

## *Staphylococcus aureus* 에서 분리된 R-plasmid pSBK203 상의 Chloramphenicol acetyltransferase 인자의 염기서열 및 유발성 분석

권동현 · 변우현

강원대학교 자연과학대학 미생물학과

### Nucleotide Sequence and Inducibility Analysis of Chloramphenicol Acetyltransferase Gene from *Staphylococcus aureus* R-plasmid pSBK203

Kwon, Dong Hyeon and Woo-Hyeon Byeon

Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences,  
Kang Weon National University

**ABSTRACT:** The nucleotide sequence of inducible chloramphenicol acetyl-transferase(CAT) gene isolated from a small plasmid pSBK203 of *Staphylococcus aureus* was determined. The base sequence shows that structural gene of pSBK203-CAT encodes a protein of 213 amino acids and has a leader region which encodes a short polypeptide of 9 amino-acids in its upstream.

<sup>35</sup>S]-Methionine labelled CAT gene product in minicell showed almost same mobility with pC194-CAT of which molecular weight is 24Kdal on polyacrylamide gel electrophoresis.

Predicted amino acid sequence of pSBK203-CAT has revealed a high degree of homology with the CATs of pC194 and pC221 than those of *cat-86*, Tn9 and *proteus mirabilis* PM13.

**KEY WORDS** □ nucleotide sequences ; CAT-gene ; *Staphylococcus aureus* plasmid ; minicell

세균의 chlormaphenicol 저항성은 여러종류의 그람양성균과 그람음성균에서 발견되었는데 돌연변이에 의한 rRNA의 염기서열 변화나 ribosome 단백질의 변화에 의한 경우도 보고된바 있지만 (Charles and Timothy, 1985; Sinda *et al.*, 1984) 대부분 chloramphenicol acetyltransferase 유전자의 존재에 기인하는 것으로 보고되고 있다. (Shaw, 1983; Linda *et al.*, 1984).

*Staphylococcus aureus*에서 분리된 plasmid pC194 CAT 유전자의 염기서열이 밝혀진 이래 (Horinouchi and Weiblum, 1982) 지금까지 같은 *S. aureus* plasmid인 pC221 에서 분리된 CAT(Shaw, 1983; Projan *et al.*, 1985)와 pUB112에서 분리된 CAT (Bruckner and Matzura, 1985), *Bacillus pumilus*에서 *Bacillus subtilis*로 clone된 *cat-86*(Harwood *et al.*, 1983) *Proteus mirabilis* PM13의 chromosomal DNA 에서 분리된 CAT(Charles *et al.*, 1985), Tn9의 CAT

(Alton and Vapnek, 1979) 등이 밝혀져 있다.

이들중 특히 그람양성균에 존재하는 CAT의 경우 주로 유발성 발현을 하는것으로 알려져 있으며 이는 pC194-CAT 인자에서 처음 밝혀진바 처럼 구조 유전자 앞부분의 leader sequence가 관여하는 것으로 인식되고 있다. (Byeon and Weisblum, 1984).

본 논문의 plasmid pSBK203-CAT는 *S. aureus* 기원으로서 (Byeon *et al.*, 1986) 약 1.3kb 크기로 *B. subtilis* 내로 clone 된 후 그 염기서열을 결정하였으며 구조유전자는 213개의 아미노산에 해당하는 639개의 염기쌍으로, 또 그 앞부분의 leader 부위는 9개의 아미노산으로 구성된 leader peptide에 해당하는 27개 염기쌍의 open reading fram으로 각각 구성 되어 있었다. 이 pSBK203-CAT의 발현은 다른 그람 양성균 유래의 CAT와 같이 유발성 발현을 하였으며 그 기구에는 leader sequence 부위가 관여하는

본 연구는 1987년도 문교부 기초과학 육성연구비의 지원에 의한 것임.

것으로 짐작된다(Ambulose *et al.*, 1986; Byeon and Weisblum, 1984; Bruckner and Matzura, 1985; Alexieva *et al.*, 1988).

