

## 마크로라이드-린코사마이드-스트렙토그라민 B(MLS)계 항생물질에 대한 유도 내성

권애란 · 최성숙 · 김숙경 · 정영자 · 최응칠\* · 김병각  
서울대학교 약학대학

(Received March 14, 1994)

## Screening of Inducible Resistance Genes to Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B(MLS) Antibiotics

Ae-Ran Kwon, Sung-Sook Choi, Sook-Kyung Kim, Young-Ja Chung,  
Eung-Chil Choi\* and Byoung-Kak Kim

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

**Abstract**—Forty nine clinical isolates of *S. aureus* showing resistance to erythromycin(EM) were selected from 83 strains isolated recently in Korea. Fourteen strains of *S. aureus* showing inducible resistance to MLS antibiotics were selected by disc agar diffusion method. Colony hybridization was executed using two MLS inducible resistance genes, *ermA* and *ermC*, identified previously from *S. aureus* as probes. *S. aureus* 375 and *S. aureus* 507 whose genes were not homologous to those probes were finally selected. It was confirmed that the resistance genes of *S. aureus* 375 and *S. aureus* 507 had no homology with those probes in southern hybridization test using *ermA*, *ermC* and *ermAM* as probes. It was determined that *S. aureus* 375 had a plasmid whose size was about 35 kb. To know if the plasmid may have the genes related to inducible resistance to MLS antibiotics, it was attempted to transform *Bacillus subtilis* BR151 and *S. aureus* RN4220 with the plasmid isolated from *S. aureus* 375. It was shown that the gene related to inducible resistance to MLS antibiotics did not exist in this plasmid. These results indicate that two clinical isolates of *S. aureus* showing inducible resistance to MLS antibiotics have novel genes that have no homology with MLS resistance genes identified so far. It is assumed that these genes may exist in chromosomal DNA.

**Keywords** □ *S. aureus*, MLS antibiotics, inducible resistance, colony hybridization, southern hybridization, *B. subtilis* BR151, *S. aureus* RN4220, transformation.

세균의 감염증 치료에 효과적으로 사용되어 온 항생물질은 최근 그의 지속적인 사용 및 남용으로 인해 내성균의 출현이 급증하고 있다. 따라서 이들 내성균의 출현 현황 파악과 내성 발생 기전의 규명 및 내성균에 유효한 항생물질의 개발이 현재 중요한 과제가 되고 있다.

Erythromycin(EM)으로 대표되는 macrolide계 항생물질과 lincomycin(LCN)으로 대표되는 lincosamide계 항생물질은 임상적으로 호흡기 계통의 감염증에 유효한 중범위 항생물질이다. Macrolide계 항

생물질의 작용 기전은 세균의 ribosomal subunit에서 진행되는 polypeptide elongation 과정의 peptidyl transferase의 작용을 억제하거나, translocation 과정을 억제 또는 이 두 가지를 다 억제함으로써 단백질 합성을 방해한다. EM은 50S subunit에서의 peptidyl transferase 작용을 억제한다. Streptogramin B의 단백질 합성 억제 기전은 아직까지 명확하게 규명되어 있지는 않지만 peptide chain 초기를 차단하여 단백질 합성을 억제하는 것으로 생각되어지고 있다.<sup>1-3)</sup>

