

위치 지정 치환 변이를 이용한 ErmSF의 ‘타겟 Adenine Binding Loop’을 형성하는 부위에 존재하는 223/227 Arginine 잔기의 23S rRNA Methylation 활성에서의 역할 규명

진형종

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

Site-directed Mutagenesis Analysis Elucidates the Role of 223/227 Arginine in 23S rRNA Methylation, Which Is in ‘Target Adenine Binding Loop’ Region of ErmSF

Hyung Jong Jin

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Science,
The University of Suwon, Hwaseong-si 445-743, Republic of Korea

(Received April 12, 2012 / Accepted May 9, 2012)

ErmSF is one of the Erm family proteins which catalyze S-adenosyl-L-methionine dependent modification of a specific adenine residue (A2058, *E. coli* numbering) in bacterial 23S rRNA, thereby conferring resistance to clinically important macrolide, lincosamide and streptogramin B (MLS_B) antibiotics. ²²²FXPPXVXS²³⁰ (ErmSF numbering) sequence appears to be a consensus sequence among the Erm family. This sequence was supposed to be involved in direct interaction with the target adenine from the structural studies of Erm protein ErmC'. But in DNA methyltransferase M. *Taq* I, this interaction have been identified biochemically and from the complex structure with substrate. Arginine 223 and 227 in this sequence are not conserved among Erm proteins, but because of the basic nature of residues, it was expected to interact with RNA substrates. Two amino acid residues were replaced with Ala by site-directed mutagenesis. Two mutant proteins still maintained its activity *in vivo* and resistant to the antibiotic erythromycin. Compared to the wild-type ErmSF, R223A and R227A proteins retained about 50% and 88% of activity *in vitro*, respectively. Even though those arginine residues are not essential in the catalytic step, with their positive charge they may play an important role for RNA binding.

Keywords: *in vivo*, *in vitro* activity test, MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein, overexpression, site-directed mutagenesis

임상적으로 중요하게 쓰여 지고 있는 macrolide-lincosamide-streptogramin B 항생제(MLS_B계 항생제)들은 서로 화학적 구조식이 상이하나 같은 내성기작에 의하여 그 항생작용이 억제될 받기 때문에 MLS_B 항생제 superfamily로 구분되어진다. 이러한 항생제들에 대해 내성을 유발하는 인자가 Erm (erythromycin resistance methyltransferase) 단백질이다. Erm 단백질은 세균의 23S rRNA 중에서 domain V의 peptidyl transferase circle에 존재

하는 특정 adenine 즉 A2058 (adenine 2058, *E. coli* numbering)의 아민(exocyclic amine)기에 메틸화를 일으켜 N⁶-메틸 adenine (m⁶A) 또는 N⁶, N⁶-메틸 adenine (m₂⁶A)을 생성하여 이들 항생제가 부착하는 것을 억제함으로써 미생물로 하여금 이들 항생제에 대하여 내성을 나타내게 하는 단백질이다(Skinner *et al.*, 1983; Weisblum, 1995; Roberts, 2004). A2058은 MLS_B계 항생제의 부착부위인 23S rRNA domain V의 peptidyl transferase center를 이루는, 매우 높이 보존된 부위에 존재하고 있다(Harms *et al.*, 2001). 현재까지 밝혀진 Erm 단백질은 약 30여 종에 달하며 이들을 함유하고 있는 미생물은 병원균에서 시작하여

*For correspondence. E-mail: hjjin@suwon.ac.kr; Tel.: +82-31-220-2290; Fax: +82-31-220-2519

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain or plasmid	Description	Reference or source
Bacterial strains		
<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	Kovalic <i>et al.</i> (1994)
<i>E. coli</i> HJJ401	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ401	this work
<i>E. coli</i> HJJ402	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ402	this work
Plasmids		
pET 23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His ₆ -tag at C-terminal end	Novagen
pHJJ105	pET23b containing <i>ermSF</i> R223A <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	Kovalic <i>et al.</i> (1994)
pHJJ401	pET23b containing <i>ermSF</i> R223A <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	this work
pHJJ402	pET23b containing <i>ermSF</i> R227A <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	this work

항생제 생산균주까지 다양하게 걸쳐있다(Cocito *et al.*, 1997; Seppala *et al.*, 1998). 이들 단백질은 아미노산 서열상에서의 유사성이 높아서 하나의 조상 단백질로부터 유래 되었을 것으로 추정되고 있다(Park *et al.*, 2010). 그리고 그 작용 기작이 동일할 것으로 사료되어 이들 단백질은 그 구조가 거의 유사할 것으로 믿어진다. 현재까지 Erm 단백질은 ErmAM (reclassified as ErmB, Roberts *et al.*, 1999)과 ErmC'의 구조가 핵자기공명법 (Yu *et al.*, 1997) 또는 단백질 결정화기법(Bussiere *et al.*, 1998)을 통하여 각각 밝혀져 있다. 그 구조를 살펴보면 이들 단백질은 Rossman fold를 취하는 catalytic domain과 몇 개의 α -helix로 구성된 substrate binding domain으로 명명된 두 개의 domain으로 구성되어 있으며 이 구조에 근거한 반응 기작과 여기에 참여하는 아미노산들이 추측되어 있다(Bujnicki, 1999; Fauman *et al.*, 1999). 구조가 밝혀진 Erm 단백질들과 DNA의 N^6 -adenine 또는 N^4 -cytosine methyltransferase 40종 이상의 단백질들을 그 구조에 기반하여 아미노산 서열을 비교 분석하였을 때 이들에게 공통적으로 나타나는 9개(motif X and motif I-VIII)의 잘 보존된 motif들이 확인되었고(Malone *et al.*, 1995), 이 중 motif VIII은 Erm 단백질의 타깃인 A2058과 직접적으로 상호작용하는 것으로 제안된 "adenine-binding loop"을 형성하고 있어(Bussiere *et al.*, 1998) 이 loop을 구성하는 아미노산들이 기질인 RNA와 상호작용 할 것으로 예상되었고 또, methylation에서의 역할을 클 것으로 사료되었다. Adenine-binding loop 부분에는 Erm 단백질들 사이에서 공통적으로 나타나는 FXPPXPVXS 아미노산 서열을 포함하고 있다(Bussiere *et al.*, 1998). 이 서열상에 존재

