

ErmSF에서 두 도메인 사이에 존재하는 잘 보존된 237번 아르지닌 잔기의 위치 지정 치환 변이의 효소 활성 검색을 통한 역할 규명

진형종

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

Mutational Analysis Elucidates the Role of Conserved 237 Arginine in 23S rRNA Methylation, Which is in the Concave Cleft Region of ErmSF

Jin Hyung Jong

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Science, The University of Suwon,
Kyunggi 445-743, Republic of Korea

(Received June 3, 2013 / Accepted June 19, 2013)

The Erm family of adenine-N⁶ methyltransferases (MTases) is responsible for the development of resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics through the methylation of 23S ribosomal RNA. Recently, it has been proposed that well conserved amino acids in ErmC' located in concave cleft between N-terminal 'catalytic' domain and C-terminal 'RNA-binding' domain interacts with substrate RNA. We carried out the site-directed mutagenesis and studied the function of the ErmSF R237 mutant *in vitro* and *in vivo*. R237 amino acid residue is located in the concave cleft between two domains. Furthermore this residue is very highly conserved in almost all the Erm family. Purified mutant protein exhibited only 51% enzyme activity compared to wild-type. *Escherichia coli* with R237A mutant protein compared to the wild-type protein expressing *E. coli* did not show any difference in its MIC (minimal inhibitory concentration) suggesting that even with lowered enzyme activity, mutant protein was able to efficiently methylate 23S rRNA to confer the resistance on *E. coli* expressing this protein. But this observation strongly suggests that R237 of ErmSF probably interacts with substrate RNA affecting enzyme activity significantly.

Keywords: antibiotic resistance factor protein, *in vivo*, *in vitro* activity test, MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) site-directed mutagenesis, protein-RNA interaction

현재 임상에서 쓰여지고 있는 macrolide-lincosamide-streptogramin B 항생제 (MLS_B계 항생제)에 대한 미생물이 갖는 내성은 기존에 알려진 대부분의 항생제에서 발견되는 내성 작용 기작이 모두 관찰되고 있다. 즉, 항생제의 화학적 변환에 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 (Leclercq1 and Courvalin, 1991). 이 중 가장 큰 내성 발생 요인은 23S rRNA의 peptidyl transferase loop에 존재하는 특정 아데닌 잔기 (A2058, *E. coli* numbering)의 N⁶ 위치에 mono- 또는 dimethylation이 유발되어 나타난다. 그 결과로 MLS_B 계 항생제들은 더 이상 ribosome에 부착될 수 없어서 나타나게 된다 (Skinner *et al.*, 1983; Weisblum, 1995; Roberts, 2004). 이러한 기작을 수행하는 단백질은 Erm (erythromycin resistance

methyltransferase)으로 이 단백질들은 아미노산 서열에 있어서의 유사성과 동등성이 높고 그 작용이 동일하므로 유사한 구조를 가진 것으로 생각되어 하나의 단백질 family로 분류되어 있다 (Weisblum, 1995). 이들 단백질은 아미노산 서열상에서의 유사성이 높아서 하나의 조상 단백질로부터 유래되었을 것으로 추정되고 있다 (Park *et al.*, 2010). Erm 단백질 중 ErmAM (ErmB로 재분류, Roberts *et al.*, 1999)과 ErmC'의 구조가 핵자기공명법 (Yu *et al.*, 1997) 또는 단백질 결정화 기법 (Bussiere *et al.*, 1998)을 통하여 각각 밝혀졌다. N-말단 부위의 촉매도메인 (catalytic domain)과 기질결합도메인 (substrate binding domain)으로 명명된 C-말단 부위 등 두 개의 도메인으로 구성되어 있으며 이 구조에 근거한 반응 기작과 여기에 참여하는 아미노산들이 추측되어 있다 (Bujnicki, 1999; Fauman *et al.*, 1999). ErmSF는 가축에 사용되는 항생제인 tylosin의 생산균주인 *Streptomyces fradiae*에서 발견되는 단백질 (Lai *et al.*, 1973; Skinner *et al.*, 1983; Birmingham *et al.*, 1986; Cundliffe, 1989)로 현재 ErmS로 재분류 되어 있으며 (Roberts *et al.*, 1999), MLS_B계 항생제 활성을 억제하는 내성

*For correspondence. E-mail: hjjin@suwon.ac.kr; Tel.: +82-31-220-2290; Fax: +82-31-220-2519

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain or plasmid	Description	Reference or source
Bacterial strains		
<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	14
<i>E. coli</i> HJJ401	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ403	this work
Plasmids		
pET 23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His ₆ -tag at C-terminal end	Novagen
pHJJ105	pET23b containing <i>ermSF NdeI-HindIII</i> gene cartridge	14
pHJJ403	pET23b containing <i>ermSF R223A NdeI-HindIII</i> gene cartridge	this work

