

방선균 유래 이차대사 생합성 유전자 분석용 DNA Microarray 제작 및 해석

남수정 · 강대경¹ · 이기형² · 김종희 · 강상순³ · 장용근⁴ · 홍순광*

명지대학교 생명과학과, ¹주이시바이오시스템 중앙연구소, ²공주대학교 산업과학대학,
³충북대학교 과학교육과, ⁴한국과학기술원 생명화학공학과

다양한 균주들을 대상으로 무작위로 신물질을 스크리닝하는 방법은 많은 노력과 시간이 소요되는 방법이며, 신물질을 발견하는 비율도 계속 낮아지고 있다. 따라서 기존 균주들을 대상으로 microarray 기술을 이용한 target-directed screening 기술의 개발은, 학문적 뿐만 아니라 산업적으로도 중요한 의미를 가진다. 본 연구에서는, 이미 분리된 방선균 각각의 유전체를 대상으로 microarray 분석을 통해, 새로운 생리활성 물질 생산 균주 및 생합성 유전자들을 확보할 수 있는 기법을 개발하기 위한 기초실험을 수행하였다. 즉, 기존에 알려진 생리활성물질 생합성 유전자들을 확보하여 DNA chip을 제조하였으며, 유전체 염기서열이 밝혀진 *S. coelicolor* 균주를 대상으로 그 효율성을 검증하였다. 전체적으로 유전자 상동성이 높을수록 반응감도도 높은 편이었으나, 이러한 상관관계가 일치하지 않는 유전자들도 있었다. 이와 같은 문제는, probe 유전자의 G+C 비율(%)을 서로 비슷하게 구성하거나, 반응조건을 최적화 시킨다면 DNA chip의 효율성을 더욱 높일 수 있을 것으로 판단된다. DNA microarray를 통한 생리활성물질 발굴 연구는 세계적으로도 보고된 바 없는 새로운 접근방법으로서, 본 연구에서 시도하고 있는 방법은 발굴 target과 대상을 지정하고 시도되기 때문에, 효율면에서 무작위 스크리닝과는 비교되지 않을 정도로 높을 것으로 예상된다. 또한 본 연구와 같은 접근방법을 최적화 시킨다면, 방선균 뿐만 아니라 다른 미생물부터 생리활성물질 및 생합성유전자 스크리닝에도 효과적으로 응용할 수 있을 것이다.

Keywords □ *Streptomyces*, DNA microarray, *S. coelicolor*

자연은 입장에서 유용하게 이용되는 항생제, 항암제, 면역 억제제 뿐만 아니라 가축용이나 농업에 이용되는 생장촉진제, 살충제, 제초제, 구충제 등을 포함하여, 경이로울 정도로 무수한 생물학적 활성을 지니는 화합물들을 창조해낸다(2-3, 11). 이러한 생리활성물질 중 60% 이상은 방선균 유래이며, 이러한 이유로 인해 방선균은 신물질 탐색 및 생합성 기작의 주요 연구대상이 되어 왔다(4-6). 그러나 신규 생리활성물질 탐색과정에서 이미 밝혀진 기지의 물질이 재차 분리되는 악순환이 계속되면서, 그 경제성과 효율성이 현격하게 떨어지고 있기 때문에 신규 생리활성물질 탐색의 효율성을 높일 수 있는 다양한 수단의 개발이 절실하다.

한편 방선균 유전체 하나에는 적게는 4개에서 많게는 100여 가지 이상의 생리활성물질을 생산할 수 있는 능력을 가지고 있다고 알려지고 있다. 이러한 생리활성물질을 생합성하는 유전자들은 일상 환경에서는 발현되지 않다가 특정 조건에서만 발현되기 때문에, 보통의 조건에서는 하나의 균주가 생산할 수 있는 대사산물을 전부 스크리닝하기 어렵다는 문제점을 가지고 있다. 이러한 사실은, 지금까지 확보된 수많은 방선균주 각각에는 아직 분리하지 못한 신규 생리활성물질을 생산할 가능성을 가지고 있

다는 것을 의미한다. 본 연구에서는, 이미 보고된 각종 생리활성물질 생합성 유전자군의 유전정보를 이용하여 생리활성물질 생합성 유전자군을 검색할 수 있는 DNA chip을 개발하고, 유전체 정보가 이미 밝혀진 *Streptomyces coelicolor* A3(2) M145 균주의 genomic DNA 및 유전자 발현양상의 변화조사를 통해 DNA chip의 응용 가능성을 확인하는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

방선균 유전자 클로닝을 위한 숙주균으로 *Escherichia coli* DH5 α F'를 사용하였으며, 생합성 유전자의 cloning 및 sequencing을 위해 pUC18과 pGEM-T vector (Promega)를 사용하였다. 생리활성물질 생산 방선균은 균주 분양기관으로부터 구입하였다(Table 1). *E. coli*는 LB (Luria-Bertani) 배지에서 37°C, 1일간 배양하였으며, 방선균은 R₂YE 배지에서 28°C에서 2~3일간 교반 배양하였다(8).

