

Virginiamycin 생합성 유도인자 Virginiae Butanolide C에 의한 Erythromycin 생산 유도

†김 현 수 · 성 립 식
계명대학교 자연과학대학 미생물학과
(접수 : 1999.11. 29., 게재승인 : 1999. 12. 17.)

Induction of Erythromycin by Virginiamycin Inducing Factor, Virginiae Butanolide C

Hyun-Soo Kim† and Lim-Shik Seong
Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea
(Received : 1999. 11. 29., Accepted : 1999. 12. 17.)

Virginiae butanolide C(VB-C) is one of the butyrolactone autoregulators, which triggers the production of virginiamycin in *Streptomyces virginiae*. In order to investigate the function of VB-C as inducer in other strains, *Streptomyces erythraeus* was used as a test strain(parent). VB-C binding receptor gene was introduced into *S. erythraeus*(transformant) and the production of VBs and specific VB-C binding protein were analysed in parent and transformant. When 300ng/ml of the synthetic VB-C was added at 0, 20, 44 h cultivation of the parent and at 44 h cultivation of the transformant, the initial production times of antibiotics were shortened by more than 8 and 6 h, respectively. The transformant showed strong antibiotic activity against *B. subtilis*. These results suggest that the VB-C might have an ability to induce the production of secondary metabolites in *S. erythraeus*.

Key Words : virginiamycin, virginiae butanolide C(VB-C), microbial hormone, autoregulator, *Streptomyces erythraeus*

서 론

방선균은 Gram(+)의 원핵생물로서 특이한 미생물이며, 사상균과 같이 현저한 형태분화를 수행하며 기저균사, 기균사, 분생포자, 포자 발아의 life cycle을 가지고 있다. 이들 방선균에 있어서 기균사, 포자형성 등의 형태분화(morphological differentiation)와 항생물질, 생리활성물질, 색소 등 2차 대사산물 생산의 생리적 분화(physiological differentiation)을 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 butanolides(VB-A, B, C, D, E)(3, 4) 등 γ -butyrolactone환을 가지는 인자를 비롯하여 수종이 이미 구조가 밝혀져 있으며, 근년에 들어 이들의 분자 level에서의 연구가 진행됨에 따라 그 기능이 하나씩 밝혀지고 있다(4-6). 이들 자기조절인자는 배양액 중 미량으로 존재하

며 수 ng/ml의 극히 저농도에서 기능을 발휘하는 점에서 원핵생물의 호르몬으로 간주되고 있다. *S. virginiae*가 생산하는 자기조절인자인 VB는 virginiamycin 생산을 유도하는 것으로 알려져 있으며(3, 4) 최근 *S. antibioticus*로부터 새로운 virginiamycin 생산 유도인자로서 NFX-1, 2, 3, 4가 분리, 정제되어(7) 다양한 자기조절인자의 존재 및 기능이 예상되고 있다. 이들 유도인자의 signal 전달과 관련하여 항생물질 생합성 mechanism 연구의 일환으로 *S. virginiae*의 경우, VBs중 VB-C의 signal 전달에 관여한다고 추정되는 결합 단백질인 VB-C receptor가 김 등에 의해 처음으로 확인 및 정제(8, 9)되었다. *S. virginiae*의 genome DNA (cell당)당 극히 적은 30~40개의 receptor가 존재한다는 결과(9)와 A-factor에 있어서도 A-factor receptor의 존재가 확인되어 repressor로서의 기능이 추정되고 있다(10). 또한 VB의 signal 전달기구의 시사(11, 12), receptor의 분리(26 kDa, 56 kDa의 2개의 subunit 형성) 및 유전자인 *barA*의 cloning(13) 등 VB 신호전달 기구에 관한 연구가 수행되고 있다. 최근 VB의 유도기능으로 VB 결합 단백질(receptor)인 BarA의 N-말단에 helix-turn-helix motif가 존재하여 DNA 결합성 단백질임이 시사되었으며, *barA* 유전자 383 bp 하류에 DNA 결합성 제어 유전자로 추정되는 *barB* 유전자(N말단에 helix-turn-helix 구조 소유) 및 259 bp 상류에 *barX* 유전자가 존재함이 밝혀졌다(14). 또한 VB receptor의

