

희소 방선균 *Sebekia benihana* 유래 신규 사이토크롬 P450 하이드록실레이즈 유전자군 분리 및 염기서열 특성규명

¹박 남 실 · ²박 현 주 · ³한 규 범 · ⁴김 상 년 · † ¹김 응 수

¹인하대학교 공과대학 생물공학과, ²성원엔비켐(주), ³(주)핸슨바이오텍, ⁴(주)LG생활건강

(접수 : 2004. 8. 2., 계재승인 : 2004. 8. 23.)

Isolation and Nucleotide Sequence Characterization of Novel Cytochrome P450 Hydroxylase Genes from Rare Actinomycetes, *Sebekia benihana*

Nam-Sil Park¹, Hyun-Joo Park², Kyuboem Han³, Sang-Nyun Kim⁴, and Eung-Soo Kim^{1†}

¹Department of Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

²SongWon Envichem, Co., Seoul 135-010, Korea

³Hanson Biotech Co., Ltd. 201 IACRI, Han Nam University, Daejeon 306-791, Korea

⁴LG Household & HealthCare, R&D Park, Daejeon 305-343, Korea

(Received : 2004. 8. 2., Accepted : 2004. 8. 23.)

A degenerate set of PCR primers based on two conserved regions (heme binding region and oxygen ligand pocket) were designed and successfully applied to amplify DNA fragments of cytochrome P450 hydroxylase (CYP) genes from a rare actinomycetes, *S. benihana*. The PCR amplified products were employed as a DNA probe to clone the entire CYP genes from *S. benihana* genomic library. Five different CYP-positive cosmids were isolated by colony hybridization as well as PCR confirmation. The complete nucleotide sequencing of five different CYP genes revealed that each unique CYP showed a significant amino acid homology to previously-known CYP genes involved in streptomycetes secondary metabolism. In addition, four CYP genes (CYP502, CYP503, CYP504, CYP506) were found to be linked to ferredoxin genes in the chromosome, and the CYP503 gene showed the high degree of amino acid similarity to the previously well-characterized CYP105 family in streptomycetes.

Key Words : *Sebekia benihana*, cytochrome P450 hydroxylase, actinomycetes

서 론

사이토크롬 P450 하이드록실레이즈 (cytochrome P450 hydroxylase, CYP)는 heme을 포함한 단백질로서 여러 가지 산화 반응을 촉매하는 효소이다(1). 이를 단백질은 다양한 항생제 전구물질의 활성화와 난분해성 물질의 해독 작용에 관여하며, 폴리케타이드, 지방산, 스테로이드를 비롯한 여러 종류의 화합물을 기질로 삼는다(1, 2). 최근 많은 생물체의 전체 유전체 서열이 알려짐에 따라 각각의 종들에서 CYP 유전자의 종류가 다양하고 그 수도 종별로 다르다는 것이 밝혀졌다. 다세포생물의 경우 인간에는 약 57개,

초파리 (*Drosophila melanogaster*)에는 약 90개, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에는 약 275개의 CYP가 존재하며, 단세포 생물의 경우 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에는 약 3 개, 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*)에는 약 20개의 CYP가 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 대장균 (*E. coli*)의 경우에는 없는 것으로 나타났다(3). CYP 단백질에 의한 하이드록실레이션은 산소분자가 활성화 된 후, 하나의 산소 원자가 기질에 결합하고 NAD(P)H로부터 수소 원자를 받아 환원되면서 이루어지며, NAD(P)H는 NAD(P)H 환원효소 (또는 페레독신 환원효소)에 의해 환원되며 이때 받은 전자를 페레독신 (ferredoxin, FD)이 받아 CYP에 전달한다(3).

방선균은 포자를 형성하고, 필라멘트 형태의 균사체를 이루며 주위의 환경 변화에 따라 독특한 형태적 분화를 거치는 대표적인 그룹 양성 토양미생물로서, 항생제, 항암제와 같은 다양한 종류의 유용 생리활성 물질을 생산해내는 균주이다. 또한 자연에 존재하는 여러 난분해성 화합

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel : +82-32-860-8825, Fax : +82-32-872-4046
E-mail : eungsso@inha.ac.kr

물을 포함한 유해 독성물질의 분해능도 탁월한 특성을 가진다(4). 특히 희소 방선균인 *S. benihana*는 면역억제제인 사이클로스포린 (cyclosporin), 항원균제인 모넨신 (monensin)과 니저리신 (nigericin) 등을 하이드록실레이션시키는 균주로서 생리활성 물질 변형과 관련하여 매우 유용한 균주로 알려져 있다(5-7). 따라서 본 연구에서는 이 희소 방선균인 *S. benihana* 균주로부터 산업적으로 많은 활용 잠재력을 가진 효소인 CYP의 신규 유전자 군을 분리하고, 염기서열 분석 및 유사 CYP와의 비교분석을 토대로, 궁극적으로는 *S. benihana* 유래 신규 CYP 유전자의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드와 배양조건

본 연구에서 사용된 균주는 방선균인 *Sebekia benihana* KCTC 9610으로서 Korean Collection for Type Cultures (KCTC, Korea)로부터 구입하였으며, GSMY (glucose 0.7%, yeast extract 0.45%, malt extract 0.5%, soluble starch 1.0%, and calcium carbonate 0.005%) 배지를 사용하여 28°C, 200 rpm에서 배양하였다. 유전자 조작을 위한 균주로서 *E. coli* DH5α를 이용하였으며, LB (Luria-Bertani) 배지에서 37°C, 200 rpm으로 배양하였다.

