

## ErmSF에서 특이적으로 발견되는 N-terminal end region에 존재하는 1-25번째 아미노산을 함유하는 peptide segment의 효소 활성에서의 역할

진 형 중

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

ERM protein은 23S rRNA의 A<sub>2058</sub>에 dimethylation시킴으로써 MLS<sub>B</sub>계 항생제의 부착을 저해하여 항생제의 활성을 억제하는 내성인자 단백질이다. ERM 단백질의 하나인 ErmSF의 N-말단부위(N-terminal end region, NTER)에 존재하는 1-25번째 아미노산을 함유하는 펩타이드의 활성에서의 역할을 알아보기 위해 이를 제거한 변이 단백질을 표현하는 유전자를 클로닝하고 대장균에서 수용성 단백질로 12.65 mg/L culture의 수율로 대량생산하였다. 이렇게 대량생산된 단백질의 활성을 *in vivo*와 *in vitro*에서 확인하였다. 그 결과 *in vitro*에서 야생형(wild type)의 단백질에 비해 15%의 활성이 감소한 것을 확인하였고 이는 제거된 펩타이드가 기질과 상호작용하여 효소의 활성에 영향을 미친다는 것을 시사하고 있다. 이렇게 감소된 효소의 활성은 생체 내(*in vivo*) 활성에도 적용되어 처음에는 변이 단백질을 함유하는 세포가 항생제의 작용에 의하여 성장억제를 받지만 시간의 경과와 함께 내성을 회복하여 밤색 배양하였을 경우는 야생형 단백질을 함유한 세포와 동일한 내성 즉 항생제에 의한 성장억제지역(inhibition zone)을 전혀 나타내지 않는 것으로 밝혀졌다.

**Key words** □ ErmSF, *in vitro* activity, *in vivo* activity, MLS (macrolide- incosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein, N-terminal end region, 23S rRNA dimethylation

ERM 단백질은 bacteria의 23S rRNA에 존재하는 특정 adenine (A<sub>2058</sub>, *E. coli* coordinate)에 methylation시킴으로써 macrolide, lincosamide, streptogramin B 항생제(MLS<sub>B</sub>계 항생제)의 부착 능력을 저해하여 미생물로 하여금 이들 항생제에 대하여 내성을 나타내게 하는 단백질이다(4, 16, 19, 21). ERM 단백질은 크게 monomethylase와 dimethylase로 나뉘어지고 이들이 나타내는 내성은 각각 type I 과 type II로 불리어 진다(14). Type I 내성은 A<sub>2058</sub>에의 monomethylation에 의하여 이루어지며 이로 인하여 lincosamide 항생제에 대하여는 내성을 나타내지만 streptogramin B나 macrolide 항생제에 대하여는 중간정도의 내성 또는 전혀 내성을 나타내지 못한다(13, 14, 21, 24). 반면 type II 내성은 dimethylation에 의하여 이루어지며 위의 모든 항생제에 대하여 강한 내성을 나타내게 되고 거의 모든 ERM 단백질은 dimethylase로 MLS<sub>B</sub> 항생제 내성(type II)을 일으키게 된다(14, 21, 23). 한편 최근 macrolide의 neutral sugar moiety를 제거하고 여기에 ketone group을 도입함과 동시에 carbamate group을 도입함으로써 개발된 ketolide 항생제는 ERM 단백질에 의한 MLSB 항생제 내성을 극복할 수 있을 것으로 생각되었으나 최근의 연구결과에 의하면 세포 내에 존재하는 cofactor (S-adenosyl-L- methionine)의 농도가 높게 유지될 때 rRNA에 dimethylation이 일어나게 되고 그 결과 형성된 dimethyladenine은 이 항생제 즉 ketolide의 부착능도 현저

히 저하시킴으로써 ERM 단백질에 의해 야기된 내성을 피해갈 수 없는 것으로 밝혀졌다(22).

임상에서 분리되는 병원균에서 발견되는 MLS<sub>B</sub>계 항생제에 대한 내성기작은 크게 두 가지로 나타난다. 그 첫 번째는 macrolide 항생제에 대하여 efflux pump로 작용하는 MefA/E에 의한 것으로 이 단백질에 의한 내성은 1-4 mg/ml 정도의 낮은 농도에서 나타나고 macrolide 항생제에 대하여만 내성을 나타내므로 M type 내성이라고 한다. 반면 ERM 단백질에 의한 내성은 MLS<sub>B</sub> 항생제 모두에 대하여 128 mg/ml 이상의 고농도에서 내성을 나타내므로 임상적으로 매우 중요한 내성 기작이다(18).

