

## 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K의 기질 특이성

김숙경 · 오태권 · 백문창 · 김병각 · 최응칠\*

서울대학교 약학대학

(Received July 16, 1997)

### Substrate Specificity of the Macrolide-Phosphotransferase K

Sook-Kyung Kim, Tae-Gwon Oh, Moon-Chang Baek,  
Byong-Kak Kim and Eung-Chil Choi\*

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

**Abstract**—The MICs of various macrolide, lincosamide and streptogramin B antibiotics against highly erythromycin-resistant *Escherichia coli* 209K strain were evaluated. *E. coli* 209K showed high MICs against 14-membered macrolides and the relatively weaker resistance to 16-membered macrolides, lincosamides and streptogramin B. The macrolide-phosphotransferase K from *E. coli* 209K showed greater substrate specificity to the 14-membered macrolide antibiotics than to the 16-membered macrolide antibiotics, lincosamide and streptogramin B. Therefore, it was considered that the high resistance was due to the macrolide-phosphotransferase K.

**Keywords** □ *E. coli* 209K, MIC, macrolide-phosphotransferase K, substrate specificity.

마크로라이드계 항생물질은 중범위 항생제로써 주로 그람 양성 세균에 기인하는 상기도 감염증의 치료에 널리 사용되며 최근에는  $\beta$ -lactam계 항생물질에 내성인 *Mycoplasma*, *Legionella*, *Chlamydia*, *Campylobacter*, *Bordetella* 균주 등의 그람 음성 세균들에도 강한 항균작용을 나타내고 있다.<sup>1)</sup> 이러한 마크로라이드계 항생물질에 대한 세균의 내성 기전에는 항생제의 작용 부위를 변화시켜 항생제가 작용 부위에 결합하지 못하도록 하는 것과<sup>2)</sup> 여러 가지 수식화 효소에 의한 항생물질 자체의 불활성화<sup>3)</sup>, 항생물질이 세포내로 투과되는 것을 막거나, 일단 세포내로 들어온 항생제의 active efflux system 등<sup>4)</sup>이 있다.

최근에 임상으로 부터 erythromycin (EM)에 대해 높은 내성 (MIC : 1,000  $\mu$ g/ml)을 나타내는 *Escherichia coli* 들이 많이 분리되고 있는데 이들의 내성 기전은 주로 마크로라이드계 항생제를 직접 불활성화시키

는 효소를 생성하는 것으로 erythromycin esterase를 생성하는 경우와<sup>5)</sup> 마크로라이드-포스포트랜스페라제를 생성하는 균주들이 보고되어 있다.<sup>6)</sup> 이러한 그람 음성 세균에서 높은 내성을 나타내게 하는 내성 인자가 EM에 감수성인 그람 양성 세균에 전달되어 그람 양성 세균에서도 발현될 수 있는 가능성이 높으므로 이들의 내성 기전에 관한 연구는 매우 중요하다고 할 수 있다.

본 연구실에서는 EM으로 대표되는 마크로라이드계 항생제에 대해 높은 내성을 나타내는 특성을 지니는 서울 대학 병원에서 임상 분리된 균주인 *E. coli* 209K 균주를 대상으로 이러한 높은 내성을 유발하는 것이 유전자 *mphK*에 의한 것임을 내성 유전자의 클로닝을 통하여 확인하였다.<sup>7)</sup> 또한 유전자 산물인 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K를 다량 분리·정제하여 여러 가지 생화학적 특성을 규명한 바 있다.<sup>8)</sup>

본 연구에서는 다양한 종류의 마크로라이드, 린코사마이드, 스트렙토그라민 B계 항생물질을 대상으로 *E. coli* 209K 균주의 MIC와 기질 특이성을 비교하여 그

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802

내성 기전을 보다 명확히 이해하였으므로 이를 보고하는 바이다.

**실험방법**

**최소저지농도 (MIC)의 측정** - 항생제로는 erythromycin(EM), oleandomycin(OM), clarithromycin(CAM), kitasamycin, tylosin, josamycin, rokita-mycin, clindamycin, lincomycin, mikamycin 등을 사용하였으며 Mueller-Hinton 배지에 전 배양한 균액을 10<sup>6</sup> cfu/ml로 희석하여 2-fold 액체 희석법으로 MIC를 측정하였다. 37°C에서 18 시간 배양한 후 균의 성장을 관찰할 수 없는 최소 농도를 MIC로 하였다.

