

Myxococcus stipitatus DSM 14675의 melithiazol 생합성 유전자 분석

현혜숙, 박수현, 조경연*
호서대학교 생명공학과

Received: June 28, 2016 / Revised: August 22, 2016 / Accepted: August 23, 2016

Analysis of the Melithiazol Biosynthetic Gene Cluster in *Myxococcus stipitatus* DSM 14675

Hyesook Hyun, Soohyun Park, and Kyungyun Cho*

Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 31499, Republic of Korea

Melithiazols are antifungal substances produced by the myxobacteria *Melitangium lichenicola*, *Archangium gephyra*, and *Myxococcus stipitatus*. Melithiazol biosynthetic genes have been identified in *M. lichenicola*, but not in *A. gephyra* and *M. stipitatus* until now. We identified a 37.3-kb melithiazol biosynthetic gene cluster from *M. stipitatus* DSM 14675 using genome sequence analysis and mutational analysis. The cluster is comprised of 9 genes (MYSTI_04973 to MYSTI_04965) that encode 4 polyketide synthase modules, 3 non-ribosomal peptide synthase modules, a putative fumarylacetoacetate hydrolase, a putative *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, and a putative nitrilase. Disruption of the MYSTI_04972 or MYSTI_04973 gene by plasmid insertion resulted in defective melithiazol production. The organization of the melithiazol biosynthetic modules encoded by 8 genes from MYSTI_04972 to MYSTI_04965 was similar to that in *M. lichenicola* Me 146. However, the loading module encoded by the first gene (MYSTI_04973) was different from that of *M. lichenicola* Me 146, explaining the difference in the production of melithiazol derivatives between the *M. lichenicola* Me 146 and *M. stipitatus* strains.

Keywords: *Myxococcus stipitatus*, myxobacteria, melithiazol

서론

점액세균(myxobacteria)은 그람음성 토양세균으로 다양한 이차대사 생리활성물질을 생산하는 것으로 잘 알려져 있다 [13, 21]. 점액세균에서 발견된 생리활성물질 대부분은 폴리케타이드(polyketide, PK), 비리보솜 펩티드(non-ribosomal peptide, NRP), 또는 폴리케타이드와 비리보솜 펩티드의 혼성체(PK-NRP)이다[21]. 폴리케타이드는 폴리케타이드 합성효소(polyketide synthase, PKS)에 의해 생합성되며, 비리보솜 펩티드는 비리보솜 펩티드 생합성효소(non-ribosomal peptide synthetases, NRPS)에 의해 생합성된다[22]. 이들은 다중도메인 효소 또는 효소복합체로 이루어져 있으며 유전

자들이 염색체 상에서 집단(gene cluster)으로 존재하는 경우가 대부분이다[22].

Melithiazol은 점액세균의 한 종류인 *Melitangium lichenicola* Me 146에서 처음 발견된 항진균 물질이다[14]. 이후, 다른 점액세균 종류인 *Archangium gephyra* Ar 7747과 *Myxococcus stipitatus* Mx s64에서도 유도체들이 분리되었다[3]. Melithiazol은 폴리케타이드와 비리보솜 펩티드의 혼성체로 β -methoxyacrylate 저해제 분류에 속하며, 미토콘드리아에서 전자전달을 억제한다[14]. Melithiazol은 *Cystobacter fuscus* AJ-13278에서 분리된 cystothiazole [12, 17]과 구조가 매우 유사하며, *Myxococcus fulvus*, *Stigmatella aurantiaca* 등에서 분리된 myxothiazol [16, 19]과도 골격 구조가 유사하다. Melithiazol, cystothiazole, myxothiazol은 모두 강력한 항진균 활성을 보이는데, melithiazol과 cystothiazole의 세포독성은 myxothiazol에 비해 약한 것으로 보고되었다[14].

Melithiazol은 A-I, K-N의 13개 유도체가 알려져 있으며

*Corresponding author

Tel: +82-41-540-5627, Fax: +82-41-5480-9538

E-mail: kycho@hoseo.edu

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

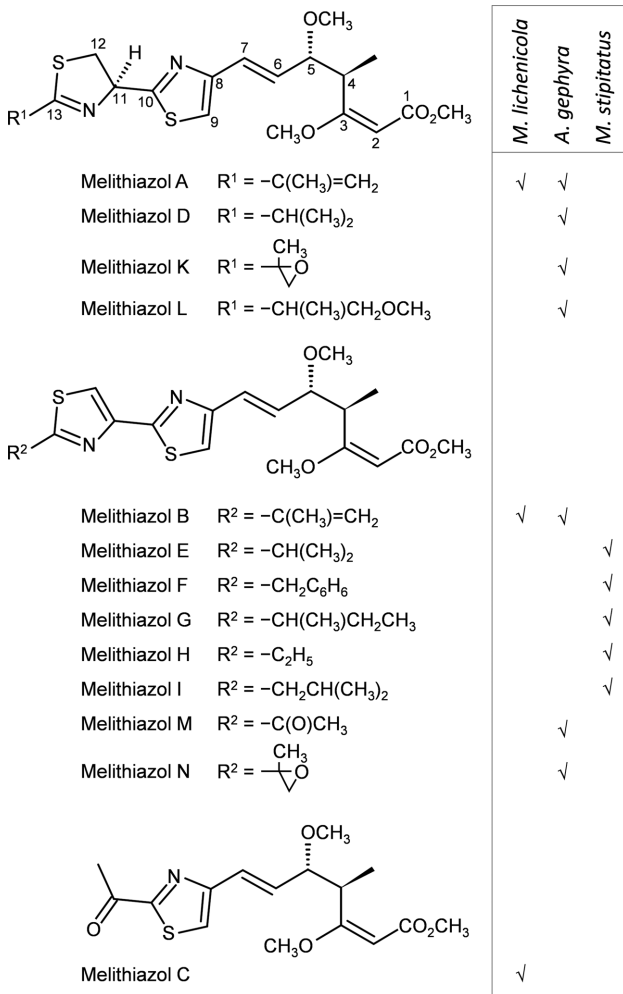


Fig. 1. The chemical structures of melithiazols and the description of their producers [3, 14]. The box shows mycobacteria, *Melintangium lichenicola*, *Archangium gephyra*, and *Myxococcus stipitatus*, and the derivatives of melithiazols that they produce.

