

보 문

희소방선균의 *seaR* 단백질 발현을 통한 기능 분석

류재기¹ · 권필승² · 이형선^{3*}

¹김천대학교 임상병리학과, ²원광보건대학교 임상병리학과, ³충원대학교 의료보건대학 임상병리학과

Functional analysis of *seaR* protein identified from *Saccharopolyspora erythraea*

Jae Ki Ryu¹, Pil-Seung Kwon², and Hyeong Seon Lee^{3*}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, Gimcheon University, Gimcheon 740-704, Republic of Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, Wonkwang Health Science University, Jeonbuk 570-750, Republic of Korea

³Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, Chungbuk 367-700, Republic of Korea

(Received August 11, 2014; Accepted January 19, 2015)

ABSTRACT: Secondary metabolism in actinomycetes has been known to be controlled by a small molecule, γ -butyrolactone autoregulator, the binding of which to each corresponding receptor leads to the regulation of the transcriptional expression of the secondary metabolites. We expected that expression of an autoregulator receptor or a pleiotropic regulator in a non-host was to be gained insight of effective production of new metabolic materials. In order to study the function of the receptor protein (*seaR*), which is isolated from *Saccharopolyspora erythraea*, we introduced the *seaR* gene to *Streptomyces coelicolor* A3(2) as host strains. An effective transformation procedure for *S. coelicolor* A3(2) was established based on transconjugation by *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 with a ϕ C31-derived integration vector, pSET152, which contained *int*, *oriT*, *attP* and *ermEp** (erythromycin promoter). Therefore, the pEV615 was introduced into *S. coelicolor* A3(2) by conjugation and integrated at the *attB* locus in the chromosome of the recipients by the ϕ C31 integrase (*int*) function. Exconjugant of *S. coelicolor* A3(2) containing the *seaR* gene was confirmed by PCR and transcriptional expression of the *seaR* gene in the transformant was analyzed by RT-PCR. In case of *S. coelicolor* A3(2), a phenotype microarray was used to analyze the phenotype of transformant compared with wild type by *seaR* expression. After that, in order to confirm the accuracy of the results obtained from the phenotype microarray, an antimicrobial susceptibility test was carried out. This test indicated that sensitivity of the transformant was higher than wild type in tetracycline case. These results indicated that some biosynthesis genes or resistance genes for tetracycline biosynthesis in transformant might be repressed by *seaR* expression. Therefore, subsequent experiments, analysis of transcriptional pattern of genes for tetracycline production or resistance, are needed to confirm whether biosynthesis genes or resistance genes for tetracycline are repressed or not.

Key words: *Saccharopolyspora erythraea*, *seaR* gene, *Streptomyces coelicolor* A3(2), transformant

방선균 중에서도 *Streptomyces* 속은 현재 사용되는 항생물질의 약 70%를 생산해 내는 이차대사산물 생산능력으로 인하여 많은 연구자들의 관심을 받아 온 미생물로서 형태분화, 일차대사 및 이차대사산물 생산 조절 기전에 관한 연구가 활발히 수행되어 왔다(Alderson *et al.*, 1993). 방선균이 생산하는 생리활성물질로는 항생물질 및 다양한 효소저해제, 면역증강제, 제조제, 구충제 등이 있으며, 이들 몇몇의 물질들은 이미 산

업화에 성공하여 의약 및 농업 분야에 응용되고 있다(Kieser *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2005). 특히, 현대 사회에서 의학적으로 항생물질 내성균의 출현에 따른 새로운 항생물질과 같은 이차대사산물의 필요성과 함께 기존에 사용되어 지고 있는 다양한 이차대사산물의 생산성 향상이라는 목적이 방선균이라는 미생물을 활발히 연구하게 된 계기가 되었다. 하지만 새로운 방선균을 분리한다거나 변이주를 획득하는 등의 일반적인 연구방법들은 많은 시간과 노력, 투자를 필요로 하기 때문에 좋은 결과를 얻기에는 한계가 있는 실정이다. 따라서 최근에

*For correspondence. E-mail: biohslee@jwu.ac.kr;
Tel.: +82-43-830-8861; Fax: +82-43-830-8679

는 일부 이차대사산물 생합성 효소의 파괴 및 생합성 효소의 형질전환, 또는 이차대사산물 생산조절유전자의 파괴 및 형질전환 등의 조작을 통한 분자 수준에서의 연구가 많이 시도되고 있다. 지금까지 방선균의 이차대사산물 조절 기전 중 가장 활발히 연구된 부분이 γ (gamma)-butyrolactone autoregulator라고 불리는 저분자의 신호전달물질과 이에 특이적으로 결합하는 γ -butyrolactone autoregulator receptor protein이라 불리는 단백질과의 상호작용에 의한 이차대사산물의 생산 및 조절에 관한 연구이다(Horinouchi et al., 1990; Onaka et al., 1995; Butler et al., 2003; Bibb, 2005; Takano, 2006). 이 조절시스템은 *Streptomyces* 속이 생산하는 γ -butyrolactone autoregulator receptor protein이 이차대사산물 생산에 관여하는 여러 유전자들의 promoter 지역에 결합하여 발현을 억제하므로 이차대사산물의 생산이 제어가 되지만, γ -butyrolactone autoregulator가 세포내에서 생산이 되면 γ -butyrolactone autoregulator가 γ -butyrolactone autoregulator receptor protein과 결합을 함과 동시에 γ -butyrolactone autoregulator receptor protein은 promoter 지역으로부터 떨어져 나오게 되므로 이차대사산물의 생산에 관여하는 여러 유전자들의 발현이 유도되어 이차대사산물의 생산이 개시되는 것으로 설명할 수 있다(Horinouchi et al., 1990; Kang et al., 2006).