하는 phenylalanine (F222 in ErmSF)은 DNA methyltransferase인 *M. Taq* I의 기질인 DNA와의 결합구조 분석에서 *M. Taq* I의 타깃 adenine과 edge-to-face 결합을 형성하고 있는 것으로 밝혀져 있으며(Goedecke *et al.*, 2001), 또한 이 phenylalanine을 치환한 변이 단백질은 야생형 단백질에 비하여 효소 활성이 약 400배 감소하여 나타났다(Pues *et al.*, 1999). ErmSF는 macrolide 항생제인 tylosin을 생산하는 *Streptomyces fradiae*로부터 자신이 생산하는 항생제에 의해 저해되는 것을 방지하기 위해 생산되는 4개의 내성 단백질 중 하나로서(Birmingham *et al.*, 1986) 다른 Erm 단백질과 같이 A2058에 dimethylation을 시키는 단백질이다. ErmSF에서도 다른 Erm 단백질과 같이 motif VIII의 adenine-binding loop 부분에 FXPPXPVXS 아미노산 서열을 가지고 있다. 이 아미노산 서열에 존재하는 223번과 227번 arginine은 타깃 adenine과 직접적으로 상호작용하여 효소 활성에 있어서 매우 중요한 phenylalanine과 매우 근접해 있고(Fig. 1), 또한 arginine은 양전하를 띠고 있어 RNA와 잘 작용할 것으로 예상되어 효소 활성에 있어서 특이적 기질 인식에 중요하게 작용할 수 있을 것으로 사료되었다. 따라서 그 잔기들의 기능을 위치 지정 치환 변이를 이용하여 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리하였다. 그리고 클로닝을 위하여 사용된 올리고뉴클레오타이드는

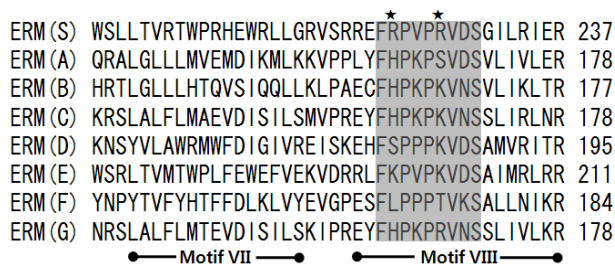


Fig. 1. Multiple sequence alignment of the representative Erm family members encompassing motif VII and VIII. Conserved FXPPXPVXS motif is shown in gray. Conserved motif VII and VIII are indicated below the alignment. Residues studied by mutagenesis in this work are indicated by asterisks (★).

Table 2. Oligonucleotide primers for cloning

Oligonucleotide primer	Sequence & description
Oligo-1	5' <u>GGAATTC</u> <u>CATATG</u> CTCGTGCACCCCGTTCTC (32mer) upstream (forward) PCR primer for Wild type ErmSF and ErmSF mutants
Oligo-2	5' CGGGAGTTC <u>CGCCGGT</u> CCCCGCGTGGAC (30mer) upstream (forward) PCR primer for R223A
Oligo-3	5' GCACCGGCGCGAACTCCCGCGGGAGATC (29mer) downstream (reverse) PCR primer for R223A
Oligo-4	5' CGGTGCCCGCCGTGGACTCGGGCATCCTC (29mer) upstream (forward) PCR primer for R227A
Oligo-5	5' GAGTCCACGGCGGGCACC GGCCGGA ACTCC (30mer) downstream (reverse) PCR primer for R227A
Oligo-6	5' <u>CCCAAGCTT</u> CCGTCCGGCCGGTCGGCT (27mer) downstream (reverse) PCR primer for Wild type ErmSF and ErmSF mutants

The underlined sequences in oligo-1 and -6 introduced *NdeI*, *HindIII* restriction sites, respectively. The italicized sequence in each oligonucleotide was added nucleotides at the end of DNA fragment for cleavage to occur more easily. Oligo-2 to -5 are overlapping oligonucleotides which contained complementary sequences and allowed the joining of two DNA fragments to produce R223A and R227A coding DNA fragments in the final PCR. Bold letters represent mutation sequences.

Table 2에 정리하였다.

