Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 23, No. 4, 384-389 (1995)

Streptoalloteichus hindustanus ATCC 31219로부터 아미노글라이코사이드계 항생제에 내성을 지정하는 유전자의 클로닝 및 염기서열 결정

김종우 · 한재진 · 최영내 · 엄준호 · 윤성준 · 현창구[1] · 서주원[1]*
동화약품공업주식회사 중앙연구소 생물공학연구실, [1]명지대학교 생명과학연구소

Cloning and Sequencing of Resistance Determinants to Aminoglycoside Antibiotics from *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31219

Jong-Woo Kim, Jae-Jin Han, Young-Nae Choi, Joon-Ho Eom, Sung-Joon Yoon, Chang-Gu Hyun[1] and Joo-Won Suh[1]*
Department of Biotechnology, Central Lab. of Research, Dong Wha Pharmaceutical Co. Ltd., Kyunggi-Do 430-010, Korea
[1]Biotechnology Research Institute, Myong Ji University, Yongin, Kyunggi-Do 449-728, Korea

Abstract — *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31219, a nebramycin complex producer, is similar to *Streptomyeces tenebrarius* in a viewpoint of resistance to a wide range of aminoglycoside antibiotics. *S. tenebrarius* has resistance mechanisms of 16s rRNA methylation and aminogycoside modification. However, it is not known whether resistance mechanisms of *Stall. hindustanus* are the same as in *S. tenebrarius*. Therefore, we have tried to isolate resistance determinants from *Stall. hindustanus*. Two different types of aminoglycoside resistance determinants were isolated from *Stall. hindustanus* and expressed in *Streptomyces lividans* TK24. The apramycin resistance gene (*amr*) and the tobramycin resistance gene (*tmr*) isolated from *Stall. hindustanus* showed broad resistance spectrum against a dozen of aminoglycoside antibiotics. The complete nucleotide sequences of apramycin resistance gene (*amr*) were determined. The deduced amino acid sequence of the *amr* gene of *Stall. hindustanus* ATCC 31219 showed extensive sequence homology to the 16s rRNA methylase gene (*kamB*) of *S. tenebrarius*.

방선균이 생산하는 생리활성물질의 분자생물학적 연구가 최근 매우 활성화되고 있으며 특히 항생제의 생합성, 내성, 조절기전 등의 연구가 *S. griseus*, *S. coelicolor* 등의 균주를 대상으로 자세히 연구되고 있다(1). 이들 연구를 통하여 항생제 생합성유전자를 cloning하는데 유용한 정보들이 밝혀지고 있는데 예를 들어 생합성유전자는 대부분 20 kb 이상의 계속되는 cluster로 구성되며 이들 cluster에는 내성유전자가 반드시 포함되며 흔히 조절유전자도 포함된다(2-4). 이러한 특징은 항생제 생합성의 일반적 특징으로서 생합성유전자를 cloning하는데 유용한 수단이 된다. 항생제에 대한 내성은 다음과 같은 세가지 기작이 알려져 있다. 첫째는 항생제를 변형시키는 기작, 둘째는 항생제의 작용부위를 변환시키는 기작, 세째는 항생제의 출입을 제한하므로써 내성을 나타내는 기작이 그것이다. 세균의 항생제에 대한 내성은 위의 세가지 방법중 한가지 이상을 가지고 내성을 나타낸다. 아미노글라이코사이드계 항생제 내성의 경우 항생제 변형 기작은 다시 세가지로 나눌 수 있는데, 즉 Acetylation(AAC), Adenylation(ANT), Phosphorylation(APH)으로써 이들은 다시 아미노글라이코사이드 항생제의 치환 위치에 따라 매우 다양해질 수 있고 이에 따라 내성 기작도 다양해질 수 있다(5).

