약학회지 제 45 권 제 3 호 245~250 (2001)
*Yakhak Hoeji* Vol. 45, No. 3

# 세균의 Methionyl-tRNA Synthetase를 저해하는 새로운 항생물질의 스크리닝

곽진환# · 조영준* · 송난규*
한동대학교 생물식품공학부, *(주) 이매진
(Received April 6, 2001; Revised May 16, 2001)

# Screening of New Antibiotics Inhibiting Bacterial Methionyl-tRNA Synthetase

Jin-Hwan Kwak#, Young-Jun Cho* and Nan-Kyu Song*
*School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Pohang 791-940*
**ImaGene Co. Ltd., Seoul 137-070, Korea*

**Abstract** — Aminoacyl tRNA synthetases of bacteria are known as potential targets for new anti-microbial agents. To isolate new inhibitors of bacterial methionyl-tRNA synthetases from natural sources, a new target-oriented screening system using whole cells which are over-expressing a target enzyme was developed. Approximately 8,000 culture broths of microorganisms from soils were tested by this screening system. Among them, ten culture broths was found to contain inhibitory activity against methionyl -tRNA synthetases of *Escherichia coli*. For the validation of the screening system, this new method was compared with *in vitro* enzymatic method. Seven out of 10 culture broths showed inhibitory activity against methionyl-tRNA synthetases of *E. coli*. This result showed that the new screening system was comparable to the enzyme assay. Thus we believe that our screening system as a new method can be applied for the screening of new antibiotics inhibiting bacterial methionyl-tRNA synthetases from natural products.

**Keywords** □ Aminoacyl tRNA synthetase, target-oriented screening system, enzyme inhibitor, antibiotics

세포 내 단백질 합성 과정은 효소, RNA 등의 수많은 세포 내 구성성분들 간의 정교한 상호작용에 의해 수행되고 있으며, 세균과 같은 원핵세포와 고등동물세포인 진핵세포간에는 단백질 생합성의 각 과정에 있어 상당한 차이가 있기 때문에, 이 과정에 관여하는 각종 효소 및 세포내 구성물질들은 새로운 항생제 개발의 좋은 표적물질이 되어 왔다. 그러나 기존의 주요 항생제들의 단백질합성 억제 작용부위들에 대해서는, 항생제의 남용으로 인해 주요 병원성 세균들이 이에 대한 내성을 이미 갖고 있다.[1] 따라서 단백질 합성을 저해하는 항생물질들 간의 교차내성 문제점들을 해결할 수 있는 유일한 방법은, 단백질 합성에 관여하는 기존의 표적물질과 전혀 다른 새로운 세균의 표적물질을 찾고 이를 이용하여 새로운 화학구조와 새로운 작용기전을 갖는 항생물질의 개발하는 것이다.

세포 내 단백질 합성에 관여하고 따라서 세포의 성장에 필수적인 amino-acyl tRNA synthetase 중 methionyl-tRNA synthetase는 이러한 관점에서 새로운 항생제를 개발을 위한 새로운 target으로서 매우 유망하다고 할 수 있다.[2-4] 세포 내 methionyl-tRNA synthetase는 세포 내에서 기질인 methionine, ATP, methionyl-tRNA와 결합하여 methionyl-tRNA에 methionine을 전달하고 이로서 methionine이 단백질의 합성에 사용될 수 있도록 하여 준다. 따라서 이 효소의 아미노산과 tRNA에 대한 특이적 결합은 단백질

# 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 054-260-1353 (팩스) 054-261-6705

합성의 정확성을 유지하는데 중요하며 세포 성장에 필수적이다. 이러한 이유로 이들 효소들의 구조와 기능에 대한 연구는 방대하게 진행되고 있으나,[5-7] 이를 응용하여 새로운 항생물질을 개발하려는 연구는 미국의 벤처기업인 Cubist사를 중심으로 비교적 최근에 시작되었고 아직 탐색연구 단계에 있기 때문에, 국내에서 이러한 연구를 지금 시작하는 것은 충분히 경쟁력을 갖출 수 있는 분야라고 할 수 있다. 지금까지 이러한 aminoacyl-tRNA synthetase를 저해하는 작용 기전을 가진 항생제로는 Mupirocin,[8] Indolmycin,[9] 등이 알려져 있으며, 이 중 Mupirocin만이 Smith Kline Beecham에 의해 상품화되어 사용되고 있는 유일한 항생제이다.

