

Virginiamycin 생합성 유도인자 Virginiae Butanolide C에 의한 2차 대사산물 생산의 유도

김현수* · 강선영

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Induction of Secondary Metabolites by Virginiamycin Inducing Factor, Virginiae Butanolide C

Kim, Hyun-Soo* and Sun-Young Kang

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University,
704-701, Korea

Abstract — Virginiae butanolide C(VB-C) is one of the butyrolactone autoregulators, which triggers the production of virginiamycin in *Streptomyces virginiae*. *Streptomyces longwoodensis* was selected as a test strain to investigate new VB-C functions. When 100 ng/ml of the synthetic VB-C was added into the culture at 5 hour and 0 hour, the initial production time of antibiotics and a dark blue pigment were shortened by 4~6 hours and 2~4 hours, respectively. HPLC analysis revealed the production of several new antibiotics by VB-C addition. In the SDS-PAGE analysis of the total protein from mycelium several new protein bands showed up and the amounts of certain protein bands increased in the presence of VB-C. The existence of specific VB-C binding protein was confirmed from *S. longwoodensis* in relation to VB-C signal transduction. These results suggest that the VB-C might have an ability to induce the production of secondary metabolites in *Streptomyces longwoodensis*.

방선균에 있어서 기균사, 포자형성 등의 형태분화(morphological differentiation)와 항생물질, 생리활성 물질, 색소등 2차 대사산물 생산의 생리적 분화(physiological differentiation)를 조절하는 자기조절인자(autoregulator)가 알려져 있다.

이들 인자는 다면형질 발현성(pleiotropic)이며 이들에 대해서 *Streptomyces*속 방선균을 중심으로 하여 수 많은 연구가 수행되어 있다. 그 중 A-factor(1), factor I(2), virginiae butanolide(VB)(3) 등 γ -butyrolactone환을 가지는 인자를 비롯하여 수종이 이미 그 구조가 밝혀져 있으며, 근년에 들어 이들의 분자 level에서의 연구가 진행됨에 따라 그 기능이 하나씩 밝혀지고 있다(4-6). 이들 자기조절인자는 배양액 중 미량으로 존재하며 수 ng/ml의 극히 저농도에서 기능을 발휘하는 점에서 원핵생물의 호르몬으로 간주되고 있다. *S. virginiae*가 생산하는 자기조절인자인

VB는 virginiamycin 생산을 유도하는 것으로 알려져 있으며(3, 4) 최근 *S. antibioticus*로부터 새로운 virginiamycin 생산 유도인자로서 NFX-1,2,3,4가 분리, 정제되어(7) 다양한 자기조절인자의 존재 및 기능이 예상되고 있다. 이들 유도인자의 signal 전달과 관련하여 항생물질 생합성 mechanism 연구의 일환으로 VB의 signal 전달에 관여하는 VB receptor의 존재가 밝혀졌으며(8, 9), A-factor에 있어서도 A-factor receptor의 존재가 확인되어 repressor로서의 기능이 추정되고 있다(10). 또한 VB의 signal 전달기구의 시사(11, 12) 및 VB receptor 유전자인 *vbr A*가 cloning되어(13) 이들 미생물 호르몬의 연구가 활발히 진행되고 있으며 최근, Hashimoto 등(14)은 항생물질 D-cycloserin 생산균인 *Streptomyces* sp. FRI-5로부터 분리한 청색색소 유도인자인 IM-2가 cycloserine 생산을 억제하는 반면 minimycin, showdomycin 등 nucleoside계 항생물질 생산을 동시에 유도한다는 괄목할 만한 사실을 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 이들 autoregulator가 방선균 *Streptomyces*속 약 59%에 걸쳐 존재하고 있는 점과 구조의 유사성 및 다면

Key words: *Streptomyces longwoodensis*, virginiae butanolide C (VB-C), VB-C binding protein, autoregulator

*Corresponding author

형질 발현성인 점을 참고하여 처음으로 다른 방선균에 대해 VB를 이용하여 항생물질 등 2차 대사산물 생산 유도 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 Ohashi 등(16)의 결과로부터 VB-A 혹은 B 및 항생물질 lysocellin을 생산하는 *S. longwoodensis* IFO 14251을 사용하였으며, 전배양 및 항생물질 생산배지로서 soybean meal 1%(Difco Co.), glucose 1%, NaCl 0.5%, CaCO₃ 0.1%의 조성의 배지를 사용하였다. 공시균의 전배양은 oat meal 사면배지에서 28°C, 5~7일간 생육시킨 slant로부터 상기의 액체배지 20 ml에 1백금이 정도 접종하여 28°C, 120 spm에서 36~48시간 배양한 균체를 -70°C에서 보존하여 전배양균으로 사용하였다.

항생물질 및 색소 생산 유도능의 확인

김 등(15)의 방법에 따라 항생물질 생산배지 25 ml에 전배양균을 3% 되게 접종하여 합성한 VB-C(2위 추출 탄소수 6개, ethanol에 용해)(8) 2.5 μl(농도는 실험의 내용에 따라 달리 사용함)를 첨가 및 미첨가하여 28°C, 120 spm에서 배양하고 배양 후 24시간부터 32시간까지 2시간 간격으로 1 ml 씩 sampling 하였다. 각 배양액의 원심(10,000×g, 5분)상등액 중 생산된 항생물질은 시험균 *Bacillus subtilis* PCI 219 및 *E. coli* K-12를 사용하여, cup 법에 의해 생성된 clear zone으로서 확인하였으며, 시험균의 생육 배지로는 polypeptone 0.5%(Difco Co.), meat extract 0.3%(Difco Co.), agar 1.5% 및 nutrient agar(Difco Co.) 배지를 각각 사용하였다. 또한 검청색 색소생성의 확인은 570 nm(UV-120-02, Shimazu Co.)에서 흡광도의 차이로 비교 검토하였다.

