

## ErmSF의 N-Terminal End Region에 존재하는 <sup>60</sup>RR<sup>61</sup>의 23S rRNA Methylation에서의 역할

진 형 중

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

ErmSF는, 23S rRNA의 A2058에 methylation 시켜서 macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS<sub>B</sub>)계 항생제의 부착을 저해함으로써 항생제의 활성을 억제하는 내성인자 단백질인 Erm 단백질의 하나로, 다른 Erm 단백질과는 달리 긴 N-terminal end region을 가지고 있고 이 부위의 25%를 arginine이 차지하고 있다. 특히 <sup>58</sup>RARR<sup>61</sup> 부위에 arginine이 모여 있어서 여기에 존재하는 R의 역할을 알아보기 위해 1-57, 1-59 그리고 1-60과 1-61이 제거된 결손 변이 단백질을 대장균에 발현하고 그 활성을 성장곡선을 작성하여 알아보았다. 그 결과 R60과 R61이 활성에 중요한 것으로 관찰되었다. 1-59의 아미노산이 결손된 유전자를 사용하여 R60A, R61A와 RR60,61AA의 위치 선정 치환 변이 단백질의 세포내 활성을 측정하여 본 결과 R60의 역할이 R61보다 큰 것으로 관찰되었으며 이들의 활성에서의 역할은 상호보완적인 것으로 나타났다. 그리고 이 아미노산들이 2차 구조인  $\alpha$ -helix의 일부일 것으로 추정되었다.

**Key words** □ deletion mutagenesis, growth curve, *in vivo* activity, leaky expression, overexpression, site-directed mutagenesis MLS<sub>B</sub> (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein

ERM 단백질은 세균의 23S rRNA 중에서 domain V의 peptidyl transferase circle에 존재하는 특정 adenine 즉 A2058 (*E. coli* coordinate)의 아민(exocyclic amine)에 methylation 시킴으로써, macrolide, lincosamide, streptogramin B 항생제(MLS<sub>B</sub>계 항생제)의 부착 강도를 낮춰서 미생물로 하여금 이들 항생제에 대하여 내성을 나타내게 하는 단백질이다(6, 13, 16, 20). 이렇게 Erm 단백질의 작용에 의하여 미생물이 동시에 내성을 나타내는 항생제들은 서로 화학적 구조식이 상이하나 같은 내성기작에 의하여 그 항생작용이 억제를 받기 때문에 MLS<sub>B</sub> 항생제 superfamily로 구분되어 진다(18). 현재까지 밝혀진 Erm 단백질은 약 30여 종에 달하며 이들을 함유하고 있는 미생물은 병원균에서 시작하여 항생제 생산균주까지 다양하게 걸쳐있다(5, 15). 그러나 이들 단백질은 아미노산 서열상에서의 유사성이 높아서 하나의 조상 단백질로부터 유래 되었을 것으로 추정되고 있다(11). 그리고 그 작용 기작이 동일할 것으로 사료되어 이들 단백질은 그 구조가 거의 유사할 것으로 믿어진다. 현재까지 Erm 단백질은 ErmAM (reclassified as ErmB, 12)과 ErmC'의 구조가 각각 핵자기공명법과 단백질 결정화기법(crystallography)을 통하여 밝혀져 있다(14). 그 구조를 살펴보면 이들 단백질은 Rossmann fold를 취하는 catalytic domain과 4개의 alpha helix로 구성된 substrate binding domain으로 명명된 domain, 즉 두 개의 domain으로 구성되어 있으며 이 구조에 근거한 반응 기작과

여기에 참여하는 아미노산들이 추측되어 있다(4). 한편 ErmSF는 macrolide 항생제인 tylosin을 생산하는 *Streptomyces fradiae*로부터 자신이 생산하는 항생제에 의해 저해되는 것을 방지하기 위해 생산되는 4개의 내성 단백질 중 하나로서(3) 다른 대부분의 Erm 단백질과 같이 A2058에 dimethylation을 시키는 단백질이다. 이 단백질은 다른 Erm 단백질에 비하여 특이적으로 긴 N-terminal end region (NTER)을 가지고 있고 현재까지는 어떤 이차구조를 가지고 있지 않은 것으로 믿어지고 있다. 그리고 이 region은 RNA와 잘 결합하리라고 예상되어지는 arginine이 약 25%를 구성하고 있고 다양한 arginine의 역할이 예상되어지고 있다. 따라서 본 연구에서는 이 N-terminal end region의 C-terminal end에 존재하는 <sup>60</sup>RR<sup>61</sup>의 활성에서의 역할을 결손 및 위치 지정 치환 돌연변이를 이용하여 밝히고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리하였다. 그리고 클로닝을 위하여 사용된 올리고뉴클레오타이드는 Table 2에 정리하였다.

