

Virginiamycin 생산유도에 관여하는 Virginiae Butanolide C(VB-C) 및 Receptor의 상관관계

김현수* · 현지숙 · 유대식
계명대학교 자연과학대학 생물학과

The Relationship between Virginiae Butanolide C(VB-C) and Receptor in Virginiamycin Production.
Hyun-Soo Kim, Ji-Sook Hyun and Tae-Shick Yu. Department of Biology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea – Virginiae butanolide C(VB-C) is one of the butyrolactone autoregulators, which triggers the production of virginiamycin in *Streptomyces virginiae*. To further understand the mechanism of virginiamycin induction, we isolated three mutants from *S. virginiae* by *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) treatment. The characteristics of the three mutants were confirmed as follows: the mutant No.1 delayed the production of the VB-C, receptor and antibiotics; the mutant No.3 hyperproduced receptor; the mutant No.4 failed to produce the VB-C. The addition of synthetic VB-C couldn't induce the production of antibiotics in the mutant No.1 due to delayed production of receptor, could provoke the production of larger amount of antibiotics than parental wild type strain in the mutant No.3 due to the presence of large amount of receptor, and could induce production of very small amount of antibiotics in the mutant No.4 due to the absence of VB-C. Antimicrobial spectrum and HPLC analysis of the mutant No.1 and No.3 suggested that the VB-C might have a specific ability to induce the production of virginiamycin M and S. These results imply that the VB-C has an ability to trigger the production of virginiamycin under receptor existence in *S. virginiae*.

방선균에 있어서 기중균사, 포자형성 등의 형태분화(morphological differentiation)와 항생물질, 생리활성물질, 색소 등 2차 대사산물 생산의 생리적 분화(physiological differentiation)를 조절하는 자기조절인자(autoregulator)가 알려져 있다. 이들 인자는 다면형질 발현성(pleiotropic)이며 이들에 대해서 *Streptomyces*속 방선균을 중심으로 하여 수많은 연구가 수행되어 있다. 그 중 A-factor(1), factor I(2), virginiae butanolide(VB)(3) 등 γ -butyrolactone환을 가지는 인자를 비롯하여 수종이 이미 그 구조가 밝혀져 있으며, 근년에 들어 이들의 분자 수준에서의 연구가 진행됨에 따라 그 기능이 하나씩 밝혀지고 있다(4-6). 이들 자기조절인자는 배양액 중 미량으로 존재하며 수 ng/ml의 극히 저농도에서 기능을 발휘하는 점에서 원핵생물의 호르몬으로 간주되고 있다. *S. virginiae*가 생산하는 자기조절인자인 VB는 virginiamycin(이하 VM으로 표기함) 생산을 유도하는 것으로 알려져 있으며(3, 4) 최근 *S. antibioticus*로부터 새로운 VM 생산 유도인자로서 NFX-1,2,3,4(7) 및 *Streptomyces* sp. FRI-5로부터 청색색소유도인자로서 IM-2(8)가 분리, 정제되어 다양한 자기조절인자의 존재 및 기능이 예상되고 있다. 이들 유도인자의 신호 전달과 관련하여 항생물질 생합성 mechanism 연구의 일환으로 VB의 신호 전달에 관여하는 VB receptor의 존재가 밝혀졌으며(9, 10), A-factor에

있어서도 A-factor receptor의 존재가 확인되어 repressor로서의 기능이 추정되고 있다(11). 또한 VB의 신호 전달기구의 시사(12, 13) 및 VB receptor 유전자인 *vbr* A가 cloning되어(14) 이들 미생물 호르몬의 연구가 활발히 진행되고 있다. 이들 유도인자의 응용면으로서 최근 Hashimoto 등(15)은 항생물질 D-cycloserine 생산균인 *Streptomyces* sp. FRI-5로부터 분리한 청색색소 유도인자인 IM-2가 cycloserine 생산을 억제하는 반면 minimycin, showdomycin 등 nucleoside계 항생물질 생산을 동시에 유도한다는 괄목할 만한 사실을 보고하였으며, 김 등(16)은 lysocellin 생산균인 *S. longwoodensis*로부터 VB-C에 의한 lysocellin을 비롯한 다른 항생물질 및 색소의 유도기능이 시사되었다. 그러나 VM 생산유도에 있어서 VB-C 및 VB-C 신호 전달에 관여한다고 예상되는 receptor의 기능은 아직 규명되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 *S. virginiae*로부터 VM 생산 유도능 결손 변이주, VB-C 결손 변이주 등을 분리하여 virginiamycin 생산유도에 관여하는 VB-C 및 receptor의 역할을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 전배양균의 조제

본 실험에 사용한 공시균주는 Yanagimoto 등(17)의 *Streptomyces virginiae* MAFF 10-06014를 사용하였으며, 전배양 및 항생물질 생산배지로서는 BYGN 배지, 즉, 배

*Corresponding author.

