

## *Mycobacterium smegmatis* 를 이용한 Viomycin 의 내성 및 작용 기전에 관한 연구

崔 應 七

東京大學 應用微生物研究所

(Received October 8, 1979)

Eung Chil Choi

*Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo, Tokyo, Japan*

Studies on the Mechanism of Resistance to and Mode of Action of Viomycin in  
*Mycobacterium smegmatis*

**Abstract**—Viomycin inhibited polypeptide biosynthesis, initiation complex formation and translocation of peptidyl-tRNA on ribosomes derived from a sensitive strain of *Mycobacterium smegmatis* (R-15), but not significantly on ribosomes from viomycin-resistant mutants(R-31 and R-43). The inhibition of translocation was stronger than that of initiation complex formation in the sensitive strain.

The binding of [<sup>14</sup>C] tuberactinomycin O, a viomycin analog, to ribosomal particles was studied by Millipore filter method. The sensitive ribosome exhibited higher affinity for the antibiotic than the resistant ribosomes. The resistance was localized on the large ribosomal subunit in a mutant(R-31), and on the small subunit in another mutant(R-43). The binding of the drug to the sensitive ribosomal subunit was markedly reduced by combination with the resistant pair subunit, and the entire ribosome became resistant to the antibiotic.

viomycin 은 수용성 염기성 peptide계 항생물질의 하나로 Gram 양성균에 유효하다. 특히 결핵균 등 항산성균에 대해서 항균성이 높기 때문에 결핵의 제 2차 치료제로 사용되고 있다. viomycin 은 세균 ribosome 계의 단백질 생합성 과정에서 initiation 과 elongation 의 두 단계를 억제한다. 즉 이 항생물질은 30S initiation complex 형성을 억제하는 동시에 peptidyl-tRNA 가 acceptor site 에서 donor site 에 전위하는 것을 방해한다<sup>1,2)</sup>. viomycin 과 구조가 거의 같은 [<sup>14</sup>C] tuberactinomycin O 가 *E. coli* 의 ribosome 과 결합하는 것이 보고되었다. *E. coli* ribosome 은 large ribosomal subunit 에 하나, small ribosomal subunit 에 하나씩 두 개의 major binding site 를 갖고 있다. 또 [<sup>14</sup>C] tuberactinomycin O 의 결합은 viomycin 에 의해 길항작용을 나타내므로 이 두 항생물질은 ribosome 위에 같은 binding site 를 갖고 있다고 추측할 수 있다<sup>3)</sup>.

Yamada 등은<sup>4,5)</sup> *Mycobacterium smegmatis* 의 viomycin 내성에 관한 연구에서 viomycin 내성

은 세균 ribosome의 small subunit의 변화에 기인하는 것과 large ribosomal subunit의 변화에 유래하는 것이 있음을 밝혀냈다. 저자는 *M. smegmatis*의 viomycin 감수성 및 내성 균주에서 ribosome 및 ribosomal subunit를 분리 정제하여 *in vitro* initiation complex 형성, polypeptide 생합성, peptidylt RNA의 translocation에 대한 viomycin의 영향을 검토하였다. 또 [ $^{14}\text{C}$ ] tubercactinomycin O와 ribosome 및 ribosomal subunit과의 결합을 실험하였다. 그 결과 viomycin 내성의 ribosomal subunit가 감수성의 pair ribosomal subunit의 결합에 영향을 미침을 알게 되었다.

## 실 험

**실험 균주**—실험에 사용한 *Mycobacterium smegmatis* R-15, R-31 및 R-43 균주는 일본 Kyushu 시에 있는 University of Occupational and Environmental Health의 Yasuo Mizuguchi 박사에게 의해 제공된 것이다. R-15 균주는 viomycin 감수성 (MIC  $5\mu\text{g}/\text{ml}$ )이고, R-31(vic A) 균주는 viomycin 내성 (MIC  $300\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로서 변화된 large ribosomal subunit를 갖고 있다. 또한 R-43(vic B) 균주도 viomycin 내성 (MIC  $100\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 변화된 small ribosomal subunit를 갖고 있다. **시약**— [ $^{14}\text{C}$ ] phenylalanine (522 mCi/m mole), [ $^{14}\text{C}$ ] leucine (354 mCi/m mole) 및 [ $^3\text{H}$ ] methionine (5.5 Ci/m mole)은 영국의 Radiochemical Centre에서 구입하였다. phosphoenolpyruvate GTP, ATP, pyruvate kinase, poly [U] 및 *E. coli* tRNA는 독일 Boehringer Mannheim의 제품을 사용하였다. poly [AUG]는 미국의 Miles Lab.의 것을 사용하였고, 기타 시약은 시판 특급을 사용하였다.

