

*Streptomyces albus*로부터 분리된 Type II Polyketide Synthase 유전자의 염기 서열 및 분석

권형진^{1,3} · C.R. Hutchinson² · 진형종^{1,2} · 김수언³ · 이계준⁴ · 서주원*¹

¹명지대학교 생명과학연구소, ²Wisconsin 대학교 약학대학 및 세균학과
³서울대학교 농화학과 및 농업생물 신소재 연구센터, ⁴서울대학교 분자미생물학 연구센터

Nucleotide Sequence and Analysis of the Genes for Type II Polyketide Synthase Isolated from *Streptomyces albus*

Hyung-Jin Kwon^{1,3}, C.R. Hutchinson², Hyung-Jong Jin^{1,2},
Soo-Un Kim³, Kye-Joon Lee⁴ and Joo-Won Suh*¹

¹Biotechnology Research Institute Myoung Ji University, Youngin, 449-728 Korea

²School of Pharmacy & Dept. of Bacteriology, University of Wisconsin-Madison,
Wisconsin 53706, USA

³Dept. of Agricultural Chemistry and The Research Center for New Biomaterials in Agriculture,
Seoul National University 441-744, Korea

⁴The Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University 151-742, Korea

Abstract— *Streptomyces albus* wild type ATCC 21838 produced salinomycin, polyether antibiotic. To clone genes related salinomycin production, a genomic library was screened using *actI* as a DNA hybridization probe. pWHM 210 was isolated, which contained an approximately 24 kb of insert DNA. A 3.8 kb region in the 24 kb insert DNA was hybridized to *actI* and the nucleotide sequence of this region was determined. Two open reading frames found in the same direction were homologous to genes for β -keto acyl synthase/acyl transferase and chain length determining factor in type II PKS (polyketide synthase). The genes were components of minimal type II PKS genes, highly conserved and showed the strong similarity to other type II PKS genes known today.

Polyketide 계 화합물들은 그 생리적 활성으로서 상업적으로 중요한 위치를 차지하고 있는데, 이는 주로 항생제로서의 이용에 있다고 볼 수 있다. Polyketide의 생합성 효소들을 통칭하여 polyketide synthase(PKS)라 하며, 이들 PKS 유전자는 크게 두가지의 형태로 나눌 수 있다(11). 하나의 multifunctional polypeptide에 의해 일련의 생합성이 진행되는 경우는 type I으로 분류된다(11, 13). Type I으로 분류되는 erythromycin의 생합성 유전자는 “modular” 구조를 갖는 multifunctional 효소를 생성하며, 각 module의 작용에 의해 한회씩의 acyl 축합 반응과 이에 따른 keto 작용기의 변환이 이루어진다(3-5). 지금까지 알려진 다른 모든 macrolide PKS들 역시 modular 구조를 갖는다고 알려져 있다(13). Aromatic polyke-

tide들의 생합성 과정은 독립적인 monofunctional 단백질들의 효소 작용에 의해 이루어지며, 이들 각각의 효소 활성 부위가 비공유적 결합에 의해 모여져 multifunctional complex의 형태를 이룬다. 이와 같은 경우를 type II로 분류한다(11).

현재까지 많은 aromatic PKS 유전자들의 염기 서열이 밝혀졌으며, 염기 서열로부터 유추한 아미노산 서열의 비교 분석으로서 그 유전자의 조성이 높은 보존도를 유지하고 있음을 알 수 있었다(6, 12, 13, 16). 이러한 유전자 상호간의 유사성은 β -keto acyl synthase/acyltransferase(KS)와 chain length determining factor(CLF) 유전자, 그리고 acyl carrier protein (ACP) 유전자를 중심으로 나타나며, 이 영역과 인접하여 존재하는 여타의 생합성 유전자들은 생성되는 polyketide 화합물의 구조에 상응하는 구성으로 나타난다. 최근에 유전자 재조합 기술을 이용하여 PKS 작용의 조절 기작을 규명하려는 접근 방법이 진행되

Key words: *Streptomyces albus*, polyketide synthase (PKS), salinomycin, polyether

*Corresponding author

어지고 있다. 이는 지금까지 클로닝된 type II-PKS 유전자들의 조합으로부터 생성되는 hybrid polyketide의 구조를 규명하는 접근 방식으로서 "mixing and matching"이라 일컬어 진다(7, 8, 10, 13, 14, 18-21, 24). 이는 많은 set의 PKS 유전자들이 cloning 되고 그 염기 서열이 밝혀짐으로서 가능하여진 일이다. 이들의 특이적 조합이 생성하는 화합물들의 구조를 연구함으로써 다양한 구조의 polyketide 골격이 생성되는 효소적 기작의 이해가 부분적으로 가능해졌다. 가까운 미래에 원하는 polyketide 구조를 분자 생물학적 기술을 이용하여 얻을 수 있으리라 믿어지며, 이에 선행하여 다양한 방선균 종에서의 보다 많은 PKS 유전자의 cloning과 그 염기 서열 결정이 필수적이라고 생각된다.

이와 같은 연구 배경에서, 본 논문에서는 salinomycin(26, polyketide-derived polyether)의 생성 균주인 *Streptomyces albus*로부터의 PKS 유전자의 분리에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 플라스미드

Streptomyces albus ATCC 21838의 유전자 library의 작성에는 *Escherichia-Streptomyces* shuttle cosmid vector pKC 505(Eli Lilly)가 이용되었다. pKC 505 cosmid library로부터 얻어진 pWHM210에 존재하는 약 24 kb의 *Streptomyces albus* DNA로부터의 세부적인 subcloning을 위한 vector로는 pGEM-3zf(-)(Promega)를 이용하였다. pGEM-3zf(-)에 cloning 된 4~5 kb의 DNA를 *Streptomyces glaucescens* 내로 전이, 발현시키기 위하여 *Streptomyces* vector인 pIJ 702를 사용하였다. 염기 서열 결정을 위한 subcloning에는 M13mp19(New England Biolabs)를 사용하였다. pGEM-3zf(-)의 형질 전환 숙주로는 *E. coli* JM109(*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, (*lac-proAB*), F, *traD36*, *proAB*, *lacI^q*ZM15를, 염기 서열 결정을 위한 M13mp19의 형질 전환 숙주로는 *E. coli* DH5αF'TM(F', φ 80, *dlacZ*, ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*), U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*, (*rk⁻*, *mk[']*), *supE44*, λ-*thi-1*, *gyrA*, *relA1*)를 이용하였다.

사용배지 및 배양조건

pGEM-3zf(-)으로 형질 전환된 *E. coli* 배양은 50 μg/ml의 ampicillin을 첨가한 LB 배지(0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1% tryptone)를 사용하였다. *E. coli* DH5αF'TM의 형질 전환 및 이로부터의 single-stran-

ded DNA 분리를 위한 배양에는 ampicillin을 첨가하지 않은 LB 배지를 이용하였다. *E. coli*의 배양은 37°C 에서 실시하였다.

사용시약 및 효소

Agarose, lysozyme, ammonium persulfate, acrylamide, N,N'-methylenebisacrylamide, 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside(X-gal), isopropyl-β-D-thiogalactoside(IPTG) 등은 Sigma Co.에서, Phenol은 Fluka Co.에서, 그리고 기타 일반 시약류는 시판 일급 이상의 분석용을 사용하였다.

T4 DNA ligase, Calf Intestine Alkaline Phosphatase, dNTP, EcoRI, HindIII, Sall, BamHI, PstI, PvuII, SmaI과 BglII는 Pharmacia 제품을 이용하였다. XhoI은 Boehringer Mannheim, SacI과 NcoI은 한국 제철 화학(KOSCO), SspI과 NdeI은 BRL에서 구입하였다.

United States Biochemical(USB)의 제품인 Sequenase version 2.0 kit를 이용하여 DNA 염기 서열을 결정하였다. Template DNA의 Nested Deletion을 위하여 Promega의 Erase a Base kit를 이용하였다. [α -³²P] dATP, [α -³²P] dCTP, [α -³⁵P] dCTP, Hybond-N membrane과 ECL gene detection system RPN 2101-version 2는 Amersham의 제품을 이용하였다.