**기질 특이성** - Kono 등의 방법<sup>9)</sup>으로 조효소액을 분리하여 효소 활성을 측정하였다. *E. coli* 209K 균주를 37°C에서 100 µg/ml의 EM을 함유하는 200 ml의 LB 배지에서 낮은 대수기까지 진탕 배양하였다. 균체를 수확한 후 TMK 완충용액 (0.06 M KCl, 0.01 M magnesium acetate, 0.006 M 2-mercaptoethanol in 0.1 M tris · HCl buffer (pH 7.8))로 세척한 뒤 동일한 완충용액 10 ml에 현탁하였다. 균체를 초음파 분쇄기 (Branson sonifier 450 : 20 kc. 5 분)로 분쇄한 뒤 4°C, 22,000×g에서 30 분간 원심분리하여 균 파편을 제거하고 남은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 200 µl의 40 mM ATP, 25 µl의 항생물질 (1 mg/ml) 과 775 µl의 TMK 완충용액에 현탁된 조효소액을 잘 섞고 37°C 에서 1 시간 반응시키고 100°C에서 3 분간 끓여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 20 µl를 종이 디스크에 loading 하여 남아있는 항생제의 역가를 역가 검정용 균주인 *Bacillus subtilis* ATCC 6633을 대상으로 하여 microbioassay를 통해 결정하였다.<sup>8)</sup>

**실험결과 및 고찰**

Table I에 다양한 종류의 항생제에 대한 MIC를 나타내었다. 그 결과 이 균주는 마크로라이드, 린코사마이드, 스트렙토그라민 B계 항생물질 모두에 대해 내성인 것으로 나타났는데, 특히 14 환계 마크로라이드인 EM, oleandomycin, clarithromycin에 대하여는 MIC가 1,600 µg/ml 이상으로 상당히 높은 내성을 나타내었다.

동일한 항생제들을 기질로 하여 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K의 기질 특이성을 측정한 결과

**Table I**— Minimal inhibition concentrations of various macrolide, lincosamide, streptogramin antibiotics against *E. coli* 209K

Antibiotics	MIC (µg/ml)
Erythromycin	>1,600
Oleandomycin	>1,600
Clarithromycin	>1,600
Kitasamycin	200
Tylosin	400
Josamycin	200
Rokitamycin	400
Clindamycin	400
Lincosamycin	200
Mikamycin	400

**Table II**— Substrate specificity of the purified macrolide-phosphotransferase K

Antibiotics	Substrate specificity (%)	
14-Membered macrolide	Erythromycin	100 <sup>a</sup>
	Oleandomycin	104
	Clarithromycin	85
16-Membered macrolide	Leucomycin	27
	Tylosin	3
	Josamycin	5
	Rokitamycin	26
Lincosamide	Clindamycin	0
	Lincomycin	0
Streptogramin B	Mikamycin	0

<sup>a</sup> The relative activity of MPH(K) was calculated from the size of growth inhibition zone when the substrate was used.

Table II와 같은 결과를 나타내었다. 그 결과 14 환계 macrolide 항생물질인 EM, OM, CAM에 대해서는 상당히 높은 활성도를 나타내는 반면 16 환계 마크로라이드계 항생물질에 대해서는 상대적으로 낮은 활성도를 나타내었고, 린코사마이드나 스트렙토그라민 B계 항생물질에 대해서는 거의 활성을 보이지 않았다. 이러한 기질 특이성을 MIC 결과와 비교하여 보면 14 환계 마크로라이드에 대한 높은 MIC와 높은 기질 특이성은 잘 일치하였다. 따라서 MIC가 1,600 µg/ml 이상인 상당히 높은 내성을 나타내는 인자는 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K의 활성에 의한 것임이 확인되었다.

