

Virginiae Butanolide C 결합단백질의 신호 전달기구에 대한 연구

김현수

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Virginiamycin 생산 유도 인자인 *virginiae* butanolide C (VB-C)의 signal 전달기구 해명을 위한 기초적 연구로서 receptor성 VB-C 결합단백질의 recycle 가능성, DNA와의 결합 가능성 및 인산화 가능성을 검토하였다. 배양 시간에 따른 [^3H] VB-C와의 결합활성은 virginiamycin 생산 증가와 함께 증대되어 VB-C 결합단백질의 recycle이 추정되었으며, *S. virginiae*의 genome DNA 공존시 40-50%의 결합 활성 저하로부터 DNA와 결합에 의한 signal 전달가능성과 [γ - ^{32}P] ATP에 의해 분자량 36,000의 VB-C 결합단백질이 인산화된 결과로부터 인산화를 통한 signal 전달가능성이 시사되었다.

KEY WORDS □ *Virginiae* butanolide C (VB-C), VB-C binding protein, Signal transducer

방선균에 있어서, 포자형성등의 형태분화, 그리고 항생물질, 생리활성물질, 색소등 2차 대사산물 생산을 조절하는 signal 분자로서, γ -lactone환을 소유한 다면형질발현성의 자기조절인자(Autoregulator)들이 분리, 구조결정되어있다 (Fig. 1). 이들 조절인자들은 극미량의 농도(수 ng/ml)에서 다양한 기능을 발휘하는 점에서 미생물성 호르몬으로 간주되고 있으며, 근년에 들어 이들의 분자 level에서의 연구가 진행됨에 따라 그 기능들이 하나씩 밝혀지고 있다. 지금까지 알려진 조절인자로서는 *S. griseus*로부터 streptomycin 생산 및 포자작생을 조절하는 A-factor(7)를 비롯하여 Factor I (4), Gräfe의 factor들 (5) 및 *S. virginiae*로부터 virginiamycin 생산을 촉진(유도)하는 인자인 *virginiae* butanolide A, B, C, D, E (이하 VB-A, B, C, D, E) (17, 8) 등이 있으며, 이들의 signal 전달에 의한 2차 대사산물 생산의 switch on-off 기구는 아직 불분명하다.

따라서 저자는 signal 전달 기구 해명의 일환으로 virginiamycin 생산 촉진(유도)인자인 VB-C를 대상으로 하여 유도 활성에 관여하는 부분구조의 해명 (13) 및 signal 전달에 관여한다고 예상되는 receptor성 결합단백질의 존재 ($K_d = 1.1 \text{ nM}$)를 처음으로 확인(9) 하여 분자량 36,000의 결합단백질을 정제(10)하였으며, 최근 정제된 VB-C 결합단백질을 이용하여 VB-C receptor 유전자(vbr A, 319개 아미노산)가 분리되어 (14) signal 전달기구 해명에 보다 박차를 가하게 되었다. 따라서 본 연구에서는 VB signal 전달기구에 관한 기초적 연구로서, 부분정제된 VB-C 결합단백질을 이용하여 VB-C receptor의 recycle 가능성, DNA와의 결합 가능성 및 인산화 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 조제

본 실험에서 사용한 균주는 Yanagimoto 등(17)의 *Streptomyces virginiae* MAFF 10-0604를 사용하였으며, 생육배지로서는 1 l 당 Bacto-casitone 7.5 g (Difco), yeast extract 7.5 g (Difco), glycerin 15 g, NaCl 2.5 g, pH 6.5 의 조성의 배지를 사용하였으며, 전배양균(28°C, 120 rpm, 48 hrs - 70°C 보존)을 3% 되게 접종하여 10 hrs (28°C, 120 rpm) 및 그 이상 본배양한 후 배양시간에 따른 배양균체를 -70°C에 보존하여 사용하였다. Virginiamycin 생산 검정균로서는 *Bacillus subtilis* PCI 219를 사용하였으며, 검정배지로서는 1 l 당 polypeptone 5 g (Daiyo Co.), meat extract 3 g (Difco), agar 15 g 되게 첨가하여 사용하였다.

조단백질의 조제

Kim 등 (10)의 VB-C 결합단백질 정제 방법에 따른 각 step의 단백질 용액, 즉, 30-50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Sephadex G-100 및 phenyl 5 pw column 을 이용한 HPLC 회분을 각 실험에 따라 적의 사용하였다.

