

*Streptomyces longwoodensis*로부터 Autoregulator Receptor Protein 유전자의 클로닝 및 특성

여수환¹ · 이성봉 · 김현수*

계명대학교 자연과학대학 미생물학과, ¹전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

Characterization and Cloning of the Gene Encoding Autoregulator Receptor Protein from *Streptomyces longwoodensis*. Yeo, Soo-Hwan¹, Sung-Bong Lee, and Hyun-Soo Kim*. Department of Microbiology, College of Natural Science, ¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Dalseo-gu, Daegu 704-701, Korea – For screening of autoregulator receptor gene from *Streptomyces longwoodensis*, PCR was performed with primers of receptor gene designed on the basis of amino acid sequences of autoregulator receptor proteins with known function. PCR products were subcloned into the *Bam*HI site of pUC19 and transformed into the *E. coli* DH5 α . The isolated plasmid from transformant contained the fragment of 100 bp, which was detected on 2% gel after *Bam*HI treatment. The insert, 100 bp PCR product, was confirmed as the expected internal segment of gene encoding autoregulator receptor protein by sequencing. Southern and colony hybridizations with the 100 bp fragment as a probe allowed to select a genomic clone of *S. longwoodensis*, pSLT harboring a 4.4 kb *Sph*I fragment. Nucleotide sequencing analyses revealed a 651 bp open reading frame (ORF) were isolated protein showing moderate homology (35~46%) with the γ -butyrolactone autoregulator receptors from *Streptomyces* sp., and this ORF was named *sltR*. The *sltR*/pET-17b plasmid was constructed to overexpress the recombinant SltR protein (rSltR) in *E. coli* BL21 (DE3)/pLysS, and the rSltR protein was purified to homogeneity by DEAE-Sephacel column chromatography, and DEAE-5PW chromatography (HPLC). The molecular mass of the purified rSltR protein was 55 kDa by HPLC gel-filtration chromatography and 28 kDa by SDS-PAGE, indicating that the rSltR protein is present as a dimer. A binding assay with tritium-labeled autoregulators revealed that the rSltR has clear binding activity with a A-factor type autoregulator as the most effective ligand.

Key words: *Streptomyces longwoodensis*, γ -butyrolactone autoregulator, receptor protein, purification, lysocellin

방선균은 그람 양성 원핵세균으로 대다수가 토양에서 분리되는 특이한 미생물로 사상균과 같이 현저한 형태분화를 수행하며, 특히 기저균사, 기중균사, 분생포자 및 포자발아의 life cycle을 가지고 있어 복잡한 형태분화와 더불어 산업적으로 유용한 항생물질, 생리활성물질, 효소 및 색소 등의 이차대사산물[2, 3]을 생산하고 있다.

이들이 생산하는 이차대사산물은 주로 포자형성시기인 배양후기에 이루어지는 것으로 보아 이차대사산물 생산과 형태분화가 밀접한 상관관계를 갖고 있음을 나타낸다(Fig. 1). 이러한 형태분화(morphological differentiation)와 이차대사산물 생산의 생리적 분화(physiological differentiation)는 방선균이 생산하는 자기조절인자(autoregulator)라고 불리는 저분자 신호전달물질과 이에 특이적으로 결합하는 autoregulator receptor 단백질의 상호작용에 의한 것으로 알려져 있다. 이들 인자는 다면형질 발현성(pleiotropic)으로 주로

Streptomyces 속인 방선균을 중심으로 수많은 연구가 수행되었다. 지금까지 밝혀진 autoregulator들은 균체 외로 미량(수 ng/ml) 분비되어지며, 극히 저농도에서 작용하여 이차대사 혹은 형태분화를 유도하므로 고등생물의 hormone에 상당하는 물질로서 원핵생물의 호르몬으로 간주한다.

지금까지 A-factor[7], factor I[4] 및 *virginiae* butanolides (VB-A, B, C, D, E)[22, 23] 등의 γ -butyrolactone환을 가지는 10종류의 autoregulator가 분리되어 구조가 밝혀졌으며 (Fig. 2), 이들 기능에 대한 분자 level에서의 연구가 진행되고 있다[5, 6, 17].

Waki 등[21]에 의하면 *Streptomyces* 속 방선균의 약 60% 이상이 지금까지 밝혀진 autoregulator이거나 유사 autoregulator를 생산하는 것으로 추정되며, 고등생물의 hormone에는 특이적인 receptor 단백질이 존재하는 것으로 알려져 있으므로 *Streptomyces* 속 방선균의 autoregulator도 특이적인 receptor 단백질이 존재하리라고 예상하였다. 실제로 *S. virginiae*로부터 BarA[18]을 시작으로 *S. griseus*로부터 ArpA[15], *S. lavendulae* FRI-5로부터는 FarA[19]가 autoregulator의 특이적인 receptor 단백질로서 분리되었고 그 유전자들도 cloning

*Corresponding author

Tel: 82-53-580-5284, Fax: 82-53-580-6447

E-mail: hskim@kmu.ac.kr

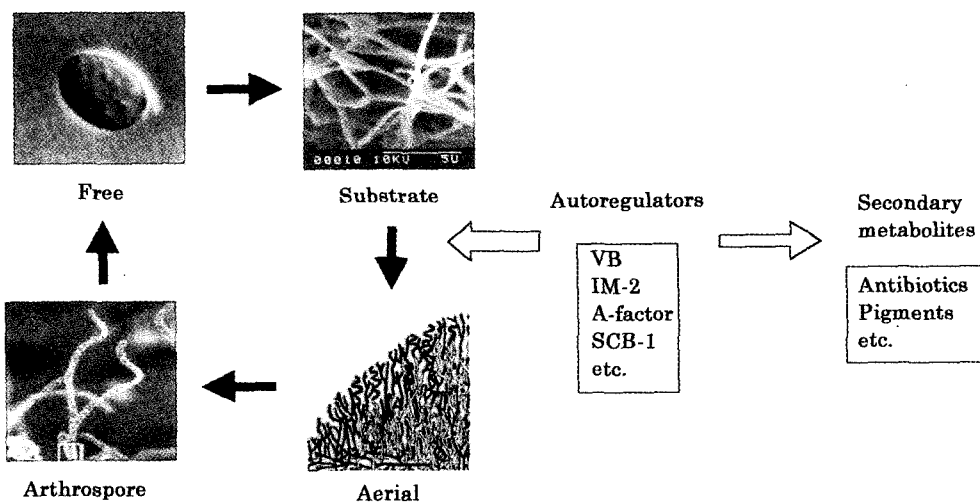


Fig. 1. Life cycle of *Streptomyces* sp.

