

## ErmSF에서 특이적으로 발견되는 N-terminal End Region의 점차적인 제거에 의한 활성화에 중요한 아미노산의 규명

이학진 · 진형증\*

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

ErmSF는 23S rRNA에 존재하는 A<sub>2058</sub>에 이중메틸화(dimethylation)시킴으로써 항생제가 부착되는 것을 억제하여 미생물에게 MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제에 대하여 내성을 나타내게 하는 ERM 계열 단백질(Erm family protein)중의 하나이다. 다른 ERM 단백질과는 달리 ErmSF는 상당히 긴 N-말단부위(N-terminal end region, NTER)를 가지고 있고 이것은 RNA와 잘 결합하는 것으로 알려진 arginine이 약 25%를 구성하고 있다. ErmSF로부터 점차적으로 NTER을 절단하면서 절단된 단백질의 활성을 *in vivo*에서 검색하였다. 다른 변이단백질과는 달리 R60번째까지 제거된 변이단백질은 활성이 많이 소실된 것을 *in vivo*상에서 관찰하였다. 이 단백질을 대량생산하여 정제하고 *in vitro*상에서 그 활성을 검색한 결과 wild type 단백질에 비해 약 98%의 활성이 소실된 것을 밝혔다. 이러한 사실은 R60이 메틸화되는 아데닌(methylatable adenine)의 근처에 존재하는 RNA와 작용하여 메틸화되는 아데닌이 활성화부위에 적절히 위치하도록 하는 역할을 담당한다는 것을 암시하고 있다.

**Key words** □ ErmSF, *in vitro* activity, *in vivo* activity, MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein

MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 계열 항생제에 대하여 미생물이 갖는 내성은 기존에 알려진 대부분의 항생제에서 발견되는 내성 작용 기작이 모두 관찰되고 있다(6, 17). 즉 항생제의 화학적 변형에 의한 내성작용기작(chemical modification of antibiotics), 항생제의 세포내 유입을 억제함으로써 나타나는 내성기작(inhibition of antibiotic uptake), 항생제 작용점의 변형에 의한 내성기작(target site modification) 등이다. 그러나 MLS 항생제에 대한 내성은 주로 항생제 작용점의 변형에 의한 것으로 나타나 있으며(22) 또 이 기작에 의한 내성이 현재 가장 문제가 되고 있다. 이것은 23S rRNA의 특정 뉴클레오타이드의 염기 즉 A<sub>2058</sub>을 이중메틸화(dimethylation)시킴으로써 항생제가 부착되는 것을 억제하여 항생제의 항생작용이 일어나지 못하게 함으로써 내성을 나타낸다(5, 22). 현재 이 이중메틸화 과정은 S<sub>N</sub>2 반응에 의하여 이루어지는 것으로 여겨지고 있다(19). 여기에 참여하는 단백질은 *erm* (erythromycin resistance methylation)이라고 하는 이름을 가진 유전자의 생성물(22)로서 현재도 항생제 생산 균주, 병원균등의 다양한 미생물에서 지속적으로 발견되고 있으며 내성에 있어서의 그 중요성이 더욱 부각되고 있다 (3). 이들 단백질은 아미노산 서열에 있어서의 유사성과 동등성이 높고 그 작용이 동일하므로 유사한 구조를 가진 것으로 생각하고 있으며 하나의 단백질 계열(family)로 분류되어 있다(4, 17, 22). ErmSF (TlrA)는 가축에 사용되는 항생제인 tylosin의 생산균주인

*Streptomyces fradiae*에서 발견되는 단백질(5, 14, 20)로 현재 ErmS로 재분류되어 있다(17). 이외에 *S. fradiae*에서는 같은 위치에 단일메틸화(monomethylation)을 일으키는 TlrD(ErmN; 7, 10, 23, 24)와 항생제 운반자(transporter), 즉 세포내 유입을 방지하는 작용을 가진 TlrC(2, 18)와 최근 그 기능이 메틸기 전이 효소(methyltransferase)로 밝혀진 TlrB(5, 15)가 있다. 앞에서 기술한 대로 MLS 항생제에 대한 내성인자로서의 중요성에 근거하여 최근 이 이중 메틸화 효소에 대한 억제제 개발의 중요성이 자주 언급되어 왔다(4, 16, 19). 따라서 이 단백질의 활성화에 중요한 역할을 담당하는 아미노산 및 그의 역할을 규명하는 것은 필수적이라고 하겠다. 이러한 사실에 근거하여 본 연구에서는 결실 돌연변이(deletion mutation)를 통하여 R60 아미노산의 중요성을 밝히고 또 이 아미노산이 제거된 단백질을 이용하여 *in vivo*와 *in vitro*에서의 활성을 검색하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주, 플라스미드 및 프라이머(primers)

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드 플라스미드는 Table 1에 정리하였다. 그리고 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머들은 Table 2에 정리하였다.