최근에는 *Streptomyces clavuligerus*로부터 ScaR (Kang et al., 2006)이 그리고 Non-*Streptomyces* 속인 *Saccharopolyspora erythraea* IFO 13426로부터 seaR이 특이적인 receptor protein으로 분리되었고 그 유전자들도 클로닝되었다(Lee et al., 2006).

또한 이차대사산물 생산 및 조절 기전에 관한 분자 수준에서의 조작을 위해서 목적 유전자의 형질전환을 통한 연구가 많이 이루어져 오고 있으며 주로 *Escherichia coli*를 이용하여 plasmid DNA를 전달하는 접합전달법(conjugal transfer)을 이용하기 시작하였으며, 방선균에 존재하는 메틸화된 DNA의 제한계를 극복하기 위해 DNA의 공여균주로 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 사용함으로써 보다 다양한 속의 방선균에 적용할 수 있게 되었다(Mazodier et al., 1989; Bierman et al., 1992; Kitani et al., 2000; Choi et al., 2004). 그리고 현재 사용되고 있는 접합전달을 위한 벡터를 가운데 방선균의 염색체에 존재하는 attB site로 integration되는 bacteriophage ϕ C31 유래의 attachment site (attP)와 integrase (int) 기능을 가진 벡터들이 가장 유용한 것으로 알려져 있다(Smokvina et al., 1990; Flett et al., 1997). 이러한 벡터들은 접합전달을 통해 *E. coli*로부터 방선균으로 전달되고 전달된 벡터의 attP site는

integrase에 의해 방선균 염색체의 attB site로 삽입되게 된다(Kieser et al., 2000; Combes et al., 2002).

접합전달법을 이용한 non-host에서 autoregulator receptor 혹은 pleiotropic regulator의 발현은 이차대사산물 혹은 새로운 대사화합물의 효율적인 생산을 유도할 것으로 기대된다. 일반적으로 발현 벡터를 제조하기 위해서는 발현 시키고자 하는 목적 유전자와 제한 효소를 이용하여 클로닝하는 방법이 사용되어지는데, 이러한 방법은 사용하고자 하는 제한 효소 인식 부위가 목적 유전자에 존재하거나 또한 벡터에 사용하고자 하는 제한 효소 사이트의 부족으로 인하여 발현 벡터의 구축에 어려움이 따르기도 한다.

본 연구에서는 이러한 제한 효소 인식 부위에 따른 발현 벡터 구축의 어려움을 해결하고자 gateway system (Invitrogen)을 이용한 발현 벡터 구축 시스템을 확립하고자 하였다. 또한, 연구에서는 새롭게 구축한 gateway system을 사용하여 희소 방선균 *Saccharopolyspora erythraea*의 receptor gene (seaR)을 *Streptomyces* 속 *Streptomyces coelicolor* A3(2)에 삽입시킨 후 *Streptomyces coelicolor* A3(2) (transformant)과 wild type 균과의 표현형의 변화 관찰을 통하여 *Streptomyces coelicolor* A3(2) (transformant)의 seaR 단백질의 기능에 관하여 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구는 방선균 유전자 연구의 모델 미생물인 *Streptomyces coelicolor* A3(2)를 숙주균으로 사용하였다. 목적 유전자인 seaR 유전자는 *Saccharopolyspora erythraea* IFO 13426의 chromosomal DNA를 이용하여 PCR방법으로 증폭 후 회수하였고, *E. coli* ET12567/pUZ8002 (Kieser et al., 2000)는 *S. coelicolor* A3(2)의 접합전달용 공여균주로 사용하였다. Entry vector (pENTR/D-TOPO Cloning Kit, Invitrogen)는 목적 유전자의 클로닝을 위하여 사용되었으며, destination vector는 Choi 등(2004)에 의해 제조된 pSET152 (Bierman et al., 1992) 유래의 vector를 사용하였다. 최종적으로 LR reaction을 통한 seaR 발현벡터를 제조하기 위하여 gateway LR clonase enzyme mixture (Invitrogen)가 사용되었다. Entry vector의 형질전환용 세포는 Mach1-T1 cell (One shot Mach-T1 chemically competent *E. coli*, Invitrogen)을 사용하였고, destination vector 및 expression vector의 형질전환 및 대량회수를 위해서는 일반적인 형질전환 균주인 *E. coli* DH5 α 를 사용하였다.

배지 및 배양조건

S. coelicolor A3(2)와 transformant (*seaR*-integrated *S. coelicolor* A3(2))의 배양에는 SFM (Soy Flour Mannitol) 배지 또는 ISP No. 2 (BD Science) 배지를 사용하였고, 계대배양을 위해 ISP No. 2 배지를 사용하였다(Kieser *et al.*, 2000). 전배양 및 항생물질 생산배지로는 YEME (Yeast Extract-malt Extract), TSB (Tryptic Soy Broth) 또는 SV 배지를 사용하였고, 실험에서 이용한 모든 방선균의 chromosomal DNA 추출을 위한 액체배양은 TSB 배지를 사용하였다. *E. coli* 및 공여균주의 일반 배양 및 형질전환에는 LB (Luria Bertani) 배지를 사용하였다. 항생물질 생산 실험은 20 ml의 YEME, TSB, 또는 SV 배지를 사용하여 각각의 포자현탁액을 1×10^6 CFU/ml가 되도록 접종하고 28°C, 120 rpm에서 36-48시간 진탕 배양한 균체를 -70°C에서 보존하여 전배양균으로 사용하였다. 항생물질 생산 검정균으로는 *Bacillus subtilis* PCI 219를 사용하였고 검정균의 생육배지로 NA (Nutrient Agar) 배지를 사용하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 Difco Laboratories Co., Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다.

