

황색포도상구균의 테트라사이클린 내성 플라스미드 동정

박정희 · 이재윤 · 문경호[#]

경성대학교 약학대학

(Received May 12, 2008; Revised June 17, 2008)

Characterization of Tetracycline Resistance Plasmids of *Staphylococcus aureus*

Jung Hee Park, Jae Yoon Lee and Kyung Ho Moon[#]

College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

Abstract — Plasmids were isolated from 15 tetracycline (Tc) resistant *S. aureus*. Two small tetracycline resistance plasmids, pKH16 and pKH17, have been isolated from *Staphylococcus aureus* JY10 and *Staphylococcus aureus* JY22, respectively and the complete nucleotide sequences of those plasmids have been determined. pKH16 consisted of 4,442 bp and showed high identity to pKH6 (99% matching percentage) isolated in 1989 from *S. aureus* SA2. pKH17 consisted of 4,441 bp and showed less identity to pKH6 (95% matching percentage) than pKH16. PCR analysis showed that *tetK* and *tetM* did not exist in ten large plasmids isolated from ten Tc resistant *S. aureus*. Twelve Tc resistant *S. aureus* showed resistance both to Tc and Mn and we might analogize that twelve Tc resistant *S. aureus* had *tetM* in their chromosome.

Keywords □ *Staphylococcus aureus*, tetracycline resistant plasmid, PCR, *tetK*, *tetM*, minocycline

테트라사이클린류의 항생제는 아직도 많이 사용되고 있는 항생제 중의 하나이며¹⁾ 그로 인해 내성균주도 고빈도로 발견되고 있다.²⁾ 테트라사이클린류의 항생제는 세균의 30S 리보솜과 결합하여 aminoacyl t-RNA와 리보솜간의 결합을 저해함으로써 단백질 생합성을 억제하는 정균제로 알려져 있다.³⁾ 황색포도상구균에 있어서 Tc 내성 기전은 두 가지로 알려져 있는데 첫째는 플라스미드에 있는 *tetK* 유전자에 의한 항생제 배출에 기인한 것이고⁴⁾ 둘째는 염색체나 플라스미드에 들어 있는 *tetM* 유전자에 의한 리보솜의 보호 작용에 기인한다고 알려져 있는데⁵⁾ 이럴 경우 Tc 뿐 아니라 minocycline(Mn)에도 내성을 보인다. *tetK*를 가지고 있는 플라스미드들은 크기가 4.0~4.5 kb이며 20~50개의 복제수를 가지고 있는데 그 중에서 가장 대표적인 플라스미드는 pT181로 알려져 있으며 이 플라스미드는 1982년 Khan 등에 의해서 처음으로 전체 염기서열이 결정되었으며⁶⁾ 뒤에 수정 보고되었다.⁴⁾ 이들의 보고에 의하면 pT181에는 세 개의 ORF가 존재하며 이들로부터 3 개의 단백질이 생성되는데 그 중에서 RepC

단백질은 플라스미드의 복제에, Pre 단백질은 플라스미드의 재조합에 관여하며 Tet 단백질은 Tc 내성에 관여한다고 알려져 있다. pT181과 유사한 플라스미드들이 여러 나라에서 발견되어 보고되었으며^{7,8)} 한국에서도 pKH6의 염기서열이 보고되었다.⁹⁾ 또한 한국에서는 24.82 kb의 Tc 내성 매개 플라스미드인 pKH1도 보고되었는데 pKH1은 pKH6의 4,011 bp 조각이 IS431mec에 의해서 병합된 형태를 하고 있었다.^{10,11)} Nisin 등은 염색체에 들어 있는 *tetM* 유전자의 염기서열을 결정하여 보고하였다.¹²⁾

