

방선균의 항생제 생합성 및 내성 유전자 조작으로 인한 항생제 생산성 증가 및 새로운 항생물질 생산



명지대학교 생물학과 서 주 원

I. 서 론

50여년전 Streptomycin이 발견된 이래 방선균에 대한 연구는 주로 새로운 항생물질을 찾기 위한 균의 분리 및 항생제 생산성 증가를 위한 산업적 발표 연구가 주된 내용이였다. 그러나 최근 방선균의 분자유전학적 연구방법의 발달과 함께 항생제의 생합성 및 내성 유전자의 분리와 이들 유전자들로 부터 발현되는 효소들의 기능에 대한 연구가 급속히 진행되고 있고, 이러한 정보의 축적과 함께 항생제 생합성 유전자들의 발현 조절을 이용한 기존 항생제의 생산성 증가 및 생합성 유전자 조작에 의한 새로운 물질의 창출에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

현재 알려진 8600여종의 항생제 중에서 약 64%에 달하는 물질들이 방선균인 Streptomyces로 부터 생산되고 있고(1), 항생제 생합성 유전자들에 대한 연구도 그 분자유전학적 연구 체계가 잘 알려진 Streptomyces 균주로 부터 시작되고 있으며 앞으로 유용한 이차 대사 산물을 생산하는 다른 미생물이나 식물체에 대한 연구로 과급되어 나갈때에 그 선도적인 연구 기반을 제공할 수 있을 것으로 사료된다. 앞으로 더 많은 이차대사 산물 생합성 유전자가 분리되고 그들 유전자에 정보가 수록된 효소들의 기능이 밝혀질 때 이들을 이용하여 drug design에 의한 새로운 Hybrid antibiotics의 창출도 멀지 않은 장래에 실현될 수 있을 것이다. 실제로 항생제의 생합성 유전자에 대한 연구 과정 중 기존 항생제의 구조를 일부 변형하여 역가나 기능성을 제고하고자

하는 시도는 상품화가 실현될수 있는 과정에 돌입하고 있다.

본 논문에서는 이러한 항생제의 생합성 및 내성 유전자에 대한 연구가 산업적으로 이용될 수 있는 길을 제시하기 위하여 첫째로는 이들 유전자를 이용하여 기존 항생제의 생산성을 높일 수 있는 방법과 둘째로는 항생제 생합성 유전자들을 이용한 새로운 물질의 창출에 대한 연구를 중심으로 살펴보고자 한다.

II. 항생제 생합성 및 내성 유전자의 조작에 의한 기존 항생제의 생산성 증가

항생제의 상품화에는 무엇보다 중요한 것이 경제성이다. 경쟁력을 갖춘 고생산 균주를 만들기 위해서는 지금까지 UV나 화학적 돌연변이원을 이용하여 돌연변이체를 유도하여 무작위적으로 screening하거나 배지 조성을 변화시키고 발효조건을 개선하여 생산 수율을 높이는 것이 주된 방법이였다.

유전자 조작에 의한 이차대사 산물의 생산성을 증가시키는데는 일반적으로 다음과 같은 방법들이 시도될 수 있다(2). 즉, 첫째로, 항생제 생합성 과정 중 가장 반응이 느린 단계에 해당하는 유전자를 증폭 도입하거나 그 유전자의 발현이 더 잘 일어나도록 promoter등을 조작하는 방법이다. 일례로 미국 Wisconsin 대학의 C.R. Hutchinson은 tetracenomycin C 생산균주인 Streptomyces glaucescens에서 분리한 PKS(polyketide synthase) 유전자(tcmla orf 1-3)들을 강력한 promoter인 ermE(erythromycin 생산균

주인 *Saccharopolyspora erythraea*의 내성 유전자 promoter(3))와 결합하여 다수 복제 plasmid인 pELE37에 삽입한 후 *S. glaucescens*를 형질전환 시킨 결과 tetracenomylin C의 직전 전구체인 tetracenomylin A2 생성이 약 28배 증가함을 발견하였다(4). 이러한 결과는 ACP(acyl carrier protein) 유전자인 *tcmla orf3*만을 사용하여 실험하여도 비슷한 결과를 보임으로서 tetracenomylin A2 생합성에 ACP효소가 rate-limiting하다는 것을 시사해 주고 있다(5). 이러한 연구들은 PKS 효소들이 더 연구되면 이들의 유전자들을 조작하여 여러가지 polyketide계 항생제 및 천연물질 생산성증대에 이용될 수 있다는 것을 시사해 주고 있다.

