

*Bifidobacterium bifidum*에서 리팜피신에 대한 내성기전

정영자* · 박성수* · 백문창 · 김병각 · 최응칠*

*식품의약품안전청 생약규격과, 서울대학교 약학대학

(Received September 24, 1997)

The Mechanism of Resistance to Rifampicin in *Bifidobacterium bifidum*

Young-Ja Chung¹, Seong Soo Park¹, Moon-Chang Baek,
Byong-Kak Kim and Eung-Chil Choi²

¹Department of Natural Medicinals, Korea Food and Drug
Administration, 5 Nockburn-Dong Eunpyong-Ku, Seoul 120-020,
²College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—*Bifidobacterium bifidum* OFR9 that exhibits acquired resistance to rifampicin and fluoroquinolones was selected by MNNG and multi-step mutation method. To investigate the resistance mechanism to rifampicin in the strain, RNA polymerase from *B. bifidum* parent strain and rifampicin-resistance OFR9 was partially purified and its sensitivity to rifampicin was assayed. The profile of RNA polymerase preparation of *B. bifidum* parent and *B. bifidum* OFR9 is similar to that of *E. coli* RNA polymerase that includes the basic subunits of β' , β , σ , α but which are a little different in size when they are compared with *E. coli* RNA polymerase subunits. RNA polymerase isolated from the parent strain was inhibited by 1 $\mu\text{g/ml}$ rifampicin but that from *B. bifidum* OFR9 was not affected by 100 $\mu\text{g/ml}$ concentration of rifampicin. RNA polymerase activity of *B. bifidum* OFR9 was maintained over 90% through that rifampicin concentration. This result is consistent with MIC values of *in vitro* test. It can be concluded that the mechanism of rifampicin resistance in *B. bifidum* OFR9 is due to an alteration of RNA polymerase.

Keywords □ *Bifidobacterium bifidum*, mutation, rifampicin, resistance mechanism, RNA polymerase, MIC.

리팜피신은 RNA polymerase와 결합하여 mRNA의 전사를 방해하는 항결핵제로서 리팜피신에 내성을 나타내는 균들은 RNA polymerase를 인지하는 유전자(*rpoB*)의 일부 제한된 부위에 돌연변이가 발생하기 때문이라고 보고되고 있다. 특히 *E. coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae* 등 주요균들의 리팜피신 내성 획득 기전은 거의 동일하게 RNA polymerase의 β -subunit를 지정하는 *rpoB* 유전자의 missense mutation으로 초래되며, isoniazid, streptomycin, pyrazinamide, ethambutol 등의 약제들도 리팜피신과 유

사한 내성기전을 갖는 것으로 밝혀지고 있다.¹⁻³⁾ 본 연구실에서 이미 보고한 바와 같이 *Bifidobacterium bifidum*을 리팜피신, 오픈록사신등과 같은 항결핵제나 항나병제에 내성을 갖는 균주로 돌연변이시켜 이들 약물을 장기복용하는 환자의 장내질환을 치료 또는 개선시킬 수 있는 정상균주를 개발하고자 리팜피신에 고도의 내성을 갖는 *Bifidobacterium bifidum* OFR9을 선발하였다.⁴⁾ 본 연구에서는 처음으로 자연돌연변이된 *B. bifidum*의 RNA polymerase 구조와 리팜피신 내성기전을 알아보기 위하여 *B. bifidum* 모균주와 내성균주의 RNA polymerase를 분리하고 *E. coli* RNA polymerase의 기본구조인 β , β' , σ , α 각 subunit의 양상과 크기를 비교하였다. 또한 각 리팜피신 농도에서의

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

RNA polymerase 활성억제정도를 비교함으로써 *B. bifidum* OFR9에 대한 리팜피신내성기전이 DNA-dependent RNA polymerase에서 기인함을 규명하였다.

