

Cloning and Functional Analysis of Gene Coding for S-Adenosyl-L-Methionine Synthetase from *Streptomyces natalensis*

Dong-Min Yoo, Yong-Il Hwang and Sun-Uk Choi\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Republic of Korea

Received November 4, 2010 / Accepted January 19, 2011

S-Adenosyl-L-methionine synthetase (SAM-s) catalyzes the biosynthesis of SAM from ATP and L-methionine. SAM plays important roles in the primary and secondary metabolism of cells. A *metK* encoding a SAM-s was searched from *Streptomyces natalensis* producing natamycin, a predominantly a strong antifungal agent, inhibiting the growth of both yeasts and molds and preventing the formation of aflatoxin in filamentous fungi. To obtain the *metK* of *S. natalensis*, PCR using primers designed from the two highly conserved regions for *metK* genes of *Streptomyces* strains was carried out, and an intact 1.2-kb *metK* gene of *S. natalensis* was cloned by genomic Southern hybridization with PCR product as a probe. To identify the function of the cloned *metK* gene, it was inserted into pSET152ET for its high expression in the *Streptomyces* strain, and then introduced into *S. lividans* TK24 as a host by transconjugation using *E. coli* ET12567(pUZ8002). The high expression of *metK* in *S. lividans* TK24 induced actinorhodin production on R5 solid medium, and its amount in R4 liquid medium was 10-fold higher than that by exconjugant including only pSET152ET.

**Key words** : *Streptomyces natalensis*, S-adenosyl-L-methionine synthetase, cloning, actinorhodin

## 서 론

방선균(actinomycetes)은 포자를 형성하는 대표적인 토양 원핵 미생물로서, 항생제와 항암제 그리고 면역억제제 등 수많은 유용 생리활성물질을 생산한다는 점에서 산업적으로 대단히 주목받는 미생물이다. 현재까지 보고된 전체 생리활성물질 중 약 60% 이상이 방선균에 의해서 생산되고 있으며 항생제의 경우에는 약 70%에 달한다. 방선균의 이차대사산물 생산 제어에는 regulatory cascade의 상위단계에 존재하는 global regulator와 이차대사산물 생합성 유전자군의 발현을 직접 활성화시키는 하위단계의 pathway-specific regulator (transcription activator)가 복잡한 상호관계를 형성하며 관여하고 있다는 것이 *Streptomyces*속 방선균의 연구를 통해 밝혀졌다[6,8,11,13].

ATP와 L-methionine으로부터 SAM synthetase (SAM-s)에 의해 생합성 되는 S-adenosylmethionine (SAM)은 세포내 단백질, 핵산, 지질, 다당류 등의 메틸화에 필요한 메틸기를 제공하는 중심적인 공급체의 역할을 할뿐만 아니라 일차 및 이차 대사산물의 생합성 조절에도 관여하고 있다는 것이 밝혀졌다[4,5,19]. 방선균의 연구를 통해 *metK* (methionine metabolic gene K) 유전자의 과발현과 SAM의 외부적인 첨가를 통해 항생물질생산이 증가되는 것이 보고되었는데 이러한 결과는 세포내 SAM이 방선균의 이차대사산물생산 유도에 관련된 경로 특이적 조절 유전자(pathway-specific regulatory genes)의 발

현에 직접 또는 간접적으로 관여하고 있기 때문으로 판단된다[7,13,14]. Park 등[14]의 보고에 의하면 *S. coelicolor* M145에 2  $\mu$ M SAM의 외부적인 첨가를 통해 항생물질의 생산이 증가되고 형태분화가 억제되었는데 SAM의 첨가는 형태분화의 조절 cascaded와 관련 깊은 oligopeptide-binding component의 발현을 촉진한다는 것이 *S. coelicolor* M145의 단백질 profiling 연구를 통해 밝혀졌다[14]. 또한 정확한 원인은 아직 밝혀지지 않았지만 SAM의 생합성능력은 같더라도 이차대사산물생산에 미치는 영향은 *metK*에 따라 다르다는 것이 최근 연구에 의해 밝혀졌다[12]. 그러나 *metK* 유전자에 대한 연구는 지금까지 일부 방선균에 제한되어 왔으며 다양한 방선균에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 인체에 대해 높은 안정성을 가짐으로써 진균성 질환뿐만 아니라 치즈와 육가공품과 같은 비살균 식품의 보존을 위해 폭넓게 사용되고 있어 산업적으로 매우 중요한 항진균성 항생물질인 natamycin [1,3,10]을 생산하는 *S. natalensis*로부터 SAM synthetase 코드하는 *metK* 유전자를 클로닝하고 그 특성을 조사하여 유용 이차대사산물의 생산 조절 연구에 보탬이 되고자 한다.

