

GOVP 12016988

615.329  
73138  
2000

과제번호 : 99-N1-01-02-A-07

유용미생물의 육종 및 개량기술  
Development of industrially useful microorganisms and and  
strain improvement

방선균 유전자 재조합기술을 이용한 신규  
aminoglycoside계 항생물질 개발에 관한 연구  
Development of new aminoglycoside antibiotics using  
recombinant DNA technology of actinomycetes

명 지 대 학 교

과 학 기 술 부

# 제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “방선균 유전자 재조합기술을 이용한 신규 aminoglycoside계 항생물질 개발에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2000 . 9. 301-6190-4

주관연구기관명 : 명지대학교

주관연구책임자 : 서 주 원

연 구 원 : 현 창 구 외 5명

# 요 약 문

## I. 제 목

방선균 유전자 재조합기술을 이용한 신규 aminoglycoside계 항생물질 개발에 관한 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

항생제 남용으로 인한 내성균주의 출현은 인류에게 커다란 도전이 되고 있으며 내성균주와의 싸움에서 승리하기 위한 인류의 노력이 더욱 절실하게 필요한 실정이다. 내성균주의 출현 속도에 비해 개발되는 신규 항생제의 양과 질이 점차 모자라는 실정이고, 개발 방법 역시 고전적인 스크리닝 방법이 그 효력을 잃어가고 있기 때문이다. 본 연구는 이러한 문제들을 해결할수 있는 방법을 찾고자 하는 필요성과 국내에서 세계적 수준의 경쟁력있는 연구분야의 기반을 마련하고자 시작되었다. 방선균 유전자 재조합 기술을 이용하여 신규 항생물질을 개발하려는 본 연구의 필요성은 신규 항생물질을 개발하는데 있어서 hybrid 항생제의 창출을 위한 유전자원의 확보등 초기 3,4년의 연구기간을 성실하고 성공적으로 수행하면 이러한 과정에서 축적된 원천기술을 이용하여 실험실 수준의 규모에서도 다수의 신규 항생물질의 개발이 가능하기 때문이다. 또한 이러한 방법을 통한 신규 아미노글라이코사이드계 항생물질은 확보된 항생물질 생합성 유전자를 이용하여 생합성 경로를 유추하고, 이를 기반으로 약리독성문제를 감안하여 기존 항생제를 기반으로 rational 하게 design되기 때문에 개발에서 상품화까지 시간을 단축할수 있음은 물론이고 현재 상품화된 반합성품들과의 경쟁에서도 가격 경쟁력이 월등히 앞설 것으로 기대되고 있다.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

- ▶ *Streptoalloteichus hindustanus*에서 아미노글라이코사이드계 항생제 다제내성 유전자 분리 및 hybrid 항생제 창출용 벡터로의 이용
- ▶ *Streptomyces griseus*에 isovaleryl transferase 유전자를 도입하여 새로운 활성을 가진 항생물질 생산균주 창출
  - *S. griseus*에 isovaleryl transferase 유전자를 도입하여 생성된 신규 항생물질 분리정제 및 구조 결정
  - 지방산 전이효소 (isovaleryltransferase)로 형질전환된 신규 항균효과를 나타내는 *S. griseus* 균주 특허화
- ▶ Isovaleryl transferase 유전자 (*carE*) 를 다양한 aminoglycoside 생산 균주로 도입한 후 새로운 항생제 활성의 탐색

- ▶ 아미노글라이코사이드계 항생제인 스펙티노마이신과 블루엔소마이신 생합성 유전자집단 분리 및 분석

#### IV. 연구개발결과

본 연구진은 carbomycin 6-deoxyhexose 당의 acylation을 담당하는 isovaleryltransferase 효소 유전자를 방선균에서 일반적으로 사용하는 constitutive-strong promoter인 *eryEp*와 분리된 아미노글라이코사이드계 항생제 다제내성 유전자를 이용하여 hybrid 항생제 개발용 vector를 구성하고 이를 이용하여 스트렙토마이신 생산균주인 *S. griseus*를 형질전환시켜, 아미노글라이코사이드계 항생제 내성세균에 항균효과를 물질을 생산하는 균주를 개발하였다. 그리고 신규 aminoglycoside 항생물질의 생산 최적조건을 확립하였으며 분리 및 구조결정도 시도되었다. 그러나, 아쉽게도 분리한 aminoglycoside 항생제가 isovaleryl 유도체가 아님이 판명되었으나 이 물질이 추정하지 못한 새로운 물질일 가능성이 있다. 이 물질의 생성 원인을 확립하는 것은 흥미있는 연구 과제라고 사료된다.

신규 hybrid 항생제 창출을 위한 vector 개발에 사용할 목적으로 *Stall. hindustanus*에서 aminoglycoside계 항생제 다제내성 유전자를 분리하였다.

Bluensomycin 생산 균주인 *Streptomyces bluensis*, Paromomycin 생산 균주인 *Streptomyces rimosus*, kanamycin 생산 균주인 *Streptomyces kanamyceticus*, spectinomycin 생산 균주인 *Streptomyces spectabilis* 와 같은 다양한 aminoglycoside 생산 균주로의 isovaleryl transferase 유전자 도입을 완료하였으며, 도입이 성공적으로 이루어진 균주를 대상으로 새로운 항생제의 생산을 탐색하고 있으므로 곧 실용화 가능성이 높은 신물질의 개발에 큰 진전을 이룰 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이 연구를 통하여 신물질 개발을 위한 유전자 조작에 있어서 필수적인 형질 전환에 관한 기술을 축적하였다. 이는 고전적인 transformation 기술을 완벽히 습득하여 실행하는 능력과 transformation 방법의 보완책으로서 conjugation 방법을 도입함으로써 이루어진 것이다. 이러한 기술의 습득은 유용 미생물 개발을 위한 유전자 조작에 있어서 가장 핵심적인 기술에 속한다고 할 수 있겠다.

또한 지속적인 신규 hybrid 항생물질의 개발을 위한 유전자원으로 이용할 목적으로 6-deoxyhexose당을 가지고 있는 스펙티노마이신과 블루엔소마이신 생합성 유전자를 분리하기 위한 유전자 탐침을 개발하여 각각 50-kb와 30-kb 상당의 생합성 유전자 집단을 분리하고, 염기서열을 결정하여 생합성 유전자들을 규명하였다. Spectinomycin 의 생합성 유전자의 경우 이 항생제의 생합성을 지정하는 전체 유전자 영역의 분리에 성공하였고, spectinomycin 생합성 경로에 대한 추정이 가능하였다.

#### V. 연구개발결과의 활용계획

생명공학 국책과제 연구과정에서 개발된 새로운 항균효과를 나타내는 *S. griseus*에서 신규 물질에 대한 구조를 분석하고 이에 대한 항균범위와 인체독성등의 연구로 산업화

가능성을 타진할 것이며 현재 본 연구과제에서 확보된 유전자원을 기초로 한 몇가지 신규 항생물질 구조설계와 개발 전략이 수립된 바, 우선 상기의 유전자원 자체에 대한 특허 뿐만 아니라 이 유전자원을 이용한 HYBRID 항생물질 개발 방법에 대한 idea 특허도 조속히 신청할 것이며 상기의 개발전략을 실험적으로 증명코자 유전자조작을 통한 신규 항생물질 창출을 지속적으로 진행시킬 계획이다. 아울러 확보된 유전자원과 pool를 이용하여 다양한 당구조 함유 생리활성물질 변환 및 창출에도 적용할수 있는 범용기술로 개발하여 그 활용범위를 넓혀가고자 한다.

## S U M M A R Y

With frequent appearance of antibiotic-resistant strains and declining probability of discovering new antibiotics by conventional screening, a novel approach to develop new antibiotics is in great need for effective control of pathogenic microorganisms. Hybrid antibiotics employing strain development by genetic manipulation have a great potential as new antibiotics. Hybrid antibiotics may have a new antimicrobial spectrum and reduced toxicity and side effects because they are developed based on rational designing.

In this study, we developed and patented the *Streptomyces griceus* strain that acquired the ability to kill a resistant strain to aminoglycoside antibiotics by introducing the isovaleryl transferase gene. A substance produced by transformants was purified and its structure was analyzed, but the relatedness between a substance and antibiotic activity is yet to be determined. In addition, we isolated the multi-drug resistant gene to aminoglycoside antibiotics from *Streptoalloteichus hindustanus* to use in a vector for development of hybrid antibiotics.

The genes are essential elements for development of hybrid antibiotics. To obtain broad ranges of genes, we isolated the gene clusters involved in spectinomycin and bluensomycin biosynthesis from *Streptomyces spectabilis* and *Streptomyces bluensis*, respectively. Their sequences were analysed and a pathway was proposed for spectinomycin biosynthesis. Understanding of aminoglycoside antibiotic biosynthesis pathways and the obtained genes through this study will be great assets for development of hybrid antibiotics.

# C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction .....	8
Chapter 2. Domestic and foreign status of research and development .....	11
Chapter 3. Content and results of research .....	13
1. Cloning of the <i>nbrB</i> gene conferring multi-drug resistance to aminoglycoside antibiotics from <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> ATCC 31219	
2. Development of a hybrid antibiotic by transformation of <i>Streptomyces griseus</i> with the isovaleryl transferase gene ( <i>carE</i> )	
3. Search transformants of various aminoglycoside-producing strains with the isovaleryl transferase gene ( <i>carE</i> ) for new antibiotic activities	
4. Isolation and analysis of the gene clusters involved in the biosynthesis of aminoglycode antibiotics	
Chapter 4. Evaluation of performance and significance .....	56
Chapter 5. Application plan of results .....	58
Chapter 6. References .....	59

## 목 차

제 1 장 서론 .....	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	13
제 1 절 <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> ATCC 31219에서 aminoglycoside 항생제에 다제 내성을 지정하는 <i>nbrB</i> 유전자의 분리	
제 2 절 Isovaleryl transferase 유전자( <i>carE</i> )의 <i>Streptomyces</i> <i>griceus</i> 로의 도입을 통한 새로운 항생물질의 개발	
제 3 절 Isovaleryl transferase 유전자 ( <i>carE</i> ) 를 다양한 aminoglycoside 생산 균주로 도입한 후 새로운 항생제 활성의 탐색	
제 4 절 Aminoglycoside 항생제 생합성 유전자의 분리 및 분석	
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....	56
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 .....	58
제 6 장 참고문헌 .....	59



## 제 1 장 서론


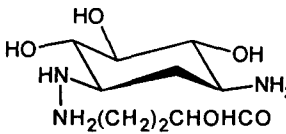
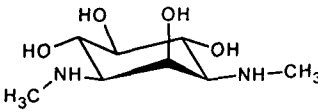
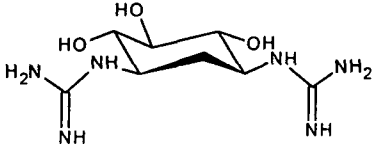
1930년대 처음 개발된 이래 항생제는 인류가 질병과 싸우는데 주요한 무기가 되어왔고, 시간이 지남에 따라 항생제 남용으로 인한 슈퍼 박테리아라 불리는 내성균주의 출현은 인류에게 커다란 도전이 되고 있으며 이를 극복하기 위한 노력이 절실히 요구되고 있다. 이와 관련하여 스미스클라인-비참의 조지 포스트 박사는 2007년까지 점점 많은 병원균이 내성을 갖게 되지만, 그에 반해 새로운 항생제는 많이 개발되지 못해 인류는 새로운 항생제가 개발되기까지 일정한 취약기간을 갖게 될 것이라고 경고하기도 하였다. 신규 항생제의 개발속도와 효능은 내성균주의 출현속도를 따라가지 못하고 있으며, 고전적인 screening 방법에 의한 신규항생제 개발방법이 점차 효력을 잃어가고 있으므로 새로운 개발방법이 절실하게 필요한 실정이다.

Hybrid 항생제 개발기술은 유전자 조작에 의한 항생물질 생합성 경로의 변형을 통한 새로운 구조의 항생물질 창출을 목표로 하는 신약개발 분야에 해당하는 기술로서 이를 통하여 생리활성의 증가나 신기능 또는 내성 세균에 대한 문제를 극복하고자 하는 첨단 핵심기술이다(Floss and Strohl, 1991; Hopwood, 1993). 기존에는 새로운 구조 및 기능의 생리활성물질이나 천연물질을 창출하기 위하여 노동집약적으로 수많은 토양시료 등을 screening 한다던가 화학적으로 반합성 하는 방법을 써왔으나 이들 방법은 기존에 알려진 균주나 물질들이 반복적으로 선별되는 문제 등으로 인하여 연구개발의 경제적 효율이 급격하게 떨어져가고 있다.

따라서 본 연구의 기술적 중요성은 합리적으로 새로운 구조의 디자인(rational drug design)에 의한 신약을 기존의 유용이차대사산물 생합성 유전자를 조작하여 우수한 활성을 가지며 내성문제를 해결할 수 있는 저독성의 신규 hybrid 항생제 개발기술을 확보, 응용하는 것이다. 즉, 기존 항생제들의 기존구조를 응용하여 약효 면에서는 유지 또는 개선 시키면서도 세균의 내성기작을 무력화시키는 방향으로 신규 hybrid 항생제를 항생제 생합성 유전자와 내성 및 조절유전자를 조작하여 개발하고자 하는 것이다.

본 연구그룹이 개발하고자 하는 hybrid 항생제의 주된 대상은 sugar로만 구성되어 있는 aminoglycoside계 항생제로 이러한 항생물질군은 넓은 항균 spectrum과 강한 살균 작용 때문에 감염증 치료제로 널리 이용되고 있으며 (국내시장 1000억원/년, 전체시장 1조원/년) 예외 없이 가지고 있는 aminocyclitol의 구조에 따라 크게 streptidine, 2-deoxystreptamine, actinamine을 포함하는 세그룹으로 분류되고, 예외적으로 aminocyclitol에 HAB ( $\alpha$ -hydroxy- $\gamma$ -aminobutyryl) 잔기를 가지고 있는 butirosin이 있으며 (표 1), 이러한 각각의 aminocyclitol 구조에 sugar가 붙어 있다(Shaw et al., 1993).

표 1. Aminoglycoside계 항생제를 구성하는 aminocyclitol 종류 및 항생제의 예

	<b>Aminocyclitol</b>	<b>Antibiotics which contain above amino cyclitol</b>
2-deoxystreptamine		<b>Paromomycin, Kanamycin Gentamicin, Sisomicin Tobramycin, Sagamicin ... etc.</b>
1-HAB-2-DOS		<b>Butirosin</b>
Actinamine		<b>Spectinomycin</b>
Streptidine		<b>Streptomycin</b>

본 연구진은 이미 생명공학실용화 사업의 1단계 지원으로, 유전공학기법을 이용하여 기존의 aminoglycoside계 항생제의 내성세균에 강한 살균력을 가진 새로운 streptomycin 구조체로서 Modified-Streptomycin(MSM)을 개발하는데 성공하였고 본 사업기간동안에도 후속연구가 계속되었으며 특허화도 성공하였다 (특허등록번호: 0261821). 또한, hybrid 항생제 개발을 위한 유전자원의 확보를 목적으로 spectinomycin과 bluensomycin 생합성 유전자의 분리하는데 성공하였다. 이를 위해 유전자 탐침을 개발하고 각각 50-kb와 30-kb 상당의 생합성 유전자 집단을 분리하였고, 30-kb 상당의 염기서열을 결정하여 생합성 유전자들을 규명하였다. 또한, nebramycin 생산균주인 *Streptoalloteichus hindustanus*에서 aminoglycoside계 항생제에 다제 내성능력을 부여하는 내성유전자를 클로닝하고 분석이 완료되어 이후 방선균 벡터 개발이나 항생제 marker로서 이용할 예정이다. 따라서, 본 연구진은 aminoglycoside계 신규항생물질생산을 위한 유전자 pool과 다제 내성 유전자를 포함하는 vector 개발 뿐만 아니라 실용화 연구를 추진할 수 있는 기술축적을 마련하였다.

Hybrid 항생제 개발은 임상시험을 제외하고도 미생물로부터 이차대사산물 생합성 유전자 클로닝 및 기능분석, 유전자 조작 및 발현, 새로운 구조의 신규물질 설계, 신규물질 정제, 구조분석, 생물활성 및 약효검색 등의 광범위한 연구내용을 포함하며 이러한 개발 기술은 현재 제약산업, 생명공학산업, 폐수처리 등의 환경산업, 건강 및 기능성 식품산업, 사료첨가제 및 수의약품 산업, 농약 산업 등의 신제품 개발이나 기존 생산공정 개발 및 개선에 대한 연구개발에서도 중요한 위치를 차지하고 있으므로 본 과제에서 개발된 핵심 기술은 향후 그 파급효과가 다양한 생물산업분야에 점증적으로 확대될 것이다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

Hybrid 항생제 개발기술을 이용한 새로운 구조의 항생물질 개발은 주로 polyketide 계열과 peptide 항생물질에 집중되어 있는데 이는 이들 항생제 생합성 경로에 대한 분자 유전학적 연구가 활발히 진행되는데 기인한다. 대표적인 연구그룹 중 미국의 Abbott Lab의 Leonard Katz 박사등은 polyketide 항생제인 erythromycin 유사체를 gene disruption과 gene replacement 기법을 이용하여 개발하였으며, 그중 11-dehydroxyerythromycin등은 상품화 단계에 접어들었고 (Katz,1997), 미국 Hutchinson 박사는 Wisconsin 대학 재직시 aromatic polyketide 항생제인 daunorubicin에서 당구조의 epimerization을 유도하여 epirubicin (4'-epidoxorubicin)을 개발하였으며 (Madduri et al., 1998), aromatic ring 구조를 가지는 polyketide 생합성 유전자를 이용한 combinatorial synthesis 방법으로 무수한 hybrid polyketide 항생제 개발이 최근 벤처기업(KOSAN Inc.)을 창업한 Stanford 대학의 Chaitan Khosla 박사팀에 의해 수행되고 있다 (McDaniel et al., 1995). 또한 peptide 항생제의 경우, peptide를 생합성하는 activation domain을 gene replacement를 통해 치환하여 새로운 구조의 hybrid peptide 항생제 개발이 독일 Philipps-Universitat의 Mohamed A. Marahiel 박사팀에 의해 성공적으로 수행되었다 (Stachelhans et. al., 1995). 국내에서는 aromatic polyketide 계열의 항생제에 대한 연구로 생명공학 연구소와 일동제약 연구소의 공동연구에 의해 daunorubicin의 11-hydroxylase (*dnrF*) 유전자를 aclacinomycin 생산균주에 gene adding하여 수행되었다(Kim et al., Hwang et al., 1995).