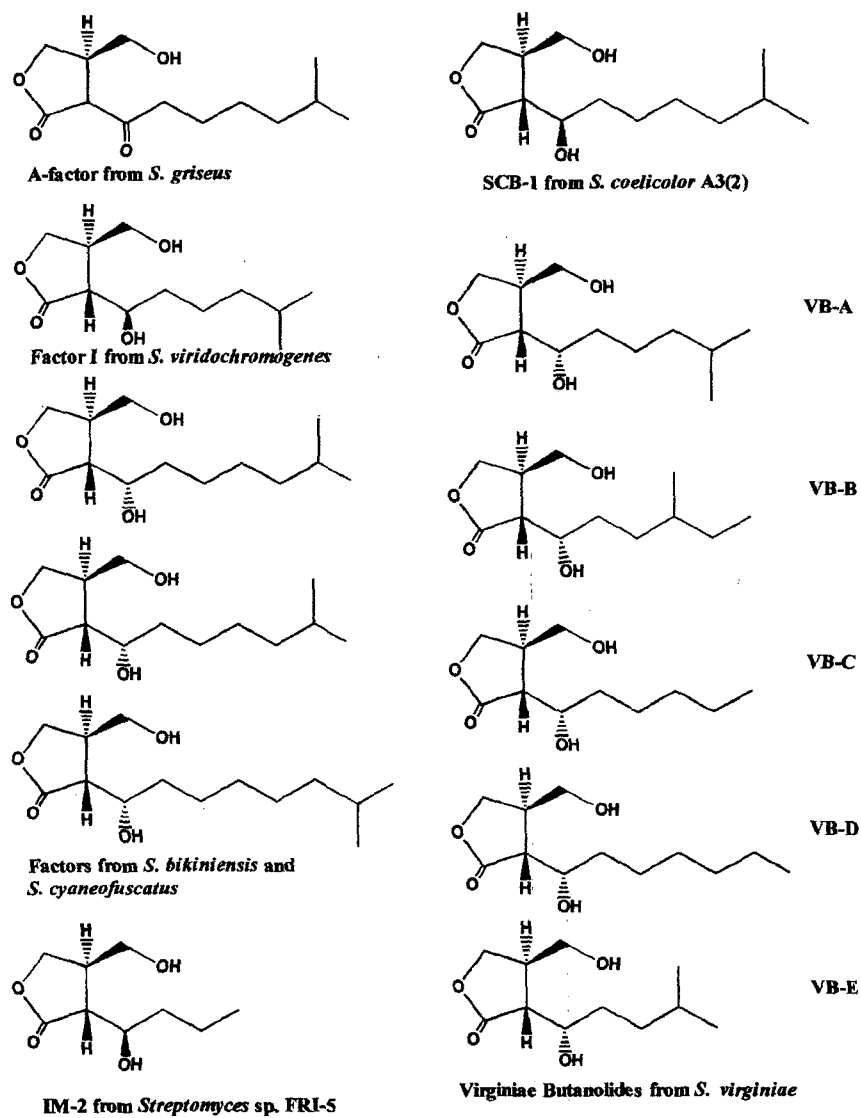


Fig. 2. Structures of γ -butyrolactone autoregulators isolated from *Streptomyces* sp.

되었다.

현재까지 밝혀진 autoregulator와 receptor protein 중, *S. virginiae*의 *virginiae butanolides*(VBs)와 VB receptor protein (BarA)이 가장 많이 연구되어 있다[11, 18]. VB type은 Kondo 등[12]에 의해 *S. virginiae*로부터 *virginiae butanolides* (VB)A~E가 분리되어 구조가 결정되었으며, 이들 유도인자의 signal 전달과 관련하여 항생물질 생합성 mechanism 연구의 일환으로 Kim[8, 10] 등에 의해, 자기조절인자인 VBs중 VB-C의 signal 전달에 관여하는 결합 단백질인 VB-C receptor가 처음으로 확인 및 정제되었다. 또한, *in vivo*[11]와 *in vitro*[11, 16] 실험에서 VB의 비존재하에 BarA는 target gene이나 operon의 promoter 지역에 있는 특정한 DNA sequence에 결합하여 transcription을 억제하며, VB가 생산되면 VB가 DNA에 결합되어 있는 BarA와 결합하여 promoter 지역으로부터 BarA가 분리되어 target gene 또는 operon의 transcription이 개시되는 결과에서 BarA가 DNA binding transcriptional repressor로 확인되었으며, VB-BarA system은 구조가 다른 *virginiamycin M1*(VM1)과 *virginiamycin S*(VS)의 생산을 같이 조절하는 것으로 확인되었다[16]. 이뿐만 아니라, Lee[14] 등의 연구에 의해, *barA* 유전자의 downstream에는 *barB-varS* operon이 위치해 있으며, *varS* gene은 *virginiamycin resistance*에 관여하는 VS-specific efflux protein으로 나타났다.

