방선균에서 신규 항생물질의 탐색과 해당유전자의 클로닝을 위한 분자유전학적 접근

현창구 · 홍순광 · 서주원
명지대학교 생명과학과

방선균은 항생물질로 대표되는 다양한 생리활성물질을 생산하는 천연유기화합물의 보고로서 신물질의 탐색 및 생합성 기작에 대해 깊이 연구되어왔다. 그러나 현재 발견된 항생물질의 70% 이상을 생산하는 이 균에서의 신규 항생물질의 탐색은 그 경제성과 효용성이 현격하게 떨어지고 있기 때문에 신규 항생물질 탐색의 효용성을 높이는 다양한 노력이 수행되어지고 있다. 그러한 일예로 rare actinomycetes를 탐색하거나 target-directed screening, 발효조건 등에 변화를 주는 연구가 진행되고 있는 실정이다. 방선균에서 항생물질의 생산은 조건적이며 균주특이적이라 할 수 있다. 왜냐하면 같은 종에 속하는 균주에서 상이한 항생물질이 생산되는가 하면 다른 종에서 동일한 항생물질이 생산되는 경우가 다수 존재하기 때문이다. 그러므로 새로운 종의 방선균을 분리한다는 것은 그만큼 신규 항생물질의 탐색 가능성이 높다는 것을 의미한다.

최근에는 분자생물학적 연구방법이 발달하면서 항생물질 생산균주에 대한 생합성 효소와 그 유전자들의 발현기작에 대한 연구는 고전적인 항생물질의 스크리닝 방법과 더불어 새로운 항생물질 탐색에 대한 중요한 연구분야가 되고 있다[1]. 실제로 다양한 항생물질의 생합성 유전자들이 분리되고 분자유전학 수준에서 이들의 생합성 과정을 예측할 수 있게 되면서 항생물질 생합성 효소들 사이에 연관관계가 높다는 사실을 알게되었고, 또한 미생물들의 이차대사과정에 관여하는 효소들이 일차대사과정에 관여하는 효소와는 달리 절대기질특이성이 상대적으로 미약하기 때문에 본래의 기질과 유사한 여러가지 기질과 반응할 수 있다는 연구결과들은 새로운 유전자의 도입과 특정유전자의 발현을 차단시키는 방법을 이용한 신규 항생물질의 창출을 가능하게 하였다[2, 3]. 이러한 생합성 유전자에 대한 분자 유전학적 연구가 활발한 항생물질의 큰 부류로는 본 지면에서 서술할 폴리케타이드 계열의 항생물질, 아미노산으로 구성된 펩타이드계 항생물질, 당 구조를 가지고 있는 항생물질 등이 있다.

항생제 생합성 유전자의 분리 방법은 초기의 항생제 생산능을 소실한 돌연변이체를 돌연변이원을 처리하여 얻은 후 complementation 실험을 통하여 획득하는 연구로부터 다양한 폴리케타이드 계열의 항생물질 생합성 유전자의 분리에서 actinorhodin 생합성 초기 폴리케타이드 ring 형성에 관여하는 유전자인 *actI* 등의 이종 탐침을 이용하여 분리하는 방법[4, 5, 6], 또는 항생제 생합성 유전자 집단내에는 조절유전자와 내성유전자도 예외없이 포함한다는 사실에서 원래 내성능력이 없는 이종 균주를 분리하고자 하는 항생물질 생산균주의 genomic library로 무작위 형질전환시켜 내성능력을 소유하는 클론을 분석하는 방법에 이르기 까지 다양하다. 이러한 수많은 연구실에서의 선행 연구들은 각각의 항생물질의 생합성 과정을 분자유전학수준 및 생화학 수준에서 어느정도 예측가능하게 하였고, 이 글의 이론적인 기초가 되었다.

본 논문에서는 다양한 항생물질중 6-deoxyhexose(6-DOH)를 구조내에 포함하는 항생물질, β-lactam과 글라이코펩타이드 항생물질을 포함하는 펩타이드 항생물질, 폴리케타이드 항생물질, 아미노글라이코사이드계 항생물질의 생합성 과정을 간략히 소개하고, 이러한 연구결과를 기초로 단일유전자를 이용하거나 생합성 경로에 대한 조작을 통해 신규 생리활성물질을 창출하기 위한 초보적인 단계로서 다양한 항생제 생합성 유전자의 분리를 시간적으로 그리고 경제적으로 용이하게 성취할 수 있는 방법을 제시하고자 하며 아울러 새로운 항생물질 탐색을 위한 방법으로서 이용하고자 한다.

Deoxy-, Dideoxyhexose를 포함하는 항생물질

Dideoxy나 deoxyhexose는 글라이코단백질, 박테리아의 세포벽, 그리고 많은 이차대사산물의 구성요소로서 자연계에 널리 분포하며 특히 2, 4-나 2, 6-dideoxyhexose는 광범위한 생리활성물질의 구조내에 존재하고 있다. 그러나 이러한 당구조의 중요성에 비해 이들의 생합성 과정이나 효소에 대한 연구는 그다지 진척이 되지 못하고 있다[7].

현재 임상에서 사용되고 있는 마크로라이드, 아미노글라이코사이드, 폴리케타이드 등과 같은 많은 항암, 항생물질들은 자신들의 구조내에 deoxy나 dideoxyhexose를 가지고 있으며 이러한 항생제에서 당 구조의 역할은 이들 항생제들의 생물학

적 활성에 직간접으로 관여하게 된다. 현재까지 보고된 항생제 생합성 유전자들은 예외없이 적게는 20 kb에서 100 kb 이상의 집단으로 구성되어 염색체 DNA상에 존재하는 것으로 알려져 있으므로 이러한 deoxy 또는 dideoxyhexose 생합성 과정과 효소를 연구함으로서 다양한 종류의 항생제 생합성 유전자의 클로닝에 적용할 수 있을 뿐만 아니라 신규 항생물질의 typing에 효과적으로 이용될수 있다(그림 1; a', b', c', d'). 6-deoxyhexose(6-DOH) 생합성의 첫번째 단계는 glucose-1-phosphate가 NDP-glucose synthase에 의해 NDP-D-glucose로 전환되는 과정이며 이는 다시 NDP-D-glucose-4,6-dehydratase에 의해 NDP-D-4-keto-6-deoxyglucose로 전환되고, 이후 3,5-epimerase의 존재여부에 따라 L-6DOH가 되거나 D-6DOH가 되는 것이다(그림 2). 이러한 L-6DOH와 D-6DOH는 isomerization, methylation, reduction, dehydration 등의 modification을 단계를 거치면서 다양한 당구조를 형성하게 된다[8].

상기의 6-DOH 형성과정 중에서 우리가 관심을 갖는 것은 NDP-D-glucose-4,6-dehydratase로 이 효소는 한분자의 물을 방출하면서 글루코오스의 4번과 6번탄소의 산화와 환원을 각각 시켜 4-keto-6-deoxyglucose로 전환시키는 역할을 담당한다. 현재까지 클로닝된 이러한 종류의 효소로는 daunorubicin, streptomycin, rubradirin, chlorothricin의 생합성에 관여하는 dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase 등이 있으며 이들 모두 높은

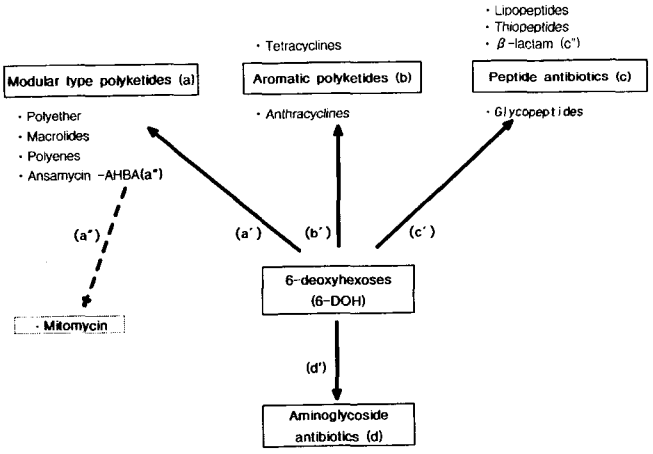


그림 1. 방선균에서의 항생물질 typing과 클로닝을 위한 모식도.