아미노글라이코사이드 항생제의 작용부위를 수식하는 경우는 아미노글라이코사이드 항생제가 단백질 합성을 저해하므로 단백질 합성에 관여하는 부분을 변환시키게 되는데 Cundliffe 등(6)의 보고에 의하면 대부분 수식되는 작용부위는 16S rRNA에 위치하고 있다. 본 연구에서는 항생제 네브라마이신 복합체를 생산하며 거의 모든 아미노글라이코사이드계 항생제

Key words: *Streptoalloteichus hindustanus* ATCC 31219, resistance determinant, 16S rRNA methylase, cloning, homology
*Corresponding author

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains and Plasmids	Relevant maker(s)	Source
Strains		
Streptoalloteicus hindustanus ATCC 31219	Table 2	ATCC
Streptomyces lividans TK24	Sm^r	ATCC
Escherichia coli DH5αF'	*sup*E44Δ*lac*U169(ϕ80*lac*ZΔM15) *hsd*R17*rec*A1*end*A1*gyr*A96thi-1*rel*A1	Promega
Plasmids		
pIJ702	Ts^r	ATCC
M13mp18, 19	Ap^r	Promega
pTMR32	Table 2	This study
pTMR321	Ts^r, Sm^r	〃
pTMR322	Ts^r, Sm^r	〃
pTMR323	Ts^r, Sm^r	〃
pTMR324	Table 2	〃

*Abbreviation: Sm; streptomycin, Ts; thiostrepton, Ap; ampicillin

에 대해 내성을 갖는 *Stall. hindustanus* ATCC 31219의 게놈으로부터 아미노글라이코사이드계 항생제에 대해 다제내성을 지정하는 DNA 단편을 cloning하여 그 내성유전자의 염기서열 및 작용기전을 밝혔다.

재료 및 방법

사용균주 및 plasmids

본 연구에 사용된 균주와 plasmid들은 Table 1과 같다.

배지 및 배양조건

Stall. hindustanus ATCC 31219의 전체 DNA의 분리 그리고 *S. lividans*의 plasmid를 분리하기 위해 10.3% sucrose, 0.5% glycin이 포함된 TSB(tryptic soy broth, Difco) 배지를 사용하여 30℃에서 36~48시간 배양하였다. 고체배지로는 TSA 배지(tryptic soy agar, Difco)를 사용하였다. 형질전환을 위한 배지로는 R2YE agar 배지와 R2YE top agar(0.5% agar)를 사용하였다(7).

제한효소 및 시약

DNA 재조합을 위해 사용한 제한효소, T4 DNA ligase, calf intestine alkaline phosphatase, RNase 등은 Boehringer Mannheim사에서 구입하여 사용하였다. X-gal, IPTG, 각종 시약 및 항생제는 sigma 제품을 사용하였으며 agarose gel로부터 DNA의 분리는 QIAGEN사의 QIAX II extraction kit를 사용하였다.

DNA 분리, 재조합 및 형질전환

Stall. hindustanus ATCC 31219와 *S. lividans*에서 전체 DNA 및 plasmid의 분리, 재조합과정은 Hopwood 등(7)의 방법을 따랐으며 형질전환과정은 다음과 같다. *S. lividans*을 TSB(tryptic soy broth, 10.3% sucrose) 50 ml에 30시간 배양 후 6000 rpm에서 원심분리 하여 상층액은 버리고 침전물을 10.3% sucrose 용액으로 일회 세척 후 다시 6000 rpm으로 원심분리 하였다. P 완충용액($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 3.68%, TES 5.73%, KH_2PO_4 0.5 g/ml)으로 침전물을 현탁시킨 후 라이소자임(lysozyme)을 3 mg/ml이 되게 첨가하여 37℃에 한시간동안 방치하였다. 한시간 후 현미경으로 관찰하여 원형질체의 생성 유무를 확인하고 6000 rpm으로 원심분리하여 10^9 원형질체/ml이 되도록 적당한 부피의 P 완충용액으로 현탁하였다. 사용 전까지 보관은 작은 용기에 분주하여 4℃에서 12시간, −20℃에서 12시간 보관한 후 −70℃에서 사용 전까지 보관하였다. DNA의 형질전환은 원형질체(10^9/ml)에 플라스미드 DNA를 5 μl 이하 첨가 후 T 완충용액(P 완충용액, PEG1000 25%) 200 μl을 넣는다. 형질전환체 일부를 R2YE 배지에 도말하여 12시간 후에 항생제가 포함된 R2YE top agar 배지(3 ml)를 중층하였다. 30℃에서 36시간 이상 경과 후에 성장하는 집락을 선발하였다. *E. coli*에서의 plasmid 분리, DNA 재조합과정 및 형질전환은 Maniatis 등(8) 의 방법에 준하였다.

