

특집: 생물공정기술의 최적화(I-IV)

방선균의 균주육종과 대사산물 생산

홍 순 광

명지대학교 이과대학 생명과학과

방선균은, 오랜 역사를 갖고 있는 알콜이나 초산발효등과 같은 식품관련산업과는 달리, 주로 현대의약품의 개발과 함께 그 응용성과 중요성이 인식되어 현재까지 가장 중요하게 다루어지고 있는 유용한 산업미생물군이다. 방선균은 토양속에 다양하게 존재하는 미생물의 일종으로 그람양성 진성세균에 속하며, 항생물질로 대표되는 이차대사산물, 생리활성물질, 비타민 등의 저분자물질을 생산할 뿐만 아니라 소염제, 소화제, 세제, 공업용 효소등으로 이용되는 다양한 종류의 생체효소와 같은 고분자물질을 생산하는등 산업적인 응용범위를 열거하기는 불가능할 정도이다.

산업미생물의 관점에서 방선균에 기대하는 많은 사항들이 이들이 갖는 물질대사의 다양성이 인류생활에 광범위하게 이용되고 있고, 또한 장래에도 바이오테크놀로지의 중요한 역할을 담당할 것으로 기대하기 때문이다. 본고에서는 방선균에 관한 지금까지 알려진 지식중, 원핵생물로서 방선균이 갖는 특징과 분자생물학이 도입된 후의 방선균의 균주육종방식의 변화 및 이들이 생산하는 저분자물질에 대하여 흥미있는 분야를 중심으로 정리하려 한다. 특히 마지막 세 부분은 방선균의 활동을 이해하고 응용하는데에 가장 중요한 두가지의 기초연구분야 - 이차대사생산의 조절 및 세포분화의 유전학적 연구 및 이를 이용한 새로운 항생제 생산개발의 응용분야에 대하여 언급하려 한다.

방선균의 습성

방선균은 자연계에서 해로운 일도 좋은일도 하고 있는 양면성을 갖고 있다. 방선균의 해로운 점중의 한가지는 동물이나 사람, 식물 크게는 삼림지대에서 기회주의적인 병원성균으로 활동한다는 점이다. 이들의 포자는 집, 농장, 공장지대의 주위를 오염시키고, 심지어는 알레르기성 결핵염이나 농부폐(Farmer's lung)와 같은 질병을 야기시키기도 한다. 방선균은 물을 오염시키고 그속에서 찌꺼기나 거품을 형성시켜 폐수처리 공장등에 문제를 일으키기도 하며, 생태파괴 및 생분해에 있어서도 주요한 활동군이다. 방선균에 의한 생태파괴의 예로는 귀중한 장비나 물질 등을 파괴하고, 건초, 곡물, 씨앗, 섬유, 목재, 펄프, 종이, 울, 탄소섬유, 고무, 플라스틱등의 부패를 담당

한다.

이러한 방선균의 해로운 점에 비하여 이들이 주는 잇점은 압도적으로 많다. 특히 생분해능은 폐기물 처리에 많이 이용되어 자연계내에서 물질의 제거 및 재생등에 이용된다. 방선균은 식물조직의 lignocellulose를 분해하여 식물체를 이용한 화학물질의 변환에 이용될 가능성이 크며, 또한 cellulase, xylanase, amylase, protease, ligninase등을 생산하여 biomass의 이용에 중대한 역할을 기대할 수 있다. 방선균은 또한 농업이나 산림에 있어서 곰팡이성 질병의 치료제로도 사용되고 의약품으로도 사용되는데, 이러한 항생제의 생산뿐 아니라 동물약품, 성장조절제, 구충제, 살충제, 항진균제, 제초제 등의 다양한 이차대사산물을 생산하는 특징을 갖는다.

방선균의 분자생물학적 고찰

방선균은 주로 한 개의 주환상염색체 이외에 염색체의 유전형질(plasmid)을 유전물질로 갖고 있지만, 최근 *Streptomyces lividans*(34), *Streptomyces coelicolor*(29) 및 *Streptomyces griseus*(33)에서는 주염색체가 환상이 아닌 직선형의 염색체로 존재하고 있음이 보고되고 있다(38). 방선균의 유전자크기는 대장균의 1.5~2배정도의 크기이며, 70~75%에 달하는 높은 G+C content를 갖고 있는데, 이러한 속성이 자연계에서의 종의 보존 및 선택력에 어떤 잇점을 제공해 주었는지도 모른다(3). 또한 반복되는 DNA 배열도 방선균에서는 널리 관찰되고 있는데, 이들이 방선균의 육종과정중에 빈번하게 관찰되는 유전학적 불안정성의 중요한 요소로 간주되고 있다(30,32). 방선균에서 나타나는 유전적인 불안정성은 또한 염색체 DNA의 genomic rearrangement에서 기인하며, 통상의 조건에서도 0.1~1% 정도의 변화된 콜로니를 형성한다. 이러한 유전자적 변이는 광범위하게 일어난 유전자의 결손이나 증폭에 기인하거나, 특정부위에서 일어나는 유전자의 integration이나 excision등에 의하며, 세포분화, 항생물질생성 및 저항성, 효소생산 및 분비, 기타 물질생산 등에 심각한 영향을 미친다(32). 유전자결손은 보통 주위의 DNA에 그에 상응하는 amplification을 수반하기도 한다. 유전자 증폭은 항생제, 수은 등에 관한 저항성균주나 물질의 고생산균주등에서 흔히 관찰되며

실제적인 표현형은 구별하기 힘들다.

방선균은 빈번하게 다양한 크기와 copy수를 갖는 plasmid를 갖고 있으며, 대부분 기능을 알 수 없는 cryptic plasmid들이다. 일반적인 방선균의 plasmid들은 G+C content가 높고, 10~40 kb의 크기로 copy수가 30 이하이다. 이들은 원형이거나 직선형이고, 자기복제능을 갖는 것과 염색체 DNA로 integration되는 형태로 존재한다. 방선균유래의 plasmid나 phage를 이용한 클로닝 벡터가 high-copy number plasmid, low-copy number plasmid, promoter-probe vector, expression vector 등이 개발되어 이제는 자유롭게 이용이 가능하다.

방선균의 유전자발현에 관한 연구는 점점 흥미있는 분야로 발전하고 있다. RNA polymerase의 holoenzyme은 여러 종류가 *S. coelicolor*에서 보고 되었고 이들은 각각 동일유전자의 서로 다른 프로모터부위를 인식하기도 하고, 특정 목적에 부합되도록 특정시기에 발현이 유도되도록 조절하는 기능을 담당한다(49). 방선균의 프로모터에 관한 보고도 많이 있지만 아직까지 공식적으로 통용되는 consensus sequence는 알 수 없고, 많은 프로모터 부분이 복수개의 프로모터로 구성되어 있고, 이들은 일렬로 때로는 중복되어 존재하는 특징을 보인다. 리보솜 결합부위는 번역개시코돈에서 멀리 떨어져 있고, 번역개시코돈은 일반적으로는 AUG이지만 GUG도 빈번하게 발견된다(5).

