

Recent Advances in Antibiotic Research: A Possible Combined Attenuation Control of the Inducible MLS Resistance

최응철·*B. Weisblum

서울대학교 약학대학·*Department of Pharmacology, University of Wisconsin, Madison, WI 53706, U. S. A.

항생물질 내성의 생화학적 기전

항생물질은 수많은 감염증의 치료에 널리 쓰이고 있으며 그 효능이 매우 탁월하여 인류건강 유지에 이바지하는 바가 매우 크다. 그러나 최근에는 이러한 항생물질의 계속적인 사용에 따라 내성균이 다수 출현하게 되었으며, 따라서 이들 내성균에 유효한 항생물질의 개발이 시급하게 되었다. 내성균의 출현을 막고 또 내성균에 유효한 항생물질을 반합성하기 위해서는 내성균의 출현 현황과 내성발생기전에 대한 연구가 필요하게 되었으며 따라서 이러한 연구가 많이 진행되고 있다.

어떤 항생물질에 감수성이 있는 세균이 그 항생물질에 대해 내성을 얻게 되는 것은 그 기전을 생화학적으로 여러가지 생각할 수 있으나 실제로는 다음 세가지가 인정되고 있다. ① 항생물질 수식 효소 또는 분해효소의 생산, ② 세포막 투과능의 변화, ③ 항생물질이 작용하는 세균내의 인자 또는 효소가 변화하여 그 항생물질이 결합하기 힘들게 만드는 것 등이다. Table 1에 항생물질이 작용하는 세포내의 인자 즉 chemoreceptor와 대표적인 내성기전을 일괄하여 표시하였다. 또 그 내성이 plasmid성일 때는 그 plasmid에 의해 만들어지는 효소도 표시하였다.

β -lactam 항생물질의 chemoreceptor는 세포벽의 peptidoglycan을 만들 때의 마지막 단계 즉 cross-linking 할 때 관여하는 transpeptidase이며, 내성기전은 두 가지, 즉 β -lactamase에 의한 β -lactam ring의 가수분해와 세포막 투과능의 장애를 들 수 있다. 아미노배당체 항생물질의 chemoreceptor는 단백질 생합성이 이루어지는 장소인 ribosome이며, 내성기전은 효소에 의한 구

조의 수식, 세포막 투과능의 변화, ribosome의 변화 등이 있다. Chloramphenicol의 chemoreceptor는 ribosome이며 내성은 효소에 의한 구조의 수식과 투과능의 변화에 기인한다. Erythromycin 등 마크로라이드계 항생물질 및 lincomycin의 chemoreceptor는 역시 ribosome이며, 그 내성은 효소에 의한 ribosome의 변화에 기인한다. Tetracycline의 chemoreceptor는 ribosome이나 내성은 투과능의 장애에 기인하는 것으로 알려져 있다.

MLS계 항생물질 내성기전

Erythromycin으로 대표되는 Macrolide계 항생물질과 Lincomycin으로 대표되는 lincosamide계 항생물질은 중범위 항생물질로서 임상적으로 호흡기 계통의 감염증에 매우 중요하게 사용되고 있다. 이들 항생물질에 대한 내성기전은 세균의 23S ribosomal RNA의 변화에 기인하는 것으로 밝혀졌다(1-6).

이들 항생물질의 항균작용을 나타내기 위해서는 chemoreceptor(target)인 세균의 ribosome과 결합하여야 하는데 이들 항생물질에 대해 내성을 갖는 세균에서는 23S ribosomal RNA의 변화(감수성 세균과 비교해서)에 기인하는 ribosome의 conformation 변화로 인해 항생물질이 ribosome과 결합할 수 없어 항생물질의 작용을 나타낼 수 없다.

23S ribosomal RNA의 변화는 RNA 중의 Adenine의 N⁶ methylation에 기인하는 것이며, Adenine이 methyl화 되기 위해서는 methylase가 필요하며, 내성균은 이러한 methylase를 만드는 유전자를 갖고 있다.

Table 1. Chemoreceptors of Drugs and the Mechanism of Resistance.

Drug	Chemoreceptors	Mechanism of resistance	Expression of plasmid
β -Lactam antibiotics	peptidoglycan transpeptidase	a) enzymatic hydrolysis of β -lactam ring b) interference of permeability	β -lactamase
Aminoglycoside antibiotics	ribosome	a) modification of drugs b) interference of permeability c) alteration of ribosome	O-phosphotransferase O-nucleotidyltransferase N-acetyltransferase
Chloramphenicol	ribosome	a) Inactivation of drug b) interference of permeability	Acetyltransferase
Erythromycin Lincomycin	ribosome	alteration of ribosome	methylase
Tetracycline	ribosome	interference of permeability	Tet protein
Sulfa drugs	dihydropteroate synthetase	a) production of resistant enzyme b) interference of permeability	resistant dihydropteroate synthetase

