

과제번호 : MG02-0302-005-1-0-0

미생물 유전체 활용기술 개발 사업
Microbial Genomics and Application Center Program

하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로
Arbekacin 생산 균주 개발
Strain development for Arbekacin using Hybrid Antibiotics
producing technology

명 지 대 학 교

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 " 하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin
생산 균주 개발 " 과제의 보고서로 제출합니다.

2005. 4 . 15

주관연구기관명 : 명지대학교

주관연구책임자 : 서 주 원

연 구 원 : 김경록 외 6명

보고서 초록

과제관리번호	MG02-0302-005-1-0-0	해당단계 연구기간	2002.10. ~ 2005. 3.	단계 구분	최종
연구사업명	중 사업명	미생물 유전체 활용기술 개발 사업			
	세부사업명	미생물 활용 기술			
연구과제명	중 과 제 명	의약용 소재 생산을 위한 미생물 대사 재설계 기술개발			
	세부(단위)과제명	하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin 생산 균주 개발			
연구책임자	서 주 원	해당단계 참여연구원수	총 : 6 명 내부 : 5 명 외부 : 1 명	해당단계 연구비	정부 : 298,750 천원 기업 : 142,270 천원 계 : 441,020 천원
연구기관명 및 소속부서명	명지대학교 생명과학과		참여기업명	(주)비엔씨바이오팜	
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위 탁 연 구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	38
<p>항생제 내성 병원균의 창궐에 대응하기 위하여 신규 항생물질 개발이 절실히 요구되나 고전적인 항생제 개발기술로는 이 급박한 수요를 충족시키기 힘든 실정으로 신속하고 목표지향적인 개발이 필요하다. 이에 대한 적절한 대안으로 기존의 천연 항생물질 구조를 변형하여 신규활성을 부가하는 하이브리드 항생물질 개발 기술이 부각되어지고 있다. 최근의 미생물 유전체 분석 기술의 발달에 근거하여 미생물 유래의 유용 항생물질 생합성유전자의 확보 및 기능 추론 기법이 괄목할만한 진보를 이루었다. 이에 따라 유전체 정보를 활용하여 항생물질의 구조 변환을 유도함으로써 활성이 개선된 우수 항생물질을 생산하도록 하는 연구가 활발히 진행되어지고 있다.</p> <p>본 연구에서는 최근 문제가 되고 있는 Vancomycin 내성균주 (VRSA)에 대한 치료제로 부각되고 있는 차세대 항생물질 Arbekcin을 유전체 정보를 이용한 대사경로 재설계를 통하여 생물학적으로 생산하는 기법을 확립하고자 하였다.</p> <p>이를 위하여 Butirosin 생산균주로 부터 AHBA 전이 관련 유전자군을 확보하고 <i>Streptomyces kanamyceticus</i> 산업균주를 확보하였으며 동 균주에 대한 형질전환 체계를 확립하였다. 또한, Dibekacin 창출을 위한 유전자원으로 Sagamicin 생합성 유전자군을 확보하였다. 유용 이차 대사산물의 생합성 조절 유전자로서 SAM synthase (SAM-s)를 확보하여 SAM-s 발현에 통하여 항생물질의 생산을 증대시킬 수 있는 새로운 기법을 확립하였다. 이상의 기반 구축 후에 AHBA 전이 유전자와 SAM-s를 활용함으로써 Arbekacin의 <i>in vitro</i> 생산 기술을 확립하였다.</p> <p>본 연구 수행을 통해 축적된 관련기술은 현재 심각한 사회문제로 대두되고 있는 항생물질 내성 병원균에 의한 감염성 질병치료에 보다 효과적으로 접근할 수 있는 platform technology로서 활용될 수 있을 것이며, 이러한 유용성을 인정받아 참여기업에 기술 이전을 완수 하였다.</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	가나마이신, 사가마이신, 아베카신, 디베카신, 하이브리드 항생물질, 에스아데노실메티오닌,			
	영 어	Arbekacin, Dibekacin, Kanamycin, Sagamicin, Hybrid antibiotics, S-Adenosyl methionine (SAM)			

요 약 문

I. 제 목

하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin 생산 균주 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

항생제 내성균의 등장으로 신규 항생물질의 개발이 절실히 요구되어지고 있으나 고전적인 항생제 개발기술로는 그 수요를 충족시키기 힘든 실정으로 신속하고 목표지향적인 개발이 필요하다. 이에 대한 적절한 대안으로 기존의 천연 항생물질 구조를 변형하여 신규 활성을 부가하는 하이브리드 항생물질 개발 기술이 부각되어지고 있다. 최근 미생물유전체 분석기술의 발달로 미생물에서 유용 항생물질 생합성유전자의 확보와 그 기능 추론이 용이해져, 확보된 유용 유전자원을 활용하여 활성이 개선된 우수 항생 물질을 개발하는 하이브리드 항생물질 생산 기술이 항생제 내성균에 대처할 수 있는 대안으로서 제시되어지고 있다.

미국의 시장조사전문회사인 BCC (Business Community Communication)에 의하면 세계 제약시장은 2002년에 이미 연간 5,400억불 (한화 650조원)을 돌파하였고 향후 2008년에는 9,000억불 (한화 1,000조원)에 달할 것으로 예상된다. 이중 아미노글라이코사이드계 항생물질은 관련시장의 20%정도를 차지하고 있고 연간 국내 매출액은 2,000억원에 달하며 세계적으로는 7조원에 달한다. 이렇듯 의약소재 산업이 고부가가치 지식기반 미래 유망 사업이지만 고전적인 탐색방법에 의한 1개의 신약개발에는 10-15년이라는 시간과 1-5억 달러의 금액이 소요되며 제품으로 승인되어 출시되기까지 연구단계에서 성공 확률은 1/5,000, 임상단계에서는 1/10 정도로 그 위험부담이 매우 크다.

이와 달리 본 연구의 기본 개념인 하이브리드 항생물질은 기존 구조로 부터 생합성 경로와 물질 구조에 근거하여 응용-개발되므로 약효의 개선 및 신약으로의 개발 가능성이 고전적인 스크리닝 방법에 비하여 월등하게 높다.

본 과제에서 다루고자 하는 Arbekacin은 최근 문제가 되고 있는 Vancomycin 내성균주 (VRSA)에 대한 치료제로 부각되고 있는 차세대 항생물질로서 내성이 보고가 거의 없어 그 가치가 높게 평가되고 있다.

그러므로, 유전체 정보를 바탕으로 생합성 유전자를 활용한 대사경로 재설계를 통하여 얻어지는 하이브리드 항생물질 개발기술을 약효와 안정성 및 장래성이 검증된 Arbekacin 과 같은 항생물질 개발에 사용하여 생물학적으로 생산하고 제품화하면 신약개발의 낮은 성공 가능성에 따른 고위험을 극복할 수 있으며 현재 심각한 사회문제로 대두되고 있는 항생물질 내성세균 및 저항성 병원균에 의한 감염성 질병치료와 아울러 약제내성을 보이는 항암치료 분야에도 효과적으로 접근할 수 있을 것이다. 이러한 기술 개발 연구는 향후 국내 생물 산업의 platform technology로서 국가 경쟁력 증진에 크게 기여할 것이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- AHBA (α -hydroxy- γ -amino butyric acid) 전이유전자 확보 및 이를 Kanamycin 생산균주에서 발현시킬 수 있는 유전자 발현 및 도입 시스템 구축
 - Butirosin 생산균주인 *Bacillus circulans*로부터 AHBA 전이유전자를 포함하는 생합성 유전자군 확보
 - AHBA의 생합성 및 전이 관련 유전자의 고발현 시스템 구축 및 이종 발현시스템 확보
- Kanamycin 고생산 *Streptomyces kanamyceticus* 확보 및 *S. kanamyceticus*에서 Kanamycin 생합성 유전자군 확보.
- *S. kanamyceticus* 의 genetic engineering 기법 확립 [Dibekacin 창출에 활용]
 - 선택적 유전자 불활성 작업에 활용될 유전자원 확보: 발현 벡터, selection marker 등
 - *S. kanamyceticus* 산업균주에 Dibekacin 의 생산 관련 유전자들과 AHBA 생합성/전이 유전자들을 도입하기 위한 유전자 도입 시스템 구축
- Sagamicin 생산균주인 *Micromonospora sagamiensis* 에서 Sagamicin 생합성 유전자군 확보 및 유전자 기능 분석
 - Dibekacin 창출에 활용할 유전자원 탐색
 - Dibekacin 을 생산하는 재조합 균주 개발을 위해 선별된 유전자의 발현 벡터 구축
- *Micromonospora purpurea* 산업균주에 대한 유전자 조작 시스템 구축
- Kanamycin 관련 다양한 유도체의 정제 및 분석기법 확립
 - Kanamycin B를 비롯한 이의 다양한 유도체에 대한 선별적 분석시스템과 분리·정제 시스템 확립
 - Dibekacin과 Arbekacin 분석 및 순수 분리 조건 확립
- 기 확보된 아미노글라이코사이드계 항생물질 다제내성 유전자를 *Streptomyces kanamyceticus* 산업균주에 도입하여 Arbekacin 저항성 균주 확보
 - *nbrB*와 같은 다제내성 유전자를 활용한 Arbekacin 내성 균주 확보
 - 전통적인 돌연변이 유발법을 병용하여 Arbekacin 내성균주 확보
- *Streptomyces kanamyceticus* 산업균주에서 Kanamycin 생산 관련 활성 조절인자 분리 및 분석
 - Global 조절인자 및 Pathway-specific 조절인자
 - 생산증대에 유용한 신규 활성조절 인자 탐색
- LC/MS, NMR을 이용하여 재조합 균주에서 생산된 DibeKacin 의 구조 분석 및 약효 검증

IV. 연구개발 결과

- Butirosin 생합성 유전자군 확보 및 AHBA (α -hydroxy- γ -amino butyric acid) 전이 유전자 확보
 - Butirosin 생산균주인 *Bacillus circulans*로부터 AHBA 전이유전자를 포함하는 생합성 유전자군 확보 및 AHBA의 활성화 시스템 구축
- Kanamycin 고생산 *Streptomyces kanamyceticus* 확보
 - 세계적인 생산 수준의 Kanamycin 고 생산 산업균주 확보
- Kanamycin 고생산 *S. kanamyceticus*에서 Kanamycin 생합성 유전자군 확보.
 - 49-kb의 kanamycin 생합성유전자군 확보 (kanamycin B 고 생산 균주 창출에 활용)
- Kanamycin 고생산 *S. kanamyceticus*에서 AHBA 전이유전자를 발현 시킬 수 있는 유전자 발현 및 도입 시스템 구축
 - 세계 최초로 *S. kanamyceticus*에 대한 gene manipulation system 확보
 - *S. kanamyceticus* 산업균주에서 Dibekacin 생산 유도과 AHBA 장착을 위한 유전자 및 발현시스템 구축
- Sagamicin 생산균주인 *Micromonospora sagamiensis* 에서 Sagamicin 생합성 유전자군 확보
 - Dibekacin 창출에 활용할 유전자원 탐색 및 기능 분석
 - *Micromonospora purpurea* 산업균주에 대한 유전자 조작 시스템 연구
- Kanamycin 관련 다양한 유도체의 정제 및 분석법 확립
 - Kanamycin B를 비롯한 *S. kanamyceticus* 형질 전환체에서 얻어질 다양한 변형 구조를 구별할 수 있는 분석시스템과 분라·정제 시스템 확보
 - Dibekacin과 Arbekacin 정제 및 분석 조건 확립
- 아미노글라이코사이드계 항생물질 다제내성 유전자를 *Streptomyces kanamyceticus* 산업균주에 도입하여 Arbekacin 저항성 균주 확보
 - Arbekacin 및 Dibekacin 내성 *S. kanamyceticus* 확보 [특허출원]
- *Streptomyces kanamyceticus* 산업균주에서 Kanamycin 생산 관련 조절인자 확보 [논문 및 국제특허]
 - 항생제 생산증대에 관여하는 유용 활성조절 인자로서 S-adenosyl methionine synthase 확보

V. 연구결과와 활용계획

- 본 연구를 통해 세계 최초로 확보된 생리활성물질 생합성 조절인자 SAM (S-adenosyl methionine) synthase 연구에 의하면 구조 내에 methyl group을 많이 포함하는 항생물질 경우 SAM에 의하여 그 생산이 2배에서 5배의 증가함을 확인하였다 [서주원 외. FEMS Microbiol. Lett. 2004]. 예로서 구충제로 상용화되어 있는 Avermectin의 생산 균주에 SAM을 활용하면 5배 이상 생산량이 증가함을 관찰하였다. 이러한 생산성 증대는 기존의 고전적인 균주개량법에 비하여 획기적인 것이다. 현재 기존의 Cepha-계열의 항생제등 고전적인 발효산업으로 생산하던 항생물질은 중국과 인도 등 후진국의 저가 공세 등으로 해가 갈수록 사업타산성이 저하되고 있는 실정이다. 이와 같은 현실에서 산업 현장에서 긴박히 요구되고 고부가가치 천연물 (예: FK-506과 같은 면역억제제등)의 생산에 SAM 관련 기술을 적용하고, 그 성공 사례를 제시함으로써 국내 제약 산업에 새로운 돌파구를 제시하고자 한다.

- 특히, 항생물질 생합성 조절 유전자원에 대한 연구는 신규성과 독창성을 갖고 있는 것으로 인정받고 있고 그 산업적인 응용가치가 매우 높아 관련 기술을 국내기업에 기술이전을 통해 산업현장에 적용하고자 한다.

- 본 연구를 통하여 확립된 Arbekcin의 생산 개념 및 기술은 항생·항암물질 생산균주 개발, 유효 성분의 선택적 생산에 의한 생산 공정의 개선, 원가절감 등 산업현장에 실제로 필요한 중요한 기술의 개발에 활용 될 것이다. 본 연구를 통해 축적된 제반 핵심기술과 개발 신약들은 국내 제약회사들의 기술력 확보 및 새로운 아이템(Item) 제공에 폭넓게 기여하도록 할 것이며 이를 통해 제약 산업 기술개발 수준을 획기적으로 끌어올리는데 기여할 수 있을 것이며 현재 심각한 사회문제로 대두되고 있는 항생물질 내성세균 및 저항성 병원균에 의한 감염성 질병치료에 보다 효과적으로 접근할 수 있는 platform technology로서 활용될 수 있을 것이다.

