

면역억제제 Tautomycetin을 생산하는 방선균의 고체배지 pH에 따른 항진균 활성

허윤아 · 최시선 · 장용근¹ · 홍순광² · 김응수*

인하대학교 생물공학과, ¹한국과학기술원 생명화학공학과, ²명지대학교 생명과학정보학부

Solid Medium pH-Dependent Antifungal Activity of *Streptomyces* sp. Producing an Immunosuppressant, Tautomycetin. Yoon-Ah Hur, Si-Sun Choi, Yong Keun Chang¹, Soon-Kwang Hong², and Eung-Soo Kim*. Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea, ¹Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Korea, ²Division of Bioscience and Bioinformatics, Myongji University, Kyonggi-do 449-728, Korea - Tautomycetin (TMC), which is produced by *Streptomyces* sp. CK4412, is a novel activated T cell-specific immunosuppressive compound with an ester bond linkage between a terminal cyclic anhydride moiety and a linear polyketide chain bearing an unusual terminal alkene. Antifungal activity against *Aspergillus niger* and TMC productivity assayed by HPLC using culture extracts from *Streptomyces* sp. CK4412 grown on solid medium adjusted at various pH were measured. The cells cultured at acidic pH (pH 4-5) medium exhibited much stronger antifungal activity as well as higher TMC productivity than those cultured at neutral pH medium, implying that the acidic pH-shock should be an efficient strategy to induce the productivity of secondary metabolites in *Streptomyces* culture.

Key words: *Streptomyces*, tautomycetin, pH-dependent antifungal activity

서 론

자연은 임상에서 유용하게 이용되는 항생제, 항암제, 면역억제제 뿐만 아니라 축산업이나 농업에 이용되는 성장촉진제, 살충제, 제초제, 구충제 등을 포함하여, 경이로울 정도로 무수히 많은 종류의 천연 생리활성물질들을 창조해 낸다[10]. 이러한 생리활성 물질을 생산하는 미생물 중 약 75% 이상은 방선균(actinomycetes)에 의한 것이며, 이러한 이유로 방선균은 항생제를 포함한 다양한 생리활성물질을 생산하는 천연 유기화합물의 보고이며 신물질의 탐색 및 생합성 기작 규명을 위한 가장 매력적인 연구대상으로 인식되어 왔다[1, 10]. 이러한 방선균은 자연계의 토양 및 담수 등 어디에서든지 발견되는 미생물로서 필라멘트 형태를 띤 대표적인 그람 양성 세균이다. 방선균은 크게 Streptomycetaceae family와 Actinomycetaceae family로 분류되며[14], 이 중 Streptomycetaceae family에 속하는 *Streptomyces*속의 방선균들은 다른 미생물에서 볼 수 없는 독특한 발생학적 성장주기(developmental life-cycle)를 갖고 이에 따른 형태적 변형(morphological differentiation)을 하며, 이와 더불어 산업적 및 의학적으로 유용한 많은 2차 대사산물을 생합성 한다[2, 3, 10].

Tautomycetin(TMC)은 국내 토양에서 분리된 방선균(*Streptomyces* sp. CK4412)로부터 생합성 되는 항진균성 2차 대사산물로서, Cyclosporin 및 FK506과 같은 기존의 면역억제제보다 작용 메카니즘 및 효능이 훨씬 탁월한 선형의 폴리케타이드계 면역억제 화합물이다[13]. 강력한 항진균 활성도 갖는 TMC는 현재 임상에서 일반적으로 사용되는 면역억제제 Cyclosporine A 보다 100배나 높은 활성을 보일 뿐만 아니라 활성화된 T 세포에만 특이적으로 작용함으로써, 차세대 면역억제제로의 개발 가능성이 매우 높은 화합물이다[13]. TMC는 선형의 type I 폴리케타이드 부분과 환형의 C8 anhydride가 에스테르 결합으로 연결되는 독특한 구조를 지니고 있으며[5], 최근 본 연구진은 TMC 생합성에 관여하는 전체 유전자군을 분리하여 그 특성을 규명하였다[6].

