



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

*Streptomyces venezuelae*

ATCC15439에서 ECF sigma  
factor SigR1의 기능에 대한 연구

Function of SigR1, an ECF sigma factor  
in *Streptomyces venezuelae* ATCC15439

2018년 08월

서울대학교 대학원

생명과학부

홍 상 아

Function of SigR1, an ECF sigma factor  
in *Streptomyces venezuelae* ATCC15439

by

Sang-Ah Hong

under the supervision of

Professor Jung-Hye Roe, Ph.D.

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the  
Requirements for the Degree of  
Master of Science

August, 2018

SCHOOL OF BIOLOGICAL SCIENCES  
GRADUATE SCHOOL  
SEOUL NATIONAL UNIVERSITY

## 국문 초록

박테리아는 일생 동안 다양한 환경에 노출되어 있으며 외부 스트레스에 적절히 반응하고 대응하는 것은 개체의 생존이나 성장에 있어 매우 중요하다. 박테리아는 전사나 번역 과정을 통해 필요한 유전자와 단백질을 발현시켜 환경에 대응하는데 특히 RNA 중합효소와 holoenzyme을 이루고 프로모터의 -10, -35 부분과 결합하여 하위 유전자를 조절하는 대표적인 전사조절자인 시그마 인자에 대한 연구는 지금까지 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 다양한 항생제와 이차대사산물의 생산자로 잘 알려진 *Streptomyces venezuelae* ATCC15439 균주에서 아직까지 그 기능이 밝혀지지 않은 SigR1이 반응하는 유도 인자와 그에 대응하는 조절 기작을 알아내고자 하였다. 또한 SigR1은 산화 스트레스에 반응하며 이미 regulon들이 잘 밝혀져 있는 SigR과 구조가 유사하다는 이유에서 SigR1이라고 이름 붙여졌는데, 실제로 두 시그마 인자의 기능이 유사할지, 다르다면 어떻게 다를지, 서로의 관계는 어떻게 확인해보고자 하였다.

SigR1이 특이적으로 반응하는 외부 조건을 찾기 위해 *sigR1* 결실 돌연변이를 다양한 항생제나 스트레스 조건 하에서 키우며 표현형을 살펴보았다. 이때 *sigR1* 결실 돌연변이는 열 충격과 SDS 스트레스에 특이적으로 생존에 결함을 보이는 것을 확인하였으며 야생형에 열 충격을 주었을 때 *sigR1*의 RNA 발현과 단백질 발현이 처리하지 않았을 때에 비해 현저히 높아진다는 것을 관찰하였다. 이와 더불어 SigR1이 스스로의 전사를 조절하는 autoregulation을 한다는 것도 발견하였다.

SigR1의 항 시그마 인자인 RsrA1의 특징에 대해서도 살펴보았다. 열 충격을 주었을 때 *sigR1*의 RNA와 단백질 발현이 높아지기 때문에 항 시그마 인자인 *rsrA1*의 RNA와 단백질 발현은 줄어들 것이라고 예상하였는데, 예상과는 다르게 *rsrA1*의 RNA와 단백질 발현 또한 높아진다는 것을 알 수 있었다. RsrA1의 기능과 SigR1 조절 기작에 대해서는 더 많

은 연구가 필요하다.

SigR1이 조절하는 regulon과 DNA 결합자리를 알아보기 위해 transcriptome 분석과 chromatin immune-precipitation(ChIP) sequencing을 진행하였다. RNA sequencing을 통한 transcript 분석을 통해 SigR1이 조절하는 표적 유전자 571개를 확보했으며 tellurite 관련 유전자와 세포막과 관련된 유전자가 특징적으로 존재하는 것을 확인하였다. 또한 실제로 표적 유전자의 프로모터 -10, -35 부분에 *sigR1*이 결합하는지 알아보기 위해 ChIP을 진행하였으며 ChIP DNA 분석을 통해 *sigR1* 결실 돌연변이에 비해 야생형에서 많이 발견되는 유전자 85개를 확보할 수 있었다. RNA sequencing과 ChIP sequencing으로 얻은 예상 regulon 목록에 공통적으로 존재하는 유전자 30개를 SigR1의 regulon이라고 결론 내렸으며, SigR1의 DNA 결합 자리 시퀀스는 GGAAC-N<sub>17</sub>-CGTT이라고 찾아낼 수 있었다.

결과적으로 SigR1은 oxidative 스트레스에 반응하는 SigR과 달리 열 충격이나 SDS 스트레스에 반응한다는 것이 관찰되었다. 또한 SigR1이 직접적으로 조절하는 regulon과 DNA 결합 자리 또한 SigR과는 다르다고 결론 내릴 수 있었다. 이러한 차이에서 보았을 때 SigR1의 이름을 새로이 명명해야 할 필요성이 제기된다.

**주요어 :** *Streptomyces venezuelae*, sigma factor, *sigR1*, *rsrA1*, heat stress, SDS, membrane, tellurite

**학 번 :** 2016-29436

## 목차

국문 초록 .....	1
목차 .....	3
그림 차례 .....	6
표 차례 .....	7
1. 서론 .....	8
1.1 <i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC15439 .....	9
1.2 ECF(Extracellular Cytoplasmic Function) 시그마 인자 .....	9
1.3 시그마 인자 <i>sigR1</i> 과 항 시그마 인자 <i>rsrA1</i> .....	11
1.4 연구 목적 .....	13
2. 실험 재료 및 방법 .....	15
2.1 박테리아 균주 및 배양 조건 .....	16
2.2 DNA 재조합 .....	21
2.2.1 <i>E. coli</i> 형질전환 .....	21
2.2.2 <i>E. coli</i> 와 <i>S. venezuelae</i> 의 접합 .....	21
2.3 DNA 분석 .....	21
2.3.1 <i>S. venezuelae</i> gDNA 추출 .....	21
2.4 RNA 분석 .....	22
2.4.1 <i>S. venezuelae</i> RNA 추출 (Kirby method) .....	22
2.4.2 <i>S. venezuelae</i> RNA 추출 (Hot phenol method) .....	22
2.4.3 qRT-PCR .....	22
2.4.4 RNA sequencing .....	27

2.5 단백질 분석 .....	27
2.5.1 Western blot .....	27
2.5.2 <i>E. coli</i> 에서 SigR1 과발현 및 정제 .....	28
2.5.3 Immuno-precipitation .....	29
2.5.4 Chromatin immuno-precipitation .....	29
2.5.5 ChIP sequencing .....	31
2.6 Spotting assay .....	32
3. 결과 .....	33
3.1 <i>sigR1</i> 의 특징 .....	34
3.1.1 분화와 성장 .....	34
3.1.2 항생제 처리 .....	36
3.1.3 다양한 스트레스 처리 .....	38
3.1.4 열 충격 하에서 <i>sigR1</i> 의 RNA, 단백질 발현정도 .....	40
3.1.5 Autoregulation 확인 .....	43
3.2 <i>sigR1</i> 의 항 시그마 인자, <i>rsrA1</i> .....	45
3.2.1 열 충격 하에서 <i>rsrA1</i> 의 RNA, 단백질 발현정도 .....	45
3.2.2 <i>rsrA1</i> 의 transmembrane domain .....	48
3.3 SigR1의 regulon 및 DNA 결합자리 .....	50
3.3.1 Transcriptome 분석 .....	50
3.3.2 ChIP 분석을 통한 SigR1의 표적 유전자 및 DNA 결합자리 ..	54
3.3.3 Tellurite 관련 유전자들의 역할 분석 .....	58
3.3.4 SigR1의 최종 regulon .....	61
4. 논의 .....	64
4.1 SigR1-RsrA1과 SigR-RsrA 시스템의 비교 .....	65
4.2 새로운 이름의 필요성 .....	66

4.3 앞으로 진행되어야 할 실험 및 전망 .....	67
5. 참고 문헌 .....	69
Abstract .....	73



## 그림 차례

그림 1. <i>Streptomyces</i> 와 <i>Mycobacterium</i> 에서의 <i>sigR1</i> .....	12
그림 2. <i>S. venezuelae</i> 에서 야생형, <i>sigR</i> 결실 돌연변이, <i>sigR1</i> 결실 돌연변이의 분화와 성장 .....	35
그림 3. 항생제 처리 .....	37
그림 4. 다양한 스트레스 처리 .....	39
그림 5. <i>sigR1</i> 의 RNA와 단백질 발현 정도 .....	42
그림 6. SigR1의 autoregulation 확인 .....	44
그림 7. <i>rsrA1</i> 의 RNA와 단백질 발현 정도 .....	47
그림 8. RsrA1의 transmembrane domain 분석 .....	49
그림 9. SigR1의 표적 유전자 특징 분석 .....	52
그림 10. SigR1의 DNA 결합 시퀀스 분석 .....	57
그림 11. Tellurite 관련 유전자들의 분석 .....	60
그림 12. SigR1의 최종 regulon graphical summary .....	62

## 표 차례

표 1. 이번 연구에 사용된 균주 .....	17
표 2. 이번 연구에 사용된 플라스미드 .....	18
표 3. 이번 연구에 사용된 cloning 프라이머 .....	19
표 4. qRT-PCR 시 유전자 발현 확인용 프라이머 .....	25
표 5. Transcriptome 분석을 통한 SigR1의 예상 표적 유전자 .....	53
표 6. ChIP sequencing을 통한 SigR1의 예상 표적 유전자 .....	56
표 7. SigR1의 최종 regulon .....	63

## 1. 서론

## 1.1 *Streptomyces venezuelae* ATCC15439

*Streptomyces*는 방선균 중 가장 많이 존재하는 속(genus)이며 G+C 비율이 높은 그람 양성균이다. 이 균주는 주로 토양에 존재하고 있으며 lignocellulose나 chitin 등 다양한 종류의 불용성 유기물질을 분해하여 탄소 순환에 중요한 역할을 하는 분해자이기도 하다(McCarthy and Williams, 1992). *Streptomyces*의 가장 두드러지는 특징은 이 균주가 항생제, 항진균제, 면역억제제 등 다양한 이차대사산물의 생산자라는 것인데(de Lima Procopio et al., 2012), 이러한 이차대사산물들은 *Streptomyces*와 같은 환경을 공유하는 생물체들과의 경쟁에 있어서 매우 중요하며 종(species)에 따라 그 종류가 다양하다. 또한 *Streptomyces*는 구조적으로 균사(hyphae)라는 영양체를 가지는데 이는 후에 포자(spore)로 분화하여 새로운 개체로 이어진다.

대표적인 *Streptomyces* 중 하나인 *Streptomyces venezuelae* ATCC15439는 9.0 Mb 길이의 선형 염색체를 가지고 있으며 액체 배지에서도 분화가 끝까지 진행된다는 특징을 가지고 있다. 이차대사산물로는 항생제인 pikromycin을 생성하는 것으로 알려져 있으며 *Streptomyces* 속에서 상대적으로 많은 연구가 되어 온 *Streptomyces coelicolor*보다 빠르게 자라고 형질전환 효율이 좋다는 장점을 가지고 있다(Song, J. Y. et al., 2016).

## 1.2 ECF(Extracellular Cytoplasmic Function) 시그마 인자

외부 스트레스에 적절히 반응하고 대응하는 것은 개체의 생존이나 성장에 있어 매우 중요하다. 박테리아는 전사나 번역 과정을 통해 필요한 유전자와 단백질을 발현시켜 환경에 대응하는데 특히 RNA 중합효소와 holoenzyme을 이루어 전사를 돕는 시그마 인자는 그 역할이 매우 중요하다. 시그마 인자는 크게 housekeeping 시그마 인자와 ECF(Extracellular Cytoplasmic Function sigma factor), 혹은 Group 4 시

그마 인자로 나뉜다. 평소 생장에 필요한 유전자를 담당해 항상 발현되는 housekeeping 시그마 인자와 달리 ECF 시그마 인자는 특정 외부 스트레스를 인식함으로써 발현 되어 regulon을 조절하는 것으로 알려져 있다 (Feklistov, A. et al., 2014).

많은 경우 ECF 시그마 인자는 항 시그마 인자와 오페론으로 함께 존재한다. 평소의 시그마 인자는 항 시그마 인자에 의해 붙잡혀 그 기능이 막혀있지만 특정 스트레스를 인식하면 항 시그마 인자가 proteolysis, degradation 등의 기작을 거쳐 시그마 인자를 놓아준다. 자유로워진 시그마 인자는 RNA 중합효소와 holoenzyme을 이루고 DNA의 특정 시퀀스를 인식하여 자신이 조절하는 regulon의 전사를 돕는다. 이때 각 시그마 인자마다 인식하는 스트레스의 종류와 DNA 시퀀스, 조절 기작 등은 조금씩 다르다.

ECF 시그마 인자는 발견된 이후로 최근까지 다양한 균주에서 활발한 연구가 진행되고 있다. 이 종류의 시그마 인자는 1994년, University of California at San Francisco Dental School의 Mark J. Buttner 랩에 소속되어있던 Michael A. Lonetto에 의해 *Streptomyces coelicolor*에서 처음 발견되었다. 당시 *S. coelicolor*에서 SigE에 대한 연구를 진행하던 Lonetto는 SigE가 그동안 밝혀져 있던 다른 시그마 인자들과는 다르게 extracytoplasmic stimuli-related effector molecule에 의해 조절되는 것을 확인하였고 이와 같은 특성을 지닌 시그마 인자들을 함께 ECF subfamily group으로 묶어 제시하였다(Lonetto M. A. et al., 1994).

방선균은 다른 박테리아들보다 훨씬 많은 수의 시그마 인자를 가지고 있으며 (*E. coli*의 경우 7개, *S. coelicolor*의 경우 65개) *S. venezuelae* ATCC15439의 경우 43개의 시그마 인자 중 34개가 ECF 시그마 인자이다.

### 1.3 시그마 인자 *sigR1*과 항 시그마 인자 *rsrA1*

*S. venezuelae*의 SigR1은 SigR과는 50 % 이상의 유사도를 가지고 있으며 *sigR*의 homologous 유전자라는 의미에서 *sigR1*이라고 명명되어 있다.

*sigR1*의 바로 뒤에 위치한 AQF52\_5272 유전자는 putative membrane protein이라고 명명되어있으며 *sigR1*과는 ORF가 22 nucleotide가 겹쳐진 오페론 구조를 가지고 있다. 대부분의 ECF 시그마 인자는 자신의 항 시그마 인자와 오페론 구조를 이루고 있기 때문에 AQF52\_5272 또한 *sigR1*의 항 시그마 인자라고 생각되고 있으며, 편의 상 본 연구에서는 *sigR*의 항 시그마 인자인 *rsrA*에서 이름을 따와 *rsrA1*이라 불렀다.

SigR1은 233개의 아미노산으로 구성되어 있으며 RsrA1은 318개의 아미노산으로 구성되어 있다. SigR1의 경우 272개의 아미노산으로 구성된 SigR과 길이 면에서 큰 차이가 없지만 RsrA1은 110개의 아미노산으로 이루어진 RsrA보다 길이가 훨씬 길다는 특징을 가지고 있다. 때문에 RsrA는 가지지 못하는 transmembrane domain을 가질 것이라고 추측하고 있다.

