

*Streptomyces*의 제2차 균사체 형성 유발물질

김 재 현

단국대 이공대 미생물학과

I. 서 론

*Streptomyces*는 그람 양성 의 원핵생물체로 생장 과정에서 포자, 균사체의 뚜렷한 분화과정을 나타낸다(Fig. 1). 한천배지의 표면에 접종된 포자는 발아되어 제 1차 균사체(Substrate mycelium, SM)를 이루게 된다. SM는 일정하게 분지되어 있는 균사체들이 서로 얽혀져 있는 상태로, 배지의 표면 또는 내부로 파고들어 성장하며 vegetative growth 단계에 해당된다. 접종 후 2일째까지 관찰 되는 콜로니는 SM으로만 이루어져 있는 매우 단단하고 배지에 흡착되어 있으며, 광택을 지

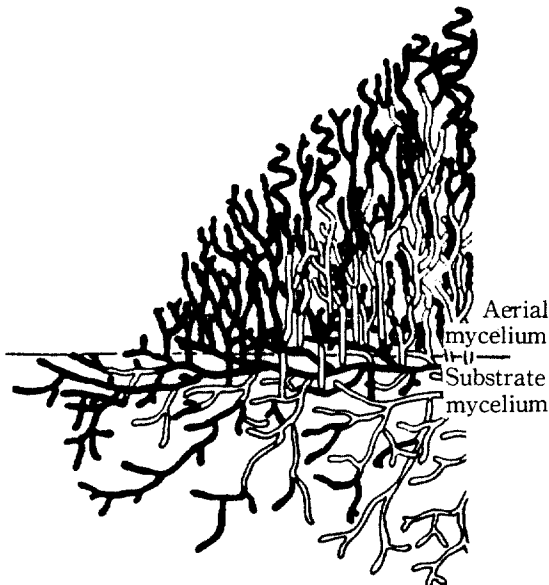


Fig.1. Idealized diagram of a vertical section through the center of a sporulating colony of *Streptomyces coelicolor*. Black represents intact cells and white represents disintegrating or lysing cells(Wildermuth 1970).

닌다. 이후에 콜로니의 생장이 계속되며 동시에 최상부에 위치하는 SM으로 부터 거의 직각으로 공중을 향하여 새로운 형태의 균사가 분지되어 나타난다. 이들을 제 2차 균사체(Aerial mycelium, AM)라 한다. AM이 나타난 콜로니는 광택이 없어지고 부드러운 흰색깔을 띠게 된다. AM의 표면은 소수성의 섬유성 외막층으로 둘러싸여 있는데, 이 성질은 배지와 직접적인 접촉 없이 공중에 노출되어 있는 AM이 건조되지 않는 데 기여하는 것으로 생각된다. AM이 성숙되면 포자형성을 위한 격막이 약 30개 정도 동시에 형성되고 각각의 격막 구간이 포자로 전환되며, 결국 포자 사슬의 형태를 이루게 된다. 즉 AM은 reproductive growth 단계에 해당된다. 포자 사슬의 형태는 species에 따라 특이하며, 대개 곧은 형태(Rectus), 굽은 형태(Flexibilis), 갈퀴리 형태(Retinaculum-Apertum) 및 나선 형태(Spira)의 4가지가 있다. 포자 사슬은 또한 독특한 색소를 지니며 성숙한 콜로니의 표면 색깔을 결정한다. AM의 색과 형태는 *Streptomyces*의 분류에 중요한 기준으로 이용된다.

위에서 약술된 바와 같이 SM으로 부터 AM의 생성은 포자형성을 위한 전제조건으로 vegetative growth와 reproductive growth의 분기점을 이루고 있으며 많은 연구들이 이 변화 과정을 유도하는 조절물질(Autoregulator)을 밝히고자 시도하였다(Kalakoutskii와 Agre 1976, Ensign 1978, Chater 1984, Dworkin 1985).

II. 조절물질

세포에 의해 분비되는 어떤 물질이 분화 과정을 유발시켜주는 사실은 이미 수 차례에 걸쳐 관찰된

바 있다. Dondero와 Scotti(1957)에 의하면 AM 능력이 퇴화된 균주들이 다른 균주들과 같은 배지에 동시 배양되면 AM을 형성함을 알 수 있었다. 이런 종류의 물질은 곰팡이들로 부터도 얻어질 수 있는 바, *Cladosporium cladosporioides* 및 *Drechslera erythrospila*의 배양액에 *S. flavochromogenes*의 AM 형성을 유도시키는 물질이 존재한다(Küster와 Attaby 1982).

