

MLS_B 항생제 내성인자인 ErmSF의 N-terminal 38개 아미노산 제거가 항생제 내성 효소활성에 미치는 영향

이학진 · 진형종*

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

Effect of Truncation of 38 Amino Acids in N-terminal Region of ErmSF, a MLS_B Antibiotic Resistance Factor Protein, on Enzymatic Activity

Hak Jin Lee and Hyung Jong Jin*

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

(Received August 14, 2014 / Accepted September 25, 2014)

ErmSF is one of the four antibiotic resistance factor proteins expressed by *Streptomyces fradiae*, antibiotic tylosin producer; which renders MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance through dimethylating A2058 of 23S rRNA, thereby reducing the affinity of antibiotic to ribosome. Unlike other Erm proteins, ErmSF harbors long N-terminal end region. To investigate its role in enzyme activity, mutant ErmSF deleted of 1-38 amino acids was overexpressed and activity *in vivo* and *in vitro* was observed. *In vitro* enzymatic assay showed that mutant protein exhibited reduced activity by 20% compared to the wild type enzyme. Due to the reduced activity of the mutant protein, cells expressing mutant protein showed weaker resistance to erythromycin than cells with wild type enzyme. Presumably, the decrease in enzyme activity was caused by the hindrance in substrate binding and (or) product release, not by defect in the methyl group transfer occurred in active site.

Keywords: 23S rRNA methylation, antibiotic resistance, deletion mutation of protein, ErmSF, *in vivo* and *in vitro* enzyme activity, MLS_B antibiotic resistance factor protein, N-terminal end region

Macrolide, lincosamide와 streptogramin B 항생제는 서로 화학적 구조는 다르나 미생물이 이들 항생제에 대하여 나타내는 내성 기작이 동일하여 MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 군(antibiotic superfamily)으로 분류된다. 이 항생제 내성 기작은 Erm (erythromycin resistance methylase)이라는 단백질에 의해 이루어지고 이 단백질은 세균의 23S rRNA에 존재하는 특정 adenine (A₂₀₅₈)에 mono-, 또는 dimethylation 시킴으로써 MLS_B 항생제가 부착되는 것을 억제함으로써 내성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Weisblum, 1995; Douthwaite *et al.*, 2005). 즉 항생제 작용부위의 변형(target site modification)에 의하여 내성을 나타낸다. 특히 Erm 단백질에 의한 내성은 다른 내성 기작과 달리 고도 내성을 나타냄으로써 임상에서 많은 문제점을 보이고 있다(Shortridge *et al.*, 1999; Feder *et al.*, 2008). 특히 *erm* 유전자의 발현은 유도(inducible)에 의한 발현과 구성 발현(constitutive expression)으로 나뉘어지나 최근에는 아마도 항생제의 사용이 증가함에 기인

하여 구성 발현이 주를 이루어 MLS_B 항생제의 사용에 더욱 많은 문제점을 야기하고 있다. Tylosin이라는 macrolide 항생제를 생산하는 *Streptomyces fradiae*는 자신이 생산하는 항생제에 의한 사멸을 방지하기 위해 4종류의 항생제 내성인자를 발현한다(Baltz and Seno, 1988; Bate *et al.*, 1999). 즉 23S rRNA의 A2058에 두 개의 methyl기를 전이하는 TlrA [ErmSF (Kamimiya and Weisblum, 1988), renamed ErmS (Roberts *et al.*, 1999)]와 한 개의 methyl기를 전이하는 TlrD [(Zalacain and Cundliffe, 1991; Gandeche and Cundliffe, 1996) renamed ErmN], domain II에 존재하는 guanine (G748)에 methyl기를 전이하는 TlrB (Liu *et al.*, 2000) 그리고 efflux pump로 작용하는 TlrC (Rosteck *et al.*, 1991)가 *S. fradiae*에서 발현된다. 한편 이들 중 하나인 ErmSF는 다른 Erm 단백질에서 발견되지 않는 독특하게 긴 N-terminal end region (NTER)을 가진다(Fig. 1). 본 연구에서는 임상적으로 큰 문제가 되는 MLS_B 항생제의 내성인자인 Erm 단백질의 활성 기작을 알아보기 위한 일환으로 ErmSF의 NTER (N-terminal end region)의 역할을 규명하고자 하였다. 특히 본 연구에서는 1-38번째 아미노산을 제거함으로써 그 활성 저하에 대한 영향 여부를 관찰하였다.