PCR

*S. benihana*에 존재하는 cytochrome P450 계열의 하이드록실레이즈를 분리하기 위해 방선균들의 CYP를 multiple sequence alignment (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)하여 그 중 보존되어 있는 heme binding region (Deg-1: 5'-TXCTX CTXATCGCXGGXCACGAGAC-3')과 oxygen ligand pocket (Deg-2: 5'-GCXAGGTTCTGXCCXAGGCCTGGTG-3')으로 degenerate PCR primer를 제작하였다(Fig. 1)(8). PCR (Idaho Technology, USA)은 총 20 μl 부피에 template 0.1 ug, 10X Taq DNA polymerase 0.2 μl (5 U/μl, TaKaRa Korea Biomedical Inc., Korea), dNTP 2 μl (TaKaRa), DMSO 2 μl (Promega, USA), 20 μM의 primer를 각각 1 μM씩 합하여 96°C에서 30초 동안 denaturation시키고, 40°C에서 30초 동안 primer annealing 시킨 후, 68°C에서 35초 동안 extension 시켰다. 이를 30회 반복시킨 후 1.5% agarose 젤에서 PCR 산물을 확인하였다. PCR 산물을 클로닝을 위하여 pGEM-T easy 벡터 (Promega)를 사용하였다.

*S. benihana*의 chromosomal DNA의 분리 및 genomic library의 제작과 스크리닝

*S. benihana*의 chromosomal DNA를 분리하기 위해서 Hopwood(4) 등 의 방법을 수정하여 사용하였으며, 분리된 DNA에서 40kb 이상의 단편을 *E. coli*-*Streptomyces* shuttle cosmid 벡터인 pOJ446에 재조합하여 *E. coli*에서 genomic library를 제작하였다 (TaKaRa). 만들어진 genomic library를 Deg-1, Deg-2로 증폭한 PCR product를 사용하여 colony hybridization을 통해 약 1000개의 재조합 콜론리를 스크리닝하였다. Colony hybridization은 재조합 *E. coli*를 50 ug/ml

의 apramycin이 들어간 LB 고체 배지에서 키운 뒤 나일론 membrane에 옮겨 고정시킨 것을 사용하였으며, DIG detection 시스템 (Roche Molecular Biochemicals, USA)의 사용법을 따랐고, DIG 라벨된 DNA는 NBT/BCIP (Roche)를 이용하여 detection하였다. Probe에 의해 검색된 콜론들을 50 μg/ml의 apramycin이 포함된 LB 액체 배지에서 배양한 후, 플라스미드 DNA를 추출하여 Deg-1, Deg-2 primer를 이용하여 CYP 유전자의 존재 여부를 확인하였다(9).

	Oxygen binding site	Heme ligand pocket
SuaC	LLL IAGHETTASM	GVHQCLGQNLARL
Sca2	LLL VAGHETTASM	GVHQCLGQNLARL
PauC	LLL TAGHETTSHM	GVHQC1GQHLART
P450 105B1	LLL VAGHETTANM	GVHQCLGQPLARV
SubC	LLL VAGHETTANM	GVHQCLGQPLARV
	***** : *	***** : *** ** *

Figure 1. Design of the degenerate PCR primers for the amplification of P450 hydroxylase genes from *S. benihana*. Homologous regions in the amino acid sequence of the O₂ binding site and heme-ligand pocket of P450 hydroxylases from *Streptomyces griseolus* (SuaC, SubC), *Streptomyces carbophilus* (Sca2), *Pseudonocardia autotrophica* (PauC), *Streptomyces griseolus* (P450 105B1) were aligned. The degenerate PCR primers were designed using boxed regions.

CYP 유전자 군의 클로닝 및 염기서열 분석

*S. benihana*로부터 증폭된 5종류의 CYP 유전자들의 central region의 염기서열을 바탕으로, primer walking을 이용하여 각 재조합 cosmid로부터 CYP 유전자의 ORF (open reading frame)의 완전한 서열을 확인하였고, ribosome binding site를 포함한 염기서열부터 stop 코돈까지의 서열을 PCR을 통해서 증폭하여 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하였다. FD 유전자가 뒷부분에 같이 있는 경우(CYP502, CYP503, CYP504, CYP506), CYP 유전자와 FD 유전자를 함께 증폭하였다. Degenerate primer를 통해서 증폭되었던 PCR 산물과 각각의 CYP와 FD의 완전한 염기서열은 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 분석하였고, Multiple Sequence Alignment는 European Bioinformatics Institute의 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)를 이용하였으며, 다른 방선균 CYP의 아미노산 정보는 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 검색하여 사용하였다.