실험방법

실험균주 - 본 실험에서는 일동제약에서 분양받은 *B. bifidum* 모균주와 이 균의 리팜피신 내성균주인 *B. bifidum* OFR9를 사용하였다.⁴⁾

시약 - Acrylamide, bis-acrylamide, agarose 등의 전기영동시약은 Bethesda Research Labs(Gaithersburg, MD, USA)사의 ultra pure 제품을 사용하였다. *E. coli* RNA polymerase, novobiocin은 Boeringer Mannheim(California, USA)사의 제품을 사용하였고 각종 배지는 Difco사의 제품을 사용하였다. (α -³²P) CTP(400 Ci/mmol) 방사능물질은 Amersham의 제품을 사용하였다.

혐기성 배양법 - 본 실험에서 배양시 혐기성 상태 유지를 위하여 Gas Pak Plus(BBL)를 사용하였다. 균을 접종한 시험관 또는 플라스크를 배양조에 넣고, 개봉한 Gas Pak Plus에 증류수 10 ml을 넣은 후, 신속히 배양조의 뚜껑을 닫고 parafilm으로 밀봉하였다. Skim milk에 보관하고 있는 *B. bifidum* 모균주와 그 돌연변이체들은 39°C에서 하룻밤 배양하여 실험에 사용하였고, 2주일마다 계대하여 skim milk broth에 보관하였다.

모균주와 내성 균주의 RNA polymerase의 분리 및 정제

Polyethyleneimine P (PEI) 분획화 - *B. bifidum* 모균주와 내성균주 OFR9를 BL-broth에서 late-log phase까지 배양한 후 균체를 수확하여 혐기성희석배지로 2회 세척하였다. 균체를 lysis buffer(TGED, 0.15 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 130 μ g/ml lysozyme, 1 mM PMSF) 40 ml에 현탁한 후 sonicator를 이용하여 30초 분쇄, 30초 정지를 20회 반복하고, 27,000 \times g로 40분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액에 5% PEI 2.4 ml을 천천히 가하면서 골고루 섞은 후 5,000 \times g에서 15분간 원심분리하여 pellet을 얻었다. 여기에 TGED buffer 9(10 mM tris · HCl (pH 7.8), 20% glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.1 mM PMSF)+0.5 M NaCl을 25 ml가하면서 현탁한 후 5,000 \times g에서 5분간 원심분리

하여 pellet을 취하였다. TED buffer+1M NaCl을 30 ml를 가하여 현탁시키고 5,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 상등액(Polymin P eluate)을 모으는 과정을 2회 반복하였다.

황산암모늄포화 - 위에서 얻은 Polymin P elution 상등액 45 ml에 황산암모늄을 16 g 가하여 완전히 녹인 후 27,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 45% 황산암모늄 용액으로 pellet을 현탁시킨 후, 27,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻고 1 ml의 TE buffer(10 mM tris · HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA)에 녹였다.

Heparin-Sepharose CL-6B 크로마토그래피 - TGED buffer로 평형시킨 heparin-sepharose CL-6B minicolumn(packing volume 10 ml)에 효소 시료를 loading한 후, TGED buffer를 2 ml 흘려서 원하는 효소를 결합시키고, TGED buffer에 NaCl을 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 M의 step gradient로 하여 이를 용출시켰다. 용출 속도는 20 ml/hr이고 각 농도별로 4 ml씩 4°C에서 분획하였다. 각 분획에서 5 μ l의 sample을 취하여 전기영동을 실시하고 RNA polymerase 각 subunit가 뚜렷한 분획을 모아 동량의 storage buffer(10 mM tris · HCl(pH 7.8), 50% glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.15 M NaCl, 10 mM MgCl₂)를 가하여 -20°C에 보관하였다.

단백질정량 - Bradford법⁵⁾을 이용하여 단백질 양을 측정하였다. BSA를 표준물질로 하여 검량선을 작성하였다.