기축에 사용되는 항생제로 macrolide 계열인 tylosin의 생산균주, *Streptomyces fradiae*는 tylosin의 항생작용으로부터 자신을 보호하기 위하여 4개의 내성인자 단백질을 발현한다(3, 12, 19). 최근에 ErmN으로 재분류된 TlrD는 ERM 단백질의 일종으로 monomethylase (5, 15, 24)이고 TlrC는 tylosin의 세포내 유입을 방지하는 transporter이다(2, 17). TlrB는 최근 또 다른 methyltransferase로 밝혀졌으며 ERM 단백질과는 달리 이 단백질은 23S rRNA의 domain II에 존재하는 guanine에 methylation시키는 것으로 밝혀졌다(12). TlrA로 알려진 ErmSF는 최근에 ErmS로 재분류되었으며 dimethylase로 작용한다(15). 이 단백질은 다른 ERM 단백질에서 찾아볼 수 없는 긴 N-terminal end region (NTER)을 함유하고 있는 것으로 밝혀졌다. 이를 구성하는 아미노산을 살펴보면 RNA와 잘 작용하는 것으로 알려진 arginine이 32% 함유된 것으로 밝혀졌다. 따라서 본 연구에서는 NTER의

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 031-220-2290, Fax: 031-220-2519  
E-mail: hjjin@mail.suwon.ac.kr

기능을 살펴보는 첫 번째 단계로 NTER을 구성하는 1-25번째의 아미노산들을 coding하는 염기 서열을 제거한 유전자를 클로닝하고 이를 대장균에서 대량생산하여 그 활성에서의 역할을 *in vivo* 와 *in vitro*에서 검색하였다.

## 재료 및 방법

### 균주, 플라스미드 및 primers

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리하였다. 그리고 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머들은 Table 2에 정리하였다.

### *ermSF* 유전자 및 NTER의 1-25번째 아미노산이 제거된 *ermSF* 유전자의 클로닝

*ermSF* 유전자의 클로닝은 이전에 발표된 방법대로 실시하였다 (7). 이렇게 얻어진 *ermSF* 유전자를 사용하여 NTER 중 아미노산 1-25를 함유하는 펩타이드가 제거된 단백질(NT25TE)을 얻기 위하여 이 펩타이드를 표현하는 염기 서열(DNA sequence)이 제거된 DNA 절편을 올리고뉴클레오타이드-1와 올리고뉴클레오타이드-2를 각각 전방향(forward), 역방향(reverse) 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하여 얻었다. 이렇게 얻어진 DNA 절편을 *XcmI*으로 절단한 T vector인 pDK101 (8)에 접합시킨 후 클로닝하여 pHJJ109으로 명명하였다. 이렇게 얻어진 플라스미드를 *NdeI*과 *HindIII*으로 절단한 후 얻어진 DNA 절편을 같은 제한효소로 처리한 표현 담체(expression vector)인 pET23b (Novagen, Madison, WI)에 접합한 후 T7 RNA 합성효소 유전자를 함유한 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환하였다. NTER에서 1-25번째 아미노산을 함유하는 펩타이드가 절단된 단백질을 표현하는 DNA

절편이 reading frame에 맞게 담체에 끼워진 클론을 플라스미드 분리 및 제한효소 절단과 dideoxy chain termination sequence analysis에 의하여 선별하였다. 여기서 얻어진 플라스미드를 pHJJ114로 명명하였다. 그리고 이 플라스미드를 함유한 대장균을 *E. coli* HJJ114로 명명하였다

### *ermSF* 및 deletion mutant *ermSF* 유전자의 발현

표현 담체에 적절히 끼워진 *ermSF* 및 변이 *ermSF* 유전자의 발현은 이미 발표된 방법에 근거하여(9) 약간의 변형과 함께 다음과 같이 수행하였다. 하룻밤 동안 배양한 *E. coli* HJJ105와 *E. coli* HJJ114를 새로운 배지에 transfer하고  $A_{600}$ 이 0.8-1.0이 되도록 37°C에서 배양한 후 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가한 후 22°C에서 24시간 배양하였다. 그리고 발현되는 정도를 SDS-PAGE (10)로 확인하였다.

