

抗生物質生産菌의 蛋白質合成系阻害抗生物質에 대한 自己耐性機構와 生合成遺傳子

白舜英 · 杉山政則* · 梁漢喆
高麗大學校 農科大學 食品工學科
* 廣島大學 工學部 醱酵工學科

Mechanisms of Self-protection and Genes Coding for Antibiotic Biosynthesis, Particularly, in Microorganisms which Produce Antibiotic Inhibitors of Protein Synthesis

Soon-Young, Paik *Masanori Sugiyama and Han-Chul Yang

Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University, Seoul 132, Korea

* Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University, Saijo-Cho, Higashi-Hiroshima 724, Japan

Abstract

Streptomycetes are attractive microorganisms for their production of various secondary metabolites such as antibiotics. Now, the development of gene manipulation in this microorganisms enables the cloning and analysis of the genes which coding for antibiotic biosynthesis and resistance to the drug. In this article, we reviewed the studies with respect to the mechanisms of self-protection and cloning of the genes condong for antibiotic biosynthesis, particularly, in microorganisms which produce antibiotic inhibitors of protein synthesis.

서 론

抗生物質의 出現은 細菌感染症의 治療面에 있어서 貢獻해 왔으나 抗生物質의 使用이 擴大됨에 따라서 病原菌의 耐性獲得이 問題로 提起되었다. 이와같은 藥劑耐性菌에 有效한 새로운 抗生物質을 開發하기 위하여는 우선 耐性 mechanism을 究明할 必要가 있다. 代表的인 耐性 mechanism으로는 ① ribosome 耐性 ② 膜透過抑制(transport barrier) ③ 不活化酵素(inactivating enzyme) 生産等이 알려져 있으며 이들은 複合적으로 作用하는 경우도 있다. 또한 修飾酵素에 의하여 抗生物質이 不活化

되거나, ribosome이 耐性化되면 transport도 抑制되는 synergistic effect도 알려져 있다. 한편, 이와같은 抗生物質을 生産하는 生産菌은 當然히 自身の 生命을 維持하며 生育하여 抗生物質의 生産을 繼續하는 것은 興味있는 일이다.

本論文에서는 抗生物質生産菌의 70% 以上을 차지하고 있는 放線菌, 그 中에서도 特히 蛋白質合成系에 作用하는 抗生物質生産菌을 中心으로 自己防禦 mechanism과 抗生物質生合成遺傳子の cloning에 關하여 考察한다.

I. ribosome 耐性

蛋白質合成은 ribosome과 蛋白質로 構成되어 있는 細胞顆粒에서 이루어진다. 抗生物質中에는

1988년 9월 5일 수리
Corresponding Author: S.Y. Paik

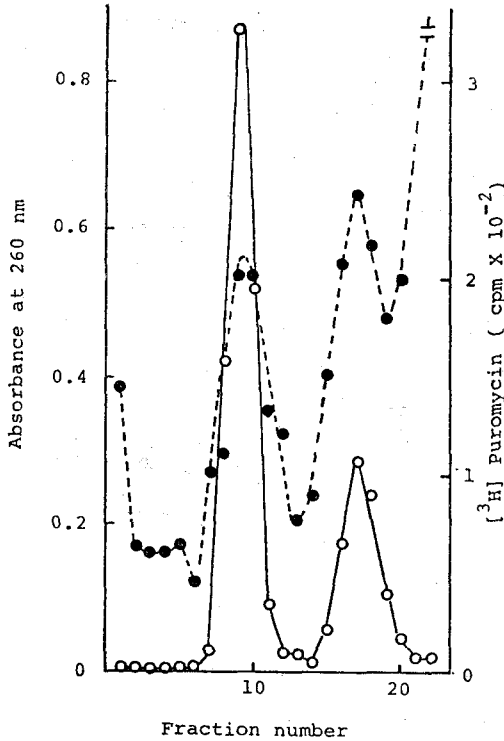


Fig. 1. Binding of [³H] puromycin to ribosomal subunits from *S. alboniger* ○—○: A₂₆₀ ●—● : radioactivity of [³H] puromycin

aminoglycoside 系, tetracycline 系, chloramphenicol 系, macrolide 系, lincomycin 系, nucleoside 系의 puromycin, blasticidin S 등이 蛋白質合成系에 一次作用點을 갖고 있다.

