

전체염기서열 결정에 의한 황색포도상구균의 내성 플라스미드 동정

이재윤 · 박정희 · 문경호[#]

경성대학교 약학대학

(Received February 13, 2008; Revised April 1, 2008)

Characterization of Antibiotic Resistance Plasmids of *Staphylococcus aureus* by Complete Nucleotide Sequence Determination

Jae Yoon Lee, Jung Hee Park and Kyung Ho Moon[#]

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

Abstract — Previously, we reported on the antibiotic resistance patterns of 50 strains of *Staphylococcus aureus* which were isolated from a hospital in Busan, Korea from July 2005 to December 2006. We have isolated small plasmids and classified plasmid types by agarose gel electrophoresis. We have selected 5 plasmids and determined complete nucleotide sequences of those plasmids. The aim of this paper is to report on the characteristics of cadmium, erythromycin, lincomycin resistance plasmids and a cryptic plasmid based on the sequence analysis obtained by using the BLAST program.

Keywords □ *Staphylococcus aureus*, small plasmid, erythromycin, lincomycin, cadmium, cryptic plasmid

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)으로 대표되는 포도상구균속 세균들의 내성은 많은 부분 크기가 작고 20~40개의 복제수를 가지고 있는 플라스미드에 의해서 매개된다.^{1,2)} 본 연구실에서는 1989년부터 항생제 내성 황색포도상구균으로부터 크기가 작은 플라스미드를 분리하고 전체염기서열을 결정하여 보고하였는데 클로람페니콜 내성 플라스미드 pKH7,^{3,6)} pKH13⁸⁾과 pKH15,⁸⁾ 테트라사이클린 내성 플라스미드 pKH6,⁴⁾ 기능을 모르는 플라스미드 pKH8⁵⁾과 pKH14⁸⁾ 그리고 smr(small multidrug resistance) 플라스미드 pKH4⁷⁾ 등이다. 저자 등은 2005년 7월부터 2006년 12월까지 부산 소재 위생병원으로부터 50개의 황색포도상구균을 분양받아 21개 항생제에 대해 내성양상을 조사하여 보고하였으며⁹⁾ 이 균주들로부터 크기가 작은 플라스미드를 분리하고 전체염기서열을 결정한 다음 BLAST 프로그램을 이용하여 동정하였다. 그 결과 기능을 알 수 없는 pKH12, cadmium 내성을 매개하는 pKH18, erythromycin(Em) 내성을 매개하는 pKH19와 pKH20 그리고 lincomycin 내성을 매개하는 pKH21을 확인하였으며, 이들 플라스미드와 다른 나

라에서 발견된 동일한 기능의 플라스미드와 비교한 결과를 보고하고자 한다.

실험 방법

실험균주

부산 소재 위생병원에서 2005년 7월부터 2006년 12월 사이에 수집된 50종의 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)을 사용하였다.⁹⁾ 염기서열 결정을 위한 재조합 플라스미드의 클로닝 균주로는 *E. coli* JM83(*ara*, Δ (*lac*, *proA*, *B*), *rps*, *strA*, *thi*, ϕ 80*dlacZ* *M15*(*rk*+, *mk*+))을 사용하였다.

플라스미드 및 효소

Phagemid인 pBluescriptII KS⁺를 클로닝 및 염기서열 결정 벡터로 사용하였으며 여러 가지 제한효소, T4 DNA ligase, 플라스미드 분리를 위한 WizardTM DNA purification systems을 Promega에서 구입하여 사용하였다.

MIC(Minimum Inhibitory Concentration) 결정

Cadmium 및 항생제에 대한 MIC는 고체배지계열희석법으로 결정하였다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4885 (팩스) 051-620-4804
(E-mail) khmun@ks.ac.kr

Plasmid 분리

*S. aureus*로부터 플라스미드의 분리는 김¹⁰⁾ 등의 방법에 의하여 분리하였으며 *E. coli* JM83의 플라스미드 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하였다.¹¹⁾

클로닝 및 염기서열 결정

*S. aureus*로부터 분리된 플라스미드와 클로닝 벡터인 pBluescriptII KS⁺를 동일한 제한효소로 처리한 후 정제하고 T4 DNA ligase를 사용하여 연결한 다음 *E. coli* JM83에 CaCl₂법¹¹⁾으로 형질전환시켜 염기서열결정에 사용하였다. 염기서열 결정은 마크로젠(서울, 한국)에 의뢰하여 수행하였다.

