

Streptomyces coelicolor bldA-like Mutant에서의 항생물질 생합성

박 은 미

수원대학교 유전공학과

*Streptomyces coelicolor*를 화학적 방법으로 돌연변이시킨 결과, 유전적 교잡방법에 의해 *bldA*와 유사한 위치인 10시 방향으로 위치가 결정되는 변이주들을 찾아내었다. 이들의 자세한 위치를 점검한 결과 *cysA*를 중심으로 반시계 방향으로 떨어져 있는 group과 시계방향으로 떨어져 있는 두가지로 나뉘었다. 반시계 방향으로 떨어져 있는 변이주들을 *bldA*와 유사한 변이주라고 생각되어 이를 확인하기 위해 정상적인 *bldA* 유전자가 cloning되어 있는 phage를 이용하여 기능적인 complementation 여부를 확인하여 보았다. Complementation이 되는 것으로 미루어 보아 이 변이주들이 *bldA*의 allele일 가능성이 매우 높으나 이들중 몇몇 변이주들은 기존의 *bldA*와 무척 다른 양상을 보였다. 즉, 고영양 배지인 R₂YE배지에서 왕성하게 spore를 생산하며 wild type이 생산하는 이상의 색소 생산을 보인 점이다. 이때까지 발견된 *bldA* 변이주들은 배지 조성에 따라 약간의 aerial mycelium을 형성하는 것이 보고되었으나 이렇게 조건에 따라서는 완전히 *bld* phenotype을 잃는 변이주는 보고되지 않았다. 이 색소 생산이 실제로 항생물질 유전자의 발현에 의한 것이라는 것을 *xyfE* fusion을 이용했을 때 유전자의 전사가 일어나는 것이 확인됨으로써 증명되었다. 또 이들 *bldA* 유사 변이주들은 *actII*-ORF4가 높은 copy수로 들어있는 plasmid에 의해 *act* 유전자를 발현하는 것도 관찰되었다.

KEY WORDS □ *Streptomyces coelicolor*, *bldA* group mutants, media dependent phenotype

방선균류는 보통 단세포 bacteria와 다르게 형태적으로 또 생리학적으로 분화의 모습을 보인다. 형태학적으로는 기균사체(aerial mycelium)라고 불리는 특수한 형태를 만든 후 포자를 형성하여 이때 생리학적으로는 2차 대사산물(secondary metabolite)이라고 불리는 vegetative growth에서는 만들지 않는 여러가지 물질을 합성하게 된다(6). 이렇게 동시에 형태적 분화와 생리적 분화가 일어나는 것으로 미루어 보아 어떤 공통된 조절 물질의 작용이 있을 것으로 짐작되어진다(4, 15). 방선균류 중에서 *Streptomyces coelicolor*류는 분화의 연구에 있어서 선도적인 역할을 해왔다. 많은 돌연변이 균주들을 이용하여 genetic mapping이 가능하며(18), phage(7)와 plasmid를 이용한 유전자 재조합 기술도 많이 축적되었기 때문이다. 특히, 이 균주는 4가지 종류의 항생물질을 생산한다. 그중 두가지 종류의 항생물질은 색깔을 가지고 있다. *S. coelicolor*의 대사물질 중 색깔을 띄는 것은 이 두가지 항생물질 뿐이므로 색소의 강약을 관찰하는 것이 곧 항생물질의 발현을 가름하는 척도로 사용된다. 그러므로, 돌연변이를 유발시킨 후 색소를 포함하지 않는 변이주들을 골라내면 두가지 항생물질의 발현에 공동으로 관여하는 조절인자(pleiotropic regulator)를 만드는 유전자에 돌연변이가 생긴 변이주들을 많이 포함하게 된다. 물론 두가지 항생물질의 구조 유전자 각각에 모두 돌연변이가 생긴 이중 돌

연변이주도 포함이 되지만, 이중 돌연변이가 생길 확률은 매우 작으므로 상대적으로 찾기 어려운 조절 유전자의 돌연변이를 쉽게 찾을 수 있게 된다. 그런 이유 때문에 *abs*, *aba* 등의 다른 류에서는 발견되기 어려운 조절 유전자들이 발견되었다. 이밖에도 *bld*, *whi*, *afs* 등으로 불리는 다양한 조절 유전자들이 발견됨으로써 분화와 관련된 유전자들의 발현을 연구하는데 큰 역할을 하고 있다.

Abs 변이주(1, 2)들은 4가지 항생제 모두가, *aba* 변이주(9)는 3가지 종류의 항생제, *afs* 변이주는 2가지 색깔있는 항생제만이(12, 13) 만들어지지 않는, 조절 인자에 이상이 있는 pleiotropic 변이주들이다. *Whi* 변이주는 항생제는 만들 수 있고 aerial mycelium도 만들지만 spore를 만들지 못하는 변이주이다. 한편, *bld* group에 속하는 변이주들은(4, 15) 형태적 분화와 생리적 분화가 억제되어 항생제도 못 만들 뿐 아니라 aerial mycelium도 만들지 못하는 특성을 보인다. 다른 변이주들이 어느 한쪽만 이상이 있는 것과 비교할 때 *bld* group은 분화의 상당한 앞 단계 물질에 이상이 생긴 것으로 보여진다. *Bld* 변이주들도 한가지 위치에 mapping하지 않고, 서로 다른 5가지의 자리에 mapping하는 다양한 변이주들이 알려지면서 *bld* pathway 자체도 상당히 복잡한 것임을 제시하고 있다.

