

Saccharopolyspora erythraea IFO 13426으로부터 Autoregulator Receptor Protein Gene의 Cloning

김현수* · 이경화 · 조재만
계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Cloning of Autoregulator Receptor Gene from *Saccharopolyspora erythraea* IFO 13426. Kim, Hyun-Soo*, Kyung-Hwa Lee, and Jae-Mann Cho. Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea – For screening of autoregulator receptor gene from *Saccharopolyspora erythraea*, PCR was performed with primers of receptor gene designed on the basis of amino acid sequences of autoregulator receptor proteins with known function. PCR products were subcloned into the *Bam*HI site of pUC19 and transformed into the *E. coli* DH5 α . The isolated plasmid from transformant contained the fragment of 120 bp, which was detected on 2% gel after *Bam*HI treatment. The insert, 120 bp PCR product, was confirmed as the expected internal segment of gene encoding autoregulator receptor protein by sequencing. Southern and colony hybridization using *Saccha. erythraea* chromosomal DNA were performed with the insert as probe. The plasmid (pEsg) having 3.2 kbp *Sac*I DNA fragment from *Saccha. erythraea* is obtained. The 3.2 kbp *Sac*I DNA fragment was sequenced by the dye terminator sequencing. The nucleotide sequence data was analyzed with GENETYX-WIN (ver 3.2) computer program and DNA database. Frame analyses of the nucleotide sequence revealed a gene encoding autoregulator receptor protein which is a region including *Kpn*I and *Sal*I sites on 3.2 kbp *Sac*I DNA fragment. The autoregulator receptor protein consisting of 205 amino acid was named EsgR by author. In comparison with known autoregulator receptor proteins, homology of EsgR showed above 30%.

Key words: *Saccharopolyspora erythraea*, γ -butyrolactone autoregulator, receptor protein, erythromycin

방선균은 Gram(+)의 세균으로서 토양에서 대다수가 분리되는 특이한 미생물로 사상균과 같이 현저한 형태분화를 수행하며 기저균사, 기중균사, 분생포자, 포자 발아의 생활환을 가지고 있다. 이러한 형태분화와 더불어 항생물질, 생리활성물질, 색소 등 산업적으로 유용한 2차 대사산물을 생산하고 있다.

방선균이 생산하는 이차대사산물은 포자형성시기인 배양 후기에 이루어지며, 이는 이차대사산물 생산과 형태 분화가 밀접한 관계를 갖고 있음을 나타낸다. 이러한 형태분화(morphological differentiation)와 2차 대사산물 생산의 생리적 분화(physiological differentiation)는 방선균이 생산하는 자기조절인자(autoregulator)라고 불리는 저분자의 신호전달물질과 이에 특이적으로 결합하는 autoregulator receptor protein의 상호작용에 의한 것으로 알려졌다[3, 10, 24]. 이들 인자는 다면형질 발현성(pleiotropic)이며 이들에 대해서 *Streptomyces*속 방선균을 중심으로 수많은 연구가 수행되었다. 지금까지 밝혀진 autoregulator들은 균체 외에 미량 분비되어 수 ng/ml의 극히 저농도에서 작용하여 이차 대사 혹은

형태 분화를 유도하므로 고등생물의 hormone에 상당하는 물질로서 원핵생물의 호르몬으로 간주한다[17, 23].

지금까지 A-factor[6], factor I[3], virginiae butanolides (VB-A, B, C, D, E)[24, 25] 등 γ -butyrolactone환을 가지는 10종의 autoregulator가 분리되어 구조가 밝혀졌으며, 이들의 기능에 대한 분자 level에서의 연구가 진행되고 있다[4, 5, 17].

Waki 등[23]에 의하면 *Streptomyces*속 방선균의 약 60% 이상이 지금까지 밝혀진 autoregulator나 유사 autoregulator를 생산하는 것으로 추정되며, 고등생물의 hormone에는 특이적인 receptor 단백질이 존재하는 것으로 알려져 있으므로, *Streptomyces*속 방선균의 autoregulator도 특이적인 receptor 단백질이 존재하리라고 예상하였다. 실제로 *S. virginiae*로부터 BarA[18]를 시작으로 *S. griseus*로부터 ArpA[14], *S. lavendulae* FRI-5로부터는 FarA[19]가 autoregulator의 특이적인 receptor 단백질로서 분리되었으며 그 유전자들도 cloning되었다.