인자 단백질인 Erm 단백질들 중의 하나이다. 최근 ErmC*에서 몇몇 개의 아미노산을 치환한 변이 단백질의 활성을 측정하여 기질인 RNA와 상호 작용하는 것으로 추측되는 아미노산을 실험적으로 밝혀내었으며, 구조적 분석에 바탕을 둔 C-말단 부위의 기질결합도메인의 아미노산들 보다는 N-말단 부위의 촉매도메인과 두 도메인이 서로 연결되는 오목한 홈 부위의 아미노산들이 기질 RNA와 상호작용하는 것으로 설명하였다(Maravic *et al.*, 2003). ErmSF의 237번 아르지닌(Arg) 잔기는 N-말단과 C-말단 도메인이 서로 연결되어 오목한 홈을 형성하고 있는 위치에 존재하며 밝혀진 구조에 따르면 잔기의 결사슬이 바깥쪽으로 향하여 존재하며(Fig. 1), 현재 밝혀진 31종류의 Erm 단백질 중 29종의 단백질에 보존되어있다(Fig. 2). 이 아미노산의 단백질 내에서의 기능을 확인하기 위하여 알라닌(Ala)으로 치환하여 그 활성을 *in vivo*, *in vitro* 상에서 확인하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오티드

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

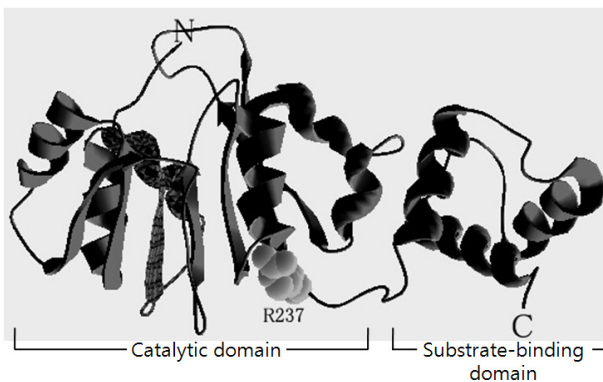


Fig. 1. Schematic diagram of Erm protein. Erm protein consists of two domains, larger N-terminal ‘catalytic’ domain and smaller C-terminal ‘RNA-binding’ domain. R237 is located in the concave cleft between two domains.

위치 지정 치환 단백질 유전자의 클로닝

야생형 *ermSF* 유전자가 클로닝 되어있는 pHJJ105 (Kovalic *et al.*, 1994)를 주형으로 하여 olig-1과 R237A 돌연변이를 일으키는 olig-3을 각각 forward, reverse primer로 이용하여 PCR을 수행하여 각 위치 지정 치환(site directed substitution) 변이를 함유한 N-말단 부위 DNA 절편을 얻어내었고 같은 방법으로 oligo-2와 oligo-4을 각각 forward, reverse primer로 하여 PCR을 수행하여 각 위치 지정 치환 단백질 유전자의 C-말단 부위를 이루는 DNA 절편을 얻어내었다. 얻어진 각각의 N-말단 부위 DNA 절편과 C-말단 부위 DNA 절편을 섞어준 후 *NdeI* 또는

	218	*	247
<i>ermS</i>	SRREFRPVPRVDSGI LRI ERRERPPLPS-AA		
<i>ermC</i>	PREYFHPPKRWSSLI RLNRK-KSRI SH-KD		
<i>ermB</i>	PAECFHPPKRWSSVL I KLTRH-TT DVPD-KY		
<i>erm38</i>	PASSFRPRPAMDAGLLTI TRNRPLVDS-AD		
<i>erm39</i>	SADAFRPRPGVDAGLLTI TRRGEPLVPT-AD		
<i>erm40</i>	SANAFRPRPTVDAGLLTI TRRAHPMIDA-AD		
<i>erm31</i>	PAFAFRPMPGVDGGVLAIRRSAPLV---GQ		
<i>ermU</i>	PRFAFRPAPSVGGI LVI ERPEPLV---RE		
<i>ermW</i>	PKTSFDPPVSDGGI LVI ERRSAPLLDD-AC		
<i>erm30</i>	RASSFRPMPRVDGGVLTIRRRPQPLPE-SA		
<i>Salinaria</i>	PRTAFRPPVPRVAGI LRI ERRERPPLPG-AA		
<i>ermO</i>	GRSRFCPPRVDAGI LRI ERRTALLTGAAA		
<i>ermV</i>	GRSRFRPVRKVDAGI VRI ERRTPLLAG-GA		
<i>ermE</i>	DRRLFPPVPRVDSAI MRLRRRAEPLLEG-AA		
<i>ermH</i>	SRWFPRPVPAMD SAVLRLERRPVPPIPP-GL		
<i>Nocardia</i>	DRRHFRPVRVDSGALLHLRRPDPPLLAG-AA		
<i>ermR</i>	DRTLFTPPVRVHSAI MRLRRPQPLLRDAAA		
<i>ermBACHA</i>	SRECFSPPPKVD SAMVFI SRKPDPI VPIY-KD		
<i>ermD</i>	SKEHFSPPP KVD SAMVRI TRKKDAPLSH-KH		
<i>erm34</i>	SRSSFSPPP KVD SAL VRI VRKQHP LFPIY-KE		
<i>ermF</i>	GPESFLPPP TVK SALLNI KRK-HLFFDF-KD		
<i>erm35</i>	NPESFLPPP TVK SALLRI ERK-QI SLDI-GL		
<i>ermQ</i>	NPEDFHPPRSDVCL VYFKRKYKDI SK-DE		
<i>ermG</i>	PRYYFHPPKVD SAL I VLKRK-PAKMAF-KE		
<i>ermT</i>	PREYFHPPKRWSSLI VLKRK-PSKISL-KD		
<i>ermY</i>	PKEYFHPPKRWSSLI I LKRK-PSKISY-KD		
<i>ermA</i>	PPLYFHPPKVD S V L I VL ERH-QPLISK-KD		
<i>Erm OCEIH</i>	PRTYFHPPRSDVSL I VL ERH-EPLILK-KD		
<i>erm33</i>	PPLYFHPPKVD S V L I VL ERH-QPLISK-KD		
<i>ermN</i>	PRQEFAPVPGSDTETLLVRSRPRPLAPW-SR		
<i>ermI</i>	SRNEFSIPVPRADTQTLLVMPRRRPSVWP-RE		