VB류의 조제

배양액 중 생산된 천연형 VB류는 김 등(15)의 방법에 따라 조제하였다. 즉, 생육배지에 전배양균을 3% 접종하여 24시간 배양한 다음, 배양액 500 ml를 10,000×g에서 20분간 원심분리(Kontron Co., T-124)하여 균체를 제거하였다. 그 상등액을 염산 산성(pH 2~3) 하에서 2배량의 ethylacetate로 추출하여 Na₂SO₄로 건조하고, 진공농축(Rotary evaporator, EY-ELA Co.) 후 생육 배지 3 ml에 용해하여 천연형 VB 용액으로 사용하였다.

HPLC에 의한 항생물질의 분석

합성 VB-C(8)를 첨가 또는 미첨가하여 28시간(VB-C 첨가), 48시간(VB-C 첨가 및 미첨가) 배양시킨 배양액으로부터 생산된 항생물질의 추출은 Ebata 등(17)의 lysocellin 추출 방법에 따라 행하였다. 즉 배양 상등액을 1 N HCl로 pH 2.0 이하의 산성으로 조정 후, 원심 분리하여 상등액을 제거한 침전물에 acetone을 첨가하여 현탁한 다음 1 N NaOH로 pH 8.0으로 조정하여 실온에서 overnight 시킨다. 다음에 n-butanol로 추출하여 진공 농축한 다음 brown syrup을 acetone에 용해시켜 불용성 물질은 여과하여 제거하였다. 여과액을 다시 농축한 다음 methanol로 용해하여 sep-pak cartridge(C₁₈, Water Co.)에 흡착시키고 50% methanol로 washing한 후 100% methanol로 용출하여 시료로 사용하였다. 조제된 항생물질은 Bondapak C₁₈ column(Waters Co.)을 사용한 reverse-phase HPLC(Waters 204)에서 Methanol : H₂O(2 : 1)의 용매를 사용하여 용출시키고 흡광도 210 nm에서 검출된 각 peak를 분취한 후, 농축하여 paper disk법(φ 8 mm, Advantec Co.)에 의해 항균력을 조사하였다.

VB-C 유도에 따른 세포내 단백질 분석

합성 VB-C를 본배양 5시간째에 100 ng/ml의 농도로 첨가 및 미첨가하여 28시간 배양시킨 후 각각의 배양 균체 1 g(wet mycelia)을 0.05 M Triethanolamine-HCl(TEA) buffer(pH 7.0) 20 ml에 현탁하여 sonicator(Lab-line Instrument No. 9100)로 0°C에서 1분간 2회 파쇄한 다음 15,000×g, 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 원심상등액을 Mol Cut(10,000 cut-off, Millipore Co.)를 사용하여 농축한 다음, 각각 150 μg의 protein을 12.5% SDS polyacrylamide gel electrophoresis에 의해 분석하였다. Protein의 정량은 protein assay kit(Bio-rad Co.)를 사용하였고, protein band의 검출은 coomassie brilliant blue R-250을 사용하였으며, marker protein(Pharmacia Co.)은 phosphorylase b(94 k), albumin(67 k), ovalbumin(43 K), carbonic anhydrase(30 k), trypsin inhibitor(20.1 k), α-lactalbumin(14.4 k)을 사용하였다.

VB-C 결합 단백질의 binding assay

*S. longwoodensis*의 VB-C binding protein 존재 유무는 김 등(9)의 방법에 따라, 각각 24시간, 28시간, 36시간 배양한 균체 1 g을 0.5 M KCl, 5 mM dithiothreitol이 첨가된 0.05 M TEA buffer 20 ml에 현탁하여 sonicator로 2분간 파쇄 후 원심상등액을 30%~70% 포화 (NH₄)₂SO₄로 농축, 탈염하여 조단백질 용

액으로 사용하였다. 경쟁적 저해를 위해 조단백질 용액 100 μ l에 최종농도 0.125 mM(3 μ l 첨가)되게 cold VB-C(non-labeled)를 첨가 또는 미첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 다음에 최종 농도가 69.6 nM(2 μ l 첨가)되게 [³H]VB-C₇(54.6 Ci/mmole)을 첨가하여 동일 조건하에서 반응시킨 다음, 80% 포화 (NH₄)₂SO₄ 용액 900 μ l를 넣어 20분간 실온에서 방치 후, 15,000 \times g에서 10분 동안 원심분리하였다. 이때 생긴 침전 (protein-ligand complex)을 동포화용액 1 ml로 1회 washing하고 100 μ l의 H₂O에 용해시켜 10 ml의 toluene 용액 [Toluene 500 g/l, Triton X-100(polyethylene glycol mono-p-isooctylphenyl ether, Nakarai Co.) 500 g/l, Omifluor(Dupont Co.) 4 g/l]에 첨가하여 scintillation counting(Beckman LS 7500) 하였다. [³H]VB-C₇에 대한 특이적인 결합은 cold VB-C의 첨가 및 미첨가의 차이로서 산출하였다.