본 연구에 사용된 공시균인 *Streptomyces longwoodensis* IFO 14251은 lysocellin 생산균으로 선행된 연구에서 VB-C에 의한 lysocellin 생산 유도 촉진과 검은색소의 생산이 유도되는 것이 입증되었다[9]. 이에 *S. longwoodensis*에서 이루어지고 있는 제어시스템, 즉 유도인자(autoregulator)와 receptor와의 관계를 분자생물학적 차원에서 규명하고 나아가 본 균주의 이차대사 제어, 특히 lysocellin 생산에 중점을 두고 autoregulator receptor 단백질을 코드하고 있는 유전자의 기능을 해석하여 lysocellin 고생산 균주를 개발하고자 한다. 또한, *Streptomyces* 속의 제어시스템을 규명하여 autoregulator의 유도능에 의한 silent gene의 발현을 유도하여 신규물질을 생산하는 것을 목적으로 하고 있다. 이를 위하여 lysocellin 생산을 제어하고 있을 것으로 여겨지는 *S. longwoodensis*로부터 기존의 autoregulator receptor 단백질과 homology를 가지는 *sltR* 유전자의 cloning 및 재조합 단백질의 발현을 통한 구조해석의 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmid

Receptor 유전자를 cloning하기 위한 공시균주는 *S. longwoodensis* IFO 14251을 사용하였으며, cloning vector로는 pUC19(Ampr, *lacZ*)와 재조합 단백질 발현용 T7 promoter plasmid인 pET-17b를 사용하였다. Plasmid 형질전

환용 competent cell은 *E. coli* DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* (Φ 80, *lacZ*, Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*]와 재조합 단백질 발현용 host인 *E. coli* BL21(DE3)/pLysS(*hsdS*, *gal*[(λ ctIts857, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lacUV5-T7 gene1*), pLysS]를 사용하였다.

사용배지 및 배양조건

공시균의 배양은 ISP medium 2를 사용하여 28°C에서 2주간 배양하였으며, chromosomal DNA의 추출을 위한 액체 배양은 slant로부터 2백금이 50 ml(250 ml erlenmeyer flask) TSB(Tryptic Soy Broth) 배지에 접종하여 28°C, 120 rpm에서 48시간 전배양한 후, 100 ml(500 ml baffled flask) TSB 배지에 상기의 전배양균을 3%가 되도록 접종하여 4일간 본배양을 실시하였다. *E. coli*는 LB(Luria Bertani) 배지에 ampicillin(50 μ g/ml)을 첨가하여 37°C, 18시간 진탕 배양하였으며, 재조합 단백질 발현은 선택항생제인 ampicillin과 chloramphenicol을 첨가한 LB 배지를 사용하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 Difco Laboratories Co.(USA), Sigma Chemical Co.(USA), Amersham Biosciences Co.(USA)로부터, 제한효소는 Takara Shuzo Co.(Japan)으로부터 구입하여 사용하였다.

Genome 및 plasmid DNA의 분리

공시균의 chromosomal DNA 분리는 Hopwood법[20]에 따라 실행하였고 *E. coli* competent cell은 Hanahan법[20]으로 제작하였다. 특히 plasmid DNA의 분리는 Flexi prep kit(Amersham Pharmacia Biotech, UK), TELT법 및 Alkaline-SDS 추출법[20]을 사용하였다.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

공시균인 *S. longwoodensis*로부터 autoregulator receptor 단백질 유전자의 존재유무를 확인하기 위해, 기존에 연구되어 있는 autoregulator receptor 단백질들의 아미노산 배열을 토대로 상동성이 높은 양 말단에 *Bam*HI site를 포함한 특이적인 forward primer(AF-V, 5'-CGCGGATCCGCSGCS-GCSNNNGTSTTCGA-3')와 reverse primer(AR-1, 5'-CGCGGATCCGAAGTGGAGTASAGSGCSCC-3')를 제작한 후, 공시균의 chromosomal DNA(100 ng/ μ l)를 template로 이용하여 각각 10 pM primer, 2.5 mM dNTP, 1/8 dil. *Ex Taq*, 10 \times *Ex Taq* buffer의 조성으로 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 95°C 5분, 94°C 1분, 60°C 40초, 72°C 50초간 30회 증폭한 후 4°C에 저장하였다.

PCR 산물의 회수 및 형질전환

PCR 산물을 2% agarose 수평 gel을 사용하여 전기영동하였으며, 완충용액으로는 TAE(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)를 사용하였다. DNA 단편은 동결용해법으로

회수한 후 *Bam*HI로 처리하고 pUC19에 ligation하여 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 형질전환균은 37°C에서 18시간 배양하여 ampicillin(50 μ g/ml)이 첨가된 LB 고체배지(0.4% X-gal, 0.1 M IPTG)에 형질전환균을 도말하였으며, white colony를 형질전환균으로 선별하였다. Competent cell은 Hanahan법[20]으로 제조하였으며, 모든 제한효소, 수식 효소 및 Marker는 Takara사 제품을 사용하였다.

Plasmid 추출 및 형질전환균의 확인

선별된 white colony를 ampicillin(50 μ g/ml)이 첨가된 3 ml의 LB 액체배지에 접종한 후, 37°C에서 18시간 배양하였다. Flexi prep kit(Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 이용하여 plasmid를 추출한 후, 다시 *Bam*HI을 처리하여 PCR 산물의 형질전환을 확인하였으며, 확인된 plasmid만을 sequencing에 사용하였다. Sequencing에 사용된 plasmid는 Alkaline-SDS 추출법으로 분리하였다.

PCR 산물의 염기배열 결정 및 해석

형질전환이 확인된 plasmid를 Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP(Amersham Pharmacia Biotech, UK)와 Cy5-labeled M13 primer를 이용하여 PCR을 수행한 후, fluorescence DNA sequencer(ALFred, Amersham Pharmacia Biotech, UK)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequence 분석과 homology 비교는 GENETYX-WIN(version. 3.2, Software Development Co., Japan)와 DNA database를 이용하였다.

Southern blot analysis

Receptor gene의 일부로 확인된 plasmid에 *Bam*HI을 처리하여 PCR 산물을 동결용해법으로 회수한 후, Random primer DNA labeling kit(version. 2, Takara Shuzo Co., Japan)와 방사성 동위원소인 [α -32P] dCTP로 labeling시켜 Southern 및 colony hybridization시 사용할 probe를 제작하였다.

