

시아노박테리아의 세포외산물에 대한 연구

1권 종 희 · † 2김 기 은

¹베를린 공과대학 생물공학과, ²서경대학교 생물공학과

(접수 : 2007. 11. 27., 게재승인 : 2008. 8. 21.)

Extracellular Products from Cyanobacteria

Jong-Hee Kwon¹ and Gi-Eun Kim^{2†}

¹Fachgebiet Technische Bioverfahrenstechnik Institut für Biotechnologie Technische Universität Berlin, Ackerstrasse 71-76, Berlin

²Department of Biotechnology, Seokyeong University, 16-1, Jungeung-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-704, KOREA

(Received : 2007. 11. 27., Accepted : 2008. 8. 21.)

Cyanobacteria have been identified as one of the most promising group producing novel biochemically active natural products. Cyanobacteria are a very old group of prokaryotic organisms that produce very diverse secondary metabolites, especially non-ribosomal peptide and polyketide structures. Though many useful natural products have been identified in cyanobacterial biomass, cyanobacteria produce also extracellular proteins related with NRPS/PKS. Detection of unknown secondary metabolites in medium was carried in the present study by a screening of 98 cyanobacterial strains. A degenerated PCR technique as molecular approaches was used for general screening of NRPS/PKS gene in cyanobacteria. A putative PKS gene was detected by DKF/DKR primer in 38 strains (38.8%) and PCR amplicons resulted from a presence of NRPS gene were showed by MTF2/MTR2 primer in 30 strains (30.6%) and by A3/A7 primer in 26 strains (26.5%). HPLC analysis for a detection of natural products was performed in extracts from medium in which cyanobacteria containing putative PKS or NRPS were cultivated. CBT57, CBT62, CBT590 and CBT632 strains were screened for a production of extracellular natural products. 5 pure substances were detected from medium of these cyanobacteria.

Key Words : cyanobacteria, extracellular product, secondary metabolite, non ribosomal peptide, etc.

서 론

수십 년간 의약학 분야의 주요 원료로 사용되어 왔던 육상 미생물과 식물에서 얻어지는 이차대사물질은 그 범위와 생물학적 활성에 있어서 한계에 이르렀으며 또한 이들로부터 발견되는 천연물질 (natural products)의 (이하 NPs) 중복율은 95%에 달하고 있다. 현재까지 인류에게 알려진 질병의 3분의 1 정도 만이 사용 및 적용 가능한 제약으로 치료 가능하며 그 중 항미생물기능집의 약제들은 자연계에서 그 내성의 증가로 인해 효능 또한 감소하고 있는 추세이다. 결국 상당수의 질병들은 아직 까지도 완전한 치료가 불가능하며, 기존의 항생제에 대한 내성을 얻은 미생물로 인한 질병의 위험성이 1990년 이래로 증가하고 있고, 그 범위가 확대되고 있다(3). 따라서 세계적으로 새로운

의약품 원료물질에 대한 연구와 개발은 현대 의학 산업에서 절실히 요구 되어지고 있다. 의학적으로 중요한 가치를 지닌 NPs는 non-ribosomal peptide synthetase (이하 NRPS)와 polypeptide synthetase (이하 PKS) 모듈 시스템에 의해서 합성 된다.

녹조류로 더 많이 알려진 시아노박테리아는 가장 대표적인 NRPS/PKS 관련 펩타이드를 생산하는 균주로써 수십 억년의 진화과정 속에서의 얻어진 유전적인 분화는 NRPS와 PKS 시스템에 다양성을 부여하였다. 지금까지, 마이크로시스템 같은 독성 물질의 생산으로 그 연구가 제한적이었던 시아노박테리아는 최근 의학적으로 가장 다양한 화학적 구조와 수많은 생화학적 활성을 가진 NPs를 생산하기 위한 소스로 여겨지고 연구되고 있다(5). 시아노박테리아는 헤파토톡신 (hepatotoxin) 같은 독성 물질을 포함해서 넓은 범위의 구조적으로 다양한 이차대사물질을 생산한다. 지금까지 약 1000여 가지의 신물질들이 시아노박테리아로부터 추출되었고 다양한 생화학적 활성을 나타내고 있다(3). 그러나 대부분의 novel drug에 대한 시아노박테리아의 연구는 세포내 단백질 (intracellular proteins)에 국한되어 있었다. 그러므로 이번 연구에서는 시아노박테리아가 생산하는 세포

