

접합전달을 이용한 *Streptomyces natalensis* ATCC27448의 형질전환 최적화 및 attB-site의 특성연구

이강무 · 최선옥 · 박해룡 · 황용일*

경남대학교 식품생명공학부

산업적으로 중요한 macrolide계 항진균 항생물질인 natamycin을 생산하는 *Streptomyces natalensis* ATCC27448의 분자 유전학적인 연구를 위해 대장균으로부터 *S. natalensis*로 plasmid DNA를 직접 도입하는 형질전환법을 확립하였다. 이러한 *S. natalensis*의 형질전환은 *oriT*와 *attP* 단편을 가지고 있는, Φ C31 유래의 integration 벡터인 pSET152를 이용하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002을 DNA 공여체(donor)로 이용한 접합전달법(conjugal transfer)을 사용하여 확립하였다. 접합전달의 가장 높은 효율은 10 mM의 MgCl₂를 포함한 MS 배지에서, 6.25×10^8 의 *E. coli* 공여체와 열처리를 하지 않은 *S. natalensis*의 포자를 사용하여 얻어졌다. 또 얻어진 접합전달체(exconjugant)에 대하여 southern blot hybridization과 벡터가 삽입된 염색체부분의 염기서열분석을 통해 attB site와 pseudo-attB site를 확인한다. attB site의 경우에는 다른 방선균들처럼 *S. natalensis* 염색체의 pirin 상동체를 코드하는 ORF내에 존재하였으나 pseudo-attB site는 염색체내 다른 site (GenBank accession no. YP_117731)에 존재하였고 그 염기서열은 attB 염기서열과 차이를 나타내었다.

Key words □ attB site, conjugal transfer, natamycin, *Streptomyces natalensis* ATCC27448

방선균은 포자를 형성하는 그람 양성 토양 박테리아로서 다양한 이차대사산물을 생산하며 특히 전체 항생물질의 70% 이상을 생산하는 유용한 미생물이다. 그러나 외부 유전자의 도입에 대한 강력한 제한계, 효율적인 형질전환 시스템의 부재, 재조합체의 불안정성 등으로 인해 분자생물학적인 연구에 있어 많은 어려움이 있다(3, 11). 지금까지 방선균의 형질전환에는 주로 protoplast법과 electroporation법 등이 사용되었다. 그러나 이들 방법들은 형질전환율이 높지 않거나 적용되는 방선균이 제한적이라는 단점이 있다. 최근에 이러한 문제를 극복하기 위하여 *Escherichia coli*를 이용하여 plasmid DNA를 전달하는 접합전달법(conjugal transfer)이 관심을 받기 시작하였다(8, 10, 12, 16, 20, 21). 접합전달법은 *E. coli* 내에서 재조합 플라스미드의 구축 및 조작이 가능하며 구축되어진 플라스미드를 방선균으로 전달할 수 있어 유전자 클로닝, 유전자 파괴, 변이유전자 회복 등에 폭 넓게 사용되고 있다. *E. coli*를 이용한 접합전달이 Mazodier 등(14)에 의해 처음으로 보고 되어진 이후, 방선균에 존재하는 메틸화된 DNA의 제한계를 극복하기 위해 DNA의 공여균주(donor)로 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002 (4, 15, 19)을 사용함으로써 보다 다양한 속(genus)의 방선균(*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Arthrobacter*, *Micromonospora*, *Norcardia*, *Rhodococcus*, *Saccharopolyspora*)에 적용할 수 있게 되었다(13, 20, 21). 그리고 현재 사용되고 있는