결과 및 고찰

합성 VB-C 및 천연형 VB류에 의한 물질 유도능의 검토

VB류 생산균(6균주) 및 비 생산균(5균주)(15)중 항생물질 생산시기등 유도능의 실험조건에 적합한 균으로서 선정된 *S. longwoodensis*(lysocellin 생산균주)의 경우, 상기의 항생물질 배지에서 VB류를 생산하였으며 항생물질의 유도가 예상되었다. Yanagimoto 등(18)이 보고한 *S. virginiae*의 경우, 합성 VB-C 및 *S. virginiae*가 생산한 천연형 VB류의 첨가시 공히 4시간 정도의 virginiamycin 생산이 촉진된 것으로 관찰되어, 합성 VB-C의 유도능과 관련하여 공시균이 생산하는 천연형 VB류(VB-A 혹은 B) 첨가에 의한 물질 유도능을 비교, 검토하였다. 조제한 천연 VB류 용액 3 ml 중 시험균 *S. virginiae*에 대해 virginiamycin 유도능을 나타낸 농도(결과 미 게재)인 10 μ l/ml와 합성 VB-C 100 ng/ml를 본배양 5시간째에 첨가하였다. 각각의 항생물질 생산 유도능을 비교해 본 결과, Fig. 1에 나타낸 바와 같이 미첨가시 32시간째부터 항생물질이 생산되는 반면, 합성 VB-C 첨가시에는 6~8시간 촉진된 26시간째부터 gram (+)인 *B. subtilis* PCI 219, gram (-)균인 *E. coli* K-12에 모두 항균력을 나타내는 항생물질 생산이 유도되며 배양 32 시간째는 미첨가시에 비해 생산량이 증가되었다. 그와 달리 *S. longwoodensis* 자신이 생산하는 천연 VB류(VB-A 혹은 B) 첨가(10 μ l/ml)의 경우 항생물질 생성 유도가 되지 않으며 미첨가시와 비교해서 gram (+) 균에 항균력을 나타내는 항생물질 생산은 오히려 약간

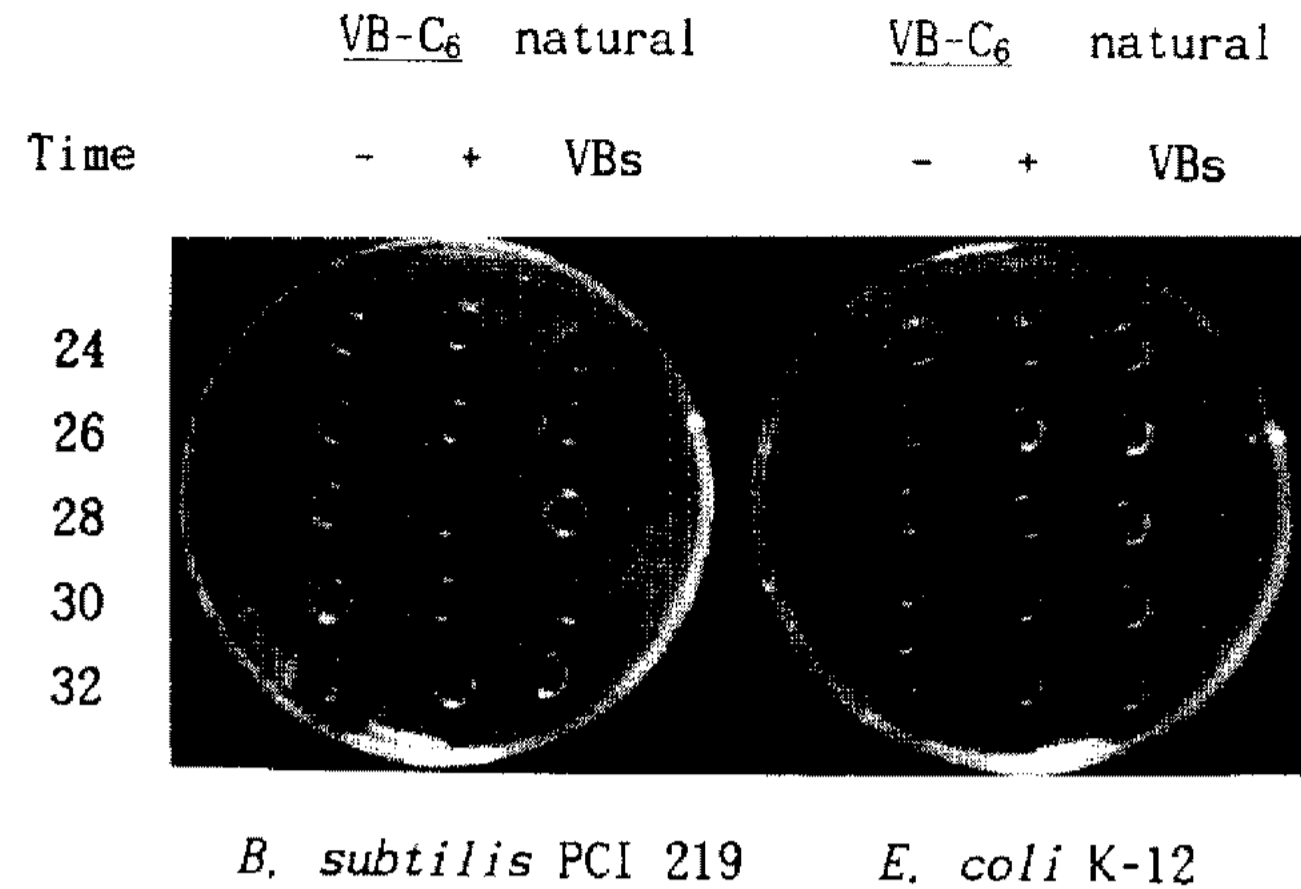


Fig. 1. Induction of antibiotics production by VB-C₆ and natural VBs in *S. longwoodensis*.

