

## MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 내성인자 단백질인 *ErmSF*의 domain발현

진형종\*

수원대학교 자연과학대학 유전공학과

MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 내성인자 단백질인 *Erm* 단백질들은 아미노산 서열 중 그 동일성과 유사성이 높아 구조적으로도 동등한 단백질의 한 집단을 형성한다. 최근 X-ray crystallography에 의해 구조가 결정된 *ErmC'* 및 *ErmAM* 단백질의 구조에 근거하여 *ErmSF* 단백질도 catalytic domain과 substrate binding domain으로 구분하였고 N-terminal end에 존재하는 catalytic domain의 대량생산을 다양한 pET 발현 vector를 사용하여 시도하였다. 그리고 catalytic domain을 coding하는 DNA 절편은 세 종류를 사용하였다: DNA 절편 1은 Met 1부터 Glu 186까지를 coding하고 DNA 절편 2는 Arg 60부터 Glu 186까지의 정보를 가진 DNA이고 DNA 절편 3은 Arg 60부터 Arg 240까지를 encoding하는 DNA이다. 사용된 다양한 발현 vector중에서 pET19b는 DNA 절편 3, pET23b는 DNA절편 1과 2를 성공적으로 대량생산하였다. 그러나 대량생산된 catalytic domain들은 불용성 단백질 집합체인 inclusion body를 형성하였다. *ErmSF* catalytic domain들의 용해성 단백질의 생산을 위하여 chaperone GroESL과 Thioredoxin의 동시 발현 및 배양온도를 22°C로 낮추어 시도했으나 대량 발현된 단백질의 용해에는 도움을 얻지 못하였다.

**Key words** □ catalytic domain, domain expression, *ErmSF*, MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) resistance factor protein

Macrolide계 항생물질은 50S ribosomal subunit에 부착하여 elongation단계에서 peptidyl-tRNA 분자의 ribosome으로부터의 분리를 유도함으로써 단백질의 생합성을 억제한다. 이 것은 가역적인 단백질의 생합성의 중단을 야기하게된다(2,3). 50S ribosomal subunit에 존재하는 macrolide 항생물질의 부착부위는 구조적으로 서로 상이한 lincosamide 및 streptogramin B 항생물질의 부착부위와 서로 겹침으로써 이 들 항생물질들은 MLS (macrolide-lincosamide-streptograminB) 항생물질 superfamily를 형성한다(20). MLS 항생물질에 내성을 갖는 대부분의 미생물들은 ERM [erythromycin ribosome methylation (20)]이라는 이름을 갖는 내성인자 단백질들의 활성화에 의해 그 내성을 나타낸다. 이 들 단백질들은 23S rRNA의 단일 adenine 잔기(A2058, *E. coli* coordinate or A2085, *B. subtilis* coordinate)의 N<sup>6</sup>위치에 methylation시켜서 mono- 또는 dimethyl adenine을 형성함으로써 항생물질이 이 부위에 부착되는 것을 방지하여 내성을 일으키게 된다(4,11,18). 현재까지 항생제 생산 균주를 비롯한 병원균에서 약 30여종의 *erm* 유전자가 분리되고 그 염기서열이 밝혀졌다(3,16). 이들은 아미노산 서열 중 그 동일성과 유사성이 높아 한 조상단백질로부터 유래되었음을 시사하고 있고 또 이러한 이유로 이들의 구조가 서로 유사할 것이므로 하나의 집단 단백질(protein

family)을 형성하고 있다(12). 이러한 보존성으로부터 *erm* 단백질에 의한 기질의 인식양식 및 그 활성화 기작이 유사하거나 동일하다는 것을 추정할 수 있다. 최근 항생제 내성 기작에 대한 중요성이 부각되는 것과 발맞추어 *ErmAM* (22) 및 *ErmC'* (1,15)의 구조가 NMR 및 X-ray crystallography등의 방법에 의하여 그 구조가 결정되었다. 그 구조는 앞에서 서술한 바와 같이 거의 동일하였고 크게 N-terminal end 쪽에 위치하는 catalytic domain과 C-terminal end쪽에 존재하는 substrate binding domain으로 구성되어 있다. 그 구조를 살펴보았을 때 이제까지 알려진 RNA와 상호작용 하는 단백질의 구조와는 다르게 되어있어 새로운 기작에 의한 단백질과 RNA의 상호작용이 이루어진다는 것을 추정할 수 있다. 한편, Domain V는 *erm* 단백질에 의해서 인식되고 methylation될 수 있는 모든 구조적 특성을 가진 23S rRNA의 절편이라는 것이 밝혀졌다(8,21,27). 뿐만 아니라 *erm* 단백질에 의하여 인식되고 methylation될 수 있는 다양한 종류의 최소기질인 RNA절편들이 알려져 있다(5,7,19,21).

따라서 본 연구에서는 새로운 기작에 의한 protein-RNA의 상호작용을 알아내고 또 이 상호작용을 근거로 한 내성 기작의 억제제를 창출하기 위한 일환으로 이미 확보된 *ermSF* 유전자로부터 catalytic domain을 coding하는 3종류의 DNA 절편들을 cloning하고 다양한 발현 담체(expression vector)를 사용하여 그 대량 발현을 *E. coli*를 이용하여 시도하였다.

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

## 재료 및 방법

### 균주, 플라스미드 및 primers

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

### *ermSF* 유전자 및 catalytic domain을 coding하는 DNA 절편의 cloning

*ermSF* 유전자의 cloning은 이전에 발표한 방법대로 cloning하였다(6,8). 이렇게 얻어진 *ermSF* 유전자를 바탕으로 3종류의 catalytic domain을 coding하는 DNA 절편을 얻었다. 첫 번째 DNA절편(DNA fragment 1)은 pHJJ105를 *XhoI* 제한효소에 의해 절단한 후 self-ligation하여 제작하였다. *XhoI* 인식부위(5'CTCGAG3')는 Leu 185와 Glu 186에 걸쳐 존재하고 *ermSF* 유전자에는 유일한 site이다(Fig. 1). 이 효소로 pHJJ105를 절단