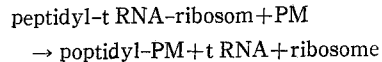
上記와 같은 抗生物質을 生産하는 放線菌은 菌糸의 分岐 및 菌菌糸形成과 같은 點에서는 糸狀菌과 類似하나, ribosome이 70 S type이며, 核膜이 없는 點에서 分類學上으로는 細菌群에 位置한다. 따라서 細菌型 ribosome을 保有하고 있는 抗生物質生産性放線菌의 蛋白質合成系의 ribosome이 自己生産抗生物質에 對해서 耐性인가 아닌가는 重要한 點이다(Table 1).

最近, *S. azureus*,¹⁾ *S. erythreus*,^{2, 28, 29)} *S. bernensis*,³⁾ *S. actuosus*⁴⁾의 ribosome 耐性化 mechanism이 밝혀졌다. 즉, 50 S ribosome subunit 生成過程中 23S r-RNA가 methyl化 됨에 따라 最終적으로 生成된 ribosome에는 自己生産抗生物質의 結合이 不可能해 진다. 따라서 生産菌의 蛋白質合成系는 阻害를 받지 않게 된다. 이와는 反對로 生産菌中에는 自己生産抗生物質에 對해서 自身

Table 1. 抗生物質生産菌 ribosome의 自己生産抗生物質에 對한 舉動

Strain	Antibiotic	Susceptibility of ribosome
<i>S. azureus</i>	Thiostrepton	Resistant
<i>S. bernensis</i>	Berninamycin	"
<i>S. tenjimariensis</i>	Istamycin	"
<i>S. erythreus</i>	Erythromycin	"
<i>S. actuosus</i>	Noshiheptide	"
<i>S. tenebrarius</i>	Nebramycin	"
<i>S. sp. 3022a</i>	Chloramphenicol	Susceptible
<i>S. aureofaciens</i>	Tetracycline	"
<i>S. griseus</i>	Streptomycin	"
<i>S. fradiae</i>	Neomycin	"
<i>S. kanamyceticus</i>	Kanamycin	"
<i>S. alboniger</i>	Puromycin	"
<i>S. morookaensis</i>	Blasticidin S	"

의 ribosome은 感受性인 경우가 있다. nucleoside 系 抗生物質의 하나인 puromycin(PM)은 *S. alboniger*에 의하여 生産된다. PM의 作用 mechanism은 蛋白質合成中の elongation 反應阻害로 알려져 있다. 즉 PM의 構造는 蛋白質合成中の 中間體인 aminoacyl-t RNA의 amino acid 未端과 類似하여 ribosome과 結合하고 있는 aminoacyl-t RNA 대신에 PM이 peptide chain과 結合하게 된다. 이 反應...은 ribosome과 結合하지 못하고 遊離하게 되므로 結果의으로는 完全한 蛋白質이 合成되지 못한다. 이 反應은 PM 反應이라고 불리우며 다음 式으로 表示된다.



筆者들은 PM이 *S. alboniger* ribosome의 30S, 50S subunit 兩쪽에 結合하는 것(Fig. 1)과 그 蛋白質合成系는 生産量에 相當하는 濃度の PM에 의하여 合成이 阻害된다는 것을 報告한 바 있다.⁵⁾

이와같이 같은 蛋白質合成阻害抗生物質을 生産하는 放線菌이라도 ribosome이 感受性인 group과 耐性인 group으로 分別되는 것은 興味있는 일이다. 또한 ribosome이 感受性인 生産菌에 있어서는 當然히 ribosome 耐性 以外の 自己耐性 mechanism이 存在한다.

