

Precursor제공 및 생합성 관련 유전자의 cloning을 통한 Monacolin-K 생산성 향상

이 미 진 · ¹정 용 섭 · † 전 계 택
강원대학교 분자생명과학과, ¹전북대학교 응용생물공학부
(접수 : 2008. 10. 22., 게재승인 : 2008. 12. 1.)

Enhanced production of monacolin-K through supplement of monacolin-K precursors into production medium and cloning of SAM synthetase gene (*metK*)

Mi-Jin Lee, Yong-Seob Jeong¹, and Gie-Taek Chun†

School of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, ¹Division of Biotechnology, Chonbuk National University
(Received : 2008. 10. 22., Accepted : 2008. 12. 1.)

Monacolin-K is a strong anti-hypercholesterolemic agent produced by *Monascus sp.* via polyketide pathway. High-yielding mutants of monacolin-K were developed through rational screening strategies adopted based on understanding of monacolin-K biosynthetic pathway. Through the experiments for investigating various amino acids as putative precursors for the monacolin-K biosynthesis, it was found that production level of monacolin-K was remarkably increased when optimum amount of cysteine was supplemented into the production medium. We suggested that these phenomena might be related to the special roles of SAM (S-adenosyl methionine), a putative methyl group donor in the biosynthetic pathway of monacolin-K, demonstrating close interrelationship between SAM-synthesizing primary metabolism and monacolin-K synthesizing secondary metabolism. Namely, increase in the intracellular amount of SAM derived from the putative precursor, cysteine which was extracellularly supplemented into the production medium might contribute to the significant enhancement in the monacolin-K biosynthetic capability of the highly mutated producers. On the basis of these assumptions derived from the above fermentation results, we decided to construct efficient expression vectors harboring SAM synthetase gene (*metK*) cloned from *A. nidulans*, with the hope that increased intracellular level of SAM could lead to further enhancement in the monacolin-K production through overcoming a rate-limiting step associated with monacolin-K biosynthesis. Hence, in order to overcome the plausible rate-limiting step associated with monacolin-K biosynthesis by increasing intracellular level of SAM, we transformed the producer mutants with an efficient expression vector harboring *gpdA* promoter of the producer microorganism, and *metK* gene. Notably, from the resulting various transformants, we were able to screen a very high-yielding transformant which showed approximately 3.3 fold higher monacolin-K productivity than the parallel nontransformed mutants in shake flask cultures performed under the identical fermentation conditions.

Key Words : *Monascus ruber*, monacolin-K, cysteine, SAM (S-adenosylmethionine), *metK*

서 론

Monacolin-K는 균사형성 자낭균속의 한 종인 *Monascus sp.*로

부터 polyketide 생합성경로를 통해 합성되는 2차 대사산물로써 Lovastatin, Mevinolin, Mevacor 등으로도 알려져 있다(1).

Endo는 1979년에 *M. ruber*로부터 강력한 콜레스테롤 생합성 저해제인 Monacolin-K를 발견하였으며 monacolin-K와 유사한 구조를 갖는 다른 활성물질도 분리하였다(2). Monacolin-K에 대해서는 특히 연구가 진행되어 소량 투여로 각종 동물 (토끼, 개, 원숭이)의 혈중 콜레스테롤을 저하시킬 뿐 아니라 중증 콜레스테롤 혈증 환자에 대해서도 극히 유효한 것으로 보고되고 있

† Corresponding Author : School of Bioscience and Biotechnology,
Kangwon National University

Tel : +82-33-250-8547, Fax : +82-33-241-4627

E-mail : gtchun@kangwon.ac.kr

다(3). 특히 동맥경화 중에서도 LDL (low density lipoprotein) 콜레스테롤의 생성을 감소시키고, HDL (high density lipoprotein)의 생성을 증가시킴으로써 비정상적인 콜레스테롤의 수치를 정상 수치로 향상시키고 체내 콜레스테롤의 합성을 억제함으로써 혈중 콜레스테롤의 수치를 감소시키는 역할을 한다.

