

Virginiamycin 생산유도에 관여하는 Virginiae Butanolide C(VB-C) 및 Receptor의 기능

김현수* · 현지숙

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Virginiamycin(VM) 생산 유도에 관여하는 virginiae butanolide C(VB-C) 및 receptor의 기능을 명확히 규명하기 위해 *S. virginiae*로부터 NTG 및 hydroxylamine 처리를 통해 두 개의 변이주를 분리하였으며, VM을 생산하는 균주에서 VB, receptor를 모두 생산하지 않는 *S. ostreogriseus*와, receptor는 생산하나 VB를 생산하지 않는 *S. graminofaciens*를 대상으로 하여 유도능의 관계를 검토하였다. 분리한 *S. virginiae* mutant N-25와 H-05는 VB가 receptor보다 먼저 생산되는 특성을 나타내었으며, VM 생산시기가 현저히 지연되었다. 이는 *S. virginiae* 모균주에서 receptor가 생산되기 이전에 합성 VB-C를 첨가하였을 때 VM 생산이 억제되는 것과 같은 현상인 것으로 판단되었다. 한편, VM 생산균인 *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*는 모두 VB를 생산하지 않으며 합성 VB-C 첨가에 의한 유도능을 검토한 결과, receptor를 생산하지 않는 *S. ostreogriseus*의 경우 VM 생산이 억제되는 반면, receptor를 생산하는 *S. graminofaciens*의 경우에는 VM 생산이 촉진되었다. 이들 결과에서 볼 때, VM 생산 촉진에 VB가 필수적이며 VB의 신호전달에 따른 VM 생산 촉진 효과는 반드시 receptor의 존재하에서 일어난다고 사료되었다. *S. graminofaciens*의 경우 합성 VB-C 첨가에 의해 생산된 항생물질을 HPLC를 이용하여 분석한 결과, 항생물질 생산량이 증가하였으며, 새로운 항생물질 생산 유도도 가능한 것으로 시사되었다.

KEY WORDS □ *Virginiae butanolide C(VB-C)*, virginiamycin, VB-C receptor, autoregulator, *Streptomyces virginiae*, *Streptomyces ostreogriseus*, *Streptomyces graminofaciens*

Gram(+) 세균인 방선균은 방사상으로 생육하며, 한 개의 포자가 발아하여 다핵성의 기저균사(substrate mycelium)를 형성하고 주위의 영양원이 고갈됨에 따라 기균사(aerial mycelium) 형성, 포자형성과 함께 다양한 2차대사산물을 생산한다. 따라서 이들 방선균은 기균사, 포자형성 등의 형태분화(morphological differentiation) 뿐만 아니라 항생물질, 색소, 생리활성물질 등 다양한 2차대사산물을 생산하는 생리적 분화(physiological differentiation)의 특징을 가지며, 이러한 생리적 분화를 조절하는 자기조절인자(autoregulator)가 알려져 있다. 이들 인자는 *Streptomyces*속 방선균을 중심으로 하여 수많은 연구가 수행되어 있으며, 지금까지 알려진 인자로서는 A-factor(12, 13)를 비롯하여 virginiae butanolides (VBs)(19, 25, 26), factor I(6), factor C(5), B-factor(11), pama-mycin(16) 등의 구조가 밝혀져 있으며, 근년에 들어 이들의 분자수준에서의 연구가 진행됨에 따라 그 기능이 하나씩 밝혀지고 있다(9, 10). 자기조절인자는 다면형질발현성(plciotropic)이며 배양액 중 미량으로 존재하고 수 ng/ml의 극히 저농도에서 기능을 발휘한다는 점에서 원핵생물의 호르몬으로 간주되고 있다. 본 연구와 관련하여 *S. virginiae*가 생산하는 자기조절인자인 VB는 virginiamycin(이하 VM으로 표기함) 생산시기를 단축시키는 유도기능을 가지는 것으로 알려져 있으며(19, 25, 26) *S. virginiae*로부터 VB-A, B, C, D, E가 분리되어 그 구조가 보고되었다(25, 26). VB류의 구조 활

성 상관관계는 VB-D(측쇄길이 C₇), VB-C(측쇄길이 C₆)가 VM 유도활성에 가장 강하며(19), receptor와의 친화성은 VB-D가 VB-C보다 다소 큰 것으로 알려져 있다(15). 또한 최근에는 *S. antibioticus*로부터 새로운 VM 생산 유도인자로서 NFX-1, 2, 3, 4(17) 및 *Streptomyces* sp. FRI-5로부터 청색색소 유도인자로서 IM-2(7, 23)가 분리, 정제되었으며, IM-2와 VBs는 15종 이상의 방선균에서 생산된다는 것이 확인되고 있다(7, 20). 이들 유도인자의 신호전달과 관련하여 항생물질 생합성 mechanism 연구의 일환으로 VB의 신호전달에 관여하는 VB receptor의 존재가 밝혀졌으며(14, 15), A-factor에 있어서도 A-factor receptor의 존재가 확인되어 repressor로서의 기능이 추정되고 있다(18). 또한 VB를 포함하는 신호전달 기구의 존재가능성(1, 2) 및 VB-C receptor 유전자인 *barA*의 cloning(21) 등 VB의 신호전달기구에 관한 연구가 계속 수행 중에 있다.

