

## 에리스로마이신 고도내성 대장균 209K 유래 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K의 정제 및 특성

김숙경 · 오태권 · 백문창 · 홍종수 · 김병각 · 최웅칠\*

서울대학교 약학대학

(Received March 14, 1997)

### The Purification and Characterization of Macrolide- Phosphotransferase K of *Escherichia coli* 209K Highly Resistant to Erythromycin

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

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

**Abstract**—Resistance gene *mphK* was cloned from *Escherichia coli* 209K strain which is highly resistant to erythromycin (EM). By using the cloned plasmid pGE64, *E. coli* NM522 was transformed. The comparison of macrolide-phosphotransferase K [MPH(K)] activity between *E. coli* 209K and *E. coli* NM522 (pGE64) showed that the total enzyme activity of NM522 (pGE64) was fifty-fold higher than that of 209K. To identify characteristics of MPH(K) more precisely, MPH(K) was isolated and purified from the NM522 (pGE64). The final purification of MPH(K) through several stages of purification process was 89 fold and the overall recovery was 11%. This enzyme was monomer with the molecular weight of 34 kDa and its isoelectric point (pI) was 5.0. The optimal pH and temperature for activity were 8.0 and 40°C, respectively.

**keywords** □ erythromycin (EM), highly resistant strain, *E. coli* 209K, *mphK*, cloning, transformation, macrolide-phosphotransferase K.

Erythromycin (EM)으로 대표되는 마크로라이드계 항생물질은 주로 그람 양성 세균인, *Staphylococcus* 속 세균이나 *Streptococcus* 속 세균등에 항균작용을 나타내어, 이들 세균에 기인하는 급성 호흡기 감염증이나 피부 감염증의 치료에 널리 사용되는 중요한 항생제이다. 특히 최근에는  $\beta$ -lactam계 항생물질이 무효하거나 작용이 약한 *Mycoplasma*, *Legionella*, *Chlamydia* 등의 그람 음성 세균 감염증에 EM이 제1차 선택약으로 여겨지고 있고<sup>1-3)</sup>, 세균성 위·장관염의 주요 원인균인 *Campylobacter*와 호흡기 질환의 환자로 부터 분리되는 *Bordetella* 균주 등도 그 대부분이 EM 등에 대해

감수성인 것으로 나타나 그 유용성이 재인식되고 있는 항생물질이다.<sup>4,5)</sup> 이러한 마크로라이드계 항생물질에 대한 세균의 내성 기전에는 항생제의 작용 부위를 변화시켜 항생제가 작용 부위에 결합하지 못하도록 하는 *erm* 유전자들에 의한 것<sup>6,7)</sup>, 여러 가지 수식화 효소에 의한 항생물질 자체의 불활성화<sup>8,9)</sup>, 항생물질이 세포내로 투과되는 것을 막거나, 일단 세포내로 들어온 항생제의 능동배출(active efflux system) 등이 있다.<sup>10)</sup>

한편 그람 음성 세균은 그람 양성 세균과 달리, 세포벽에 lipopolysaccharide와 단백질로 구성된 외막을 지니고 있어, 마크로라이드계 항생물질이 잘 투과되지 못해, 본래부터 낮은 농도의 EM (2<MIC<250  $\mu$ g/ml) 등에 대해 내성을 지니고 있어<sup>11)</sup>, 그 내성 기전에 관한 연구가 활발하지 못하였다. 하지만 최근 임상으로부터

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-880-7874 (팩스) 02-886-5802

MIC가 1,000  $\mu\text{g/ml}$  이상인, 상당히 높은 내성을 나타내는 그람 음성 세균들이 많이 분리되고 있으며<sup>12, 13)</sup>, 이들 그람 음성 세균에서 높은 내성을 나타내게 하는 내성 인자가 EM에 감수성인 그람 양성 세균에 전달되어 그람 양성 세균에서도 발현될 수 있는 가능성이 높으므로 본 연구자는 이들의 내성 기전에 관한 연구를 수행하여 왔다. 본 연구의 대상균 주인 *E. coli* 209K 균주는 서울 대학 병원에서 임상 분리된 균주로서, EM으로 대표되는 마크로라이드계 항생제에 대해 높은 내성을 나타내며 이 내성 기전은 유전자 *mphK*에 의해 마크로라이드계 항생물질이 인산화되어 더 이상 항균작용을 나타내지 못하게 되는 것으로 밝혀졌다.<sup>4)</sup>