위치 지정 치환 단백질 유전자의 클로닝

Wild type *ermSF* 유전자가 클로닝 되어있는 pET23b (pHJJ105, Kovalic *et al.*, 1994) 플라스미드를 주형으로하여 oligo-1과 R223A 돌연변이를 일으키는 oligo-3과 R227A 돌연변이를 야기하는 oligo-5를 각각 forward, reverse primer로 이용하여 PCR을 수행하여 각 위치 지정 치환(site directed substitution) 변이를 함유한 N-말단 부위 DNA 절편을 얻어내었고 같은 방법으로 oligo-2, -4와 oligo-6을 각각 forward, reverse primer로 하여 PCR을 수행하여 각 위치 지정 치환 단백질 유전자의 C-말단 부위를 이루는 DNA 절편을 얻어내었다. 얻어진 각각의 N-말단 부위 DNA 절편과 C-말단 부위 DNA 절편을 섞어준 후 *NdeI* 또는 *HindIII* 제한효소 인식 자리와 DNA 절편 말단에서의 제한효소 작용이 일어나도록 덧붙여 넣은 nucleotide가 포함된 oligo-1과 -6을 양방향 primer로 하여 다시 한 번 PCR을 수행하여 223번과 227번 arginine이 alanine으로 치환된 단백질을 coding하는 DNA 절편을 얻어내었다. 얻어진 각 DNA 절편에 제한효소 *NdeI*과 *HindIII*을 처리하고 같은 제한효소를 처리한 표현 담체(expression vector)인 pET23b (Novagen, USA)에 접합한 후 T7 RNA 합성효소 유전자를 함유한 *E. coli* BL21(DE3) (Studier and Moffatt, 1986)에 형질 전환하였다. 각 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 각각 pHJJ401, 402로 명명하였다. 그리고 이 플라스미드를 함유한 대장균을 *E. coli* HJJ401, 402로 명명하였다.

위치 지정 치환 유전자의 발현

표현 담체에 적절히 끼워진 각 변이 유전자의 발현은 이미 발표된 *ermSF* 유전자의 발현 방법에 근거하여(Jin, 2008) 다음과 같이 수행하였다. 하룻밤 동안 배양한 각 대장균 세포를 새로운

배지에 10% (v/v)로 전이하고 A₆₀₀이 0.8-1.0이 되도록 37℃에서 배양한 후 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 각각 37℃에서 8시간 더 배양하였다. 이 배양액을 사용하여 단백질의 대량발현과 leaky 발현을 SDS-PAGE를 이용하여 검색하였다.

발현된 단백질의 생체 내 활성 검색(항생제 내성 검사)

생체 내 활성검색은 이미 발표된 방법을 사용하여 디스크 확산 방법을 사용하여 결정하였다(Jin, 1999). 간단히 기술하면 다음과 같다. 원형의 거름종이(Whatman, UK)에 200 mg/ml의 erythromycin 용액을 500 µg 또는 1,000 µg이 되도록 점적한 후 말린 다음 배지 위에 야생형 또는 변이 단백질을 발현하는 균주를 면봉을 사용하여 도포한 후 그 위에 erythromycin 용액을 점적한 원형의 거름종이를 균주 위에 올린 후 하루 동안 배양하여 그 inhibition zone을 관찰하였다. 다만 빈 벡터를 포함한 균주를 도포한 부분에는 erythromycin을 100 µg만 점적한 원형 거름종이를 올려놓은 후 관찰하였다.

발현된 단백질의 정제

변이 단백질의 정제는 기존에 발표된 방법을 사용(Jin and Yang, 2002), 약간 변형하여 실시하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 하룻밤 동안 배양한 각 대장균 세포를 새로운 배지에 10% (v/v)로 전이하고 A₆₀₀이 0.8-1.0이 되도록 37℃에서 배양한 후 IPTG를 1 mM이 되도록 첨가한 후 대량 발현된 단백질의 수용성 단백질로의 전환을 위해 온도를 낮추어 22℃에서 18시간 더 배양하였다. 100 ml LB 배지에 배양한 각 변이 단백질을 발현하는 대장균을 원심분리(8,000×g)하여 얻어진 세포를 lysozyme (5 mg/ml)을 함유하는 buffer A (20 mM Tris-HCl; pH 7.0, 500 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM imidazole)에서 분산시킨 후 상온에서 20분간 두어 lysozyme에 의해 세포벽이 분해되도록 하였다. 이 후 -80℃에서 얼린 후 녹여서 세포가 분쇄되도록 하였다. 여기에 DNase I (2.5 µg/ml) 및 RNase A (2.5 µ

g/ml)을 넣고 반응시킨 후 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액으로부터 단백질을 분리하는 공급자(Novagen, USA)가 제공한 과정에 근거, Ni^{2+} affinity column chromatography법에 의하여 분리하였다. buffer A로 평형을 이룬 His 결합 수지가 충전된 컬럼에 위에서 얻어진 용액을 loading한 후 buffer B (20 mM Tris-HCl; pH 7.0, 500 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 80 mM imidazole)을 사용하여 컬럼에 부착되지 않거나 잘못 부착된 단백질을 씻어낸 후 원하는 단백질을 buffer C (20mM Tris-HCl; pH 7.0, 500 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 300 mM imidazole)를 사용하여 얻어내었다. 얻어진 단백질은 공급자(GE Healthcare, USA)가 제공한 과정에 근거, PD-10 컬럼을 이용하여 imidazole을 제거하였다. Buffer D (20 mM Tris-HCl; pH 7.0, 200 mM KCl, 10 mM MgCl_2)로 평형을 이룬 PD-10 컬럼에 Buffer C를 이용하여 얻어진 용액을 loading한 후 buffer D를 원하는 단백질이 용출될 때까지 넣어주어 imidazole이 제거된 단백질 용액을 얻어내었다. 얻어진 단백질 용액을 dialysis tubing (M/W cut 3,000)에 넣은 후 50% glycerol이 포함된 buffer D에 넣고 4°C에서 하룻밤동안 둔 후 회수하여 *in vitro* 활성 측정에 사용하였다.