그러나 현재까지 aminoglycoside 계열의 항생제에서 hybrid 항생제 개발기술을 통한 신기능 항생물질을 개발한 예는 아직 보고 되지 않은 상태이며, 관련 기초연구로서 독일의 Pipersberg 박사팀에서 streptomycin을, 일본의 Kyowa Hakko Kogyo, Co. Ltd에서 fortimicin의 생합성 경로에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 국외 뿐만 아니라 국내에도 아직 초기진입 단계이고, aminoglycoside계 항생제 생합성 유전자에 대한 연구는 최근 본 연구진과 선문대학교 송재경 교수팀이 spectinomycin 생합성 유전자를 분리, 분석한 바 있다.

Hybrid 항생제 개발은 현재 polyketide 화합물의 aglycon의 변환에 초점이 맞추어진 상태로 1998년부터 항생제 구조에서 생물학적으로 당구조를 변환시키려는 노력이 결실을 맺고 있다. 이러한 노력은 많은 생리활성물질 구조는 당이 포함되어 있고 이들의 구조변환은 화학적으로 힘들기 때문이다. 본 연구과제는 주요 연구 대상이 당 구조로만 이루어진 aminoglycoside계 항생제의 당 구조를 변환시키는 것을 목표로 삼고 있는데 이러한 당을 생합성 하거나 붙여주는 효소들은 일반적인 이차대사에 관여하는 효소보다는 기질 특이성이 높은 것으로 알려져 있다. 그러므로 신규 aminoglycoside계 항생제 개발을 통해 얻어지는 경제적 효과와 더불어 유전자원을 분리하면서 쌓은 당 생합성 유전자들에 대한 연구경험 축적은 이후 항혈전 저해제인  $\alpha$ -glucosidase 저해제 개발등에 효과적으로 응용가능하고, 기타 대부분의 항생제들이 그 구조체내에 당을 가지고 있는데 이러한 생산균주를 이용하여 당구조가 변형된 신규물질을 창출하는데 이용하고자 한다. 그리고 당을

modification하는 효소를 이용하여 자연에 존재하지 않는 새로운 고가의 당(sugar) 구조 창출등에 효과적으로 응용가능하기 때문에 hybrid 항생제 개발 기술뿐만 아니라 당 생합성에 관한 기술적 수요도 폭증하리라 예상된다.

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31219에서 aminoglycoside 항생제에 다제 내성을 지정하는 *nbrB* 유전자의 분리

*Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31219에서 aminoglycoside 항생제 다제 내성 유전자의 클로닝을 위한 숙주균주로 통상적으로 상기의 aminoglycoside 항생제에 내성능력이 없는 *Streptomyces lividans*를 이용하는데 그 방법을 간단히 요약하면, *Stall. hindustanus* 전체 DNA를 적당한 제한효소 절단후 방선균용 벡터에 서브클로닝하고 *S. lividans*를 형질전환시키고 형질전환된 *S. lividans*중 원래의 없었던 항생제 내성능력을 획득한 형질전환체를 선별함으로써 가능하다. 이와 같이 내성 능력을 갖게 된 형질전환체는 *Stall. hindustanus* 유래의 aminoglycoside 항생제 다제 내성 유전자를 포함한 방선균 벡터로 형질 전환되어 있을 가능성이 높기 때문이다.

*Stall. hindustanus*를 배양한 후 용균시켜 염색체 DNA를 순수분리하여 제한효소 *PstI*으로 부분 절단한 후 미리 *PstI*으로 절단된 방선균용 플라스미드 벡터인 pIJ702에 T4 DNA 연결효소로 연결하였다. 상기의 플라스미드와 *Stall. hindustanus* 유래의 DNA 혼합체를 이용해 aminoglycoside 항생제에 대하여 내성능력이 없는 *S. lividans*를 형질전환시켰다. 이러한 형질전환체들은 pIJ702의 항생제 마아커인 thiostrepton 내성(20  $\mu\text{g/ml}$ )으로 일차 형질전환체를 선발하였으며 이들 형질전환체를 다시 aminoglycoside 항생제인 tobramycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ) 고체배지에 배양한후 생존한 형질전환체를 최종 선발하였다.

클로닝된 *nbrB*를 포함하는 plasmid가 tobramycin 뿐만 아니라 다른 aminoglycoside 항생제에도 내성능력을 부여하는지 알아보기 위해서, 즉 다제내성 유전자의 발현을 확인하기 위해 형질전환체를 R<sub>2</sub>YE 고체배지에 도말한 후 내성의 검정을 위해 gentamicin, kanamycin, apramycin, sisomicin, neomycin 등의 aminoglycoside 항생제가 포함된 액체 배지에 접종하고 28°C에서 48시간 배양하여 형질전환체의 성장유무를 관찰한 결과 형질전환된 *S. lividans*는 gentamicin (500  $\mu\text{g/ml}$  이상), tobramycin (500  $\mu\text{g/ml}$  이상), kanamycin (500  $\mu\text{g/ml}$  이상), sisomisin (500  $\mu\text{g/ml}$  이상), adriamycin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), neomycin (50  $\mu\text{g/ml}$ )등 많은 aminoglycoside 항생제에 대해 내성을 보이는 것으로 보아 본 연구에서 분리한 *Stall. hindustanus* 유래의 DNA 단편이 다제내성 능력을 소유하고 있음을 확인하였다.

DNA 염기서열결정을 수행하였고, 다제내성 유전자(*nbrB*)의 DNA 염기서열 결정 결과는 GenBank (AF038408)에 등록하였다. 일차적인 DNA 염기서열 결과를 기초로 단백질 코딩하는 부분을 검색하고자 CODONPREFERENCE 프로그램을 이용하였으며 그 결과 이 지역에 한 개의 단백질을 코딩하는 open reading frame이 존재함을 확인할 수 있었다. 이 단백질은 염기 순서가 116인 ATG를 개시 코돈으로 하여 염기서열이

959인 TGA를 종결 코돈까지 281개의 아미노산으로 구성되어 있었고 예상되는 분자량은 30,992 Dalton이었다. 이 단백질의 코돈 사용빈도를 보면 전체 G+C 함량이 71.7%이고 그 중 세 번째 코돈의 G+C 함량은 97.9%로 전형적인 방선균 코돈 사용 형태와 유사하였다.

데이터베이스를 통한 아미노산 상동성 검색을 한 결과 *Streptomyces tenebrarius*에서 분리된 KgmB와 85.1%, *Micromonospora zionensis*에서 분리된 Sgm과 59.6%, *M. rosea*에서 분리한 Grm 효소와 57.7%의 상동성을 보이고 있었으며 이들 단백질 모두 16S rRNA 메틸화효소를 암호화하는 것으로 보아 *nbrB* 역시 16S rRNA 메틸화효소를 암호화할 것으로 판단되었다. 이러한 아미노글라이코사이드계 항생제 다제내성 유전자의 클로닝은 이후 클로닝 숙주가 생산하는 nebramycin의 생합성에 관여하는 유전자 분리를 위해 유용한 탐침으로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 aminoglycoside 항생제 생산균주를 이용한 hybrid 항생제 개발시 형질전환된 숙주 미생물의 안정적인 유지를 위한 항생제 marker 유전자로 효과적으로 이용 가능하다고 사료된다.

## 제 2 절 Isovaleryl transferase 유전자(*carE*)의 *Streptomyces griceus* 로의 도입을 통한 새로운 항생물질의 개발

### 1. 항생물질 개발

Isovaleryl transferase 는 carbomycin 생산 균주인 *S. thermotolerans* 에서 mycaminose 에 연결된 mycarose 의 4 번 위치에 isovaleryl group을 acyl group 으로서 도입하여 carbomycin 의 생합성을 완료하는 효소이다. 이 효소는 tylosin, spiramycin 구조에도 isovaleryl group 을 도입할 수 있는 것으로 알려져 있으며 isovaleryl tylosin 은 그 생리 활성이 tylosin에 비하여 우수하다고 보고되어져있다(Okamoto et al. 1980a; Okamoto et al. 1980b; Hwang et al. 1997). 1980 연도 초에 보고된 이 연구 결과는 tylosin을 carbomycin 생산 균주인 *S. thermotolerans* 에 투여하였을 때 tylosin 의 당 잔기에 acylation 이 일어나며 이러한 acyl tylosin 이 개선된 생리 활성을 보인다는 것이다. Tylosin 의 구조의 변화는 macrolide 구조의 3 번 위치에 acetyl 잔기가 도입되는 것과 marcolide 당에 mycaminose 를 통하여 연결된 mycarose 의 4 번 위치에 acetyl, propionyl, butyryl 과 isovaleryl 등의 다양한 acyl 잔기가 도입되는 것이다(그림 1).

이들 유도체중에서 3-acetyl-4"-isovaleryl tylosin (그림 1) 은 그 활성이 우수하여 실용화되었으며 현재도 이 화합물의 생체 전환 효율을 높이는 연구가 산업적으로 큰 가치를 인정받고 있다. Tylosin 의 acylation을 지정하는 유전자를 *S. thermotolerans* 로부터 분리하려는 노력은 isovaleryl transferase 유전자 (*carE*)를 분리하는 데에 이르렀다. *carE* 가 지정하는 isovaleryl transferase 는 spiramycin 의 당 구조에도 acylation을 진행시킨다는 사실이 보고되었다(Epp et al., 1989; Arisawa et al. 1993).

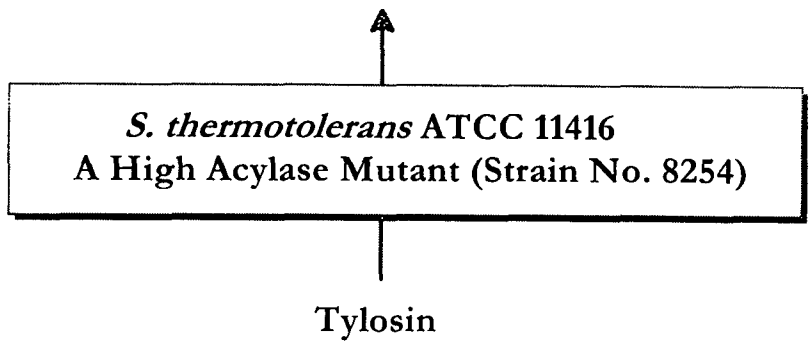
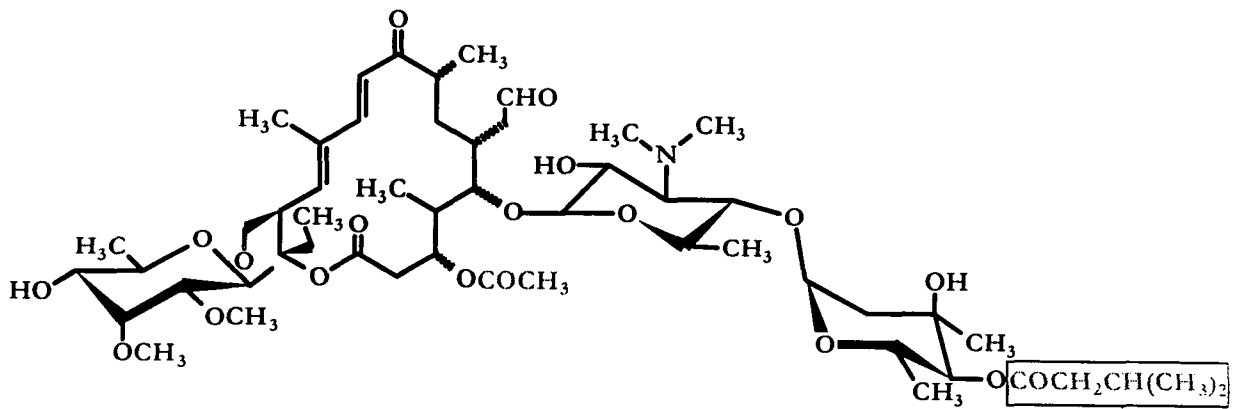
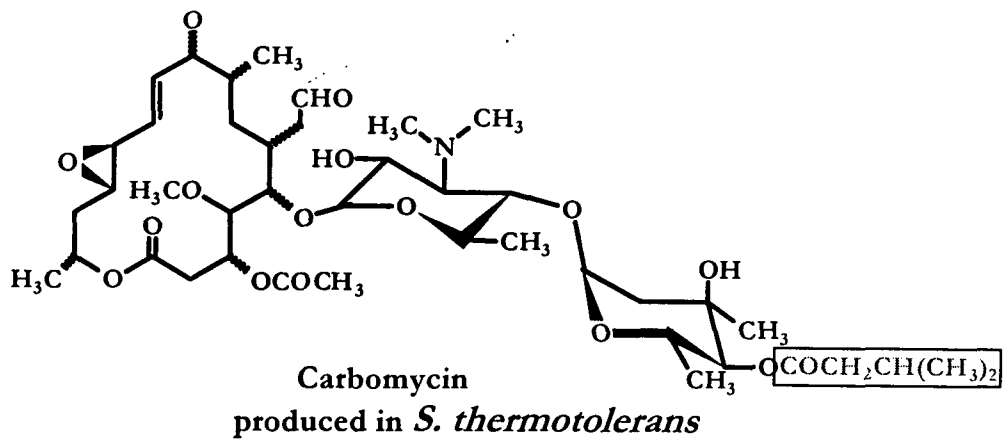


그림 1. *S. thermotolerans* 에 의한 acyl tylosin 생산의 모식도



본 연구에서는 새로운 항생 물질을 개발하려는 노력의 일환으로서 isovaleryl transferase 유전자를 확보하여 acylation 된 당 구조를 갖는 새로운 aminoglycoside 항생제의 개발을 시도하였다. 연구의 진행에 있어서 *carE* 의 도입을 통하여 생성될 수 있는 새로운 항생 물질에 대한 내성을 지정하기 위하여 본 실험실과 동화약품 (주) 의 공동 연구로 분리된 *amr* 유전자를 이용하였다. *amr* 유전자는 16S rRNA methylase를 지정하며 이중 *Streptomyces* 에 도입하였을 때 host 균주에 다양한 aminoglycoside 에 대한 내성을 유발함을 확인하였다. *carE* 와 *amr* 유전자를 low-copy *E. coli*-*Streptomyces* shuttle plasmid 인 pKC1218 에 ligation 하여 pKTC 로 명명하였다. 우선적으로 pKTC를 streptomycin 생산 균주인 *S. griseus*로 도입하여 aminoglycoside에 다제 내성을 띄는 *Serratia marcescens* AG4410을 이용하여 새로운 항생제 활성을 탐색하였다. 이러한 실험을 통하여 놀랍게도 pKTC 가 도입된 *S. griseus*에서 강력한 항생제 역가가 생산됨을 관찰하였다 (그림 2).

