

## Small Multidrug Resistance(*smr*) 플라스미드 pKH4의 염기서열 결정

고창학 · 문경호 #

경성대학교 약학대학

(Received August 27, 1999)

### Complete Nucleotide Sequence of Small Multidrug Resistance Plasmid pKH4

Chang Hak Koh and Kyung Ho Moon #

College of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

**Abstract** — The complete nucleotide sequence of pKH4, a small multidrug resistance (*smr*) plasmid isolated from multidrug resistant *Staphylococcus aureus* SA5, was determined. Sequence analysis has revealed that pKH4 has two open reading frames for Rep and Smr proteins. The comparison of the amino acid sequence of Smr protein of pKH4 with those of other Smr proteins of various *Staphylococcus* showed that Smr protein of pKH4 is a new member of the SMR family.

**Keywords** □ Antiseptic resistance; *Staphylococcus aureus*; SMR family.

포도상구균속의 세균에 있어 4급 암모늄 화합물이나 ethidium bromide(EtBr)에 대한 내성을 매개하는 유전자는 *qacC*,<sup>1)</sup> *smr*<sup>2)</sup> 혹은 *ebr*<sup>3)</sup>로 알려져 왔으나 최근에 와서 *smr*로 사용되고 있다.<sup>4)</sup> 이 유전자를 가지고 있는 플라스미드로는 *S. aureus*에서 분리된 2.4-kb의 pSK89,<sup>5)</sup> coagulase-negative staphylococci에서 분리된 2.4-kb의 pSK108,<sup>6)</sup> 그리고 식품 제조 공정과 연관된 staphylococci에서 분리된 2.8-kb의 pST827<sup>7)</sup> 과 2.4-kb의 p2H6<sup>8)</sup> 등이 보고되었다. 한국에서는 항생제 다제내성균 *S. aureus* SA2로부터 2.4-kb의 pKH8이 분리되어 전체 염기 서열이 결정되었다.<sup>9)</sup> 각각의 플라스미드들은 전체 염기 서열이 결정되었는데 특이한 것은 한국에서 *S. aureus*로부터 분리된 pKH8의 전체 염기 서열이 같은 종의 *S. aureus*로부터 분리한 pSK89보다 다른 종인 coagulase-negative에서 분

리한 pSK108과 높은 상동성을 보인다는 점이다.<sup>9)</sup> *smr* 유전자의 산물인 Smr 단백질은 110 개 전후의 아미노산을 가지고 있으며 4 개의 단편이 세포막을 관통하는 4 TMS(transmembrane segment)의 3차 구조를 하고 있다.<sup>10)</sup> Smr 단백질은 proton motive force에 의해서 안으로 들어온 화합물들을 밖으로 배출하여 내성을 나타낸다고 알려져 있다.<sup>4)</sup>

*Staphylococcus aureus* SA5는 임상에서 분리된 균으로서 엠피실린, 에리스로마이신, 겐타마이신, 가나마이신, 메치실린, 스트렙토마이신, 테트라사이클린, 토부라마이신, 트리메토프림의 9개 항생제와 benzalkonium chloride에 내성을 보이는 다제 내성균으로서 보고되었는데<sup>11)</sup> 이들 항생제에 대한 내성 기전을 규명하기 위한 기초 실험으로 플라스미드를 조사하여 본 결과 2.8-kb의 pKH3와 2.4-kb의 pKH4 등 2개의 플라스미드를 가지고 있음을 확인하였다. 이 2개의 플라스미드들과 항생제 내성과의 연관성을 규명하기 위하여 pKH3와 pKH4의 전체 염기 서열을 결정하여 분

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 051-620-4885 (팩스) 051-628-6540

석한 결과 pKH4는 *smr* 유전자를 가지고 있는 *smr* 플라스미드였으며 pKH3는 복제에 관여하는 *rep* 유전자만을 가지고 있는 cryptic 플라스미드로 밝혀졌다. 본 논문에서는 pKH4의 전체 염기 서열과 pKH4의 *Smr* 단백질에 대하여 보고하고자 한다.