항생제 내성 유전자의 cloning 및 내성의 검정

Stall. hindustanus ATCC 31219의 항생제 내성유전자를 클로닝하는 과정은 다음과 같다. 스트렙토마이세스 플라스미드인 pIJ702를 제한효소 *Pst*I로 완전 절단하여 벡터(vector) DNA로 사용했고 *Stall. hindustanus* ATCC 31219의 게놈(genome) DNA는 *Pst*I으로 부분 절단하여 삽입 DNA로 사용하였다. 부분 절단된 게놈 DNA와 완전 절단된 벡터 DNA의 결합은 DNA 결합 효소(T4 DNA ligase)에 의해 반응이 이루어졌으며 *S. lividans* TK24로 형질전환하여 디오스트렙톤 내성(Thiostreptone resistance)으로 1차 선발하였다. 이 형질전환체들을 tobramycin(50 μg/m*l*)이 포함된 고체 배지에 replica하여 성장하는 형질전환체를 분리하였다. 내성의 검정은 항생제가 포함된 YEME(3 g yeast extract, 5 g peptone, 3 g malt extract, 1 g glucose/1 *l*) 배지에 접종하여 30℃에서 36~42시간 배양시 성장 유무로 판정하였다.

Southern hybridization 분석

분리된 *Stall. hindustanus* ATCC 31219의 전체 DNA를 적절한 제한효소로 처리하고 gel electrophoresis에 의해 DNA를 전개한 다음 Maniatis 등(8)의 방법으로 Nylon 막에 부착시킨 후 Boehringern Mannhaim사의 DIG Labeling and detection kit 및 pTMR 32의 insert DNA를 probe로 하여 사용지침서에 따라 실행하였다.

염기서열 결정 및 분석

pTMR32 plasmid의 insert를 M13mp18 및 M13mp 19로 옮긴 다음 Promega사의 erase a base system을 이용하여 sequencing derivates을 만들었다. 이들로부터 단일가닥 DNA를 분리하여 Sanger의 dideoxy chain termination 방법으로 염기서열을 결정하였다. 염기서열을 DNA/Protein Sequence 분석 소프트웨어 DNASIS/PROSIS(Hitachi Software Engineering Co., Ltd)를 이용하여 GenBank 자료를 이용 분석하였다.

결과 및 고찰

내성유전자의 클로닝

Stall. hindustanus ATCC 31219의 항생제 내성유전자를 클로닝하는 과정은 Fig. 1과 같다. *S. lividans* 1326으로 형질전환하여 디오스트렙톤 내성(Thiostreptone resistance)을 갖는 3000개의 형질전환체를 얻었다. 이 형질전환체들을 tobramycin(50 μg/m*l*)이 포함된 고체 배지에 replica하여 성장하는 두개의 형질전환체를 분리하였으며 이렇게 얻어진 형질전환체는

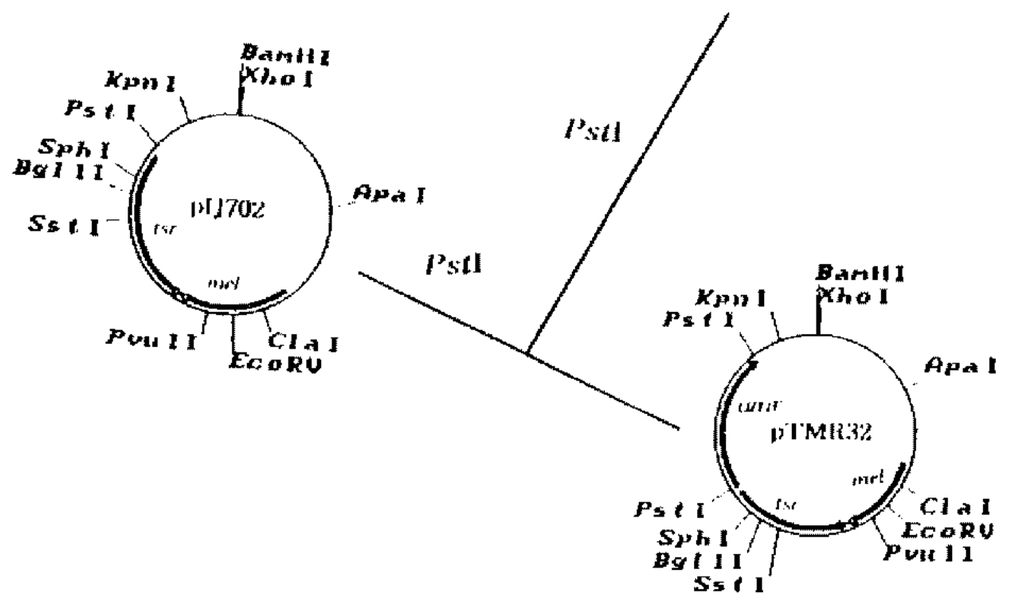

Fig. 1. Scheme of cloning resistance determinants against aminoglycoside antibiotics.