[3, 14], 점액세균의 종류에 따라 생산하는 유도체가 다르다 (Fig. 1). *M. lichenicola* Me 146은 melithiazol A, B, C를 생산하며, *A. gephyra* Ar 7747은 melithiazol A, B, D, K, L, M, N을 생산한다[14]. *M. stipitatus* Mx s64는 *M. lichenicola* Me 146 및 *A. gephyra* Ar 7747과는 다르게 melithiazol E, F, G, H, I를 생산한다[14]. 유도체 간의 차이는 대부분 13번 탄소에 연결되어 있는 R기의 차이이다(Fig. 1). Melithiazol C를 제외한 모든 유도체들은 myxothiazol A 및 Z와 유사하게 강한 항진균 활성을 보인 반면, 마우스 섬유아세포주에 대한 세포독성은 상대적으로 매우 낮은 것으로 보고되었다[3, 14]. Melithiazol C는 다른 유도체들에 비해 약한 항진균 활성을 보이는 반면, 세포독성은 강하다. *M.*

*stipitatus*에 의해 생산되는 melithiazol E, F, G, H, I의 항진균 활성과 세포독성은 다른 melithiazol 유도체들과 대체로 유사한 것으로 알려져 있다[3, 14].

M. lichenicola Me 146 균주의 melithiazol 생합성 유전자는 보고되어 있으나[20], *A. gephyra*와 *M. stipitatus*의 melithiazol 생합성 유전자는 알려져 있지 않다. 최근 *M. stipitatus* DSM 14675의 유전체 서열이 공개되었으므로[6], 본 연구에서는 *M. stipitatus* DSM 14675 유전체 분석을 통해 melithiazol 생합성 유전자를 탐색하였으며, *M. stipitatus*와 *M. lichenicola* Me 146이 서로 다른 melithiazol 유도체를 생산하는 이유를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

균주

*Myxococcus stipitatus*의 새 표준균주인 *M. stipitatus* DSM 14675은 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)에서 구입하였다. *M. stipitatus* KYC595와 KYC596 균주는 본 연구에서 DSM 14675 균주의 염색체에 pSH123과 pSH124 플라스미드를 각각 삽입하여 제조하였다. *Candida albicans* ATCC 18804는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 구입하였다.

플라스미드 및 균주의 제조

pSH123 플라스미드는 두 개의 올리고뉴클레오티드 5'-GGATTGACGTCGAGGAACAG-3' (SH111)과 5'-GGATTC TGTCGTTGAGGAG-3' (SH112)을 프라이머로 사용하고 DSM 14675 균주의 유전체 DNA를 주형으로 중합효소연쇄반응(PCR)을 실시하여 얻은 MYSTI_04973 유전자의 내부 DNA 조각(505 bp)을 pCR2.1 벡터(Invitrogen, USA)에 삽입하여 제조하였다. pSH124 플라스미드는 또 다른 두 개의 올리고뉴클레오티드 5'-GGATGGAGAATCGACCAGAC-3' (SH113)과 5'-CCTGGCGTACTGCATCTACA-3' (SH114)을 프라이머로 사용하여 PCR 증폭을 통해 얻은 MYSTI_04972 유전자의 내부 DNA 조각(489 bp)을 pCR2.1 플라스미드 벡터에 삽입하여 제조하였다.

제조한 플라스미드는 전기천공을 통해 DSM 14675 균주에 도입하였으며, 가나마이신(100 µg/ml)이 들어있는 배지에서 배양함으로써 상동재조합에 의해 플라스미드가 염색체의 목표 지점에 삽입된 KYC595와 KYC596 균주를 선별하였다. 목표지점으로서의 플라스미드의 삽입은 pCR2.1 벡터 DNA 부위에 상보적인 올리고뉴클레오티드(M13F 또는 M13R)와 염색체 상의 삽입부위 부근에 상보적인 올리고뉴클레오티드를 프라이머로 사용하고, 제조한 균주의 유전체 DNA를 주형으로 사용한 PCR을 통해 확인하였다. pSH123 플

라스미드의 유전체 DNA로의 삽입 확인을 위해서는 올리고뉴클레오티드 5'-GCGGATAACAATTTCACACAGG-3' (M13R) 과 5'-GAAGCGAGGCTCGTCCATCA-3' (SH118)을 사용하였으며, pSH124 플라스미드의 유전체 DNA로의 삽입 확인을 위해서는 올리고뉴클레오티드 5'-TGTA AACGACG GCCAGT-3' (M13F)과 5'-GGACAGGCTGACGAAGACAC-3' (SH117)을 사용하였다.

배지 및 배양조건

*M. stipitatus*의 일반적 배양을 위해서는 VY3 [15] 또는 CYE 배지[5]를 사용하였으며, 배양추출물의 제조를 위해서는 CYS 배지[15]를 사용하였다. CYS 배지는 0.5% casitone, 0.1% 효모추출물, 0.3% 가용성 전분, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.05% CaCl₂, 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (pH7.6), 0.1% 미량원소용액, 0.5 µg/ml cyanocobalamine을 함유하고 있었으며, 미량원소용액은 1 리터당 100 mg MnCl₂·4H₂O, 20 mg CoCl₂, 10 mg CuSO₄, 10 mg Na₂MoO₄·2H₂O, 20 mg ZnCl₂, 5 mg LiCl, 5 mg SnCl₂·2H₂O, 10 mg H₃BO₃, 20 mg KBr, 20 mg KI, 8 g EDTA Na-Fe³⁺ salt (trihydrate)를 함유하고 있었다. *C. albicans*는 YM 배지[15]에서 배양하였다. 모든 균주들은 30°C에서 배양하였다.

