

Staphylococcus aureus에서 분리된 유발성 β -Lactamase 유전자의 유전적 구성

김영선 · 민경일 · 변우현*

강원대학교 자연과학대학 미생물학과

항생물질에 대한 다중 저항성을 갖는 *Staphylococcus aureus* 균주의 chromosomal DNA로부터 유발성 발현을 하는 β -lactamase(*bla*) 유전자를 확인, 분리하였다. Cloning에 이어 결정된 염기서열을, *S. aureus*에서는 지금까지는 plasmid 상에서만 분리, 보고되어 있는 *bla* 유전자들의 염기서열과 비교하였다. 본 *bla* 유전자의 구조유전자 부분인 843base의 염기서열은 기 발표된 pPC1, pI258, pS1, pI1071, pUB101, pI3796 및 pI3804 유래의 *bla* 유전자들 중 pPC1, pI258 및 pS1상에 존재하는 *bla* 구조유전자의 염기서열과 완전히 일치하였고 나머지 것들보다도 매우 높은 상동성(99%)을 유지하고 있었다. *bla* 구조 유전자의 상류 370 base 및 하류 220 base까지 결정된 염기서열을 비교한 결과에서는 다른 모든 *bla* 구조유전자의 상류 140 base에 위치하는 HindIII 인식부위가 약 230 base 이상 더 왼쪽으로 옮겨가 있었고 이 HindIII 인식부위를 포함하는 염기서열에서 ORF의 C말단이 발견되었다. 하류 서열에서는 pI1071 유래 *bla*가 갖는 두개의 직접반복 염기서열중 하나가 결손된 형태를 보이고 있다. 구조 유전자 상류에 존재하는, 80개 아미노산으로 구성된 ORF의 상동성 검색 결과 Tn4001의 transposase의 C말단과 일치함이 발견되었다.

KEY WORDS □ *Staphylococcus aureus*, β -lactamase, *bla*

속주로 하여금 β -lactamase항생물질들인 penicillin, ampicillin, methicillin 및 cephalosporin 등에 대해 저항성을 갖게 하는 β -lactamase 유전자인 *bla* 인자는 세균에서 발견되는 항생물질에 대한 저항성 인자들 중에서 가장 먼저 그 중요성이 인식되면서 광범한 연구대상으로 사용되어 오고 있다. 그람 음성균 유래의 β -lactamase들은 Richmond와 Skyes (10)에 의해 효소로서의 성질을 기준으로 Class I에서 Class V까지로 분류되어 보고된 바 있으나 그람 양성균 유래 β -lactamase들에 대해서는 이 분류 체계가 잘 적용되지는 않았으며 Ambler(1)가 그람 음성, 양성균의 유래에 따른 구분없이 단지 아미노산 서열의 상동성을 기준으로 분류를 시작하여 현재에 이르고 있다.

그람 양성균들 중에서 β -lactamase가 분리, 보고된 것들은 *Bacillus*속과 *Staphylococcus*속의 균들이며 이 중에서 특히 여러 종류의 질병과 관련이 많은 *Staphylococcus aureus*균에서 분리되는 저항성 인자가 집중적으로 연구 대상이 되고 있다. 지금까지 발견된 *S. aureus*의 β -lactamase들은 대부분 20~30 kb 크기의 plasmid상에서 발견되고 있으며 cloning되어 그 염기 서열이 밝혀진 것들이 7가지 알려져 있다. 염기서열이 밝혀진 β -lactamase 유전자를 가지고 있는 plasmid들로는 pPC1, pI258, pS1, pI1071, pUB101, pI3796 및 pI3804 등이 알려져 있으며(4, 8, 12) 이들 *S. aureus* 유래 β -lactamase들의 구조 유전자 염기서열은 서로 간 매우 높은 상동성을 갖고 있는

것으로 밝혀져 있다.

본 연구에서 사용된 *bla* 인자는 서울대 병원에서 임상적으로 분리된 항생물질에 대한 다중 저항성을 갖는 *S. aureus* 균주(2)에서 확인된 것으로서 위에서 언급된 staphylococcal *bla* 유전자들과 달리 염색체 DNA 상에 존재하는 것으로 확인되었을 뿐만 아니라 유발성 발현을 하고 있어서 연구 대상으로 선정하였다.

본 연구에서는 *S. aureus*의 염색체에서 분리된 이 *bla* 유전자의 유전적 구성 즉, *bla* 인자와 그 주위의 염기서열을 일단 밝히고자 하였으며 이들이 지금까지 밝혀진 다른 *S. aureus* 유래의 *bla*들 및 그 주변의 염기서열들과 어느 정도 상동성을 갖고 있는지를 비교 분석하여 이 유전자가 염색체 DNA 상에 존재하게 된 이유 및 그 발현 조절 관련 유전자의 존재 여부에 대한 자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmid

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

제한효소 및 시약

실험에 사용된 제한효소들 및 T4-DNA ligase 등은 체첵화학과 New England BioLabs에서 구입하여 사용하였고 DNA 분리와 정제 및 완충용액에 사용된 시약과 항생물질, lysozyme 및 RNase 등은 Sigma

Table 1. Bacterial strains, plasmid and phage.