접합전달을 위한 벡터들 가운데 방선균의 염색체에 존재하는 attB site로 integration되는 Φ C31유래의 attachment site (*attP*)와 integrase (*int*) 기능을 가진 벡터들이 가장 유용한 것으로 알려져 있다(8, 19). 이러한 벡터들은 접합전달을 통해 *E. coli*로부터 방선균으로 전달되고 전달된 벡터의 attP site는 integrase에 의해 방선균 염색체의 attB site로 삽입되게 된다. 그러나 산업적으로 중요한 macrolide계의 항진균 항생물질인 natamycin을 생산하는 *Streptomyces natalensis* ATCC27448에 대한 접합전달법은 지금까지 보고된 바가 없다. 그러므로 본 연구에서는 *S. natalensis*의 분자생물학적인 연구를 위해 고효율 형질전환방법으로 접합전달법을 최초로 시도하여 최적화 하였으며 또한 *S. natalensis*의 염색체에 존재하는 attB site의 특징을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 plasmids

실험의 전반에 걸쳐 *S. natalensis* ATCC27448의 포자를 접합전달의 수용체로서 사용하였다. *E. coli* XL-10Gold는 클로닝을 위한 host로 사용하였으며 메틸화가 결손된 *E. coli* ET12567/pUZ8002를 접합전달의 DNA 공여균주로 사용하였다. pSET152 (5.7 kb) (4)는 접합전달의 부위-특이적 재조합(site-specific recombination) 벡터로 사용하였으며 pKC1132(4)의 유도체로 *S. natalensis*로부터 유래된 4.8 kb의 염색체 단편을 포함하고 있는 pKM4를 상동 재조합(homologous recombination)에 사용하였다.

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 055-249-2685, Fax: 055-249-2995
E-mail: yihwang@kyungnam.ac.kr

배지 및 배양조건

S. natalensis ATCC27448의 포자회수를 위하여 TBO (tomato paste 20 g/l, oat meal 20 g/l, agar 25 g/l, pH 7.2) 한천배지를 사용하였고, *S. natalensis*와 공여균주간의 접합전달을 위해 TBO 한천배지, ISP2 (yeast extract 4 g/l, malt extract 10 g/l, glucose 4 g/l, agar 20 g/l, pH 7.0 - 7.4), ISP4 (soluble starch 10 g/l, K₂HPO₄ 1 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 1 g/l, NaCl 1 g/l, (NH₄)₂SO₄ 2 g/l, CaCO₃ 2 g/l, FeSO₄ · 7H₂O 0.001 g/l, MnCl₂ · 4H₂O 0.001 g/l, ZnSO₄ · 7H₂O 0.001 g/l, agar 15 g/l, pH 7.0 - 7.4), AS-1 (yeast extract 1 g/l, L-alanine 0.2 g/l, L-arginine 0.2 g/l, L-asparagin 0.5 g/l, soluble starch 5 g/l, NaCl 2.5 g/l, Na₂SO₄ 10 g/l, agar 20 g/l, pH 7.5), YEME (yeast extract 3 g/l, peptone 5 g/l, malt extract 3 g/l, glucose 10 g/l, agar 20 g/l) 한천배지, MS (mannitol 20 g/l, soya flour 20 g/l, agar 20 g/l) 배지를 사용하였다. Natamycin 생산용 배지로는 sucrose가 첨가되지 않은 YEME배지(1)를 사용하였고, 방선균의 염색체 DNA 추출을 위한 액체배양은 TSB (pancreatic digest of casein 17 g/l, papaic digest of soybean meal 3 g/l, NaCl 5 g/l, K₂HPO₄ 2.5 g/l, glucose 2.5 g/l) 배지를 이용하였다. *E. coli* 및 공여균주의 일반 배양 및 형질전환에는 Luria Bertani (LB) 배지를 이용하였다.

Natamycin 생산을 위하여 100 ml의 YEME 배지에 포자현탁액을 1×10⁵ CFU/ml이 되도록 접종하고, 30°C에서 180 rpm으로 진탕배양하였다. *E. coli* 및 공여균주의 액체배양은 37°C에서 180 rpm으로 각각 진탕배양하였다.