Key words: Virginiae butanolide C(VB-C), virginiamycin, VB-C receptor, autoregulator, *Streptomyces virginiae*

지 1/당 bacto-casitone 7.5 g(Difco Co.), yeast extract 7.5 g, glycerol 15 g, NaCl 2.5 g, pH 6.5를 사용하였다. VM 생산 검정균으로서는 *Bacillus subtilis* PCI 219를 사용하였으며, 검정균의 생육배지로서는 polypeptone 0.5% (Difco Co.), meat extract 0.3%(Difco Co.), agar 1.5% 되게 첨가하여 사용하였다. 공시균 및 변이주의 전배양은 oat meal 평판배지에서 28°C, 7~10일간 생육시킨 colony로부터 제조한 spore 용액을 BYGN 배지 25 ml에 일정량(≈ 5×10^6 spores) 접종하여 28°C, 120 rpm에서 36~48시간 배양한 균체를 -70°C에서 보존하여 전배양균으로 사용하였다.

변이주의 분리

*S. virginiae*로부터 각종 변이주의 분리는 Hopwood 등 (18)의 방법에 따라 수행하였다. 즉, *S. virginiae* spore 용액 1 ml를 원심분리(12,000×g, 10분)한 후 침전에 0.05 M Tris-malate buffer(pH 9.0) 1 ml를 첨가하여 현탁한 용액에 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine(NTG) 5 mg을 첨가, 용해시켜 실온에서 1시간 처리하였다. 다음 원심분리하여 상등액을 제거하고 20% glycerol 1 ml를 첨가하여 10^6 배까지 희석한 다음 oat meal 평판배지상에 $10 \mu\text{l}$ 씩 도말하여 28°C에서 5일간 배양하였다. 생성된 colony를 임의로 선별하여 BYGN 평판배지에 접종하여 2일간 배양한 다음 검정균 *B. subtilis* PCI 219가 함유된 배지를 증충하여 37°C에서 15시간 배양후 항생물질 생산을 확인하였다.

VB-C 및 VB-C receptor의 조제

본 실험에 사용된 합성 VB-C는 김 등(9)이 조제한 VB-C₆(2위 측쇄 탄소수 6개, ethanol에 용해)를 사용하였으며, parent주 및 각종 변이주가 생산하는 천연형 VB류는 김 등(18)의 방법에 따라 조제하였다. 즉, BYGN 배지 25 ml에 전배양균을 3% 접종하여 28°C, 120 rpm에서 배양한 후 각 배양시간에 따른 배양상등액 20 ml를 염산산성(pH 2~3)에서 2배량의 ethylacetate로 추출하여 Na₂SO₄로 탈수하고 진공농축 후 BYGN 배지 1 ml에 용해시켜 천연형 VB-C 용액으로 사용하였다.

VB-C receptor는 김 등(10)의 방법에 따라 조제하였다. 즉, 각 배양시간에 따라 배양한 균체 약 1 g을 0.5M KCl, 5 mM dithiothreitol이 함유된 0.05M triethanolamine-HCl buffer(TEA buffer, pH 7.0) 20 ml에 현탁하여 sonicator로 2분간 파쇄후 원심분리(12,000×g, 20분)하고 그 상등액을 30~50% 포화되게 (NH₄)₂SO₄로 침전시켜 투석한 다음 조단백질 용액으로 사용하였다.

VB-C의 VM 유도 활성 측정

VB-C의 VM생산촉진능은 김 등(9)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, *S. virginiae* 및 변이주의 전배양(-70°C 보존)균을 멸균한 BYGN 배지로 세척한 후 2 ml($\phi 16 \times$

165 mm test tube 사용), 혹은 25 ml(100 ml Erlenmeyer flask 사용) BYGN 배지에 3% 되게 접종하여 120 rpm, 28°C에서 배양하였다. VB-C의 첨가는, 합성 VB-C의 경우 본배양 0시간 및 5시간 후에 100 ng/ml를, 천연형 VB-C의 경우 본배양 5시간 후에 500 μl 를 각각 첨가하여 배양 8시간부터 2시간 간격으로 1 ml(25 ml 배양) 혹은 2 ml(2 ml 배양)씩 sampling 하였다. 각 배양액의 VM 생산은 검정균 *B. subtilis* PCI 219가 함유된 평판배지에서 cup 법에 의해 생성된 clear zone으로 확인하였다.

VB-C receptor 결합 활성 측정

상기 조제된 receptor protein을 protein assay kit(Bio-rad Co.)로 정량하여 100 μg 의 조단백질 용액에 0.5M KCl 및 5 mM dithiothreitol이 함유된 0.05M TEA buffer를 첨가하여 100 μl 로 조정된 다음, 최종농도 0.125 mM(3 μl 첨가)되게 cold VB-C(non-labeled)를 첨가 및 미첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 다음에 최종농도가 69.6 nM(2 μl 첨가)되게 [³H]VB-C₇(54.6 Ci/mmol)을 첨가하여 동일 조건하에서 반응시킨 다음, 80% 포화 (NH₄)₂SO₄ 용액 900 μl 를 넣어 20분간 실온에서 방치후, 15,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 이때 생긴 침전 (protein-ligand complex)을 동포화용액 1 ml로 1회 세척하고 100 μl 의 H₂O에 용해시켜 10 ml의 toluene 용액[toluene 100 g/l, Triton X-100(polyethylene glycol mono-n-octylphenyl ether, Nakarai Co.) 500 g/l, Omnifluor (Dupont Co.) 4 g/l]에 첨가하여 scintillation counting (Beckman LS 7500)하였다. [³H]VB-C₇에 대한 특이적인 결합은 cold VB-C의 첨가 및 미첨가의 차이로써 산출하였다.