한편, VB의 신호전달기구에 대한 분자수준에서의 연구가 진행되고 있으나 명확한 기구의 해명은 되지 않고 있는 상황에서 최근 김 등(4)은 *S. virginiae*로부터 VB결손변이주 등을 분리하고 VM 생산촉진에 관여하는 VB 및 VB receptor의 상관관계를 검토하여, VM 생산촉진에 VB의 생산이 요구되며 VB의 신호전달에 VB receptor가 필수적임을 밝혔다. 따라서 A-factor receptor가 streptomycin 생산에 repressor로서 작용하는 것으로 보고(18)되고 있는 반면, VB receptor는 VM 생산촉진을 위한 VB신호전달에 관여한다고 예상되고 있다.

*To whom correspondence should be addressed

본 연구에서는 VB-C 및 receptor의 기능을 명확히 규명하기 위해 *S. virginiae*로부터 VM생산지연 변이주를 분리하는 한편, VM을 생산하는 균 중에서 VB, receptor를 생산하지 않는 *S. ostreogriseus*와 receptor는 생산하나 VB를 생산하지 않는 *S. graminofaciens*를 대상으로 하여 VM생산촉진에 관여하는 VB-C 및 receptor의 역할을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 실험에 사용된 공시균주는 Yanagimoto 등(26)의 *Streptomyces virginiae* MAFF10-06014와, *S. ostreogriseus* IFO 13423, *S. graminofaciens* IFO13455를 사용하였으며, 생육배지로서는 전배양의 경우, 김 등(4)의 BYGN배지, 즉, 배지 1 L당 bacto-casitone 7.5 g(Difco Co.), yeast extract 7.5 g, glycerol 15 g, NaCl 2.5 g, pH 6.5를 사용하였으며, 본 배양의 경우, *S. virginiae* 모균주 및 변이주의 항생물질 생산배지로 전배양과 동일한 BYGN 배지를 사용하였고, *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*의 항생물질 생산배지로 K-1배지, 즉 배지 1 L당 soluble starch 20 g(Yakuri Pure Chemicals Co.), bacto-soytone 10 g(Difco Co.), KCl 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, NaCl 5 g, $NaNO_3$ 2 g을 사용하였다.

항생물질 생산 검정균으로서 *Bacillus subtilis* PCI 219를 사용하였으며, 검정균의 생육배지로는 polypeptone 0.5% (Difco Co.), meat extract 0.3%(Difco Co.), agar 1.5%를 첨가하여 사용하였다.

공시균 및 변이주의 전배양은 oat meal 평판배지에서 28°C, 7-10일간 생육시킨 colony로부터 제조한 spore 용액을 BYGN배지 25 ml에 일정량($=5 \times 10^6$ spores) 접종하여 28°C, 100 spm(strokes per min)에서 36-48시간 배양한 균체를 70°C에서 보존하여 전배양균으로 사용하였다.

변이주의 분리

*S. virginiae*로부터 각종 변이주의 분리는 Hopwood 등(8)의 NTG처리와 hydroxylamine 처리법을 사용하였다. 즉 NTG 처리의 경우, *S. virginiae* spore용액 1 ml를 원심분리(12,000 × g, 10분)한 후 침전에 0.05 M Tris-malate buffer(pH 9.0) 1 ml를 첨가하여 현탁한 용액에 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) 5 mg을 첨가, 용해시켜 실온에서 1시간 처리하였다. 이를 원심분리하여 상등액을 제거하고 20% glycerol 1 ml를 첨가하여 10^5 배까지 희석한 다음 oat meal 평판 배지상에 10 μl씩 도말하여 28°C에서 5일간 배양하였다.

Hydroxylamine(NH_2OH) 처리의 경우, 멸균된 0.45 μm filter (Corning Co.)로 제균한 20% hydroxylamine을 BYGN배지로 희석하여 최종농도가 0.5%되도록 *S. virginiae* spore용액 100 μl를 첨가하여 28°C에서 1-2시간 처리하였다. 이를 원심분리하여 상등액을 제거하고 BYGN배지에 10^5 배까지 희석한 다음 ISP배지 No. 2, 즉 배지 1 L당 yeast extract(Difco Co.) 4 g, malt extract(Difco Co.) 10 g, glucose 4 g, agar 20 g, pH 7.3을 사용한 평판배지상에 100 μl씩 도말하여 28°C에서 5일간 배양하였다.

각각의 처리에 의해 생성된 colony를 임의로 선별하여 BYGN 평판배지에 접종한 후 항생물질 생산이 지연되는 균주를 대상으로 ISP No. 2 사면배지에 접종하여 배양한 다음 변이주로 사용하였다.