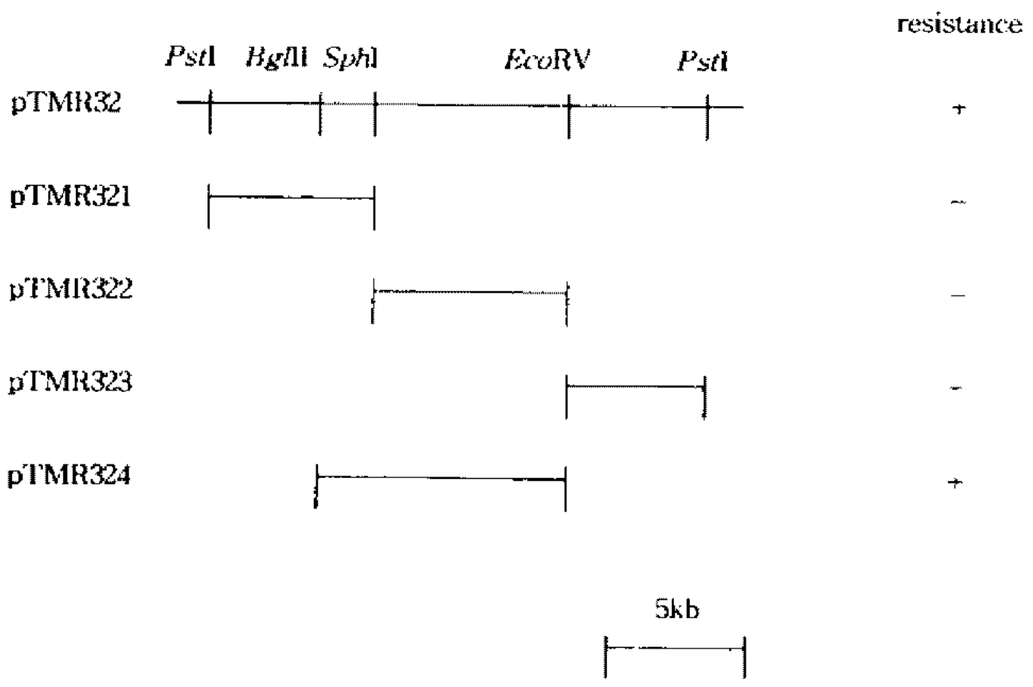

Fig. 2. Restriction map of pTMR32.

적어도 tobramycin 50 μg/m*l*까지 내성을 나타내었다. 이들 형질전환체에서 분리된 Plasmid DNA(pTMR31, 32)를 *Pst*I으로 절단해 본 결과 삽입된 DNA의 크기는 약 5.4, 1.8 kb로 밝혀졌다. 두 plasmid 중 크기가 작은 pTMR32 insert의 염기서열을 결정하기 위해서 restriction mapping과 subcloning을 실시하였다. mapping의 결과는 Fig. 2와 같다.

클론된 다제내성 유전자의 *S. lividans*에서 발현

pTMR31, 32 플라스미드로 형질전환된 *S. lividans* 1326의 여러가지 아미노글라이코사이드 항생제에 대한 내성을 검정한 결과는 Table 2와 같다. 내성검정 결과의 특징은 pTMR31의 경우는 kanamycin, tobramycin, gentamycin에 특징적으로 높은 내성을 보이며 pTMR32의 경우는 kanamycin과 apramycin에 특징적으로 높은 내성을 나타내었다. 이러한 결과는 Cundliffe 등(9-11)이 *S. tenebrarius*에서 cloning하여 보고한 *kamB, kgmB* 그리고 Hasegawa 등(12)이 *S. tenjimariensis*에서 cloning하여 보고한 *kamA* 유전자에 의해서 나타나는 내성표현과 비슷하다. *kamA, kamB*

Table 2. Minimal inhibitory concentrations of aminoglycosides for *Stall. hindustanus*, *S. tenebrarius* and *S. lividans* harboring pTMR31, pTMR32 and *kam*B

antibiotics (μg/ml)	*Stall. hindustanus*	*S. tenebrarius*	*S. lividans* (*kam*B)	*S. lividans* (pTMR31)	*S. lividans* (pTMR32)
Kanamycin	>1000	>1000	>1000	>500	>500
Tobramycin	>1000	>1000	300	>500	50
Apramycin	>1000	>1000	1000	50	<500
Gentamycin	>1000	>1000	30	>500	30
Sisomycin	>1000	>1000	300	500	200
Neomycin	>1000	>1000	100	50	200

Spore were streaked on YEME agar plate containing antibiotics and growth was monitored after 3~5 day incubation at 30℃.

