

Article

*Firmicutes*와 *Actinobacteria*에 속하는 세균들의 Erm 단백질 *in vitro* 활성 비교

진형종*

수원대학교 융합과학대학 생명공학과

In vitro activity comparison of Erm proteins from *Firmicutes* and *Actinobacteria*

Hyung Jong Jin*

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Convergence Science, The University of Suwon, Kyunggi-Do 18323, Republic of Korea

(Received July 27, 2016; Revised September 5, 2016; Accepted September 6, 2016)

ABSTRACT: Erm proteins methylate the specific adenine residue (A₂₀₅₈, *E. coli* numbering) on 23S rRNA to confer the MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance on a variety of microorganisms ranging from antibiotic producers to pathogens. When phylogenetic tree is constructed, two main clusters come out forming each cluster of *Actinobacteria* and *Firmicutes*. Two representative Erm proteins from each cluster were selected and their *in vitro* methylation activities were compared. ErmS and ErmE from *Actinobacteria* cluster exhibited much higher activities than ErmB and ErmC' from *Firmicutes*: 9 fold difference when ErmC' and ErmE were compared and 13 fold between ErmS and ErmB. Most of the difference was observed and presumed to be caused by N-terminal and C-terminal extra region from ErmS and ErmE, respectively because NT59TE in which N-terminal end 59 amino acids was truncated from wild type ErmS exhibited only 22.5% of wild type ErmS activity. Meanwhile, even NT59TE showed three and 2.2 times more activity when it was compared to ErmB and C, respectively, suggesting core region from antibiotic producers contains extra structure enabling higher activity. This is suggested to be possible through the extra region of 197RWS199 (from both ErmS and ErmE), 261GVGGSLY267 (from ErmS), and 261GVGGNIQ267 (from ErmE) and 291SW293 (from ErmS) and 291GAV293 (from ErmE) by multiple sequence alignment.

Key words: *Actinobacteria*, *Firmicutes*, ErmB, ErmC', ErmE, ErmS, MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein

Erm (erythromycin resistance rRNA methylase) 단백질은 23S rRNA의 peptidyltransferase center에 존재하는 특정 뉴클레오타이드(A2058, *E. coli* numbering)의 exocyclic amino기에 methylation 시킴으로써 MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제가 ribosome에 부착되는 것을 방지하여 이들 항생제에 내성을 나타내게 하는 항생제내성인자 단백질이다(Weisblum, 1995). 이 단백질은 병원성 미생물에서 시작하여 항생제를 합성하는 미생물까지 다양한 종류의 미생물에 존재하고 현재까지 약 38종의 단백질이 알려져 있다

(Roberts *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2010; Schwendener and Perreten, 2012; Wipf *et al.*, 2014, 2015; Anastasi *et al.*, 2015). 이들 단백질은 진화과정 중 잘 보존되어 있는 23S rRNA를 기질로 하고 또 아미노산 서열상의 보존성이 높아 그 구조가 유사할 것으로 예측되고 있다. 물론 Erm 단백질의 기질은 23S rRNA 전체로 규정될 수 있지만 서로의 크기를 비교하였을 때 조금 더 합리적인 완전기질의 규정이 요구되었고 Erm 단백질에 의해 인식되고 methyl화 되는데 필요한 모든 구조적 염기서열을 모두 가진 것으로 23S rRNA의 domain V가 규정되었다(Fig. 1) (Kovalic *et al.*, 1994; Vester and Douthwaite, 1994). Erm 단백질 중 현재까지 그 구조가 밝혀진 단백질은

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

*Streptococcus pneumoniae*에서 발견되는 ErmB (Yu *et al.*, 1997)와 *Staphylococcus aureus*에서 발견되는 ErmC' (Bussiere *et al.*, 1998; Schluckebier *et al.*, 1999)이다. 그 구조를 살펴보면 N-terminal domain은 Rossman fold (Rao and Rossmann, 1973)라고 알려져 있는 α/β open twisted sheet 구조를 가지며 여기서 methyl기의 전이가 일어난다. 그리고 C-terminal domain은 3개의 α -helix로 구성되어 있으며 이러한 구조는 Erm 단백질