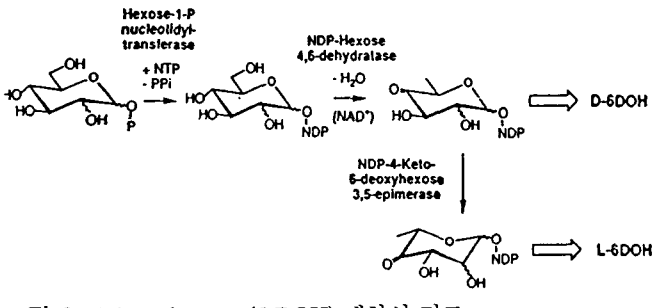


그림 2. 6-deoxyhexoses(6-DOH) 생합성 경로.

아미노산 상동성을 보이고 있다. 그러므로 항생제 구조내에 deoxy나 dideoxyhexose를 포함하는 항생제의 생합성 유전자의 분리와 typing을 위한 일차적인 전략으로 dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase의 아미노산 보존율이 뛰어난 지역에서 PCR 프라이머를 제작하는 방법을 생각할 수 있다. 그러나 최근에 발표되는 연구결과에 의하면 이러한 dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase와 상동성을 지니는 유전자가 항생제 생산균주의 염색체 내에 항생물질 생합성 유전자 집단과는 별도로 다수 존재할 가능성이 있다는 사실이 밝혀졌다. 조금 구체적으로 서술하자면 필자의 연구실에서도 세개의 당으로 구성된 아미노글라이코사이드계 항생제인 sisomicin 생합성 유전자를 분리하기 위해 상기에 서술한 방법을 통하여 dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase 유사 유전자가 포함된 4종류의 cosmid clone을 분리하였는데 이 clone들에서 세 종류의 다른 NDP-D-glucose-4,6-dehydratase 유사유전자가 존재하고 있음을 알 수 있었다. 또한 erythromycin 생산균주와 chlorothricin 생산균주 내에도 dTDP-D-glucose-4,6-dehydratase 유사 유전자가 항생제 생합성 유전자집단외에도 존재하고 있다는 사실이 밝혀져 있으며 [9, 10], daunorubicin 생합성 유전자 집단 내에서도 해당유전자가 frame-shift된 형태, 즉 기능을 못하는 형태로 존재하고 있었고 염색체상에 한 copy 이상의 NDP-D-glucose-4,6-dehydratase 유전자가 존재하고 있다고 보고하였다[11]. 그러므로 이 효소를 이용한 생합성 유전자의 분리와 신규 항생물질의 typing에는 실패할 확률이 높게된다. 이러한 실패확률을 보완하는 방법으로서 필자의 연구실에서는 NDP-glucose synthase 유전자를 target으로 하여 6-DOH moiety를 갖는 항생물질의 탐색과 그 해당유전자의 분리에 이용하고자 하였다[12].

dTDP-D-glucose synthase 유전자인 경우 daunorubicin, streptomycin, rubradirin, chlorothricin, avilamycin, granaticin, mithramycin 생산균주에서 생합성 유전자를 분리함으로 밝혀졌는데 예외없이 모두 dTDP-D-glucose-4, 6-dehydratase 유전자의 바로옆에 존재하고 있었으며 서로간의 아미노산 상동성이 높음을 알 수 있었다. 우리는 이러한 아미노산 상동성을 기초로 증폭예상크기가 300-bp인 AG4(5'-RYGTCSGTGATCTCSAGCTCGCCSCG-3')와 AG5(5'-GACTTCRTSATGTATCTSGGCGACAA-3') 프라이머를 제작하고 18개의 방선균을 대상으로 typing을 하였다(표 1). 그 중 14개의 방선균에서 양성반응을 나타내었으며 streptomycin 생산균주인 *S. griseus*와 *S. glaucescens* 균주에서는 GenBank에 보고된 것과 동일한 염기서열을 가진 증폭산물임을 확인할수 있었다. 또한 *S. bluensis, Stall. hindustanus, S. rimosus, S. kanamyceticus, S. flavopersicus*에서 얻어진 증폭산물에 대한 염기서열을 결정한 후 상호간의 유연관계를 phylogenetic tree를 이용하여 확인한 결과, 그림 3에서 볼 수 있듯이 스트렙토마이신 생산에 관여하는 StrD와 블루엔소마이신 생산균주에서 분리한 BlmD가 밀

표 1. 방선균을 대상으로 한 항생물질 생산능의 typing

Strains	TypeI	6-DOH	AHBA	Peptide
Actinoplanes teichomyceticus KCTC9543		●	●	●
Amycolata autotrophica IFO12743		●		●
Micromonospora inyoensis ATCC27600	●			●
Micromonospora olivasterospora ATCC21819		●		●
Micromonospora purprea ATCC15835				●
Micromonospora sagamiensis ATCC21826	●		●	●
Streptoalloteichus hindustanus ATCC31219		●		●
Streptomyces bluensis ATCC27420	●	●		●
Streptomyces cinnamonensis ATCC15413	●			
Streptomyces flavopersicus KCTC9221	●	●		
Streptomyces glaucescens GLA.O		●		●
Streptomyces griseus ATCC10137	●	●		●
Streptomyces kanamyceticus ATCC12853	●	●		●
Streptomyces fradiae NRRL2702	●	●		
Streptomyces nogalater IMSNU21069		●		●
Streptomyces rimosus ATCC14827	●	●		●
Streptomyces spectabilis ATCC27741	●	●		●
Streptomyces tenebrarius KCTC9047		●		●

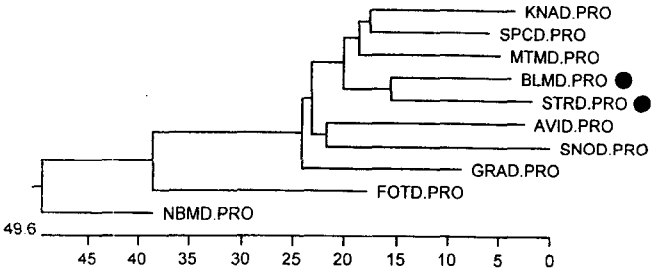


그림 3. AG4, AG5 프라이머를 이용한 증폭산물에 대한 phylogenetic tree.

접한 유연관계가 있음을 보여주고 있는데 블루엔소마이신과 스트렙토마이신의 구조적 유사성을 감안할 때 설득력있는 결과라 보여진다. 실제로 우리는 *blmD* 유전자를 탐침으로 하여 *strS, strT, strD*와 유사성을 보이는 블루엔소마이신 생합성 유전자를 효과적으로 분리하였다.