둘째로는 종종 방선균내에서 생산되는 항생제에 대한 그 세포의 내성이 항생제 생산성의 한계를 결정지을 수 있으므로 특히 내성기작이 항생제를 세포외로 배출하는 것이라든가 하는 등에 있어서 항생제 내성 유전자의 증폭도입 및 발현으로 항생제 생산성을 높일 수도 있다(6). 어떤 방선균들은 두개 이상의 항생제 내성 기작을 가지고 있기도 하나 이중적어도 하나의 항생제 내성 유전자는 대부분 항생제 생합성 유전자들과 함께 게놈상의 일부분에 cluster되어 있는 것으로 알려져 있어서 항생제 생합성 유전자들을 분리하는데 있어서 실험상 용이한 내성 유전자들 우선 분리하는 방법이 많이 이용되고 있기도 하다(7, 8). 세포내에서 항생제가 생합성 되기 전에 항생제 내성 유전자가 발현되어 항생제 생산균이 자신이 생산하는 항생제에 의해 죽지 않도록 하는 방어 기작이 알려져 있다(6). 그러므로 항생제 내성 유전자의 발현 조절은 일반적으로 생합성 유전자와 함께 일어나고 생산되는 항생제에 대한 내성정도가 항생제 생합성 능력의 한계를 지배하게 될 때는 항생제 내성 유전자들 증폭도입 하거나 강력한 promoter를 이용하여 내성 유전자의 발현을 높임으로서 원하는 항생제 생산성을 높일 수 있는 것이다. 특히 항생제 내성 기작이 생합성된 항생제를 세포외로 배출시키는 것일 때는 이러한 항생제 내성 유전자 조작에 의한 항생제 생산성 증대가 더욱 유효할 것이다.

*Streptomyces rimosus*를 이용한 tetracycline 생산 발효에서 tetracycline 농도에 따라 tetracycline 내성 유전자인 *tetA*와 *tetB*의 발현이 조절됨을 볼 수 있

표 1. *Streptomyces*의 2차 대사산물 생성조절 유전자.

유전자	기 능
<i>act II</i>	<i>S. coelicolor</i> 에 도입시 actinorhodin 생성량 30~40배 증가
<i>mmy</i>	<i>S. coelicolor</i> 에서 methylenomycin 생합성 유전자군의 일부를 불활성화 시킬시 methylenomycin 생성 증가
<i>afsB</i>	<i>S. lividans</i> 에 도입시 actinorhodin과 undecylprodigiosin 생성 증가
<i>redD</i>	<i>S. coelicolor</i> 에 도입시 undecylprodigiosin 생성 약 30배 증가
<i>strR</i>	<i>S. griseus</i> 에 도입시 streptomycin 생성 5~7배 증가
<i>brpA</i>	<i>S. hygroscopicus</i> 의 bialaphos 생합성 및 내성 유전자 발현 조절
<i>dnrR1/R2</i>	<i>S. peuceletius</i> 에 도입시 daunorubicin 생성 증가

으며(9), streptomycin 생산 균주인 *Streptomyces griseus*에서도 내성 유전자인 SPH 유전자(*strA=aphD*)는 streptomycin에 의해 그 발현이 유도되는 것을 관찰할 수 있고 *strA* 유전자는 streptomycin 생합성 유전자인 *strB*를 활성화 시키는 *strR* 유전자에 의해 positive control을 받는 것으로 확인되고 있다(10). 실제로 산업계에서 항생제 고생산성 균주를 screening할때도 배지에 첨가하는 항생제를 고농도로 올려서 screening 하는 것도 이와 같은 원리의 적용이라 하겠다(11).

