

M1-0027000006-01H020013710

방선균에서 균체 분화와 이차 대사 산물 생합성
조절인자에 관한 연구

Studies on the connecting the intracellular and
extracellular mediators of development in antibiotic producing
Streptomyces species

서울대학교 생명과학부

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “방선균에서 균체 분화와 이차대사산물 생합성 조절인자에 관한 연구”
과제의 보고서로 제출합니다.

2002. 12. 9

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 이 계 준

연 구 조 원 : 김 성 근
김 대 위

협동연구기관명 : John Innes Centre

협동연구책임자 : K. Chater

보고서초록

과제관리번호	M1-0027000006 -01H020013710	해당단계 연구기간	2002. 12. 1 ~ 2002. 11. 30	단계 구분	(해당단계)/(총단계)
연구사업명	중 사업명	과학기술국제화사업			
	세부 사업명	국제공동연구사업			
연구과제명	중 과제명	방선균에서 균체 분화와 이차대사산물 생합성 조절인자에 관한 연구			
	세부(단위)과제명				
연구책임자	이 계 준	해당단계 참여연구원수	총 : 3 명 내부 : 3 명 외부 : 명	해당단계 연구비	정부: 38,000 천원 기업: 천원 계: 천원
연구기관명 및 소속부서명	서울대학교 생명과학부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 영국		상대국연구기관명 : John Innes Centre		
위탁 연구					
요약 (연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	136
<p>방선균에서 균체분화와 항생물질의 생합성을 조절하는 인자를 규명하고 해당 인자를 생합성하는 유전자의 구조와 그 발현 양상을 동시에 연구하여 항생물질 생합성과 균체 분화와의 관계성을 규명하는 기초연구를 수행하여 장차 산업적으로 항생물질 생산의 생산 수율을 증진하는 원리를 개발하여 실제 활용코자 하였다.</p> <p><i>S. clavuligerus</i>에서 (p)ppGpp 생합성 유전자를 해독하고 동 유전자를 절제한 변이주 <i>RelA</i> 및 <i>SpoT</i>를 취득하여 비교한 결과, 항생물질 생합성과 세포분화가 완전히 소실된 것으로 확인되었다. 따라서 (p)ppGpp는 항생물질 및 세포분화에서 중요한 조절 인자로 판단되었다. 현재 (p)ppGpp가 항생물질 생합성 과정에 직접 관련된 목적 물질을 규명하는 연구를 진행하고 있다. 또한 β-lactam 항생물질분해효소를 저해하는 BLIPs를 생성하는 유전자를 규명하고 동 물질을 생성하는 유전자를 절제한 변이주 (null mutants) 제조하고 BLIPs가 세포내에서 상호작용하는 물질을 규명하고자 yeast two-hybrid system 및 proteomics 방법으로 해당 단백질을 규명하는 연구를 진행하고 있다. 한편 세포분화에 깊게 관련된 것으로 확인된 저분자 protease 저해물질을 분해하는 효소가 세포분화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 이를 위해 John Innes Centre에서 개발한 PCR-Targeting 방법을 이용하여 유전자를 효율적으로 파괴하여 변이주의 특성을 분석중이다.</p> <p>본 연구실에서는 항생물질 및 세포 분화에 관련된 물질을 분리 동정 및 그 특성을 규명하고 해당 유전자를 분석하는 일에 우선 집중하였다. 한편 영국의 John Innes Biotechnology Center에서 유전자를 완벽하게 해독한 <i>Streptomyces coelicolor</i>를 기본으로 하여 해당 유전자의 기능과 발현 기작을 규명하고자 하였다. 현재까지 얻은 연구 결과에 몇 가지를 더 보완하면 세계적으로 우수한 학술지에 게재될 가능성이 매우 높다고 판단된다. 이미 수 차례 국내외 학술발표대회에서 발표한바 있고 많은 관심을 가지고 본 연구 결과를 주시하고 있는 바 본 연구의 결과는 기초는 물론 응용 면에서도 크게 활용될 것으로 판단된다.</p>					

색인어 (각 5개 이상)	한글	방선균, β -lactamase 저해제 GST pull down, (p)ppGpp, RelA, SpoT, Yeast Two-hybrid
	영어	<i>Streptomyces</i> , protease inhibitor, β -lactamase inhibitor, GST pull down, (p)ppGpp, RelA, SpoT, Yeast Two-hybrid

요 약 문

I. 제 목: 방선균에서 균체 분화와 이차 대사산물 생합성 조절인자에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

미생물 대사산물 중 가장 유용한 물질인 항생물질의 생합성을 조절하는 인자를 규명하고 동 조절물질이 항생물질 생합성에 직·간접적으로 관여하는 기작에 관한 기초 연구를 수행하였다. 또한 항생물질 생합성은 항상 균체의 분화와 밀접한 관련이 있기 때문에 균체 분화를 조절하는 인자를 동시에 규명하고 해당 인자를 생합성하는 유전자의 구조와 그 발현양상을 규명하고자 하였다. 항생물질 생합성과 균체 분화와의 관계성을 밝히는 것은 중요한 항생물질 생산을 증진할 수 있어 장차 산업적으로 항생물질 생산하는 데에 매우 중요한 핵심 사항이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구의 연구 내용과 범위는 다음과 같다.

- 1) β -lactam계 항생물질을 생산성하는 *Streptomyces clavuligerus*에서 항생물질 생합성을 조절하는 인자와 그 작용기작을 규명.
- 2) β -lactam계 항생물질을 불활성화하는 β -lactamase를 저해하는 물질의 생성과 생체 내에서의 작용기작을 규명.
- 3) 항생물질 생합성과 수반되어 일어나는 세포 분화조절 물질을 검색하고 동 조절 물질이 세포 분화과정에 관여하는 작용기작을 규명하고자 하였다.

본 연구실에서는 항생물질 및 세포 분화에 관련된 물질을 분리 동정 및 그 특성을 규명하고 해당 유전자를 분석하는 일에 우선 집중하였다. 한편 영국의 John Innes Biotechnology Center에서는 유전자를 완벽하게 해독한 *Streptomyces coelicolor*를 기본으로 하여 본 연구실에서 얻은 유전자의 기능과 발현 기작을 규명하는 연구를 수행하고자 하였다. 방선균의 유전학과 동 연구에 필요한 방법과 재료 등을 완벽하게 갖추고 있는 연구실과 상호 방문연구를 통하여 상승적인 연구 결과를 얻게 되었다.

IV. 연구 개발 결과

β -lactam계열 항생물질인 cephamycin 및 clavulanic acid를 생합성하는 방선균 *Streptomyces clavuligerus*에서 cephamycin 및 clavulanic acid 생합성을 조절하는 중요한 인자인 (p)ppGpp 생합성과 동 조절 물질이 항생물질 생합성 및 세포분화에 미치는 영향을 규명하였다. 우선 *S. clavuligerus*에서 ppGpp를 생합성에 관련된 효소인 RelA 와 SpoT를 coding 하는 유전자를 일차 규명한 것에 이어 동 유전자를 특이적으로 절제한 변이주 (null mutants)를 취득하였다. 그 결과 RelA 생합성이 결여된 균주 *S. clavuligerus* SMF387 (Δ relA) 및 SpoT 합성이 결여된 *S. clavuligerus* SMF3815 (Δ spoT)는 항생물질 생합성 능력이 완전 또는 부분적으로 상실한 것을 확인하였고 또한 세포 분화가 완전 및 부분적으로 저해를 받는 것을 확실하게 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 (p)ppGpp는 항생물질 및 세포분화에서 중요한 조절 인자로 확인하였다. (p)ppGpp가 세포내에서 작용하는 위치 또는 상호작용하는 물질을 규명하고자 relA 및 spoT 유전자에 변이를 유도한 변이유전자를 제조하고 동 변이 유전자로 형질 전환한 변이주에서 항생물질 생합성과 세포분화의 변화를 분석하는 연구를 진행하고 있다.

한편 β -lactam 항생물질만을 선택적으로 불활성화하는 β -lactamase의 역할과 동 효소를 선택적으로 저해하는 β -lactamase inhibitory proteins (BLIPs)의 생체내 역할을 종합적으로 분석하는 연구를 진행하였다. 우선 *Streptomyces exfoliatus* SMF19가 생성하는 BLIPs를 생성하는 유전자를 선택적으로 절제한 변이주 (null mutants) 제조하고 yeast two-hybrid, two dimensional electrophoresis법, 그리고 GST pull down 방법 등으로 BLIPs의 생체내에서 역할을 규명하는 연구를 진행하고 있다. 본 연구의 결과 모균에 비하여 변이주에서 특이하게 소멸되는 단백질 수 종이 있음을 확인하였고 따라서 proteomics 방법으로 해당 단백질을 규명하는 연구를 진행하고 있다. GST tagged BLIP-II를 생성할 수 있는 발현 벡터를 제작하고 이를 과량발현을 시도하여 GST tagged BLIP-II를 분리 중에 있다. 따라서, 이러한 단백질 상호작용 분석기술을 통해 얻은 결과를 종합하여, BLIPs와 직접적으로 상호작용하거나 생체내의 생리학적 변화에 관련된 단백질을 규명할 것으로 기대하고 있다.

또한 세포분화에 깊숙히 관련된 것으로 확인된 저분자 protease 저해물질이 균체에서의 생합성과 세포분화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다, 동 저분자 물질은 non-ribosomal peptide synthesis에 의하여 합성되는 것으로 추정하고 있으며 따라서 동 물질의 생합성에 관련된 효소의 특성 규명과 해당 유전자를 분석하고자 하였다. *S. exfoliatus* SMF13 야생균주와 protease 저해물질을 선택적으로 불활성화하는 효소 (LIE) 그리고 targeted protease (TLP) 의 역동적 상호관계를 분석한 것에 protease 저해물질의 생합성에 관련된 효소를 coding 하는 유전자를 분석하는 연구를 진행하고 있다.

V. 연구개발결과의 활용계획

*Streptomyces clavuligerus*에서 규명된 (p)ppGpp 생합성 관련 효소인 RelA 및 SpoT의 생합성 유전자인 *relA* 및 *spoT*는 *Streptomyces coelicolor*에서 규명된 것과 매우 높은 상동성을 나타내었다. 현재 *Streptomyces clavuligerus* 유전체는 미 해독 상태이나 *Streptomyces coelicolor*의 유전체는 완벽하게 규명되었고 structural genomics를 통하여 현재 유전자의 50%이상 그 기능이 규명된 상태이다. 따라서 본 *S. clavuligerus*에서의 연구 결과를 *S. coelicolor*의 유전체 및 proteomics 연구와 결부시켜 진행하는 것은 매우 유익할 것이므로 계속 협력 연구를 진행할 예정이다. β -lactamase를 저해하는 BLIPs는 그 단백질의 구조가 이미 규명되었고 앞으로의 생체내의 그 기능이 밝혀지면 이를 토대로 하여 β -lactamase 저해물질을 rational design하는 기초를 제공하여 새로운 물질의 창출이 가능하게 될 것이다.

세포분화에 밀접한 관련이 있는 저분자성 peptide는 그 자체가 염증과 같이 생체 질병 관련된 proteases를 저해하는 특성이 있어 새로운 염증치료제로서의 활용가능성이 높다고 판단되며 이를 분해하는 효소 (LIE)를 피파하는데 사용한 PCR-Targeting method는 앞으로 다양한 유전자의 연구에 사용될 것으로 기대한다. 현재까지 얻은 연구 결과에 몇 가지를 더 보완하면 세계적으로 우수한 학술지에 게재될 가능성이 매우 높다고 판단된다. 이미 수 차례 국내외 학술발표대회에서 발표한바 있고 많은 관심을 가지고 본 연구 결과를 주시하고 있는 바 본 연구의 결과는 기초는 물론 응용 면에서도 크게 활용될 것으로 판단된다.

SUMMARY

For many years, the two laboratories (Keith Chater in U K and Kye Joon Lee in Korea) have been working in parallel to study the regulation of secondary metabolism and morphological differentiation in streptomycetes (the bacteria mainly involved in industrial production of antibiotics).

The K. Chater laboratory has focussed on a genetic approach using the model organism, *S. coelicolor* A3(2), and the Seoul laboratory has exploited the more favourable physiological properties of other streptomycetes that do not have well developed genetics. In this proposal, we aim to bring our complementary approaches together to achieve greater penetrance of questions of mutual (and general) interest. The proposed studies will focus on the regulation and roles of extracellular proteins that are associated with, or causally connected to, sporulation.

These have been studied in K J Lee laboratory two organisms: *S. clavuligerus* and *S. exfoliatus*, which has the special feature of undergoing submerged sporulation, and in which extracellular proteases are associated with sporulation; and *S. exfoliatus*, in which two extracellular BLIPs (β -lactamase inhibition proteins) have been discovered, one of which is essential for aerial growth and sporulation on solid medium.

The aim of our study is to relate these extracellular phenomena to a more global analysis of the intracellular genetic regulation of morphological differentiation that has been carried out at Norwich using *S. coelicolor* A3(2). From this we hope to gauge the extent to which the phenomena being studied are species-specific or of general relevance to the whole *Streptomyces* genus. The experiments proposed will include the following. The objectives of the current

(1) Insertion of the *S. clavuligerus* and *S. exfoliatus* genes at single copy into a large collection of *S. coelicolor* developmental mutants to evaluate the dependence of the transgenes on the *S. coelicolor* developmental regulatory genes. The production of the extracellular proteins will be monitored immunologically. The mutants to be tested may include those with sporulation-specific blocks (*whi* mutants), and those with blocks that affect both morphological development and secondary metabolism (*bld* and *relA* mutants).

(2) The analysis of *S. coelicolor* genes, related to the *S. clavuligerus* and *S. exfoliatus* genes that are expected to emerge from the ongoing *S. coelicolor* genome sequencing project. These genes will be analysed by disruption and by transcription studies at Norwich, and biochemical analysis of extracellular protein production using the fermentor facility in Seoul.

The planned collaboration would involve two visits from Korea to UK for the performance of genetic experiments involving *S. coelicolor*, of a total duration of 6 months, and one visit of Professor Chater to Seoul for the purpose of on-site evaluation and planning of work in K. J. Lee laboratory involving *S. coelicolor*.

목 차

제출문	i
보고서 초록	ii
요약문	iii
영문 요약문	vi
목차	viii
제 1 장 연구 개발 과제의 개요	1
제 2 장 국내 외 기술 개발 현황	2
제 1 절 β -lactam 항생물질 생합성 유발인자에 관한 연구	2
1. Stringent response의 개요	2
2. <i>relA/spoT</i> homologues의 분류	2
3. <i>Escherichia coli</i> RelA 단백질의 기능 연구	3
4. 방선균에서의 <i>relA/spoT</i> homologues에 대한 연구	3
5. <i>Streptomyces clavuligerus</i> 에서 항생물질 생합성 조절인자 연구	4
6. 본 연구의 목적	5
제 2 절 β -lactam 항생물질 불활성효소 억제인자 연구	6
1. <i>S. exfoliatus</i> SMF19의 β -lactamase inhibitory protein 연구	6
2. BLIP 연구 동향	6
3. 단백질 상호작용 분석 기술	7
4. 본 연구의 목적	7
제 3 절 PCR방법을 이용한 <i>Streptomyces</i> spp.의 세포분화관련유전자의 disruption	9
1. <i>S. exfoliatus</i> SMF13의 세포분화 조절인자에 관한 연구	9
2. PCR Targetingdmd 이용한 유전자 파괴법	10
3. 본 연구의 목적	11
제 3 장 연구범위 및 연구수행 방법	12
제 1 절 β -lactam 항생물질 생합성 유발인자에 관한 연구	12
1. 연구내용	12
2. 재료 및 방법	12
3. 결과 및 고찰	20
제 2 절 β -lactam 항생물질 불활성효소 억제인자 연구	39
1. 연구내용	39

2. 재료 및 방법	39
3. 결과 및 고찰	57
제 3 절 PCR방법을 이용한 <i>Streptomyces</i> spp.의 세포분화관련유전자의 disruption	92
1. 연구내용	92
2. 재료 및 방법	92
3. 결과 및 고찰	93
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	99
제 1 절 연구 목표 달성도	99
제 2 절 기술발전예의 기여도	99
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	100
제 1 절 추가 연구의 필요성	100
제 2 절 타 연구에의 응용	100
제 3 절 기업화 추진 방안	101
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	102
제 1 절 β -lactam 항생물질 생합성 유발인자에 관한 연구	102
제 2 절 β -lactam 항생물질 불활성효소 억제인자 연구	103
제 3 절 방선균 세포분화 조절 인자의 생합성에 관한 연구	104
제7장 참고문헌	105
첨부분서	120

제1장 연구 개발 과제의 개요

항생물질의 생합성을 조절하는 인자를 규명하고 동 조절물질이 항생물질 생합성에 직·간접적으로 관여하는 기작과 균체 분화를 조절하는 인자를 규명하고 해당 인자를 생합성 하는 유전자의 구조와 그 발현 양상을 동시에 연구하여 항생물질 생합성과 균체 분화와의 관계성을 규명하는 기초연구를 수행하여 장차 산업적으로 항생물질 생산의 생산 수율을 증진 하는데 활용코자 하였다.

*S. clavuligerus*에서 cephamycin 및 clavulanic acid 생합성을 조절하는 중요한 인자인 (p)ppGpp 생합성이 결여된 $\Delta relA$ 및 $\Delta spoT$ 변이주는 항생물질 생합성 능력이 완전 또는 부분적으로 상실한 것을 확인하였고 또한 세포 분화가 완전 및 부분적으로 저해를 받는 것을 확실하게 확인하였다. 이러한 결과를 통하여 (p)ppGpp는 항생물질 및 세포분화에서 중요한 조절 인자로 확인하였다. 또한 (p)ppGpp가 세포 내에서 작용하는 위치 또는 상호작용 하는 물질을 규명하고자 *relA 및 *spoT* 유전자에 변이를 유도한 변이유전자를 제조하고 동 변이 유전자로 형질 전환한 변이주에서 항생물질 생합성과 세포분화의 변화를 분석하는 연구를 진행하고 있다.*

한편 β -lactam 항생물질만을 선택적으로 불활성화 하는 단백질 BLIPs를 생산 하는 *S. exfoliatus*에서 BLIPs를 생성하는 유전자를 선택적으로 절제한 변이주 (null mutants) 제조한 결과 모균에 비하여 변이주에서 특이하게 소멸되는 단백질 수종이 있음을 확인하였고 따라서 proteomics 방법으로 해당 단백질을 규명하는 연구를 진행하고 있다. 세포분화에 깊게 관련된 것으로 확인된 저분자 protease 저해물질이 균체에서의 생합성과 세포분화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다, 또한 세포분화와 관련된 유전자를 PCR-targeting system을 이용하여 매우 효율적으로 파괴하고 있다.

본연구실에서는 항생물질 및 세포 분화에 관련된 물질을 분리 동정 및 그 특성을 규명하고 해당 유전자를 분석하는 일에 우선 집중하였다. 한편 영국의 John Innes Biotechnology Center에서 유전자를 완벽하게 해독한 *Streptomyces coelicolor*를 기본으로 하여 해당 유전자의 기능과 발현 기작을 규명하고자 하였다. 방선균의 유전학과 동 연구에 필요한 방법과 재료 등을 완벽하게 갖추고 있는 연구실과 상호 방문연구를 통하여 상승적인 연구 결과를 얻도록 과제를 수행하였다. 현재까지 얻은 연구 결과에 몇 가지를 더 보완하면 세계적으로 우수한 학술지에 게재될 가능성이 매우 높다고 판단된다. 이미 수 차례 국내외 학술발표대회에서 발표한바 있고 많은 관심을 가지고 본 연구 결과를 주시하고 있는 바 본 연구의 결과는 기초는 물론 응용 면에서도 크게 활용될 것으로 판단된다.

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 β -lactam 항생물질 생합성 유발인자에 관한 연구

1. Stringent response의 개요

Stringent response는 세균에서 아미노산이나 탄소원이 고갈될 때 유전자의 발현을 조절하는 광범위한 적응 기작이다 (for review, see Cashel, 1996). 40년 전에 그람 음성 세균인 *Escherichia coli* (Stent and Brenner, 1961)에서 처음 발견된 이 기작은 영양분이 고갈된 세포에서 rRNA의 합성 감소와 아미노산 생합성 유전자의 활성화, stationary sigma factor인 σ^s 의 활성화 등과 같은 크나큰 전사적 변화로 특징 지워진다 (Gentry *et al.*, 1993). 이런 stringent response는 (p)ppGpp라는 effector molecule의 합성을 통해 매개 된다 (Cashel and Gallant, 1969).

2 *relA/spoT* homologues의 분류

*E. coli*에서는 2개의 단백질이 (p)ppGpp 합성에 관련되어 있는데, 하나는 리보솜에 결합하여 아미노산 결핍상태일 때 아미노산이 없는 tRNA를 인지하여 (p)ppGpp를 합성하는 RelA이고 (Hasheltine and Block, 1973), 다른 하나는 세포질 단백질인 SpoT로서 (Gentry and Cashel, 1995) 탄소원 고갈 (Hernandez and Bremer, 1991; Murray and Bremer, 1996) 혹은 지방산 고갈 (Seyfzadeh *et al.*, 1993)상태일 때 (p)ppGpp를 합성한다. SpoT는 또한 (p)ppGpp 분해 기능도 존재한다 (Hernandez and Bremer, 1991; Murray and Bremer, 1996). 이런 *E. coli*의 RelA와 SpoT는 높은 상동성 때문에 gene duplication에 의해 하나의 유전자로부터 생성되었다는 가설이 세워지게 되었다 (Metzger *et al.*, 1989).

*E. coli*와는 다르게 *Bacillus subtilis* (Wendrich and Marahiel, 1997), *Corynebacterium glutamicum* (Wehmeier *et al.*, 1998), *Mycobacterium tuberculosis* (Avarbock *et al.*, 1999), *Staphylococcus aureus* (Gentry *et al.*, 2000), *Streptococcus equisimilis* (Mechold *et al.*, 1996; Mechold and Malke, 1997), *Streptomyces coelicolor* (Chakraborty *et al.*, 1996; Martinez-Costa *et al.*, 1996, 1998), *Streptomyces antibioticus* (Hoyt and Jones, 1999)와 같은 여러 그람 양성 세균은 오직 하나의 *relA/spoT* paralog가 존재한다. 이 단백질은 (p)ppGpp합성과 분해 활성을 동시에 가지고 이런 *relA/spoT* paralog 유전자에 돌연변이가 생기면 세균은 다양한 생리학적 결함을 보여 준다. *B. subtilis*에서 *relA/spoT* 유전자가 결손된 균주는 아미노산 요구 세균이 되고 (Wendrich and Marahiel, 1997) σ^H 에 의해 조절 받는 여러 유전자의 발현이 결여된다 (Eymann *et al.*, 2001). *Mycobacterium tuberculosis*의 *rel* 돌연변이는 오랜 혐기성 상태에서 생존율이 현저히 떨어진다 (Primm *et al.*, 2000). 또한 *Streptomyces relA* 돌연변이는 항생제 생산 감소, 형태

분화 지연 등과 같은 양상을 보여준다 (Chakraburttty and Bibb, 1997).

이렇듯 지금까지 다양한 세균에서 RelA/SpoT homologues가 연구되었고 이런 RelA/SpoT homologues의 아미노산 서열을 기초로 phylogenetic tree를 작성하여 (p)ppGpp 대사에 관련된 효소의 명명법과 진화학적 관계가 다음과 같이 제시되었다 (Wendrich *et al.*, 2000; Gerhard, 2001). 첫 번째는 가장 초기에 다른 RelA/SpoT homologues로부터 분리되어 나온 그룹으로 탄소원 결핍이 아닌 아미노산 결핍을 인지하여 (p)ppGpp를 합성하고 이 단백질은 (p)ppGpp를 분해하지는 못한다. 대표적으로 *E. coli*의 RelA가 있고 표기법은 RelA_{*E.coli*}로 한다. 두 번째는 그람 양성 세균인 *Bacillus/Clostridium* 과 actinobacterial의 Rel 그룹으로 이 그룹은 (p)ppGpp를 아미노산과 탄소원이 고갈되었을 때 (p)ppGpp를 합성하고 또한 망간이온 (Mn²⁺)을 보조인자로 (p)ppGpp를 분해할 수 있다. 표기법 RelA 대신 Rel로 한다. 마지막은 *E. coli*의 SpoT로 대표되는 그룹으로 아미노산 고갈이 아닌 탄소원 고갈을 인지하여 (p)ppGpp를 합성하고 또한 망간이온 (Mn²⁺)을 보조인자로 (p)ppGpp를 분해한다. 표기법은 SpoT_{*E.coli*}로 한다.

3. *Escherichia coli* RelA 단백질의 기능 연구

*E. coli*에서 C-말단이 다양하게 제거된 RelA를 *P_{tac}* promoter 조절 하에 발현시켜서 RelA의 도메인 조사를 하였다 (Schreiber *et al.*, 1991). 그 결과 전체 길이의 RelA는 리보솜에 결합하여 (p)ppGpp를 합성하지만 C-말단이 제거된 RelA (아미노산 1부터 455)는 리보솜에 결합하지 않고 (p)ppGpp를 끊임없이 합성하였다. 또한 이 해독 종결된 단백질 (반감기, 7.5분)은 전체길이의 RelA (반감기, 2시간부터 3시간)에 비해 대사적으로 불안정 하였다. 나머지 C-말단 (아미노산 455부터 744)에서는 효소활성이 발견되지 않았다. 이에 따라 *E. coli* RelA는 기능적으로 (p)ppGpp를 합성하는 N-말단 도메인 (아미노산 1부터 455)과 RelA의 활성을 조절하는 C-말단 도메인 (아미노산 455부터 744), 즉 2개의 서로 다른 도메인으로 구성되었음이 밝혀졌다. 그리고 최근에 RelA의 C-말단 도메인 (아미노산 455부터 744)이 상호작용을 통해 (p)ppGpp 합성 활성을 조절함이 밝혀졌고 (Gropp *et al.*, 2001) 아미노산 455부터 538, 아미노산 550부터 682가 RelA의 이합체 형성에 관여하고 아미노산 550부터 682는 리보솜 결합에 작용함이 조사되었다 (Yang *et al.*, 2001).

4. 방성균에서 RelA/SpoT homologues 단백질의 기능 연구

특이적으로 그람 양성 세균인 *Streptomyces coelicolor*는 한 개체에 두개의 서로 다른 *relA/spoT* homologues가 존재한다 (Sun *et al.*, 2001). 그 중 하나인 RelA는 아미노산 847개, 분자량 94.2kDa의 단백질로 기존에 알려진 RelA/SpoT homologues와 높은 유사성을 갖는다 (Chakraburttty, *et al.*, 1997). *S. coelicolor* RelA는 지금까지 연구된 바에 의하면 염기서열뿐만 아니라 기능상으로도 다른 그람 양성균의 RelA/SpoT homologues와 비슷하다. 즉 *S. coelicolor* RelA는

(p)ppGpp 합성 능력을 지니고 있고 (Chakraborty *et al.*, 1996, 1997) *E. coli*에서 발견되었을 때 (p)ppGpp 합성 능력과 (p)ppGpp 분해 활성이 나타났다 (Martinez-Costa *et al.*, 1998). 그리고 *S. coelicolor* *relA*의 대부분의 유전자를 hygromycin으로 대체한 돌연변이 균주 (M570)는 정상균주 (M600)와 생장에 있어서 별 차이를 보이지 못하였으나 질소 결핍 상태에서 (p)ppGpp 생산과 항생제 생산을 하지 못하였다 (Chakraborty, *et al.*, 1997). 또 다른 *relA/spoT* homologues 단백질은 *rshA* (*relA spoT* homologue)로 *S. coelicolor* genome sequencing project (http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_coelicolor)를 통해 밝혀졌다. RshA는 아미노산 721개, 분자량 78.4kDa의 단백질로 *S. coelicolor* RelA와 42 % 아미노산 상동성을 지닌다. 그러나 RshA의 (p)ppGpp 합성 능력과 (p)ppGpp 분해 능력은 존재하지 않았다 (Sun *et al.*, 2001). 최근에 *S. coelicolor*와 유사하게 *S. clavuligerus*도 두개의 *relA/spoT* homologues가 존재함이 genomic library를 이용한 shotgun method에 의해 밝혀졌다 (Jin, 2002). 그 중 하나인 RelA는 아미노산 843개로 이루어져 있고 분자량이 93.3kDa으로 *S. coelicolor* RelA와 90 % 아미노산 상동성을 보인다. 또 다른 하나는 SpoT로 아미노산 738개, 분자량 78.8kDa으로 *S. coelicolor*의 RshA와 63 %의 아미노산 상동성을 보인다. 또한 기능적으로도 *S. coelicolor*와 유사하게 hygromycin으로 *relA* 내부를 치환한 *S. clavuligerus* SMF387 (Δ *relA*)에서는 (p)ppGpp가 발견되지 않은 반면 apramycin으로 내부를 치환한 *S. clavuligerus* SMF3815 (Δ *spoT*)에서는 (p)ppGpp의 양이 거의 정상균주 수준에 가까웠다. 이렇듯 *S. coelicolor*와 *S. clavuligerus*에서는 특이적으로 두개의 *relA/spoT* homologues가 존재한다. 그러나 그 중 RelA만이 (p)ppGpp 대사에 관한 기능이 밝혀진 반면 *S. coelicolor*의 RshA나 *S. clavuligerus* SpoT의 기능은 아직 명확히 규명된 상태가 아니다.

5. *Streptomyces clavuligerus*에서 항생물질 생합성 조절인자에 관한 연구

*Streptomyces clavuligerus*에서 항생제 생합성 조절 유전자로 *ccaR*과 *claR*이 존재한다 (Alvaro *et al.*, 2002). 이 중 *ccaR*은 cephamycin 유전자군에 속해 있고 cephamycin, clavulanic acid, non-clavulanic acid인 clavams의 생합성에 필수적인 유전자이다. 그리고 CcaR은 ActII-ORF4, RedD, AfsR, DnrI 등의 항생제 생합성 조절 단백질과 유사한 구조를 보인다 (Barton *et al.*, 1995; Walters *et al.*, 1994). *ccaR*의 특징을 보면 다른 조절단백질과 비슷하게 항생제 생합성 전에 전사량이 증가하고 또한 *ccaR*을 과량 발현시키면 cephamycin과 clavulanic acid의 생산량이 2-3배 증가하며 *ccaR* 결손균주는 cephamycin과 clavulanic acid를 생산하지 못한다. (Perez-Llarena *et al.*, 1997). *ccaR*과 비슷하게 *claR*도 clavulanic acid 생합성에 관여하는 유전자를 조절한다 (Alvaro *et al.*, 2002). 일례로 *claR* 이 결손균주에서는 clavulanic acid가 생성되지 않았다. 또한 유전자 서열분석과 아미노산 서열분석결과에 따르면 ClaR은 다른 transcriptional regulator (LysR)에서 발견되는

helix-turn-helix motif가 C-말단에 있으며 (Ashish *et al*, 1998) 이는 *clpR*이 regulatory gene임을 보여주는 예가 된다. 그러나 이런 항생제 생합성 조절인자들이 어떤 요인에 의해 활성화되고 억제되는가에 대해서는 잘 알려진 바가 없다.

그러나 *S. coelicolor*의 항생제 생합성 조절인자인 *actII-ORF4*와 *redD*의 전사량이 지수 성장기로부터 정체기로 변하는 단계, 즉 (p)ppGpp의 축적시기에 크게 증가한다는 사실과 (Strauch *et al.*, 1991; Takano and Bibb, 1994) (p)ppGpp를 생합성하지 못하는 *relA* 결손균주인 *S. coelicolor* M570이 질소원 고갈 상태에서 actinorhodin과 undecylprodigiosin의 생산을 못한다는 사실은 (Chakraborty and Bibb, 1997) (p)ppGpp와 항생제 생합성 사이에 밀접한 관계가 있음을 의미한다. 더욱이 *S. coelicolor*에서 지수성장기의 세포에서 해독종결된 RelA 단백질을 대량생산하였을 때 (p)ppGpp가 축적되어 항생제 생합성 조절유전자인 *actII-ORF4*의 전사량을 증가함을 발견하였고 (Andrew *et al*, 2001) 또한 이런 전사량의 증가는 (p)ppGpp와 RNA polymerase beta-subunit와의 관계에 의해서임이 밝혀졌다 (Xu J., *et al*, 2002). 이로서 (p)ppGpp가 항생제 생합성을 조절하는 요인 중 하나로 이 조절은 항생제 생합성 조절인자의 전사단계에서 이루어진다.

6. 본 연구의 목적

본 연구에서는 *S. clavuligerus*의 RelA와 SpoT의 기능을 밝히고자 *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$)와 *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)의 형태분화를 관찰하고 (p)ppGpp를 정량하였다. 그리고 *S. clavuligerus* ATCC27064, *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$), *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)를 회분 배양하여 (p)ppGpp와 clavulanic acid의 생합성 사이에 밀접한 관계가 있음을 밝혔다. 또한 *E. coli* RelA가 C-말단 (아미노산 455부터 744)의 상호작용에 의해 이합체를 이루면서 효소활성을 조절한다는 내용에 기초를 두어 *S. clavuligerus* RelA와 SpoT의 상호작용을 Yeast two-hybrid system으로 조사하였다. 그리고 *S. clavuligerus* RelA와 SpoT의 위치와 양을 조사하기 위해서 쥐에서 RelA의 일부분 (아미노산 246부터 479)과 SpoT의 일부분 (아미노산 180부터 390)에 대한 polyclonal antibody를 제작하였다. 마지막으로 *S. clavuligerus* RelA의 기능적 연구를 위해서 다양하게 C-말단이 제거된 RelA와 (p)ppGpp phosphohydrolase domain이 제거된 RelA, (p)ppGpp synthetase domain과 (p)ppGpp phosphohydrolase domain이 모두 제거된 RelA를 암호화하는 벡터를 제작하였다.

제2절 β -lactam 항생물질 불활성효소 억제인자 연구

1. *Streptomyces exfoliatus* SMF19의 β -lactamase inhibitory protein의 연구

토양에서 분리된 *Streptomyces exfoliatus* SFM19 (Kim *et al*, 1991; Kim *et al*, 1994)는 두 종류의 β -lactamase inhibitory protein, BLIP-I과 BLIP-II를 생산하며 이 BLIPs는 *S. clavuligerus* (Doran *et al*, 1990)에서 생산하는 BLIP보다, 더 낮은 K_i value를 보인다. BLIP-I을 coding하는 *bliA* gene과 BLIP-II를 coding하는 *bliB* gene은 cloning되었고 또한 각각의 gene이 knock-out된 변이균주가 제작 (Kang, 2000)되었다. BLIP-I과 BLIP-II 그리고 둘 모두를 knock-out 시킨 변이균주들은 동일하게 bald 형태를 보였으며, 탄소원의 종류와 농도에 따라 그 분화 양상이 달라지기도 하였다 (Kang *et al*, 2000). 이런 결과를 바탕으로, 세포 외 단백질인 BLIP-I과 BLIP-II가 방선균의 분화에 영향을 주는 것으로 생각되어지고 있다. 또한 BLIP와 마찬가지로 BLIP-I의 49번째 aspartate를 site-directed mutagenesis를 한 결과 이 자리가 TEM-1 β -lactamase 활성 저해 (Petrosino *et al*, 1999; Kang *et al*, 2000)에 매우 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌고 X-ray Crystallography를 통한 구조분석 결과 BLIP와 매우 유사한 3차원 구조를 갖는 다는 것이 밝혀졌다. BLIP-II의 경우도 X-ray Crystallography에 의해 3차원 구조가 결정 (Lim *et al*, 2001)되었는데 특이적으로 이 구조는 원핵생물에서 흔하지 않은 각각 3개의 β -sheet으로 이루어진 7개의 반복구조가 원형을 이루는 구조를 보여주었다. 이것은 매우 기능이 다양한 WD-40 repeat와 구조적으로 유사하고 또한 인간의 RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation)과 21 %의 유사도를 보이는 특징을 나타내었다.

2. BLIP 연구 동향

BLIPs의 구조와 정확한 기능을 아는 것은 기존의 알려진 저분자량 β -lactamase inhibitor (clavulanic acid, tazobactam *etc*)와 다른 계열의 drug design에 대한 연구에 있어서 매우 중요하다. 현재, *S. clavuligerus*에서 생산되는 BLIP를 이용한 결합 부위와 결합방식에 대한 연구를 통해 β -lactamase 저해제 개발을 위한 peptide design (Rudgers *et al*, 1999; Rudgers *et al*, 2001)이 이루어지고 있으며, site-directed mutagenesis된 TEM-1 β -lactamase에 대한 BLIP의 저해 양상을 β -lactamase 저분자량 저해제와 비교함을 통해 새로운 계열의 β -lactamase 저해제의 설계 가능성을 제시하였다 (Schroeder *et al*, 2002). 이러한 연구 추세에, BLIP 및 BLIP-I과 다른 특이적 구조를 가지며 간접적으로 β -lactamase의 활성을 저해하는 BLIP-II의 생체 내에서의 정확한 기능을 유추하여 내는 것은 이 단백질의 작용기작과 특이적 활성자리 등을 규명할 수 있으므로, 이것은 3차원 구조분석을 토대로 한 새로운 β -lactamase 저해 물질 개발에 있어 매우 중요하다고 할 수 있다.

3. 단백질 상호작용 분석 기술

현재로서는 BLIPs가 방선균의 형태분화에 큰 영향을 주는 것으로 추정되지만, 정확한 기능은 규명되지 않았다. 이 단백질들의 정확한 기능을 규명하기 위해서는 단백질 상호작용 분석기술들이 필요하다. 그 중 첫 번째로, Yeast Two-Hybrid system은 단백질간의 상호작용을 생체 내 (*in vivo*)에서 볼 수 있다는 것과 상호작용이 예상되는 단백질의 DNA 염기서열을 곧바로 얻을 수 있다는 큰 장점을 지니고 있다. 또한, Yeast Two-Hybrid는 system의 신뢰성, 폭 넓은 응용 그리고 쉬운 사용법 등으로 단백질간의 상호작용을 검출하는데 많이 쓰이고 있는 기본적인 기술이다.

두 번째로 2-DE는 proteomics 분야에서 널리 사용되고 있는 기술로서, IEF (IsoElectro Focusing)에 있어서 편차를 줄일 수 있는 IPG phor system (Amersham, Co., Ltd)이 개발되면서 더욱 보편화되었다. 또한 최근에 개발된 다양한 mass analysis (MALDI-ToF, ESI Q-ToF) 방법에 의해 peptide pattern과 sequence 분석이 가능해졌기 때문에, 전체 genome이 밝혀진 경우에는 peptide finger print를 이용하여, genome이 밝혀지지 않은 경우에는 ESI Q-ToF를 이용한 internal peptide sequencing을 통하여서 미량의 단백질의 아미노산 서열 분석이 가능하게 되었다. 2-DE를 통하여서 일반적으로 사용되는 방법은 정상균주와 연구하는 단백질이 결손된 변이균주를 같은 성장 시간대의 샘플을 취하여서 2-DE를 시행하여 발현양의 변화를 보이는 단백질을 분리하여 냄으로써, 우리가 찾고자 하는 목적 단백질을 간접적으로 찾아내는 방법이다.

세 번째로는, 상호작용을 단백질 수준에서 알 수 있는 방법으로 GST Pull Down 방법이 있다. GST gene fusion system은 단백질의 항체를 사용하지 않고도 단백질 분리와 detection을 할 수 있는 장점이 있다. GST-tagged bait 단백질을 glutathione affinity gel에 고정시키고 prey 단백질을 column에 흘려주어 bait 단백질과 상호 작용하는 미지의 단백질을 밝혀내는 것이다.