방선균의 유전자 발현에 있어 재미있는 특징은, 유전자에 따라서는 전사물인 mRNA의 5-말단이 번역개시 코돈의 첫문자와 일치 한다는 점이다. 이와같은 번역양식은 erythromycin, streptomycin, streptothricin, micinamycin 등의 생합성 유전자 내에 있는 내성유전자에서 관찰 된다. 또한, 후술하는 A-factor 생합성 유전자 *afsA*의 전사개시 부위도 개시코돈 ATG의 A임이 밝혀졌다(25). 이들 유전자의 공통점은 발현시기가 배양후기의 항생물질 생산이 개시되기 직전이라는 점이다. 이와같은 유전자들의 발현에 있어, ribosome은 mRNA의 5-말단을 인식하고 결합하여, 그의 말단에서부터 번역을 시작하는 것으로 생각되어, 어쩌면 이와같은 mRNA의 번역은 생육시기 특이적 발현을 위한 조절기구의 하나로 추측된다.

방선균은 세포의 효소나 저분자의 물질을 분비하는 데에 큰 장점이 있다. 방선균을 이질단백질의 발현체로 쓸수 있는 장점은 병원성이 없고, 단백질의 분비가 용이하며, 대규모 산업적 공정에서 오랫동안 사용되어 왔다는 점 등이다.

방선균의 생활사

방선균은 filament형으로 성장하며, 표면에서는 기저균사가 영양분을 소모하며 기저균사를 형성하고 결국에는 그 끝에 포자를 형성한다(Fig. 1). 기저균사는 초기 배양시 biomass의 직선적인 증가를 보이고, 약간 느슨한 hyphae가 선단부분에 자라 생물산업

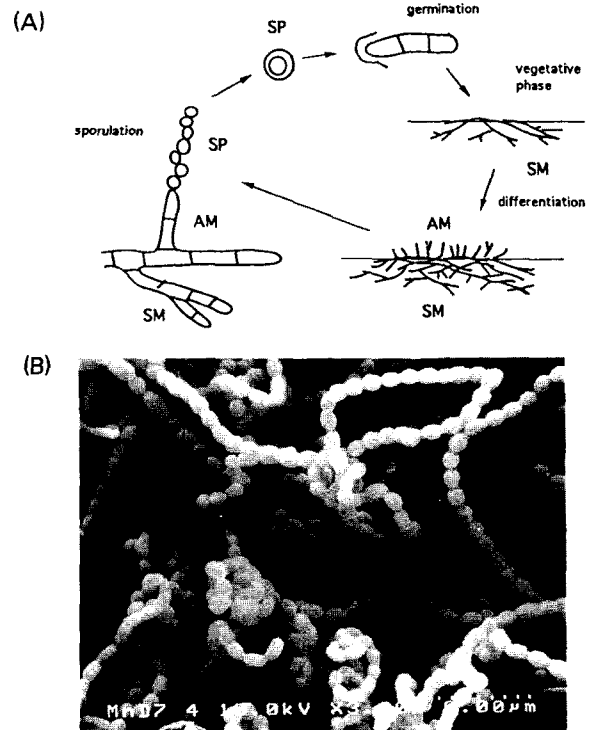


Fig. 1. Morphology and differentiation of *Streptomyces*. (A) Life cycle of a *Streptomyces*. SP, arthrospores or conidia; SM, substrate mycelium; AM, aerial mycelium. (B) Scanning electron micrograph of sporulating streptomycete aerial hyphae forming chains of arthrospores. *Streptomyces coelicolor* A(3)2 shows smooth spore surface.

면서 glycogen이 축적되며 기균사가 형성된다. 성장율이 저하됨에 따라서 이차대사산물이 만들어지고, 동시에 mycelium이 성장을 계속하여 agar 표면을 덮게 된다. 이와같은 세포분화기간에는 세포중량의 증가는 관찰되지 않는다.

비록 상기의 표면성장이 자연계에서의 방선균의 성장방법이지만, 산업적으로는 액체배지 내에서의 submerged culture 방법이 보편적이다. 액체 배양에서의 성장은 전혀 다른 방법으로 일어나며, 배양기의 조건에 따라 mycelia의 모양이 달라지게 되며, 가능하면 pellet을 형성하지 않고 잘 분산된 형태의 성장을 보이는 조건이 최적 생산조건이 되게 된다.

방선균과 효소

방선균 유래의 많은 효소들은 효소공정, 임상의학 및 치료 등 바이오테크놀로지 분야에서 관심을 모으고 있다(Table 1). 일반적으로 효소는 고온에서의 안정성 및 활성도, 이상적인 기질특이성 등으로 선호되며, 방선균유래의 가장 중요한 효소는 glucose isomerase이다. 이외에 glycosidase (biomass분해용 amylase, cellulase, xylanase, chitinase), 피혁가공 및 세제용 분

Table 1. Cloned enzymes and other proteins from *Streptomyces* with a potential for biological application

Catalytic activity	Producer
Agarase	<i>S. coelicolor</i> A3(2)
β-galactosidase	<i>S. lividans</i> 66
Protease A, serine-proteinase	<i>S. griseus</i>
Protease B, serine-proteinase	<i>S. griseus</i>
Trypsin, serine-proteinase	<i>S. griseus</i>
Metalloprotease	<i>S. lividans</i> 66
Metalloprotease	<i>S. cacaoi</i>
Aminopeptidase	<i>S. griseus</i>
Carboxypeptidase, metallocarboxypeptidase	<i>S. griseus</i>
α-amylase	<i>S. hygroscopicus</i>
α-amylase	<i>S. limosus</i>
Pullulanase	<i>S. lividans</i> 66
Xylanase	<i>S. lividans</i> 66
Cellulase(endoglucanase)	<i>S. lividans</i> 66
Chitinase	<i>S. lividans</i> 66
Chitinase	<i>S. plicatus</i>
Alkaline phosphatase(StrK)	<i>S. griseus</i>
Endo-β-N-acetylglucosaminidase H	<i>S. plicatus</i>
Lysozyme	<i>S. coelicolor</i> "Muller"
β-lactamase	<i>S. badius</i> , <i>S. cacaoi</i> , <i>S. fradiae</i> , <i>S. lavendulae</i>
Cholesterol oxidase	<i>S. sp.</i> SA-COO
Esterase	<i>S. scabies</i>
α-Amylase inhibitor, tendamistat	<i>S. tendae</i>
α-Amylase inhibitor, Haim-II	<i>S. griseosporus</i>
Proteinase inhibitor LEP-10	<i>S. lividans</i> 66
Proteinase inhibitor LTI	<i>S. longiosporus</i>
β-lactamase inhibitor	<i>S. clavuligerus</i>

해효소인 protease, 식품 보존 및 알콜발효 정화용 또는 과일주스 가공용 pectinase 등이 상업적으로 유용하다. 이외에도 치료용인 L-asparaginase나 urate oxidase, 제한효소, 광학이성질체 분리를 위한 acylase와 lipase, 진단용 고정화효소 (예> cholesterol oxidase, L-glutamate oxidase, choline oxidase, urate oxidase, phospholipase 등)이 이용될 전망이다. 한편 xanthine dehydrogenase, neuramidase 등과 같은 많은 방선균 효소는 기질 특이성이 아주 엄격하거나, 이상결합을 갖고 있어 다양한 물질변환이나, 기작연구, 구조결정에 이용된다.

