

Bacillus licheniformis EMR-1에서의 MLS 유도내성 기전 erm K의 크로닝

최응철 · 광진환 · B. 와이스브럼*

서울대학교 약학대학, 위스컨신대학교 의과대학*

(Received June 8, 1988)

MLS Inducible Resistance Mechanism in *Bacillus licheniformis* EMR-1 Cloning of erm K, a MLS Resistance Determinant

Eung-Chil Choi, Jin-Hwan Kwak and *Bernard Weisblum

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea and

*Medical School, University of Wisconsin, Madison, WI 53706 U.S.A.

Abstract—Inducible MLS resistance gene of *Bacillus licheniformis* specified by erm K was subcloned in *Bacillus subtilis* and the DNA sequence corresponding to its control region was determined. The determinant erm K was in Pvu II=Hind III fragment, which was 1.3 kb. The leader region is capable of forming a complex series of inverted complementary repeat sequences (ICRS) centering on at least six axes of symmetry, some of them mutually exclusive, in a way that resulted ultimately in post-transcriptional unmasking of the ribosome loading site for methylase synthesis.

항생물질은 수많은 감염증의 치료에 널리 쓰이고 있으며 그 효과 또한 매우 크다. 그러나 최근에는 이러한 항생물질의 계속적인 사용에 따른 내성균의 출현으로 인해 치료상 문제가 발생하고 있으며 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.

Erythromycin(EM)으로 대표되는 macrolide계 항생물질과 lincomycin(LCM)으로 대표되는 lincosamide계 항생물질은 증범위 항생물질로서 임상적으로 호흡기 계통의 감염증에 매우 중요하게 사용되고 있다. 이들 항생물질에 대한 내성 기전은 세균의 23S ribosomal RNA의 변화에 기인하는 것으로 밝혀졌다.¹⁻⁴⁾

이들 항생물질이 항균작용을 나타내기 위해서는 chemoreceptor(target)인 세균의 ribosome과 결합하여야 하는데 이들 항생물질에 대한 내성

을 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. 즉 내성을 갖게 된다.

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

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)가 그것이다. Constitutive mutation 보다는 inducible mutation이 분자생물학적 견지에서 더욱 흥미를 끌고 있으며 연구가 활발히 진행되고 있다. 항

생물질이 내성을 유도한다는 것은 이미 존재하고 있는 내성 관련 유전자를 조절한다는 것을 의미하는 것이며, 항생물질이 생체내에서 물질대사를 억제하는 주 작용외에 유전자 발현을 조절하는 기능을 갖고 있다는 데 큰 의의가 있다.

어떤 기전에 의해 내성이 유도되는가 즉 조절되는가를 구명하는 것이 관심의 초점이다. 이러한 기전은 EM내성 *Staphylococcus aureus*에 존재하는 plasmide pE 194의 inducible MLS resistance gene인 erm C의 연구에서 밝혀지고 있다.⁵⁻⁷⁾

이 연구에서 밝혀진 기전은 post-transcriptional attenuation(또는 translational attenuation) mechanism으로 설명되고 있다.

MLS계 항생물질의 유도내성 기전, 다시 말해, 유전자 발현조절 기전을 보다 명백히 하기 위해서는 앞에서 언급된 erm C를 이용하여 제기된 translation attenuation 기전을 보다 깊게 연구함과 동시에, 내성 기전이 비슷하거나 보다 복잡하리라 예견되는 균주(MLS계 항생물질에 대해 유도내성을 나타내는 *Bacillus*속 균이나, MLS계 항생물질을 생산하는 *Streptomyces*속 균)에서 내성과 관련된 methylase 유전자를 cloning하고, DNA염기 배열을 결정하고, 거기에서 유추되는 mRNA의 2차 구조를 해명하며, 더 나아가 mRNA 수준에서 그 2차 구조를 해명하는 것이 바람직하다.

위의 연구내용을 실현하기 위해서는 두가지 측면에서 접근할 수 있다. 첫째는 합성적 방법으로 유기합성적 방법에 의해 필요로 하는 DNA를 만들어 이용하는 방법이다. 즉 erm C의 정상적인 regulatory sequences에서 특정부위의 염기를 다른 염기로 대체시킨 변형 regulatory sequences를 합성하여 적당한 cloning vector에 삽입시킨 후 발현시키고, 이때 나타나는 생리적 특성, (즉 특정 MLS계 항생물질에 의해 내성이 유도되는 특성)을 검토하여 변형된 염기배열, 나아가서는 변형된 아미노산과 내성유도 특이성과의 관계를 밝히는 것이다. 둘째는 분석적 방법으로, 앞에서 언급한 바와같이 천연에 존재하는 균주에서, 또는 돌연변이법에 의해 나타난 생리적으로 흥미 있는 균주를 택해, 내성 유전자를 cloning하고,

DNA 염기배열을 결정하여 그 구조의 특성을 생리적 특성과 연관시키는 것이다.