배양추출물의 제조

M. stipitatus 균주들을 2% Amberlite XAD-16 레진 (Sigma, USA)을 넣은 50 ml CYS 배지에서 7일 동안 진탕 배양한 뒤 레진을 회수하였다. 레진을 50% 아세톤으로 2회, 100% 아세톤으로 2회 추출하고, 회전증발기를 사용하여 아세톤만을 제거한 다음, 남은 수용액을 에틸아세테이트로 추출한 후 건조시키고 80% 메탄올에 용해하였다.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 분석

Zorbax SB-C18 칼럼(4.6 × 150 mm, 5 µm)을 장착한 Agilent 1260 VL Infinity Series HPLC 시스템을 사용하였다(Agilent Technologies, USA). 이동상 A는 0.1% 포름산을 함유한 증류수, 이동상 B는 0.1% 포름산을 함유한 아세토니트릴을 사용하였다. 유속은 0.5 ml/min으로 처음 30분 간 60% B 용매, 30-50분 간 60%에서 100% B 용매 기울기, 50-55분 간 100% B 용매, 그리고 55-60분 간 60% B 용매로 용리하였다. 용리액은 photo diode array (PAD) 검출기를 사용하여 검출하였다.

항진균 활성 조사

시료 10 µl를 6 mm 종이디스크(Advantec MFS, Japan)에 흡수시킨 후, 건조시키고, *C. albicans* ATCC 18804가 도

말된 평판배지 위에 올려놓았다. 음성 대조구로는 80% 메탄올을 사용하였다. 30°C 배양기에서 2일간 배양한 후, 성장저지환의 지름을 측정하여 항진균 활성을 조사하였다.

서열 분석

이차대사산물 생합성 유전자의 분석은 antiSMASH 프로그램[2, 9]을 이용하였다. Conserved domain의 분석은 미국 국립생물정보센터(NCBI)의 CD-Search 프로그램[8]을 사용하였다. 서열정돈은 Clustal X2 프로그램[7]을 이용하였으며, 계통수의 분석은 MEGA 6 프로그램[18]을 사용하였다.

결과 및 고찰

유전체 분석에 의한 *M. stipitatus* DSM 14675 균주의 melithiazol 생합성 유전자 탐색

Melithiazol 생합성 유전자군은 Weinig 등에 의하여 *M. lichenicola* Me 146으로부터 처음 발견되었다[20]. 서열분석 결과에 따르면 *M. lichenicola* Me 146의 melithiazol 생합성 유전자군은 세 개의 polyketide synthase (PKS) 유전자와 두 개의 non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) 유전자, 그리고 한 개의 PKS-NRPS 혼성 유전자로 구성되어 있다[20]. *M. lichenicola* Me 146 이외에 *A. gephyra* Ar 7747과 여러 *M. stipitatus* 균주에서도 melithiazol 생산이 보고 되었으므로[1, 14] 최근에 공개된 *A. gephyra* DSM 2261의 유전체(Accession No. CP011509)와 *M. stipitatus* DSM 14675의 유전체(Accession No. CP004025) [6]에 melithiazol 생합성 유전자가 존재하는지 조사하여 보았다.

antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) 프로그램은 은닉 마르코프 모델(hidden Markov model (HMM)) 프로파일에 기초하여 생물의 유전체 정보로부터 다양한 종류의 이차대사산물 생합성 유전자군을 밝혀내며, 유전자 각각에 대한 상세 분석도 제공하는 프로그램이다[2, 9]. antiSMASH 분석 결과, *A. gephyra* DSM 2261의 유전체에는 *M. lichenicola* Me 146의 melithiazol 생합성 유전자군과 유사한 유전자군이 발견되지 않았다. 하지만 *M. stipitatus* DSM 14675의 유전체에는 염기서열 6,360,714-6,398,046 bp에 위치한 약 37.3 kb 크기의 유전자군 (MYSTI_04973-MYSTI_04965)이 *M. lichenicola* Me 146 균주에서 분석된 melithiazol 생합성 유전자군과 유사한 구조의 이차대사산물을 생산할 가능성이 높은 것으로 분석되었다(Fig. 2). Melithiazol은 cystothiazole [12, 17] 및 myxothiazol [16, 19]과도 골격 구조가 유사한데, 이 유전자군은 *Cystobacter fuscus* AJ-13278의 cystothiazole 생합성 유전자군[4] 및 *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1의 myxothiazol 생합성 유전자군[16]과 유전자 구성이 유사하였다(Fig. 2).