염기서열 분석

염기서열을 결정한 다음 염기서열 및 ORF 분석은 NCBI의 BLAST를 이용하여 수행하였다.¹²⁾

실험 결과

플라스미드 분리와 염기서열 결정 및 분석

*S. aureus*로부터 플라스미드를 분리하여 염기서열을 결정하고 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 분석한 결과 Table I의 결과를 얻었다. 각각의 플라스미드의 염기서열은 NCBI의 GenBank에 EC168704(pKH12), EC333812(pKH18), EC350089(pKH19), EC350090(pKH20) 그리고 EC350088(pKH21)로 등록하였다.

Cryptic 플라스미드 pKH12

S. aureus JY43으로부터 분리된 pKH12는 3,010 bp로 이루어져 있는데 염기서열분석 결과 기능을 알 수 없는 cryptic 플라스미드로 확인되었다. 이와 유사한 플라스미드는 미국에서 분리 동정된 3,125 bp의 pUSA01¹³⁾과 최근 한국에서 동정된 3,124 bp의 pKH14⁸⁾가 있다. 3개의 플라스미드 모두 331개의 아미노산으로 구성된 Rep 단백질과 193개의 아미노산으로 구성된 hypothetical 단백질을 가지고 있었다. 전기영동 상에서 pKH12와 같은 크기의 플라스미드로 *S. aureus* JY8로부터 분리된 pKH10과 *S. aureus* JY25로부터 분리된 pKH11이 있었는데 전체염기서열을 결정해 본 결과 둘 다 pKH12와 100% 동일한 염기서열을 가지고 있었다.

Cadmium 내성 플라스미드 pKH18

S. aureus JY11로부터 분리된 pKH18은 3,332 bp로 이루어져 있었는데 염기서열분석 결과 cadmium 내성을 매개하는 플라스미드로 확인되었으며 MIC를 측정해 본 결과 64 µg/ml로 나타났다. pKH18은 미국에서 분리된 3,333 bp의 pC55s(GenBank, AY048756)와 유사한 플라스미드로 확인되었으며 크기 면에서 1 bp의 차이를 보였고 17 부위에서 염기쌍 치환이 일어났다. 이와 같은 염기서열의 차이가 있음에도 불구하고 209개의 아미노산으로 이루어진 CadD 단백질과 115개의 아미노산으로 이루어진 CadX 단백질에서는 100% 동일성을 보였으며 331개의 아미노산으로 이루어진 Rep 단백질의 경우에도 98% 동일성을 보여주었다. *S. aureus* JY7, JY9, JY28, JY30, JY35, JY40 그리고 JY49도 pKH18과 동일한 크기의 플라스미드를 가지고 있었다. 다른 나라의 경우를 보면 24,653 bp의 pN315,¹⁴⁾ 20,654 bp의 pMW2,¹⁵⁾ 21,845 bp의 pUB101,¹⁶⁾ 20,652 bp의 pSAS,¹⁷⁾ 그리고 17,334 bp의 pBORa53¹⁸⁾처럼 크기가 큰 플라스미드에서 CadD와 CadX를 확인할 수 있었다. 3,972 bp의 pRW001도 cadmium 내성을 매개하는 플라스미드인데 이 플라스미드는 완전한 형태의 *cadD* 유전자를 가지고 있는데 반하여 *cadX* 유전자는 뒤 부분이 IS257에 의해서 결실된 형태였다.¹⁹⁾

Em 내성 플라스미드 pKH19와 pKH20

S. aureus JY37로부터 분리된 pKH19와 *S. aureus* JY30으로부터 분리된 pKH20은 각각 2,473 bp와 2,412 bp로 이루어져 있었는데 염기서열분석 결과 둘 다 Em 내성을 매개하는 플라스미드로 확인되었으며 MIC를 측정해 본 결과 둘 다 256 µg/ml 이상으로 나타났다. pKH19는 염기서열 비교에 있어 다른 나라에서 분리된 Em 내성 플라스미드 2473 bp의 pE5,²⁰⁾ 2473 bp의 pWBG738(GenBank, DQ088624), 그리고 2475 bp의 pT48과²¹⁾ 99% 이상의 동일성을 보여주었으며 Rep 단백질과 ErmC 단백질의 아미노산 서열은 100% 동일하였다. pKH20은 pKH19에서 nt 960~1020 사이의 61 bp가 결실된 플라스미드로 확인되었다. *S. aureus* JY28, JY31, JY35 그리고 JY42도 pKH19와 동일한 크기의 플라스미드를 가지고 있었다.

