

시아노박테리아 Non-ribosomal Peptides의 효과적인 연구를 위한 New Degenerate Primer의 개발

김 기 은

서경대학교 생물공학과

(접수 : 2007. 9. 27., 게재승인 : 2007. 10. 23.)

New Degenerate Primer for the Cyanobacterial Non-ribosomal Peptides

Gi-Eun Kim

Department of Biotechnology, Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea

(Received : 2007. 9. 27., Accepted : 2007. 10. 23.)

Cyanobacteria have been identified as one of the most promising group producing novel biochemically active natural products. Cyanobacteria are a very old group of prokaryotic organisms that produce very diverse secondary metabolites, especially non-ribosomal peptide and polyketide structures. Large multienzyme complexes which are responsible for the non-ribosomal biosynthesis of peptides are modular for the addition of a single amino acid. An activation of amino acid substrates results in an amino adenylate occurring via an adenylation domain (A-domain). A-domains are responsible for the recognition of amino acids as substrates within NP synthesis. The A-domain contains ten conserved motifs, A1 to A10. In this study, ten conserved motifs from A1 to A10 were checked regarding their amino acid sequence of the NRPS-module of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. The part of the amino acid sequence chosen was that which contained as many conserved motives as possible, and then these amino sequence were compared between other cyanobacteria to design a new degenerate primer. A new degenerate primer (A3/A7 primer) was designed to detect any putative NP synthetase region in unknown cyanobacteria by a reverse translation of the conserved amino acid sequence and a search for cyanobacterial DNA bank.

Key Words : Cyanobacteria, non-ribosomal biosynthesis, *Microcystis aeruginosa*, degenerate primer

서 론

현재 육상 식물이나 미생물에서 발견되는 생물학적 활성을 가지는 물질의 중복율은 95%에 달하고 있으므로 novel drug의 개발을 위한 새로운 이차대사물질의 소스에 대한 연구의 필요성은 점차 확대되어지고 있다(1). 그러므로 새로운 소스로서 현재 시아노박테리아를 포함한 수중 미생물에 대한 연구는 높은 관심을 받고 있다. 시아노박테리아는 hepatotoxin같은 독성물질을 포함해서 넓은 범위의 구조적으로 다양한 이차대사물질을 생산한다. 지금까지 많은 새로운 novel structures들이 *Lyngbya* or *Symploca* 같은 시아노박테리

아로부터 정제되었다(2). 그러나 여전히 이차대사물질 연구에서 육상 미생물이 차지하는 비중은 큰데, 그 이유는 수중 미생물을 정성분석으로 screening하는 과정이 균주의 느린 성장과 낮은 생산성에 기인해서 복잡하기 때문이다(3, 4). 그러므로 시아노박테리아 연구에서 잠재적으로 중요한 이차대사물질을 생산하는 균주를 연구하기 위해서 계통발생학적이고 분자생물학적인 접근이 필요하다(5). 대다수의 의학적으로 중요한 natural products는 NRPS나 PKS에 의해서 만들어지며, 시아노박테리아에서 생산되는 이차대사물질들은 large modular enzyme complexes에 의해서 non-ribosomally 합성되어지거나 polyketide origin에 속한다. Non-ribosomal peptide synthesis은 acyladenylation과 thioesterification에 의한 amino acid의 활성화와 4'-phosphopantetheine cofactor로 인한 peptide elongation 그리고 thioesterase에 의한 종결로 이루어진다(6). 이중 A-domain 부분은 NPs 합성에 있어서 필수요소로 자리잡고 있으며 10개의 high conserved motifs로

† Corresponding Author : Department of Biotechnology,
Seokyeong University, Seoul 136-704, Korea

Tel : +82-2-940-7154, Fax : +82-2-919-0345

E-mail : gkeun@skuniv.ac.kr

(A1~A10) 구성되어 있다(7). 진화적으로 보존된 유전자 서열의 NRPS나 PKS의 기작에 관련된 이해는 degenerate primers screening 기술로 이어졌다. Degeneracy는 한 종류의 아미노산이 복수의 codon에 대응하는 현상을 말한다. Degeneracy로 인하여 어떤 특이한 아미노산 서열을 코딩하는 유전자의 염기서열은 결정할 수 없지만 가능성이 있는 염기서열 모두를 포함하는 oligonucleotide를 합성할 수 있다. 아미노산 서열정보 이용해서 특정 아미노산을 생산하는 균주의 해당 유전자를 검출할 수 primer의 디자인이 가능하고 이것을 degenerate primer라고 한다(6, 8). 만약 조합의 수가 그다지 많지 않고 적당한 길이의 degenerate oligonucleotide를 디자인할 수 있다면 이 oligonucleotide는 비교적 특이성 높은 primer로서 이차대사물질 연구에 유용한 시아노박테리아 균주를 검출하는데 효과적으로 사용되어질 수 있다. 이번 연구에서 A1에서 A10까지의 motifs가 *Microcystis aeruginosa* PCC 7806의 NRPS-module 안의 아미노산 서열에서 조사되어 졌고 새로운 degenerate primer가 만들어졌다. 새로 디자인된 degenerate primer에 대한 Screening결과는 시아노박테리아의 NRPS 유전자를 검출하기 위해 개발된 MTF2/MTR2 degenerate primer와 비교 분석되었다(9).