#### *ermSF* 유전자 및 N-terminal end region (NTER)이 제거된 *ermSF* 유전자의 클로닝

*ermSF* 유전자의 클로닝은 이전에 발표한 방법대로 실시하였다

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 031-220-2290, Fax: 031-220-2290  
E-mail: hjjin@mail.suwon.ac.kr

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids

Bacterial strains or plasmids	Description	Reference or source
<b>Bacterial strains</b>		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for plasmid expression vectors that utilize the T7 promoter: possesses T7 RNA polymerase gene under <i>lac</i> control	Novagen
<i>E. coli</i> HJJ1105	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ105	9
<i>E. coli</i> HJJ1114	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ114	This work
<i>E. coli</i> HJJ1115	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ115	This work
<i>E. coli</i> HJJ1116	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ116	This work
<i>E. coli</i> HJJ1117	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ117	This work
<i>E. coli</i> HJJ1118	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ118	This work
<b>Plasmids</b>		
pDK101	T vector for direct cloning of PCR products: purified from <i>E. coli</i> ATCC 77406	12
pET 23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His <sub>6</sub> -tag at C-terminal end	Novagen
pHJJ105	pET23b containing <i>ermSF NdeI-HindIII</i> gene cartridge	9
pHJJ114	pET23b containing DNA fragment encoding NT25TE	This work
pHJJ115	pET23b containing DNA fragment encoding NT49TE	This work
pHJJ116	pET23b containing DNA fragment encoding NT59TE	This work
pHJJ117	pET23b containing DNA fragment encoding NT60TE	This work
pHJJ118	pET23b containing DNA fragment encoding NT61TE	This work

(9). 이렇게 얻어진 *ermSF* 유전자를 사용하여 N-말단 부위 중 각 절편(segment) [아미노산 잔기 1-25, NT25TE (아미노산 1-25가 제거된 단백질); 아미노산 잔기 1-49, NT49TE; 아미노산 잔기 1-59, NT59TE; 아미노산 잔기 1-60, NT60TE; 아미노산 잔기 1-61, NT61TE]이 제거된 DNA 절편을 올리고뉴클레오타이드-4, -5, -6, -7, -8과 올리고뉴클레오타이드-9를 각각 정방향(forward), 역방향(reverse) 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하여 얻었다. 이렇게 얻어진 DNA 절편을 *XcmI*으로 절단한 T 벡터(T vector)인 pDK101(12)에 접합시킨 후 클로닝하여 각각 pHJJ109, pHJJ110, pHJJ111, pHJJ112 그리고 pHJJ113으로 명명하였다. 이렇게 얻어진 각 플라스미드를 *NdeI*과 *HindIII*으로 절단한 후 얻어진 각 DNA 절편을 같은 제한효소로 처리한 표현 벡터(expression vector)인 pET23b (Novagen, Madison, WI)에 접

합한 후 T7 RNA 합성효소(polymerase) 유전자를 함유한 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 하였다. NTER이 절단된 단백질에 대한 유전정보를 갖는 DNA 절편이 reading frame에 맞게 벡터에 끼워진 클론을 플라스미드 분리 및 제한효소 절단과 dideoxy chain termination 염기서열 분석에 의하여 선별하였다. 여기서 얻어진 각 플라스미드를 pHJJ114, pHJJ115, pHJJ116, pHJJ117 그리고 pHJJ118으로 명명하였다. 그리고 이 플라스미드를 함유한 대장균을 각각 *E. coli* HJJ114, HJJ115, HJJ116, HJJ117 그리고 HJJ118로 명명하였다.