### 발현된 단백질의 정제

변이 단백질(NT25TE)의 정제는 기존에 발표된 방법을 사용 (7), 약간 변형하여 실시하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 원심분리(8,000 × g)하여 얻어진 세포를 lysozyme (5 mg/ml)을 함유하는 buffer A [20mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole]에서 분산시킨 후 상온에서 20분간 배양하고 -80°C에서 얼린 후 녹여서 세포를 분쇄하였다. 여기에 DNase I (2.5 µg/ml) 및 RNase A (2.5 µg/ml)을 넣고 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액으로부터의 단백질 분리는 공급자(Novagen)가 제공한 과정에 근거,  $Ni^{2+}$  affinity column chromatography법에 의하여 분리하였다. buffer A로 평형을 이룬 His · bind resin이 충전된 컬럼에 위에서 얻어진 용액을

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain or plasmid	Description	Reference or source
<b>Bacterial strains</b>		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for plasmid expression vectors that utilize the T7 promoter; possesses T7 RNA polymerase gene under <i>lac</i> control	Novagen
<i>E. coli</i> HJJ105	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ105	9
<i>E. coli</i> HJJ114	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ114	this work
<b>Plasmids</b>		
pDK101	T vector for direct cloning of PCR products; purified from <i>E. coli</i> ATCC 77406	8
pET23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His <sub>6</sub> -tag at C-terminal end	Novagen
pHJJ105	pET23b containing <i>ermSF</i> <i>NdeI</i> - <i>HindIII</i> gene cartridge	9
pHJJ114	pET23b containing DNA fragment encoding NT25TE	this work

**Table 2.** Primers

Oligonucleotide primer	Sequence & description
Oligo-1	5' <u>catatgcgtgctgaccgtgctccgggtcgtggccgtgaccgtgac</u> (45-mer) upstream (forward) PCR primer for NT25TE gene
Oligo-2	5' <u>aagcttcggtccgccggtcggtc</u> (24-mer) downstream (reverse) PCR primer for all of truncated <i>ermSF</i> genes
Oligo-3	5' <i>taatacgactcactatagagactcggtgaaa</i> (33-mer) upstream (forward) PCR primer for <sup>a</sup> BDV DNA containing T7 promoter
Oligo-4	5' cctctcgtaaggacacg (20-mer) downstream(reverse) PCR primer for BDV DNA

Note. The underlined sequence in oligo-1 and oligo-2 introduced *NdeI* and *HindIII* restriction site, respectively. The italicized nucleotides in oligo-3 indicate T7 promoter sequence.

<sup>a</sup>BDV denotes *Bacillus subtilis* 23S rRNA domain V.

loading한 후 buffer B [20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl, 80 mM imidazole]을 사용하여 컬럼에 부착되지 않거나 잘못 부착된 단백질을 씻어낸 후 원하는 단백질을 300 mM imidazole이 함유된 buffer B를 사용하여 얻어내었다.

#### 발현된 단백질의 생체 내 활성검색(항생제 내성 검사)

생체 내 활성검색은 이미 발표된 방법인 디스크 방법을 사용하여 결정하였다(6). 간단히 기술하면 다음과 같다. 원형의 거름 종이(Whatmann 3M)에 25 mg/ml의 erythromycin 용액을 250 µg 이 되도록 점적한 후 말린 다음 새롭게 배지 위에 도포된 미생 물위에 올린 후 하루 동안 배양하여 그 성장억제지역을 관찰하였다.

#### Domain V의 *in vitro* transcription에 의한 제조

*B. subtilis* 23S rRNA Domain V (BDV)를 표현하는 DNA 조각을 얻기 위하여 *B. subtilis* BD170의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 올리고뉴클레오타이드-3과 올리고뉴클레오타이드-4를 각각 정방향, 역방향 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하여 얻어내었다. 각각의 올리고뉴클레오타이드는 *B. subtilis* 23S rRNA 뉴클레오타이드의 2022-2042, 2672-2692번째에 해당된다. 얻어진 DNA 절편은 올리고뉴클레오타이드-3에서 제공되는 T7 promoter 서열을 가지고 있으므로 T7 DNA-dependent RNA polymerase를 이용하여 RNA를 합성하는데 주형으로 사용하였다. 합성 방법은 transcription buffer [40 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM spermidine, 0.01% Triton X-100, 5 mM DTT]에 80 mM polyethylene glycol (MW 8,000), NTP (4 mM each), 28 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 nM DNA 주형을 첨가하고 T7 RNA polymerase를 넣은 후 37°C에서 4시간동안 반응하였다. phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 사용하여 추출한 후 에탄올 침전시켰고 얻어진 침전물을 TE buffer에 녹여 4% 7 M urea-polyacryl amide gel을 이용하여 확인하였다.

