

## DNA Microarray 시스템을 이용한 방선균 독소루비신 생합성 유전자군의 발현패턴 분석

강 승 훈 · 김 명 근 · <sup>1</sup>박 현 주 · † 김 응 수  
인하대학교 생물공학과, <sup>1</sup>성원엔비켄(주)  
(접수 : 2004. 12. 15., 게재승인 : 2005. 4. 12.)

### Expression Profiles of *Streptomyces* Doxorubicin Biosynthetic Gene Cluster Using DNA Microarray System

Seung-Hoon Kang, Myung-Gun Kim, Hyun-Joo Park<sup>1</sup>, and Eung-So Kim†  
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
<sup>1</sup>SongWon Envichem Co., Seoul 135-010, Korea  
(Received : 2004. 12. 15., Accepted : 2005. 4. 12.)

Doxorubicin is an anthracycline-family polyketide compound with a very potent anti-cancer activity, typically produced by *Streptomyces peucetius*. To understand the potential target biosynthetic genes critical for the doxorubicin overproduction, a doxorubicin-specific DNA microarray chip was fabricated and applied to reveal the growth-phase-dependent expression profiles of biosynthetic genes from two doxorubicin-overproducing strains along with the wild-type strain. Two doxorubicin-overproducing *S. peucetius* strains were generated *via* over-expression of a *dnrI* (a doxorubicin-specific positive regulatory gene) and a *doxA* (a gene involved in the conversion from daunorubicin to doxorubicin) using a streptomycetes high expression vector containing a strong *ermE\** promoter. Each doxorubicin-overproducing strain was quantitatively compared with the wild-type doxorubicin producer based on the growth-phase-dependent doxorubicin productivity as well as doxorubicin biosynthetic gene expression profiles. The doxorubicin-specific DNA microarray chip data revealed the early-and-steady expressions of the doxorubicin-specific regulatory gene (*dnrI*), the doxorubicin resistance genes (*dnrA*, *dnrB*, *dnrC*), and the doxorubicin deoxysugar biosynthetic gene (*dnmL*) are critical for the doxorubicin overproduction in *S. peucetius*. These results provide that the relationship between the growth-phase-dependent doxorubicin productivity and the doxorubicin biosynthetic gene expression profiles should lead us a rational design of molecular genetic strain improvement strategy.

**Key Words** : Doxorubicin biosynthesis, DNA-microarray system, gene expression profile, *Streptomyces peucetius*

### 서 론

독소루비신은 *Streptomyces peucetius*에 의해 생합성되는 anthracycline계 type II polyketide 화합물로서, DNA topoisomerase II의 작용을 저해하여 DNA double strand를 파괴하는 기작을 통해 항암제로서의 역할을 하는 것으로 알려져 있다(1). *S. peucetius*에서 생산되는 독소루비신은 유전체에 클러스터 되어있는 약 40여개의 유전자들이 암호화한 다양한 효소반응을 거쳐 생합성 되는데, 우선 starter unit인 한

분자의 propionyl CoA와 extender unit인 9개의 malonyl CoA가 연속적으로 축합반응을 일으켜 polyketide 사슬이 형성된다. 여기에 cyclization, dehydration과 hydroxylation반응을 거쳐 polyketide backbone인  $\epsilon$ -rhodomycinone이 생합성 되고(Fig. 1), 생합성된  $\epsilon$ -rhodomycinone은 다음 단계의 methylation, hydroxylation, decarboxylation과 glycosylation을 거쳐서 최종적으로 독소루비신으로 생합성되는 것으로 알려져 있다(2, 3). 생합성 유전자와 더불어 독소루비신의 생산에 관여하는 또 다른 중요 유전자 군으로는, 내성 유전자 및 경로 특이적 조절 유전자가 보고되었다. *S. peucetius*의 독소루비신 내성은 DnrA, DnrB, DnrC, DnrD에 의해 이루어지는 것으로 알려져 있으며, 이 중 ABC transporter의 일종인 DnrA는 DnrB와 coupling을 이루어서 합성된 독소루비신을 세포 밖으로 배출시키는 것으로 알려져 있다(4, 5). 또한 *S. peucetius*에서의 독

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,  
Inha University, Incheon 402-751, Korea.  
Tel : +82-32-860-8318, Fax : +82-32-872-4046  
E-mail : eungsoo@inha.ac.kr

소루비신 생합성과 관련된 조절기작은 DnrO, DnrN, DnrI를 통한 cascade 형태로 이루어졌으며, 이러한 조절기작 중 가장 마지막 단계의 DnrI는 독소루비신 생합성 관련 유전자들의 promoter 부분에 직접적으로 결합함으로써 독소루비신 생합성 유전자의 발현을 촉진시키는 역할을 한다고 보고되었다(6, 7). 그러나 독소루비신의 조절기작은 생합성 과정과 직접적인 연관이 있는 일부 유전자만이 알려져 있으며, 다른 대부분의 방선균에서와 마찬가지로 2차 대사과정과 관련이 있는 상위단계에서의 조절기작은 규명되지 않고 있는 실정이다.

독소루비신을 포함하여 산업적으로 유용산물을 생산하는 방선균에서의 유용산물 생산성 향상을 위한 균주개량 전략은 현재까지도 NTG나 UV 등의 mutagen을 사용한 돌연변이 및 스크리닝 방법에 의존해 왔다. 그러나 이러한 방법은 생

합성에 관여하는 조절유전자들의 분자유전학적 특성에 대한 이해와는 상관없이 무작위적으로 이루어지기 때문에, 독소루비신 생합성에 관여하는 모든 유전자군의 발현을 종합적으로 비교분석함으로써 보다 체계적이고 효과적인 분자수준에서의 균주개량 전략이 필요하다고 할 수 있다(8). 특히, 최근 보고에 의하면 DNA microarray 시스템을 이용하여 고생산성 산업균주인 *Saccharopolyspora erythraea*가 생산하는 erythromycin과 *Streptomyces fradiae*가 생산하는 tylosin의 생합성 유전자군 발현이 성공적으로 분석된 사례를 볼 수 있다(9). 따라서 DNA microarray 시스템은 방선균 2차 대사산물 생합성 유전자군의 발현을 보다 체계적이고 종합적으로 분석할 수 있는 매우 효율적인 분석방법으로 제시되고 있다. 본 연구에서는 우선 경로 특이적 조절유전자 (*dnrI*) 및

