KSBB Journal 2009. 24: 279~286 KSBB

*Streptomyces avermitilis*에서 *olmA5* Gene의 Knock-out에 의한 Oligomycin 합성 억제

강현우 · 유연우*

아주대학교 분자과학기술학과

Inhibition of Oligomycin Biosynthesis by *olmA5* Gene Knock-out in *Streptomyces avermitilis*

Hyun Woo Kang and Yeon Woo Ryu*

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon, 443-749, Korea.

Abstract *Streptomyces* is well known for their ability to synthesize enormous varieties of antibiotics as secondary metabolites. Among them, *S. avermitilis* produces avermectins, a group of antiparasitic agents used in human and veterinary medicine. However, *S. avermitilis* also produces oligomycin, which is a potential toxic inhibitor of oxidative phosphorylation in mammalian cells. Therefore, we decided to disrupt oligomycin synthetase gene to prevent co-production of oligomycin in *S. avermitilis*. To create plasmid for disruption, the smallest gene of oligomycin synthetase gene cluster was obtained by PCR from *S. avermitilis* chromosome. Then, apramycin resistance gene was inserted in oligomycin synthetase gene for selection. After transformation of this plasmid, oligomycin synthetase gene (*olmA5*) in the chromosome was displaced with disruption cassette on the plasmid via homologous recombination. As a result of this gene replacement, we obtained mutants (*olmA5::apra*) that no longer makes the toxic oligomycin. And the mutants confirmed by PCR and HPLC analysis. However, showed no increasement of avermectin production in the mutant was observed.

Keywords: Streptomyces avermitilis, avermectin, oligomycin, gene knock, homologous recombination

서 론

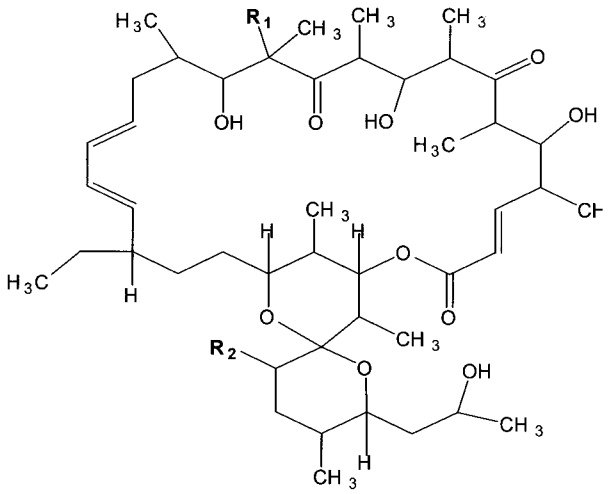
*Streptomyces avermitilis*는 멜라닌 같은 갈색색소 항생제인 avermectin과 oligomycin 등을 이차대사 산물로 세포내에 생산한다. 특히 *S. avermitilis*는 항 기생충 및 항 곤충의 활성스펙트럼을 갖는 항생제인 avermectin의 유일한 생산자이다(1). Genome은 linear form으로 9,025,608 bp로 이루어졌고, GC content는 70.7%이며, 7,574개 이상의 open reading frame (ORF)들이 존재한다고 알려졌다.

Oligomycin은 avermectin과 함께 *S. avermitilis*에서 생산되는 이차대사산물 중의 하나로서 ATP-synthase와 결합하여 ATP의 합성을 저해한다. 결국, 미토콘드리아에서 산화적 인산화반응 (oxidative phoshorylation)을 억제하여 세포를 사멸시키므로 포유동물에 독성물질로 작용하는 반면에 식물에 자생하는 곰팡이를 사멸하는 진균제로 사용되기도 한다(2). Huang 등(3)이 *Streptomyces sp.* MA-5038 (*S. avermitilis*)에서 처음으로 oligomycin을 분리하였으나, 그 세포독성으로 인해 많은 연구는 이루어지지 않았다. 그러나 *S. avermitilis*에서 full genome sequencing이 완료됨에 따라 oligomycin의 생합성에 관여하는 7개의 유전자 (*olm*)가 거대한 cluster를 형성하고 있는 것으로 밝혀졌다(4). Oligomycin은 Fig. 1에서와 같이 두 부분의 치환기 차이에 따라 세 종류로 분류되지만 *S. avermitilis*에서는 oligomycin A와 oligomycin C만이 생성된다. 이와 같이 *S. avermitilis*의 야생균주는 avermectin 뿐만 아니라 polyketide 유래의 oligomycin을 생산하기 때문에 avermectin의 산업적 생산 과정에서 oligomycin은 제거되어야만 하는 대사산물이다.

따라서 본 연구에서는 *S. avermitilis*의 oligomycin 생합성 과정에 관여하는 유전자를 knock-out 시켜 oligomycin의 생합성이 이루어지지 않도록 유도하고, *S. avermitilis*로부터

***Corresponding author**
Tel: +82-31-219-2449, Fax: +82-31-216-8777
e-mail: ywryu@ajou.ac.kr

유용한 항생물질인 avermectin 만을 생산할 수 있는 균주 개발에 대한 연구를 수행하였다.



		R_1	R_2
Oligomycin	A	OH	H
	B	OH	=O
	C	H	H

Fig. 1. Structure of oligomycins.

실험재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

본 연구에서 사용한 *Streptomyces avermitilis* NRRL 8165 (ATCC 31267)는 avemectin의 생산과 *olmA5* gene을 cloning하기 위한 chromosomal DNA source로 사용하였다. *Escherichia coli* XLI-Blue는 integration vector 구축을 위한 cloning과 blue/white screening을 위한 host로 사용하였고, *E. coli* ET12567/pUZ8002는 방선균으로의 형질전환 시에 methyl-specific restriction barrier를 극복하기 위한 demethylation host로 사용되었을 뿐 아니라, intergeneric conjugation을 위한 공여 균주로 사용하였다(5).

