

## 유사 생합성 경로를 가진 *Streptomyces* sp.의 혼합배양을 이용한 Doxorubicin생합성

최윤화<sup>1</sup> · 홍영수 · 임재윤<sup>1</sup> · 이정준\*

<sup>1</sup>충북대학교 자연과학대학 미생물학과, 생명공학연구소 천연물생합성 R.U.

**The Mixed Cultivation of *Streptomyces* sp. for Doxorubicin Production. Yun-Hwa Choi<sup>1</sup>, Young-Soo Hong, Jai-Yun Lim<sup>1</sup> and Jung Joon Lee\***. <sup>1</sup>Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-600, Korea - We selected two mutants namely strain D5 and Nu23 by mutagenesis of anthracycline producing *Streptomyces*: the former is an  $\epsilon$ -rhodomycinone overproducing mutant selected from *Streptomyces* sp. C5, a baumycin producer and the latter, a blocked mutant of early pathway for doxorubicin biosynthesis obtained from *Streptomyces peucetius* ATCC 27952, a doxorubicin producer. The mutant strain Nu23 does not produce anthracycline metabolites but retains the most of enzyme activities converting aklavinone to doxorubicin and the mutant strain D5 produced  $\epsilon$ -rhodomycinone at a level of 150  $\mu$ g/ml. These strains were grown separately in NDYE medium and each was mixed at day 3 by equal volume of culture broth but the quantity of doxorubicin produced was far below an estimation based on the level of  $\epsilon$ -rhodomycinone normally produced by the strain D5. On the other hand doxorubicin was reached at maximum level after 4 days in the mixed culture condition which was composed of culture broth of strain D5 grown for 6 day and that of strain Nu23 grown for 3 day. It was turned out that the growth of mutant strain D5 was inhibited by the accumulation of daunorubicin and doxorubicin in mixed culture broth, which cause the limitation of  $\epsilon$ -rhodomycinone.

생체내에서 일어나는 각종 화학반응을 명확히 이해하고자 하는 연구들은 재조합 유전자기술의 발달과 함께 많은 발전이 되어 왔다(1, 2). 항생물질로 대표되는 2차 대사산물의 생합성연구도 재조합 유전자 기술을 이용하여 대사산물의 생합성유전자 및 그들이 암호화한 효소의 반응 기작이 상세히 밝혀지고 있다(2-4). 특히 polyketide항생제의 경우, 항생제를 생합성하는 유전자를 *in vitro*상에서 발현시키거나 유사구조의 항생제 생합성 유전자를 치환시켜 새로운 구조의 항생제를 생합성하는 연구도 이루어지고 있다(5, 6). 이러한 연구결과는 화학적 합성이 불가능한 항생제의 새로운 유도체 개발가능성과 항생제의 발효수율을 증가시키는 방법을 제시해 주고 있다(7, 8). 그러나 항생물질 생합성은 수많은 효소가 연속적으로 참여하는 다단계 반응으로 재조합 유전자기술을 발효생산에 이용하는데 한계가 있다. 이런 문제점 극복하는 방법을 모색하고자 두가지 유사골격의 항생제를 생산하는 균주에서 상이한 생합성 단계가 차단된 변이주를 선별하여 이들을 혼합배양함으로써 율속단계의 효소활성이나 생합성 중간체를 상호보완하여 주는 모델시스템으로 doxorubicin 생합성 과정을 이용하여 고찰하여 보

았다(Fig. 1).

Doxorubicin은 daunorubicin과 aclacinomycin 등과 함께 널리 사용되는 대표적인 anthracycline계 항암제이다(9, 10). *Streptomyces peucetius*에서 처음으로 분리되었던 daunorubicin은 많은 *Streptomyces* 종들에서 계속해서 발견되었다(11). *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952로부터 분리된 doxorubicin은 daunorubicin보다는 독성 및 부작용이 낮아서 현재까지 급성 leukemia, 유방암, 방광암, Hodgkin's 병에 사용되고 있으나, 심장에 나쁜 영향을 미치는 결점 때문에 투여량 및 사용 기간에 제한을 받고 있다(12). 이 doxorubicin의 생합성 경로는 한 분자의 propionyl-CoA와 9개의 malonyl-CoA의 축합반응으로 생성된 polyketide사슬이 ring을 형성하고, 그 뒤에 dehydration과 hydroxylation반응을 거쳐  $\epsilon$ -rhodomycinone을 합성하고 methylation, hydroxylation, decarboxylation과 glycosylation을 거쳐 doxorubicin이 만들어 진다(13). 본 연구는 baumycin생합성 균주인 *Streptomyces* sp. C5에 돌연변이제를 처리하여 생합성 중간체인  $\epsilon$ -rhodomycinone을 대량 생산하는 균주인 *Streptomyces* sp. D5를 분리하였다(14). 또한 *S. peucetius* subsp. *caesius*로부터 doxorubicin과 같은 anthracycline계 화합물은 생합성하지 않지만 생합성 후반에 관여하는 효소 활성은 보유하고 있는 것으로 보고 한(15) Nu23균주를 이용하여 doxorubicin을 생산하기 위해 혼합배양을

