

MLS계 항생제에 대한 유도내성 유전자 *ermK* 및 그 돌연변이체의 유도내성 표현형

최성숙 · 최웅칠*

서울대학교 약학대학

(Received July 16, 1997)

Characteristics of the Resistance Phenotypes by Inducible Resistance Gene *ermK* and Its Terminator Region Mutants

Sung-Sook Choi and Eung-Chil Choi*

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—The characteristics of the resistance phenotypes of *Bacillus subtilis* having *ermK* and its terminator region mutants were determined. Wild type *ermK*(pEC101) and pECMT109(methylase SD-region mutant) showed typical inducible resistance phenotype. pECMT1(terminator1 region mutant) and pECMT2(terminator2 region mutant) showed constitutive resistance to kitasamycin but inducible resistance to tylosin. In contrast, pECMT3(terminator1 and terminator 2 double mutant) and pECMT309(terminator1, terminator2 and methylase SD region triple mutant) showed constitutive resistance both to kitasamycin and tylosin.

Keywords □ Resistance, MLS antibiotics, *ermK*, Phenotypes.

Erythromycin(EM)으로 대표되는 MLS계 항생물질에 대한 내성은 주로 그 target site인 23S rRNA의 methylation에 기인하며¹⁻³⁾ 메틸화에 관계된 유전자(*erm*)의 발현 조절기전은 전사후 단계의 조절기전(translational attenuation)으로 설명되어 왔다.⁴⁻⁷⁾ 즉 세균의 아미노산 생합성 operon에서 발견되는 전사단계의 조절기전(transcriptional attenuation)과 유사하나⁸⁾ *erm*유전자의 경우에는 유도자인 EM의 존재 유무에 관계없이 항상 같은 수준으로 full-length의 mRNA가 합성되나 EM이 존재할 때에만 translation이 진행되는 translational attenuation으로 설명된다.

그러나 과등은⁹⁻¹⁰⁾ *B. licheniformis* EMR 균주에서 분리된 MLS내성 유전자인 *ermK*의 경우는 지금까지

알려진 내성 조절기전인 전사후 조절(translational attenuation) 기전이 아닌 전사단계에 조절(transcriptional attenuation)에 의해 그 발현이 조절됨을 밝혔다. 즉 내성 유도 물질인 EM이 존재하지 않을 때에는 leader region에 존재하는 2개의 transcriptional terminator에 의해 전사가 중지되어 truncated mRNA가 합성되며 EM 존재 시에는 terminator의 2차 구조가 해체되어 full length의 mRNA가 만들어 지고 leader region의 재배열에 따른 SD-2의 노출로 methylase의 생성이 유도된다. 한편 Hue등은¹¹⁾ *ermK*와 leader 영역의 염기서열이 3개만 다른 *ermD*의 경우 그 유전자 발현이 기존의 *erm* 유전자와 동일한 전사후 단계에서 조절된다고 보고 하였다.

본 연구자들은 *ermK* 유전자 발현을 보다 확실히 규명하여 MLS내성 조절 기전의 다양성을 보고자 하여 *ermK* leader 영역에 존재하는 transcriptional terminator에 site-directed mutation을 도입하여 그 이

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802

차구조를 불안정화 시켰다. 이와같이 하여 만든 5종의 돌연변이체와 wild type *ermK*를 대상으로 Northern blot, beta-galactosidase assay 등을 실시한 결과 *ermK*는 그 발현이 주로 전사단계에서 조절됨을 밝힌바 있다.¹²⁾ 본 연구에서는 wild type *ermK* 및 그 돌연변이체가 나타내는 유도내성 표현형을 비교하고자 하였다.

균주 및 PLASMID – 본실험에서는 wild type *ermK* 유전자가 크로닝된 plasmid pEC101을 갖고있는 *Bacillus subtilis* UOTO 277¹⁰⁾ 및 돌연변이된 *ermK* 유전자가 크로닝된 plasmid pECMT1, pECMT2, pECMT3, pECMT109, pECMT309를 갖고있는 *Bacillus subtilis* UOTO277균주를 사용하였다.¹²⁾(Fig. 1)

배지 및 항생제 – 균 배양용 배지로는 LB배지를 사용하였으며 사용된 항생제는 erythromycin(EM), kitasamycin(KIT), tylosin(TYL)이다.