저자들은 erythromycin 등 macroide계 항생물질에 유도내성을 나타내는 세균을 공기중에서 분리하여 이 세균이 *Bacillus*속 세균임을 확인하였으며 이 *Bacillus*속 세균이 소량의 erythromycin 또는 oleandomycin과의 접촉에 의해 내성이 유도되어 erythromycin, oleandomycin에 고도의 내성을 나타냄을 밝힌바 있다.⁸⁾ 이 *Bacillus* EMR 세균이 *Bacillus licheniformis*임을 동정하였으며, 이 내성균에서 lincosamide계 항생물질도 유도내성인자로 작용함을 구명하였다.⁹⁾

본 연구에서는 이 내성균에서 내성을 나타내는 methylase gene을 cloning하여 이 gene이 삽입된 vector pBS 42를 pEC 101라 명명하였으며 이어서 pEC 101에서 methylase 유전자가 존재하는 부분을 subcloning하였으며, 이 유전자를 erm K라 명명하였다. 이어 erm K의 leader region에 해당하는 부분의 DNA 염기배열을 결정하였다.

또한 *B. licheniformis* EMR 균주에서 carbomycin, tylosin 등에도 내성인 mutant와 그밖의 생리적 특성이 있는 mutant를 선별하고 이 mutant가 갖는 methylase의 DNA 염기배열을 결정하여, erm K의 그것과 비교함으로써 내성 조절 기구를 보다 명백히 하고자 하였다.

실 험 방 법

균주 및 프라스미드—본 실험에 사용한 주요한 균주 및 프라스미드는 다음과 같다. *Bacillus licheniformis* EMR⁹⁾(ery^r) 및 분리내성 mutant 균주, *E. coli* CSH 26 (lac⁻ cam^s)¹⁰⁾ *B. subtilis* UOTO 277 (ery^r, cam^s rec E₄)¹¹⁾ pBS 42(cam^r, ery^s)¹¹⁾

효소 및 항생물질—Restriction endonuclease인 EcoR₁, Bam H₁, Hind III, Pvu II, Msp I, Dde I과 CIP, T₄ DNA ligase, polynucleotide kinase, RNA polymerase I (*E. coli*)은 New England Biolabs(Beverly, MA, USA)의 것을 사용하며, BAP는 Sigma Chemical Company(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용했다.

Chloramphenicol(CAM), erythromycin(EM), lincomycin(LCM), clindamycin(CLDM), oleanomycin(OM), leucomycin(LM) carbomycin, tylosin 등의 항생물질은 Sigma사의 제품을 사용했다.

본태성 내성 균주의 분리—*B. licheniformis* EMR에서 자연돌연변이법과 돌연변이원에 의한 방법을 이용하여 내성 본태성 내성 균주를 분리했다.

(1) 자연돌연변이법—*B. licheniformis* EMR을 agar slant나 agar plate에 배양하여 다수의 single colony를 얻고, 이 colony들을 carbomycin(10 μ g/ml)이나 tylosin(10 μ g/ml)을 함유한 agar에 도말하여 37°C에서 하루밤 배양한 후 생존한 single colony를 carbomycin 또는 tylosin 내성 mutant로 선별했다.

(2) 돌연변이원에 의한 방법—*B. licheniformis*를 액내 배양한 후 강도 및 시간을 변화시키며 UV를 조사한 후, 이 배양액을 carbomycin(10 μ g/ml)이나 tylosin(10 μ g/ml)을 함유한 agar plate에 도말하고 배양하여 생존한 single colony를 선별했다.

총 DNA 제조—*B. licheniformis*의 내성 mutant를 100ml의 LB배지에 접종 37°C에서 하루밤 배양하고, 원심분리하여 균체를 수확했다. 균체를 3ml의(50mM Tris·Cl pH 8.0, 50mM EDTA, 25% sucrose) 용액에 현탁시킨후 0.6ml의 lysozyme용액(5mg/ml)을 더하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 0.6ml의 10% SDS 용액과 1.05ml의 5M sodium perchlorate를 더한 후 5.25ml의 chloroform를 넣고 진탕했다. 원심분리하여 수층을 취했다. 5ml의 ethanol을 넣고 생성된 DNA를 glass 끝에 취했다. Pellet를 3ml의 TES(20mM Tris·Cl, pH 8.0, 10mM NaCl, 0.1mM EDTA)에 용해시킨 후 1mg의 proteinase K을 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 0.5ml의 5M sod. perchlorate을 더하고 동량의 chloroform으로 처리하고, 수층을 취해 ethanol 침전시켰다. 생성된 DNA를 glass 끝에 취한 후 pellet를 TE(10mM Tris·Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)에 용해시킨다. Total DNA를 EcoR₁으로 complete di-

gestion 시켰다.

