

DNA 마이크로어레이 시스템 분석을 통한 *S. lividans* 유래 항생제 조절유전자 *afsR2* 기능 분석

김창영 · 노준희 · 이한나 · 김응수*

인하대학교 생물공학과

Functional Analysis of an Antibiotic Regulatory Gene, *afsR2* in *S. lividans* through DNA microarray System

Chang-Young Kim, Jun-Hee Noh, Han-Na Lee, and Eung-Soo Kim*

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea.

Abstract *AfsR2* in *Streptomyces lividans*, a 63-amino acid protein with limited sequence homology to *Streptomyces* sigma factors, has been known for a global regulatory protein stimulating multiple antibiotic biosynthetic pathways. Although the detailed regulatory mechanism of AfsK-AfsR-AfsR2 system has been well characterized, very little information about the AfsR2-dependent down-stream regulatory genes were characterized. Recently, the null mutant of *afsS* in *S. coelicolor* (the identical ortholog of *afsR2*) has been characterized through DNA microarray system, revealing that *afsS* deletion regulated several genes involved in antibiotic biosynthesis as well as phosphate-starvation. Through comparative DNA microarray analysis of *afsR2*-overexpressed *S. lividans*, here we also identify several *afsR2*-dependent genes involved in phosphate starvation, morphological differentiation, and antibiotic regulation in *S. lividans*, confirming that the AfsR2 plays an important pleiotrophic regulatory role in *Streptomyces* species.

Keywords: *afsR2*, *Streptomyces lividans*, DNA-microarray system, sigma factor

서 론

방선균은 그람 양성 토양 미생물로서 다양한 형태적 변형 및 생리학적 분화를 갖는 생물학적으로 매우 매력적인 미생물로 알려져 있다(1). 또한 산업적으로도 매우 유용한 항생제, 항암제, 면역억제제와 같은 다양한 2차 대사산물을 생산하여, 인간 및 동식물의 질병 치료에도 꾸준히 사용되어 왔다(2, 3). 최근 방선균에 대한 연구 패러다임은, 우선 신규 방선균 종 동정 및 유용 생리활성 물질을 분리하여 그에 따른 생합성 유전자를 분리하고(4, 5), 방선균의 전체적인 대사 조절 기작에 대한 연구결과를 접목시킴으로써 궁극적으로는 보다 다양한 유용 신규 생리활성 물질의 분리 및 생산성 향상을 도모하고자 하는 방향으로

진화하고 있다(6, 7).

*afsR2*는 *S. lividans* 유래 조절유전자이며, actinorhodin (ACT), undecylprodigiocin (UND)의 항생제 생합성을 증가시키는 것으로 알려져 있으며(8), *S. coelicolor* 조절 유전자인 *afsS*와는 염기서열상 동일하며 AfsK-AfsR-AfsR2 (AfsS) two-component 시스템으로 상위 조절 기작이 비교적 잘 규명되어 있는 실정이다(9). 하지만 많은 연구에도 불구하고 AfsR2가 어떤 기작을 통해서 항생제의 생합성 증가에 관여하는지는 아직 밝혀지지 않은 상태이다. AfsR2가 과발현 되었을 때, pathway-specific 조절 유전자들의 발현이 증가되는 것이 확인된 바 있으나 이것이 AfsR2의 direct-interaction에 의한 현상인지는 확인되지 않았다(10) 또한 *afsR2*가 존재하지 않는 외래 방선균에서 AfsR2를 발현시켰을 때 해당 방선균의 항생제 생합성이 증가한다는 연구보고는 AfsR2가 단지 pathway-specific 조절유전자의 발현에만 관여하는 것이 아니라 보다 많은 기능을 가지고 있음을 암시하고 있다(11, 12).

*Corresponding author

Tel: +82-32-860-8318, Fax: +82-32-872-4046
e-mail: eungsoo@inha.ac.kr

현재까지 AfsR2의 down-stream 조절기작을 규명하기 위하여 많은 연구가 진행되어 왔으며, 이전 연구에서 *afsR2* 염기서열 분석을 통해 3개의 α -helixes를 포함한 sigma factor의 domain III에 해당하는 sigma-like 기능을 보고한 바 있으며, RNA polymerase의 결합과 관련된 sigma factor로서의 기능성도 제시되었다(13). 또한 AfsR2 과발현 균주를 이용하여 2D electrophoresis 연구에서는 AfsR2의 과발현이 phosphate starvation과 관련된 단백질 발현을 촉진한다는 결과가 보고된 바 있다(14). 특히 최근에는 *S. coelicolor* 유래의 *afsR2* null mutant를 이용한 마이크로어레이 연구 결과, AfsR2가 phosphate starvation과 관련된 유전자들의 발현에 관여함으로써 nutritional starvation stress를 줄여 주는 것으로 예측되었고, 또한 ECF-sigma factor의 발현과도 밀접한 관련이 있으며 하나 이상의 sigma factor가 발현 하는데 필요한 linker로서의 기능성도 제시되었다(15).