현재까지 밝혀진 autoregulator와 receptor protein 중, *S. virginiae*의 virginiae butanolides(VBs)와 VB receptor protein (BarA)이 가장 많이 연구되고 있다[11, 18]. VB type은 Kondo 등[12]에 의해 *S. virginiae*으로부터 VB A~E가 분리되어 구조가 결정되었으며, 이들 유도인자의 signal 전달과

*Corresponding author
Tel: 82-53-580-5284, Fax: 82-53-580-6447
E-mail: hskim@kmu.ac.kr

관련하여 항생물질 생합성 기작 연구의 일환으로, Kim[7, 10] 등에 의해, 자기조절자인 VBs중 VB-C의 signal 전달에 관여하는 결합 단백질인 VB-C receptor가 처음으로 확인 및 정제되었다. 또한, *in vivo*[11]와 *in vitro*[11, 16] 실험에서 VB의 비존재시에 BarA는 target gene이나 operon의 promoter 지역의 특정한 DNA 서열에 결합하여 전사를 억제하며, VB가 생산되면 VB가 DNA에 결합되어 있는 BarA와 결합하여 promoter 지역으로부터 BarA가 분리되어 target gene 또는 operon의 전사가 개시되는 결과에서 BarA가 DNA binding transcriptional repressor로 확인되었으며, VB-BarA system은 구조가 다른 virginiamycin M₁(VM₁)과 virginiamycin S(VS)의 생산을 같이 조절하는 것이 확인되었다[16]. 뿐만 아니라, Lee[13] 등에 의해, *barA* 유전자의 downstream에는 *barB-varS* operon이 위치해있으며, *varS* gene은 virginiamycin 내성에 관여하는 VS-specific efflux protein으로 나타났다.

이들 유도인자의 응용면으로, Kim 등[9]에 의해 lysocellin 생산균인 *S. longwoodensis*로부터 VB-C에 의한 lysocellin을 비롯한 다른 항생물질 및 색소의 유도능과 *S. erythraeus* IFO 13426으로부터 VB-C에 의한 erythromycin(EM)생산 유도능이 시사된 바 있다[8].

본 연구의 공시균으로 사용된 방선균의 일종인 *Saccharopolyspora erythraea*가 생산하는 EM은 Gram(-)균 보다 Gram(+)-균의 세포벽에 훨씬 투과가 잘되어 Gram(-)균에 비해 Gram(+)-균에 100배의 활성을 나타내는 정균성 약물로, 삼상정좌창, 중이염, *Campylobacter*성 장염, 신생아 결막염, *Legionnaire's disease*, 수술전 제제, *Mycoplasma*, *Chlamydia* 감염과 Gram(+)-균에 의한 대부분의 감염에 사용된다[1, 2, 15]. 항균력은 대체로 penicillin G와 비슷하며, penicillin 과민성 환자 중 특히, 연쇄상 구균, 포도상 구균, 폐렴 구균, *Clostridia*에 의해서 일어나는 감염증에 대체약으로 적용된다[22].

따라서 본 연구는 *Saccha. erythraea* IFO 13426의 2차 대사조절과 관련이 있는 autoregulator receptor protein을 코딩하는 유전자가 존재할 것으로 예상되므로 EM의 생산 조절 기구를 규명하기 위하여, 기존의 *Streptomyces*속 receptor gene의 공통배열을 primer로 이용한 PCR법으로 공시균의 γ -butyrolactone autoregulator receptor gene의 존재를 확인한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmid

Receptor 유전자를 cloning하기 위한 공시 균주는 방선균 *Saccharopolyspora erythraea* IFO 13426을 사용하였다. Cloning vector는 pUC19를 사용하였으며, plasmid 형질전환 competent cell은 *E. coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169*(Φ 80

lacZ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*)와 *E. coli* XL10-Gold(*Tet*^R Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1* *supE44* *thi-1* *recA1* *gyrA96* *relA1* *lacHte* [*F'* *proAB*, *lacI*^q Δ M15 *Tn10*(*Tet*^R) *Amy* *Cam*^R]^o)를 사용하였다.