Table 1. Precursors used in fermentation processes

precursor	Product	Microorganism	Reference
Phenylacetic-acid related compounds	Penicillin G	<i>Penicillium chrysogenum</i>	(6)
Phenoxy acetic acid	Penicillin V	<i>Penicillium chrysogenum</i>	(7)
Chloride	Chlortetracycline	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	(8)
Chloride	Griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvin</i>	(9)
Tryptophan	Ergot alkaloid	<i>Claviceps sp.</i>	(10)
Leucine	Bacitracin	<i>Bacillus licheniformis</i>	(11)
Methionine	Cephalosporin C	<i>Cephalosporium acremonium</i>	(12, 13)
Nucleosides and bases	Nikkomycins	<i>Streptomyces tendae</i>	(14)
Dihydronevobionic acid	Diglydronevo-biocin	<i>Streptomyces sp.</i>	(15)
p-Hydroxycinnamate	Organomycin A and B	<i>Streptomyces organonensis</i>	(16)
DL- α -Amino butyric acid L-Threonine	Cyclosporin A Cyclosporin C	<i>Tolypocladium inflatum</i>	(17)
Tyrosine or p-hydroxy-phenylglycine	Dimethylvanco-mycin	<i>Nocardia orientalis</i>	(18)

콜레스테롤 저해제가 초기에 연구되었다. 그러나 이 경우에는 중간대사산물들이 체내에 축적되어 부작용을 나타내는 것으로 알려졌다. 따라서, 초기의 율속 단계인 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A) reductase에 의해 HMG-CoA로부터 mevalonate로 전환되는 반응을 저해하여 콜레스테롤의 생합성을 저하시키는 방법이 연구되었다. Monacolin-K는 HMG-CoA 환원효소에 대해 매우 효과적인 competitive inhibitor로 작용한다. 즉, monacolin-K의 구조가 HMG-CoA 환원효소의 기질인 HMG-CoA와 매우 유사하고 HMG-CoA 환원효소에 대한 친화도가 10,000배나 크기 때문에 HMG-CoA 환원효소와 미리 결합함으로써 콜레스테롤 생합성 속도를 제한하여 혈관 속의 콜레스테롤 수치를 효과적으로 감소시키게 된다(4)(Fig. 1).

일반적으로 대다수의 이차대사산물은 일차대사산물의 최종 대사물이거나 중간대사물인 precursor로부터 유도된다(5). 이는 이차대사산물 생합성에 필요한 기질 (substrate)을 공급해주는 일차대사의 활성을 조절해주는 기질이 생산균주의 이차대사활성에도 심각하게 영향을 미칠 수 있음을 암시한다. 아미노산이 주요한 precursor로 작용하며 그 외에도 다양한 종류의 precursor가 알려져 있다(6-11)(Table 1). Precursor는 생산균주의 생장에 이용되기 보다는 가능한한 직접적으로 이차대사산물 생합성에 이용되도록 다양한 배지공급전략을 통해 제공되어야한다(12). 이는 동일한 precursor를 놓고 일차대사와 이차대사의 경쟁이 가능하기 때문이다(5). 한 예로써, *S. clavuligerus*에 의한 cephamycin C 생합성시 precursor인 α -aminoadipate는 lysine으로부터 형성되며, 한편 lysine은 단백질합성을 위한 아미노산으로 이용되므로 lysine의 이차대사로의 이용 효율성이 cephamycin C의 생산성 증가에 매우 중요한 요소가 된다(13). 그러므로 원하는 이차대사산물의 수율을 높이기 위해 이와같은 precursor를 배지중에 첨가하는 방법이 있을 수 있으며 또한 유전자조작을 통해 cell pool 내에 원하는 precursor의 과다생합성을 유도하기 위한 다양한 시도가 최근들어 활발하게 진행되고 있는 실정이다(14, 15).

실험재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에서는 Monacolin-K 생산균주로서 자낭균에 속하는 *Monascus ruber*의 돌연변이주를 모균주로 사용하였다. 포자형성 배지인 PDA (potato dextrose agar) plate에 균주를 접종하여 28°C에서 7일간 배양한 후 20% glycerol이 포함된 증류수로 spore를 수거하여 여과한 후 잔여물을 제거한 포자들로 liquid stock을 만들고 -80°C deep freezer에 보관하였다.

성장배양은 7일간 PDA에서 배양한 spore들을 20% glycerol이 포함된 증류수로 수거하여 성장배지 (glucose 30 g/l, (NH₄)₂SO₄ 10 g/l, KH₂PO₄ 0.75 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/l, CaCl₂ 0.1 g/l, trace element solution 1 ml/l) 50 ml에 접종하였으며 이를 진탕배양기에서 28°C, 120 rpm으로 5일간 배양하였다. 생산배양은 성장배지에서 자란 mycelium을 생산배지 (glycerol 60 g/l, lactose 20 g/l, yeast extract 16 g/l, KH₂PO₄ 5 g/l) 30 ml에 10% (v/v)으로 접종하여 28°C, 230 rpm에서 10일간 배양하였다. 성장배양은 250 ml baffled flask를 이용하였고, 생산배양은 250 ml 일반 플라스크를 이용하였다.

