

MLS 계 항생물질 유도 내성 유전자의 크로닝과 유전자의 조절기전 *Streptococcus* sp. TR-1에서 분리한 pMB 4 Plasmid 의 MLS 계 항생물질 유도내성

정순학·곽진환·김희선·심미자*·최응철·김병각
서울대학교 약학대학, *서울시립대학교
(Received March 7, 1990)

Cloning of the MLS Antibiotics Inducible Resistance Gene and Its Control Mechanism Inducible Resistance to MLS Antibiotics of pMB4 Plasmid Isolated from *Streptococcus* sp. TR-1

Soon-Hak Jeong, Jin-Hwan Kwak, Hee-Sun Kim, and Mi-Ja Shim*,
Eung-Chil Choi and Byong-Kak Kim
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742
and Seoul City University*, Seoul 130-743, Korea

Abstract—*Streptococcus* sp. TR-1 which has inducible resistance to MLS antibiotics was isolated from soil samples in Korea. *Streptococcus* sp. TR-1 was cultured in Lysis broth, then a plasmid was isolated by modified Elliker method. *Bacillus subtilis* UOTO277 was transformed with that plasmid. This result showed that the plasmid has the gene relating with inducible resistance to MLS antibiotics. It was named pMB4 and its size was determined about 2.4 Kb by results of digestion with various restriction enzymes. Restriction endonuclease cleavage site map of pMB4 plasmid was made by double digestion of the plasmid. pMB4 plasmid has different restriction endonuclease site map from the other plasmids that have been discovered in *Streptococcus* sp. so far. And it could be identified that pMB4 plasmid does not have homology with ermK of *Bacillus licheniformis* EMR but has homology with ermC of *Staphylococcus aureus* from the results of Southern hybridization.

Keywords □ MLS antibiotics, resistance, gene cloning, *Streptococcus*, pMB4.

Erythromycin(EM)으로 대표되는 macrolide 계 항생물질과 lincomycin으로 대표되는 lincomosamide 계 항생물질은 중범위 항생물질로서, 임상적으로 호흡기 계통의 감염증에 매우 중요하게 사용되고 있다. 이들 항생물질의 작용 기전은 이들이 세균의 large subunit 인 50S ribosome 과 결합함으로써 단백질의 생합성을 저해하는 것으로 밝혀져 있다.^{1,2)} 이들 MLS 계 항생물질에 대해 세균이 내성을 갖게 되는 기전은 세균의 23S rRNA 중 특정 부위의 adenine 이 methylase 에 의해 N6-monomethylation 또는 N6, N6-dimethylation 됨으로써 ribosome 의 conformation 이 변하게 되

고, 따라서 MLS 계 항생물질이 더 이상 ribosome 과 결합할 수 없게 되어 이의 결과로 세균은 내성을 갖게 된다.³⁻⁸⁾ 이것에 의한 내성에는 두 가지의 경우가 있을 수 있는데, 첫째는 세균이 MLS 계 항생물질에 대해 항상 내성을 갖는 본태성 내성 또는 지속성 내성(constitutive resistance)이고, 둘째는 세균이 낮은 농도의 특정 MLS 계 항생물질(대체로 EM 또는 OM)과 접촉한 후에야만 MLS 계 항생물질들에 대해 내성을 갖게 되는 유도내성(inducible resistance)이다.

지속성 내성보다는 유도내성이 분자생물학적 견지에서 더욱 중요하여 유전자 발현기작을 이해하는데

많은 정보를 제공해 주고 있다. MLS계 항생물질에 대한 유도내성기전, 즉 MLS 내성 유전자의 발현조절기전을 보다 명백하게 규명하기 위해서는 ermC 등에서 밝혀진 translational attenuation 기전을 보다 깊게 연구함과 동시에, 내성 기전이 비슷하거나 보다 복잡하리라 예견되는 균주에서 내성과 관련된 methylase 유전자를 cloning 하고, DNA 염기배열을 결정하여 거기에서 유추되는 mRNA의 2차 구조를 해석하는 것이 필요하다. 그래서 지금까지 밝혀진 다른 MLS 내성 유전자의 발현기전과 비교 검토함으로써, MLS 내성 유전자의 발현조절기전을 보다 자세히 설명할 수 있을 뿐만 아니라 지금까지 알려지지 않은 또 다른 유전자 발현기전의 발견 가능성도 기대할 수 있다.

