

[SIII-2]

Physiological and Genetic Factors Controlling *Streptomyces* Regulatory Gene Expression Involved in Antibiotic Biosynthesis

김 응 수

인하대학교 화공생명공학부

Abstract

While the biosynthetic gene cluster encoding the pigmented antibiotic actinorhodin is present in the two closely related bacterial species, *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor*, it normally is expressed only in *S. coelicolor*---generating the deep blue colonies responsible for the *S. coelicolor* name. However, multiple copies of the *afsR2* gene, which activates actinorhodin synthesis, result in the ability of *S. lividans* to also synthesize large amounts of actinorhodin. Here we report that the phenotypic property that historically distinguishes these two *Streptomyces* species is determined conditionally by the carbon source used for culture. Whereas growth on glucose repressed actinorhodin production in *S. lividans*, culture on solid media containing glycerol as the sole carbon source dramatically increased the expression of *afsR2* mRNA---leading to extensive actinorhodin synthesis by *S. lividans* and obliterating its phenotypic distinction from *S. coelicolor*. *afsR2* transcription under these conditions was developmentally regulated, rising sharply at the time of aerial mycelium formation and coinciding temporally with the onset of actinorhodin production. Our results, which identify media-dependent parallel pathways that regulate actinorhodin synthesis in *S. lividans*, demonstrate carbon source control of actinorhodin production through the regulation of *afsR2* mRNA synthesis. The nucleotide sequences of *afsR2* revealed two putative important domains; the domain containing direct repeats in the middle and the domain homologous to sigma factor sequence in the C-terminal end. In this work, we constructed various sized *afsR2*-derivatives and compared the actinorhodin stimulating effects in *S. lividans* TK21. The experimental data indicate that the domain homologous to sigma factor sequence in the C-terminal end of *afsR2* plays a critical role as an antibiotic stimulating function. In addition, we also observed that the single copy integration of *afsR2* regulatory gene into *S. lividans* TK21 chromosome significantly activates antibiotic overproduction.

Introduction

방선균 *S. coelicolor* 는 현재까지 유전학적으로 가장 연구가 많이 된 대표적인 방선균으로서, 구조적으로 다른 4 가지 항생제 actinorhodin, undecylprodigiosin, methylenomycin, calcium-dependent antibiotic (CDA)을 생합성 한다. 이들 생합성 유전자는 플라스미드 유래 methylenomycin

을 제외하고는 모두 염색체 상에 운집 되어있다. 특히 actinorhodin 은 이중에서도 분자유전학 및 생화학적으로 가장 많이 연구된 대표적인 polyketide 계 화합물이며, 생합성에 관련된 모든 유전자가 염색체 상에 운집되어 있다고 밝혀진 최초의 항생제이기도 하다(Malpartida 와 Hopwood, 1984; Malpartida 등, 1990). 대부분의 항생제 생합성에 관여하는 조절 유전자는 *S. coelicolor* 와 이와 유전학적으로 매우 유사한 *S. lividans* 에서 분리, 동정되었다. 이들을 조절 기능에 따라 분류하면, 1) 특정 항생제의 생합성만을 조절하는 경로 특이적 (pathway-specific) 조절 유전자, 2) 구조적으로 다른 2 가지 이상의 항생제 생합성을 조절하는 global 조절 유전자 (조절을 받는 항생제의 수에 따라 class I, II, III 로 더 세분화 됨), 그리고 3) 항생제 생합성과 형태적 분화에 모두 관여하는 pleiotrophic 조절 유전자로 구분할 수 있다. 경로 특이적 조절 유전자는 일반적으로 항생제 생합성에 관여하는 모든 생합성 유전자군(gene cluster)을 분리, 동정함으로써 밝혀졌는데, actinorhodin 과 undecylprodigiosin 의 경우 각각 *actII-orf4* 와 *redD* 라는 경로 특이적 조절 유전자가 생합성 유전자군 안에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (Chater, 1992).