\*Corresponding author

Tel. 82-42-860-4360, Fax. 82-42-860-4595

E-mail: jilee@kribb4680.kribb.re.kr

Key words: *Streptomyces*, Mutant, Mixed culture, Doxorubicin

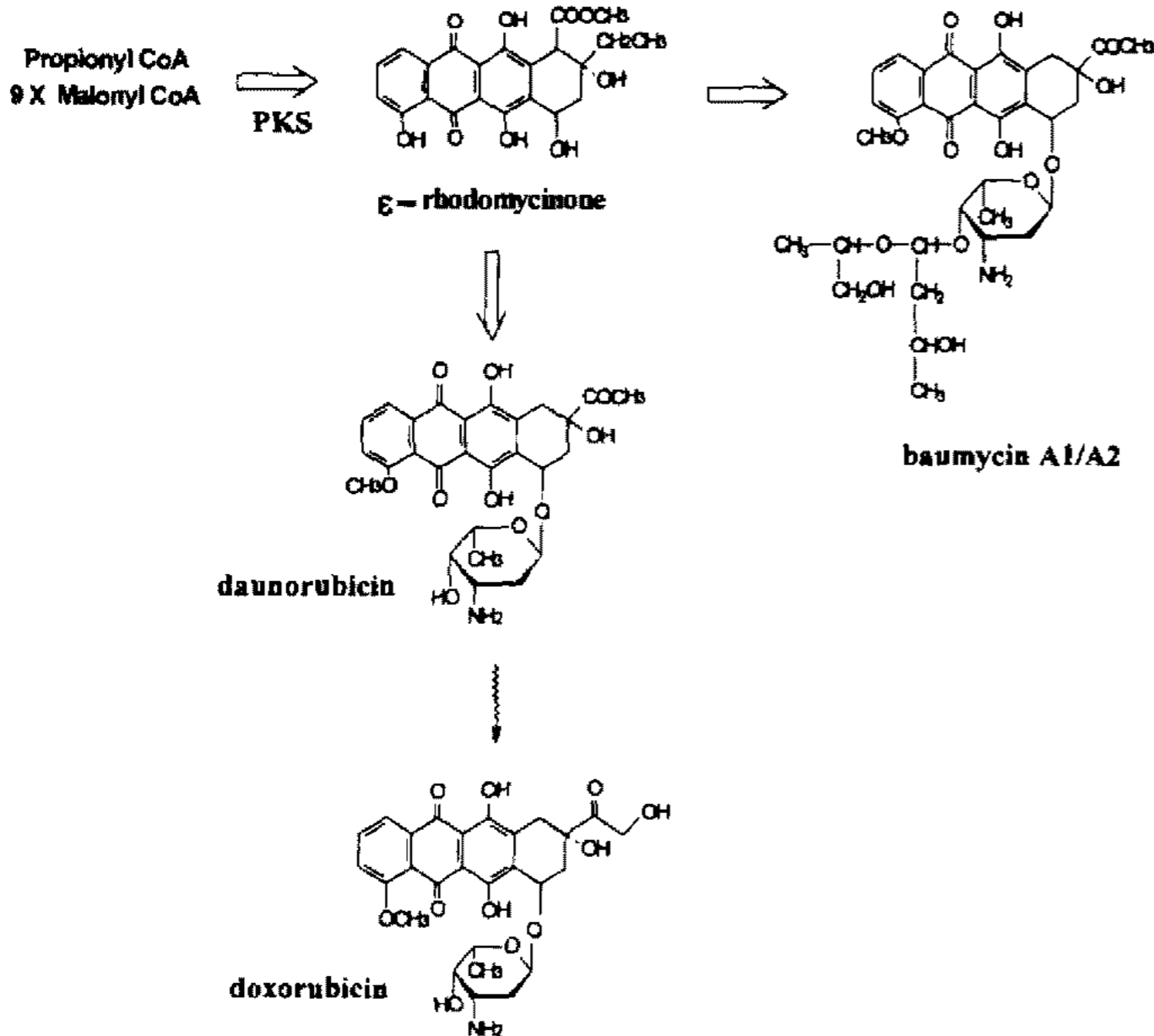


Fig. 1. Biosynthesis pathway of doxorubicin and baumycin.

시행하고 doxorubicin 생합성 효율의 증가를 위한 세가지 다른 혼합배양 양식을 검토하여 보았다. 이 시스템에서 같은 생산 배지내에서 생합성 중간체 생산균인 D5가 생산한 ε-rhodomyacinone을 이용하여 다음 단계의 생합성 과정이 Nu23균체내에서 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 생합성 경로를 공유한 서로 다른 균에서의 생합성 중간체의 상호교환에 의한 특정 균주의 생합성 조절 기전을 극복하여 생산성을 증가시키고, 변형된 생합성 중간체를 첨가하여 줌으로써 새로운 구조의 anthracycline 항생제를 합성할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 재료

본 연구에 사용한 *Streptomyces* 균주는 NCI(National Cancer Institute, U.S.A.)인 Fredrick Cancer Center에서 제공받은 *Streptomyces* sp. C5에 *N*-methyl-*N'*-nitro-*N'*-nitrosoguanidine(NTG)와 Ultraviolet(UV) light를 처리하여 얻은 돌연변이주인 *Streptomyces* sp. D5와 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952에 돌연변이원을 처리하여 분리한 변이주인 Nu23을 사용하였다(15). Doxorubicin과 daunorubicin은 Sigma와 (주)일동 제약에서 구하여 사용하였고 ε-rhodomyacinone은 *Streptomyces* sp. D5 발효후에 정제하여 사용하였다.

#### 배지와 배양조건

*Streptomyces* 균주들은 R2YE 평판배지(16)에서 보존하였고 *Streptomyces* 포자형성은 ISP 평판배지 즉, 4.5% malt extract(Difco), 0.5% yeast extract(Difco), 0.5%

soluble starch, 2.2% agar를 용해하여 pH 7.4로 조정하여 사용하였다. 각 균주의 대사산물의 생산을 위해 NDYE 배지 즉, 4.5% maltose(Sigma), 0.5% yeast extract, 0.48% HEPES, 0.43% NaNO<sub>3</sub>, 0.023% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.012% MgSO<sub>4</sub>, 0.2% 10×trace element solution를 pH 7.4로 조정하여 사용하였다(17). 혼합배양을 위한 균주는 ISP 평판배지에서 포자가 형성된 것을 가로 세로 1×1 cm의 크기로 잘라 100 ml의 NDYE 액체배지에 접종하여 28℃, 250 rpm의 교반 속도로 배양하였다.

