

## 산성 pH 충격 스트레스에 의한 스트렙토마이세스 시에리컬러 M511의 프로디지닌 생산 증대

모상준\*

이화여자대학교 화학나노과학

**Enhanced Prodiginines Production in *Streptomyces coelicolor* M511 by Stress of Acidic pH Shock.** Mo, SangJoon\*. Department of Chemistry and Nano Science, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea – Undecylprodiginine and streptorubin B are red-pigmented antibiotics produced by *Streptomyces coelicolor* A3(2). In this study, we investigated the correlation between productivity of these red-pigmented antibiotics and stress of pH shock. Biosynthesis of these red-pigmented antibiotics is enhanced at acidic pH shock on solid R2YE medium. The optimal pH shock is pH 4 which led to 1.6 fold and two-fold increase in the production of undecylprodiginine and streptorubin B as compared with control, respectively. In addition, the extract of pH 4 shocked cells exhibited a remarkable activity against *Trichophyton mentagrophytes*. However, neutral and basic pH shock did not give raise to promote a production of these red-pigmented antibiotics as well as antifungal activity. Thus, although the acidic pH shock is simple and easy method, it should be extremely effective approach to enhance a productivity of these red-pigmented antibiotics and other secondary metabolites.

**Key words:** Prodiginine, red-pigmented antibiotics, *Streptomyces coelicolor*, acidic pH shock

### 서 론

방선균은 포자, 기저균사, 기중균사, 포자로 이어지는 형태적 분화를 거치는 세균이며, 항생제, 항암제, 면역억제제로 대표되는 다양한 종류의 생리활성물질과 유용한 효소를 생산하는 학문적이며 동시에 경제적인 세균으로 많은 연구가 이루어지고 있는 대표적 그람 양성세균이다[7]. 특히, 다양한 종류의 이차대사산물의 경우 현재까지 보고된 미생물 유래 유용 생리활성물질 중 70% 이상이 방선균에서 생산된 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로, 방선균은 다양한 생리활성 기능을 가진 이차대사산물 생산공장으로 인식되어 신물질 및 생합성 기작 연구를 위한 중요한 표적 균주로 많은 관심이 집중된 대표적 유용 세균이다[1, 11]. 대부분의 방선균 유래 이차대사산물은 물리적으로 무리 지어진 유전자군의 복잡한 생합성 경로 암호에 의해 생산되며, 보통 유전자군에 자리잡고 있는 pathway-specific transcriptional activators에 의해 생합성 유전자 군이 조절된다. 이러한 특징으로 많은 연구자들은 이차대사산물 생산관련 물질대사 및 생합성 유전자 조절 연구에 관심을 집중하고 있으며[6], DNA microarray 분석을 이용하여 이차대사물질의 생산과 형태적 분화 프로그램에 관계가 있는 포괄적 조절 경로(global

regulatory pathway) 발견에만 노력을 기울이고 있는 실정이다[15]. 하지만 목표하는 한두 유전자의 조작으로 전체 대사 시스템을 변화시키는 것은 방선균이 가진 이차대사산물 생산시스템의 복잡성 때문에 매우 어려운 것이 사실이어서 지금까지 발표된 대부분의 연구는 조절유전자의 유전적 조작, 즉 positive regulator의 과발현이나 negative regulator의 삭제를 통한 생산성 증대 연구가 많이 이루어지고 있다[4, 14]. 이외에 다른 방법으로는 salt shock, oxidative stress 혹은 pH shock과 같은 다양한 외부적 자극을 주어 이차대사산물의 생산량을 극대화시키는 방법이 있으며, 이차대사물질 신호전달 네트워크와 관련이 있는 regulator들은 특히 이런 외부적 자극에 매우 민감하게 반응하고 이런 반응의 결과가 생산량 극대화로 이어진다는 많은 연구가 발표되고 있다[3, 12, 13, 19].