전기영동분석(SDS-PAGE) - 분리된 RNA polymerase에 대한 SDS polyacrylamide gel 전기영동은 변형된 Laemmli 방법에 의해 수행하였다.⁶⁾ 4%의 stacking gel 및 10%의 separating gel로 slab gel을 만든 후 sample을 loading하고 60 V에서 30분, 100 V에서 2시간 정도 전기영동한 후 gel을 staining solution(20% isopropanol, 10% acetic acid, 0.4 g/l Coomassie brilliant blue)에 2시간 담근 후 destaining solution(10% acetic acid, 30% methanol)으로 탈색시켰다. 표준단백질로는 trypsin inhibitor(20 kDa), trypsinogen(24 kDa), glyceraldehyde-3-phosphodehydrogenase(36 kDa), egg albumin(45 kDa), bovine serum albumin(66 kDa)등의 SDS molecular weight markers MW SDS-70L kit(Sigma)와 fructose-6-phosphate kinase(85 kDa), β -galactosidase(116

Table I— Purification of RNA polymerase from *B.bifidum* parent

Step	Protein (mg)	Activity (units)	Specific Activity (unit/mg)	Fold Purification	Yield (%)
Cell extract	248.0	1160.0	3.1	1.0	100
PEI eluate	99.0	472.5	5.0	1.6	40.7
Amm. sulfate ppt	19.8	225.0	11.6	3.7	19.4
Heparin-Sepharose CL-6B eluate	0.4	40.8	102.0	33.0	3.5

* One unit is the enzyme activity that incorporates 1 nmol CMP into an acidprecipitable fraction in 10min at 37°C under the incubation conditions.

Table II— Purification of RNA polymerase from *B.bifidum* OFR9

Step	Protein (mg)	Activity (units)	Specific Activity (unit/mg)	Fold Purification	Yield (%)
Cell extract	192.0	580.0	3.0	1.0	100
PEI eluate	49.5	360.0	7.3	2.4	62.1
Amm. sulfate ppt	11.8	215.0	18.2	6.1	37.1
Heparin-Sepharose CL-6B eluate	0.2	49.3	246.5	82.0	8.5

* One unit is the enzyme activity that incorporates 1 nmol CMP into an acidprecipitable fraction in 10min at 37°C under the incubation conditions.

kDa), α_2 -macroglobulin(170 kDa)를 사용하였다.

모균주와 내성균주의 RNA polymerase 활성비교 -

RNA polymerase assay는 Jendrisak과 Burgess 등의 방법⁷⁾을 변형시켜 실시하였다. 적절량의 효소와 리팜피신을 각 농도 가하고 50 mM tris · HCl(pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.2 mM DTT, 14.3% glycerol, 2 mM MnSO₄, 각 0.16 mM의 ATP, GTP, UTP, 0.16 mM(α -³²P) CTP(4 μ Ci/nmol), 20 μ /ml calf thymus DNA를 반응 혼합액으로하여 37°C에서 10분 간 반응시킨 후 차갑게 식힌 10% TCA 125 μ 를 가하여 얼음 속에 30분간 방치시켰다. Whatman GF/C filter를 이용하여 반응액을 여과한 후, filter를 10 mM pyrophosphate를 함유한 5% TCA 2 ml로 세척하고 충분히 건조시킨 후, scintillation cocktail에 filter를 담가 liquid scintillation counter로 방사능을 측정하고 모균주와 내성균주의 RNA polymerase 활성을 %로 환산하여 비교하였다. 대조로는 *E. coli* RNA polymerase를 사용하여 위와 동일한 조건에서 반응하였고 blank로는 위의 반응 혼합액에 효소를 가하지 않고 실험하였다.