국내에서는 분자설계 및 화학합성법에 의한 methionyl-tRNA synthetase 저해제의 개발은 수년 전부터 국내의 연구진에 의해 시작되었으나,[10-11] 천연물 자원으로부터 이 효소의 저해제를 개발하려는 시도는 아직 진행되고 있지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 *E. coli*의 methionyl-tRNA synthetase 유전자를 이용하여 디스크 확산법으로 직접 methionyl-tRNA synthetase 저해제를 검색할 수 있는 새로운 target-oriented 스크리닝 시스템을 만들고, 그리고 이 독특한 약효 검색계를 이용하여 약 8,000여 종의 방선균 및 진균 배양액에 대해 methionyl-tRNA synthetase에 대한 저해 효과가 있는 물질을 검색하였다. 한편, 위의 검색계에서 methionyl-tRNA synthetase에 대해 저해효과 및 항균효과를 갖는 것으로 선발된 균주의 배양액에 대해서는, 이 항균 효과가 과연 세균의 새로운 표적물질인 methionyl-tRNA synthetase에 대한 저해효과에 기인하는 것인지를 확인하기 위해, 다시 효소활성측정법으로 methionyl-tRNA synthetase에 대한 효소 억제 시험을 병행하여 이 검색계의 재현성 및 유용성을 검증하고자 하였다.

## 실험방법

### 시약

Mueller-Hinton 배지, LB 배지는 Difco사에서 구입하였고, methionine, $tRNA^{fMet}$는 Sigma사 제품을, 항균력 측정용 cellulose disk는 Toyo Roshi Kaisha사 제품을, [$^{35}$S] methionine는 Amersham 제품을 구입하여 사용하였다. Cocktail 용액은 Wallac사의 Optiphase supermix를 구입하여 사용하였으며, 방선균 및 진균 배양액은 대전 생명공학연구원에서 분양을 받았다.

### 디스크법을 이용한 토양미생물 배양액의 항균력 측정

Methionyl-tRNA synthetase inhibitor를 개발하기 위해 먼저 8,000 종의 방선균 및 진균 배양액에 대해, 1차 항균력 검색 균주인 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*을 이용하여 디스크법[12]으로 항균력을 검색하였다. Mueller-Hinton(MH) 고체배지에서 시험균을 멸균 면봉을 이용하여 도포한 후, 직경 8 mm의 cellulose disk에 토양미생물 배양액 30 μl를 첨가한 후, 이 디스크를 배지 위에 올려놓고 하루 동안 배양하였다. 만일 어떤 물질이 시험균에 대해 항균 효과를 나타내게 되면, 디스크 주위에 저지원(clear zone)이 생기게 되는데, 이것으로 시험물질의 항균력을 확인하였다.