#### *ermSF* 및 변이 *ermSF* 유전자들의 발현

표현 벡터에 적절히 끼워진 *ermSF* 및 변이 *ermSF* 유전자의 발현은 이미 발표된 방법에 근거하여 (9) 약간의 변형과 함께 다

**Table 2.** Primers

oligonucleotide primer	sequence & description
Oligo-4	5' <u>catatg</u> cgtgctgaccgtgctccgggtgctggccgtgaccgtgac (45-mer) upstream (forward) PCR primer for NT25TE gene
Oligo-5	5' <u>catatg</u> cgtgacgggtgctctccggaccgcgcggcgag (45-mer) upstream (forward) PCR primer for NT49TE gene
Oligo-6	5' <u>catatg</u> cgtgtaactgtctcagaactctcggccggggcc (45-mer) upstream (forward) PCR primer for NT59TE gene
Oligo-7	5' <u>catatg</u> cgtgaactgtctcagaactctggcgcggggcctc (45-mer) upstream (forward) PCR primer for NT60TE gene
Oligo-8	5' <u>catatg</u> gaactgtctcagaactctggcgcggggcctcgc (45-mer) upstream (forward) PCR primer for NT61TE gene
Oligo-9	5' aagcttccgtccggcggctcgct (24-mer) downstream (reverse) PCR primer for all of truncated <i>ermSF</i> genes
Oligo-10	5' taatacgaactataagagactcgggaaa (33-mer) upstream (forward) PCR primer for "BDV DNA containing T7 promoter
Oligo-11	5' cctctgtaagacacg (20-mer) downstream(reverse) PCR primer for BDV DNA

음과 같이 수행하였다. 하룻밤 동안 배양한 *E. coli* HJ114, HJ115, HJ116, HJ117 그리고 HJ118와 *E. coli* HJ1105를 새로운 배지에 옮긴 후 A<sub>600</sub>이 0.8-1.0이 되도록 37°C에서 배양하고 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 후 22°C에서 24시간 배양하였다. 그리고 발현되는 정도를 SDS-PAGE(13)로 확인하였다.

**발현된 단백질의 정제**

NTER의 각 부분이 제거된 5 종류의 단백질 중 아미노산 잔기 1-60번째가 제거된 단백질 (NT60TE)이 *in vivo*에서 활성이 상당 부분 소실되었다. 따라서 이 변이 단백질의 *in vitro* 활성을 검색하기 위해 변이 단백질의 정제를 실시하였다. 변이 단백질의 정제는 기존에 발표된 방법을 사용(9), 약간 변형하여 실시하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 원심분리 (8,000 × g)하여 얻어진 세포를 라이소자임 (lysozyme, 5 mg/ml)을 함유하는 완충용액 A [20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl, 5 mM imidazole]에서 분산시킨 후 상온에서 20분간 배양하고 -80°C에서 얼린 후 녹여서 세포를 분쇄하였다. 여기에 DNaseI (2.5 μg/ml) 및 RNase A (2.5 μg/ml)을 넣고 반응시킨 후 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액으로부터의 단백질 분리는 공급자 (Novagen)가 제공한 과정에 근거, Ni<sup>2+</sup> 부착 크로마토그래피(Ni<sup>2+</sup> affinity column chromatography)법에 의하여 분리하였다. 완충용액 A로 평형을 이룬 His·bind resin이 충전된 컬럼에 위에서 얻어진 용액을 넣은 후 완충용액 B [20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl, 80 mM imidazole]을 사용하여 컬럼에 부착되지 않거나 잘못 부착된 단백질을 씻어낸 후 원하는 단백질을 300 mM imidazole이 함유된 완충용액 B를 사용하여 얻어내었다.

**발현된 단백질의 생체내 활성검색 (항생제 내성 검사)**

생체내 활성검색은 이미 발표된 방법을 사용하여 디스크 방법을 사용하여 결정하였다(8). 간단히 기술하면 다음과 같다. 야생형의 거름종이(Whatmann 3M)에 25 mg/ml의 에리스로마이신 (erythromycin) 용액을 250 μg이 되도록 점적한 후 말린 다음 새 통게 배지위에 도포된 미생물위에 올린 후 하루 동안 배양하여 생장 저해 지역(inhibition zone)을 관찰하였다.

