

*Actinodura roseorufa*에서 생산되는 UK-58,852로부터  
PKS type I 에 관련된 생합성 유전자의 분리 및 분석

김자용, 이주호\*, 김대희\*\*, 김동현\*\*, 송재경\*\*, 이희찬  
선문대학교 화학공학과, \*(주)진캠, \*\*선문대학교 화학과  
전화 (041) 530-2376, FAX (041) 541-7426

To clone genes related UK-58,852 production, genomic DNA of strain *Actinodura roseorufa* was used for the construction of genomic library using pOJ446 cosmid vector. The genomic library was screened using dehydratase PCR product and *eryA* gene as a DNA hybridization probe. pHD54 was isolated, which contained an approximately 35kb of inserted DNA. *Bam*HI, *Sma*I and sonicator fragments hybridized to *eryA* probe. All of pHD54 *Bam*HI, *Sma*I and sonicator fragments were subcloned into pGEM7 and some fragments which hybridized to *eryA* probe were sequenced. The nucleotide sequence was analysed using BLAST program. The sequence identities were observed in KS,AT, KR, ER and PKS loading domains. Also oxidoreductase showed similarity to rifamycin module10, and dTDP-*D*-glucose 4,6 dehydratase and TDP-*D*-glucose synthase involved in biosynthesis of sugar showed similarity to *Streptomyces argillaceus*.

## 서론

Polyketide<sup>1</sup>는 단순 출발물질인 acetyl-, propionyl- 또는 butyl-CoA의 축합으로 부터 환원 또는 탈수 반응을 거쳐 생성되는 천연화합물로서, 지방산 생합성에 관여하는 fatty acid synthase (FAS)와 아미노산 서열이 유사한 polyketide synthase(PKS)에 의해 생합성된다<sup>2</sup>. PKS는 반응기작의 차이에 따라 다기능 효소인 경우 type I 과 단기능 효소인 경우 type II로 분류하였지만<sup>3-4</sup>, 이들이 다기능 효소 또는 단기능 효소라는 공통점을 제외하고 실제 반응기작은 많은 차이를 보이고 있다. Type I PKS의 경우 module 형태의 다기능 효소로서 단계적인 축합반응을 촉매하며 한번의 축합반응에 대해 하나의 module multifunctional enzyme이 관여한다. 즉 축합반응의 회수에 따라 modular multifunctional enzyme의 수가 결정된다. Type I PKS에 의해서는 macrolide 또는 complex polyketide로 지칭되는 화합물들이 합성되며 대표적인 예로 erythromycin, avermectin, rifamycin 등이 있다. Type II PKS는 단기능 효소들의 결합체가 효소활성부위를 반복 사용하여 축합반응을 촉매하지

만 poly- $\beta$ -ketone 구조를 합성하고 최종적으로 aromatic polyketide 구조로 변형되고 대표적인 예로는 actinorhodin, tetracenomycin, daunorubicin 등이 있다.<sup>5</sup>

Polyether는 Polyketide 계열 생합성 유전자중의 하나로써, bisglycoside polyether ionophore UK-58,852<sup>6-10</sup>는 *Actinomadura roseorufa*(ATCC53666)로부터 분리되었고, 이것은 C<sub>2</sub>(acetate), C<sub>3</sub>(propionate) 소단위체와 당 일부분으로 구성되어 있다 (Fig. 1). Polyether 계열 항생제는 gram-positive bacteria와 호기성 세균에 좋은 활성을 나타낸다. Polyether는 높은 비경구 독성 때문에 항생제로써 인체에 투여하지 못하고, 척추 동물이나 무척추 동물에서 상피조직의 세포내 기생체에 대한 가축병 치료제나 소와 양 같은 반추동물의 성장촉진제로 쓰이고 있지만 구조의 복잡성 때문에 화학적인 합성으로는 구조변경이 거의 불가능하다. 본 연구에서는 polyether 항생제인 UK-58,852의 생합성 과정과 유전자 분석을 연구하고자 한다.

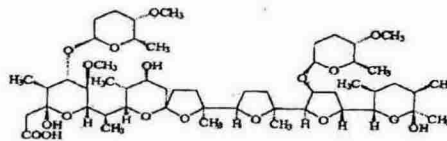


Figure 1. The structure of UK-58,852

## 재료 및 방법

### < Bacterial strains and vectors >

*E. coli* strain는 *Escherichia coli* XL1-Blue MRF' (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA)을 host strain으로 사용하였고, *Actinomadura* strain는 *Actinomadura roseorufa* Huang (ATCC53666)에서 생산된 UK-58,852 항생제를 사용하였다. 벡터는 pOJ446 (*E. coli*-*Streptomyces* shuttle cosmid)는 Eli Lilly Co.,로부터 입수하였다. pIJ2306은 David Schumann group으로부터 입수하였고, macrolide type PKS 염기서열을 갖는 *eryA* DNA인 pCS5는 Abbott 연구실에 Leonard Katz로부터 입수하였다. pGEM7 (PROMEGA, Inc.)는 DNA 조작에 사용하였다.