Strains, plasmid or phage	Relevant genotype or phenotype	Reference or source
Strains		
<i>S. aureus</i> SBK110	Ap ^r	(2)
<i>B. subtilis</i> BD170	<i>thr5, trpC2</i>	B. Weisblum
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , <i>recA13, ara14, proA2, galK2</i>	G. Cooper
Plasmid and phage		
pHW20		(7)
M13mp18		(10)

Chemical Co.에서, 세균의 배양을 위한 배지 구성 성분들은 Difco Laboratories에서 각각 구입하여 사용하였다. DNA 염기서열 분석을 위한 [α -³⁵S] dATP는 Amersham에서, DNA sequencing kit와 Klenow fragment는 New England BioLabs에서, 또한 X-gal, IPTG, urea 및 acrylamide는 Sigma Chemical Co.에서 각각 구입하여 사용하였다.

유발성 발현 측정

균을 약 0.5 μ g/ml 농도의 ampicillin에 30분 노출시킨 후 이어 50 μ g/ml의 ampicillin에 다시 노출시킨 실험구의 균 성장곡선을 시간별, 660 nm에서의 흡광도 변화로 측정하며 동시에 0.5 μ g/ml에 노출시키지 않고 직접 50 μ g/ml에 노출시킨 실험구의 성장도 같은 방법으로 측정하여 두 실험구의 성장곡선을 서로 비교하였다.

전기영동 및 DNA 절편의 추출

제조합 DNA 및 DNA 단편들은 agarose gel 전기영동 방법의 시행을 통해 확인되었으며 agarose gel로부터 DNA 절편 추출은 International Biotec, Inc.의 electroeluter를 사용하였다.

Bacillus subtilis의 형질전환

제조합 plasmid를 사용한 *B. subtilis*의 형질전환은 Dubnau 등의 방법(3)에 의해 제조된 competent cell을 이용하여 수행되었다.

E. coli의 형질전환

대장균의 형질전환은 CaCl₂를 사용하는 표준방법을 사용하였다(9).

β -Lactamase의 assay

β -Lactamase의 기질인 polyvinylalcohol(PVA)을 0.75%(Wt/Vol) 포함한 LP 한천배지(=L agar plate + PVA)에 균을 접종하여 colony들이 나타날 때까지 배양한 후 iodine 용액을 한천배지 위에도 포함한다. β -Lactamase를 생성하는 colony의 주위에는 투명대가 나타나는데 이는 효소에 의해 PVA가 이미 가수분해되어 iodine과 PVA의 반응에 의한 독특한 자색이 나타나지 않기 때문이며 이 투명부위의 크기를 비교하여 β -lactamase의 활성을 정성적 및 준정량적으로 확인하였다(6).

염기서열 결정 및 분석

DNA 염기서열 결정을 위해 만들어진 DNA 단

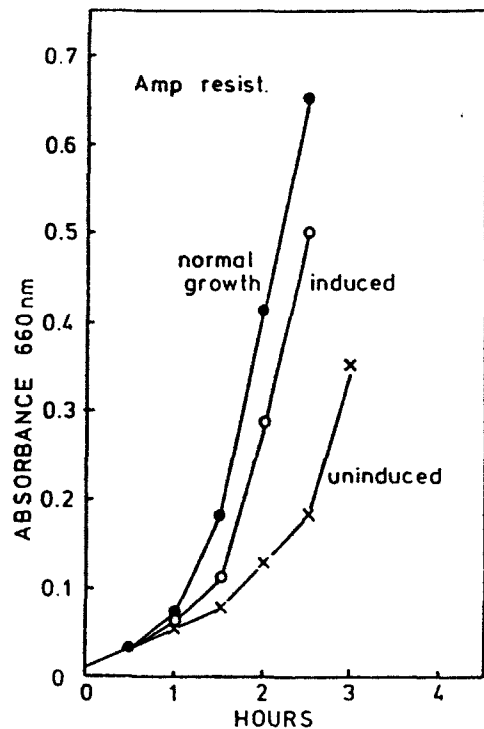


Fig. 1. Induction of ampicillin resistance of *Staphylococcus aureus* in liquid medium.

Induced: Pretreated cells at 0.5 μ g/ml of ampicillin were challenged to 50 μ g/ml of ampicillin. The O.D. at 660 nm was measured in every 30 minutes.

Uninduced: Cells were challenged to 50 μ g/ml of ampicillin without pretreatment and growth was measured.

편들은 M13mp18 vector에 cloning한 후 Sanger 등 (11)의 dideoxy chain termination 방법에 따라 염기서열을 결정하였으며 얻어진 DNA 염기서열을 대상으로, 해독을 위한 ORF 포함여부, 2차구조 존재 여부, 제한효소 인식부위의 확인 및 부분적 상동성 등을 Hitachi Co.의 DNASIS program을 이용하여 컴퓨터로 분석하였다.