DNA 조작 및 분리

방선균의 chromosomal DNA 분리는 Hopwood 방법(Kieser *et al.*, 2000)에 따라 실행하였고, *E. coli* DH5a competent cell은 Hanahan 방법(Sambrook *et al.*, 1989)으로 제조하였다. Plasmid DNA의 분리는 FlexiPrep kit (GE Lifescience) 및 alkaline-SDS 추출법(Sambrook *et al.*, 1989)을 사용하였으며, 모든 제한효소, 수식효소 및 전기영동용 DNA 마커는 TaKaRa 제품을 사용하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

Sacch. erythrae 유래 *seaR* 유전자는 PCR을 통한 증폭을 위하여 GenBank accession number AB188088의 핵산 염기서열을 근거로 특이적인 primers를 (주)바이오니아에 의뢰하여 제작하였다. 접합전달에 의한 방선균의 형질전환 유무는 pSET152의 전체 염기서열 중 apramycin 저항성 유전자를 PCR로 증폭할 수 있는 약 1 kb 정도의 유전자를 토대로 primers를 (주)바이오니아에서 제작하여 확인하였고 *seaR* 유전자의 발현유무는 *seaR* 염기서열을 참조하여 *SphI* site를 포함하는 primers를 (주)바이오니아에서 제작하여 확인하였다(Table 1). PCR (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems)은 Prime STAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)와 Go Taq Master Mix (Promega)를 이용하여 수행하였다. DNA는 TAE 완충용

Table 1. Design of PCR primers

	Sequences (5' → 3')
SeaR1-F	CACCCGGAGTCGCCGGAGCCGCGTGATGCC
SeaR1-R	TCAGCGGGGGCGTTCGTCGGGCGGCTGGAG
Apr-F	CCCCGGCGGTGTGCTG
Apr-R	GACGTCGCGGTGAGTTCAGGC
SeaR2-F	ATTGCATGCCGCTTCTACTTCCACTTCCG (<i>SphI</i>)
SeaR2-R	GTTGCATGCCGTTGGTGCGAAGCCACTC (<i>SphI</i>)

SeaR2 primer contains a restriction enzyme recognition site at the 5'-end (underline).

액(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 1-2% 아가로즈 겔을 사용하여 100 V에서 전기영동 하였다.

PCR 산물의 염기배열 결정 및 해석

Sequencing은 DNA sequencer (MegaBASE500, GE Lifescience)를 이용하거나 (주)솔젠트사에 의뢰하였고, 염기서열 분석과 상동성 비교는 GENETYX-WIN (version 3.2, Software Development)과 NCBI DNA database를 이용하였다.

접합전달에 의한 *S. coelicolor* A3(2)의 형질전환 및 Reverse transcription (RT)-PCR

*E. coli*에서 *S. coelicolor* A3(2)로 plasmid의 접합전달은 Kieser 등(2000)이 확립한 방법에 따라 수행하였다. 목적 유전자인 *seaR* 유전자의 발현 벡터인 pEV615를 포함하는 공여균주 *E. coli* ET12567/pUZ8002는 apramycin (50 µg/ml;Am), chloramphenicol (25 µg/ml;Cm), kanamycin (50 µg/ml;Km)이 첨가된 LB 액체배지에 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.2-0.4가 될 때까지 37°C에서 배양한 후, 동량의 새로운 LB 액체배지로 두 번 세척하고 최종적으로 0.1배의 새로운 LB 액체배지로 재현탁하여 *S. coelicolor* A3(2)를 접합전달을 위한 공여균주로 사용하였다. 열처리하지 않은 5 µl (1.5×10^7 CFU/ml), 10 µl (3×10^7 CFU/ml)의 *S. coelicolor* A3(2) 포자는 2×YT 배지 0.3 ml로 각각 현탁한 후 준비된 공여균주 현탁액 500 µl (1.25×10^8 CFU/ml)와 잘 혼합한 후 실온에서 10분간 정치배양하였다. 배양한 혼합액은 원심분리하여 상층액을 제거하였으며, 얻어진 pellet은 10 mM MgCl₂를 포함한 SFM 한천배지에 도말하고 28°C에서 16-20시간 정치배양 하였으며 형질전환체의 선별을 위해 1.5 ml의 DW에 0.25 mg nalidixic acid (Nal)와 1 mg apramycin을 첨가하여 배지위에 증점시킨 후 30°C에서 2-3일간 더 배양하였다. 선발된 접합전달체(exconjugant)는 apramycin (0.25 mg/ml)이 함유된 ISP No. 2 배지에 계대배

양하였다.

형질전환을 통하여 선발된 각각의 형질전환체(transformant)는 20 ml의 TSB 배지에 포자현탁액(1×10^6 CFU/ml)을 접종하여, 28°C, 120 rpm에서 10, 12, 14시간 진탕배양 후 배양액을 시험관에 넣어 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체로부터 전체 RNA (RNeasy mini purification kit, Qiagen)를 추출하고 DNase I (TaKaRa)을 처리하여 chromosomal DNA를 제거하였다. cDNA를 합성하기에 앞서 DNase I을 처리한 전체 RNA내의 chromosomal DNA의 존재유무는 전체 RNA를 주형으로 사용하여 SeaR2 primers를 이용하여 PCR을 수행하여 확인하였다. DNase I으로 처리한 전체 RNA는 Superscript III reverse transcriptase kit (Invitrogen)와 Random primers (Invitrogen)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 최종적으로 형질전환된 *seaR* 유전자의 발현 유무를 확인하기 위하여 cDNA를 주형으로 이용하여 PCR을 수행하였다.

