

# 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 chromosome을 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 coding하는 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  $\gamma$ -

butyrolactone ring을 가진 A-factor(2-isocaprolyl-3R-hydroxymethyl- $\gamma$ -butyrolactone)이다. Table 1에서 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.

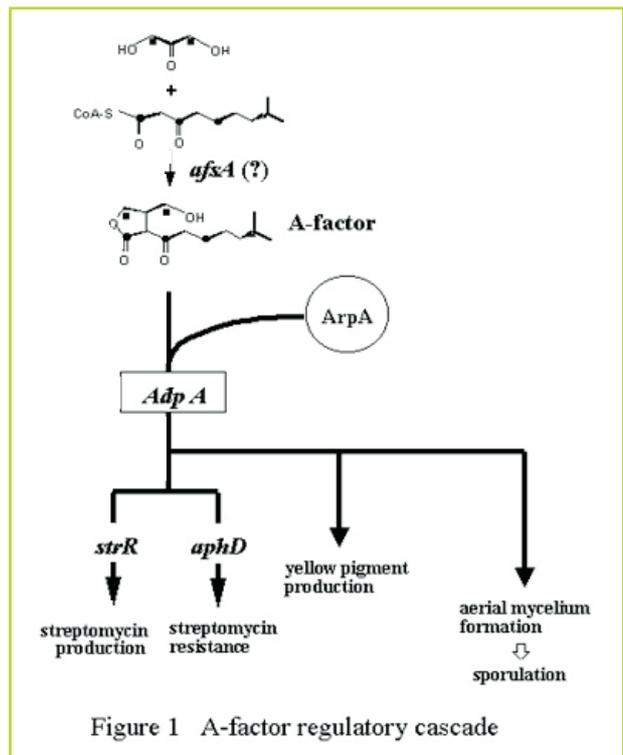
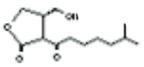
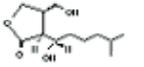
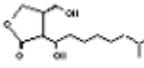
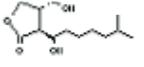
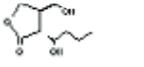
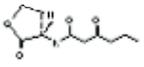
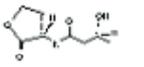
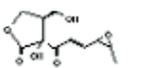
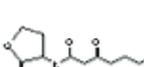
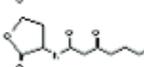
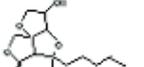


Figure 1 A-factor regulatory cascade

Table 1 Chemical signalling molecules having a  $\gamma$ -butyrolactone ring

Factors	Producer	Biological activities
	<i>Streptomyces griseus</i>	streptomycin sporulation
	<i>S. virginiae</i>	virginiamycin
	<i>S. bikiniensis</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  $\gamma$ -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 메카니즘이 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, threonine잔기가 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 system 도 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