\*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

MLS계 항생물질에 대해 내성을 획득하게 되는 기

전은 macrolide계 항생물질에 대해 내성인 *Escherichia coli*의 경우 ribosomal protein인 L4나 L22의 돌연변이에 의해서 ribosome의 구조가 변해 항생물질이 결합하지 못해 내성이 되거나<sup>4,5)</sup> 23S rRNA의 N<sup>6</sup>-monomethylation 또는 N<sup>6</sup>,N<sup>6</sup>-dimethylation에 의한 50S subunit의 구조 변화로 항생물질이 결합하지 못하여 내성을 획득한다.<sup>6)</sup> MLS계 항생물질에 대해 내성인 *Staphylococcus aureus*에서처럼 N-methyltransferase(methylase) 유전자의 생성물에 의한 세균의 23S rRNA의 구조변화는 MLS계 항생물질에 대한 내성 연구에서 가장 중요한 관심거리가 되고 있다. 그 조절 기전은 Weisblum 등에 의해 연구되었는데 23S rRNA 중 특정 adenine이 methylase에 의해 N<sup>6</sup>-mono 또는 N<sup>6</sup>, N<sup>6</sup>-dimethylation되어 그 결과 50S subunit의 conformation이 변하고 이로 인해 항생물질이 결합하지 못하게 되어 내성이 발현되며, 이것은 translational attenuation 기전에 의해 규명되어 지고 있다.<sup>7)</sup> MLS계 항생물질에 대한 내성에는 두 가지 경우가 있는데, 항상 내성을 갖는 본태성 내성과 낮은 농도의 특정 MLS계 항생물질과 접촉한 다음에만 다른 MLS계 항생물질에 대해 내성을 나타내는 유도 내성이 있다. 유전자 발현 기작을 이해하기 위한 분자생물학적 전지에서 보면 후자의 유도 내성이 더 의의가 있다.

MLS 내성 유전자의 발현 조절 기전을 보다 명백하게 규명하기 위해서는 지금까지 밝혀진 유전자들과는 별도로 유도 내성을 나타내는 다양한 종의 균주들로부터 내성 유전자들을 cloning하고 염기배열을 결정하여 이로부터 유추되는 mRNA의 2차 구조를 해석하는 것이 필요하다. 이를 지금까지 밝혀진 다른 MLS 내성 유전자의 발현 기전과 비교 검토함으로써 MLS 내성 유전자의 발현 조절 기전을 보다 자세히 설명할 수 있을 뿐 아니라 지금까지 알려지지 않은 또 다른 유전자 발현 기전의 발견 가능성도 기대할 수 있다.

이와 같은 목적으로 최근 한국에서 분리한 *Staphylococcus aureus* 임상 분리 균주 83종을 대상으로 MLS 유도 내성을 갖는 14종을 디스크 확산법에 의해 선별하였다. 이미 *Staphylococcus aureus*에서 분리된 MLS 내성 유전자인 *ermA*와<sup>8)</sup> *ermC*를<sup>9)</sup> probe로 colony hybridization을 실시하여 이들과 동질성이 없는 *Staphylococcus aureus* 375와 *Staphylococcus aureus*

507을 최종 선별하였다. *ermA*, *ermC*와 더불어 *Streptococcus sanguis*에서 분리된 *ermAM*을 probe로 Southern hybridization을 실시하여 위 probe들에 동질성이 없음을 확인함으로써 두 종의 *Staphylococcus aureus* 임상 균주들은 지금까지 발견된 MLS 내성 유전자와는 다른 새로운 유전자를 가짐을 밝혔다. *Staphylococcus aureus* 375에 약 35 Kb 크기의 plasmid가 존재함을 확인하였고 이 plasmid를 이용하여 *Bacillus subtilis* BR151과 *Staphylococcus aureus* RN 4220의 형질 전환을 시도한 결과, 이 plasmid상에는 MLS 내성 유전자가 존재하지 않는 것으로 추정되었다.

### 실험방법

**균주 및 플라스미드**—본 실험에서는 고대 부속병원, 영동 세브란스 병원, 신촌 세브란스 병원, 여의도 성모병원, 이대 부속 병원, 서울대 부속 병원 등에서 입원 환자로 부터 분리한 83종의 *Staphylococcus aureus*를 대상으로 검색하였으며 형질전환을 위한 host로서 *B. subtilis* BR151와 *S. aureus* RN4220을 사용하였다. 그리고 pLS200, pE194 및 pAM77을 이용하여 southern hybridization용 DNA probe를 제조하였다.