### Methionyl-tRNA synthetase 을 저해하는 물질의 스크리닝

디스크법에 의해 시험균주에 대해 항균효과를 보이는 배양액 중에서 methionyl-tRNA synthetase에 대해 저해효과를 갖는 것만을 검색하기 위해, 시험 배지 중에서 이 효소의 기질 중의 하나인 methionine이 시험물질의 항균력에 미치는 영향을 측정하여, 항균 효과가 배지 중의 methionine에 의해 영향을 받는 시험물질만을 선발하였다. 즉 배지 중에 methionine이 존재하지 않는 M9 고체배지(200 ml 5X M9, 10 ml 20% glucose, 1 ml 1 M MgSO4, 20 g Bacto-agar, 789 ml D.W)와 배지 중에 methionine이 과량 존재하는 M9-Met 고체배지(400 mg methionine, 200 ml 5X M9, 10 ml 20% glucose, 1 ml 1 M $MgSO_4$, 20 g Bacto-agar, 789 ml D.W)에 각각 *E. coli* JM109를 접종한 뒤, 시험 물질 30 μl가 함유된 디스크를 올려놓고 하루 동안 배양하였다. 두 종류의 배지에서 시험물질에 의한 저지원의 크기를 비교하여서, 만일 M9-Met 배지에서의 저지원의 크기가 M9 배지에서의 크기보다 작거나 또는 저지원이 사라지면, 이 항균물질은 methionyl-tRNA synthetase의 기질인 methionine에 의해 항균력이 소실된 것임을 알 수 있다. 그러나 이것만으로는 이 항균물질이 methionyl-tRNA synthetase의 저해제라고 단정할 수 없기 때문에, 이것을 보완하기 의해 *E. coli*의 methionyl-tRNA synthetase

가 cloning되어 있는 pJB104 plasmid[13]로 형질전환되어 있는 *E. coli* JM109(pJB104) 균주를 이용하였다. 즉 배지 중 methionine에 의해 항균효과가 상쇄되는 시험물질에 대해서만, 다시 M9 배지에서(*E. coli* JM109(pJB104) 균주의 경우에는 M9 배지에(pJB104 plasmid의 selection marker인 ampicillin이 50 μg/ml의 농도로 함유되어 있음) *E. coli* JM109와 methionyl-tRNA synthetase 유전자가 고도발현(overexpression)되어 있는 *E. coli* JM109(pJB104)을 각각 접종한 후, 디스크를 올려놓고 하루 배양하여, 저지원의 크기 변화를 측정하였다. 이번에도 이 시험물질에 의한 저지원의 크기가 *E. coli* JM109에서 보다 *E. coli* JM109(pJB104)에서 작아지거나 사라지면, 이 항균물질은 고도발현된 methionyl-tRNA synthetase 유전자에 의해 항균효과가 상쇄된 것을 알 수 있고, 따라서 이 물질은 methionyl-tRNA synthetase의 저해효과와 직접 관련 있는 물질임을 추정할 수 있었다.

### 대장균의 Methionyl-tRNA synthetase 의 분리 및 정제

위의 검색계의 유효성을 평가하고 또 이 검색계에서 선발된 항균물질이 실제로 이 효소에 대한 저해효과를 갖는 지를 확인하기 위해, *E. coli*로부터 methionyl-tRNA synthetase를 분리 정제하였다.

이미 그 염기서열이 밝혀진 *E. coli*의 methionyl-tRNA synthetase 유전자[3]로부터 PCR을 수행하여, 이것을 단백질 발현 벡터인 pET-28a에 cloning한 다음, *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시켰다. 이와 같이 대량 발현된 methionyl-tRNA synthetase를 분리 정제하기 위하여, 형질전환체를 IPTG로 단백질 발현을 유도시킨 2L의 LB broth에 배양하여 수확한 다음, 45 ml의 buffer용액(50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 5% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.24 M NaCl, 1.4 mM β-mercaptoethanol, 0.1 mM phenylmethylsulfonylflouride(PMSF))에 현탁시켰다. 이를 초음파분쇄기를 사용하여 균을 분쇄시킨 후, 30%~50%의 ammonium sulfate로 침전시키고 50 mM potassium phosphate buffer에 녹인 후 동일 buffer로 dialysis시켰다. 이것을 DEAE-sephadex column에서 0~0.5 M NaCl gradient로 분획을 얻었으며, methionyl-tRNA synthetase가 함유된 분획은 Amicon사의 Centricon-30을 이용하여 농축하였다. 이 같이 분리 정제된 효소는 8% SDS-PAGE를 통해 확인하였다.