Probe의 확보

생리활성물질 생합성 유전자 69종의 염기서열은 GenBank Database로부터 확보하였으며, 확보한 방선균들의 genome 으로부터 관련유전자들을 PCR (polymerase chain reaction) 방법으로

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-330-6198, Fax: 031-335-8249
E-mail: skhong@mju.ac.kr

Table 1. Strains used in this study

Strains	Products
<i>Streptomyces griseus</i> IFO 13350	Streptomycin
<i>Streptomyces bluensis</i> ATCC 27420	Bluensomycin
<i>Streptomyces spectabilis</i> ATCC 27741	Spectinomycin
<i>Streptomyces tenebrarius</i> KCTC 9047	Nebramycin
<i>Streptomyces abikoensis</i> KCTC 41505	Destomycin
<i>Micromonospora sagamiensis</i> ATCC	Sagamycin
<i>Actinoplanes</i> sp KCTC 9162	Acarbose
<i>Streptomyces albus</i> KCTC 9015	Salbostatin
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> KCTC 1717	Validamycin
<i>Amycolatopsis orientalis</i> KCCM 40595	Vancomycin
<i>Amycolatopsis orientalis</i> KCTC 9425	Ristocetin
<i>Saccharothrix aerocolonigenes</i> KCTC 9384	Rebeccamycin
<i>Amycolatopsis mediterranea</i> KCTC 1739	Rifamycin
<i>Streptomyces hygroscopicus</i> KCTC 9846	Rapamycin
<i>Streptomyces noursei</i> KCTC 1083	Nystatin
<i>Streptomyces spheroids</i> KCCM 40342	Novobiocin
<i>Streptomyces viridochromogenes</i> KCCM 41485	Avilamycin
<i>Streptomyces macromomyceticus</i> KCCM 12297	Auromomycin
<i>Streptomyces galbus</i> KCCM 41354	Galbonolide
<i>Streptomyces steffisburgensis</i> KCCM 40338	Steffimycin
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) M145	Actinorhodin

클로닝하여 DNA chip 제작용 probe를 확보하였다 (Table 2). 대장균으로부터 plasmid DNA 분리과 유전자 조작 및 형질전환은 일반적인 방법에 준하여 행하였다(13).

DNA chip 의 제작

DNA chip 제작 및 분석은 Takara Korea Biomedical 사에서 수행하였다. 확보한 69종의 탐침의 농도를 360 ng/μl로 보정한 후 probe 20 μl에 spotting solution (2X SSC)을 첨가하였다. Arrayer (Affymetrix 사)를 사용하여 probe DNA를 slide에 spotting한 후, spotting이 완료된 slide를 70-80°C 에서 1시간 동안 방치하였다. UV crosslink machine을 이용하여 slide에 자외선을 조사한 후, anhydrous succinic acid solution에 담가 흔들어 주었다. 이어, 증류수 및 숙신산 용액으로 slide를 2회 세척하여 결합하지 않은 물질들을 제거하였다. 다음으로, 100°C 증류수에 2분간 담갔다가 물기를 제거한 후, 차가운 ethanol에 1분간 담가 두었다. 마지막으로 ethanol을 제거한 후 상온에서 건조 시켰다.

Genomic DNA 형광표식

제작된 DNA chip의 microarray의 분석을 위해서, 전체 염기서열이 밝혀진 *S. coelicolor* A3(2) M145 균주의 genome을 사용하였다. Hopwood 등의 방법 (7)에 따라 회수한 genomic DNA 단편을 random priming법 (8)으로 Cy5-dUTP를 incorporation 시켜 형광 표식하였다. 형광 표식 반응에 사용된 genomic DNA, random hexamer 및 human β-actin fragment (control)의 양은 각각 5 μg, 1 nmol, 20 ng 이었으며, 37°C에서 2.5 시간동안 반응 시켰다. 형광표식 반응산물은 G-50 Purification column으로 미반

Table 2. Comparison of DNA homology between the target genes for DNA microarray and the chromosomal DNA of *S. coelicolor*