†Corresponding Author : Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, 704-701, Korea
Tel : 053-580-5284, Fax : 053-580-5164
E-mail : hskim@kmucc.keimyung.ac.kr

기능은 *barA* 및 *barB*의 상류 promotor에 결합하여 *barA* 및 *barB*의 발현을 억제하며, 생산된 VB와 결합에 의해 promotor로부터 해리되어 *barA* 및 *barB*의 발현과 함께 virginiamycin 생산이 개시되는 repressor로 밝혀졌다(15). BarB는 제어인자로 추정되나 기능은 아직 불명이며 *barB* gene 및 *barX* gene의 기능연구가 계속 수행중에 있다. 이들 유도인자의 응용면으로서, Hashimoto 등(16)은 항생물질 D-cycloserin 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 보고하였다. 뿐만 아니라 김 등(17)에 의해 lysocellin 생산균인 *S. longwoodensis*로부터 VB-C에 의한 lysocellin을 비롯한 다른 항생물질 및 색소의 유도기능이 시사되었다. 본 연구에 사용한 공시균은 *Streptomyces erythraeus* IFO 13426으로 erythromycin(EM)을 생산하며 유도인자 생산 연구는 Gräfe factor의 경우 IMET 40276 균주는 생산하나 ATCC 11635 균주는 생산하지 않는다는 보고(18)가 있을 뿐이다. 따라서 균주에 따라 유도인자 생산능의 차이, VB류 및 IM-2의 생산은 보고(19) 되지 않은 점과 이들 autoregulator가 방선균 *Streptomyces*속 약 59%에 걸쳐 존재하고 있으며 구조의 유사성 및 다면형질 발현성인 점을 참고하여 본 연구에서는 공시균의 합성 VB-C에 의한 EM생산 유도기구를 규명하기 위하여 VB-C 및 VB-C receptor를 이용하여 항생물질 생산 유도 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 실험은 항생물질 erythromycin(EM)을 생산하는 *Streptomyces erythraeus* IFO 13426을 공시 균주로 사용하였다. 공시 균주의 전 배양을 위해 glucose 5 g/l, sucrose 10 g/l, bacto tryptone 5 g/l, yeast extract 2.5 g/l 조성의 배지를 사용하였으며, 본배양을 위해 RS배지(glucose 5 g/1.1 l, raw sugar 10 g/1.1 l, tryptone 5 g/1.1 l, EDTA 36 mg/1.1 l, yeast extract 2.5 g/1.1 l, betaine 1.29 g/1.1 l, sodium propionate 0.11 g/1.1 l, pH 7.0~7.2)를 사용하였다. 공시균의 전배양은 ISP medium No. 2 사면배지(malt extract 10 g/l, yeast extract 4 g/l, glucose 4 g/l, agar 15 g/l, pH 7.3)에서 28°C, 5-7일간 생육시킨 colony로부터 제조한 spore용액을 상기의 전배양 배지 25 ml에 일정량(약 5×10^6 spores) 접종한 후 28°C, 150 rpm에서 36~48시간 배양한 균체를 -70°C에서 보존하여 전배양균으로 사용하였다.

시험균주 및 배양조건

Erythromycin 및 기타 유도항생물질의 항균 효과를 검토하기 위한 시험균주로 Gram(+)세균 7균주, Gram(-)세균 9균주, 곰팡이 3균주, 효모 3균주를 사용하였다. 세균은 LB배지(peptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5% pH 7.0)에 1~2일 배양하여 4°C에서 보존하여 사용하였고, 곰팡이중 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840과 *Aspergillus niger* KCTC 6985는 KCTC medium No. 31배지(malt extract 2%, glucose 2%, peptone 0.1%, agar 2%, pH 6.0), *Aspergillus flavus* KCTC 6961은 No. 30배지(sucrose 3%, NaNO₃ 0.3%, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, KCl 0.05%, FeSO₄ · 7H₂O 0.001%, agar 1.5%, pH 6.0)에 배양하

였으며, 각 균주를 평판배지에 접종하여 28°C에서 5~7일간 배양한 다음, spore용액을 제조하여 4°C에서 보존하여 사용하였다. 효모류는 Y배지(yeast extract 1%, glucose 2%, peptone 2%, agar 1.5%, pH 6.0)를 사용하여 28°C에서 2~3일간 배양한 다음 4°C에서 보존하면서 사용전에 24시간 계대배양하여 사용하였다.

