Archangium gephyra 의 tubulysin 생합성 유전자 분석

최주오^{1,2}, 박태준¹, 강다운², 이정주², 김영필², 이필구², 정재용², 조경연^{1*}

¹호서대학교 생명공학과

²메코스큐어메드(주)

Received: April 26, 2021 / Revised: May 13, 2021 / Accepted: May 14, 2021

Analysis of Tubulysin Biosynthetic Genes in *Archangium gephyra*

Juo Choi^{1,2}, Taejoon Park¹, Daun Kang², Jeongju Lee², Yungpil Kim², Pilgoo Lee², Gregory J. Y. Chung², and Kyungyun Cho^{1*}

¹Department of Biotechnology, Hoseo University, Asan 31499, Republic of Korea

²MECOX CureMed Co., Seoul 06744, Republic of Korea

Tubulysins are a group of bioactive secondary metabolites from myxobacteria exhibiting strong anticancer activity against various cancer cell lines. In this study, we describe the identification of putative tubulysin biosynthetic gene clusters (*tubA~tubF*) in the genome sequences of two tubulysin-producing myxobacterial strains, *Archangium gephyra* MEHO_002 and MEHO_004. The inactivation of the putative tubulysin biosynthetic genes resulted in a tubulysin-production defect. The DNA sequences of the *A. gephyra* MEHO_002 and MEHO_004 tubulysin biosynthetic genes were 97% identical, and the amino acid sequences of the encoded proteins shared a similarity of 97–100%. The nucleotide sequences of the tubulysin biosynthetic gene clusters in MEHO_002 and MEHO_004 were 86% identical to that in *Cystobacter* sp. SBCb004 known as a tubulysin-producing myxobacterium, and the organization of the clusters was identical except for the lack of a *tubZ* gene in the clusters in MEHO_002 and MEHO_004. The amino acid sequences of the proteins encoded by each gene were 88–97% similar to those encoded by SBCb004, and the domain compositions of the proteins were also identical.

Keywords: *Archangium gephyra*, tubulysin, myxobacteria, secondary metabolite

서론

포유류 세포에서 미세소관(microtubule)은 세포의 분열, 성장, 이동에 결정적인 역할을 한다[1]. 미세소관은 튜불린(tubulin)으로 구성되어 있으며, 튜불린의 중합과 해체를 통해 기능을 수행한다. 이러한 중요한 기능으로 인해 미세소관은 항암제 개발의 주요 타겟이 되어왔다. 미세소관의 기능을 저해하는 대표적인 항암물질로는 paclitaxel, vinblastine, epothilone 등이 있다[2].

Tubulysin은 점액세균에 의해 생산되는 이차대사 생리활성물질로 튜불린의 중합을 저해하여 미세소관의 해체를 초래함으로써 세포독성을 보이는데(Fig. 1) [3–5], paclitaxel, vinblastine, epothilone 보다도 훨씬 더 강력한 활성을 나타

내는 것으로 보고되었다[6]. Tubulysin은 다양한 암세포주에 대해 항암활성을 보이지만[7, 8] 강한 세포독성으로 인해 최근에는 항체약물접합체(antibody-drug conjugate)의 탑재 약물로 관심을 받고 있다[9–12].

Tubulysin은 다섯 개의 아미노산(L-pipecolic acid, L-isoleucine, L-valine, L-cysteine, L-phenylalanine 또는 L-

Fig. 1. The structure of tubulysin A and B.

***Corresponding author**

Tel.: +82-41-540-5627, Fax: +82-41-540-9538

E-mail: kycho@hoseo.edu

Fig. 2. The growth of *Archangium gephyra* MEHO_003 and MEHO_004 in liquid medium. The wild type strain MEHO_003 and the dispersion mutant MEHO_004 were cultured in the CYS medium for 5 days.

tyrosine)과 두 단위의 acetate로 핵심구조가 이루어져 있는데, 이는 5개의 비리보솜 펩타이드 합성효소(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS) 모듈과 2개의 폴리케타이드 합성효소(polyketide synthase, PKS) 모듈에 의해 생합성된다[13]. Tubulysin은 점액세균 *Angiococcus disciformis*, *Archangium gephyra*, *Cystobacter* sp.에서 분리되었으며, 현재까지 23개의 자연 유도체들이 알려져 있다[5]. Tubulysin 생합성 유전자군은 *A. disciformis* An d48과 *Cystobacter* sp. SBCb004로부터 밝혀져 보고되었다(Fig. 2) [5, 13]. 하지만 *A. gephyra*의 tubulysin 생합성 유전자군은 아직까지 보고되지 않았다. 본 연구에서는 유전체 분석을 통해 국내 토양에서 분리된 *A. gephyra* 균주들의 tubulysin 생합성 유전자군을 탐색하여 분석하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