	Target gene	Probe size (Kb)	Gene Bank accession number	Homology (%)
1	AG-BlmC	1.1	AF210249	56
2	AG-Des	0.5	Personal communication	61
3	AG-Nbm	0.5	AJ579650	60
4	AG-SpcM	0.7	AF145038.	59
5	AG-SpcS2	0.8	AF145039	59
6	AG-StrB1	0.9	Y00459	57
7	AG-StsC	0.9	Y08763	58
8	AN-RifG	1.1	AF040570	58
9	AN-RifH	1.2	AF040570	58
10	AN-RifI	0.7	AF040570	59
11	AN-RifK	1.0	AF040570	58
12	COM-NovI	1.0	AF170880	56
13	COM-NovL	1.0	AF170880	60
14	COM-NovM	1.0	AF170880	58
15	ENE-ABC	0.5	AF546155	60
16	ENE-PKS	0.8	AF546155	66
17	GLY-Core	0.6	Personal communication	67
18	GLY-GTF2	0.5	Personal communication	60
19	GLY-GtfD	1.0	AF351621	57
20	GLY-HPD	0.5	Personal communication	60
21	GLY-PGO	0.6	Personal communication	63
22	ID-GTF	1.0	AJ414559	56
23	ID-RebD1	1.0	AJ414559	58
24	ID-RebD2	0.9	AJ414559	56
25	ID-RebD3	1.0	AJ414559	55
26	ID-RebH	1.0	AJ414559	56
27	ID-RebO	1.0	AJ414559	57
28	OR-AviGT2	0.7	AF333038	58
29	OR-AViGT3	1.0	AF333038	57
30	OR-AviGT4	1.0	AF333038	62
31	OR-AviM1	1.1	AF333038	58
32	OR-AviM3	1.2	AF333038	58
33	OR-AviX12	1.2	AF333038	58
34	PKS-I-Dye	0.5	Personal communication	76
35	PKS-I-Gal1	0.4	Personal communication	63
36	PKS-I-Gal2	0.9	Personal communication	70
37	PKS-II-dpsA	1.1	L35560	65
38	PKS-I-Nys	1.2	AAF71766	58
39	PKS-I-Rapa2	1.0	AF007101	62
40	PKS-I-Rapa3	0.8	AF007101	57
41	PKS-I-Rif	1.2	AAC01711	62
42	PKS-I-Sal	0.6	AB087998	69
43	PKS-II-dpsB	1.2	L35560	59
44	PKS-II-dpsD	1.0	L35560	69
45	PKS-II-dpsE	0.7	L35560	58
46	PKS-II-dpsF	1.0	L35560	58
47	PKS-I-Rapa1	1.2	AF007101	60
48	POL-NysL	1.0	AF263912	56
49	POL-NysDI	1.0	AF263912	57
50	POL-NysDII	1.0	AF263912	57
51	POL-NysDIII	1.0	AF263912	58
52	PPA-RapP1	1.0	AF007101	59
53	PPA-RapP2	1.0	AF007101	62

Table 2. continued

Taget gene	Probe size (Kb)	Gene Bank accession number	Homology (%)
54 PPA-RapP3	1.0	AF007101	58
55 PPA-RapP4	1.0	AF007101	57
56 SAG-BtrB	1.0	In our study	57
57 SAG-BtrM	1.0	In our study	57
58 SAG-OXY	0.8	In our study	57
59 SAG-Scyllo	1.2	In our study	56
60 VA-AcbC	0.5	Y18523	58
61 VA-AcbD	1.2	AJ293724	56
62 VA-AcbK	0.7	Y18523	58
63 VA-AcbO	0.7	Y18523	58
64 VA-SalL	0.9	In our study	58
65 VA-SalC	0.5	In our study	57
66 VA-SalM	0.9	In our study	58
67 VA-SalN	0.8	In our study	59
68 VA-SalO	0.8	In our study	60
69 Va-ValC	0.5	In our study	58

응물을 제거하였으며, chloroform extraction과 ethanol 침전을 실시하여 회수한 후에 증류수 5.5 µl에 녹여 다음의 실험에 사용하였다.

DNA hybridization 및 microarray 분석

형광표식 산물에 동량의 2X hybridization solution (6X SSC, 0.2% SDS, 5X Denhardt's solution, 0.1 mg/ml salmon sperm DNA)을 첨가하여 95°C에서 2분간 처리하여 형광표식된 산물을 변성시킨 후, 실온에서 수초간 원심 분리하여 튜브 내에 모았다. 변성된 형광표식 산물을 DNA chip에 올려 놓고 cover glass로 덮은 후 37~65°C에서 12~16시간 동안 암조건에서 hybridization을 실시하였다.

Hybridization 후 58°C의 2X SSC/0.2% SDS 용액내에서 cover glass를 제거하고 68°C의 2X SSC/0.2% SDS 용액에서 5분간, 실온의 2X SSC 용액에서 5분간, 실온의 0.05X SSC 용액에서 5분간 세척을 실시한 뒤, 500 × g에서 5분간 원심분리 하여 수분을 제거하였다. Hybridization된 DNA chip은 428TM Array Scanner (Affymetrix)를 이용하여 Cy5 channel에 대해 scanning한 뒤, raw image를 저장하였다. 저장된 image로부터 ImaGene 프로그램(BioDiscovery Inc. USA)을 이용하여 형광의 raw intensity를 추출하였다.