VBs 용액 제조 및 VB 활성 측정

각 배양시간에 따른 배양상등액 20 ml를 염산산성 하(pH 2-3)에서 2배량의 초산에틸로 추출, 건조(무수 Na_2SO_4 첨가), 농축(evaporator 사용, EYELA Co). 한 뒤, *S. virginiae* 생육배지에 용해시켜 VBs 용액으로 사용하였으며, VB 활성측정은 Yanagimoto 등(17)의 방법을 변경한 1 ml 계, 즉, *S. virginiae* 생육배지 70 ml (500 ml 삼각플라스크)에 전배양균 (48 hrs 배양, -70°C 보존)을 3% 접종하여, 28°C, 120 rpm에서 8시간 본배양하여 냉각 원심분리 (10,000×g, 10분,

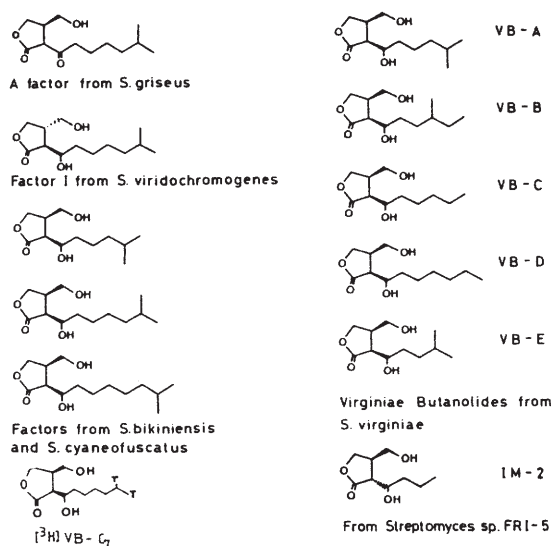


Fig. 1. Structure of several autoregulators isolated from *Streptomyces* sp.

4°C)한 균체를 새로운 배지 35 ml에 현탁한뒤, 500 μ l를 각 VB용액 100 μ l가 함유된 새로운 배지 500 μ l (ϕ 10 \times 150 mm시험관 사용)에 첨가하여 동일조건하에서 4시간 배양 하였다.

Virginiamycin생산은 VBs용액 미첨가균 (virginiamycin 미생산)과 같이 배양상징액을 시험균 *B. subtilis* PCI 219를 이용하여 cup법에 의한 저지원의 크기로서 측정하였다.

VB-C 결합단백질의 활성 측정

Kim등(10)의 황산암모늄 침전법에 따라, 각 실험에 사용된 조단백질 용액에 완충액 A (0.5 M KCl, 5 mM dithiothreitol 및 0.1 mM p-amidinophenyl methane sulfonyl fluoride hydrochloride가 함유된 0.05 M triethanolamine-HCl, pH 7.0)를 첨가한 100 μ l에 최종농도 0.125 mM (3 μ l첨가)되게 cold VB-C₆ (non-labeled)첨가 및 미첨가하여 실온에서 20분간 반응 후, 최종농도 69.6 nM(2 μ l첨가)되게 [³H]VB-C₇ (54.6 Ci/mmol) (Fig. 1)을 첨가하여 동일조건하에서 반응시킨 다음, 80% 포화 (NH₄)₂SO₄용액 (완충액 A 사용) 900 μ l를 넣어 원심분리(15,000 \times g, 10 분)하여 얻은 침전 (protein-ligand complex)을 100 μ l의 H₂O에 용해 후 10 ml의 toluene-용액 (toluene 500 g/l, Triton X-100(polyethylene glycol mono-p-isooctylphenyl ether, Nakarai Co.) 500 g/l, Omifluor(ppo, New England Nuclear Co.) 4 g/l)에 첨가하여 scintillation counting (Beckman LS 7500) 하였다.

[³H]VB-C₇에 대한 특이적인 결합은 cold VB-C₆의 첨가 및 미첨가시의 차이로서 산출하였다.

*S. virginiae*의 genome DNA조제

Lysozyme-EDTA-SDS를 이용한 Hunter(6)의 방

Table 1. Time course of Virginiamycin and Virginiae Butanolides (VBs) production.