Fig. 2. Multiple sequence alignment of the Erm family. Conserved amino acid residues are shown in gray. R237 residue studied by mutagenesis in this work is indicated by asterisks (*).

Table 2. Oligonucleotide primers for R237A coding gene cloning

Oligonucleotide primer	Sequence and description
Oligo-1	5' <u>GGAATTC</u> CATATGGCTCGTGCACCCCGTTCTC (32mer) upstream (forward) PCR primer for Wild type ErmSF and ErmSF mutants
Oligo-2	5' CGGATCGAGGCGCGCGAGCGGCCCTGCTG (30mer) upstream (forward) PCR primer for R237A
Oligo-3	5' CGCTCGCGCGCCT CGATCCGGAGGATGC(29mer) downstream (reverse) PCR primer for R237A
Oligo-4	5' <u>CCCAAGCTT</u> CCTCCGGCCGGTCCGGCT (27mer) downstream (reverse) PCR primer for Wild type ErmSF and ErmSF mutants

The underlined sequences in oligo-1 and -4 introduced *Nde*I, *Hind*III restriction sites, respectively. The italicized sequence in each oligonucleotide was added nucleotides at the end of DNA fragment for cleavage to occur more easily. Oligo-2 and -3 are overlapping oligonucleotides which contained complementary sequences and allowed the joining of two DNA fragments to produce R237A coding DNA fragments in the final PCR. Bold letters represent mutation sequences.

*Hind*III 제한효소 인식 자리와 DNA 절편 말단에서의 제한효소 작용이 일어나도록 덧붙여 넣은 뉴클레오티드가 포함된 oligo-1 과 -4를 양방향 primer로 하여 다시 한번 PCR을 수행하여 237번 아르지닌이 알라닌으로 치환된 단백질을 지령하는 DNA 절편을 얻어내었다. 얻어진 각 DNA 절편에 제한효소 *Nde*I과 *Hind*III을 처리하고 같은 제한효소를 처리한 표현 담체(expression vector)인 pET23b (Novagen, USA)에 접합한 후 T7 RNA 합성효소 유전자를 함유한 *E. coli* BL21(DE3) (Studier and Moffatt, 1986)에 형질 전환하였다. 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 각각 pHJJ403으로 명명하였다. 그리고 이 플라스미드를 함유한 대장균을 *E. coli* HJJ403으로 명명하였다.

위치 지정 치환 유전자의 발현

표현 담체에 적절히 끼워진 각 변이 유전자의 발현은 이미 발표된 *ermSF* 유전자의 발현 방법에 근거하여(Jin, 2011) 다음과 같이 수행하였다. 하룻밤 동안 배양한 각 대장균 세포를 새로운 배지에 10% (v/v)로 전이하고 A_{600} 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. 이 배양액을 사용하여 단백질의 대량발현과 leaky 발현을 SDS-PAGE를 이용하여 검색하였다.

발현된 단백질의 생체 내 활성 검색(항생제 내성 검사)

생체 내 활성검사는 이미 발표된 방법을 사용하여 디스크 방법을 사용하여 결정하였다(Jin, 1999). 간단히 기술하면 다음과 같다. 원형의 거름종이(Whatmann 3 M)에 200 mg/ml의 erythromycin 용액을 100 μ g 또는 1,000 μ g이 되도록 점적한 후 말린 다음 배지 위에 야생형 또는 변이 단백질을 발현하는 세균 및 빈 벡터를 포함한 세균을 면봉을 사용하여 도포한 후 그 위에 erythromycin 용액을 점적한 원형의 거름종이를 각 세균 위에 올린 후 하루 동안 배양하여 그 inhibition zone을 관찰하였다.

Erythromycin 최소 저해농도(minimal inhibition concentration, MIC) 분석

접종 후 밤샘 배양한 R237A 변이 단백질 유전자를 갖는

pHJJ403 플라스미드를 포함하고 있는 *E. coli* HJJ403을 50 μ g/ml ampicillin을 넣은 새로운 LB 배지에 1:50으로 희석한 후 OD₆₀₀에서 0.8-1.0이 되도록 배양하였다. 배양액을 같은 농도의 ampicillin을 포함한 LB 120 μ l에 5×10^5 세포가 되도록 희석하고 다양한 농도의 erythromycin (4,096 μ g/ml로부터 반씩 희석하여 0.03125 μ g/ml까지)을 넣고 같은 조건에서 18시간 동안 더 배양하여 erythromycin에 대한 최소 저해농도를 검색하였다.