#### 결손 변이 단백질 및 위치 지정 치환 단백질 유전자의 클로닝

결손 변이(deletion mutation) 단백질 및 위치 지정 치환(site directed mutation) 단백질 유전자의 클로닝은 야생형 *ermSF* 유전자를 가지고 있는 pHJJ105 플라스미드(9)를 주형으로 사용하

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 82-31-220-2290, Fax: 82-31-220-2519  
E-mail: hjjin@suwon.ac.kr

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain or plasmid	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> HJJ105	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ105	9
<i>E. coli</i> HJJ116	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ116	1
<i>E. coli</i> HJJ117	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ117	1
<i>E. coli</i> HJJ118	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ118	1
<i>E. coli</i> HJJ301	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ301	this work
<i>E. coli</i> HJJ302	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ302	this work
<i>E. coli</i> HJJ303	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ303	this work
<i>E. coli</i> HJJ304	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ304	this work
<b>Plasmids</b>		
pET23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His <sub>6</sub> -tag at C-terminal end	Novagen
pDK101	T vector for direct cloning of PCR products: purified from <i>E. coli</i> ATCC 77406	8
pHJJ105	pET23b containing <i>ermSF</i> <sup>a</sup> NT59TE <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	9
pHJJ116	pET23b containing <i>ermSF</i> <sup>a</sup> NT59TE <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	1
pHJJ117	pET23b containing <i>ermSF</i> <sup>a</sup> NT60TE <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	1
pHJJ118	pET23b containing <i>ermSF</i> <sup>a</sup> NT61TE <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	1
pHJJ301	pET23b containing <i>ermSF</i> <sup>a</sup> NT57TE <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	this work
pHJJ302	pET23b containing <i>ermSF</i> <sup>a</sup> NT59TE R60A <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	this work
pHJJ303	pET23b containing <i>ermSF</i> <sup>a</sup> NT59TE R61A <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	this work
pHJJ304	pET23b containing <i>ermSF</i> <sup>a</sup> NT59TE RR60,61AA <i>NdeI-HindIII</i> gene cartridge	this work

<sup>a</sup> For mutant abbreviation, refer to text

Table 2. Oligonucleotide primer for cloning

Oligonucleotide primer	Sequence and description
Oligo-1	5' <u>CATATGCGTGCGCGTCGCTGA</u> ACTGTCTCAGAACTTCCTCGCCCGC (45 mer) upstream (forward) PCR primer for <sup>a</sup> NT57TE
Oligo-2	5' <u>CATATGGCTCGTGA</u> ACTGTCTCAGAACTTCCTCGCCCGCCGGGCC (45 mer) upstream (forward) PCR primer for <sup>a</sup> NT59TE R60A
Oligo-3	5' <u>CATATGCGTGCTGA</u> ACTGTCTCAGAACTTCCTCGCCCGCCGGGCC (45 mer) upstream (forward) PCR primer for <sup>a</sup> NT59TE R61A
Oligo-4	5' <u>CATATGGCTGCTGA</u> ACTGTCTCAGAACTTCCTCGCCCGCCGGGCC (45 mer) upstream (forward) PCR primer for <sup>a</sup> NT59TE RR60.61AA
Oligo-5	5' <u>AAGCTTCCGTC</u> CGGCCGGTTCGGCT (24mer) downstream (reverse) PCR primer for Wild type <i>ErmSF</i> and <i>ErmSF</i> mutants

<sup>a</sup> For mutant abbreviation, refer to text

여 올리고뉴클레오타이드-1, 2, 3, 4를 전방향 프라이머로 사용하고 각각의 프라이머에 대하여 올리고뉴클레오타이드-5를 역방향 프라이머로 사용하여 PCR을 수행함으로써 행하였다. 이렇게 얻어진 DNA 절편을 *XcmI*으로 절단한 T vector인 pDK101 (8)에 접합시킨 후 클로닝하여 pHJJ001, 002, 003 그리고 004로 명명하였다. 이렇게 얻어진 플라스미드를 *NdeI*과 *HindIII*로 절단한 후 얻어진 DNA 절편을 같은 제한효소로 처리한 표현 담체 (expression vector)인 pET23b (Novagen, Madison, USA)에 접합한 후 T7 RNA 합성효소 유전자를 함유한 *E. coli* BL21(DE3) (17)에 형질전환하였다. 각 단백질을 표현하는 DNA 절편이 reading frame에 맞게 담체에 끼워진 클론을 플라스미드 분리 및 제한효소 절단과 dideoxy chain termination sequence analysis에 의하여 선별하였다. 여기서 얻어진 플라스미드를 pHJJ301, 302,

