*Korean Journal of Life Science*
Vol. 12. No. 5. 632~648, 2002

총 설

# Polyketide 이차대사물질의 생합성

윤여준[1] · 송재경[2†]

[1]울산대학교 공과대학 생명화학공학부
[2]선문대학교 자연과학부, 생체분자재설계연구소

# Biosynthesis of Polyketide Secondary Metabolites

Yoon, Yeo Joon and Sohng, Jae Kyung†

*University of Ulsan, School of Chemical Engineering and Bioengineering*
*San 29, Muger 2-dong, Nam-gu, Ulsan, 680-749, Korea*
*Sunmoon University, Division of Natural Sciences*
*#100, Kalsan-ri, Tangjeong-myeon, Asan-si, Chungnam, 336-708, Korea*

## Abstract

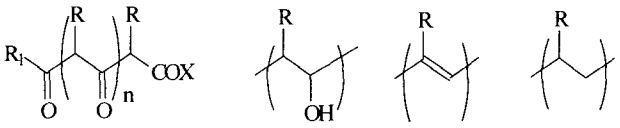
The term polyketide defines a class of natural products synthesized through the successive condensation of small carboxylic acids, which results in products containing multiple carbonyl or hydroxyl groups, each separated by one carbon atom, as in the structural element $CH_2C(=O)CH_2CH(OH)CH_2C(=O)$-. Plant flavonoids, fungal aflatoxins, as well as hundreds of compounds of different structures that can inhibit the growth of bacteria, viruses, fungi, parasites or human tumor cells are included in this diverse group. Some of antifungal polyketides also have immunosuppresive activity. Polyketides can vary widely in structure, and the diversity of polyketide structures reflects the wide variety of their biological properties. This review focuses on the biosynthesis of polyketides and recent progress in combinatorial biosynthesis of new hybrid polyketide compounds.

**Key words** – polyketides, *Streptomyces*, combinatiorial biosynthesis

## 서 론

Polyketide계 화합물이란 multiple ketone 그룹, $(CH_2\text{-}CO)_n$, 을 가지고 있는 물질이다 [35]. 단순한 구조의 acetyl-, propionyl-, 또는 butyl-CoA를 출발물질로 하여 축합 반응을 거쳐 탄소 한 개를 사이에 두고 ketone (β-ketone) 또는 ketone의 환원형이 연속적으로 형성하여 만들어지는 천연 화합물이며, polyketone에 있는 대부분의 keto 그룹은 환원 등의 과정을 거쳐 여러 가지 다른 기능기로 변형된다 (Scheme 1).

Polyketide 계열 사슬 길이는 대부분 4개에서 10개 bui-




Scheme 1

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 041-530-2246, Fax : 041-541-7425
E-mail : sohng@omega.sunmoom.ac.kr

lding block이 축합 반응하여 합성되지만, 사슬길이는 보다 다양하게 존재한다. Polyketide에 대한 정의가 이처럼 광대한 것만큼 다양한 구조의 polyketide계 화합물이 자연계에 존재하며 그 응용가치도 매우 높고 실제로 의약의 풍부한 공급원이 되고 있다. 항생제 erythromycin, tetracycline, methymycin, 항암제 doxorubicin, neocazinostatins, 면역억제제 rapamycin, FK506, antiparasitic 제제 avermectin, nemadectin, 항진균제 amphotericin, griseofulvin, 심장순환기약제 lovastatin, compactin 그리고 동물약품 monensin, tylosin이 그 산업적 예이며 rapamycin과 FK506은 세포의 signal transduction 규명에 사용되기도 했다 (Fig. 1) [19].

대부분의 polyketide는 방선균 등이 생산하는 중요한 천연물로서 Coenzyme A-activated carboxyl acid의 축합으로 형성된다. 그러나 다양한 구조를 가지는 polyketide계 화합물이라도 이들 모두 poly-β-ketone 중간체를 거쳐 생합성되는 공통점을 가지고 있기 때문에, 이에 관여하는 효소들의 특징도 매우 유사하다. Polyketide와 fatty acid의 생합성은 CoA로부터 전이 된 acyl 부분 (starter unit)이 β-ketoacyl synthase (KS)에 의해 반응이 시작된다. 사슬 합성의 각각의 단계는 carboxylated된 acyl 그룹 (extender unit)이 CoA로부터 acyl carrier protein (ACP)로 옮겨지고, 효소에 결합되어 있는 두 개의 acyl 그룹은 decarbosylation 되면서 축합된다. Fatty acid 생합성의 경우 증가하는 사슬의 β-carbonyl은 methylene으로 완벽하게 환원이되지만, polyketide 생합성의 경우 증가하는 사슬의 β-carbonyl은 그대로 keto 그룹으로 남거나, 환원 등에 의해, hydroxyl, 이중결합 혹은 methylene 기능기로 전이된다. Polyketide의 사슬의 길이, 환원 정도, stereochemistry 및 cyclization은 각각 PKS에 따라 다르며, cyclized polyketide에서 부수적으로 환원, methylation, acylation, glycosylation 및 산화반응에 따라 구조가 다양하게 생합성 된다. Polyketide와 fatty acid의 화학적 구조는 크게 다르지만 분석된 유전자 집단을 보면 크게 5가지 종류로 나눌 수 있다 (Fig. 2). 첫 번째 그룹에 속하는 actinorhodin, granaticin 및 tetracenomycin과 같은 bacterial aromatic polyketide를 생합성하는 PKS와 bacterial 및 plant FAS는 비교적 작은 active site로 구성되어 있다. 각각의 active site는 독립된 효소로 구성되어 있다. 두 번째 그룹은 동물 및 fungal의 FAS 및 6-methylsalicyclic acid synthase (MSAS)와 같은 fungal PKS로서 하나 혹은 두 개의 polypeptide로 구성되어 있고, 독립된 active site는 domain 형태로 구성되어있다. 복수효소 (*mutienzyme*)에는 두가지 다른 형태가 있는데 전체 반응에서 전체 효소 반응 수 보다 적은 수의 active site가 있는 것이 있다. 이것은 몇 개의 active site는 합성과정에서 반복적으로 작용하고 있는 예가 되며 두 번째 그룹이 여기에 속한다. 세 번째 그룹은 두 번째와 달리 같은 복수효소지만 modular PKS의 특성이 있다. 탄소사슬을 형성하고 변형하는 과정에서 각각의 active site는 각각의 효소반응에 작용하며, active site는 module로 집단화되어 있으며, 각 module은 탄소사슬의 축합과 환원에 필요한 active site를 가지고 있다. 네번째 그룹은 chalcone과 stilbene 합성 효소인 PKS는 한 개의 단백질로 구성되어 있고, 위에 설명된 PKS 및 FAS와 유사성이 전혀 없다. 이들 합성은 근본적으로 다른 합성효소로 보여진다. 마지막 그룹은 polyketide synthase와 nonribosomal polypeptide synthase의 hydrid된 형태로 전체적인 형태는 modular type으로 구성되어 있다.

## Fungal polyketide synthase (methylsalicylic acid synthase, MSAS)

일반적으로 fungal polyketide synthase로서 6-methylsalicylic acid synthase (MSAS)는 가장 간단하고 잘 연구되어 있는 다중기능 효소이며, acetyl-CoA와 malonyl-CoA 기질에 대한 매우 높은 특이성, 사슬의 길이 조절, 그리고 방향특이성이 있는 keto 그룹을 환원시키는 등의 특징을 지닌 매우 큰 multi-domain protein이다. 그들은 생물학적으로 활성이 강한 여러 천연물들로서 항생제, 항암제, 면역억제제, 그리고 약리학적으로 중요한 여러 이차대사 물질들로 이용되고 있다 [35]. 1960년부터 여러 연구가들은 acetyl-CoA와 malonyl-CoA로부터 methylsalicylic acid (MSA)가 어떻게 생합성 되는지 밝혀내기 위해 곰팡이인 *Penicillium patulum*의 crude extract 실험을 시작하였으며 [9], 최근에 이르러 그 효소의 정제를 통해 MSAS가 180-kDa 단량체들로 이루어진 750-kDa에 해당하는 동종사량체로 구성되어 있다는 것을 증명하기까지 이르렀다 [41]. MSAS는 사슬 길이의 조절에 대한 메커니즘과 환원반응의 방향특이성, 그리고 PKS에 의한 building block 특이성 등에 대한 연구를 하는데 아주 유용한 모델 형태로서 그 유전자들을 클론하여