본 연구에서는 EM에 내성인 임상 분리 균주 *E. coli* 209K에서 유래한 내성 유전자 *mphK*로 형질전환된 *E. coli* NM522 균주로부터 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K를 다량 분리·정제하여 그 특성을 규명하였다.

## 시약 및 재료

사용 벡터 pGEM-3ZF(+)는 Promega사(Madison, WI)의 제품, cellulose 튜브와 centriprep 10은 각각 Viskose사(Chicago, IL)와 Amicon사(Beverly, MA)의 것을 사용하였으며, DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100, Sephadex G-75 superfine은 Pharmacia사(Upsala, Sweden)의 제품을 사용하였다. isoelectric focusing gel에 사용한 acrylamide/bis (30:0.8) 용액, ampholytes (pH 4-9), TEMED 및 EM 등은 Sigma사(St. Louise, MO)의 것을 사용하였다.

## 실험방법

### *E. coli* NM522 균주의 형질전환

*mphK*에 의해 code되는 유전자 산물인 마크로라이드-포스포트랜스페라제 K(macrolide-phosphotransferase K, MPH(K))를 다량 생산하기 위하여, 내성 유전자 *mphK*<sup>14)</sup>를 copy number가 큰 pGEM-3ZF(+) vector와 T4 DNA ligase로 ligation하여 재조합 plasmid인 pGE64 (Fig. 1)를 만들고 이를 이용하여 *E. coli* NM522를 형질전환 시켰다.<sup>15)</sup>

### 효소의 활성화

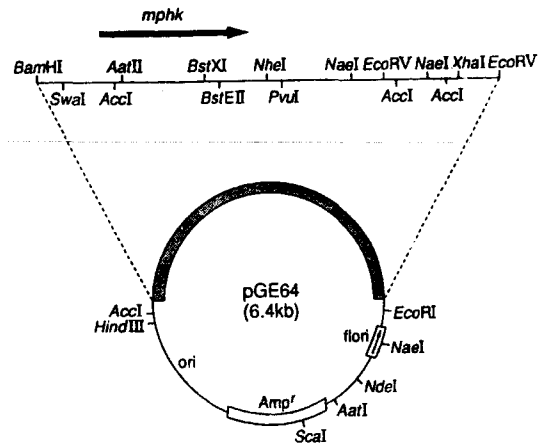


Fig. 1 — Restriction endonuclease map of pGE64 recombinant plasmid

*E. coli* 209K 균주와 *mphK* 유전자가 클로닝된 *E. coli* NM522 (pGE64) 균주로부터 Kono 등의 방법<sup>16)</sup>으로 효소원을 분리하여 효소 활성을 측정하였다. 각각의 균주를 37°C에서 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 EM을 함유하는 200 ml의 LB 배지에서 후반 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 sonicator (Branson sonifier 450:20 kc, 5 분)로 분쇄한 뒤 4°C, 22,000×g에서 30 분간 원심분리하여 균 파편을 제거하고 남은 상등액을 효소원으로 사용하였다.

200  $\mu\text{l}$ 의 40 mM ATP, 25  $\mu\text{l}$ 의 EM (1 mg/ml) 과 775  $\mu\text{l}$ 의 TMK 완충용액에 현탁된 효소원을 잘 섞고 37°C에서 1 시간 반응시키고 100°C에서 3 분간 끓여 반응을 정지시켰다. 반응액 중 20  $\mu\text{l}$ 를 종이 디스크에 흡착하여 남아있는 항생제의 역가를 역가 검정용 균주인 *B. subtilis* ATCC 6633을 대상으로 하여 microbioassay를 통해 결정하였다. MPH(K) 1 unit은 1 시간 동안 1 nmol의 EM을 불활성화 시키는 효소의 양으로 정의하였다.

