(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C12N 15/76 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0009200
(43) 공개일자 2007년01월18일

(21) 출원번호 10-2005-0064292
(22) 출원일자 2005년07월15일
심사청구일자 2005년07월15일

(71) 출원인 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 김응수
서울 송파구 오륜동 올림픽선수촌아파트 120-501
김창영
서울 영등포구 신길3동 278-1호 4통 2반
박현주
서울특별시 동작구 흑석2동 28 한강현대APT 112-1304

(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 프로테오믹스를 이용하여 동정된 스트렙토마이세스리비단스에서 항생제 생합성을 촉진하는 잠재적 A f s R2-타겟 단백질

(57) 요약

본 발명은 프로테오믹스를 이용하여 스트렙토마이세스 리비단스에서 항생제 생합성을 촉진하는 잠재적 AfsR2-타겟 단백질의 동정에 관한 것이다. *afsR2* 유전자의 과발현이 스트렙토마이세스 리비단스에서 항생제의 생합성을 촉진한다는 것을 잘 알려져 있지만, AfsR2의 표적 단백질 및 그들의 신호전달 기작은 잘 알려져 있지 않으므로, 본 발명은 프로테오믹스를 이용하여 AfsR2의 표적 단백질을 밝혀 항생제 생합성 기작을 밝힐 수 있고, 본 발명에서 밝혀진 유전자를 이용하여 항생제 고생산성 균주의 확립에 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

대표도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

프로테오믹스를 이용하여 야생형 *S. lividans* 균주 및 *afsR2* 유전자가 과발현되는 *S. lividans* 변이체에서 발현이 변화된 유전자를 동정하는 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현이 변화된 유전자를 동정하는 방법:

(i) 야생형 *S. lividans* 균주 및 *afsR2* 유전자가 과발현되는 *S. lividans* 변이체의 단백질을 추출하는 단계;

(ii) 상기 단백질을 이용하여 각각의 2D-겔 전기영동을 수행하는 단계;

(iii) 2D-겔 전기영동을 바탕으로 강도의 차이를 보이는 스팟을 비교하는 단계; 및

(iv) 차이를 보이는 스팟을 MALDI-TOF 분석으로 유전자를 동정하는 단계.

청구항 3.

제 1항에 있어서, *afsR2* 유전자가 과발현되는 *S. lividans* 변이체는 *S. lividans* ESK206인 발현이 변화된 유전자를 동정하는 방법.

청구항 4.

잠재적 분비되는 용질 결합 단백질(putative secreted solute binding protein)(SCO 6569), 잠재적 분비되는 단백질(putative secreted protein)(SCO 1860), 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)(SCO 1947) 및 잠재적 뉴클레오티드-결합 단백질(putative nucleotide-binding protein)(SCO 5249)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 *afsR2*의 과발현에 의해 저 조절되는 유전자의 군, 및 잠재적 조절 단백질(putative regulatory protein)(SCO 0512), 구아노신 펜타포스페이트 합성효소(guanosine pentaphospate synthetase)/폴리리보뉴클레오티드 뉴클레오티딜트랜스퍼라제(polyribonucleoitide nucleotidyltransferase)(SCO 5737), 잠재적 탈수소효소(putative dehydrogenase)(SCO 5262), 가설적 단백질(hypothetical protein)(SCO 7800), 잠재적 프룩토스 1,6-비스포스페이트 알도라제(putative fructose 1,6-bisphosphate aldolase)(SCO 3649), 잠재적 인산염 전송 시스템 조절자(putative phosphate transport regulator)(SCO 4228), 그럴듯한 3-하이드록시 아실-CoA 디하이드로제나제(probable 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)(SCO 3834), 델타-1-피롤린-5-카르복실화 탈수소효소(Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase)(SCO 5520), 그럴듯한 항-시그마 팩터(probable anti-sigma factor)(SCO 3548), 잠재적 가수분해효소(putative hydrolase)(SCO 0267), 슈퍼옥시드 디스뮤타제(superoxide dismutase)(SCO 5254) 및 잠재적 산화환원효소(putative oxidoreductase)(SCO 4352)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 *afsR2*의 과발현에 의해 과 조절되는 유전자의 군을 이용하여 항생제 고생산성 균주를 확립하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

프로테오믹스를 이용하여 스트렙토마이세스 리비단스에서 항생제 생합성을 촉진하는 잠재적 AfsR2-타겟 단백질의 동정에 관한 것이다.

스트렙토마이세스(*Streptomyces*)속 박테리아는 항생제, 항암제, 면역억제제 및 효소 억제제와 같은 의학적으로 중요한 물질인 다양한 이차 대사산물을 생산하는 능력이 있는 것으로 잘 알려져 있다(Chater et al., Trends Genet., 5: 372-377, 1990; Hopwood et al., Proc. R. Soc. Lond. Series, 235: 2257-2269, 1987; Nakamura et al., Biocechno.