방선균으로부터 total RNA의 분리

S. coelicolor A3(2) M145 균주를 Tryptic Soy Broth 또는 peptide 항생제의 생산배지 (1% glucose (Sigma), 2% soluble starch (Sigma), 0.5% yeast extract (Difco), 0.5% casein (Sigma), 4.6% MOPS (Sigma), pH 7.0)에서 28°C에서 2일간 배양한 후에, 배양액을 50 ml falcon tube에 담아 8,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 2 ml의 X solution (1 mM EDTA-25 % SDS 1.5 ml, 15% phenol 0.6 ml, DEPC water 7.88 ml)을 첨가하여 현탁시키고 glass bead를 넣어 1분 간격으로 8분간

vortex 하였다. 여기에 5 ml의 phenol:chloroform (1:1)을 첨가하여 3-4분간 vortex하여 RNA를 추출한 다음, RNA easy clean up Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다.

cDNA 제작 및 microarray 분석

분리된 RNA를 labelling하고 제작한 방선균용 microarray에 hybridization하였다. cDNA는 Superscript II(-) (Invitrogen, USA)와 RNA 3 µg, cDNA labelling random primer 0.25 µg을 반응하여 합성하였으며, oligo dT primer를 positive control로 하였다. 정제한 cDNA에 5 µg의 5 × 반응 buffer와 5 µl의 dNTP-dUTP mix (dGTP, dATP, dCTP 각각 0.5 mM, aminoallyl dUTP 0.2 mM, dTTP 0.3 mM)를 첨가한 후 42°C에서 2시간 동안 반응시켜 aminoallyl d-UTP를 incorporation 시켰다. 반응 후, Microcon YM30 columns (Millipore, USA)을 사용하여 반응액으로부터 free amine을 제거하고 Speed vac (Savant, USA)으로 건조 시켰다. 다음, 0.05 M sodium bicarbonate (pH 9.0)에 FluoroLink Cy5 (emission 635 nm, Red) 나 Cy3 (emission 532 nm, Green) monofunctional dye (Amersham Pharmacia Biotech, USA)를 반응액의 1/16 만큼 첨가하고 1시간 동안 암실에서 반응시켜 probe를 형광 표식 하였다. 형광 표식된 probe에 hybrid solution (Ambion, USA)을 첨가하고 95°C에서 5분간 처리하여 변성시킨 후, 68°C까지 식힌 다음 42°C에서 18시간 동안 hybridization 시켰다. 남아있는 dye는 Qia-Quick PCR purification column (Qiagen, USA)으로 제거하였고, hybridization에 사용하기 위하여 probe를 Typhoon scanner (Amersham, USA)로 정량하였다. 형광표식된 probe에 hybrid 용액 (Ambion, USA)을 넣고 95°C에서 5분간 denaturation 시키고, 68°C로 식힌 후, hybridization을 42°C에서 18시간 실시하였다. Hybridization된 slide는 Gene Pix 400A scanner Gene Pix 3.0 software (Axon Instruments, USA)를 이용하여 scanning 및 분석하였다.

결과 및 고찰

DNA microarray에 이용할 유전자 probe 확보

생리활성물질 생산균주 발굴용 DNA chip을 개발하기 위해, aminoglycoside 계열, valienamine 함유 생리활성물질, glycopeptide 계열, indolocarbazole 계열, ansamycin, pipercolic acid 함유 이차대사산물, polyene 계열, coumarin 계열, orthosomycin, enediyne 계열, macrolide, aromatics 등 12가지 계열, 총 69종의 생리활성물질 생합성 유전자들의 유전정보를 확보하였다(1-5, 6, 9-12, 14-17, 19-21). 확보된 유전정보를 바탕으로, 생리활성물질 생산 방선균들로부터 생리활성물질 생합성 유전자들을 PCR 방법으로 클로닝하였으며, 이를 이용하여 DNA chip을 제작하였다. 클로닝한 유전자들과 *S. coelicolor* A3(2) M145 유전체와의 상동성을 조사한 결과, 전반적으로 55~65% 정도의 상동성을 보이는 것을 알 수 있었다 (Table 2). 제작한 probe 유전자들이 실제로 *S. coelicolor* DNA와 결합하는지를 확인하기 위해, 상동성이 가장 높은 PKS-I-*gall* probe (76%)와 PKS-II-*dpsA* probe (70%)을 사

용하여, *S. coelicolor* 의 genomic DNA와 Southern hybridization 실험을 실시한 결과, positive 반응을 얻음으로써, DNA chip의 유용성을 예비 검증 하였다(자료미제시).

DNA chip과 *S. coelicolor* genomic DNA와의 반응조건 적정화

앞서 분석한 microarray용 probe와 *S. coelicolor* A3(2) M145 genomic DNA와의 최적반응조건을 탐색하기 위해, *S. coelicolor* A3(2) M145 genomic DNA의 절단 유무, hybridization 온도, washing 온도에 따른 labeling 및 washing 효율을 비교 분석하였다.