Incubation Time (h)	Virginiamycin production Inhibitory zone (ϕ , mm)	VBs Activity ^b
10	None	None
24	24	15
36	20	16
48	13	15
60	12	15
	Control ^c	15
	- VB-C ₆	None
	+ VB-C ₆	15

None; not produced

^aThe amount of virginiamycin in each culture filtrates was measured by cup method as described in Material and Methods.

^bVBs production was detected by the measurement of virginiamycin inducing activity in each 100 μ l VBs solution prepared as described in Materials and Methods.

^cVB-C₆ (non addition) and +VB-C₆(50 ng/ml addition) were used as indicators for measuring virginiamycin inducing activity.

법을 변경하여 본 배양 10시간째의 *S. virginiae* 배양균체로부터 DNA를 분리하여 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 용해, 4°C에 보존하였으며, DNA의 정량은 UV (260 nm)법에 의해 50 μ g/ml를 흡광도 1로 하여 산출하였다.

DNA 공존하의 결합활성 측정

실험에서 사용한 반응액은 0.05 M KCl(혹은 0.5 M KCl)을 함유한 완충액 A로 100 μ l되게 조정하였으며, 반응시의 조성은 Table 3, 4에 나타내었다.

각각의 DNA (1 μ g/10 μ l), 균체 파쇄 후의 원심상징액(10 μ l) 및 cold VB-C₆ (0.125 nM)의 존재 혹은 비존재하에서 10 μ l의 결합 단백질용액(phenyl 5 pw HPLC 활성획분)을 첨가하여 실온에서 20분간 반응시킨후, [³H] VB-C₇ (69.6 nM)을 첨가하여 동일조건에서 반응시킨 다음 특이적인 [³H] VB-C₇결합활성을 측정하였다.

VB-C 결합단백질의 인산화

10 μ l의 Sephadex G-100 활성획분에 CaCl₂ (1 mM)와 MgCl₂ (1 mM)를 첨가하여 cold VB-C₆(30 μ M)존재 및 비존재하에서 10 μ M의 [γ -³²P] ATP (25 Ci/m mole, Amersham Co.)를 넣고 실온에서 2시간 반응시킨 후, 40 μ l의 2% SDS 용액 (2% SDS, 10% glycerol, 5% mercaptoethanol, 0.001% bromophenol blue, 0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8)으로 반응을 중지한 뒤, 100°C, 10분간 열변성시켜 4-20% gradient SDS 전기영동(Daiichi Co. ready made mini gel 사용)을 하였다. 인산화의 확인은 진조시킨 gel을 X 선 film(Kodak X-Omat AR-5)을 이용한 autoradiography로서 검출하였다(-70°C, 12

Table 2. Binding activity of VB-C binding protein at various incubation times

Incubation time (h)	Total protein (mg, 280 nm)	Specific [³ H] VB-C ₇ binding (10 ³ dpm/mg protein)
10	109.2	12.4
24	47.025	2.2
36	48.64	20.3
48	42.4	30.7
60	42.12	32.4

Each cell (2 g wet mycelia) was disrupted by sonicator for 1 min 2 times at 4°C, and crude protein solutin prepared by 30-50% saturation of solid ammonium sulfate was used. Each 30 μ l of crude protein solution was assayed for specific [³H] VB-C₇ as described in Materials and Methods.

시간).

결과 및 고찰

Virginiamycin 및 VBs생산의 경시적 변화

VB-C 결합단백질의 세포내에서 VB-C signal 전달 기구의 검토와 관련하여, *S. virginiae*의 virginiamycin 및 VBs생산의 경시적 변화를 조사한 결과를 Table 1에 나타내었다.

Yanagimoto등(17)이 보고한 VBs 및 virginiamycin의 최대 생산량이 각각 14시간, 18시간부터 24시간까지 일정하다는 결과와 일치하였으며, 생산된 virginiamycin의 경우 본배양 약 36시간부터 분해되어 60시간에는 거의 분해되는 결과를 보인 반면 (저지원 ϕ 12 mm; virginiamycin 농도-5 μ g/ml), VBs의 경우, 세포내에서 생산되어 사용되고 세포외로 방출된 여분의 VBs양이 본배양 60시간까지 거의 일정한 결과 (VBs 농도증가에 따라 유도량 증대, 미 발표)로부터,

항생물질 유도에 필요한 양만이 생산되어 상당히 안정한 상태를 유지하며, 이는 필요에 따라 세포외에 존재하는 VB가 세포내로 수송되기 위한 것으로 추정되었다.