고체배지상에서의 유도내성 표현형 관찰 – pEC101(*ermK*)을 갖고있는 *Bacillus subtilis* UOTO 277균주는 EM 또는 oleandomycin(OM) 과의 접촉에 의해 다른 MLS계 항생제에 대해 내성을 획득하게 되는데 이는 고체배지 상에서 disk법으로 확인할 수 있다. 즉 EM또는 OM에 의해 그 주변에 있는 균들도 내성을 획득하여 고체배지상에서 저지원이 찌그러진 D-shape을 형성하게 된다. 따라서 wild type pEC 101(*ermK*) 및 terminator region이 변한 5가지 돌연변이체들의 표현형을 agar disk method에 의하여 관찰한 결과 terminator1이 변한 돌연변이체는 D-shape을 나타내기는 하나 저지원의 크기가 작아졌다. terminator 2만 변

한 돌연변이체는 TYL주변에는 여전히 찌그러진 모양의 D-shape의 저지원을 나타내고 있으나 KIT에 대해서는 본태성 내성을 나타내고 있음을 관찰할 수 있었다. terminator 1, 2 모두 변한 돌연변이체의 경우에는 KIT 주변에는 균이 모두 자라 본태성 내성 균주의 표현형과 동일하였다. 즉 terminator의 2차 구조가 해체되어 EM 존재 유무에 관계없이 methylase가 합성됨을 알 수 있었다. TYL의 주위에는 D-shape이 아닌 원형의 저지원을 형성하였다. D-shape이 아닌 원형의 저지원을 나타낸 것은 TYL에 대한 이균주의 MIC 값이 증가한 것에 기인하는 것으로 생각되어진다(pEC101 MIC = 2.5 µg/ml, pECMT3 MIC > 10 µg/ml). Methylase 합성에 필요한 SD-region이 노출되도록 만든 돌연변이체 pECMT109의 경우 그 표현형은 wild type과 유사하였고, T1과 T2 및 SD-2 region에 돌연변이가 된 pECMT309의 경우에는 그 표현형이 본태성 내성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 2).

액체법에 의한 유도내성 관찰 – Weaver 등¹³⁾은 액체 배지상에서 항생제에 대한 내성이 유도 되는 것을 비탁법으로 관찰하였을 때 내성이 유도 되는데는 적절한 시간이 요구되는 것을 관찰하였다. 모균주와 돌연변이체에 대한 EM의 다른 macrolide계 항생제에 대한 유도 능력을 비교하기 위해 액체법에 의한 유도 내성 실험을 하였다. LB 액체배지 10 ml에 wild type 및 돌연변이체를 각각 접종하여 37°C에서 하루밤 진탕 배양 하였다. LB배지 5 ml에 탁도(OD=550 nm) 0.2가 되도록 표준 균액을 넣고 inducer로 EM을 0.1 µg/ml의 농도로 첨가하였다. 37°C에서 3시간 진탕 배양후 새로운 배지 5 ml에 위의 균액을 탁도 0.05가 되도록 넣고 EM, KIT 및 TYL을 각각 100 µg/ml 농도가 되도록 첨가하였다. 대조군으로 위의 배양액을 사용하되 항생물질을 첨가하지 않은 것과 induction시키지 않고 3시간 동안 배양한 균액에 항생물질을 넣은 것을 동시에 실험하였다. 위의 실험군과 대조군을 37°C 동일 조건에서 진탕배양하면서 1시간마다 550 nm에서 흡광도를 측정하여 성장 정도를 확인 하였다.