먼저, genomic DNA 절단여부에 의한 반응효율은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 제한효소 *Sma*I으로 절단했을 경우(Fig. 1 (B))가 절단하지 않았을 경우(Fig. 1 (A))보다 반응감도가 상대적으로 더 높음을 알 수 있었다. 또한, 일부 유전자를 제외하고는 DNA homology와 반응감도와의 상관관계는 전체적으로 비례하는 양상을 나타내었다(Fig. 2). Genomic DNA를 물리적으로 절단했을 경우에도 동일한 양상을 나타내었다(자료미제시). 다음으로, hybridization 온도 및 washing 온도가 반응효율에 미치는 영향에 대해 조사한 결과는 Fig. 3 에서 보는 바와 같다. *S. coelicolor* genomic DNA를 제한효소 처리한 후 65°C 및 37°C 에서 각각 hybridization하여 비교한 결과, 65°C에서 hybridization 한 경우 (Fig. 3(A), 3(B))가 37°C 에서 처리한 경우 (Fig. 3(C), 3 (D))보다 DNA homology와 반응감도사이의 상관관계가 높은 편이었다. 즉, hybridization온도가 낮을 경우에는 비특이적 결합이 많아, DNA homology와 반응 감도간의 상관관계가 낮은 것으로 판단되었다. 한편, washing온도에 따른 반응감도의 뚜렷한 차이가 없었다 (Fig. 3(A)와 3(B) 및 3(C)와 3(D) 간의 비교).

배지 종류에 따른 *S. coelicolor* 의 유전자 발현양상 비교

DNA chip의 적정 반응 조건하에서, 배지 종류에 따른 *S. coelicolor* 유전자들의 발현양상을 조사하였다. 먼저, *S. coelicolor* A3(2) M145를 Tryptic Soy Broth와 peptide 항생물질인 methyl-enomycin 생산용 배지(Mops 46 g, glucose 10 g, soluble starch 20 g, yeast extract 5 g, malt extract 5 g, tween-80 5g/1L) 에서 각각 2일간 배양하였다. 배양된 *S. coelicolor* 균사체로부터 total

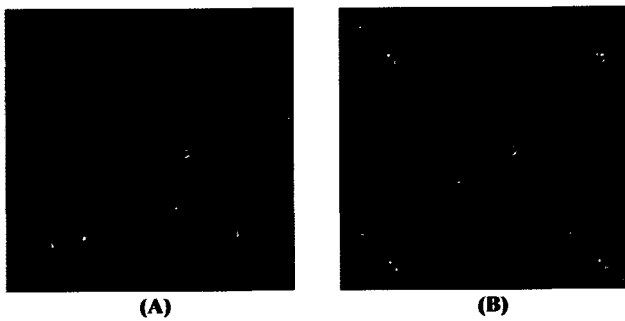


Fig. 1. Comparison of labeling and washing efficiency between non-fragmented genomic DNA (A) and fragmented genomic DNA (B).

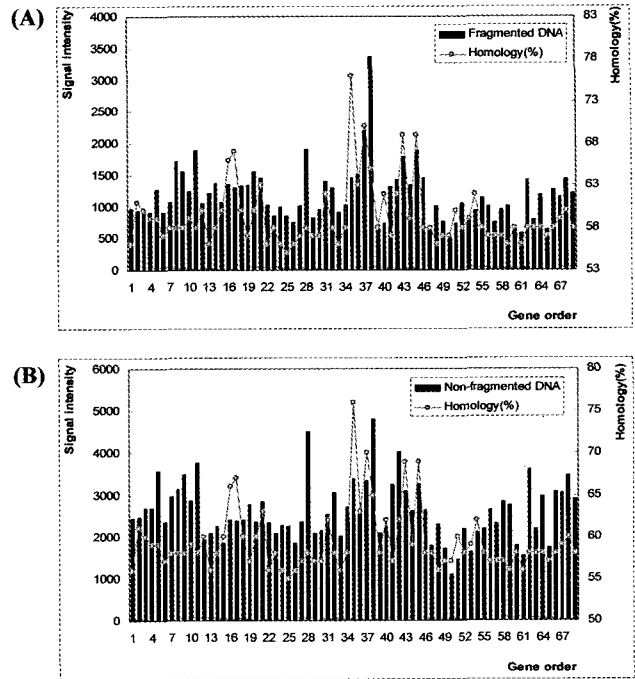


Fig. 2. Relationship of DNA homology and reaction sensitivity between fragmented genomic DNA(A) and non-fragmented genomic DNA(B).

RNA를 분리하였으며, Tryptic Soy Broth에서 분리한 total RNA는 Cy3, peptide 생산용 배지에서 분리한 RNA는 Cy5로 각각 형광표식하였으며, Gene Pix 400A scanner 와 Gene Pix 3.0 software (Axon Instruments, USA)를 이용하여 분석하였다(Fig. 4(A), 4(B)).

Fig. 5(A) 에서 보는 바와 같이, Tryptic Soy Broth 에서 배양한 경우가 peptide 생산용 배지에서 배양한 경우보다 전체적인 반응감도가 더 높았으며, 2가지 배지 모두에서 PKS-I-Sal (#42, homology 62%) 유전자의 감도가 가장 높았다.