VB-C 결합단백질의 경시적 결합활성 변화

VB-C 결합단백질의 존재량이 cell 당 30-40개(9)의 극히 적은양이 존재하는 점과 대다수의 자기조절인자가 수십 ng/ml(VBs의 유효농도; 수 ng/ml)(13)의 저농도에서 유도활성을 발휘하는 점에서 VB-C 결합단백질의 recycle기능이 예상되어 본배양 10시간부터 60시간까지의 경시적인 VB-C 결합활성 변화를 조사하였다. Table 2에서 보인 바와 같이, 본배양 10시간의 경우 지금까지 추정되어온 결과(세포내 물질생성 순서; VB-C 결합단백질, VBs, virginiamycin의 순)(9)와 같이 결합단백질이 생성 (VB-C 및 virginiamycin은 미생산) 되었으며 24시간의 경우 생성된 VB-C의 결합에 따라 (virginiamycin생산) [³H VB-C₇]과의 결합활성이 저하되었으며, 36시간부터 60시간까지의 경우, virginiamycin생산중지와 함께 결합한 VB-C₆가 결합단백질로부터 해리되어 [³H] VB-C₇과의 결합활성이 점차 증가하는 결과를 나타내었다. 이들 결과로부터 세포내에서의 극미량의 VB-C 결합단백질이 기능 발휘후 분해되지 않고 안정한 상태로 recycle된다고 추정되었다.

결합활성에 미치는 DNA의 영향

Signal전달기구에 있어서, steroid hormone receptor의 경우, DNA의 enhancer영역 (HRE : hormone response element)에 결합하여 전사조절을 실행하는 (3) 점과, A-factor 결합단백질의 경우 Miyake등 (12)은 A-factor비존재하에서 promotor와 결합하여 streptomycin생산을 억제하나, A-factor와 결합하여 promotor로부터 분리되어 promotor가 기능을 발휘하는 (streptomycin 생산개시) repressor로서의 가설을 보고하였으며 이같은 가설과 관련하여 VB-C 결합단백질의 genome DNA공존하의 결합활성(phenyl

Table 3. Effect of genome DNA on the VB-C binding activity

Procedure for binding activity measurement	Specific [³ H]VB-C ₇ binding (10 ³ dpm)	Relative activity (%)
	(0.05 M KCl)	
1) BP+DNA \longrightarrow \pm VB-C ₇ + *VB-C ₇	14.32	61
2) BP-DNA \longrightarrow \pm VB-C ₇ + *VB-C ₇	23.49	100
3) BP \pm VB-C ₆ + *VB-C ₇ + DNA \longrightarrow	20.91	89
4) -DNA \pm VB-C ₆ + *VB-C ₇ + BP \longrightarrow	23.42	99.7
5) +DNA \pm VB-C ₆ + *VB-C ₇ - BP \longrightarrow	-0.15	0

Ten μ l of the DNA solution(+DNA) or TE buffer alone(-DNA) was added. Incubation indicated by each arrow was done for 20 min at room temperature. Specific [³H] VB-C₇ binding activity was measured as described in Materials and Methods.

BP: Binding protein, \pm VB-C₆: plus or minus 0.125 mM non-labeled VB-C₆, *VB-C₇: 69.6 nM [³H]VB-C₇.

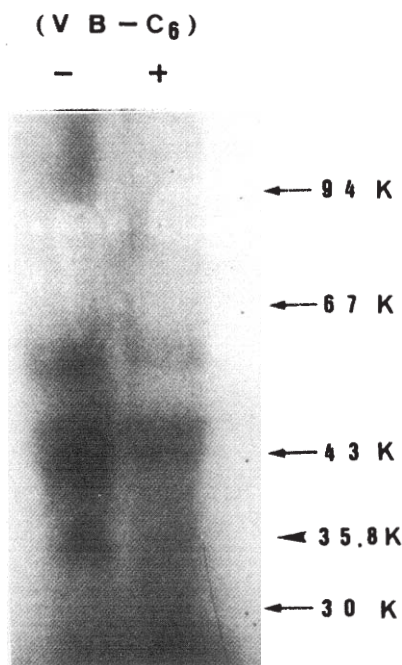
Table 4. Effect of genome DNA on the VB-C binding activity in the presence of cell-free extract and KCl