하였을 때 His<sub>6</sub>-tag을 coding하는 부분의 앞에 존재하는 *XhoI* 인식부위(담채 속의 muticloning site의 일부)도 인식되게 된다. 따라서 pHJJ105를 *XhoI*으로 절단한 후 self-ligation을 하였을 경우는 substrate binding domain이 제거되고 catalytic domain의 3' end에 6개의 His<sub>6</sub>-tag이 포함된 발현 담채(pHJJ106)를 생성한다. 두 번째 절편(DNA fragment 2)은 DNA fragment 1에서 N-terminal end region이 제거된 절편이다. 이 절편을 함유한 발현 담채를 얻기 위해 pHJJ105를 주형으로 하여 PCR을 행하였다. Forward primer는 5' end에 *NdeI* site와 겹치며 methionine을 coding하는 39-mer의 oligonucleotide (oligo-1)를 사용하였고 reverse primer는 3' end가 *XhoI* 인식부위와 겹치는 27-mer의 oligonucleotide (oligo-2)를 사용하였다(Table 2). 세 번째 절편(DNA fragment 3)은 DNA fragment 2에서 55개의 아미노산을 더 coding하는 DNA 절편으로 forward primer는 oligo-1을 사용하였고 reverse primer는 3' end가 *BamHI*과 겹치는 27-mer의 oligonucleotide (oligo-3)를 사용하여 PCR을 수행하여 얻었다

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains 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> Trx	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pT-Trx	23
<i>E. coli</i> GroESL	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pT-GroESL	23
<i>E. coli</i> HJJ105	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ105	6, 8
<i>E. coli</i> HJJ106	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ106	This work
<i>E. coli</i> HJJ107	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ107	This work
<i>E. coli</i> HJJ108	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ108	This work
Plasmids		
pDK101	T vector for direct cloning of PCR products: purified from <i>E. coli</i> ATCC77406	9
pET 19b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His <sub>6</sub> -tag at N-terminal end	Novagen
pET 23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His <sub>6</sub> -tag at C-terminal end	Novagen
pT-Trx	pACYC containing gene encoding <i>E. coli</i> thioredoxin(Trx)	23
pT-GroESL	pACYC containing genes encoding <i>E. coli</i> chaperonins GroES and GroEL	23
pHJJ105	pET23b containing <i>ermSF</i> <i>NdeI</i> - <i>HindIII</i> gene cartridge	6, 8
pHJJ106	pET23b containing DNA fragment encoding <i>ErmSF</i> catalytic domain residues (1-186)	This work
pHJJ107	pET23b containing DNA fragment encoding <i>ErmSF</i> catalytic domain residues (60-186)	This work
pHJJ108	pET19b containing DNA fragment encoding <i>ErmSF</i> catalytic domain residues (60-240)	This work

**Table 2.** Primers

oligonucleotide primer	sequence & description
Oligo-1	5' <u>CAT ATG</u> CGT CGT GAA CTG TCT CAG AAC TTC CTC GCC CGC (39-mer) upstream (forward) PCR primer for DNA fragment 2 and 3
Oligo-2	5' <u>CTC GAG</u> CTG GGT GAC GAA GGT CGC CGA (27-mer) downstream (reverse) PCR primer for DNA fragment 2
Oligo-3	5' <u>GGA TCC</u> TCA CCG CTC GCG CCG CTC GAT (27-mer) downstream (reverse) PCR primer for DNA fragment 3

The underlined sequence in oligo-1, oligo-2 and oligo-3 introduced *NdeI*, *XhoI* and *BamHI* restriction site, respectively.