4. 본 연구의 목적

이 연구의 목적은 BLIPs가 어떠한 기능을 갖는지를 단백질 상호작용 기술들을 사용하여 분석하는데 있다. BLIP-II와 구조적으로 유사한 RCC1이 Ran과 상호작용을 통해 구조적인 변화를 유도하여 GTPase 활성을 가지게 함이 보고되었으며 (Louis *et al*, 2001), BLIP-I의 경우 TEM-1 β -lactamase와 비슷한 구조를 갖는 Penicillin binding protein등의 상호작용 가능성 등이 보고되었다 (Lim *et al*, 2001). 또한 두 종류의 BLIPs 모두 방선균의 형태분화에 영향을 주므로, 직접적으로 또는 간접적으로 두 단백질의 영향하에 있는 단백질을 검색함으로써 두 단백질이 방선균 내에서의 역할을 규명할 수 있을 것으로 기대한다. 먼저, Yeast Two-Hybrid system을 이용하여 검색을 하였으며, BLIP-I과 BLIP-II간의 상호작용 여부를 확인

결과 두 단백질간의 상호작용이 없음을 밝혔으며, 전체 genome sequence가 밝혀진 *Streptomyces coelicolor*를 이용하여 cDNA library를 제작하여 결과로 BLIP-I과 상호작용할 것으로 기대되는 최종 11개의 후보 유전자와 BLIP-II와 상호작용할 것으로 기대되는 5개의 유전자를 얻었으며 분석 중에 있다

BLIPs의 기능을 더 정확히 유추하기 위해 간접적인 상호작용 또는 pathway에 관련된 단백질을 검출할 수 있는 Two Dimensional Electrophoresis (2-DE)를 이용하여서는, BLIPs에 의해 발현양이 조절 받는 단백질을 검색하여 characterization 할 것이다. BLIP-I을 coding하는 *bliA*, BLIP-II를 coding하는 *bliB*를 각각 knock out시킨 변이균주와 정상균주의 2-DE를 시행하여 발현양의 변화가 있는 spot을 분리, 분석하여 BLIP-I 그리고 BLIP-II의 기능에 연관된 단백질을 검색할 수 있을 것으로 기대한다.

GST Pull Down 실험에서는 BLIP-I과 BLIP-II를 coding하는 *bliA*, *bliB* 유전자를 GST encoding 벡터에 삽입하여 GST tagged BLIP-I, BLIP-II 단백질을 생성하고 이것을 glutathione-resin complex에 결합시킨 후 *S. exfoliatus* SMF19의 단백질 중 BLIP-I, BLIP-II와 상호작용 하는 단백질을 검색하고자 한다. 이러한 여러 단백질 상호작용 기술들을 종합적으로 사용하여서 BLIP-I과 BLIP-II의 직간접적인 상호작용 단백질을 찾음으로서 생체 내의 역할을 명확히 규명할 수 있을 것으로 기대한다.

제 3 절 PCR방법을 이용한 *Streptomyces* spp.의 세포분화관련 유전자의 disruption

1. *Streptomyces exfoliatus* SMF13의 세포분화 조절인자에 관한 연구

방선균은 자연 생태계에서 널리 분포되어 있는 미생물 집단 중의 하나로 생태계에서 유기물질의 재순환과 상업적으로 유용한 항생물질, 효소, 생리활성물질들을 생산하는 세균으로 그 중요성을 널리 인정받고 있다. 또한 환경 변화에 따라 특이한 분화 과정을 거치며 분화 현상은 일차 대사 산물과 이차 대사 산물의 생합성에 밀접하게 연관되어 있어서 미생물의 환경 변화에 대한 적응 기작의 연구에 중요한 재료로 이용되고 있다.

방선균은 특이하게 고체 및 액체 배양시 균사 형태로 정단증식 및 분지증식을 하는 기층균사를 갖고 있으며, 고체 배양시는 배양 조건에 따라 기층균사로부터 수직으로 기균사를 형성한 후 그로부터 호기성 포자를 형성하는 세포 분화 과정을 지니고 있다 (Ensign, 1978; Chater, 1989A and B). 이러한 분화 과정은 여러 가지 환경 요인 중 특히 영양 성분의 고갈, 즉 제한된 탄소원, 무기인, 질소원 하에서 촉진되며, 이러한 형태적 분화는 항생물질, pigment, 기타 생리활성물질 등과 같은 이차 대사 산물과 protease, cellulase, amylase, lipase 등과 같은 균체 외 효소들의 생합성과 같은 생리적 분화 현상과 밀접하게 연관되어 있다 (Kim and Lee, 1995A). 기균사는 substratum에 직접 붙어 있지 않아 토양 내 기질로부터 직접 영양분을 공급받기가 어려워서, 기균사의 성장에는 기층균사의 분해 산물이 영양분으로 사용되어진다 (Mendez *et al.*, 1985; Miguez *et al.*, 1994). 이러한 방선균의 생리적 형태학적 분화에는 단백질 분해 효소들이 관련되어 있어 방선균의 이차 대사와 단백질 분해 효소의 관계성에 대한 연구들이 진행되어 왔다 (Gibb and Strohl, 1988; Ginther, 1978; James *et al.*, 1991; Mendez *et al.* 1985).

Streptomyces exfoliatus SMF13은 생활사 도중 leupeptin, leupeptin inactivating enzyme (LIE), Trypsin-like protease (TLP)를 차례로 생산한다. *S. exfoliatus* SMF13이 생성하는 thiol계 단백질 분해 효소 (trypsin) 저해물질은 Acetyl-Leu-Leu-Argininal (leupeptin), Acetyl-Ile-Leu-Argininal, Acetyl-Leu-Ile-Argininal의 구조를 갖고 있으며 이러한 leupeptin과 그 유도체들은 다양한 방선균들로부터 생성된다 (Aoyagi *et al.*, 1969; Kim *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993). 이러한 leupeptin과 그 유도체들 (이하 leupeptin)에 의해 TLP의 활성은 저해 받고, 단백질 분해 효소와 저해물질은 배양 조건과 성장 시기에 따라 길항적으로 생합성이 조절되었다 (Kim and Lee, 1995B and C). 회분 배양시 TLP의 생산은 균체의 성장과 연관되어 일어났으며 영양성분이 고갈되면서 균체의 성장이 멈추고 LIE가 생산되었다. LIE의 생산과 더불어 leupeptin의 활성은 급격히 소실되고, leupeptin의 활성이 거의 소실된 stationary phase 말기에 TLP의 활성이 급격히 증가되었다. TLP의 활성이 증가하면서 균체의 급격한 lysis가 일어났으며 TLP는 균체 단백질의 가수분해에 중요한

역할을 수행하였다. 고체 배양시 leupeptin은 기충균사의 성장과 연관되어 생성되었으며, 기균사 형성 직전 유도된 LIE에 의해서 그 활성이 소실되고 TLP의 활성이 증가하면서 기균사의 성장이 일어났다. bld mutant와 whi mutant를 선별하여 그 특성을 분석한 결과 bld mutant는 LIE와 TLP를 생성할 수 없었으나, whi mutant는 LIE와 TLP를 생성할 수 있었다. 이상과 같은 결과에서 TLP는 균주가 빈 영양 상태에 이르면 기충균사나 비성장 균사를 분해하여 평판 배양에서의 기충균사 형성과 심층배양에서의 말단 성장을 위한 영양분을 제공하는 것으로 추정하였다. Leupeptin은 성장 균사나 기충균사가 성장 제한 균사에서 생산되는 TLP에 의해 분해되는 것을 막아 주는 역할을 하며, LIE는 TLP의 활성이 필요할 때 leupeptin을 분해하여 TLP의 활성이 나타나게 하는 역할을 하는 것으로 추정하였다 (Kim and Lee, 1996).

2. PCR Targeting을 이용한 유전자 파괴법

전체 세균의 유전체의 서열의 이용이 가능해짐에 따라 기능이 잘 알려지지 않은 다양한 유전자와 ORF들의 분자 구조와 조직을 알 수 있게 되었다. 그러나 체계적인 유전자의 파괴를 통해서만이 유전자의 기능에 대한 중요한 정보를 얻을 수 있다. 비록 유전자 대체를 통해 염색체 상의 유전자를 파괴하는 방법이 많이 개발되었지만, 이 방법들은 모두 염색체로의 재조합하기 이전에 적당한 재조합 플라스미드를 생성하여야 한다. 이와는 대조적으로 *Saccharomyces cerevisiae*는 35-nt의 세균의 염색체와 상동성이 있는 프라이머를 사용하여 원하는 selectable marker를 지닌 선형 DNA를 PCR 한 후 모균주에 바로 형질전환 시켜 유전자를 파괴할 수 있다. 이 PCR을 매개한 유전자 파괴 방법은 yeast의 높은 재조합 효율을 이용한 효과적이고 특이적인 유전자 파괴 방법이다. 이런 유전체의 직접적 파괴는 *Candida albican*에서도 50- to 60-nt의 상동성 있는 프라이머를 이용하여 yeast와 비슷한 방법으로 시행되었다. 이와는 대조적으로 많은 세균은 내부의 *recBCD* exonuclease 때문에 선형 DNA는 쉽게 형질전환이 되지 않고 분해된다. 그러나 λ RED (*gam*, *bet*, *exo*)가 존재할 경우 선형 DNA의 재조합 비율을 매우 높인다. 이런 현상을 개발하여 Datsenko와 Wanner (2000)는 *Escherichia coli*에서 36-nt의 세균의 염색체와 상동성이 있는 프라이머를 사용하여 원하는 selectable marker를 지닌 선형 DNA를 PCR 하여 모균주에 형질전환 시킨 후 재조합하여 40개의 서로 다른 유전자 파괴를 하였다.

이런 PCR을 매개한 유전자 파괴방법을 응용하여 쉽게 *Streptomyces coelicolor* 코스미드안의 유전자가 있는 부분을 39-nt의 염색체와 상동성 있는 프라이머로 selectable maker가 존재하게끔 PCR한 산물로 대체할 수 있다. 또한 disruption cassette (39-nt의 염색체와 상동성 있는 프라이머로 selectable maker가 존재하게끔 PCR한 선형 DNA)에는 *oriT* (RK2)가 존재하여 PCR targeted cosmid DNA (disruption cassette에 의해 재조합된 코스미드)를 효과적으로 pUZ8002 플라스미드

의 도움 아래 *E. coli*에서 방선균으로 conjugation할 수 있다. Conjugation은 protoplast에 의한 형질전환보다 훨씬 더 효율적이고 또한 많은 actinomycetes에 적용할 수 있다. 또한 방선균내의 methyl-specific restriction system은 ET12567과 같은 methylation-deficient *E. coli* host에 DNA를 경유함으로서 해결할 수 있다.

3. 본 연구의 목적

본 연구에 있어서 PCR-targeting system을 이용하여 *S. exfoliatus* SMF13의 *lie* 유전자의 파괴를 매우 효율적으로 수행하여 그 기능을 밝히는데 있다.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 β -lactam 항생물질 생합성 유발인자에 관한 연구

1. 연구내용

본 연구에서 *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$)와 *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)의 형태분화를 관찰하고 (p)ppGpp를 정량한 결과 *S. clavuligerus*에서 RelA가 (p)ppGpp의 생합성에 주된 기능을 함을 밝혀냈다. 그리고 *E. coli* RelA의 C-말단 도메인 (아미노산 455부터 744)이 상호 작용하여 이합체를 이루면서 활성을 조절한다는 사실을 근거로 하여 *S. clavuligerus*의 RelA와 SpoT 상호작용을 Yeast two-hybrid system을 사용하여 조사하였다. 그 결과 RelA와 SpoT 상호작용이 가장 강하고, 두 번째로 SpoT와 SpoT, 세 번째로 RelA와 RelA 순으로 상호작용이 강함을 확인하였다. 이런 상호작용을 통해 *S. clavuligerus*의 SpoT가 RelA의 (p)ppGpp 합성 조절에 작용 할 것으로 추정된다. 그리고 RelA와 SpoT의 상호 작용 도메인을 찾고자 했으나 RelA의 C-말단 도메인 (아미노산 474부터 843)과 SpoT의 C-말단 도메인 (아미노산 413부터 738)이 상호작용과 관계없이 reporter유전자를 활성화 시켰기 때문에 Yeast two-hybrid system 실험이 불가능하였다.

또한 RelA와 SpoT 단백질의 리보솜 결합능력을 조사하기 위해 각각에 대한 항체를 제작하였다. 우선 RelA의 일부분 (아미노산 246부터 479)과 SpoT의 일부분 (아미노산 180부터 390)의 N-말단에 히스티딘기를 붙여 *E. coli*에서 대량생산하여 분리한 후 쥐에 주입하여 혈액을 채취하였다. 이 혈액으로부터 혈청을 분리한 후 이 혈청을 항체로 사용하였다. 제작된 항체의 질은 *E. coli*로부터 대량생산된 RelA와 SpoT를 western blotting함으로써 확인하였다.

마지막으로 *S. clavuligerus*의 RelA 단백질의 기능 연구를 위해 다양하게 C-말단이 제거된 RelA와 (p)ppGpp phosphohydrolase domain이 제거된 RelA (p)ppGpp synthetase domain과 (p)ppGpp phosphohydrolase domain이 모두 제거된 RelA를 암호화하고 있는 벡터를 제작하였다.

2. 재료 및 방법

가. 사용 균주 및 플라스미드

본 연구에서 사용한 균주 및 플라스미드는 Table 1.과 Table 2.이다. 일반적인 cloning을 위한 균주로 *E. coli* DH5a를 사용하였고 *E. coli*에서 단백질 대량생산을 위한 균주로는 BL21(DE3)pLysS를 사용하였다. 그리고 Yeast two-hybrid system에 사용한 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* AH109 이다. *E. coli*에서 제조한 제조항

Table 1. Microorganisms used in this study

Microorganism	Genotypes	References
<i>Escherichia coli</i>		
DH5a	F ⁻ Φ dlacZ Δ M15 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ m _k ⁺) <i>supE44 thi-1 gyrA96</i> Δ (<i>lacZYA</i> ⁻ <i>agrF</i>) U169 λ ⁻	Hanahan, 1983
ET12567(pUZ8002)	<i>dam</i> ⁻ <i>dcm</i> ⁻ for methylation-deficient DNA manipulation	MacNeil, 1989
BL21(DE3)pLys	F ⁻ <i>ompT hsdSB (rB⁻ mB⁻) gal dcm</i> (DE3) Lys	Novagen. In
<i>Streptomyces spp.</i>		
<i>S. clavuligerus</i> ATCC27064	clavulanic acid and cephamycin producer, wild-type strain	Nagarajan <i>et al.</i> , 1971
<i>S. clavuligerus</i> SMF387	<i>relA</i> disruption mutant, Hyg ^r	Jin, 2002
<i>S. clavuligerus</i> SMF3815	<i>spoT</i> disruption mutant, Apr ^r	Jin, 2002
<i>S. clavuligerus</i> SMF389	disruption in <i>relA</i> ; complemented Apr ^r	Jin, 2002
<i>S. clavuligerus</i> SMF3817	disruption in <i>spoT</i> ; complemented Tsr ^r	Jin, 2002
<u>Yeast</u>		
AH109	MATa, <i>trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52,</i> <i>his3-200, gal44, gal804, LYS2::</i> <i>GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3,</i> <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2,</i> <i>URA3 MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; Holtz, unpublished

Table 2. Plasmids used in this study.

Plasmid	Description	Reference
pUC18	<i>E. coli</i> high copy number phagemid, fl origin, Amp ^r	Yanisch-Perron, 1985
pSET152	<i>E. coli</i> replicon, <i>Streptomyces</i> ØC31 attachment site, Apr ^r	Flett <i>et al.</i> , 1997
pET19b	<i>E. coli</i> expression vector, Amp ^r	Novagen Inc.
pET30a(+)	<i>E. coli</i> expression vector, Kan ^r	Novagen Inc.
pIJ8600	<i>Streptomyces</i> spp. expression vector, Tsr ^r , Apr ^r	Takano <i>et al.</i> , 1995
pUWL-KS	<i>E. coli</i> - <i>Streptomyces</i> shuttle vector, Tsr ^r	Wehmeier, 1995
pSMF388	Wild-type <i>relA</i> fragment inserted pSET152	Jin, 2002
pSMF3816	Wild-type <i>spoT</i> fragment inserted pUWL-KS	Jin, 2002
pSMF41045	pUC18 derivative bearing the fragment of from <i>EcoRI</i> of <i>spoT</i> and to <i>BamHI</i> of downstream of <i>spoT</i> .	Kim, unpublished
pET19b(RelA _{anti})	pET19b derivative bearing the a.a 246-479 of RelA	This study
pET19b(SpoT _{anti})	pET19b derivative bearing the a.a 180-390 of SpoT	This study
pET30a(+)(RelA)	pET30a(+) derivative bearing the full length RelA (aa 1-843)	Jin, unpublished
pET30a(+)(SpoT)	pET30a(+) derivative bearing the full-length SpoT (a.a 1-738)	This study
pET30a(+)(RelAN)	pET30a(+) derivative bearing the NTD of RelA (a.a 1-463)	This study
pET32a(+)-RelA (a.a 228-843)	pET32a(+) derivative bearing the a.a 228-843 of RelA	This study

Table 2. Plasmids used in this study (continued).

Plasmid	Description	Reference
pGADT7	GAL4(768-881)AD, LEU2, amp ^r , HA epitope tag	CLONTECH
pGBKT7	GAL4(1-147)DNA-BD, TRP1, kan ^r , c-Myc epitope tag	CLONTECH
pGADT7-T	SV40 large T-antigen(84-708) in pGADT7, LEU2, amp ^r	CLONTECH
pGBKT7-53	murine p53(72-390) in pGBKT7, TRP1, kan ^r	CLONTECH
pGBKT7-lam	Human lamin C(66-230) in pGBKT7, TRP1, kan ^r	CLONTECH
pGADT7(RelA)	pGADT7 derivative bearing the full-length RelA (a.a 1-843)	This study
pGADT7(SpoT)	pGADT7 derivative bearing the full-length SpoT (a.a 1-738)	This study
pGADT7(RelAN)	pGADT7 derivative bearing the NTD of RelA (a.a 1-463)	This study
pGADT7(RelAC)	pGADT7 derivative bearing the CTD of RelA (a.a 474-843)	This study
pGADT7(SpoTN)	pGADT7 derivative bearing the NTD of SpoT (a.a 1-409)	This study
pGADT7(SpoTC)	pGADT7 derivative bearing the CTD of SpoT (a.a 413-738)	This study
pGBKT7(RelA)	pGBKT7 derivative bearing the full-length RelA (a.a 1-843)	This study
pGBKT7(SpoT)	pGBKT7 derivative bearing the full-length SpoT (a.a 1-738)	This study
pGBKT7(RelAN)	pGBKT7 derivative bearing the NTD of RelA (a.a 1-463)	This study
pGBKT7(RelAC)	pGBKT7 derivative bearing the CTD of RelA (a.a 474-843)	This study
pGBKT7(SpoTN)	pGBKT7 derivative bearing the NTD of SpoT (a.a 1-409)	This study
pGBKT7(SpoTC)	pGBKT7 derivative bearing the CTD of SpoT (a.a 413-738)	This study
pGBKT7-RelA (a.a 1-100, 228-843)	pGBKT7 derivative bearing the a.a 1-100, 228-843 of RelA	This study
pGBKT7-RelA (a.a 1-100, 381-843)	pGBKT7 derivative bearing the a.a 1-100, 381-843 of SpoT	This study
pGBKT7-RelA (a.a 1-779)	pGBKT7 derivative bearing the a.a 1-779 of RelA	This study
pGBKT7-RelA (a.a 1-638)	pGBKT7 derivative bearing the a.a 1-638 of RelA	This study
pGBKT7-RelA (a.a 1-487)	pGBKT7 derivative bearing the a.a 1-487 of RelA	This study
pGBKT7-RelA (a.a 1-417)	pGBKT7 derivative bearing the a.a 1-417 of RelA	This study

플라스미드를 ET12567 (pUZ8002)를 경유하여 demethylation한 후 *Streptomyces* spp.에 transformation하였다.

나. 균주 배양

*E. coli*는 액체배양의 경우 37°C, 200 rpm에서 배양하였고 고체배양의 경우 37°C에서 배양하였다. *Streptomyces* spp.와 Yeast는 액체배양의 경우 30°C, 200 rpm, 고체배양의 경우 30°C에서 배양하였다. 균주 배양시 적절한 항생제를 배지 내에서 최종 농도가 다음과 같이 되도록 첨가하였다. (amphicillin 100 ug ml⁻¹, kanamycin 50 ug ml⁻¹, chloramphenicol 34 ug ml⁻¹, tetracyclin 10 ug ml⁻¹, hygromycin 50 ug ml⁻¹, apramycin 50 ug ml⁻¹).

(p)ppGpp 측정시 *S. clavuligerus*의 배양은 다음과 같이 하였다. 먼저 GYM plate에 나온 spore를 resuspension solution (0.85 % NaCl, 0.001 %, Triton X-100, glass bead)에 분산한 후 여기서 5 ml을 취하여 GYM medium (50 ml)에 접종하여 30°C, 200 rpm shaking incubator에서 24시간 배양한 다음 이 배양액에서 5 ml (OD₅₉₅에서 1.948)을 CD medium (50 ml)에 접종하여 동일한 조건으로 30시간 배양하였다. 배양액을 Whatman filter paper (GF/C)를 이용하여 균체를 회수한 후 이를 다시 transfer medium (50 ml)에 접종하였다. Transfer medium에 옮긴 후 이들 각각을 5, 15, 30, 60분씩 배양 후 다시 균체를 회수하였다.

다. *E. coli* 균주내로의 형질전환

*E. coli*의 형질전환은 CaCl₂ 방법 (Hanahan, 1983)의 방법을 변형하여 사용하였다. Single colony를 5 ml의 LB 배지에서 밤새 키운 후 50 µl를 5 ml의 TYM 배지에 계대 하여 4-6시간동안 배양하였다. 배양한 세포 1 ml을 다시 100 ml의 TYM 배지에 계대하여 OD₅₅₀이 0.5가 될 때까지 배양하였다. 그 후 세포를 4°C에서 원심분리를 통해 수확하고 20 - 40 ml의 Tbf I에 세포를 현탁하여 1시간 동안 얼음에 방치하였다. 다시 세포를 4°C에서 원심분리를 통해 수확한 후 3 - 4 ml의 Tbf II 용액을 넣고 조심스럽게 pellet을 현탁하고 200 µl 씩 분주하여 -70°C에서 보관하였다. 플라스미드를 형질전환 시 분주된 세포를 상온에서 녹인 후 100 ng의 플라스미드를 첨가하고 얼음 속에서 30분간 방치하였다. 42°C에서 90초간 열처리한 후 얼음에서 2분 동안 보관하였다. 0.8 ml의 LB broth를 더해준 다음 150 rpm, 37°C에서 45분 동안 배양하고 그 후 0.1 ml의 배양액을 적당한 항생제를 포함하는 선택배지에 도말해서 37°C에서 16시간 배양하였다.

라. *E. coli* 균주에서의 플라스미드 분리

E. coli 에서의 플라스미드는 alkaline lysis 방법 (Sambrook *et al.*, 1989) 및 Plasmid Purification Kit (NucleoGen, Korea)을 이용해 분리하였다.

마. 제한 효소 및 변형효소

제한효소 및 변형효소들은 남도바이오 (남도바이오, Korea)의 제품을 구입하여 사용하였으며, 제조회사에서 추천하는 방법 및 버퍼로서 반응시켰다.

바. 연쇄 중합 반응

PCR은 *Premix Taq*TM (*TaKaRa Ex Taq*TM version) (Takara, Japan)의 제품과 Table 3.의 primer (코아바이오, Korea)를 사용하여 제조회사에서 추천하는 방법으로 반응시켰다. PCR 산물은 sequencing (마크로젠, Korea)을 통하여 확인하였다.

사. DNA 정제

PCR 산물 혹은 agarose gel상의 DNA는 PCR Purification Kit (Nucleogen, Korea)를 이용하여 제조회사에서 추천하는 방법으로 정제하였다.

아. 항체생산

분리된 단백질을 SDS-PAGE를 한 후 coomassie blue staining을 하였다. 그 후 원하는 단백질 밴드를 잘라내어 곱게 으갠 후 약간의 PBS에 섞어 8주령, female, ICR mouse에 주사하였다. 2번의 boosting을 10일 간격으로 한 후 첫 주사 후 30일째 되는 날 채혈하였다. 채혈한 피를 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 응고시킨 후 원심분리 하여 항체를 포함하고 있는 상등액을 얻었다.

자. Western blotting

분석하고자하는 단백질을 SDS-PAGE 한 후 transfer buffer에 10분간 equilibrate시켰다. Sponge, 3 MM paper, gel, nitrocellulose membrane, 3 MM paper, sponge의 순으로 transfer cassette를 만든 후에 4°C에서 300 mA로 3시간동안 transfer하였다. Transfer가 끝난 후 membrane을 떼어내고 fresh하게 준비된 blocking solution (TBS-T with 5 % skim milk)에 3시간이상 상온에서 incubation 하였다. 그 후 primary antibody solution (Diluted with TBS-T containing 2.5 % skim milk)를 첨가한 뒤 1시간 incubation 하였다. 15분, 5분, 5분 간격으로 3번 washing 해주고 secondary antibody solution (HRP conjugated anti-mouse IgG was 1/6000 diluted with TBS-T containing 2.5 % skim milk)를 넣고 1시간동안 incubation한 뒤 다시 15분, 5분, 5분 3번 washing 해주었다. 그 후 ECL로 확인하였다. Secondary antibody 및 ECL 관련 시약은 Amersham Pharmacia Biotech (Amersham Pharmacia Biotech, USA)의 제품을 사용하였다.

Table 3. Primers used in this study.

Primer	Sequence (5' → 3')
RelAB_(XbaI)	TTCGACCTCTCTAGAAACGAGGTCTTC
SpoTF_(XbaI)	GGCGAGGAGTCTAGAGAGCCAGCCGGG
RelAN_(NdeI)	GGAGCGCATATGCCAGACGAGGCCCGT
RelAN_(BamHI)	CATGTCGTTGACGTGGGGATCCTAGCC
RelAC_(NdeI)	GACGACCATATGAACGACATGGCGTGG
RelAC_(BamHI)	CGCCCCGGATCCTTATGGCCGGCGGGC
SpoTN_(NdeI)	GTGCCCCATATGAGTGCAGAGGCCGCG
SpoTN_(BamHI)	GGGGCGGGTTCGGGTGGATCCGCTAGCC
SpoTC_(NdeI)	GGCGAGCATATGGACCCGACCCGCCCC
SpoTC_(BamHI)	ACCACCGGATCCAGGTCAGCCGGTGGC
RelA _{anti} _(NdeI)	GACCGGCTCCACCATATGCGCACCATG
RelA _{anti} _(BamHI)	CGAGGGATCCTCGGTCTACTTCTGTCA
SpoT _{anti} _(NdeI)	GACCGGCTGCACCATATGCGCACCCTC
SpoT _{anti} _(BamHI)	GTCGGATCCGGGGGTGGACTACTGTCA
RelA_(1251bp)	CGGGATCCCGACCGGCTAGCCGTTGGG
RelA_(1461bp)	CAGCGGATCCAGGAACTCCTAGGGGTC
RelA_(1914bp)	CGGGATCCTAGTCGGGGTAGCGCATCT
RelA_(2337bp)	CGGGATCCGGGTCTAGTCCGACAGCAG
RelA_(300bp)	AACGGGGGTACCCGGGGAGGAGCGCTG

차. Yeast two-hybrid 실험

Yeast two-hybrid 실험은 Clontech (Clontech, USA)의 MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System3 & Libraries를 이용하였다. 사용한 Yeast 균주는 AH109로 *HIS3*, *ADE2*, *MEL1*, *LacZ*를 reporter 유전자로 갖고 있다. Yeast two-hybrid에서 사용한 vector는 DNA binding domain을 원하는 단백질의 N-말단에 결합하여 발현시킬 수 있는 pGBKT7와 activation domain을 원하는 유전자의 N-말단에 결합하여 발현시킬 수 있는 pGADT7이다. Yeast에 관한 전반적인 실험은 Yeast Protocols Handbook (Clontech, USA)와 MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System3 & Libraries User Manual (Clontech, USA)에 따라 하였다.

카. (p)ppGpp의 분리 및 검출

Cell pellet을 1M formic acid (10 ml)에 넣고 4°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, 4°C에서 1,000 x g 으로 10분간 원심분리 하여 상등액을 얻고 이 상등액을 filtration (0.45 μm)하였다. 그 후 freeze drying하여 얻은 분말을 증류수 (300 μl)에 녹이고 phenol 및 chloroform extraction하여 상등액을 취한 후 cosmonice filter (0.45 μm , d = 0.4 cm)를 이용하여 filtration하였다. 이 상등액을 HITACHI D-7000 system의 Partisil 10-SAX (4.6 x 250 mm) column과 HITACHI L-7400 UV detector (260 nm)을 이용하여 (p)ppGpp를 검출하였다. 검출에는 7 mM KH_2PO_4 (pH4.0)의 low buffer와 0.5 M KH_2PO_4 + 0.5 M Na_2SO_4 (pH5.4)의 high buffer를 이용하였다. (p)ppGpp의 검출은 0분에서 60분까지 high buffer를 중심으로 0 %에서 100 %의 gradient method로 검출하였으며, flow rate는 1.0 ml min⁻¹이었다.

타. Clavulanic acid의 정량

Streptomyces clavuligerus ATCC 27064에서 생산된 clavulanic acid의 측정은 측정하고자 하는 sample 400 μl 와 imidazole 100 μl 를 잘 섞은 후 상온에서 15분간 반응시킨 다음 HPLC에 sample 20 μl 를 loading하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *Streptomyces clavuligerus*의 RelA 및 SpoT의 역할

(1) *Streptomyces clavuligerus* RelA 및 SpoT가 형태적 분화에 미치는 영향

S. clavuligerus ATCC27064, *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$), *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$), *S. clavuligerus* SMF389 ($\Delta relA$, complemented), *S. clavuligerus* SMF3817 ($\Delta spoT$, complemented)를 GYM medium에서 30°C, 6일간 배양한 결과 *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$)이 분화과정이 심하게 손상되어서 bald phenotype을 나타내었고, *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)는 포자형성이 wild type에 비해 지연되었지만 거의 정상적인 분화과정을 나타내었다 (Figure 1). 이는 RelA가 SpoT에 비해 형태분화에 있어서 중요한 signal molecule인 (p)ppGpp의 생합성에 주요한 역할을 담당하기 때문인 것으로 생각된다. 즉, *relA* disruptant의 경우는 SpoT가 존재하여도 RelA가 없기 때문에 (p)ppGpp의 농도가 낮고 낮은 (p)ppGpp의 농도는 GTP를 감소시키지 못한다. 세포내의 높은 GTP는 형태분화를 억제 하여 bald phenotype을 나타낸다. 반대로 SpoT disruptant의 경우에는 wild type에 비해 약간 늦은 형태분화를 보여주었는데 이는 SpoT를 disruption하여도 RelA가 (p)ppGpp를 합성하여 정상적인 형태분화를 하기 때문이다. *S. clavuligerus* SMF389 ($\Delta relA$, complemented), *S. clavuligerus* SMF3817 ($\Delta spoT$, complemented)는 wild type과 같은 분화 양상을 보여주었다. 이는 결손된 RelA 혹은 SpoT가 보완되었기 때문이다.

(2) *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$) 그리고 *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)에서 (p)ppGpp의 측정

S. clavuligerus ATCC 27064, *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$) 그리고 *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)에서 nutrient-shift down을 하여 (p)ppGpp를 측정 한 결과 wild type에서는 shift down 후 15분경에 최대 100 pmol⁻¹, $\Delta relA$ 의 경우는 0.37 pmol⁻¹ 그리고 $\Delta spoT$ 의 경우는 80 pmol⁻¹가 생산됨을 확인할 수 있었다 (Figure 2). RelA와 SpoT는 대개 (p)ppGpp를 합성 분해의 두 기능을 가진 것으로 알려져 있는데 $\Delta spoT$ 에서는 SpoT의 합성 기능이 제거된 상태임으로 wild type보다 적은양의 (p)ppGpp가 생산된 것이며, $\Delta relA$ 와 $\Delta spoT$ 를 비교해 볼 때, RelA가 (p)ppGpp합성에 주된 역할을 하고 있음을 알 수 있었다. 또한 이번 실험은 N-limitation을 이용한 실험이므로 C-limitation에 의해 활성화 된다고 알려진 SpoT의 활성이 상대적으로 낮아졌기 때문이라고 생각해 볼 수도 있겠다. 또한 nutrient-shift down 이 후 15분까지는 (p)ppGpp의 양이 점 점 증가하다가 감소하는 것으로 보아 (p)ppGpp는 세포 내가 외부로 신호를 받았을 때 합성되어 이 신호를 세포 내 전달한 다음 사라지는 조절자의 역할을 함을 알 수 있었으며 shift

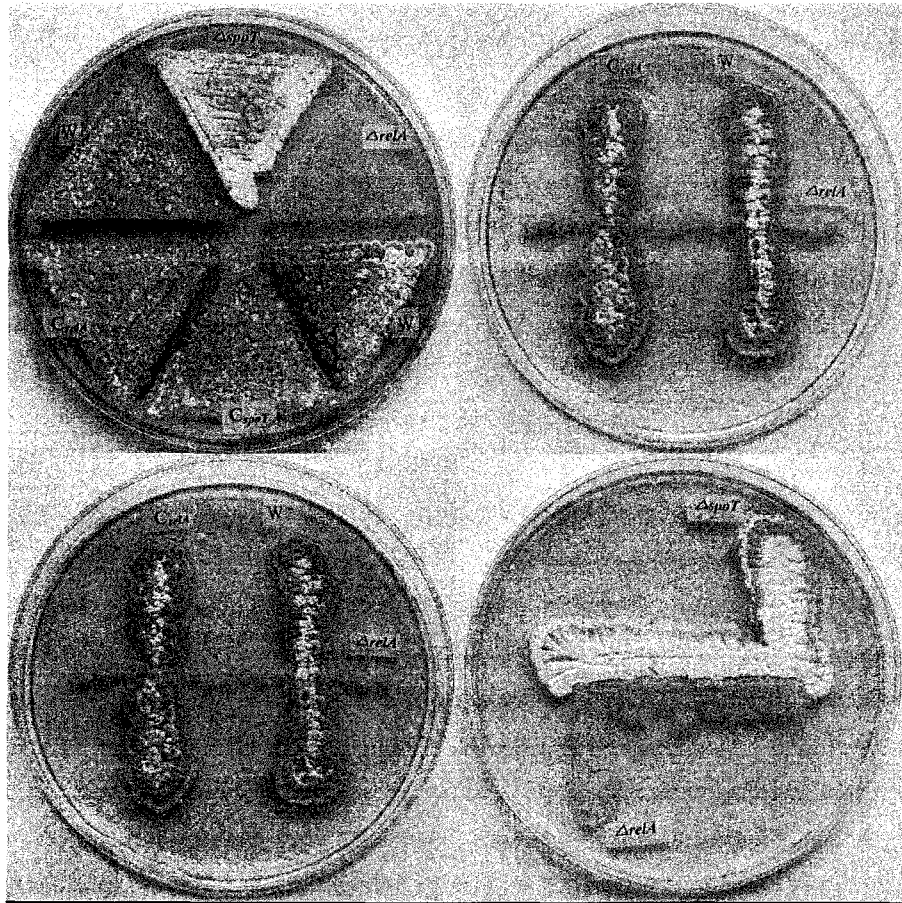


Figure 1. Plate culture of *S. clavuligerus* ATCC 27064, *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$) and *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$) on GYM medium. Spore was produced in wild type, but not in two mutant strain.

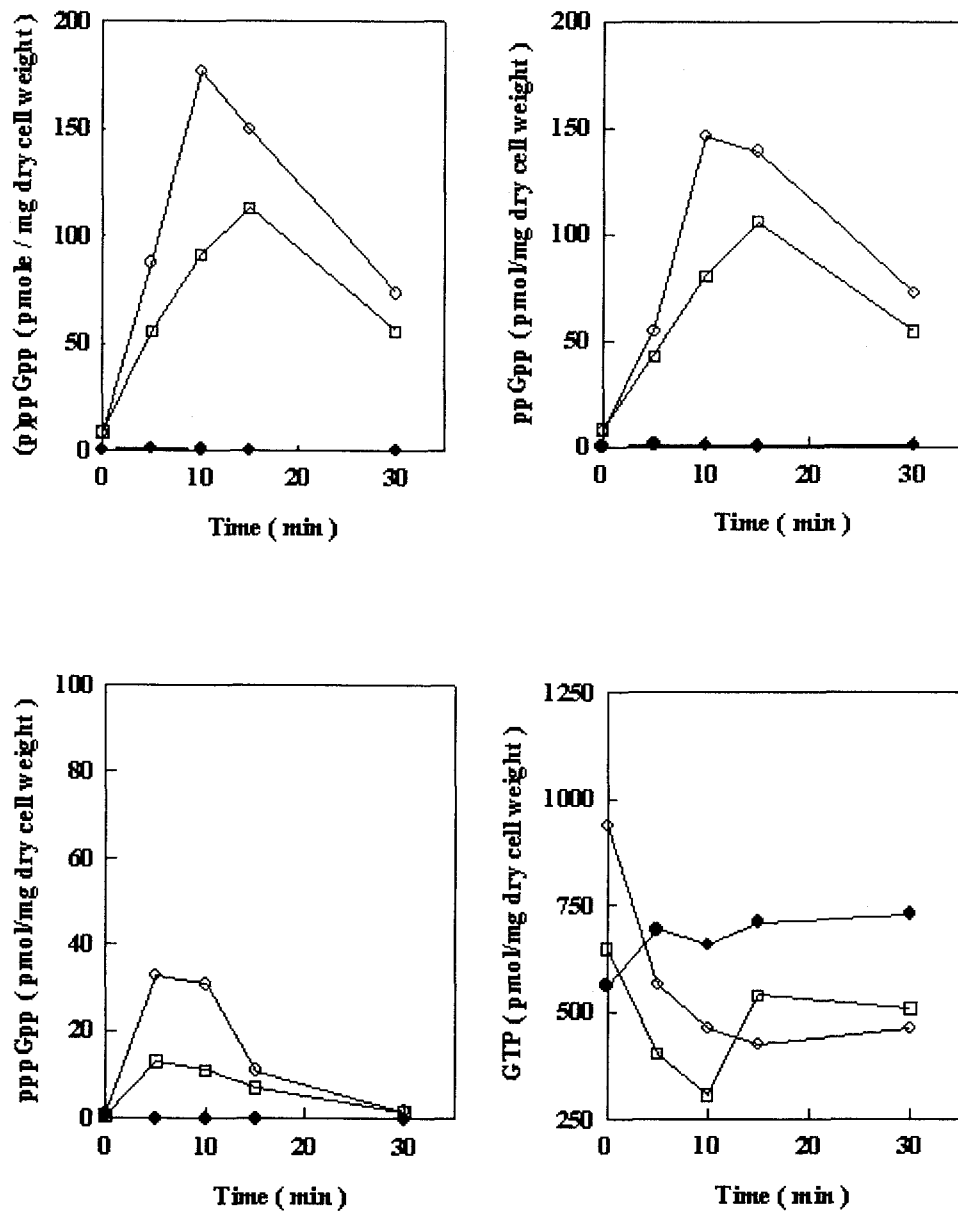


Figure 2. The (p)ppGpp produced from *S. clavuligerus* ATCC 27064 (○), $\Delta relA$ (●) and $\Delta spoT$ (□)

down 후 시간이 지남에 따라 세포의 상태가 악화되며 세포의 색깔 자체도 진한 검은 색으로 변화하는 것을 보아 과량의 (p)ppGpp의 합성이 세포에 toxic 하다.

(3) *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064, *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$), *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$) 발효하여 clavulanic acid 측정결과 wild type과 *relA* mutant에서의 clavulanic acid를 정량한 결과 wild type에서는 최대 $64 \text{ mg } \ell^{-1}$ 생산되었으며, *relA* mutant에서는 $3.7 \text{ mg } \ell^{-1}$ 이 생산되었다. 이런 결과를 바탕으로 (p)ppGpp는 cell의 nutrition stress에 대한 signal molecule로서 항생제 생산에도 관여하고 있음을 간접적으로 알 수 있었다 (Figure 3).