## 재료 및 방법

사용균주, plasmid 및 배양조건

본 연구에서 *metK* 유전자의 클로닝을 위한 공시균은 natamycin을 생산하는 *S. natalensis* ATCC 27448이며, 클로닝을 위한 벡터로는 pUC19와 숙주로 *E. coli* XL-10Gold를 사용하였

## \*Corresponding author

Tel : +82-55-249-2258, Fax : +82-55-249-2995

E-mail : suchoi@kyungnam.ac.kr

다. Actinorhodin의 생산을 위해 고체배양은 R5배지[16], 액체 배양은 R4배지[17]를 각각 사용하였다. 액체배양은 *S. lividans* TK24의 wild-type과 형질전환체 포자들( $5 \times 10^5$ )을 20 ml (300 ml erlenmeyer flask) R4배지에 접종하여 28°C, 140 rpm에서 72시간 배양한 후, 100 ml (500 ml erlenmeyer flask) R4배지에 2%가 되도록 접종하여 5일간 본배양을 실시하였다.

#### DNA 조작 및 염기서열 결정

대장균에서의 DNA 분리 및 형질전환은 Sambrook 등[16]의 방법을 사용하였고 *S. natalensis*의 genomic DNA는 Rao 등[15]의 방법으로 회수하였다. *S. natalensis*로부터 *metK* 유전자의 클로닝을 위해 방선균 유래 MetK로부터 확인된 보존성이 높은 2영역을 토대로 제작된 F2 (5'-CGGAATTCARG GNCAYCCSGAYAARATC-3')와 R2 (5'-CGGAATTCTCN ACYTTSSWSGGRTCYTT-3')를 primer로 사용하여 PCR을 진행하였다. 얻어진 PCR 산물은 pUC19를 이용하여 클로닝한 후, ABI PRISM TM 3100 (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였으며 NCBI의 BLASTX 상동성 검색을 통해 PCR산물을 동정하였다. Southern blot과 Colony hybridization을 위해 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Tokyo, Japan)와 0.5-kb *metK* 유전자 단편을 probe로 사용하였다.

#### *metK* 고발현용 재조합 플라스미드 및 형질전환체의 구축

*metK* 유전자의 고발현 벡터를 구축하기 위해 erythromycin 내성유전자의 프로모터를 토대로 만든 *ermE* 프로모터와 apramycin 내성유전자(*apr<sup>r</sup>*), *phC31* 유래의 attachment site (*attP*)와 integrase (*int*), 그리고 RK2 *oriT*를 포함하고 있어 접합전달의 부위-특이적 재조합(site-specific recombination) 벡터로 사용되는 pSET152ET (6 kb) [2]를 이용하여 *metK*의 고발현을 위한 재조합 플라스미드(pCD1)를 구축하였다. pSET152ET 벡터의 *lacZ* 유전자에 존재하는 *Ban*HI과 *Xba*I site에 자체 ribosome-binding sequence와 terminator를 포함한 1.3-kb *metK* 유전자 단편을 삽입하여 *metK* 고발현용 재조합 플라스미드인 pCD1을 제작하였다. 또 pCD1을 *S. lividans* TK24에 도입하기 위해 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 DNA 공여균주로 사용하는 접합전달법(conjugal transfer)을 이용하였다. pCD1을 포함하는 공여균주 *E. coli* ET12567/pUZ8002은 apramycin (50 µg/ml), chloramphenicol (25 µg/ml), kanamycin (50 µg/ml)이 첨가된 LB 배지에 접종한 후, OD<sub>600</sub>에서 0.4가 될 때까지 배양하여 침전 회수하고 0.1배의 LB 배지로 재현탁하여 0.5 ml 2×YT에 현탁된  $1 \times 10^5$  *S. lividans* TK24 포자와 잘 혼합한 다음, 원심분리하여 상정액을 제거한 뒤 얻어진 pellet을 10 mM의 MgCl<sub>2</sub>를 포함한 MS배지에 도말하고 28°C에서 16~20시간 동안 정치배양하였다. 형질전환체의 선별을 위해 1.5 ml의 살균수에 0.5