결과 및 고찰

*S. benihana*로부터 신규 CYP 유전자의 central region 증폭

*S. benihana*로부터 다양한 CYP 유전자를 클로닝하기 위해 여러 방선균 CYP들의 보존되어 있는 부분을 바탕으로 제작한 degenerate primer(8)를 이용하여 PCR을 수행하였다. Template는 *S. benihana*의 chromosomal DNA를 이용하였고, PCR 결과 350 bp의 DNA가 증폭된 것을 볼 수 있었다. PCR 산물은 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하였고, 그 중 하나의 콜론의 염기 서열 분석 결과 여러 방선균들의 CYP와 높은 유사성을 보였다(data not shown). Nikkomycin 생산 균주인 *Streptomyces tendae*의 CYP105K1 (NikF)과는 60%의 일치도, 78%의 유사도로 가장 높은 유사성을 보였고,

*Streptomyces ansochromogenes*의 CYP105K2과는 58%의 일치도, 75%의 유사도, *Micromonospora echinospora*의 CYP105W1 (CalE10)과는 60%의 일치도, 76%의 유사도, *Streptomyces avermitilis* MA-4680의 CYP105D7과는 62%의 일치도, 74%의 유사도, *Pseudonocardia autotrophica*의 CYP105X1 (PauC)과는 61% 일치도, 72%의 유사도를 가지는 것으로 나타났다. 따라서 Deg-1과 Deg-2 primer를 통해 증폭된 350bp PCR 산물에는 적어도 하나 이상의 CYP 단편을 가지고 있을 것으로 판단되었다.

(A) *CYP50I*

1 ATGTCGAGGCCCTGCCTACCCCTGTACCTTCCCACCGAGCCGCCCCCTCCCGCTTCGAC
61 CCTCTGAGGTGCTCGTGCCTGGGGGAGCAGGCCCATCGCCCGCTCGGCTATCCGAT
121 GACCGTCACCCAGGGCTTGTTGACCGCCCTTCGCGGCCAGGAGCTGGCTACCGGA
181 TCGGGCTTCAAGCAGCTGTTGGAGAACCTGCACTGGCCGATCCGCTGGAGGGCTCGAG
241 CGGGAGAACCTGCTCAAGCCGCCGCTTCATCGAGATGGACCCGCCGACCACTCC
301 CGCTTCAAGGAGCACGCTGGCGGCCGAGTTCAGCTTCAAGCTGGAGGAGCAGGCC
361 CGGATTCAGGAGCACGATCACCGAAAGGGCTTCGGACGCCATGGACGCCGAGGGGCC
421 GACCTGATCAGGAGGTTCCGCTTCCCGTCCCTCGCTGGTATTGGAGCTCTGGCC
481 GTGGCGTACCGGACAGGAGGGCTCCGGCGGACTCCGGGACTCCGGGACGCCGCTTGG
541 TCAGCAGGGAGGAGTTCGGCGGCCGACGGGCGACTGGGACTTACCTGAGA
601 GTCCGAAGGAGCGGGCGCAACCGCTGACGACCTGCTCAGGGCTCGTCCGGCG
661 GATCTCTTCATGAGGAATCGGGGGGAGCCTGCTCTCTGGCTGGAGCCAGCTGAG
721 ACCACGGCCAACATCTGGGGCTGGTACCTTCCGGCTCTGAGGCTACCGGGAGCCTG
781 CGGCCCTCTGGGGCTGGAGGCCGCCGCTGATCGAGGGGGCGCTGGAGGACTCTCCGCTA
841 CTGGCGTACGCATCTGGGGCGCTCAGGGCGCTCTGAGGAGCTGAGATCGGGT
901 CAGACGATCAGGAAAGGGCTGGTACGATCTGGGGCGGCCAACCTGGGACCC
961 GAAAGCTTCAAGACATCTGAGACCTTCAAGCTACCCGGCCGCCAGCTGGCCACCTG
1021 ACCTTCGGGACGGCATCCACCGTAGCTGGCTCGTCACTGGCTGGAGATGAGATGGC
1081 GTGCCCTTCCCGCGCTGGTCCGGGCTTCCGGGCTCTGGCTGGCGTCCGGTCCGAG
1141 GAGGTTCCGATGGCACGGACATGAGCATTCAGGGCGCACCAGCTGGCGTCACTGG
1201 TAG

(C) CYP503

1 ATGACGAATAGCGCTGCGAGCTGCCGTGAGGGGGCTGCCGTTGCCCCGCGCC
61 GCCTACAGGGGGCTGGGGAGCAGGGGGCATGACCAAGGTCGCCGTGACCCAGGGGGCC
121 GAGGGCTGGTGGGTGTCGGGCGATGAGGAAGGCCGGTGCCTGCTCGCGAGGGGGCTTQ
181 TCTCTGACGGCGGCGAAAGCGCTTCCCCTCTTCAACCTCGATGCCGCCACCTCTGCAA
241 CAGGGTCCGGCAGGGCAGGGCAGGTGATCGCATGCCATGCCAGGGGGGCCAACACTCGCGGT
301 CGCCGCTGGTGTAGCGGAGTTACCGTGAAAGCCGGCTGGCGGCCATGCCGCCGCGAT
361 CAGGACATCTGTCACAGGGCCACCATCATGGTGGAGCGGCCACCTCTGATGGACGACCC
421 GCCGGGGGGCTCTGCCAAGCTGCCGCCATACATCGACGCCATGATACCCGCAAGGAGT
481 CGGAACCCGGGCGACGACTGGTGGCCGGGAGATGCCGCCGCCAACGGGGGGGGCGCC
541 TGCACACGGGGGGCTGGTGGACCTGGCTTCTCTGCTGTCGACGCCGGGCCAGGACCA
601 CGCGGAACATGATCTCGCTCGCGTGGTGGCGCTGCTCTCCACCCGGAGCAACTGACCG
661 TTGGTCAAAGGCCGACCCGGCGAACAGCCCATGGCCGTGGAGGAACCTGCTGCCATCTC
721 CCATCGCCGAGGGGCTACCTCCGGGTGCGGCCAGAACGCTGCGACATGGGGGCGCGA
781 CGCATCAGGGCCGGAGGGCGTCATCTCTCCGGGTCTGCCGCCAACCTGGACCCGGCGG
841 CGTTCAAGGACCCGGCTGACCTGGATCTGAGGCCGGGCTGCCACCCACTCGCTTCTG
901 GCTTCGGCCGGCACCGTACCTCCGGGCAAGAACCTGGCCGGGAGATGGAGCTGCGAT
961 TGACACACTGTTGGCGGATCTACCTCCGGGTCTGCCGCCAACCTGGAGGACCTGGCG
1021 CGTTCAGGGGAGCGCGTCACTACCGGGCTCACGAACTCCGGTCACTTGGTGA