Phenotype microarray

S. coelicolor A3(2)와 transformant [*seaR*-integrated *S. coelicolor* A3(2)]의 변화된 표현형을 확인하기 위하여 한국생명공학연구원 단백질산업기술개발센터에 의뢰를 하여 표현형 microarray (Biolog)를 사용하여 수행하였다. 표현형 microarray는 1,920여 가지의 기질이 20장의 96-well plate에 포함되어 있기 때문에 wild type과 transformant의 생육곡선의 비교를 통하여 표현형을 비교할 수 있는 microarray 방법이다. 20장의 plate에는 다양한 종류의 탄소원, 질소원, 인, 황, 삼투압, pH, 항생제, 억제제 등을 측정하는 기질이 포함되어 있으며, 기질에 의해 일어나는 영향을 쉽게 분석한다.

Minimum inhibitory concentration (MIC) test와 Disk diffusion test

MIC 시험은 미생물 동정 및 항균제 감수성 검사 장비인 Vitek II System (bioMérieux)를 이용하여 MIC를 측정하였다. 각각의 균액을 macfaland 탁도 1.0에 맞추어 초미량의 각종 건조 항균제가 들어있는 microwell로 구성된 플라스틱 카드 (AST-P601 card)에 접종한 후 28°C에 24시간 배양하여 장비에 장착하였다. 항균제 존재에 의해 세균의 성장이 저해되면서 생기는 탁도의 변화를 Transmittance Optical System이 15분마다 카드를 읽어 탁도를 측정하고 측정된 수치는 Vitek II 전용 프로그램의 알고리즘에 의해 분석되어 항균제 존재 시의 세균 성장여부를 판정한다. 프로그램상의 판정 기준에 따라 균이 검사한 항생제에 감수성이 있는지 여부를 판정하고 MIC

를 검사하였다. Disk diffusion test는 각각의 균액을 MacFaland 탁도 1.0에 맞추어 Mueller Hinton Agar (BD Science)에 접종하여 tetracycline disc (30 µg, BD Science)를 사용하여 CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) 지침에 따라 검사하였다.

결과 및 고찰

seaR expression vector의 개발

목적 유전자인 *seaR* 유전자는 *Sacch. erythrae* IFO 13426의 chromosomal DNA와 특이적으로 결합하도록 제작된 primer를 이용하여 PCR을 수행하고 1% agarose gel에 전기영동 후 615 bp 정도의 목적 DNA 단편인 *seaR* 유전자를 회수하였다(Fig. 1). 회수된 단편은 entry vector에 삽입하였으며, *seaR* 유전자가 삽입된 entry vector의 *attL* site와 destination vector의 *attR* site를 이용한 LR reaction으로 *seaR* 발현 벡터(pEV615)를 제조(Fig. 2)한 다음, 이를 *E. coli* ET12567/pUZ800에 형질전환 하였다. 형질전환된 균으로부터 plasmid DNA를 분리하여 전기영동 한 결과 Fig. 3A에서 보는 바와 같이 4.4 kb 위치에 나타났고, 분리된 plasmid DNA를 *Cla*I로 처리한 결과 1.1 kb 및 5.5 kb의 2개의 단편이 확인되었으며, 제조된 *seaR* 발현 벡터를 pEV615 (6.6 kb)라고 명명하였다(Fig. 3B). 제조된 pEV615는 *oriT*, *attP*, *ermEp*과 *seaR* 유전자 단편을 가지고 있는 bacteriophage ΦC31 유래의 integration vector이다.

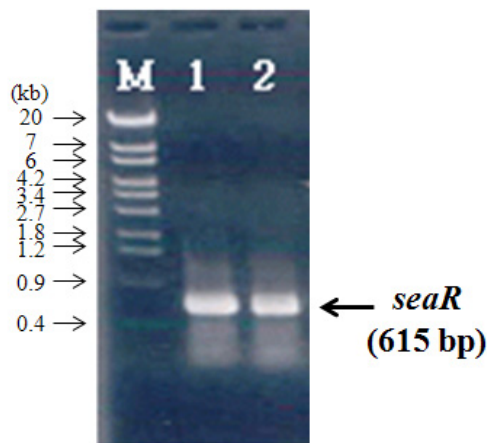


Fig. 1. Gel electrophoresis of amplified PCR products from isolated *S. erythrae* genomic DNA. PCR amplification was carried out using SeaR1-F and SeaR1-R primers. M: λ -EcoT14I digest marker, 1-2: amplified *seaR* gene.

