

Avermectin을 생산하는 *Streptomyces avermitilis*에서의 Proteomics-guided AfsR2-dependent 유전자의 발현

김명근 · 박현주 · 임종혁 · 김응수*
인하대학교 생물공학과

Functional Expression of Proteomics-guided AfsR2-dependent Genes in Avermectin-producing *Streptomyces avermitilis*. Kim, Myung-Gun, Hyun-Joo Park, Jong-Hyuk Im, and Eung-So Kim*. Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea - AfsR2 is a global regulatory protein involved in the stimulation of secondary metabolite biosynthesis in various *Streptomyces* species including avermectin-producing *S. avermitilis*. Among several AfsR2-dependent genes identified from the comparative proteomics, the polyribonucleotide nucleotidyltransferase (PNP) and the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) genes were previously proposed to regulate the actinorhodin production in *S. lividans* upon *afsR2* over-expression positively and negatively, respectively. To show the biological significance of the PNP and GPD genes in the *S. avermitilis* strains, these two genes were functionally expressed in both the wild-type and the avermectin-overproducing mutant strains. The PNP gene expression stimulated secondary metabolite production in the wild-type *S. avermitilis* ATCC31267, but not in the avermectin-overproducing *S. avermitilis* ATCC31780. Interestingly, the GPD gene expression stimulated secondary metabolite production by 4-fold in the wild-type *S. avermitilis* ATCC31267 and by 2.5-fold in the avermectin-overproducing *S. avermitilis* ATCC31780, respectively. These results suggest that the biological significance of the *afsR2*-dependent PNP and GPD gene expressions on antibiotic biosynthetic regulation could be significantly different depending on *Streptomyces* species.

Key words: AfsR2-dependent genes, avermectin, *Streptomyces*

서 론

*Streptomyces avermitilis*는 포자를 생성하고 형태적 분화를 하는 그램 양성 토양 방선균으로서, 멜라닌과 같은 갈색 색소를 띠는 항구충(anthelmintic) avermectin 및 세포성장 저해제 oligomycin을 포함한 다양한 이차대사 산물을 생산하는 것으로 알려져 있으며, 전체 유전체 분석이 완료됨에 따라 *S. coelicolor*와 더불어 방선균의 유전학적 연구에 활발히 응용되는 대표적인 산업미생물이다[18, 24]. Avermectin은 8가지 화학적으로 유사한 구조의 complex로 생합성되는 16-membered 폴리케타이드계 macrocyclic lactones 화합물로서, A1a, A2a, B1a, B2a가 주된 구조적 형태로 합성되며 특히 B1a가 가장 뛰어난 항구충 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[6-8]. Avermectin은 vertebrate neuron의 aminobutyric acid-gated chloride channel을 변화시키는 것으로 알려져 있으며, 사람과 박테리아에는 작용하지 않고 오직 nematode와 insect receptor에만 선택적으로 결합하는 것으로 알려져 있

다[2]. Ivermectin은 avermectin B1의 수소화 산물로 그 활성이 avermectin B1보다 더 뛰어나 현재 상업적으로 가장 널리 사용되고 있으며, 최근에는 human disease strongyloidiasis에도 효과가 있는 것으로도 보고되고 있다[19].

방선균 유래 이차 대사산물의 생합성에 관여하는 여러 조절유전자들은, 특정 대사산물의 생합성에만 관여하는 'pathway-specific' 조절유전자와, 하나 이상의 대사산물의 생합성을 동시에 조절하는 'global' 조절유전자로 크게 나뉘어 진다[1, 14, 15, 17]. 대표적인 방선균 유래 global 조절유전자인 *afsR2*는 63개의 아미노산으로 이루어진 조절단백질을 코딩하고 있으며 *S. lividans*와 *S. coelicolor*에 의해 합성되는 폴리케타이드 항생제 actinorhodin의 생합성을 활성화시킬 뿐만 아니라, avermectin을 생산하는 *S. avermitilis*에서도 *afsR2*를 높은 사본 수로 도입함으로써 avermectin 생산성이 2배 이상 증가되었다는 연구결과가 발표되었다[10]. 최근 본 연구진은 *afsR2*의 chromosomal integration을 통해 일반적으로는 항생제 actinorhodin 생산이 거의 안 되는 *S. lividans*를 항생제 고생산 변이균주로 재설계 하였고, 이들 두 균주의 comparative proteomics를 통하여 야생형과 변이주에서 각각 발현이 두드러진 유전자군을 선별하였고, 이들을 각각 방선균 발현벡터에 클로닝하여 *S. coelicolor*에 재도입함

*Corresponding author
Tel: 82-32-860-8318, Fax: 82-32-872-4046
E-mail: eungsoo@inha.ac.kr

로써 이들 proteomics-guided *afsR2*-dependent 유전자들의 기능을 고찰하였다[Park et al., unpublished data].