추출한 공시균의 chromosomal DNA에 pUC19의 MCS(Multi Cloning Site)에 위치한 10종류의 제한효소(*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Pst*I, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Sph*I 및 *Xba*I)를 각각 처리한 후, 1% agarose gel에 전기영동하고 agarose gel을 변성용액(0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)에 30분 1회 처리하여 중화용액(1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.2)에 15분씩 2회 처리하였다. 이후 agarose gel의 DNA를 nylon membrane(Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, UK)으로 transfer하고 UV illuminator 하에서 5분간 조사하여 DNA를 고정하였다.

Hybrid bag에 Rapid-hyb buffer(Amersham Pharmacia Biotech, UK) 20 ml와 membrane을 넣고 15분간 prehy-

bridization한 후, 방사성 동위원소 [α -32P] dCTP로 표지된 probe를 넣고 65°C에서 2시간 hybridization을 하였다. Hybridization이 끝난 membrane의 비특이적인 signal을 제거하기 위해 2 \times SSC/0.1% SDS(r.t), 1 \times SSC/0.1% SDS(r.t), 0.2 \times SSC/0.1% SDS(65°C)의 조건으로 세척한 후, -80°C에서 5시간동안 X-ray film에 노출시킨 다음 현상하였다.

Colony hybridization

공시균인 *S. longwoodensis*의 chromosomal DNA를 제한 효소 *Sph*I로 처리하고 1% agarose gel에 전기영동하여 약 4.4 kb의 DNA 단편을 회수한 후, pUC19의 *Sph*I site에 ligation시켰다. Competent cell인 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켜 약 1,000개의 DNA library를 작성하였다. Colony들을 nylon membrane(Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech, UK)에 transfer하고 10% SDS, 변성용액, 중화용액 및 2 \times SSC 용액으로 상온에서 각각 5분씩 처리한 후, UV illuminator하에서 5분간 조사하여 DNA를 고정시켰다. Colony hybridization에 사용한 probe와 이후의 작업은 Southern hybridization과 동일하게 수행하였다.

4.4 kb *Sph*I 단편의 subcloning 및 sequencing

Colony hybridization을 통해 얻은 4.4 kb DNA 단편의 모든 염기배열을 결정하기 위해, pUC19의 MCS에 포함된 10종류의 제한효소를 처리하여 1% agarose gel에 전기영동한 후, sequencing에 적절한 단편을 선택하여 subcloning하였다. 본 연구에 사용한 vector는 pUC19를, Competent cell은 *E. coli* DH5 α 를 사용하였으며, DNA염기배열 결정은 앞서 제시한 방법과 동일하게 수행하였다.

재조합 단백질 발현을 위한 plasmid 제조

*sltR*의 염기서열을 기초로 하여 재조합 단백질 발현을 위한, primers(SB-1: 5'-ATCGGGATCCTATGGCGAAACAGGAAC-3', SB-2: 5'-CTTGAATTCGCCCTACGAAGCTGCC-3')를 제작한 후, 4.4 kb *Sph*I fragment를 함유하는 plasmid DNA(pSLT, 100 ng/ μ l)를 template로 이용하여 각각 10 pM primer, 2.5 mM dNTP, 1/8 dil. *Ex Taq* 및 10 \times *Ex Taq* buffer의 조성으로 PCR을 수행하였다. PCR반응은 95°C 5 min, 94°C 1 min, 67°C 40 sec, 72°C 50 sec간 30회 증폭한 후, 4°C에 저장하였다. 1% agarose gel로 전기영동하여 650 bp 부근의 목적 PCR 산물을 회수한 후, 제한 효소 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 처리하고 동일 제한효소로 처리한 pET-17b vector에 결합시켜 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. DNA 염기배열의 변화를 확인하기 위하여 plasmid를 추출하고 sequencing을 수행하여 정확한 염기배열을 가진 재조합 단백질(rSLtR) 발현용 plasmid(*sltR*/pET-17b)를 획득하였다.

재조합 단백질 발현의 확인

재조합 단백질 발현용 plasmid(*slr/pET-17b*)를 *E. coli* BL21(DE3)/pLysS에 형질전환시켜 획득한 colony를 선택항생제인 ampicillin(25 µg/ml)과 chloramphenicol(25 µg/ml)이 첨가된 LB 배지(3 ml)에 접종하여 37°C, 120 spm으로 18시간 배양한 후, 배양액 300 µl에 동량의 40%(v/v) glycerol을 첨가하여 stock균을 제작하여 -80°C에 보관하였다.

전배양은 선택항생제인 ampicillin(25 µg/ml)과 chloramphenicol(25 µg/ml)이 첨가된 30 ml의 LB 배지에 stock균 5 µl을 접종하여 37°C, 120 spm으로 18시간 배양한 후, 본 배양(200 ml의 LB 배지)에 전배양균을 1%되게 접종하여 37°C, 120 spm으로 배양하였다.

배양 중 OD600 값이 0.4-0.6이 되면 0.1 mM IPTG를 첨가한 후, 배양시간별로 sampling하여 균체를 회수하였다. 각각의 균체에 멸균수 500 µl을 첨가하고 현탁하여 초음파 파쇄(4°C, 30 sec × 6회)를 한 후, 파쇄액을 14,000 rpm, 20분간 원심분리하여 상등액과 침전물을 분리하였다. 각각의 상등액과 침전물에 1×SDS buffer를 첨가하여 10분간 끓인 후, SDS-PAGE를 수행하여 재조합 단백질의 발현을 확인하였다. 단백질의 정량은 Bradford method[1]에 따라 수행하였으며, Protein assay kit(Bio-Rad Co.)와 표준단백질로 bovine serum albumin(Sigma Co., USA)을 사용하였다.

재조합 단백질의 정제

조단백질의 조제 - 재조합 단백질의 정제를 수행하기 위해, 배양한 균체를 회수하여 buffer A[0.02 M TEA, 20%(v/v) glycerol, 5 mM ME, 1 mM DTT, 0.1 mM pAPMSF, 0.05 M KCl, pH 7.0]에 현탁하고 초음파 파쇄(4°C, 1 min × 5회)를 하여 4°C, 14,000 rpm, 20분간 원심분리를 한 후, 상등액을 회수하여 조단백질 용액으로 사용하였다.