Wild type pEC101의 경우 소량의 EM(0.1 µg/ml)에 노출시킨 후 과량의 항생제(KIT, TYL 100 µg/ml) 등에 노출시켰을 때는 일정시간 후 모든 경우 균의 성장이 확인 되었다. 반면 EM에 의한 유도가 없는 경우에는 고농도의 KIT에 대해서는 8시간 이후에 균의 성장이 관찰 되었는데, 이는 EM존재와 관계없이 미량으로

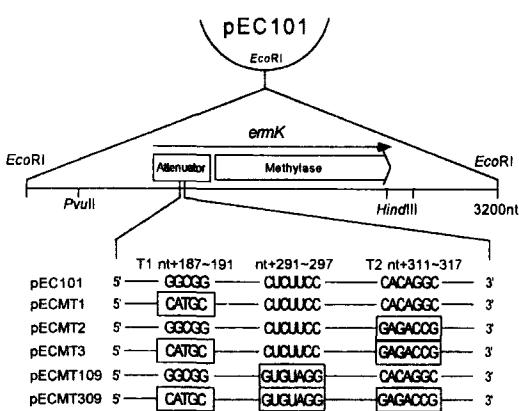


Fig. 1 – Schematic representation of mutant plasmids used in this study. pEC101 and its leader region mutants. The mutated regions are shown in boxes.

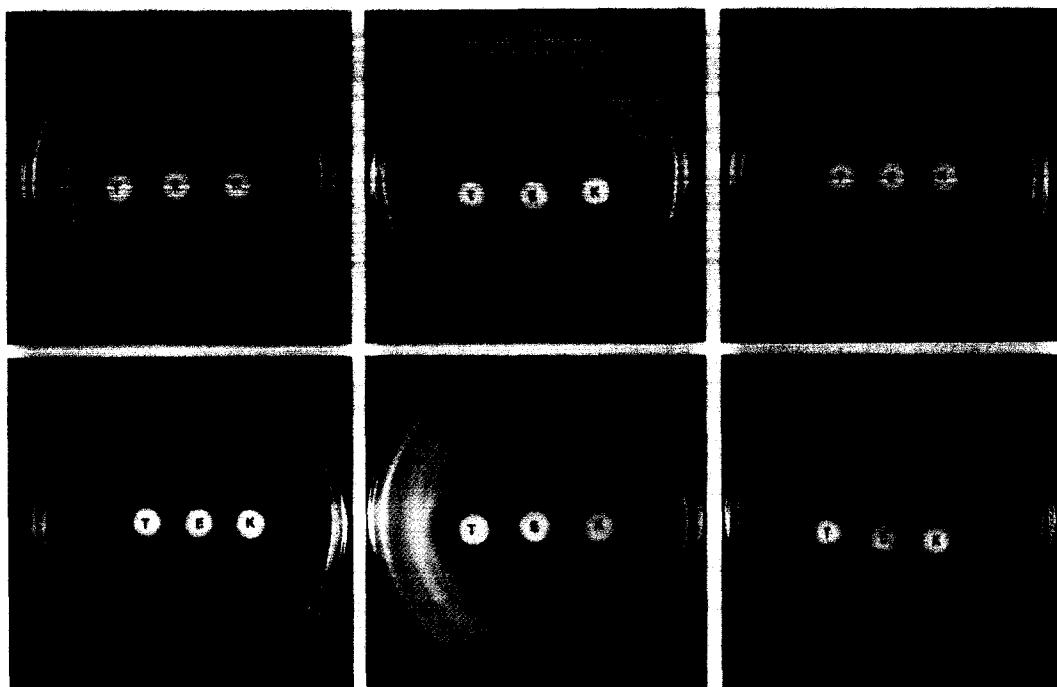


Fig. 2—Inhibition zone patterns on the bacterial lawns of the wild type *B. subtilis* having pEC101(*ermK*) and its terminator region mutants.

A: wild type pEC101, B: pECMT1(terminator1 region mutant), C: pECMT2(terminator 2 region mutant), D: pECMT3(terminator 1 and 2 double mutant), E: pECMT109(methylase SD-region mutant), F: pECMT309(terminator1 , terminator 2 and methylase SD-region mutant)