저자 등은 부산 소재 위생병원에서 2005년 7월부터 2006년 12월 사이에 수집된 50종의 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 내성 양상을 조사하였는데 그 중에서 15종의 균주가 Tc 내성을 나타내었다.¹³⁾ 이 들 15종 균주의 플라스미드 양상을 조사하였는데 7개의 균주는 크기가 큰 플라스미드를, 2개의 균주는 크기가 작은 플라스미드를, 3개의 균주는 큰 플라스미드와 작은 플라스미드를 모두 가지고 있었으며 그리고 3개의 균주는 아무 플라스미드도 가지고 있지 않았다. 작은 크기의 플라스미드를 가지고 있는 5개의 균주 중에서 3개의 플라스미드는 기능을 알 수 없는 cryptic 플라스미드로 동정 보고되었다.¹⁴⁾ 본 논문에서는 크기가 작은 플라스미드인 pKH16과 pKH17의 전체 염기서열과 특성 그리고 PCR을 통하여 큰 플라스미드에 대한 *tetK*와 *tetM* 유전자

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 051-620-4885 (팩스) 051-620-4804
(E-mail) khmun@ks.ac.kr

Table I - Oligonucleotide primers used in this study

Primer	Sequence (5'-3')	Start bp	Amplicon (kb)	Accession no. ^a
TetK-F	CCTGGAATTACAAACTGGGT	462	1.08	U38428
TetK-R	CCTCCCTACAATTGCTATACC1518	1518		
TetM-F	GGAGCGATTACAGAATTAGG	96	1.78	M21136
TetM-R	CGGGTCTGGCAAACAGGTT	1879		

^aGenBank Accession numbers (www.ncbi.nlm.nih.gov).

의 존재 여부와 이를 통한 내성 기전을 보고하고자한다.

실험 방법

실험군주

부산 소재 위생병원에서 2005년 7월부터 2006년 12월 사이에 수집된 50종의 황색포도상구균 중에서 Tc 내성을 나타내는 15 종의 균주를 선별하여 사용하였다. 염기서열 결정을 위한 재조합 플라스미드의 클로닝 균주로는 *E. coli* JM83(*ara*, Δ (*lac*, *proA*, *B*), *rps*, *strA*, *thi*, ϕ 80dlacZ M15(*rk+*, *mk+*))을 사용하였다.

플라스미드 및 효소

Phagemid인 pBluescriptII KS⁺를 염기서열 결정 벡터로 사용하였으며 여러 가지 제한효소, T4 DNA ligase, 플라스미드 분리를 위한 WizardTM DNA purification systems을 Promega에서 구입하여 사용하였다. PCR 반응을 위한 PCRMix를 제노텍에서 구입하여 사용하였다.

Plasmid 분리

Tc 내성 매개 플라스미드 pKH16을 *S. aureus* JY10으로부터, pKH17을 *S. aureus* JY22로부터 김¹⁵⁾ 등의 방법에 의하여 분리하였으며 *E. coli* JM83의 플라스미드 분리는 alkaline lysis 방법을 사용하였다.¹⁶⁾

클로닝 및 염기서열결정

*S. aureus*로부터 분리된 플라스미드와 클로닝 벡터인 pBluescriptII KS⁺를 동일한 제한효소로 처리한 후 정제하고 T4 DNA ligase를 사용하여 연결한 다음 *E. coli* JM83에 CaCl₂법¹⁶⁾으로 형질전환시켜 염기서열결정에 사용하였다. 염기서열 결정은 마크로젠에 의뢰하여 수행하였다.

염기서열 분석

염기서열을 결정한 다음 염기서열 및 ORF 분석은 NCBI의 BLAST를 이용하여 수행하였다.¹⁷⁾

MIC(Minimum Inhibitory Concentration) 결정

Mn에 대한 MIC는 고체배지계열희석법으로 결정하였다.¹⁸⁾

PCR 분석

*tetK*와 *tetM* 유전자를 확인하기 위하여 Table I에 나와 있는 oligonucleotide primer를 제노텍에 의뢰하여 합성하였다. PCR 반응액(100 μM forward primer 2 μL, 100 μM reverse primer 2 μL, PCRMix 4 μL, DNA template 1 μL, ddw 11 μL)을 다음과 같이 반응시켰다. 95°C에서 5분 동안 전처리하고 주반응(94°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분)을 30회 반복한 다음 72°C에서 5분 처리하여 반응을 완결시키고 1% agarose 젤에서 전기영동하여 PCR 반응 산물을 확인하였다.