**항생물질, 효소 및 방사성 동위원소**—Erythromycin(EM), kitasamycin(KIT), tylosin(TYL), mikamycin(MIK), chloramphenicol(CAM) 등의 항생물질 및 Trizma base, EDTA, SDS, sucrose, Denhardt's solution 등은 Sigma사의 제품을 사용하였으며, formamide은 Aldrich 제품을, 전기영동 시약 및 cesium chloride, ammonium sulfate 등은 Bethesda Research Labs(BRL)사의 ultra pure 제품을 사용하였다. 방사성 동위 원소인  $\alpha$ -<sup>35</sup>S-dATP(>1000 Ci/mmol)는 New England Nuclear(NEN) 제품을 사용하였다. 각종 제한효소는 New England Biolabs(NEB), KOSCO, Promega, Boehringer Mannheim사로부터, DNase I, DNA polymerase I는 KOSCO사로부터 구입하였고 Lysozyme, Lysostaphin, RNase, DNAase 등은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

**Erythromycin에 대한 내성균의 선별**—EM이 10  $\mu$ g/ml의 농도로 함유되어 있는 MH(Mueller-Hinton) 고체 평판 배지에 임상분리균의 액내 배양액을 접종하여 균의 성장여부를 관찰하였다.

고체배지 디스크법에 의한 MLS 유도 내성균의 선발—3 ml의 top agar 배지에 EM 내성균의 액내 배양액 100  $\mu$ l를 가한 후 항생물질이 함유되지 않은 MH 고체 평판 배지에 분주하였다. EM, KIT, TYL 등의 항생물질이 20  $\mu$ g/disk 농도로 함유된 디스크를 배지위에 놓고 하룻밤 배양한 다음 디스크 주위의 균의 성장 형태를 관찰하였다.

**Colony Hybridization<sup>10)</sup>**—MLS계 항생물질에 대해 유도 내성을 나타내는 14종의 *Staphylococcus aureus*의 유전자가 이미 *Staphylococcus aureus*에서 밝혀진 MLS 내성 유전자인 *ermA* 및 *ermC* 유전자와 동질성이 있는지를 확인하기 위하여 pLS220의 *EcoRI-EcoRI* 절편(1.3 Kb) [*ermA*], pE194의 *TaqI-TaqI* 절편(1.4 Kb) [*ermC*]을 probe로 colony hybridization을 실시하였다.

**S. aureus 375 임상 분리 균주로부터 플라스미드의 분리<sup>11)</sup>**—*Staphylococcus*속의 plasmid는 lysozyme에 의한 방법으로는 cell wall이 잘 파괴되지 않거나 분리된 plasmid의 양이 아주 적으므로 lysis broth를 이용한 변형된 Elliker법을 응용하여 plasmid를 분리하였다.

**제한효소에 의한 플라스미드의 절단과 그 크기 결정**—*S. aureus* 375에서 분리한 plasmid를 *BamHI*, *EcoRI*, *NdeI*, *PstI* 등의 제한효소로 절단하고 1% agarose gel에 전기영동하여 plasmid의 크기 및 그 절단된 형태를 확인하였다.

**총 DNA의 분리**—*S. aureus* 375와 *S. aureus* 507 균주를 각각 100 ml의 LB배지에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하고 원심분리하여 균체를 수확하였다. 여기에 3 ml의 TE buffer를 가하여 잘 현탁한 다음 lysozyme (5 mg/ml)과 lysostaphin(5 mg/ml)를 0.3 ml씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 0.6 ml의 10% SDS용액과 1.05 ml의 5 M sodium perchlorate 용액을 가하여 잘 섞은 다음 동량의 chloroform으로 수회 추출한 후 수층만을 취해 무수 ethanol로 침전시켰다. 생성된 DNA를 다시 유리봉 끝에 취한 후 DNA를 1 ml의 TE buffer에 녹였다. 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 DNA양을 정량하였다.