본 연구에서는 *afsR2* 조절유전자의 기능적 역할을 탐색하고자 *afsR2* 과발현 *S. lividans* 균주를 이용하여 마이크로어레이 연구를 수행하였다. 이는 기본적으로 유전자들의 발현이 저하되어 있는 *S. lividans*에서 *afsR2*의 기능을 관찰하기 위한 적절한 방법으로 유전자들의 발현이 활성화 되어 있는 *S. coelicolor*의 *afsS* null mutant를 이용한 연구와 상호 보완적인 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단되었다. 본 연구를 통해서 AfsR2를 과발현 하였을 때, 기존에 알려진 phosphate starvation 관련 유전자들과 일부 ECF-sigma factor들의 과발현을 재확인하였으며, 더불어 형태적 분화와 관련 있는 *whi* 관련 유전자와 ACT 생산과 밀접한 관련이 있는 *abaA*-like pleiotrophic regulatory gene의 발현과도 관련이 있음을 추가적으로 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구결과를 토대로 *afsR2*가 방선균 내에서 2차 대사산물의 조절기작 및 생합성에 매우 중요한 key-factor 역할을 담당하고 있음을 제시할 수 있었다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구를 위해서 *S. lividans* TK21에 pMOV532와 pMOV536이 각각 transformation 되어 있는 재조합 균주를 사용하였다(16). 균주 배양을 위해 50 ml 2 × YT medium에 $6\sim 60 \times 10^9$ spore를 접종하여 30°C, 200 rpm으로 대략 10시간 동안 germination하였다. Spore를 현미경으로 관찰하였고 최소 10^7 spore/ml가 되는 시점에서 centrifugation (5000 × g, 15 min)하여 pellet을 모았다. 모아진 pellet을 10 ml R5⁻ medium에 wash (brief sonication)하여 re-centrifugation (5000 × g, 15 min)하였고 최종 1 ml R5⁻ medium에 resuspend하여 사용하였다. 1 ml germinated cell을 300 ml R5⁻ medium (in 2000 ml flask)에 접종하여 30°C, 200 rpm 조건으로 배양하였다.

균주 성장 및 항생제 정량 분석

균주 성장과 항생제의 정량 분석을 위해 R5⁻ culture에서 매 2~4시간 단위로 3 ml 배양액을 수집하였다. 균주 성장을 측정하기 위해 1 ml 배양액에 100 ul 0.1 M HCl을 첨가한 뒤 sonication (max, 2 × 10 sec)하였고 OD₄₅₀을 측정하였다.

Extracellular γ -ACT과 intracellular ACT를 측정하기 위해 1 ml 배양액에 100 ul 1 M HCl을 첨가한 뒤 centrifugation (5000g, 5min) 하여 상등액과 pellet을 분리하였다. 상등액에 1 vol. MeOH/CHCl₃ (1 : 1) 첨가한 뒤 vortexing 하여 extracellular γ -ACT를 추출하였다. Centrifugation (3000 g, 15 min)으로 CHCl₃ layer (bottom)을 분리한 후에 542 nm에서 흡광도를 측정하여 extracellular γ -ACT를 정량하였다. Intracellular ACT는 pellet에 1 ml 1 M KOH를 첨가한 뒤 1분 동안 vortexing하여 추출하였다. Centrifugation (5000 g, 5 min)으로 상등액을 분리한 후에 640 nm에서 흡광도를 측정하여 intracellular ACT를 정량하였다.

UND는 1 ml 배양액에서 상등액을 제거하고 pellet을 0.9 ml MeOH에 resuspend하여 추출하였다. 그 후에 100 ul 5 M HCl을 첨가하여 pH를 낮추고 530 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

DNA 마이크로어레이 hybridization

균주 배양 과정에서 필요한 시간대의 배양시료를 채취하여 바로 1/5 Vol. ice-cold stop solution (5% phenol in EtOH)을 첨가하여 RNA 분해를 방지하였다(17). 그 후에 centrifugation (4°C, 7000 rpm, 10 min)하여 pellet을 분리한 뒤 -80°C에 보관하여 일괄적으로 total RNA를 분리하였다. Total RNA은 액체질소로 동결건조 시킨 후에 RLT buffer에 resuspend 시킨 후 RNeasy mini kit (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA)를 사용하여 추출하였다.

DNA 마이크로어레이 hybridization을 위해 이전에 제작된 *S. coelicolor* chip을 사용하였으며(18), 각각의 반응 당 10 ug total RNA와 200 ng genomic DNA가 사용되었다. Total RNA로부터 cDNA 합성을 위하여 random hexamer primer (IDT, Coralville, IA, USA)를 사용하였으며, superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 reaction mixture를 첨가하여 반응을 수행하였다. cDNA는 Alexa 647 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 labeling하였고, gDNA는 Label IT Cy3 reagents (Mirus Bio Corp., Madison, WI)를 이용하여 labeling하였다. 그 후에 50% formamide가 포함된 DNA chip에 labeling된 cDNA와 gDNA를 hybridization 하였다. 50°C에서 10시간 동안 incubation 후에 DNA chip을 wash한 후 ScanArray5000 (PerkinElmer, Wellesley, USA)을 이용하여 microarray image를 scanning 하였다. 자세한 microarray hybridization 조건은 <http://hugroup.cems.umn.edu/Protocols/protocol.htm>에 공유되어 있다. Scanning한 image는 GenePix (MolecularDevices, Union City, CA, USA)를

이용하여 fluorescence intensity 값을 얻었고 log₂ (cDNA/gDNA)로 환산하여 *afsR2* 발현에 의한 유전자 발현 패턴을 분석하였다.

결과 및 고찰

***afsR2* 과발현 *S. lividans* TK21의 유전자 발현 패턴 분석**

기존의 *afsR2*가 과발현 vector에 cloning되어 있는 pMOV532와 negative control로 *afsR2*의 N-terminal 부분이 deletion되어 있는 pMOV536을 사용하였다. 이 두 plasmid를 이용하여 *afsR2*가 과발현 된 재조합 *S. lividans* TK21를 제작하여 본 연구에 사용하였다. *afsR2*의 전사체 발현 분석을 위해 7800개의 ORF를 포함하고 있는 *S. coelicolor* DNA Chip을 사용하였다. *S. lividans*는 유전학적으로 *S. coelicolor*와 매우 유사하기 때문에 모든 ORF를 동일하게 포함하고 있는 것으로 추정되었다(18).