본 논문에서는 *S. lividans*에서 proteomics-guided *afsR2*-target 유전자로 선별된 polyribonucleotide nucleotidyltransferase(PNP)와 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GPD) 유전자들을 산업적으로 매우 활용가치가 높은 avermectin 생산균주에 도입하고 이들의 과 발현 시 *S. avermitilis*에서의 avermectin을 포함한 이차대사산물의 생산성 변화를 규명함으로써, 궁극적으로는 avermectin 고생산성 균주 개발을 위한 신규 target 유전자 발굴에 대한 기반을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양조건

본 연구에서는 avermectin 생산균주인 wild-type *S. avermitilis* ATCC31267과 over-producer *S. avermitilis* ATCC31780을 각각 ATCC(American Type Cell Culture, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 단기보관을 위하여, R2YE 고체배지 [103 g sucrose, 0.25 g K₂SO₄, 10.12 g MgCl₂·6H₂O, 10 g glucose, 0.1 g Difco casamino acids, 2 ml trace element solution, 5 g yeast extract, 5.73 g TES buffer, 22 g agar를 증류수 1 L에 녹여 멸균 후 1 ml KH₂PO₄(0.5%), 0.4 ml CaCl₂·H₂O(5M), 1.5 ml L-proline(20%), 0.7 ml NaOH (1 N) 첨가]에서 포자 상태로 4°C에서 보관하였으며, 중 장기 보관으로는 20% glycerol의 spore suspension으로 -70°C에 보관하였다[5]. 배양시 100 ml의 MF 배지 [70 g sucrose, 14 g soybean meal, 2.5 g yeast extract, 0.1 g NaCl, 1 g CaCO₃, 0.5 g KH₂PO₄, 10 g MOPS를 증류수 1 L에 녹이고 멸균한 후 pH 7로 맞춰 사용]에 통기가 잘 되도록 제작한 플라스크에 접종하여 30°C, 200 rpm으로 12일간 배양하면서 HPLC 분석을 통한 avermectin-type 대사산물의 생산성을 확인하였다.

HPLC를 이용한 Avermectin-type 대사산물 분석

S. avermitilis ATCC31267 및 고생산성 균주인 ATCC31780이 생산하는 avermectin-type 대사산물은 C-18 reverse phase (150×4.6 mm) column(Agilent, USA)을 사용하여 HPLC로 정량분석 하였다. 추출은 배양액의 일정량을 취하여 1 volume의 추출액(ethyl acetate)를 섞고, 14시간 동안 200 rpm, 30°C의 진탕 배양기에서 추출한 후 7000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 취하고, 이를 다시 evaporation 후 methanol에 녹여 분석하였다. HPLC분석을 위한 mobile phase는 methanol:water(85:15, v/v)를 사용하였고, 유속은 1.2 ml/min, column 온도는 40°C로 고정하였고, UV absorbance detector(Younlin Co., Korea)를 이용하여 246 nm에서 avermectin-type 대사산물의 생산량을 분석하였다.

Avermectin-type 대사산물 생산량의 비교분석은 대조군의 최종생산량 대비 형질전환체의 생산량을 피크 면적대비 (retention time 기준으로 4.9분에서 15분까지의 모든 peak area) 절대값 합으로 비교하였다. 따라서 본 분석에서는 avermectin의 8가지 화학적으로 유사한 구조의 avermectin complex와 avermectin과 구조적으로 유사한 *S. avermitilis* 유래 이차대사산물을 모두 합한 값을 avermectin-type 대사산물의 양으로 표시하였다.