*sigR1-rsrA1* 시스템은 *Streptomyces* 뿐만 아니라 같은 방선균 중 연구가 많이 되어온 *Mycobacteria*까지 잘 보존되어있다. *M. tuberculosis*와 *M. smegmatis*에서 *sigR1*의 homologous 유전자는 *sigE*이며 *rsrA1*의 homologous 유전자는 *rseA*이다. *rseA*는 그 길이가 *rsrA1*보다 많이 짧다는 특징을 지니고 있다.

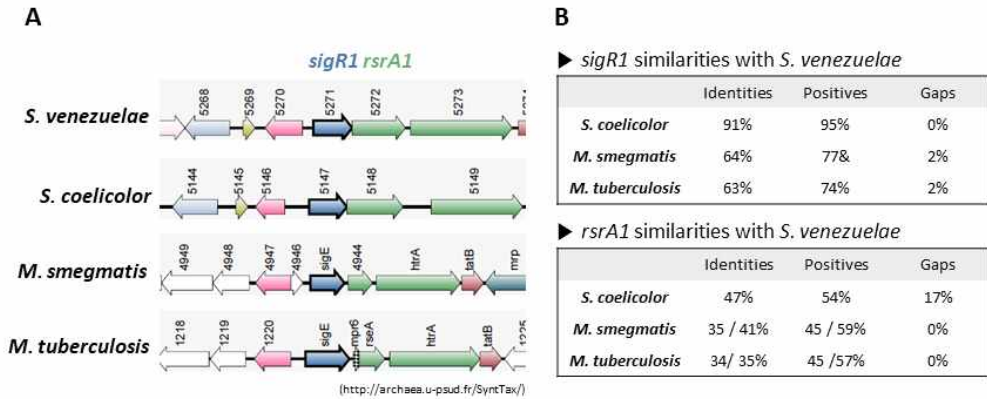


그림 1 *Streptomyces*와 *Mycobacterium*에서의 *sigR1*

*S. venezuelae*, *S. coelicolor*, *M. tuberculosis*, 그리고 *M. smegmatis*에서의 *sigR1* 오페론 구조(A)와 유사도(B)를 나타낸 그림이다. *Streptomyces*의 *rsrA1*보다 *Mycobacteria*의 *rseA*의 길이가 더 짧으며 각 유전자들의 유사도는 B의 표와 같다. 그림 (A)의 alignment는 <http://archaea.u-psub.fr/SyntTax> 프로그램을 사용하였다.

## 1.4 연구 목적

ECF 시그마 인자(Group 4 시그마 인자)는 다양한 환경에 대응하여 세포 내의 유전자와 단백질 발현을 조절하는 주 조절자로 많은 연구가 되어왔다. 하지만 *sigR*의 homologous 유전자로만 알려진 SigR1이 어떠한 스트레스에 반응하는지, 항 시그마 인자인 RsrA1은 어떠한 기작을 가지고 SigR1의 기능을 조절하는지, 그리고 SigR1이 얼마나 많은 하위 유전자를 조절하는지 대해서는 밝혀진 바가 없다.

그에 반해, *Streptomyces*와 같은 문(phylum)인 Actinobacteria의 *Mycobacterium*에서는 *sigR1*의 homologous gene인 *sigE*에 대한 연구가 상당 부분 진행되어 있다. *Mycobacterium tuberculosis*의 SigE는 항 시그마 인자인 RseA에 의해 조절되며 세포 벽 스트레스, 산화 스트레스, 열 충격 등에 관여한다는 것이 밝혀졌다(Manganelli, R. et al., 2002). 또한 SigE의 DNA 결합자리 시퀀스가 SigH(*Streptomyces sigR*의 homologous 유전자)의 DNA 결합자리 시퀀스와 상당히 비슷하다는 것도 또한 알려졌으며 regulon도 대략적으로 밝혀진 상태이다. 이러한 연구는 *S. venezuelae* ATCC15439의 SigR1 또한 세포 벽 스트레스나 열 충격 등과 관련된 기능을 수행할 것이라는 점을 시사하며 *sigR1* 결실 돌연변이에 비슷한 스트레스를 처리하여 표현형을 살펴봄으로써 그동안 밝혀지지 않았던 SigR1의 발현 조건과 기작을 확인할 수 있을 것으로 보인다.

본 연구를 통해 외부 자극에 대응하여 하위 유전자를 발현하고 스트레스에 대응하는 역할을 하는 *sigR1* 유전자에 대해 이해하고, 그 전체 조절 기작을 알아냄으로써 *sigR*과의 차이점을 밝힘과 동시에 *sigR1*만의 구별되는 기능과 서로간의 상관관계를 확인해보고자 한다. 이를 위해 먼저 *sigR1* 결실 돌연변이를 이용하여 SigR1이 특이적으로 반응하는 스트레스를 찾아보았으며 스트레스 하에서 *sigR1*의 발현 정도와 SigR과의 관련성을 살펴보았다. 또한 SigR1의 항 시그마 인자인 RsrA1의 특징을 알아 보았으며 마지막으로 transcriptome 분석과 ChIP sequencing을 통해 SigR1의 regulon과 DNA 결합 자리를 확인해보았다. 궁극적으로는 이를



바탕으로 방선균의 생리기작과 그 정교한 유전자 조절을 이해해 보고자 하였다.

## 2. 실험 재료 및 방법

## 2.1 박테리아 균주 및 배양 조건

이번 연구에서 사용된 *Streptomyces venezuelae* ATCC15439와 *Escherichia coli* 균주들은 표 1에 나열되어있다.

*Streptomyces venezuelae*는 30℃에서 MYM 배지(10 % maltose extract, 4 % maltose, 4 % yeast extract)에서 배양되었으며 접합 실험 시에는 SFM(soy flour 2 %, mannitol 2 %) 고체 배지도 사용하였다.

*Escherichia coli*는 37℃에서 LB(1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl)배지에서 배양했다. *E. coli*의 여러 균주 중 DH5  $\alpha$ 는 plasmid의 형질전환을 할 때 사용되었으며 BL21은 단백질 과발현 시, 그리고 ET12547은 *E. coli*와 *S. venezuelae*의 접합 실험을 할 때 사용되었다.

표 1 이번 연구에 사용된 균주

균주	Source / reference
<b><i>S. venezuelae</i> ATCC15439</b>	
<i>ΔsigR</i>	Lab stock, 김지은
<i>ΔsigR1</i>	Lab stock, 김지은
<i>ΔsigR::pSET152-sigRrsrA</i>	이번 연구
<i>ΔsigR1::pSET152-sigR1rsrA1</i>	이번 연구
<i>ΔsigR1::pSET152-sigR1rsrA1-6xmyc</i>	이번 연구
<i>ΔsigR1::permE</i>	이번 연구
<i>ΔsigR1::permE-telR</i>	이번 연구
<i>ΔsigR1::permE-terB</i>	이번 연구
<i>ΔsigR1::permE-terD2</i>	이번 연구
<b><i>E. coli</i></b>	
DH5 <i>a</i>	Hanahan, 1983
BL21(DE3)pLysS	Studier and Moffatt, 1986
ET12567pUZ8002	Gust, B. et al., 2003
DH5 <i>a</i> ::SV <i>sigR1</i>	이번 연구
BL21(DE3)pLysS::SV <i>sigR1</i>	이번 연구
ET12567pUZ8002::pSET152- <i>sigRrsrA</i>	이번 연구
ET12567pUZ8002::pSET152- <i>sigR1rsrA1</i>	이번 연구
ET12567pUZ8002::pSET152- <i>sigR1rsrA1-6x myc</i>	이번 연구
ET12567pUZ8002::pSET152- <i>permE</i>	이번 연구
ET12567pUZ8002::pSET152- <i>permE-telR</i>	이번 연구
ET12567pUZ8002::pSET152- <i>permE-terB</i>	이번 연구
ET12567pUZ8002::pSET152- <i>permE-terD2</i>	이번 연구

표 2 이번 연구에 사용된 플라스미드

균주	Genotype / description	Source / reference
pET15b	<i>E. coli</i> 과발현 벡터	Novagen
pET15b:: <i>sigR1</i>	<i>sigR1</i> 을 가진 pET15b	이번 연구
pET15b:: <i>rsrA1</i>	<i>rsrA1</i> 을 가진 pET15b	이번 연구
pSET152	Conjugative plasmid	Bierman, M. et al., 1992
pSET152:: <i>sigR1rsrA1</i>	<i>sigR1-rsrA1</i> 을 가진 pSET152	이번 연구
pSET152:: <i>sigRrsrA</i>	<i>sigR-rsrA</i> 를 가진 pSET152	이번 연구
pSET152:: <i>sigR1rsrA1</i> -6x myc	<i>sigR1-rsrA1</i> 의 Cterm에 myc tagging을 가진 pSET152	이번 연구
pSET152:: <i>permE</i>	<i>ermE</i> 프로모터를 가진 pSET152	이번 연구
pSET152:: <i>tel R</i>	<i>ermE</i> 프로모터와 <i>tellurite R gene</i> 을 가진 pSET152	이번 연구
pSET152:: <i>terB</i>	<i>ermE</i> 프로모터와 <i>terB</i> 를 가진 pSET152	이번 연구
pSET152:: <i>terD2</i>	<i>ermE</i> 프로모터와 <i>terD2</i> 를 가진 pSET152	이번 연구

표 3 이번 연구에 사용된 cloning 프라이머

프라이머	Sequences	Note
SV SigR1 NdeI F	ATT CATATG GTGGATCGGGGAGGA	pET15b에 <i>sigR1</i> 을 cloning할 Foward/ Reverse
SV SigR1 Xho1 R	TAA CTCGAG CGCTGTCCCTGCCT	
SV <i>rsrA1</i> F	GCG CATATG ATGGGAGGCAGGGACAGC	p E T 1 5 b 에 <i>rsrA1</i> (TM domain 제외)을 cloning할
SV <i>rsrA1</i> R2	ATT CTCGAG TCAGAAGCGCCGCGCG	Foward/ Reverse
SV <i>sigR1rsrA1</i> EcoRV G2	gacatgattacgaattcgatCCGCGA GACGCGGCAGGA	p S E T 1 5 2 에 <i>sigR1rsrA1</i> operon 넣을 gibson assembly용 Foward/ Reverse
SV <i>sigR1rsrA1</i> XbaI G	gcttgggctgcaggtcgactTCAGC GGTGGGAGCCGAG	
SV <i>sigRrsrA</i> EcoRV F	AAG GATATC AAGAAGGTCGCGCCCGC	p S E T 1 5 2 에 <i>sigRrsrA</i> operon 넣 을 Foward/ Reverse
SV <i>sigRrsrA</i> XbaI R	ATA TCTAGA CTACTCCTGCGGAGCGG	
<i>ermE</i> F	ggctgcaggtcgactAGCCCGACC CGAGCACGC	pSET152에 <i>ermE</i> 프로모터를 넣을 Gibson assembly용 Foward/ Reverse
<i>ermE</i> R	catgattacgaattcgatGTCCGTA CCTCCGTTGCTCGACTAG	
<i>ermE</i> -tellurite R F	ggctgcaggtcgactAGCCCGACC CGAGCACGC	pSET152에 <i>ermE</i> 프로모터와 <i>tel R</i> 유 전자를 넣을 Gibson assembly용 Foward/ Reverse
<i>ermE</i> -tellurite R R	atgccacGTCCGTACCTCCGT TGCTCGACTAG	
<i>ermE</i> -tellurite R F2	gtacggacGTGGCGATGTGGG ATCGG	
<i>ermE</i> -tellurite R R2	catgattacgaattcgatTCAGATG CCGA ACTCCGC	
<i>ermE</i> - <i>terB</i> F	ggctgcaggtcgactAGCCCGACC CGAGCACGC	pSET152에 <i>ermE</i> 프로모터와 <i>terB</i> 유전 자를 넣을 Gibson assembly용 Foward/ Reverse
<i>ermE</i> - <i>terB</i> R	agcgccatGTCCGTACCTCCG TTGCTCGACTAG	
<i>ermE</i> - <i>terB</i> F2	gtacggacATGGCGCTGTGGG ACCGC	
<i>ermE</i> - <i>terB</i> R2	catgattacgaattcgatCTAAAGG TCGA ACTCGTGCGGC	
<i>ermE</i> - <i>terD2</i> F	ggctgcaggtcgactAGCCCGACC CGAGCACGC	pSET152에 <i>ermE</i> 프로모터와 <i>terD2</i> 유
<i>ermE</i> - <i>terD2</i> R	acagccatGTCCGTACCTCCGT	

ermE-terD2 F2	TGCTCGACTAG gtacggacATGGCTGTGAGCC TGTCC	전자를 넣을 Gibson assembly용 Foward/ Reverse
ermE-terD2 R2	catgattacgaattcgatTTAGAGG TTCACGCCGAAG	
SV sigR1rsrA1 EcoRV G3	tctagaagatcgatgtgatTCAGCG GTGGGAGCCGAG	p S E T 1 5 2 에 <i>sigR1rsrA1</i> operon 과 6x myc을 넣을 primer set
SV rsrA1-myc-R	CCGCTGCCGCGGTGGGAGC CGAGCGG	
SV rsrA1-myc-F	CTCGGCTCCCACCGCGGCA GCGGC TCCTTCGAG	
myc-pSET152 R	AGCTATGACATGATTACGA ATTCGATGGATCCTCATCA CAGGTCCT	

## 2.2 DNA 재조합

### 2.2.1 *E. coli* 형질전환

*E. coli*로의 DNA 도입은 가장 보편적으로 쓰이고 있는  $\text{CaCl}_2$ 를 이용한 방법을 사용하였다 (Sambrook, J. et al., 1989).

### 2.2.2 *E. coli*와 *S. venezuelae*의 접합

원하는 유전자가 cloning 된 vector(pSET152)를 ET12567 competent cell에 transformation 해주었다. Transformants는 chloramphenicol(12.5  $\mu\text{g/ml}$ )과 kanamycin(50  $\mu\text{g/ml}$ ), 그리고 vector의 selecting antibiotics인 apramycin(50  $\mu\text{g/ml}$ )이 들어간 10ml LB에서 OD<sub>600</sub>이 0.4-0.6이 될 때까지 키워주었다. 이후 10ml의 LB로 두 번 세척하여 남아있는 antibiotics를 제거하였다. LB 세척 과정을 거치며 약  $10^8$ 개의 spore를 500  $\mu\text{l}$ 의 2xYT에 넣어주고 50°C에서 약 10분간 pre-germination 시켜주었다. 세척이 끝난 ET12567 셀과 pre-germination이 끝난 *S. venezuelae* spore는 한 튜브에 섞어 SFM 배지에 갈아주었으며 30°C에서 약 12시간 배양하였다. 12시간이 지나면 0.5 mg의 nalixidic acid와 1.25 mg의 apramycin을 섞은 1ml의 멸균수를 배지 위에 overlay 해주었고 약 30시간 뒤 콜로니가 뜨면 MYM 배지에 옮겨 급었다.