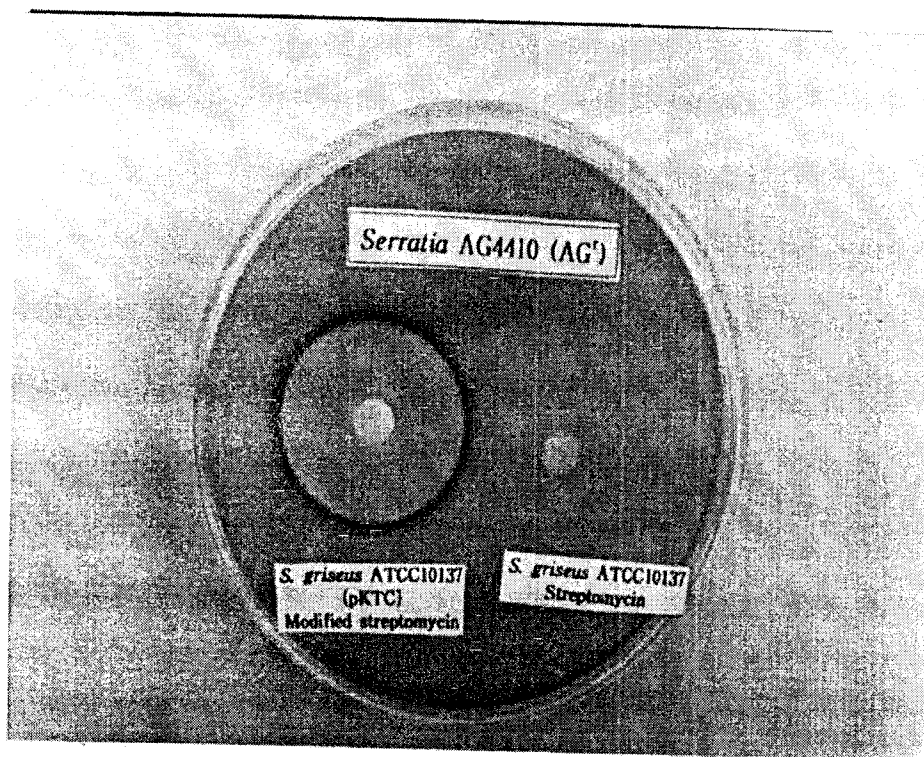
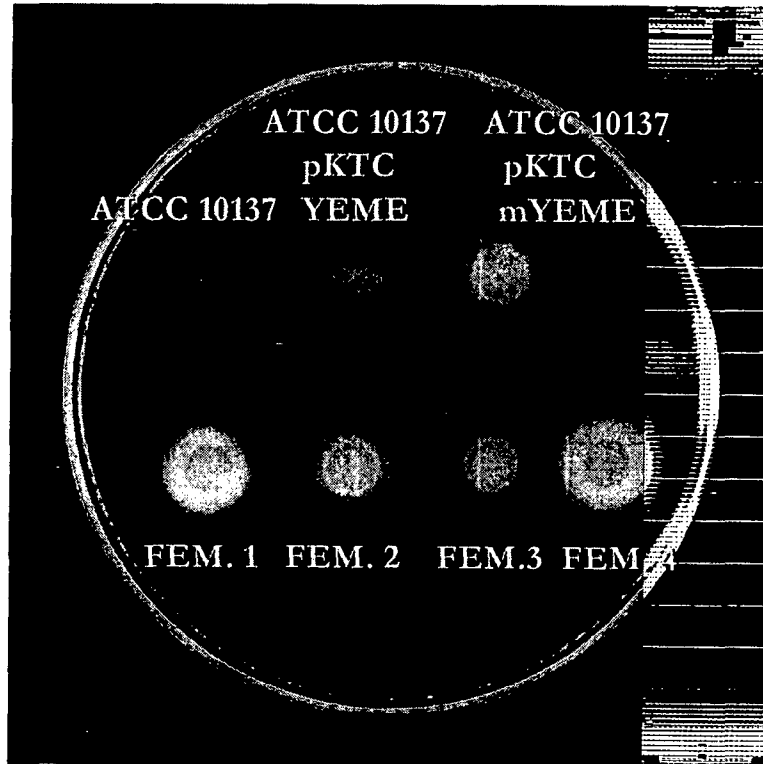


그림 2. pKTC 로 형질 전환된 *S. griseus*에서 생산되는 항생제 활성. *carE* 유전자 도입에 의하여 *S. griseus* ATCC 10137 에서 Aminoglycoside 내성 균주인 *Serratia marcescens* AG4410 에 강력한 항생제 역가를 보이는 물질이 생산되었다.

## 2. *S. griseus*에 isovaleryl transferase 유전자를 도입하여 생성된 새로운 aminoglycoside 항생제 생산 조건의 최적화

전통적인 aminoglycoside 생산을 위한 요건을 구비하도록 배지 조성을 디자인 하였다. Aminoglycoside 생산에서 효과적인 탄소원은 glucose이며, C/N 비는 7:1 부근이 유효한 것으로 알려져 있다. 또한 칼슘 이온의 역할과, 적정 농도의 NaCl이 aminoglycoside 생산에 좋은 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이상의 요건을 바탕으로 하여 기존에 알려진 modified YEME 배지(yeast extract, 0.3%; peptone, 0.5%; malt extract, 0.3%; glucose 1%;  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.1%;  $KH_2PO_4$ , 0.03%; sucrose 1%; pH, 6.8)를 대조군으로 생산성을 향상시킬 수 있는 배지 조성 확립을 시도하였다. 시도된 배지중 가장 생산 효율이 높았던 배지는 2 %의 Soybean meal, 1 %의 starch, 2 %의 glucose, 0.3 %의  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.05%의  $KH_2PO_4$ , 0.05 %의  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 와 0.2 %의  $CaCO_3$ 를 포함한다. 배양 시작 시에 pH를 7.0으로 조정하며 이틀 배양 후 5 %의 glucose를 첨가 투여하였다.

발효 배양에서 streptomycin 생산의 요건을 참고하여 FEM1 배지를 준비하였다. FEM1 배지와 더불어 FEM2, 3 배지를 고안하여 *GTKC*를 배양, 활성을 검정하였다 (그림 3). 활성 검정 결과, FEM2, 3 배지에서의 생산량은 modified YEME에 비해 유의성 있는 증가를 보이지 않았다. 반면 FEM1 배지의 경우 그 활성이 modified YEME에 비하여 70 ~ 80 % 증가하였다. 활성 물질의 생산을 극대화하기 위하여 FEM4 배지를 고안하였다. FEM4 배지의 배양에 경우 stationary phase에 도달 후 하루가 경과하여 배지 내에 total sugar 함량이 0.5 % 이하로 떨어진 시기에 5 %의 glucose를 첨가하였다. FEM4 배지를 사용하여 배양 함으로서 활성 물질의 생산을 FEM1 배지에서의 배양보다 30 ~ 50 % 증가시킬 수 있었다 (그림 3). *GKTC* 발효 배양 조건을 확립하였으므로 대량 배양을 통한 활성 물질의 순수 분리를 시도하였다.



modified YEME: Glc, 1%; Suc, 1%; YE, 0.3%; ME, 0.3%; Peptone, 0.5%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.3%; MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 0.1%

FEM1: Soybean meal, 7%; Starch, 5%; Glc, 2%; NaCl, 0.4%; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.3%; CaCl<sub>2</sub>, 0.1%; pH, 7.0

FEM2: Soybean meal, 4%; Starch, 4%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05%; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.05%; CaCO<sub>3</sub>, 0.2%; NaCl, 0.4%; pH, 7.0

FEM3: Soybean meal, 4%; Starch, 4%; YE, 0.3%; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.3%; CaCl<sub>2</sub>, 0.1%; pH, 7.0

FEM4: Soybean meal, 2%; Starch, 1%; Glc, 2%; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.3%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05%; MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.05%; CaCO<sub>3</sub>, 0.2%; pH 7.0; 5% of additional Glc at 2 days.

그림 3. 발효배지에 따른 항균활성의 비교. 30°C에서 배양한 1% LB *Serratia marcescens* AG4410 배양액(OD550, 0.8-1.0)을 포함하는 ISP3 agar medium을 이용하여 항균활성을 측정하였다. 20 $\mu$ l의 발효배양액을 2mm 반경의 whatman paper에 사용하였고, plate는 붉은 색이 발색시까지 30°C에서 배양하였다.

### 3. Isovaleryl transferase 유전자로 형질 전환된 *S. griseus* 에서 새로운 항생 물질의 분리 및 구조 결정

*carE* 유전자가 지정하는 isovaleryl transferase 의 도입에 의하여 *S. griseus*에서 생산된 물질은 isovaleryl streptomycin 또는 isovaleryl aminoglycoside 일 것으로 예측되었으므로 알려진 aminoglycoside 분리 방법에 기초하여 활성 물질의 분리를 시도하였다. Aminoglycoside 화합물의 분리는 그 구조적 특성에 기초하여 양이온 교환 수지가 이용된다. 이는 amino 잔기의 양 전하의 존재에 기초한 것이다. 양이온 교환 수지인 CG-50에서 암모니아수 농도 구배로서 용출된 각 fraction 의 *S. marcescens* AG4410 에 대한 항생제 역가를 측정하여 major aminoglycoside 항생제 (mSM-2) 와 하나의 minor aminoglycoside 항생제 (mSM-1) 가 존재함을 확인하였다 (그림 4). 이들이 수용성 물질이며 cation 에 특이적인 IRC-50 를 통하여 일차 분리된 점에 기초하여 이들이 aminoglycoside 계열의 항생제임을 예측할 수 있었다. 이 물질을 분리하여 그 화학 구조를 결정하기 위하여 pKTC 로 형질 전환된 *S. griseus* 를 대상으로 항생제 활성 생산을 극대화하는 배양 조건을 확립하여 이 물질의 배양에 착수하였다. 일차적으로 IRC-50 양이온 교환 수지를 이용하여 항생제 활성을 농축하였다. 농축된 용액을 양이온 교환 수지인 CG-50 에 적용하고 교환 수지 용량의 2 배에 해당하는 물로 세척한 후 암모니아수의 농도 구배에 따라 용출을 시도하였다. 용출된 분획들의 항생제 활성을 *S. marcescens* AG4410에 대하여 측정하여 활성 물질의 분리를 시도하였다.  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  분석을 통하여 화합물의 구조의 개략적인 구조를 파악하였으며 화합물의 구조 결정을 완료하기 위하여  $^1\text{H-}^1\text{H}$  COSY (HMQC),  $^1\text{H-}^{13}\text{C}$  COSY (TOCSY) 및 HMBC 분석을 시도하였다

mSM-2 의  $^1\text{H-NMR}$  spectrum (그림 5) 을 분석한 결과 본 화합물이 aminoglycoside 항생제임은 확인할 수 있었으나, isovaleryl group 의 존재로 인하여 관찰되리라고 예상되었던 2 개의 methyl hydrogen 의 peak (1.0 ppm 영역에 integration 6) 와  $\alpha$ -methylene hydrogen 의 peak (2.3 ppm 영역에 integration 2) 를 관찰할 수 없었다 (그림 5).

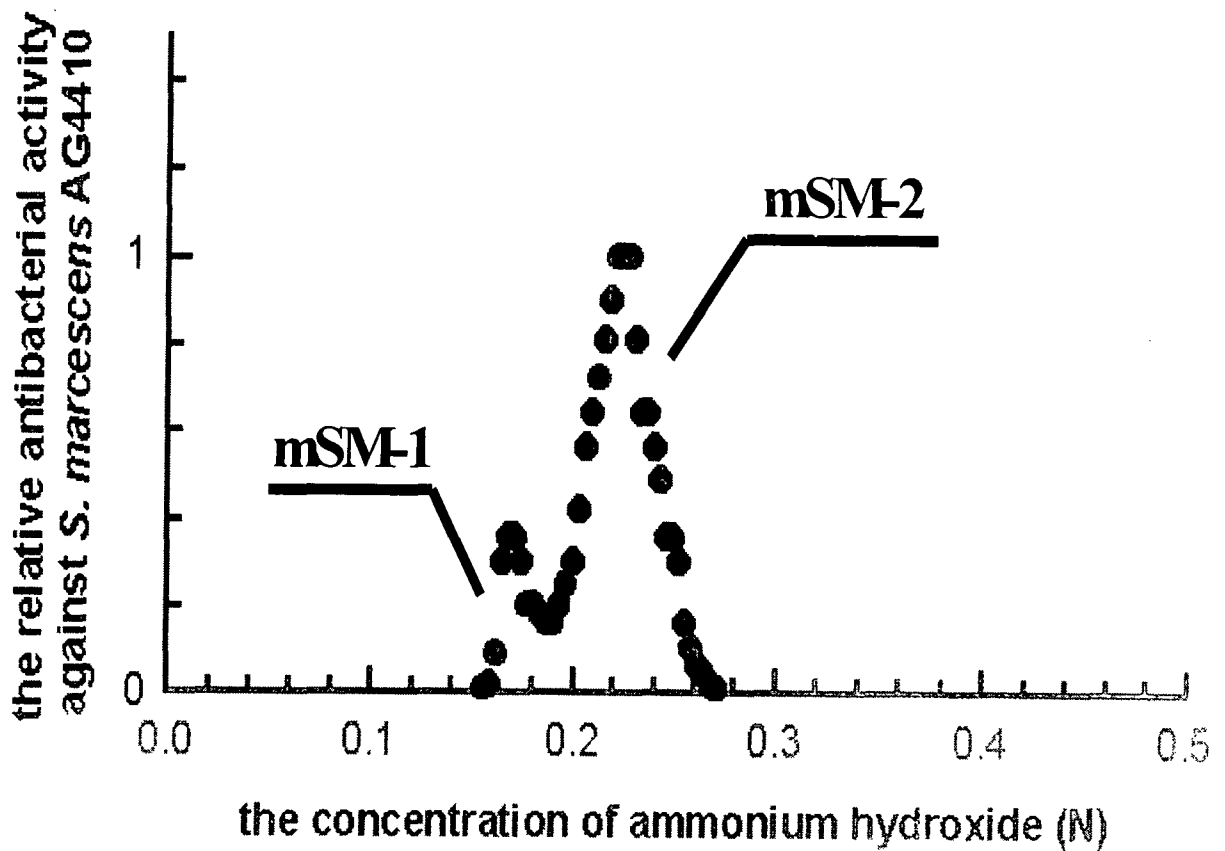


그림 4. Isovaleryl transferase 유전자가 도입된 *S. griseus*에서 생산되는 항생제 활성의 양이온 교환 수지 (CG-50) 를 이용한 분리. pKTC 로 형질 전환된 *S. griseus*를 액체 배양에서 약 10 일간 배양한 후 배양액을 IRC-50 resin chromatography를 통하여 일차 분리하였다. IRC-50 resin chromatography를 통하여 얻어진 활성 부위를 농축하여 CG-50 resin 에 흡착시킨 후 0.5 M 까지의 암모니아수 농도 구배 (X축)에서 용출하였다. 용출된 fraction 들의 항생제 활성을 측정하여 상대값으로서 Y 축에 표시하였다. 상대적인 항생제 활성의 측정은 *S. marcescens* AG4410 에 대한 inhibition zone 의 면적으로 산출하였다.



분리된 물질의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum (그림 6, 표 2) 을 분석한 결과 mSM-2 가 streptomycin 계열의 화합물이 아님을 확인할 수 있었다.  $^{13}\text{C}$ -NMR 의 분석에 있어서는 문헌 (Tohma et al. 1989) 에 보고된 chemical shift 값을 기준으로 하였다: Streptomycin 유사체 화합물들에 특이적인 streptidine 의 guanidine group (158.3 ~159.1 ppm) 이 관찰되지 않을 뿐 아니라, streptose group 에 특이적인 신호 (12.3 ~ 13.7 ppm) 도 관찰되지 않았다.

유전자 재조합을 통한 aminoglycoside 물질 연구가 세계적으로 아직 다른 구조물보다 더딘 것은 이 물질들의 분리, 정제 와 분석이 까다로운데 기인하는데 본 연구진에서도 많은 노력을 기울여 이제는 그 분리 정제 system 이 확립되었다. 분리된 물질을 isovaleryl 유도체나 streptomycin 유도체와 다른 구조를 가진 화합물이라는 것을 알 수 있었으며, two-dimensional NMR spectrum 의 분석을 통하여 분리된 화합물이 pseudotetrasaccharide 일 것으로 예상할 수 있었다. 그러나, 분명히 bioassay에서 확인되었듯이 내성 균주에 대한 활성을 보였음은 내성 균주를 죽이는 새로운 물질이 생성되고 있으며 이 물질은 새로운 유전자 도입에 의한 silent 유전자 발현에 따라 생성된 미지의 물질로 예측되어지며, 생성된 미지의 물질에 대한 후속 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

그러나, 오히려 예측에 벗어나는 새로운 항생 물질의 생성은 본 연구의 목적인 새로운 항생 물질의 개발에 있어서 매우 가치있는 결과라고 할 수 있겠으며, 이러한 현상을 규명하기 위한 새로운 접근 방안이 모색되어야 한다고 사료된다. mSM-1 으로 지칭된 물질의 분리를 시도하였으나 여러 화합물의 혼합물로 분리되거나, 활성이 chromatography 과정 중 쉽게 유실됨을 관찰할 수 있었다.



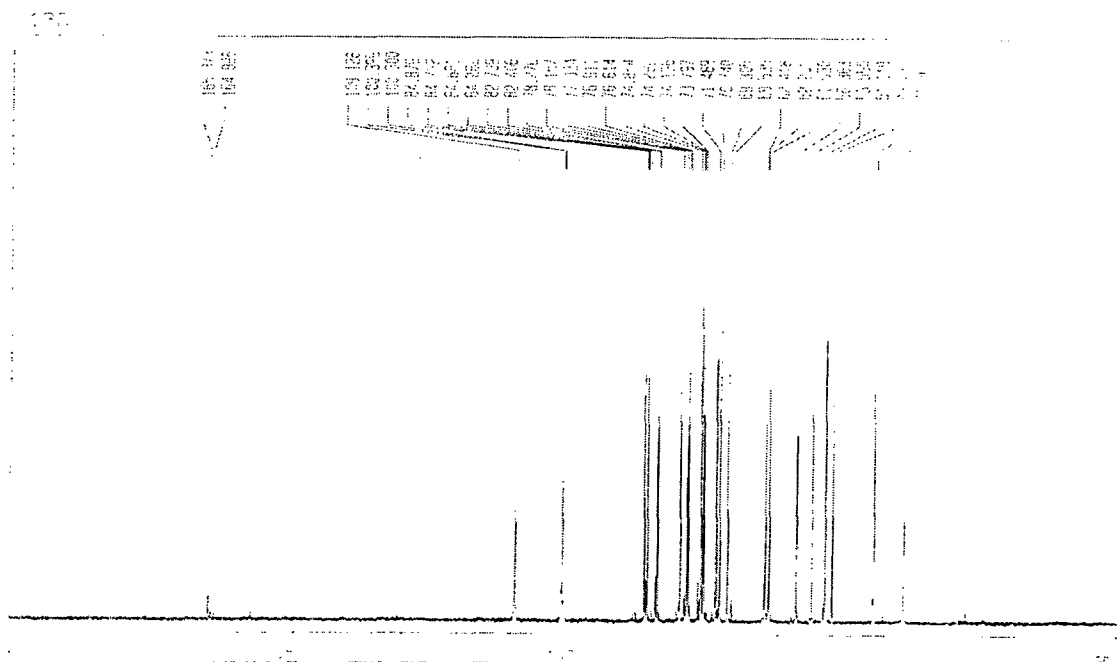


그림 6. 분리된 mSM-2 의  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum. Tohma et al. (1989; Ashimycin A and B, new streptomycin analogues. *J. Antibiot.* 42: 1205-1212) 에 보고된 streptomycin 유사체들의  $^{13}\text{C}$ -chemical shift 값을 도식화하여 밑에 표시하였다.