재조합 균주 제작을 위한 PCR 클로닝

유전자 조작을 위해 R2YE 배지에 *S. lividans* TK21을 2일간 배양하여 genomic DNA를 분리하였다[5]. 클로닝을 위하여 *E. coli* DH5α와 플라스미드로는 pGEMT-easy(Promega, USA) 및 방선균 발현벡터 pSE34를 사용하였다[21]. *AfsR2*-dependent up-regulated protein인 PNP(polyribonucleotide nucleotidyltransferase)와 down-regulated protein인 GPD(glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase)를 클로닝하기 위한 polymerase chain reaction(PCR) primer로는, GPD forward primer: 5'-GATCCACGAGGAGATCGGTCCGTG-3'; GPD reverse primer: 5'-AAGCTTGATCAGAGCTGGTT-3', PNP forward primer: 5'-GGATCCATCGGAGAAACC-ACTAGTG-3'; PNP reverse primer: 5'-AAGCTTCGTCAC-TTGTCCGC-3'를 사용하였다. PCR은 Rapid Thermocycler (Idaho technology, U.S.A.)를 이용하여 denature(96°C, 30 sec), annealing(40°C, 30 sec), extension(68°C, 35 sec) 조건으로 30 cycle 동안 수행하였다[13]. PCR을 통해 증폭된 유전자 산물은 pGEMT-easy에 다시 클로닝 한 후 각각 *Bam*HI 과 *Hind*III으로 처리하여 pSE34에 다시 클로닝 하였다. Avermectin 생산균주의 형질전환은 protoplast를 통한 PEG polyethylene glycol(PEG)-mediated transformation 방법을 이용하여 최적화 하였다[5].

결과 및 고찰

S. avermitilis Protoplast 형질전환 및 Avermectin 추출 방법 최적화

일반적으로 방선균의 유전자 도입에 이용되는 PEG-mediated protoplast transformation 방법을 이용했을 때, *S. avermitilis*에서는 매우 낮은 형질전환 효율이 관찰되었다[23]. 따라서 protoplast transformation 방법을 최적화하기 위하여, PEG의 종류와 농도, 최적 배양시간과 lysozyme의 농도, 그리고 lysis 시간과 regeneration을 위한 overlay time 등을 최적화를 하였다. YEME(sucrose 170 g, yeast extract 1.5 g, malt extract 1.5 g, glucose 5 g, peptone 2.5 g을 1 L의 증류수에 녹인) 배지에 0.2%의 2.5 M MgCl₂·6H₂O 와 2.5%의 20% glycine을 첨가하여 배양하고 growth phase에 따라 wild type은 40시간, over-producer는 60시간 배양

후 수확하였다. 10.3% sucrose solution으로 2회 세척 후 1 mg/ml lysozyme 농도의 solution으로 37°C에서 30분간 lysis하였고, 25% PEG1000을 사용하였다. Regeneration을 위한 항생제(thiostrepton) overlay time은 20시간으로 최적화하여 최초 매우 낮은 효율의 형질전환 비율을 *S. avermitilis*에서 효율적인 비율로의 형질전환 최적화를 확립하였다.

이전에 보고된 avermectin의 추출 방법(culture broth에 1 volume의 methanol을 넣고 추출)으로는 avermectin 생산량을 효율적으로 비교분석하기 어려워, 기존 방법과 더불어 dichloromethane을 이용한 추출방법과 소수성 화합물의 추출에 이용되는 dichloromethane+ethyl acetate 혼합액, 및 ethyl acetate를 이용한 추출 방법을 확립하였다. HPLC 분석을 위해 최적화된 추출방법은 수확한 배양 broth에 1 volume의 ethyl acetate를 넣고, 12시간 동안 baffled flask에서 200 rpm으로 추출한 후 원심분리하고, 상등액을 분리하여 다시 evaporation 후 MeOH에 elution하여 분석에 이용하였다. 기존의 메탄올 추출 및 HPLC 분석에서는 avermectin을 포함한 *S. avermitilis* 유래 이차대사산물이 거의 검출되지 않았으나(Fig. 1A), methanol+dichloromethane(Fig. 1C) 및 ethylacetate(Fig. 1D)으로 추출한 경우에는 dichloromethane(Fig. 1B)으로 추출한 경우보다 HPLC 피크 면적 값을 기준으로 각각 2.3배, 7.5배의 avermectin을 포함한 *S. avermitilis* 유래 이차대사산물이 검출되었다.

