

보 문

## 희소방선균 SeaR 유전자가 *Streptomyces virginiae*의 virginiamycins 생산에 미치는 영향

류재기<sup>1</sup> · 김현경<sup>1</sup> · 김병원<sup>1</sup> · 김동찬<sup>1</sup> · 이형선<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>김천대학교 임상병리학과, <sup>2</sup>중원대학교 임상병리학과

## Effect of SeaR gene on virginiamycins production in *Streptomyces virginiae*

Jae-Ki Ryu<sup>1</sup>, Hyun-Kyung Kim<sup>1</sup>, Byung-Won Kim<sup>1</sup>, Dong-Chan Kim<sup>1</sup>, and Hyeong-Seon Lee<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Gimcheon University, Gimcheon 39528, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Biomedical Laboratory Science, Jungwon University, Chungbuk 28024, Republic of Korea

(Received July 30, 2015; Accepted September 1, 2015)

**ABSTRACT:** In order to study the effect of the receptor protein [SeaR], which is isolated from *Saccharopolyspora erythraea*, we introduced the SeaR gene to *Streptomyces virginiae* as host strains. An effective transformation procedure for *S. virginiae* was established based on transconjugation by *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002 with a  $\phi$ C31-derived integration vector, pSET152, which contained *int*, *oriT*, *attP*, and *ermEp*<sup>+</sup> (erythromycin promoter). Therefore, the pEV615 was introduced into *S. virginiae* by conjugation and integrated at the *attB* locus in the chromosome of the recipients by the  $\phi$ C31 integrase (*int*) function. Transformants of *S. virginiae* containing the SeaR gene were confirmed by PCR and transcriptional expression of the SeaR gene in the transformants was analyzed by RT-PCR, respectively. And, we examined the production time of virginiamycins in the culture media of both the transformants and the wild type. The production time of virginiamycins in the wild type and transformants was the same. When 100 ng/ml of synthetic VB-C<sub>6</sub> was added to the state of 6 or 8 hour cultivation of wild type and transformants, respectively, the virginiamycins production was induced, meaning that the virginiamycins production in the wild type was detected 2 h early than transformants. From these results, SeaR expression was also affected to virginiamycins production in transformants derived from *S. virginiae*. In this study, we showed that the SeaR protein worked as a repressor in transformants.

**Key words:** *Saccharopolyspora erythraea*, SeaR gene, *Streptomyces virginiae*, transformant, virginiamycin

방선균(Actinomycetes)은 토양 유래의 미생물의 하나로 곰팡이와 유사한 형태의 포자와 균사체를 형성하는 그람 양성 세균이다. 그 중에서도 *Streptomyces* 속은 현재 사용되는 항생물질의 약 70%를 생산해 내는 이차대사산물 생산능력으로 인하여 많은 연구자들의 관심을 받아 온 미생물로서 형태 분화, 이차대사 및 이차대사산물 생산 조절 메커니즘에 관한 연구가 활발히 수행되어 왔다(Alderson *et al.*, 1993; Chater, 1993; Kieser *et al.*, 2000). 방선균이 생산하는 생리활성물질로는 항생물질 및 다양한 효소저해제, 면역증강제, 체초제, 구

충제 등이 있으며, 이들 몇몇의 물질들은 이미 산업화에 성공하여 의약 및 농업 분야에 응용되고 있다(Umezawa, 1988; Hwang *et al.*, 2005). 지금까지 방선균의 이차대사산물 조절 메커니즘 중 가장 활발히 연구된 부분이  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator라고 불리는 저분자의 신호전달물질과 이에 특이적으로 결합하는  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator receptor protein이라 불리는 단백질과의 상호작용에 의한 이차대사산물의 생산 및 조절에 관한 연구이다(Horinouchi *et al.*, 1990; Onaka *et al.*, 1995; Butler *et al.*, 2003; Bibb, 2005). 현재까지 밝혀진  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator들은 균체외로 미량(ng/ml)이 분비되어 극히 저농도에서 작용하여 이차대사 혹은 형태

\*For correspondence. E-mail: biohslee@jwu.ac.kr;  
Tel.: +82-43-830-8861; Fax: +82-43-830-8679