GEM-T Easy vector (Promega, USA)는 *olmA5* gene을 cloning하기 위해 사용하였고, pIJ773은 apramycin resistance gene을 얻기 위한 PCR template로 사용하였다(6). Oligomycin 생합성 유전자를 knock-out 시키기 위해 사용한 pKC1139는 *E. coli- Streptomyces* 간의 shuttle vector로 온도 민감성 복제기점을 가지고 있기 때문에 방선균 내에서 34℃ 이상의 온도로 배양 시에는 벡터의 복제가 중단된다(7). 이와 같은 특성을 이용하면 차후의 필요에 의해 벡터의 제거가 용이하기 때문에 pKC1139는 oligomycin 생합성 유전자를 deletion하기 위한 삽입 벡터제조에서 backbone으로 사용하였다.

시약 및 배양 배지

Ampicillin 등의 항생제와 일반시약들은 Sigma Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, yeast extract 등의 배지 성분들은 Difco (Detroit, Michigan, USA)사의 제품을 사용하였으며, 제한효소 등의 유전자조작용 시약들은 Promega (USA)사와 New England Biolabs Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용한 배지는 *E. coli*는 Luria-Bertani (LB) 액체 배지에서 37℃, 180 rpm의 조건으로 진탕배양기로 배양하였으며(34), 선택적 배양은 LB 배지에 ampicillin (100 ㎍/ml), apramycin (100 ㎍/ml), kanamycin (50 ㎍/ml), chloramphenicol (12.5 ㎍/ml) (Sigma Co.)을 각각 표시된 적정 농도로 첨가하여 사용하였다. *S. avermitilis*의 균주보관 및 sporulation 유도를 위해서 YMG agar plate를 사용하였으며(8), chromosomal DNA나 삽입된 플라스미드를 얻기 위한 세포배양에는 glycine 0.5% (w/v)가 함유된 YEME 배지를 사용하였다(9). 또한 conjugation을 수행한 후에 transformants를 선별하기 위해서는 MS 고체배지 (mannitol 2%, soya flour 2% 및 agar 2%)에 selection marker로 apramycin을 50 ㎍/ml의 농도로 첨가하여 사용하였다. *S. avermitilis*의 wild type과 transformants는 30℃, 200 rpm으로 baffled flask를 이용하여 YMG나 YEME 액체 배지에 apramycin을 20 ㎍/ml의 농도로 첨가하여 배양하였다. *S. avermitilis*의 avermetin 생산을 위한 배양은 SM 액체배지(10) 25 ml에 *S. avermitilis*의 spore를 접종하여 2~3일간 30℃, 200 rpm으로 진탕배양 후 avermectin 생산배지인 modified MF배지 50 ml에 5% (v/v) 접종하여 약 8일간 30℃, 200 rpm으로 배양하였다(10).

Chromosomal DNA 및 plasmid의 분리

S. avermitilis NRRL8165를 25 ml YEME 배지가 들어있는 250 ml baffled flask에서 30℃, 200 rpm으로 3-4일 동안 진탕배양 한 후, 배양액을 3000 rpm, 10 분간 원심분리 하여 세포들을 수집하였다. 이 세포들을 50 mM EDTA와 60 ㎕의 10 mg/ml lysozyme으로 전처리를 한 다음 genomic DNA isolation kit (Promega, USA)을 이용하여 chromosomal DNA를 분리하였다(9).

모든 *E. coli* plasmid는 다음과 같이 분리하였다. 즉, 원하는 plasmid가 존재하는 *E. coli*를 5 ml LB broth에 접종하여 37℃ 항온 배양기에서 12 시간정도 진탕 배양하였다. Optical density (A_{600})가 1.0~1.5일 때, 배양액 2 ml를 6분 동안 12,000 rpm으로 원심 분리하여 얻은 pellet을 DNA-spin™ plasmid DNA purification kit (㈜ INTRON, Korea)를 이용하여 plasmid를 분리하였으며, 정제된 plasmid DNA는 -20℃에 보관하면서 사용하였다. 또한, 모든 *Streptomyces* plasmid의 분리는 Hopwood 등의 방법(11)을 응용하여 다음과 같이 분리하였다. 즉 원하는 plasmid를 가진 *Streptomyces*를 50 ml

YEME 액체 배지에 접종하여 30℃ 항온배양기에서 3-4일간 진탕 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 수집된 cell들을 멸균된 10.3% sucrose 용액으로 충분히 세척한 후에 QIAGEN Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, USA)을 이용하여 plasmid를 분리하였다. 정제된 plasmid DNA는 동일하게 -20℃에 보관하면서 사용하였다.

OlmA5 gene 및 apramycin resistance gene cassette의 PCR

Oligomycin 생합성 유전자 (*olmA5*)를 증폭하기 위하여 *S. avermitilis* NRRL8165로부터 분리한 chromosomal DNA를 template로 PCR을 수행하였다(12). 이때에 사용한 primer는 *S. avermitilis* genome data(13)을 이용하여 forward primer로는 5'-ATGTCCGACGAGGAGAAGTTCCGC-3'와 reverse primer로는 5'-CTATTGAGCGGTGGTGCTCGCGGT-3'으로 제작하여 사용하였으며, oligonucleotide의 합성은 바이오닉스 (Korea)에 의뢰하였다. 유전자증폭은 thermal cycler (TakaraD-1528, Japan)를 사용하였다. 이때 *S. avermitilis*의 높은 GC contents를 고려하여 GC capture solution (intron, Korea)을 PCR 반응 시에 혼합액에 첨가하였다. 증폭된 DNA fragment를 agarose gel (0.7%)로 분리한 다음 pGEM-T Easy vector에 cloning하였으며, 이 cloning된 plasmid를 T-olmA5라 하였다. Cloning 된 putative *olmA5* gene의 염기서열은 바이오닉스 (Korea)에 의뢰하여 염기서열을 확인하였고, 얻어진 염기서열은 DNA STAR program을 이용하여 분석하고, NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Genbank data base를 통한 Nucleotide-nucleotide BLAST search를 수행하여 비교하였다.