표 2. Streptomycin 계열의 화합물들의  $^{13}\text{C}$  NMR shifts

Carbon	Streptomycin	Ashimycin A	Ashimycin B
1	59.7	59.6	59.7
2	71.5	72.1	71.7
3	59	59.3	59.3
4	78.9	76.6	78.7
5	74.2	74.3	74.0
6	72.4	72.3	72.4
C=NH (1)	<b>159.1</b>	<b>159.1</b>	<b>159.1</b>
C=NH (3)	<b>158.6</b>	<b>158.3</b>	<b>158.5</b>
1'	106.7	107.3	106.4
2'	85.3	81.6	84.1
3'	83.1	83.4	83.2
4'	78.3	78.8	78.0
5'	<b>13.4</b>	<b>12.3</b>	<b>13.7</b>
CHO (3')	90.5	89.9	90.5
1''	95.2	92.6	95.5
2''	62.3	62.0	66.4
3''	70.4	68.6	68.4
4''	70.1	78.6	71.0
5''	73.7	71.8	73.5
6''	61.2	60.2	61.3
NCH <sub>3</sub> (2'')	33.1	32.7	41.3
C=O			171.5
CH <sub>2</sub> OH			58.9
1'''		106.7	
2'''		82.0	
3'''		74.3	
4'''		83.3	
5'''		62.0	
COOH		177.2	

#### 4. pKTC 로 형질 전환된 *S. griseus* 에서 도입된 외부 유전자 (isovaleryl transferase 를 지정하는 *carE* 와 aminoglycoside 항생제에 대한 다제 내성을 지정하는 *amr*) 의 존재 및 안정성 검사

Recombinant plasmid 가 도입된 균주들은 일차적으로 plasmid vector 내에 존재하는 항생제 내성 유전자에 의한 지정하는 항생제 내성을 이용하여 선택되어지지만, protoplast regeneration 과정에서 자연적인 저항성 균주가 발생할 경우가 많이 있으므로 transformant 로 선택된 균주들로부터 직접 plasmid를 분리함으로써 형질 전환이 되었음을 확인하는 것이 일반적인 확인 방법 이라고 할 수 있다. 또한 이를 통하여 plasmid 의 존재 뿐 아니라 균주내로 도입된 recombinant plasmid 가 chromosomal DNA 로 삽입되거나, deletion 되지 않고 안정하게 존재하는가를 확인할 수 있다. 그러나, *S. lividans* 와 같이 그 유전적인 조작이 용이한 균주를 제외하고는 plasmid 를 genomic DNA 와 선별하여 추출하는 것이 어려운 방법으로 여겨지고 있다.

pKTC는 pKC1218 에 isovaleryl transferase 유전자 (*carE*) 와 aminoglycoside 항생제에 대한 다제 내성을 지정하는 16S rRNA methylase 유전자 (*amr*)를 연결한 것이다. pKC1218 은 *Streptomyces* 내에서 low-copy 로 존재하는 plasmid 이므로 plasmid를 직접 분리하는 것은 매우 어렵다고 사료되었다. 따라서, 형질 전환 균주들의 균사체로부터 total DNA를 분리한 후 Southern blot 분석 방법을 통하여 도입 plasmid 의 존재 및 안정성을 검증하였다.

Isovaleryl transferase 유전자와 aminoglycoside 다제 내성을 지정하는 유전자를 함유한 plasmid (pKTC) 가 도입된 *S. griseus* ATCC 10137 을 R2YE 에서 배양하여 균사체를 얻은 후 일반적인 genomic DNA 의 분리 방법에 따라 total DNA 를 분리하였다. 분리한 total DNA를 두가지 이상의 제한 효소로 절단하여 같은 효소로 절단된 authentic plasmid DNA 와 함께 전기 영동으로 분리한 후 Southern blot 분석에 적용하였다.

본 실험에서는 DNA 를 *Bam*H I 으로 절단하거나 *Eco*R I -*Hind*III 로 절단하여 실험에 적용하였다.

Prehybridization 과 hybridization 은 68 °C 의 'high-stringency' 조건에서 진행하였으며, hybridization 후의 membrane washing 작업 또한 'high-stringency' 조건 (0.2 × SSC, 68 °C) 에서 진행하였다. Probe 는 authentic pKTC DNA를 *Eco*R I -*Hind*III 로 절단한 후 DIG-labelling 방법에 따라 표지화하였으며 신호 검출 또한 DIG-detection 방법을 이용하였다.

Isovaleryl transferase 유전자 (*carE*) 와 aminoglycoside 다제 내성을 지정하는 유전자 (*amr*) 를 함유한 plasmid (pKTC) 가 도입된 *S. griseus* ATCC 10137 의 total DNA를 이용하여 Southern blot 분석을 실시함으로써 pKTC 가 *S. griseus* 종 내에서 intact 하게 존재하는 것을 확인하였다 (그림 7).

여 백

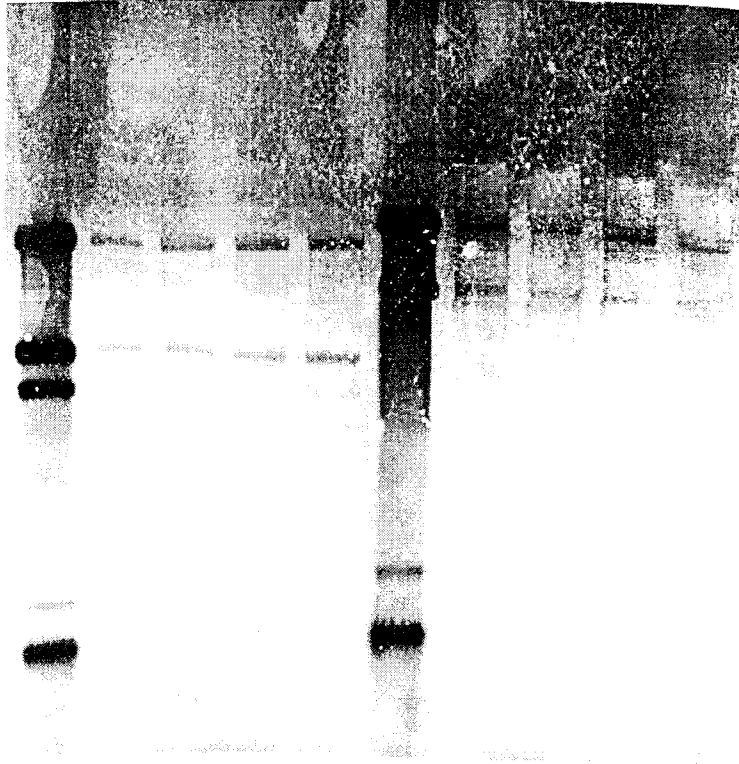


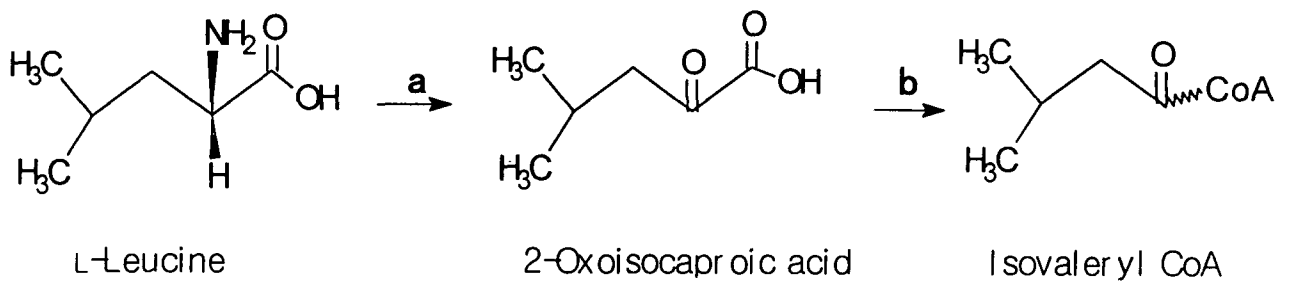
그림 7. pKTC 가 도입된 *S. griseus* 의 total DNA 에 pKTC DNA를 탐침으로 이용한 Southern blot 분석을 실시한 결과. Lane 2 와 7, 3 과 8, 4 와 9, 5 와 10 은 각각 형질 전환 균주 a, b, c, d 로부터 분리된 total DNA 를 지칭한다. Lane 2, 3, 4 와 5 에 적용된 DNA 는 *Bam*HI 효소로 처리된 것이며, lane 7, 8, 9 와 10 에 적용된 DNA 는 *Eco*RI 과 *Hind*III 효소로 절단된 것이다. Lane 1 에는 *Bam*HI 으로 절단된 pKTC DNA 가 lane 2 에는 *Eco*RI 과 *Hind*III 로 절단된 pKTC DNA 가 적용되었다. 탐침으로는 *Eco*RI 과 *Hind*III 로 절단된 pKTC DNA 가 이용되었다.

## 5. *S. griseus* 에 isovaleryl transferase (*carE*) 를 지정하는 유전자에 의한 항생 물질 생산의 특성 연구

본 연구에서의 일차적인 목적은 isovaleryl 유도체의 분리에 있으므로 액체 배양체내에서의 isovaleryl 유도체에 의한 것으로 추정되는 활성의 생산성을 검증하였다. 액체 배양을 진행함에 있어서 isovaleryl transferase 의 기질인 isovaleryl CoA 의 전구체인 L-leucine 을 배양체내에 투여하였다. 투여된 L-leucine 은 균체 성장과 일차 대사에 우선적으로 이용될 가능성이 높으므로 균체 성장이 완료된 후 'stationary phase' 에 L-leucine을 일정량 투여하였다. Isovaleryl donor 로서는 L-leucine 뿐 아니라 isovalerate 도 가능할 수 있으나, 생합성 경로 상 isovalerate 는 isovaleryl CoA 로 직접 전산화되는 않을 것으로 판단되어졌으며, Huang et al. (1997)은 isovaleryl donor 로서 isovaleryl CoA를 제외하면 leucine 이 가장 효과적인 것으로 보고하였다. Isovaleryl CoA 가 미생물의 fermentation 배양에 투여하기는 너무 경제성이 없는 것으로 판단되어졌으므로 L-leucine을 isovaleryl donor 로서 배지에 투여하였다. 지금까지 규명된 천연물의 생합성 경로에 한하여서 예측할 때 L-leucine 이 isovaleryl CoA 의 가장 효율적인 전구체라고 할 수 있다 (그림 8). 2-oxoisocaproic acid 의 경우 생합성 경로상에 존재하기는 하지만 화학적으로 불안정할 것으로 예측되고 또한 구입이 불가능한 화합물이다. 액체 배양은 modified YEME 배지를 이용하여 진행하였다. 항생제 생산은 배양 조건에 있어서의 산소의 공급에 크게 지배받는 것이 일반적인 개념이므로 산소 공급을 원활하게 하기 위하여 baffled flask 를 이용하였으며 shaking 속도는 250 rpm 이상에서 유지하였다. Flask 에 담겨지는 배지의 양은 flask 부피의 의 1/5 을 넘지 않도록 하였으며, *S. griseus* 형질 전환 균주들의 배양에 있어서는 액체 배지에 apramycin 이 25  $\mu\text{g/ml}$  가 되도록 투여하였다.

형질 전환 균주 및 모균주를 5 일간 위에 기술한 조건 하에서 배양하여 균체 성장이 완료된 시기에 L-leucine을 100 mM phosphate (pH 7.0) 용액으로서 0.5 mg/L 가 되도록 투여하였다. L-leucine 의 농도의 선정에 있어서는 Arisawa et al. (1995)의 보고를 참조하였다. L-leucine 의 일차 투여 후 4 일간 배양하고 일정량의 배양액을 취하여 -20  $^{\circ}\text{C}$  에 보관하고 나머지 배양체에는 0.5 mg/L 의 L-leucine을 이차로 투여한 후 같은 조건에서 계속 배양하였다. L-leucine 의 이차 투여 후 4 일간 배양하여 발효 배양체를 확보하였다.

액체 배양 진행에 있어서 isovaleryl CoA 의 생성에 의존하는 화합물의 생산성을 검증하기 위하여 isovaleryl CoA 의 전구체로 알려진 L-leucine을 액체 배양체에 투입하고, L-leucine 이 투입되지 않은 배양체와의 생산성 차이를 검증하였다. L-leucine 의 투입은 액체 배양에서는 고체 배지에 비하여 항생제 생산 정도가 미비한 것이 isovaleryl CoA 의 공급에서의 결핍에서 기인할 가능성이 있다고 예측되었기 때문이다.



**a: *Branched-chain amino acid aminotransferase***

**b: *Branched-chain oxo acid dehydrogenase complex***

그림 8. 알려진 생체내에서의 Isovaleryl CoA 의 생합성 경로.

4 개의 형질 전환 균주를 대상으로 25  $\mu\text{g/ml}$  의 apramycin 이 투여된 modified YEME에서 액체배양을 진행하였다. 5 일 배양 후 L-leucine을 100 mM phosphate (pH 7.2) 용액으로서 배양액 내에 0.5 mg/ml 가 되도록 투여하였다. 4 일 배양 후 5 ml 의 배양액을 취한 후  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  에 보관하고 ('9 일' 로 지칭), 같은 농도의 L-leucine 을 추가로 배양액 내에 처리한 후 4 일간 배양하였다 ('13일' 로 지칭). 얻어진 균주 배양액을 이용하여 *S. marcescens* AG4410 에 항생제 역가를 측정하였다 (표 3). 1 ml 의 배양액을 적용하였을 때, 최대 지름 1.7 cm 의 저해환을 관찰할 수 있었다. 나타난 항생제 역가가 L-leucine 의 투여에 의하여 증가하는 현상은 isovaleryl CoA 의 생합성과의 관련성을 간접적으로 뒷받침해주는 결과이기는 하지만 검출되는 항생제 역가가 분리를 시도하기에는 너무 낮은 것으로 판단되었다. 관찰되어진 항생제 역가를 화학적인 검출 방법과 연계하기 위하여 '13 일' 의 배양액을 IRC-50 resin 을 이용하여 농축한 후 TLC를 실시한 후 Ninhydrin 방법으로 검출을 시도하였다 (그림 9). 검출되는 화합물들과 표 1의 항생제 역가와 비교하면 box 로 표시된 부분에 검출된 spot 이 역가와 상관 관계가 있는 것으로 판단되어졌다.

Isovaleryl 유도체라고 추정된 물질의 생산을 확인하기 위하여 액체 배양 실험을 반복하였으나, 항생제 역가를 관찰할 수 없었다. 이러한 문제점의 원인은 균주의 유전적인 불안정성을 우선 추측할 수 있으며, 또한 본 실험에 이용된 *S. griseus* 균체 내에서의 isovaleryl CoA 의 생합성 능력이 매우 불안정할 가능성도 예상되었다. 또한 mSM-1 에 관찰되었듯이 항생제 역가의 생산을 검출하는 데에 있어서 재현성이 없음은 목표의 물질이 화학적으로 또는 생물학적으로 불안정한 데에서 기인할 가능성도 있다고 사료된다.

이미 기술한 바와 같이 새로운 유전자 도입에 의한 silent 유전자 발현에 의한 새로운 물질의 생산에 대한 가능성에 대하여 그 원인적인 면을 규명하는 연구와 미지의 물질인 mSM-2 에 대한 연구가 계속적으로 수행되어야 할 것으로 사료된다.



배양에 이용된 균주	'9 일' 배양액의 항생제 역가 (L-leucine 이 투여되지 않은 배양 / L-leucine 이 투여된 배양)	'13 일' 배양액의 항생제 역가 (L-leucine 이 투여되지 않은 배양 / L-leucine 이 투여된 배양)
<i>S. griseus</i> 모균주	-/-	-/-
pKTC 도입 균주, a	-/-	1.3 / 1.5
pKTC 도입 균주, b	-/-	1.0 / 1.5
pKTC 도입 균주, c	-/-	1.0 / 1.3
pKTC 도입 균주, d	±/±	1.25 / 1.7

표 3. pKTC 가 도입된 *S. griseus* 에서 생산되는 aminoglycoside 내성 균주인 *S. marcescens* AG4410 에 대한 항생 역가의 생성. 1 ml 의 배양액을 농축하여 항생제 역가 측정에 적용하였다. 항생제 역가는 나타난 저해환의 지름으로 표시하였다.