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, Seokyeong University, 16-1, Jungeung-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-704, KOREA
Tel : +82-2-940-7154, Fax : +82-2-919-0345
E-mail : gkeun@skuniv.ac.kr

외단백질 (extracellular proteins)에 대한 연구방법을 모색하고 특성화 하였다. NRPS/PKS에 관련된 유전자를 탐지하는 degenerated primers가 분자유전학적 스크리닝을 위하여 사용되었고 HPLC를 통해 정성분석이 이루어졌다.

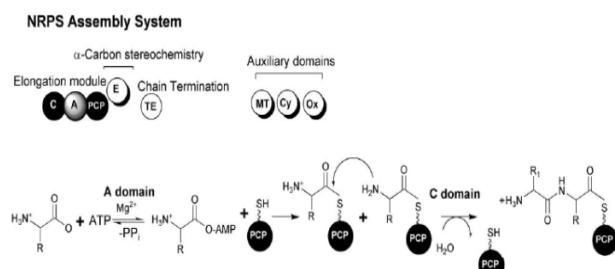


Figure 1. The Strucure of the NRPS modules and its mechanism C: condensationdomain, A: adenylation domain, PCP: peptidyl carrier protein, E: epimerase domain, TE: thioesterase, MT: methyl transferase, Cy: cyclization domain, Ox: oxidoreductase domain.(10)

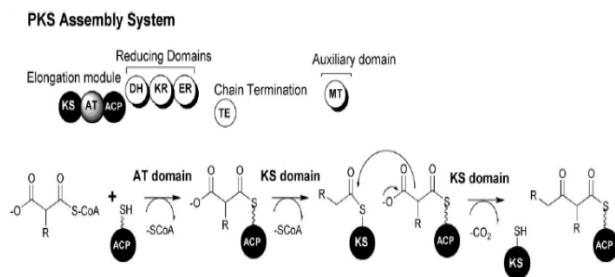


Figure 2. The Structure of PKS module and its mechanism KS: ketosynthase, AT: acyl transferase, ACP: acyl carrier protein, DH: dehydratase, KR: ketoreductase, ER: enoyl reductase, TE: thioesterase, MT: methyl transferase(10).

재료 및 방법

시아노박테리아와 배양

시아노박테리아에서 제공된 98개의 균주들이 이번 실험에서 선별되었고, BG11 배지를 사용하여 25°C에서 광배양 (대략 1500lx) 되었다. 총 DNA를 추출하기 위해서 3주 동안 500 ml 플라스크에서 교반 배양되었다. 균주의 농도는 Beckman spectrometer DU-50 (Beckman instruments, Fullerton, USA)에 의해서 750 nm에서 측정 되었다.

DNA 추출 PCR 분석

시아노박테리아의 전체 DNA는 SDS/lysozyme 방법에 의해서 추출된다(10). NRPS/PKS 유전자의 유무는 degenerate primers에 의한 PCR 증폭에 의해서 조사되었다. NRPS gene의 탐침에는 MTF2/MTR2와 A3/A7 degenerate primers 쓰여졌고 PKS 유전자에는 DKF/DKR degenerate primer가 관련 유전자의 증폭과 탐지를 위해 사용되었다(11, 12). MTF2/MTR2와 DKF/DKR의 경우에는 증류수 7 μl 이외에 Taq polymerase Mix, 10 μl; DNA, 1 μl; 정방향 primer, 1 μl; 역방향 primer, 1 μl가 들어간다. PCR 반응은 94°C로 5분간의 분리과정을 거친 후 증폭 과정으로 94°C, 30초 55°C, 30초 72°C 1분을 30회 시행하였으며 72°C, 10분과 10°C로 마무리 되었다. A3/A7의 경우에는