여러가지 *bld* 변이주 중 가장 쉽게 발견되는 것이 *bldA* 변이주이다. 가장 먼저 발견되기도 한 이 *bldA*

유전자를 clone한 결과(14), 그 생산물이 tRNA라는 것이 밝혀지게 되었다. Vegetative growth에는 별로 쓰이지 않는 UUA codon을 인지하여 leucine을 가져다 주는 이 tRNA는 2차 대사로 넘어가는 조절물질을 합성하는 데는 꼭 필요한 것으로 여겨진다. 그러나, 이 tRNA가 그런 조절기작에 어떻게 구체적으로 관여되어지는지는 아직 밝혀지지 않고 있다. 저자는 다수의 *bld* 변이주 중에서 *bldA*와 그와 유사한 변이주들을 여러가지 골라내었다. 이런 변이주들의 항생제 발현이 억제되는 이유를 여러가지 방법을 통해 접근하여 보았다.

재료 및 방법

Bacteria 균주들과 phage

이 실험에서 사용된 균주들은 *S. coelicolor* A3(2)로부터 유래된 것들이다. Phage인 KC603, KC900을 배양하기 위해서는 *S. lividans* 1326이 쓰여졌다. KC603과 KC900이 만들어진 과정은 참고문헌 3, 17에서 각각 자세히 설명되어 있다. 이 실험에서 사용한 모든 균주들의 목록이 Table 1에 있다.

배양방법

Minimal media, R₂YE 등 모든 media는 Hopwood(11) 등에 의해 설명된 대로 사용하였다. 단, maltose가 든 R₂YE media는 보통의 R₂YE media에서 사용하는 glucose를 maltose로 치환한 것이다. 균주의 배양, 유전적 교잡의 방법, spore의 분리 등도 Hopwood(11)에 의해 설명된 방법을 따랐다. 그러나, spore 분리시에는 주사기 대신 1000 μ l Eppendorf tip중간부분에 숨을 끼워서 멸균하여 사용하는 방법으로 치환하였다.

유전적 mapping 방법

Chromosome간의 recombination은 plasmid SCP1에(18) 의해 이루어지는데, 이 SCP1은 9시 방향으로 chromosome에 삽입되었다. SCP1의 삽입은 두가지 phenotype으로 확인할 수 있다. 첫째는, agar를 분해하는 능력이 상실되는 점이다(10). *Aga*⁺ 균주들은 일반적으로 고체배지가 가지고 있는 agar를 분해함으로써 파 들어가는 듯한 모양의 colony를 이룬다. 그러나, SCP1의 삽입이 agarase 유전자를 파괴시킴으로 NF strain은 편편한 모양의 colony를 이룬다. 둘째, phenotype은 *mmv* 유전자가 SCP1에 있으므로(19) NF가 될 때 *mmv*⁺가 되는 것이다. NF×SCP1⁻ cross (Fig. 1)의 경우에는 거의 100%에 가까운 자손들이 NF가 되며 9시 부분을 제외하고는 대부분 SCP1⁻의 marker를 취하므로 Fig. 1의 경우 대부분의 자손들이 *hisA1*, *strA1*으로 남는 경향을 보인다. 그러므로 9시부터 12시까지의 marker들의 분포만의 mapping 정보를 주게 되며 반면, NF×NF의 경우에는 한쪽으로 치우치는 일이 없이 어떤 marker를 살아남게 했느냐에 따라 고른 경사도를 이루는 결과를 보인다.

Transduction과 보완실험

Bld 변이주들에 대한 KC603을 이용해 실시하는 transduction에 의한 보완 실험은 다른 곳(4, 17)에서 설명된 그대로이다. KC603 phage 용액을 *bld* 변이주가 이미 도말되어 있는 R₂YE plate에 80 μ l 정도를 한 군데에 떨어뜨려 주고 마를 때까지 기다린다. Phage가 떨어뜨려진 자리를 표시를 해 놓았다가 그 자리에 sporulation이 되는지 관찰하고 그 표 A안에 자란 mycelium은 viomycin이 있는 배지에 도말하여 lysogenize된 colony를 찾는 것이다.

Catechol 2,3-deoxygenase (xy/E) activity

Reporter로서 삽입된 xy/E 유전자(3)의 역가측정은

Table 1. Strains of *S. coelicolor*, phage and plasmid used in this study.