### 실험방법

**플라스미드 및 실험균주** - *smr* 플라스미드 pKH4는 *S. aureus* SA5로부터 분리하여 사용하였으며 phagemid인 pBluescript II KS<sup>+</sup>를 클로닝 및 염기서열 결정 벡터로 사용하였다. 클로닝 및 염기서열 결정을 위한 재조합 플라스미드의 수용균주로는 *E. coli* JM83 {*ara*,  $\Delta$ (*lac*, *proA*, *B*), *rps*, *strA*, *thi*,  $\phi$ 80*dlacZ* M15(*rk*<sup>+</sup>, *mk*<sup>+</sup>)}을 사용하였다.

**효소 및 시약** - 여러가지 제한효소나 T4 DNA ligase, 플라스미드 분리를 위한 Wizard<sup>TM</sup> DNA purification systems, 결실돌연변이를 위한 Erase-a-Base<sup>®</sup> system 그리고 염기서열 결정을 위한 SILVER SEQUENCE<sup>TM</sup> DNA sequencing systems, T3 promotor primer 및 T7 promotor primer를 Promega에서 구입하여 사용하였다.

**플라스미드 분리** - *S. aureus* SA5로부터 pKH4의 분리는 김<sup>12)</sup> 등의 방법에 의하여 분리하였으며 *E. coli* JM83의 플라스미드 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하였다.<sup>13)</sup> DNA 결실이나 염기서열 결정을 위한 플라스미드 분리는 Wizard<sup>TM</sup> DNA purification systems을 사용하여 분리하였다.

**결실돌연변이체의 생성** - 염기서열 결정을 위한 결실돌연변이체는 Erase-a-Base<sup>®</sup> system을 사용하여 제조자의 방법에 따라 만들었다. 결실돌연변이체 중에서 원하는 크기의 플라스미드를 가지고 있는 균주들을 얻기 위하여 결실돌연변이체의 플라스미드를 분리한 다음 전기영동하여 선별하였다.

**클로닝 및 염기서열 결정** - pKH4의 전부 혹은 단편들을 pBluescript II KS<sup>+</sup>에 클로닝하기 위하여 pKH4와 pBluescript II KS<sup>+</sup>를 동일한 제한효소를 사용하거나 compatible end를 만드는 제한효소로 처리하였다. 처리된 단편들은 T4 DNA ligase를 사용하여 연결하였으며 *E. coli* JM83에 CaCl<sub>2</sub>법<sup>14)</sup>으로 형질전환시켜 염기서열 결정에 사용하였다. 염기서열 결정은 SILVER SEQUENCETM DNA sequencing sys-

tems을 사용한 Sanger법에 의하여 수행하였다.<sup>15)</sup>

### 실험 결과 및 고찰

pKH4의 전체 염기 서열을 결정한 결과가 Fig. 1에 나와 있다. pKH4의 전체 염기 서열은 2487 bp로 나타났다. ORF를 분석한 결과 2 개를 확인할 수 있었는데 하나는 플라스미드의 복제에 관여하는 Rep 단백질이었으며 다른 하나는 benzalkonium chloride와 같은 4 급 암모늄화합물의 내성을 매개하는 Smr 단백질이었다. 일반적으로 Smr 단백질의 유전자를 가지고 있는 *smr* 플라스미드들은 334 개의 아미노산으로 구성된 Rep 단백질과 107 개의 아미노산으로 구성된 Smr 단백질을 가지고 있는데<sup>6,9)</sup> pKH4도 같은 수의 아미노산을 가지고 있었다(Fig. 1). 현재까지 아미노산 서열이 밝혀진 Smr 단백질을 살펴보면 pSK89,<sup>1)</sup> pWBG32,<sup>2)</sup> pSK108,<sup>6)</sup> pST827,<sup>7)</sup> pKH8,<sup>9)</sup> p2H6<sup>8)</sup> 등이 있는데 이 중에서 pSK89, pWBG32, pSK108, pKH8은 동일한 아미노산 서열을 가지고 있으며, pST827의 경우 1개의 아미노산에서 차이를 보인다고 알려져 있다. 한편 최근에 분리된 p2H6의 경우 아미노산 서열에 있어 위에서 언급한 다른 플라스미드의 Smr 단백질과 많은 차이를 보여 새로운 형태의 Smr 단백질로 분류되었다. 따라서 pKH4의 Smr 단백질의 아미노산 서열을 pSK89와 p2H6와 비교해 보았는데 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 pKH4의 Smr 단백질은 pSK89의 Smr 단백질뿐만 아니라 새롭게 보고된 p2H6의 Smr 단백질의 아미노산 서열과도 많은 차이를 보여 새로운 형태의 Smr 단백질임을 알 수 있었다. Paulsen 등은 여러 staphylococci의 Smr 단백질의 아미노산 서열을 비교 분석하여 아미노산 서열이 잘 보존된 16 개의 아미노산을 보고하였는데 이 아미노산들은 Smr 단백질에 있어 활성이나 3 차구조에 중요하게 관여하고 있다고 알려져 있다.<sup>10)</sup> pKH4의 Smr 단백질의 경우에는 위의 16개 아미노산 중에서 14개에서 동일한 염기서열을 보였으며 서열이 다른 2개의 아미노산 경우에도 Ser-32가 Thr-32로 Val-72가 Leu-72로 치환되어 2개 다 같은 계열의 아미노산으로 치환된 형태를 보여주었다.