#### 돌연변이주 선별 및 분석

변이주 D5는 *Streptomyces* sp. C5 spore(10<sup>9</sup> cfu/ml)에 NTG를 최종농도 1 mg/ml(0.05 M TM buffer; 0.05 M Tris, 0.05 M maleic acid, pH 8.5)에서 50분간 37℃에서 처리 한후 R2YE 배지에 도달하고 7일간 배양한 후 color가 다른 colony를 선별하였다(18). 변이주 Nu23은 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC 27952 spore(10<sup>9</sup> cfu/ml)를 돌연변이 유도제인 NTG를 처리하고 모균주보다 doxorubicin에 대한 내성이 3배 정도 큰 농도인 300 μg/ml doxorubicin이 첨가된 R2YE 평판배지에 도달하여 5-6일간 배양하여 생존한 colony를 morphology 및 color로 선별하였다. 이렇게 선별한 돌연변이주인 *Streptomyces* sp. strain D5와 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* strain Nu23에 대한 자체 대사산물 생합성 양상을 확인 하기위해 NDYE 액체 배지에서 28℃, 250 rpm, 7일간 배양하여 HPLC로 분석하였다.

#### Doxorubicin 생산을 위한 혼합배양

변이주 D5와 Nu23을 500 ml baffled 플라스크에 100 ml의 NDYE 액체배지를 넣어 28℃에서 배양한 후 각각의 배양액을 혼합해 주는 시간 및 혼합량에 따라서 A형, B형, C형의 세가지 상이한 조건에서 혼합배양실험을 실시하였다. A형태는 변이주 D5가 ε-rhodomyacinone을 생산하기 시작하는 단계인 3일째 배양액을 3일간 배양한 변이주 Nu23의 배양액과 동일한 부피로 혼합 배양 했다. B형태는 변이주 D5에서 ε-rhodomyacinone 생산량이 가장 많은 6일째 배양액과 3일간 배양한 변이주 Nu23의 배양액을 동일한 부피로 혼합 배양 했으며, C형태는 변이주 D5에서 ε-rhodomyacinone 생산량이 가장 많은 6일째 배양액에 3일간 배양한 동량의 Nu23 배양액을 3500 rpm, 20분간 원심 분리하여 얻은 균체만을 혼합하여 각각의 대사산물 생성을 비교하였다.

#### *Streptomyces* sp. D5의 약제 내성 측정

Doxorubicin과 daunorubicin에 대한 변이주 D5의 내성 측정은 doxorubicin과 daunorubicin를 각각 10, 20, 30, 40, 50 μg/ml의 농도가 되게 만든 R2YE 배지에 변

이주 D5의 spore가  $1.3 \times 10^8$  cfu/ml되게 도달하여 28°C에서 5일간 배양했을 때 생존한 colony수를 측정하여 결정하였다.

### Anthracycline계 대사물질의 분리 및 확인

Anthracycline계 대사산물을 분리하기 위하여 NDYE 배지에 배양한 배양액에 oxalic acid(30 mg/ml)를 첨가하여 50°C에서 45분간 가수분해 하였다. 가수분해 시킨 후에 10 N NaOH 용액을 사용하여 pH 8.5로 조정된 후 같은 용량의  $\text{CHCl}_3$ :MeOH(9:1)를 용매로 대사산물을 추출하고 3500 rpm에서 20분간 원심분리하여 용매층을 회수하였다. 회수한 용매층을 감압 농축하여 잔사를 20  $\mu$ l의 MeOH에 용해하여 HPLC분석을 위한 검액을 만들었다. HPLC 분석은 YMC-Pack ODS-A column을 이용하여 mobile phase는 acetonitrile과 20 mM phosphoric acid와 10 mM sodium dodecyl sulfate(SDS)가 첨가된 3차 증류수를 42:58비율로 혼합하여 유속 2.5 ml/min로 UV 254 nm파장에서 분석하였다. 대사산물의 정량을 위해 표준  $\epsilon$ -rhodomycinone, daunorubicin, doxorubicin을 MeOH에 일정한 농도로 녹여 HPLC로 각각의 농도별로 얻은 각 peak의 면적과 농도사이의 관계로 표준곡선을 그려 대사산물의 생산량을 정량하였다.

## 결 과

### 변이주 D5의 분석

변이주 D5와 Nu23가 생산하는 anthracycline 대사산물을 분석하기 위하여 NDYE배지에서 7일간 배양하면서 1일 간격으로 배양액을 취하여 분석하였다. 채취한 배양액에서 분리한 대사산물의 분석 결과 변이주 D5는  $\epsilon$ -rhodomycinone을 배양 6일째 166  $\mu$ g/ml까지 생산하고 7일부터는 감소함을 확인하였고 균체량도 대사산물의 생산과 같은 양상으로 배양 6일째 15 g/l까지 증가 한뒤 7일부터 감소하기 시작하였으며, 이 기간 동안 pH의 변화는 7.5에서 8.5사이로 거의 변화가 없었으나 점차 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 변이주 Nu23은 anthracycline계 화합물은 전혀 생산하지 않았고 균체량은 3일째 급격히 증가하여 6일째 11.3 g/l로 증가했다가 7일 이후 서서히 감소했다. 변이주 Nu23의 배양액에 doxorubicin생합성 중간체인  $\epsilon$ -rhodomycinone을 첨가해 주고 doxorubicin으로 생물전환 활성을 측정한 결과 아주 효율적으로 doxorubicin으로 전환됨을 HPLC로 확인하였다(15). 따라서 분리한 변이주 Nu23은 anthracycline계 항암물질의 생합성 경로중 초기 단계인 polyketide ring 구조를 만들어 주는 polyketide synthase유전자 발현이 차단된 변이주이지만, doxorubicin생합성 경로상의 중간 전구물질이 존재하는 조건에서는 doxorubicin생산에 관