OlmA5 gene의 disruption을 위한 resistance marker로 pIJ773에 존재하는 apramycin resistance gene (*aac(3)IV*)을 PCR amplification으로 준비하여 사용하였다(6). Apramycin resistance gene은 cloning 된*olmA5* gene의 중앙에 있는 *Stu* I site에 삽입할 것이므로 primer 제작 시에 이를 고려하여 primer 양 끝에 *Stu* I site를 추가하였다.

Conjugation에 의한 integration vector의 전달

Oligomycin 생합성 유전자를 knock-out 시키기 위해 구축된 integration vector인 pKC-olmA5-apra를 *S. avermitilis*에 삽입시키기 위하여 *E. coli*와 *S. avermitilis* 간의 conjugation에 의한 vector의 전달 방법을 사용하였다(14, 15). *S. avermitilis*에서의 methyl specific restriction barrier를 극복하기 위하여 먼저 pKC-olmA5-apra를 demethylation host인 *E. coli* ET12567/pUZ8002에 transformation하여 vector를 modify 시켰다(16, 17). *S. avermitilis*는 YMG agar plate에서 7일간 배양하여 spore를 만들고 미리 준비된 2xYT medium (tryptone 16 g/l, yeast extract 10 g/l, NaCl 5 g/l)을 plate에 2 ml loading 한 후 spore를 잘 긁어 suspension하였다. 이렇게 회수된 spore는 50℃ 항온조에 10분정도 담가 두어 발아시켰다. pKC-olmA-apra을 함유하고 있는 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 대수기까지 배양한 후 미리 발아된 *S. avermitilis*의 spore와 함께 각각 500 ㎕ 씩 혼합하였다. 그 혼합액을 MS agar plate에 200 ㎕ 씩 spreading 하여 30℃ 항온 배양기에서 18-20시간 배양한 후, selection marker인 apramycin과 nalidixic acid가 포함된 멸균수를 plate 위에 overlay 하였다. Apramycin은 pKC-olmA5-apra가 형질전환 된 균주를 선별하기 위한 selection marker이고, nalidixic acid는 함께 혼합한 *E. coli* 의 생육을 억제하기 위하여 첨가하였다. 항생제를 overlay 하여 3-4일 정도 30℃의 항온 배양기에서 배양한 후 plate에 colony 형성 유무를 확인하여 *olmA5* gene이 파괴된 mutant를 선별하였다(Fig. 2).

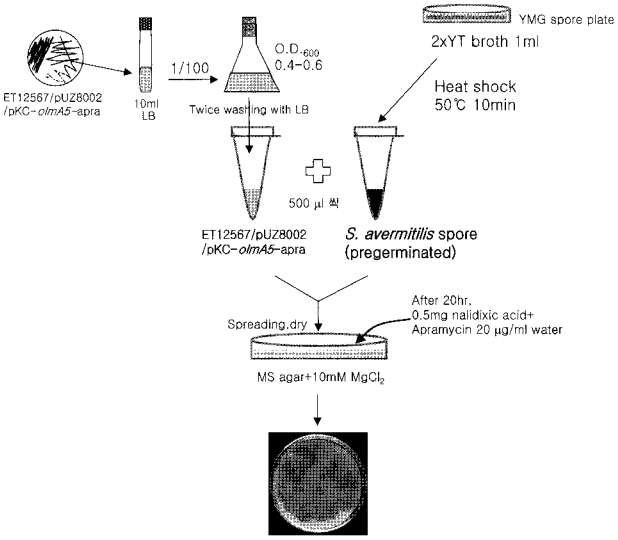


Fig. 2. Intergeneric transfer of plasmid from *E. coli* to *S. avermitilis*.

Mutant (*olmA5::apra*)의 확인

Mutant (*olmA5::apra*)를 선별한 후에 *olmA5* gene이 disruption 된 것을 확인하기위하여 PCR를 수행하였다. 즉 mutants colony를 25 ml YEME 액체배지에 접종하여 30℃ 항온 배양기에서 3일간 진탕 배양한 후에 chromosomal DNA를 분리하여 chromosomal DNA를 주형으로 PCR을 수행하였다(18). PCR를 위한 primer A set (forward : 5'-AAGGCCTTATTCCGGGGATCCGTCGACC-3', reverse: 5'-AAGGCCTTTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3')는 apramycin resistance gene에만 존재하는 sequence로 apramycin resistance gene의 존재 여부를 확인하였고, primer B set (forward : 5'-GCATTCGCAGGGTGAGGTCGCTGC-3', reverse : 5'-ACGTCAGGGACAGCAGCGAGGAGT-3')는 *olmA5* gene에만 존재하는 sequence로 wild type과 mutants에서 apramycin resistance gene (1462 bp)의 삽입 여부를

PCR product의 size 비교를 통해 확인하여, 목표 유전자의 disruption 여부를 확인 할 수 있도록 제작하였다.

Oligomycin과 avermetin의 분석

7일간 배양된 wild type과 mutant의 배양액 5 ml을 각각 채취하여 멸균수로 2회 washing한 후, 수집된 세포에 동량의 methanol을 첨가하여 200 rpm으로 30℃에서 3시간 교반시켰다. 교반 후에 3,000 rpm, 5분간 원심분리 한 후 상등액을 채취하여 이를 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석에는 Capcell pak C_{18} column (4.6 × 250 mm, Shiseido)을 이용하였고, 이동상 용매는 acetonitrile : methanol : water = 60 : 16 : 24로 mixing하여 사용하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 유지하였고, column의 온도는 40℃로 유지시켰다. Sample injection volume은 20 ㎕로 하였으며, UV detector (UV 725S system, Younglin, Keora)를 사용하여 avermectin과 oligomycin을 246 nm에서 분석하였다(19). 분석에 사용된 avermectin Bla의 표준물질은 Merck사 (USA)에서 구입하였으며, oligomycin A, B, C의 표준물질은 Sigma사 (USA)에서 구입하여 사용하였다. Fig. 3은 *S. avermitilis* NRRL8165의 추출액과 표준물질인 avermectin B1a, oligomycin A, B, C를 HPLC를 통해 분석한 결과이다.