Procedure for binding activity measurement	Specific [^3H]VB-C ₇ binding (10 ³ dpm)	Relative activity (%)
(0.05 M KCl)		
1) BP+Sup \pm VB-C ₆ +*VB-C ₇ +DNA	32.09	87
2) BP+Sup+DNA \pm VB-C ₆ +*VB-C ₇	33.30	90
3) BP+DNA \pm VB-C ₆ +*VB-C ₇ +Sup	14.07	38.4
4) BP+Sup-DNA \pm VB-C ₆ +*VB-C ₇	36.65	100
0.5 M KCl (0.05 M KCl)		
6) BP+DNA \pm VB-C ₆ +*VB-C ₇	22.22(11.68)	98(55.3)
7) BP-DNA \pm VB-C ₆ +*VB-C ₇	21.49(21.06)	100(100)

Sup; Supernatant

Reaction conditions are identical to those described in Table 3.

"2 g of wet mycelia was sonicated and centrifuged for 10 min at 12000 \times g. Then the supernatant(Sup) was used as a cell-free extract.

**Fig. 2.** Phosphorylation of the partially purified VB-C binding protein.

Partially purified VB-C binding protein (concentrated Sephadex G-100 fraction, Kim *et al.*, 1990) was phosphorylated by [γ - ^{32}P] ATP with or without the non-labeled VB-C₆ and analyzed on the 4-20% gradient SDS-PAGE using autoradiography.

5 pw 활성획분 사용, 10)을 검토하였다. Table 3에서 보인 바와 같이 unbound form(VB-C와 미결합)의

경우 DNA공존시 약 40%의 결합활성저해(실험 1, 2)를 나타내었으며, bound form(VB-C와 결합)의 경우 DNA공존시(실험 3)도 약 10%정도의 결합활성저해를 보였다. 이는 DNA와 결합에 의한 결합단백질의 구조 변화에 따라 ligand(VB-C)와의 결합능 저해 및 ligand의 해리에 의한 결과로서 추정되며, 따라서 VB-C 결합단백질의 DNA와 결합가능성이 예상되었다. 또한, DNA에 의한 결합활성과 관련하여, Table 4에서 보인 바와 같이 unbound form의 경우 cell-free extract(상징액)공존시에 DNA공존에 의한 결합활성저하가 방지되었으며(약 50%, 실험 1, 2, 3), 0.5 M KCl존재시(실험 5, 6)에도 같은 결과를 보였다. 이는 steroid hormone receptor의 경우, Mo⁶⁺이온(2) 및 세포질성 인자인 modulator(16)가 ligand와의 결합 활성 안정에 관여하는 보고와 비교할때, ligand와의 결합을 위해 안정한 구조체를 유지하기위한 0.5 M KCl(9.10의 보고 재입증) 및 세포질성 인자(*S. virginaliae* 유래)의 존재가 예상되었다 (정제 step중 Phenyl 5 pw column HPLC전인 Sephadex G-100까지 부분 정제된 결합단백질의 경우 DNA공존에 의한 저해 효과 없음-세포질성 인자 공존 예상, 결과 미첨부).

VB-C 결합단백질의 인산화

진핵세포 유래의 여러가지 receptor의 signal전달 기구 중, 인산화 및 탈인산화를 통한 기능조절의 보고(15)와 관련하여 VB-C 결합단백질의 인산화 가능성을 검토하였다. 부분 정제된 Sephadex G-100 활성획분(10)에 cold VB-C₆존재, 비존재하에서 [γ - ^{32}P] ATP를 이용하여 인산화 반응을 시킨 결과, Fig. 2에서 보인 바와 같이 ligand(VB-C₆)와의 결합에 관계없이 분자량 약 36,000의 위치에서 인산화된 protein이 검출되었으며(VB-C 결합단백질의 분자량 약 36,000, 10) 이는 반응액중에 존재하는 protein kinase 혹은 결합 단백질의 autophosphorylation에

의한 것으로 추정되며, 또한 ATP첨가에 의한 결합 활성의 변화가 없는 결과(1)로부터 인산화에 의한 VB-C기능조절의 가능성도 예상되었다. 이상의 결과들을 기초로 하여, 앞으로 원핵세포에서 형태 분화 및 2차대사산물을 조절하는 호르몬성 물질의 signal전달 기구를 해명하기 위해, VB-C결합단백질을 토대로 하여 VB-C자극에 의한 세포내 Ca^{2+} 이온 및 nucleotide의 거동, 결합단백질의 DNA와 결합부위 및 결합에 의한 전사조절의 변화, 인산화 및 탈인산화에 의한 VB-C전사효과 및 다양한 변이주(예; VB, 결합 단백질 결손변이주)를 이용한 VB, 결합 단백질의 기능등이 연구되어야 할 과제이다.