mg의 nalidixic acid와 1 mg의 apramycin을 첨가하여 배지 위에 중첩시킨 후, 28°C에서 6일간 더 배양하였다. 선발된 접합전달체를 nalidixic acid (25 µg/ml) 및 apramycin (25 µg/ml)이 함유된 선택 배지에 계대배양한 뒤 얻어진 균주들로부터 chromosome DNA를 추출하고 PCR를 이용하여 형질전환 유무를 확인하였다.

#### Actinorhodin 측정과 *metK* 염기서열의 GeneBank 등록

R4 액체배지에서 생산된 actinorhodin의 생산량은 Kieser 등[9]의 방법에 의해 측정되었으며 본 논문에 보고된 *S. natalensis* ATCC 27448의 *metK* 염기서열은 GeneBank에 accession number AB524882로 등록되었다.

### 결과 및 고찰

*S. natalensis*로부터 SAM-s를 코딩하는 *metK* 유전자의 클로닝

*S. natalensis*로부터 SAM-s를 코딩하는 *metK* 유전자를 클로닝하기 위해 지금까지 확인된 방선균 유래 MetK로부터 보존성이 높은 2영역을 확인하였으며 방선균의 codon usage를 고려해 PCR을 위한 primer를 제작하였다. 제작된 primer와 *S. natalensis*로부터 얻어진 genomic DNA를 주형으로 사용한 PCR에서 854 bp의 예상된 PCR 산물을 획득할 수 있었으며 염기서열분석을 통해 *S. lydicus*, *S. peuceticus*, 그리고 *S. spectabilis* 유래의 MetK들과 아미노산서열에서 90%이상의 높은 상동성을 보인다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 PCR을 통해 획득된 산물이 *S. natalensis* 유래 *metK* 유전자의 일부분으로 확인됨에 따라 전체 *metK* 유전자의 ORF를 클로닝하기 위한 Southern blot과 Colony hybridization의 probe로 사용한다. *metK* 유전자를 클로닝하기 위해 *S. natalensis*의 genomic DNA를 *Ecd*RI과 *Pvu*I으로 처리하고 Southern blot을 실시한 결과 약 4 kb 부근에 강한 positive signal을 확인할 수 있었다. 따라서 *Ecd*RI과 *Pvu*I으로 처리한 genomic DNA를 전기영동한 후 4 kb 부근의 genomic DNA를 겔로부터 회수하고 T4 DNA polymerase의 평활화와 *Hind*III-*Sma*I adaptor의 연결 후 *Hind*III로 처리된 pUC19에 삽입하여 *E. coli* XL-10Gold에 형질전환시켰다. 획득된 형질전환체들은 Colony hybridization을 통해 positive 콜로니를 확인하였으며 그 결과 300개의 형질전환체 중 5개의 콜로니로부터 positive signal을 확인할 수 있었다. 얻어진 5개의 콜로니들은 모두 동일한 3,950 bp의 DNA 단편을 포함하고 있었으며 염기서열분석결과 3개의 ORF가 존재하고 있다는 것이 확인되었다(Fig. 1A, B). 또한 Fig. 1C에서 보는 바와 같이 NCBI의 database를 이용한 BLAST 검색을 통해 1,209 bp (402 amino acid, 43.5 kDa)의 염기를 가진 *orf2*는 *S. peucetius* ATCC 27952와 *S. pristinaespiralis* ATCC 25486의 MetK (accession no. CAJ43279.1,