VB 및 VB-C receptor의 조제

본 실험에 사용된 합성 VB-C는 김 등(15)이 조제한 VB-C(2위축쇄탄소수 6개, ethanol에 용해)를 사용하였으며, *S. ostreogriseus*, *S. graminofaciens* 및 *S. virginiae* 변이주가 생산하는 천연형 VB류는 김 등(3)의 방법에 따라 조제하였다. 즉, 상기 균주를 각각 K-1배지 및 BYGN배지 25 ml에 전배양균을 3% 접종하여 28°C, 100 spm에서 배양한 후 각 배양 시간에 따른 배양상등액 20 ml를 염산산성(pH 2-3)하에서 2배량의 ethylacetate로 추출하여 Na_2SO_4 로 탈수하고 진공농축 후 ethanol 100 μl에 용해시켜 천연형 VB용액으로 사용하였다.

VB-C receptor는 김 등(14)의 방법에 따라 조제하였다. 즉, 각 배양 시간에 따라 배양한 균체 약 1 g을 0.5 M KCl, 5 mM dithiothreitol이 함유된 0.05 M triethanolamine HCl buffer(TEA buffer, pH 7.0) 20 ml에 현탁하여 sonicator로 2분간 파쇄 후 원심분리(12,000 × g, 20분)하고 그 상등액을 *S. virginiae* 변이주의 경우에는 30-50%, *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*의 경우에는 30-80% 포화되게 $(NH_4)_2SO_4$ 로 침전시켜 투석한 다음 조단백질 용액으로 사용하였다.

VB의 virginiamycin 유도활성 측정

VB의 virginiamycin 생산촉진능은 김 등(4)의 방법을 사용하여 검토하였다. 즉, *S. virginiae* 모균주 및 변이주, *S. ostreogriseus*, *S. graminofaciens*의 전배양균(-70°C 보존)을 멸균한 BYGN 및 K-1배지로 각각 세척한 후 25 ml의 동일 배지에 3%되게 접종하여 100 spm, 28°C에서 배양하였다. VB의 첨가는, 합성 VB-C의 경우 *S. virginiae* 모균주 및 변이주는 본배양 6시간 후에 200 ng/ml를, *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*는 본배양 12시간 후에 300 ng/ml를 첨가하였으며, 천연형 VB의 경우 본배양 6시간 후에 100 μl를 각각 첨가하였다.

각 배양균주의 항생물질 생산유무는, VB-C 첨가 이후 2시간 정도의 간격으로 sampling하여 검정균 *B. subtilis* PCI 219가 함유된 평판배지에서 cup법에 의해 생성된 clear zone으로 확인하였으며, 배양액 중에 함유된 VM은 Yanagimoto 등(26)이 보고한 5 mg/ml의 농도일 경우 13 mm의 저지원이 나타나는 것으로 판단하였다.

VB-C receptor 결합활성 측정

VB-C receptor의 결합활성은 김 등(4)의 방법을 사용하여 측정하였다. 즉, 상기 조제된 receptor protein을 protein assay kit(Bio-rad Co.)로 정량한 후, 100 μg의 조단백질 용액에 0.5 M KCl 및 5 mM dithiothreitol이 함유된 0.05 M TEA buffer를 첨가하여 100 μl로 조정하고 최종농도 0.125 mM(3 μl 첨가)되게 합성한 cold VB-C(non-labeled, 축쇄길이 C_6)를 첨가 및 미첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 다음에 tritium으로 label한 축쇄길이 C_7 인 [3H]VB-C(54.6 Ci/

mmole, VB-D와 동일구조)을 최종농도 69.6 nM(2 μ l 첨가) 되게 첨가하여 동일조건하에서 반응시킨 다음, *S. virginiae* 변이주의 경우에는 80%, *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*의 경우에는 100% 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액 900 μ l를 넣어 20분간 실온에서 방치 후, 15,000 \times g에서 20분간 원심분리하였다. 이때 생긴 침전(protein-ligand complex)을 80% 포화 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 용액 1 ml로 1회 세척하고 다시 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 100 μ l의 H_2O 에 용해시켜 10 ml의 toluene 용액[toluene 100 g/L, Triton X-100(polyethylene glycol mono-*p*-isooctylphenyl ether, Nakarai Co.) 500 g/L, Omni-fluor(Dupont Co.) 4 g/L]을 첨가하여 scintillation counting(Beckman LS7500)하였다. [^3H]VB-C에 대한 특이적인 결합은 cold VB-C 첨가 및 미첨가의 차이로써 산출하였다.

HPLC에 의한 항생물질의 분석

*S. graminofaciens*를 배양하여 항생물질이 생산되는 시기(VB-C 첨가시: 24시간, 26시간, 30시간 배양, VB-C 미첨가시: 26시간, 30시간 배양의 배양상등액 20 ml를 2배량의 ethylacetate로 추출하여 Na_2SO_4 로 탈수하고 진공농축한 후 100 μ l의 methanol에 용해시켰다. 이를 0.45 μ m filter(Millipore Co.)에 여과시킨 후 역상 HPLC(Shimadzu LC-10AD, Shimadzu Shimpak column C_{18} , $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}=1:1$, 0.1% trifluoroacetic acid, UV 305 nm)를 실시하여 검출된 각 peak의 pattern을 standard VM-M, S와 비교, 분석하고, peak별로 분취(시료 5 μ l씩 3회 injection), 농축하여 *B. subtilis* PCI 219에 대한 항균력을 조사하였다.