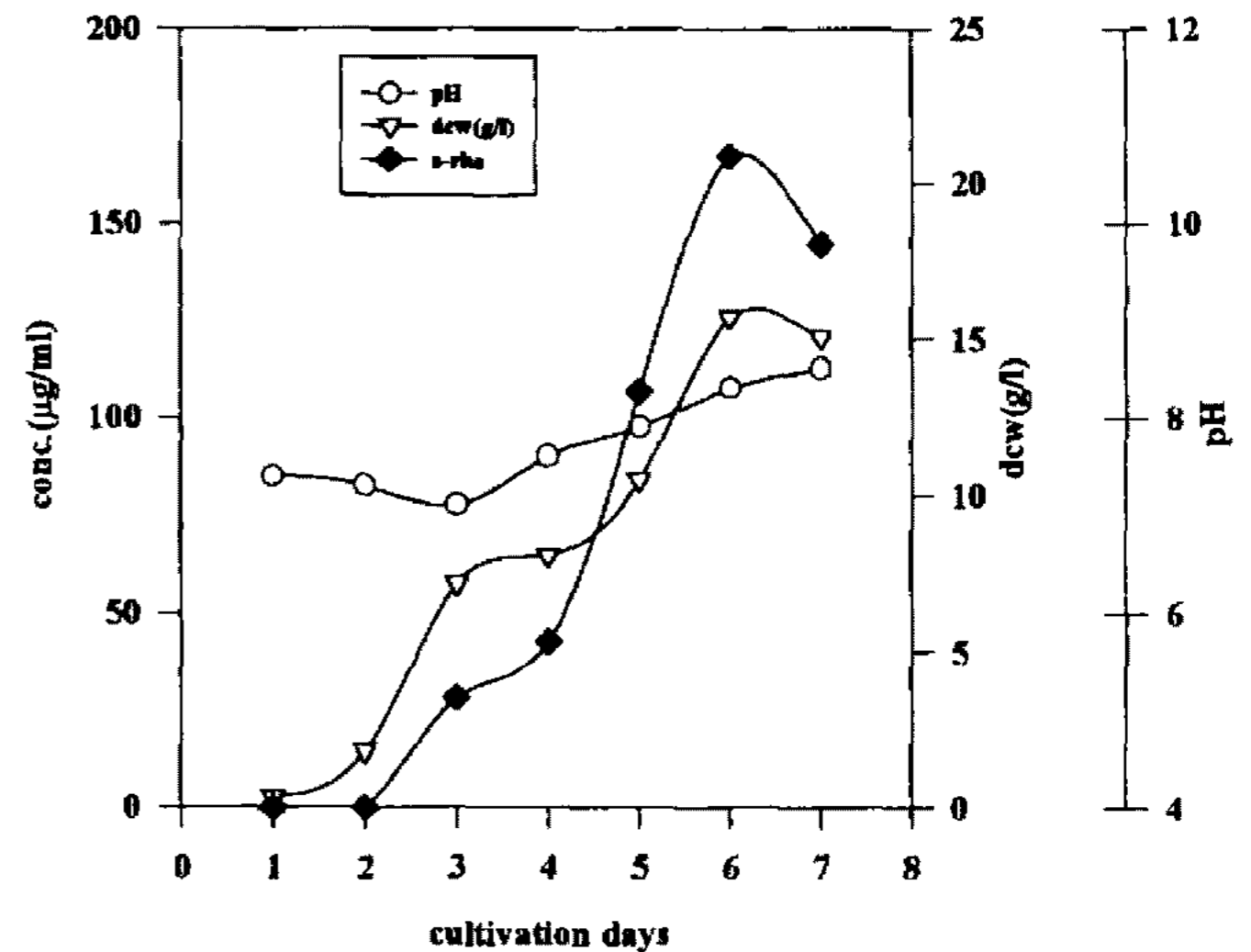


Fig. 2. Growth and  $\epsilon$ -rhodomycinone production of *Streptomyces* sp. D5 in NDYE.

dcw: dry cell weight,  $\epsilon$ -rho:  $\epsilon$ -rhodomycinone.

여하는 모든 효소활성을 완전하게 갖고 있는 변이주임을 알 수 있었다.

### Doxorubicin 생산을 위한 혼합 배양

변이주 D5가  $\epsilon$ -rhodomycinone을 20  $\mu$ g/ml정도 생산하기 시작하는 3일째 배양액에 3일간 배양한 Nu23의 배양액을 동일 부피로 혼합하는 A 형태의 혼합 배양을 시행하였다(Fig. 3). 혼합 1일후에 2  $\mu$ g/ml의 daunorubicin이 확인되었고 혼합 2일째 doxorubicin도 미량 관찰되었다. 그리고 3일째 doxorubicin도 17  $\mu$ g/ml 관찰되었고 혼합 4일째 가장 많은 8  $\mu$ g/ml의 daunorubicin이