*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	Jin and Yang (2002)
<i>E. coli</i> HJJ114	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ114	Jin (2006)
<i>E. coli</i> HJJ115	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ115	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> <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	Jin and Yang (2002)
pHJJ114	pET23b containing NT25TE <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	Jin (2006)
pHJJ115	pET23b containing NT38TE <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	this work

Table 2. Oligonucleotide primers for cloning

Oligonucleotide primer	Sequence & description
Oligo-1	(Met) 5' <u>GGAATTCC</u> ATGCGTTCTCCGGACAGCCCCGGGAACACCAGC (43mer) upstream (forward) PCR primer for NT38TE
Oligo-2	5' <u>CCCAAGCTT</u> CCGTCCGGCCGGTCCGGCT (27mer) downstream (reverse) PCR primer for NT38TE
Oligo-3	5' taatacagactactataGAGAGACTCGGTGAAA (33-mer) upstream (forward) PCR primer for ^a BDV DNA containing T7 promoter.
Oligo-4	5' CCTCTCGTACTAAGGACACG (20-mer) downstream (reverse) PCR primer for BDV DNA

The underlined sequences in oligo-1 and -2 introduced *NdeI* recognition sequence overlapping methionine codon in bold letters and *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. ^aBDV denotes *Bacillus subtilis* 23S rRNA domain V. Lowercase nucleotides in oligo-3 indicate the T7 promoter sequence.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 primers

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드 그리고 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머들 각각 Table 1, Table 2에 나타내었다.

ermSF 유전자 및 NTER의 1-38번째 아미노산이 제거된 *ermSF* 유전자의 클로닝

ermSF 유전자는 이미 앞에서 얻어진 것을 사용하였다(Kovalic *et al.*, 1994). 얻어진 *ermSF* 유전자를 사용하여 NTER 중 아미노산 1-38를 함유하는 펩타이드가 제거된 단백질(NT38TE)을 얻기 위해 이 펩타이드를 표현하는 염기서열(DNA sequence)이 제거된 *ermSF* 유전자 절편을 올리고뉴클레오타이드-1와 올리고뉴클레오타이드-2를 각각 전방향(forward), 역방향(reverse) 프라이머로 사용하여 PCR (HBPX2220, Thermo Fisher Scientific Inc., USA)을 수행하여 얻었다. 각 프라이머의 5' 쪽에 인위적으로 넣은 *NdeI*과 *HindIII* 인식 서열에 상응하는 제한효소를 처리하여 얻어진 DNA 절편을 같은 제한효소로 처리한 표현담체(expression vector)인 pET23b (Novagen, USA)에 접합하였다. 그 후 T7 RNA 합성 효소 유전자를 함유한 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환하였다. 형질 전환 대장균에서 플라스미드를 분리하고 제한효소 절단과 dideoxy chain termination sequence analysis에 의하여 1-38 번째 아미노산이 절단된 단백질을 표현하는 DNA 절편이 reading frame에 맞게 담체에 끼워진 클론을 선별하였다. 여기서 얻어진 플라스미드를 pHJJ115로 명명하였다. 그리고 이 플라스미드를 함유한 대장균을 *E. coli* HJJ115로 명명하였다.

ermSF 및 결손변이 *ermSF* 유전자의 발현

표현담체에 적절히 끼워진 *ermSF* 및 결손변이 *ermSF* 유전자의 발현은 이미 발표된 방법에 근거(Jin and Yang, 2002), 일부 변형하여 수행하였다. 하룻밤 배양한 *E. coli* HJJ105와 *E. coli* HJJ115를 새 배지에 전이하고 600 nm에서 흡광도가 0.8-1.0이 되도록 37°C에서 배양한 후 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 후 22°C에서 24시간 배양하고 그 발현 정도를 SDS-PAGE (Laemmli, 1970)로 확인하였다.