#### 정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색

정제된 단백질의 *in vitro* 활성은 기존에 발표된 방법을 약간 변형하여 검색하였다(7, 23). 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 10 mM dithiothreitol의 조성을 가진 완충 용액에 3.3 pmole의 *S*-[methyl-<sup>3</sup>H]adenosylmethionine (SAM; Amersham, arlington Height, IL; sp act 80 Ci/mmol), 10 U of RNasin (Promega, Madison, WI), 10 pmol의 domain V와 250 ng의 truncated ErmSF (NT25TE)를 넣고 총 부피가 50 µl되도록 한 후 37°C에서 1시간 배양한 후 물로 포화된 phenol로 추출하여 반응을 정지시킨 후에 12% trichloroacetic acid로 침전시킨 다음 침전물을 건조하고 유입된 방사선량을 측정하였다.

## 결 과

#### NTER 중 1-25 아미노산을 함유하는 펩타이드가 제거된 ErmSF의 발현을 위한 발현 플라스미드의 제작

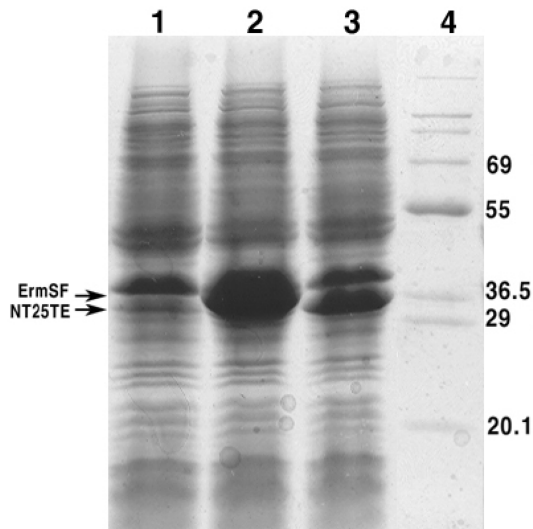
ErmSF는 현재까지 밝혀진 다른 ERM 단백질들에서 발견되지 않는 약 57개의 아미노산으로 구성된 긴 NTER을 가지고 있다. 특히 이 부분은 RNA와 잘 binding하는 것으로 알려진 arginine 이 약 32%를 차지하고 있으며(Fig. 1) 특히 이 부분 중 N-terminal 쪽에 존재하는 펩타이드는 핵자기공명분석에 의하면 특정한 이차구조를 가지지 않는 것으로 밝혀졌다(자료 미 제시). 따라서 NTER의 역할을 규명하는 첫 번째 단계로 NTER에서 1-25번째 아미노산을 함유하는 펩타이드가 제거된 NT25TE (Fig. 1)를 표현하는 DNA절편을 얻고 이를 발현 담체에 끼워 넣었다. 얻어진 NT25TE는 야생형 ErmSF가 가지고 있는 G486C와 G649A의 변이를 모두 가지고 있었으며 이는 단백질의 활성화에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 이미 밝혀졌다(7). 여기서 얻어지는 단백질은 발현 담체인 pET23b에 의하여 제공되는 6개의 histidine 꼬리를 표현하는 DNA 염기서열을 3' 말단에 갖게 되고 이를 이용하여 야생형 및 변이 ErmSF를 분리 정제하였다.

#### Truncated ErmSF의 발현

NTER에서 1-25번째 아미노산을 표현하는 염기서열(DNA sequence)이 제거된 DNA 절편을 함유한 pET23b를 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질전환 한 후 IPTG로 발현을 유도하고 그 발현정도를 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다(Fig. 2). Fig. 2에서 보여 지는대로 빈 벡터(empty vector)만을 함유한 세포내에서 발현된 단백질의 양상과는 달리 DNA 절편을 함유한 발현 담체에서는 37 kDa의 야생형 ErmSF에서부터 조금 이동이 빨라진 단백질이 대량 발현된 것을 관찰할 수 있었다. 핵산의 염기서열로부터 추정된 이들 단백질의 분자량은 각각 6개의 histidine tag을 포함하여 야생형 ErmSF (37 kDa)보다 약간 작은 34.41 kDa이었으며 SDS-PAGE상에서도 그 이동정도가 lactic anhydrase (36.5 kDa)와 carbonic anhydrase (29 kDa)사이에서 나타나 예상한 정도의

ErmAM	M-----	
ErmC'	M-----	
ErmSF	MARAPRSPHPARSRETSRAHPYPGTRADRAPGRGR	35
	↑ (NT25TE)	
ErmAM	-----N-KNIKYSQNFLT	14
ErmC'	-----NEKNIKHSQNFITS	15
ErmSF	DRDRSPDSPGNTSSRDGGRSPDRARRELSQNFLAR	70
ErmAM	EKVLNQIIKQLNLKETDTVYEI . . . . .	245
ErmC'	KHNIDKIMTNIRLNEHDNIFEI . . . . .	244
ErmSF	RAVAERVARLVRPAPGGLLEV . . . . .	319

**Fig. 1.** Amino acid sequence alignment of N-terminal end regions in ErmAM, ErmC' and ErmSF. Unlike the other homologous proteins, ErmSF contains long N-terminal end region (57 a.a) and it contains 32% arginine residues (18 a.a/57 a.a). The arrow indicates the starting amino acid of mutant ErmSF (NT25TE) in which 1-25 amino acids from NTER of ErmSF was truncated, but methionine was added just before starting amino acid for proper expression.