실험 결과

플라스미드의 염기서열결정 및 분석

15개의 *S. aureus* 균주들의 플라스미드 양상이 Table II에 나와 있다. 3개의 균주는 플라스미드를 가지고 있지 않았으며 5개의 균주에서 크기가 작은 플라스미드가 분리되었다. 이 중에서 3개의 균주가 가지고 있는 pKH12의 경우는 이미 cryptic 플라스미드로 보고되었으므로¹⁴⁾ *S. aureus* JY10의 pKH16과 *S. aureus* JY22의 pKH17의 염기서열을 결정하고 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 분석하였다. 그 결과 4,442 bp의 pKH16과 4,441 bp의 pKH17은 Tc 내성을 매개하는 플라스미드로 확인되었으며 각각 플라스미드의 염기서열을 NCBI의 GenBank에 EU170347(pKH16)과 EU164802(pKH17)로 등록하였다.

pKH16과 pKH17

Tc 내성을 매개하는 pKH16과 pKH17의 염기서열을 비교한 결과 전체적으로는 두개 모두 pT181^{4,6)} 및 pKH6⁹⁾와 유사한 서열을 가지고 있었다. pKH16은 pKH6 보다 단지 3 bp를 더 가지고 있었으나(Fig. 1) pKH17은 많은 차이를 나타내었다. pKH17

Table II - Plasmids of various *S. aureus*

Plasmid	<i>S. aureus</i> strain
Lp ^a	JY2, 3, 4, 8, 10, 13, 18, 22, 24, 38
pKH12	JY8, 25, 43
pKH16	JY10
pKH17	JY22
none	JY20, 21, 39

^aLarge plasmid.

pKH16	1801	AACGACTTATTAAAAATAAGTCTAGTGTGTTATTAGACTAAACTATTA	1853
pKH6	1801	AACGACTTATTAAAAATAAGTCTAGTGTGTTA--GACTTAAACTATTA	1850

Fig. 1 – Comparative view of the nucleotide sequence of pKH16 and pKH6.

pT181	361	TFAERVNLTEDEPKLNLGLAGNLDDKMNPELYSEQEQQQEQQQKNQKRDRGMHL	413
pKH1		TFAERVNLTEDEPKLNLGLAGNLDDKMNPELYSEQEQQQEQQQKNQKRDRGMHL	
pKH6		TFAERVNLTEDEPKLNLGLAGNLDDKMNPELYSEQEQQQEQQQKNQKRDRGMHL	
pKH16		TFAERVNLTEDEPKLNLGLAGNLDDKMNPELYSEQEQQQEQQQKNQKRDRGMHL	
pKH17		TFAERVNLTEDEPKLNLGLAVHLDDKKNESRII FRTGTATRTTKESKTR	408

Fig. 2 – Comparative view of the Pre protein of Tc resistant plasmids.

Table III – MICs of minocycline of various *S. aureus* strains

Strain	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
JY2, JY10, JY22	<0.5
JY8, JY21, JY25, JY43	8
JY3, JY4, JY13, JY18, JY20, JY24, JY38, JY39	16

은 pKH16보다 전체적으로 한개 적은 염기쌍을 가지고 있었으나 이 차이 외에도 많은 경우의 염기쌍 삽입과 탈락 그리고 염기쌍치환을 나타내었다. 일반적으로 pT181 계열의 플라스미드들은 3개의 단백질을 가지고 있는데 복제에 관여하는 RepC 단백질, Tc 내성을 매개하는 Tet 단백질, 플라스미드 재조합에 관여하는 Pre 단백질이다. pKH17의 경우 위와 같은 많은 차이에도 불구하고 RepC와 Tet 단백질의 아미노산 서열은 100% 동일하였으나 Pre 단백질의 경우에는 381 번째 아미노산부터 서열차이를 보였다(Fig. 2).

PCR 분석

이전에 한국에서 분리된 *S. aureus* SA8의 경우 pKH6¹⁰ 병합된 형태의 크기가 큰 pKH1을 가지고 있었으므로^{10,11)} Table II의 큰 플라스미드들을 대상으로 합성 oligonucleotide를 이용한 PCR 법으로 tetK 유전자를 검색하였으며 아울러 tetM 유전자의 존재 여부도 검색하였다. 그 결과 *S. aureus* SA8에서만 tetK의 반응산물이 만들어졌으나 나머지 플라스미드에서는 tetK와 tetM의 반응산물이 없었다.