### Methionyl-tRNA synthetase 효소 활성 저해능 측정

이와 같이 대량 생산된 효소를 이용하여 methionine 및 ATP를 기질로 한 aminoacylation 반응 조건을 확립하였고, 이로부터 위의 검색계에서 선발된 항균물질이 실제로 methionyl-tRNA synthetase의 aminoacylation 반응을 저해하는 지를 다음과 같이 측정하였다. 50 μl의 반응혼합액(20 mM HEPES(pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 0.15 M $NH_4Cl$, 1 mg/ml BSA, 2 mM ATP, 4 μM $tRNA^{fMet}$, 4 mM $MgCl_2$, 20 μM methionine, 10 μCi [$^{35}$S] methionine)에 5 nM의 methionyl-tRNA synthetase와 5 μl의 시험물질을 넣고 잘 섞은 후 상온에서 20 분간 반응시켰다. 반응액 30 μl를 취하여 10% cold trichloroacetic acid(TCA) 용액으로 미리 적셔 놓은 Whatman 3MM filter pad (2.3 cm) 위에 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 5% TCA 용액으로 30분간씩 3회 washing하였다. 95% EtOH에 15 분간 방치한 후, pad를 건조시킨 다음, 5 ml의 cocktail 용액을 첨가하여 β-counter로 aminoacylated $tRNA^{Met}$을 정량하였다. 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 aminoacylation 반응에 대한 시료의 저해 효과를 측정하였다.

## 실험결과 및 고찰

### 디스크법을 이용한 항균력 측정 및 Methionyl-tRNA synthetase 저해물질의 스크리닝

8,000 종의 토양미생물 배양액에 대해, 1차 항균력 검색 균주인 *S. aureus*와 *E. coli*를 이용하여 항균력을 검색한 결과, Fig. 1-(1)의 (A), (B)와 같이 항균효과를 갖는 650여 종의 배양액을 1차 선발하였다. 이들 항균력을 갖는 물질 중에서, 세균의 methionyl-tRNA synthetase의 활성과 관련이 있는 물질만을 스크리닝하기 위해, 배지 중의 methionone이 존재하지 않는 M9 고체배지와 methionine이 고농도로 존재하는 M9-Met 고체배지에서 시험 물질에 의한 저지원의 크기에 변화가 나타난(Fig. 1-(2)의 (A), (B)와 같은 패턴을 보이는) 75 종의 배양액만을 2차 선발하였다. 이들 배양액들은 효소의 기질인 methionine에 의해