반응감도가 가장 높았던 PKS-I-Sal 유전자의 2가지 배지에서의 감도를 각각 100으로 환산하여 배지 종류에 따른 유전자 발현량의 변화를 상대 비교 (Target gene 감도/PKS-I-Sal 감도)한

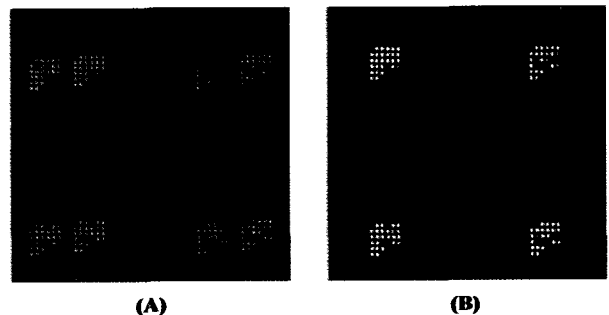


Fig. 4. Total RNA analysis of *S. coelicolor* depending on culture medium. (A) Red : Cy3 (Tryptic Soy Broth), Green : Cy5 (Peptide Antibiotic Production Medium) (B) Overlap image of Cy3 and Cy5.

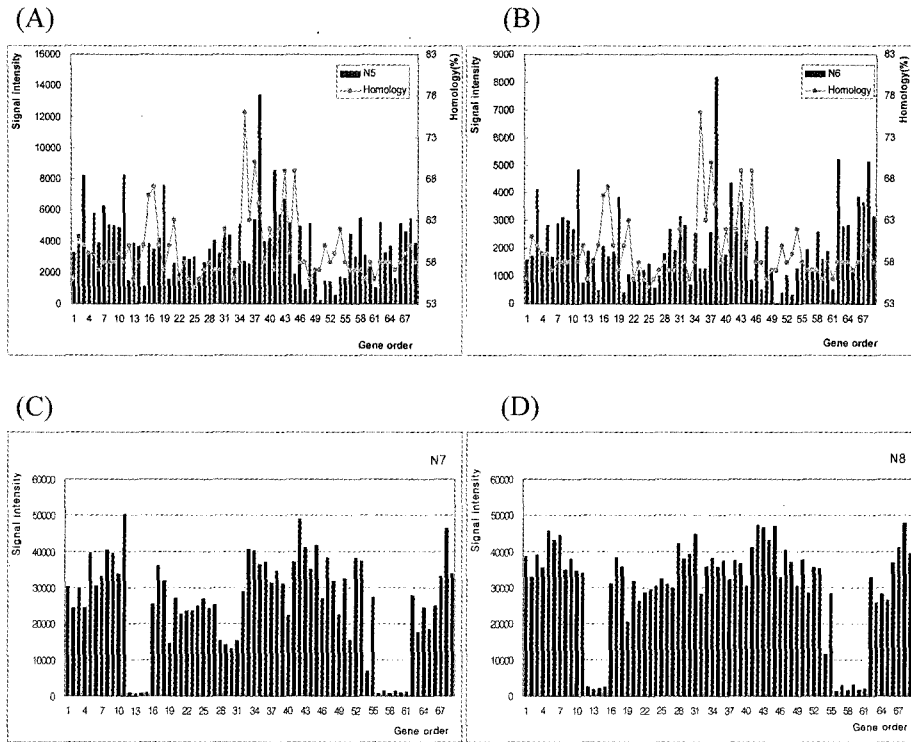


Fig. 3. Effect of hybridization and washing temperatures on microarray sensitivity. (A) hybridization temperature 65°C + washing temperature 20°C, (B) hybridization temperature 65°C + washing temperature 55-65°C, (C) hybridization temperature 37°C + washing temperature 20°C, (D) hybridization temperature 37°C + washing temperature 55-65°C.

결과, AN-RifI (#10, Aminoquinolate/shkimate dehydrogenase)의 경우 TSB 배지에서 반응감도가 더 높지만 (Fig. 5(A)), production medium의 반응감도 증가분을 감안하여 비교해 보면 (Fig. 5(B)) 오히려 production medium에서 증가한 것을 알 수 있었다. 같은 방법으로 ID-RebD1 (#23, Indole synthase), SAG-OXY (#58, Sagamicin oxidoreductase), VA-AcbC (#60, Sedoheptulose 7-phosphate cyclase) 유전자에서도 production medium에서 발현량이 상대적으로 증가하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5(B), Fig. 6 (B)). 한편, AG-SpcM (#4, Methyltransferase), AG-StsC (#7, L-arginine: scyllo-inosamine amidinotransferase), ID-GTF (#22, Glycosyltransferase), ID-RebD3 (#25, Indole synthase), POL-NysL (#51, Modification of the nystatin macrolactone ring), VA-AcbK (#62, Acarbose 7-kinase) 등의 발현량은 Tryptic Soy Broth 에서 배양했을 때 발현량이 상대적으로 증가한다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 5(B), Fig. 6(B)).

이러한 결과는, 동일한 균주 일지라도 배양조건에 따라 생합성 유전자의 발현이 조절된다는 것을 의미하며, 같은 균주 일지라도 배양조건을 달리하면 새로운 생리활성물질을 생산할 수 있을 가능성을 시사한다.