1	GTG	GCC	GGT	GCA	CCC	CGA	TCG	CCC	CAC	CCT	GCC	CGC	TCG	CGG	GAG	ACC
	Met	Ala	Arg	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	His	Pro	Ala	Arg	Ser	Arg	Glu	Thr
										(10)						
	TCC	CGC	GCC	CAC	CCG	CGG	TAC	GGC	ACC	CGT	CGC	GAT	CGC	GCC	CCC	GGC
	Ser	Arg	Ala	His	Arg	Pro	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ala	Asp	Arg	Ala	Pro	Gly
															(20)	
100	CGT	GGC	GGT	GAC	GGT	GAC	CGC	AGC	CCC	GAC	AGC	CCC	GGC	AAC	ACC	AGC
	Arg	Gly	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg	Ser	Pro	Asp	Ser	Pro	Gly	Asn	Thr	Ser
															(40)	
	AGC	CGC	GAC	GGC	GGC	CGC	AGC	CCC	GAC	CGC	CGC	CGG	CGC	GAG	CTC	TCG
	Ser	Arg	Asp	Gly	Gly	Arg	Ser	Pro	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Leu	Ser
															(50)	
200	CAG	AAC	TTC	CTC	GCC	CGC	CGG	GCC	GTC	GCC	GAG	CGC	GTC	GCG	CGC	CTG
	Glu	Asn	Phe	Leu	Ala	Arg	Arg	Ala	Val	Ala	Glu	Arg	Val	Ala	Arg	Leu
															(60)	
	GTC	CGG	CGG	GCC	CCC	GGC	GGT	CTG	TTG	CTG	GAG	GTC	GGC	GCC	GGG	CGC
	Val	Arg	Pro	Ala	Pro	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Glu	Val	Gly	Ala	Gly	Arg
															(70)	
300	GGC	GTC	CTG	ACC	GAG	GCG	CTG	GCC	CCG	TAC	TGC	GGG	CGG	CTG	GTC	GCC
	Gly	Val	Leu	Thr	Glu	Ala	Leu	Ala	Pro	Tyr	Cys	Gly	Arg	Leu	Val	Ala
															(80)	
	CAC	GAG	ATC	GAC	CCC	CGT	CTG	CTG	CCG	GCG	CTG	CGC	GAC	CGG	TTC	GGC
	His	Glu	Ile	Asp	Pro	Arg	Leu	Leu	Pro	Ala	Leu	Arg	Asp	Arg	Phe	Gly
															(90)	
400	GGC	CGG	CAC	CAT	GCC	CAT	GTG	CGG	ATC	AGC	GGC	GGC	GAC	TTC	CTG	GCA
	Gly	Pro	His	His	Ala	His	Val	Arg	Ile	Ser	Gly	Gly	Asp	Phe	Leu	Ala
															(100)	
	GCC	CCC	GTC	CCC	CGT	GAG	CCG	TTC	GCC	CTC	GCG	GGG	AAC	ATC	CCC	TAC
	Ala	Pro	Val	Pro	Arg	Glu	Pro	Phe	Ala	Leu	Ala	Gly	Asn	Ile	Pro	Tyr
															(110)	
500	TCC	CGG	ACC	GCG	GGA	ATC	GTG	GAC	TGG	GCG	CTG	CGG	GCG	CGC	ACG	CTC
	Ser	Arg	Thr	Ala	Gly	Ile	Val	Asp	Trp	Ala	Leu	Arg	Ala	Arg	Thr	Leu
															(120)	
	ACC	TCG	GCG	ACC	TTC	GTC	ACC	CAG	CTC	GAG	TAC	GCC	CGC	AAG	CGG	ACC
	Thr	Ser	Ala	Thr	Phe	Val	Thr	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	Arg	Lys	Arg	Thr
															(130)	
600	GGC	GAC	TAT	GGA	CGC	TGG	AGC	CTG	CTG	ACG	GTG	CGG	ACC	TGG	CCC	CGC
	Gly	Asp	Tyr	Gly	Arg	Trp	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Arg	Thr	Trp	Pro	Arg
															(140)	
	CAC	GAG	TGG	CGG	CTG	CTC	GGC	AGG	GTC	TCC	CGC	CGG	GAG	TTC	CGG	CCG
	His	Glu	Trp	Arg	Leu	Leu	Gly	Arg	Val	Ser	Ala	Arg	Glu	Phe	Arg	Pro
															(150)	
700	GTG	CCC	CGC	GTG	GAC	TCG	GGC	ATC	CTC	CGG	ATC	GAG	CGG	CGC	GAG	CGG
	Val	Pro	Arg	Val	Asp	Arg	Gly	Ile	Leu	Arg	Ile	Glu	Arg	Arg	Arg	Arg
															(160)	
	CCC	CTG	CTG	CCG	TCC	GCC	GCC	CTC	GGC	GAC	TAC	CAC	CGC	ATG	GTG	GAG
	Pro	Leu	Leu	Pro	Ser	Ala	Ala	Leu	Gly	Asp	Tyr	His	Arg	Met	Val	Glu
															(170)	
800	CTG	GGT	TTC	TCC	GGC	GTG	GGC	GGA	TCG	CTG	TAC	GCA	TCG	CTG	CGC	CGG
	Leu	Gly	Phe	Ser	Gly	Val	Gly	Gly	Ser	Leu	Tyr	Ala	Ser	Leu	Arg	Arg
															(180)	
	GCC	CAC	CGG	GCG	GGG	CCG	CTC	GAC	GCC	GCG	TTC	CGT	GCC	GCG	CGG	CTG
	Ala	His	Arg	Ala	Gly	Pro	Leu	Asp	Ala	Ala	Arg	Arg	Ala	Ala	Arg	Leu
															(190)	
900	GAC	CGG	TCC	GTC	GTC	GTC	GCG	TAT	GTC	ACA	CCG	GAG	CAG	TGG	CTC	ACG
	Asp	Arg	Ser	Val	Val	Val	Arg	Tyr	Val	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Leu	Thr
															(200)	
	GTC	TTC	CGC	ACG	TTG	CGG	CCC	GTC	CGC	AGC	CGA	CCG	GCC	GGA	CGG	957
	Val	Phe	Arg	Thr	Leu	Arg	Pro	Val	Arg	Ser	Arg	Pro	Ala	Gly	Arg	(319)

**Fig. 1.** The *ermSF* DNA sequence and deduced amino acid sequence. The nucleotide sequence of *ermSF* is shown with the deduced amino acid sequences. Numbers above the printed nucleotide enumerate the nucleotide residues which range from 1 to 957. Numbers in parenthesis below the line enumerate amino acids deduced from the nucleotide sequence and range from 1 to 319. Recognition sites for some restriction endonucleases which are unique in *ermSF* gene are also shown.

(Table 2). 이렇게 PCR을 수행하여 얻어진 각 DNA 절편을 T vector인 pDK101(9)에 접합시켜서 cloning하였다. 이 재조합 발현 단백질을 *NdeI*과 *XhoI* 또는 *NdeI*과 *BamHI*로 절단하고 동일하

게 처리된 pET23b 또는 pET19b에 각각 접합시킨 후 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 cloning하여 pHJJ107, pHJJ108을 얻었다. 얻어진 plasmid의 *ermSF* 유전자의 염기서열을 dideoxy chain termination법에 의해 확인하였다. 형질 전환된 균주로부터 plasmid를 순수 분리한 후 이를 발현 균주인 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환하여 각각 *E. coli* HJJ106, *E. coli* HJJ107 및 *E. coli* HJJ108이라고 명명된 발현 균주를 얻었다.

### Catalytic domain의 발현

*ermSF* 유전자의 catalytic domain 발현은 다음과 같이 실시하였다. 하룻밤 동안 배양된 *E. coli* HJJ106, *E. coli* HJJ107 및 *E. coli* HJJ108을 새로운 LB 배지에 10% (V/V) transfer하고 A<sub>600</sub>이 0.8-1.0이 되도록 37°C에서 배양한 다음 IPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 후 용해성 단백질을 얻기 위해 37°C와 22°C에서 각각 배양하였다.

그리고 chaperone GroESL과 Thioredoxin 유전자를 함유한 pACYC vector를 가지고 있는 *E. coli* GroESL과 *E. coli* Trx (Table 1)에 cotransformation시켜 위와 같은 방법으로 발현을 시도하였다. 그리고 발현되는 정도를 SDS-PAGE (10) 및 tricine-SDS-PAGE (17)를 통하여 관찰하였다.