Bioproc. Eng., 8: 37-40, 2004). 일반적으로 스트렙토마이세스에 의해 생산되는 대부분의 대사산물은 복잡한 메카니즘을 가지고 있는 세포 성장의 휴지기 동안 생산되고, 일시적으로 배양 시 고체 배지의 표면에 자라는 기균사(aerial mycelium)의 형성에 관여한다(Chater et al., Trends Genet., 5: 372-377, 1990; Hopwood et al., Proc. R. Soc. Lond. Series, 235: 2257-2269, 1987; Nakamura et al., Biocechno. Bioproc. Eng., 8: 37-40, 2004; Chamness et al., Regulation of Bacterial Differentiation, 61-93, 1994; Kim et al., Biotechnol. Bioproc. Eng. 9: 459-464, 2004; Lee et al., Biotechno. Bioproc. Eng. 8: 173-178, 2004). 하지만, 지금까지 복잡한 스트렙토마이세스 조절 네트워크는 일부분만 동정 되고 있고 몇 가지 중요한 조절 유전자가 밝혀져 있다. 그 중 일부는 이차 대사산물 생산에만 영향을 주는 반면, 다른 것들은 대사산물 생산 및 형태학상의 분화 모두에 영향을 주는 등 스트렙토마이세스는 다중 조절 시스템이 있는 것으로 밝혀졌다(Chamness et al., Regulation of Bacterial Differentiation, 61-93, 1994; Champness et al., Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics, 227-233, 1993).

스트렙토마이세스에서 항생제 생합성 경로에 영향을 주는 것으로 알려진 몇 가지 조절 유전자는 *afs*(A-factor synthesis) 유전자 패밀리로, *afsR, afsK* 및 *afsR2*를 포함한다(Hara et al., J. Gen. Microbiol. 129: 2939-2944; Horinouchi et al., J. Bacterol., 155: 1238-1248; Horinuchi et al., Gene., 95: 49-56; Stein et al., J. Bacteriol., 171: 2258-2261; Vogtli et al., Mol. Microbiol., 14: 643-653). *S. coelicolor*에서 *asfS* (Matsumoto et al., Actinomycetologica, 9: 37-43, 1995)로 알려진 스트렙토마이세스 리비단스(*S. lividans*)의 *afsR2*는 63개의 아미노산을 구성되고, 그 기능 및 메커니즘이 시그마 팩터 단백질(sigma factor protein)과 관련이 있는 것으로 보이는 단백질을 코딩한다(Kim et al., unpublished data). *S. lividans*에서 *afsR2*의 발현은 생리학적으로 조절되고, 단일 염색체의 *afsR2* 유전자로부터 mRNA 합성이 특정 성장 조건에서 촉진되는 것으로 보고되고 있다(Kim et al., J. Bacteriol., 183: 2198-2205, 2001). 야생형 *S. lividans*는 전형적인 성장 상태에서는 악티노호딘(actinorhodin)을 생산하지 않지만, 최근에 본 발명자들은 이를 *afsR2* 유전자의 염색체 통합(integration)으로 악티노호딘을 과발현하는 균주로 형질전환시키는데 성공하였다(Kim et al., J, Microbiol., Biotechnol., 14: 1089-1092, 2004). *S. lividans*에서 *afsR*2의 과발현은 항생제의 생합성을 촉진하는 주요 요인이라는 것은 명백히 잘 알려져 있지만, *afsR*2-표적 단백질 및 그들의 신호 전달 조절 메커니즘은 잘 알려져 있지 않다.

이에 본 발명자들은 AfsR2의 표적단백질을 밝혀 항생제 생합성 기작을 밝힐 수 있고 항생제 고생산성 균주의 확립에 유용하게 사용할 수 있는 유전자를 동정하기 위하여, 프로테오믹스를 이용하여 스트렙토마이세스 리비단스에서 항생제 생합성을 촉진하는 잠재적 AfsR2-타겟 단백질을 동정함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 프로테오믹스를 이용하여 스트렙토마이세스 리비단스에서 항생제 생합성을 촉진하는 잠재적 AfsR2-타겟 단백질을 동정하는 것이다.

발명의 구성

본 발명은 프로테오믹스를 이용하여 야생형 *S. lividans* 균주 및 *AfsR2* 유전자가 과발현되는 *S. lividans* 변이체에서 발현이 변화된 유전자를 동정하는 방법을 제공한다.

본 발명은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 발현이 변화된 유전자를 동정하는 방법을 제공한다:

(i) 야생형 *S. lividans* 균주 및 *AfsR2* 유전자가 과발현되는 *S. lividans* 변이체의 단백질을 추출하는 단계;

(ii) 상기 단백질을 이용하여 각각의 2D-겔 전기영동을 수행하는 단계;

(iii) 2D-겔 전기영동을 바탕으로 강도의 차이를 보이는 스팟을 비교하는 단계; 및

(iv) 차이를 보이는 스팟을 MALDI-TOF 분석으로 유전자를 동정하는 단계.