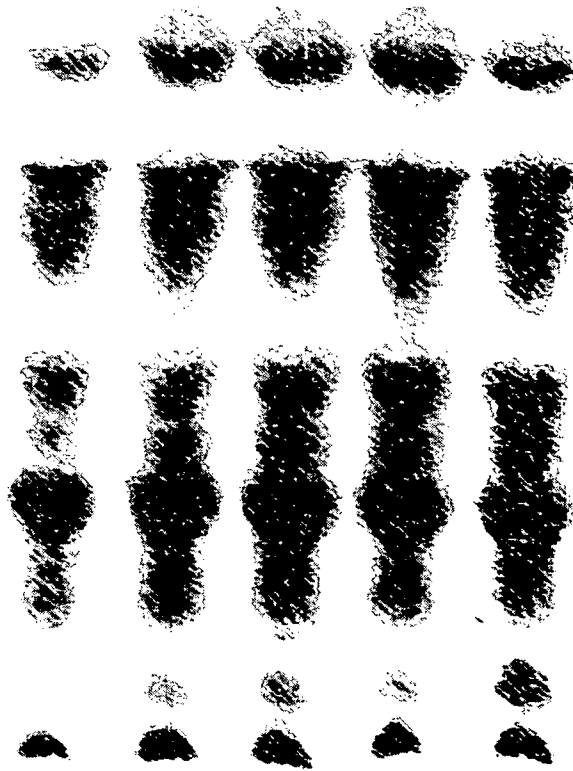


그림 9. pKTC 로 형질 전환된 *S. griseus* 균주의 액체 배양액의 TLC chromatogram. modified YEME에서 13 일간 유지된 배양액을 IRC-50 resin을 통하여 농축하였다. 원 배양액으로서 400  $\mu$ l 에 해당하는 농축액을 TLC 에 적용하였다. TLC 의 전개 용매로는 isopropanol, methanol, 1 N 암모니아수; 1, 2, 2 를 이용하였으며 검출방법은 Ninhydrin 을 이용하였다. Lane 1 에 적용된 시료는 *S. griseus* ATCC 10137 모균주 배양액의 농축액이며, lane 2-4 에는 pKTC 로 형질 전환된 *S. griseus* 균주 a-d 의 배양액을 적용하였다.

여 백

### 제 3 절 Isovaleryl transferase 유전자 (*carE*) 를 다양한 aminoglycoside 생산 균주로 도입한 후 새로운 항생제 활성의 탐색

Isovaleryl transferase 유전자(*carE*)가 streptomycin 생산 균주에서 새로운 항생제 활성을 유발함을 관찰하였으므로 다른 aminoglycoside 에 *carE* 를 도입한 후 aminoglycoside 내성 균주에 대한 항생제 활성을 탐색하였다.

*carE* 유전자와 함께 aminoglycoside 항생제에 다제 내성을 지정하는 *amr* 유전자가 pKC1218 에 삽입된 pKTC를 다양한 aminoglycoside 생산 균주에 도입한 후 새로운 항생제 활성을 탐색하였다. 유전자 도입에 host 로서 이용된 균주는 bluensomycin을 생산하는 *S. blensis* (보고되어진 aminoglycoside 중에서 streptomycin 과 그 화학구조가 가장 유사함으로 우선적으로 선택되었다. Streptomycin 의 streptidine 구조의 1 번 탄소에 존재하는 guanidine 작용기 대신에 carbamoyl 작용기가 존재하는 bluensidine 이 bluensomycin 에는 존재한다.), kanamycin을 생산하는 *S. kanamyceticus* 와 paromomycin을 생산하는 *S. rimosus* 등을 우선적으로 선정하였다. kanamycin 과 paromomycin 이 선정된 것은 transformation을 비롯한 유전자 조작 기술을 본 실험실이 확립하고 있고, 또한 aminoglycoside 시장에서 높은 점유율을 차지하고 있기 때문이다. 이외에 spectinomycin 을 생산하는 *S. spectabilis*를 선정하였다. Spectinomycin 의 경우 streptidine 과 bluensidine 에 비교될 수 있는 actinamine 구조를 갖고 있고 그 생합성 유전자의 연구가 빠른 시간 안에 이루어지면 세계적으로 선도적 위치를 차지할 수 있음에 따라 본 연구에 포함하였다.

pKTC 의 도입에 있어서는 일차적으로 PEG를 이용한 transformation 방법을 시행하였다. Transformation 에 이용되는 DNA 는 host 균주의 restriction 체계에 의한 손상을 피하기 위하여 DNA methylation 기능이 무력화된 *E. coli* GM2929 strain 에 도입한 후 분리하여 이용하였다. Transformation 방법으로서 유전자 도입이 어려운 균주들에 있어서는 conjugation 방법을 이용하였다. Actinomycetes 으로의 유전자 도입에 PEG를 이용한 transformation 방법이 주로 이용되어져 왔으나 *Streptomyces* 를 포함한 많은 actinomycetes 종에 있어서 PEG-transformation 기술이 제한적이고 또한, 최근의 기초 과학의 발전 (conjugation plasmid 분리 와 이들의 conjugation 기능의 이해) 에 따라 대안으로서 conjugation 기술의 사용이 늘어나고 있는 추세이다. 본 연구에서 pKTC 의 제조에 이용된 pKC1218 은 광범위한 actinomycetes 종에 대하여 conjugation 이 가능한 vector 인 것으로 보고되어져있다.

pKC1218을 *E. coli* ET12567 에 도입한 후 host 균주와 conjugation 실시하였다. Conjugation 수행 후 donor 세포인 *E. coli* ET 12567을 제거하기 위하여 nalidixic acid 를 이용하였다. Transformation 과 conjugation 두 경우 모두에 있어서 형질 전환체의 선택은 apramycin을 이용하여 실시하였다.

Isovaleryl transferase 유전자를 도입하여 새로운 aminoglycoside 의 acyl 유도체의 생성을 도모함과 함께 propionyl transferase 유전자의 도입을 같은 맥락에서 진행하였다. 형질 전화 대상 균주로는 본 연구 과제에서 생합성 유전자 분리를 진행하였던 균주들을 우선적으로 선택하였다. 이들은 bluensomycin 생산 균주인 *S. bluensis*, paromomycin 생산 균주인 *S. rimosus*, spectinomycin 생산 균주인 *S. spectabilis* 등이다. 이들 이외에 kanamycin 생산 균주인 *S. kanamyceticus* 등에 유전자 도입을 시도하였다.

Aminoglycoside 항생제에 내성을 보이는 균주를 대상으로 항생제 활성을 검사함으로써 새로운 항생제의 생산을 추적하는 연구를 진행 중에 있다.

## 제 4 절 Aminoglycoside 항생제 생합성 유전자의 분리 및 분석

본 연구인 '유전자 조작을 이용한 새로운 생리 활성 물질의 개발'의 진행에 있어서, 항생제의 생합성 경로에 대한 정확한 해석과 이를 지정하는 유전자들에 대한 광범위한 자원 없이는 '유용 신물질의 개발'이라는 목표를 달성하는 것은 많은 어려움이 있으며, 조급하게 실용화에 다가가려고 하는 연구 태도로 인하여 수명이 짧은 일회적 연구로 끝나거나 국외 선진 group 들과의 격차가 현재에도 계속적으로 커지고 있다는 것이다. 우선 다양한 생합성 유전자군을 분리 분석하고, 이러한 과정에서 천연물 생합성에 대한 광범위한 정보를 확보하여야 앞으로 다양한 물질을 설계하고 유전자 조작을 통하여 설계 물질의 생산을 실현할 수 있을 것으로 믿어진다. 그래서 국외 선진 group 과 대등하게 할 수 있는 유전자 분리 기술과 이를 통한 유전자 분리 및 분석에 대한 노력을 더욱 심도 있게 진행하였다.

많은 항생제들에서 발견되는 당들은 생리 활성에 있어서 필수적인 역할을 담당하고 있는 것으로 인정되어지고 있다. 따라서, 항생제에 존재하는 당 구조의 생합성 및 이들의 생합성을 지정하는 유전자의 분리 및 분석에 있어서의 많은 연구가 이루어졌다. 이와 같은 연구를 통하여 많은 이차 대사 산물에 존재하는 당들이 6-deoxyhexose 이며 이들이 dTDP-glucose 의 생성을 통하여 생합성 된다는 사실이 밝혀졌다. 이차 대사에 특이적인 당 구조 중 가장 많은 비중을 차지하는 6-deoxyglucose 의 생합성 경로는 그림 19에 도식화 한 바와 같이 이루어지는 것으로 확립되어있다. 그림 20에는 streptomycin 의 경우를 들어 그 생합성 효소들을 표시하였다. 많은 경우 epimerization 단계는 그림에서 제시된 바와 같이 필수적인 것은 아니며 생합성 경로에 있어서 dTDP-glucose 의 생성과 dTDP-glucose 의 탈수화 반응이 6-deoxyhexose 의 생성에 필수적인 것으로 인정되어지고 있다. dTDP-glucose synthase 는 dTDP-glucose 4,6 dehydratase 와 함께 6-deoxyhexose 의 생합성에 관여한다. dTDP-glucose synthase 가 aminoglycoside 생합성에 있어서 중요한 것은 이들이 이차 대사물질의 전구체로의 생합성 경로에 당이 진입하는 첫 번째 단계라는 것이다. 이차 대사 산물에서 흔히 발견되는 6-deoxyhexose 는 모두 dTDP-glucose 구조를 통하여 생성됨에 따라 dTDP-glucose synthase 유전자가 특이적인 이차 대사 생합성 유전자로서 보존성이 높다는 사실이 확립되어있다.

본 연구에서 aminoglycoside 생합성 유전자 분리의 효율적인 방법을 확립하기 위하여 dTDP-glucose synthase 의 보존 지역을 이용한 PCR 방법을 선택하였다. 이는 dTDP-glucose synthase 단계가 기술한 바와 같이 glucose 가 이차 대사 산물 생합성으로 진입하는 'committed' 단계이고 이러한 점에서 특이적이고도 보존성이 높을 것으로 예상되어지고 있기 때문이다.

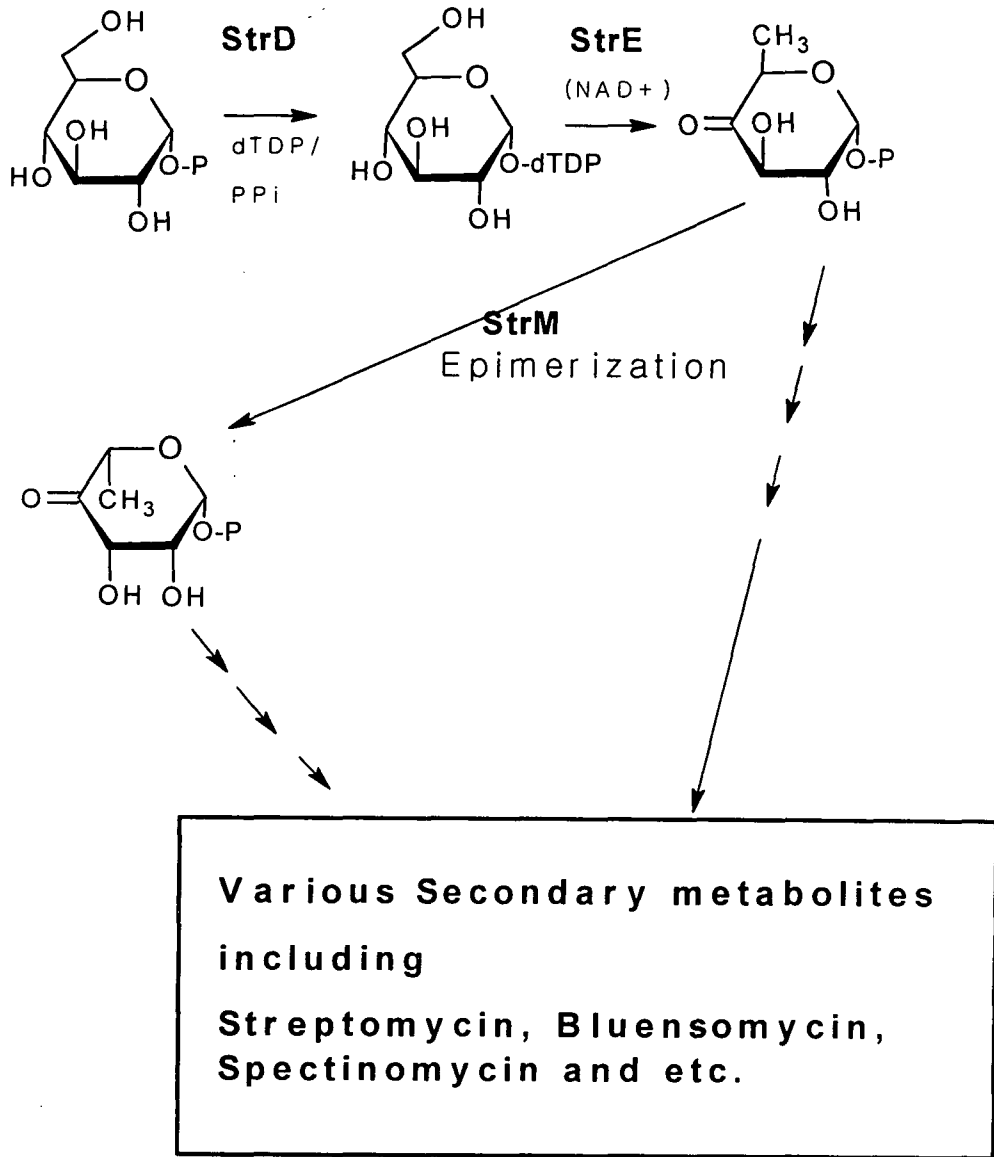


그림 10. 항생제를 포함한 많은 이차 대사 산물에서 당 moiety 로서 발견되는 6-deoxyglucose 의 생합성 경로. 지정된 생합성 효소 (유전자) 는 streptomycin 의 생합성 경로에서 확립된 효소들을 표시하였다.

## 1. 이차 대사에 특이적인 dTDP-glucose synthase 유전자의 분리를 위한 PCR primer의 설계

dTDP-glucose synthase를 지정하는 유전자를 지표로서 aminoglycoside 의 생합성 유전자를 분리하려는 전략은 대부분의 생합성 유전자들이 'cluster' 의 형태로 chromosome 상에서 함께 모여서 존재한다는 사실에 근거하여 수립한 것이다. 일부의 경우 두가지의 개별적인 항생제 생합성 유전자군까지 'cluster' 형태로 존재한다는 사실이 보고되어져있다 (*S. clavuligerus* 에서의 cephamycin C 와 clavulanic acid 생합성 유전자군, 이들을 지칭하여 'supercluster' 라는 용어까지 사용되어진다.).

Aminoglycoside 의 생합성 유전자 경우도 역시 'cluster' 의 형태로 존재하는 것으로 알려져있다 (*S. griseus* 와 *S. glaucescens* 의 streptomycin 생합성 유전자군과 *Micromonospora olivasterospora* 의 fortimicine 생합성 유전자군 등).

이와 같은 배경에 dDTP-glucose synthase 유전자를 분리하여 이를 이용하여 chromosome 상에서 생합성 유전자군을 분리하는 전략을 수립하였다.

PCR 의 설계는 GenBank 에 등재된 dTDP-glucose synthase 들을 분석하여 설계하였으며, 유전자 분리의 대상 균주로는 bluensomycin을 생산하는 *S. bluensis*, kanamycin을 생산하는 *S. kanamyceticus*, paromomycin을 생산하는 *S. rimosus*, spectinomycin을 생산하는 *S. spectabilis*, fortimicin을 생산하는 *Micromonospora olivasterospora* 를 선정하였다.

GenBank 에 등재된 dTDP-glucose synthase 유전자를 multiple alignment를 이용하여 분석하고 (그림 11) PCR 을 위한 보존 지역을 추론하였다.