항균 spectrum의 분석

본배양 6시간째에 100 ng/ml의 VB-C를 첨가 및 미첨가한 parent균 및 변이주를 배양시간에 따라 sampling 하여 배양상등액중 생성된 항생물질에 대한 항균 spectrum을 검토하였다. 항균력은 paper disk법($\phi 8$ mm, Advantec Co.)을 사용하여 clear zone으로 확인하였다. 사용된 검정균들은 Table 7에 나타난 Gram(+), Gram(-) 및 효모 등을 사용하였으며, 생육배지로는 세균의 경우 Luria Broth(LB) 배지를, 그리고 yeast의 경우 Sabouraud 배지를 사용하였다.

HPLC에 의한 VM-M, S의 분석

Parent균 및 변이주를 배양하여 항생물질이 생산되는 시기(parent균 ; 20시간 배양, mutant No.1 ; 44시간 배양, mutant No.3 ; 22시간 배양)의 배양상등액 각각 5 ml를 SEP-PAK cartridge(C₁₈, Water Co.)에 흡착시켜 각각 3 ml의 50% 및 100% methanol로 용출시켰다. 그 중 항균력을 가지는획분(100% MeOH 용출획분)을 농축한 후 methanol 50 μl 에 용해시켜 역상 HPLC(Shima-

dzu LC-10AD, Shimadzu Shimpak column, CH₃CN : H₂O = 6 : 4, 0.1% trifluoroacetic acid, UV 305 nm)하여 검출된 각 peak를 분취한 후, 농축하여 *B. subtilis* PCI 219에 대한 항균력을 paper disk법으로 조사하였다.

결과 및 고찰

VB-C 유도활성 측정법의 검토(VB-C bioassay)

VB-C의 유도 활성 측정은 Yanagimoto 등(17) 및 김 등(9)의 방법이 특이적인 assay법으로서 사용되어 왔으나, 이들 방법은 생육배지의 교환 등 복잡하며, 배양시간이 13시간 이상 소요되는 점에서 보다 간편한 assay법을 검토하였다. Table 1에서 보인 바와 같이 직접 2 ml 및 25 ml 배지에 본배양을 수행하여 VB-C를 본배양 5 시간째에 첨가함으로써 유도능을 확인한 결과(0시간 첨가시는 VM 생산 억제, 결과 미계제), 미첨가시에 비해 2 ml 배양의 경우 본배양 16시간째 VM 생산이 유도되었으며 25 ml 배양시 본배양 8시간째 유도능을 나타내었다. 각 배양계의 유도시기의 차이는 통기량에 기인한다고 사료되며, 따라서 이후의 VB-C assay는 25 ml계를 사용하였다.

각종 변이주의 분리

VM 생산유도에 관여하는 VB-C 및 receptor의 기능을 규명하기 위해 VB-C 결손 변이주, receptor 결손 변이주 등의 각종 변이주의 분리가 요구된다. A-factor의 경우, Hara 등(19)은 *S. griseus*로부터 UV, 고온(37°C), acrydine orange 처리 등에 의해 A-factor 결손 변이주를 분리하였으며, *S. virginiae*의 경우 지난 수년간 Virgie 등(20)이 UV 및 NTG 처리에 의한 VM 및 VB-C 결손 변이주를 분리하였으나 대개가 복귀되었으며, 본 연구자에 의해

37°C 처리, UV 처리, acrydine orange 처리, ethidium bromide 처리, NTG 처리(pH 8.0) 등을 통하여 분리된 변이주도 거의 복귀되었다. 따라서 본 연구에서는 pH 9.0 하에서 NTG 처리를 하여 생성된 colony중 다수의 항생물질 결손 변이주가 분리되었으나 연구 내용상 유도능의 지표가 항생물질 생산이므로 항생물질 결손 변이주로서는 유도능의 검토가 불가능하였다. 그러므로 항생물질 생산능을 소유한 colony를 대상으로 하여 검토하였으며 그 결과 유도능의 결손, receptor의 대량생산, VB-C 결손 변이주 등 3주를 취득하여 계대배양 등을 통해 미복귀 상태임을 확인하였고, 본 실험에 사용하였다.

***S. virginiae*(parent) 및 변이주의 virginiamycin 생산**

위에서 언급한 바와 같이 NTG 처리(pH 9.0)후 예비 실험을 통하여(결과 미계제) 분리한 3가지 변이주 및 parent균을 생육배지 25 ml를 사용한 액체 배양에서 배양 8시간부터 48시간까지의 항생물질 생산능을 조사하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 parent균이 본배양 12시간 경과 후부터 VM을 생산하는 것과 비교하여 mutant No.3은 parent균과 유사한 생산시기를 보인 반면, No.1의 경우에는 생산시기가 4시간, No.4는 22시간 정도 늦어지는 결과를 나타내었다.