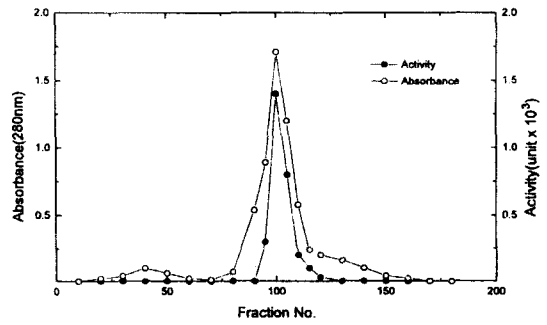
### 효소의 정제

4 l의 *E. coli* NM522 (pGE64) 배양액으로부터 위와 같은 방법으로 얻은 100 ml의 효소원을 cellulose 튜브(seamless cellulose tubing, size 27/32,

Viskose Corp. Chicago, IL)에 넣고 4°C의 TMK 완충용액에서 하룻밤 동안 투석시켰다. 투석시킨 효소원을 centriprep 10 (Amicon, mw/co: 10,000 Da)을 이용하여 30 ml로 농축시켰다. 이 효소원에 대해 4°C에서 DEAE-Sephadex A-50, Sephadex G-100, Sephadex G-75 superfine (Pharmacia) 젤 칼럼 크로마토그래피를 차례로 실시하였다. 칼럼으로 부터의 단백질 용출은 280 nm에서의 흡광도 측정으로 확인하였으며, 단백질 농도는 BSA를 표준물질로 하여 Lowry등의 방법으로 측정하였다.<sup>17)</sup> 또한 각 분획마다 100 µl의 시료를 취하여 항생제의 효소적 불활성화를 측정하여 활성을 나타내는 분획만을 모아 다음 단계의 칼럼 크로마토그래피를 수행하였다. 투석시킨 효소원을 30 ml로 농축하여 TMK 완충용액으로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-50 칼럼 (5×30 cm)에 적용시킨 후 0~0.4 M NaCl (TMK 완충용액)로 용출시켜 MPH(K) 활성을 보이는 분획 (분획당 10 ml씩 : 47~53 번)만을 모아 centriprep-10 (Amicon)으로 10 ml까지 농축시켰다. 이 효소 용액을 TMK 완충용액으로 평형시킨 Sephadex G-100 칼럼 (2.5×70 cm)에 적용시키고 TMK 완충용액으로 용출시켰다. MPH(K) 효소 활성을 보이는 분획 (5 ml씩 : 15~20 번)을 모아 centriprep-10 (Amicon)으로 5 ml까지 농축시켰다. 이를 다시 TMK 완충용액으로 평형시킨 Sephadex G-75 superfine 칼럼 (1.5×70 cm)에 적용시키고 효소 활성을 나타내는 분획을 (1 ml씩 : 100~105 번) 모아 -20°C에 보관하였다. 마지막 단계에서의 효소 활성 profile은 A280 profile과 일치하였다 (Fig 2).

**효소의 특성**

정제된 MPH(K)의 분자량을 측정하기 위하여 Sephadex G-75 superfine gel 여과 크로마토그래피를 실시하였고, 효소 활성도에 대한 온도와 pH의 영향을 살펴보았다. 또한 효소의 isoelectric point (pI)를 결정하기 위해 pH 4~9의 isoelectric focusing gel을 만들어 순수 분리된 MPH(K)를 동량의 2×gel sample 완충용액 (2.4% ampholyte 포함)와 섞어 gel에 loading한 후 150 V에서 30 분간 전기영동 한 뒤, 200 V에서 2.5 시간 동안 일정한 전압으로 focusing하였다. Isoelectric point를 결정하기 위해 pH 3~9의 isoelectric point (pI) marker를 나란히 loading하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 10% trichloroacetic



**Fig. 2** — Sephadex G-75 superfine column chromatography of the macrolide-phosphotransferase K produced by *E. coli* NM522(pGE64). The active fraction from Sephadex G-100 column were concentrated by Centriprep and the concentrated protein was put on a column (1.5×70 cm) equilibrated with TMK buffer and eluted with the same buffer at a flow rate of 20 ml/hr. 1 ml aliquots were collected at each fraction.