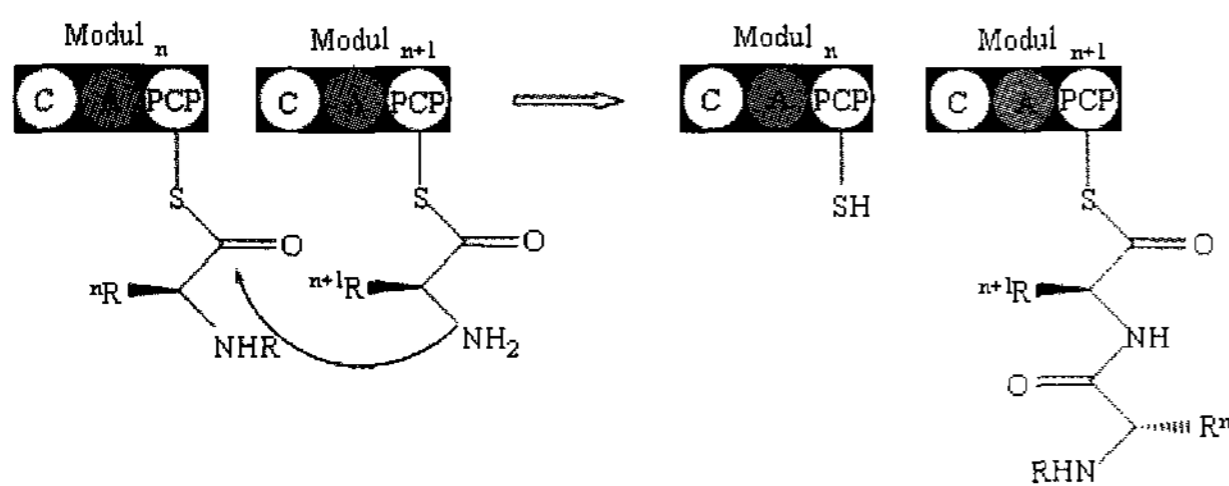


Figure 1. Module structures of the NRPS and their mechanisms, C: condensation domain, A: adenylation domain, PCP: peptidyl carrier protein(10).

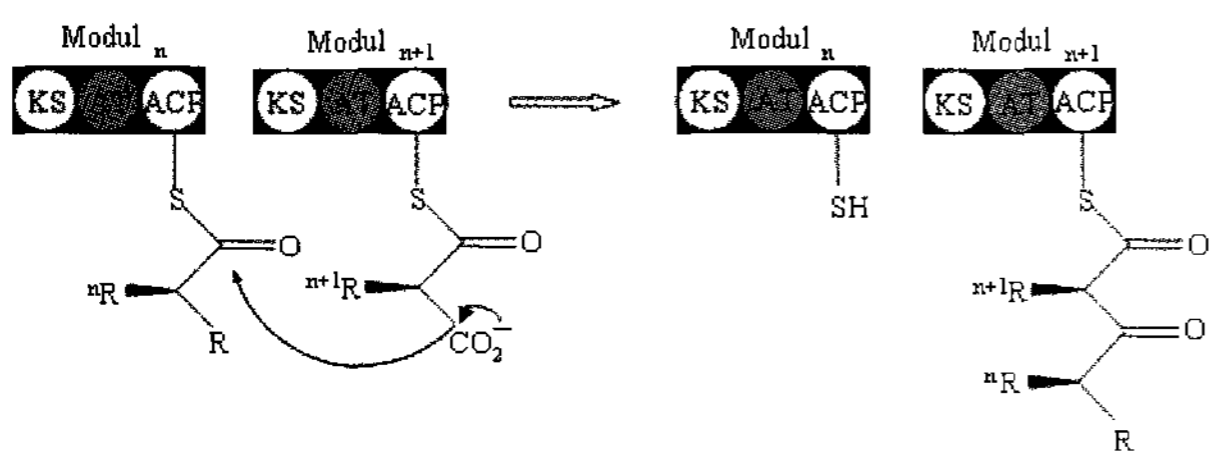


Figure 2. Module structures of the PKS, KS: ketosynthase, AT: acyl transferase, ACP: acyl carrier protein(10).