Parent주 및 변이주의 VB-C 생산

김 등(9, 10)은 *S. virginiae*의 70 ml(500 ml Erlenmeyer flask 사용) 배양에서 receptor, VB-C, VM 생산의 순으로 일어난다고 보고하였다. 따라서 25 ml 배양에서 parent주와 분리한 mutants의 VB-C 생산능을 조사하기 위해, 본배양 8시간부터 34시간까지 배양한 배양액으로부터 각각의 천연형 VB-C를 시간별로 제조하였다. 각 제조액 중의 VB-C 존재 유무를 확인하기 위해 5시간 본배양시킨 *S. virginiae*에 이들 천연형 VB-C 500 µl를 첨가하여 8시간 배양한 후 VM 생산 촉진을 확인한 결과, Table 3에서 보인 바와 같이 parent균은 항생물질 생산 전인

Table 1. Inducing activity of the VB-C on 2 ml and 25 ml culture system from *Streptomyces virginiae*

Incubation time (hour)	2 ml culture		25 ml culture	
	-VB-C	+VB-C	-VB-C	+VB-C
	Inhibitory zone (φ, mm)			
6	-	-	-	-
8	-	-	-	10
10	-	-	-	11
12	-	-	-	12
14	-	-	10	15
16	-	14	14	16
18	-	14	15	15
20	14	15	17	17

Cultivation was performed on a reciprocating shaker (120 strokes per min) at 28°C. 100 ng/ml of synthetic VB-C (1 mg/ml-EtOH) was added at cultivation time of 5 hours.

Table 2. Time course of the virginiamycin production in *S. virginiae* (parent) and mutants

Strains	Virginiamycin production time (hour)										
	8	10	12	14	16	20	26	32	34	36	48
	Inhibitory zone (φ, mm)										
Parent	-	-	10	13	16	16	16	16	16	16	16
Mutant											
No.1	-	-	-	-	10	13	13	13	13	15	16
No.3	-	9	10	12	13	13	15	15	13	12	12
No.4	-	-	-	-	-	-	-	-	9	10	10

Cultivation was performed with a 25 ml portion of medium in a 100 ml Erlenmeyer flask on a reciprocating shaker (120 strokes per min) at 28°C.

Table 3. Time course of the VB-C production in *S. virginiae* (parent) and mutants

Strains	VB-C production time (hour)									
	8	10	12	14	16	18	20	24	28	34
Parent	-	+ ^a	+	+	+	+	+	+	+	·
Mutant										
No.1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	·
No.3	-	±	+	+	+	+	+	+	+	·
No.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Natural VB-C was prepared from 20 ml of each culture broth as described in Materials and Methods. 500 µl of prepared VB-C was added at cultivation time of 5 hours and the production of antibiotics was detected at cultivation time of 8 hours. Culture conditions were almost identical as described in Table 2.

^a +; diameter of inhibitory zone is above 12 mm.

배양 10시간째부터 VB-C 생산이 확인되었으며, 이는 Yagimoto 등(17)의 70 ml 배양에서 12시간째부터 VB-C를 생산한다는 보고에 비해 생산시기가 2시간 정도 빠른 양상을 보였다. 한편 mutant의 경우 No.1 및 No.3주는 각각 16시간, 10시간째부터 VB-C를 생산하였으며, No.4주는 34시간까지 생산되지 않은 결과로부터 VB-C 결손 변이주로 판정되었다. 또한 Table 2의 항생물질 생산시기와 비교할 때, VB-C 생산 후 VM 생산이 개시되는 parent주의 결과(9, 17)와는 달리 mutant No.1, 3은 VB-C가 VM과 거의 비슷한 시기에 생산되며, No.4의 경우는 VB-C 결손에 의해 항생물질 생산량의 감소 및 생산시기의 지연이 일어난다고 사료되었다.

Parent주 및 변이주의 receptor 생산

VB-C의 신호전달에 관여한다고 예상되는(9, 10) receptor의 생산유무를 배지 25 ml에서 배양한 균체를 사용하여 tritium label한 [³H]VB-C₇(9)로써 확인하였다. Fig. 1에서 보인 바와 같이 배양시간에 따른 receptor의 생산은 parent균의 경우 김 등(9)의 보고와 같이 배양 10시간 이전부터 미량의 receptor가 생산된다고 사료되었으며, mutant No.1, 4는 생산시기가 아주 늦은 배양 16시간 경과시에 소량의 receptor가 검출되기 시작하였고, No.3의 경우, parent균에 비해 receptor 생산시기는 비슷하지만 2배 이상 많은 양의 receptor가 생산되는 결과를 나타내었다.