셋째로 항생제 생합성 유전자들의 발현을 조절하는 유전자들 조작하는 방법으로써 positive regulatory 유전자는 증폭 도입하고 negative regulatory 유전자는 제거하거나 발현을 억제시키는 방법이다. 항생제 생합성 유전자들의 발현을 조절하는 유전자들도 대부분 항생제 생합성 유전자들과 함께 cluster되어 있으며 이미 여러 경우에 positive 및 negative 유전자들이 분리되어 (표1)에서 보는 바와 같이 항생제 생산 능력을 증대시킬 수 있다는 것을 보여주고 있다(12).

넷째로는 이차대사산물을 위해 소용되는 일차대사산물들이 충분히 공급되도록 항생제 생합성에 이용되는 영양분 이용을 조절하는 유전자의 발현을 증폭시키는 것을 들 수 있겠다. 일반적으로 이차대사

표 2. 항생제 생합성 유전자를 분리하기 위한 방법들(20).

1. Detection of individual gene product by cloning in a standard host;	Candicidin (PABA synthetase); <i>Gene</i> , 25 , 119 (1982) Actinomycin (phenoxazinone synthetase); <i>J. Biol. Chem.</i> 259 , 14151, 14158 (1984).
2. Complementation of block mutant;	Actinorhodin; <i>Nature</i> , 309 , 462 (1984) Undecylprodigiosin; <i>J. Bacteriol.</i> , 172 , 326 (1990). Clavulanic acid; <i>Biotechnol.</i> , 2 , 808 (1984) Tetracenomycin; <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 84 , 4445 (1987)
3. Mutational cloning	Methylenomycin; <i>Gene</i> , 26 , 67 (1983) Lincomycin; Proceeding GIM90 (Strasbourg, 1990), p. 207-218
4. Cloning antibiotic resistance gene, analysis of linked DNA;	Erythromycin; <i>Biotechnol.</i> , 4 , 229 (1986) Oxytetracycline; <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 215 , 231 (1989) Bialaphos; <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 205 , 42 (1986).
5. Probing gene library with synthetic oligonucleotide matched to partial amino acid sequence of biosynthetic enzyme;	Tylosin (macrocin O-methyl transferase); <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 84 , 8248 (1987)
6. Probing gene library with polyketide synthase actI/III;	β-lactam (isopenicillin N synthetase); <i>Gene</i> , 62 , 187 (1988) Daunorubicin; <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 86 , 3135 (1989).

산물인 항생제 생합성 유전자들은 세포가 활발히 성장하는 기간에는 발현이 억제되며 용이하게 이용할 수 있는 인, 탄소, 질소 영양분들에 의해서도 항생제 생합성 능력이 저해된다(13). 일례로 polyether계 항생제는 간단한 지방산인 acetate, butyrate, propionate들이 그 구조체의 근간을 이루는데 소모 되는데 이들은 일차대사 산물인 valine이 L-valine dehydrogenase에 의해 분해되어 공급된다(14). Valine은 erythromycin이나(15) tylosin의(16) 생산성을 높이는데도 아주 유효하다는 것이 알려져 있다.

III. 항생제 생합성 유전자 조작에 의한 새로운 항생물질 창출

항생제 생합성 효소들의 기질에 대한 특이성이 어느 정도 구조에 유사성이 있는 물질에도 작용할 수 있다는 사실에서 부터 여러 중간 대사물의 구조 유사체를 배양액에 넣어 최종 생산물의 구조를 바꾸어 보려는 directed biosynthesis나(17, 18) mutasynthesis와(19) 같은 방법들이 이용되었으나 항생제 생합성 유전자들이 분리되고(방선균으로 부터 항생제 생합성 유전자들을 분리해 내는 방법은(표2)에 몇가지 예를 들어 소개한다(20)) 그에 해당하는 효

소의 기능들이 알려지면서 이들 유전자를 직접 조작하여 역가나 기능이 발전된 기존 항생제와 유사 하거나 또는 새로운 구조를 가진 물질을 만들어 내고자 하는 연구가 시도되고 있다.