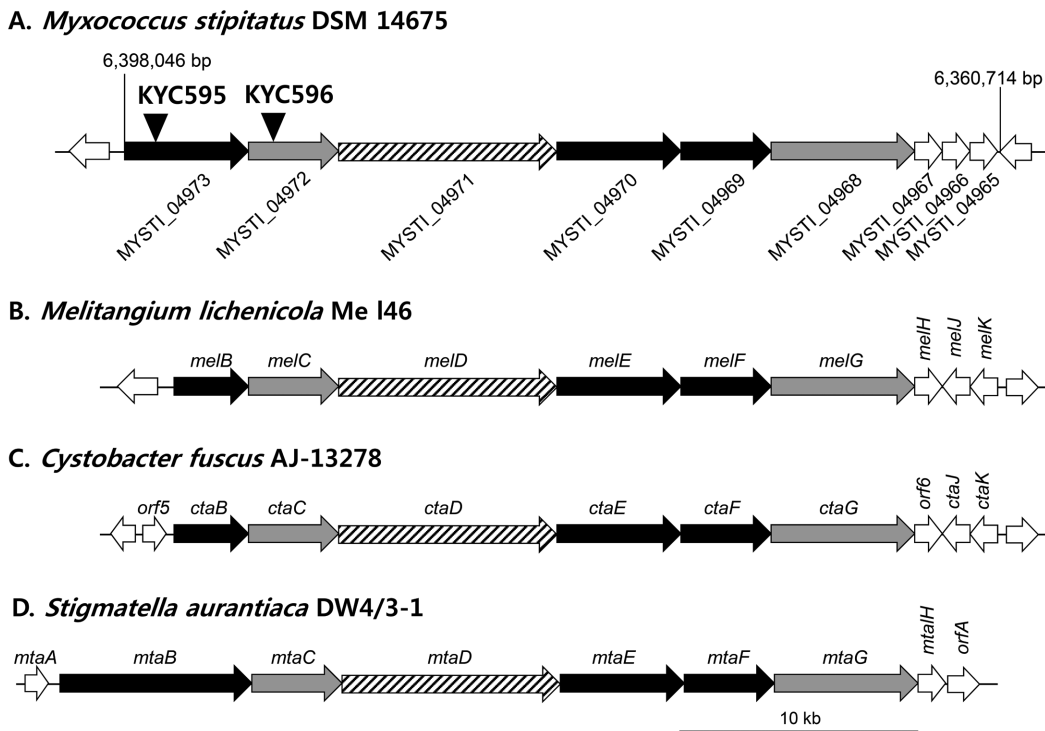


Fig. 2. Biosynthetic gene clusters of melithiazol, cystothiazole, and myxothiazol. Melithiazol biosynthetic gene clusters from *Myxococcus stipitatus* DSM 14675 (A) and *Melitangium lichenicola* Me 146 [20] (B), cystothiazole biosynthetic gene cluster from *Cystobacter fuscus* AJ-13278 [4] (C), and myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 [16] (D) are shown. ■ Polyketide synthase (PKS); ▒ Non-ribosomal peptide synthetase (NRPS); ▤ PKS/NRPS hybrid.

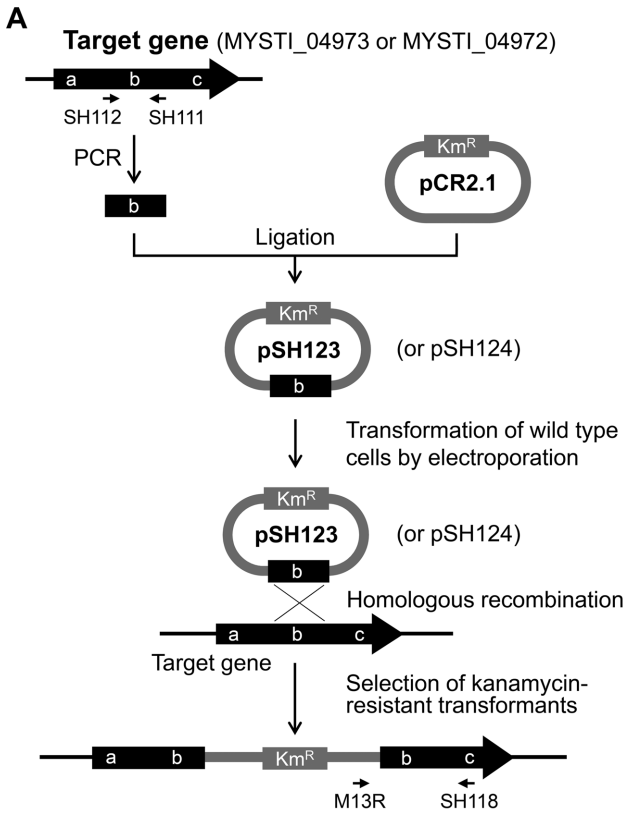
삽입돌연변이에 의한 생합성 유전자의 불활성

M. stipitatus DSM 14675의 유전체에서 탐색된 MYSTI_04973-MYSTI_04965 부위가 melithiazol 생합성 유전자군인지 확인하기 위하여 플라스미드 삽입을 통한 유전자 불활성 변이주를 제조하고 melithiazol 생산 여부를 조사하였다. 플라스미드 삽입에 의한 유전자 불활성 변이주 제조과정은 Fig. 3에 보였다. 먼저 목표 유전자의 내부 서열에 상보적인 한 쌍의 프라이머(pSH123의 경우 SH111과 SH112 프라이머, pSH124의 경우 SH113과 SH114 프라이머)를 사용한 PCR을 통해 MYSTI_04973 유전자의 내부 DNA 조각(505 bp)과 MYSTI_04972 유전자의 내부 DNA 조각(489 bp)을 증폭한 후, 각각의 DNA 조각을 가나마이신 저항성 유전자를 가지고 있는 pCR2.1 벡터에 삽입하여 플라스미드 pSH123과 pSH124를 제조하였다(Fig. 3). 그리고 전기천공을 통해 각각의 플라스미드를 야생형 균주인 *M. stipitatus* DSM 14675에 도입하고 가나마이신 저항성 변이주를 선별함으로써 KYC595과 KYC596 균주를 각각 제조하였다(Fig. 3). pCR2.1 플라스미드 벡터 자체는 *M. stipitatus* 내에서 자가 복제하지 못하며, 상동재조합을 위한 서열 부분이 없어서 염색체로 삽입되지도 않는다. 따라서 pSH123 또는 pSH124 플

라스미드를 야생형 균주인 DSM 14675 균주에 도입하고 가나마이신이 들어있는 배지에서 배양하면 플라스미드가 상동재조합에 의해 클로닝한 DNA 조각과 동일한 서열의 염색체 부위로 삽입된 균주만 선별된다(Fig. 3). 플라스미드의 삽입은 염색체 상 목표지점 부근에 상보적인 프라이머(pSH123의 경우 SH118, pSH124의 경우 SH117 프라이머)와 pCR2.1 벡터 DNA에 상보적인 프라이머(pSH123의 경우 M13R, pSH124의 경우 M13F 프라이머)를 사용한 PCR을 통해 확인하였다(Fig. 3).