발현된 단백질의 정제

변이 단백질의 정제는 기존에 발표된 방법을 사용(Jin and Yang, 2002), 약간 변형하여 실시하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 하룻밤 동안 배양한 각 대장균 세포를 새로운 배지에 10% (v/v)로 전이하고 A_{600} 이 0.8-1.0이 되도록 37°C에서 배양한 후 IPTG를 1 mM이 되도록 첨가한 후 대량 발현된 단백질의 수용성 단백질로의 전환을 위해 온도를 낮추어 22°C에서 18시간 더 배양하였다. 100 ml LB 배지에 배양한 각 변이 단백질을 발현하는 대장균을 원심분리(8,000 \times g)하여 얻어진 세포를 lysozyme (5 mg/ml)을 함유하는 buffer A (20 mM Tris-HCl; pH 7.0, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole)에서 분산시킨 후 상온에서 20분간 두어 lysozyme에 의해 세포벽이 분해되도록 하였다. 이후 -80°C에서 얼린 후 녹여서 세포가 분쇄되도록 하였다. 여기에 DNase I (2.5 μ g/ml) 및 RNase A (2.5 μ g/ml)을 넣고 반응시킨 후 원심분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액으로부터 단백질 분리는 공급자(Novagen)가 제공한 과정에 근거, Ni²⁺ affinity column chromatography법에 의하여 분리하였다. Buffer A로 평형을 이룬 His 결합수지가 충전된 컬럼에 위에서 얻어진 단백질 용액을 장전한 후 buffer 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 buffer B를 사용하여 얻어내었다.

Domain V의 *in vitro* transcription에 의한 제조

Erm 단백질에 의하여 인식되고 methylation 될 수 있는 완전 기질인 23S rRNA domain V (Vester and Douthwaite, 1994)를 합성하는 방법은 기존에 발표된 것과 같이 실시하였다(Jin, 2006). 간단히 서술하면 다음과 같다. *B. subtilis* 23S rRNA Domain V (BDV)를 지령하는 DNA 조각을 얻기 위하여 *B. subtilis* BD170의 chromosomal DNA를 주형으로 하여 T7

promoter 서열을 포함한 올리고뉴클레오티드 5' *taatcgactcact atagagagactcgggaaa*와 5' *ctctcgtactaaggacacg*를 각각 forward, reverse primer로 사용하여 PCR을 수행하여 얻어내었다. 각각의 올리고뉴클레오티드는 *B. subtilis* 23S rRNA nucleotide의 2022-2042, 2672-2692번째에 해당된다. 얻어진 DNA 단편은 올리고뉴클레오티드에서 제공되는 T7 promoter 서열(이텔릭체 염기서열)을 가지고 있으므로 T7 DNA-dependent RNA polymerase를 이용하여 RNA를 합성하는데 주형으로 사용하였다. 합성 방법은 transcription buffer (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 (4 mM each), 28 mM MgCl₂, 300 nM DNA 주형을 첨가하고 T7 RNA polymerase를 넣은 후 37°C에서 4시간 동안 incubation하였다. Phenol: chloroform: isoamylalcohol (25:24:1) 용액을 사용하여 추출한 후 에탄올로 침전시켰고 얻어진 침전물을 TE 버퍼에 녹여 7 M urea, 4% polyacrylamide gel을 이용하여 BDV RNA band를 잘라낸 후 용출하여 준비하였다.

정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색

정제된 단백질의 *in vitro* 활성은 기존에 발표된 방법을 약간 변형하여 검색하였다(Zalacain and Cundliff, 1989; Jin and Yang, 2002). 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl₂, 40 mM KCl, 10 mM DTT의 조성을 가진 완충용액에 66 nM *S*-[methyl-³H]adenosylmethionine (SAM; Amersham, arlington Height, IL; sp act 80.7 Ci/mmol), 200 nM의 domain V RNA와 R237A 변이 단백질을 넣고 총 부피가 300 µl 되도록 하여 37°C

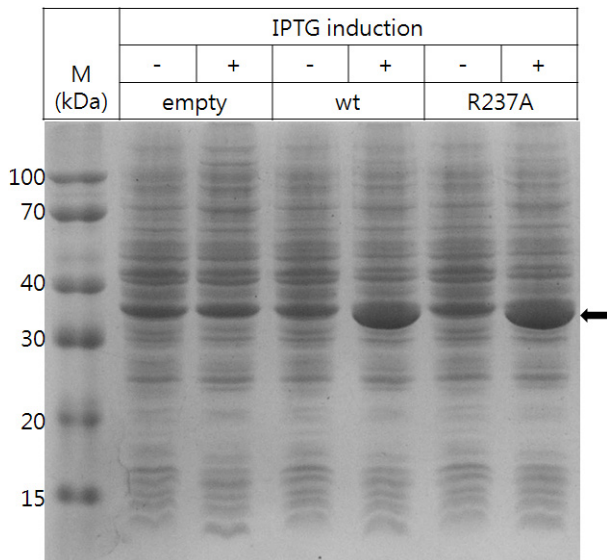


Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of expression of R237A mutant ErmSF protein in *E. coli* with and without IPTG induction. After 8 h incubation in the presence of IPTG at 37°C following transfer into new medium, cell culture was boiled to disrupt the cells in 6× sample buffer, resolved on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then stained with Coomassie brilliant blue.