저자 등은 erythromycin 등의 macrolide계 항생물질에 대해 유도내성을 나타내는 세균을 토양 중에서 분리하여 이 세균이 *Bacillus licheniformis* EMR임을 동정하였으며, 이 내성균에서는 lincosamide계 항생물질도 유도내성 인자로 작용할 수 있음을 규명하였다.^{9,10)} 또한 이 균주로부터 MLS계 항생물질에 대한 유도내성을 일으키는 methylase 유전자를 cloning 하였으며, 이 내성 유전자를 ermK라 명명하였다.¹¹⁾ 그리고 ermK의 구조 유전자와 leader 부분의 DNA 염기배열을 확인하였으며 그로부터 아미노산 서열을 유추하였고, S1 nuclease mapping에 의해 ermK의 promoter 부분과 transcription이 시작되는 부위를 확인하였다. 돌연변이 균주의 분석과 컴퓨터 분석에 의해 mRNA leader 부분의 2차 구조를 해석하였고, 이 결과 ermK에서는 translational attenuation 기전 뿐만 아니라 transcription 단계에서의 조절기전도 존재하는 새로운 유전자 발현조절기전임을 밝힌 바 있다.¹²⁾ 또한 우리나라 토양시료에서 다수의 세균을 분리하고, 그 중에서 erythromycin 등의 MLS계 항생물질에 의해서 다른 MLS계 항생물질에 대한 유도내성을 갖는 균주들을 분리하였으며, 이 분리된 균주 중에서 세균의 형태, disk법에 의한 내성 pattern을 검토하여 이미 연구 보고된 세균들과는 다른 4종류의 균주를 선별하였다. 선별된 균주를 대상으로 각각 균주를 동정하고 유도내성의 특징을 조사하였다.¹³⁾

본 연구에서는 EM과의 접촉에 의해 다른 MLS

계 항생물질에 대해 유도내성을 갖는 *Streptococcus* sp. TR-1 균주로부터 plasmid를 분리하였으며, 이 plasmid 상에 유도내성과 관련된 MLS 내성 유전자가 존재함을 확인하였다. 또 이 내성 유전자가 지금까지 발견된 다른 MLS 내성 유전자 중 *Staphylococcus aureus*에서 분리된 plasmid pE194(ermC) 및 *Bacillus licheniformis* EMR의 MLS 내성 유전자 ermK와의 유사성이 있는지를 확인하기 위하여, ermC의 TaqI-MobI 절편(576 bp) 및 ermK의 MspI-MspI 절편(654 bp)을 probe로 하여 Southern hybridization을 실시하였다. 또한 여러 가지 제한효소를 사용하여 plasmid의 크기 및 제한효소 지도(restriction endonuclease cleavage site map)를 작성하였다.

실험재료 및 방법

사용균주—*Streptococcus* sp. TR-1,¹³⁾ *Bacillus subtilis* UOTO277(EM^s, CAM^s, recE4)¹⁴⁾

항생물질 및 효소—Erythromycin, chloramphenicol, chalomycin, clindamycin, tylosin 등의 항생물질은 Sigma사(미국) 제품을 사용하고, carbomycin, cirramycin, kitasamycin, maridomycin, ostreogrycin B 등의 항생물질은 미국 Wisconsin 대학교의 Weisblum 교수로부터 얻었다. ATP, bovine serum albumin, trizma, ethidium bromide, SDS, glycerol, bromophenolblue, xylene cyanol 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. Agarose는 Sigma사 및 Bethesda Research Labs.사(미국) 제품을 사용하였고, [α -³²S]dATP(>1000 Ci/mmol)는 Amersham(미국) 제품을 사용하였다. 제한효소인 BamHI, HindIII, PvuII, Sau3AI은 Promega사(미국) 제품을 사용하였고 BglI, MboI, SmaI은 New England Biolabs(미국) 것을 사용하였으며, AccI, BclI, TaqI은 Boehringer Mannheim사(서독) 제품을 사용하였다. Calf intestine alkaline phosphatase(CIP)는 Promega사 제품을 사용하였고, lysozyme, RNase는 Sigma사 제품을 사용하였으며, DNA Polymerase는 Boehringer Mannheim사 제품을 사용하였다.

MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 갖는

Streptococcus sp. TR-1 균주로부터 plasmid의 분리—*Streptococcus sp. TR-1*은 erythromycin (EM)과 oleandomycin(OM)에 의해 다른 MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 갖는다. 이러한 유도내성에 관여하는 유전자가 chromosome 상에 존재하는지 또는 plasmid 상에 존재하는지를 확인하기 위하여 이 균주로부터 plasmid를 분리하였다. *Streptococcus* 속으로부터 lysozyme에 의한 방법으로 plasmid를 분리하면 cell wall이 잘 파괴되지 않거나 분리된 plasmid의 양이 아주 적으므로, Lysis broth(Bacto tryptone 5g, yeast extract 2.5g, gelatin 2.5g, NaCl 4g, NaOAc 1.5g, glucose 10g, glycine 5g/d, H₂O 1L)를 이용한 Elliker 방법¹⁵⁻¹⁸⁾을 수정하여 *Streptococcus sp. TR-1*으로부터 plasmid를 분리하였다. EM이 함유(10 µg/ml)된 LB-agar 배지에서 배양한 *Streptococcus sp. TR-1* 균주를 취하여 Lysis broth에 접종하고 37°C에서 하룻밤 배양한 다음 다시 Lysis broth에 2%가 되도록 접종한 후 log phase에 도달하기까지 32°C에서 4시간 동안 진탕 배양하였다. 원심분리하여 수확한 균체를 6.7% Sucrose-50 mM Tris·HCl-1 mM EDTA (pH 8.0) 혼합용액 30 ml에 현탁시키고 37°C가 되도록 가온하였다. 7.5 ml의 lysozyme(10 mg/ml in 25 mM Tris·HCl, pH 8.0)을 가한 다음 37°C에서 5분간 방치하였다. 0.25 M EDTA-50 mM Tris·HCl(pH 8.0) 혼합용액을 3.75 ml 가한 다음, 다시 2.25 ml의 SDS[20% (w/v) in 50 mM Tris·HCl-20 mM EDTA, pH 8.0]를 가한 후 즉시 혼합하였다. Lysis가 완전하게 되도록 37°C에서 10분간 가온한 다음, 15 ml conical tube에 나눠 담은 후 vortexing 하였다. 3 N NaOH 2.4 ml을 가한 후 잘 혼합하고나서 2 M Tris·HCl(pH 7.0) 3.9 ml을 가하고 3분 동안 부드럽게 섞어주었다. 5 M NaCl 5.7 ml을 가한 후 3% NaCl로 포화된 phenol 55.8 ml을 넣고 잘 섞은 다음 5000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 취한 다음 여기에 chloroform-isoamyl alcohol(24:1) 55.8 ml을 가하여 잘 섞은 후 전과 같이 원심분리하였다. 상등액을 새 tube에 옮긴 후 1 volume의 isopropanol을 가한 후 0°C에서 1시간 이상 방치한 다음 8000 rpm에서 20분간 원심분리하였다.

Isopropanol을 제거한 후 DNA pellet를 TE buffer에 녹여 8 ml로 만든 후, 여기에 다시 CsCl 8g을 녹였다. 이 용액에 EtBr(10 mg/ml) 0.8 ml을 섞은 다음 20°C에서 45000 rpm으로 36시간 초원심분리하여 plasmid를 분리 정제하였다.

Bacillus subtilis UOTO 277의 형질전환¹⁹⁻²¹⁾—*Bacillus subtilis* UOTO 277 균주를 staph medium에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양한 다음 250 ml 삼각플라스크에 SPMMI 배지 13.5 ml와 배양균액 1.5 ml를 넣고 37°C에서 300 rpm으로 3.5시간 진탕 배양하였다. 멸균된 500 ml 삼각플라스크에 SPMMII 배지 36 ml을 넣고 SPMMI 배양균액 4 ml을 넣은 후, 다시 37°C에서 250 rpm으로 1.5시간 진탕 배양하였다. 5000 rpm에서 5분간 원심분리하여 균체를 얻고 이 균체를 4 ml의 상등액으로 현탁하였다. 이 competent cell 현탁액 0.5 ml와 SPMMII 0.5 ml을 50 ml 삼각플라스크에 넣은 후 *Streptococcus sp. TR-1*에서 분리한 plasmid 용액 10 µl를 가한 다음 37°C에서 300 rpm으로 40분간 진탕 배양하였다. EM(0.5 µg/ml)이 함유된 LB 배지 2 ml를 가한 다음 37°C에서 1시간 동안 정지 배양하였다. 5000 rpm으로 3분간 원심분리하여 균체를 얻고 약 200 µl의 상등액으로 현탁시킨 후 EM(10 µg/ml)이 함유된 LB-agar 평판배지에 도말하였다. 37°C에서 배양하여 생성된 집락을 취해 순수배양하였다. 순수배양에 의해 생성된 집락을 취하여 LB 배지에 접종하고 37°C에서 하룻밤 배양한 다음 배양액 200 µl를 취하여 3 ml의 Top-agar에 현탁시킨 후 LB-agar 평판배지에 붓고 그 위에 MLS계 항생물질이 함유된 disk를 놓아 유도내성 pattern을 확인하였다.