방선균의 탐색 및 생리활성 물질

방선균은 산업적으로 가장 중요하게 생각되어온 균군인 만큼 지금까지 많은 종이 분리되었고, 이들이 생산하는 물질도 수천종 이상 보고 되었다(Fig. 2). 따라서 지금도 많은 연구실에 방선균으로부터 유용물질을 분리하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 그 결과 이미 분리된 방선균이 반복되어 분리되고 이로부터 분리한 물질이 기존의 물질과 동일한 물질들이 일

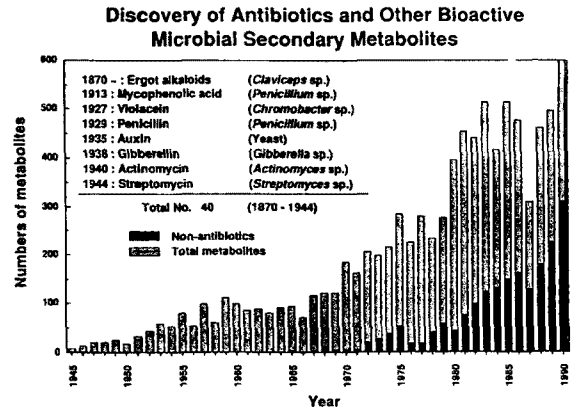


Fig. 2. The discovery of microbial bioactive compounds(40).

려져 점점 방선균으로부터 새로운 화합물을 발견하는 일이 어렵게 되었다. 이러한 난관을 극복하기 위하여는 보다 체계적인 방선균의 분류체계가 마련되고, 기존의 배양방법과는 다른 방법으로 방선균을 분리해내는 기술의 개발이 필요하게 되었다. 또한 탐색방법에 있어서도 미량의 화합물의 활성을 측정해 낼 수 있는 target-oriented assay법을 개발하는 일이 중요하다.

기존의 방선균유래의 활성물질은 항균제, 항암제, 항진균제, 살충제, 구충제, 면역조절제 등이다. 항생물질의 생산은 종특이성이 있으며, 화학적으로 방대한 다양성을 갖는다. 지금까지 알려진 항생물질 6000여종중 2/3 이상이 방선균에서 유래한 것으로 보통 한종의 배양액내에는 생합성 효소의 broad한 기질특이성때문에 유사한 항생제의 혼합물형태로 존재한다. 항생제 생산균이 자신이 생산하는 항생제에 대한 저항성을 갖는다는 사실은 새로운 항생제유도체 탐색에 좋은 도구로 이용된다. 새로운 항생제의 유도체를 창출하는 방법에는 생산 배양액내에 특정반응기를 첨가하거나(directed biosynthesis), 합성저해 변이주(mutational biosynthesis)를 이용하거나, 기존항생물질의 물질변환, 기존균주의 돌연변이, 세포융합, conjugation, 재조합 DNA 기술 등을 이용하는 방법 등을 생각할 수 있다(Table 2).

방선균은 항생물질이외에도 효소저해제, 면역억제제 및 다양한 생리활성물질의 생산자이기도 하다. Proteases, peptidases, glycosidases 등을 비롯한 60종 이상의 효소저해제들이 이미 구조와 함께 기능이 알려져 있고, 그 용도도 특정 치료제, 항암제, 면역촉진제, 면역억제제 등 아주 다양하다.

방선균에서의 이차대사산물 생산조절

지금까지는 방선균이 생산하는 이차대사산물의 중요성에 대하여만 언급하였으나, 이들이 중요한만큼 보다 경제적인 방법으로 이차대사산물을 생산할 필요가 있다. 이를 위하여는 방선균의 이차대사생산에 이르는 조절기구를 명확히 이해하

Table 2. Biotechnological perspectives in secondary metabolites biosynthesis

Strategies	Goals
Screening of new bioactive compounds	Rare streptomycetes as a screening source Target-directed screening Use unusual culture media and cultural conditions Pathway engineering Directed biosynthesis Mutasynthesis Use of mutants with blocked or changed biosynthetic pathways Hybrid end products Biotransformations Newly designed products Expression of latent genes after recombination Cell fusion Expression of silent genes
Overproduction	Classical mutation and selection Recognition of inducing factors Enhanced gene dosage, especially of rate-limiting bottleneck enzymes Manipulation of regulators : enhancement of activators, deletion of repressors Constitutive expression Enhancement of resistance
Removal of undesirable products	Classical mutation and selection Cell fusion Genetic recombinations

고, 생산을 극대화시킬 필요가 있으며, 이차대사생산은 진핵생물의 노화현상과도 연관성이 적지않은 것으로 판단되어 이의 조절연구는 학문적으로도 상당한 가치를 지니게 된다. 따라서 지금까지 연구된 방선균의 이차대사 조절기구에 대하여 살펴보기로 한다.

이차대사산물의 생산시기

방선균에 있어서 이차대사산물(idiolite)을 생산 하는 시기는, 성장속도가 빠른 영양성장기(trophophase)가 지난후 영양소등의 결핍으로 성장속도가 늦어진 세포성장 후기가 이차대사산물의 생합성시기(idiophase)이다. 이러한 현상은 주로 빠른 성장을 지지해주는 영양배지에서 관찰되고, 이 경우 성장 영양소들은 idiolite 생합성효소의 형성을 저해한다. 그러나, 화학적으로 합성된 한정배지에서는 균체의 성장이 더디고, 일반적으로 idiophase는 trophophase와 중복되어 나타난다. 늦은 성장을 지지하는 배지에서는 어떤 growth factor가 성장초기에서 부터 제한되고, 성장기간 동안의 영양소에 의한 억제효과를 상실케 하고, 그 결과 이차대사의 생합성을 억제하지 않는 것으로 생각한다. 이차대사는 문자그대로 영양생장에는 아무런 영향을 미치지 않는 요소를 갖고 있지만, 이차대사가 반드시 성장이 멈추거나 성장이 늦추어진 다음에 시작되어야 할 이유는 없는 것이다.

방선균에서의 이차대사가 idiophase에 이루어진다는 것은 생물산업

생산균에게는 아주 경제적이라고 할 수 있다. 일반적으로 방선균은 성장기간동안에 자신이 생산하는 물질에 대하여 감수성을 보이며, 이러한 감수성은 이차대사를 생산하는 시기 직전부터 사라지게 된다. 항생제 생산균주의 항생제 내성은 항생제의 효소적 변형, 항생제가 작용하는 목표물의 변형, 항생제의 체내 흡수억제 및 배출촉진등의 방법으로 이루어지며, 이들에 관여하는 효소는 이차대사생산 직전에 합성되는 공통점을 갖고 있다.

이차대사산물의 생합성 개시

일반적으로 idiolite 생합성효소를 코드하는 유전자는 염색체 DNA상에 존재하지만 때로는 *S. coelicolor*에서의 methyl-entomycin 생합성 유전자와 같이 plasmid상에 존재하기도 한다 (7). 생합성효소들은 최대성장율을 보이는 시기에서는 발현되지 않고, 성장이 둔화되었을때 합성이 유도된다. 모든 종류의 항생제의 생산은 균주성장이 낮을 때에만 일어나고 있는데, 이와같은 사실로부터 어떤 이차대사의 생합성 유전자의 발현은 늦은 성장율에 의하여만 유도되거나, 어떤 경우는 성장율을 저하시키기 위하여 특정영양소의 결핍이 필요하다는 사실을 추측해 볼 수 있다.