SUMMARY

Development of novel antibiotics is urgently demanded to overcome multi-antibiotic resistance pathogenic bacteria that included those with methicilline- and vancomycin-resistance. However, the strategy using classical screening method is not efficient enough to cope with rapidly evolving drug-resistant pathogens. Combinatorial biosynthetic technology emerges as the alternative strategy by providing hybrid antibiotics whose structure are so complex that the chemical synthesis is no more realistic tools. Combinatorial biosynthesis means engineering cell to biosynthesize unnatural product by manipulating its biosynthetic genes. Moreover, recent advances in genomics have provided a plenty of genetic informations regarding to antibiotics biosynthesis and its regulations. These data could be applied to enlarge the horizon of combinatorial biosynthesis and whereby diversity of hybrid antibiotics, helping us to control deadly pathogens.

Arbekacin, the semi-synthetic aminoglycoside antibiotics, was active against VRSA (Vancomycin resistance *Staphylococcus aureus*) and is structurally AHB(α -hydroxy- γ -amino butyryl)-linked dibekacin. Arbekacin was prepared from kanamycin B by chemical modifications that were inspired by naturally occurring aminoglycoside antibiotics; 3',4'-deoxysugar from sagamicin and AHBA from butirosin. Hence combinatorial biosynthesis could provide biological system to generate arbekacin from kanamycin B by employing biosynthetic genes for gentamicin and butirosin.

We obtained the gene cluster for butirosin biosynthesis from *Bacillus circulans* and from the cluster gene encoding AHB-carrier was identified. The AHB-carrier was expressed in *E. coli* and obtained as the recombinant protein to guide AHB transfer reaction. Eventually, we successfully convert in vitro dibekacin to arbecin by cell-free conversion. Kanamycin biosynthetic gene clusters from *Streptomyces kanamyceticus* and Sagamicin biosynthetic gene clusters from *Micromonospora sagamiensis* were also obtained and analyzed to provided to genetic materials for the advanced genetic engineering. Genetic manipulation of *S. kanamyceticus* is kernel point to produce of arbekacin in the industrial kanamycin producer, so we first demonstrated that this strain is transformable with the integration vector.

Generally, the engineered strain producing hybrid antibiotics showed severely impaired productivity. One strategy is to provide self-resistance to toxicity of unnatural antibiotics, For this, we prepare the strain highly resistant to arbekacin by mutational approach. We identified S-adenosyl methionine synthetase (SAM-s) as the general activator of antibiotic biosynthesis and demonstrated that SAM employed novel mechanism to activate the secondary metabolism. We prepared expression construct with AHB-carrier and SAM-s and used to generate the strain efficiently biotransform dibekacin to arbekacin.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Domestic and foreign status of research and development	6
Chapter 3. Contents and results of research	9
1. Isolation of gene clusters for reconstitution and design of producer microorganism.	9
2. Genemanipulation system and detection system	12
3. Arbekacin production by genetic and metabolic engineering.	15
4. Exploration of regulatory gene	17
Chapter 4. Evaluation of performance and significance	18
Chapter 5. Application plan of results	19
Chapter 6. Science and Technology Information obtained in this work	34
Chapter 7. References	36

목 차


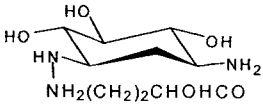
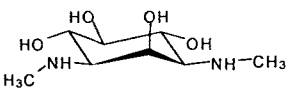
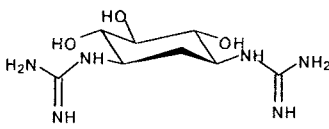
제 1 장 서론	1
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	6
제 1 절 국외연구동향	6
제 2 절 국내연구동향	8
제 3 장 연구개발수행내용 및 결과	9
제 1 절 미생물 유전체와 유전자 재설계를 통한 생산 균주 창출용 유전자원 확보	9
제 2 절 유전자원 활용시스템 구축 및 분석법 확립	12
제 3 절 미생물 유전체와 유전자 재설계를 통한 Arbekacin 생산 창출	15
제 4 절 조절유전자원 탐색 및 수율 연구	17
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	18
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	19
특정연구개발 활용계획서	19
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보	34
제 7 장 참고문헌	36

제 1장 서 론

- 최근 미생물 유전체와 수삽에서 수백 킬로 base pair에 이르는 유용 항생물질 생합성 유전자들과 그 기능이 속속 밝혀지면서 항생물질 내성균주의 저항성 기작을 피할 수 있도록 기존의 항생물질 구조를 변형하는 데에 유전자 공학을 활용하는 연구가 시작되었다.
- 하이브리드 항생물질 개발기술은 천연적으로 생산되지 않는 새로운 구조의 항생물질 창출을 목표로 하는 신약개발 분야에 해당하는 기술로서 기존의 항생물질의 구조에 다른 구조를 붙이거나 변형하여 기존의 항생물질을 새로운 활성이나 능력을 가진 항생물질로 재창출하는 것이다. 이를 통하여 항생물질 활성의 증가나 신기능 및 내성 세균에 대한 문제를 극복하고자 하는 첨단 핵심 기술이다. 반면 기존의 고전적인 탐색(screening) 방법에 의한 신규 항생물질의 발견은 점차 줄어가고 있는 실정이고 내성균주의 출현속도를 따라가지 못하고 있는 실정이다. 따라서 기존의 고전적인 방법이 아닌 새로운 방법의 신규항생물질 개발 방법이 절실히 요구되는 상황에서 하이브리드 항생물질 개발 기술은 신규 또는 기존 구조 변형 항생물질 개발의 어려움을 해결할 수 있는 대안으로 제시되고 있다.
- 이와 같은 원리를 이용한 하이브리드 항생물질 개발기술을 통해 본 연구진이 개발하고자 하는 주된 대상은 당구조(sugar moiety) 로만 구성되어 있는 아미노글라이코사이드계 항생물질이다. 아미노글라이코사이드계 항생물질은 넓은 항균 작용범위(spectrum) 와 강한 살균작용으로 감염증 치료제로 널리 이용되고 있으며 β -lactam 계열 항생물질에 대한 내성과 저항성 문제를 해결 할 수 있는 대안으로 제시되고 있다.
- 아미노글라이코사이드계 항생물질은 예외 없이 공통구조인 aminocyclitol을 가지며 그 구조에 따라 streptidine, 2-deoxystreptamine, actinamine을 포함하는 세 그룹으로 분류되며 이들 각각의 aminocyclitol 구조에 다양한 당구조가 붙어 있는 것이 일반적이지만 예외적으로 aminocyclitol에 AHBA(α -hydroxy- γ -aminobutyryl) 잔기를 가지고 있는 butirosin의 경우도 있다 (표 1).
- 아미노글라이코사이드계 항생물질에서 임상적으로 널리 사용되고 있는 경우는 화학적 합성 제품인 Isepamicin과 Amikacin(1-N-AHBA-kanamycin A)이 있으며 1996년과 1997년에 일본, 미국, 프랑스 등지에서 Vancomycin 내성 VRSA이 발견되면서 일본을 중심으로 Vancomycin 내성균주에 대한 치료제로 사용되기 시작한 Arbekacin(1-N-AHBA-3',4'-dideoxykanamycin B)을 꼽을 수 있다.
- 최근에 와서 Vancomycin 내성 균주에 대한 치료제로서 부각되기 시작한 Arbekacin과 달리 Isepamicin과 Amikacin에 대한 내성균 출현에 대한 빈번한 보고가 학계를 긴장시키고 있으며 (표 2), Amikacin은 93년 이후 제품 판매실적에 변화가 없다. 이것은 치료제로서의 가치를 상실해가는 Amikacin의 운명과 함께 인간과 병원성미생물간의 '진화적 군비경쟁 (evolutionary arms race)'의 일면을 살펴볼 수 있다.
- Arbekacin은 표 2에서와 같이 다제내성균인 MRSA에 대한 치료효과가 높으며 최근 들어

Vancomycin 내성 세균에 대한 약효가 검증되어 차세대 항생물질로의 가치가 부각되고 있다. 표 2의 Arbekacin과 같은 유용한 아미노글라이코사이드계 반합성 항생물질 중에서 생물학적으로 생산이 보고되어진 경우는 아직까지 없지만 본 연구진이 축적한 노하우와 미생물 유전자원들을 이용하면 생물학적 생산 가능성이 높다고 사료된다. 본 연구에서 가장 중점을 두고 있는 하이브리드 항생물질은 Arbekacin 이다.

표 1. 아미노글라이코사이드계 항생물질에서 Aminocyclitol 종류 및 항생물질의 예

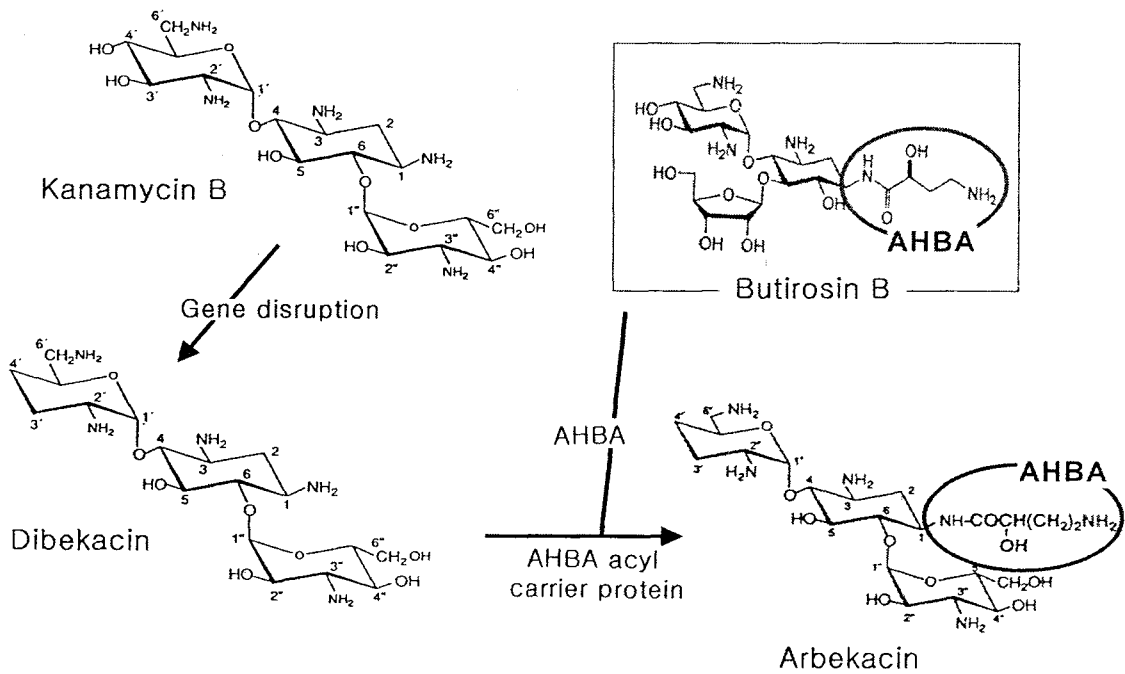
	Aminocyclitol	Antibiotics which contain above amino cyclitol
2-deoxystreptamine		Paromomycin, Kanamycin, Gentamicin, Sisomicin, Tobramycin, Sagamicin, etc
1-AHBA-2-DOS		Butirosin
Actinamine		Spectinomycin
Streptidine		Streptomycin

- 또한, 신규 항생물질 개발에 장기간의 시간 소요, 노력, 비용 외에도 약리작용 및 독성실험이 완료되기 전까지는 신약으로서 성공가능성을 전혀 예측할 수 없는 높은 위험부담이 있기 때문이다. 이미 인체사용에 대한 안정성이 검증된 Arbekacin과 같은 반합성 제품을 미생물 유전체와 하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용하여 생산하고 제품화하면, 위에서 열거하고 있는 극히 낮은 신약으로서의 성공 확률에 대한 고위험의 부담을 극복할 수 있다.

표 2. '죽음의 세균'이라고 불리는 MRSA의 항생물질 내성균 출현빈도
(2000년, 일본 후생성 자료)

Antibiotics	Resistance rate of MRSA (Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
Arbekacin	2%
Isepamicin	94%
Amikacin	100%
Dibekacin	94%
Kanamycin	94%
Gentamicin	80%
Tobramycin	94%
Ofloxacin	96%
Temafloxacin	96%
Levofloxacin	96%
Erythromycin	98%
Clarithromycin	98%
Tetracycline	94%
Minocycline	94%
Fosfomycin	100%

그림 1. 하이브리드 항생물질 개발기술을 이용한 Arbekacin 생산 모식도



- Arbekacin은 Dibekacin(3',4'-dideoxykanamycin B)의 1번 탄소에 AHBA 잔기가 결합된 항생 물질이며 선도물질인 Kanamycin B는 *Streptomyces kanamyceticus* 에서 소량만이 생산된다. 따라서 *S. kanamyceticus* 산업균주의 Kanamycin 생합성 경로를 재설계하고 Sagamicin 생합성 유전자군의 유전정보를 이용하여 Dibekacin을 생산하는 균주를 확보한다. 여기에 AHBA 잔기 유전자를 도입하여 Arbekacin이 생물학적으로 생산되도록 한다. AHBA 잔기는 저가로 구입하여 기질로 배양액에 첨가한다 (그림 1). 이렇게 확보된 Arbekacin 생산균주는 위탁연구를 통해 실용화까지 연결하고자 한다.
- 세계 제약시장 판매규모는 연간 4000억 달러 (480조원)의 거대시장이며 국내 항생물질은 1148개 품목에 9,600억원 시장으로 알려져 있다. 이중에서 아미노글라이코사이드계 항생물질은 관련시장의 20%가량을 차지하고 있어 국내는 1,920억원, 세계적으로는 7.2조원의 시장을 점유하고 있다.
- 일반적인 신규 항생물질의 탐색과정은 수천 종의 토양미생물 및 식물을 탐색할 때 소요되는 시간, 노력, 비용만도 엄청나지만 그렇게 탐색된 신물질이라도 약리작용 및 독성실험이 완료되기 전까지는 신약으로서 성공가능성을 전혀 예측할 수 없다.
- 이와 달리 본 연구의 기본 개념인 하이브리드 항생물질은 기존의 구조로부터 생합성 경로와 물질구조에 근거하여 개발되고 응용하기 때문에 약효의 개선 및 신약개발 가능성이 고전적인 스크리닝 방법에 비해 월등하게 높으며 이미 안정성과 장래성이 검증된 Arbekacin과 같은 반합성 제품을 미생물유전체와 하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용하여 생산하고 제품화하면, 위에서 열거하고 있는 극히 낮은 신약으로서의 성공 확률에 대한 고위험의 부담을 극복할 수 있다.
- 인간이 항생물질을 개발하면 항생물질 내성 병원성 미생물들이 그에 대한 내성을 획득하는 과정은 마치 경주와 같다. 병원성 미생물들은 지금까지 개발된 대부분의 항생물질에 대해 성공적으로 내성을 획득해왔고 1980년대 중반부터 다제내성 결핵균과 같이 여러 가지 항생물질에 동시에 내성을 가진 세균들이 증가하기 시작했다.
- 항생물질 내성세균에 대한 결정적인 위기의 징후가 드러난 것은 1990년대 초, 가장 강력한 항생물질이며 최후의 보루로 생각되었던 Vancomycin에 내성을 가진 병원성 미생물인 VRE(Vancomycin Resistant Enterococci)이 발견되었을 때였다.
- Vancomycin은 Penicillin의 대체약인 Methicilline에 내성을 갖게 된 *Staphylococcus aureus* 가 창궐하자 개발해서 사용하기 시작하였으며, 질병에 대항하여 인류가 개발한 항생제 가운데 가장 강력한 효과를 발휘하는 것으로 알려졌다. '죽음의 세균'이라고도 불리는 MRSA(Methicilline Resistance *Staphylococcus aureus*)는 Methicilline에 내성을 지닌 포도상구균이다. Vancomycin은 MRSA에 대항할 수 있는 유일한 항생물질이었다. 이외에도 Vancomycin은 β -Lactam계 항생물질에 민감한 환자나 β -Lactam 항생물질 내성균에 쓰여 왔다.
- 1996년 일본에서 Vancomycin에 내성을 보이는 병원성 세균인 VRSA(Vancomycin Resistance *Staphylococcus Aureus*)가 세계 최초로 발견되었다. '슈퍼 박테리아'라고도 부르

는 VRSA는 면역력이 약해진 인체에 침투할 경우 단일 항생제로는 치료할 수 없고 몇 가지 항생제를 섞은 혼합 치료법으로도 완치를 확신하지 못하며, 결국 치명적인 패혈증을 유발한다. 지금까지 NCCLS(National Committee for Clinical and Laboratory Standards)의 기준에 따라 약 37개의 균주가 다양한 내성 수준을 보인다고 보고 되어있다.