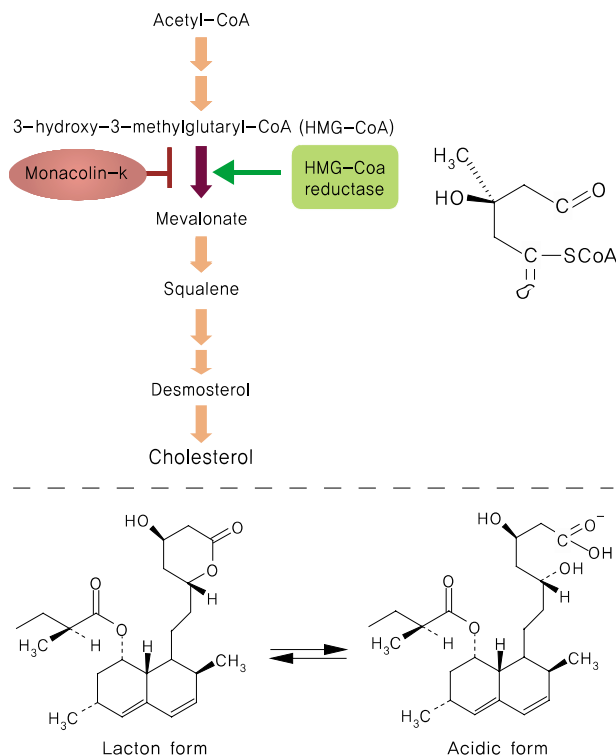


Figure 1. Monacolin-K, a potent competitive inhibitor of HMG-CoA reductase, resembles 3-hydroxyl-3-methylglutaryl CoA, the substrate for HMG-CoA reductase.

콜레스테롤의 생합성 과정에는 25개 이상의 효소가 작용하는데 이 중에서 마지막 단계에 관여하는 효소인 desmosterol 환원 효소에 의해 축대되는 desmosterol의 sterol로의 전환을 저해하는

Monacolin-K 추출 및 정량분석

M. ruber 배양액을 homogenizer로 균일화 시킨 후 sample로 취한 10 ml에 동량의 acetone을 첨가하여 완전히 혼합한 후에 12시간 동안 200 rpm, 28℃의 진탕 배양기에서 배양한 후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 monacolin-K를 포함하고 있는 1 ml의 상등액을 취했다. HPLC 분석을 위한 전처리 과정으로 이 상등액을 15,000 rpm에서 10분간 다시 원심분리한 후 얻은 상등액을 0.2 μm의 microfilter를 통과시켜 sample을 만들고 이를 이용하여 monacolin-K의 농도를 정량 분석하였다. Monacolin-K lactone form의 표준용액으로는 순수한 mevinolin을 농도별로 methanol에 용해시켜 사용하였고, acidic form인 mevinolinic acid 표준용액은 6 ml의 methanol에 4.5 mg의 lactone form mevinolin을 녹이고 0.1 M NaOH 15 ml을 가한 뒤 20분 동안 sonication하고 1시간동안 50℃에서 가열한 후, 0.1 M HCl을 더하여 pH를 7.7로 조정하면서 methanol로 최종 volume이 30 ml이 되도록 하여 0.2 μm의 microfilter로 여과하여 얻었다(18). HPLC 운전조건은 다음과 같다 : column은 Mightysil RP-18 GP 250-4.6 (5 μm) (Kanto chemical co. INC.)을 사용하였고, mobile phase는 methanol과 ortho-phosphoric acid를 77.5대 22.5 비율로 혼합하여 사용하였으며 유속은 1.2 ml/min로 하였다. Column 온도는 40℃로 고정하였고, UV absorbance detector (Younglin Co., Korea)를 이용하여 238 nm에서 시료 내의 monacolin-K를 검출하였다.

발현벡터

본 연구에서는 발현벡터로 pBARGPE1을 이용하였다(Fig. 2).

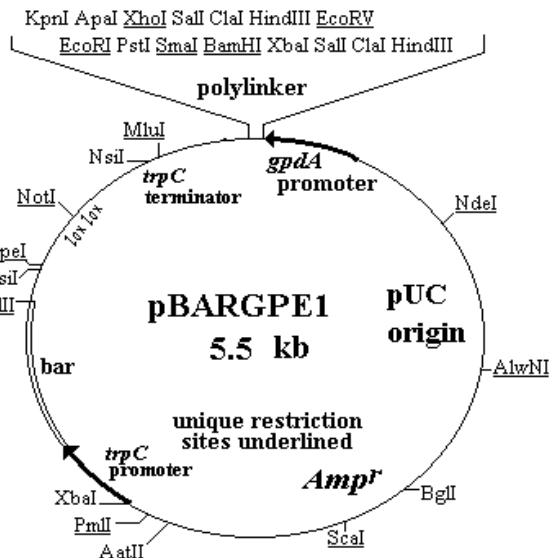


Figure 2. The map of pBARGPE1 (5.5 kb) containing bar gene as a selective marker.