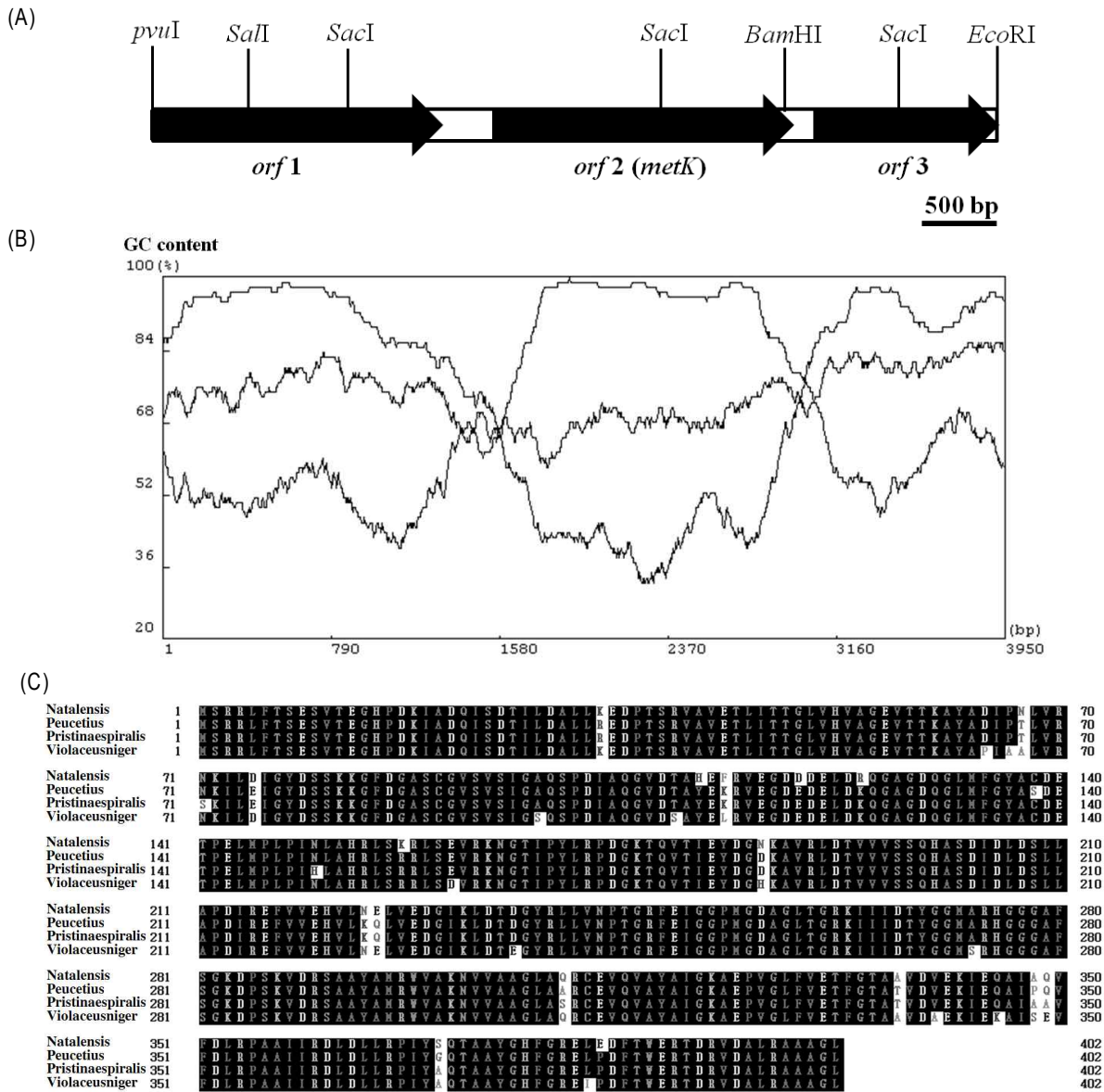


Fig. 1. (A) Gene organization of the 4-kb *PvuI-EcoRI* DNA fragment cloned from *S. natalensis* genomic DNA. *orf3* is truncated. (B) Frame analysis of the 4-kb *PvuI-EcoRI* region. (C) Alignment of overall amino acid sequences of MetKs. *Natalensis*, *S. natalensis* ATCC 27448 (this study); *Peuceetius*, *S. peuceetius* ATCC 27952 (accession no. CAJ43279.1); *Pristinaespiralis*, *S. pristinaespiralis* ATCC 25486 (accession no. ZP\_06912940.1); *Violaceusniger*, *S. violaceusniger* Tu 4113 (accession no. ZP\_07605998.1).

ZP\_06912940.1)와 96%, *S. violaceusniger* Tu 4113의 MetK (accession no. ZP\_07605998.1)와 95% 일치하는 매우 높은 상동성을 보였다. 따라서 *orf2*는 *S. natalensis*에서 SAM-s를 코딩하는 *metK* 유전자로 확인되었으며 GeneBank에 accession number AB524882로 그 염기서열이 등록되었다. 또 *orf1*과 *orf3*는 각각 *S. violaceusniger* Tu 4113의 phosphopantothenoylecysteine decarboxylase (accession no. ZP\_07605997.1)와 85%, 그리고 primosome assembly protein PriA (accession no. ZP\_07605999.1)와 80%의 상동성을 보였다.

*metK* 고발현용 플라스미드 및 형질전환체의 구축