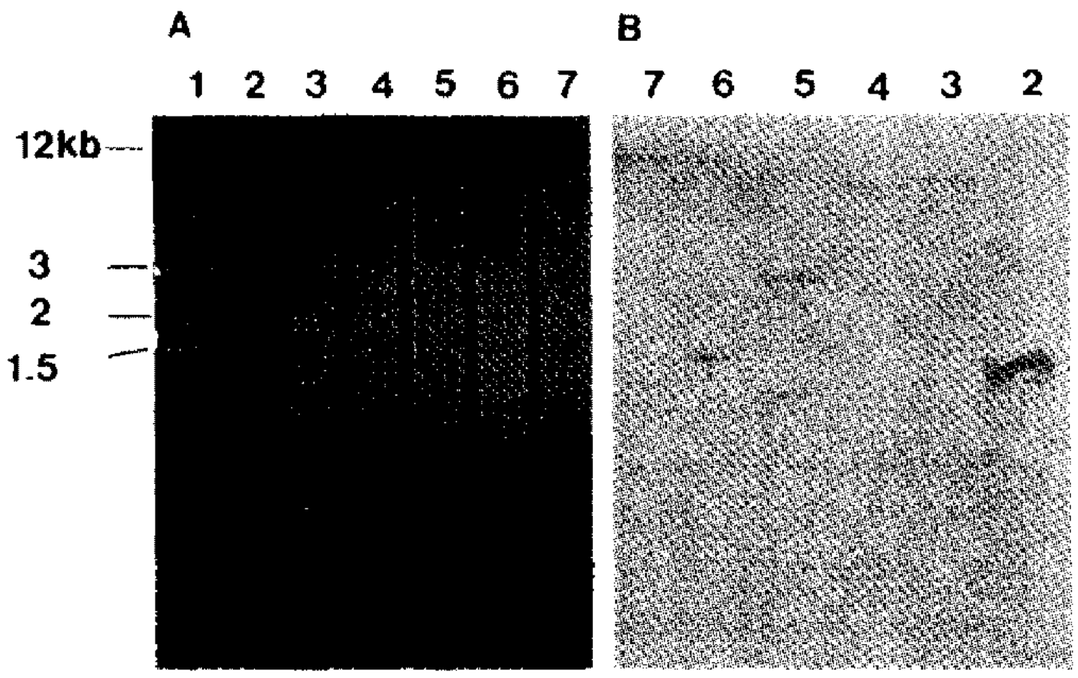

Fig. 3. Southern hybridization analysis of *Stall. hindustanus* ATCC 31219 with isolated kanamycin-aparamycin resistance determinant (*amr*).
(A) Genomic DNA from *Stall. hindustanus* ATCC 31219 was digested with restriction enzymes. Lane 1; size maker, 2; probe (*amr*), 3; *Sac*I, 4; *Sal*I, 5; *Sma*I, 6; *Sph*I, 7; *Ssp*I.
(B) The 1.8 kb *Pst*I fragment (*amr*) was labelled using DIG.

```
1     A AAC CCG AAC ACG GTC GHC GTG AGC GTT ACT GGC CCA GTA ACC   43
44  ACT ATC TTG CTC AGC CTC TGC GGT CCG TCA TCG GGT CCG TCA GAC   88
89  GTC CGT CAC GGA CCC GGT CAC GGA CCC GTC AGA TGG CTC ATC GGT  133
134 CGT CAT CCT GAC GGC AGC CTG ACG GAC CGA TGA CGG ACC CGA TGA  178
179 CGG ACC CGA TGA CGG GCG CCG GCC ACC CCC CCC GTC AGA TCG CGA  223
224 GCT ACC CGC GCG GAC AGG TCG GAG GGC GGC GCG CGG TTA CGC TGA  268
269 CCG ATG CGC CGC GTG GTG GGC AAG CGG GTC CTG GAG TTC TCC GAA  313
314 GCC GAG TTC GAC CAG CTC CGG AGT CAG TAC GAC GAG GTG GTG CTC  358
359 GAC GTC GGC ACC GGC GAC GGC AAG CAC CCG TAC AAG GTC GCC CGC  403
404 CAG CAC CCG AAC CAG CTC GTC GTC GCA CTG GAC GCC GAC AAG ACC  448
449 AGG ATG GAG CGG ATG TCG GCG AAG GCG GCG GCC AAG CCG GCG AAG  493
1       M  E  R  M  S  A  K  A  A  A  K  P  A  K              14
494 GGC GGC CTG CCC AAC CTG CTC TAC CTG TGG GCG ACC GCG GAG AAG  538
15  G  G  L  P  N  L  L  Y  L  W  A  T  A  E  K              29
539 CTG CCG CCG CTG ACC GGC GTG GGC GAG CTG CAC GTC CTC ATG CCC  583
30  L  P  P  L  T  G  V  G  E  L  H  V  L  M  P              44
584 TGG GGC AGC CTC GTG CGC GGC ATC CTC GGC TCC TCG CCG GAG ATG  628
45  W  G  S  L  V  R  G  I  L  G  S  S  P  E  M              59
629 CTG CGG GGG CTG GCC GCG GTC TGC CCG CCG GAC GCC GCC TTC CTC  673