303 그리고 304로 명명하였다. 그리고 이 플라스미드를 함유한 대장균을 각각 *E. coli* HJJ301, 302, 303, 304로 명명하였다. 각 플라스미드를 함유한 대장균 세포는 야생형 *ErmSF*로부터 1-57 아미노산이 제거된 단백질(NT57TE) 그리고 NT59TE에서 R60A로 전이된 단백질(NT59TE R60A), R61A (NT59TE R61A) 및 RR60,61AA (NT59TE RR60, 61AA)로 전이된 단백질을 발현하게 된다. 그리고 1-59가 제거된 단백질(NT59TE), 1-60이 제거된 단백질(NT60TE), 1-61이 제거된 단백질(NT61TE)은 기존에 클론되어 대장균에 형질전환된 것을 사용하여 발현하였다(1, Table 1).

#### 결론 변이 및 위치 지정 치환 유전자의 발현

표현 담체에 적절히 끼워진 각 변이 유전자의 발현은 이미 발효된 *ermSF* 유전자의 발현 방법에 근거하여(9) 약간의 변형과

함께 다음과 같이 수행하였다. 하룻밤 동안 배양한 각 대장균 세포를 새로운 배지에 전이[transfer, 10% (v/v)]하고 A<sub>600</sub>이 0.8~1.0이 되도록 37°C에서 배양한 후 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 각각 37°C에서 8시간 더 배양하였다. 그 후 단백질의 대량발현과 leaky 발현을 SDS-PAGE를 이용하여 검색하였고 leaky 발현이 관찰되지 않거나 거의 관찰되지 않을 경우는 세포의 성장에 장애를 가져다주지 않는 정도의 단백질의 발현을 위해 적당한 농도의 IPTG를 사용하여 그 발현을 유도하였다.

#### 각 변이 유전자를 함유한 대장균의 성장 곡선 측정

*E. coli* BL21(DE3) 세포를 37°C에서 하룻밤 동안 배양 후 새로운 배지에 10% (v/v)으로 전이하고 30분, 45분, 60분 동안 더 배양한 후 각각의 OD값을 측정하고, 각 배양액을 10<sup>9</sup>으로 희석한 것을 배지에 도달하여 생긴 콜로니의 개수를 세어 표준 곡선(standard curve)을 작성하였다(Cell# = -236.96x<sup>2</sup> + 875.84x + 195.14; x=OD값). 이 표준곡선을 이용하여 동일한 방법으로 각 변이 단백질을 발현하는 균주들을 하룻밤 동안 배양한 후 새로운 배지에 전이하여 약 60분간 배양하고 OD값을 측정, 세포수를 계산하였다. 그리고 각각의 *E. coli* 세포수가 5×10<sup>6</sup>개/ml이 되도록 erythromycin (150 μg/ml)을 함유하거나 함유하지 않은 새로운 배지에 옮겨 배양하면서 30분 간격으로 OD값을 측정 후 이 값을 바탕으로 성장 곡선을 작성하였다. 성장곡선 작성 시 최소한 3번의 측정치를 평균하여 작성하였다.

## 결 과

#### 변이 유전자들의 발현을 위한 발현 플라스미드의 제작

ErmSF의 NTER은 많은 arginine으로 구성되어 있는데 특히 <sup>58</sup>RARRE<sup>62</sup> 부분은 arginine이 집중되어 있어서 이들의 활성에서의 역할을 알아보기 위해 결손 변이와 위치 지정 치환 변이를 이용하여 변이유전자를 생성하였다. 그리고 DNA 염기서열을 결정하여 원하는 변이 이외의 변이가 유도되지 않았음을 확인하고 이를 T7 promoter가 장착된 발현 담체에 끼워 넣었다. 여기서 얻어지는 단백질은 발현 담체인 pET23b에 의하여 제공되는 6개의 histidine 꼬리를 표현하는 DNA 염기서열을 3' 말단에 갖게 되고 이를 분리 정제에 이용할 수 있을 것이다.