재료 및 방법

Multiple alignment of amino acid sequences

M. aeruginosa PCC7806에서 알려진 *mcyA* gencluster의 아미노산 서열이 NRPS 유전자 탐지를 위한 새로운 degenerate primer 디자인을 위해서 사용되어졌다. 진화적으로 보존된 10개의 A-domain motifs의 위치는 *McyA* 아미노산 서열 안에서 확인되어졌고 300~500 amino acids의 크기 내에서 가장 많은 A-domain motifs를 포함하는 영역이 선택되어졌다. 선택된 아미노산 서열은 NCBI (National

Center for Biotechnology Information; <http://ncbi.nlm.nih.gov/>)의 gapped alignment program인 BLAST에 (Basic Local Alignment Search Tool) 의해서 다른 시아노박테리아 균주와 상동성이 조사되고 비교되어졌다. 조사되어진 상동영역의 각각 다른 종의 아미노산 서열은 Multiple sequence alignment (MULTALIN; <http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/>)에 의해서 consensus가 조사되어졌다. 높은 consensus를 가진 아미노산 서열 중에서 PCR 증폭에 적합한 두 부분이 DNA의 multiple alignment를 위하여 사용되어졌다.

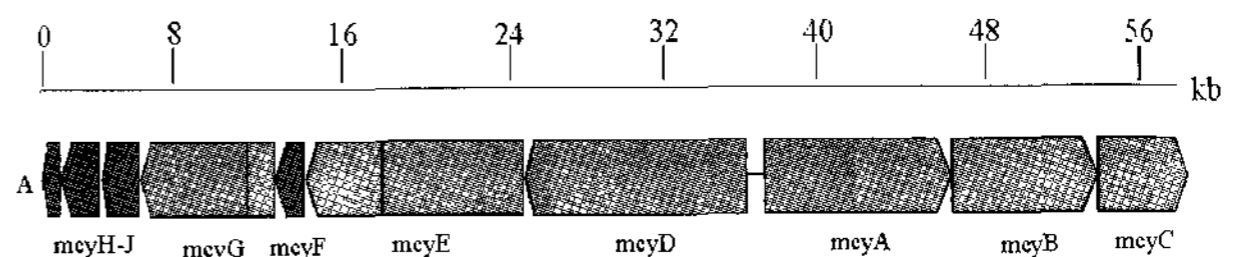


Figure 3. NRPS gencluster of *M. aeruginosa* PCC7806.

Multiple alignment of DNA sequences

높은 consensus를 보이는 앞 부분은 정방향 primer로 사용되고 뒷 부분은 역방향 primer로 설계된다. 각기 해당 아미노산 서열의 상보적인 DNA서열은 codon 조합을 이용한 reverse translating과 시아노박테리아 DNA database를 (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>) 통해서 결정되어지고 ExPASy Proteomics Server internet program에 의해서 (<http://www.expasy.ch/>) DNA 서열과 아미노산 서열 사이의 상보성 검증이 이루어졌다. 여러 종류의 시아노박테리아에서 구해진 높은 consensus를 가진 아미노산 서열에 상보적인 유전자는 다시 Multiple sequence alignment (MULTALIN)에 의해서 그 consensus가 조사되어진다. DNA alignment에서 degeneracy를 최대한 줄일 수 있는 high conserved 염기서열이 degenerate primer로 설계되어진다.

시아노박테리아와 배양

Cyanobitech GmbH에서 (www.cyanobitech.de) 제공된 균주들이 이번 실험에서 선별되었고, BG11 Medium을 사용하여 25°C에서 광배양 (대략 1500 lx) 되었다. Total DNA를 추출하기 위해서 3주 동안 500 ml 플라스크에서 교반 배양되어졌다. 균주의 농도는 Beckman spectrometer DU-50 (Beckman instruments, Fullerton, USA)에 의해서 750 nm에서 측정되어졌다.

DNA 추출과 PCR

시아노박테리아의 전체 DNA는 SDS/lysozyme 방법에 의해서 추출되어진다(11). PCR 반응액 20 µl에는 증류수 1 µl 이외에 Taq polymerase Mix, 10 µl; DNA, 1 µl; 정방향 primer, 4 µl; 역방향 primer, 4 µl가 들어간다. PCR 반응은 94°C로 5분간의 분리과정을 거친 후 증폭과정으로 denaturation 94°C, 30초; annealing 38~45°C (미확정), 30초; extension 72°C 1분을 30회 시행하였으며 72°C, 10분과 10°C로 마무리 되었다. 특히 Annealing 온도를 조절함으로써 PCR에 적합한 조건을 찾았다. 새롭게 디자인된 degenerate primer는 시아노박테리아에서 NRPS gene의 탐침에 사용되어온 MTF2/MTR2 degenerate primer와 비교 분석되었다(9).

결과 및 고찰

가능한 많은 A-domain motifs를 가지는 500 이하의 아미노산 서열이 가지도록 조사하였고, 8개의 motifs를 (A1~A8) 가지는 아미노산 서열 부분이 M. aeruginosa PCC7806의 McyA안에서 degenerate primer 디자인을 위해서 선택되었고 Fig. 4에서 표시되었다. 선택되어진 아미노산 서열의 유사성이 BLAST를 통해서 다양한 14개의 시아노박테리아에서 조사되어졌다.