VB-C에 의한 변이주의 항생물질 유도능

VB-C의 기능은 VM생산에 직접 관여하는 기능이 아닌, VM 생산을 촉진하는 유도기능을 가진다고 추정되고 있다(17). 따라서 위의 결과에서 보인 변이주의 특성으로부터 VM 생산촉진에 관여하는 인자를 규명하기 위해 분리 변이주의 VB-C에 의한 항생물질 유도능을 검토하

Table 4. Induction of virginiamycin production by synthetic VB-C in various mutants

A: Mutant No.1

VB-C addition (100 ng/ml)	Virginiamycin production time (hour)						
	12	16	20	24	28	36	48
	Inhibitory zone (φ, mm)						
+	-	-	-	-	-	±	±
-	-	±	13	12	13	15	16

B: Mutant No.3

VB-C addition (100 ng/ml)	Virginiamycin production time (hour)									
	8	10	12	14	16	18	20	22	24	36
	Inhibitory zone (φ, mm)									
+	14	16	14	13	12	11	11	11	11	11
-	-	-	12	12	12	13	13	13	15	12

C: Mutant No.4

VB-C addition (100 ng/ml)	Virginiamycin production time (hour)										
	26	28	30	32	34	36	40	42	44	46	48
	Inhibitory zone (φ, mm)										
+	-	±	10	11	10	10	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	±	10	11	11	10	10	10

VB-C was added at cultivation time of 6 hours (A and B) and 24 hours (C).

였다. VB-C 첨가 시기는, mutant No.1, 3주의 경우 VB-C가 생산되기 전인 본배양 6시간째에 합성 VB-C(100 ng/ml)를 첨가하였으며, parent균에 비해 receptor 생산시기가 늦고 cell내 VB-C가 생산되지 않는 mutant No.4의 경우 receptor가 생산되기 전인 본배양 12시간 이전에 합성 VB-C 첨가시 VM 생성이 저해되므로(결과 미제) receptor가 생산된 24시간째에 첨가하였다. Table 4에서 나타낸 바와 같이, VB-C 생산시기와 VB-C receptor 생산시기가 parent균과 유사한 mutant No.3의 경우, VM 생성이 4시간 촉진되었으며, 유도 초기의 항생물질의 양이 parent균(Table 1 참조)보다 약간 증가한 것은 생산된 receptor의 양이 parent균보다 많은 결과라고 사료되었다. VB-C의 VM 생산 촉진기능과 관련하여, cell 내에서 VB-C 생산 결손에 따른 항생물질 생산량이 미량이며 생산시기가 매우 늦으나(Table 2, 3) 본배양 24시간째 VB-C 첨가에 의해 항생물질 생산이 촉진된 mutant No.4의 결과(Table 4)와, VB-C 생산시기가 늦은 만큼 항생물질 생산이 지연된 mutant No.1의 결과(Table 2, 3)로부터 VB-C는 VM 생산유무와는 무관하며 VM 생

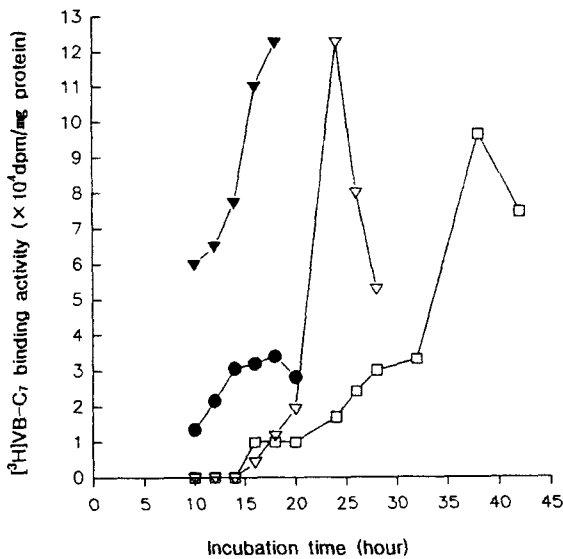


Fig. 1. $[^3\text{H}]$ VB-C₇ binding activity of cell-free extract from *S. virginiae* (parent) and mutants
 Each cell (1 g wet mycelia) was disrupted by sonicator for 1 min 2 times at 4°C, and the crude protein solution prepared by 30~50% saturation of solid ammonium sulfate was used. Each 100 μg of the crude protein was assayed for $[^3\text{H}]$ VB-C₇ binding activity described in Materials and Methods.
 ●: parent strain, ▽: mutant No.1, ▼: mutant No.3, □: mutant No.4.

산을 촉진하는 trigger로서 작용한다고 사료되었다. 한편, receptor의 기능과 관련하여, mutant No.1의 경우, receptor가 생산되기 전 VB-C 첨가에 의한 항생물질 생산 유도능은 보이지 않고 오히려 생산 저해를 보였으며, 이는 Yanagimoto 등(17)이 보고한 배양초기(본배양 4시간 이전) VB-C 첨가시 VM 생산이 억제된다는 보고와 일치하였다. 또한 이같은 효과는 receptor가 생산되기 전 (Fig.1 참조) VB-C 단독으로 존재시에 항생물질 생산이 억제되는 결과로 추정되었다. No.4의 경우에서도 receptor 생산 전인 본배양 12시간 이전에 VB-C 첨가시 항생물질 생산이 억제된 결과(결과 미계제)를 나타내었으며, 이들 결과에서 볼 때 *S. virginiae*에 있어서 VM 생산 촉진에 VB-C가 필수적이며 VB-C의 신호전달에 따른 VM 생산 촉진은 receptor의 존재하에서 일어난다고 추정되었다.