Strain, phage and plasmid	Relevant genotype	Source
<i>S. coelicolor</i>		
J650	<i>cysD18</i> , <i>methB2</i> , <i>agarA1</i> , NF, SCP2 ⁺	K. Chater
1514	<i>proA1</i> , <i>cysA15</i> , <i>argA1</i> , <i>uraA1</i> , <i>nicA1</i> , <i>agaA1</i> , NF, SCP2 ⁺	K. Chater
J1501	<i>hisA1</i> , <i>uraA1</i> , <i>strA1</i> , SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>Pgl</i> ⁻	K. Chater
B2	<i>hisA1</i> , <i>uraA1</i> , <i>strA1</i> , <i>bld-b2</i> , SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>Pgl</i>	This work
B4	<i>hisA1</i> , <i>uraA1</i> , <i>strA1</i> , <i>bld-b4</i> , SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>Pgl</i> ⁻	This work
B16	<i>hisA1</i> , <i>uraA1</i> , <i>strA1</i> , <i>bld-b16</i> , SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>Pgl</i> ⁻	This work
B27	<i>hisA1</i> , <i>uraA1</i> , <i>strA1</i> , <i>bld-b272</i> , SCP ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>Pgl</i> ⁻	This work
abs8752	<i>hisA1</i> , <i>uraA1</i> , <i>strA1</i> , <i>abs-8752</i> , SCP1 ⁻ , SCP2 ⁻ , <i>Pgl</i> ⁻	W. Champness
604	<i>hisA1</i> , <i>uraA1</i> , <i>strA1</i> , <i>act</i> ⁻ , <i>red</i> ⁻	W. Champness
Phage		
ΦC31KC603	C ⁺ ΔattP and <i>bldA</i> ⁺ insert <i>Vio</i> ^r	K. Chater (17)
ΦC31KC900	C ⁺ ΔattP <i>Vir</i> ^r <i>Vph</i> ^r <i>actI</i> ::xy/E fusion	K. Chater (3)
Plasmid		
pAT107	2.5 kb <i>Sph</i> I <i>actII</i> -ORF4 insert	W. Champness (5)

SCP1, *S. coelicolor* plasmid1; SCP2, *S. coelicolor* plasmid2; NF, SCP1 is integrated into the chromosome at 9 o'clock(see text) *Pgl*⁻, ΦC31 sensitive; *Vir*^r, viomycin resistant; *tsr*^r, thiostrepton resistant.

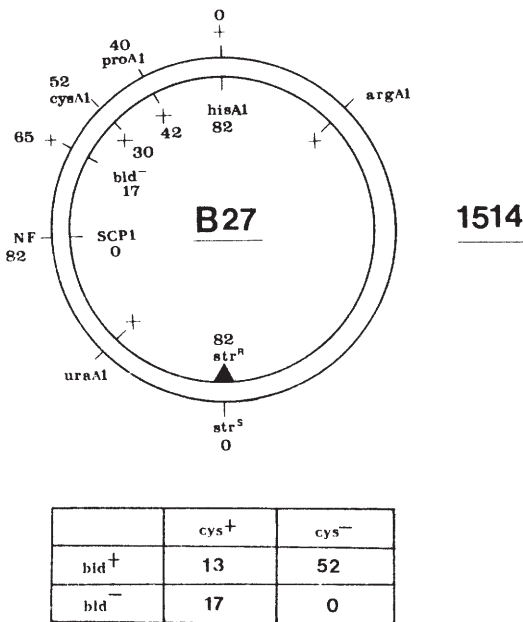


Fig. 1. Determination of the location of the B27.

Bld mutant B27 was mixed with 1514, and the recombinant colonies were detected without any selection. Since B27 was UF and 1514 was NF, most of the B27 marker was dominated in recombinants except 9 o'clock region. This principle generated a sharp gradient between *SCP1* and *hisA*, and *bld* marker can be most fittable between *SCP1* and *cysA*.

다음과 같다. 우선 R₂YE agar plate에 원하는 균주를 가로, 세로, 2 cm 가량을 조밀하게 도말한다. 3일 정도 30°C에 기른 후에, plate 위에 spray를 사용해 0.5 M의 catechol 용액을 뿌려준다. 빛의 차단을 위해 aluminum foil로 싸서 3시간 동안 상온에 보관한 후 노란색이 생겼는지를 확인한다. 빛이 들어가면 갈색이 생기게 되어 노란색을 식별하는데 방해가 된다.

Protoplast 만드는 법과 transformation

*S. coelicolor*는 protoplast를 만들어야만 clone된 plasmid를 transform할 수 있다. Protoplast 만드는 법은 Hopwood *et al.*(11)을 따랐다. Transformation도 Hopwood *et al.*(11)을 따랐으나 T buffer 대신 25% PEG 1000이 든 P buffer를 사용하였으며, protoplast와 DNA를 고체 배지에 뿌려준 후 18시간 정도 경과 후 1 ml/ 물에 8 µl의 thiostrepton stock solution을 희석하여 고체배지에 고르게 퍼져서 스며들게 함으로써 transformant만 자라게 하였다.

