The Korean Journal of Microbiology (2011) Vol. 47, No. 2, pp. 170-173
Copyright ⓒ 2011, The Microbiological Society of Korea

단 보

Sorangium cellulosum 균주들의 에포틸론 생합성 유전자 보존

현혜숙 · 윤진권 · 조경연*
호서대학교 생명공학과 점액세균은행

Conservation of the Epothilone-Biosynthetic Genes in *Sorangium cellulosum* Strains

Hyesook Hyun, Jinkwon Youn, and Kungyun Cho*
Myxobacteria Bank, Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 336-795, Republic of Korea
(Received June 13, 2011 / Accepted June 21, 2011)

The epothilone biosynthetic gene cluster (*epoA~F*, *epoK*) of *Sorangium cellulosum* KYC3013, an epothilone producing myxobacterium isolated in Korea, was cloned. When the amino acid sequences of the encoded proteins were compared with those from *S. cellulosum* SMP44, *S. cellulosum* So ce90, and *S. cellulosum* So0157-2, which were isolated in other continents or country, the proteins from different strains were 97.4-99.8% identical each other. This suggested that the epothilone-biosynthetic gene clusters are well conserved in *S. cellulosum* strains.

***Keywords*:** *Sorangium cellulosum*, epothilone, epothilone biosynthetic gene, myxobacteria

에포틸론(epothilone)은 택솔(taxol)과 유사하게 진핵세포의 미세소관 기능을 저해함으로써 항암활성을 갖는 물질이다(3). 에포틸론은 1993년에 독일의 Höfle 등(6)에 의해 점액세균 *Sorangium cellulosum* So ce90으로부터 유도체 A와 B가 처음 분리되었으며, 비슷한 시기에 미국 연구팀에 의해 *S. cellulosum* SMP44로부터도 분리되었다(1). 이후 다양한 에포틸론 유도체들이 분리되었는데(5), 이들 중 Bristol-Myers Squibb (BMS)가 항암제로 개발한 에포틸론-B 유도체 익사벱필론(ixabepilone)이 2007년 미국 식품의약청의 승인을 받아 현재 익셈프라(Ixempra™)라는 제품명으로 판매되고 있으며(13), 다른 여러 유도체들도 임상 시험 중이다(2).

에포틸론은 폴리케타이드(polyketide)와 비리보솜 펩티드(non-ribosomal peptide)의 혼성체로 다기능 단백질 복합체인 폴리케타이드 합성효소(PKS)와 비리보솜 펩티드 합성효소(NRPS)에 의해 생합성된다(8, 11). 세균에서 발견되는 대부분의 폴리케타이드 합성효소 유전자들과 마찬가지로 에포틸론 생합성효소 유전자들도 염색체 상에서 유전자군으로 함께 존재한다. *S. cellulosum* So ce90의 에포틸론 생합성 유전자군은 Molnar 등(11)에 의해 클로닝되었으며, *S. cellulosum* SMP44의 에포틸론 생합성 유전자군은 Julien 등(8)에 의해 클로닝되었다. 에포틸론 생합성 유전자군은 크기가 대략 56 kb로 PKS loading 모듈(*epoA*), NRPS를 암호화하는 유전자(*epoB*), 8개의 PKS 모듈을 이루는 유전자들(*epoC~F*), 그리고 에포틸론-C, D를 에포틸론-A, B로 에폭시화시키는 P450 효소 유전자(*epoK*)로 구성되어 있다(8, 11).

S. cellulosum KYC3013은 LC-MS/MS 분석을 통해 에포틸론 생산이 직접 확인된 국내 분리 균주이다(7). 본 연구에서는 에포틸론 생합성 유전자군 전체를 클로닝하기 위하여 *S. cellulosum* KYC3013의 유전체 코스미드 라이브러리를 제조하였으며, 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 에포틸론 생합성 유전자를 갖는 클론들을 선별한 후, 유전자군의 전체 염기서열을 결정하였다. 코스미드 라이브러리 제조를 위해 *S. cellulosum* KYC3013을 ST21 배지(7)에서 배양한 후, 유전체 DNA를 분리하였으며, SuperCos1 Cosmid Vector kit (Stratagen, USA)를 사용하여 총 776개의 클론으로 구성된 라이브러리를 제조하였다. 에포틸론 생합성 유전자를 갖는 클론의 탐색은 *epoA*, *epoD*, *epoK* 유전자 부위를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머들을 사용한 PCR을 통해 이루어졌다. *epoA* 유전자를 갖는 클론의 탐색을 위해서는 올리고뉴클레오티드 5′-TCGTCTTGTCCCTTCAGCAC-3′과 5′-ACAGCCTCACGCACAGGTC-3′을 PCR 프라이머로 사용하였으며, *epoD* 유전자를 갖는 클론의 탐색을 위해서는 올리고뉴클레오티드 5′-GCAAGACCGACATACGGGAT-3′과 5′-CATCAAGCACACCATCATCG-3′을 PCR 프라이머로 사용하였다. *epoK* 유전자를 갖는 클론의