Carbon Source-Dependent Actinorhodin Biosynthesis in *S. lividans*

S. lividans 는 일반적인 방선균용 고체배지 YEME (Yeast-Extract-Malt-Extract)에서는 대표적인 typeII 폴리케타이드 항생제 actinorhodin 의 생합성이 원활히 일어나지 않는다 (Hopwood et al. 1985). 하지만 이런 야생형 *S. lividans* 에 *afsR2* 와 같은 조절유전자를 사본 수가 높은 플라스미드에 클로닝하여 형질전환 시키면 actinorhodin 생합성이 촉진된다고 보고되었다 (Voglti et al., 1994). 따라서 *S. lividans* 가 actinorhodin 를 생합성하지 못하는 이유는 염색체에 single-copy 로 존재하는 *afsR2* 의 발현이 일반적인 배양조건 (즉 YEME 배지) 하에서는 억제되기 때문으로 추정되며, 따라서 다양한 생리적 상태에서 *S. lividans* 를 배양하면 *afsR2* 조절 유전자가 특정 생리적 상태에서만 발현되는 배양조건을 찾을 수 있으리라 예측되었다 (즉 야생형 *S. lividans* TK21 만이 actinorhodin 항생제를 합성하는 배양조건).

따라서 항생제 생합성 조절 기능에 차이를 보일 것으로 예상되는 두 종류의 *S. lividans* 균주; *S. lividans* TK21 (야생형 *S. lividans*)와 *S. lividans* SL94 (*afsR2* 가 염색체 상에서 제거된 *S. lividans* 돌연변이주)를 여러 다양한 생리적 상태, 즉 growth-arrest, heat or cold-shock, 여러 다양한 carbon, nitrogen, phosphate source 등에서 배양하여 이들 두 균주의 성장 특성과 actinorhodin 항생제 생산성 등을 비교 분석하였다. *S. lividans* 의 경우, heat-shock, cold-shock 과 같은 배양온도 변화 (20-50) 및 배지의 pH (pH5-pH10) 변화에 따른 actinorhodin 생합성 차이는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 탄소원과 질소원에 따른 영향은 현격한 차이를 보였는데, 최소영양배지 (Hopwood et al., 1985)에 유일한 탄소원으로 glycerol 과 N-asparagine 을 첨가한 경우에만 야생형 *S. lividans* TK21 에 의한 actinorhodin 생합성이 관찰되었다. 그러나 *afsR2* 가 염색체 상에서 제거된 *S. lividans* SL94 돌연변이주에서는 같은 배양조건 하에서도 actinorhodin 생합성이 관찰되지 않았다. 본 연구에서 사용된 actinorhodin 은 염기조건 하에서 푸른색을 띠고 있기 때문에 암모니아 fuming 을 통해 고체배지에서 쉽게 그 생합성 여부를 정성적으로 확인할 수 있었다. 또한 glycerol 의 농도를 변화시키면서 실험을 수행한 결과, 일정 농도 (20ml/l glycerol) 이상의 glycerol 탄소원은 오히려 actinorhodin 생산성을 감소시키는 기질저해 현상이 관찰되었고, 5-10

ml/l glycerol 배양조건하에서 actinorhodin 의 생합성이 최적임을 알 수 있었다. 하지만, 일반적인 방선균용 고체배지에 사용되는 glucose 탄소원 경우에는 *S. lividans* 유래 actinorhodin 생합성이 전혀 유도되지 않았고, glucose 와 glycerol 이 함께 함유된 배양조건 하에서도 *S. lividans* 에 의한 actinorhodin 생합성은 유도되지 않았다.

Glucose 탄소원에 의한 actinorhodin 생산성 억제 원인을 규명하기 위하여, 우선 *S. lividans* TK21 과 SL94 를 1% glucose 가 함유된 배지에 다양한 농도 (2.5-40 ml/l)의 glycerol 를 첨가하여 배양한 후 actinorhodin 의 생합성을 비교하였다. Glycerol 과 glucose 가 함께 함유된 배지에서는 대부분의 경우 actinorhodin 의 생합성이 관찰되지 않았으나, 40 ml/l glycerol 이 함유된 경우에는 actinorhodin 의 생합성이 어느 정도 유도됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 actinorhodin 생합성 조절 유전자 *afsR2* 의 발현이 glucose 와 glycerol 의 농도 변화에 따라 조절될 수 있음을 제시하고 있다.