사 사

이 논문은 1991년도 교육부지원 한국학술진흥재단의 자유공모(지방대학 육성)과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- 김현수, 1992. *Streptomyces virginiae*가 생산하는 virginiae butanolide C (VB - C) 결합단백질의 결합활성에 미치는 일반적인 특성. 산업 미생물 학 회지, 투고 중.
- Dahmer, M.K., P.R. Housley and W.B. Pratt, 1984. *Annu. Rev. Physiol.* **46**, 67-81.
- Evans, R.M., 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, **240**, 889-895.
- Gräfe, U., W. Schade, I. Eritt and W.F. Fleck, 1982. A new inducer of anthracycline biosynthesis from *Streptomyces viridochromogenes*. *J. Antibiot.* **35**, 1722-1723.
- Gräfe, U., G. Reinhardt, W. Schade, I. Eritt, W.F. Fleck and L. Radics, 1983. Interspecific inducers of cytodifferentiation and anthracycline biosynthesis from *Streptomyces bikiniensis* and *S. cyaneofuscatus*. *Biotechnol. Lett.* **5**, 591-596.
- Hunter, I.S., 1985. DNA cloning, pp. 19-44, IRL Press, Oxford Washington DC.
- Kleiner, E.M., S.A. Pliner, V.S. Soifer, V.V. Onoprienko, T.A. Balashova, B.A. Rosynov and A. S. Khokhlov, 1976. The structure of A-factor, a bioregulator from *Streptomyces griseus*. *Bioorg. Khim.* **2**, 1142-1147.
- Kondo, K., Y. Higuchi, S. Sakuda, T. Nihira and Y. Yamada, 1989. New virginiae butanolides from *Streptomyces virginiae*. *J. Antibiot.* **42**, 1873-1876.
- 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.
- 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.
- Miyake, K., S. Horinouchi, M. Yoshida, N. Chiba, K. Mori, N. Nogawa, N. Morikawa and T. Beppu, 1989. Detection and properties of A-factor binding protein from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **171**, 4298-4302.
- Miyake, K., T. Kuzuyama, S. Horinouchi and T. Beppu, 1990. The A-factor-binding protein of *Streptomyces griseus* negatively controls streptomycin production and sporulation. *J. Bacteriol.* **172**, 3003-3008.
- 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.
- Okamoto, S., T. Nihira, H. Kataoka, A. Suzuki and Y. Yamada, 1992. Purification and molecular cloning of a butyrolactone autoregulator receptor from *Streptomyces virginiae*. *J. Biol. Chem.* in press.
- Oriti, E., D.B. Mendel, L.I. Smith and A. Munck, 1989. Agonist-dependent phosphorylation and nuclear dephosphorylation of glucocorticoid receptors in intact cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 9728-9731.
- Peter, V., and L. Gerald, 1988. Evidence that the modulator of the glucocorticoid-receptor complex is the endogenous molybdate factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 1462-1466.
- Yanagimoto, M. and G. Terui, 1971. Physiological studies on staphylomycin production. (II) Formation of a substance effective in inducing staphylomycin production. *J. Ferment. Technol.* **49**, 611-618.

(Received April 1, 1992)

(Accepted April 21, 1992)

ABSTRACT: Some Properties on the Signal Transduction in *Virginiae* Butanolide C Binding Protein

Hyun-Soo Kim (Department of microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea)

Virginiae butanolide C (VB-C) binding protein binds to virginiamycin inducing factor and the protein may function as a possible pleiotropic signal transducer. To further understand signal transducing mechanism, some properties of VB-C binding protein were investigated. VB-C binding activity was gradually increased during 60 hrs incubation; whereas the amount of produced VBs was not changed. However, VB-C binding activity was decreased by 30-50% in the presence of genome DNA. The binding protein could be phosphorylated by [γ - 32 P] ATP. These results suggest that the DNA binding and phosphorylation may be involved in signal transducing mechanism.