

Stimulation of Actinorhodin Production by *Streptomyces lividans* with Chromosomally-Integrated Antibiotic Regulatory Gene, *afsR2*

김창영, 박현주, 김응수*

인하대학교 생물공학과 미생물분자생물공학실험실

전화 (032) 860-8835, FAX (032) 872-4046

ABSTRACT

Streptomyces lividans is one of the most commonly-used streptomycetes strain as a molecular cloning and expression host. Unlike its close relative *S. coelicolor*, however, *S. lividans* rarely produces secondary metabolite such as actinorhodin in a typical glucose-containing culture condition, due to insufficient expression of some antibiotic regulatory genes including *afsR2*⁶⁾. Although multiple copies of *afsR2* or a glycerol-specific culture condition stimulated actinorhodin production in *S. lividans*, both failed to stimulate actinorhodin production in *S. lividans* cultured in a typical glucose-containing medium. To generate a culture-condition-independent actinorhodin-overproducing *S. lividans* strain, the *afsR2* gene was integrated into the *S. lividans* TK21 chromosome via homologous recombination, followed by the genetic confirmation. This *S. lividans* strain produced a significant amount of actinorhodin in both glucose-containing liquid and plate cultures, with higher actinorhodin productivity compared to the *S. lividans* containing multiple copies of *afsR2*. These results suggest that a chromosomal integration of a single copy of an antibiotic regulatory gene is a promising method for the development of a stable antibiotic-overproducing streptomycetes strain.

서론

Streptomycetes는 특이적인 morphological differentiation과 매우 다양한 secondary metabolites를 생산하는 Gram-positive filamentous soil bacteria로 알려져 있다¹⁾. 현재 사용되는 미생물 유래 항생제의 약 70% 정도가 streptomycetes가 속해있는 actinomycetes로부터 만들어 진다²⁾. 이렇게 다양한 streptomycetes 중에서도 *S. coelicolor*는 유전학적 및 생화학적으로 가장 연구가 많이 진행되어져 있으며, actinorhodin, undecylprodigiosin, CDA, methylenomycin과 같은 화학적으로 서로 다른 4가지의 항생제를 만들어낸다고 알려져있다. 특히 actinorhodin의

생합성과 조절기작은 분자유전학적인 수준에서 이미 규명되었다³⁾.

*S. lividans*는 *S. coelicolor*와 유전학적으로 매우 유사하며 actinorhodin 생합성에 필요한 모든 유전정보를 가지고 있지만 일반적인 성장조건에서는 항생제를 생산하지 못한다. 또한 *S. lividans*는 streptomycetes cloning과 expression을 위한 host로 사용되고 있다. 특히 *S. lividans*는 global regulatory gene인 *afsR2* gene을 분리하는데 유용한 host로 사용되었고, 이 *afsR2* gene을 *S. lividans*에 multiple copies로 도입하였을 때 actinorhodin 생합성을 촉진시키는 효과를 보였다⁴⁾. 이 *afsR2* gene은 *S. coelicolor*의 *afsS* gene과 매우 유사하고 63개의 아미노산으로 되어있으며 *afsR* gene의 3' 바로 다음에 위치하고 있다⁵⁾. 아직 정확한 기능이나 조절기작이 밝혀지지 않았지만, 특정 성장조건에서 *afsR2* gene을 over-expression시켰을 때 actinorhodin의 생산이 촉진된다는 연구보고가 있었다⁶⁾. 하지만 *S. lividans*에서 *afsR2* gene의 발현을 통한 actinorhodin overproduction은 glycerol을 탄소원으로 한 minimal plate medium과 같은 특정성장조건에서만 가능하다⁶⁾. 때문에 plasmid를 사용하지 않고 성장조건에 크게 영향을 받지 않는 antibiotic overproduction strain의 제작은 다방면에서 매우 유용하게 사용되어질 것이다.

본 연구에서는 *S. lividans* strain의 chromosomal DNA에 *afsR2* gene을 homologous recombination을 통해 integration시켰다. 그 결과 일반적인 liquid나 plate 성장조건에서 *afsR2* gene이 chromosomal DNA에 도입된 *S. lividans* strain의 actinorhodin 생산성이 actinorhodin-overproduction strain인 *S. coelicolor*의 생산수준만큼 크게 향상되는 것을 볼 수 있었다. 이는 regulatory gene의 chromosomal integration이 좀 더 안정적인 antibiotics-overproducing streptomycetes strain을 개발하는 방법임을 제시한다.