**Domain V의 *in vitro* transcription에 의한 제조**

*B. subtilis* 23S rRNA Domain V (BDV)의 유전정보를 갖는 DNA 절편을 얻기 위하여 *B. subtilis* BD170의 염색체 DNA를 주형으로 하여 올리고뉴클레오타이드-10과 올리고뉴클레오타이드-11을 정방향, 역방향 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하여 얻어내었다. 각각의 올리고뉴클레오타이드는 *B. subtilis* 23S rRNA 뉴클레오타이드 2022-2042, 2672-2692번째에 해당된다. 얻어진 DNA 절편은 올리고뉴클레오타이드-10에서 제공되는 T7 promoter 서열을 가지고 있으므로 T7 DNA 의존성 RNA 합성효소(T7 DNA-dependent RNA polymerase)를 이용하여 RNA를 합성하는데 주형으로 사용하였다. 합성 방법은 RNA 전사 완충용액 [40 mM Tris-HCl (pH 8.1), 1 mM spermidine, 0.01% Triton

X-100, 5 mM DTT)]에 80 mM polyethylene glycol (MW, 8,000), NTP (각각 4mM 씩), 28 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 nM DNA 주형을 첨가하고 T7 RNA 합성효소를 넣은 후 37°C에서 4시간동안 반응하였다. phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 사용하여 추출한 후 에탄올 침전시켰고 이 것을 TE 완충용액에 녹여 4% 7M urea-polyacrylamide 겔을 이용하여 확인하였다.

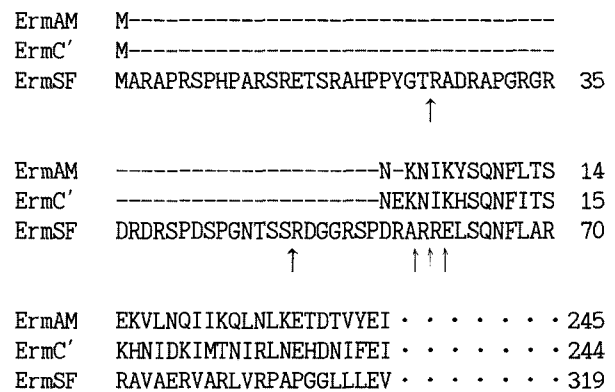
**정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색**

정제된 단백질의 *in vitro* 활성은 기존에 발표된 방법을 약간 변형하여 검색하였다(9, 24). 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM KCl, 10 mM dithiothreitol (DTT)의 조성을 가진 완충용액에 3.3 pmole의 S-[methyl-<sup>3</sup>H] adenosylmethionine (SAM; Amersham, Arlington Height, IL; sp. act. 80 Ci/mmol), 10 U of RNasin (Promega, Madison, WI), 10 pmol의 domain V와 250 ng의 야생형(wild type) 및 변이 ErmSF를 넣고 총 부피가 50 μl 되도록 한 후 37°C에서 1시간 배양한 후 몰로 포화된 페놀로 추출하여 반응을 정지시킨 후에 12% trichloroacetic acid로 침전시킨 다음 침전물을 건조하고 유입된 방사선량을 측정하였다.

**결 과**

**NTER의 각 부분이 제거된 변이 ErmSF의 발현을 위한 발현 플라스미드의 제작**

ErmSF는 현재까지 밝혀진 다른 ERM 단백질과는 달리 약 71개의 아미노산으로 구성된 긴 NTER을 가지고 있다. 특히 이 부분은 RNA와 잘 결합하는 것으로 알려진 arginine이 약 25%를 차지하고 있으며(Fig. 1) 핵 자기 공명 분석에 의하면 특정한 이차구조를 가지지 않는 것으로 밝혀졌다(자료미제시). 따라서 NTER에 존재하는 여러 부분의 역할을 알아보기 위해 각 부분을 제거한 변이 ErmSF(Fig. 1)의 유전정보를 함유하는 DNA 절편을 얻고 이를 발현 벡터에 끼워 넣었다. 얻어진 변이 ErmSF는



**Fig. 1.** Amino acid sequence alignment of N-terminal end regions in ErmAM, ErmC' and ErmSF. Unlike the other homologous proteins, ErmSF contains long N-terminal end region(71a.a). The arrow indicates the starting amino acid in each truncated ErmSF, but methionine was added just before each starting amino acid for proper expression.