(E) CYP506

1 GTGACGGAGCCCGCTACACCGTGAACGCCCTGCCACCAGTCGCCCTCCGGCTGCCCG
61 TTGACCCGCCAGGGAGGTGTCGCCAGCTGGCAGAGCAACCCACTCAGCAGGATGGTC
121 TTCCCCAGGCCAGCTGGCTGGCTGGACCTGAGCCCTGGCCCTGGGGCTGGCTGCT
181 GGGCACCGCCCGCTTACGGCAGGGCAGGCTCATGCACCTGCCCTGGGGCATC
241 TCGGCGAGAGGCCGCCCGCCGCCGCGCCGCGATGTTATCGGCGTGCATCCGGCGAG
301 CACACCGCTAACGCCAGCTTCACGGGGAACTACCGGCTGGAGATGCCAGTCCTC
361 GGGCCGCCGCTGAGGAGATACCGGCCAGGAGCACTGGACGCCATGGCCAGGGCGAGCTG
421 CCTGTTGACCTGGTCAAGGCCCTAGGCCAGGGCTCCGGCTGGATGATCTGAGCTG
481 CTGGCGTTCTCCATACGCCAGGGAGTTCTTCAAGGCTGAGGCCCTGGCCGAAACCA
541 TTGACGCCGCTCCGGAGGAGCATACGGCCTACATGCGCTGGAGGATCTCGAC
601 CGCGTGTCTGGCCAAAGGCCGCCACCCCGACAGGAGCACTGGGGCTGGGGCT
661 GAGGGAGCTACCGACGAGGAGCTACCAACATGGGTTCTGCTGCTGGGCCGGCT
721 GACACACCCGCCAACATGCTGGCTGGACCTTCTGCCCTCTGAGCACCCGGGGAGC
781 CTGGCCGCCCTGGGGCCGACCCGGGCTCTGGCAGGACAGGGCTGGAGGCTCTGG
841 TACCTGAGCATCACCCACCGGGATAACGGCCGACTGGAGGATGTCGAGCTAACGGT
901 CACGCTGATAACAGGGGGAGGGCTGGCTGGCCCTCTGGCCGAGGGCCAAACGGGAC
961 GAGGCTCTGGCCACCCGGGACACTCTGGACCTGACGGCTGGAGGACATCTGG
1021 TTGCGTACGGCTGCCACCGTAGCTGGCTGGCCAGCACTGGCCGGCTGGAGATGGGGCT
1081 GGGCTTCCCGCTGGTACCCGGTACCGGTTCTGGACGCTGGGGCTGGCCATATCTCAG
1141 GTGCCGCTGGCACCAATTCCGACATCTACGGCTGACCGGGCTCCGGTGGGGAC
1201 AAGGAGTAG

S. benihana 균주로부터 5개의 신규 CYP 유전자의 분리 및 염기서열 분석

*S. benihana*에 존재하는 CYP 유전자의 완전한 서열을 확인하기 위하여, Deg-1과 Deg-2를 통해 증폭한 CYP central region의 PCR 산물들을 probe로 하여, *S. benihana*의 1300개의 genomic library를 colony hybridization을 통해 스크리닝하였다. 총 19개의 재조합 cosmid (pESK501~pESK519)가 Deg-1과 Deg-2로 증폭되었고, 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과, 총 5 종류의 서로 다른 신규 CYP (CYP501, CYP502, CYP503,