LTYQELNEKANQLGHYLQKLGVKPEELVGIYIERSLEMVVGLLAVLKAGGAYVPLDPNYPQERLSYLLDGTGKVIITGESLRGLLD EYRGIVVALDITDWSAISQESQSNCDSDGVTGENLAYVIYTSSTGSKPKGVMNNHKGAINRLLWQNDTYQLTKSDCILQKTPFSFDVSVWEFFWPLLAGATLVVAEPEGHKDYTYLQIQLKQQTITLHFVPSMLRVFLQPELKGCSLKRVCSEALSLELTQRFHFHDCCELHNLYGPTAAIDVTVWPCLPESQKAIVSIGRPIANTQIYILNPHLQPVPVIGVIGELHIGGIGLARGYLNRPELTAEKFIPIPFKVEAGIGGEIRAKLYKTGDLARYLPDGNIEFLGRIDHQVKIRGFRIELGEIEAALSQHPAVEQA

Figure 4. The selected amino acids sequence in the NRPS-module of Microcystis aeruginosa PCC 7806 contains 8 conserved A-domain motifs ((A1~A8); A1: LTYxEL A2: LKAGxAYVPID A3: LAYxxYTSGTTGxPKG A4: FDxS A5: NxYGPTE A6: GELxIxGxGLARGY A7: YKTGD A8: GRxDxQVKIRGxRVELEEVE (6). x is any amino acid).

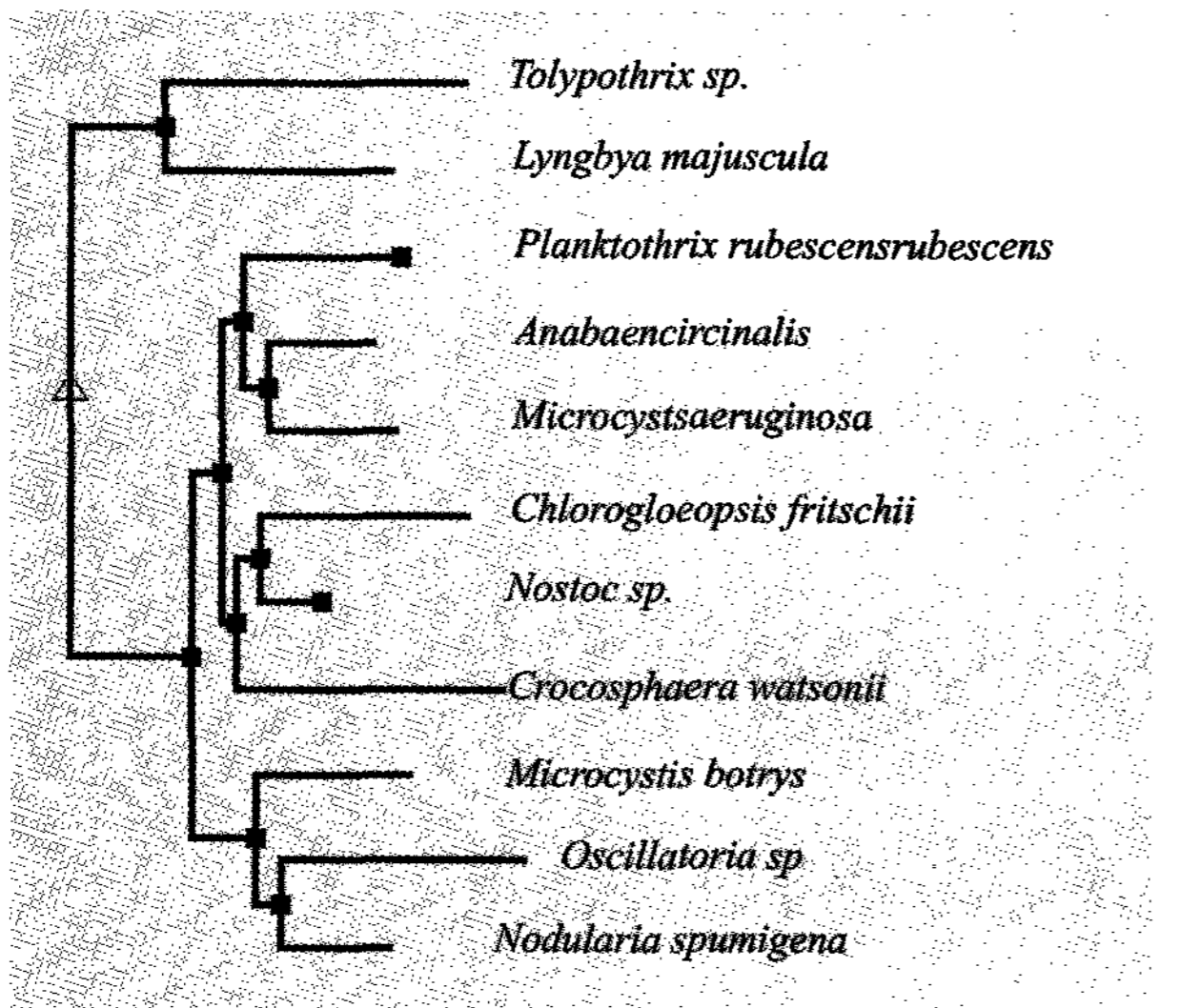


Figure 5. The phylogenetic tree. Cyanobacterial strains were selected and compared with each other in order to find highly conserved sequences (Anabaena variabilis, Nostoc punctiforme Planktothrix agardhi were not shown).