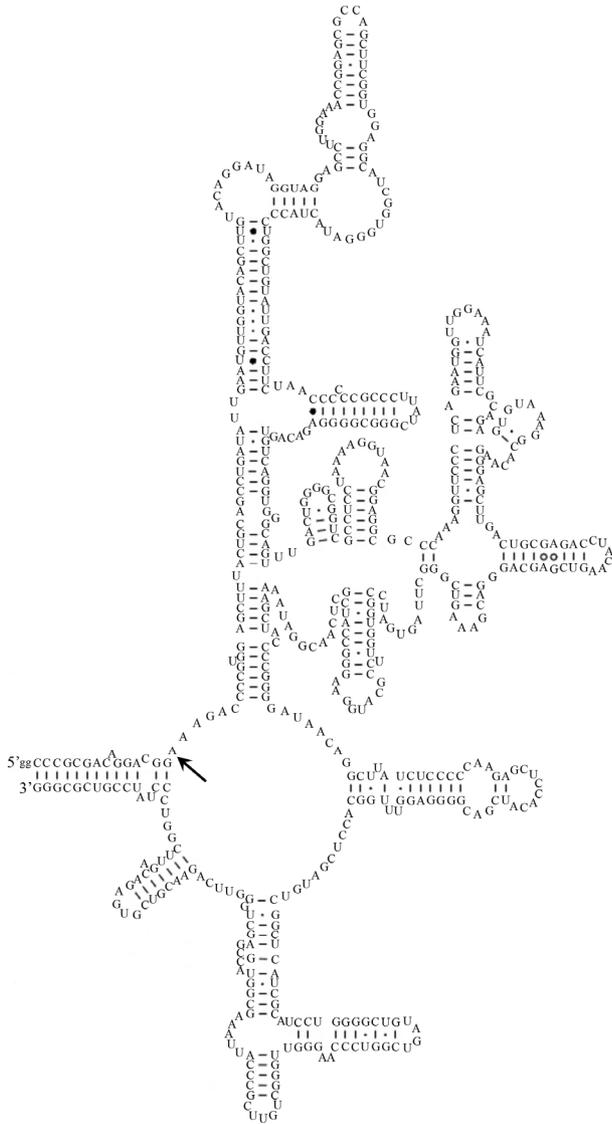


Fig. 1. Schematic diagram of *Bacillus subtilis* domain V. The 583-nt domain V (nucleotide 2043 to 2625, *E. coli* numbering) from *B. subtilis* 23S rRNA is redrawn from Gutell Lab's Comparative RNA Website (<http://www.rna.icmb.utexas.edu>). The arrowed adenine (A2085, *B. subtilis* numbering) indicates the target for the Erm methyltransferase (methylatable adenine). Domain V have been known to contain all the structural element to be recognized and methylated by Erm proteins (Kovalic *et al.*, 1994; Vester and Douthwaite, 1994). In this study, domain V was used as substrate for comparing the *in vitro* activity of ErmS, E, C, and B.

에서만 발견되는 독특한 구조로 RNA와 결합하는데 작용하는 것으로 추정되어 RNA 결합 domain이라고 불린다. 현재까지 밝혀진 단백질들을 모아 계통수 분석(phylogenetic analysis)을 하였을 때 크게 *Actinobacteria*와 *Firmicutes*로 이루어진 집단(cluster)을 형성한다(Park *et al.*, 2010). *Actinobacteria*는 대부분 항생제를 생성하는 미생물들로 구성되는 반면 *Firmicutes*는 병원균으로 이루어진다. 항생제 생성균에서의 내성인자의 역할은 스스로 생성하는 항생제에 의해 사멸되는 것을 방지하는 것이고(Cundliffe, 1989) 병원균에서의 역할은 치료제로 사용되는 항생제에 대한 자가 방어 기작으로 이해할 수 있을 것이다. 이러한 사실을 근거로 본 연구에서는 병원균에서 발견되는 대표적인 Erm 단백질인 ErmB와 ErmC', 그리고 macrolide 항생제인 tylosin과 erythromycin의 생성 균주인 *Streptomyces fradiae* (Baltz and Seno, 1988)와 *Saccharopolyspora erythraea* (Cundliffe, 1989)에서 발견되는 ErmS와 ErmE를 사용하여 Erm 단백질의 큰 두 집합을 형성하는 *Actinobacteria*와 *Firmicutes*에 존재하는 두 단백질의 활성을 비교하고자 하고 활성 차이를 나타내는 기작을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

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

시약

제한 효소들과 DNA 변형 효소들은 New England Biolab에서 구입하여 제공된 방법으로 처리하였다. 세균 배양을 위한 LB 배지와 Bacto agar 등은 Difco Laboratories에서 구입하였다. PCR을 위한 *Taq* polymerase와 nucleotides는 TaKaRa Shuzo Co.에서, His-Bind resin은 Novagen에서 각각 구입하였다. 전기영동을 위한 acrylamide, bis-acrylamide, ammonium persulfate, TEMED 등과 같은 것들은 Bio-Rad에서 구입하였다. 그 외에 일반적인 염류와 완충용액 시약, agarose와 항생제 등은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

ErmB, ErmC', ErmE, ErmS와 N-terminal 부위가 삭제된 ErmS (NT59TE)를 coding하는 DNA 절편의 획득과 발현 벡터 제작

ErmS (Jin and Yang, 2002)와 ErmS의 N-terminal 부위 99

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain or plasmid	Description	Reference or source
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	High transformation efficiency competent cell	BRL
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for plasmid expression vectors that utilize the T7 promoter. It 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 which contains ErmS structural gene	Jin and Yang (2002)
<i>E. coli</i> HJJ116	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ105 which contains NT59TE structural gene	Lee and Jin (2004)
<i>E. coli</i> HJJB101	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJB101 which contains ErmB structural gene	this work
<i>E. coli</i> HJJC101	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJC101 which contains ErmC' structural gene	this work
<i>E. coli</i> HJJE101	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJE101 which contains ErmE structural gene	this work
ATCC11635	Source of DNA template for obtaining <i>ermE</i> by PCR	this work
Plasmids and transposon		
pET 23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His ₆ -tag at C-terminal end	Novagen
pHJJ105	pET23b containing <i>ermS NdeI-HindIII</i> gene cartridge	Jin and Yang (2002)
pHJJ116	pET23b containing NT59TE <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	Lee and Jin (2004)
pHJJB101	pET23b containing <i>ermB NdeI-XhoI</i> gene cartridge	this work
pHJJC101	pET23b containing <i>ermC' NdeI-XhoI</i> gene cartridge	this work
pHJJE101	pET23b containing <i>ermE NdeI-XhoI</i> gene cartridge	this work
pIM13	Source of DNA template for obtaining <i>ermC'</i> , originated from <i>B. subtilis</i>	Monod <i>et al.</i> (1986)
Transposon Tn1545	Source of DNA template for obtaining <i>ermB</i> , the conjugative transposon from <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Trieu-Cuot <i>et al.</i> (1990)