결과 및 고찰

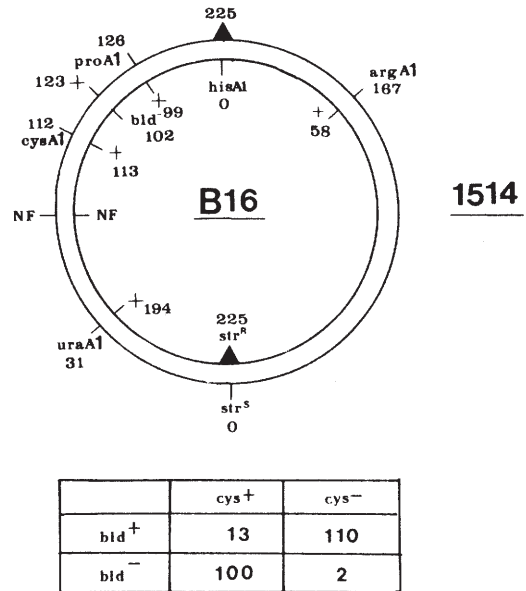


Fig. 2. The location of the B16 on *S. coelicolor* genetic map.

Recombinants between B16 and 1514 were selected on minimal plates containing streptomycin. Parental B16 was selected against because of *his* marker and parental 1514 were selected against because of streptomycin. Recombinants show overall gradients between *hisA* and *str^R*. B16 marker was repeatedly mapped counter clockwise *cysA*, which might be new location as a *bld* mutant.

Bld mutant의 추출과 phenotype의 분석

본 실험실과 협력관계에 있는 W. Champness 박사의 실험실에서 화학적 방법을 통해 돌연변이를 유발시켜, 추출된 30여개의 *bld* 변이주 후보를 하나하나 유전학적 방법에 의해 분석하여 보았다. 이 *bld* 변이주 후보들은 J650 strain과 mating을 시켜 얻어진 spore들을 냉동보관하여 보존한 것이었다. *Bld* 변이주들은 spore를 만들지 못하므로 오래 보존할 수 없지만 conjugational mating에서는 조절물질 전달이 일어나므로 당대에 한해 spore를 만들 수 있는 점을 이용한 것이다. 그러므로 J650 parental strain은 물론 여러가지 recombinant가 섞여 있었기 때문에 streptomycin이 든 minimal plate에서 serial dilution을 하여 *his*, *ura* 인 *bld* strain을 다시 골라 내어 original 변이주 대신으로 사용하였다.

보통 wild type strain의 경우는 aerial mycelium의 형성은 30°C에서 3일 정도 있으면 이루어지는데 반해 *bld* 변이주들은 항생제 생산은 물론 aerial mycelium도 생산하지 않는 변이주로서 정의되어 있다. 그

Table 2. Effect of the various media on expression of *bld* phenotype.

Media	Strain	<i>bldA</i>		B27		B18	
		amy	pig	amy	pig	amy	pig
glucose minimal		—	—	—	—	—	—
glucose minimal+SO ₄ (5 mM)		—	—	—	—	—	—
glucose minimal+PO ₄ (15 mM)		—	—	—	—	—	—
glucose minimal+high calcium		—	—	—	—	—	—
maltose minimal		+	—	++	—	++	+/-
R ₂ YE		+++	—	—	—	+++	+++

amy, aerial mycelium; pig, pigmentation.

러나, 이제까지 발견된 *bldB*를 제외한 대부분 *bld* 변이주들이 glucose나 cellobiose가 아닌 maltose, arabinose, galactose, glycerol 등의 다른 carbon source가 있는 minimal medium에서는 aerial mycelium을 형성하는 것으로 관찰되어졌다. 이런 media에 따른 aerial mycelium의 형성은 wild type의 aerial mycelium의 형성과 비교했을 때 완전하지 못한 경우가 대부분이고 *bld* 변이주 종류에 따라서 심한 차이를 보인다. 또한, 항생물질 생산의 경우도 media 종류에 따라 항생물질을 만드는 *bld* 변이주들도 있었다. 그러므로 새로운 *bld* 변이주 후보에 대해 여러가지 media에서의 phenotype을 검사하는 것은 어떤 group에 속하는지 아는데 첫번째 test로서 많이 이용된다. 30여개의 후보중에서 20여개가 maltose media에서 *bldA*처럼 약간의 aerial mycelium을 형성하였다. 이들중 phenotype이 분명하고 건강한 7개의 변이주들에 대하여 유전학적 분석을 시도했다.

Mating을 이용한 mapping

Table 1에 표시된 7개의 *bld* 변이주 중에서 B2, B4, B6, B18, B27의 5개는 *cysA*로부터 반시계 방향으로 mapping되었다. Fig. 1이 B27과 1514 strain과의 mapping 결과를 나타내고 있다. 시계로 치면 9시 방향에 있는 NF marker와 12시 방향에 있는 *hisA* marker 사이에서 1514가 가지는 marker들은 반시계 방향으로 그 빈도가 더 많이 나타나는 것이 관찰된다. 안쪽 원에 표시된 B27의 marker들은 시계방향으로 점점 빈도가 많이 나타나는 것을 알 수 있다. *Bld*⁺는 1514에 속한 marker이고 *bld*⁻는 B27의 marker이므로 *bld*의 위치를 NF와 *cysA* 사이에 두는 것이 자연스러운 결과이다. 아울러서 *bld*와 *cysA*와의 linkage를 조사하였다. 만약 *bld*가 *cysA* 가까이에 있다면 parental type이 *cysA*⁻, *bld*⁺와 *cysA*⁺, *bld*⁻가 recombinant인 *cysA*⁺*bld*⁺나 *cysA*⁻*bld*⁻보다 훨씬 많이 관찰될 것으로 예상된다. Fig. 1의 밑부분에 있는 것처럼 parental type이 많이 관찰됨으로써 *cysA*에 가까이 있는 것으로 보인다.