**균의 배양**—증류수 1 l 당 beef extract 10 g, polypeptone 10 g, NaCl 2 g, glycerine 40 ml를 용해시킨 후, 1N NaOH로 pH 7.0으로 조절한 배지를 사용하여, *M. smegmatis* 균주를  $37^\circ\text{C}$ 에서 72시간 전배양하고, 30 l jar fermentor에 15 l의 동일 배지를 사용하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 본배양하였다.

**S-30 Fraction, S-100 Fraction, Ribosome 및 Ribosomal Subunits의 제조**—Ohta 등의 방법<sup>6)</sup>을 주로 해서 분리 정제하였다. 대수증식기에 수확한 *M. smegmatis* 균체를 buffer I (10mM Tris-HCl, pH 7.8, 80mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 10mM magnesium acetate 6mM 2 mercaptoethanol) 2배량에 현탁시켜 sonicator를 사용하여  $4^\circ\text{C}$ 의 저온실에서 10분간에 걸쳐 분쇄하였다. 이것을  $20,000\times g$ , 20분간 원심분리하여 균 파편을 제거하고, 상등액을 취해 다시  $27,000\times g$  30분간 2회 원심분리하여 조 추출액을 얻었다. 이것을 S-30 fraction으로 사용하였다. 이 S-30 fraction을 다시  $105,000\times g$  (Beckman, Type 40 rotar 40,000 rpm)로 3시간 초원심분리하여 상등액을 S-100 fraction, 침전을 조 70S ribosome으로 사용하였다. 70S ribosome을 정제하기 위하여 buffer II (1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 20mM Tris-HCl, pH 8.1, 40mM magnesium acetate, 10mM 2-mercaptoethanol, 2mM EDTA)에 현탁시켜 하루밤 가볍게 교반한 후,  $105,000\times g$ 로 초원심분리하여 침전을 취하였으며, RNase를 제거하기 위하여 0.5M LiCl 함유 buffer (10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM magnesium acetate, 6mM 2-mercaptoethanol,  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  polyvinylsulfate)로 세척하였다<sup>7)</sup>.

30S 및 50S ribosomal subunit의 분리 조제는 다음과 같이 하였다. 70S ribosome을 buffer III (10mM Tris-HCl, pH 7.8, 80mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 1mM magnesium acetate, 6mM 2-mercaptoethanol)에 현탁시켜 동일 buffer에 대해 3시간 투석한 후 같은 buffer를 사용한 10~30% sucrose

density gradient에 얹어, Beckman SW 27 rotar를 사용하여 20,000 rpm, 15시간 원심분리하였다. 이것을 Hitachi社의 density gradient fraction collector를 사용하여 30S subunit fraction과 50S subunit fraction을 각각 모은 후  $Mg^{2+}$ 를 20 mM로 높혀  $105,000 \times g$ 로 15시간 원심분리하여 생긴 침전을 buffer I로 현탁하여 사용하였다.

**Initiation Factors, Elongation Factor G, N-Acetyl-[ $^{14}C$ ]phenylalanine-tRNA, [ $^3H$ ] fMet-tRNA**—initiation factors의 제조는 Ohta의 방법을 따랐다. N-acetyl-[ $^{14}C$ ] phe-tRNA는 Haenni 및 Chapevill의 방법<sup>8)</sup>에 준하여 제조하였으며, elongation factor G는 Nishizuka 등의 방법<sup>9)</sup>에 따라 분리 정제하였다. [ $^3H$ ] fMet-tRNA는 Hershey 및 Thach의 방법<sup>10)</sup>에 의해 제조하였다.

**[ $^{14}C$ ] Tuberactinomycin O의 제조<sup>11)</sup>**—tuberactinomycin O 15mg과 동량의 [ $^{14}C$ ] urea를 0.3ml의 3N HCl에 용해시킨 후, 실온에서 40일간 반응시켰다. 반응완료 후 Sephadex G 10 column chromatography를 행하여 정제하였다. 이렇게 해서 얻은 [ $^{14}C$ ] tuberactinomycin O는 paper chromatography(acetone: 10% ammonium acetate: 10% ammonia water=30:9:1)에서 단일 spot를 나타냈으며 specific activity는 15.0 Ci/mol이었다(Fig. 1).

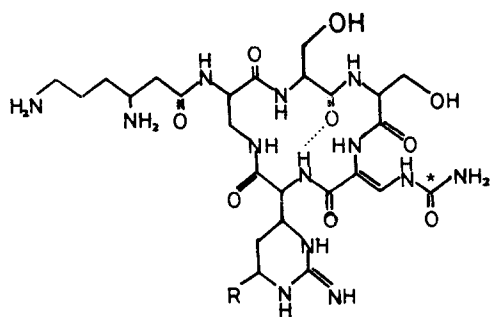


Fig. 1—Chemical structure of viomycin and tuberactinomycin O. Viomycin: R=OH, Tuberactinomycin O: R=H.