Mn에 대한 MIC

Mn에 대한 MIC 값이 Table III에 나와 있다. 3개의 균주에서 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 미만으로 나타났으며 나머지 12개 균주에서는 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 나타났다.

고 찰

Tc 내성을 가지고 있는 작은 플라스미드 2개의 염기서열을 결정하고 분석한 결과 이 플라스미드들은 pT181 및 pKH6

계열임을 확인할 수 있었다. 그 중에서 pKH16은 단지 3개의 염기가 삽입된 형태로 기존의 플라스미드들과 큰 변화가 없었으나 (Fig. 1) pKH17의 경우에는 전체 크기에서는 큰 차이가 없었으나 많은 경우의 삽입 및 탈락 그리고 염기쌍 치환이 발견되었다. 이와 같은 많은 차이에도 불구하고 RepC와 Tet 단백질의 아미노산 서열은 100% 동일하였으나 Pre 단백질의 경우에는 381 번째 아미노산부터 서열차이를 보였다(Fig. 2). 한국에서 동시대에 분리된 pKH16과 pKH17의 서열 분석 결과 pT181 계열의 플라스미드가 한국에서 유전적으로 변이되고 있음을 확인할 수 있었다.

한국에서 pKH6 외에 pKH1도 발견되었는데^{10,11)} 이 플라스미드는 pKH6의 4,011 bp 조각이 IS431mec에 의해서 병합된 형태였다. 본 연구에 사용된 15개의 Tc 내성 균주 중에서 10개의 균주들이 크기가 큰 플라스미드를 가지고 있었으므로(Table II) 이 플라스미드들이 tetK나 tetM 유전자를 가지고 있는지 알아보기 위하여 이 유전자들의 염기서열을 참고로 primer를 합성하고 PCR을 수행하여 반응산물 생성 여부를 확인하였다. 그 결과 10 개의 플라스미드 모두에서 tetK나 tetM 유전자의 반응산물을 확인할 수 없었다.

염색체에서 발견되는 tetM 유전자는 Tc와 Mn 내성을 모두 매개하는 것으로 알려져 있으므로^{5,12)} 염색체에 의한 내성 여부를 확인하기 위하여 Mn에 대한 MIC 값을 결정하였으며 그 결과 12 개의 균주에서 MIC 값이 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상으로 나타났다(Table III). 한편 Warsa¹⁹⁾ 등은 아시아 여러 나라에서 215개의 *Staphylococcus aureus*를 분양받아 Mn에 대한 MIC 값과 tetM 유전자와 연관성을 조사하였는데 MIC 값 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 균주에서 tetM 유전자를 확인하였으며 한국으로부터 분양된 5개의 균주는 모두 tetM 유전자만 가지고 있음을 보고 하였다. 따라서 MIC 값이 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상인 12개의 균주는 Mn 내성과 함께 tetM을 가지고 있음을 유추할 수 있었다. *S. aureus* JY2의 경우에는 내성기전을 확인할 수 없었다.

이상의 연구 결과로부터 한국에서 발견되는 Tc 내성균은 염색체에 tetM을 가지고 있어 Tc와 Mn에 모두 내성을 나타내는 균주가 다수를 차지하고 있음을 유추할 수 있었으며 두개의 균주에서 pT181 계열의 플라스미드를 가지고 있음을 확인할 수 있었는데 그 중에 하나에서 많은 염기서열 변화를 볼 수 있었다.

결 론

Tc 내성을 나타내는 15개의 *S. aureus*의 플라스미드를 분리하고 이 중에서 크기가 작은 플라스미드 pKH16(4,442 bp)과 pKH17(4,441 bp)의 염기서열을 결정하였다. 둘 다 pT181 및 pKH6 계열의 플라스미드로 확인되었으며 pKH16은 3 쌍의 염기가 삽입된 형태로, 반면에 pKH17은 여러 곳에서 염기쌍 치환과 삽입 및 결실이 나타나, 끝부분에서 몇 개의 아미노산이 결실