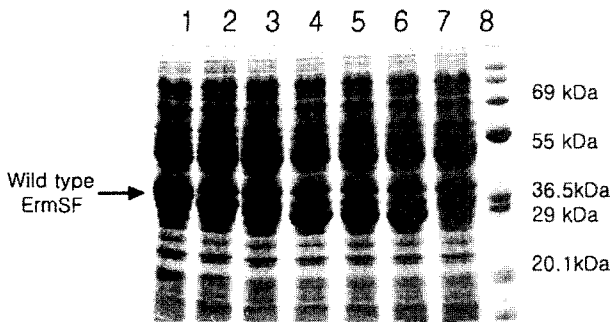
모두 야생형 ErmSF가 가지고 있는 G528C와 G690A의 변이를 모두 가지고 있었으며 이는 단백질의 활성에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 이미 밝혔다(9). 여기서 얻어지는 단백질은 발현 벡터인 pET23b에 의하여 제공되는 6개의 histidine꼬리를 표현하는 DNA 염기서열을 3' 말단에 갖게 되고 이를 이용하여 야생형 및 변이 ErmSF를 분리 정제하였다.

**각 변이 ErmSF의 발현**

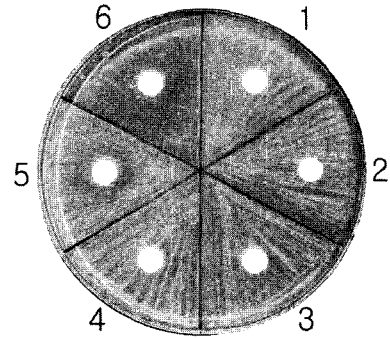
NTER의 각 부분이 제거된 DNA 절편을 함유한 pET23b를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환한 후 IPTG로 발현을 유도하고 그 발현정도를 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다(Fig. 2). Fig. 2에서 보여지는 대로 빈 벡터(empty vector)만을 함유한 세포내에서 발현된 단백질의 양상과는 달리 각 DNA 절편을 함유한 발현벡터에서는 39kD의 야생형 ErmSF에서부터 조금씩 이동이 빨라지면서 단백질이 대량발현된 것을 관찰할 수 있었다. 핵산의 염기서열로부터 추정된 이들 단백질의 분자량은 각각 6개의 히스티딘 꼬리를 포함하여 야생형 ErmSF에서 시작하여 각각 37.05, 34.41, 32.77, 31.84, 30.78, 30.62 그리고 30.46 kDa이었다. 그리고 NT59TE, NT60TE, NT61TE의 경우는 SDS-PAGE상에서의 이동양상이 기대한대로 거의 비슷하게 관찰되었다(lane 6, 7, and 8 in Fig. 2).

**각 N-말단부위가 제거된 변이 ErmSF의 생체 내에서의 활성 검색**

대량생산된 변이 ErmSF들의 생체 내에서의 활성은 이들이 세포에 가져다주는 항생제 내성을 결정함으로써 검색하였다. Fig.



**Fig. 2.** Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the expressed N-terminal end region truncated ErmSFs (NTTEs). *E. coli* BL21(DE3) was transformed with expression plasmid pHJJ114, pHJJ115, pHJJ116, pHJJ117 and pHJJ118. 100 µl of cell culture induced with 1 mM IPTG was denatured in 6X sample buffer, resolved on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, wild type ErmSF of 37.05 kDa (pHJJ105); lane 2, NT25TE of 34.41 kDa (pHJJ114); lane 3, NT49TE of 32.77 kDa (pHJJ115); lane 4, NT59TE of 31.84 kDa (pHJJ116); lane 5, NT60TE of 30.78 kDa (pHJJ117); lane 6, NT61TE of 30.62 kDa (pHJJ118); lane 7, empty vector; lane 8, molecular size marker in kDa: bovine serum albumin 69; glutamic dehydrogenase 55; lactic dehydrogenase, porcine muscle 36.5; carbonic anhydrase, bovine liver 29; trypsin inhibitor, soybean 20.1.



**Fig. 3.** Antibiotic susceptibility assay. In each section of agar plate, *E. coli* cells containing DNA fragment encoding each truncated *ermSF* were spread with cotton swab. In the center of each section, paper circle containing erythromycin (250 µg) was placed, and incubated overnight at 37°C. All grew well in the presence of erythromycin except cells expressing NT60TE and empty vector. But the inhibition zone in section 5 was much smaller than that of section 6. Section 1, *E. coli* cells harboring pHJJ105; section 2, *E. coli* cells harboring pHJJ114; section 3, *E. coli* cells harboring pHJJ115; section 4, *E. coli* cells harboring pHJJ116; section 5, *E. coli* cells harboring pHJJ117; section 6, *E. coli* cells harboring empty vector.