### 발현된 catalytic domain의 정제

위와 같이 배양된(100 ml) *E. coli* 세포를 얻기 위해 8,000 $\times$ g에서 6분간 원심 분리하였고 얻어진 세포들을 5 mg/ml의 농도로 lysozyme을 함유하는 buffer A [20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl, 5 mM imidazole]에 분산시킨 후 상온에서 20분간 배양하여 세포벽을 약하게 하였다. 그리고 -80°C에 보관하여 세포 분산 액을 얻린 후 상온에서 녹여서 세포를 분쇄하였다. 얻어진 세포분쇄 액을 DNaseI (2.5  $\mu$ g/ml) 및 RNase A (2.5  $\mu$ g/ml)을 처리하고 얻어진 분쇄 액을 39,000 $\times$ g에서 원심분리 하여 inclusion body를 포함하는 불용성 세포분쇄 물을 제거하였다. 얻어진 상등액을 다음과 같이 Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography법을 사용하여 공급자(Novagen, Madison, USA)가 제공한 과정에 따라 분리하였다. 즉 buffer A로 이미 평형을 이룬 His $\cdot$ Bind resin (3 ml)이 충전된 column에 loading한 후 buffer B[20 mM Tris $\cdot$ HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl, 60 mM imidazole]을 사용하여 resin에 부착되지 않았거나 잘못 부착된 단백질을 세척하였다. 마지막으로 resin에 부착된 단백질을 두 가지 농도(300 mM 및 600 mM)의 imidazole이 함유된 buffer B를 사용하여 resin으로부터 유출시켰다.

### 발현된 catalytic domain의 생체 내 활성 조사(항생제 내성 검사)

*E. coli* HJJ106, *E. coli* HJJ107, *E. coli* HJJ108, *E. coli* HJJ105 및 DNA절편을 가지고 있지 않은 pET23b를 함유한 *E. coli* 등 각각의 잘 자란 *E. coli* 배양액을 면봉을 사용하여 LB agar plate에 잘 도포 하였다. Whatmann 3M paper를 hole



puncher를 사용하여 둥근 모양으로 자르고 이 위에 erythromycin (Sigma, St. Louis, USA)이 50  $\mu$ g, 100  $\mu$ g 및 250  $\mu$ g이 되도록 점적한 후 공기 중에서 말렸다. 각 catalytic domain을 발현시키는 *E. coli* 세포의 항생물질 내성을 알아보기 위해 각 균주가 도포된 LB plate의 중간에 erythromycin을 함유하는 종이를 놓았다. 그 후 37°C에서 배양한 후 균들의 성장억제를 관찰하였다.

## 결 과

### 6개의 histidine이 부착된 catalytic domain발현을 위한 발현 plasmid들의 제작

기존에 구조가 밝혀진 ErmAM, ErmC와 ErmSF는 서로 각각 26.5%와 24.5%의 아미노산 동일성을 갖고 또 그 유사성은 각각 56.8%, 58.2 %에 달하고 있다. 한편 ErmSF는 다른 현재까지 알려진 *erm* 단백질과는 달리 약 66개의 아미노산으로 구성된 긴 N-terminal end region을 가지고 있다. 그리고 이 N-terminal end region은 특정한 2차 구조를 가지지 않는 것으로 밝혀졌다 (unpublished result). 이러한 사실에 근거하여 아미노산 서열 비교(amino acid sequence alignment)를 통한 ErmSF의 catalytic domain을 예측하고 또 N-terminal end region의 영향을 고려하여 3종류의 catalytic domain을 coding하는 DNA 절편들을 제작하였다. 첫 번째 DNA절편은 ErmSF가 특이적으로 가진 긴 N-terminal end region을 함유하고 Glu 186까지의 아미노산을 coding하는 DNA로서 pET23b에 끼워 넣어 cloning하였다. 따라서 이 DNA 절편은 3' end에 발현 vector인 pET23b에 의하여 제공되는 6개의 histidine꼬리를 coding하는 DNA염기서열을 갖게 된다. 그리고 이 절편은 Fig. 2에서 보여지는 ErmAM의 구조 중  $\beta$ 8과  $\beta$ 9사이에 존재하는 loop에서 절단이 일어난 것으로 믿어진다. 두 번째 절편은 N-terminal end region이 제거되고 Glu 186까지의 아미노산을 함유한 catalytic domain을 coding하는

DNA로 pET23b에 넣어서 cloning하였다. 세 번째 절편은 N-terminal end가 제거되고 Arg 240까지의 아미노산을 함유하는 catalytic domain을 coding하는 DNA로서 pET19b에 넣어 cloning 하였다. 따라서 이 DNA 절편은 5' end에 6개의 histidine를 coding하는 DNA염기서열을 갖게 되고 앞에서 서술하였듯이 ErmSF는 N-terminal end loop region을 가지므로 이 histidine 꼬리는 단백질의 용해성에 영향을 미치지 않을 것으로 믿어진다. 그리고 이 단백질이 발현되었을 때  $\beta$ 9과  $\alpha$ 8사이의 loop에서 절단이 일어난 것으로 사료된다(Fig. 2). DNA 염기서열 분석 결과 이들은 모두 cloning과정 중 돌연변이를 일으키지 않았다.

### Catalytic domain의 발현 및 정제

3종류의 catalytic domain을 coding하는 DNA를 함유한 발현 vector, pHJJ106, pHJJ107 및 pHJJ108을 T7 RNA polymerase를 발현하는 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 시켰다. 용해성 단백질을 얻기 위하여 37°C와 22°C에서 배양한 결과 두 가지의 배양 온도에서 Met 1-Glu 186까지의 아미노산을 가진 21 kDa (pHJJ106, Fig. 3, lane 1), Arg 60-Glu 186까지의 아미노산을 함

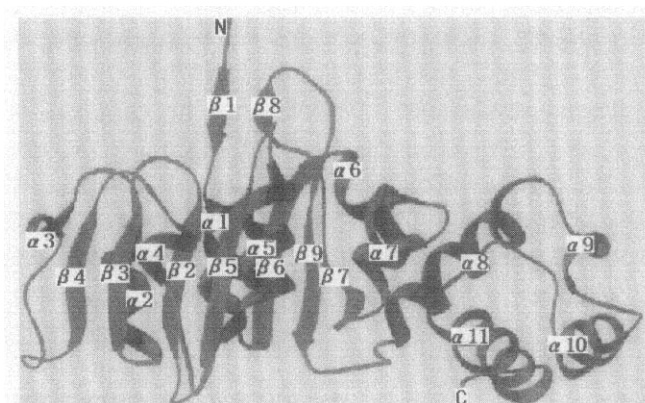


Fig. 2. Schematic diagram of ErmAM (residues 9-245).