전체 유전자 정보가 알려진 *Streptomyces coelicolor* A3(2)는 22 종류의 이차대사산물을 생산하는 것으로 알려져 있고[2], 이중 올리고파이롤(oligopyrrole) 계열의 붉은색 항생물질 운데실프로디지닌(undecylprodiginine)과 스트렙토루빈(streptorubin) B는(Fig. 1) 23개의 동일 생합성 유전자에 의해 합성되며, 폴리케타이드 합성효소(PKS) 및 비리보솜 펩타이드 합성효소(NRPS)의 혼합 생합성 경로를 통해 합성된 2-undecylpyrrole(UP)과 4-methoxy-[2,2'-bipyrrrole]-5-carboxaldehyde(MBC)의 최종 응축 결합으로 이루어지는 것으로 알려져 있다[5, 8]. 최근 몇몇 프로디지닌(prodiginine)들은 항세포사멸 효과를 조절하는 BCL-2 family 단백질에

\*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-4446, Fax: 82-2-3277-3419

E-mail: sangjoon@ewha.ac.kr

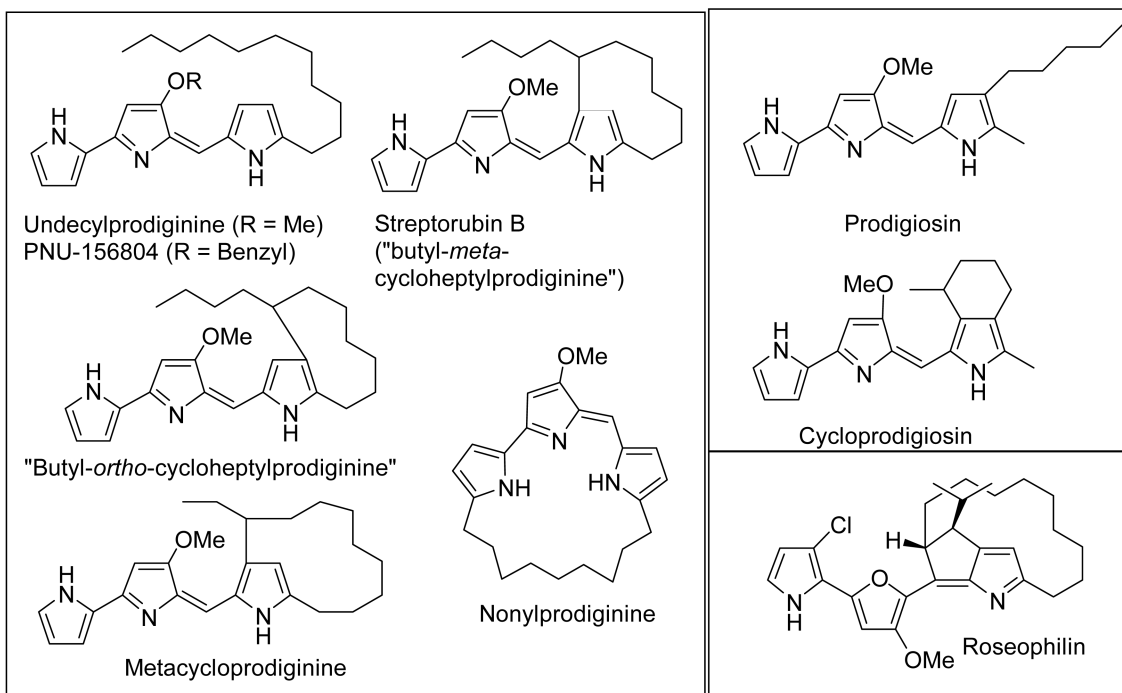


Fig. 1. Structures of prodiginine family.

결합, pro-apoptotic BH3 단백질의 결속을 방해하여 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 역할을 가진 것으로 보고되었고 [23], 합성 프로디지닌 화합물 ‘obatoclax’(GX15-070)가 다양한 암세포 치료를 위한 임상치료 시험단계로 알려지면서 큰 관심을 불러일으키고 있다(Fig. 1)[21]. 최근, 영국의 Challis 그룹은 스트렙토루빈 B의 생합성 경로를 조절하는 효소를 발견, 실험실에서 합성하기 어려운 한계를 가지고 있던 유망 항암제 및 그 관련 유도체들을 세포내 합성능력과 조합 유기합성(conventional organic synthesis)을 혼용함으로써 다양한 구조의 항암 활성을 가진 프로디지닌 화합물 개발을 제시하는 연구 결과를 발표하였다[10].