Table 2. Primers

Oligonucleotide primer	Sequence & description
Oligo-1	5'- <u>GGAATTC</u> CATATGAGCAGTTCGGACGAGCAGCCGCGCCG-3' (40-mer) upstream (forward) PCR primer for <i>ermE</i> gene with pET expression vector system
Oligo-2	5'- <u>CCGCTCGAG</u> CCGCTGCCCGGTCCGCC-3' (27-mer) downstream (reverse) PCR primer for <i>ermE</i> gene with pET expression vector system
Oligo-3	5'- <u>GGAATTC</u> CATATGAACGAAAAAACATCAAACACTCTC-3' (38-mer) upstream (forward) PCR primer for <i>ermC'</i> gene with pET expression vector system
Oligo-4	5'- <u>CCGCTCGAG</u> CTTATTAATAATTATA-3' (27-mer) downstream (reverse) PCR primer for <i>ermC'</i> gene with pET expression vector system
Oligo-5	5'- <u>GGAATTC</u> CATATGAACAAAAACATCAAATACTCTCAAA-3' (38-mer) upstream (forward) PCR primer for <i>ermB</i> gene with pET expression vector system
Oligo-6	5'- <u>CCGCTCGAG</u> TTTCTCCCGTTAAATAATAG-3' (30-mer) upstream (reverse) PCR primer for <i>ermB</i> gene with pET expression vector system
Oligo-7	5'-taatacagactactataggCCCGGACAGGACGGAAAG-3' (38-mer) upstream (forward) PCR primer for domainV gene
Oligo-8	5'-CCCGGACGGATAGGGACCG-3' (20-mer) downstream (reverse) PCR primer for domainV gene

The underlined sequence in oligo-1, -3, -5, and oligo-2, -4, -6 was introduced for *NdeI* and *XhoI* restriction site, respectively. The italicized sequence in each oligonucleotide was added at the end of DNA fragment for cleavage to occur more easily. The lower case sequence in oligo-7 indicate T7 promoter sequence

개 아미노산을 제거한 NT59TE (N-Terminal 59 amino acids truncated ErmS)를 발현하는 벡터는 이미 얻어 놓은 것을 사용하였다(Lee and Jin, 2004). ErmB (Yu *et al.*, 1997), ErmC' (Bussiere *et al.*, 1998) 그리고 ErmE (Vester and Douthwaite,

1994)는 ErmS 대량생산에 사용하였던 방법을 변형하여 발현 벡터 제작을 수행하였다. *ermE* 유전자를 얻기 위하여 *Saccharopolyspora erythraea*의 크로모솜 DNA를, lysozyme (최종농도 2 mg/ml)과 SDS (최종농도 1%)를 처리하여 세포를 분쇄하여

얻어낸 후 3 M KOAc와 phenol/chloroform으로 정제하고 주형으로 사용하였다. *ermB* 유전자는 *Streptococcus pneumoniae*의 conjugative transposon인 Tn1545을 플라스미드 분리법을 사용하여 얻어 주형으로 사용하여 얻어내었다. *ermC'* 유전자는 *Bacillus subtilis*의 pIM13 플라스미드를 주형으로 사용하여 얻어내었다(Table 1). *NdeI* 또는 *XhoI* 제한효소 인식 자리와 DNA 절편 말단에서의 제한효소 작용이 일어나도록 덧붙여 넣은 올리고뉴클레오타이드들 중에 *ermB*는 올리고뉴클레오타이드-5, -6, *ermC'*는 올리고뉴클레오타이드-3, -4, *ermE*는 올리고뉴클레오타이드-1, -2를 각각 전방향, 역방향 프라이머로 사용하여 PCR을 수행함으로써 각 단백질을 코딩하는 DNA 절편을 얻어내었다. 얻어진 각 DNA 절편을 제한효소 *NdeI*과 *XhoI*로 처리하고 같은 제한효소를 처리한 표현 벡터(expression vector)인 pET23b (Novagen)에 접합한 후 *E. coli* DH5 α 에 형질전환 하고 얻어진 형질 전환 대장균으로부터 플라스미드를 획득하고 염기서열 분석을 통해 얻어진 각 유전자의 염기서열과 정확한 아미노산 발현 배열성을 확인하였다. 여기서 얻어진 각 유전자의 발현 벡터를 T7 RNA 합성효소 유전자를 함유한 *E. coli* BL21 (DE3) (Studier and Moffatt, 1986)에 형질 전환하였다. 여기서 얻어진 플라스미드를 각각 pHJJB101, pHJJC101, pHJJE101로 명명하였다. 그리고 이 플라스미드를 함유한 대장균을 *E. coli* HJJB101, HJJC101, HJJE101로 명명하였다.

ermS, *B*, *C'*, *E* 및 결손변이 NT59TE 유전자의 발현

표현 벡터에 적절히 끼워진 *ermS*, *ermB*, *ermC'*, *ermE* 그리고 NT59TE 유전자의 발현은 이미 발표된 방법에 근거(Jin and Yang, 2002), 일부 변형하여 수행하였다. 하룻밤 배양한 *E. coli* HJJ105, HJJ116, HJJB101, HJJC101, HJJE101를 새 배지에 전이하고 600 nm에서 흡광도가 0.8-1.0 되도록 37°C에서 배양한 후 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가한 후 22°C에서 24시간 배양하고 그 발현 정도를 12% 불연속 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)로 확인하였다.