결과 및 고찰

S. virginiae 변이주의 분리

김 등(4)은 VM 생산에 관여하는 VB 및 receptor의 상관관계를 규명하기 위해 *S. virginiae*로부터 pH 9.0 하에서 NTG를 처리하여 생성된 colony 중 항생물질 생산능을 소유한 균주로부터 합성 VB-C에 의한 유도능의 결손, VB-C receptor의 대량생산, VB-C 결손 변이주 등 3주를 분리한 바 있다. 이들 변이주로부터 VM 생산촉진에 VB가 필수적이며 VB의 signal 전달에 receptor의 존재가 필수적이라고 추정하였다. 따라서 본 연구에서는 VM 생산촉진에 관여한다고 예상되는 VB-C 및 VB-C receptor의 기능을 규명하기 위해 *S. virginiae*로부터 NTG 처리(pH 9.0) 및 0.5% hydroxylamine 처리를 통해 얻은 colony들을 검토하여 항생물질 생산이 지연되는 변이주를 분리하였다. 이들 변이주를 취득하여 계대배양을 통해 미복귀 상태임을 확인하였고, VM 생산, receptor 생산 및 VB-C에 의한 유도능을 검토하였다.

S. virginiae 변이주, *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*의 virginiamycin 생산

김 등(4)의 실험결과인 VB의 유도기능은 VM 생산유도에 특이적이라고 추정되는 점으로부터 VB-C 및 receptor의 기능을 확인하기 위해 *S. virginiae* 변이주 및 VM을 생산하는 다른 방선균인 *S. ostreogriseus*와 *S. graminofaciens*를 대상으로 VB 및 receptor의 상관관계를 검토하였다. 위에서 언

급한 바와 같이 NTG(pH 9.0) 및 hydroxylamine 처리 등을 통하여 분리한 2가지 변이주와 *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*를 각각의 생육배지 25 ml를 사용한 액체배양에서 배양 14시간 이후의 항생물질 생산능을 조사하였다. *S. virginiae* 모균의 경우 김 등(4)의 결과에서와 같이 배양 12시간 후부터 항생물질이 생산되는 것과 비교하여, 본 실험에서 사용된 균들의 경우 Table 1에 나타난 것처럼 두 가지의 변이주는 모균주보다 약 4.5일 정도 늦어진 시기에 미량의 항생물질이 생산되었고, *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*는 각각 배양 14시간 및 26시간 이후에 생산되는 결과를 나타내었다.

사용 균주의 VB 생산

김 등(14, 15)은 *S. virginiae* 모균주의 경우 receptor, VB, VM 순으로 생산된다고 보고하였다. 따라서 각종 균주의 VB 생산능을 조사하기 위해, 항생물질이 생산되기 전의 각 배양액으로부터 천연형 VB를 추출하였다.

각 추출액 중의 VB 존재 유무를 확인하기 위해 *S. virginiae* 모균주의 본배양 6시간째에, 추출액으로부터 조제한 천연형 VB 용액 100 μ l 또는 대조구로서 합성 VB-C(200 ng/ml)를 첨가하여, 배양 8시간째부터 VM 생산유도(촉진)를 확인하였다. 이 때 천연형 VB용액의 첨가가 합성 VB-C 첨가와 같은 VM 생산 촉진 효과를 나타내면 천연형 VB제조액 내에 VB가 존재하는 것으로 판단하였다. Table 2에서 보인 바와 같이 *S. virginiae* 변이주 N-25 및 H-05의 경우 항생물질 생산시기(Table 1)보다 4일 이상이 빠른 배양 6시간 이후와 배양 24시간째에 VB가 생산되었다. 이 결과는 receptor가 생산되기 전에 VB가 생산될 경우 VM 생산이 억제된다는 김 등(4)의 보고와 비교할 때 이들 변이주 역시 VB가 receptor보다 빨리 생산되어 VM 생산시기가 지연된다고 추정되었다.

한편, *S. ostreogriseus*와 *S. graminofaciens*의 경우 VB는 전혀 생산되지 않으나 위의 두 변이주와 비교했을 때 항생물질이 빨리 생산되는 양상을 나타내었다. 따라서, VB의 결

Table 1. Time course of the virginiamycin production in various strains

A: *S. virginiae* mutants

Mutants	Virginiamycin production time(day)				
	1	2	3	4	5
	Inhibitory zone(ϕ , mm)				
N-25	-	-	-	-	9
H-05	-	-	-	-	9

B: *S. ostreogriseus* and *S. graminofaciens*

Strains	Virginiamycin production(hour)										
	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32
	Inhibitory zone(ϕ , mm)										
<i>S. ostreogriseus</i>	-	12	15	15	16	17	17	17	17	17	17
<i>S. graminofaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	9	10	11	12

Cultivation was performed with a 25 ml portion of BYGN medium(A) or K-1 medium(B) in a 100 ml Erlenmeyer flask on a reciprocating shaker(100 strokes per min) at 28°C.