포도당은 최고의 성장을 유도하지만 이차대사의 형성은 저해하며, polysaccharides, oligosaccharides, oils 등이 포도당보다 이차대사생산에 더 유용한 탄소원으로 작용한다. 한가지

의 배지에 빨리 이용되는 탄소원과 천천히 대사되는 탄소원이 공존할 때, 이차대사를 생산하지 않는 시기에는 빨리 이용되는 탄소원을 주로 이용하고, 좋아하는 탄소원이 고갈되었을 때 두 번째 탄소원이 이차대사형성을 위하여 이용된다.

탄소원에 의한 저해효과는 효소의 생합성을 억제하거나 효소활성을 저해함으로써 이루어진다(Table 3). 예를들면, *No-cardia lactamdurans*에서 포도당은 cephamycin 생합성경로의 expandase 합성을 억제하고 glucose-6-phosphate는 cyclase의 활성을 저해하며, 6-phosphoglycerate, fructose-1,6-diphosphate, fructose-2,6-diphosphate는 expandase의 활성을 저해한다(11). 또한 *Streptomyces antibioticus*에서 포도당은 actinomycin의 생합성 유전자를 전사단계에서 억제한다(26).

방선균의 이차대사생산에 c-AMP의 역할은 특기할 만한 것이 없고, 오히려 idiophase에 비하여 trophophase에서의 세포내 c-AMP의 농도가 높은 것이 일반적인 사실이다(10).

이차대사생산의 억제 및 저해현상은 암모늄이온이나 어떤 특정한 아미노산에 의해서도 관찰된다. 전통적으로 방선균 발효에 사용되는 soy bean meal은 천천히 대사되어, 이차대사산물 생산에 저해효과를 보이는 암모늄이온이나 아미노산의 과다축적을 방지한다. 한정배지에서 천천히 대사되는 아미노산을 사용한다. 암모늄이온은 streptomycin, cephamycin, clavulanic acid, rifamycin, erythromycin, chloamphenicol, leucomycin, tylosin 등의 생산에 저해효과를 보인다. 질소원에 의한 저해효과에 대한 확실한 설명은 뒷받침 되지 않지만 이들 질소원에 의한 효소활성의 저해효과는 몇 개의 예가 보고되었다. Cephamycin 생합성의 cyclase(6), expandase(4)나 tylosin 생합성의 valine dehydrogenase(39)는 암모늄이온에 의하여 효소합성이 억제되고, 역시 *Streptomyces fradiae*의 valine dehydrogenase(39) 및 tetracycline 생합성의 anhydrotetracycline oxygenase(1)의 활성도 암모늄이온에 의하여 저해받고 있음이 확인 되었다. 이러한 암모늄이온에 의한 저해효과는 tribasic magnesium phosphate나 zeolite와 같은 NH₄⁺-trapping agents의 첨가로 회복이 가능하다(37).

질소원에 의한 저해효과는 이차대사가 동일한 branched pathway를 공유하여 형성될 때 특정 아미노산에 의하여 심각하게 나타난다. 예를들면, *S. griseus*에서 candidicin 생합성과 방향족 아미노산의 관계가 극명한 예를 보여주고 있다(35). 이곳에서 분기점은 chorismic acid이고, 한 방향은 tryptophan, phenylalanine, tyrosine 과 같은 방향족 아미노산으로 합성이 이루어지고, 다른 쪽은 p-aminobenzoic acid (PABA)를 경유한 candidicin의 합성경로로 진행된다. Candidicin의 생합성은 세가지 아미노산에 의하여 축적적으로 저해를 받는데, 이는 공통 pathway의 첫 번째 생합성 효소인 DAHP synthetase와 candidicin 생합성 branch의 첫 번째 효소인 PABA synthase의 합성이 3개의 아미노산에 의하여 축적적으로 억제되기 때문이다.

Table 3. Catabolite repression by glucose

Metabolite	Enzyme or process repressed
Cephamycin	Aminoacyl-cysteinyI-valine formation Deacetoxycephalosporin C synthase
Deacetylcephalosporin C	Cephalosporin C acetylhydrolase
Kanamycin	N-acetylkanamycin aminohydrolase
Neomycin	Phosphatases
Penicillin	Valine incorporation
Puromycin	O-demethylpuromycin O-methyltransferase
Tetracycline	Anhydrotetracycline oxygenase

많은 이차대사물은 인산의 농도가 suboptimal growth 일때 최상의 생산능을 보인다. 이러한 인산농도에 예민한 이차대사는 aminoglycoside 항생제, tetracyclines, polyenes, tylosin, cephalosporine 등을 포함한다. 이러한 인산의 효과는 두가지로 요약된다. 첫째는 인산이 이차대사에 관여하는 phosphatase의 활성을 저해하거나 생합성을 억제하는 일이다. 이러한 현상은 streptomycin 생합성에서 관찰할 수 있는데, 마지막 단계인 streptomycin phosphate에서 인산기를 떼어내는 과정에 작용하는 phosphatase가 인산에 의하여 저해를 받는다(48). 이러한 형태의 인산저해효과는 인산화된 중간체를 갖고있는 모든종류의 이차대사생산에서 일어나고 있을 것으로 추측된다(Fig. 3). 두 번째의 과정은 보다 일반적인 것으로 세포내 인산 또는 배지내의 인산에 의하여 생산된 effector가 phosphatase 이외의 다른 생합성효소의 발현을 억제하거나 효소활성을 저해하는 것이다. 가능한 effector는 ATP 또는 ADP인데, 이들은 많은 종의 방선균에서 trophophase에서의 농도는 아주 높고, idiophase 직전에 현저히 감소하는 현상이 관찰되었다. 또한 *S. griseus*의 휴지기 세포에 10 mM phosphate를 첨가하면 5분 이내에 세포내의 ATP 농도가 2~3배로 증가하면서 10분 이내에 candidicin의 생산이 감소하는 사실이 관찰되었다(36). 또한 tetracycline이나 streptothricin 생산균주에서는 야생균주에 비하여 세포내의 ATP 농도가 훨씬 낮다는 보고도 있다. Cephamycin이나 tylosin등과 같은 많은 항생제의 생합성 효소가 인산에 의하여 생합성 저해를 받고 있는 것으로 알려져 있고, 이를 이용하여 인산의 흡수를 늦추거나 인산저해효과가 감쇄된 변이주가 이차대사의 고생산균주로 분리되기도 하였다.

이차대사의 생합성 유도현상은 빈번히 관찰되는데, 때로는 일반적인 아미노산이나 특수한 분자들이 유도물질로 작용한다. 방향족아미노산인 트립토판은 *Streptomyces parvulus*의 actinomycin 생합성 효소인 hydroxykynurenunase효소의 합성을 유도하고(45), *Streptomyces tendae*에서 분지형 아미노산은 nikkomycin 생합성을 유도한다(51).

유명한 이차대사 생산의 유도현상은 streptomycin 생합성 균주인 *S. griseus*에서 관찰된 A-factor에 관련된 이야기이다(2).

