

*Streptomyces virginiae*가 생산하는 Virginiae Butanolide C (VB-C) 결합단백질의 결합활성에 미치는 일반적 특성

김 현 수*

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Characterization of the Binding Activity of Virginiae Butanolide C Binding Protein in *Streptomyces virginiae*

Kim, Hyun-Soo

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Abstract — Virginiae butanolide (VB) is an autoregulator which triggers virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. VB-C binding protein activity was investigated under various additives. The VB-C binding protein was almost fully observed in soluble fraction (>90%) and the binding activity was optimum at pH 7.0. The VB-C binding activity was increased about 15% in 0.5 M KCl, whereas decreased about 60% in 20 mM Mo^{6+} . Chelating reagents (ethylenediamine tetraacetic acid, ethyleneglycol bis(2-aminoethylether) tetraacetic acid, 8-hydroxyquinoline) and SH protecting reagents (mercaptoethanol, dithiothreitol, thioglycerol) inhibited the VB-C binding activity about 30~55% and 3~20%, respectively. Serine protease inhibitor (phenyl methane sulfonyl fluoride), nucleotides (guanosine 5'-monophosphate, adenosine 3',5'-cyclic monophosphate), and phosphatases (alkaline, acid phosphatase) increased the VB-C binding activity about 17%, 6~20%, and 4~13%, respectively.

*Streptomyces*속은 기균사, 포자 형성의 복잡한 형태분화 및 다양한 항생물질, 색소, 효소 등 2차 대사 산물을 생산하는 유용한 미생물이다. 이들 미생물에 있어서 흥미있는 특징 중의 하나는 다면형질 발현성의 autoregulator라고 명명된 세포외성 signal molecule에 의해 극미량인 수 nmole의 농도에서 항생물질 생산 및 기균사 형성이 유도되는 것이 알려져 있으며, 따라서 이들 자기 조절인자들은 미생물성 호르몬으로 간주하고 있다(1).

지금까지 알려진 자기 조절인자로서는(Fig. 1) *S. griseus*로부터 streptomycin 생산과 기균사 형성에 관여하는 A-factor(2, 3), *S. viridochromogenes*로부터 Factor I(4), *S. bikiniensis* 및 *S. cyaneofuscatus*로부터 factors(5), *S. virginiae*로부터 virginiamycin

생산을 촉진(유도)하는 인자로서 virginiae butanolide A, B, C, D, E(VB-A, B, C, D, E)(6, 7) 및 *Streptomyces* sp. FRI-5로부터 청색색소 생산유도인자인 IM-2(8) 등이 알려져 있으며 이들 자기 조절인자 중 VB의 signal 전달기구는 아직 불명이다. 따라서 저자는 이들 다면형질 발현성의 자기조절인자인 VB의 signal 전달기구를 해명하기 위한 일환으로서 *S. virginiae*로부터 virginiamycin 생산을 촉진하는 VB-C를 대상으로 하여 유도활성에 관여하는 VB의 부분구조를 해명하였으며(9), 이들 인자가 미생물성 호르몬이라는 가설에 입각하여 [3H] label하여 합성한 VB-C 유도체([3H] VB-C, Fig. 1)를 이용하여 최초로 고친화력을 가진 VB-C 결합단백질($K_d=1.1$ nM)의 존재를 입증하였으며(10), 분자량 약 36,000의 VB-C 결합단백질을 분리, 정제하였다(11).

본 연구에서는 VB-C의 signal 전달기구 해명의 기초적 연구로서 VB-C 결합 활성이 존재하는 crude 결합단백질(10)에 대해 VB-C의 결합활성에 관여하는

Key words: *Streptomyces virginiae*, virginiae butanolide C (VB-C), VB-C binding protein, bacterial hormone.