* For correspondence. E-mail: kycho@hoseo.edu; Tel: +82-41-540-5627; Fax: +82-41-548-6231

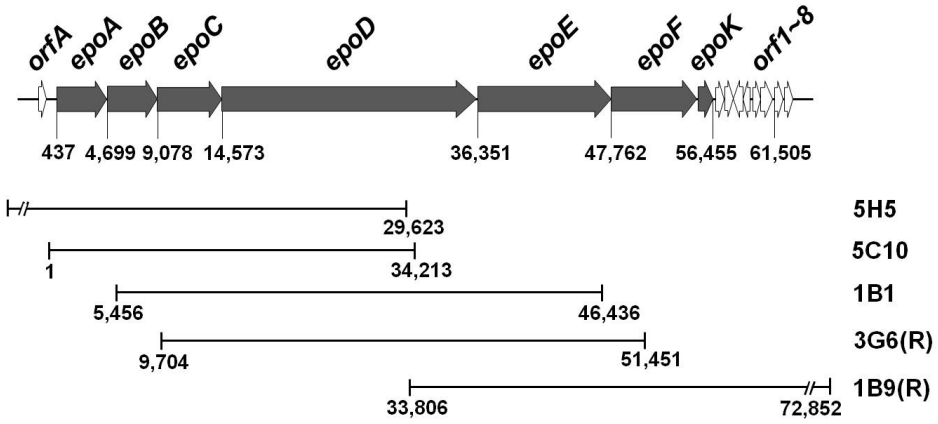

Fig. 1. Physical map of the epothilone biosynthetic gene cluster from *S. cellulosum* KYC3013 and the cloned DNA fragments. The numbers indicate the nucleotide positions from the first nucleotide of the cloned fragment 5C10. DNA sequence was deposited in GenBank (accession number: GU063811).

탐색을 위해서는 올리고뉴클레오티드 5′-CGATGAGGAGACC AAGAC-3′과 5′-TCGGGGAACCTACGGAA-3′을 PCR 프라이머로 사용하였다. PCR 분석을 통해 이들 유전자들을 갖는 여러 클론들을 탐색할 수 있었으며, 탐색된 클론의 말단 염기서열을 분석함으로써 *epoA*와 *epoD* 유전자를 갖는 두 개의 클론(5H5, 5C10), *epoD* 유전자만을 갖는 두 개의 클론(1B1, 3G6), 그리고 *epoK* 유전자만을 갖는 한 개의 클론(1B9)을 선별하였다(Fig. 1). 전체 에포틸론 생합성 유전자군의 염기서열 결정은 클론 5C10과 클론 1B9를 주형으로 사용하여 ㈜마크로젠에 의뢰하여 이루어졌으며, 에포틸론 생합성 유전자군을 포함하는 총 72,852 bp의 염기서열 정보를 얻을 수 있었다(GenBank accession no.: GU063811).

얻어진 서열 중 에포틸론 생합성 유전자군이 차지하는 부분은 미국 국립생물정보센터(NCBI)의 GenBank에 수록되어 있는 *S. cellulosum* So ce90, *S. cellulosum* SMP44, *S. cellulosum* So0157-2의 에포틸론 생합성 유전자군(AF210843, AF217189, EU414841)의 경우와 마찬가지로 약 56 kb였으며, 동일한 배열의 7개의 유전자(*epoA~F, epoK*)를 암호화하고 있었다(Fig. 1). 염기서열은 So ce90, SMP44, So0157-2와 각각 98.8%, 99.3%, 98.7%로 동일하여 최대 1.3%의 차이만을 보

Table 1. Homology of the protein products of the epothilone biosynthetic genes from *S. cellulosum* KYC3013 to those from *S. cellulosum* SMP44, *S. cellulosum* So ce90, and *S. cellulosum* So0157-2