분화를 유도하는 고등생물의 호르몬에 상당하는 물질로 간주되었다(Takano, 2006). 고등생물의 호르몬의 경우 반드시 호르몬과 결합을 하는 수용체 단백질이 존재하기 때문에 이들  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator도 고등생물의 호르몬과 마찬가지로 특이적으로 결합하는 receptor protein이 존재하리라고 예상하여 연구를 수행한 결과, *Streptomyces virginiae*로부터 분리된 BarA를 시작으로 *Streptomyces griseus*로부터 ArpA, *Streptomyces lavendulae* FRI-5로부터 FarA, *Streptomyces coelicolor* A3(2)로부터 ScbR이  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator와 결합을 하는 receptor protein으로서 분리되고 기능에 관한 연구도 활발히 진행되어져 왔다(Okamoto *et al.*, 1995; Onaka *et al.*, 1995; Nakano *et al.*, 1998; Takano *et al.*, 2001). 최근에는 Non-*Streptomyces* 속인 *Saccharopolyspora erythraea* IFO 13426로부터 SeaR이 특이적인 receptor protein으로 분리되었고 이차대사산물 생산 및 조절 메커니즘에 관한 분자레벨 수준에서의 조작을 위해서 목적 유전자의 형질전환을 통한 연구가 많이 이루어져 오고 있다(Lee *et al.*, 2006). 본 연구에서는 접합전달법을 이용하여 *Saccharopolyspora erythraea*의 receptor gene (SeaR)을 *Streptomyces virginiae*에 도입시킨 후 형질전환된 방선균과 wild type과의 형태변화를 통하여 형질 전환에 사용된 Non-*Streptomyces* sp. 유래의 SeaR 단백질의 다양한 기능분석에 관하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 plasmid

본 연구는 virginiamycin M과 virginiamycin S의 생산 균주인 *Streptomyces virginiae* MAFF 10-06014를 숙주균으로 사용하였다(Yanagimoto and Terui, 1971). 목적 유전자인 SeaR는 *Saccharopolyspora erythraea* IFO 13426의 chromosomal DNA를 이용하여 PCR 방법으로 증폭 후 회수하였고, *E. coli* ET12567/pUZ8002는 *S. virginiae*의 접합전달용 공여균주로 사용하였다(Kieser *et al.*, 2000). Entry vector (pENTR/D-TOPO Cloning Kit, Invitrogen)는 목적 유전자의 클로닝을 위하여 사용되었으며, destination vector는 Choi 등(2004)에 의해 제조된 pSET152 유래의 vector를 사용하였다(Bierman *et al.*, 1992). 최종적으로 LR reaction을 통한 SeaR 발현백터를 제조하기 위하여 gateway LR clonase enzyme mixture (Invitrogen)가 사용되었다. Entry vector의 형질전환용 세포는 Mach1-T1 cell (One shot Mach-T1 chemically competent *E.*

*coli*, Invitrogen)을 사용하였고, destination vector 및 expression vector의 형질전환 및 대량회수를 위해서는 일반적인 형질전환 균주인 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 사용하였다.

### 배지 및 배양조건

*S. virginiae*와 transformant (SeaR-integrated *S. virginiae*)의 배양에는 SFM (Soy flour mannitol) 배지 또는 ISP No. 2 (BD Science) 배지를 사용하였고, 계대배양에는 ISP No. 2 배지를 사용하였다(Kieser *et al.*, 2000). 전배양 및 항생물질 생산배지로는 YEME (Yeast extract-malt extract), TSB (Tryptic soy broth) 또는 SV 배지를 사용하였고, 실험에서 이용한 모든 방선균의 chromosomal DNA 추출을 위한 액체배양은 TSB 배지를 사용하였다. *E. coli* 및 공여균주의 일반 배양 및 형질전환에는 LB (Luria Bertani) 배지를 사용하였다. 항생물질 생산 실험은 20 ml의 YEME, TSB, 또는 SV 배지를 사용하여 각각의 포자현탁액을  $1 \times 10^6$  CFU/ml가 되도록 접종하고 36-48시간 진탕 배양한 균체를 -70°C에서 보존하여 전배양균으로 사용하였다. 항생물질 생산 검정균으로는 *Bacillus subtilis* PCI 219를 사용하였고 검정균의 생육배지로 NA (Nutrient Agar) 배지를 사용하였다. 실험에 사용한 모든 시약은 Difco Laboratories Co., Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였다.

### DNA 조작 및 분리

방선균의 chromosomal DNA 분리는 Hopwood 방법에 따라 실행하였고, *E. coli* DH5 $\alpha$  competent cell은 Hanahan 방법으로 제조하였다(Kieser *et al.*, 2000). Plasmid DNA의 분리는 FlexiPrep Kit (GE Lifescience) 및 alkaline-SDS 추출법을 사용하였으며, 모든 제한효소, 수식효소 및 전기영동용 DNA 마커는 TaKaRa 제품을 사용하였다(Sambrook *et al.*, 1989).