Lincosamide 내성 플라스미드 pKH21

S. aureus JY50으로부터 분리된 pKH21은 2,531 bp로 이루어져 있었는데 염기서열분석 결과 lincosamide 내성을 매개하는 플라스미드로 확인되었으며 MIC 값은 lincomycin에 대해서는 32 µg/ml, clindamycin에 대해서는 0.25 µg/ml로 나타나 lincomycin에 대해서만 내성을 나타냄을 알 수 있었다. pKH21은 *S. simulans*으로부터 분리된 pLNU5와 크기는 동일하며 한 개의 염기쌍에서만 차이를 보였는데 pKH21의 nt 2294의 C가 pLNU5에서 A로 치환된 형태를 하였으나 이 플라스미드들이 가지고 있

Table 1 – Plasmids of various *S. aureus*

Strain	Plasmid	Size (bp)	Resistance
<i>S. aureus</i> JY43	pKH12	3,010	cryptic
<i>S. aureus</i> JY11	pKH18	3,332	cadmium
<i>S. aureus</i> JY37	pKH19	2,473	erythromycin
<i>S. aureus</i> JY30	pKH20	2,412	erythromycin
<i>S. aureus</i> JY50	pKH21	2,531	lincomycin

는 2개의 ORF에는 영향이 없었다.²²⁾ 또한 pKH21은 *S. aureus*에서 분리된 pBMSa1와 유사한 플라스미드로 확인되었다.²³⁾

고 찰

황색포도상구균으로부터 작은 크기의 플라스미드를 분리한 다음 전체염기서열을 결정하고 BLAST 프로그램을 이용하여 분석한 결과 현재 한국에서 황색포도상구균들이 가지고 있는 플라스미드를 동정할 수 있었다.

3개 균주가 가지고 있는 pKH12는 기능을 알 수 없는 cryptic 플라스미드로 확인되었는데 이와 유사한 플라스미드는 2004년 한국에서 분리된 pKH14와⁸⁾ 2006년 미국에서 분리된 pUSA01이¹³⁾ 있다. 한편 pKH12는 1989년 한국에서 분리된 pKH3²⁴⁾와도 유사한 플라스미드로 확인되었는데 이들 플라스미드가 계속하여 존재한다는 것은 이 플라스미드가 나름대로 생존에 중요한 기능을 하고 있기 때문일 것으로 추측된다.

50개의 균주 중에서 8개의 균주가 가지고 있는 cadmium 내성 매개 플라스미드인 pKH18은 2001년 미국에서 분리된 pC55s (GenBank, AY048756)와 거의 유사한 플라스미드로 확인되었으며 pC55s 이후로는 이와 유사한 플라스미드는 보고된 적이 없었다.

Em 내성 플라스미드는 2개가 분리되었는데 5개의 균주가 가지고 있는 pKH19와 1개의 균주에서만 분리된 pKH20이었다. pKH19는 다른 나라에서 분리된 Em 내성 플라스미드와 유사하였는데^{20,21)} 이에 반하여 pKH19의 염기서열 중에서 61개의 염기쌍이 결실된 형태의 pKH20은 처음으로 보고되는 플라스미드였다. 61개 염기쌍의 결실 차이에도 불구하고 pKH19와 pKH20 두 플라스미드의 Rep 단백질이나 ErmC 단백질의 ORF에는 전혀 영향이 없었다.

Lincosamide 내성을 매개하는 플라스미드 pKH21은 2007년 *S. simulans*에서 분리된 pLNU5와 거의 동일한 플라스미드로 확인되었으며²²⁾ 둘 다 lincomycin에 내성을 나타내고 clindamycin에서는 내성을 나타내지 않았다. pKH21은 *S. aureus*에서 분리된 pBMSa1과도 유사한 플라스미드로 확인되었다.²³⁾

플라스미드 전체염기서열을 결정함으로써 현재 우리나라에서 분리되는 황색포도상구균들이 가지고 있는 작은 크기의 플라스미드를 동정할 수 있었으며 전체적으로 다른 나라에서 분리된 것들과 유사한 서열을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 이 서열에 관한 자료들은 한국에서 분리되는 플라스미드의 연구에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

2005년 7월부터 2006년 12월 사이에 부산 소재 위생병원으로

부터 분양받은 50종의 황색포도상구균으로부터 작은 크기의 플라스미드를 분리한 다음 전체염기서열을 결정하고 BLAST 프로그램을 이용하여 동정하였다. 그 결과 기능을 알 수 없는 pKH12, cadmium 내성을 매개하는 pKH18, Em 내성을 매개하는 pKH19와 pKH20 그리고 lincomycin 내성을 매개하는 pKH21을 확인할 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 2008학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었음.