#### 야생 및 변이 *ermSF*의 발현과 단백질 발현양이 세포 성장에 미치는 영향

야생 *ermSF*의 경우는 pET 담체 체계(system)에서 매우 잘 발현되는 것으로 밝혀졌다(7). 본 연구에서 제작된 변이 유전자들도 이 체계를 이용하였고 1 mM IPTG로 발현을 유도하였을 때 상당히 많은 정도로 발현이 되었다(Fig. 2B and 3B). 뿐만 아니라 lac operon에서 leaky한 발현이 발견되는 것(17)과 같이 이 체계를 이용한 돌연변이 유전자의 발현은 IPTG에 의한 유도가 없어도 소량의 단백질이 발현되는 것이 관찰되었다(Fig. 2B and 3B). 한편 ErmSF가 leaky하게 발현되더라도 대장균의 성장에는

큰 영향을 미치지 않았다. 즉, *ermSF* 유전자를 함유하지 않은 빈 담체(empty vector)를 함유한 세포와의 성장 차이는 거의 관찰되지 않았다(Fig. 1). 반면 1 mM IPTG에 의한 발현이 유도되었을 때, 그 성장은 저해되고 그 저해되는 정도는 erythromycin을 첨가하였을 때보다 더 심하게 성장이 저해 받는 것으로 나타났다(Fig. 1). 따라서 야생 및 변이 ErmSF의 활성측정을 위한 성장곡선 작성에는 IPTG에 의한 단백질의 발현유도를 사용하지 않고 leaky 발현에 따른 erythromycin에 대한 내성에 기인한 성장 정도를 측정하였다. 그리고 위에서 언급한 지나치게 많은 양의 발현 이외에 적절한 발현에서도 발현 양에 따른 세포 내에서의 활성 즉 내성 변화에 기인한 항생제 존재 하에서의 성장이 차이를 보일 수 있다. 이러한 사실은 본 연구에서와 같이 단백질의 활성을 세포의 성장으로 측정하려고 하는 실험에서는 중요하게 고려되어야 할 부분이다. 변이 단백질의 경우에는 NT60TE와 NT61TE의 경우를 제외하고는 leaky하게 발현된 단백질의 양은 SDS-PAGE에서 판단하였을 때 거의 유사한 것으로 관찰(Fig. 2B and 3B) 되었으므로 세포의 성장과 단백질의 활성의 상관관계에는 큰 문제가 없는 것으로 생각되었다. 한편, 야생형 ErmSF는 다른 변이 단백질에 비하여 leaky하게 발현되는 단백질의 양이 상대적으로 적었으나 활성을 충분히 나타내는 것으로 관찰되어서 양성대조군(positive control)으로서의 역할을 적절히 한 것으로 사료되었다.

#### 결손 변이 단백질의 활성측정

ErmSF의 <sup>58</sup>RARR<sup>61</sup> motif의 활성에서의 역할을 알아보기 위해 1-57의 아미노산이 제거된 변이 유전자(NT57TE)와 <sup>58</sup>RA<sup>59</sup>까지

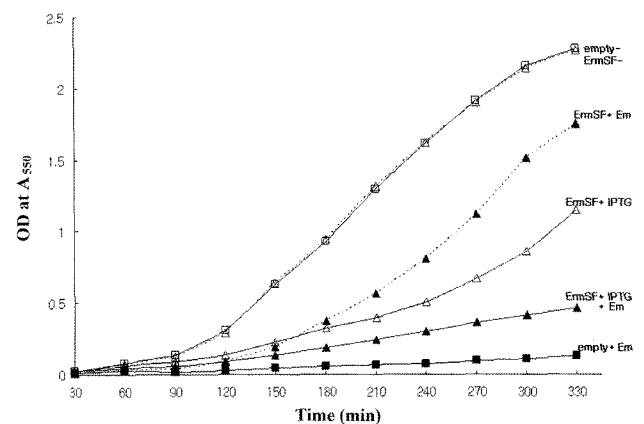


Fig. 1. Effects of various factors on *E. coli* growth.

(—□—), growth curve of *E. coli* harboring empty plasmid without erythromycin (Em) ;(·-·△-·-), *E. coli* showing leaky expression of ErmSF without Em ;(·-·▲-·-), *E. coli* showing leaky expression of ErmSF with Em (150 μg/ml) ;(—▲—), *E. coli* overexpressing ErmSF in the presence of IPTG (1 mM) ;(—▲—), *E. coli* overexpressing ErmSF by IPTG (1 mM) in the presence of Em (150 μg/ml) ;(—■—) *E. coli* harboring empty plasmid with Em (150 μg/ml). ErmSF overexpressed in the cell by IPTG induction showed more deleterious effect on cell growth than antibiotic, erythromycin (150 μg/ml).