에서 반응시킨 후 0, 5, 10, 30 그리고 60분 마다 50 µl씩 얻어내어 12% trichloroacetic acid로 반응을 종결시킨 다음 침전물을 건조하고 유입된 방사선량을 측정하였다.

결과

R237A 변이 ErmSF의 대장균에서의 발현

얻어진 R237A 변이 ErmSF를 지령하는 DNA 절편을 함유한 pET23b (pHJJ403)를 *E. coli* BL21(DE3) (*E. coli* HJJ403)에 형질전환 한 후 IPTG로 발현을 유도하고 그 발현 정도를 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다(Fig. 3). 야생형 ErmSF의 IPTG 유도에 의한 발현 정도를 확인한 기존 연구(Jin, 2008)와 같이 두 종류의 변이 단백질은 모두 1 mM IPTG로 발현을 유도하였을 때 세균 내에서 대량 발현되었으며 IPTG를 첨가하지 않아 발현을 유도하지 않았을 때에는 야생형 ErmSF와 같이 매우 약한 leaky 발현을 나타내었다.

R237A 변이 ERMSF의 생체 내에서의 활성 검색

R237A 변이 ErmSF의 생체 내에서의 활성을 확인하기 위하여 세균 내에서 발현된 변이 단백질에 의한 항생제 내성을 확인하였다. Erythromycin 100 µg을 점적한 원형의 거름종이를 놓은 plate에서는 빈 pET23b 플라스미드를 함유한 세균을 제외한 모든 세균에서 항생제에 의하여 생장이 저해되는 부위(inhibition zone)가 전혀 나타나지 않았으나, 1000 µg을 점적한 원형의 거름종이를 놓은 plate에서는 빈 pET23b 플라스미드를 함유한 세균을 도달한 부위에 비하여 매우 작긴 하지만 R237A 변이 ErmSF를 발현하는 세균 뿐만 아니라 야생형 ErmSF를 발현하는 세균에서도 항생제에 의해 생장이 저해된 부분이 동일하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 변이 ErmSF를 발현하는 세균도 야생 ErmSF를 발현하는 세균과 같이 항생제에 대한 내성을 유지하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 변이 단백질을 발현하는 세균에 대하여 erythromycin에 대한 최소 저해 농도(MICs)를 확인하였다. 야생형 ErmSF를 발현하는 세균의 경우에는 >4,096 µg/ml을 나타내었고 대조군인 빈 플라스미드를 포함한 세균은 64 µg/ml을 나타내었다. R237A 변이 ErmSF를 발현하는 세균은 야생형 단백질을 발현하는 세균과 같은 >4,096 µg/ml의 MIC값을 나타내었다(Table 3). 따라서 야생형 및 변이 단백질들의 세균 생체 내에서의 활성은 차이가 없었다.

정제된 단백질의 *in vitro* 활성 검색

생체내에서 발현된 R237A 변이 단백질을 발현하는 세균은 야생형 ErmSF를 발현하는 세균과 같이 항생제인 erythromycin에 대한 내성을 동일하게 나타내는 것으로 관찰되었다(Table 3 and Fig. 4). 그러나 적용된 변이의 효소 활성에서의 역할을 보다 정확히 판단하기 위해서는 *in vitro*에서의 활성 측정이 필수이므로 야생형 ErmSF와 변이 단백질과의 효소활성을 비교하기 위해 순수 분리한 변이 단백질을 이용하여 *in vitro*에서의 활성을 Erm 단백질의 완전 기질로 밝혀진 domain V (Vester and Douthwaite, 1994)를 사용하여 검색하였다. R237A 변이 단백질은 야생형

Table 3. Effects of R237A mutation on erythromycin resistance

ErmSF variant	Em MIC ($\mu\text{g/ml}$)
Negative control (empty pET23b)	64
Wild-type	>4,096
R237A	>4,096

ErmSF에 비하여 한 시간 반응시킨 후 cpm을 비교하였을 때 51%의 활성을 나타내었다(Fig. 5).

고찰

Erm 단백질 중 ErmB와 ErmC' 단백질의 구조가 밝혀져 있으며 이 중 ErmC'은 co-factor인 SAM과의 결합구조가 밝혀졌지만, 기질인 RNA와의 결합구조는 밝혀져 있지 않다. 구조가 밝혀진 Erm 단백질들의 N-말단 부위는 40종 이상의 DNA의 N^6 -아데닌 또는 N^1 -시토신 methyltransferase 단백질들의 구조에 기반하여 아미노산 서열을 비교·분석하였을 때 이들에게 공통적으로 나타나는 9개(motif X and motif I-VIII, Malone *et al.*, 1995)의 잘 보존된 motif들이 동일하게 확인되었다. Erm 단백질은 이러한 motif로 구성된 촉매도메인 외에 C-말단 부위에 몇 개의 α -helix로만 구성된 작은 도메인을 가지고 있는 즉, 두 개의 도메인으로 구성된 단백질이다. Erm 단백질 표면의 전하의 분포를 확인하였을 때 부위의 몇 개의 α -helix로만 구성된 작은 도메인과 N-말단 부위인 촉매도메인과 연결되는 부위가 양전하를 띠는 아미노산이 높게 분포되어있으며 두 도메인이 연결되는 부위는 기질인 RNA에 잘 부착할 수 있는 오목한 홈이 매우 잘 나타나 있다(Yu *et al.*, 1997; Bussiere *et al.*, 1998). 이러한 양전하의 분포에 근거하여 C-말단 부위의 작은 도메인을 'substrate-binding