ErmAM consists of two domains, catalytic domain and substrate binding domain. The catalytic domain assume  $\alpha/\beta$  twisted open sheet structure( $\beta$ 1 to  $\alpha$ 7) and the substrate binding domain is formed by 4  $\alpha$  helices( $\alpha$ 8- $\alpha$ 11). Each  $\alpha$  helix and  $\beta$  strand is numbered (adapted from reference 24).

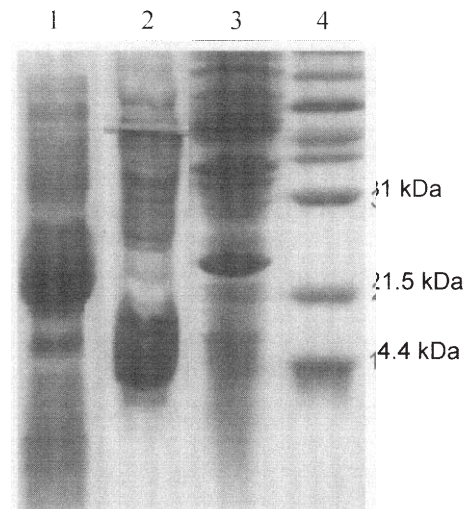
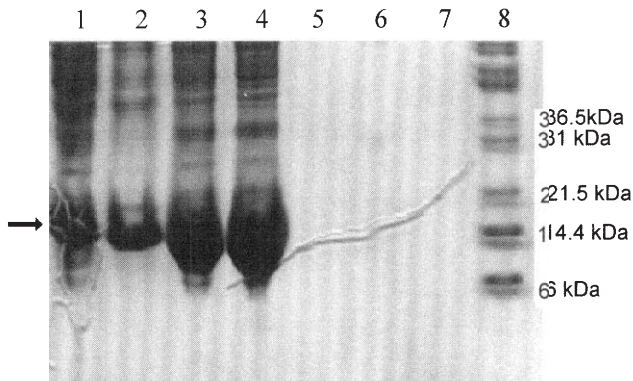


Fig. 3. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis of the expressed catalytic domain of ErmSF.

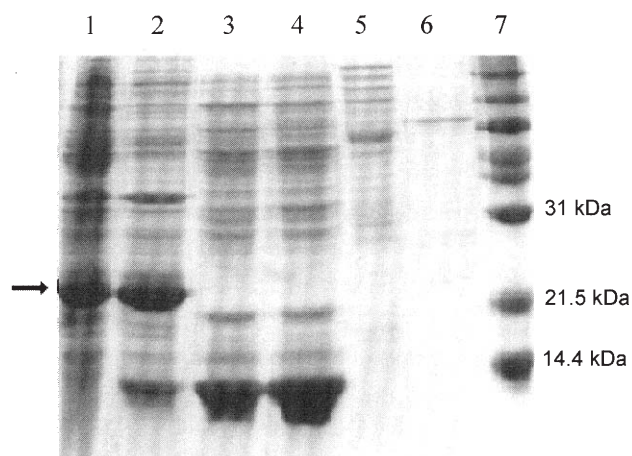
*E. coli* BL21(DE3) was transformed with expression plasmid pHJJ106, pHJJ107 and pHJJ108. Overnight grown *E. coli* HJJ106, HJJ107 and HJJ108 were transferred (10%, v/v) to new LB medium, incubated for 1.5 hr at 37°C to reach an  $A_{600}$  of 0.8-1.0. In order to induce catalytic domain expression, IPTG was added to the final concentration of 1mM and incubation continued for 18 hrs at 22°C and 37°C. 100  $\mu$ l of cell culture was denatured in 6X sample buffer, and was resolved on 15% tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then stained with Coomassie brilliant blue. The same results were obtained with two different incubation temperatures. Lane 1, catalytic domain of 21 kDa (pHJJ106); lane 2, catalytic domain of 14.7 kDa (pHJJ107); lane 3, catalytic domain of 23.5 kDa (pHJJ108); lane 4, molecular size marker in kDa: bovine serum albumin, 66.3; glutamic dehydrogenase, 55.4; lactate dehydrogenase, 36.5; carbonic anhydrase, 31; trypsin inhibitor, 21.5; lysozyme, 14.4; aprotinin, 6.

유하는 14.7 kDa (pHJJ107, Fig. 3, lane 2)과 Arg 60-Arg 240까지의 아미노산을 가진 23.5 kDa (pHJJ108, Fig. 3, lane 3) 즉 3 종류의 catalytic domain이 모두 대량생산되었다. 이렇게 대량생산된 catalytic domain들의 용해성을 알아보기 위해 발현된 단백



**Fig. 4.** Purification of the expressed catalytic domain of ermSF protein (protein of DNA fragment 2; 14.7 kDa).

*E. coli* HJJ107 was grown at 22°C in the presence of IPTG. Cell pellets of 100 ml culture was treated with lysozyme (5 µg/ml) for 20 minutes, frozen at -80°C for 30 min and thawed at room temperature. The resultant lysate was treated DNase I (2.5 µg/ml), RNase A (2.5 µg/ml) and centrifuged (39,000×g, 30 min) to remove the particulated material (inclusion body fraction). The resultant supernatant was loaded onto the 3 ml immobilized Ni<sup>2+</sup> affinity column. Lane 1, total cell protein; 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, 60 mM imidazole column wash; lane 7, 300 mM imidazole elute; lane 8, molecular size marker: refer to Fig. 3.