Cultivation was performed with a 25 ml portion of medium in a 100 ml Erlenmeyer flask on a reciprocating shaker (120 strokes per min) for 32 hrs at 28°C. At 5 hrs cultivation, 2.5 μ l of VB-C₆ solution (-: non addition, +: 100 ng/ml addition) and 10 μ l of natural VBs were added. Antibiotics production was detected as described in Materials and Methods.

저해받는 경향을 나타내었다. 따라서 *S. longwoodensis*에 있어서 합성 VB-C에 의한 특유의 유도능이 입증되었다.

VB-C 첨가 시기에 따른 유도능

*S. virginiae*의 경우, 본배양 4시간 이전에 VB-C 첨가시 VB류 생산 및 virginiamycin 생산이 억제된다는 Yanagimoto 등(18)의 보고와 관련하여 *S. longwoodensis*에 있어서 VB-C 첨가 시기에 따른 유도능을 검토하였다. 합성 VB-C를 본배양 초기(0시간), 본배양 5시간째 그리고 본배양 10시간째에 100 ng/ml의 농도로 첨가하여 첨가 시기에 따른 유도능을 조사한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 본배양 0시간과 5시간째에 VB를 첨가한 경우 2~4시간 정도, 본배양 10시간째에 VB를 첨가한 경우 2시간 정도의 항생물질 생산이 촉진되었다. 이는 *S. virginiae*의 경우와 다른 결과를 나타내었으며, 따라서 *S. longwoodensis*에 있어서 항생물질 유도를 위한 VB-C 첨가 시기는 동일 시간대의 항생물질 생산량으로 보아 본배양 5시간째가 적합하다고 사료되었다.

VB-C 첨가 농도에 따른 항생물질 유도능

VB-C의 첨가 농도에 따른 항생물질 생성 유도능을 조사한 결과, Table 2에서 보는 바와 같이 배지 1 ml당 VB-C를 50~500 ng 첨가시 2~4시간의 항생물질 생산 시기가 촉진되었을 뿐만 아니라, 500 ng 첨가의

경우 생산되는 항생물질의 양이 증가하였으며 배양 32시간째 생산된 항생물질은 gram (+)균보다 gram (-)균에 약간 더 큰 항균력을 나타내었다. 이 결과는 *S. virginiae*의 경우 첨가된 VB-C의 양이 일정 농도 까지 증가할수록 동일 시간에서의 virginiamycin 생산이 증가한다는 실험결과(본 저자, 미 발표)와 유사한 결과를 나타내었다.

합성 VB-C 첨가에 의한 색소 유도능

Table 1. Effect of addition time of synthetic VB-C on antibiotics induction

Incubation time (hour)	VB-C addition time (hour) ^a			
	-VB-C	0	5	10
<i>(B. subtilis PCI 219)</i>				
24	-	-	-	- ^b
26	-	-	-	-
28	-	+	++	-
30	-	++	+++	+++
32	++	+++	+++	+++
<i>(E. coli K-12)</i>				
24	-	-	-	-
26	-	-	-	-
28	-	+	+++	-
30	+	+++	+++	+++
32	++	+++	+++	+++

^aVB-C was added at cultivation time of 0, 5, and 10 hours, respectively. ^b+, -; diameter of inhibitory zone (-: no production, +: 12 mm, ++; 13~15 mm, +++: 16~19 mm, ++++: above 19 mm)

Table 2. Effect of VB-C concentration on antibiotics induction

Incubation time (hour)	VB-C concentration (ng/ml)					
	0	10	50	100	200	500
<i>(B. subtilis PCI 219)</i>						
24	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
28	-	-	+	+	+	++
30	-	-	++	++	++	++++
32	+	+	+++	+++	+++	++++
<i>(E. coli K-12)</i>						
24	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-
28	-	-	-	-	-	++
30	-	-	++	++	+++	++++
32	++	++	++++	++++	++++	++++

VB-C was added at cultivation time of 5 hours.

VB-C 첨가에 의한 항생물질 유도 뿐만 아니라 *S. longwoodensis* 자신이 생산하는 검청색 색소 생산의 유도가 관찰되어 본배양 초기(0시간) 및 5시간째에 100 ng/ml의 합성 VB-C를 첨가한 후 배양 18시간째 부터 2시간 간격으로 3 ml씩 sampling하여 원심 상등액을 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. Table 3에서 나타낸 바와 같이 VB 미첨가의 경우, 본배양 24시간부터 자체내의 검청색 색소가 생산되었으나, 배양초기에 합성 VB-C를 첨가한 경우 6시간 단축된 18시간부터 미첨가시와 비슷한 양의 색소 생성이 관찰되었으며, 5시간째 첨가시 2시간 정도의 색소 생산 시간이 단축되었다. 이 결과는 본배양 5시간째 VB-C를 첨가한 경우에 가장 강한 항생물질 생산 유도능을 보이는 것과 달리 본배양 초기에 합성 VB-C를 첨가할 때 가장 강한 색소 유도능을 나타내어, 따라서 VB-C첨가 시기에 따른 2차 대사산물 생산에 있어 VB-C의

Table 3. Effect of a dark blue pigment induction by synthetic VB-C on *S. longwoodensis*

Incubation time (hour)	VB-C addition time (hour)		
	-VB-C	0	5
(A. 570 nm)			
18	0.084	0.253	0.118
20	0.097	0.292	0.146
22	0.164	0.425	0.224
24	0.234	0.604	0.313
26	0.329	0.837	0.454

Culture conditions were almost identical as described in Fig. 1. The produced dark blue pigment was measured at 570 nm.