결과 및 고찰

β -Lactamase 유전자의 위치 확인 및 유발성 발현 측정

S. aureus SBK110 균주의 β -lactamase 활성은 지금까지 발표된 다른 *S. aureus* 유래의 유전자들이 plasmid상에 존재하는 것과 달리 ethidium bromide, acridine orange 및 cyclohexamide 등의 처리로 curing되지 않는 것으로 미루어 DNA상에 존재하고 있는 것으로 확인되었다. β -Lactamase 유전자는 일

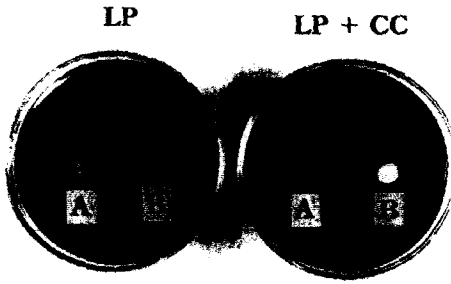


Fig. 2. The assay of β -lactamase activity on the polyvinylalcohol containing L agar plates (LP) and on cephalosporin C (as inducer) containing L agar plates (LP+CC). A, ampicillin sensitive *Staphylococcus aureus* ATCC6538; B, ampicillin resistant *Staphylococcus aureus*. The inducible *bla* gene conferring B strain is showing wider clear zone on LP+CC plate than on LP plate.

반적으로 *S. aureus*의 염색체상에서 발견되지 않는 유전자이므로 본 연구의 대상이 된 β -lactamase 유전자의 경우 plasmid를 통해 염색체 DNA로 전위되었을 것으로 짐작되고 있다. 유발성 발현 실험결과는 0.5 μ g/ml의 ampicillin에 미리 노출시켰던 균들의 50 μ g/ml에서의 생장이 직접 50 μ g/ml에 노출시킨 실험구에 비해 ampicillin에 의한 균의 성장 저해정도가 훨씬 낮은 것으로 나타났으며 이는 그 발현이 유발성 발현임을 보여주는 결과이다(Fig. 1).

정성적인 유발성을 측정하기 위해서는 위의 재료 및 방법에서 언급한 LP 한천배지와 여기에 β -lactamase 유발원으로서 cephalosporin C를 첨가한 한천배지 LPC를 동시에 사용하였는데 LP 배지상에서의 균의 β -lactamase 분비에 따른 투명대의 넓이가 유발원을 포함한 LPC 배지상에서의 colony 주위에 생긴 투명대에 비해 좁을 경우 유발성 발현을 하는 것으로 판정하였으며 본 실험에서 사용하고 있는 균주에 대한 β -lactamase의 유발성 발현 여부의 결정은 이 방법을 통해 손쉽게 확인할 수 있었다(6)(Fig. 2).

β -Lactamase 유전자의 cloning

통상적으로 *Staphylococcus*속이나 *Streptococcus*속과 같은 그람 양성균들의 유전자를 cloning하기 위해서는 *B. subtilis*를 숙주로 하는 형질전환 체계를 사용하는 것이 보통이며 chloramphenicol, erythromycin 및 aminoglycoside계열 항생물질에 대한 저항성 인자의 cloning이 이 체계를 통해 수행되어 오고 있다. 이러한 근거에서 실험초기 *S. aureus*의 *bla* 유전자를 같은 *B. subtilis*를 숙주로 사용하여 cloning하고 또 이 세포내에서 유지하려 시도하였으나 이 경우에는 *B. subtilis* 내에서의 재조합 plasmid의 불안정성과 숙주의 ampicillin에 대한 고도의 민감성

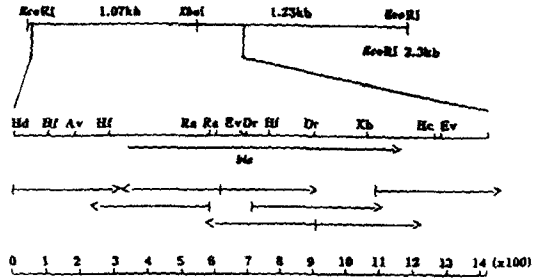


Fig. 3. Restriction recognition sites and sequencing strategy of *bla* containing fragment. Av, *Ava*I; Dr, *Dra*I; Ev, *Eco*RV; Hc, *Hinc*II; Hf, *Hinf*I; Hd, *Hind*III; Rs, *Rsa*I; Xb, *Xba*I.

때문에 방법으로 정착시키지 못했으며 따라서 *E. coli*를 숙주세포로 cloning을 수행하였다.

기 발표된 *S. aureus*의 β -lactamase 저항성 유전자의 경우 모두 제한효소 *Xba*I 인식부위를 포함하는 1 kb 범위내에 구조 유전자가 존재하는 것으로 보고되고 있다. *S. aureus* SBK110 염색체 DNA의 *Eco*RI 부분 가수분해 절편을 *E. coli* cloning vector에 연결시켜 발현시킨 후 저항성이 확인된 재조합 plasmid의 삽입부위 내에서 *Xba*I 부위가 인식되어 *bla* 인자의 cloning을 확인하였다(Fig. 3).