**Fig. 2.** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the expressed mutant ErmSF (NT25TE). *E. coli* BL21 (DE3) was transformed with recombinant plasmid pHJJ114 containing DAN fragment in which 1-25 amino acid encoding region was deleted from *ermSF*. Overnight grown *E. coli* cells were transferred (10%, v/v) to new LB medium, incubated for 1.5 h at 37°C to reach an A600 of 0.8-1.0. In order to induce the expression, IPTG was added to the final concentration of 1 mM and incubation continued for 18 h at 22°C. 100 µl of cell culture was boiled to disrupt the cells in 6X sample buffer, resolved on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, empty vector; lane 2, wild type ErmSF of 37.05 kDa (*E. coli*, HJJ1105); lane 3, NT25TE of 34.41 kDa (*E. coli*, HJJ114); lane 4, molecular size marker in kDa: bovine serum albumin, 69; glutamic dehydrogenase, 55; lactic dehydrogenase in porcine muscle, 36.5; carbonic anhydrase in bovine liver, 29; trypsin inhibitor in soybean, 20.1.

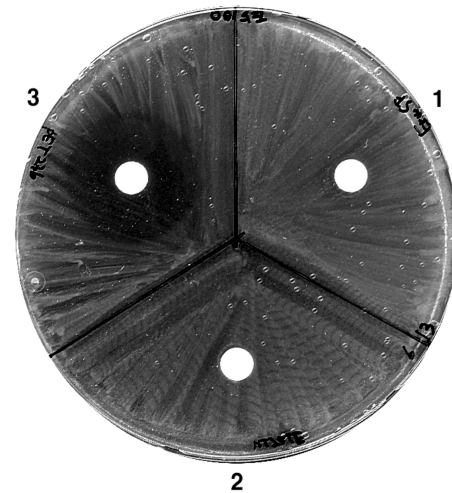
분자량을 갖는 것으로 관찰되었다(Lane 3 in Fig. 2).

#### Truncated ErmSF의 생체 내에서의 활성 검색

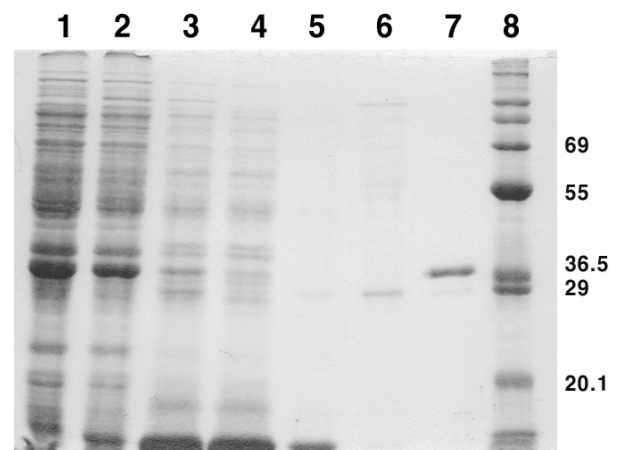
대량생산된 변이 ErmSF의 생체 내에서의 활성은 이들이 세포에 가져다주는 항생제 내성을 결정함으로써 검색하였다. Fig. 3에서 보여지는대로 빈 백타를 함유한 *E. coli*의 경우는 항생제에 의해 성장이 저해되어서 생장저해지역이 명확하게 관찰되었다. 반면 발현된 야생형 ErmSF를 함유하는 대장균의 경우는 전혀 저해를 받지 않았다. NT25TE의 경우도 야생형 ErmSF의 경우와 같이 항생물질인 erythromycin에 의하여 저해를 받지 않았으므로 1-25번째의 아미노산을 함유하는 peptide가 제거되어도 생체 내에서의 활성 즉 항생제에 대한 내성 발현은 큰 영향을 받지 않은 것으로 나타났다.

