

*Streptomyces peucetius*에서의 ϵ -rhodomycinone 추출 및 이종균주에서의 rhodomycin D 생산 연구

¹박 성 희 · ³차 민 호 · ³김 은 정 · ²윤 여 준 · ⁴송 재 경 · ⁴이 희 찬 · ⁴류 광 경 · † ^{1,3}김 병 기
¹서울대학교 생물공학 협동과정, ²이화여자대학교 나노과학부, ³서울대학교 화학생물공학부, ⁴선문대학교 생체분자재설계연구소
(접수 : 2007. 10. 1., 게재승인 : 2008. 1. 17.)

NDP-sugar production and glycosylation of ϵ -rhodomycinone in *Streptomyces venezuelae*

Sung-Hee Park¹, Min-Ho Cha³, Eun-Jung Kim³, Yeo Joon Yoon², Jae Kyung Sohng⁴, Hee Chan Lee⁴,
Kwangkyoung Liou⁴, and Byung-Gee Kim^{3†}

¹Institute of Molecular Biology and Genetics, Interdisciplinary Program for Bioengineering, Seoul National University,
Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

²Division of Nano Sciences, Ewha Womans University, 11-1, Daehyun-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-750, Korea

³Institute of Bio Engineering, School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University,
Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea

⁴Institute of Biomolecule Reconstruction, SunMoon University, Chungnam 336-708, Korea

(Received : 2007. 10. 1., Accepted : 2008. 1. 17.)

Anthracycline antibiotics doxorubicin (DXR) is clinically important cancer therapeutic agent produced by *Streptomyces peucetius*. DXR result by further metabolism of rhodomycin D (RHOD) and require a deoxy-sugar component for their biological activity. In this study, production of TDP-L-daunosamine and its attachment to ϵ -rhodomycinone (RHO) to generate RHOD has been achieved by bioconversion in *Streptomyces venezuelae* that bears eleven genes. *S. peucetius* seven genes (*dnmUTJVZQS*) were transformed by plasmid and *S. venezuelae* two genes *desIII, IV* and two more *S. peucetius* *drvA, B* genes were integrated into chromosomal DNA. To generate the feeding substrate RHO, 6L *S. peucetius* grown on agar plate was harvested, extracted with organic solvent and then purified using preparative HPLC. Recombinant *S. venezuelae* grown on agar plate containing RHO was harvested and its n-butanol soluble components were extracted. The glycosylated product of aromatic polyketide RHO using heterologous host *S. venezuelae* presents the minimal information for TDP-L-daunosamine biosynthesis and its attachment onto aglycone. Moreover, the structure of auxiliary protein, DnrQ, was predicted by fold recognition and homology modeling in this study. This is a general approach to further expand of new glycosides of antitumor anthracycline antibiotics.

Key Words : *Streptomyces peucetius* *Streptomyces venezuelae*, ϵ -Rhodomycinone, Rhodomycin D, Glycosyltransferase DnrQ, homology modeling

서 론

Doxorubicin (DXR)은 오랜 기간 지속되는 통증과 각종

† Corresponding Author : Institute of Bio Engineering, School of
Chemical and Biological Engineering, Seoul National University,
Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea.

Tel : +82-2-880-6774, Fax : +82-2-876-8945

E-mail : byungkim@snu.ac.kr

부작용에도 불구하고, 치료목적으로 각종 항암, 항생 치료에 가장
광범위하게 쓰이는 의약품 중 하나이다(1). 현재까지 밝혀진
자연계에서 DXR을 생산하는 미생물은 *Streptomyces peucetius*
ATCC 29050이며, 생합성으로 생산되는 양이 수요에 훨씬
미치지 못하기 때문에 주로 대사 중간체인 daunorubicin (DNR)
으로부터 화학적인 합성을 통해 산업화 되고 있다(1). DXR
생합성 생산량이 적은 것은, 생합성 경로에서 당 전이 단계의
효율이 가장 큰 원인으로 알려진 바 있다(2). 당 전이를 담당
하는 효소는 glycosyltransferase (GT)라고 알려진 DnrS인데,

Type II polyketide synthase (PKS)에 의하여 형성된 aglycone 인 ϵ -rhodomycinone (RHO)에 daunosamine을 전이하여 항생력을 가지는 rhodomycin D (RHOD)를 만들어낸다(Fig. 1)(3). 일반적으로 Type II PKS에 의하여 생산되는 대사 물질들의 당 전이 효소는 단독으로 활성을 갖지 못하고 도움 효소에 의존해서 활성화 된다고 알려져 있다(4). 이렇게 만들어진 당 전이 이후의 대사 체들의 농도는 aglycone인 RHO의 생산량에 비하여 10% 미만인것으로 알려져 있다(2).