원형질체의 형성

포자형성 배지에서 7일간 배양하여 형성된 포자를 수거하여 고체 최소배지에 도달하고 37℃에서 72시간 동안 배양하였다. 고체 최소배지에서 자란 균사체를 다시 액체 최소배지에 접종하여 36 시간 동안 진탕배양한 후 배지성분 등의 잔여물을 여과시켜 얻은 균사체를 0.6 M KCl로 두 번 세척한 후 균사체 1 g (wet weight)을 측정하고 OM-A buffer (1.2 M MgSO₄, 10 mM

phosphate buffer, pH 5.8) 5 ml과 2% Novozyme 234를 첨가하여 28℃, 80 rpm에서 2~3시간동안 반응시켜 원형질체를 형성하였다. 형성된 원형질체는 trapping buffer (0.6 M sorbitol, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0) 10 ml을 이용하여 회수하였고 STC buffer (1.2 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)로 세척하여 원형질체만을 회수하였다.

REMI method를 이용한 형질전환

STC buffer 1 ml에 2×10⁷ protoplasts를 현탁하여 원형질체를 준비하고 도입하고자 하는 재조합 발현벡터를 제한효소 처리하여 linear 형태로 만든 후 그중 10 μl를 protoplast 현탁액 100 μl와 혼합하여 ice에 10분간 방치하였다. 여기에 40% PEG 4000을 포함하는 STC buffer 800 μl를 혼합하고 생산균주의 chromosomal DNA를 random하게 절단하고자 발현벡터와 같은 제한효소를 20~40 unit 첨가하여 ice에 10분간 방치하였다. 이 혼합액 100 μl를 5 ml의 재생배지 (1.2% agar, 1.2 M sorbitol)에 첨가하여 bottom agar (2% agar, 1.2 M sorbitol)에 pour plating 하였다. 37℃에서 4시간 배양하여 세포를 재생시킨 후 그 위에 최종 농도가 50 μg/ml이 되도록 하는 PPT를 도말 하였다.

결과 및 고찰

cysteine 첨가에 의한 Monacolin-K 생산성 증가

앞서 언급한 대로 배지에 아미노산을 첨가하면 배양액 내에서 탄소원과 질소원으로 이용되는 아미노산이 polyketide pathway에 의해 생합성되는 monacolin-K에 다양한 종류의 전구체를 제공할 것이라 판단하여 생산배지에 20가지 아미노산 (Table 2)을 2 g/L와 6 g/L농도로 각각 첨가하였다. 배양결과 cysteine을 2 g/L 농도로 첨가했을 경우 아미노산을 첨가하지 않은 대조군에 비해 monacolin-K 생산성이 증가했을 뿐 아니라 monacolin-K의 lactone form이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3). 선형 실험결과 생산균주에 의해 monacolin-K는 acidic form으로 생산되며 일부만이 lactone form으로 생산되는 결과를 볼 수 있었는데, cysteine을 2 g/L 농도로 첨가했을 경우 monacolin-K의 lactone form이 증가하는 주목할 만한 결과를 관찰할 수 있었다. Monacolin-K의 lactone form이 acidic form보다 더 안정적이기 때문에 본 현상은 생산성에 긍정적인 효과를 줄 것이라 생각할 수 있었다. 따라서 아미노산 첨가실험 결과 제일 좋은 효과를 보였던 cysteine을 생산배지에 다양한 농도로 첨가하여 cysteine의 생산성 증가 효과를 조사하였다. cysteine을 0.5~1.5 g/L 농도로 첨가했을 경우가 첨가하지 않은 대조군에 비해 생산성이 뚜렷하게 증가하고 lactone form의 양도 동시에 증가하는 결과를 관찰하였으며, 특히 cysteine을 1.5 g/L 농도로 첨가했을 경우 안정적으로 가장 높은 생산성을 보여주었다(Fig. 4).

Cysteine을 첨가했을 때 이와 같이 monacolin-K의 생산성이 증가하는 이유를 1차대사의 중간산물인 SAM (S-adenosylmethionine)과 관련지어 추측하였다. 일반적으로 SAM은 세포내 methyl기나 methylene을 제공해주는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 monacolin-K 구조에 있는 methyl기 역시 SAM에서 유래하는 것으로 발표된 바 있다(16). 한편 SAM은 methionine

adenosyltransferase에 의해 ATP와 methionine으로부터 생합성되며(17), 이러한 SAM과 cysteine이 sulfur의 동화작용에 관련되어 있을 것이라는 연구결과를 Fig. 5에 제시하였다(18). 본 연구결과 관찰된 cysteine에 의한 monacolin-K 생산성 증가 효과로부터 첨가된 cysteine이 여러 단계를 거쳐 methionine이 되고 이것은 methionine adenosyltransferase에 의해 SAM으로 전환된 것으로 추측하였다. 따라서 cysteine이 SAM의 전구체 역할을 하게 되고 이로 인해 monacolin-K의 생합성이 증가된 것으로 가정하였다.