*S. avermitilis*에서 PNP 및 GPD 유전자의 발현

Global regulatory 유전자인 *afsR2*는 기존 연구에서 생화학적 및 유전학적으로 유사한 방선균의 두 균주 *S. coelicolor*와 *S. lividans*에서 화학적 구조와 생합성 경로가 전혀 다른

두 항생제 actinorhodin과 undecylprodigiocin을 과생산시키는 positive 조절 유전자로 밝혀졌고[14], *S. avermitilis* 균주에서도 *afsR2*의 과발현에 의한 avermectin의 생산성 향상이 보고되었다[10]. 최근 본 연구진은 *S. lividans*에서의 comparative proteomics 방법을 이용하여, *afsR2* 유전자의 과발현에 따라 그 발현량에 조절을 받는 *afsR2*-dependent 단백질들을 다수 선별하였으며, 이들 단백질들의 발현이 방선균의 이차대사산물의 생합성 조절에 중요한 역할을 할 것으로 예측하였다 [3]. 따라서 *afsR2*를 *S. lividans*에서 과발현시켰을 시, actinorhodin 생산성 향상과 함께 up-regulated 된 단백질 polyribonucleotide nucleotidyltransferase(PNP, SCO5737)과 actinorhodin 생산성 저하와 함께 down-regulated 된 단백질 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase(GPD, SCO1947)도 *afsR2*에 영향을 받는 *S. avermitilis*의 이차대사산물 생산성에 영향을 줄 것으로 예상되어, 이들 유전자들을 각각 방선균 발현벡터인 pSE34에 클로닝하여 *S. avermitilis*에 도입하였다(Fig. 2). AfsR2-dependent up-regulated 단백질로 선정된 PNP의 과발현을 위하여 제작된 pPNP와 pSE34를 각각 *S. avermitilis* 균주에 transformation 하였고, 12일간 배양하면서 HPLC 분석을 통한 avermectin-type 대사산물의 생산량을 비교하였다. 대조군인 ATCC31267/pSE34에 비하여 ATCC31267/pPNP의 경우 약 5.5배의 avermectin-type 대사산물의 생산량 증가를 확인할 수 있었다(Fig. 3a). 본 결과는, PNP 유전자의 발현이 *S. lividans*에서와 유사한 기작으로 *S. avermitilis*에서도 이차대사산물의 생산성을 증가시키는 것으로 추정되었다. 하지만, PNP 유전자의 발현 효과가 over-producer인 *S. avermitilis* ATCC31780에서는 전혀 관찰되지 않았으며, 오히려 이차대사산물의 생산성이 저하되는 결과를 나타냈다(Fig. 3a). 비록 PNP 단백