Phylogenic tree 와 multiple alignment 분석을 통한 분석에서 보고되어진 dTDP-glucose synthase 들이 두 개의 group 으로 나누어짐을 관찰할 수 있었다(그림 12). 첫 번째 group 은 gram 음성균의 lipopolysaccharide 와 O-antigen 생합성에 관여하는 효소들이 속하는 것으로 관찰되었다. Gram 양성균에서 tylosin 과 pikromycin 의 생합성 관련 효소 또한 첫 번째 group 에 속하였다. 첫 번째 group 의 효소들은 아미노산 잔기 6-16 과 191- 198 부위에 높은 보존성을 보였다. 두 번째 group 에 속하는 효소들이 항생제를 비롯한 이차 대사의 생성에 관련하는 효소들이므로 관찰되어졌다. 첫 번째 group에서 관찰되어진 C-terminal '보존 지역' 외에 아미노산 잔기 100-109 영역에서 높은 보존성을 나타내었다. 관찰되어진 세 개의 영역에 대하여 PCR primer를 작성하였으며 작성된 primer를 이용하여 다양한 aminoglycoside 항생제 생산 균주에 대하여 dTDP-glucose synthase 유전자 증폭을 시도하였다. Primer 작성에 있어서는 actinomycetes 에서의 codon usage에 기초하였다



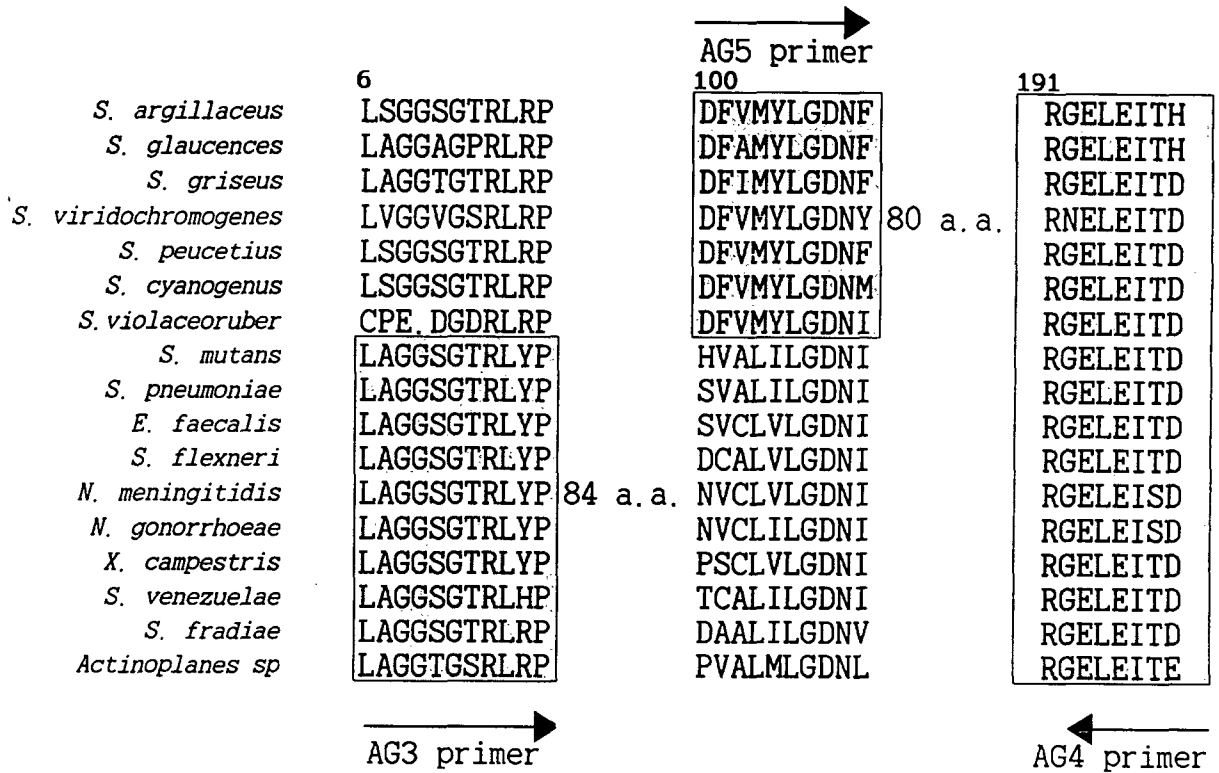


그림 11. dTDP-glucose synthase 에 특이적인 primer 작성을 위한 알려진 dTDP-glucose synthase 유전자의 multiple alignment 분석. 분석을 통하여 높은 보존성을 보인 부분 (본문 참조) 만을 표시하였으며 그림에 나타난 것과 같이 분석을 통하여 확립된 보존 영역의 서열을 이용하여 AG3 와 AG4 primer를 작성하였다. Mutiple alignment을 위하여 이용된 dTDP-glucose synthase 의 서열들은 GenBank에서 확보하였으며, 이들의 accession number 는 다음과 같다: *S. argillaceus* (GenBank accession number Y10907), *S. glaucences* (no. AJ006985.1), *S. griseus* (no. P08075), *S. peucetius* (no. L47163.1), *S. cyanogenus* (no. AF080235.1), *S. viridochromogenes* (no. Y11985.1), *S. violaceoruber* (no. L37334.1), *S. venezuelae* (no. AF079762.1), *S. fradiae* (no. S49053), *S. mutans* (no. P95778), *S. pneumoniae* (no. AF026471.1), *E. faecalis* (no. AF071085.1), *S. flexneri* (no. D55213), *N. meningitidis* (no. L09189.1), *N. gonorrhoeae* (no. P37762), *X. campestris* (no. P55256), and *Actinoplanes sp.* (no. Y18523.1).

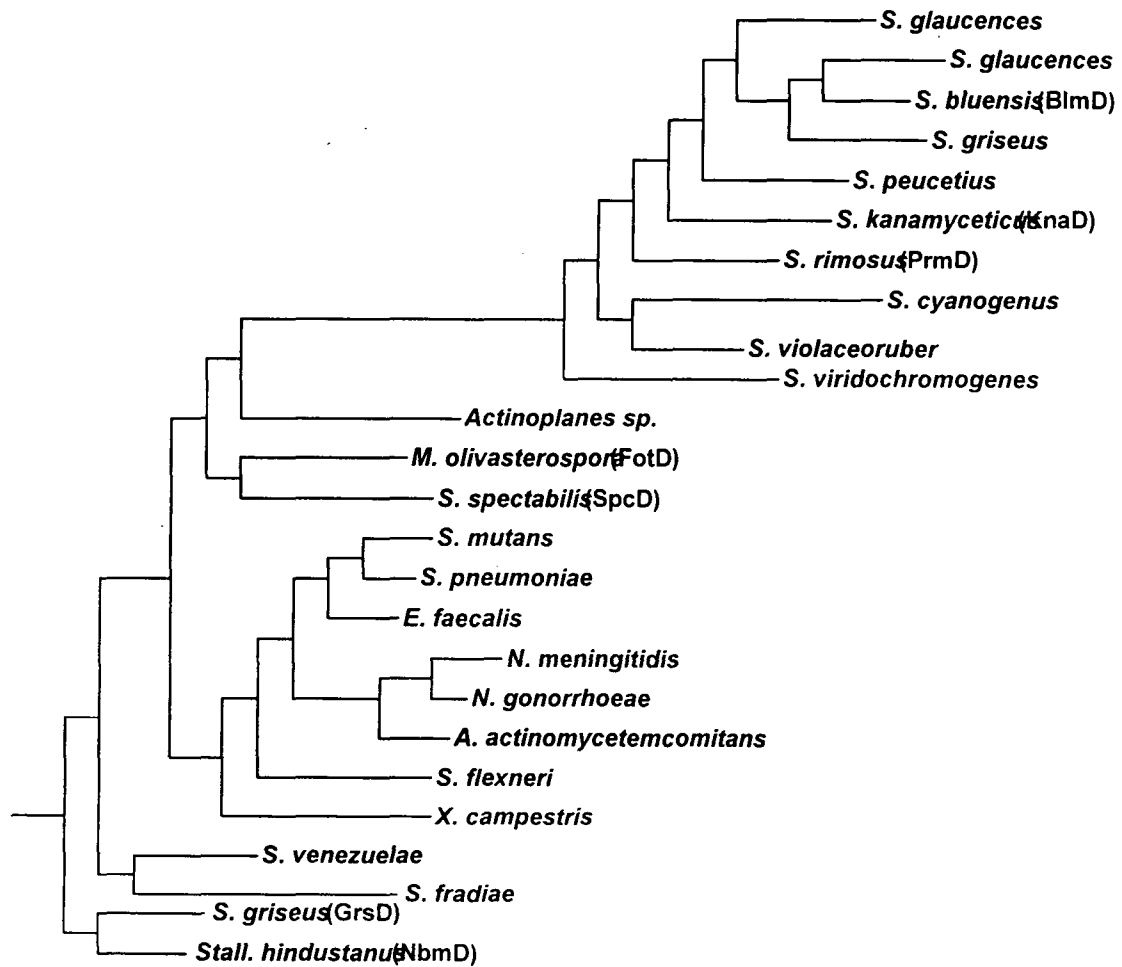


그림 12. dTDP-glucose synthase 들의 phylogenetic tree. 본 실험에 적용된 aminoglycoside 생합성 균주들은 bluensomycin을 생산하는 *S. bluensis* (BlmD), kanamycin을 생산하는 *S. kanamyceticus* (KnaD), paromomycin을 생산하는 *S. rimosus* (PmD), spectinomycin을 생산하는 *S. spectabilis* (SpcD), fortimicin을 생산하는 *Micromonospora olivasterospora* (FtmD). Phylogenetic tree 의 작성된 나머지 deduced amino acid 서열은 GenBank에서 확보하였다: *S. argillaceus* (GenBank accession number Y10907), *S. glaucences* (no. AJ006985.1), *S. griseus* (no. P08075), *S. peucetius* (no. L47163.1), *S. cyanogenus* (no. AF080235.1), *S. viridochromogenes* (no. Y11985.1), *S. violaceoruber* (no. L37334.1), *S. venezuelae* (no. AF079762.1), *S. fradiae* (no. S49053), *S. mutans* (no. P95778), *S. pneumoniae* (no. AF026471.1), *E. faecalis* (no. AF071085.1), *S. flexneri* (no. D55213), *N. meningitidis* (no. L09189.1), *N. gonorrhoeae* (no. P37762), *X. campestris* (no. P55256), and *Actinoplanes* sp. (no. Y18523.1).

## 2. PCR을 통하여 aminoglycoside 생산 균주로부터 dTDP-glucose synthase 유전자의 분리

선정된 aminoglycoside 생산 균주로부터 PCR을 통하여 dTDP-glucose synthase 유전자 단편을 분리하였으며 이들의 염기 서열을 결정하였다. 염기 서열로부터 추론된 아미노산 서열의 분석을 통하여 분리된 유전자가 dTDP-glucose synthase 유전자임을 확인하고 phylogenetic tree 의 작성을 통하여 본 방법의 효율성을 증명하였다 (그림 12).

### 3. Aminoglycoside 생합성 유전자군의 분리

분리된 dTDP-glucose synthase를 이용하여 이들이 위치한 aminoglycoside 생합성 유전자군의 분리를 시도하였다. 생합성 유전자군의 분리에 선택된 균주는 *S. bluensis*, *S. rimosus* 와 *S. spectabilis*로서 각각 bluensomycin, paromomycin 과 spectinomycin의 생산 균주이다. Bluensomycin의 경우 streptomycin과의 구조적 유사성에 기초하여 알려진 streptomycin의 생합성 유전자 구성과의 비교 실험에 연구 가치가 있으며 bluensomycin의 blensidine, spectinomycin의 actinamine 과 spectinomycin의 actinospectose가 보이는 특이한 구조로서 이들의 생합성 경로의 확립 및 생합성 유전자에 대한 연구에 가치가 있다고 할 수 있다.

PCR을 통하여 증폭된 절편들을 cloning한 후 염기 서열을 결정하였다. PCR 반응의 조건은 50  $\mu$ l 반응액에서 [94  $^{\circ}$ C, 3 min]- [30 amplification cycle: 98  $^{\circ}$ C, 20 sec; 67  $^{\circ}$ C, 1 min]-[72  $^{\circ}$ C, 10 min]의 조건에서 진행하였다. PCR로 증폭된 DNA들을 pGEM-T vector에 ligation한 후 *E. coli*로 형질 전환하여 cloning을 시도하였다.

#### 가. Bluensomycin 생합성 유전자군

*S. bluensis* chromosomal DNA에서 4-kb *Bam*HI 영역에서 *S. bluensis* 유래의 dTDP-glucose synthase 유전자에 대한 hybridization 신호를 관찰하였다. *S. bluensis* 유래의 4-kb *Bam*HI DNA 영역을 분리하여 Bluescript KS(+)에 ligation한 후 *E. coli*에 mini-library를 작성하였다. 작성된 Mini-library를 대상으로 plasmid isolation, PCR 증폭을 실시하여 dTDP-glucose synthase가 포함된 DNA의 clone을 얻었다. Cloning된 4-kb *Bam*HI 영역의 염기 서열을 결정하였으며 (GenBank accession number AF126354). 결정된 염기 서열을 분석하여 3개의 완전한 coding region이 존재함을 관찰하였다. Aminotransferase 유전자 (*blmS*), streptomycin 생합성 유전자군의 *strT*와 유사성을 보이는 유전자 (*blmT*)와 dTDP-glucose synthase 유전자 (*blmD*)가 존재함을 확인하였다. 예측한 바와 같이 BlmD는 StrD와 높은 유사성을 보였으며 (그림 13), *blmD*와 인접하여 dTDP-glucose 4,6-dehydratase 유전자 (*blmE*)가 존재함을 확인하였다.

또한 bluensomycin 생합성 유전자군을 분리하기 위하여 pDW103(그림 14)을 이용하여 *S. bluensis* ATCC27420의 cosmid library를 구축하였고, dTDP-glucose synthase 유전자를 probe로 하여 screening하였다. pDW103은 유전자 cloning을 위하여 동화약품(주)과의 공동 연구의 일환으로 제조된 *E. coli*-*Streptomyces* shuttle cosmid이다. 대부분의 shuttle cosmid가 apramycin 내성 유전자로서 *E. coli*와 *Streptomyces*에서의 형질 전환체를 선별하도록 되어있는데 aminoglycoside 생산 균주의 항생제 생산성 연구에 있어서 apramycin의 이용이 장애가 될 가능성이 높으므로 pOJ446 cosmid vector에 thiostrepton 내성을 지정하는 유전자와 ampicillin 내성을 지정하는 유전자를 삽입하여

pDW103을 제조하였다. Thiostrepton 내성 유전자는 pIJ702 유래의 1.1-kb *BamH I* 절편을 ampicillin 유전자는 pBR322 유래의 1.1-kb *EcoR I* -*Dra I* 절편을 이용하였다. 30 kb insert를 갖는 cosmid를 선발하였고 현재 약 8 kb의 염기서열이 결정되었다. 염기서열 분석결과 12 ORF가 확인되었고 deduced amino acid의 비교로 각 gene product의 기능을 추정하였다(그림 15).

BlmS 는 Streptomycin 생합성 유전자군의 StrS 와 유사성을 보임에 따라 bluensidine 의 생합성에 관련하는 aminotransferase 로 추정되고, BlmT 는 Streptomycin 생합성 유전자군의 StrT 와 유사성을 보이지만 그 기능은 명확히 추론하기 어렵다. BlmD 는 Streptomycin 생합성 유전자군의 StrD 와 유사성을 보임에 따라 streptose 의 생합성에 관련하는 dTDP-glucose synthase 로 추정된다.

여 백

Score = 1453 (668.0 bits), Expect = 6.6e-192, P = 6.6e-192  
 Identities = 280/354 (79%), Positives = 314/354 (88%)

```

BlmD:    1 MKALVLAGGSGTRLRPITHHTSAKQLVPVANKPVLFGLEAIAAAGIKNVGLIVGMSGDI 60
          MKALVLAGG+GTRLRPITHHTSAKQLVPVANKPVLFGLEAI AAGI +VG++VGD + +I
StrD:    1 MKALVLAGGTGTRLRPITHHTSAKQLVPVANKPVLFGLEAIRAAGIIDVGIVGDTADEI 60

BlmD:    61 SEAVGDGSKFGLSISYIEQREPLGLAHAVLISRDLGEDDFAMYLGNDFIVGGIDEVRE 120
          AVGDGS+FGL +SYI Q +PLGLAH VLISRDLGEDDF MYLGNDF+VG +++ VRE
StrD:    61 VAAVGDGSRFGLKVSYPQSKPLGLAHCVLISRDLGEDDFIMYLGNDFVVGVEDSVRE 120

BlmD:    121 FRRDRPDAHLLTHVSDPQSFVVAELDATGRVGRGLEEKPRHPKSDLALVGIVLFSPIHE 180
          FR RPD AHL+LT V +P+SFGVAEL +G+V GLEEKP HPKSDLALVGIVLFSPIHE
StrD:    121 FRAARPDAHMLTRVPEPRSFVVAELSDSGQVGLGLEEKPAHPKSDLALVGIVLFSPIHE 180

BlmD:    181 AVRAVKPSWRGELEITDAVQWLIDTGKDVRSRQITGYWKDTGNVSDMLEVNRLVLETIDP 240
          AV A+ PSWRGELEITDAVQWLID G+DVRS I+GYWKDTGNV+DMLEVNRLVLET +P
StrD:    181 AVAAITPSWRGELEITDAVQWLIDAGRDRVSTVISGYWKDTGNVDMLEVNRLVLETTEP 240

BlmD:    241 HCAGHVDEHSDLVGRVQVDDGAVVRNSRVVGPVIGAGSVVVDVSYVGPFTSIGEDCVIED 300
          C G VDE SDL+GRV V++GA VRNSRV+GP VIGAG+ V +SYVGPFTS+ EDCV+ED
StrD:    241 RCDGLVDERSDLIGRVLVEEGA EVRNSRVMGPTVIGAGTRVINSYVGPFTSLAEDCVVED 300

BlmD:    301 SEVEFSIVLRRASLSGVRREASLIGRHVQVTSAPPVPHAHRLVLGDHSAQIS 354
          SEVEFSIVLR AS+SGVRR+EASLIGRHVQVTSAP VPHAHRLVLGDHS AQIS
StrD:    301 SEVEFSIVLRGASISGVRRIEASLIGRHVQVTSAPVPHAHRLVLGDHSRAQIS 354
  
```

그림 13. BlmD 와 StrD 의 아미노산 서열 비교.