형질전환된 Bacillus subtilis UOTO 277 균주로부터 plasmid의 분리—형질전환된 *Bacillus subtilis* UOTO 277의 colony를 취하여 EM(10 µg/ml)이 함유된 LB 배지 1 L에서 하룻밤 배양하였다. 5000 rpm으로 5분간 원심분리하여 균체만을 수확한 후 Birnboim과 Doly의 방법²²⁾을 응용하여 crude plasmid를 분리한 다음 CsCl-EtBr 초원심분리법에 의해 plasmid를 순수분리 정제하였다.

Plasmid의 제한효소 지도작성—분리한 plasmid를 Acc I, Bcl I, Bgl I, Eco RI, Hind III, Mbo I, Msp I, Pvu II, Sma I, Taq I, Xba I, Xho I

등의 제한효소로 절단하고, 1% agarose gel에 전기영동하여 그 절단된 형태를 확인하였다. 또한 두 가지씩의 제한효소를 사용하여 plasmid를 절단한 다음 1% agarose gel에 전기영동하여 그 절단된 형태를 확인하고, 상대적인 크기를 비교하여 제한효소 지도를 작성하였다.

Southern hybridization—*Staphylococcus aureus*의 *ermC* 및 *Bacillus licheniformis* EMR의 *ermK*와 homology가 있는지를 확인하기 위하여, *ermC*의 Taq I-Mbo I 절편(576 bp)과 *ermK*의 Msp I-Msp I 절편(654 bp)을 probe로 하여 Southern hybridization을 실시하였다.²³⁾

각 DNA 절편(Taq I-Mbo I, Msp I-Msp I) 0.5 μ g을 Nick translation buffer 5 μ l, dNTPs (200 μ M dGTP, dCTP, dTTP) 8 μ l, [α -³⁵S] dATP (3000 Ci/mmol) 3 μ l (30 μ Ci), d. H₂O, DNase 4 μ l (200 pg), DNA polymerase 1 μ l (5 units)와 혼합하여 총 반응을 50 μ l로 한 다음 15°C에서 1시간 반응시켰다. 0.5 M EDTA를 2 μ l 가하여 반응을 종결시킨 다음, Sephadex G-50 spun column으로 미반응 동위원소를 제거하고 liquid scintillation counting을 하여 총 cpm을 측정하였다. 한편 *Streptococcus* sp. TR-1으로부터 분리한 plasmid를 Acc I로 완전히 절단한 다음 1%의 agarose gel에서 전기영동하였다. Size marker로 사용한 lambda DNA (Hind III digested) lane을 EtBr로 염색하여 band 위치를 확인한 다음, transfer할 gel을 1.5 M NaCl과 0.5 M NaOH 혼합액에 상온에서 1시간 정도 흔들어서 DNA를 denaturation시켰다. Gel을 다시 충분한량의 1 M Tris HCl (pH 8.0)과 1.5 M NaCl 혼합액에 담근 후 흔들어서 상온에서 1시간 정도 반응시켜 DNA를 중화시켰다. Gel을 Southern의 방법에 따라 20x SSC buffer (3 M NaCl, 0.3 M sodium citrate, pH 7.0)에서 12시간 동안 nitrocellulose (NC) filter (0.45 μ m)로 이동시킨 후, 80°C의 진공상태에서 2시간 동안 구워서 DNA를 NC filter에 고착시켰다. 구운 filter를 6x SSC 용액에 완전히 적신 다음 heat sealable plastic bag에 조심스럽게 넣고, prehybridization 용액 (6x SSC, 0.5% SDS, 5x Denhart's solution, 100 μ g/ml denatured salmon sperm