실험결과

모균주와 내성균주의 RNA polymerase의 분리 - 모

균주와 이중내성균주의 각 분리 단계별 단백질 양과 활성을 Table I, II에 나타내었다. Polyethyleneimine elution의 결과 모균주가 41%, 내성균주는 62% 정도 회수되었다. 얻어진 PEI eluate를 황산암모늄으로 50% 되게 포화하여 침전물을 얻었는데, 단백질양은 세포 추출물 단계보다 8.0~6.1%로 감소하였고 활성은 50%로 감소하였다. Heparin-Sepharose CL-6B를 통과시켰을 때 0.2 M NaCl 농도에서 두 균주의 RNA polymerase가 분리되었는데 세포 추출물과 비교시 최종 칼람 통과액의 specific activity는 모균주는 32배, 내성균주는 82배였고, 회수율은 약 3.5%와 8.5%였다. 각 분리단계별 분획으로 RNA polymerase에 대한 SDS-PAGE를 실시한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. PEI 분획 상등액과 PEI를 0.5 M NaCl로 세척한 분획에서는 β' , β subunit 부위 band를 관찰할 수 없었다 (lane B, C). PEI 분획을 1 M NaCl로 elution한 후 황산암모늄 침전 분획을 TE buffer로 녹여 전기영동하였을 때 β' , β subunit를 관찰할 수 있었다(lane D). 모균주와 OFR9의 RNA polymerase(lane E, F)를 *E. coli* RNA polymerase(lane G)와 비교하였을 때, β' subunit(160 kDa)는 크기가 거의 일치하였고, β subunit는 약간 작은 크기인 140~150 kDa으로 추정되었다. *B. bifidum* 모균주와 OFR9균주의 RNA polymerase분획은 비교적 β' 와 β subunit의 band의 구

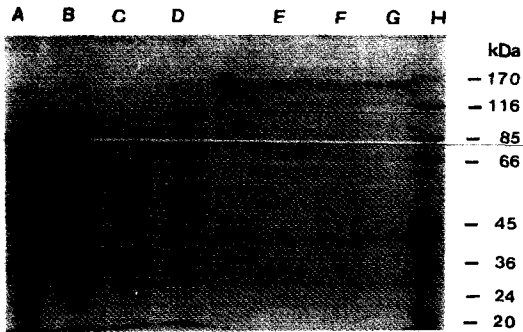


Fig. 1—SDS-PAGE patterns of various fractions of the RNA polymerase purification from *B. bifidum* strains.
 A. Cell extract of OFR9
 B. PEI supernatant of OFR9
 C. PEI wash of OFR9
 D. 0-45% ammonium sulfate ppt. of OFR9
 E. Heparin-Sepharose CL-6B eluate of parent
 F. Heparin-Sepharose CL-6B eluate of OFR9
 G. *E. coli* RNA polymerase
 H. Molecular weight markers

분이 명확하였고 σ factor는 minor protein⁸⁾으로 인해 1개의 뚜렷한 band로 구별할 수는 없었지만 *E. coli*의 σ factor(70 kDa)와 유사한 크기일 것으로 추정할 수 있었다. σ subunit(37 kDa) 역시 *E. coli* 경우와 크기가 유사함을 확인할 수 있었다. Levin등⁹⁾은 *M. smegmatis*의 RNA polymerase를 분리하였을 때, RNA polymerase와 무관한 minor protein이 동시에 분리되어 하나의 σ factor를 명확하게 인지할 수 없었다고 보고하였다. Wiggs등도 여러 균주의 RNA polymerase를 분리하였는데 균주마다 σ subunit의 양이 차이가 난다고 보고하였다. Lowe등은 개선된 분리과정을 개발하고, σ subunit를 분리하여 그 특성을 보고하였다.

리팜피신에 의한 RNA polymerase 활성 억제 - 여러 종의 균주에 있어서 리팜피신은 RNA polymerase 억제제이며, RNA polymerase β -subunit와 복합체를 형성함으로써 세포의 전사개시단계를 방해한다.¹⁰⁾ 내성 돌연변이 균주의 RNA polymerase는 리팜피신과 복합체를 형성하지 않으며, 최근까지 리팜피신 내성 돌연변이의 β -subunit gene(*rpoB*)에 대하여 연구가 진행되고 있다.¹¹⁻¹³⁾ 리팜피신 내성균주에서 분리된 RNA polymerase는 *in vitro*에서 리팜피신에 감소된 감수성을 나타내는데 이것은 리팜피신 내성기전의 하나가 RNA polymerase 변형에 의한 것임을 의미한다. *B.*