*Corresponding author

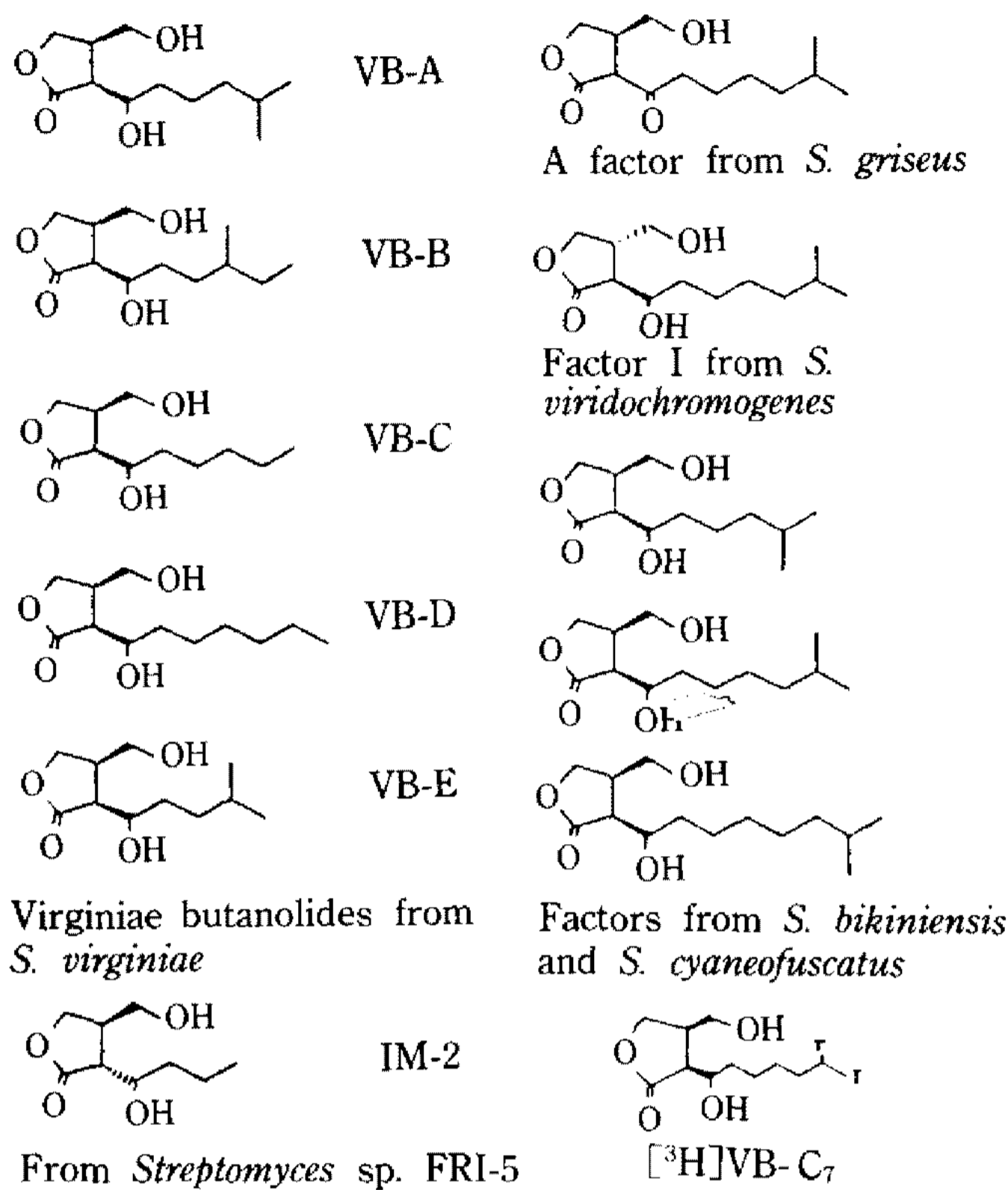


Fig. 1. Structures of signal molecules isolated from *Streptomyces* sp.

일반적 특성을 검토한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

본 실험에 사용한 균주는 Yanagimoto 등(6)의 *Streptomyces virginiae* MAFF 10-06014를 사용하였으며, 생육배지로서는 배지 1l당 bacto-casitone(Difco) 7.5g, yeast extract 7.5g, glycerol 15g, NaCl 2.5g, (pH 6.5)를 사용하였다.