## 2.3 DNA 분석

### 2.3.1 *S. venezuelae* gDNA 추출

전날 MYM 배지에 접종해 놓은 *S. venezuelae*를 수거하여 1분간 13000 rpm, 4°C에서 원심분리하고 상층액을 제거했다. Lysozyme(50 mg/ml) 70  $\mu\text{l}$ 와 TER 630  $\mu\text{l}$ 을 넣어주고 37°C에서 1시간동안 배양한 뒤 EDTA(0.5 M) 70  $\mu\text{l}$ , proteinase K(20 mg/ml), 그리고 SDS(10%)를 넣어주고 용액이 투명해질 때까지 10분 이상 55°C에서 반응시켰



다. 이후 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 700  $\mu\text{l}$  넣어주고 inverting 후 4°C에서 밤새 incubation하였다. 다음날, 20분간 12000 rpm, 4°C에서 원심분리하고 상층액 400  $\mu\text{l}$ 와 isopropyl alcohol 400  $\mu\text{l}$ 를 섞어 -20°C에서 1시간 이상 방치하였다. 이후 70 % ethanol로 세척하고 pellet을 dry 한 뒤 50  $\mu\text{l}$ 의 삼차수를 넣어 최종 gDNA를 elution 하였다.

## 2.4 RNA 분석

### 2.4.1 *S. venezuelae* RNA 추출 (Kirby method)

전날 MYM 배지에 접종한 *S. venezuelae*를 수거하였다. 수거한 셀에 2X kirby mix를 600  $\mu\text{l}$  넣고 Q500 sonicator와 3mm tip을 이용하여 20 %의 power로 1초에 한번씩 5번 pulse를 주었다. 이후 바로 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 600  $\mu\text{l}$ 의 넣고 20초 이상 vortexing 하였다. Vortexing 후 20분간 sample을 13000 rpm, 4°C에서 원심분리하였고, 상층액 350  $\mu\text{l}$ 에 isopropyl alcohol 700  $\mu\text{l}$ , NaOAC(3 M) 35  $\mu\text{l}$ 을 넣어 다시 vortexing 하였다. 이후 ethanol precipitation 과정을 거치고 pellet을 dry 한 뒤 100  $\mu\text{l}$ 의 삼차수를 넣어 RNA를 elution 하였다. 추출된 RNA는 nano-drop 2000 spectrometer(Thermo scientific)를 통해 정량하였다.

### 2.4.2 *S. venezuelae* RNA 추출 (Hot phenol method)

전날 MYM 배지에 접종한 *S. venezuelae*를 수거하였다. 수거한 셀에 lysozyme solution (2 mg/ml in Sol I buffer)을 넣고 suspend한 뒤 30°C에서 10분 이상 incubation 하였다. 5분간 13000 rpm, 4°C에서 원심분리한 뒤 AE buffer 500  $\mu\text{l}$ 를 추가로 넣고 suspend 하였으며 SDS(10 %) 50  $\mu\text{l}$ 을 넣고 빠르게 inverting 하였다. 이후 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 550  $\mu\text{l}$ 을 넣고

40초 이상 vortexing 해주었다. 샘플이 어느 정도 차가워지면 20분간 4°C에서 12000 rpm으로 원심분리 하였으며 상층액 350  $\mu$ l에 isopropyl alcohol 700  $\mu$ l, NaOAC(3 M) 35  $\mu$ l 넣고 다시 vortexing 하였다. 이때 하얗게 침전물로 형성되는 gDNA는 yellow tip의 끝을 구부러트리 밖으로 빼주며 제거하였으며 ethanol precipitation 과정을 거쳐 RNA 추출을 마무리하였다.

## 2.4.3 qRT-PCR

### 2.4.3.1 DNase 처리

추출한 RNA 50  $\mu$ g에 DNase buffer 5  $\mu$ l, RNase inhibitor 1  $\mu$ l, DNase 1  $\mu$ l를 넣고 삼차수로 최종 부피가 50  $\mu$ l을 맞추었다. 37°C에서 30분간 enzyme들을 반응시켰으며 반응이 끝나면 5  $\mu$ l의 inactivation agent를 넣어주고 태핑하며 5분 간 기다렸다. 5분이 지나면 2분 간 4°C에서 1000 g로 원심분리 하였고 상층액을 조심스레 따 새 튜브로 옮겼다.

### 2.4.3.2 cDNA 합성

Nano-drop을 이용하여 DNase 처리가 끝난 RNA의 농도를 재었다. RNA의 양이 1  $\mu$ g이 되도록 PCR 튜브에 넣고 2  $\mu$ l의 random primer(0.1  $\mu$ g/ $\mu$ l)를 넣어주었으며 삼차수를 넣어 최종 부피가 10  $\mu$ l가 되도록 맞춰주었다. 이후 PCR 기기를 사용하여 65°C에서 5분, 10°C에서 5분 처리한 뒤 4  $\mu$ l의 5X reaction buffer, 4  $\mu$ l의 2.5 mM dTNPs, 1  $\mu$ l의 RevertAid reverse transcriptase를 추가로 넣어주고 삼차수를 이용해 최종 부피를 20  $\mu$ l으로 맞추었다. 마찬가지로 PCR 기기를 사용하여 25°C 10분, 50°C 60분, 70°C 15분 처리를 해준 뒤 10°C에서 reaction을 멈추었다.

#### 2.4.3.3 qRT-PCR

만들어진 cDNA를 각각 1/10과 1/2000으로 희석하였다. 모든 qRT-PCR의 reference gene으로는 16s rRNA를 사용했으며 16s rRNA qRT-PCR primer를 사용한 튜브는 모두 1/2000으로 희석된 cDNA를 template으로 넣어주었다. 그 외 분석을 원하는 유전자의 qRT-PCR 시에는 1/10으로 희석된 cDNA를 template으로 넣어주었다. 희석된 cDNA 3  $\mu$ l에 10 pmol으로 희석한 F/R primer 2  $\mu$ l, 2X cyber green buffer 10  $\mu$ l, 삼차수 5  $\mu$ l을 넣어 최종 볼륨을 20  $\mu$ l로 맞추어주었다. 이후 qRT-PCR 기기를 사용하여 denaturation 95°C 15분, reaction cycle 95°C 10초, 60°C 15초, 72°C 30초를 40번 반복하였다. 데이터는 엑셀 파일로 받아 보정 후 분석하였다.

표 4 qRT-PCR 시 유전자 발현 확인용 프라이머

프라이머	Sequences	Note
SV sigR1 RT F	ACCAATCTCTTCCTCGAC ATG	<i>sigR1</i> RNA 발현 확인
SV sigR1 RT R	TCGAAGTGGGTGTCGTTG	
SV sigR RT F	GATTCCTCGACCAGATGT ACTC	<i>sigR</i> RNA 발현 확 인
SV sigR RT R	GTACAGCCACGCCTTGAG	
SV rsrA1 RT F	GCCGAGCAGTTCTTCGAG	<i>rsrA1</i> RNA 발현 확인
SV rsrA1 RT R	CTTCCGGATCCACGAGGT	
SV Tellurite RT F2	GCTCATCCTCACCAACGA C	<i>tellurite R</i> gene RNA 발현 확인
SV Tellurite RT R2	TCTTCGCCACCTTGACAA C	
SV TerB RT F2	CGGTTTCGACGAGAATCTG GA	<i>terB</i> RNA 발현 확 인
SV TerB RT R2	TCGGTCTTGTCGAAGTCT CC	
SV TerD RT F2	AAGCTGTCCATCCTCAAC G	<i>terD</i> RNA 발현 확 인
SV TerD RT R2	GAGAAGGAGTTGACCGTG AAG	
SV TerD-2 RT F2	AGATCAACGTCAACCTGG C	<i>terD2</i> RNA 발현 확인
SV TerD-2 RT R2	ATGCGGATGTAGGCGTTC	
SV sigR1 RT F2	CGGTTCCAAATTCGCGTA AAG	<i>sigR1</i> TSS와 start codon 사이 p r i m e r , autoregulation 확 인
SV sigR1 RT R2	GGCTCTGGTGGTGTCCA	
SV sigR1 ChIP F4	TTGACGCAACGGTGA CTG TA	<i>sigR1</i> 프로모터 부 분 ChIP 확인
SV sigR1 ChIP R4	TTTACGCGAATTTGGAA CCG	
SV Tellurite r RT F	GCGGCATGTG TACTGAGG	<i>tel R</i> 프로모터 부 분 ChIP 확인
SV Tellurite r RT R	CTCGTTGGACACGCATCA TC	
SV TerB RT F	CGGTCCGGAACCTTCGG	<i>terB</i> 프로모터 부분 ChIP 확인
SV TerB RT R	CGTCGTCGGTTGTTTCTA CG	

SV TerD RT F	GAACCCGCGGAGGGTAAG	<i>terD</i> 프로모터 부분
SV TerD RT R	CGGTGAGAGGGATGTTTCG AG	ChIP 확인
SV TerD-2 RT F	TGTCATCCATGTTCCCCG GA	<i>terD2</i> 프로모터 부
SV TerD-2 RT R	GTCGCTCGCCTGGAGAAA	분 ChIP 확인

#### 2.4.4 RNA sequencing

*sigR1*이 induction 되는 조건인 열 충격을 주고 2시간 후의 상황에서 야생형과 *sigR1* 결실 돌연변이 셀을 약 30 ml씩 수거하였다. 수거한 셀은 hot phenol method(2.4.2)를 이용하여 RNA를 추출하였으며, 정량 후에는 RNA 셀을 내려 purity를 확인하였다. 실험 결과의 신뢰도를 위해 같은 실험을 두 번 반복하여 총 4개의 샘플을 보냈고, 분석을 의뢰한 RNA의 양은 야생형의 경우 약 20  $\mu$ g, *sigR1* 결실 돌연변이의 경우 약 13  $\mu$ g이었다. 분석에는 Macrogen 社의 도움을 받았다.

## 2.5 단백질 분석

### 2.5.1 Western blot

전날 MYM 혹은 LB 배지에 접종해놓은 셀을 수거하였다. 수거한 셀은 500  $\mu$ l의 lysis buffer(20mM Tris-HCl(pH7.9), 10 % glycerol, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, 0.1 mM DTT(fresh), 1 mM PMSF(fresh))를 넣어준 후 suspend 하였다. 이후 Q500 sonicator를 이용해 25 %의 amplitude로 여러 번 셀을 깨주고 20분 간 4°C 13000 rpm으로 원심분리 하였다. 상층액을 따 새 e-tube에 옮겨주었고 bradford 용액을 이용하여 각 sample의 농도를 재었다. 같은 농도가 되도록 sample의 양을 조절하고 총 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 5X SDS buffer를 넣은 후 100°C에서 10분 간 끓여주었다. 끓인 sample은 12 % precast gel에 loading 하여 SDS-PAGE를 실행하였다.

SDS-PAGE가 끝나면 gel을 잘라 50~60 mA에서 90분 간 membrane transfer를 수행하였다. Transfer가 끝난 membrane은 5 ml의 TBST-BSA 5 % 용액에 담가 rocker에서 흔들어주며 1시간 이상 blocking 하였다. Blocking이 끝나면 원하는 first antibody를 1  $\mu$ l 넣어준 후(5000:1) 1시간~2시간동안 binding 시켜주었다. 이후 TBST 1X 용액으로 10분씩 3번 세척 하였고 TBST-BSA 0.5 % 용액과

secondary antibody 1  $\mu$ l를 넣어(5000:1) 30분 간 binding 시켰다. 마지막으로 TBST 1X 용액으로 5분씩 2번 wash 하였으며 준비된 membrane은 Luminograph II(ATTO) 기계를 사용하여 감광하고 사진을 찍었다.

### 2.5.2 *E. coli*에서 SigR1의 과발현 및 정제

pET15b 벡터의 T7 프로모터 뒤쪽으로 *sigR1* 유전자를 cloning 하였다. 이때 *sigR1* ORF만 넣었주었던 벡터는 IPTG(isopropylthio- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) induction 시 inclusion body를 형성하여 insoluble한 단백질을 만들었기 때문에 *sigR1* 유전자의 종결코돈을 없애고 pET15b 시퀀스를 66개 더 넣어주어 태깅의 역할을 하는 벡터를 고안하여 새로 클로닝 하였다. 완성된 벡터는 *E. coli* BL21(DE3)pLysS 셀에 transformation 하였고 50  $\mu$ g/ml의 ampicillin이 들어간 LB 배지에서 37 $^{\circ}$ C 16시간 정도 키워졌다. Fresh한 colony를 액체 LB 배지에 접종하였고 OD<sub>600</sub>이 약 0.5~0.8 정도에 도달하였을 때 0.5 mM의 IPTG를 넣어주었다. 이후 37 $^{\circ}$ C에서 3시간을 더 키우고 셀을 수거하였다.

수거한 셀은 1 mg/ml의 lysozyme이 들어간 Ni-NTA binding buffer(20 mM Tris-HCl(pH7.9), 0.5 M NaCl<sub>2</sub>, 40 mM imidazole, 1 mM PMSF)에 풀어주었으며 얼음에서 약 30분 간 방치하였다. 이후 30분~40분 동안 30 % amplitude로 sonication 하여 셀을 깨주었다. Sonication 후 lysate를 30분 간 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm에서 원심분리 하여 cell debris를 제거해주었고 그 상층액을 또 다시 30분 간 4 $^{\circ}$ C 27000 rpm에서 원심분리 하여 membrane fraction도 제거해주었다.

Affinity chromatography에 사용될 column은 증류수로 2번 깨끗하게 씻어내었고 NiSO<sub>4</sub>를 흘려내려 nikeli loading 되게 하였다. 이후의 단백질 정제 방법은 pET system manual을 따랐다.

정제된 단백질은 amicon filter에 넣어 5000 g로 원심분리하며 농축함과 동시에 buffer를 바꾸어주었고(20 mM Tris-HCl(pH7.4), 10 %

glycerol) Abclone 社에 맡겨 항체 제작을 진행하였다.

### 2.5.3 Immuno-precipitation

원하는 포인트에서 수거한 야생형과 *sigR1* 결실 돌연변이 셀에 500  $\mu$ l의 lysis buffer(20 mM Tris-HCl(pH7.9), 10 % glycerol, 5 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaCl, 0.1 mM DTT(fresh), 1 mM PMSF(fresh))와 5  $\mu$ l의 protease inhibitor cocktail을 넣어주었다. 이후 Q500 sonicator를 이용하여 최대한 많이 sonication 해주고 20분 간 4°C 13000 rpm에서 원심분리 해주었다. 상층액을 따고 bradford assay를 통해 두 단백질의 농도를 재었으며, 같은 농도가 되도록 튜브에 분주하고 lysis buffer를 이용하여 부피를 똑같이 맞추어주었다. 이후 끝을 가위로 자른 팁을 이용해 AG bead 20  $\mu$ l을 넣고 4°C orbital shaker에서 1시간동안 섞어주며 pre-clearing하였다. Pre-clearing이 끝나면 1분 간 4°C 3000 rpm으로 원심분리 하여 bead를 spin down해주고 상층액을 새 튜브로 옮겼다. 새로 옮긴 튜브에는 10  $\mu$ l의 항체를 넣고 4°C orbital shaker에서 밤새 섞어주었다. 다음날 아침, 튜브에 AG bead 50  $\mu$ l를 추가로 넣고 4°C orbital shaker에서 4시간 이상 섞어주며 기다렸다. 4시간 후 1분 간 4°C 3000 rpm으로 원심분리 하여 bead를 spin down 하였고 lysis buffer 1 ml을 아주 조심스레 튜브에 넣으며 3번 wash 하였다. 마지막에는 lysis buffer 50  $\mu$ l을 넣고 섞어주어 bead의 단백질이 떨어지도록 하였으며 5X SDS dye 8  $\mu$ l를 넣고 100°C에서 10분 간 끓여주었다. 준비된 sample은 5분 간 4°C 13000 rpm에서 원심분리하고 상층액을 7  $\mu$ l 따서 precast gel에 로딩하고 SDS-PAGE를 진행하였으며 running이 끝나면 gel staining을 통해 단백질을 관찰하였다.