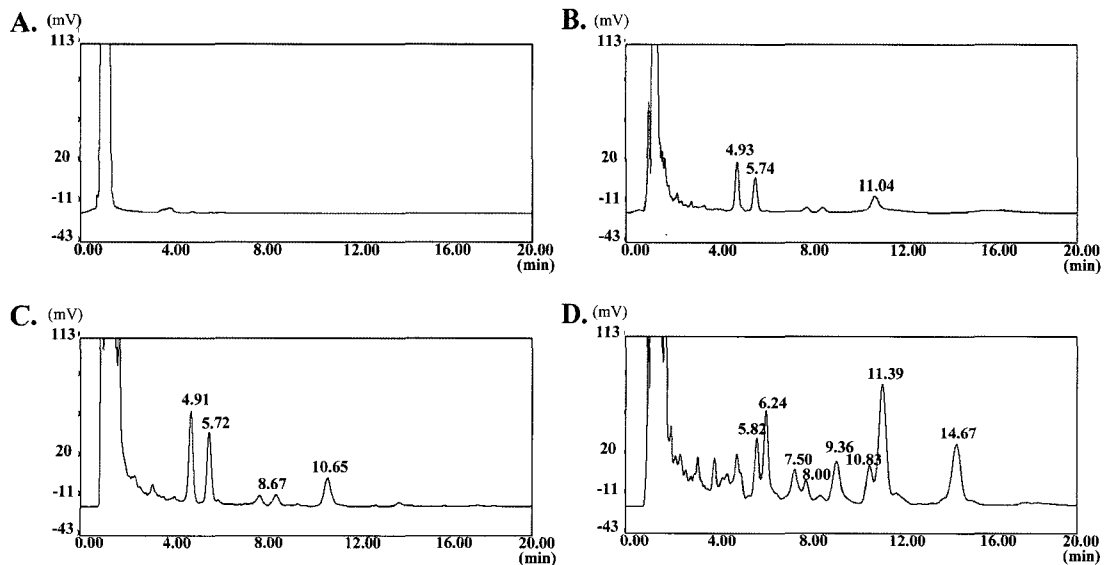


Fig. 1. HPLC assay chromatograms of *S. avermitilis* culture extracted by methanol (A), dichloromethane (B), methanol + dichloromethane (C) and ethyl-acetate (D).

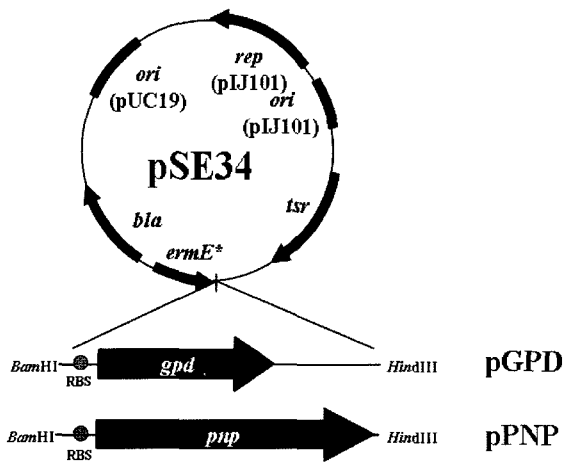


Fig. 2. Schematic maps of pPNP and pGPD.

질이 *afsR2*-dependant 발현 패턴을 보이고 mRNA stability 조절을 통한 방선균 이차대사산물의 생합성 조절 가능성이 제시되었으나[22], PNP가 *S. avermitilis*의 이차대사산물 생산성 조절에도 영향을 미치는 진정한 의미의 조절 단백질인지에 대해서는 보다 다양한 조건에서의 연구가 필요하다고 사료된다.

AfsR2-dependent down-regulated 단백질로 선정된 GPD 유전자도 PNP와 같은 방법으로 *S. avermitilis*에 형질전환하여 이차대사산물의 생산성을 비교분석 하였다. Wild type인 *S. avermitilis* ATCC31267 에서는 avermectin-type 대사산물의 생산량이 4배 가량 증가하였으며, over-producer인 *S. avermitilis* ATCC31780에서도 약 2.5배의 생산량 증가를 나타내었다(Fig. 3b). 이러한 결과는, 흥미롭게도 GPD 유전자의 발현에 의한 *S. lividans*에서의 actinorhodin 생산성 감소와는 상반되는 결과이다(Park *et al.*, unpublished data). GPD가 방선균의 기초대사 및 이차대사와 관련된 에너지 형성에 매우 중요한 효소임을 감안할 때 [20], GPD 유전자의 발현이 방선균의 이차대사산물의 생산성에 매우 중요한 역할을 함에는 분명하나, GDP 조절기작은 이차대사산물의 종류 및 생합성 기작에 따라 전혀 다르게 작용될 수 있음을 암

시하고 있다. 본 연구결과는, 이전까지 제시된 많은 방선균 이차대사산물 조절 유전자들의 역할에 관한 새로운 시각을 보여준다는 점에서 그 의미가 크다고 사료되며, 이들 조절 단백질들에 대한 보다 구체적인 분자수준에서의 연구 필요성을 제시하고 있다.