Transformant의 제조

항생물질 생합성 유도인자인 VB-C의 유도기능을 응용하기 위해 VB-C에 결합하는 receptor유전자인 *barA*(2.8 kb)가 함유된 pARS 701(9 kb)(13)를 EM 생산균주인 *S. erythraeus*에 도입하였다. Okamoto 등(13)이 제작한 pARS 701 plasmid는 *S. lividans* TK21 균주에 포함되어 있었고, 이 균주를 thioestrepton(50 µg/ml)이 함유된 YEME 배지에서 배양한후 plasmid를 분리하여 형질전환에 사용하였다. pARS 701의 형질전환을 위해 parent 균주인 *S. erythraeus* 포자현탁액 100 µl를 YEME(20)배지에 배양한 후 배양균체를 lysozyme solution으로 처리하여 protoplast를 제조하였다. 그 후 protoplast에 transformation시켜 R2LE(21)배지에 도말하여 28°C에서 14~20시간 배양하였다. 생성된 colony위에 thioestrepton(50 µg/ml)을 포함한 soft agar를 증충하여 재생된 colony를 다시 thioestrepton이 함유된 slant에 계대배양하여 transformant로 사용하였다. Plasmid(pARS 701)의 형질전환 유무는 계대배양한 transformant를 thioestrepton이 함유된 YEME배지에 배양하여 배양균체로부터 pARS 701을 분리하여 agarose gel(1%) 전기영동을 통하여 확인하였다.

*Streptomyces erythraeus*로부터 erythromycin(EM) 생산

본 연구의 공시균을 이용하여 미생물 호르몬인 VB-C에 의한 EM 생산유도능을 확인하기 위해 EM생산 시기를 조사하였다. RS배지에 전배양균을 3%접종하여 28°C, 150 rpm에서 배양하여 배양일수별로 sampling하여 항생물질 생산시기를 검토한 후, 다시 두 시간 간격으로 sampling하여 생산 time course를 결정하였다.

VB용액의 조제

배양액 중 생산된 천연형 VB류(VB-A~E)는 김 등(17)의 방법에 따라 조제하였다. 즉, 50ml의 RS배지에 전배양균을 3%접종하여 28°C, 150 rpm에서 1~4일까지 배양하였다. 배양상등액을 염산산성(pH 2~3)하에서 2배량의 ethylacetate로 추출하여 Na₂SO₄로 탈수하고, 진공농축(Rotary evaporator, EYELA Co.)후 ethanol 1 ml에 용해하여 천연형 VB용액으로 사용하였다. 천연형 VB류의 생산확인용 추출한 VB용액을 김 등(17)의 방법에 따라 시험균 *S. virginiae*을 이용한 VB bioassay를 통하여 virginiamycin (VM)생산 유도능으로 확인하였다.

VB-C receptor의 binding assay

*S. erythraeus*의 VB-C binding protein(receptor) 존재 유무는 김 등(9)의 방법에 따라 판단하였다. 먼저 각각 1일, 2일간 배양한 균체 1 g을 0.5 M KCl, 5 mM dithiothreitol이 첨가된 0.05 M triethanolamine(TEA) buffer(pH 7.0) 10 ml에 현탁하여 sonicator로 3분간 파쇄 후 원심상등액을 30~80% 포화(NH₄)₂SO₄로 농축, 탈염하여 조단백질 용액을 제조하였다. 조단백질을 protein assay kit(Bio-rad Co.)로 정량한 후, 100 µg의 조단백질 용액에