폴리케타이드 항생물질

폴리케타이드계 화합물들은 그 생리적 활성으로서 상업적으로 중요한 위치를 차지하고 있는데, 이는 주로 항암, 항생물질로서의 이용에 있다고 볼 수 있다. 폴리케타이드 생합성 효소들을 통칭하여 polyketide synthase(PKS)라 하며, 이들 PKS 유전자는 크게 두가지의 형태로 나눌 수 있다. 하나의 multifuntional polypeptide에 의해 일련의 생합성이 진행되는 경우는 type I으로 분류된다. Type I으로 분류되는 에리스로마이신 생합성 유전자는 "modular" 구조를 갖는 multifunctional 효소들로 이루어져 있고, 각 module의 작용에 의해 한회씩의 acyl 축합반응과 이에 따른 keto 작용기의 변환이 이루어진다. 지금까지 알려진 다른 모든 마크로라이드 PKS들 역시 modular 구조를 갖는다고 알려져 있다. Aromatic 폴리케타이드들의 생합성 과정은 독립적인 monofunctional 단백질들의 효소 작용에 의해 이루어지며, 이들 각각의 효소 활성 부위가 비공유적 결합에 의해 모여져 multifunctional complex의 형태를 이룬다. 이와 같은 경우를 type II로 분류한다.

Modular type 폴리케타이드 항생물질

Modular type 폴리케타이드 생합성효소는 기다란 ORF안에 여러개의 enzyme이 암호화 되어 있는 module 구조가 연속되어 있는 multifunctional enzyme system으로서 각 module의 구조는 비슷하며 생합성 하는 폴리케타이드의 크기에 비례하여 여러차례 반복된다. 카르복시산을 building block으로 한 탄소사슬의 연속적인 축합이 끝나면 항생제 구조 고유의 lactone ring을 형성한다(그림 4). 이러한 형태의 생합성 과정을 겪는 화합물로는 에리스로마이신과 같은 마크로라이드계 항생물질, monensin과 같은 polyether계 항생물질, amphotericin B와 같은 polyene계 항생물질, rubradirin과 같은 ansamycin계 항생물질 등이 있다(그림 5). 생합성 유전자에 대한 연구인 경우, erythromycin을 비롯하여 rapamycin, oleandomycin, tylosin, avermectin, rifamycin, rubradirin 등 이 생산균주에서 클로닝되었고, erythromycin 생산균주에서는 이들의 modular구조 중 특정 domain을 제거하거나 thioesterase유전자를 이용한 hybrid 항생제 창출에 대한 예가 보고되었다[13]. 이런 항생물질의 생합성 과정에서 특이한 것 중의 하나는 각각 module에 존재하는 acyltransferase doamin의 active site가 해당 module이 이용

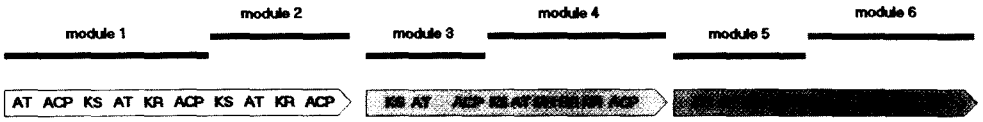


그림 4. Modular type 폴리케타이드 항생물질인 erythromycin PKS domain 구성도.

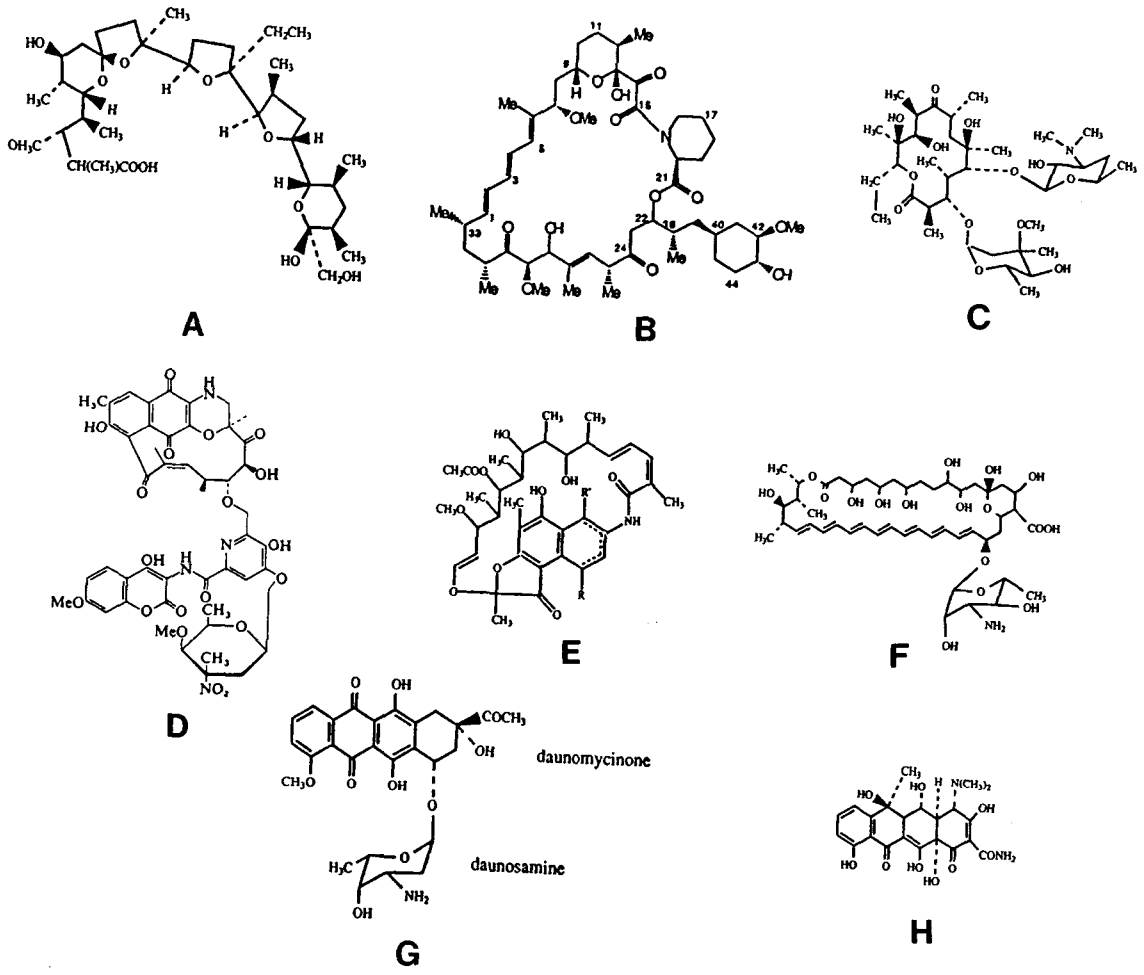
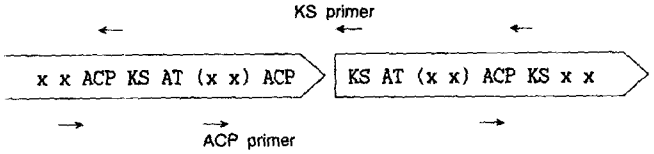


그림 5. 폴리케타이드 항생물질.
A, monensin (polyether); B, rapamycin (macrolide); C, erythromycin (macrolide); D, rubradirin (ansamycin); E, rifamycin (ansamycin); F, amphotericin B (polyene); G, daunorubicin (anthracycline); H, oxytetracycline (tetracycline).