한편 본 논문의 pSBK203-CAT 을 *E. coli* vector 에 재조합시켜 *E. coli*내에서 발현시켰을 때에는 *B. subtilis*내에서와는 달리 지속성 발현을 하는 것으로 나타났는데 이는 지금까지 발표된 여타의 CAT 발현양상과 다른점으로서 그 기구의 차이는 차후 연구될 것이다.

pSBK203-CAT의 염기서열과 아미노산 서열은 같은 *S. aureus* 기원의 pC194-CAT 및 pC221-CAT 의 서열과는 높은 상동성을 나타내는 반면 *Proteus mirabilis* PM13 및 Tn9의 CAT 염기서열들과는 매우 낮은 상동성을 보여주고 있다.

**재료 및 방법**

**균주 및 plasmid**

본 실험에 사용된 균주와 plasmid는 Table 1에 나타난 바와 같다.

**제한효소 및 시약**

재조합 DNA를 구성하기 위한 제한효소 및 T4-DNA ligase 등은 New England Bio Lab에서 구입하여 사용하였고 DNA분리와 정제 및 완충용액에 사용된 시약과 항생제, lysozyme, RNase 등은 Sigma chemical Co. 에서, 배지에 사용된 시약은 Difco Lab에서 각각 구입 사용하였다. DNA 염기서열 분석을 위한 [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP는 Amersham 에서,

DNA sequence kit 및 Klenow fragment 는 New England Bio Lab. 에서, X-gal, IPTG, urea, acrylamide는 Sigma chemical Co. 에서 구입하여 사용하였다.

**전기영동 및 DNA단편 추출**

재조합 DNA 및 DNA단편을 확인하기 위한 agarose gel 전기영동은 Maniatis 등(1982)의 방법에 따라 시행하였으며 agarose gel로부터 DNA단편의 추출은 International Biotec. Inc.의 electroeluter를 사용하였다.

**Minicell 내에서의 CAT 유전자의 발현 확인**

CAT 유전자를 포함하고 있는 재조합 plasmid 에 의해 형질전환된 *B. subtilis* CU403으로부터 Mertens 와 Reeve (1977)의 방법에 따라 sucrose density gradients를 만들어 minicell을 분리하고 minicell 내의 plasmid 유전자 산물의 발현 여부 및 유발성 여부를 확인하기 위하여 Shivakumar 등의 방법(1979)에 따라 chloramphenicol의 전처리(1.5  $\mu$ g/ml) 및 비전처리후 [<sup>35</sup>S]-methionine 이 첨가된 최소배지 1.5ml내에서 minicell을 37 $^{\circ}$ C, 30분간 표지하고 1000g에서 10분간 원심분리 한뒤 다시 0.1ml 의 25% sucrose, 50mM Tris(pH8.0), 1mM EDTA 에 재분산시켰다. 여기에 10 $\mu$ l의 lysozyme 용액 (10mg/ml)을 첨가, 15분간 37 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 100 $\mu$ l의 cracking 용액을 가하여 용균시킨뒤 polyacrylamide gel electrophoresis한후 x-ray film에 노출시켜 autoradiogram을 만들었다.

**Table 1. Bacterial strains and plasmids**

Strain or Plasmid	Relevant genotype or phenotype	Reference or source
<i>S. aureus</i> D-H-1	Cm-r Em-r Km-r Tc-r Ap-r	Byeon <i>et al.</i> (1985)
<i>B. subtilis</i> BD170	thr-5 trpC2	B. Weisblum
<i>B. subtilis</i> CU403	thyA ThyB MetB divIVB1	B. Weisblum
<i>E. coli</i> HB101	F-minus recA13 ara14 proA2 galK2	G. Cooper
plasmids		
pBD9	Km-r Em-r	
pBR322	Tc-r Ap-r	
pSBK203	Cm-r	Byeon <i>et al.</i> (1985)
pTQ16	Em-r Cm-r Km-r	Kwon <i>et al.</i> (1986)
pHW20	Tc-r Cm-r	Kwon <i>et al.</i> (1985)
pBK41	Em-r Ap-r	Kwon <i>et al.</i> (1985)
pBK424	Em-r Ap-r	Kwon <i>et al.</i> (1985)
pHW27	Cm-r Ap-r	Kwon <i>et al.</i> (1985)
pHW33	Cm-r Ap-r	Kwon <i>et al.</i> (1985)
pHW25	Cm-r	Kwon <i>et al.</i> (1985)
pHW29	Em-r Cm-r Ap-r	present study
pHW31	Cm-r Em-r	present study