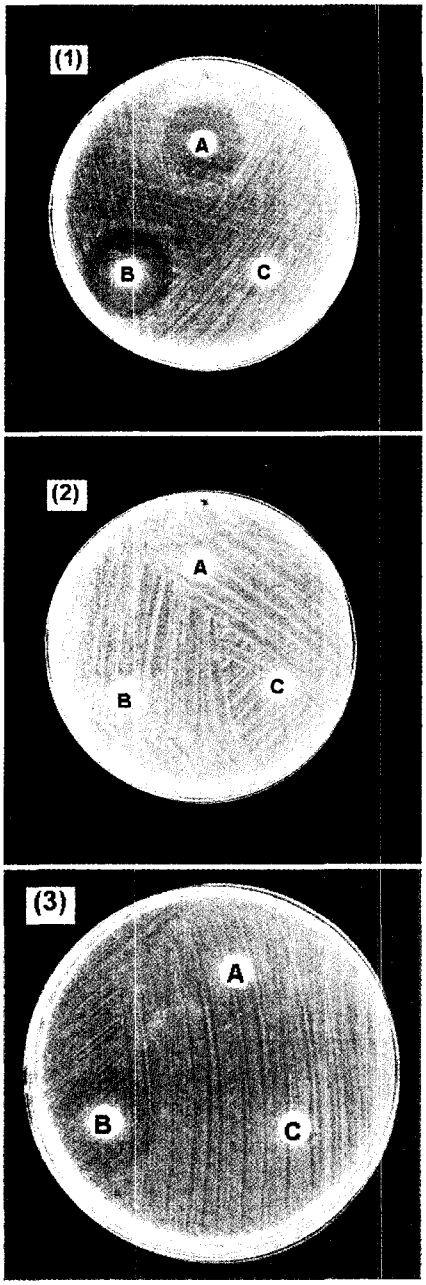


**Fig. 1** – Patterns of Clear Zone by Disk Method. (1) *E. coli* JM109 on M9 agar medium; Both (A) and (B) have strong antibacterial activity, (2) *E. coli* JM109 on M9-Met agar medium; Both (A) and (B) have decreased antibacterial activity, (3) *E. coli* JM109 (pJB104) on M9 agar medium containing 50 μg/ml of ampicillin; Only broth (A) has decreased antibacterial activity.

항균력이 상실되었지만, 그러나 이 결과만으로는 이 물질들이 methionyl-tRNA synthetase의 저해제인 것을

**Table I** – Antibacterial activity of the culture broths against *E. coli* JM109 and *E. coli* JM 109 (pJB104)

| Culture Broth of Soil Bacteria | Diameter of Clear Zone (mm) | | |
|---|---|---|---|
| | *E. coli* JM109 (M9 agar medium) | *E. coli* JM109 (M9-Met agar medium) | *E. coli* JM109 (pJB104) (M9 agar medium with 50 μg/ml of ampicillin) |
| G000791 | 23 | 18 | (-) |
| G000261 | 25 | (-) | (-) |
| G91425 | 27 | 11 | (-) |
| G91399 | 26 | (-) | (-) |
| G91381 | 12 | (-) | 9 |
| G91192 | 12 | (-) | (-) |
| G91172 | 14 | (-) | (-) |
| G90997 | 24 | (-) | 12 |
| G90834 | 12 | (-) | (-) |
| G82593 | 29 | (-) | (-) |

단정할 수가 없다. 따라서 다시 배지 중의 methionine에 의해 항균력이 소실되는 75 종의 배양액들에 대해서만 각각 *E. coli* JM109와 *E. coli* JM109(pJB104)이 접종되어 있는 M9 고체배지에서 저지원 크기의 변화를 측정하여, methionyl-tRNA synthetase가 high copy로 존재하는 *E. coli* JM109(pJB104) 균주에 대해 항균력이 감소하는 경향을 보이는 배양액들을 최종 선발하였다. Table I의 결과와 같이 약 8,000 여종의 배양액 중에서 최종적으로 10 종의 토양미생물 배양액이 Fig. 1-(3)의 (A)와 같은 패턴을 보였는데, 이 배양액들은 효소의 기질인 methionine에 항균력이 감소되었을 뿐만 아니라, 고도 발현된 효소 그 자체에 의해서도 항균력이 상쇄되는 것으로 보아(gene dosage effect)이 배양액 중에는 세균의 methionyl-tRNA synthetase를 저해하는 물질이 존재함을 추정 할 수 있었다.

### Methionyl-tRNA synthetase 의 분리 정제 및 효소 저해활성 측정

시험관내에서 methionyl-tRNA synthetase의 효소활성을 측정하기 위해 대장균의 methionyl-tRNA synthetase를 대량 분리 정제하였다. 최종적으로 DEAE-Sephadex column을 이용하여 효소를 분리 정제하여 SDS-PAGE에서 확인한 결과, Fig. 2에서와 같이 DEAE-Sephadex column의 0~0.5 M NaCl 농도