하는 지방산 전구체가 acetate, propionate, butyrate인가에 따라서 다르게 나타난다는 것이다(그림 6). 기존의 modular type 항생물질의 생합성 유전자 분리를 위한 전형적인 방법은 마크로라이드계 항생물질로서 가장 잘 연구된, 에리스로마이신 eryKS 유전자를 이용하는 것으로 현재까지 별 어려움없이 효과적으로 이용되어 왔지만, 상기에 서술한 modular type 폴리케타이드 생합성 유전자의 특징인 이러한 acyltransferase doamin의 active site의 특징을 이용하면 modular type 폴리케타이드 항생물질의 생합성 유전자를 분리할 수 있을 뿐만 아니라 분리된 유전자가 직접 목적하는 항생제 생합성 유전자인지 여부를 전구체 이용 순서를 비교함으로서 판단할 수 있으며[14] 방선균을 대상으로 신규 modular type의 항생물질의 생산여부를 typing 하는데도 효과적으로 적용가능하다. 필자의 연구실인 경우, 상기의 active site의 특이성에 대한 보고가 있기 전, modular type 폴리케타이드 항생물질을 생산하는 유전자들의 domain 구성이 KS domain과 ACP domain이 반복된다는 사실에서 각각의 domain에서 프라이머를 제작하고 typing을 시도하였다(그림 1a, 그림 7). 표 1은 그 결과를 요약한 것으로 10개의 방선균에서 효과적으로 700-bp 정도의 증폭산물을 획득하였고, DNA 염기서열 결정으로 이 증폭산물이 modular type 폴리케타이드 생합성에 관여한다고 최종확인하였다. Modular type 폴리케타이드 항생물질중 rifamycin,

```
(A)
Ery 0      RVEVVQPALFAVQTSLAALW ----- 11aa ----- GHSIG
Ave 0      RVDVVQPTLFAVMISLAALW ----- 11aa ----- GHSLG
(B)
Rap02      ETGYAQPALFALQVALFGLL ----- 11aa -----  GHSVG
Rap05      ETGYAQPALFALQVALFGLL ----- 11aa -----  GHSVG
Rap08      ETGYAQPALFALQVALFGLL ----- 11aa -----  GHSVG
Rap09      ETGYAQPALFALQVALFGLL ----- 11aa -----  GHSVG
Rap11      ETGYAQPALFALQVALFGLL ----- 11aa -----  GHSVG
Rap12      ETGYAQPALFAMQVALFGLL ----- 11aa -----  GHSVG
Rap14      DTLYAQAGIFAMEAALFGLL ----- 11aa -----  GHSIG
Ave 2      QTRYAQPALFAFQVALHRLL ----- 12aa -----  GHSLG
(C)
Rap01      RVDVVQPASWAVMVSLAAVW ----- 11aa -----  GHSQG
Rap03      RVDVVQPASWAVMVSLAAVW ----- 11aa -----  GHSQG
Rap04      RVDVVQPASWAVMVSLAAVW ----- 11aa -----  GHSQG
Rap06      RVDVVQPASWRMMVSLAAVW ----- 11aa -----  GHSQG
Rap07      RVDVVQPASWAVMVSLAAVW ----- 11aa -----  GHSQG
Rap10      RVDVVQPASWAVMVSLAAVW ----- 11aa -----  GHSQG
Rap13      RVDVVQPASWAMMVSLAAVW ----- 11aa -----  GHSQG
Ery 1      RVDVVQPVMFAVMVSLASMW ----- 11aa -----  GHSQG
Ery 2      RVDVVQPVLFAVMVSLARLW ----- 11aa -----  GHSQG
Ery 3      RVDVVQPVLFAVMVSLAELW ----- 11aa -----  GHSQG
Ery 4      RVDVLQPVLFSIMVSLAELW ----- 11aa -----  GHSQG
Ery 5      RVDVVQPALFAVMVSLAALW ----- 11aa -----  GHSQG
Ery 6      RVDVVQPVLFSVMVSLARLW ----- 11aa -----  GHSQG
Ole 5      RVDVVQPALWAVMVSLARTW ----- 11aa -----  GHSQG
Ole 6      RVDVVQPALWAVMVSLARTW ----- 11aa -----  GHSQG
```

그림 6. Type I PKS의 AT domain 중 active site 지역에서의 multiple alignment.



KS primer 5' AGKGAXGAXGAGCAGGCGGTXTCXAC 3'
ACP primer 5' GCKTCCCGXGACCTGGGCTTCGACTC 3'
(X=G+C).

그림 7. Modular type 폴리케타이드 항생물질의 typing과 생합성 유전자 분리를 위한 프라이머 제작 모식도.

rubradirin을 포함하는 ansamycin 계열의 항생물질과 항암제인 mitomycin은 mC_7N unit가 구조체 내에 존재하는데 이는 3-amino-5-hydroxybenzoic acid(AHBA)에서 유래되며 ansamycin인 경우 linear polyketide의 assembly시 starter unit로서 그 역할을 하게된다. AHBA 생합성 과정에서 첫 번째 단계에 참여하는 AHBA synthase 효소는 mC_7N unit를 가진 항생제, 이를테면 ansamycin 계열 뿐만아니라 mitomycin 등과 같은 항암제의 탐색을 가능하게 해준다. AHBA synthase 효소에 대한 클로닝은 rifamycin 생산균주인 *Amycolatopsis mediterranei*(AF 040570), ansamitocin 생산균주인 *Actinosynnema pretiosum autraticum*(U33059), ansatrienin A 생산균주인 *S. collinus* (Z54208)에서 보고되었으며[15] 우리는 이들간의 아미노산 상동성을 기초로 AHBA-1(5'-ACSGAGGTSATCGTSCCSGCST-TCACSTTC-3')과 AHBA-2(5'-SGCSCCGTGSGCGTGSGCS-GCGTCCTG-3') 프라이머를 제작하여 18종의 방선균을 대상으로 typing한 결과(그림 1a"), 이제까지 ansamycin 계열이나 mitomycin 류의 항생물질 생산에 대한 보고가 없는 *Actinoplanes teichomyceticus* KCTC9543과 *Micromonospora sagamiensis* ATCC21826 균주에서 예상크기 260-bp 증폭산물을 획득하고 염기서열결정으로 최종확인하였다(그림 8). 더욱 특이한 것은 *Actinoplanes teichomyceticus* KCTC9543인 경우 AHBA synthase의 존재는 확인되었으나 ansamycin 계열의 항생제이면 증폭되어야 할 modular type 폴리케타이드용 프라이머로는 증폭되지 않았기 때문에 이종에서의 AHBA moiety는 ansamycin 이외에 신규 항생물질, 예를들면 mitomycin과 같은 항생물질의 생산가능성을 보여주는 결과라 생각되어진다[16].

Aromatic polyketide 항생물질

Aromatic 폴리케타이드 항생물질은 크게 tetracycline계와 anthracycline계로 나눌수 있으며 여기에는 의약용 및 농업용으로 쓰이는 oxytetracycline과 항암제로 이용되는 daunorubicin이 각각을 대표하는 화합물이다. 폴리케타이드 물질은 그 구조와 생합성 과정이 지방산 생합성과 유사하며 그 생합성 유전자에도 유사성을 가진다는 것이 밝혀졌다. 실제로 polyketide synthase 유전자들의 유사성은 최근 여러 균주에서 밝혀지고 있으며 type II PKS인 경우, *S. coelicolor*의 actinorhodin 생합성 유전자인 *act I/act III*를 probe로 이용하여 많은 종류의 색다른 균주에서 생합성 유전자가 클로닝되었다. 현재까지 밝혀진 type II PKS 유전자들을 포함하는 생산균주로는 *S. cinnamonensis, S. peucetius, S. albus, S. glaucescens, S. coelicolor, S. venezuelae* ISP5230, *S. rimosus, S. argillaceus, S. griseus* 등이며 이러한 type II PKS들의 염기서열로부터 유추한 아미노산 서열의 비교분석으로서 그 유전자의

```
AMEDI   TEVIVPAFTFISSSQAAQRLGAVTVPVDVDAATYNLDPEAVAAAVTPRTKVIMPVHMAGLMADMDALAKISADTGVPLLQDAAHAH
APRET   TEVIVPAFTFISSSQAVQRLGAVAVPVDVDPDTYCLDVAAAEDAVTSRTSAIMPVHMAGQFADMDRLDKLSASTGVPVVQDAAHAH
SCOLL   TEVIVPAFTFISSSQAAQRLGAVVVPVDVDPETYCIDPAEAAKAITPRTRAIMPVHMAGQLADMDALEKVAADSGVPLIQDAAHAQ
A21826  TEVIVPAFTFISSSLAAQRLGAVAVPVDVDLDTYCIQPEAVAAAITDRTRVIMSVHMAGQMSDMDALDKIAADAGVSILQDAAHAH
K9543   TEVIVPAFTFISSSQAAQRLGAVAVPVDVDPATYCIDVAATEAAITDRTRVIMPVHMAGQLADMDALVRLSTESGVPLLQDAAHAH
        *************** * ****** ******  **  .       *.* **  ** *****  .*** * .... .** ..******.
```