(B) CYP502

1 GTGACCGATCAGAATCTGGAAACCCGGTGAACCTGCCACCCGGCGGACCCCCGCTGC
61 CCGTCTGGACCCGGCCGAAGACTGGCCGTCGCTGGCTGACTGCCAGCGGCTCAGCCGGCT
121 GCGTTCTGGACCCGGCCGAAGACTGGCCGTCGCTGGCTGACTGCCAGCGGCTCAGCCGGCT
181 CTGGCCGATCACCGCTTCAAGGTCTAGGTCGATGGATCTCAAGACCTGGCGCTTCCGGGGCG
241 AACGCTCTGGCCGGGAGCGGTGACAGGCGCCGGCATGGTCTGGCTGTCATGGACGAT
301 CGGATCACAGGGCTTCTGGCTGCTGACGGGGCATGGTACCGGCTAGGGTACGGGATGAGG
361 CGGCCGAGCTGGCATGCTCCAGGATCACGGGGCAGGACTGGCTAGGGTACGGGCTAGGGC
421 GGGCCGCCCGTGTAGCTCGTGAGCGGTTGCTCTGGCGATCCCTCGCTGGTGTACTGCG
481 GAGCTGCTGGCGTTCTGGCATGGAGATCAGGCGCTTCTGGCGAGGACGACGGCCGGTGGCC
541 GTGATCTGGAGGCCCTCGGGAAAGCAGGCCAGCTGGCGGGAGCGGCTCACGGACTC
601 TTGGCCGACCTGGTGGCGACAAGCGTTGAGGCCAACGGGACGACTCTGGGGGTG
661 ATCACCGACAGTGGCTGACCTGACCCGAGGGAGCTGACCCACCTGGTTGGCGCTGCTGATC
721 CGCCGGACGAGGCCAGCGGAACATCGTGGCTCCGGCTTCGGCTCTCCGGCC
781 CCCGGGCAACTGGACCCGCTACGGGGGCGACACTCTAACCTGACGGGAGCAGGGCTGGAGAG
841 CTGCTACGGTACCTGACCATATTACCGGGGCTCGCCGAGCTGTGCGCCCTTGGGGAC
901 GTGCAAGCTGGACGGGCACTCGGCGGGGAGACGGTGTACCTGGGCTCGGGCG
961 TGTCAATGGTACCTGGGGGGTTGGGGACGGGAGCTGCTGGCTCGGGCTGACGGACTGGGAA
1021 GCCGGGACCACTGGCTTGGGCGAGGGCTGACCAAGGTGTCAGCTGGCTACGGACTGGGG
1081 AGGATCTGGAGATGGCTCGGTATCGCATCTGGCTGAGCTGGGGTTCCGGCACTGGGGCTG
1141 GCGCTGGACGGCTGAGATCTGGCTCGGGCTGGGGCTCCGGCTACGGGGTGGCG
1201 CTTCGGCTCACCTGGGGAGCGGATGA

(D) *CYP504*

Figure 2. Nucleotide sequences of the five CYP genes from *S. benihana*.

CYP504, CYP506) 유전자들이 존재하였다(Fig. 2).

다섯 개의 CYP 모두 primer가 annealing되는 부분(Fig. 3)은 다른 부분에 비해 상당히 보존되어 있었고, *Streptomyces coelicolor*와 *S. peucetius*의 CYP에서 관찰되는 I-helix (oxygen activation motif, Fig. 3 (A)), K-helix (EXXR motif, Fig. 3 (B)), Heme binding domain(Fig. 3 (C))도 보존되어 있는 것을 확인할 수 있었다(3, 10). 특히 K-motif의 경우, 다섯개의 CYP 모두 ELLR로 보존되어 있었으며, I-helix는 AGXXT로, Heme binding domain은 FGHGXHQCLG로 몇 개의 아미노산을 제외한 나머지 부분이 상당히 보존되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 3).

이들 CYP 유전자들의 완전한 ORF를 확인하기 위하여, 350bp central region의 서열을 이용하여 primer를 제작하였고(data not shown), 5개의 서로 다른 350bp central region을 가진 재조합 cosmid (pESK501~pESK504, pESK506)를 이용하여 앞 뒤 서열을 읽어 나갔다. 이들 cosmid에 존재하는 CYP 단백질들을 각각 CYP501~CYP504, CYP506로 명명하였고, 이 중 CYP501을 제외한 나머지 CYP (CYP502, CYP503, CYP504, CYP506)의 stop 코돈의 뒤쪽에는 FD 유전자가 존재하였는데, 위의 CYP와 같은 방법으로 명명하였다(FD502, FD503, FD504, FD506).