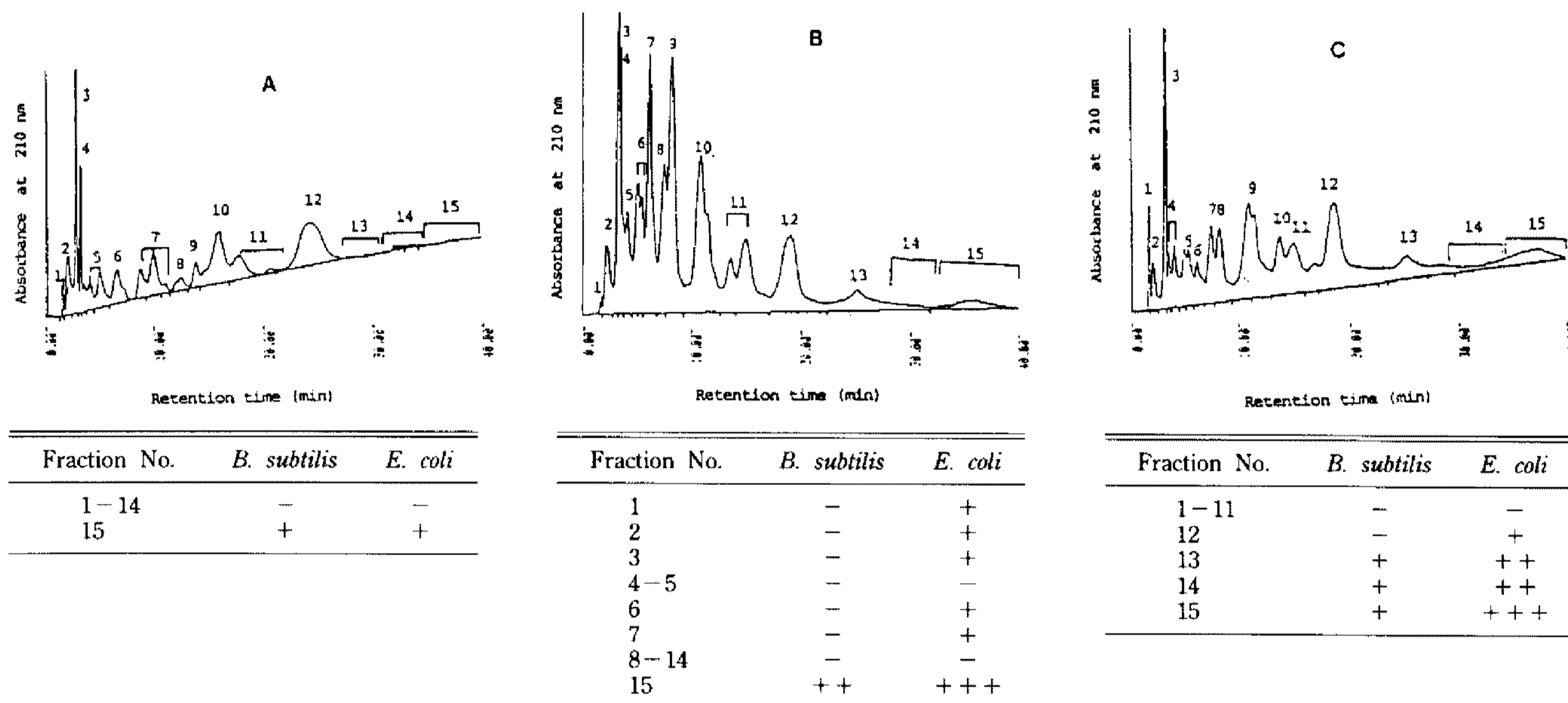


Fig. 2. HPLC chromatograms of induced antibiotics by addition of synthetic VB-C. Culture conditions and analysis procedures are described in Materials and Methods. The elution was done on an ODS column (Waters μ Bondapak, 4.6 \times 300 mm) with methanol : water (2 : 1, v/v) as solvent at a flow rate of 0.8 ml/min and detected at 210 nm. (A): -VB-C (48 hr), (B): +VB-C (28 hr), (C): +VB-C (48 hr)

새로운 유도 기능이 시사되었다.

