

방선균의 이차대사산물 생산과 형태분화 조절의 메카니

강대경
(주)이지바이오시스템 생물자원 연구소

1. 서론

약 7억년 전에 *Bacillus subtilis*로 부터 분리되어 독립적으로 진화해 온 것으로 알려진 방선균 Genus *Streptomyces*는 균사상으로 성장하는 토양 미생물이다. 생육환경이 나쁠 경우에는 포자를 형성하고 있다가, 환경이 좋아지면 발아하여 기저균사, 기중균사 등의 과정을 거쳐 포자를 형성하는 생활환을 가진다. 이와 같이 방선균은 그람양성의 원핵생물이면서도 곰팡이와 같이 균사를 형성할 뿐만 아니라 진핵생물의 특징인 linear chromosome 을 가지고 있으므로, 원핵생물과 진핵생물사이의 boundary microorganism이라고 부르기도 한다.

*Streptomyces*는 이와 같이 복잡한 형태적 분화(morphological differentiation)뿐만 아니라, 항생물질이나 효소를 비롯한 수많은 생리활성물질을 생산하는 생리적 분화(physiological differentiation)를 한다. 전세계에서 발견된 6,000여종의 항생물질 중 60% 이상이 방선균 유래인데다, 각종 효소 등의 생리활성물질의 보고라고 일컬어질 만큼 산업적으로 매우 중요한 미생물이다. 또한 토양의 주요미생물로서 유기물 분해에도 중요한 역할을 하기도 한다.

1980년대부터 영국의 Hopwood group 등에 의해 연구, 개발되기 시작한 방선균 유전자 재조합기술로 말미암아, 방선균의 이차대사와 형태분화에 관한 유전학적 연구가 비약적으로 발전하게 되었다. 특히, 이러한 접근방법으로 이차대사산물 생산과 관련된 생합성효소 유전자뿐만 아니라 생합성 조절단백질을 coding 하는 유전자도 cloning하여 연구할 수 있게 되었다.

이러한 연구를 통하여, 방선균에서의 이차대사산물 생산과 형태분화는 서로 밀접하게 관련되어 tight하게 조절받고 있으며 매우 복잡한 조절 메카니즘을 가지고 있다는 사실이 밝혀지게 된다.

2. 이차대사산물 생산과 분화의 조절 메카니즘

(1) Small molecule signaling에 의한 조절

대부분의 경우에 signal processing은 외부의 signal이 cytoplasmic membrane내로 전달되고, 이어서 intracellular effector와의 interaction에 의해 일어나게 된다. 이러한 신호전달물질은 세포 내로의 신호전달뿐만 아니라 cell-cell communication 역할도 하게 되는데, 이러한 사실은 *Vibrio fischeri*, *Myxococcus xanthus*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* spp 뿐만 아니라 eucaryotic slime mold *Dictyostelium discoideum* 등에서의 연구를 통해서도 잘 알려져 있다. 세포 외부로부터 전달된 신호전달물질은 독소유전자의 발현, 형광물질 생산, 항생물질이나 효소 등의 생산 및 포자형성에 필요한 세포내의 다양한 유전자의 발현을 유도한다.

방선균에서 연구되고 있는 대표적인 저분자 신호전달물질은 γ -

butyrolactone ring을 가진 A-factor(2-isocaprolyl-3R-hydroxymethyl- γ -butyrolactone)이다. Table 1 에서 보는 바와 같이 A-factor는 그람음성 박테리아에서 많이 발견되고 있는 homoserine lactone-quorum sensing molecule과 유사한 구조를 가지고 있다. A-factor는 1967년에 러시아의 과학자인 Khokhlov에 의해 *Streptomyces griseus*의 배양액으로부터 발견되었는데, 항생물질 생산능이 결핍된 변이주에 이 물질을 첨가하면 항생물질 생산능이 회복된다는 사실로 주목받게 되었다. 그 후, A-factor에 관한 연구는 Beppu and Horinouchi group에 의해 더욱 심도 깊게 연구가 진행되어, A-factor 및 A-factor receptor protein에 의한 방선균의 이차대사 및 형태분화 조절 메커니즘이 규명되고 있다(Figure 1).