60  L  R  G  L  A  A  V  C  P  P  D  A  A  F  L              74
674 GTG GCG CTG AAC CTG CAC GCG TGG CGG CCC CCG GTG CCC GAG GTG  718
75  V  A  L  N  L  H  A  W  R  P  P  V  P  E  V              89
719 GGC GAG CAC CCC GAA CCC ACC CCG GAG ACC GTG GAC GAG GGA CTG  763
90  G  E  H  P  E  P  T  P  E  T  V  D  E  G  L              104
764 GCC GCG CTA CGC GCA GGC CGG CTG GCA GCT CAC CGA CTG CCG GTA  808
105 A  A  L  R  A  G  R  L  A  A  H  R  L  P  V              119
809 CCT GGC CGC GGA GGA GGT GGC GGC CCT GGA AGA CCT CCT GGA CCC  853
120 P  G  R  G  G  G  G  G  P  G  R  P  P  G  P              134
854 GCC GGC TGA ACT CCT CCC GGG ACC GGT TCG ACG TGC TCG CCC TCA  898
135 A  G  *                                                   137
899 CCG GCA AGA TCT GAC GGG GTC CTC CCT CAA TGC CAG TGC ATG CGT  943
944 CGG CCA CCG ATG CCG GTA GCT ACC GAT GCC GGG CCC AAG GGT GCG  988
989 CCG ACG AGT CGT CCG CTC CGT CAC GTC CTG GTG CTC GAC GTC GCT 1033
1034 CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG GGT ACC GAG CTC GAA TTC 1078
1079 GCC C                                                    1082
```

Fig. 4. Nucleotide and deduced amino acid sequence of *amr*, 16S rRNA methylase coding area. Putative ribosome binding sites are marked by under line.

그리고 *kgmB* 유전자는 모두 16S ribosomal RNA methylase를 암호화하고 있으면서 *kamA*, *kamB*는 kanamycin과 apramycin에 높은 내성을 보이고 *kgmB*는 kanamycin과 gentamycin에 높은 내성을 보인다. 따라서 pTMR32의 insert DNA 내에 존재하는 내성유전자(*amr*)는 *kamA*, *kamB* 유전자와 같은 기능을 갖는 유전자인 것으로 생각되었다.

내성유전자의 *Stall. hindustanus* ATCC 31219 유래 확인 실험

항생제 내성유전자의 기원이 *Stall. hindustanus* ATCC 31219 임을 확인하기 위하여 pTMR31,32의 insert DNA를 probe로 하여 Southern hybridization한 결과 Fig. 3과 같이 내성유전자가 *Stall. hindustanus* ATCC 31219 유래임을 확인하였다.