VB-C 결합단백질의 조제

S. virginiae 생육배지 70 ml(500 ml 삼각 flask)에 48시간 배양한 전배양균(-70°C 보존)을 3% 접종하여 28°C, 120 rpm에서 10시간 본 배양한 후, 배양균체를 0.5 M KCl, 5 mM dithiothreitol(DTT), 0.1 mM (*p*-amidinophenyl)methane sulfonyl fluoride hydrochloride(PAMSF)가 함유된 0.05 M triethanol amine (TEA)-HCl(pH 7.0, Buffer A) 적량에 현탁 후, 초음파 파쇄(1분간 2회)하여 원심(13,000×g, 10분)상등액을 30~50%(NH₄)₂SO₄ 침전, 투석 후 조단백질 용액으로 사용하였다.

VB-C 결합활성 측정

Kim 등(11)의 방법에 따라, 100 μl 반응액(각각 3 점)에 cold VB-C₆(1,600배량, 0.125 mM) 첨가 및 미첨가하여 20분간 반응시킨 후, 최종농도 69.6 nM [³H] VB-C₇ (54.6 Ci/mmol)를 첨가, 20분간 반응시킨 뒤, 0.9 ml의 80% 포화(NH₄)₂SO₄ 용액을 가한 침전을 100 μl H₂O에 용해하여 10 ml의 toluene 용액(toluene 500g/l, Triton X-100 500g/l, omnifluor 4g/l)으로 scintillation counting(Beckman LS 7500)하여 첨가 및 미첨가한 cold VB-C₆의 차로서 특이적인 결합단백질의 양을 산출하였다.

가용성 획분의 조제

균체 2g을 buffer A에 현탁, 1분간(2회) sonicator로 파쇄 후 전세포 획분으로 하였으며, 20분간 원심분리(11,750×g)한 상등액을 막단편 함유 가용성 획분(I) 및 그 중 5 ml를 2시간 초원심분리(100,000×g)하여 얻은 상등액을 완전한 가용성 획분(II)으로 사용하였으며, 각 획분 50 μl에 대해 VB-C 결합활성을 측정하였다.

기타 결합활성에 미치는 성분 및 반응액의 조제

0.05 M TEA buffer(pH 7.0) 80 μl에 조단백질용액 20 μl를 첨가하여, 각 반응액에 실험조건에 따라 주어진 첨가물을 최종농도가 되게 조제한 후 VB-C 결합활성을 측정하였다.

사용 시약

각 실험에 사용한 시약 중 triethanolamine, toluene 및 Triton X-100 (polyethylene glycol mono-*p*-isooctylphenyl ether)는 Nakarai Co., omnifluor는 England Nuclear Co., 기타 시약은 Wako Co., Sigma Co.의 특급 시약을 사용하였다.

결과 및 고찰

VB-C 결합단백질의 존재 부위

본 VB-C 결합단백질의 존재가 진핵세포의 호르몬 receptor와 비교할 때 peptide hormone receptor와 달리, steroid hormone receptor와 같이 세포질에 존재한다는 것이 intact cell(결합활성, -) 및 세포질 성분(>95%)의 결합활성 결과(11)에서 추정하였으나, 세포질 성분 중 세포막 단편에의 존재가능성을 검토하기 위해 막성분과 분리하여 그 결합활성을 측

Table 1. Intracellular localization of the VB-C binding protein

Fraction	Specific [³ H] VB-C ₇ binding	
	(10 ⁴ dpm)	(%)
Total cell	1.62	100
Sup(I)	1.49	91.9
Sup(II)	1.48	91.3

50 μl of each fraction was assayed for specific [³H] VB-C₇ binding as described in Materials and Methods.

정한 결과를 Table 1에 나타내었다.

가용성 획득 I, II에서 90% 이상의 VB-C 결합활성이 존재하는 점에서 VB-C 결합 단백질이 세포질에 존재한다는 것이 재확인되었으며, 이는 소수성이 강한 steroid hormone이 세포막 수동확산에 의해 통과하여 세포내의 receptor와 결합하는 것과 같이 소수성이 강한 VB가 세포내에서 생합성되어 세포외로 이동하며, 또한 외부에서 첨가된 VB 역시 수동확산에 의해 통과, 세포내에 존재하는 VB-C 결합단백질과 결합하여 기능을 발휘한다고 추정되었다.