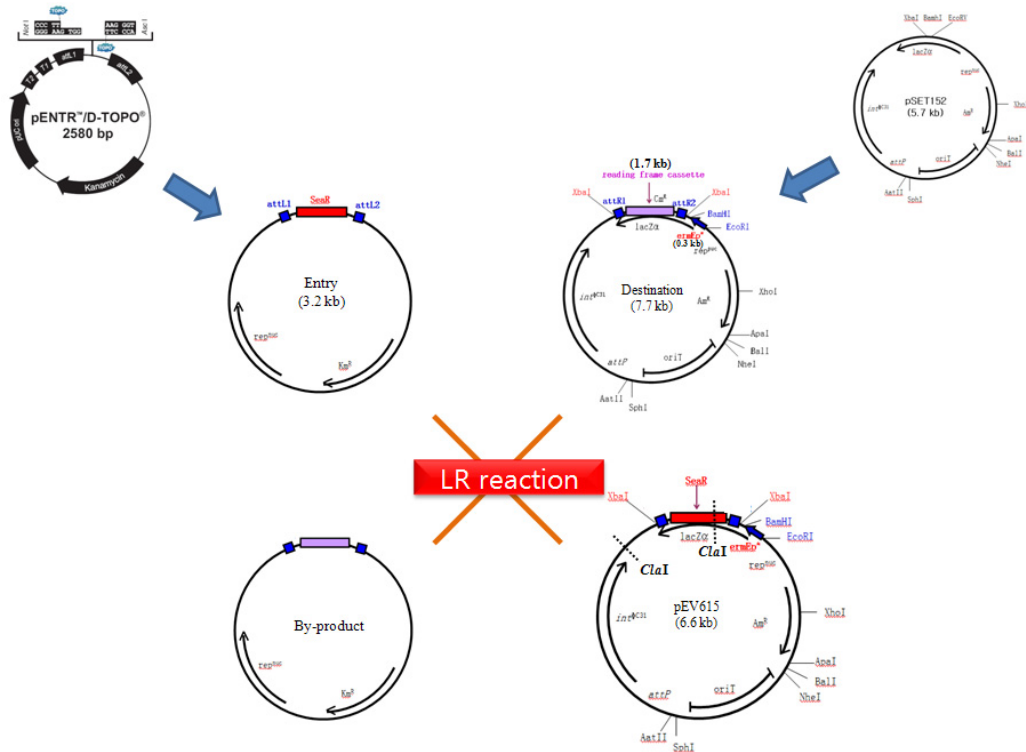


Fig. 2. Construction of expression vector (pEV615) for autoregulator receptor production. Facilitates recombination of an *attL* substrate (entry clone) with an *attR* substrate (destination vector) to create an *attB*-containing expression clone. This reaction is catalyzed by LR clonase enzyme mix.

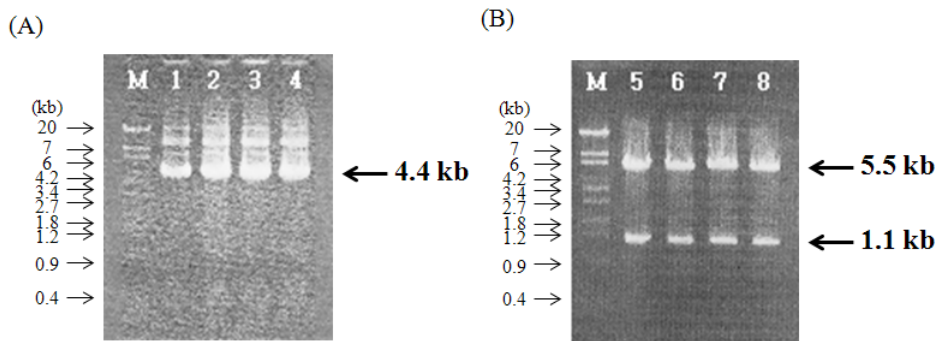


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis analysis of pEV615. (A) Plasmid was isolated from transformant (ET12567/pUZ8002) and subjected to 1% agarose gel electrophoresis. (B) pEV615 was digested with *Clal*. M, λ -EcoT14I digest marker; 1-4, pEV615, 5-8: *Clal* digest.

목적유전자의 integration 확인

접합전달을 통한 방선균의 형질전환 실험으로 *S. coelicolor* A3(2)를 숙주균으로 사용한 경우는 4개의 transformant를 선택하였으며 각각의 transformant에 대한 pEV615 vector의 정상적인 염색체내 통합을 확인하기 위해 Am (25 μ g/ml)이 함유된 ISP No. 2 배지에 계대배양하였으며 다시 Am (25 μ g/ml)이 함유된 10 ml TSB 액체배지에 접종하고 배양하여 균체를 회수한 후 각각의 균체로부터 chromosomal DNA를 분리하였

다. 분리된 chromosomal DNA는 통합 확인을 위해 pEV615 vector에 존재하는 apramycin 내성유전자와 특이적으로 결합하는 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 1% agarose gel에 전기영동 한 결과 Fig. 4와 같이 약 1 kb의 apramycin 내성유전자의 증폭이 확인되었다.

목적유전자의 발현

방선균 염색체에 존재하는 *attB* site로 삽입된 *seaR* 유전자

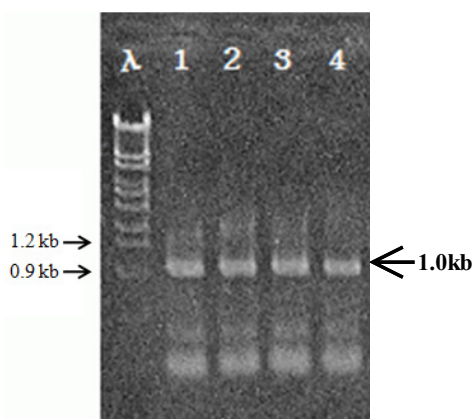


Fig. 4. Gel electrophoresis of amplified PCR products from isolated exconjugants. M, λ -EcoT14I digest marker; 1-4, PCR products which include apramycin-resistant gene in pEV615 from *seaR*-integrated *S. coelicolor* A3(2).

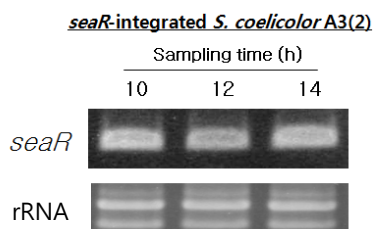


Fig. 5. The *seaR* expression of *S. coelicolor* A3(2) analysis by RT-PCR. PCR amplification as carried out using the primer (Forward, 5'-ATTGCA TGCCGCCT TCTACTTCCACTTCG-3'; Reverse, 5'-GTTGCATGCC TTGGTGCGA AGCCACTC-3'), which are manufactured by sequences located in *seaR* gene. Primers were designed to generate PCR products of approximately 450 bp and *SphI* site (underlined).