플라스미드 삽입에 의한 melithiazol 생산능 상실

플라스미드 삽입돌연변이에 의해 실제 melithiazol 생산능이 상실되었는지 확인하기 위하여 야생형 균주인 DSM 14675 균주와 플라스미드 삽입변이주인 KYC595과 KYC596 균주를 각각 배양하여 배양추출물을 제조한 후, 제조한 배양추출물을 HPLC로 분석하였다. 그 결과 KYC595과 KYC596 균주 배양추출물의 HPLC 크로마토그램에서는 야생형인 DSM 14675 균주 배양추출물의 크로마토그램에서 검출된 40.1분과 41.2분 피크가 사라졌음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한, DSM 14675 균주 배양추출물의 40.1분 및 41.2분



Target gene	Inserted plasmid	Mutant
MYSTI_04973	pSH123	KYC595
MYSTI_04972	pSH124	KYC596

Fig. 3. A gene disruption strategy. a, b, and c refer to the arbitrary regions in the target gene. SH111 and SH112 were PCR primers used for amplifying an internal DNA fragment of MYSTI_04973. M13R and SH118 were PCR primers used for verifying the insertion of pSH123.

피크를 함유한 39.50-41.50분 분획은 *C. albicans*에 대해 항진균 활성을 보였지만, KYC595과 KYC596 균주 배양추출



Fig. 5. Defects in antifungal substance production due to plasmid insertion mutations. Paper discs of 6 mm diameter containing HPLC fractions, from 39.50 min to 41.50 min, of DSM 14675 extract (A), KYC595 extract (B), and KYC596 extract (C) were placed on plates inoculated with *Candida albicans* ATCC 18804, and the plates were incubated for 2 days.

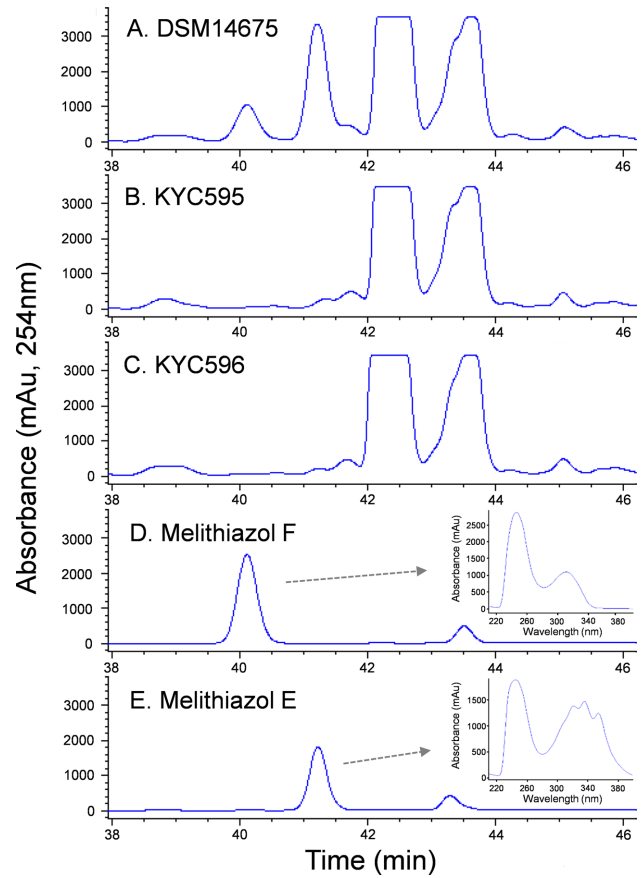


Fig. 4. High-performance liquid chromatography chromatograms of the culture extracts of *Myxococcus stipitatus* strains DSM 14675, KYC595, and KYC596. Melithiazol E and F isolated from *M. stipitatus* KYC4013 [1] were used as standards. Inserts in the panel D and E are UV spectra of the respective melithiazols.

물의 동일한 분획은 항진균 활성을 보이지 않았다(Fig. 5). *M. stipitatus* KYC4013 균주로부터 분리한 melithiazol 유도체들[1]과 비교하였을 때, DSM 14675 균주 배양추출물의 40.1분 피크는 melithiazol F와 동일한 지연시간을 보였으며,

41.2분 피크는 melithiazol E와 동일한 지연시간을 보였다 (Fig. 4). PDA 분석에 의한 40.1분 피크와 41.2분 피크의 UV 분광스펙트럼 역시 melithiazol F 및 melithiazol E와 동일한 양상이었다. 이는 DSM 14675 균주 배양추출물의 40.1분 피크와 41.2분 피크 물질이 melithiazol이며, KYC595와 KYC596 균주의 경우 플라스미드 삽입에 의해 melithiazol 생산능이 상실되었음을 보여주었다. 따라서 이러한 결과는 *M. stipitatus* DSM 14675 균주의 MYSTI_04973-MYSTI_04965 유전자들이 melithiazol 생합성 유전자임을 직접적으로 나타내었다. 한편, 42-44분 사이에 보인 피크들은 phenalamide 유도체들[1]인데, melithiazol G, H, I와 같은 다른 유도체들은 phenalamide와 섞여 나타남으로 인해 단독 피크로 보이지 않은 것으로 사료된다.