아울러 pKH3의 전체 염기 서열도 결정되었는데 (GenBank AF151117) pKH3는 331개의 아미노산으로 구성된 Rep 단백질 만을 가지고 있는 cryptic 플라스-

GATATCCAAATAGCAGTCATAAAATCGCTCCCTTTTATGCAAACTTTATCACAATAGTTATCGATTTACGGTCTATTTTTCATCGTTATA 90  
 ATCTAGTTAAATCCCGTAAGCGCACTTATACGTCCGATAAAATCGACGTATGCAAAACCATAATCGACCTTCGTGGTTTTTAAATCTTAGT 180  
 TTTAAGTAATCGGTGTCAGCAGCAGATATAAAAATTAATCTGCATTATTAGTAATCGCGGTTGTAGCCGTAGATATAAAAATTAATCT 270  
 ACATCAAAATTTAAGCTAAGATTTAAGCTACTAGTTTTTGTCTAGTAGCTTTTTTATTTTAAAAATTTAAATACCTTTATTTTGAATTTT 360  
 AATGGGGCATTTTAAAGATTTAGGGTAATCATATAGTTTTATGCCTAAAAACTTATATAAGCTCTTAAAAAGCAAAATAGAGCCAAAT 450  
 AAATATATGCTATTTCCAAAAGCAAAAATTTGAGCAAAATCCAGTGTGATTTTTTAAAACTGTCCATTTACATGCAAACTTAAAAAGTT 540  
 AGCATGAAAACCTGGTCAACCATGCGGGTTGAAACGCTATAGTTCCCGCAGGCAAAAAGCATAAAAAACGCTAGCTTTTAAAGCTAACGTT 630  
 R  
 TCAAATCTTTTAAAGTAATAATTTGTTTTTCAAATTCAAAATTCGAGTAATGAATGTCCTTTTCTTCTGTCGTGTTTATATCTT 720  
 K L D K L Y Y N Q K E F N W I A T I S H A K E E E D T T K D  
 CGTCACTGTATTAATCAAATACCATCTTCGGCATCATCAAATTTAAATCTTATGTTTTGTTTAAAGCAATCCACCATAACTCAACA 810  
 E D S T N I L N G D E A D D L N L I K H K Q K L L G G Y S L  
 TACGTTTTTCGATAAAACCTTTTCCAAATCGTTCAGGATTTCTTGATTTCTTCGTATCATCAGTAAAAAATCAGATGACTTAACCG 900  
 M R K R Y L G K E L D N V I E Q N R E D D D T L F D S S K V  
 AATATTTAGAGTTTCTTTGATAGCTGCTGAATATCTTTATCGCCTTTTGATTTGGTTTGATCGATTTAATATTTGCTACAGGTCGAT 990  
 S Y K S T E K I A A Q I D K D G K Q N P K I S K I N A V P R  
 AATCAACTGTAATGCTTTTTTCCATAAATCGACCCATTCGCTCGGTAATATAGTTTTCTTTTTCTCAAATAAGCATTTCACAACAC 1080  
 Y D V Q L A K K W L D V W E T Q T I Y N E K K R F Y A N E V  
 ATAAACAAACGTCATATGTTGGTTATAACTACCGTCATTTTTATTAAGTGTACTTCAGTTGAGCGTAAAAAACCTACCAAAATCTTTT 1170  
 C L L V H M H Q N Y S G D N K N V T V E T S R L F G V L N K  
 TAACTTTGTATACATTTTAAATTTATTAAGAGCCTTAGACATATGCTTTAACTTTGTTCTAATGGTCCCGCTTATGCAATTTTAG 1260  
 K V K T Y M K L K N F A K S M H K L S Q E L H G D G D I A N K  