\*The asterisk represents the position, labeled with radioactive carbon atom.

후 2ml의 냉 5% trichloroacetic acid를 넣어 반응을 정지시키고, 90°C에서 20분간 가열하였다. glass filter(Whatman GF/C)을 사용하여 여과하였다. 2ml의 5% TCA로 3회 세척한 후, glass filter를 건조시켜, glass filter 위의 방사능을 liquid scintillation counter(Beckman LS 230)을 사용하여 측정하였다. poly [U]의 존생 [ $^{14}C$ ] phenylalanine incorporation의 경우는 [ $^{14}C$ ] leucine의 incorporation 반응계에서 amino acid mixture와 [ $^{14}C$ ] leucine을 빼고 그 대신 20 $\mu$ g의 poly [U]와 [ $^{14}C$ ] phenylalanine 0.04 $\mu$ ci를 넣어 반응시켰다.

2) 70S initiation complex 형성에 대한 viomycin의 영향 : 반응액 100 $\mu$ l 안에 50mM Tris-HCl, pH7.8, 40 mM  $NH_4Cl$ , 6 mM 2-mercaptoethanol, 6 mM  $Mg(OAc)_2$ , 0.4 mM GTP, 10  $\mu$ g poly[AUG], 60  $\mu$ g protein의 initiation factors, 140  $\mu$ g의 washed 70S ribosome, 7.2  $\mu$ g [ $^3H$ ] fMet-tRNA 및 항생물질을 넣어 30°C에서 10분간 반응시킨 후 2 ml의 washing buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 60mM  $NH_4Cl$ , 10mM magnesium acetate, 6mM 2-mercaptoethanol)을 넣어 반응을 중지시키고, Millipore filter(HA, pore 0.45 $\mu$ m)을 사용하여 여과하였다. 2.5ml의

**실험 방법**—1) Cell free계 polypeptide synthesis에서 viomycin의 영향 : endogenous mRNA에 의한 [ $^{14}C$ ] leucine의 incorporation 및 poly [U]에 의한 [ $^{14}C$ ] phenylalanine incorporation은 Nirenberg의 방법<sup>12)</sup>을 약간 변형해서 실시하였다. endogenous mRNA에 의한 [ $^{14}C$ ] leucine의 incorporation의 경우 반응액 200 $\mu$ l 안에 50mM Tris-HCl, pH7.8, 40 mM  $NH_4Cl$ , 6mM 2mercaptoethanol, 10mM  $Mg(OAc)_2$ , 2mM ATP, 5mM phosphoenolpyruvate, 4 $\mu$ g pyruvate kinase, 0.1mM GTP, 0.05mM amino acid mixture(-Leu), 20 $\mu$ g *E. coli* tRNA, protein 3mg의 S30 fraction, [ $^{14}C$ ] leucine 0.1  $\mu$ ci 및 항생물질을 넣은 후, 37°C에서 45분간 incubation 시킨

냉 washing buffer 로 3 회 세척한 후, Millipore filter 를 건조시켜 Millipore filter 위의 방사능을 측정하였다.

3) Peptidyl transferase 반응 및 peptidyl-tRNA 의 translocation 에 대한 viomycin 의 영향 : 100 $\mu$ l 의 반응액에 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 15 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM dithiothreitol, 10  $\mu$ g poly[U], 44 $\mu$ g N-acetyl [<sup>14</sup>C] phe-tRNA 및 washed ribosome 2 A<sub>260</sub> unit 를 넣고, 37°C 에서 60분간 incubation 시켰다. 시험관을 빙냉시킨 후, 2군으로 나누어 1군에는 항생물질만을 추가하고 2군에는 200 $\mu$ g 의 EF-G, 0.2mM GTP 및 항생물질을 추가한 후 37°C 에서 10분간 더 반응시켰다. 다음 각 시험관에 0.45mM puromycin 을 넣고 0°C 30분간 반응시켰다. 0.1M sodium acetate, pH 5.5 1 ml 을 넣어 반응을 중지시키고 1.5 ml 의 ethylacetate 로 추출하여 ethylacetate 층의 방사능을 Bray's scintillator 을 넣어 측정하였다.

hybrid ribosome 인 경우에는 같은 반응계에서 washed ribosome 대신 1.4 A<sub>260</sub> unit 의 50S ribosomal subunit 와 0.7 A<sub>260</sub> unit 의 30S subunit 를 넣어 반응시켰다.

4) [<sup>14</sup>C] Tuberactinomycin O 와 ribosomal particle 의 결합 : Millipore filter 방법으로 실시하였다. 100 $\mu$ l 의 반응액에 10mM Tris-HCl, pH7.8, 10mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 30mM NH<sub>4</sub>Cl, 6mM 2-mercaptoethanol, 1 $\mu$ g polyxynylsulfate, 1 $\mu$ M ribosome 또는 ribosomal subunit 및 0.2~25 $\mu$ M [<sup>14</sup>C] tuberactinomycin O 을 넣고 30°C 에서 5분 반응시키고, 1ml 의 냉 washing buffer 로 반응을 중지시키고, Millipore filter 를 사용하여 여과하고 filter 위의 방사능을 측정하였다.