domain' (Yu *et al.*, 1997), 또는 'RNA-recognition domain' (Bussiere *et al.*, 1998)이라 명명하였다. 그러나 C-말단 부위의 작은 도메인에 포함된 몇몇의 아미노산을 치환하여 기질과의 상호작용 능력 또는 효소 활성을 실험적으로 진행한 연구에서 이 도메인은 직접적으로 기질 RNA와 부착되기 보다는 N-말단 부위의 큰 도메인의 구조적 안정화를 유지하는 것으로 제안되었으며(Maravic *et al.*, 2003) 또한, 이 두 도메인을 분리하여 따로 발현하였을 때 모두 불용성 단백질을 형성하는 것으로 밝혀졌다(Jin, 2001). 기존 연구에 따르면 N-말단 부위 도메인과 이 N-말단 부위 도메인이 C-말단 부위의 작은 도메인과 연결되는 즉, 오목한 홈을 형성하는 부분에 존재하는 아미노산들이 기질인 RNA와 상호작용하는 것으로 분석되었다(Maravic *et al.*, 2003). ErmSF의 R237은 바로 그 오목한 홈에 위치하여 기질과의 상호작용이 예상되었다(Fig. 1). 현재까지 밝혀진 Erm 단백질은 약 30여 종에 달하며(Cocito *et al.*, 1997; Seppala *et al.*, 1998), 이들 단백질은 아미노산 서열상에서의 유사성이 높아서 하나의 조상 단백질로부터 유래 되었을 것으로 추정되고 있으며(Park *et al.*, 2010), 그 작용 기작이 동일하여 이들 단백질은 그 구조가 거의 유사할 것으로 예측되어 진다. ErmSF에서의 65Q, 93/95/97G, 114E, 116D, 159P, 222F, 224/226P 등의 아미노산은 현재까지 밝혀진 31종의 모든 Erm 단백질에서 동일하게 보존되어 있으며 이 아미노산 잔기들은 Erm 단백질 뿐만 아니라 SAM을 co-factor로 사용하는 methyltransferase에서 공통적으로 나타나는, co-factor와 직접적으로 상호작용하고 있는 motif들(Malone *et al.*, 1995; Schluckbier *et al.*, 1999) 또는, 타깃 아데닌과 상호작용하고 있는 motif (Goeddecke *et al.*, 2001)에 포함된 아미노산들이다. 이와 같이 모든 Erm 단백질에서 같은 아미노산으로 보존된 잔기인 경우에는 Erm 단백질 뿐만 아니라 다른 종류의 methyltransferase에서도 동일하게 중요한 역할을 수행하는 아미노산임을 확인할 수 있었다. ErmSF의 R237은 그러한 motif에 포함되지는 않지만 모든 Erm 단백질에서 단 2종만을 제외하고 모두 같은 아미노산

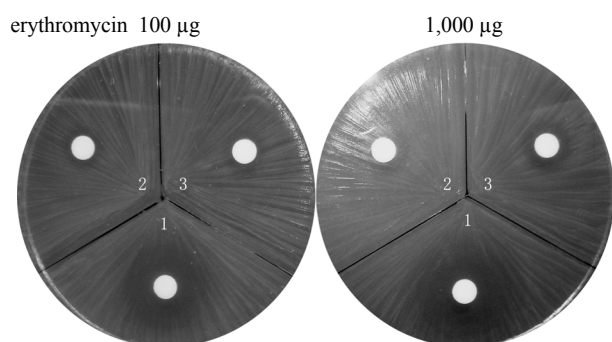


Fig. 4. Antibiotic susceptibility assay. Erythromycin stock solution (100 mg/ml) was dropped on Whatmann 3 M paper circle to reach the final amount of erythromycin 100 or 1,000 μg . In each section of agar plate, *E. coli* cells containing DNA fragment encoding wild type or mutated *ermSF* were spread with cotton swab. In the center of each section, paper circle containing 100 or 1,000 μg erythromycin was placed. The resulting agar plate was incubated overnight at 37°C. All grew well in the 100 μg of erythromycin except cells containing empty vector. But the inhibition zone which appeared in section 2, 3 were much smaller than that of section 1 in the 1,000 μg of erythromycin. Sections: 1, *E. coli* cells harboring empty vector; 2, *E. coli* cells harboring pHJJ105; 3, *E. coli* cells harboring pHJJ403.

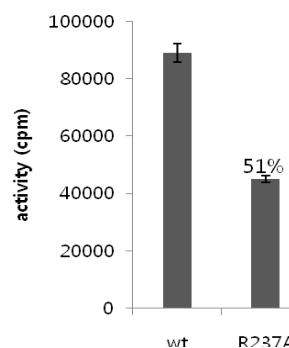


Fig. 5. *In vitro* methylation assay of R237A mutant ErmSFs. *In vitro* methylation activity of wild-type and mutant ErmSFs. Methylation of the RNA (23S rRNA domain V) was measured by incorporated radio-activity (cpm) from tritium labeled SAM. Reaction was carried out in methylation buffer (50 mM Tris-HCl; pH 7.5, 40 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 10 mM DTT) containing 0.2 μM RNA, 0.2 μM protein, 0.66 μM [methyl- ^3H]AdoMet (80.7 Ci/mmol) in a total reaction volume of 0.3 ml. Methylation reactions were carried out at 37°C for up to 60 min.