A. gephyra MEHO_001 (=KYC2615)과 MEHO_003 (=KYC4066)은 본 연구팀이 국내 토양에서 분리한 균주이다 [14]. *A. gephyra* MEHO_002는 *A. gephyra* MEHO_001의 분산변이주이다. *A. gephyra* MEHO_004, MEHO_005, MEHO_007은 본 연구에서 제조하였다. 점액세균의 일반적인 배양을 위해서는 VY/3 배지[15]를 사용하였으며, 배양추출물 제조를 위해서는 CYS 배지[15]를 사용하였다. 모든 균주는 32°C에서 배양하였다.

플라스미드 및 균주의 제조

A. gephyra MEHO_004는 *A. gephyra* MEHO_003 균주의 분산변이주로, 기존에 알려진 방법[16]에 따라 선발하였다. 먼저 야생형 균주인 *A. gephyra* MEHO_003을 CYS 액체배지에서 계대배양한 후, CYS 평판배지에 도말하여 S-운 동성이 상실된 균주를 선발한 다음, 다시 액체배지에 배양하

여 분산 성장하는 것으로 확인된 균주를 최종 MEHO_004로 명명하였다.

A. gephyra MEHO_005는 MEHO_002 균주의 *tubB* 유전자에 pJO115 플라스미드를 삽입하여 제조하였다. pJO115 플라스미드는 올리고뉴클레오타이드 5'-CTCAACAACGGA TGCTGTTC-3'와 5'-TCACGTAATCGCCATACTGC-3'를 프라이머로 사용하고 *A. gephyra* MEHO_002 균주의 유전체 DNA를 주형으로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하여 얻은 *tubB* 유전자의 내부 DNA 조각(507 bp)을 pCR2.1 벡터(Promega, USA)에 삽입하여 제조하였다. 이때 DNA 조각이 가진 *tubB* 유전자의 전사방향은 벡터의 *lacZ* 유전자 전사방향과 반대 방향으로 삽입된 것을 선발하였다.

A. gephyra MEHO_007은 MEHO_004 균주의 *tubB* 유전자에 pJO118 플라스미드를 삽입하여 제조하였다. pJO118 플라스미드는 올리고뉴클레오타이드 5'-CTCAACAACGGA TGCTGTTC-3'와 5'-TCACGTAATCGCCATACTGC-3'를 프라이머로 사용하고 *A. gephyra* MEHO_004 균주의 유전체 DNA를 주형으로 PCR을 실시하여 얻은 *tubB* 유전자의 내부 DNA 조각(507 bp)을 pCR2.1 벡터에 삽입하여 제조하였다. 이때 DNA 조각이 가진 *tubB* 유전자의 전사방향은 벡터의 *lacZ* 유전자 전사방향과 반대 방향으로 삽입된 것을 선발하였다.

제조한 플라스미드는 전기천공을 통해 점액세균 균주에 도입하였으며, 50 µg/ml 가나마이신이 들어있는 배지에서 배양함으로써 상동재조합에 의해 플라스미드가 *tubB* 유전자에 삽입된 균주를 선발하였다. 플라스미드가 정확히 *tubB* 유전자에 삽입되었는지는 벡터 DNA 부위에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 5'-ACTGGCCGTCGTTTTACA-3'와 염색체 상의 삽입부위 부근에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 5'-GCAGCAGATCGAACATGAC-3'를 프라이머로 사용하고, 형질전환된 균주의 유전체 DNA를 주형으로 사용한 PCR을 통해 확인하였다.

배양추출물의 제조

균주들을 1% Amberlite XAD-16 레진(Sigma, USA)을 넣은 CYS 배지에서 7일 동안 진탕배양한 뒤 레진을 회수하였다. 레진을 증류수로 3회 세척한 뒤, 레진 무게의 5배(v/w)에 해당하는 100% 메탄올로 3회 추출하고, 회전증발기를 사용하여 건조하였다. 증류수와 에틸아세테이트를 1:1 비율(v/v)로 섞어 넣은 후, 잘 흔들어준 다음, 에틸아세테이트 층을 회수하여 회전증발기로 건조하고 100% 메탄올에 용해하였다.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Tubulysin의 분석을 위해서는 Zorbax SB-C18 칼럼

(4.6 × 150 mm, 5 μm)을 장착한 Agilent 1260 VL Infinity Series HPLC 시스템을 사용하였다(Agilent Technologies, USA). 이동상 A 용매로 0.1% trifluoroacetic acid (FTA)를 함유한 증류수, 이동상 B 용매로는 0.1% FTA를 함유한 아세트니트릴을 사용하였다. 용매의 유속은 0.5 ml/min으로 0–5분 간 40% B 용매, 5–25분 간 40에서 45% B 용매 기울기, 25–30분 간 45에서 100% B 용매 기울기, 30–35분 간 100% B 용매, 35–40분 간 40% B 용매로 용리하였다. 용리액은 photo diode array (PDA) 검출기를 사용하여 254 nm에서 검출하였다.