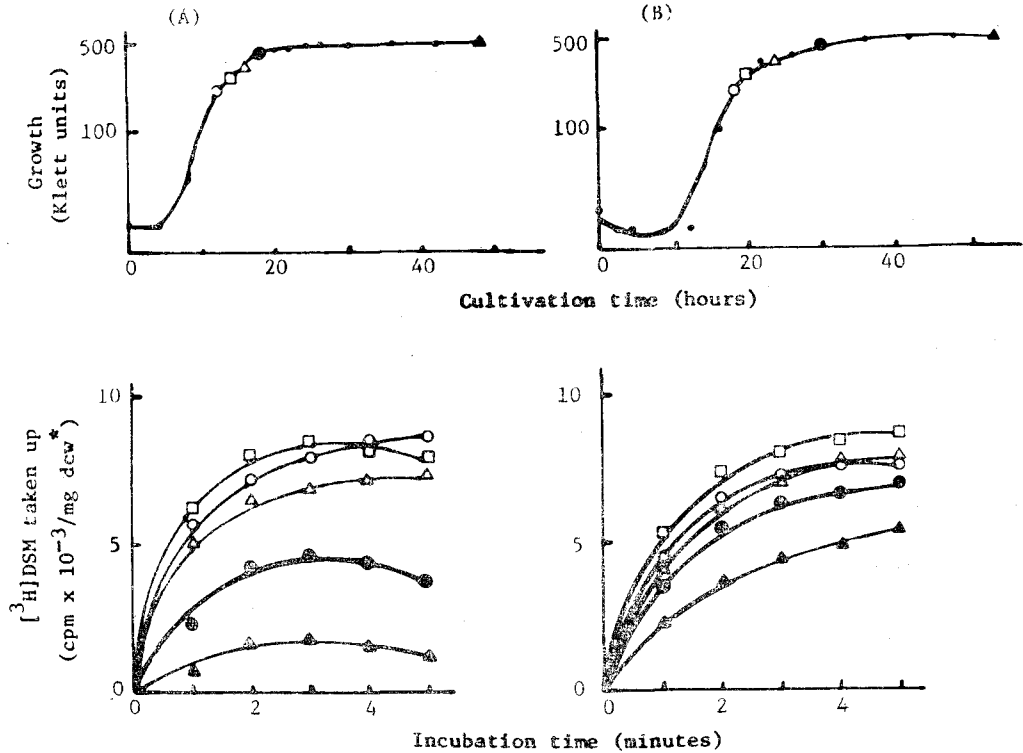


Fig. 2. The time course of growth of *S. griseus* HUT 6037 (A) and *S. griseus* E1-1 (B), and uptake of [³H] dihydrostreptomycin by these cells

The symbols (○, □, △, ● and ▲) in the figures of [³H] DSM uptake are corresponding with the symbols shown in the figures of the growth curve

II. 抗生物質에 對한 膜透過抑制機構

Streptomycin(SM)生産菌 *S. griseus* HUT 6037과 SM感受性變異株 E1-1의 細胞에 生産量에 相當하는 濃度の SM을 添加하여 細胞內透過性을 調査하였다. 그 結果, Fig. 2에서 보는 바와 같이 SM耐性인 *S. griseus* HUT 6037은 E1-1 菌株에 比하여 late log phase에서 부터 SM의 膜透過性이 현저히 低下하는 것을 알 수 있다(杉山等 未發表). 이와같은 事實로 볼때 SM生産菌에 있어서는 菌이 發育하여 SM生産期에 도달하면 分泌된 SM의 細胞內流入을 抑制하는 mechanism이 形成되는 것을 알 수 있다. SM以外에도 chloramphenicol生産菌,⁶⁾ Oleandomycin生産菌⁷⁾은 膜透過가 自己耐性에 重要な 役割을 하고있다는 報告가 있다.