VB-C 첨가 및 미첨가에 의해 유도된 항생물질의 항균 spectrum

Table 4의 결과에서 본배양 6시간째 VB-C의 첨가시 mutant No.1의 경우에는 VB-C에 의한 유도능이 없었으며 No.3의 경우에는 VB-C에 의한 유도능이 parent균과 거의 유사하였다. 따라서 parent균과 mutant No.1 및 No.3 균주가 생산하는 항생물질의 유사성을 검토하기 위해 Gram(+), Gram(-), 효모 등의 검정균을 대상으로 항균

spectrum을 조사하였다. Table 4의 결과로부터 항생물질이 생산된 시간대에 배양상등액을 1 ml씩 sampling하여 조사한 각 시료들의 항균 spectrum을 Table 5에 나타내었다. Parent균의 경우, VB-C 첨가 및 미첨가시 비슷한 항균 spectrum을 나타내었고, mutant No.1의 경우에는 VB-C 첨가시 항생물질 생산이 억제되어 극미량의 항생물질만을 생산하였으며 VB-C 미첨가시 parent균과 유사한 경향을 보이거나 *Candida albicans* KCTC 1940에 대한 항균력을 나타내었다. 한편, No.3의 경우 VB-C 미첨가시 parent균에 비해 *Pseudomonas* sp.균과 *Mycobacterium phlei* KCTC 1932에 대한 항균력은 나타내지 않았으며 No.1과 같이 *Candida albicans* KCTC 1940에 대한 항균력을 나타내었고, VB-C 첨가시는 미첨가시와 달리 오히려 억제되는 경향을 나타내었다. 따라서 Virgie 등(20)이 HPLC 분석을 통하여 VB-C 첨가 및 미첨가시에 VM-M 및 S만의 경시적인 생산유도가 일어난다고 보고한 바와 같이 parent균에 있어서 VB-C에 의한 유도는 VM-M 및 S에 대해 특이적이라고 사료되었으며, 이와 같이 나타난 parent균과의 항균 spectrum 차이에서 볼 때, mutant No.1과 No.3은 VB-C 첨가에 의한 유도가 아닌 변이에 의한 VM-M 및 S 생산량의 차이 및 다른 항균성 물질의 생산이 추정되었다.

항생물질의 HPLC 분석

Table 5에서 나타난 항균 spectrum의 차이로부터 parent균 및 변이주 No.1과 No.3주가 생산하는 항생물질의 pattern을 조사하기 위해 VB-C 미첨가시 생산되는 항생물질을 HPLC를 통하여 분석하였다. Fig.2에서 보인 바와 같이 parent균이 생산한 VM-M과 S peak의 retention time은 각각 6.4 min 및 11.1 min대에서 나타났으며, 그 면적비율은 각각 4% 정도(Shimadzu chromatopak integrator 사용, 결과 미계제)의 양으로 생산되었다. 한편, mutant No.1의 경우 VM-M의 생산은 6.4 min대에 비슷한 양(4%)으로 검출되나 VM-S는 11.1 min대에 극히 미량(0.6%)이 생산되었다. 또한 No.3의 경우 VM-M은 6.4 min대에 3.5% 정도 검출되었으며 VM-S는 11.1 min대에 2배 이상(7.8%)이 검출되었다. 이들 VM-M,S의 생산량 및 HPLC pattern이 다른 점에서 fraction별로 분취하여 *B. subtilis* PCI 219를 사용한 항균력을 검토한 결과, Table 6에서 보인 바와 같이 parent균의 경우 VM-M 및 S, 즉 fraction No.2 및 5에서만 항균력을 나타내었다. Mutant No.1의 경우 VM-M을 포함하는 fraction No.2, 3, 4에서는 항균력을 보였으나 VM-S 획분(fraction No.5)에서는 항균력을 나타내지 않았으며, mutant No.3은 parent균과 같이 VM-M 및 S(fraction No.2, 5) 획분, 그리고 fraction No.4 획분에서 강한 항균력을 보였다. 따라서 HPLC pattern의 차이 및 항균력의 차이로부터 mutant No.1과 No.3의 경우 NTG 처리에 의해 VM-M,S 생산량의 변화 및 VM 유도체 혹은 다른 항생물질의 생산이

Table 5. Antimicrobial spectra of antibiotics produced by *S. virginiae* (parent), mutants No.1 and No.3