의 발현유무는 RT-PCR의 수행으로 알 수 있다. 선택된 각각의 transformant 배양액은 원심분리하여 균체를 회수하고 전체 RNA를 추출하였다. 전체 RNA와 함께 추출되는 chromosomal DNA는 DNase I을 처리하여 제거하였으며 전체 RNA로부터 cDNA를 합성한 후 *seaR* 유전자와 특이적으로 결합하는 primer를 이용하여 PCR을 수행하고 1% agarose gel에 전기영동한 결과 Fig. 5와 같이 각각의 transformant로부터 샘플링 시간대별로 일정하게 발현되는 약 450 bp의 DNA 단편을 확인 할 수 있었다. 증폭된 단편이 *seaR* 유전자 유래의 단편인지 확인을 위하여 10시간째 단편을 각각 아가로스 겔로부터 회수한 후 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과 *seaR* 유전자 유래의 단편임을 확인하였다. 이러한 결과로부터 transformant에 삽입된 pEV615 발현 벡터로부터 *seaR* 유전자가 지속적으로 발현되고 있음을 확인하였다.

S. coelicolor A3(2)와 transformant의 phenotype microarray

TSB 액체배지나 YEME 액체배지를 사용한 *S. coelicolor* A3(2)와 transformant의 일반적인 성장 패턴 비교 실험에서는 두 균의 차이가 거의 없음을 확인하였다(자료 미제시). 이는 *seaR* 유전자의 지속적인 발현이 *S. coelicolor* A3(2)의 일차대사(primary metabolism)에는 큰 역할을 하지 않는 것을 나타내는 것으로 이차대사에 영향이 있을 것으로 예상되었다. 또한 *S. coelicolor* A3(2)의 경우 방선균 연구에 있어서 모델균으로써 분자유전학적으로 많은 연구가 진행되어 왔으며 게놈 프로젝트를 통한 염기서열도 활용이 가능하므로 좀 더 자세한 표현형의 변화를 확인하고자 표현형 microarray를 수행하였다. PM은 1,920여 가지의 기질에 대한 wild type 및 transformant의 성장 차이를 비교하는 실험으로써 빨간색으로 표시된 기질에서는 transformant의 성장이 wild type보다 빠른 것을 나타내는 것으로서 사용된 기질에서는 *seaR* 유전자의 발현으로 인하여 transformant의 성장이 빨라졌다는 것을 나타낸다. 반대로 초록색을 나타낸 기질에서는 wild type의 성장이 transformant보다 빨라졌다는 것을 나타낸다. 사용된 기질에서 노란색은 두 균주의 성장이 같다는 것을 나타낸다. 이와 같이 표현형 microarray 결과에서 두 균의 성장 차이가 50% 이상인 조건을 확인한 결과 tetracycline 항생제 기질에 대하여 wild type이 transformant에 비해 빠르게 성장하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 6) 이러한 결과로 미루어볼때, 기존에 tetracycline의 생산 및 내성활성을 가진 *S. coelicolor* A3(2)에 *seaR* 유전자의 삽입으로 tetracycline에 대한 생산 및 내성활성을 억제시키는 것이라 예상할 수 있다. 종합적으로 볼 때 특정 기질에 대한 wild type 또는 transformant의 표현형의 변화를 설명하는 것으로서 *seaR* 유전자의 발현으로 인하여 특정 생합성 유전자들의 발현이 억제되거나 또는 상위 레벨 조절 유전자들의 발현 억제를 통한 상위 레벨 조절 유전자의 지배를 받는 유전자들의 활성화에 의한 변화라는 것을 예상할 수 있다.

항균제 감수성 검사

본 실험을 통하여 획득한 표현형 microarray 결과의 신뢰성을 확인하기 위하여 *S. coelicolor* A3(2)가 대표적으로 생산하는 tetracycline에 대한 감수성 검사를 수행하였다. 표현형 microarray에서 실험한 *S. coelicolor* A3(2)와 transformant의 항균제 감수성 결과 확인을 위하여 MIC 검사와 평판배지 디스크 확산법을 시행하였다. MIC 검사결과 Table 2에서 나타난 것처럼 tetracycline에 대한 MIC의 농도가 wild type보다 50% 낮아진 것을 보였으며(Table 2), 이는 transformant의 tetracycline

(A)