그림 8. AHBA 프라이머로 증폭된 산물과 AHBA 효소들과의 multiple alignment.

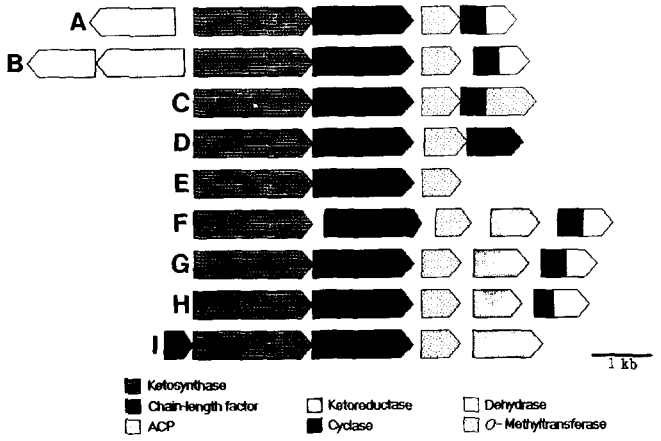


그림 9. Type II PKS 유전자들이 유전적 구성 모식도.
A, actinorhodin; B, granaticin; C, tetracenomycin; D, spore pigment (WhiE); E, griseusin; F, frenolicin; G, S. cinnamonensis type II PKS; H, S. albus type II PKS.

조성이 높은 보존도를 유지하고 있음을 알 수 있었다(그림 9). 이러한 유전자 상호간의 유사성은 β-keto acyl synthase/acyl transferase(KS/AT)와 chain length determining factor(CLF) 유전자, 그리고 acyl carrier protein(ACP) 유전자를 중심으로 나타나며, 이 영역과 인접하여 존재하는 여타의 생합성 유전자들은 생성되는 aromatic 폴리케타이드 화합물의 구조에 상응하는 구성으로 나타난다. 이중 aromatic ring 길이를 결정하는데 중추적인 역할을 담당하는 CLF 유전자를 조작하여 다양한 chain 길이를 가지는 aromatic 화합물을 창출시키는 방법도 보고되었다[2, 17]. 또한 Seow 등은 *minimal* PKS 지역 중 ketosynthase 지역과 acyl carrier protein 지역에서 primer를 제작한 후 배양과정을 거치지 않고 직접 토양시료에서 CLF 지역을 증폭시켜 신규 항생물질을 발견한 예를 보고하였다[18]. 그러므로 이들이 이용한 primer는 aromatic 폴리케타이드 화합물의 생합성 유전자의 분리와 typing에 이용가능하다.

또한 많은 aromatic 폴리케타이드 화합물들은 구조 내에 6-DOH moiety를 가지는 경우가 많으므로 전자에 서술한 AG4, AG5 프라이머를 이용하여 교차확인할 수도 있다(그림 1; b').

Peptide 항생물질

펩타이드 항생제는 이름 그대로 아미노산들이 펩타이드 결합으로 이루어진 항생제를 통칭하는 말로 생체내에 존재하지 않는 D형 아미노산, 비단백질요소, 일반적으로 잘 존재하지 않는 N-메틸아미노산이나 베타-아미노산 등을 포함하는 구조를 갖고 있으며 종종 환형구조 형태를 띤다. 또한 thiazole과 같은 heterocyclic ring을 포함하는 구조를 가지고 있기도 하다. 펩타이드 항생제에 대한 연구는 페니실린과 세팔로스포린 등의 베타락탐 항생제와 항암제로 쓰이고 있는 엑티노마이신,

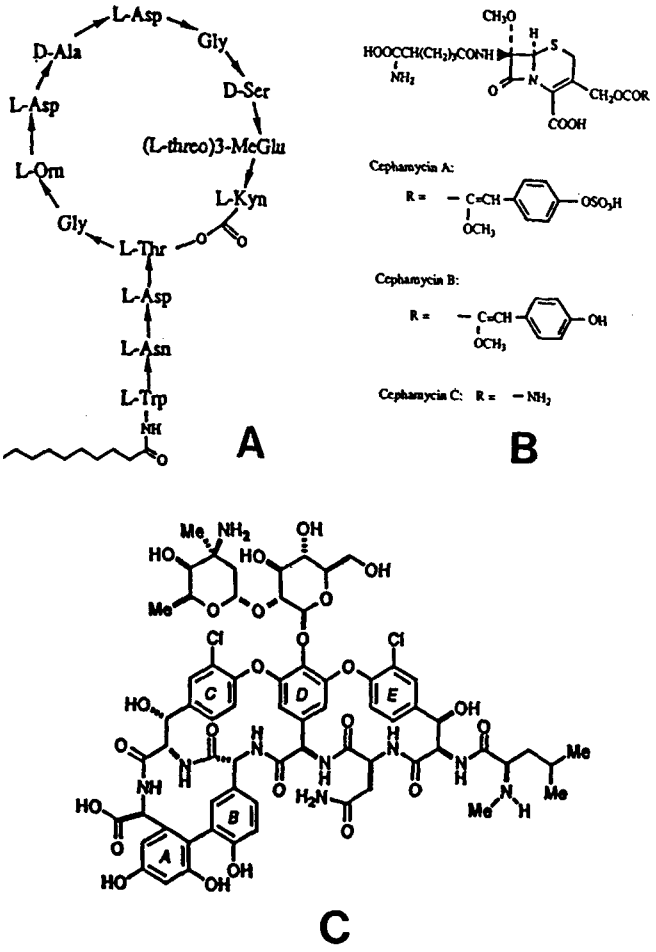


그림 10. 여러 가지 peptide 항생물질들.
A, daptomycin; B, cephamycin; C, vancomycin.

글라이코펩타이드 항생제인 반코마이신 등에서 활발히 연구되고 있다(그림 10). 이러한 펩타이드 항생제의 생합성 과정은 대다수가 thiotemplate 기작이라는 과정을 거치게 되는데 이 기작의 중요한 특징은 항생제 구조에서 아미노산잔기 서열이 중합과정을 활성화시키는 multifunctional 효소의 특정부위에 결합되는 전구체들의 순서에 의해 결정된다는 것이다. 이러한 중합과정은 첫번째 아미노산과 다음번의 아미노산의 카르복실기 사이에 펩타이드 결합이 형성됨으로서 시작되며 이러한 단계에서 소요되는 에너지는 thioester 결합이 깨지면서 공급된다. 상기의 과정은 완전한 구조가 형성될때까지 계속되며 최종단계에서 thioesterase 효소에 의해 release됨으로서 종결된다. 전체적으로 peptide 항생제의 생합성 과정은 polyketide의 type I PKS들의 작용기작과 유사함을 알 수 있다[19, 20].