**DNA염기서열 분석**

DNA염기서열분석을 위한 계획은 Fig. 1과 같다. 이때 만들어진 DNA단편들은 M13mp8, M13mp9 vector 에 subcloning 한후 Sanger 등(1977)의 dideoxy chain termination 방법에 따라 염기서열을 결정하였다.

**결 과**

**pHW29와 pHW31의 구성 및 이들의 *E. coli*와 *B. subtilis*내에서의 발현**

*S. aureus* 균주에서 분리된 plasmid pSBK203상의 chloramphenicol(CAM)저항성인자를 *Bacillus* 내로 cloning하는 첫 단계로서 pBD9을 vector로한 pTQ16을, 그람음성균인 *E. coli*내에서의 발현을 위해서는 pBR322를 vector로 한 재조합 plasmid pHW20을 각각 구성한바 있다. (Kwon *et al.*, 1986). 이들 plasmid 상의 CAM저항성인자의 발현은 pTQ16의 경우 *B. subtilis* 내에서 유발성으로 나타나는데 비해 pHW20은 *E. coli*내에서 지속성 발현을 하였다. 동일 유전자의 두 숙주내에서의 발현양상 차이가 pTQ16과 pHW20에 cloning된 pSBK203절편이 크기 차이 및 이에 따른 조절부위의 포함여부에서 기인 된 것인지를 확인하기 위하여 pTQ16에는 그람음성균에서 복제될 수 있도록 pBR322의 복제 개시부위를, pHW20에는 pSBK203유래의 복제 개시부위를 각각 재조합시켜 pHW29와 pHW31을 만들고 (Fig. 2, Fig. 3 및 Fig. 4) 이들의 *B. subtilis*

와 *E. coli*내에서의 발현양상을 실험한바 두 plasmid 모두 *E. coli* 내에서는 지속성 발현을, *B. subtilis* 내에서는 유발성 발현을 각각 나타내었다. (Fig. 5).

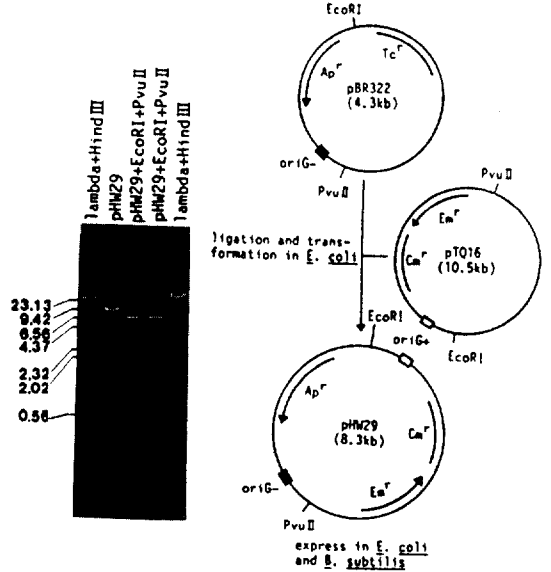


Fig. 2. Construction scheme and agarose gel electrophoresis profile of restriction endonuclease digests of pHW29.