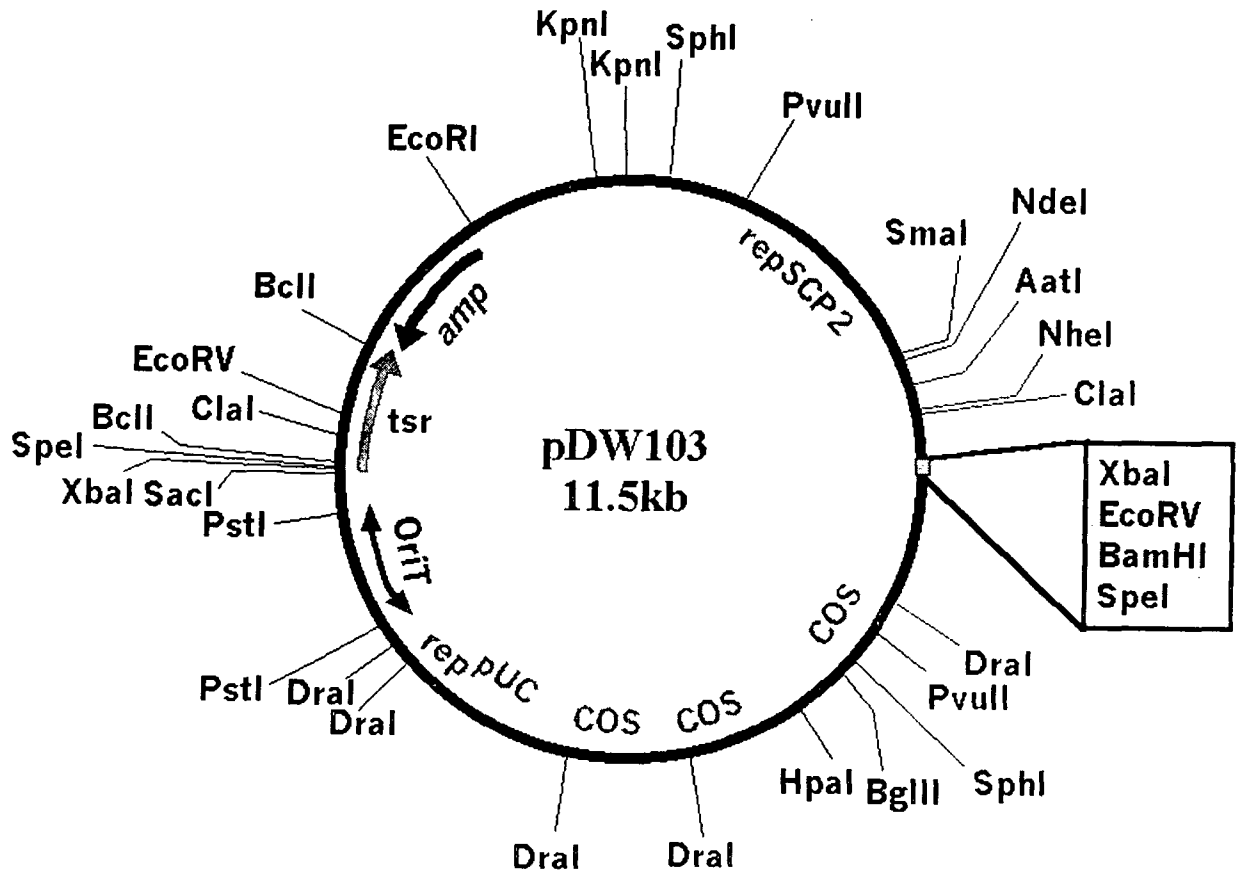
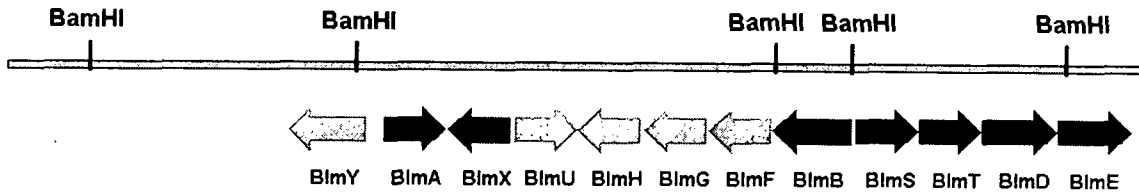


그림 14. *E. coli*-*Streptomyces* shuttle cosmid vector, pDW103 의 restriction map. *S. spectabilis* 의 genomic DNA를 *Sau3A* I 으로 partial digestion 한 후 pDW103 의 *BamH* I / *Hpa* I 에 ligation 한 후 library 작성에 이용하였다.





Enzyme Name	Amino Acids	Postulated Function
BlmT	319aa	Unknown
BlmX	258aa	Methyltransferase (N-methyl-L-glucosamine)
BlmB	348aa	Amidinotransferase (aminocyclitol)
BlmS	379aa	Amidinotransferase (N-methyl-L-glucosamine)
BlmD	356aa	dTDP-glucose synthase (streptose)
BlmE	327aa	dTDP-glucose 4.6-dehydratase (streptose)

그림 15. Bluensomycin 생합성 유전자

#### 나. Paromomycin 생합성 유전자군

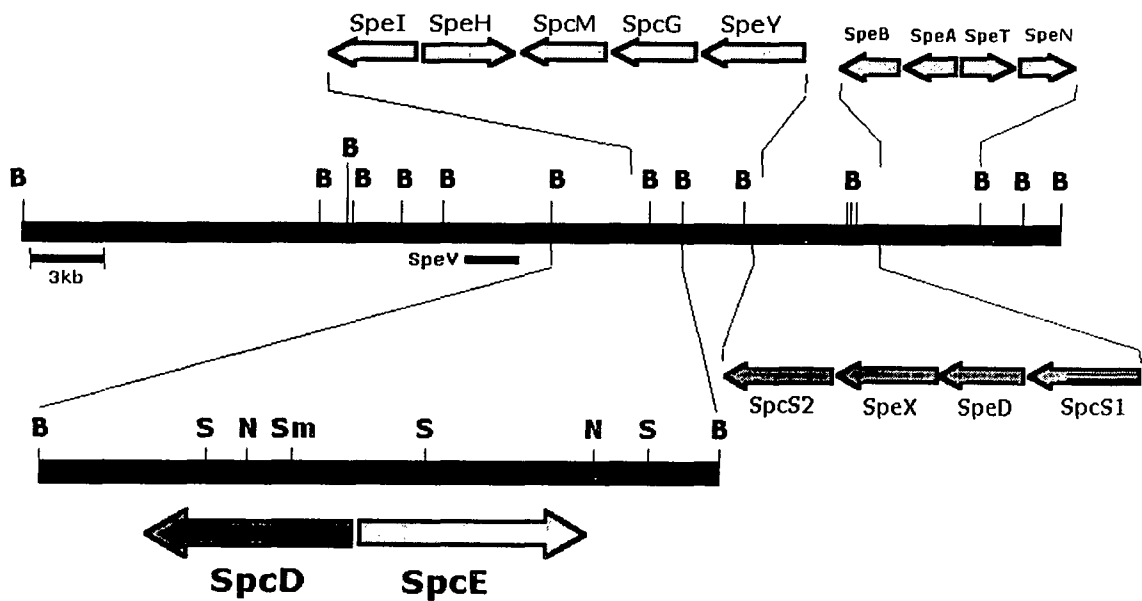
*S. rimosus* chromosomal DNA에서 6-kb *Bam*H I 영역에서 *S. rimosus* 유래의 dTDP-glucose synthase 유전자에 대한 hybridization 신호를 관찰하였다. *S. rimosus* 유래의 6-kb *Bam*HI DNA 영역을 분리하여 Bluescript KS(+) 에 ligation 한 후 *E. coli* 에 mini-library를 작성하였다. 작성된 Mini-library를 대상으로 plasmid isolation, PCR 증폭을 실시하여 dTDP-glucose synthase 가 포함된 DNA의 clone을 얻었다. Cloning 된 6-kb *Bam*HI 영역의 염기 서열을 결정하였으며, 염기 서열의 분석을 통하여 dTDP-glucose synthase, dTDP-glucose 4,6-dehydratase, glycosyltransferase 유전자의 존재를 확인하였다. 따라서, 본 유전자가 이차 대사의 당 대사에 특이적인 6-deoxyhexose 생합성에 관련하고 있음을 확인하였다. *S. rimosus* 유래의 유전자에 대하여는 염기 서열 결정을 계속 수행하고 있으며 분리된 유전자가 paromomycin 생합성을 지정하는 유전자군의 일부인지를 규명하기 위하여서는 나머지 영역에 대한 유전자 분석이 필요할 것으로 사료된다.

#### 다. Spectinomycin 생합성 유전자군

Spectinomycin 은 세계적으로 그 생합성 경로가 아직 명확히 밝혀져 있지 않으므로 그 생합성 유전자의 분리와 기능 분석이 다른 항생제 유전자들에 비하여 높은 가치를 갖고 있다고 판단된다. 따라서, *S. spectabilis* 의 경우 pDW103 (그림 14)를 이용하여 genomic library를 작성하고 dTDP-glucose synthase 유전자를 탐침으로 screening을 실시하였다.

Library 구축을 위하여서 pDW103 DNA를 *Bam*H I /*Hpa* I 으로 절단하여 이용하였다. *S. spectabilis* 의 genomic DNA 를 *Sau*3A I 으로 'partial digestion' 한 후 탈인산화된 *Bam*H I /*Hpa* I -pDW103 에 ligation 하였다. 얻어진 ligation mixture는 Stratagene (La Jolla, CA) 의 Gigapack II-XL lambda extract를 이용하여 *in vitro* packaging 한 후 *E. coli* XL-1-Blue MRF' 의 형질 전환에 이용하였다.

구축된 library를 대상으로 screening을 시도하여 두 개의 positive clone을 분리하였으며, 각 clone 은 30-kb 의 *S. spectabilis* 유래의 DNA를 함유하며 Southern blot 분석을 통하여 두 개의 clone 이 15-kb 영역에서 overlapping 됨을 확인하였다. 따라서, dTDP-glucose synthase 유전자가 포함되어있는 45-kb DNA를 *S. spectabilis* 로부터 분리하였으며 그 분석 결과로 2 건의 특허를 출원하였다. 현재 45-kb 영역의 염기 서열 결정을 완료하였으며, 염기 서열 분석을 통하여 16 개의 ORF 가 존재함을 확인할 수 있다 (그림 16).



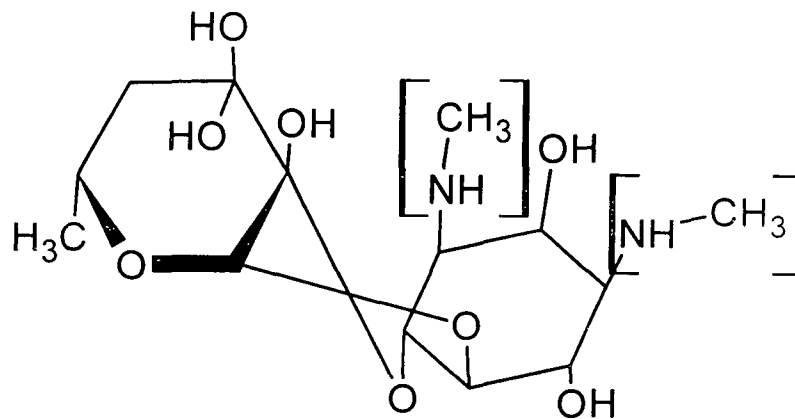
Enzyme Name	Amino Acids	Postulated Function
SpcD	291 aa	dTDP-glucose synthase
SpcE	330 aa	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
SpeI	309 aa	Keto-isomerase
SpeH	345 aa	Dehydrogenase
SpcM	268 aa	Methyltransferase
SpcG	273 aa	Glycosyltransferase
SpeY	302 aa	Unknown
SpcS2	439 aa	L-glutamine: <i>scyllo</i> -inosose aminotransferase
SpeX	396 aa	Unknown
SpeD	266 aa	Unknown
SpcS1	442 aa	PLP-dependent dehydrogenase
SpeB	374 aa	<i>myo</i> -inositol-dehydrogenase
SpeA	265 aa	<i>myo</i> -inositol-monophosphatase
SpeT	419 aa	ABC transporter
SpeN	310 aa	Resistance

그림 16. Spectinomycin 생합성 유전자

그림 16 에 보여지듯이 divergent 한 경향으로 위치한 두 유전자는 *strD* 와 *strE* 와 높은 유사성을 보였다. 이들 유전자를 각각 *spcD*, *spcE* 라 명명하였으며, dTDP-glucose synthase 와 인접하여 dTDP-glucose 4,6-dehydratase 가 위치함에 근거하여 본 유전자군이 spectinomycin 생합성 유전자군임을 예상할 수 있었다. Glycosyltransferase를 지정하는 유전자 (*spcG*) 와 N-methyltransferase를 지정하는 유전자 (*spcM*) 도 확인되었다 (그림 16). Spectinomycin 이 화학 구조상 다른 aminoglycoside 와 구별되는 것이 특이적인 actinamine 의 존재이다 (그림 17). Actinamine 은 streptomycin 의 streptidine 과 같이 *myo*-inositol pathway 에 의하여 생성되는 aminohexitol 계열의 화합물이다. Streptidine 생합성 경로에서 amine group 에 작용하는 amidinotransferase 의 작용에 의해 두 개의 guanidine group 이 존재하는 것에 기초하여 볼 때 actinamine 의 경우 amine group 에 N-methyltransferase 가 작용된 것이라고 예상할 수 있다 (그림 18). 따라서, *S. spectabilis* 에서 분리된 유전자군내에서 N-methyltransferase 유전자를 발견한 것은 분리된 45-kb DNA 에 spectinomycin 생합성을 지정하는 유전자들이 포함되어 있다는 것을 뒷받침해주는 결과이다.

SpeY, SpeX, SpeD의 경우 기능이 알려진 단백질들과 유사성을 보이지 않으므로 그 기능을 명확히 추론하기는 어려운 것으로 나타났다. *spcS1* 와 *spcS2* 의 경우 deduced amino acid 수준에서 4-aminobutyrate aminotransferase 와 L-glutamine:*scyllo* inosose aminotransferase 에 높은 유사성을 보였다. SpcS2 (*scyllo* inosose aminotransferase) 와 SpcM (N-methyltransferase) 는 actinamine 의 생합성 경로에 관여하며, SpcD (dTDP-glucose synthase) 와 SpcE (dTDP-glucose dehydratase) 는 6-deoxyhexose 생합성에 관여하는 것으로 판단되어진다. SpcG 의 경우 이들 두 당 유도체의 결합에 관여하는 것으로 판단되어진다.

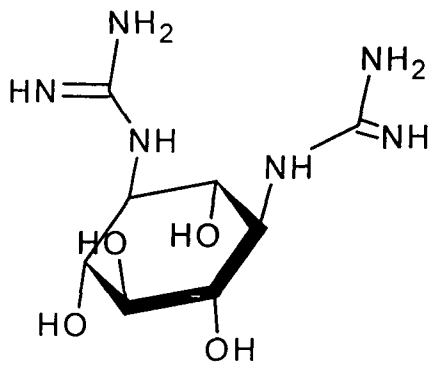
이상의 유전자의 기능을 분석하여 actinospectose (그림 19)와 actinamine (그림 20) 생합성 경로를 제안할 수 있었다.



**6-Deoxyhexose**

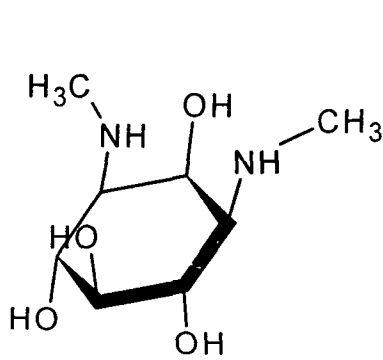
**Actinamine**

그림 17. Spectinomycin 의 화학 구조. Spectinomycin 에 특이적인 N-methyl group을 괄호로 표시하였다.



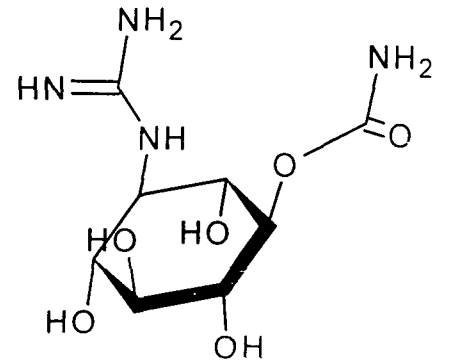
**"Streptidine"**

**in streptomycin**



**"Actinamine"**

**in spectinomycin**



**"Bluensidine"**

**in bluosomycin**

그림 18. Aminoglycoside에서 발견되는 streptomine 계열의 당 구조. Streptomycin 에 존재하는 streptidine, spectinomycin 에 존재하는 actinamine, bluosomycin 에 존재하는 bluensidine 의 구조를 도식화하였다.