***afsR2* Copy Number Effect on Glucose Repression**

Glucose 탄소원에 의한 *afsR2* 조절유전자의 발현 억제를 극복하기 위한 방법으로, *afsR2* 유전자가 방선균용 high-copy 플라스미드 pIJ487 에 클로닝된 pMOV532 (Voglti et al., 1994)로 야생형 *S. lividans* 를 형질전환 시킨 후, glucose 농도에 따른 actinorhodin 생산성을 비교하였다. 본 실험에서 대조군으로 사용한 벡터 pMOV536 은 *afsR2* 유전자의 promoter 와 N-terminal 부분이 제거된 플라스미드로서 조절유전자로서의 기능이 전혀 발현되지 않는 것으로 보고되어 있다 (Voglti et al., 1994). 비록 pMOV532 를 포함한 *S. lividans* 형질전환체와 야생형 *S. lividans* 에 의한 actinorhodin 절대량의 비교는 불가능하지만 (형질전환체와 야생형의 성장 차이로 인하여), pMOV532 를 포함하는 *S. lividans* 형질전환체에서는 야생형 *S. lividans* 에 비해 훨씬 낮은 glucose 기질저해 현상이 관찰되었다. 그러나 glycerol 과 glucose 가 함께 함유된 대부분의 경우 actinorhodin 생합성이 유도됨을 알 수 있었다. 따라서 *S. lividans* 유래 actinorhodin 생합성은 적정한 농도 (2.5-10 ml/l)의 glycerol 을 유일한 탄소원으로 사용할 때만 유도될 수 있으며, 일반적인 배양조건 하에서는 glucose 와 같은 기질저해 기작을 통하여 *S. lividans* 염색체에 존재하는 *afsR2* 유전자의 발현을 억제시켜 actinorhodin 생합성을 조절하리라 사료된다. 또한 *S. lividans* 세포 내에서 *afsR2* 조절유전자의 사본 수 증가를 통하여 이와 같은 기질 저해로 인한 actinorhodin 의 생산성 저해현상을 극복할 수 있는 가능성도 제시하였다.

Cell Cycle-, Glycerol-, and *afsR*-Dependent *afsR2* Expression

앞서 관찰된 결과에 의하면, *S. lividans* 는 특정 생리적 상태에서만 염색체 상에 존재하는 *afsR2* 기능을 발휘함으로써 actinorhodin 생합성을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 이와 같은 현상을 유발하는 *afsR2* 조절기작을 분자수준에서 규명하기 위하여, 우선 야생형 *S. lividans* TK21, *afsR2*-deleted *S. lividans* SL94, *afsR*-deleted *S. lividans* SL41 (Voglti et al., 1994)를 탄소원이 다른 두 종류의 고체배지 (0.5% glucose 포함 최소영양배지와 0.25% glycerol 포함 최소영양배지)에 confluent streaking 을 이용하여 각각 3 개씩 접종하였다. 30 에서 일정 시간 배양 후, 특징적인

분화시기 (day 2; substrate mycelia, day 4; aerial mycelia, day 7; spore)에 해당하는 세균으로부터 각각 전체 RNA 를 분리하였다. 고체배지에서 배양된 방선균 유래 전체 RNA 분리 방법은 Kirby 혼합액과 유리구슬을 이용한 전형적인 방선균 RNA 분리방법에 따라 수행되었으며 (Hopwood et al., 1985), 이렇게 하여 얻어진 균별, 분화 시기별로 수확된 전체 RNA 와 pMOV532 에 클로닝된 *afsR2* 유전자를 탐침으로 사용하여 Northern-hybridization 을 수행하였다 (Hopwood et al., 1985).

Northern-hybridization 실험결과, *afsR2* 전사체는 glycerol 최소영양배지에서 성장한 야생형 *S. lividans* TK21 에서만 관찰되었으며, *S. lividans* SL94 와 *S. lividans* SL41 에서는 *afsR2* 의 발현을 확인할 수 없었다. 또한 야생형 *S. lividans* 의 경우에도, 형태 분화적 시기에 따라 *afsR2* 의 발현 양이 조절되는 즉, actinorhodin 생합성이 시작되는 aerial mycelia 상태에서 *afsR2* 전사량이 최고가 됨이 관찰되었다. 특히 완전한 *afsR2* 유전자는 갖고 있으나 바로 인접해 있는 다른 조절유전자 *afsR* 이 제거된 *S. lividans* SL41 의 경우에도, 전혀 *afsR2* 의 전사체가 관찰되지 않았다. 이와 같은 연구결과는 *S. lividans* 유래 actinorhodin 생합성을 위한 *afsR2* 의 발현에는 *afsR* 조절유전자도 중요하게 관여함을 제시하고 있다. 또한 glucose 최소영양배지에서 성장시킨 경우에는, 본 실험에 사용된 세 종류의 *S. lividans* 모두에서 *afsR2* 전사체가 확인되지 않았고 또한 actinorhodin 생합성도 관찰되지 않았다. 따라서 *S. lividans* 가 일반적인 배양조건에서 actinorhodin 을 생성하지 못하는 이유는 *afsR2* 조절 유전자가 glucose 와 같은 탄소원에 의해 catabolite repression 을 받기 때문임이 본 실험을 통해 증명되었다. 또한 *S. lividans* 유래 *afsR2* 는 actinorhodin 생합성에 있어서 꼭 필요한 조절유전자이며, 이런 *afsR2*-dependent actinorhodin 생합성 조절기작은 배양조건 (glycerol 최소영양배지), 분화시기 (aerial mycelia), 그리고 인접한 조절유전자 (*afsR*)가 모두 만족될 때만 *afsR2* 조절유전자의 전사를 촉진시킴으로써 actinorhodin 생합성을 조절하리라 추정된다.