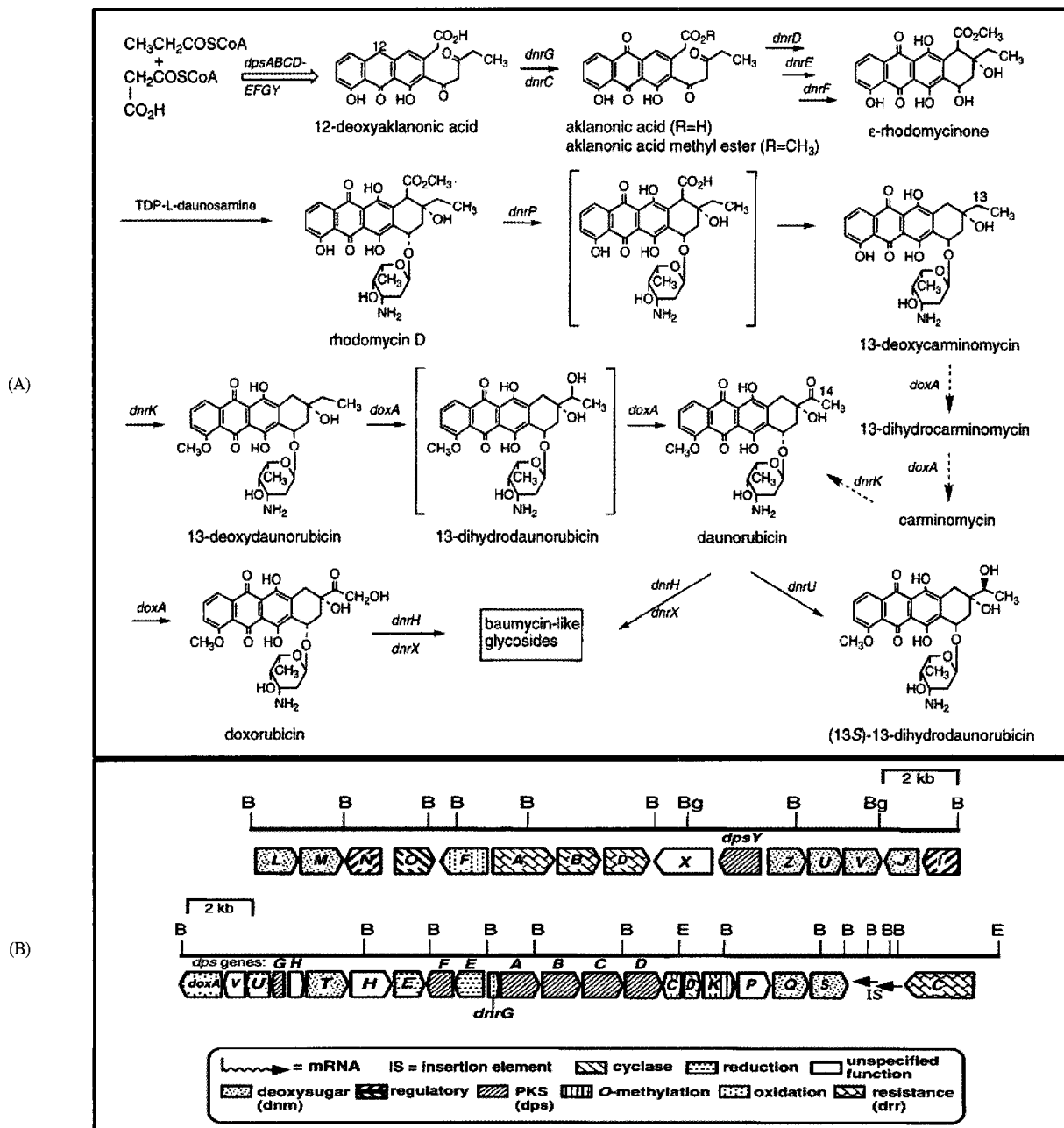


Figure 1. (A) Doxorubicin biosynthetic pathway. (B) Physical and functional map of doxorubicin gene cluster (Hutchinson et al., 1999).

전구체 전환에 관여하는 특정 생합성 경로유전자 (*dox4*)의 발현을 통한 독소루비신 생산성 향상을 시도하였다. 또한 독소루비신 생합성에 관여하는 40여개의 유전자 DNA 칩을 제작하여 DNA microarray 시스템을 이용한 고생산성 재조합 균주의 생합성 유전자군 발현패턴을 대조군과 비교분석함으로써, 독소루비신 생산성 향상에 결정적인 역할을 하는 유전자들을 선별 및 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배양조건

본 연구에서는 독소루비신 생산 균주인 *S. peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 균주와 wild-type 균주인 *S. peucetius* ATCC29050을 사용하였다. 배양에 사용된 균주는 20% glycerol이 포함된 stock으로 -20°C에 보관되었고, 이 stock을 25 ml의 NDYE 배지 (4.5% maltose, 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% 10X trace element solution pH 7.4)에 접종하여 30°C, 200 rpm으로 배양 후 HPLC 분석을 통해 독소루비신 생산성을 확인하였다.

### HPLC를 이용한 독소루비신 정량분석

*S. peucetius* ATCC27952 및 고생산성 균주가 생산하는 독소루비신은 C-18 reverse phase (250 × 4.6 mm) column (Waters, Ireland)을 사용하여 high-performance liquid chromatography (HPLC)로 정량분석 되었다. 추출은 배양액의 일정량을 취하여 1 vol.의 추출액 (Iso-propyl alcohol : 30% HCl = 50 : 1)을 섞고 30분 교반한 후 15000 rpm에서 10 min 원심분리하여 상등액을 filtration하였다. HPLC 분석을 위한 mobile phase는 acetonitrile/water (1 : 1 v/v) 혼합액에 sodium dodecyl sulfate (1.327 g/l)와 phosphoric acid (0.68 ml/l)를 섞어 사용하였고, 유속은 1 ml/min, column 온도는 상온으로 유지하여 UV detector로 254 nm에서 독소루비신의 생산량을 정량분석하였다.

### 재조합 균주제작을 위한 PCR 및 클로닝 방법

유전자 조작을 위해 R2YE배지에 *S. peucetius* ATCC 29050 균주를 5일간 배양하여 genomic DNA를 분리하였다 (10). 클로닝을 위하여, *E. coli* DH5a와 *S. lividans* TK21균주를 이용하였으며, 플라스미드로는 pGEM T-easy (Promega, USA)와 방선균 발현벡터 pSE34를 사용하였다. *dox4*와 *dnr1*를 클로닝하기 위한 polymerase chain reaction (PCR) primer로는 (forward primer *dox4*-1: 5'-GGATCCGGTCTGCACTGCGGGAGGGGT-3'; reverse primer *dox4*-2: AAGCTTTCGGATCAGCGCAGCCAGAC-3'; forward primer *dnr1*-1: 5'-GGATCCGAAATATGCCACCTGCTGA-3'; reverse primer *dnr1*-2: 5'-AAGCTTGTGGACAGTACTCCTTGT-3')를 사용하였다. PCR은 Rapid Thermocycler (Idaho technology, USA)를 이용하여 denature (96°C, 30초), annealing (40°C, 30초), extension (68°C, 35초) 조건으로 30 cycle 동안 반응시켰다 (11). PCR을 통해 증폭된 유전자 산물은 pGEM T-easy에 클로닝 한 후 각각 *Bam*HI과 *Hind*III로 처리하여 pSE34에 다시 클로닝하였다. 독소루비신 생산 균주의 형질전환은 protoplast를 통

한 PEG transformation 방법으로 기존에 보고된 방선균 실험서를 따라 수행하였다 (10). 형질전환된 균주는 thiostrepton (0.5 mg/ml)을 사용하여 선별하였다.