문 헌

- 1) Lyon, B. R. and Skurray, R. : Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. *Microbiological Reviews* **51**, 88 (1987).
- 2) Novick, R. P. : Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 537 (1989).
- 3) Yoon, S. J., Lee, D. W., Kim, W. K., Shin, C. K., Im, S. W. and Moon, K. H. : Nucleotide sequence of Rep and Cat proteins encoded by chloramphenicol-resistance plasmid pKH7. *Yakhak Hoeji* **39**, 676 (1995).
- 4) Lee, D. W., Yoon, S. J., Kim, W. K., Shin, C. K., Im, S. H. and Moon, K. H. : Complete nucleotide sequences of pKH6, a tetracycline-resistance plasmid from multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* SA2. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 423 (1996).
- 5) 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).
- 6) Moon, K. H., Park, B. D., Lee, D. S. and Lee, B. R. : Nucleotide sequence of Pre protein in chloramphenicol resistance plasmid pKH7. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**(6), 566 (1998).
- 7) Koh, C. H. and Moon, K. H. : Complete nucleotide sequence of small multidrug resistance plasmid pKH4. *Yakhak Hoeji* **43**, 789 (1999).
- 8) Park, J. H., Lee, J. Y. and Moon, K. H. : Characterization of plasmids of chloramphenicol resistant *Staphylococcus aureus*. *Yakhak Hoeji* **52**, 33 (2008).
- 9) Lee, J. Y., Park, J. H. and Moon, K. H. : Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Busan. *Yakhak Hoeji* **51**, 164 (2007).
- 10) 김종명, 김기현, 문경호 : 황색포도상구균에서 테트라사이클린 내성을 나타내는 플라스미드의 동정. *약학회지* **36**, 255 (1992).
- 11) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : *Molecular cloning*,

- Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- 12) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. : Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403 (1990).
 - 13) Diep, B. A., Gill, S. R., Chang, R. F., Phan, T. H., Chen, J. H., Davidson, M. G., Lin, F., Lin, J., Carleton, H. A., Mongodin, E. F., Sensabaugh, G. F. and Perdreau-Remington, F. : Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **367**, 731 (2006).
 - 14) Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H. and Hiramatsu, K. : Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1225 (2001).
 - 15) Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K. and Hiramatsu, K. : Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**, 1819 (2002).
 - 16) O'Brien, F. G., Price, C., Grubb, W. B. and Gustafson, J. E. : Genetic characterization of the fusidic acid and cadmium resistance determinants of *Staphylococcus aureus* plasmid pUB101. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 313 (2002).
 - 17) Holden, M. T. G., Feil, E. J., Lindsay, J. A., Peacock, S. J., Day, N. P. J., Enright, M. C., Foster, T. J., Moore, C. E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S. D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K. D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B. G., Spratt, B. G. and Parkhill, J. : Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: Evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9786 (2004).
 - 18) Massidda, O., Mingoia, M., Fadda, D., Whalen, M. B., Montanari, M. P. and Varaldo, P. E. : Analysis of the β -lactamase plasmid of borderline methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*: Focus on bla complex genes and cadmium resistance determinants *cadD* and *cadX*. *Plasmid* **55**, 114 (2006).
 - 19) Crupper, S., Worrell, V., Stewart, G. C. and Iandolo, J. J. : Cloning and expression of *cadD*, a new cadmium resistance gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **181**, 4071 (1999).
 - 20) Projan, S. J., Monod, M., Narayanan, C. S. and Dubnau, D. : Replication properties of pIM13, a naturally occurring plasmid found in *Bacillus subtilis*, and of its close relative pE5, a plasmid native to *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **169**, 5131 (1987).
 - 21) Catchpole, I., Thomas, C., Davies, A. and Dyke, K. G. H. : The nucleotide sequence of *Staphylococcus aureus* plasmid pT48 conferring inducible macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance and comparison with similar plasmids expressing constitutive resistance. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 697 (1988).
 - 22) Luethje, P., Koeckritz-Blickwede, M. and Schwarz, S. : Identification and characterization of nine novel types of small staphylococcal plasmids carrying the lincosamide nucleotidyl-transferase gene *lnu(A)*. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 600 (2007).
 - 23) Loeza-Lara, P. D., Soto-Huipé, M., Baizabal-Aguirre, V. M., Ochoa-Zarzosa, A., Valdez-Alarcon, J. J., Cano-Camacho, H. and Lopez-Meza, J. E. : pBMSa1, a plasmid from dairy cow isolate of *Staphylococcus aureus*, encodes a lincomycin resistance determinant and replicates by the rolling-circle mechanism. *Plasmid* **52**, 48 (2004).
 - 24) 고창학 : 경성대학교 박사학위 논문집, pp. 35-36 (2000).