사용배지 및 배양조건

공시균의 배양은 ISP Medium No. 2를 사용하여 28°C에서 3주간 slant 배양하였으며, Chromosomal DNA의 추출을 위한 액체배양은 slant로부터 2백금을 50 ml(250 ml Erlenmeyer flask) TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에 접종하여 28°C, 200 rpm에서 48시간 전배양하였고, 본배양은 100 ml(500 ml baffled flask) TSB배지에 전배양균을 3%되게 접종하여 4일간 실시하였다. *E. coli*는 LB(Luria Bertani) 배지에 ampicillin(50 μ g/ml)을 첨가하여 37°C, 18시간 진탕 배양하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 Difco Laboratories Co.(USA), Sigma Chemical Co.(USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Genome 및 plasmid DNA의 분리

공시균의 genome DNA 분리는 Hopwood 법[21]에 따라 실행하였으며, plasmid DNA의 분리는 Flexi Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech., UK), TELT법, Alkaline-SDS 추출법으로 수행하였다.

Polymerase Chain Reaction(PCR)

공시균으로부터 receptor gene의 존재를 확인하기 위해 기존에 연구되어 있는 autoregulator receptor protein들의 아미노산 배열 중 보존영역이 높은 helix-turn-helix motif(Fig. 1)을 토대로 양 말단에 *Bam*HI site(-로 표기)를 포함한 특이적인 forward primer(AF-V, 5'-CGCGGATCCGCSGCSGCSNNGTSTTCGA-3')와 reverse primer(AR-1, 5'-CGCGGATCCGAAGTGGAAAGTASAGSGCSCC-3')를 제작하였으며, 기존의 알려진 receptor와 유사한 receptor의 분리를 위

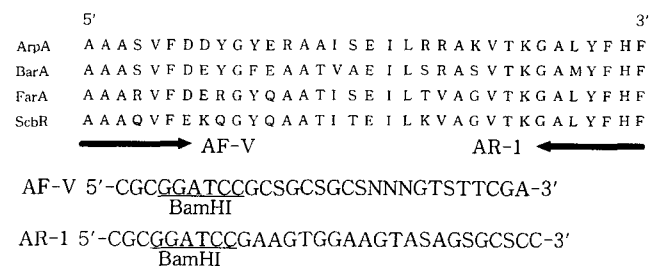


Fig. 1. Design of PCR primer for cloning of the gene encoding the γ -butyrolactone autoregulators receptor proteins. ArpA: Autoregulators receptor protein of A-factor, BarA: Autoregulators receptor protein of Virginiae Butanolide, FarA: Autoregulators receptor protein of IM-2, ScbR: Autoregulators receptor protein of SCB-1, AF-V: Forward primer, AR-1: Reverse primer.

해 조제한 primer 배열중 아미노산 배열은 같으나 공통 염기서열이 다른 S와 N은 공통배열이 없는 경우 *Streptomyces* 속 균주의 발현 비율이 높은 아미노산 code의 다양한 배열을 가진 primer로 제조하여 사용하였다. 공시균의 chromosomal DNA(100 ng/ml)를 template로 이용하여 각각 10 pmole primers, 2.5 mM dNTPs, 1/8 dil. *Ex Taq*, 10X *Ex Taq* buffer의 조성으로 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 95°C 5 min, 95°C 1 min, 66°C 40 sec, 72°C 50 sec간 35 회 증폭한 후 4°C에 저장하였다.

PCR 산물의 회수 및 형질 전환

PCR산물을 2% agarose 수평 gel을 사용하여 전기영동하였으며, 완충용액으로는 TAE(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였다. DNA 단편은 동결용해법으로 회수한 후 *Bam*HI로 처리하고 pUC19에 ligation하여, *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 형질전환균은 37°C에서 18시간 배양하여 ampicillin(50 μ g/ml)이 첨가된 LB 고체배지(0.4% X-gal, 0.1 M IPTG를 도말)에 형질전환균을 도말하였으며, white colony를 형질전환균으로 선별하였다. Competent cell은 Hanahan 법[25]으로 제조하였으며, 모든 제한효소, 수식효소 및 Marker는 Takara사 제품을 사용하였다.