PM12B MicroPlate™

A1 Penicillin G	A2 Penicillin G	A3 Penicillin G	A4 Penicillin G	A5 Tetracycline	A6 Tetracycline	A7 Tetracycline	A8 Tetracycline	A9 Carbencillin	A10 Carbencillin	A11 Carbencillin	A12 Carbencillin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
B1 Oxacillin	B2 Oxacillin	B3 Oxacillin	B4 Oxacillin	B5 Penimepicycline	B6 Penimepicycline	B7 Penimepicycline	B8 Penimepicycline	B9 Polymyxin B	B10 Polymyxin B	B11 Polymyxin B	B12 Polymyxin B
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
C1 Paromomycin	C2 Paromomycin	C3 Paromomycin	C4 Paromomycin	C5 Vancomycin	C6 Vancomycin	C7 Vancomycin	C8 Vancomycin	C9 D,L-Serine hydroxamate	C10 D,L-Serine hydroxamate	C11 D,L-Serine hydroxamate	C12 D,L-Serine hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
D1 Sisomicin	D2 Sisomicin	D3 Sisomicin	D4 Sisomicin	D5 Sulfamethazine	D6 Sulfamethazine	D7 Sulfamethazine	D8 Sulfamethazine	D9 Novobiocin	D10 Novobiocin	D11 Novobiocin	D12 Novobiocin
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
E1 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E2 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E3 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E4 2,4-Diamino-6,7-disopropyl-pteridine	E5 Sulfadiazine	E6 Sulfadiazine	E7 Sulfadiazine	E8 Sulfadiazine	E9 Benzethonium chloride	E10 Benzethonium chloride	E11 Benzethonium chloride	E12 Benzethonium chloride
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
F1 Tobramycin	F2 Tobramycin	F3 Tobramycin	F4 Tobramycin	F5 Sulfathiazole	F6 Sulfathiazole	F7 Sulfathiazole	F8 Sulfathiazole	F9 5-Fluoroorotic acid	F10 5-Fluoroorotic acid	F11 5-Fluoroorotic acid	F12 5-Fluoroorotic acid
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
G1 Spectinomycin	G2 Spectinomycin	G3 Spectinomycin	G4 Spectinomycin	G5 Sulfamethoxazole	G6 Sulfamethoxazole	G7 Sulfamethoxazole	G8 Sulfamethoxazole	G9 L-Aspartic-β-hydroxamate	G10 L-Aspartic-β-hydroxamate	G11 L-Aspartic-β-hydroxamate	G12 L-Aspartic-β-hydroxamate
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
H1 Spiramycin	H2 Spiramycin	H3 Spiramycin	H4 Spiramycin	H5 Rifampicin	H6 Rifampicin	H7 Rifampicin	H8 Rifampicin	H9 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H10 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H11 Dodecyltrimethyl ammonium bromide	H12 Dodecyltrimethyl ammonium bromide
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4

(B)

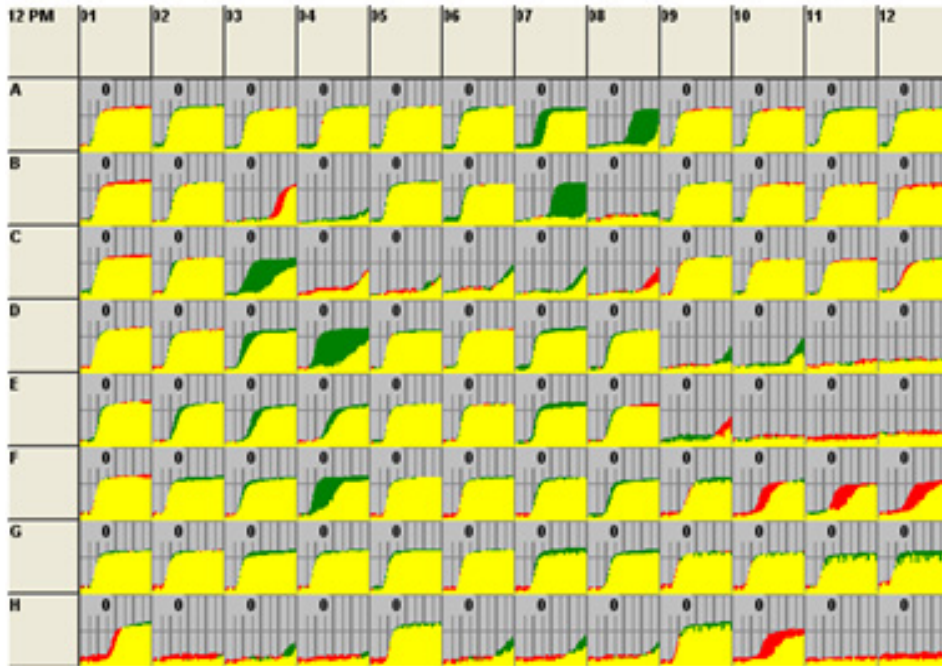


Fig. 6. The composition (A) and result (B) of microplate 12 of phenotype microarray using *S. coelicolor* A3(2) and transformant.

에 대한 감수성이 높아진 것을 확인하였다. Fig. 7에서 나타난 것처럼 평판배지 디스크 확산법의 경우도 transformant의 tetracycline에 대한 억제대가 wild type 보다 상대적으로 큰 것을 확인하였다. Wild type과 transformant를 이용한 항균제 감

수성 검사 결과는 표현형 microarray 결과와 일치하는 것을 확인하였다. 이 결과를 통하여 transformant에서 *seaR* 유전자의 지속적인 발현이 tetracycline 생성 기작 또는 tetracycline 내성 유전자의 발현 억제를 통한 표현형의 변화라고 생각된다.

Table 2. The results of MIC test

Antimicrobial	MIC	
	Wild type	Transformant
Cefoxitin screen	POS	POS
Benzylpenicillin	≥ 0.5	≥ 0.5
Oxacillin	≥ 4	≥ 4
Gentamicin	≤ 0.5	≤ 0.5
Habekacin	≤ 1	≤ 1
Ciprofloxacin	≤ 0.5	≤ 0.5
Inducible clindamycin	NEG	NEG
Erythromycin	≥ 8	≥ 8
Telithromycin	≥ 4	≥ 4
Clindamycin	≥ 8	≥ 8
Quinupristin	≥ 16	≥ 16
Linezolid	≥ 8	≥ 8
Teicoplanin	≥ 32	≥ 32
Vancomycin	≥ 32	≥ 32
Tetracycline	8	4
Tigecycline	≤ 0.12	0.5
Fusidic acid	≥ 32	≥ 32
Mupirocin	≥ 512	≥ 512
Rifampicin	≥ 32	≥ 32
Trimethoprim	≤ 10	≤ 10