Tubulysin의 분리를 위해서는 Agilent Zorbax SB-C18 PrepHT 칼럼(21.2 × 250 mm, 7 μm)을 사용하였다. 이동상 A는 0.1% TFA를 함유한 증류수, 이동상 B는 0.1% TFA를 함유한 아세트니트릴을 사용하였다. 유속은 6 ml/min으로 0–60분 간 40–50% B 용매 기울기, 60–70분 간 100% B 용매, 70–71분 간 100–40% B 용매 기울기, 71–80분 간 40% B 용매 방법으로 분리를 하였다.

High-resolution Tandem MS 분석

Tubulysin의 tandem MS 분석은 한국기초과학지원연구원(KBSI)에 의뢰하여 15T FT-ICR 질량분석기(solariX XR™ system, Bruker Daltonics, USA)를 사용하여 이루어졌다.

DNA 서열 분석

유전체 DNA의 분리는 일반적으로 알려진 방법을 사용하였다[17]. 유전체 DNA의 염기서열 결정은 마이크로젠에 Whole Genome De novo Sequencing을 의뢰하여 실시하였다. 이차대사산물 생합성 유전자의 분석은 antiSMASH (antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell) 프로그램[18]을 이용하였다. 서열 상동성 분석은 미국 국립생물정보센터(NCBI)의 BLAST 프로그램[19]을 사용하였고, 단백질 도메인 분석은 NCBI의 CD-Search 프로그램[20]을 사용하였다. *A. gephyra* MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생합성 유전자군의 DNA 서열은 NCBI의 GenBank DNA 서열 데이터베이스에 제출되었다(Accession numbers, MW489865 and MW489866).

결과 및 고찰

*A. gephyra*의 tubulysin 생합성 유전자 탐색

A. gephyra MEHO_001과 *A. gephyra* MEHO_003은 PCR 검출에 의해 tubulysin 생합성 유전자를 가진 것으로 선별되었으며, LC-MS 분석에 의해 tubulysin A와 B를 생산하는 것으로 확인된 균주들이다[14]. *A. gephyra* MEHO_

001과 MEHO_003 균주는 다른 대부분의 야생 점액세균들과 마찬가지로 액체배양 시 세포들이 응집되는 특성을 보인다. 이러한 특성은 발효조를 이용한 대량배양에 장애가 되며, 균주 개선을 위한 유전자 조작도 불가능하게 한다. 점액세균은 S-운동성에 관여하는 유전자가 불활성화될 경우 분산하여 성장한다[21]. 본 연구팀은 액체배양 과정에서 자연적으로 S-운동성이 상실된 균주를 선발하는 방식으로 MEHO_001 균주의 분산변이주를 분리하여 MEHO_002로 명명하였고, MEHO_003 균주의 분산변이주를 분리하여 MEHO_004로 명명하였다. MEHO_002와 MEHO_004 균주는 CYS 액체배지에서 배양할 경우 야생형 균주와 달리 완전히 분산하여 성장하였다(Fig. 2).

Tubulysin 생합성 유전자군을 탐색하기 위하여 *A. gephyra* MEHO_002와 MEHO_004 균주에 대해 유전체 서열 분석을 실시하였다. 야생형 균주 대신 분산변이주의 유전체를 분석한 이유는 분산변이주들이 상대적으로 다루기 쉬우며 향후 유전자 조작 및 물질생산이 이들 균주들을 대상으로 이루어질 것으로 생각했기 때문이었다. MEHO_002와 MEHO_004 균주로부터 유전체 DNA를 분리한 후, Whole Genome De novo Sequencing을 실시한 결과, MEHO_002 균주의 경우에는 15개 contig로 구성된 총 13,208,011 bp의 유전체 염기서열을 얻을 수 있었으며, MEHO_004 균주의 경우에는 8개 contig로 구성된 총 13,119,373 bp의 유전체 염기서열을 얻을 수 있었다.