산업적인 중요성에 비하여 방선균의 유전체 및 전사체 분석 연구는 타 균주에 비하여 보고된 예가 적으며, DNA-chip의 경우에도 유전체 분석이 완료된 *S. coelicolor*를 중심으로 하는 수 편의 논문만이 보고되어 있다(8, 18). 방선균의 평균 G/C 비율은 특이하게도 70% 이상에 달해 그 해석에 상당히 어려움이 있

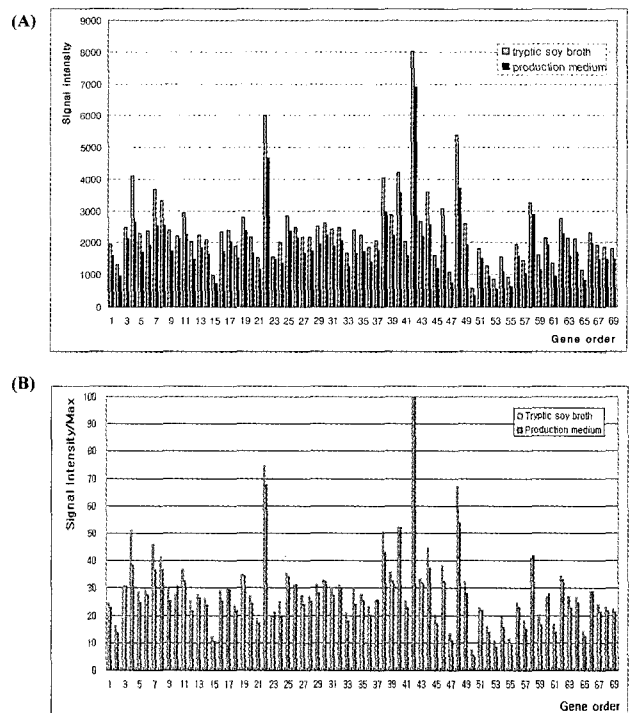


Fig. 5. Comparison of RNA expression profiles of *S. coelicolor* A3(2) M145 according to culture medium. (A) Comparison of DNA chip sensitivity between Tryptic Soy Broth and peptide production medium, (B) Relative sensitivity of the DNA chip according to culture medium.

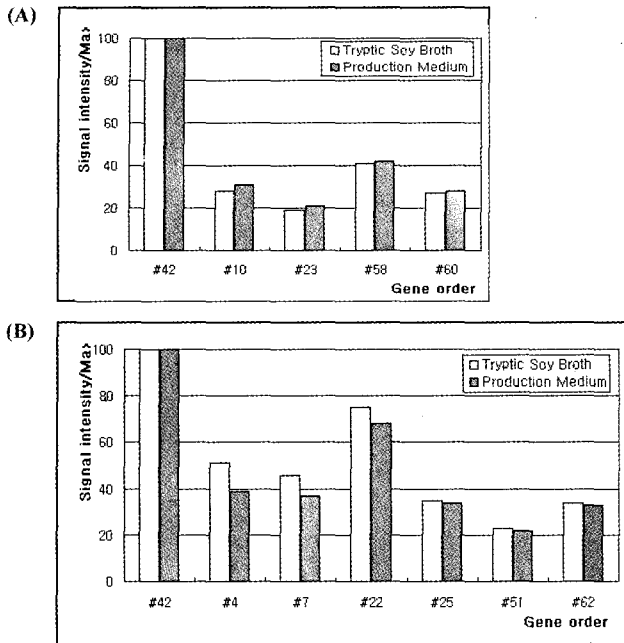


Fig. 6. Comparison of RNA expression profiles of *S. coelicolor* A3(2) M145 according to culture medium.

므로, 이를 잘 제어할 수 있는 기술개발이 절대적으로 필요하며, 이를 통해 신규물질의 탐색이 보다 효율적으로 이루어 질 수 있기를 기대한다.

감사의 글

본 연구는 경기도 차세대 성장동력 연구비의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다. 참여기업인 다카라코리아바이오 메디칼사의 지원에도 감사드립니다.