E. coli 내로 cloning된 *bla* 유전자의 유발성-지속성 발현 여부 측정결과 지속성 발현을 하는 것으로 확인되었다. 여기에는 두가지 이유가 있을 수 있는데 첫째는 cloning된 절편내에 발현조절 관련 유전자가 포함되지 않았기 때문일 수가 있으며, 둘째는 발현 조절 관련 인자가 cloning된 절편내에 포함되어 있는 하나 유발성 그람 양성균의 유전자가 그람 음성균 내에서는 지속성으로 발현하는 일반적인 경향성 때문일 수도 있다. *B. subtilis*를 숙주로한 유발성 *bla* 유전자의 cloning은 성공적이지 못했고 또 *E. coli*를 숙주로 사용할 경우에는 두번째 문제점이 대두되기 때문에 현재 진행중인, 발현조절 유전자를 확인, 분리하고자 하는 연구에서는 *S. aureus*를 직접 형질전환의 숙주로 사용하는 방법을 채택하여 수행하고 있다.

β -Lactamase 유전자의 염기서열 결정 및 분석

Cloning된 *bla* 유전자의 전 구조유전자의 염기서열이 결정되었다(Fig. 3). Cloning된 *bla* 유전자의 *Xba*I 인식부위 가까이에 위치하는 *Hind*III 인식부위의 거리가 기 발표된 *bla* 유전자의 경우와 차이를 나타내는 것으로 미루어 유전적 구성이나 구조 유전자의 염기서열이 다를 것으로 추정되었으나 실제 구조유전자 843bp의 염기서열은 기 발표된 pPC1, pI 258 및 pSI 상에 존재하는 *bla* 구조유전자의 염기서열과 완전히 일치하였고 나머지 것들과도 매우 높은 상동성(99%)을 유지하고 있었다.

β -Lactamase 구조유전자 주위 염기서열의 분석

5' CT TGC GCA TCA TTG GAT GAT GGA TTC GAA GAC GCC TTT CAA
 Cys Ala Ser Leu Asp Asp Gly Phe Glu Asp Ala Phe Gln

TAT ACC GTA CAA GGA AAT TCC CAC AAT CGA CTA AAG AGT ACC AAT
 Tyr Thr Val Gln Gly Asn Ser His Asn Arg Leu Lys Ser Thr Asn

CTA ATT GAA CGA CTG AAT CAA GAA GTA CGC AGA AGA GAA AAG ATT
 Leu Ile Glu Arg Leu Asn Gln Glu Val Arg Arg Arg Glu Lys Ile

ATT CGC ATC TTC CCC AAT CAA ACA TCA GCC AAT CGC TTA ATT GGA
 Ile Arg Ile Phe Pro Asn Gln Thr Ser Ala Asn Arg Leu Ile Gly

GCC GTT CTT ATG GAC CTA CAT GAT GAA TGG ATT TAT TCT TCA AGA
 Ala Val Leu Met Asp Leu His Asp Glu Trp Ile Tyr Ser Ser Arg

AAA TAC ATC AAT TTT GAT AAG TAG AAATGGTAAACATTGTATAGACTTT
 Lys Tyr Ile Asn Phe Asp Lys ***

TACACAGGAGTCTGGACTTGACTAACTATTGACACCGATATTACAATTGTAATATTAT
 -35 -10

1
 TGATTATAAAAATTACAACGTAAATATC GGAGG GTTTATT TTG AAA AAG TTA
 +1 5.0 Met Lys Lys Leu

30
 ATA TTT TTA ATT GTA ATT GCT TTA GTT TTA AGT GCA TGT AAT TCA
 Ile Phe Leu Ile Val Ile Ala Leu Val Leu Ser Ala Cys Asn Ser

60 90
 AAC AGT TCA CAT GCC AAA GAG TTA AAT GAT TTA GAA AAA AAA TAT
 Asn Ser Ser His Ala Lys Glu Leu Asn Asp Leu Glu Lys Lys Tyr

120
 AAT GCT CAT ATT GGT GTT TAT GCT TTA GAT ACT AAA AGT GGT AAG
 Asn Ala His Ile Gly Val Tyr Ala Leu Asp Thr Lys Ser Gly Lys

150 180
 GAA GTA AAA TTT AAT TCA GAT AAG AGA TTT GCC TAT GCT TCA ACT
 Glu Val Lys Phe Asn Ser Asp Lys Arg Phe Ala Tyr Ala Ser Thr

210
 TCA AAA GCG ATA AAT AGT GCT ATT TTG TTA GAA CAA GTA CCT TAT
 Ser Lys Ala Ile Asn Ser Ala Ile Leu Leu Glu Gln Val Pro Tyr

240 270
 AAT AAG TTA AAT AAA AAA GTA CAT ATT AAC AAA GAT GAT ATA GTT
 Asn Lys Leu Asn Lys Lys Val His Ile Asn Lys Asp Asp Ile Val