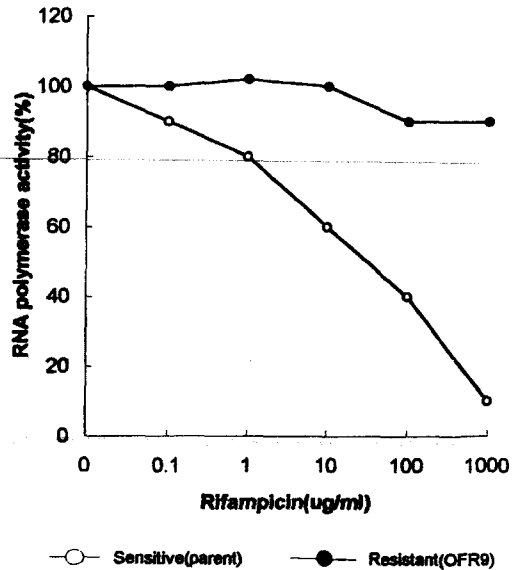


Fig. 2—Effect of rifampicin on RNA polymerase prepared from the parent and resistant strains of *B. bifidum*.

bifidum OFR9의 리팜피신 내성기전을 알아보기 위하여 모균주 및 내성균주의 RNA polymerase를 부분분리 정제하고 실험방법에서 설명한 조건에서 10분간 반응하였을 때, 내성균주에서 분리정제된 RNA polymerase는 리팜피신 100 µg/ml 이상의 농도에서도 RNA합성이 진행되었고 모균주의 RNA polymerase 경우는 1 µg/ml의 농도에서도 반응이 억제되었다(Fig. 2). 이는 Table III의 *in vitro* 상태의 MIC결과와도 일치한다. 이 결과는 *B. bifidum* OFR9의 리팜피신에 대한 주요 내성기전은 RNA polymerase의 변형에 의한 것임을 의미한다. *B. bifidum* OFR9의 RNA polymerase는 변형에 의하여 리팜피신에 대한 감수성이 저하됨으로써 모균주의 RNA polymerase

Table III—Antimicrobial activity of antituberculosis agents against *B. bifidum* strains

Drug	MIC (µg/ml)	
	parent	OFR9
Rifampicin	1	>256
Kanamycin	128	256
Isoniazid	>256	>256
Ethambutol	>256	>256
Pyrazinamide	>256	>256
D-cycloserine	64	64

와는 달리, 100 µg/ml 이상인 고농도의 리팜피신 존재하에서도 (α -³²P) CTP의 incorporation이 진행될 수 있었다. 이는 Linn, Morishita,¹⁴⁾ White¹⁵⁾ 등의 다른 균주에서의 리팜피신 내성기전 연구와도 일치하는 결과이다.

고 찰

항생제에 대한 균의 생화적 기전은 크게 target site의 변화, 세포막 투과성의 변화, 항생제를 불활성화시키는 효소생성으로 나눌 수 있으며,¹⁶⁾ 지금까지 보고된 리팜피신에 대한 내성기전은 리팜피신의 target site인 DNA-dependent RNA polymerase의 β subunit 변화가 중요하며, cell permeability의 변화에 의한 내성이 *Mycobacteria*에서 보고된 예가 있다.¹⁷⁾ *B. bifidum* OFR9이 획득한 리팜피신 내성기전을 알아보기 위해 모균주와 내성균주의 RNA polymerase를 부분분리정제하고 각 리팜피신 농도에서 RNA polymerase 반응을 실시하여 RNA polymerase 활성을 비교하였다. *B. bifidum* 모균주와 OFR9의 RNA polymerase는 많은 연구가 이루어진 *E. coli* RNA polymerase의 기본적인 구조인 β' , β , σ , α 각 subunit의 양상과 일치하였으나, 각 subunit의 크기에는 차이가 있었다. β' subunit는 약 160 kDa으로 *E. coli*와 유사하였고,¹⁸⁾ 140~150 kDa으로 추정되었으며, *Lactobacillus curvatus* RNA polymerase 양상과 유사하였다.¹⁹⁾ σ factor는 minor protein으로 인해 1개의 뚜렷한 밴드로 구별할 수 없었지만 *E. coli*의 factor(85 kDa)와 유사한 크기로 추정된다. α subunit (40 kDa) 역시 *E. coli* 경우와 크기가 유사한 band를 확인하였다. *In vitro*에서 RNA polymerase 활성에 대한 리팜피신의 영향을 비교한 결과, 내성균주의 RNA polymerase는 100 µg/ml 이상의 리팜피신 농도에서도 90%의 활성이 유지되었지만, 모균주의 경우는 1 µg/ml의 농도에서도 반응이 억제되었다. 이는 *in vitro* 때의 MIC 값과도 부합한다. 따라서 *B. bifidum* OFR9의 리팜피신 내성 또한 RNA polymerase에서 기인함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 White 등의 *Mycobacterium smegmatis*¹⁵⁾와 Morishita 등의 *Lactobacillus casei*¹⁴⁾의 RNA polymerase 활성비교 연구에서도 밝혀졌다.