Table 2. Various amino acids supplemented into production medium

1	Alanine	11	Leucine
2	Arginine	12	Cystein
3	Aspartate	13	Methionine
4	Asparagine	14	Phenylalanine
5	Lysine	15	Proline
6	Glutamate	16	Serine
7	Glutamine	17	Threonine
8	Glycine	18	Tryptophan
9	Histidine	19	Tyrosine
10	Isoleucine	20	Valine

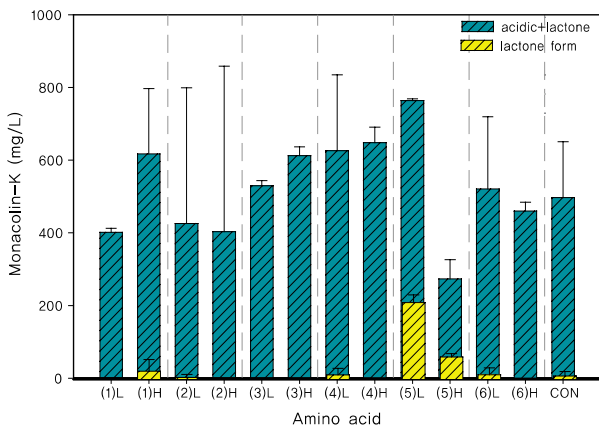


Figure 3. Effect of various amino acids supplemented into the brown rice production medium on the monacolin-K production.

(1): glutamate, (2) glycine, (3): isoleucine, (4): leucine, (5): cysteine, (6): tyrosine, L: 2 g/L, H: 6 g/L.

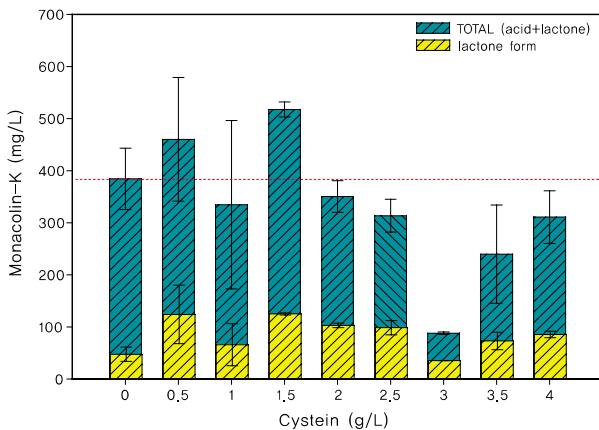


Figure 4. Effect of concentration of cysteine supplemented into the production medium on the monacolin-K production. (Various concentrations of cysteine were added into the production medium at the start of fermentation.)

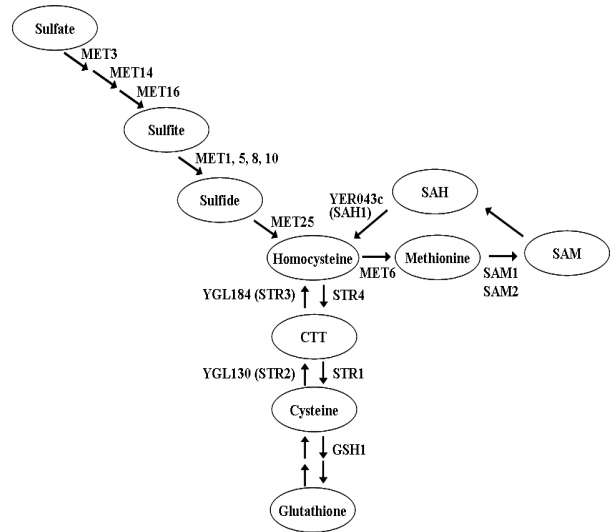


Figure 5. Schematic representation of the biochemical step involved in sulfur assimilation, biosynthesis of methionine, SAM, cysteine and glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*, and the genes that coded the corresponding enzymes. CTT, cystathionine; SAH, S-adenosylhomocysteine; SAM S-adenosylmethionine (Hansen. J *et al*, 2000).