방선균 유래 이차대사물질의 생합성 시기가 세포의 배양 상태, 외부적 스트레스 및 성장속도와 밀접한 관계가 있는 것은 이미 알려진 사실이고, 최근 다양한 외부적 스트레스에 따른 생리활성물질의 생산 변화에 관한 연구가 많이 진행되고 있다[22]. 특히 pH 변화에 따른 생리활성물질의 생산성 증가 및 관련 유전자의 조절 기작이 많이 밝혀져 pH 변화를 통한 생리활성 물질의 생산성 극대화 가능성이 입증되고 있는 단계이다[18, 19, 20]. 따라서 본 연구에서도 외부적 스트레스인 pH의 변화를 생리활성물질의 특성이 전혀 다른 프로디지닌을 생산하는 *S. coelicolor* M511에 적용하여 pH 변화에 의해 prodiginine 계열 화합물 생산성이 증가함을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 연구에서는 프로디지닌 생산 균주 *S. coelicolor* M511을 Warwick 대학의 Dr. Greg Challis로부터 분양 받아 사용하였다. 균주의 보관 및 배양은 표준실험 방법을 따랐으며 [17], 고체배지에서의 pH shock 실험은 선행연구 방법을 따라 수행하였다[16, 19, 20]. 동량의 균주를 접종하여 배양하기 위해 glycerol 포자 저장 용액 100  $\mu$ L를 셀로판 디스크 위에 접종하여 실험하였다. 배지의 pH 조성이 초기 균주의 성장에 영향을 미칠 수도 있으므로, 배양 균주가 붉은색을 생산하기 시작할 때까지는 R2YE 배지의 셀로판 디스크 위에서 배양한 후, 균주가 배양된 셀로판 디스크만 각기 다른 pH 배지에 각각 무균적으로 옮긴 후 6일을 더 배양하였다. 대조군(control)으로는 R2YE 배지[17]에서 키운 균주를 사용하였다.

### 분석방법

각 pH별 배지의 셀로판 디스크 위에서 배양한 균주를 동량의 methanol로 2일간 추출한 후 추출물을 정량적으로 비교 분석하기 위하여 회전식 증발기(BÜCHI Rotavapor R-200, Switzerland)를 이용하여 농축시키고 이를 200  $\mu$ L methanol로 용리하였다. 용리한 시료 10  $\mu$ L를 미리 준비된 산성화된 methanol 990  $\mu$ L에 넣고 자외/가시선 분광광도계(Varian Cary 5000, USA)를 사용하여 파장 530 nm( $\epsilon_{530} = 100, 500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )의 흡광도를 정량분석에 사용하였다[24].

추출물의 정성적 분석은 HPLC를 사용하였으며, 컬럼은 Supelco Discovery HS C<sub>18</sub> 컬럼(5 µm, 4.6×250 mm, Supelco, USA), 이동상은 A: methanol:acetonitrile:water(40:10:50, (v/v)%/B: methanol (100, (v/v)%을 이용하여 60분까지 기울기 용리법으로 수행하였고 유속은 0.5 mL/min, 검출은 530 nm에서 확인하였다. 대조군(control)으로는 R2YE 배지 [17]에서 자란 균주 추출액을 사용하였다.

**항진균 활성 측정**

각 pH에서 배양한 세포로부터 추출된 전체 프로디지닌의 항진균 활성 변화를 알아보기 위해 *Trichophyton mentagrophytes*를 사용하여 활성 실험을 수행하였다. *T. mentagrophytes*는 Sabourauds agar 배지(Peptone 10 g, dextrose 40 g, agar 20 g, 증류수 1 L)에 곰팡이 포자를 접종하여 30°C에서 6 hr정도 배양한 후, 정량분석에 사용하였던 추출물 10 µL를 종이 디스크에 흡수시켜 올려놓고 1-2일 더 배양한 다음 항진균 활성을 측정하였다. 대조군(control)으로는 R2YE 배지[17]에서 자란 균주의 추출액을 사용하였다.