한편 7개의 변이주중에서 2개의 변이주 즉, B16, B26은 앞의 group과 상당히 가깝게 위치하나 약간 다른 위치 즉, *cysA*와 *proA* 사이로 그 위치가 map-

ping되었다(Fig. 2). *proA*와 *cysA* 사이에 발견된 *bld* 변이주들은 이제껏 없었으므로 이 두 변이주가 정말 새로운 종류의 *bld* 변이주인지 아닌지를 확인하기 위해 더 많은 연구가 진행되고 있는 중이다.

BldA group에 속하는 변이주들의 여러가지 media에서의 항생물질 발현.

우리가 *bld* 후보들을 mapping하는 동안 이들의 phenotype이 각각의 후보별로 조금씩 다른 양상을 나타내는 것이 관찰되었다. B18의 경우 *bldA*와 유사한 것으로 mapping되었으나 영양이 좋은 media인 R₂YE(R5)에서는 많은 양의 색소를 생산하며, sporulation도 어느 정도 가능성이 관찰되었다. 각 변이주 후보들의 여러가지 media에서의 성격을 알아보기 위해 Table 2에서 처럼 여러 종류의 배지를 만들어 media에 따르는 항생물질 발현을 살펴보았다.

가장 두드러지게 색다른 반응을 보이는 B18의 경우는 R₂YE(R5) media에서의 색소의 생산이었다. 종래 *bldA* 변이주는 maltose 배지에서 약간의 aerial mycelium이 관찰됨으로써 condition에 따른 반응의 가능성을 제시해 주었다. 그러나, *bldA*가 나타내는 aerial mycelium의 정도는 wild type의 것과 비교시 매우 적은 양이었다. 그런데, B18의 경우는 maltose가 든 R₂YE(R5) media에서는 aerial mycelium뿐 아니라 완전히 spore가 만들어져서 성숙되어 있었으며 wild type보다도 많거나 비슷한 양을 보였다. 뿐만 아니라 아주 짙은 색을 나타낼 만큼 색소생산도 wild type보다 뒤지지 않았다. 그런데, 이렇게 왕성하게 자란 spore를 glucose minimal plate에 접종하면 전혀 색소를 나타내지 않았다.

BldA clone에 의한 complementation test

B18, B27은 여러가지 media에서 *bldA*와 매우 다른 phenotype을 보였다. 단순히 B18, B27이 *bldA*보다 더 약한 변이주라면 minimal에서나 R₂YE에서나 모두 약한 phenotype을 보일 것으로 예상할 수 있으나 media에 따라 달라짐을 보였다. 그래서, 이들 변이주들이 *bldA* clone에 의해 complement되는지를 알아보기로 했다.

Piret과 Chater에 의해 만들어진 *bldA* clone은 phageC31을 vector로 하여 *bldA* 유전자를 포함한다고 생각되는 5.6 kb chromosomal insert를 가지는

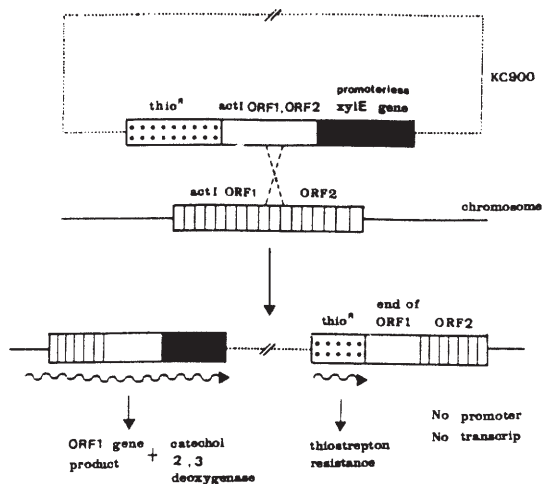


Fig. 3. Construction of a chromosomally located *actI::xylE* fusion using KC900.

The small fragment containing ending parts of *actI*-ORF1 and the starting parts of *actI*/ORF2 was inserted into phage vector and used to direct integration of the KC900 phage into the chromosomal *actI* region, disrupting the transcription unit that contains *actI*, and placing *xylE* (black) under the control of the *actI* promoter region. This phage vector was constructed as reference and kindly given to the author. This illustration was developed according to the explanation of the original paper of the Bruton *et al.* (3).

phage clone이다(17). KC603이라고 불리는 이 phage는 Chater 실험실에서 발견한 6개의 다른 *bldA* 변이주들을 complement하였다(17). 이 KC603은 attachment site가 delete되었기 때문에 *bldA* region과 homologous recombination을 하여야 안정되게 발현될 것이다.