III. 抗生物質不活化酵素

藥劑耐性을 支配하는 遺傳子를 포함하고 있는

plasmid는 腸內細菌等에서는 R因子(resistance factor)라고 불리며 球菌에서는 r因子라 한다. 抗生物質不活化酵素의 大部分은 이 R因子라고 하는 plasmid 保持菌에 의하여 生合成된다. 이 抗生物質不活化酵素는 aminoglycoside系, chloramphenicol系, β -lactam系 등의 抗生物質耐性菌에 存在하며, 그 反應形式에 따라 phosphotransferwe, nucleotidyltransferase, acetyltransferase로 나누어진다. 또한 이들 不活化酵素는 分子中의 作用部位, 基質特異性等에 따라서 細分化되어 있으며 지금까지 約 20種類가 여러가지 plasmid 혹은 細菌에서 부터 分離되어 있다.^{7-11, 24-27)}

抗生物質生産菌으로서의 PM生産菌 *S. alboniger*가 PM acetyltransferase(PAT)를 生合成한다는 것이 筆者等에 의하여 報告된 바 PAT는 acetyl COA 共存下에서 PM의 2''-NH₂ group을 acetyl화한다(Fig. 3). 이 PAT는 精製되어 그 酵素學的諸性質⁸⁾도 밝혀졌다. PAT에 의하여 acetyl화된 PM은 PM感受性細菌의 發育을 阻害하지 않으며 *in vitro* 蛋白質合成系에도 作用하지 않는 것

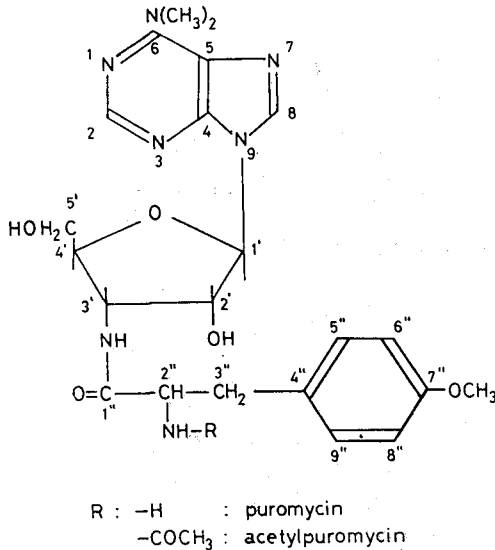


Fig. 3. The chemical structure of puromycin and the acetylated product

으로 보아 본 효소가 PM 생산菌의 自己耐性因자의 하나일 것으로 추측되어 진다. 또한 벼의 稻熱病에 有効한 blasticidin S (BS) 를 acetyl 化 시키는 BS acetyltransferase가 그 생산菌, *S. morookaensis*에 存在함이 確認되었다.⁹⁾(Fig. 4) 본 효소는 精製¹⁰⁾되어 現在, 遺傳子의 cloning이 進行中에 있다. 以外에도 이와같은 抗生物質不活化酵素는 neomycin 생산菌, *S. fradiae* (neomycin 3'-phosphotransferase),¹¹⁾ kanamycin 생산菌, *S. kanamyceticus* (kanamycin 6'-N-acetyltransferase)¹²⁾ 등에도 存在하고 있는 것이 報告되어 있다. 이와는 反對로 ribosome 耐性인 생산菌, 例를들면 istamycin 생산菌, *S. tenjimariensis* 등에는 不活化酵素가 存在하지 않는 것도 알려져 있다.¹³⁾

IV. 抗生物質生合成遺傳子의 cloning

一般的으로, 二次代謝産物인 抗生物質의 生合成은 複雑한 Step을 거쳐 合成되므로 當然히 수많은 효소가 關與하게 된다. 따라서 放線菌에 있어서의 遺傳子操作은 發理系가 單純한 自己耐性遺傳子에서 부터 始作된 것은 當然한 歸結이라고 하겠다. 以後, 抗生物質生合成缺失變異株의 生産性 回復을 指標로 하여 生合成遺傳子를 取得하려는 approach에 의하여 研究가 進行되어 왔다.¹⁴⁾