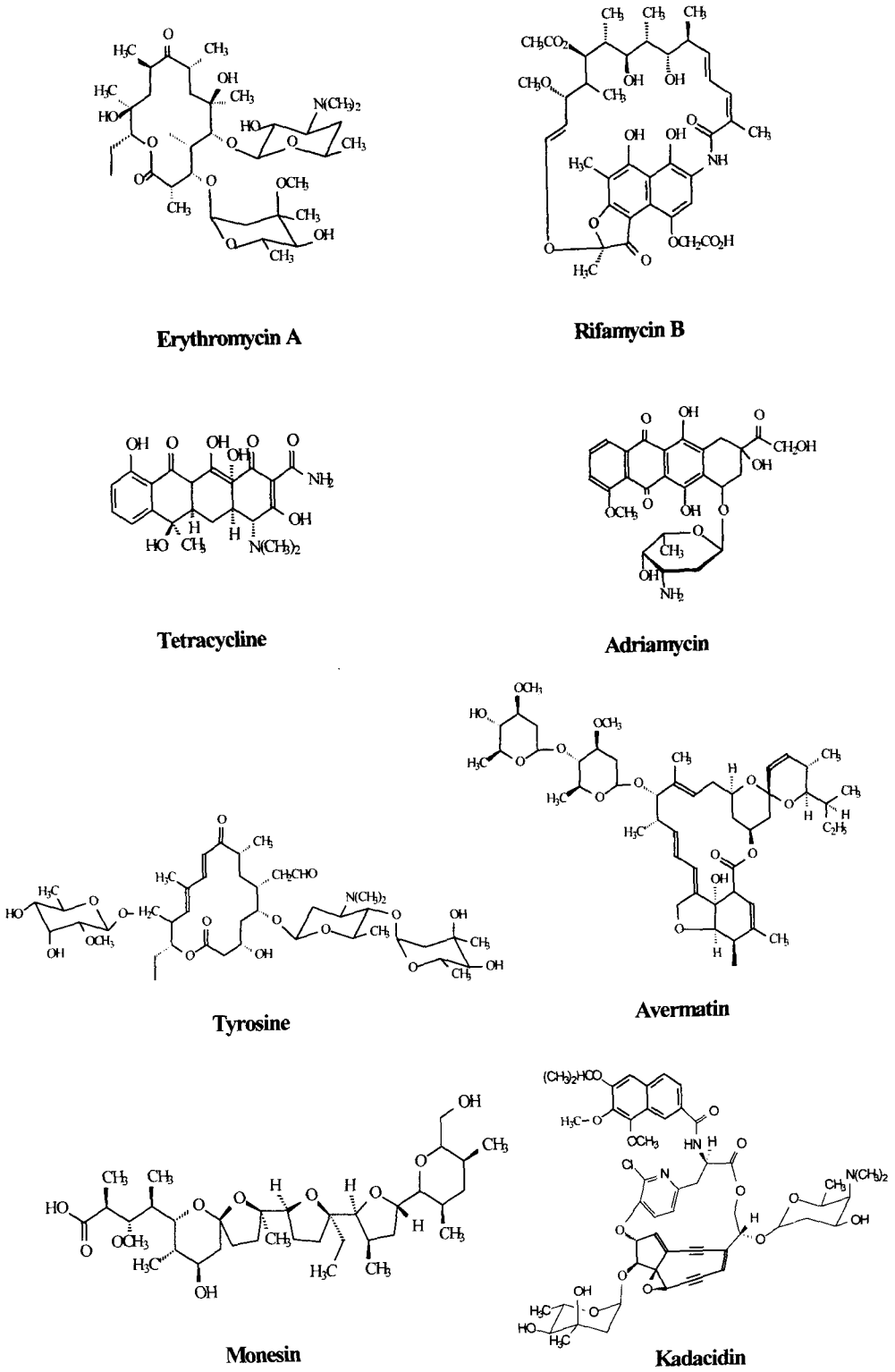



Fig. 1. Structures of polyketides.

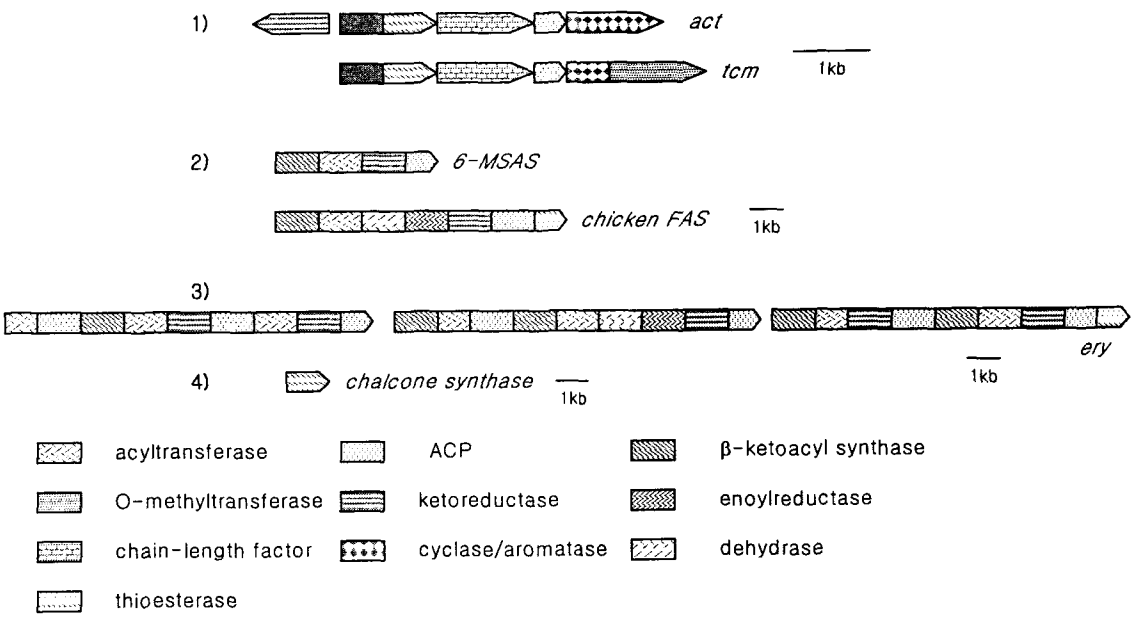



Fig. 2. Clusters of fatty acid and polyketide synthases.

염기서열 분석한 결과 ketosynthase (KS), acyltransferase (AT), ketoreductase (KR), 그리고 acyl carrier protein (ACP)등의 존재를 확인하였다 [2]. 6-MSAS의 생합성 과정은 acetyl-CoA로부터 유도된 acetyl 기로 생합성이 시작되고 malonyl-CoA에서 유도된 확장 기들이 decarboxylated 되게 축합되어 polyketide 사슬이 연결되며, 특정한 곳의 carbonyl 기를 hydroxyl 기로 환원시킬 수 있는 NADPH를 이용한다(Fig. 3).

다시 말하면, NADPH와 acetyl-CoA 그리고 malonyl-CoA의 존재 하에선 tetraketide인 methylsalicylic acid가 생합성 되고, NADPH가 존재하지 않을 때는 환원이 되지 않은 triketide인 triacetic acid lactone (TAL)이 생합성 된다. 또한 그러한 MSAS 유전자들을 *Streptomyces coelicolor* 안에서 heterologously하게 발현시키고 [3], 최근에는 *Bacillus subtilis* 에서 얻어진 phosphopantetheinyl transferase와 함께 yeast인 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Escherichia coli*에서 발현시킴으로써 [21] MSAS에 대한 유전적 조작을 좀 더 용이하게 하였을 뿐만 아니라 그들의 구조적인 분석을 바탕으로 PKS의 구조와 기능의 상호 관련성에 대하여 접근할 수 있었다. 그리고 fungal polyketide는 대략 전체 사슬 길이가 *6~18* 탄소들로 이루어져 있으며 보기 드문 그 구조의 다양성 때문에 combinatorial approach에도 응용되고 있다.

## Bacterial polyketide synthase

Polyketide synthase는 polyketide 생합성에 있어 가장 중요한 효소들의 복합체(enzyme complex)로서, polyketide계 화합물의 탄소 backbone의 생합성에 관여한다. PKS의 주요 구성요소로는, 탄소-탄소 축합반응에 실제로 관여하는 β-ketoacyl-synthase (KS), 축합반응에 사용되는 특정 기질(acyl-기)을 인지하여 PKS의 KS active site로 운반하는 역할을 하는 acyltransferase(AT), 탄소-탄소 축합반응이 KS에 의해 원활히 일어날 수 있도록 탄소 기질을 잡아주는 acyl carrier protein (ACP), 축합반응으로 β위치에 생성된 ketone을 hydroxyl-기로 환원시켜주는 ketoreductase (KR), hydroxyl-기를 탄소 이중결합으로 만들어주는 dehydratase (DH), 그리고 이런 불포화 탄소 이중결합을 완전히 포화된 탄화수소물로 환원시켜주는 enoylreductase (ER) 등이 있다.

하나의 multifunctional polyketide에 의해 일련의 생합성이 진행되는 경우는 type I 으로 분류된다. type I 으로 분류되는 PKS의 생합성 유전자는 "module"구조를 갖는 multifunctional 효소를 생산하며, 각 module의 작용에 의해 한 회씩의 acyl 축합반응과 이에 따른 ketone 작용기의 변환이 이루어진다. 하나의 다기능 효소에 의해 반복으로 축합 반응이 일어나는 것이 아니라 한번의 축합 반응에 대

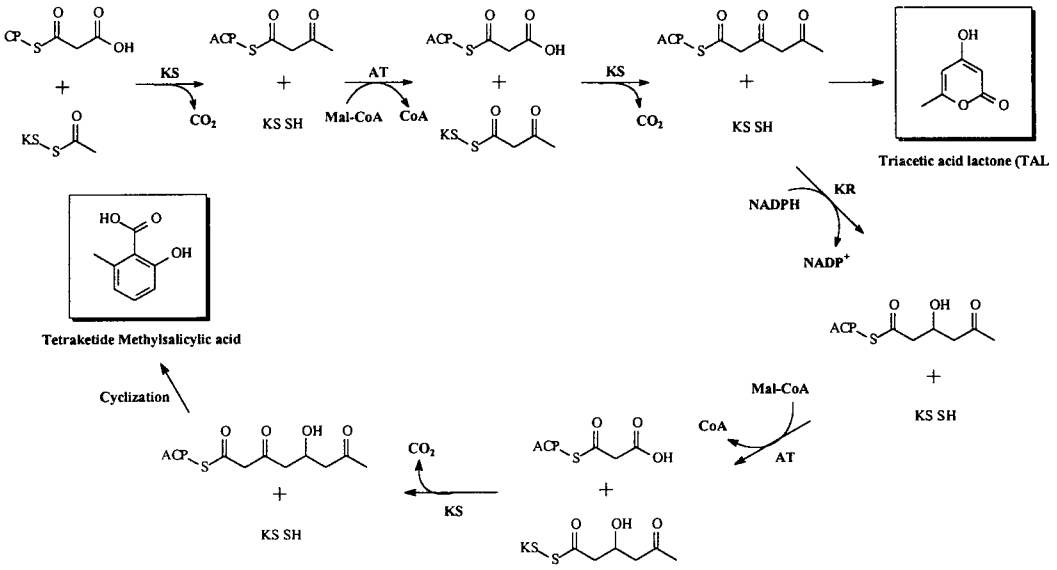



Fig. 3. Biosynthesis of tetraketide methylsalicylic acid and triacetic acid lactone by 6-methylsalicylic acid synthaase (MSAS).

해 하나의 module multifunctional enzyme이 관여해 축합 반응의 횟수에 따라 module multifunctional enzyme의 수가 결정된다. Type I PKS에 의해 macrolide 또는 complex polyketide 화합물들이 생성되며 대표적인 예로는 erythro--mycin, avermectin, rifamycin 등이 있다 [8,11,1].