Functional Domain Characterization of *afsR2*

afsR2 유전자의 염기서열 상에는 'Thr-Xaa2-Asp-Asn-His-Met-Pro-Xaa2-Pro-Ala'의 아미노산 구조가 3 번이나 반복이 되는 direct repeats domain 과 core binding, promoter recognition 과 DNA melting 에 관여 한다고 알려진 sigma factor sequence 와 유사한 domain 이 있음이 보고 되었고, 이 두 가지 domain 은 *afsR2* 유전자의 중요한 역할을 담당할 것이라고 추정되어져 왔다. *afsR2* 유전자의 항생제 overproduction 에 관한 특성을 알아보기 위하여, *afsR2* 유전자가 high copy number plasmid 인 pIJ487 에 cloning 되어 있는 pMOV532 와 그 기능이 결핍된 pMOV536 을 *S. lividans* TK21 에 도입하였다. 그 결과 *S. coelicolor* M145 에 비해 항생제 생산성이 현저히 떨어졌던 *S. lividans* TK21 의 항생제 생산능력이 pMOV532 를 도입하였을 때 크게 향상됨을 확인하였다 따라서 *afsR2* gene sequence 에 존재하는 direct repeats domain 과 sigma factor domain 이 얼마나 중요한 역할을 하는지 알아보기 위하여 *afsR2* 유전자의 크기를 순차적으로 줄여 나감으로써 항생제 생산량의 변화를 관찰하였다. 실험결과 탄소원으로 0.5% glucose 를 넣은 Minimal Media 에서는 *afsR2* 유전자는 크기에 상관없이 actinorhodin 의 blue pigment 를 발견할 수 없었으며, 이는 이전에 보고 되어진 glucose 의 repression 에 의한 효과로 보여 진다. 이와는 반대로 탄소원으로 0.25%, 0.5% glycerol 을 넣은 minimal Media 에서는 blue pigments 를 확인할 수 있었으며, 특히

pCY103 과 pCY104 에서 blue pigments 의 생산량의 차이를 확실히 구분할 수 있었다. 이는 direct repeats domain 보다 pCY104 에 포함되어 있는 sigma factor domain 이 더욱 중요한 인자임을 제시한다. 또한 pCY105 와 pCY106 의 blue pigments 가 pCY104 와 거의 차이가 나지 않음을 볼 때, *afsR2* 유전자의 stop codon 이후의 sequence 는 제거되더라도 actinorhodin 의 생산에는 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있다. 또한 *afsR2* 유전자를 *S. lividans* TK21 chromosome 에 도입하였을 때, *afsR2* 유전자를 plasmid 상태로 도입한 것보다 더 많은 blue pigments 가 생산되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 chromosome 에 조절유전자의 직접적인 도입이 항생제 생산성 극대화의 효과적인 방법임을 제시하고 있다.

References

1. Chater, K.F. (1992) Genetic regulation of secondary metabolic pathways in *Streptomyces*, in: Secondary metabolites: their function and evolution (Chadwick, D.J., Whelan, J., Eds.). pp.144-162. Chichester, U.K.: Wiley. Ciba Foundation Symposium 171.
2. Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrempf, H. (1985) Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich, UK: John Innes Foundation.
3. Malpartida, F., Hopwood, D.A. (1984) Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* **309**: 462-464.
4. Malpartida, F., Niemi, J., Navarrete, R., Hopwood, D.A. (1990) Cloning and expression in a heterologous host of the complete set of genes for biosynthesis of the *Streptomyces coelicolor* antibiotic undecylprodigiosin. *Gene* **93**: 91-99.
5. Vogtli, M., Chang, P.-C., and Cohen, S.N. (1994) a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Mol. Microbiol.* **14**: 643-653.