DNA 조작 및 분리

대장균에서의 DNA 조작은 Sambrook 등(18)의 방법을 사용하였고 *S. natalensis*에서의 DNA 조작은 Kieser 등(9)의 방법을 사용하였으며 *S. natalensis* 접합전달체의 total DNA는 Rao 등(17)의 방법으로 회수하였다. Southern blot hybridization을 위해 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science, Tokyo, Japan)와 pSET152의 0.5-kb apramycin-resistant 유전자 단편을 probe로 사용하였다. DNA 염기서열 결정은 pSET152의 attP site 양쪽으로 각각 100 bp 떨어진 부분의 염기서열을 이용하여 ATTPR primer (5'-CTGGGTGGGTTACACGACGCCCT-3')와 ATTPL primer (5'-CGTTGGCGCTACGCTGTGTCGCTG-3')를 제작하고 이를 이용하여 수행하였다.

접합전달

*E. coli*에서 *S. natalensis* ATCC27448으로 plasmid의 접합전달은 Kieser 등(9)이 확립한 방법에 따라 수행하였다. pSET152를 포함하는 공여균주 *E. coli* ET12567/pUZ8002은 apramycin (50 µg/ml; 이하 Apr), chloramphenicol (25 µg/ml; 이하 Cm), kanamycin (50 µg/ml; 이하 Km)이 첨가된 LB 배지에 접종한 후, 600 nm에서 흡광도가 0.45가 될 때까지 배양하였다. *S. natalensis*의 생육에 저해가 되는 첨가된 항생제를 제거하기 위해 동량의 LB 배지로 두 번 세척한 후 0.1 배의 LB 배지로 재현탁

하여 *S. natalensis* ATCC27448와의 접합전달을 위한 공여균주로 사용하였다. 열처리하지 않은 1×10⁷의 *S. natalensis* 포자를 2×YT 배지 0.5 ml로 현탁한 후 준비된 공여균주 현탁액 0.5 ml (1.25×10⁸)와 잘 혼합한 다음, 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 얻어진 pellet을 10 mM의 MgCl₂를 포함한 6 종류(MS, AS-1, TBO, ISP4, YEME, ISP2)의 고체배지에 도말하고 30°C에서 16~20시간동안 정지배양하였다. 형질전환체의 선별을 위해 1.5 ml의 살균수에 0.5 mg의 nalidixic acid (이하 Nal)와 1 mg의 Apr을 첨가하여 배지위에 증침시킨 후, 30°C에서 6일간 더 배양하였다. 선발된 접합전달체를 Nal (25 µg/ml) 및 Apr (25 µg/ml)이 함유된 선택 배지에 계대배양하여 얻어진 균주들의 염색체 DNA를 추출하고 PCR에 의해 형질전환 유무를 확인하였다.

염기서열의 accession number

본 논문에 보고 되어진 *S. natalensis*의 attB site와 pseudo-attB site의 염기서열은 GeneBank에 accession number AY944248과 AY944249로 각각 등록되었다.

결과 및 고찰

최적배지의 선택

*S. natalensis*의 접합전달을 위한 최적배지선정을 위해 6가지의 배지(MS, AS-1, TBO 한천배지, ISP4, YEME 한천배지, ISP2)가 사용되었다. MS와 AS-1 배지는 방선균의 접합전달에 가장 많이 사용되는 배지로 많은 방선균에서 매우 높은 접합전달 효율을 보였고(8, 9, 16), ISP2 배지는 *S. lavendulae* FRI-5(10)에, ISP4는 회소 방선균 *Kitasatospora setae*(5)의 접합전달에 최적배지이다. TBO 한천배지는 *S. natalensis*의 포자형성에, YEME 배지는 액체 배양에 사용되므로 한천을 첨가하여 접합전달에 사용하였다(1). 6가지 배지를 각각 *S. natalensis*의 접합전달실험을 적용해 본 결과 AS-1, TBO 한천배지, YEME 한천배지, ISP2에서는 접합전달체도 얻을 수 없었다. 그러나 MS와 ISP4 배지를 사용하였을 경우에만 *S. natalensis*의 접합전달이 가능하다는 사실을 확인할 수 있었다(Table 1). 그러나 MS 배지가 ISP 4배지에 비해 15배 높은 접합전달 효율을 보였으므로 MS 배지를 *S.*

Table 1. Effects of medium on transconjugation efficiency

Medium ^a	Transconjugation frequency ^b
MS	1.3×10 ⁻⁵
ISP4	8.7×10 ⁻⁷
YEME	-
AS-1	-
ISP2	-
TBO	-

^aEach medium contains 10 mM MgCl₂.