### Polymerase chain reaction (PCR)

접합전달에 의한 방선균의 형질전환 유무는 pSET152의 전체 염기서열 중 apramycin 저항성 유전자를 PCR로 증폭할 수 있는 약 1 kb 정도의 유전자를 토대로 primers를 제작하여 확인하였고, SeaR 유전자의 발현유무는 SeaR 염기서열을 참조하여 *SphI* site를 포함하는 primers를 제작하여 확인하였다(Ryu *et al.*, 2015). PCR (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems)은 Prime STAR HS DNA Polymerase (TaKaRa)와 Go Taq Master Mix (Promega)를 이용하여 수행하였다. 결과는 1% 아가로즈 겔에서 전기영동 하였다.

## PCR 산물의 염기배열 결정 및 해석

Sequencing은 DNA sequencer (MegaBASE500, GE Life-science)를 이용하거나 (주)솔젠트사에 의뢰하였고, 염기서열 분석과 상동성 비교는 GENETYX-WIN (version 3.2, Software Development)과 NCBI DNA database를 이용하였다.

## 접합전달에 의한 *S. virginiae*의 형질전환 및 Reverse transcription (RT)-PCR

*E. coli*에서 *S. virginiae*로 plasmid의 접합전달은 Kieser 등 (2000)이 확립한 방법에 따라 수행하였다. 목적 유전자인 SeaR 유전자의 발현 벡터인 pEV615를 포함하는 공여균주인 *E. coli* ET12567/pUZ8002는 apramycin (50 µg/ml; Am), chloramphenicol (25 µg/ml; Cm), kanamycin (50 µg/ml; Km)이 첨가된 LB 액체배지에 접종하여 600 nm에서 흡광도가 0.2-0.4가 될 때까지 37°C에서 배양한 후, 동량의 새로운 LB 액체배지로 두 번 세척하고 최종적으로 0.1배의 새로운 LB 액체배지로 재현탁하여 *S. virginiae*를 접합전달을 위한 공여균주로 사용하였다. 열처리하지 않은 5 µl ( $1.5 \times 10^7$  CFU/ml), 10 µl ( $3 \times 10^7$  CFU/ml)의 *S. virginiae* 포자는 2×YT 배지 0.3 ml로 각각 현탁한 후 준비된 공여균주 현탁액 500 µl ( $1.25 \times 10^8$  CFU/ml)와 잘 혼합한 후 실온에서 10분간 정치배양하였다. 배양한 혼합액은 원심분리하여 상층액을 제거하였으며, 얻어진 pellet은 10 mM MgCl<sub>2</sub>를 포함한 SFM 한천배지에 도말하고 28°C에서 16-20시간 정치배양 하였으며 형질전환체의 선별을 위해 1.5 ml의 DW에 0.25 mg nalidixic acid (Nal)와 1 mg apramycin을 첨가하여 배지 위에 증점시킨 후 30°C에서 2-3일간 더 배양하였다. 선발된 형질전환체(transformant)는 apramycin (0.25 mg/ml)이 함유된 ISP No. 2 배지에 계대배양하였다.

형질전환을 통하여 선발된 각각의 형질전환체(transformant)는 20 ml의 TSB 배지에 포자현탁액( $1 \times 10^6$  CFU/ml)을 접종하여 10, 12, 14시간 진탕배양 후 배양액을 시험관에 넣어 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수한 균체로부터 전체 RNA (RNeasy Mini Purification Kit, Qiagen)를 추출하고 DNase I (TaKaRa)을 처리하여 chromosomal DNA를 제거하였다. cDNA를 합성하기 앞서 DNase I을 처리한 전체 RNA 내의 chromosomal DNA의 존재유무는 전체 RNA를 주형으로 사용하여 SeaR2 primers를 이용하여 PCR을 수행하여 확인하였다. DNase I으로 처리한 전체 RNA는 Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen)와 Random primers (Invitrogen)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 최종적으로 형질전환된 SeaR 유전자의 발현 유무를 확인하기 위하여 cDNA를 주형으

로 이용하여 PCR을 수행하였다.

## Virginiamycins 생산 및 VB-C6의 유도 활성 측정

*S. virginiae* 및 transformant (SeaR-integrated *S. virginiae*)의 전배양균(-70°C 보존)은 멸균한 SV 배지로 세척한 후 200 ml (baffled flask)의 SV 배지에 3% 되게 접종하여 배양하였다. 샘플채취는 본배양 8시간부터 20시간까지 2시간 간격으로 10 ml씩 하였고, VB-C<sub>6</sub>에 의한 VMs 유도 활성 측정은 본배양 4, 6, 8시간 후에 각각 100 ng/ml의 VB-C<sub>6</sub>를 첨가하여 VB-C<sub>6</sub>의 첨가시기에 의한 유도 활성을 측정하였다. 본 시험에 사용된 합성 VB-C<sub>6</sub>는 Kim 등(1989)이 조제한 VB-C<sub>6</sub> (ethanol에 용해)를 사용하였다. 채취한 샘플 배양액을 원심하여 상등액 중 생산된 VMs는 검정균 *B. subtilis* PCI 219를 사용하여 paper disk (Φ=6 mm, Whatman)법에 의해 생성된 clear zone으로 확인하였다.