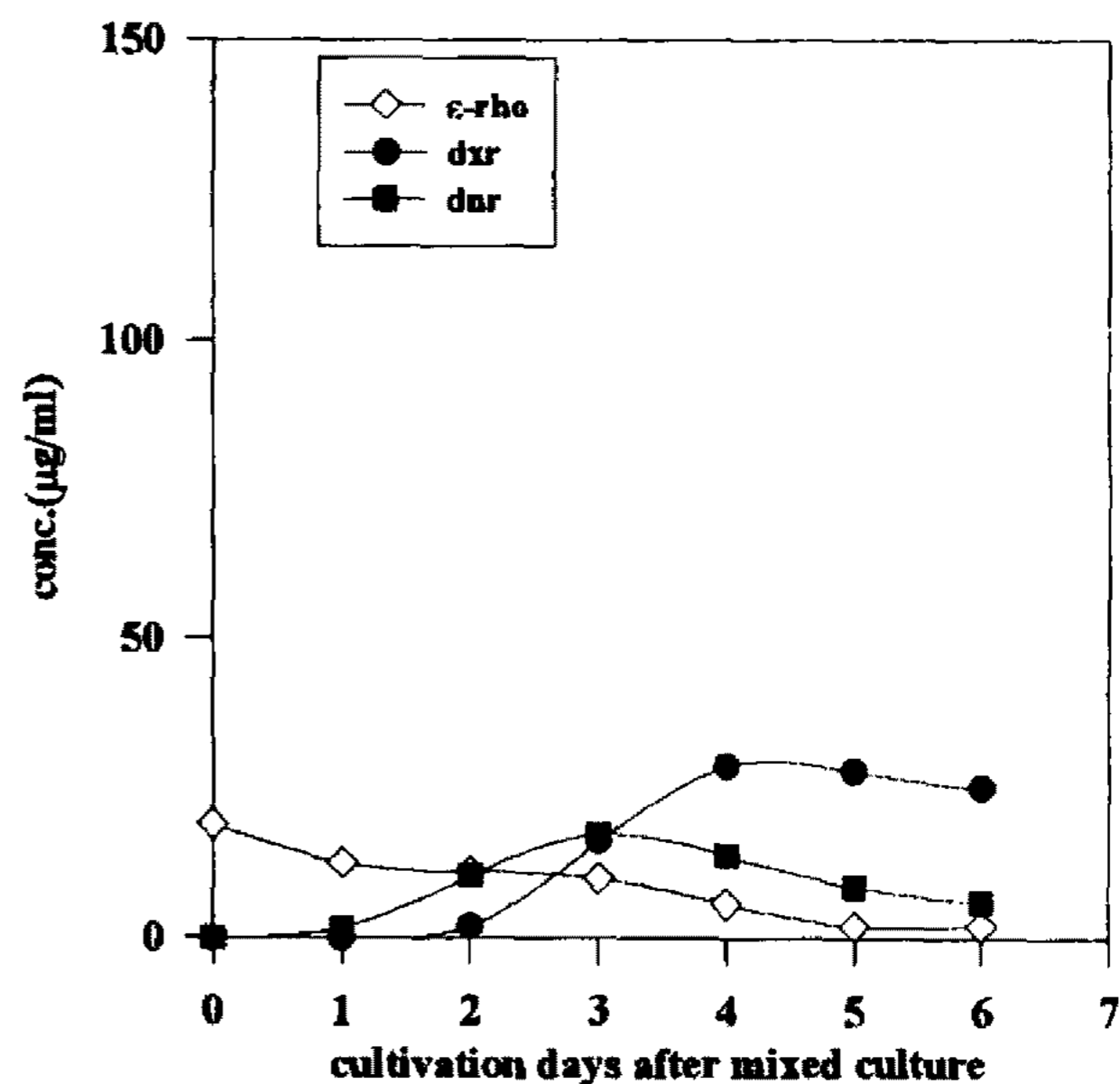


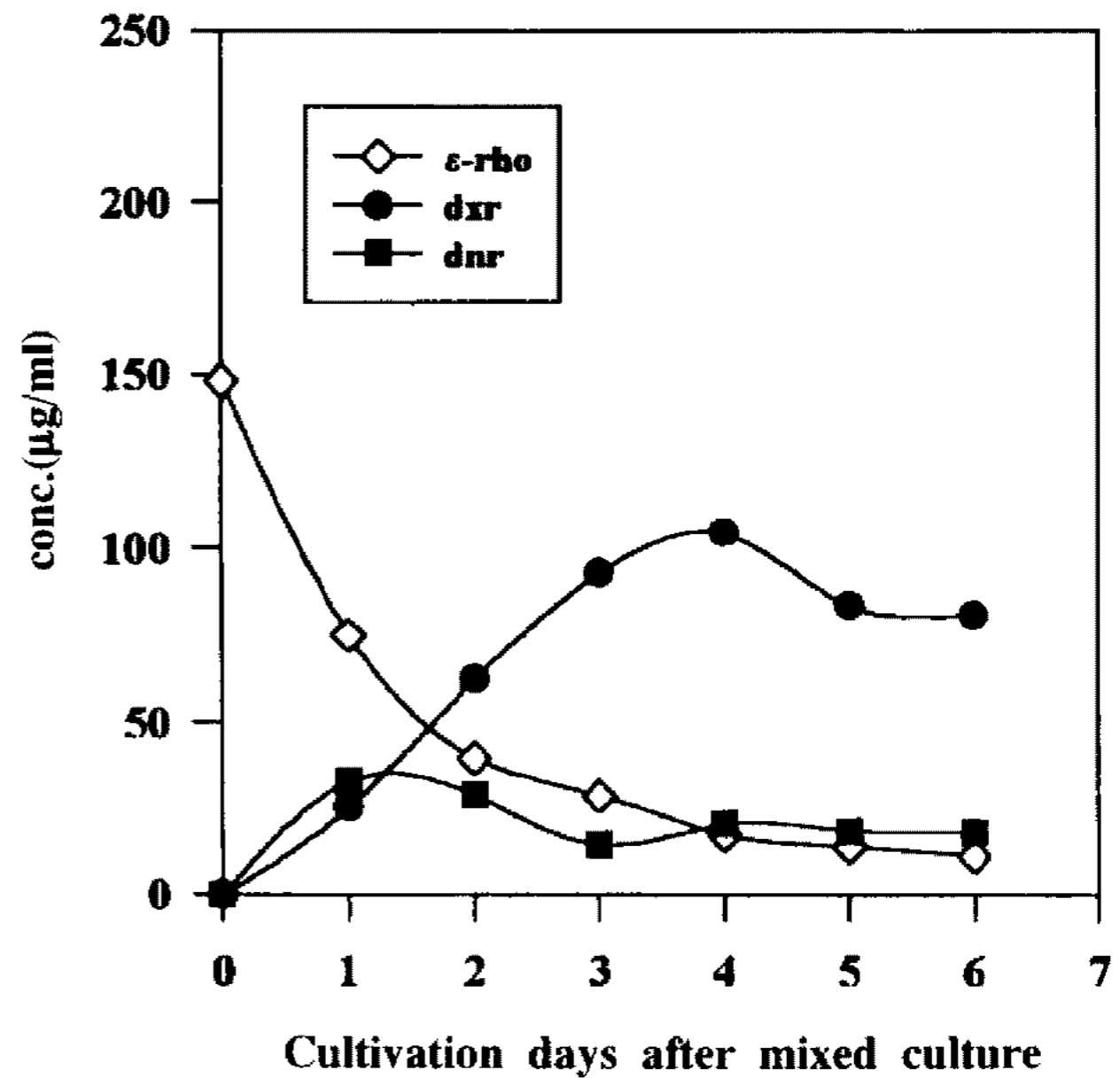
Fig. 3. Production of doxorubicin by mixed culture A type. Cultivation was carried out for 6 days after mixing day 3 broths of strain D5 and Nu23.  $\epsilon$ -rho:  $\epsilon$ -rhodomycinone, dnr: daunorubicin, dxr: doxorubicin.