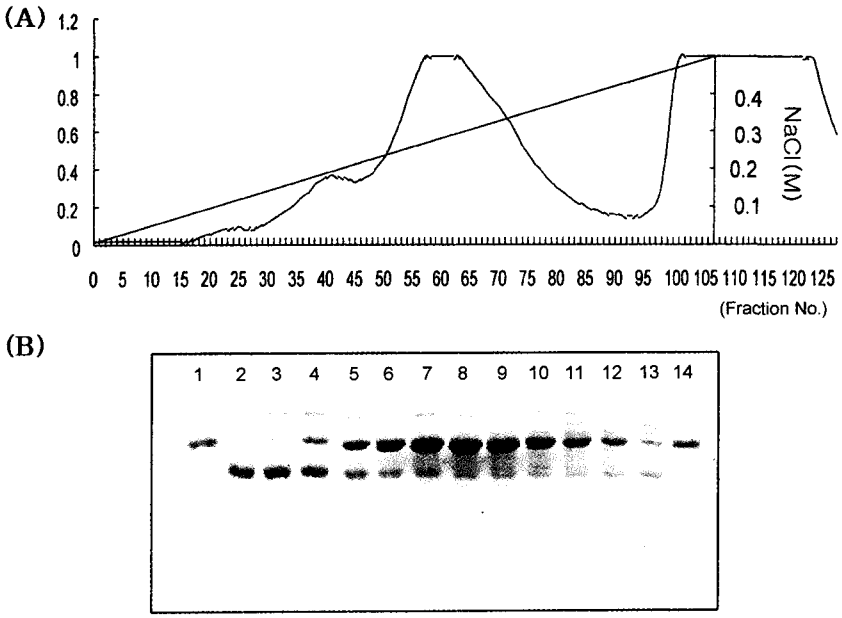


**Fig. 2** – Purification of methionyl-tRNA synthetase by DEAE-Sephadex chromatography. (A) Methionyl-tRNA synthetase was eluted at the concentration of 0.27 M NaCl. (B) Fractions of No. 54-66 (lane 2~13) were collected and concentrated by Centricon-30, and then each fraction was run on 8% SDS-PAGE.

구배에서 분획 54~66에 해당되는 부분이 methionyl-tRNA synthetase임을 알 수 있었다. 이 분획만을 취하여 농축한 결과, SDS-PAGE gel상에서 순도 약 80% 정도의 methionyl-tRNA synthetase를 28 mg/ml의 농도로 얻을 수 있었고, 이를 효소 저해 반응에 사용하였다.

위의 whole cell을 이용한 검색법에 의해 선발된 10 종의 배양액들이 실제로 시험관내에서 methionyl-tRNA synthetase의 효소 활성을 저해하는 지를 확인하기 위해 효소 반응을 실시하여, 저해제가 포함되어 있지 않는 대조군과의 차이를 백분율로 표시하여 inhibition rate를 결정하였다. Table II에서처럼 7 종의 배양액들이 실제로 시험관내에서 세균의 methionyl-tRNA synthetase를 저해하는 재현성을 보였다.

이와 같이 효소의 기질인 methionine과의 competition test와 methionyl-tRNA synthetase가 고도발현된 균주를 이용한 디스크법을 이용해 간편하고 경제적인 검색계를 개발할 수 있었다. 이 검색계는 방사성동위원소의 사용과 고비용 그리고 오랜 시간이 소요되는 직접적인 효소활성측정법과는 달리 빠른 시간에 많은 시료를 스크리닝할 수 있는 장점이 있으므로, 이 검색계로 일차적으로 methionyl-tRNA synthetase 저해제를 스크리닝하고 최종적으로 효소활성측정법을 활용하면, 새로운 항생물질의 개발에 매우 유용할 것으로 사료된다.