인 아르지닌으로 동일하게 보존되어있어(Fig. 2) 효소 활성화에 중요한 역할을 수행하고 있을 가능성이 예상되었다. 야생형 및 R237A 변이 단백질은 lac operon이 갖는 조절 기작의 leakiness에 의하여 IPTG에 유도되지 않아도 클로닝된 단백질이 적게라도 발현되게 되며 그 단백질의 기능이 생체 내에서 발현되어 항생제인 erythromycin에 대해 낮은 농도(100 µg)에서는 내성을 나타내었다. 야생형 ErmSF를 발현하는 세균도 약간의 성장 저해를 받는 높은 농도의 erythromycin (1,000 µg)에서도 R237A 변이 단백질을 발현하는 세균은 야생형 ErmSF를 발현하는 세균과 같은 정도의 성장 저해만을 나타내었다(Fig. 4). 이는 변이 단백질 또한 항생제에 대하여 충분한 내성을 유발하고 있음을 알 수 있었다. 또한 변이 단백질을 발현하는 세균의 최소 저해 농도 역시 야생형과 같은 >4,096 µg/ml 나타냄으로써(Table 3) 발현된 단백질의 생체 내 활성에서의 차이는 확인할 수 없었다. 그러나 R237A 변이 단백질을 순수 분리하여 *in vitro* 상에서의 활성을 검색하였을 때 야생형에 비하여 51%의 활성만을 나타내었다(Fig. 5). SDS-PAGE 상에서 확인한 변이 단백질의 발현량은 야생형의 발현량과 같은 수준이었다(Fig. 3). 따라서 발현량에 의해 내성이 증대되어 나타난 것은 아닌 것으로 추정되었다. ErmSF는 항생제인 tylosin의 생산균주인 *Streptomyces fradiae*에서 발견되는 단백질로써 스스로 생산한 항생제에 의하여 자살하게 되는 것을 막기 위하여 강력한 방어 기작 즉, 항생제에 대한 강한 내성을 나타내어야 할 것이며, 그 내성 유발 인자인 ErmSF의 효소 활성이 매우 강력할 것이다. 실제로 고도 내성(MIC>4,096 µg/ml)을 나타내는 것을 밝혀진 병원균인 *Streptococcus pneumoniae*에서 발견된 내성 유발 인자 단백질인 ErmB에 비하여 ErmSF는 *in vitro*에서 효소 활성이 약 10배 정도 강하게 나타났(unpublished result). 따라서 야생형 단백질보다 변이 단백질의 활성이 약 절반으로 저해되더라도 항생제에 대한 충분한 내성을 유지할 수 있을 것으로 사료된다. 그러므로 *in vivo*에서는 변이 단백질을 발현하는 세균과 야생형 단백질을 발현하는 세균에서의 차이점이 확인되지 못한 것으로 판단되었다. R237이 위치하는 부위는 기질인 RNA와 상호작용 할 것으로 예측되는 N-말단과 C-말단 도메인이 서로 연결되어 오목한 홈을 형성하고 있는 부위임을 고려하였을 때 이 잔기가 가지고 있는 양전하가 기질인 RNA와 상호작용하거나 또는 상호작용할 수 있는 환경을 제공하고 있다고 믿어지며 거의 모든 Erm 단백질에서 동일한 아미노산으로 보존되어 있는 것으로 보아 거의 모든 Erm 단백질에서 동일한 기작을 수행할 것으로 예상할 수 있었다. 이러한 연구는 항생제 내성 유발 단백질 작용 기작 및 그 단백질에 대한 저해제 개발 즉, SAM을 co-factor로 사용하는 많은 종류의 methyltransferase에 영향을 주지 않고 Erm 단백질에만 특이적으로 적용할 수 있는 저해제 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

적요

Erm 단백질은 23S rRNA의 특정 아데닌 잔기 N⁶ 위치에 methylation을 일으켜 임상적으로 중요하게 사용되는 macrolide-lincosamide-streptogramin B계 항생제에 내성을 유발시킨다.