DEAE-Sephacel column chromatography - DEAE-Sephacel (Amersham Biosciences, UK)을 open column(φ3.5 × 45 cm)에 충전한 후, 조단백질 용액을 주입하여 흡착시켰다. Buffer A로 비결합 단백질을 제거한 후, 0.1 M, 0.15 M 및 0.2 M의 KCl이 함유된 buffer A를 이용하여 DEAE-Sephacel에 결합된 단백질을 용출하여 5 ml씩 분획하였다.

DEAE-5PW HPLC chromatography - DEAE-Sephacel column chromatography를 수행한 후, 재조합 단백질의 존재가 확인된 분획을 한외여과장치(Amicon Co., USA)를 이용하여 농축하였다. 농축된 단백질을 0.1 M KCl이 함유된 buffer A로 평형화시켜 DEAE-5PW HPLC column(TSK gel DEAE-5PW, φ7.5 × 7.5 cm, Tosoh Co., Japan)에 주입하여 0.6 M KCl이 함유된 buffer A로 linear gradient로 단백질을 정제하였다.

재조합 단백질의 분자량 측정

정제한 재조합 단백질의 분자량 측정은 Laemmli 방법[13]

에 따라 14% SDS-PAGE로 전기영동하고 gel을 Coomassie brilliant blue G-250으로 염색한 후, 확인하였다. Native 상태의 분자량 측정은 gel filtration HPLC(TSK-G3000SWXL, Mr<5 × 10⁵, Tosoh Co., Japan)을 사용하여 분자량을 측정하였으며, buffer B(0.1 M potassium phosphate, 0.2 M NaCl, pH 7.0)로 용출하였다.

재조합 단백질의 결합활성

재조합 단백질의 결합활성은 *Streptomyces* 속 유래의 autoregulator로 기존에 합성되어 있는 VB-C7, IM-2, A-factor non-labeled cold autoregulator와 [³H] labelled autoregulator인 [³H]VB-C7의 경쟁적 저해를 통하여 결합활성을 확인하였다. 조단백질 용액 100 µl에 각각의 non-labeled cold autoregulator의 최종농도가 13.9 nM이 되도록 첨가 및 미첨가하여 실온에서 20분간 반응시킨 후, labelled autoregulator 7.9 pM을 첨가하여 동일 조건하에서 반응시켰다. 반응액에 80% 포화(NH₄)₂SO₄용액 900 µl을 넣고 14,000 rpm, 20분간 원심분리하여 획득한 침전물을 동 포화 용액으로 세척한 후, 100 µl의 H₂O로 용해시켜 10 ml의 toluene용액[Toluene 500 g/l, Triton X-100(polyethylene glycol mono-p-isooctylphenylether, Nalcarai Co. Japan) 500 g/l, Omniflour(Dupont Co.) 4 g/l]을 첨가하여 Scintillation counting(Beckman LS 7500)을 하였다. 본 receptor의 결합활성은 3회 반복실험과 각 시료당 3점씩 제조하여 평균값을 산출하였으며, [³H]VB-C7에 대한 특이적인 결합은 non-labelled cold autoregulator의 첨가 및 미첨가의 차이로서 산출하였다.

결과 및 고찰

목적 PCR 산물의 확인

공시균에 있어서 autoregulator receptor protein의 존재를 확인하기 위해, 기존에 알려진 receptor 유전자의 공통배열을 이용하여 제작한 primers(AF-V, AR-I)로 PCR을 수행하고 2% agarose gel에 전기영동한 결과, 예상되는 크기인 약 100 bp의 PCR 산물이 확인(Fig. 3-A)되었다.

회수한 PCR 산물을 앞서 제시한 방법에 따라 pUC19 vector에 ligation후, *E. coli* DH5α에 형질전환시켜 선발된 형질전환균으로부터 plasmid를 분리하고 BamHI를 처리하여 1% agarose gel에 전기영동한 결과, pUC19(2.7 kb)외에 PCR산물이 100 bp 위치에 나타나 공시균의 PCR 단편이 *E. coli* DH5α에 형질전환 되었음이 확인(Fig. 3-B)되었다.

염기배열 해석

형질전환이 확인된 plasmid의 염기배열을 DNA sequencer로 해석한 결과, 그 기능이 명백히 밝혀진 *Streptomyces* 속 유래의 방선균의 receptor protein 유전자의 아미노산 염기배