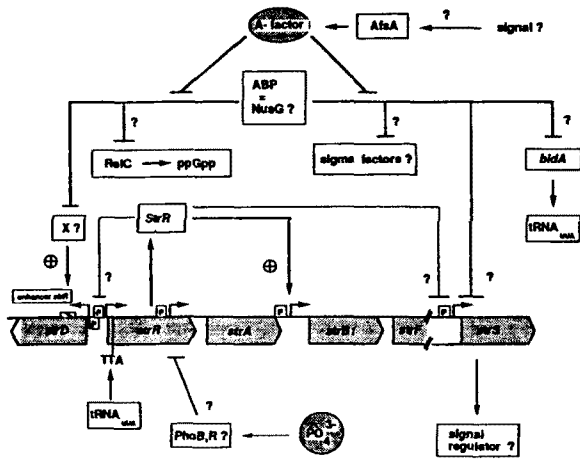


Fig. 3. Hypothetical regulatory network in a typical antibiotic gene cluster(40). The central part of the gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus* is shown, the regulation of which is subjected to the presence and concentrations of the autoregulator A-factor and phosphate as globally regulating molecules, as well as to specific regulatory proteins encoded by the *strR* and *strS* genes. *AfsA*, A-factor synthase; *AfbP*, A-factor binding protein; X, postulated A-factor dependent regulator of *strR*; *bldA*, *tRNA_{UUA}* gene; *PhoB,R?*, putative dual regulator of phosphate-controlled genes; *RelA, C*, stringent control factors involved in production of guanosine-tetraphosphate(ppGpp).

방선균의 형태분화와 항생물질 생산이 미생물 호르몬(microbial hormone 또는 autoregulator로 칭함)이라고 불리는 화학물질에 의해 조절되는 사실은 A-factor (2-isocapryloyl-3-R-hydroxy-methyl-r-butylolactone)의 연구에 의해 확인되어 있다(22-25). A-factor는 1967년 러시아의 Khokhlov 등에 의해 스트렙토마이신 생산균 *S. griseus*에서 발견되어, 본 균의 스트렙토마이신 비생산균 및 기균사 비형성변이주에서 두가지의 형질을 동시에 회복시키는 물질로서 단리되었다(28).

그 후의 연구결과 *S. griseus*의 스트렙토마이신 생산능, 포자착생능을 동시에 결손한 변이주가, 동균의 야생형주가 생산하는 물질에 의해 상기의 형질을 동시에 회복하는 것을 발견, 그 물질이 A-factor임이 확인되었다(13). 또한 A-factor는 10^{-9} M이라는 극저농도에서 자신의 streptomycin 생합성 및 포자착생 뿐 아니라 streptomycin 저항성도 유도하는 다형질적(pleiotrophic)인 조절물질임이 밝혀졌다. A-factor 생산성은 *S. griseus* 이외에도, *S. coelicolor* 및 *S. lividans*를 포함한 많은 방선균에도 확인되었다.

한편 A-factor 이외에도 A-factor와 동상의 기능을 나타내는 물질들이 다양한 방선균류에서 보고되고 있다(12). Anthracycline을 생산하는 *S. griseus*에서 분리된 Factor I, virginiamycin 생산균인 *S. virginiae*로부터 분리된 virginia bu- 생물산업

tanolide 등이 보고되어 있고, 이들은 모두 A-factor와 유사한 γ -lactone 구조를 하고 있다(50). A-factor의 조절 cascade는 *afsA* 유전자의 발현에 의한 A-factor의 합성으로부터 시작된다(Fig. 3). A-factor의 정보는 A-factor 결합 단백질로부터 streptomycin 생합성 및 저항성을 보이는 유전자 *strR*, *aphD*와 같은 하류 위치의 유전자에 전달된다. A-factor 결합 단백질(ABP)은 세포질 내에 존재하는 분자량 약 26,000달톤의 단백질이다. A-factor 결합단백질의 결손주는 streptomycin 생산 및 저항성, 포자착생능이 야생주에서 나타나는 그것보다 현저한 증가를 보이는 사실로부터, 세포가 왕성히 성장하고 있는 대수증식기와 같은 A-factor 비존재하에서 A-factor 결합단백질은 cascade 하류 위치의 유전자 발현에 repressor로서 기능하고 있는 것으로 추측된다. 그러나 그림 3에서 보이고 있는 streptomycin 생산에와 같이, 생체내에서 일어나는 이차대사의 생합성조절기구는 A-factor와 같은 광범위한 hormonal control 이외에도, 전술한 phosphate나 기타 영양소의 농도와 관련된 인자들, *StrR* 또는 *StrS*와 같은 생합성 유전자군내에 존재하는 pathway-specific regulators, 시그마인자 및 희귀코돈을 갖는 tRNA 등에 의한 전사 및 번역단계에서의 조절, stringent control factors 등에 의한 조절 등 다수의 제어기구에 의하여 제어를 받고 있으며, 이는 생체내외의 미묘한 변화를 감지하고 이에 적응하여 생존하기 위한 생명유지의 한 방편인 것으로 판단된다.

이차대사산물의 생합성 정지

이차대사 생산의 종결은 주로 두가지의 큰 이유를 들수 있다. 그중 하나는 생합성 대사경로에 관여하는 생합성효소의 비가역적인 변형이 일어나는 것이고 다른 하나는 생산된 이차대사산물에 의하여 일어나는 feed-back inhibition이다. 효소의 변형에 대하여는 아직까지 직접적인 증거는 없으나, 이차대사물에 의한 feed-back inhibition의 예는 많이 보고되고 있다. *Streptomyces venezuelae*에서 chloramphenicol을 생합성하는 효소중 방향족 아미노산과의 분지점에서 파생되는 첫 번째 생합성 효소인 arylamine synthetase(27), kanamycin 생합성의 acetyltransferase(41), puromycin, indolemycin, tylosin 생합성의 O-methyltransferase(1) 등은 그 좋은 예이다.

방선균의 형태학적 분화

생리적분화로 불리는 이차대사와 함께 세포의 형태적분화 또한 방선균의 주요한 특징이다(Fig. 1, (A)). 방선균의 탐색 및 동정, 이차대사형성의 조절등이 형태적분화와 중요한 연관성을 갖고 있음에도 불구하고, 분자생물학적인 방법을 동원하여 쌓여진 베일을 벗기는 일이 금후의 주요한 과제라 하겠다.

원핵생물의 일종인 방선균은 다른 원핵생물과 마찬가지로 콜로니를 형성하지만, 콜로니의 복잡성이 일반적인 원핵생물과는 다르다. 방선균에서 콜로니는 성숙된 형태가 아니고, 포자 형성, 포자 발아, 세포성장으로 구성되는 생활사중의 한부분일 뿐이다. 성장은 세포가 길게 연결된 mycelia 형태로 부터 가지를 형성하여 결국에는 고체배지상에서 mycelial mat를 형성하며, 수일안에 공기중으로 뿔어나가는 기균사의 형성이 시작된다. 이차대사의 생산은 바로 이 시기와 일치하여 시작되며, 기균사는 후에 따라서 꼬이거나 나선형의 형태로 발달하고 각 구획마다 격막이 형성되어 성숙한 haploid 상태의 포자가 염주상으로 형성된다(Fig. 1, (B)). 포자는 아주 낮은 정도의 물질대사만을 영위할 뿐 휴지상태의 삶을 유지하다가, 적당한 조건이 되면 발아는 및 튜브를 형성하고 다시 영양세포로 성장하는 생활사를 반복하게 된다.