합성된 methylase에 의한 것으로 생각된다. 그러나 TYL에 대해서는 24시간 후에도 그 성장을 확인 할 수 없었다. terminator 1만 변한 pECMT1의 경우 소량의 EM으로 induction 하지 않고 과량의 KIT(100 µg/ml) 및 TYL(100 µg/ml)에 노출 시켰을 때 KIT에 대해서는 4시간 후부터 그 성장을 확인할 수 있었으나 TYL에 대해서는 wild type과 같이 24시간 후에도 균의 성장을 관찰할 수 없었다. terminator 2만 변한 pECMT2의 경우에는 KIT에 대해서는 2시간 이후부터 성장을 확인 할 수 있었다. 그러나 TYL에 대해서는 여전히 24시간 후에도 성장을 관찰할 수 없었다. terminator 1, 2가 모두 변한 pECMT3의 경우에는 유도자인 EM에 노출시킨 경우나 그렇지 않은 경우 모두 과량의 KIT 존재하에서 그 성장 정도가 큰 차이없이 양호하였으나 여전히 TYL에 대해서는 24시간 후에도 그 성장을 관찰할 수 없었다. 액체 배지법으로 내성 유도 양상을 관찰한 결과, pECMT1보다는 pECMT2의 성장이 우수하였으며 pECMT3는 EM 유무에 관계없이 KIT에서의 성장 정도가 양호하였다. terminator의 2차

구조로서는 terminator1이 보다 강력한 terminator로 추정 되었으나 pECMT1보다는 pECMT2의 성장이 더 양호한 것으로 관찰 되었다. 이것은 terminator2 영역이 methylase translation에 필요한 SD-2 와 인접하여 있고 따라서 terminator2의 염기서열을 바꾼 돌연변이체에서는 SD-2가 노출될 수 있는 2차구조가 되어 ribosome이 쉽게 접근하여 methylase 합성을 시작한 것으로 생각된다. 즉 이 결과로서 전사단계에서 그 유전자 발현이 조절된다고 설명된 *ermK*의 경우에도 실험적 방법으로 검출할 수 없는 정도의 소량의 full length mRNA는 항상 합성되고 있으며, pECMT2의 경우는 2차 구조상 pECMT1보다는 SD-2 와 인접하여 있고, 따라서 terminator1이 그대로 존재 하는 경우에도 basal level의 full length mRNA의 노출된 SD-2에 ribosome이 결합하여 methylase가 합성 되므로 더 잘 자라는 것으로 추정된다. pECMT109의 경우 액체배지상에서의 표현형은 wild type pEC101과 유사함을 나타냈다. pECMT309의 경우에는 고농도의 KIT에 노출 시켰을 때는 EM에 의한 유도에 관계없이 성장이 양호