^bValues represent average frequencies of three independent experiments.

- indicates no exconjugant.

*natalensis*의 접합전달을 위한 최적배지로 선정하고 이후 실험에 계속 사용하였다.

배지에 첨가되는 $MgCl_2$ 의 최적농도

방선균의 접합전달에 있어 $MgCl_2$ 의 정확한 역할은 아직 밝혀지지 않았지만 접합전달의 효율을 증가시키기 위해 일반적으로 10 mM 농도로 $MgCl_2$ 가 배지에 첨가되어져 왔다(9). 그러나 Choi 등(5)에 따르면 *K. setae*의 접합전달에 첨가되는 $MgCl_2$ 의 농도는 10 mM보다 높은 30 mM이었다. 이러한 결과는 첨가되는 $MgCl_2$ 의 농도는 사용되는 균에 따라 다를 수 있다는 것을 의미하는 것으로 *S. natalensis*에 대한 $MgCl_2$ 의 최적 첨가농도를 확인하기 위해 최적배지로 선정된 MS 배지에 0에서 40 mM까지 다양한 농도의 $MgCl_2$ 를 첨가하여 접합전달을 실시하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 $MgCl_2$ 가 첨가된 경우에는 그렇지 않은 경우보다 접합전달의 효율이 모두 증가되었다. 그러나 10 mM이상의 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 따라서 *S. natalensis*에 대한 $MgCl_2$ 의 첨가농도는 10 mM이 최적인 것으로 판단된다.

포자의 열처리 효과

접합전달에 사용되는 포자를 *E. coli* ET12567/pUZ8002 공여 균주와 혼합 전에 약 50°C에서 10분간 열처리과정을 거치면 접합전달 효율이 향상되는 것으로 보고 되었다(7, 9, 14). 이는 열처리가 포자의 발아를 촉진하여 접합전달의 효율이 향상되거나(15) 방선균에 존재하는 제한계를 일시적으로 약화시킴으로써 효율이 증가되는 것으로 알려져 있다(2, 7). *S. natalensis* 포자의 최적 열처리 온도를 결정하기 위하여 먼저 30°C에서 55°C까지 10분간 처리하여 열에 대한 포자의 내성을 열처리하지 않은 경우와 비교하였다. 그 결과 40°C 이상의 열처리부터 포자의 생존율이 감소하여 55°C의 열처리에서는 포자가 전혀 생존하지 못했다(Fig. 1). 이러한 결과는 *S. natalensis* 포자의 경우 다른 방선균들의 포자에 비해 열에 대한 내성이 비교적 약하다는 사실을 나타내는 것으로 열처리 범위를 40°C 이내로 제한하여 접합전달

Table 2. Effects of $MgCl_2$ concentration in MS medium on the transconjugation efficiency

Concentration of $MgCl_2$ added in MS medium (mM)	Transconjugation frequency ^a
0	9.1×10^{-7} (100 ^b)
5	5.1×10^{-6} (560)
10	1.3×10^{-5} (1,428)
15	1.2×10^{-5} (1,318)
20	1.0×10^{-5} (1,098)
40	8.8×10^{-6} (967)

^aValues represent average frequencies from three independent experiments.

^bRelative values are indicated in the parentheses, taking the frequency with no $MgCl_2$ as 100%.