지금까지 무수한 종류의 방선균들이 산업적으로 이용되어 왔지만, 이들 모두를 대상으로 하는 분자유전학적 연구는 이루어지지 않고, 일부의 균에 관하여만 연구가 되고 있다. 이중 *S. coelicolor*(16)와 *S. griseus*(15,46,47)에 관한 연구가 가장 활발하며, 특히 *S. coelicolor*의 경우에는 눈으로 식별할 수 있는 색소성 항생제인 actinorhodin, undecylprodigiosin 등의 이차대사산물 및 Ca^{2+} -antibiotics 및 methylenomycin과 같은 다양한 이차대사산물을 생산하는 이유로 가장 활발히 연구되어 왔고, 그 결과 100종 이상의 유전자의 염색체상의 위치가 밝혀져 있다(18,29).

형태분화에 이상을 보이는 변이체는 콜로니의 형태에 따라서 크게 두가지로 분류 된다. Bald (*bld*) 변이주는 기균사의 성장에는 이상이 없지만 기균사의 성장에 이상을 보여 머리카락이 없는 것과 같은 콜로니형태를 보이는 사실로부터 그 이름이 유래하였다. *S. coelicolor*의 *bld* 변이주는 그 특성에 따라 7가지 classes(*bldA-G*)로 분류되어 염색체상에 분산 되어 mapping되어 있다. 이들은 보통의 조건에서 색소성 항생물질인 actinorhodin의 생합성능도 소실되어 있으나, 놀랍게도 이종의 5 classes(*bld A, C, D, G, H*)는 포도당 이외의 탄소원을 사용함에 따라서 발현이 유도되는 conditional mutants임이 밝혀져 형태분화에서의 탄소원의 중요성을 인식하게 되었다. 그중에서 K. Charter 등은, *bldA* 변이를 회복 시키는 DNA 단편을 클론화하여, 그 염기 배열을 결정한 결과 *bldA* 유전자는 UUA라 하는 leucin 코돈을 갖는 tRNA를 코드하고 있음이 밝혀졌다(31). 지금까지 밝혀진 많은 유전자들의 해석으로부터, 높은 GC 함량을 갖는 방선균에서는 UUA 라는 leucine 코돈이 사용되는 일이 거의 없는 것으로 알려져 있고, *Streptomyces hygroscopicus*의 hygromycin 저항성 유전자 *hyg*, *Streptomyces thermotolerans*의 carbomycin 저항성 유전자 *carB*, *Streptomyces glaucescens*의 streptomycin 저항성 유전자 *sph*, *S. griseus*의 streptomycin 생합성 조절유전자 *strR* 등에서 관찰될

뿐이다. 따라서, *S. coelicolor* A3(2)를 포함한 많은 방선균에서는 UUA를 코돈으로 사용하는 leucyl-tRNA를 개입시켜, 그 균의 세포분화와 이차대사 생산을 조절하고 있는 것으로 사료된다. 따라서 이와같은 번역단계에서의 조절기구가 생체내의 복잡한 유전자발현을 위한 조절 cascade의 한 방편으로 이용되고 있음을 쉽게 가정할수 있다(Fig. 3).

한편, *S. coelicolor* A3(2)의 포자 비착생주중 기균사는 형성하지만 포자형성에 이르는 단계에 변이를 보이는 균주를 white(*whi*) 변이주로 정의하고, 연구를 지속하여 지금까지 9 classes의 *whi* 변이주들이 분리 되었다. 그중 *whiG* 변이주를 회복시키는 단편을 클로닝하여 분석한 결과, *whiG* 유전자는 그의 염기배열로부터 σ -factor를 코드하는 것으로 추정되었고, 본 유전자를 high-copy number plasmid에 넣어 도입시키면 영양 증식기에도 포자를 형성하는 것이 관찰 되었다. 또한 본 유전자는 보통의 영양 증식에는 필요하지 않은 것으로 생각되어, 아마도 포자 형성 유전자군의 전사를 담당하는 것으로 예상하고 있다(5).

생합성 유전자를 이용한 신규 생리활성물질의 개발

이차대사조절에 대한 많은 연구결과를 활용하여 그동안 균주의 개량에 이용하여 왔다. 따라서, 돌연변이균주를 탐색함에 있어서, 인산저항성 균주를 조사하거나, 아미노산이 전구체로 이용되는 경우 아미노산 유도체에 대한 저항성 균주 탐색, catabolite repression이 관찰되는 경우 2-deoxy sugar와 같은 탄수화물 유도체의 저항성 균주 탐색, 항생제 내성균주탐색 등의 방법으로 많은 고생산균주가 얻어졌고 산업적으로 사용되고 있다(Table 2).

유전자조작기술이 발달함에 따라, 구조유전자나 저항성 유전자, 조절유전자의 유전자 copy 수를 증가시켜주는 방법으로 균주개량 방법도 변화되고 있다. 지금까지 수집중에 달하는 이차대사 생산 유전자가 클로닝 되었고, 그 결과 모든 이차대사 생합성 유전자는 염색체 DNA 또는 plasmid DNA에 유전자군의 cluster를 이루고 존재하고 있음을 알게 되었다. 다행히 생합성 유전자군내에는 생합성하는 이차대사물에 대한 저항성유전자와 생합성을 활성화 또는 억제시킬수 있는 조절유전자가 존재하고 있는 것이 일반적인 사실이다. 이러한 경우 유전자 조작기술로 억제유전자의 기능을 잃게하는 방법이나, 활성화 유전자의 기능을 강화시키는 방법으로 수집배에 달하는 항생제 생산능의 향상을 이루는 보고도 있다(7,21,44). 그러나 실제 생체내에서의 조절기구는 한두개의 조절유전자로만 구성되어 있는 것이 아니고, 수십가지의 조절인자들이 관여하는 것으로 밝혀지고 있어 앞으로 이에 관한 연구결과에 귀추가 주목된다(Fig. 3).