나. Yeast two-hybrid system을 이용한 *S. clavuligerus* RelA와 SpoT의 상호 작용 확인

(1) Yeast two-hybrid system에 사용할 벡터 제

우선 RelA (a.a 1-843)의 경우 기존에 제작되어 있던 pET30a(+)(RelA)를 이용하였다. pET30a(+)(RelA)를 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하여 *relA*를 포함하고 있는 DNA를 agarose gel extraction 하여 분리하였다. 그 후 같은 제한효소로 잘린 pGBKT7 혹은 pGADT7에 ligation하여 pGADT7(RelA), pGBKT7(RelA)를 얻었다. SpoT (a.a 1-738)는 제한 효소의 제약 때문에 *spoT*의 5' 쪽을 PCR하여 *NdeI* site를 생성하였다. pSMF3816을 주형으로 하고 SpoTN_(*NdeI*), SpoTF_(*XbaI*)을 primer로 하여 PCR하였다. 이 PCR 산물을 *NdeI*과 *EcoRI*으로 절단한 후 agarose gel extraction 하였다. *spoT*의 3' 쪽은 pSMF41045를 *EcoRI*과 *BamHI*으로 절단하여 agarose gel extraction 하여 얻었다. 그 후 PCR하여 얻은 *spoT*의 5' 쪽과 pSMF41045에서 얻은 *spoT*의 3' 쪽을 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단된 pGBKT7 혹은 pGADT7에 ligation하여 pGADT7(SpoT), pGBKT7(SpoT)를 얻었다. RelA (a.a 1-463)은 pSMF388을 주형으로 RelAN_(*NdeI*)과 RelAN_(*BamHI*)을 primer로 하여 PCR하였고, RelA (a.a 474-843)은 pSMF388을 주형으로 RelAC_(*NdeI*)과 RelAC_(*BamHI*)을 primer로, SpoT (a.a 1-409)는 pSMF3816을 template로 SpoTN_(*NdeI*)과 SpoTN_(*BamHI*)을 primer로, SpoT (a.a 413-738)은 pSMF3816을 template로 SpoTN_(*NdeI*)과 SpoTN_(*BamHI*)을 primer로 각각 PCR하였다. PCR 산물을 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하고 agarose gel extraction 한 후 같은 제한 효소로 잘린 pGADT7과 pGBKT7에 ligation하여 원하는 재조합 플라스미드를 얻었다.

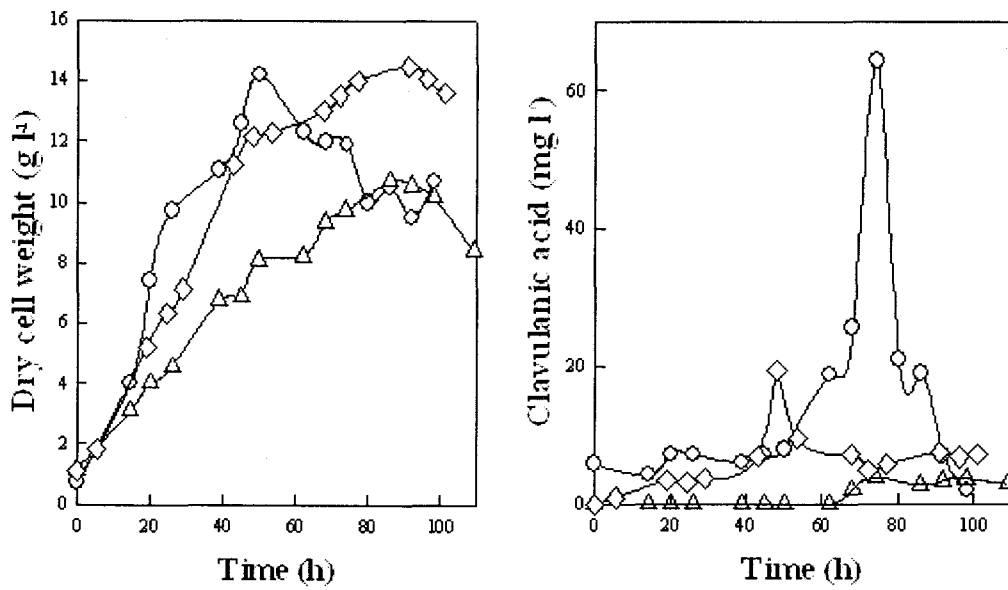


Fig 3. *S. clavuligerus* ATCC 27064 wild type(○)과 두 가지 유도체 $\Delta relA$ (△), $\Delta spoT$ (◇)로부터 분리한 clavulanic acid를 측정 한 결과

(2) pGBKT7(RelA), pGBKT7(SpoT), pGBKT7(RelAN), pGBKT7 (RelAC), pGBKT7(SpoTN), pGBKT7(SpoTC)로 형질전환 된 AH109균주의 자가 활성화 확인

pGBKT7(RelA), pGBKT7(SpoT), pGBKT7(RelAN), pGBKT7(RelAC), pGBKT7(SpoTN), pGBKT7(SpoTC)를 AH109 균주에 형질전환한 후 트립토판이 없는 배지인 SD/-Trp에 spreading하여 원하는 재조합 플라스미드로 형질전환 된 균주를 선별하였다. pGBKT7을 재조합한 플라스미드로 형질전환 된 균주는 *TRP1* 을 발현하여 트립토판이 없는 배지 내에서도 성장가능하다. 선별된 균주를 SD/-Trp/X- α -Gal 혹은 SD/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal에 streaking하여 30°C에서 5 일간 배양하여 형질전환 된 AH109 균주가 reporter유전자인 *MEL1* 혹은 *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* 을 활성화하는지 여부를 각각 테스트하였다.

SD/-Trp/X- α -Gal 결과를 보면 각각의 플라스미드로 형질전환 된 AH109 균주가 잘 성장하였다 (Figure 4). 이는 각각의 재조합 플라스미드로부터 생성되는 단백질이 AH109균주의 성장에 큰 영향이 없음을 의미한다. 그러나 SD/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal에서는 pGBKT7(RelAC) 혹은 pGBKT7(SpoTC)로 형질전환 된 AH109 균주만 성장하였다 (Figure 4). 이는 AH109 균주 내에서 DNA binding domain에 결합된 RelA (a.a 474-843) 혹은 SpoT (a.a 413-738)이 *HIS3*, *ADE2* reporter 유전자를 활성화 시켰기 때문에 히스티딘과 아데닌이 없는 배지 내에서도 생장이 가능했다. 또한 SD/-Trp/X- α -Gal 과 SD/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal에서 pGBKT7(RelAC) 혹은 pGBKT7(SpoTC)로 형질전환 된 AH109 균주만이 *MEL1* reporter 유전자 또한 활성화 시켜 파란색을 나타냈다. *MEL1*은 α -galactosidase를 암호화하는 유전자로 α -galactosidase는 외부로 분비되어 X- α -Gal를 분해하여 파란색을 나타낸다.

결론적으로 pGBKT7(RelAC) 혹은 pGBKT7(SpoTC)로 형질전환 된 AH109균주는 자가 활성화하여 *HIS3*, *ADE2*, *MEL1* reporter유전자 모두를 활성화 시켰다. pGADT7(RelA), pGADT7(SpoT)는 테스트한 결과 자가 활성화하지 않았다 (Data not shown). 이에 따라 Yeast two-hybrid 실험은 RelA (a.a 1-843)과 SpoT (a.a 1-738)만을 하기로 하였다.

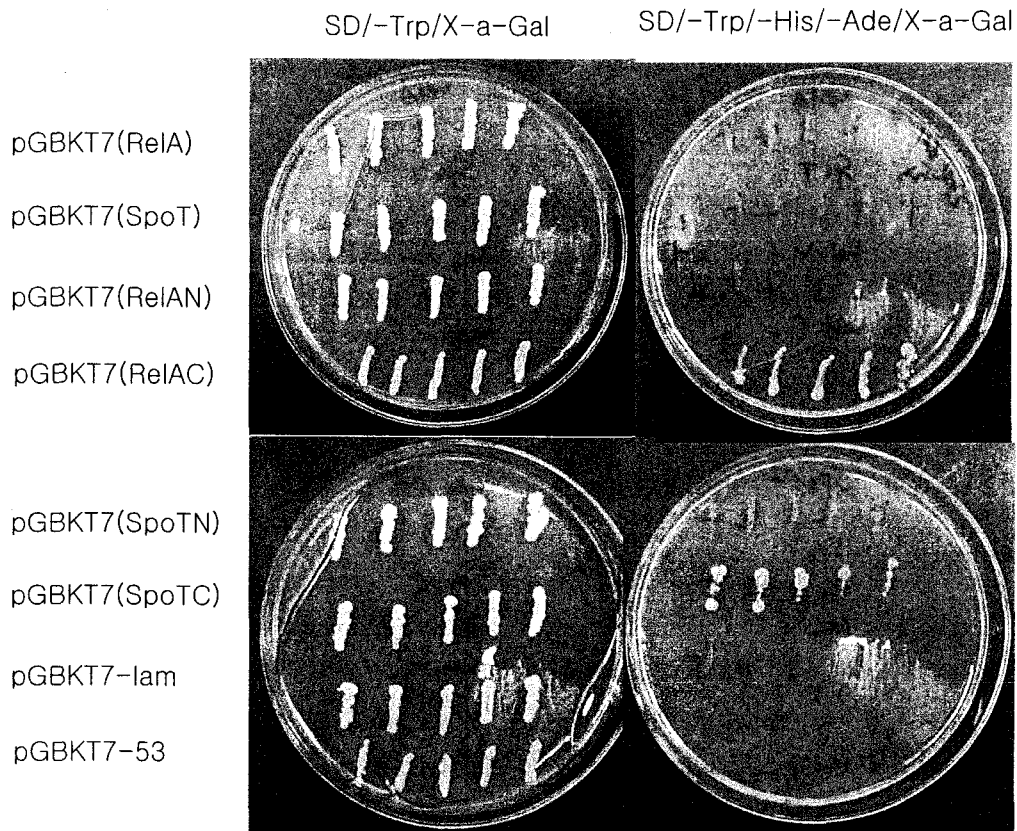


Figure 4. Test for autonomous activation. RelA (a.a 1-843), SpoT (a.a 1-738), RelA (a.a 1-463), RelA (a.a 474-843), SpoT (a.a 1-409), SpoT (a.a 413-738) and pGBKT7-lam, pGBKT7-53 was cloned to pGBKT7, respectively. And the recombinant plasmid was transformed to AH109 (*HIS3*, *ADE2*, *MEL1* reporter) and spreaded to SD/-Trp. Several colonies were streaked to SD/-Trp/X-a-Gal and SD/-Trp/-His/-Ade/ X-a-Gal. Then incubated at 30°C for 5 days.

(3) Yeast two-hybrid system을 이용하여 RelA와 SpoT의 상호작용 확인

RelA (a.a 1-843)과 SpoT (a.a 1-738)의 상호작용 확인을 위해서 table 4.와 같은 조합으로 AH109 균주에 형질전환 하였다. AD-RelA/BD, AD/BD-RelA, AD-SpoT/BD, AD/BD-SpoT는 AH109 균주 내에서의 자가 활성화 여부에 대한 테스트고 positive control은 yeast two-hybrid 실험에서 상호작용 함이 이미 알려진 p53과 large T-antigen이 AH109 균주 내에서 DNA binding domain과 activation domain에 각각 결합되어 발현된다. 이와는 대조적으로 negative control은 상호작용하지 않는 human lamin C와 large T-antigen이 각각 DNA binding domain 과 activation domain에 각각 결합되어 발현된다. 형질전환 된 AH109 균주를 SD/-Leu/-Trp에 spreading하여 재조합 플라스미드를 지니고 있는 균주를 선별 하였다. pGBKT7을 재조합한 플라스미드와 pGADT7을 재조합한 플라스미드로 동시에 형질전환 된 AH109 균주는 벡터에 있는 *LEU2*와 *TRP1*의 발현에 의해 루이신과 트립토판이 없는 배지 내에서도 성장 가능하다. 그 후 선별된 균주를 SD/-Leu/-Trp 혹은 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade에 streaking하여 30°C에서 5일간 배양하여 형질전환 된 AH109 균주가 reporter유전자인 *HIS3*, *ADE2*를 활성화하는지 여부를 각각 테스트하였다.

실험 결과 negative control을 비롯하여 AD-RelA/BD, AD/-RelA, AD-SpoT/BD, AD/BD-SpoT는 SD/-Leu/-Trp에서는 잘 자라지만 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade에서는 자라지 못 하였다 (Figure 5). 이는 DNA binding domain 혹은 activation domain에 결합된 RelA (a.a 1-843), SpoT (a.a 1-738)이 자가 활성화하지 않음을 의미한다. 그리고 positive control을 비롯하여 AD-RelA/BD-RelA, AD-RelA/BD-RelA, AD-SpoT/BD-SpoT, AD-SpoT/BD-SpoT 모두 SD/-Leu/-Trp와 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade에서는 잘 자랐다 (Figure 5). 이는 형질전환된 AH109 균주 내에서 RelA (a.a 1-843)와 RelA (a.a 1-843), RelA (a.a 1-843)와 SpoT (a.a 1-738), SpoT (a.a 1-738)와 SpoT (a.a 1-738)이 상호작용 하여 *HIS3*, *ADE2* reporter 유전자를 활성화했기 때문이다. 그러나 RelA (a.a 1-843)와 RelA (a.a 1-843)는 상호작용이 강하지 못하기 때문에 AD-RelA/BD-RelA의 경우 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade에서 성장 속도가 느렸고 붉은색을 나타내며 자랐다 (Figure 5). 실제로 pGADT7(RelA)와 pGBKT7(RelA)로 형질전환된 균주를 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade에 spreading후 30°C, 5일간 배양했을 때 colony가 전혀 생성되지 않았다 (Data not shown). 왜냐하면 형질전환 초기에는 재조합 플라스미드의 수가 적기 때문에 재조합 단백질 의 발현양도 적기 때문이다. 그러므로 상호작용이 약한 단백질의 경우 형질전환 된 균주를 바로 spreading하면 colony가 생성되지 않지만 SD/-Leu/-Trp에서 재조합 플라스미드를 지닌 균주를 선택한 후 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade에 streaking하면 서서히 자란다.

Table 4. Plasmid set cotransformed into AH109.

plasmid set	Description
AD-RelA/BD	pGADT7(RelA) and pGBKT7 were cotransformed into AH109
AD/BD-RelA	pGADT7 and pGBKT7(RelA) were cotransformed into AH109
AD-SpoT/BD	pGADT7(SpoT) and pGBKT7 were cotransformed into AH109
AD/BD-SpoT	pGADT7 and pGBKT7(SpoT) were cotransformed into AH109
AD-RelA/BD-RelA	pGADT7(RelA) and pGBKT7(RelA) were cotransformed into AH109
AD-RelA/BD-SpoT	pGADT7(RelA) and pGBKT7(SpoT) were cotransformed into AH109
AD-SpoT/BD-RelA	pGADT7(SpoT) and pGBKT7(RelA) were cotransformed into AH109
AD-SpoT/BD-SpoT	pGADT7(SpoT) and pGBKT7(SpoT) were cotransformed into AH109
positive control	pGADT7-T and pGBKT7-53 were cotransformed into AH109
negative control	pGADT7-T and pGBKT7-lam were cotransformed into AH109

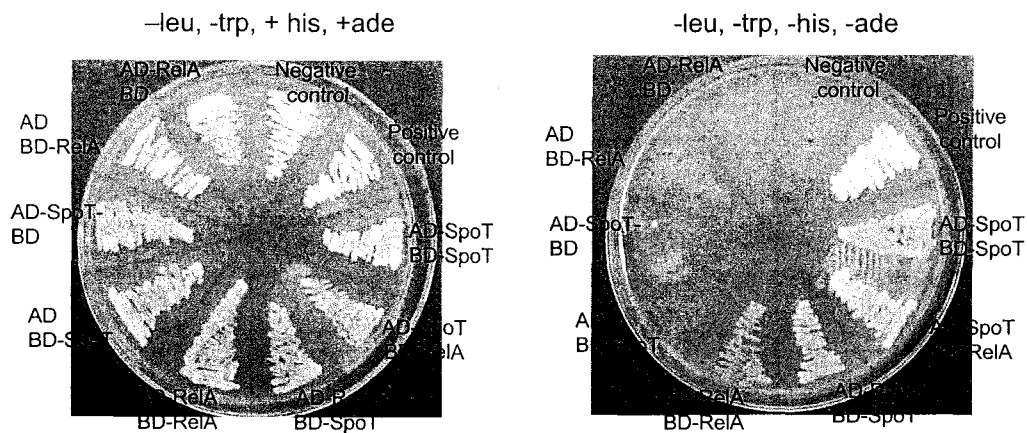


Figure 5. Verification of RelA and SpoT interactions using yeast two-hybrid system. RelA (a.a 1-843), SpoT (a.a 1-738) cloned to pGADT7, pGBKT7 were transformed into AH109 (*HIS3*, *ADE2*, *MEL1* reporter) and spreaded to SD/-Leu/-Trp. Single colony was streaked to SD/-Leu/-Trp and SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade. Then incubated at 30°C for 5 days.

결론적으로 히스티딘과 아데닌이 없는 배지에서 *HIS3*, *ADE2* reporter 유전자의 활성화를 조사한 결과 RelA (a.a 1-843)와 SpoT (a.a 1-738), SpoT (a.a 1-738)와 SpoT (a.a 1-738)이 상호작용 하였고 RelA (a.a 1-843)와 RelA (a.a 1-843)도 약하게 상호작용 하였다.

(4) β -galactosidase assay를 통한 RelA와 SpoT의 상호작용 세기의 정량화

RelA (a.a 1-843)과 SpoT (a.a 1-738)의 상호작용의 세기를 정량화 하기 위하여 *lacZ* reporter 유전자가 발현하는 β -galactosidase의 활성을 o-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG)를 이용하여 측정하여 세 번의 독립적인 실험 결과 positive control의 β -galactosidase의 활성이 9.14 Miller units로 가장 높게 나왔으며 AD-SpoT/BD-RelA가 3.92 Miller units, AD-RelA/BD-SpoT가 1.72 Miller units가 나왔다 (Figure 6). 나머지 균주에서는 Miller units이 1미만의 값이 나왔다 (Figure 6). 이렇듯 β -galactosidase의 활성이 적게 나온 이유는 reporter 유전자를 조절하는 promoter의 종류에 있다. *HIS3*나 *ADE2*는 *GAL1*과 *GAL2*와 같은 강한 promoter의 조절을 받는데 비해 *MEL1*과 *lacZ*는 상대적으로 약한 *MEL1* promoter의 조절을 받는다. 그러므로 *HIS3*와 *ADE2* reporter 유전자에 의해 SpoT (a.a 1-738)과 SpoT (a.a 1-738), RelA (a.a 1-843)과 RelA (a.a 1-843)의 상호작용이 관찰되었으나 *lacZ* reporter 유전자에 의해서는 관찰되지 않았다.

지금까지 AH109에서 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade에서 생장에 의한 *HIS3*, *ADE2* reporter 유전자의 활성측정과 *lacZ* reporter 유전자에 의해 발현되는 β -galactosidase의 활성측정 실험에 근거하여 상호작용의 세기를 추정해보면 RelA (a.a 1-843)와 SpoT (a.a 1-738)의 상호작용이 가장 세고 SpoT (a.a 1-738)와 SpoT (a.a 1-738)의 상호작용의 세기가 두 번째로 강하며 RelA (a.a 1-843)와 RelA (a.a 1-843)의 상호작용의 세기가 가장 약했다.

아직 *Streptomyces clavuligerus*에서 RelA (a.a 1-843)와 SpoT (a.a 1-738)의 상호작용이 (p)ppGpp 대사에 미치는 영향이 아직 조사되지 않았다. 그러나 *E. coli*에서 (p)ppGpp 합성을 못하는 점 돌연변이가 된 RelA 혹은 (p)ppGpp 합성을 못하는 RelA의 C-말단 도메인을 정상균주에서 발현시키면 정상균주의 RelA는 (p)ppGpp의 합성 능력이 저해된다 (Gropp *et al.*, 2001). 이 연구 결과에 비추어 추론해볼 때 *S. clavuligerus*에서 (p)ppGpp 합성 능력이 없는 SpoT (a.a 1-738)이 RelA (a.a 1-843)과 상호작용해서 (p)ppGpp 합성을 저해하는 듯 하다.

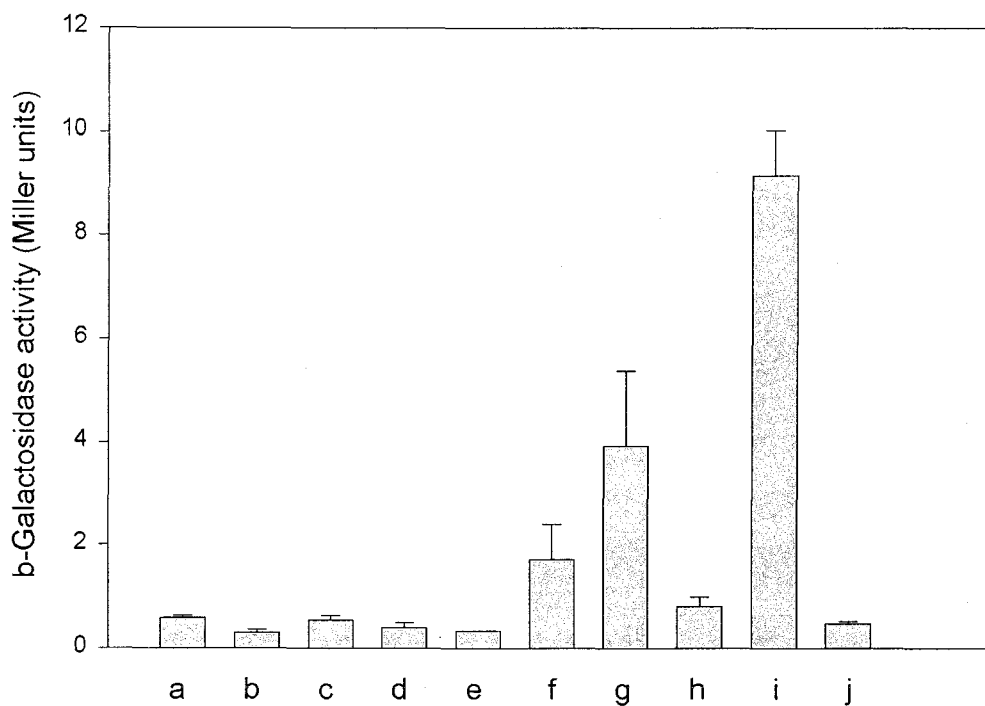


Figure 6. β -galactosidase assay using ONPG as substrate. The specific activities of the β -galactosidase reporter in AH109 carrying the indicated combination of two-hybrids were determined. The values are the averages of three independent determinations. The two-hybrid plasmid combinations were as follows: a, pGADT7(RelA)/pGBKT7; b, pGADT7/ pGBKT7(RelA); c, pGADT7(SpoT)/pGBKT7; d, pGADT7 /pGBKT7(SpoT); e, pGADT7(RelA) /pGBKT7(RelA); f, pGADT7(RelA) /pGBKT7(SpoT); g, pGADT7(SpoT) /pGBKT7(RelA); h, pGADT7(SpoT)/ pGBKT7(SpoT); i, pGADT7-T /pGBKT7-53 (positive control); j, pGADT7-T/pGBKT7-lam(negative control)

다. RelA (a.a 246-479) 혹은 SpoT (a.a 180-390)에 대한 항체 제작

(1) pET19b(RelA_{anti}) 와 pET19b(SpoT_{anti}) 제작

RelA의 아미노산 246부터 479를 pSMF388을 주형으로 RelA_{anti}(NdeI)과 RelA_{anti}(BamHI)을 primer로 하여 PCR하였다. 이 PCR 산물을 NdeI과 BamHI으로 절단한 후 같은 제한효소로 절단된 pET19b에 ligation하여 pET19b(RelA_{anti})를 제작하였다. pET19b에 재조합된 플라스미드는 나중에 단백질 분리시 이용되는 9개의 히스티딘기를 N-말단에 암호화하고 있다. RelA와 비슷하게 SpoT도 180부터 390부분을 pSMF3816을 주형으로 SpoT_{anti}(NdeI)과 RelA_{anti}(BamHI)을 primer로 PCR한 후 NdeI과 BamHI으로 절단하였다. 그리고 같은 제한효소로 절단된 pET19b에 ligation하여 pET19b(SpoT_{anti})를 제작하였다.

(2) RelA (a.a 246-479) 와 SpoT (a.a 180-390)의 대량생산 및 분리

pET19b(RelA_{anti}) 혹은 pET19b(SpoT_{anti})를 각각 BL21(DE3)pLysS 균주에 형질 전환 하였다. 형질전환이 된 균주를 1 mM의 IPTG로 induction하여 37°C에서 3시간동안 배양한 후 대량생산된 단백질의 solubility를 조사한 결과 RelA (a.a 246-479)와 SpoT (a.a 180-390) 모두 insoluble 형태인 inclusion body를 형성하였다 (Data not shown). 이에 따라 induction한 세포에서 inclusion body를 분리한 후 6 M의 urea를 포함하는 Binding buffer로 insoluble한 단백질을 녹여냈다. 녹여낸 용액을 His·Bind Column에 loading하고 Binding buffer (6 M urea), Washing buffer (20 mM imidazole, 6 M urea), Washing buffer (40 mM imidazole, 6 M urea)로 3번의 washing을 한 후 Strip buffer로 단백질을 elution시켰다. 그 후 elution된 용액을 ultrafiltration으로 농축하였다. 그 결과 30kDa의 재조합 RelA (a.a 246-479)와 26.4kDa의 재조합 SpoT (a.a 180-390)을 얻을 수 있었다(Figure 7). 이렇게 분리되어 농축된 재조합 RelA (a.a 246-479) 혹은 재조합 SpoT (a.a 180-390)를 쥐에 주사하여 항체를 생산하였다.

(3) 재조합 RelA (a.a 246-479) 혹은 재조합 SpoT (a.a 180-390)의 항체를 이용한 Western blotting

쥐로부터 생산한 재조합 RelA (a.a 246-479)의 항체의 질을 *E. coli*에서 대량생산한 재조합 RelA (a.a 246-479), RelA (a.a 1-463), RelA (a.a 1-843)을 western blotting 함으로써 확인하였고, 재조합 SpoT (a.a 180-390)에 대한 항체의 질은 재조합 SpoT (a.a 180-390), SpoT (a.a 1-738)을 western blotting 함으로써 확인하였

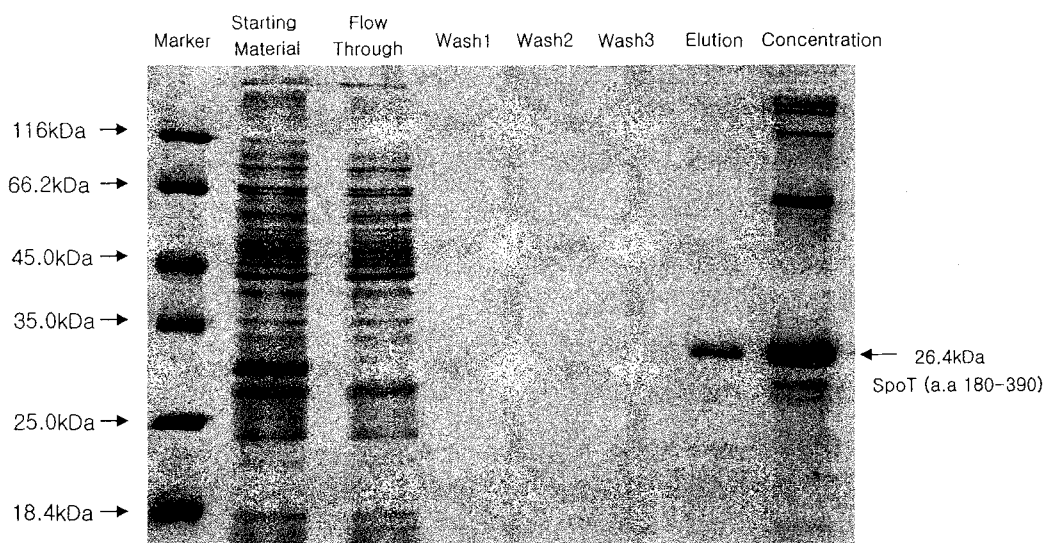
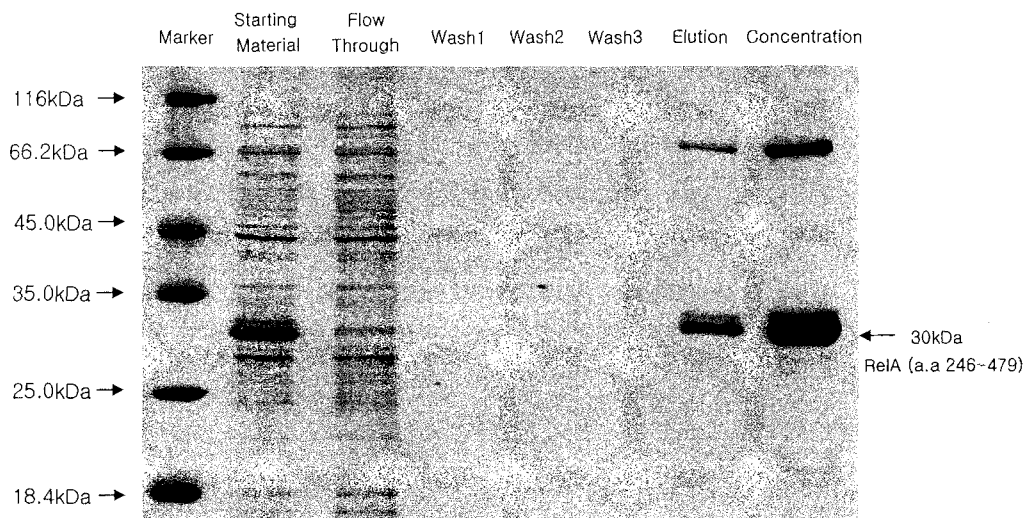


Figure 7. Purification of recombinant RelA (a.a 246-479) or recombinant SpoT (a.a 180-390).

다. RelA (a.a 1-843)은 pET30a(+)(RelA)를 BL21(DE3)pLysS에서 대량생산하여 얻었고 RelA (a.a 1-463)과 SpoT (a.a 1-738)은 pET30a(+)(RelAN)과 pET30a(+)(SpoT)를 BL21(DE3)pLysS에서 각각 대량생산하여 얻었다. pET30a(+)(RelAN)과 pET30a(+)(SpoT)는 pGBKT7(RelAN)과 pGBKT7(SpoT)를 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단한 후 원하는 DNA를 agarose gel extraction하여 pET30a(+)에 ligation하여 얻었다.

Anti-rRelA (a.a 246-479)를 이용하여 재조합 RelA (a.a 246-479), RelA (a.a 1-463), RelA (a.a 1-843), SpoT (a.a 180-390), SpoT (a.a 1-738)를 western blotting 한 결과 Anti-rRelA (a.a 246-479)는 재조합 RelA (a.a 246-479)와 RelA (a.a 1-463) 그리고 RelA (a.a 1-843)를 인지하여 signal을 보이는 반면 재조합 SpoT (a.a 180-390)와 SpoT (a.a 1-738)는 인지하지 못 하였다 (Figure 8). 이는 Anti-rRelA (a.a 246-479)가 cross하게 SpoT와 작용하지 않음을 의미하고 또한 RelA에 대한 항체가 잘 만들어졌음을 의미한다. 그러나 재조합 RelA (a.a 246-479), RelA (a.a 1-463), RelA (a.a 1-843)의 경우 대부분의 단백질이 polyacrylamide로부터 nitrocellulose membrane으로 transfer가 제대로 되지 않았다 (Figure 8). 그 이유는 재조합 RelA (a.a 246-479), RelA (a.a 1-463), RelA (a.a 1-843)의 경우 pI가 각각 9.37, 9.87, 9.47로 너무 높기 때문으로 추정된다. 재조합 SpoT (a.a 180-390)와 SpoT (a.a 1-738)의 경우 pI가 각각 6.16, 5.78이다. Anti-rSpoT (a.a 180-390)의 경우 Anti-rSpoT (a.a 180-390)은 재조합 RelA (a.a 246-479)와 RelA (a.a 1-843)를 인지하지 못 하였으나 재조합 SpoT (a.a 180-390)와 SpoT (a.a 1-738)는 인지하였다 (Figure 9). 그러므로 Anti-rSpoT (a.a 180-390)도 cross하게 RelA와 작용하지 않고 항체도 잘 생성되어졌다.

라. *S. clavuligerus* (*ΔrelA*)에서 다양하게 변형된 RelA의 발현

(1) 다양하게 변형된 RelA를 암호화 하는 벡터 제작

RelA의 C-말단이 다양하게 제거된 단백질을 암호화하는 재조합 플라스미드를 다음과 같이 제작하였다. pSMF388을 주형으로 RelAN_(*NdeI*)과 RelA_(1251bp)를 primer로 PCR 한 후 *kpnI*과 *BamHI*으로 절단하였다. 이 PCR 생성물은 아미노산 417이후에 종결 코돈과 *BamHI* site를 형성한다. 그리고 pGBKT7(RelA)를 *kpnI*과 *BamHI*으로 절단한 후 pGBKT7을 포함한 RelA의 N-말단부분을 agarose gel extraction하였다. 그 후 제한 효소로 처리된 PCR 산물과 ligation 하여 pGBKT7-RelA(a.a 1-417)를 생성하였다. 위와 같은 방식으로 pGBKT7-RelA(a.a

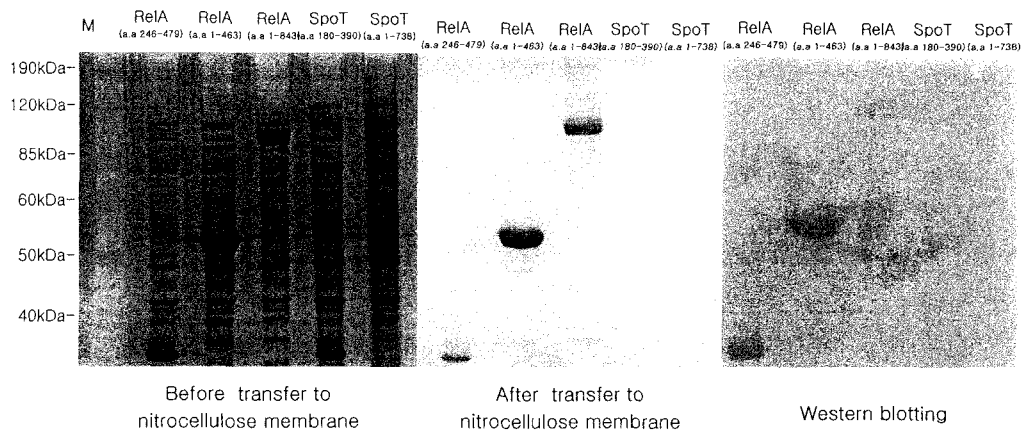


Figure 8. Western blotting of Anti-rRelA (a.a 246-479). Western blotting of Anti-rRelA (a.a 246-479) against recombinant RelA (a.a 246-479), 30kDa; RelA (a.a 1-463), 51.7kDa; RelA (a.a 1-843), 93.3kDa; recombinant SpoT (a.a 180-390), 28.2kDa; SpoT (a.a 1-738), 78.9kDa.

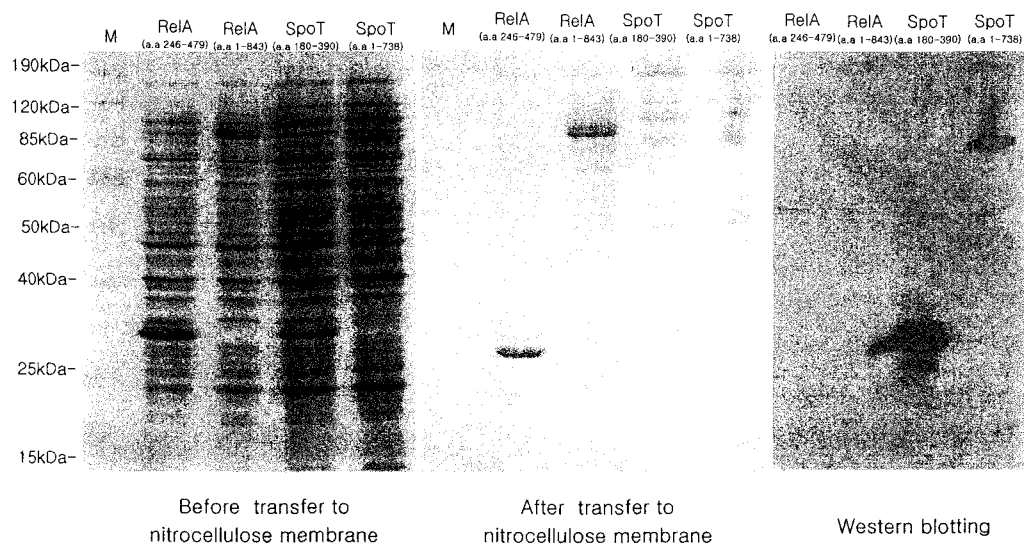


Figure 9. Western blotting of Anti-rSpoT (a.a 180-390). Western blotting of Anti-rSpoT (a.a 180-390) against recombinant RelA (a.a 246-479), 30kDa; RelA (a.a 1-843), 93.3kDa; recombinant SpoT (a.a 180-390), 28.2kDa; SpoT (a.a 1-738), 78.9kDa.

1-487)도 pSMF388을 주형으로 RelAN_(NdeI)과 RelA_(1461bp)를 primer로 사용하여 PCR 한 후 제작하였다. pGBKT7-RelA(a.a 1-638)을 제작하기 위해 pSMF388을 주형으로 RelAB_(XbaI)과 RelA_(1914bp)를 primer로 사용하여 PCR한 후 PCR 산물을 *BstEII*와 *BamHI*으로 절단하였다. 그 후 pGBKT7(RelA)를 *BstEII*와 *BamHI*으로 절단하고 pGBKT7과 RelA의 N-말단부분을 포함하는 DNA를 agarose gel extraction 한 후 제한 효소로 절단된 PCR 산물과 ligation하여 pGBKT7-RelA(a.a 1-638)을 제작하였다. pGBKT7-RelA(a.a 1-779)의 제작도 위의 방식과 비슷하게 하였다. pSMF388을 주형으로 RelAB_(XbaI)과 RelA_(2337bp)를 primer로 사용하여 PCR한 후 PCR 산물을 *AatII*와 *BamHI*으로 절단하였다. 그리고 pGBKT7(RelA)를 *AatII*와 *BamHI*으로 절단하고 pGBKT7과 RelA의 N-말단부분을 포함하는 DNA를 agarose gel extraction 한 후 제한 효소로 절단된 PCR 산물과 ligation하여 pGBKT7-RelA(a.a 1-779)를 제작하였다. (p)ppGpp phosphohydrolase domain이 제거된 RelA (p)ppGpp synthetase domain과 (p)ppGpp phosphohydrolase domain이 모두 제거된 RelA를 암호화 하고 있는 벡터도 제작하였다. 우선 클로닝에 필요한 pET32a(+)-RelA(a.a 228-843)을 pET30a(+)(RelA)를 *NcoI*으로 절단한 후 같은 제한효소로 잘려진 pET32a(+)에 ligation하여 얻었다. 이 때 *NcoI*으로 처리된 pET32a(+)에 CIAP 처리를 한 후 agarose gel extraction 하여 self ligation을 방지하였고 pET32a(+)에 들어간 insert 의 방향성은 제한 효소를 처리하여 분석하였다. pGBKT7-RelA(a.a 1-100, 381-843)을 얻고자 pSMF388을 template로 RelAN_(NdeI)과 RelA_(300bp)를 primer로 PCR 하고 이 산물을 *NdeI*과 *KpnI*으로 절단한 후 agarose gel extraction 하였다. 그와 동시에 pET32a(+)-RelA (a.a 228-843)도 *KpnI*과 *BamHI*으로 digestion한 후 RelA (a.a 381-843)을 암호화하는 DNA를 agarose gel extraction 하였다. 그 후 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단된 pGBKT7에 *NdeI*과 *KpnI*으로 절단된 PCR 산물과 *KpnI*과 *BamHI*으로 절단된 *relA*의 3' 부분을 ligation하였다. pGBKT7-RelA(a.a 1-100, 228-843)은 위와 비슷한 방법으로 재조합하였다. 차이점은 pET32a(+)-RelA (a.a 228-843)를 *KpnI*과 *BamHI*으로 digestion할 때 *KpnI*을 partial digestion하여 RelA (a.a 228-843)을 암호화하는 DNA를 agarose gel extraction 하여 분리한 점이다. (p)ppGpp synthetase domain만 가지고 있는 RelA는 pET19b(RelA_{anti})를 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단한 후 같은 벡터로 절단된 pGBKT7에 ligation하였다 (Figure 10).