- 미국 방역센터 (CDC, USA)의 1992년 보고서는 미국 전역에서 병원에 입원중인 환자 중 항생물질 내성 및 저항성 세균으로 인한 사망이 1만 3천 3백명에 이르렀다는 보고가 있다. 우리나라의 경우 특히 항생물질 오용 및 남용이 심각하여 내성 비율이 높은 것으로 알려져 있고 사회적인 문제로 심각하게 받아들여지고 있다.
- 국내에서도 1999년 6월 최초의 VRSA 감염이 확인됨으로써 국내·외 언론의 비상한 관심을 끈 바 있다. 그러나 처방전 없는 마구잡이 항생물질 투약으로 인해 이미 Penicillin, Streptomycin, Tetracycline 등과 같은 주요 항생물질들에 대한 내성이 세계 최고수준이라는 사실이 줄곧 알려졌었기 때문에, VRSA 감염 확인은 이미 예견되었던 문제를 단지 확인한 것에 불과하다.
- 이러한 내성 및 저항성 문제의 해결을 위한 신물질 탐색에 막대한 연구비가 거대 제약회사 연구소를 통해 쏟아 부어지고 있으나 약효가 개선된 신약의 개발속도는 내성균주의 출현빈도에 비해 떨어지고 있는 실정이며 1997년 Science지에서는 병원균과 인류가 맞선 '전선'에서 인간이 서서히 밀리고 있음을 심각하게 지적하였다.
- 이러한 다제내성 및 저항성 세균에 대처하기 위한 방안으로 기존 항생물질 구조를 하이브리드 항생물질기술과 유전자조작에 의하여 변형시켜 저항성 기작을 피하면서도 활성을 갖도록 하는 하이브리드 항생물질 개발이 본 연구진이 시도하고자하는 연구의 목표이며 본 연구가 성공적으로 수행되면 현재 심각한 사회문제로 대두되고 있는 항생물질 내성세균 및 저항성 병원균에 의한 감염성 질병치료와 아울러 약제내성을 보이는 항암 치료 분야에도 효과적으로 접근할 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 연구개발동향

제 1 절. 국외 연구개발 동향

- 최근에 영국 John Innes Center와 Sanger Institute가 공동으로 *Streptomyces coelicolor* 의 전체 유전체의 염기서열을 결정하였고 (Bentley *et. al.*, 2002), 최근 일본 Kitasato 연구소에서는 구충제 Avermectin을 생산하는 산업균주 *Streptomyces avermitilis*에 대한 유전체 염기서열을 발표하였다(Omura *et. al.*, 2001).
- 현재 GOLD와 NCBI에서 검색되는 진행 중인 Microbial genome project 중 기존의 병원균이나 연구목적에서 산업적인 응용을 목적으로 한 project수가 증가하고 있다. 위에서 언급한 *S. avermectitis*이외에도 항생제 spiramycin과 angucycline계 항암제 생산균주인 *S. ambofaciens*, 항진균제 nystatin 생산균주 *S. noursei*, 항암제 생산균주 *S. peucetius*와 같은 방선균이나 최근 생리활성물질 생산균주로 부상하고 있는 *Myxococcus xanthus*와 같은 미생물에 대한 full genome sequence project가 진행되고 있다.
- 최근 들어 미생물 유전체와 수심에서 수백 킬로 base pair에 이르는 유용 항생물질 생합성 유전자들과 그 기능이 속속 밝혀지면서 이러한 유전체 정보를 이용하여 하이브리드 항생물질 개발은 물론 기존 항생물질 생산 균주 개량에 박차를 가하고 있으며 이러한 기술을 이용한 새로운 구조의 항생물질 개발은 주로 polyketide 계열과 peptide 항생물질에 집중되어 있는데 이는 이들 항생물질 생합성 경로에 대한 미생물 유전체 및 분자유전학적 연구가 상대적으로 활발히 진행되었기 때문이다.
- 최근 괄목할만한 연구로는 natural hybrid 항생물질의 생합성 연구이다. 이전에 개별적으로 연구되어 왔던 polyketide synthase (PKS) 나 nonribosomal peptide synthetase (NRPS)가 자연적으로 hybrid 된 생합성 유전자군과 이들이 지정하는 생합성 경로에 대한 연구이다. 가장 대표적인 예가 미국의 Ben Shen group에 의해 소개된 Bleomycin (그림 2) 연구로 Bleomycin의 경우 L-serine, L-asparagine (X2), L-histidine이 NRPS에 의해 생합성된 후 PKS가 작용하고 다시 β -alanine과 2개의 L-cysteine이 NRPS에 의해 만들어진 후 L-gulose와 carbamoyl-D-mannose가 결합하여 생성되는 것으로 나타났으며 이들의 생합성유전자는 90Kb 정도의 거대한 유전자군으로 NRPS-PKS-NRPS를 형성하는 genetic organization을 보여주었다 (Chem. Biol. 2000).
- 신규 구조의 항생 및 항암물질 연구도 진행되었는데 Thorson 등에 의해 연구된 Eneidyne 계열 항암물질 Calcheamicin (Science, 2002) 에 대한 연구나 미국의 Khosla 등에 의해 연구된 Myxobacteria 유래 항암제 Epothilone 관련 연구 (Science, 2000)도 매우 흥미롭다. Hutchinson 등은 항암제 Geldanamycin 관련 생합성 유전자군 (FEMS Microbiol. Lett. 2003)과 그 응용에 관련한 연구 (Chem. Biol. 2004)를 수행하였는데 이러한 일련의 연구는 주로 PKS 구조의 항암물질에 집중하고 있는 것을 알 수 있다.

Epirubicin (4'-epidoxorubicin)을 개발하였다. Leonard Katz 연구그룹에서는 macrolide polyketide계 항생물질인 erythromycin 유사체들을 유전자 불활성화 기법(gene disruption)과 유전자 치환 기법(gene replacement)을 이용하여 개발하였으며 11-dehydroxyerythromycin 등은 상품화 단계에 접어들었다.

- Peptide 항생물질의 경우는 peptide를 생합성 하는 activation domain을 유전자 불활성화 기법을 통해 치환하여 새로운 구조의 하이브리드 peptide 항생물질 개발이 독일의 Mohamed A. Marahiel 박사 연구그룹에 의해 성공적으로 수행되었다.
- 아미노글라이코사이드계 항생물질의 경우에는 하이브리드 기술을 통한 신기능 항생물질을 개발한 예는 아직 보고되지 않은 상태이다. 또한, 이러한 연구도 극히 일부에서만 이루어지고 있는 실정이다.
- 대표적인 관련 연구로서는 독일의 Pipersberg 박사 연구팀의 Streptomycin과 일본의 Kyowa Hakko Kogyo, Co. Ltd의 Fortimicin의 생합성 경로에 대한 연구를 꼽을 수 있다. 2000년에 일본의 Sankyo co.와 Tokyo technology Int.에서는 *Bacillus circulans* SANK72073 으로부터 Butirosin 생합성 유전자군으로부터 AHBA 전이 유전자를 확보하였다고 발표가 있으나 기능 분석에 관한 더 이상의 보고는 없는 실정이며, 영국의 Wellington등은 *Micromonospora echinospora*로부터 gentamicin 생합성 유전자군을 분리하였다고 보고하였다 (J. Antibioit., 2003).

제 2 절. 국내 연구개발 동향

- 하이브리드 항생물질 개발연구에서 항암물질이나 아미노글라이코사이드계 항생물질 생합성 유전자를 이용한 신약개발은 국외 뿐만 아니라 국내에도 아직 초기 진입 단계이다.
- 최근 한국생명공학연구원 홍영수 박사 등이 Geldanamycin의 생합성유전자 (carbamoyltransferase등)을 기능 규명 연구를 보고 하였다 (J. Am. Chem. Soc. 2004).
- Aromatic polyketide계 항생물질에 대한 연구는 1996 년에 생명공학 연구소(현 한국생명공학원)와 일동제약 연구소의 공동연구에 의해 daunorubicin의 11-hydroxylase(*dnrA*) 유전자를 aclacinomycin 생산균주에 도입하여 hydroxyl기를 첨가한 예가 있다.
- 아미노글라이코사이드계 항생물질 생합성 유전자에 대한 연구는 최근 본 연구진의 Spectinomycin 과 Bluensomycin 생합성 유전자 분리 및 분석이 대표적이며 선문대 송재경 교수팀에서도 독립적으로 Spectinomycin 생합성 유전자군을 분리하였다. 국내에서도 아미노글라이코사이드 유전자원의 확보와 유전자 분석기술 및 효소 기능 분석기술의 축적으로 아미노글라이코사이드 항생물질과 같은 30kb 이상의 항생물질 생합성 유전자군에 대한 연구와 이에 대한 이용에 관심을 가지게 되었다.

제 3 장 연구수행내용 및 결과

제 1 절. 미생물 유전체와 유전자 재설계를 통한 생산 균주 창출용 유전자원 확보

가. AHBA 전이유전자 확보를 위한 Butirosin 생합성유전자군 확보 및 분석

1) Arbekacin은 Vancomycin, Methicilline 뿐 아니라 다른 아미노글라이코사이드계 항생물질에 대해 내성을 갖는 세균의 감염치료에 효과적인데 이것은 2-DOS의 1번 탄소 아미노그룹에 AHBA 잔기가 존재 때문이다. 이 AHBA 잔기는 Butirosin 구조에서도 존재하기 때문에 이에 상관된 유전자원을 확보하기 위하여 Butirosin 생산균주인 *Bacillus circulans* 으로부터 genomic DNA를 분리하여 genomic library를 제작하였다. 구축된 genomic library로부터 Butirosin 생합성에 관여하는 유전자군을 확보하였다 (그림 3).

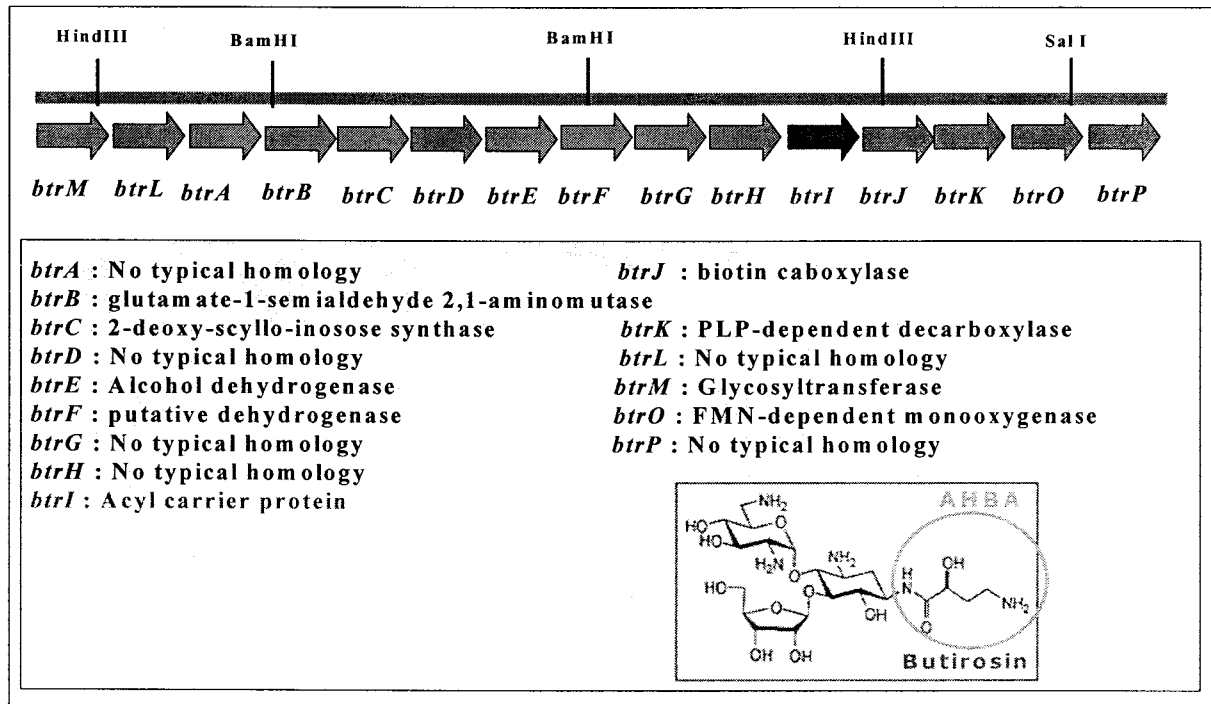


그림 3. *Bacillus circulans* 로부터 분리된 Butirosin 생합성 유전자군

2) 확보된 Butirosin 생합성균은 크기가 20Kb 정도이며 염기서열분석을 통해 15개 ORF가 존재함을 확인하였다. 이들 중 AHBA 전이효소유전자(*btrI*)를 확보하였다.