유전자 도입을 통한 재조합 생산균주 개발

지속적인 rational screening을 통해 생산 균주의 monacolin-K 생합성 능력이 매우 활성화 되어있고, 생산배지의 성분과 농도가 최적화 되어있는 상태에서 첨가한 cysteine이 precursor 역할을 하는 것으로 볼 수 있었다(19). 첨가한 cysteine의 많은 부분이 탄소원과 질소원으로 사용되기 보다는 monacolin-K의 생합성과 관련된 SAM을 합성하는데 주로 사용되었을 것이라는 가정에 비추어 볼 때, monacolin-K 고생산성 균주 스스로 SAM을 과량 생합성하게 된다면, 생산배지에 cysteine의 별도 첨가 없이도 첨가했을 경우와 마찬가지로 monacolin-K 생산성이 증가될 수 있을 것으로 기대되었다. 따라서 본 연구에서는 SAM을 합성하는 효소인 SAM synthetase를 encoding하는 metK 유전자를 생산균주에 도입함으로써 재조합 형질전환균주를 개발하고자 하였다.

SAM synthetase는 많은 생물체에서 methionine으로부터 SAM을 생합성하는 효소이며, SAM synthetase 유전자는 다양한 생물체에서 밝혀져 있다. 그러나 본 연구에서 monacolin-K의 생산 균주로 이용하는 *M. ruber*의 경우 아직까지 SAM synthetase에 대해 밝혀진 것이 없으므로 *M. ruber*와 같은 자낭균류 중에서 SAM synthetase의 유전자 염기서열이 밝혀져 있는 *Aspergillus nidulans*의 SAM synthetase를 이용하여 SAM 유전자 (metK)를 클로닝 하고자 하였다.

*A. nidulans*의 경우 metK 유전자 (약 1.2 kb)에 의해 SAM synthetase가 합성된다. chromosomal DNA로부터 PCR을 이용하여 metK 유전자를 증폭하고 발현벡터인 pBARGPE1에 삽입 하였으며 벡터의 polylinker 앞에 있는 *A. nidulans* 유래 gpdA promoter를 생산균주인 *M. ruber*의 gpd promoter로 교체하여 재조합 발현벡터 pBMmetK를 제작하였다(Fig. 6). 발현벡터는 selectable marker로 phosphinothricin 저항성 유전자 (bar)를 포함하여 세포내 도입 시 phosphinothricin (PPT)에 대한 저항성을 갖는다. 이는 PPT가 glutamic acid의 유사체로 glutamine의 합성을 저해하게 되는데 *Streptomyces hygroscopicus*로부터 분리된 PPT 저항성 유전자 산물 (phosphinothricin acetyltransferase)이

PPT를 불활성화 시키기 때문이다. 형질전환 후 모균주로부터 형질 전환체를 선별하고자 PPT의 최소저해농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정된 결과 50 ppm으로 나타났다(Fig. 7). 생산균주의 원형질체를 형성하고 REMI method(20, 21)에 의해 발현벡터를 도입하여 형질전환 하였다. 앞서 결정된 MIC에서 PPT에 저항성을 갖는 형질전환체를 선별하였고(Fig. 8) 선별한 PPT 저항성 균주와 모균주의 monacolin-K 생산성을 확인한 결과 100~1000 mg/L에 이르는 생산성을 나타냈다(Fig. 9). 형질 전환체와 대조균의 monacolin-K 생산성을 확인한 결과 대조균에 비해 형질전환체에서 monacolin-K 생산성이 약 3.3배가량 증가한 것을 관찰할 수 있는데 이는 *metK* 유전자가 생산균주의 DNA 내로 삽입되어 안정적으로 발현됨으로써 세포내에서 많은 methyl기를 제공함으로써 monacolin-K 생산성이 향상된 것으로 판단된다. 현재는 분자적 수준에서 이러한 형질전환체 내에서 *metK* 유전자의 발현정도를 확인하는 중이다.

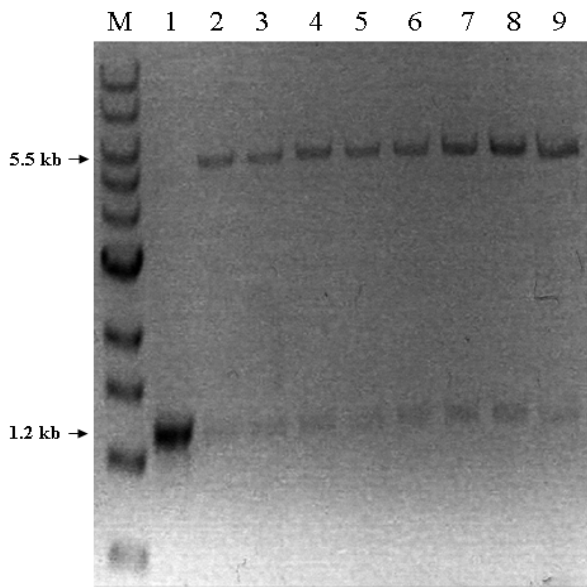


Figure 6. The pBMmetK vector linearized with the restriction enzymes (*Bam*HI, *Nde*I) and analyzed on agarose gel. Lane M : 1 kb ladder; lane 1 : *M. ruber* *gpdA* promoter; lane 2~9 : the pBMmetK vector linearized with the above restriction enzymes.