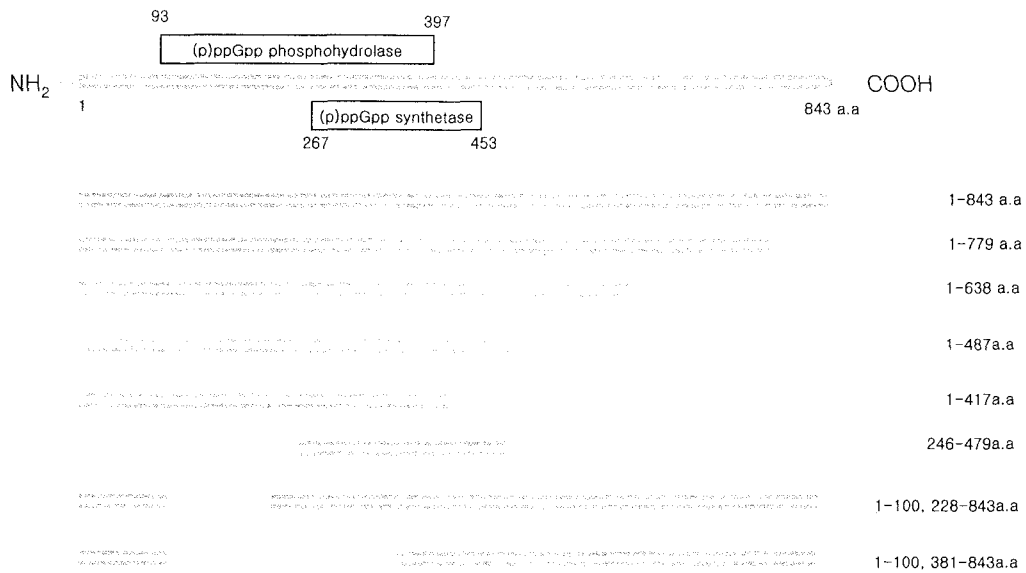


Figure 10. Schematic representation of the derivatives of *S. clavuligerus* RelA. The putative (p)ppGpp phosphohydrolase domain and (p)ppGpp synthetase domain is compared with that of *S. coelicolor* (Martinez-Costa *et al*, 1998).

제2절 β -lactam 항생물질 불활성효소 억제인자 연구

1. 연구내용

토양에서 분리한 *Streptomyces exfoliatus* SMF19에서 분리되는 β -lactamase inhibitory protein (BLIP-I, BLIP-II)의 생체 내 역할에 대해 종합적으로 분석하는 연구를 시행하였다. *Streptomyces exfoliatus* SMF19에서 분리되는 BLIP-I과 BLIP-II는 기존의 보고된 *Streptomyces clavuligerus*의 BLIP보다 TEM-1 β -lactamase에 대해 낮은 K_i value를 보인다. 또한 BLIP-I과 BLIP-II를 암호화하는 *bliA* 유전자와 *bliB* 유전자를 각각 선택적으로 절제한 변이주 (null mutant)의 경우 배양결과 모두 bald phenotype을 보였다. 현재, BLIPs들의 3차원 구조는 이미 규명되었다. 이들의 구조와 생체 내의 기능을 밝히는 것은 BLIPs들의 작용기작과 특이적 활성자리 등을 유추하여 낼 수 있으므로, BLIP와 유사한 BLIP-I과 전혀 다른 저해 양상을 보이는 BLIP-II의 생체 내 기능을 밝힘으로써 새로운 β -lactamase 저해 물질을 design하는 기초정보를 얻고자 하였다.

BLIPs의 기능을 찾기 위해 단백질 상호작용 분석기술을 사용하였으며, 기존에 사용했던 Yeast Two-Hybrid에 이어 Two Dimensional Electrophoresis (2-DE) 그리고 GST Pull Down 방법을 사용하였다. 실험결과 현재 2-DE를 통하여서 모균주에 비해 변이균주들 (*bliA* null mutant, *bliB* null mutant)에서 특별히 소멸되는 단백질들이 있음을 확인하였고 현재 이 단백질을 분리하여 ESI Q-ToF 통한 아미노산 서열 분석 중에 있다. GST Pull Down의 경우, 현재 GST tagged BLIP-II를 생성할 수 있는 벡터를 제작하여 *E. coli*에서 과량 발현을 하여 GST tagged BLIP-II를 분리 중에 있다. 따라서 이러한 단백질 상호작용 분석기술을 통해 얻은 결과를 종합하여, BLIPs와 직접적으로 상호작용 하거나 생체내의 생리학적 변화에 관련된 단백질을 규명할 것으로 기대하고 있다.

2. 재료 및 방법

가. *bliA*, *bliB*, *bliA* and *bliB* 유전자가 선택적으로 제거된 *Streptomyces exfoliatus* SMF19의 null mutant의 제작

(1) *bliA* 유전자의 knockout

BLIP-I을 coding하는 *bliA* 유전자의 중간에 hygromycin resistance gene을 첨가함으로써 *S. exfoliatus* SMF19에서 *bliA::hyg* mutant를 얻었다. *bliA* 전체 유전자를 포함하고 있는 pSMF1101에서 *KpnI*-*XhoI* (2kb) fragment를 얻어서 pZErO-2 벡터에 subcloning하여 pSMF11041을 얻었다. *hyg* 유전자는 pJOE829에서 양쪽 끝에 *MfeI* 제한효소를 넣어 PCR을 통해 증폭하였다 (5'-GTCGCACAATTGGGCG GTGGCGTACACCGT-3'/5'-GAGCTGCAATTGAAGCTCGGCCGACCACCC-3')

PCR로 얻어진 *hyg* 유전자를 *MfeI*으로 잘라서 pSMF11041의 *EcoRI* 위치에 첨가함으로써 pSMF11042을 얻었다. pSMF11042의 *KpnI-SphI* (3.5kb) fragment를 *KpnI/SphI* 제한효소로 처리한 pIJ702 벡터에 ligation하여 pSMF11043을 얻었다. pSMF11043을 *S. lividans*에 transformation하여 hygromycin (50 ug ml⁻¹)과 thiostrepton (50 ug ml⁻¹)이 첨가된 TSB 배지에서 자라는 transformant를 얻었고 여기서 plasmid (pSMF11043)를 분리하여 *S. exfoliatus* SMF19에 transformation하였다. *S. exfoliatus* SMF19에서 pSMF11043을 함유하고 있는 transformant를 얻어 hygromycin (50 ug ml⁻¹)만을 포함하고 있는 minimal medium에서 5번 계대배양하여 Hyg^r/Thiostrepton-sensitive (Thio^s) recombinant (*S. exfoliatus* SMF110451)를 얻었다.

(2) *bliA* 유전자의 knockout

bliB 유전자의 knockout 균주의 제조를 위해서는 *bliB* 유전자의 중간에 hygromycin resistance gene을 첨가함으로써 *S. exfoliatus* SMF19에서 *bliB::hyg* mutant를 얻었다. 완전한 *bliB* 유전자를 포함하고 있는 pSMF251에서 *SacII* (1.6 kb) fragment를 얻어 pBluescript II KS(+)에 subcloning하여 pSMF252를 얻었다. pSMF252의 *BamHI* (1.5kb) fragment를 pZErO-2 벡터에 subcloning하여 pSMF2521를 얻었다. *hyg* 유전자는 pJOE829에서 양쪽 끝에 *MfeI* 제한효소를 넣어 PCR을 통해 증폭했다. PCR로 증폭한 *hyg* 유전자는 *MfeI*으로 자른 뒤 pBluescript II KS(+)/*MfeI*에 insertion시켜 pSMF312을 만들었다. pSMF312의 *KpnI/XbaI* (1.4 kb) fragment를 pSP72에 subcloning하여 pSMF316을 얻었다. *hyg* 유전자를 포함하고 있는 pSMF316을 *XhoI*으로 잘라서 얻어진 fragment (1.4kb)를 pSMF2521의 *SalI* site에 첨가함으로써 pSMF319를 만들었다. pSMF319를 *BglII*로 자른 뒤 pIJ702와 ligation시켜 pSMF320을 얻었다. pSMF320을 *S. lividans*에 transformation하여 hygromycin (50 ug ml⁻¹)과 thiostrepton (50 ug ml⁻¹)이 첨가된 bennett 배지에서 자라는 transformant를 얻었고 여기서 plasmid (pSMF320)를 분리하여 *S. exfoliatus* SMF19에 transformation하였다. *S. exfoliatus* SMF19에서 pSMF320을 함유하고 있는 transformant를 얻어 hygromycin (50 ug ml⁻¹)만을 포함하고 있는 minimal medium에서 5번 계대배양하여 Hyg^r/Thiostrepton-sensitive (Thio^s) recombinant를 얻었다.

Table 5. Microorganisms used in disruption work

Microorganisms	Characteristics	Reference
<i>S. lividans</i> TK24	Wild-type strain, <i>str-6</i>	Hopwood, 1985
<i>S. exfoliatus</i> SMF19	β -lactamase inhibitory protein producing strain isolated from soil	Kim and Lee, 1991, 1994
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> <i>hsdS</i> <i>gal(cItsI857</i> <i>ind1</i> <i>Sam7</i> <i>nin5</i> <i>lacUV5</i> -T7 <i>genel</i>)	Hanahan, 1983
<i>S. exfoliatus</i> SMF110451	<i>bliA::hyg</i> (no producing BLIP-I)	This work

Table 6. Plasmids used in disruption work

plasmids	Characteristics	Reference
pBluescriptII KS(+)	<i>E. coli</i> vector (<i>amp^r</i> , <i>lacZ</i> , <i>lacI</i>)	Stratagen
pET-30a(+)	<i>E. coli</i> over-expression vector (<i>kan</i> <i>T7lac</i> <i>chloramp</i>)	Novagen
pZErO-2	Kan ^r	Invitrogen
pSP72	Amp ^r	Promega
pJOE829	Streptomyces pIJ101 replicon; Hyg ^r	J. Altenbuchner
pIJ702	high copy number plasmid of <i>Streptomyces</i> , Tsr ^r	Katz, 1985
pIJ486	high copy number plasmid of <i>Streptomyces</i> , Tsr ^r	Hopwood, 1985
pSET152	Am ^r <i>lacZ</i> α	Gene, 116, 43
pSMF1130	pET-30a(+) vector containing <i>bliA</i>	This study
pSMF1101	the recombinant cosmid containing <i>bliA</i>	This study
pSMF1104	pZero-2 derivative containing c. 4kb PstI fragment hybridizing to the gene probe, BLI1	This study
pSMF1106	1.5 kb <i>Bam</i> HI- <i>Apa</i> I insert containing <i>bliA</i> in pZErO-2	This study
pSMF110041	2 kb <i>Kpn</i> I- <i>Xho</i> I insert from pSMF1104 in pZErO-2	This study
pSMF11042	an insertion of <i>hyg</i> into <i>Eco</i> RI of pSMF11401	This study
pSMF11043	4.5 kb <i>Kpn</i> I- <i>Sph</i> I insert from pSMF11042 in pIJ702	This study
pSMF251	4kb <i>Apa</i> I insert conferring <i>bliB</i> in pZErO-2	This study
pSMF252	1.6kb <i>Sac</i> II insert conferring <i>bliB</i> from pSMF251 in pBluescript II KS(+)	This study
pSMF2521	1.5 kb <i>Bam</i> HI insert conferring <i>bliB</i> from pSMF251 in pZErO-2	This study
pSMF312	1.4kb <i>Mfe</i> I insert conferring <i>hyg</i> in pBluescript II KS(+)	This study

(3) *bliA*와 *bliB* 유전자의 동시 knockout

*bliA*와 *bliB*가 동시에 disruption된 double mutant를 얻기 위해 *S. exfoliatus* SMF110451 (*bliA::hyg*)에서 *bliB* 유전자의 중간에 apramycin resistance gene을 첨가하였다. pSP72 벡터를 *XhoI/SaII*으로 자른 뒤 self-ligation시켜 pSMF43041을 얻었다. 완전한 *bliB* 유전자를 포함하고 있는 pSMF251에서 *SacII* (1.6kb) fragment를 얻어 pBluescript II KS(+)에 subcloning하여 pSMF252를 얻었다. pSMF252의 *BamHI* (1.5kb) fragment를 pSMF43041에 subcloning하여 pSMF2520를 얻었다. pSET152에서 *apr* 유전자를 *SaII*으로 자른 뒤 pSMF2521/*SaII*에 첨가시켜 pSMF327을 얻었다. pSMF327을 *BglIII*로 자른 뒤 pIJ486/*BglIII*에 ligation시켜 pSMF328을 얻었다. pSMF328을 *S. lividans* TK24에 transformation시켜 apramycin (50 ug ml⁻¹)과 thiostrepton (50 ug ml⁻¹)이 들어간 bennett medium에서 자라는 colony를 얻어 pSMF328을 분리하였다. 분리한 pSMF328은 *S. exfoliatus* SMF110451에 transformation 시켰다. *S. exfoliatus* SMF110451에서 pSMF328을 함유하고 있는 transformant를 얻어 hygromycin (50 ug ml⁻¹), apramycin (50 ug ml⁻¹)을 포함하고 있는 minimal medium에서 3번 계대배양 하여 Hyg^r, Apr^r and Thio^s recombinant를 얻었다.

나. Yeast Two Hybrid를 이용한 상호작용 단백질의 검색

(1) Yeast two hybrid system을 이용한 BLIP-I, B의 상호작용 단백질의 검색을 통한 BLIP의 생체 내 역할 규명

(가) 클로닝

bliA 유전자를 클로닝하기 위해 pSMF11401을 주형으로 하고 BliA forward (5'-g gAA TTC CAT ATg gTg gTg AAg gCA Cgg ATT gCg-3')과 BliA reverse (5'-CgC ggA TCC TCA ggT CAg gCT gCG CTg gTA-3')을 primer로 하여 *pfu* polymerase (Promega)로 *bliA*를 증폭하였다. 이를 pGADT7의 *NdeI*과 *BamHI* 자리로 클로닝한 벡터가 pGADT7-*bliA*이고 pGBKT7의 *NdeI*과 *BamHI* 자리로 클로닝한 벡터가 pGBKT7-*bliA*이다. 이와 같은 방법으로 *bliB* 유전자를 클로닝하기 위해 pSMF252를 주형으로 하고 BliB forward (5'-CCg gAA TTC ATg CCg AAC ggA ATC gTC CgA-3')과 BliB reverse (5'-CgC gAA TCC TCA gCC CTT Cgg ggC gTA ggC-3')으로 하여 *pfu* polymerase (Promega)로 *bliB*를 증폭하였다. 이를 pGADT7의 *EcoRI*과 *BamHI* 자리로 클로닝한 벡터가 pGADT7-*bliB*이고 pGBKT7의 *EcoRI*과 *BamHI* 자리로 클로닝한 벡터가 pGBKT7-*bliB*이다. 모든 증폭 산물은 sequencing (Takara)을 통해 염기서열을 확인하였다.

(나) 효모 동시 형질 전환

1 ml의 YPDA에 AH109 균주를 접종한 후 30°C, 250 rpm에서 OD₆₀₀이 1.5이상 될 때까지 배양하고 이렇게 키운 균을 300 ml의 YPDA에 OD₆₀₀이 0.2 - 0.3이 되도록 계대한 후 30°C, 250 rpm에서 OD₆₀₀이 0.5 - 1.0이 될 때까지 배양하였다. 이를 1,000 x g, 5분간 상온에서 농축한 후 멸균된 1 X TE 버퍼에 분산한 다음 다시 한번 1,000 x g, 5분간 상온에서 농축한 후 1.5 ml의 1 X TE/LiAc버퍼에 분산하였다. 이렇게 준비된 균 100 μl를 형질전환 하고자 하는 플라스미드 0.1 ug과 herring testes carrier DNA 0.1 mg과 섞어 준 후 0.6 ml의 PEG/LiAc용액을 넣어주었다. 그 후 30°C에서 30분간 200 rpm으로 배양한 후 70 μl의 DMSO를 첨가하고 조심스럽게 섞어 주었다. 42°C에서 15분간 열을 가한 후 1 - 2분간 얼음에 놓아 두었다. 10,000 x g에서 5초간 원심분리하여 세포를 모은 후 0.5 ml의 1X TE 버퍼에 분산하고 그 후 SD/-Trp/-Leu과 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 배지에 도말하였다.

(다) β-galactosidase assay

5 ml의 SD/-Trp/-Leu에 형질전환된 AH109를 접종한 후 16 - 18시간동안 배양하였다. 배양액 2 ml을 8 ml의 YPD에 계대한 후, 30°C, 250 rpm에서 OD₆₀₀이 0.5 - 0.8이 될 때까지 배양하였다. 1.5 ml의 배양액을 10,000 × g로 30초 동안 원심분리하여 농축하고 1.5 ml의 Z버퍼에 분산시켰다. 10,000 × g로 30초 동안 다시 원심분리하고 300 μl Z버퍼에 분산시킨 후 새 튜브에 100 μl를 넣어주었다. 그 후 액체질소에 0.5 - 1분 동안 얼리고 0.5 - 1분간 37°C에서 녹였다. 이 과정을 2번 반복한 후, β-mercaptoethanol이 함유된 Z버퍼 700 μl와 ONPG가 함유된 Z버퍼 160 μl를 넣어주고 30°C에서 반응시켰다. 블랭크는 100 μl의 Z버퍼와 β-mercaptoethanol이 함유된 Z버퍼 700 μl를 섞어 만들었다. 반응시킨 튜브의 색이 노란색으로 변할 때까지의 시간을 재고 400 μl 1 M Na₂CO₃를 넣어 반응을 종료시킨다. 10,000 × g로 10분간 원심분리하고 상등액의 OD₄₂₀을 구한다. 각 샘플들의 β-galactosidase unit을 구한다.

$$\beta\text{-galactosidase units} = 1,000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

t = elapsed time(in min) of incubation

V = 0.1 ml × concentration factor

OD₆₀₀ = A₆₀₀ of 1 ml of culture

Table 7. Microorganisms used in Yeast Two-Hybrid work

Microorganisms	Relavant characteristic	References
<i>E. coli</i>		
DH5a	F- ϕ lacZ Δ M15endA1recA1hsdR17(rk-mk+)supE44 thi-1gyrA96 Δ (lacZYA- <i>agrF</i>)U169 λ -	Hanahan, 1983
Yeast		
AH109	MATa, <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4</i> Δ , <i>gal80</i> Δ , LYS2::GALI UAS-GALITATA-His3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ	James <i>et al.</i> , 1996; Holtz, Unpublished
Y187	MAT?, <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>gal4</i> Δ , <i>met</i> ⁻ , <i>gal80</i> Δ , URA3::GALL1UAS-GALITATA- lacZ, MEL1	Harper <i>et al.</i> , 1993

Table 8. Plasmids used in Yeast Two-Hybrid work

Vectors	Description	Selection on SD Medium	References
pGADT7-Rec	GAL4(768-881)AD, LEU2, amp ^r , HA epitope tag	-Leu	CLONTECH
pGBKT7	GAL4(1-147)BD, TRP1, kan ^r , c-myc epitope tag	-Trp	CLONTECH Louret <i>et al.</i> , 1997
pGADT7- <i>bliA</i>	<i>bliA</i> inserted into <i>NdeI</i> and <i>BamHI</i> site of pGADT7	-Leu	This study
pGADT7- <i>bliB</i>	<i>bliB</i> inserted into <i>NdeI</i> and <i>BamHI</i> site of pGADT7	-Leu	This study
pGBKT7- <i>bliA</i>	<i>bliA</i> inserted into <i>NdeI</i> and <i>BamHI</i> site of pGBKT7	-Trp	This study
pGBKT7- <i>bliB</i>	<i>bliB</i> inserted into <i>NdeI</i> and <i>BamHI</i> site of pGBKT7	-Trp	This study
pGADT7-T	SV40 large T-antigen(84-708) in pGADT7, LEU2, amp ^r	-Leu	CLONTECH
pGBKT7-53	murine p53(72-390) in pGBKT7, TRP1, kan ^r	-Trp	CLONTECH
pGBKT7-lam	Human laminC(72-390) in pGBKT7, TRP1, kan ^r	-Trp	CLONTECH

(2) *S.coelicolor* cDNA Library 제작

BLIPs의 생체 내 역할을 규명하기 위하여 염기서열이 이미 알려진 *S. coelicolor*의 cDNA library를 제작하여 BLIP-I과 BLIP-II를 가지고 상호작용 단백질을 각각 검색함으로써, 이 두 단백질의 생체 내 역할을 규명하고자 한다.

(가) mRNA extraction by RNeasy Protect mini kit

*Streptomyces coelicolor*를 1×10^9 이 될 때까지 4°C에서 3 - 5분간 $5000 \times g$ 로 원심분리하여 농축한다. lysozyme을 함유하고 있는 TE버퍼 100 μ l에 분산하고 RLT버퍼 350 μ l을 첨가한다. 250 μ l 에탄올 (96 - 100 %)을 첨가하고 이것을 RNeasy mini spin column에 넣고 $8000 \times g$ 로 15초간 원심분리한다. 같은 방법으로 RW1 버퍼 700 μ l을 RNeasy mini spin column에 넣고 $8000 \times g$ 로 15초간 원심분리한다. RPE buffer 500 μ l을 RNeasy column에 넣고 $8000 \times g$ 로 15초간 원심분리하고 RPE 500 μ l을 다시 첨가한 후 최고속도로 2분간 원심분리한다. 새 튜브에 RNeasy column을 옮기고 RNase가 제거된 TDW 30 - 50 μ l를 넣어준다. $8000 \times g$ 로 1분간 원심분리한다.

(나) Random Primer를 이용한 First-Strand cDNA 합성

멸균된 0.25 ml 튜브에 1 - 2 μ l RNA sample, 1.0 μ l CDSIII/6 Primer (Random primer, 5'-ATT CTA gAg gCC gAg gCg gCC gAC ATg -NNN NNN-3')를 넣어주고 4.0 μ l가 될 때까지 TDW를 첨가한다. 72°C에서 2분간 배양하고 얼음에 2분간 놓아둔 후 잠시동안 원심분리기로 가라 앉혀준다. 여기에 2.0 μ l 5 X first-strand buffer, 1.0 μ l DTT (20 mM), 1.0 μ l dNTP Mix (10 mM), 1.0 μ l MMLV reverse transcriptase를 넣고 9.0 μ l가 될 때까지 TDW를 첨가한다. 25 - 30°C에서 10분간 배양하고 42°C에서 10분간 더 배양한다. 여기에 SMARTIII Oligonucleotide (5'-AAG CAg Tgg TAT CAA CgC AgA gTg gCC ATT ATg gCC ggg-3') 1.0 μ l를 넣고 75°C에서 10분간 놓아둔 후 상온에서 튜브를 식혀준다. 1.0 μ l (2 units) RNase H를 첨가하고 37 °C에서 20분간 반응시킨다. 차가운 0.5 ml 튜브에 2 μ l를 넣은 후, LD PCR을 시행한다.

(다) Long Distance-PCR (LD PCR)을 이용한 ds cDNA 증폭

2개의 튜브에 2 μ l First-Strand cDNA, 70 μ l Deionized H₂O, 10 μ l 10 X Advantage 2 PCR Buffer, 2 μ l 50 X dNTP Mix, 2 μ l 5' PCR Primer (5'-TTC CAC CCA AgC AgT ggT ATC AAC gCA gAG Tgg-3'), 2 μ l 3' PCR Primer (5'-gTA TCg ATg CCC ACC CTC TAg Agg CCg Agg Cgg CCg ACA-3'), 10 μ l 10 X GC-Melt Solution, 2 μ l 50 X Advantage 2 Polymerase Mix를 각각 넣어준다. 95°C에서 30초 가열한 후, 95°C 10초, 68°C 6분 두 과정을 22번 반복한다. 그 후 68°C에서 5분간 반응시킨다.

(라) CHROMA SPIN+TE-400 Column을 이용한 ds cDNA의 분리

CHROMA SPIN Column을 여러 번 섞어주어 gel matrix를 분산시켜준 후 700 × g로 5분간 원심분리한다. cDNA 샘플 95 μl를 가운데에 넣어주고 700 × g로 5분간 원심분리한 후 column을 통과한 용액을 모은다. 그 후, 1/10 부피의 Sodium Acetate (3 M, pH4.8)과 2.5 부피의 95 % 에탄올을 넣어준다. 1시간동안 -20℃에 놓아둔 후 10,000 × g에서 20분간 원심분리한다. 상등액을 완전히 제거하고 10분간 건조시킨다. 20 μl의 멸균된 증류수에 녹인다.

(마) 합성한 ds cDNA와 pGADT7-Rec의 AH109균주로의 형질전환

1 ml의 YPDA에 AH109 균주를 접종한 후 30℃, 250 rpm에서 OD₆₀₀이 1.5 이상 될 때까지 키운다. 이렇게 키운 균을 300 ml의 YPDA에 OD₆₀₀이 0.2 - 0.3이 되도록 계대한 후 30℃, 250 rpm에서 OD₆₀₀이 0.5 - 1.0이 될 때까지 키운다. 이를 1,000 × g, 5분간 상온에서 농축한 후 멸균된 1 X TE 버퍼에 분산한다. 다시 한번 1,000 × g, 5분간 상온에서 농축한 후 1.5 ml의 1 X TE/LiAc 버퍼에 분산한다. 이렇게 준비된 균 600 μl를 20 μl ds cDNA, 6 μl pGADT7-Rec (0.5 μg/μl), 20 μl Herring Testes Carrier DNA와 함께 섞어준다. 그 후 2.5 ml의 PEG/LiAc 용액을 넣어주고 강하게 섞어준다. 그 후 30℃에서 45분간 200 rpm으로 배양한 후 160 μl의 DMSO를 첨가하고 조심스럽게 섞어 준다. 42℃에서 20분간 열을 가한 후 700 × g에서 5분간 원심분리하여 세포를 모은 후 3 ml의 YPD Plus Liquid Medium에 분산시킨다. 30℃에서 90분간 250 rpm으로 배양한 후 700 × g에서 5분간 원심분리하여 세포를 모은다. 15 ml의 NaCl 용액 (0.9 %)에 분산하고 150 μl씩 SD/-Leu에 도말한다. 30℃에서 콜로니가 생길 때까지 3 - 6일간 배양한다. 배지를 3 - 4시간동안 4℃에 놓아둔 후 5 ml freezing medium을 각각의 배지에 넣어준다. 콜로니를 조심스럽게 긁어모으고 세포수가 2 × 10⁷ cells/ml이 될 때까지 농축한다. 1 ml씩 분주하여 -80℃에 보관하고 library 크기를 계산하기 위하여 100배, 1000배, 10000배 희석한 후 100 μl를 SD/-Leu에 도말하여 30℃에서 콜로니가 생길 때까지 2 - 3일간 배양한다.

(3) BLIP-I 및 BLIP-II와 상호작용 하는 단백질의 검색

(가) Maing에 의한 검색

1.5 ml 씩 분주되어 있는 AH109 [library]를 상온에서 녹이고 Y187 [bait] 배양액과 함께 2 l 용량의 멸균된 플라스크에 넣어준다. 2 X YPDA/Kan (50 μg/ml) 45 ml를 첨가하고, 20 - 24 시간동안 30℃에서 30 - 50 rpm으로 배양한다. 20시간 후 광학현미경하에서 접합체를 확인하고 4시간동안 더 mating시킨다. 멸균된 100 ml 원심분리 용기에 mating 혼합물을 옮겨주고 1000 × g로 10분간 원심분리한다. 0.5

X YPDA/Kan (50 µg/ml) 10 ml에 cell pellet을 분산시킨다. mating 효율을 계산하기 위해 10배, 100배, 1000배, 10000배 희석하여 100 µl씩 3종류의 SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Leu/-Trp에 도말한다. 나머지 mating mixture를 200 µl씩 SD/-His/-Leu/-Trp, SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal 배지에 도말하여 콜로니가 생길 때까지 30°C에서 배양한다. 콜로니를 세어 mating 효율을 계산한다.

$$\# \text{ cfu/ml of diploids} / \# \text{ cfu/ml of limiting partner} \times 100 = \% \text{ Diploid}$$

(나) 효모 플라스미드의 분리 및 증폭

위의 mating검색의 결과로 나온 백터를 가지고 있는 후보 효모균주를 4 - 5번 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 배지에 계대한 후, SD/-Trp/-Leu 5 ml 액체배지에 접종한 후 16 - 18시간을 배양 후 10,000 x g에서 5분간 원심분리하여 세포를 얻었다. 그리고, RPM Yeast Plasmid Isolation Kit를 이용하여 BD-Bait와 AD-cDNA 두개의 vector를 효모에서 분리하였다. 효모에서 얻은 플라스미드는 농도가 적고, 두 종류의 백터가 섞여 있으므로, 상호작용하는 단백질후보 물질의 염기서열 분석을 위해 AD-cDNA를 가지고 있는 백터, pGADT7만을 증폭, 분리하여야 한다.

먼저 백터의 증폭을 위해, 대장균 (*E. coli* DH5a)에 효모에서 분리한 백터를 형질전환 시킨다. 이 때 AD-cDNA를 가지고 있는 pGADT7 백터만을 분리하기 위해, pGADT7만이 내성을 갖는 LB + Kanamycin (50 ug ml⁻¹)배지에 도말하여 주었다. 14 - 16시간 후, 자라난 싱글콜로니만을 따서 LB + Kanamycin (50 ug ml⁻¹)에 접종하여 14 - 16시간 배양 후, alkaline lysis solution방법을 이용하여 miniprep을 하였다. 그 후, pGADT7에 들어 있는 BLIP와 상호작용 하는 후보단백질 유전자의 크기를 알기 위하여, 유전자가 들어가 있는 백터의 멀티 클로닝 위치 (Multi Cloning Sites)중에서 유전자 양 바깥쪽에 있는 *EcoRI*과 *BamHI*으로 제한효소 처리하였다. 그리고 1 % agarose gel에 걸어서 전기영동 한 후, EtBr로 염색한 후 UV로 관찰하여 BLIP와 상호작용 하는 것으로 기대되는 후보단백질유전자의 크기를 확인하였다.

다. Two Dimensional Electrophoresis를 이용한 BLIP-I과 BLIP-II의 target 단백질 검색

(1) *S. exfoliatus* SMF19의 배양

S. exfoliatus SMF19 wild type, *bliA* disruptant 그리고 *bliB* disruptant 균주 (Table 9)들을 Bennette 고품배지에서 30°C, 1주일정도 배양한 후, single colony를 따서 YED 또는 TSB 액체배지 100 ml에 접종하였다. 액체 배지에서 30°C에서 150 rpm으로 48시간 배양 후, 5 l fermentor에 전체 부피 4 l의 10 %를 접종하였다. BLI-producing 배지 (glucose 2.5 %, soytone 1.5 %, yeast extract 0.2 %, CaCO₃ 0.06

%, K_2HPO_4 0.12 %, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.0001 %, $FeSO_4$ 0.00025 %)가 사용되었으며 배양 조건은 30°C, 300 rpm, 1.0 vvm으로 하였고 3 - 4 일간 배양을 하였다. 6 - 7 시간마다 샘플을 채취하여 건조균체질량과 BLIP 활성 그리고 Glucose 농도를 정량 하였다. 건조 균체량 측정은 배양액을 10 ml 취한 다음 미리 무게를 달아 놓은 여과지로 감압 여과하면서 생리 식염수로 3회 세척한 후 80°C 건조기에서 12시간 건조하여 건조 균체량을 측정하였다. 똑같은 시료에 대하여 두 번 반복 실행하여 평균값을 구하였다. 포도당 농도는 효소이용측정방법을 응용한 Glucose E-kit (영동제약, Co., Ltd)를 사용하여 정량하였다.

(2) 단백질성 β -lactamase inhibitor의 저해 활성 측정

단백질성 β -lactamase inhibitor의 저해 활성은, penicillinase에 대한 저해 활성 여부를 Penicillin G (Sigma Co., Ltd.)와 Iodine solution을 통해 알아보는 (Sawai *et. al* 1978) 방법을 변형하여 사용하였다. 배양액을 약 $6,000 \times g$ 에서 30분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 사용하여 그 β -lactamase 저해 활성을 측정하였다. 먼저 20 mM phosphate buffer 2.34 ml을 test tube에 담고 배양 상등액 100 μ l와 Bacto penase (Difco) 20 μ l를 넣고 섞은 후 상온에서 5분간 preincubation 시킨다. Substrate solution 250 μ l를 첨가한 후 37°C에서 30분간 incubation 한 후에 Iodine reagent 2 ml (95 % acetate buffer (pH4.0), 5 % I_2KI)을 첨가한 후에 OD₅₄₀에서 흡광도를 측정했으며, 활성 계산은 다음과 같은 방법을 사용하여 penase의 상대적인 저해값으로 계산하였다.

Control : blank without enzyme - blank with enzyme

Sample : blank without enzyme - blank with enzyme

Activity (%) = (Control - Sample)/Control \times 100

(3) 세포 내 단백질과 세포 외 단백질 샘플의 준비

Cell free extract와 extracellular protein을 준비하기 위해 샘플 (50 ml)을 먼저 $10,000 \times g$ 에서 원심분리를 하여 상등액과 pellet을 따로 모은다. Cell pellet은 다시 DW 또는 extraction buffer (1.5 M Tris-HCl (pH8.8), 5 mM $MgCl_2$)로 washing 한 후 2-4 ml extraction buffer에 resuspension하고, French press cell을 이용해 14,000 psi의 압력으로 cell을 파쇄하고 $170,000 \times g$ 로 ultracentrifuge (Beckman)를 이용하여 원심 분리하여 상등액, 즉 cytosol fraction을 얻는다. 상등액을 DNase I과 RNase A를 첨가한 후 -20°C에서 20 - 30분간 정치하여 nucleotide를 분해하여 준다. 그 후 같은 부피의 TCA/Acetone (20 % wt/vol)을 더한 후 -20°C에서 1시간 이상 정치하였다. $12,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리를 하여 단백질을 모은 후, cold acetone으로 두 번 씻어준다. 그 후 5분간 dry한 후 lysis solution (8 M urea, 4 % CHAPS, 40 mM Trizma base) 0.2 - 0.4 ml에 녹여준다. 세포 외 단백질의 경우는,

처음에 샘플 (50 ml)에서 모은 상등액에 동일 부피의 TCA/Acetone (20 % wt/vol) 을 더한 후, -20°C에서 1시간 이상 정치하였다. 정치가 끝난 후 12,000 × g에서 15 분간 원심분리를 하여 단백질을 모은 후, cold acetone으로 두 번 씻어준다. 그 후 5분간 건조한 후 lysis solution (8 M urea, 4 % CHAPS, 40 mM Trizma base) 0.1 - 0.2 ml에 녹여준다. 세포 내 단백질과 세포 외 단백질을 준비한 후 Bradford (Bio-Rad, Co., Ltd) 방법을 이용하여 각 샘플의 단백질 농도를 정량하였다.

(4) IEF (Iso Electro Focusing)

IEF (Iso Electro Focusing) system으로 IPG phor system (Amersham, Co., Ltd) 을 사용하였다. 하나의 strip에 150 µg의 샘플 단백질을 loading하였으며 pH 3 - 10 (NL, 13 cm strip)을 이용하였다. 샘플의 조성은 cell free extract 또는 세포 외 단백질 30 - 50 µl, DTT 0.7 mg, 0.5 % IPG buffer (pH3 - 10, NL, Amersham)을 rehydration buffer에 넣어 주었고 최종 부피는 250 µl로 하였다. 준비된 250 µl의 샘플을 IPG strip holder에 균일하게 loading한 후, -20°C에서 보관하고 있는 IPG strip (pH3 - 10, NL)을 꺼내어 커버필름을 제거한 후 gel을 샘플 쪽으로 향하여 holder에 넣어준다. 그리고 IPG Phor system에 넣어 20시간이상 전기영동하여 IEF를 시행한다.

(5) SDS-PAGE

20시간이상 IEF가 끝난 후 strip을 꺼내어 SDS equilibration buffer 10 ml (DTT, 10 mg ml⁻¹)에 넣어서 천천히 흔들며 주면서 15분간 incubation한다. 첫 번째 equilibration이 끝난 후 buffer를 버리고 다시 SDS equilibration buffer 10 ml (Iodoacetamide, 25 mg ml⁻¹)에 strip을 넣어서 다시 15분간 incubation한다. Equilibration이 끝나면 준비된 12.5 % SDS PAGE (ProteanII, Biorad Co., Ltd)에 strip을 gel에 잘 밀착되도록 위에 놓아준 뒤, sealing solution (5 mg agarose ml⁻¹ SDS electrophoresis buffer)을 1 - 2 ml 정도 부어서 strip을 고정하여 준다. sealing solution이 굳으면, 영동기에 장착하여 20 mA로 고정하여 전기영동을 시작한다. 어느 정도 sealing solution에 stacking이 끝나면 30-50 mA로 전류를 올려서 전기영동을 한다. 2-DE가 끝난 후 gel은 Coomassie brilliant blue solution에서 여러 시간 동안, 염색한 후 destaining solution (5 % acetic acid, 15 % methanol)에서 destaining을 하였다.

(6) Western blotting

분석하고자 하는 단백질을 denatured된 상태로 전기영동 한 후 transfer buffer에 30 분간 equilibrate시켰다. Sponge, 3 MM paper, gel, NC membrane, 3 MM paper, sponge의 순으로 transfer cassette를 만든 후에 300 mA에서 1시간동안 transfer하였다.

Table 9. Microorganisms used in Two Dimensional Electrophoresis

Microorganisms	Characteristics	Reference
<i>S. exfoliatus</i> SMF19	β -lactamase inhibitory protein producing strain isolated from soil	Kim and Lee, 1991, 1994
<i>S. exfoliatus</i> SMF19 <i>bliA</i> disruptant	<i>bliA::hyg^r</i>	Kang and Lee
<i>S. exfoliatus</i> SMF19 <i>bliB</i> disruptant	<i>bliB::hyg^r</i>	Kang and Lee

이 때 얼음은 30분 간격으로 바꾸어주었다. Transfer가 끝난 후 membrane을 떼어내고 fresh하게 준비된 blocking solution에 1시간동안 incubation하였다. 이어 TTBS로 15분, 5분, 5분 간격으로 washing 해주고 primary antibody ($2 \mu\text{l ml}^{-1}$)를 첨가한 뒤 1시간 incubation 하였다. 15분간 3번 washing 해주고 secondary antibody (Amersham Co., Ltd, HRP-linked, $1 \mu\text{l ml}^{-1}$)를 넣고 30분간 incubation한 뒤 다시 15분간 3번 washing 해준 다음 ECL (Amersham Co., Ltd)로 확인하였다.