Total RNA sample을 분리하기 위하여 pMOV532/*S. lividans* TK21 (*afsR2*-overexpressed strain)과 pMOV536/*S. lividans* TK21을 배양하여 균주 성장과 ACT, UND 항생제의 생산량을 측정하였으며, 동시에 sample을 수집하였다(Fig. 1). 12 hr부터 두 균주 모두 growth phase로 들어갔으며 22 hr부터 stationary phase로 UND를 생산하기 시작했고, 36 hr에서는 pMOV532/*S. lividans* TK21만이 ACT 생산이 시작되었다. 성장을 측정하는 매 단계마다 1.5 ml의 배양액을 수집하여 total RNA를 추출하였다. 이후 microarray는 전사체의 발현 패턴이 크게 변하는 3개의 시점인 growth phase (12 hr), UND production phase (22 hr), ACT production phase (36 hr)의 total RNA를 사용하여 수행하였다.

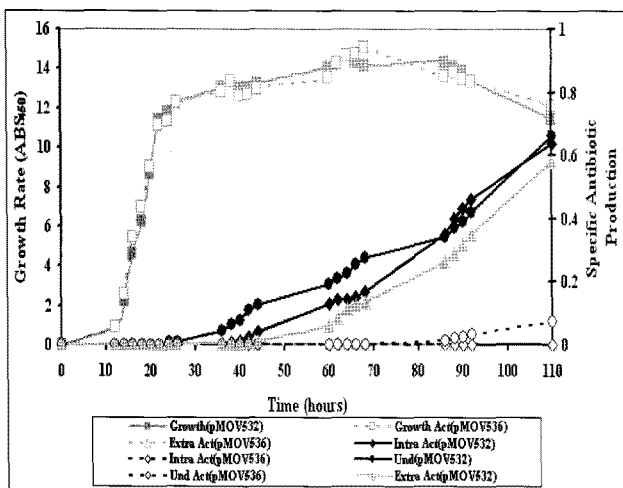


Fig. 1. Time course of growth, UND production, ACT production via *S. lividans* TK21 included pMOV532 or pMOV536.

DNA microarray를 수행한 후에 제작된 균주 안에서 목표한 *afsR2* 발현이 제대로 이루어졌는지 확인하기 위하여 AfsK-AfsR-AfsR2 system의 발현 정도를 비교해보았다. 그 결과, pMOV532/*S. lividans* TK21에서 *afsK*와 *afsR*의 발현은 이루어지지 않은 반면 *afsR2*의 발현은 배양 초기부터 높은 수준을 이루고 있으며, 대조군인 pMOV536/*S. lividans* TK21의 경우 *afsK*, *afsR*, *afsR2* 모두 발현이 이루어지지 않는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이는 사용한 *S. lividans* TK21내에 있는 AfsK-AfsR-AfsR2 시스템의 발현이 일반적인 상태에서는 이루어지지 않고 있으며, 두 균주 간의 유전자 발현 정도의 차이가 *afsR2*의 발현에 의한 것임을 나타낸다. 성장 초기부터 *afsR2*의 발현이 매우 높게 나타난 이유는 *afsR2*가 과발현 벡터에 의해 도입되었기 때문인 것으로 추정되었다.

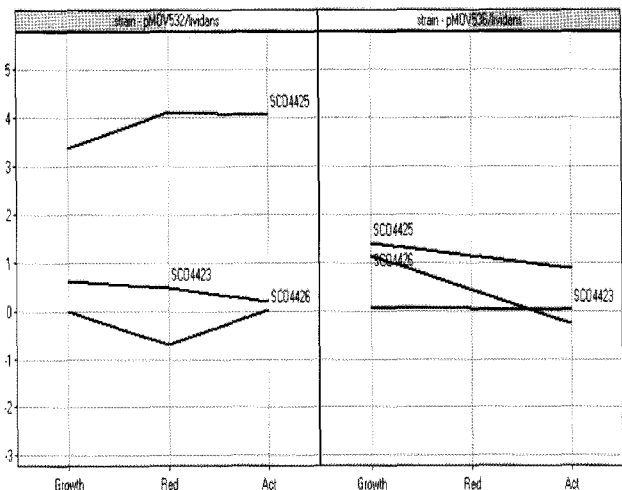


Fig. 2. Transcriptome expression of AfsK-AfsR-AfsR2 system.

항생제 생합성 유전자들의 발현 변화

*S. lividans*는 4가지 항생제 생합성 유전자 (ACT, UND, CDA, methylenomycin)들을 가지고 있으나 일반적인 성장 조건에서는 UND만을 생산하는 것으로 알려져 있다(19). *afsR2*의 과발현에 의해 균주 배양 과정에서 ACT의 생산성이 크게 증가한 것을 확인하였고, 이를 DNA 마이크로어레이 분석 결과를 통해 전사체 수준에서의 항생제 생합성 유전자들의 발현 패턴을 비교해보았다(Fig. 3). 그 결과, ACT의 경우 눈에 띄게 전체적인 유전자 발현 정도가 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었으며(Fig. 3A), UND의 유전자 발현 또한 증가하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B). 하지만 CDA (calcium-dependant antibiotic)의 경우에는 예상대로 전사체의 발현 수준이 negative control과 크게 차이가 나지 않았다. 이와 더불어, *S. lividans*에 존재하던 NRPS, type I polyketide, coelichelin과 관련된 생합성 유전자들의 발현 또한 증가하는 것이 관찰되었다(data not shown).