B18과 B27을 KC603으로 infect하여 lysogen을 찾았을때 이들은 sporulation도 하고 항생물질도 생산함으로써 이 clone에 의해 complement되었음을 알았다. 그러므로 B18, B27은 *bldA*의 서로 다른 allele이거나 적어도 *bldA*에 의해 complement되는 유전자에 변이가 생긴 것으로 여겨진다.

xylE fusion을 이용한 항생물질 유전자 발현의 측정

Media에 따라 특별히 많은 색소를 생산하는 *bld* 변이주들이 KC603에 의해 complement됨으로써 *bldA*의 allele일 가능성이 많아졌다. 그러므로 관찰되는 색소들이 진짜 *act*나 *red* 유전자가 발현되어서 생기는 것인지 확인하기 위하여 transcriptional fusion을 이용하였다.

Act 유전자 promoter에 자신의 promoter가 없는 *xylE* 유전자를 연결한 fusion을 Φ C31에 넣어준 것이

Table 3. Effects of *bld* mutation on transcription of a *actI::xylE* or a *red::xylE* fusion.

Strain	<i>xylE</i> activity
B18::KC900 (<i>actI::xylE</i> fusion)	++
B18::KC902 (<i>red::xylE</i> fusion)	++
<i>BldA</i> :: KC900	+/-
<i>BldA</i> :: KC902	+/-
604 :: KC900	+++
604 :: KC902	+++

KC900 phage이고 *red* 유전자를 report할 수 있는 phage가 KC902이다(3). Fig. 3에서 보는 바와 같이 KC900 phage는 자체의 attachment site가 제거되어 있기 때문에 정상적으로 lysogenize될 수 없다. 그러나 KC900에는 phage 유전자 뿐만 아니라 *act* 유전자의 일부가 함께 포함되어 있으므로 숙주 균주가 가지고 있던 *act* 유전자와의 homologous recombination에 의해 숙주의 염색체 안으로 삽입될 수 있다. 그리고, *act* 유전자 중간에 *xylE* 유전자를 promoter없이 연결하여 놓았기 때문에 결국 *xylE*의 발현이 숙주인 *act* 유전자의 promoter에 의해 결정되게 된다. 그러므로, *xylE*의 역가가 *act* promoter의 강도를 나타내는 척도로 이용되게 된다.

KC900과 KC902의 두가지 phage를 각각 B18에 infect하여 lysogen을 찾아 B18이 색소를 생산하는 media에서 자라게 한 후 조사한 결과 *xylE* activity가 상당히 측정되었는데 이것으로 B18이 나타내는 색소가 진짜로 *act*나 *red* 유전자의 발현에 의한 것이며 또한 *act*, *red*의 두 유전자가 모두 발현됨을 알 수 있었다(Table 3). 그리고, 604균주는 *act*나 *red*의 구조 유전자 각각에 돌연변이가 있어 아무 색소도 생산하지 못하는 균주이다. 그러나, 이 균주의 *act* 및 *red*의 promoter는 발현이 잘 되므로 fusion되었을 때 *xylE* 활성이 강하게 관찰되었다.

ActII-ORF4 plasmid를 넣어 주었을 때 *act* 유전자 발현

BldA 변이주는 UUA codon을 인지하여 leucine을 가져다 주는 tRNA 유전자가 기능을 못해서 생기는 변이주임이 알려져 있다. 이 UUA codon은 1차 대사에 필요한 단백질에는 포함되지 않은 것이고 2차 대사를 위한 중요한 조절 물질에 포함되기 때문에 그 물질의 결여에 의해 *bld*같은 여러가지 phenotype을 갖는 변이주가 생기는 것으로 추정되어진다. 그런데, 이 UUA codon이 *act* 유전자의 발현을 위해 꼭 필요한 positive regulator인 *actII*-ORF4안에 존재함으로써(8) *bldA* 변이주는 *act* 유전자에 대해서는 특별한 regulation을 보이는 것이 알려졌다(고찰 참조).

B18, B27 변이주의 *act* 유전자 발현을 관찰하기 위해 *actII*-ORF4가 high copy로 들어있는 pAT107 plasmid로(16) transformation해 보았다. Table 4에서 보는 바와 같이 pAT107 plasmid가 있는 B27은

Table 4. The degree of complementation by pAT107.

Strain	Media	R ₂ YE	Glucose minimal	Maltose minimal
B27		—	—	—
B27 with pAT107		++	+	++
abs8752 with pAT107		++++	++	++

Plasmid pAT107(5) which was obtained from a SphI library of M124 DNA in pIJ702 is the kind gift from W. Champness.

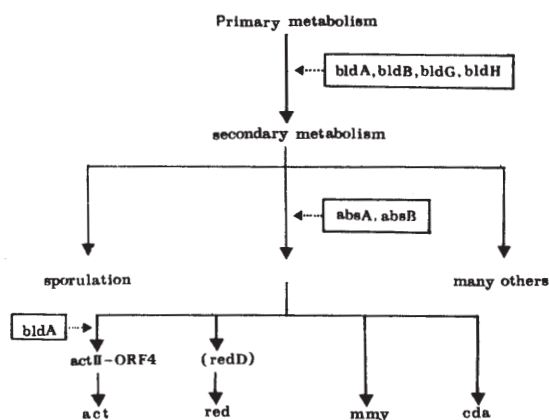
상당량은 *act*를 발현하였다. 그러나, abs8752에 pAT107 plasmid가 들어있는 clone에 비해서는 상대적으로 작은 양을 보였다. *BldA* 변이주들은 일반적으로 *actII-ORF4*에 stop codon과 같은 UUA codon이 있지만 *act* 색소를 생성하는 것으로 보고되어 있으므로 B27도 일반 *bldA*와 비슷한 양상을 보인 것으로 여겨진다.