나. GST Pull down에 의한 BLIP-II와 상호작용하는 단백질의 검색

(1) 클로닝

bliB 유전자를 클로닝하기 위해 pSMF252를 주형으로 하고 *bliB* forward (5'-CCg gAA TTC ATg CCg AAC ggA ATC gTC CgA-3')과 *bliB* reverse(5'-CgC gAA TCC TCA gCC CTT Cgg ggC gTA ggC-3')으로 하여 *pfu* polymerase (Promega)로 *bliB*를 증폭하여 pGADT7의 *EcoRI*과 *BamHI*자리로 클로닝하여 pGADT7-*bliB*를 제작하였다. BLIP-II 단백질에 GST를 붙여주기 위해 GST 유전자가 있는 pGEX 4T-1 벡터에 *bliB* 유전자를 클로닝하기 위해서 pGADT7-*bliB*와 pGEX4T-1을 각각 *EcoRI/XhoI*으로 처리하여 gel extraction (E.Z.N.A gel extraction kit)한 후 ligation시켜 pGEX 4T-1/*bliB*를 만든다.

(2) Overexpression test

5 ml LA (LB + ampicillin $100 \mu\text{g ml}^{-1}$) broth에 pGEX 4T-1/*bliB*로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)을 접종한 후 37°C에서 150 rpm으로 OD₆₀₀이 0.4 - 1.0이 될 때까지 배양한 다음, IPTG를 최종농도 1 mM로 첨가한 후 다시 37°C에서 150 rpm으로 3시간 동안 induction시킨 후 sampling하여 OD₆₀₀를 측정한다.

(3) 분획화 (fractionation) 및 solubility 측정

대량생산된 GST-BLIP-II의 expression locus와 solubility를 알아보기 위해 microtube 두 개에 induction시킨 sample을 1 ml씩 각각 넣고 10,000 x g로 1분간 원심분리하여 cell pellet을 얻는다. Total cell protein은 100 μl PBS에 cell pellet을 재 분산하고 2X sample buffer를 넣은 후 sonication (15 % amplitude, 2 sec ON, 5 sec OFF, 5 rounds)하여, 70°C에서 3분간 denaturation시켜 준비하였다. 나머지 튜브에는 100 μl 20 mM Tris-Cl, pH7.5를 넣고 동일한 조건으로 sonication한 후 14,000 x g로 10분간 원심분리 하여 상등액은 따로 모아 100 μl 2X sample buffer를 넣어 70°C에서 3분간 denaturation시켜 soluble fraction을 얻었으며, cell debris pellet은 100 μl 20 mM Tris-HCl (pH7.5)로 두 번 washing하였다. 100 μl 0.5 % SDS와 100 μl 2X sample buffer를 넣어주고, 동일한 조건으로 sonication한 후 70°C에서 3분간 denaturation하여 insoluble fraction을 얻었다. Total cell protein,

soluble fraction, insoluble fraction으로 준비된 sample을 12 % acrylamide gel에 전기 영동하여 GST-BLIP II의 locus와 solubility를 확인한다.

(4) Scale up

5 ml LA (LB +ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$) broth에 pGEX 4T-1/*bliB*로 형질전환된 *E. coli* BL21(DE3)을 접종한 후 37°C에서 150 rpm으로 OD₆₀₀이 0.4 - 1.0이 될 때까지 배양한다. 이것을 200 ml LB media 5개에 2 ml씩 접종하여 OD₆₀₀이 0.4 - 1.0이 될 때까지 배양한 후, IPTG를 최종농도 40 μM 로 첨가한 후 20°C에서 12시간 배양한다.

(5) Cell extraction 준비 - soluble fraction

위에서 배양한 1 l의 배양액을 10,000 x g로 5분간 원심분리하여 cell을 얻은 후, 차가운 1X GST Bind/Wash Buffer 40 ml에 분산시킨다. 얻어낸 cell을 sonication이나 French Press 을 통해 lysis 시킨 후, 39,000 x g로 20분간 원심분리하여 상등액만 얻어낸다. 상등액은 0.45 μm membrane으로 filtering한다.

(6) Prey protein의 준비를 위한 *S. exfoliatus* SMF19의 배양

Prey protein은 *S. exfoliatus* SMF19의 배양액으로부터 extracellular fraction, cytoplasmic membrane과 cell wall 및 cytosol fraction으로 나누어 준비한다. 종균 배양을 위해서 *S. exfoliatus* SMF19의 포자를 TSB 배지에 접종하여, 30°C, 150 rpm에서 48시간 동안 배양한다. *S. exfoliatus* SMF19의 fermentor 배양에는 5L 규모의 jar fermentor (KFC, Korea)를 사용한다. 배양배지는 BLI-producing 배지를 사용하고, 종균 접종은 48시간 동안 배양한 종균 배양액을 10 % 농도로 접종한다. 배양 조건은 30°C의 온도를 유지하면서 300 rpm의 agitation을 해 주고 통기율은 1.0 vvm으로 유지한다.

(7) 단백질 샘플 분획화

배양한 cell을 10,000 x g로 20분간 원심분리하여 cell pellet을 얻고 상등액은 분리하여 extracellular fraction을 얻는다. 10 mM Tris-HCl (pH7.5)로 pellet을 두 번 씻어주고 French Press를 사용하여 900 psi로 cell을 disruption시킨다. 5,000 x g로 15분간 원심분리하여 상등액만 얻어 꺼지지 않은 cell은 제거한다. 170,000 x g로 60분간 원심분리하여 상등액은 Cytosol fraction으로 분리하고 pellet은 Triton X-100 1 %가 포함되어 있는 10 mM Tris-HCl (pH7.0) 2 ml에 분산시켜 cytoplasmic membrane과 cell wall fraction으로 얻어낸다.

Table 10. Microorganisms used in GST pull down

Strain	Relavant characteristic	References
<i>E. coli</i> DH5a	$F^- \phi lacZ \Delta M15 endA1 recA1 hsdR17(rk^- mk^+) supE44$ $thi^-1 gyrA96 \Delta(lacZYA^- agrF)U169 \lambda^-$	Hanahan, 1993
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm(DE3)$	Novagen
<i>S. exfoliatus</i> SMF19	β -lactamase inhibitory protein producing strain isolated from soil	Kim and Lee, 1991, 1994

Table 11. Plasmids used in GST pull down

Vectors	Description	References
pSMF251	4kb <i>Apa</i> I insert conferring <i>bliB</i> in pZErO-2	Park, 1997
pSMF252	1.6kb <i>Sac</i> II insert conferring <i>bliB</i> from pSMF251 in pBluescript II KS (-)	Park, 1997
pGEX 4T-1	Expression vector of GST tagged fusion protein in <i>E. coli</i>	Amersham
pGADT7- <i>bliB</i>	<i>bliB</i> inserted into <i>Nde</i> I and <i>Bam</i> HI site of pGADT7	This study
pGEX4T-1/ <i>bliB</i>	pGEX 4T-1 containing <i>bliB</i>	This study

(8) Column chromatography

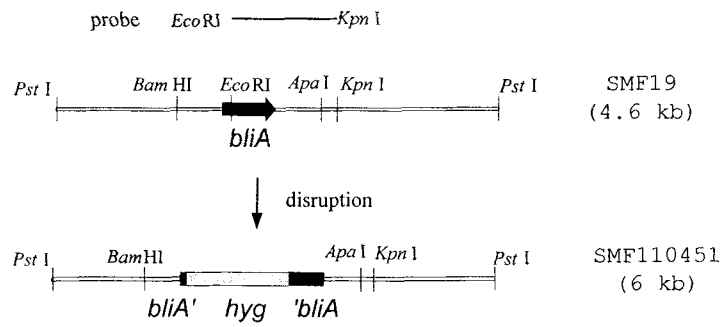
GST Bind/Wash Buffer 5 volumes (12.5 ml)을 흘려주어 resin을 씻어줌과 동시에 equilibration 한 다음, 준비된 cell extract (bait sample)를 column에 loading한다. 1X GST Bind/Wash Buffer 10 volumes (25 ml)으로 resin을 씻어주고 flow-through fraction을 모아서 얼음에 보관한다. column에 cap을 끼운 후, 준비된 prey protein sample을 흘려주고 4°C에서 적어도 한 시간 정도 rocker로 흔들어주며 incubation시킨다. cap을 벗긴 후 prey flow through를 모아 얼음에 보관한다. 1X GST Bind/Wash Buffer 16 volumes을 흘려주어 binding하지 않은 단백질은 씻어준다. Wash fraction은 모아서 얼음에 보관한다. 1X GST Elution Buffer 3 volumes (7.5 ml)으로 resin에 결합한 단백질을 떨어 뜨려준다.

3. 결과 및 고찰

가. *bliA*, *bliB*, *bliA* and *bliB* 유전자가 선택적으로 제거된 *Streptomyces exfoliatus* SMF19의 null mutant의 제작

bliA 유전자의 insertional inactivation은 pSMF11041의 *EcoRI*-*KpnI* (1.2kb) fragment를 probe로 하여 ECL direct nucleic acid labelling system을 사용하여 Southern hybridization을 시행하여 확인하였다. *S. exfoliatus* SMF19의 genomic DNA를 *PstI*으로 자를 경우 4.6kb의 band가 얻어지는 반면 *hyg*이 첨가된 *S. exfoliatus* SMF110451의 경우 6kb 정도의 band가 얻어졌다 (Figure 11). *bliB* 유전자의 insertional inactivation은 pSMF2521의 *SacII*-*SalI* (667bp) fragment를 probe로 하여 ECL direct nucleic acid labelling system을 사용하여 Southern hybridization을 시행하여 확인하였다. *S. exfoliatus* SMF19의 genomic DNA를 *SacII*으로 자를 경우 1.6kb의 band가 얻어지는 반면 *hyg*이 첨가된 *S. exfoliatus* SMF110451의 경우 1.3kb 정도의 band가 얻어졌다 (Figure 12). Double null mutant의 경우는 *bliA*가 이미 파괴된 균주에서 *bliB* 유전자를 다시 파괴한 것을 확인하기 위해, pSMF2521의 *SacII*-*SalI* (667bp) fragment를 probe로 하여 ECL direct nucleic acid labelling system을 사용하여 Southern hybridization을 시행하여 확인하였다. *S. exfoliatus* SMF19의 genomic DNA를 *SacII*으로 자를 경우 1.6kb의 band가 얻어지는 반면 *apr*이 첨가된 double mutant의 경우 3.0kb 정도의 band가 얻어졌다 (Figure 13). *S. exfoliatus* SMF19에서 *bliA* 유전자가 knockout되어 나타나는 형태적 변화를 알아보기 위해서 *S. exfoliatus* SMF19 wild type과 *bliA::hyg*, *bliB::hyg*, *bliA::hyg/bliB::apr* 균주를 minimal medium에 배양하였다. 그 결과 mutant 균주들이 bald phenotype을 나타내었다. 따라서 BLIP-I 뿐만 아니라 BLIP-II 역시 morphological differentiation에 관여함을 알았다 (Figure 14).

(A)



(B)

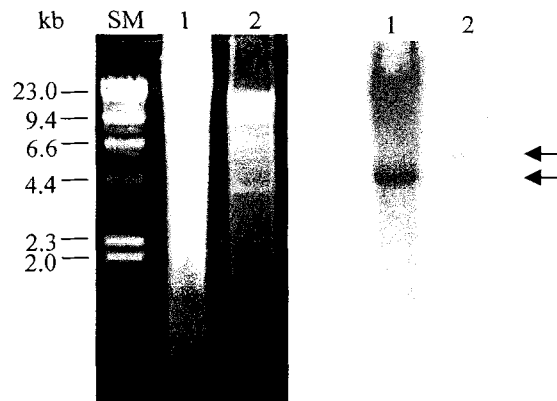
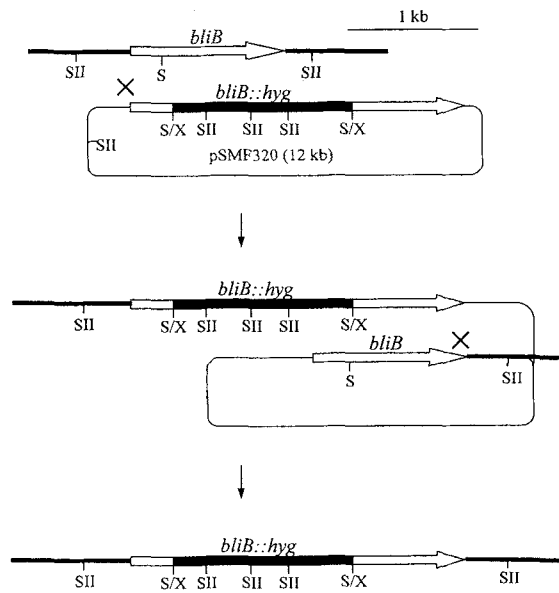


Figure 11. Analysis of the *bliA* mutant obtained by gene replacement. (A) Diagram showing the replacement of the wild-type *bliA* gene by a mutant allele containing an hygromycin resistance gene. (B) Hybridization analysis of a Southern blot of *Pst*I-digested DNAs from wild type(lane1), *bliA::hyg* mutant(lane2).

(A)



(B)

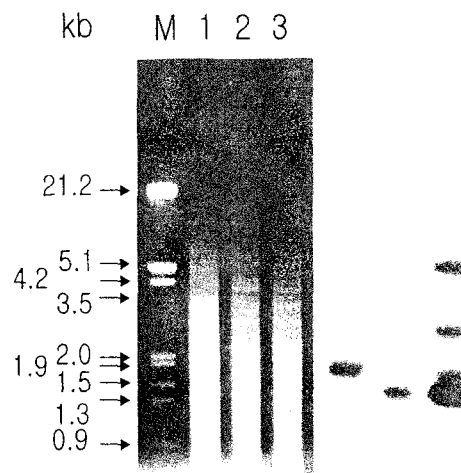
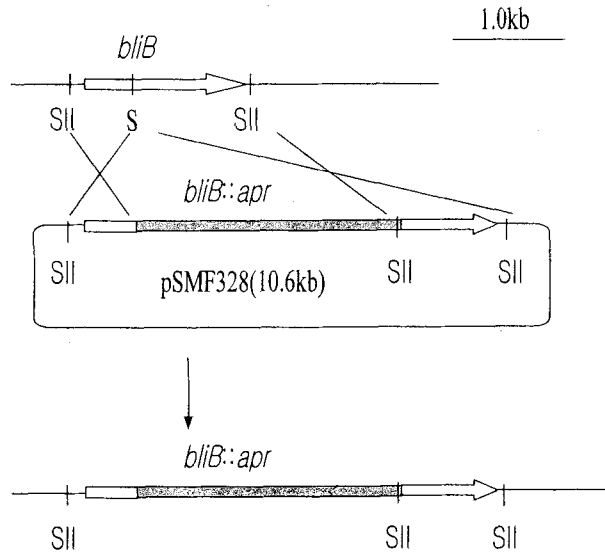


Figure 12. Analysis of the *bliB* mutant SMF19 *bliB::hyg* obtained by gene replacement. (A) Diagram showing the replacement of the wild-type *bliB* gene by a mutant allele containing a hygromycin resistance gene (*hyg*) in its coding region. (B) Hybridization analysis of a Southern blot of *SacII*-digested DNAs from SMF19 (lane 1), SMF19 *bliB::hyg* (lane 2) and SMF19/pSMF320 (lane 3). The probe used was the 667 bp *SacII*-*SalI* fragment from upstream to internal of *bliB*.

(A)



(B)

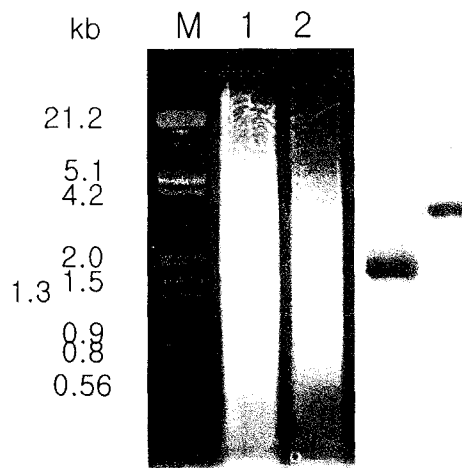


Figure 13. Analysis of the double(*bliA*, *bliB*) mutant obtained by gene replacement. (A) Diagram showing the replacement of the wild-type *bliB* gene by a mutant allele containing a apramycin resistance gene (*apr*) in its coding region. (B) Hybridization analysis of a Southern blot of *SacII*-digested DNAs from SMF19 (lane 1), double mutant, *bliA::hyg bliB::apr* (lane 2). The probe used was the 667 bp *SacII-SalI* fragment from upstream to internal of *bliB*.

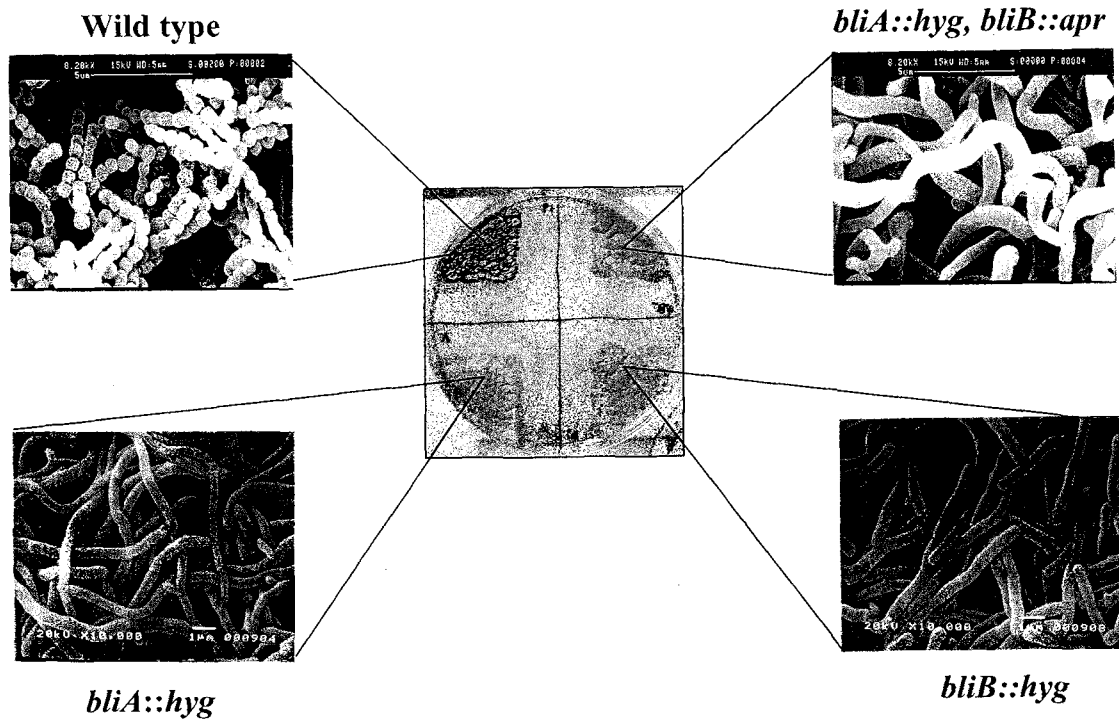


Figure 14. Growth of wild type and mutants (*bliA*⁻, *bliB*⁻, *bliA*⁻ & *bliB*⁻) on minimal medium

나. Yeast Two Hybrid를 이용한 BLIP-I과 BLIP-II의 상호작용 단백질 검색

1. Yeast two hybrid system을 이용한 BLIP-I, II의 상호작용 단백질의 검색을 통한 BLIP의 생체 내 역할 규명

BLIP-I과 BLIP-II간의 상호작용여부와 BLIP-I 또는 BLIP-II가 동종이복합체 (homodimer)를 이루는지를 판단하기 위해 리포터유전자 (Histidine, Adenine 생합성 유전자, lacZ 유전자)를 가진 효모 AH109에 BLIP-I, BLIP-II과 BLIP-II의 유전자를 클로닝한 벡터를 table 12.과 같은 조합으로 동시에 형질전환을 시켜주었다. SD/-Trp/-Leu배지는 binding domain과 activation domain을 가지고 있는 두 개의 벡터, pGBKT7, pGADT7에 genetic marker로 leucine과 tryptophan 생합성 유전자가 있기 때문에 형질전환을 확인하기 위한 대조군으로 사용되었다. SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 배지와 SD/-Trp/-Leu/-His 배지의 경우는 단백질간의 상호작용에 의한 리포터 유전자 (Histidine, Adenine 생합성 유전자)의 발현을 통한 효모의 성장 유무를 통해 상호작용여부를 확인할 수 있었다 (Table 12). SD/-Trp/-Leu/-His배지의 경우는 리포터유전자에 의한 상호작용여부를 확인하기가 어렵지만, SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade의 경우에는 확실하게 확인이 가능하였다 (Figure 15). 결과적으로, BLIP-I 과 BLIP-II간의 상호작용이 없음과 BLIP-I 또는 BLIP-II가 동종이복합체 (homodimer)를 이루지 않는다는 것을 배지에서 성장을 통해 확인하였고, 이것을 다시 확인하기 위하여, 리포터 유전자 중에서 lacZ를 이용한 정량 assay인 β -galactosidase assay를 하였다 (Table 13). 정량 assay의 결과 positive control의 unit값과 비교하여 볼 때, BLIP-I와 BLIP-II의 상호작용이 없음과 BLIP-I, BLIP-II 모두 동종이복합체 (homodimer)를 이루지 않음을 확인하였다.

2. *S. coelicolor* cDNA Library 제작

앞의 실험에서 BLIP-I과 BLIP-II의 상호작용이 없으며 동종이복합체 (homodimer)를 이루지 않음을 확인하였다. 따라서, BLIPs의 생체 내 역할을 규명하기 위해 상호작용하는 target 단백질을 찾기 위해, cDNA library를 만들어 screening을 하기로 하였다. *S. coelicolor*의 액체배양액에서 RNA를 분리한 후, RT (Reverse Transcriptase) PCR에 의해 cDNA를 합성하고, LD (Long Distance)-PCR에 의해 증폭하였다. 합성된 cDNA Library 7 μ l를 1.2 % agarose gel에서 전기영동 후에, EtBr (Ethidium Bromide)로 염색하고 UV로 관찰한 결과 cDNA가 합성이 잘 된 것을 확인할 수 있었다 (Figure 16). 또한 400bp 이하의 cDNA들은 하나의 단백질을 coding하는 유전자를 찾기에는 부적합하기 때문에 합성된 cDNA를 CHROMA SPIN + TE-400 column을 통과시킨 결과 400bp 이하의 cDNA들은 column에서 걸러짐을 볼 수 있다 (Figure 17). 이 cDNA를 사용하여, *S. cerevisiae* Y187균주에 pGADT7Rec (leucine 생합성 유전자가 genetic marker)과

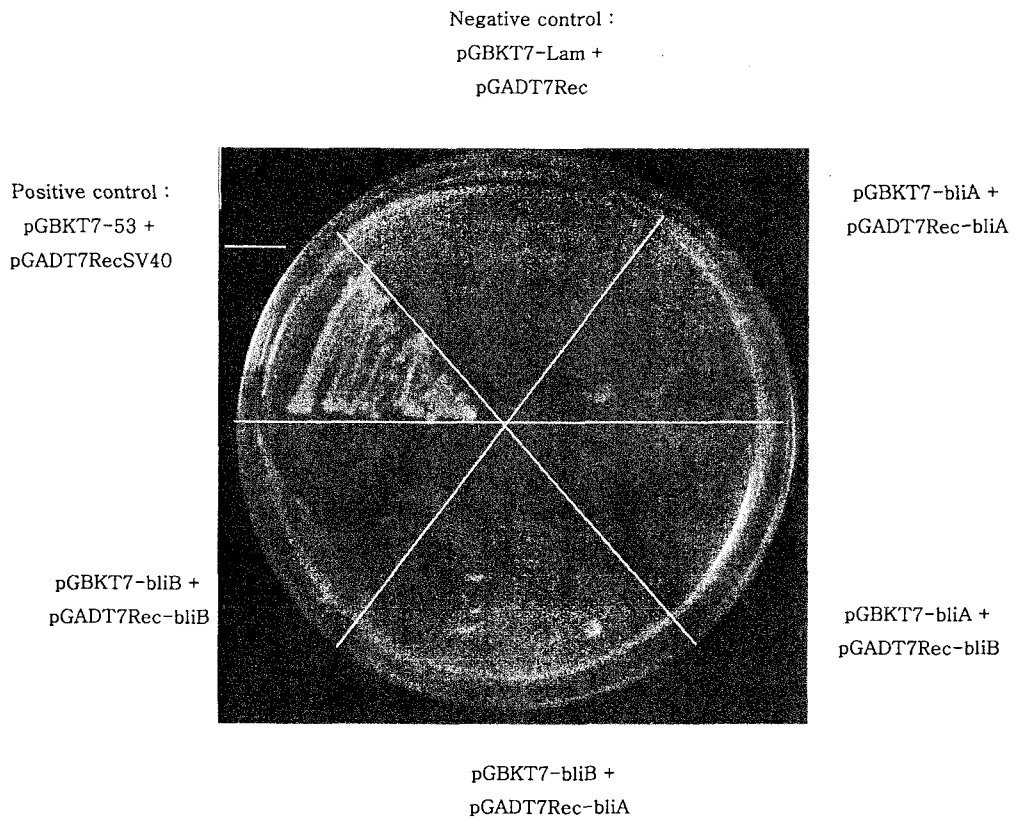
Table 12. BLIPs interaction analysis
by nutrition selection (Auxotroph)

	SD/-Leu/-Trp Plate(Control) ¹⁾	SD/-Leu/-Trp /-His plate ²⁾	SD/-Leu/-Trp /-His/-Ade plate ³⁾
Positive control :			
pGBKT7-53 +pGADT7-SV 40	+++	++	++
Negative control :			
pGBKT7-Lam +pGADT7-SV40	+++	+	-
pGBKT7- <i>bliA</i> +pGADT7- <i>bliA</i>	+++	+	-
pGBKT7- <i>bliA</i> +pGADT7- <i>bliB</i>	+++	+	-
pGBKT7- <i>bliB</i> +pGADT7- <i>bliA</i>	+++	+	-
pGBKT7- <i>bliB</i> +pGADT7- <i>bliB</i>	+++	+	-

1) 동시형질전환 확인을 위한 대조군

2) Histidine에 의한 선택은 3-Aminotriazole을 넣어주어야 하며 상호작용여부를 판단하기가 쉽지 않다.

3) Histidine과 Adenine에 의한 선택은 잘 이루어진다.



**Figure 15. BLIPs interaction analysis
by nutrition selection (Auxotroph)**

Table 13. β -galactosidase assay of BLIPs

Sample	OD ₆₀₀	OD ₄₂₀	Unit
Positive Control pGBKT7-53 + pGADT7-SV 40	0.883	0.8680	196.6
Negative Control pGBKT7-Lam + pGADT7-SV40	0.671	0.0086	0.017
pGBKT7- <i>bliA</i> + pGADT7- <i>bliA</i>	0.707	0.0156	0.016
pGBKT7- <i>bliA</i> + pGADT7- <i>bliB</i>	0.812	0.0143	0.024
pGBKT7- <i>bliB</i> + pGADT7- <i>bliA</i>	0.574	0.0013	0.003
pGBKT7- <i>bliB</i> + pGADT7- <i>bliB</i>	0.667	0	0

함께 형질전환한 뒤, leucine이 빠져 있는 Synthetic Dropout 배지에 도말하였고, 4 - 5일 배양 후에 세포를 freezing medium을 이용하여 고형배지 위의 세포를 회수하였다. 그 후에, 1.5 ml씩 나누어 분주하여 mating을 위한 *S. coelicolor* cDNA library를 준비하였다. 이 Library의 농도는 1×10^9 cells ml⁻¹이며, 무작위로 콜로니를 선택하여 cDNA insert를 확인한 결과, 53 %비율로 *S. coelicolor* cDNA insert가 들어 있음을 확인하였다.

3. BLIP-I 및 BLIP-II와 상호작용하는 단백질의 검색

위에서 제작한 cDNA Library를 사용하여 mating 방법에 따라 BLIP-I과 상호작용하는 단백질을 검색하였다. SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 배지에서 5 - 6일이 지난 후 200개 이상의 콜로니가 나왔으며, 이 중에서 성장이 빠른 96개의 콜로니를 골라낸 뒤, 3 - 4번 계대배양 하였다. 그 뒤에, 96개의 후보균주에서 pGADT7-cDNA 벡터를 효모에서 분리하였고, 이것을 *E. coli* DH5a에 형질전환 시켜 AD-cDNA를 가지고 있는 벡터 (pGADT7)을 증폭하고 분리하였고, cDNA insert가 들어가 있는 클로닝 위치의 바로 앞과 뒤에 있는 *EcoRI*과 *BamHI*로 처리하여 크기를 확인하였다 (Figure 18) 그 후, β -galactosidase assay에 의해 상호작용의 강도를 확인하였고 상호작용 강도가 높고 크기가 큰 37개의 후보균주만을 골라서 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열 결과를 NCBI Blast search에 의해서 분석하였으며 이 중에서, 프레임과 유전자의 방향이 맞는 것만을 선택하였다 (Table 14).

BLIP-II의 경우도 위에 제작한 cDNA Library를 사용하여 mating 방법에 따라 BLIP-II와 상호작용 하는 단백질을 검색하였다. SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 배지에서 5 - 6일이 지난 후 13개 이상의 콜로니가 나왔으며, 이 중에서 7개의 큰 콜로니를 골라낸 뒤, 3 - 4번 계대배양 하였다. 그 뒤에, 7개의 후보균주에서 pGADT7-cDNA 벡터를 효모에서 분리하였고, 이것을 *E. coli* DH5a에 형질전환 시켜 AD-cDNA를 가지고 있는 벡터 (pGADT7)을 증폭하고 분리한 뒤, cDNA insert가 들어가 있는 클로닝 위치의 바로 앞과 뒤에 있는 *EcoRI*과 *BamHI*로 처리하여 크기를 확인하였다 (Figure 19). 그 후, β -galactosidase assay에 의해 상호작용의 강도를 확인하였고 상호작용 강도가 높고 크기가 큰 7개의 후보균주만을 골라서 염기서열 분석을 의뢰하였다. 염기서열 결과를 NCBI Blast search에 의해서 분석하였으며 이 중에서, 프레임과 유전자의 방향이 맞는 것만을 선택하였다 (Table 15).

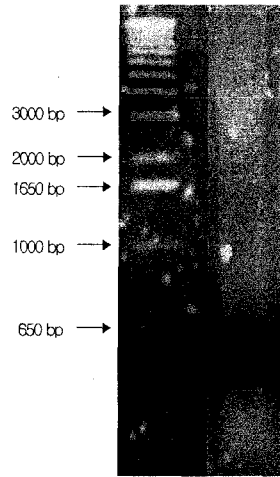


Figure 16. Construction of cDNA by RT PCR & LD PCR

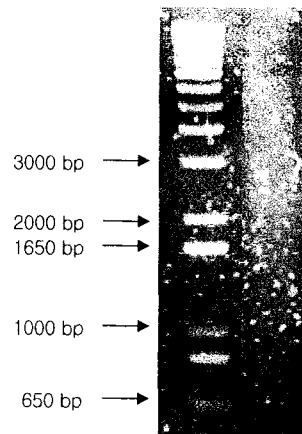
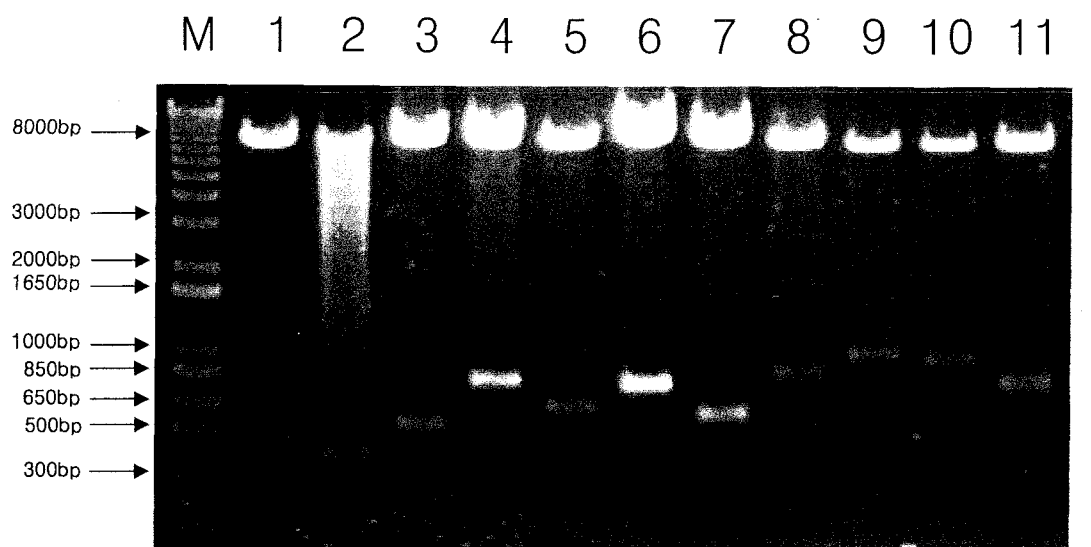


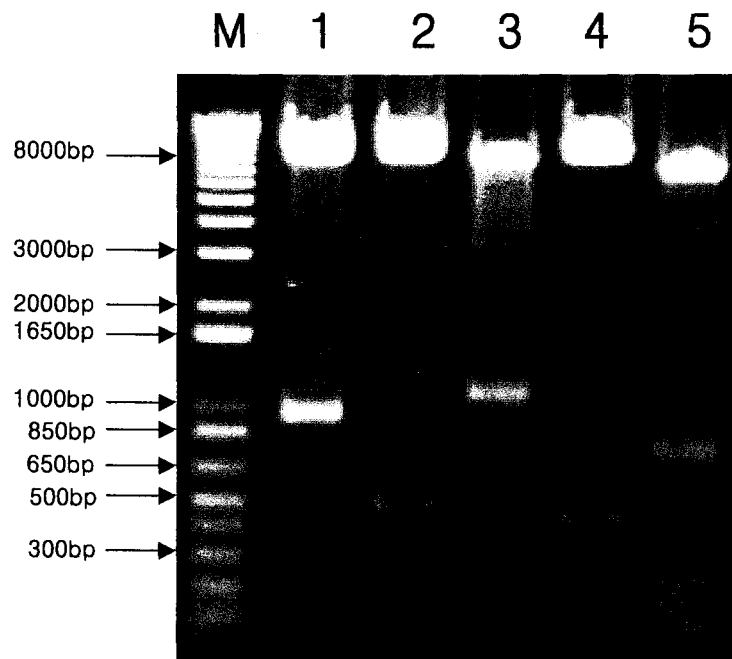
Figure 17. Cut off Under 400bp cDNA of *S. coelicolor* by CHROMA SPIN + TE-400 column



M : 1kb Plus DNA Ladder

1 : DA15	2 : DA21	3 : DA23	4 : DA26
5 : DA46	6 : DA49	7 : DA58	8 : DA59
9 : DA76	10 : DA77	11 : DA92	

Figure 18. Size analysis of Interaction candidates of BLIP-I
 (Amplified in *E.coli* DH5a, digested by *EcoRI/BamHI*)



M : 1kb Plus DNA ladder

1 : EB1

2 : EB5

3 : EB8

4 : EB11

5 : DB3

Figure 19. Size analysis of Interaction candidates of BLIP-II
 (Amplified in *E.coli* DH5 α , digested by *EcoRI/BamHI*)

Table 14. Analysis of cDNA sequences of candidates in *S. coelicolor* interacted with BLIP-I.

중요도	Sample No	size(bp)	Frame	Sequencing Primer	Sequencing Methods	cosmid	Gene
1	DA82	850	x	T7	Direct		
1	DA49	900	O	5-ADS	Plasmid	SC5F7	Putative two component system response
2	DA29	850	X	5-ADS	Plasmid		
2	DA59	1100	O	T7	Direct	SCD72A	Putative membrane protein
2	DA94	800	X	T7	Direct		
2	DA76	1000	O	5-ADS	Plasmid	SCF81	Hypothetical protein SCF81.13
3	DA24	350	X	T7	Direct		
3	DA77	900	O	5-ADS	Plasmid	SCH63	Putative cytochrome P450 oxidoreductase
3	DA21	400	O	5-ADS	Plasmid	SC5F1	Putative ABC transporter solute binding
3	DA3	500	X	T7	Direct		
3	DA85	600	X	T7	Direct		
3	DA43	550	X	5-ADS	Direct		
3	DA23	600	O	5-ADS	Plasmid	SCF11	putative secreted protein
3	DA44	500	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA40	550	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA75	1000	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA64	600	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA93	500	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA65	700	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA73	900	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA5	250	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA26	800	O	5-ADS	Plasmid	SCC22	Hypothetical protein
3	DA28	700	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA25	500	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA47		X	5-ADS	Plasmid		
3	DA15	500	O	5-ADS	Plasmid	SCBAC2 5F8	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
3	DA95	500	X	5-ADS	Plasmid		

Table 14. Analysis of cDNA sequences of candidates in *S. coelicolor* interacted with BLIP-I. (Continued)

중요 도	Sampl eNo	size(bp)	Frame	Sequencin g Primer	Sequencin g Methods	cosmid	Gene
3	DA27	300	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA51	800	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA33	400	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA17	350	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA62	850	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA46	550	O	5-ADS	Plasmid	SCJ9A	Putative oxidoreductase
3	DA84	600	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA92	700	O	5-ADS	Plasmid	SCF9.13	protein kinase-like protein, pk3
3	DA52	250	X	5-ADS	Plasmid		
3	DA58	600	O	5-ADS	Plasmid	SCBAC 17A6	Putative flavin-binding monooxygenase

Table 15. Analysis of cDNA sequences of candidates
in *S. coelicolor* interacted with BLIP-II.

중요도	Sample No	size(bp)	Frame	Sequencing Primer	cosmid	Gene
1	EB8	1100	O	5-ADS	SCD31	Putative regulatory protein
1	EB9	300	X			
2	EB6	250	X			
2	EB1	900	O	5-ADS	SCD25 SCD25	Putative integral membrane protein Hypothetical protein
2	DB3	800	O	5-ADS	SCH24	Putative replicative DNA helicase
3	EB5	500	O	5-ADS	SCJ9A	Putative oxidoreductase
3	EB11	400	O	5-ADS	SCJ1	Conserved hypothetical protein

다. Two Dimensional Electrophoresis를 이용한 BLIP-I과 BLIP-II의 target 단백질 검색

(1) *S. exfoliatus* SMF19의 배양

S. exfoliatus SMF 19 wild type, *bliA* disruptant 그리고 *bliB* disruptant를 5L fermentor를 이용하여 배양하였고, 각각 6-7시간마다 샘플을 취하여 DCW와 glucose정량 그리고 BLIP의 활성을 측정하였다. 세 가지 균주 모두에서 성장곡선을 얻을 수 있었으며 (Figure 20 - 22), 이 샘플들을 사용하여 각각 2-DE를 하기 위하여 준비하였다.

(2) 세포 내 단백질과 세포 외 단백질 샘플의 준비와 Two Dimensional Electrophoresis

세포 내 단백질의 2-DE를 하기 위한 샘플을 준비하기 위해서, 전체 세포 중에서 여기서는 mid-exponential phase와 late-exponential phase에 있는 샘플을 취하여 cell을 french press를 통하여 cell disruption을 한 후 protease의 활성을 최소화할 수 있는 basic한 조건에서 TCA/Acetone방법을 이용하여 샘플을 준비하였고 이 샘플은 Urea (8 M)와 CHAPS (4 %)를 포함한 lysis solution에 $5-10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ 정도의 농도가 되도록 준비되었고, 농도는 Bradford (Biorad) 시약과 microassay method를 이용하여 정량 되었다. 그리고 IPG Phor system (Amersham Co., Ltd)을 이용하여 pH3-10 NL (non linear) strip (Amersham Co., Ltd)으로 Iso Electro Focusing을 한 뒤, PROTEAN II (Bio Rad, Co., Ltd) system을 사용하여 SDS-PAGE를 걸어서 spot을 분리한 후 Coomassie brilliant blue R250을 이용하여 staining/destaining 하였다 (Figure 23 - 25). 실험 결과 wild type과 mutant 균주를 비교함으로써 *S. exfoliatus* SMF19의 분화에 BLIP-I과 BLIP-II의 활성과 관련되어 있을 것으로 예상되는 spot을 찾았다. 차이가 나는 spot을 찾기 위해서는 landmark를 선정하고 축과 도형을 그려 줌으로서 대칭적으로 있는 spot들을 비교하여 발현양의 변화를 확인하고 표시하였다. 각각 wild와 mutant에서 발현양이 증가 또는 감소하는 spot들을 비교분석하고, trypsin으로 처리하여 peptide fragmentation을 만든 뒤, peptide sequencing method로 사용되고 있는 ESI Q-ToF를 이용하여 internal peptide sequence를 얻어 characterization할 계획이다.