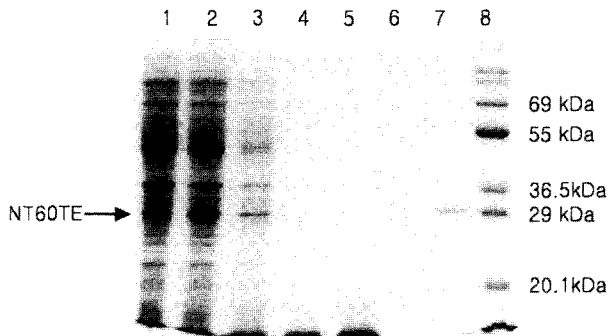
3에서 보여지는 대로 빈 벡터를 함유한 *E. coli*의 경우는 항생제에 의해 성장이 저해되어서 생장 저해 지역이 명확하게 관찰되었다. 반면 발현된 야생형 ErmSF를 함유하는 대장균의 경우는 전혀 저해를 받지 않았다. 다른 변이 ErmSF의 경우도 모두 야생형 ErmSF의 경우와 같이 모두 저해를 받지 않았으나 아미노산 잔기 1-60이 제거된 변이 ErmSF (NT60TE)의 경우는 저해된 정도가 빈 벡터만 들어간 경우와 비교하여 작지만 명확한 생장 저해 지역을 관찰할 수 있었다.

**대량생산된 단백질의 정제**

대량생산된 단백질을 함유하는 세포를 분쇄한 후 원심분리를 사용하여 세포 분쇄물 및 불용성 단백질(inclusion body)를 포함하는 불용성물질을 제거하고(Fig. 4, lane 2) 용해성 단백질을 함유하는 상등액을 얻었다(Fig. 4, lane 3). 이렇게 얻어진 단백질용액을 Ni<sup>2+</sup>이 고정화된 resin이 있는 컬럼에 넣고 80 mM imidazole이 함유된 완충용액을 사용하여 씻어낸 후(Fig. 4, lane 6) 300 mM이 함유된 완충용액을 사용하여 N-말단부위가 제거된 변이 ErmSF를 얻어내었다(Fig. 4, lane 7). 여기서 얻어진 단백질의 양을 BSA(Bovine serum albumin)를 표준 품으로 사용하여 정량하였을 때 IPTG로 유도된 1 L 배양액 중 2.4 mg이었다.

**정제된 단백질의 in vitro 활성 검색**

생체 내에서 활성이 저하된 NT60TE의 *in vitro* 활성을 알아보기 위해 ERM 단백질의 완전 기질로 밝혀진 domain V(11, 21)를 사용하여 활성을 검색하였다. Table 3에서 보여지는 대로 야생형 ErmSF에 비하여 약 2%정도의 활성을 나타내었다.



**Fig. 4.** Purification of the expressed NT60TE. *E. coli* HJJ107 was grown at 22°C in the presence of IPTG. Cell pellets of 100 ml culture was disrupted with lysozyme treatment and freezing and thawing. The resultant lysate was treated with DNase I and RNase A. The resultant supernatant after centrifugation was loaded onto immobilized Ni<sup>2+</sup> affinity column. Lane 1, total cell protein; lane 2, inclusion body fraction; lane 3, supernatant fraction of lysate; lane 4, affinity run-through; lane 5, 5 mM imidazole column wash; lane 6, 80 mM imidazole column wash; lane 7, 300 mM imidazole elute; lane 8, molecular size marker: refer to Fig. 2.

## 고찰

본 연구에서는 RNA와 잘 결합하는 것으로 알려진 arginine이 25%를 차지함으로써 활성화에 큰 영향을 미칠 것으로 기대되는 ErmSF의 NTER을 점차적으로 제거한 변이 ErmSF들의 유전정보를 갖는 DNA 절편을 클로닝하고 *E. coli* 에서 발현하여 그 활성을 *in vivo*와 *in vitro*에서 검색하였다. 일반적으로 단백질의 일부분이 제거된 truncated protein을 발현할 때 많은 단백질들이 불용성 단백질로 발현되어진다(1). 이러한 현상에 대한 첫 번째 원인은 제거된 부분이 이차구조를 가짐으로써 이 이차구조가 단백질의 다른 부분과 상호작용을 하면 이 부분이 제거되었을 때 기존에 존재하는 상호작용이 깨짐으로써 안정성을 잃어 단백질끼리 엉김(aggregate)을 형성하는 것이다. 그 두 번째 원인은 단백질의 일부가 제거됨으로써 단백질의 접힘(protein folding) 과정에서 다른 부분의 접힘에 필요한 부분이 없어짐으로써 단백질의 접힘이 정상적으로 이루어지지 않아서 일어나는 것으로 추정할 수 있다. 그러나 NTER이 점차적으로 제거된 단백질들(NT25TE, NT49TE, NT59TE, NT60TE, NT61TE)의 경우는 모두 대량생산