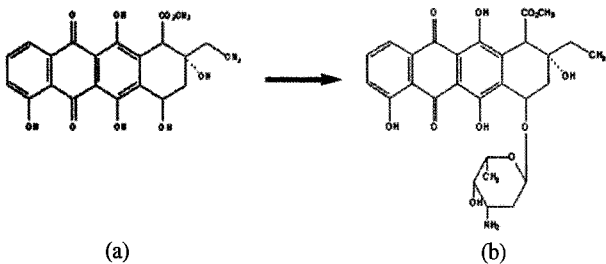


Figure 1. Daunosamine attachment to ϵ -rhodomycinone by DnrS and DnrQ. (a) ϵ -rhodomycinone, (b) rhodomycin D.

당 전이 효율이 낮은 이유는 크게 세 가지로 생각되는데, 먼저 당 전이 효소의 활성 및 안정성이 떨어지기 때문일 수 있고, 전이되는 활성화 당 수여체인 TDP-L-daunosamine의 농도가 낮기 때문일 수 있으며, 마지막으로 생산되는 당화된 대사 체의 독성이 생산 속도에 영향을 주어 생산량이 감소할 수 있다. 본 연구에서는 DXR 생합성 경로의 당 전이와 활성화 당 생합성에 관련된 최소단위의 유전자들을 알아보고, 이들을 내성 유전자와 함께 이중균주인 *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439에서 발현하여 RHOD의 생산을 확인하고자 하였다. 이를 위해서 야생 숙주인 *Streptomyces peucetius* ATCC 29050의 대량 배양을 통해 당 전이의 기질로 사용되는 aglycone RHO의 정제 실험도 함께 이루어졌다. 또한, GT의 도움 효소인 DnrQ의 모델링으로 대략적인 구조를 예측하고 당 전이 반응에서의 역할에 대해 예측할 수 있었다.

재료 및 방법

균주와 plasmid 및 재료

Escherichia coli DH5a와 pLITMUS28i (New England Biolabs, Beverly, Mass.)은 통상적인 보조 클로닝에 사용되었다. 지속적인 강력 promoter인 ermEp*을 갖는 방선균용 다수복제 벡터인 pIBR25와 융합 벡터인 pSET152는 선문대학교 송재경 교수님 실험실에서 제공받았다. *Streptomyces peucetius* ATCC 29050은 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)에서 구입하였으며, *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439는 이화여자 대학교 윤여준 교수님 실험실에서 제공받았다.

본 실험에 사용된 대부분의 시약은 씨그마알드리치코리아(유)에서 구입하였고, 균주 배양에 사용한 조성 성분은 Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA) 제품이 사용되었다. 제한 효소와 중합효소는 Roche (Basel, Switzerland), 제넨메드 (GENENMED, Korea)의 제품이 각각 사용되었고, primer 제작 및 시퀀싱은 코스모진텍 (COSMO, Korea)에 의뢰하

였다. DNA 분리 정제는 진올바이오테크놀로지 (generalbiosystem, Korea), TLC plate는 Merck (Darmstadt, Germany)의 Silica gel 60 F₂₅₄가 사용되었다.

RHO의 분리 및 정제

6L의 NDYE 고체 배지에 4일 동안 30°C에서 배양한 *S. peucetius*를 배지와 함께 수거하여 동량의 n-butanol로 녹여내었다(5). 녹여낸 용액은 evaporator로 50 ml까지 농축하였고, 두 배의 heptane을 첨가 한 후 pH 1.8의 증류수로 씻어주었다. 이렇게 얻어진 heptane과 n-butanol 수용체는 모두 증발하여 ethyl acetate로 녹여내었다. 그 후, C₁₈ column을 이용하여 분리하고, RHO authentic을 참고하여 같은 위치의 분리 물을 수거하였고, 최종적으로 동결 건조하여 기질 분말을 얻을 수 있었다.