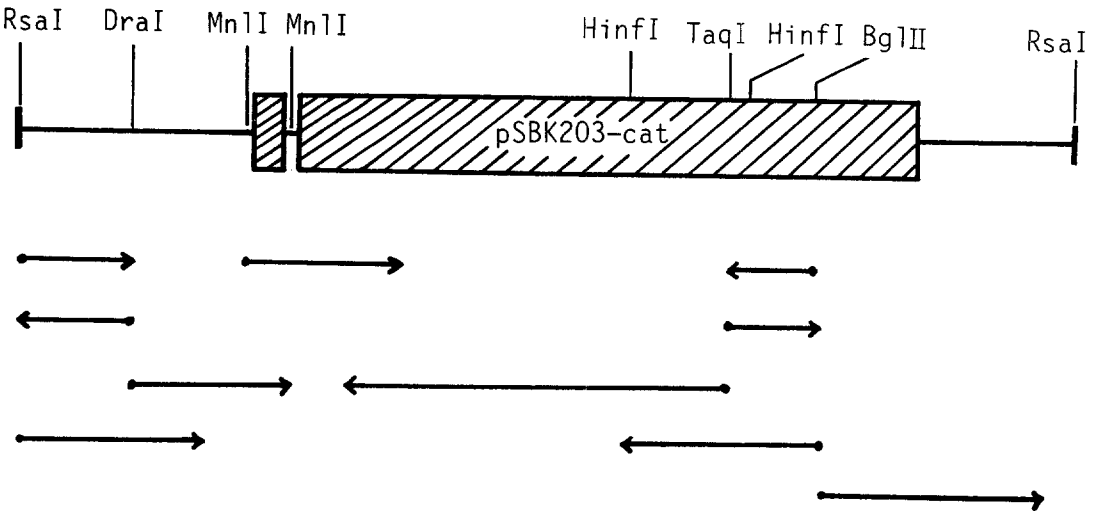


Fig. 1. Sequencing strategy. Cross-hatched box represents ORF of leader peptide and CAT.

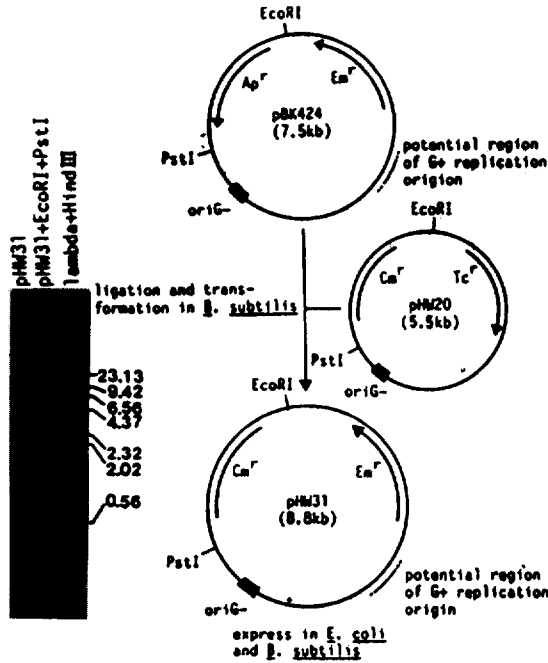


Fig. 3. Construction scheme and agarose gel electrophoresis profile of restriction endonuclease digests of pHW31.

**Minicell을 이용한 CAT유전자 산물 확인 및 CAM에 의한 유발여부 확인**

pSBK203상의 CAT 유전자 산물확인 및 CAM에 의한 유발성 여부를 알아보기 위해 *B. subtilis*의 minicell 생성변이주 CU403을 이용, 이 균주에 i) pSBK203, ii) pC194, iii) pBR322에 pBK203의 CAT 부위와 복제개시 부위를 재조합시킨 pHW25(Kwon *et al.*, 1986)의 세 plasmid를 형질전환 도입시키고 이들 균주로부터 minicell을 분리한 후 Shivakumar등(1979)의 방법에 따라 [<sup>35</sup>S]methionine으로 표지된 세 plasmid 유전자 산물의 autoradiogram을 얻었다. pSBK203-CAT의 크기는 pC194-CAT(24Kdal)와 거의 같은 크기로 나타났으며 CAM을 전처리한 경우 유전자 산물의 생성정도가 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 6).

**염기서열 및 아미노산 서열**

염기서열이 결정된 부위에서 나타난 가장 긴 open reading frame(ORF)은 213개의 codon으로 구성되어 있었으며 이 ORF에 의한 단백질은 24 Kdal에 해당하였다. 또한 예상되는 아미노산 순서도 이미 발표된 CAT의 아미노산서열과 높은 상동성을 갖는 것으로 나타나고 있어 cloning 된 부위는 CAT 부위가 확실한 것으로 믿어진다(Fig. 7).