감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발 연구 센터를 통한 한국 과학재단 우수연구 센터 지원금과 보건 복지부의 보건의료기술 연구개발사업의 지원금에 의해 수행된 것으로 지원에 깊이 감사드립니다.

문 헌

- 1) Douglass, J., and Steyn, L. M. : A ribosomal gene mutation in streptomycin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J. Infect. Dis.* **167**, 1505 (1993).
- 2) Honore, N. and Cole, S., T. : Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 414 (1993).
- 3) Sinder, D. E. Jr. and Montagne, J. R. : The neglected global tuberculosis problem: A report of the 1992 world congress on tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **169**, 1189 (1994).
- 4) Chung, Y. J., Kim, S. K. and Choi, E. C. : The effects of *Bifidobacterium bifidum* OFR9, a strain resistant to antituberculosis and antileprosy agents, on fecal flora in mice. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **43**, 61 (1997).
- 5) Lowe, P. A. Hager, D. A. and Burgess, R. R. : Purification and properties of the α subunit of *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase. *Biochem.* **18**, 1344 (1979).
- 6) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
- 7) Linn, T., Losick, R. and Sonenshein, A. L. : Rifampin resistance mutation of *Bacillus subtilis* altering the electrophoretic mobility of the β -subunit of ribonucleic acid polymerase. *J. Bacteriol.* **122**, 1387 (1975).
- 8) Wiggs, J. L., Brush, J. W. and Chamberlin, M. J. : Utilization of promoter and terminator sites on bacteriophage T7 DNA by RNA polymerases from a variety of bacterial orders. *Cell* **16**, 97 (1979).
- 9) Levin, M. E. and Hatfull, G. F. : *Mycobacterium smegmatis* RNA polymerase : DNA supercoiling action to rifampicin and mechanism of rifam-

- picin resistance. *Mol. Microbiol.* **8**, 277 (1993).
- 10) Wehrli, W. : Rifampin : mechanism of action and resistance. *Rev. Infect. Dis.* **5**, S407 (1983).
 - 11) Lisitsyn, N. A., Sverdlov, E. D., Moiseyeva, E. P. and Nikiforov, V. G. : Mutation to rifampicin resistance at the beginning of the RNA polymerase β subunit gene in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **196**, 173 (1984).
 - 12) Miller, L. P., Crawford, J. T. and Shinnick, T. M. : The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 805 (1994).
 - 13) Burgess, R. R. : RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* **25**, 711 (1971).
 - 14) Morishita, T. and Yura, T. : Altered nutritional requirements associated with mutations affecting the structure of ribonucleic acid polymerase in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **125**, 416 (1976).
 - 15) White, R. J., Lancini, G. C. and Silvestri, L. G. : Mechanism of action of rifampin on *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **108**, 737 (1971).
 - 16) Gale, E. F., Cundliffe, E., Richmond, M. H. and Waring, M. J. : *The molecular basis of antibiotic action*, 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd., pp 550-561 (1972).
 - 17) Hui, J., Gordon, N. and Kajiok, R. : Permeability barrier to rifampin in Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **11**, 773 (1977).
 - 18) Tada, M. and Tada, M. : Purification of DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **67**, 139 (1970).
 - 19) Stetter, K. O. and Zillig, W. : Transcription in lactobacillaceae. DNA-dependent RNA polymerase from *Lactobacillus curvatus*. *Eur. J. Biochem.* **48**, 527 (1974).