antiSMASH 프로그램은 생물의 유전체 정보로부터 다양한 종류의 이차대사산물 생합성 유전자군을 밝혀내며, 유전자 각각에 대한 상세 분석도 제공하는 프로그램이다[18]. antiSMASH 프로그램을 이용하여 MEHO_002 균주 유전체에 존재하는 이차대사산물 생합성 유전자군을 분석한 결과, tubulysin 생합성 유전자군으로 추정되는 유전자군이 길이가 가장 긴 contig에 존재하는 것으로 나타났다(Fig. 3A). MEHO_004 균주의 경우에도 마찬가지로 길이가 가장 긴 contig에 tubulysin 생합성 유전자군으로 추정되는 유전자군이 존재하는 것으로 분석되었다(Fig. 3B). Tubulysin 생합성 유전자군으로 추정되는 유전자군은 약 38 kb 크기로 8개 유전자로 구성되어 있는데(Fig. 3), 각 유전자가 암호화하는 단백질의 아미노산 서열이 *Cystobacter* sp. SBCb004의 튜블라이신 생합성 유전자가 암호화하는 단백질들의 아미노산 서열과 88% 이상 유사하며, 도메인 구성도 동일하였으므로 이들을 각각 *tubA*, *orf2*, *orf1*, *tubB*~*F*로 명명하였다.

Tubulysin 생합성 유전자의 확인

A. gephyra MEHO_002와 MEHO_004 균주의 염색체에 존재하는 유전자들이 실제 tubulysin 생합성에 관여하는지 실험적으로 증명하기 위하여 *tubB* 유전자 내부 DNA 조각

A. *Archangium gephyra* MEHO_002 **B. *Archangium gephyra* MEHO_004** **C. *Angiococcus disciformis* An d48** **D. *Cystobacter* sp. SBCb004**

Fig. 3. Tubulysin biosynthetic gene clusters. Tubulysin biosynthetic gene clusters from *A. gephyra* MEHO_002 (Accession number, MW489865), *A. gephyra* MEHO_004 (MW489866), *Angiococcus disciformis* An d48 (AJ620477) [13], and *Cystobacter* sp. SBCb004 (GU002154) [5] are shown. The inverted triangles indicate where plasmids were inserted in the MEHO_005 and MEHO_007 strains.

을 가진 pJO115와 pJO118 플라스미드를 제조하여 MEHO_002와 MEHO_004 균주의 염색체에 각각 삽입함으로써 *tubB* 유전자가 불활성화된 MEHO_005와 MEHO_007 균주를 제조하였다. 제조한 균주들을 CYS 배지에서 배양하여 배양추출물을 제조하고 HPLC로 분석한 결과, 두 균주의 배양추출물 모두에서 tubulysin A와 B에 해당하는 피크가 사라진 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

사라진 피크가 tubulysin인지 확인하기 위하여 MEHO_004 균주의 배양추출물에서 tubulysin A에 해당하는 peak 물질을 분리하여 15T FT-ICR 질량분석기를 사용하여 질량을 분석하였다. 1차 이온화된 물질은 $[M+H]^+$ 의 m/z 값이 844.452655로 0.19 ppm에서 분자식이 $C_{43}H_{66}N_5O_{10}S$ 로 추정되었으며, 이는 피크에 대한 동위원소 미세구조 분석을 통해서 확인되었다. 따라서 해당 물질의 분자식은 $C_{43}H_{65}N_5O_{10}S$ 로 tubulysin A일 것으로 예상되었다. 이 피크 물질을 2차 이온화하여 분석하였을 때 m/z 값이 742.384353, 504.216237, 239.175383, 211.180471인 조각 피크들이 검출되었는데, 이러한 조각 양상은 기존에 알려진 tubulysin A의 조각 양상(MoNA ID, CCMSLIB00000478582)과 흡사하였다. 이에 더해, 조각피크의 분자량을 기초로 재구성한 물질의 구조도 tubulysin A인 것으로 분석되었다(Fig. 5). 따라서 이러한 결과는 플라스미드 삽입에 의해 사라진 피크물질

Fig. 4. HPLC chromatograms of the culture extracts. (A) *A. gephyra* MEHO_002 and MEHO_005 strains. (B) *A. gephyra* MEHO_004 and MEHO_007 strains.

Fig. 5. The tandem MS data of tubulysin A from *A. gephyra* MEHO_004.

은 tubulysin이며, 본 연구에서 발견된 *tubB~F* 유전자군이 tubulysin 생합성 유전자군임을 직접적으로 보여주었다.