### < UK-58,852의 생합성 과정을 위한 유전자 조작 >

UK-58,852의 생합성에 관여하는 유전자를 분리하기 위해 *Actinomadura roseorufa*의 genomic DNA를 ISP2 배지에 7일 동안 배양하여 total DNA를 얻어서 *E. coli*-*Streptomyces* shuttle cosmid vector인 pOJ446과 ligation을 한 후, genomic library를 만들었다. Genomic library는 dehydratase PCR product와 *eryA* 유전자를 probe로 하여 sugar 생합성 유전자와 polyketide type I 유전자가 집단으로 존재하는 cosmid pHD54를 분리하였고, 이를 제한 효소인 *Bam*HI, *Sma*I 와 Sonicater를 이용해서 subcloning 하였다.

< BLAST에 의한 DNA 분석 >

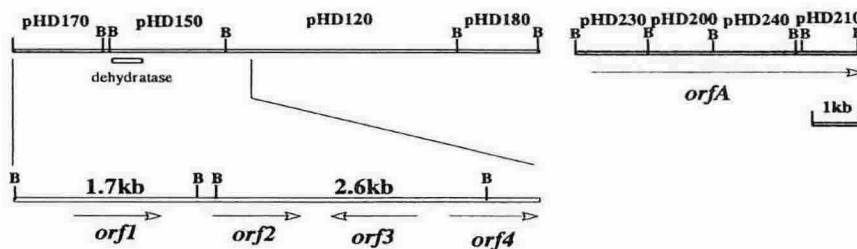
염기서열 분석은 구조 유전자와 open reading frame에 의해서 polypeptides에 상동 관계를 갖는 단백질을 바탕으로 GenBank/EMBL 염기서열 자료를 찾기 위해 BLAST 프로그램을 이용했다. (<http://www.blast.genome.ad.jp/>)

결과 및 고찰

< UK-58,852 생합성 유전자의 clone >

Dehydratase probe는 *Actinomadura roseorufa*로부터 얻어진 templates를 사용하고 알려진 11개의 dehydratase를 기초로 하여 아미노산에 일치되는 염기서열에 따라 디자인된 dTDP-D-glucose 4,6 dehydratase의 PCR primers를 사용하여 PCR방법에 의해서 얻어졌다. 또한 macrolide type PKS 염기서열을 갖는 *eryA* DNA인 pCS5는 *Hind*III와 *Sst*I로 반응하여 PKS DNA probe를 얻었다. 이 두 probe를 유전자로 하여 sugar 생합성 유전자와 polyketide type I 유전자가 집단으로 존재하는 cosmid pHD54를 분리하였다.

< 유전자 분석과 그에 따른 UK-58,852의 가정된 생합성 >



Proposed function (similar gene)

<i>orf 1</i>	dTDP-D-glucose synthase
<i>orf 2</i>	dTDP-D-glucose 4,6 dehydratas
<i>orf 3</i>	oxidoreductase
<i>orf 4</i>	dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glycose 3,5-epimerase
<i>orf A</i>	polyketide synthase(PKS)

Figure 2. DNA analysis of the cluster and their proposed function

현재까지 염기서열을 부분 분석한 결과 sugar 부분의 *orf1*~*4*는 약 4.5kb, PKS 부분인 *orfA*는 약 4kb정도 분석됐다(Fig.2). *orf1*~*4*는 UK-58,852에 있는 deoxysugar 생합성에 관계하는 유전자로 추정된다. 일반적으로 dTDP-D-glucose synthase에 의해 glucose-1-phosphate로부터 TDP-glucose로 전환되고 *orf2* TDP-glucose는 TDP-4-keto-6-deoxyglucose로 전환된다. Ketosugar는 *orf3*, *orf4* 및 알려져 있지 않은 일부 유전자에 의해 oxidoreductase가 합성된다. *orfA*는 rifamycin PKS 유전

자와 매우 유사성이 있고 현재 분석된 유전자 *orfA* 중에는 fatty acid loading domain으로 PKS의 start unit가 될 것으로 추정된다.