TypeⅡ PKS가 관여하는 aromatic polyketid들의 생합성 과정은 독립적인 monofunctional 단백질들의 효소 작용에 의해 이루어지며, 이들 각각의 효소 활성부위가 비공유적 결합에 의해 모여져 multifunctional complex의 형태를 이룬다. 이와 같이 단 기능 효소들의 결합체가 효소 활성부위를 반복 사용하여 축합 반응을 촉매하여 poly-β-ketone 구조를 합성하고 최종적으로 aromatic polyketide 구조로 변형된다. TypeⅡPKS 에 의해서 합성되는 대표적인 화합물로는 actinorhodin, tetracyclin, daunorubicin 등이 있다.

### 1) Aromatic polyketide synthase

Aromatic polyketide 계열의 생합성에 참여하는 효소는 단기능을 가진 PKS로 구성되어 있으며 염기서열 분석을 통해 PKS 각각에 해당하는 acyl transferase (AT; condensing 효소), acyl carrier protein (ACP), ketoreductase (KR), cyclase/dehydratase (CYC/DH) 유전자 집단의 존재가 밝혀졌다. Type II polyketide synthase는 acetyl-CoA가 여러 개의 malonyl-CoA와 반복된 축합 과정을 거쳐 탄소가 16~20 개로 구성된 poly-β-carbonylthioester가 합성되고, KR, cyclase, dehydratase 효소 등에 의해 tricyclic과 tetracyclic fused-ring을 가진 aromatic 화합물로서 합성된다. TypeII PKS 유전자는 기본적인 단위 PKS (minimal PKS) 유전자를 포함하고 있으며 이들에 의해 poly-β-ketone 구조가 생합성 된다. Minimal PKS는 acyltransferase domain을 포함하는 ketosynthase (KS)와 축합반응의 횟수를 결정할 것으로 알려진 chain length factor (CLF), 그리고 acyl carrier protein (ACP)로 구성된다. CLF는 ketosynthase와 아미노산 서열이 상당히 유사하지만 ketosynthase의 활성부위인 cysteine을 포함하고 있지 않다. Poly-β-ketone의 크기가 CLF에 의해서만 아니라 KS와 같이 존재할 때 결정되는 것으로 알려진 이후로 CLF는 KSβ로, KS는 KSα로 명명되고 있다. Minimal PKS 이외에 poly-β-ketone을 aromatic-ring을 포함하는 구조로 전환시키는 효소인 cyclase 또는 aromatase, poly-β-ketone의 특정한 위치의 ketone을 환원시키는 ketoreductase (KR) 등이 PKS의 주요 구성효소로서 주로 발견된다. PKS의 주요 구성효소에 의해 합성된 aromatic 화합물은 oxidase, methyltransferase, hydroxylase, glycosyltransferase 등에 의해 주변구조가 변형되어, 생물학적 활성이 높은 물질로서 생합성 된다 (Table 1) [40,5,42,13].

여러개의 잘 알려진 typeII PKS 유전자 10 여개 중에 actinorhodin과 tetracenomycin의 생합성 기작에 대해서 가

Table 1. Type II PKS and biosynthetic genes.

| Compounds | Starter | Extender | Gene Designation | PKS Genes | Organisms | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Actinorhodin | AcetylCoA | 7MalonylCoA | act | KSα,KSβ,ACP,Aromatase, Cyclase,KR | *S.coelicolor* | 13 |
| Tetracenomycin | AcetylCoA | 9MalonylCoA | tcm | KSα,KSβ,ACP, 3Cyclase | *S.gaucescens* | 42 |
| Granaticin | AcetylCoA | 7MalonyCoA | gra | KSα,KSβ,ACP,Cyclase,KR | *S.violaceoruber* | 40 |
| Aklavinone | Propionyl-CoA | 9MalonylCoA | akn | KSα,KSβ,ACP,Cyclase,KR | *S.galilaeus* | 43 |
| Daunorubicin | Propionyl-CoA | 9MalonylCoA | dps | KSα,KSβ,ACP,Cyclase,KR,AT | *S.peucetius* | 37 |
| Oxytetracycline | Malonamyl-CoA | 8MalonylCoA | otc | KSα,KSβ,ACP,Cyclase,KR,AT,CoA ligase, Asparaginase | *S.rimosus* | 22 |
| Frenolicin | AcetylCoA | 8MalonyCoA | fren | KSα,KSβ,ACP,Cyclase,KR | *S.roseofulvus* | 4 |
| Griseusin | AcetylCoA | 9MalonylCoA | gris | KSα,KSβ,ACP,Cyclase,KR | *S.griseus* | 45 |
| Jadomycin | AcetylCoA | 9MalonylCoA | jad | KSα,KSβ,ACP,Cyclase,KR | *S.venezuelae* | 14 |
| Mithramycin | AcetylCoA | 9MalonylCoA | mtm | KSα,KSβ,ACP,Cyclase,KR | *S.argillaceus* | 24 |

장 많은 연구가 이루어졌다. 가장 많이 연구가 되어 있는 aromatic polyketide로는 *Streptomyces coelicolor* A3에서 생산되는 benzoisochromanequinone계 항생제인 actinorhodin이 있다. Labeling 실험에 의해 actinorhodin이 8개의 acetate로부터 합성됨이 밝혀졌고 block mutant에 의해 누적된 중간체와 shunt product의 구조 분석을 통해 생합성 과정이 증명되었다 (Fig. 4). Block mutant를 이용한 실험결과에 따르면, *act*I, *act*VII, *act*IV들은 polyketide 사슬초기합성에 관여하고, *act*III는 polyketide의 reduction, *act*IV는 dehydration, 그리고 *act*VI, *act*VA, *act*VB는 cyclization과 reduction 반응을 촉매 함이 증명되었다 [27, 7].

### 2) Aromatic PKS의 heterogeneous 조합

Aromatic polyketide 화합물의 생합성 유전자 조작을 통한 신규 화합물의 합성 가능성은 생합성 유전자의 기능을 확인하고자 하는 실험과정 중에 얻어진 결과이다. Aromatic polyketide 생합성 중간체로서 반응성이 매우 높은 poly-β-ketone이 생성되기 때문에 확보된 생합성 효소의 기질에 대한 활성 확인과 촉매 산물의 구조분석이라는 전형적인 in vitro 실험이 불가능하다. 이와 같은 방법상의 한계는 재조합 PKS 유전자를 형질전환 시킨 균주에서 생성되는 화합물의 구조분석에 의한 유전자기능 확인이라는 방법에 의해 극복되었고 부수적으로 새로운 구조의 polyketide를 합성할 수 있는 방법도 얻게 되었다. 재조합 PKS 유전자를 이용하여 얻어진 결과들은 종합하여 보면 다음과 같이 정리할 수 있다 (Table 2, Fig. 5).

① 기본 골격인 poly-β-ketone의 길이는 minimal PKS에 의해 결정된다. Minimal PKS의 구성 단위중 하나인 ACP는 기본 골격의 길이에 영향을 주지 않고 교환될 수 있으며 (Table 2, entry 1~6), KSα와 KSβ는 교환 가능한 경우와 없는 경우가 공존한다 (Table 2, entry 7~19).

② KR은 길이가 다른 poly-β-ketone을 인식하여 일반적으로 9번 탄소의 carbony기를 히드록실 기로 환원시킨다 (Table 2, entry 20~24).

③ Poly-β-ketone의 접힘은 KR이 없는 경우, 일반적으로 존재하는 cyclase의 종류에 의해서 결정되며 (Table 2, entry 25~28) 현재까지 11번 탄소와 9번 탄소 그리고 극히 예외적으로 7번 탄소의 접힘만이 관찰되었다. KR이 있는 경우 접힘은 환원되는 탄소의 위치에서 일어난다.

④ 재조합 PKS의 경우 2차 또는 3차 고리화는 효소반응이 아닌 구조적 불안정성에 의해서 결정된다.

결론적으로 TypeII PKS에 의해서 생성된 aromatic polyketide의 구조는 생합성에 참여하는 구성효소간의 상호 작용에 의해서 결정된다. 이와같은 TypeII PKS 유전자의 작용기작 특징은 이들을 조합적 (combinatorial biosynthetis)으로 이용하여 새로운 구조의 화합물을 합성하기 위한 시도에 한계로서 작용할 것이다. 새로운 구조의 aromatic polyketide를 합성하기 위한 시도는 이와 같은 한계 때문에 앞으로는 PKS 구성 효소중 일부 특히 cyclase를 이용한

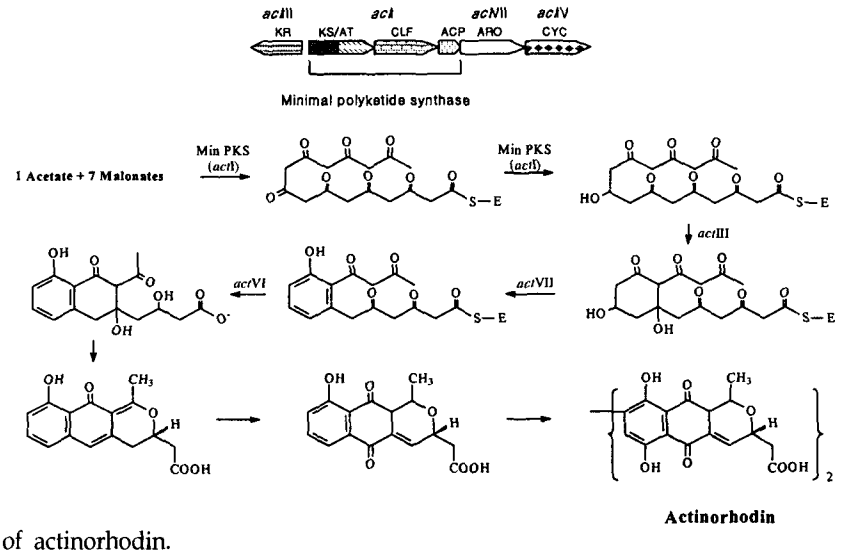



Fig. 4. Biolsynthesis of actinorhodin.