**Southern Hybridization<sup>12)</sup>**—*S. aureus* 375와 *S. aureus* 507에 존재하는 MLS 내성 유전자가 이미 *S. aureus*에서 분리된 MLS 내성 유전자인 *ermA*, *ermC*

와 더불어 *S. sanguis*에서 분리된 내성 유전자인 *ermAM*과 동질성이 있는가를 알아보기 위해 Southern hybridization을 실시하였다. *S. aureus* 375로부터 분리한 plasmid를 *BamHI*으로 완전 절단하고 또한 *S. aureus* 375와 *S. aureus* 507로부터 분리한 total DNA를 *BclI*으로 완전 절단한 다음 1% agarose gel에 loading하여 전기영동을 실시하였다. Transfer할 gel을 1.5 M NaCl-0.5 N NaOH 용액에 상온에서 1시간 정도 흔들며 주면서 DNA를 denaturation시켰다. Gel을 다시 충분한 양의 1M Tris.Cl(pH 8.0)-1.5 M NaCl 용액에 담근 후 흔들며 주면서 1시간 정도 반응시켜 DNA를 중화시켰다. Gel을 acryl plate에 뒤집어 놓고 20 $\times$ SSC 용액으로 적신 NC filter와 3MM paper 2장을 차례로 올려 놓은 후 하룻밤 눌러 놓아 DNA가 NC filter에 transfer되도록 하였다. 다음 날 NC filter를 6 $\times$ SSC 용액에 적신 후 공기 건조 시키고 80°C의 진공 상태에서 2시간 동안 구워 DNA를 NC filter에 고착시켰다. 구운 filter를 6 $\times$ SSC 용액에 완전히 적신 후 plastic bag에 조심스럽게 넣고 prehybridization 용액 약 5 ml를 가해 1시간 정도 고루 적신 후, 5분간 끓여 denaturation시킨 hybridization probe(1 $\times$ 10<sup>7</sup> cpm/ $\mu$ l)를 가하고 bag을 sealing하여 42°C에서 하룻밤 shaking하였다. 다음 날 filter를 꺼내어 250 ml의 2 $\times$ SSC-0.1% SDS 용액으로 상온에서 10분씩 4회 세척하고, 500 ml의 0.1 $\times$ SSC-0.1% SDS 용액으로 52°C에서 10분씩 2회 세척하였다. NC filter를 상온 건조 시킨 후 X-ray film에 이틀동안 직접 노출시켜 autoradiograph를 얻었다.

**Bacillus subtilis BR151의 형질 전환<sup>13)</sup>**—MLS 유도 내성과 관련된 유전자가 plasmid상에 존재하는지를 확인하기 위하여 *S. aureus* 375 균주로부터 분리된 plasmid로 형질전환시켰다. *B. subtilis* BR151 균주를 staph medium에 접종하여 37°C에서 하룻밤 배양하였다. 삼각 플라스크에 SPMM I(Spizizen's minimal medium)용액 13.5 ml과 1.5 ml의 배양 균액을 넣고 37°C에서 300 rpm의 속도로 3.5시간 배양하였다. 새 플라스크에 36 ml의 SPMM II용액과 위의 배양 균액 4 ml를 넣고 다시 37°C에서 250rpm의 속도로 1.5시간 배양하였다. 5분간 원심분리하여 얻은 competent cell을 4 ml의 SPMM II용액으로 현탁시켰다. 0.5 ml의 competent cell 현탁액과 0.5 ml의 SPMM II를 플라스크에 넣고 *S. aureus* 375에서 분리한 plasmid

DNA 용액 10  $\mu$ l를 가한 후 37°C에서 300 rpm의 속도로 40분간 진탕배양하였다. Erythromycin이 0.05  $\mu$ g/ml의 농도로 함유된 LB 배지 2 ml를 첨가한 후 37°C에서 60분간 정치배양하였다. 원심분리하여 균체를 얻고 EM이 10  $\mu$ g/ml의 농도로 함유된 LB agar plate에 도말하였다. 37°C에서 이틀간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다.