이제까지 발견된 *bld* 변이주의 종류는 상당히 여러가지가 있으나 서로의 연관관계를 이해하는데는 어려움이 많이 있다. Sporulation과 항생물질 생산의 조절 mechanism을 좀 더 자세히 이해하기 위해서는 가능한 모든 *bld* type의 변이주가 밝혀져야만 그 pathway를 짐작하는데 도움이 될 것이다. 또한, 이렇게 새로운 *bld* 변이주를 찾으려는 시도에서 *cys*와 *pro* 사이에 map되는 변이주들도 새로운 후보일 가능성이 있다.

저자는 기존의 *bldA* group에 속할 것으로 생각되는 변이주들을 많이 찾았는데 이 결과는 다른 실험실에서도 우선적으로 많이 발견되는 *bld* 변이주들이 *bldA*인 것과 일치하는 것이다. 다만 많은 후보들을 분석하는 과정에서 종래의 *bldA*보다 훨씬 media에 따라 강한 sporulation과 색소를 띄는 conditional한 *bld* 변이주들을 볼 수 있었다.

BldA 변이주는 가장 먼저 발견된 *bld*로서 그 분자생물학적 이유가 특수 tRNA였음이 밝혀짐에 따라 (14) 많은 주목을 끈 변이주이다. 그렇지만 *bldA* 변이주에 대해 아직도 풀려지지 않는 몇가지 문제점이 남아 있다. 첫째는, tRNA 유전자라면 작은 유전자라고 볼 수 있는데 왜 80~90%의 *bld* 후보가 *bldA*로 귀착되는가 하는 것이다. 두번째는, UUA codon이 *actII-ORF4*에 존재하는 이유에(5, 8) 관해서이다. *Bld* 변이주는 sporulation과 항생물질 생산이 모두 안되는 변이주이기 때문에 regulation cascade에서 볼 때 상당히 앞선 부분의 어떤 조절물질의 결여로 생기는 변이주라고 짐작이 된다(Fig. 4).

그러므로, phenotype의 관점으로부터 보아도 *actII-ORF4*에 있는 UUA codon은 적어도 sporulation에는 전혀 상관없이 있는 것을 짐작할 수 있다. 실제로 pAT107같은 plasmid가 *bldA* 및 다른 *bld* 변이주에서 *act* 유전자 발현만을 유도하는 것으로 보아 *actII-ORF4*는 단지 *act* 유전자에만 관여하고 있음을 알

**Fig. 4.** Schematic drawing of proposed expression and/or activation dependence relationships.

All of the *bld* gene product seems to regulate some step involved in transition between primary metabolism and secondary metabolism. However *bldA* seems to have additional target, since expression of *actII-ORF4* includes translational dependence on the *bldA* tRNA.

수 있다. 그렇다면, *bldA*가 가지지 못하는 regulator는 *actII-ORF4*와는 상관이 없는 물질일 것이다. 그런데, *act* 유전자에 대해서 유독 또 하나의 regulation을 할 수 있게 *actII-ORF4*에 UUA codon을 두게된 이유는 흥미로운 일이다. 특히 최근에 *afsR*이 clone된 plasmid가 *bldA* 변이주에서 *red*만을 발현하게 하고 *act*는 발현하는 것을 도와주지 못함이 발견됨으로써 더욱 논란의 대상이 되고 있다(W. Champness와의 개인적인 정보 교환). 세번째 *bldA*의 문제는 그 phenotype이 배양 배지에 따라서 변한다는 점이다. 배양 배지를 glucose 대신 maltose를 사용하게 되면 aerial mycelium을 어느 정도 생산해 내는 것이 관찰되었다. 2차대사 자체가 환경에 따라서 좀 더 유리한 쪽으로 나아가려는 적응현상이라고 이해할 때 배지에 따른 변화는 오히려 당연한 것으로 생각될 수도 있다. 다른 종류의 방선균류에서도 그의 항생제 생산의 phosphate나 ammonium 이온의 농도에 따라 변하는 것이 관찰된 적이 있다(20). 그런데, 이번에 찾은 B18같은 경우는 변화의 정도가 매우 심했다. Maltose minimal 배지에서 sporulation을 보이는 동시에, R₂YE에서는 왕성한 sporulation과 더불어 강한 색깔을 보였으며, 이것은 R₂YE에서는 마치 *bld* 변이주가 전혀 아닌 것처럼 보일 정도였다. 그러나, R₂YE에서 자란 colony를 minimal plate로 옮기면 다시 *bld* phenotype을 보이는 것이다. 거의 conditional한 *bld*라 보일 정도의 media dependency를 보였는데 그런 점들이 환경을 monitor하는 기능과 어떤 관계가 있는 것인지 흥미롭게 생각된다. 그러

므로, 이 변이주가 배지에 따라서 이렇게 예민하게 변화를 하기 때문에 환경이나 배지 조건이 조절물질의 생산에 어떤 영향을 미치는지 좀 더 세밀히 관찰하는데 유용하게 사용될 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 연구를 진행하는데 받은 많은 도움에 대해 W. Champness 박사께 감사 드린다.

