

Polyene 특이적인 PCR에 의한 희소 방선균 유래 Cryptic Polyene Hydroxylase 유전자의 분리

박현주 · 명지선¹ · 박남실¹ · 한규범² · 김상년³ · 김응수^{1*}
성원엔비켄(주), ¹인하대학교 생물공학과, ²(주)한스바이오텍, ³(주)LG 생활건강

Isolation of Cryptic Polyene Hydroxylase Gene in Rare Actinomycetes via Polyene-specific Degenerate PCR. Park, Hyun-Joo, Ji Seon Myeong¹, Nam Sil Park¹, Kyuboem Han², Sang-Nyun Kim³, Eung-So Kim^{1*}. SongWon Envichem Inc., Kangnam-gu, Seoul, 135-010, Korea, ¹Department of Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea. ²Hanson Biotech Co., Ltd. 201 IACRI, Han Nam University, Daeduk-gu, Daejeon 306-791, Korea, ³LG Household & HealthCare, R&D Park, Daejeon 305-343, Korea -The polyene antibiotics including nystatin, pimaricin, amphotericin and candicidin are a family of most promising antifungal polyketide compounds, typically produced by rare actinomycetes species. The biosynthetic gene clusters for these polyenes have been previously investigated, revealing the presence of highly homologous biosynthetic genes among polyene-producers such as polyketide synthase (PKS) and cytochrome P450 hydroxylase (CYP) genes. Based on amino acid sequence alignment among actinomycetes CYP genes, the highly-conserved regions specific for only polyene CYP genes were identified and chosen for degenerate PCR primers, followed by the PCR-screening with various actinomycetes genomic DNAs. Among tested several polyene non-producing actinomycetes strains, *Pseudonocardia autotrophica* strain was selected based on the presence of PCR product with polyene-specific CYP gene primers, and then confirmed to contain a cryptic novel polyene hydroxylase gene in the chromosome. These results suggest that the polyene-specific hydroxylase gene PCR should be an efficient way of screening and isolating potentially-valuable cryptic polyene antibiotic biosynthetic genes from various microorganisms including rare actinomycetes.

Key words: Polyene, actinomycetes, hydroxylase gene

항진균 및 항바이러스 활성을 지닌 polyene 계열의 항생 물질은 일반적으로 20-40개의 탄소로 이루어진 거대한 macrolactone 링 구조를 지니며, 분자 내에 약 3-8개의 conjugated double bond를 갖는 전형적인 type I polyketide macrolide 화합물이다(Fig. 1)[6, 13]. 현재까지 보고된 대부분의 polyene 계열의 항생물질들은 그람 양성 토양미생물인 방선균 (actinomycetes)에 의해 생합성 된다고 알려져 있으며[6], 진균류의 세포막에 존재하는 sterol과 결합하고 channel을 형성하여 K⁺, Mg²⁺ 등의 세포내 성분을 세포외로 누출시키는 대사장애를 일으킴으로써, 곰팡이 및 효모와 같은 진균류에 대한 우수한 항진균 활성을 갖는다고 알려져 있다[4, 6, 15]. 비록 polyene 화합물이 갖는 강한 독성 부작용으로 인하여 광범위한 의약품으로서의 사용이 한정되고는 있으나, 탁월한 항진균 및 항바이러스 활성의 우수성으로 인하여 신규 및 개량된 polyene macrolide 항생물질의 개발이 절실히 요구되고 있는 상황이다[3, 9, 13].

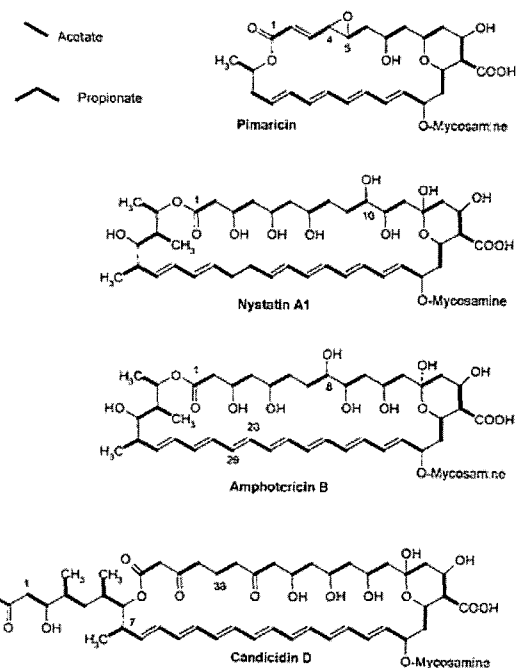


Fig. 1. Chemical structures of polyene compounds nystatin, amphotericin, pimaricin, and candicidin.