Table 2. Time course of the VB production in various strains

Strains	VB production time(h)						
	6	10	14	24	48	72	96
<i>S. virginiae</i> mutant							
N-25	±	+	+	+	+	+	+
H-05	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. ostreogriseus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. graminofaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-

Natural VB was prepared from 20 ml of each culture broth as described in Materials and Methods. 100 µl of prepared VB was added at cultivation time of 6 hours and the production of antibiotics was detected at cultivation time of 8 hours. Culture conditions were almost identical as described in Table 1.

*Diameter of inhibitory zone bigger than 12 mm.

손에 의해 VM의 생산이 지연된다는 김 등(4)의 보고와 비교할 때, VB의 결손에 의한 경우보다 VB 생산이 지나치게 빨리 일어나는 경우에 항생물질 생산을 억제하는 경향이 더욱 큰 것으로 사료된다.

사용 균주의 VB-C receptor 생산

Table 2의 결과에서 변이주 N-25 및 H-05의 경우 VB는 생산되나 VM 생산시기가 아주 늦어진 점으로부터 VB-C receptor의 생산시기가 VB보다 늦거나, receptor의 결손이 예상되었다. 따라서 VB-C의 신호전달에 관여한다고 예상(4, 14, 15)되는 VB-C receptor의 생산유무를 배지 25 ml에서 배양한 균체를 사용하여 [³H]VB-C₇로써 확인하였다. Table 3에서 보인 바와 같이 배양시간에 따른 receptor의 생산은, 배양 6시간째부터 VB를 생산하기 시작하는(Table 2) *S. virginiae* mutant N-25의 경우 VB 생산이 시작된 이후인 배양 10시간째부터 receptor가 생산되기 시작하여 증가하였다가 다시 감소하는 경향을 보였으며, H-05의 경우 역시 VB가 생산(배양 24시간)된 이후(Table 2)인 배양 4일째에 생산되기 시작하였다. 위에서 추정된 바와 같이 두 가지 *S. virginiae* mutants는 receptor가 생산되기 이전에 VB를 생산하고 VM의 생산이 아주 지연되는 점으로 보아 먼저 생산된 VB에 의해 VM의 생산이 억제된다는 것이 입증되었으며, 이 경우 VB 결손 변이주(4)에 비해 VM 생산시기가 현저히 지연되는 결과를 보였다. 또한 변이주 N-25의 경우 배양 120시간째에 receptor의 양이 증가하는 이유는 김 등(2)이 보고한 바와 같이 receptor의 recycle에 기인한다고 사료되었다.

한편, *S. ostreogriseus*는, VB-C receptor를 생산하지 않았으며 *S. graminofaciens*는 배양 10시간째부터 소량의 receptor 생산이 확인되었다. 따라서 *S. ostreogriseus*의 경우 receptor가 생산되지 않으므로 배양초기에 합성 VB-C를 첨가할 경우 첨가된 VB-C로 인해 항생물질 생산이 억제될 것으로 예상되었으며, *S. graminofaciens*의 경우 receptor가 생산되므로 VB-C 첨가에 의한 항생물질 생산 유도(촉진)가 가능하다고 사료되었다.

합성 VB-C에 의한 각종 균주의 항생물질 유도능

*S. virginiae*에 있어서 VB의 기능은 VM생산을 촉진하는

유도기능을 가진다고 추정되고 있으며(26), 본 실험실에서 이미 변이주를 이용한 실험을 통해 VB가 VM 생산에 직접 관여하지 않고 VM 생산 유도(촉진)에 필수적임을 밝혔다(4). 따라서 위의 결과에서 보인 *S. virginiae* 변이주 및 두 균주의 특성으로부터 VM 생산촉진에 관여하는 인자의 기능을 명확히 규명하기 위해 VM생산균인 *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*를 대상으로 합성 VB-C에 의한 유도능을 검토하였다. 본배양 12시간째에 합성 VB-C(300 ng/ml)를 첨가하여 실시한 유도능 검색의 결과는 Table 4에서 보인 바와 같이, *S. ostreogriseus*의 경우 배양 14시간째부터 생산(Table 1)되었던 항생물질이 VB-C 첨가시에는 억제되는 경향을 보였으며, *S. graminofaciens*의 경우 배양 26시간째부터 생산되었던 항생물질이 VB-C에 의해 생산촉진되어 배양 24시간째부터 생산되었다. 이와 같은 결과는, *S. ostreogriseus*의 경우 receptor를 생산하지 않으므로(Table 3) 합성 VB-C 첨가시 VM의 생산을 억제한 것으로 사료되었는데, 이는 *S. virginiae*에 있어서 배양초기에 VB-C 첨가시 VM 생산이 억제된다는 Yanagimoto 등의 보고(26)와 일치하였으며, 김 등(4)의 변이주를 이용한 결과가 입증되었다. 한편, *S. graminofaciens*의 경우에는 본배양 10시간째부터 receptor를 생산하였기 때문에(Table 3) 합성 VB-C 첨가시 VM생산이 촉진된 것으로 사료되었다.