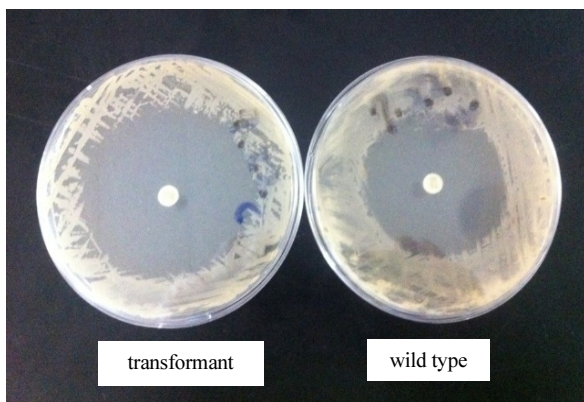


Fig. 7. The result of disk diffusion test. Plate at the left indicates transformant and plate at the right indicates *S. coelicolor* A3(2) wild type. The concentration of tetracycline in paper disc is 30 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

적 요

방선균이 생산하는 이차대사산물은 자기조절인자(γ -butyrolactone autoregulator)라고 불리는 저분자의 신호전달물질과 이에 특이적으로 결합하는 autoregulator receptor protein의 상호작용에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다. 그러므로 non-host에

autoregulator receptor 혹은 pleiotropic regulator의 발현은 이차대사산물 혹은 새로운 대사화합물의 효율적인 생산을 유도할 것으로 기대된다. 희소방선균 *Saccharopolyspora erythraea* 으로부터 receptor (*seaR*) 유전자의 기능을 연구하기 위해 다른 속의 균주인 *Streptomyces coelicolor* A3(2)로 *seaR* 유전자를 삽입하여 형질전환하였다. *S. coelicolor* A3(2)의 형질전환은 *oriT*, *attP*, *ermEp*^{*}과 *seaR* gene 단편을 가지고 있는 Φ C31 유래의 integration vector인 pEV615 (6.6 kb)를 이용하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002를 DNA 공여체로 이용한 접합전달법을 사용하여 확립하였다. *seaR* 유전자의 삽입 유무는 PCR방법으로 확인하였고, *seaR* 유전자의 전사 발현은 RT-PCR방법으로 확인하였다. *S. coelicolor* A3(2)의 경우 표현형 microarray 실험을 통하여 *seaR* 유전자의 발현에 따른 표현형의 변화를 확인하였다. 특히, 표현형 microarray 실험에 나타난 tetracycline 항생제 기질에 대하여 wild type이 transformant에 비해 빠르게 성장하는 것은 항균제 감수성 검사와 일치하였다. 이는 tetracycline 생합성 유전자 및 내성 유전자의 발현 억제에 따른 변화라고 예상할 수 있으며 이를 위하여 tetracycline 생합성 관련 유전자 및 내성 유전자의 발현 패턴 분석등과 같은 분자 수준에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

References

- Alderson, G., Ritchie, D.A., Cappellano, C., Gool, R.H., Ivanova, N.M., Huddleston, A.S., Flaxman, C.S., Kristufek, V., and Lounes, A. 1993. Physiology and genetics of antibiotic production and resistance. *Res. Microbiol.* **144**, 665-672.
- Bibb, M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in Streptomyces. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 208-215.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N., and Schoner, B.E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**, 43-49.
- Butler, M.J., Takano, E., Bruheim, P., Jovatic, S., Marinell, F., and Bibb, M.J. 2003. Deletion of *scbA* enhances antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **61**, 512-516.
- Choi, S.U., Lee, C.K., Hwang, Y.I., Kinishita, H., and Nihira, T. 2004. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B₁ producer. *Arch. Microbiol.* **181**, 294-298.
- Combes, P., Till, R., Bee, S., and Smith, M.C.M. 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple pseudo-*attB* sites for the Φ C31-encoded site-specific recombination system. *J. Bacteriol.* **184**, 5746-5752.

- Flett, F., Mersinias, V., and Smith, C.P.** 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**, 223–229.
- Horinouchi, S., Kito, M., Nishiyama, M., Furuya, K., Hong, S.K., Miyake, K., and Beppu, T.** 1990. Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **95**, 49–56.
- Hwang, J.H., Lee, C.K., Lee, K.M., Jo, B.K., Park, H.R., and Hwang, Y.I.** 2005. Development of a recombinant *Streptomyces griseus* with *sprA* and *sprB* genes for proteolytic enzyme production. *Kor. J. Microbiol.* **41**, 87–92.
- Kang, S.J., Lee, C.K., Choi, S.U., Kim, H.S. and Hwang, Y.I.** 2006. In vivo function analysis of γ -butyrolactone autoregulator receptor gene(*scaR*) in *Streptomyces clavuligerus*. *J. Life Science* **16**, 76–81.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A.** 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation.
- Kitani, S., Bibb, M.J., Nihira, T., and Yamada, Y.** 2000. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J. Microbiol Biotechnol.* **10**, 535–538.
- Lee, Y.J., Yeo, S.H., Lee, I.S., Lee, S.P., Kitani, S., Nihira, T., and Kim, H.S.** 2006. Cloning and characterization of gene encoding γ -butyrolactone autoregulator receptor from *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 77–83.
- Mazodier, P., Petter, R., and Thompson, C.** 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **171**, 3583–3585.
- Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T., and Horinouchi, S.** 1995. Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**, 6083–6092.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, USA
- Smokvina, T., Mazodier, P., Boccart, F., Thompson, C.J., and Guerineau, M.** 1990. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* **94**, 53–59.
- Takano, E.** 2006. γ -Butyrolactones: *Streptomyces* signaling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 287–294.