*Corresponding author

Tel: 82-32-860-8318, Fax: 82-32-872-4046

E-mail: eungsoo@inha.ac.kr

현재 nystatin, amphotericin, pimaricin, candicidin 등의 대표적인 polyene 계열 화합물들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근 이들 생산균으로부터 polyene 생합성에 관여하는 gene cluster가 클로닝되었다[1, 2, 3, 5, 7]. 이 중 nystatin, amphotericin, pimaricin 생합성 gene cluster에 대한 유전정보 염기서열은 완전히 해독되었고, 규명된 유전 정보에는 polyene 생합성에 공통적으로 요구되는 polyketide synthase (PKS), transport, regulation, post-polyketide modification 유전자들이 gene cluster에 포함되어 있음이 밝혀졌다 [3, 8, 16, 17]. 일반적으로 polyene 계열의 화합물들이 생합성 되기 위해서는 반복적인 탄소 중합반응인 polyketide biosynthesis가 선행되고, 이어서 post-polyketide modification 과정을 거친다. 특히 이 post-polyketide modification 과정에서, cytochrome P450 계열의 특정 hydroxylase 효소에 의한 위치 특이적인 hydroxylation이 일어나야만 본래의 활성을 지닌 화합물이 되는 것으로 알려져 있으며, 앞서 언급한 nystatin, amphotericin, pimaricin, candicidin 등의 polyene 화합물 생합성에서도 cytochrome P450 hydroxylase (CYP)에 의한 hydroxylation 과정을 필수적으로 거치는 것으로 보고되었다[10, 11, 12]. 이와 같은 polyene 생합성 유전자들에 대한 분자유전학적 연구는, 기존의 전통적인 균주 스크리닝을 통한 신규 polyene 화합물 발굴이 아니라, polyene 생합성에 필수적으로 요구되는 특정 유전자의 존재 유무를 검색하여 신규 polyene 생산 균주를 선별할 수 있는 소위 “genomics-based *in silico* drug development” 전략을 가능하게 하였다[18]. 본 연구에서는 현재까지 알려진 polyene 화합물들의 생합성 gene cluster 안에 존재하는 CYP 유전자들에서만 특이적으로 발견되는 특정 보존 영역을 이용하여

degenerate PCR primer를 제작하고, 이렇게 제작된 degenerate primer를 사용한 PCR 방법을 통해 희소 방선균 유전체에 존재하는 cryptic polyene gene cluster를 탐색함으로써, 궁극적으로는 미생물 유전체 검색을 통한 polyene 계열의 신규 항진균제 및 항바이러스제의 개발 가능성을 제시하고자 한다.

Polyene-specific CYP 유전자 클로닝을 위한 degenerate PCR primer를 제작하기 위해서, 기존에 밝혀진 polyene 생합성에 관여하는 CYP 유전자들의 염기서열을 비교 분석하였다. 염기서열 비교에 사용된 유전자들은 amphotericin 생산균주인 *Streptomyces nodosus* 유래 *amphN*, nystatin 생산균주인 *Streptomyces noursei* 유래 *nysN*, pimaricin 생산균주인 *Streptomyces natalensis* 유래 *pimG*, candicidin 생산균주인 *Streptomyces griseus* 유래 *canC*이다[2, 5, 7, 8, 17]. 염기서열 비교 분석 결과, 이들 polyene-specific CYP 유전자들은 일반적인 cytochrome P450 계열의 hydroxylase 유전자들이 갖는 oxygen binding site 와 heme legand pocket의 conserved 부분 이외에 추가적으로 보존된 영역이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 2). 따라서 degenerate PCR primer는 이 polyene-specific CYP에만 특이적으로 존재하는 보존 영역을 이용하여 제작하였다 (forward primer PEH-1: 5'-TGGATCGGCGACGACCG(G/C)(A/G/C)(T/C)CGT-3'; reverse primer PEH-2: 5'-CCG(T/A)A(G/C)AG(G/C)A(T/C)(G/C)CCGTCGTACTT-3')(Fig. 2). PCR은 Rapid Thermocycler (Idaho technology, USA)를 이용하여 denaturation (96°C, 30초), annealing (40°C, 30초), extension (72°C, 35초) 조건으로 30 cycle 동안 수행하였다. Polyene-specific CYP 스크리닝에 사용된 균주로는, polyene 생합성 유전자를 갖지 않는 방선균 3종 [*S. coelicolor* M145, *S.*