Table 2. Polyketides produced by recombinant PKSs.

| Entry | KSα | KSβ | ACP | KR | CYC | Metabolites | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ACP change,1 | *act* | *act* | *act* | | | SEK4 | 31 |
| 2 | *act* | *act* | *tcm* | | | SEK4 | 39 |
| 3 | *act* | *act* | *act* | *act* | actVII,IV | DMAC | 28 |
| 4 | *act* | *act* | *gra* | *act* | actVII,IV | DMAC | 28 |
| 5 | *act* | *act* | *fren* | *act* | actVII,IV | DMAC | 29 |
| 6 | *act* | *act* | *tcm* | *act* | actVII,IV | DMAC | 28 |
| KSα+β change,7 | *tcm* | *tcm* | *act* | *act* | actVII,IV | RM20 | 28 |
| 8 | *fren* | *fren* | *act* | *act* | actVII,IV | DMAC,RM18,RM18b | 29 |
| 9 | *act* | *act* | *tcm* | | tcmJ,N | UWM1 | 39 |
| 10 | *dps* | *dps* | *tcm* | | tcmJ,N | TcmF2 | 33 |
| 11 | *jad* | *jad* | *tcm* | | tcmJ,N | TcmF2 | 34 |
| KSα change,12 | *gra* | *act* | *act* | *act* | actVII,IV | DMAC | 28 |
| 13 | *tcm* | *act* | *act* | *act* | actVII,IV | DMAC | 28 |
| 14 | *fren* | *act* | *act* | *act* | actVII,IV | DMAC | 29 |
| 15 | *act* | *tcm* | *tcm* | | tcmJ,N | - | 39 |
| KSβ change,16 | *act* | *gra* | *act* | *act* | actVII,IV | DMAC | 28 |
| 17 | *tcm* | *act* | *tcm* | | tcmJ,N | TcmF2,UWM1(trace) | 39 |
| 18 | *act* | *tcm* | *act* | *act* | actVII,IV | - | 28 |
| 19 | *act* | *fren* | *act* | *act* | actVII,IV | - | 29 |
| KR change,20 | *tcm* | *tcm* | *tcm* | *act* | | RM20b | 31 |
| 21 | *tcm* | *tcm* | *tcm* | *act* | tcmJ,N | RM20b | 30 |
| 22 | *tcm* | *tcm* | *tcm* | *dps* | tcmJ,N | RM20b,TcmF2 | 34 |
| 23 | *tcm* | *tcm* | *tcm* | *jad* | tcmJ | RM20b | 34 |
| 24 | *otc* | *otc* | *otc* | *act* | otc | RM20b | 12 |
| Folding change,25 | *tcm* | *tcm* | *tcm* | | tcmJ,N | TcmF2 | 39 |
| 26 | *act* | *act* | *act* | | tcmJ,N | RM77 | 30 |
| 27 | *fren* | *fren* | *fren* | | tcmJ,N | PK8 | 23 |
| 28 | *tcm* | *tcm* | *tcm* | | actVII,IV | SEK15,SEK15b | 31 |

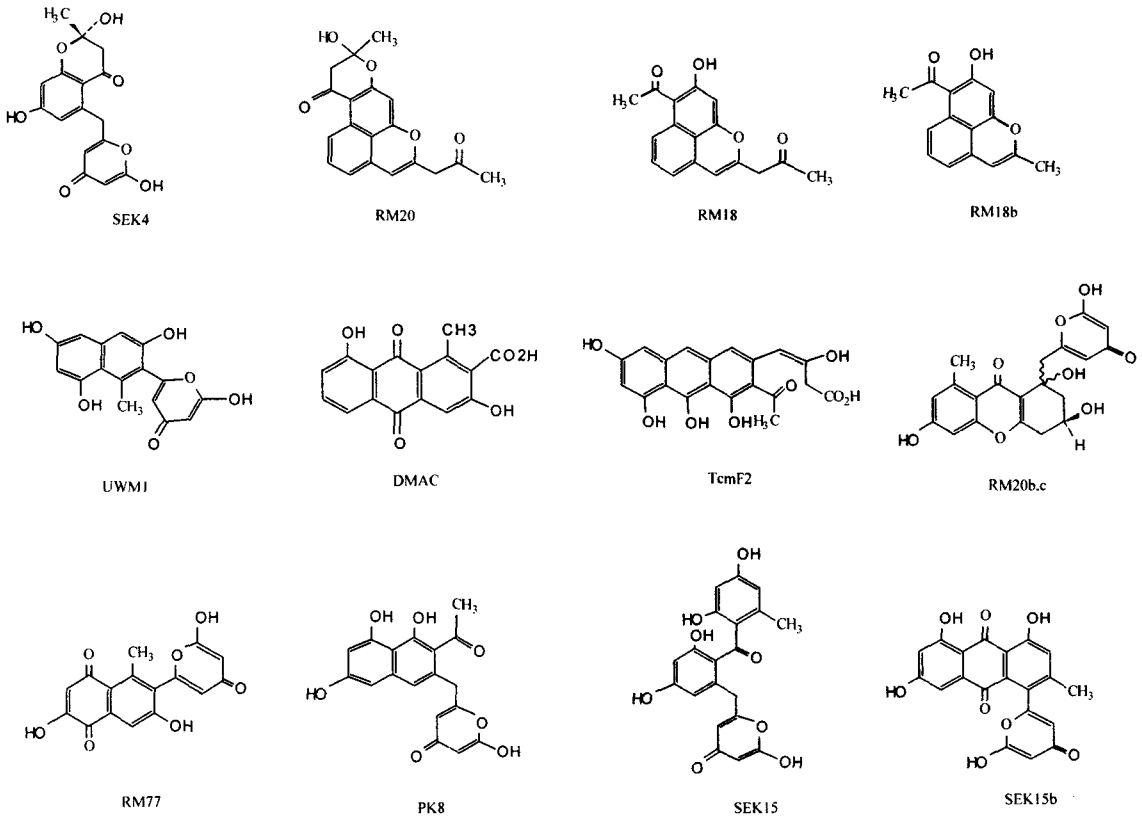



Fig. 5. Hybrid aromatic polyketides produced recombinant PKS.

구조변경에 많은 연구가 이루어질 것으로 예상된다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 서로 다른 2차 대사물질의 마지막 고리화를 촉매하는 효소는 크게 두 종류로 나누어지며 이들 유전자 (예를들어 tetracenomycin의 *tcmI*와 actinorhodin의 *act*VI-*orf*1) 간의 상호 교환에 의해 hybrid antibiotics를 합성할 수 있는 가능성이 높다고 하겠다. 이와 같은 방법에 의해 생합성되는 화합물의 구조는 본래 구조와 크게 다르지 않기 때문에 추후에 이들을 변형시키는 oxidase, sugar transferase, methyltransferase 등을 효과적으로 도입할 수 있는 가능성도 높을 것이다.

### 3) Modular polyketide synthase

Macrolide polyketide는 다기능 효소인 type I PKS에 의해 축합 과정 후에 환원, 환원-dehydration 혹은 환원-dehydration-환원 과정을 단계마다 거쳐 macrolide 형태의 화합물 (highly reduced macrolide)로서 합성된다. Type I PKS에 의해 합성된 polyketide는 aromatic polyketide보다 poly-β-keto 중간체가 보다 환원되어 홀수번째 탄소에 여러 가지 기능 그룹 (keto, hydroxyl, enoly 혹은 alkane)을 가진 화합물로 존재하며 macrolide, macrolactam, polyether, polyene 등 여러 가지 천연물이 이와 같은 기작을 거쳐 생산된다. macrolide polyketide인 erythromycin aglycone (*eryA*)과 avermectin aglycone (*avr*) 생합성에 해당하는 유전자가 자세히 밝혀져 있다.

생합성 유전자의 분석과 발현된 연구 결과에 따르면, 각각 module로부터 한 unit의 polyketide가 합성되며 fatty acid 생합성과 유사하게 반복되어, 각각 module에 해당하는 생합성을 거쳐 완벽한 polyketide가 합성된다. Module은 생합성 cycle중 하나의 cycle에 해당한다. 일반적인 complex polyketide의 생합성 과정은, 축합과정과 특별한 acyl group (acetate, propionate, butylate, m-$C_7N$ unit)의 선택, β-탄소의 변형 등에 해당하는 요소 등이 있어, 한 cycle의 반응 과정이 끝나면 합성과정에 있는 polyketide가 ACP로 옮겨진 후, 다음 과정에 참여하는 module의 KS와