증류수 1 μl 이외에 Taq polymerase Mix, 10 μl; DNA, 1 μl; 정방향 primer, 4 μl; 역방향 primer, 4 μl가 들어간다. PCR 반응은 94°C로 5분간의 분리과정을 거친 후 증폭과정으로 denaturation 94°C, 30초 annealing 40°C, 30초 extension 72°C 1분을 30회 시행하였으며 72°C, 10분과 10°C로 마무리 되었다

Table 1. The degenerated primers (IUPAC ambiguity codes: M, AC; R, AG; Y, CT; D, AGT; N, ACGT)used for the identification of NRPS/PKS genes in direct/reverse direction

DKF	5'-GTGCCGGTNCCRTGNGYYTC-3'
DKR	5'-GCGATGGAYCCNCARCARMG-3'
MTF2	5'-GCNGGYGGYGCNTAYGTNCC-3'
MTR2	5'-CCNCGDATYTTNACYTG-3'
A3 forward	5'-ATYTAYACITCIGGYTCIACIGG-3'
A7 reverse	5'-TAARTCICCICTYTTRTAIA-3'

16S rDNA-PCR 분석

PCR Screening과 HPLC 정성분석을 통하여 선별되어 지는 균주가 알려지지 않은 경우 16S rDNA-PCR을 통해서 동정하였다. 시아노박테리아의 16S rRNA 유전자를 27F (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') und 1492R (5'-GGYTACCTTGTACGACTT-3')을 이용하여 PCR로 증폭하여 서열분석하고 그 결과를 BLAST (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)에 적용하여 비교 분석하였다. PCR 반응은 96°C로 2.5분간의 분리과정을 거친 후 증폭과정으로 96°C, 30초 53°C, 30초 72°C 3분을 30회 시행하였으며 72°C, 10분과 10°C로 마무리 하였다.

배지의 고체상 추출 (Solid Phase Extraction)

시아노박테리아는 2 L까지 배양 되었고 CO₂가 멀균필터를 통해 탄소원으로써 공급되었다. 배양액에서 시료를 채취하여 원심분리를 통해 시아노박테리아의 균체를 분리하였다. 세포가 분리된 배지는 고체상추출 (Solid Phase Extraction, 이하 SPE)을 하기 위해서 PD10-Column 또는 PD5-Column (Pharmacia GmbH, Erlangen)에 로딩되었다. 배지의 로딩 후 20% 메탄올에 의해서 탈염되었고 50%와 80%의 메탄올에 의해서 세포외부단백질 (extracellular proteins)은 펌프를 사용하여 추출되었다. 이 과정을 통해서 낮은 분자량의 이온성 물질들이 분리되고 HPLC를 통한 정성 분석의 해상도가 향상될 수 있다.

HPLC을 통한 배지의 정성분석

추출액은 회전농축기 (rotary evaporator)에 의해서 4 ml까지 농축 되고 다시 진공 원심농축기 (vacuum centrifugal evaporator)에 의해서 건조된다. 그 다음 20% 메탄올에 용해시킨 후, 13,000 rpm으로 10분간 원심 분리한다. 상층액은 CE-membrane (pore size 0.45 μl)를 통해서 필터 되어지고 그 다음 HPLC에 의해서 분석된다. HPLC (analytical HPLC)로 배지 추출액의 정성분석이 이루어졌고 다시 HPLC (preparative HPLC)에 의해서 분리 정제되었다. 분석 HPLC에서는 모든 균주에 대해서 42분 동안 15%~55%의 아세تون이트릴로 증류수에 대해서 gradient 되었고, 2.5 ml/min의 속도로 65분간 분석되었다. 각각 UV 검출기에서는 흡광도를 (200 nm와 238 nm) 측정하게 되며 측정된 흡광도는 전기적 신호로 바뀌어서 컴퓨터에 저장된다.