본 발명은 또한 잠재적 분비되는 용질 결합 단백질(putative secreted solute binding protein)(SCO 6569), 잠재적 분비되는 단백질(putative secreted protein)(SCO 1860), 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)(SCO 1947) 및 잠재적 뉴클레오티드-결합 단백질(putative nucleotide-binding protein)(SCO 5249)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 *afsR2*의 과발현에 의해 저 조절되는 유전자, 및 잠재적 조절 단백질(putative regulatory protein)(SCO 0512), 구아노신 펜타포스페이트 합성효소(guanosine pentaphospate synthetase)/폴리리보뉴클레오티드 뉴클레오티딜트랜스퍼라제(polyribonucleoitide nucleotidyltransferase)(SCO

5737), 잠재적 탈수소효소(putative dehydrogenase)(SCO 5262), 가설적 단백질(hypothetical protein)(SCO 7800), 잠재적 프룩토스 1,6-비스포스페이트 알도라제(putative fructose 1,6-bisphosphate aldolase)(SCO 3649), 잠재적 인산염 전송 시스템 조절자(putative phosphate transport regulator)(SCO 4228), 그럴듯한 3-하이드록시 아실-CoA 디하이드로제나제(probable 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)(SCO 3834), 델타-1-피롤린-5-카르복실화 탈수소효소(Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase)(SCO 5520), 그럴듯한 항-시그마 팩터(probable anti-sigma factor)(SCO 3548), 잠재적 가수분해효소(putative hydrolase)(SCO 0267), 슈퍼옥시드 디스뮤타제(superoxide dismutase)(SCO 5254) 및 잠재적 산화환원효소(putative oxidoreductase)(SCO 4352)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 *afsR2*의 과발현에 의해 과 조절되는 유전자의 군을 이용하여 항생제 고생산성 균주의 확립하는 방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

AfsR2 단백질의 생물학적 중요성을 조사하기 위하여, 두 가지 *S. lividans*를 선택하였다; 악티노호딘을 덜 생산하는 야생형 TK21 균주 및 악티노호딘 과-생산하는 ESK206 균주(도 1A 및 1B 참조). ESK206 균주는 *afsR2*의 상동 염색체 통합(homologous chromosomal integration)으로 제작된 안정화된 형질전환체이다(Kim et al., J, Microbiol., Biotechnol., 14: 1089-1092, 2004). 이들 두 균주 사이의 유일한 유전자 차이는 *afsR2*의 카피 수이기 때문에(TK21에서는 하나의 카피 및 ESK206에서는 두 개의 카피), 두 균주는 항생제 조절에 관여하는 잠재적 AfsR2-표적 단백질을 측정하기 위하여 비교 프로테오믹스를 수행하기 위한 완벽한 쌍이 될 수 있다. 이들 두 *S. lividans* 균주를 8일 동안 배양하였다. 세포 성장 및 악티노호딘 생산을 결정하기 위하여 샘플을 24시간 마다 수거하였다(도 1C 및 1D 참조). 최고 악티노호딘 생산을 보이는 8시간째 배양을 수거하고 2D 겔 전기영동을 수행하였다. pH 4-10 및 pH 4-7의 범위를 가지는 두 개의 독립적인 2D 겔 전기영동 실험을 바탕으로, 두 배 이상의 강도 차이를 보이는 340개의 스팟을 비롯하여 총 약 10,000개의 단백질 스팟을 동정하였다(도 2 및 도 3 참조). 단 하나의 유전자의 과-발현으로 많은 단백질의 발현을 유도하는 것으로 미루어, 항생제 촉진을 위한 AfsR2의 효과는 매우 복잡하고 조절 메커니즘의 상류 경로에 관여하는 것으로 보인다.

340개의 단백질 스팟 중에서, 10배 이상의 발현 차이를 보이는 가장 두드러지는 16개의 단백질 스팟을 MALDI-TOF를 이용하여 추가로 분석하였다(표 1 참조). MALDI-TOF에 의해 분석된 모든 단백질의 동정은 생리학적으로 관련이 있는 *S. coelicolor*의 완벽한 게놈 서열 때문에 성공적으로 이루어졌다.

*afsR2*가 발현되자마자, 저-조절된 단백질은 잠재적 분비되는 용질 결합 단백질(SCO 6569), 잠재적 분비되는 단백질(SCO 1860), 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)(SCO 1947) 및 잠재적 뉴클레오티드-결합 단백질(SCO 5249)이다. 저-조절된 단백질 중에서, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(SCO 1947)는 일차 신진대사에 관련된 에너지 생산에 필요한 주요 효소로 알려져 있다(Kormanec et al., Microbiology, 143: 3555-3561, 1997; Sprusansky et al., Microbiology, 147: 1291-1301, 2001). ESK206에서 AfsR2에 의해 유도되는 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소의 저 조절은 AfsR2 발현은 악티노호딘 및 건강한 포자 형성을 포함하는 이차 신진대사를 시작한다는 것을 의미한다.