#### 대량생산된 단백질의 정제

대량생산된 단백질을 함유하는 세포를 분쇄한 후 원심분리를 사용하여 세포 분쇄물 및 불용성 단백질(inclusion body)를 포함하는 불용성 물질을 제거하고(Fig. 4, lane 2) 용해성 단백질을



**Fig. 3.** Antibiotic susceptibility assay. Erythromycin stock solution (25 mg/ml) was dropped on Whatmann 3M paper circle to reach the final amount of 250 µg of erythromycin. In each section of agar plate, *E. coli* cells containing wild type ErmSF and NT25TE expression vector, and empty vector were spread with cotton swab. In the center of each section, paper circle containing erythromycin was placed, and the resulting agar plate was incubated overnight at 37°C. All grew well in the presence of erythromycin except cells harboring empty vector. Section 1, *E. coli* cells harboring pHJJ114; section 2, *E. coli* cells harboring NT25TE; section 3, *E. coli* cells harboring empty vector.



**Fig. 4.** Purification of the expressed NT25TE. *E. coli* HJJ114 was grown at 22°C in the presence of IPTG. Cell pellets of 100 ml culture was treated with lysozyme (5 µg/ml), frozen at -80°C and thawed at room temperature. The resultant lysate was treated with DNase I (2.5 µg/ml), RNase A (2.5 µg/ml) and centrifuged to remove the particulated materials including inclusion body. The resultant supernatant was loaded onto immobilized Ni<sup>2+</sup> affinity column. Lane 1, total cell proteins; lane 2, inclusion body fraction; lane 3, supernatant fraction of lysate; lane 4, affinity run-through; lane 5, 5 mM imidazole column wash; lane 6, 100 mM imidazole column wash; lane 7, 300 mM imidazole elute; lane 8, molecular size marker: refer to Fig. 2.

**Table 3.** Methylation of domain V of *B. subtilis* 23S rRNA by recombinant wild type ErmSF and NT25TE *in vitro*

Protein	RNA	Activity (cpm) <sup>a</sup>
ErmSF	+	19,840
"	-	50
NT25TE	+	16,860
"	-	50
-	+	20

<sup>a</sup>substrate activities were determined under standard assay condition described in the text (Materials and Methods).

함유하는 상등액을 얻었다(Fig. 4, lane 3). 이렇게 얻어진 단백질을 용액을  $\text{Ni}^{2+}$ 이 고정화된 resin이 있는 컬럼에 넣고 100 mM imidazole이 함유된 완충용액을 사용하여 씻어낸 후 (Fig. 4, lane 6) 300 mM이 함유된 완충용액을 사용하여 변이 ErmSF를 얻어 내었다(Fig. 4, lane 7). 여기서 얻어진 단백질의 양을 BSA를 표준 품으로 사용하여 정량하였을 때 IPTG로 유도되어 발현된 1 liter 배양액 중 12.65 mg이었다. 한편 Figure 4의 lane 2에서도 관찰할 수 있듯이 발현된 단백질의 많은 부분이 불용성 단백질로 발현되어 불용성 단백질 분획(inclusion body fraction)에 남아 있는 것을 알 수 있다.

#### 정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색

생체 내에서 발현되어 NT25TE를 함유하는 host 즉 *E. coli*에 항생물질 즉 erythromycin에 대한 내성을 나타내는 데는 큰 문제가 없는 것으로 관찰되었으나 그 *in vitro*에서의 활성을 야생형 ErmSF와 비교하여 알아보기 위해 ERM 단백질의 완전 기질로 밝혀진 domain V (9, 20)를 사용하여 활성을 검색하였다. Table 3에서 보여 지는 대로 야생형 ErmSF에 비하여 약 85%정도의 활성을 나타내었다.

#### 고 찰

본 연구에서는 RNA와 잘 결합하는 것으로 알려진 arginine이 32%를 차지함으로써 활성화에 큰 영향을 미칠 것으로 기대되는 ErmSF의 NTER 중 1-25번째 아미노산을 함유하는 펩타이드를 제거한 ErmSF를 표현하는 DNA 절편을 클로닝하고 *E. coli*에서 발현하여 그 활성을 *in vivo*와 *in vitro*에서 검색하였다. 일반적으로 단백질의 일부가 제거된 변이 단백질을 발현할 때 많은 단백질들이 불용성 단백질로 발현되어 짐으로써(1) 많은 문제점을 야기한다. 이러한 현상에 대한 첫 번째 원인은 제거된 부분이 이차구조를 가짐으로써 이 이차구조가 단백질의 다른 부분과 상호작용을 하면 이 부분이 제거되었을 때 기존에 존재하는 상호작용이 깨짐으로써 안정성을 잃어 단백질끼리 aggregate를 형성하는 것이다. 그 두 번째 원인은 단백질의 일부가 제거됨으로써 단백질의 접힘(protein folding) 과정에서 다른 부분의 접힘에 필요한 부분이 없어짐으로써 단백질의 접힘이 정상적으로 이루어지지 않아서 일어나는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 NTER 중 일부가 제거된 NT25TE의 경우는 용해성 단백질로 대량생산