300
 GCT TAT TCT CCT ATT TTA GAA AAA TAT GTA GGA AAA GAT ATC ACT
 Ala Tyr Ser Pro Ile Leu Glu Lys Tyr Val Gly Lys Asp Ile Thr

330 360
 TTA AAA GCA CTT ATT GAG GCT TCA ATG ACA TAT AGT GAT AAT ACA
 Leu Lys Ala Leu Ile Glu Ala Ser Met Thr Tyr Ser Asp Asn Thr

390
 GCA AAC AAT AAA ATT ATA AAA GAA ATC GGT GGA ATC AAA AAA GTT
 Ala Asn Asn Lys Ile Ile Lys Glu Ile Gly Gly Ile Lys Lys Val

420 450
 AAA CAA CGT CTA AAA GAA CTA GGA GAT AAA GTA ACA AAT CCA GTT
 Lys Gln Arg Leu Lys Lys Glu Leu Gly Asp Lys Val Thr Asn Pro Val

480
 AGA TAT GAG ATA GAA TTA AAT TAC TAT TCA CCA AAG AGC AAA AAA
 Arg Tyr Glu Ile Glu Leu Asn Tyr Tyr Ser Pro Lys Ser Lys Lys

510 540
 GAT ACT TCA ACA CCT GCT GCT TTC GGT AAG ACT TTA AAT AAA CTT
 Asp Thr Ser Thr Pro Ala Ala Phe Gly Lys Thr Leu Asn Lys Leu

570
 ATC GCA AAT GGA AAA TTA AGC AAA GAA AAC AAA AAA TTC TTA CTT
 Ile Ala Asn Gly Lys Leu Ser Lys Glu Asn Lys Lys Phe Leu Leu

600 630
 GAT TTA ATG TTA AAT AAT AAA AGC GGA GAT ACT TTA ATT AAA GAC
 Asp Leu Met Leu Asn Asn Lys Ser Gly Asp Thr Leu Ile Lys Asp

660
 GGT GTT CCA AAA GAC TAT AAG GTT GCT GAT AAA AGT GGT CAA GCA
 Gly Val Pro Lys Asp Tyr Lys Val Ala Asp Lys Ser Gly Gln Ala

690 720
 ATA ACA TAT GCT TCT AGA AAT GAT GTT GCT TTT GTT TAT CCT AAG
 Ile Thr Tyr Ala Ser Arg Asn Asp Val Ala Phe Val Tyr Pro Lys

750
 GGC CAA TCT GAA CCT ATT GTT TTA GTC ATT TTT ACG AAT AAA GAC
 Gly Gln Ser Glu Pro Ile Val Leu Val Ile Phe Thr Asn Lys Asp

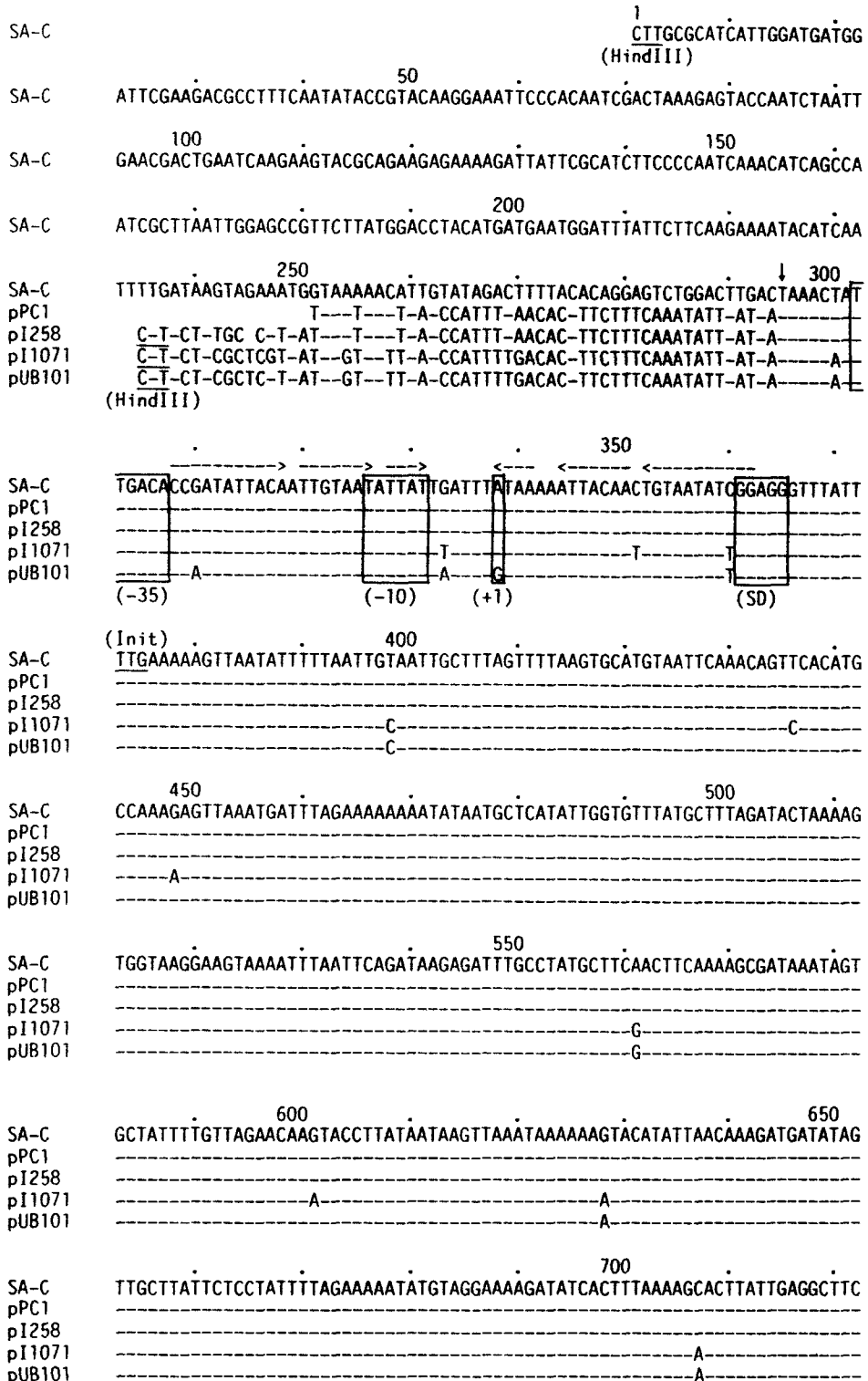
780 810
 AAT AAA AGT GAT AAG CCA AAT GAT AAG TTG ATA AGT GAA ACC GCC
 Asn Lys Ser Asp Lys Pro Asn Asp Lys Leu Ile Ser Glu Thr Ala