 TCGATAAAGTAAGAATAACCAACGAGCAGTTGGCTTTCTTTAACTACTTCTCAATCACTTTTGAGCTGTAACTATTTTCATAG 1350  
 T S L T L F L W R A T P K E K V V E E I V K Q A Q Y S N K M  
 CACGCCCAAATACAACTGGGCATAAATTTGACTTACAAAACCATGCTTATGTAATTTCAAATAACCTTCATCAGTTGGCTGAACT 1440  
 A R R W N C V P C L K S K C F W T K H L K L Y G E D T P K F  
 CTAAGACGTTACCACATGTTTTACGTTAAAAGCCTTTTTTATTTTAAAAATTCAGTATATCGCATAACTTACATATCTATCTTCT 1530  
 E L V N G C Q K V N F A K K I K L I E L I D A Y S V N D I K  
 TTTCTCCATGGGCGTTGTTCCCACTTTTCGTATATCTTTAATGTTTTATTACTTGATTTTCGTCTATACATTTAGTAGTATTAT 1620  
 K E R W P R Q K G S K T M D K L T K N D Q N E D I C K T T N  
 ATTGCATATAAAAAGACCTCCAGTATTGATTTAAGCGTCGTAACCTTAATCATATTACTGGAGCTTTTTTATGTCAAATTTTTCTTTCAG 1710  
 Y Q M ← Rep  
 CACAAAAATACATAAAAACACTGTATCAACCAACAGATAAAACAACTTTTAAATCTTTGAGTTATTCTATATAGTATCAAGACAAGAAGA 1800  
 AACTGGTTTCACTCGCCTCAAACCCCTCAACCCCTCAAAAAAGCTATACCACGGAAATCAAAACAAAAATTCAGACTATTTTAAAAAAA 1890  
 TTCAACCGATAAAAATACCTTGAAGGAGGTGTTTTATGCCATATATATTTACTTATAGCAATAATAACCGAAAATAATAGGACAAGT 1980  
 Smr → M P Y I Y L L I A I I T E I I G T S  
 TTTTAAAAATCAGCAGAAGTTTTACAAAACATGCGCAACACTAGGAACACTTATTTCGTTCCGAATATGTTTTACTTTTTAAAGTACA 2070  
 F L K S A E G F T K L W P T L G T L I S F G I C F Y F L S T  
 GCCATGAAATATTTACCATAAATATTTTCATATGCAACATGGGCAGGATTAGGTTTAGTACTTACAACCTAGTTTCAGTCATTATTTTT 2160  
 A M K Y L P L N I S Y A T W A G L G L V L T T L V S V I I F  
 AAAGAAATATTAATCTAATAGTATTTTCAATAACCCCTAATTTATTTGGAGTAGTACTTCTGATGTTTTGGATCAGGACACTAA 2250  
 K E N I S I N L I S I T I L I I I G V V L N V F S G H  
 TTGCTTTATCCAATGCTTTATTGACGTTGAGCCTCGGAACCCCTAACAAATCCCAAAACTTGTGCAATGGTTCGGCTTAAAGCTCACGC 2340  
 TATGCCGACATTCGTCTACAAGTTAGTTAAGGGTCTTCTCAACTTCAATAAATTTTCTCGGCATAAATCGGTGTTCTATTTTTTATTT 2430  
 TTACTCTCTGATAGCAAAAACGCCATCCAATACAAAACCACATACCTATAATC 2487

Fig. 1 – Complete nucleotide sequence of pKH4. The amino acid sequences of Rep and Smr proteins are shown. GenBank accession number is U81980.