NCBI의 BlastX를 이용하여 다른 단백질과의 유사성을

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment

CYP502	VTDQNLGTPVTLPTRRDPACPFDPPPEELTRLRDSQPLTRLAFPDGHVGWLVTGYDAARRV	60
CYP506	VTEPPY-TV-TALPTMRPPGCPFDPPPEELAQLREQHPLSRMVFPDGHVGWLVTSHALARAV	59
CYP501	MSEASF-TPVTFPTERPS--PFDPPVEVLGRPWREQAP RPLRYPDGHQGWLTGFSAAKAV	57
CYP504	-----MTYPMSRQR--RLDPPDEL--FDDPAPVRPLTFADGHVGWLVRGHAAGRAV	47
	: * * : ***: * : * : : . *** * *** .. . : *	
CYP502	LADPRFSVRMDLKHSPPLPRRNVLAGSGDKPAPGMFVVMDDPDHRRFRRLLTGQFTVQRMR	120
CYP506	VADPRFSSRHELMHSPFPFG-A SAERPPPAAPGMF GVDPPEHTRYRKLLTGKFTVRRMR	118
CYP501	LTDSPRFSSLLENLHWPIRWEGLEPE-NFVQPPGFFMQMDPPDHSFRKQLAAQFTVRRMR	116
CYP504	LSDPRFSTEPD-LQHPLVASRHLPLK-GRV-PPGFFLRLMDAPDHTRYRRLLTGHFTVRPMN	104
	: * . *** : : * : . . ***: * : * : * : : * : . : ***: **.	
CYP502	RLEPRI VQITADHLDAMAKAGPPV р VQAFA LP PSLV CELLGVРYEDHAFFQEQTAVA	180
CYP506	SLAARVEE TAEHLDAMERQGPPV р VQAYAQPVPALM CELLGVРYADREFFQPHALAL	178
CYP501	QLEPRIEQI TEEVL DAMERGGAPADL QEFA LPVPSLV CELLGVРYADRERFQRDSATA	176
CYP504	QLQPR EE AATCLDDMERAGPPADLVRDFALP PSLV CELLGVРYEDREN FQNESARL	164
	* . * : * : * * : * . * . * : : * * : * : * : * : : * : . : * . : :	
CYP502	VOLEASVEQATVAAGRLTDYFADLVRHKRSSPTDDLGGI TDSLTDDEELTT GLALLI	240
CYP506	NNFDAVPEEQYAAVALQEYLHALVLA KRATPTDDLLGDLAR-EELTDEELTN GVLLL	237
CYP501	LRVGSTREEVGAATGSMMGYLYELVARKRAEPADDL SGLVAGGDLFHEE AGAGL	236
CYP504	LRLDSSPGEMESA VDDLVKYFYTLIARKRVEPANDLLTGL GGGELEDDE AGMGFL	224
	: : * : * : * : * : * : * : * : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :	
(A)	[AGHETITANMLALGVALGVALRHPGQLDAYRADTSLTDSAVEELLRYLTIIHRGSPSRAALAD	300
CYP502	[AGLDITITANMLALGTFA LLSPGQLA ALRADPGLADQAVEELLRYLSITHTG--IRAALED	295
CYP506	[AGHETITANMLGLGTFA LLSDPGQLA ALRSEPLIEGA VEELLRYLAVTHLG-PLRAALED	295
CYP501	[AGHETITANMLALGTFA LLEHPEQLALVRDDPAVIDNAVEELLRYLSIHVG-PTRTAVED	283
CYP504	*** : * : * : * : * : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :	
(B)	(B)	
CYP502	VELDGQL RAGETVII GLPAVN RDPARFADPDVLRLGREGARHHIAFGHGVHQCLGQQLA	360
CYP506	VELNGHV KAGESVALSAQAANRDPERFADPDTLH-R-LATGHL SF GHGVHQCLGQQLA	354
CYP501	VEIAGQT RK GQVVT SVPAA NRDPERFDDPETFDVTRPATVGH TF GHG HQCLGQQLA	355
CYP504	VVI EGTT RAGECVALS PAANR DPSRFADPCAL D VRQPAGS-HLSFGHG HQCLGQQLA	342
	* : * : * : * : . * . * : * : * : * : : * : : * : : * : : * : : * : : * : :	
(C)	(C)	
CYP502	R EMR GYRMLFERFPALRLAVPAAE SMREASLAYGVRRLPVTWEQA	408
CYP506	R EMRVALPALVTRFPTLRLA SSAEVPLRTNSD YGVHRLPVAWDKE	402
CYP501	R EMRVAFPALFRRFPGLRLAVPSEEVPMRTDMS YGAHQLPV W---	400
CYP504	R EMRVAYPALLRRFPSLRLAVPAEEVPMRADMS YGVHSLRVTW--	387
	* : * : * : * : . * . * : * : * : * : : * : : * : : * : : * : : * : :	

Figure 3. Alignment of the deduced amino acid sequences of five CYP genes. Regions of primer annealing sequence are highlighted in dotted box. Conserved motif is indicated by boxed area ((A): I-helix, (B): K-helix, (C): heme binding motif).

검색한 결과, CYP503의 경우 *Streptomyces tendae*의 CYP105K1 (NikF) 단백질과 가장 높은 유사성을 보였고, 나머지 CYP들은 *Streptomyces* sp.의 CYP105C1 (ChoP) 단백질과 40% 이상의 유사성을 나타냈다(Table 1). Nikkomycin은 *Streptomyces tendae*, *Streptomyces ansochromogenes*와 같은 방선균에서 생산되는 뉴클레오시드 항생제 (nucleoside antibiotics)로서 살충제로 쓰이며(11,12), calicheamicin은 *Micromonospora echinospora*로부터 생산되는 enediyn계 물질로서 항암제로 쓰인다(13). 이러한 항생제들의 생합성은 대부분 PKS (polyketide synthase)에 의해 기본골격이 만들어지고, 당의 첨가나 하이드록실레이션 등의 변형에 의해서 활성을 가진 물질로 만들어진다(14). CYP105K1, CYP105W1도 항생제 전구물질을 활성이 있는 항생제로 만들어 주는 중요한 역할을

하는 단백질이다. 따라서 CYP503도 nikkomycin이나 calicheamicin과 같은 항생물질 또는 2차 대사산물의 변형과 관련되어 있는 CYP일 것으로 추정된다. 이와 달리 나머지 4개의 CYP는 cholesterol oxydase (ChoA)와 함께 전사되는 CYP105C1과 가장 높은 유사성을 지니는데(15), 이들은 콜레스테롤, 스테로이드, 지방 등과 같은 물질이나 외부 난분해성 물질의 분해와 관련이 있을 것으로 보인다.