Plasmid 분리 및 형질전환균의 확인

선별된 white colony를 ampicillin(50 μ g/ml)이 첨가된 3 ml LB 액체배지에 접종한 후 37°C에서 18시간 배양하였다. Flexi Prep Kit를 이용하여 plasmid를 분리한 후 다시 *Bam*HI 처리하여 PCR 산물의 형질전환을 확인하였고, 형질전환이 확인된 plasmid만을 sequencing에 이용하였다. Sequencing시 사용된 plasmid는 Alkaline-SDS 추출법으로 분리하였다.

PCR 산물의 염기배열 결정 및 해석

형질전환이 확인된 plasmid를 Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP(Amersham Pharmacia Biotech., UK)와 Cy5-labeled M13 primer를 이용하여 PCR을 수행하고, fluorescence DNA sequencer(ALFred, Amersham Pharmacia Biotech., UK)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequence 분석과 homology 비교는 GENETYX-WIN Ver 3.2(Software Development Co., Japan)와 DNA database를 이용하였다.

Southern blot analysis

Receptor gene의 일부로 확인된 plasmid에 *Bam*HI을 처리하여 PCR 산물을 동결용해법으로 회수한 후, Random Primer DNA Labeling Kit version 2(Takara Shuzo Co., Japan)와 방사성 동위원소인 [α -³²P] dCTP로 labeling시켜 Southern 및 colony hybridization시 사용할 probe를 제작하

였다.

추출한 공시균의 chromosomal DNA에 pUC19의 MCS (Multi Cloning Site)에 위치한 10가지 제한효소(*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I, *Xba*I)를 각각 처리한 후, 1% agarose gel에 전기영동하고 agarose gel을 변성용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 30분에 1회 처리 후, 중화용액(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.2)에 15분씩 2회 처리하였다. 이후 agarose gel의 DNA를 nylon membrane(Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech., UK)으로 transfer하고 5분간 UV 조사하여 DNA를 고정하였다.

Hybrid bag에 Rapid-hyb buffer(Amersham Pharmacia Biotech., UK) 20 ml와 membrane을 넣고 15분간 prehybridization한 후, 방사성 동위원소 [α -³²P] dCTP로 표지된 probe를 넣고 65°C에서 2시간 hybridization하였다. Hybridization이 끝난 membrane의 비특이적인 signal을 제거하기 위해 2 \times SSC/0.1% SDS(r.t), 1 \times SSC/0.1% SDS(r.t), 0.2 \times SSC/0.1% SDS(65°C)의 조건으로 washing한 후 -80°C에서 1시간 동안 X-ray film에 노출시킨 다음 현상하였다.

Colony hybridization

공시균의 chromosomal DNA를 제한효소 *Sac*I으로 처리하고 1% agarose gel에 전기영동한 후 약 3.2 kbp의 DNA 단편을 회수하여 pUC19의 *Sac*I site에 ligation시켰다. Competent cell인 *E. coli* XL10-Gold에 형질전환시켜, DNA library를 작성하였다. Colony들을 nylon membrane에 transfer한 후 10% SDS, 변성용액, 중화용액, 2 \times SSC 용액으로 상온에서 각각 5분씩 처리하였으며, 5분간 UV 조사하여 DNA를 고정시켰다. Colony hybridization에 사용한 probe와 이후의 작업은 Southern hybridization과 동일하게 수행하였다.

3.2 kbp *Sad*단편의 subcloning 및 sequencing

Colony hybridization을 통해 얻은 3.2 kbp DNA단편의 모든 염기배열을 결정하기 위해, pUC19의 MCS에 포함된 제한효소를 처리하여 1% agarose gel에 전기영동한 후 sequencing에 적절한 단편을 선택하여 subcloning하였다. Vector는 pUC19를 사용하였으며 competent cell은 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다. DNA 염기배열결정은 앞서 제시한 방법과 동일하게 수행하였다.