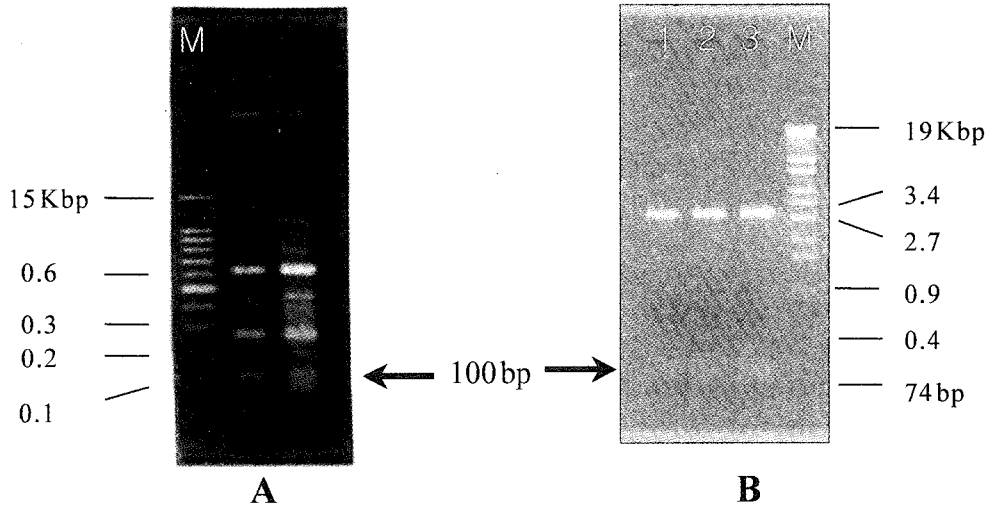


Fig. 3. Gel electrophoresis of PCR fragment on *S. longwoodensis* IFO 14251. A. PCR product, M: 100 bp DNA ladder; B. *Bam*HI treatment of PCR fragments on transformed *E. coli* DH5α. lane 1: R-1 *Bam*HI treatment, lane 2: R-2 *Bam*HI treatment, lane 3: R-3 *Bam*HI treatment, lane M: λEcoT14I.

```

ArpA SIVDAAASVFDDYGYERAAI SEILRRAKVTKGALYFHFAS
BarA AIVRAAASVFDEYGFEAATVAEILSRASVTKGAMYFHFAS
FarA AILSAAARVFDERGYQAATI SEILTVAGVTKGALYFHFQS
ScbR TILDAAAQVF EKQGYQAATITEILKVAGVTKGALYFHFQS
    AF-V                                     AR-1
    
```

Fig. 4. Alignment of the amino acid sequence of PCR product from *Streptomyces* sp., and known autoregulator receptor proteins.

결과 높은 상동성을 나타내었다. 따라서 본 PCR 산물이 *S. longwoodensis*가 보유하고 있는 receptor protein 유전자(R-gene)의 일부분일 것이라는 가능성이 시사됨으로 이후, 본 PCR 산물을 receptor protein 유전자의 cloning을 위한 probe로 이용하였다.

Southern blot analysis

R-gene의 존재가 확인된 plasmid를 이용하여 *Bam*HI 처리를 하여 2% agarose gel에 전기영동을 한 후, 100 bp에 위치한 PCR 산물을 회수하여 Southern 및 colony hybridization시 probe로 사용하였다(Fig. 4). 상기의 PCR 산물(100 bp)을 방사성 동위원소[α-32P]dCTP로 표지하고 Southern hybridization을 실시한 결과, 제한효소 *Kpn*I, *Sal*I, *Sma*I, 및 *Sph*I의 다양한 위치에서 강한 positive signal이 나타났다(Fig. 5). 이들 positive signal 중에서 적당한 크기로 생각되는 약 4.4 kb의 *Sph*I단편(*Stl*)을 공시균의 receptor protein gene의 cloning을 위한 target DNA 단편으로 확정하였다.

Colony hybridization

상기의 Southern hybridization 결과를 토대로 4.4 kb *Sph*I 단편의 DNA library를 작성하여 colony hybridization

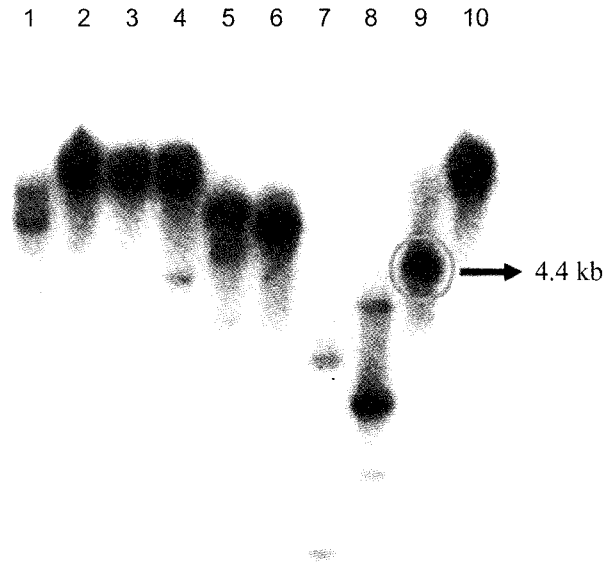


Fig. 5. Result of genomic Southern blot analysis of *S. longwoodensis*. Each lane was treated restriction enzymes as follows. lane 1: *Bam*HI, lane 2: *Eco*RI, lane 3: *Hind*III, lane 4: *Kpn*I, lane 5: *Pst*I, lane 6: *Sac*I, lane 7: *Sal*I, lane 8: *Sma*I, lane 9: *Sph*I, lane 10: *Xba*I. Circular area was 4.4 kb of DNA fragment digested with *Sph*I.

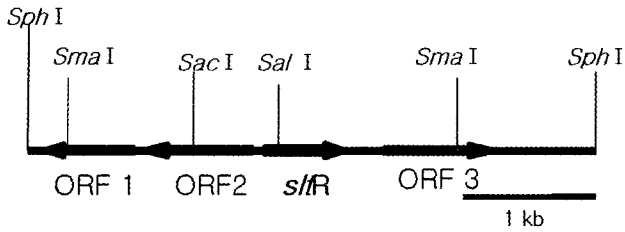


Fig. 6. Localization of the gene encoding autoregulator receptor protein (4.4 kb *Sph* I DNA fragment).

을 실시하였다. 그 결과, 약 1,000개의 colony 중 1개의 colony에서 가장 강한 positive signal이 나타났으며, 이 4.4 kb의 *Sph*I 단편을 보유하고 있는 plasmid를 pSLT라 명명하였다.

pSLT의 염기결정 및 ORF 검색

S. longwoodensis 유래의 *Sph*I 4.4 kb DNA 단편(pSLT)의 염기배열을 결정하기 위해, M13 forward와 reverse primer를 이용하여 primer walking법으로 염기배열을 결정하였다. 염기배열의 정확성을 기하기 위해 sequencing을 3회 반복하여 실시한 결과, Fig. 6에서 보여주는 바와 같이 autoregulator receptor protein 유전자와 3개의 ORF가 존재하였다. *S. longwoodensis* 유래의 autoregulator receptor protein 유전자를 *sltR*로 명명하였다. 기존에 알려진 autoregulator receptor protein의 아미노산 수는 BarA 232개, ArpA 276개, FarA 221개, ScbR 215개이나, 본 공시균이 보유한 *Sl*tR은 216개의 아미노산(Fig. 7)으로 구성되어 있을 뿐만 아니라 이들 하부에 항생물질 생합성 유전자들을 제어

한다고 추정하는 helix-turn-helix DNA binding motif(Fig. 8)를 코드하는 것이 확인되었다.