Domain V의 *in vitro* transcription에 의한 제조

Erm 단백질에 의하여 인식되고 methylation될 수 있는 완전 기질인 23S rRNA domain V (Kovalic *et al.*, 1994; Vester and Douthwaite, 1994)를 합성하는 방법은 기존에 발표된 것과 같이 실시하였다(Jin, 2006). 간단히 서술하면 다음과 같다. *B. subtilis* 23S rRNA Domain V (BDV)를 encoding하는 DNA 조각을 얻기 위하여 *B. subtilis* BD170의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 T7 promoter 서열을 포함한 올리고뉴클레오타이드 5' taatagactcactata gagagactcggtagaa와 5' cctctcgtagaaggacacg를 각각 forward, reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하여 얻어내었다. 각각의 올리고뉴클레오타이드는 *B. subtilis* 23S rRNA nucleotide의 2022-2042, 2672-2692번째에 해당된다. 얻어진 DNA fragment는 올리고뉴클레오타이드 제공되는 T7 promoter 서열(밑줄 친 염기

서열)을 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 dithiothreitol)에 80 mM polyethylene glycol (MW, 8,000), NTP (4 mM each), 28 mM MgCl_2 , 300 nM DNA 주형을 첨가하고 T7 RNA polymerase를 넣은 후 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. phenol : chloroform : isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 사용하여 추출한 후 에탄올로 침전시켰고 얻어진 침전물을 TE에 녹여 7 M urea, 4% polyacrylamide gel을 이용하여 BDV RNA band를 잘라낸 후 elution하여 준비하였다.

정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색

정제된 단백질의 *in vitro* 활성은 기존에 발표된 방법을 약간 변형하여 검색하였다(Zalacain and Cundliff, 1989; Jin and Yang, 2002). 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl_2 , 40 mM KCl, 10 mM dithiothreitol의 조성을 가진 완충용액에 66 nM S-[methyl- ^3H]adenosylmethionine (SAM; Amersham, USA; sp act 80.7 Ci/mmol), 200 nM의 domain V RNA와 R223A 또는 R227A 변이 단백질을 넣고 총 부피가 300 μl 되도록 하여 37°C에서 반응시킨 후 0, 5, 10, 30 그리고 60분에 50 μl 씩 얻어내어 12% trichloroacetic acid로 반응을 종결시킨 다음 침전물을 건조하고 유입된 방사선량을 측정하였다.

결 과

R223A, R227A 변이 ErmSF의 대장균에서의 발현

얻어진 R223A 또는 R227A 변이 ErmSF를 coding하는 DNA 절편을 함유한 pET23b 플라스미드인 pHJJ401과 pHJJ402를 *E. coli* BL21(DE3)에 각각 형질 전환하여 *E. coli* HJJ401과 *E. coli* HJJ402를 제조하였다. 형질 전환된 각각의 *E. coli*를 IPTG로 변이 단백질의 발현을 유도하고 37°C에서 배양하여 그 단백질들

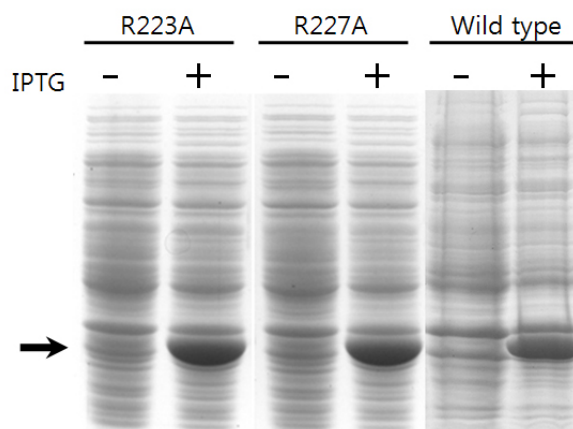


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of expression of R223A, R227A mutant ErmSF and wild type ErmSF proteins in *E. coli* with and without IPTG induction. After 8 h incubation in the presence of IPTG at 37°C following transfer into new medium, cell culture was boiled to disrupt the cells in 6× sample buffer, resolved on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then stained with Coomassie brilliant blue.

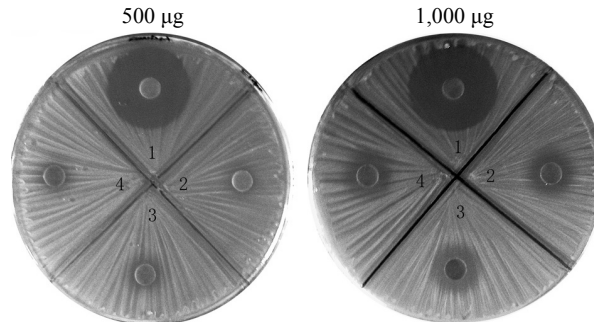


Fig. 3. Antibiotic susceptibility assay. Erythromycin stock solution (100 mg/ml) was dropped on Whatmann 3M paper circle to reach the final amount of erythromycin 500 or 1000 µg. In each section of agar plate, *E. coli* cells containing DNA fragment encoding wild type or mutated *ermSF* were spread with cotton swab. In the center of each section, paper circle containing 500 or 1000 µg erythromycin was placed except *E. coli* cells harboring empty vector section in which only 100 µg erythromycin was used. The resulting agar plate was incubated overnight at 37°C. All grew well in the 500 µg of erythromycin except cells containing empty vector. But the inhibition zone which appeared in section 2, 3, 4 were much smaller than that of section 1 in the 1000 µg of erythromycin. Section 1, *E. coli* cells harboring empty vector; section 2, *E. coli* cells harboring pHJJ105; section 3, *E. coli* cells harboring pHJJ401; section 4, *E. coli* cells harboring pHJJ402.