나. Kanamycin B 창출을 위한 Kanamycin 생합성유전자군 확보 및 분석

- 1) Kanamycin은 *S. kanamyceticus*에서 생산되며 Kanamycin A, B, C의 세가지 componet가 알려져 있다. 이들 중 kanamycin A가 주 생산물인 것으로 알려져 있어 본 연구에서 주목적으로 하는 Kanamycin B의 생산을 증대시킬 수 있는 생합성 유전자원이 존재하는지 확인하고 사용하기 위하여 *S. kanamyceticus*의 genomic library로부터 총 49kb에 달하는 Kanamycin 생합성 유전자를 확보하였다 (그림 4).
- 2) Kanamycin 생합성유전자군에서는 kanamycin self-resistance에 관련된 6'-N acetyltransferase와 ribosomal methylase가 각각 발견되었고 transporter가 상동성에 근거하여 Kanamycin의 배출에 사용되는 것으로 판단된다. 3가지의 조절유전자도 발견되어 생산성을 조절하는데 활용할 수 있을것으로 예상되었다. 생합성유전자로는 2-deoxystreptamine의 생합성에 관여하는 유전자를 모두 가지고 있었고 2개의 glycosyltransferase의 존재도 확인되었다.

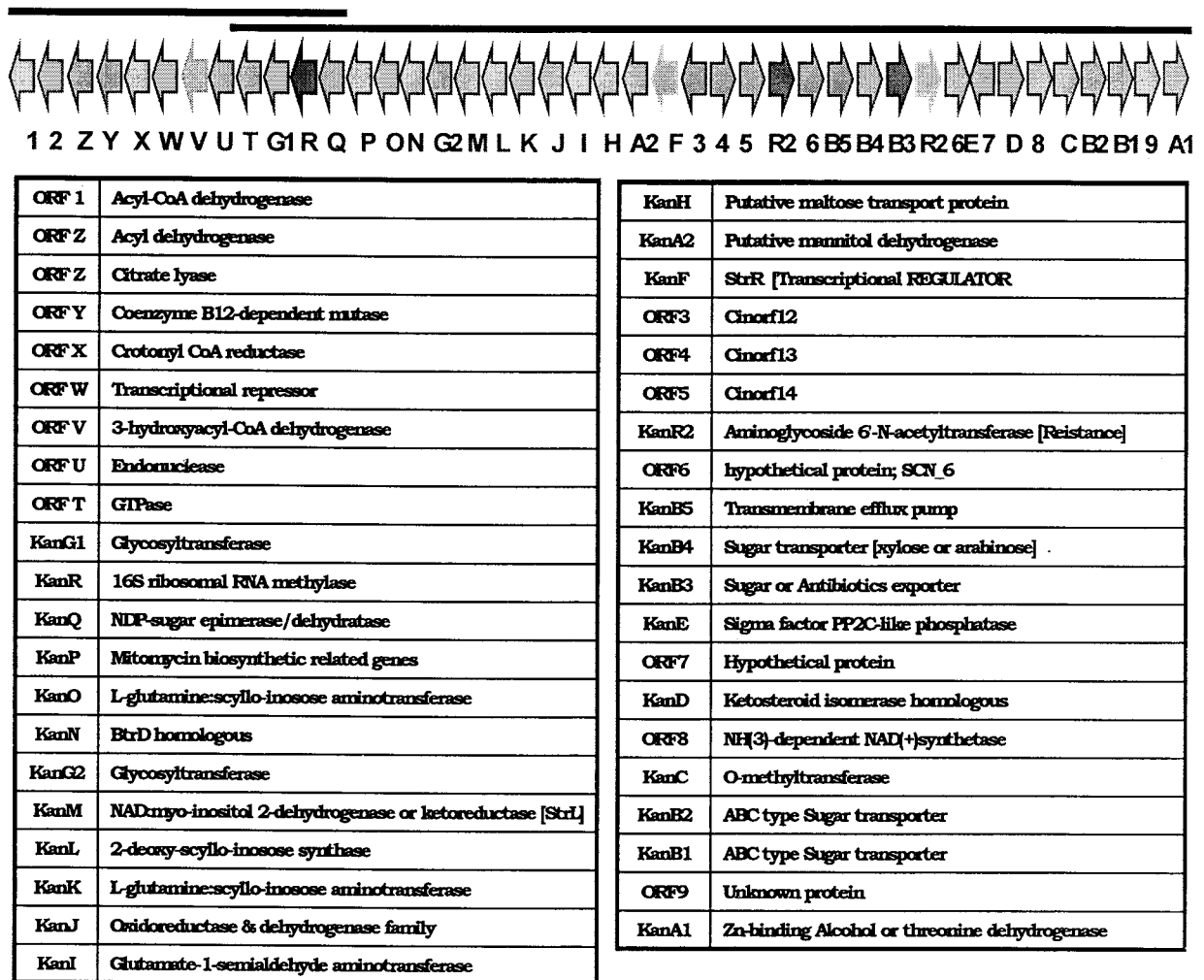


그림 4. *Streptomyces kanamyceticus* 산업균주로 부터 분리한 Kanamycin 생합성 유전자군 Kanamycin 생합성에 관여하는 유전자의 상동성에 근거한 기능과 저항성 유전자, 조절유전자를 비롯한 44개의 ORF가 확인되었고 각 ORF의 방향을 화살표로 표시하였다.

3) 본 연구에서 중요한 Kanamycin B의 생합성에 관여하는 유전자로는 *kanP*가 작용할 것으로 예상되었다. 그 이유는 Kanamycin의 구조에서 Kanamycin A와 B는 모두 glucose에서 변형된 구조이나 Kanamycin B는 2번 탄소에 NH₂ group이 포함되어 있는 것이 glucosamine에서 유래하는 것으로 알려져 있고 *kanP*가 Lincomycin이나 Mitomycin 생합성 유전자와 단백질 수준에서 상당한 상동성을 보이며 이는 NDP-glucosamine의 어느 형태에서 유래한 것으로 판단되기 때문이다. 따라서, 본 연구진은 *kanP* 유전자를 target으로 형질전환 시스템과 gene inactivation method를 보완하여 이 유전자의 기능을 보이고자 하였다 [제 2절. 참조].

다. Dibekacin 창출을 위한 Sagamicin 생합성유전자군 확보

1) Dibekacin은 Kanamycin B에서 3',4'-탄소의 OH group이 제거된 형태로 이러한 것은 자연계에 존재하는 항생물질 sagamicin등의 gentamicin 관련 항생물질에서 찾아볼 수 있다. 본 연구진은 *Micromonospora sagamiensis*로부터 3',4'-탄소의 OH group 제거에 관여하는 유전자원을 확보하기 위하여 Sagamicin의 생합성 유전자군을 분리하였으며 이를 Dibekacin의 생산에 활용하고자 하였다. 이를 위하여 *M. sagamiensis*의 genomic library를 구축하고 이들로부터 약 15kb의 Sagamicin 생합성유전자군을 분리하였으며 Gentamicin/Sagamicin 내성유전자와 2-DOS 생합성에 관여하는 14개의 ORF들을 확보하였다 (그림 5).

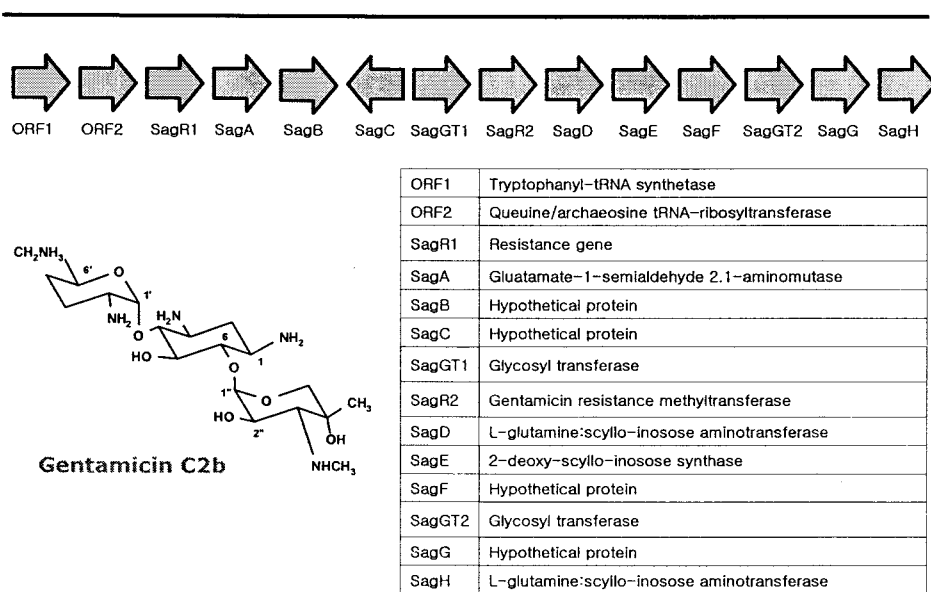


그림 5. *Micromonospora sagamiensis*로부터 분리한 sagamicin 생합성유전자군

Sagamicin 저항성유전자를 비롯한 13개의 ORF가 확인되었고 각 ORF의 방향을 화살표로 표시하였다.

2) Sagamicin 자가내성 유전자인 *sagR1* 다음에 존재하는 *sagB*와 *sagC* 유전자는 desosamine의 3'-dehydroxylation에 관여하는 oxidoreductase들과 매우 높은 상동성을 보이고 있어 Dibekacin 전환에 필요한 유전자원으로 선정하고 기능분석을 실시하였다.

제 2 절. 유전자원 활용시스템 구축 및 분석법 확립

가. *Streptomyces kanamyceticus* 및 *Micromonospora sagamiensis*에 대한 gene manipulation system 시스템 구축

- 1) 제 1절에서 확보된 유전자원의 활용을 극대화하고 최종적으로 Arbekacin을 창출하기 위해서는 Kanamycin B를 생산하는 *S. kanamyceticus*에 대한 gene manipulation system을 필수적이다. 가장 먼저 Thomson (1992)등의 방법을 이용한 protoplast 제조법을 이용하여 plasmid 형질전환방법을 시도하였으나 균주의 재생이 안정적이지 못하여 방선균에서 널리 이용되고 있는 conjugation 방법을 이용하고자 하였다. Conjugation 기법을 성공적으로 확립하여 *E. coli*와 *S. kanamyceticus* 사이의 conjugant를 $1 \times 10^6/\mu\text{g}$ 수율로 얻을 수 있었다 (그림 6).
- 2) 이러한 시스템을 이용하여 불활성화 시키고자 하는 DNA를 모균주에 도입하고 knock-out을 통한 각 유전자의 기능분석 또는 발현하고자 하는 유전자의 삽입에 이용하고자 하였다. 그 대상 유전자는 앞서 언급한 *kanP*의 삭제와 *sagB*와 *sacC*의 첨가이다.

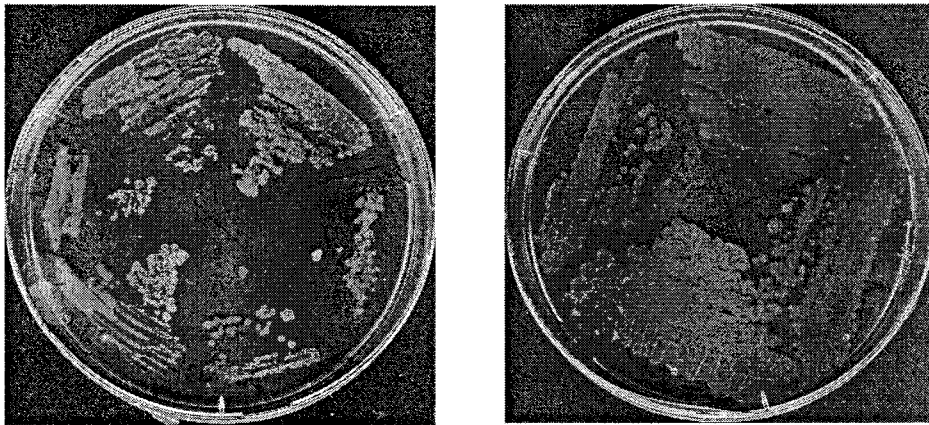


그림 6. *Streptomyces kanamyceticus* 산업균주에서 Kanamycin 유사체를 창출하기 위한 Gene Manipulation system.

Thomson 방법을 변형하여 제조한 *S. kanamyceticus* 산업균주의 Protoplast를 이용한 형질전환 시스템을 보여주고 있다. Apramycin(좌)과 Thiostreptone (우) 두 가지 selection maker를 형질 전환주 선별에 이용하였다.

- 3) *M. sagamiensis*에 대한 형질전환을 포함한 gene manipulation system에 대한 보고는 없으나 *Streptomyces*의 방법을 이용하여 성공한 사례가 있어 *S. kanamyceticus*와 유사한 conjugation 방법과 *S. lividans*을 이용한 외부발현 두 가지를 모두 사용하여 dibekacin 창출에 필요한 유전자원을 확보하고 기능을 분석하고자 하였다.

나. 생물학적 검증법 연구

- 1) 본 연구에서 다루는 항생물질 Arbekacin은 AHBA 잔기를 가지고 있으며 이는 유사한 반합성 항생물질 Amikacin에서 그 활성차이를 볼 수 있다. 즉, Amikacin의 전구체인 kanamycin A는 알려진 바에 의하면 8종의 phosphotransferase (AP)나 acetyltransferase(AAC)등의 아미노글라이코사이드 수식효소에 의해 내성이 발생하는 반면 Kanamycin A에 AHBA기가 도입된 amikacin의 경우 6'-AAC를 제외하고는 내성이 발생하지 않는 것으로 나타나 항생제 내성을 극복하는 새로운 패러다임으로 자리잡게 되었다. 본 연구에서 다루고자 하는 Arbekacin의 경우 Dibekacin에 AHBA가 도입되어 기존의 아미노글라이코사이드계 항생물질외에도 Vancomycin과 Methicilline에 내성인 균주에도 활성을 나타내고 있다. 한편, Dibekacin의 경우 Kanamycin B에서 3',4' 탄소의 OH에서 산소가 제거된 형태로서 일찌기 *S. tenebrarius*에서 생산되는 Tobramycin의 3'-위치에도 산소가 제거된 항생물질이 발견되었는데 이러한 경우 병원 원내감염균으로 문제가 되고 있는 *Pseudomonas* 등에 효과가 우수한 것이 확인되었다. 이러한 것은 Kanamycin 구조에서의 3'과 4'탄소의 OH group은 APH의 기질로서 내성의 가장 큰 원인이 되는 것으로 알려져 이러한 것이 Dibekacin의 개발로 연결된 것이다.
- 2) 본 연구진에서는 이러한 점에 착안하여 Kanamycin과 Gentamcin에 모두 감수성인 *Bacillus subtilis* ATCC6633균과 Kanamycin과 같이 AHBA가 도입되지 않거나 OH 기가 존재할 경우에는 내성을 나타내는 *Pseudomonas aeruginosa*를 사용한 항생물질 구조에 따른 신속한 검출방법을 개발하여 특허출원하였다 (그림 7).