DNA) 0.2 ml을 bag의 가장자리로부터 채워넣은 다음, 68°C에서 3시간 정도 흔들어 주면서 반응시킨 후 prehybridization 용액을 제거하였다. 다시 hybridization 용액 [6x SSC, 0.01 M EDTA, ³⁵S-labeled denatured probe DNA (2.3 \times 10⁷ cpm/ μ g), 5x Denhart's solution, 0.5% SDS, denatured salmon sperm DNA (100 μ g/ml)]을 NC filter가 충분히 적실만큼 넣고, 기포들을 조심스럽게 제거하고 plastic bag을 풀고루 잘 문질러 준 다음 68°C에서 15시간 반응시켰다. Plastic bag을 제거한 후 NC filter를 2x SSC와 0.5% SDS 혼합액에 상온에서 5분간 방치한 다음, 다시 2x SSC와 0.1% SDS 혼합액에 담겨서 상온에서 15분간 흔들어 주었다. NC filter를 다시 0.1x SSC와 0.5% SDS 혼합액에 담겨 68°C에서 2시간 정도 세척한 다음, 위 혼합액을 새로 넣고 30분 정도 더 세척하였다. NC filter를 Whatman 3 mm paper에서 건조시킨 후 X-ray film에 하루 동안 직접 노출시켜 autoradiograph를 얻었다.

실험결과

***Streptococcus* sp. TR-1 균주로부터 Plasmid의 분리**—Elliker 방법을 응용하여 *Streptococcus* 속 TR-1 균주로부터 plasmid를 분리하고 agarose gel 전기영동에 의해 확인하였다. 즉 plasmid를 여러 가지 제한효소로 절단하고 1% agarose gel에 전기영동한 결과, 이 plasmid는 Acc I, Bcl I, Mbo I, Taq I 등에 의해 절단되어, 1-3개의 DNA 절편을 생성하였는데, 이 절편들의 크기에 의해 plasmid 전체의 크기는 약 2.4 kb임을 추정할 수 있었다 (Fig. 1).

***Bacillus subtilis* UOTO 277의 형질전환**—*Bacillus subtilis* UOTO 277 균주를 competent cell로 만든 다음 *Streptococcus* sp. TR-1 균주로부터 분리한 plasmid로써 형질전환한 결과, 형질전환된 *Bacillus subtilis* UOTO 277 균주의 MLS계 항생물질에 대한 disk pattern은 *Streptococcus* sp. TR-1 균주의 그것과 동일한 pattern을 나타냈다. 이로써 *Streptococcus* sp. TR-1 균주에서 MLS계 항생물질에 대한 유도내성에 관여하는 유전자는 plasmid 상에 존재함을 알 수 있으며, 이



Fig. 1.—Plasmid DNA isolated from *Streptococcus* sp. TR-1.
Lane A and F, *Hind*III digested lambda DNA; lane B, *Acc*I digested plasmid DNA; lane C, *Bcl*I digested; lane D, *Taq*I digested; lane E, *Mbo*I digested; lane G, natural plasmid DNA.

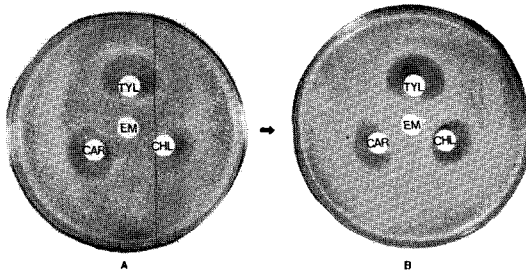


Fig. 2.—Inducible resistance patterns by disk method. The distorted inhibition zone (D-shaped form) surrounding the indicates that EM diffusing from the disk on the center induces resistance to CAR, CHL, TYL. (CAR: carbomycin, CHL: chalcomycin, TYL: tylosin).
A. *Streptococcus* sp. TR-1
B. *Bacillus subtilis* UOTO277 transformed with pMB4 plasmid

plasmid를 pMB4라 명명하였다(Fig. 2).

Plasmid의 제한효소 지도 작성—Alkaline lysis 법 및 CsCl-EtBr density gradient 초원심분리에 의해 분리된 pMB4 plasmid를 *Acc*I, *Bcl*I, *Mbo*I, *Taq*I 등으로 이중절단하여 1% agarose gel에 전기영동하였다(Fig. 3) 그리고 생성된 DNA band의 상대적인 크기에 의해 제한효소 지도를 작성하였다(Fig. 4). 이 pMB4 plasmid는