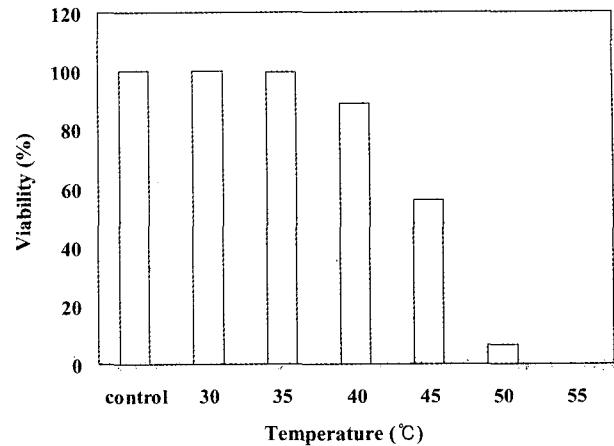


Fig. 1. Effects of temperature on the viability of *S. natalensis* spores. Spores (10^3 /ml) in $2 \times$ YT medium were incubated for 10 min at the temperature indicated. The data are the average of three independent experiments, and expressed as a percent of the colony count obtained in the absence of heat treatment (control).

을 실시하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 포자에 대해 각각 30°C, 35°C, 40°C에서 10분간 열처리한 뒤, 열처리를 하지 않은 것보다 접합전달 효율을 비교해 보았을 때 열처리를 할수록 그리고 열처리의 온도가 높을수록 오히려 효율은 크게 감소하는 경향을 나타냈다(Table 3). 그러므로 *S. natalensis*의 접합전달에는 열처리가 효과적이지 않은 것으로 판단되었다.

DNA 공여체로 사용되는 최적 *E. coli* 수의 확인

방선균의 접합전달에서 plasmid DNA의 공여체로 사용되는 *E. coli*의 수는 접합전달에 매우 중요한 영향을 미친다(5). 따라서 *S. natalensis*의 접합전달에 필요한 최적의 *E. coli* 수를 조사하기 위해 Table 4에서 보는 바와 같이 공여체인 *E. coli* 수를 1.25×10^7 에서 1.25×10^9 까지 나누어 적용해 보았다. 그 결과 공여체의 수가 증가할수록 접합전달의 효율이 증가하는 경향을 보였다. 그러나 6.25×10^8 보다 공여체의 수가 두 배 많은 1.25×10^9 의 경우에는 오히려 효율이 조금 감소하는 결과를 보였으므로 *S. natalensis*에 대한 *E. coli*의 최적 공여체 수는 6.25×10^8 으로 판

Table 3. Effects of heat treatment of spores on transconjugation efficiency

Temperature of heat treatment ^a	Transconjugation frequency ^b
No heat treatment	1.3×10^{-5} (100 ^c)
30°C	1.1×10^{-5} (84.6)
35°C	9.5×10^{-6} (73.1)
40°C	8.8×10^{-6} (67.7)

^aThe heat treatment of spores was performed for 10 min.

^bValues represent average frequencies of three independent experiments.

^cRelative values are indicated in the parentheses, taking the frequency with no heat treatment as 100%.

Table 4. Effects of the number of *E. coli* donor cells on transconjugation efficiency

Number of recipient spores	Transconjugation frequency ^a			
	Number of <i>E. coli</i> ET12567/pUZ8002(pSET152)			
	1.25×10^7	1.25×10^8	6.25×10^8	1.25×10^9
1×10^7	6.4×10^{-6}	1.3×10^{-5}	2.2×10^{-5}	1.9×10^{-5}

^aValues represent average frequencies of three independent experiments.

단된다.

지금까지 확립된 부위-특이적 재조합의 최적조건으로 상동 재조합이 가능한지를 확인하기 위해 상동 재조합용 벡터인 pKC1132에 *S. natalensis* 유래의 4.8 kb DNA 단편을 삽입시킨 pKM4를 *E. coli* ET12567/pUZ8002에 형질전환 시키고 이를 공여체로 이용하여 접합전달을 시도하였다. 일반적으로 상동 재조합은 부위-특이적 재조합에 비해 100-1,000배정도 효율이 낮아 상동 재조합체를 얻는 것이 쉽지 않은 것으로 보고 되었다(8). 그러나 본 연구에서 구축된 *S. natalensis*를 위한 최적 접합전달 방법으로 1×10^9 의 포자를 사용하였을 때 2×10^{-9} 의 효율로 상동 재조합체를 얻을 수 있었다.