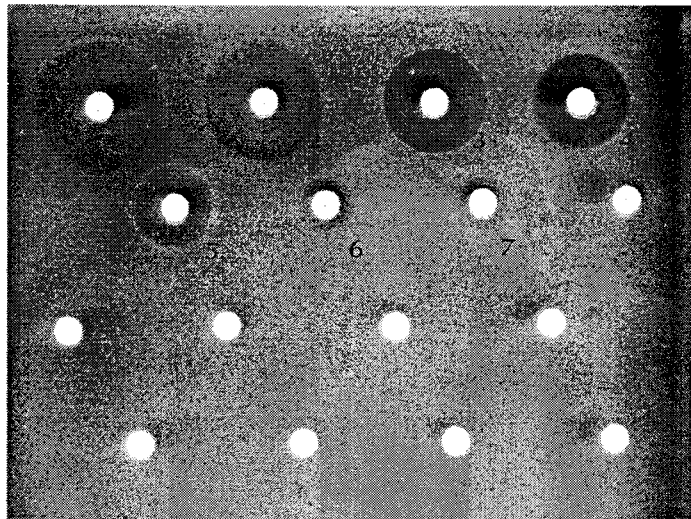


그림 7. *Pseudomonas aeruginosa*를 이용하여 AHBA잔기가 도입된 항생물질 검출을 위한 Bioassay system.

상단은 authentic Arbekacin standard (sigma제품)를 paper disc에 loading한후 28℃에서 24시간 배양하였다. 농도는 좌측상단으로부터 [1 : 500 μ g, 2 : 300 μ g, 3 : 100 μ g, 4 : 50 μ g, 5 : 25 μ g, 6 : 5 μ g, 7 : 3 μ g, 8 : 1 μ g]

하단(2단)의 좌측으로부터 8개의 sample은 authentic Kanamycin A를 동량 loading하여 동일 조건에서 배양한 것이다. AHBA 잔기가 도입되어야만 저해환이 형성되는 것을 알 수 있다.

다. 정제 및 검출시스템 구축

- 1) 발효액이나 *in vitro* 반응액 중에 존재하는 아미노글라시코사이드 (AG)계 항생물질을 정제할 수 있는 방법과 이를 monitoring 하여 고수율로 정제할 수 있는 방법을 확립하였다. AG 항생물질의 경우 NH_2 group을 갖고 있어 Amberlite IRC-50과 같은 anion exchange resin을 H^+ 또는 NH_4^+ 형태로 제조한 후 정제하고 다시 CG-50이나 Dowex 계통의 미세한 ion exchange resin을 사용하면 고순도의 AG 항생물질을 획득할 수 있음을 확인하였다.
- 2) 정제도중 간편하게 AG 항생물질의 존재를 monitoring 할 수 있는 방법으로 나. 항에서 언급한 bioassay 방법과 함께 TLC를 이용하여 용이하게 검출할 수 있었다. 전개용매로서는 CH_3Cl MeOH : NH_4OH = 2 : 1 : 1을 기본으로 암모니아수를 17%와 28%의 것, 두 가지를 사용하였다. 전자의 전개용매는 AHBA가 포함된 Amikacin등의 분리가 용이하였고 후자는 Sagamicin등의 분리에 용이하였다. 발색은 Nynhydrin과 H_2SO_4 를 병행하였다.
- 3) 자세한 분석을 위해서 HPLC를 사용하였다. Kanamycin계열의 AG 항생물질 분석에는 OPA (O-phthaldehyde)를 이용한 post-column derivatization법을 사용하였고 Sagamicin 분석에는 OPA와 시료 반응 후 분석하는 pre-column derivatization법을 사용하였다.
- 4) 각 분획의 항생물질 활성과 특성을 조사하여 활성분획을 농축하고 얻어진 활성 분획들을 감압 건조 하에서 농축하여 LC/MS 및 NMR을 이용한 화학적인 특성을 평가할 수 있을 정도의 시료를 확보할 수 있고 정제도중 또는 유전자 재조합기술을 이용하여 창출된 *in vitro* 또는 *in vivo*에서의 Kanamycin 유사체의 생산수율을 monitoring 하는 등에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

제 3 절. 미생물 유전체와 유전자 재설계를 통한 Arbekacin 생산 창출

가. Arbekacin 내성균주 제조

- 1) 최종적으로 Arbekacin을 생산하는 *S. kanamyceticus* 생산균주를 창출하기 위해서는 무엇보다도 최종산물인 Arbekacin에 대하여 내성을 가지고 있어야 한다. 그러나 Arbekacin이 항생제 중 활성이 매우 뛰어나고 본 연구진이 보유하고 있는 균주가 Kanamycin A를 주산물로 과대생산토록 제조된 산업균주이므로 동 균주를 더 mutation하여 저항성균주를 만드는 것 보다 본 연구진이 이미 확보하고 있는 다제내성유전자 *nbrB*를 활용하는 것이 더 바람직하다고 판단하였다. 사전연구에 의하면 *nbrB*는 AHBA를 포함하고 있는 반합성 항생물질 Amikacin에도 내성을 가지고 있고 Dibekacin과 유사한 Tobramycin에도 내성을 보이기 때문이다 (서주원 외, J. Microbiol. Biotechnol., 1998).
- 2) 전통적인 mutation을 통한 Arbekacin, Dibekacin 내성균주의 확보도 병행하여 실시하였다. 먼저 UV를 사용하고 확보된 균주를 NTG를 사용하여 가일층 돌연변이 시켰다. 확보된 균주의 내성은 최종적으로 표 3와 같은 표현형을 보여주었다. Arbekacin에 대한 내성이 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났으나 Amikacin에 대해서는 40배 증가된 내성 표현형을 보여주었다. 이러한 점은 향후 내성이 좀 더 증대될 수 있음을 나타내고 있으며 산업적응용가능성이 높아 특허 출원하였다.

항 생 제	내성 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	
	변 이 주	기존균주
Arbekacin	=< 10	0
Dibekacin	=< 10	0
Amikacin	=> 200	5
Tobramycin	=< 20	5
Gentamicin	=< 20	5
Sagamicin	=< 20	5
Kanamycin B	>= 3,000	>= 1,000

표 3. *S. kanamyceticus* 변이주의 아미노글라이코사이드계 내성균주의 내성 표현형

나. Arbekacin의 *in vitro* 창출

- 1) 본 과제수행에 있어 핵심이 되는 AHBA를 자연적으로 포함하고 있는 Butirosin의 생산균주 *Bacillus circulans*의 유전체로부터 AHBA 전이 유전자를 분리하여 이를 이용한 유전자 도입 시스템을 구축하였고 이 시스템의 작동여부를 본 연구의 최종목표인 Arbekacin 창출로 확인하였다 [그림 8]. *In Vitro* 반응을 통하여 AHBA 전이효소를 이용하고 dibekacin으로부터 Arbekacin이 창출됨을 확인함으로써 향후 Arbekacin 실용화를 촉진 시킬 수 있을 것으로 사

료되며 제 2절에서 언급한 유전자 도입시스템 연구와 Arbekacin 내성 균주를 이용하여 유전자의 삭제 및 치환을 통하여 접근할 수 있을 것으로 판단된다.

- 2) AHBA 전이 유전자의 기능을 분석하고 활성을 검증하기 위해 Kanamycin, Dibekacin을 비롯한 기질 항생물질을 대상으로 하는 기능분석을 수행하였고 이를 이용한 AHBA 전이 유전자 활용 시스템을 구축하였다. 먼저 AHBA의 단독발현을 통해 AHBA 전이유전자가 작용하는 지 확인하기 위하여 AHBA 전이유전자를 pET21a vector에 cloning 하고 *E. coli* BL21에서 T7 promoter 하에서 과대 발현되도록 유도하였다. 즉 AHBA 전이유전자를 harboring한 BL21과 control로써 pET-21a만을 harboring한 BL21을 각각 배양 한 후에 적절한 buffer에서 sonication 하여 cell-free extract를 조제하였다. 이를 통하여 Armikacin이 Arbekacin으로 전환됨을 *in vitro* bioconversion system에서 HPLC를 통해 확인하였다.

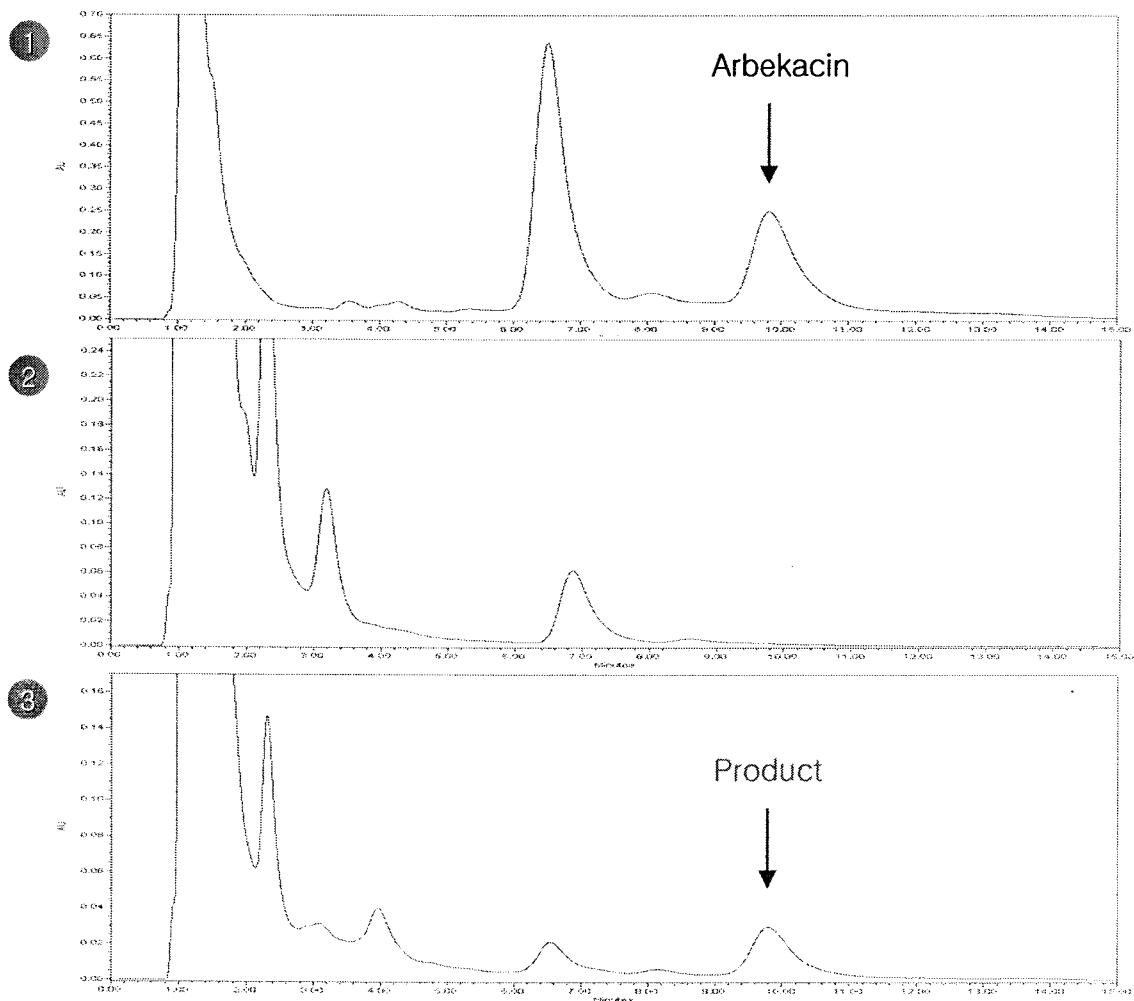


그림 8. AHBA 전이효소 과대발현 통한 Arbekacin 전환

- (1) Standard (4-amino-2-hydroxybutyric acid, Dibekacin, Arbekacin)
- (2) pET-21a를 이용한 *in vitro* reaction
- (3) pETACP를 이용한 *in vitro* reaction.

empty vector만 존재할 경우에는 product가 생성되지 않으며 AHBA 전이효소가 존재할 경우에만 Standard와 동일한 retention time의 생성물(↓)을 보여주고 있다.

제 4 절. 조절유전자원 탐색 및 수율 연구

가. Arbekacin 생산 재설계 균주용 Kanamycin 활성 조절 기작 관련 유전자원 확보

- 1) 현재까지 세포내에 축적되어 항생물질 생산을 증가시키고 형태분화에 영향을 주는 물질로는 A-factor와 ppGpp가 잘 알려져 있다. A-factor는 γ -butyrolactone 계열의 신호 전달 물질로 세포 내에서 일정농도 이상이 되면 항생 물질 생산과 형태 분화에 필요한 유전자인 *adpA*의 전사를 억제하고 있던 ArpA(A-factor 결합 단백질)과 결합함으로써 ArpA가 *adpA*의 프로모터로부터 해리되어 *adpA*의 전사가 일어나도록 한다. 그 결과로 이차대사 및 분화와 관련된 하류 유전자들이 발현하게 된다. ppGpp는 대사과정 불균형으로 인해 생성되는 물질로 미생물의 성장 후기에 축적되어 항생물질 생산과 형태 분화를 조절하는 것으로 알려져 있다. 이외에도 *S. coelicolor* 에서 보고된 pathway-specific 조절유전자(*actII/ORF4*, *mmvR*, *redD*)와 global 조절유전자(*abaA*, *absA*, *absB*, *afsB*, *afsR*, *afsK*, *afsQ1/Q2*, *bldA,B,D,G,H,I,E,F*)등이 항생물질 생산을 조절하는 것으로 알려져 있다.
- 2) 일반적으로 항생물질 생산균주를 유전적인 manipulation을 통해 새로운 균주를 창출할 경우 목적 생산물의 수율이 감소한다는 것이 보고되어 있고 이러한 점에서 Kamaycin 생산균주 대사 재설계를 통하여 얻어질 Arbekacin 생산에 있어서의 수율 감소에 대처할 방안이 필요하다. 이를 위하여 우선 Kanamycin 생산 활성조절인자 분리 및 분석이 필요하였다. Kanamycin과 관련하여 알려진 global regulator나 pathway-specific 조절유전자는 알려져 있지 않으나 본 연구에 필요한 신규 조절 유전자원을 탐색하여 S-adenosyl methionine synthetase (SAM-s)가 *S. kanamyceticus* 산업균주에서 kanamycin 유사체들의 생산을 증대시키는 효과가 있음을 발견하였다.
- 3) 활성 조절기작 관련 유전자원으로서의 SAM-s의 효과를 좀 더 자세히 연구한 결과 방선균에 있어 기존의 A-factor나 ppGpp보다 광범위하고 높은 생산성을 유도할 수 있음을 발견하였다 (t서주원 외, FEMS Microbiol. Lett., 2004) (그림 8). 방선균은 현재 사용되고 있는 항생물질의 70%정도를 차지하는 중요한 미생물군으로, 본 연구진은 SAM의 처리가 조사된 20여 종 방선균 모두에서 항생물질의 생산을 촉진시키는 효과가 있는 것으로 확인하였다. 이는 SAM synthase를 방선균에서 광범위한 활성 조절 유전자원으로써 활용할 수 있음을 의미하고 산업적으로 큰 활용가치가 있어 유럽 등에 국제특허를 출원하였다 [국제특허 등록].