840
 AAG AGT GTA ATG AAG GAA TTT TAA TATTCTAAATGCATAATAAATCTGAT
 Lys Ser Val Met Lys Glu Phe ***

AACATCTTATATTTTGTATTATCGTTGACATGTATAATTTTGATATCAAAAACGTGATTT
 TCCCTCTATTATTTTCGAGATTTATTTTCTTAATCTCTTTAAACAACTAGAAAATTTG
 TATATACAAAAAATTATAATAATAATAGTAAGGCTCAATATAGGTTGTTTCATC 3'

Fig. 4. Nucleotide sequence of the *bla* gene and its flanking region and deduced amino acid sequence of β -lactamase.

bla 구조 유전자부위 846base(종결코돈 포함)와 그 상류로 370 base까지 및 종결코돈의 하류는 220 base까지 결정된 염기서열을 기 발표된 *bla* 유전자 및 그 주위 염기서열과 비교한 결과를 Fig. 5에 표시 하였다. 결정된 전체 염기서열에서 *bla* 유전자 개시 코돈은 372번부터 시작하고 있으며(그림에서 (Init)로 표시) 종결코돈은 1216번 염기에서 시작하고 있다 (그림에서 (Term)으로 표시). 다른 plasmid 유래의 *bla* 유전자들에서는 공통적으로 *Hind*III 인식부위가 개시코돈의 약 140 base 상류인 235번 부근에 위치 하는데 비해 본 실험 대상인 *bla*(SA-C-*bla*, *bla* from *Staphylococcus aureus* chromosomal DNA)에서는 이보다 약 130 base 이상 더 상류쪽으로 옮겨가서 *bla* 개시코돈과 약 370 base의 거리를 두고 *Hind*III 인식부위가 존재하고 있었다(Fig. 5의 서열에서는 맨 앞쪽). 이들 *bla* 유전자 상류의 염기서열 비교에서 본 실험 대상 SA-C-*bla*를 제외한 다른 모든 plasmid 유래의 *bla* 유전자 염기서열들은 서로간에 *bla* 구조 유전자는 물론 *bla* 개시코돈으로부터 그 140 base 상류의 *Hind*III 인식부위까지의 염기서열 조차도 매우 높은 상동성을 유지하고 있는데 비해 SA-C-*bla*는 이들과 구조 유전자로부터 상류 78 base(그림상 ↓로 표시된 295번 염기)까지만 이들과의 상동성이 인정되었고 그 이상은 전혀 비교할 수가 없을 정도로 달랐다. 그러나 실제로 *bla* 유전자의 전사를 위한 promoter 및 이의 해독을 위한 ribosome 결합부위 들은 비교대상이 된 모든 염기서열에서 상동성이 유지되고 있는. 개시코돈으로부터 상류 78 base 사이에 존재하며 잘 보존되어 있었다(각각 (-35), (-10), (+1) 및 (SD)로 표기). 특히 이 부위 내에는 안정된 역방향 반복서열(inverted repeat sequence, 그림에서 6개의 →로 표시)이 존재하고 있는데 이는 아마도 *bla* mRNA의 2차구조에 기여함으로써 *bla*의 유발성 발