A-factor는 10^{-9} M 농도에서도 *S. griseus*의 streptomycin 생산, streptomycin에 대한 내성, 색소 생산, 기중균사 형성을 위한 switch 역할을 한다. nM 농도에서도 이러한 pleiotropic한 효과를 준다는 사실로부터 eukaryotic hormone receptor와 유사한 역할을 하는 receptor protein이 존재할 것으로 예상되었고, 꾸준한 연구를 통해 1995년에 Horinouchi group에 의해 A-factor와 specific하게 결합하는 A-factor receptor protein (ArpA) 및 이를 coding하는 유전자(*arpA*)가 발견되었다.

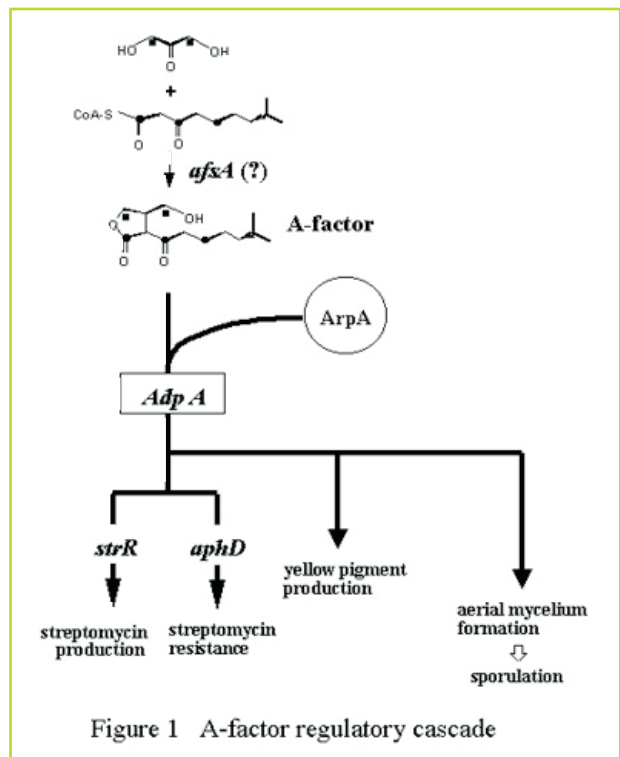
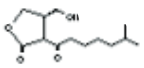
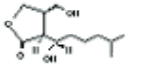
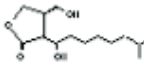
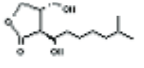
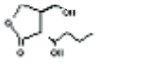
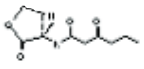
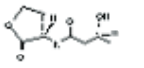
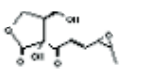
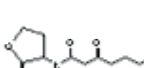
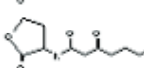
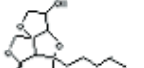


Figure 1 A-factor regulatory cascade

Table 1 Chemical signalling molecules having a γ -butyrolactone ring

Factors	Producer	Biological activities
	<i>Streptomyces griseus</i>	streptomycin sporulation
	<i>S. virginiae</i>	virginiamycin
	<i>S. chirimensis</i> <i>S. cyaneofuscatus</i>	anthracycline
	<i>S. viridochromogenes</i>	anthracycline
	<i>Streptomyces</i> sp. FRI-5	blue pigment
	<i>Vibrio fischeri</i>	bioluminescence
	<i>Vibrio harveyi</i>	bioluminescence
	<i>Streptomyces</i> sp. Y-86_36923	antibiotic
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	virulence
	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	conjugation
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	elicitor