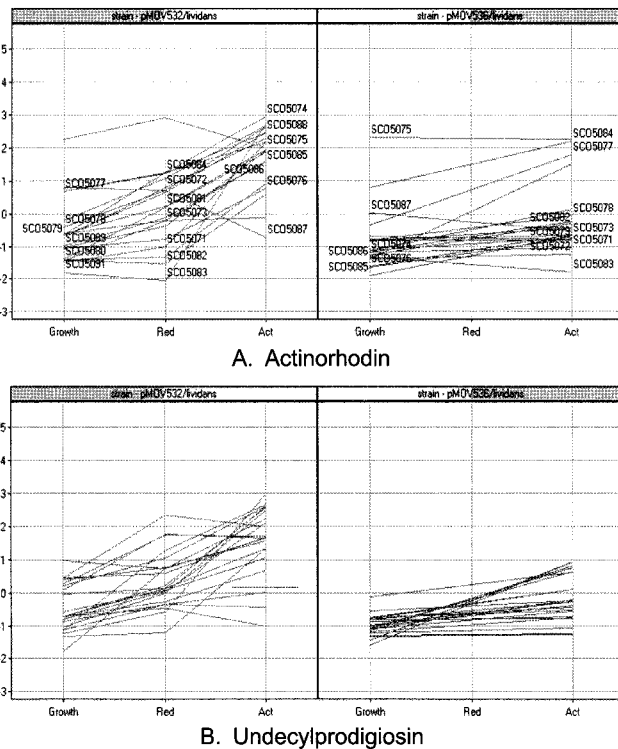


Fig. 3. Variations of antibiotics-related gene expression via *afsR2* overexpression.

Nutritional starvation과 관련된 유전자들의 발현 증가

*AfsR2*의 발현이 nutritional starvation stress를 줄여주는 역할을 한다는 연구가 보고된 바 있다. 이를 확인하기 위하여 본 연구에 사용된 *afsR2* 과발현 균주의 ACT 생산 시점에서 nutrition starvation related genes의 전사체 발현 변화를 비교해보았다. 분석 결과, 총 42개의 nutrition starvation related genes이 positive하게 발현이 증가하였다(Table. 1). SCO0324, SCO1196, SCO1565, SCO1906, SCO2286, SCO2348, SCO3790, SCO4139 (*pstB*), SCO4142 (*pstS*), SCO4144, SCO4152 (*ushA*), SCO4226, SCO4227, SCO4228, SCO4230 (*regX3*), SCO4873, SCO4878, SCO4879, SCO4880, SCO6691, SCO7631, SCO7697, SCO7722의 23개 유전자는 phosphate starvation stress에 작용하는 유전자들로 알려져 있다. 이들 중 대부분은 염기서열 상에 유사성을 갖는 잠재적인 phosphate response genes이며, 이 중 4개의 유전자는 그 특성에 대한 연구가 진행되어 있는 것으로 나타났다(Fig. 4A). SCO4139 (*pstB*)는 phosphate ABC transport system ATP-binding protein으로 알려져 있으며 258개의 아미노산으로 coding되어 있다(20). SCO4142 (*pstS*)는 phosphate-binding protein precursor로서 370개의 아미노산으로 coding되어 있다(21). 방선균은 다른 미생물들과 마찬가지로 2차 대사로 넘어가는 시점에서는 중요한 nutrient인 phosphate starvation stress를 받게 된다. 이러한 문제를 해결하기 위해 미생물은 Pst system을 가지고 있으며 PstS, PstA,

PstB, PstC의 4가지 subunit으로 구성되어 있다. PstB는 catalytic subunit으로 cellular membrane을 통해 phosphate를 들여오는데 필요한 ATP hydrolysis에 관여한다. PstS는 periplasmic membrane에서 phosphate에 binding하는 역할을 수행한다. 이 Pst system은 거의 모든 미생물에 존재하는 super-family 중에 하나이며 기본적으로 가지고 있는 기능이라 할 수 있다(22). *AfsR2*의 과발현에 의해 Pst system의 2가지 subunit 발현이 증가된다는 것은 *AfsR2*가 적극적으로 phosphate starvation stress를 줄여주기 위하여 관여하며 최종적으로 2차 대사산물의 생산성을 증가시키는데 기여한다고 생각할 수 있다.

Table 1. Up-regulated genes related nutritional limitation stress

| Gene name | also known as | Role |
|-----------|---------------|--|
| SCO0324 | | putative secreted protein |
| SCO1196 | | putative secreted protein |
| SCO1565 | | putative glycerophosphoryl diester phosphodiester |
| SCO1906 | | putative secreted protein |
| SCO2207 | | hypothetical secreted protein |
| SCO2209 | | putative transcriptional regulator |
| SCO2210 | <i>gln II</i> | glutamine synthetase |
| SCO2217 | | putative secreted protein |
| SCO2218 | | putative lipoprotein |
| SCO2286 | | putative alkaline phosphatase |
| SCO2348 | | putative secreted protein |
| SCO2910 | | putative cystine synthase |
| SCO2911 | | conserved hypothetical protein |
| SCO3790 | | conserved hypothetical protein |
| SCO4139 | <i>pstB</i> | phosphate ABC transport system ATP-binding protein |
| SCO4142 | <i>pstS</i> | phosphate-binding protein precursor |
| SCO4144 | | conserved hypothetical protein SCD 84.12c |
| SCO4152 | <i>ushA</i> | putative secreted 5'-nucleotidase |
| SCO4164 | <i>cysA</i> | putative thiosulfate sulfurtransferase (fragment) |
| SCO4165 | <i>sseC2</i> | conserved hypothetical protein |
| SCO4226 | | hypothetical protein |
| SCO4227 | | hypothetical protein |
| SCO4228 | | putative phosphate transport system regulatory protein |
| SCO4230 | <i>regX3</i> | putative response regulator |
| SCO4293 | <i>thrC-1</i> | putative threonine synthase |
| SCO4294 | | conserved hypothetical protein |
| SCO4873 | | hypothetical protein SCK20.14c |
| SCO4878 | | putative glycosyltransferase |
| SCO4879 | | conserved hypothetical protein |
| SCO4880 | | putative transferase |
| SCO5583 | <i>amt</i> | ammonium transporter |
| SCO5584 | <i>glnB</i> | nitrogenregulatory protein P-II "nitrogen regulator" |
| SCO6094 | | putative transport system integral membrane protein |
| SCO6098 | <i>cysD</i> | sulfate adenyltransferase subunit 2 |
| SCO6100 | <i>cysH</i> | phosphoadenosine phosphosulfate phosphosulfate |
| SCO6101 | | hypothetical protein SCBAC1A6.25c |
| SCO6102 | <i>nirA</i> | putative nitrite/sulphite sulphite |
| SCO6691 | | putative phospholipase C "putative phospholipase C |
| SCO7631 | | putative secreted protein |
| SCO7697 | | putative secreted putative secreted |
| SCO7722 | | conserved hypothetical protein |