분석되어진 14개의 시아노박테리아에 대한 계통발생학적 구조가 조사되어졌다. Anabaena variabilis, Nostoc punctiforme, Planktothrix agardhi 는 계통중복으로 인해서 계통도에서 표시되지 못하였지만, 그러나 전체적으로 시아노박테리아의 11가지 계통에 관한 진화적으로 보존된 유전적 정보에 대한 연구가 이루어 질 수 있었다. 서로 다른 시아노박테리아에서 얻어진 아미노산 서열은 Multiple sequence alignment (MULTALIN)에 의해서 consensus가 조사되어졌고 여러 부분에서 높은 consensus가 보여졌다.

Primer가 PCR을 통해서 증폭시키는 목표 DNA의 크기를 1000 bp 이하로 하고 그리고 primer의 길이를 20 bp 이상으로 할 수 있는 아미노산 서열을 고려하여 consensus 부분 중에서 두개의 상동영역이 선택되었었으며, 그 두 영역은 A3 motif와 A7 motif에 해당하였다. 따라서 각기 관련된 motifs의 이름을 인용해서 새롭게 디자인된 degenerate primer를 A3/A7이라 명명하였다. 두 부분의 아미노산 서열은 상보적인 DNA로 sequence alignment (BLAST/MULTALIN) 되었고 degeneracy를 최소화시키는 쪽으로 A3 motif 부분에서 정방향 primer가 설계되었고 A7 motif 부분에서 역방향 primer가 디자인되었다. Degenerate primer 제작에서 N (A,C,G,T)이 사용될 경우 degeneracy는 4배 증가하게 된다. 그래서 degeneracy를 줄이기 위해서 N이 사용될 경우 Inosin을 사용하였다.

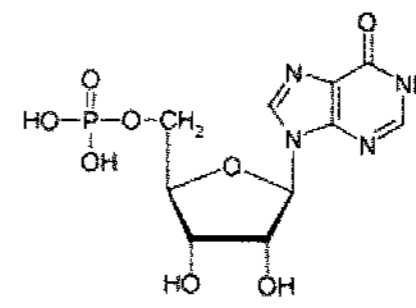


Figure 6. Structure of the Inosine.