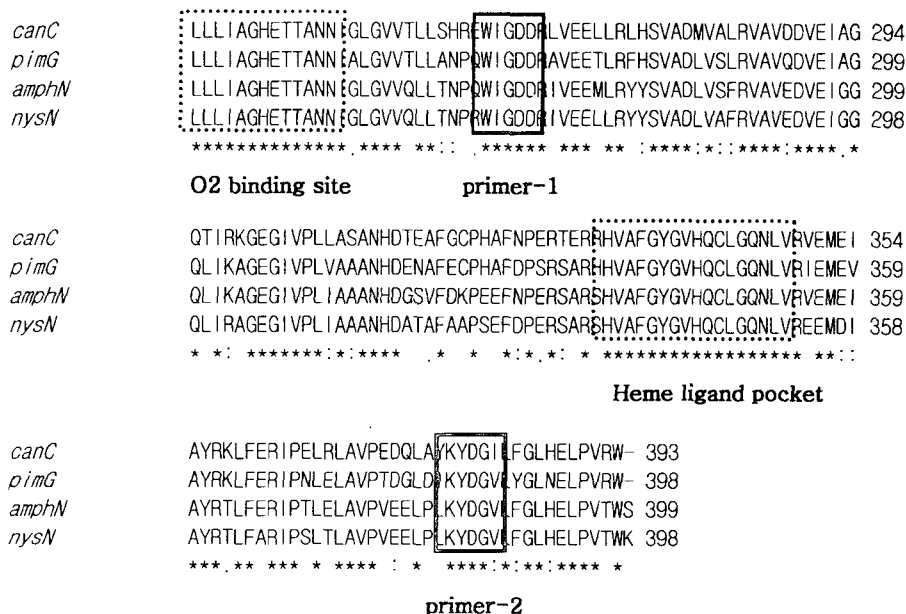


Fig. 2. Degenerate PCR primers for amplification of polyene-specific CYP gene.

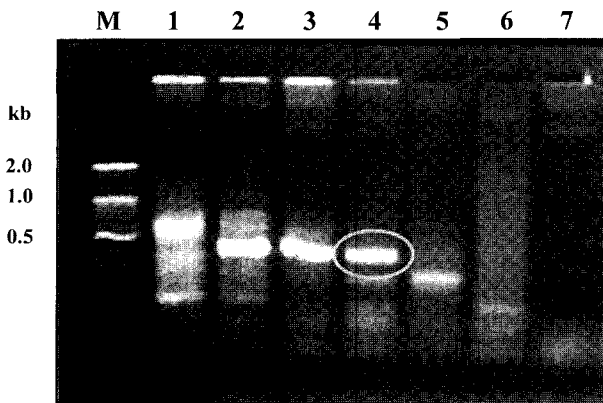


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of PCR products with polyene-specific degenerate primers. Lane M, 100bp ladder marker; lane 1, *S. coelicolor*; lane 2, *S. nodosus*; lane 3, *S. noursei*; lane 4, *P. autotrophica*; lane 5, *S. benihana*; lane 6, *S. avermitilis*; and lane 7, *S. peuceitius*.

avermitilis (ATCC31267), *S. peuceitius* (ATCC29050)]과 polyene 생산균주 2종 [*S. nodosus* (KCTC 9035), *S. noursei* (KCTC 1083)], 그리고 polyene 생합성 여부가 규명되지 않은 희소 방선균 2종 [*Pseudonocardia autotrophica* (KCTC 9441), *Sebekia benihana* (KCTC 9660)]를 포함하여 총 7종이 사용되었다. 각각의 방선균 배양 및 DNA 분리 는 기존에 보고된 방선균 실험서를 따라 수행하였다[14].