되었고 생체 내에서의 활성 즉 이 단백질에 의하여 항생제 내성이 야기되는 것은 이들 모든 단백질이 생체 내에서 용해성 단백질로 생산되어서 활성을 가진 것으로 설명할 수 있다. 따라서 이러한 사실로부터 ErmSF의 NTER이 ErmSF의 접힘에 큰 영향을 미치지 않는다는 것과 단백질의 본체와 상호 작용하는 뚜렷한 이차구조를 가지지 않는다는 사실을 암시하고 있다. 따라서 이러한 결과는 핵자기 공명법으로 NTER을 구조 분석하였을 때 구조를 갖지 않는다는 사실 (자료미제시)을 뒷받침하여 주고 있다.

한편 NT60TE는 생체 내에서의 활성이 많이 소실된 것으로 밝혀졌다. 이 단백질의 용해성과 *in vitro*에서의 활성을 검색하기 위하여 대량생산된 단백질의 순수분리를 수행하였다. 이 단백질 역시 야생형 ErmSF의 경우(9)와 마찬가지로 많은 양의 단백질이 불용성 단백질로 대량생산된 것을 알 수 있다. 그러나 생체 내 활성을 검색하였을 때 성장 저해 지역이 pET23b만을 가진 세포보다 작게 나타남으로써 어느 정도의 내성은 관찰할 수 있었다는 사실과 순수 분리하였을 때 2.4 mg/L culture로 얻어진다는 사실은 이 단백질은 세포에 항생제 내성을 가져다주기에 충분한 양의 단백질이 용해성 단백질로 존재하는 것을 의미한다.

이 단백질의 *in vitro* 활성은 야생형 ErmSF에 비하여 98%가 감소하였다. 이러한 사실은 기존에 2.2Å의 해상도로 결정구조분석법(crystallography)에 의하여 결정된 ErmC' 구조에 메틸화되는 아데닌을 끼워 넣어진 구조에 근거하여 보았을 때(19), 즉 60RRELS64의 아미노산 1차 구조 서열 중에 S64가 메틸화되는 아데닌과 반데르발스 반경(Vander waals radius) 간격으로 접촉하여 존재하므로, R60이 메틸화되는 아데닌의 근처에 존재하는 RNA와 상호 작용하여 메틸화되는 아데닌이 활성화 부위에 적절히 위치하도록 하는 작용을 할 것으로 사료된다. 따라서 R60이 제거되었을 때 활성화 부위로 메틸화되는 아데닌이 적절히 위치하지 못하여 그 활성이 상당히 줄어든 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2003년도 한국과학재단 목적기초연구사업 중 특정 기초 연구비 지원(R01-2003-000-11734-0)에 의하여 수행된 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. 진형중. 2001. MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 내성인자 단백질인 ErmSF domain 발현. *Kor. J. Microbiol.* 37, 245-252.
2. Birmingham, V.A., K.L. Cox, J.L. Larson, S.E. Fishman, C.L. Hershberger, and E.T. Seno. 1986. Cloning and expression of a tylosin resistance gene from a tylosin-producing strain of *Streptomyces fradiae*. *Mol. Gen. Genet.* 204, 532-539.
3. Buriankova, K., F.D. Populaire, O. Dorson, A. Dondran, J.C. Ghnassia, J. Weiser, and J.L. Nd Pernadet. 2004. Molecular basis of intrinsic macrolideresistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 143-150.
4. Bussiere, D.E., S.W. Muchmore, C.G. Dealwis, G. Schluckebier,

**Table 3.** Methylation of domain V of *B. subtilis* 23S rRNA by recombinant wild type ErmSF and NT60TE *in vitro*

Protein	RNA	Activity (cpm) <sup>a</sup>
ErmSF	+	10,247
"	-	20
NT60TE	+	210
"	-	19
-	+	20

<sup>a</sup>Activities were determined under standard assay condition described in the text (Materials and Methods).