재료 및 방법

S. lividans TK21 chromosome에 *afsR2* gene을 integration시키기 위하여 template로 *S. lividans* TK21의 total chromosomal DNA를 사용하여 *afsR2* gene의 promoter를 포함한 하나의 완전한 open reading frame을 증폭하였다. Polymerase chain reaction(PCR)을 수행하기 위하여 primer(*Bam*HI-containing forward primer *afsR2*-1:5'-GGATCCGTCGACCGGTGGCCGGG-3'; *Pst*I-containing reverse primer *afsR2*-2S:5'-CTGCAGGGTCACCGTCCCCGCGGACG-3')를 제작하였으며, Rapid Thermocycler(Idaho technology, USA)를 이용하여 denature(96°C, 30초), annealing(40°C, 30초), extension(72°C, 35초) 조건으로 PCR을 수행하였다⁷⁾. 증폭된 0.58-kb *afsR2* gene fragment를 pGEMT plasmid(Promega, USA)에 cloning하여 sequencing으로 확인하였다. 그런 다음에 0.58-kb *Bam*HI and *Pst*I fragment를 streptomycetes-*E. coli* shuttle vector인 pWHM3 plasmid에 thiostrepton promoter의 반대방향으로 subcloning하여

'pESK206'이라고 명명하였다. 이 pESK206 plasmid를 PEG를 이용한 protoplast transformation을 통해 *S. lividans* TK21에 도입한 후에 thiostrepton antibiotic selection을 이용하여 integrated strain을 선별하였다⁷⁾.

결과 및 고찰

pESK206 plasmid를 *S. lividans* TK21에 transformation한 뒤에 pESK206이 integration된 *S. lividans* strain을 선별하여 '*S. lividans* ESK206'이라고 명명하였다. 이 *S. lividans* ESK206 strain은 R2YE plate medium에서 매우 왕성한 성장과 sporulation을 이루었다. 뿐만 아니라 *S. lividans* ESK206 strain은 몇 번의 regeneration 후에도 plate 상에서 actinorhodin으로 보이는 blue-pigment의 양이 actinorhodin을 overproducing하는 *S. coelicolor* strain 수준으로 증가하였다(Fig. 1). *S. lividans* ESK206 chromosome에 *afsR2* gene이 integration되었는지 유전학적으로 확인하기 위해 *S. lividans* ESK206 strain의 total chromosomal DNA를 template로 사용하고 *afsR2* gene의 internal region을 증폭하기 위한 primer pair #1(control)과 plasmid region과 chromosomal region을 증폭하기 위한 primer pair #2를 제작하여 PCR analysis를 수행하였다(Fig. 2a). 그 결과 primer pair #1을 사용하였을 때 *S. lividans* TK21과 *S. lividans* ESK206에서 모두 0.58-kb의 DNA fragment가 chromosome으로부터 증폭되었다. 그러나 primer pair #2를 사용하였을 때에는 오직 *S. lividans* ESK206에서만 약 0.6-kb의 DNA fragment가 chromosome으로부터 증폭되었다. 이는 *S. lividans* ESK206이 homologous recombination을 통해 *S. lividans* TK21 chromosome에 pESK206이 안정적으로 integration되었음을 뜻한다(Fig. 2b). *S. lividans* ESK206 strain은 thiostrepton 없이 반복적인 배양을 수행하여, pESK206 plasmid가 extra copies로 존재하지 않음을 확인하였다(data not shown).

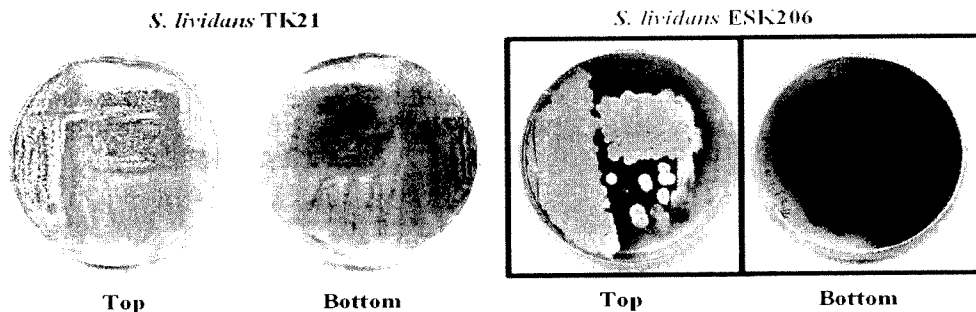


Figure 1. Actinorhodin production by the wild-type *S. lividans* TK21 (left) and the *S. lividans* ESK206 (right). Each strain was streaked on R2YE media plate, followed by a week of incubation at 30C. Each plate was placed upside down for ammonia fuming as well as photography.

afsR2 gene이 multiple copies(pESK206)로 *S. lividans* TK21에 도입된 것과 *afsR2* gene이

integration된 *S. lividans* ESK206의 정량적인 비교를 위하여 각 strain을 25ml R2YE liquid medium에 30°C에서 12일 동안 culture하여 2일마다 sampling하여 actinorhodin의 양과 dry cell weight을 분석하였다. 그 결과, *S. lividans* ESK206이 pESK206가 도입된 *S. lividans* TK21보다 2일정도 빠르게 actinorhodin을 생산하기 시작하였으며, actinorhodin의 생산성은 *S. lividans* ESK206이 평균 37.5%나 높게 유지하였다(Fig. 3). 또한 pWHM3 plasmid만이 포함된 *S. lividans* TK21은 같은 기간동안에 actinorhodin을 생산하지 못했다(Fig. 3). 이러한 결과들은 antibiotics regulatory gene의 chromosomal integration이 좀 더 안정적이고 우수한 antibiotic-overproducing streptomycetes strain의 개발 방법임을 제시한다.