ErmAM	M-----	
ErmC'	M-----	
ErmSF	MARAPRSPHPARSRETSRAHPYPYGTADRAPGRGR	35
	↑(NT25TE)	
ErmAM	-----N-KNIKYSQNFLT	14
ErmC'	-----NEKNIKHSQNFLT	15
ErmSF	DRDRSPDSPGNTSSRDGGRSPDRARRELSQNFLAR	70
	↑(NT38TE)	
ErmAM	EKVLNQIIKQLNLKETDTVYEI	245
ErmC'	KHNIDKIMTNIRLNEHDNIFEI	244
ErmSF	RAVAERVARLVRPAPGGLLLE	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 (NT38TE) in which 1-38 amino acids from NTER of ErmSF was truncated, but methionine was added just before starting amino acid for proper expression.

대량발현된 단백질 정제

ErmSF와 결손 변이 단백질(NT25TE (Jin, 2006)와 NT38TE)의 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 µg/ml) 및 RNase A (2.5 µg/ml)을 넣고 반응시키고 4°C에서 20,000 × g로 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액으로부터 단백질 분리는 공급자 (Novagen, USA)가 제공한 과정에 따라 Ni²⁺ affinity column chromatography법에 의하여 분리하였다. 즉, buffer A로 평형을 이룬 Hisbind resin이 충전된 컬럼에 위의 상등액을 loading 한 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.

발현된 단백질의 *in vivo* 활성 검색(항생제 내성검사)

대량 발현된 단백질의 세포 내 활성검사는 이미 발표된 바와 같이 디스크 확산방법으로 결정하였다(Jin, 1999). 원형거름종이 (Advantec, Toyo, Japan)에 25 mg/ml의 erythromycin 용액을 250 µg이 되도록 점적 후 말렸다. 이렇게 얻어진 항생제 함유 거름종이를 새롭게 고형 배지 위에 도포된 미생물위에 올린 후 하루 동안 배양하여 그 성장억제 지역을 관찰하였다.

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 주형으로 하여 T7 promoter 서열을 함유한 올리고뉴클레오타이드-3과 올리고뉴클레오타이드-4를 정방향, 역방향 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였다. 각각의 올리고뉴클레오타이드는 *B. subtilis* 23S rRNA 뉴클레오타이드의 2022-2042, 2672-2692번째의 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, 4% 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, USA; sp act 80 Ci/mmol), 10 U of RNasin (Promega, USA), 10 pmol domain V와 200 ng

의 ErmSF 또는 결손 변이 ErmSF (NT25TE와 NT38TE)를 넣고 총 부피가 50 µl되도록 한 후 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 12% trichloroacetic acid로 침전시켜 반응을 정지시킨 후에 침전물을 건조하고 유입된 방사선량을 측정하였다.

결 과

1-38 아미노산이 제거된 결손 변이 ErmSF 단백질의 발현

ErmSF에서 1-38번째 아미노산을 표현하는 염기서열(DNA sequence)이 제거된 DNA 절편이 적절하게 끼워진 pET23b를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환한 후 IPTG로 발현을 유도하고 그 발현 유무 및 정도를 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다(Fig. 2). Fig. 2에 나타난 바와 같이 빈 벡터(empty vector)를 함유한 세포 내에서 관찰되는 단백질의 발현 양상과는 달리 결손 변이 DNA 절편을 함유한 발현 담체에서는 분자량의 저하로 인하여 37 kDa의 야생형 ErmSF에서부터 조금 이동이 빨라진 단백질이 대량 발현된 것을 관찰할 수 있었다. 핵산의 염기 서열로부터 예상된 이들 단백질의 분자량은 각각 6개의 histidine tag를 포함하여 32.9 kDa이었으며 SDS-PAGE상에서도 그 이동 정도가 lactic anhydrase (36.5 kDa)와 carbonic anhydrase (29 kDa) 사이에서 나타나 예상한 정도의 분자량을 갖는 것으로 관찰되었다(lane 3 in Fig. 2).