펩타이드 항생제 생합성 유전자에 대한 연구는 최근 10년 동안 꾸준히 진행되어 박테리아와 곰팡이를 대상으로 분자유전학적 수준에서 규명되고 있으며 아미노산이 활성화를 위해 ATP를 소모하여 아데닐레이트 형태를 띤다고 밝혀지고 있다. 활성을 지닌 아미노산들은 펩타이드 생합성 효소들의 *active*

site에 thioester 결합을 통해 공유적으로 결합된다. 이러한 전체적인 과정을 수행하는데는 cofactor로서 4'-phosphopantotheine이 관여하게 되는데 현재까지 축적된 펩타이드 항생제 생합성 유전자의 유전정보에 따르면 모든 펩타이드 항생제 생합성 효소들은 반복적인 domain을 구성하고 있음을 보여준다. 이런 각각의 domain이 펩타이드 항생제를 구성하는 아미노산들의 활성을 책임지게 된다. 생합성 유전자들간의 상동성 비교결과 이러한 domain에는 아미노산의 활성화와 ATP, phosphopantotheine 결합을 위한 지역등 6개 정도의 지역에서 높은 아미노산 보존율을 지니고 있음을 알 수 있다. 이를 Core I~Core 6라 명명되었는데 각각의 motif site와 연계해서 그 기능을 다음과 같이 유추하고 있다[21, 22]. Core 1 motif의 기능은 알려져 있지 않고 Core 2에서 Core 5는 ATP 결합과 ATP 가수 분해에 관련되어 있다고 알려져 있으며 특히 Core 2 motif는 lysine을 포함하는 glycine이 풍부한 서열(YSGTTGXPKGV)을 가지고 있고 이른바 phosphate-binding loop를 형성하는 Walker typeA motif(GXXXXGKT/S) 와 유사한 기능을 가지고 있다. 따라서 Core 2에서 Core 5 motif는 amino adenylate를 형성하는 module이다.

Core 6 motif는 각각의 구성 아미노산 활성 domain의 카르복실 말단에서 발견되고 amide 혹은 ester 결합의 형성을 촉매한다. 이것은 지방산 생합성 효소와 polyketide 생합성 효소의 Acyl Carrier Protein(ACP) 내의 보조 인자인 4'-phosphophantetheine의 결합부위와 유사하고, 그 보조 인자는 Core 6 motif(DNFYXLGGHSL)의 serine에 공유 결합되어 있다. 따라서 Core 6 motif는 thioester를 형성하는 module이다.

Spacer motif는 peptide synthetase의 non-homologous한 지역에서 확인되었다. Multidomain으로 구성된 pepetide 생합성 효소 내에서 아미노말단 지역에 위치해 있지만 gramicidine S 생합성 효소의 소단위 중 하나인 gramicidine S synthetase 1과 2처럼 아미노활성 domain 내의 카르복실 말단에 위치해 있다[21, 22].

특히 이 유전자들 중 core 1과 core 2라고 명명된 부위는 아미노산 서열이 잘 보존되어 있는 것으로 나타났다[23]. 또 core 1과 core 2 사이의 간격은 균주마다 다소 차이는 있지만 60~90 aa 정도로 일정한 거리를 나타내고 있으며, 하나의 생합성 유전자 내에서도 이들 'core 1/60~90 aa inner space/Core 2'로 구성된 complex는 다시 수 백에서 수 천 bp의 간격을 두고 3~5회 반복되는 것을 알 수 있었다(그림 11).

이러한 펩타이드 생합성에 관여하는 유전자의 특징은 방선균에서의 펩타이드 화합물의 생산여부와 그 해당유전자의 분리에 효과적으로 이용될수 있다(그림 1c). 실제적으로 core 1과 core 2 지역에서 각각 PEP1(5'-TTGAAGGCSGGSGGSG-CSTWCGTSCCSATC-3'), PEP2(5'-SACSCCCTTSGGSTTS-WCSGTSGTSCC-3') 프라이머를 제작한 후 18종의 방선균을 대상으로 typing한 결과 14개의 종에서 양성반응을 나타내었으며 몇몇 증폭산물의 염기서열결정 결과, 기존의 펩타이드 생합성 효소들과 모두 높은 상동성을 지니고 있었다. 결국 이런 프라이머는 방선균에서의 펩타이드 화합물의 typing에 효과적으로 이용가능하다는 것을 보여주고 있다. 또한 typing이 아닌 펩타이드 화합물의 생합성 유전자의 분리만을 위한 방법으로는 상기에 서술한 프라이머들을 상보적으로 제작하면 기존의 200-300 bp의 증폭산물보다 훨씬 큰 증폭단편을 획득할 수도 있다(그림 11).

이런 펩타이드 항생물질에는 일반적인 linear, 또는 cyclic 펩타이드외에 글라이코펩타이드 항생물질과 β-lactam 항생물질이 포함되는데, 글라이코펩타이드 항생제에서의 당 구조는 역시 dTDP-glucose에서 유래되는 것이 대부분이므로 상기의 서술한 펩타이드 화합물 분리를 위한 PEP1, PEP2 프라이머외에 dTDP-glucose synthase용 AG4, AG5 프라이머를 이용하여 확인 분리가 가능하다(그림 1c').

또한 β-lactam 항생물질인 경우 이들의 생합성 과정에는 δ-L-aminoadipate, L-cysteinyl-D-valine(ACV)에서 isopenicillin N 으로의 전환이 필수적인데 이 과정에서 isopenicillin N synthase(IPNS) 효소가 관여하게 된다. IPNS 효소의 클로닝은 곰팡이와 방선균에서 9종이 보고되었으며 이들 사이에는 그림 12에서 보듯이 아미노산 서열이 잘 보존된 지역이 존재함을 알 수 있다. 그러므로 이 효소를 target으로 하여 β-lactam 항생물질의 생합성 유전자를 클로닝하거나 미지의 방선균에서의 β-lactam 항생물질의 생산여부를 알아보기 위한 typing에 효과적으로 이용될수 있다고 사료된다(그림 1c").

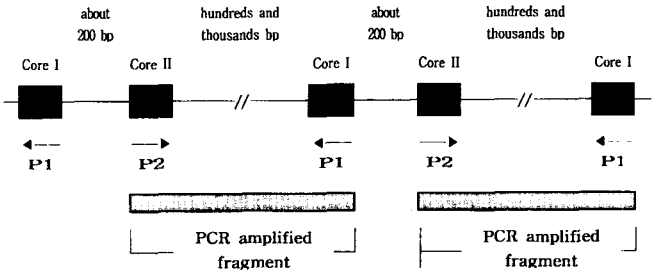


그림 11. 펩타이드 화합물의 typing과 생합성 유전자의 분리를 위한 모식도.