내성유전자의 염기서열 결정

내성검정의 결과 *amr* 유전자의 내성패턴이 *S. tenebrarius*에서 Cundliffe 등(11)이 cloning하여 보고한 *kamB*, 그리고 *S. tenjimariensis*에서 Hasegawa

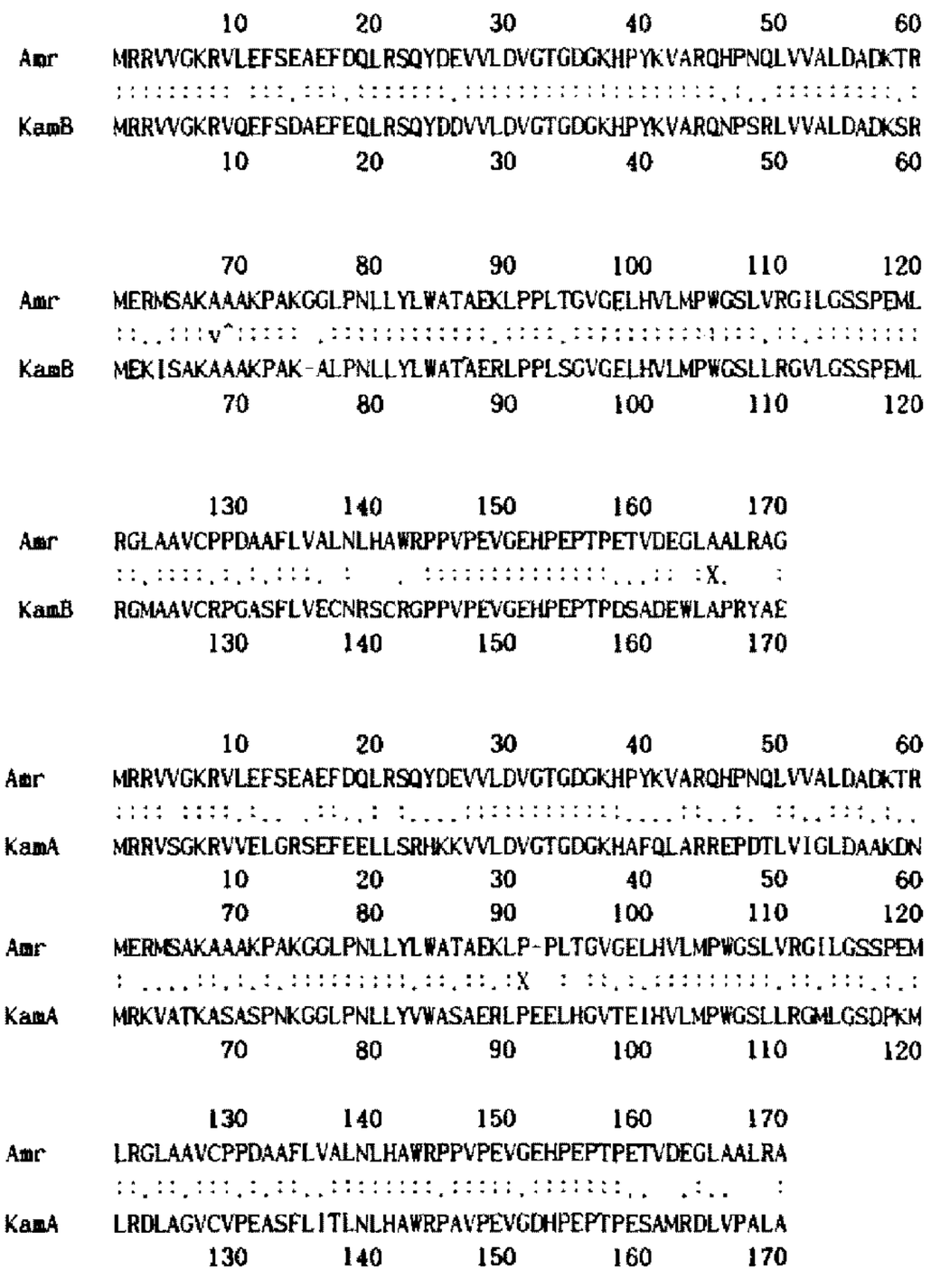

Fig. 5. Comparison of amino acid sequence of Amr to KamA, B, 16S rRNA methylase.