Agarose gel로부터 DNA를 분리하기 위하여 DEAE cellulose membrane(Schlicher and Schyell NA-45)을 이용하거나, Bio 101 Inc.의 제품인 Gene Clean kit를 이용하였다.

플라스미드 DNA의 분리 및 형질 전환

플라스미드 분리는 alkaline-SDS 처리에 의해 플라스미드를 분리한 다음 ammonium acetate-isopropanol을 이용하여 DNA를 침전 분리시키는 방법을 이용하여 정제하였다(22). 형질 전환을 위한 competent cell은 Sambrook 등(22)의 방법을 이용하여 준비하였다. 준비된 competent cell은 200 μl aliquot의 0.1 M CaCl₂-15% glycerol 현탁액 상태로 -70°C 에 보관하며 사용하였다. 형질 전환 방법 또한 Sambrook 등의 방법을 따라 실시하였다.

Single stranded phage stock의 준비 및 single stranded DNA의 분리

적절한 크기의 *S. albus* DNA로 재조합된 M13mp19 double stranded DNA로 위에 설명한 방법에 따라 *E. coli* DH5αF'을 형질 전환시킨 후, 3 ml의 top agar

상에서 20 μ l의 2% X-gal, 10 μ l의 20% IPTG와 200 μ l의 숙주 세포 LB 현탁 배양액과 고루 섞은 후 LB plate에 부어 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 생성된 plaque를 취하여 1 ml의 LB 액체 배지로 옮긴 후 상온에서 2시간 이상 방치한 후 4°C에 보관하였다. 이상은 Sambrook 등의 방법을 따른 것이며, 이렇게 준비된 phage stock으로부터의 single stranded DNA 분리 또한 Sambrook 등의 방법에 따라 진행하였다. M13 phage를 PEG로 침전시킨 후, phenol 추출 및 EtOH 침전으로 single stranded DNA를 분리하였다.

염기 서열 결정

염기 서열 결정은 Sequenase version 2.0 kit를 이용, Sanger 방법(23)의 원리에 근거한 USB manual에 따라 실시하였다. Template로 double stranded DNA를 사용할 경우는 DNA 용액에 0.5 체적의 0.4 M NaOH와 0.4 mM EDTA 혼합 용액을 첨가하여 37°C에서 30분간 처리하여 denaturation 시킨 후 0.1 체적의 3 M NaOAc(pH 4.5~5.5)와 3 체적의 EtOH을 가하여 침전 분리한 DNA 3 μ g을 이용하였다. Single stranded DNA의 경우는 전항에 설명한 방법에 따라 분리한 DNA 1 μ g을 template로 이용하였다. *Streptomyces* DNA의 높은 GC 함량에 따른 핵산의 이차 구조 생성을 줄이기 위하여 7-deaza dNTP를 이용하여 termination 반응을 진행하였으며, 서열 결정이 확실하지 않은 부분에 한하여 dITP를 이용하였다. 합성 반응이 끝난 각 반응물은 90°C로 가열하고 얼음물로 빠르게 식힌 후, 즉시 8.3 M Urea를 포함한 polyarylamide gel(8%, 40×44×0.035 cm³)에 loading 하여 전기 영동하였다. 전기 영동이 끝난 gel은 gel drier(Vision Co.)를 이용하여 수분을 제거한 후 intensifying screen이 부착된 diskette에서 X-ray film(Curix XP, Agfa)에 적정 시간 노출하였다. X-ray film의 감광은 ³²P-dNTP을 이용할 경우는 -70°C에서 ³⁵S-dCTP의 경우는 상온에서 진행하였다.

Oligonucleotide는 ABI(Applied Biotechnology Inc.) 제품인 nucleotide synthesizer를 이용하여 17~18 mer를 합성하여 사용하였다. 염기서열 결정 방법은 위와 동일하게 진행하였으나, template에 대하여 3~5 당량의 oligomer를 사용하였다.

Southern hybridization

actI probe는 BRL의 nick translation kit를 사용하여, BRL manual에 따라 준비하였다. *actI*은 *Streptomyces coelicolor*로부터 얻어진 PKS 유전자로서, pol-

yketeide 계 색소인 actinorhodin 생합성 과정의 KS/AT, CLF와 ACP 유전자를 포함하고 있다(6, 9). *actI*은 *BamHI* partial digested 절편으로서 그 크기는 3106 bp이며(6), pBR 329의 *BamHI* site에 subcloning 된 것을 사용하였다. Prehybridization은 50°C에서 2시간 동안 진행한 후 hybridization은 50°C에서 밤새 진행하였다(2, 16, Hopwood, D.A.; personal communication). 준비된 blot은 2×SSC로 50°C에서 15분 동안 세척하고, 2×SSC, 0.1% SDS로 50°C에서 30분 동안 세척한 후 0.1×SSC로 50°C에서 10분 세척하였다.

결과 및 고찰

*Streptomyces albus*로부터의 PKS 유전자 분리

*Streptomyces albus*로부터 salinomycin 생합성 유전자를 클로닝하기 위하여 *Escherichia-Streptomyces* shuttle cosmid vector pKC 505(Eli Lilly)을 이용하여 *S. albus* ATCC 21838 종의 유전자 library를 만들었다. 이 유전자 library에 대하여 *actI*을 probe로 이용하여 Southern hybridization을 실행하여 pWHM 210을 분리하였다(*S. albus* ATCC 21838 게놈 DNA에 대하여 *actI*을 hybridization시켰을 때 하나의 *actI* 유사 유전자 신호만이 검출되었다. results not shown). *actI*은 *Streptomyces coelicolor*에서 분리된 actinorhodin 생합성 유전자의 일부로서 polyketide 생합성과정 중의 초기 반응의 효소를 코딩하고 있다(6, 9, 재료 및 방법; Southern hybridization). *act* 유전자는 최초로 분리, 동정된 typeII PKS 유전자이며, Southern hybridization 실험에서 *actI*이 다른 polyketide 생성 균주의 genomic DNA 절편에 강하게 결합한다는 연구 결과가 보고된 후 *act* 유전자를 이용하여 많은 typeII PKS 유전자들이 클로닝되었다(13, 16). *act* 유전자를 포함한, 많은 typeII PKS 유전자의 연구로부터 *actI* 유사 영역이 코딩하는 효소가 β -ketoacyl synthase/acyl transferase, chain length determining factor와 acyl carrier protein 임이 밝혀졌으며, 이들을 통칭하여 minimal PKS라고 한다(19).

pWHM 210은 약 24 kb의 *S. albus* DNA를 갖고 있었으며 그 제한효소지도는 Fig. 1과 같다. pWHM 210으로 20개의 salinomycin(-) 변종에 대하여 complementation 실험을 실시하였을 때 하나의 변종에서 polyether 생성 능력의 복구를 확인할 수 있었다(results not shown, *S. albus*의 salinomycin(-) 변종들에 대하여서는, 생합성 과정상의 변이 위치를 밝히지 못하였다). pWHM 210으로 형질 전환된 *Streptomyces lividans*에서 erythrocyte에 대하여 이온 투과 활성을