된 Pre 단백질을 가지고 있었다. PCR 법을 이용하여 크기가 큰 10개의 플라스미드에서 *tetK*와 *tetM*를 조사하여 본 결과 두 유전자가 모두 존재하지 않음을 확인하였다. Mn 내성을 확인한 결과 12개의 군주가 Mn 내성을 나타내 부산에서 분리된 Tc 내성 *S. aureus*의 80%에서 염색체에 존재하는 *tetM* 유전자에 의한 Tc 와 Mn의 교차내성을 유추해 볼 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 2008년도 경성대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- 1) Trzcinski, K., Cooper, B. S., Hrynewicz, W. and Dowson, C. G. : Expression of resistance to tetracyclines in strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 763 (2000).
- 2) Han, L. L., McDougal, L. K., Gorwitz, R. J., Mayer, K. H., Patel, J. B., Sennott, J. M. and Fontana, J. L. : High frequencies of clindamycin and tetracycline resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pulsed-field type USA300 isolates collected at Boston Ambulatory Health Center. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1350 (2007).
- 3) Lyon, B. R. and Skurray, R. : Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic Basis. *Microbiological Reviews* **51**, 88 (1987).
- 4) MoJumdar, M. and Khan, S. : Characterization of the tetracycline resistance gene of plasmid pT181 of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **170**, 5522 (1988).
- 5) Warsa, U. C., Nonoyama, M., Ida, T., Okamoto, R., Okubo, T., Shimauchi, C., Kuga, A. and Inoue, M. : Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in *Staphylococcus aureus* of asian countries by the Polymerase Chain Reaction. *J. Antibiotics* **49**, 1127 (1996).
- 6) Khan, S. A. and Novick, R. P. : Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline-resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**, 251 (1983).
- 7) Kono, M., Sasatsu, M. and Hamashima, H. : Transformation of *Bacillus subtilis* with staphylococcal plasmid DNA. *Microbiol. Lett.* **5**, 55 (1978).
- 8) Gillespie, M. T., May, J. W. and Skurray, R. A. : Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated at an Australian hospital between 1946 and 1981. *J. Med. Microbiol.* **19**, 137 (1985).
- 9) Lee, D. W., Yoon, S. J., Kim, W. G., Shin, C. K., Im, S. H., Lee, B. R. and Moon, K. H. : 항생제 다재내성균 *Staphylococcus aureus* SA2로부터 분리한 테트라사이클린 내성 플라스미드 pKH6의 염기서열. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 423 (1996).
- 10) Kim, W. G., Yoon, S. J., Kim, J. M., Shin, C. K., Im, S. H. and Moon, K. H. : Association of *tet* gene with partial sequence of IS431mec in tetracycline resistance plasmid pKH1. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 171 (1996).
- 11) Kim, W. G., Shin, C. K. and Moon, K. H. : Relationship between two tetracycline resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **6**, 292 (1996).
- 12) Nesin, M., Svec, P., Lupski, J. R., Godson, G. N., Kreiswirth, B., Kornblum, J. and Projan, S. J. : Cloning and nucleotide sequences of a chromosomally encoded tetracycline resistance determinant, *tetA(M)*, from a pathogenic, methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2273 (1990).
- 13) Lee, J. Y., Park, J. H. and Moon, K. H. : Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Busan. *Yakhak Hoeji* **51**, 164 (2007).
- 14) Lee, J. Y., Park, J. H. and Moon, K. H. : Characterization of antibiotic resistance plasmids of *Staphylococcus aureus* by complete nucleotide sequence determination. *Yakhak Hoeji* **52**, 147 (2008).
- 15) 김종명, 김기현, 문경호 : 황색포도상구균에서 테트라사이클린 내성을 나타내는 플라스미드의 동정. *약학회지* **36**, 255 (1992).
- 16) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory (1982).
- 17) Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. : Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403 (1990).
- 18) 강재선, 문경호 : 황색포도상구균의 항생제 내성 양상. *약학회지* **34**, 122 (1990).
- 19) Warsa, U. C., Nonoyama, M., Ida, T., Okamoto, R., Okubo, T., Shimauchi, C., Kuga, A. and Inoue, M. : Detection of *tet(K)* and *tet(M)* in *Staphylococcus aureus* of Asian countries by the Polymerase Chain Reaction. *J. Antibiotics* **49**, 1127 (1996).