attB site와 pseudo-attB site의 확인

접합전달에서 Φ C31 유래의 attP site를 포함하는 pSET152 벡터는 integrase에 의해 방선균의 염색체에 존재하는 attB site로 삽입되게 된다. *S. natalensis*의 염색체에 존재하는 attB site의 위치와 수, 그리고 그 염기서열을 확인해 보기 위해 먼저 9개의 접합전달체로부터 염색체 DNA를 추출한 뒤 pSET152내에는 인식 서열이 없는 제한 효소, *Nru*I로 절단하고 pSET152의 Apr 내성 유전자를 probe로 사용하여 Southern blot hybridization을 수행하였다. 그 결과 9개의 접합전달체에서 11 kb의 위치에 동일한 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이것은 *S. natalensis*의 염색체에 동일한 attB site가 한곳에 존재한다는 것을 시사하는 것이다. 또한 attB site의 염색체상의 위치와 염기서열을 확인하기

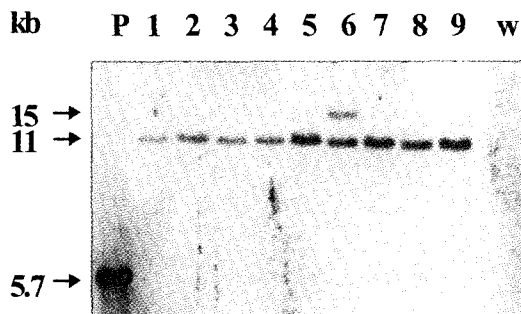


Fig. 2. Southern blot analysis of *Nru*I-digested genomic DNA of exconjugants. Lane P; plasmid pSET152, lane 1-9; apramycin-resistant exconjugants of *S. natalensis*, lane W; wild-type *S. natalensis*. Genomic DNA from the wild-type strain and exconjugants was digested with *Nru*I. pSET152 was digested with *Bam*HI (lane P).

위해 pSET152가 삽입되어진 9개의 접합전달체로부터 염색체 DNA를 추출하여 *Nru*I로 처리한 뒤 아가로스 전기영동을 통해 11 kb 부근의 DNA단편을 회수하였다. 얻어진 DNA는 self ligation한 뒤 *E. coli* XL10-Gold로 형질전환 하고, Apr (50 µg/ml)으로 형질전환체를 선별하여 attB site를 클로닝하였다. 9개의 접합전달체로부터 클로닝된 염색체 DNA단편의 염기서열을 ATTPR, ATTPL primer를 이용하여 분석한 결과 *S. natalensis*의 attB site는 모두 동일하게 잘 보존되어 있었고 이미 알려진 attB site(6)의 염기서열에 대해 84.3%-96.1%의 상동성을 보였다(Fig. 3A). 그리고 *S. natalensis*의 attB site 또한 다른 방선균의 경우처럼 염색체 내의 pirin 상동체를 코드하는 ORF내에 위치해 있었다.

한편 Fig. 2에서 보는 바와 같이 6번째 접합전달체에는 11 kb의 밴드 외에 15 kb 위치에 또 다른 밴드가 확인되어 앞서와 같은 방법으로 15 kb 위치의 염색체 DNA를 회수하여 클로닝한 뒤 상기에서 언급한 primer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과 이미 알려진 attB site에 대해 50.0%-70.3%의 낮은 상동성을 보이는 pseudo-attB site (*pseN*)를 확인할 수 있었고(Fig. 3B) attB site와는 다르게 염색체의 hypothetical protein (GenBank accession no. YP_117731)을 코드하는 ORF내에 위치해 있었다. 그러므로 6번째 접합전달체의 경우 염색체의 전혀 다른 두 곳 (attB site와 pseudo-attB site)에 pSET152벡터가 삽입된 것이다. 그런데 15 kb의 밴드가 다른 8개의 접합전달체에서 나타나지 않은 것은 attB site와 pseudo-attB site간에 나타나는 상동성의 차이만큼 pSET152가 pseudo-attB site에 삽입되는 빈도가 attB site보다 낮았기 때문인 것으로 판단되어진다(6).