< TDP-glucose-synthase 유전자의 발현 >

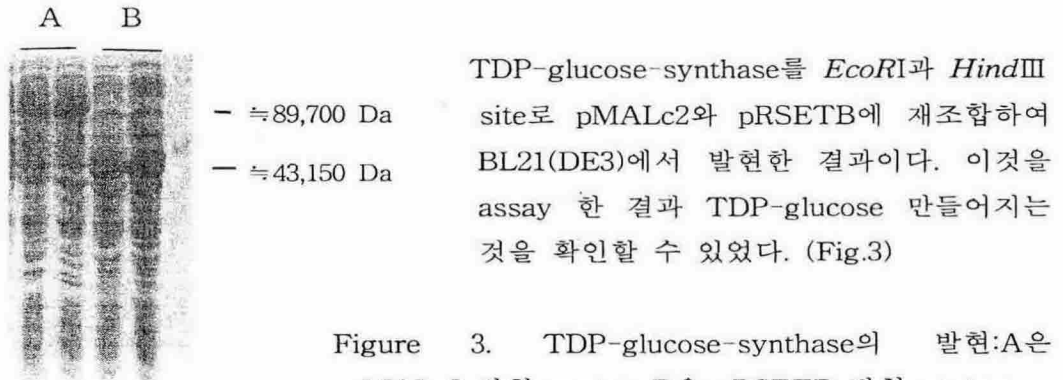


Figure 3. TDP-glucose-synthase의 발현:A은 pMALc2 발현 vector, B은 pRSETB 발현 vector

요 약

UK-58,852의 생합성에 관여하는 유전자를 분리하기 위해 *Actinomadura roseorufa*의 genomic DNA와 *E. coli-Streptomyces* shuttle cosmid vector인 pOJ446이 genomic library를 만들었다. Genomic library는 dehydratase PCR product와 *eryA* 유전자를 probe로 하여 sugar 생합성 유전자와 polyketide type I 유전자가 집단으로 존재하는 cosmid pHD54를 분리하였고, 이를 제한 효소인 *BamHI*, *SmaI*와 Sonicater를 이용해서 subcloning 하였다. 이들의 염기서열을 부분 분석한 결과, polyketide 생합성에 관여하는 ketoacyl synthase, methylmalonyl acyltransferase, ketoreductase, enolreductase 그리고 PKS loading domain 등 polyketide synthase type I 임을 보여주고 있고, BLAST 분석된 결과를 보면 polyketide synthase 유전자는 rifamycin<sup>11-12</sup> 생합성 유전자와 유사성이 높다. 그리고 sugar 생합성에 관여하는 유전자로는 oxidoreductase, dTDP-D-glucose 4,6 dehydratase, dTDP-D-glucose synthase 그리고 dTDP-4-keto-6-deoxy-D-glycose 3,5-epimerase으로 구성된 gene cluster를 확인하였다. 그리고 염기서열 분석된 유전자중 dTDP-D-glucose synthase를 발현하여 유전자의 기능을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Collie, N. (1893) *J. Chem. Soc.* 1893, 122-26
2. O'Hagen, D. (1991) in *The Polyketide Metabolites*, New York, Ellis Hopwood. Paradkar, A. S. and Jonsen, S. E. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 1307
3. Hopwood, D. A., and Sherman, D. H. (1990) *Annu. Rev. Gener.* 24, 37-66

4. Katz, L., and Donadio, S. (1993) *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 875-912
5. Sohng, J. K., Kim, C. G., Polyketide 계열 이차대사물질의 생합성 및 응용 (1997) *Biochem. News* 17(4), 181-190
6. Dirlam JP. Bordner J. Chang SP. Grizzuti A. Nelson TH. Tynan EJ. Whipple EB. The isolation and structure of CP-120,509, a new polyether antibiotic related to semduramicin and produced by mutants of *Actinomadura roseorufa*. *J Antibiot (Tokyo)* 45(9):1544-8, 1992 Sep.
7. Funayama S. Nozoe S. Tronquet C. Anraku Y. Komiyama K. Omura S. Isolation and structure of a new polyether antibiotic, octacyclomycin. *J Antibiot (Tokyo)* 45(10):1686-91, 1992 Oct.
8. Ricketts AP. Chappel LR. Frame GM. Glazer EA. Migaki TT. Olson JA. CP-72,588, a semisynthetic analog of the polyether ionophore UK-58,852 with increased anticoccidial potency. *Antimicrob Agents Chemother* 36(10):2080-4, 1992 Oct.
9. Dirlam JP. Cullen WP. Huang LH. Nelson TH. Oscarson JR. Presseau-Linabury L. Tynan EJ. Whipple EB. CP-91,243 and CP-91,244, novel diglycoside polyether antibiotics related to UK-58,852 and produced by mutants of *Actinomadura roseorufa*. *J Antibiot (Tokyo)* 44(11):1262-6, 1991 Nov.
10. Tynan EJ 3d. Nelson TH. Davies RA. Wernan WC. The production of semduramicin by direct fermentation. *J Antibiot (Tokyo)* 45(5):813-5, 1992 May
11. August PR. Tang L. Yoon YJ. Nung S. Muller R. Yu TW. Taylor M. Hoffmann D. Kim CG. Zhang X. Hutchinson CR. Floss HG. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amiclatopsis mediterranei* S699. *Chemistry & Biology*. 5(2):69-79, 1998 Feb.
12. Kim CG. Yu TW. Fryhle CB. Handa S. Floss HG. 3-Amino-5-hydroxybenzoic acid synthase, the terminal enzyme in the formation of the precursor of mC7N units in rifamycin and related antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*. 273(11):6030-40, 1998 Mar.