Melithiazol 생합성 유전자군의 분석

M. stipitatus DSM 14675 균주의 melithiazol 생합성 유전자군은 동일한 방향으로 전사되는 MYSTI_04973부터 MYSTI_04965까지의 9개 유전자로 구성되어 있다 (Fig. 2, Table 1). antiSMASH 분석 결과, 유전자군을 구성하는 첫 번째 유전자(MYSTI_04973)는 3-methyl butyryl-CoA에 특이적인 acyltransferase (AT), ketosynthase (KS), 또 다른 AT, 그리고 acyl carrier protein (ACP) 도메인을 갖는 PKS

를 암호화하는 것으로 예측되었다 (Table 1). 두 번째 유전자 (MYSTI_04972)는 cysteine을 기질로 사용하는 NRPS를 암호화하는 것으로 예측되었다. 세 번째 유전자(MYSTI_04971)는 cysteine을 기질로 사용하는 NRPS와 malonyl-CoA에 특이적인 AT, dehydratase (DH), ketoreductase (KR), ACP 도메인을 갖는 NRPS-PKS 혼성체를 암호화하는 것으로 예측되었다. 네 번째 유전자(MYSTI_04970)는 KS, methyl malonyl-CoA에 특이적인 AT, o-methyl transferase (oMT), KR, ACP 도메인을 갖는 PKS를 암호화하는 것으로 예측되었다. 다섯 번째 유전자(MYSTI_04969)는 KS, malonyl-CoA에 특이적인 AT, oMT, ACP 도메인을 갖는 PKS를 암호화하는 것으로 예측되었다. 여섯 번째 유전자 (MYSTI_04968)는 glycine을 기질로 사용하는 NRPS를 암호화하는 것으로 예측되었다. 일곱 번째 유전자(MYSTI_04967)는 fumarylacetoacetate (FAA)-hydrolase을 암호화하는 것으로 예상되었다. *M. lichenicola* Me 146의 경우, 일곱 번째 유전자(MYSTI_04967)가 암호화하는 단백질은 melithiazol 생합성에 관여하지 않는 것으로 보고되었다[20]. 여덟 번째와 아홉 번째 유전자인 MYSTI_04966, MYSTI_04965는 각각 S-adenosylmethionine-dependent methyl transferase (SAM)와 nitrilase를 암호화하는 것으로 예측되었다. *M. lichenicola* Me 146의 경우 *melK*와 *melJ* 유전자

Table 1. Comparison between the melithiazol biosynthetic genes from *Mycococcus stipitatus* DSM 14675 and from *Melitangium lichenicola* Me 146.

<i>M. stipitatus</i> DSM 14675					<i>M. lichenicola</i> Me 146			
ORF No.	Product size (aa)	Predicted function	PKS/NRPS motif	Similarity (%)	Gene	Product size (aa)	Predicted function	PKS/NRPS motif
04973	1,878	PKS	AT1(3-metbut)-KS-AT2*-ACP	(77)	<i>melB</i>	1,050	PKS	KS-AT(isobut)-ACP
04972	1,348	NRPS	C-A(cys)	77	<i>melC</i>	1,323	NRPS	C-A(cys)
04971	3,199	NRPS/PKS	C-A(cys)-PCP-KS-AT(mal)-DH-KR-ACP	74	<i>melD</i>	3,284	NRPS/PKS	C-A(cys)-PCP-KS-AT(mal)-DH-KR-ACP
04970	1,916	PKS	KS-AT(mmal)-oMT-KR-ACP	77	<i>melE</i>	1,912	PKS	KS-AT(mmal)-oMT-KR-ACP
04969	1,357	PKS	KS-AT(mal)-oMT-ACP	81	<i>melF</i>	1,360	PKS	KS-AT(mal)-oMT-ACP
04968	1,739	NRPS	C-A(gly)-PCP-TE	83	<i>melG</i>	1,747	NRPS	C-A(gly)-PCP-TE
04967	341	FAA hydrolase		80	<i>melH</i>	329	FAA hydrolase	
04966	295	SAM		83	<i>melK</i>	301	SAM	
04965	348	Nitrilase		83	<i>melJ</i>	335	Nitrilase	

A, adenylation; aa, amino acid; ACP, acyl carrier protein; AT, acyltransferase; C, condensation; cys, cysteine; DH, dehydratase; FAA hydrolase, fumarylacetoacetate hydrolase; gly, glycine; isobut, isobutyrate; KR, ketoreductase; KS, ketosynthase; mal, malonate; mmal, methyl malonate; NRPS, Non-ribosomal peptide synthetase; oMT, o-methyl transferase; ORF, open reading frame; PCP, peptidyl carrier protein; PKS, polyketide synthase; SAM, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase; TE, thioesterase; 3-metbut, 3-methyl butyrate.

Similarity: similarity to the corresponding proteins of *M. lichenicola* Me 146.

* indicates a presumably inactive domain.

에 의해 암호화된 SAM과 nitrilase가 MelG에 의해 더해진 glycine을 제거하고 그 자리에 methyl ester 잔기를 생성하는 것으로 알려져 있다[11, 20].

전사되는 방향은 유전체 서열의 역순인 MYSTI_04973에서 MYSTI_04965 방향으로 전사되는 것으로 분석되었는데 (Fig. 2), MYSTI_04973부터 MYSTI_04965까지의 아홉 개 유전자들은 서로 번역공역되어 있거나 유전자 간 간격이 39 bp 이하이므로 한 개의 mRNA로 전사되는 오페론일 가능성이 높은 것으로 추정되었다. 한편, 8-9번째 유전자인 *M. lichenicola* Me 146의 *melJ*와 *melK* 유전자들은 다른 *mel* 유전자들과 반대 방향으로 전사되지만 *melJ*와 *melK*에 해당하는 DSM 14675의 유전자들(MYSTI_04965와 MYSTI_04966)은 모두 다른 유전자와 동일한 방향으로 전사되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