가장 두드러지게 과-조절된 단백질은 구아노신 펜타포스페이트 합성효소(guanosine pentaphospate synthetase)/폴리리보뉴클레오티드 뉴클레오티딜트랜스퍼라제(polyribonucleoitide nucleotidyltransferase)(SCO 5737), 잠재적 탈수소효소(putative dehydrogenase)(SCO 5262), 잠재적 프룩토스 1,6-비스포스페이트 알도라제(putative fructose 1,6-bisphosphate aldolase)(SCO 3649), 잠재적 인산염 전송 시스템 조절자(putative phosphate transport regulator)(SCO 4228), 슈퍼옥시드 디스뮤타제(superoxide dismutase)(SCO 5254) 및 잠재적 산화환원효소(putative oxidoreductase)(SCO 4352)이다.

인산염(phosphate)의 농도는 스트렙토마이세스 항생제 생산에 중요한 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다(Umeyama et al., Gene, 258: 55-62, 2000; Vomastek et al., Eur. J. Biochem., 257: 55-61, 1998). ESK206에서 AfsR2에 의해 유도된 잠재적 인산염 전송 시스템 조절자(SCO 4228)의 과-조절은 많은 인산염 의존적인 키나제(phosphate-dependent kinase)가 잠재적 AfsR2-표적 단백질임을 내포한다.

흥미롭게도, 총 ESK206 RNA로 수행한 *S. lividans* DNA 마이크로 어레이 데이터는 잠재적 인산염 전송 시스템 조절자(SCO 4228)의 의미 있는 전사체 증가를 보이고 있다(Kang and Kim, unpublished data). 슈퍼옥시드 디스뮤타제(SOC 5254)는 휴지기 동안 다양한 산화 스트레스에 대한 주요 방어 단백질로 제시되고 있다(Chung et al., J. Bacteriol., 181: 7381-7384, 1999; Folcher et al., J. Biol. Chem., 276:44297-44306, 2001). 따라서, AfsR2는 직접적으로 슈퍼옥시드 디스뮤타제의 발현을 유도하지는 않지만, 간접적으로 휴지기의 신진대사를 촉진할 수 있다.

비교 프로테오믹스로 동정 된 가장 타당한 AfsR2의 표적 단백질은 구아노신 펜타포스페이트 합성효소(guanosine pentaphospate synthetase)/폴리리보뉴클레오티드 뉴클레오티딜트랜스퍼라제(polyribonucleoitide nucleotidyltransferase)(SCO 5737)이다. 상기 단백질은 원래 가장 잘 알려진 세균의 분자, ppGpp의 생합성에 관여하는 효소이다. 실험에서, ppGpp의 농도의 증가가 다양한 스트렙토마이세스 종에서 항생제의 생합성 및 형태학적 분화와 일치한다는 것이 확인되고 있다(Martinez-Costa et al., J. Biol. Chem., 271: 10627-10634, 1996; Chakaburtty et al., J. Bacteriol., 179: 5854-5861, 1997). 추가로, ppGpp는 몇 가지 항생제 경로 특이적인 조절 유전자뿐만 아니라 50개 이상의 유전자의 발현에 관련된 RpoS 시그마 팩터를 유도하는 것으로 제시되고 있다(Galss et al., Mol. Gen. Genet., 203: 265-268, 1986; Ochi et al., J. Bacteriol., 169: 3608-3616, 187; Kelly et al., J. Bacteriol., 173: 2297-2300, 1991). 최근, 상기 SCO 5737 단백질은 스트렙토마이세스 종에서 전반적인 RNA 안정성을 조절하는 RNA polyA 중합효소(polymerase) 활성을 포함하는 것으로 확인되었다(Sohberg et al., J. Bacteriol., 185: 7273-7278, 2003). 따라서, 구아노신 펜타포스페이트 합성효소(guanosine pentaphospate synthetase)/폴리리보뉴클레오티드 뉴클레오티딜트랜스퍼라제(polyribonucleoitide nucleotidyltransferase) (SCO 5737)는 AfsR2에 의해 유도되는 다양한 기능을 가진 표적 단백질이다.