Ligation—EcoR₁으로 분해한 total DNA 2 μ g과 EcoR₁으로 분해 후 dephosphorylation¹⁴⁾시킨 pBS 42 1 μ g을 합하고, 여기에 10배 ligation buffer, 증류수 및 2 μ l(1 Weiss unit)의 T₄ DNA ligase을 더하여 pBS 42의 최종농도가 40ng/ μ l 되게했다. 15°C에서 하루밤 동안 반응시켰다. (ligated pBS 42)

E. coli 형질전환—*E. coli* CSH 26을 CH minimal medium에서 하루밤 배양하고, 상법에 따라 competent cell를 만들었다.

Competent cell 현탁액 200 μ l에 ligated pBS 42을 넣고(330ng) 얼음 속에 30분간 방치한 후 42°C에서 3분간 heat shock를 가했다. 0.5 μ g/ml의 CAM를 포함한 LB agar에 접종한후 37°C에서 2일간 배양. 생성된 집락을 취했다. (*E. coli* library)

EM 내성 유전자의 크로닝¹⁴⁾

(1) Competent cell 제조—*B. subtilis* UOTO 277를 Staph medium에 접종하여 37°C에서 하루밤 배양했다. 250ml flask에 SPMM I 13.5ml와 1.5ml의 배양균액을 넣고, 300rpm의 회전속도로 37°C에서 3.5시간 배양했다. 새 flask에 361ml의 SPMM II와 위의 배양균액 4ml을 넣고, 250rpm의 속도로 37°C에서 1.5시간 배양했다. 원심분리하여 균체를 얻고, 이 균체를 4ml의 상징액으로 현탁했다. (competent cells)

(2) *B. subtilis*계 형질전환—0.5ml의 competent cell 현탁액과 0.5ml SPMM II를 50ml flask에 넣고, *E. coli* library에서 분리한 plasmid 용액 10 μ l를 첨가한후 37°C에서 300rpm 속도로 40분간 배양했다. CAM(0.5 μ g/ml)과 EM(0.05 μ g/ml)를 포함한 LB 2ml를 더한후 37°C에서 60분간 정지배양했다. 원심분리하여 균체를 얻고, 100~200 μ l의 상징액으로 현탁한 후 EM(10 μ g/ml)과 CAM(10 μ g/ml)를 함유한 LB agar에 접종, 37°C에서 2일간 배양하여 성장한 집락을 취했다.

pEC 101의 Restriction Site Mapping—크로닝된 균주에서 확인된 plasmid를 pEC 101라고 명명하고, Pst I, Bam HI, Hind III, Bgl II,

EcoR₁, Ava I, Cla I, Sal I, Bcl I, Dra I, Pvu II, Kpn I 등의 제한효소를 사용하여 mapping 했다. carbomycin 및 tylosin 내성균에서 cloning 한 plasmid에 대해서도 동일방법을 적용했다.

Subcloning—pEC 101의 어느 부분에 목적하는 EM methylase gene이 있는가를 확인하기 위해 subcloning을 실시했다.

(1) Blunt Cutting of pBS 42—pBS 42를 Bam HI으로 절단한후 S1 buffer 존재하에 S1 enzyme으로 반응시켰다. 0.25M EDTA으로 반응을 종결시키고 phenol/chloroform으로 추출한후 ethanol 침전시켜 얻은 침전을 TE에 용해시켰다.

(2) pEC 101의 Digestion 및 Fragment 분리—Restriction site mapping에 생성될 수 있는 fragment를 확인한 후 그 fragment를 만드는 제한효소(EcoR₁, Hind III, Pvu II, Bcl I 등)로 digestion 시킨후 S1 enzyme으로 처리했다. 2% agarose gel의 전기영동을 실시하여 해당하는 부분을 절단해내고, electroelution에 의해 fragment를 추출했다. Phenol/CHCl₃으로 추출한 후 ethanol 침전법에 의해 fragment의 pellet를 얻고 이것을 TE에 용해시켰다.