SCO4228의 발현 증가는 매우 흥미로운 결과 중에 하나이다. 이 유전자는 putative phosphate transport system regulatory

protein으로 이번에 2D electrophoresis 연구 보고에서도 지속적으로 *afsR2*에 의해 up-regulated 되는 것으로 나타난다(14). 아직 그 기능에 대해서는 정확하게 밝혀지지 않았지만 *afsR2*가 phosphate 전달 system에 관여하는 결정적인 단서가 될 수 있을 것이다. 그 외에 SCO2207, SCO2209, SCO2210, SCO2217, SCO2218, SCO5583, SCO5584, SCO2910, SCO2911, SCO4164, SCO4165, SCO4293, SCO4294, SCO6094, SCO6098, SCO6100, SCO6101, SCO6102 등의 phosphate response 외에 다른 방향으로 nitrogen limitation에 작용하는 유전자들의 발현 증가도 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 그 중 SCO2210 (*glnII*)는 glutamine synthetase로 glutamate metabolism에 관여함으로써 2차 대사에 영향을 주는 유전자이다(23). 더불어 SCO5584는 nitrogen regulatory protein P-II으로 nitrogen limitation을 조절하는 factor이다. 그 외에도 SCO4164 (putative thiosulfate sulfurtransferase), SCO6098 (sulfate adenylyltransferase subunit2), SCO6100 (phosphoadenosine phosphosulfate reductase) 등의 발현이 매우 큰 차이로 증가되었다는 것도 주목해 볼만하다.

2차 대사로 넘어가는 시점에서 nutrient starvation stress는 방선균의 생존 및 생리활성 물질의 합성을 제한하는 중요한 요소이다(24). 본 연구에서 *afsR2*를 과발현 시켰을 때, *S. lividans* TK21에 일어난 가장 큰 변화는 nutrient starvation에 관여하는 유전자들의 활성이 크게 증가하였다는 것이다. 그와 동시에 일반적으로는 생산하지 못했던 ACT의 생산이 이루어졌다는 것은 *AfsR2*가 nutrient limitation을 해결하는 역할을 수행하며, 단순히 pathway-specific regulatory gene의 활성에 관여하는 것이 아니라 방선균의 2차 대사 과정을 성공적으로 수행하는데 필요한 key-factor로 작용하는 것을 암시하고 있다.

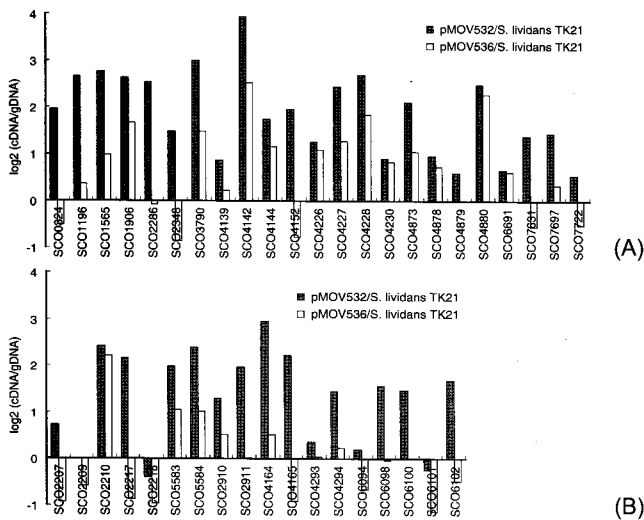


Fig. 4. Comparison of 42 genes expression related nutritional response at the stationary phase (36 hr). (■) : pMOV532/*S. lividans* TK21, *afsR2* over-expression; (□) : pMOV536/*S. lividans* TK21; negative control)

다른 조절 유전자들의 발현

*afsR2*는 sigma factor-like domain을 가지고 있으며 또 다른 조절 유전자들의 발현에 관여할 것으로 예측되어 왔다. *AfsR2* 과발현이 nutrient limitation stress를 줄여주는 역할 이외에 여러 조절 factor로 작용할 것으로 보이는 조절 유전자들에 어떤 영향을 주었는지 분석해보았다. *AfsR2* 발현에 의해 크게 영향은 받은 조절 유전자는 SCO2954 (*sigL*) 과 SCO5147 (*sigE*)로 RNA polymerase sigma factor이다(Fig. 5A, B). 이들 두 sigma factor는 ECF subfamily sigma 70 factor에 속한다. Sigma factor는 여러 종류로 나누어지며 각각 다양한 신호에 의해 여러 조절 기작을 가지게 되는데(25), 특히 *sigL*은 housekeeping-sigma factor로 알려져 있다. *sigE*는 일반적으로 cell wall의 구조에 관여하는 것으로 알려져 있고(26, 27), *sigE* 유전자가 *S. coelicolor* 내에서 과발현 되었을 경우 actinorhodin의 생산이 촉진되었다(28). 주목할 점은 *sigL*과 *sigE*의 염기서열을 비교해 볼 때, sigma factor의 regionIII에 해당하는 부분이 비어있는 것을 알 수가 있다. *afsR2*의 sigma-like domain이 sigma70의 regionIII에 해당한다는 점으로 미루어 보아, *afsR2*가 *sigL*과 *sigE*를 RNA polymerase와 연결 시켜주는 linker로서의 역할을 고려해 볼 수 있다.