유전자 조작 및 균주 선별

drdA, drdB, des3, des4 유전자는 pLITMUS28i에 클로닝하여 BamHI과 XbaI의 제한 효소로 pSET152 vector에 삽입하였다. dnmU, dnmT, dnmZ, dnmJ, dnmV, dnmQ, dnmS 또한 pLITMUS28i에 초기 클로닝 하여, BamHI과 HindIII로 pIBR25에 삽입하였다. 제작된 벡터는 차례로 *S. venezuelae*에 protoplast방법으로 형질전환 하였다. *E. coli*는 37°C에서 LB 배지로 배양되어 ampicillin (100 ppm)으로 선별하였다. *S. peucetius*와 *S. venezuelae*는 30°C, NDYE 배지에서 배양하였고, 형질 전환된 *S. venezuelae*는 apramycin (50 ppm)과 thiostrepton (12 ppm)으로 선별하였다(6).

결과 및 고찰

*S. venezuelae*는 현재까지 알려진 방선균 중 gene manipulation을 비롯한 형질 전환 기법이 가장 손쉬운 균주로 알려져 있다(7). 배양에 걸리는 시간이 하루 정도로 짧으며, protoplast 기법을 이용한 형질전환 효율도 매우 좋은 편이다(8). 본 연구에서는 DXR생산 과정 중 glycosylation에 대한 연구의 이중 균주로 *S. venezuelae*를 선정하여, 당 합성 및 전이를 위해 필요한 최소 단위의 유전자를 형질 전환하고, exogenous aglycone을 feeding하여 in vivo로 당화 반응을 보내었다. Aglycone 기질인 RHO를 획득하기 위하여 *S. peucetius*의 배양 물을 추출한 후 HPLC로 분석한 결과, RHO의 authentic 시료와 비교하여 같은 위치의 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

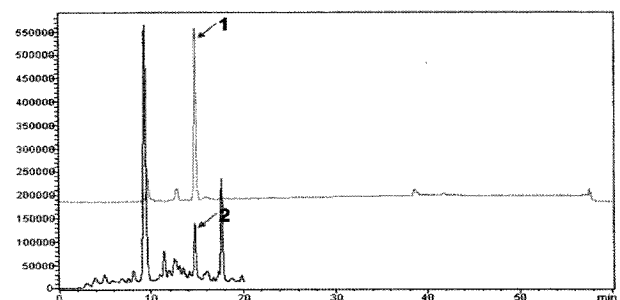


Figure 2. HPLC analysis of ϵ -rhodomycinone. 1: ϵ -rhodomycinone authentic, 2: extract of *S. peucetius*.

이것을 preparative HPLC로 authentic 시료와 같은 위치의 peak를 분리하고, 분리한 시료를 동결 건조하여 1.5 mg의 순수 시료를 얻었으며, TLC로 분석한 결과, silica plate에 loading 하였을 때, 보라색의 authentic과 일치하는 색을 확인하였고, 용매로 분리하였을 때 동일한 R_f 값을 확인하였으며, UV 파장 310 nm하에서 동일한 위치, 모양 및 색으로 미루어 보아 RHO를 성공적으로 분리하였음을 확인하였다(Fig. 3).

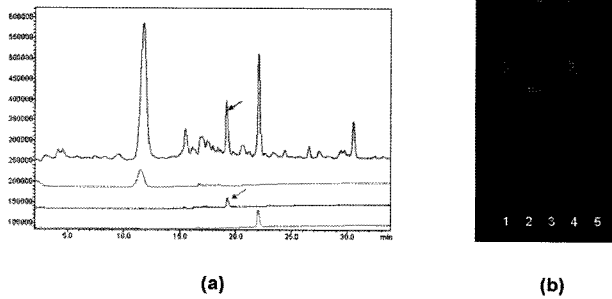


Figure 3. Purification of ε-rhodomyconone. (a) purification by preparative HPLC, (b) TLC analysis, 1: Authentic; 3: purified ε-rhodomyconone; 5: doxorubicin.

RHOD의 생산을 위해서는 생산 균주가 내성을 가져야 하므로, *S. peucetius*의 유전자중 내성 유전자인 *drA*와 *drB*를 *S. venezuelae*에 도입하여 DXR 50 ppm 이상에 대한 내성이 생기는 것을 확인하였다 (data not shown). 또한, 당 공여체인 활성화 당 TDP-L-daunosamine 합성 및 전이가 반응 숙주 내에서 이루어지도록 필요한 생합성 유전자들이 조사되었다(Fig. 4).