### 2.5.4 Chromatin immuno-precipitation

전날 MYM 100 ml에 접종하였던 야생형과 *sigR1* 결실 돌연변이의 OD<sub>600</sub>가 약 1.0 이 되었을 때 플라스크를 30°C에서 37°C로 옮겨주었으



며, 37°C에서 두 시간을 더 배양하였다. 두 시간 뒤 각 플라스크에 2.8 ml의 formaldehyde를 넣고 30분 간 더 배양해주었다(cross-linking). 30분 후 2.5 M glycine을 5 ml넣고 rocker를 이용하여 RT에서 5분 간 섞어주었다(quenching). 이후 5분 간 4°C 7000 rpm에서 원심분리하고 상층액을 버린 뒤 25 ml의 PBS buffer로 셀을 두 번 wash해주었다. 셀을 모은 뒤에는 lysis buffer(20 mM Tris-HCl(pH8.0), 50 mM NaCl, 10 mg/ml lysozyme, 1x protease inhibitor) 5 ml을 넣어 suspend하고 37°C에서 25분 간 반응시켰다. 이후 5 ml의 IP buffer(100 mM Tris-HCl(pH 8.0, 250 mM NaCl, 0.5 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1x protease inhibitor)를 추가로 넣고 ice에 2분 간 놓아두었다. 2분 후 Q500 sonicator와 얇은 팁을 이용하여 20 % amplitude, 20초 씩 6번 셀을 깨주었고 cell lysate 50  $\mu$ l에는 0.3 M의 NaCl을 넣어 65°C에서 밤새 반응시켜주었다(다음날 sonication 확인용). 남은 cell lysate는 10분 간 4°C 12000 rpm으로 원심분리 하였으며 상층액을 다시 한 번 원심분리 하여 최대한 불순물이 없는 상층액을 얻었다. 상층액은 nano-drop을 이용하여 DNA농도를 잰으며 각 튜브에 DNA가 1000  $\mu$ g 들어가도록 계산하고 총 부피는 lysis buffer로 맞추어주었다. 농도와 부피를 맞춘 튜브에서 50  $\mu$ l은 새로 따서 다른 튜브에 넣어 -20°C에서 보관하며 이후 실험의 input control로 사용하였다. 남은 샘플에는 20  $\mu$ l의 AG bead를 넣고 orbital shaker를 이용하여 4°C에서 pre-clearing 하였다. 1시간 뒤 bead를 spin down하고 상층액을 새 튜브로 옮겨 뺐으며 2  $\mu$ l의 SigR1 항체를 넣고 밤새 orbital shaker에서 rotating 시켰다. 다음날, 65°C에서 반응시킨 cell lysate는 DNA gel에 걸어 electrophoresis를 진행하였고 DNA가 깨진 정도를 살펴보았다(100~500 bp 정도에 걸쳐 DNA가 나오는 것이 가장 바람직함). 항체와 밤새 반응시킨 샘플에는 50  $\mu$ l의 AG bead를 추가로 넣어주고 4시간 이상 shaking 하였으며 4시간 후 1분 간 4°C 3000 rpm으로 원심분리한 뒤 상층액은 버렸다. 남아있는 bead에 0.5X IP buffer를 1 ml 넣고 15

분간 shaking을 두 번, 1X IP buffer 1 ml을 넣고 15분간 shaking을 두 번 하며 bead를 wash 하였고 마지막으로 IP elution buffer(50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM EDTA, 1 % SDS) 150  $\mu$ l 넣어 65°C에서 밤새 incubation 하였다. 전날 수거해둔 input control에는 IP elution buffer 50  $\mu$ l을 넣고 같이 incubation 하였다.

다음날, 튜브를 두세 번 inverting한 뒤 4°C 3000 rpm 으로 가볍게 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮겨주었다. 남은 bead에는 TE buffer(10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1mM EDTA) 50  $\mu$ l을 넣고 다시 65°C에서 5분 간 incubation 하였으며 가볍게 원심분리 후 상층액을 위의 튜브에 같이 넣었다. 각 튜브는 TE buffer를 이용해 총 부피가 200  $\mu$ l이 되도록 맞추어주었으며 다시 한 번 원심분리를 통해 bead를 깨끗이 제거하였다. 각 튜브에 10 mg/ml의 proteinase K를 3  $\mu$ l 넣고 55°C에서 2시간 반응시켰으며 이후 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 200  $\mu$ l 넣고 vortexing 20초, RT에서 3분 간 방치, 다시 vortexing 20초를 해준 뒤 3분 간 4°C 13000 rpm으로 원심분리 하였다. 가장 위층은 새 튜브에 옮겼으며 PCI organic phase에 TE buffer 100  $\mu$ l을 더 넣고 vortexing 20초, RT에서 3분 간 방치, 다시 vortexing 20초를 반복하여 3분 간 4°C 13000 rpm으로 원심분리하였다. 마찬가지로 가장 위층은 새 튜브에 같이 넣고 상층액 부피와 같은 부피(200  $\mu$ l)의 chloroform을 넣어 vortexing 후 원심분리함으로써 phenol을 완벽히 제거하였다. 이후 ethanol precipitation 과정을 거쳐 ChIP DNA 추출을 마무리하였다. 추출한 ChIP DNA는 qRT-PCR을 통해 enrichment fold를 계산하였다.

### 2.5.5 ChIP sequencing

RNA sequencing을 보냈던 조건과 같이 열 충격 처리 후 2시간이 지난 야생형과 *sigR1* 결실 돌연변이 cell을 수거하였다. 이때 ChIP 실험 후 얻게 되는 DNA 양이 매우 적었기 때문에 cell 수거 단계에서 야생형과

*sigR1* 결실 돌연변이 cell을 약 2 L 씩 배양하여 전부 수거하고 ChIP(2.5.4)을 진행하였다. Macrogen 社의 QC 결과 ChIP DNA는 야생형의 경우 0.5  $\mu\text{g}$ , *sigR1* 결실 돌연변이의 경우 0.3  $\mu\text{g}$ 으로 측정되었으며 peak의 사이즈가 조금 넓긴 했지만 분석을 진행하기에는 문제가 없다고 판단되어 그대로 분석하였다.

## 2.6 Spotting assay

평균한 MYM 배지가 어느 정도 식으면 원하는 compound를 원하는 농도만큼 넣고 30 ml 씩 petri-dish에 부어 굳혔다. 표현형을 관찰하고 싶은 *S. venezuelae* 균주 spore를 모두  $6 \times 10^6$  개로 맞추어주고 10배씩 희석하였으며 48-pin replica plater(sigma)를 사용하여 배지에 찍어주었다. Spore가 완전히 마르면 30°C에서 약 30~40시간까지 키우고 사진을 찍었다.

열 처리 조건의 경우 아무것도 처리하지 않은 MYM 배지에 spore를 찍고 약 14~16시간 후 30°C에서 37°C로 plate를 옮겨주었으며 40시간까지 더 키우고 사진을 찍었다.

### 3. 결과

### 3.1 *sigR1*의 특징

#### 3.1.1 분화와 성장

상동재조합을 통해 *S. venezuelae* ATCC15439의 *sigR1* 유전자를 hygromycin resistance cassette로 치환한 결실 돌연변이를 확보하였다. *sigR1* 결실 돌연변이는 gDNA PCR과 RNA qRT-PCR, western blotting을 통해 DNA와 RNA, 단백질 level에서 모두 *sigR1*의 발현이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 추후 실험을 위해 vector control과 complementation 균주도 함께 제작하였다.

*sigR1* 결실 돌연변이의 특징을 확인 해보기 위해 MYM 고체배지에 야생형, *sigR1* 결실 돌연변이, *sigR* 결실 돌연변이 spore를 굵어 5일 뒤 분화 정도를 확인해보았다. 그 결과 세 균주 모두에서 정상적인 분화가 일어난다는 것을 알 수 있었다.

또한 세 균주의 MYM 액체 배지에서의 성장을 관찰하기 위해 MYM 액체 배지에 야생형, *sigR1* 결실 돌연변이, *sigR* 결실 돌연변이 spore를 접종하고 12시간 뒤부터 OD<sub>600</sub> 값을 재보았다. *sigR* 결실 돌연변이는 야생형에 비해 성장이 살짝 더뎠지만 *sigR1* 결실 돌연변이는 야생형과 비슷한 수준으로 성장이 제대로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

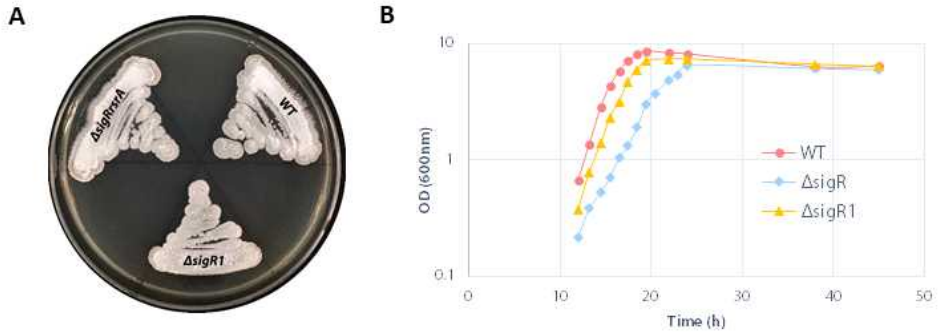


그림 2 *S. venezuelae*에서 야생형, *sigR* 결실 돌연변이, *sigR1* 결실 돌연변이의 분화와 성장

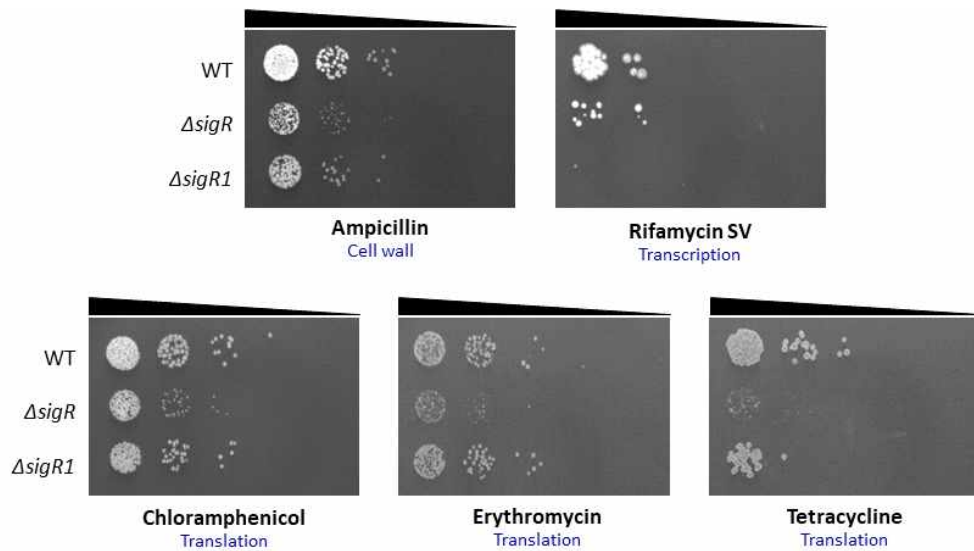
야생형과 *sigR* 결실 돌연변이, *sigR1* 결실 돌연변이를 고체 배지와 액체 배지에서 키웠을 때의 사진(A)과 OD<sub>600</sub> 그래프(B)이다. (A)의 경우 MYM 고체 배지에 spore 1 $\mu$ l를 떨어뜨려 spreading 후 약 3일 후 사진을 찍었으며 (B)의 경우 MYM 액체 배지에 spore를 1 $\mu$ l씩 접종한 후 12시간 후부터 1시간 내지는 2시간 간격으로 OD<sub>600</sub> 값을 재었다.

● : 야생형, ◆ : *sigR* 결실 돌연변이, ▲ : *sigR1* 결실 돌연변이

### 3.1.2 항생제 처리

*sigR1*의 항생제 처리 하에서 특징을 알아보기 위해 MYM 배지에 cell wall synthesis 관련 항생제(ampicillin, vancomycin), 전사과정 저해 항생제(rifamycin SV), 그리고 번역과정 저해 항생제(chloramphenicol, erythromycin, tetracycline)를 처리한 후 야생형, *sigR* 결실 돌연변이, *sigR1* 결실 돌연변이 균주를 spotting 하여 cell viability를 측정해보았다. 이때, SigR1과 구조가 비슷하다고 알려진 SigR의 결실 돌연변이를 함께 spotting하여 둘 사이의 유사성 혹은 차이점을 살펴보았다.

그 결과, 다양한 스트레스와 폭 넓게 관련되어있는 *sigR*의 결실 돌연변이는 대부분의 경우 야생형 균주보다 항생제 감수성을 보였으며 *sigR1* 결실 돌연변이는 전사 과정 저해 항생제인 rifamycin SV에 특이적으로 생존에 결함을 보이는 것을 관찰할 수 있었다. *sigR* 결실 돌연변이와 *sigR1* 결실 돌연변이가 반응하는 항생제가 서로 다르다는 사실로부터 SigR과 SigR1은 서로 다른 외부 스트레스에, 서로 다른 반응을 할 수도 있다는 가능성을 얻을 수 있었다(그림 3).



### 그림 3 항생제 처리

순서대로 cell wall과 관련된 항생제인 ampicillin( $15 \mu\text{g/ml}$ ), 전사 과정과 관련된 rifamycin SV( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ), 번역 과정과 관련된 chloramphenicol( $2 \mu\text{g/ml}$ ), erythromacin( $15 \mu\text{g/ml}$ ), tetracycline( $10 \mu\text{g/ml}$ )을 처리한 배지에 야생형, *sigR* 결실 돌연변이, *sigR1* 결실 돌연변이를 spotting 하여 viability를 확인하였다. 모두 3번 이상 반복된 결과 중 가장 대표적인 사진이다.