결합활성 최적 pH

VB-C 결합단백질의 결합활성 최적 pH를 조사하기 위해 0.05 M TEA buffer를 pH 4~10까지 조정하여 각 pH 용액 80 μl에 조단백질용액 20 μl를 첨가, 실온에서 20분간 방치 후 잔존 결합활성을 측정하였다.

Fig. 2에서 보인 바와 같이 결합활성은 pH 5~7까지 70% 이상 유지되었으나 (최적 pH 7.0) pH 8.0에서 75% 이상 급격한 활성 저하를 나타내었으며, 이는 진핵세포 유래인 Juvenile-hormone receptor(12)와 비교할 때, 최적 pH(7.0)는 유사하나 pH 7~9까지 안정한 것과 상이한 결과를 나타내었다.

금속이온의 영향

0.05 M TEA buffer(pH 7.0)에 최종농도 0.5 M KCl, 0.5 M NaCl 및 5 mM CaCl₂, MgCl₂, ZnCl₂와 20 mM Na₂MoO₄의 금속이온을 첨가하여 조제한 후 조단백질용액 20 μl를 첨가하여 실온에서 20분간 방치 후 잔존 결합활성을 측정하였다. Table 2에서 보인 바와 같이 KCl 존재하에서는 약 15% 결합활성이 증대되었으며, 이는 KCl이 ligand(VB-C)와의 결합 안정성에 관여함을 알 수 있으며, 평형투석시 KCl 존재의 경우