M. stipitatus 균주들은 *M. lichenicola* Me 146과는 기본골격은 동일하나 13번 탄소의 치환기가 서로 다른 melithiazol 유도체들을 생산한다. *M. lichenicola* Me 146은 melithiazol A, B, C를 생산하는 반면, *M. stipitatus* 균주들은 melithiazol E, F, G, H, I를 생산한다(Fig. 1) [3, 14]. *M. stipitatus* DSM 14675와 *M. lichenicola* Me 146의 melithiazol 생합성 유전자군[20]을 비교 분석한 결과, 두 균주의 melithiazol 생합성 유전자군은 전체적으로 매우 유사한 구성의 유전자를 가지나, 첫 번째 유전자에서는 큰 차이가 있는 것으로 분석되었다. *M. stipitatus* DSM 14675의 첫 번째 유전자 MYSTI_04973은 1,878 aa 크기의 AT1-KS-AT2-ACP 도메인 구성을 갖는 PKS를 암호화하는 것으로 예측된 반면, *M. lichenicola* Me 146의 첫 번째 유전자 *melB*는 1,050 aa 크기의 KS-AT-ACP 도메인 구성을 갖는 PKS를 암호화하는 것으로 나타났

다(Table 1).

PKS의 기질 특이성은 AT 도메인의 활성부위 및 주변의 24개 아미노산들의 잔기 분포 특성[23]과 Minowa 등의 방법에 기초한 은닉 마르코프 모델(hidden Markov model (HMM)) 프로파일[10]을 사용하여 예측 가능하며 antiSMASH 프로그램[2, 9]을 이용하여 분석할 수 있다. *M. lichenicola* Me 146와 *M. stipitatus* DSM 14675 균주 모두 세 번째 유전자(*melD*, MYSTI_04971)와 다섯 번째 유전자(*melF*, MYSTI_04969)의 AT 도메인은 malonyl-CoA를, 네 번째 유전자(*melE*, MYSTI_04970)의 AT 도메인은 methyl malonyl-CoA를 기질로 받아 들이는 것으로 나타나 동일한 골격을 형성할 것으로 추정되었다(Fig. 6). 하지만, *M. lichenicola* Me 146 균주의 첫 번째 유전자 *melB*의 AT 도메인이 isobutyryl-CoA에 특이적인 것에 비해[20], *M. stipitatus* DSM 14675의 첫 번째 유전자(MYSTI_04973)의 첫 번째 AT 도메인(AT1)은 3-methylbutyryl-CoA에 특이적인 것으로 예측되었으며, 두 번째 AT 도메인(AT2)은 활성부위를 포함하여 결실된 아미노산 서열이 많아 불활성화된 상태일 것으로 추정되었다. 따라서 *M. stipitatus* DSM 14675와 *M. lichenicola* Me 146은 서로 다른 starter molecule을 사용함으로써 서로 다른 유도체를 생산하는 것으로 사료된다. 생산하는 melithiazol 유도체의 구조를 고려할 때 *M. lichenicola* Me 146은 첫 번째 아실 물질로 isobutyryl-CoA만을 사용함으로써 melithiazol A, B, C만을 생산하는 반면, *M. stipitatus*는 3-methylbutyryl-CoA를 사용하여 melithiazol I를 생산할 뿐만 아니라 동시에 isopropyl-CoA, phenylacetyl-CoA, 2-methylbutyryl-CoA, propyl-CoA 등을 기질로 사용하여 melithiazol E, F, G, H도 생산하는 것으로 사료된다.

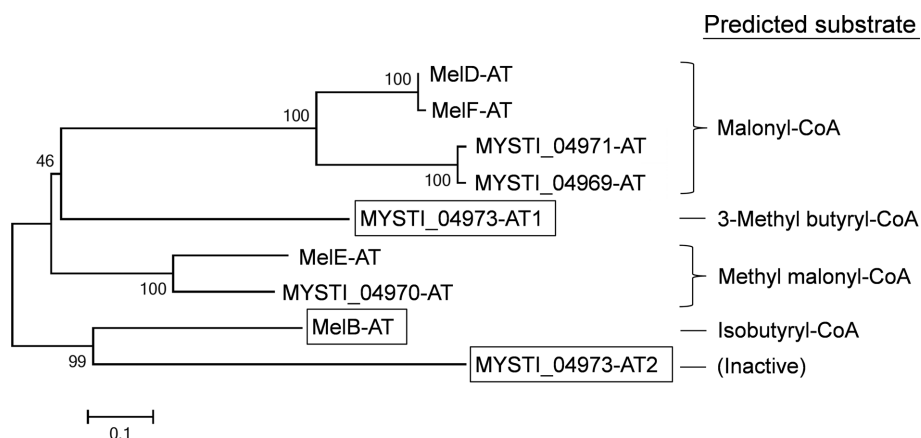


Fig. 6. Phylogenetic tree of the acyltransferase (AT) domains encoded by melithiazol biosynthetic genes. AT domains of the melithiazol biosynthetic genes from *Myxococcus stipitatus* DSM 14675 (MYSTI) and *Melittangium lichenicola* Me 146 [20] (Mel) were aligned using the Clustal X2 program, and a phylogenetic tree was generated using the MEGA 6 program. The bootstrap values were expressed as percentages of 1,000 replications. The scale bar represents 0.1 substitutions per amino acid position. AT domains of MelB and MYSTI_04973 are boxed. Predicted substrates of AT domains are shown on the right side of the tree.