**Table 1. Resistance level of *Streptomyces* sp. D5 against daunorubicin and doxorubicin**

Antibiotic Conc. (μg/ml)	Daunorubicin		Doxorubicin	
	Colony number	%	Colony number	%
0 μg/ml	1.3 × 10 <sup>8</sup>	100	1.3 × 10 <sup>8</sup>	100
10 μg/ml	0	0	0.4 × 10 <sup>8</sup>	31
20 μg/ml	0	0	0.2 × 10 <sup>8</sup>	17
30 μg/ml	0	0	0.06 × 10 <sup>8</sup>	4.5
40 μg/ml	0	0	0.02 × 10 <sup>8</sup>	1.5
50 μg/ml	0	0	0	0

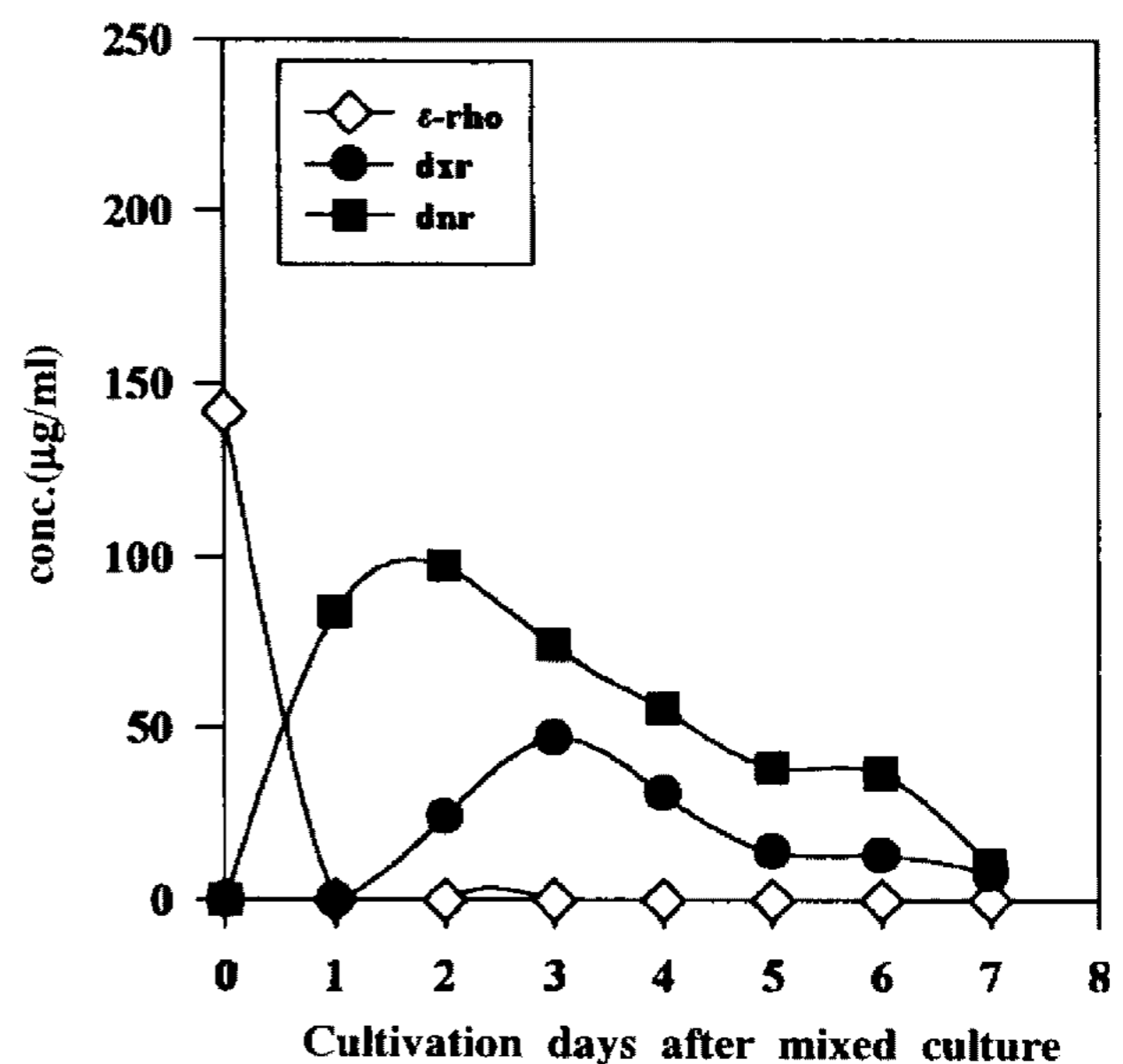
합성되었다. 이로써 두 균주의 혼합배양에 의해 변이주 D5 균주에서 생산된 ε-rhodomyconone이 변이주 Nu23 균주에 의해 이용되어 ε-rhodomyconone이후의 생합성 반응이 진행됨을 확인할 수 있었다. 그러나 혼합 초기부터 ε-rhodomyconone 생성량이 D5 단독 배양시와 같은 양상으로 증가하지 않아 doxorubicin 생산이 제대로 일어나지 않았다. 이는 혼합배양에 의한 배양조건의 급격한 변화, 즉 배양 부피의 2배 증가로 인한 변이주 D5의 cell mass의 희석 또는 변이주 Nu23 배양액내의 어떤 조절자의 영향일 수도 있고 혼합배양에 의해 생성되는 대사산물에 의한 영향일 수도 있었다. 그래서 먼저 혼합배양의 산물인 doxorubicin과 daunorubicin에 대한 변이주 D5의 내성을 측정하여 보았다. 그 결과, 변이주 D5의 경우 혼합배양시 생성되는 daunorubicin에 대해서는 전혀 내성을 나타내지 못했고, doxorubicin에 대해서도 40 μg/ml 농도이상에서는 내성을 나타내지 않았다(Table 1). 따라서 변이주 D5의 성장 초기에 혼합배양은 생산된 doxorubicin과 daunorubicin에 의해 변이주 D5의 성장이 저해되어 지속적인 ε-rhodomyconone공급이 차단되기 때문에 최종 doxorubicin과 daunorubicin생산이 낮아진 것으로 생각된다.