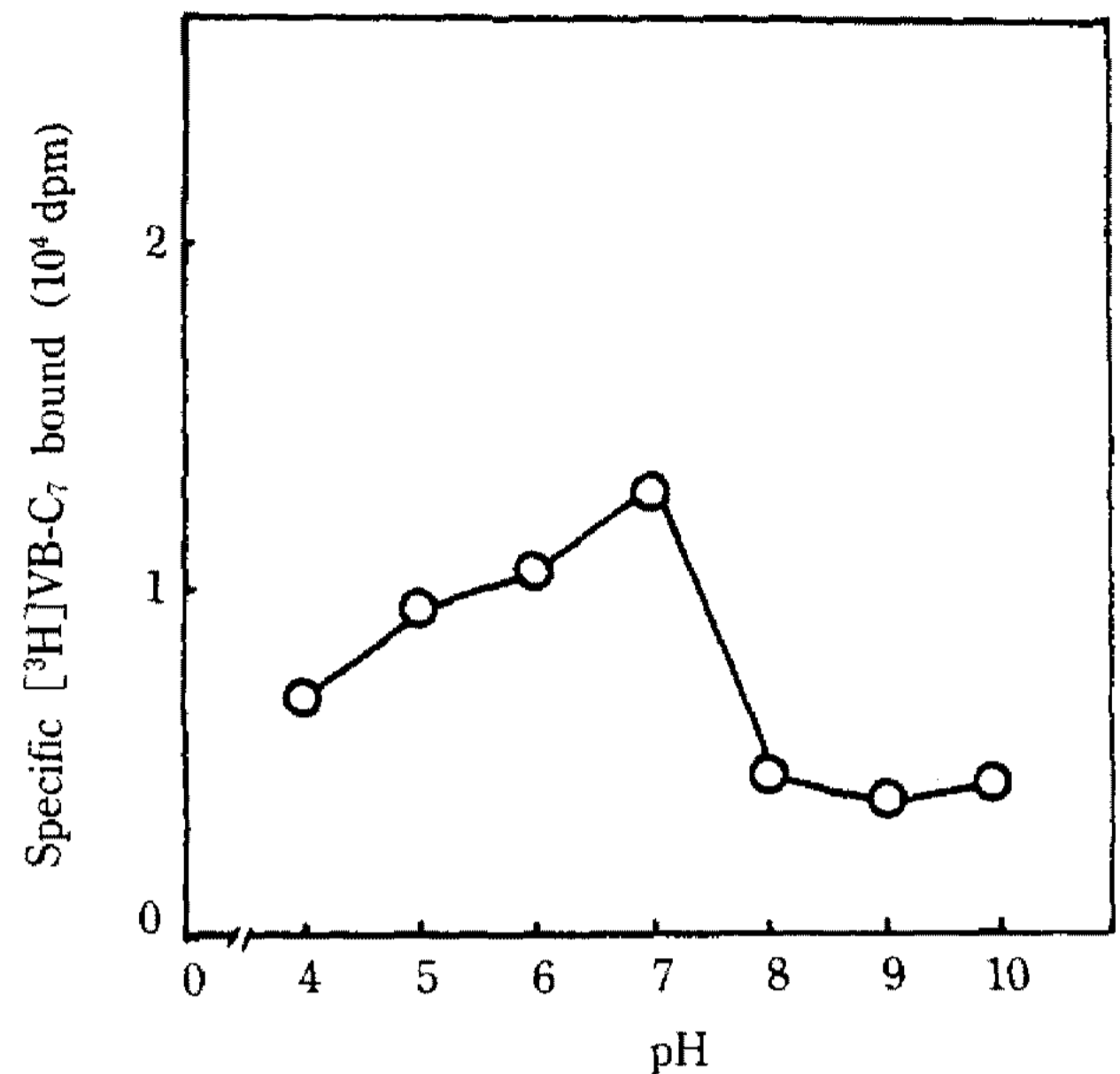


Fig. 2. VB-C binding activity at different pH values. VB-C binding protein samples were prepared by adding 20 μl of crude protein and 80 μl of buffer A at desired pH. After 20 minutes incubation at room temperature, samples were assayed for specific [³H] VB-C₇ binding as described in Materials and Methods.

Table 2. Effect of various metal ions on VB-C binding activity

Metal ion	Concentration (mM)	Specific [³ H] VB-C ₇ binding (10 ⁴ dpm)	Relative activity (%)
KCl	500	2.20	114.5
NaCl	500	1.95	101.5
Ca ²⁺	5	1.64	85.2
Mg ²⁺	5	1.79	93.4
Zn ²⁺	5	1.91	99.4
Mo ⁶⁺	20	0.77	40.0
None	—	1.92	100.0

None: 0.05 M triethanolamine-HCl buffer only

ligand-receptor complex가 안정성을 나타낸 결과 (10)와 일치함을 보였다. 또한 Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺의 경우 85% 이상 활성이 유지되었으나 Mo⁶⁺의 존재의 경우 60%의 결합활성 저하를 보였다. 이는 steroid hormone receptor의 경우 Mo⁶⁺ 이온의 존재시 ligand와의 결합 안정성(13)을 보이는 것과 상이하며, 본 VB-C 결합단백질이 원핵세포에서 유래된 점에서 진핵세포내의 steroid hormone receptor와 상이한 성질을 소유한다고 추정되었다.

Table 3. Effect of various chelating reagents on VB-C binding activity

Reagent (5 mM)	Specific [³ H] VB-C ₇ binding (10 ⁴ dpm)	Relative activity (%)
EDTA	0.869	45.0
EGTA	1.33	69.4
8-HQ	1.38	71.8
None	1.92	100

EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid, EGTA: ethyleneglycol bis(2-aminoethylether) tetraacetic acid, 8-HQ: 8-hydroxy quinoline-5-sulfonic acid

Table 4. Effect of various SH protecting reagents on VB-C binding activity

Reagent (5 mM)	Specific [³ H] VB-C ₇ binding (10 ⁴ dpm)	Relative activity (%)
ME	1.87	97.3
DTT	1.51	78.7
TG	1.59	82.7
None	1.92	100

ME: mercaptoethanol, DTT: dithiothreitol, TG: thioglycerol

킬레이트 시약의 영향

킬레이트 시약의 공존하에 결합활성을 측정하기 위해 동일조건하에서 5 mM의 EDTA, EGTA 및 8-hydroxy quinoline-5-sulfonic acid(8-HQ)을 첨가한 결과, Table 3에서 보인 바와 같이 30~55%의 결합활성 저해를 나타내었다. 따라서 ligand(VB-C)와의 결합을 위해 금속이온과의 결합에 의한 안정한 구조체를 형성한다고 추정되었다.