대량 발현된 단백질 정제

ErmS, *ErmB*, *ErmC'*, *ErmE* 그리고 NT59TE의 정제는 기존에 발표된 방법을 사용(Jin and Yang, 2002), 일부 변형하여, 다음과 같이 실시하였다. 위의 단백질을 대량 발현하는 세포를 lysozyme (5 mg/ml)을 함유하는 buffer A (20 mM Tris-HCl; pH 7.0, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole)에 분산 후 상온에서

20분 배양하고 -80°C에서 얼린 후 녹여서 세포를 분쇄하였다. 여기에 DNase I (2.5 μ g/ml) 및 RNase A (2.5 μ g/ml)을 넣고 반응시키고 4°C에서 20,000 \times g로 20분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액으로부터 단백질 분리는 공급자(Novagen)가 제공한 과정에 따라 Ni²⁺ affinity column chromatography법에 의하여 분리하였다. 즉, buffer A로 평형을 이룬 His-bind resin이 충전된 컬럼에 위의 상등액을 loading한 후 buffer B (20 mM Tris-HCl; pH 7.0, 500 mM NaCl, 80 mM imidazole)로 부착되지 않거나 잘못 부착된 단백질을 씻어내고 원하는 단백질을 300 mM imidazole이 함유된 buffer B를 사용하여 얻어내었다.

기질인 domain V의 *in vitro* transcription에 의한 제조

B. subtilis 23S rRNA domain V (BDV)를 표현하는 DNA 절편을 얻기 위해 *B. subtilis* BD170의 chromosomal DNA를 주형으로하여 T7 promoter 서열을 함유한 올리고뉴클레오타이드-7과 올리고뉴클레오타이드-8을 정방향, 역방향 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였다. 각각의 올리고뉴클레오타이드는 *B. subtilis* 23S rRNA 뉴클레오타이드의 2043-2061, 2606-2625번째의 염기서열을 포함한다. Domain V는 위의 방법으로 얻어진 DNA 절편을 주형으로 다음과 같이 합성하였다. 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 MgCl₂]에 300 nM DNA 주형을 첨가하고 T7 RNA polymerase를 사용, 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. Phenol 추출과 에탄올 침전 후, 5% 7 M urea-polyacryl amide gel을 이용하여 확인하였다.

정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색

정제된 단백질의 *in vitro* 활성은 기존에 발표된 방법을 일부 수정하여 검색하였다(Zalacain and Cundliffe, 1989; Jin and Yang, 2002). 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 10 mM DTT 조성의 완충용액에 1 pmole의 S-[methyl-³H]adenosylmethionine (SAM; Amersham; sp act 80 Ci/mmol), 10 U of RNasin (Promega), 100 nmol의 domain V와 200 ng의 단백질을 넣고 총 부피가 50 μ l 되도록 한 후 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 12% trichloroacetic acid로 침전시켜 반응을 정지시킨 후에 침전물을 건조하고 유입된 방사선량을 측정하였다.

다중 아미노산 배열 정렬의 작성

ErmS, ErmE, ErmC'와 ErmB의 아미노산 배열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 protein database에서 획득하였다. 이렇게 얻어진 아미노산 배열은 Clustal X2를 사용하여 다중 아미노산 배열 정렬을 수행하였다. 다중 아미노산 배열을 표현하는 그림은 ESPript (Robert and Gouet, 2014)를 사용하여 작성하였다.

결 과

ErmS, ErmE, ErmC', ErmB 그리고 1-59번째 아미노산이 삭제된 ErmS (NT59TE)의 발현 및 정제

ErmS와NT59TE는 이미 발표된 대로 대장균에서 발현이 잘 되었다(Jin and Yang, 2002; Lee and Jin, 2004). ErmE, ErmC', ErmB를 coding하는 DNA 절편을 함유한 pET23b (pHJJE101, pHJJC101, pHJJB101)를 각각 *E. coli* BL21(DE3) (*E. coli* HJJE101, *E. coli* HJJC101, *E. coli* HJJB101)에 형질전환 한 후 그 발현 정도를 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다. 이렇게 대량생산이 확인된 단백질들은 표현 벡터인 pET23b에서 단백질의 C 말단에 제공되는 6개의 His-tag을 함유하게 되고, 이를 이용하여 Ni²⁺-친화 크로마토그래피를 사용, 순수 분리하였다(Fig. 2).

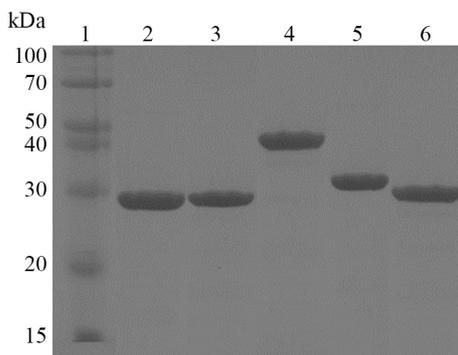


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of purified ErmB, ErmC', ErmE, ErmS, and its truncated protein NT59TE. Each *E. coli* cells overexpressing ErmB, ErmC', ErmE, ErmS, and NT59TE (*E. coli* HJJB101, *E. coli* HJJC101, *E. coli* HJJE101, *E. coli* HJJ105, and *E. coli* HJJ116) was grown at 22°C in the presence of IPTG. Cell pellets of 100 ml culture was disrupted with lysozyme treatment and freezing and thawing. The resultant lysate was treated with DNase I and RNase A. The resultant supernatant after centrifugation was loaded onto immobilized Ni²⁺ affinity column for purification. Lanes: 1, molecular size marker in kDa: 100, 70, 50, 30, 20, 15, mid-range pre-stained protein size markers from Elpis biotech; 2, ErmB 29.9; 3, ErmC' 30; 4, ErmE 44.1 kDa; 5, ErmS 37.1 kDa; 6, NT59TE 30.6 kDa. Each molecular weight includes hexahistidine tag.