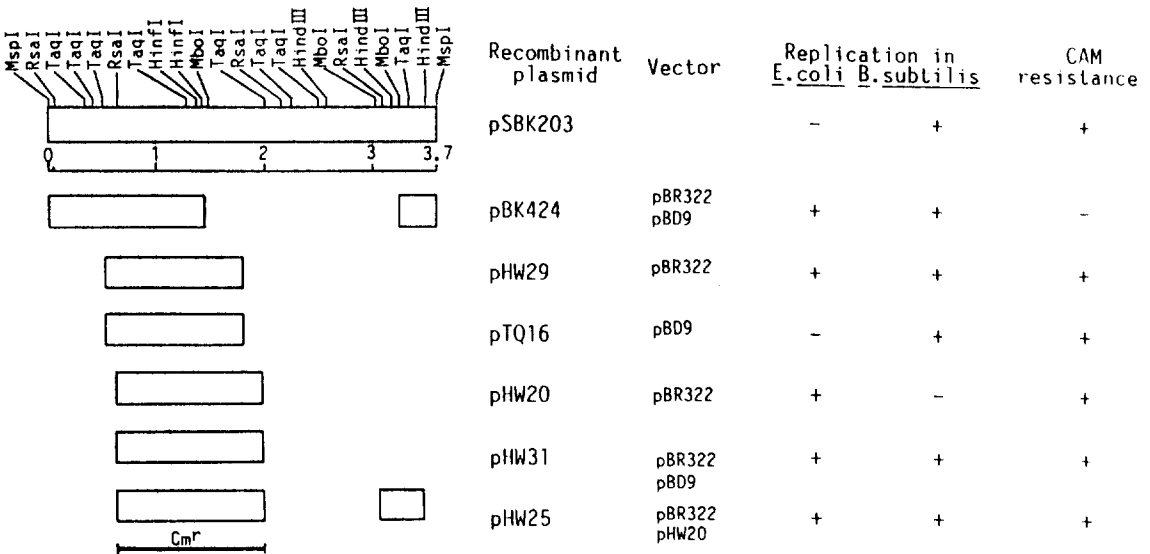


Fig. 4. Schematic diagram summarizing properties of pSBK203 CAT-containing plasmids.