혼합배양 B 형태인 ε-rhodomyconone 생산량이 가장 많은 변이주 D5의 6일째 배양액과 3일간 배양한 Nu23의 배양액을 동일한 부피로 혼합 배양을 실시한 결과, 혼합 4일째 배양액에서 doxorubicin이 10<sup>4</sup> μg/ml 생성되었고, daunorubicin은 혼합 1일째 최고 33 μg/ml까지 생성되었다(Fig. 4). 이 경우 변이주 D5에 의해 생산된 ε-rhodomyconone의 90%이상이 danunomycin과 doxorubicin으로 전환됨을 관찰할 수 있었다. 이것은 기질 생산성이 더 높은 변이주와 혼합배양시에 더 많은 산물을 생성할 수 있는 가능성을 시사한다. 또한 변이주 Nu23의 배양액내에 존재할 수 있는 생합성 조절인자나 배양 부피의 변화로 인한 영향을 최소화 하기 위해 3일간 배양한 변이주 Nu23을 원심분리하여 균체만을 변이주 D5의 3일 배양액과 6일 배양액에 첨가하였다. 변이주 D5의 3일 배양액에서는 Fig. 3와 같은 양상으로 아주 적은 량



**Fig. 4. Production of doxorubicin by mixed culture B type.** Cultivation was carried out for 6 days after mixing day 6 broth of strain D5 and day 3 broth of strain Nu 23. ε-rho: ε-rhodomyconone, dnr: daunorubicin, dxr: doxorubicin.

의 daunorubicin과 doxorubicin이 생성되었고, 6일 배양액에서는 daunorubicin은 최고 97 μg/ml까지 생산되었고 doxorubicin은 47 μg/ml이 생성되었다(Fig. 5). 이 결과는 혼합배양 조건에서의 doxorubicin생산은 중간체인 ε-rhodomyconone의 지속적인 공급이 중요한 인자임을 말해준다. 변이주 D5 6일 배양액에서는 혼합 배양 2일 후에 B type의 경우 보다 3배 많은 80 μg/ml의 daunorubicin이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이



**Fig. 5. Production of doxorubicin by mixed culture C type.** Cultivation was carried out for 6 days after mixing day 6 broth of strain D5 and day 3 mycelia of strain Nu23. ε-rho: ε-rhodomyconone, dnr: daunorubicin, dxr: doxorubicin.

렇게 과량 생성된 danunorubicin은 변이주 D5의 생육을 저해하여  $\epsilon$ -rhodomycinone의 생산을 급격히 중단시킬 뿐 아니라 과량의 daunorubicin이 doxorubicin으로 빠른 전환이 일어나지 않고 축적된다. 이 결과는 변이주 Nu23 균주를 이용한 daunorubicin과  $\epsilon$ -rhodomycinone의 생물전환에서도 daunorubicin이  $\epsilon$ -rhodomycinone보다 더 낮은 전환율이 관찰된 것과 일치한다(15).

## 고 찰

본 연구는 baumycin과 doxorubicin의 생합성과정의 공통 중간체인  $\epsilon$ -rhodomycinone을 배양액에서 분리하지 않고 배양 과정에서 다른 균주의 생합성 경로에 기질로 이용될 수 있게 함으로서 효율적인 생합성 반응이 가능하다는 것을 확인하였다. 이들 혼합 배양에서 나타나는 문제점은 doxorubicin생산에 있어서 기질인  $\epsilon$ -rhodomycinone량이 초기 혼합 배양 이후 지속적인 감소 현상이 나타나는 것이다. 이는 doxorubicin과 daunorubicin의 생산량은 혼합 배양시 변이주 D5가 공급 하는  $\epsilon$ -rhodomycinone양에 영향을 받는다는 것을 알 수 있었으며 주된 원인은 변이주 D5가 daunorubicin과 doxorubicin에 대한 저항성이 약하기 때문인 것으로 판명되었다. 따라서, doxorubicin의 생산에 가장 적절한 혼합배양 형태는 변이주 D5가 계속 생존하여  $\epsilon$ -rhodomycinone을 일정량 공급할 수 있는 방법으로 daunorubicin과 doxorubicin에 높은 내성을 가진 변이주를 사용하거나 doxorubicin 내성유전자로 형질전환된 변이주 D5를 이용한다면 가능할 것이다. 또한 기질을 제공한 균주가 다른 균에서 생성되는 중간산물 또는 최종산물에 대해 영향이 최소화되는 배양조건을 찾는 것도 중요할 것이다. 본 실험에서는 doxorubicin의 전단계 산물인 daunorubicin이 주 생성물로 축적되는 경우가 자주 관찰되었는데, 이는 이 단계를 촉매하는 효소인 daunorubicin C-14 hydroxylase가 cytochrome P450계열 효소(19)이기 때문에 용존 산소 및 cofactor인 NADPH의 재생과 관련이 높을 것으로 생각되며 이에 대한 연구도 필요하고, 아울러 상기효소를 변이주 Nu23에서 과량발현 시킬 수 있는 시스템 개발도 요청된다.