Tubulysin 생합성 유전자군 분석

A. gephyra MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생합성 유전자군(*tubA~tubF*)은 DNA 염기서열이 서로 97% 동일하였다. 이들 염기서열은 *Cystobacter* sp. SBCb004의 tubulysin 생합성 유전자군 염기서열과는 86% 동일하였으며, *A. disciformis* An d48의 tubulysin 생합성 유전자군과는 75% 동일하였다. 따라서 *A. gephyra* MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생합성 유전자군은 DNA 염기서열에서 서로 매우 유사하지만 *Cystobacter* sp. SBCb004

의 tubulysin 생합성 유전자군과는 14% 다르며 *A. disciformis* An d48의 tubulysin 생합성 유전자군과는 25% 다른 것으로 나타났다. 하지만 유전자 구성은 매우 유사하여 *tubZ* 유전자를 제외하고는 *tubA*로부터 *tubF*까지의 유전자 구성이 동일하였다(Fig. 3).

A. gephyra MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생합성 유전자들이 암호화하는 단백질들의 아미노산 서열은 서로 97–100% 유사하였다(Table 1). 이들의 아미노산 서열은 *Cystobacter* sp. SBCb004의 tubulysin 생합성 유전자군 염기서열과 88–97% 유사하였으며(Table 2와 3), *A. disciformis* An d48의 tubulysin 생합성 유전자군과는 70–89% 유사하였다(Table 1S). 하지만 각 단백질을 구성하는 도

Table 1. Comparison between the tubulysin biosynthetic genes of *Archangium gephyra* MEHO_002 and MEHO_004.

<i>A. gephyra</i> MEHO_002		Identity/Similarity (%)	<i>A. gephyra</i> MEHO_004	
Gene	Product size (aa)		Gene	Product size (aa)
<i>tubA</i>	431	96/99	<i>tubA</i>	430
<i>orf2</i>	219	99/100	<i>orf2</i>	219
<i>orf1</i>	394	99/100	<i>orf1</i>	394
<i>tubB</i>	1,498	98/98	<i>tubB</i>	1,498
<i>tubC</i>	2,622	98/98	<i>tubC</i>	2,622
<i>tubD</i>	3,509	98/98	<i>tubD</i>	3,509
<i>tubE</i>	1,159	98/98	<i>tubE</i>	1,159
<i>tubF</i>	2,831	97/97	<i>tubF</i>	2,827
<i>orf18</i>	367	96/98	<i>orf18</i>	367
<i>orfD</i>	120	95/95	<i>orfD</i>	120

Identity/Similarity: Identity and similarity of the amino acid sequences between the proteins encoded by *A. gephyra* MEHO_002 and MEHO_004.

Table 2. Comparison between the tubulysin biosynthetic genes of *A. gephyra* MEHO_002 and *Cystobacter* sp. SBCb004.

<i>A. gephyra</i> MEHO_002					<i>Cystobacter</i> sp. SBCb004	
Gene	Product size (aa)	Predicted function	PKS/NRPS motif predicted by antiSMASH	Identity/Similarity (%)	Gene	Product size (aa)
<i>tubA</i>	431	NRPS	C	81/88	<i>tubA</i>	432
<i>orf2</i>	219	hypothetical protein		76/87	<i>orf2</i>	219
-	-			-	<i>tubZ</i>	386
<i>orf1</i>	394	hypothetical protein		91/97	<i>orf1</i>	394
<i>tubB</i>	1,498	NRPS	C-A(pip)-nMT-PCP	84/89	<i>tubB</i>	1,520
<i>tubC</i>	2,622	NRPS	C-A(ile)-PCP-C-A(val)-nMT-PCP	85/90	<i>tubC</i>	2,626
<i>tubD</i>	3,509	PKS/NRPS	KS-AT(mal)-KR-DH-ER-ACP-C-A(cys)-PCP	85/90	<i>tubD</i>	3,511
<i>tubE</i>	1,159	NRPS	C-CAL-PCP	86/90	<i>tubE</i>	1,161
<i>tubF</i>	2,831	PKS	KS-AT(mal)-KR-cMT-KR-DH-ER-ACP-TE	82/88	<i>tubF</i>	2,843
-	-			-	<i>orf17</i>	337
<i>orf18</i>	367	patatin-like protein		80/89	<i>orf18</i>	368
<i>orfD</i>	120	hypothetical protein		60/72	<i>orfD</i>	124

A, adenylation domain; aa, amino acid; ACP, acyl-carrier protein domain; AT, acyltransferase; C, condensation domain; CAL, co-enzyme A ligase domain; cMT, carbon methyltransferase; cys, cysteine; DH, dehydrase; ER, enoylreductase domain; ile, isoleucine; KR, ketoreductase domain; KS, ketosynthase domain; mal, malonate; nMT, nitrogen methyltransferase; NRPS, non-ribosomal peptide synthetase; PCP, peptidyl-carrier protein domain; pip, pipecolic acid; PKS, polyketide synthase; TE, thioesterase domain; val, valine. Identity/Similarity: Identity and similarity to the corresponding proteins encoded by *Cystobacter* sp. SBCb004.