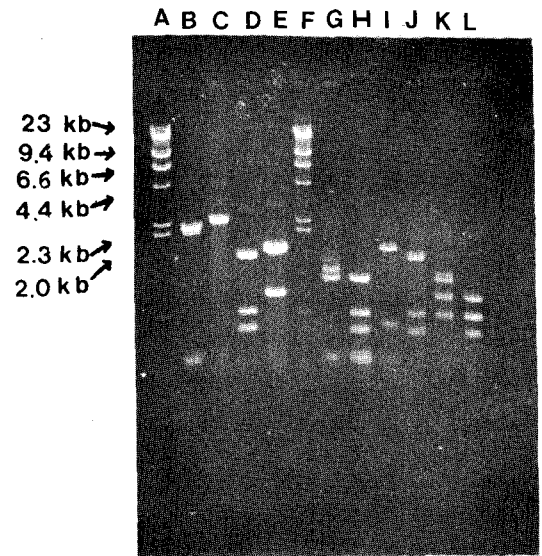


Fig. 3.—Agarose gel electrophoretic analysis of pMB4 plasmid.
Lane A and F, *Hind*III digested lambda DNA; lane B, *Acc*I digested pMB4; lane C, *Bcl*I digested; lane D, *Mbo*I digested; lane E, *Taq*I digested; lane G, *Acc*I-*Bcl*I digested; lane H, *Acc*I-*Mbo*I digested; lane I, *Acc*I-*Taq*I digested; lane J, *Bcl*I-*Mbo*I digested; lane K, *Bcl*I-*Taq*I digested; lane L, *Mbo*I-*Taq*I digested pMB4.

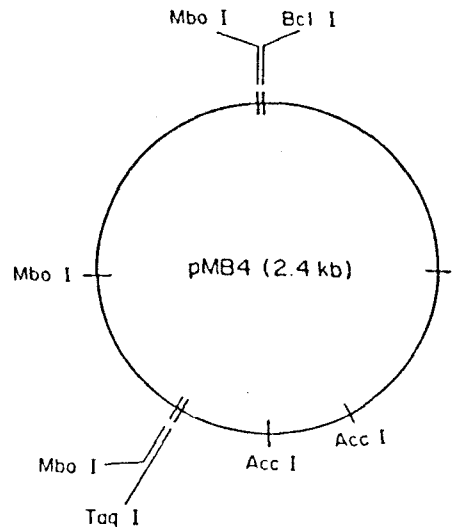


Fig. 4.—Restriction endonuclease map of pMB4.

Streptococcus 속에서 지금까지 발견된 plasmid들과는 크기가 다르고 제한효소 절단 위치도 다른 새로운 plasmid임을 알 수 있었다.

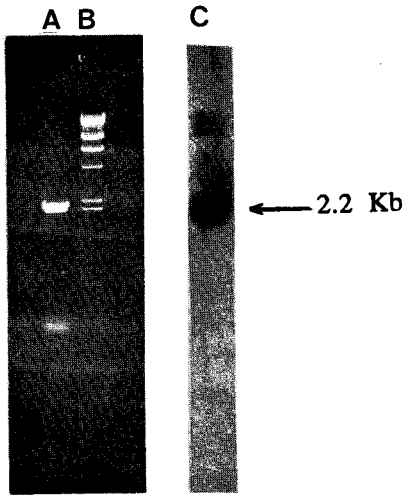


Fig. 5.—Southern blot of *ermC* (*TaqI*-*MboI* fragment) on pMB4 plasmid digested with *AccI*. Lane A, *AccI* digested pMB4 (*TaqI*-*MboI*); lane B, *HindIII* digested lambda DNA; lane C, southern blot.

Southern hybridization에 의한 *ermC* 및 *ermK* 유전자와의 동질성(homology) 확인—pMB4 plasmid가 *Staphylococcus aureus*의 *ermC* 및 *Bacillus licheniformis* EMR의 *ermK*와 동질성이 있는지 확인하기 위해, 이들의 구조 유전자내의 DNA 절편을 probe로 하여 *AccI*으로 완전히 절단된 pMB4와 Southern hybridization하고, autoradiograph한 결과, *AccI* 절편 중 2.2kb에서 *ermC*와 homology가 있는 band를 확인할 수 있었으나, *ermK*와는 homology가 없음을 알 수 있었다(Fig. 5).

고 찰

MLS계 항생물질은 세균의 50S rRNA subunit에 결합하여 polypeptide elongation 과정의 translocation을 차단하거나, peptidyl transferase의 작용을 억제하여 단백질 생합성을 저지함으로써 항균작용을 나타낸다. 세균이 MLS계 항생물질에 대해 내성을 나타내는 기전은, 내성에 관련된 유전자의 산물인 methylase가 23S rRNA의 특정 adenine을 N-monomethylation 또는 N,N-dimethylation시킴으로써 그 구조를 변화시키

고, 결국 50S subunit의 conformation의 변화를 초래해 항생물질이 chemoreceptor인 ribosome에 결합하지 못하게 함으로써 내성을 갖게 된다.