지금까지의 생물전환 연구는 단일 효소반응을 이용한 정밀화학 제품 생산이 대부분이었으나 본 연구의 결과는 적당한 균주선택을 이용하면 첨가해준 전구체가 다단계 반응을 통한 최종 목적 화합물 생산이 가능함을 보여 주었다. 또한 혼합배양 방법은 목표로 하는 항생제의 생합성 연구에 대한 사전 정보 없이도 유사구조를 생산하는 균주들 간에 적용하다면 새로운 구조의 항생제를 생합성할 수 있을 것으로 예상되는데, 항생제 생합성 효소의 경우, 그 기질 특이성이 상당히 유연함이 많은 연구자들에

의해 보고되어 있어 이런 특징을 이용하여 유사 구조를 가진 균주의 생합성 차단균주간의 혼합배양으로 다양한 구조의 새로운 항생제 생산을 기대할 수 있을 것이다. 본 실험과 같이 동일한 생합성 경로를 거쳐 합성되는 물질의 경우 전구 물질을 과잉 생산하는 균주를 생합성 율속 단계의 반응을 개선한 균주와 혼합 배양함으로써 항생물질의 생산효율을 증가시킬 수 있으리라 생각된다.

## 요 약

Anthracycline계 항암물질 생산균주의 생합성 경로가 차단되어 중간물질인  $\epsilon$ -rhodomycinone을 과량 생산하는 *Streptomyces* sp. C5의 변이주 D5을  $\epsilon$ -rhodomycinone을 doxorubicin으로 전환할 수 있는 효소활성을 갖은 *Streptomyces peucetius* ATCC 27952의 변이주 Nu 23과 혼합배양하여 배양액내에서 기질의 분리없이 doxorubicin을 생산할 수 있음을 확인하였고 배양조건을 검토하였다. 그 결과 변이주 Nu23을 NDYE배지에서 3일간 배양하여  $\epsilon$ -rhodomycinone의 생산량이 가장 많은 배양 6일째의 변이주 D5 배양액과 동량의 부피비로 혼합 배양한 B형태에서 104  $\mu\text{g/ml}$ 의 doxorubicin을 생산할 수 있었다.

## 참고문헌

1. McDaniel, R., S. Ebert-Khosla, D. A. Hopwood, and C. Khosla. 1996. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature*. **375**: 549-554.
2. Hopwood, D. A., F. Malpartida, H. M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B. A. Rudd, H. G. Floss, and S. Omura. 1985. Production of hybrid antibiotics by genetic engineering. *Nature*. **314**: 642-644.
3. 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.
4. Fishman, S. E., K. Cox, J. L. Larson, P. A. Reynolds, E. T. Seno, W.-K. Yen, R. Van Frank, and C. L. Hershberger. 1987. Cloning genes for the biosynthesis of a macrolide antibiotic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8248-8252.
5. Otten, S. L., K. J. Stutzman-Engwall, and C. R. Hutchinson. 1990. Cloning and expression of daunorubicin biosynthesis genes from *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*. *J. Bacteriol.* **172**: 3427-3434.
6. Donadio, S., J. B. Mcalpine, P. J. Sheldon, M. Jackson and L. Katz 1993. An erythromycin analog produced by reprogramming of polyketide synthesis. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA.* **90**: 7119-7123.
7. Hwang, C. K., H. S. Kim, Y.-S. Hong, Y. H. Kim, S.-K. Hong, S.-J. Kim, and J. J. Lee. 1995. Expression of *Streptomyces peucetius* genes for doxorubicin resistance and aklavinone 11-hydroxylase in *Streptomyces galilaeus* ATCC 31133 and production of a hybrid aclacinomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 1616-1620.
  8. Kim, H. S., Y.-S. Hong, Y. H. Kim, O.-J. Yoo, and J. J. Lee. 1996. New anthracycline Metabolites produced by the aklavinone 11-hydroxylase gene in *Streptomyces galilaeus* ATCC 31133. *J. Antibiotics* **49**: 355-360.
  9. Arcamone, F. 1984. Antitumor anthracycline: recent developments. *Med. Res. Rev.* **4**: 153-188.
  10. Arcamone, F., G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, and C. Spalla. 1969. Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *Streptomyces peucetius* var *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**: 1101-1110.
  11. White, R. J. and R. M. Stroshane. 1984. Daunorubicin and adriamycin: properties, biosynthesis and fermentation, pp.569-594. In; *Biotechnology of industrial antibiotics*, E. J. Vandamme(ed.), Vol. 22. Marcel Dekker, Inc., New York.
  12. Davis, H. L. and T. E. Davis 1979. Daunorubicin and adriamycin in cancer treatment: an analysis of their roles and limitations. *Cancer Treat. Rep.* **63**: 809-815.
  13. Yoshimoto, A., T. Nakamura, K. Kubo, O. Johdo, and H. Tone. 1995. Daunomycin biosynthesis by microbial conversion of precursor metabolites using biosynthetically blocked mutants. *J. Ferment. Bioengin.* **79**: 229-235.
  14. Bartel, P. L. N. C. Connors, and W. R. Strohl. 1990. Biosynthesis of anthracyclines: analysis of mutants of *Streptomyces* sp. strain C5 blocked in daunomycin biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1877-1886.
  15. Hwang, C. K., H. S. Lee, Y.-S. Hong, N. S. Paek, T. H. Kim, and J. J. Lee. 1997. Characterization of doxorubicin-nonproducing mutant, Nu23 of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 363-366.
  16. Hopwood, D. W., 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. Schremp. 1985. *Genetic manipulation of Streptomyces. A laboratory manual*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
  17. Dekleva, M. L., J. A. Titus, and W. R. Strohl. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. *Can. J. Microbiol.* **31**: 287-294.
  18. Delic, V., D. A. Hopwood, and E. Friend. 1970. Mutagenesis by *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation Research.* **9**: 167-182.
  19. Dickens, M. L. and W. R. Strohl. 1996. Isolation and Characterization of a gene from *Streptomyces* sp. strain C 5 that confers the ability to convert daunomycin to doxorubicin on *Streptomyces lividans* TK24. *J. Bacteriol.* **178**: 3389-3395

(Received 13 August 1997)