VB-C 첨가 및 미첨가에 따른 항생물질의 HPLC 분석

Table 1, 2의 결과에서 보듯이 VB-C 미첨가시에 비해 첨가시의 경우가 동일 시간대의 항균력이 대체로 gram(-)균에 강한 것으로 이들 항생물질을 HPLC를 이용하여 분석하였다. 합성 VB-C를 본배양 5시간째에 100 ng/ml의 농도로 첨가하여 28시간(B)과 48시간(C) 배양시킨 배양액과 VB-C를 미첨가 하여 48시간 배양(A, 28시간 배양시 항생물질 미생산)시킨 배양액 각각 300 ml를 300 ml의 n-butanol로 1회 추출, 농축하여 C₁₈ column을 이용한 역상 HPLC로서 항생물질을 비교 분석하였다. Fig. 2에서 보인 바와 같이 VB-C를 미 첨가하여 48시간 배양시킨 경우(A), retention time 35분 이후인 fraction No.15에서 gram(+), gram(-) 균에 모두 항균력을 나타내는 항생물질이 검출되었다. VB-C를 첨가하여 28시간 배양시킨 경우(B) 미첨가 시와 같이 retention time 35분 이후인 fraction No. 15에서 gram(+), gram(-)균에 모두 항균력을 나타 내었으며 미첨가시에는 나타나지 않던 fraction No. 1, 2, 3, 6, 7에서 gram(-)균에 항균력을 가지는 항 생물질이 새로이 검출되었다. 또한 VB-C를 첨가하여 48시간 배양시킨 경우 fraction No. 12에서는 gram (-)균에만 항균력을 나타내는 항생물질이 검출되었

으며 fraction No. 13과 14에서는 gram(+)균과 gram (-)균에 모두 항균력을 나타내는 항생물질이 검출되 었고 fraction No. 15는 VB-C 미첨가시와 같이 gram (+)균과 gram(-)균에 모두 항균력을 나타내었다. 이러한 결과에서 VB-C 미첨가와 첨가시 48시간 배 양시킨 경우를 비교해 보면 fraction No. 15의 항생 물질은 VB-C 첨가 및 미첨가시 모두 생산되므로 *S. longwoodensis* 자체내에서 생산되는 항생물질이라 사 료되는 반면, VB-C 미첨가시에는 존재하지 않던 reten tion time 20분 이후인 fraction No. 12, 13, 14번에서 gram(+), gram(-)균에 모두 항균력을 가진 항생물 질이 검출되어 이들은 합성 VB-C 첨가에 의해 유도 되어지는 새로운 항생물질로 추정되었다. 즉, VB-C를 첨가하여 28시간 배양시(B) retention time 5분 이 내의 항균력을 나타내는 peak들이 전구체로 합성되어 시간이 경과(48시간, C)됨에 따라 새로운 항생물질로 전환된다고 사료되었다. 따라서 Table 1, 2에서 VB-C 첨가 후 배양 28~32시간대의 항균력이 gram(-)균에 다소 강한 이유는 gram(-)균에 유효한 전구체로 추 정되는 새로운 항생물질에 의한 효과라고 예상된다. 이 결과는 Hashimoto 등(14)이 보고한 IM-2의 유도 기능과 비교할 때 IM-2 첨가에 의한 기존의 항생물 질인 cycloserine의 생산이 억제되는 결과와는 상이 하나, 새로운 nucleoside계 항생물질의 유도와 유사한 기능을 보이므로, 최초로 VB-C가 다른 방선균에서