**Table II** – Inhibitory activities of 10 culture broths selected from the screening system against aminoacylation of methionyl-tRNA synthetase

| Culture Broth of Soil Bacteria | Inhibition rate (%) |
|---|---|
| G000791 | (-) |
| G000261 | (-) |
| G91425 | 84 |
| G91399 | (-) |
| G91381 | 90 |
| G91192 | 70 |
| G91172 | 59 |
| G90997 | 91 |
| G90834 | 74 |
| G82593 | 100 |

## 결 론

세균의 amino-acyl tRNA synthetase는 새로운 항생제의 개발을 위한 좋은 표적물질로서 알려져 있으며, 따라서 약물설계에 의한 화학합성법과 천연물질의 스크리닝에 의해 새로운 효소저해제를 개발하려는 연구가 많이 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 토양미생물의 배양액으로부터 간편하면서 경제적인 methionyl-tRNA synthetase 저해제 검색계를 개발하였다. 직접 methionyl-tRNA synthetase를 이용해 효소저해제를 스크리닝하는 방법은 방사능물질의 사용과 고비용 그리고 오랜 시간이 소요되기 때문에, 본 연구에서 개발된 세균의 whole cell을 이용한 디스크법을 이용하면 빠른 시간에 많은 시료를 스크리닝할 수 있는 장점이 있고 재현성이 높기 때문에 새로운 항생물질의 개발을 위한 유용한 검색계로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 논문은 1999년도 한국학술진흥재단의 연구비(KRF-99-003-F00383)에 의하여 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 문 헌

1) Neu, H. C. : The crisis in antibiotic resistance. *Science* **257**, 1064 (1992).
2) Schimmel, P, Tao, J. and Hill, J. : Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new anti-infectives. *FASEB J.* **12**, 1599 (1998).
3) Dardel, F., Fayat, G and Blanquet, S. : Molecular cloning and primary structure of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase gene. *J. Bacteriol.* **160**, 1115 (1984).
4) Yu, X. Y., Hill, J. M., Yu, G., Wang, W., Kluge, A. F., Wendler, P. and Gallant, P. : Synthesis and structure-activity relationships of a series of novel thiazoles as inhibitors of aminoacyl-tRNA synthetases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 375 (1999).
5) Mechulam, Y., Schmitt, E., Maveyraud, L., Zelwer, C., Nureki, O., Yokoyama, S., Konno, M. and Blanquet S. : Crystal structure of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase highlights species-specific features. *J. Mol. Biol.* **294**, 1287 (1999).
6) Tzagoloff, A., Vambutas, A. and Akai, A. : Characterization of MSM1, the structural gene for yeast mitochondrial Methionyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.* **179**, 365 (1989).
7) Serre, L., Verdon, G., Choinowski, T., Hervouet, N., Risler, J. L. and Zelwer, C. : How methionyl-tRNA synthetase creates its amino acid recognition pocket upon L-methionine binding. *J. Mol. Biol.* **306**, 863 (2001).
8) Parenti, M. A., Hatfield, S. M. and Leyden, J. J. : Mupirocin: a topical antibiotic with a unique structure and mechanism of action. *Clin. Pharm.* **6**, 761 (1987).
9) Werner, R. G., Thorpe, L. F., Reuter, W. and Nierhaus, K. H. : Indolmycin inhibits prokaryotic tryptophanyl-tRNA ligase. *Eur. J. Biochem.* **68**, 1 (1976).
10) Lee, J., Kang, S. U., Kang, M. K., Chun, M. W., Jo, Y. J., Kwak, J. H, and Kim, S. : Methionyl Adenylate Analogues as Inhibitors of Methioninyl-tRNA Synthetase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 1365 (1999).
11) Lee, J., Kang, M. K., Chun, M. W., Jo, Y. J., Kwak, J. H. and Kim, S. : Methionine Analogues as Inhibitors of Methioninyl-tRNA Synthetase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **8**, 3511 (1998).
12) National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility tests-5th ed.; *NCCLS M2-A5.* Villanova, Pa. (1993).
13) Mellot, P., Mechulam, Y., Corre, D. L., Blanquet, S. and Fayat, G. : Identification of an amino acid region supporting specific methionyl-tRNA synthetase: tRNA recognition. *J. Mol. Biol.* **5**, 429 (1989).