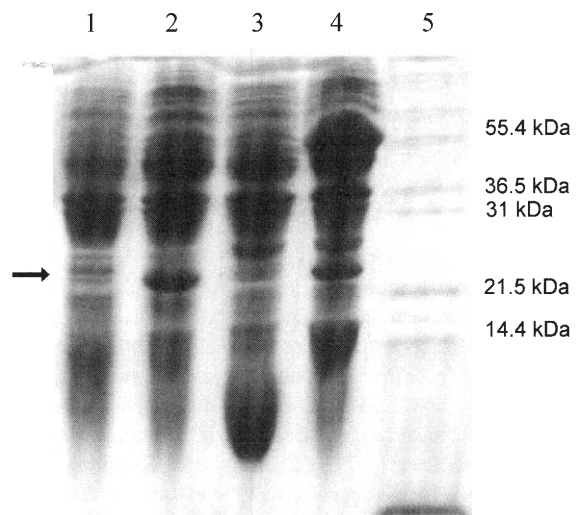
**Fig. 5.** Purification of the expressed catalytic domain of ermSF protein (protein of DNA fragment 3; 23.5 kDa).

The growth of *E. coli* HJJ108 and the purification of the expressed catalytic domain was carried out as described in Fig. 3 and Fig. 4., respectively. Lane 1, total cell protein; lane 2, inclusion body fraction; lane 3, supernatant fraction of lysate; lane 4, affinity run-through; lane 5, 60 mM imidazole column wash; lane 7, 300 mM imidazole elute; lane 8, molecular size marker in kDa: glutamate dehydrogenase 55; ovalbumin 42.7; aldolase 40; carbonic anhydrase 31; soybean trypsin inhibitor (double) 21.5/19.7; lysozyme 14.4.

질을 Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography (14)에 의해 정제하여 SDS-PAGE에 의해 분석한 결과 Arg 60-Glu 186와 Arg 60-Arg 240을 함유하는 catalytic domain들은 total cell extract (Fig. 4, lane 1; Fig. 5, lane 1)와 inclusion body fraction (Fig. 4, lane 2; Fig. 5, lane 2)에서 대량생산된 단백질을 확인할 수 있었으나 300 mM imidazole을 사용한 정제된 단백질의 분획(Fig. 4, lane 6; Fig. 5, lane 7)에서는 대량생산된 단백질을 확인할 수 없었다. 600 mM imidazole을 사용한 elution조건에서도 용해성단백질은 확인되지 않았다. Met 1-Glu 184의 아미노산을 함유한 단백질도 같은 결과를 보여주었다(data not shown). 용해성을 증가시키기 위한 또 다른 방법으로 chaperone인 GroESL과 Thioredoxin을 발현시키는 담체(23)와 각 발현 담체를 동시에 형질전환 시켰다. 특히 Arg 60-Arg 240의 아미노산을 함유하는 catalytic domain의 경우는 GroESL을 동시에 발현시켰을 때 발현된 단백질의 양은 pHJJ108을 단독으로 발현시킨 경우(Fig. 6, lane 2)에 비해 약간의 감소를 보였으나 대량생산에는 성공하였다(Fig. 6, lane 4). 그러나 Thioredoxin을 동시에 발현시켰을 경우는 전혀 발현이 없었었다(Fig. 6, lane 3). GroESL과 동시에 발현된 Arg 60-Arg 240의 단백질의 용해성을 알아보기 위해 대량생산된 단백질을 정제한 결과 이 경우도 앞의 경우와 같이 용해성 단백질의 생산은 이루어지지 않았다(Fig. 7). 다른 2종류의 catalytic domain의 경우도 동일한 양상을 보였다(data not shown).

#### 발현된 catalytic domain의 *E. coli*내에서의 활성

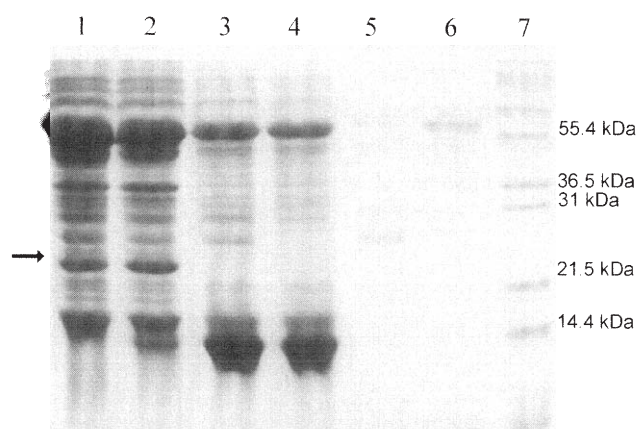
ermSF 유전자를 함유하는 *E. coli* (*E. coli* HJJ105)는 37°C에



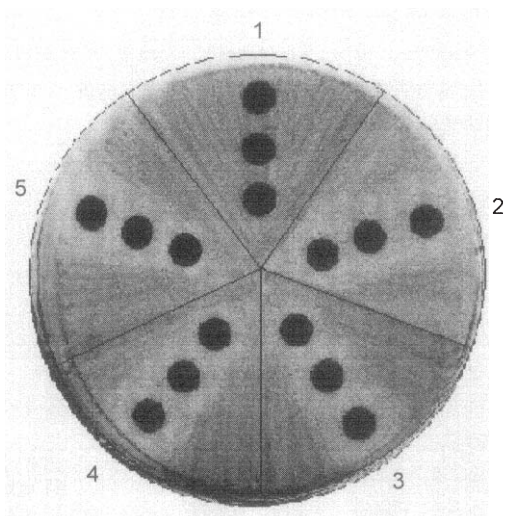
**Fig. 6.** Catalytic domain expression of ermSF protein with coproduction of GroESL or Trx.

pHJJ108 was transformed into *E. coli* cells producing GroESL or Trx. Incubation was performed as indicated in Fig. 3. 100 µl of cell extracts were analyzed on a 13% SDS-PAGE. Coproduction of Trx abolished the overexpression of catalytic domain. Lane 1, *E. coli* harboring empty pET 23b vector; lane 2, *E. coli* harboring pHJJ108; lane 3, *E. coli* cotransformed with pT-Trx and pHJJ108; lane 4, *E. coli* cotransformed with pT-GroESL and pHJJ108; lane 5, molecular size marker: refer to Fig. 3.





**Fig. 1.** Purification of the expressed catalytic domain of *ermSF* protein (protein of DNA fragment 3; 23.5 kDa) in presence of GroESL. The growth condition of *E. coli* HJJ108 and the Purification was performed as described in Fig. 3 and Fig. 4, respectively. Lane 1 total cell protein; lane 2, inclusion body fraction; lane 3, supernatant fraction of lysate; lane 4, affinity run-through; lane 5, 60mM imidazole column wash; lane 6, 300mM imidazole elute; lane 7, molecular size marker: refer to Fig. 3.