Streptomycin 생성균인 *S. griseus*는 분화를 촉진시키는 2가지 물질을 분비하는 것으로 알려져 있는데, 이들은 배양액으로 부터 추출되어 각각 Factor A 및 Factor C로 명명 되었다.

1. Factor C

Streptomycin을 생산하지 못하나 배양액에서 포자를 형성하는 균주(52-1)에서 분비되는 물질로 Streptomycin을 생산하나 포자형성 능력이 없는 균주(45)의 포자형성을 유발시키는 물질이다(Szabo 등 1967).

Factor C는 단백질로 소수성 아미노산의 함량이 60%이상 되는 분자량 34,500인 물질로 mRNA 합성을 촉진하며 포자형성을 transcription 수준에서 조절하는 물질로 생각되고 있다(Biró 등 1980). 최근에 *S. coelicolor*의 RNA polymerase의 Sigma factor는 σ^{36} 와 σ^{49} 의 2종류가 있음이 밝혀졌는데(Westphelling 등 1985), σ^{49} 를 가지는 holoenzyme은 *Bacillus subtilis*의 $E\sigma^{37}$ 과 promotor 인식 능력이 비슷한 것으로 나타났다. 이는 *Streptomyces*의 분화 과정에서도 transcription 수준에서의 조절기작이 존재할 수 있음을 강력히 시사해 주는 것으로 위의 Factor C와 연관되는 결과로 생각된다. 그러나 AM 형성에 Factor C가 직접적으로 영향을 미치는 사실은 현재까지 알려진 바 없다.

2. Factor A

Streptomycin 생성능이 있고 AM을 형성하는 균주(Str⁺ Amy⁺)의 배양액으로 부터 추출된 물질로 항생제 및 포자형성능이 없는 돌연변이주(Str⁻ Amy⁻)의 Streptomycin, Leukaemomycin 등의 항생물질과 AM 형성을 동시에 유발시키는 효과를 가진다(Khokhlov 등 1973, Gräfe 등 1984). 이 물질은 분자량 242의 γ -lactone 구조를 가지는 2S-Isocapryloyl-3S

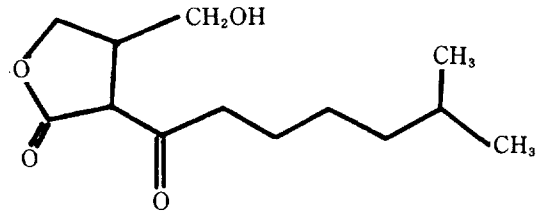


Fig.2. Molecular structure of factor A.

-hydroxymethyl- γ -butyrolactone 이고(Fig. 2), 2~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로도 그 활성을 충분히 나타낼 수 있다(Gräfe와 Ertt 1983). *S. griseus*의 Str⁺ Amy⁺ 균주와 Str⁻ Amy⁻ 균주의 탄소화물 대사에서 볼 수 있는 뚜렷한 차이는 Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH)와 NAD(P)-glycohydrolase(NADPase) 활성도이다. 즉 Amy⁺ 균주의 G6PDH 활성도는 매우 낮고, NADPase 활성도는 높다. Amy⁻ 균주의 효소 활성은 역으로 나타났다. NADPase의 반응물질인 Phospho-adenosinediphospho-ribose(P-ADP-rib)는 G6PDH의 억제자로 생각되며, Factor A의 작용으로 정상을 회복하는 사실로 미루어 이 효소들의 작용이 형태 분화와 밀접히 연관되어 있음을 알 수 있었다(Gräfe 등 1981, Khokhlov 1982). Factor A는 *S. coelicolor*에서도 발견되어 afs A 및 afs B 유전자의 위치가 결정되었다(Hara 등 1983). 이 중 afs B는 pIJ 141를 사용하여 클로닝 되었다. 또한 *S. bikiniensis*로 부터도 Factor A 유전자가 pIJ 385를 이용하여 클로닝 되었다(Horinouchi 등 1985).