본 발명에서는 2D 겔-전기영동 및 MALDI-TOF 분석을 이용한 프로테오믹스를 이용하여 항생제 조절에 관련된 지금까지 알려져 있지 않은 AfsR2 표적 단백질을 규명하였으며, 다양한 유전자들의 발현을 확인함으로써 AfsR2는 스트렙토마이세스에서 다양한 유전자 발현을 조절하는 중요한 조절 단백질임을 제시한다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> *S. lividans* ESK206 균주의 제조

AfsR2 단백질을 조사하기 위하여, 두 가지 *S. lividans*를 선택하였다; 악티노호딘을 거의 생산하지 않는 야생형 TK21 균주 및 악티노호딘 과-생산하는 ESK206 균주(도 1a 및 1b). 도 1a 및 b는 야생형 *S. lividans* TK21(a) 및 *S. lividans* ESK206(b)에 의한 악티노호딘 생산을 나타낸 사진이다. 같은 배양 접시를 두 회 사진촬영 하였다; 콜로니 윗면 사진(colony-side-up)(좌) 및 콜로니 아랫면 사진(colony-side-down(우). 세포 성장 및 악티노호딘 생산을 결정하기 위하여 샘플을 24시간 마다 12일 동안 수거하여 세포건조중량 (cell dry weight) 및 악티노호딘 생산을 측정하였다(도 1c 및 1d). 도 1c 및 d는 pWHM3을 포함하는 *S. lividans* TK21(삼각형) 및 *S. lividans* ESK206(원형)의 R2YE 액체 배양에서 세포 건조중량 (cell dry weight)(c) 및 악티노호딘 생산(d)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 1c 및 1d에서 보듯이, 균주의 성장에는 거의 차이를 보이고 있지 않지만, 예상대로 ESK206 균주에서 악티노호딘의 생산이 증가하여 있음을 확인하였다.

<실시예 2> 2D 겔-전기영동(2D gel-electrophoresis)

최고 악티노호딘 생산을 보이는 8시간째 배양을 수거하고 2D 겔 전기영동을 수행하였다. *S. lividans* 세포 펠렛을 수거하고 PBS로 2회 세척하였다. 다음, 샘플 완충액(7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT, 1mM benzamidine을 포함하는 2% pahrmalyte)을 첨가하여 motor-driven homogenization(PowerGen 125, Fischer Scientific)을 수행하였다. 1시간 동안 실온에서 볼텍스하면서 단백질을 추출한 다음, 15,000 x g, 1시간, 15℃에서 원심분리하였다. 펠렛에서 불용성 물질을 버리고 가용성 분획만을 2D 겔-전기영동 하였다.

IPG(immobilized pH gradients) 드라이 스트립을 12-16시간 동안 샘플 완충액(7M urea, 2% CHAPS를 포함하는 2M thiourea, 1% DTT, 및 1% pahrmalyte)에 담근 후, 각 샘플 200 ug을 로딩한다. 제조사의 지시에 따라 Multiphor II electrophoresis unit 및 EPS 3500 XL power supply를 이용하여 20℃에서 등전 집중(isoelectric focusing, IEF) 분석을 수행하였다. IEF에서 샘플의 투입을 위하여 3시간 동안 전압을 150에서 3500V로 증가시킨 후, 3500V로 유지하고 96 kVh 후, 집중을 완성하였다. 다음, 스트립을 10분 동안 1회는 1% DTT 및 2회는 2.5% iodoacetamide와 함께 평형 완충액(6M urea를 포함하는 50mM Tris-Cl, pH 6.8, 2% SDS 및 30% glycerol)에 배양하였다. 평형화된 스트립을 SDS-PAGE 겔(20-24cm, 10-16%)에 삽입하였다. SDS-PAGE는 제조사의 지시에 따라 Hoefer DALT 2D 시스템(Amersham Bioscience, USA)을 이용하여 수행하였다. 2D 겔을 20℃, 1700 Vh에서 작동시키고 그 후, 고정 및 감작 단계 없이 Oakley et al.에 의해 서술된 대로 실버 염색(Oakey et al., Anal. Biochem., 105: 361-363, 1980)을 수행하였다(도 2).

도 2는 23cm 큰 겔 시스템(10-16% 구배(gradient))을 이용한 2D-겔 전기영동 사진이다. 도 2a는 pH 4-10 구배에서의 *S. lividans* TK21, 도 2b는 pH 4-7 구배에서의 *S. lividans* TK21, 도 2c는 pH 4-10 구배에서의 *S. lividans* ESK206 및 도 2d는 pH 4-7 구배에서의 *S. lividans* ESK206이다.

도 2에서 보듯이, 단 하나의 유전자의 과-발현으로 많은 단백질의 발현을 유도하는 것으로 미루어, 항생제 촉진을 위한 AfsR2의 효과는 매우 복잡하고 조절 메커니즘의 상류 경로에 관여하는 것으로 보인다.

<실시예 3> 이미지 분석(Image analysis) 및 인-겔 효소 절단(in-gel enzymatic digestion)

대조군 또는 정상 샘플과 비교하여 2배 이상의 단백질 발현을 보이는 단백질 스팟을 선택하기 위하여, 디지털화된 이미지의 정량분석을 제조사에 의해 제공된 프로토콜에 따라 PDQuest 소프트웨어(version 7.0, BioRad, USA)를 이용하여 수행하였다(도 3). 각 스팟의 양을 총 유효 스팟의 강도로 표준화하였다.