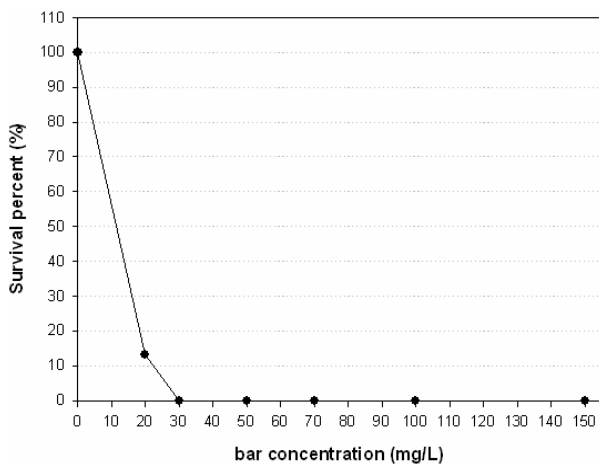


Figure 7. Survival percent of *Monascus* according to concentration of PPT (bar).

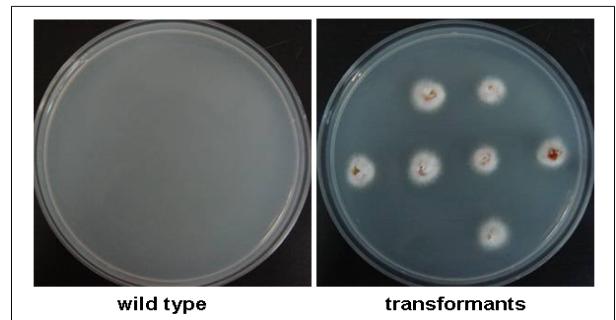


Figure 8. Photographs of survived colonies.

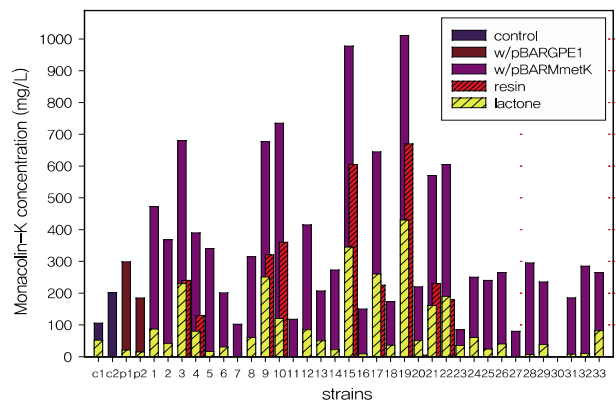


Figure 9. Monacolin-K production of the putative transformants (w/pBMmetK) harboring the pBMmetK vector.

요약

Monacolin-K는 *Monascus* sp.로부터 polyketide pathway를 통해 생합성 되는 이차대사산물로서 강력한 콜레스테롤 저해제로 알려져 있다. 본 연구에서는 monacolin-K의 생합성 경로에 대한 이해에 근거한 지속적인 rational screening을 통해 monacolin-K의 생산성을 향상시킬 수 있었는데 그 중에서 특히 monacolin-K 생합성에 관련된 전구체를 최적화된 생산배지에 첨가함으로써 monacolin-K 생산성이 대조균에 비해 눈에 띄게 증가하는 결과를 확인하였다. 황의 동화작용에서 cysteine이 여러 단계를 거쳐 S-adenosylmethionine (SAM)으로 전환된다는 연구결과와 더불어, SAM은 다양한 세포내에서 주된 methyl donor 역할을 하므로 monacolin-K 구조에 포함되어있는 많은 methyl기 역시 SAM으로부터 유래한다고 알려져 있다. 따라서 첨가한 cysteine이 SAM을 생합성하는데 이용된 것으로 보고 SAM을 생산균주 내에서 고농도로 생산한다면 monacolin-K 생산성이 증가할 것이라 기대하였다. 따라서 여러 균주에서 보고된 SAM synthetase 유전자를 cloning하여 생산균주 내로 도입함으로써 생산균주가 cysteine의 별도첨가 없이도 세포내에서 SAM을 고농도로 생산하도록 하여 monacolin-K의 생산성을 향상시키고자 하였다. 이를 위해 염기서열이 밝혀진 균사형성 곰팡이인 *Aspergillus nidulans*로부터 SAM synthetase를 암호화하는 *metK* 유전자를 cloning하고 *Monascus* 유래의 *gpdA* promoter에 의해 발현되도록 하는 재조합 발현벡터 pBMmetK를 제작하였고 이를 생산균주 내로 도입하여 형질전환체와 대조균의 monacolin-K 생산성을 확인한 결과, 대조균에 비해 형질전환체