의 발현 정도를 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다(Fig. 2). 야생형 ErmSF의 IPTG 유도 유무에 의한 발현 정도를 확인한 기존 연구(Jin, 2008)와 같이 두 종류의 변이 단백질은 모두 1 mM IPTG로 발현을 유도하였을 때 대장균 세포내에서 야생형 ErmSF와 같이 대량 발현되었으며 IPTG를 첨가하지 않아 발현을 유도하지 않았을 때에도 역시 야생형 ErmSF와 같이 매우 약한 leaky 발현을 나타내었다. 변이 단백질들은 형질 전환된 *E. coli* 세포내에서 야생형 ErmSF와 동일하게 발현되었고 따라서 IPTG 유도 없이 37°C에서 배양한 후 *in vivo* 상에서 나타나는 항생제에 대한 내성의 정도는 발현된 변이 단백질의 활성에 의해 결정될 것으로 예상할 수 있었다.

R223A, R227A 변이 ErmSF의 생체 내에서의 활성 검색

R223A와 R227A 변이 ErmSF의 생체 내에서의 활성은 이들이 세포에 가져다 주는 항생제 내성을 확인함으로써 검색하였다. LB plate의 각 구획 별로 빈 pET23b 플라스미드, 야생형

ErmSF를 발현하는 플라스미드(pHJJ105) 그리고 R223A 또는 R227A 변이 ErmSF를 발현하는 플라스미드 등을 각각 함유한 대장균을 도말한 후 erythromycin을 500 또는 1,000 µg을 점적한 원형의 종이 filter를 놓은 후 37°C에서 배양하여 항생제에 의하여 생장이 저해되는 정도를 확인하였다. 다만 빈 pET23b 플라스미드를 함유한 대장균을 도말한 부분에는 erythromycin 100 µg을 점적한 원형의 종이 filter를 놓았다. Erythromycin 500 µg을 점적한 원형의 종이 filter를 놓은 plate에서는 빈 pET23b 플라스미드를 함유한 대장균을 제외한 모든 대장균에서 항생제에 의하여 생장이 저해되는 부위(inhibition zone)가 전혀 나타나지 않았으나, 1000 µg을 점적한 원형의 종이 filter를 놓은 plate에서는 빈 pET23b 플라스미드를 함유한 대장균을 도말한 부위에 비하여 매우 작긴 하지만 R223A 또는 R227A 변이 ErmSF를 발현하는 대장균뿐만 아니라 야생형 ErmSF를 발현하는 대장균에서도 항생제에 의해 생장이 저해된 부분이 동일하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 변이 ErmSF를 발현하는 대장균도 야생

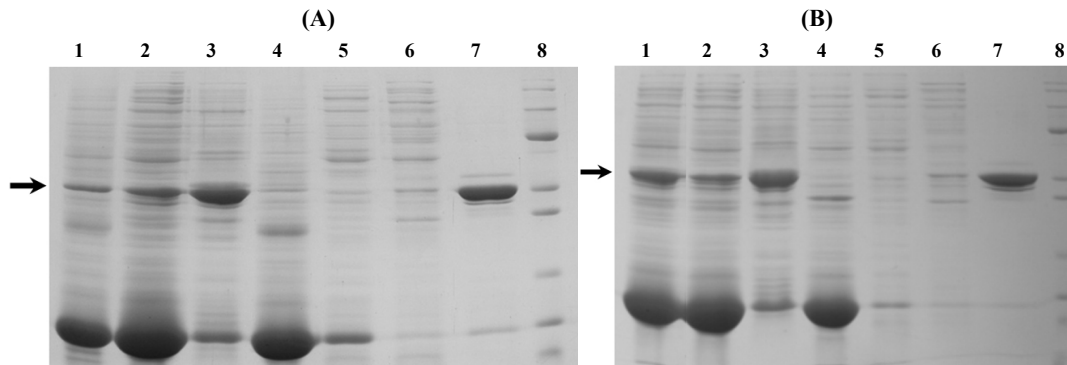


Fig. 4. Purification of the overexpressed R223A or R227A mutant ErmSF. *E. coli* HJJ401 (A) or HJJ402 (B) were grown at 22°C in the presence of 1 mM IPTG. Cell pellets of 100 ml culture was treated with lysozyme (5 mg/ml), frozen at -80°C and thawed at room temperature. The resultant lysate was treated with DNase I (2.5 µg/ml), RNase A (2.5 µg/ml) and centrifuged to remove the particulated material (inclusion body fraction). The resultant supernatant was loaded onto immobilized Ni²⁺ affinity column. Lanes: 1, total cell protein; 2, supernatant fraction of lysate; 3, inclusion body fraction; 4, affinity run-through; 5, 5 mM imidazole column wash; 6, 100 mM imidazole column wash; 7, 300 mM imidazole elute; lane 8, molecular size marker.

ErmSF를 발현하는 대장균과 같은 정도로 항생제에 대한 내성을 유지하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3) 즉, 야생형 및 변이 단백질들의 대장균 생체 내에서의 활성에서의 차이는 확인할 수 없었다.