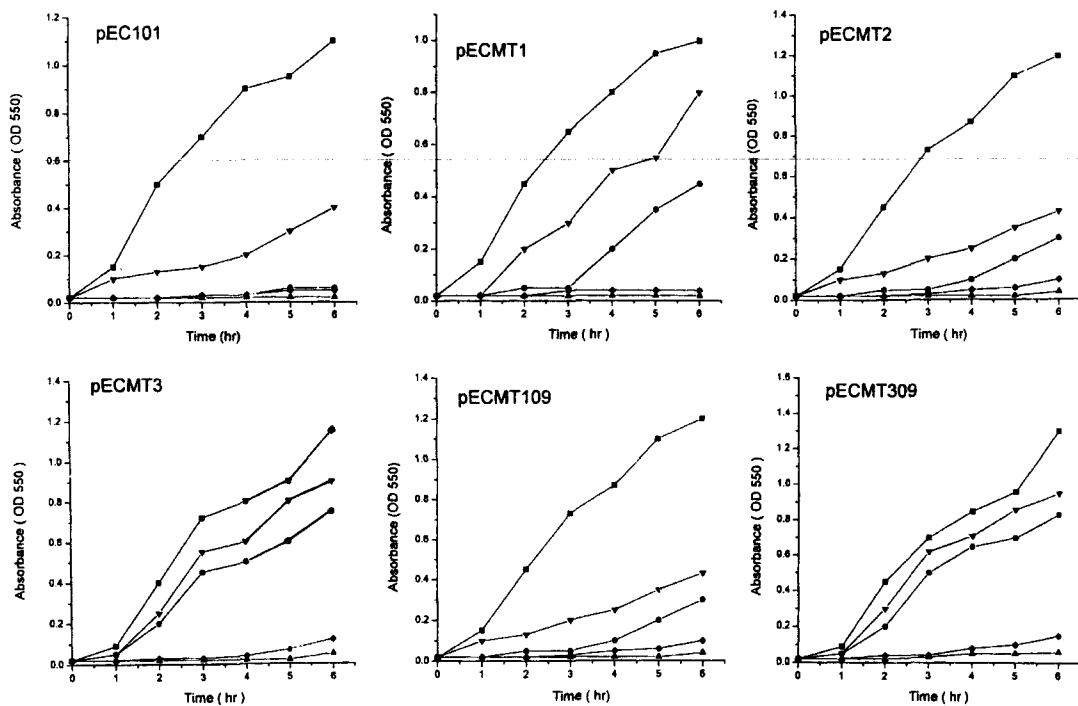


Fig. 3—Inducibility of erythromycin, kitasamycin and tylosin in *B. subtilis* having pEC101, pECMT1, pECMT2, pECMT³, pECMT109 and pECMT309.
 (■: Control, ●: -Em+Kit, ▲: -Em+Tyl, ▼: +Em+Kit, ◆: +Em+Tyl)

하였으며 소량의 EM에 노출없이 고농도의 TYL에 노출시켰을 때에도 15시간 후부터는 그 성장을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

이상의 유도내성 실험을 통하여 관찰한 결과 terminator1과 terminator2가 각각 변한 돌연변이체는 유도 내성 양상을 나타내나 wild type보다 빠르게 유도되는 것을 알 수 있었다. terminator 1 및 terminator 2가 모두 바뀐 돌연변이체 및 triple mutant의 경우에는 EM존재에 관계없이 균이 성장하여 지속성 내성으로 변한 것을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품개발연구센터를 경유한 과학재단 지원에 의해 수행된 것으로 그 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Lai, C. T., Dahlberg, J. E. and Weisblum, B. :

Structure of an inducibly methylable nucleotide sequences in 23S ribosomal ribonucleic acid from erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochem.* **12**, 457 (1973).

- 2) Ettayebe, M., Prasad, S. S. and Morgan, E. A. : Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **162**, 551 (1985).
- 3) Denoya, C. D. and Dubnau, D. : Site and substrate specificity of the *ermC* 23S rRNA methyltransferase *J. Bacteriol.* **169**, 3857 (1987).
- 4) Shivakumar, A. G., Hahn, J., Grandi, G., Kozlov, Y. and Dubnau, D. : Posttranscriptional regulation of an erythromycin resistance protein specified by plasmid pE194. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3903 (1980).
- 5) Horinouchi, S. and Weisblum, B. : Post-transcriptional modification of RNA conformation : mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7079 (1980).

- 6) Shivakumar, A. G. and Dubnau, D. : Characterization of a plasmid specified ribosome methylase associated with macrolide resistance *Nucl. Acids Res.*, **9**, 2549 (1981).
- 7) Horinouchi, S. and Weisblum, B. : Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.*, **150**, 804 (1982).
- 8) Kolter, R. and Yanofsky, C. : Attenuation in amino acid biosynthesis operons. *Ann. Rev. Genet.*, **160**, 113 (1982).
- 9) Choi, E. C., Kwak, J. H. and Weisblum, B. : MLS inducible resistance mechanism in *Bacillus licheniformis* EMR-1, cloning of *ermK*, an MLS resistant element. *Yakhak Hoeji* **32**, 213 (1988).
- 10) Kwak, J. H., Choi, E. C. and Weisblum, B. : Transcriptional attenuation control of *ermK*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.*, **173**, 4725 (1991).
- 11) Hue, K. K. and Bechhofer, D. H. : Regulation of the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *ermD*. *J. Bacteriol.*, **174**, 5860 (1992).
- 12) Choi, S. S., Kim, S. K., Oh, T. G. and Choi, E. C. : Role of mRNA termination in regulation of *ermK*. *J. Bacteriol.*, **179**, 2065 (1997).
- 13) Weaver, J. R. and Pattee, P. A. : Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.*, **88**, 1574 (1964).