에서 Monacolin-K 생산성이 약 3.3배가량 증가한 것을 관찰하였다. 이는 *metK* 유전자가 생산균주의 DNA 내로 삽입되어 안정적으로 발현됨으로써 세포내에서 많은 methyl 기를 제공함으로써 monacolin-K 생산성이 향상된 것으로 판단되며, 현재는 분자적 수준에서 이러한 형질전환체 내에서 *metK* 유전자의 발현 정도를 확인하는 중이다.

감 사

본 연구는 2단계 BK21 사업, 강원대학교 생명공학연구소와 전북대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구센터의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Endo A. (1979), Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species, *J. Antibiot.* **32**, 852-854.
- Endo, A. (1980), Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, *J. Antibiot.* **33**, 334-336.
- Endo, A. (1985), Compactin (ML-236B) and related compound as potential cholesterol-lowering agents that inhibit HMG-CoA reductase, *J. Med. Chem.* **28**, 401-405.
- Alberts, A. W., J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Albers-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, and J. Springer (1980), Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3957-3961.
- Drew S. W. and A. L. Demain (1977), Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 343-356.
- Moyer A. J. and R. D. Coghill (1947), The effect of phenylacetic acid on penicillin production, *J. Bacteriol.* **53**, 329-341.
- Krupinski V. M., J. E. Robbers, and H. G. Floss (1976), Physiological study of ergot: induction of alkaloid synthesis by tryptophan at the enzymatic level, *J. Bacteriol.* **125**, 158-165.
- Haavik H. I. and F. Froyshov (1982), In Peptide Antibiotics-Biosynthesis and Functions, H. Kleinkauf and H. von Doren, editors, pp155-159, Walter de Gruyter, Berlin/NY.
- Eiki H., I. Kishi, T. Gomi, and M. Ogawa (1992), In Harnessing Biotechnology for the 21st Century, M.R. Ladisch, and A. Bose, editors, pp223-227, American Chemical Society, Washington.
- Kobel H. and R. Traber (1982), Directed biosynthesis of Cyclosporins, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 237-240.
- Boeck L. D., F. D. Mertz, R. K. Wolter, and C. E. Higgins (1984), N-demethylvancomycin, a novel antibiotic produced by a strain of *Nocardia orientalis*, *J. Antibiot.* **37**, 446-453.
- Vining L. C. (1970), Effect of tryptophan on alkaloid biosynthesis in cultures of a *Claviceps* species, *Can. J. Microbiol.* **16**, 473-480.
- Aharonowitz Y. (1986), In Regulation of Secondary Metabolite Formation, Workshop Conferences Hoechst vol. 16, H. Kleinkauf, H. von Doren, H. Dornauer, and G. Neesemann, editors, pp89-101, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim-Deerfield Beach, Florida-Basel.
- Elander R. P. (1989), In Fermentation Process Development of Industrial Organisms, J. O. Neway, editor, pp169-220, Marcel Dekker, New York.
- Martin J. F., T. D. Ingolia, and S. W. Queener (1990), In Molecular Industrial Mycology, Systems and Applications for Filamentous Fungi, S. A. Leong and R. M. Berka, editors, pp149-196, Marcel Dekker, New York.
- Friedrich, J., M. Zuzek, M. Bencina, A. Cimerman, A. Strancar, and I. Radez (1995), High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin and mevinolinic acid in fermentation broths, *J. Chromatography* **704**, 363-367.
- Lu S. C. (2000), S-adenosylmethionine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 391-395.
- GroBmann K., K. Herbster, and M. Mack (2000), Rapid cloning of *metK* encoding methionine adenosyltransferase from *Corynebacterium glutamicum* by screening a genomic library on a high density colony-array, *FEMS Microbiol. Lett.* **193**, 99-103.
- Hansen J. and P. F. Johannesen (2000), Cysteine is essential for transcriptional regulation of the sulfur assimilation genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet* **263**, 535-542.
- Schiesle R. H. and T. D. Peters (1991), Integration of DNA fragments by illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 7585-7589.
- Xu J., M. H. Mo, X. W. Huang, and K. Q. Zhang (2005), Improvement on genetic transformation in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* and its quantification on dung samples. *Mycopathologia* **159**, 533-538.