Gene	function	strain
<i>drA</i>	Resistance gene	<i>Streptomyces peucetius</i>
<i>drB</i>		
<i>desIII</i>	Glucose-1-phosphate thymidyl transferase	<i>Streptomyces venezuelae</i>
<i>desIV</i>	Glucose-4,6-dehydratase	
<i>dnmS</i>	glycosyltransferase	<i>Streptomyces peucetius</i>
<i>dnmQ</i>	unknown but required for daunosamine biosynthesis or attachment to epsilon-rhodomyconone in the daunorubicin pathway	
<i>dnmT</i>	TDP-4-keto-6-deoxy-2,3-dehydrase	
<i>dnmZ</i>	unkown	
<i>dnmJ</i>	C3-aminotransferase	
<i>dnmU</i>	TDP-4-keto-6-deoxyglucose-epimerase	
<i>dnmV</i>	TDP-4-ketohexulose reductase	

Figure 4. The TDP-L-daunosamine biosynthesis and glycosylation genes and origin.

이들 유전자 중, 내성 관련 유전자인 *drA*, *drB*와 활성화 당 중간체인 TDP-4-keto-6-deoxyglucose까지의 반응을 보내는 *des3*, *des4* 유전자는 반응 숙주의 chromosomal DNA에 삽입되었고, TDP-4-keto-6-deoxyglucose로부터 TDP-L-daunosamine까지 반응을 보낼 *dnmU*, *dnmT*, *dnmZ*, *dnmJ*, *dnmV* 유전자와 당 전이를 담당할 *dnmQ*, *dnmS* 유전자가 plasmid DNA의 형태로 반응 숙주에 전달되었다(Fig. 5)(9-12). *dnmZ*는 그 기능이 정확하게 알려진 바가 없으나, 당 생합성 유전자에서 제외하였을 때, TDP-L-daunosamine이 생산되지 않

음을 확인하였다(data not shown)(13). 이렇게 만들어진 반응 균주는 기질인 RHO가 함유되어있는 배지에서 5일 동안 배양되었으며, 배지와 균주는 RHO의 분리 방법과 동일한 방법으로 수거 및 추출되었다. 추출한 생산물을 TLC로 분석하였을 때, 기질인 RHO와는 다른 위치에서 새로운 물질이 UV light 310nm하에서 검출되었다. 이를 *Micrococcus luteus*에 대하여 Bioassay를 수행하였다. 그 결과, 반응 추출물에서 약한 anti-bacterial activity가 생긴 것을 확인함으로써 RHO에 glycosylation이 일어났음을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

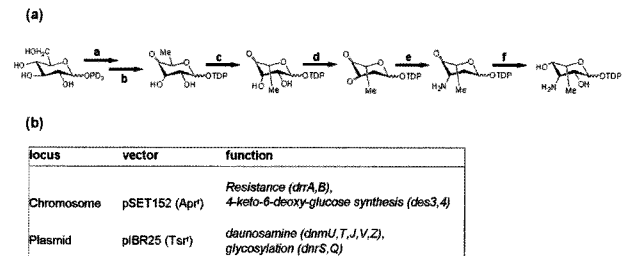


Figure 5. (a) Proposed pathway for biosynthesis of TDP-L-daunosamine, a: *desIII* b: *desIV* c: *dnmT*, Z d: *dnmJ* e: *dnmU* f: *dnmV*, (b) *S. venezuelae* mutant design.

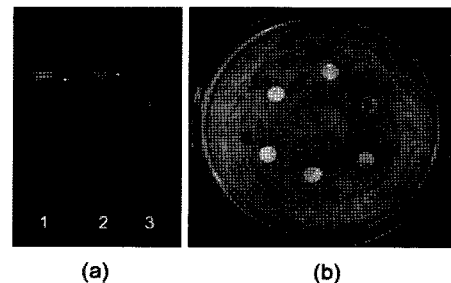


Figure 6. Assay for glycosylated ε-rhodomyconone (rhodomycon D). (a) TLC result, 1: ε-rhodomyconone; 2: rhodomycon D; 3: doxorubicin, (b) Bioassay on *M. luteus*, 1: rhodomycon D; 2: solvent (n-butanol); 3: ε-rhodomyconone; 4: doxorubicin; 5: solvent (methanol); 6: DDW.