Polyene-specific CYP 유전자 분리를 위한 PCR 수행 결과, 기존에 polyene 생산균주로 보고된 *S. nodosus*와 *S. noursei*에서는 예상했던 크기인 약 350 bp에서 증폭된 DNA 단편을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한 polyene 생합성 유전자를 갖고 있지 않은 *S. coelicolor*, *S. avermitilis*, *S. peuceitius*에서는 예상된 크기의 DNA 단편이 증폭이 되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는, 대부분의 방선균에 수집 종류의 유사한 CYP가 존재함에도 불구하고 본

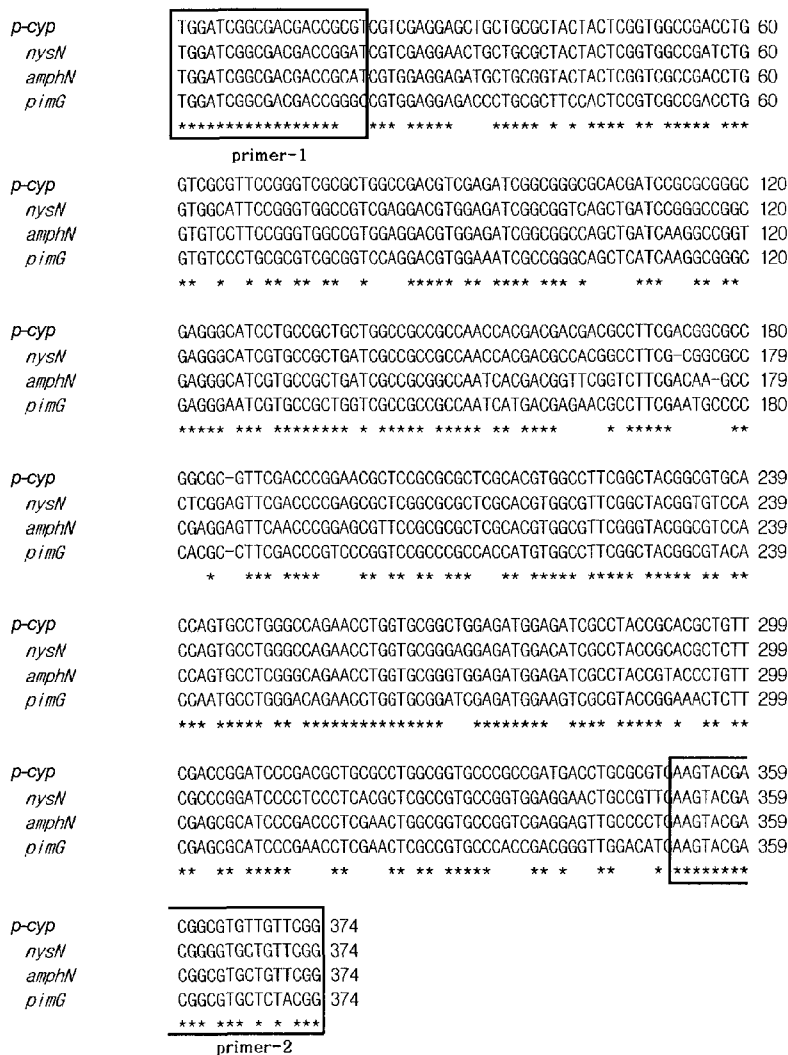


Fig. 4. Alignment of nucleotide sequences of PCR product isolated from *P. autotrophica* (*p-cyp*) and other homologous *cyp* genes (*nysN*, *amphN*, *pimG*).

연구에서 사용한 degenerate PCR primer를 이용하여 polyene-specific CYP 유전자를 특이적이고 선택적으로 선별할 수 있음을 제시하고 있다. 특히 polyene-specific degenerate PCR primer를 이용하여 polyene 생산여부가 확인되지 않은 회소방선균 *P. autotrophica* 유전체로부터 polyene-specific CYP로 추정되는 약 350 bp의 DNA 단편이 증폭되었고(Fig. 3), 이는 *P. autotrophica* 유전체에 신규 cryptic polyene 생합성 유전자가 존재함을 강하게 암시하고 있다. *P. autotrophica* 유래 polyene-specific CYP로 추정되는 약 350 bp의 PCR 단편을 pGEMT-easy vector (Promega, USA)에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 이 350 bp의 PCR 단편은 *S. noursei*의 nysN(72%), *S. nodosus*의 amphN(71%), *S. natalensis*의 pimG(64%)와 같은 기존에 보고된 polyene-specific CYP 유전자들과 비교적 높은 유사성을 보인다. 따라서 이는 *P. autotrophica*에서 분리된 신규 polyene-specific CYP 유전자로 판명되었다(Fig. 4). 이와 같은 결과는, 회소방선균을 포함한 다양한 미생물의 유전체를 polyene-specific degenerate PCR primer를 이용하여 검색함으로써, 기존의 배양조건에서 polyene 화합물의 생합성 유무를 확인하는 전통적인 스크리닝 방법에서 간과되었던 무한한 유전체의 잠재력을 검색할 수 있는 새로운 신약개발 전략이 될 수 있으리라 확신한다.