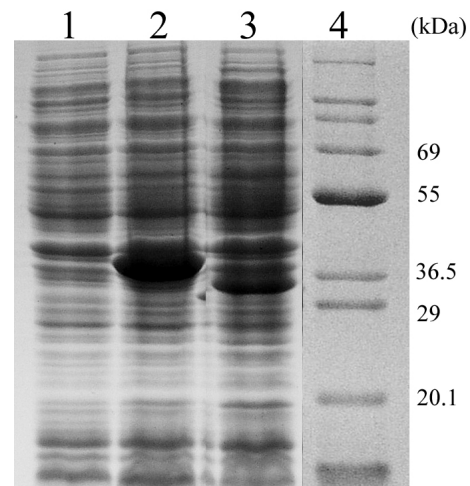


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the expressed mutant ErmSF (NT38TE). *E. coli* BL21 (DE3) was transformed with recombinant plasmid pHJJ115 containing DAN fragment in which 1-38 amino acid encoding region was deleted from *ermSF*. Overnight grown *E. coli* 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 6× sample buffer, resolved on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then stained with Coomassie brilliant blue. Lanes: 1, empty vector; 2, wild type ErmSF of 37.0 kDa (*E. coli* HJJ105); 3, NT38TE of 32.9 kDa (*E. coli* HJJ115); 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.

Table 3. *In vitro* Methylation on transcripts of 23S rRNA domain V by modified N-terminal end region of ErmSF methyltransferase

Protein	Wild type	NT25TE	NT38TE	Cont. (w/o protein)
Activity (cpm) ^a	24419	21258	19583	45

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

결손변이 ErmSF의 *in vivo*에서의 활성 검색

대량생산된 결손변이 ErmSF의 *in vivo*에서 나타내는 활성은 이들을 발현하는 세포가 나타내는 항생제 내성을 결정함으로써 검색하였다. Fig. 3에서 보여지는데로 빈담체를 함유한 대장균은 항생제(erythromycin)에 의해 성장이 저해되어서 생장 저해 지역이 명확하게 관찰되었다. 반면 발현된 야생형 ErmSF를 함유하는 대장균의 경우는 전혀 저해를 받지않았다. NT38TE의 경우도 기 보고된 NT25TE (Jin, 2006)의 경우와 같이 erythromycin에 의하여 저해를 받지 않았다. 따라서 1-38번째의 아미노산을 함유하는 peptide가 제거되어도 단백질의 활성은 유지되었고 이것이 항생제에 대한 내성으로 나타났다. 그러나 항생제를 함유하는 원형의 거름종이 주변의 대장균 밀도가 야생형 ErmSF를 발현하는 대장균에 비해 저하되어 있는 것이 관찰되었다.

대량 생산된 결손변이 단백질의 정제

대량생산된 결손변이 단백질은 야생형 ErmSF 그리고 25개의 아미노산이 제거된 NT25TE와 동일한 과정을 채택함으로써 다음과 같이 성공적으로 정제되었다. 세포를 분쇄한 후 원심분리하여 세포파쇄물 및 불용성단백질(inclusion body) 등의 불용성물질을 제거하고(Fig. 4, lane 2) 용해성 목적단백질을 함유하는 상등액을 얻었다(Fig. 4, lane 3). 이렇게 얻어진 단백질용액을 Ni^{2+} 이 고정화된 resin이 있는 컬럼에 넣고 100 mM imidazole이 함유된 완충용액을 사용하여 씻어낸 후 (Fig. 4, lane 6) 300 mM이 함유된 완충용

액을 사용하여 결손변이 ErmSF를 얻어내었다(Fig. 4, lane 7). 여기서 얻어진 단백질의 양은 BSA를 표준품으로 사용하여 정량하였을 때 IPTG로 유도되어 발현된 1 L 배양액 중 14.2 mg이었다. 한편 Fig. 4의 lane 2에서도 관찰할 수 있듯이 야생형 ErmSF나 NT25TE의 경우와 같이 발현된 단백질의 많은 부분이 불용성 단백질로 발현되어 불용성 단백질 분획(inclusion body fraction)에 남아있는 것을 알 수 있다.