대량생산된 단백질의 정제

1 mM IPTG 존재 하에 22°C에서 배양, 수용성 단백질로 전환 되도록 유도하여 대량생산된 변이 단백질은 표현 담체인 pET23b에서 단백질의 C-말단에 제공되는 6개의 His-tag을 함유하고 있어서 이를 이용하여 순수 분리하였다. 대량생산된 단백질을 함유하는 세포를 분쇄한 후 원심분리를 사용하여 세포분쇄물 및 inclusion body를 포함하는 불용성물질을 제거하고(Figs. 4A and 4B, lane 3) 용해성 단백질을 함유하는 상등액을 얻었다(Figs. 4A and 4B, lane 2). 이렇게 얻어진 단백질용액을 Ni^{2+} 이 고정화된 His 결합수지가 있는 컬럼에 넣고 100 mM imidazole이 함유된 완충용액을 사용하여 씻어낸 후(Figs. 4A and 4B, lane 6) 300 mM이 함유된 완충용액을 사용하여 R223A 또는 R227A 변이 ErmSF를 얻어내었다(Figs. 4A and 4B, lane 7). 용해성 단백질로 분리된 각 변이단백질은 야생 ErmSF를 순수 분리한 기존 연구결과(Jin and Yang, 2002)에서와 비슷하게 1 L 배양시 약 120 mg 정도로 분리되었다.

정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색

생체 내에서 발현된 R223A, R227A 변이 단백질을 발현하는 대장균은 야생형 ErmSF를 발현하는 대장균과 같이 항생물질 즉 erythromycin에 대한 내성을 동일하게 나타내는 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 그러나 적용된 변이의 효소 활성에서의 역할을 보다 정확히 판단하기 위해서는 *in vitro*에서의 활성 측정이 필수적이다. 따라서 야생형 ErmSF와 변이 단백질과의 효소활성을 비교하기 위해 순수 분리한 변이 단백질을 이용하여 *in vitro*에서의 활성을 Erm 단백질의 완전 기질로 밝혀진 domain V (Vester and Douthwaite, 1994)를 사용하여 검색하였다. R223A와 R227A 변이 단백질은 야생형 ErmSF에 비하여 한 시간 반응

시킨 후의 활성이 약 50%, 88% 정도를 각각 나타내었다(Fig. 5). 따라서 치환된 각 잔기들은 효소 활성에서 결정적인 기능을 수행하지는 않지만, 그 것들이 위치하는 부위를 고려하였을 때 이들이 가지고 있는 양전하가 기질인 RNA와의 상호작용할 수 있는 환경을 제공하고 있다고 믿어지며, 또한 R223이 좀 더 중요하게 작용하고 있음을 확인하였다.

고 찰

현재까지 밝혀진 Erm 단백질은 약 30여 종에 달하며(Cocito *et al.*, 1997; Seppala *et al.*, 1998), 이들 단백질은 아미노산 서열 상에서의 유사성이 높아서 하나의 조상 단백질로부터 유래되었을 것으로 추정되고 있으며(Park *et al.*, 2010), 그 작용 기작이 동일하여 이들 단백질은 그 구조가 거의 유사할 것으로 사료된다. Erm 단백질 중 ErmAM (Yu *et al.*, 1997)과 ErmC'의 구조 그리고 특히 ErmC'의 경우에는 cofactor와의 결합체 구조도 밝혀졌다(Bussiere *et al.*, 1998; Schluckbier *et al.*, 1999). 이들 구조분석을 통하여 Erm 단백질은 cofactor인 AdoMet (*S*-adenosyl-L-methionine)을 이용하는 일반적인 methyltransferase의 전형인 $\alpha/\beta/\alpha$ 샌드위치 구조를 갖는 큰 N-말단 catalytic domain (Bujnicki, 1999; Fauman *et al.*, 1999)과 이미 알려져 있는 다른 단백질의 RNA 결합 domain (Burd and Dreyfuss, 1994; Draper and Reynaldo, 1999)과는 다른 몇 개의 α -helix로만 구성된 작은 C-말단 domain으로 구성되어 있으며 이 domain은 RNA 결합 domain으로 제안되었다(Yu *et al.*, 1997). 이들 구조에 근거한 반응 기작과 여기에 참여하는 아미노산들이 추측되어 있다(Bujnicki, 1999; Fauman *et al.*, 1999). 또한 이 두 domain을 각각 따로 발현하였을 때에는 모두 불용성 단백질을 형성하여 단백질 folding에 두 domain이 서로 협력되어야 하는 것으로 확인되었다(Jin, 2001). N-말단 catalytic domain은 구조가 밝혀진 Erm 단백질들과 DNA의 N^6 -adenine 또는 N^4 -cytosine methyltransferase 등 40종 이상의 단백질들을 그 구조에 기반하여 아미노산 서열

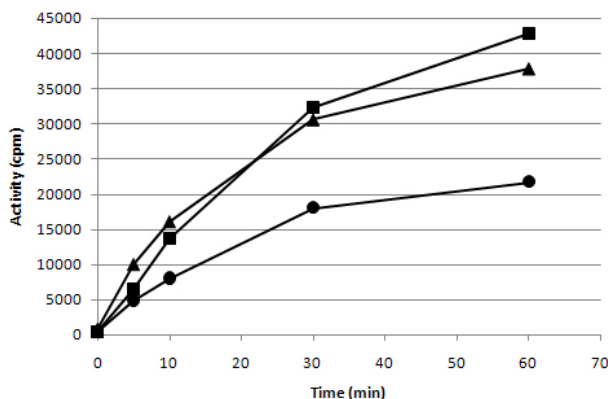


Fig. 5. *In vitro* methylation assay of R223A, R227A mutant ErmSFs. *In vitro* methylation activity of wild-type and mutant ErmSFs. Methylation of the RNA (23S rRNA domain V) was measured by incorporated radio-activity (cpm) from tritium labelled SAM. Reaction was carried out in methylation buffer (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 40 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 10 mM DTT) containing 0.2 μM RNA, 0.2 μM protein, 0.66 μM [methyl- ^3H]AdoMet (80.7 Ci/mmol) in a total reaction volume of 0.3 ml. Methylation reactions were carried out at 37°C for up to 60 min. Wild type ErmSF (—■—), R223A (—●—), R227A (—▲—).