이러한 시도들은 방선균의 항생제 생합성 유전자들이 유전적으로 가까운 다른 균들에서도 발현됨이 밝혀지면서 연구가 활성화되고 있다. 이러한 연구의 효시는 영국의 John Innes Institute의 D.A.Hopwood를 중심으로 한 *Streptomyces coelicolor*의 색소 물질인 actinorhodin 생합성 유전자들로부터 시작되었는데 *S. coelicolor* A3에서 actinorhodin 생합성 유전자들을 분리하여 이들의 일부 또는 전부를 medermycin 생산 균주인 *Streptomyces* sp. AM-7161이나 granaticin/dihydrogranaticin 생산 균주인 *S. violaceoruber* Tu22에 도입하였을때 각각 새로운 유사 구조체인 mederhodin과 dihydrogranatirhodin을 생산하였는데 원래의 항생물질 보다도 더 많은 양을 생산하였다(21)(그림1). 이러한 결과들은 항생제 생합성 효소들이 기질의 작용점에 구조가 유사한 다른 생합성 중간물질에 작용하여 새로운 물질들을 만들어 내는것이 가능함을 증명해 주었다. 이와 같은 맥락에서 더욱 명확한 실험은 isovalerylsipramycin 생산을 들 수 있겠는데, carbomycin을 생산하는 *St-*

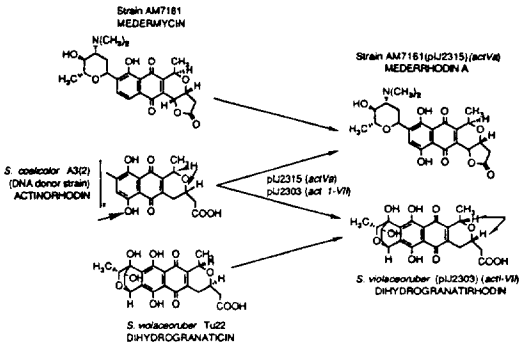


그림 1. 자연적인 isochromanone quinone계 항생제의 유전자 도입으로 변형한 후의 구조.

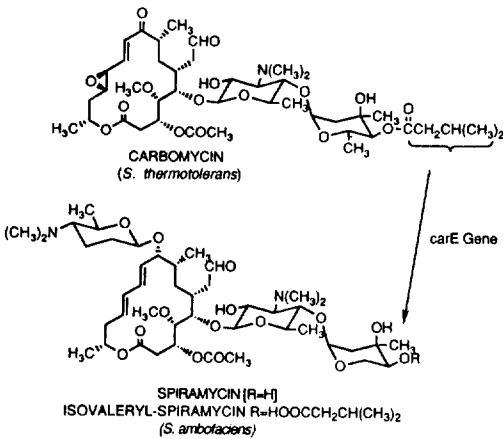


그림 2. Carbomycin과 spiramycin 그리고 hybrid antibiotic 4"-isovalerylspiramycin의 구조.

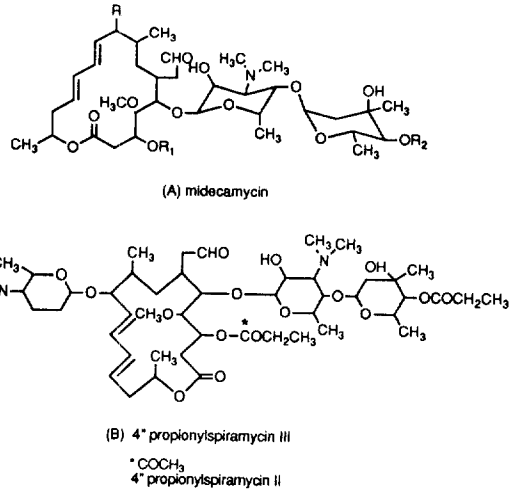


그림 3. Midecamycin과 4"-propionylspiramycin III & II의 구조.