**S. aureus RN4220의 형질전환<sup>14,15</sup>**—*S. aureus* RN4220을 10 ml의 LB에 접종하여 37°C에서 하룻밤 동안 배양한 다음 원심분리하여 얻은 pellet을 10 ml의 HBM에 현탁시켰다. 이 현탁액에 lysozyme(4 mg/ml)과 lysostaphin(100  $\mu$ g/ml)이 함유된 HBM 10 ml를 가하고 37°C에서 2~3시간 방치하였다. 이 반응액을 원심분리(15분, 7,000 rpm) 하여 cell debris를 제거하고, 상등액을 다시 원심분리(15분, 19,000 rpm) 하여 protoplast pellet을 얻었다. 2 ml의 HBM으로 protoplast pellet을 현탁시키고 이중 200  $\mu$ l의 현탁액에 20  $\mu$ l의 2 $\times$ HB, 1  $\mu$ g의 plasmid DNA, 1.8 ml의 40% PEG 6,000을 가하여 상온에서 2분 동안 방치하였다. 10 ml의 HBM을 가하여 PEG 용액을 희석시키고 원심분리(30분, 4°C, 19,000 rpm) 하여 pellet을 얻었다. 이 pellet을 0.4 ml의 HBM에 현탁시키고 100  $\mu$ l씩 DM3 재생배지에 도말하여 37°C에서 전배양하였다. EM(10  $\mu$ g/ml)을 함유하는 HB/TSB (2 $\times$ TSA(Tryptic soy broth agar)와 2 $\times$ HB를 동량 섞은 배지) 5 ml를 전배양한 배지위에 부어 굳히고 37°C에서 2~4일간 배양하였다.

**실험결과**

**임상 분리 균주의 MLS계 항생물질에 대한 내성**—EM에 대한 내성균주의 출현빈도는 총 83종의 균주 중 49주(59%)였다. MLS계 항생물질에 대한 내성 표현형은 49종의 내성균주 중에서 14주(17%)가 유도 내성을 보였고 35주(42%)가 본태성내성을 보였다 (Table I).

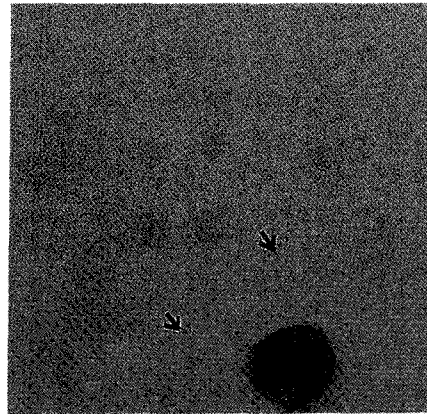
**유도내성 표현형을 갖는 균주의 colony hybridization**—MLS계 항생물질에 대해 유도내성 표현형을 갖는 14주에 대해 *ermA*, *ermC*를 <sup>35</sup>S-dATP로 표지하여 colony hybridization을 실시하였다. 결과 12종의 균주들은 *ermA* 및 *ermC* 유전자에 대해 동질성을 보였으며, 두 probe에 대해 동질성이 없는 *S. aureus*

375와 *S. aureus* 507를 선발하였다(Fig. 1).

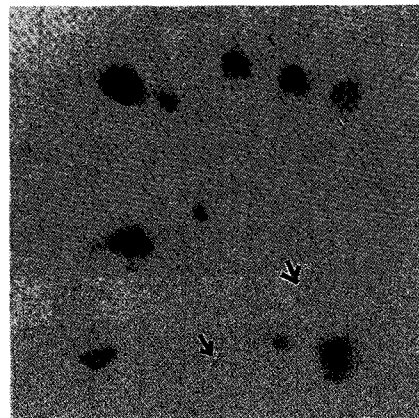
**S. aureus 375 임상 분리 균주로부터 분리된 pla**

**Table I**—MLS phenotypes of clinically isolated *Staphylococcus aureus*

Microorganism (No. of isolates)	No. of isolates with phenotypes		
	MLS resistant Inducible	MLS Constitutive	MLS susceptible
<i>S. aureus</i> (83)	14(17%)	35(42%)	34(41%)