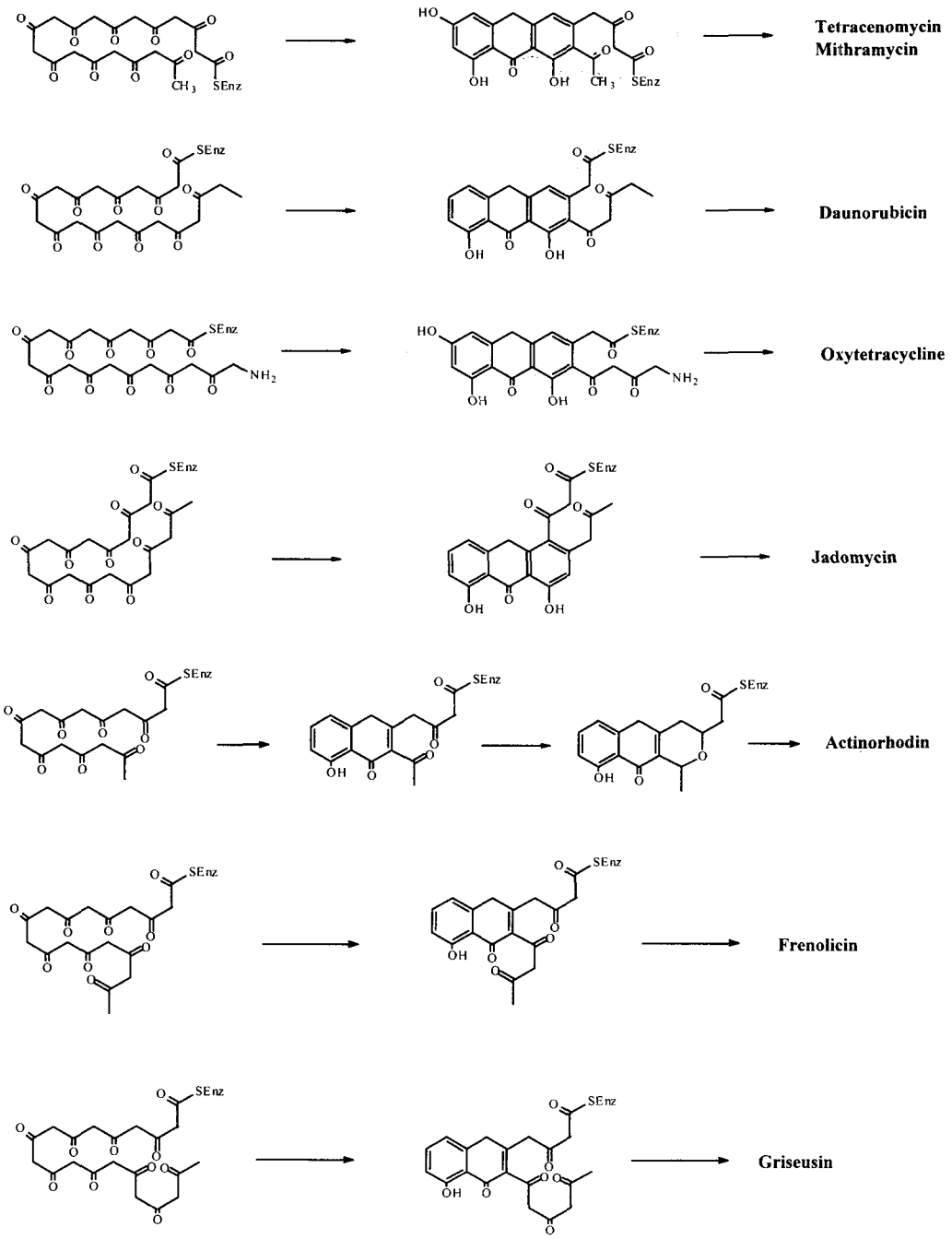



Figure 6. Structures of aromatic polyketides involved in cyclization step.

acyl group unit (extender)와 반응하여 그 다음 합성 과정이 진행된다. 이 과정은 반복으로 진행되며, 각 elongation 단계마다 새로운 module이 참여하여 예정된 탄소사슬의 크기에 도달할 때까지 진행된다. *Saccharopolyspora erythraea*에서 생산되는 erythromycin이 대표적인 예로서 aglycone 생합성 유전자인 *eryA* 유전자가 자세히 연구되었다.

이들 유전자 분석으로부터 6-dEB (6-deoxyerythronolide B)의 합성과정에 참여하는 3개의 *eryA* ORF (*eryAI, eryII*와 *eryIII*) 유전자는 module이라고 불리는 반복되는 synthase unit가 6개로 구성되어 있고 총 크기는 약 32kb로 구성되

어 있고, 특히 6-deoxy-erythronolide B를 형성하는데 관여하는 ery PKS 유전자들은 32 kb 에 걸쳐 그림에서 처럼 중앙에 위치하고 있고, 6-deoxyerythronolide B (6-dEB) 부터 erythromycin A까지 생성되는 단계에 관여하는 non-PKS 유전자는 양쪽에 위치하고 있으며, 전체 erythromycin 생합성 관련 유전자는 60 kb로 밝혀졌다 [20] (Fig. 7).

각 Module을 거칠 때마다 두개의 탄소가 늘어나며, 최종적으로 14개의 탄소로 이루어진 복잡한 macrolide인 6-dEB가 생합성 된다 (Fig. 8). *eryA*에 있는 모든 module에는 축합과정에 참여하는 ketosynthase (KS), AT와 ACP에 해당하는 domain이 포함되어 있고, β-carbon을 변형시키는 기능을 가진 domain [KR, dehydratase (DH), enoylreductase (ER)]은 각 module에 따라 달리 분포되어 있다. 각 module을 살펴보면 DEBS1 앞 부분에 starter unit인 propionate에 해당하는 AT와 ACP domain으로 구성된 loading module이 있고, DEBS3 끝 부분에는 chain extension의 종말을 나타내는 TE domain으로 구성된 end module이 있다. 그리고 module3에는 KR domain이 없어 nonfunctional로 생각되며 DEBS3의 끝 module은 thioesterase 활성에 의해 polyketide chain의 lactonization을 촉진시키고 그 결과 효소로부터 macrolide를 release 시키는 기능을 가지고 있다. module4 에서는 methylene group을 형성하는데 필요한 한 set의 환원 domain을 완벽하게 가지고 있다. 따라서 module 4와 erythromycin PKS의 다른 module 사이의 차이점이 AT와 KR domain 사이의 다른 DH, ER 그리고 KR의 존재여부에 따라 기능이 달라지는데 있다는 것을 알 수 있다. 위의 생합성 과정은 유전자의 특정 domain을 무력화 (gene disruption)하여 각 domain의 기능을 확인하였고, 뿐만 아니라 유전자 기능의 무력화를 이용하여 구조를 변형시킬 수 있음을 보여주고 있다. 이것은 변형된 구조가 다음 단계의 효소에 의해 인식되어야 하는 전제 조건이 있지만 대부분의 PKS는 기질에 대한 특이성이 떨어지기 때문에 이 방법을 이용한 polyketide의 구조변형은 많이 이용되고 있다 (*Fig. 9*).

### 4) Module polyketide 유전자의 Reprograming

Erythromycin의 PKS 유전자는 chain extension이 각 module에 의해 합성되고 있음을 볼 수 있고, 촉매하는 각각의 protein을 "cassette"로 불리워질 수 있다. 또한 이런 구성으로 미루어 볼 때 cassette의 순서를 조절함으로써 한 cassette로부터 다른 cassette로의 growing chain의 이동이 가능하다는 것을 알 수 있다.

① Module 숫자의 조절을 통한 polyketide 구조변형

Module 숫자의 조절을 통해서 생성된 polyketide의 구조를 분석함으로써 complex polyketide가 module type의 다기능효소에 의해 순차적이고 연속적인 반응기작에 의해 합성됨을 입증할 수 있다. DEBS를 생산하는데 관여하는 다기능 효소중, module1과 module2를 포함하는 DEBS1과 *DEBS3*의 thioesterase (*TE*)를 재조합하여 triketide를 합성하여, 예상된 반응기작에 의해 생합성이 이루어 진다는 것이 증명되었다 [16]. Module3에 TE를 hybrid 시킨 효소와 *DEBS1*을 생산하는 유전자를 *S. coelicolor* CH999에 형질전환시킬 경우 tetraketide가 생산되며 [27] (Fig. 10), module 5와 module 6를 hybrid 시킨 효소와 DEBS1 그리고 DEBS2 유전자의 형질전환체로부터 6-dEB의 ring 크기가 줄어든 화합물이 생산된다는 것을 보여줌으로써 [17, 18] TE가 인식할 수 있는 기질이 다양하다는 것과 module 숫자 조절을 통해 macrolide polyketide의 크기를 조절할 수 있다는 것을 증명하였다 (Fig. 10). 뿐만 아니라 DEBS1+TE hybrid 유전자를 이용한 경우 *in vitro*에서 출발물질인 propionyl CoA대신 acetyl CoA, butylyl CoA 또는 2-methyl-3-hydroxybutyl N-acetylcysteamine thioester가 전구체로서 인식되며, 조효소인 NADPH를 첨가하지 않으면 6-ethyl-2-hydroxy-3,5-dimethyl-2H-pyran-2-one이 생산된다는 것을 증명함으로써 다양한 종류의 erythromycin 유도체를 얻을 수 있는 가능성을 보여 주었다.

② Domain 교환에 의한 polyketide 구조변형

Erythromcyin PKS 유전자의 module1, 2, 6의 AT domain을 rapamycin PKS 중 malonylCoA를 도입하는 AT domain으로 치환했을 때 malonylCoA가 extender unit로 도입된 erythromycin 변형구조가 합성되었다 (Fig. 11). Table 3 에서 보는 바와 같이 현재까지 4가지 종류의 extender unit로 이용할 수 있는 AT domain이 확인되었기 때문에 polyketide lactone ring의 짝수번째 탄소에 조합적으로 다양한 구조를 도입할 수 있을 것이다. Avermectin의 경우 starter unit로 isobutyryl-CoA와 2-methyl butyryl-CoA 뿐만 아니라 다양한 구조의 화합물을 인식한다는 점

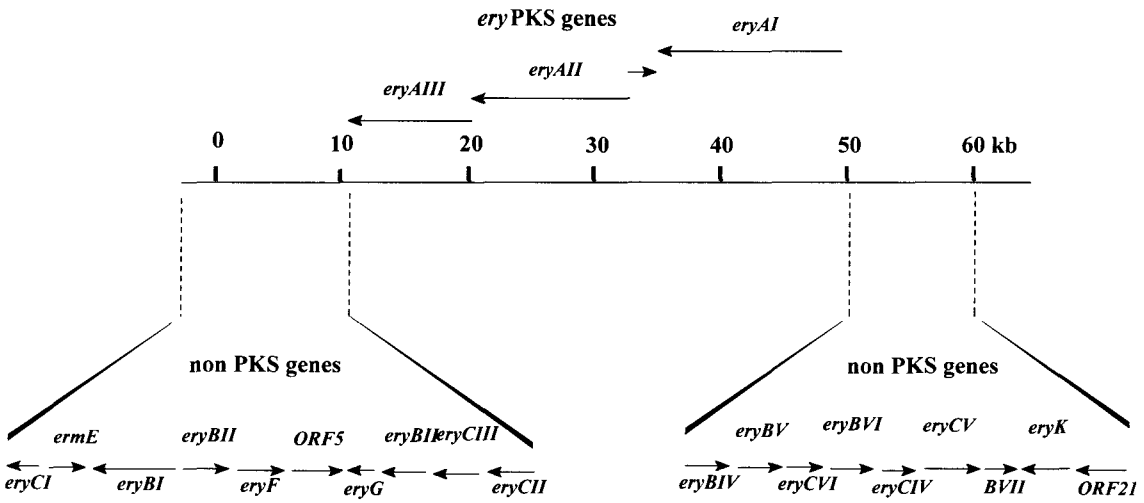



Fig. 7. Genomic map of *S. erythraea* involved in erythromycin biosynthesis.