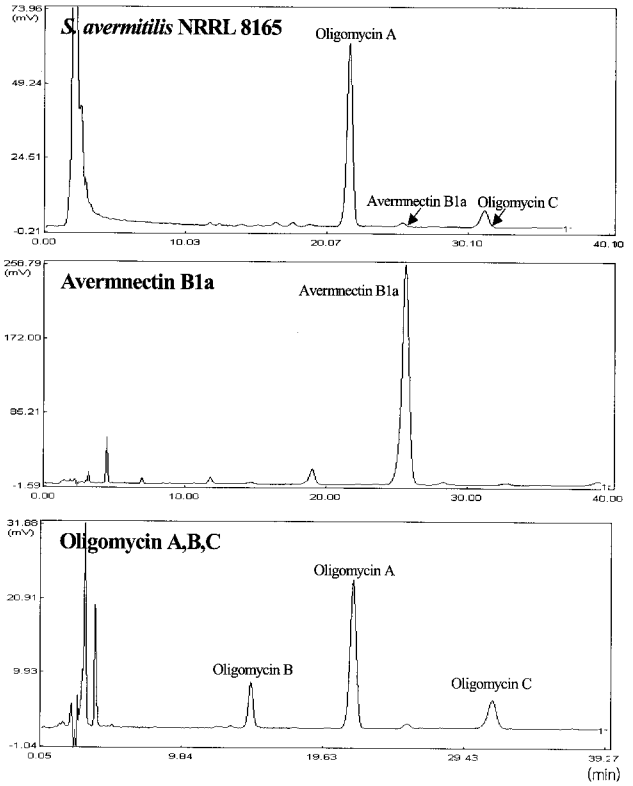


Fig. 3. HPLC analysis of metabolites of *S. avermitilis* NRRL8165, avermectin B1a and oligomycins standard. The concentration of avermectin B1a and oligomycin A,B,C is 200 ㎍/ml and 50 ㎍/ml, respectively.

결과 및 고찰

OlmA5 gene의 cloning

Oligomycin 생합성 유전자 (*olmA5*)를 얻기 위하여 분리한 *S. avermitilis* NRRL 8165의 chromosomal DNA를 template로 하여 PCR를 수행하였다. 그 결과 *olmA5*으로 예상되는 5,724 bp의 증폭된 단편을 얻을 수 있었다. Fig. 4(A)는 *S. avermitilis* NRRL8165로부터 순수 분리해 낸 chromosomal DNA의 전기영동 사진이고, (B)에서는 검정색 화살표로 표시된 부분이 5,724 bp에 해당하는 PCR product의 band이다. 이 band를 agarose gel로부터 elution 하여 pGEM-T easy vector에 cloning 하였고, 이를 T-olmA5라 하였다. T-olmA5를 이용하여 염기서열을 분석한 결과 PCR product는 oligomycin 생합성 유전자인 *olmA5*로 확인되었다. Sequencing 된 *olmA5* gene의 5'-end 쪽 737 bp를 web 상의 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에서 Nucleotide-nucleotide BLAST search를 수행한 결과 NCBI genome data 상의 *S. avermitilis* oligomycin biosynthetic gene cluster로 확인되었다. PCR 과정에서 큰 size의 DNA를 증폭하기 위해 *Taq* polymerase를 사용하였으나 737개의 nucleotides 중 730개가 일치하여 99% 정도의 일치도를 보였다. 이는 homologous recombination에 의한 gene disruption을 목적으로 cloning 한 것이므로 몇 개 정도의 nucleotides가 불일치할 지라도 homologous recombination에서는 큰 문제가 없었다.

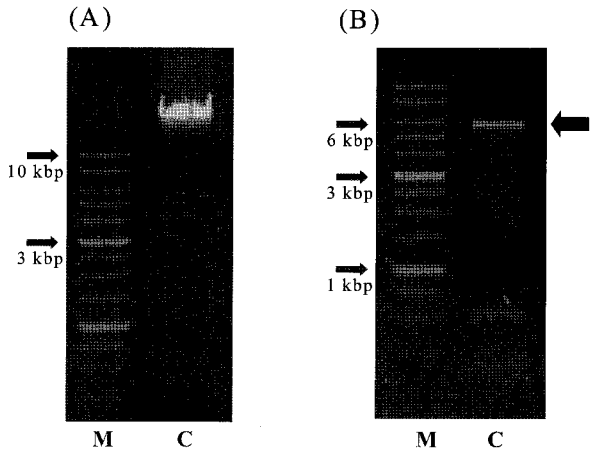


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of chromosomal DNA (A) and PCR product (*olmA5*) (B). (A): Lane M, 1kb ladder; lane C, chromosomal DNA of *S. avermitilis* NRRL 8165. (B): Lane M, 1kb ladder; lane C, PCR product of *olmA5* (5724bp).