을 비교 분석하였을 때 9개(motif X and motif I-VIII)의 잘 보존된 motif들이 확인되었다(Malone *et al.*, 1995). 이 중 motif VIII은 Erm 단백질의 타깃인 A2058과 직접적으로 상호작용하는 것으로 제안된 "adenine-binding loop"를 형성하며, Erm 단백질들 사이에서 공통적으로 나타나는 FXPPXPVXS 서열을 포함하고 있으며(Bussiere *et al.*, 1998), 이 서열상의 phenylalanine (F222 in ErmSF)은 DNA methyltransferase인 *M. Taq* I의 기질인 DNA와의 결합구조 분석에서 *M. Taq* I의 타깃 adenine과 edge-to-face 결합을 형성하고 있는 것으로 밝혀졌다(Goedecke *et al.*, 2001). ErmSF에서 관찰되는 motif VIII의 FXPPXPVXS 서열에서 F 다음의 X에 위치한 R223과 두 번째 P 다음의 X에 자리하는 R227은 Erm 단백질에서 완전히 보존되어 있지는 않지만 타깃 adenine 근처에 존재하고 단백질의 표면에 존재하며 또한 양전하를 띠고 있어 RNA와의 상호작용을 예측할 수 있었다(Fig. 1). 각각의 arginine 잔기를 전하를 띠지 않는 alanine으로 치환한 R223A, R227A 변이 단백질들은 대장균 내에서 IPTG의 유도에 의하여 수용성 단백질로 대량 발현되었으며(Fig. 4), IPTG 유도에 의한 대량 발현과 순수 분리하는 동안의 컬럼에서의 행동 양식이 야생형 단백질과 동일한 것으로 보아 각 변이 단백질의 구조적 변형은 야기되지 않은 것으로 판단되었다. 야생형 및 변이 단백질을 발현하는 균주는 lac operon이 갖는 조절기작의 leakiness에 의하여 IPTG로 유도하지 않아도 클로닝된 단백질이 조금이나마 발현되어 그 기능을 생체 내에서 나타내어 항생제인 erythromycin에 대해 내성을 나타내었다(Fig. 3, 500 µg). 그러나 높은 농도의 erythromycin에 대해서는 야생형 ErmSF 단백질과 변이 단백질을 발현하는 균주들 모두 비슷하게 생장의 저해를 나타냄으로써 발현된 단백질의 생체 내 활성에서의 차이는 확인 할 수 없었다(Fig. 3, 1000 µg). 따라서 변이 단백질들을 순수 분리하여 *in vitro* 상에서의 활성을 검색하였다. 1시간 동안 반응을 진행하였을 때 R227A 변이 단백질은 야생형에 비하여 약 88%의 활성을 나타내었으나 R223A 변이 단백질의 경우에는 약 50%의 활성을 나타내어서 치환된 각 잔기들은 효소 활성에서 결정적인 기능을 수행하고 있지는 않는 것으로 확인되었다(Fig. 5). 이들이 위치하는 부위는 타깃인 A2058과 직접적으로 상호작용하고 있는 부위임을 고려하였을 때 이들이 가지고 있는 양전하가 기질인 RNA와의 상호작용할 수 있는 환경을 제공하고 있다고 믿어지며 특히 Erm 단백질의 타깃인 A2058과 직접적으로 상호작용하고 있는 F222의 바로 옆에 존재하는 R223은 기질인 RNA와 직접적으로 상호작용하거나, 또는 F222가 타깃 adenine과 상호작용하기 위한 올바른 방향성을 유지하도록 도움을 주고 있다고 믿어지며 따라서 R227 보다는 R223이 효소 활성을 유지하는데 좀 더 중요하게 작용하고 있음을 확인하였다. 이러한 연구는 항생제 내성 유발 단백질 작용 기작 및 그 단백질의 저해제 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

적 요

ErmSF는 23S rRNA의 A2058 (*E. coli* numbering)에 methylation을 유발하여 macrolide-lincosamide-streptogramin

B (MLS_B)계 항생제의 부작을 저해함으로써 항생제 활성을 억제하는 내성인자 단백질인 Erm 단백질들 중의 하나이다. Erm 단백질들 사이에서 공통적으로 나타나는 ²²²FXPPXPVXS²³⁰ (ErmSF numbering) 서열은 Erm 단백질인 ErmC'와 DNA methyltransferase인 *M. Taq* I의 구조를 분석한 연구에서 타깃인 adenine과 직접적으로 상호작용하는 부위로 제안되거나 확인되었다. 따라서 이 부분 중 Erm 단백질 사이에서 잘 보존되어 있지는 않지만 염기성인 잔기의 특성상 기질인 RNA와 상호작용이 예상되는 223, 227번 arginine을 alanine으로 위치 지정 치환한 변이 단백질을 이용하여 그 잔기의 효소 활성에서의 역할을 확인하였다. 두 변이 단백질은 생체 내에서 그 활성을 여전히 유지하고 있어서 항생제인 erythromycin에 대하여 내성을 나타내었으나 *in vitro* 상에서는 R223A 또는 R227A가 야생형 ErmSF에 비하여 약 50%, 88%의 활성을 각각 나타내어 효소 활성에서 각 잔기가 결정적이지는 않지만 중요한 역할을 수행하고 있음을 확인하였다.