(3) Ligation 및 Transformation—Blunt cut pBS 42를 2)에서 얻은 fragment와 각각 ligation 시켜 ligated pBS 42을 얻었다. 각각의 ligated pBS 42을 *B. subtilis* UOTO 277에 직접 transformation 시킨후 EM(10μg/ml) 함유 LB agar에 접종시켜 집락 생성 여부를 관찰했다. 생성된 집락을 순수 분리하고 각 균주에 대하여 알카리법에 의해 plasmid를 확인하고, 그 plasmid를 몇종의 제한효소로 digestion시켜 그 pattern을 관찰했다. 또한 plasmid가 들어있는 *B. subtilis*의 항생물질 내성, 감수성의 pattern을 parent EMR 균주의 그것과 비교하여 어느 fragment에 의해 내성이 생기는가를 결정했다.

DNA Sequencing of erm K—위의 subcloning에 의해 결정된 methylase gene을 erm K라 명명하였다.

(1) erm K 포함 최소 DNA fragment의 Subcut.—pEC 101를 제한효소로 digestion시키고,

2% agarose 전기영동, electroelution에 의해 erm K가 포함되어 있는 최소 DNA fragment를 얻었다. 이 최소 fragment를 다시 Ava I, Bst N I, Dde I, Hin F I, Ava II, Mbo I, Msp I, Taq I 등의 제한효소를 작용시켜 절단여부 및 그 pattern을 조사했다. 다음 Msp I과 Dde I, Msp I+Hinf I, Dde I+Hinf I와 같은 형식의 double digestion을 실시하여 그 절단 pattern을 관찰하고 DNA sequencing에 적당한 fragment를 선택했다.

(2) γ -³²P end-labeled fragment 제조—한가지 효소(예를 들어 Msp I)로 1차 cutting한후 CIP로 dephosphorylation했다. 다음 (γ -³²P) ATP·end-labeling하고 제 2의 효소(Dde I)으로 2차 cutting했다. 필요로 하는 end-labelled fragment를 8% acryamide gel 전기영동법에 의해 분리했다. 이때 end-labeling은 다음과 같이 했다. 즉 DNA 용액 38.5μl에 (0.2M Tris·HCl pH 9.5, 10mM spermidine 1mM EDTA) 용액 5μl을 더하고 증류수를 더해 50μl로 했다. 10배 blunt end kinase buffer 7μl와 *E. coli* polynucleotide kinase 1μl(1 unit)을 더하여 잘 혼합했다. 이것을 건조시킨 (γ -³²P) ATP(300μCi)에 옮기고 37°C에서 30분간 반응시키고 0.25M EDTA 6μl로 반응을 종결시켰다. Phenol/chloroform으로 추출하고 ethanol 침전법에 의해 pellet를 얻고 40μl의 TE에 용해시켰다.

(3) 화학반응, 전기영동—Maxam and Gilbert의 방법을 적용시켰다.¹⁶⁾ 위에서 얻은 end-labeled fragment를 사용하여 G, A+G, T+C 및 C반응을 시키고, ethanol 침전법에 의해 pellet를 얻었다. Vacuum pump에 의해 건조시키고, 여기에 1.0M piperidine을 더해 90°C에서 30분간 반응시킨후 감압 건조시켰다. Formamide dye을 가해 용해시키고 90°C에서 1분 가열하여 얼음속에 급냉하여 변성시킨 다음 전기영동에 적용했다. 6% 및 20% acrylamide gel 전기영동을 실시했다. Constant power 상태에서 gel plate의 온도가 50~60°C되게 유지하면서 영동시키며, end-labeled된 DNA의 radioactivity량에 따라 노출시간을 조절했다.

실 험 결 과

본태성 내성 균주의 분리—*B. licheniformis* EMR 균주로부터 carbomycin이나 tylosin에도 내성인 균주(본태성 내성)를 자연 돌연변이법과 UV조사법에 의해 분리하였다. 그 결과를 Table I에 표시하였으며, 그 균주에서 내성 유전자가 크로닝된 경우에는 내성유전자가 삽입된 프라스미드의 이름을 병기하였다.