세포 외 단백질의 2-DE를 하기 위한 샘플을 준비하기 위해서, 전체 샘플 중에서 여기서는 mid-exponential phase와 late-exponential phase에 있는 샘플의 상등액을 취하여 protease의 활성을 최소화할 수 있는 basic한 조건에서 TCA/Acetone 방법을 이용하여 샘플을 준비하였고 이 샘플은 Urea (8 M)와 CHAPS (4 %)를 포함한 lysis solution에 $5-10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ 정도의 농도가 되도록 준비되었고, 농도는 Bradford (Biorad) 시약과 microassay method를 이용하여 정량 되었다. 그리고 IPG Phor system (amersham Co., Ltd)을 이용하여 pH3 - 10 NL (non linear)

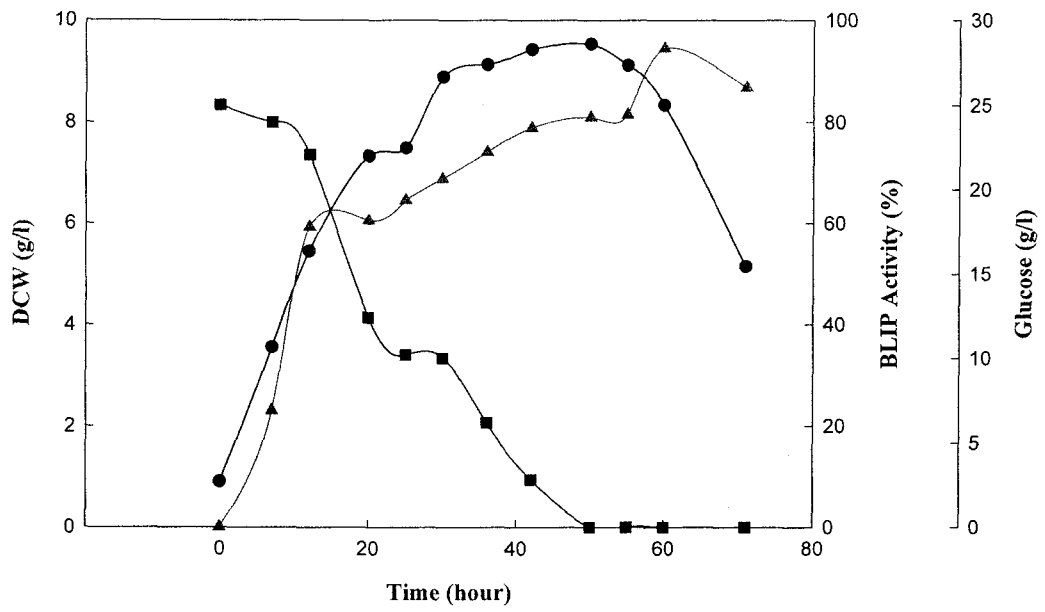


Figure 20. Growth and BLIP activity curve of *S. exfoliatus* SMF19 wild type. DCW, ● ; Glucose, ■ ; BLIP activity, ▲.

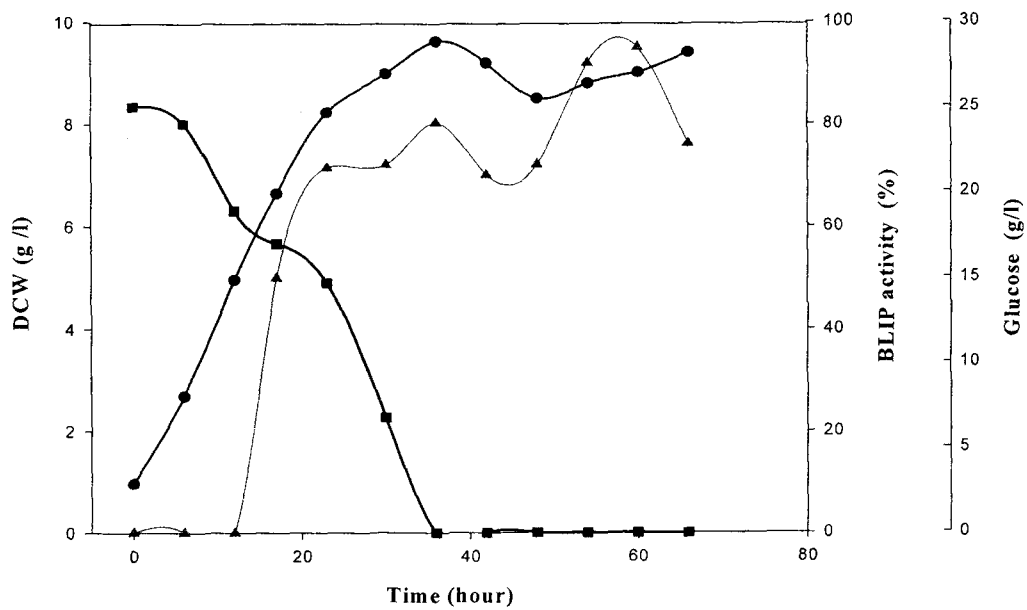


Figure 21. Growth and BLIP activity curve of *S. exfoliatus* SMF19 *bliA* disruptant. DCW, ● ; Glucose, ■ ; BLIP activity, ▲.

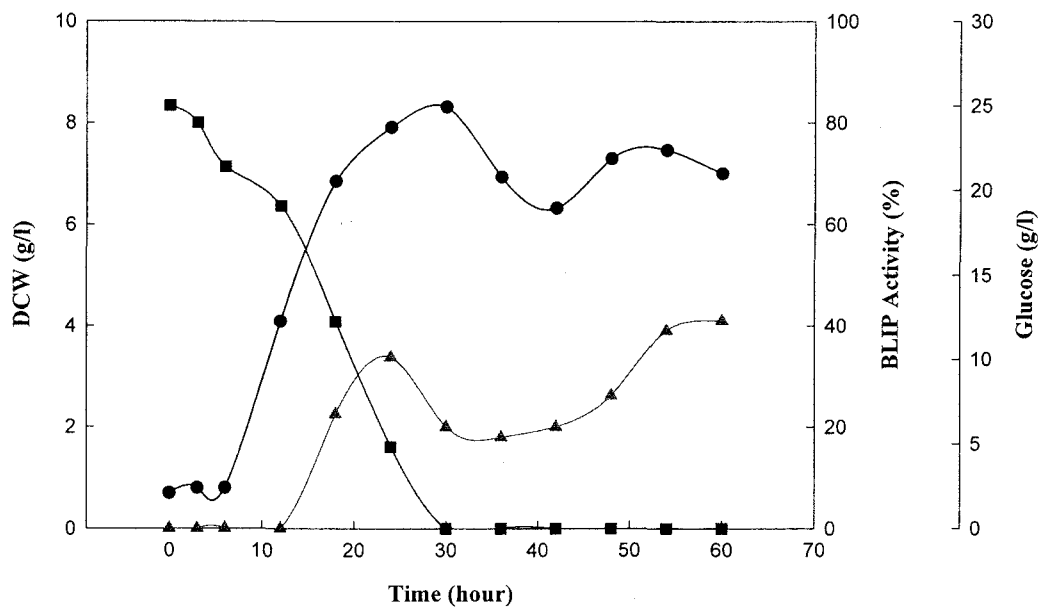


Figure 22. Growth and BLIP activity curve of *S. exfoliatus* SMF19 *bliB* disruptant, DCW, ● ; Glucose, ■ ; BLIP activity, ▲.

strip (Amersham Co., Ltd)으로 Iso Electro Focusing을 한 뒤, PROTEAN II (Bio Rad, Co., Ltd) system을 사용하여 SDS-PAGE를 걸어서 spot을 분리한 후 Coomassie brilliant blue R250을 이용하여 staining/destaining 하였다. (Figure 26 - 27) 발현양의 변화를 보이는 spot들은 cell free extract에서의 방법과 동일하게 하였으며, mid exponential에서는 변화량을 찾기가 쉽지 않았으며 세포 외 단백질의 경우 세포 내 단백질의 경우보다 시간에 따른 발현양의 변화가 심하여서 spot을 찾기가 쉽지 않았다. 발현양의 증가 또는 감소를 BLIP-I이 발현되지 않는 균주 (*bliA*- disruptant)에서 보인 이 spot들은 마찬가지로 ESI-Q ToF를 이용하여 internal peptide sequence를 분석하여 characterization 할 계획이다.

(3) Western analysis

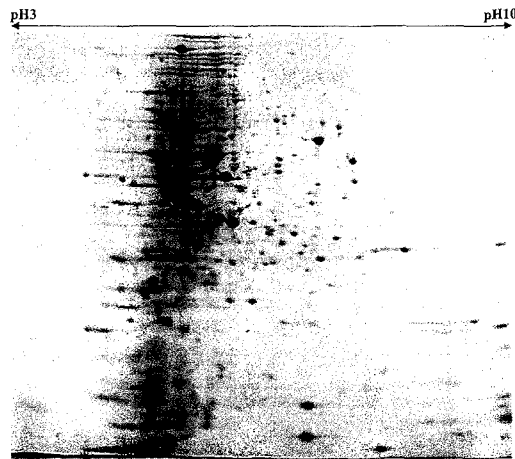
S. exfoliatus SMF19 *bliB* disruptant를 이용하여 시간에 따른 BLIP-I의 발현을 western blotting으로 확인하였다 (Figure 28). BLIP-I의 발현양은 Figure 22.의 BLIP-I만의 activity와 일치하게 나타나고 있음을 보여주고 있다.

2-DE gel상에서 BLIP-I의 위치를 찾아 center로 잡기 위해, 세포 외 단백질 샘플의 2-DE를 시행한 후 BLIP-I의 pI value (4.7)와 Molecular weight (18kDa)을 고려하여 gel의 왼쪽 하단을 잘라내어서 western transfer cassette에 장착하고 western을 하였으며 (Figure 29) 결과적으로 BLIP-I의 위치로 예상되는 signal을 얻을 수 있었다 (Figure 30B). 같은 시간대에서의 cell free extract에서의 detection을 시도하였으나, 너무 많은 non specific signal로 인하여 분석이 어려웠다 (Figure 30A). 이 두 가지의 western blotting을 통하여 BLIP-I의 발현과 위치를 확인할 수 있었으나, 2-DE gel상에서 정확히 어느 spot인지에 대하여서는 좀 더 분석이 필요하다.

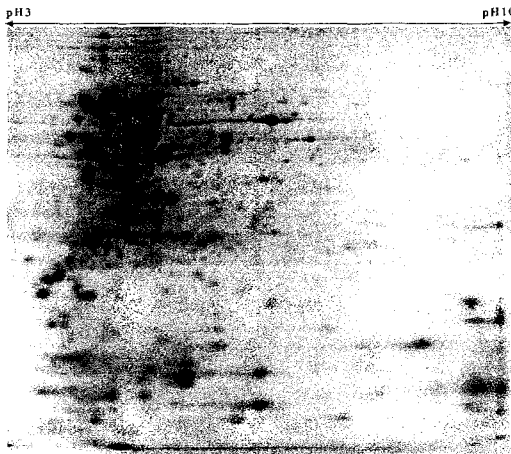
나. GST Pull Down

(1) Bait protein 준비

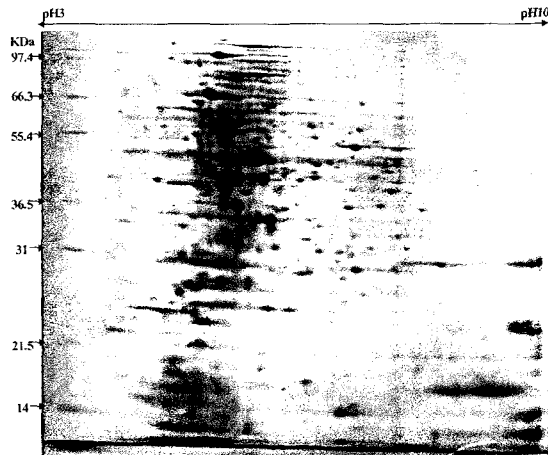
bliB 유전자를 클로닝하기 위해 pSMF252를 주형으로 하고 *bliB* forward (5'-CCg gAA TTC ATg CCg AAC ggA ATC gTC CgA-3')과 *bliB* reverse(5'-CgC gAA TCC TCA gCC CTT Cgg ggC gTA ggC-3')으로 하여 *pfu* polymerase(Promega)로 *bliB*를 증폭하였다. 이를 pGADT7의 *EcoRI*과 *BamHI*자리로 클로닝한 벡터가 pGADT7-*bliB*이다. 증폭산물은 sequencing (Takara)을 통해 염기서열을 확인하였다. BLIP-II 단백질에 GST를 붙여주기 위해 GST 유전자가 있는 pGEX 4T-1 벡터에 *bliB* 유전자를 클로닝 하기 위해 pGADT7-*bliB*와 pGEX4T-1을 각각 *EcoRI/XhoI*으로 처리하여 gel extraction (E.Z.N.A gel extraction kit)한 후 (Figure 31) ligation시켜 pGEX 4T-1/*bliB*를 제조하였다 (Figure 31 - 33). 제조한 벡터로 *E. coli* BL21(DE3)를 형질전환 하여 IPTG로 3시



A) Wild type
- Cell free extract 12h

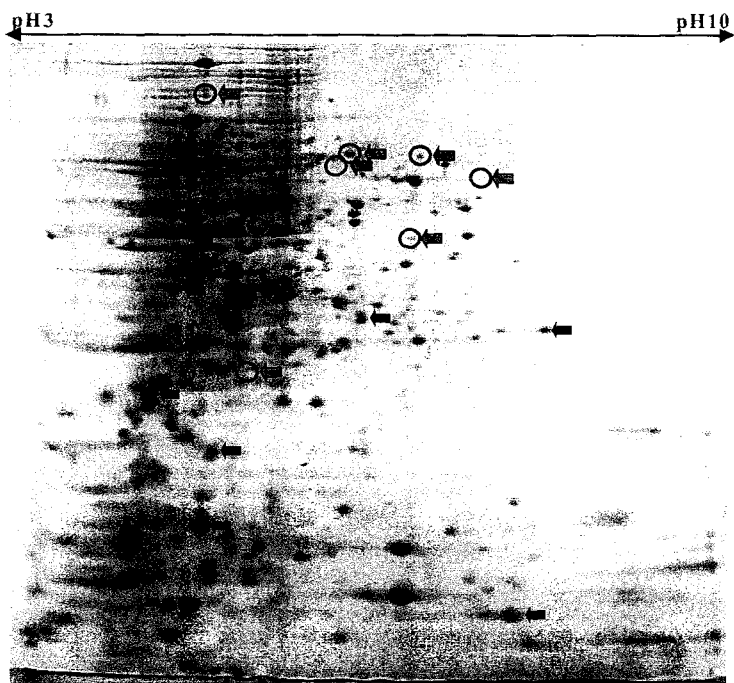


B) *bliA* disruptant
- Cell free extract 17h

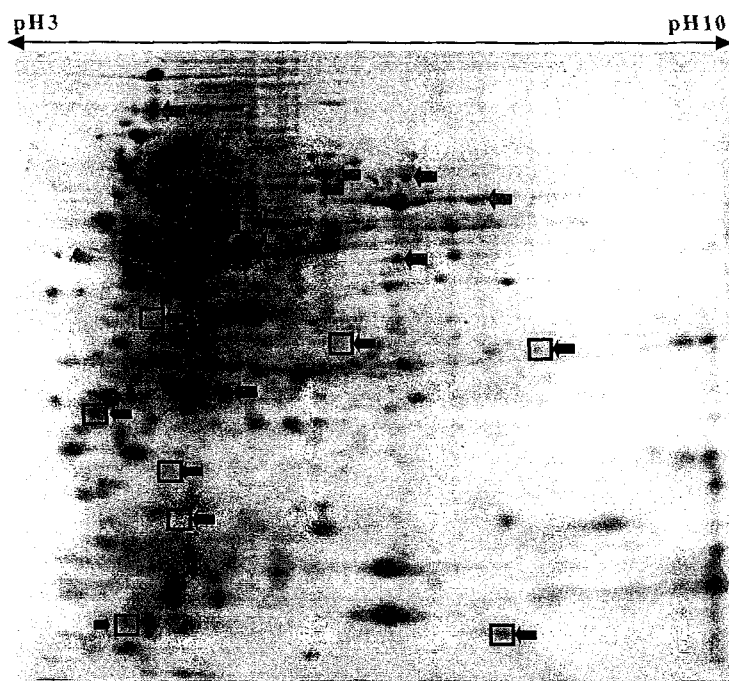


C) *bliB* disruptant
- Cell free extract 12h

Figure 23. Two Dimensional Electrophoresis of *S. exfoliatus* SMF19 wild type, *bliA* disruptant and *bliB* disruptant at mid exponential phase

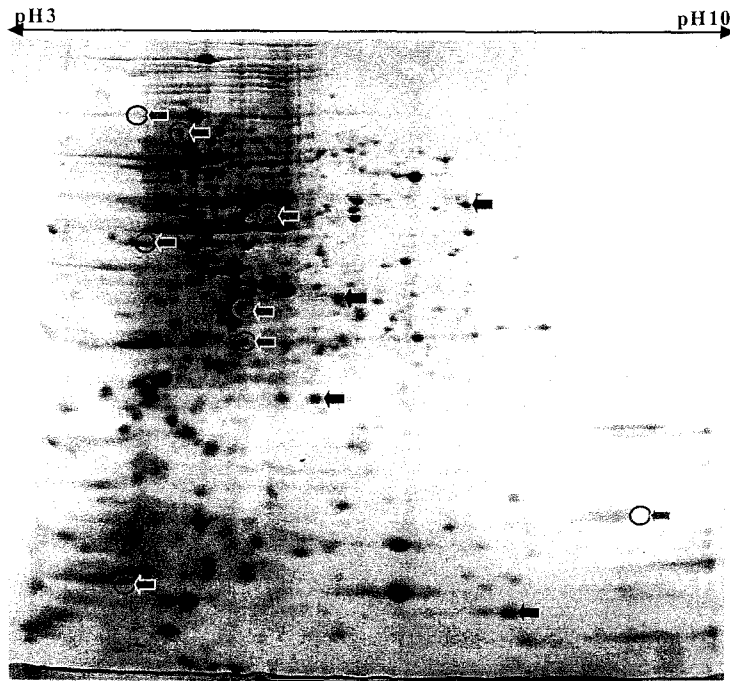


A) Wild type
- Cell free extract 36h

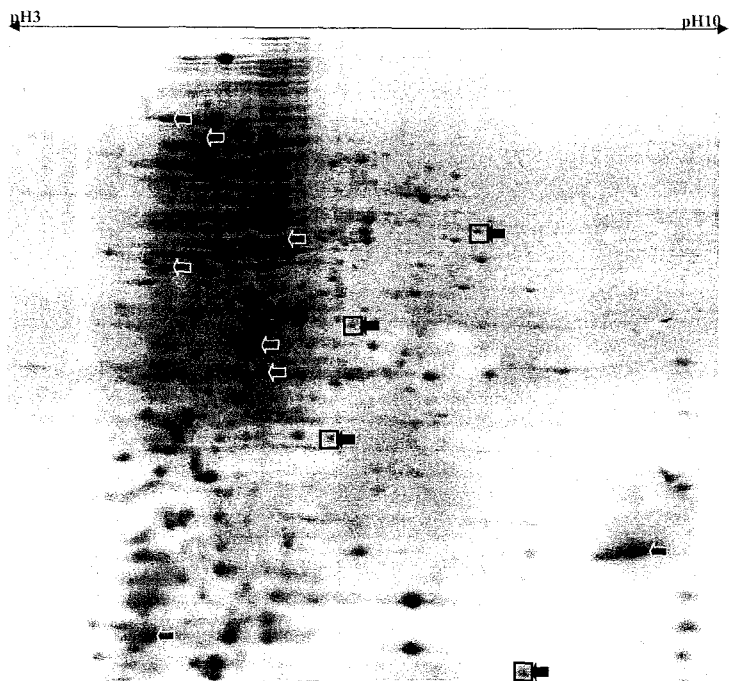


B) *bliA* disruptant
- Cell free extract 36h

Figure 24. Two Dimensional electrophoresis of *S. exfoliatus* SMF19 wild type and *bliA* disruptant at late exponential phase.
(decreased spot (○) in wild type, decreased spot (□) in mutant strain)

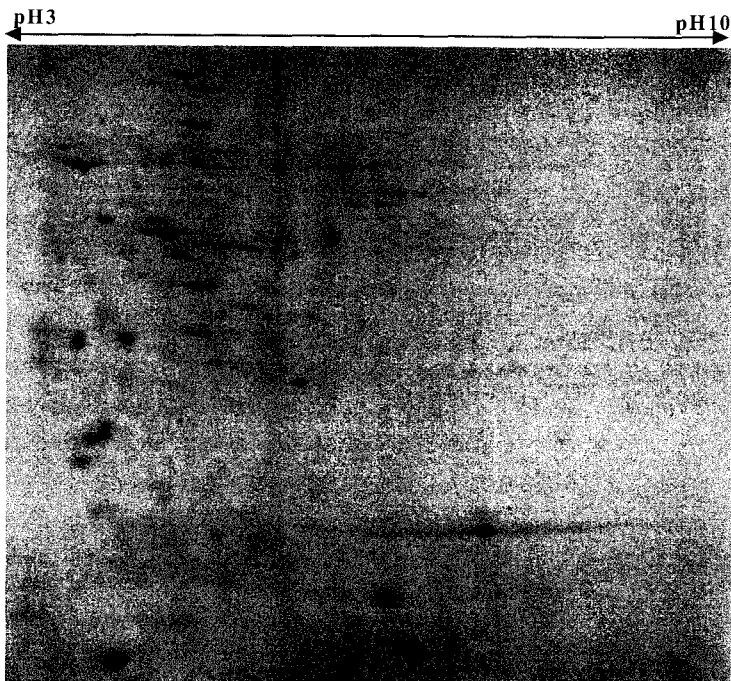


A) Wild type
- Cell free extract 36h

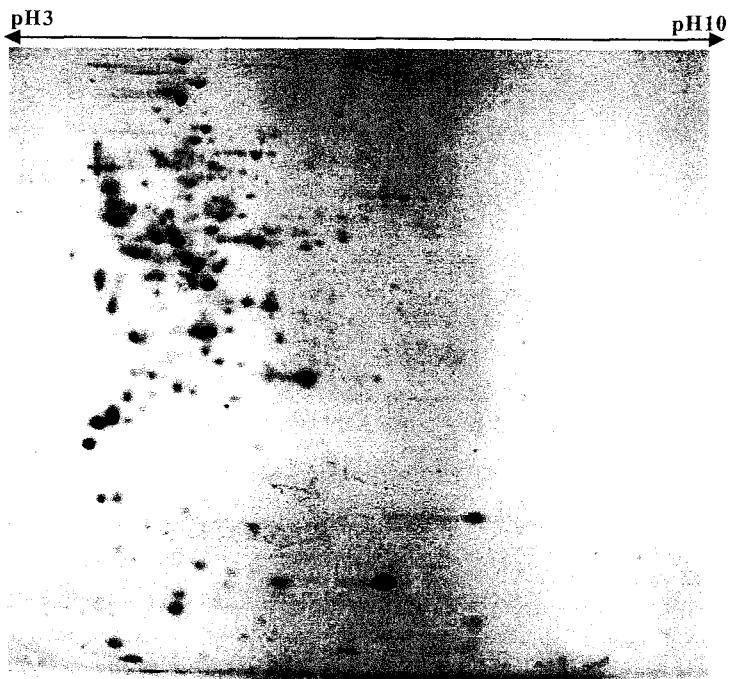


B) *bliB* disruptant
- cell free extract 24h

Figure 25. Two Dimensional electrophoresis of cell free extract of *S. exfoliatus* SMF19 wild type and *bliB* disruptant at late exponential phase (decreased spot (○) in wild type, decreased spot (□) in mutant strain)

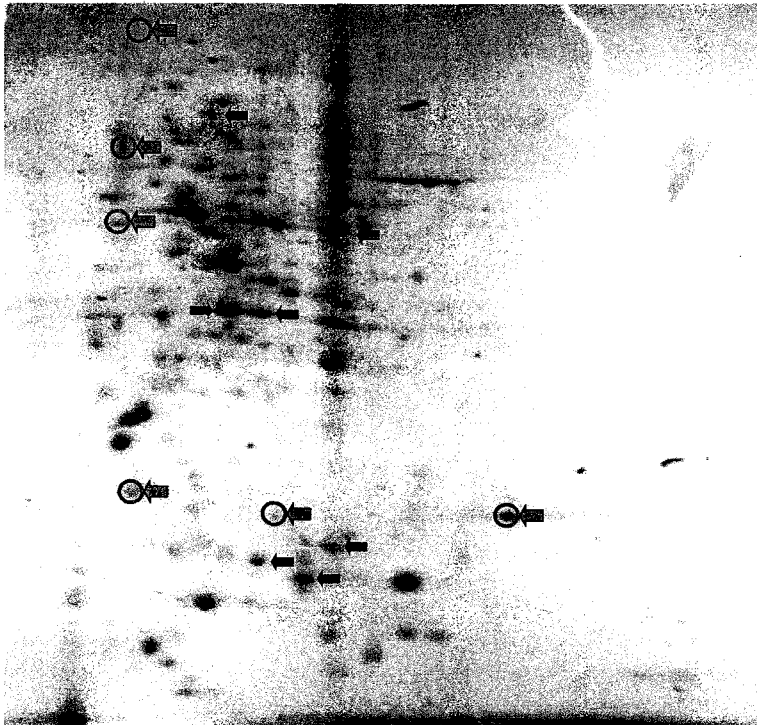


A) Wild type
-Extracellular
protein 20h



B) *bliA* disruptant
-Extracellular
protein 17h

Figure 26. Two Dimensional electrophoresis of extracellular protein of *S. exfoliatus* SMF19 wild type and *bliB* disruptant at mid-exponential phase



A) Wild type
-Extracellular
protein 42h

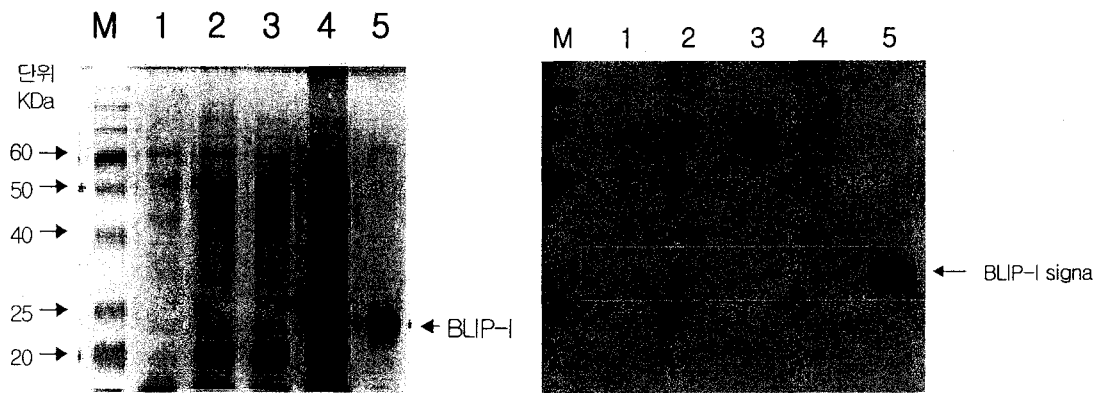


B) *bliA* disruptant
-Extracellular
protein 36h

Figure 27. Two Dimensional electrophoresis of extracellular protein of *S. exfoliatus* SMF19 wild type and *bliB* disruptant at late exponential phase (decreased spot (○) in wild type, decreased spot (□) in mutant strain)

A) SDS PAGE

B) Western blotting



M :Protein Marker

1 : *S. exfoliatus* SMF19 *bliB* disruptant 12h sample supernatant

2 : *S. exfoliatus* SMF19 *bliB* disruptant 18h sample supernatant

3 : *S. exfoliatus* SMF19 *bliB* disruptant 24h sample supernatant

4 : *S. exfoliatus* SMF19 *bliB* disruptant 60h sample supernatant

Figure 28. SDS PAGE and western analysis of BLIP-I

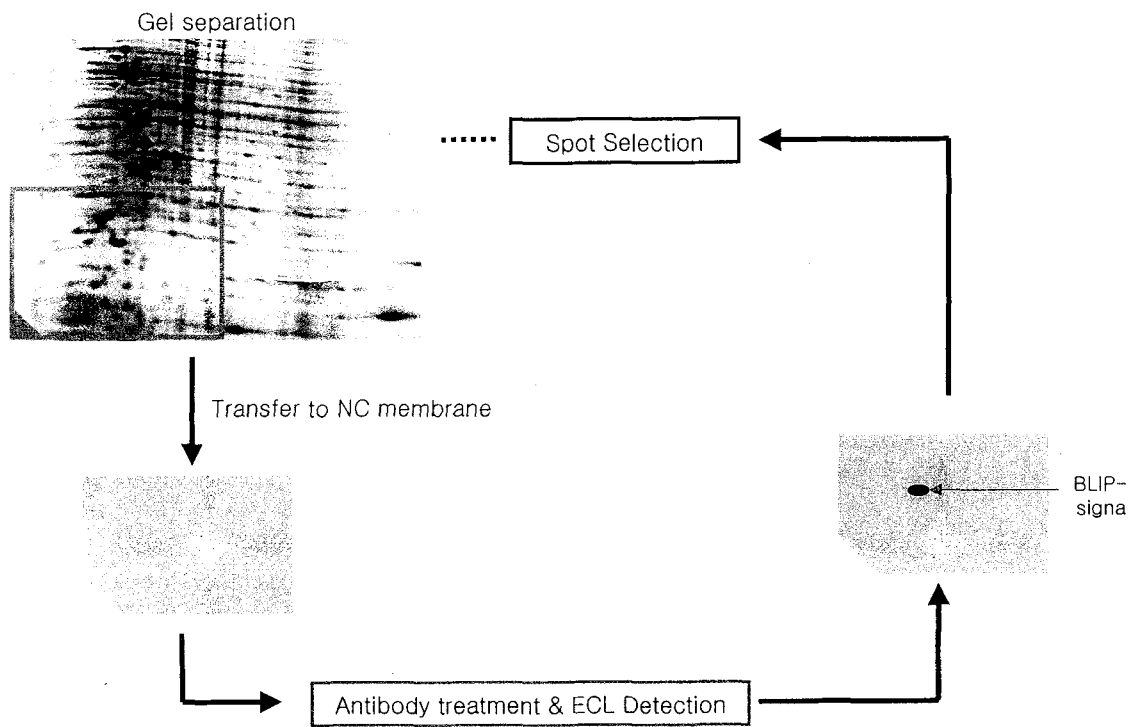


Figure 29. Scheme for BLIP-I detection on Two Dimensional Electrophoresis Gel

A) Western detection of BLIP-I on 2-DE gel of cytosol fraction



B) Western detection of BLIP-I on 2-DE gel of extracellular fraction

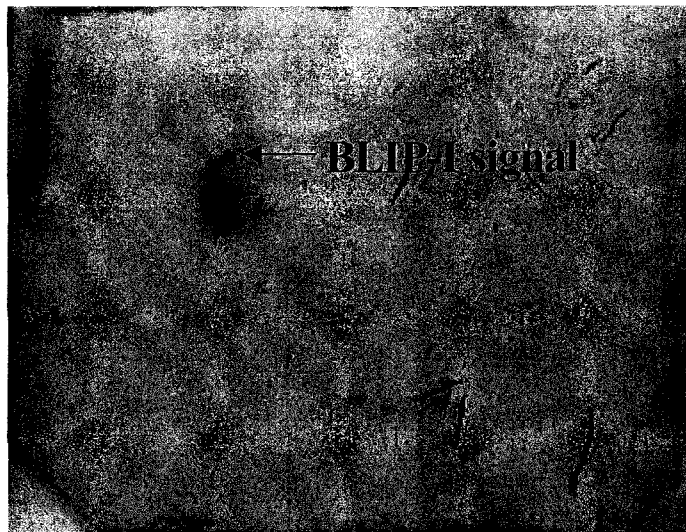
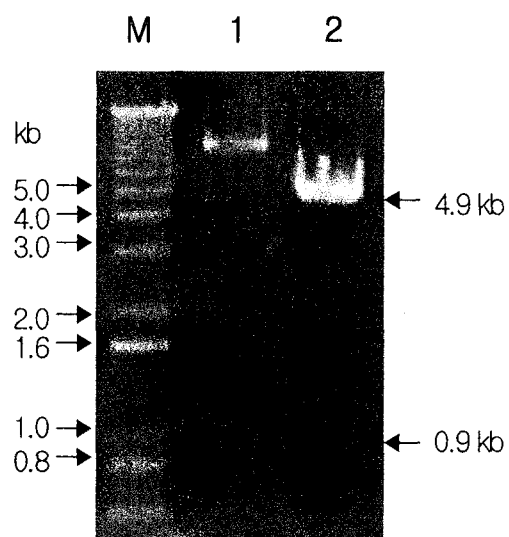


Figure 30. Western detection of BLIP-I on 2-DE gel

간동안 induction시킨 후 과량발현 여부를 SDS-PAGE 상에서 확인하였다 (Figure 34). 과량발현의 확인과 함께 GST-BLIP-II의 solubility도 함께 측정하기 위해 sample을 total cell protein, soluble fraction, insoluble fraction으로 나누어 준비하였다. 그 결과 GST-BLIP-II (57.3kDa)는 대부분 insoluble한 fraction에서 확인되었다.

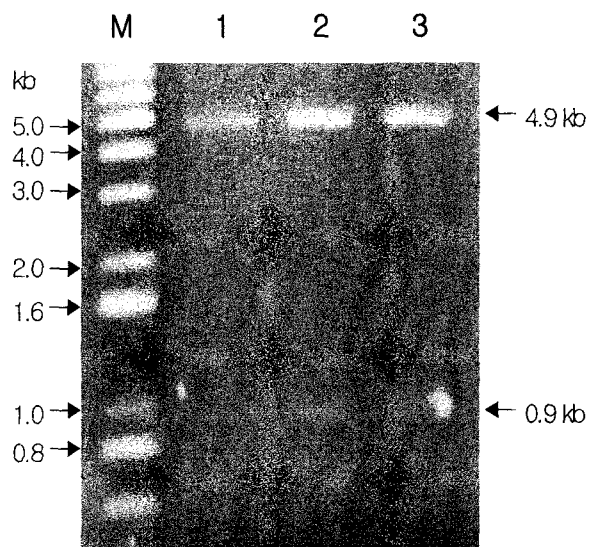
(2) Prey protein 준비

종균 배양을 위해서 *S. exfoliatus* SMF19의 포자를 TSB 배지에 접종하여, 30°C, 150 rpm에서 48시간 동안 배양하였다. *S. exfoliatus* SMF19의 fermentor 배양에는 5L 규모의 jar fermentor (KFC, Korea)를 사용하였다. 6시간 간격으로 sampling하여 DCW, pH, glucose, BLIP activity를 각각 측정하였다 (Figure 20). 현재 이 샘플을 가지고 시간대별로 분획화를 하여서 GST-tagged BLIP-II를 붙인 column에 흘려주어서 BLIP-II와 상호작용 하는 단백질만을 elution하려 하고 있다.



M	1kb DNA plus ladder
1	pGADT7- <i>bliB</i>
2	pGEX 4T-1

Figure 31. pGADT7-*bliB* and pGEX 4T-1 digested by *EcoRI* and *XhoI*



M	1kb DNA plus ladder
1-3	pGEX 4T-1/ <i>bliB</i>

Figure 32. Identification of pGEX4t-1/*bliB* cloning

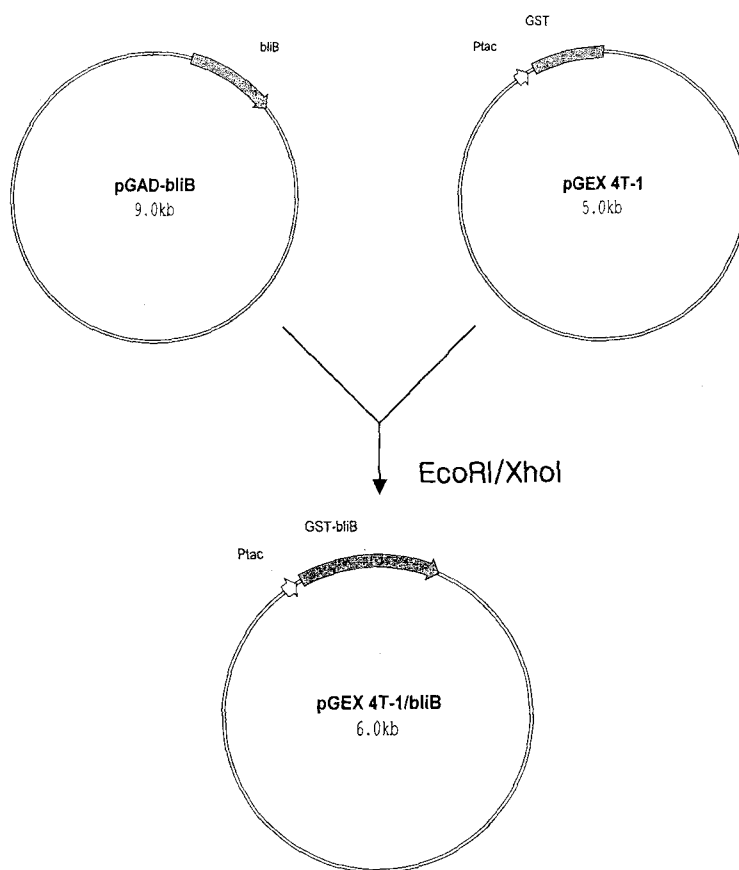
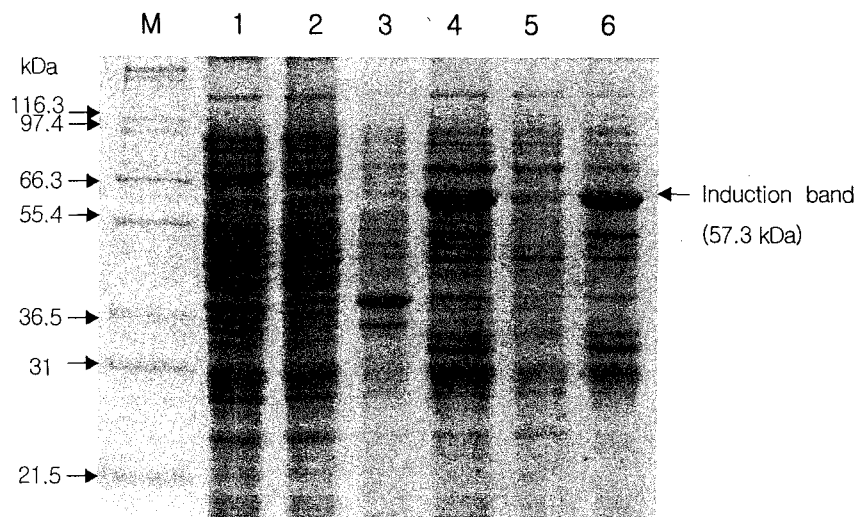


Figure 33. Construction of pGEX 4T-1/*bliB* for expression of GST-BLIP-II



uninduced sample	1	Total cell protein
	2	soluble fraction
	3	insoluble fraction
induced sample	4	Total cell protein
	5	soluble fraction
	6	insoluble fraction

Figure 34. Expression of GST-BLIP-II in *E. coli* BL21(DE3) strain

제 3 절 PCR방법을 이용한 *Streptomyces* spp.의 세포분화관련유전자의 disruption

1. 연구내용

S. exfoliatus SMF13이 생성하는 leupeptin을 분해하는 효소인 LIE 단백질, leupeptin inactivating enzyme (34.7kDa)의 생리학적 특성을 규명하고자 새로 고안된 PCR-targeting method를 이용한 gene disruption을 시도 하였다. PCR-targeting method는 기존의 gene disruption 방법과 달리 deletion 하고자 하는 유전자의 상·하위 부위의 39-nt의 homologous tail을 갖는 linear antibiotic cassette DNA를 이용하여 gene deletion과 replacement를 하는 방법이다.