요 약

*S. lividans*에서 클로닝된 조절유전자인 *afsR2*를 과발현시 나타나는 up-regulated protein과 down-regulated protein 관련 유전자들을 proteomics 방법으로 선별하였고[3], 이를 방선균 발현백터인 pSE34를 이용하여 제작된 pPNP, pGPD를 *S. avermitilis*에 형질전환시켜 avermectin 및 이차대사산물의 생산량 차이를 비교 분석하였다. 그 결과 up-regulated protein으로 예상되던 PNP는 wild-type *S. avermitilis*에서만 제한적으로 avermectin-type 대사산물의 생산성 향상을 촉진시켰으며, 이와 반대로 down-regulated protein으로 예상되었던 GPD는 avermectin-type 대사산물의 생산량을 wild type *S. avermitilis*에서는 4배, over-producer *S. avermitilis*에서는 2.5배 증가시켰다. 본 연구결과는, 방선균 조절 단백질들이 이차대사산물의 종류 및 생합성 기작에 따라 전혀 다르게 작용될 수 있음을 암시하며, 향후 이들 조절 단백질들에 대한 보다 구체적인 분자수준에서의 연구 필요성을 제시하고 있다.

감사의 글

This work was supported by the Korean Systems Biology Research Grant (M10503020001-05N0302-00111) from the Ministry of Science and Technology.

REFERENCES

1. Balt, R. H. 1994. Gene Expression in Recombinant Microorganisms, Chapter 6 : Gene Expression in Recombinant

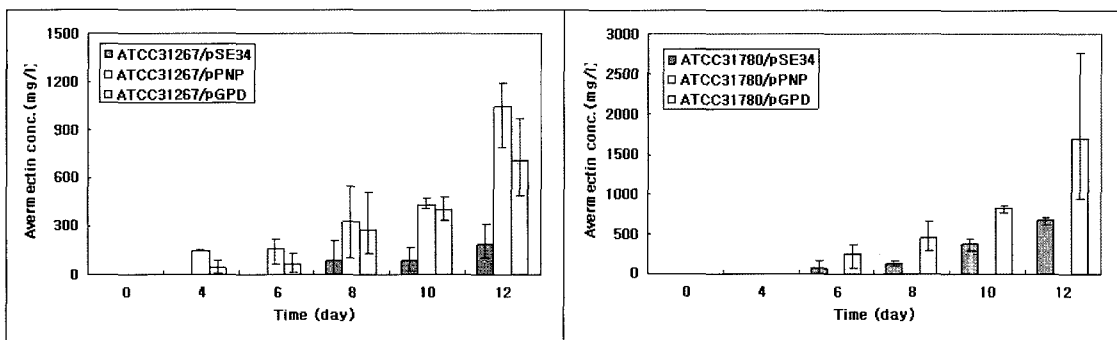


Fig. 3. Volumetric productivity (average of triplicates) of avermectin-type metabolites by the *S. avermitilis* transformants of ATCC31267 (left) and ATCC31780 (right).