(12.65 mg/L culture) 되었고 생체 내에서의 활성 즉 이 단백질에 의하여 항생제 내성이 야기되는 것은 일부 SDS-PAGE 상에서 대량 생산된 단백질이 inclusion body fraction에서 관찰되었지만 이 단백질이 생체 내에서 활성을 갖는 용해성 단백질로 생산된 것으로 설명할 수 있다. 따라서 이러한 사실로부터 적어도 ErmSF의 NTER중에서 N-terminal end쪽에 존재하는 1-25번째의 아미노산을 함유하는 펩타이드는 ErmSF의 접힘에 큰 영향을 미치지 않는다는 것과 단백질의 본체와 상호 작용하는 뚜렷한 이차구조를 가지지 않는다는 사실을 암시하고 있다. 따라서 이러한 결과는 핵자기 공명법으로 NTER을 구조 분석하였을 때 이 펩타이드를 포함하는 NTER의 N-말단부분이 구조를 갖지 않는다는 사실(자료 미 제시)을 뒷받침하여 주고 있다.

한편 NT25TE의 생체 내에서의 활성 즉 A<sub>2058</sub>에 dimethylation 시킴으로써 MLSB 항생제에 대하여 내성을 나타내는 활성은 유지하고 있는 것으로 밝혀졌다. 이 단백질의 용해성과 *in vitro*에서의 활성을 검색하여 제거된 펩타이드가 활성화에 미치는 영향을 검색하기 위하여 대량 생산된 단백질의 순수분리를 수행하였다. 이 단백질 역시 야생형 ErmSF의 경우(7)와 마찬가지로 많은 양의 단백질이 불용성 단백질로 대량 생산된 것을 알 수 있다. 그러나 생체 내 활성을 검색하였을 때 항생제에 의한 성장 저해 지역이 야생형 ErmSF를 발현시키는 세포와 같은 정도로 나타남으로써 어느 정도의 활성을 관찰할 수 있었다는 사실과 순수 분리하였을 때 12.65 mg/L culture로 얻어진다는 사실은 이 단백질은 세포에 항생제 내성을 가져다주기에 충분한 양의 단백질이 용해성 단백질로 존재하는 것을 의미한다. 그리고 *in vitro*에서의 활성이 야생형 단백질에 비하여 85%정도의 활성만 유지한다는 것은 제거된 펩타이드가 기질과 상호작용하여 효소의 활성화에 영향을 미친다는 것을 시사하고 있다.

한편 야생형 ErmSF와 NT25TE를 발현하는 세포를 한천배지 위에 도포하고 erythromycin을 함유하는 거름종이를 그 위에 놓고 세포의 성장 억제를 시간별로 관찰하였을 때(자료미제시) 야생형 ErmSF를 발현하는 세포는 성장 억제가 거의 관찰되지 않았으나 NT25TE의 경우는 초기에는 성장이 억제되어 성장억제지역이 관찰되었다. 그러나 시간이 지남에 따라 점차로 줄어들어 밤새 배양한 후에는 야생형과 같은 정도, 즉 성장억제지역이 관찰되지 않았다. 이러한 사실은 NT25TE의 *in vitro* 활성이 야생형 ErmSF에 비하여 15%가 감소하였다는 사실을 뒷받침하여 주고 있다. 즉 단백질의 활성이 상대적으로 낮아서 세포내에서 새롭게 생성되는 23S rRNA 중에서 dimethylation되는 수가 적어 항생제에 의해 성장 억제를 받았으나 시간이 지남에 따라 점차적으로 그 수가 증가함으로써 항생제의 활성을 억제하는 것으로 사료되어진다.