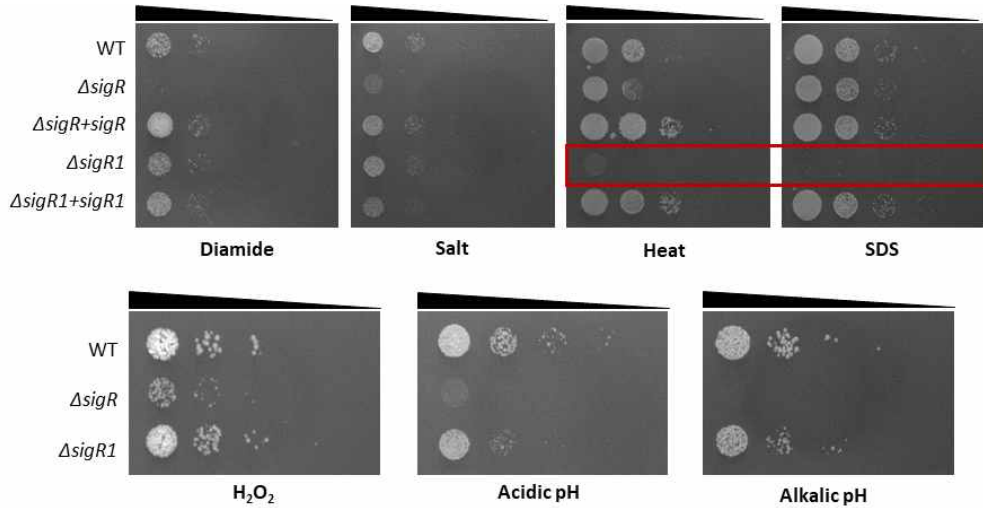


### 3.1.3 다양한 스트레스 처리

SigR1 특이적인 유도 인자들에 대해 더 자세히 알아보기 위해 항생제뿐만 아니라 다양한 스트레스를 처리한 MYM 배지에 야생형, *sigR* 결실 돌연변이, *sigR1* 결실 돌연변이를 spotting 하여 cell viability를 측정해 보았다. 이때 실험에 사용된 스트레스는 *S. coelicolor*에서 *sigR*의 역할과 관련된다고 알려져 있는 diamide(산화 스트레스)와 *sigR1*의 homologous 유전자로 알려진 Mycobacterium tuberculosis의 *sigE*가 특이적으로 반응한다고 알려진 스트레스인 열, SDS, pH, 그리고 그 밖의 대표적인 외부 스트레스로 구성하였다.

Spotting assay 결과, *sigR1* 결실 돌연변이는 열 충격과 SDS 스트레스에 특이적으로 생존에 결함을 보이는 것을 알 수 있었다. 특히 열 충격에 관해서는 고체 배지가 아닌 액체 배지에서의 표현형도 확인해보았는데, *S. venezuelae*를 MYM 액체배지에서 OD<sub>600</sub> 1.0까지 키운 후 37°C incubator로 플라스크를 옮겨주고 매 시간마다 OD<sub>600</sub>를 재어 growth curve를 그어본 결과, *sigR1* 결실 돌연변이가 *sigR* 결실 돌연변이나 야생형에 비해 growth 양상이 확연하게 늦어진다는 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

다양한 스트레스를 처리한 결과 *sigR1*의 표현형과 감수성이 *sigR* 결실 돌연변이와는 다른 것을 다시 한 번 확인함으로써 *sigR1*이 *sigR*과는 서로 다른 역할과 스트레스 조절 기작을 가지고 있을 것이라고 해석되었다 (그림 4).



#### 그림 4 다양한 스트레스 처리

순서대로 diamide (0.5 mM), salt (0.5 M), heat (30°C에서 12시간 키운 후 37°C로 옮겨줌), SDS (0.01 %), hydrogen peroxide (100 μM), acidic pH (autoclave 전 pH 5.0), alkaline pH (autoclave 전 pH 9.3)을 처리한 배지에 야생형, *sigR* 결실 돌연변이, *sigR1* 결실 돌연변이를 spotting하여 viability를 확인하였다. 모두 3번 이상 반복된 결과 중 가장 대표적인 사진이다.

### 3.1.4 열 충격 하에서 *sigR1*의 RNA, 단백질 발현정도

*sigR1*이 특이적으로 반응하는 열 충격과 SDS 스트레스 중 SDS는 cell 수거 후 RNA나 단백질을 분석하는 과정에서 셀에 남아 영향을 끼칠 수도 있다고 생각하였다. 따라서 보다 다루기 쉬운 열 충격에 대해 중점적으로 연구를 진행해보았다.

먼저, 열 충격을 준 조건에서 *sigR1*의 RNA induction 정도를 확인하였다. *S. venezuelae*를 30°C MYM 액체 배지에서 OD<sub>600</sub> 1.0까지 키운 후 플라스크를 37°C로 옮겨주었고 그 후 0시간, 1시간, 2시간, 3시간에서 셀을 수거하였다. 수거한 셀은 kirby method를 통해(2.4.1) RNA를 추출하고 열 충격을 주지 않은 control 셀과 함께 qRT-PCR을 진행하며 RNA 발현 정도를 살펴보았다. 그 결과 열 충격을 1시간동안 받은 셀은 열 충격을 받지 않은 셀에 비해 *sigR1*의 RNA level이 2배 정도 높게 나타났다으며 스트레스 처리 시간이 길어질수록 9배까지 RNA 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(그림 5. A).

다음으로는 SigR1의 단백질 발현 정도를 살펴보았다. SigR1의 단백질을 정확하게 살펴보기 위해 SigR1 항체를 제작하였는데, 항체 제작을 위해 T7 프로모터와 N-terminal his tag을 가진 벡터인 pET15b에 *sigR1*을 클로닝하고 *E. coli*에 transformation한 뒤, IPTG induction을 통해 SigR1을 과발현 하였다. 이후 단백질을 추출하고 nikel 컬럼을 사용한 affinity chromatography를 통해 SigR1만을 정제하였으며, Abclone社에 단백질을 보내 토끼를 이용한 polyclonal 항체를 제작하였다.

항체 제작이 완료된 후, RNA 발현 조건과 마찬가지로 열 충격을 0시간, 1시간, 2시간 준 조건에서 셀을 수거하고 SigR1 항체를 이용하여 western blotting을 진행하였다. 그 결과 SigR1 단백질 또한 *sigR1* RNA와 마찬가지로 열 충격을 받은 셀에서 열 충격을 받지 않은 셀에 비해 그 발현이 높다는 것을 확인할 수 있었다(그림 5. B).

즉, 열 충격 조건에서는 *sigR1*의 RNA와 단백질 모두 induction된다는 결론을 얻을 수 있었다.

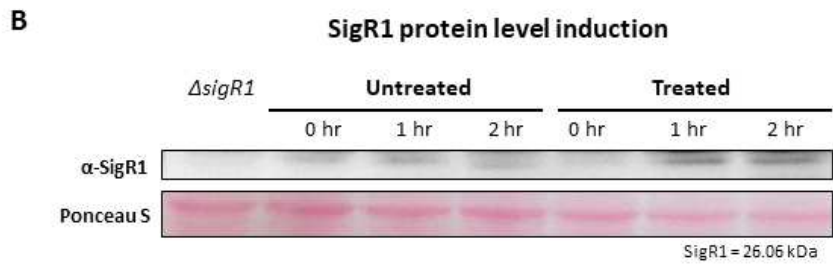
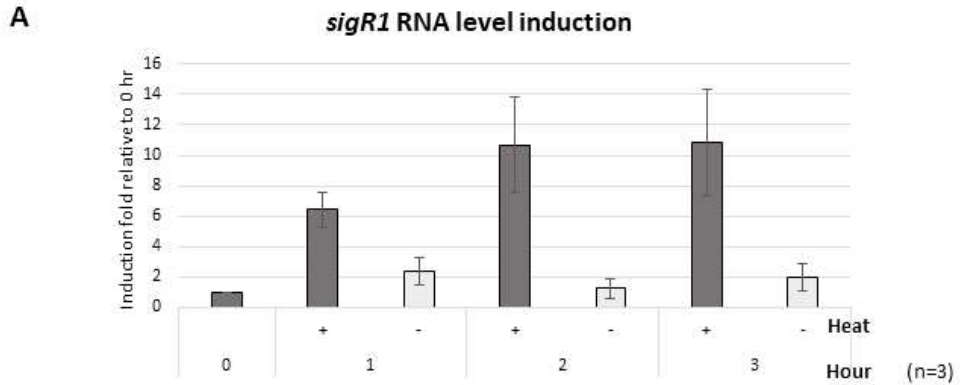


그림 5 *sigR1*의 RNA와 단백질 발현 정도

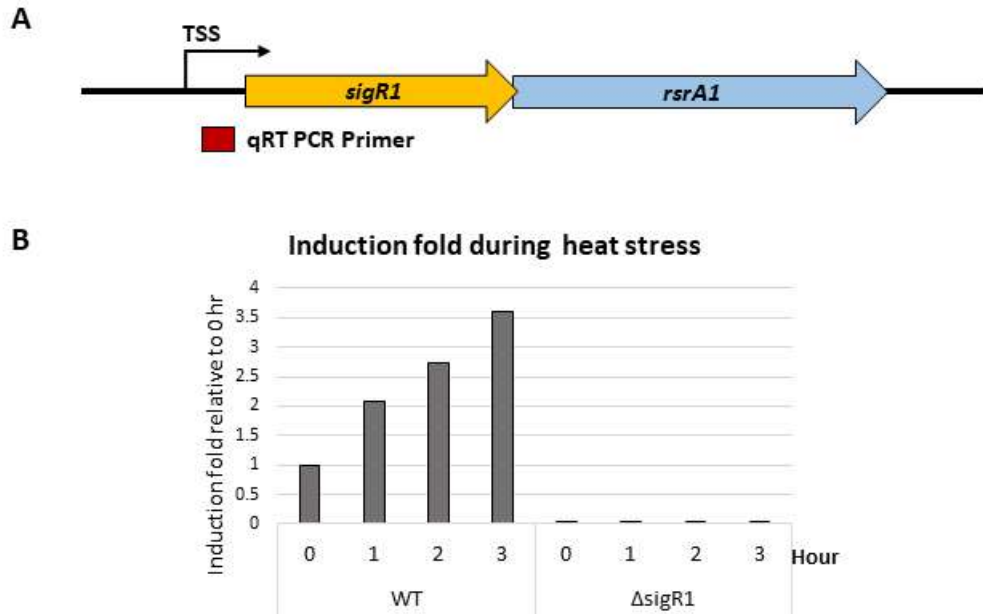
열 충격을 주어 0시간, 1시간, 2시간에서 셀을 수거하여 RNA 발현정도 (A)와 단백질 발현정도(B)를 살펴보았다. (A)는 2번씩 총 3번 실험하고 SEM으로 오차막대를 나타냈으며 (B)는 3번의 반복된 실험 중 대표적인 결과를 나타내었다.

### 3.1.5 Autoregulation 확인

열 충격에 의해 induction 되는 SigR1의 상위 조절자를 알아보기 위한 실험을 진행하였다. 대부분의 시그마 인자의 경우, 자기 자신의 전사를 스스로 조절하는 autoregulation을 한다고 알려져 있었기 때문에 SigR1 또한 autoregulation을 할 확률이 높다고 생각하였다. 이에 gDNA 상에서 *sigR1*의 transcription start site와 open reading frame 사이에 qRT-PCR 프라이머를 제작하고 그 사이의 transcript 양을 알아보는 방법을 통해 *sigR1*의 autoregulation 여부를 확인해보았다(그림 6. A).

실험 조건은 *sigR1*의 RNA가 induction 되는 열 충격을 준 조건으로 하였으며, SigR1이 autoregulation하는 것이 아니라 다른 단백질에 의해 전사가 조절될 경우 *sigR1* 결실 돌연변이에서는 야생형과 마찬가지로 TSS와 ORF 사이의 transcript가 정상적으로 발현될 것이라고 생각하였다.

실험 결과, *sigR1* 결실 돌연변이에서는 야생형과 반대로 transcript 발현이 거의 되지 않았으며 이를 통해 SigR1이 자기 자신의 전사를 조절하는 autoregulation을 하고 있다는 사실을 알아낼 수 있었다(그림 6. B).



### 그림 6 SigR1의 autoregulation 확인

*sigR1*의 TSS와 ORF 사이에 qRT-PCR 프라이머를 제작하였으며(A) 열 충격 하에서 야생형과 *sigR1* 결실 돌연변이의 transcript 양 비교를 해보았다(B). (B)는 3번 이상 반복된 결과 중 가장 대표적인 사진이다.

### 3.2 *sigR1*의 항 시그마 인자, *rsrA1*

#### 3.2.1 열 충격 하에서 *rsrA1*의 RNA, 단백질 발현 정도

열 충격 하에서 *sigR1*의 RNA와 단백질 발현이 늘어난다는 것을 확인한 후, *sigR1*의 항 시그마 인자인 *rsrA1*의 발현은 어떻게 될 것인지 알아보았다.

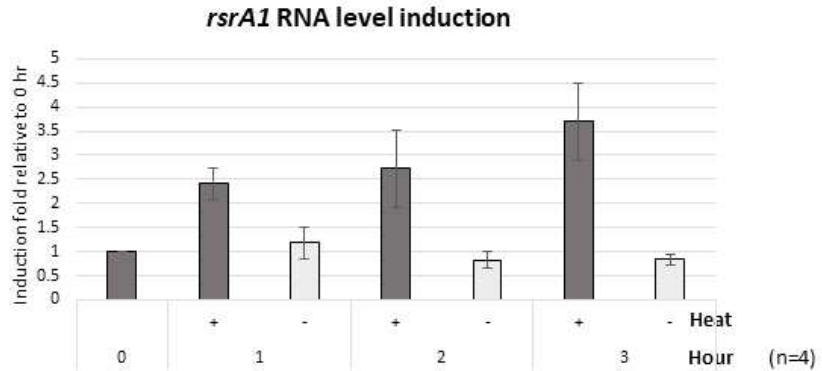
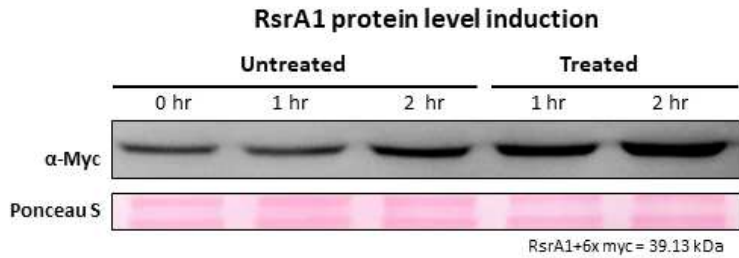
*sigR1*의 RNA 발현 정도를 확인했을 때와 같은 셀에서 qRT-PCR 프라이머만 다르게 하여 *rsrA1*의 RNA 발현량을 살펴보았다. 그 결과 열 충격을 1시간동안 받은 셀은 열 충격을 받지 않은 셀에 비해 *rsrA1*의 RNA level이 2배 정도 높게 나타났으며 스트레스 처리 시간이 길어질수록 3~4배까지 RNA 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, *sigR1*과 비슷한 양상으로 RNA 양이 증가한다고 결론내릴 수 있었다(그림 7. A).

RsrA1의 단백질 발현을 살펴보기 위해서는 *rsrA1* 뒤에 6x myc 태깅을 달아준 균주를 제작하였다. pSET152 벡터에 *sigR1-rsrA1* 오페론과 C terminus 6x myc 태깅을 넣어주었으며 제작한 벡터는 *E. coli*와의 접합을 통해 *S. venezuelae*으로 넣어주었다. 만들어진 균주는 RNA 발현 확인 실험과 같은 조건인 열 충격 후 0시간, 1시간, 그리고 2시간에서 셀을 수거하였으며 시중에 판매하는 Myc 항체를 사용하여 western blot을 진행하였다. 그 결과 *rsrA1*의 RNA 발현과 마찬가지로 열 충격을 받은 셀이 열 충격을 받지 않은 셀에 비해 단백질 또한 발현이 높아진다는 것을 관찰할 수 있었다(그림 7. B).