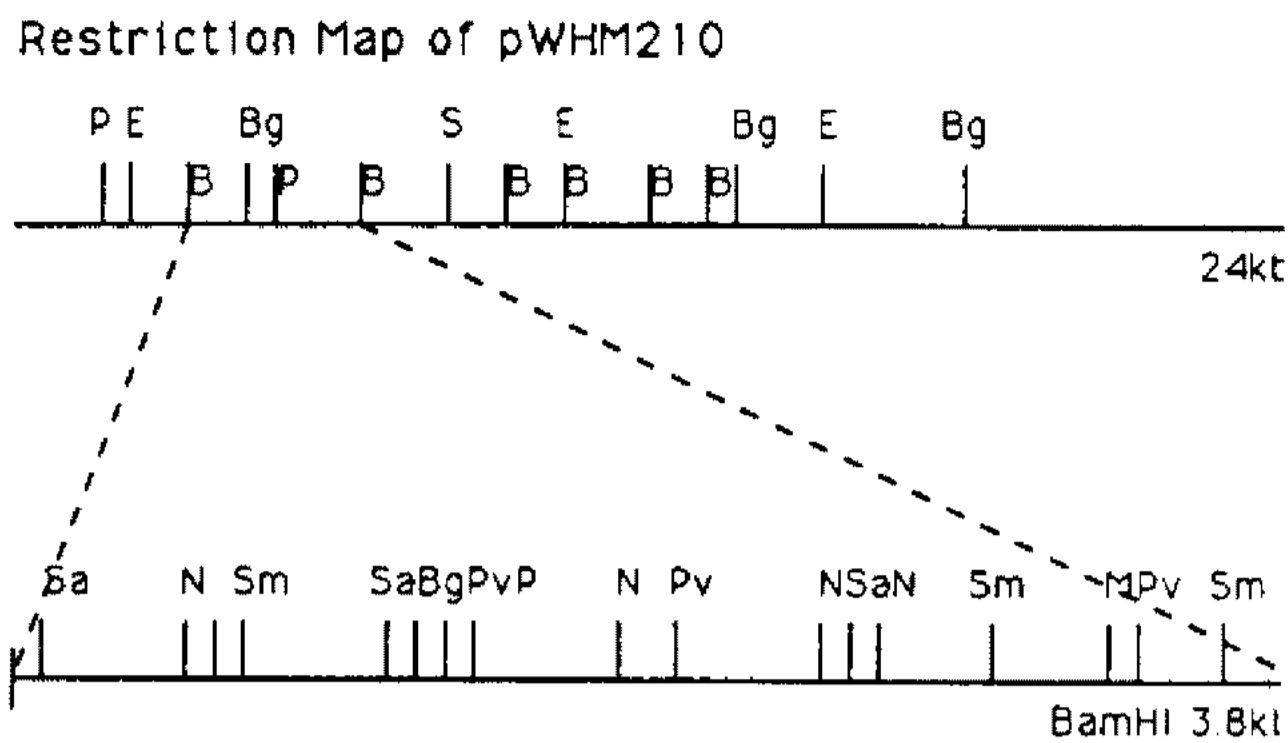


Fig. 1. pWHM210 with 24 kb insert DNA from *S. albus*, which hybridized with *actI*.

In pWHM210, BamHI 3.8 kb fragment hybridized with *actI*.

B, Bg, E, M, N, P, Pv, Sa and Sm indicate BamHI, BglII, EcoRI, MluI, NcoI, PstI, PvuII, Sall and SmaI, respectively.

보이는 물질이 생성되었다. 이 ionophore는 HPLC와 질량 분석에서 salinomycin과 동일한 성질을 보였다. 또한, 이 생성물은 [1-¹⁴C] propionate를 투여하였을 때 ¹⁴C으로 표지되었다(Hutchinson, C.R.; unpublished data). 따라서 이 물질이 polyketide 생합성 경로에 따라 salinomycin과 동일한 전구체로부터 생성됨을 추론할 수 있다. 이상의 실험 결과에서 pWHM 210에 cloning 된 24 kb의 *S. albus* DNA 내에 salinomycin의 생합성 관련 유전자들이 포함되어 있음을 추론할 수 있었다.

pWHM 210에 cloning 된 24 kb DNA에서 *actI* 유사 영역 즉 minimal PKS 유전자 부위를 분리하기 위하여 24 kb DNA의 BamHI, PstI 제한 효소 절편에 대하여 *actI*을 probe로 이용하여 Southern hybridization을 실시하였다(hybridization 조건은 pWHM 210의 분리 조건과 동일하다). 3.8 kb BamHI 절편과 1.5 kb, 2.3 kb PstI 절편이 *actI*에 hybridization 되었다 (Results not shown, PstI이 3.8 kb BamHI 절편을 1.5 kb와 2.3 kb으로 절단한다). 이 3.8 kb BamHI 절편을 pGEM-3zf(-)의 BamHI site에 cloning 하였다.

Cloning 된 3.8 kb DNA의 기능을 확인하기 위하여 complementation 실험을 진행하였다. *S. albus*의 salinomycin(-) 변종 중에는 그 유전적 성격이 정확히 파악된 것이 없는 까닭에 이 3.8 kb DNA 절편의 complementation 실험을 이중 *Streptomyces* 인 *S. glaucescens*에 대하여 실시하였다. *S. glaucescens*는 aromatic polyketide 인 tetracenomycin 생성 균주로서 유전적 성격이 정확히 파악된 tetracenomycin C(-) 변종들이 존재한다(Hutchinson, C.R.; personal communication). pIJ 702를 사용하여 *tcmIa*(KS/AT 유전자 부

위에 변이가 생겨 tetracenomycin C 생합성 과정에서 최초의 효소적 반응이 차단된 것)를 3.8 kb BamHI 절편으로 형질 전환시켰을 때 형질 변환된 tetracenomycin(-) 변종에서 tetracenomycin 생성 능력이 회복됨을 확인할 수 있었다(Hutchinson, C.R.; unpublished data).

이상에서, 분리된 3.8 kb BamHI에 KS/AT 유전자가 존재함을 확인할 수 있었으나, 이것이 salinomycin 생합성의 PKS의 일부인지는 확인할 수 없었다. 생성 균주인 *S. albus*에 대하여 'Gene disruption' 실험을 수행하여 그 기능을 확인하는 작업이 현재 진행중에 있다.

분리 유전자의 염기 서열 결정

*Streptomyces albus*에서 클로닝된 3.8 kb BamHI DNA 절편을 pGEM-3zf(-)의 BamHI site에 subcloning 하였다. 이 3.8 kb DNA 중 Sall 1.4 kb DNA 절편과 pGEM-3zf(-)의 polycloning site에 존재하는 Sall site와 3.8 kb insert의 Sall site로 얻어지는 1.2 kb DNA 절편을 M13mp19의 Sall site에 각각 양쪽 방향으로 subcloning 하였다. 1.2 kb Sall 절편에 대하여서는 이 영역내에 존재하는 SmaI, XhoI과 PvuII site로 subcloning 하여 template로 사용하였다(SmaI; 1.2 kb-M13 clone을 SmaI으로 절단한 후 self ligation 시켰다. insert DNA 내의 SmaI 절편을 분리한 후 SmaI으로 절단된 M13mp19에 ligation 시켰다. PvuII; insert DNA 내의 PvuII와 M13mp19 polycloning site 밖에 존재하는 PvuII(M13mp19 내의 PvuII의 위치; 6053, 6375, polycloning site의 위치; 6230-6288)로의 절단에 의해 얻어지는 DNA 절편을 분리한 후 SmaI으로 절단된 M13mp19에 ligation 시켰다. XhoI; XhoI, Sall double digestion으로 얻어지는 DNA 절편을 분리한 후 Sall으로 절단된 M13mp19에 ligation 시켰다). 1.4 kb 절편은 PvuII와 NcoI site를 이용하였다(PvuII; insert DNA 내의 PvuII와 M13mp19 polycloning site 밖에 존재하는 PvuII로의 절단에 의해 얻어지는 DNA 절편을 분리한 후 SmaI으로 절단된 M13mp19에 ligation 시켰다. NcoI; insert DNA 내의 NcoI 절편을 분리한 후 Klenow fragment 처리에 의한 방법으로 SmaI으로 절단된 M13mp19에 ligation 시켰다).