**Fig. 8.** Antibiotic susceptibility assay.

Erythromycin stock solution (500  $\mu\text{g/ml}$ ) was dropped on Whatmann 3M paper circle to reach final amount of erythromycin, 50  $\mu\text{g}$ , 100  $\mu\text{g}$  and 250  $\mu\text{g}$ . In each compartment of agar plate, *E. coli* cells containing DNA fragment encoding each catalytic domain was spread with cotton swab. In the center of each compartment, paper circles containing erythromycin were placed, and the resulting agar plate was incubated overnight at 37°C. *E. coli* cells harboring pHJJ105 (containing *ermSF* gene) grew in the presence of erythromycin, whereas the other cells, including cell containing empty vector did not. Compartment 1, *E. coli* cells harboring pHJJ105; compartment 2, *E. coli* cells harboring pHJJ106; compartment 3, *E. coli* cells harboring pHJJ107; compartment 4, *E. coli* cells harboring pHJJ108; compartment 5, *E. coli* cells harboring empty pET23b vector.

서 배양하였을 때 대부분이 inclusion body를 형성하였고 활성을 가지고 용해성을 나타내는 단백질은 SDS-PAGE상에서 검색할 수 없었다(6). 그러나 항생제 내성검색(antibiotic susceptibility

assay)를 통한 항생제 내성을 검색한 결과 그 활성 즉 내성을 나타내었다(6,8). 이 것은 발현된 대부분의 단백질이 inclusion body를 형성하여 활성을 가지지 못하였지만 발현된 일부 단백질이 용해성 단백질로 생성되어 세포 내에서 새로 생성되는 ribosome의 23S rRNA의 특정 부위 즉 A2085에 dimethylation (4,11,18)시킴으로써 나타나는 결과이다. 따라서 대부분 inclusion body로 생성된 catalytic domain의 활성을 측정하기 위하여 항생제 내성검색을 실시하였다. Fig. 8에서 보여지는 바와 같이 *ermSF* 유전자 전체를 갖는 *E. coli* 세포는 모든 농도의 erythromycin에서 내성을 나타내었으나 빈 담체(empty vector)를 가진 세포는 내성을 나타내지 않았다. 그리고 발현된 모든 catalytic domain들도 역시 활성 즉 erythromycin에 내성을 나타내지 않았다.

## 고 찰

ErmSF 단백질의 catalytic domain을 용해성 단백질로 얻기 위하여 3 종류의 catalytic domain을 제작하고 pET23b 및 pET19b를 사용하여 그 발현을 유도하였다. 현재까지 *E. coli*에서 용해성 단백질의 생산을 위하여 여러 가지 방법이 사용되어 왔으나 그 성공은 각 단백질에 따라 다양하였다(13). 그러나 ErmSF (6,8)의 경우는 37°C의 배양온도에서 거의 모든 단백질이 불용성 단백질의 집합체를 형성하였으나 배양온도를 22°C로 낮추었을 때 liter culture당 126 mg의 단백질의 대량생산에 성공하였다(accepted to protein expression and purification). N-terminal end region이 제거된 ErmSF의 경우도 22°C에서 대량생산에 성공하였다(unpublished result). 그리고 chaperone인 GroESL과 Thioredoxin의 존재 하에 단백질의 용해성이 *E. coli*에서 증가된다는 보고가 있었으므로(23) 배양온도를 37°C와 22°C로 하여 그리고 chaperone GroESL 및 Thioredoxin을 같이 발현시켜서 용해성 단백질의 생산을 시도하였다. 그러나 3종류의 catalytic domain 모두 대량발현에는 성공하였으나 용해성 단백질로의 전환은 이루어지지 않았다. 이러한 사실을 종합하여 보았을 때 *erm* 단백질을 구성하는 catalytic domain과 substrate binding domain이 소수성 아미노산 잔기에 의하여 상호작용을 하기 때문인 것으로 추정된다. 밝혀진 구조(ErmAM, Fig. 2; 24)에 따르면 catalytic domain에 존재하는  $\alpha 7$ 의 Leu 143, Thr 147, His 146과  $\alpha 6$ 와  $\alpha 7$ 사이에 있는 loop위에 있는 ile 137과 substrate binding domain위에 있는  $\alpha 8$ 의 Leu 143, Thr 147 및  $\alpha 11$ 의 Tyr 228간의 소수성 상호작용이 존재한다. 이러한 소수성 상호작용에 참여하는 catalytic domain의 잔기들이 분리된 catalytic domain의 용해성 단백질로의 대량생산에 역작용을 하여 용해성 단백질의 생산에 이르지 못했을 것으로 사료된다. 또 하나의 가능성은 세포 내에서 일어나는 folding과정 중 catalytic domain의 folding에 substrate binding domain의 보조적인 역할을 생각해 볼 수 있다.

37°C에서 발현시킨 ErmSF는 거의 모든 단백질이 불용성 단백질로 발현이 되었지만 ErmSF를 발현하는 *E. coli*는 MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 내성을 보였다.

따라서 불용성 단백질로 catalytic domain을 발현시키는 *E. coli* 세포들에 대하여도 항생제 내성을 검색하였다. 그러나 내성은 발현되지 않았다. 이러한 결과는 발현된 모든 단백질이 모두 불용성 단백질이든지 또는 본 연구자가 SDS-PAGE를 통하여 검색할 수 없는 catalytic domain이 용해성 단백질이 생성되었지만 substrate binding domain이 활성을 가지고 있지 않을 가능성이 있다. 그러나 생물학적인 경제성을 고려하였을 때 catalytic domain만이 활성을 가지는 것은 생각하기 힘들다. 따라서 정확한 활성을 가지기 위해서는 catalytic domain 및 substrate binding domain을 모두 가져야 할 것으로 믿어진다.