정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색

NT38TE를 발현하는 대장균은 erythromycin에 대한 내성을 나타내었다. 그러나 항생제를 함유하는 원형거름종이 주변에는 대장균의 밀도가 감소한 것으로 관찰되어 효소활성이 저하된 것으로 사료되었다. 따라서 그 저하 정도를 알아보기 위해 세포 외에서의 활성을 야생형 ErmSF 및 기존에 보고하였던 NT25TE와 비교하여 알아보기 위해 Erm 단백질의 완전기질로 밝혀진 domain V (Kovalic *et al.*, 1994; Vester and Douthwaite, 1994)를 사용하여 활성을 검색하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 NT25TE는 야생형 ErmSF에 비하여 약 87% 정도의 활성을 나타내었고 NT38TE는 야생형 ErmSF에 비하여 80% 그리고 NT25TE에 비하여 92%의 활성을 나타내었다.

고 찰

현재까지 발견된 Erm 단백질의 수는 약 40종 가까이 된다. 이들을

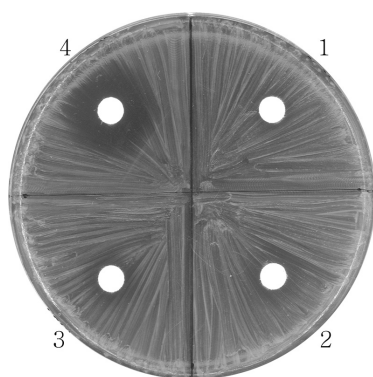


Fig. 3. Antibiotic susceptibility assay. Erythromycin stock solution (25 mg/ml) was dropped on filter paper circle to reach the final amount of 250 µg of erythromycin. In each section of agar plate, *E. coli* cells containing wild type ErmSF, NT25TE, and NT38TE expression vector, and empty vector were 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 pHJJ105; section 2, *E. coli* cells harboring pHJJ115; section 3, *E. coli* cells harboring pHJJ114; section 4, *E. coli* cells harboring empty vector.

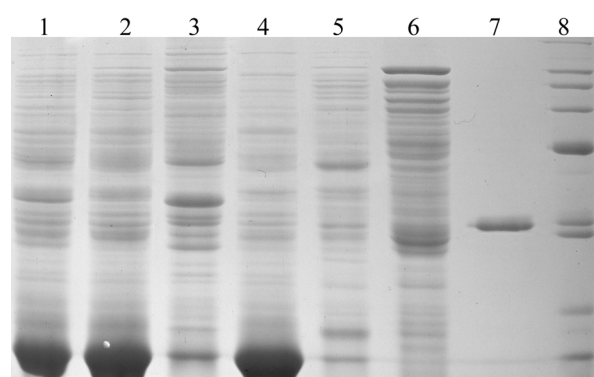


Fig. 4. Purification of the expressed NT38TE. *E. coli* HJJ115 was grown at 22°C in the presence of IPTG. Cell pellets of 100 ml culture was treated with lysozyme (5 µg/ml), frozen at -80°C and thawed at room temperature. The resultant lysate was treated with DNase I (2.5 µg/ml), RNase A (2.5 µg/ml) and centrifuged to remove the particulate materials including inclusion body. The resultant supernatant was loaded onto immobilized Ni^{2+} affinity column. Lanes: 1, total cell proteins; 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; 8, molecular size marker: refer to Fig. 2.