그리고 접합전달의 부위-특이적 재조합을 위해 사용되는 *S. natalensis* 염색체의 attB site와 pseudo-attB site에 pSET152벡터의 삽입만으로 *S. natalensis*의 표현형에 변화가 생기는지를 확인

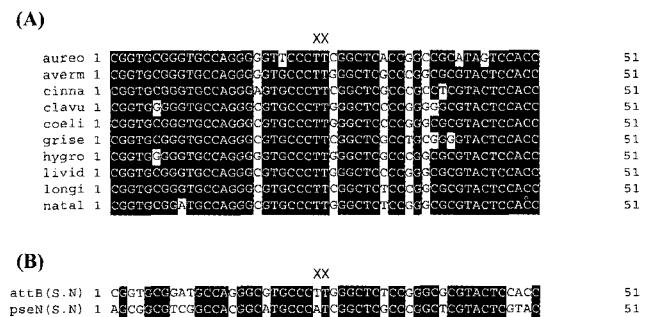


Fig. 3. Sequences of attachment sites in Φ C 31 integration. (A) Sequences of the attB site of *S. natalensis* and alignment with attB sites of *Streptomyces* species: aureo, *S. aureofaciens*; averm, *S. avermitilis* MA-4680; cinna, *S. cinnamomensis*; clavu, *S. clavuligerus*; coeli, *S. coelicolor* A3(2) strain M145; grise, *S. griseus* ATCC 12475; hygro, *S. hygrosopicus* NRRL5491; livid, *S. lividans* 66 TK64; longi, *S. longisporoflavus* 83E6; natal, *S. natalensis* ATCC27448 (this work). (B) Sequences of the pseudo-attB site (*pseN*) and alignment with the attB site of *S. natalensis*. XX represents the location of sequence at which the crossover between attB and attP occurs.