완전기질인 domain V를 사용한 ErmS, ErmE, ErmC' 및 ErmB 그리고 NT59TE의 *in vitro* 활성 비교

Erm 단백질의 계통분석에서 두 집단을 구성하는 항생제 생성균에서 비롯된 ErmS와 ErmE 그리고 ErmS에서 1-59번째 아미노산이 제거된 NT59TE와 병원균에서 유래한 ErmC'와 ErmB의 대량 생산이 성공하여 두 집단을 대표하는 Erm 단백질의 *in vitro*에서의 활성을 완전기질인 domain V를 사용하여 (Fig. 3) 비교하였다. Table 3에서 보여지는 바와 같이 전체적으로 항생제 생성균에서 유래된 Erm 단백질은 병원균에서 유래된 단백질보다 높은 활성을 보였으며 적게는 9배에서 많게는 13배 높은 활성을 보였다. 즉 ErmC'와 ErmE 비교시 9배, ErmB와 ErmS 비교시 13배의 차이가 나는 것으로 관찰되었다. 그러나 ErmS에서 N-terminal end region을 차지하는(Fig. 4) 것으로 관찰된 1-59번째 아미노산을 제거한 NT59TE와 그 활성을 비교하여 보면 그 활성의 차이는 ErmC', ErmB와 비교하였을 때 2.2, 3배로 줄어드는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 아직까지 항생제 생성균에서 유래된 Erm 단백질의 경우는 병

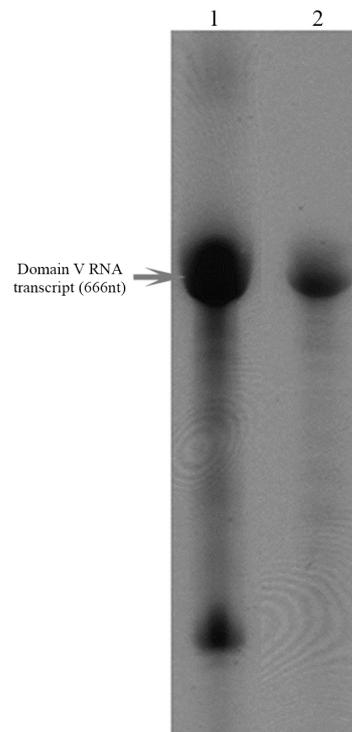


Fig. 3. Synthesis of domain V RNA transcripts. The whole domain V of 23S rRNA (666nt) were prepared by *in vitro* T7 transcription system. After transcription reaction, the sample was phenol-chloroform extracted and ethanol precipitated. The resulting product was resolved on 5% PAGE gel containing 7 M urea to separate the Domain V transcript and pre-matured transcripts (lane 1), the domain V band was then sliced, purified and subjected to the gel electrophoresis (lane 2).

Table 3. Methylation of 23S rRNA domain V transcripts by various Erm methyltransferase *in vitro*

Protein	ErmS	NT59TE	ErmE	ErmC'	ErmB	Cont. (w/o protein)
Activity (cpm) ^a	100,562	23,086	95,177	10,395	7,818	45

^a The activity (cpm) was the mean of at least three independent experiments.