방선균이 항생제를 포함한 다양한 구조의 유용한 생리활성물질을 생성하며, 이들의 생합성 시기가 세포의 배양상태 및 성장속도와 관련이 있다는 것은 이미 주지의 사실이다[12]. 그러나 방선균이 항생제를 포함한 다양한 생리활성물질들을 생합성하는 진정한 목적이 무엇이며, 이들의 생합성이 어떤 기작으로 조절되는지는 아직 완벽하게 이해되지 않고 있으며, 현재도 이에 관한 다양한 연구가 여러 생리적 인자 및 생합성 조절 유전자를 중심으로 이루어지고 있다[4]. 또한 방선균 배양 시 영양분의 농도 및 특정 성장제한 인자의 규명 등에 관한 보고가 그리 많지 않아서, 이들 대사물질이 성장시기와 밀접한 연관이 있는 항생제 생산에 미치는 영

*Corresponding author

Tel: 82-32-860-8318, Fax: 82-32-872-4046

E-mail: eungsoo@inha.ac.kr

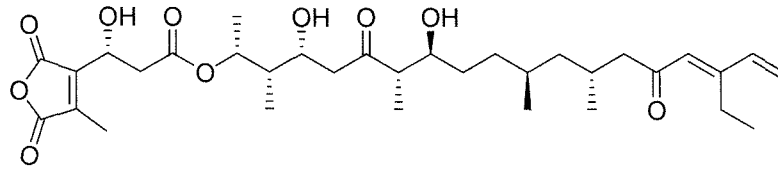


Fig. 1 Structure of Tautomycetin.

항의 정도를 예측하거나 또한 일반화하는 것은 매우 어려운 일이다. 특히 세포의 성장속도나 배지의 영양학적 요소에 의한 2차 대사산물의 생산성 증가에 관한 보고는 많지만, 비영양학적 요소들이 2차 대사산물 생합성에 주는 스트레스에 관한 연구는 매우 제한적이다[7, 8]. 최근 배지의 pH 변화를 통한 2차 대사산물의 생산성 극대화 가능성이 *S. coelicolor* 및 *S. kasugaensis* 균주에서 성공적으로 입증되었다[9, 11]. 따라서 본 연구에서는 이러한 대표적인 비영양학적 요소인 배지의 pH 변화를 대사산물의 특성 및 균주가 전혀 다른 TMC 생산 균주에 적용함으로써, 보다 일반적인 pH-shock에 의한 방선균 유래 유용 생리활성물질의 생산성 증대 전략을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양조건

본 연구에서는 포휴먼텍(주)로부터 TMC 생산균주, *Streptomyces* sp. CK4412를 분양 받아 사용하였다. 단기보관을 위하여, R2YE 고체배지 [103 g sucrose, 0.25 g K₂SO₄, 10.12 g MgCl₂ · 6H₂O, 10 g glucose, 0.1 g casamino acids,

2 ml trace element solution, 5 g yeast extract, 5.73 g TES buffer, 22 g agar를 증류수 1 L에 녹여 멸균 후 1 ml KH₂PO₄ (0.5%), 0.4 ml CaCl₂ · H₂O(5 M), 1.5 ml L-proline(20%), 0.7 ml NaOH(1 N) 첨가에서 포자 상태로 4°C에서 보관하였으며, 중·장기 보관으로는 20% glycerol의 spore suspension으로 -70°C에 보관하였다[10]. 고체배지에서의 pH-shock 방법을 적용하기 위하여, pH에 영향을 줄 수 있는 요소인 TES buffer와 NaOH는 제외한 변형된 R2YE 고체배지 [103 g sucrose, 0.25 g K₂SO₄, 10.12 g MgCl₂ · 6H₂O, 10 g glucose, 0.1 g casamino acids, 5 g yeast extract, 증류수 800 ml, 1 ml KH₂PO₄(0.5%), 8 ml CaCl₂ · 2H₂O(3.68%), 1.5 ml L-proline(20%), 0.2 ml trace element solution]를 기본 배지로 사용하였고, 필요한 경우 pH를 각각 4, 5, 6, 7.5로 맞춰 사용하였다. 배지의 pH 조성이 초기 균주의 성장에 영향을 미칠 수도 있으므로, 배양 2일까지는 기본 배지의 셀로판지 위에서 배양한 후, 이를 셀로판지만을 다른 pH의 배지에 각각 옮긴 후 5일을 더 배양하였다(Fig. 2).