Table 2. The used HPLC apparatus

Type	HPLC	Column
analytical HPLC	CTO-10AC VP Shimadzu	Symmetry shield™ PR18 5 μm 10 x 250 mm steel column Part No, WAT 248000
	ELSD-LT Shimadzu LCMS-2010A	Discovery Bio Wide Pore C18 HPLC column 25cm x 10 mm 5 μm
preparatory HPLC		

결과

PCR 스크리닝

총 98 개체의 시아노박테리아에서 NRPS/PKS 유전자를 확인하기 위해 3가지 디제너레이티드 프라이머 (degenerated primers)를 사용하여 분석하였다.

실험된 38개의 균주에서 putative PKS 유전자는 DKF/DKR degenerated primer를 사용하여 검출하였다. NRPS 유전자의 존재는 MTF2/MTR2 degenerated primer와 A3/A7 degenerated primer를 사용하여 확인될 수 있다. 30개의 균주를 MTF2/MTR2 degenerated primer를 사용하는 방법으로 선택하였고, A3/A7 degenerated primer를 사용하는 방법으로는 26개의 균주가 선별되었다.

Microcystis aeruginosa PCC 7806에서 MTF2/MTR2와 A3/A7 degenerated primer의 결합위치를 확인한 결과 A3/A7 degenerated primer는 MTF2/MTR2 degenerated primer에 의해서 중복되는 유전자 서열의 안쪽 영역을 중복시켰다. 원래 두가지 degenerate primer들이 중복시키는 부분이 유사한 부분은 있지만, 실험에 의하면 PCR analysis의 분포와 결과는 균주에 따라 다르게 나타났다.

Table 3. PCR screening of 3 primers, DKF/DKR, MTF2/MTR2 and A3/A7

Stem-Nr.	MTF2/MTR	DKF/DKR	A3/A7	Stem-Nr.	MTF2/MTR	DKF/DKR	A3/A7	Stem-Nr.	MTF2/MTR	DKF/DKR	A3/A7
CBT 7	+	+	+	CBT 257	-	-	-	CBT 654	+	-	+
CBT 41	+	+	-	CBT 259	-	-	-	CBT 657	-	-	-
CBT 43	-	+	+	CBT 552	-	-	-	CBT 658	+	-	+
CBT 45	+	+	+	CBT 554	-	-	-	CBT 660	+	-	+
CBT 46	-	-	-	CBT 558	+	+	+	CBT 661	+	+	-
CBT 48	-	-	-	CBT 559	-	+	-	CBT 662	+	-	+
CBT 49	-	+	-	CBT 589	-	+	-	CBT 664	-	-	-
CBT 51	-	-	-	CBT 590	-	-	-	CBT 666	-	-	-
CBT 55	+	+	+	CBT 591	-	-	+	CBT 667	+	-	-
CBT 57	-	-	-	CBT 596	-	-	-	CBT 668	+	+	-
CBT 59	-	-	-	CBT 597	-	+	+	CBT 669	-	-	-
CBT 60	-	+	-	CBT 605	-	-	-	CBT 670	-	-	-
CBT 62	-	+	-	CBT 608	+	+	+	CBT 675	+	+	+
CBT 69	-	-	-	CBT 610	+	+	+	CBT 676	+	-	+
CBT 71	-	-	-	CBT 615	+	+	+	CBT 678	-	-	-
CBT 74	-	+	-	CBT 616	-	-	+	CBT 679	-	-	-
CBT 75	+	+	-	CBT 617	-	-	-	CBT 680	-	-	-
CBT 144	-	-	-	CBT 619	-	+	-	CBT 681	-	-	+
CBT 156	-	+	-	CBT 631	+	+	+	CBT 682	-	-	-
CBT 196	+	+	-	CBT 632	-	+	-	CBT 684	-	-	-
CBT 202	-	+	-	CBT 635	+	+	+	CBT 685	-	-	-
CBT 203	-	-	+	CBT 637	-	-	-	CBT 686	-	-	-
CBT 205	-	-	-	CBT 638	-	-	-	CBT 687	-	-	-
CBT 212	-	-	-	CBT 642	+	+	+	CBT 688	+	-	-
CBT 217	+	+	+	CBT 643	-	-	-	CBT 689	-	-	-
CBT 219	-	-	-	CBT 644	-	-	-	CBT 690	-	-	-
CBT 227	-	+	-	CBT 645	+	+	+	CBT 692	-	-	-
CBT 233	+	+	-	CBT 646	-	-	-	CBT 693	+	-	-
CBT 237	-	-	-	CBT 647	+	+	+	CBT 695	-	-	-
CBT 245	-	+	-	CBT 648	+	+	+	CBT 697	-	+	-
CBT 251	-	+	-	CBT 649	-	-	-	CBT 698	-	-	-
CBT 252	-	-	-	CBT 651	+	+	+	CBT 699	-	-	-
CBT 253	-	-	-	CBT 652	-	-	-				