현재 가장 잘 알려진 시그마 인자와 항 시그마 인자의 모델은 항 시그마 인자가 특정 스트레스를 인식한 후, degradation이나 proteolysis 등을 통해 분해되고, 붙잡고 있던 시그마 인자를 놓아주어 regulon을 조절하는 구조이다. 따라서 *rsrA1*의 발현을 알아보는 본 실험을 시작하기 이전에는 *sigR1*의 발현이 높아지는 열 충격 상황에서 *rsrA1*의 발현은 반대로 낮아진다고 예상하였다. 하지만 당초 예상과는 다르게 RNA와 단백질



level 모두에서 *rsrA1*이 *sigR1*과 같은 경향을 보인다는 것이 관찰되었으며 따라서 SigR1과 RsrA1의 단백질 상황에서의 상호작용과 그 조절 기작에 대해서는 후속 연구가 더 필요하다.

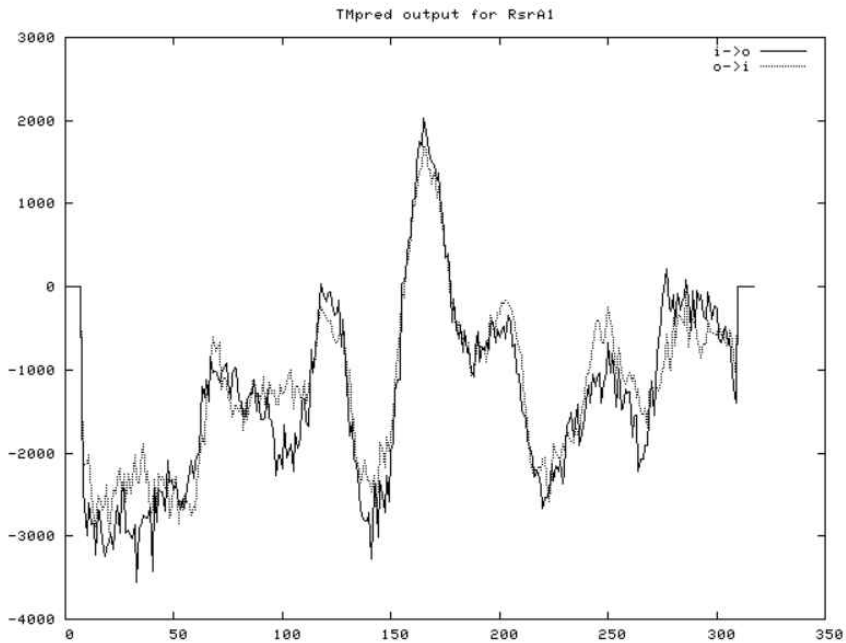
**A****B**

### 그림 7 *rsrA1*의 RNA와 단백질 발현 정도

열 충격을 주어 0시간, 1시간, 2시간에서 셀을 수거하여 RNA 발현정도 (A)와 단백질 발현정도(B)를 살펴보았다. (A)는 2번씩 총 4번 실험하고 SEM으로 오차막대를 나타냈으며 (B)는 3번의 반복된 실험 중 대표적인 결과를 나타내었다.

### 3.2.2 RsrA1의 transmembrane domain

RsrA1의 특징을 조금 더 알아보기 위해 항 시그마 인자가 가질 수 있는 특징 중 하나인 transmembrane domain 여부를 알아보았다. RsrA1의 transmembrane domain은 단백질의 membrane spanning segment를 알아보는 bioinformatics tool인 TMpred를 사용하였다(Hofmann, K. A. W. S. et al., 1993). RsrA1의 단백질 시퀀스를 넣고 프로그램을 돌린 결과, RsrA1이 상당히 높은 가능성으로 하나의 transmembrane domain을 가진다는 결론을 얻을 수 있었다. TMpred 프로그램은 RsrA1의 총 318개의 아미노산 중 156번째 아미노산부터 175번째 아미노산까지 20개의 아미노산이 hydrophobic한 transmembrane domain이라고 제시하였으며, 그 앞 뒤 단백질의 cytosolic, 혹은 셀 밖 위치에 대해서는 좀 더 알아볼 필요가 있다(그림 8).



**그림 8 RsrA1의 transmembrane domain 분석**

TMpred ([https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED\\_form.html](https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html))를 통해 RsrA1의 transmembrane domain 분석을 진행하였다. X축은 아미노산의 길이를 나타내고 있으며 Y축은 0을 기준으로 음의 값은 hydrophilic, 양의 값은 hydrophobic한 특징을 나타내고 있다. 156번째 아미노산부터 175번째는 양의 값을 가지는 hydrophobic한 transmembrane domain일 것이라고 추측된다.

### 3.3 SigR1의 regulon 및 DNA 결합자리

#### 3.3.1 Transcriptome 분석

RNA sequencing을 통한 *sigR1* transcript 분석을 통해 SigR1의 대략적인 regulon을 알아보려고 하였다. 평소 *sigR1*의 RNA 발현정도가 매우 낮기 때문에 *sigR1*의 RNA 발현이 induction 되는 조건인 열 충격을 2 시간 준 조건에서 야생형과 *sigR1* 결실 돌연변이 셀을 수거하여 RNA를 추출하였고 Macrogen社에 맡겨 분석을 진행하였다. Macrogen社에서는 raw data만을 넘겨주었고, 실험실의 김연범 학생이 data를 받아 남은 분석을 진행하였다.

야생형에 비해 *sigR1* 결실 돌연변이에서 그 발현이 줄어들거나 늘어난 유전자를 SigR1의 표적이라 생각하였으며 EggNog 사이트를 통한 COG(Clusters of Orthologous Groups of proteins) 분석을 통해 SigR1 표적의 기능적 분류를 할 수 있었다. SigR1이 up-regulation 시키는 유전자들의 경우 SigR1이 down-regulation 시키는 유전자에 비해 transcription과 signal transduction, replication and repair, defense mechanism, 그리고 translation과 관련된 cluster가 많이 나타나는 것을 알 수 있었으며 SigR1이 down-regulation 시키는 유전자들의 경우 transport와 관련된 cluster들이 상대적으로 많이 나타나는 것을 확인할 수 있었다(그림 9. A).

다음으로는 실험실의 최준선 학생의 도움을 받아 유전자들의 GO(Gene ontology) 분석도 진행하였다. SigR1이 up-regulation 시키는 것으로 생각되는 유전자들의 경우 exodeoxyribonuclease VII activity, identical protein binding, uracil DNA N-glycosylase activity가 molecular function으로 묶인 카테고리의 상위에 위치하였다. 또한 DNA catabolic process와 cytokinesis, cell septum assembly는 biological process로 묶인 카테고리의 상위에 위치하였다(그림 9. A).

Transcriptome 분석 결과 야생형에 비해 *sigR1* 결실 돌연변이에서 RNA 발현이 줄어든 유전자들을 SigR1의 예상 regulon이라 보았으며 *sigR1* 결실 돌연변이에서 RNA 발현이 줄어든 유전자들 중 log2 fold change가 2 이상, q-value 0.01 이하로 조건을 잡아 총 571개의 유전자를 확보하였다. 유전자 리스트의 상위에는 *tellurite resistance gene*, *terB*, *terD*와 같이 tellurite 관련 유전자라고 명명된 유전자들이 많이 나오는 것을 알 수 있었다. 이 외에도 membrane protein, ABC transporter, helicase 등이 특징적으로 보이며 열 충격 환경에서 셀을 수거하여 추출한 RNA지만 열 충격과 관련된 유전자는 특별히 확인되지 않았다(표 5).

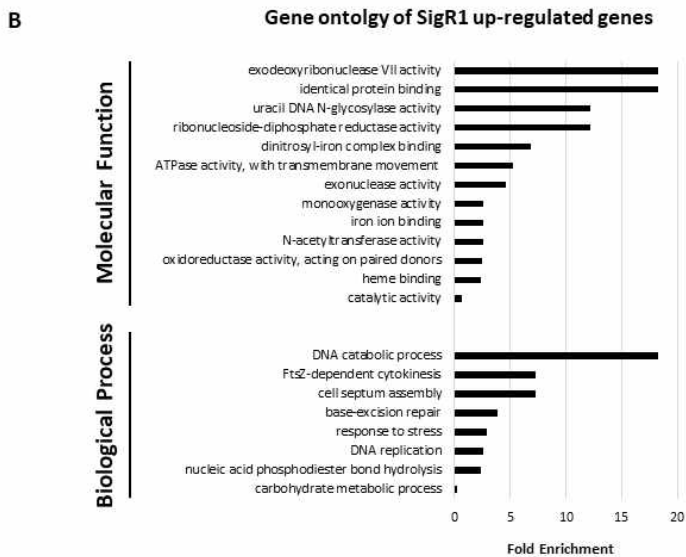
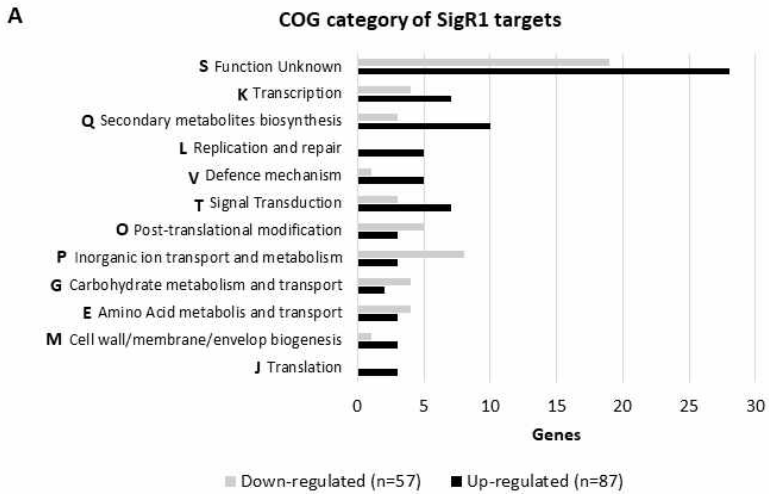


그림 9 SigR1의 표적 유전자 특징 분석

EggNOG database (<http://eggnogdb.embl.de>)를 통해 COG(Clusters of Orthologous Group) 분석(A)과 KEGG pathway를 통해 GO(Gene ontology) 분석(B)을 하며 SigR1 표적 유전자들의 특징을 알아보았다.

**표 5 Transcriptome 분석을 통한 SigR1의 예상 표적 유전자**

Log2 FC(Fold Change)의 절댓값이 큰 순서대로 상위 20개의 유전자를 나열하였다. 이때 FC는 야생형 대비 *sigR1* 결실 돌연변이에서 줄어든 RNA의 양 변화를 나타낸다.

Gene number	Log2 FC	Product	Gene name
AQF52_RS26145	9.619	RNA polymerase sigma factor SigE	<i>sigR1</i>
AQF52_RS00540	7.137	IstB_IS21 domain containing protein	
AQF52_RS00545	6.770	tellurium resistance protein	
AQF52_RS08240	6.544	hypothetical protein	
AQF52_RS30750	5.282	Tellurite resistance TerB	<i>terB</i>
AQF52_RS10115	4.862	Putative membrane protein	
AQF52_RS13285	4.653	ArsR family transcriptional regulator	
AQF52_RS09425	4.476	stress-induced protein	<i>terD</i>
AQF52_RS37905	4.387	Transcriptional regulator	
AQF52_RS37910	4.311	hypothetical protein	
AQF52_RS31320	4.115	erythronolide synthase	<i>salC</i>
AQF52_RS31325	4.079	amino acid adenylation protein	
AQF52_RS08245	3.957	pseudo	
AQF52_RS22035	3.954	chemical-damaging agent resistance protein C	<i>terD</i>
AQF52_RS31315	3.882	cytochrome	P450
AQF52_RS31330	3.879	type I polyketide synthase	
AQF52_RS15065	3.833	hypothetical protein	
AQF52_RS38585	3.802	capsule biosynthesis protein CapD	<i>capD</i>
AQF52_RS31310	3.715	protein mbtH	<i>mbtH</i>
AQF52_RS04275	3.622	hypothetical protein	



### 3.3.2 ChIP 분석을 통한 SigR1의 direct 표적 및 DNA 결합자리

RNA sequencing과 같은 조건에서 ChIP을 진행하고 sequencing 분석을 함으로써 SigR1의 직접적인 표적과 DNA 결합자리를 알아보고자 하였다. 먼저 ChIP 실험의 조건을 잡기 위해 RNA sequencing을 통해 얻어낸 SigR1의 예상 regulon 중 autoregulation 한다고 밝혀진 자기 자신 (*sigR1*)과 tellurite 관련 유전자의 프로모터 부분에 보존되어있는 시퀀스가 있는지 확인하였고, 그 부분의 앞뒤로 프라이머를 제작하여 ChIP-qPCR을 진행하였다. 그 결과 *sigR1* 결실 돌연변이에 비해 야생형에서 DNA enrichment가 일어난다는 사실을 확인할 수 있었고, 셀을 대량 수거하여 ChIP-qPCR과 동일한 조건에서 ChIP을 진행한 뒤, Macrogen社에 ChIP sequencing을 의뢰하였다. Macrogen社에서는 raw data 파일만을 받았으며 실험실의 김연범 학생의 도움으로 남은 분석을 진행하였다.

*sigR1* 결실 돌연변이에 비해 야생형에서 그 양이 enrichment 되는 유전자들을 SigR1의 regulon이라 보았으며 *sigR1* 결실 돌연변이에 비해 야생형에서 2배 이상 enrichment 되고  $-\log(q)$  value 값 10 이상으로 조건을 잡아 총 85개의 유전자를 확보하였다. 유전자 리스트의 상위에는 RNA sequencing 결과와 마찬가지로 *tellurite resistance gene*, *terB*, *terD*와 같은 tellurite 관련 유전자들이 많이 발견되었고, membrane protein, lipoprotein, amidohydrolase 등의 유전자가 보였다. 열 충격과 관련된 유전자는 특별히 확인되지 않았다(표 6).

SigR1의 DNA 결합자리 시퀀스를 알아보기 위해 확보한 리스트에 존재하는 유전자들의 enrichment peak으로부터 앞뒤로 100 nucleotide, 총 200 nucleotide의 시퀀스들을 MEME(Multiple Em for Motif Elicitation) suite 4.12.0 프로그램을 사용하여 분석해보았다. 그 결과 총 49개의 site에서 GGAAC-N<sub>17</sub>-CGTT의 배열이 나타나는 것을 확인

할 수 있었다. 이때 앞쪽의 motif인 GGAAC는 프로모터 앞쪽으로 -35 부분을 인식하며 뒤쪽 motif인 CGTT는 프로모터 앞쪽으로 -10 부분을 인식하는 것으로 보인다(그림 9. A).