ArpA는 homo dimer로서 streptomycin을 비롯한 각종 생리활성 물질 생산과 형태 분화에 필요한 유전자(*adpA*)의 promotor region에 결합함으로써 streptomycin을 비롯한 이차대사산물 생산과 형태 분화를 억제하는 repressor 역할을 한다. ArpA는 전사조절인자인 LysR family나 LacI family와 유사한 domain 구조, 즉 N-terminal operator binding domain과 C-terminal effector-binding domain을 가지고 있다. 세포내의 A-factor가 일정농도 이상 높아지면, *adpA*의 전사를 억제하고 있던 ArpA와 결합함으로써 ArpA가 *adpA*의 promotor로부터 해리되어 *adpA*의 전사가 일어나고, 따라서 이차대사 및 분화와 관련된 downstream gene들이 발현하게 된다.

A-factor 유사물질은 많은 다른 방선균에서도 발견되고 있는데, 이러한 A-factor 유사물질들은 *S. virginiae*에서의 virginiamycin 생산, *S. cyaneofuscatus*에서의 anthracycline 생산, *S. coelicolor*에서의 actinorhodin과 undecylprodigiosin 생산 등을 유도한다. 이와 같은 일련의 연구 결과들은, A-factor와 같은 γ -butyrolactone계 저분자 물질이 방선균에 광범위하게 존재하여 항생물질, 효소를 비롯한 각종 생리활성물질의 생산과 형태 분화를 조절한다는 근거를 뒷받침하고 있다.

(2) Protein phosphorylation 에 의한 조절

생물체내에서의 단백질 인산화 시스템은 eukaryotic Ser/Thr/Tyr phosphorylation system, prokaryotic two-component regulatory system, phosphoenol-pyruvate: sugar phosphotransferase system(PTS)로 나눌 수 있다. 단백질 인산화가 세포내의 기능과 생리활성을 조절한다는 것이 많이 밝혀져 왔고, 특히 eukaryote에서의 단백질 인산화는 세포 분화 및 발암, 세포 사멸 등에 중요한 역할을 한다는 사실이 널리 알려져 있다.

방선균에서도 단백질 인산화가 이차대사산물의 생산, 분화 조절과 밀접한 관계가 있다는 것이 kinase 또는 phosphatase inhibitor를 사용한 *in vitro* 실험을 통하여 제안된 이후, 이와 관련된 유전자들이 속속 클로닝됨으로써 그 메커니즘이 구체적으로 밝혀지게 되었다.

1980년대 중반에 밝혀진 two-component regulatory system은, 외부의 signal에 의해 cell membrane에 존재하는 sensor kinase의 histidine 잔기가 자기인산화된 후 partner인 response regulator의 aspartic acid 잔기에 인산기를 전달함으로써, 인산화된 response regulator가 세포내 대사를 조절하는 일련의 유전자들의 발현을 조절하게 된다는 것이다. Bacteria에 일반적인 two-component system은 방선균에서도 발견되었는데, *S. coelicolor*의 색소성 항생물질의 생산을 유도하는 *afsQ1/afsQ2*, *S. griseus*의 포자형성을 조절하는 *anfR* response regulator gene, sigma factor(SigE)의 전사를 조절하는 *cseB/cseC* 가 그 대표적인 예이다.

한편, 진핵생물에서 일반적인 Ser/Thr/Tyr 인산화 기구가 방선균에서도 존재하여 이차대사산물 생산과 형태분화를 조절한다는 연구결과가 1990년대 초에 들어와 밝혀지게 되었다. Fig. 2는 방선균에 prokaryotic two-component regulatory system과 eucaryotic Ser/Thr/Tyr phosphorylation system이 함께 존재한다는 것을 보여주는 모델로서, 세포외의 신호에 의해 AfsK kinase의 serine, threonine 잔기가 자기인산화되면, 인산화된 AfsK가 AfsR의 serine과 threonine 잔기를 인산화시킴으로써, 인산화된 AfsR이 색소성 항생물질의 생산을 유도하게 된다.