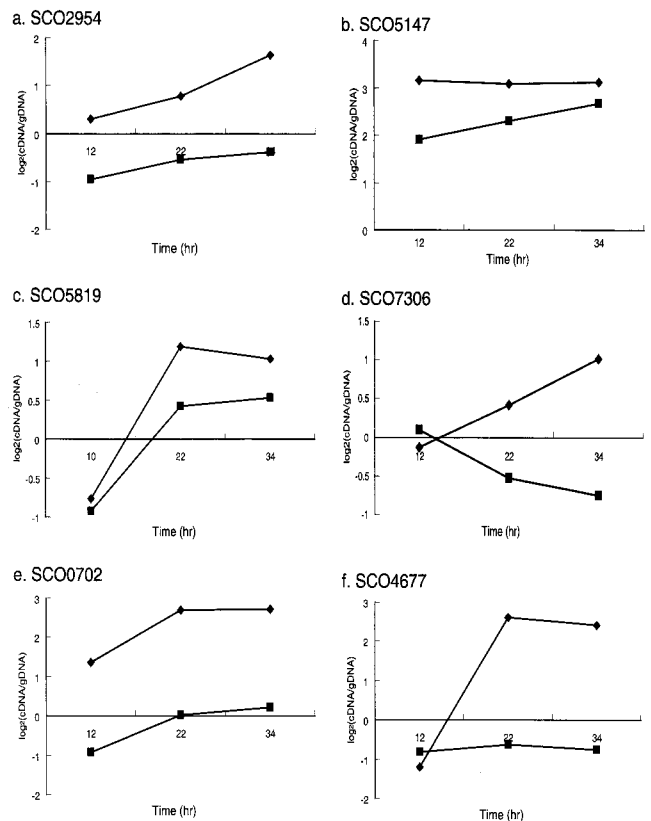


Fig. 5. Up-regulated six regulatory genes via *afsR2*-expression. (◆) : pMOV532/*S. lividans* TK21, *afsR2*over-expression; (■) : pMOV536/*S. lividans* TK21; negative control)

기존의 phosphate starvation 관련 유전자와 sigma factor 유전자들의 발현 이외에도 *afsR2*보다 기능적으로 상위에 있는 것으로 알려진 pleiotrophic 조절 유전자들의 발현 정도를 비교해 보았다. 특이하게도 방선균의 morphological differentiation을 조절하는 유전자 중에 하나인 SCO5819 (*whiH*)와 SCO7309 (putative *whiB*-like protein)의 발현이 *afsR2*의 과발현에 의해 크게 증가되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5C, D). 대조군인 pMOV536/*S. lividans* TK21에서는 *whiE*의 발현이 전혀 이루어지지 않은 반면에 pMOV532/*S. lividans* TK21에서는 *whiE*가 매우 높은 수준으로 발현되었으며, *S. coelicolor* M145와 거의 비슷한 수준으로 증가되는 것을 확인하였다(data not shown). *whi* 관련 조절 유전자는 방선균이 성장 마지막 단계인 sporulation의 형성에 직접적으로 관여하며 이러한 형태적인 분화는 2차 대사물질의 생합성에도 영향을 미치는 것으로 알려져 왔다(29, 30). 이를 뒷받침 하는 실험적인 예로써 plasmid 또는 chromosomal integration을 통해 *afsR2*를 *S. lividans*에 도입하였을 경우 빈약하였던 spore 형성이 다시 활성화 되며 ACT 생산이 이루어지는 것이 지속적으로 확인되어 왔다(31). 이와 반대로 *S. coelicolor*의 chromosomal DNA 상에서 *afsR2*를 deletion시켰을 때 왕성하던 sporulation이 사라지는 것 또한 마찬가지로 할 수 있다. 이전 연구에 따르면, *whi* 조절유전자의 deletion은 형태적인 분화의 결여와 동시에 amino acid limitation이 일어난다는 연구보고가 있다(32). 이러한 결과를 토대로 *afsR2*가 직간접적으로 2차 대사로 넘어가는 시기에 *whi* 관련 유전자의 발현에 관여함으로써 방선균의 대사를 촉진시키고 항생제의 생합성 유전자의 발현에 영향을 미친다고 생각할 수 있다. *afsR2*가 *whi* 유전자에 직접적으로 관여할 가능성은 매우 적은 것으로 판단되며 앞서 언급한 여러 sigma factor의 발현에 linker로서 작용하여 결과적으로 *whi* 유전자의 발현으로 이루어질 가능성이 높다. 물론 *whi* 유전자들의 경우 형태적 변형과 관련하여 다양한 signal에 작용할 가능성이 크므로 *afsR2*뿐만 아니라 다른 조절 기작에 의해서도 발현 패턴이 바뀔 수도 있다.