최근 ErmC'에서 N-말단 catalytic domain과 C-말단 substrate binding domain를 연결하는 오목한 홈 형성부위에 존재하는 잘 보존된 아미노산 잔기가 기질과 상호작용하는 것으로 제안되었다. 우리는 ErmSF에서 두 domain의 연결 부위의 오목한 홈에 위치하여 기질과의 상호작용이 예상되며 또한 Erm 단백질들 사이에서 매우 높게 보존되어있는 237번 아르지닌 잔기를 치환하여 그 기능을 *in vivo*, *in vitro*상에서 검색하여 분석하였다. R237A 변이 단백질을 발현하는 세균은 야생형 단백질을 발현하는 세균과 비교하여 *in vivo* 상에서는 차이를 나타내지 않았으나 순수분리 한 후 *in vitro*에서의 효소 활성은 야생형에 비하여 51%만을 나타내어 그 잔기가 기질 부착 기능을 수행하고 있다고 제안할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 2012년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구결과의 일부(20120002499)로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Birmingham, V.A., Cox, K.L., Larson, J.L., Fishman, S.E., Hershberger, C.L., and Seno, E.T. 1986. Cloning and expression of a tylosin resistance gene from a tylosin-producing strain of *Streptomyces fradiae*. *Mol. Gen. Genet.* **204**, 532-539.
- Bujnicki, J.M. 1999. Comparison of protein structures reveals monophyletic origin of the AdoMet dependent methyltransferase family and mechanistic convergence rather than recent differentiation of N4-cytosine and N6-adenine DNA methylation. *In Silico Biol.* **1**, 1-8.
- Bussiere, D.E., Muchmore, S.W., Dealwis, C.G., Schluckebier, G., Nienaber, V.L., Edalji, R.P., Walter, K.A., Lador, U.S., Holzman, T.F., and Abad-Zapatero, C. 1998. Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry* **37**, 7103-7112.
- Cocito, C., Di, Giambattista, M., Nyssen, E., and Vannuffel, P. 1997. Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 7-13.
- Cundliffe, E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 207-223.
- Fauman, E.B., Blumenthal, R.M., and Cheng, X. 1999. Structure and evolution of AdoMet-dependent MTases. S-Adenosylmethionine-dependent Methyltransferases: Structures and Functions, pp. 1-38. *In* Cheng, X. and Blumenthal, R.M. (eds.), World Scientific Inc, Singapore.
- Goedecke, K., Pignot, M., Goody, R.S., Scheidig, A.J., and Weinhold, E. 2001. Structure of the N6-adenine DNA methyltransferase M. Tag I in complex with DNA and a cofactor analog. *Nature Struct. Biol.* **8**, 121-125.
- 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.
- Jin, H.J. 2001. Domain expression of ErmSF, MLS(macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein. *Kor. J.*

- Microbiol.* **37**, 245–252.
- Jin, H.J.** 2006. Functional role of peptide segment containing 1-25 amino acids in N-terminal end region of ErmSF. *Kor. J. Microbiol.* **42**, 165–171.
- Jin, H.J.** 2008. Functional role of 60RR61 in 23S rRNA methylation, which is in N-terminal end region of ErmSF. *Kor. J. Microbiol.* **44**, 193–198.
- Jin, H.J.** 2011. Investigation on inhibitory effect of ErmSF N-terminal end region peptide on ErmSF methyltransferase activity *in vivo* through development of co-expression system of two different proteins in one cell. *Kor. J. Microbiol.* **47**, 200–208.
- Jin, H.J. and Yang, Y.D.** 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**, 149–159.
- Kovalic, D., Giannattasio, R.B., Jin, H.J., and Weisblum, B.** 1994. 23S rRNA Domain V, a fragment that can be specifically methylated *in vitro* by the ErmSF(TlrA) methyltransferase. *J. Bacteriol.* **176**, 6992–6998.
- Lai, C.J., Weisblum, B., Fahnestock, S.R., and Nomura, M.** 1973. Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* **74**, 67–72.
- Leclercq, R. and Courvalin, P.** 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1267–1272.
- Malone, T., Blumenthal, R.M., and Cheng, X.** 1995. Structure-guided analysis reveals nine sequence motifs conserved among DNA amino-methyltransferases, and suggests a catalytic mechanism for these enzymes. *J. Mol. Biol.* **253**, 618–632.
- Marabic, G., Bujnicki, J.M., Feder, M., Pongor, S., and Flogel, M.** 2003. Alanine-scanning mutagenesis of the predicted rRNA-binding domain of ErmC' redefines the substrate-binding site and suggests a model for protein-RNA interactions. *Nucleic Acids Res.* **31**, 4941–4949.
- Park, A.K., Kim, H., and Jin, H.J.** 2010. Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, Erm and KsgA, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* **309**, 151–162.
- Roberts, M.C.** 2004. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Mol. Biotechnol.* **28**, 47–62.
- Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., and Seppala, H.** 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincomycin-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2823–2830.
- Schluckebier, G., Zhong, P., Stewart, K.D., Kavanaugh, T.J., and 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.
- Seppala, H., Skurnik, M., Soini, H., Roberts, M.C., and Huovinen, P.** 1998. A novel erythromycin resistance methylase gene (ermTR) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 257–262.
- Skinner, R., Cundliffe, E., and Schmidt, F.J.** 1983. Site for action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *J. Biol. Chem.* **258**, 12702–12706.
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130.
- Vester, B. and Douthwaite, S.** 1994. Domain V of 23S rRNA contains all the structural elements necessary for recognition by the ErmE methyltransferase. *J. Bacteriol.* **176**, 6999–7004.
- Weisblum, B.** 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 577–585.
- Yu, L., Petros, A.M., Schnuchel, A., Zhong, P., Severin, J.M., Walter, K., Holzman, T.F., and Fesik, S.W.** 1997. Solution structure of an rRNA methyltransferase (ErmAM) that confers macrolide-lincosamide-streptogramin antibiotic resistance. *Nature Struct. Biol.* **4**, 483–489.
- Zalacain, M. and Cundliffe, E.** 1989. Methylation of 23S rRNA by *tlrA(ermSF)*, a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* **171**, 4254–4260.