## 결 과

**Cell-free Poly 계 Peptide Synthesis 에 대한 Viomycin 의 영향**—*M. smegmatis* R-15, R-31, R-43의 세 균주의 균체에서 S30 fraction 을 조제하여 cell-free 계 polypeptide biosynthesis 반응을 행하고 viomycin 의 영향을 보았다. viomycin 감수성 균주인 *M. smegmatis* R-15에서 조제한 S30 fraction 을 사용한 cell-free 계 즉 endogenous mRNA 에 의한 [<sup>14</sup>C] leucine incorporation 및 poly [U] 의존성 [<sup>14</sup>C] phenylalanine incorporation 이 viomycin 에 의해 강하게 억제되었다. 개략적인 50% inhibition 은 0.2~0.4 $\mu$ M 의 농도에서 나타났다. 이에 반하여 *M. smegmatis* R-

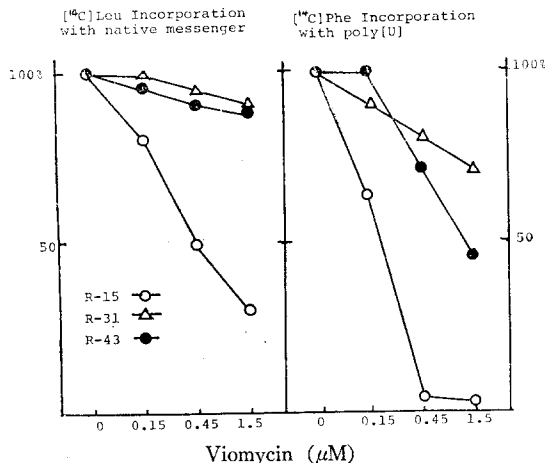


Fig. 2—The effect of viomycin on protein synthesis

31 및 R-43균주에서 조제한 S30 fraction 을 사용한 cell free 계의 경우 0.15~1.5 $\mu$ M 의 viomycin 농도 범위내에서는 viomycin 의 영향이 미약하였다. 이 결과는 viomycin 내성이 단백질 생합성 과정에 관여되어 있음을 의미하는 것이다(Fig. 2).

Table I 에 재구성 hybrid ribosome 을 사용한 poly[U] 의존성 [<sup>14</sup>C] phenylalanine incorporation 에 대한 viomycin 의 영향을 표시하였다. R-15의 30S ribosomal subunit 와 R-15의 50S subunit 로 된 재구성 ribosome 계에서 [<sup>14</sup>C] phenylalanine incorporation 은 viomycin 에 의해 억제되었다. 이에 반하여 R-31 의 50S ribosomal subunit 을 포함한 재구성

Table I—The effect of viomycin on polyphenylalanine synthesis on hybrid ribosomes

Source of hybrid ribosomes		Viomycin ( $\mu\text{M}$ )			Sensitivity to viomycin
30S	50S	0	0.45	1.5	
R-15	R-15	100 (3088 cpm)	49	30	S
R-31	R-31	100 (3270)	104	100	R
R-31	R-15	100 (2401)	57	39	S
R-15	R-31	100 (4000)	104	86	R
R-43	R-43	100 (5400)	90	61	R
R-43	R-15	100 (3750)	80	63	R
R-15	R-43	100 (4354)	57	39	S

hybrid ribosome 계에서는 viomycin의 영향이 미약하였다. 또 R-43의 30S ribosomal subunit를 포함한 재구성 hybrid ribosome 계에서도 viomycin의 영향이 미약하였다. 이 결과 R-31의 내성은 50S ribosomal subunit에 기인하며, R-43의 내성은 30S ribosomal subunit에 기인하는 것이 확인되었다(Table I).

**70S Initiation Complex 형성에 대한 Viomycin의 영향**—*E. coli*의 *in vitro* initiation complex 형성은 viomycin에 의해 f2 RNA 또는 poly[AUG] 의존성 70S initiation complex 형성뿐만 아니라, 30S initiation complex 형성도 억제된다고 보고되어 있다<sup>11</sup>. *M. smegmatis*이 *in vitro* initiation complex에 대한 viomycin의 영향을 Table II에 표시하였다. R-15의 *in vitro* 70S initiation complex 형성이 viomycin에 의해 억제되었으나 R-31 및 R-43의 *in vitro* 계에서는 viomycin에 의한 억제가 미약하였다.