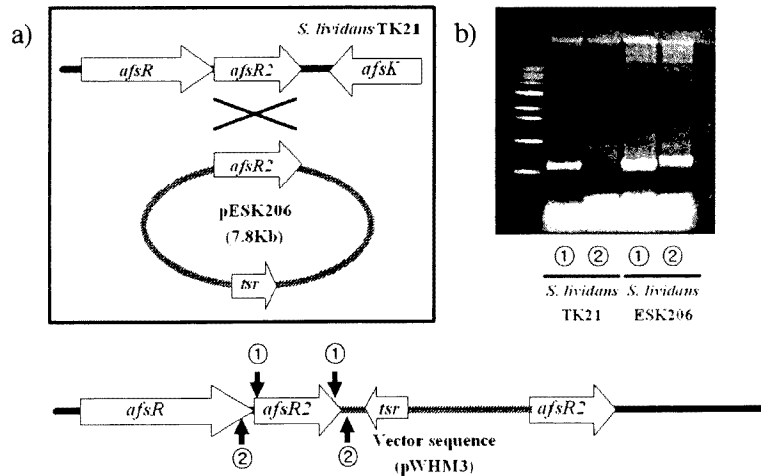


Figure 2. a. Schematic presentation of pESK206 integration into the *S. lividans* Tk21 chromosome via *afsR2* homologous recombination. The small arrows with number 1 and 2 indicate the locations of PCR primers. b. PCR-amplified fragments in EtBr-stained 1.5 % agarose gel: lane 1, molecular weight size marker (*JHind*III) lane 2, *S. lividans* TK21 with the primer #1; lane 3, *S. lividans* TK21 with the primer #2; lane 4, *S. lividans* ESK206 with the primer #1; lane 5, *S. lividans* ESK206 with the primer #2.

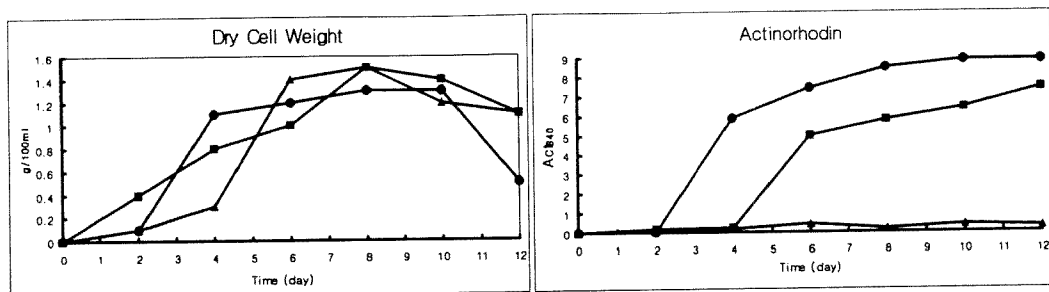


Figure 3. Measurement of dry cell weight(left) and actinorhodin production (right) in R2YE liquid culture by pWHM3-containing *S. lividans* (▲), pESK206-containing *S. lividans* (■), and *S. lividans* ESK206 (●).

참고문헌

1. Chater, K.F., 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. Annu. Rev. Microbiol. 47, 685-713.
2. Chater, K.F., Bibb, M.J., 1997. Regulation of bacterial antibiotic production. In: Kleinkauf, H., von Dohren, H. (Eds.), Products of Secondary Metabolism, Biotechnology, 7. Weinheim, Germany: VCH, pp. 59-105.
3. Huang, J., Lih, C.-J., Pan, K.-H., Cohen, S.N., 2001. Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. Genes & Development 15, 3183-3192.
4. Vöggtli, M., Chang, C., Cohen, S.N., 1994. *afsR2*: a previously undetected gene encoding a 63-amino-acid protein that stimulates antibiotic production in *Streptomyces lividans*. Mol. Microbiol. 14, 643-653.
5. Umeyama, T., Lee, P.-C., Horinouchi, S., 2002. Protein serine/threonine kinase in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 419-425.
6. Kim, E.-S., Hong, H.-J., Choi, C.-Y., Cohen, S.N., 2001. Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of *afsR2* gene transcription. J. Bacteriol. 183, 2198-2203.
7. Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Keiser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., Schrepf, H., 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual, John Innes Foundation, Norwich, UK.