	43	101	219	281
A. nidulans (M21882)	GFFYAVNHG	KAVESFCYLNP	HEDVSLITVLYQ	NAERQSLPFF
P. chrysogenum (P08703)	GFFYAVNHG	KAVESFCYLNP	HEDVSLITVLYQ	NEERQSLPFF
C. acremonium (P05189)	GFFYAVNHG	KAVESFCYLNP	HEDVSLITVLYQ	NEERQSLPFF
Flavobacterium sp. (P16020)	GFFYAANHG	KANESFCYLNP	HQDVSLITVLYQ	NAERLSIPFF
L. lactamgenus (X56660)	GFFYAANHG	KANESFCYLNP	HQDVSLITVLYQ	NAERLSIPFF
S. clavuligerus (P10621)	GFFYATNHG	KAVESFCYLNP	HLDVSMITVLFQ	NAERLSLPFF
S. jumonjinensis (P18286)	GFFYASNHG	KAVESFCYLNP	HLDVSMITVLYQ	NAERLSLPFF
N. lactamdurans (P27744)	GFFYAANHG	KAVESFCYLNP	HFDVSMITVLYQ	NAERLSLPFF
S. griseus (X54609)	GFFYASHHG	KAVESWCYLNP	HLDVSMITVLFQ	NAERLSLPFF
S. lipmanii (M22081)	GFFYASHHG	KTVESWCYLNP	HLDVSMITVLFQ	NAERLSLPFF
S. cattleya (D78166)	GFFYASHHG	ETVESWCYLNP	HLDVSMITVLSK	NAERLSLPFF
		*	* *	*

그림 12. IPNS 효소들의 multiple alignment.
*, active site.

Aminoglycoside 항생물질

아미노글라이코사이드계 항생제는 전자에 서술한 당으로부터 유래한 이차대사산물로 스트렙토마이신, 스펙티노마이신등의 항균제를 포함하며 분자 내에 D-glucose 유래의 aminocyclitols, deoxystreptamine, streptidine, actinamine 등을 포함하고 있다(그림 13). 이 부류의 항생물질에 대한 분자유전학적 연구는 대표적으로 스트렙토마이신을 대상으로 과거 15년 동안 독일의 Piepersberg 그룹에서 진행되어 오고 있다. 스트렙토마이신은 *S. griseus*에서 생산되며 streptamine에 두 개의 guanidine 기를 가지고 있는 streptidine에 streptose, U-methyl-L-glucosamine으로 구성되어있고 이들 모두 D-glucose에서 유래되는 것으로 밝혀졌다[24]. 최근의 연구결과에 따르면 아미노글라이코사이드계 항생제는 monoaminocyclitol을 가진 경우 스트렙토마이신에서 stsA 상당 유전자가 반드시 존재하고, diaminocyclitols인 경우 *stsA*와 *stsC* 상당 유전자가 존재한다고 보고되었다. *stsA*와 *stsC*는 각각 아미노글라이코사이드계 항생제의 생합성 과정에 반드시 필요한 첫 번째와 두 번째의 transamination을 담당한다는 것이다[25]. 그러므로 아미노글라이코사이드계 항생제의 생합성 유전자의 분리와 typing에 *stsA*와 *stsC* 유전자를 효과적으로 이용하는 것이 가능하다(그림 1d). 필자의 연구실에서는 6-DOH 생합성 유전자 분리를 위한 AG4, AG5 프라이머를 이용하여 *S. bluensis*에서 아미노글라이코사이드계 항생제인 블루엔소마이신 생합성 유전자를 분리하여 일명 BlmS, BlmT, BlmD 지역에 대한 연구를 진행시키고 있기 때문에 *stsA*와 *stsC* 프라이머에 대한 효과적인 제작은 그리 멀지 않은 듯 하다.

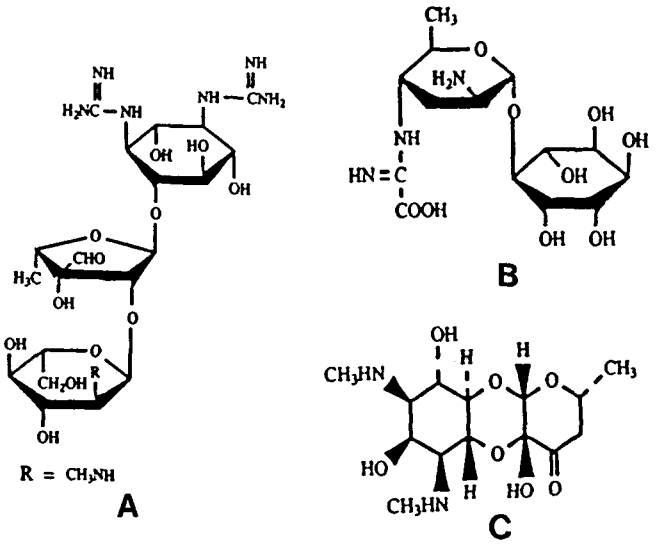


그림 13. 아미노글라이코사이드계 항생제.
A, streptomycin; B, validamycin; C, spectinomycin.

결론 및 전망

과거 10년 동안 신규 항생물질의 70%가 방선균을 그 원천으로 삼고 있으며 앞으로도 방선균은 항생물질을 포함하는 생리활성물질의 보고로서 중요한 역할을 담당할 것이라 사료된다. 그러나 신규 항생물질 탐색과정에서 이미 밝혀진 항생물질이 재차 분리되는 악순환이 계속되면서 신규 항생물질 탐색의 경제성과 효용도면에서 혁신적인 탐색방법이 강력하게 요구되고 있으며 이러한 취지에서 일본을 중심으로한 여러국가들은 극한환경 및 해양등에서 서식하는 방선균을 포함하여 rare actinomycetes에 대한 탐색에 중요한 비중을 두고 있으며 어느정도 그 성과를 이루고 있다. 이러한 탐색법은 방선균을 분리하는데 있어서 분류학자들의 경험, 즉 배양상태와 콜로니 형태등을 기초로하여 얻어지는 그들의 경험적 직감이 중요하게 작용하게 된다. 분류학자들은 앞으로도 방선균을 대상으로 한 신규 생리활성물질의 탐색에 중요한 위치를 차지할 것이라 보인다. 그러나 분류학적 접근의 한계는 역시 균주 특이적인 신규 항생물질의 직접적인 탐색에 이용할 수는 없다는 것이다, 즉, 새로운 방선군을 분리함으로서 얻게되는 신규 물질의 탐색가능성을 높이는 정도에 그친다는 것이다.

신규 항생물질의 탐색과정에서 또다른 강력한 방법 중의 하나는 일차대사과정이 중요한 핵심이 될 수 있다. 그 이유는 항생물질 대상균주에서 일차대사과정은 항생물질을 포함하는 이차대사산물의 생합성 과정에서 전구체들을 공급하는데 적절하게 조절될 수 있기 때문이다. 아미노글라이코사이드계 항생제인 경우 일차대사과정들이 이들 항생물질의 생합성에 필요한 당 구조의 전구체를 공급하는데 조절의 기능을 할 수 있으며, 폴리케타이드계 항생제와 amino acid-related antibiotics 역시 자신들의 일차대사산물들이 전구체 공급을 유도할 수 있다. 이러한 방법들은 발효조건의 개선에 의한 신물질 탐색과 연관이 높다.

마지막으로 본고에서 서술한 현재까지의 항생물질 생합성 기작의 분자유전학적 연구결과들에 기초로 하여, 방선균을 대상으로 대상균주에서 직접적으로 생합성하는 항생물질을 typing하는 방법이다. 8,000 kb에 달하는 방선균의 genome 중에서 30-40% 정도는 이차대사산물의 생합성과 방선균의 형태분화에 관여할 것이라 여겨지며, 이러한 측면에서 기존에 분리한 방선균에서 조차도 우리가 간과해버린 항생물질등이 다수 존재한다고 사료된다. 이러한 사실은 상기의 여러 실험결과가 뒷받침해 주고 있다. 이러한 typing을 중심으로 하여 target-directed screening, 발효조건 등의 개선을 통한 신규 항생물질의 분리는 본고에 서술한 항생물질이외의 화합물의 생합성 연구의 진척과 더불어 신규 항생물질 탐색을 위한 강력한 방법으로서 그 역할을 다 할 수 있을것이라 확신한다.