### 독소루비신 생합성 유전자군 PCR 증폭 및 DNA microarray 칩 제작

DNA microarray 칩 제작을 위한 독소루비신 생합성 유전자 염기서열은 NCBI의 Entrez Nucleotides Database에서 확보하였고, PCR 증폭을 위한 primer는 각 유전자들의 모든 ORF를 포함하도록 제작되었다. 각 유전자들을 증폭하기 위한 PCR 조건은, No. 1; denature (96°C, 30초), annealing (40°C, 30초), extension (68°C, 35초), No. 2; denature (96°C, 30초), annealing (55°C, 30초), extension (68°C, 35초), No. 3; denature (96°C, 30초), annealing (50°C, 30초), extension (68°C, 90초)의 세 가지이고, 세 조건 모두 30 cycle 동안 반응시켰다. 각 유전자들의 primer 염기서열과 PCR 조건은 Table 1에 정리하였다. PCR을 통해 증폭된 유전자 산물은 pGEM T-easy에 클로닝된 후 sequencing을 통하여 DNA의 염기서열을 재확인하였다. pGEM T-easy에 클로닝된 각 유전자들은 벡터 내에 포함된 universal primer를 사용하여 각각 다시 PCR로 증폭되었고, DNA chip 제작을 위한 sample로 사용하였다. DNA chip은 poly-L-lysine이 코팅된 slide glass를 사용하였고, 유전자의 spotting은 Pixsys 5500 (cartesian technologies Inc., USA), DNA chip의 scanning은 Genepix Personal 4100A (Axon Instruments Inc., USA)를 사용하였다. DNA chip의 제작과 분석은 GenoCheck Co., Ltd. (Korea)에서 수행하였다.

### DNA microarray 시스템을 이용한 유전자 발현패턴 분석방법

성장에 따른 total RNA는 RNeasy Mini Kit (QIAGEN GmbH, Germany)을 사용하여 준비되었고, cDNA 합성을 위한 template로 사용하였다. 각 실험에 사용된 total RNA는 15 µg이며, reverse transcription 과정을 위한 primer는 70% GC-contents random hexamer가 사용되었다. Fluorescent dye labeling을 위한 과정으로, 우선 total RNA를 70°C에서 10 min 처리하여 denature시킨 후 바로 얼음에 보관하고 random primer와 reaction mixture [5X first stand buffer, 0.1 M DTT, dNTP (4 mM dATP, 4 mM dTTP, 10 mM dGTP, 0.5 mM dCTP), Cy3 (or Cy5)-dCTP (PerkinElmer, USA)와 SuperScript II (Invitrogen, USA)]를 혼합하였다. 그 후 42°C에서 2 hr 동안 처리하여 cDNA를 합성하고, stop solution을 첨가하여 65°C에서 10 min간 incubation시켰다. 여기에 3 M sodium-acetate (pH 5.2)와 100% EtOH을 첨가하고 -20°C deep freezer에서 30 min동안 침전시킨 다음 원심분리 과정을 통해 cDNA를 분리하였다.

Hybridization과정은 labeling된 cDNA와 hybridization solution을 섞은 후 65°C에서 10min간 incubation시키고, 각각 Cy3와 Cy5로 labeling된 cDNA를 1 : 1로 섞은 후 끓는 물에서 2 min간 방치하고 바로 45°C에서 20 min간 incubation시켰다. DNA chip상에서 유전자가 spotting된 부분에 준비된 sample을 올려놓고 cover glass를 덮은 후 65°C에서 12 hr~16 hr 정도 incubation시켰다(12). Hybridization chip을 washing하