		* * *	* * * * *	*	* * * *	*	
pSK89	MPYIYLLIIAISTEIVGS AFLKSEGF SKFIPSLGTIISFGICFYFLSKTMQHLPLNITYA						60
pKH4	MPYIYLLIIAIIITEIIGTSFLKSAEGFTKLWPTLGTLSIFGICFYFLSTAMKYLPLNISYA						
p2H6	MPYLYLLLSIVSEIVGS AFLKSSDGF SKLYPTITTIISFLICFYFLSKTMQHLPLNITYA						
		* * * * *	* * * * *	*	* * * *	*	
pSK89	TWAGLGLVLTIVSVIIIFKEQINLITIVSIVLIIIVGVVSLNIFGTSH						107
pKH4	TWAGLGLVLTIVSVIIFKENINLISIFSITLIIIGVLLNVFGSGH						
p2H6	SWAGLGLVLTIVSVLIFKEQINLISIIISIIIFGVLLNIFGSSH						
		*	*	*	*	*	*

Fig. 2 – Aligned Smr proteins from various staphylococci species. Different amino acid residues, between Smr protein of pKH4 and that of pSK89, are indicated by asterisks above the sequence, and different amino acid residues between Smr protein of pKH4 and that of p2H6 are indicated by asterisks below the sequence.

미드로 확인되었다. 이상의 결과로부터 *Staphylococcus aureus* SA5가 나타내는 여러 내성 중에서 pKH4에 의해서 매개되는 benzalkonium chloride 내성 외에는 전부 다 염색체에 기인하는 것으로 추정되었다.

### 감사의 말씀

이 연구는 1998학년도 경성대학교 학술지원연구비의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Littlejohn, T. G., DiBerardino, D., Messerotti, L. J., Spiers, S. J. and Skurray, R. A.: Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* **101**, 59 (1991).
- 2) Grinius, L., Dreguniene, G., Goldberg, E. B., Liao, C. H. and Projan, S. J.: A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. *Plasmid* **27**, 119 (1992).
- 3) Sasatsu, M., Shima, K., Shibata, Y. and Kono, M.: Nucleotide sequence of a gene that encodes resistance to ethidium bromide from a transferable plasmid in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 10103 (1989).
- 4) Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A.: Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* **60**, 575 (1996).
- 5) Leelaporn, A., Paulsen, I. T., Tennent, J. M., Littlejohn, T. G. and Skurray, R. A.: Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* **40**, 214 (1994).
- 6) Leelaporn, A., Forth, N., Paulsen, I. T., Hettiarachi, A. and Skurray, R. A.: Multidrug resistance plasmid pSK108 from coagulase-negative staphylococci; relationships to *Staphylococcus aureus* qacC plasmids. *Plasmid* **34**, 62 (1995).
- 7) Heir, E., Sundheim, G., and Holck, A. L.: Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 149 (1995).
- 8) Heir, E., Sundheim, G. and Holck, A. L.: The *Staphylococcus qacH* gene product: a new member of the SMR family encoding multidrug resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **163**, 49 (1998).
- 9) Im, S. H., Yoon, S. J., Kim, W. K., Shin, C. K., Lee, D. W. and Moon, K. H.: Characterization of cryptic plasmid of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* SA2. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 145 (1996).
- 10) Paulsen, I. T., Skurray, R. A., Tam, R., Saler, M. H. Jr, Turner, R. J., Weiner, J. H., Goldberg, E. B. and Grinius, L. L.: SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. 1996. *Molecular Microbiol.* **19**, 1167 (1996).
- 11) Kang, J. S. and Moon, K. H.: Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Pusan. *Yakhak Hoeji* **34**, 122 (1990).
- 12) Kim, K. H., Kim, J. M. and Moon, K. H.: Characterization of tetracycline resistant plasmid in *Staphylococcus aureus* by restriction enzyme mapping. *Yakhak Hoeji* **36**, 255 (1992).
- 13) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 368 (1982).
- 14) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory. p. 250 (1982).
- 15) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, 5463 (1977).