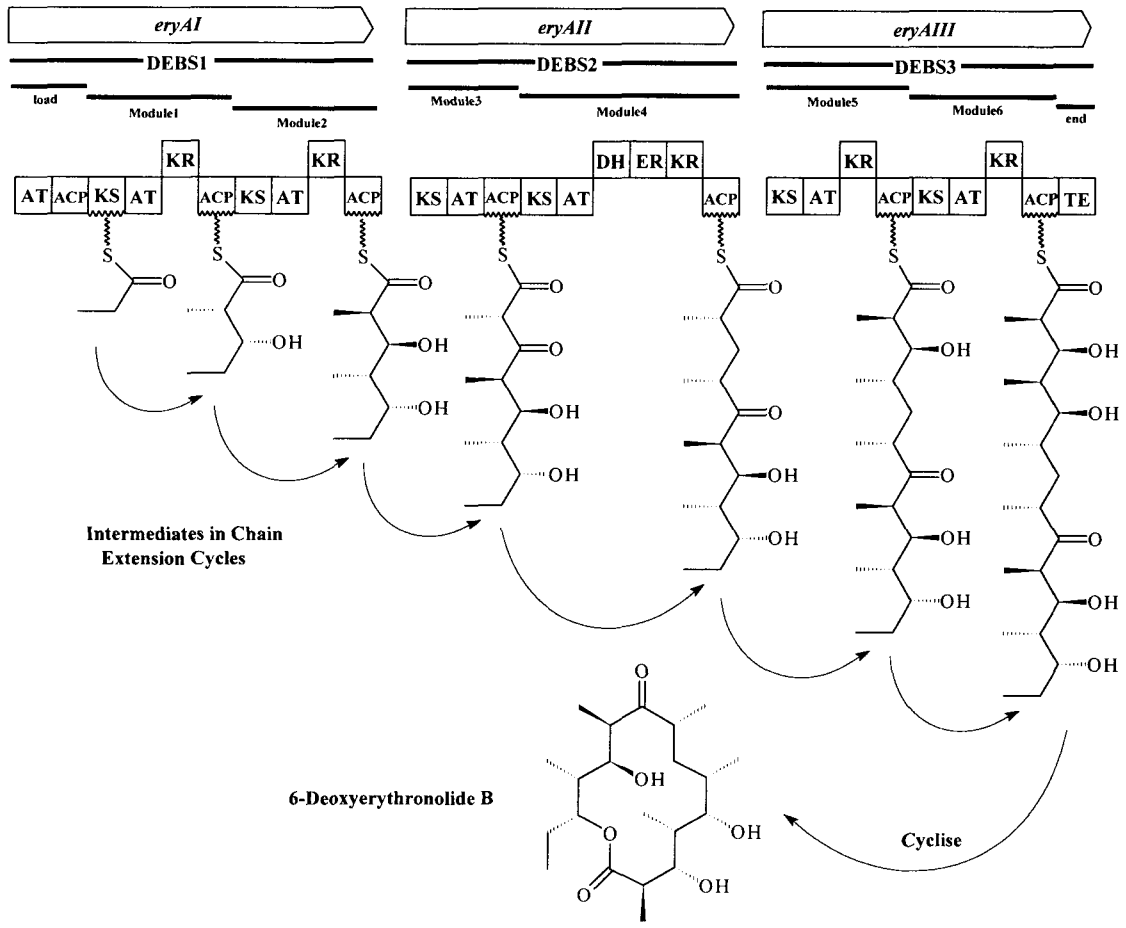



Fig. 8. Biosynthesis of 6-deoxyerythronolide B

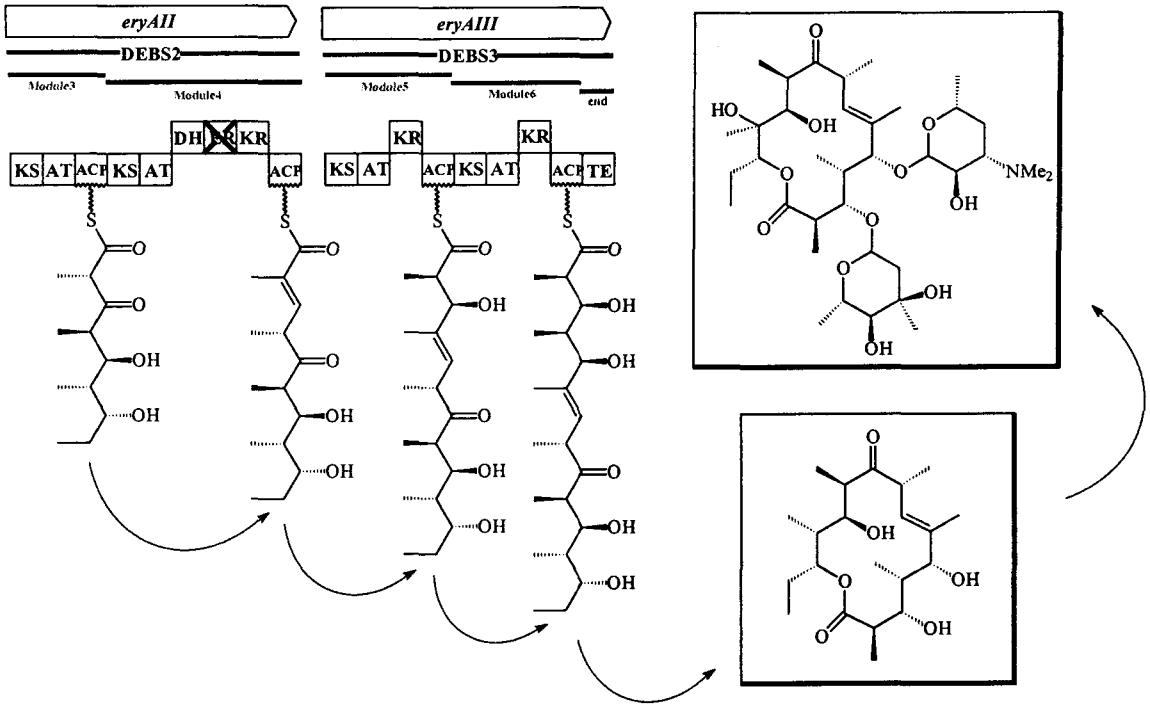



Fig. 9. Erythromycin derivative produced by hybrid PKS in which ER domain of DEBS module 4 was disrupted.

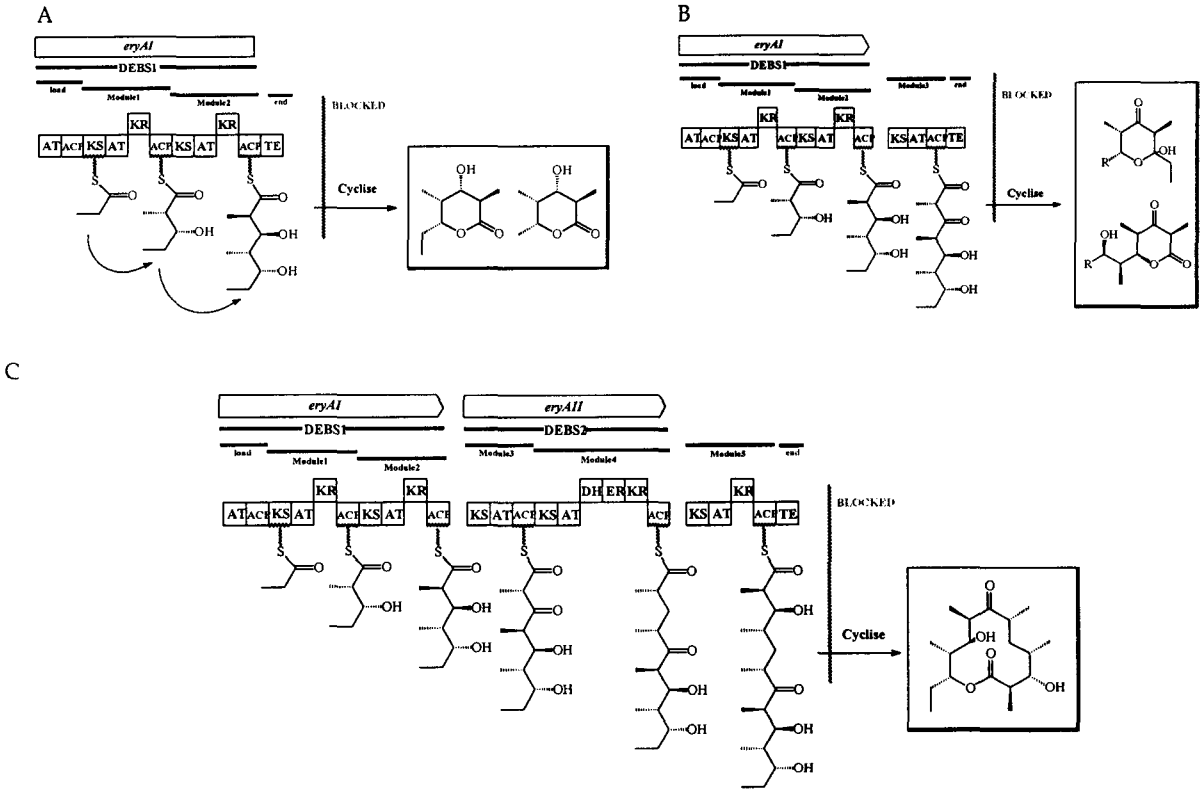



Fig. 10. Intermediates produced by hybrid PKSs in which DEBS TE domain was replaced.