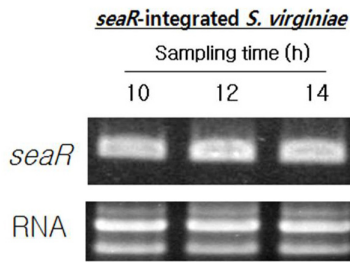
## HPLC에 의한 virginiamycins의 분석 및 항균력 조사

합성 VB-C<sub>6</sub>를 본배양 8시간에 첨가 후 *S. virginiae* (wild type)와 SeaR-integrated *S. virginiae* (transformant)는 2시간, 4시간 더 배양하였다. 각각의 배양 상등액 2 ml를 SEP-PAK cartridge (Water)에 흡착시킨 후 각각 2 ml의 50% 및 100% methanol로 용출하여 농축한 후 methanol 100 µl에 용해하여 그 중 20 µl를 paper disk법으로 *B. subtilis* PCI 219에 대한 항균력을 조사하고 Shimadzu LC-10AD (Japan)를 이용한 역상 HPLC Haisil C18 column (Chrom Tech), CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O=6:4, 0.1% trifluoroacetic acid, flow rate 1 ml/min, UV 305 nm로 virginiamycins의 생산을 분석하였다.

## 결과 및 고찰

### SeaR expression vector의 개발

목적 유전자인 SeaR는 *S. erythrae* IFO 13426의 chromosomal DNA와 primer를 이용하여 PCR을 수행하고 1% 아가로즈겔에 전기영동 후 615 bp 정도의 목적 DNA 단편인 SeaR 유전자를 회수하여 entry vector에 삽입하였으며, 삽입된 entry vector의 attL site와 destination vector의 attR site를 이용한 LR reaction으로 SeaR 발현 벡터(pEV615)를 제조한 다음, 이를 *E. coli* ET12567/pUZ800에 형질전환 하였다. 형질전환된 균으로부터 plasmid DNA를 분리하여 전기영동 한 결과 4.4 kb 위치에 나타났고, 분리된 plasmid DNA를 ClaI으로 처리한 결과



**Fig. 1.** The SeaR expression of *S. virginiae* analysis by RT-PCR. PCR amplification as carried out using the primer (Forward, 5'-ATTGCATGC CGCT TCTACTTCCACTTCG-3'; Reverse, 5'-GTTGCATGCGTTGG TGCGAAGCCACTC-3'), which are manufactured by sequences located in SeaR gene. Primers were designed to generate PCR products of approximately 450 bp and *SphI* site (underlined).

1.1 kb 및 5.5 kb의 2개의 단편이 확인되었으며, 제조된 SeaR 발현 벡터를 pEV615 (6.6 kb)라고 명명하였다. 제조된 pEV615는 *oriT*, *attP*, *ermEp*과 SeaR 유전자 단편을 가지고 있는 bacteriophage  $\Phi$ C31 유래의 integration vector이며 결과는 본 연구자의 선행 연구 논문에 게재되었다(Ryu *et al.*, 2015).

### 목적유전자의 발현

방선균 염색체에 존재하는 *attB* site로 삽입된 SeaR 유전자의 발현유무는 RT-PCR의 수행으로 알 수 있다. Transformant 배양액은 원심분리하여 균체를 회수하고 총 RNA를 추출하여 cDNA를 합성한 후 SeaR 유전자와 특이적으로 결합하는 primer를 이용하여 PCR을 수행하고 1% 아가로즈겔에 전기영동 하였다. 그 결과 Fig. 1과 같이 각각의 transformant로부터 10시간부터 일정하며 지속적으로 발현되는 약 450 bp의 DNA 단편을 확인 할 수 있었다. 증폭된 단편이 SeaR 유전자 유래의 단편인지 확인을 위하여 10시간째 단편을 각각 아가로즈겔로부터 회수한 후 클로닝하여 염기서열을 분석한 결과 SeaR 유전자 유래의 단편임을 확인하였다. 결과적으로 transformant에 삽입된 pEV615 발현 벡터로부터 SeaR 유전자가 지속적으로 발현되고 있음을 확인하였다.