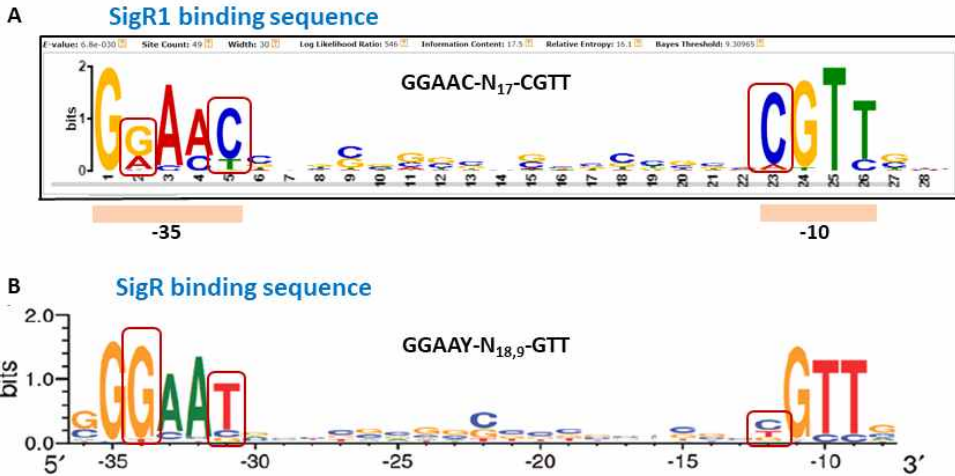
이 시퀀스는 *S. coelicolor*에서 이미 알려져 있는 SigR의 DNA 결합자리인 GGAAT-N<sub>18,9</sub>-GTT(Kim, M. S. et al., 2012)와는 비슷한 양상을 보인다. 단, 각 결합자리 두 번째 G의 보존 정도가 다르며 motif의 다섯 번째 nucleotide가 C와 T로 차이를 보인다. 또한 SigR1의 DNA 결합자리의 경우 GTT 앞의 C가 매우 보존되어있지만 SigR의 motif의 경우 그렇지 않다는 차이가 있다(그림 9. B).

SigR1과 SigR은 DNA 결합자리에서도 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었으며 각기 조절하는 regulon의 종류도 다르다는 결론을 내릴 수 있었다.

**표 6** ChIP sequencing을 통한 SigR1의 예상 표적 유전자

FE(Fold Enrichment)의 절댓값이 큰 순서대로 상위 20개의 유전자를 나열하였다. 이때 FE는 *sigR1* 결실 돌연변이 대비 야생형에서 늘어난 ChIP DNA의 양 변화를 나타낸다.

Gene number	FE	Product	Gene name
AQF52_RS37360	5.716	Putative lipoprotein	
AQF52_RS05320	4.746	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	
AQF52_RS30750	4.743	Tellurite resistance TerB	<i>terB</i>
AQF52_RS26150	4.529	Putative membrane protein	<i>rsrA1</i>
AQF52_RS23355	4.357	NADH-quinone oxidoreductase subunit F	
AQF52_RS10000	4.112	Trypsin protease	
AQF52_RS27535	4.111	Putative neutral zinc metalloprotease	
AQF52_RS14175	4.062	Secreted protein	
AQF52_RS00545	4.026	tellurium resistance protein	
AQF52_RS11170	4.009	hypothetical protein	
AQF52_RS22035	3.987	chemical-damaging agent resistance protein C	<i>terD</i>
AQF52_RS18550	3.939	NTP pyrophosphohydrolase including oxidative damage repair enzyme	
AQF52_RS12065	3.600	Citrate lyase beta subunit	
AQF52_RS28895	3.598	Two-component system response regulator	
AQF52_RS28330	3.570	hypothetical protein	
AQF52_RS29175	3.558	Transmembrane protein	
AQF52_RS36595	3.543	Membrane protein	
AQF52_RS09425	3.502	stress-induced protein	<i>terD</i>
AQF52_RS26450	3.489	hypothetical protein	
AQF52_RS15005	3.382	hypothetical protein	



### 그림 10 SigR1의 DNA 결합 시퀀스 분석

MEME (<http://meme-suite.org/tools/meme>) 사이트를 통한 motif 분석을 통해 SigR1 결합 시퀀스를 찾아냈으며(A) 이전 연구를 통해 밝혀진 SigR의 결합 시퀀스(B)를 비교해보았다. SigR1 결합 시퀀스의 경우 GGAAC-N<sub>17</sub>-CGTT로 SigR의 결합 시퀀스 두 번째 G와 보존 정도가 다르며 다섯 번째 nucleotide 또한 C/T로 다르다. 또한 -10 부분을 인식하는 GTT 앞의 C가 굉장히 보존되어있다는 특징을 가진다.

### 3.3.3 Tellurite 관련 유전자들의 역할 분석

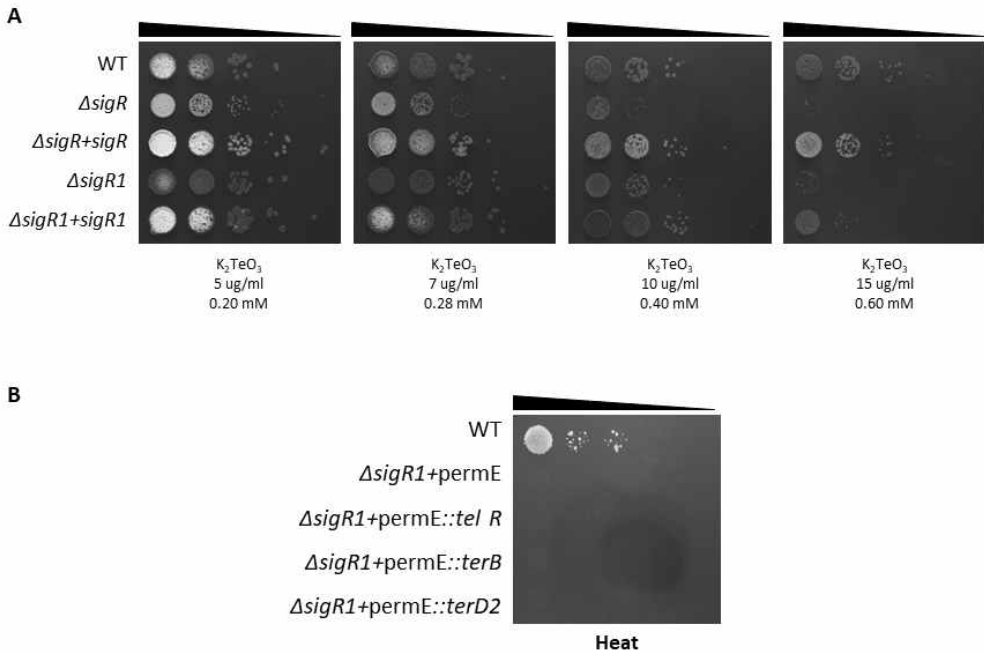
RNA sequencing과 ChIP sequencing 결과 얻어진 예상 표적 리스트에 계속해서 상위에 나타나는 tellurite 관련 유전자들의 역할을 확인해보고자 하였다. *Streptomyces coelicolor*에서 *terD* domain을 가지는 유전자인 *tdd8*의 경우 분화와 관련된 역할을 하는 것이 밝혀진 바 있지만 (Sanssouci, E. et al., 2011) 다른 tellurite 관련 유전자들에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다. Tellurite compound의 경우 셀 내에서 산화 스트레스를 일으키는 물질로 알려져 있는데 (Chasteen, T. G. et al., 2009) 본 연구에서 확인된 tellurite와 관련된 기능을 수행하는 유전자로 명명되어있는 유전자들이 실제로 tellurite compound와 관련된 역할을 수행할 것인지에 대해서는 확실하지 않다. 따라서 major regulon인 tellurite 관련 유전자들의 실제 역할에 대해 알아보고 분석해보고자 하였다.

Tellurite 관련 유전자들이 실제로 tellurite와 관련된 기능을 할 것인지 알아보기 위해 MYM 고체 배지에  $K_2TeO_3$ 를 농도별로 처리하여 야생형과 *sigR* 결실 돌연변이, *sigR1* 결실 돌연변이를 spotting 함으로써 cell viability를 살펴보았다. 그 결과 야생형에 비해 *sigR*과 *sigR1* 결실 돌연변이 모두 cell viability가 떨어진다는 것을 확인하였는데, *sigR1*보다 *sigR* 결실 돌연변이가 훨씬 큰 감수성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 때문에 tellurite 스트레스가 *sigR1* 특이적인 스트레스는 아니라고 생각되었으며, tellurite 관련 유전자들이 실질적으로 tellurite compound와 관련된 역할을 수행할 것이라고는 결론내릴 수 없었다(그림 10. A).

그렇다면 tellurite 관련 유전자들이 명명된 이름과는 다르게 RNA sequencing과 ChIP sequencing의 조건이었던 열 충격과 관계된 역할을 하는 것은 아닌지에 대한 의문이 제기되었다. 이를 확인해보기 위해 regulon 목록 상위에 위치한 tellurite 관련 유전자 4개의 앞에 *ermE* 프로모터를 달아준 벡터를 cloning 하였으며, 이 벡터를 *sigR1* 결실 돌연변이

이에 transformation 하여 tellurite 관련 유전자 과발현 균주를 제작하였다. *terD*의 경우 유전자 특성 상 PCR이 어려워 cloning을 끝까지 진행하지 못했으며 나머지 유전자 과발현 균주들은 모두 열 충격을 처리해봄으로써 열 충격과의 관계를 관찰해보았다. 그 결과 tellurite 관련 유전자를 과발현 시켜도 열 충격에 대한 감수성을 극복하지는 못한다는 것을 알 수 있었다(그림 10. B).

위의 결과를 통해 tellurite와 관련된 기능을 수행할 것이라고 명명된 유전자들이 실제로 tellurite와 관련된 기능을 하는 것이 아니며, 각 유전자는 열 충격과 관련된 역할을 가진 것도 아니라는 결론을 내릴 수 있었다. 열 충격 하에서의 표현형을 극복하기 위해 각각의 유전자 하나만이 아니라 관련 유전자들의 결합된 기능이 필요한 것인지, 혹은 열 충격과도 관련이 없는 아예 새로운 기능을 수행하는 것인지에 대해서는 조금 더 연구가 필요하다.



### 그림 11 Tellurite 관련 유전자들의 분석

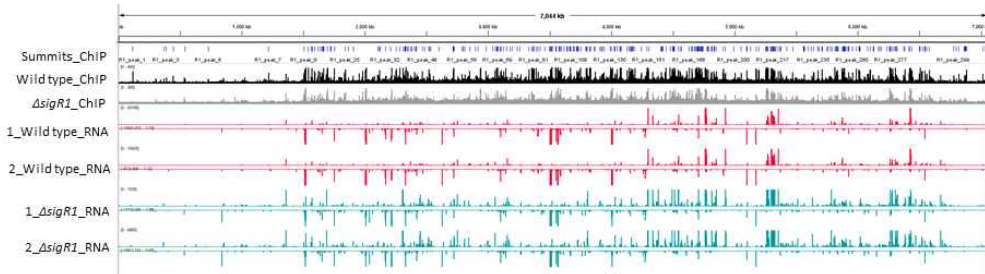
SigR1의 주요 regulon인 tellurite 관련 유전자들의 역할을 분석하기 위해 사진에 나와 있는 농도로  $K_2TeO_3$ 를 처리한 고체 배지에 야생형과 *sigR* 결실 돌연변이, *sigR1* 결실 돌연변이와 각각의 complementary 균주를 spotting 하여 그 표현형을 살펴보았다(A). 또한 각 tellurite 관련 유전자의 앞에 *ermE* 프로모터를 달아 *sigR1* 결실 돌연변이에 transformation 하여 tellurite 유전자 과발현 균주를 제작한 후 열 충격 하에서 표현형을 살펴보았다(B). 모두 3번 이상 반복된 결과 중 가장 대표적인 사진이다.

#### 3.3.4 SigR1의 최종 regulon

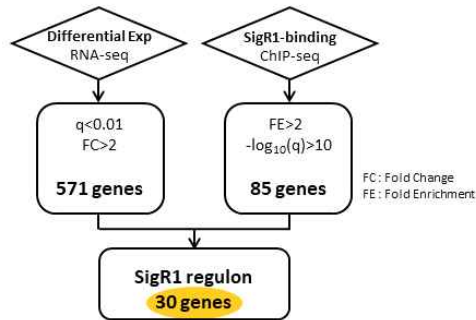
야생형과 *sigR1* 결실 돌연변이를 이용한 RNA sequencing과 ChIP sequencing을 통해 얻어낸 유전자 리스트에서 공통적으로 발견되는 유전자 30개를 SigR1의 최종적인 regulon이라고 결론 내렸다(그림 11).

이때, ChIP sequencing 결과 얻어진 유전자들의 fold enrichment가 생각보다 높지 않고, cut off 조건을 통해 얻어진 유전자 수가 적기 때문에 얻어낸 30개의 regulon은 최소 개수라고 생각한다. 즉, 정확히 하자면 SigR1은 30개 이상의 regulon을 가진다고 결론내릴 수 있으며 그 목록은 다음과 같다(표 7).





RNA seq and CHIP seq condition  
: heat stress 2 hr



### 그림 12 SigR1의 최종 regulon graphical summary

*sigR1*이 induction 되는 조건인 열 충격 2시간 조건에서 야생형과 *sigR1* 결실 돌연변이의 RNA를 뽑아 transcriptome 분석을 하고(위의 그림 1\_Wild type\_RNA, 2\_Wild type\_RNA, 1\_Δ*sigR1*\_RNA, 2\_Δ*sigR1*\_RNA), SigR1 항체를 이용한 ChIP DNA를 ChIP sequencing하여(위의 그림 Summit\_ChIP, Wild type\_ChIP, Δ*sigR1*\_ChIP) SigR1의 최종 regulon을 찾아보았다. RNA sequencing의 경우 q value 0.01 이하, fold change 2 이상으로 cut off 하여 총 571개의 유전자를 얻어냈으며 ChIP sequencing의 경우 fold enrichment 2 이상,  $-\log(q)$  value 10 이상으로 cut off 하여 총 85개의 유전자를 얻어내었다. 최종적으로는 공통되는 30개의 유전자를 확보하였으며 SigR1의 최종 regulon이라고 결론 내렸다.

**표 7 SigR1의 최종 regulon**

RNA sequencing과 ChIP sequencing 결과로 얻어진 SigR1 최종 regulon 30개의 리스트이다. log2 FC가 큰 순서로 나열되어있다.