**A**

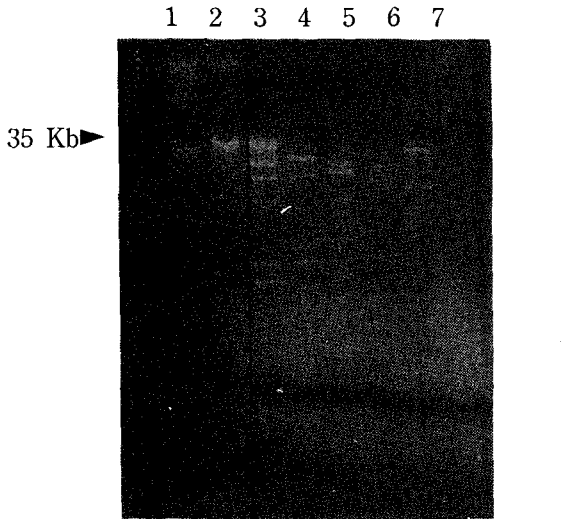


**B**

**Fig. 1**—Colony hybridization of *S. aureus* with MLS inducible phenotype.

(A) Autoradiograph probed by <sup>35</sup>S-labelled *ermA*

(B) Autoradiograph probed by <sup>35</sup>S-labelled *ermC*



**Fig. 2**—*S. aureus* 375 plasmid DNA digested with various restriction enzymes  
 lane 1: original *S. aureus* 375 plasmid  
 lane 2: *S. aureus* 375 plasmid digested with *Bam*HI  
 lane 3: lambda DNA digested with *Hind*III (size marker)  
 lane 4: *S. aureus* 375 plasmid digested with *Eco*R I  
 lane 5: *S. aureus* 375 plasmid digested with *Nde* I  
 lane 6: lambda DNA digested with *Bst*EII(size marker)  
 lane 7: *S. aureus* 375 plasmid digested with *Pst*I

**smid의 특징**—Lysis broth를 이용한 변형된 Elliker 법으로 *S. aureus* 375 균주에 plasmid가 존재함을 확인하였다. *S. aureus* 375에서 분리한 plasmid를 *Bam*HI, *Eco*RI, *Nde*I, *Pst*I 등의 제한효소로 절단하고 1% aarose gel에 전기영동하여 그 절단된 형태를 확인하였을 때 그 크기는 약 35 Kb 정도였다(Fig. 2).

**Southern hybridization**—*S. aureus* 375로부터 분리한 plasmid를 *Bam*HI으로 완전 절단하고 또한 *S. aureus* 375와 *S. aureus* 507로부터 분리한 total DNA를 *Bcl*I으로 완전 절단하여 이용하였다. *ermA*와 *ermC*를 probe로 한 Southern hybridization을 통해 동질성이 없음을 확인하였고 C panel의 band는 background로 판정하였다(Fig. 3). *Streptococcus sanguis*에서 분리한 *ermAM*을 probe로 하여 Southern

hybridization을 실시하였을때 동질성이 없음을 확인하였다(Fig. 4).

**속주세포로의 형질전환**—*S. aureus* 375에서 분리한 plasmid를 이용하여 *B. subtilis* BR151을 형질전환시킨 결과 EM에 내성인 형질전환체를 얻을 수 없었다. *S. aureus* RN4220을 protoplast 상태로 하여 *S. aureus* 375에서 분리한 plasmid로 형질전환시켰으나 형질전환체가 생성되지 않았다.

**고 찰**

최근 한국에서 분리한 *S. aureus* 임상 분리 균주 83종 중 49종의 균주가 erythromycin(EM)에 내성임을 확인하였다. 이 49종 중 14종은 일단 EM에 접촉한 후에는 다른 macrolide, lincosamide, streptogramin B(MLS)계 항생물질에 대해서도 내성이 유도됨을 확인하였다. 즉 14환계 macrolide계 항생물질인 EM에 의해 내성이 유도되어 16환계 macrolide계 항생물질인 CHAL, KIT, TYL뿐만 아니라 lincosamide계 항생물질인 CLN에 대해서도 내성이 나타남을 확인하였다. 이러한 유도 내성의 조절은 세균의 23S rRNA의 변화에 기인하는 것으로 밝혀져 있다. 본 연구에서는 이미 *S. aureus*에서 분리된 MLS 내성 유전자인 *ermA*와 *ermC*를 probe로 colony hybridization을 실시하여 지금까지 보고된 MLS 내성 유전자들과 동질성이 없는 *S. aureus* 375와 *S. aureus* 507를 최종 선발하였고 이는 MLS계 항생물질에 대한 새로운 유도 내성 유전자를 가질 것으로 기대되어 더욱 연구를 진행하였다. *ermA*, *ermC*와 더불어 *S. sanguis*에서 분리된 MLS 내성 유전자인 *ermAM*을 probe로 Southern hybridization을 실시한 결과 위 probe들에 동질성이 없음을 확인되었다.