0.5 M KCl 및 5 mM dithiothreitol이 함유된 0.05 M TEA buffer를 첨가하여 100 μ l로 조정하고, 최종농도 0.125 mM(3 μ l 첨가)되게 cold VB-C(non-labeled)를 첨가 및 미첨가하여 실온에서 20분간 반응시켰다. 다음에 최종농도가 69.6 nM(2 μ l 첨가)되게 [³H]VB-C₇(54.6 Ci/mmmole)을 첨가하여 동일조건하에서 반응시킨 다음 100% 포화(NH₄)₂SO₄ 용액 900 μ l를 넣어 20분간 실온에서 방치 후, 15,000 \times g에서 10분 동안 원심분리하였다. 이때 생긴 침전(protein-ligand complex)을 동포화용액 1 ml로 1회 washing하고 다시 원심분리하여 상등액을 제거한 후, 100 μ l의 H₂O에 용해시켜 10 ml의 toluene 용액(Toluene 500 g/l, Triton X-100(polyethylene glycol mono-*p*-isooctylphenyl ether, Nakarai Co.) 500 g/l, Omnifluor(Dupont Co.) 4 g/l)을 첨가하여 scintillation counting(Beckman LS 7500)하였다. [³H]VB-C₇에 대한 특이적인 결합은 cold VB-C의 첨가 및 미첨가의 차이로서 산출하였다.

항생물질 생산 유도능의 확인

김 등의 방법(17)에 따라 RS배지 25 ml에 전배양균을 3%되게 접종하여 합성한 VB-C(2위 측쇄 탄소수 6개, ethanol에 용해) 300 ng/ml를 배양 0, 20, 44시간째에 첨가 및 미첨가하여 28 $^{\circ}$ C, 150 rpm에서 배양하고 배양후 62시간부터 72시간까지 2시간 간격으로 1 ml씩 sampling하였다. 각 배양액의 원심상등액 중 생산된 항생물질을 시험균 *B. subtilis* PCI 219 및 *E. coli* K-12를 사용하여 cup을 이용한 agar diffusion법에 의해 생성된 clear zone으로서 확인하였다.

항균 spectrum의 분석

유도 항생물질의 항세균 및 항진균 효과를 검토하기 위하여 본배양 44시간째에 VB-C(300ng/ml)를 첨가 및 미첨가하여 4일간 배양한 후, 배양상등액을 사용하여 세균 17균주, 곰팡이 3균주, 효모 3균주를 대상으로 항균 spectrum을 검토하였다. 항균 효과는 각 시험균이 함유된 평판배지위에 paper disc를 얹고 배양액 20 μ l를 첨가하여 28 $^{\circ}$ C(효모, 곰팡이) 및 37 $^{\circ}$ C(세균)에서 1~2일간 배양한 다음 clear zone의 유무로서 확인하였다.

결과 및 고찰

Transformant의 제조

plasmid가 존재하지 않는 EM 생산 균주인 *S. erythraeus*에 VB-C receptor 생합성 유전자인 *barA*(2.8kb)가 함유된 plasmid pARS 701을 도입하여 transformant를 제조하고 thiostrepton이 함유된 YEME배지에 계대배양하였다. 그리고 pARS 701을 분리하여 전기영동한 결과 Figure 1A에서 보는 바와 같이 9 kb의 pARS 701이 *S. erythraeus*에 transformation되었음을 확인하였다. 분리된 9 kb의 plasmid를 *Bam*HI으로 처리한 결과(Figure 1B) 2.8 kb 및 6.2 kb의 2개의 fragment가 확인되었으며, VB-C receptor gene(*Bam*HI site)은 2.8 kb 크기(13)의 단편임이 확인되었다.