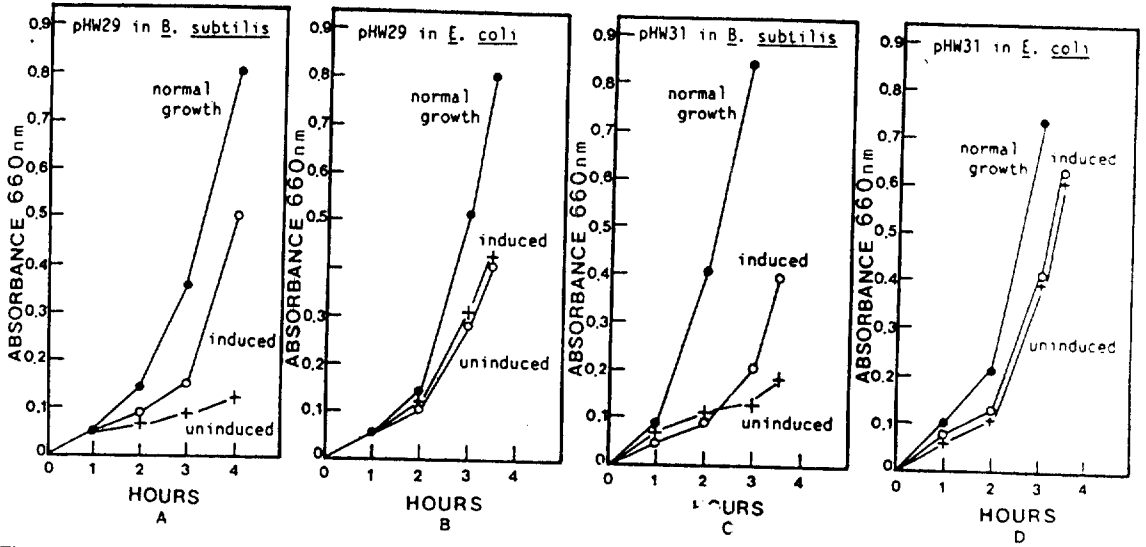


Fig. 5. Inducibility of CAM resistance in *E. coli* and *B. subtilis* carrying pHW29 and pHW31, respectively. An early-logphase culture of four strains induced by addition of 0.5  $\mu$ g/ml of CAM to the growth medium. After incubation for 30min. additional CAM was added to a final concentration of 20  $\mu$ g/ml, and growth was followed by measurement of O.D. at 660nm.

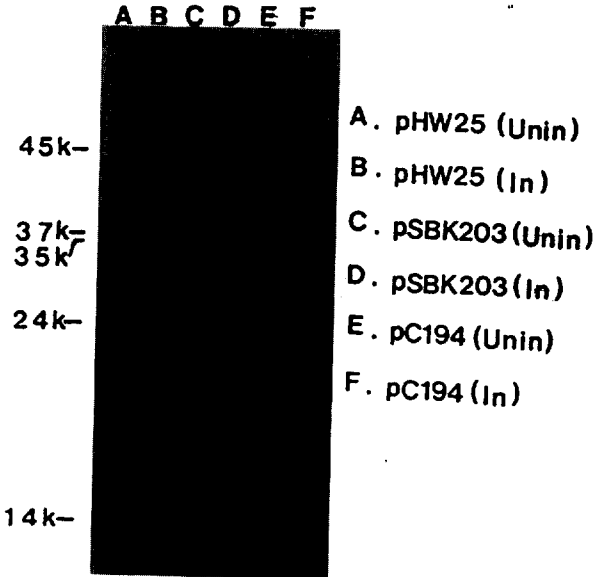


Fig. 6. Protein synthesized by *B. subtilis* CU403 minicell.

고찰

CAT 유전자 산물들의 비교

현재까지 발표된 CAT 유전자들의 아미노산 구성과 pSBK203-CAT의 아미노산 구성은 Fig. 8에서 보는 바와 같으며 이로부터 계산된 아미노산 서열

상의 상동성은 Table 2와 같다. pSBK203 CAT는 같은 *S. aureus* 유래의 plasmid pC194와 pC221 CAT 및 pUB112로부터 분리된 CAT들과 각각 116개(55%), 166개(78%) 및 163개(76%)의 아미노산을 서열상 같은 위치에 존재시키고 있으며 이는 *cat-86*, Tn9 및 *Proteus mirabilis* PM13 CAT와의 상동성인 89개(42%), 82개(38%) 및 83개(39%)에 비해 훨씬 높은 수치를 보이고 있다.

DNA염기서열상의 상동성은 pC194-CAT와는 총 639bp중 419bp(66%)가, pC221-CAT와는 549bp(85%)가 각각 같은 것으로 나타났다. 이는 진화학적 측면에서 같은 *S. aureus* 유래의 CAT-gene 내에서도 pC221과 가장 근연관계가 깊은 것을 암시하여 주고 있다. 또한 본 연구에서 CAT-gene 구조뿐만 아니라 plasmid 구성에 관하여는 pSBK203 전체의 염기서열이 밝혀진 후 분석이 이루어질 것이다.

CAT 유발성 발현

지금까지 알려진 유발성 CAT들인 pC194-CAT, pC221-CAT, pUB112-CAT 및 *cat-86*에서와 마찬가지로 CAT 구조유전자 앞부분에 존재하는 9개의 아미노산으로 구성된 짧은 leader peptide coding sequence와 이 서열을 포함하는 주위 염기서열상의 역방향 반복부위(Inverted Repeated Sequence, IRS)가 pSBK203-CAT의 유발에 관여하는 것으로 알려져 있다(Brückner & Matzura, 1985; Ambulos et.