하기위해 6번째의 접합전달체(*attB* site와 *pseudo-attB* site에 pSET152백터가 각각 삽입된 것)를 포함하는 9개의 접합전달체와 야생주에 대하여 natamycin생산과 형태분화를 비교해 보았으나 그 차이는 확인되지 않았다(자료 미제시). 그러므로 *S. natalensis*의 *attB* site를 이용한 접합전달법은 매우 안정적이고 효율적인 형질전환방법이며 *pseudo-attB* site는 *attB* site와 함께 또는 대신 해서 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 경남대학교 학술논문게재연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Aparicio, J.F., R. Fouces, M.V. Mendes, N. Olivera and J.F. Martin. 2000. A complex multienzyme system encoded by five polyketide synthase genes is involved in the biosynthesis of the 26-membered polyene macrolide pimarinin in *Streptomyces natalensis*. *Chem. Biol.* 7, 895-905.
- Bailey, C.R. and D.J. Winstanley. 1986. Inhibition of restriction in *Streptomyces clavuligerus* by heat treatment. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2945-2947.
- Baltz, R.H. 1998. Genetic manipulation of antibiotic-producing *Streptomyces*. *Trends Microbiol.* 6, 76-82.
- Bierman, M., R. Logan, K. O'Brien, E.T. Seno, R.N. Rao and B. E. Schoner. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116, 43-49.
- Choi, S.U., C.K. Lee, Y.I. Hwang, H. Kinoshita and T. Nihira. 2004. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B1 producer. *Arch. Microbiol.* 181, 294-298.
- Combes, P., R. Til, S. Bee and M.C. Smith. 2002. The *Streptomyces* genome contains multiple *pseudo-attB* sites for the Φ C31-Encoded site-specific recombination system. *J. Bacteriol.* 184, 5746-5752.
- Engel, P. 1987. Plasmid transformation of *Streptomyces tendae* after heat attenuation of restriction. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1-3.
- Flett, F., V. Mersinias and C.P. Smith. 1997. High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 155, 223-229.
- Kieser, T., M.J. Bibb, M.J. Buttner, K.F. Chater and D.A. Hopwood. 2000. *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation, Norwich, U.K.
- Kitani, S., M.J. Bibb, T. Nihira and Y. Yamada. 2000. Conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces lavendulae* FRI-5. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10, 535-538.
- MacNeil, D.J. 1988. Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* 170, 5607-5612.
- Matsushima, P. and R.H. Baltz. 1996. A gene cloning system for '*Streptomyces toyocaensis*'. *Microbiology* 142, 261-267.
- Matsushima, P., M.C. Broughton, J.R. Turner and R.H. Baltz. 1994. Conjugal transfer of cosmid DNA from *Escherichia coli* to *Saccharopolyspora spinosa*: effects of chromosomal insertions on macrolide A83543 production. *Gene* 146, 39-45.
- Mazodier, P., R. Petter and C. Thompson. 1989. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* 171, 3583-3585.
- Motamedi, H., A. Shafiee and S.J. Cai. 1995. Integrative vectors for heterologous gene expression in *Streptomyces* spp. *Gene* 160, 25-31.
- Paranthaman, S. and K. Dharmalingam. 2003. Intergeneric conjugation in *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces* sp. strain C5: Chromosomal integration and expression of recombinant plasmids carrying the *chiC* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 84-91.
- Rao, R.N., M.A. Richardson and S. Kuhstoss. 1987. Cosmid shuttle vectors for cloning and analysis of *Streptomyces* DNA. *Methods Enzymol.* 153, 166-198.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, New York.
- Smokvina, T., P. Mazodier, F. Bocard, C.J. Thompson and M. Guerinneau. 1990. Construction of a series of pSAM2-based integrative vectors for use in actinomycetes. *Gene* 94, 53-59.
- Stegmann, E., S. Pelzer, K. Wilken and W. Wohlleben. 2001. Development of three different gene cloning systems for genetic investigation of the new species *Amycolatopsis japonicum* MG417-CF17, the ethylenediaminedisuccinic acid producer. *J. Biotechnol.* 92, 195-204.
- Voeykova, T., L. Emelyanova, V. Tabakov and N. Mkrtumyan. 1998. Transfer of plasmid pTO1 from *Escherichia coli* to various representatives of the order Actinomycetales by intergeneric conjugation. *FEMS Microbiol. Lett.* 162, 47-52.

(Received February 14, 2005/Accepted March 22, 2005)

ABSTRACT: Transformation using Conjugal Transfer and *attB* Site Properties of *Streptomyces natalensis* ATCC27448

Kang-Mu Lee, Sun-Uk Choi, Hae-Ryong Park, and Yong-Il Hwang*

(Division of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea)

Streptomyces natalensis ATCC27448 produces natamycin, a commercially important macrolide antifungal anti-

biotic. For molecular genetic study of *S. natalensis*, we have developed a system for introducing DNA into *S. natalensis* via conjugal transfer from *Escherichia coli*. An effective transformation procedure for *S. natalensis* was established based on transconjugation from *E. coli* ET12567/pUZ8002 using a Φ C31-derived integration vector, pSET152, containing *oriT* and *attP* fragments. The high frequency was obtained on MS medium containing 10 mM MgCl₂ using 6.25×10^8 of *E. coli* donor cells without heat treatment of spores. In addition, southern blot analysis of exconjugants and the sequence of plasmids containing DNA flanking the insertion sites from the chromosome revealed that *S. natalensis* contains a single Φ C31 *attB* site and at least a secondary or pseudo-*attB* site. Similar to the case of various *Streptomyces* species, a single Φ C31 *attB* site of *S. natalensis* is present within an ORF encoding a pirin-homolog, but a pseudo-*attB* site is present within a distinct site (GenBank accession no. YP_117731) and also its sequence deviates from the consensus sequences of *attB* sequence.