이들 결과에서 볼 때 *S. virginiae* 뿐만 아니라 VM 생산균인 *S. ostreogriseus* 및 *S. graminofaciens*의 경우에도 VM 생산촉진에 VB-C가 필수적이며 VB-C의 신호전달에 따른 VM생산촉진은 receptor의 존재하에서 일어난다고 추정되었다.

*S. graminofaciens*가 생산하는 항생물질의 분석

Table 4에서 보인 바와 같이 *S. virginiae*를 제외한 VM 생산균 중에서 VB-C 첨가시 VM생산촉진을 보였던 *S. graminofaciens*를 대상으로 하여 VB-C 첨가에 의한 항생물질 생산 pattern을 검토하였다. 본배양 12시간째에 합성 VB-C를 첨가 및 미첨가한 다음 항생물질이 생산되는 시기인 30시간

Table 3. [³H]VB-C₇ binding activity of cell-free extract from various strains

Strains	VB-C receptor production time(h)									
	6	10	14	18	22	24	48	72	96	120
	[³ H]VB-C ₇ binding activity (×10 ⁴ dpm/mg protein)									
<i>S. virginiae</i> mutant										
N-25	- ^a	+	++	.	.	+	-	.	+	++
H-05	+	+
<i>S. ostreogriseus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. graminofaciens</i>	.	±	+	+	+	±	-	.	.	.

Each cell(1 g wet mycelia) was disrupted by sonicator for 1 min 2 times at 4°C, and the crude protein solution prepared by 30-50% (*S. virginiae* mutants) or 30-80% (*S. ostreogriseus*, *S. graminofaciens*) saturation of solid ammonium sulfate was used. Each 100 µg of the crude protein was assayed for [³H]VB-C₇ binding activity as described in Materials and Methods. ^a[³H]VB-C₇ binding activity(×10⁴ dpm/mg protein)(. : No production, ±: under 1.0 × 10⁴, +: 1.0-4.0 × 10⁴, ++: above 4.0 × 10⁴).

Table 4. Induction of virginiamycin production by synthetic VB-C in *S. ostreogriseus* and *S. graminofaciens*

A: *S. ostreogriseus*

VB-C addition (300 ng/ml)	Virginiamycin production time(h)						
	10	12	14	16	18	20	22
	Inhibitory zone(ϕ , mm)						
+	-	-	-	14	14	14	14
-	-	-	12	15	15	16	17

B: *S. graminofaciens*

VB-C addition (300 ng/ml)	Virginiamycin production time(h)							
	20	22	24	26	28	30	32	34
	Inhibitory zone(ϕ , mm)							
+	-	-	9	10	11	12	12	10
-	-	-	9	10	11	11	11	12

300 ng/ml of synthetic VB-C was added at cultivation time of 12 hours.

제의 배양상등액을 각각 추출하여 농축한 시료를 C_{18} column을 이용한 역상 HPLC로써 분석하였다. Fig. 1에서 보인 바와 같이 standard VM-M 및 S의 용출시간(Fig. 1, A)과 비교할 때, VB-C를 첨가하지 않은 경우(B)에 생산된 VM-M과 S는 각각 retention time 5.9 min 및 11.1 min에 검출되었으며, 그 면적비율은 1.3% 및 0.7% 정도(Shimadzu chromatopak integrator 사용, 결과 미제)로 아주 미량이 생산되었다. 이에 반해 VB-C를 첨가한 경우(C), VM-S는 11.1 min 대에 거의 비슷한 양(0.9%)으로 검출되었으나 5.9 min 대인 M은 3.3%로 VB-C를 미첨가한 경우에 비해 약 2.5배 가량 증가하였다. VM-M, S 생산량 및 HPLC pattern의 차이로부터 fraction별로 분취한 후 *B. subtilis* PCI 219를 사용한 항균력 검토결과, Table 5에서 보인 바와 같이 VB-C 미첨가시 VM-M을 함유하는 fraction No. 3에서는 항균력을 보이지 않았으나, VM-S를 포함하는 fraction No. 7에서는

Table 5. Antibacterial activity of HPLC fractions from Fig. 1

VB-C addition (300 ng/ml)	Antibacterial activity ^a						
	Fraction number ^b						
	1	2	3	4	5	6	7
	Inhibitory zone(ϕ , mm)						
-	-	10	-	-	-	-	10
+	-	18	11	-	-	10	10

^aAntibacterial activity was detected as described in Materials and Methods. ^bFraction number(retention time): 1, 2.0-4.5(min); 2, 4.5-5.5(min); 3, 5.5-6.5(min); 4, 6.5-8.0(min); 5, 8.0-9.5(min); 6, 9.5-10.5(min); 7, 10.5-11.5(min).