*S. aureus* 375에서는 plasmid가 존재함을 확인하였으며 *S. aureus* 507에는 plasmid가 없는 것으로 추정된다. *S. aureus* 375에서 분리된 plasmid는 *Eco*RI, *Bam*HI, *Nde*I, *Pst*I, *Bcl*I, *Bgl*I 등의 제한효소로 절단되며 그 크기는 약 35 Kb 정도이다. MLS 내성 유전자가 plasmid상에 존재하는지를 알아 보기 위해 *S. aureus* 375로부터 분리된 plasmid를 이용하여 *Bacillus subtilis* BR151과 *S. aureus* RN4220의 형질전환을 시도한 결과, 이 plasmid 상에는 MLS 내성 유전자가 존재하지 않는 것으로 추정되었다.

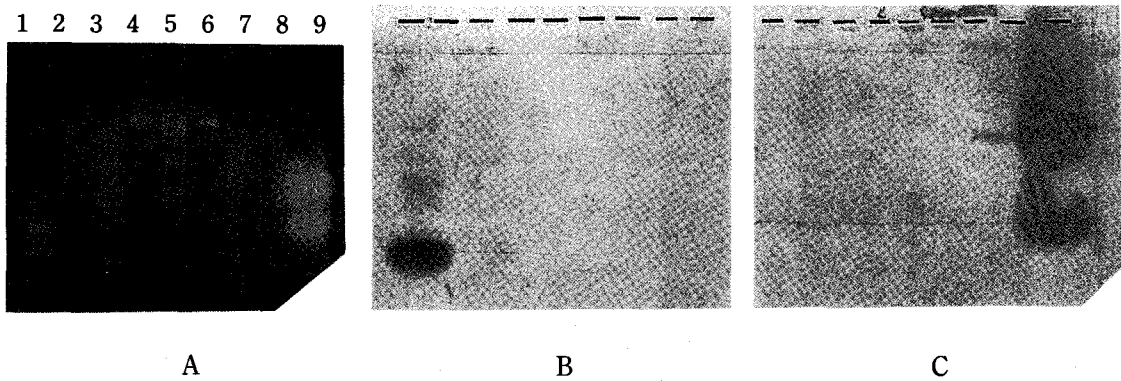


Fig. 3—Southern hybridization of DNA prepared from *S. aureus* 375 and *S. aureus* 507 probed by  $^{35}\text{S}$ -labelled *ermA* and *ermC*

(A) 1% agarose gel electrophoresis pattern

- lane 1: pE194 digested with *TaqI*(*ermC*-positive control)
- lane 2: *S. aureus* 507 total DNA digested with *BclI*
- lane 3: *S. aureus* 375 total DNA digested with *BclI*
- lane 4: *S. aureus* 375 plasmid DNA digested with *BamHI*
- lane 5: lambda DNA digested with *HindIII*(size marker)
- lane 6: *S. aureus* 375 plasmid DNA digested with *BamHI*
- lane 7: *S. aureus* 375 total DNA digested with *BclI*
- lane 8: *S. aureus* 507 total DNA digested with *BclI*
- lane 9: pLS200 digested with *EcoRI*(*ermA*-positive control)

(B) Autoradiograph of southern hybridization probed by *ermC*

(C) Autoradiograph of southern hybridization probed by *ermA*.