이러한 내성 기전을 보다 자세하게 규명하기 위해, 토양시료로부터 MLS 항생물질에 대해 유도내성을 갖는 *Streptococcus* sp. TR-1 균주를 분리하였다. 이 균주는 EM에 내성을 나타내며 일단 EM에 접촉한 후에는 다른 MLS계 항생물질에 대해서도 내성이 유도됨을 확인하였다. 즉 14환계 MLS계 항생물질인 EM에 의해 내성이 유도되어, 16환계 항생물질인 carbomycin, chalomycin, tylosin에 대해서도 내성을 갖게됨을 확인하였다. MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 나타내는 *Streptococcus* sp. TR-1 균주에서 이 내성과 관련있는 유전자가 chromosome 상에 존재하는지, 아니면 plasmid 상에 존재하는지를 확인하기 위하여, 먼저 변형된 Elliker 방법을 응용하여 plasmid를 분리하였다. 그리고 이 plasmid로써 *Bacillus subtilis* UOTO 277 균주를 형질전환한 결과, 형질전환된 *Bacillus subtilis* UOTO 277 균주의 유도내성 pattern은 *Streptococcus* sp. TR-1 균주와 동일한 유도내성 pattern을 나타냈다. 따라서 *Streptococcus* sp. TR-1 균주의 methylase에 대한 유전자는 plasmid 상에 존재하고 있음을 알 수 있었으며, 이 plasmid를 pMB4라 명명하였다. 이 pMB4 plasmid는 *AccI*, *BclI*, *MboI*, *TaqI* 등의 제한효소로 절단되며 그 크기는 약 2.4 kb임을 알 수 있었고, 또한 여러 종류의 제한효소를 처리하여 제한효소 지도를 작성한 결과, pMB4는 지금까지 *Streptococcus*속 세균에서 발견된 plasmid들과는 다른 새로운 plasmid임을 추정할 수 있었다.²⁴⁻²⁸⁾ 따라서 pMB4 plasmid상의 MLS 내성 유전자는 새로운 유전자일 가능성이 있었다. 한편 pMB4 plasmid상의 MLS 내성 유전자가 *Staphylococcus aureus*의 *ermC* 및 *Bacillus licheniformis* EMR의 *ermK*와의 homology가 있는지를 확인하기 위해, *ermC*의 구조 유전자 중 *TaqI*-*MboI* 절편과 *ermK* 구조 유전자 중 *MspI*-*MspI* 절편을 probe로 하여 Southern hybridization한 결과, *ermC*와는 homology가 존재하지만 *ermK*와는 homology가 없음을 알 수 있었다.

결 론

토양시료로부터 MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 갖는 *Streptococcus* sp. TR-1 균주를 분리하였으며, 이 균주는 EM과의 접촉에 의해 다른 MLS계 항생물질에 대해서도 내성을 갖게 된다. 변형된 Elliker 방법에 의해 이 균주로부터 plasmid를 분리하였으며, 이 plasmid로써 *Bacillus subtilis* UOTO277을 형질전환한 결과, 유도내성과 관련있는 MLS 내성 유전자는 *Streptococcus* sp. TR-1 균주의 plasmid 상에 존재함을 알 수 있었다. 이 plasmid를 pMB4라 명명하였으며, 그 크기는 약 2.4 kb 이었다. 또 AccI, BclI, MboI, TaqI 등 여러 종류의 제한효소를 이용하여 pMB4의 제한효소 지도를 작성한 결과, 이 plasmid는 지금까지 *Streptococcus* 속 세균에서 발견된 plasmid와는 다른 새로운 plasmid임을 추정할 수 있었다. pMB4 plasmid를 *Staphylococcus aureus*의 ermC 및 *Bacillus licheniformis* EMR의 ermK와 Southern hybridization을 실시한 결과, pMB4 plasmid의 MLS 내성 유전자는 ermC와는 homology가 있으나, ermK와는 homology가 없음을 알 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 1988년도 문교부 학술연구조성비(유전공학)와 한국과학재단의 기초연구비에 의하여 연구된 것이며, 이에 깊이 감사드린다.