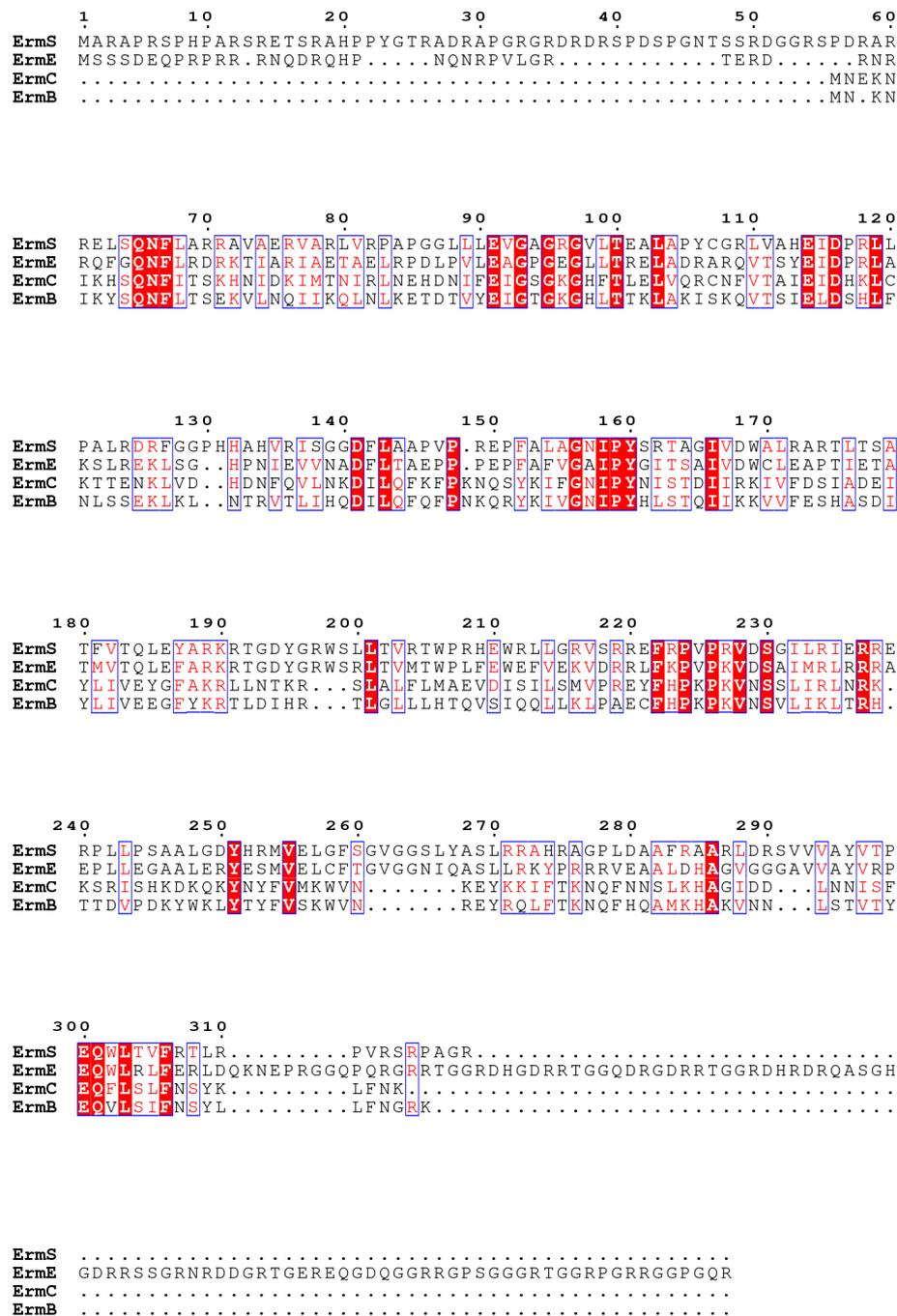


Fig. 4. Sequence alignment of several representative Erm proteins, ErmS, ErmE, ErmC', and ErmB. Conserved residues are shown in white in background and conservative substitutions are shown in red. It is noticeable that ErmS harbors a long N-terminal end and ErmE a long C-terminal end compared to the other two Erm proteins, ErmC' and B which are originated from pathogens, *Furmicutes*. From the multiple sequence alignment, clearly distinguishable region in the core structure of Erm protein could be detected between two groups of Erm proteins from antibiotic producers and pathogens: 197RWS199 (in both ErmS and ErmE); 261GVGGSly267 (observed in ErmS) and 261GVGGNIQ267 (in ErmE); 291SVV293 (in ErmS) and 291GAV293 (in ErmE).

원균에서 유래된 단백질에 비하여 높은 *in vitro* 활성을 나타내고 있다.

다중 아미노산 배열 정렬에서 나타난 두 Erm 단백질 집단의 차이점

Erm 단백질의 계통수 분석에서 대표적으로 나타나는 두 집단(항생제 생성균과 병원균)에서 관찰되는 *in vitro*에서의 활성의 차이를 구조적인 측면에서 규명하기 위해 다중 아미노산 배열 정렬을 수행하였다. 다중 아미노산 배열 정렬(Fig. 4)에서 나타난 대로 ErmS, ErmE, ErmC'와 ErmB를 사용한 다중 아미노산 배열의 정렬은 잘 보존된 아미노산(붉은색 바탕에 백색 글씨로 표시된 아미노산)과 중간 정도 보존된 아미노산(백색 바탕에 붉은색 글씨로 표시된 아미노산)들이 잘 정렬된 것으로 보아 잘 수행된 것으로 나타났다. 여기서 주목되는 부분은 ErmS에서는 다른 단백질보다 긴 N-terminal end를 보유하고 있다는 것이다. 이것은 약 59아미노산으로 이루어져서 이를 제거한 NT59TE를 제작하여 그 활성을 검색하였다. 그리고 ErmE는 대조적으로 C-terminal end가 상대적으로 긴 것으로 나타났다. 이러한 차이점은 N-terminal end와 C-terminal end에서 보여지는 차이점이고 Erm 단백질의 핵심 구조에서의 차이점을 검색하였다. 병원균에서 유래된 ErmC'와 ErmB는 다중 아미노산 배열 정렬에서 거의 모든 아미노산이 뜨는 공간이 없이 거의 완벽하게 정렬이 되었다. 그러나 이들을 항생제 생성균과 같이 정렬을 하였을 때는 항생제 생성균에서 비롯된 ErmS와 ErmE에서 공통적으로 관찰되는 뜨는 공간이 관찰되었다. 그 곳은 세 곳의 동일한 부분에서 공통적으로 관찰되었다. 즉 197RWS199 (ErmS와 ErmE 모두로부터 유래), 261GVGGSly267 (ErmS로부터 유래) 그리고 261GVGGNIQ267 (ErmE로부터 유래)와 291SVV293 (ErmS로부터 유래) 그리고 291GAV (ErmE로부터 유래) 등이 있었다. 한편 ErmS에서만 특이적으로 관찰되는 2개의 아미노산이 첨부된 것을 관찰할 수 있었는데 그것은 130PH131으로 단백질 핵심구조에서 ErmE와 공통적으로 관찰되지 않는 병원균과의 차이점이 발견된 곳이다.