Table 1. Doxorubicin biosynthetic genes and PCR primers

Gene	spot position		Product	PCR primer		DNA size	PCR condition
	Row	Column		forward	reverse		
<i>dnmZ</i>	1	1	putative flavoprotein	catatgacaagaacctgtgacag	tcacgcccacgccactctgctc	1 kb	1
<i>dnrD</i>	1	2	methylaklanonic acid cyclase	catatgagcagcagatcgtctgg	tcaggggcccagccctcgggggtg	0.4 kb	1
<i>dnmJ</i>	1	3	putative protein kinase	catatgiccacctgctgtgcaat	tcacaggcttcagcagactccgcg	1 kb	1
<i>dnmL</i>	1	4	glucose-1-phosphate thymidyltransferase	catatgaagctctcgtctgctcg	tcatgaggagatccaccctgctg	1 kb	1
<i>dnrN</i>	1	5	regulatory protein	catatgaccctccagctggtgattg	tcagatccagccggacatactggcg	0.6 kb	1
<i>dpsG</i>	1	6	daunorubicin acyl carrier protein	catatgctgagctcagctggcgg	tcatgcccccctcagcctctcg	0.25 kb	1
<i>dpsH</i>	1	7	daunorubicin biosynthesis enzyme	catatggaccgacgggtgtccgctc	tcagtccagcccctccgggtgacg	0.6 kb	1
<i>dnrE</i>	1	8	unknown	catatggagaacacacagcgtaccg	tcacgtcaccgagagacccccgtcc	0.7 kb	1
<i>drrB</i>	1	9	daunorubicin resistance protein	catatgacgagctcccggcaccg	tcaggggcgtctgtgtgctgtac	0.8 kb	1
<i>dpsY</i>	1	10	polyketide cyclase	catatggtctgtgtggccggagag	tcattctgcagcagggacccggcg	0.8 kb	1
<i>drrA</i>	2	1	daunorubicin resistance protein	catatgaacacagcagccgacacggg	tcatgccacctctctctccgccc	1 kb	1
<i>drrD</i>	2	2	daunorubicin resistance protein	catatgagcggcaccactctgtcc	tcacgaaggccccctgagccggcg	1.5 kb	1
<i>dpsF</i>	2	3	daunorubicin-doxorubicin polyketide synthase	catatgtccgagtgccgcttcagc	tcaggcgtggaactcggctactgac	1 kb	1
<i>dpsD</i>	2	4	daunorubicin-doxorubicin polyketide synthase	catatggatgcccggcgtattccc	tcaccggccggctcggcactgagc	1 kb	1
<i>dnrI</i>	2	5	putative transcriptional regulator	ggatccggaaatagccacctgctga	aagcttgggacacgtgactctgtg	0.8 kb	1
<i>doxA</i>	2	6	daunorubicin C-14 hydroxylase	ggatccggctgaactcggggagggt	aagcttgggagatcagcagccagac	1.2 kb	1
<i>dnrM</i>	2	7	TDP-D-glucose-4,6-dehydratase	catatgacctgaagatcctggtga	tcaggatccggtgagcgtgcccac	1 kb	2
<i>dnrO</i>	2	8	putative repressor	catatgaccgagacgccatccgca	tcaccggctgctgcccgtgacc	1 kb	2
<i>dnrF</i>	2	9	aklavinone C-11 hydroxylase	catatggccttgacgaagccggatg	tcagttgccggaggggcgccgac	1.4 kb	2
<i>dnmT</i>	2	10	doxorubicin biosynthesis protein DnmT	catatgaccgcccagatcgcccgtt	gaactcacctccggggcgccgga	1.5 kb	2
<i>dnmV</i>	3	1	thymidine diphospho-4-keto-2,3,6-trideoxy-hexulose reductase	catatgcccggctgctgttctggggg	ctaggcccggggcggctgcccgggtc	0.8 kb	2
<i>dnrG</i>	3	2	anthraquinol monoxygenase	catatgccacagccagaaccgaacg	ttcagctctcggccctccggggccc	0.38 kb	2
<i>dpsA</i>	3	3	daunorubicin-doxorubicin polyketide synthase	catatgaaccggcgatgctatca	tcacctctcagagcggctcagcagc	1.3 kb	2
<i>dpsB</i>	3	4	daunorubicin-doxorubicin polyketide synthase	catatgacaggttaccggcagcaga	tcacggccccccggaccaccaga	1.2 kb	2
<i>dnrV</i>	3	5	doxorubicin biosynthesis protein DnrV	catatgaccaggttccggccggcg	tcggcctcagcagcggcccccgcg	0.8 kb	2
<i>dpsE</i>	3	6	daunorubicin-doxorubicin polyketide synthase	catatgtccgagcagccgaccggg	tcagttagctccgagccaccacag	0.8 kb	2
<i>dnrH</i>	3	7	putative baumycin biosynthesis protein	catatgcccgtctgtctgccacca	ctaggcaccggctgtggaaggcagc	1.3 kb	2
<i>dnrK</i>	3	8	carminomycin O-methyltransferase	catatgacagccgaaccgacgtcg	tcgtgtgtcagcggcgggtgcccgc	1 kb	2
<i>dnrP</i>	3	9	10-carbomethoxy-13-deoxycarminomycin esterase	catatgccgacacgatgatcacca	tcacactgtcggcccgggtgtgg	0.9 kb	2
<i>dnmS</i>	3	10	glycosyl transferase	catatgaaggtgctctgtgacggcgt	aaagcccctagtgccggacccctg	1.3 kb	2
<i>dpsC</i>	4	1	daunorubicin-doxorubicin polyketide synthase	catatgagcgtgccgagggggcgc	atgacggctcctcaccggcgccg	1.1 kb	2
<i>dnrX</i>	4	2	daunorubicin/doxorubicin biosynthesis enzyme	catatggagccgaacgatcgacat	tcacctgagcggatccagcggccc	1.2 kb	3
<i>dnmU</i>	4	3	putative epimerase	catatgaagggcggggaactggcgg	tcaccctctcgcgtgaccggccc	0.6 kb	3
<i>dnrC</i>	4	4	unknown	catatgaggattcgtctacaag	tcagtgggaccccggcggtgag	0.8 kb	3
<i>drrC</i>	4	5	daunorubicin resistance protein(UvrA-like protein)	catatgacgacgagcgtattcaga	aaggatcagcggccggccggtgtg	2.3 kb	3
<i>dnrU</i>	-	-	daunorubicin C-13 ketoreductase	catatgacggcctccaccggcacc	tcagtgcgggtgtcggcagcggc	0.8 kb	2
<i>dnmQ</i>	-	-	unknown	catatgccacaccacgtccggcg	tcacttggggccagccagcagag	1.2 kb	3
control 1	4	6	<i>S. peuceitius</i> 16S rDNA			-	-
control 2	4	7	plant gene			-	-
control 3	4	8	plant gene			-	-

기 위해서 0.1% SDS가 포함된 2X SSC buffer 50 ml에 담긴 후 2 min간 흔들어주고, 바로 1X SSC buffer 50 ml로 옮겨 3 min간 흔들어 주었다. 마지막으로 0.2X SSC buffer로 옮긴 후 다시 2 min간 흔들어주고 washing 용액을 버린 다음 원심분리를 통해서 hybridized chip에서 washing solution 성분을 제거하였다. DNA chip의 스캐닝은 Genepix Personal 4100A 시스템을 사용하여 수행하였고, 결과 분석은 스캐닝을 통해 분석된 각 spot의 fluorescent dye intensity 값을 기준으로 전체 유전자의 발현 패턴을 Hierarchical clustering을 통해 grouping하여 분석하였다.

결과 및 고찰

경로 특이적 조절유전자 (*dnrI*) 및 전구체 전환 생합성 유전자 (*doxA*)의 과발현

독소루비신 생합성과정을 특이적으로 조절하는 *dnrI* 유전자의 도입으로 인해 독소루비신 생산성이 증가되었다는 사실은 이미보고 된바 있다(13, 14). 그러나 이러한 보고는

단순히 *dnrI* 유전자를 multicopy 형태로 도입하여 얻은 결과이기 때문에 본 연구에서는 *ermE\** 프로모터를 포함하는 방선균용 발현 vector인 pSE34에 *dnrI* 유전자를 클로닝하여 도입함으로써 세포내에서 안정적인고 효율적으로 *dnrI*가 발현될 수 있도록 유도하였다.

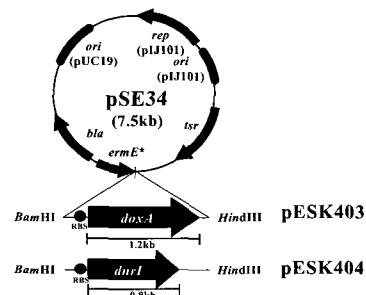


Figure 2. Schematic maps of pESK403 and pESK404.

이와 더불어 독소루비신의 전구체로부터 독소루비신으로의 생전환에 관여하는 *doxA* 유전자도 pSE34에 클로닝하

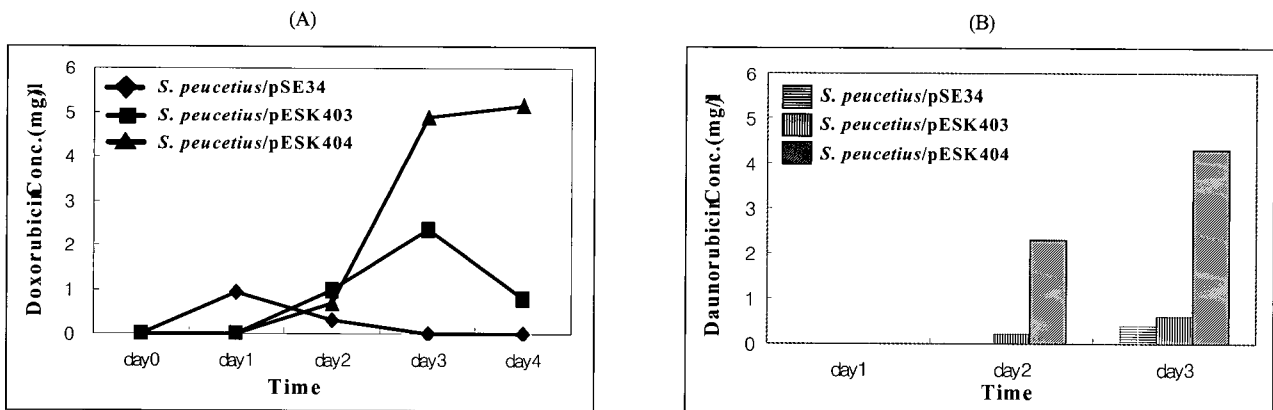
여 도입함으로써 다나루비신에서 독소루비신으로의 생 전환 효율을 높이고자 하였다(15). 전구체 전환 생합성 유전자인 *doxA*와 경로 특이적 조절유전자인 *dnrI*의 클로닝은 각 유전자의 RBS (ribosome binding site)를 포함하여 전체 ORF를 클로닝하여 각각을 pESK403, pESK404라고 명명하였다(Fig. 2).