Genes	Proteins	Size (aa)	Identities[a] (%) to the proteins from		
			So ce90	SMP44	So0157-2
orfA	Putative transposase	158	No similarity	99.4	NA
epoA	Type I polyketide synthase; epothilone PKS loading module	1,421	98.1	99.4	98.7
epoB	Non-ribosomal peptide synthetase; epothilone synthase module 1	1,410	97.4	98.8	98.5
epoC	Type I polyketide synthase; epothilone synthase module 2	1,832	99.1	99.4	98.6
epoD	Type I polyketide synthase; epothilone synthase modules 3, 4, 5, and 6	7,257	98.8	99.1	98.6
epoE	Type I polyketide synthase; epothilone synthase modules 7, and 8	3,798	98.2	99.3	98.1
epoF	Type I polyketide synthase; epothilone synthase module 9	2,439	97.9	99.1	97.6
epoK	P450 epoxidase	419	99.0	99.8	98.1
orf1	Hypothetical protein	179	96.1	99.4	NA[b]
orf2	Hypothetical protein	185	97.8	NA	NA
orf3	Hypothetical protein	284	94.7	NA	NA
orf4	Hypothetical protein	155	95.5	NA	NA
orf5	Hypothetical protein	149	97.3	NA	NA
orf6	Cation efflux protein	305	98.0	NA	NA
orf7	Type I restriction-modification system endonuclease	132	No similarity	NA	NA
orf8	Hypothetical protein	216	No similarity	NA	NA

[a] The protein products of the epothilone biosynthetic genes from *S. cellulosum* KYC3013 (GU063811) were compared to those from *S. cellulosum* SMP44 (AF217189), *S. cellulosum* So ce90 (AF210843), and *S. cellulosum* So0157-2 (EU414841)
[b] NA, sequences are not available.

였다. 각 균주들의 유전자가 암호화하고 있는 단백질들을 서로 비교하여본 결과, 단백질들의 크기가 서로 동일하였으며, 아미노산 서열도 서로 97.4-99.8%로 동일하였다(Table 1). 한 예로, 7,257개 아미노산으로 이루어져 있는 EpoD 단백질은 So ce90, SMP44, So0157-2와 각각 98.8%, 99.1%, 98.6%로 동일하였다. 따라서 약 56 kb의 크기임에도 불구하고 에포틸론 생합성 유전자군은 KYC3013을 포함한 네 균주에서 매우 잘 보존되어 있는 것으로 나타났다.

KYC3013은 국내에서 분리된 균주이며(7), So ce90는 독일 GBF 연구팀에 의해 남아프리카에서 분리된 균주이고(3), SMP44은 미국 Emporia State University에서 보유하고 있는 균주이다(1). 또한, So0157-2은 중국 산동대학교에서 분리한 균주이므로(4) 이들은 서로 다른 대륙 또는 나라에서 분리된 균주들이다. 이에 더해, *epoA* 유전자 바로 앞에 위치한 유전자는 KYC3013, SMP44, So ce90에서 밝혀져 있는데, KYC3013과 SMP44에서는 잘 보존되어 있지만, So ce90에서는 전혀 보존되어 있지 않다. 또한, *orf6* 아래에 위치한 유전자들의 염기서열은 KYC3013와 So ce90의 경우에만 밝혀져 있는데, *orf7*부터는 유사성이 전혀 없으므로 에포틸론 생합성 유전자군 주변의 유전자들은 최소한 KYC3013와 So ce90 사이에서는 보존되어 있지 않은 것으로 분석되었다(Table 1).

이 등이 국내에서 분리한 34균주의 *S. cellulosum*를 대상으로 셀룰라아제 유전자 *xylB1*의 염기서열 유사성을 분석한 결과, 균주 간 최대 9.8%의 서열 차이를 보이는 것으로 나타났으며, *groEL1* 유전자의 경우에도 균주 간 최대 4.1%의 서열 차이를 보이는 것으로 나타났다(10). *S. cellulosum*은 많은 수의 이차대사산물을 생산하지만 생합성 유전자군 전체가 클로닝되어 서열이 분석된 물질은 에포틸론 외에 ambruticin (DQ897667), chivosazol (DQ065771), disorazol (AJ874112), etnangien (AM746676), jerangolid (DQ897668), leupyrrin (HM639990), myxochelin (AM746676), sorangicin (HM584908), soraphen (U24241), spirangien (AM407731), thuggacin (GQ981380)이며, 모두 각각 한 균주에서만 클로닝되었다. 그런데, PCR에 의한 부분 분석에 의하면, soraphen 생합성 유전자 *sorA*의 경우, 국내에서 분리한 균주 *S. cellulosum* KYC3047이 독일에서 분리한 균주 *S. cellulosum* So ce26과 6%의 서열차이를 보인 것으로 보고되었다(9). 국내에서 분리한 균주들의 ambruticin과 disorazol 생합성 유전자도 국외에서 분리된 균주들의 서열과 6% 이상의 차이를 보이고, sorangicin과 spirangien의 경우에는 더 큰 차이를 보이는 것으로 분석되었다(미발표 결과). 따라서 균주 간 최대 1.3%의 염기서열 차이 밖에 보이지 않는 에포틸론 생합성 유전자군은 이차대사생합성 유전자군 중에서도 상대적으로 매우 잘 보존되어 있는 유전자군으로 사료된다.