#### Peptidyl Transferase 반응 및 Peptidyl-tRNA

의 **Translocation에 대한 Viomycin의 영향**—EF-G 및 GTP가 존재하지 않는 ribosome 계에서 행해지는 N-acetylphenyl alanine-puromycin synthesis를 peptidyl transferase 반응의 model system으로 하여 그에 대한 viomycin의 영향을 검토하였다. Table III에서 알 수 있는 바와 같이 R-31 및 R-43 균주의 ribosome 계에서 뿐만아니라 viomycin 감수성의 R-15의 ribosome 계에서도 이 puromycin 반응은 viomycin에 의해 영향을 받지 않았다. 동시에 행한 실험에서 peptidyl transferase 반응의 억제제인 blasticidin S에 의해서는 이 puromycin 반응이 강력히 억제되었다<sup>13</sup>.

EF-G와 GTP를 첨가함으로써 증가되는 puromycin 반응을 이용하여 peptidyl-tRNA가 acceptor site에서 donor site에 전위하는 반응에 대한 viomycin의 영향을 검토하였다<sup>14</sup>. 증가된 puromycin 반응은 R-15의 ribosome 계에서 뿐만아니라 R-31 및 R-43의 ribosome 계에서도 fusidic acid에 의해 강하게 억제되었다. 또한 R-15의 ribosome 계에서 증가된 N-acetylphenylalanine-puromycin 합성이 viomycin에 의해 강하게 억제되었으며 개략적인 50% inhibition은 0.4  $\mu\text{M}$

Table II—The effect of viomycin on initiation complex formation: i. e. [<sup>3</sup>H] fMet-tRNA binding to 70S ribosomes with poly[AUG]

Antibiotics	<i>M. smegmatis</i> strains		
	R-15	R-31	R-43
None	100 (3852 cpm)	100 (5053)	100 (2845)
Viomycin 1.5 $\mu\text{M}$	75	91	101
15	40	83	98
150	17	52	83
Streptomycin 100	60	63	56
Kasugamycin 100	61	60	45

**Table III**—Effects of viomycin on peptidyl transfer and translocation of peptidyl-tRNA on ribosomes, derived from viomycin-sensitive and -resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*.

<i>Mycobacterium smegmatis</i> strains	Antibiotics	Ac-Phe-puromycin formation			Translocation of peptidyl-tRNA	
		-EF-G, cpm	GTP %	+EF-G, GTP cpm	cpm	%
R-15 (sensitive to viomycin)	None	960	100	1,943	983	100
	Viomycin 0.15 $\mu$ M	880	92	1,631	751	76
	1.5	756	79	882	126	13
	15.	779	81	815	36	4
	Fusidic acid 0.19mM	892	93	1,167	275	28
	Blasticidin S 0.24mM	212	22			
R-31 (viomycin-resistant alteration on the large ribosomal subunit)	None	667	100	1,450	783	100
	Viomycin 0.15 $\mu$ M	702	105	1,468	766	98
	1.5	636	95	1,348	712	91
	15.	583	87	1,408	825	105
	Fusidic acid 0.19mM	662	99	937	275	35
	Blasticidin S 0.24mM	172	27			
R-43 (viomycin-resistant alteration on the small ribosomal subunit)	None	686	100	1,354	668	100
	Viomycin 0.15 $\mu$ M	704	102	1,322	618	93
	1.5	689	100	1,346	657	98
	15.	556	81	1,185	629	94
	Fusidic acid 0.19mM	680	99	780	100	15
	Blasticidin S 0.24mM	171	25			

viomycin의 농도에서 나타났다. 이에 반하여 R-31 및 R-43의 ribosome 계에서는 증가된 puromycin 반응이 viomycin에 의해 억제되지 않았다. 이 결과는 large subunit 내성인 R-31의 ribosome 계에서 뿐만 아니라 small subunit 내성인 R-43의 ribosome 계에서도 peptidyl-tRNA의 translocation이 viomycin 내성임을 나타내는 것이다(Table III).

**재구성 Hybrid Ribosome 계에서 Peptidyl-tRNA의 Translocation에 대한 Viomycin의 영향**  
—R-15, R-31 및 R-43 균주에서 분리정제된 ribosomal subunit로 재구성된 hybrid ribosome 계를 사용하여 translocation에 대한 viomycin의 영향을 보았다. EF-G와 GTP에 의해 증가되는 puromycin 반응이, R-15의 30S subunit와 R-15의 50S subunit로 재구성된 ribosome 계에서 뿐만 아니라, R-43의 50S subunit와 R-15의 30S subunit로 구성된 hybrid ribosome 계 및 R-31의 30S subunit와 R-15의 50S subunit로 재구성된 hybrid ribosome 계에서도 viomycin에 의해 현저하게 억제되었으며, 이 항생물질에 대해 감수성임을 나타내고 있다. 이에 반하여 R-31의 50S subunit을 포함하고 있는 재구성 ribosome 계 및 R-43의 30S subunit를 함유한 재구성 ribosome 계에서는 viomycin에 의해 puromycin 반응이 영향을 받지 않았다. 이 결과는 peptidyl-tRNA의 translocation 내성이 R-31의 ribosome의 large subunit 또는 R-43의 ribosome의 small subunit에 기인함을 의미하며, 내성 subunit와 감수성 pair subunit로 재구성된 ribosome은 그 ribosomal subunit가 감수성 균주에서 분리되었거나 또는 내성 균주에서 분리되었거나 관계없이 viomycin에 대해 내성임을 나타내고 있다(Table IV).