완전한 유전체 서열이 밝혀진 방선균인 *Streptomyces coelicolor*의 경우에는 FD 유전자가 6개(3), *Streptomyces avermitilis*에는 9개(16), *Streptomyces peucetius*에는 2개가 존재하는 것으로 나타났는데(10), *S. benihana*의 경우 본 연구를 통해 CYP의 뒤쪽에 존재하는 4개의 FD가 발견되었다. 일반적으로 CYP의 뒤쪽에는 FD가 붙어있는 경우가 많은

Table 1. Comparison between the deduced amino acid sequences of 5 CYP genes of *S. benihana* with that of other CYP genes

CYPs	Match in the databases ^a		CYPs ^b (secondary metabolite)	Identities	Positives
	Strains				
CYP501	<i>Streptomyces</i> sp.	CYP105C1		52%	64%
	<i>Streptomyces peucetius</i>	CYP166B1		47%	63%
	<i>Streptomyces peucetius</i>	CYP105F2		45%	59%
	<i>Streptomyces lavendulae</i>	CYP105F1		45%	57%
	<i>Streptomyces griseolus</i>	CYP105B1		44%	57%
CYP502	<i>Streptomyces</i> sp.	CYP105C1		49%	60%
	<i>Streptomyces peucetius</i>	CYP166B1		49%	58%
	<i>Streptomyces peucetius</i>	CYP105F2		46%	59%
	<i>Streptomyces lavendulae</i>	CYP105F1		44%	59%
	<i>Streptomyces griseolus</i>	CYP105B1		44%	56%
CYP503	<i>Streptomyces tendae</i>	CYP105K1 (nikkomycin)		47%	62%
	<i>Micromonospora echinospora</i>	CYP105W1 (calicheamicin)		43%	58%
	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	CYP105D7		46%	58%
	<i>Pseudonocardia autotrophica</i>	CYP105X1		43%	57%
	<i>Streptomyces lividans</i>	CYP105D4		43%	57%
CYP504	<i>Streptomyces</i> sp.	CYP105C1		49%	61%
	<i>Streptomyces peucetius</i>	CYP166B1		47%	62%
	<i>Streptomyces griseolus</i>	CYP105B1		49%	61%
	<i>Streptomyces lavendulae</i>	CYP105F1		45%	60%
	<i>Streptomyces peucetius</i>	CYP105F2		44%	59%
CYP506	<i>Streptomyces</i> sp.	CYP105C1		53%	64%
	<i>Streptomyces peucetius</i>	CYP166B1		51%	64%
	<i>Streptomyces peucetius</i>	CYP105F2		49%	62%
	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	CYP105D7		46%	59%
	<i>Streptomyces griseolus</i>	CYP105B1		45%	59%

^aDatabase search at NCBI website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

^bCYP name as annotated at website: <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>.

Table 2. Comparison between the deduced amino acid sequences of 4 FD genes of *S. benihana* with that of other FD genes

FDs	Match in the databases ^a		FDs	Identities	Positives
	Strains				
FD502	<i>Streptomyces griseolus</i>	SubB (ferredoxin-2)		65%	78%
	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	Putative ferredoxin		60%	76%
FD503	<i>Streptomyces noursei</i>	NysM (ferredoxin)		55%	65%
	<i>Streptomyces griseus</i>	Ferredoxin		54%	68%
FD504	<i>Streptomyces griseolus</i>	SubB (ferredoxin-2)		54%	68%
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Putative ferredoxin		57%	61%
FD506	<i>Streptomyces griseolus</i>	SubB (ferredoxin-2)		48%	67%
	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	Putative ferredoxin		47%	60%

^aDatabase search at NCBI website: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

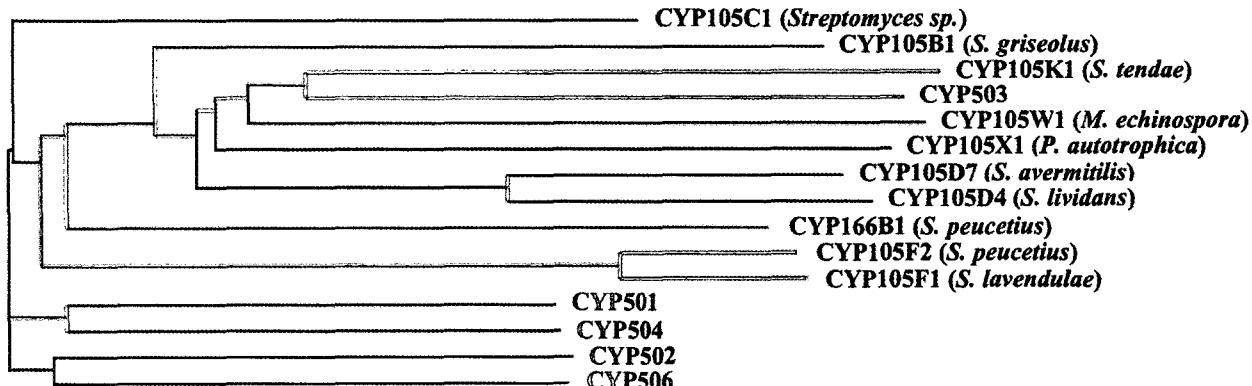


Figure 4. Phylogenetic tree of CYPs with other actinomycetes CYPs.

데, 이는 CYP의 전자 수용 과정에서 FD가 전자 전달체로서 함께 작용하기 때문이며, 이로 인해 보다 높은 효소 활성이 나타나기도 한다(2). FD503의 경우 다른 FD와 달리 *Streptomyces noursei*의 NysM과 55%의 일치도로 가장 높은 유사성을 보였으며, 나머지 FD (FD502, FD504, FD506)들은 *Streptomyces griseolus*의 SubB와 가장 높은 유사성을 나타냈다 (Table 2).

또한 CYP501~CYP504, CYP506의 기능을 분자계통학적으로 확인하기 위하여 이미 알려진 방선균의 CYP와 비교한 결과 (Fig. 4), CYP503의 경우에는 2차 대사산물 생산과 관련된 CYP105 family와 유사성이 높았고, 나머지 CYP들은 CYP503과 달리 서로 하나의 sub family를 이루었으며, BLAST 검색 결과에서 나타난 것과 같이 스테로이드 계열의 물질에 하이드로실레이션 시킬 것으로 추정된다.