결과 및 고찰

목적 PCR 산물의 확인

공시균에 있어서 receptor protein의 존재를 확인하기 위해 기존에 알려진 receptor의 공통된 특징으로 ligand인 autoregulator와 1:1결합, dimer 형성, N말단영역에 추정되

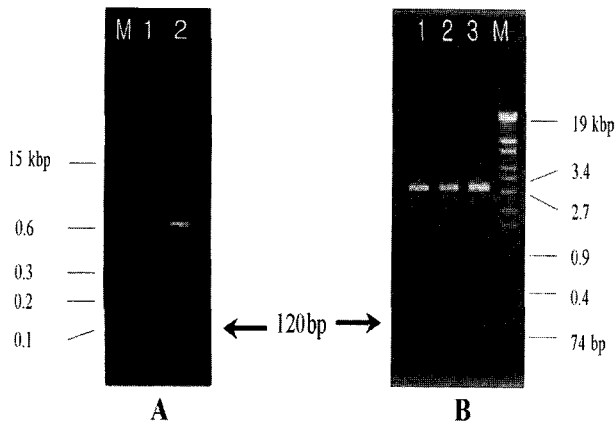


Fig. 2. Gel electrophoresis of PCR fragments from *Saccha. erythraea* IFO 13426 and transformed *E. coli* DH5 α . A. PCR product, M: 100 bp DNA ladder, B. *Bam*HI treatment of PCR fragments on transformed *E. coli* DH5 α , R-1, R-2, and R-3. Lane 1: R-1 *Bam*HI treatment, Lane 2: R-2 *Bam*HI treatment, Lane 3: R-3 *Bam*HI treatment, M: λ EcoT141.

는 helix-turn-helix motif를 가진다고 알려져 있다[11, 23]. 따라서 이들 유전자의 공통배열을 이용하여 제작한 primers로 PCR을 수행한 후 2% agarose gel에 전기영동한 결과, 예상 크기인 약 120 bp의 PCR 산물이 확인되었다(Fig. 2A).

회수한 PCR 산물을 pUC19 vector에 ligation 후, *E. coli* DH5 α 에 형질전환 시켰으며, 3개(R-1, R-2, R-3)의 선발된 형질전환 균으로부터 plasmid를 분리하고 *Bam*HI을 처리하여 1% agarose gel에 전기영동한 결과, pUC19(2.7 kbp)외에 PCR 산물이 각 120 bp 위치에 나타나 공시균의 PCR 단편이 *E. coli* DH5 α 에 형질전환 되었음이 확인되었다(Fig. 2B).

염기배열 해석

형질전환이 확인된 plasmid를 M13 primer를 이용하여 PCR 수행한 후 염기배열을 결정하였다. 해석용 Software인 GENETYX-WIN을 이용하여 얻어진 염기배열을 아미노산 배열로 변환시켜 기지의 배열과 비교·검토하였다. 그 결과, Fig. 3에 나타난 바와 같이 사용 primer인 AF-V와 AR-1 염

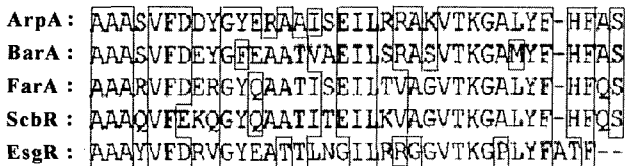


Fig. 3. Alignment of the amino acid sequence of PCR product from *Saccha. erythraea* and known autoregulator receptor proteins. EsgR: Autoregulators receptor protein from *Saccha. erythraea*.

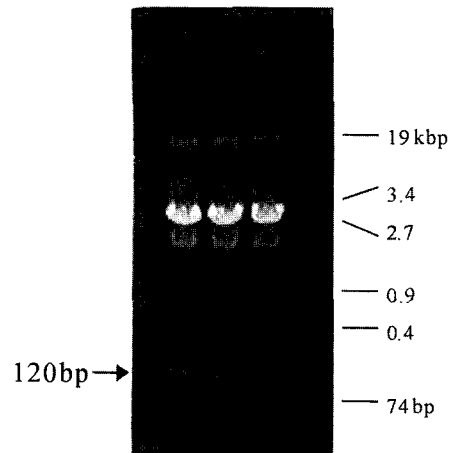


Fig. 4. Gel electrophoresis of probe fragment.

역에서 기지의 *Streptomyces*속 유래의 receptor gene(R-gene)과 상동성이 확인되었고, primer부분의 보존성(Fig. 1)도 높은것이 입증되었다. 이 결과에서 receptor의 검색에 receptor 유전자를 표적으로한 PCR법이 매우 유효한 수단이라고 사료되었다.