SA-C AATGACATATAGTGATAATACAGCAAACAATAAAATTATAAAAGAAATCGGTGGAATCAAAAAGTTAAA
 pPC1 -----
 pI258 -----
 pI1071 -----G-----
 pUB101 -----G-----T-----

800 CAACGTCTAAAAGAAGCTAGGAGATAAAGTAACAAATCCAGTTAGATATGAGATAGAATTAATACTATT
 pPC1 -----
 pI258 -----
 pI1071 -----
 pUB101 -----

900 CACCAAAGAGCAAAAAGATACTTCAACACCTGCTGCTTTCGGTAAGACTTTAAATAAACTTATCGCAA
 pPC1 -----
 pI258 -----
 pI1071 -----
 pUB101 -----

950 TGGAAAATTAAGCAAAGAAAACAAAAATTCCTTACTTGATTTAATGTTAAATAATAAAAGCGGAGATACT
 pPC1 -----
 pI258 -----
 pI1071 -----
 pUB101 -----

1050 TTAATTAAGACGGTGTCCAAAAGACTATAAGGTTGCTGATAAAAGTGGTCAAGCAATAACATATGCTT
 pPC1 -----
 pI258 -----
 pI1071 -----T-----T-----G-----G-----
 pUB101 -----T-----G-----

1100 CTAGAAAATGATGTTGCTTTTGTATTATCCTAAGGGCCAATCTGAACCTATTGTTTTAGTCATTTTTACGAA
 pPC1 -----
 pI258 -----
 pI1071 -----
 pUB101 -----

1150 TAAAGACAATAAAAGTGATAAGCCAAATGATAAGTTGATAAGTGAAACCGCCAAGAGTGTAATGAAGGAA
 pPC1 -----
 pI258 -----
 pI1071 -----
 pUB101 -----

1250 (Term) TTTTAATATTCTAAATGCATAATAAATACTGATAACATCTTATATTTTGATTATCGT
 pPC1 -----ATTTTGATTAT-----
 pI258 -----ATTTTGATTAT-----
 pI1071 -----T-----G-----CGT
 pUB101 -----GTTCTGTTGCAAAGTTGAATTTATAATATAATTTTAACAAAAGGAGTCTTCT

1300 TGACATGTATAATTTGATATCAAAAACCTGATTTTCCCTCTATTATTTTCGAGATTTATTTCTTAATTC
 pPC1 -----
 pI258 -----
 pI1071 -----
 pUB101 -----
 pUB101 -----GATGAACTATTTACATATAAACAATTTAACAAGGATGTTATCACTGTAGCCGTTGGCTACTATGTAAG

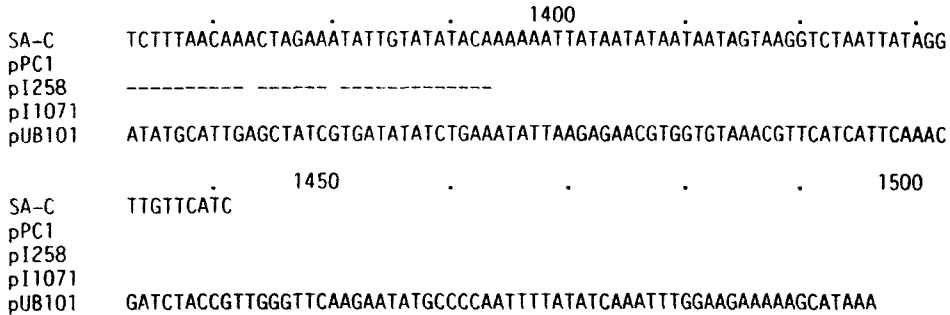


Fig. 5. Nucleotide alignment of five *bla* genes from *Staphylococcus aureus* plasmid pPC1 (4), pI258 (10), pI1071 (4), pUB101 (7), and *S. aureus* chromosomal DNA (SA-C, Fig. 4). “-” designates identical amino acid as SA-C. Two *Hind*III recognition sites are indicated, one for SA-C-*bla* and the other for the rest of *bla*'s from plasmids. Six arrows extended from base number 308 to 362 mean inverted repeat sequence and two arrows from 1256 to 1279 mean direct repeat sequence. Promoter (-35, -10), transcription initiation site (+1), and ribosome binding site (SD) are boxed. Open reading frame of *bla* starts from the base number 373 which indicated as (Init) and terminate at the base number 1216 indicated as (Term).

현에서 중요한 역할을 할 것으로 믿어지고 있다. *bla*상류 78 base부터 상류 140 base 사이, 즉 SA-C-*bla*와 비교대상 *bla*들의 염기서열이 확연히 달라지는 이 부위가 갖는 의미는 아직 짐작되지 않고 있다.

하류 서열에서는 pI1071 유래의 *bla*가 갖는 두개의 직접 반복 염기서열(Fig. 5에서 1256번 염기에서 1279번 염기 사이에 →로 표시된 부분) 중 하나가 본 SA-C-*bla*에서는 결손된 형태를 보이고 있다(Fig. 5).