문 헌

- 1) Pestka, S.: Inhibitor of protein synthesis, in Molecular Mechanisms of Protein Biosynthesis, Weissbach, H. and Pestka, S., Eds., Academic Press, New York, 467, 99 (1979).
- 2) Oleinick, N.K. and Corcoran, J.W.: Two types of binding of erythromycin to ribosomes from antibiotic sensitive and resistant *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.* 244, 727 (1969).
- 3) Lai, C.J. and Weisblum, B.: Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistance strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 856 (1971).
- 4) Lai, C.J. Weisblum, B., Fahnestock, S.R. and Nomura, M.: Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincosamide and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 74, 67 (1973).
- 5) Shivakumar, A.G., Gryczan, T.J., Kozlov, Y.L. and Dubnau, D.: Organization of the pE194 genome. *Mol. Gen. Genet.* 179, 241 (1980).
- 6) Lai, C.J., Dahlberg, J.E. and Weisblum, B.: Structure of an inducibly methylatable nucleotide sequence in 23S ribosomal ribonucleic acid from erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry* 12, 457 (1973).
- 7) Denoya, C.D. and Dubnau, D.: site and substrate specificity of the ermC 23S rRNA methyltransferase. *J. Bacteriol.* 169, 3857 (1987).
- 8) Weisblum, B., Siddhikol, C., Lai, C.J. and Demohn, V.: Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus* requirement for induction. *J. Bacteriol.* 106, 835 (1971).
- 9) Choi, E.C., Kim, B.K., Shim, M.J., Chung, K.S., Woo, J.W., Kim, H.R. and Lee, C.K.: Studies on the resistance to antibiotics in bacteria: induced resistance to antibiotics in *Bacillus* sp. *Yakhak Hoeji* 26, 169 (1982).
- 10) Choi, E.C., Woo, J.W. and Weisblum, B.: Inducible resistance to lincosamide antibiotics by lincosamide antibiotics in *Bacillus licheniformis*. *Yakhak Hoeji* 30, 217 (1986).
- 11) Choi, E.C., Kwak, J.H. and Weisblum, B.: MLS inducible resistance mechanism in *Bacillus licheniformis* EMR-1, cloning of erm K, MLS resistance element. *Yakhak Hoeji* 32, 213 (1988).
- 12) Choi, E.C., Woo, J.W., Woo, J.S., Kwak, J.H. and Kim, B.K.: The cloning of MLS antibiotics inducible resistance gene. *Arch. Pharm. Res.* 12(3), 176 (1989).
- 13) Kwak, J.H.: Inducible Resistance Mechanism to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Antibiotics in *Bacillus licheniformis* EMR; Cloning of ermK, a MLS Resistance Determinant and Control Mechanism of the Gene Expression. Ph. D. thesis (1989).
- 14) Band, L. and Henner, D. J.: *Bacillus subtilis* requires a stringent Shine-Dalgarno region for gene expression. *DNA* 3, 17 (1984).

- 15) Elliker, P.R., Anderson, A.W. and Hanneesson, G.: An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci.* **39**, 1611 (1956).
- 16) Anderson, D.G. and McKay, L.L.: Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 549 (1983).
- 17) Herman, R.E. and McKay, L.L.: Isolation and partial characterization of plasmid DNA from *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**, 1103 (1985).
- 18) Klaenhammer, T.R. McKay, L.L. and Baldwin, K.A.: Improved lysis of group N Streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 592 (1978).
- 19) Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J.: Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **81**, 741 (1961).
- 20) Chang, S. and Cohen, S.N.: High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**, 11 (1979).
- 21) Cryzen, T., Contents, S. and Dubnau, D.: Molecular cloning of heterologous chromosomal DNA by recombination between a plasmid vector and a homologous resident plasmid in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **177**, 459 (1980).
- 22) Birnboim, H.C. and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513 (1979).
- 23) Southern, E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503 (1975).
- 24) Lyin, B.R. and Skurray, R.: Antimicrobial Resistance of *Staphylococcus aureus*; *Gene Basis. Micro. Reviews* **51**(1), 88 (1987).
- 25) Behnke, D. and Ferretti, J.J.: Molecular cloning of an erythromycin resistance determinant in Streptococci. *J. Bacteriol.* **144**, 806 (1980).
- 26) Golubkov, V.I., Reichardt, W., Boitsov, A.S., Malke, H. and Totolian, A.A.: Sequence relationships between plasmids associated with conventional MLS resistance and zonal lincomycin resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Gen. Genet.* **187**, 310 (1982).
- 27) Weisblum, B., Holder, S.B. and Halling, S.M.: Deoxyribonucleic acid sequence common to Staphylococcal and Streptococcal plasmids which specify erythromycin resistance. *J. Bacteriol.* **138**, 990 (1979).
- 28) Yagi, Y., Franke, A.E. and Clewell, D.B.: Plasmid determined resistance to erythromycin, comparison of strain of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus pyogenes* with regard to plasmid homology and resistance inducibility. *Antimicro. Ag. Chemother.* **7**, 871 (1975).