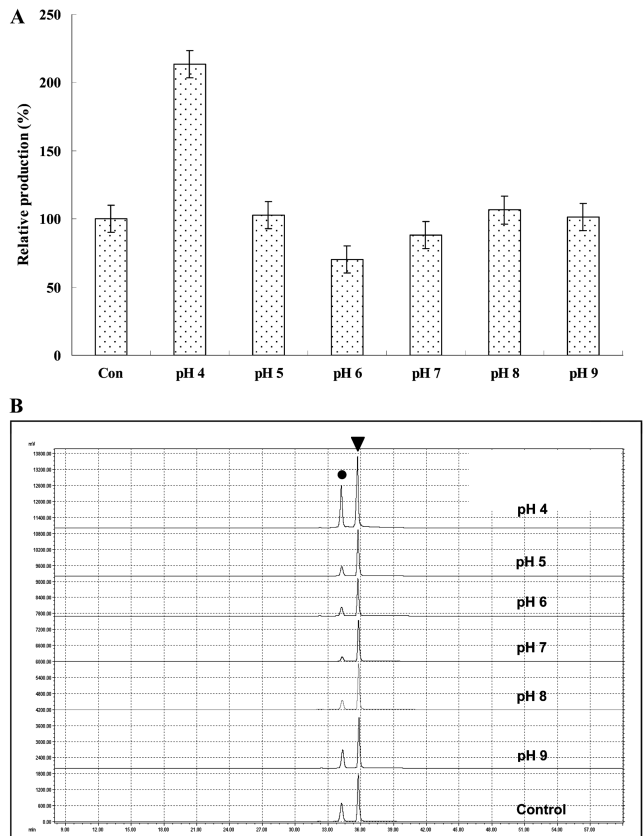
**결과 및 고찰**

**pH 변화에 따른 전체 프로디지닌 생산량 변화**

pH 변화에 따른 *S. coelicolor* 균주의 프로디지닌 생산성 변화를 관찰하기 위하여, 각기 다른 pH에서 자란 균주의 셀로판 디스크만 회수하여 동량의 methanol이 들어있는 비이커에 넣고 추출하였고, 전체 프로디지닌 생산량은 파장 530 nm의 흡광도를 이용하여 확인하였다. pH 4의 산성 배지에서 자란 균주의 전체 프로디지닌의 양은 비교군(control) 보다 약 2배 이상 생산량이 증가하였다(Fig. 2A). 특히 pH 4와 pH 5의 경우 두 실험군의 pH 차이는 1이지만 전체 프로디지닌 생산량은 2배 이상 차이 나는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 그러나, 실험 배지의 pH가 염기성인 경우 비교군과 비교하여 생산량의 차이는 없었다. 이것은 고체배지에서 pH shock에 의한 환경변화가 중성과 염기성의 경우보다는 산성인 경우가 이차대사산물의 생산성 극대화에 더 효과적인 방법임을 알 수 있었고, 이 결과는 *Streptomyces kasugaensis*가 생산하는 kasugamycin, *S. coelicolor*가 생산하는 actinorhodin과 methylenomycin에서도 동일한 결과가 관찰되었다[9, 18, 19].

**pH 변화에 따른 전체 프로디지닌 정성분석**

HPLC를 사용하여 pH 변화에 따른 전체 프로디지닌의 정성적 분석을 하였다. *S. coelicolor*는 스트렙토루빈 B와 운데실프로디지닌을 1:2의 비율로 생산하는데, pH 4의 산성배지에서 자란 균주의 경우 비율이 1.3:2로 스트렙토루빈 B의 생산량이 약간 증가했으며, 대조군과 비교할 때 스트렙토루빈 B 생산량은 2배, 운데실프로디지닌 생산량은 1.6배 증가하