SltR 단백질의 상동성 검색

*Sl*tR 유전자 염기배열을 DNA database의 BLAST 및 GENETYX-Win(version. 3.2) computer program을 이용하여 상동성 검색을 조사한 결과를 Table 1과 Fig. 9(Apr A이 외는 결과 미제시)에 나타내었다. 기존의 *Streptomyces* sp. 유래의 autoregulator receptor protein 유전자들과 아미노산 레벨에서 35~46%의 높은 상동성을 가지며, autoregulator receptor protein들이 하부의 항생물질 생합성 유전자들을 제어하기 위해, 보유하고 있는 helix-turn-helix DNA binding motif를 *sltR*이 code하고 있기 때문에 *sltR*은 *S. longwoodensis*가 보유하는 autoregulator receptor protein을 code하는 유전자로 추정되었다.

재조합 단백질 발현용 plasmid 제작 및 발현 확인

재조합 단백질 발현을 위해, 2종류의 primers(SB-1, SB-2)를 제작한 후, 4.4 kb *Sph*I fragment를 함유하는

Table 1. Homology of *Sl*tR to other γ -butyrolactone autoregulator receptor proteins.

Known γ -butyrolactone autoregulator receptor proteins	<i>Sl</i> tR (<i>S. longwoodensis</i>)	
	Identity (%)	Positives (%)
<i>ArpA</i> (<i>S. griseus</i>)	35	63
<i>BarA</i> (<i>S. virginiae</i>)	43	60
<i>FarA</i> (<i>S. lavendulae</i> FRI-5)	46	60
<i>ScbR</i> (<i>S. coelicolor</i> A3(2))	46	49

Helix-turn-Helix

```

      10      20      30      40      50      60
MAKQERAI RT RRAILEAAGA VFDEHGYAST TISMVLERAD VTKGALYFHF PSKESLAQAV

      70      80      90     100     110     120
VESQVSFGAV PPQACKLQEV IDMTFVVGRQ LLGNALLRGS VRLAVDQETP AGVDHGEPFR

     130     140     150     160     170     180
QWADRLTELL ELAQERGELL PTVRPRDTVE LLVGCFTGVQ LMARALTDRA DLADRLAVMV

     190     200     210     220     230     240
AHILPSIAVP GLLPGLDARA DRGARVLASE EERAAS*
    
```

Fig. 7. Amino acid sequence of *Sl*tR from *S. longwoodensis*.

helix-turn-helix motif

```

ArpA  SIVDAAASVFDDYGYERAAISEILRRAKVTKGALYFHFAS
BarA  AIVRAAASVFDEYGFEEATVAEILSRASVTKGAMYFHFAS
FarA  AILSAAARVFDERGYQAATISEILTVAGVTKGALYFHFQS
ScbR  TILDAAAQVFEEKQGYQAATITEILKVAGVTKGALYFHFQS
Sl
```

Fig. 8. Amino-terminal sequences of *Sl*tR and similar proteins in the database.

Table 2. Binding activity of rSlrR protein. (Unit : dpm)

	Hot (Hot only)		Cold (Cold+Hot)	
	[³ H]VB-C ₇	A-factor	IM-2	VB-C ₇
Crude protein (pET-SlrR)	45006	10682	27004	23984

을 측정 한 결과, 55 kDa으로 나타났다(Fig. 12-B). 이상의 결과로부터 *S. longwoodensis* 유래의 receptor 단백질은 dimer 형태로 존재하는 것으로 추정되었다.

재조합 단백질의 결합활성

재조합 단백질이 *Streptomyces* 속 유래의 receptor인지를 확인하기 위해, 공동구조인 γ -lactone환을 가지며 기존에 합성되어 있는 non-labeled cold autoregulator인 VB-C₇, IM-2 및 A-factor를 사용하여 [³H]로 label된 [³H]VB-C₇과의 경쟁적 저해를 비교하였다. [³H]VB-C₇에 대한 특이적인 결합은 non-labeled cold autoregulator의 첨가 및 미첨가의 차이로서 산출하였다. 그 결과, VB, IM-2에 비해 A-factor에 대한 높은 결합활성이 확인(Table 2) 되었으며, 이 결과는 공시균이 생산하는 receptor는 A-factor type에 대한 특이적인 결합활성을 가지는 ArpA type으로 추정된다. 향후 공시균이 생산한다고 추정되는 autoregulator의 생산 확인 및 분리를 위한 연구를 수행함으로써 receptor의 특이적인 결합활성과 특성을 보다 명확히 규명되리라 추정한다. 또한 receptor의 특성이 규명됨으로써 공시균의 receptor 유전자의 파괴에 의한 항생물질의 대량생산 및 silent gene의 발현에 따른 신물질의 생산기술 개발이 예상되고 있다.

요 약

공시균인 *S. longwoodensis* IFO 14251의 autoregulators 및 receptor gene 탐색의 일환으로 기존의 *Streptomyces* 속 receptor gene의 공통배열을 primer로 이용하여 PCR을 수행하였다. 예상되는 100 bp 크기의 단편을 pUC19 vector에 ligation하여 *E. coli* DH5 α 에 transformation한 후, plasmid를 분리하여 BamHI을 처리하여 2% agarose gel에 전기영동한 결과, pUC19 외에 receptor gene PCR product가 100 bp 위치에 존재하는 것을 확인하였다. 형질전환된 plasmid로 PCR을 수행한 후, 염기배열을 결정하여 분석한 결과, *Streptomyces* sp. 유래의 receptor gene의 일부분임이 확인되었다. 따라서 *S. longwoodensis* IFO 14251에는 lysocellin 생산에 관여한다고 추정되는 autoregulator receptor protein을 코딩하는 유전자가 존재할 것으로 예상되어 100 bp의 PCR product를 probe로 이용하여 Southern 및 colony hybridization을 통하여 4.4 kb의 *SphI* 단편을 가지는 plasmid(pSLT)를 제작하였고 이를 sequencing한 결과, *Streptomyces* 속 유래의 autoregulator receptor 단백질을 코