erm K의 Cloning—*Bacillus licheniformis* EMR 균주에서 총 DNA를 제조하여 EcoRI으로 완전 절단시킨 후 pBS 42에 삽입시켰다. *E. coli* CSH 26에 이 조합 프라스미드를 형질전환시킨 후 chloramphenicol(10µg/ml)를 함유한 한천배지에서 배양시켜 *E. coli* library를 만들었다. *E. coli* library 집락을 함한 후, 여기서 프라스미드를 조제하였다. 이 프라스미드를 *B. subtilis* UOTO 277에 형질전환시킨후 EM(10µg/ml) 함유 한천배지에 배양하였다. 37°C에서 2일 배양했을 때 집락형성이 확인되었으며 이 집락을 취하여 순수 분리한 후, 이 균주의 표현형(EM에 의해 생기는 carbomycin 또는 tylosin 디스크 주위의 D형 저지원)을 *B. licheniformis* EMR의 경우와 비교했을때 동일함이 확인되었다. (사진 생략) 또한 형질전환된 *B. subtilis*에서 제조된 프라스미드로 *B. subtilis* UOTO 277를 재 형질전환했으며 동일한 표현형을 얻었다. 이 표현형에 관련된 유도내성 유전자들 erm K로 명명하고, 이

Table I—Constitutive resistant mutants from *Bacillus licheniformis*.

Mutant No.	Nutation method	Plasmid containing resistant gene
Car R2	Spontaneous	pEC 201
Car R 6	Spontaneous	pEC 301
Tyl R 13	Spontaneous	pEC 401
Tyl R113	Spontaneous	pEC 501
Car R 3	Spontaneous	pEC 601
Car R 5	Spontaneous	pEC 701
Car R 101	UV	pEC 111
Car R 102	UV	pEC 121

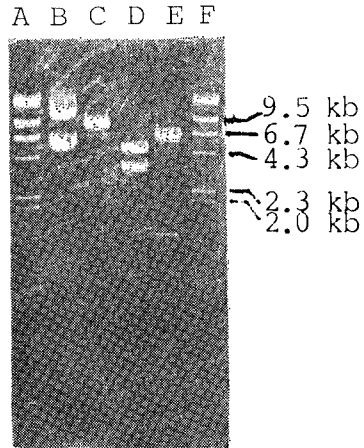


Fig. 1—Electrophoretic characterization of pEC 101 plasmid.
Lane A and F: Hind III digested Lambda DNA
Lane B: pEC 101 plasmid
Lane C: Bam HI digested pEC 101 plasmid
Lane D: EcoRI digested pEC 101 plasmid
Lane E: Pvu II+Hind III digested pEC 101 plasmid

유전자가 포함된 프라스미드를 pEC 101로 명명하였다.

Fig. 1에 pEC 101 및, pEC 101를 EcoRI 등으로 분해하여 1% agarose젤 전기영동한 패턴을 표시하였다. Lane C에서 Bam HI의 절단으로 pEC 101의 크기가 7.7kb 정도라는 것이 확인되었으며 Lane D의 EcoRI 분해에 의해 4.5kb(pBS 42)와 3.2kb의 두 밴드가 나타나 erm K가 포함된 삽입 DNA의 크기가 3.2kb 정도임이 확인되었다.

pEC 101의 제한효소 절단위치—pEC 101 프라스미드를 EcoRI, Pvu II, Hind III, Bcl I 및 기타의 제한효소로 절단한 후 1% agarose 전기영동을 실시하고, 나타난 밴드의 크기들을 조합하여 Fig. 2에 표시한 제한효소 절단 위치를 확인하였다. 삽입된 3.2kb DNA 절편에는 Pvu II site, Hind III site 및 Bcl I site가 각각 2개씩 존재하였다. 각 site 사이의 거리는 Fig. 3에 표시하였다.

erm K의 Subcloning—Fig. 2에 표시한 제한효소 절단 위치를 근거로 하여, Fig. 3에 표시한

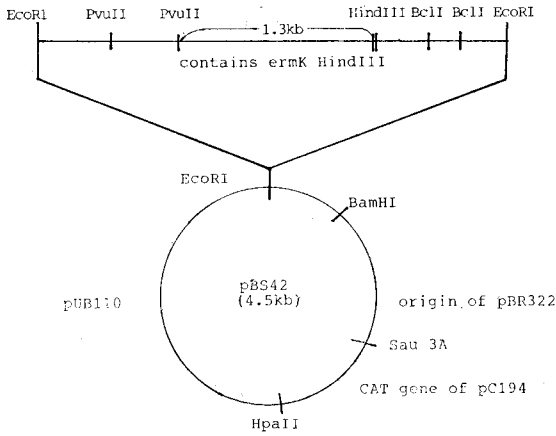


Fig. 2—Restriction site map of pEC 101

DNA 절편을 만들어 subcloning에 이용하였다. 즉 pEC 101을 EcoRI와 Hind III으로 절단하고 S1 효소로 처리한 후 전기영동하여 2,300bp의 E=H 절편을, pEC 101을 Pvu II와 Bcl I으로 절단하고 같이 처리하여 1,600bp의 P=B 절편을, Pvu II와 Hind III으로 절단하고 같이 처리하여 1,300bp의 P=H 절편을 얻었다. 세 절편을 pBS 42에 삽입시킨 후 *B. subtilis* UOTO 277에 형질 전환시킨 결과 세 경우 모두 유도내성 패턴을 갖는 집락이 다수형성하였다. 이 결과로 유도내성 유전자가 1,300bp의 P=H 절편에 존재함이 확인되었다.