HPLC를 이용한 TMC 분석 및 항진균 활성 측정

고체배지의 pH 변화에 따른 TMC 생산성을 정량적으로

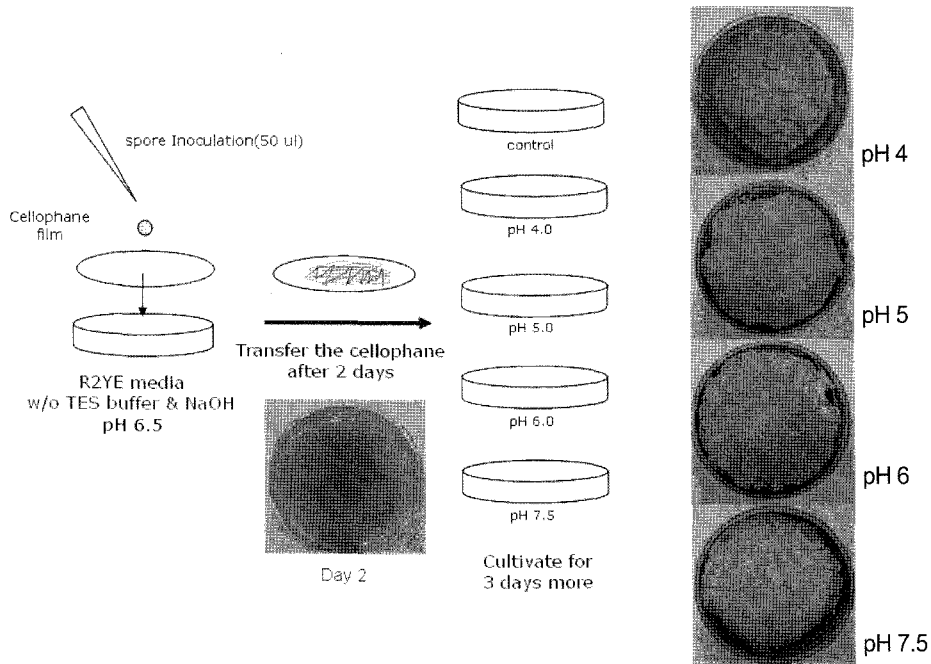


Fig. 2 Schematic presentation for pH-shock procedure.

비교분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다. R2YE 고체배지에서 7일 동안 배양한 cell을 배지와 함께 mixer에서 혼합하고 동량의 chloroform으로 추출한 후, rotoevaporator를 이용하여 농축시키고 이를 적당량의 MeOH으로 용리하였다. HPLC분석을 위하여, 컬럼은 역상 C18 4 µm 컬럼(Genesis, USA)을 사용하였고, 이동상은 methanol : water : buffer (1% diethylamine - formic acid, pH 7.3) = 75:15:10을 isocratic 조건으로 사용하였고, 유속은 1.0 ml/min, 그리고 TMC 검출은 UV absorbance detector(Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 273 nm에서 확인하였다. 또한, 각 pH에서 배양한 세포로부터의 항진균 활성 변화를 알아보기 위해 *Aspergillus niger*를 사용하여 생물학적 정량실험을 수행하였다. *A. niger*는 ME 배지(malt extract 20 g, glucose 20 g, peptone 1 g, agar 20 g, 증류수 1 L)에 멸균된 물을 이용하여 곰팡이 포자를 얇게 핀 상태로 30°C에서 6 hr정도 배양하였다. 그리고 HPLC 분석에 사용하였던 추출물 15 µl를 종이 디스크에 흡수시켜 올려놓은 후 1-2일 배양한 후 항진균 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