본 실험실에서는 ErmSF와 N-terminal end region이 제거된 단백질의 활성을 가진 용해성 단백질로의 대량생산에는 성공하였다. 그러나 분리된 catalytic domain은 대량생산에는 성공하였지만 용해성 단백질로의 전환은 이루어지지 않았다. 그러나 catalytic domain과 erm 단백질에 의해서 인식되고 methylation될 수 있는 모든 구조적 특성을 다 가진 domain V (8,9,26)의 특정 부분과의 상호작용을 밝히는 작업은 새로운 단백질과 RNA의 상호작용을 밝히는 데 매우 중요하고 또 이 과정을 억제하는 억제제의 개발에 중요할 것으로 믿어진다. 따라서 용해성 catalytic domain을 확보하기 위해 이미 본 실험실에서 성공한 불용성 단백질로 발현된 ErmSF의 재활성화 과정을 이용한 catalytic domain의 재활성화 또는 proteinase K와 같은 비 특이적 단백질 분해 효소를 이용한 대량생산된 ErmSF (126 mg/L culture)를 절단하여 catalytic domain을 포함한 단백질 절편을 얻고자 한다.

## 감사의 글

본 연구는 2000년도 한국과학재단 목적기초연구사업 중 특정 기초연구비 지원(2000-2-20200-002-3)에 의하여 수행된 연구결과 의 일부로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Bussiere, D.E., S.W. Muchmore, C.G. Dealwis, G. Schluckebier, V.L. Nienaber, R.P. Eadji, K.A. Walter, U.S. Lador, T.F. Holzman, and C. Abad-Zapatero. 1998. Crystal Structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry*, 37, 7103-7112.
- Chu, D.T.W. 1999. Recent developments in macrolides and ketolides. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 467-474.
- Cocito, C., M.D. Giambattista, E. Nyssen, and P. Vannffel. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 7-13.
- Cundliffe, E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 207-223.
- Hansen, L.H., B. Vester, and S. Douthwaite. 1999. Core sequence in the RNA motif recognized by the ErmE methyltransferase revealed by relaxing the fidelity of the enzyme for its target. *RNA* 5, 93-101.
- 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, 252-257.
- Kovalic, D., R.B. Giannattasio and B. Weisblum 1995. Methylation of minimalist 23S rRNA sequence in vitro by ErmSF(TlrA) N-methyltransferase. *Biochemistry*, 34, 15838-15844
- 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, 6992-6998.
- 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.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, C.J., B. Weisblum, S.R. Fahnestock, and M. Nomura. 1973. Alteration of 23 S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 74, 67-72.
- Lafontaine, E., J. Delcour, A.-L. Glasser, J. Desgres, and J. Vanderhaute. 1994. The DIM1 gene responsible for the conserved m62Am62 dimethylation in the 3-terminal loop of 18S rRNA is essential in yeast. *J. Mol. Biol.* 241, 492-497.
- Markrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia-coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.
- Porath, J., J. Carlsson, L. Olsson, and G. Belfrage. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258, 598-599.
- Schluckebier, G., P. Zhong, K.D. Stewart, T.J. Kavanaugh, and C. Abad-Zapatero. 1999. The 2.2 Å Structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implication for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* 289, 277-291
- Seppala, H., M. Skurnik, H. Soini, M.C. Robertserm, and P. Huovinen. 1998. A novel erythromycin resistance gene(ermTR) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 257-262
- Schagger, H. and G.V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 116, 368-379
- 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.
- Vester, B., A.K. Nielsen, L.H. Hansen, S. Douthwaite 1998. ErmE methyltransferase recognition elements in RNA substrates. *J. Mol. Biol.* 282, 255-265.
- 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.
- Villsen, I.D., B. Vester, and S. Douthwaite. 1999. ErmE methyltransferase recognize features of the primary and secondary structure in a motif within domain V of 23S rRNA. *J. Mol. Biol.* 286, 365-374
- Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577-585.
- Yasukawa, T., C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto, and S. Ishii. 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 43, 25328-25331.
- Yu, L., A.M. Petros, A. Schnuchel, P. Zhong, J.M. Severin, K. Walter, T.F. Holzman, and S.W. Fesik. 1997. Solution structure of an rRNA methyltransferase(ErmAM) that confers macrolide-lin-

- cosamide-strepto gramin antibiotic resistance. *Nature Struct. Biol.* 4, 483-489.
25. Zalacain, M. and E. Cundliffe 1989. Methylation of 23S rRNA by tlrA(ermSF), a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 171, 4254-4260.
26. Zhong, P., S.D. Pratt, R.P. Edalji, K. Walter, T.F. Holzman, A.G. Shvakumar, and L. Katz. 1995. Substrate requirements for ErmC methyltransferase activity. *J. Bacteriol.* 177, 4237-4332.

(Received November 15, 2001/Accepted December 1, 2001)

---

**ABSTRACT : Domain Expression of *ErmSF*, MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) Antibiotic Resistance Factor Protein**

**Hyung Jong Jin** (Department of Genetic Engineering, College of Natural Science, The University of Suwon, Kyunggi-Do 445-743, Korea)

Erm proteins, MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) resistance factor proteins, show high degree of amino acid sequence homology and comprise of a group of structurally homologous N-methyltransferases. On the basis of the recently determined structures of ErmC and ErmAM, ErmSF was divided into two domains, N-terminal end catalytic domain and C-terminal end substrate binding domain and attempted to overexpress catalytic domain in *E. coli* using various pET expression systems. Three DNA fragments were used to express the catalytic domain: DNA fragment 1 encoding Met 1 through Glu 186, DNA fragment 2 encoding Arg 60 to Glu 186 and DNA fragment 3 encoding Arg 60 through Arg 240. Among the pET expression vectors used, pET19b successfully expressed the DNA fragment 3 and pET23b succeeded in expression of DNA fragment 1 and 2. But the overexpressed catalytic domains existed as inclusion body, a insoluble aggregate. To assist the soluble expression of ErmSF catalytic domains, Coexpression of chaperone GroESL or Thioredoxin and lowering the incubation temperature to 22°C were attempted, as did in the soluble expression of the whole ErmSF protein. Both strategies did not seem to be helpful. Solubilization with guanidine-HCl and renaturation with gradual removal of denaturant and partial digestion of overexpressed whole ErmSF protein (expressed to the level of 126 mg/l culture as a soluble protein) with proteinase K, nonspecific proteinase are under way.