Sall site로 subcloning 된 clone 각각에 대하여서는 BamHI과 SacI digestion을 이용하여 Nested deletion을 진행하여 template를 준비하였다. 4개의 clone 중 1.2 kb Sall clone의 한 방향의 경우, BamHI digestion으로 insert DNA가 vector로부터 분리되어 Nes-

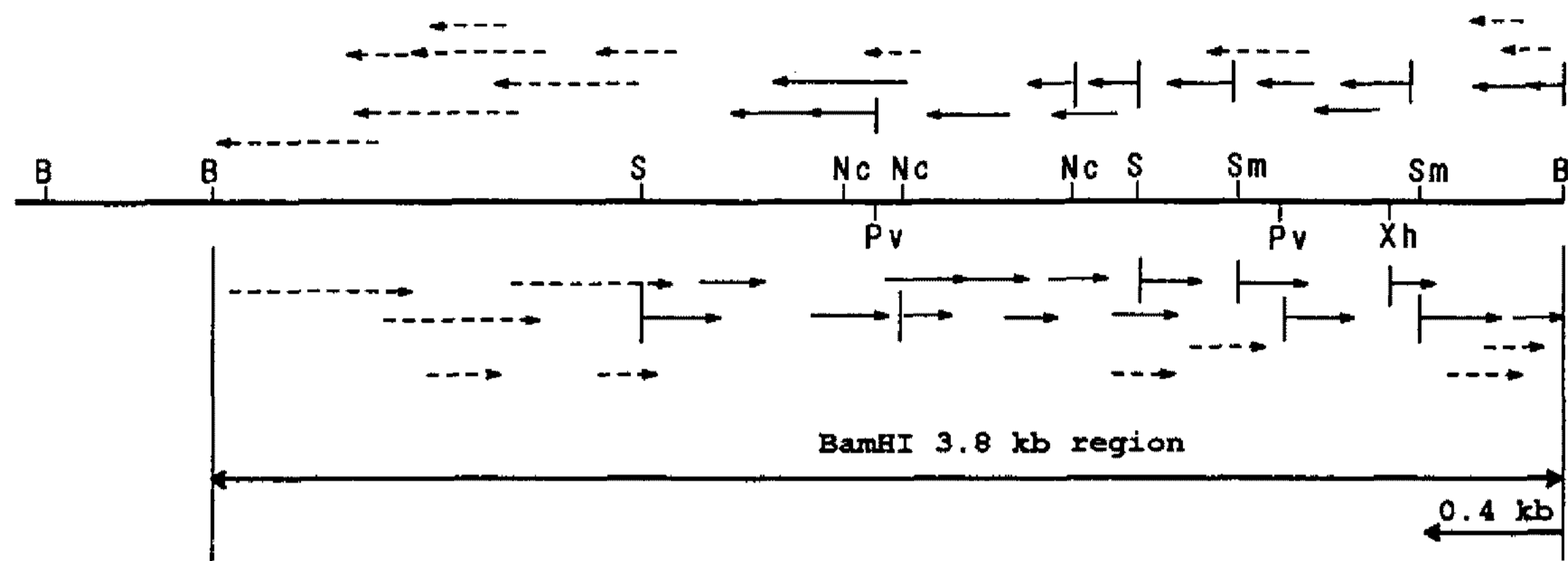


Fig. 2. Restriction map and sequencing strategy of the 3.8 kb DNA fragment from pWHM 210.

Clones used for sequencing were obtained as described in Material and Methods. The arrow indicate the extent of sequence obtained from each clones (The dashed arrow indicate the extent of sequence obtained using synthetic oligonucleotide as sequencing primer).

B, Nc, Pv, S, Sm and Xh indicate BamHI, NcoI, PvuII, Sall, SmaI and XhoI, respectively.

ted deletion을 진행할 수 없었다. 이는 pGEM-3zf(-) 내의 3.8 BamHI DNA를 Sall digestion으로 분리하는 과정 중에 pGEM-3zf(-) polycloning site의 BamHI site가 1.2 kb Sall DNA 절편의 말단에 존재하게 되었기 때문이다. 이들 clone의 연결 부위는 위에 설명한, 3.8 kb BamHI 절편으로 subcloning 된 pGEM-3zf(-)으로 Nested deletion을 진행하여 얻어진 clone을 이용하여 그 서열을 결정하였다. 이상 설명한 2.6 kb 영역에서 적당한 clone이 얻어지지 않은 부분과 compression 때문에 그 서열이 확실하지 않은 부분에 한하여서는 15~17 mer의 primer를 합성하여 염기 서열 결정을 진행하였다. 3.8 kb BamHI 절편중 이 2.6 kb 이외의 영역에 대하여서는 primer를 합성하여 그 염기 서열을 결정하였다. 이상 설명된 sequencing strategy를 도식화하면 Fig. 2와 같다.

유전자 염기 서열의 분석

결정된 염기 서열을 FRAME(1, 2)으로 분석하여 단백질 코딩 영역을 탐색하였으며, 얻어진 잠정적인 ORF에 대하여 16S rRNA와 결합 가능한 서열(Shine-Dalgarno sequence)이 적절한 위치에 존재하는 지를 확인하였다. 이들 중 *actI* DNA 중 β -ketoacyl synthase/acyl transferase(KS)와 chain length determining factor(CLF)의 크기에 해당하는 두개의 완전한 ORFs가 존재함을 알 수 있었으며, 잠정적으로 ORF 1, ORF 2라 명명하였다. ORF 1은 TTG 번역 시작 코돈으로부터 -13 위치에 GGGAGG의 16S rRNA 결합 가능 서열이 존재하였으며, TGA를 끝으로 1272 bp의 길이를 취하고 있었다. ORF 1의 번역 시작 코돈은 TTG로서, 이 매우 드문 시작 코돈의 존재 예

가 *actI*-ORF 1, actinorhodin 생합성과정 중의 KS/AT 유전자, 등에서 보고되어졌다(6, 15). ORF 2의 경우는 -11 위치에 AGGAGC의 서열이 존재하며, ATG를 시작 암호로 TGA까지 1212 bp이다. 이들의 G+C 함량은 각각 70.7%, 74.3%이며, 둘 모두에 있어서 TTT나 TTA 코돈은 존재하지 않는다(27). ORF 1와 ORF 2는 DNASIS(Pharmacia)의 DNA Homology Search program에서 55.0%의 유사성을 보였다 (Fig. 3., ORF 1, 2의 염기 서열).

유추 아미노산 서열의 분석

ORF 1과 2의 유추 아미노산 서열은 PROSIS(Pharmacia)의 Protein Homology Search program에서 상호간에 38.9%의 유사성을 보였다. Fig. 4에 이들의 Homology Plot(PROSIS, Pharmacia)이 제시되어 있다. ORF 1의 번역 종말 코돈과 ORF 2의 번역 시작 코돈이 ATGA의 배열로서 겹쳐 존재함으로써 이 둘의 번역이 함께 이루어져, 생성물이 유사 이배수체로 존재함을 짐작할 수 있다(2). 이와 같은 염기 서열의 성향은 알려진 type II PKS의 KS/AT, CLF 유전자들의 일반적인 성격과 일치하는 것이다.

ORF 1, 2의 유추 아미노산 서열을 PROSIS(Pharmacia) Homology Search program으로 알려진 type II PKS 유추 서열과 비교 분석하였다. ORF 1은 *tcmK*, tetracenomycin 생합성의 KS 유전자와 ORF 2는 *tcmL*, tetracenomycin 생합성의 CLF 유전자의 유추 아미노산 서열과 각각 66.9%, 56.7%의 유사성을 보였다. 위에 설명한 p-WHM 210의 분자 생물학적, 생화학적 연구 결과와 결정된 서열의 분석 결과에 기초하여 ORF 1, 2는 *Streptomyces albus* 내의 poly-