***S. erythraeus*로부터 erythromycin생산**

본 공시균(parent주) 및 transformant의 항생물질 생산 유도능을 비교하기 위해 EM생산 최적 배지조성인 RS배지에서 배양일 수별로 생산능을 검토한 결과 두 균주 모두 배양 3일째에 항생

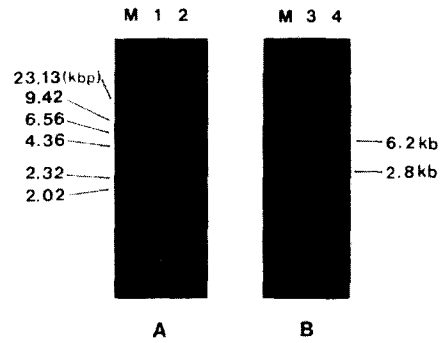


Figure 1. Agarose gel electrophoretic analysis of pARS 701 (A) Plasmid was isolated from transformant and subjected to 1% agarose gel electrophoresis. (B) pARS 701 was digested with *Bam*HI. M: DNA marker, 1: pARS 701(*S. lividans* TK 21), 2: pARS 701 (transformant), 3: *Bam*HI digest(*S. lividans* TK 21), 4: *Bam*HI digest (transformant)

Table 1. Time course of the Em production in *S. erythraeus* parent and transformant.

Incubation time (hour)	Antibiotics production			
	<i>E. coli</i> K-12		<i>B. subtilis</i> PCI 219	
	Parent	Transformant	Parent	Transformant
	Inhibitory zone (\varnothing , mm)			
60	-	10	-	-
62	-	10	-	+
64	-	11	-	+
66	-	12	-	10
68	9	12	-	11
70	10	11	-	10
72	10	12	-	11

물질을 생산하였다(결과 미공개). 따라서 항생물질 생산 시점을 보다 정확하게 결정하기 위해 본배양 60시간째부터 다시 두시간 간격으로 sampling 하여 항생물질 생산을 조사하였다. Table 1에서 보인 바와 같이 parent는 68시간, transformant는 60시간 이전부터 항생물질을 생산하였으며, transformant가 parent보다 8시간 이상 빠른 결과를 나타내었다. 이 결과로 도입한 receptor유전자의 초기발현과 생산된 유도인자와의 결합에 의해 항생물질생산 유전자의 발현촉진 가능성이 시사되었다.

***S. erythraeus*의 VB류 생산**

공시균의 합성 VB-C에 의한 EM생산 유도기구를 규명하기 위하여 공시균의 배양액 중 천연형 VB류의 생산을 *S. virginiae*을 이용한 VB bioassay를 통하여 virginiamycin(VM)생산 유도능으로 확인하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 parent의 경우 2일째 배양액에서 추출한 VB류에 의하여 *S. virginiae*의 VM생산이 4시간 정도 빨라졌다. 또한 1, 3, 4일째 배양액에서 추출한 VB류에 의하여 2시간 정도 촉진되었고 3, 4일 배양이 2일보다 다소 유도능이 약한 것은 VB-receptor의 결합으로 free상태의 VB량이 감소한 결과로 추정되었다. 한편 transformant는 1, 2, 3, 4일째 배양액에서 추출한 VB류 모두 VM 생산시기를 2시간 정도 촉진하였으며 1일째 생산된 VB량에 의해 유도된 VM의 생산량이 다소 증가되었다. 따라서 본 공시균은 parent와 transformant 모

Table 2. Induction of virginiamycin production by natural VBs in *S. virginiae*.

Incubation time(hour)	- VBs	+ Natural VBs extract (days)								
		parent				transformant				
		1	2	3	4	1	2	3	4	
Inhibitory zone (∅, mm)										
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-
12	-	10	15	14	13	15	14	14	13	
14	15	12	17	16	16	17	16	17	16	
25	18	13	17	18	17	15	15	18	16	

^a Natural VBs were prepared from 50 ml of culture broth at cultivation time of 1~4 days and added to *S. virginiae* cultures at incubation time of 6 h.

Table 3. Specific [³H]VB-C₇ binding activity of cell-free extract by *S. erythraeus*.