최근에 들어서 발달된 DNA 재조합기술은 생명현상의 분자 생물학 및 생화학적 연구를 보다 근본적으로 가능하게 하여, 지금까지 이해할 수 없었던 많은 생체 내에서의 화학반응들을 명확히 이해할 수 있도록 하였다(19,20). 따라서 20 내지 30 단계 이상의 긴 생합성 경로를 거쳐 합성되는 많은 2차 대사산물의 생합성과정이 유전학적 및 생화학적으로 자세히 밝혀지고 있다. 즉, 상당수의 2차대사 생합성 관련 유전자가 클로닝 되어 그들의 기능들이 밝혀지고 있고, 이들이 코드하는 효소들의 역할이 생합성 과정에서 밝혀지면서, 이와 같은 2차대사산물의 생합성 관련 유전자 또는 효소를 이용한 새로운 2차대사산물을 창출하려는 시도가 이루어지고 있다. 그 예로 Hopwood 등이 actinorhodin 생합성 유전자를 유사한 항생물질을 생산하는 균주에 도입시켜 새로운 hybrid 항생물질인 mederrhodin과 dihydrogranatirhodin 생산을 처음으로 보고하였다(21). 최근에는 항생물질 생합성의 초기 단계, 즉 항생물질의 기본골격이 만들어지는 단계에서 유전자에 변화를 일으켜 새로운 구조의 물질을 얻으려는 시도가 활발하게 진행되고 있다. 이 연구는 천연물질 중에서 구조적으로 변화가 많으며 동시에 다양한 생리활성을 갖는 식물이나 미생물에서 얻어지는 polyketide, macrolide, peptide, aminoglycoside, β -lactam 계열의 항생제, mycotoxin, 색소, 향미성분 등의 생합성 초기 단계에 관여하는 유전자 및 후기의 수식효소를 코드하는 유전자를 대상으로 하고 있다. 특히 polyketide synthase에 의한 특이한 축합 program은 최근의 활발한 연구에 힘입어, 몇개의 복잡한 open reading frame으로 알려진 각각의 구성 단편들이 밝혀지고 있고, 이들이 생성하는 단백질은 ketoacyl synthase, acyl carrier protein, oxidoreductase, acyltransferase 등의 기능을 수행함이 밝혀 졌다. 실제로 이들이 매개하는 polyketide 생합성 과정은 지방산의 생합성 과정과 유사하지만 매 합성단계마다 특이한 수식반응을 갖음으로 해서 아주 다양한 종류의 화합물의 생합성이 가능한 것으로 밝혀져 있다(42). 따라서 이와 관련된 유전자를 조작하면 carbon chain의 길이와 side chain의 치환기 등을 변화시킬 수 있고, 그리하여 기본골격이 다른 새로운 항생제의 생합성을 유도할 수 있을 것이다(43). Peptide 항생제의 경우도 리보솜을 이용하여 합성되는 경우나 효소에 의하여 합성되는 경우에 관계없이, 유전자의 적절한 조합으로 새로운 아미노산으로 치환된 항생물질의 개발이 무궁무진한 조합으로 전개될 전망에 있다. 이와같은 생각에 기초하여 많은 종류의 항생물질 생합성 유전자를 연구 응용하면, 기존의 무작위한 방법의 천연물질 screening 방법에 비하여 보다 예측 가능한 효능을 갖는 hybrid형 항생물질의 개발이 가능할 것으로 사료 된다(14,17).

또한 방선균은 한가지의 항생물질만을 생산하지 않고, 한종에서 다종의 항생물질 생합성이 일어나고 있으며 아주 특수한 조건에서만 합성되는 항생물질도 존재한다. 즉, 방선균내에는

평상시에는 잘 발현하지 않는 silent 유전자들이 다수 존재하고 있고, 적절한 조건으로 이들의 기능을 깨워줄 수만 있다면 새로운 항생제의 생산 유도가 가능할 것으로 생각 된다. 기타, 기능을 알고 있는 유전자를 이용하여 특이 합성과정을 억제하는 방법으로 새로운 항생제의 개발이 가능할 것이며 (mutational biosynthesis), protoplast fusion등의 방법으로 한 균주에서 합성된 중간체를 다른 균주가 생산한 새로운 효소와 반응시키는 방법으로 많은 종류의 유용한 새로운 이차대사산물의 생산이 가능하게 될 전망이다(8).

이러한 항생물질 생산균의 분자유전학적 연구는 항생물질 생산성 증대에 이용될 수 있을 뿐만 아니라, 새로운 기능의 유전자를 도입해 주거나, 특정 유전자의 발현을 차단해 줌으로써 항생물질의 기본골격을 변형시킬 수 있는 방법을 제공해주고, 결국에는 유전자의 기능을 이용하여 인공적으로 설계한 구조의 화합물 합성에까지 응용될수 있을 것이다(Table 2). 이러한 점에서 볼때, 방선균의 분자 유전학적인 연구는 토양미생물로부터 신규 생리활성물질을 탐색하는 일과 함께 미래의 생리활성물질 창출연구에 매우 중요한 분야를 점유하게 될 것으로 사료된다.

참고문헌

- Behal, V., Neuzil, J. and Z. Hostalek, 1983. Effects of tetracycline derivatives and some cations on the activity of anhydrotetracycline oxygenase. *Biotechnol. Lett.* **5**, 537-542.
- Beppu, T. and S. Horinouchi, 1991. Molecular mechanisms of the A-factor-dependent control of secondary metabolism in *Streptomyces*. *Planta Medica* **57**, S44-S47.
- Bibb, M. J., P. R. Findlay and M. W. Johnson, 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein coding sequences. *Gene* **30**, 157-166.
- Brana, A. F., Wolfe, S. and A. L. Demain, 1986. Relationship between nitrogen assimilation and cephalosporin synthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Arch. Microbiol.* **146**, 46-51.
- Buttner, M. J., A. M. Smith, L. Servin-Gonzalez and M. J. Bibb, 1988. RNA polymerase heterogeneity and the agarase gene (*dagA*) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). In: *Biology of Actinomycetes '88* (eds. Okami, Y., Beppu, T., Ogawara, H.), pp41-46, Japan Sci. Soc. Press, Tokyo.
- Castro, J. M., Liras, P., Cortes, J. and J. F. Martin, 1985. Regulation of α -aminoadipylcysteinyl-valine, isopenicilline synthetase, isopenicilline N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in *Streptomyces lactamdurans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 32-40.
- Charter, K. F., 1990. The improving prospects for yield increase by genetic engineering in antibiotic producing *Strep-*