- Streptomyces*, p337- 356.
2. Burg, R. W., B. M. Miller, E. E. Baker, J. Birnbaum, S. Currie, R. Hartman, Y. L. Kong, R. L. Monaghan, R. Oiwa, and S. Omura. 1979. Avermectins, New Family of Potent Anthelmintic Agents; Producing Organism and Fermentation Antimicrob. *Agents. Chemother.* **15**: 361-367.
 3. Kim, C.-Y., H.-J. Park, and E.-S. Kim. 2005. Proteomics-driven Identification of Putative AfsR2-target Protein Stimulating Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces lividans* *Biotechnol. Bioproc. Eng.* **10**: 248-253.
 4. Goodfellow, M. and S. T. Williams 1984. The biology of the actinomycetes, Academic Press, N.Y. Chapter **3**: Morphology, p166-170.
 5. Hopwood, D.W., 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. Shrempf. 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. Norwich, UK: The John Innes Foundation.
 6. Ikeda, H. and S. Omura. 1998. Avermectin Biosynthesis *Chem. Rev.* **97**: 2591- 2609.
 7. Ikeda, H., H. Kotaki, and S. Omura. 1987. Genetic Studies of Avermectin Biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 5615-5621.
 8. Ikeda, H., T. Nonomiya, M. Usami, T. Ohta, and S. Omura. 1999. Organization of the Biosynthetic Gene Cluster for the Polyketide Anthelmintic Macrolide Avermectin in *Streptomyces avermitilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 9509-9514.
 9. Ikeda, H., Y. Takada, C. H. Pang, K. Matsuzaki, H. Tanaka, and S. Omura. 1995a. Direct Production of 5-oxo Derivatives of Avermectins by a Recombinant Strain of *Streptomyces avermitilis*. *J. Antibiotics* **48**: 95-97.
 10. Lee, J. Y., Y. S. Hwang, S. S. Kim, E.-S. Kim, and C. Y. Choi. 2000. Effect of a Global Regulatory Gene, *afsR2*, from *Streptomyces lividans* on Avermectin Production in *Streptomyces avermitilis*. *J. Biosci. Bioeng.* **89**: 606-608.
 11. MacNeil, D. J., K. M. Gewain, C. L. Ruby, G. Dezeny, P. H. Gibbons, and T. MacNeil. 1992. Analysis of *Streptomyces avermitilis* Genes Required for Avermectin Biosynthesis Utilizing a Novel Integration Vector. *Gene* **111**: 61-68.
 12. MacNeil, T., K. M. Gewain, and D. J. MacNeil. 1993. Deletion Analysis of the Avermectin Biosynthetic Genes of *Streptomyces avermitilis* by Gene Cluster Displacement. *J. Bacteriol.* **175**: 2552-2563.
 13. Kim, E.-S., K. D. Cramer, A. L. Shreve, and D. H. Sherman. 1995. Heterologous Expression of an Engineered Biosynthetic Pathway: Functional Dissection Type II Polyketide Synthase Components in *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* **177**: 1202-1207.
 14. Martin, V., P. C. Chang, and S. N. Cohen. 1994. *afsR2*: A Previously Undetected Gene Encoding a 63-amino-acid Protein that Stimulates Antibiotic Production in *Streptomyces lividans*. *Mol. Microbiol.* **14**(4): 643-653.
 15. Stein, D. and S. N. Cohen. 1989. A Cloned Regulatory Gene of *Streptomyces lividans* can Suppress the Pigment Deficient Phenotype of Different Development Mutants. *J. Bacteriol.* **171**: 2258- 2262.
 16. Stohl, W. R. 1997. Biotechnology in Antibiotics, Chapter **1**: Industrial Antibiotics: Today and the Future, Marcel Dekker, Inc., N.Y., p1-11.
 17. Horinouchi, S. 2003. AfsR as an Integrator of Signals that are Sensed by Multiple Serine/Threonine Kinase in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 462-467.
 18. Ikeda, H., J. Ishikawa, A. Hanamoto, M. Shinose, H. Kikuchi, T. Shiba, Y. Sakaki, M. Hattori, and S. Omura. 2003. Complete Genome Sequence and Comparative Analysis of the Industrial Microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 505-506.
 19. Gaisser, S., L. Kellenberger, A. L. Kaja, A. J. Weston, R. E. Lill, G. Wirtz, S. G. Kendrew, L. Low, R. M. Sheridan, B. Wilkinson, I. S. Galloway, K. Stutzman-Engwall, H. A. McArthur, J. Staunton, and P. F. Leadlay. 2003. Direct Production of Ivermectin-like Drugs after Domain Exchange in the Avermectin Polyketide Synthase of *Streptomyces avermitilis* ATCC31272. *Org. Biomol. Chem.* **1**: 2840-2847.
 20. Kormanec, J., A. Lempelova, M. Farkasovsky, and D. Homerova. 1995. Cloning, Sequencing and Expression in *Escherichia coli* of a *Streptomyces aureofaciens* Gene Encoding Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase. *Gene* **165**: 77-80.
 21. Kang, S. H., M. G. Kim, H.-J. Park, and Kim, E.-S. 2005. Expression Profiles of *Streptomyces* Doxorubicin Biosynthetic Gene Cluster Using DNA Microarray System. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **20**: 220-227.
 22. Bralley, P. and G. H. Jones 2004. Organization and Expression of the Polynucleotide Phosphorylase Gene (*pnp*) of *Streptomyces*: Processing of *pnp* Transcripts in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* **186**: 3160-3172.
 23. Hwang, Y. S., E.-S. Kim, S. Biro, and C. Y. Choi 2003. Cloning and Analysis of a DNA Fragment Stimulating Avermectin Production in Various *Streptomyces avermitilis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 1263-1269.
 24. Yoon, Y. J., E.-S. Kim, Y. S. Hwang and C. Y. Choi 2004. Avermectin: Biochemical and Molecular Basis of Its Biosynthesis and Regulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 626-34.

(Received Aug. 17, 2006/Accepted Sep. 15, 2006)