GT인 *DnrS*는 *DnrQ* 없이 단독으로는 활성을 갖지 못하며, 이와 비슷한 GT의 auxiliary protein들이 방선균 이종균주에서 발견되었다(4),(14),(15). 특히, 이러한 성질은 doxorubicin을 비롯하여 erythromycin, oleandomycin, tylosin등 polyketide계열 항생제의 생합성 경로에서만 발견되는데, 현재까지 auxiliary protein의 정확한 기능은 밝혀지지 않았다. 주로 GT의 upstream에 위치하며, GT와 거의 동일한 유전자 크기를 가진다. 단순 서열 유사성 비교인 Blast 검색으로는 유사한 기능을 가지는 유전자를 찾을 수 없지만, 구조 기반 검색 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm)으로 이 단백질이 myxobacterium *Sorangium cellulosum*의 대사산물인 항암 후보 물질 Epothilones 생합성에 관계하는 P450epoK (PDB 1Q5E)과 유사한 단백질 접힘 구조임을 알 수 있었다(16, 17). P450epoK는 macrolide 생합성에 관계하는 bacterial P450과도 매우 유사한 구조를 갖는다는 사실을 알 수 있었으며, 이와 같은 결과를 바탕으로 구조 모델링 (http://147.46.145.70/automodel)을 시도하였다(Fig. 7). P450 구조에는 sheet 평행 구조가 두 군데 자리하는 것과는 달리, *DnrQ*의 구조 모델에는 하나의 sheet군집만 발견되었다. 그러나 전체적으로 helix 위주로 구조가 형성되었고, sheet 구조는

helix 구조를 보조하는 위치에 있다는 점에서 비슷한 경향을 보였으며, 반응에 관계하는 예상 주요 잔기들이 helix구조 상에 존재할 확률이 높은 것으로 예측할 수 있었다.

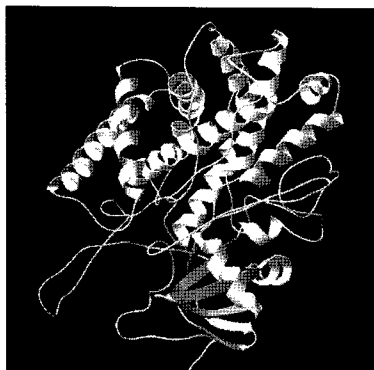


Figure 7. Homology modeling result of DnrQ.

요 약

*Streptomyces peucetius*가 생산하는 anthracycline 계열의 doxorubicin은 치료목적으로 사용되는 중요한 항암제 중 하나이다. Doxorubicin은 rhodomycin D에서부터 몇 단계의 생합성 과정을 더 거쳐 생산되는데, 생물학적 활성을 갖기 위해서는 deoxy-sugar의 전이가 반드시 일어나야 한다. 본 논문에서는 이종균주인 *Streptomyces venezuelae*에 11개의 유전자를 형질 전환하여 TDP-L-daunosamine를 생산하고 이것을 ϵ -rhodomycinone에 전이하여 rhodomycin D를 생산하는 연구를 수행하였다. *S. peucetius* 유래의 7개 유전자 *dnmU*, *T*, *J*, *V*, *Z*, *Q*, *S*를 당 합성 및 전이를 위해 plasmid 형태로 전이하였으며, *S. venezuelae*의 *desIII*, *IV*와 doxorubicin 내성 유전자인 *draA*, *B*는 chromosomal DNA에 삽입하였다. Aglycone 기질인 ϵ -rhodomycinone을 확보하기 위하여 6L의 고체 배지에 *S. peucetius*를 배양하여 유기용매로 추출하고 preparative HPLC로 분리 정제 하였다. 결과적으로 이종균주인 *S. venezuelae*에서 ϵ -rhodomycinone에 당 전이가 일어난 생성물을 확인함으로써 deoxy-sugar의 생합성 및 전이에 필요한 최소한의 유전적 정보를 확인할 수 있었다. 또한, 유사서열 단백질 모델링을 통하여, 최초로 당 전이 반응에 필수적인 도움효소 DnrQ의 구조를 예측하였다.

감 사

This work was supported by Ministry of Commerce, Industry and Energy (grant no. 10023194) and by a grant (no. 20050401034682) from the BioGreen 21 Program, Rural Development Administration, Republic of Korea.