Sal B

CTA	CAG	CTG	GGA	GAC	CTC	CCG	TTC	AGC	GCG	CGA	CAC	GTT	GTG	ATC	ACC	48
GCG	ATC	GAG	GTG	ATC	GCC	CCC	GCC	GCT	GTC	CGC	AGC	GAC	ATC	ATC	TGG	96
Gly	Ile	Glu	Val	Ile	Ala	Pro	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Glu	Val	Thr	Trp	
AAC	CTG	CTG	AGC	AAC	GAC	CGT	ACC	CCG	ACA	CGG	GCC	ATC	ACC	TTC	TTC	144
Asn	Leu	Leu	Ser	Asn	Gly	Arg	Thr	Ala	Thr	Arg	Gly	Ile	Thr	Phe	Phe	
GAC	CCC	GCC	CCC	TTC	CCG	TCC	CCG	GTG	GCC	GCC	GAA	CCG	GAC	TTC	GAC	192
Asp	Pro	Ala	Pro	Phe	Arg	Arg	Arg	Val	Ala	Ala	Asp	Ala	Asp	Phe	Asp	
CCC	TAC	GAG	CAC	GAC	CTG	ACC	CCG	CAG	GAG	GTG	CCG	CTG	GAC	CCG	CCG	240
Pro	Tyr	Glu	His	Ile	Leu	Thr	Pro	Gln	Val	Arg	Arg	Leu	Asp	Arg	Arg	
GCC	GCG	CAG	TTC	GCC	GTG	GTC	GCC	TGG	CCG	GCC	GTC	GCC	GAC	AGC	AGC	288
Ala	Ala	Gln	Phe	Ala	Val	Val	Ala	Ser	Arg	Gly	Ala	Val	Ala	Asp	Ser	
GCC	CTC	GAC	ATC	CCC	TCC	CTG	GAC	CCG	CAC	CCG	CCG	GTG	GCC	ACC	GTG	336
Gly	Leu	Asp	Ile	Pro	Ser	Leu	Asp	Pro	His	Arg	Val	Gly	Val	Thr	Val	
GCC	AGC	GCC	GTG	GCC	CCG	ATG	GCC	CTG	GAC	CAG	GAG	TAC	CCG	GTG	GTG	384
Gly	Ser	Ala	Val	Gly	Ala	Met	Gly	Leu	Asp	Gln	Glu	Tyr	CCG	Arg	Val	
GTG	AGC	GAC	GCG	Gly	CCG	Leu	GAC	ACC	GTG	GAC	CAC	ACC	TAC	CCG	GTG	432
Val	Ser	Asp	Ser	Gly	Arg	Leu	Asp	Thr	Val	His	His	Tyr	Ala	Val	Val	
CCG	CAC	CTG	TAC	GAC	TAC	ATG	GTG	CCC	AGC	TCC	TTC	GCC	GAG	GTG	GTG	480
Pro	His	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Met	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Ala	Ala	Val	Val	
GCC	TGG	GCG	GTG	GCG	GAA	GCC	CCC	ACC	GTC	GTC	TCC	ACC	GCC	GCC	GCC	528
Ala	Trp	Ala	Val	Gly	Ala	Glu	Gly	Pro	Ser	Thr	Val	Val	Ser	Thr	Gly	
TCC	ACC	TCC	GCC	ATC	GAC	TCC	GTG	GCC	TAC	GCC	GTG	GAA	CTG	GTC	CCG	576
Cys	Thr	Ser	Ser	Ile	Asp	Ser	Val	Gly	Ile	Val	Glu	Leu	Val	Arg	Arg	
GAG	GGA	TGG	GCC	GAC	GTG	GTG	ATC	GCC	GCC	TCC	TCC	GAC	CCG	CCG	ATC	624
Glu	Ser	Ala	Asp	Val	Val	Ile	Ala	Gly	Ser	Ser	Arg	Ala	Pro	Ile	Ile	
TCA	CCG	ATC	ACC	ATG	GCC	TTC	GAC	CCG	ATC	AGC	CCG	ACC	CCG	CCG	CCG	672
Ser	Pro	Ile	Thr	Met	Ala	Cys	Phe	Asp	Ala	Ile	Lys	Ala	Thr	Thr	Pro	
CCG	CAC	GAC	GAA	CCC	GAG	TGC	GCC	TCC	CCG	CCG	TTC	GAC	AGC	CCG	CCG	720
Arg	His	Asp	Ala	Pro	Glu	Cys	Ala	Ser	Arg	Pro	Phe	Asp	Lys	Thr	Arg	
AAC	GGA	TTC	GTG	CTC	GCC	GAG	GGA	ACC	GCC	TTC	TTC	GTG	CTG	GAG	GAA	768
Asn	Gly	Phe	Val	Leu	Gly	Glu	Gly	Thr	Ala	Phe	Phe	Val	Leu	Glu	Glu	
CTC	GAC	AGC	GCC	CCG	AGC	GCC	GCC	CAC	ATC	TAC	ATC	GAG	ATC	GCC	GCC	816
Leu	Asp	Ser	Ala	Arg	Lys	Arg	Gly	Ala	Ile	Ile	Ile	Ala	Glu	Ile	Ala	
GCC	TAC	GCC	ACC	CCG	TCC	AAC	GCC	TAC	CAC	ATG	AGC	GCC	CTG	CCG	CCC	864
Gly	Tyr	Ala	Thr	Arg	Ser	Asn	Ala	Ile	His	Met	Thr	Gly	Leu	Arg	Pro	
GAC	GCC	GTG	GAG	ATG	GCC	GAG	CCG	ATC	CCG	CTG	CCG	CTG	GCC	GAG	GCC	912
Asp	Gly	Val	Glu	Met	Ala	Glu	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Leu	Gly	Glu	Ala	
CCG	CTG	AAC	CCG	CAG	TCC	ATC	GAC	IAC	ATC	AAC	GCC	CAC	GCC	TGG	GCC	960
Arg	Leu	Asn	Pro	Gln	Ser	Ile	Asp	Tyr	Ile	Asn	Ala	His	Gly	Ser	Gly	
ACC	AAA	CAG	AAC	GAC	CCG	CAC	GAG	ACG	GCC	GCG	TTC	AGC	CCG	AGC	CTC	1008
Thr	Lys	Gln	Asn	Asp	Arg	His	Glu	Thr	Ala	Ala	Phe	Lys	Arg	Ser	Leu	
GGC	GAC	CAC	GCC	TAC	CCG	ACC	CCG	GTG	AGC	TCC	ATC	AGC	TGG	ATG	GTG	1056
Gly	Asp	His	Ala	Ile	Arg	Thr	Pro	Val	Ser	Ser	Ile	Lys	Ser	Met	Val	
GCG	CAC	TGG	CTC	GCC	CCG	ATC	GCC	TCC	ATC	GAG	ATC	GCC	TGG	GCA	GCA	1104
Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ala	Ile	Gly	Ser	Ile	Glu	Ile	Ala	Ala	Ser	Ala	
CTC	GCC	ATG	GAG	TAC	GAC	GTG	GTG	CCG	CCC	ACC	GCC	AAC	CTG	CAC	ACC	1152
Leu	Ala	Met	Glu	Tyr	Asp	Val	Val	Pro	Pro	Thr	Ala	Asn	Leu	His	Thr	
CCC	GAC	CCC	GAG	TGC	GAC	CTC	GAC	IAC	GTG	CCC	CTG	GTG	GCC	CCG	GAC	1200
Pro	Asp	Pro	Glu	Cys	Asp	Leu	Asp	Tyr	Val	Pro	Leu	Val	Ala	Arg	Asp	
CAG	CTG	ATC	GAC	CCG	GTG	CTC	ACG	GTG	GCC	AGC	GGA	TTC	GCC	GCC	TTC	1248
Gln	Leu	Ile	Asp	Ala	Val	Leu	Thr	Val	Gly	Ser	Gly	Phe	Gly	Gly	Phe	
CAG	AGC	GCC	ATG	GTG	CTC	GCC	ACC	CCC	GAA	AGC	AGC	CTC	GTA	TGA	TGA	1293
Gln	Ser	Ala	Met	Val	Leu	Ala	Thr	Pro	Glu	Arg	Ser	Leu	Val	Val	Val	