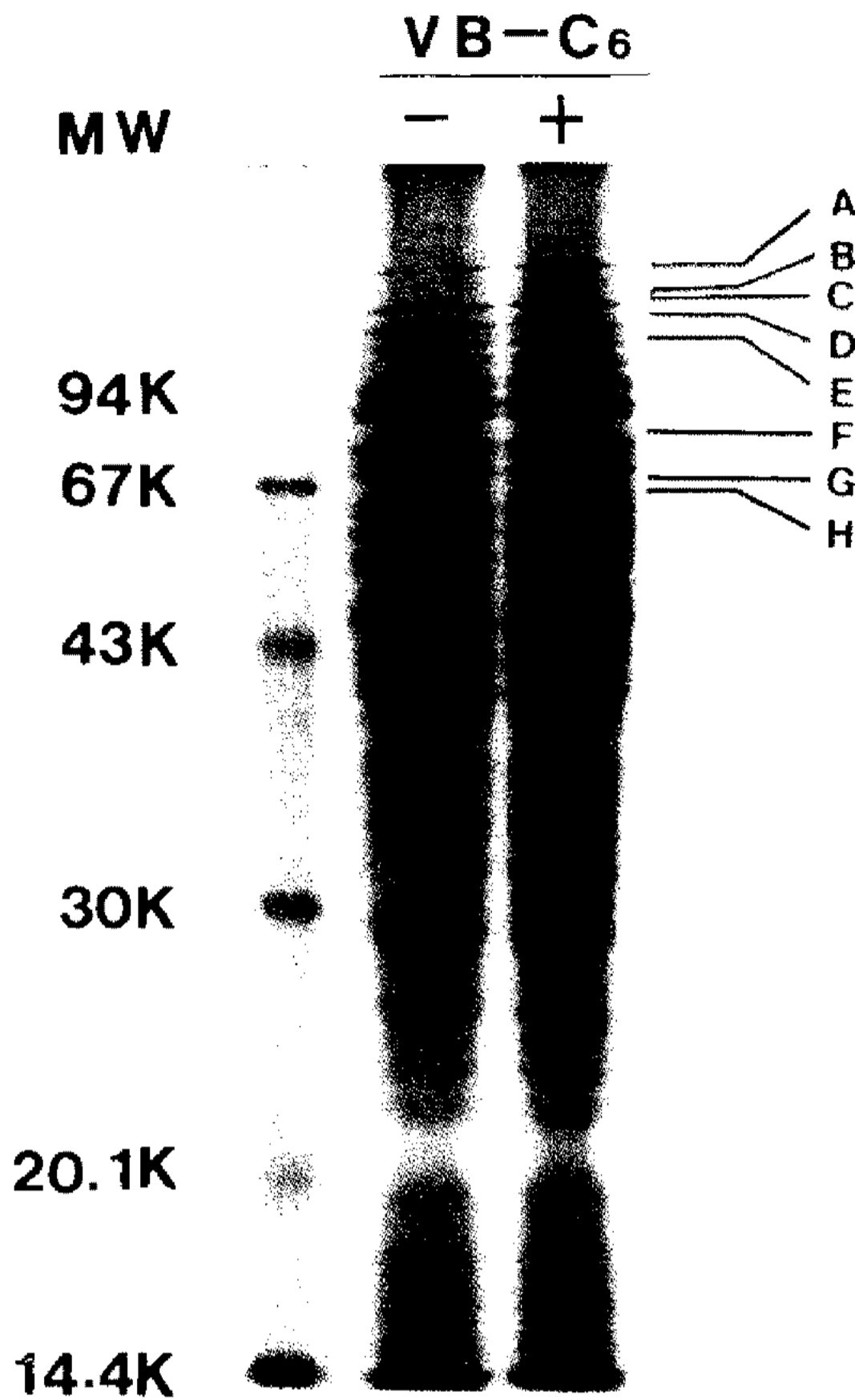


Fig. 3. SDS-PAGE band patterns of mycelial proteins induced by VB-C addition.

The VB-C (100 ng/ml) was added at 5 hrs after inoculation. Each 150 µg of mycelial proteins from 28 hr cultures was subjected to SDS-12.5% polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie brilliant blue R-250. Other experimental conditions were described in Materials and Methods.

새로운 2차 대사산물의 생산을 유도하는 기능이 시사되었다.

VB-C의 유도에 따른 세포내 protein pattern

VB-C에 의한 항생물질 및 색소의 유도 기능이 시사됨에 따라 VB-C 첨가에 따른 세포내 단백질의 변화를 검토하였다. 100 ng/ml의 VB-C를 첨가 및 미첨가하여 28시간 배양시킨 배양 균체를 파쇄한 후 total protein을 SDS-PAGE로 분석하였다. Fig. 3에서 보인 바와 같이 VB-C 첨가시의 경우 VB-C 미첨가시에는 존재하지 않던 분자량 94 K 이상의 C, D bands 및 약 80 K 부근의 F band와 같은 새로운 단백질 생성이 확인되었으며, 그외 A, B, E, G, H bands와 같은 단백질들은 미첨가시에 비해 다소 생산량이 증대되었다. 이 같은 결과는 Gräfe 등(19)의 보고와 같이, 포자형성 결손 변이주인 *S. griseus*에 factor I를 첨가하였을 경우 항생물질 생산 및 포자형성에

Table 4. [³H]VB-C₇ binding activity of cell-free extract from *S. longwoodensis*

Incubation time (hour)	Specific [³ H]VB-C ₇ binding (10 ³ dpm/mg protein)
24	28.78
28	—
36	8.31

Cell-free extract was incubated with 69.6 nM [³H]VB-C₇ for 20 minutes in the presence and absence of 0.125 nM non-labeled VB-C. Other experimental conditions were described in Materials and Methods.

관여한다고 예상되는 새로운 여러가지 단백질의 생산 회복 및 양의 증가가 유도된 결과와 비교할 때, VB-C 첨가에 따라 대사산물 생산에 관여한다고 예상되는 세포내 다수의 단백질이 새로이 합성되거나 촉진된다고 추정되었다.

VB-C receptor성 결합 단백질의 존재

*S. virginiae*의 경우, 자기조절인자인 VB의 signal 전달에 관여하는 결합 단백질인 VB receptor가 김 등(8, 9)에 의해 처음으로 분리 및 정제되었고 *S. virginiae*의 genome DNA(cell당)당 극히 적은 30~40개의 receptor가 존재한다는 결과(8)를 기초로 하여 본 실험의 대상균인 *S. longwoodensis*에 있어서 VB signal 전달과 관련하여 VB 결합 단백질의 존재 유무를 조사하였다. 김 등(9)의 방법에 따라 가장 유도활성이 강한 VB-C₇(측쇄의 길이 C7)을 이용하여 tritium label한 [³H]VB-C₇을 ligand로 사용하였다. 배양 24, 28, 36시간째의 균체를 파쇄한 상등액으로부터 조제한 조단백질에 대해 VB-binding assay 법을 통해 특이적인 VB-C 결합 단백질의 존재를 경쟁적 저해를 사용하여 검토하였다. 결과는 Table 4에 나타낸 바와 같이 본 배양 24시간 이전에 이미 VB-C와 특이적으로 결합하는 결합 단백질의 존재가 확인되었으며, 28시간째는 ligand와의 결합능이 소실되나 이는 자신이 생산한 비 특이적인 VB류(VB-A or B)와 결합에 의한 결과로 추정되며, 36시간째에는 ligand(VB류)와의 해리에 의해 다시 [³H]VB-C₇과의 결합 활성이 증가된다고 사료되었다. 따라서 *S. longwoodensis*에 있어서도 *S. virginiae*에 존재하는 recycle성 VB-C 결합 단백질과 유사한 기능을 가진 VB-C 결합 단백질(12)의 존재가 시사되었다.