### *S. virginiae* 및 transformant의 virginiamycins (VMs) 생산

TSB 배지나 SV 배지를 사용한 *S. virginiae*와 transformant의 일반적인 growth pattern 비교 실험에서도 두 균의 growth pattern 차이가 거의 없음을 확인하였다. 이는 SeaR 유전자의 지속적인 발현이 *S. virginiae*의 일차대사에는 큰 역할을 하지 않는 것을 나타내는 것으로 이차대사에 영향이 있을 것으로 예상되었다. *S. virginiae*의 경우 방선균 연구에 있어서 이차대사산물, 즉 항생물질 생산을 조절하는 receptor 단백질과 auto-

**Table 1.** Time course of the virginiamycins production in *S. virginiae* (wild type) and SeaR-integrated *S. virginiae* (transformants)

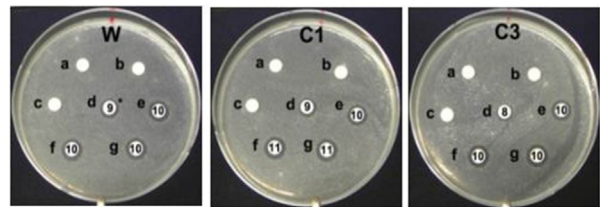
Strain	Virginiamycins production time (h)						
	8	10	12	14	16	18	20
	Inhibitory zone ( $\Phi$ , mm)						
Wild type	-	-	-	9.0	10.0	10.0	10.0
C1	-	-	-	9.0	10.0	11.0	11.0
C3	-	-	-	8.0	10.0	10.0	10.0

regulator 관계에 관한 연구가 많이 진행되어 왔기 때문에 이차대사산물의 생산의 변화를 통하여 SeaR 유전자가 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

Wild type 및 transformant의 virginiamycins (VMs) 생산 확인은 -70°C에 보존된 전배양균을 멸균한 SV 배지로 세척하고 100 ml의 SV 배지에 3% 되게 접종하여 배양 8시간부터 20시간까지의 VMs 생산능을 조사하였다. Table 1 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *S. virginiae*와 transformant C1, C3는 본배양 14시간 경과 후부터 VMs을 생산하였다.

### VB-C6에 의한 transformant의 항생물질 유도능

VB-C<sub>6</sub>의 기능은 VMs 생산에 직접 관여하는 기능이 아닌 VMs 생산을 촉진하는 유도기능을 가진다고 알려져 있으며 VB-C<sub>6</sub> 첨가 후 2시간 이후에 VMs의 생산이 시작되는 것으로 알려져 있다(Nihira *et al.*, 1988). VB-C<sub>6</sub>에 의한 유도활성을 측정하기 위해 본 배양 4, 6, 8시간 후에 100 ng/ml의 VB-C<sub>6</sub>를 각각 첨가하였다. VB-C<sub>6</sub>에 의한 wild type과 transformant C1, C3의 VMs의 유도능을 조사한 결과, 본배양 4시간 후에 100 ng/ml의 VB-C<sub>6</sub> 첨가 시 wild type 및 transformant C1, C3 모두 VB-C<sub>6</sub>에 의한 VMs 생산이 유도되지 않았다(Table 2 and Fig. 3A). 이는 *S. virginiae*의 repressor로서 알려진 autoregulator receptor인 BarA가 생성이 되지 않아 VB-C<sub>6</sub>에 의한 VMs 생산이 유도되지 않은 것으로 보인다(Nakano *et al.*, 1998). 본배양



**Fig. 2.** Time course of the virginiamycins production in *S. virginiae* (wild type) and SeaR-integrated *S. virginiae* (transformants) (W, wild type; C1, C3, transformants; a, 8 h; b, 10 h; c, 12 h; d, 14 h; e, 16 h; f, 18 h; and g, 20 h cultivation).



**Table 2.** Induction of virginiamycins production by addition of synthetic VB-C<sub>6</sub> at 4 h cultivation

Strain	VB-C <sub>6</sub> (4 h)	Virginiamycins production time (h)					Inhibitory zone ( $\Phi$ , mm)		
		6	8	10	12	14	16		
Wild type	+	-	-	-	-	8.0	9.0		
	-	-	-	-	-	10.0	11.0		
C1	+	-	-	-	-	6.5	8.0		
	-	-	-	-	-	9.0	11.0		
C3	+	-	-	-	-	8.0	9.0		
	-	-	-	-	-	10.0	11.0		