본 연구를 통해 클로닝된 *S. natalensis* 유래 *metK* 유전자가 방선균에서 이차대사산물생산 유도 기능을 포함하고 있는지 확인하기 위해 재료 및 방법에서 설명된 것과 같이 *armE* 프로모터를 가진 pSET152ET 벡터를 이용하여 *metK* 고발현용 플라스미드(pCD1)를 구축하였다(Fig. 2). 구축된 pCD1은 접합전달법을 이용하여 방선균의 분자생물학적인 연구와 이차대사산물생산 제어 유전자 연구에 사용되고 있는 *S. lividans* TK24의 genomic DNA로 도입되었으며 Southern blot analysis를 통해 삽입된 pCD1이 여러 세대 동안 *S. lividans* TK24의 ge-

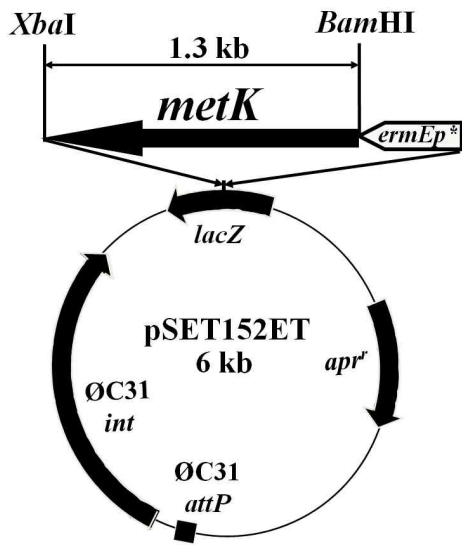


Fig. 2. Construction of pCD1 vector for high expression of *metK* gene. *ermE\** was derived from promoter of erythromycin resistance gene. *apr'*, apramycin resistance gene; ØC31 *int*, integrase gene; *attP*, attachment site of genomic *attB* site.

genomic DNA에 안정하게 유지되고 있는지 확인되었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 PCR로 얻어진 0.5-kb *metK* 유전자 단편을 probe로 사용한 Southern blot analysis에서 *S. lividans* TK24의 wild-type (lane 1)과 pSET152ET벡터만이 도입된 형질전환체 (lane 2)에서는 어떠한 signal도 보이지 않았지만 pCD1이 도입된 뒤 5번 이상의 계대배양을 거친 형질전환체 (lane 3)에서는 재조합 플라스미드 pCD1 (lane 4)과 같이 *metK* 유전자에 대한 positive signal이 명확하게 확인되었다. 따라서 *S. lividans* TK24의 genomic DNA에 도입된 재조합 플라스미드 pCD1이 여러 세대 동안 안정하게 유지되고 있음을 확인할 수 있었다.