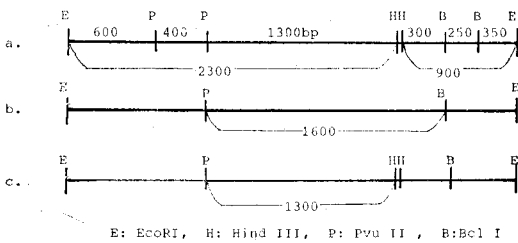


Fig. 3—DNA fragments from pEC 101 for the subcloning of ermK.

pEC 101 was cut by EcoRI, and Hind III, and treated with S1 nuclease. E=H fragment was prepared by 1% agarose gel electrophoresis. P=B fragment and P=H fragment were prepared by digesting of pEC 101 with Pvu II and Bcl I, Pvu II and Hind III respectively.

erm K Leader 부분의 DNA의 염기배열 결정—pEC 101에서 P=H 절편을 얻고 이 P=H 절편을 다시 여러종류의 제한효소로 절단하여 얻은 제한효소 절단 부위표를 기초로 하여, Fig. 4에 표시한 전략에 의해 erm K leader 부분의

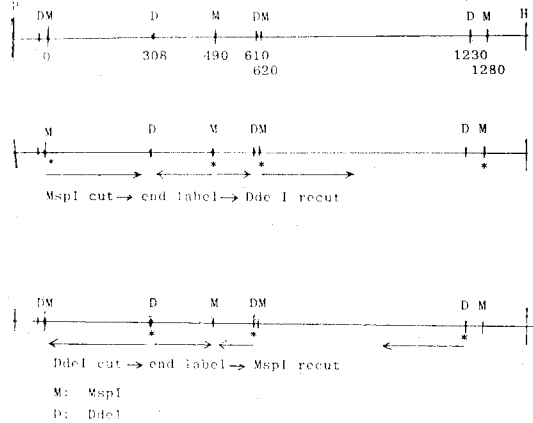


Fig. 4. DNA sequencing strategy of erm K.

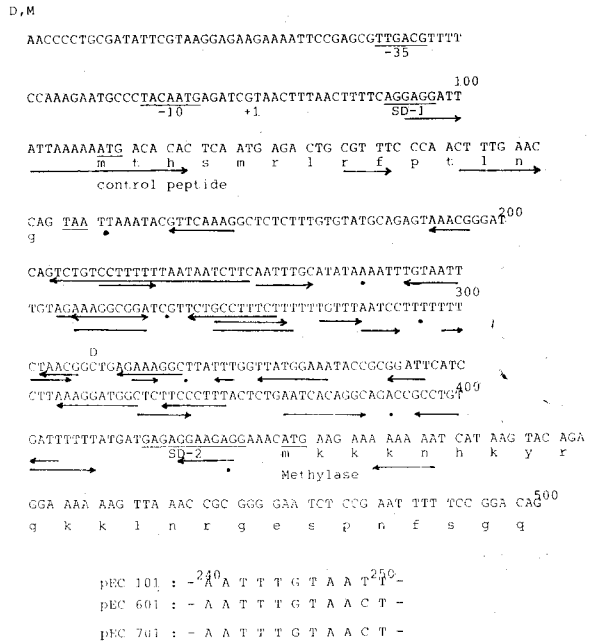


Fig. 5—DNA base sequences of the leader region of erm Ks, from pEC101, pEC 301 and pEC 501.

• : Axes of complementary symmetry
→ ← : Inverted complementary repeat sequences
D : Dde I, M : Msp I

DNA 염기배열을 결정하였다. Maxam-Gilbert 법을 적용하여 얻은 결과를 Fig. 5에 표시하였다. 또한 carbomycin에도 내성을 갖는 즉 본태성 내성을 나타내는 균주인 Car R3와 Car R5에서 각각 erm K를 크로닝하여 그 프라스미드를 pEC 601, pEC 701이라 명명하고, 이들에게서 유래하는 erm K의 leader 부분의 DNA 염기배열을 결정하여 Fig. 5에 같이 표시하였다. Car R3의 erm K의 Car R5의 erm K에서는 249번의 T가 C로 변환하였다.