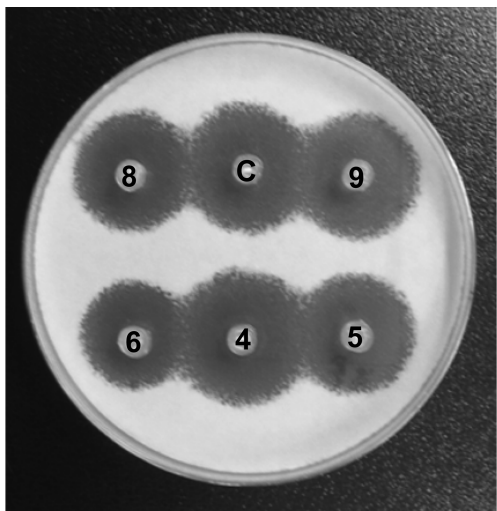


**Fig. 2. The overall production and HPLC analysis of prodiginine in pH shocked *S. coelicolor* M511.** (A) The overall prodiginine concentration was determined by absorbance at 530 nm of a methanolic mycelia extract. Con; control. (B) HPLC analysis of methanol extract of *S. coelicolor* M511 cultured at pH 4, 5, 6, 7, 8, and 9. Analysis of prodiginines were carried out by reverse-phase HPLC and detected by absorbance 530 nm. ●, Streptorubin B; ▼, Undecylprodiginine. Control is *S. coelicolor* M511 culture extracts from R2YE medium.

였다(Fig. 2B). 그러나, pH 7의 배지에서 자란 균주의 스트렙토루빈 B는 대조군과 비교하여 생산량이 3.8배 감소하였고, 운데실프로디지닌 생산량은 1.2배 감소하는 오차범위의 변화를 보였다(Fig. 2B). 이런 결과는 배지의 산성화가 전체 프로디지닌의 생산성 향상에는 관여를 하나 이들 붉은색 항생제 계열 화합물 생합성에는 필수적 요인이 아니며, 다만 산성 조건의 환경적 변화가 이차대사물질 신호전달 시스템을 활성화시켜 생산성 증가로 연결되는 결과를 낳은 것으로 사료된다.

**항진균 능력 검사**

정량분석에 사용한 시료를 이용하여 프로디지닌의 항진균 활성을 알아보았다. *T. mentagrophytes*를 이용한 항진균 활성 실험에서도 pH 4의 배지에서 자란 균주 추출물이 중성 및 염기성 배지에서 자란 균주 추출물 보다 강한 항진균 활성을 보였다(Fig. 3). 고체배지의 pH 변화가 균주의 프로디



**Fig. 3. Antifungal activity assays of crude products from pH shocked *S. coelicolor* M511.** 4, *S. coelicolor* M511 culture extracts from modified R2YE medium (pH 4); 5, *S. coelicolor* M511 culture extracts from modified R2YE medium (pH 5); 6, *S. coelicolor* M511 culture extracts from modified R2YE medium (pH 6); 8, *S. coelicolor* M511 culture extracts from modified R2YE medium (pH 8); 9, *S. coelicolor* M511 culture extracts from modified R2YE medium (pH 9); C, *S. coelicolor* M511 culture extracts from R2YE medium (control).

지닌 생산력을 증가시키는 매우 효과적인 방법임을 다시 한번 입증하는 실험이었고, 이런 동일한 결과는 다른 방선균에서도 관찰되었다[16]. 다만 중성 및 염기성 배지조건의 균주 배양은 전체 프로디지닌의 생산량의 급격한 감소로 이어지지 않았고, 이러한 결과가 항진균 활성 실험에서도 관찰되는 것을 알 수 있었다.