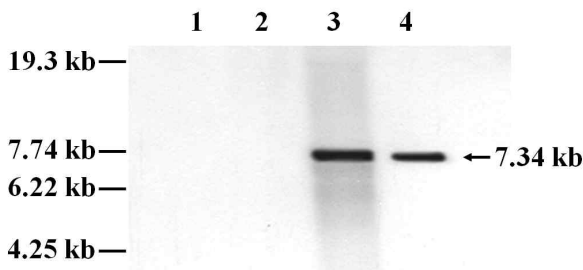


Fig. 3. Southern hybridization analysis of *EcdRI*-digested genomic DNAs and plasmid. Lane 1, *S. lividans* TK24 wild-type strain; lane 2, pSET152ET-integrated strain; lane 3, pCD1-integrated strain; lane 4, pCD1. The probe used was 0.5-kb PCR fragment amplified from the *metK* gene.

*metK* 고발현을 이용한 *S. lividans* TK24의 actinorhodin 생산 유도

*S. lividans* TK24는 *S. coelicolor* A3(2)와 유전적으로 매우 유사하여 색소계 항생물질인 actinorhodin을 생산할 수 있는 정상적인 생합성 유전자군을 가지고 있지만 경로특이적 촉진인자(pathway-specific activator)의 발현을 유도할 수 있는 조절인자의 기능부족으로 인하여 일반적인 조건에서는 *S. coelicolor* A3(2)와 달리 actinorhodin을 전혀 생산하지 못하는 특징을 가진 방선균이다[9]. 따라서 *S. natalensis* 유래 *metK*의 이차

(A)



(B)

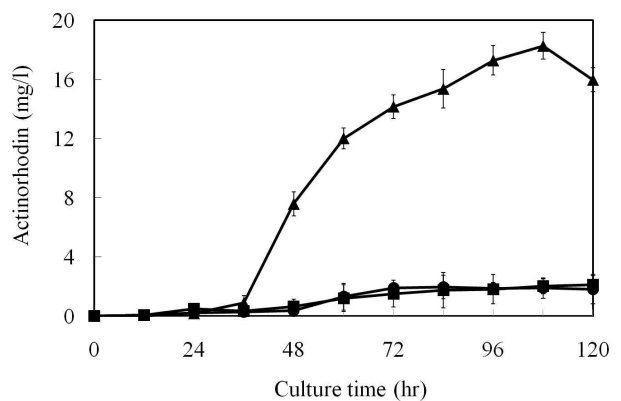


Fig. 4. Effect of the introduction of pCD1 on the production of actinorhodin (blue color) in *S. lividans* TK 24. (A) For solid culture spores of each strain were inoculated on R5 agar medium, followed by incubation for 7 days at 28°C. 1, *S. lividans* TK24 wild-type strain; 2, pSET152ET-integrated strain; 3, pCD1-integrated strain. (B) For liquid culture spores ( $5 \times 10^5$ ) of each strain was inoculated in R4 medium, followed by incubation for 5 days at 28°C on a rotary shaker (180 rpm). Symbols: solid circles, *S. lividans* TK24 wild-type strain; solid square, pSET152ET-integrated strain; solid triangle, pCD1-integrated strain. Bars represent SD of three experiments (n=3).