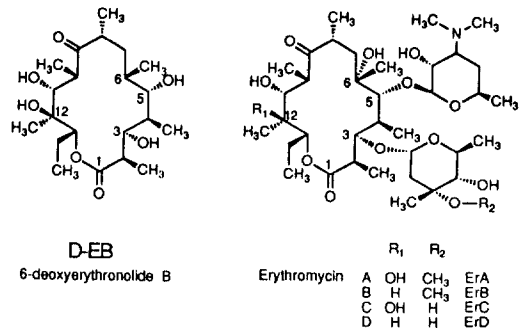


그림 4. Erythromycin 생합성 과정 중 polyketide synthase에 의해 합성된 6-deoxyerythronolide B와 완성된 erythromycin의 구조.

*Streptomyces thermotolerans*에서 분리된 carbomycin 생합성 유전자 중 *carE* 유전자를 spiramycin을 생산하는 *Streptomyces ambofaciens*에 도입하였을 때 4"-isovaleryl spiramycin이 생성되었다(22)(그림2). 이와 유사한 연구로써 중국 Institute of Medicinal Biotechnology의 Yiguang Wang은 *carE* 유전자를 probe로 사용하여 midecamycin 생산 균주인 *Streptomyces mycarofaciens*에서 4"-propionyl transferase 유전자를 분리하고 *S. ambofaciens*에 도입하여 4"-propionylspiramycin II와 III을 만들어 실용화 단계에 와 있다고 한다(Yiguang Wang, personal communication)(그림3). 이보다는 훨씬 간단한 예로 미국의 Abbott 회사에서는 *Saccharopolyspora erythraea*에서 erythromycin 생합성 유전자를 분리하여

그 유전자들의 기능을 연구하던 중 C-6 hydroxylase 유전자를 계놈에 도입될 수 있는 plasmid에 삽입하여 생산 균주를 형질전환시켜서 gene disruption에 의하여 이 유전자가 발현되지 않은 결과 완성된 erythromycin의 erythronolide 구조에서 6번 탄소 위치에 -OH기가 -H로 바뀐 유사체가 생성되었는데 이는 약효도 기존 제품과 비슷하고 경구투여시 기존 제품보다 내산성이 뛰어나 곧 상품화가 되리라 한다(C.R. Hutchinson, personal communication)(그림4). 이와 비슷한 연구들로 여러 제약회사에서 PKS(polyketide synthase)유전자들을 조작하여 더욱 환원된 상태의 tylosin이나 avermectin 유사체를 만들어

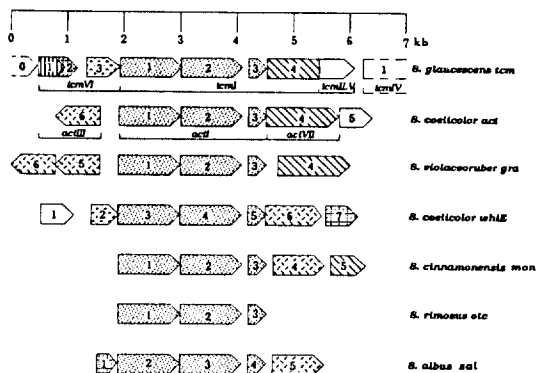


그림 5. 방선균에서 잘 보존되어 있는 polyketide synthase 유전자 구성 비교.