Figure 3. MTF2/MTR2 and A3/A7 primer-binding position in gene sequence in *Microcystis aeruginosa* PCC 7806.

SPE & 정성분석

배양과정에서 생산되는 세포외부물질의 여부를 배양 후 세포들을 제거하고 남는 배지를 분석한 결과, CBT57, CBT62, CBT590 and CBT632 균주들이 extracellular product의 생산을 위한 균주로 선별되었다. 세포외물질들이 검출된 CBT57, CBT62, CBT590 and CBT632 균주들이 세포외 산물 (extracellular product)의 생산을 위한 균주로 선별되었다. CBT62와 CBT632는 DKF/DKR degenerated primer와 degenerated PCR screening에 의해서 선별되었지만 CBT57와 CBT590은 어느 degenerated primer에 의해서도 검출되지 않았다. MTF2/MTR2와 A3/A7 degenerated primers에 의해서 선택되는 균주들은 세포내부물질 (intracellular) 관련 NPs를 생산하는 것이 확인되었지만 그 균주의 배지에서는 관련 생산물을 찾지 못하거나 아주 낮은 농도로 발견되었다. 대략 5가지 정도의 물질들이 배지에서 검출되었다.

16S rDNA-PCR을 이용한 군주 동정

세포외부단백질 (extracellular proteins)을 생산하는 균주, CBT62, CBT590 CBT632는 16S rDNA-PCR 분석에 의해서 동정되었다.

Table 4. Analysis about unknown cyanobacteria was performed by sequencing PCR products for 16S rRNA. Gene sequence amplified by 16S rRNA-DNA primer was compared with 16S rRNA sequence of known strains by BLAST

Strain Number	Primer	Identity
CBT57	<i>Unknown (not in database)</i>	
CBT62	<i>Pleurocapsa</i> sp.	100%
CBT590	<i>Leptolyngbya</i>	100%
CBT632	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	99%

배양액에서 세포외물질이 확인된 4가지 균주들을 동정하였다. 각각 다른 균주들의 프라이머를 사용한 결과 CBT57의 경우에는 확인이 불가능하였고, CBT62는 *Pleurocapsa* sp., CBT590은 *Leptolyngbya*, CBT632는 *Synechocystis* sp. PCC6803 확인되었다.