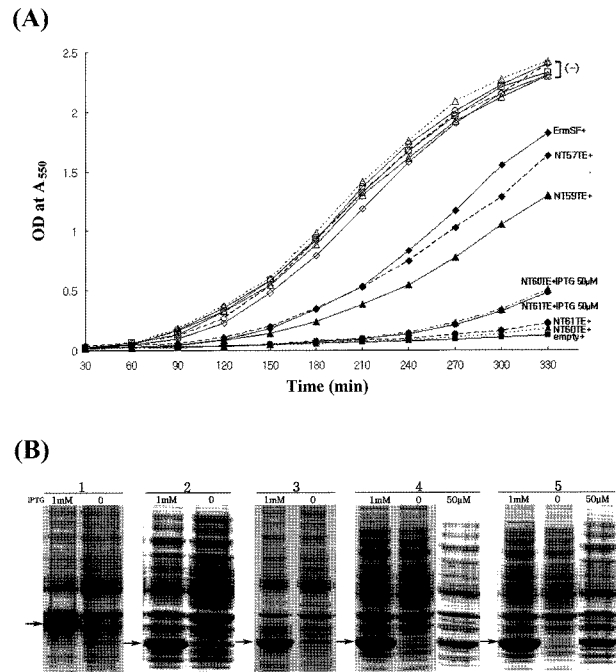
제거된 1-59 (NT59TE), 1-60 (NT60TE) 그리고 1-61 (NT61TE) 까지의 아미노산이 제거된 변이유전자를 함유한 대장균의 성장을 erythromycin 존재 하에 측정하였다. NT60TE와 NT61TE의 경우는 leaky 발현에 의한 내성과 SDS-PAGE상의 단백질 발현이 거의 관찰되지 않아 일상적으로 본 실험실에서 단백질의 발현에 사용되는 IPTG (1 mM) 농도의 1/20의 농도(50 μM)로 발현을 유도하였다. 이 때 발현된 양은 대장균 내에서 자연적으로 가장 많이 발현된 다른 단백질의 양과 비슷하였으나(Fig. 2B Panel 4, 5), 1 mM의 IPTG로 유도된 단백질의 양과는 많은 차이를 보였다. 이러한 단백질량의 증가는 항생제에 대한 내성도 증가시켜 상당한 성장의 증가를 보여주었다(Fig. 2A). 따라서 Fig. 1에서 관찰되는 바와 같이 단백질의 발현 증가에 의한 성장의 저하와, 이에 따른 항생제에 대한 내성에 의한 성장 관찰 결과가 크게 왜곡되는 현상은 관찰되지 않은 것으로 사료된다. 이렇게 야생 단백질과 변이 단백질이 대장균 세포내에서 발현됨으로써 얻어지는 항생제 내성에 의한 항생제 존재 하에서의 성장 정도에 근거한 단백질의 활성을 관찰하여 본 결과(Fig. 2A), 1-57까지의 아미노산은 단백질의 활성에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 관찰되었으나 <sup>58</sup>RA<sup>59</sup>의 경우는 활성에 많은 영향을 미치는 것으로 나타났다. 그리고 R60과 R61의 경우는 단백질의 활성에 지대한 영향을 미쳐 이들이 삭제된 변이 단백질의 경우는 그 활성이 상당히 저해된 것으로 밝혀졌다(Fig. 2A).

**<sup>60</sup>RR<sup>61</sup>의 위치 지정 치환 변이 단백질의 활성 측정**

NT60TE와 NT61TE는 다른 결손 변이 단백질에 비하여 상당한 활성의 저하를 보여주었다. 따라서 NT59TE에서 R60과 R61을 alanine으로 치환한 변이 단백질을 제작하여 그 활성을 측정하였다. R61A 변이 단백질은 그 활성의 저하가 관찰되지 않았으나 R60A 변이 단백질의 경우는 상당한 활성의 저하를 보여주었다. 그리고 RR60, 61AA 이중 변이 단백질은 더욱 활성이 저하되어, 50 μM의 IPTG로 발현이 유도되어 더 많은 단백질의 발현이 이루어진 NT60TE 또는 NT61TE와 유사한 단백질 활성을 보이는 것으로 관찰되었다(Fig. 3A).