Table IV—The effect of viomycin on translocation of peptidyl-tRNA on hybrid ribosomes.

Source of ribosomal subunits		Viomycin $\mu\text{M}$	Ac-Phe-puromycin synthesis enhanced by EF-G and GTP		Sensitivity to viomycin
30S	50S		cpm	%	
R-15	R-15	0	1,065	100	sensitive
		0.15	503	47	
		1.5	137	13	
R-31	R-31	0	2,457	100	resistant
		0.15	2,498	102	
		1.5	2,342	95	
R-31	R-15	0	1,372	100	sensitive
		0.15	773	56	
		1.5	69	5	
R-15	R-31	0	2,096	100	resistant
		0.15	2,130	102	
		1.5	1,957	39	
R-43	R-43	0	1,235	100	resistant
		0.15	1,198	97	
		1.5	1,106	90	
R-43	R-15	0	752	100	resistant
		0.15	736	98	
		1.5	602	80	
R-15	R-43	0	1,737	100	sensitive
		0.15	1,175	68	
		1.5	512	30	

[ $^{14}\text{C}$ ] Tuberactinomycin O와 감수성 및 내성 Ribosomal Particle의 결합—*M. smegmatis*의 viomycin 감수성 및 내성 균주에서 ribosome 및 ribosomal subunit를 분리 정제하여, viomycin 유사 항생물질인 [ $^{14}\text{C}$ ] tuberactinomycin O와의 결합반응을 Millipore filter method를 이용하여 검토하였다. 사용한 항생물질의 농도범위는 0.2~25 $\mu\text{M}$ 이었다. association constant와 binding site를 결정하기 위하여 binding data를 equilibrium binding에 대한 Scatchard equation  $r/A=Kn-Kr$ 에 따라 plot하였다. 이 식에서 r은 ribosomal particle 1 mole에 대해 결합한 [ $^{14}\text{C}$ ] tuberactinomycin O의 mole 수, A는 결합하지 않은 free [ $^{14}\text{C}$ ] antibiotic의 molar 농도, K는 association constant, n은 binding site의 수를 각각 표시한다. [ $^{14}\text{C}$ ] tuberactinomycin O가 ribosomal particle에 결합할 때, 항생물질의 농도 의존성을 Fig. 3에 표시하였다. R-15의 ribosome의 경우, 결합반응에서 ribosome의 농도를 1 $\mu\text{M}$ 로 고정하였을 때, 1 $\mu\text{M}$ 의 항생물질 농도에서 1 mole의 ribosome에 대해 0.23 mole의 [ $^{14}\text{C}$ ] tuberactinomycin O가 결합하였으며 8 $\mu\text{M}$ 의 항생물질 농도에서 0.9mole의 항생물질이 1 mole의 ribosome과 반응하였다. Table V에 표시된 것처럼 Scatchard plot에 의해, R-15의 ribosome은 대략  $4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ 의 association constant( $K_a$ )를 갖는 한개의 binding site와 적어도 한 개의 친화성이 낮은 binding site를 더 갖고 있음을 알 수 있다. 반면 내성 ribosome(R-31 및 R-43)에는 [ $^{14}\text{C}$ ] tuberactinomycin O의