참 고 문 헌

1. Adamidis, T. and W. Champness, 1992. Genetic analysis of *absB*: A *Streptomyces coelicolor* locus involved in global antibiotic regulation. *J. Bacteriol.* **174**, 4622-4628.
2. Adamidis, T., P. Riggle, and W. Champness, 1990. Mutations in a new *Streptomyces coelicolor* locus which globally block antibiotic biosynthesis but not sporulation. *J. Bacteriol.* **172**, 2962-2969.
3. Bruton C.J., E.P. Guthrie, and K.F. Chater, 1991. Phage vectors that allow monitoring of transcription of secondary metabolism genes in *Streptomyces*. *Biotechnology* **9**, 652-656.
4. Champness, W.C., 1988. New loci required for *Streptomyces coelicolor* morphological and physiological differentiation. *J. Bacteriol.* **170**, 1168-1174.
5. Champness, W., P. Riggle, T. Adamidis, and P. Vandervere, 1992. Identification of *Streptomyces coelicolor* genes involved in regulation of antibiotic synthesis. *Gene* **115**, 55-60.
6. Chater, K., 1984. Morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. p. 89. In R. Losick and L. Shapiro(ed.), *Microbial development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
7. Chater, K.F., C.J. Bruton, A.A. King, and J.E. Suarez, 1982. The expression of *Streptomyces* and *Escherichia* drug resistance determinants cloned into the *Streptomyces* phage Φ C31. *Gene* **19**, 21-32.
8. Fernandes-Moreno, M.A., J.L. Caballero, and D.A. Hopwood, 1991. The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct target for translational control by the *bldA* tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* **66**, 769-780.
9. Fernandez-Moreno, M.A., A.J. Martin-Triana, D.A. Hopwood, and F. Malpartida, 1992. *AbaA*, a new pleiotropic regulatory locus for antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **174**, 2958-2967.
10. Hodgson, D. and K. Chater, 1981. A chromosomal locus controlling extracellular agarase produced by *S. coelicolor* A3(2) and its inactivation by chromosomal integration of plasmid SCP1. *J. Gen. Microbiol.* **124**, 339-348.
11. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Keiser, C.J. Brunton, H.M. Kieser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf, 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*, a laboratory manual. John Innes Foundation, Norwich.
12. Horinouchi, S. and T. Beppu, 1984. Production in large quantities of actinorhodin and undecylprodigiosin induced by *afsB* in *Streptomyces lividans*. *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2131-2133.
13. 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.
14. Leskiw, B.K., E.J. Lawlor, J.M. Fernandez-Abalos, and K.F. Chater, 1991. TTA codons in some genes prevent their expression in a class of developmental antibiotic-negative *Streptomyces* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**, 2461-2468.
15. Merrick, M.J., 1976. A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* **96**, 299-315.
16. Passantino, R., A. Puglia, and K. Chater, 1991. Additional copies of the *acrII* regulatory gene induce actinorhodin production. *J. General Microbiol.* **137**, 2059-2064.
17. Piret, J.M. and K. Chater, 1985. Phage-mediated cloning of *bldA*, a region involved in *Streptomyces coelicolor* morphological development. *J. Bacteriol.* **163**, 965-972.
18. Vivian, A., 1971. Genetic control of fertility in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Plasmid involvement in the interconversion of UF and IF strains. *J. Gen. Microbiol.* **95**, 96-106.
19. Wright, H.M. and D.A. Hopwood, 1976. Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* **95**, 96-106.
20. Young, M.D., L.L. Kempe, and F.G. Barder, 1985. Effect of phosphate, glucose and ammonium on cell growth and lincomycin production by *Streptomyces lincolnensis* in chemically defined media. *Biotechnol. Bioeng.* **27**, 327-333.

(Received November 25, 1993)

(Accepted December 29, 1993)

ABSTRACT: Antibiotic Biosynthesis in *bldA*-like Mutant of *Streptomyces coelicolor*

Park, Uhnmee (Department of Genetic Engineering, University of Suwon, P.O. Box 77, Suwon 445-743, Korea)

The author isolated 7 mutant candidates which mapped around *cysA* (which was 10 o'clock). They were divided into two groups. One of them was located counterclockwise to *cysA*, and the other was clockwise to *cysA*. Since *bldA* was mapped counterclockwise to *cysA*, the candidate which mapped counterclockwise to *cysA* was transduced with phage containing wild type *bldA* gene clone. The candidates might be the alleles of *bldA*, because they were complemented by *bldA* clone. However some of such mutants sporulated very well and developed as much pigment as wild type on rich media plate. Their phenotype was not like *bld* mutant at all on such conditions. There were real antibiotics gene expressions, since transcriptional reporter gene *xyIE* had shown high activities. Majority of the *bldA* like mutants showed *act* gene expressions when they were transformed with high copy number plasmid containing *actII-ORF4*.