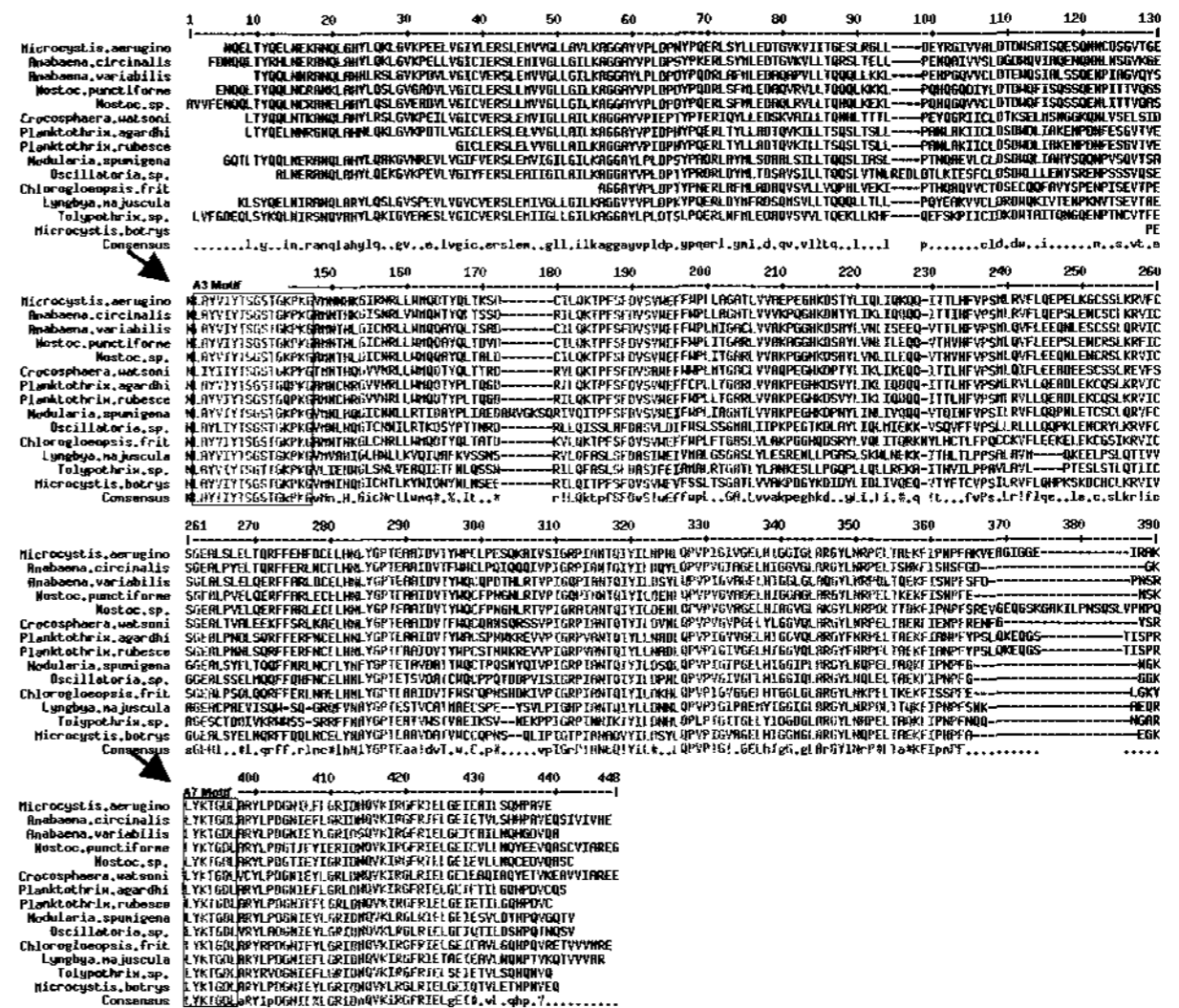


Figure 7. Amino acid sequences of several cyanobacteria were aligned in a multiple fashion for the design of a new primer. Highly conserved amino acid sequences were selected and shown in the two boxes. The front box represents the A3 motif and the rear box represents the A7 motif.

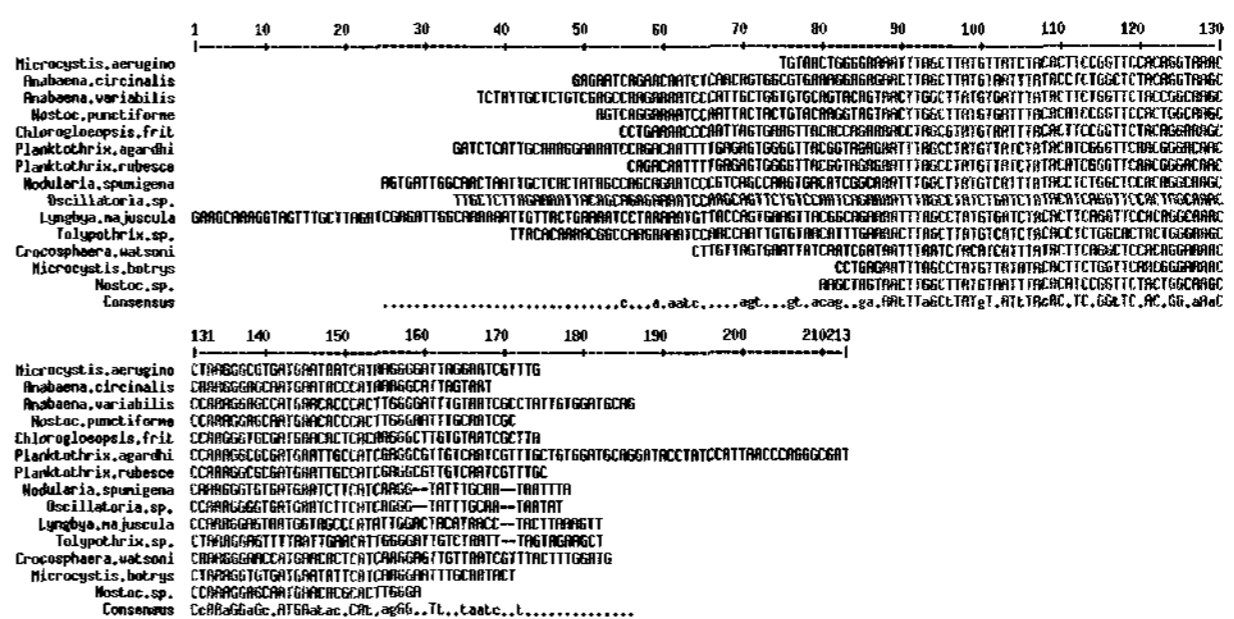


Figure 8. MULTALIN alignments about nucleotide sequences corresponding to the A3 motif. Highly conserved sequence is checked above.

Table 1. The new degenerated primer A3/A7 (IUPAC ambiguity codes: M, AC; R, AG; Y, CT; D, AGT; N, ACGT; I, Inosin)

A3 forward	5'-ATYTAYACITCGGYTCIACIGG-3'
A7 reverse	5'-TAARTCICCGTYTTRTAIA-3'