요 약

모넨신, 니저리신, 사이클로스포린 등을 하이드록실레이션 시키는 균주인 *S. benihana*에 존재하는 여러 가지 CYP를 클로닝하기 위해, 방선균 CYP의 보존된 부분을 통해서 degenerate primer를 제작하였고, colony hybridization을 통해서 스크리닝 한 결과 총 5 종류의 CYP가 검색되었다. 아미노산 서열의 분석 결과 방선균의 CYP들과 매우 높은 유사성을 가졌으며, 이를 CYP의 앞 뒤 서열의 검색 결과 이 중 4개의 CYP의 downstream에는 FD 유전자가 존재함을 알 수 있었다. CYP503의 경우 다른 나머지 4개의 CYP의 서열과 차이가 많았으며, 2차 대사산물의 변형과 관련되어 있을 것으로 예상되며, ChoP와 유사성을 보이는 나머지 4개의 CYP는 스테로이드 계열 물질의 하이드록실레이션과 밀접한 연관이 있을 것으로 추정된다.

감 사

본 연구는 21C 프론티어 연구개발사업 미생물유전체 MG3-1과제 (M102KK010012-04K1101-01211)의 지원으로 이루어 졌으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Roberts, G. A., G. Grogan, A. Greter, S. L. Flitsch, and N. J. Turner (2002), Identification of a new class of cytochrome P450 from a *Rhodococcus* sp., *J. Bacteriol.* **184**, 3898-3908.
2. Hussain, H. A. and J. M. Ward (2003), Enhanced heterologous expression of two *Streptomyces griseolus* cytochrome P450s and *Streptomyces coelicolor* ferredoxin reductase as potentially efficient hydroxylation catalysts, *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 373-382.
3. Lamb, D. C., T. Skaug, H. L. Song, C. J. Jackson, L. M. Podust, M. R. Waterman, D. B. Kell, D. E. Kelly, and S. L. Kelly (2002), The cytochrome P450 complement (CYPome) of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Biol. Chem.* **277**, 24000-24005.
4. Hopwood, D. A., M. J. Bibb, K. F. Chater, T. Kieser, C. J. Bruton, H. M. Kieser, D. J. Lydiate, C. P. Smith, J. M. Ward, and H. Schrempp (1985), Genetic Manipulation of *Streptomyces* A Laboratory Manual, p161-211, John Innes Foundation, Norwich.
5. Kuhnt, M., F. Bitsch, J. France, H. Hofmann, J. J. Sanglier, and R. Traber (1996), Microbial biotransformation products of cyclosporin A, *J. Antibiot.* **49**, 781-787.
6. Vaufréy, F., A. M. Delort, G. Jeminet, and G. Dauphin (1990), Biocconversion of monensin by a soil bacterium, *Sebekia benihana*, *J. Antibiot.* **43**, 1189-1191.
7. Delort, A. M., G. Jeminet, M. Sancelme, G. Dauphin (1988), Microbial conversion of nigericin in three successive steps, by *Sebekia benihana*, *J. Antibiot.* **41**, 916-924.
8. Hyun, C. G., J. M. Kim, S. K. Hong, and J. W. Suh (1998), An efficient approach for cloning P450 hydroxylase genes from actinomycetes, *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 295-299.
9. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), Molecular Cloning, 2nd ed., Cold spring Harbor Laboratory Press.
10. Parajuli, N., D. B. Basnet, L. H. Chan, J. K. Sohng, and K. Liou (2004), Genome analyses of *Streptomyces peucetius* ATCC 27952 for the identification and comparison of cytochrome P450 complement with other *Streptomyces*, *Arch. Biochem. Biophys.* **425**, 233-241.
11. Brunner, C., B. Lauer, W. Schwarz, V. Mohrle, and C. Bormann (1999), Molecular characterization of co-transcribed genes from *Streptomyces tendae* Tu901 involved in the biosynthesis of the peptidyl moiety of the peptidyl nucleoside antibiotic nikkomycin, *Mol. Gen. Genet.* **262**, 102-114.
12. Wang, G., L. Nie, and H. Tan (2003), Cloning and characterization of *sanO*, a gene involved in nikkomycin biosynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*, *Lett. Appl. Microbiol.* **37**, 452-457.
13. Ahlert, J., E. Shepard, N. Lomovskaya, E. Zazopoulos, A. Staffa, B. O. Bachmann, K. Huang, L. Fonstein, A. Czisny, R. E. Whitwam, C. M.

- Farnet, and J. S. Thorson (2002), The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS, *Science* **297**, 1173-1176.
14. Urlacher, V. and R. D. Schmid (2002), Biotransformations using prokaryotic P450 monooxygenases, *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 557-564.
15. Horii, M., T. Ishizaki, S. Y. Paik, T. Manome, and Y. Murooka (1990), An operon containing the genes for cholesterol oxidase and a cytochrome P-450-like protein from a *Streptomyces* sp., *J. Bacteriol.* **172**, 3644-3653.
16. Lamb, D. C., H. Ikeda, D. R. Nelson, J. Ishikawa, T. Skaug, C. Jackson, S. Omura, M. R. Waterman, and S. L. Kelly (2003), Cytochrome p450 complement (CYPome) of the avermectin-producer *Streptomyces avermitilis* and comparison to that of *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 610-619.