에포틸론은 진핵세포의 미세소관 기능을 저해하는 항암물질로 알려져 있지만 *S. cellulosum* 균주에서의 실제 역할은 알려져 있지 않다. 유전체가 분석된 *S. cellulosum* So ce56의 경우에는 에포틸론 생합성 유전자군을 가지고 있지 않으며(12), 국내에서 분리된 *S. cellulosum* 균주들의 경우에도 약 20%만이 이 유전자군을 가지고 있는 것으로 분석되었다(7). 따라서 *S. cellulosum*의 성장에 에포틸론 생산이 필수적인 것으로는 보이지 않는다. 그럼에도 불구하고 56 kb 크기의 유전자군이 서로 다른 대륙에서 분리된 균주들 내에 잘 보존되어 있어 생존에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보여진다. *S. cellulosum*은 죽은 식물체를 분해하여 영양분을 얻는 셀룰로오스 분해성 점액세균으로, 진균과 경쟁하는 관계이며, 이들이 형성하는 자실체는 작은 동물에 의해 먹히기도 한다. 진핵생물의 기능을 저해하는 에포틸론이 이러한 환경조건에서 생존 경쟁력을 제공할 가능성이 높다.

적요

국내에서 분리된 에포틸론 생산 점액세균 *Sorangium cellulosum* KYC3013의 에포틸론 생합성 유전자군(*epoA~F, epoK*)을 클로닝하였다. 이 유전자들이 암호화하고 있는 단백질들의 아미노산 서열을 다른 대륙 또는 나라에서 분리된 *S. cellulosum* SMP44, *S. cellulosum* So ce90, *S. cellulosum* So0157-2의 단백질들과 비교한 결과 서로 97.4-99.8% 동일하였다. 이러한 결과는 에포틸론 생합성 유전자들이 *S. cellulosum* 균주들 사이에서 잘 보존되어 있음을 보여주었다.

감사의 말

이 논문은 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것입니다 (2010-0022869).

참고문헌

1. Bollag, D.M., P.A. McQueney, J. Zhu, O. Hensens, L. Koupal, J. Liesch, M. Goetz, E. Lazarides, and C.M. Woods. 1995. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res.* 55, 2325-2333.
2. Cheng, K.L., T. Bradley, and D.R. Budman. 2008. Novel microtubule-targeting agents - the epothilones. *Biologics.* 2, 789-811.
3. Gerth, K., N. Bedorf, G. Höfle, H. Irschik, and H. Reichenbach. 1996. Epothilones A and B: antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacteria). production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* 49, 560-563.
4. Gong, G.L., X. Sun, X.L. Liu, W. Hu, W.R. Cao, H. Liu, W.F. Liu, and Y.Z. Li. 2007. Mutation and a high-throughput screening method for improving the production of epothilones of *Sorangium*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34, 615-623.
5. Hardt, I.H., H. Steinmetz, K. Gerth, F. Sasse, H. Reichenbach, and G. Höfle. 2001. New natural epothilones from *Sorangium cellulosum*, strains So ce90/B2 and So ce90/D13: isolation, structure elucidation, and SAR studies. *J. Nat. Prod.* 64, 847-856
6. Höfle, G., N. Bedorf, K. Gerth, and H. Reichenback. 1993. Patent DE 4138042.
7. Hyun, H., J. Chung, J. Kim, J.S. Lee, B.M. Kwon, K.H. Son, and K. Cho. 2008. Isolation of *Sorangium cellulosum* carrying epothilone gene clusters. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1416-1422.
8. Julien, B., S. Shah, R. Ziermann, R. Goldman, L. Katz, and C.

Khosla. 2000. Isolation and characterization of the epothilone biosynthetic gene cluster from *Sorangium cellulosum*. *Gene* 16, 153-160.
9. Lee, C., H. Hyun, and K. Cho. 2009. Isolation of myxobacteria carrying soraphen biosynthetic gene clusters. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*. 37, 10-16.
10. Lee, H., J. Youn, and K. Cho. 2011. Phylogenetic analysis of *Sorangium cellulosum* strains based on cellulase gene sequences. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*. 39, 20-28.
11. Molnár, I., T. Schupp, M. Ono, R. Zirkle, M. Milnamow, B. Nowak-Thompson, N. Engel, C. Toupet, A. Stratmann, D.D. Cyr, and *et al*. 2000. The biosynthetic gene cluster for the microtubule- stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem. Biol.* 7, 97-109.
12. Schneiker, S., O. Perlova, O. Kaiser, K. Gerth, A. Alici, M.O. Altmeyer, D. Bartels, T. Bekel, S. Beyer, E. Bode, and *et al*. 2007. Complete genome sequence of the myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *Nat. Biotechnol*. 25, 1281-1289.
13. Stein, A. 2010. Ixabepilone. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 14, 65-71.