도 3은 2D-겔 전기영동에서 *S. lividnas* TK21 및 *S. lividans* ESK206 사이에 다른 강도를 보이는 단백질 스팟 이미지를 보이는 사진이다.

pH4-10 및 pH 4-7의 범위를 가지는 두 개의 독립적인 2D 겔 전기영동 실험을 바탕으로, 두 배 이상의 강도 차이를 보이는 340개의 스팟을 비롯하여 총 약 10,000개의 단백질 스팟을 동정하였다.

340개의 단백질 스팟 중에서, 10배 이상의 발현 차이를 보이는 가장 두드러지는 16개의 단백질 스팟을 MALDI-TOF를 이용하여 더 분석하였다(표 1).

종래 Shevchenko et al.(Shevchenko et al., Anal. Chem., 68: 850-858, 1996)에 의해 서술한 대로 변형된 돼지 트립신을 이용하여 단백질 스팟을 효소학적으로 인-겔 절단하였다. 겔 조각에서 SDS를 제거하기 위하여 50% 아세토니트릴(acetonitrile)로 세척하고 염색하였다. 건조된 겔 조각을 트립신(8-10 ng/㎕)과 8-10 시간 동안 37℃에서 배양하였다. 5㎕의 0.5% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)을 첨가하여 단백질 가수분해 반응을 종결시켰다. 트립신분해 펩티드를 50% 아세토니트릴과 겔 조각 추출액의 수용성 층을 섞어서 회복하였다. 농축 후, 펩티드 혼합물을 C18ZipTips (Millipore, USA)를 이용하여 제염하고, 1-5㎕의 아세토니트릴에서 용출하였다. 상기 용출액의 분취량을 같은 부피의 50% 아세토니트릴에 있는 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid의 포화된 용액과 혼합하고, 1㎕의 혼합물을 표적 플레이트로 스팟을 만들었다.

<실시예 4>MALDI-TOF 분석 및 데이터 조사

MALDI-TOF에 의해 분석된 모든 단백질의 동정은 생리학적으로 관련이 있는 *S. coelicolor*의 완벽한 게놈 서열 때문에 성공적으로 이루어졌다. 단백질 분석은 Ettan MALDI-TOF(Amersham Bioscience, USA)를 이용하여 수행하였다. 펩티드를 지체된 추출 접근법(delayed extraction approach)을 이용하여, N2 레이저로 337nm에서 증발시켰다(evaporate). time of flight analysis를 위하여 20 KV 주입 펄스(injection pulses)로 가속화하였다. 단백질 동정을 위하여 Rockefeller University에 의해 개발된 조사 프로그램 ProFound(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)를 단백질 지문 감식법(peptide mass fingerprinting)에 의해 사용하였다(표 1). 내재적 스탠더드로 trypsin auto-digestion ion peak *m/z*(842.510 및 2211.1046)으로 스펙트럼을 조절하였다.

표 1은 MALDI-TOF를 이용하여 동정한 단백질, 그들의 PI 및 MW의 목록이다. (a)는 *S. lividans*에서 *afsR2*-과발현에 의해 저-조절된 단백질이고, (b)는 *S. lividans*에서 *afsR2*-과발현에 의해 과-조절된 단백질이다.

*afsR2*가 발현되자마자, 저-조절된 단백질은 잠재적 분비되는 용질 결합 단백질(putative secreted solute binding protein)(SCO 6569), 잠재적 분비되는 단백질(putative secreted protein)(SCO 1860), 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)(SCO 1947) 및 잠재적 뉴클레오티드-결합 단백질(SCO 5249)이다(표 1a).

가장 두드러지게 과-조절된 단백질은 구아노신 펜타포스페이트 합성효소(guanosine pentaphospate synthetase)/폴리리보뉴클레오티드 뉴클레오티딜트랜스퍼라제(polyribonucleoitide nucleotidyltransferase)(SCO 5737), 잠재적 탈수소효소(putative dehydrogenase)(SCO 5262), 잠재적 프룩토스 1,6-비스포스페이트 알도라제(putative fructose 1,6-

bisphosphate aldolase)(SCO 3649), 잠재적 인산염 전송 시스템 조절자(putative phosphate transport regulator)(SCO 4228), 슈퍼옥시드 디스뮤타제(superoxide dismutase)(SCO 5254) 및 잠재적 산화환원효소(putative oxidoreductase)(SCO 4352)이다(표 1b).