3. Pamamycin

Puromycin 생성 균주인 *S. alboniger*의 AM 형성을 촉진시키는 물질을 균사체로 부터 추출 분석한 결과, 새로운 항생물질인 Pamamycin이 밝혀졌다. 그의 분자량은 621로 ($\text{C}_{36}\text{H}_{63}\text{NO}_7$)의 원소 구성을 가진다(McCann과 Pogell 1979).

III. SM과 AM 성분의 차이점

Streptomyces 콜로니를 이루는 2가지 종류의 균사체는 외견상 미소한 차이를 나타내고 있다. AM의 균사가 약간 더 두꺼우며 분지되는 빈도가 낮다. 그러나 이러한 점들로는 그 특징을 설명하기

Table 1. Contents of monosaccharides in aerial-and substrate mycelium($\mu\text{g}/\text{mg}$ dried mycelium) (Neumeier 1984).

		Glycerin	Arabinose	Mannose	Glucose	Galactose
<i>S. chrestomyceticus</i>	aerial	7.1	0.0	7.1	15.1	0.0
	substrate	6.7	0.0	6.7	4.4	10.4
<i>Streptomyces</i> sp.	aerial	9.2	0.0	9.2	29.1	0.0
	substrate	9.3	0.0	9.3	6.7	35.4
<i>S. coerulatus</i>	aerial	5.5	5.7	5.5	29.3	0.0
	substrate	6.5	13.9	6.5	13.8	19.3
<i>S. rimosus</i> 2955	aerial	5.1	0.0	7.2	2.5	0.0
	substrate	1.6	0.0	5.1	1.2	1.5
<i>S. rimosus</i> 2963	aerial	2.8	1.1	1.9	1.4	0.0
	substrate	2.6	6.3	7.0	10.0	17.3
<i>S. streptomycini</i>	aerial	2.0	1.8	1.7	6.3	0.0
	substrate	2.2	5.8	8.0	1.2	19.7
<i>S. flavochromogenes</i>	aerial	2.8	0.0	9.9	3.1	2.8
	substrate	3.3	0.0	6.4	2.0	4.5
<i>S. griseus</i> unversport	aerial	2.5	0.0	24.3	26.7	0.0
	substrate	1.5	0.0	13.3	13.2	5.9
<i>S. griseus</i> versport	aerial	4.1	0.0	34.9	77.5	0.0
	substrate	1.8	0.0	18.0	12.5	6.3
Quotient	aerial substrate				2,9	

에 부족하여, Neumeier(1984)는 선택적으로 채취한 AM 및 SM의 아미노산과 당의 함량을 조사하였다. 이때 사용된 Lab-Lemco-Yeast extract 배지상에서 사용된 균주들은 왕성한 생장을 보이나 포자형성은 지연되어 이루어진다. 따라서 AM만을 용이하게 분리 채취할 수 있었다.

1. 아미노산

아미노산 함량에 있어서 AM이 SM보다 전반적으로 높게 나타났으며, 특히 Serine, aspartic acid 및 glutamic acid의 함량이 각각 1.4배, 1.9배, 2.5배 높은 것을 알 수 있었다. 이 사실은 AM의 peptidoglycan층이 더 두터운 것에 기인하는 것으로 생각된다. De Jong과 McCoy(1966)는 포자의 aspartic acid 함량이 높음을 밝힌 바 있고, *Bacillus subtilis*의 포자에는

glutamic acid 함량이 높은 것이 알려져 있다 (Foester 1972).

2. 당

각 균주의 당 함량을 조사한 결과 볼 수 있는 특성은 첫째 AM의 Glucose 함량이 SM보다 약 3배 높으며, 둘째 Galactose는 SM에만 존재하는 것이다(Table 1). Galactose 존재 여부는 균사체의 종류를 결정하는 요인이 된다. 이들 균주에서 Galactose는 ascorbic acid 생합성의 전구 물질로 작용하는 것으로 생각되며, ascorbic acid 또한 SM에만 존재한다(Table 2).

ascorbic acid는 AM 형성에 서로 상반된 효과를 미치는데, 즉 $0.6 \times 10^{-2} \text{M}$ 의 농도에서는 AM 형성을 억제하지만 10^{-4}M 의 낮은 농도에서는 촉진한다. 억제효과는 이미 알려진 ascorbic acid의