항균력을 나타내었다. 또한 fraction No. 2에서도 항균효과를 나타냄에 따라 VM 이외의 다른 항생물질의 생산이 예상되었다. 이와 비교해서 VB-C 첨가시에는 VM-M 및 S에 해당되는 fraction No. 3 및 No. 7에서 모두 항균력을 나타내었으며, fraction No. 3의 항균력은 VB-C 미첨가시보다 더 크게 나타난 것으로 보아 합성 VB-C의 첨가에 의해 VM의 생산이 촉진된 것으로 사료되었다. 또한 fraction No. 2는 VB-C 미첨가시보다 항균력이 현저히 증가하였는데 이 결과는 VM 이외의 다른 항생물질이 VB-C에 의해 유도되어 나타난 것인 것으로 추정되었다. 뿐만 아니라, VB-C 첨가시에만 검출되는 peak 중 retention time 9.5 min에서 10.5 min 확보인 fraction No. 6의 경우 항균효과를 보임에 따라 VB-C에 의한 silent gene의 발현가능성도 시사되었다. 따라서 VB-C에 의한 silent gene의 발현가능성은 김 등(3)이 보고한 lysocellin 생산균인 *S. longwoodensis*에서도 VB-C 첨가에 따른 새로운 항생물질이 생산된 결과와 유사한 기능을 가진다고 추정되었다. 이들 결과로부터 VM 생산촉진은 *S. virginiae* 뿐만 아니라 *S. ostreogriseus*, *S. graminofaciens*와 같은 VM 생산균에서도 VB-C가 필수적이며 VB-C의 signal 전달에 VB-C receptor가 관여한다는 김 등(4)의 결과가 재입증되었다. 앞으로 VB-C receptor가 결합된

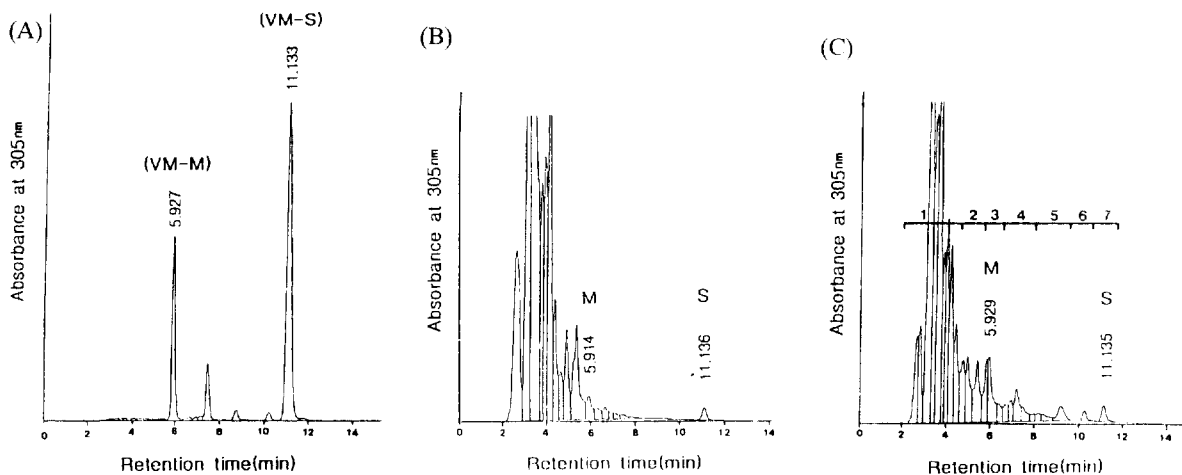


Fig. 1. HPLC chromatograms of extracts by *S. graminofaciens*. 300 ng/ml of synthetic VB-C was added at cultivation time of 12 hours, and culture conditions and analysis procedures were described in Materials and Methods. The elution was done on an ODS column (Shimadzu Shimpak, 4.6×300 mm) with 50% CH_3CN containing 0.1% TFA as solvent at a flow rate of 1.0 ml/min and detected at 305 nm. (A) standard virginiamycin M and S (B) - VB-C(30 hours) (C) + VB-C(30 hours).

*S. ostreogriseus*를 대상으로 연구중에 있는 receptor gene의 도입에 따른 유도기능을 검토함으로써 VM생산유도에 VB의 signal 전달기구가 더욱 명확히 규명되리라 확신한다.