Southern blot analysis

R-gene의 존재가 확인된 plasmid를 이용하여 *Bam*HI 처리를 하여 2% agarose gel에 전기영동을 한 후 120 bp에 위치한 PCR 산물을 회수하여 Southern 및 colony hybridization시 probe로 사용하였다(Fig. 4). Southern blot을 실시한 결과, 제한효소 *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I의 다양한 위치에서 강한 positive signal이 나타났다(Fig. 5). 이들 positive signal 중에서 적당한 크기로 생각되는 약 3.2 kbp의 *Sac*I 단편(*Esg*)을 공시균의 receptor protein gene의 cloning을 위한 target DNA 단편으로 확정하였다.

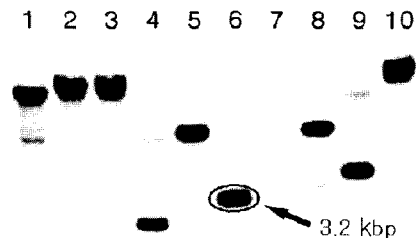


Fig. 5. Result of genomic Southern blot analysis of *Saccha. erythraea*. Each lane was treated with restriction enzymes as follows. 1: *Bam*HI, 2: *Eco*RI, 3: *Hind*III, 4: *Kpn*I, 5: *Pst*I, 6: *Sac*I, 7: *Sal*I, 8: *Sma*I, 9: *Sph*I, 10: *Xba*I. Circular area was 3.2 kbp of DNA fragment digested with *Sac*I.

은 상동성을 보인점에서 *EsgR*은 *Saccha. erythraea*가 보유하는 autoregulator receptor protein을 code하는 유전자로 추정되었다. 현재 receptor gene 상·하류 영역의 조절 유전자의 존재를 검색중에 있으며, 향후 EM생산과 관련한 연구중에 있다.

요 약

공시균인 *Saccha. erythraea* IFO 13426으로부터 VB-C에 의한 erythromycin 생산 유도능이 시사된 바 있으므로, 공시균으로부터 VB-C와 특이적으로 결합하는 autoregulators 및 receptor gene을 탐색하여, EM의 생산 조절 기구를 규명하고자 하였다. 탐색의 일환으로 기존의 *Streptomyces*속 receptor gene의 공통배열을 primer로 이용하여 PCR을 수행하였고, 예상 크기인 120 bp의 단편을 pUC19 vector에 ligation하여 *E. coli* DH5 α 에 형질전환한 후, plasmid를 분리하여 *Bam*HI를 처리하여 2% agarose gel에 전기영동한 결과, pUC19 (2.7 kbp)외에 receptor gene PCR 산물이 120 bp 위치에 존재하는 것을 확인하였다. 형질전환된 plasmid로 PCR을 수행하여 염기배열을 결정 한 후 해석한 결과 *Streptomyces* sp. 유래의 receptor gene과 유사함을 확인하였다. 따라서 *Saccha. erythraea* IFO 13426에는 항생물질인 erythromycin의 생산에 관여한다고 추정되는 autoregulator receptor protein을 코드하는 유전자가 존재할 것으로 예상되어 120 bp의 PCR product를 probe로 이용하여 Southern 및 colony hybridization을 통하여 3.2 kbp의 *Sac*I 단편을 가지는 plasmid(pESG)를 제작하였고, 이를 sequencing한 결과, autoregulator receptor protein 유전자가 *Kpn*I과 *Sal*I을 포함하는 영역에 존재한다는 것을 알 수 있었으며 이를 *EsgR*이라 명명하였다. 유전자 해석 결과, *EsgR*은 205개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이는 기존의 autoregulator receptor proteins과 비교시 30% 이상의 상동성을 나타내었으며, 기존의 autoregulator receptor protein들이 하부의 항생물질 생합성 유전자들의 제어를 위해 보유하고 있는 helix-turn-helix DNA binding motif를 *EsgR*이 보유하고 있는 점에서, *EsgR*은 *Saccha. erythraea*가 보유하는 autoregulator receptor protein을 code하는 유전자로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 연구년 지원과 과학기술부·과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원 및 산업화 연구센터의 일부지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- David adair, C., Marc gunter, Thomas G. Stovall, Gayle Mcelroy, Jean-Claude Veille and Joseph M. Ernest. 1998. Chlamydia in pregnancy: a randomized trial of azithromycin and erythromycin. *J. Obstet Gynecol.* **91**: 165-168.
- Gautier-Bouchardon, A. V., A. K. Reinhardt, M. Kobisch, and I. Kempf. 2002. In vitro development of resistance to enrofloxacin, erythromycin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma synoviae*. *J. Veteri. Microbiol.* **88**: 47-58.
- Gräfe, U., W. shade, I. Eritt, W. F. Fleck, and L. Radics. 1982. A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiot.* **35**: 1722-1723.
- 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., Y. Kumada, and T. Beppu. 1984. Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* **158**: 481-487.
- Khokhov, A. S., I. I. Tavalova, L. N. Borisova, S. A. Pliner, L. N. Shevchenko, Kolnitskaya, N. S. Ivkina, and I. A. Rapoport. 1967. A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomycetes streptomycini*. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **177**: 232-235.
- 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., L. S. Seong. 1999. Induction of erythromycin by virginiamycin inducing factor, virginiae butanolide C. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 682-687.
- Kim, H. S. and S. Y. Kang. 1994. General Microbiology, Physiology and metabolism ; induction of secondary metabolites by virginiamycin inducing factor, virginiae butanolide C. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 459-466.
- 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.
- Kinoshita, H., H. Ipposhi, S. Okamoto, H. Nakano, T. Nihira, and Y. Yamada. 1997. Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 6986-6993.
- Kondo, K., Y. Higuchi, S. Sakuda, T. Nihira, and Y. Yamada. 1989. New virginiae butanolides from *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **42**: 1873-1876.
- Lee, C. K., Y. Kamitani, T. Nihira, and Y. Yamada. 1996. Identification and *in vivo* functional analysis of *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 3293-3297.
- Meisler, D. M., M. B. Raizman, and E. I. Traboulsi. 2000. Oral erythromycin treatment for childhood blepharokeratitis. *J. AAPOS.* **4**: 379-380.
- Miyake, K., T. Kuzuyma, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1990. The A-factor binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin and sporulation. *J. Bacteriol.* **172**: 3003-3008.