참고문헌

- Ahlert J., E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa, B.O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Czisny, R.E. Whitwam, C.M. Farnet, and J.S. Thorson. 2002. The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science* 297, 1173-1176.
- August P.R., L. Tang, Y.J. Yoon, S. Ning, R. Muller, T.W. Yu, M. Taylor, D. Hoffmann, C.G. Kim, X. Zhang, C.R. Hutchinson, and H.G. Floss. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* 5, 69-79.
- Barna J.C.J. and D.H. Williams. 1984. The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Ann. Rev. Microbiol.* 38, 339-357
- Brautaset T., O.N. Sekurova, H. Sletta, T.E. Ellingsen, A.R. Strlm, S. Valla, and S.B. Zotchev. 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* 7, 395-403.
- Distler J., A. Ebert, K. Mansouri, K. Pissowotzki, M. Stockmann, and W. Piepersberg. 1987. Gene cluster for streptomycin synthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucleic Acids Res.* 15, 8041-8056.
- Grimm A., K. Madduri, A. Ali, and C.R. Hutchinson. 1994. Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene* 151, 1-10.
- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, and J.M. Ward. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, England.
- Huang J.C. J. Lih, K.H. Pan, and S.N. Cohen. 2001. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes Dev.* 15, 3183-3192.
- Jung Y.G., S.H. Kang, C.G. Hyun, Y.Y. Yang, C.M. Kang, and J. W. Suh. 2003. Isolation and characterization of bluensomycin biosynthetic genes from *Streptomyces bluensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 219, 285-289.
- Liu W., S. D. Christenson, S. Standage, and B. Shen. 2002. Biosynthesis of the enediyne antitumor antibiotic C-1027. *Science* 297, 1170-1173.
- Long B.H., W.C. Rose, D.M. Vyas, J.A. Matson, and S. Forenza. 2002. Discovery of antitumor indolocarbazoles: rebeccamycin, NSC 655649, and fluorindolocarbazoles. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* 2, 255-266.
- Mahmud T., S. Lee, and H.G. Floss. 2001. The biosynthesis of acarbose and validamycin. *Chem. Rec.* 1, 300-310.
- Russell D. W. and J. Sambrook. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
- Schwecke T, J.F. Aparicio, I. Molnar, A. Konig, L.E. Khaw, S.F. Haydock, M. Oliynyk, P. Caffrey, J. Cortes, and J.B. Lester. 1995. The biosynthetic gene cluster for the polyketide immunosuppressant rapamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92, 7839-7843.
- Sekurova O., H. Sletta, T.E. Ellingsen, S. Valla, and S. Zotchev. 1999. Molecular cloning and analysis of a pleiotropic regulatory gene locus from the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC11455. *FEMS. Microbiol. Lett.* 177, 297-304.
- Steffensky M., A. Muhlenweg, Z.X. Wang, S.M. Li, and L. Heide. 2000. Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1214-1222.
- Stratmann A., T. Mahmud, S. Lee, J. Distler, H.G. Floss, and W. Piepersberg. 1999. The AcbC protein from Actinoplanes species is a C7-cyclitol synthase related to 3-dehydroquinate synthases and is involved in the biosynthesis of the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. *J. Biol. Chem.* 274, 10889-10896.
- Takano E, H. Kinoshita, V. Mersinias, G. Bucca, G. Hotchkiss, T. Nihira, C.P. Smith, M. Bibb, W. Wohlleben, and K. Chater. 2005. A bacterial hormone (the SCB1) directly controls the expression of a pathway-specific regulatory gene in the cryptic type I polyketide biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 56, 465-479.
- van Wageningen A.M., P.N. Kirkpatrick, D.H. Williams, B.R. Harris, J.K. Kershaw, N.J. Lennard, M. Jones, S.J. Jones, and P.J. Solenberg. 1998. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem. Biol.* 5, 155-162.

20. Weitnauer G, A. Muhlenweg, A. Trefzer, D. Hoffmeister, R.D. Sussmuth, G. Jung, K. Welzel, A. Vente, U. Girreser, and A. Bechthold. 2001. Biosynthesis of the orthosomycin antibiotic avilamycin A: deductions from the molecular analysis of the *avi* biosynthetic gene cluster of *Streptomyces viridochromogenes* Tu57 and production of new antibiotics. *Chem. Biol.* 8, 569-581.
21. Zotchev S., K. Haugan, O. Sekurova, H. Sletta, T.E. Ellingsen, and S. Valla. 2000. Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Microbiology* 146, 611-619.

(Received April 26, 2005/Accepted June 2, 2005)

ABSTRACT : Construction and Analysis of a DNA Microarray for the Screening of Biosynthetic Genes of Secondary-Metabolites formation in *Streptomyces*

Soo Jung Nam, Dae-Kyung Kang¹, Ki Hyeong Rhee², Jong-Hee Kim, Sang Sun Kang³, Yong Keun Chang⁴, and Soon-Kwang Hong* (Department of Biological Science, Myongji University, Yongin 449-728, Korea, ¹Bio-Resources Institute, Easy Bio System Inc., Chonan 330-820, Korea, ²College of Industrial Science, Kongju National University, Chungnam 340-802, Korea, ³Division of Science Education, Chungbuk National University, Chongju 361-763, Korea, ⁴Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon 305-701, Korea)

Streptomyces produces many kinds of secondary-metabolites including antibiotics. Screening of a new compound and elucidation of a biosynthetic pathway for the secondary metabolites are very important fields of biology, however, there is a main problem that most of the identified compounds are already researched compounds. To solve these problems, a microarray system that is based on the data related to the biosynthetic genes for secondary-metabolites was designed. For the main contents of DNA microarray, the important genes for the biosynthesis of aminoglycosides, polyenes group, enediyne group, alpha-glucosidase inhibitors, glycopeptide group, and orthosomycin group were chosen. A DNA microarray with 69 genes that were involved in the biosynthesis for the antibiotics mentioned above was prepared. The usability of the DNA microarray was confirmed with the chromosomal DNA and total RNA extracted from *S. coelicolor* whose genomic sequence had already been reported.