딩하는 유전자와 3개의 open reading frame(651 bp)을 확인하여 *slrR*이라 명명하였다. 유전자 해석 결과, 기존의 autoregulator receptor proteins과 비교시 35~46%의 homology를 나타내었다. 재조합 단백질의 발현을 위해, *slrR*/pET-17b plasmid를 제작하고 *E. coli* BL21(DE3)/pLysS을 host cell로 이용하여 재조합 단백질을 발현시켰다. SlrR 재조합 단백질의 정제는 DEAE-Sepharose column chromatography와 DEAE-5PW chromatography(HPLC)를 통해 수행하였다. Gel filtration chromatography(HPLC, 55 kDa)와 SDS-PAGE(28 kDa)를 통해 분자량을 확인한 결과, 재조합 단백질은 dimer형태로 존재하는 것으로 확인되었다. 또한, 결합활성에 있어 A-factor type의 autoregulator에 대해 가장 강한 결합활성을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부, 한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터의 지원(R12-2001-044-02001-0)에 의한 연구 결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Chater, K. F. 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 685-713.
- Champness, W. C. and K. F. Chater. 1994. Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* sp. In *Regulation of Bacterial Differentiation*. P. J. Piggot, C. P. Moran, and P. Youngman. (eds.), Washington, D. C.; American Society for Microbiology. USA.
- Grafe, U., W. Shade, I. Eritt, W. F. Fleck, and L. Radics. 1982. A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiot.* **35**: 1722-1723.
- Horinouchi, S., O. Hara, and T. Beppu. 1983. Cloning of a pleiotropic gene that positively controls biosynthesis of A-factor, actinorhodin, and prodigiosin in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* **155**: 1238-1248.
- Horinouchi, S., Y. Kumada, and T. Beppu. 1984. Unstable genetic determinant of A-factor biosynthesis in streptomycin-producing organisms: cloning and characterization. *J. Bacteriol.* **158**: 481-487.
- Khokhov, A. S., I. I. Tavalova, L. N. Borisova, S. A. Pliner, L. N. Shevchenko. Kolnitskaya, N. S. Ivkina, and I. A. Rapoport. 1967. A-factor responsible for the biosynthesis of streptomycin by a mutant strain of *Actinomycetes streptomycini*. *Doklady Akademii Nauk SSSR* **177**: 232.
- Kim, H. S., H. Tada, T. Nihira, and Y. Yamada. 1990.

- Purification and characterization of virginiae butanolide C-binding protein, a possible pleiotropic signal-transducer in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **43**: 692-706.
9. Kim, H. S. and S. Y. Kang. 1994. General microbiology, physiology and metabolism; Induction of secondary metabolites by virginiamycin inducing factor, virginiae butanolide C. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 459-466.
 10. Kim, H. S., T. Nihira, H. Tada, M. Yanagimoto, and Y. Yamada. 1989. Identification of binding protein of virginiae butanolide C, an autoregulator in virginiamycin production from *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **42**: 769-778.
 11. Kinoshita, H., H. Ipposhi, S. Okamoto, H. Nakano, T. Nihira, and Y. Yamada. 1997. Butyrolactone autoregulator receptor protein (BarA) as a transcriptional regulator in *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* **179**: 6986-6993.
 12. Kondo, K., Y. Higuchi, S. Sakuda, T. Nihira, and Y. Yamada. 1989. New virginiae butanolides from *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **42**: 1873-1876.
 13. Laemmli, L. K. 1970. Cleavage structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
 14. Lee, C. K., Y. Kamitani, T. Nihira, and Y. Yamada. 1996. Identification and *in vivo* functional analysis *Streptomyces virginiae*. *J. Bacteriol.* **181**: 3293-3297.
 15. Miyake, K., T. Kuzuyma, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1990. The A-factor binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin and sporulation. *J. Bacteriol.* **172**: 3003-3008.
 16. Nakano, H., E. Takehara, T. Nihira, and Y. Yamada. 1998. Gene replacement analysis of the *Streptomyces virginiae* *barA* gene encoding the butyrolactone autoregulator receptor reveals that BarA acts as a Repressor in virginiamycin biosynthesis *J. Bacteriol.* **180**: 3317-3322.
 17. Nihira, T., Y. Shimizu, H. S. Kim, and Y. Yamada. 1988. Structure-activity relationships of virginiae butanolide C, an inducer of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **41**: 1828-1837.
 18. Okamoto, S., K. Nakamura, T. Nihira, and Y. Yamada. 1995. Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* **270**: 12319-12326.
 19. Ruengjitchachawalya, M., T. Nihira, and Y. Yamada. 1995. Purification and characterization of the IM-2-binding protein from *Streptomyces* sp. strain FRI-5. *J. Bacteriol.* **177**: 551-557.
 20. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: *A laboratory manual* (ed.) 2, Cold spring harbor laboratory, Cold spring harbor. New York. USA.
 21. Waki, M., T. Nihira, and Y. Yamada. 1997. Cloning and characterization of the gene (*farA*) encoding the receptor for an extracellular regulatory factor (IM-2) from *Streptomyces* sp. strain FRI-5. *J. Bacteriol.* **179**: 5131-5137.
 22. Yamada, Y., T. Nihira, and S. Sakuda. 1997. Butyrolactone autoregulators inducers of virginiamycin in *Streptomyces virginiae*: their structures, biosynthesis, receptor proteins, and induction of virginiamycin biosynthesis. *Biotechnology of antibiotics*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 63-79.
 23. Yamada, Y., K. Sugimura, K. Kondo, M. Yanagimoto, and H. Okada. 1987. The structure of inducing factors for virginiamycin in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **40**: 496.

(Received May 20, 2005/Accepted June 3, 2005)