Sal C

1290	ATG	ACC	GCC	TCC	GTG	GTG	GTG	ACC	GCC							1316
Met	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Val	Val	Thr	Gly							
CTG	GCC	GTG	GTG	TCA	CCC	AAC	GCC	ATG	GCG	GTG	AAG	GAC	TAC	TGG	GCG	1364
Leu	Gly	Val	Val	Ser	Pro	Asn	Gly	Met	Gly	Val	Lys	Asp	Tyr	Trp	Ala	
GCC	ACC	CTG	GCC	GCC	AGC	CAC	GCC	ATC	GCC	CCG	ATC	ACC	CCG	TTC	GAC	1412
Ala	Thr	Leu	Gly	Gly	Lys	His	Gly	Ile	Gly	Arg	Ile	Thr	Arg	Phe	Asp	
CCC	ACC	GCC	TAC	CCG	CCC	CGT	CTG	GCC	GCG	CAG	ATC	GAG	GAC	TTC	GAC	1460
Pro	Thr	Gly	Tyr	Pro	Pro	Arg	Leu	Ala	Gly	Gln	Ile	Glu	Asp	Phe	Asp	
GCC	GAG	GAA	CTG	CTG	CCG	AGC	CCG	CTG	CTG	CCG	CAG	ACC	GAC	CCG	GTG	1508
Ala	Glu	Glu	Leu	Leu	Pro	Ser	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Thr	Asp	Arg	Val	
ACC	CCG	CTG	GCC	CTG	GTG	GCC	CCG	ATC	TGG	GCA	CTC	CCG	GAC	GCC	GCC	1556
Thr	Arg	Leu	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Ile	Trp	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly
GCC	GAC	CCC	GCG	CAC	CTG	CCC	GAG	TTC	GAC	ATG	GCC	GTG	ATC	ACC	GCC	1604
Ala	Asp	Pro	Ala	His	Leu	Pro	Glu	Phe	Asp	Met	Gly	Val	Ile	Thr	Ala	
TCC	GCC	CCG	GCC	GCC	Gly	TTC	GAG	TTC	GCC	CAG	GCC	GAA	CTG	CAG	GCC	1652
Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Phe	Glu	Gly	Gly	Gln	Gly	Glu	Leu	Gln	Ala	Leu
TGG	AGC	CAG	GCC	AGC	CAG	TAC	GTG	TCC	GCC	TAC	CAG	TCC	TTC	GCC	TGG	1700
Trp	Ser	Gln	Gly	Ser	Gln	Ile	Val	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Phe	Ala	Trp	
TTC	TAC	GCC	GTG	AAC	AGC	CCG	CAG	GTG	ATC	TCC	ATC	CCG	AAC	GCC	ATG	1748
Phe	Tyr	Ala	Val	Asn	Ser	Gly	Gln	Ile	Ser	Ile	Arg	Asn	Gly	Met	Lys	
GCC	CCC	TCC	GCC	GTG	GTG	GTG	GTG	ACC	GAA	GCC	CCG	GCC	GCC	CTG	GAC	1796
Gly	Pro	Ser	Gly	Val	Val	Val	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Gly	Leu	Asp	Ala
GTG	CCG	CAG	GCC	CCG	CCG	CAG	ATC	CCG	CCG	GCC	ACC	CCG	CTG	ATC	GTG	1844
Val	Ala	Gln	Ala	Arg	Arg	Gln	Ile	Arg	Arg	Gly	Thr	Pro	Leu	Ile	Val	
ACC	GCC	GCC	GTG	GAC	GCC	TCC	ATC	TGC	CCG	TGG	GCC	TGG	GTG	GCC	CAG	1892
Thr	Gly	Gly	Gly	Asp	Ala	Ser	Ile	Cys	Pro	Trp	Gly	Trp	Val	Ala	Gln	
CTG	GCC	TGC	GCC	CCG	CTC	ACC	ACC	AGC	GAC	GAA	CCC	GAC	CAC	GCC	TAC	1940
Leu	Ala	Ile	Gly	Arg	Glu	Thr	Thr	Ser	Asp	Glu	Pro	Asp	His	Ala	Tyr	
CTG	CCC	TTC	GAC	CCG	GAC	CCG	ACC	GCC	IAC	CCC	GGA	GAG	GCC	GCC	GCC	1988
Leu	Pro	Phe	Asp	Arg	Asp	Ala	Asn	Gly	Tyr	Val	Pro	Gly	Glu	Gly	Gly	
CCG	ATC	CTC	ATC	GCC	GAG	GAC	GCC	GAT	GCC	GCA	CCG	GCC	CCG	GCC	GTG	2036
Ala	Ile	Leu	Ile	Ala	Glu	Asp	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Ala	Arg	Gly	Val	
CCG	CCC	TAC	GCC	GAG	GTG	GCC	GCC	TAC	GGA	GCC	ACC	ATC	GAT	CCC	CCG	2084
Arg	Pro	Tyr	Gly	Glu	Ile	Ala	Gly	Ile	Gly	Ala	Thr	Ile	Asp	Pro	Arg	
CCC	GCC	AGC	GGA	CCG	GAA	CCC	AAC	CTG	GCC	AAG	GCC	ATC	GAG	CCG	GCA	2132
Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Arg	Glu	Pro	Asn	Leu	Ala	Lys	Ala	Ile	Glu	Thr	Ala
CTG	GCC	GAC	GCC	GAC	GTG	AAC	GCC	GCC	GAC	ATC	GAC	GTG	GTA	TTC	GCC	2180
Leu	Ala	Asp	Ala	Asp	Val	Asn	Ala	Ala	Asp	Ile	Asp	Val	Val	Ile	Ala	
GAC	CCG	CCG	CCG	ACC	CCG	CCC	GCC	GAC	CTC	GCC	GAG	GCC	CCG	GCC	GTG	2228
Asp	Ala	Pro	Ala	Thr	Arg	Ala	Gly	Asp	Leu	Ala	Glu	Ala	Arg	Ala	Val	
AGC	ACG	GTG	TTC	GCC	GAC	CCG	AGC	GCC	GTG	CCG	GTG	ACC	GTG	CCC	AGC	2276
Ser	Thr	Val	Phe	Gly	Asp	Arg	Gly	Gly	Val	Pro	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Thr
ATG	ACC	GCG	CCG	CTG	TAC	TCC	GCC	GCC	CCG	CCC	CTG	GAC	CTG	CCG	GCC	2324
Met	Thr	Gly	Arg	Leu	Tyr	Ser	Gly	Ala	Pro	Leu	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	
CCG	TTC	CTC	GCC	CTG	CCG	GAC	GCC	GTG	ATC	CCG	CCC	ACC	GTG	CAC	ATC	2372
Ala	Phe	Leu	Ala	Leu	Arg	Asp	Gly	Val	Ile	Pro	Pro	Thr	Val	His	Ile	
GAC	CCG	TGC	GCC	GAC	TAC	CCC	CTC	GAC	CTG	GTG	CTG	GCC	GAA	CCC	CCG	2420
Asp	Pro	Cys	Ala	Asp	Tyr	Pro	Pro	Leu	Val	Leu	Gly	Glu	Gly	Pro	Arg	
CCG	GCC	GAG	CTG	CCG	ACC	GCC	CTG	GTG	CTG	GCC	CCG	GGA	GCC	GCC	GCC	2468
Pro	Ala	Glu	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Gly	Gly	
TTC	AAC	TCC	GCC	ATG	GTG	GTG	CCG	GCC	GCC	TGA						2501
Phe	Asn	Ser	Ala	Met	Val	Val	Arg	Ala	Ala	Val						

Fig. 3. The nucleotide sequence of DNA region encompassing two ORFs, salB, C. The translational start and stop sites and the potential ribosomal binding sites preceding the ORFs are in boldface and underlined. The predicted amino acid sequence was shown above the nucleotide sequence.