*Bacillus licheniformis*에서 발견된 유발성 β-lactamase 유전자의 한 종류인 *penP*의 경우 이의 발현을 조절하는 repressor인 *penI* 및 antirepressor인 *penJ*의 존재도 밝혀져 있으나(5, 6, 13) *S. aureus*의 *bla* 연구의 경우 구조 유전자 관련 연구된 연구는 비교적 많이 보고되고 있으나 유발성 발현 내지 이와 관련된 조절 유전자에 대한 연구는 별로 보고된 바 없다.

구조 유전자 상류, *Hind*III 인식부위를 포함하는 부위에 존재하는 ORF가 발현 조절과 관련된 유전자의 일부일 것으로 추측하였으나 이 서열에서 예측된 polypeptide의 C말단 아미노산 서열을 PC-GENE을 통해 상동성 검색을 수행한 결과 Tn4001의 transposase의 C말단과 일치한다는 결과를 얻었다. 이는 *S. aureus*에서는 지금까지 plasmid상에서만 알려졌던 *bla* 유전자가 본 실험에서 처럼 chromosomal DNA상에 존재하게 된 근거가 바로 transposon에 의한 plasmid로부터 chromosomal DNA로의 전위에 의한 결과임을 짐작케 하는 증거로 생각되고 있다. 한가지 문제는 기 발표된 Tn4001이 gentamycin, tobramycin 및 kanamycin에 대한 저항성만을 갖고 있으며 ampicillin 저항성은 갖고 있지 않다는 점인데 이는 앞으로 *bla* 유전자 주위의 염기서열을 더 넓게 결정한 후 이 서열과 Tn4001 및 ampicillin을 포함하고 있는 transposon들인 Tn4201, Tn4002 및 Tn

3852 등의 염기서열을 비교함으로써 올바른 해석을 내릴 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

본 논문은 1992년도 교육부 유전공학 특성화 연구비 지원에 의해 수행되었음.

참 고 문 헌

1. Ambler, R.P., 1979. Amino acid sequences of β-lactamases. p. 99-127. In J. M. T. Hamilton and J. T. Smith (ed.). Beta-lactamase. Academic Press, London.
2. Byeon, W.-H., Y.S. Kim, E.H. Cho, D.H. Kwon, H.Z. Lea, and S.J. Hong, 1985. R-Plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Microbiol.* 23, 282-290.
3. Dubnau, D. and R. Davidoff-Aberlson, 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* 56, 209-221.
4. East, A.K. and K.G.H. Dyke, 1989. Cloning and sequence determination of six *Staphylococcus aureus* β-lactamases and their expression in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1001-1015.
5. Himeno, T., T. Imanaka, and S. Aiba, 1986. Nucleotide sequence of the penicillinase repressor gene *penI* of *Bacillus licheniformis* and regulation of *penP* and *penI* by the repressor. *J. Bacteriol.* 168, 1128-1132.
6. Imanaka, T., T. Himeno, and S. Aiba, 1987. Cloning and nucleotide sequence of the penicillinase

- antirepressor gene *penJ* of *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* **169**, 3867-3872.
7. 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* and *B. subtilis* using cloned fragment. *Kor. J. Microbiol.* **25**, 262-273.
 8. Lacey, R.W. and J. Grinstead, 1972. Linkage of fusidic acid resistance to the penicillinase plasmid in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **73**, 501-508.
 9. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
 10. Richmond M.H. and R.B. Skyes, 1973. The β -lactamase of Gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol.* **9**, 31-88.
 11. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
 12. Wang, P.-Z. and R.P. Novick, 1987. Nucleotide sequence and expression of the β -lactamase gene from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **169**, 1763-1766.
 13. Wittman, V. and H.C. Wong, 1988. Regulation of the penicillinase genes of *Bacillus licheniformis*: Interaction of the *pen* repressor with its operators. *J. Bacteriol.* **170**, 3206-3212.

(Received December 28, 1993)

(Accepted January 31, 1993)

ABSTRACT: Genetic Organization of an Inducible β -Lactamase Gene Isolated from Chromosomal DNA of *Staphylococcus aureus*

Kim, Young Sun, Kyung Il Min, and Woo-Hyeon Byeon* (Department of Microbiology, Kangweon National University Chuncheon 200-701, Korea)

An inducible β -lactamase gene (*bla*) was identified and isolated from the chromosomal DNA of multiple drug resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Determined base sequence of *bla* and of its flanking region was compared with those of *bla* genes identified on the staphylococcal plasmids pPC1, pI258, pI1071, and pUB101. Base sequence of 843 base-long structural gene of our *bla* was same as that of pPC1-, pI258-, and pS1-*bla*. However, *Hind*III recognition site which is found in most of the *bla* genes at 140 base upstream from the structural gene was moved to the site of 370 base upstream from the structural gene. And one of the two direct repeat sequence found in downstream flanking region of pI1071-*bla* was deleted in our *bla*. Amino acid sequence homology analysis of the ORF located around *Hind*III recognition site reveals that this 80 amino acids-long polypeptide is C-terminus of transposase of Tn4001.