요 약

S. virginiae 유래의 virginiamycin 생합성 유도인

자인 VB-C를 이용하여 다른 방선균인 *S. longwoodensis*(lysoceillin 생산균)를 대상으로 하여 2차 대사산물 생산 유도능을 검토하였다. 본배양 0시간 및 5시간째에 합성 VB-C를 100 ng/ml의 농도로 첨가시 약 2~6시간의 항생물질 생산시기와 본배양 0시간에 VB-C 첨가시 2~4시간의 색소의 생산 시기가 단축되었다. 또한 VB-C 유도에 의해 생성된 항생물질의 HPLC 분석 결과, 새로운 항생물질의 유도가 시사되었다. VB-C 첨가시 균사내 총 단백질 pattern을 SDS-PAGE로 분석한 결과, 미첨가시에 비해 2차 대사산물 생산에 관여한다고 예상되는 새로운 단백질의 생산 및 몇몇 단백질 양의 증가가 확인되었다. 또한 VB-C의 signal 전달에 관여한다고 추정되는 VB-C에 특이적인 결합 단백질의 존재가 확인되었다. 따라서 본 연구의 결과는 미생물 호르몬인 VB-C의 signal이 처음으로 다른 VB류 생산 방선균에서도 전달되어 2차 대사산물 생산을 촉진하는 새로운 유도기능의 확인과 silent gene의 발현에 따른 새롭고 다양한 항생물질을 2차 대사산물로서 생산 유도할 수 있는 가능성을 시사하였다.

감사의 말

이 논문은 1993년도 한국학술 진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Khokhlov, A.S., I.I. Tovarova, L.N. Borisova, S.A. Pliner, L.A. Shevchenko, E.Ya. Konitskaya, N.S. Ivkina, and I.A. Rapoport. 1967. A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomycetes streptomycini*. *Dokady Akad. Nauk. SSSR*. **177**: 232-235.
2. Gräfe, U., W. shade, I. Eritt, W.F. Fleck, and L. Radies. 1982. A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiot.* **35**: 1722-1723.
3. Yamada, Y., K. Sugamura, K. Kondo, M. Yanagimoto, and H. Okada. 1987. The structure of inducing factors for virginiamycin in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **40**: 496-504.
4. Nihira, T., T. Shimizu, H.S. Kim, and Y. Yamada. 1988. Structure activity relationships of virginiae butanolide C, an inducer of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **41**: 1828-1837.
5. Horinouch, S., O. Hara, and T. Beppu. 1983. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and *Sterptomycetes lividans*. *J. Bacteriol.* **155**: 1238-1248.
6. Horinouch, S., S.Y. Kumada, and T. Beppu. 1984. Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organism: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* **158**: 481-487.
7. Li, W., T. Nihira, S. Sakuda, T. Nishida, and Y. Yamada. 1992. Isolation and structure of a new butyrolactone autoregulator from *Streptomyces* sp. FRI-5. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 214-217.
8. Kim, H.S., T. Nihira, H. Tada, M. Yanagimoto, and Y. Yamada. 1989. Identification of binding protein of virginiae butanolide C, an autoregulator in virginiamycin production, from *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **42**: 769-778.
9. Kim, H.S., H. Tada, T. Nihira, and Y. Yamada. 1990. Purification and characterization of virginiae butanolide C-binding protein, a possible pleiotropic signal-transducer in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **43**: 692-706.
10. Miyake, K., T. Kuzuyama, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1990. The A-factor binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin and sporulation. *J. Bacteriol.* **172**: 3003-3008.
11. 김현수. 1992. *Streptomyces virginiae*가 생산하는 Virginiae Butanolide C(VB-C) 결합 단백질의 결합 활성에 미치는 일반적 특성. *산업미생물학회지* **20**: 257-262.
12. 김현수. 1992. Virginiae butanolide C 결합 단백질의 신호 전달기구에 대한 연구. *한국미생물학회지* **30**: 181-186.
13. Okamoto, S., T. Nihira, H. Kataoka, A. Suzuki, and Y. Yamada. 1992. Purification and molecular cloning of a butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* **267**: 1093-1098.
14. Hashimoto, K., T. Nihira, S. Sakuda, and Y. Yamada. 1992. IM-2, a butyrolactone autoregulator, induces production of several nucleoside antibiotics in *Streptomyces* sp. FRI-5. *J. Ferment Bioeng.* **73**: 449-455.
15. 김현수, 강선영. 1993. VB-C에 의한 항생물질 유도 방선균의 검색. *계명대 기초과학 연구소 연구논집* **12**: 27-32.
16. Ohashi, H., Y.H. Zheng, T. Nihira, and Y. Yamada. 1989. Distribution of virginiae butanolides in antibiotic-producing Actinomycetes, and identification of the inducing factor from *Streptomyces antibioticus* as virginiae butanolide A. *J. Antibiot.* **42**: 1191-1195.
17. Ebata, E., H. Kasahara, K. Secine, and Y. Inoue. 1975. Lysoceillin, a new polyether antibiotic I. isolation, purification, physicochemical and biological

- cal properties. *J. Antibiot.* **253**: 118-121.
18. Yanagimoto, M. and G. Terui. 1971. Physiological studies on staphylomycin production. (II) formation of a substance effective in inducing staphylomycin production. *J. Ferment. Technol.* **49**: 611-618.
19. Gräfe, U. and Eva Sarfert. 1985. Reconstitution by a butyrolactone autoregulator of the parental protein pattern in an asporogenous mutant of *Streptomyces griseus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **28**: 249-253.

(Received July 25, 1994)