6시간 후에 100 ng/ml의 VB-C<sub>6</sub> 첨가 시 wild type은 항생물질 생산시기가 4시간 단축되었고 transformant C1과 C3는 항생물질 생산시기가 2시간 단축되었다(Table 3 and Fig. 3B). 본 배양 8시간 후에 100 ng/ml의 VB-C<sub>6</sub> 첨가 시 wild type과 transformant C1, C3 모두 항생물질 생산시기가 4시간 단축되었다(Table 4 and Fig. 3C). 그러나 특이하게 transformant C1과 C3는 wild type과 비교하여 VB-C<sub>6</sub> 첨가에 의해 VMs 생산

**Table 3.** Induction of virginiamycins production by addition of synthetic VB-C<sub>6</sub> at 6 h cultivation

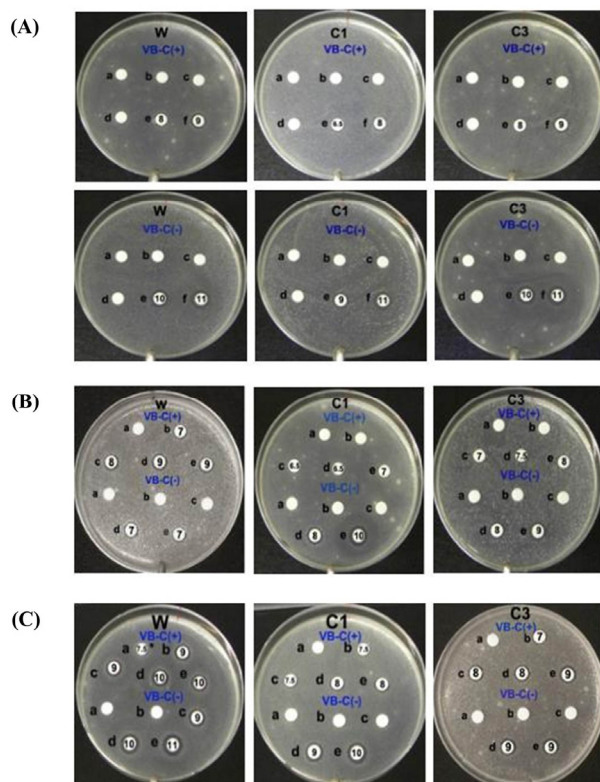
Strain	VB-C <sub>6</sub> (6 h)	Virginiamycins production time (h)					Inhibitory zone ( $\Phi$ , mm)	
		8	10	12	14	16		
Wild type	+	-	7.0	8.0	9.0	9.0		
	-	-	-	-	7.0	7.0		
C1	+	-	-	6.5	6.5	7.0		
	-	-	-	-	8.0	10.0		
C3	+	-	-	7.0	7.5	8.0		
	-	-	-	-	8.0	9.0		

이 억제되었다. 이 결과는 VB-C<sub>6</sub>에 의한 유도의 경우 *S. virginiae* 내의 BarA에 의해 VMs 생산시기가 2-4시간 단축되었다고 사료되나, transformant C1, C3의 경우 VB-C<sub>6</sub> 첨가 시 VMs 생산이 억제되는 것은 receptor로 추정되는 SeaR이 VMs 생산 유전자에 결합하여 억제자로 기능 한다고 생각된다.

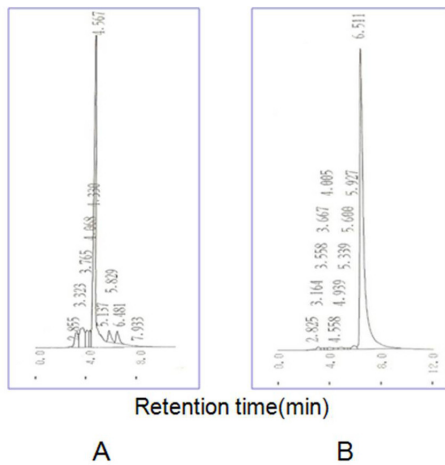
### HPLC에 의한 virginiamycins의 분석

Wild type과 transformant C1, C3가 생산하는 virginiamycins의 분석은 standard virginiamycin M (1 mg/ml)과 virginiamycin S (1 mg/ml)을 이용하여 비교하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 virginiamycin M은 retention time이 4.5 min, virginiamycin S는 6.5 min에 검출되었다.