보유하는 미생물은 Firmicutes, Actinobacteria와 일부 Bacteroides 등이다. 이들 중, N-terminal end extension은 Firmicutes와 Actinobacteria에서 일부 발견되고 대부분은 Actinobacteria의 Erm에서 발견된다(Park *et al.*, 2010). 이 중에서도 *S. fradiae*에서 발견되는 ErmSF의 N-terminal end region이 가장 길다. 특히 RNA와 잘 상호작용하는 것으로 알려진 arginine이 약 32%가 존재하여 효소활성에 지대한 역할을 할 것으로 기대되었다. 앞서 5개의 arginine을 함유하는 1-25 아미노산을 제거하였을 때 약 13%의 활성저하를 보였다. 따라서 본 연구에서는 이 후 6개의 arginine을 더 가지고 있는 26-39개까지의 아미노산이 포함된 1-39개의 아미노산을 제거한 결손변이 단백질을 만들어 그 효소활성에서의 기여도를 측정하고자 하였다. 그러나 번역을 위한 첫번째 아미노산인 methionine이 후에 arginine, serine이 순차적으로 나오는 1-38의 아미노산이 제거된 결손변이 단백질은 본 연구에서 보고한 바와 같이 14.2 mg/L 배양액으로 다량의 단백질이 대량 생산되었으나 methionine 후에 serine이 바로 나오게 되는 1-39의 아미노산이 제거된 결손변이 단백질은 대량생산이 전혀 관찰되지 않았다(자료 미제시). 이러한 결과는 배양온도의 상승 즉 37°C 또는 더 높은 온도에서의 배양, 발현 유도 물질인 IPTG 양의 조절 등에 의해서도 발현이 전혀 관찰되지 않았다. 따라서 처음 계획한 것보다 arginine이 한 개 적은 펩타이드의 활성에서의 역할을 관찰하였다. 즉 1-38 아미노산을 제거하였을 때는 이미 보고한 야생형 ErmSF나 NT25TE의 경우와 마찬가지로 22°C에서 발현된 많은 단백질이 용해성 단백질로 변환되어 상당히 많은 양(14.2 mg/L 배양액)을 얻을 수 있었으며 그리고 앞의 다른 두 단백질과 같이 이러한 배양온도의 저하를 통해서도 용해성 단백질로 전환되지 않은 단백질이 아직도 많이 존재함을 알 수 있었다.

이렇게 1-38번째 아미노산이 제거된 단백질의 활성을 측정한 결과 약 20% 정도의 활성이 소실되었다. 따라서 이러한 활성의 소실은 NTER의 제거와 함께 점차적으로 일어나는 것으로 관찰되었다. 즉 1-25 아미노산이 제거된 단백질보다 1-38 아미노산이 제거된 단백질이 더 많은 활성의 소실을 보여주었기 때문이다. 그렇지만 이러한 활성의 소실은 NTER을 가지고 있지 않은 Erm 단백질의 효소 활성을 감안하였을 때 NTER의 제거가 ErmSF의 활성화 부위에서 일어나는 효소의 작용에 영향을 미침으로써 이루어진 것으로 여겨지지는 않는다. 그 이유는 제거된 NTER의 1-38번째 아미노산이 현재 밝혀진 활성화 부위로부터 멀리 떨어져 있기 때문이다(Yu *et al.*, 1997; Bussiere *et al.*, 1998; Schluckebier *et al.*, 1999). 따라서 아마 기질의 부착(binding to substrate) 또는 생성물의 효소로부터 이탈(release of product)의 과정에 영향을 주어 이루어진 것으로 추정된다. 이렇게 소실된 활성은 항생제 내성으로 관찰되는 세포내에서의 활성에서도 관찰할 수 있었다. 즉 본 연구에서 수행한 디스크확산법(disc diffusion method)에 의한 항생제 내성 검사에서는 각 내성인자 단백질을 발현하는 대장균을 도포한 다음 항생제를 함유한 원형 거름종이 디스크를 그 위에 올려놓는다. 이 때 강한 활성을 갖는 야생형 ErmSF는 초기에 거의 성장억제를 받지 않아 밤새 배양 후에도 성장한 균의 밀도가 디스크의 먼 곳과 가까운 곳이 거의 균일하였으나 1-25 또는 1-38 아미노산을 제거한 결손 돌연변이