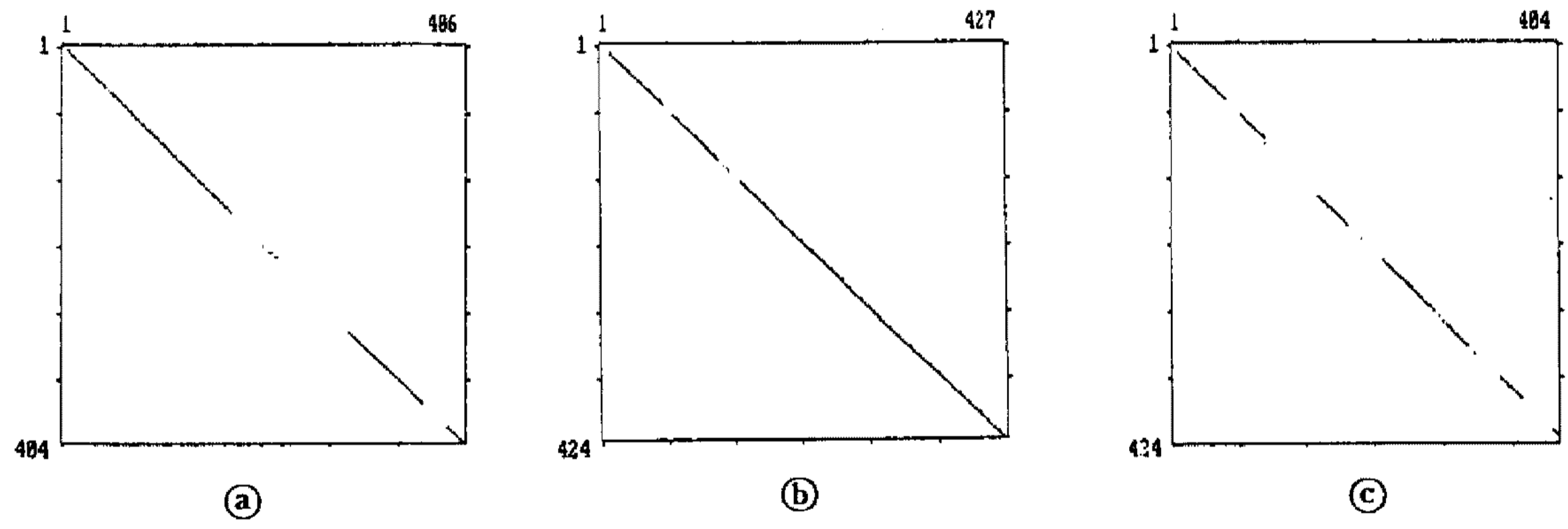


Fig. 4. Homology plot of the predicted protein product (window size, a stringency). The nucleotide sequences of tcmk, l were obtained from EMBL library with Database Access of DNASIS. a) SalB versus SalC (30, 17

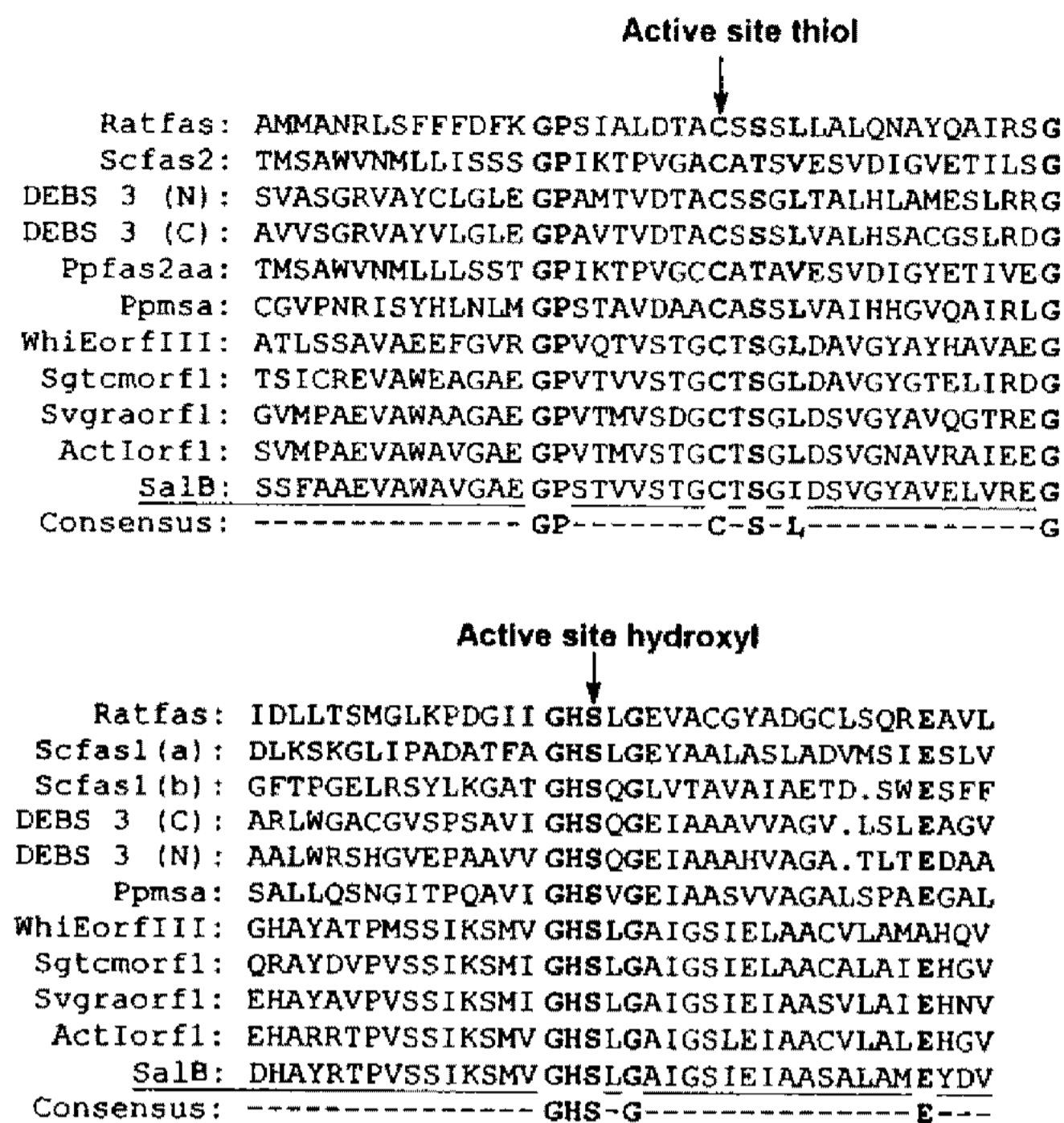


Fig. 5. Alignments of the putative active sites for the SalB with other FASs and PKSs from different origins (Fernandez-Moreno, M.A., 1992).

A derived consensus sequence is given below. The conserved residues are in boldface.

Ratfas, rat FAS; Scfas 2, *S. cerevisiae* FAS 2; Scfas 1 *S. cerevisiae* FAS 1; Ppfas, *P. patulum* MSA synthase; DEBS 3 (C, N), *S. erythraea* eryA-ORF A, domains C and N; Sgtcmorf 1, *S. glaucescens* tcmI-ORF 1; Svgraorf 1, *S. violaceoruber* gra-ORF 1; Actorf 1, *S. coelicolor* actI-ORF 3; SalB, *S. albus* salB.

최초 과정에 관여한다고 믿어지고 있으며, 이들 minimal PKS의 작용 기작이 구체적으로 입증된 것은 근래 이루어진 chimeric PKS의 발현 결과에 기인하는 것이다(7, 8, 13, 14, 18, 19, 24). Minimal PKS는 acetyl CoA, propionyl CoA, malonyl CoA 등의 acyl 전구체로부터 oligoketide를 생합성한다. 생성된 oligoketide는 KS/AT-CLF의 영향하에 최초의 cyclization 반응을 거치게 된다. 이 cyclization은 알려진 몇가지의 경우를 제외하고는 C-7과 C-12 사이에 일정하게 진행된다. 현재까지 그 생성 oligoketide에 대한 특이성이 매우 이완되어 있는 *fren*(18)과 특이한 유전자 구조를 갖고 있는 *tcm*, tetracenomycin 생합성 유전자(25)만이 이 항상성을 벗어난다(7, 8). 두번째 cyclization은 aromatase(6, 20, *actVII*의 생성물)에 의해 진행되어지는데, 현재까지 알려진 바에 의하면 이들의 특이성은 minimal PKS의 영향을 받지 않으며, 첫번째 cyclization을 거친 polyketide의 골격의 성격, 탄소 골격의 수와 ketoreduction의 유무 등에 영향을

받는 듯하다. 따라서, 다양한 polyketide 구조의 기본 골격은 KS/AT와 CLF의 작용에 의해 결정되어진다고 말할 수 있다(20).