내고자 하는 연구도 진행되고 있다(2). Polyketide계 천연물질은 이차대사 산물중 가장 많이 알려졌고 항생제, 항암제, 색소 등으로 널리 이용되고 있는데 방선균으로부터 이들 생합성 유전자들이 속속 분리되고 있고 필자의 연구실에서도 미국 Hutchinson 박사 실험실과 공동으로 가축 항생제 및 성장 촉진제등으로 사용되고 있는 salinomycin 생합성 유전자들을 *Streptomyces albus*로부터 분리하여 그 기능을 연구하고 있는데 (그림5)에서 보듯이 여러 polyketide 구조체 생산균주들에서 polyketide 생합성 유전자들이 잘 보존되어 있는것으로 확인되어 이들을 mix and match하여 새로운 구조체를 만들고자 하는 전망을 밝혀해주고 있다(2, 23, 24).

항생제 생합성 및 유전자를 직접 조작한것은 아니지만 국내의 동아제약연구소에서도 aminoglycoside계 항생제에 내성 기작을 보이는 aminoglycoside-3'-phosphotransferase 유전자를 포함한 plasmid를 반응시킬 대장균에 도입하여 kanamycin B를 (kg당 \$1000내외) 반응 활성이 높은 kanamycin B-3'-phosphate로 변형한 후 간단한 화학반응으로 고가인 tobramycin을(kg당 \$ 12,000내외) 만들고자하는 연구가 성공적으로 진행되어 실용화 단계에 있다고 한다(25)(그림6).

항생제 생합성 유전자들을 혼합하거나 조합하여 유사구조체 생산 균주에 도입하므로써 새로운 구조체를 만들어 내고자하는 연구는 그러한 유전자와 그 산물인 항생제 생합성 효소들에 대한 충분한 기능이나 생화학적 지식이 없더라도 산업적으로 시도해

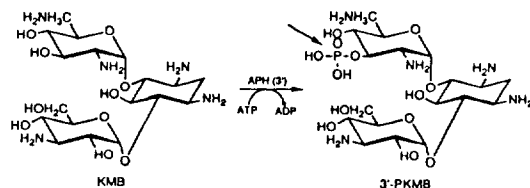


그림 6. Aminoglycoside-3'-phosphotransferase에 의해 변형된 kanamycin B-3'-phosphate와 kanamycin B의 구조.

볼 수 있는 연구이기에 더욱 흥미롭다. 또한 이러한 연구 과정 중에 기존에 알려지지 않았던 유전자들이나 효소들의 기능이 밝혀지기도 하는 것이다.

IV. 결 론

방선균의 항생제 생합성 및 내성 유전자들에 대한 연구는 앞으로 이들 유전자와 효소들에 대한 학문적 관심과 함께 산업적으로 유용하게 이용될 수 있어 그 연구가 더욱 활성화되리라 본다. 이와같은 연구에는 방선균에 다른 이종 균주의 DNA를 도입할때 발생하는 restriction barriers문제, 새로운 구조체의 항생제가 만들어 질때 생산균주가 새로 생성된 항생제에 내성을 갖게하는 문제, 항생제 생합성 유전자들의 발현에 관여하는 host-specific factor들이 이종균에는 결핍되었을때 발생하는 문제등 더욱 연구가 진전되어야 할 사안들도 적지않다. 그러나 이러한 연구들이 현재와 같은 속도로 진행된다면 가까운 장래에 산업계에서 기존 항생제 생산수율 증가는 물론 생합성 유전자들을 혼합하고 조합하여 drug design에 의한 새로운 유용 물질 창출도 멀지 않은 장래에 가능하리라 본다.

결론적으로 산업계에서 많이 이용되고 있는 방선균의 항생제 생합성 및 내성 유전자에 대한 연구가 학계에서 많이 확산되어 이루어 지도록 하여야 이를 바탕으로 산업계에서 실용적으로 유용하게 이용할 수 있을 것이며, 이러한 연구는 우리나라의 현실상 절실히 필요하고 또한 분명히 그 결실이 기대되는 만큼 이미 활발한 연구를 진행중인 선진국들의 연구 수준을 따라잡기 위해서도 산학 협동체제를 구축하여 시급하고도 활발하게 추진하여야 할 것이다(26).