#### 감사의 글

본 연구는 2003년도 한국과학재단 목적기초연구사업 중 특정 기초 연구비 지원(R01-2003-000-11734-0)에 의하여 수행된 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 진형중. 2001. MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 내성인자 단백질인 ErmSF의 domain 발현. *Kor. J. Microbiol.* 37, 245-252.
2. Birmingham, V.A., K.L. Cox, J.L. Larson, S.E. Fishman, C.L. Hershberger, and E.T. Seno. 1986. Cloning and expression of a tylosin resistance gene from a tylosin-producing strain of *Streptomyces fradiae*. *Mol. Gen. Genet.* 204, 532-539.
3. Cundliffe, E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 207-223.
4. "Frontiers in Biotechnology : Antibiotic Resistance" 1994. *Science* 264, 317-476.
5. Gandeche, A.R. and E. Cundliffe. 1996. Molecular analysis of thrD, an MLS resistance determinant from tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene* 180, 173-176.
6. Jin, H.J. 1999. ermSF, a ribosomal RNA adenine N6-methyltransferase gene from *Streptomyces fradiae*, confers MLS(macrolide-lincosamide-streptogramin B) resistance to *E. coli* when it is expressed. *Mol. Cells* 9, 252-25.
7. Jin, H.J. and Y.D. Yang. 2002. Purification and biochemical characterization of the ErmSF macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance factor protein expressed as a hexahistidine-tagged protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 25, 149-59.
8. Kovalic, D., J.H. Kwak, and B. Weisblum. 1991. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.* 19, 4650.
9. Kovalic, D., R.B. Giannattasio, H.J. Jin, and B. Weisblum. 1994. 23S rRNA Domain V, a fragment that can be specifically methylated in vitro by the ErmSF (TlrA) methyltransferase. *J. Bacteriol.* 176, 6992-699.
10. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature.* 227, 680-685.
11. Lai, C.J., B. Weisblum, S.R. Fahnestock, and M. Nomura. 1973. Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 74, 67-72.
12. Liu, M., F. Kirpekar, G.P. Van Wezel, and S. Douthwaite. 2000. The tylosin resistance gene thrB of *Streptomyces fradiae* encodes a methyltransferase that targets G748 in 23S rRNA. *Mol. Microbiol.* 37, 811-20.
13. Liu, M. and S. Douthwaite. 2002. Methylation at nucleotide G745 or G748 in 23S rRNA distinguishes Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 44, 195-204.
14. Poehlsgaard, J. and S. Douthwaite. 2005. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 870-81.
15. Roberts, M.C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L.B. Jensen, J. Rood, and H. Seppala. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamin-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2823-2830.
16. Roberts, M.C. 2004. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Mol. Biotechnol.* 28, 47-62.
17. Rosteck Jr., R.R., P.A. Reynolds, and C.L. Hershberger. 1991. Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* tylosin resistance and ATP-binding transport. *Gene* 102, 27-32.
18. Shortridge, V.D., G.V. Doer, A.B. Brueggemann, J.M. Beyer, and R.K. Flamm. 1999. Prevalence of macrolide resistance mechanisms in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a multicenter antibiotic resistance surveillance study conducted in the United States in 1994-1995. *Clin. Infect. Dis.* 29, 1186-1188.
19. Skinner, R., E. Cundliffe, and F.J. Schmidt. 1983. Site for Action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *J. Biol. Chem.* 258, 12702-12706.
20. Vester, B. and S. Douthwaite. 1994. Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase. *J. Bacteriol.* 176, 6999-7004.
21. Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577-585.
22. Xiong, L., Y. Korkhin, and A.S. Mankin. 2005. Binding site of the bridged macrolides in the *Escherichia coli* ribosome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 281-288.
23. Zalacain, M. and E. Cundliffe. 1989. Methylation of 23S rRNA by thrA(ermSF), a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 171, 4254-4260.
24. Zalacain, M. and E. Cundliffe. 1991. Cloning of thrD, a fourth resistance gene, from the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene* 97, 137-142.

(Received July 20, 2006/Accepted August 16, 2006)

# ABSTRACT : Functional Role of Peptide Segment Containing 1-25 Amino Acids in N-terminal End Region of ErmSF

Hyung Jong Jin (Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Science, University of Suwon, Kyunggi-Do 445-743, Korea)

ERM proteins transfer the methyl group to A<sub>2058</sub> in 23S rRNA to confer the resistance to MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotics on microorganism ranging from antibiotic producers to pathogens. To define the functional role of peptide segment encompassing amino acid residues 1 to 25 in NTER (N-terminal end region) of ErmSF, one of the ERM proteins, DNA fragment encoding mutant protein deprived of that peptide was cloned and overexpressed in *E. coli* to obtain a purified soluble form protein to the apparent homogeneity in the yield of 12.65 mg per liter of culture. The *in vitro* activity of mutant protein was found to be 85% compared to wild type ErmSF, suggesting that this peptide interact with substrate to affect the enzyme activity.

This diminished activity of mutant protein caused the delayed expression of antibiotic resistance *in vivo*, that at first cells expressing mutant protein showed the retarded growth due to the antibiotic action but with time cells inhibited by antibiotic gradually recovered the viability to exert the resistance to the same extent as those with wild type protein.