고 찰

현재까지 밝혀진 바에 의하면 Erm 단백질 family의 가장 가깝고 또 유일한 이웃 단백질은 16S rRNA의 3' end의 인접한 두 개의 adenine에 dimethylation을 수행하는 KsgA/Dim1 단백질 family이다(Arthur *et al.*, 1987; O'Farrell *et al.*, 2004). 이 두

단백질 family를 계통수 분석을 하면 두 개의 뚜렷한 clade를 형성한다. 그리고 Erm family 단백질은 두 개의 뚜렷한 집단을 형성한다. 즉 항생제 생성균주를 포함하는 *Actinobacteria*가 함유하는 Erm 단백질과 병원균을 포함하는 *Firmicutes*가 함유하는 Erm 단백질의 두 집단으로 분리된다(Park *et al.*, 2010). Erm 단백질의 기능은 23S rRNA의 특정 adenine에 methylation 시킴으로써 항생제가 부착되는 것을 억제하여 내성을 일으키는 단백질이다. 결국 항생제 생성균주에 존재하는 Erm 단백질은 자체 생성된 항생제에 의해 사멸되는 것을 방지하기 위해 보유되는 단백질이고 병원균의 Erm은 외부로부터 유입되는 항생제에 대한 방어기전으로 보유되는 것으로 사료된다. 한편 23S rRNA의 domain V는 Erm 단백질에 의해 methylation 될 수 있는 모든 구조적 특성을 가지고 있는 완전기질로 밝혀져 있다. 따라서 크게 두 집단으로 나뉘어지는 Erm 단백질 중에서 *Actinobacteria*에서는 ErmE와 ErmS를 *Firmicutes*에서는 ErmB와 ErmC'를 선택하여 완전기질인 domain V 활성을 비교하여 보았다. 4개의 단백질의 1차 구조를 다중 아미노산 정렬에서 살펴보면(Fig. 4) ErmS는 특징적으로 긴 N-terminal end를 가지고 있고 ErmE는 긴 C-terminal end를 보유한 것으로 나타났다. 이들 항생제 생성 균주의 활성을 병원균의 것과 비교하였을 때 많게는 약 13배(ErmS와 ErmB 비교시) 적게는 약 9배(ErmC'와 ErmE를 비교하였을 때)의 차이가 나는 것으로 관찰되었다. 그러나 ErmS를 살펴보았을 때 이 긴 N-terminal end를 제거하였을 때 상당한 활성의 감소가 일어났다(Table 3; Lee and Jin, 2004). 그리고 ErmE의 경우도 C-terminal end를 제거하였을 때 같은 현상을 관찰할 수 있을 것으로 사료된다. 결국 항생제 생성균주가 보유한 Erm 단백질의 경우는 N-terminal 이나 C-terminal에 존재하는 가외의 부착 부분에 의해 단백질의 활성이 높아지고 그 결과 병원성균이 보유한 Erm 단백질보다 높은 활성을 갖게 되는 것으로 사료된다. 한편 이렇게 항생제 생성균주가 특이적으로 보유한 N-terminal end를 제거한 NT59TE ErmS의 활성을 ErmB 또는 ErmC'와 비교하였을 때 많게는 3배(ErmB와 비교하였을 때)에서 적게는 2.2배(ErmC'와 비교하였을 때)의 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이러한 차이를 구조적으로 살펴보았을 때(Fig. 4) 다중 아미노산 배열 정렬에서 관찰되는 부분은 다음과 같다. 이 다중 아미노산 배열 정렬에서 보여주는 번호(ErmS를 기준으로 붙인 번호)를 기준으로 살펴보았을 때 특징적으로 197RWS199 (ErmS와 ErmE 공통)와 261GVGGSly267 (ErmS의 경우), 261GVGGNIQ267 (ErmE의 경우)와 291SVV293 (ErmS의 경우), 291GAV293 (ErmE의 경우)의 세 군데에서 병원균의 경우와 비교하였을 때 peptide가 더 많이 부착된 것을 발견할 수 있었다. 따라서 항생

제 생성균이 보유한 Erm 단백질은 병원균이 보유한 Erm 단백질에 비해 그 활성이 높은 것으로 관찰되었고 이러한 현상은 N-terminal과 C-terminal에 부착된 가외의 아미노산뿐만 아니라 단백질 본체에 부가적으로 부착된 아미노산 배열에 의하여 일어나는 현상으로 추정된다. 이렇게 항생제 생성균주가 보유한 Erm 단백질이 병원균이 보유한 Erm 단백질보다 높은 활성을 보이는 것은 생물학적으로 접근하였을 때 충분히 이해할 수 있는 현상으로 사료된다. 미생물의 경우는 원핵세포로서 진핵세포와 같이 세포 내 소기관으로 나뉘어 각기 독립적인 생명현상을 수행하기 어려운 구조를 가지고 있다. 따라서 세포의 한 쪽에서 생성된 항생제는 보다 쉽게 생성균주의 리보솜에 부착되어 생성균을 사멸시킬 확률이 높다. 이를 방지하기 위해 보다 활성이 높은 항생제 내성인자 단백질 즉 Erm 단백질을 보유하는 것은 어찌 보면 당연한 것으로 사료된다. 이러한 추론은 tylosin 생성 균주인 *Streptomyces fradiae*의 경우, 스스로 생성한 항생제에 의해 사멸되는 것을 방지하기 위해 4개의 서로 다른 항생제 내성인자를 가진 것(Baltz and Seno, 1988; Bate *et al.*, 1999)으로도 그 추론이 정당화될 수 있을 것이다. 그러나 erythromycin 생성균주이면서 ErmE 오직 한 개의 Erm 단백질만 보유한 *Saccharopolyspora erythraea* (Uchiyama and Weisblum, 1985)의 경우는 좀 더 면밀하고 깊은 연구와 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

Actinobacteria에서 발견되는 항생제 생성균주에서 유래된 Erm 단백질들은 각 단백질의 특성에 따라 N-terminal end extra region 또는 C-terminal end extra region 그리고 단백질 본체에서 발견되는 아미노산의 부착을 통하여 그 활성을 증가시키는 것으로 추정된다.