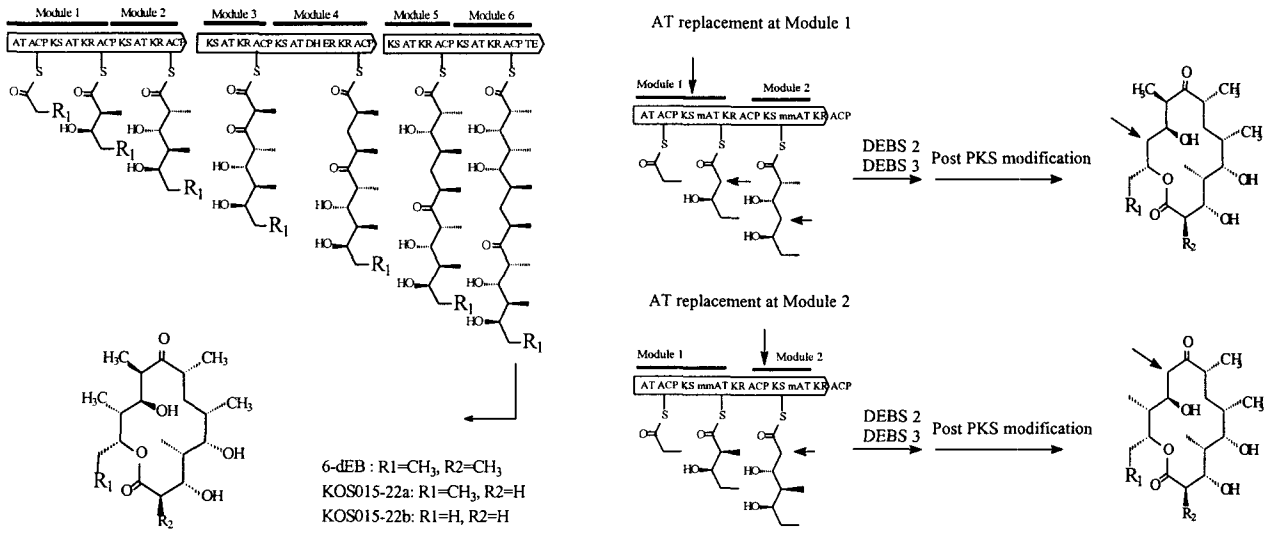



Fig. 11. New compounds produced by hybrid PKSs in which AT domain of module 1, 2, 6 of DEBS was substituted by malonyl-CoA specific rapamycin AT domain.

Table 3. Polyketides biosynthesized by Type I PKS.

| Compound | Starter | Extender | Moules | ORF | Organism | Reference |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Erythromycin | PropionylCoA | MethylmalonylCoA | 6 | 3 | *Sacch.erythraea* | 10 |
| Tylosin | PropionylCoA | 4MethylmalonylCoA<br>2MalonylCoA<br>1EthylmalonylCoA | 7 | 5 | *S.fradiae* | 32 |
| Niddamycin | MalonylCoA | 1MethylmalonylCoA<br>4MalonylCoA<br>1EthylmalonylCoA<br>1HydroxymalonylCoA | 7 | 5 | *S.caelestis* | 15 |
| Avermectin | IsobutyrylCoA or<br>2-Methyl<br>butyrylCoA | 5MethylmalonylCoA<br>7MalonylCoA | 12 | 2 | *S.avermitilis* | 25 |
| Rifamycin | AHBA | 8MethylmalonylCoA<br>2MalonylCoA | 10 | 5 | *A.mediterranei* | 1 |
| Rapamycin | Shikimate | 7MethylmalonylCoA<br>7MalonylCoA<br>Pipecolic acid | 15 | 3 | *S.hygroscopicus* | 38 |

을 이용하여 erythromycin module 1의 starter unit를 도입하는 AT domain을 avermectin의 starter unit를 도입하는 AT domain으로 유전자 치환이 시도되었다. 그림 7에서 보는 바와 같이 erythromycin의 starter unit가 예상했던 대로 isobutyrylCoA와 2-methyl butyrylCoA를 이용한 구조로 변형되었다.

존재하지 않는 domain을 도입할 경우에도 예상된 변형 구조가 생합성 되었는데 이는 domain 교환에 의해서 변형할 수 있는 구조가 상당히 다양할 수 있음을 보여 주는 것이다. 예를 들어 erythromycin module2의 KR domain이 rapamycin PKS 유전자에 존재하는 DH/KR 또는 DH/ER/KR domain으로 치환되었을 경우 예상되는 화합물이 합성되었다 (Fig. 12).

5) Combinatorial biosynthesis

조합론적인 방법을 생합성 경로에 적용한 것이 조합 생합성으로 자연에 존재하는 반응경로 및 기구를 변용하여 자연에 존재하지 않는 비천연물질을 확보하려는 의도적이고 정교한 신물질 창출방법이다. 조합 생합성은 화학적인 방법으로 구조변형이 어려운 생리활성물질의 생합성 유전자를 조작하여 구조적 다양성을 확보하려는 방법으로 현재까지 주로 polyketide 계열의 항생물질 구조변형에 도입되고 있다. 조합 생합성 방법에 의한 구조변형을 위해 polyketide 항생물질 생합성 유전자에 적용된 결과들 중에 대표적인 예가 PKS에 의해서 합성되는 화합물로서 erythromycin이 있다. 다기능을 가진 PKS는 촉매작용을 하는 활

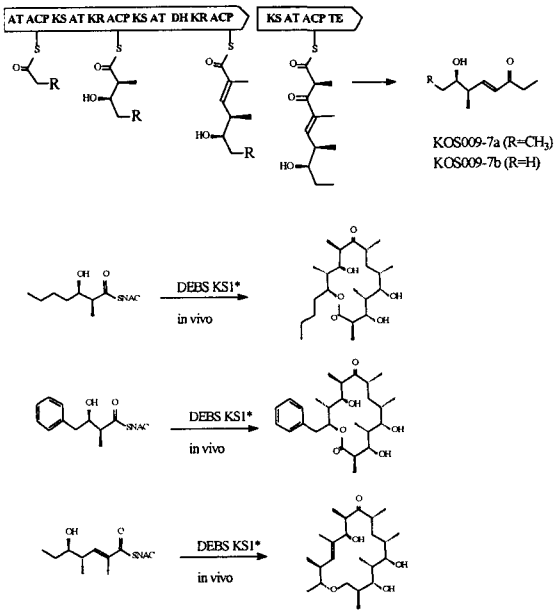



Fig. 12. Biosynthesis of tetraketide produced by replacement of DEBS KR2 domain with DH/KR domains and structures of hybrid macrolides produced by feeding acyl-NAC to DEBS KS1 null mutant.

성부위가 모듈 형식으로 존재하기 때문에 module PKS라고도 불린다. module PKS는 동물 지방산합성효소 (FAS)와 높은 아미노산 서열 유사성을 보이며 케토합성효소 (ketosynthase, KS), 아실전달효소 (acyltransferase, AT), 탈수화효소 (dehydratase, DH), 에놀환원효소 (enoylreductase, ER), 케토환원효소 (ketoreductase, KR), 아실전달 단백질 (acyl carrier protein, ACP), 티오에스테르화효소 (thioesterase, TE) 등 동물 FAS에 존재하는 활성부위를 모두 보유하고 있다. 하지만 동물 FAS가 이들 활성부위를 반복 사용하여 두 개의 탄소 단위로 구성된 아세틸-CoA (acetylCoA)와 말로닐-CoA (malonylCoA)의 축합 반응을 촉매 하는데 반해 모듈 PKS는 두 개의 탄소, 세 개의 탄소 및 네 개의 탄소 단위로 구성된 카르복실산 각각의 축합 반응을 한 개의 모듈에서 촉매 한다. 따라서 마크로라이드 화합물의 구조로부터 몇 개의 축합 반응이 진행되었는지를 확인하면 생합성 유전자가 몇 개의 모듈로 구성되어 있는 지를 예측할 수 있다. 동물 FAS와 모듈 PKS의 또 다른 차이점은 모듈 PKS가 보유하는 환원 활성부위의 다양성이다. 동물 FAS는 포화된 탄소 골격을 합성하지만 모듈 PKS는 환원 활성부위의 구조에 따라 케톤, 히드록실기, 알켄, 알칸 등 다양한 구조의 화합물을 합성할 수 있다.

조합 생합성 방법은 이미 코산 (KOSAN biosciences)에 의해 효용성이 이미 확인되었고, 적절한 골격을 출발점으로 하여 다양한 유사화합물을 도출하고 있다 [44]. 이 방법론은 산업적 가치가 높고 또 그 생합성 과정이 비교적 상세히 밝혀진 폴리케티드 계열에 자주 적용되고 있는데, 이들 polyketide계 물질은 모듈 형태의 복합 효소계를 그 생합성에 채용하고 있어서 생합성 단계별로 조합론적인 접근이 더욱 가속화 된 경우이다. polyketide는 생합성 유전자의 일부가 잘리면 작은 크기의 polyketide가 생산될 것이고, 효소의 일부분이 다른 기능으로 교체되면 화학적 구조가 다른 polyketide가 생산될 것이다. 새 단위가 삽입되면 복잡성이 증가된 polyketide를 생산할 수 있다. 예를 들어 erythromycin의 경우 조합 다양성 (combinatorial potential)은 PKS의 여러 효소 중 주요한 아실전달효소 AT의 숫자와 유전자 집단내의 모듈 수효 M으로 추측이 가능하다. 즉 $CP=AT_L \times (AT_E \times 4)^M$ 인데 로딩 도메인 (loading domain)의 특이성별 AT 수효 $AT_L$과 탄소사슬 길이를 연장하는 말로닐전달효소(malonyltransferase) 수효 $AT_E$, β-carbon 변

형 수효 4, 그리고 M이 변수로 작용한다. Erythromycin의 경우 M=6, AT=3 으로 만 놓아도 대략 CP=10,000,000 이 계산된다. polyketide는 모듈이 다양하기 때문에 조합될 수 있는 잠재력은 크다. 뿐만 아니라 대부분의 항생제는 당을 가지고 있다. 당의 대부분은 데옥시당 (deoxysugar)로 이루어져 있으며, 현재 알려져 있는 데옥시당은 200여 개 이상이 알려져 있다. 따라서 이들과 조합은 보다 다양한 천연물을 합성할 수 있다. 최근에 이러한 시도로 *Streptomyces venezuelae*가 생산하는 항생제 methymycin에 데옥시당 형성에 대한 예를 보여주고 있다 [46,6].