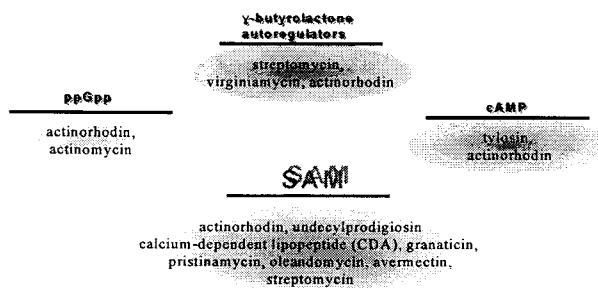


그림 9. SAM에 의한 광범위한 항생물질 생산 촉진 효과

제 4 장 사업개발목표의 달성도 및 대외기여도

제 1 절. 목표달성도 및 기여도

가. 개발목표 달성도

- 1) Arbekacin을 생물학적으로 생산하는 균주를 하이브리드 기술과 생체 대사 재설계 기술을 이용하여 생산하고자 Kanamycin 생합성 유전자군을 확보하였으며 [논문게재]와 본 균주에 대하여 유전자 조작 시스템을 확립하였다. Kanamycin B의 고생산 균주에 Sagamicin 생합성 유전자를 적용하여 Dibekacin을 생산을 유도하는 전략 수립을 완수하였다.
- 2) Butirosin 생합성 유전자군을 확보하고 이로부터 동정된 AHBA 전이유전자를 이용하여 Arbekacin의 생물학적으로 생산 기법을 확립하였다 [특허출원]. 그러므로 계획한 사업개발 목표를 달성하였다고 판단된다.
- 3) 하이브리드 항생물질 창출 후에 수율 감소를 방지하고자 생산조절 유전자원 탐색 중 SAM synthase가 이차 대사산물 생산과 형태분화에 관여함을 세계최초로 규명하여 기존의 연구목표에 더하여 실용화가치가 있는 기술개발과 특허 및 기술이전 등의 성과를 거두었다.

나. 기여도

- 기존에 알려진 A-factor나 ppGpp보다 광범위하고 높은 생산성을 담보할 수 있는 SAM synthase를 세계 최초로 규명하여 저명 국제학술지인 Journal of Bacteriology (2003)에 발표하였고 의약산업에 가치 있는 항생제 생산현장에 적용 가능한 기술임을 밝혔다 [국제특허출원 및 방송, 매체보도].

제 5 장 사업수행결과 활용계획 및 기대효과

제 1 절. 결과 활용계획

가. 아미노글라이코사이드 (AG) 계 항생물질 생합성 유전자원

- 1) 본 연구과제 수행 중 확보한 Kanamycin, Sagamicin, Butirosin 생합성 유전자원은 향후 본 과제 뿐 아니라 향후 국내에서 독자적인 연구로 세계적인 수준으로 기술력을 진보시키는데 일조할 수 있을 것으로 판단된다. 현재 선진국들은 주로 polyketide 나 peptide 등에 연구를 집중하고 있고 일부에서 당 또는 당을 포함하는 생리활성물질의 연구를 수행하고 있는 실정 이므로 AG 항생물질과 같이 당과 유사하나 aminocyclitol을 포함하면서 당과 특성이 다른 항생물질에는 아직 관심을 갖고 있지 않기 때문이다.
- 2) 당 구조에 의해 그 활성이 결정되거나 특이성을 갖는 아미노글라이코사이드계 항생물질뿐만 아니라 Acarbose와 같은 당뇨병치료제등의 경우에도 본 기술을 활용할 수 있다. 이를 통하여 활성이나 내성문제가 개선된 하이브리드 활성물질을 다양하게 개발하는데 활용할 수 있을 것으로 사료된다.
- 3) 본 연구진은 과제 종료이후에도 연구에 매진하여 상기 유전자원들을 활용한 AG 항생물질 개발을 계속적으로 수행할 것이다.

나. 아미노글라이코사이드 항생제 생산균주의 genetic manipulation system

- 1) 미국을 비롯한 선진국들이 생리활성물질 생합성 유전자원의 활용분야에서 현재와 같은 과학적인 지위에 올라설 수 있었던 것은 생리활성물질 생산미생물에 genetic level에서의 접근과 manipulation system개발에 집중한 까닭이다. 즉, 활용 측면에 중점을 둔 연구를 해온 것이다.
- 2) 이러한 점에 착안하여 본 연구진은 최종적으로 Arbekacin 생산 균주 창출에 사용될 Arbekacin 내성, Kanamycin 고생산 균주의 genetic manipulation system을 세계 최초로 개발하고 integration vector등의 도입에 성공하였다. 한 번 개발된 system은 향후 생합성 유전자원의 활용뿐만 아니라 유전자나 단백질 수준에서의 기능 규명에 폭넓게 활용될 것이다. Kanamycin 생합성 유전자군만 해도 49kb 정도에 65개 이상의 유전자들이 단백질을 지정하는 ORF로 나타났기 때문이다. 이러한 것을 신규한 단백질의 기능 규명 측면이나 metabolomics 측면에서 대사산물에 미치는 영향들을 연구하면 매우 흥미로운 뿐만 아니라 국내 관련 연구 분야의 수준도 한층 향상시킬 수 있을 것으로 판단되기 때문이다.

다. SAM synthase를 이용한 광범위한 방선균 이차대사산물 생산 촉진

- 하이브리드 항생물질 창출 후에 수율 감소를 방지하고자 기존에 알려진 A-factor나 ppGpp

보다 광범위하고 높은 생산성을 담보할 수 있는 SAM synthase를 세계최초로 규명하고 이러한 방선균에서의 이차대사산물 생산 촉진 기작이 의약산업에 가치 있는 항생제 생산현장에 적용 가능한 기술임을 확인하여 참여기업에 기술 이전하여 현장에서 활용토록 하였다. 그러나 이러한 기술의 활용이 기술 이전된 기업에만 국한되지 않고 널리 활용될 것으로 예상된다.

제 2 절. 기대효과

가. 생리활성물질 생산 미생물의 유전체 정보를 이용한 대사재설계 및 관련 기술의 활용

- 1) 본 연구진이 관심을 갖고 오랜 기간 노력을 경주한 아미노글라이코사이드계 항생물질은 선진 연구그룹들이 치열하게 경쟁하고 있는 polyketide계와 peptide계 항생물질에 관한 연구들과는 대상 항생물질과 접근방법에 차이가 있어 빠른 시간 내에 해당분야에서 국제적으로 경쟁력을 가진 연구그룹으로 부상할 가능성이 높다. 또한 특정분야에서 선도적인 위치를 점하게 되면 관련 연구 개발 선진 연구그룹과 대등한 입장에서 공동연구 개발 사업을 이끌어 낼 수 있는 위치가 확보될 것이다.
- 2) 본 기술은 하이브리드 아미노글라이코사이드계 항생물질과 항암물질 개발 분야 뿐만 아니라 6-deoxyhexose당을 포함하는 macrolide, polyether, ansamycin계 항생제 생산균주를 대상으로 당구조를 변화시켜 새로운 구조체의 항생물질 개발에 응용이 가능하고 아미노글라이코사이드계 항생제와 유사한 당구조를 가지고 있지만 생물학적 활성이 항균효과보다는 항혈전 치료제나 당뇨병치료제로 부가가치가 높은 물질의 창출에 효과적으로 이용이 가능하므로 기술개발에 따른 경제적 산업적 파급효과가 지대할 것으로 사료된다.

나. SAM synthase를 이용한 광범위한 생리활성 이차대사산물 생산 촉진기술

- 1) 기존에 알려진 A-factor나 ppGpp보다 광범위하고 높은 생산성을 담보할 수 있는 SAM synthase는 현재 항생제, 항암제, 면역억제제등의 상용화된 생리활성물질의 주요 원천인 방선균에서의 이차대사산물 생산 촉진 기작을 본 연구진의 독창적인 발견에 의해 의약산업 현장에 널리 상용화 되면 기존의 역가의 증대나 수율향상을 위해 많은 시간과 비용이 소비되던 상황에서 시간과 비용의 단축을 이끌어 낼 수 있을 것을 판단된다. 특히, 현재 산업현장에서 중국의 저가 공세 등으로 고전하는 상황에서 항생제 생산현장에 적용 가능한 관련 기술 개발로 SAM에 효과가 높고 부가가치가 높은 물질을 생산하는 미생물을 target으로 하여 연구개발한다면 효과를 극대화시킬 수 있을 것으로 판단된다.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	21세기 프론티어연구개발사업		
	세부사업명	미생물유전체활용기술개발사업		
과제명	하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin 생산 균주 개발			
연구기관	명지대학교	연구책임자	서주원	
총연구기간	2002년 10 월 1 일. ~ 2005년 3 월 31 일 (30개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	298,750	142,270	441,020	
기술분야				
참여기업	(주)비엔씨바이오팜			
공동연구기관				
위탁연구기관	(주)비엔씨바이오팜			
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전(√)	3. 후속연구추진(√)	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용(교육,연구)(√)	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2004 년 5 월 일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 서 주 원 (인)</p> <p style="text-align: right;">연구기관장 : 정 근 모 (직인)</p> <p>과학기술부장관 귀하</p>				

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

가. 연구목표

- 하이브리드 항생물질 개발기술을 이용하여 미생물유전체와 유전자를 재설계함으로써 AHBA 전이유전자를 *Streptomyces kanamyceticus* 산업균주에 도입한 균주로부터 Arbekacin의 생물학적 생산균주 개발

나. 연구내용

- 1) AHBA 전이 유전자를 활용한 Arbekacin 생산 기법 확립
- 2) *S. kanamyceticus*에서 Kanamycin B 생산을 위한 Kanamycin 생합성 유전자군 확보 및 유전자 조작시스템 확보
- 3) Dibekacin 생산을 위한 Sagamicin 생합성 유전자군 확보
- 4) *S. kanamyceticus* 로부터 Kanamycin 생합성 유전자원 및 조절 유전자원으로 SAM synhtase 확보 및 항생물질 생산 촉진 기작 연구
- 5) Bioassay와 HPLC를 이용한 신속한 아미노글라이코사이드 항생물질 계열별 검출 및 정제방법 확보

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
특허	10-2003-0026582	2003. 4. 26	서주원	대한민국	출원
특허	02758891.2-2405	2003. 12. 9	서주원	유럽	출원
특허	10/491,492	2004. 4. 1	서주원	미국	출원
특허	PCT/KR/01344	2002. 7. 16	서주원	PCT	출원
특허	10-2004-0007736	2004. 2. 6	서주원	대한민국	출원
특허	10-2004-0035453	2004. 5. 14	서주원	대한민국	출원
특허	10-2004-0105979	2004. 5. 15	서주원	대한민국	출원
특허	10-2004-0105980	2004. 12. 15	서주원	대한민국	출원

나. 프로그램 등록목록

다. 노하우 내역

- (1) 아미노글라이코사이드 (Aminoglycoside, AG)계 항생물질 생합성유전자를 선별적으로 분리할 수 있는 방법
- (2) *Streptomyces kanamyceticus* 의 genetic manipulation 방법
- (3) Kanamycin 생산균주의 mutation을 통한 항생제 역가 증대 및 항생제내성균주 제조 방법
- (4) AG 계 항생물질을 신속하게 검출하고 정제할 수 있는 방법
- (5) AG 계열 항생물질의 외부발현을 통한 활성 검증
- (6) S-adenosyl methionine (SAM)의 첨가를 통한 방선균에서 광범위한 항생물질 생산증대 기법
- (7) SAM synthetase의 발현에 의한 항생물질의 증대 방법

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제 목	게재연월일	호	발 행 기 관	국 명	SCI게재 여부
Journal of Bacteriology	Accumulation of S-Adenosyl-L-methionine Enhances Production of Actinorhodin but Inhibits Sporulation in <i>Streptomyces lividans</i> TK23	2003 년 1 월 15 일	185(2)	ASM (American society of Microbiology)	미 국	○
FEMS Microbiology Letters	Widespread activation of antibiotic biosynthesis by S-adenosylmethionine in <i>streptomycetes</i>	2004 년 9 월 15일	238	Federation of	Netherland.	○
Journal of Microbiology and Biotechnology	Isolation, Genetic organization of a 49.6kb Gene cluster for kanamycin biosynthesis from <i>Streptomyces kanamyceticus</i> and Characterization of kanamycin acetyltransferase	2005 년 4 월	게재예정	Korean society of Microbiology	대한민국	○
계 : 3 건						