Incubation time(day)	[³ H]VB-C ₇ binding activity (10 ³ dpm/mg protein)	
	Parent	Transformant
1	-	1.98
2	8.33	-

^a Cell-free extract was incubated with 69.6 nM [³H]VB-C₇ for 20 minutes in the presence and absence of 0.125 mM non-labeled VB-C. Other experimental conditions were described in Materials and Methods.

두 VB류를 생산하며, parent의 경우는 배양 2일째에 VB류의 생산량이 증가됨에 반하여, transformant는 배양 1일째에 VB류 생산량이 증가된다고 추정되며, parent처럼 현저한 차이가 없는 점은 receptor gene의 발현으로 생산된 VB와 결합에 의해 free 상태의 VB가 다소 감소되었기 때문이라고 사료되었다.

VB-C receptor 생산능 검토

Table 2의 결과에서 receptor의 존재가 예상되는 점에서 본 실험의 대상균인 *S. erythraeus*에 있어서 VB signal 전달과 관련하여 VB 결합 단백질의 존재유무를 조사하였다. 배양 1, 2일째의 균체를 파쇄한 상등액으로부터 조제한 조단백질에 대해 VB-binding assay법(9)을 통해 특이적인 VB-C결합 단백질의 존재를 경쟁적 저해를 사용하여 검토하였다. 결과는 Table 3에 나타낸 바와 같이 parent는 배양 2일부터 receptor의 생산이 확인되었으며, transformant는 receptor gene의 발현으로 배양 1일째부터 receptor를 생산하며 2일째는 생산된 VB와 결합에 의해 free의 receptor 검출이 확인되지 않았다고 사료되었다. 이들 결과에서 VB와 receptor의 생산시기는 김 등(8, 9)의 보고와 같이 receptor → VBs → antibiotics의 순으로 예상되며, receptor의 생산에 의해 VBs가 유도되는 기구가 transformant에서 추정되었다. 따라서 본 공시균 역시 EM 생산유도를 위해 *S. virginiae*와 유사한 VB signal 전달 기구를 소유한다고 예상되었다.

VB-C의 첨가에 따른 EM의 생산 유도능

Table 1의 EM 생산시기, Table 2, 3의 VB 생산 및 receptor 생산결과로부터 공시균주 및 transformant의 VB-C에 의한 항생물질 생산 유도능을 검토하였다. VB의 첨가시기는 *S. virginiae*의 경우 본배양 4시간 이전에 VB를 첨가할 경우 VM 생산이 저해되는 결과(22)와 비교하기위해 본 공시균의 VB류 및 receptor 생산시기와 항생물질 생산시기를 고려하여 합성VB-C의 첨가시

Table 4. Effect of addition time of synthetic VB-C on antibiotics induction.

Incubation time (hour)	VB-C addition time (hour) ^a							
	Parent				Transformant			
	no addition	0	20	44	no addition	0	20	44
Inhibitory zone (∅, mm) ^b								
(<i>E. coli</i> K-12)								
60	-	10	10	11	10	10	10	11
62	-	11	11	12	10	10	10	13
64	-	12	13	12	11	10	10	13
66	-	11	13	13	12	12	12	14
68	9	13	14	13	12	11	12	14
70	10	14	13	13	11	12	12	14
72	10	12	13	13	12	12	12	14
(<i>B. subtilis</i> PCI 219)								
60	-	-	-	-	-	+	±	12
62	-	±	±	10	±	±	±	15
64	-	10	10	10	±	±	±	15
66	-	10	10	10	10	10	10	15
68	-	±	10	10	11	10	10	16
70	-	±	10	11	11	10	10	14
72	-	+	10	11	10	10	10	14

^a 300 ng/ml of synthetic VB-C was added at cultivation time of 0, 20 and 44 h.
^b Antibacterial activity was tested by agar diffusion method(cup) using culture broth(300 μl).