단백질을 표현하는 대장균은 아마도 단백질 활성의 저하에 의하여 초기에 강한 저해를 받아 16시간 동안 배양 후에 관찰하여 보면 디스크에 가까운 쪽은 균 밀도가 먼 쪽에 비하여 많이 저하되어있는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 현상은 야생형에 비하여 활성이 20% 저하된 NT38TE 뿐만 아니라 13%가 저하된 NT25TE의 경우에서도 관찰된 것으로서 내성인자 단백질의 효소활성의 중요성을 인식할 수 있었다.

적 요

ErmSF는 macrolide 항생물질인 tylosin을 생성하는 *Streptomyces fradiae*가 보유한 4개의 항생제 내성인자 단백질 중 하나로 23S rRNA의 A₂₀₅₈에 dimethylation 시킴으로써 항생제가 부착되는 것을 막음으로써 그 내성을 일으킨다. ErmSF는 다른 Erm 단백질과는 달리 긴 N-terminal end region을 가지고 있어서 그 역할을 알아보기 위해 1-38번째의 아미노산을 제거한 결손변이 단백질을 고안하고 대장균에서 발현하여 그 활성을 *in vivo*와 *in vitro*에서 관찰하였다. 결손변이 단백질을 발현하는 대장균은 결손에 의한 활성 저하에 기인하여 야생형 단백질을 발현하는 대장균에 비하여 항생제에 대한 내성이 손상된 것을 관찰하였다. 세포 외 *in vitro*에서의 활성은 야생형 ErmSF에 비하여 약 20%가 손상된 것으로 나타났다. 이렇게 관찰된 활성의 저하는 결손 변이에 의한 활성화 부위에서 일어난 결손에 의한 것이라기 보다는 기질의 부착 또는 생성물의 효소에서의 이탈 과정이 손상되어서 나타나는 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구결과의 일부(NRF-2010-0011442)로 이에 감사드립니다.

References

- 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.
- Douthwaite, S., Jalava, J., and Jakobsen, L. 2005. Ketolide resistance in *Streptococcus pyogenes* correlates with the degree of rRNA dimethylation by Erm. *Mol. Microbiol.* **58**, 613-622.
- Feder, M., Purta, E., Koscinski, L., Cubrilo, S., Maravic, V.G., and Bujnicki, J.M. 2008. Virtual screening and experimental verification to identify potential inhibitors of the ErmC methyltransferase responsible for bacterial resistance against macrolide antibiotics. *ChemMedChem*. **3**, 316-322.
- Gandeche, A.R. and Cundliffe, E. 1996. Molecular analysis of tlrD, an

- MLS resistance determinant from the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene* **180**, 173–176.
- 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.
- 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. 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.
- Kamimiya, S. and Weisblum, B.** 1988. Translational attenuation control of ermSF, an inducible resistance determinant encoding rRNA N-methyltransferase from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **170**, 1800–1811.
- 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 T. *Nature* **227**, 680–685.
- Liu, M., Kirpekar, F., Van Wezel, G.P., and Douthwaite, S.** 2000. The tylosin resistance gene tlrB of *Streptomyces fradiae* encodes a methyltransferase that targets G748 in 23S rRNA. *Mol. Microbiol.* **37**, 811–820.
- 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.
- 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**(12), 2823–2830.
- Rosteck, P.R. Jr., Reynolds, P.A., and Hershberger, C.L.** 1991. Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* tylosin resistance and ATP-binding transport. *Gene* **102**, 27–32.
- 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.
- Shortridge, V.D., Doern, G.V., Brueggemann, A.B., Beyer, J.M., and Flamm, R.K.** 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.
- 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. *Nat. 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.
- Zalacain, M. and Cundliffe, E.** 1991. Cloning of tlrD, a fourth resistance gene, from the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene* **97**, 137–142.