고체배지의 pH 변화와 TMC 생산성과의 상관관계를 규명하기 위하여, 방선균 CK4412를 기본 배지에서 2일 배양하고 이를 각각 다른 pH의 배지에 각각 이동시킨 후 5일을 더 배양하면서 항진균 활성 및 TMC 생산량을 비교분석하였다. 각기 pH가 다르게 제작된 고체배지 위에 배지로부터의 영양분 공급이 가능한 셀로판지를 깔고 배양한 cell을 들어내고 고체배지만을 mixer로 혼합한 후 동량의 chloroform으로 30°C, 20 min 흔들어 주면서 추출하였다. 이때, 각 배지마다 같은 양의 agar powder를 넣고 제작하였음에도 불구하고, pH가 낮은 산성인 고체배지일수록 배지가 단단하지 않고 묽은 현상을 보였다. 추출한 샘플은 두 층으로 나뉘게 되는데 아래의 chloroform층을 깨끗하게 분리한 후 rotoevaporator를 이용하여 농축시키고 1/20 vol.의 methanol에 용리하였다. 우선 항진균 활성 측정결과, pH가 낮을수록 즉, 배지가 산성인 조건에서 배양될수록 항진균 활성이 높아짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). pH 4나 pH 5의 경우, pH 6이나 pH 7.5에서 배양된 경우보다 확연히 *Aspergillus niger* 균주에 대한 항진균 활성도가 높아짐을 확인할 수 있다. 이는 고체배지의 pH가 산성인 경우가 증성이나 혐기성의 경우보다 2차 대사산물의 생산에 유리하게 작용함을 보이는 결과이다. 이와 같은 pH-shock에 의한 2차대사산물의 생산성 증가 현상은 *S. coelicolor* 및 *S. kasugaensis*와 같은 다른 방선균에서도 관찰되었다[9, 11]. 또한, HPLC 분석에서도 이와 부합되는 결과를 보였는데, 동일한 extracts를 HPLC로 정량 분석한 결과, TMC peak로 사료되는 12 min 이후 peak들이 산성인 pH 4 또는 pH 5 조건에서 pH 6과 pH 7.5