SH기 보호제의 효과

동일 조건하에서 반응액 중 최종농도 5 mM의 mercaptoethanol(ME), dithiothreitol(DTT), thioglycerol(TG)을 첨가하여 결합활성을 측정한 결과, Table 4에서 보인 바와 같이 20% 이하의 약간 결합활성 저하를 나타내었다. 이는 결합활성에 sulfhydryl기보다 disulfide 결합의 관여가 예상되며, 따라서 이들 시약에 의해 disulfide 결합이 절단되어 VB-C 결합단백질의 구조변화에 의한 결합활성이 저하되었다고 추정되며, Table 3의 결과와 비교할 때 unbound form의 VB-C 결합단백질의 구조 형성에 금속이온이 보다 큰 역할을 한다고 사료되었다.

Table 5. Effect of various protease inhibitors on VB-C binding activity

Reagent (5 mM)	Specific [³ H] VB-C ₇ binding (10 ⁴ dpm)	Relative activity (%)
NEM	1.57	81.6
DTNB	1.78	92.5
TPCK	1.61	83.76
PMSF	2.25	117.4
None	1.92	100

NEM: N-ethylmaleimide, DTNB: 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid), TPCK: N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone, PMSF: phenylmethane sulfonyl fluoride

Protease 저해제에 의한 결합활성

Steroid hormone receptor의 경우 세포질내 공존하는 protease에 의해 쉽게 분해(14)되는 점에서 VB-C 결합단백질의 protease 저해제 첨가에 의한 결합활성을 검토하였다. 동일 반응조건하에서 SH protease 저해제인 N-ethyl maleimide(NEM)와 5,5-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 및 serine protease 저해제인 N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone(TPCK) 및 phenylmethane sulfonyl fluoride(PMSF)를 최종농도 1 mM되게 첨가하여 VB-C 결합활성을 측정된 결과, Table 5에 보인 바와 같이 PMSF 첨가시 17%의 활성증가를 나타내었으며, 이는 serine protease의 저해에 의한 VB-C 결합단백질의 보호에 기인한다고 예상되며, 기타 약 20% 미만의 활성저하는 protease 저해제에 의한 VB-C 결합부위의 화학 수식의 결과(alkylation)라고 추정되었다.

Nucleotide 및 Phosphatase 공존하의 결합활성

VB signal 전달기구에 있어서 진핵세포의 hormone receptor와 비교할 때 결합단백질의 인산화 및 탈인산화에 의해 signal 전달 가능성도 예상되고 있다. 따라서 nucleotide 3 인산 및 phosphatase 공존하의 VB 결합활성을 측정하기 위해 동일 조건하에서 ATP, GTP(5 mM MgCl₂ 존재하) 및 cAMP를 최종농도 0.1 mM되게, 그리고 alkaline phosphatase 3.4 units 및 acid phosphatase 3.6 units를 첨가하여 VB-C 결합활성을 측정하였다.

Table 6에서 보인 바와 같이 GTP, cAMP 존재시 6~20% 활성증대를 보인 반면, ATP의 경우 인산화에 의한(세포질내 kinase 존재 예상) 결합활성 변화는 없다고 추정되었으며, 탈 인산화에 의한 결합활성은

Table 6. Effect of nucleotides and phosphatases on VB-C binding activity

Reagent	Concentration	Specific [³ H] VB-C ₇ binding (10 ⁴ dpm)	Relative activity (%)
	(mM)		
ATP	0.1	1.87	97.3
GTP	0.1	2.29	119.2
cAMP	0.1	2.04	106.4
	(units)		
Alkaline phosphatase	3.4	2.01	104.7
Acid phosphatase	3.6	2.18	113.6
None	—	1.92	100

glucocorticoid receptor의 경우 ligand와의 결합활성이 저하되는 점(15)과 달리 약 4~10% 정도 증가하였다. 따라서 인산화 및 탈 인산화에 의한 ligand (VB-C)와의 결합 및 해리에 따른 signal 전달 가능성이 시사되었다.

요 약

*Streptomyces virginiae*가 생산하는 virginiamycin 생산 유도인자(virginiae butanolide C, VB-C) 결합 단백질의 ligand(VB-C)와의 결합활성에 미치는 일반적인 성질을 검토한 결과, 본 VB-C 결합단백질은 막성분을 제외한 세포질에 90% 이상 존재하며, 최적 pH는 7.0인 것이 입증되었다. KCl 존재하 약 15%의 결합활성이 증대되었으며, Mo⁶⁺ 이온 존재시 60%의 결합활성 저하를 보였다.