고 찰

Macrolide계 항생물질, lincosamide계 항생물질 및 streptogramin B계 항생물질(MLS)에 대해 공통적으로 내성을 나타내는 세균중에는 본태적으로 항상 내성을 나타내는 균주와 소량의 MLS계 항생물질과 접촉함으로써 내성이 유도되는 유도내성균주가 있다. 유도내성의 기전은 erythromycin에 유도내성인 *Staphylococcus aureus*에 포함되어 있는 erm C 유전자에서 자세히 설명되고 있다. 즉 post-transcriptional attenuation control로 설명되고 있는바, 이기전은 내성에 관여하는 효소(23S rRNA의 adenine를 methyl화하는 효소)의 mRNA가 합성된 후 소량의 MLS계 항생물질의 존재여부에 따라 mRNA의 2차 구조가 변형되어 translation이 진행되기도 하고 일어나지 않기도 한다는 설명이다.

이 post-transcriptional attenuation control을 보다 확고히 하기 위하여, 또는 이러한 control 기전 이외에 다른 기전(예를 들어 transcriptional attenuation control)이 있지 않겠느냐를 밝히기 위해 본 연구에서는 우선 토양에서 분리된 *B. licheniformis* EMR에서 유도내성 유전자를 크로닝하고자 하였으며, 동시에 carbomycin 등에도 내성을 나타내는 본태성 내성 균주를 다수 분리하여 유도내성 유전자의 leader 부분의 DNA 염기배열의 변화를 검토하였다. *B. licheniformis* EMR에서 만든 총 DNA를 EcoRI으로 완전절단한 후 pBs 42에 삽입시켜 먼저 *E. coli*에 형질전환시키고 다시 *B. subtilis*에 2차 형질전환시킴

으로써 erythromycin 유도내성 유전자를 크로닝할 수 있었다. 크로닝 유전자가 목적하는 유도 내성 유전자인가를 확인하기 위해서는 유전자가 포함되어 있는 프라스미드(pEC 101)를 다시한번 *B. subtilis*에 형질전환시키는 방법과 프라스미드 pEC 101이 함유된 *B. subtilis*가 나타나는 표현형이 *B. licheniformis* EMR이 갖는 표현형과 같은가를 관찰하는 방법에 의해 확인하였다. 그 결과 *B. subtilis*에 재 형질전환되었고, 그 표현형이 동일함이 관찰되어 크로닝된 것이 목적하는 유전자임이 확인되었다.

pEC 101의 크기는 Bam H 1으로 절단하여 전기영동함에 의해 7.7kb 정도임이 밝혀졌으며, 또한 pEC 101을 EcoRI으로 절단하여 전기영동했을 때 4.5kb(pBS 42)와 3.2kb의 두 밴드가 확인되어 pBS 42에 삽입된 DNA 절편이 3.2kb임을 알 수 있었다(Fig. 1).

Fig. 2에 표시된 pEC 101의 제한효소 절단 위치를 기초로 하여 Fig. 3에 표시된 DNA 절편을 만들어 subcloning함으로써 해당 유전자가 들어 있는 최소 DNA 절편이 P=H 절편임이 밝혀졌다. P=H 절편의 크기는 약 1,300bp로, 이것은 700~900bp 정도의 구조 유전자와 300~400bp 정도의 leader 부분을 함유하는데 충분한 크기이다.

1,300bp 절편중에서 우선 leader 부분의 염기배열을 Fig. 4에 표시된 전략에 의하여 결정하였다. 앞 부분 500bp를 결정하여 Fig. 5에 표시하였다. Fig. 5에서 보는 바와같이 -35부분, -10부분, SD-1, SD-2등이 확인되었으며 leader 부분에 14개의 아미노산으로 구성된 control peptide가 추정되었다. leader 부분에도 적어도 6개의 inverted complementary repeat sequence(ICRs) 대칭점이 추정된다. 이것으로부터 mRNA에서 6개의 stem and loop의 형성이 가능하리라 추측된다. 따라서 erm K에서도 이러한 stem and loop의 형성 및 해체에 의해 translation의 진행 또는 억제가 행해지는 posttranscriptional attenuation 조절기전이 존재하리라 생각된다.