한편 16 환계 마크로라이드, 린코사마이드, 스트렙토그라민 B계 항생물질에 대한 효소 활성은 낮거나 거의 나타나지 않았는데 MIC는 200~400 µg/ml로 중등의 내성을 나타내었다. 이는 그람 음성 세균이 그람 양성 세균과 달리, 세포벽에 lipopolysaccharide와 단백질로 구성된 외막을 지니고 있어, 마크로라이드계 등의 항

생물질이 잘 투과되지 못해 나타나는 내인적 내성에 기인하는 것으로 사료된다.<sup>10)</sup>

이와 같이 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K가 14 환계 마크로라이드에만 특이적으로 강한 효소 활성을 나타내는 것으로 보아 이 효소의 활성 부위가 lactone ring의 구조, 크기, 치환기등을 인식하리라 추정되며, 이런 특성을 활용하여 임상에서 분리된 균주들의 여러 마크로라이드에 대한 MIC를 측정하여 14 환에만 특이적으로 높은 MIC를 나타내는 균주는 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K를 지니리라 판단할 수 있을 것이다.

특히 본 연구자가 클로닝한 *mphK* 유전자의 염기 조성 중 G+C(%) 비율이 65%로써 상당히 높게 나타났다.<sup>7)</sup> 이는 대부분의 *E. coli* 유전자들이 48~52%인 것에 비해 상당한 차이를 나타내는 것이므로 *mphK* 유전자가 본래부터 *E. coli*에서 유래한 유전자가 아니라고 추정할 수 있다. 즉, *mphK* 유전자는 *Streptomyces*와 같은 EM 생성 균주에서 유래하여 transposition 등의 방법으로 *E. coli* 209K 내로 도입되었으리라 추정할 수 있다. 또한 최근에 그람 음성 세균에 존재하는 erythromycin esterase가 그람 양성 세균인 *St. aureus*로 전달되어 발현된 보고가 있으므로<sup>11)</sup>, *mphK* 유전자 역시 그람 음성 세균 뿐 만 아니라 그람 양성 세균에도 널리 퍼질 가능성이 크다고 할 수 있으므로 이상과 같은 연구를 통해 내성 기전을 잘 이해하는 것은 내성을 예방하거나, 이러한 내성 인자를 피할 수 있는 새로운 항생제의 유도체를 만드는 데 큰 도움을 줄 수 있을 것이다.

### 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 (신의약품 개발 연구센터) 지원과 서울 대학교 발전 기금 포철 학술 연구비 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) Malmberg, A. S. : The renaissance of erythromycin. *J. Antimicrob. Chemother.* **18**, 293 (1986).
- 2) Leclerq, R. and Courvalin, P. : Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics by target modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1267 (1991).
- 3) Leclerq, R. and Courvalin, P. : Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin B antibiotics in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1273 (1991).
- 4) Goldman, R. C. and Capobianco, J. O. : Role of an energy-dependent efflux pump in plasmid pNE24 mediated resistance to 14- and 15-membered macrolides in *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1973 (1990).
- 5) Ounissi, H. and Courvalin, P. : Nucleotide sequence of the gene *ereA* encoding the erythromycin esterase in *Escherichia coli*. *Gene* **35**, 271 (1985).
- 6) O'Hara, K., Kanda, T. and Kono, M. : Structure of a phosphorylated derivative of oleandomycin obtained by reaction of oleandomycin with an extract of an erythromycin resistant strain of *Escherichia coli*. *J. Antibiot.* **41**, 823 (1988).
- 7) Kim, S. K., Baek, M. C., Choi, S. S., Kim, B. K. and Choi, E. C. : Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Escherichia coli mphK* gene encoding macrolide-phosphotransferase K. *Mol. Cells* **6**, 153 (1996).
- 8) 김숙경, 오태권, 백문창, 홍중수, 김병각, 최응칠 : 에리스로마이신 높은 내성 대장균 209K 유래 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K의 정제 및 특성. *약학회지* **41**, 359 (1997).
- 9) Kono, M., O'Hara, K., Sato, K. and Ohmiya, K. : Simple assay for determining streptomycin inactivation with intact cells of bacteria and its applications to *P. aeruginosa* clinically isolated. *Chemotherapy* **34**, 281 (1986).
- 10) Andremont, A., Sancho-Garnier, H. and Tancrede, C. : Epidemiology of intestinal colonization by members of the family Enterobacteriaceae highly resistant to erythromycin in a hematology-oncology unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* **29**, 1104 (1986).
- 11) Wondrack, L., Massa, M., Yang, B. V. and Sutcliffe, J. : Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 992 (1996).