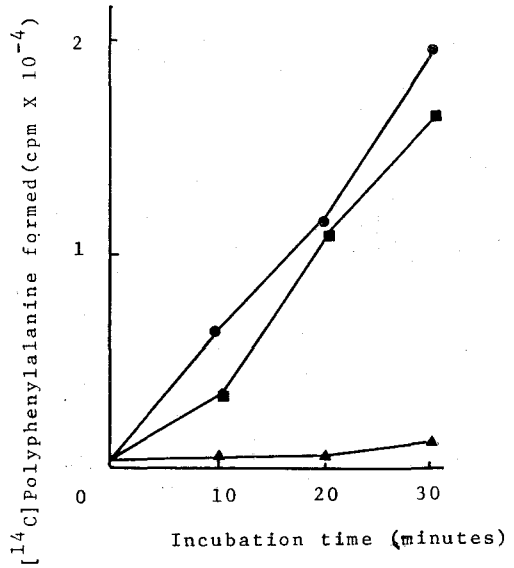


Fig. 4. Protection of polyphenylalanine synthesis against blasticidin S inhibition by BS-acetyltransferase ●; Control ■; the enzyme fraction incubated with BS and acetyl CoA ▲; the enzyme fraction incubated with BS in the absence of added acetyl CoA

抗生物質生合成에 關與하는 全遺傳子의 cloning에 成功한 代表的인 例로는 actinorhodin을 들 수 있다.^{15, 22)} 1984年 Hopwood 등¹⁵⁾에 의한 이 研究는 low copy plasmid pIJ 922를 vector로서 32.5 kb DNA fragment를 挿入시킨 pIJ 2303을 actinorhodin 非生産菌 *S. parvulus* ATCC 12434에 transformation 함으로써 actinorhodin 生産性을 갖게 하는데 成功하였다. 즉, 이 32.5kb DNA 中에는 actinorhodin 生合成에 必要한 全遺傳子가 cluster로서 存在하고 있는 것이 밝혀졌다.

1986年 Murakami 등¹⁶⁾은 除草劑로서 使用되고 있는 bialaphos의 生合成遺傳子를 生産菌, *S. hygrosopicus* SF 1293에서 分離하는데 成功하였다. 이 抗生物質은 적어도 13 step의 효소反應을 거쳐 生合成되는 것이 알려져 있다. pIJ 702에 의하여 cloning 된, 이들 효소反應을 code 하는 遺傳子는 cluster로서 存在하고 있었다.

Ohnuki 등¹⁷⁾은 streptomycin 생산菌 *S. griseus*의 非生産變異株를 宿主로서 pOA 154를 vector로 하여 SM 6-phosphotransferase와 amidinotransferase를 clone 化 하는데 成功하였다. 또한 이들 遺傳子의 近傍에는 制御遺傳子 *str R*, streptidine-6-phosphate와 dihydrostreptose를 連結하는 효소

를 code 하는 遺傳子 등이 cluster로서 存在하는 것도 밝혀졌다.²⁹⁾

한편, *S. erythreus*의 erythromycin 生合成遺傳子は *S. erythreus*의 cosmid library로 부터 35kb의 DNA fragment로서 cloning 되었다(probe로는 erythromycin 耐成遺傳子が 使用되었다). 이 遺傳子를 *S. lividans* TK 23에 transformation 하면 transformant는 erythromycin A 生産性を 갖게 된다고 報告되었다.¹⁸⁾

이외에도 methylenomycin,^{19,20)} undecylprodigiosin²¹⁾ 등의 生合成遺傳子が cloning 되어 있다.

V. 放線菌遺傳子の 工業的應用

遺傳子操作에 의한 抗生物質生産은 아직 基礎研究段階로 다른 醫藥部門에 比하면 相當히 停滯되어 있는 實情이다. 그러나 앞으로 放線菌遺傳子の 發現과 制御에 關한 研究의 進展에 따라, 이들 基礎知識을 基盤으로 가까운 將來에 工業的 應用도 可能하게 되리라 믿는다.