기(0, 20, 44시간)에 따른 유도능을 조사하였다. 합성 VB-C(8)를 배양액중에 첨가 및 미첨가하여 EM의 생산시기를 조사하므로써 항생물질의 생산유도능을 확인하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 parent의 경우 배양 0, 20, 44시간째에 VB-C를 첨가함에 따라 약 8시간 이상 항생물질 생산 시작 시점이 빨라졌으며 transformant는 배양 44시간째에 VB-C를 첨가한 경우 미첨가한 경우보다 6시간 이상 단축되었다. 또한 항생물질의 생산량도 증가되었으며, 특히 parent에 비해 *B. subtilis*에 대한 항균력이 증가되었다. 따라서 본 공시균에 있어서 항생물질 생산 유도를 위한 VB-C 첨가시기는 항생물질의 생산시기와 동일 시간대의 항생물질 생산량으로 보아 본배양 44시간째가 적합하다고 사료되었다. 또한 본배양 0시간에 첨가하여도 유도능이 존재하는 점에서 *S. virginiae*와 다소 다른 signal 전달기구가 예상되며, transformant의 경우 배양 초기 receptor gene의 발현과 생산된 VB와 결합에 따른 signal 전달에 의해 parent보다 EM생산시기가 빠르며, 본배양 44시간째 VB-C 첨가시 EM생산량 증가 이유는 불명이나 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

항균 spectrum

공시균이 생산하는 항생물질의 VB-C 첨가 및 미첨가에 따른 항균력의 차이를 검토하기 위하여 Gram(+)세균 7균주, Gram(-)세균 9균주, 곰팡이 3균주, 효모 3균주를 대상으로 항균 spectrum을 조사하였다. Table 4의 결과를 바탕으로 본배양 44시간째에 VB-C를 첨가 및 미첨가하여 항균력을 검토한 결과 Table 5에서 보인 바와 같이 parent보다는 transformant가 생산한 항생물질의 항균효과가 다소 큰 것으로 나타났으며, VB-C를 첨가한 경우 미첨가한 경우보다 넓은 항균 spectrum을 보였다. 이들 결과에서 공시균인 *S. erythraeus*에서 VB signal 전달에 따른 항생물질 생산유도가 입증되었으며, VB-C receptor gene의 도입

Table 5. Antimicrobial spectrums.

Strains	Parent		Transformant	
	-	+	-	+
	VB-C	VB-C	VB-C	VB-C
	Inhibitory zone (ϕ , mm)			
Gram(+) bacteria				
<i>Bacillus circulans</i>	12	14	13	14
<i>Bacillus licheniformis</i> IFO 12197	-	10	8	11
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	-	-	±	8
<i>Bacillus thermoglucosidus</i>	±	9	8	11
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1927	±	8	8	11
<i>Streptococcus equii</i>	8	8	8	8
<i>Streptococcus zooepidemicus</i>	±	10	8	11
Gram(-) bacteria				
<i>Escherichia coli</i> K-12	±	9	±	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1930	8	11	11	13
<i>Pseudomonas fluorescens</i> KCTC 1645	9	10	10	11
<i>Serratia marcescens</i>	-	9	8	10
Fungi				
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFO 5840	-	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-
<i>Asprgillus flavus</i>	-	-	-	-
Yeast				
<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	-	-	-	-
<i>Hansenula anomala</i>	18	18	18	18
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16	16	16	16

³ Antimicrobial activity was detected by the disc diffusion method using 20 μ l of culture broth at cultivation time of 4 days. 300 ng/ml of synthetic VB-C was added at cultivation time of 44 h.

에 따른 발현과 함께 VBs의 유도, 항생물질의 생산시기의 단축 및 생산량의 증가가 예상됨에 따라 다양한 *Streptomyces* sp. 균주를 대상으로 항생물질의 대량생산을 비롯하여 silent gene의 발현에 따른 새로운 2차 대사산물 생산에도 응용되리라 예상된다.