Integration vector의 구축 (pKC-olmA5-apra)

T-vector에 cloning 된 5,724 bp의 *olmA5* gene에 대한 염기서열로부터 NEB cutter 프로그램을 이용하여 제한효소

인식자리를 확인한 결과 *Stu* I site가 하나만이 존재하는 것으로 확인하였다. 따라서 apramycin resistance gene cassette를 pIJ773으로부터 PCR로 증폭하여 얻은 다음에 T-olmA5의 *olmA5* gene에 apramycin resistance gene cassette를 삽입시켰다. 이때 apramycin resistance gene cassette는 양끝에 PCR을 위한 priming site를 가지고 있고, 안쪽으로는 FLP recombinase에 의해 인식되는 FRT site와 apramycin resistance gene, oriT 들로 구성되어 있다. 삽입한 apramycin resistance gene cassette의 양쪽 약 3 Kbp가 *S. avermitilis* chromosomal DNA와 double crossover 될 homologous sequence로 recombination의 확률을 높여 쉽게 gene replacement가 일어나도록 homologous sequence size를 크게 하였다. 이러한 과정은 최종 vector의 size가 너무 커서 *S. avermitilis*로의 transforamtion이나 cell 내에서의 replication을 저해할 수 있지만, 고농도의 cell과 spore를 이용한 conjugation 방법을 이용하여 극복할 수 있었다. 이렇게 구축된 T-olmA5-apra는 *Eco* RI site를 이용하여 integration vector인 pKC1139에 subcloning 하였다. 이러한 과정의 cloning strategy를 Fig. 5에 diagram으로 나타내었다. 최종 integration vector인 pKC-olmA5-apra의 구축은 restriction enzyme에 의한 insert의 cutting size 확인과 PCR을 통해 최종적으로 확인하였다.

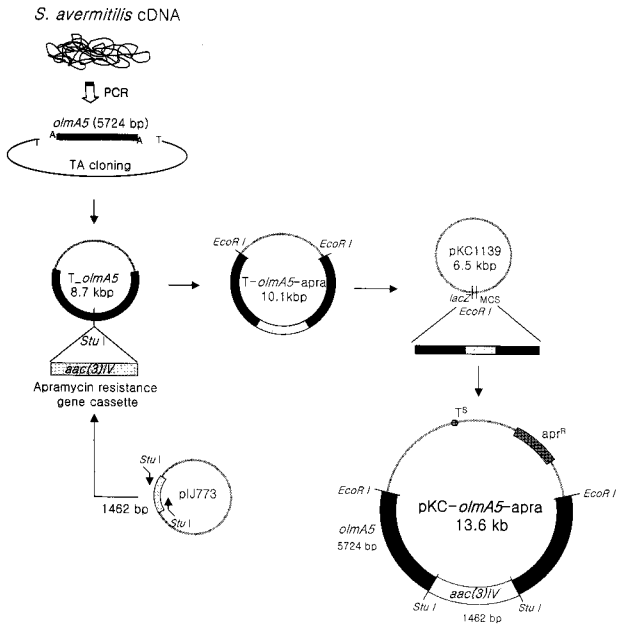


Fig. 5. Schematic diagram of construction of integration vector, pKC-olmA5-apra. Abbreviations : *olmA5*, oligomycin biosyntheyic gene 5 ; MCS, multicloning site ; T^S, temperature sensitive origin ; apr^R, apramycin resistance gene.

Conjugation에 의한 plasmid transfer

구축한 pKC-olmA5-apra를 conjugation에 의하여 *E. coli*로부터 *S. avermitilis*로 전달하였다. Selection marker (apramycin)를 overlay 시킨 후 4일이 경과된 MS agar plate에서는 pKC-olmA5-apra가 *E. coli*에서 *S. avermitilis*로 전달된 transformants 만이 colony 형태로 자라게 된다. Fig. 6의 (A)는 positive control로서 conjugation을 실시한 mixture를 apramycin으로 overlay 하지 않은 plate에 spreading 한 plate로서 cell이 lawn으로 자라 spore가 형성된 것을 확인 할 수 있었다. 반면에 Fig. 6의 (B-1)와 (B-2)는 각각 apramycin으로 overlay를 실시한 transformants plate의 앞과 뒷면을 보여주고 있다. pKC-olmA5-apra가 형질전환된 cell만이 apramycin에 대한 내성이 있어 colony를 형성하였다. Plate의 뒷면 사진인 (B-2)은 *S. avermitilis*의 melanin pigment가 나와 colony 주변이 검게 변한 것을 확인할 수 있었다. 반면, wild type의 균주는 20 ㎕/ml의 apramycin이 첨가된 agar plate 에서 어떤 colony도 확인되지 않았다.

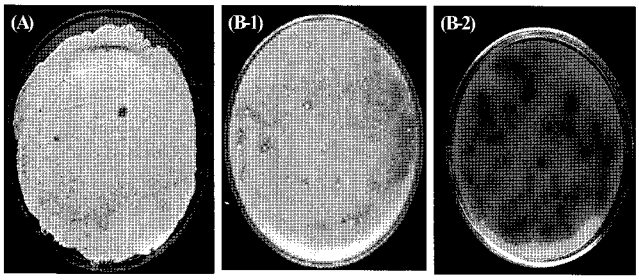


Fig. 6. Plates of transformants by conjugation. (A) The front side of transformant on non-selective medium plate, (B-1,2) The front and reverse sides of transformant on selective medium plate with apramycin 20 ㎕/ml), respectively.