감사의 말

본 연구는 2011년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구결과의 일부(20110004986)로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Birmingham, V.A., Cox, K.L., Larson, J.L., Fishman, S.E., Hershsberger, C.L., and Seno, E.T. 1986. Cloning and expression of a tylosin resistance gene from a tylosin-producing strain of *Streptomyces fradiae*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 532-539.
- Bujnicki, J.M. 1999. Comparison of protein structures reveals monophyletic origin of the AdoMet dependent methyltransferase family and mechanistic convergence rather than recent differentiation of N4-cytosine and N6-adenine DNA methylation. *In Silico Biol.* **1**, 1-8.
- Burd, C.G. and Dreyfuss, G. 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* **265**, 615-621.
- Bussiere, D.E., Muchmore, S.W., Dealwis, C.G., Schluckebier, G., Nienaber, V.L., Edalji, R.P., Walter, K.A., Lador, U.S., Holzman, T.F., and Abad-Zapatero, C. 1998. Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry* **37**, 7103-7112.
- Cocito, C.D., Giambattista, M., Nyssen, E., and Vannuffel, P. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **39**, 7-13.
- Draper, D.E. and Reynaldo, L.P. 1999. RNA binding strategies of ribosomal proteins. *Nucleic Acids Res.* **27**, 381-388.
- Fauman, E.B., Blumenthal, R.M., and Cheng, X. 1999. Structure and evolution of AdoMet-dependent MTases. S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases: Structures and Functions, pp. 1-38. In Cheng, X. and Blumenthal, R.M. (eds.), World Scientific Inc., Singapore.
- Goedecke, K., Pignot, M., Goody, R.S., Scheidig, A.J., and Weinhold, E. 2001. Structure of the N6-adenine DNA methyltransferase M. Taq I in complex with DNA and a cofactor analog. *Nature Struct. Biol.* **8**, 121-125.

- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., and Agmon, I. 2001. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell* **107**, 679–688.
- Jin, H.J. 1999. *ErmSF*, a ribosomal RNA adenine N6-methyltransferase gene from *Streptomyces fradiae*, confers MLS_B(macrolide-lincosamide-streptogramin B) resistance to *E. coli* when it is expressed. *Mol. Cells* **9**, 252–257.
- Jin, H.J. 2001. Domain expression of ErmSF, MLS_B(macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein. *Kor. J. Microbiol.* **37**, 245–252.
- Jin, H.J. 2006. Functional role of peptide segment containing 1–25 amino acids in N-terminal end region of ErmSF. *Kor. J. Microbiol.* **42**, 165–171.
- Jin, H.J. 2008. Functional role of 60RR61 in 23S rRNA methylation, which is in N-terminal end region of ErmSF. *Kor. J. Microbiol.* **44**, 193–198.
- Jin, H.J. and Yang, Y.D. 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**, 149–159.
- Kovalic, D., Giannattasio, R.B., Jin, H.J., and Weisblum, B. 1994. 23S rRNA Domain V, a fragment that can be specifically methylated *in vitro* by the ErmSF(TlrA) methyltransferase. *J. Bacteriol.* **176**, 6992–6998.
- Malone, T., Blumenthal, R.M., and Cheng, X. 1995. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *J. Mol. Biol.* **253**, 618–632.
- Park, A.K., Kim, H., and Jin, H.J. 2010. Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, Erm and KsgA, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **309**, 151–162.
- Pues, H., Bleimling, N., Holz, B., Wölcke, J., and Weinhold, E. 1999. Functional roles of the conserved aromatic amino acid residues at position 108 (motif IV) and position 196 (motif VIII) in base flipping and catalysis by the N6-adenine DNA methyltransferase from *Thermus aquaticus*. *Biochemistry* **38**, 1426–1434.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., and Seppala, H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosycin-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2823–2830.
- Roberts, M.C. 2004. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Mol. Biotechnol.* **28**, 47–62.
- Schluckebier, G., Zhong, P., Stewart, K.D., Kavanaugh, T.J., and Abad-Zapatero, C. 1999. The 2.2 Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* **289**, 277–291.
- Seppala, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M.C., and Huovinen, P. 1998. A novel erythromycin resistance methylase gene (ermTR) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 257–262.
- Skinner, R., Cundliffe, E., and Schmidt, F.J. 1983. Site for action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *J. Biol. Chem.* **258**, 12702–12706.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130.
- Vester, B. and Douthwaite, S. 1994. Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase. *J. Bacteriol.* **176**, 6999–7004.
- Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 577–585.
- Yu, L., Petros, A.M., Schnuchel, A., Zhong, P., Severin, J.M., Walter, K., Holzman, T.F., and Fesik, S.W. 1997. Solution structure of an rRNA methyltransferase (ErmAM) that confers macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotic resistance. *Nature Struct. Biol.* **4**, 483–489.
- Zalacain, M. and Cundliffe, E. 1989. Methylation of 23S rRNA by *tlrA(ermSF)*, a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **171**, 4254–4260.