[표 1]

a.				
스팟 ID	PI	분자량	명칭	SCO 번호
1302	4.4	37.8	잠재적 분비되는 용질 결합 단백질	6569
3224	5.0	28.8	잠재적 분비되는 단백질	1860
3413	4.9	46.7	글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소	1947
7202 7218	6.0 6.2	30.7 28.2	잠재적 뉴클레오티드-결합 단백질	5249
b.				
2123	4.7	23.9	잠재적 조절 단백질	0512
2526	4.9	50.6	구아노신 펜타포스페이트 합성효소/ 폴리리보뉴클레오티드 뉴클레오티딜트랜스퍼라제	5737
3114	5.0	26.4	잠재적 탈수소효소	5262
3322	4.9	31.6	가설적 단백질	7800
4322	5.2	39.8	잠재적 프룩토스 1,6-비스포스페이트 알도라제	3649
4214 5207 8008	5.2 5.4 6.8	28.3 28.0 16.0	잠재적 인산염 전송 시스템 조절자	4228
4706	5.1	69.7	그럴듯한 3-하이드록시 아실-CoA 디하이드로제나제	3834
4710	5.2	87.9	델타-1-피롤린-5-카르복실화 탈수소효소	5520
5414	5.6	40.0	그럴듯한 항-시그마 팩터	3548
5301	5.4	30.7	잠재적 가수분해효소	0267
9003	7.8	13.0	슈퍼옥시드 디스뮤타제	5254
9121	7.9	27.0	잠재적 산화환원효소	4352

발명의 효과

afsR2 유전자의 과발현이 스트렙토마이세스 리비단스에서 항생제의 생합성을 촉진한다는 것을 잘 알려져 있지만, AfsR2의 표적 단백질 및 그들의 신호전달 기작은 잘 알려져 있지 않으므로, 본 발명은 프로테오믹스를 이용하여 AfsR2의 표적 단백질을 밝혀 항생제 생합성 기작을 밝힐 수 있고, 본 발명에서 밝혀진 유전자를 이용하여 항생제 고생산성 균주의 확립에 효과적으로 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1a 및 b는 야생형 *S. lividans* TK21(a) 및 *S. lividans* ESK206(b)에 의한 악티노호딘의 생산을 나타낸 사진이다. 같은 배양 접시를 2회 사진촬영 하였다; 콜로니 윗면 사진(colony-side-up)(좌) 및 콜로니 아랫면 사진(colony-side-down)(우). 도 1c 및 d는 pWHM3을 포함하는 *S. lividans* TK21(삼각형) 및 *S. lividans* ESK206(원형)의 R2YE 액체 배양에서 세포건조중량 (cell dry weight)(c) 및 악티노호딘 생산(d)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

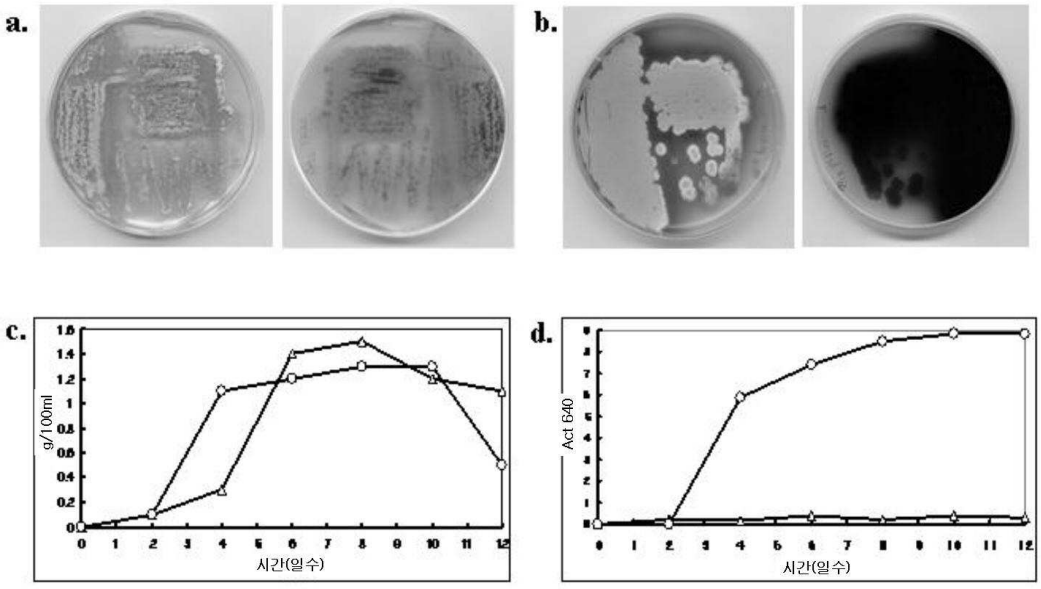
도 2는 23cm 큰 겔 시스템(10-16% 구배(gradient))을 이용한 2D-겔 전기영동 사진이다. 도 2a는 pH 4-10 구배에서의 *S. lividans* TK21, 도 2b는 pH 4-7 구배에서의 *S. lividans* TK21, 도 2c는 pH 4-10 구배에서의 *S. lividans* ESK206 및 도 2d는 pH 4-7 구배에서의 *S. lividans* ESK206이다.