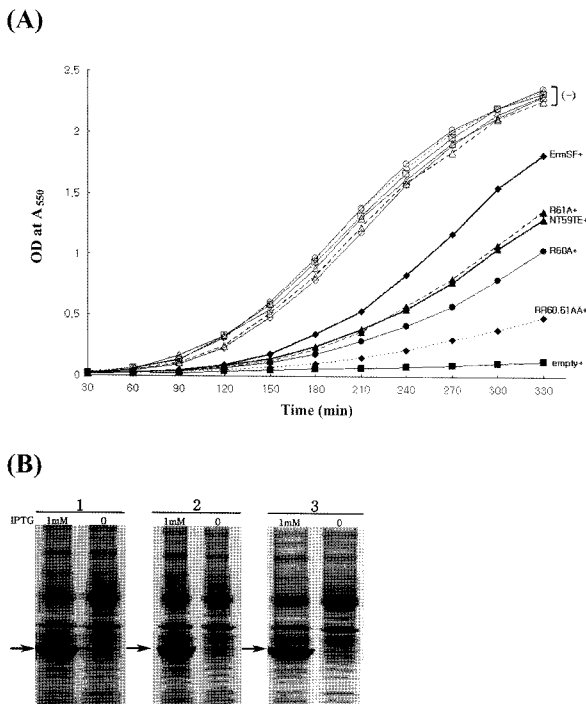
**고 찰**

항생물질은 그가 가진 항생작용에 의해 이 항생제에 감수성이 있는 미생물의 성장을 억제한다. 따라서 균이 자라는 배지에 항생제를 넣어주었을 때 그 농도에 따라 미생물의 성장도 억제되게 된다. 그러나 세포내에 항생제에 대한 내성을 가져다주는 단백질이 유도 발현되었을 경우는 일정농도의 항생제가 존재할 때 이 단백질의 양에 따라 세포의 성장이 영향을 받게 된다. 이러한 현상은 NT60TE와 NT61TE의 경우 관찰되었으며 단백질의 양이 증가함에 따라 성장이 증가하였다. 그러나 이 현상도 단백질의 발현 양이 더욱 증가하게 되면 오히려 세포 성장에 좋지 않은 영향을 끼치게 되는 것으로 밝혀졌다. 단백질의 발현을 위하여 세포가 이용할 수 있는 에너지의 상당부분을 단백질 생합성에 사용하여 그 성장이 저해되는 것으로 믿어진다(2). 그러므로 동등



**Fig. 2.** (A) Expression of ErmSF and various N-terminal end truncated ErmSF proteins in *E. coli*. Cells carrying ErmSF or mutant genes grow in the presence of erythromycin (+, 150 μg/ml), while control cells do not (-). *E. coli* cells expressing wild type and mutant ErmSF grow well to a similar extent in the absence of Em. But with Em, each cell grows according to the activity of each protein expressed in the cell. All the cells except those expressing NT60TE and NT61TE, expressed ErmSF or other mutants in the absence of IPTG (leaky expression). The expression of NT60TE and NT61TE was induced with 50 μM IPTG or without IPTG. (—◆—), growth curve of *E. coli* HJJ105 (ErmSF) with Em; (—◆—), *E. coli* HJJ301 (NT57TE) with Em; (—▲—), *E. coli* HJJ116 (NT59TE) with Em; (—▲—), *E. coli* HJJ117 expressing NT60TE by IPTG (50 μM) with Em; (—◆—), *E. coli* HJJ118 expressing NT61TE by IPTG (50 μM) with Em; (—◆—), *E. coli* HJJ118 (NT61TE) with Em; (—▲—), *E. coli* HJJ117 (NT60TE) with Em; (—■—), *E. coli* harboring empty plasmid with Em. (B) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of wild type ErmSF and various N-terminal end region truncated ErmSF proteins. The concentration of IPTG used for induction is indicated on the top of each lane. After 8 hr incubation following transfer into new medium, cell culture was boiled to disrupt the cells in 6× sample buffer, resolved on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then stained with Coomassie brilliant blue. Panel 1, *E. coli* HJJ105 (wild type ErmSF); panel 2, *E. coli* HJJ301 (NT57TE); panel 3, *E. coli* HJJ116 (NT59TE); panel 4, *E. coli* HJJ117 (NT60TE); panel 5, *E. coli* HJJ118 (NT61TE).

한 양의 단백질이 발현되었을 때는 세포의 성장은 단백질의 활성에 따라 즉 단백질이 나타내는 내성에 의해 좌우되게 된다. 따라서 대장균에서 발현된 단백질의 활성에 따른 세포의 성장이 변화할 때 이 세포의 성장곡선을 측정하는 것은 단백질의 활성을 측정하는데 매우 좋은 방법이 될 것이므로 많은 실험에서 사



**Fig. 3.** (A) Expression of N-terminal end 1-59 amino acid truncated ErmSF (NT59TE) mutant protein and its substitution mutant proteins (NT59TE R60A, NT59TE R61A and NT59 RR60, 61AA) in *E. coli*. Cells expressing ErmSF or mutant protein grow in the presence of Em (+, 150 µg/ml), while control cells do not (-). (—●—), growth curve of *E. coli* HJJ105 (ErmSF) with Em; (---▲---), *E. coli* HJJ303 (NT59TE R61A) with Em; (—■—), *E. coli* HJJ116 (NT59TE) with Em; (—●—), *E. coli* HJJ302 (NT59TE R60A) with Em; (---◆---), *E. coli* HJJ304 (NT59TE RR60,61AA) with Em; (—■—), *E. coli* harboring empty plasmid with Em. (B) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of NT59TE and its substitution mutant proteins. The concentration of IPTG is indicated on the top of each lane. Panel 1, *E. coli* HJJ302 (NT59TE R60A); panel 2, *E. coli* HJJ303 (NT59TE R61A); panel 3, *E. coli* HJJ304 (NT59TE RR60,61AA).