SalB, C와 대표적인 type II PKS 간의 비교 분석

알려진 몇몇 type II PKS에 대하여 β -keto acyl synthase의 유추 아미노산 서열을 비교하면 그 서열의 보존도가 매우 높음을 알 수 있다. KS/AT에 있어서 예상되는 활성 부위는 VSTGCTSGLD-V와 GHSLGA이며 기질의 thio acyl 기가 cysteine의 -SH에 결합하며, 사슬 연결 단위는 serine의 -OH에 결합한다고 여겨진다(2, 12). 그러나, CLF의 경우는 이러한 활성 부위가 발견되지 않았으며, 각 유전자들 사이의 유사성에 있어서 KS와 같은 전 영역에 걸친 유사성은 보이지 않는다. *S. albus*로부터 분리한 유전자의 염기 서열이 위에 열거된 조건들을 만족함을 유추 아미노산 서열의 비교로부터 확인할 수 있었다. SalB와 대표적인 type II PKS의 KS 및 AT의 활성 부위를 비교 분석하면 Fig. 5와 같다.

요 약

Polyketide 계 이온 투과성 항생제인 salinomycin의 생성 균주인 *Streptomyces albus*에서 그 생합성 유전자를 분리하기 위하여, *actI*을 probe로 이용하여 *S. albus* ATCC 21838 유전자 library로부터 약 24 kb의 *S. albus* DNA를 포함하고 있는 pWHM 210을 분리하였다. 이 24 kb DNA 중에서 *actI*에 유사성을 보이는 3.8 kb BamHI 절편을 분리하여 염기 서열을 결정, 분석하였다. 이 영역에 존재하는 두개의 완전한 ORFs가 type II PKS(polyketide synthase)의 β -keto acyl synthase/acyl transferase와 chain length determining factor 유전자에 해당하는 것임을 확인할 수 있었다. 이들은 잘 보존된 minimal type II PKS 유전자의 일부로, 알려진 다른 type II PKS 유전자들과 높은 유사성을 보였다.

감사의 글

본 연구는 학술진흥재단의 1991~4년도 대학부설 연구소 지원연구비 및 과학재단의 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터) 지원연구비(JWS)와 미국 NIH grant GM 25799(CRH)의 지원에 의한 것이며, 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Bibb, M.J., P.R. Findlay, and M.W. Johnson. 1984. The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein encoding sequence. *Gene* **30**: 157-166.
2. Bibb, M.J., B. Sandor, M. Haideh, F.C. John, and C.R. Hutchinson. 1989. Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens* *tem* I genes provides key information about the enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis. *EMBO J.* **8**: 2727-2736.
3. Cortes, J., S.F. Haydock, G.A. Roberts, D.J. Bevitt, and P.F. Leadly. 1990. An unusually large multifunctional polyketide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* **348**: 176-178.
4. Donadio, S., M.J. Staver, J.B. MaAlpine, S.J. Swanson, and L. Katz. 1991. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* **252**: 675-679.
5. Donadio, S. and L. Katz. 1992. Organization of the enzyme domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* **111**: 51-60.
6. Fernandez, M., M.A., E. Matinez, L. Boto, D.A. Hopwood, and F. Malpartida. 1992. Nucleotide sequence and deduced functions of a set of co-translated genes of *Streptomyces coelicolor* A3(2) including the polyketide synthase for the antibiotic actinorhodin. *J. Bio. Chem.* **267**: 19278-19290.
7. Fu, H., S.E. Khosla, D.A. Hopwood, and C. Khosla. 1994. Engineered biosynthesis of novel polyketide: Dissection of the catalytic specificity of the act ketoreductase. *J.A.C.S.* **116**: 4166-4176.
8. Fu, H., R. McDaniel, D.A. Hopwood, and C. Khosla. 1994. Engineered biosynthesis of novel polyketide: Stereochemical course of two reaction catalyzed by a polyketide synthase. *Biochemistry* **33**: 9321-9326.
9. Hallam, S.E., F. Malpartida, and D.A. Hopwood. 1988. DNA sequence, transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* **74**: 305-320.
10. Hopwood, D.A., F. Malpartida, H.M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B.A.M. Rudd, H.G. Floss, and S. Mura. 1985. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature* **314**: 642-644.
11. Hopwood, D.A. and D.H. Sherman. 1990. Molecular genetics of polyketide and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Genet.* **24**: 37-66.
12. Hutchinson, C.R., H. Decker, H. Motamedi, B. Shen, R.G. Summer, E. Wendt-Pienkowski, and W.L. Wessel. 1992. Molecular genetics and biochemistry of type II polyketide stnase from the perspective of tetracenomycin C biosynthesis in *Streptomyces glaucescens*. *Actinomycetologia* **6**: 49-68.
13. Katz, L. and S. Donadio. 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 875-912.
14. Khosla, C., R. McDaniel, S.E. Khosla, R. Torres, D.A. Sherman, M.J. Bibb, and D.A. Hopwood. 1993. Genetic construction and functional analysis of hybrid polyketide synthase containing heterologous acyl carrier proteins. *J. Bacteriol.* **175**: 2197-2204.
15. Leskiw, B.K., M. Mevarech, L.S. Barritt, S.E. Jensen, D.J. Henderson, D.A. Hopwood, C.J. Bruton, and K.F. Chater. 1990. Discovery of an insertion sequence, IS116, from *Streptomyces clavuligerus* and its relatedness to other transposable elements from actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 1251-1258.
16. Malpartida, F., S.E. Hallam, H.M. Kieser, H. Motamedi, C.R. Hutchinson, M.J. Butler, D.A. Sugden, M. Warren, C. McKillop, C.R. Bailey, G.O. Humphreys, and D.A. Hopwood. 1987. Homology between *Streptomyces* genes coding for synthesis of different polyketide used to clone antibiotic biosynthetic genes. *Nature* **325**: 818-821.
17. Marsden, A.F.A., P. Caffrey, J.F. Aparicio, M.S. Loughran, J. Staunton, and P.F. Leadly. 1994. Stereospecific acyl transfer on the erythromycin-producing polyketide synthase. *Science* **263**: 378-380.
18. McDaniel, R., S.E. Khosla, D.A. Hopwood, and C. Khosla. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketide: Manipulation and analysis of an aromatic polyketide synthase with unproven catalytic specificities. *J.A.C.S.* **115**: 11671-11675.
19. McDaniel, R., S.E. Khosla, D.A. Hopwood, and C. Khosla. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketide. *Science* **262**: 1546-1550.
20. McDaniel, R., S.E. Khosla, D.A. Hopwood, and C. Khosla. 1994. Engineered biosynthesis of novel polyketide: *act* VII and *act* IV genes encode aromatase and cyclase enzymes, respectively. *JOAC* **116**: 10855-10859.
21. Omura, S., H. Ikeda, F. Malpartida, H.M. Kieser, and D.A. Hopwood. 1986. Production of new hybrid antibiotics, mederrhodins A and B, by genetically engineered strain. *Antimicro. Agents Chemother.* **29**: 13-19.
22. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and M. Maniatis.

1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press. Cold Spring Harbor, NY.
23. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
24. Sherman, D.H., E.S. Kim, M.J. Bibb, and D.A. Hopwood. 1992. Functional replacement of genes for individual polyketide synthase components in *Streptomyces coelicolor* A3(2) by heterologous genes from a different polyketide pathway. *J. Bacteriol.* **174**: 6184-6190.
25. Summers, R.G., E. Wendt-Pienkowski, H. Motamedi, and C.R. Hutchinson. 1992. Nucleotide Sequence of the *tcm II-tcm IV* Region of the Tetracenomylin C Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces glaucescens* and Evidence that the *tcmN* Gene Encodes a Multifunctional Cyclase-Dehydratase-O-Methyl Transferase. *J. Bacteriol.* **174**: 1810-1820.
26. Westley, J.W. 1977. Polyether antibiotics: versatile carboxylic acid ionophores produced by *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* **22**: 177.
27. Wright, F. and M.J. Bibb. 1992. Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* **113**: 55-65.

(Received 10 January 1995)