적 요

Erm 단백질은 미생물의 23S rRNA의 특정 nucleotide (A₂₀₅₈)에 methylation 시킴으로써 MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제에 대하여 내성을 나타내는 항생제 내성인자 단백질이다. 이 단백질들을 계통수분석을 하였을 때 두 개의 주된 집단 즉 항생제 생성균과 병원균으로 각각 구성된 Actinobacteria와 Firmicutes에서 유래된 단백질로 구분된다. 두 집단을 각각 대표하는 2개의 단백질을(항생제 생성균 유래 ErmS와 ErmE, 병원균 유래 ErmC'와 ErmB) 선택하여 그 활성을 비교하였다. 전체적으로 항생제 생성균에서 비롯된 Erm 단백질이 병원균에서 비롯된 단백질에 비해 높은 활성을 보였다. ErmC'와 ErmE 비교시 9배, ErmB와 ErmS 비교시 13

배의 차이가 남. ErmS에서 59개의 아미노산이 제거된 NT59TE 단백질의 활성이 야생형 보다 22.5% 정도에 머물렀기 때문에 이러한 활성의 현격한 차이는 ErmS에서는 N-terminal에 붙어 있는 가외의 아미노산에 의한 것으로 관찰되었고 ErmE에서는 C-terminal의 가외의 아미노산에 의한 것으로 추정되었다. 그러나 NT59TE가 ErmC'와 ErmB에 비하여 2.2, 3배의 높은 활성을 보이는 것으로 관찰되어 단백질의 핵심부위에서도 높은 활성을 도와주는 부위가 있음을 알 수 있다. 다중 아미노산 배열 정렬로부터 이 부위는 197RWS199 (ErmS와 ErmE 모두로부터 유래), 261GVGGSly267 (ErmS로부터 유래) 그리고 261GVGGNIQ267 (ErmE로부터 유래)와 291SVV293 (ErmS로부터 유래) 그리고 291GAV293 (ErmE로부터 유래)으로 추정되었다.

감사의 말

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2015년도 산학연협력 기술개발사업(No. C0350515)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

References

- Anastasi, E., Giguere, S., Berghaus, L.J., Hondalus, M.K., Willingham-Lane, J.M., MacArthur, I., Cohen, N.D., Roberts, M.C., and Vazquez-Boland, J.A. 2015. Novel transferable *erm*(46) determinant responsible for emerging macrolide resistance in *Rhodococcus equi*. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 3184-3190.
- Arthur, M., Brisson-Noel, A., and Courvalin, P. 1987. Origin and evolution of genes specifying resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics: data and hypotheses. *J. Antimicrob. Chemother.* **20**, 783-802.
- Baltz, R.H. and Seno, E.T. 1988. Genetics of *Streptomyces fradiae* and tylosin biosynthesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 547-574.
- Bate, N., Butler, A.R., Gandeche, A.R., and Cundliffe, E. 1999. Multiple regulatory genes in the tylosin biosynthetic cluster of *Streptomyces fradiae*. *Chem. Biol.* **6**, 617-624.
- 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.
- Cundliffe, E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 207-233.
- 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.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Lee, H.J. and Jin, H.J.** 2004. Deletion of N-terminal end region of ErmSF leads to an amino acid having important role in methyl transfer reaction. *Korean J. Microbiol.* **40**, 257–262.
- Monod, M., Denoya, C., and Dubnau, D.** 1986. Sequence and properties of pIM13, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance plasmid from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **167**, 138–147.
- O'Farrell, H.C., Scarsdale, J.N., and Rife, J.P.** 2004. Crystal structure of KsgA, a universally conserved rRNA adenine dimethyltransferase in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **339**, 337–353.
- 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.
- Rao, S.T. and Rossmann, M.G.** 1973. Comparison of super-secondary structures in proteins. *J. Mol. Biol.* **76**, 241–256.
- Robert, X. and Gouet, P.** 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**, W320–324.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., and Seppala, H.** 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2823–2830.
- 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.
- Schwendener, S. and Perreten, V.** 2012. New MLS_B resistance gene *erm(43)* in *Staphylococcus lentus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4746–4752.
- 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.
- Trieu-Cuot, P., Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., and Courvalin P.** 1990. Nucleotide sequence of the erythromycin resistance gene of the conjugative transposon Tn1545. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3660.
- Uchiyama, H. and Weisblum, B.** 1985. N-Methyl transferase of *Streptomyces erythraeus* that confers resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics: amino acid sequence and its homology to cognate R-factor enzymes from pathogenic bacilli and cocci. *Gene* **38**, 103–110.
- 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.
- Wipf, J.R., Schwendener, S., Nielsen, J.B., Westh, H., and Perreten, V.** 2015. The new macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm(45)* is located within a genomic island in *Staphylococcus fleurettii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3578–3581.
- Wipf, J.R., Schwendener, S., and Perreten, V.** 2014. The novel macrolide-Lincosamide-Streptogramin B resistance gene *erm(44)* is associated with a prophage in *Staphylococcus xylosum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 6133–6138.
- 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. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 483–489.
- Zalacain, M. and Cundliffe, E.** 1989. Methylation of 23S rRNA caused by *tlrA (ermSF)*, a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **171**, 4254–4260.