Erythromycin으로 대표되는 Macrolide계 항생물질과 lincomycin으로 대표되는 lincosamide계 항생물질 및 Streptogramin B에 공통적으로 내성을 나타내는 내성균에는 두 종류가 있다. 즉 언제나 내성이 발현되는 constitutive mutant (mutation)와 소량의 항생물질의 접촉에 의해 내성이 유도되는 inducible mutant (mutation)이 그것이다. constitutive mutation 보다는 inducible mutation이 분자생물학적 견지에서 더욱 흥미를 끌고 있으며 연구가 활발히 진행되고 있다. 항생물질이 내성을 유도한다는 것은 이미 존재하고 있는 내성 관련 유전자를 조절한다는 것을 의미하는 것이며, 항생물질이 생체내에서 물질대사를 억제하는 주 작용 외에 유전자 발현을 조절하는 기능을 갖고 있다는데 큰 의의가 있다.

Post-transcriptional Attenuation Control

어떤 기전에 의해 내성이 유도되는가 즉 조절되는가를 구명하는 것이 관심의 초점이다. 이러한 기전은 EM내성 *Staphylococcus aureus*에 존재하

는 plasmid pE194의 inducible MLS resistance gene인 *erm C*의 연구에서 밝혀지고 있다 (7-9).

이 연구에서 밝혀진 기전은 post-transcriptional attenuation(또는 translational attenuation) mechanism 이라고 하며 다음과 같은 기전으로 설명되고 있다. *erm C* mRNA는 EM의 존재 여부에 관계없이 같은 level로 생성되며 소량의 EM이 존재할 때에는 translation까지 진행되나 EM이 존재하지 않을 때에는 이 mRNA가 translation되지 않는다. Fig. 1a에서 보는 바와 같이 EM이 존재하지 않을 때에는 mRNA의 2차구조가 1-2, 3-4의 Stem and loop 구조를 갖게 되며, 따라서 methylase의 translation에 필요한 SD-2가 masking되어 ribosome의 접근이 불가능해지며 그 결과로 methylase가 translation되지 않는다.

반대로 소량의 EM이 존재할 때에는 leader peptide의 translation이 진행되다가 1부분에서

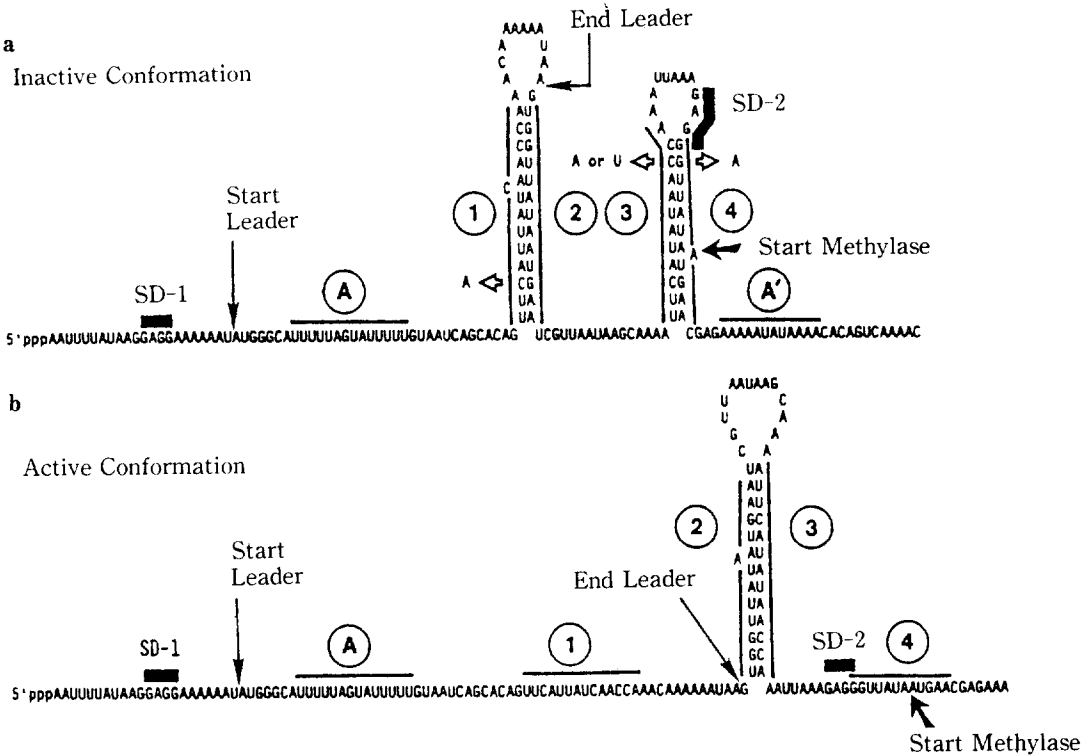


Fig.1. Two alternate conformations of the *ermC* mRNA.

a) Inactive conformation in which the methylase Shine and Dalgrano sequence(SD-2) and AUG initiation codon are sequestered in stem and loop structure 3+4. b) Active conformation in which SD-2 and the methylase AUG codon are free of secondary structure interactions.