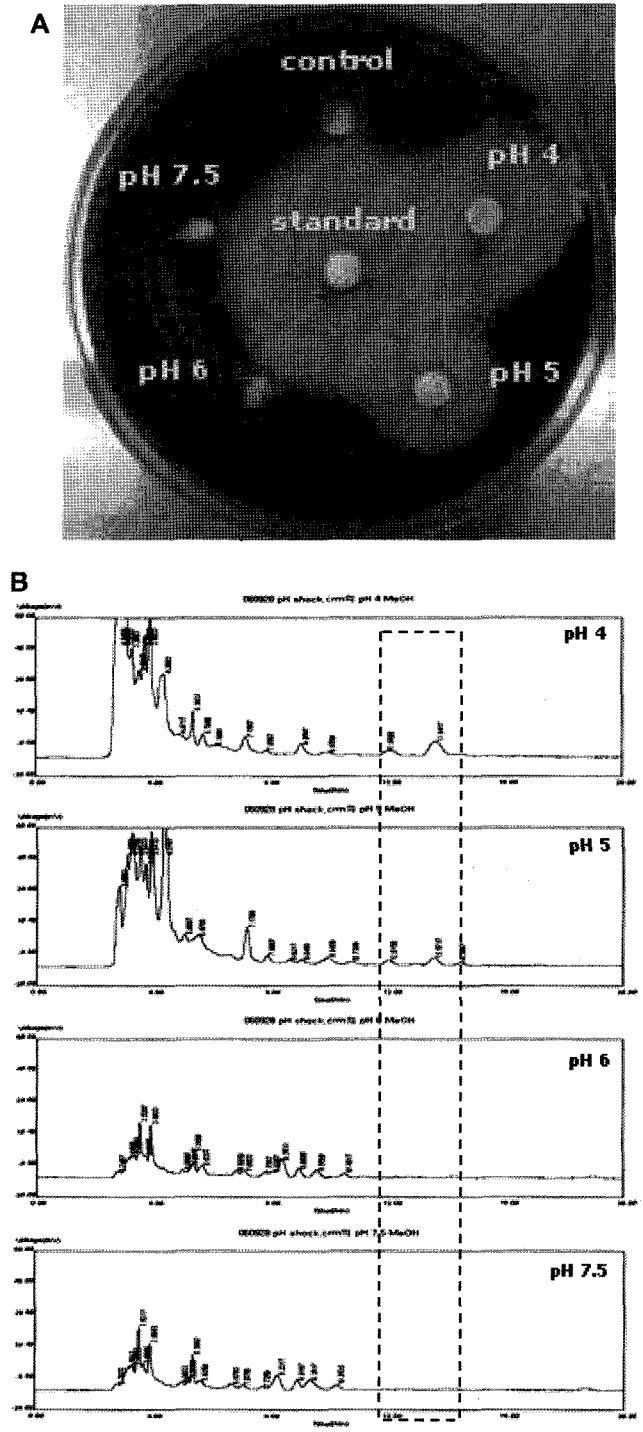


Fig. 3 (A) Comparison of antifungal activity against *Aspergillus niger* by TMC produced in *Streptomyces* sp. CK4412. Standard, TMC Control, *Streptomyces* sp. CK4412 culture extracts in control medium; pH 4, *Streptomyces* sp. CK4412 culture extracts in modified medium (pH 4); pH 5: *Streptomyces* sp. CK4412 culture extracts in modified medium (pH 5); pH 6: *Streptomyces* sp. CK4412 culture extracts in modified medium (pH 6); pH 7.5: *Streptomyces* sp. CK4412 culture extracts in modified medium (pH 7.5). (B) HPLC analysis of chloroform-extracts of *Streptomyces* sp. CK4412 cultured at pH 4, pH 5, pH 6, and pH 7.5. The TMC peaks were highlighted by dotted box.

조건에서 보다 높음을 확인할 수 있었다. 하지만, Fig. 3B에서 볼 수 있듯이 산성인 경우(pH 4 또는 pH 5)와 다르게 중성이나 염기성인 경우(pH 6이나 pH 7.5 조건)에 TMC peak으로 추정되는 peak들이 거의 보이지 않고 있다. 이는 중성이나 염기성 조건에서의 TMC 생산량이 극히 미량이기 때문에 검출하지 못하였기 때문이지 물질이 합성되지 않는 것은 아니라 사료된다. 이 사실은 전 파장 UV-scan을 통해 TMC 특유의 흡수파장패턴을 통해 중성과 염기성인 조건에서도 물질이 생산됨을 확인하여 증명되었다. 따라서, 이 물질의 생성에 acidic pH가 필수적이지는 않으며 산성조건에서 TMC가 더 많이 생합성 되는 것으로 사료된다(Fig. 3B). 참고로, TMC 생산균주의 액체 배양의 경우에서도 배지의 pH buffering 방법에 따라 TMC 생산성이 매우 민감하게 변화함을 관찰하였다[Hur *et al.*, unpublished data].

따라서, 본 연구결과를 통하여 TMC 생산균주 *Streptomyces* sp. CK4412의 경우도 *S. coelicolor*와 유사하게 2차 대사산물의 생산성이 배지의 pH에 의하여 영향을 받으며, 배지가 산성인 경우가 염기성인 경우보다 TMC 생산성이 향상됨을 제시함으로써, 배지의 pH 최적화를 통한 TMC 생산성 최적화 가능성을 제시하고 있다.