Table 2. Comparison of ascorbic acid contents in submerged mycelium grown with added glucose or galactose ($\mu\text{g/g}$ fresh weight)(Neumeier 1984).

strain	control	Galactose	Glucose
<i>S. chrestomyceticus</i>	12.0	65.7	12.1
<i>S. viridochromogenes</i>	2.5	12.0	2.5
<i>S. coerulatus</i>	2.5	23.0	2.5
<i>Streptomyces</i> sp.	2.5	18.0	2.5
<i>S. roseochromogenus</i>	2.5	28.0	2.5
<i>S. rimosus</i> 2963	0.0	6.0	0.0
<i>S. streptomycini</i>	0.0	0.0	0.0
<i>S. luteolutescens</i>	1.7	9.5	0.0

생장억제와 일치한다(Fletcher 등 1983). 이때 ascorbic acid의 대사 산물인 glyoxal 화합물에 의하여 이 억제효과가 나타나는 것으로 생각된다(Kang 등 1982). 여기서 발견된 흥미있는 사실은 위에서 논의된 Factor A와 ascorbic acid가 모두 γ -lactone 구조를 가지며, 이들이 AM 형성을 촉진하는 농도 범위가 거의 같다는 점이다. 이 두 물질은 균사체 내에서 서로 밀접하게 관련되어 있음을 알 수 있다. Factor A는 모든 *Streptomyces*에 존재하는 것이 아니라 약 26.3%의

균주들에서만 발견되었다(Eritt 등 1984). 따라서 ascorbic acid가 AM 형성을 조절하는 중심적 위치에 있을 가능성이 높으며, Factor A는 Fig. 3과 같은 생합성 경로를 통해 ascorbic acid로부터 생성되리라 생각된다. 여기에서 지방산 물질대사도 관련됨을 추측할 수 있다. Gräfe 등(1982)에 의하면 *S. hygrosopicus*의 Amy⁻ 균주는 Amy⁺ 균주에 비해 12-Methyltetradecanoic acid : 14-Methylpentadecanoic acid의 비율이 감소되어 있음을 알았으나, 분화와의 직접적 관련은 현재까지 조사되지 않고 있다.

REFERENCES

1. Biró, S., Békési, I., Vitális, S. and Szabo, G. (1980). A substance effecting differentiation in *Streptomyces griseus*. Purification and properties. *Eur. J. Biochem.*, **103**, 359-363.
2. Chater, K.F. (1984). Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. In Losick, R. and Shapiro, L. ed. *Microbial development*. 89-115. Cold Spring Harbor monograph series.
3. De Jong, P.I. and McCoy, E. (1966). Qualitative analysis of the spore walls and vegetative cell walls of some representa-

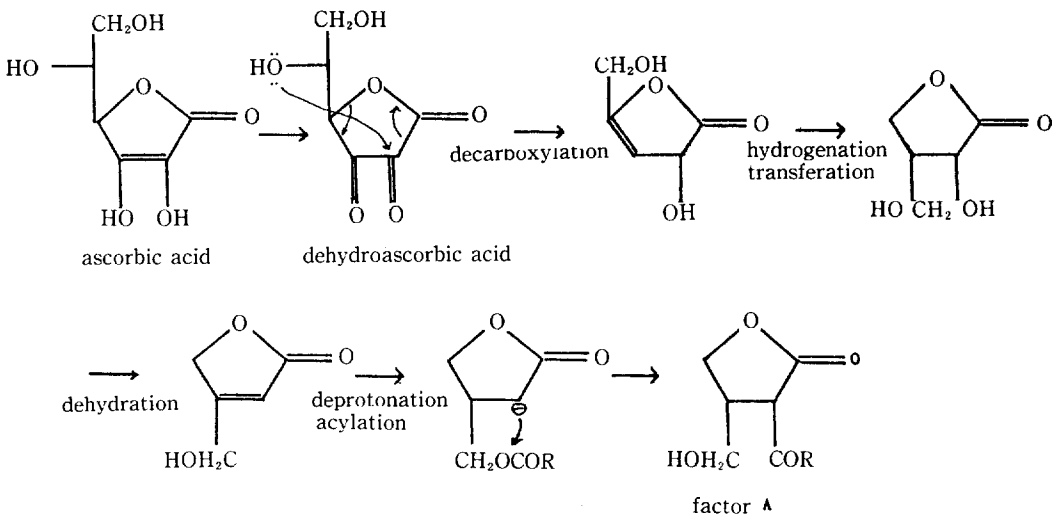


Fig.3. A hypothetical biosynthesis of factor A from ascorbic acid.