Oligomycin gene이 knock-out된 mutants의 선별

앞에서 얻은 trnasformants는 apramycin에 내성을 가지므로 *E. coli*로부터 integration vector가 *S. avermitilis*로 전달된 것이라 할 수 있다. 이렇게 얻어진 50여개의 colonies는 apramycin이 존재하는 selection agar plate에서 2차, 3차 계대 과정을 거쳤다. Colony의 계대 배양은 멸균된 이쑤시개를 이용하여 단일 colony를 picking 하여 새로운 selection agar plate streaking 하였다. Fig. 7은 계대 배양 과정 중의 plate 사진들이다. 이러한 계대 배양을 통하여 oligomycin knock-out mutants의 선별 방법은 *S. avermitilis*로 주입된 벡터 (pKC-olmA5-apra)가 자가 복제를 통해 많은 copy 수를 만들어 *S. avermitilis*의 chromosomal DNA와의 recombination의 효율을 높이고, mutant 들의 유전적 안정성을 확인하고자 하였다(Fig. 7(B)). 이러한 mutants를 39℃에서 배양하여 pKC-olmA5-apra의 온도 민감성 origin을 통해 vector의 자가 복제를 멈추게 하여 pKC-olmA5-apra가 모두 curing이 되도록 유도하였다(Fig. 7(C)). 이때 pKC-olmA5-apra이 deletion 되기 전에 vector에 존재하는 *olmA5* gene과

*S. avermitilis*의 chromosome에 존재하는 *olmA5* gene 사이에 genetic recombination이 일어난 mutants만이 apramycin에 저항성이 존재한다. 즉 apramycin resistance gene을 끼워 넣은 양쪽 side로 3 Kbp의 homologous sequence가 *S. avermitilis*의 *olmA5* gene과 double crossover가 되어 *S. avermitilis*의 chromosomal DNA 내로 apramycin resistance gene cassette가 주입되었기 때문이다(Fig. 8).

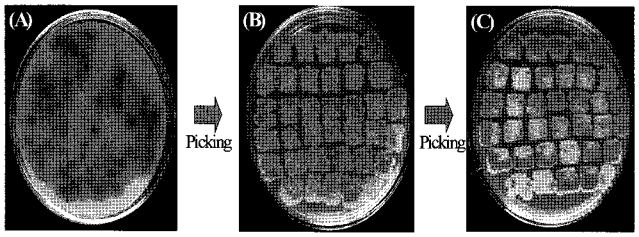


Fig. 7. Selection of knock-out mutants (*olmA5::apra*). (A) The transformant on MS agar plate with apramycin (20 ㎍/ml). (B) The picked transformants (2nd, 3rd transfer) on YMG agar plate with apramycin (20 ㎍/ml). The transformants are transfered to test genetic stability and to easily replace target gene (*olmA5*). (C) The transfered transformants on YMG agar plate with apramycin (20 ㎍/ml) at 39℃. The transformants with the plasmid pKC-olmA5-apra were incubated at 39℃ to eliminate autonomously replicating plasmid.

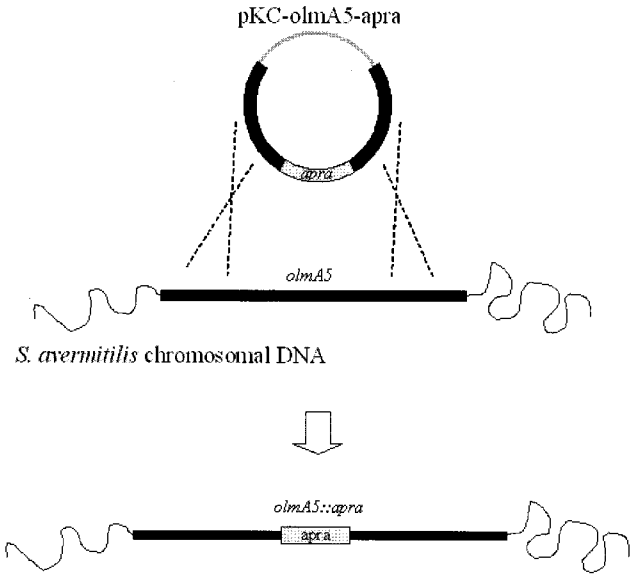


Fig. 8. Generation of mutant (*olmA5::apra*) disrupted oligomycin biosynthetic gene. Abbreviations: apra; apramycin resistance gene, *olmA5*; oligomycin biosynthetic gene 5.

이렇게 선별된 30여개의 균주들 중 3개의 mutants를 무작위로 선발하여 25 ml YEME 액체 배지에서 3일간 배양한 후, 그 chromosomal DNA를 분리하여 chromosomal DNA를 주형으로 PCR을 수행하였다(18). Fig. 9(C)와 같이 primer A set는 apramycin resistance gene에만 존재하는 sequence로 apramycin resistance gene의 존재 여부를 확인할 수 있고, primer B set는 *olmA5* gene에만 존재하는 sequence로 이용하여 wild type과 mutants에서 apramycin resistance gene (1462 bp)의 삽입 여부를 PCR product의 size 비교를 통해 확인하여, 목표 유전자의 disruption 여부를 확인 할 수 있도록 제작하였다. 이 primer들을 사용하여 PCR를 수행한 결과는 Fig. 9(A, B)에 나타내었다. Fig. 9(A)는 primer A set를 사용하여 PCR을 수행한 결과로, lane C를 보면 wild type strain (*olmA5*)의 chromosomal DNA에는 apramycin resistance gene이 존재하지 않으므로 어떠한 product band도 없었으나, lane 1, 2, 3에 해당하는 3개의 knock-out mutant (*olmA5::apra*)들은 모두 apramycin resistance gene에 해당하는 1.4 Kbp size의 PCR product가 존재하였다. 또한, Fig. 9(B)는 primer B set를 사용한 PCR의 결과로서, lane C에서 wild type의 chromosomal DNA에는 *olm5A* gene인 1.6 Kbp size의 product를 얻은 반면, lane 1, 2, 3에서 3개의 knock-out mutant (*olmA5::apra*)들은 1.6 Kbp의 *olm5A* gene에 apramycin resistance gene size인 1.4 Kbp를 더한 3 Kbp의 product를 얻을 수 있었다. 이러한 결과로 세 개의 knock-out mutant (*olmA5::apra*)들은 모두 gene replacement에 의하여 *olmA5* gene이 disruption 되었다는 것을 확인할 수 있었다.