용되었다(10, 19).

본 연구에서 사용된 실험이 성공적으로 적용되기 위해서는 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 양의 단백질이 발현이 되어야 하고 발현된 단백질의 양이 단백질의 활성을 충분히 반영하여 세포의 성장에 영향을 미쳐야한다는 전제가 있어야 한다. 이를 위해서 본 연구에서 이용한 것이 lac operon이 갖는 조절기작의 leakiness이다. 즉 유도제(inducer)가 없이도 유전자의 발현이 이루어지는 현상이다. 이 현상은 이 체계(system)를 이용한 단백질의 대량 발현을 시도할 때 그 대상 단백질이 독성을 띄었을 때 문제가 되었던 현상으로(17) 본 연구에서는 야생 ErmSF를 leaky 발현을 유도하였을 때 성장에 전혀 영향을 주지 않을 만큼의 단백질을 발현하였고 또 항생제에 대하여도 충분한 내성을 보여주어 항생제의 존재 하에 활성에 따른 성장을 보여주었다. 뿐만 아니라 NT60TE와 NT61TE의 경우를 제외하고 모든 변이 단백질

은 그 발현 양이 거의 유사하여 세포의 성장이 단백질의 활성을 충분히 반영하고 있는 것으로 나타났다.

즉, 약 25%의 arginine으로 구성된 ErmSF의 NTER을 1-57, 1-59, 1-60과 1-61로 점차적으로 제거할수록 활성이 저하되어 이들 단백질을 발현하는 세포의 항생제 존재 하에서의 성장이 억제되었다. 특히 R60과 R61까지 제거된 결손 단백질의 경우는 50 µM 농도의 IPTG로 발현을 유도하여 상당한 정도의 단백질이 발현되었음에도 불구하고 모두 급격한 활성의 저하에 따른 성장의 저해가 관찰되었다. 이러한 관찰 결과는 R60과 R61이 단백질 활성에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 나타내는 것으로써 이들의 역할을 더 정확히 알기위해 NT59TE에서 R60A, R61A와 RR60,61AA 변이 유전자를 제조하여 그 단백질의 활성을 조사하였다. R61A는 거의 활성에서의 소실을 보여주지 않았지만 R60A의 경우는 R60과 R61 결손 단백질에 비하여는 작지만 상당한 정도의 활성에 있어서 소실을 보여주었다. 그리고 RR60,61AA 이중 치환 변이 단백질의 경우는 R60, R61 결손 변이 단백질 정도 또는 그 보다 약간 작은 활성의 소실을 보여주었다. 결손 단백질과 위치지정 치환 변이 단백질의 활성 차이는 아마 R60과 R61을 포함한 주위의 아미노산이 취하는 2차 구조에 기인한 것으로 사료된다. 그리고 실제로 단백질 또는 펩타이드의 2차 구조를 추정하는 프로그램을 사용하여 이 부분의 2차 구조를 추정하여 본 결과 <sup>58</sup>RRRELSQNF<sup>67</sup> 부분이 α-helix를 이루고 있을 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 A59까지 제거되었을 경우, α-helix가 유지되나 R60까지 제거되었을 경우는 α-helix가 그 구조를 유지할 수 없어서 활성이 저하되는 것으로 추측된다. 반면, alanine의 경우는 α-helix를 잘 이루는 아미노산으로 R60A, R61A 또는 RR60, 61AA의 경우는 돌연변이를 도입했음에도 불구하고 α-helix 잘 유지하고 있는 것으로 추정되어 각 arginine의 활성에서의 역할을 잘 나타내는 것으로 사료된다. 즉, R61보다는 R60의 활성에서의 역할이 중요하고 또 이들은 상호보완적으로 작용하여 두 아미노산이 모두 치환되었을 경우는 활성이 매우 저하되는 것으로 믿어진다. 그리고 이들 돌연변이에 의하여 활성이 완전히 없어지는 것이 아니므로 이 아미노산은 활성화 부위는 아니지만 기질인 RNA와 상호작용하여 methylation이 잘 일어나도록 하는데 중요한 역할을 하는 것으로 믿어진다.