각 유전자의 도입에 의한 독소루비신 생산성의 증가를 관찰하기 위하여 NDYE 배지에 진탕 배양하여 성장에 따른 독소루비신 생산량을 HPLC로 분석하였다. 경로 특이적 조절유전자인 *dnrI*가 도입된 *S. peucetius*/pESK404의 경우 대조군으로 vector만 포함된 *S. peucetius*/pSE34에 비해 약 5.5배의 생산성 증가가 이루어진 것으로 확인되었고, 전구체 전환 생합성 유전자인 *doxA*가 도입된 *S. peucetius*/pESK403의 경우 대조군에 비해 약 2.5배의 독소루비신 생산성 증가가 이루어진 것으로 확인되었다(Fig. 3A). 독소루비신의 전구체인 다나루비신의 생산성을 측정한 결과, *S. peucetius*/pESK403의 경우 3일째까지 미량의 다나루비신이 생산되는 것으로 확인되었고, 이러한 결과는 세포내에서 생합성된 다나루비신 중 대부분이 DoxA에 의해 독소루비신으로 생전환된 것으로 추측된다. 반면 *S. peucetius*/pESK404에서의 다나루비신은 3일째까지 높은 농도로 생산되는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과는 DnrI에 의해 세포성장 후반까지 독소루비신 생합성과정이 지속되는 것으로 추측된다(Fig. 3B). 그러나 *S. peucetius*/pESK403의 경우와는 달리 *S. peucetius*/pESK404에서의 다나루비신 생산성이 지속되는 이유는 세포내 DoxA의 발현양이 극히 적기

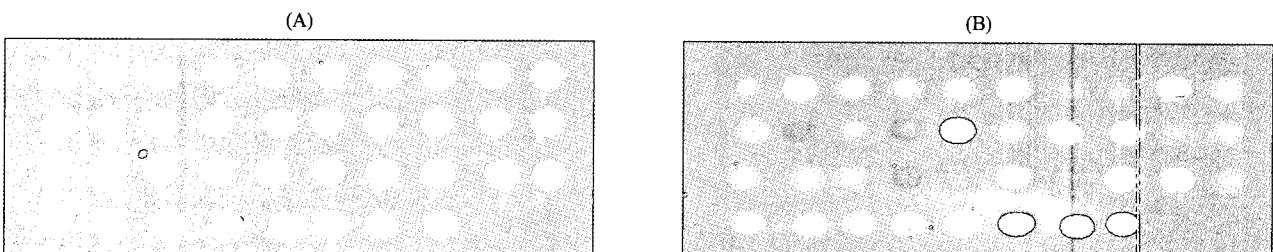
때문에 대부분의 다나루비신이 독소루비신으로 생전환되지 못하고 남아있는 것으로 판단된다. 이러한 결과는 조절유전자의 도입이나 생합성 과정의 metabolic flux를 원활하게 만들어줌으로서 유용 생리활성 물질의 생산성을 향상시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다.

#### 독소루비신 생합성 유전자군 발현분석을 위한 DNA microarray 시스템 구축

DNA chip제작을 위한 37개의 독소루비신 생합성 유전자의 DNA 염기서열은 NCBI Entrez Nucleotides Database에서 확보하였다. 각 유전자들을 증폭하기 위해서 start codon과 stop codon을 포함한 각 유전자들의 전체 ORF를 포함하도록 primer를 제작하였다. 각 유전자들의 증폭조건은 denature (96°C, 30초), annealing (40°C, 30초), extension (68°C, 35초)를 기본으로 annealing 온도와 extension 시간에 변화를 주어 총 세 가지 조건하에서 수행하였다(Table 1). 증폭된 유전자는 pGEM T-easy에 클로닝한 후 sequencing을 통해서 각 유전자들의 염기서열을 재확인하였으며, 이 과정에서 클로닝된 *dnrU*, *dnmQ* 유전자는 기존에 보고된 *S. peucetius* 유래 유전자와 염기서열이 다르게 규명되어 DNA chip 제작에는 포함시키지 않았다. Cloning된 각 유전자들은 벡터 내의 universal primer를 사용하여 재 증폭하였고, 모든 증폭 산물은 농도를 균일하게 조정하여 spotting을 위한 sample로 사용하였다. DNA chip spotting에는 35개의 독소루비신 생합성 유전자와 세 개의 positive control을 포함하였다. Positive control로는 plant유래의 유전자 두 종류와 *S. peucetius*의 16S rDNA를 사용하였다(Fig. 4).



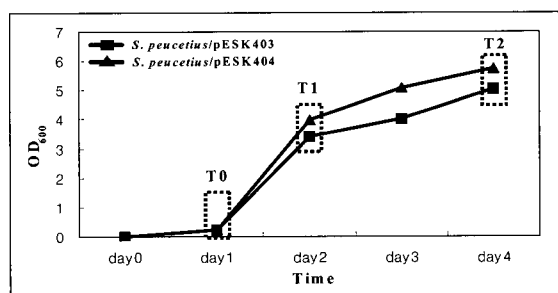
**Figure 3.** (A) Doxorubicin production by pSE34-containing *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 (◆), pESK403-containing *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 (■), pESK404-containing *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 (▲). (B) Daunorubicin production by pSE34-containing *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 (□), pESK403-containing *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 (▤), pESK404-containing *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius* ATCC27952 (▥).