Test strains	Parent										Mutant No.1						Mutant No.3					
	-VB-C		+VB+C		-VB-C		+VB-C		-VB-C		+VB-C		-VB-C		+VB-C		-VB-C		+VB-C			
	14 ^b	16	8	10	12	24	48	48	44	48	48	12	14	16	12	14	16	12	14	16		
Gram(+)																						
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	±	++++ ^a	++	+++	+++	+++	+++	+++	~	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
<i>Streptococcus lactis</i> IFO 12007	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	±	+	++	++	±	++	++	±	±	±		
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	++	+++++	+++++	+++++	+	+	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12197	±	+++	+	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++	++	+	++	++	+	+	+		
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219 ATCC 6633	+	+++	+	+	++	++	++	±	±	+	+	+	++	++	++	++	++	++	++	++		
<i>Mycobacterium smegmatis</i> KCTC 1057	-	++	++	+++	+++	+	+++	-	-	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++		
<i>Mycobacterium phlei</i> KCTC 1932	+	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
Gram(-)																						
<i>Escherichia coli</i> K-12 IFO 03301	±	++	+	++	++	+	++	±	±	+	+	+	++	++	+	++	++	+	+	+		
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1923	-	++++	+	+	+	++	+++	-	-	+	-	-	+	+	-	+	++	-	-	-		
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	±	+++	++	++	++	++	+++	-	-	+	+	+	+++	+++	+	+++	+++	+	+	+		
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 1645	-	++	+	+	+	+	++	±	±	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1930	-	±	+++++	+++++	+++++	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-		
Yeast																						
<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	±	+	-	±	+	-	±	+		
<i>Cryptococcus neoformans</i> KCTC 7003	-	-	-	-	-	±	±	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-		

100 ng/ml of VB-C was added at cultivation time of 6 hours. Culture conditions were almost identical as described in Table 2. ^a+, -; diameter of inhibitory zone (-); No production, +; 12 mm, ++; 13~15 mm, +++; 16~19 mm, ++++; 20~25 mm, +++++; above 25 mm). ^b sampling time

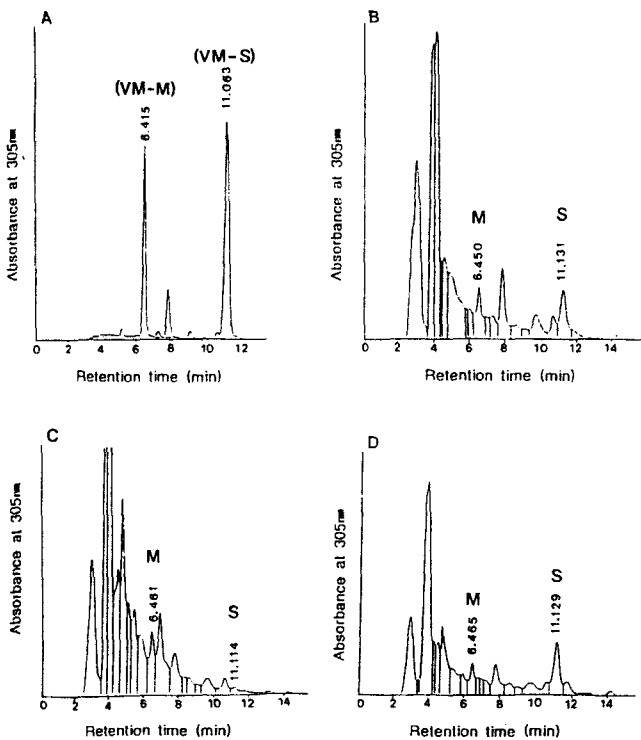


Fig. 2. HPLC chromatograms of antibiotics produced by *S. virginiae* (parent) and mutants

Culture conditions and analysis procedures are described in Materials and Methods. The elution was done on an ODS column (Shimadzu Shimpak, 4.6×300 mm) with 60% CH₃CN containing 0.1% TFA as solvent at a flow rate of 0.8 ml/min and detected at 305 nm.

(A): standard virginiamycin M and S, (B): parent strain, (C): mutant No.1, (D): mutant No.3.

Table 6. Antibacterial activity of HPLC fractions from Fig. 2

Strains	Antibacterial activity ^a				
	Fraction number ^b				
	1	2	3	4	5
Parent	±	+	-	±	+
Mutant					
No.1	±	+	+	+	-
No.3	±	+	±	++	+

^a Antibacterial activity was detected as described in Materials and Methods.

^b Fraction number (retention time); 1: 2.0~6.0 (min), 2: 6.0~7.5 (min), 3: 7.5~8.5 (min), 4: 8.5~10.8 (min), 5: 11.0~12.0 (min).

일어난다고 사료되었다.