acid (TCA)에 10 분간 담근 후 다시 1% TCA용액에 옮겨 2시간 이상 방치하여 ampholytes에 의한 염색 방해가 없도록 한 후 gel을 염색, 탈색, 건조하여 pI를 결정하였다.<sup>18)</sup>

**결과 및 고찰**

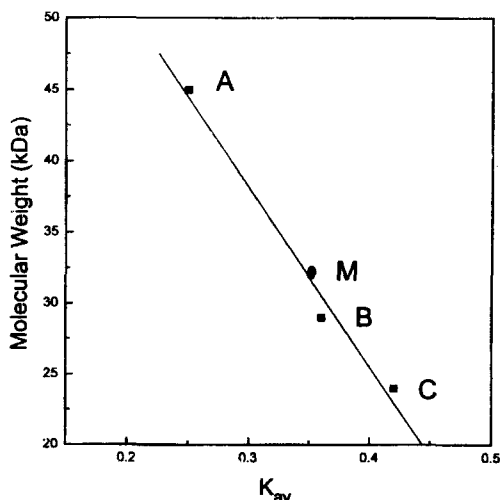
**MPH(K)의 다량 생산과 정제**

*E. coli* 209K 균주와 *E. coli* NM522 (pGE64) 균주를 각각 200 ml씩 배양하여 얻은 세포 내용물 중의 MPH(K)의 효소활성량을 측정한 결과 *E. coli* 209K의 경우는 총효소활성량이 0.07unit이었고 *E. coli* NM522 (pGE64)의 경우는 3.5 unit으로 50 배 가량 많았다. 이상의 결과는 클로닝하기 위하여 사용한 벡터인 pGEM-3Zf(+)의 copy number가 크기 때문에 그로부터 발현되는 MPH(K)의 효소 활성도 높게 나타난 것에 기인하는 것으로 사료된다. 따라서 MPH(K)를 내성 유전자가 클로닝된 균주로 부터 분리하면 50 배 이상 많은 효소를 생산할 수 있어 매우 효율적이라 사료 된다.

*E. coli* NM522(pGE64)를 4L 배양하여 균체를 얻고, 이 균체를 파괴하여 얻은 효소원을 출발로 하여 DEAE-Sephadex A-50 칼럼, Sephadex G-100 칼럼, Sephadex G-75 Superfine 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 MPH(K)를 정제하였다. 각 정제 단계별

**Table I**—Purification of MPH(K) from *E. coli* NM522(pGE64)

Purification step	Enzyme activity ( $\times 10^3$ units)	Specific activity (Units/mg protein)	Recovery (%)	Purification (fold)
Crude extract (dialyzed)	83.5	55.6	100	1
DEAE-Sephadex A-50	41.2	890.2	49.3	16
Sephadex G-100	20.1	1704.1	24.1	30.6
Sephadex G-75 Superfine	9.3	4925.0	11.1	89.2

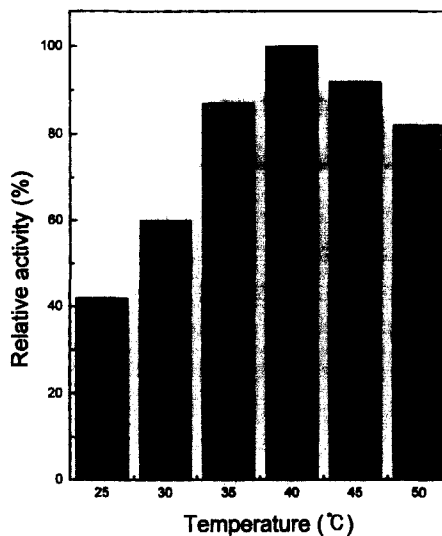
**Fig. 3**—Estimation of molecular weight of MPH(K) by Sephadex G-75 superfine gel permeation chromatography

A: egg albumin (45 kDa), B: carbonic anhydrase (29 kDa)  
C: trypsinogen (24 kDa), M: MPH(K)