참고문헌

1. Berdy, J.(1989) In bioactive metabolites from microorganisms(Edited by Bushell, M.E. & U. Grafe) Elsevier.
2. Hutchinson, C.R., Borell, G.W., Donovan, M.J., Kato, F., Motamedi, H., Nakayama, H., Rubin, R.L., Streicher, S.L., Summers, R.G., Wendt-Pienkowski, E., and Wessel, W.L.(1991) *Planta Med.* **57**: S36-S43.
3. Bibb, M.J., and Janssen, G.R. (1987) In genetics of industrial microorganisms: Proceedings of the fifth international symposium, (Alacevic, M., Hranueli, D., Toman, Z., eds), Part B, pp. 309-318, Pliva, Zagreb, Yugoslavia.
4. Summers, R.G., Wendt-Pienkowski, E., Wessel, W.L., Hutchinson, C.R., unpublished work.
5. Gramajo, H., White, J., Bibb, M.J., personal communication.
6. Martin, J.F., and Liras, P. (1989) *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 173-206.
7. Butler, M.J., Friend, E.J., Hunter, I.S., Kaczmarek, F.S., Sudgen, D.A., Warren, M. (1989). *Mol. Gen. Genet.* **215**: 231-238.
8. Stanzak, R., Matsushima, P., Baltz, R.H., Rao, R.N. (1986). *Bio/Technology* **4**: 229-232.
9. Ohnuki, T., Katoh, T., Imanaka, T., Aiba, S. (1985). *J. Bacteriol.* **161**: 1010-1016.
10. Ohnuki, T., Imanaka, T., Aiba, S. (1985). *J. Bacteriol.* **164**: 85-94.
11. Liu, C.-M., Hermann, T.E., Miller, P.A. (1979). *J. Antibiot.* **32**: 1025-1032.
12. Hutchinson, C.R., Borell, C.W., Otten, S.L., Stutzman-Engwell, K.J., and Yi-guangd Wang (1989). *J. of Medical Chemistry*, vol. 32:929-937(1989).
13. Martin, J.F. (1989). In regulation of secondary metabolism in Actinomycetes. ed. S. Shapiro. Boca Raton, Fla: CRC.
14. Sherman, M.M., Yue S. and Hutchinson, C.R. (1986). *J. Antibiotics*, **39**: 1135.
15. Stark, W.M.(1961). *Prog. Indust. Microbiol.*, **3**: 213.
16. Dotzlaf, J.E.(1984). *Antimicrob. Agents Chemother.*, **25**: 216.
17. Halliday, W.J. and Arnstein, H.R.V. (1956)*J. Biochem.*, **64**: 380-384.
18. Omura, S., Ikeda, H., Matsubara, H., and Sadakane, N., *Antibiot J.*(1980). **33**: 1570-1572.
19. Jr. Rinehart, K.L.(1977). *Pure and Appl. Chem.*, **49**: 1361-1384.
20. 이정준(1992) In exploitation of novel microorganisms, especially actinomycetes; UNESCO regional training workshop, pp. 126-131. Korea.
21. Hopwood, D.A., F. Malpartida, Kieser, H.M., Ikeda, H., Duncan, J., Fujii, I., Rudd, B.A.M., Floss, H.G., and Omura, S. (1984). *Nature(London)*, 314, 642.
22. Epp, J.K., Huber, M.L., Turner, J.R., Schoner, B.E. (1989). In genetics and molecular biology of industrial microorganisms(eds. C.L. Hershberger, S. Queener, G. Heremen), Washington, Am. Soc. Microbiol.
23. Hutchinson, R.C., Decker, H., Motamedi, H., Shen, B., Summers, R.G., Wendt-Pienkowski E., and L. W., Wessel. (1992). *Actinomycetologica*, in press(Nov. 1992). Japam.
24. 권형진, Kato, F., Hutchinson, C.R., 서주원.(1992) In recent progress in molecular biology and genetic engineering in Korea 1992(2). p. 226. Korea.
25. 김계원, 양중익. (1992). Personal Communication.
26. 서주원. (1991). *유전공학*. **36**: 90-94.