메인 구성은 동일한 것으로 분석되었다. *A. gephyra* MEHO_002와 MEHO_004 균주의 *tubB~F* 유전자들은 *Cystobacter* sp. SBCb004와 동일한 도메인 구성을 가진 비리보솜 펩타이드 합성효소(NRPS), 폴리케타이드 합성효소(PKS) 또는 NRPS와 PKS의 혼성체를 암호화하는 것으로 분석되었다(Table 2와 3). 그리고 *tubA*, *orf1*, *orf2* 유전자들도 동일한 단백질을 암호화하는 것으로 분석되었다.

A. gephyra MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생합성 유전자군과 *Cystobacter* sp. SBCb004 및 *A. disciformis* An d48의 tubulysin 생합성 유전자군의 가장 큰 차이는 *tubZ* 유전자의 존재이다. *Cystobacter* sp. SBCb004와 *A. disciformis* An d48에는 *tubZ* 유전자가 있지만 *A. gephyra* MEHO_002와 MEHO_004 균주에는 없다(Fig. 3, Table 2와 3). *tubZ* 유전자는 lysine cyclodeaminase 유사 단백질을 암호화하는 유전자로 lysine으로부터 tubulysin 생합성의 시작 물질인 pipecolic acid를 만드는 것으로 추정되고 있다[13, 22]. *Cystobacter* sp. SBCb004와 *A. disciformis* An d48의 *tubZ* 유전자를 불활성화시키는 경우 생산되는 유도체의 종류와 생산량이 달라지기는 해도 여전히 tubulysin이 생산된다[5, 23]. 따라서 다른 유전자에 의해 암호화되는 lysine cyclodeaminase의 기능에 의해 pipecolic acid가 공급되기도 하는 것으로 제안되었다. 유전체 서열 분석에 의하면

A. gephyra MEHO_002와 MEHO_004 균주는 염색체의 다른 위치에 *Cystobacter* sp. SBCb004의 *TubZ* 단백질과 아미노산 서열이 44~50% 유사한 두 개의 lysine cyclodeaminase 유사 단백질을 암호화하는 유전자를 가지고 있는 것으로 나타났다. 따라서 tubulysin 생합성 유전자군에 *tubZ* 유전자가 없어도 tubulysin 생산에 문제가 없을 것으로 추정된다.

*A. gephyra*의 표준균주인 DSM 2261^T 균주의 유전체에는 tubulysin 생합성 유전자군이 없다. MEHO_002와 MEHO_004의 유전체에서는 tubulysin 생합성 유전자군(*tubA~tubF*)과 *orf18*, *orfD*이 DSM 2261^T 유전체의 AA314_01909와 AA314_01912 유전자에 해당하는 유전자들 사이에 삽입되어 있다. *orf18*은 patatin-like protein을 암호화하며 *orfD*는 hypothetical protein을 암호화하는 것으로 분석되었다. tubulysin 생합성에 관련하여 *orf18*과 *orfD*의 기능은 알려져 있지 않다. 한편, MEHO_002와 MEHO_004의 유전체에서는 DSM 2261^T 유전체의 AA314_01910과 AA314_01911 유전자에 해당하는 유전자가 존재하지 않는다. 따라서 MEHO_002와 MEHO_004 균주에서는 이 두 유전자를 포함하는 1,867 bp DNA 부위가 tubulysin 생합성 유전자군을 가진 약 40 kb 크기의 DNA로 교체된 것으로 추정된다. AA314_01910과 AA314_01911 유전자는 hypothetical protein을 암호화한다.

Table 3. Comparison between the tubulysin biosynthetic genes of *A. gephyra* MEHO_004 and *Cystobacter* sp. SBCb004.

<i>A. gephyra</i> MEHO_004					<i>Cystobacter</i> sp. SBCb004	
Gene	Product size (aa)	Predicted function	PKS/NRPS motif predicted by antiSMASH	Identity/Similarity (%)	Gene	Product size (aa)
<i>tubA</i>	430	NRPS	C	81/89	<i>tubA</i>	432
<i>orf2</i>	219	hypothetical protein		77/87	<i>orf2</i>	219
-	-			-	<i>tubZ</i>	386
<i>orf1</i>	394	hypothetical protein		91/97	<i>orf1</i>	394
<i>tubB</i>	1,498	NRPS	C-A(pip)-nMT-PCP	84/89	<i>tubB</i>	1,520
<i>tubC</i>	2,622	NRPS	C-A(ile)-PCP-C-A(val)-nMT-PCP	85/90	<i>tubC</i>	2,626
<i>tubD</i>	3,509	PKS/NRPS	KS-AT(mal)-KR-DH-ER-ACP-C-A(cys)-PCP	85/90	<i>tubD</i>	3,511
<i>tubE</i>	1,159	NRPS	C-CAL-PCP	86/90	<i>tubE</i>	1,161
<i>tubF</i>	2,827	PKS	KS-AT(mal)-KR-cMT-KR-DH-ER-ACP-TE	82/88	<i>tubF</i>	2,843
-	-			-	<i>orf17</i>	337
<i>orf18</i>	367	patatin-like protein		81/89	<i>orf18</i>	368
<i>orfD</i>	120	hypothetical protein		62/72	<i>orfD</i>	124