○ 학술회의 발표 실적 (필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	발표일	장 소	발 행 기 관	국 명
Annual Meeting of Society of Industrial Microbiology	SAM is a Novel Intracellular Factor For The Regulation of Antibiotic Production and Cell Differentiation in Streptomyces	2003년 8월 10일	Hyatt Regency Hotel, Minoapolis	SIM	미국
13th International Symposium on the Biology of Actinomycetes	SAM is a Novel Intracellular Factor For The Regulation of Antibiotic Production and Cell Differentiation in Streptomyces	2003년 12월 1일	Melbourne convention center	ISBA	호주
13th International Symposium on the Biology of Actinomycetes	Methyltransferase involved in the Spectinomycin Biosynthesis also exerts self-resistance in <i>Streptomyces spectabilis</i> .	2003년 12월 1일	Melbourne convention center	ISBA	호주
13th International Symposium on the Biology of Actinomycetes	Effects of S-Adenosyl-L-Methionine(SAM) as a novel intracellular factor on antibiotics production and Morphological differentiation in <i>Streptomyces</i> sp.	2003년 12월 1일	Melbourne convention center	ISBA	호주
13th International Symposium on the Biology of Actinomycetes	Characterization and Isolation of O-carbamoyltransferase gene from <i>Streptomyces bluensis</i> .	2003년 12월 1일	Melbourne convention center	ISBA	호주
한국 생화학 분자생물학회	Isolation & characterization of acyl carrier protein involved butirosin biosynthesis in <i>Bacillus circulans</i> NCIMB 12336	2003년 4월 14일	서울대학교	한국 생화학분자생물학회	한국
한국방선균 생물학연구회(방선균분자생물학의 최근 동향 워크숍)	S-adenosyl-L-Methionine on antibiotics production and morphological differentiation in <i>Streptomyces</i> sp.	2003년 4월 21일	선문대학교	한국방선균생물학연구회	한국
2004 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	S-adenosylmethionine Activates Actinorhodin Biosynthesis by Interacting with Serine/Threonine kinase AfsK and Increasing ph	2004년 4월 13일	천안상록리조트	The Microbiological society of Korea	한국
2003 Annual meeting, BioExhibition & International symposium	S-adenosylmethionine is a Novel intracellular factor for the Antibiotic production and Morphological differentiation in <i>Streptomyces</i>	2003년 6월 24일	무주리조트 티롤호텔	Korean society for Microbiology and Biotechnology	한국

2003 International Symposium and Annual Meeting of the KSACB	Isolation and Characterization of Oxidoreductase and Dehydrogenase in the <i>sag</i> Genes of <i>Micromonospora sagamensis</i>	2003년 10월 23일	경기도 이천 지산리조트	한국농화학회	한국
2004년 한국응용생 명과학회 추계학술 대회	S - a d e n o s y l methionine, a novel intracellular factor for both cell differentiation and antibiotics production in <i>Streptomyces</i>	2004년 10월 21일	대천한화리 조트	한국응용생명과학회	한국
2004 Annual meeting & International symposium of the KMB	Function of S-adenosylmethionine on the Antibiotics production in <i>Streptomyces</i>	2004년 6월 21일	대구인터볼 고호텔	Korean society for Microbiology and Biotechnology	한국
2004 International Meeting of the Microbiological Society of Korea	S-adenosylmethionine Activates Actinorhodin Biosynthesis by Interacting with Serine/Threonine kinase AfsK and Increasing ph	2004년 월 일	천안상록리 조트	The Microbiological society of Korea	한국
계 : 13 건					

3. 연구성과

- 본 연구진은 ‘하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin 생산 균주 개발’ 과제를 수행하면서 Arbekacin 창출에 필요한 유전자원 확보 및 관련 기술 확립을 위해 노력한 결과 크게 세 분야에서 괄목할 만한 성과를 거두었다고 사료된다
- 첫 번째는 AHBA 전이유전자군을 포함하는 Butirosin 생합성 유전자군을 포함하여 3가지 이상의 항생물질 생합성 유전자군을 확보하였고 세계 최초로 Kanamycin 생산 균주에 대한 genetic manipulation system을 마련하는 등의 성과를 거두었다.
- 두 번째로 이러한 유전정보를 바탕으로 Arbekacin의 *in vitro* 생물학적 창출에 성공하였고 생성된 물질의 검출과 정제방법을 개발하였다.
- 세 번째로 창출된 Arbekacin의 생산 증대를 연구하던 중 발견된 S-adenosylmethionine synthetase에 의한 방선균에서의 광범위한 항생물질 생산 증대기술에 관련된 내용으로 본 연구는 세계적인 과학 잡지에 게재되었으며 해외 학술대회에 초청받아 여러 차례 강연 후 큰 관심과 호평을 받은 바 있다. 또한 국제특허와 국내언론 보도 등이 있었다. 무엇보다도 이러한 기술을 관련기업에 기술이전을 실시하였다.
- 종합적으로 본 연구를 통한 연구성과는 정량적으로 국내특허 5건, 국제특허 2건, SCI논문 3편, 국제학회 건 및 국내학회 건, 언론보도 5회, 기술이전 1 건 등의 성과가 있었다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획 (6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 연구를 통해 가장 중요한 성과로 평가할 수 있는 SAM관련 기술을 참여기업인 (주)B&C Biopharm.에 기술이전하여 현장에서 사용되게 하였다. 본 연구의 특징은 기존의 항생물질등을 생산하는 유용미생물 특히, 방선균에서의 생산성 증대기술이 기존의 방법으로는 한계에 이르러 날로 국제 경쟁력이 저하되고 있는 국내 현실에서 매우 중요한 기술로 평가받고 있으며 국제적으로도 2003년 호주에서 열린 국제 방선균 생물학회 (ISBA, 2004, Melbourne, 호주)에서 발표한 것과 같이 국내외에서 상당한 신성과 독창성을 갖고있는것으로 인정받고 있으며 산업적인 활용 및 응용가치가 매우 높기 때문이다.

본 연구과제의 연구결과들은 우리나라에서 독창적으로 진행할 수 있는 연구분야로 향후 당을 포함하는 모든 계열의 항생·항암물질 개발에 응용할 수 있다. 특히, 당 구조에 의해 그 활성이 결정되거나 특이성을 갖는 아미노글라이코사이드계 항생물질 뿐만 아니라 daunorubicin 과 같은 항암물질의 경우에도 본 기술을 활용할 수 있다. 특히, 최근 연구가 활발한 당뇨병 치료제나 면역억제제 개발에도 활용할 수 있을것으로 본 연구진은 판단하고 있으며 최종적으로 이를 통하여 활성이나 내성문제가 개선된 하이브리드 항생물질을 다양하게 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구진이 관심을 갖고 오랜 기간 노력을 경주한 아미노글라이코사이드계 항생물질은 선진연구그룹들이 치열하게 경쟁하고 있는 polyketide계와 peptide계 항생물질에 관한 연구들과는 대상 항생물질과 접근방법에 차이가 있어 빠른시간내에 해당분야에서 국제적으로 경쟁력을 가진 연구그룹으로 부상할 가능성이 높다고 판단하고 있다.

나. 활용방법

본 연구과제 결과에 대한 활용방법은 크게 두 가지로 나뉠 수 있다. 첫째, SAM관련 기술을 참여기업에 기술이전을 통해 현장에서 활용하도록 하고 지속적인 연구와 지원을 통해 더 폭 넓은 생리활성물질 예를 들면, 면역억제제, 당뇨치료제등으로 확대하여 생산성을 증대시키고 경제성을 제고할 수 있는 지를 확인하고자 한다. 이를 위하여 SAM을 통해 효과를 보인 방선균을 중심으로 면역억제제 생산균주, 당뇨병치료제 생산균주등을 입수하여 연구중에 있다. 두 번째는 arbeakcin의 생산 개법 및 기술을 응용하면 항생·항암물질 생산균주 개발, 유효성분의 선택적 생산에 의한 생산공정의 개선, 원가절감 등 산업현장에 실제로 필요한 중요한 기술로 활용 될 것이다. 특히, AHBA 전이유전자와 같이 본 연구를 통해 축적된 제반 핵심기술과 개발신약들은 국내 제약회사들의 기술력 확보 및 새로운 아이템(Item) 제공에 폭넓게 기여하도록 할 것이며 이를 통해 제약산업 기술개발 수준을 획기적으로 끌어올리는데 기여할 수 있을 것이다.

[향후조치]

본 연구를 통해 획득한 연구결과들은 이미 논문, 특허등을 통하여 게재된 것 이외에도 SAM관련 균주육종이나 SAM에 의한 조절 기작등을 추가로 연구에 매진하고 AG 항

생물질 생합성유전자와 대사재설계 기술을 이용한 획기적인 균주 육종방법에 관한 진척과 성과를 세계적인 수준의 논문에 게재하기 위해 노력을 경주할 예정이다. 예를 들면, sagamicin/gentamicin 생합성유전자 관련 유전자를 외부발현이나 hybrid 기술을 이용하여 dibekacin을 창출하는 것과 같은 결과물들이 예상된다. 이러한 연구가 성공한 후에는 고유의 물질특허나 독자적인 생산 공정 기술이 선진국에 비하여 적은 우리나라 실정에서 독창성있고 신규성을 갖추고 있는 과제에 대한 연구가 원활하게 이루어지도록 지원 해주시기를 바란다.

다. 3차년도이후 활용계획 (6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 연구진의 판단으로는 본 연구과제에서 수행된 연구결과들은 우리나라에서 독창적으로 진행할 수 있는 연구분야로 향후 SAM을 이용한 균주 육종이나 대사조절 및 재설계를 통한 유용물질의 생산에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 무엇보다도 Methyl group이 포함되어 있는 생리활성물질의 생산성 증대에 탁월한 효능을 보이고 있고 임상에서 상용화되어 사용되고 있는 생리활성 유용물질만 해도 10여종이 넘는 실정이다. 또한, 당을 포함하는 대부분의 항생·항암물질 개발에 응용할 수 있다. 특히, 당 구조에 의해 그 활성이 결정되거나 특이성을 갖는 아미노글라이코사이드계 항생물질 뿐만 아니라 daunorubicin 과 같은 항암물질의 경우에도 본 기술을 활용할 수 있다. 특히, 최근 연구가 활발한 당뇨병 치료제나 면역억제제 개발에도 활용할 수 있을 것으로 본 연구진은 판단하고 있으며 최종적으로 이를 통하여 활성이나 내성문제가 개선된 하이브리드 항생물질을 다양하게 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구진이 관심을 갖고 오랜 기간 노력을 경주한 아미노글라이코사이드계 항생물질은 선진연구그룹들이 치열하게 경쟁하고 있는 polyketide계와 peptide계 항생물질에 관한 연구들과는 대상 항생물질과 접근방법에 차이가 있어 빠른시간내에 해당분야에서 국제적으로 경쟁력을 가진 연구그룹으로 부상할 가능성이 높다고 판단하고 있다. 따라서, 본 연구진은 앞서 언급한 방선균에서 생산되는 면역억제제와 당뇨병치료제 생합성유전자군과 생산균주의 육종을 통한 유용물질 생산과 증대기술 개발에 매진할 것이다.

5. 기대효과

가. 기술적측면

기술적 측면에서 최근의 미생물관련 기술의 최대 현안은 유전체 분석을 비롯한 연구를 통해 쏟아지는 유전정보로부터 어떻게 단백질의 기능을 분석하고 밝혀진 유용유전자를 활용하는 가의 문제이고 또한나 이러한 유용유전자나 유용생리활성물질을 생산하는 미생물을 확보하고 활용하는가 이다. 이러한 측면에서 본 연구진은 vancomycin 내성 균주에 효과가 큰 반합성 항생물질 arbekacin을 생물학적 방법으로 생산할 수 있는 유용 생합성유전자를 확보하고 이들의 생산균주에 대한 manipulation방법을 연구하면서 독자적인 기술력을 확보하였고 분석 및 검출기술을 크게 향상시킨 것으로 판단하고 있다. 선진국의 관련 연구 group이 주로 PKS와 NRPS등에 연구를 주력하여 현재는 그 source가 국한되어 있는 상태에서 본 연구진이 AG계열 항생물질 관련연구를 독

자적으로 꾸준히 수행하여 기술력을 향상시키고 있어 향후 선진국에서 이러한 분야에 관심을 갖기 시작하더라도 충분히 경쟁할 수 있는 능력으로 향상되고 있다고 판단하고 있다. 또한, SAM을 이용한 항생물질 생산증대기술을 기존의 고전적인 방법에 의한 생산균주의 생산량과 역가 향상이 한계에 이른 국내 생물산업에 활력을 불어넣을 수 있는 기술로 판단된다. 특히, 중국이나 인도에서 저가의 의약품원료가 범람하는 현실에서 국내 기술은 이미 발효와 정제분야에서는 세계 정상급의 기술을 가지고 있으므로 역가 향상에 SAM관련기술을 적용하게 빠른 시간내에 역가향상을 가져온다면 유용 생리활성 물질의 고생산 공정 개발에 의한 발효산업 발전등의 큰 파급효과를 기대 할 수 있으며 향후 신약디자인에 의한 생물학적 생산에도 적용하여 활용가능한 독자기술로 판단된다.

나. 경제·산업적 측면

유용산업 균주개발에는 많은 시간과 돈, 연구인력이 필요하다. 그러나 중국, 인도등에서 값싼노동력등을 바탕으로 저가의 의약품원료를 내놓아 국내 생물산업에 큰 위기를 초래하고 있다. 이러한 현실에서 SAM 관련기술을 이용한 생리활성 물질 생산증대기술을 활용하여 부가가치가 큰 항생/항진균/항암물질 및 면역억제제, 당뇨병치료제 생산등에 활용한다면 경제적으로 이윤은 물론 국내생물산업에 큰 도움이 되리라 사료된다. 향후 세계 제약시장 판매규모는 연간 4,000억 달러 (480조원)의 거대시장으로 성장할 것으로 예상되고 있고 제약 산업의 경제·산업성만을 고려한다면, 대체 물질이 없고, 선진국형 질병 치료에 이용되고, 장기간 복용해야하는 약품 재료를 대상으로 선정해야 할 것이다. 또한, 현시점에서 미생물로부터의 생산 수율이 낮아 단가가 높을 수밖에 없는 물질이어야 한다. 이러한 요건을 고려하여 대상으로 선정할 수 있는 물질들은 예를들어 면역억제제인 FK506 (세계, \$800 million; 국내, 90 억원)등을 들 수 있다. 또한, arbekacin과 같은 효과가 입증된 아미노글라이코사이드계 항생물질을 디자인하고 생산을 창출할 수 있는 기술또한 산업적으로 매우 중요한 기술이다. 특히, 국내 항생물질은 1148개 품목에 9,600억원 시장으로 알려져 있고 이중에서 아미노글라이코사이드계 항생물질은 관련시장의 20%가량을 차지하고 있어 국내는 1,920억원, 세계적으로는 7.2조원의 시장을 점유하고 있는 실정으로 향후 vancomycin 내성세균등이 더 확산되어 이러한 균주내성을 극복할 수 있는 항생물질의 수요가 더 확대될 것은 너무나 분명하기 때문이다. 기존의 방법으로 일반적인 신규 항생물질의 탐색과정은 수천 종의 토양미생물 및 식물을 탐색할 때 소요되는 시간, 노력, 비용만도 엄청나지만 그렇게 탐색된 신물질이라도 약리작용 및 독성실험이 완료되기 전까지는 신약으로서 성공가능성을 전혀 예측할 수 없다. 본 연구에서 언급한 아미노글라이코사이드계 항생물질의 경우 넓은 항균 작용 spectrum 과 강한 살균작용으로 감염증 치료제로 널리 이용되고 있으며 β -lactam 계열 항생물질에 대한 내성과 methicillin 내성균에 의한 저항성 문제를 해결 할 수 있는 대안으로 제시되고 있다.