중단되게 되고, 1-2의 Stem and loop의 결합이 불안정하게 되어 2-3의 Stem and loop의 구조를 형성되게 된다(Fig.1b). 그렇게 되면 SD-2의 masking이 풀려 methylase mRNA가 translation 된다.

translation의 결과 methylase가 만들어지면 23S RNA의 adenine의 1-2개가 methyl화 되고, 그 결과로 초래되는 ribosome의 conformation의 변화로 EM의 target인 ribosome과의 결합이 불가능해진다. 즉 EM의 항균작용이 불가능해지고 내성이 된다.

MLS계 항생물질 내성기전 연구 방향

MLS계 항생물질의 유도내성 기전, 다시 말해, 유전자 발현조절 기전을 보다 명백히 하기 위해서는 앞에서 언급된 *erm C*를 이용하여 제기된 translation attenuation 기전을 보다 깊게 연구함과 동시에, 내성 기전이 비슷하거나 보다 복잡

하리라 예견되는 균주(MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 나타내는 *Bacillus* 속 균이나, MLS계 항생물질을 생산하는 *Streptomyces* 속 균)에서 내성과 관련된 methylase 유전자를 cloning하고, DNA 염기 배열을 결정하고, 거기에서 유추되는 mRNA의 2차 구조를 해명하며, 더 나아가 mRNA 수준에서 그 2차 구조를 해명하는 것이 바람직하다.

위의 연구내용을 실현하기 위해서는 두 가지 측면에서 접근할 수 있다. 첫째는 합성적 방법(synthetic method)으로, 유기합성적 방법에 의해 필요로 하는 DNA를 만들어 이용하는 방법이다. 즉 *erm C*의 정상적인 regulatory sequences에서 특정부위의 염기를 다른 염기로 대체시킨 변형 regulatory sequences를 합성하여 적당한 cloning vector에 삽입시킨 후 발현시키고, 이때 나타나는 생리적 특성, (즉 특정 MLS

계 항생물질에 의해 내성이 유도되는 특성)을 검토하여 변형된 염기배열, 나아가서는 변형된 아미노산과 내성유도 특이성과의 관계를 밝히는 것이다. 둘째는 분석적 방법(Analytical method)으로, 천연에 존재하는 균주에서, 또는 돌연변이법에 의해 나타나나 생리적으로 흥미있는 균주를 택해, 내성 유전자를 cloning하고, DNA 염기배열을 결정하여 그 구조의 특성을 생리적 특성과 연관시키는 것이다.

현재 미국 위스컨신 대학교(매디슨) 의과대학 약리학과 분자생물학 연구실의 와이스브럼(Bernard Weisblum) 교수팀에서 이 관계 연구를 계속 진행하고 있다. 동 연구실에서는 *erm C*의 DNA 염기배열을 결정하여, 앞에서 언급된 translational attenuation mechanism을 제시하였다(8). 최근에는, 이때 DNA 염기배열로부터 추정된 mRNA의 Stem and loop 구조를 mRNA 수준에서 직접 증명하였다(9). 즉 5'-end를 포지한 Run-off transcripts를 S1, 및 V1 nuclease로 부분 분해시킨 후, 전기 영동 함으로써, 세계의 stem-loop(EM이 존재하지 않을 때 1-2, 3-4와 EM이 존재할 때의 2-3)를 확인하였다.

또한 동 연구팀에서 EM을 생산하는 *Streptomyces erythreus*에서 methylase 유전자(*erm E*)를 cloning하고 DNA 염기배열을 결정하고, 이것으로부터 아미노산 배열을 결정하여, *erm C* 등 이미 보고된 *erm* 유전자의 아미노산 배열과 비교 검토하였다(10).

동 연구실에서는 계속해서 앞에서 언급된 합성법과 분석법에 의해 연구를 진행하고 있다. 특히 *erm C*의 정상 leader sequences 부분을 합성법으로 특성 염기로 대체된 변형 leader sequences를 만들어 이것이 나타낼 유도특성과의 관계를 구명하려는 연구와 각종의 MLS 항생물질을 생산하는 *Streptomyces*속 균이 갖고 있는 methylase 유전자를 cloning하는 연구에 힘을 기울이고 있다(11).