본 배양 8시간 후에 VB-C<sub>6</sub> 첨가하여 VMs이 유도 생산되는 10시간, 12시간 배양액은 정제 및 농축하여 20  $\mu$ l 샘플을 paper disk법으로 *B. subtilis* PCI 219에 대한 항균력을 조사 하였다. Table 5에서 보인 바와 같이 wild type과 C3는 항균력이 나타났으나, C1의 경우 10시간째 항균력을 보이지 않았다. 5  $\mu$ l의 샘플을 주입하여 HPLC 분석한 결과 Fig. 5에서 보인 바와 같이 transformant C1과 C3보다 wild type이 더 많은 VMs이 용

**Fig. 3.** Induction of virginiamycins production by addition of synthetic VB-C<sub>6</sub> at 4(A), 6(B), and 8(C) h cultivation (W, wild type; C1, C3, transformants; a, 6 h; b, 8 h; c, 10 h; d, 12 h; e, 14 h; and f, 16 h cultivation).**Table 4.** Induction of virginiamycins production by addition of synthetic VB-C<sub>6</sub> at 8 h cultivation

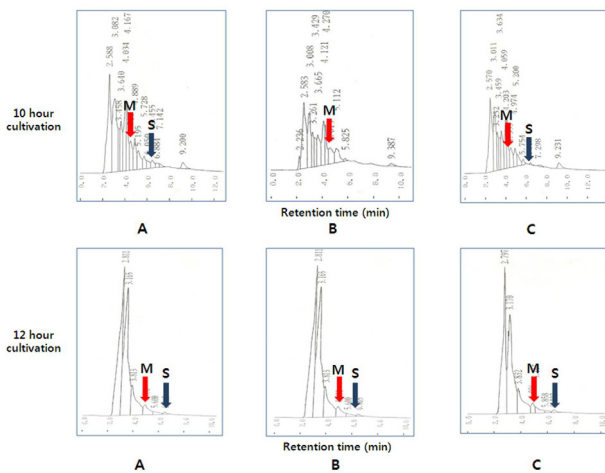
Strain	VB-C <sub>6</sub> (8 h)	Virginiamycins production time (h)					Inhibitory zone ( $\Phi$ , mm)	
		10	12	14	16	18		
Wild type	+	7.5	9.0	9.0	10.0	10.0		
	-	-	-	9.0	10.0	11.0		
C1	+	-	7.5	7.5	8.0	8.0		
	-	-	-	-	9.0	10.0		
C3	+	-	7.0	8.0	8.0	9.0		
	-	-	-	-	9.0	9.0		



**Fig. 4.** HPLC chromatograms of virginiamycin M and S produced by *S. virginiae*. (A) standard virginiamycin M (1 mg/ml), (B) standard virginiamycin S (1 mg/ml).

**Table 5.** Antibacterial activity of *S. virginiae* (wild type) and SeaR-integrated *S. virginiae* (transformant C1, C3) at 10 and 12 h cultivation

Incubation time (h)	Strains		
	Wild type	C1	C3
	Inhibitory zone ( $\Phi$ , mm)		
10.0	8.5	-	6.5
12.0	10.0	8.5	10.0



**Fig. 5.** HPLC chromatograms of virginiamycins produced by *S. virginiae* and transformants (A) wild type, (B) transformant C1, (C) transformant C3.

출되었고, 배양 10시간 후 보다 배양 12시간 후에 더 많은 VMs이 용출되었다. C1의 경우 10시간째 virginiamycin M은 미약하게 검출되었으나 항균력을 보이지 않았으며, 12시간째 virginiamycin M과 virginiamycin S가 검출된 결과에서 virginiamycin M이 먼저 생산되는 것을 확인하였다.

## 적 요

본 연구는 희소방선균 *Saccharopolyspora erythrae* receptor gene (SeaR)의 기능을 연구하기 위해 다른 속의 균주인 *Streptomyces virginiae*에 SeaR 유전자를 도입하였다. *S. virginiae*의 형질 전환은 *oriT*, *attP*, *ermEp\**과 SeaR 유전자 단편을 가지고 있는  $\Phi$  C31 유래의 integration vector인 pEV615 (6.6 kb)를 이용하여 *Escherichia coli* ET12567/pUZ8002를 DNA 공여체(donor)로 이용한 접합전달법(conjugal transfer)을 사용하여 확립하였다. SeaR 유전자의 삽입 유무는 PCR방법으로 확인하였고, SeaR 유전자의 전사 발현은 RT-PCR방법으로 확인하였다. *S. virginiae*의 경우, virginiamycins 생산은 wild type (*S. virginiae*)와 transformants (C1, C3) 모두 최초생산시기가 14시간으로 같았다. VB-C<sub>6</sub> 첨가시기에 따른 항생물질 유도능 확인결과 본 배양 4시간에 VB-C<sub>6</sub> 첨가 시 wild type과 transformants (C1, C3) 모두 VB-C<sub>6</sub>에 의한 virginiamycins 생성이 유도되지 않았다. 본배양 6시간, 8시간에 VB-C<sub>6</sub> 첨가하였을 시 VB-C<sub>6</sub>에 의한 virginiamycins 생성이 유도되는 것을 확인하였다. 이 결과는 VB-C<sub>6</sub>에 의한 유도의 경우 *S. virginiae* 내의 BarA에 의해 VMs 생산시기가 2-4시간 단축되었다고 사료되나, transformants C1, C3의 경우 VB-C<sub>6</sub> 첨가 시 virginiamycins 생산이 억제되는 것은 SeaR이 virginiamycins 생합성 유전자에 결합하여 억제자로 기능 한다고 추정 되었다. 이러한 결과로 인하여 외부에서 도입된 SeaR gene이 virginiamycins 생산에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