본 연구에서는 *M. stipitatus* DSM 14675 유전체 6,360,714–6,398,046 bp에 위치한 유전자군 MYSTI_04973-MYSTI_04965가 melithiazol 생합성 유전자임을 밝혔으며, 첫 번째 유전자 MYSTI_04973가 암호화하는 PKS의 도메인 구성의 차이로 인해 *M. lichenicola* Me 146과 같은 다른 점액세균들이 생산하는 melithiazol 유도체들과 다름을 규명하였다. 본 연구에서 분석된 여러 PKS 및 NRPS 유전자들은 향후 점액세균을 기반으로 하는 조합생합성 연구에 유용한 재료로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

요약

Melithiazol은 점액세균 *Melitangium lichenicola*, *Archangium gephyra*, *Myxococcus stipitatus*에 의해 생산되는 향진균 물질이다. *M. lichenicola*의 melithiazol 생합성 유전자는 이미 알려져 있지만, *A. gephyra*와 *M. stipitatus*의 melithiazol 생합성 유전자들은 아직까지 밝혀져 있지 않다. 본 연구에서는 유전체 서열 분석과 돌연변이 분석을 통해 *M. stipitatus* DSM 14675 균주로부터 37.3 kb 크기의 melithiazol 생합성 유전자군을 발견하였다. 이 유전자군은 9개(MYSTI_04973–MYSTI_04965)의 유전자로 구성되어 있는데, 4개의 polyketide synthase 모듈과 3개의 non-ribosomal peptide synthase 모듈, 그리고 fumarylacetoacetate hydrolase, S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase, nitrilase를 암호화하는 것으로 분석되었다. 플라스미드 삽입 돌연변이를 통해 MYSTI_04972 유전자 또는 MYSTI_04973를 불활성화시켰을 때 melithiazol 생산능이 상실되었다. MYSTI_04972부터 MYSTI_04965까지의 8개 유전자가 암호화하는 melithiazol 생합성 모듈의 구성은 *M. lichenicola* Me 146에서와 유사하였다. 하지만 첫 번째 유전자(MYSTI_04973)에 의해 암호화되는 로딩 모듈의 구성은 *M. lichenicola* Me 146과 달랐는데, 이러한 차이는 *M. stipitatus* 균주들이 어떻게 *M. lichenicola* Me 146과는 다른 구조의 melithiazol 유도체들을 생산하는지 설명해준다.

References

- An D, Park S, Lee JS, Cho K. 2014. Production of bioactive substances by a myxobacterium *Myxococcus stipitatus* KYC4013. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 331–338.
- Blin K, Medema MH, Kazempour D, Fischbach MA, Breitling R, Takano E, Weber T. 2013. antiSMASH 2.0 — a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucl. Acids Res.* **41**: W204–W212.
- Böhlendorf B, Herrmann M, Hecht H, Sasse F, Forche E, Kunze B, et al. 1999. Antibiotics from gliding bacteria, 85 Melithiazols A–N: new antifungal α -methoxyacrylates from myxobacteria. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**: 2601–2608.
- Feng Z, Qi J, Tsuge T, Oba Y, Kobayashi T, Suzuki Y, et al. 2005. Construction of a bacterial artificial chromosome library for a myxobacterium of the genus *Cystobacter* and characterization of an antibiotic biosynthetic gene cluster. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 1372–1380.
- Hagen DC, Bretscher AP, Kaiser D. 1978. Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **64**: 284–296.
- Huntley S, Kneip S, Treuner-Lange A, Søgaard-Andersen L. 2013. Complete genome sequence of *Myxococcus stipitatus* strain DSM 14675, a fruiting myxobacterium. *Genome Announc.* **1**: e0010013.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947–2948.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucl. Acids Res.* **43**: D222–D226.
- Medema MH, Blin K, Cimermanic P, de Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, et al. 2011. antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters. *Nucleic Acids Res.* **39**: W339–W346.
- Minowa Y, Araki M, Kanehisa M. 2007. Comprehensive analysis of distinctive polyketide and nonribosomal peptide structural motifs encoded in microbial genomes. *J. Mol. Biol.* **368**: 1500–1517.
- Müller I, Müller R. 2006. Biochemical characterization of MelJ and MelK. *FEBS J.* **273**: 3768–3778.
- Ojika M, Suzuki Y, Tsukamoto A, Sakagami Y, Fudou R, Yoshimura T, et al. 1998. Cystothiazoles A and B, new bithiazole-type antibiotics from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*. *J. Antibiot.* **51**: 275–281.
- Reichenbach H. 2005. Myxococcales. pp. 1059–1144. In Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Bergey's Manual Trust, East Lansing, MI, USA.
- Sasse F, Böhlendorf B, Herrmann M, Kunze B, Forche E, Steinmetz H, et al. 1999. Melithiazols, new beta-methoxyacrylate inhibitors of the respiratory chain isolated from myxobacteria. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **52**: 721–729.
- Shin H, Youn J, An D, Cho K. 2013. Production of antimicrobial substances by strains of myxobacteria *Coralloccoccus* and *Myxococcus*. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 44–51.
- Silakowski B, Schairer HU, Ehret H, Kunze B, Weinig S, Nordsiek G, et al. 1999. New lessons for combinatorial biosynthesis from myxobacteria. The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J. Biol. Chem.* **274**: 37391–37399.
- Suzukia Y, Ojikaa M, Sakagamia Y, Fudou R, Yamanaka S. 1998. Cystothiazoles C–F, new bithiazole-type antibiotics from the myxobacterium *Cystobacter fuscus*. *Tetrahedron* **54**: 11399–11404.

18. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **30**: 2725-2729.
19. Trowitzsch W, Reifensahl G, Wray V, Gerth K. 1980. Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus* (myxobacterales). II. structure elucidation. *J. Antibiot.* **33**: 1480-1490.
20. Weinig S, Hecht HJ, Mahmud T, Müller R. 2003. Melithiazol biosynthesis: further insights into myxobacterial PKS/NRPS systems and evidence for a new subclass of methyl transferases. *Chem. Biol.* **10**: 939-952.
21. Weissman KJ, Müller R. 2010. Myxobacterial secondary metabolites: bioactivities and modes-of-action. *Nat. Prod. Rep.* **27**: 1276-1295.
22. Williams GJ. 2013. Engineering polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**: 603-612.
23. Yadav G, Gokhale RS, Mohanty D. 2003. Computational approach for prediction of domain organization and substrate specificity of modular polyketide synthases. *J. Mol. Biol.* **328**: 335-363.