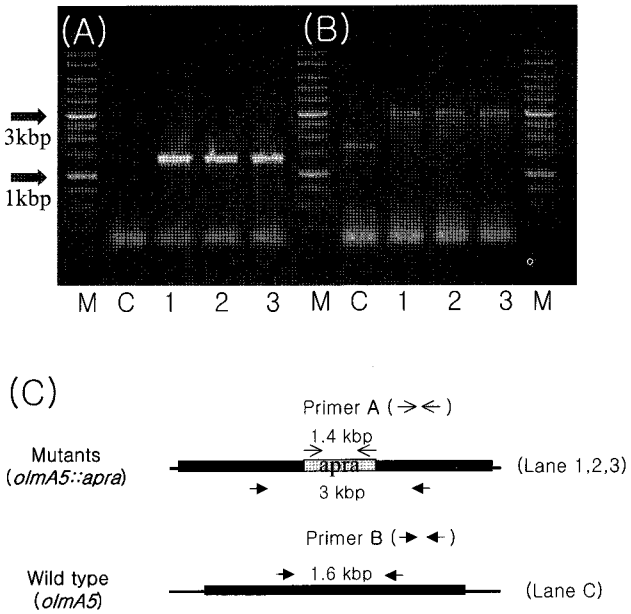


Fig. 9. Confirm of knock-out mutants (*olmA5::apra*) by PCR. (A) 0.7% agarose gel electrophoresis of PCR product using primer A set. Lane M, 1 kb ladder; lane C, wild type (control); lane 1, 2, 3, knock-out mutant (*olmA5*::apra). (B) 0.7% agarose gel electrophoresis of PCR product using primer B set. Lane M, 1k bladder; lane C, wild type (control); lane 1, 2, 3, knock-out mutant (*olmA5*::apra). (C) Diagram of chromosomal DNA with *olmA5* in mutants and wild type. The sets of arrow represent primers for confirmation of knock-out mutants.

Oligomycin과 avermectin의 분석

선별된 mutants는 최종적으로 액체 배양을 통해 oligomycin의 생성 여부를 확인하였다. *S. avermitilis*의 avermectin 생산은 SM 배양액 25 ml가 들어있는 250 ml baffled flask에 접종하여 2~3일간 30℃, 200 rpm으로 진탕배양 후 avermectin 생산배지인 modified MF medium 50 ml이 들어있는 500 ml baffled flask에 5% (v/v)로 접종하여 약 8일간 30℃, 200 rpm으로 배양하였다. 배양한 세포를 원심분리한 후에 세포로부터 methanol로 avermectin과 oligomycin을 추출하여 HPLC로 분석한 결과를 Fig. 10에 나타내었다. 실험결과에서 *S. avermitilis*의 wild type 균주는 여전히 oligomycin A, C가 많은 양으로 생산되었으며, avermectin의 양은 상대적으로 매우 적은 양이 생산되었다. 반면에 gene replacement에 의해 oligomycin의 생합성 gene을 knock-out 시킨 mutant에서는 oligomycin A와 C가 전혀 검출되지 않았으며, avermectin의 생산량에는 차이가 거의 없는 것으로 보아 oligomycin의 생합성 저해가 avermectin의 생산에는 영향을 미치지 않는 것으로 판단되었다. 이는 Ikeda 연구그룹이 transposon Tn4560을 이용한 random mutagenesis를 통해 oligomycin을 생산하지 않는 *S. avermitilis* mutant 균주의 avermectin 분석 결과와 유사하였다(20).

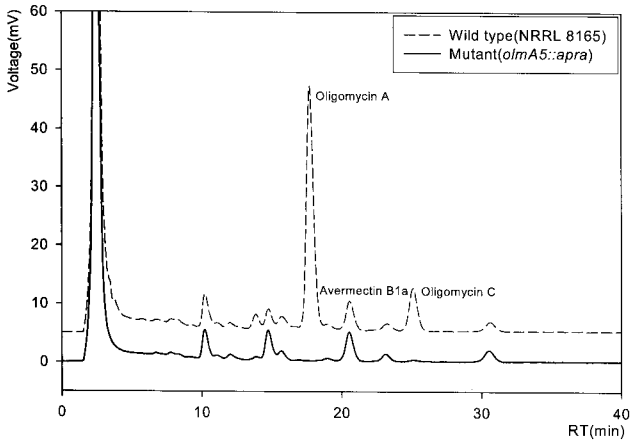


Fig. 10. Confirm of deletion mutants (*olmA5::apra*) by HPLC analysis. The mutant (*olmA5::apra*) produce only avermectins, but no oligomycin A, C.

비록 이 mutant 균주가 avermectin의 생산량을 증대시키지는 않았으나, 이 균주 (*olmA5::apra*)는 세포독성 물질인 oligomycin을 전혀 생산하지 않고 avermectin 만 생산한다는 장점 때문에 차후의 avermectin 생산량 증대를 위한 균주 개량의 훌륭한 source가 될 수 있을 것이다. 그리고 *S. avermitilis*의 배양을 통해 avermectin을 생산하는 산업 현장에서는 이러한 mutant의 사용으로 avermectin과 oligomycin의 분리, 정제과정을 간소화하여 유용산물인 avermectin 만을 순수하게 얻어낼 수 있기 때문에 분리, 정제 과정에 소요되는 시간과 비용을 절감할 수 있다. 또한, 산업현장의 근로자들이 세포독성물질인 oligomycin을 다루어야하는 위험성으로부터 보호할 수 있다. 또 하나의 장점은 차후에 이 mutant를 가지고 다른 유전자의 knock-out 이나 over expression 등의 genetic study를 할 경우, mutant (*olmA5::apra*)에 대한 selective marker로써 vector에 apramycin resistance gene의 반복 사용이 가능하다는 것이다. 이는 mutant의 *olmA5*의 사이에 삽입된 apramycin resistance gene cassette의 FRT site를 이용하여 그 selective marker로 구축된 mutant (*olmA5::apra*)로부터 제거할 수 있기 때문이다(6, 21). 이는 초기에 pKC-olmA5-apra를 구축할 때, pIJ773을 template로 사용하여 apramycin resistance gene cassette를 얻어낸 이유이기도 하다.