Chelating reagents(EDTA, EGTA, 8-hydroxy quinoline-5-sulfonic acid) 존재시 30~55% 결합활성 저해를 보였으며, SH기 보호제(mercaptoethanol, dithiothreitol, thioglycerol) 첨가의 경우 3~20%의 결합력 저하를 보인 반면, protease inhibitor인 PMSF 존재시에 17%의 결합활성 증대를 나타내었다. 또한 nucleotides(GMP, cAMP) 및 phosphatase(alkaline, acid phosphatase) 공존하의 경우 5~20%의 결합활성 증가를 나타내었으며, 인산화, 탈 인산화 반응에 의한 signal 전달기구 가능성과 함께 앞으로 원핵세포의 2차 대사산물 생산계의 새로운 기구 해명이 기대되고 있다.

감사의 말

본 연구는 1991년도 교육부 지원 한국 학술진흥재단의 지방대학 육성과제 학술연구 조성비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. Khokhlov, A.S. 1980. *Frontiers Bioorganic Chemistry and Molecular Biology*, pp. 201-210. Pergamon Press, Oxford.
2. Kliner, E.M., S.A. Pliner, V.S. Soifer, V.V. Onoprienko, T.A. Balashova, B.A. Rosynov and A.S. Khokhlov. 1976. The structure of A-factor, a bio-regulator from *Streptomyces griseus*. *Bioorg. Khim.* 2: 1142-1147.
3. Hara, O. and T. Beppu. 1982. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*-the role of A-factor. *J. Antibiot.* 35: 349-358.
4. Gräfe, U., W. Schade, I. Eritt, W.F. Fleck, and L. Radics. 1982. A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiot.* 35: 1722-1723.
5. Gräfe, U., G. Reinhardt, W. Schade, I. Eritt, W.F. Fleck and L. Radics. 1983. Interspecific inducers of cytodifferentiation and anthracycline biosynthesis from *Streptomyces bikiniensis* and *S. cyaneofuscatus*. *Biotechnol. Lett.* 5: 591-596.
6. Yamada, Y., K. Sugamura, K. Kondo, M. Yanagimoto and H. Okada. 1987. The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* 40: 496-504.
7. Kondo, K., Y. Higuchi, S. Sakuda, T. Nihira and Y. Yamada. 1989. New virginiae butanolides from *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* 42: 1873-1876.
8. Sato, K., T. Nihira, S. Sakuda, M. Yanagimoto and Y. Yamada. 1989. Isolation and structure of a new butyrolactone autoregulator from *Streptomyces* sp. FRI-5. *J. Ferment. Bioeng.* 68: 170-173.
9. Nihira, T., T. Shimizu, H. S. Kim and Y. Yamada. 1988. Structure activity relationships of virginiae butanolide C, an inducer of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* 41: 1828-1837.
10. Kim, H.S., T. Nihira, H. Tada, M. Yanagimoto and Y. Yamada. 1989. Identification of binding protein of virginiae butanolide C, an autoregulator in virginiamycin production from *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* 42: 769-778.
11. Kim, H. S., H. Tada, T. Nihira and Y. Yamada. 1990. Purification and characterization of virgi-

- nae butanolide C-binding protein, a possible pleiotropic signal-transducer in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **43**: 692-706.
12. Ozyhar, A. and M. Kochman. 1987. Juvenile-hormone-binding protein from the hemolymph of *Galletia mellonella*(L). *Eur. J. Biochem.* **162**: 4298-4302.
13. Housley, P.R., J.F. Grippo, M.K. Dahmer and W. B. Pratt. 1984. *Biochemical Actions of Hormone*. pp. 347-375, Academic Press, New York.
14. Puca, G.A., E. Nola, V. Scica and F. Bressiana. 1977. *J. Biol. Chem.* **252**: 1358-1366.
15. Peter, V.B. and L. Gerald. 1988. Evidence that the modulator of the glucocorticoid-receptor complex is the endogeneous molybdate factor. *J. Biol. Chem.* **85**: 1462-1466.

(Received March 20, 1992)