A, adenylation domain; aa, amino acid; ACP, acyl-carrier protein domain; AT, acyltransferase; C, condensation domain; CAL, co-enzyme A ligase domain; cMT, carbon methyltransferase; cys, cysteine; DH, dehydrase; ER, enoylreductase domain; ile, isoleucine; KR, ketoreductase domain; KS, ketosynthase domain; mal, malonate; nMT, nitrogen methyltransferase; NRPS, non-ribosomal peptide synthetase; PCP, peptidyl-carrier protein domain; pip, pipecolic acid; PKS, polyketide synthase; TE, thioesterase domain; val, valine. Identity/Similarity: Identity and similarity to the corresponding proteins encoded by *Cystobacter* sp. SBCb004.

MEHO_002와 MEHO_004 균주는 tubulysin 생합성 유전자군의 DNA 염기서열이 서로 97% 동일하며 유전체 서열도 전반적으로 매우 유사하다. 하지만 MEHO_002 균주는 argyrim 생합성 유전자군을 가져 argyrim을 생산하는 반면, MEHO_004 균주는 argyrim 생합성 유전자를 가지지 않아 argyrim을 생산하지 않는다는 점이 다르다(Fig. 4). Argyrim은 점액세균과 방선균에서 분리된 cyclic octapeptide 계열의 물질로 항암과 항세균 활성을 보인다[24, 25]. MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생산수율은 유사한데, HPLC 분석 시 상대적으로 많은 양이 생산되는 argyrim이 tubulysin과 유사한 위치에서 분리되기 때문에 argyrim을 생산하지 않는 MEHO_004 균주가 tubulysin을 생산하여 분리하고자 할 때 더 유리할 것으로 보인다.

결론적으로, 본 연구에서는 유전체 분석을 통해 *A. gephyra* MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생합성 유전자군을 탐색하였으며, 유전자 불활성화를 통해 이들이 tubulysin 생합성 유전자임을 확인하였다. Tubulysin은 강력한 항암활성으로 인해 응용을 위한 다양한 연구가 이루어지고 있는 물질이다. MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생산수율은 플라스크에 배양하는 경우 0.2–1.0 mg/l 수준으로 기존에 알려진 균주들의 생산수율[22]과 유사하게 매우 낮다. 탐색된 유전자는 향후 유전자 조작에 의한 tubulysin 생산수율의 증대 및 유도체 생산을 위한 중요한

재료로 사용될 것으로 기대한다.

요 약

Tubulysin은 다양한 암세포주에 대해 강한 항암활성을 보이는 점액세균 유래 이차대사 생리활성물질이다. 본 연구에서는 tubulysin을 생산하는 두 균주의 점액세균 *Archangium gephyra* MEHO_002와 MEHO_004의 유전체 분석을 통해 tubulysin 생합성 유전자들로 추정되는 유전자군을 발견하였으며, 플라스미드 삽입에 의한 유전자 불활성화를 통해 이들 유전자들이 tubulysin 생산과 직접 연관되어 있음을 확인하였다. *A. gephyra* MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생합성 유전자군(*tubA*~*tubF*)은 DNA 염기서열이 서로 97% 동일하였으며, 암호화하는 단백질들의 아미노산 서열도 서로 97–100% 유사하였다. MEHO_002와 MEHO_004 균주의 tubulysin 생합성 유전자군은 tubulysin 생산 점액세균으로 알려진 *Cystobacter* sp. SBCb004의 tubulysin 생합성 유전자군과 DNA 염기서열이 86% 동일하였다. 유전자군의 구성은 *tubZ* 유전자가 존재하지 않는다는 점을 제외하고는 SBCb004의 tubulysin 생합성 유전자군 구성과 동일하였다. 각 유전자가 암호화하는 단백질의 아미노산 서열은 *Cystobacter* sp. SBCb004의 tubulysin 생합성 유전자가 암호화하는 단백질들과 88–97% 유사하였으며, 각 단백질들의