16. Nakaro, H., E. Takehara, T. Nihira, and Y. Yamada. 1998. Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae* *barA* gene encoding the butyrolactone autoregulator receptor reveals that BarA acts as a Repressor in virginiamycin biosynthesis. *J. Bacteriol.* **180**: 3317-3322.
17. Nihira, T., Y. 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.
18. Okamoto, S., K. Nakamura, T. Nihira, and Y. Yamada. 1995. Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* **270**: 12319-12326.
19. Ruenjitchatchawalya, M., T. Nihira, and Y. Yamada. 1995. Purification and characterization of the IM-2-binding protein from *Streptomyces* sp. strain FRI-5. *J. Bacteriol.* **177**: 551-557.
20. Sakuda, S. and Y. Yamada 1991 Stereochemistry of butyrolactone autoregulators from *Streptomyces*. *Tetrahedron Lett.* **32**: 1817-1820.
21. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed., Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor. NY.
22. Scheinfeld, N. S., W. D. Tutrone, O. Torres, and J. M. Weinberg. 2003. Macrolide in Dermatology. *J. Clinics in dermatology.* **21**: 40-49.
23. Waki, M., T. Nihira, and Y. Yamada. 1997. Cloning and characterization of the gene (*farA*) encoding the receptor for an extracellular regulatory factor (IM-2) from *Streptomyces* sp. strain FRI-5. *J. Bacteriol.* **179**: 5131-5137.
24. Yamada, Y., T. Nihira, and S. Sakuda. 1997. Butyrolactone autoregulators inducers of virginiamycin in *Streptomyces virginiae* : their structures, biosynthesis, receptor proteins, and induction of virginiamycin biosynthesis. pp. 66-79 *In* Biotechnology of antibiotics, Marcel Dekker, Inc., New York.
25. Yamada, Y. K. Sugimura, K. Kondo, M. Yanagimoto, and H. Okada. 1987. The structure of inducing factors for virginiamycin in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **40**: 496-504.

(Received Jan. 16, 2003/Accepted Apr. 16, 2003)