2. 재료 및 방법

가. PCR targeting primer의 제작 및 PCR amplification

lie gene (Figure 36)의 start codon (ATG)을 포함하는 upstream nucleotides (39-nt)와 stop codon (TAG)를 포함하는 downstream nucleotides (39-nt)를 각각 priming site에 overhang되도록 하여 upstream primer (59-mer)와 downstream primer (58-mer)를 제작하였다 (Figure 36 and 37). 이들을 이용해 template DNA인 pIJ773 apramycin cassette DNA로부터 High Fidelity PCR Amplification Kit (Bio-Rad Co., Ltd.)를 이용하여 5'-extended apramycin cassette를 PCR amplification하였으며, 증폭프로그램은 초기 denaturation 과정이 94°C에서 2분, 증폭이 30번 반복 (DNA denaturation이 95°C에서 40초, primer 재결합이 47°C에서 40초, primer extension이 72°C에서 1분), 그리고 primer extension이 72°C에서 5분이었다. PCR product는 targeting의 높은 효율을 위해서 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Co., Ltd.)로 정제 및 농축하여 200 ng μl^{-1} 이상이 되도록 하였다.

나. PCR targeting into pSMF39 plasmid

PCR targeting하기 위해서 pSMF39 plasmid가 transformation된 *E. coli* BW25113 strain (containing pIJ790 recombination plasmid)을 OD₆₀₀이 약 0.5정도 까지 배양한 다음, 10 % glycerol로 4번 washing하여 최종 100 μl 에 cell을 농축하였다. 여기에 농축 및 정제된 5'-extended apramycin cassette (>200 ng μl^{-1})를 GenePulser II system (Bio-Rad Co., Ltd.)을 이용해 0.2 cm electroporation cuvette에서 Electroporation (2.5 kV, 200 Ω , 25 μF) 하였으며, time constant는 4.5에서 4.9였다.

다. Verification of the mutagenised pSMF39

pSMF39 plasmid에 apramycin cassette가 targeting되었는지 확인하기 위해서 transformants로부터 phenol extraction 방법으로 plasmid를 분리하여 apramycin cassette 내에 존재하는 apramycin gene을 digestion 할 수 있는 *SstI* (Roche Co., Ltd.) 으로 절단하여 751bp의 생성 여부를 mutagenised pSMF39 plasmid를 확인하였다.

라. Transfer of the mutagenised pSMF39 into *E. coli* ET12567 and *S. exfoliatus* SMF13

S. exfoliatus SMF13은 methyl sensing mechanism으로 self or non-self를 구분하기 때문에 우선 mutagenised pSMF39 plasmid를 *E. coli* ET12567 strain (non-methylation strain and containing conjugative pUZ8002 plasmid)에 GenePulser II system (Bio-Rad Co., Ltd.)에서 electroporation하였다. Mutagenised pSMF39 plasmid를 갖는 *E. coli* ET12567 strain을 *S. exfoliatus* SMF13의 spore suspension (약 1.0×10^8 개)과 conjugation 하여 mutagenised pSMF39 plasmid를 *S. exfoliatus* SMF13 세포 내로 transfer하였으며, 계대배양을 통해서 *lie* gene의 upstream와 down stream 유전자들 간의 homologous recombination을 유도하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 5'-extended apramycin antibiotic cassette의 PCR amplification

pIJ773 apramycin cassette DNA (1,384bp)로부터 증폭 및 농축된 5'-extended apramycin cassette는 78bp가 확장되게 되는데, 결과 (Figure 38)에서 볼 수 있듯이 1,462bp가 증폭된 것을 확인할 수 있었다.

나. *lie* gene이 deletion된 pSMF39 plasmid의 확인

증폭 및 농축된 5'-extended apramycin cassette (1,462bp)를 *E. coli* BW25113 (containing pSMF39)에 electroporation하여 전체 60개의 apramycin resistant colony들 중에서 positive transformants로 생각되는 4개의 large colony들로부터 plasmid를 분리하였으며, 이들을 제한효소 (*SstI*)으로 절단하였을 시에 751bp가 생성되는 것을 확인하여 apramycin resistant gene이 targeting 되어 *lie* gene이 pSMF39 plasmid에서 deletion되었다는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 39).

다. *lie* gene disruptant stain의 확인

S. exfoliatus SMF13의 spore suspension (약 1.0×10^8 개)으로부터 1차적으로 12개의 apramycin resistant exconjugants들을 얻을 수 있었으며, 계대배양을 통해서 최종 2개의 *lie* gene이 deletion되었을 것으로 생각되는 colony들을 얻었다.

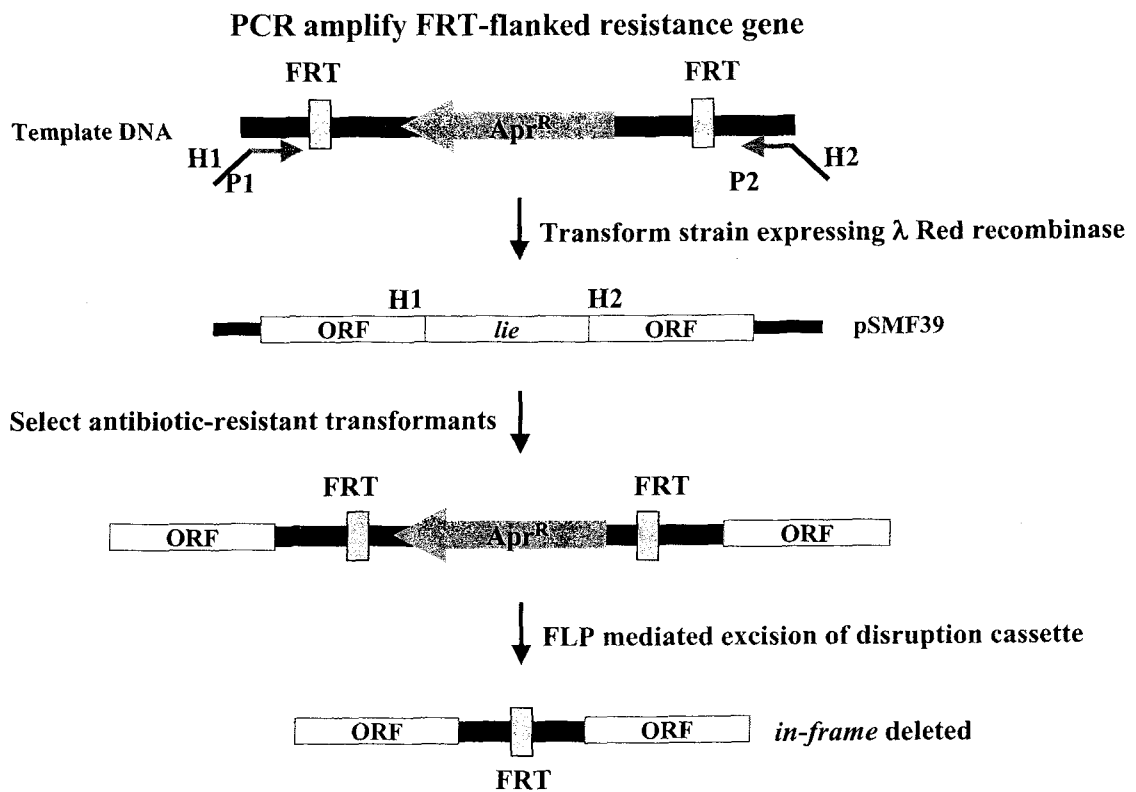


Figure 35. PCR targeting strategy used for *lie* gene disruption.

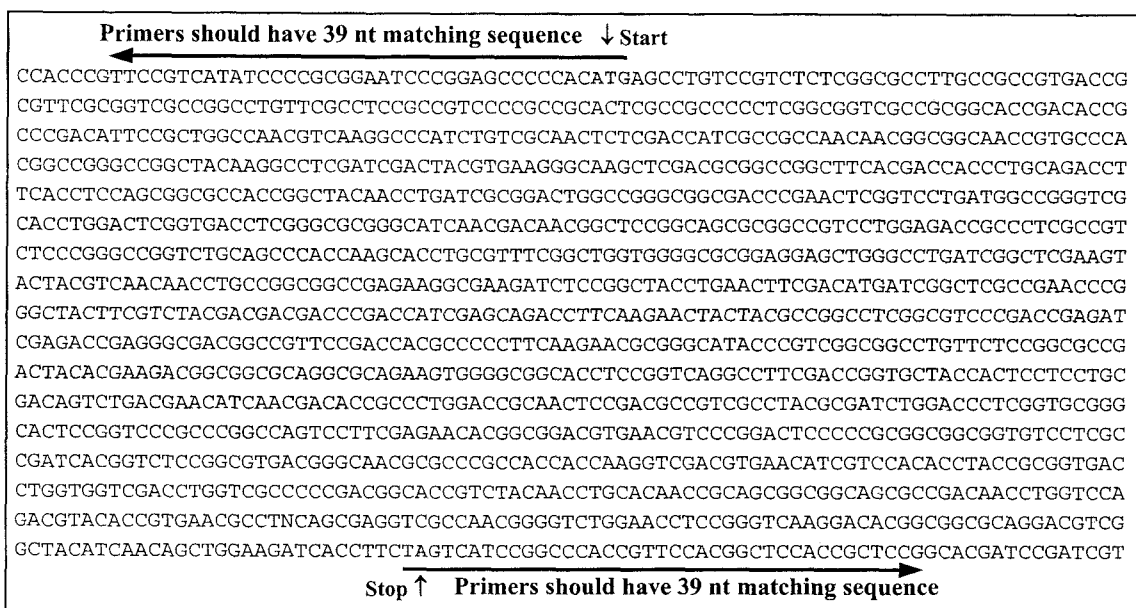


Figure 36. Nucleotide sequence of *lie* (leupeptin inactivating enzyme) gene in plasmid pSMF39.

SELIEF, forward primer (with priming site, 20-nt), 59 mer

5'-TTCCGTCATATCCCCGCGGAATCCCGGAGCCCCACATGATTCCGGGGATCCGTCGACC-3'
|← Matching sequence with the *S. exfoliatus* SMF13 →|← Priming sequences (20-nt) →|
39-nt (matching sequence with pSMF39 sequence)

SELIER, reverse primer (with priming site, 19-nt), 58 mer

5'-CGGAGCGGTGGAGCCGTGGAACGGTGGGCCGGATGACTATGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'
|← Matching sequence with the *S. exfoliatus* SMF13 →|← Priming sequences (19-nt) →|
39-nt (matching sequence with pSMF39 sequence)

Figure 37. Designing PCR primers for making *in-frame* deletion of *lie* (leupeptin inactivating enzyme) gene

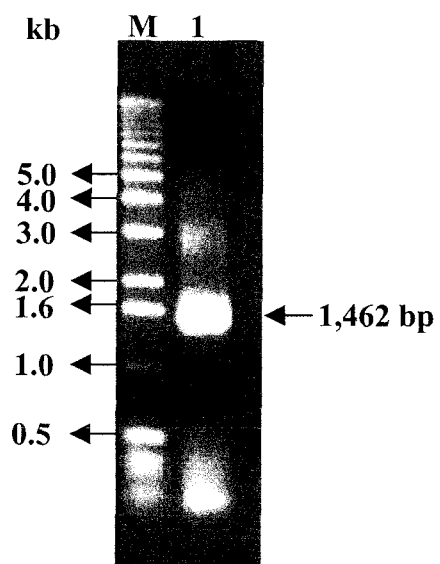


Figure 38. Agarose gel electrophoresis of the PCR product, 5'-extended apramycin cassette (*aac(3)IV*)

Lane M: 1kb DNA Ladder

1: amplified 5'-extended apramycin cassette

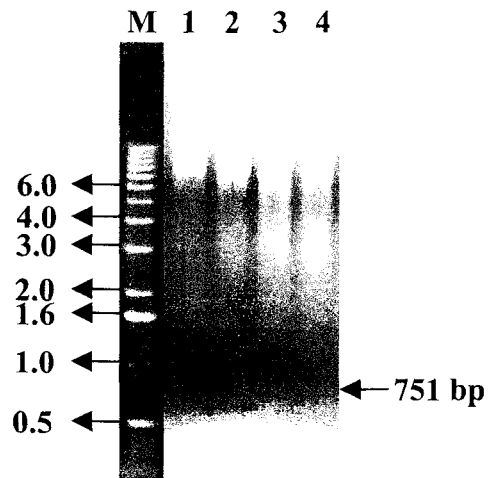


Figure 39. Verification of the mutagenised pSMF39 by digestion with *SstI* which isolated and purified from 4 positive transformants.

- Lane M: 1kb DNA Ladder
- 1: Transformant # 1 / *SstI*
 - 2: Transformant # 2 / *SstI*
 - 3: Transformant # 3 / *SstI*
 - 4: Transformant # 4 / *SstI*

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구 목표 달성도

연도	연구목표	평가착안점	연구개발목표의 달성도 및 달성 내용
1차년도	항생물질 생산 방선균의 생합성 최적환경 및 조절 인자 분석과 해당 유전자 분석	1. 생합성 최적 조건 확립 여부 2. 생합성 조절 인자 유전자 규명	100 % 1. 항생물질 생산 방선균의 생합성 조절 인자의 생합성 최적 조건 및 생합성 조절 유전자로서 <i>relA</i> 및 <i>spoT</i> 의 역할 규명 2. 항생제 내성 문제 해결의 실마리를 쥐고 있는 β -lactamase inhibitory proteins(BLIP-I, II)의 특성 규정 및 작용기작 부분 규명
2차년도	항생물질 생합성 조절인자 유전자의 조절 및 특성 규명	생합성 조절 인자 유전자의 조절 및 특성 규명	100 % 1. 항생 물질 생합성 조절 유전자로서 <i>relA</i> 및 <i>spoT</i> 의 작용 기작 규명과 RelA 단백질과 SpoT 단백질의 상호작용에 의한 항생물질 생합성 조절 기작 규명 2. β -lactamase inhibitory proteins(BLIP-I, II)의 세포내 작용기작 상세 규명을 위한 target protein 검색 3. 항생제 생산을 위한 세포 분화 조절 인자 생산의 최적화와 그 생합성 유전자의 탐색

제 2 절 기술발전에의 기여도

본 연구에서 미생물 대사산물 중 가장 유용한 방선균의 항생물질 생합성 최적화 환경 및 생합성 조절인자와 세포분화 조절 인자를 규명하고 해당물질의 합성, 생체 내 작용부위, 작용물질, 상호 작용 기작에 대한 연구를 수행하여 해당 분야 기초 연구에 기여한 바가 매우 크며, 이는 장차 산업적으로도 항생물질 생산의 생산 수율을 증진시키는 것이다. 또한 본 연구에서 항생 물질 생합성 조절 인자들과 균체 분화와의 관계성을 밝히는 과정에서 단백질의 상호작용을 연구하기 위하여 사용하였던 proteomics의 기술들 (Yeast Two-Hybrid System, 2D-electrophoresis, 그리고 GST pull down 등)을 축적하여 앞으로 해당 분야의 연구 가속화를 위한 발판을 마련하였다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가 연구의 필요성

본 연구를 통해 항생제 생합성 조절 인자의 작용 기작이 밝혀진 *S. clavuligerus*는 여러 종류의 β -lactam계열의 항생제를 생산할 뿐만 아니라, 저분자량 β -lactamase 저해 물질인 clavulanic acid와 고분자량 β -lactamase 저해 물질인 β -lactamase inhibitory protein을 생성하는 유용한 균주이다. 또한, *S. clavuligerus*에서 항생제 생합성 유전자들에 관한 연구가 많이 진행되어 있다. 하지만 그 전체적인 조절에 대한 연구를 수행하기에는 그 유전적 기초 연구가 많이 부족한 형편이다. 그래서 일정 부분 방선균 유전자 연구는 유전체를 완전히 해독한 *Streptomyces coelicolor* (영국의 John Innes Centre)를 기준으로 해당 유전자의 기능과 발현 기작을 연구하고 있다. 따라서 항생 물질 생합성의 극대화를 위해서는 항생물질 생합성 유전자뿐만 아니라 그 바탕이 되는 세포 생장의 조절 인자 및 세포 분화 조절 인자와 그 작용 기작을 밝히는 작업이 필요하다.

제 2 절 타 연구에의 응용

항생물질 생합성 조절 인자는 항생제 생합성 뿐만 아니라 균체의 성장과 분화와도 밀접한 관련을 가지고 있다. 항생물질 생합성 조절 인자인 (p)ppGpp는 세포 생리적 분화뿐만 아니라 형태적 분화와도 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 균체의 성장과 분화를 조절하는 것으로 밝혀진 leupeptin과의 관련성에 대한 연구 또한 필요하다.

또한 항생물질에 대한 내성이 증가함에 따라, 기존에 미생물이 생산하는 항생제로는 한계가 있다. 그래서 항생제 내성을 극복할 수 있는 β -lactamase 저해 물질의 개발이 필요한 상황이다. β -lactamase inhibitory proteins (BLIP-I과 II)과 β -lactamase와의 상호관계뿐만 아니라 BLIP와 상호작용하는 target protein과의 구조와 기능을 밝히는 연구가 필요하다.

기능이 밝혀져있지 않은 유전자의 경우 체계적인 유전자의 파괴를 통해서만이 유전자의 기능에 대한 중요한 정보를 얻을 수 있다. 그러나 방선균과 같이 형질전환의 어려움이 많은 세균의 경우 유전자를 파괴하는데 많은 시간과 비용이 소요된다. 최근 John Innes Centre에서 개발된 PCR-targeting method는 방선균 유전자의 파괴를 매우 효율적이고 빠르게 시행할 수 있다. 이런 PCR-targeting method를 응용하면 다양한 유전자의 파괴가 매우 효율적으로 진행되므로 유전자 기능 규명에 매우 유용하다.

제 3 절 기업화 추진 방안

β -lactam 항생물질 저해 효소의 불활성 물질의 연구를 통하여서는, 기존에 보고되어 있는 저분자량 β -lactamase 저해제 (clavulanic acid, tazobactam, etc)가 보여 주는 기존의 저해 방식을 벗어나 새로운 유형의 저해제를 BLIPs들의 구조와 기능 규명을 통하여 rational drug design에 이용될 수 있을 것으로 보인다. 또한, BLIPs의 특이적 활성자리와 저해 방식을 규명하여 peptide 제작등을 통해 새로운 저분자량 β -lactamase 저해제의 설계는, 장기적으로 미생물의 내성에 대하여 β -lactam 항생물질과 함께 사용되어 상승효과를 내 것으로 기대한다.

효과적인 유전자의 파괴 방법의 응용을 통하여서는, 원하는 유전자의 기능을 정확하게 추정할 수 있으므로, 다양한 유전자 기능 연구에 응용될 것으로 기대한다. 또한 대사 공학 (metabolic engineering)에 있어서 이차대사산물 생합성 경로에 관련되어 있는 유전자의 파괴에 이용함으로써 매우 효과적일 것으로 기대한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 β -lactam 항생물질 생합성 유발인자에 관한 연구

Stringent response는 세균에서 아미노산이나 탄소원이 고갈될 때 유전자의 발현을 조절하는 광범위한 적응 기작으로 *Escherichia coli*에서 *relA*와 *spoT* 두 개의 효소가 관여한다. *E. coli*에서 RelA는 질소원 고갈시 (p)ppGpp를 합성하고 SpoT는 에너지원이 고갈시 (p)ppGpp 분해를 억제하여 (p)ppGpp의 양을 늘린다. 증가된 (p)ppGpp의 양은 rRNA의 합성 감소와 아미노산 생합성 유전자의 활성화, stationary sigma factor인 σ^s 의 활성화 등과 같은 크나큰 전사적 변화를 일으킨다. 그람 음성 세균인 *E. coli*와는 다르게 그람 양성 세균에서는 하나의 RelA/SpoT homologues가 존재한다. 이 단백질은 (p)ppGpp 합성과 분해 활성을 동시에 가지며 아미노산과 탄소원이 고갈되었을 때 (p)ppGpp를 합성한다. 이렇듯 지금까지 연구된 바에 기초를 두어 (p)ppGpp 대사에 관련된 효소의 진화학적 관계가 다음과 같이 제시되었다. 첫 번째 그룹은 탄소원 결핍이 아닌 아미노산 결핍을 인지하여 (p)ppGpp를 합성하는 단백질로 (p)ppGpp를 분해하지는 못한다. 대표적으로 *E. coli*의 RelA가 있다. 두 번째는 그람 양성 세균인 *Bacillus/Clostridium*과 actinobacterial의 Rel 그룹으로 이 그룹은 (p)ppGpp를 아미노산과 탄소원이 고갈되었을 때 (p)ppGpp를 합성하고 또한 망간이온 (Mn^{2+})을 보조인자로 (p)ppGpp를 분해할 수 있다. 마지막은 *E. coli*의 SpoT로 대표되는 그룹으로 아미노산 고갈이 아닌 탄소원 고갈을 인지하여 (p)ppGpp를 합성하고 또한 망간이온 (Mn^{2+})을 보조인자로 (p)ppGpp를 분해한다. 그런데 특이적으로 그람 양성 세균인 *Streptomyces coelicolor*는 한 개체에 두개의 서로 다른 RelA/SpoT homologues가 존재한다. 그 중 하나인 RelA는 (p)ppGpp합성 능력을 지니고 있고 또한 (p)ppGpp 분해 활성이 있지만 다른 하나인 RshA는 (p)ppGpp합성 능력과 (p)ppGpp분해 능력이 밝혀지지 않았다. 그리고 *S. coelicolor*와 유사하게 *S. clavuligerus*도 두개의 RelA/SpoT homologues가 존재하고 각각 RelA와 SpoT라 명명되었다.

RelA/SpoT homologues의 기능에 대한 연구는 *E. coli*의 RelA에서 많이 진행되었다. *E. coli*의 RelA는 기능적으로 (p)ppGpp를 합성하는 N-말단 도메인 (아미노산 1부터 455)과 RelA의 활성을 조절하는 C-말단 도메인 (아미노산 455부터 744), 즉 2개의 서로 다른 도메인으로 구성되었음이 밝혀졌고 또한 RelA의 C-말단 도메인 (아미노산 455부터 744)이 상호작용을 통해 (p)ppGpp합성 활성을 조절함이 밝혀졌다. 그리고 아미노산 455부터 538, 아미노산 550부터 682가 RelA의 이합체 형성에 관여하고 아미노산 550부터 682는 리보솜 결합에 작용함이 조사되었다.

이런 RelA 단백질의 기능에 대한 이해로부터 항생제 생합성도 Stringent response의 일부임이 밝혀졌다. 이는 *S. coelicolor*에서 해독종결된 RelA 단백질을 대량생산하여 (p)ppGpp를 영양분이 풍부한 상태에서 축적시켰을 때 항생제 생합성 조절인자인 *actII-ORF4*의 전사량이 증가하였다. 이는 (p)ppGpp가 항생제 생합성을 활성화 함을 의미한다.

제2절 β -lactam 항생물질 불활성효소 억제인자 연구

토양에서 분리된 *Streptomyces exfoliatus* SFM19 (Kim *et al*, 1991; Kim *et al*, 1994)는 두 종류의 β -lactamase inhibitory protein, BLIP-I과 BLIP-II를 생산하며 이 BLIPs는 *S. clavuligerus* (Doran *et al*, 1990)에서 생산하는 BLIP보다, 더 낮은 K_i value를 보인다. BLIP-I의 homologue인 BLIP는 많은 연구가 캐나다 연구그룹 (University of Alberta, Jensen SE)에서 보고되었다. BLIP의 경우 disruption mutant의 제작 결과, 형태 분화에는 영향이 없고 clavam 계열의 항생물질 생산에만 변화를 보이는 것이 보고되었다 (Thai W *et al*, 2001) 또한 BLIP의 3차원 구조 분석 결과 (Strynadka NC *et al*, 1996)를 토대로 하여 49번째 aspartate를 site-directed mutagenesis를 한 결과 이 자리가 TEM-1 β -lactamase 활성 저해 (Petrosino *et al*, 1999)에 매우 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다. BLIP-II의 경우, 진핵생물에서 흔하지 않은 각각 3개의 β -sheet으로 이루어진 7개의 반복구조가 원형을 이루는 구조를 보여주었는데, 이것은 매우 기능이 다양한 WD-40 repeat와 구조적으로 유사하고 또한 인간의 RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation)과 21 %의 유사도를 보이는 특징을 나타내었다. RCC1은 분자생물학적으로 많은 연구가 보고되었으며, 이 단백질은 GTPase Ran의 상호작용 단백질로서 Ran과 결합하여 구조적인 변화를 야기하여 GTPase 활성화에 영향을 끼친다. RCC1을 호모에서 mutation을 한 결과 chromatin condensation, mating, transport등에 영향을 주며, 특히 진핵생물에서 원형질과 핵사이의 물질 전달에도 관여함이 보고되었다 (Louis *et al*, 1998).

BLIPs의 구조와 정확한 기능을 아는 것은 기존의 알려진 저분자량 β -lactamase inhibitor (clavulanic acid, tazobactam *etc*)와 다른 계열의 drug design에 대한 연구에 있어서 매우 중요하다. 현재, *S. clavuligerus*에서 생산되는 BLIP를 이용한 결합부위와 결합 방식에 대한 연구를 통해 β -lactamase 저해제 개발을 위한 peptide design (Rudgers *et al*, 1999; Rudgers *et al*, 2001)이 이루어지고 있으며, site-directed mutagenesis된 TEM-1 β -lactamase에 대한 BLIP의 저해 양상을 β -lactamase 저분자량 저해제와 비교함을 통해 새로운 계열의 β -lactamase 저해제의 설계 가능성을 제시하였다 (Schroeder *et al*, 2002).

제 3 절 PCR방법을 이용한 *Streptomyces* spp.의 세포분화관련 유전자의 disruption

전체 세균의 유전체의 서열의 이용이 가능해짐에 따라 기능이 잘 알려지지 않은 다양한 유전자와 ORF들의 분자 구조와 조직을 알 수 있게 되었다. 그러나 체계적인 유전자의 파괴를 통해서만이 유전자의 기능에 대한 중요한 정보를 얻을 수 있다. 비록 유전자 대체를 통해 염색체 상의 유전자를 파괴하는 방법이 많이 개발되었지만, 이 방법들은 모두 염색체로의 재조합하기 이전에 적당한 재조합 플라스미드를 생성하여야 한다. 이와는 대조적으로 *Saccharomyces cerevisiae*는 35-nt의 세균의 염색체와 상동성이 있는 프라이머를 사용하여 원하는 selectable marker를 지닌 선형 DNA를 PCR 한 후 모균주에 바로 형질전환 시켜 유전자를 파괴할 수 있다. 이 PCR을 매개한 유전자 파괴 방법은 yeast의 높은 재조합 효율을 이용한 효과적이고 특이적인 유전자 파괴 방법이다. 이런 유전체의 직접적 파괴는 *Candida albican*에서도 50- to 60-nt의 상동성 있는 프라이머를 이용하여 yeast와 비슷한 방법으로 시행되었다. 이와는 대조적으로 많은 세균은 내부의 *recBCD* exonuclease 때문에 선형 DNA는 쉽게 형질전환이 되지 않고 분해된다. 그러나 λ RED (*gam*, *bet*, *exo*)가 존재할 경우 선형 DNA의 재조합 비율을 매우 높인다. 이런 현상을 개발하여 Datsenko와 Wanner (2000)는 *Escherichia coli*에서 36-nt의 세균의 염색체와 상동성이 있는 프라이머를 사용하여 원하는 selectable marker를 지닌 선형 DNA를 PCR 하여 모균주에 형질전환 시킨 후 재조합하여 40개의 서로 다른 유전자 파괴를 하였다. 이런 PCR을 매개한 유전자 파괴방법을 응용하여 쉽게 *Streptomyces coelicolor* 코스미드안의 유전자가 있는 부분을 39-nt의 염색체와 상동성 있는 프라이머로 selectable maker가 존재하게끔 PCR한 산물로 대체할 수 있다. 또한 disruption cassette (39-nt의 염색체와 상동성 있는 프라이머로 selectable maker가 존재하게끔 PCR한 선형 DNA)에는 *oriT* (RK2)가 존재하여 PCR targeted cosmid DNA (disruption cassette에 의해 재조합된 코스미드)를 효과적으로 pUZ8002 플라스미드의 도움 아래 *E. coli*에서 방선균으로 conjugation할 수 있다. Conjugation은 protoplast에 의한 형질전환보다 훨씬 더 효율적이고 또한 많은 actinomycetes에 적용할 수 있다. 또한 방선균내의 methyl-specific restriction system은 ET12567과 같은 methylation-deficient *E. coli* host에 DNA를 경유함으로써 해결할 수 있다.

7장 참고문헌

Aoyagi, T. 1989. in Bioactive metabolites from microorganisms. *Progress in Industrial Microbiology*, Vol. 27. (Bushell, M. E. and Gräfe, U., ed) pp. 403-418, Elsevier Science Publishing Company Inc., New York

Aoyagi, T., S. Yoshida, N. Matususa, T. Ikeda, M. Hamada, and T. Takeuchi. 1991B. Leuhistin, a new inhibitor of aminopeptidase M, produced by *Bacillus laterosporus* BMI156-14F1. *J. Antibiot.* 44:573-578.

Avarbook, D., Salem, J., Li, L.S., Wang, Z.M., and Rubin, H. 1999. Cloning and characterization of a bifunctional *relA/spoT* homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *gene* 233:261-269.

Bergmann, M. and Ross, W. F. 1936. On proteolytic enzymes. X. The enzymes of papain and their activation. *J. Biol. Chem.* 114:717-26.

Bibb, M. 1996. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 142:1335-1344

Brown, A.G., D. Butterworth, G. Hanscomb, J.D. Hood, C. Reading, and G.N. Rolinson. 1976. Naturally occurring β -lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J. Antibiot.* 29:668-669

Bush, K. 1989. Classification of β -lactamases : Groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:271-276

Bushell, M.E. 1988. Growth, product formation and fermentation technology. In: Actinomycetes in biotechnology (Goodfellow M., S.T. Williams and M. Mordarski eds.). Academic Press London.

Butterworth, D., M. Cole, G. Hanscomb, and G.N. Rolinson. 1979. Olivanic acids, a family of β -lactam antibiotics with β -lactamase inhibitory properties produced by a *Streptomyces* species. 1. Detection, properties, and fermentation studies. *J. Antibiot.* 32:287-294

Cashel, M., and Gallant, J. 1969. Two compounds implicated in the function of

the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* 221:838-841.

Cashel, M., Gentry D.R., Hernandez V.J., and Vinella, D. 1996. The stringent response. In: *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. F.C. Neidhardt(Editor-in-Chief). ASM Press, Washington D.C. p.1458-1496.

Chakraborty, R., and Bibb, M. 1997. The ppGpp synthetase gene(*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3 plays a conditional role in antibiotic production and morphological differentiation. *J. Bacteriol.* 179:5854-5861.

Chakraborty, R., White, J., Takano, E., and Bibb, M. 1996. Cloning, characterization and disruption of a ppGpp synthetase gene (*relA*) of *Streptomyces coelicolor* A3, *Mol. Microbiol.* 19:357-368.

Chater KF. 1998. Fred Griffith Review Lecture. Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology.* 144:1465-1478.

Chater, K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:685-713.

Cho, Y.-H., Lee, E.-J., and Roe, J.-H. 2000. A developmentally regulated catalase required for proper differentiation and osmoprotection of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 35:150-160.

Cho, Y.H. and Roe, J.H. 1997. Isolation and expression of the *catA* gene encoding the major vegetative catalase in *Streptomyces coelicolor* Muller. *J. Bacteriol.* 179: 4049-4052.

Choudhury SB, Lee JW, Davidson G, Yim YI, Bose K, Sharma ML, Kang SO, Cabelli DE, Maroney MJ. 1996. Examination of the nickel site structure and reaction mechanism in *Streptomyces seoulensis* superoxide dismutase. *Biochemistry.* Mar 23;38(12):3744-3752.

Chung, H.J., Choi, J.H., Kim, E.J., Cho, Y.-H., and Roe, J.H. 1999. Negative regulation of the gene for Fe-containing superoxide dismutase by an Ni-responsive factor in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 181(23):7381-7384.

Chung, H.J., Kim, E.J., Suh, B., Choi, J.H., and Roe, J.H. 1999. Duplicate gene for

- Fe-containing superoxide dismutase in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene*. 231:87-93.
- Chung, Y. H., B. K. Lee., and K. J. Lee.** 1990. Characters of protease inhibitor isolated from *Streptomyces fradiae*. *Kor. Jour. Microbiol.* 28:65-70
- De Crecy-Lagard V, Servant-Moisson P, Viala J, Grandvalet C, Mazodier P.** 1999. Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Mol Microbiol.* 32: 505-517.
- Doran, J.L., B.K. Leskiw, S. Aippersbach, and S.E. Jensen.** 1990. Isolation and characterization of a β -lactamase-inhibitory protein from *Streptomyces clavuligerus* and cloning and analysis of the corresponding gene. *J. Bacteriol.* 172:4909-4918
- Dubnau D.** 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol Rev.* Sep;55(3):395-424.
- Dworkin M.** Recent advances in the social and developmental biology of the Myxobacteria. *Microbiol Rev.* Mar, 1996:70-102.
- Eymann, C., Mittenhuber, G., and Hecker, M.** 2001. The stringent response, σ H-dependent gene expression and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 264:913-923.
- Flett, F., Mersinias, V., and Smith, C. P.** 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting *Streptomyces*. *FEMS Microbiol.* 155(2):223-229.
- Forsman, M. and M. Granstrom.** 1992. Mutagenic analysis of the promoter of the *Streptomyces fradiae* β -lactamase-encoding gene. *Gene*. 121:87-94
- Gentry, D., Li, T., Rosenberg, M., and McDevitt, D.** 2000. The *rel* gene is essential for *in vitro* growth of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 182:4995-4997.
- Gentry, D.R., and Cashel, M.** 1995. Cellular localization of the *Escherichia coli* SpoT protein. *J. Bacteriol.* 177:3890-3893.
- Gentry, D.R., Hernandez, V.J., Nguyen, L.H., Jensen, D.B., and Cashel, M.**

1993. Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ_s is positively regulated by ppGpp. *J. Bacteriol.* 175:982-7989.

Gerhard, M. 2001. Comparative genomics and evolution of genes encoding bacterial (p)ppGpp synthetases/hydrolases (the Rel, RelA and SpoT proteins). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3(4):585-600.

Grassmann, W. and H. Dyckerhoff. 1928. Über die Proteinase and die Polypeptidase der Hwfw. Hoppe-Seyler's. *Z. Physiol. Chem.* 179:41-78.

Gropp, M., Strausz, Y., Gross, M., and Glaser, G. 2001. Regulation of *Escherichia coli* RelA requires oligomerization of the C-terminal domain. *J. Bacteriol.* 183:570-579.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.

Haseltine, W.A., and Block, R. 1973. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:1564-1568.

Hernandez, V.J., and Bremer, H. 1991. *Escherichia coli* ppGpp synthetase II activity requires *spoT*. *J. Biol. Chem.* 266:5991-5999.

Hobbs, G., C.M. Frazer, D.C. Gardner, F. Flett and S.G. Oliver. 1990. Pigmented antibiotic production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): kinetics and the influence of nutrients. *Journal of General Microbiology* 136:2291-2296.

Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, and T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. *The John Innes Foundation*, Norwich, United Kingdom.

Hori M, Hemmi H, Suzukake K, Hayashi H, Uehara Y, Takeuchi T, Umezawa H. 1978. Biosynthesis of leupeptin. *The Journal of Antibiotics.* 31(1): 95-98.

- Hoyt, S., and Jones, G.H. 1999. RelA is required for actinomycin production in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* 181:3824-3829.
- Huang W, Zhang Z, Palzkill T. 2000. Design of potent beta-lactamase inhibitors by phage display of beta-lactamase inhibitory protein. *J Biol Chem.* 19;275(20): 14964-14968.
- James, P., Halladay, J., Craig, E. A. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.* 144:1425-1436.
- Jin W. 2002. Roles of *relA* and *spoT* genes on the regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces clavuligerus*. A Thesis for the Ph.D. Degree. Department of Microbiology, Graduate School, Seoul National University.
- Kang, J.-G., Paget, M.S.B., Seok, Y.-J., hahn, M.-Y., Bae, J.-B., Hahn, J.-S. Kleanthous, C., Buttner, M.J., and Roe, J.-H. 1999. RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J.* 18:4292-4298.
- Kang, J.G., Hanh,M.Y., Ishihama,A., and Roe,J.H. 1997. Identification of sigma factors for growth phase-related promoter selectivity of RNA polymerases from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nucleic Acids Res.* 25:2566-2573.
- Kang, S. G. and K. J. Lee. 1997. Kinetic analysis of morphological differentiation and protease production in *Streptomyces albidoflavus* SMF301. *Microbiology.* 143:2709-2714
- Kang, S. G., D. H. Lee, A. C. Ward and K. J. Lee. 1998. Rapid and quantitative analysis of clavulanic acid production by the combination of pyrolysis mass spectrometry and artificial neural network. *J. Microbiol. Biotech.* 8:523-530.
- Kang, S. G., I. S. Kim, T. Y. Rho, and K. J. Lee. 1995. Production dynamics of extracellular proteases accompanying morphological differentiation of *Streptomyces albidoflavus* SMF301. *Microbiol.* 141:3095-3103
- Kang, S. G., R. G. W. Kenyon, A. C. Ward, and K. J. Lee. 1998. Analysis of the differentiation state in *Streptomyces albidoflavus* SMF301 by the combination of pyrolysis mass spectrometry and neural network. *J. Biotech.* 62:1-10.
- Kang, S. G., W. Jin, M. Bibb and K. J. Lee. 1998. Actinorhodin and

undecylprodigiosin production in wild-type and *relA*⁻ mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Letters* 168:221-226.

Kang, S.G., H.U. Park, H.S. Lee, H.T. Kim, and K.J. Lee. 2000. New β -lactamase inhibitory protein (BLIP-I) from *Streptomyces exfoliatus* SMF19 and its role on the morphological differentiation. *J.Biol.Chem.* 275:16851-16856

Katz, E., C.J. Thompson, and D.A. Hopwood. 1983. Cloning and expression of the tyrosinase gene from *Streptomyces antibioticus* in *Streptomyces lividans*. *J. Gen. Microbiol.* 129:2703-2714

Kawada M, Umezawa K. 1995. Suppression of in vitro invasion of human fibrosarcoma cells by a leupeptin analogue inhibiting the urokinase-plasmin system. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 209(1):25-30.

Kim IS, Lee KJ. 1995. Kinetic study on the production and degradation of leupeptin in *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *Journal of Biotechnology.* 42(1): 35-44.

Kim IS, Lee KJ. 1996. Trypsin-like protease of *Streptomyces exfoliatus* SMF13, a potential agent in mycelial differentiation. *Microbiology.* 142(7):1797-806.

Kim J. S., Jang J. H., Lee J. W., Kang S. O., Kim K. S., and Lee J. K., 2000. Identification of cis site involved in nickel-responsive transcriptional repression of *sodF* gene coding for Fe- and Zn-containing superoxide dismutase of *Streptomyces griseus*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1493:200-207.

Kim, H. T. 1997. Cloning and expression of a gene encoding protease inhibitor of *Streptomyces fradiae* SMF9.