대사산물생산 유도 기능을 확인하기 위해 *S. lividans* TK24를 이용하여 *metK*의 고발현이 *S. lividans* TK24로부터 actinorhodin의 생산을 유도할 수 있는지 확인해 보았다. 그 결과 Fig. 4A에서 보는 바와 같이 R5 고체배지에 배양한 *S. lividans* TK24의 wild-type과 pSET152ET벡터만이 도입된 균주에서는 어떠한 색소의 생산도 확인되지 않은 반면에 재조합 플라스미드 pCD1이 도입된 형질전환체의 주변에는 파란색 항생물질인 actinorhodin의 생산이 강하게 유도된 것을 확인할 수 있었다. 또한 R4 액체배지에서도 actinorhodin의 생산량 차이를 명확히 확인할 수 있었는데 *S. lividans* TK24의 wild-type과 pSET152ET벡터, 그리고 재조합 플라스미드 pCD1이 도입된 균주들의 액체배양에서 균체량의 차이는 없었던(자료 미제시) 반면에 pCD1이 도입된 형질전환체의 actinorhodin 생산량은 다른 두 균주들에 비해 월등히 높았다. 또한 Fig. 4B에서 보는 바와 같이 *S. lividans* TK24의 wild-type과 pSET152ET벡터만이 도입된 형질전환체는 배양기간 120시간 동안 actinorhodin의 뚜렷한 증가를 확인할 수 없었지만 pCD1이 도입된 형질전환체에서는 배양 48시간부터 actinorhodin 생산이 시작되어 배양 108시간 만에 최고 생산량에 도달하였으며 wild-type에 비해 actinorhodin 생산량이 10배 증가되었다. 이러한 결과는 *metK* 유전자의 고발현과 SAM의 외부적인 첨가를 통해 actinorhodin의 생산량을 증가시킨 다른 연구결과들에 비해 생산량 증가치가 가장 큰 것이다[13,18,20]. 또한 본 연구를 통해 확인된 actinorhodin 생산의 증가는 *S. coelicolor* A3(2)의 연구결과[13]에서 보고된 것과 같이 *S. natalensis* 유래 *metK*가 *S. lividans* TK24로부터 actinorhodin의 생합성 유전자군의 발현을 직접 유도하는 경로특이적 촉진인자 ActII-ORF4의 발현을 직접 또는 간접적으로 증가시킨 것이 그 원인이 된 것으로 판단된다. 따라서 본 연구를 통해 클로닝된 *S. natalensis* 유래 *metK* 유전자는 방선균에서 이차대사산물생산을 유도할 수 있는 우수한 기능을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

### 감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.2008-0058974).

### References

1. Aparicio, J. F., A. J. Colina, E. Ceballos, and J. F. Martín. 1999. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. A new polyketide synthase organization encoded by two subclusters separated by functionalization genes. *J. Biol. Chem.* **274**, 10133-10139.
2. Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao, and B. E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**, 43-49.
3. Bolard, J. 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta.* **864**, 257-304.
4. Chiang, P. K., R. K. Gordon, J. Tal, G. C. Zeng, B. P. Doctor, K. Pardhasaradhi, and P. P. McCann. 1996. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* **10**, 471-480.
5. Fontecave, M., M. Atta, and E. Mulliez. 2004. S-adenosylmethionine: nothing goes to waste. *Trends Biochem. Sci.* **29**, 243-249.
6. Hesketh, A., J. Sun, and M. Bibb. 2001. Induction of ppGpp synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits *actII-ORF4* transcription and actinorhodin biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **39**, 136-144.
7. Huh, J. H., D. J. Kim, X. Q. Zhao, M. Li, Y. Y. Jo, T. M. Yoon, S. K. Shin, J. H. Yong, Y. W. Ryu, Y. Y. Yang, and J. W. Suh. 2004. Widespread activation of antibiotic biosynthesis by S-adenosylmethionine in streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 439-447.
8. Kawachi, R., U. Wangchaisoonthorn, T. Nihira, and Y. Yamada. 2000. Identification by gene deletion analysis of a regulator, *VmsR*, that controls virginiamycin biosynthesis in *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* **182**, 6259-6263.
9. Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
10. Martín, J. F. 1977. Biosynthesis of polyene macrolide antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 13-38.
11. Ohnishi, Y., S. Kameyama, H. Onaka, and S. Horinouchi. 1999. The A-factor regulatory cascade leading to streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: identification of a target gene of the A-factor receptor. *Mol. Microbiol.* **34**, 102-111.
12. Oh, T. J., N. P. Niraula, K. Liou, and J. K. Sohng. 2010. Identification of the duplicated genes for S-adenosyl-L-methionine synthetase (*metK1-sp* and *metK2-sp*) in *Streptomyces peucetius* var. *caesius* ATCC 27952. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 398-407.
13. Okamoto, S., A. Lezhava, T. Hosaka, Y. Okamoto-Hosoya, and K. Ochi. 2003. Enhanced expression of S-adenosylmethionine synthetase causes overproduction of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **185**, 601-609.
14. Park, H. S., S. K. Shin, Y. Y. Yang, H. J. Kwon, and J. W. Suh. 2005. Accumulation of S-adenosylmethionine induced oligopeptide transporters including BldK to regulate differentiation events in *Streptomyces coelicolor* M145. *FEMS Microbiol. Lett.* **249**, 199-206.
15. Rao, R. N., M. A. Richardson, and S. Kuhstoss. 1987. Cosmid shuttle vectors for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 166-198.
16. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor

- Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, New York.
17. Shima, J., A. Hesketh, S. Okamoto, S. Kawamoto, and K. Ochi. 1996. Induction of actinorhodin production by *rpsL* (encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **178**, 7276-7284.
  18. Shin, S. K., H. S. Park, H. J. Kwon, H. J. Yoon, and J. W. Suh. 2007. Genetic characterization of two S-adenosylmethionine-induced ABC transporters reveals their roles in modulations of secondary metabolism and sporulation in *Streptomyces coelicolor* M145. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**, 1818-1825.
  19. Wang, J. X. and R. R. Breaker. 2008. Riboswitches that sense S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine. *Biochem. Cell Biol.* **86**, 157-168.
  20. Xu, D., H. J. Kwon, and J. W. Suh. 2008. S-Adenosylmethionine induces BldH and activates secondary metabolism by involving the TTA-codon control of *bldH* expression in *Streptomyces lividans*. *Arch. Microbiol.* **189**, 419-426.

초록 : *Streptomyces natalensis*로부터 S-adenosyl-L-methionine synthetase 유전자의 클로닝 및 기능분석

유동민 · 황용일 · 최선욱\*

(경남대학교 식품생명학과)

ATP와 L-methionine으로부터 SAM synthetase (MetK)에 의해 생합성 되는 S-adenosylmethionine (SAM)은 세포내 메틸화에 필요한 메틸기를 제공하는 중심적인 공급체의 역할을 할뿐만 아니라 방선균에서는 일차 및 이차대사산물의 생산 조절에 관여하고 있다는 사실이 밝혀졌다. 이에 본 연구에서는 산업적으로 매우 중요한 항진균성 항생물질인 natamycin을 생산하는 *S. natalensis*로부터 SAM synthetase 코딩하는 *metK* 유전자를 클로닝하고 동정하였다. *S. natalensis*에서 클로닝된 *metK*는 1,209 bp의 염기를 가진 유전자로써 아미노산서열에서 *S. pristinaespiralis* ATCC 25486과 *S. peucetius* ATCC 27952의 MetK와 96%, *S. violaceusniger* Tu 4113과 95% 일치하는 매우 높은 상동성을 보였다. 또 pSET152ET 벡터를 이용해 구축한 *metK* 고발현용 재조합 플라스미드 pCD1를 *S. lividans* TK24의 genomic DNA에 도입하여 actinorhodin 생산 유도를 시도해 본 결과 R5 고체배지에서 pCD1이 도입되지 않은 균주에서는 actinorhodin 생산을 전혀 확인할 수 없었지만 pCD1이 도입된 형질전환체에서는 actinorhodin 생산이 강하게 유도되었으며 R4 액체배지에서는 actinorhodin 생산량이 10배 증가되었다. 따라서 본 연구를 통해 클로닝된 *S. natalensis* 유래 *metK* 유전자는 방선균에서 이차대사산물의 생산을 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.