이러한 일련의 연구들에 의해, 방선균은 원핵생물에서 전형적인 two-component regulatory system 뿐만 아니라 진핵생물에서 일반적인 Ser/Thr/Tyr phosphorylation system도 가지고 있다는 것이 일반적인 사실로 받아들여지게 되었다.

(3) Stringent response factor에 의한 조절

세포의 분화와 이차대사산물의 생산은 대개 영양분의 제한과 함께 일어난다(이를 stringent response라고 함). Guanosine 5'-diphosphate 3'-diphosphate(ppGpp)나 guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate(pppGpp)와 같은 stringent response factor가 오래전부터 방선균에서도 발견됨으로써 이차대사산물 생산과의 관련성이 암시되었는데, 그 후 여러 그룹들에 의해 *S. aureofaciens*의 chlortetracycline 생산, *S. galilaeus*의 aclacinomycin 생산, *S. lavendulae*의 fomycin 생산과 밀접한 관련이 있다는 사실이 알려지게 되었다. 1980년대 후반에 들어와 ppGpp 생합성유전자인 *relA*가 *S. coelicolor* 및 *S. griseus*로부터 각각 cloning되었고 이차대사와의 관련성 연구를 통해, 세포내의 ppGpp level 및 GTP

pool이 항생물질 생산을 조절한다는 가설이 제안되었다. 한편, 이와 같은 연구를 통해 세포내의 ppGpp 및 GTP pool이 A-factor에 의한 조절기구와 서로 독립적이라는 것이 밝혀졌으며, 이는 이들 상호간에 독립적인 이차대사 조절기작이 존재한다는 것을 의미하고, 또한 세포내에서 상호간의 cross talk 또는 별도로 이차대사와 형태분화가 조절됨을 제시하고 있다.

(4) cAMP에 의한 조절

cAMP는 그람음성세균에서는 catabolite repression 및 독소 생산, 진핵생물에서는 신호전달기구의 second messenger로 잘 알려져 있지만, 그람양성세균에서는 오랜 기간동안 세포내에서의 그 역할이 알려지지 않았다. 최근 들어 방선균 *S. coelicolor* 및 *S. griseus*로부터 cAMP 생합성 유전자인 adenylate cyclase gene(*cyaA*)이

각각 cloning 됨으로써 방선균의 이차대사와 형태분화와의 관련성을 규명할 수 있게 되었다.

*S. griseus*의 경우를 좀 더 구체적으로 설명하면, A-factor에 비 의존적으로 이차대사산물 생산능과 포자형성능을 가진 *ArpA* 변이주(*S. griseus* HO2)를 host로 하여 *S. griseus* wild strain 유래의 gene library를 도입하는 shot gun cloning에 의해, *S. griseus* HO2의 이차대사산물 생산과 포자형성을 억제하는 유전자로서 adenylate cyclase gene(*cyaA*)을 획득하게 되었다. cAMP 생합성 효소를 coding하는 *cyaA*를 high copy number vector에 실어 *S. griseus* HO2에 도입하면 다량의 cAMP가 생산되며, streptomycin 및 yellow pigment 생산, 포자 형성능이 억제되었다. 한편 cAMP를 *S. griseus* HO2에서 다량 발현시키면 stringent response factor인 ppGpp의 세포내 축적이 저해되며, 수 종류의 단백질의 tyrosine 인산화 패턴이 growth stage-dependent하게 영향을 받는다는 것이 anti-tyrosine antibody를 사용한 Western blotting 실험에 의해 확인되었다.

이와 같은 실험들을 통해, 방선균 *S. griseus*에 있어서 A-factor regulatory cascade 뿐만 아니라, ppGpp 및 protein tyrosine phosphorylation이 개입된 cAMP regulatory pathway가 존재하여 조절기구간의 cross talk 또는 전혀 별개의 기작으로 방선균의 이차대사산물 생산과 분화를 조절한다는 가설이 제안되었다.