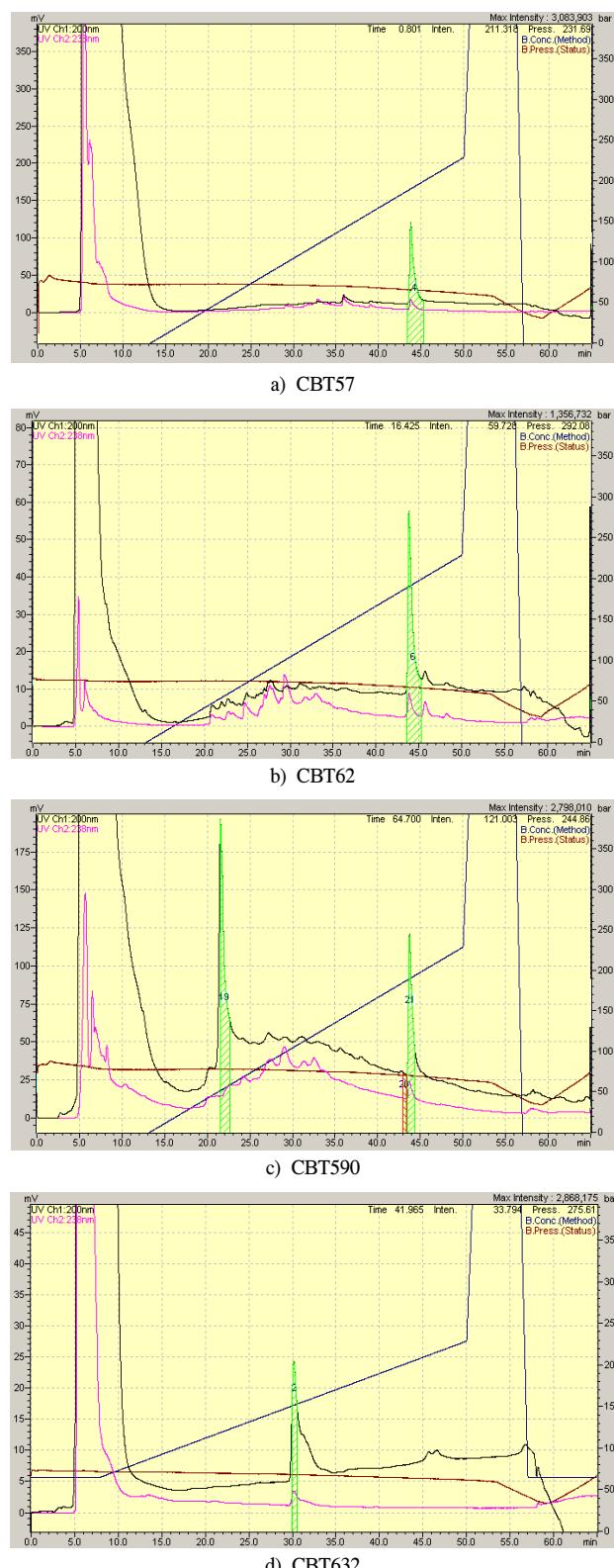


Figure 4. Sample of HPLC analysis (three out of five diagrams were shown).

REFERENCES

1. Fenical, W. (1993), Chemical Studies of Marine-Bacteria - Developing a New Resource. *Chem. Rev.* **93**, 1673-1683.
2. Moore, B. S. and J. N. Hopke (2001), Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *Chembiochem* **2**, 35-38.
3. Chen, G., G. Y. Wang, X. Li, B. Waters, and J. Davies (2000), Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide. *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**, 1145-1153.
4. Wagner-Döbler, I., W. Beil, S. Lang, M. Meiners, and H. Laatsch (2002), Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Adv Biochem. Eng. Biotechnol.* **74**, 207-238.
5. Stevens H. (2004), Communities of heterotrophic bacteria in the German Wadden Sea-diversity, dynamics and abundance. Dissertation. Institute for Chemistry and Biology of the Marine Environment, Universität Oldenburg. Oldenburg, Germany.
6. Stachelhaus, T., A. Hüser, and M. A. Marahiel (1996), *Biochemical* characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem. Biol.* **3**, 913-921.
7. Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz (1997) *Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis*. *Chem. Rev.* **97**, 2651-2673.
8. Kwok, S., S. Y. Chang, J. J. Sninsky, and A. Wang (1994), A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers. *PCR Methods Appl.* **3**(4), p.S39-47.
9. Dittmann, E., B. A. Neilan, M. Erhard, H. von Döhren, and T. Börner (1997), Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene which is responsible for hepatoxin production in the cyanobacterium *Microcystis PCC7806*. *Mol. Microbiol.* **26**(4), 779-787.
10. Schwarzer, D. and M. A. Marahiel (2001), Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **88**, 93-101.
11. Franche, X. and T. G. Damerval (1988), Tests on nif probes and DNA-Hybridization, *Meth. Enzymol.* **167**, 803-808.