요 약

*S. virginiae*에서 virginiamycin 생산촉진에 관여하는 호르몬성 물질인 *virginiae* butanolide C(VB-C) 및 rece-

ptor의 유도기구를 규명하기 위해, NTG 처리에 의해 분리한 3종류의 변이주를 사용하여 유도능의 관계를 검토하였다. 분리한 3가지 변이주 중 No.1은 VB-C, receptor 및 항생물질 생산 지연, No.3은 receptor 대량생산, No.4는 VB-C 결손, receptor 및 항생물질 생산시기 지연 등의 특성을 나타내었다. 이들 변이주의 합성 VB-C 첨가에 의한 유도능의 특징은, No.1의 경우 receptor 생산시기 지연으로 인한 항생물질 생산 억제, No.3의 경우 다량의 receptor 생산으로 인한 유도 초기 항생물질의 양적 증가가 나타났으며, No.4의 경우 적당한 양의 receptor를 생산함에 따라 정상적인 유도능을 가졌음이 시사되었으나 VB-C 결손으로 인한 항생물질 생산량의 감소 및 생산시기 지연 등의 특성도 함께 나타내었다. 또한 이들 변이주가 생산한 항생물질의 평균 spectrum 및 HPLC 분석 결과, virginiamycin M 또는 S의 생산량의 변화 및 유도체 혹은 새로운 항생물질의 생산 가능성, 그리고 VB-C에 의한 VM-M 및 S의 특이적인 유도가 시사되었다. 이들 결과로부터 virginiamycin 생산 촉진을 위해서는 VB-C가 필수적이며, receptor 존재시에 VB-C의 신호 전달에 따른 항생물질 유도가 일어난다고 판단된다. 또한 앞으로 VB-C⁺, receptor⁻ 및 VB-C⁻, receptor⁻ 등의 변이주가 분리되어 다양한 변이주에 대한 유도능의 검토가 이루어져야 한다고 사료되며 VB-C같은 2차 대사산물 생산 촉진인자의 다양한 활용이 기대된다.

감사의 말

본 연구는 1994년도 계명대학교 비사연구기금으로 이루어졌음

참고문헌

1. Khokhlov, A.S., I.I. Tovarova, L.N. Borisova, S.A. Pliner, L.A. Shevchenko, E.Ya. Konitskaya, N.S. Ivkina, and I.A. Rapoport. 1967. A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomycetes streptomycini*. *Dokady Akad. Nauk. SSSR*. 177: 232-235.
2. Gräfe, U., W. shade, I. Eritt, W.F. Fleck, and L. Radics. 1982. A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiot.* 35: 1722-1723.
3. Yamada, Y., K. Sugamura, K. Kondo, M. Yanagimoto, and H. Okada. 1987. The structure of inducing factors for virginiamycin in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* 40: 496-504.
4. 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.
5. Horinouch, S., O. Hara, and T. Beppu. 1983. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthe-

- sis of A-factor, actinorhodin and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **155**: 1238-1248.
6. Horinouchi, S., S.Y. Kumada, and T. Beppu. 1984. Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organism: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* **158**: 481-487.
 7. Li, W., T. Nihira, S. Sakuda, T. Nishida, and Y. Yamada. 1992. New inducing factors for virginiamycin production from *Streptomyces antibioticus*. *J. Ferment. Bioeng.* **74**: 214-217.
 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. 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.
 10. Kim, H.S., H. Tada, T. Nihira, and Y. Yamada. 1990. Purification and characterization of virginiae butanolide C-binding protein, a possible pleiotropic signal-transducer in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **43**: 692-706.
 11. Miyake, K., T. Kuzuyama, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1990. The A-factor binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin and sporulation. *J. Bacteriol.* **172**: 3003-3008.
 12. 김현수. 1992. *Streptomyces virginiae*가 생산하는 Virginiae Butanolide C(VB-C) 결합 단백질의 결합 활성에 미치는 일반적 특성. 한국산업미생물학회지 **20**: 257-262.
 13. 김현수. 1992. Virginiae butanolide C 결합 단백질의 신호 전달기구에 대한 연구. 한국미생물학회지 **30**: 181-186.
 14. Okamoto, S., T. Nihira, H. Kataoka, A. Suzuki, and Y. Yamada. 1992. Purification and molecular cloning of a butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* **267**: 1093-1098.
 15. Hashimoto, K., T. Nihira, S. Sakuda, and Y. Yamada. 1992. IM-2, a butyrolactone autoregulator, induces production of several nucleoside antibiotics in *Streptomyces* sp. FRI-5. *J. Ferment. Bioeng.* **73**: 449-455.
 16. 김현수, 강선영. 1994. Virginiamycin 생합성 유도인자 Virginiae Butanolide C에 의한 2차 대사산물 생산의 유도. 한국산업미생물학회지 **22**: 459-466.
 17. Yanagimoto, M. and G. Terui. 1971. Physiological studies on staphylomycin production (II). Formation of a substance effective in inducing staphylomycin production. *J. Ferment. Technol.* **49**: 611-618.
 18. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, 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. The John Innes Foundation, Norwich.
 19. Osamu Hara and T. Beppu. 1981. Mutants blocked in streptomycin production in *Streptomyces griseus*-The role of A-factor. *J. Antibiot.* **35**: 349-358.
 20. Vergie P. Almenteros, Shohei Sakuda and Yasuhiro Yamada. 1987. Relationship between the production of virginiamycin and its inducers, virginiae butanolides, in *Streptomyces virginiae*. *Ann. Rep. I.C. Biotech. Japan* **10**: 201-207.

(Received 16 September 1995)