요 약

Tautomycetin(TMC)은 국내 토양에서 분리된 방선균(*Streptomyces* sp. CK4412)로부터 생합성 되는 항진균성 2차 대사산물로서, Cyclosporin 및 FK506과 같은 기존의 면역억제제보다 작용 메커니즘 및 효능이 훨씬 탁월한 신형의 폴리케타이드계 면역억제 화합물이다. 고체배지의 pH 변화와 TMC 생산성과의 상관관계를 규명하기 위하여, 방선균 CK4412를 다양한 pH 조건에서 배양하면서 항진균 활성 및 TMC 생산량을 비교분석 하였다. 고체배지의 pH를 산성조건(pH 4-5)으로 유지하여 방선균 CK4412 균주를 배양할 경우, 중성 pH 조건에서 배양한 경우보다 훨씬 탁월한 항진균 활성 및 TMC 생산성이 관찰되었다. 본 연구결과는 대표적인 방선균 *S. coelicolor*에서 입증된 pH-shock에 의한 2차대사산물의 생산성 증대효과가 대사산물의 특성과 균주가 전혀 다른 TMC 생산균주 CK4412에서도 관찰됨을 입증함으로써, pH 조절에 의한 다양한 종류의 방선균 유래 유용 생리활성물질의 생산성 증대 전략을 제시하고 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(NO.R01-2006-000-10860-0) 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 또한 본 연구에 사용된 균주를 제공해 주신 (주)포휴먼텍에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Alderson G, D. A. Ritchie, C. Cappellano, R. H. Cool, N. M. Ivanova, A. S. Huddleston, C. S. Flaxman, V. Kristufek and A. Lounes. 1993. Physiology and genetics of antibiotic production and resistance. *Res. Microbiol.* **144**: 665-672.
2. Champness, W. 1988. New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J. Bacteriol.* **170**: 1168-1174.
3. Chater, K. F. 1990. Multi-level regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet.* **5**: 372-377.
4. Chater, K. F. 1992. Genetic regulation of secondary metabolic pathways in *Streptomyces*. *Ciba Found. Symp.* **171**: 144-162.
5. Cheng, X. C., T. Kihara, X. Ying, M. Uramoto, H. Osada, H., Kusakabe, B. N. Wang, Y. Kobayashi, K. Ko, I. Yamaguchi, Y. C. Shen, and K. Isono. 1989. A new antibiotic, tautomycetin. *J. Antibiot.* **42**: 141-144.
6. Choi, S. S., Y. A. Hur, D. H. Sherman, and E.-S Kim. 2007. Isolation of the biosynthetic gene cluster for tautomycetin, a linear polyketide T cell-specific immunomodulator from *Streptomyces* sp. CK4412. *Microbiology* **153**: 1095-1102.
7. Doull, J. C., S. W. Ayer, A. K. Singh, and P. Thibault. 1993. Production of a novel polyketide antibiotic, jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J. Antibiot.* **44**: 869-871.
8. Doull, J. L. and L. C. Vining. 1990. Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 449-454.
9. Hayes, A., G. Hobbs, C. P. Smith, S. G. Oliver, and P. R. Butler. 1997. Environmental signals triggering methylenomycin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **179**: 5511-5515.
10. Hopwood, D. A. 1987. Towards an understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis: of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc. Lond. Series B* **23**: 2257-2269.
11. Kim, C. J., Y. K. Chang, and G. T. Chun. 2000. Enhancement of kasugamycin production by pH shock in batch cultures of *Streptomyces kasugaensis*. *Biotechnol. Prog.* **16**: 548-552.
12. Sarubbi, E., K. E. Rudd, and M. Cashel. 1988. Basal ppGpp level adjustment shown by new *spoT* mutants affect steady state growth rates and *rrnA* ribosomal promoter regulation in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **213**: 214-222.
13. Shim, J. H., H. K. Lee, E. J. Chang, W. J. Chae, J. H. Han, D. J. Han, T. Morio, J. J. Yang, A. Bothwell, and S. K. Lee. 2002. Immunosuppressive effects of tautomycetin *in vivo* and *in vitro* via T cell-specific apoptosis induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 10617-10622.
14. Williams S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. Wellington, P. H. Sneath, and M. J. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.

(Received Jan. 8, 2007/Accepted Feb. 25, 2007)