총효소활성량과 정제도를 Table I에 나타내었다. MPH(K)의 정제도는 DEAE-Sephadex A-50 칼럼, Sephadex G-100 칼럼 및 Sephadex G-75 Superfine 칼럼 크로마토그래피에 의해 각각 16배, 1.9배, 2.9배로 높아져 결국 89배 정제되어 비교적 우수하게 정제되었다. 한편 MPH(K)의 총효소활성량은 효소원 때를 100%로 하였을 때 각 단계에서 49%, 24%, 및 11%로 되었다. 이러한 효소 정제도와 회수율은 다른 효소의 정제에서 볼 수 있는 것과 거의 같은 것이었다.

#### MPH(K)의 분자량

분리, 정제된 MPH(K)의 분자량을 결정하기 위하여 Sephadex G-75 superfine gel 여과 크로마토그래피를 실시하였다. 표준 단백질로는 trypsinogen (24 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), egg albumin (45 kDa)을 사용하였으며 표준 단백질의  $K_{av}$ 값을 분자량

**Fig. 4**—Effect of the temperature on the MPH(K) activity.

의 상용 대수값에 대하여 회기 곡선을 그려본 결과 효소의 분자량이 약 34 kDa인 것으로 추정되었다 (Fig. 3). 또한 SDS-PAGE에 의해 해당 단백질의 분자량이 약 34 kDa로 추정되었으므로<sup>14)</sup> 분리 정제된 MPH(K)는 약 34 kDa의 단일 subunit로 구성된 monomer인 것으로 확인되었다.

#### MPH(K) 활성에 대한 온도, pH의 영향과 isoelectric point (pI)

25°C부터 50°C까지 온도 조건만을 변화시켜 효소의 활성도를 측정된 결과 40°C가 최적 반응 온도임을 알 수 있었다. 또한 45°C에서도 높은 활성도를 보였으며 50°C에서는 활성이 약 20% 정도로 감소하였다 (Fig. 4). 이러한 점에서 볼 때 이 효소는 비교적 고온에서도 활성을 나타내었으므로 열에는 안정하다고 할 수 있었다. 또한 pH 조건만을 변화시켜 효소의 활성도를 측정한 결과, Fig. 5에서 보여지는 바와 같이 pH 8.0이 최적 pH였다. 또한 냉장 또는 냉동 상태로 효소를 장기간

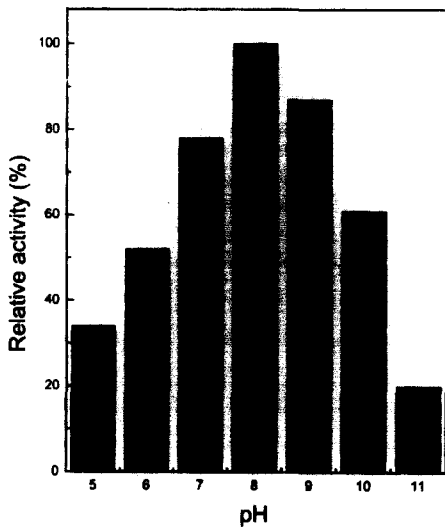


Fig. 5 — Effect of the pH on the MPH(K) activity.

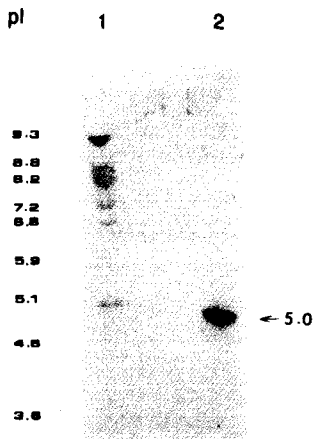


Fig. 6 — Isoelectric focusing gel electrophoresis. (Lane 1) the pI standards including amyloglycosidase (3.6), trypsin inhibitor (4.6), β-lactoglobulin (5.1), carbonic anhydrase II (5.9), myoglobin (6.8, 7.2), lens culinaris lectin (8.2, 8.6, 8.8), trypsinogen(9.3) (Lane 2) the purified MPH(K)