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재) 없음

기술 요약서

■ 기술의 명칭

S-Adenosylmethionine synthetase 발현에 의한 항생물질 생산 촉진 기술

※기술이란? 과제 수행결과 확보된 신기술, 산업재산권, 기술적 노하우 등 개발된 성과중 수요자에게 공급할 수 있는 형태의 기술을 의미함

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	MG02-0302-005-1-0-0			
과제명	하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin 생산 균주 개발			
사업명	미생물유전체활용기술개발사업			
세부사업명	하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin 생산 균주 개발			
연구기관	명지대학교	기관유형	대학	
참여기관(기업)	(주)비엔씨바이오팜			
총연구기간	3 년			
총연구비	정부(298,750)천원 민간(142,270)천원 합계(441,020)천원			
연구책임자 1	성명	서주원	주민번호	
	근무기관 부서	명지대학교 생명과학과	E-mail	jwsuh@mju.ac.kr
	직위/직급	교수	전화번호	031-330-6190
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	서주원	소속/부서	명지대학교 생명과학과
	직위/직급	교수	E-mail	jwsuh@mju.ac.kr
	전화번호	031-330-6190	FAX	031-336-0870
	주소	(449-728) 경기도 용인시 남동 산 38-2 명지대학교 백마관 2229호		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

S-adenosylmethionine(SAM) synthetase의 발현 또는 SAM의 첨가에 의해 방선균에서의 향생물질 생산량을 증대시키는 기술

<기술적 특징>

- (1) 본 기술은 주로 methyl donor로 알려진 SAM synthetase가 발현될 경우 *Streptomyces*에서의 향생물질 생산량을 증대시킬 수 있음
- (2) 특히, methyl group이 많이 포함되어 있는 향생물질 일 수록 효과가 좋은 것으로 나타나있으며 생산량 증대정도는 2~5배 임.
- (3) methyl group이 포함되어 있지 않아도 효과가 있음.
- (4) SAM의 발현기술은 자체 promoter 또는 항시발현 promoter를 이용할 수 있으며 SAM을 물질로서 외부 첨가로도 가능함

[용도·이용 분야]

- (1) 방선균에서 생산되는 생리활성물질의 생산 증대시
- (2) 유용물질 생산균주의 균주육종을 통한 수율 증대
- (3) 상기 미생물의 대사공학 및 유전공학을 통한 균주 육종

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	대사경로 재설계와 hybrid 기술을 이용한 dibekacin의 <i>Streptomyces lividans</i> 에서의 생산 기술 개발
개발단계	<input checked="" type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	본 연구를 통해 확인된 dibekacin 생산관련 유전자원을 활용하여 방선균에서의 생리활성물질 생산에 활용되는 <i>S. lividans</i> 을 이용하여 발현을 통하여 생산하는 기술을 세계 최초로 개발하는데 응용하고자 한다.

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호	MG02-0302-005-1-0-0			
과제명	하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin 생산 균주 개발			
사업명	미생물유전체활용기술개발사업			
세부사업명	하이브리드 항생물질 개발 기술을 이용한 균주 재설계로 Arbekacin 생산 균주 개발			
연구기관	명지대학교	기관유형	대학	
참여기관(기업)	(주)비엔씨바이오팜			
총연구기간	3 년			
총연구비	정부(298,750)천원 민간(142,270)천원 합계(441,020)천원			
연구책임자	소 속	명지대학교	성 명	서 주 원
	전화번호	031-330-6190	E-mail	jwsuh@mju.ac.kr
연구개발 주요내용				
<p>Dibekacin은 kanamycin B에서 3',4'-deoxy 형태의 반합성 항생물질로 이러한 구조를 형성할 가능성이 높은 유전자 source는 gentamicin계열의 sagamicin 생합성유전자에서 찾아볼 수 있다. 본 연구진은 과제수행중 <i>Micromonospora sagamiensis</i>로 부터 sagamicin 생합성유전자군을 확보한 바 있으며 기능분석을 통하여 dibekacin 생산 및 sagamicin backbone형성에 관여하는 유전자를 확보하고 있다. 그러므로, 이를 <i>Streptomyces lividans</i>와 같은 방선균에서 항생물질 생합성유전자군을 발현에 의한 생산을 통하여 본 유전자군의 기능을 증명함과 동시에 dibekacin의 생물학적 창출연구에 활용하고자 한다. 이와 같은 방법은 Kwon등 [Science, 2002]에 의해 polyketide인 nonactin에 적용된 바 있으나 AG계열의 항생물질에 대해서는 수행된 바 없다.</p>				

제 6 장. 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

최근 전체 유전체 염기서열이 밝혀진 *Streptomyce coelicolor* A3(2)의 경우 이미 5가지 종류의 항생물질이 알려져 있었으나 추가로 10가지 이상의 2차대사산물들이 생합성될 것으로 예상되었다 (Nature, 2002). 물론 이들이 직접 생산 되는지는 확인되지 않았으나 이러한 경우와 마찬가지로 다른 방선균들에서도 이미 알려진 생리활성물질 이외에 추가적으로 여러 생리활성물질을 만들어낼 것으로 예상하고 있으며 이러한 것과 함께 아직 탐색되지 않은 희귀방선균, 해양미생물 등에서는 더 많은 신규구조나 활성을 가지는 신물질이 분리될 것으로 예상되고 있으며, 이들로부터 생산된 신규한 구조나 활성을 가지는 생리활성물질 생합성유전자에 대한 연구가 더 활발해질 것으로 판단된다. 이들에서 생산되는 물질을 전체적으로 규명하는 metabolomics가 functional genomics, proteomics와 함께 증가할 것으로 예상된다.

대사공학의 발달과 대사분석 및 재설계 기술의 발달에 의해 방선균의 생합성유전자를 대장균에서 발현시켜 생산하는 연구도 수행되었는데 대표적인 것이 Khosla 등에 의해 수행된 Erythromycin aglycone의 대장균 내에서 생산이다. Erythromycin PKS는 발현시 1,082KDa의 거대단백질인데 이에 대한 거대 유전자군을 대장균내에 도입·발현시킬 뿐만 아니라 전구체를 제공하는 propionyl-CoA carboxylase와 Holo-ACP의 작용을 돕는 Sfp를 동시에 발현시켜 성공할 수 있었다. 이러한 전략은 Ansamycin계열 항생물질 전구체 생산에도 적용되었다 (PNAS, 2003).

Hybrid 항생제 개발기술을 이용한 새로운 구조의 항생물질 개발은 주로 polyketide 계열과 peptide 항생물질에 집중되어 있는데 이는 이들 항생제 생합성 경로에 대한 분자유전학적 연구가 활발히 진행되는데 기인한다. 최근 들어 가장 주목되는 것은 이전의 연구가 aglycone에 집중된 것에 비해, 현재는 glycone moiety의 생합성 경로와 당 전이효소에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다는 것이다. 대표적인 것으로 영국의 Cundliffe에 의해 수행된 *Streptomyces narbonensis* (narbomycin producer)로부터 aminohexose 변형유전자군을 이용하여 *Streptomyces fradiae* (tylosin producer)에서 deoxyaminohexose를 생산하도록 하는데 성공 (Nature Biotechnol., 2002) 한 것 등이 주목할 만하며 미국 Texas대학의 Liu 그룹의 Desosamine생합성 효소들의 기질특이성에 대한 연구등이 주요 연구성과로 평가된다. 또한, 하버드 대학 Walsh 그룹이 수행한 Epivancosamine에 대한 생합성연구(PNAS, 2000)도 주목받을만하다. 동시에 신규한 구조의 항생 및 항암물질 연구도 진행되었는데 Thorson 등에 의해 연구된 Eneidyne 계열 항암물질 Calcheamicin (Science, 2002) 연구나 미국의 Khosla등에 의해 연구된 Myxobacteria 유래 항암제 Epothilone 관련 연구 (Science, 2000)도 매우 흥미롭다. Hutchinson등은 항암제 Gendanamycin 관련 생합성 유전자군 (FEMS Microbiol. Lett. 2003)과 그 응용에 관련한 연구 (Chem. Biol. 2004)를 수행하였는데 이러한 일련의 연구는 주로 PKS 구조의 항암물질에 집중하고 있는 것을 알 수 있다.

두드러진 최근의 연구동향은 기존의 방선균을 중심으로 한 생리활성물질 생합성유전자 군의 연구에서 벗어나 해양미생물이나 공생미생물등으로 다양해지고 있는 것이다. 대표적인 것이 독일의 Piel등은 해면동물 *Theonella swinhoei*의 공생미생물로부터 Pederin과 딱정벌레에서 분리된 *pseudomonas*계열의 공생미생물에서 분리되는 Onnamide라는 polyketide계열의 항암물질 생합성유전자를 확보하고 기능을 분석하여 발표하였다 (PNAS, 2004) (그림 10). 또한, 미국의 Sherman group에서도 Bryostatin의 생합성유전자에 관한 연구를 보고하였다 (Chem. Biol., 2004).

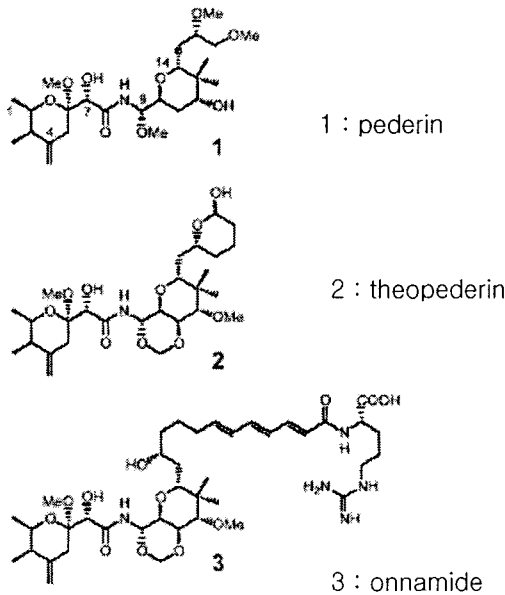


그림 10. 해양공생미생물에서 발견된 pederin과 onnamide계열 항암제

그러나, 아직 Polyketide, NRPS 생산균주의 manipulation에 국한하여 연구가 진행되고 있으나 일본과 독일뿐 아니라 스페인등에서 당뇨병치료제나 아미노글라이코사이드계 항생물질, 당을 포함한 항암물질에 대한 연구를 수행하고 있다.

지구 상에는 아직까지 우리가 밝혀 내지 못한 많은 생리활성물질들이 존재하고 이러한 것들중 생리활성이 있는 신규물질을 탐색하고 그 화학적 성질을 규명하는 것은 새로운 세기에는 이전보다 더 큰 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 기대되며 human genome sequence information을 통한 최신의 세포, 분자생물학의 정보 및 기법에 입각한 효율적이고 신속한 assay system을 통한 신물질탐색 경쟁은 더 치열해질 전망이다. 이후 발견되는 생리활성물질을 생산하는 미생물이나 그 생합성유전자의 활용과 생산균주의 육종이 중요한 과제로 부각될 전망이다.

제 7 장 참 고 문 헌

Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). 2002, Nature. 417(6885) : 141-7.

Borisova SA, Zhao L, Sherman DH, Liu HW. Biosynthesis of desosamine: construction of a new macrolide carrying a genetically designed sugar moiety. Org Lett. 1999, 1(1):133-6

Borisova SA, Zhao L, Melancon III CE, Kao CL, Liu HW. Characterization of the glycosyltransferase activity of desVII: analysis of and implications for the biosynthesis of macrolide antibiotics. J Am Chem Soc. 2004. 126(21):6534-5.

Cane DE, Walsh CT, Khosla C. Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. Science. 1998. 282(5386):63-8

Cheng YQ, Tang GL, Shen B. Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. J Bacteriol. 2002. 184(24):7013-24

Du L, Sanchez C, Chen M, Edwards DJ, Shen B. The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. Chem Biol. 2000. 7(8):623-42.

Hildebrand M, Waggoner LE, Liu H, Sudek S, Allen S, Anderson C, Sherman DH, Haygood M. bryA: an unusual modular polyketide synthase gene from the uncultivated bacterial symbiont of the marine bryozoan *Bugula neritina*. Chem. Biol. 2004. 11(11):1543-52.

Hutchinson CR. Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: falling together by coming apart. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2003. 100(6):3010-2

Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Sakaki Y, Hattori M, Omura S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* 2003. 21(5):526–31

Kwon HJ, Smith WC, Scharon AJ, Hwang SH, Kurth MJ, Shen B. C–O bond formation by polyketide synthases. *Science.* 2002. 297(5585):1327–30

Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G, Marinelli F. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2001. 79(3–4):399–405.

Patel K, Piagentini M, Rascher A, Tian ZQ, Buchanan GO, Regentin R, Hu Z, Hutchinson CR, McDaniel R. Engineered biosynthesis of geldanamycin analogs for Hsp90 inhibition. *Chem. Biol.* 2004, 11(12):1625–33

Pfeifer BA, Admiraal SJ, Gramajo H, Cane DE, Khosla C. Biosynthesis of complex polyketides in a metabolically engineered strain of *E. coli*. *Science.* 2001. 291(5509):1790–2

Piel J, Hui D, Wen G, Butzke D, Platzer M, Fusetani N, Matsunaga S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004. 101(46):16222–7

Sanchez C, Du L, Edwards DJ, Toney MD, Shen B. Cloning and characterization of a phosphopantetheinyl transferase from *Streptomyces verticillus* ATCC15003, the producer of the hybrid peptide–polyketide antitumor drug bleomycin. *Chem Biol.* 2001. 8(7):725–38.

Shen B, Du L, Sanchez C, Edwards DJ, Chen M, Murrell JM. Cloning and characterization of the bleomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *J. Nat. Prod.* 2002. 65(3):422–31.

Shen B, Du L, Sanchez C, Edwards DJ, Chen M, Murrell JM. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide–polyketide natural product biosynthesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2001, 27(6):378–85.

Tang L, Shah S, Chung L, Carney J, Katz L, Khosla C, Julien B. Cloning and

heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science*. 2000. 287(5453):640-2

Tang GL, Cheng YQ, Shen B. Leinamycin biosynthesis revealing unprecedented architectural complexity for a hybrid polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase. *Chem Biol*. 2004. 11(1):33-45.

Watanabe K, Rude MA, Walsh CT, Khosla C. Engineered biosynthesis of an ansamycin polyketide precursor in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003. 100(17):9774-8