### 감사의 말

본 연구는 2007년도 정부의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구결과와 일부(KRF-2007-313-C00667)로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. 이학진, 진형중. 2004. ErmSF에서 특이적으로 발견되는 N-terminal end region의 점차적인 제거에 의한 활성에 중요한 아미노산의 규명. *Kor. J. Microbiol.* 40, 257-262.
2. Baick, J.W., J.H. Yoon, S. Namgoong, D. Sll, S.I. Kim, S.H. Eom, and K.W. Hong. 2004. Growth inhibition of *Escherichia coli* dur-

- ing heterologous expression of *Bacillus subtilis* glutamyl-tRNA synthetase that catalyzes the formation of mischarged Glutamyl-tRNA<sup>Gln</sup>. *J. Microbiol.* 42, 111-116.
3. Birmingham, V.A., K.L. Cox, J.L. Larson, S.E. Fishman, C.L. Hersberger, 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.
  4. Bussiere, D.E., S.W. Muchmore, C.G. Dealwis, G. Schluckebier, V.L. Nienaber, R.P. Edalji, K.A. Walter, U.S. Lador, T.F. Holzman, and C. Abad-Zapatero. 1998. Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry* 37, 7103-7112.
  5. Cocito, C., M. Di. Giambattista, E. Nyssen, and P. Vannuffel. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* 39, 7-13.
  6. "Frontiers in Biotechnology: Antibiotic Resistance". 1994. *Science* 264, 317-476.
  7. Jin, H.J. 1999. *ermSF*, a ribosomal RNA adenine N6-methyltransferase gene from *Streptomyces fradiae*, confers MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) resistance to *E. coli* when it is expressed. *Mol. Cells* 9, 252-257.
  8. 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.
  9. 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, 6992-6998.
  10. Kwon, A.R., Y.H. Min, E.J. Yoon, J.A. Kim, M.J. Shim, and E.C. Choi. 2006. ErmK leader peptide : amino acid sequence critical for induction by erythromycin. *Arch. Pharm. Res.* 29, 1154-1157.
  11. Lafontaine, D., J. Delcour, A.L. Glasser, J. Desgrs, and J. Vandenhoute. 1994. The DIM1 gene responsible for the conserved m6(2) Am6(2)A dimethylation in the 3'-terminal loop of 18S rRNA is essential in yeast. *J. Mol. Biol.* 241, 492-497.
  12. 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.
  13. Roberts, M.C. 2004. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Mol. Biotechnol.* 28, 47-62.
  14. Schluckebier, G., P. Zhong, K.D. Stewart, T.J. Kavanaugh, and C. Abad-Zapatero. 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.
  15. Seppala, H., M. Skurnik, H. Soini, M.C. Roberts, and P. Huovinen. 1998. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 257-262.
  16. 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.
  17. Studier, F.W. and B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
  18. 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.
  19. Weaver, J.R. and P.A. Pattee. 1964. Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 88, 574-580.
  20. Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577-585.

(Received July 23, 2008/Accepted September 9, 2008)

#### ABSTRACT : Functional Role of <sup>60</sup>RR<sup>61</sup> in 23S rRNA Methylation, Which Is in N-Terminal End Region of ErmSF

Hyung Jong Jin (Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Science, The University of Suwon, Kyunggi-Do 445-743, Republic of Korea)

ErmSF is one of the proteins which are produced by *Streptomyces fradiae* to avoid suicide by its autogenous macrolide antibiotic, tylosin and one of ERM proteins which are responsible for transferring the methyl group to A<sub>2058</sub> (*Escherichia coli* coordinate) in 23S rRNA, which reduces the affinity of MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotics to 23S rRNA, thereby confers the antibiotic resistance on microorganisms ranging from antibiotic producers to pathogens. ErmSF contains an extra N-terminal end region (NTER), which is unique to ErmSF and 25% of amino acids of which is arginine known well to interact with RNA. Noticeably, arginine is concentrated in <sup>58</sup>RARR<sup>61</sup> and functional role of each arginine in this motif was investigated through deletion and site-directed mutagenesis and the activity of mutant proteins in cell. R60 and R61 was found to play an important role in enzyme activity through the study with deletion mutant up to R60 and R61. With the site-directed mutagenesis using deletion mutant of 1 to 59 (R60A, R61A, and RR60,61AA), R60 was found more important than R61 but R61 was necessary for the proper activity of R60 and vice versa. And these amino acids were presumed to assume a secondary structure of  $\alpha$ -helix.