Kim, I. S. and K. J. Lee. 1995. Physiological roles of leupeptin and extracellular proteases in mycelium development of *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *Microbiol.* 141: 1017-1025

Kim, I. S. and K. J. Lee. 1995. Regulation of production of leupeptin, leupeptin-inactivating enzyme, and trypsin-like protease in *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *Jour. Ferm. Bioengin.* 80:434-439

- Kim, I. S. and K. J. Lee.** 1996. Trypsin like protease of *Streptomyces exfoliatus* SMF13, a potential agent in mycelial differentiation. *Microbiol.* 142:1797-1806
- Kim, I. S. et al.** 1993. The structure of protease inhibitors produced by *Streptomyces exfoliatus* SMF13. *Kor. Jour. Microbiol.* 31:326-334
- Kim, I. S. et al.** 1995. Physiological importance of trypsin-like protease during morphological differentiation of *Streptomyces*. *Jour. Microbiol.* 33:315-321.
- Kim, I. S., Kim, Y. B. and Lee, K. J.** 1998. Characterization of leucine inactivating enzyme from *Streptomyces exfoliatus* SMF13 which produces leupeptin. *Biochem. J.* 331:539-545.
- Kim, J. H. and I. C. Hancock.** 2000. Pellet forming and fragmentation in liquid culture of *Streptomyces griseus*. *Biotechnology Letters* 22:189-192.
- Kim, M .K., H. I. Kang and K. J. Lee.** 1991. Purification and characterization of proteinaceous β -lactamase inhibitor from the culture of *Streptomyces sp.* SMF19. *J. Microbiol. Biotech.* 1:85-89
- Kim, M.K., and K.J. Lee.** 1994. Characteristic of β -lactamase inhibitor proteins from *Streptomyces exfoliatus* SMF19. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1029-1032
- Kim, M.K., H.I. Kang, and K.J. Lee.** 1991. Purification and characterization of proteinaceous β -lactamase inhibitor from the culture broth of *Streptomyces sp.* SMF19. *J. Microbiol. Biotechnol.* 1:85-89
- Kim,E.J., Chung,H.J., Suh,B., Hah,Y.C., and Roe,J.H.** 1998. Expression of sodF gene encoding iron- and zinc-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Muller. *J. Bacteriol.* April, 2014-2020. 180(8):2014-2020.
- Kim,E.J., Chung,H.J., Suh,B., Hah,Y.C., and Roe,J.H.** 1998. Transcriptional and Post-transcriptional regulation of sodN gene encoding nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces coelicolor* Muller. *Mol. Microbiol.* 27:187-195.
- Kleerebezem M, et al.** Quorum sensing by peptide pheromones and two-component signal-transduction systems in Gram-positive bacteria. *Mol Microbiol.* 1997 Jun;24(5):895-904.

- Kojima, S., Y. Nishiyama, I. Kumagai, and K. Miura.** 1991. Inhibition of subtilisin BPN' by reaction site P1 mutants of *Streptomyces subtilisin* inhibitor. *J. Biochem.* 109: 377-382
- Kushner, D.J., and C. Breuil.** 1977. Penicillinase (β -lactamase) formation by blue-green algae. *Arch. Microbiol.* 112:219-223
- Kushner, S. R.** 1978. An improved method for transformation of *E. coli* with ColEI derived plasmid. in Genetic Engineering (ed. Boyer, H.W. and Nicosia, S.) Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. 2:17-24
- Lee, B. K., Y. H. Chung and K. J. Lee.** 1990. The fermentation kinetics of protease inhibitor production by *Streptomyces fradiae*. *Kor. Jour. Microbiol.* 28:264-267
- Lee, K. J.** 1998. Dynamics of morphological and physiological differentiation in actinomycetes group and quantitative analysis of the differentiation. *J. Microbiol. Biotech.* 8:1-7.
- Lee, K. J., S. G. Kang and I. S. Kim.** 1998. Trypsin (*Streptomyces exfoliatus* and *S. albidoflavus*). pp 21-22. Handbook of proteolytic enzymes. (eds by) A. J. Barrett, N. D. Rawlings and J. F. Woessner. Academic Press.
- Lim D, Park HU, De Castro L, Kang SG, Lee HS, Jensen S, Lee KJ.** 2001. Crystal structure and kinetic analysis of beta-lactamase inhibitor protein-II in complex with TEM-1 beta-lactamase. *Nat Struct Biol.* 8(10):848-852
- Louis Renault,, Ju" rgen Kuhlmann, Andreas Henkel, and Alfred Wittinghofer.** 2001. Exchange on Ran by the Regulator of Chromosome Condensation (RCC1). *Cell*, Vol. 105, 245-255
- MacNeil, D. J.** 1989. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* 170:5607-5612.
- Martinez-Costa, O.H., Arias, P., Romero, N.M., Parro, V., Mellado, R.P., and Malpartida, F.** 1996. A *relA/spoT* homologous gene from *Streptomyces coelicolor* A3(2) controls antibiotic biosynthesis genes. *J. Biol. Cheml.* 271:10627-10634.
- Martinez-Costa, O.H., Fernandez-Moreno, M.A., and Malpartida, F.** 1998. The *relA/spoT* homologous gene in *Streptomyces coelicolor* encodes both

ribosome-dependent (p)ppGpp-synthesizing and -degrading activities. *J. Bacteriol.* 180:4123-4132.

Matthew, M., and A.M. Harris. 1976. Identification of β -lactamases by analytical isoelectric focusing : Correlation with bacterial taxonomy. *J. Gen. Microbiol.* 94:55-67

Matthew, M., and R.B. Sykes. 1977. Properties of the β -lactamase specified by the *pseudomonas* plasmid RPL11. *J. Bacteriol.* 132:341-345

Mechold, U., and Malke, H. 1997. Characterization of the stringent and relaxed responses of *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol.* 179:2658-2667.

Mechold, U., Cashel, M., Steiner, K., Gentry, D., and Malke, H. 1996. Functional analysis of a *relA/spoT* gene homolog from *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol.* 178:1401-1411.

Metha, R.J., C.H. Nash. 1978. β -lactamase activity in Yeast. *J. Antibiot.* 31:239-240

Metzger, S., Sarubbi, E., Glase, G., and Cashel, M. 1989. Protein sequences encoded by the *relA* and the *spoT* genes of *Escherichia coli* are interrelated. *J. Biol. Chem.* 264:9122-9125.

Migueluez, E.M., C. Martin, C. Hardisson and M.B. Manzanal. 1993. Synchronous germination of *Streptomyces antibioticus* spores: Tool for the analysis of hyphal growth in liquid cultures. *FEMS Microbiology Letters* 109:123-130.

Murao, S. and Sato, S. 1970. New pepsin inhibitor (S-PI) from streptomyces EF-44-201. *Agricul. Biol. Chem.* 34:1265-1267.

Murao, S., Shin, T., Katsu, Y., Nakatani, S., and Hirayama, K. 1985. Novel thiol proteinase inhibitor, thiostatin, produced by a strain of *Bacillus cereus*. *Agricul. Biol. Chem.* 49:895-897.

Murray, K.D., and Bremer, H. 1996. Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 259:41-57.

Nagarajan, R., Boeck, L. D., Gorman, M., Hamill, R. L., Higgins, C. E., Hoehn, M. M., Stark, W. M., and Whitney, J. G. 1971. Beta-lactam antibiotics from *Streptomyces*. *J. Am. Chem. Soc.* 93(9):2308-2310.

Nakayama, M., A. Iwasaki, S. Kimura, T. Mizoguchi, S. Tanabe, A. Murakami, I. Watanabe, M. Okuchi, H. Itoh, Y. Saino, F. Kobayashi, and T. Mori. 1980. Carpetimycin A and B, new β -lactam antibiotics. *J. Antibiot.* 33:1388-1390

Nodwell JR, McGovern K, Losick R. 1996. An oligopeptide permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol.* 22: 881-893.

Nodwell JR, Yang M, Kuo D, Losick R. 1999. Extracellular complementation and the identification of additional genes involved in aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. *Genetics.* 1999 Feb;151(2):569-584.

Oda, K., Y. Fukuda, S. Murao, K. Uchida, and M. Kainosho. 1989. A novel proteinase inhibitor, tyrostatin inhibiting some pepstatin-insensitive carboxyl proteinase. *Agric. Biol. Chem.* 53:405-415.

Ogawara, H. 1975. Production and property of β -lactamases in *Streptomyces*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 8:402-408

Ogawara, H., A. Manteku, and S. Shimada. 1981. β -lactamase from *Streptomyces cacaoi*; purification and properties. *J. Biol. Chem.* 256:2649-2655

Ogawara, H., and S. Horikawa. 1979. Purification of β -lactamase from *Streptomyces cellulosa* by affinity chromatography on Blue Sepharose. *J. Antibiot.* 32:1328-1335

Ogawara, H., and S. Nozaki. 1977. Effect of acriflavine on the production of β -lactamase in *Streptomyces*. *J. Antibiot.* 30:337-338

Ogawara, H., S. Horikawa, S. Shimada-Miyoshi, and K. Yasuzawa. 1978. Production and property of beta-lactamase in *Streptomyces*: Comparison of the strain isolated newly and thirty years ago. *Antimicrob. Agents Chemother.*

13:865-870

Okamura, K., S. Hirata, V. Okumura, Y. Fukagawa, Y. Shimauchi, K. Kouno, T. Ishikura, and J. Lein. 1978. ps-5, a new β -lactam antibiotic from *Streptomyces*. *J. Antibiot.* 31:480-482

Paget, M. S. B., Kang, J.G., Roe, J.H., and Buttner, M. J. 1998. R, an RNA polymerase sigma factor that activates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor*. *EMBO J.* Oct 1;17(19):5776-5782.

Peczynska-Czoch, W., and Mordarski, M. 1988. in *Actinomycetes in Biotechnology* (Goodfellow, M., Williams, S. T., and Mordarski, M., ed.) pp. 220-283, Academic Press, London

Philips, M. A. and R. J. Fletterick. 1992. Proteases. *Current Opinion in Structural Biology.* 2:713-720.

Primm, T.P., Andersen, S.J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., and Barry, C. E. III. 2000. The stringent response of *Mycobacterium tuberculosis* is required for long-term survival. *J. Bacteriol.* 182:4889-4898.

Readings C., and M. Cole. 1977. Clavulanic acid : a β -lactamase inhibiting β -lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 11:852-857

Richmond, M.H., and R.B. Sykes. 1973. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. In: Rose, A.H., and D.W. Tempest (ed) *Advances in microbial physiology*, vol 9. Academic Press, London New York, pp31-88

Rudgers GW, Huang W, Palzkill T. 2001. Binding properties of a peptide derived from beta-lactamase inhibitory protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(12): 3279-3286.

Rudgers GW, Palzkill T. 1999. Identification of residues in beta-lactamase critical for binding beta-lactamase inhibitory protein. *J Biol Chem.* 12;274(11):6963-6971.

- Ryding NJ, Bibb MJ, Molle V, Findlay KC, Chater KF, Buttner MJ. 1999. New sporulation loci in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* Sep;181(17):5419-5425.
- Saino T, Someno T, Ishii S, Aoyagi T, Umezawa H. 1988. Protease-inhibitory activities of leupeptin analogues. *The Journal of Antibiotics.* 41(2):220-225.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarath, G., R. S., Motte, De La, and Wagner, F. W. 1989 in Proteolytic Enzymes: A Practical Approach (Beynon, R. J., and Bond, J. S., ed.) pp.25-55, IRL Press
- Sawai, T., I. Takahashi, and S. Yamagashi. 1978. Iodometric assay method for β -lactamase with various β -lactam antibiotics as substrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13:910-913
- Schreiber, G., S. Metzger, E. Aizenman, S. Roza, M. Cashel, and G. Glaser. 1991. Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266:3760-3767.
- Schroeder WA, Locke TR, Jensen SE. 2002. Resistance to beta-lactamase inhibitor protein does not parallel resistance to clavulanic acid in TEM beta-lactamase mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(11):3568-3573.
- Seyfzadeh, M., Keener, J., and Nomura, M. 1993. *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11004-11008.
- So, N. -w., J. -h. Kim , I. C. Hancock, and J. -y. Rho, A lead absorbing protein with superoxide dismutase activity from *Streptomyces subbrutilus*. Manuscript in preparation.
- Stent, G.S., and Brenner, S. 1961. A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47:2005-2014.
- Strauch, E., Takano, E., Baylis, H.A., and Bibb, M.J. 1991. The stringent

response in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 5:289-298

Strohl, W. R. 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20(5):961-974

Suda, H., T. Aoyagi, M. Hamada, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1979. Antipain, a new protease inhibitor isolated from actinomycetes. *J. Antibiot.* 25: 263-266.

Suda, H., T. Aoyagi, T. Takeuchi, and H. Umezawa. 1973. A thermolysin inhibitor produced by actinomycetes. Phosphoramidon. *J. Antibiot.* 26:621-623.

Sun, J., Hesketh, A., and M. Bibb. 2001. Functional analysis of *relA* and *rshA*, two *relA/spoT* homologues of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bacteriol.* 183:3488-3498.

Suzukake K, Fujiyama T, Hayashi H, Hori M, Umezawa H. 1979. Biosynthesis of leupeptin. II Purification and properties of leupeptin acid synthetase. *The Journal of Antibiotics.* 32(5):523-530.

Suzukake K, Hayashi H, Hori M, Umezawa H. 1980. Biosynthesis of leupeptin. III. Isolation and properties of an enzyme synthesizing acetyl-L-leucine. *The Journal of Antibiotics.* 33(8):857-862.

Suzukake K, Hori M, Tamemasa O, Umezawa H. 1981. Purification and properties of an enzyme reducing leupeptin acid to leupeptin. *Biochimica et Biophysica Acta.* 661(2):175-181.

Suzukake K, Takada M, Hori M, Umezawa H. 1980. Biosynthesis of leupeptin. IV. Is protein turnover in leupeptin producer cells affected by leupeptin? *The Journal of Antibiotics.* 33(10):1172-1176.

Sykes, R.B., and M. Matthew. 1976. The β -lactamases of gram-negative bacteria on their role in resistance to β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 2:115-157

- Sykes, R.B., and M.H. Richmond.** 1970. Intergeneric transfer of a β -lactamase gene between *Ps. aeruginosa* and *E. coli*. *Nature*. 226:952-954
- Taguchi, S.** 1992. *Streptomyces subtilisin* inhibitor : General characterization and its applicataion. *Actinomycetol.* 6:9-20
- Takano, E., and Bibb, M. J.** 1994. The stringent response, ppGpp and antibiotic production in *streptomyces coelicolor* A3(2). *Actinomycetologica.* 8:1-10
- Takano, E., White, J., Thompson, C. J. and Bibb, M. J.** 1995. Construction of thiostrepton-inducible, high-copy-number expression vectors for use in *streptomyces* spp. *Gene.* 166:133-137
- Tamuro, A., K. Kanaori, S. Kojima, I. Kumagai, K. Miura, and K. Akasaka.** 1991. Mechanisms of temporary inhibition in *Streptomyces subtilisin* inhibitor induced by an amino acid substitution, tryptophan 86 replaced by histidine. *Biochemistry.* 30:5275-5286
- Umezawa H, Okami Y, Hotta K.** 1978. Transfer of the leupeptin-producing ability of the strain, *Streptomyces roseus* MA839-A1, by conjugation. *The Journal of Antibiotics.* 31(1):99-102.
- Vigal, T., J. A. Gil, A. Daza, M. D. Garacia-Gonzalez, P. Villadas, and J. F. Martin.** 1991. Effects of replacement of promoters and modification of the leader peptide region of the *amy* gene of *Streptomyces griseus* on synthesis and secretion of a -amylase by *Streptomyces lividans*. *Mol. Gen. Genet.* 231:88-96
- Wallace, R.J., P. Vance, A. Weissfeld, and R. Martin.** 1978. β -lactamase production and resistance to β -lactam antibiotics in *Nocardia*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 14:704-709
- Wehmeier, L., Schfer, A., Burkovski, A., Krmer, R., Mechold, U., Malke, H., Phler, A., and Kalinowski, J.** 1998. The role of the *Corynebacterium glutamicum* *rel* gene in (p)ppGpp metabolism. *Microbiology.* 144:1853-1862.
- Wehmeier, U. F.** 1995. New multifunctional *Escherichia coli*-*Streptomyces* shuttle vectors allowing blue-white screening on XGal plates. *Gene.* 165:149-150

- Wendrich, T.M., and Marahiel, M.A. 1997. Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 26:65-79.
- Wendrich, T.M., Bechering, C.L., and Marahiel, M.A. 2000. Characterization of the *relA/spoT* gene from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 190:195-201.
- Wilson, Vanessa T. W., E. Cundliffe 1998. Characterization and targeted disruption of a glycosyltransferase gene in the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene.* 214: 95-100
- Wosten HA, Willey JM. 2000. Surface-active proteins enable microbial aerial hyphae to grow into the air. *Microbiology.* Apr;146 (Pt 4):767-773.
- Xu, J., Tozawa, Y., Lai, C., Hayashi, H., Ochi, K. 2002. A rifampicin resistance mutation in the *rpoB* gene confers ppGpp-independent antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol genet genomics.* 268(2):179-189.
- Yaginuma, S., Asahi, A., Morishita, A., Hayashi, M., Tsujino, M., and Tokoda, M. 1989. Isolation and characterization of new thiol protease inhibitors estanins A and B. *J. Antibiot.* 42:1362-1369.
- Yang, X., Ishiguro, EE. 2001. Dimerization of the RelA protein of *Escherichia coli*. *Biochem Cell Biol.* 79:729-736.
- Yoon HS and Golden JW. 1998 Heterocyst pattern formation controlled by a diffusible peptide. *Science.* Oct 30;282(5390):935-938.
- Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO. 1996. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *Biochem J.* Sep 15;318 (Pt 3):889-896.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	과학기술국제화사업		
	세부사업명	국제공동연구사업		
과제명	방선균에서 균체 분화와 이차 대사 산물 생합성 조절 인자에 관한 연구			
연구기관	서울대학교	연구책임자	이 계 준	
총연구기간	2000년. 12월. 1일. ~ 2002년. 11월. 30일. (24 개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	38,000,000		38,000,000	
기술분야	생명공학기술 / 미생물활용산업기술			
참여기업				
공동연구기관	John Innes Centre (U.K.)			
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용(교육연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

- 첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2002년 12월 9일

연구책임자 : 이 계 준 (인)
연구기관장 : 서울대학교 (직인)

과학기술부장관 귀하

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

방선균에서 균체분화와 항생물질의 생합성을 조절하는 인자를 규명하고 해당 인자를 생합성하는 유전자의 구조와 그 발현 양상을 동시에 연구하여 항생물질 생합성과 균체 분화와의 관계성을 규명하는 기초연구를 수행하여 장차 산업적으로 항생물질 생산의 생산 수율을 증진하는 원리를 개발하여 실제 활용코자 하였다.

*S. clavuligerus*에서 (p)ppGpp 생합성 유전자를 해독하고 동 유전자를 절제한 변이주 $\Delta relA$ 및 $\Delta spoT$ 를 취득하여 비교한 결과, 항생물질 생합성과 세포분화가 완전히 소실된 것으로 확인되었다. 따라서 (p)ppGpp는 항생물질 및 세포분화에서 중요한 조절 인자로 판단되었다. 현재 (p)ppGpp가 항생물질 생합성과정에서 직접 관련된 목적 물질을 규명하는 연구를 진행하고 있다. 또한 β -lactam 항생물질분해효소를 저해하는 BLIPs를 생성하는 유전자를 규명하고 동 물질을 생성하는 유전자를 절제한 변이주 (null mutants) 제조하고 BLIPs가 세포내에서 상호작용하는 물질을 규명하고자 yeast two-hybrid system 및 proteomics 방법으로 해당 단백질을 규명하는 연구를 진행하고 있다. 한편 세포분화에 깊게 관련된 것으로 확인된 저분자 protease 저해물질을 분해하는 효소가 세포분화에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. 이를 위해 John Innes Centre에서 개발한 PCR-Targeting 방법을 이용하여 유전자를 효율적으로 파괴하여 변이주의 특성을 분석중이다.

본 연구실에서는 항생물질 및 세포 분화에 관련된 물질을 분리 동정 및 그 특성을 규명하고 해당 유전자를 분석하는 일에 우선 집중하였다. 한편 영국의 John Innes Biotechnology Center에서 유전자를 완벽하게 해독한 *Streptomyces coelicolor*를 기본으로 하여 해당 유전자의 기능과 발현 기작을 규명하고자 하였다. 현재까지 얻은 연구 결과에 몇 가지를 더 보완하면 세계적으로 우수한 학술지에 게재될 가능성이 매우 높다고 판단된다. 이미 수 차례 국내외 학술발표대회에서 발표 한바 있고 많은 관심을 가지고 본 연구 결과를 주시하고 있는 바 본 연구의 결과는 기초는 물론 응용 면에서도 크게 활용될 것으로 판단된다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

영국의 John Innes centre에서 개발한 PCR-Targeting disruption method를 국내에서 처음으로 도입하여 유전자파괴를 효율적으로 수행하였다. 기존의 방법에 비해 시간과 비용 및 효율면에서 많은 이점이 있는 노하우를 국내 처음으로 얻었다.

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적 (필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재 여부
		년 월 일				
계: 건수						

*현재 3편의 논문의 초안의 작성중이나 연구가 진행되어 data를 보충 후 국제 학술지에 투고할 예정이다.

○ 학술회의 발표 실적 (필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
Genetics Industrial Microorganisms 2002	The functional study of two RelA/SpoT homologues from <i>S. clavuligerus</i>	2002년 7월 3일		한국 미생물학회, 한국 미생물 생명공학회, 한국 산업미생물 학회	대한민국
	Physiological role of β -lactamase inhibitory proteins in <i>Streptomyces exfoliatus</i> SMF19				
	The role of extracellular protease in differentiation of <i>Streptomyces exfoliatus</i> SMF13				
오송 추계 생물과학 연합학회	Cell-free synthesis of new leupeptin analogues as inhibitors of serine and cysteine proteases in <i>Streptomyces exfoliatus</i> SMF13	2002년 10월 22일		한국 미생물학회, 한국 미생물 생명공학회	대한민국
	Research for biological function of BLIP-I, II by using protein-protein interaction analysis technique				
	The role of extracellular protease in differentiation of <i>Streptomyces exfoliatus</i> SMF13				
계: 2건수	6건수				

3. 연구성과

가. 항생물질 생합성 유발인자에 관한 연구

*S. clavuligerus*에서 (p)ppGpp 생합성 관련 효소인 RelA 와 SpoT가 방선균의 형태분화에 미치는 영향을 조사하고자 *S. clavuligerus* ATCC27064 (wild type), *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$) 및 *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)를 GYM medium에서 배양하였다. 그 결과 *S. clavuligerus* ATCC27064 (wild type)는 정상적인 분화양상을 보여주었으나 *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$)는 심하게 손상된 분화 패턴을 보여주었다. 그에 비해 *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)는 wild type에 비해 약간 늦지만 정상적인 분화양상을 보여주었다. 방선균의 분화는 세포내의 (p)ppGpp의 양과 GTP의 양에 밀접한 관련이 있으므로 질소원 고갈상태일 때 (p)ppGpp의 합성여부와 GTP의 양을 측정된 결과 분화양상을 뒷받침하듯 wild type에서는 (p)ppGpp를 정상적으로 합성하고 또한 GTP의 양이 낮았다. 그러나 *S. clavuligerus* SMF387 ($\Delta relA$)는 (p)ppGpp를 합성하지 못하였고 또한 GTP의 양이 높았다. *S. clavuligerus* SMF3815 ($\Delta spoT$)는 wild type과 비슷하였다. 분화양상과 (p)ppGpp 측정결과를 토대로 볼 때 RelA 단백질이 (p)ppGpp합성에 주요한 기능이 있어 방선균의 분화를 조절함을 알 수 있지만 SpoT 단백질이 (p)ppGpp에 대사에 미치는 영향은 아직 모호하다. SpoT 단백질이 (p)ppGpp 대사에 관련된 기능을 밝히기 위해 RelA 단백질과의 상호작용을 Yeast Two-Hybrid system으로 조사하였다. 조사 결과 SpoT가 RelA와 가장 강하게 상호작용 하였고 SpoT와 SpoT가 두 번째로 강하고 RelA와 RelA는 약하게 상호작용하였다. 이에 따라 SpoT는 RelA와의 상호작용을 통해 (p)ppGpp대사를 조절할 것으로 추정된다.

나. β -lactam 항생물질 불활성 억제 인자에 관한 연구

Streptomyces exfoliatus SMF19가 생성하는 β -lactamase inhibitory protein들의 생체내에서의 역할을 규명하기 위해서 각각의 유전자를 knockout 시킨 null mutant를 제조하여 형태학적인 차이를 보았으며, Yeast Two-Hybrid 와 Two Dimensional Electrophoresis, 그리고 GST Pull Down 방법을 통하여 상호작용하는 단백질을 분석함으로써 BLIPs의 생체내 역할을 규명하고자 하였다. 먼저, Yeast Two Hybrid system을 이용하여 *in vivo*에서 상호작용 하는 단백질을 검색하여 각각의 후보단백질들의 유전자를 검색하였다. 또한, BLIPs의 기능을 좀 더 정확히 밝히기 위해 간접적인 상호작용 또는 pathway에 관련된 미지의 단백질을 Two Dimensional Electrophoresis를 이용하여 검색하였다. 현재, 발현양의 변화를 보이는 단백질을 분리하여 peptide sequencing 중이다. 마지막으로, GST Pull Down 방법에서는 GST tagged BLIP-II를 생성할 수 있는 발현 벡터를 제작하였으며, 과량발현을 시도하여 GST tagged BLIP-II를 분리 중에 있으며 BLIP-I 역시 발현벡터를 제작 중에 있다. 따라서, 이러한 단백질 상호작용 분석기술을 통해 얻은 결과를 종합하여, BLIPs와 직접적으로 상호작용 하거나 생체내의 생리학적 변화에 관련된 단백질을 밝혀냄으로써 BLIP-I과 BLIP-II의 역할을 명확하게 규명하고자 하

였다.

다. PCR방법을 이용한 *Streptomyces* spp.의 세포분화관련 유전자의 disruption

방선균 *Streptomyces exfoliatus* SMF13의 세포분화에 깊은 관련이 있는 것으로 확인된 단백질분해효소 저해물질 (leupeptin)을 분해하는 LIE (leupeptin inactivating enzyme)의 생체에서의 기능과 생리적 특징을 알기 위해 John Innes centre에서 개발된 PCR-Targeting method를 사용하여 LIE를 암호화하는 *lie* 유전자를 disruption하였고 확인 중에 있다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획 (6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

다양하게 C-말단이 제거된 RelA 혹은 (p)ppGpp 합성 도메인이 제거된 RelA, (p)ppGpp 합성 도메인과 (p)ppGpp 분해 도메인이 제거된 RelA를 방선균에서 발현하여 RelA의 기능을 밝히고 세포에 미치는 영향을 관찰한다. 또한 이런 해독 종결된 RelA를 이용하여 영양충분조건하에 (p)ppGpp의 세포 내 농도를 높인 후 이에 따른 항생제 생합성 유발인자의 전사량의 변화를 S1 mapping을 이용하여 밝히고 항생제의 농도를 측정한다. 이를 통해 (p)ppGpp와 항생제 생합성 사이의 관련 기작이 증명될 것이다. 단백질 상호작용 분석기술을 이용한 BLIPs의 기능 규명을 위한 연구에서는 2-DE를 이용하여 분리한 단백질들을 질량분석기 (ESI Q-ToF)를 사용하여 peptide 아미노산 염기서열을 분석 할 계획이다. 마지막으로 PCR-targeting method를 통해 *lie*유전자를 파괴한 균주를 southern blotting으로 확인한 뒤 *lie*유전자 파괴 균주의 형태분화와 같은 생리학적 특성과 발효를 통해 분화와 관련된 효소의 kinetics를 분석할 것이다.

나. 활용방법

(p)ppGpp에 의해 조절되는 항생제 생합성 유발인자를 (p)ppGpp 탐색 및 검출기법을 이용하여 상호간의 관계를 확립하는데 활용할 것이다. 또한 이번 연구에서 확립된 단백질 상호작용분석기술과 처음으로 도입된 PCR-Targeting disruption 방법은 다양한 기능연구에 적용할 수 있을 것이다.

다. 차년도이후 활용계획 (6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

우리는 차년에 이러한 연구결과를 토대로 내년내에 방선균내에서 항생물질 생합성에 관련된 일반적인 기작을 규명하기 위해 항생물질 유발인자의 조절하에 있는 유전자를 다양한 분자생물학적 기술을 사용하여 규명할 것이다. 또한 β -lactamase inhibitory protein 역시 단백질 상호작용 분석 기술을 이용하여 기존의 연구를 계속 진행할 것이며 이로써, 두 단백질의 특성을 규명할 것이다. 마지막으로 영국의 John Innes centre에서 도입한 PCR targeting 방법을 다양한 유전자의 특성을 규명하기 위하여 사용할 계획이

다. 2002년 3월에 한 명의 학생을 파견하여 연구를 진행하였으며, 2003년 1월경에 John Innes Centre에 두 명의 학생을 파견하여, 5개월이상 course work을 통하여 proteomics, metabolic engineering, (p)ppGpp의 조절하에 있는 조절인자의 규명과 기작을 밝힐 것이다. 초청장은 별첨으로 첨부하였다. (별

5. 기대효과

본 연구는 미생물 대사산물 중 가장 유용한 항생물질 생합성 조절 인자를 규명하고 해당물질의 생체 내 작용부위 및 작용물질에 대한 기초 연구를 수행하여 장차 산업적으로 항생물질 생산의 생산 수율을 증진시키는 것이다. 또한, 항생물질 생산 방선균의 항생물질 생합성 최적환경 및 조절인자 분석을 규명하고 동 인자에 의하여 조절받는 유전자를 규명시키는데 있다. 그리고 항생물질 생합성 조절인자와 유전자 산물의 상호 조절작용 기작을 규명하는데 기여하였을 뿐 아니라, 항생물질 생합성 및 균체 분화를 조절하는 인자 규명을 통해 그 특성을 조사하여, 해당 인자를 생합성하는 유전자의 cloning을 통한 구조 연구 및 균주 개선을 통한 이차대사 산물 생산 수율을 높이는 데 기여할 수 있었다. 항생물질 생합성 및 균체분화를 조절하는 인자를 규명하고 그 특성을 조사하는 연구에서는 우선 해당인자를 생합성하는 유전자를 cloning 하여 그 구조를 연구하여 분화와 의 관계성을 밝혔으며, 방선균에서 생성되는 β -lactamase inhibitory 단백질의 상호작용 단백질과 단백질 분해 효소 및 저해제의 분해효소의 생리학·형태학적 역할과 그 중요성을 연구하기 위하여 proteomics의 기술들인 Yeast Two-Hybrid System, 2DE 그리고 GST pull down 등의 기술들을 체계적이고 종합적으로 사용하여 단백질의 생체내 다양한 기능을 명확하게 규명할 수 있도록 하였다.

6. 문제점 및 건의사항

현재까지는 기초연구 단계에 필요한 연구방법의 선택과 실제 연구에 적용하였다. 지금까지 얻은 방법과 data를 기초로 하여 좀더 심도있는 연구를 진행하면 빠른 시일내에 국제적으로 인정되는 좋은 논문을 완성할 것으로 확신하고 있다.

1월중에 약 6개월 예정으로 John Innes Centre의 연구실에 합류하며 현재까지 얻은 결과를 이용하여 proteomics 및 metabolic engineering techniques을 적용하면 해당 단백질의 발현 양상과 아울러 대사산물 생합성의 flux 조절에 관한 좋은 결과를 얻게 될 것이다.

모처럼 양국간에 상호보완적 연구를 수행하였는 바 본 연구의 발전적 확대 연구가 계속되는 방안을 강구하였으면 합니다.

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

1. (p)ppGpp 검출기술과 정량기술의 도입
2. 단백질 상호작용 검색 기술의 종합적 사용에 의한 단백질 기능 규명
: Yeast Two-Hybrid, Two Dimensional Electrophoresis, GST Pull Down
3. 단백질분해 효소 저해제의 생합성 유전자의 분리 및 클로닝

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	M1-0027000006-01H020013710			
과제명	방선균에서 균체분화와 이차대사산물 생합성 조절인자에 관한 연구			
사업명	과학기술국제화사업			
세부사업명	국제공동연구사업			
연구기관	서울대학교 생명과학부	기관유형	학교	
참여기관(기업)				
총연구기간	24 개월 (2000. 12. 1. ~ 2002. 11. 30.)			
총연구비	정부(38,000)천원 민간()천원 합계(38,000)천원			
연구책임자 1	성명	이 계 준	주민번호	
	근무기관 부서	서울대학교 생명과학부	E-mail	lkj12345@snu.ac.kr
	직위/직급	교수	전화번호	02-880-6705
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명		소속/부서	
	직위/직급		E-mail	
	전화번호		FAX	
	주소	(-)		

[기술의 개요와 특징]

1. (p)ppGpp 검출 기술

ppGpp는 stringent response를 매개하는 signal molecules로 이는 shift down method를 이용하여 검출하였다. 1 % casamino acid가 들어 있는 배양액에서 casamino acid를 제거한 배양액으로 옮김으로써 (p)ppGpp의 synthetase를 활성화하였으며 이런 방법을 통하여 최대 150 pmole mg⁻¹(cell weight)의 ppGpp를 검출하였다.

2. 단백질 상호작용 검색 기술

Proteomics의 기술로 가장 많이 쓰이는 기술은 단백질간의 상호작용과 관련성을 통해 각 단백질들의 기능과 역할을 찾아내는 것이다. 여기서는 가장 일반적으로 쓰이는 *in vivo* system인 Yeast Two-Hybrid System과 *in vitro* system인 GST pull down을 사용하였으며, Yeast Two-Hybrid system의 경우는 cDNA library를 제작하여 전체 genome의 상호작용 단백질 유전자를 검색하여 단기간내에 생체내에서 정확하게 찾을 수 있는 기술을 사용하였다. Two Dimensional Electrophoresis는 세포내·외 약 3,000개 이상의 단백질을 각각의 고유한 특성에 따라서 높은 분리능으로 단백질의 발현량의 변화를 통해 단백질간의 상호관계성을 규명할 수 있는 proteomics의 핵심기술이며 더욱이 IEF에 있어서 그 편차를 줄이는 IPG Phor system 개발과 mass 분석법의 발달로 인하여 그 효용성이 극대화된 최첨단 기술이다.

3. PCR Targeting을 이용한 disruption method

최근 공동연구기관인 John Innes에서 개발된 PCR-Targeting 방법은 방선균과 같이 형질전환이 어려운 미생물에 있어서 기존의 방법보다 훨씬 효율적으로 해당 유전자를 disruption할 수 있는 기술이다. 먼저 *E. coli*에서 사용된 이 방법은 *Streptomyces coelicolor*처럼 전체 genome cosmid를 가지고 있는 방선균에서 먼저 개발되었으며, 우리는 이 방법을 개량 적용하여 *Streptomyces exfoliatus* SMF19에서 사용하였다. 앞으로, 효율적이고 높은 수율로 인하여 해당 유전자를 파괴시켜 기능을 알아보는 방법과 대사공학 (metabolic engineering)으로의 응용이 다양한 균주에 걸쳐 가능한 기술이다.

[용도 · 이용분야]

- (1) 항생물질 생합성 조절 기작 규명
- (2) 상호작용 단백질 검색에 의한 단백질의 생체 내 기능 규명
- (3) 효율적인 유전자의 파괴에 의한 생리학적 특성 규명 및 대사공학에의 응용

■ 기술의 분류

[기술코드] 413/411 (3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 정보산업 기계설비 소재 정밀화학·공정 생명과학
 원자력 자원 에너지 항공·우주 해양
 교통 보건·의료 환경 기초·원천 기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 신제품개발 신공정개발 기존제품개선 기존공정개선
 기 타 (기초 및 응용과학 연구에의 적용)

[기술의 용도] (복수 선택(√로 표시)가능합니다)

- 기계설비 부품소자 원료재료 소프트웨어
 가공처리기술 자동화기술 불량률 감소 등 현장애로기술
 제품설계기술 공정설계기술 기 타 (생물공학기술)

■ 산업재산권 보유현황 (기술과 관련한)

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호

* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재

* '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

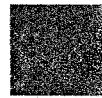
기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input checked="" type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호	M1-0027000006-01H020013710			
과제명	방선균에서 균체 분화와 이차 대사 산물 생합성 조절 인자에 관한 연구			
사업명	과학기술국제화사업			
세부사업명	국제공동연구사업			
연구기관	서울대학교 생명과학부	기관유형	학교	
참여기관(기업)				
총연구기간	24개월			
총연구비	합계 : (38)백만원 - 정부 : (38)백만원 민간 : ()백만원			
연구책임자	소속	서울대학교 생명과학부	성명	이 계 준
	전화번호	02-880-6705	E-mail	lkj12345@snu.ac.kr
연구개발 주요내용				
<p>항생물질 생합성 유발인을 검출하였으며 그 유발인자의 생합성 유전자를 cloning하여 그 역할과 작용을 규명하였다. 세포 내 분화와 연관이 있는 β-lactamase inhibitory protein-I, II 를 다양한 단백질 상호작용기술을 도입, 적용하여 현재 분석 중에 있으며, 또한 세포분화조절 인자와 관련이 있는 protease 저해제를 분해하는 효소 (LIE)의 역할을 규명하기 위해 PCR-Targeting 방법을 사용하여 disruption을 하였으며, 국내에서 처음으로 기술을 도입하였으며 이를 실험에 적용하였다.</p>				

[별지]

John Innes Biotech Institute (U.K.)에서
보낸 초청장



JOHN INNES CENTRE

MOLECULAR MICROBIOLOGY

Direct Dial Tel: (01603) 450297

Fax: (01603) 450778

E-Mail: keith.chater@bbsrc.ac.uk

07 November 2002

Mr Daewi Kim
Laboratory of Biotechnology and
Fermentation Microbiology
School of Biological Sciences
Seoul National University
Seoul 151-742
Korea

Dear Mr Kim

This letter is a formal confirmation of my invitation to you to join my laboratory for a period of 3-6 months from January 2003. Your visit will be funded by the collaborative grant awarded to Prof Lee and myself under the British Council/KISTEP joint scheme.

I look forward to the possibility of significant and mutually beneficial progress in the important areas of *Streptomyces* proteomics and metabolic engineering.

With best wishes

Yours sincerely

Prof K F Chater, FRS
Head, Department of Molecular Microbiology



JOHN INNES CENTRE

MOLECULAR MICROBIOLOGY

Direct Dial Tel: (01603) 450297

Fax: (01603) 450778

E-Mail: keith.chater@bbsrc.ac.uk

07 November 2002

Mr Yong Ku Ryu
Laboratory of Biotechnology and
Fermentation Microbiology
School of Biological Sciences
Seoul National University
Seoul 151-742
Korea

Dear Mr Ryu

This letter is a formal confirmation of my invitation to you to join my laboratory for a period of 3-6 months from January 2003. Your visit will be funded by the collaborative grant awarded to Prof Lee and myself under the British Council/KISTEP joint scheme.

I look forward to the possibility of significant and mutually beneficial progress in the important areas of *Streptomyces* proteomics and metabolic engineering.

With best wishes

Yours sincerely

Prof K F Chater, FRS
Head, Department of Molecular Microbiology



JOHN INNES CENTRE

Department of Molecular Microbiology
Direct Dial Tel: +44 (0) 1603 450297
Fax: +44 (0) 1603 450778
e-mail: keith.chater@hbsrc.ac.uk

26 February 2002

TO WHOM IT MAY CONCERN

I am inviting Prof. Kye Joon Lee and Mr. Jae Young Kim to the John Innes Centre for about one month, starting early in March 2002. We have maintained a close collaboration for the last few years concerning our many complementary and common interests in *Streptomyces*, and during this visit they will join my laboratory to carry out the first stages in a joint project "Connecting the intracellular and extra cellular mediators of development in antibiotic-producing *Streptomyces* species".

Yours faithfully,



Professor Keith Chater FRS
Head, Department of Molecular Microbiology

Director, Professor Chris Lamb