## 적 요

*S. aureus*에서 분리된 plasmid pSBK203 상의 CAT유전자 염기서열을 결정하였으며 유발성 발현현상이 확인되었다. 염기서열 결과에 의해 예측된 단백질의 아미노산 서열 분석 결과 pC221-CAT와는 78%의 가장 높은 상동성을 나타냈으며 pC194-CAT와는 55%, 그람음성균 유래의 CAT 중 하나인 Tn9-CAT와는 38%의 상동성을 각각 보여주고 있다.

## REFERENCES

1. Alexieva, Z., E. J. Duvall, E.P. Ambulos, U.J.Kim, and P.S. Lovett, 1988. Chloramphenicol induction of *cat-86* requires ribosome stalling at a specific site in the leader. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 3057-3061.
2. Alton, N. K., and D. Vapnek, 1979. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* **282**, 864-866
3. Ambulos, N. P., Jr., E. J. Duvall, and P.S. Lovett, 1986. Analysis of the regulatory sequences needed for induction of the chloramphenicol acetyltransferase gene *cat-86* by chloramphenicol and ampicillin. *J. Bacteriol.* **167**, 842-849.
4. Brückner, R., and H. Matzura, 1985. Regulation of the inducible chloramphenicol acetyltransferase gene of the *Staphylococcus aureus* plasmid pUB112. *EMBO J.* **4**, 2295-2300.
5. Byeon, W.-H., Y.S. Kim, E.H. Cho, D.H. Kwon, H. Z. Lea, and S.J. Hong, 1985. R-plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 282-290.
6. Byeon, W.-H., and B. Weisblum, 1984. Post-transcriptional regulation of chloramphenicol acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **158**, 543-550.
7. Charles, I.G., S. Harford, E.Y. Brookfield, and W.V. Shaw, 1985. Resistance to chloramphenicol in *Proteus mirabilis* by expression of a chromosomal gene for chloramphenicol acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **164**, 114-122.
8. Duvall, E. J., N. P. Ambulos, Jr., and P.S. Lovett, 1987. Drug-free induction of a chloramphenicol acetyltransferase gene in *Bacillus subtilis* by stalling ribosomes in a regulatory leader. *J. Bacteriol.* **169**, 4235-4241.
9. Harwood, C. R., D. M. Williams, and P. S. Lovett, 1983. Nucleotide sequence of a *Bacillus pumilus* gene specifying chloramphenicol acetyltransferase. *Gene* **24**, 163-169.
10. Horinouchi, S., and B. Weisblum, 1980. Posttranscriptional modification of mRNA conformation: Mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7079-7083.
11. Horinouchi, S., and B. Weisblum, 1982. Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible chloramphenicol resistance. *J. Bacteriol.* **150**, 815-825.
12. Kwon, D.H., Y.S. Kim, W.-H. Byeon, 1986. Studies on antibiotics resistance gene in *Staphylococcus aureus* plasmid: Cloning of chloramphenicol resistance determinant. *Kor. J. Microbiol.* **24**, 341-351.
13. Kwon, D.H., J.S. Suk, and W.-H. Byeon, 1987. Cloning of *ori* region of R-plasmid pSBK203 and construction of new shuttle-vectors for *E. coli* & *B. subtilis* using cloned fragments. *Kor. J. Microbiol.* **5**, 262-273.
14. Linda, M.A., T.M. Henkin, G.H. Chambliss, and K.F. Bott, 1984. New chloramphenicol resistance locus in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **158**, 386-388.
15. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning, a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.*
16. Mertens, G., and J. N. Reeve. 1977. Synthesis of cell envelope components by anucleate cells (minicells) of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **129**, 1198-1207.
17. Projan, S. J., J. Kornblum, S.L. Moghazeh, I. Edelman, M.L. Gennaro, and R.P. Novick, 1985. Comparative sequence and functional analysis of pT181 and pC221, cognate plasmid replicons from *Staphylococcus aureus*. *Mol. Gen. Genet.* **199**, 452-464.
18. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
19. Shivarkumar, A.G., J. Hahn, and D. Dubnau, 1979. Studies on the synthesis of plasmid-coded proteins and their control in *Bacillus subtilis* minicells. *Plasmid* **2**, 279-289.
20. Shaw, W.V., 1983. Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *Crit. Rev. Biochem.* **14**, 1-43.

(Received May 22, 1989)