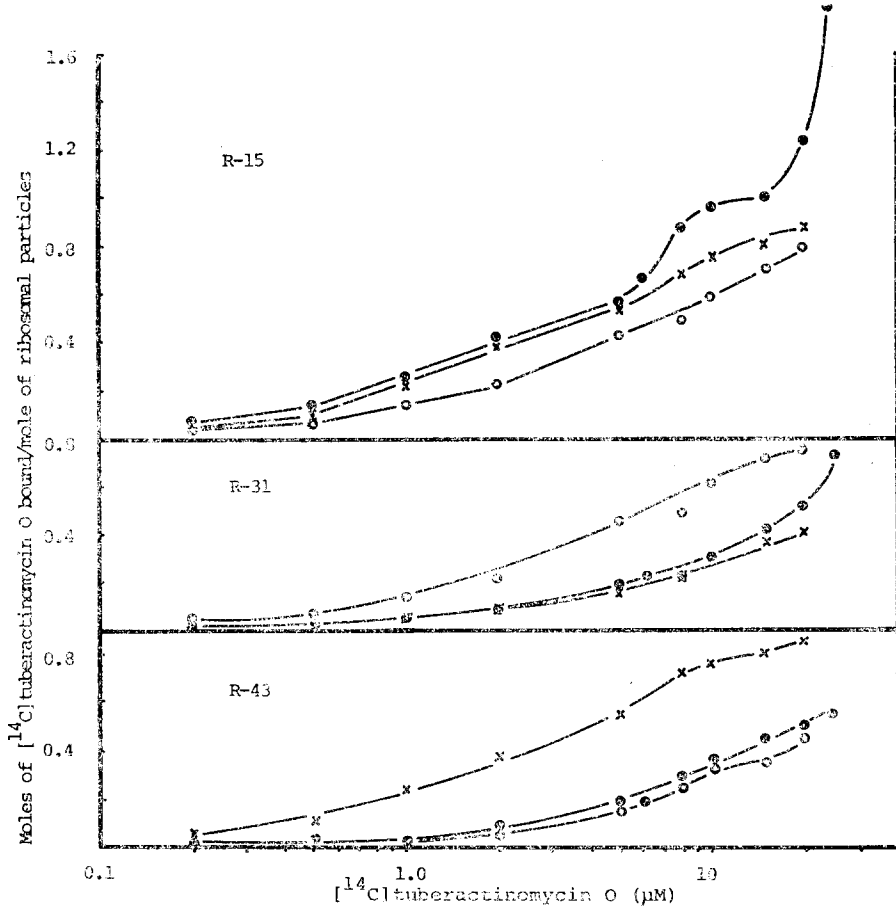


Fig. 3—The binding of  $[^{14}\text{C}]$  tuberactinomycin O to ribosomal particles, derived from viomycin-sensitive and -resistant strains of *Mycobacterium smegmatis*. ●—● ribosomes, ×—× the large ribosomal subunit, ○—○ the small ribosomal subunit.

결합량이 적었다. 즉  $8\ \mu\text{M}$ 의 항생물질 농도에서  $0.22\sim 0.3$  mole의 항생물질이 1 mole의 ribosome에 결합하였다. R-31과 R-43의 ribosome은 각각  $K_a\ 4.4\times 10^4$  및  $5.0\times 10^4\ \text{M}^{-1}$ 의 주 binding site를 갖고 있으며, 이 association constant는 R-15의 ribosome의  $K_a$ 의 약 1/10에 해당하였다. 이 결과는 내성 ribosome은 감수성 ribosome에 비해 viomycin과의 결합이 약함을 의미하고 있다.

R-31의 large ribosomal subunit는 R-15 및 R-43의 large subunit에 비해 이 항생물질에 대해 친화성이 약했다. 이것은 R-15 및 R-43의 large subunit가 감수성에 대해, R-31의 large subunit가 내성임을 나타낸다. 한편 small ribosomal subunit의 결합에 있어서, R-15와 R-31의 small subunit는 R-43의 small subunit에 비해 높은 친화성을 나타내었다. 이 결과는 앞의 두 subunit가 감수성이며 뒤의 subunit가 내성임을 의미하고 있다. 이러한 결과는 viomycin 내성은 ribosomal subunit에 대한 항생물질의 친화성이 낮음에 기인함을 표시하는 것이며 또한 내성 subunit가 감수성의 pair subunit의 결합 능력에 현저하게 영향을 주고 있음을 의미한다 (Table V).



**Table V**—Association constants ( $K_a$ ) obtained from the Scatchard plots of data for binding of [ $^{14}$ C] tuberactinomycin O to the ribosome or ribosomal subunits.

Ribosomal particles	<i>Mycobacterium smegmatis</i> strains		
	R-15	R-31	R-43
Ribosome	$4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$	$4.4 \times 10^4$	$5.0 \times 10^4$
Large subunit	$3.4 \times 10^5$	$4.6 \times 10^4$	$3.5 \times 10^5$
Small subunit	$1.9 \times 10^5$	$1.8 \times 10^5$	$5.1 \times 10^4$

## 고 찰

*Mycobacterium smegmatis* 균주를 사용하여 cell free 계로 viomycin의 내성기전 및 작용기전에 대하여 검토하였다. viomycin은 대장균의 cell free 계에서는 감수성이긴 하지만, *in vivo*에서는 내성이므로, viomycin의 내성기전 및 작용기전을 연구하는데는 *in vivo*에서도 감수성이 강한 *Mycobacterium* 속 균주를 사용하는 것이 보다 합리적이라고 사료된다. Liou 등의<sup>13)</sup> f2 RNA를 mRNA로 하고 *E. coli*의 S-30 fraction을 사용한 [ $^{14}$ C] leucine incorporation 및 poly [U] 의존성 [ $^{14}$ C] phenylalanine incorporation에서 50% inhibition은 각각 viomycin 4  $\mu\text{M}$  및 30  $\mu\text{M}$ 였다. 이에 반하여 endogenous mRNA와 *M. smegmatis* R-15의 S-30 fraction을 이용한 [ $^{14}$ C] leucine incorporation 및 poly [U] 의존성 [ $^{14}$ C] phenylalanine incorporation에서는 50% inhibition viomycin 0.2~0.4  $\mu\text{M}$ 이었다. 이 점은 *in vivo* 감수성균에서 조제한 cell free 계에서보다 감수성임을 의미하고 있다.