보관시 활성을 유지하는 최적 pH를 알아 보기 위해 pH 조건을 변화시켜 4°C에서 각각 8 시간, 24 시간 방치하였을 때 pH 5 또는 6에서는 활성을 거의 90% 이상 유지하였다. 반면 다른 범위의 pH 조건하에서는 활성이 현저히 저하됨을 알 수 있었다. 따라서 이 효소의 최적 반응 온도는 40°C, pH는 8.0이며 활성 보존에 적합한 pH의 범위는 5~6이었다. 5.5%의 isoelectric focusing gel (pH 3-9)상에서 MPH(K)의 pI를 확인

한 결과 5.0 으로 결정되었다 (Fig. 6). 이러한 pI값은 효소 활성도에 미치는 pH의 영향을 살펴본 연구에서 활성보존에 적합한 pH의 범위가 5-6이었던 것과 비교할 때 이 효소는 자신의 pI 부근에서 안정하다는 것을 알 수 있었다.

결 론

1. *E. coli* 209K 균주와 *E. coli* NM522 (pGE64) MPH(K)의 총효소활성량을 비교한 결과 mphK로 형질전환된 균주의 총효소활성량이 50 배 가량 높게 나타났다.
2. *E. coli* NM522 (pGE64) 균주로부터 MPH(K)를 분리, 정제하여 특성을 살펴본 결과, gel 여과 크로마토그래피를 통해 분자량 34 kDa의 단일 subunit로 구성된 monomer임이 확인되었다. 효소 활성에 미치는 온도와 pH의 영향을 살펴본 결과 활성의 최적 온도는 40°C, 최적 pH는 8.0이었다. 또한 MPH(K)의 pI는 5.0 으로 결정되었다.

감사의 말씀

본 연구는 서울 대학교 발전 기금 포철 학술 연구비와 신의약품 개발 연구센타를 경유한 과학 재단 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Arai, S., Yoshida, K., Izawa, A., Kumagai, K. and Ishida, N. : Effect of antibiotics on growth of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Antibiot.*(A) **19**, 118 (1966).
- 2) Oriel, J. D. and Ridgway, G. L. : Comparison of erythromycin and oxytetracycline in the treatment of cervical infection by *Chlamydia trachomatis*. *J. Infect.* **2**, 259 (1980).
- 3) Weissenburger, D. D., Rappaport, N., Ahlkwalia, M. S., Melvani, R. and Renner, E. D. : Legionnaires disease. *American J. Med.* **69**, 476 (1980).
- 4) Ahonkhai, V., Cherubin, C. E., Sierra, M. F., Bokkenheuser, V. D., Shulman, M. A. and Mosenthal, A. C. : *In vitro* susceptibility of *Cam-*

- pylobacter fetus subsp. jejuni* to N-formimidoyl thienamycin, rosamicin, cefoperazone, and other antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**, 850 (1981).
- 5) Trollfors, B. : Effect of erythromycin and amoxicillin on *Bordetella pertussis* in the nasopharynx. *Infection* **6**, 228 (1978).
  - 6) 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).
  - 7) Murphy, E. : Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **162**, 633 (1985).
  - 8) Arther, M. and Courvalin, P. : Contribution of two different mechanisms to erythromycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**, 694 (1986).
  - 9) 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).
  - 10) 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).
  - 11) Taubeneck, U. : Susceptibility of *Proteus mirabilis* and its stable L-forms to erythromycin and other macrolides. *Nature* **196**, 195 (1962).
  - 12) Barthelemy, P., Autissier, D., Gerbaud, G. and Courvalin, P. : Enzymatic hydrolysis of erythromycin by a strain of *E. coli*: a new mechanism of resistance. *J. Antibiot.* **37**, 1692 (1984).
  - 13) Andreumont, 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).
  - 14) 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).
  - 15) Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. : High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23 (1990).
  - 16) 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).
  - 17) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
  - 18) Robertson, E. F., Dannelly, H. K., Malloy, P. J. and Reeves, H. C. : Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrylamide minigel system. *Anal. Biochem.* **167**, 290 (1987).