- tive species of *Streptomyces*. *Can. J. Microbiol.*, **12**, 985-994.
4. Dondero, N.C. and Scotti, T. (1957). Excretion by *Streptomyces* of factors causing formation of aerial hyphae by old cultures. *J. Bacteriol.*, **73**, 584-585.
 5. Dworkin, M. (1985). *Streptomyces*. In Developmental biology of the bacteria. 85-104.
 6. Ensign, J.C. (1978). Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**, 185-219.
 7. Eritt, I., Gräfe, U. and Fleck, W.F. (1984). Inducers of both cytodifferentiation and anthracycline biosynthesis of *Streptomyces griseus* and occurrence in actinomycetes and other microorganisms. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **24**, 3-12.
 8. Fletcher, R.D., Albers, A.C., Chem, A.K. and Albertson, J.N. Jr. (1983). Ascorbic acid inhibition of *Campylobacter jejuni* growth. *Appl. Environ. Microbiol.*, **5**, 792-795.
 9. Foester, H.F. (1972). Spore pool glutamic acid as a metabolite in germination. *J. Bacteriol.*, **111**, 437-442.
 10. Gräfe, U., Roth, M., Christner, A. and Bormann, E.J. (1981). Biochemical characteristics of non-streptomycin-producing mutants of *Streptomyces griseus*. I. Role of NAD(P)-glycohydrolase in cell differentiation. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **21**, 635-642.
 11. Gräfe, U., Reinhardt, G., Krebs, D., Roth, M. and Noack, D. (1982). Altered lipid composition in a non-differentiating derivative of *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Gen. Microbiol.*, **128**, 2693-2698.
 12. Gräfe, U. and Eritt, I. (1983). On biological inactivity of 4,5-Dihydroxy-n-decanoic acid-4-lactones. *J. Antibiotics*, **36**, 1592-1593.
 13. Gräfe, U., Eritt, I., Reinhardt, G., Krebs, D. and Fleck, W.F. (1984). Modification by genetic changes of the pleiotropic interference of butyrolactone-type autogulators with differentiation of *Streptomyces griseus*. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **24**, 515-523.
 14. Hara, O., Horinouchi, S., Uozumi, T. and Beppu, T. (1983). Genetic analysis of A-factor synthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces griseus*. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2939-2944.
 15. Horinouchi, S., Nishiyama, M., Suzuki, H., Kumada, Y. and Beppu, T. (1985). The cloned *Streptomyces bikiniensis* A-factor determinant. *J. Antibiotics*, **38**, 636-641.
 16. Kalakoutskii, L.V. and Agre, N.S. (1976). Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.*, **40**, 469-524.
 17. Kang, S.O., Sapper, H. and Lohmann (1982). The oxidative degradation of L-ascorbic acid via an α -ketoaldehyde. *Z. Naturforsch.*, 1064-1069.
 18. Khokhlov, A.S., Anisova, L.N., Tovarova, I.I., Kleiner, E.N., Kovalenco, I.V., Krasilnikova, O.I., Kornitskaya, E. Ya. and Pliner, S.A. (1973). Effect of A-factor on the growth of asporogenous mutants of *Streptomyces griseus*. *Z. Allg. Mikrobiol.*, **13**, 647-655.
 19. Khokhlov, A.S. (1982). Problems of studies of specific cell autogulators (On the example of substances produced by some actinomycetes). In Ananchenko, S.N. ed. *Frontiers of bioorganic chemistry and molecular biology*, 201-210.
 20. Küster, E. and Attaby, H.S.H. (1982). Formation of fertile aerial mycelium within asporogenous streptomycetes as induced by fungal metabolites. *Z. Allg. Mikrobiol.*, 107-117.
 21. McCann, P.A. and Pogell, B.M. (1979). Pamamycin, A new antibiotic and stimulator of aerial mycelia formation. *J. Antibiotics*, **32**, 673-678.
 22. Neumeier, W. (1984). Biochemische Unterschiede zwischen dem Luft- und Substratmyzel bei einigen Streptomyceten.