감사의 글

본 연구는 21C 프론티어연구사업 미생물유전체 MG3-1 과제(M102KK010012-04K1101-01211)의 지원에 의해 수행되었기에, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Aparicio, J. F., A. J. Colina, E. Ceballos, and J. F. Martín. 1999. The biosynthetic gene cluster for the 26-membered ring polyene macrolide pimaricin. *J. Biol. Chem.* **274**: 10133-10139.
- Aparicio, J. F., R. Fouces, M. V. Mendes, N. Olivera, and J. F. Martín. 2000. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimaricin in *Streptomyces natalensis*. *Chem. Biol.* **7**: 895-905.
- Aparicio, J. F., P. Caffrey, J. A. Gil, and S. B. Zotchev. 2002. Polyene antibiotic biosynthesis gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**: 179-188.
- Bolard, J. 1986. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim. Biophys. Acta.* **864**: 257-304.
- Brautaset, T., O. N. Sekurova, H. Sletta, T. E. Ellingsen, A. R. Strom, S. Valla, and S.B. Zotchev. 2000. Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei* ATCC 11455: analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway. *Chem. Biol.* **7**: 395-403.
- Brautaset, T., P. Bruheim, H. Sletta, L. Hagen, T. E. Ellingsen, A. R. Strom, S. Valla, and S. B. Zotchev. 2002. Hexaene derivatives of nystatin produced as a result of an induced rearrangement within the nysC polyketide synthase gene in *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Chem. Biol.* **9**: 367-373.
- Caffrey, P., S. Lynch, E. Flood, S. Finnan, and M. Oliynyk. 2001. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. *Chem. Biol.* **8**: 713-723.
- Campelo, A. B. and J. A. Gil. 2002. The candicidin gene cluster from *Streptomyces griseus* IMRU 3570. *Microbiology* **148**: 51-59.
- Gupte, M., P. Kulkarni, and B. N. Ganguli. 2002. Antifungal antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**: 46-57.
- Mendes, M.V., E. Recio, R. Fouces, R. Luiten, J. F. Martín, and J. F. Aparicio. 2001. Engineered biosynthesis of novel polyenes: a pimaricin derivative produced by targeted gene disruption in *Streptomyces natalensis*. *Chem. Biol.* **8**: 635-644.
- Munro, A. W. and J. G. Lindsay. 1996. Bacterial cytochromes P-450. *Mol. Microbiol.* **20**: 1115-1125.
- O'Keefe, D. P. and P. A. Harder. 1991. Occurrence and biological function of cytochrome P450 monooxygenases in actinomycetes. *Mol. Microbiol.* **5**: 2099-2105.
- Resat, H., F. A. Sungur, M. Baginski, E. Borowski, and V. Aviyente. 2000. Conformational properties of amphotericin B amide derivatives - impact on selective toxicity. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **14**: 689-703.
- Kieser, T., M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, and D. A. Hopwood. 2000. Practical *Streptomyces* Genetics. A Laboratory Manual. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Seo, Y. W., K. W. Cho, H. S. Lee, T. M. Yoon, and J. H. Shin. 2000. New Polyene Macrolide Antibiotics from *Streptomyces* sp. M90025. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 176-180.
- Rodriguez, E. and R. McDaniel. 2001. Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 526-534.
- Zotchev, S., K. Haugan, O. Sekurova, H. Sletta, T. E. Ellingsen, and S. Valla. 2000. Identification of a gene cluster for antibacterial polyketide-derived antibiotic biosynthesis in the nystatin producer *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Microbiology* **146**: 611-619.
- Zazopoulos, E., K. Huang, A. Staffa, W. Liu, B. O. Bachmann, K. Nonaka, J. Ahlert, J. S. Thorson, B. Shen, and C. M. Farnet. 2003. A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nat. Biotechnol.* **21**: 187-190.

(Received Aug. 5, 2004/Accepted Sep. 9, 2004)