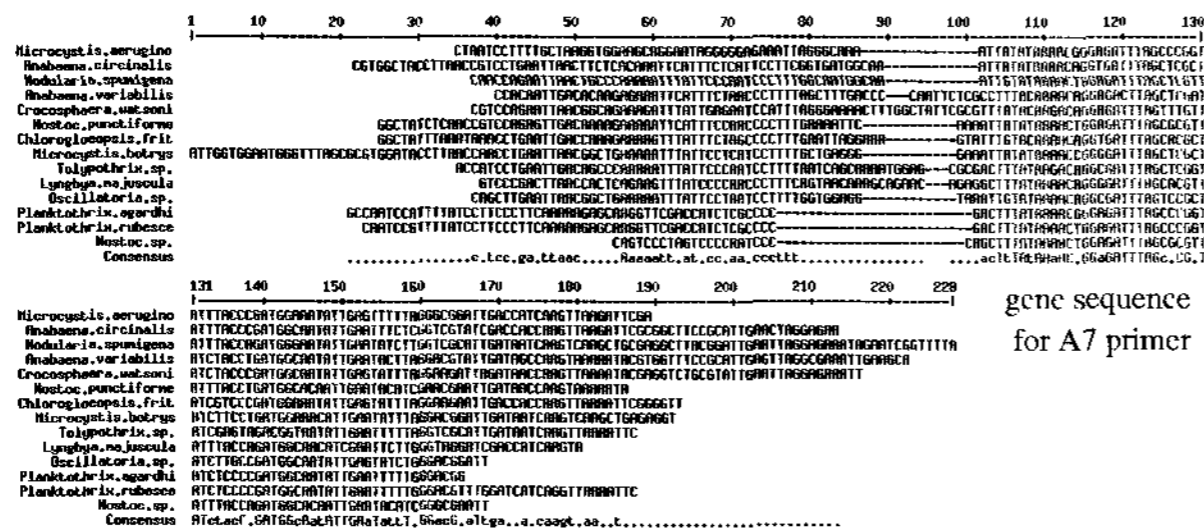


Figure 9. MULTALIN alignments about nucleotide sequences corresponding to the A7 motif. Reverse primer was derived from the highly conserved sequence checked above.

98개의 배양된 시아노박테리아에서 MTF2/MTR2 degenerate primer에 의해 증폭되어지는 30개의 시아노박테리아 중 21개는 A3/A7 degenerate primer에 의해서도 검출되었다. 그러나 MTF2/MTR2 degenerate primer로 스크링되는 9개의 균주는 검출하지 못하였지만 MTF2/MTR2 degenerate primer에 의해서 검출되는 양은 6개의 균주를 새로 디자인된 A3/A7 degenerate primer로 더 선별할 수 있었다.