등에 의해 cloning된 *kamA*와 비슷하므로 DNA 염기서열을 비교분석하기 위하여 pTMR32 내성유전자의 DNA 염기서열을 결정하였다(Fig. 4). DNA의 GC%는 72.9%로서 전형적인 스트렙토마이세스의 GC% 범주 안에 있음을 나타냈다. 결정된 염기서열을 DNA/Protein Sequence 분석 소프트웨어 DNASIS/PROSIS (Hitachi Software Engineering Co., Ltd)를 이용하여 GenBank로 분석한 결과 내성패턴으로 예상했던 것처럼 Cundliffe 등에 의해 *Streptomyces tenebrarius* 에서 그리고 Hasegawa 등에 의해 *Streptomyces tenjimariensis*에서 cloning되어 보고된 *kamB, kamA* 유전자와 DNA 염기서열에서 79%, 62% 그리고 단백질 아미노산 서열에서 80%, 63%의 높은 상동성을 보였다(Fig. 5). 따라서 *Stall. hindustanus* ATCC 31219로부터 cloning된 *amr* 유전자는 16S rRNA를 수식하여 kanamycin과 apramycin에 강한 내성을 지정하는 *kamA, kamB* 유전자(16S ribosomal RNA methylase gene)와 같은 기능을 하는 유전자임을 알 수 있었다.

요 약

Nebramycin 복합체를 생산하는 *Stall. hindustanus* ATCC 31219로부터 아미노글라이코사이드계 항생제(특히 kanamycin, apramycin에 대해 높은 내성(500 μg/m*l*)을 보임)에 대해 다제내성을 나타내는 유전자를 cloning하였다. cloning된 유전자의 염기서열을 결정한 결과 16S ribosomal RNA methylase인 KamA, KamB와 아미노산 서열이 63%와 80%로 매우 높은 상동성을 보였다. 따라서 clone된 유전자는 16S ribosomal RNA methylase 임을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센타)의 연구비지원에 의하여 이루어진 결과의 일부로서 이에 감사드린다.

참고문헌

1. Baltz, R.H., G.D. Hegeman, and P.L. Skatrud. 1993. Industrial Microorganisms: Basic and Applied Molecular Genetics. ASM press, Pp. 183-194.
2. Martin, J.F. and P. Liras. 1989. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu. Rev. Microbial.* **43**: 173-206.
3. Distler, J., C. Braun, A. Ebert, and W. Pipersberg. 1987. Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: Analysis of a central region including the major resistance gene. *Mol. Gen. Genet.* **208**: 204-210.
4. Distler, J., A. Ebert, K. Mansouri, K. Pissowotzki, M. Stockmann, and W. Pipersberg. 1987. Gene cluster for streptomycin biosynthesis in *Streptomyces griseus*: nucleotide sequence of three genes and analysis of transcriptional activity. *Nucl. Acids Res.* **15**: 8041-8056.
5. Shaw, K.J., P.N. Rather, R.S. Hare, and G.H. Miller. 1993. Molecular gentics of aminoglycoside resistance genes and familial relationship of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol. Rev.* **57**: 138-163.
6. Beauclerk, A.A.D. and E. Cundliffe. 1987. Sites of action of two ribosomal RNA methylase responsible for resistance to aminoglycoside. *J. Mol. Biol.* **193**: 661-671.
7. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kieser, C.J. Bruton, H.M. Kiesser, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf. 1985. Genetic manipulation of *Streptomyces*. The John Innes Foundation Norwich.
8. Maniatis, T., J. Sambrook, and E.F. Fritsch. 1989. Molecular Cloning, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.
9. Piendl, W., A. Bock, and E. Cundliffe. 1984. In-

volvement of 16S ribosomal RNA in resistance of the aminoglycoside producers *Streptomyces tenjimariensis, Streptomyces tenebrarius* and *Micromonospora purpurea. Mol. Gen. Genet,* **194**: 24-29.
10. Skeggs, P.A., D.J. Holmes, and E. Cundliffe. 1987. Cloning of aminoglycoside-resistance determinants from *Streptomyces tenebrarius* and comparison with related genes from other Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 915-923.
11. Skeggs, P.A., J. Thompson, and E. Cundliffe. 1985. Methylation of 16S ribosomal RNA and resistance to aminoglycoside antibiotics in clones of streptomyces lividans carrying DNA from *Streptomyces tenjimariensis. Mol. Gen. Genet.* **200**: 415-421.
12. Ohta, T. and M. Hasegawa. 1993. Analysis of the nucleotide sequence of fmrT endoding the self-defense gene of the istamycin producer, *Streptomyces tenjimariensis* ATCC 31602: comparison with the sequences of *kamB* of *Streptomyces tenebrarius NCIB 10028 and kamC* of *Saccharopolyspora hiruta. J. Antibiot.* **46**: 511-517.

(Received 10 February 1995)