최근에는 분리한 생합성 유전자들을 이종균주에서 발현시

켜 구조체가 다른 신규 물질을 창출하거나 항생역가에 부작용을 야기시키는 side chain을 유전공학적으로 제거시킴으로서 역가의 상승을 야기시키는 방법 등 항생제공학에서 새로운 분야도 개척되고 있다.

또한 유전공학 기법을 이용한 더욱 적극적인 접근방법으로 세포 내에서 유용한 이차대사산물을 생산하기 위해 이들의 생합성 경로를 재구성하려는 시도가 현재 진행되고 있다. Side chain 등을 제거하거나 도입하는 등과 같이 하나의 유전자를 이용한 신규 생리활성 물질을 창출하는 방법이 소극적인 전략이라면, pathway engineering이라 명명된 후자의 방법은 신규 생리활성물질의 창출을 위한 적극적인 전략이라 표현하고 싶다. 이러한 pathway engineering의 또 하나의 장점은 돌연변이 선발과 같은 고전적인 방법과 유전공학이라는 개념이 접목되어 새로운 생리활성 물질 창출 가능성을 더욱 높일 수 있다는 것이다[26]. 그러므로 유전자조작을 통해 역가의 상승이나 부작용의 감소 등을 목표로하거나 hybrid 항생제 창출의 궁극적인 목표의 기본적인 단계로서 다양한 항생제 생합성 유전자의 분리와 이를 기반으로 한 생합성 경로의 추적은 필연적이라 할 수 있다. 그러므로 신규 항생물질 탐색을 위한 상기의 typing 방법은 목적하는 항생물질의 생합성 유전자의 분리에도 효과적으로 이용될수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

이 연구는 생명공학국책연구비와 명지대학교 지역연구센터(RRC)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Hutchinson, C. R. and Fujji, I. 1995. Polyketide synthase gene manipulation; A structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 201–238.
2. McDaniel, R., S. Ebert-Kosla, D. A. Hopwood, and C. Khosla. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* **262**: 1546–1550.
3. Hwang, C. K., H. S. Kim, Y. S. Hong, Y. H. Kim, S. K. Hong, S. J. Kim, and J. J. Lee. 1995. Expression of *Streptomyces peucetius* genes for doxorubicin resistance and aklavinone 11-hydroxylase in *Streptomyces galilaeus* ATCC 31133 and production of a hybrid aclacinomycin. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1616–1620.
4. Fernandez-Moreno, M. A., E. Martinez, L. Boto, D. A. Hopwood, and F. Malpartida. 1992. Nucleotide sequence and deduced functions of a set of cotranscribed genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin *J. Biol. Chem.* **267**: 19278–19290.
5. Kim, E. S., M. J. Bibb, M. J. Butler, D. A. Hopwood, and D. H. Sherman. 1994. Sequences of the oxytetracycline polyketide synthase-encoding *otc* genes from *Streptomyces rimosus. Gene* **141**: 141–142.
6. Yu, T. W., M. J. Bibb, W. P. Revill, and D. A. Hopwood. 1994. Cloning, sequencing, and analysis of the griseusin polyketide synthase gene cluster from *Streptomyces griseus. J. Bacteriol.* **176**: 2627–2634.
7. Liu, H. W. and J. S. Thorson. 1994. Pathways and mechanisms in biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu. Rcv. Microbiol.* **48**: 223–256.
8. Lombo, F., K. Siems, A. F. Brana, C. Mendez, K. Bindseil, and J. A. Salas. 1997. Cloning and insertional inactivation of *Streptomyces argillaceus* genes involved in the earliest steps of biosynthesis of the sugar moieties of the antitumor polyketide mithramycin. *J. Bacteriol.* **179**: 3354–3357.
9. Linton, K. J., B. W. Jarvis, and C. R. Hutchinson. 1995. Cloning of the genes encoding thymidine diphosphoglucose 4,6-dehydatase and thymidine diphospho-4-keto-6-deoxyglucose 3,5-epimerase from the erythromycin-producing *Saccharopolyspora erythraea. Gene* **153**: 33–40.
10. Sohng, J. K. and J. C. Yoo. 1996. Cloning, sequencing and expression of dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase gene from *Streptomyces antibioticus* Tu99, a producer of chlorothricin *J. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 183–191.
11. Gallo, M. A., J. Ward, and C. R. Hutchinson. 1996. The *dnrLM* gene in *streptomyces peucetius* contains a naturally ocurring framesfift mutation that is supressed by another locus outside of the daunorubicin-production gene cluster. *Microbiology* **142**: 269–275.
12. Hyun, C. G., J. H. Bang, and J. W. Suh. 1998. Development of a gene probe for the dNDP-glucose synthase in aminoglycoside antibiotic-producing actinomycetes. *J. Microbiology* in submitted.
13. Donadio, S., J. B. McAlpine, P. J. Sheldon, M. Jackson, and L. Katz. 1993. An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 7119–7123.
14. Haydock, S. F., J. F. Aparicio, I. Molnar, T. Schwecke, L. E. Khaw, A. Konig, A. F. Marsden, I. S. Galloway, J. Staunton, and P. F. Leadlay. 1995. Divergent sequence motifs correlated with the substrate specificity of (methyl) malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase domains in modular polyketide synthases. *FEBS Lett.* **374**: 246–248.
15. August, P. R., L. Tang, Y. J. Yoon, S. Ning, R. Muller, T. W. Yu, M. Taylor, D. Hoffmann, C. G. Kim, X. Zhang, C. R. Hutchinson, and H. G. Floss. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: Deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* **5**: 69–79.
16. Hyun, C. G. and J. W. Suh. In preparation.
17. McDaniel, R., S. Ebert-Kosla, D. A. Hopwood, and C.

Khosla. 1995. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature* **375**: 549–554.

18. Seow, K. T., G. Meurer, M. Gerlitz, E. Wendt-Pienkowski, C. R. Hutchinson, and J. Davies. 1997. A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: A means to access and use genes from uncultured microorganisms. *J. Bacteriol.* **179**: 7360–7368.
19. Kleikauf, H. and H. V. Dören. 1996. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. *Eur. J. Biocem.* **236**: 335–351.
20. Kleinkauf, H. and H. V. Dören. 1995. Linking Peptide and polyketide Biosynthesis. *J. Antibiot.* **48**: 563–567.
21. Stachelhaus, T. and M. A. Marahiel. 1995. Modular structure of encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEME Microbiol. Lett.* **125**: 3–14.
22. Kleinkauf, H. and H. V. Dören, 1990. Biochemistry of peptide Antibiotics, 1st ed., Walter de Gruyter and Co., Berlin, Germany, pp. 103–127.
23. Borchert, S., S. Patil, and M. A. Marahiel. 1992. Identification of putative multifunctional peptide synthetase genes using highly conserved oligonucleotide sequences derived from known synthetases. *FEMS Microbiol. Lett.* **92**: 175–180.
24. Piepersberg, W. 1995. Streptomycin and related aminoglycosides, pp. 531–570. In L. Vining and C. Stuttard (ed), Biochemistry and genetics of antibiotic biosynthesis. Butterworth-Heinemann, Boston.
25. Ahlert, J., J. Distler, K. Mansouri, and W. Piepersberg. 1997. Identification of *stsC*, the gene encoding the L-glutamine:scyllo-inosose aminotransferase from streptomycin-producing Streptomycetes. *Arch. Microbiol.* **168**: 102–113.
26. Piepersberg, W. 1994. Pathway engineering in secondary metabolite-producing actinomycetes. *Crit. Rev. Biotechnol.* **14**: 251–285.