poly [AUG]의존성 70S initiation complex형성은 *E. coli*의 경우와 *M. smegmatis*의 경우에서 viomycin에 의한 50% inhibition이 각각 12  $\mu\text{M}$  및 8  $\mu\text{M}$ 로 큰 차이가 없었다. 한편 peptidyl-tRNA의 A site에서 P site로의 translocation에 대한 viomycin의 영향에서는 *E. coli*계나 *M. smegmatis*계 모두 50% inhibition이 약 0.4  $\mu\text{M}$ 로 차이가 없었으며, translocation 억제제 initiation 억제제보다 주 작용점이란 것을 나타내고 있다.

*M. smegmatis*의 R-31과 R-43균주의 viomycin 내성은 large ribosomal subunit 또는 small subunit의 변이에 의한 것이 확인되었다. 감수성인 large subunit 또는 감수성인 small subunit에 대한 이 항생물질의 결합이 내성 pair ribosomal subunit에 의해 극적인 영향을 받고 있어 70S ribosome이 되었을 때, 감수성 subunit의 결합능도 저하되었다. 두 ribosomal subunit 상호간의 간섭의 원인에 대해서는 더 연구가 필요하다. 그렇지만 ribosome 전체의 conformation의 변화, 또는 binding site를 막음으로써 또는 양자에 의해서, 항생물질에 대한 ribosome의 친화성이 감소된다는 것을 생각할 수 있다. erythromycin 내성 및 cycloheximide 내성의 경우 유사한 현상이 보고된 바 있다. 즉 Saltzman과 Apirion은<sup>15)</sup> large ribosomal subunit에 대한 erythromycin 결합이 erythromycin이 직접 결합하지 않는 small subunit의 변화에 의해서 영향을 받음을 보고하고 있으며, Sutton 등<sup>16)</sup>은 *Tetrahymena thermophila*의 cycloheximide 내성이 60S ribosomal subunit 또는 40S ribosomal subunit의 변화에 의해 생김을 보고하고 있다. 이러한 것으로 미루어 볼 때 ribosomal subunit 상호간의 간섭에 의해 ribosome 전체가 어떤 항생물질에 대한 친화성이 약화되고 그 결과 내성화된다고 사료된다.

이 연구를 지도해주신 東京大學 應用微生物研究所 田中信男 教授님과 항상 격려하여 주신 서울大學校 藥學大學 金炳珏 教授님께 깊은 감사의 뜻을 표하는 바이다.

## 문 헌

1. Y-F. Liou and N. Tanaka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 477(1976).
2. J. Modollel and D. Vazquez, *Eur. J. Biochem.*, **81**, 491(1977).
3. M. Misumi, N. Tanaka and T. Shiba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 971(1978).
4. T. Yamada, K. Masuda, K. Shoji and M. Hori, *J. Bact.*, **112**, 1(1972).
5. T. Yamada, K. Masuda, Y. Mizuguchi and K. Suga, *Antimicrob. Ag. Chemother.*, **9**, 817(1976).
6. T. Ohta, S. Sarker and R.E. Thach, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **58**, 1638(1967).
7. F. Dohme and K.H. Nierhaus, *J. Mol. Biol.*, **107**, 585(1976).
8. A.L. Haenni and F. Chapeville, *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 135(1966).
9. Y. Nishizuka, F. Lipmann and J. Lucas-Lenard, *Methods in Enzymology* **12B**, 708, Academic Press, New York, **1968**.
10. J.W.B. Hershey and R.E. Thach, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **57**, 759(1967).
11. S. Nomoto, T. Teshima and T. Shiba, *J. Antibiotics*, **31**, 792(1978).
12. M.W. Nirenberg, *Methods in Enzymology* **6**, 17, Academic Press, New York, **1964**.
13. H. Yamaguchi and N. Tanaka, *J. Biochem. (Tokyo)*, **60**, 632(1966).
14. N. Tanaka, T. Kinoshita and H. Masukawa, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **30**, 278(1968).
15. L. Saltzman and D. Apirion, *Molec. Gen. Genet.*, **143**, 301(1976).
16. C.A. Sutton, M. Ares, Jr. and R.L. Hallberg, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 3158(1978).