- tomyces*. *Biotechnology* **8**, 115-121.
8. Charter, K. F. and C. J. Bruton, 1983. Mutational cloning in *Streptomyces* and the isolation of antibiotic genes. *Gene* **26**, 67-78.
 9. Charter, K. F. and C. J. Bruton, 1985. Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. *EMBO J.* **4**, 1893-1897.
 10. Columbo, A. L., Crespi-Perellino, N, and S. Micalizio, 1982. Relationship between growth, cyclic AMP and tylosin production in two mutants of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol. Lett.* **4**, 747-752.
 11. Cortes, J., Liras, P., Castro, J. M. and J. F. Martin, 1986. Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* is exerted on the formation of α -aminoadipyl-cysteinyl-valine and deacetoxycephalosporine C synthase. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 1805-1814.
 12. Grafe, U., W. Schade, I. Eritt, W. F. Freck and L. Radics, 1982. A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiot.* **35**, 1722-1723.
 13. Hara, O., and T. Beppu, 1982. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus* - the role of A-factor. *J. Antibiot.* **35**, 349-358.
 14. Hwang, C. K., Y.-S. Hong, S.-K. Hong, Y. S. Kim and J. J. Lee, 1995. Expression of *Streptomyces peucetius* genes for doxorubicin resistance and aklavinone 11-hydroxylase in *Streptomyces galilaeus* ATCC 31133 ; production of a hybrid aclacinomycin. *Antimicrob. Agents and Chemo.* **39**, 1616-1620.
 15. Hong, S.-K., A. Matsumoto, S. Horinouchi and T. Beppu, 1993. Effects of protein kinase inhibitors on in vitro protein phosphorylation and cellular differentiation of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* **236**, 347-354.
 16. Hong, S.-K., M. Kito, T. Beppu and S. Horinouchi, 1991. Phosphorylation of the AfsR product, a global regulatory protein for secondary-metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* **173**, 2311-2318.
 17. Hong, Y.-S., C. K. Hwang, S.-K. Hong, Y. H. Kim and J. J. Lee, 1994. Molecular cloning and characterization of the aklavinone 11-hydroxylase gene of *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952. *J. Bacteriol.* **176**, 7096-7101.
 18. Hopwood, D. A., 1967. Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol. Rev.* **31**, 373-403.
 19. Hopwood, D. A., M. J. Bibb, C. J. Bruton, K. F. Charter, J. S. Feitelson and J. A. Gil, 1983. Cloning of *Streptomyces* genes for antibiotic production. *Trends in Biotechnol.* **1**, 42-48.
 20. Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Charter, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward and H. Schrempf, 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces* : A laboratory manual, John Innes Foundation, Norwich.
 21. Hopwood, D. A., F. Malpartida, H. M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. M. Rudd, H. G. Floss and S. Omura, 1985. Production of "hybrid" antibiotics by genetic engineering. *Nature* **314**, 642-644.
 22. Horinouchi, S. and T. Beppu, 1992. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 377-398.
 23. Horinouchi, S. and T. Beppu, 1992. Regulation of secondary metabolism and cell differentiation in *Streptomyces* : A-factor as a microbial hormone and the AfsR protein as a component of a two-component regulatory system. *Gene* **115**, 167-172.
 24. Horinouchi, S., M. Kito, M. Nishiyama, K. Furuya, S.-K. Hong, K. Miyake and T. Beppu, 1984. Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **95**, 49-56.
 25. Horinouchi, S., H. Suzuki, M. Nishiyama and T. Beppu, 1989. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (*afsA*) responsible for A-factor biosynthesis. *J. Bacteriol.* **171**, 1206-1210.
 26. Jones, G. H. 1985. Regulation of phenoxazinone synthase expression in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **163**, 1215-1221.
 27. Jones, A. and D. W. S. Westlake, 1974. Regulation of chloramphenicol synthesis in *Streptomyces* sp. 3022a. *Can. J. Microbiol.* **20**, 1599-1611.
 28. Khokhlov, A. S., I. I. Tovarova, L. N. Borisova, S. A. Pliner, L. A. Shenchenko, E. Y. Korniskaya, N. S. Ivkina and I. A. Rapoport, 1967. The A-factor which causes the biosynthesis of streptomycin in a mutant strain of *Actinomyces streptomycini*. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **177**, 232-235.
 29. Kieser, H. M., T. Kieser and D. A. Hopwood, 1992. A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.* **174**, 5496-5507.
 30. Kumaravel, S. and K. Dharmalingam, 1994. Structural organization, amplification, deletion and rearrangements of DNA sequences associated with an unstable region of the chromosome of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Indian J. Biochem. Biophys.* **31**, 280-287.
 31. Lawlor, E. J., H. A. Baylis and K. F. Charter, 1987. Pleiotropic morphological and antibiotic deficiencies result from mutations in a gene encoding a tRNA-like product in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Genes Dev.* **1**, 1305-1310.
 32. Leblond, P. and B. Decaris, 1994. New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **123**, 225-232.
 33. Lezhava, A., T. Mizukami, T. Kajitani, D. Kameoka, M. Redenbach, H. Shinkawa, O. Nimi & H. Kinashi, 1995. Physical map of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**, 6492-6498
 34. Lin, Y. S., H. M. Kieser, D. A. Hopwood and C. W. Chen, 1993. The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol. Microbiol.* **10**, 923-933.

35. Martin, J. F. 1983. Polyenes. In: *Biochemistry and Genetic Regulation of commercially Important Antibiotics* (L. C. Vining, ed.), pp. 207-229. Addison Wesley, Reading, Massachusetts.
36. Martin, J. F. and A. L. Demain, 1976. Control by phosphate of candicidin production. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **71**, 1103-1109.
37. Masuma, R., Tanaka, Y. and S. Omura, 1983. Ammonium ion-depressed fermentation of tylosin by the use of a natural zeolite and significance in the study on the biosynthetic regulation of the antibiotic. *J. Ferment. Technol.* **61**, 607-614.
38. Netolitzky, D. J., X. Wu, S. E. Jensen and K. L. Roy. 1995. Giant linear plasmids of beta-lactam antibiotic producing *Streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**, 27-34.
39. Omura, S., Tanaka, Y., Mamada, H. and R. Masuma, 1984. Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids on the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot.* **37**, 494-502.
40. Piepersberg, W., 1993. Streptomycetes and corynebacteria. In "Biotechnology, volume I" (eds Rehm, H.-J. and G. Reed) pp433-468, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Germany.
41. Satoh, A., Ogawa, H. and Y. Satomura, 1975. Role and regulation mechanism of kanamycin acetyltransferase in kanamycin biosynthesis. *Agricul. Biol. Chem.* **39**, 2331-2336.
42. Shen, B. and C. R. Hutchinson, 1993. Enzymatic synthesis of a bacterial polyketide from acetyl and malonyl coenzyme A. *Science* **262**, 1535-1540.
43. Strohl, W. R., P. L. Bartel, Y. Li, N. C. Connors and R. H. Woodman, 1991. Expression of polyketide biosynthesis and regulatory genes in heterologous *Streptomyces*. *J. Ind. Microbiol.* **7**, 163-174.
44. Stutzman-Engwall, K. J., S. L. Otten and C. R. Hutchinson, 1992. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol.* **174**, 144-154.
45. Troost, T., Hitchcock, M. J. M. and E. Katz, 1980. Distinct kynureninase and hydroxykynureninase enzymes in an actinomycin-producing strain of *Streptomyces parvulus*. *Biochim. Biophys. Acta* **612**, 97-106.
46. Ueda, K., K. Miyake, S. Horinouchi and T. Beppu, 1993. A gene cluster involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces griseus* encodes proteins similar to the response regulators of two-component regulatory systems and membrane translocators. *J. Bacteriol.* **175**, 2006-2016, 1993.
47. Vujaklija, D., K. Ueda, S.-K. Hong, T. Beppu and S. Horinouchi, 1991. Identification of an A-factor-dependent promoter in the streptomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces griseus*. *Mol. Gen. Genet.* **229**, 119-128.
48. Walker, M. S. and J. B. Walker, 1971. Streptomycin biosynthesis. Separation and substrate specificities of phosphatases acting on guanidino-deoxy-scylo-inositol phosphate and streptomycin(streptidino) phosphate. *J. Biochem. Chem.* **246**, 7034-7040.
49. Westpheling, J., M. Ranes and R. Losick, 1985. RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor*. *Nature* **313**, 22-27.
50. 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.
51. Zahner, H. and R. Kurth, 1982. Overproduction of microbial metabolites-the supply of precursors from the intermediary metabolism. In: *Overproduction of Microbial Products* (V. Krumphanzl, B. Sikyta and Z. Vanek, eds.), pp. 167-179. Academic Press, London.