도메인 구성도 동일하였다.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Etienne-Manneville S. 2010. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**: 104-111.
- Risinger AL, Giles FJ, Mooberry SL. 2009. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.* **35**: 255-261.
- Sasse F, Steinmetz H, Heil J, Höfle G, Reichenbach H. 2000. Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **53**: 879-885.
- Khalil MW, Sasse F, Lünsdorf H, Elnakady YA, Reichenbach H. 2006. Mechanism of action of tubulysin, an antimetabolic peptide from myxobacteria. *ChemBioChem* **7**: 678-683.
- Chai Y, Pistorius D, Ullrich A, Weissman KJ, Kazmaier U, Müller R. 2010. Discovery of 23 natural tubulysins from *Angiococcus disciformis* An d48 and *Cystobacter* SBCb004. *Chem. Biol.* **17**: 296-309.
- Steinmetz H, Glaser N, Herdtweck E, Sasse F, Reichenbach H, Höfle G. 2004. Isolation, crystal and solution structure determination, and biosynthesis of tubulysins - powerful inhibitors of tubulin polymerization from myxobacteria. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**: 4888-4892.
- Dömling A, Richter W. 2005. Myxobacterial epothilones and tubulysins as promising anticancer agents. *Mol. Divers.* **9**: 141-147.
- Kaur G, Hollingshead M, Holbeck S, Schauer-Vukasinovic V, Camalier RF, Domling A, et al. 2006. Biological evaluation of tubulysin A: a potential anticancer and antiangiogenic natural product. *Biochem. J.* **396**: 235-242.
- Murray BC, Peterson MT, Fecik RA. 2015. Chemistry and biology of tubulysins: antimetabolic tetrapeptides with activity against drug resistant cancers. *Nat. Prod. Rep.* **32**: 654-662.
- Reddy JA, Dorton R, Bloomfield A, Nelson M, Dirksen C, Vetzal M, et al. 2018. Pre-clinical evaluation of EC1456, a folate-tubulysin anti-cancer therapeutic. *Sci. Rep.* **8**: 8943.
- Szigetvari NM, Dhawan D, Ramos-Vara JA, Leamon CP, Klein PJ, Ruple AA, et al. 2018. Phase I/II clinical trial of the targeted chemotherapeutic drug, folate-tubulysin, in dogs with naturally-occurring invasive urothelial carcinoma. *Oncotarget* **9**: 37042-37053.
- Courter JR, Joseph Z, Hamilton JZ, Hendrick NR, Zaval M, Waight AB, et al. 2020. Structure-activity relationships of tubulysin analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **30**: 127241.
- Sandmann A, Sasse F, Müller R. 2004. Identification and analysis of the core biosynthetic machinery of tubulysin, a potent cytotoxin with potential anticancer activity. *Chem. Biol.* **11**: 1071-1079.
- Hyun H, Choi J, Kang D, Kim Y, Lee P, Chung GJY, et al. 2021. Screening of myxobacteria carrying tubulysin biosynthetic genes. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **49**: 32-38.
- Shin H, Youn J, An D, Cho K. 2013. Production of antimicrobial substances by strains of myxobacteria *Corallococcus* and *Myxococcus*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **41**: 44-51.
- Lee B, Lee C, Cho K. 2003. Isolation of dispersed mutants from wild myxobacteria. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 342-347.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, N.Y., USA.
- Blin K, Shaw S, Steinke K, Villebro R, Ziemert N, Lee SY, et al. 2019. antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Res.* **47**: W81-W87.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Mereshuk Y, McGinnis S, Madden TL. 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.* **36**: W5-W9.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, et al. 2015. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* **43**: D222-D226.
- Shimkets LJ. 1986. Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **166**: 837-841.
- Chai Y, Shan S, Weissman KJ, Hu S, Zhang Y, Müller R. 2012. Heterologous expression and genetic engineering of the tubulysin biosynthetic gene cluster using Red/ET recombination and inactivation mutagenesis. *Chem. Biol.* **19**: 361-371.
- Ullrich A, Chai Y, Pistorius D, Elnakady YA, Herrmann JE, Weissman KJ, et al. 2009. Pretubulysin, a potent and chemically accessible tubulysin precursor from *Angiococcus disciformis*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**: 4422-4425.
- Selva E, Gastaldo L, Saddler GS, Toppo G, Ferrari P, Carniti G, et al. 1996. Antibiotics A21459 A and B, new inhibitors of bacterial protein synthesis. I. Taxonomy, isolation and characterization. *J. Antibiot.* **49**: 145-149.
- Sasse F, Steinmetz H, Schupp T, Petersen F, Memmert K, Hofmann H, et al. 2002. Argynins, immunosuppressive cyclic peptides from myxobacteria. I. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **55**: 543-551.