## 요 약

운데실프로디지닌과 스트레토틴 B는 *S. coelicolor*가 생산하는 붉은색 항생물질이다. 이번 연구에서 이들 붉은색 항생제의 생산성과 pH shock 스트레스와의 상관관계를 연구하였다. unde실프로디지닌과 스트레토틴 B의 생합성은 고체 R2YE 배지에서 산성 pH shock에 의해 증가되었다. 최적 pH shock은 pH 4로 비교균과 비교하여 각각 1.6배 및 2배 unde실프로디지닌과 스트레토틴 B의 생산성이 증가되었다. 게다가, 산성 pH 4의 세포 추출물은 *T. mentagrophytes*에 대한 주목할만한 저항 활성을 나타내었다. 그러나, 중성 및 염기성 pH shock에서는 이들 항생제의 생산성뿐만 아니라 항진균 활성 증가가 일어나지 않았다. 그러므로, 비록 산성 pH shock이 간단하고 쉬운 방법이지만, 이들 붉은색 항생물질과 다른 이차대사산물의 생산성 향상에는 매우 효과적인 접근방법일 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 국토해양부 해양 극한생물 분자유전체 연구단 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Anderson, 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.
- Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, and D. A. Hopwood. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.
- Beppu, T. 1995. Signal transduction and secondary metabolism: Prospects for controlling productivity. *Trends Biotechnol.* **13**: 264-269.
- Bruheim, P., H. Sletta, M. J. Bibb, J. White, and D. W. Levine. 2002. High-yield actinorhodin production in fed-batch culture by a *Streptomyces lividans* strain overexpressing the pathway-specific activator gene *actII-ORF4*. *J. Ind. Microbiol. Biotech.* **28**: 103-111.
- Cerdeño, A. M., M. J. Bibb, and G. L. Challis. 2001. Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): new mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem. Biol.* **8**: 817-829.
- Chater, K. F. 1992. Genetic regulation of secondary metabolic pathway in *Streptomyces*. *Ciba Found. Symp.* **171**: 144-162.
- Chater, J. K. 1998. Talking in genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology* **144**: 1465-1478.
- Gerber, N., A. McInnes, D. Smith, J. Walter, J. Wright, and L. Vining. 1978. Biosynthesis of prodiginines. <sup>13</sup>C assignments and enrichment pattern in nonyl-, cyclononyl-, methylcyclodecyl-, and butylcycloheptylproginine produced by actinomycete cultures supplemented with <sup>13</sup>C-labeled acetate and <sup>15</sup>N-labeled nitrate. *Can. J. Chem.* **56**: 1155-1163.
- Hayes, A., G. Hobbs, C. P. Smith, S. G. Oliver, and P. R. Butler. 1997. Environmental signals rigging methylenomycin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **179**: 5511-5.
- Haynes, S. W., P. K. Sydor, A. E. Stanley, L. Song, and G. L.

- Challis. 2008. Role and substrate specificity of the *Streptomyces coelicolor* RedH enzyme in undecylprodiginine biosynthesis. *Chem. Commun.* **16**: 1865-1867.
11. 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.
  12. Horinouchi, S. 2003. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 462-467.
  13. Horinouchi, S. and T. Beppu. 1992. Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces*: A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene* **115**: 167-172.
  14. Hu, H., Q. Zhang, and K. Ochi. 2002. Activation of antibiotic biosynthesis by specified mutations in the *rpoB* gene (encoding the RNA polymerase  $\beta$  subunit) of *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **184**: 3984-3991.
  15. Hung, J. L., C.-J. Lih, K.-H. Pan, and S. N. Cohen. 2001. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthesis pathways in *Sytreptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes Dev.* **15**: 3183-3192.
  16. Hur, Y. A., S. S. Choi, Y. K. Chang, S. K. Hong, and E. S. Kim. 2007. Solid medium pH-dependent antifungal activity of *Streptomyces* sp. producing an immunosuppressant, Tautomycetin. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 26-29.
  17. Keiser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
  18. 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.
  19. Kim, Y. J., J. Y. Song, M. H. Moon, C. P. Smith, S. K. Hong, and Y. K. Chang. 2007. pH shock induces overexpression of regulatory and biosynthetic genes for actinorhodin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 1119-1130.
  20. Kim, Y. J., M. H. Moon, J. Y. Song, C. P. Smith, S. K. Hong, and Y. K. Chang. 2008. Acidic pH shock induces the expressions of a wide range of stress-response genes. *BMC Genomics* **9**: 604.
  21. Nguyen, M., R. C. Marcellus, A. Roulston, M. Watson, L. Serfass, M. S. R. Murthy, D. Goulet, J. Viallet, L. Bélec, X. Billot, S. Acoca, E. Purisima, L. Wiegmans, L. Cluse, R. W. Johnstone, P. Beauparlant, and G. C. Shore. 2007. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 19512-19517.
  22. Sevcikova, B. and J. Kormanec. 2004. Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodiginin, upon salt stress conditions. *Arch. Microbiol.* **181**: 384-389.
  23. Shore, G. C., J. Bajorath, F. L. Stahura, and M. S. R. Murthy. 2003. *International Patent application WO 2003015788*.
  24. Williams, R. P., J. A. Green, and D. A. Rappo-Port. 1956. Studies on pigmentation of *Serratia marcescens*. I. Spectral and paper chromatographic properties of prodiginine. *J. Bacteriol.* **71**: 115-120.

(Received May 10, 2010/Accepted July 8, 2010)