즉, 期待되는 工業的 應用으로는 ① 放線菌遺傳子 cluster 導入에 의한 抗生物質非生産菌의 生産菌으로의 轉換 ② 抗生物質生産菌의 生産性改良 (bioreactor의 研究의 進展을 前題로 하여) ③ 新藥으로서의 hybrid antibiotics의 開發 등을 들 수 있다.

참 고 문 헌

1. Cundlife, E.: Nature, 272 : 792(1978)
2. Graham, M.Y. and Weisblum B.: J. Bacteriol., 137 : 1464(1979)
3. Thompson, C.J., Cundlife, E. and Stark, M.J.R.: J. Gen. Microbiol., 128 : 875(1982)
4. Cundlife, E. and Thompson, C.J.: J. Gen. Microbiol., 126 : 185(1981)
5. Sugiyama, M., Paik, S.Y. and Nomi, R.: J. Gen. Microbiol., 131 : 1999(1985)
6. Malik, V.S. and Vining, L.C.: Can. J. Microbiol., 18 : 583(1972)
7. Fierro, J.F., Hardission, C. and Salas J.A.: J. Gen. Microbiol., 133 : 1931(1987)
8. Paik, S.Y., Sugiyama M. and Nomi, R.: J. Antibiot., 38 : 1761(1985)
9. Sugiyama, M., Takeda, A., Paik, S.Y., Nimi, O. and Nomi, R.: J. Antibiot., 39 : 827(1986)
10. Sugiyama, M., Takeda, A., Paik, S.Y. and Nimi, O.: Submitted to J. Antibiot. (1988)
11. Dowing, J.E.: FEMS Microbiol. Lett., 6 : 95(1979)
12. Satho, A., Ogawa, H. and Satomura, Y.: Agric. Biol. Chem., 39 : 1593(1975)
13. Yamamoto, H., Hotta, K. Okami, Y. and Umezawa, H.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 100 : 1396(1981)
14. Sugiyama, M., Paik, S.Y. and Nomi, R.: Kor. J. Microbiol. Bioeng., 13(1) : 93(1985)
15. Marpartida, F. and Hopwood, D.A.: Nature, 309 : 462(1984)
16. Murakami, T., Anzai, H., Imai, S., Satho, A., Nagaoka K. and Thompson, C.J.: Mol. Gen. Genet., 205 : 42(1986)
17. Ohnuki, T., Imanaka T. and Aiba, S.: J. Bacteriol., 164 : 85(1985)
18. Stanzak, R., Matsushima, P., Baltz, R.H. and Rao, R.N.: Biotechnol., 4 : 229(1986)
19. Chater, K.F. and Bruton, C.J.: EMBO J., 4 : 1883(1985)
20. Chater, K.F. and Bruton, C.J.: Gene, 26 : 67(1983)
21. Feitelson, J.S. and Hopwood, D.A.: Mol. Gen. Genet., 190 : 394(1983)
22. Malpartida, F. and Hopwood, D.A.: Mol. Gen. Genet., 205 : 66(1986)
23. Distler, J., K. Mansouri and Pipersberg, W.: FEMS Microbiol. Lett., 30 : 151(1985)
24. Bibb, M., Janssen, G.R. and Ward, J.M.: Gene, 41 : E357(1986)
25. Yamashita, F., Hotta, K., Kurasawa, S., Okami, Y. and Umezawa, H.: J. Antibiot., 38 : 58(1985)
26. Hotta, K., Ishikawa, J., Ichihara, M., Naganawa, H. and Mizuno, S.: J. Antibiot., 41 : 94(1988)
27. Ishikawa, J., Koyama, Y., Mizuno, S. and Hotta, K.: J. Antibiot. 41 : 104(1988)
28. Skinner, R.H. and Cundlife, E.: J. Gen. Microbiol., 128 : 2411(1982)
29. Skinner, R.H., Cundlife, E. and Schmidt, F.J.: J. Biol. Chem., 258 : 12702(1983)