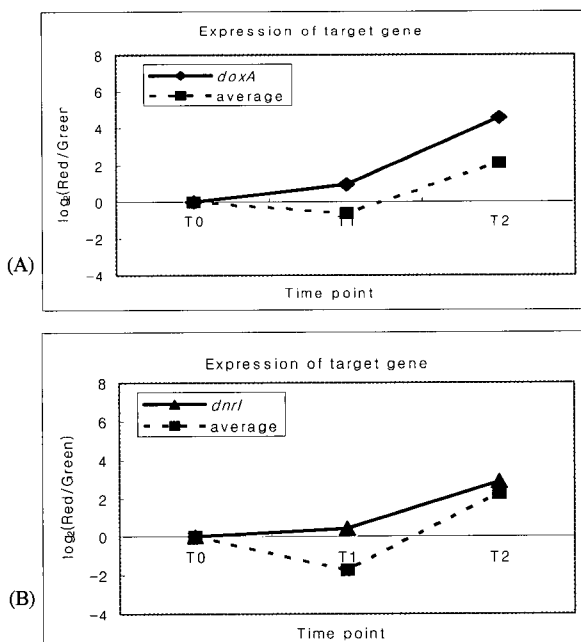
**Figure 4.** Image of doxorubicin-specific DNA microarray chip ((A) Image of Cyto-61 labeling DNA chip, (B) Image of *S. peucetius*/pESK404 T0 vs T2 DNA chip).

**독소루비신 DNA microarray 시스템에 의한  
생합성 유전자군 발현패턴 분석**

독소루비신 고생산성 균주 (*S. peucetius*/pESK403, *S. peucetius*/pESK404)의 성장에 따른 독소루비신 생합성 유전자군 발현 패턴을 분석하기 위하여, 각 균주의 성장에 따라 특정시간대에서의 total RNA를 분리하였다(Fig. 5). 독소루비신이 생산되기 이전인 접종 후 24 hr을 T0 time point로 정하였고 fluorescent dye인 Cy3로 labeling하였다. 그 이후의 time point는 독소루비신 생산이 시작되는 시점인 접종 후 48 hr을 T1 time point, 독소루비신 생산성이 최대인 접종 후 80 hr을 T2 time point로 정하였고, 이를 각각 Cy5로 labeling 하였다. 이렇게 labeling된 T0 point cDNA와 T1, T2 time point의 cDNA를 각각 1 : 1로 섞어 경쟁적으로 DNA chip에 hybridization시켰다.



**Figure 5.** Growth of *Streptomyces peucetius*/pESK403 and *Streptomyces peucetius*/pESK404 in liquid NDYE media. T0-T2 indicates times (timepoints 0 to 2) when cultures were harvested for isolation of total RNA.



**Figure 6.** Expression of target genes. (A) Array data for *doxA* gene. The plots of the *doxA* (◆) gene and the plots of average transcript profile of all DXR biosynthetic genes (■) as  $\log_2$  (red/green) values for the *S. peucetius*/pESK403. (B) Array data for *dnrI* gene. The plots of the *dnrI* (▲) gene and the plots of average transcript profile of all DXR biosynthesis genes (■) as  $\log_2$  (red/green) values for the *S. peucetius*/pESK404.

**Table 2.** Expression profile of doxorubicin biosynthetic genes in *S. peucetius*/pESK403 and *S. peucetius*/pESK403 (F<sup>+</sup>: Flagging)

Gene	<i>S. peucetius</i> /pESK403		<i>S. peucetius</i> /pESK404	
	Intensity Ratio	Intensity Ratio	Intensity Ratio	Intensity Ratio
	T1/T0	T2/T0	T1/T0	T2/T0
<i>dnmZ</i>	F <sup>+</sup>	3.053	0.521	2.103
<i>dnrD</i>	1.412	6.638	1.093	3.924
<i>dnmJ</i>	F	3.454	1.043	3.584
<i>dnmL</i>	F	1.485	0.32	1.329
<i>dnrN</i>	F	3.887	0.925	4.848
<i>dpsG</i>	F	7.992	0.75	5.674
<i>dpsH</i>	F	F	0.607	2.334
<i>dnrE</i>	F	1.26	F	1.71
<i>drrB</i>	F	5.478	0.611	4.4
<i>dpsY</i>	F	5.513	0.478	2.417
<i>drrA</i>	F	11.05	0.879	8.53
<i>drrD</i>	F	F	F	F
<i>dpsF</i>	F	2.304	F	2.996
<i>dpsD</i>	F	F	F	F
<i>dnrI</i>	1.361	7.311	1.847	3.808
<i>doxA</i>	1.932	23.951	0.113	3.606
<i>dnrM</i>	F	3.029	0.435	2.278
<i>dnrO</i>	F	6.606	0.864	6.207
<i>dnrF</i>	F	F	0.363	1.328
<i>dnmT</i>	F	5.447	F	2.191
<i>dnmV</i>	F	1.814	F	2.042
<i>dnrG</i>	F	10.486	F	99.765
<i>dpsA</i>	F	3.054	F	8.578
<i>dpsB</i>	F	F	F	F
<i>dnrV</i>	F	F	F	F
<i>dpsE</i>	F	5.635	0.575	7.65
<i>dnrH</i>	F	F	F	F
<i>dnrK</i>	0.025	2.863	1.134	2.203
<i>dnrP</i>	F	4.58	0.393	4.082
<i>dnmS</i>	F	F	F	2.704
<i>dpsC</i>	F	3.51	0.151	4.992
<i>dnrX</i>	F	4.523	0.521	5.062
<i>dnmU</i>	F	5.426	0.594	11.619
<i>dnrC</i>	F	4.945	0.687	10.942
<i>drrC</i>	F	17.99	2.696	35.153

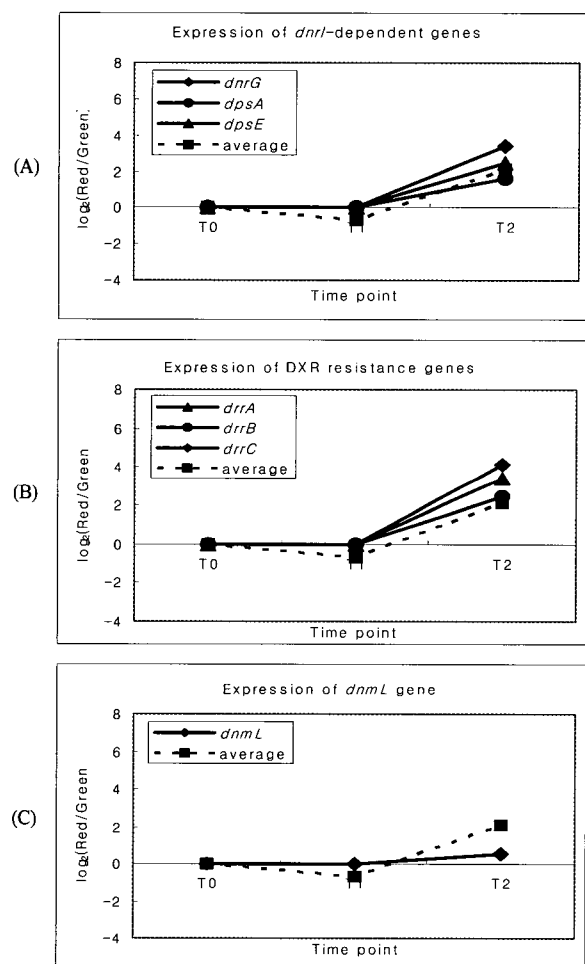
DNA microarray를 통하여 분석한 결과 *S. peucetius*/pESK403과 *S. peucetius*/pESK404 두 균주 모두 독소루비신 생산성의 증가에 따라 독소루비신 생합성 유전자군의 발현 패턴이 유사하게 증가하는 양상을 보였다(Table 2). 그러나 일부 spot에서는 공통적으로 signal이 관찰되지 않았는데 (Flagging), 이는 이러한 유전자들의 발현이 극히 낮은 수준으로 이루어졌거나, 유전자의 발현은 이루어졌지만 cDNA 합성에 사용된 random hexamer가 모든 생합성 유전자의 cDNA를 합성하는데 적합하지 못했던 것으로 추측된다. 과발현을 유도한 *S. peucetius*/pESK403의 *doxA* 유전자나 *S. peucetius*/pESK404의 *dnrI* 유전자 모두 다른 독소루비신 생합성 유전자들보다 높은 수준으로 발현되었다. 이는 pSE34의 *ermE*<sup>\*</sup> 프로모터에 의해 세포성장 초기부터 안정적으로 유전자의 발현이 이루어지고 있음을 입증하고 있다(Fig 6).