참고문헌

- 김현수. 1992. *Streptomyces virginiae*가 생산하는 virginiae butanolide C(VB-C) 결합 단백질의 결합 활성에 미치는 일반적 특성. 한국산업미생물학 회지 20, 257-262.
- 김현수. 1992. Virginiae butanolide C 결합 단백질의 신호 전달기구에 대한 연구. 한국미생물학회지 30, 181-186.
- 김현수, 강선영. 1994. Virginiamycin 생합성 유도인자 virginiae butanolide C에 의한 2차 대사산물 생산의 유도. 한국산업미생물학회지 22, 459-466.
- 김현수, 현지숙, 유대식. 1996. Virginiamycin 생산유도에 관여하는 virginiae butanolide C(VB-C) 및 receptor의 상관관계. 한국산업미생물학회지 24, 59-66.
- Biró, S., Békési, I. Vitális, and G. Szabó. 1980. A substances effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. *Eur. J. Biochem.* 103, 359-363.
- Gräfe, U., W. Schade, I. Enitt, W. Freck, and L. Radics. 1982. A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiotics.* 35, 1722-1723.
- Hashimoto, K., T. Nihira, and Y. Yamada. 1992. Distribution of virginiae butanolides and IM-2 in the genus *Streptomyces*. *J. Ferment. Bioeng.* 73, 61-65.
- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: A laboratory manual. The John Inners Foundation, Norwich.
- Horinouchi, 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 *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 155, 1238-1248.
- Horinouchi, 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.
- Kawaguchi, T., Asahi, T., Satoh, T., Uozumi, T. and Beppu, T. 1984. B-factor, an essential regulatory substance inducing the production of rifamycin in *Nocardia* sp. *J. Antibiotics.* 37, 1587-1595.
- Khokhlov, A.S., I.I. Tovarova, L.N. Borisova, S.A. Pliner, L.A. Shevchenko, E.Ya. Konitskaya, N.S. Tvkina, and I.A. Rapoport. 1967. A factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomyces streptomycini*. *Dokady A kad, Nauk. SSSR.* 177, 232-235.
- Khokhlov, A.S., L.N. Anisova, I.I. Tovarova, E.M. Klinier, I.V. Kovalenko, O.I. Krasilnikova, E.Y. Kornitskaya, and S.A. Pliner. 1973. Effect of A-factor on the growth of asporogeneous mutants of *Streptomyces griseus* not producing this factor. *Z. Allg. Mikrobiol.* 13, 647-655.
- 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.
- 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.
- Kondo, S., K. Yasui, M. Katayama, S. Marumo, and T. Kondo. 1987. Structure of pamamycin 607, an aerial mycelium inducing substance of *Streptomyces alboniger*. *Tetrahedron Lett.* 28, 5861-5864.
- Li, W., T. Nihira, S. Sakuda, T. Nishida, and Y. Yamada. 1992. New inducing factors for virginiamycin production from *Streptomyces antibioticus*. *J. Ferment. Bioeng.* 74, 214-217.
- 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.
- Nihira, T., Y. Shimidzu, H.S. Kim, and Y. Yamada. 1988. Structure-activity relationships of virginiae. *J. Antibiotics.* 41, 1828-1837.
- Ohashi, H., Zheng, Y-H, 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. Antibiotics.* 42, 1191-1195.
- Okamoto, S., K. Nakamura, T. Nihira, and Y. Yamada. 1995. Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* 270, 12319-12326.
- Osamu Hara and T. Beppu. 1981. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*-The role of A-factor. *J. Antibiot.* 35, 349-358.
- Sato, K., T. Nihira, S. Sakuda, M. Yanagimoto, and Y. Yamada. 1989. Isolation and structure of a new butyrolactone autoregulator from *Streptomyces* sp. FRI-5. *J. Ferment. Bioeng.* 68, 170-173.
- Vergie P. Alementeros, Shohei Sakuda, and Yasuhiro Yamada. 1987. Relationship between the production of virginiamycin and its inducers, virginiae butanolides, in *Streptomyces virginiae*. *Ann. Rep. I.C. Biotech. Japan* 10, 201-207.
- Yamada, Y., K. Sugamura, K. Kondo, M. Yanagimoto, and H. Okada. 1987. The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiotics.* 40, 496-504.
- Yanagimoto, M. and G. Terui. 1971. Physiological studies on staphyomycin production(II). Formation of a substance effective in inducing staphylomycin production. *J. Ferment. Technol.* 49, 611-618.

(Received April 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

ABSTRACT: Functions of Virginiae Butanolide C(VB-C) and Receptor in Virginiamycin Production

Hyun-Soo Kim* and Ji-Sook Hyun (Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea)

Streptomyces virginiae produces a set of autoregulators termed virginiae butanolide A~E(VB-A~E) which trigger virginiamycin production, and possesses a high-affinity virginiae butanolide receptor. To elucidate the functions of VB-C and VB-C receptor, we isolated two mutants from *S. virginiae* by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and hydroxylamine. The characteristics of the mutants showed that the producing time of antibiotics was very delayed due to a slower production of VB-C receptor than that of VB. In *S. ostreogriseus*(VB⁻, receptor⁻) and *S. graminofaciens*(VB⁻, receptor⁺), which produce the virginiamycin, the addition of synthetic VB-C repressed the production of antibiotics in *S. ostreogriseus* but induced the production in *S. graminofaciens*. HPLC analysis of *S. graminofaciens* suggested that the VB-C might have an ability to induce the production of virginiamycin and other antibiotics. These results imply that the VB-C has an ability to trigger the production of other secondary metabolites as well as virginiamycin under VB-C receptor existence.