본태성 내성 균주인 Car R3와 Car R5에서 각각 크로닝된 erm K에서는 249번의 T가 각각 C

로 변해있었다. 이러한 염기의 변화는 이 염기가 포함되어 있는 mRNA 부분에서 만들어지는 stem and loop의 형성 또는 해체에 크게 영향을 미쳐, 유도내성 이 본태성 내성으로 변환하는데 결정적인 역할을 하리라 사료되지만 이것을 확실하게 밝히기 위해서는 보다 많은 본태성 내성 균주를 분리하고, 그들 erm K의 leader 부분을 분석하여야만 가능하리라 생각된다.

결 론

Erythromycin 등에 의해 내성이 유도되어 macrolide계 항생물질 등에 고도의 내성을 나타내는 *Bacillus licheniformis* EMR 균주에서 Macrolide-lincosamide-streptogramin B계 항생물질에 대한 유도내성 조절을 확인하기 위한 연구의 일환으로 동 균주에서 유도내성 관련유전자를 크로닝하였다.

위 균주의 총 DNA를 EcoRI로 완전 절단하고, pBS 42 vector에 삽입시킨 후 *E. coli* CSH 26에 형질전환, *B. subtilis* UOTO 277에 재 형질전환함으로써 유도내성 유전자를 크로닝하였으며 삽입된 DNA 절편은 3.2kb정도였다.

Subcloning하여 유도내성 유전자 erm K가 포함된 1.3kb의 Pvu II-Hind III 절편을 얻었다. erm K의 leader 부분의 DNA 염기배열을 결정하였던바 적어도 7개의 Inverted complementary repeat sequence가 예상되었으며, 이로부터 생기는 stem and loop의 형성 또는 해체가 내성의 발현 또는 억제에 통제된다고 생각되었다. 또한 본태성 내성 균주에서 크로닝된 erm K의 leader 부분 중 변환된 염기가 확인되었으며 이로인해 유도내성이 본태성 내성으로 바뀐다고 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 한국학술진흥재단의 1986년도 연구비와 한국과학재단의 기초연구비(1987~1989)에 의하여 이루어진 것이다. 두 재단에 깊이 감사드린다.

문 헌

- 1) Weaver, J.R. and Patte, P.A.: Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **88**, 574 (1964).
- 2) Weisblum, B., Siddhikol, C., Lai, C.J. and Demohn, V.: Erythromycin inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: requirements for induction. *J. Bacteriol.* **106**, 835 (1971).
- 3) Lai, C.J., Dahlberg, J.E. and Weisblum, B.: Structure of an inducibly methylatable nucleotide sequence in 23S ribosomal ribonucleic acid from erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biochemistry*, **12**, 457 (1973).
- 4) Lai, C.Y., Weisblum, B., Fahnestock, S.R. and Nomura, M., Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* **74**, 67 (1973).
- 5) Gryczan, T., Grandi, G., Hahn, J., Grandi, G. and Dubunau, D.: Conformational alteration of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-induced drug resistance. *Nucleic Acids Res.* **8**, 6081 (1980).
- 6) Horinouchi, S. and Weisblum, B.: Posttranscriptional modification of messenger RNA conformation: Mechanism of erythromycin inducible resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 7079 (1981).
- 7) Mayford, M. and Weisblum, B.: Messenger RNA from *Staphylococcus aureus* that specifies Macrolide-Lincosamide-Streptogramin resistance: Demonstration of its conformation and of the leader peptide it encodes. *J. Mol. Biol.* **185**, 769 (1985).
- 8) Choi, E.C., Kim, B.K., Shim, M.J., Chung, K.S., Woo, J.W., Kim, H.R. and Lee, C.K.: Studies on the resistance to antibiotics in bacteria. Induced resistance to macrolide antibiotics in *Bacillus sp. Yakhak Hoeji* **26**, 169 (1982).
- 9) Choi, E.C., Woo, J.W. and Weisblum, B.: Inducible resistance to lincosamide antibiotics by lincosamide antibiotics in *Bacillus licheniformis*.

- Xakhak Hoeji* 30, 317 (1986).
- 10) Miller, J.H.: *Experiments in molecular genetics*, Cold Spring Harber Laboratory Press, Cold Spring Harber U.S.A. (1972).
 - 11) Band, L. and Henner, D.J.: *Bacillus subtilis* requires a stringent Shine-Dalgarno region for gene expression. *DNA*, 3, 17 (1984).
 - 12) Chaconas, G. and Van de Sande, J.H.: *Methods in Enzymol.* 65, 75 (1980).
 - 13) Mandel, M. and Higa, A.: Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159 (1970).
 - 14) Dubnau, D.: *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Academic Press, p.33 (1983).
 - 15) Maxam, A.M. and Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65, 499 (1980).