요 약

방선균은 다양한 생리활성 물질을 이차대사산물로 생산하는 산업적으로 매우 유용한 미생물이다. 이에 따라 많은 연구진들이 방선균에 대한 분자생물학적 연구와 산업적 이용에 대한 연구들을 수행하고 있다. 방선균 중에서도 *S. avermitilis*는 강력한 구충효과가 있는 avermectin을 생산하지만, 또한 포유동물 세포의 미토콘드리아에서 산화적 인산화반응을 억제하는 oligomycin도 함께 생성된다. 따라서 *S. avermitilis*에서 oligomycin의 생성을 제거시키기 위하여 oligomycin synthetase gene을 disruption 시키기 위한 연구를 수행하였다. 이를 위하여 *S. avermitilis*로부터 cloning한 oligomycin synthetase gene (*olmA5*)의 중앙부분에 apramycin resistance gene을 끼워 넣어 integration vector로 구축한 후에 *S. avermitilis*의 chromosomal DNA와의 homologous recombination에 의하여 *olmA5* gene의 disruption을 유도하였다. Disruption mutants (*olmA5::apra*)는 PCR을 통해 *olmA5* gene의 위치에 apramycin resistance gene이 존재하는 것으로 확인하였고, 또한 HPLC 분석을 통해 oligomycin 생합성이 완전히 제거된 것임을 확인하였다. 그러나 disruption mutant (*olmA5::apra*)를 이용하여 avermectin 만을 생산할 수 있었으나, avermectin의 생산량에는 거의 변화가 없었다. 이러한 mutants는 산업적으로 avermectin을 생산하기 위한 균주 개량의 훌륭한 source가 될 수 있을 것이다.

감 사

This work was supported by grant No. R01-2003-000-10283-0 from the Basic Research Program of the Korea Science and Engineering Foundation.

접수 : 2008년 12월 23일, 게재승인 : 2009년 4월 16일

REFERENCES

1. Burg, R. W., B. M. Miller, and E. E. Baker (1979), Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **15**(3), 361-367.
2. Pinna, L. A., M. Lorini, and N. Siliprandi (1967), Effect of oligomycin and succinate on mitochondrial metabolism of adenine nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* **143**(1), 18-25.
3. Huang, L., G. A. Schonberg, R. L. Monaghan, K. Jakubas, S. S. Pong, O. D. Hensens, R. W. Berg, D. A. Ostlind, J. Conroy, and E. O. Stapley (1984), Discovery, production and purification of the Na^+, K^+ activated ATPase inhibitor, L-681,110 from the fermentation broth of *Streptomyces sp.* MA-5038. *J. Antibiot.* (Tokyo) **37**(9), 970-975.
4. Omura, S., H. Ikeda, J. Ishikawa, A, Hanamoto, C. Takahashi, M. Shinose, Y. Takahashi, H. Horikawa, H. Nakazawa, T. Osonoe, *et al.* (2001) Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. **98**(21), 12215-12220.
5. MacNeil, D. J. (1992), Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**(1), 61-68.
6. Gust, B., T. Kieser, and K. F. Chater (2002), REDIRECT^c technology : PCR-targeting system in *Streptomyces coelicolor.* The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
7. Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E. T. Seno, R. N. Rao, and B. E. Schoner (1992), Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene,* 1992. **116**(1), 43-49.
8. Hwang, Y. S., J. Y. Lee, E. S. Kim, and C. Y. Choi (2001), Optimization of transformation procedures in avermectin high-producing *Streptomyces avermitilis. Biotechnol. Lett.* **23**, 457-462.
9. Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood (2000), Practical Streptomyces Genetics. The John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.
10. Hwang, Y. S., E. S. Kim, S. Biro, and C. Y. Choi (2003), Cloning and analysis of a DNA fragment stimulating avermectin production in various *Streptomyces avermitilis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**(2), 1263-1269.
11. Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Burton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, and H. Schremp (1985), Genetic manipulation of *Streptmyces.* A laboratory manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
12. Tomich, P. K. (1988), *Streptomyces* cloning: useful recombinant DNA systems and a summation of cloned genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**(10), 1465-1471.
13. Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, and S. Omura (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis. Nat Biotechnol.* **21**(5), 526-531.
14. Flett, F., V. Mersinias, and C. O. Smith (1997), High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting Streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* **155**(2), 223-229.
15. Mazodier, P., R. Petter, and C. Thompson (1989), Intergeneric conjugation between *Escherichia coli and Streptomyces species. J. Bacteriol* **171**(6), 3583-3585.
16. MacNeil, D. J. (1988), Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis. J. Bacteriol,* **170**(12), 5607-5612.
17. Kwak, J., H. Jiang, and K. E. Kendrick (2002), Transformation using *in vivo* and *in vitro* methylation in *Streptomyces griseus. FEMS Microbiol. Lett.* **209**(2), 243-248.
18. Van Dessel, W., L, Van mellaert, N. Geukens, and J. Anne (2003), Improved PCR-based method for the direct screening of *Streptomyces transformants. J. Microbiol. Methods,* **53**(3), 401-403.
19. Yong, J. H. and W. H. Byeon (2005), Alternative production of avermectin components in *Streptomyces avermitilis* by gene replacement. *J. Microbiol.* **43**(3), 277-284.
20. Ikeda, H., Y. Takada, C. H. Pang, H. Tanaka, and S. Omura (1993), Transposon mutagenes is by Tn4560 and applications with avermectin-producing *Streptomyces avermitilis. J. Bacteriol.* **175**(7), 2077-2082.
21. Cherepanov, P. P. and W. Wackernagel (1995), Gene disruption in *Escherichia coli:* TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**(1), 9-14.