## 감사의 말

이 연구는 2015년도 김천대학교 교내학술비 지원에 의한 것임.

## References

- Alderson, G., Ritchie, D.A., Cappellano, C., Gool, R.H., Ivanova, N.M., Huddleston, A.S., Flaxman, C.S., Kristufek, V., and Lounes, A. 1993. Physiology and genetics of antibiotic production and resistance. *Res. Microbiol.* **144**, 665-672.
- Bibb, M.J. 2005. Regulation of secondary metabolism in Streptomyces. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 208-215.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N., and Schoner, B.E. 1992. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.

- Gene* **116**, 43–49.
- Butler, M.J., Takano, E., Bruheim, P., Jovatic, S., Marinell, F., and Bibb, M.J.** 2003. Deletion of *scbA* enhances antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 512–516.
- Chater, K.F.** 1993. Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 685–713.
- Choi, S.U., Lee, C.K., Hwang, Y.I., Kinishita, H., and Nihira, T.** 2004. Intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to *Kitasatospora setae*, a bafilomycin B<sub>1</sub> producer. *Arch. Microbiol.* **181**, 294–298.
- Horinouchi, S., Kito, M., Nishiyama, M., Furuya, K., Hong, S.K., Miyake, K., and Beppu, T.** 1990. Primary structure of AfsR, a global regulatory protein for secondary metabolite formation in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Gene* **95**, 49–56.
- Hwang, J.H., Lee, C.K., Lee, K.M., Jo, B.K., Park, H.R., and Hwang, Y.I.** 2005. Development of a recombinant *Streptomyces griseus* with *sprA* and *sprB* genes for proteolytic enzyme production. *Kor. J. Microbiol.* **41**, 87–92.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A.** 2000. Practical Streptomyces Genetics. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Kim, H.S., Nihira, T., Tada, H., Yanagimoto, M., and Yamada, Y.** 1989. Identification of binding protein of virginiae butanolide C, an autoregulator in virginiamycin production from *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **42**, 769–778.
- Lee, Y.J., Yeo, S.H., Lee, I.S., Lee, S.P., Kitani, S., Nihira, T., and Kim, H.S.** 2006. Cloning and characterization of gene encoding  $\gamma$ -butyrolactone autoregulator receptor from *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 77–83.
- Nakano, H., Takehara, E., Nihira, T., and Yamada, Y.** 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.
- Nihira, T., Shimizu, Y., Kim, H.S., and Yamada, Y.** 1988. Structure-activity relationships of virginiae butanolide C, an inducer of virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **41**, 1828–1837.
- Okamoto, S., Nakamura, K., Nihira, T., and Yamada, Y.** 1995. Virginiae butanolide binding protein from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* **270**, 12319–12326.
- Onaka, H., Ando, N., Nihira, T., Yamada, Y., Beppu, T., and Horinouchi, S.** 1995. Cloning and characterization of the A-factor receptor gene from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **177**, 6083–6092.
- Ryu, J.K., Kwon, P.S., and Lee, H.S.** 2015. Functional analysis of SeaR protein identified from *Saccharopolyspora erythraea*. *Kor. J. Microbiol.* **51**, 39–47.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, USA.
- Takano, E.** 2006.  $\gamma$ -Butyrolactones: *Streptomyces* signaling molecules regulating antibiotic production and differentiation. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 287–294.
- Takano, E., Chakraborty, R., Nihira, T., Yamada, Y., and Bibb, M.J.** 2001. A complex role for the  $\gamma$ -butyrolactone SCB1 in regulating antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **41**, 1015–1028.
- Umezawa, H.** 1988. In Actinomycetes in Biotechnology. London: Academic Press, USA.
- Yanagimoto, M. and Terui, G.** 1971. Physiological studies on staphylomycin production: Formation of a substance effective in inducing staphylomycin production. *J. Ferment. Technol.* **49**, 611–618.