Putative regulator (SCO0702, SCO4677) 또한 *afsR2*에 의해 발현량이 증가되는 결과를 볼 수 있었다(Fig. 5E, F). SCO0702는 pleiotrophic regulatory locus *abaA*와 매우 유사한 유전자로 192개의 amino acid를 coding하고 있고, SCO4677 또한 염기서열상에 유사성이 매우 높은 것으로 보인다. 두 개의 유전자 모두 *abaA*와 유사한 기능이나 조절 기작을 가지고 있을 것으로 예상된다. *abaA*는 *S. coelicolor* 유래 pleiotrophic 조절 유전자로 알려져 있으며, ACT 생합성 pathway에 직접적으로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(33). 이는 *afsR2*가 pleiotrophic regulatory factor들에 영향을 미칠 수 있음을 나타낸다. 그 외에도 SCO0930 (putative lipoprotein), SCO2953 (putative membrane protein), SCO1627 (putative ATP-GTP binding protein), SCO1629 (conserved hypothetical protein SCI41.12c), SCO3579 (putative regulatory protein), SCO2958 (putative transcriptional regulator), SCO1860 (putative

secreted protein), SCO4948 (nitrate reductase beta chain NarH3), SCO1626 (putative cytochrome P450), SCO7486 (putative ROK-family transcriptional regulator), SCO7347 (hypothetical protein SC9H11.01.), SCO3537 (putative DNA-binding protein), SCO1625 (putative ribosomal pseudouridine synthase), SCO5455 (putative two-component system response regulator), SCO6422 (putative two-component system regulatory protein) 등이 *afsR2*에 의해 과발현 되었다(Fig. 6). 이러한 결과들은 매우 작은 조절유전자 중의 하나인 *afsR2*의 역할이 매우 광범위함을 뒷받침한다.

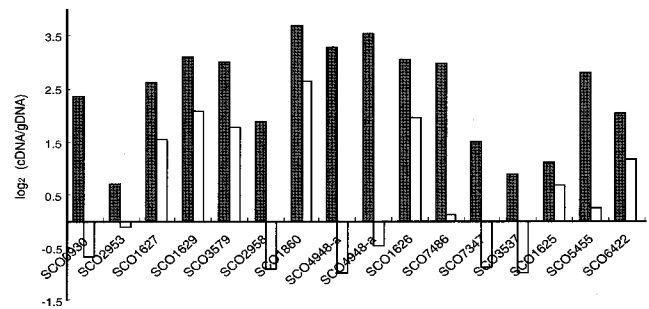


Fig. 6. Up-regulated genes related other regulation via *afsR2* expression. (■) : pMOV532/*S. lividans* TK21, *afsR2* over-expression; (□) : pMOV536/*S. lividans* TK21; negative control)

요약

AfsR2 과발현 *S. lividans* TK21을 이용하여 DNA microarray를 수행하였다. 그 결과, phosphate starvation과 관련 있는 42개의 유전자들이 up-regulated 되었으며, 특히 SCO4139 (*pstB*, phosphate ABC transport system ATP-binding protein)와 SCO4142 (*pstS*, phosphate-binding protein precursor)는 *afsR2*가 phosphate와 같은 nutrient starvation에 적극적으로 관여한다는 것을 나타내며, SCO4228 (putative phosphate transport system regulatory protein)은 기존에 수행되었던 2D-electrophoresis 연구나 *afsS* null *S. coelicolor*를 이용한 DNA microarray 연구에서도 공통적으로 보고되었던 유전자로서 phosphate limitation에 대한 *afsR2*의 효과가 지속적으로 검증되고 있음을 뜻한다. 또한 *afsR2* 과발현을 통해서 sigma factor인 SCO2954 (*sigL*)과 SCO5147 (*sigE*)의 발현이 유도되었으며 두 유전자의 구조적인 특징을 고려해 보았을 때 *afsR2*가 RNA polymerase와의 linker로서의 역할을 추측해 볼 수 있다. 뿐만 아니라 *whi* 관련 유전자들의 발현 또한 *afsR2*에 의해 증가되었다. 이는 *afsR2*가 단순히 2차 대사물질 생합성 조절에만 관여하는 것이 아니라 형태적 분화에 작용함으로써 최종적으로 여러 2차 대사물질의 합성을 유도한다고 말할 수 있다. 이러한 결과들을 토대로 *afsR2*가 기존에 항생제 생합성에만 관여하는 global regulatory 조절인자가 아닌 방선균이

stationary phase로 전환되는 시점에서 형태적 분화에 영향을 미치고 phosphate limitation stress를 줄여주는 2차 대사의 key-factor regulatory 유전자임을 알 수 있다.

감 사

본 연구는 미국 미시간 대학의 David Sherman 교수의 기술적 지원과 학술진흥재단 지역대학우수과학자지원사업 (D00249)의 연구비 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