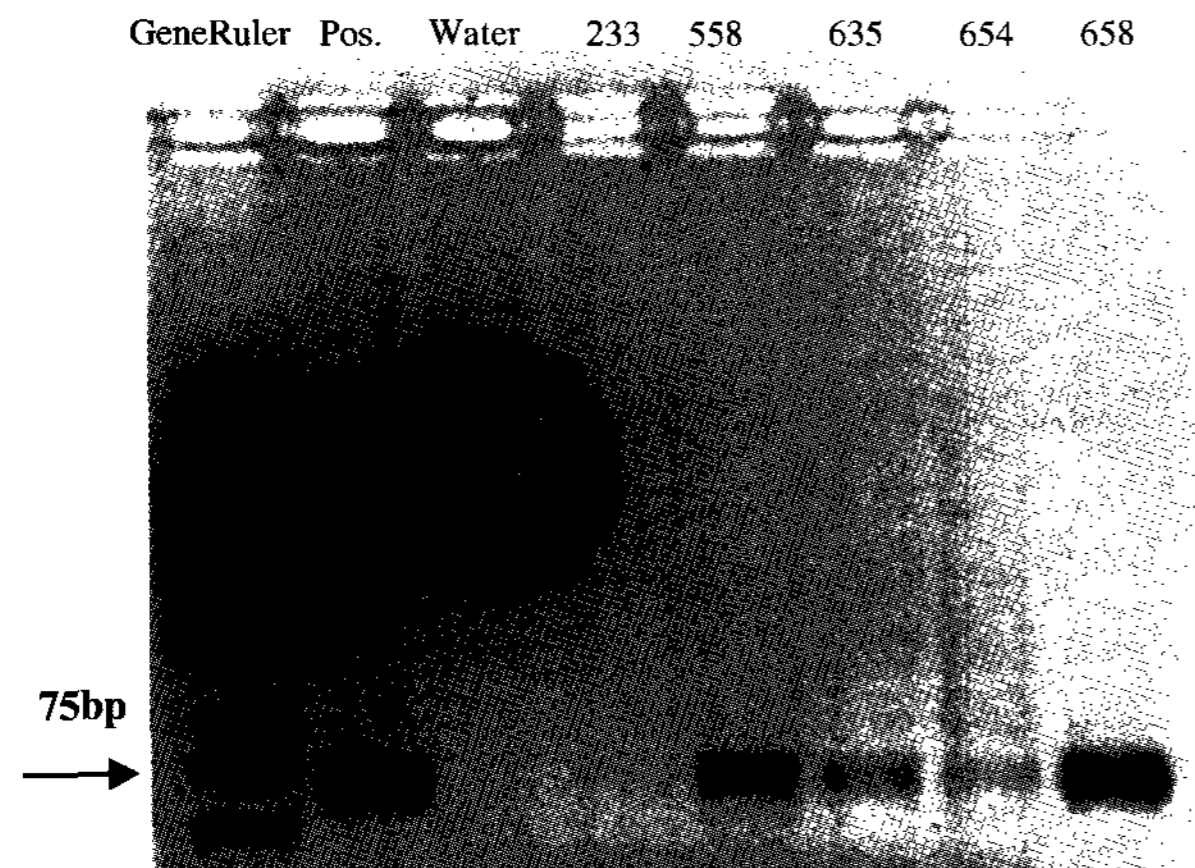


Figure 10. An example of PCR screening through the new designed A3/A7 primers. Some 730 bp fragment was amplified by degenerate A3/A7 primer. Positive control: CBT 265 *Microcystis* sp. Strain PCC 7806, Negative Control: water without a DNA template. Annealing temperature was determined at 40°C.

요약

Cyanobacterial A-domain의 A3 motif와 A7 motif의 높은 진화론적 보존성에 의거해서 Non-ribosomal peptides를 생산하는 시아노박테리아를 Screening할 수 있는 degenerated primer를 만들 수 있었다. Degenerate primer서열의 종류는 가능하면 1,000개 정도까지를 기준으로 만드는 것이 좋다. Primer의 종류가 너무 많으면 primer 1종류 당 mol수가 적게 되어 특이성도 저하된다. 그러므로 Primer의 종류가 많

을 경우는 inosin을 N (4종류의 염기) 부분에 이용하면 어느 염기에도 강하게 결합하지 않고 두 가닥 DNA 형성을 저해하지도 않으므로 degeneration을 줄이는데 도움이 된다. Degenerate primer의 annealing 온도는 primer에 포함되어있는 서열 중 가장 낮은 Tm을 기준으로 한다. 이번 연구처럼 N (ACGT) 대신에 Inosin을 이용하였을 때에는 Inosin이 Tm을 높게 하지 않고 Tm을 낮게 하지 않으므로 Tm 계산시 고려하지 않아도 되었다. PCR 효율이 떨어질 우려가 있으므로 충분한 Tm값 (대개 45~60°C 이상)을 갖는 서열을 디자인하여 primer로 PCR하는 것이 좋지만, A3/A7 degenerate primer에서는 실험에 의해 40°C로 annealing 온도가 (Tm) 다소 낮게 설정되었다, 그러므로 검출되지 않은 NRPS gene을 가진 균주와 CBT635, CBT654와 같이 약한 PCR band의 형성은 새로 제작된 primer의 낮은 Tm 기인한다고 생각되어진다. Tm의 이론적인 값은 $Tm = \{(G+C)*4 + (A+T)*2\}$ 의 식을 통해서 정방향 primer에서 54°C 역방향 primer에서 42°C로 계산되었다. 새로운 degenerate primer에 의해서 MTF2/MTR2로 검출되지 않는 6개의 균주가 더 검출되었으며, A3/A7과 MTF2/MTR2를 이용한 통합 PCR Screening을 통해서 NRPS gene 검출에 특이성과 효율성을 높일 수 있다.

REFERENCES

1. Fenical, W. (1993), Chemical Studies of Marine-Bacteria - Developing a New Resource, *Chem. Rev.* **93**, 1673-1683.
2. Moore, B. S. and J. N. Hopke (2001), Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway, *ChemBiochem.* **2**, 35-38.
3. Chen, G, G. Y. Wang, X. Li, B. Waters, and J. Davies (2000), Enhanced production of microbial metabolites in the presence of dimethyl sulfoxide, *J. Antibiot. (Tokyo)* **53**, 1145-1153.
4. Wagner-Döbler, I., W. Beil, S. Lang, M. Meiners, and H. Laatsch (2002), Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **74**, 207-238.
5. Stevens, H. (2004), Communities of heterotrophic bacteria in the German Wadden Sea - diversity, dynamics and abundance. Dissertation. Institute for Chemistry and Biology of the Marine Environment, Universität Oldenburg. Oldenburg, Germany.
6. Stachelhaus, T., A. Hüser, and M. A. Marahiel (1996), Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases, *Chem. Biol.* **3**, 913-921.
7. Marahiel, M. A., T. Stachelhaus, and H. D. Mootz (1997), Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis, *Chem. Rev.* **97**, 2651-2673.
8. Kwok, S., S. Y. Chang, J. J. Sninsky, and A. Wang (1994), A guide to the design and use of mismatched and degenerate primers, *PCR Methods Appl.* **3**(4), S39-47.
9. Dittmann, E., B. A. Neilan, M. Erhard, H. von Döhren, and T. Börner (1997), Insertional mutagenesis of a peptide synthase gene which is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis* PCC7806, *Mol. Microbiol.* **26**(4), 779-787.
10. Schwarzer, D. and M. A. Marahiel (2001), Multimodular biocatalysts for natural product assembly, *Naturwissenschaften* **88**, 93-101.
11. Franche, X. and T. G. Damerval (1988), Tests on nif probes and DNA-Hybridization, *Meth. Enzymol.* **167**, 803-808.