*S. peucetius*/pESK403의 독소루비신 관련 유전자군의 발현 패턴은 전반적으로 독소루비신 생합성 유전자의 발현 뿐만 아니라 내성유전자의 발현 역시도 두드러지게 증가

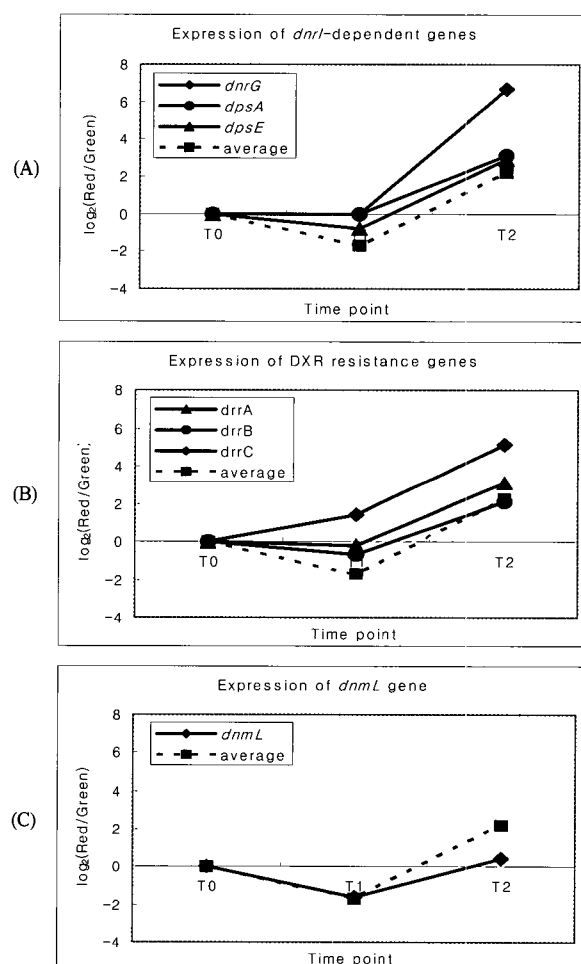
하였으며(Fig. 7), 이러한 경향은 *S. peucetius*/pESK404의 경우에서도 유사하게 나타났다(Fig. 8). 따라서 본 연구 결과는 내성유전자의 과발현을 유도함으로써 독소루비신 생산성 증가를 이끌어낼 수 있다는 가능성을 제시해 주고 있다(16).

DnrI에 의해 조절을 받는 독소루비신 생합성 유전자는 *drrAB*, *dnrG-dpsABCD*, *dpsEF*, *dnrDKPQS*, *dnmLM* operon과 *dnrC*, *drrC* 유전자들로 알려져 있다(17, 18). *S. peucetius*/pESK403의 경우 DnrI에 의해 조절을 받는 유전자들의 발현을 관찰한 결과, 다른 독소루비신 생합성 유전자들과 비슷한 수준으로 발현이 이루어졌다(Fig. 7). 그러나 비교적 초반부터 *dnrI* 유전자를 과 발현 시킨 *S. peucetius*/pESK404의 경우, DnrI에 의해 조절을 받는 대부분의 유전자들은 다른 생합성 유전자들에 비해 발현 수준이 높게 유지되고 있음을 확인할

수 있었다(Fig 8). 그러나 *S. peucetius*/pESK404의 경우, *dnrI* 유전자를 과발현시켰음에도 불구하고 독소루비신의 deoxy-sugar 부분인 TDP-daunosamine을 합성하는데 관여하는 glucose-1-phosphate thymidyltransferase인 *dnmL* 유전자는 다른 DnrI 의존적인 유전자들과 비교하여 그 발현양이 상당히 낮은 수준임을 확인할 수 있었다(Fig. 8). 이러한 결과는 *S. peucetius*/pESK403의 경우에서도 마찬가지로 확인되었고(Fig. 7), *dnmL*의 프로모터 부분의 sequence를 확인한 결과 다른 *dnrI*-dependent 유전자들과 마찬가지로 DnrI-binding region이 온전히 보존되어있는 것을 확인할 수 있었다(data not shown). 이러한 결과는 *S. peucetius*의 독소루비신 생합성 과정에 있어 *dnmL*의 발현을 극대화함으로써 TDP-daunosamine의 공급을 원활하게 만들어준다면 결과적으로 독소루비신 생산성의 증가를 유도할 수 있는 가능성을 제시해주고 있다.



**Figure 7.** (A) Expression of DnrI-dependent genes. The plots of the *dnrG* (◆), *dpsA* (●), *dpsE* (▲) genes and the plots of average transcript profile of all DXR biosynthesis genes (■) as  $\log_2(\text{red/green})$  values for the *S. peucetius*/pESK403. (B) Expression of DXR resistance genes. The plots of the *drrA* (▲), *drrB* (●), *drrC* (◆) genes and the plots of average transcript profile of all DXR biosynthesis genes (■) as  $\log_2(\text{red/green})$  values for the *S. peucetius*/pESK403. (C) Expression of *dnmL* gene. The plots of the *dnmL* (◆) gene and the plots of average transcript profile of all DXR biosynthesis genes (■) as  $\log_2(\text{red/green})$  values for the *S. peucetius*/pESK403.



**Figure 8.** (A) Expression of DnrI-dependent genes. The plots of the *dnrG* (◆), *dpsA* (●), *dpsE* (▲) genes and the plots of average transcript profile of all DXR biosynthesis genes (■) as  $\log_2(\text{red/green})$  values for the *S. peucetius*/pESK404. (B) Expression of DXR resistance genes. The plots of the *drrA* (▲), *drrB* (●), *drrC* (◆) genes and the plots of average transcript profile of all DXR biosynthesis genes (■) as  $\log_2(\text{red/green})$  values for the *S. peucetius*/pESK404. (C) Expression of *dnmL* gene. The plots of the *dnmL* (◆) gene and the plots of average transcript profile of all DXR biosynthesis genes (■) as  $\log_2(\text{red/green})$  values for the *S. peucetius*/pESK404.