이상으로 방선균의 이차대사와 형태 분화를 global하게 조절하는 기작의 연구동향에 대해 간단히 요약해 보았다. 이외에도 영양분 등의 특정 대사물질, 특정 항생물질의 생합성에만 관여하는 pathway-specific 조절유전자, high G+C 미생물인 방선균에서 흔히 발견되지 않는 leucine UUA codon을 translation시키는 tRNA를 coding하는 *bldA* 유전자 등 여러 인자들이 방선균의 생리활성물질 생산과 형태분화를 조절하는 것으로 알려지고 있다.

3. 맺음말

방선균의 유전자 조작에 필요한 genetic tool과 technique이 지속적으로 개발됨으로써 형질전환효율 개선 및 targeted mutation,

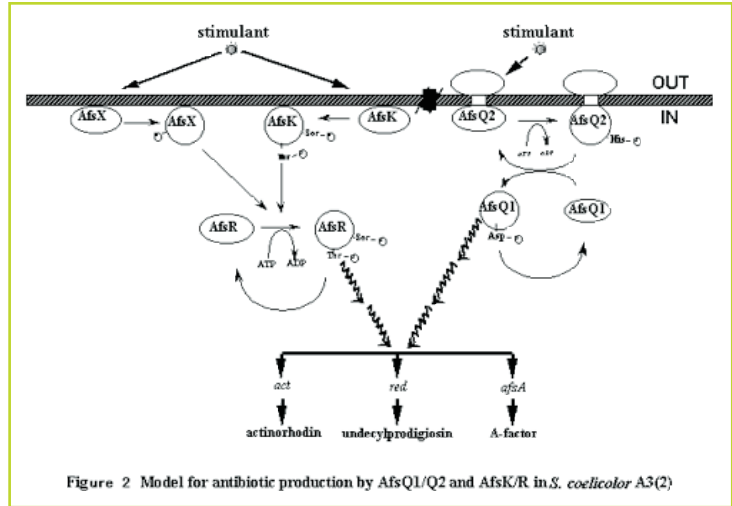


Figure 2 Model for antibiotic production by AfsQ1/Q2 and AfsK/R in *S. coelicolor* A3(2)

효율적인 균주 개량 등이 가능하게 되었다. 또한, 최근 들어 몇몇 방선균들의 genome에 대한 정보가 속속 밝혀지고 있다. 미국의 Diversa가 Celera와 공동으로 *S. diversa*의 genome sequencing을 올 초에 완료하였으며, 유전학적 연구의 대표적인 재료중의 하나인 *Streptomyces coelicolor*의 genome sequencing도 지난 7월에 완료되었다. 그리고 avermectin 항생물질 생산균주인 *S. avermitilis*의 genome sequencing도 올해 안에 완료하는 것을 목표로 진행하고 있다.

이와 같이 학문적으로 산업적으로 중요한 방선균들의 genome에 대한 정보들이 상세히 밝혀지기 시작하면서 생리활성물질의 생산과 형태분화 메커니즘의 규명이 더욱 활발해질 것으로 예상된다. 이러한 연구 결과들과 DNA microarray, 2D-gel electrophoresis, DNA shuffling 기술 등이 서로 결합함으로써, 지금까지의 단순한 균주 스크리닝 및 random mutation에 의한 균주 개량보다 더욱 효과적인 균주 육종 및 신물질 개발이 가능해질 것으로 예상된다.

강대경

이학박사
 (주)이지바이오시스템
 생물자원연구소, 부소장



- 1982 ~ 1986 서울대학교 동물자원과학과 (학사)
- 1986 ~ 1988 서울대학교 대학원 동물자원과학과 (석사)
- 1988 ~ 1995 동서식품(주) 기술연구소 연구원/선임연구원
- 1995 ~ 1999 일본 동경대학교 대학원 응용생명공학전공 (박사)
- 1999 ~ 2000 미국 국립보건원 (Postdoc)
- 2000 ~ 현재 (주)이지바이오시스템 생물자원연구소 부소장