도 3은 2D-겔 전기영동에서 *S. lividans* TK21 및 *S. lividans* ESK206 사이에 다른 강도를 보이는 단백질 스팟 이미지를 보이는 사진이다. 이 사진에서 숫자로 보이는 각 단백질은 동정하여 표 1에 나열하였다.

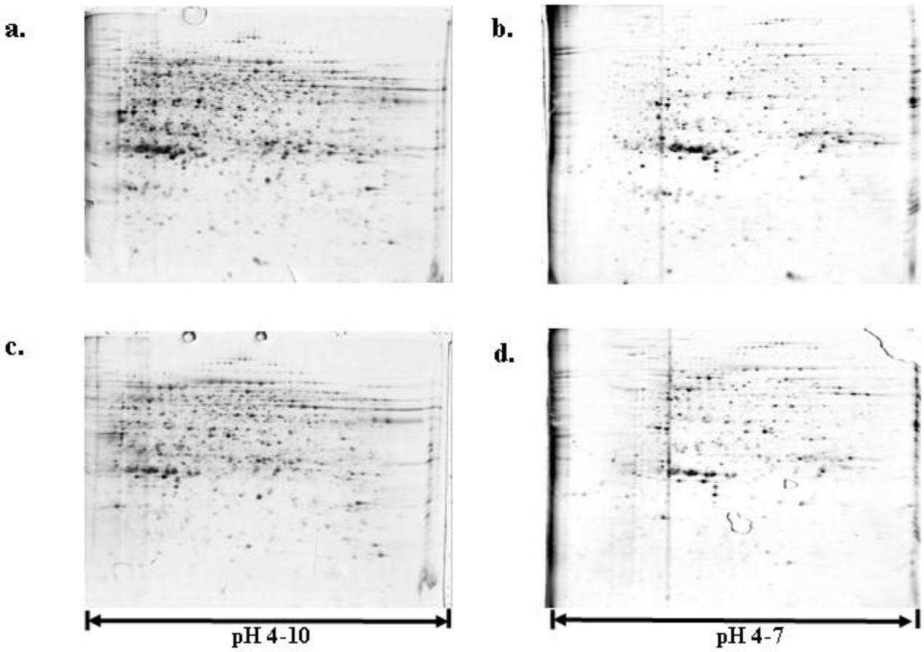
표 1은 MALDI-TOF를 이용하여 동정한 단백질, 그들의 PI 및 MW의 목록이다. 표 1a는 *S. lividans*에서 *afsR2*-과발현에 의해 저-조절된 단백질이고, 표 1b는 *S. lividans*에서 *afsR2*-과발현에 의해 과-조절된 단백질이다.

도면

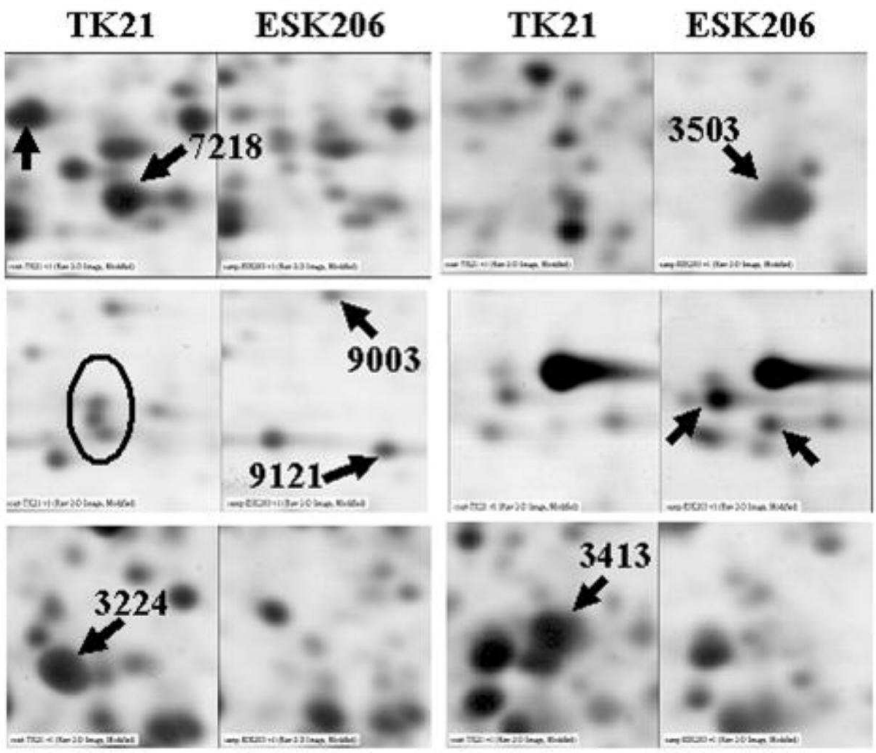
도면1



도면2


a.
b.
c.
d.
pH 4-10
pH 4-7

도면3


TK21
ESK206
TK21
ESK206
7218
3503
9003
9121
3224
3413