- V.L. Nienaber, R.P. Edalji, K.A. Walter, U.S. Lador, T. F. Holzman, C. Abad-Zapatero. 1998 Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry*. 37, 7103-7112.
5. Cundliffe, E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 207-223.
  6. "Frontiers in Biotechnology : Antibiotic Resistance" 1994. *Science* 264, 317-476
  7. Gandecha, A.R. and E. Cundliffe. 1996. Molecular analysis of tlrD, an MLS resistance determinant from tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene* 180, 173-176.
  8. Jin, H.J. 1999. *ermSF*, a ribosomal RNA adenine N<sub>6</sub>-methyltransferase gene from *Streptomyces fradiae*, confers MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) resistance to *E. coli* when it is expressed. *Mol. Cells* 9, 252-25
  9. Jin H.J. and Y.D. Yang. 2002. Purification and biochemical characterization of the ErmSF macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance factor protein expressed as a hexahistidine-tagged protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 25, 149-59.
  10. Kamimiya, S. and B. Weisblum. 1988. Translation attenuation control of *ermSF*, an inducible resistance determinant encoding rRNA N-methyltransferase from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 170, 1800-1811.
  11. Kovalic, D., R.B. Giannattasio, H.J. Jin, and B. Weisblum. 1994. 23S rRNA Domain V, a fragment that can be specifically methylated in vitro by the ErmSF (TlrA) methyltransferase. *J. Bacteriol.* 176, 6992-699
  12. Kovalic, D., J.H. Kwak, and B. Weisblum. 1991. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.* 19, 4650.
  13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature.* 227, 680-685.
  14. Lai, C.J., B. Weisblum, S.R. Fahnestock, and M. Nomura. 1973. Alteration of 23 S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 74, 67-72.
  15. Liu M. and S. Douthwaite. 2002. Methylation at nucleotide G745 or G748 in 23S rRNA distinguishes Gram-negative from Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 44, 195-204.
  16. Maravic, G., M. Feder, S. Ponger, M. Fogel, and J.M. Bujnicki. 2003. Mutational analysis defines the roles of conserved amino acid residues in the predicted catalytic pocket of the rRNA:m<sup>6</sup>A methyltransferase ErmC'. *J. Mol. Biol.* 332, 99-109.
  17. Roberts, M.C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L.B. Jensen, J. Rood, and H. Seppala. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamin-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2823-2830.
  18. Rosteck Jr, R.R., P.A. Reynolds, and C.L. Hershberger. 1991. Homology between proteins controlling *Streptomyces fradiae* tylosin resistance and ATP-binding transport. *Gene* 102, 27-32.19.
  19. Schluckebier G, Zhong P, Stewart KD, Kavanaugh TJ, Abad-Zapatero C. 1999. The 2.2 Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. *J Mol. Biol.* 289, 277-291.
  20. Skinner, R., E. Cundliffe, and F.J. Schmidt. 1983. Site for Action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *J. Biol. Chem.* 258, 12702-12706.
  21. Vester, B., and S. Douthwaite. 1994. Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase. *J. Bacteriol.* 176, 6999-7004
  22. Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577-585.
  23. Zalacain, M. and E. Cundliffe. 1991. Cloning of *tlrD*, a fourth resistance gene, from the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene* 97, 137-142.
  24. Zalacain, M. and E. Cundliffe. 1989. Methylation of 23S rRNA by *tlrA(ermSF)*, a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 171, 4254-4260.

(Received October 15, 2004/Accepted December 8, 2004)

---

**ABSTRACT : Deletion of N-terminal End Region of ErmSF Leads to an Amino Acid Having Important Role in Methyl Transfer Reaction**

**Hak Jin Lee and Hyung Jong Jin\*** (Department of Genetic Engineering, College of Natural Science, The University of Suwon, Kyunggi-Do 445-743, Korea)

ErmSF is one of the ERM proteins which transfer the methyl group to A2058 in 23S rRNA to confer the resistance to MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotics on microorganism. Unlike other ERM proteins, ErmSF contains long N-terminal end region (NTER), of which 25% is composed of arginine that is known to interact with RNA well. Gradual deletion of NTER led us to the point where mutant protein lost much of activity *in vivo*. Overexpressed and purified mutant protein showed much reduced activity *in vitro*: 2% activity relative to that of wild type protein. This fact suggests that this amino acid interact with RNA close to methylatable adenine to locate it at an active site properly.