Gene number	Log2 FC	FE	Product	Gene name
AQF52_RS26145	9.619	2.040	RNA polymerase sigma factor SigE	<i>sigR1</i>
AQF52_RS00545	6.770	4.026	tellurium resistance protein	
AQF52_RS08240	6.544	2.899	hypothetical protein	
AQF52_RS30750	5.282	4.743	Tellurite resistance TerB	<i>terB</i>
AQF52_RS10115	4.862	3.149	Putative membrane protein	
AQF52_RS09425	4.476	3.502	stress-induced protein	<i>terD</i>
AQF52_RS22035	3.954	3.987	chemical-damaging agent resistance protein C	<i>terD</i>
AQF52_RS31330	3.879	2.710	type I polyketide synthase	
AQF52_RS15065	3.833	2.424	hypothetical protein	
AQF52_RS27715	3.604	2.477	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	
AQF52_RS29255	3.583	3.369	TerD-family protein	
AQF52_RS18420	3.541	2.494	ABC transporter	
AQF52_RS28330	3.494	3.570	hypothetical protein	
AQF52_RS10265	3.086	2.163	hypothetical protein	
AQF52_RS29260	3.039	3.369	acetyltransferase	
AQF52_RS16905	2.732	3.111	hypothetical protein	
AQF52_RS15005	2.635	3.382	hypothetical protein	
AQF52_RS26150	2.627	4.529	Putative membrane protein	<i>rsrA1</i>
AQF52_RS12090	2.616	2.338	chemical-damaging agent resistance protein C	<i>terD</i>
AQF52_RS11170	2.615	4.009	hypothetical protein	
AQF52_RS30475	2.423	2.638	rsgA ribosome small subunit-dependent GTPase A	<i>rsgA</i>
AQF52_RS29385	2.367	3.243	peptidase M16	
AQF52_RS05315	1.708	4.746	Geranylgeranyl reductase	
AQF52_RS21385	1.700	3.087	Putative integral membrane protein	
AQF52_RS28895	1.643	3.598	Two-component system response regulator	
AQF52_RS18120	1.548	2.479	Membrane protein	
AQF52_RS13675	1.526	2.890	Secreted protein	
AQF52_RS06735	1.488	2.477	hypothetical protein	
AQF52_RS21520	1.409	2.987	putative secreted protein	
AQF52_RS29195	1.403	3.251	GTPaseHflX	<i>hflX</i>

## 4. 논의

#### 4.1 SigR1-RsrA1과 SigR-RsrA 시스템의 비교

SigR-RsrA 시스템은 *S. coelicolor*에서 많은 연구가 진행되어왔다. SigR은 크게 두 종류의 유도 인자에 의해 조절이 되는데, thiol-oxidants나 electrophiles에 의해 induction되거나 번역 저해 항생제에 의해 induction되어 하위 유전자를 조절하는 것으로 밝혀져 있다. *S. coelicolor*가 thiol-oxidants나 electrophiles 등에 노출되면, 항 시그마 인자인 RsrA의 thiol 기에 disulfide bond가 형성되어 구조적 변화가 일어나고, 붙잡혀 있던 SigR이 풀려난다. 자유로워진 SigR은 자기 자신을 포함하여 약 100 개 이상의 regulon을 조절하는데, N-terminal에 55개의 아미노산을 더 가진 SigR' 이라는 단백질의 발현을 통해 반응을 더욱 증폭시키기도 한다. *S. coelicolor*가 tetracycline과 같은 번역과정 저해 항생제의 영향을 받으면, WblC/WhiB7이라는 DNA-결합 단백질의 도움으로 SigR이 induction되어 그 regulon을 조절하기도 한다(Yoo, J. S. et al., 2016).

이와 다르게 SigR1은 산화 스트레스보다는 열 충격이나 SDS 스트레스, 그리고 전사과정 저해 항생제에 취약하다. 하지만 아직 RsrA1이 어떠한 경로를 통해 변화를 겪고 SigR1을 조절하는지는 알려지지 않았으며, SigR1의 unstable한 form인 SigR1' 이나 *sigR1*의 induction을 돕는 또 다른 단백질의 존재도 밝혀진 바 없다.

두 유전자는 DNA 결합 시퀀스에서도 차이점을 보인다. SigR의 경우 GGAAT-N<sub>18,19</sub>-GTT라는 시퀀스가 밝혀져 있는데(Kim, M. S. et al., 2012), 이번 연구를 통해 밝힌 SigR1의 DNA 결합 시퀀스는 GGAAC-N<sub>17</sub>-CGTT이다. 두 유전자의 결합 motif는 두 번째 G의 보존 정도에 차이가 있으며 다섯 번째 nucleotide가 각각 T와 C라는 것, 그리고 프로모터 -10 부분을 인식하는 GTT 앞의 C가 SigR1의 경우 굉장히 보존되어있다는 차이점을 가지고 있다.

결과적으로 SigR과 SigR1이 인식하는 스트레스, regulon의 종류와 수,

그리고 DNA 결합 시퀀스의 차이로 보았을 때 두 유전자는 서로 다른 역할과 기능을 수행하는 단백질이라고 결론내릴 수 있었다.

## 4.2 새로운 이름의 필요성

*sigR1*의 역할이 *sigR*과 다르다는 사실로부터 *sigR1*의 이름을 새로이 명명해야 할 필요성이 제기된다. *sigR1*이라는 이름에서부터 *sigR*과 비슷한 유도 인자와 regulon을 공유한다는 느낌을 줄 수 있기 때문이다.

*M. tuberculosis*나 *M. smegmatis* 등 다른 종들에서 *sigR1*의 homologous 유전자들은 거의 대부분 *sigE*라는 이름을 가지고 있다. 하지만 *S. venezuelae*에서 *sigE*는 이미 존재하고 있다(AQF52\_3632). 다른 종들과의 일관성을 위해 *sigE1*이라는 이름을 고려해보았지만 *sigE1*이 자칫 *sigE*의 homologous 유전자라는 느낌을 주기 쉽고, 실제로는 phylogenetic tree 상에서 *sigE*와 *sigR1*의 거리가 꽤 멀기 때문에 적합하지 않은 이름이라고 생각한다.

SigR1이 열 충격에 의해 induction 되고 하위 유전자들을 조절한다는 의미에서 *sigH*나 *sigT* 등의 이름도 고려해보았지만 이러한 이름들도 이미 *S. venezuelae*에 존재하고 있다(AQF52\_5370, AQF52\_4086). 이에 envelope 스트레스나 열 충격이라는 두 가지 이니셜을 모두 활용하여 *sigEH*, *sigHE* 등의 새로운 이름이 가능할 것이라고 생각된다. 혹은 열 충격에서 벗어나 *sigR1*이 induction 되는 또 다른 스트레스 조건인 SDS 스트레스의 이름을 따 *sigS*라는 이름도 고려하고 있다.

또한 지금까지는 *sigR1*의 항 시그마 인자인 AQF52\_5272 유전자를 *sigR*의 항 시그마 인자인 *rsrA*의 이름을 따 *rsrA1*이라고 불러왔지만 새로 짓게 되는 시그마 인자의 이름에 따라 함께 역할을 하고 있는 항 시그마 인자의 이름도 바뀌어야 할 것이다.

### 4.3 앞으로 진행되어야 할 실험 및 전망

*sigR1*의 항 시그마 인자인 *rsrA1*에 대한 연구가 가장 먼저 필요하다. 본 연구에서는 열 충격 하에서 *rsrA1*의 RNA와 단백질 발현이 *sigR1*과 같은 경향으로 나타난다는 사실을 밝혔다. 하지만 스트레스 하에서 degradation, proteolysis, 혹은 구조적 변화 등을 거쳐 잡고 있던 시그마 인자를 놓아주는 항 시그마 인자의 역할로 볼 때 *sigR1*과 *rsrA1*의 발현 방향이 같은 결과는 이해하기 어렵다. 따라서 정확한 RsrA1의 역할이 무엇인지, 어떠한 경로와 방법을 통해 SigR1의 기능을 돕는지에 대한 추가적인 공부가 필요하다. 특히 SigR1이 RsrA1 존재 시 기능이 억제되는지, 혹은 반대로 활성화되는지 알아보기 위해 *E. coli* two plasmid 균주 제작을 통해 두 유전자 사이의 관계를 밝힐 수 있다. SigR1과 RsrA1을 과발현하는 pET 벡터와 SigR1이 인식하는 프로모터와 lacZ를 가진 벡터를 하나의 *E. coli*에 transformation 하여 각각의 유전자가 존재할 때의 lacZ 발현 정도, 그리고 두 유전자가 함께 존재할 때의 lacZ 발현 정도를 비교하여 RsrA1의 기능을 간접적으로 알아낼 수 있을 것이다. 또는 *in vitro* transcription assay를 통해 각 유전자의 존재 유무에 따른 transcription 정도를 알아내어 RsrA1의 정확한 기능에 대해 이해할 수 있을 것이다.

RsrA1의 파트너 단백질을 찾는 연구도 진행되어야 한다. *M. tuberculosis*에서 *rsrA1*의 homologous 유전자인 *rseA*에 대한 논문 (Barik, S. et al., 2010)에서 RseA가 ClpC1P2와 interaction하고 그에 의해 inactivation 된다는 것이 밝혀져 있다. 이 결과를 참고하여 *S. venezuelae*에서 ClpC1P2의 homologous 유전자를 밝히고, 그 유전자들과 RsrA1과의 interaction을 밝히는 실험이 수행되어도 좋을 것이다. 가장 간단한 방법으로는 셀에서 단백질을 뽑아 두 개의 항체로 co-IP 실험을 해보거나 각 단백질을 과발현 및 정제하여 *in vitro* pull down assay를 진행하는 것이 있다. 이를 통하여 RsrA1이 외부 스트레스 하에서 어떠한 단백질과 반응하는지, 어떠한 경로를 통해 SigR1의 역할을 돕는지

밝힐 수 있을 것이며 궁극적으로는 *sigR1-rsrA1* 오페론에 대해 보다 깊은 이해를 할 수 있을 것이라고 생각한다.

SigR1의 major regulon인 tellurite 관련 유전자들의 역할도 확인되어야 한다. 본 연구에서는 tellurite 관련 유전자들이 tellurite domain만을 가지고 있을 뿐 실제 역할이 tellurite compound와 관계되었다고는 보이지 않으며, 각 유전자는 열 충격과의 관련성도 적다고 결론 내렸다. 따라서 tellurite와 관련된 유전자 모두를 *ermE* 프로모터 하에서 과발현 시킨 균주를 제작하여 각 유전자들의 합동 역할을 살펴보거나 유전자 결실 돌연변이를 제작하여 그 표현형을 살펴보는 실험이 수행되어야 할 것이다.

## 5. 참고문헌



Barik, S., Sureka, K., Mukherjee, P., Basu, J., & Kundu, M. (2010). RseA, the SigE specific anti-sigma factor of *Mycobacterium tuberculosis*, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpC1P2 proteolysis. *Molecular microbiology*, *75*(3), 592–606.

Bierman, M., Logan, R., O'brien, K., Seno, E. T., Rao, R. N., & Schoner, B. E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene*, *116*(1), 43–49.

Chasteen, T. G., Fuentes, D. E., Tantaleón, J. C., & Vásquez, C. C. (2009). Tellurite: history, oxidative stress, and molecular mechanisms of resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *33*(4), 820–832.

de Lima Procopio, R. E., da Silva, I. R., Martins, M. K., de Azevedo, J. L., & de Araujo, J. M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of infectious diseases*, *16*(5), 466–471.

Feklistov, A., Sharon, B. D., Darst, S. A., & Gross, C. A. (2014). Bacterial sigma factors: a historical, structural, and genomic perspective. *Annual review of microbiology*, *68*, 357–376.

Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T., & Chater, K. F. (2003). PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a

protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(4), 1541–1546.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, *166*(4), 557–580.

Hofmann, K. A. W. S. (1993). TMbase—A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem. Hoppe–Seyler*, *374*, 166.

Kim, M. S., Dufour, Y. S., Yoo, J. S., Cho, Y. B., Park, J. H., Nam, G. B., ... & Roe, J. H. (2012). Conservation of thiol-oxidative stress responses regulated by SigR orthologues in actinomycetes. *Molecular microbiology*, *85*(2), 326–344.

Lonetto, M. A., Brown, K. L., Rudd, K. E., & Buttner, M. J. (1994). Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(16), 7573–7577.

Manganelli, R., Voskuil, M. I., Schoolnik, G. K., & Smith, I. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor  $\sigma^E$ : role in global gene expression and survival in macrophages. *Molecular microbiology*, *41*(2), 423–437.

McCarthy, A. J., & Williams, S. T. (1992). Actinomycetes as

agents of biodegradation in the environment—a review. *Gene*, *115*(1), 189–192.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

Sanssouci, E., Lerat, S., Grondin, G., Shareck, F., & Beaulieu, C. (2011). tdd8: a TerD domain-encoding gene involved in *Streptomyces coelicolor* differentiation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *100*(3), 385–398.

Song, J. Y., Yoo, Y. J., Lim, S. K., Cha, S. H., Kim, J. E., Roe, J. H., ... & Yoon, Y. J. (2016). Complete genome sequence of *Streptomyces venezuelae* ATCC 15439, a promising cell factory for production of secondary metabolites. *Journal of biotechnology*, *219*, 57–58.

Yoo, J. S., Oh, G. S., Ryoo, S., & Roe, J. H. (2016). Induction of a stable sigma factor SigR by translation-inhibiting antibiotics confers resistance to antibiotics. *Scientific reports*, *6*, 28628.

## Abstract

# Function of SigR1, an ECF sigma factor in *Streptomyces venezuelae* ATCC15439

Sang-ah Hong  
Biological sciences  
The Graduate School  
Seoul National University

Being exposed to a variety of environments throughout their lives, it is crucial for bacteria to have rapid and proper responses to external stresses to maintain growth and survival. To react quickly to the changeable environment, bacteria transcribe crucial genes and translate them to proteins. Sigma factor, a typical transcriptional regulator that regulates the sub-genes by forming a holoenzyme with RNA polymerase and binding to the -10 and -35 regions of the promoter, is one of the key proteins of bacteria that is being actively researched hitherto.

In this study, we aimed to investigate the inducing agents and the corresponding regulatory mechanisms of SigR1, whose functions are yet to be understood in *Streptomyces venezuelae* ATCC15439, a well-known producer of various antibiotics and

secondary metabolites.

In particular, we wanted to observe whether SigR1 has SigR-like responsive functions to oxidative stresses; how much common features they share or how different they are from each other since SigR1 was named after SigR for having similar structure.

To investigate under which external conditions SigR1 specifically reacted to, *sigR1* deletion mutant strain was grown under various antibiotics and stress conditions respectively. Under heat and SDS stresses, the *sigR1* deletion mutant exhibited deficiency in survival and the wild type showed increased *sigR1* RNA and protein expression levels under heat stress. In addition, we also found that SigR1 autoregulates itself.

Next, we studied the characteristics of RsrA1, an anti-sigma factor of SigR1. We hypothesized that the RNA and protein expression of *rsrA1* would be reduced since the RNA and protein expression of *sigR1* were increased under heat stresses. Unexpectedly, *rsrA1* expression was also elevated, requiring further research on the function of RsrA1 and SigR1 regulation mechanisms.

Transcriptome analysis and Chromatin Immuno-precipitation (ChIP) sequencing were performed to determine the regulon and DNA binding sequences of SigR1. Transcriptome analysis through RNA sequencing confirmed that 571 target genes are regulated by SigR1, including genes related to tellurite compound and membrane. Furthermore, ChIP DNA analysis were conducted to observe whether SigR1 binds to the promoter -10, -35 region of the target genes and to obtain 85 enriched genes in the wild type

compared to *sigR1* deletion mutants, respectively. We concluded that 30 common genes on the lists obtained by RNA sequencing and ChIP sequencing are regulons of SigR1, and the DN binding sequence of SigR1 could be found as GGAAC-N<sub>17</sub>-CGTT.

Finally, it was observed that SigR1 responds to heat or SDS stress unlike SigR which responds to oxidative stress. We also conclude that the regulon and DNA binding sites directly regulated by SigR1 are also different from that of SigR. Considering such difference, it is necessary to rename SigR1.

**Keywords :** *Streptomyces venezuelae*, sigma factor, *sigR1*, *rsrA1*, heat stress, SDS, membrane, tellurite

**Student Number :** 2016-29436