REFERENCES

1. Hutchinson C. R., and Colombo A. L. (1999), Genetic engineering

- of doxorubicin production in *Streptomyces peucetius*: a review. *J. Ind Microbiol Biotechnol* **23**, 647-652.
2. Lomovskaya N., Otten S. L., Doi-Katayama Y., Fonstein L., Liu X. C., Takatsu T., Inveni-Solari A., Filippini S., Torti F., Colombo A. L., and Hutchinson C. R. (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.
3. Olano C., Lomovskaya N., Fonstein L., Roll J. T., and Hutchinson C. R. (1999), A two-plasmid system for the glycosylation of polyketide antibiotics: bioconversion of epsilon-rhodomycinone to rhodomycin D. *Chem Biol* **6**, 845-855.
4. Hong J. S., Park S. J., Parajuli N., Park S. R., Koh H. S., Jung W. S., Choi C. Y., and Yoon Y. J. (2007), Functional analysis of desVIII homologues involved in glycosylation of macrolide antibiotics by interspecies complementation. *Gene* **386**, 123-130.
5. Kieser T., and Hopwood D. A. (1991) Genetic manipulation of *Streptomyces*: integrating vectors and gene replacement. *Methods Enzymol* **204**, 430-458.
6. J. Sambrook, E. F. Fritsch, and Maniatis T. (1989), Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y.
7. Yoon Y. J., Beck B. J., Kim B. S., Kang H. Y., Reynolds K. A., and Sherman D. H. (2002), Generation of multiple bioactive macrolides by hybrid modular polyketide synthases in *Streptomyces venezuelae*. *Chem Biol* **9**, 203-214.
8. Jung W. S., Lee S. K., Hong J. S., Park S. R., Jeong S. J., Han A. R., Sohng J. K., Kim B. G., Choi C. Y., Sherman D. H., and Yoon Y. J. (2006), Heterologous expression of tylosin polyketide synthase and production of a hybrid bioactive macrolide in *Streptomyces venezuelae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **72**, 763-769.
9. Kaur P. (1997), Expression and characterization of DrrA and DrrB proteins of *Streptomyces peucetius* in *Escherichia coli*: DrrA is an ATP binding protein. *J. Bacteriol* **179**, 569-575.
10. Scotti C., and Hutchinson C. R. (1996), Enhanced antibiotic production by manipulation of the *Streptomyces peucetius* *dnrH* and *dnmT* genes involved in doxorubicin (adriamycin), biosynthesis. *J. Bacteriol* **178**, 7316-7321.
11. Xue Y., Zhao L., Liu H. W., and Sherman D. H. (1998), A gene cluster for macrolide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*: architecture of metabolic diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**, 12111-12116.
12. Borisova S. A., Zhao L., Sherman D. H., and Liu H. W. (1999), Biosynthesis of desosamine: construction of a new macrolide carrying a genetically designed sugar moiety. *Org Lett* **1**, 133-136.
13. Otten S. L., Gallo M. A., Madduri K., Liu X., and Hutchinson C. R. (1997), Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius* *dnmZUV* genes encoding three enzymes required for biosynthesis of the daunosamine precursor thymidine diphospho-L-daunosamine. *J. Bacteriol* **179**, 4446-4450.
14. Madduri K., and Hutchinson C. R. (1995), Functional characterization and transcriptional analysis of a gene cluster governing early and late steps in daunosamine biosynthesis in *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol* **177**, 3879-3884.
15. Otten S. L., Liu X., Ferguson J., and Hutchinson C. R. (1995), Cloning and characterization of the *Streptomyces peucetius* *dnrQS* genes encoding a daunosamine biosynthesis enzyme and a glycosyl transferase involved in daunosamine biosynthesis. *J. Bacteriol* **177**, 6688-6692.
16. Nagano S., Li H., Shimizu H., Nishida C., Ogura H., Ortiz de Montellano P. R., and Poulos T. L. (2003), Crystal structures of epothilone D-bound, epothilone B-bound, and substrate-free forms of cytochrome P450epoK. *J. Biol Chem* **278**, 44886-44893.
17. Heinz D. W., Schubert W. D., and Hofle G. (2005), Much anticipated--the bioactive conformation of epothilone and its binding to tubulin. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 1298-1301.