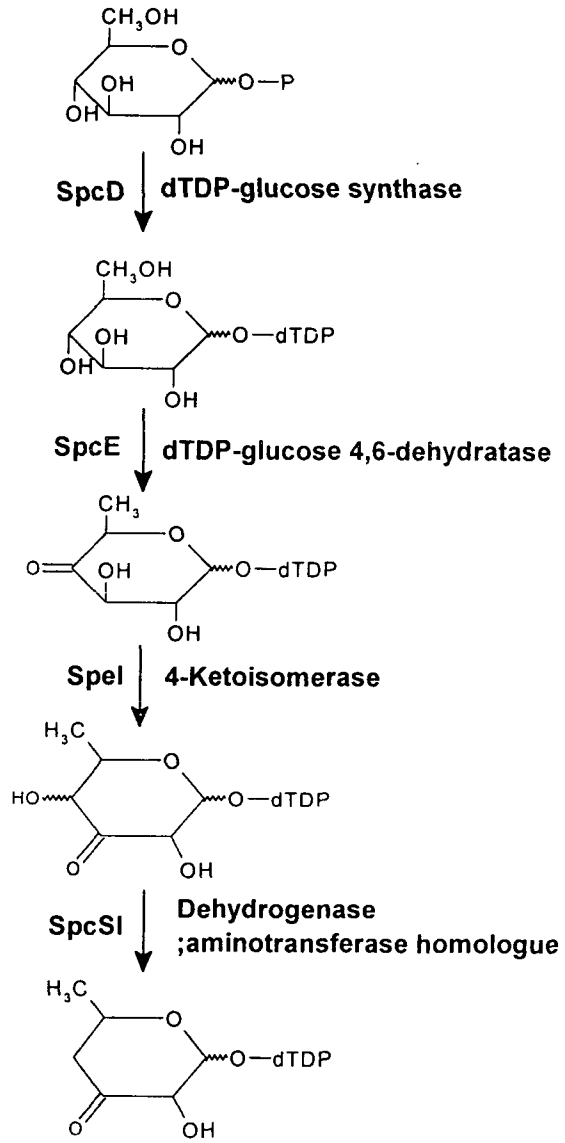


그림 19. Actinospectose 생합성 경로

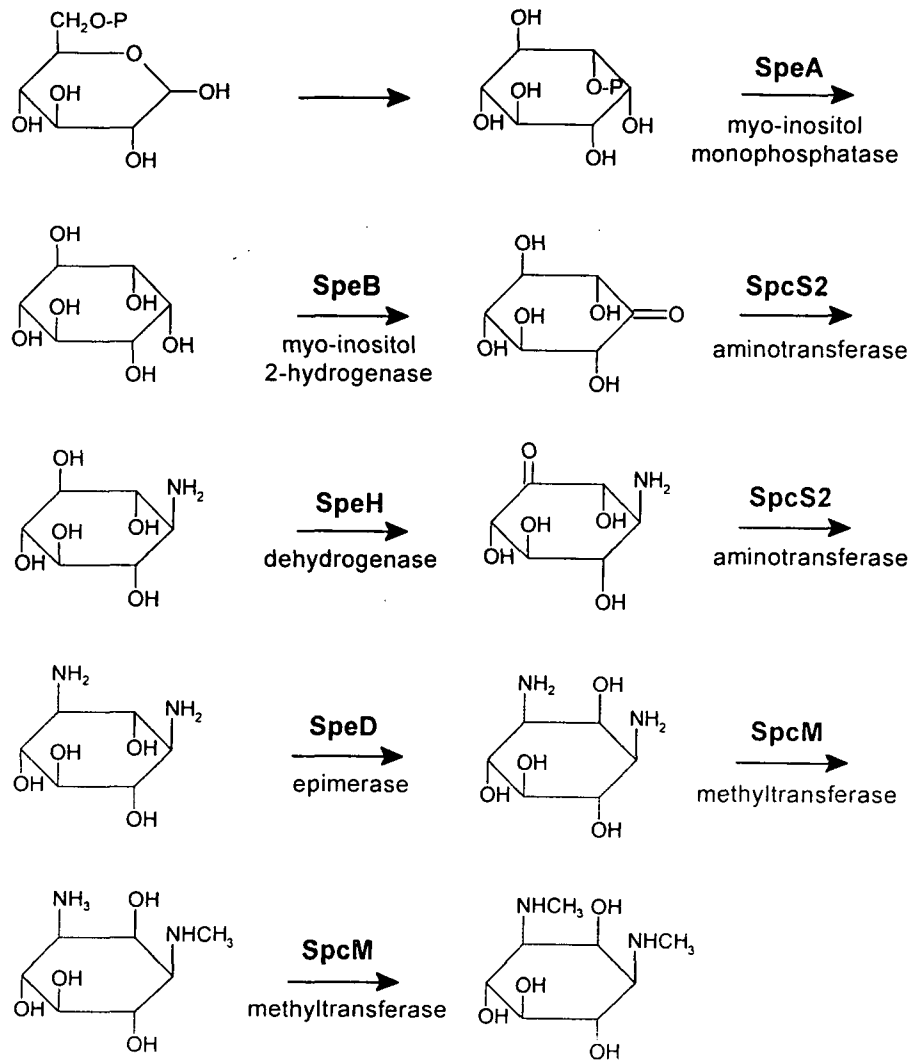


그림 20. Actinamine의 생합성 경로



## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 연구과제의 궁극적인 목적은 aminoglycoside계 항생제 생합성 경로와 유전자 분석으로 새로운 신규항생물질의 창출에 있다. 본 연구진은 isovaleryl transferase 유전자를 *S. griseus* 에 형질 전환하여 기존의 aminoglycoside계 내성세균에 강한 살균력이 있는 물질을 생산하는 균주를 개발하여 특허화 하였다 (등록번호: 0261821). 그리고 신규 aminoglycoside 항생물질의 생산 최적조건을 확립하였으며 분리 및 구조결정도 시도되었다. 그러나, 아쉽게도 분리한 aminoglycoside 항생제가 isovaleryl 유도체가 아님이 판명되었으나 이 물질이 추정하지 못한 새로운 물질일 가능성이 있다. 이 물질의 생성 원인을 확립하는 것은 흥미있는 연구 과제 라고 사료된다. 또한, 본 연구를 통하여 확립된 기술은 신규 aminoglycoside계 항생물질 창출에 기반기술로 이용될 것이다.

본과제의 또 하나의 성과는 *Stall. hindustanus*에서 aminoglycoside계 항생제 다제내성 유전자 분리에 있다. *nbrB* 다제내성 유전자는 생명공학 실용화 사업 일단계에서 개발된 *amr*과 함께 신규 hybrid 항생제 창출을 위한 vector 개발에 유용하게 사용될 것이다.

Bluensomycin 생산 균주인 *S. bluensis*, paromomycin 생산 균주인 *S. rimosus*, kanamycin 생산 균주인 *S. kanamyceticus*, spectinomycin 생산 균주인 *S. spectabilis* 와 같은 다양한 aminoglycoside 생산 균주로의 isovaleryl transferase 유전자 도입을 완료하였으며, 도입이 성공적으로 이루어진 균주를 대상으로 새로운 항생제의 생산을 탐색하고 있으므로 곧 실용화 가능성이 높은 신물질의 개발에 큰 진전을 이룰 수 있을 것으로 사료된다. 또한 이 연구를 통하여 신물질 개발을 위한 유전자 조작에 있어서 필수적인 형질 전환에 관한 기술을 축적하였다. 이는 고전적인 transformation 기술을 완벽히 습득하여 실행하는 능력과 transformation 방법의 보완책으로서 conjugation 방법을 도입함으로써 이루어진 것이다. 이러한 기술의 습득은 유용 미생물 개발을 위한 유전자 조작에 있어서 가장 핵심적인 기술에 속한다고 할 수 있겠다.

무엇보다도 본 연구의 두드러진 연구업적은 새로운 구조의 항생제 창출을 위한 aminoglycoside 생합성 유전자원의 분리 확보이다. 새로운 구조의 항생제 창출을 위한 유전자원 확보를 위하여 spectinomycin, bluensomycin 등의 생합성 유전자를 분리 확보하여 국제적인 수준에 도달된 것으로 판단되며 이 연구로 2 건의 특허를 출원하였다. 확보된 유전자는 이후의 유전자 조작을 통한 새로운 생리 활성 물질의 개발에 유용한 자원이 될 수 있으리라 믿어진다. Bluensomycin 의 생합성 유전자군으로부터 빠른 시간 내에 분리가 가능한 cabamoyl transferase 는 aminoglycoside 생합성 경로에 있어서 bluensomycin 의 경우에서만 발견되는 것으로 이 유전자의 작용에 대한 기작을 이해하는 것은 훌륭한 학문적 성과라고 생각되며 이를 응용하여 aminoglycoside 의 생합성 경로를 변형하여 cabamoyl 유도체를 개발하는데 이용될 수 있을 것이다.

Spectinomycin 의 생합성 유전자의 경우 이 항생제의 생합성을 지정하는 전체 유전자 영역의 분리에 성공하였다. 이는 유전자 자원의 확보라는 관점에서 그 자체로 대단한

파급 효과가 있는 성과인 것이다 (두개의 특허를 출원하였음). 또한 spectinomycin 생합성 경로의 확립이 가능하여졌으며 기능이 확립된 spectinomycin 생합성 유전자를 이용한 신물질 개발의 가능성은 광범위하여 본 연구진의 고무감은 매우 특별한 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

생명공학 국책과제 연구과정에서 개발된 새로운 항균효과를 나타내는 *S. griseus*에서 신규 물질에 대한 구조를 분석하고 이에 대한 항균범위와 인체독성 등의 연구로 산업화 가능성을 타진할 것이며 현재 본 연구과제에서 확보된 유전자원을 기초로 한 몇가지 신규 항생물질 구조설계와 개발 전략이 수립된 바, 우선 상기의 유전자원 자체에 대한 특허뿐만 아니라 이 유전자원을 이용한 HYBRID 항생물질 개발 방법에 대한 idea 특허도 조속히 신청할 예정이다.

또한 상기의 개발전략을 실험적으로 증명코자 유전자조작을 통한 신규 항생물질 창출을 지속적으로 진행시킬 계획이다. 아울러 확보된 유전자원과 pool를 이용하여 다양한 당구조 함유 생리활성물질 변환 및 창출에도 적용할 수 있는 범용기술로 개발하여 그 활용범위를 넓혀가고자 한다.

## 제 6 장 참고문헌

- ▶ Arisawa A, Kawamura N, Takeda K, Tsunekawa H, Okamura K, Okamoto R. Cloning of the macrolide antibiotic biosynthesis gene *acyA*, which encodes 3-O-acyltransferase, from *Streptomyces thermotolerans* and its use for direct fermentative production of a hybrid macrolide antibiotic. *Appl. Environ. Microbiol.* 1994. 60(7):2657-60
- ▶ Arisawa A, Kawamura N, Tsunekawa H, Okamura K, Tone H, Okamoto R. Cloning and nucleotide sequences of two genes involved in the 4''-O-acylation of macrolide antibiotics from *Streptomyces thermotolerans*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1993 Dec;57(12):2020-5.
- ▶ Arisawa A, Kawamura N, Narita T, Kojima I, Okamura K, Tsunekawa H, Yoshioka T, Okamoto R. Direct fermentative production of acyltylocins by genetically-engineered strains of *Streptomyces fradiae*. *J. Antibiotics* 1995 49:349
- ▶ Baltz RH. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* 1998. 6(2):76-83
- ▶ Decker H, Haag S. Cloning and characterization of a polyketide synthase gene from *Streptomyces fradiae* Tu2717, which carries the genes for biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A and a gene probably involved in its oxygenation. *J. Bacteriol.* 1995. 177(21):6126-6136
- ▶ Epp JK, Huber ML, Turner JR, Goodson T, Schoner BE. Production of a hybrid macrolide antibiotic in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces lividans* by introduction of a cloned carbomycin biosynthetic gene from *Streptomyces thermotolerans*. *Gene.* 1989 Dec 28;85(2):293-301.
- ▶ Floss HG, and Strohl WR. Genetics engineering of hybrid antibiotics. A Progress Report, *Tetrahedron*, 1991, 47:6045-6058
- ▶ Hopwood DA, Sherman DH. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* 1990. 24:37-66
- ▶ Hopwood DA. Genetic engineering of *Streptomyces* to create hybrid antibiotics. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1993. 4(5):531-537
- ▶ Huang G, Okamoto R, Hikita A, Park YS, Okabe M. Optimization of conditions for

conversion of tylosin to a novel antibiotic, acetyl-isovaleryl tylosin(AIV), by *Streptomyces thermotolerans* and scale-up to 200-liter pilot scale fermentor. *J. Ferment. Bioeng.* 1997 84:77

- ▶ Hutchinson CR. Biosynthetic studies of daunorubicin and tetracenomyacin C. *Chem. Rev.* 1997. 97(7):2525-2535
- ▶ Hwang CK, Kim HS, Hong YS, Kim YH, Hong SK, Kim SJ, Lee JJ. Expression of *Streptomyces peucetius* genes for doxorubicin resistance and aklavinone 11-hydroxylase in *Streptomyces galilaeus* ATCC 31133 and production of a hybrid aclacinomyacin. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1995. 39(7):1616-1620
- ▶ Hyun CG, Kim SS, Sohng JK, Hahn JJ, Kim JW, Suh JW. An efficient approach for cloning dNDP-glucose synthase gene from actinomycetes and its application in *Streptomyces spectabilis*, a spectinomycin producer. *FEMS Microbiol Lett.* 2000. 183; 183-189
- ▶ Katz L, Donadio S. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* 1993. 47:875-912
- ▶ Katz, L. Manipulation of modular polyketide synthases *Chem. Rev.* 1997. 97:2557-2575
- ▶ Khosla C. Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthases. *Chem. Rev.* 1997. 97:2577-2590
- ▶ Kim HS, Hong YS, Kim YH, Yoo OJ, Lee JJ. New anthracycline metabolites produced by the aklavinone 11-hydroxylase gene in *Streptomyces galilaeus* ATCC 31133. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1996. 49(4):355-360
- ▶ Kuhstoss S, Huber M, Turner JR, Paschal JW, Rao RN. Production of a novel polyketide through the construction of a hybrid polyketide synthase. *Gene* 1996. 183(1-2):231-236
- ▶ Lau J, Fu H, Cane DE, Khosla C. Dissecting the role of acyltransferase domains of modular polyketide synthases in the choice and stereochemical fate of extender units. *Biochemistry* 1999. 38(5):1643-1651
- ▶ Madduri K, Kennedy J, Rivola G, Inveni-Solari A, Filippini S, Zanuso G, Colombo AL, Gewain KM, Occi JL, MacNeil DJ, Hutchinson CR. Production of the antitumor drug epirubicin (4'-epidoxorubicin) and its precursor by a genetically engineered strain of *Streptomyces peucetius*. *Nat. Biotechnol.* 1998. 16(1):69-74

- ▶ Marsden AF, Wilkinson B, Cortes J, Dunster NJ, Staunton J, Leadlay PF. Engineering broader specificity into an antibiotic-producing polyketide synthase. *Science* 1998. 279(5348):199-202
- ▶ McDaniel R, Ebert-Khosla S, Hopwood DA, Khosla C. Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* 1993. 262(5139):1546-1550
- ▶ Niemi J, Mantsala P. Nucleotide sequences and expression of genes from *Streptomyces purpurascens* that cause the production of new anthracyclines in *Streptomyces galilaeus*. *J. Bacteriol.* 1995. 177(10):2942-2945
- ▶ Okamoto R, Fukumoto T, Nomura H, Kiyoshima K, Nakamura K, Takamatsu A, Naganawa H, Takeuchi T, Umezawa H. Physico-chemical properties of new acyl derivatives of tylosin produced by microbial transformation. *J Antibiot (Tokyo)*. 1980a Nov;33(11):1300-8.
- ▶ Okamoto R, Tsuchiya M, Nomura H, Iguchi H, Kiyoshima K, Hori S, Inui T, Sawa T, Takeuchi T, Umezawa H. Biological properties of new acyl derivatives of tylosin. *J Antibiot (Tokyo)*. 1980b Nov;33(11):1309-15.
- ▶ Seow KT, Meurer G, Gerlitz M, Wendt-Pienkowski E, Hutchinson CR, Davies JA study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. *J. Bacteriol.* 1997. 179(23):7360-7368
- ▶ Shaw KJ, Rather PN, and Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbial Rew.* 1993. 57;138-163
- ▶ Solenberg PJ, Matsushima P, Stack DR, Wilkie SC, Thompson RC, Baltz RH. Production of hybrid glycopeptide antibiotics in vitro and in *Streptomyces toyocaensis*. *Chem. Biol.* 1997. 4(3):195-202
- ▶ Stachelhaus T, Schneider A, Marahiel MA. Rational design of peptide antibiotics by targeted replacement of bacterial and fungal domains. *Science* 1995. 269(5220):69-72
- ▶ Strohl WR, Connors NC. Significance of anthraquinone formation resulting from the cloning of actinorhodin genes in heterologous streptomycetes. *Mol. Microbiol.* 1992 6(2):147-152
- ▶ Tohma et al. Ashimycin A and B, new streptomycin analogues. *J. Antibiotic* 1989

- ▶ Xue Y, Wilson D, Zhao L, Liu Hw, Sherman DH. Hydroxylation of macrolactones YC-17 and narbomycin is mediated by the pikC-encoded cytochrome P450 in *Streptomyces venezuelae*. Chem. Biol. 1998. 5(11):661-667
- ▶ Ylihonko K., Hakala J., Kunnari T., Mantsala P. Production of hybrid anthracycline antibiotics by heterologous expression of *Streptomyces nogalater* nogalamycin biosynthesis genes. Microbiology 1996. 142 :1965-1972