요 약

Streptomyces virginiae 유래의 virginiamycin 생합성 유도인자인 VB-C를 이용하여 다른 방선균에의 항생물질 생산 유도 기능을 검토하였다. Erythromycin 생산균인 *Streptomyces erythraeus*를 공시균주로 사용하였으며, VB-C 결합 receptor 유전자가 포함된 plasmid(pARS 701, 9 kb)를 공시균주에 도입하여 transformant로 사용하였다. Parent와 transformant 모두 유도인자인 VB-C를 생산하였으며, VB-C의 signal 전달에 관여하는 결합 단백질의 존재가 확인되었다. Parent는 본배양 0, 20, 44시간째에 합성 VB-C 300 ng/ml를 첨가시 초기 항생물질 생산시기가 약 8시간 이상 단축되었다. Transformant는 본배양 44시간에 첨가시 6시간 이상 항생물질 생산시기가 단축되었고 항생물질 생산량도 증가되었으며, parent에 비해 *B. subtilis*에도 강한 항균력을 나타내었다. 또한 항균 spectrum은 parent보다는 transformant가 생산한 항생물질의 항균효과가 더 큰 것으로 나타났으며, VB-C를 첨가한 경우 미첨가 경우보다 넓은 항균spectrum을 보였다. 이들 결과에서 공시균인 *S. erythraeus*에서 VB signal 전달에 따른 항생물질 생산유도가 입증되었으며, VB-C receptor gene의 도입에 따른 발

현과 함께 VBs의 유도, 항생물질의 생산시기의 단축 및 생산량의 증가가 예상됨에 따라 다양한 *Streptomyces* sp. 균주를 대상으로 항생물질의 대량생산을 비롯한 새로운 2차 대사산물 생산에의 응용이 예상되었다.

감사의 말

본 연구는 1998년도 계명대학교 비사 연구기금으로 수행되었으며, plasmid를 제공해주신 일본 국립 오사카대학 Yamada 교수께 감사드립니다.

REFERENCES

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 *Actinomyces 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 biosynthesis of A-factor, actinorhodin and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3 (2) and *Streptomyces lividans*, *J. Bacteriol.*, **155**, 1238-1248.
6. Horinouch, 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), Isolation and structure of a new butyrolactone autoregulator from *Streptomyces* sp. FRI-5, *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 214-217.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Kim, H. S. (1992), Characterization of the binding activity of Virginiae butanolide C binding protein in *Streptomyces virginiae*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 257-262.
12. Kim, H. S. (1992), Some properties on the signal transduction in Virginiae butanolide C binding protein, *Kor. Jour. Microbiol.*, **30**, 181-186.

13. Okamoto, S., K. Nakajima, and Y. Yamada (1995), Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 12319-12326.
14. Kinoshita, H., H. Ipposhi, S. Okamoto, H. Nakano, T. Nihira, and Y. Yamada (1997), Butyrolactone autoregulator receptor protein(BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*, *J. Bacteriol.*, **179**, 6986-6993.
15. Nakano, H., E. Takehara, T. Nihira, and Y. Yamada (1998), Gene-replacement analysis of the *Streptomyces virginiae barA* gene encoding butyrolactone autoregulator receptor reveals that BarA acts a repressor in virginiamycin biosynthesis, *J. Bacteriol.*, **180**, 3317-3322.
16. 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.
17. Kim, H. S. and S. Y. Kang, (1994), Induction of secondary metabolites by virginiamycin inducing factor, Virginiae butanolide C, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 459-466.
18. Erritt, I., U. Gräfe, and W. F. Fleck (1984), Inducers of both cytodifferentiation and anthracycline biosynthesis of *Streptomyces griseus* and their occurrence in actinomycetes and other microorganism, *Z. Allg. Microbiol.*, **24**, 3-12.
19. Hashimoto, K., T. Nihira, and Y. Yamada (1992), Distribution of virginia butanolide and IM-2 in the Genus *Streptomyces*, *J. Ferment. Bioeng.*, **73**, 61-65.
20. 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, United Kingdom.
21. Patti, M., and R. Baltz (1989), *Streptomyces lipmanii* expresses two restriction system that inhibit plasmid transformation and bacteriophage plaque formation, *J. Bacteriol.*, **171**, 3128-3132.
22. Yanagimoto, M., and G. Terui (1971), Physiological studies on streptomycin production(II) Formation of a substance effective in inducing staphylomycin production, *J. Ferment. Technol.*, **49**, 611-618.