DNA microarray 시스템을 통한 독소루비신 생합성 유전자 발현패턴 분석결과, 전체 생합성 유전자의 발현을 촉진하는 경로특이적 유전자인 *dnrI* 유전자 뿐 아니라, *DnrI*에 조절을 받는 deoxysugar 합성유전자인 *dnmL* 그리고 독소루비신 내성유전자인 *draA*, *drbB*, *drnC*의 안정적이고 꾸준한 발현이 독소루비신 생산성 증가를 위한 주요 인자임을 확인할 수 있었다.

## 요 약

독소루비신 생합성 유전자의 발현을 촉진시키는 유전자인 *dnrI*와 다나루비신으로부터 독소루비신으로의 생전환에 관여하는 유전자인 *doxA*를 *ermE*<sup>\*</sup> 프로모터가 포함된 pSE34에 도입하였을 때 각각 5.5배, 2.5배의 독소루비신 생산성 증가가 이루어졌다. 독소루비신 생합성 유전자군의 발현패턴 분석을 위한 DNA microarray system을 구축하였고, 고생산 균주의 독소루비신 생합성 유전자 발현 패턴을 DNA microarray를 통해 확인하였다. 독소루비신 생합성 유전자군의 세포 성장에 따른 발현패턴을 분석한 결과, 독소루비신 생산성 증가에 따라 생합성 유전자의 발현도 증가함을 확인할 수 있었고, pSE34를 통해 도입해준 *doxA*, *dnrI* 유전자의 경우 전체 생합성 유전자의 평균보다 높은 수준의 발현량을 보여줌으로써, *ermE*<sup>\*</sup> 프로모터에 의해 발현이 극대화되었음을 확인할 수 있었다. 독소루비신 내성 유전자의 경우 다른 독소루비신 생합성 유전자들에 비해 발현 정도가 크게 증가했고, *DnrI*에 의해 조절을 받는 다른 유전자들의 발현 수준과 비교하였을 때 TDP-daunosamine을 생합성의 첫 번째 단계에 관여하는 *dnmL* 유전자는 그 발현량의 증가가 크지 않았다. 따라서 DNA microarray 시스템 분석 결과, 독소루비신 생산성 극대화를 위해서는 *dnrI*, *doxA*, *draA*, *drbB*, *drnC*, *dnmL* 등의 유전자들의 안정적 발현이 매우 중요하고도 핵심적인 인자임을 확인되었다.

## 감 사

본 연구는 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Arcamone, F. (1984), Antitumor anthracycline: recent developments, *Med. Res. Rev.* **4**, 153-188.
- Grimm, A., K. Madduri, A. Ali, and C. R. Hutchinson (1994), Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase, *Gene*, **151**, 1-10.
- Hutchinson, C. R. and A. L. Colombo (1999), Genetic engineering of doxorubicin production in *Streptomyces peucetius* : a review, *J. IND. MICROBIOL. BIOT.* **23**, 647-652.
- Kaur, P. and J. Russell (1998), Biochemical coupling between the *DrrA* and *DrrB* Proteins of the Doxorubicin Efflux Pump of *Streptomyces peucetius*, *J. Biol. Chem.* **273**, 17933-17939.
- Lomovskaya, N., S. K. Hong, S. U. Kim, L. Fonstein, K. Furuya, and C. R. Hutchinson (1996), The *Streptomyces peucetius drrC* Gene Encodes a UvrA-Like Protein Involved in Daunorubicin Resistance and Production, *J. Bacteriol.* **178**, 3238-3245.
- Furuya, K. and C. R. Hutchinson (1996), The *DnrN* Protein of *Streptomyces peucetius*, a Pseudo-Response Regulator, Is a DNA-Binding Protein Involved in the Regulation of Daunorubicin Biosynthesis, *J. Bacteriol.* **178**, 6310-6318.
- Otten, S. L., C. Olano, and C. R. Hutchinson (2000), The *dnrO* gene encodes a DNA-binding protein that regulates daunorubicin production in *Streptomyces peucetius* by controlling expression of the *dnrN* pseudo response regulator gene, *Microbiology*, **146**, 1457-1468.
- Rodriguez, E., Z. Hu, S. ou, Y. Volchegursky, and C. R. Hutchinson (2003), Rapid engineering of polyketide overproduction by gene transfer to industrially optimized strains, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 480-488.
- Lum, A. M., J. Huang, C. R. Hutchinson, and C. M. Kao (2003), Reverse engineering of industrial pharmaceutical-producing actinomycete strains using DNA microarrays, *Metabolic Engineering*, **6**, 186-196.
- 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. Schrepf (1985), Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. Norwich, UK, John Innes Foundation.
- Kim, E.-S., K. D. Cramer, A. L. Shreve, and D. H. Sherman (1995), Heterologous expression of an engineered biosynthetic pathway : Functional dissection type II polyketide synthase components in *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **177**, 1202-1207.
- Huang, J., C. J. Lin, K. H. Pan, and S. N. Cohen (2001), Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathway in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays, *Genes Dev.* **15**, 3183-3192.
- Park, H.-S., S.-H. Kang, H.-J. Park, and E.-S. Kim (2004), Doxorubicin Productivity Improvement by the Recombinant *Streptomyces peucetius* with High-Copy Regulatory Genes Cultured in the Optimized Media Composition, *J. Microbiol. Biotechnol.*, In press.
- Stutzman-Engwall, K. J., S. L. Otten, and C. R. Hutchinson (1992), Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp and the overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*, *J. Bacteriol.* **174**, 144-154.
- Lomovskaya, N., S. L. Otten, Y. D. Katayama, L. Fonstein, X. C. Liu, T. Takatsu, A. I. Solari, S. Filippini, F. Torti, A. L. Colombo, and C. R. Hutchinson (1999), Doxorubicin Overproduction in *Streptomyces peucetius* : Cloning and Characterization of the *dnrU* Ketoreductase and *dnrV* Genes and the *doxA* Cytochrome P-450 Hydroxylase Gene, *J. Bacteriol.* **181**, 305-318.
- Dairi, T., K. Aisaka, R. Katsumata, and M. Hasegawa (1995), A self-defense gene homologous to tetracycline effluxing gene essential for antibiotic production in *Streptomyces aureofaciens*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**(10), 1835-1841.
- Otten, S. L., J. Ferguson, and C. R. Hutchinson (1995), Regulation of Daunorubicin Production in *Streptomyces peucetius* by the *dnrR2* Locus, *J. Bacteriol.* **177**, 1216-1224.
- Sheldon, P. J., S. B. Busarow, and C. R. Hutchinson (2002), Mapping the DNA-binding domain and target sequence of the *Streptomyces peucetius* daunorubicin biosynthesis regulatory protein, *DnrI*, *Mol. Microbiol.* **44**(2), 449-460.