접수 : 2008년 9월 9일, 게재승인 : 2009년 4월 2일

REFERENCES

- Huang, J., C. J. Lih, K. H. Pan, and S. N. Cohen (2001), Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes Dev.* **15**, 3183-3192.
- Petkovic', H., J. Cullum, D. Hranueli, I. S. Hunter, N. Peric'-Concha, J. Pigac, A. Thamchaipenet, D. Vujaklija and P. F. Long (2006), Genetics of *Streptomyces rimosus*, the Oxytetracycline Producer, *Microbiol. Mol. Biol. review.* **70**(3), 704-728.
- Hutchinson, C. R. and A. L. Colombo (1999), Genetic engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peuceitius*, a review. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 647-652.
- Zhang, H., Y. Wang, and B. A. Pfeifer (2008), Bacterial hosts for natural product production. *Mol. Pharm.* **5**(2), 212-225.
- Rodriguez, E., Z. Hu, S. Ou, Y. Volchegursky, C. R. Hutchinson, and R. McDaniel (2003), Rapid engineering of polyketide overproduction by gene transfer to industrially optimized strains, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**(8), 480-8.
- Rodriguez-Garcia, A, S. Barreiro, F. Santos-Beneit, A. Sola-Landa, and J. F. Martin (2007), Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a *phoP* mutant. *Proteomics.* **7**, 2410-2429.
- Lum, A. M., J. Huang, C. R. Hutchinson, and C. M. Kao (2004), Reverse engineering of industrial pharmaceutical-producing actinomycete strains using DNA microarrays, *Metab. Eng.* **6**, 186-196.
- Sevcikova B. and J. Kormanec (2004), Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Arch. Microbiol.* **181**, 384-389.
- Lee Y., K. Kim, J. W. Suh, S. Rhee, and Y. Lim (2007) Binding study of AfsK, a Ser/Thr kinase from *Streptomyces coelicolor* A3(2) and S-adenosyl-L-methionine. *FEMS Microbiol. Lett.* **266**, 236-240.
- Kim E. S., H. J. Hong, C. Y. Choi, and S. N. Cohen (2001), Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. *J. Bacteriol.* **183**, 2198-2203.
- Park, H. S., S. H. Kang, H. J. Park, and E. S. Kim (2005), Doxorubicin Productivity Improvement by the Recombinant *Streptomyces peuceitius* with High-Copy Regulatory Genes Cultured in the Optimized Media Composition. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 66-71.
- Lee J, Y. Hwang, S. Kim, E. Kim, and C. Choi (2000), Effect of a global regulatory gene, *afsR2*, from *Streptomyces lividans* on avermectin production in *Streptomyces avermitilis*. *J. Biosci. Bioeng.* **89**(6), 606-608.
- Kim C. Y., H. J. Park, and E. S. Kim (2006), Functional dissection of sigma-like domain in antibiotic regulatory gene, *afsR2* in *Streptomyces lividans*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 1477-1480.
- Kim C. Y., H. J. Park, and E. S. Kim (2005), Proteomics-driven identification of putative AfsR2-target proteins stimulating antibiotic biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, 248-263.
- Wei, L., P. J. Karthik, C. Salim, M. Sarika, G. Frank, Y. S. Kyung, D. H. Sherman, and W. S. Hu (2008), Genome-wide transcriptome analysis reveals that a pleiotropic antibiotic regulator, AfsS, modulates nutritional stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *BMC Genomics.* **9**, 56-70.
- Vögtli M., P. C. Chang, and S. N. Cohen (1994), *afsR2*: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol. Microbiol.* **14**(4), 643-653.
- Bernstein J. A., A. B. Khodursky, P. H. Lin, D. Lin-Chao, and S. N. Cohen (2002), Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 9697-9702.
- Jayapal K. P., W. Lian, G. Frank, D. H. Sherman, and W. S. Hu (2007), Comparative genomic hybridizations reveal absence of large *Streptomyces coelicolor* genomic islands in *Streptomyces lividans*. *BMC Genomics.* **8**, 229.
- 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**(8), 665-672.
20. Fischer R. J., S. Oehmcke, U. Meyer, M. Mix, K. Schwarz, T. Fiedler, and H. Bahl (2006), Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *J. Bacteriol.* **188**(15), 5469-5478.
 21. Diaz M., A. Esteban, J. M. Fernandez-Abalos, and R. I. Santamaria (2005), The high-affinity phosphate-binding protein PstS is accumulated under high fructose concentrations and mutation of the corresponding gene affects differentiation in *Streptomyces lividans*. *Microbiol.* **151**, 2583-2592.
 22. Braibant M., P. Lefèvre, L. de Wit, P. Peirs, J. Ooms, K. Huygen, A. B. Andersen, and J. Content (1996), A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding proteins of a phosphate transporter homologous to the *Escherichia coli* Pst system. *Gene.* **176**, 171-176.
 23. Fink D., N. Weissschuh, J. Reuther, W. Wohlleben, and A. Engels (2002), Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **46**, 331-347.
 24. Reuther J. and W. Wohlleben (2007), Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and post-translational regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **12**, 139-146.
 25. Mazurakova V., B. evcikova, B. Rezuchova, and J. Kormanec (2006), Cascade of sigma factors in *streptomycetes*: identification of a new extracytoplasmic function sigma factor sigma J that is under the control of the stress-response sigma factor sigmaH in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch. Microbiol.* **186**(6), 435-446.
 26. Cho Y. H., E. J. Lee, B. E. Ahn, and J. H. Roe (2001), SigB, an RNA polymerase sigma factor required for osmoprotection and proper differentiation of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **42**, 205-214.
 27. Paget M. S., L. Chamberlin, A. Atrih, S. J. Foster, and M. J. Buttner (1999), Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor σ^E is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **181**, 204-211.
 28. Kang S. H., J. Huang, H. N. Lee, Y. A. Hur, S. N. Cohen, and E. S. Kim (2007), Interspecies DNA Microarray Analysis Identifies WblA as a Pleiotropic Down-Regulator of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* **189**(11), 4315-4319.
 29. Shen X. L., H. J. Dong, X. P. Hou, W. J. Guan, and Y. Q. Li (2008), FtsY affects sporulation and antibiotic production by *whiH* in *Streptomyces coelicolor*. *Curr. Microbiol.* **56**(1), 61-65.
 30. Geiman D. E., T. R. Raghunand, N. Agarwal, and W. R. Bishai (2006), Differential gene expression in response to exposure to antimycobacterial agents and other stress conditions among seven *Mycobacterium tuberculosis whiB*-like genes. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **50**(8), 2836-41.
 31. Kim C. Y., H. J. Park, Y. J. Yoon, H. Y. Kang, and E. S. Kim (2004), Stimulation of actinorhodin production by *streptomyces lividans* with a chromosomal-integrated antibiotic regulatory gene *afsR2*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**(5), 1089-1092.
 32. Flårdh K., K. C. Findlay, and K. F. Chater (1999), Association of early sporulation genes with suggested developmental decision points in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **145**(Pt 9), 2229-2243.
 33. Fernández-Moreno M. A., A. J. Martín-Triana, E. Martínez, J. Niemi, H. M. Kieser, D. A. Hopwood, and F. Malpartida (1992), *abaA*, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **174**(9), 2958-2967.