***erm K*의 Cloning; Transcriptional Attenuation Control의 가능성**

본 연구자는 erythromycin 등 macrolide계 항

생물질에 유도내성을 나타내는 세균을 공기중에서 분리하여 이 세균을 공기중에서 분리하여 이 세균이 *Bacillus*속 세균임을 확인하였으며 이 *Bacillus*속 세균은 소량의 erythromycin 또는 oleandomycin과의 접촉에 의해 내성이 유도되어 erythromycin, oleandomycin에 대해 고도의 내성을 나타내었다(12). 이 *Bacillus*속 세균은 EMR-1 *Bacillus*속 세균이라 명명되었는데 erythromycin, clindamycin 등 macrolide계 항생물질에 대해 유도내성을 갖는 것 이외에 lincomycin, clindamycin 등 lincosamide계 항생물질에 대해서도 내성을 나타냄이 디스크법에 의해 예견되었다.

이어 유도내성을 나타내는 *Bacillus* EMR 세균이 *Bacillus licheniformis*임이 동정 되었으며, 이 내성균에서 lincosamide계 항생물질도 유도내성인자로 작용함이 구명되었다(13).

계속해서 이 내성균에서 내성을 나타내는 유전자(methylase gene)가 cloning 되었으며, 이 유전자의 leader region의 DNA 염기배열이 결정되어, 그 염기배열로부터 *erm C*에서 볼 수 있는 translational attenuation mechanism이 존재함이 밝혀졌다. 또한 이 유전자에는 rho-independent termination에 의한 transcriptional control mechanism도 있을 가능성이 예견되었다.

B. licheniformis EMR 균주에서 총 DNA를 제조하여 EcoRI으로 완전 분해시킨 후, pBS 42(*E. coli*와 *B. subtilis*의 Shuttle vector, chloramphenicol resistant)에 ligation시켰다. *E. coli* CSH 26에 이 조합 plasmid를 transformation 시킨 후 chloramphenicol(10 µg/ml)를 함유한 한천배지에서 배양시켜 *E. coli* library를 만들었다. *E. coli* library 집락을 합한 후 Mini-Prep법에 의해 plasmid를 만들었다. *B. subtilis* UOTO 277에 조제된 plasmid를 transformation 시킨 후, erythromycin(10 mg/ml) 함유 한천배지에 배양시켜 성장한 집락을 취하였다. 이 균주의 Phenotype(erythromycin에 의해 생기는 carbomycin 또는 tylosin 디스크 주위의 D형 저지원)를 *B. licheniformis* EMR의 경우와 비교하여 내성유전자가 cloning 되었음을 확인하

plate로 한 *in vitro* mRNA Runoff Transcripts 실험에서 full-length transcript로 생각되는 400 nucleotide band와 termination transcript로 여겨지는 210 nucleotide band가 확인되었다.

이와같은 data는 예비 증거에 불과하나 앞으로의 DNA-mRNA hybridization 실험 등에서 확인되리라 생각된다.

REFERENCES

1. Weaver, J.R. and Pattee, P.A. (1964). *J. Bacteriol.* **88**, 574(1964).
2. Weisblum, B. Siddhikol, C. Lai, C.J. and Demohn, V. (1971). *J. Bacteriol.* **106**, 835.
3. Ono, H. Inoue, M. Mao, J.C. and Mitsuhashi, S. (1974). *Antimicrob. Ag. Chemother.* **11**, 661.
4. Tanaka, K. Teraoka, H. Tamaki, M. Otaka, E. and Osawa, S. (1969). *Science* **162**, 576.
5. Lai, C.J. Dahlberg, J.E. and Weisblum, B. (1973). *Biochemistry* **12**, 457.
6. Lai, C.J. Weisblum, B. Fahnestock, S.R. and Nomura, M. (1972). *J. Mol. Biol.* **74**, 67.
7. Gryczan, T. Grandi, G. Hahn, J. Grandi, G. Dubnau, D. (1980). *Nucleic Acids Res.* **8**, 6081.
8. Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7079.
9. Mayford, M. and Weisblum, B. (1985). *J. Mol. Biol.* **185**, 769.
10. Uchiyama, H. and Weisblum, B. (1985). *Gene* **38**, 103.
11. Weisblum, B. Personal communication.
12. Choi, E.C. Kim, B.K. Shim, M.J. Chung, K.S. Woo, J.W. Kim, H.R. and Lee, C.K. (1982). *Yakhak Hoeji* **26**, 169.
13. Choi, E.C. Woo, J.W. and Weisblum, B. (1986). *Yakhak Hoeji* **30**, 317.
23. Szabó, G., Békési, I. and Vitalis, S. (1967). Mode of action of factor-C, a substance of regulatory function in cytodifferentiation. *Biochim. Biophys. Acta.* **145**, 159-169.
24. Westpheling, J., Raney, M. and Losick, R. (1985), RNA polymerase heterogeneity in *Streptomyces coelicolor*. *Nature*, **313**, 22-27.
25. Wildermuth, H. (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.*, **60**, 43-50.

<7 page에서 계속>