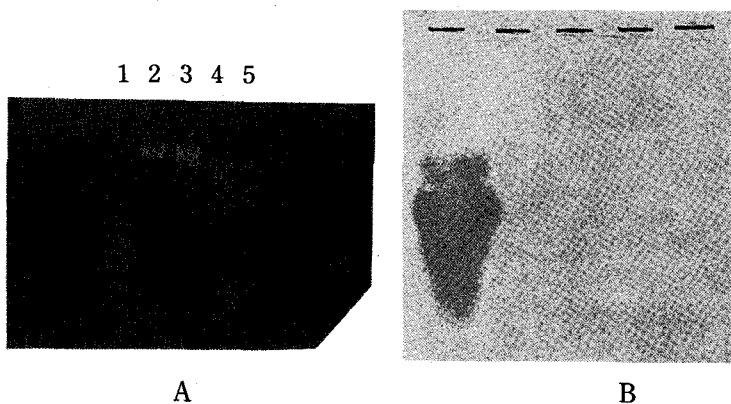


Fig. 4—Southern hybridization of DNA prepared from *S. aureus* 375 and *S. aureus* 507 probed by  $^{35}\text{S}$ -labelled *ermAM*

(A) 1% agarose gel electrophoresis pattern

- lane 1: pAM 77 digested with *DdeI*(*ermAM*-positive control)
- lane 2: *S. aureus* 375 plasmid DNA digested with *BamHI*
- lane 3: lambda DNA digested with *HindIII*(size marker)
- lane 4: *S. aureus* 375 total DNA digested with *BclI*
- lane 5: *S. aureus* 507 total DNA digested with *BclI*

(B) Autoradiograph of southern hybridization probed by *ermAM*

이로써 선발된 두 균주는 지금까지 발견된 MLS 내성 유전자와는 다른 새로운 유전자를 가지며, 유전자 발현 조절에 관한 새로운 정보를 가질것으로 기대된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발 연구 센터 (한국과학재단)의 지원과 92년도 보건사회부의 신약 개발 지원 연구사업의 지원에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사드립니다.

### 문 헌

- 1) Pestka, S.: Inhibitors of protein synthesis, in molecular mechanisms of protein biosynthesis, Weissbach, H. and Pestka, S., Eds., Academic Press, New York, **467**, 99 (1977).
- 2) Jenssen, W. D., Thakker-Varia, S., Dubin, D. T. and Weinstein, M. P.: Prevalence of MLS resistance and *erm* gene classes among clinical strains of *Staphylococci* and *Streptococci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 883 (1987).
- 3) Leclercq, R. and Courvalin, P.: Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1273 (1991).
- 4) Wittmann, H. G., Stoffler, G., Apirion, D., Rosen, L., Tanaka, K., Tamaki, M., Takata, R., Dekio, S., Otaka, E. and Osawa, S.: Biochemical and genetic studies on two different types of erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli* with altered ribosomal proteins. *Mol. Gen. Genet.* **127**, 175 (1973).
- 5) Tipper, D. J., Johnson, C. W., Ginther, C. L., Leighton, T. and Wittmann, H. G.: Erythromycin resistant mutations in *Bacillus subtilis* cause temperature sensitive sporulation. *Mol. Gen. Genet.* **150**, 147 (1977).
- 6) Horinouchi, S. and Weisblum, B.: Post-transcriptional modification of RNA conformation: mechanism that regulates erythromycin-induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **7**, 7079 (1980).
- 7) Horinouchi, S., Byeon, W. H. and Weisblum, B.: A complex attenuator regulates inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics in *Streptococcus sanguis*. *J. Bacteriol.* **154**, 1252 (1983).
- 8) Murphy, E.: Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **162**, 633 (1985).
- 9) Horinouchi, S. and Weisblum, B.: Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**, 804 (1982).
- 10) Benton, W. D. and R. W. Davis: Screening  $\lambda$ gt recombinant colonies by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180 (1977).
- 11) Anderson, D. G. and McKay, L. L.: Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic *Streptococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 549 (1983).
- 12) Southern, E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **93**, 503 (1975).
- 13) Bensi, G., Iglesias, A., Canosi, U. and Trautner, A.: Plasmid transformation in *B. subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* **184**, 400 (1981).
- 14) Chang, S. and Cohen, S. M.: High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**, 111 (1979).
- 15) Lindberg, M., Sjostrom, J. E. and Johansson, T.: Transformation of chromosomal and plasmid characters in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **109**, 844 (1972).