## 참 고 문 헌


1. August, P. R., L. Tang, Y. J. Yoon, S. Ning, R. Mueller, T. W. Yu, M. Taylor, D. Hoffmann, C. G. Kim, X. Zhang, C. R. Hutchinson and H. G. Floss. 1998. Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the *rif* biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem. Biol.* **5**, 69-79.
2. Beck, J., S. Ripka, A. Siegner, E. Schiltz and E. Schweizer. 1990. The multifunctional 6-methylsalicylic acid synthase gene of *Penicillium patulum*. Its gene structure relative to that of other polyketide synthases. *Eur. J. Biochem.* **192**, 487-498.
3. Bedford, D. J., E. Schweizer, D. A. Hopwood and C. Khosla. 1995. Expression of a functional fungal polyketide synthase in the bacterium Streptomyces coelicolor A3(2). *J. Bacteriol.* **177**, 4544-4548.
4. Bibb, M. J., D. H. Sherman, S, Omura and D.A. Hopwood. 1994. Cloning, sequencing and deduced functions of a cluster of *Streptomyces* genes probably encoding biosynthesis of the polyketide antibiotic frenolicin. *Gene* **142**, 31-39.
5. Bibb, M. J., S. Biro, H. Motamedi, J. F. Collins and C. R. Hutchinson. 1989. Analysis of the nucleotide sequence of the *Streptomyces glaucescens tcm*I genes provides key information about the enzymology of polyketide antibiotic biosynthesis. *EMBO J.* **8**, 2727-2736.
6. Chen, H., M. G. Thomas, B. K. Hubbard, H. C. Losey, C. T. Walsh and M. D. Burkart. 2000. Deoxysugars in glycopeptide antibiotics: enzymatic synthesis of TDP-L-epivancosamine in chloroeremomycin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 11942-11947.
7. Cole, S. P., B. A. M. Rudd, D. A. Hopwood, C. J. Chang and H. G. Floss. 1987. Biosynthesis of the antibiotic actinorhodin. Analysis of blocked mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Antibiot.* **40**, 340-347.
8. Cortés, J., S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt and P. F. Leadlay. 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharospolyspora erythraea*. *Nature* **348**, 176-178
9. Dimroth, P., H. Walter and F. Lynen. 1970. Biosynthesis of 6-methylsalicylic acid. *Eur. J. Biochem.* **13**, 98-110.
10. Donadio, S. and L. Katz. 1992. Organization of the enzymatic domains in the mutifuctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene* **111**, 51-60.
11. Donadio, S., M. J. Staver, J. B. McAlpine, S. J. Swanson and L. Katz. 1991. Modular organization of the genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* **252**, 675-679.
12. Fu, H., D. A. Hopwood and C. Khosla. 1994. Engineered biosynthesis of novel polyketides: evidence for temporal, but not regiospecific, control of cyclization of an aromatic polyketide precursor. *Chem. Biol.* **4**, 205-210.
13. Hallam, S. E., F. Malpartida and D. A. Hopwood. 1988. Nucleotide sequence, transcription and deduced function of a gene involved in polyketide antibiotic synthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Gene* **74**, 305-320.
14. Han, L., K. Yang, E. Ramalingam, R. H. Mosher and L. C. Vining. 1994. Cloning and characterization of polyketide synthase genes for jadomycin B biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Microbiology* **140**( Pt 12), 3379-3389.
15. Kakavas, S. J., L. Katz and D. Stassi. 1997. Identification and characterization of the niddamycin polyketide synthase genes from *Streptomyces caelestis*. *J. Bacteriol.* **179**, 7515-7522.
16. Kao, C. M., G. Luo, L. Katz, D. E. Cane and C. Khosla. 1994. Engineered biosynthesis of a triketide lactone from an incomplete modular polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11612-11613
17. Kao, C. M., L. Katz and C. Khosla. 1994. Engineered biosynthesis of a complete macrolactone in a heterologous host. *Science* **265**, 509-512.

18. Kao, C. M., Luo, G. Katz, L. Cane, D. E., and Khosla, C. 1995. Manipulation of macrolide ring size by directed mutagenesis of a modular polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 9105-9106.
19. Katz, L. 1997. Manipulation of modular polyketide synthase, *Chem. Rev.* **97**, 2557-2575.
20. Katz, L. and S. Donadio. 1993. Polyketide synthesis: prospects for hybrid antibiotics. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 875-912.
21. Kealey, J. T., L. Liu, D. V. Santi, M. C. Betlach and P. J. Barr. 1998. Production of a polyketide natural product in nonpolyketide-producing prokaryotic and eukaryotic hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 505-509.
22. Kim, E.-S., M. J. Bibb, M. J. Butler, D. A. Hopwood and D. H. Sherman. 1994. Sequences of the oxytetracycline polyketide synthase-encoding otc genes from *Streptomyces rimosus*. *Gene* **141**, 141-142.
23. Kramer, P. J., J. X. Zawada, R. McDaniel, C. R. Hutchinson, D. A. Hopwood and C. Khosla. 1997. Rational Design and Engineered Biosynthesis of a Novel 18-Carbon Aromatic Polyketide. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 635-639.
24. Lombo, F., G. Blanco, E. Fernandez, C. Mendez and J. A. Salas. 1996. Characterization of *Streptomyces argillaceus* genes encoding a polyketide synthase involved in the biosynthesis of the antitumor mithramycin. *Gene* **172**, 87-91.
25. MacNeil, D. J., J. L. Occi, K. M. Gewain and T. MacNeil. 1994. Correlation of the avermectin polyketide synthase genes to the avermectin structure. Implications for designing novel avermectins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **721**, 123-132.
26. Malpartida, F. and D. A. Hopwood. 1984. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a *Streptomyces* antibiotic and its expression in a heterologous host. *Nature* **309**, 462-464.
27. McDaniel, R., C. M. Kao, H. Fu, P. Hevezi,, C. Gustafsson, M. Betlach, G. Ashley, D. E. Cane and C. Khosla. 1997. Gain-of-function mutagenesis of a modular polyketide synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 4309-4310.
28. McDaniel, R., S. E. Khosla, D. A. Hopwood and C. Khosla. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketides. *Science* **262**, 1546-1550.
29. McDaniel, R., S. E. Khosla, D. A. Hopwood and C. Khosla. 1993. Engineered biosynthesis of novel polyketides: manipulation and analysis of an aromatic polyketide synthase with unproven catalytic specificities. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 11671-11675.
30. McDaniel, R., S. E. Khosla, D. A. Hopwood and C. Khosla. 1995. Rational design of aromatic polyketide natural products by recombinant assembly of enzymatic subunits. *Nature* **375**, 549-554
31. McDaniel, R., S. E. Khosla, H. Fu, D. A. Hopwood and C. Khosla. 1994. Engineered biosynthesis of novel polyketides: influence of a downstream enzyme on the catalytic specificity of a minimal aromatic polyketide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 11542-11526.
32. Merson_Davies, L. A. and E. Cundliffe. 1994. Analysis of five tylosin biosynthetic genes from the tyllBA region of the Streptomyces fradiae genome. *Mol. Microbiol.* **13**, 349-355.
33. Meurer, G. and C. R. Hutchinson. 1995. Daunorubicin type II polyketide synthase enzymes DpsA and DpsB determine neither the choice of starter unit nor the cyclization pattern of aromatic polyketides. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5899-5900.
34. Meurer, G., M. Gerlitz, W. Pienkowski, L. C. Vining, J. Rohr and C. R. Hutchinson. 1997. Iterative type II polyketide synthases, cyclases and ketoreductases exhibit context-dependent behavior in the biosynthesis of linear and angular decapolyketides. *Chem. Biol.* **4**, 432-443.
35. O'Hagen, D. 1991. *The Polyketide Metabolites.* New York, Ellis Horwood.
36. Pieper, R., G. Luo, D. E. Cane and C. Khosla. 1995. Remarkably broad substrate specificity of a modular polyketide synthase in a cell-free system. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 11373-11374.
37. Rajgarhia, V. B. and W. R. Strohl. 1997. Minimal *Streptomyces* sp. strain C5 daunorubicin polyketide biosynthesis genes required for aklanonic acid biosynthesis. *J. Bacteriol.* **179**, 2690-2696.
38. Ruan, X., D. Stassi, S. Lax and L. Katz. 1997. A second type-I PKS gene cluster isolated from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 29253, a rapamycin-producing strain. *Gene* **203**, 1-9.
39. Shen, B., R. G. Summers, W. Pienkowski and C. R. Hutchinson. 1995. The *Streptomyces glaucescens* tcmKL polyketide synthase and tcmN polyketide cyclase genes govern the size and shape of aromatic polyketides. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6811-6821.

40. Sherman, D. H., F. Malpartida, M. J. Bibb, H. M. Kieser and D. H. Hopwood. 1989. Structure and deduced function of the granaticin-producing polyketide synthase gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tu22. *EMBO J.* **8**, 2717-2725.
41. Spender, J. B. and P. M. Jordan. 1992. Purification and properties of 6-methylsalicylic acid synthase from *Penicillium patulum*. *Biochem. J.* **288**, 839-846.
42. Summers, R. G., E. Wendi-Pienkowski, H. Motamedi and C. R. Hutchinson. 1993. The tcmVI region of the tetracenomycin C biosynthetic gene cluster of *Streptomyces glaucescens* encodes the tetracenomycin F1 monooxygenase, tetracenomycin F2 cyclase, and, most likely, a second cyclase. *J. Bacteriol.* **175**, 7574-7580.
43. Tsukamoto, N. 1994. Nucleotide sequence of the aknA region of the aklavinone biosynthetic gene cluster of Streptomyces galilaeus. *J. Bacteriol.* **176**, 2473-2475.
44. Xue, Q., G. Asley, C. R. Hutchinson and D. V. Santi. 1999. A multiplasmid approach to preparing large libraries of polyketides *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96*: 11740-11745.
45. Yu, T-W., M. J. Bibb, P. W. Revill and D. A. Hopwood. 1994. Cloning, sequencing, and analysis of the griseusin polyketide synthase gene cluster from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **176**, 2627-2634.
46. Zhao, L., D. H. Sherman and H. W. Liu. 1998. Biosynthesis of desosamine-Construction of a new methymycin/neomethymycin analogue by deletion of a desosamine biosynthetic gene *J. Am. Chem. Soc.* **120,** 10256-10257.

(Received August 22, 2002; Accepted October 14, 2002)