

서로 다른 두 단백질의 세포 내 동시 발현 체계의 개발을 통한 ErmSF에서 특이적으로 발견되는 N-Terminal End Region (NTER)을 포함하는 펩타이드의 생체내에서의 ErmSF 활성 억제 효과 검색

진형종

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

Investigation on Inhibitory Effect of ErmSF N-Terminal End Region Peptide on ErmSF Methyltransferase Activity *In Vivo* Through Development of Co-Expression System of Two Different Proteins in One Cell

Hyung Jong Jin

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Science, The University of Suwon, Kyunggi-Do 445-743, Republic of Korea

(Received August 22, 2011 / Accepted September 15, 2011)

Most problematic antibiotic resistance mechanism for MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotics encountered in clinical practice is mono- or dimethylation of specific adenine residue at 2058 (*E. coli* coordinate) of 23S rRNA which is performed by Erm (erythromycin ribosome resistance) protein through which bacterial ribosomes reduce the affinity to the antibiotics and become resistant to them. ErmSF is one of the four gene products produced by *Streptomyces fradiae* to be resistant to its own antibiotic, tylosin. Unlike other Erm proteins, ErmSF harbors idiosyncratic long N-terminal end region (NTER) 25% of which is comprised of arginine well known to interact with RNA. Furthermore, NTER was found to be important because when it was truncated, most of the enzyme activity was lost. Based on these facts, capability of NTER peptide to inhibit the enzymatic activity of ErmSF was sought. For this, expression system for two different proteins to be expressed in one cell was developed. In this system, two plasmids, pET23b and pACYC184 have unique replication origins to be compatible with each other in a cell. And expression system harboring promoter, ribosome binding site and transcription termination signal is identical but disparate amount of protein could be expressed according to the copy number of each vector, 15 for pACYC and 40 for pET23b. Expression of NTER peptide in pET23b together with ErmSF in pACYC 184 in *E. coli* successfully gave more amounts of NTER than ErmSF but no inhibitory effects were observed suggesting that there should be dynamicity in interaction between ErmSF and rRNA rather than simple and fixed binding to each other in methylation of 23S rRNA by ErmSF.

Keywords: Co-expression, ErmSF, *in vivo* assay, MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein, NTER peptide

MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 계열 항생제에 대하여 내성을 가진 미생물에서는 항생제의 화학적 변환

에 의한 내성(chemical modification of antibiotics), 항생제의 세포 내 유입을 억제함으로써 나타나는 내성(inhibition of antibiotic uptake), 항생제 작용점의 변형에 의한 내성(target site modification) 등 기존에 알려진 대부분의 항생제들에서

* For correspondence. E-mail: hjjin@suwon.ac.kr; Tel.: +82-31-220-2290; Fax: +82-31-220-2519

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain and plasmid	Description	Reference or source
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	High transformation efficiency competent cell	4
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for plasmid expression vectors that utilize the T7 promoter. It possesses T7 RNA polymerase gene under <i>lac</i> control	Novagen
<i>E. coli</i> HJJ105	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ105 which contains ErmSF structural gene	9
<i>E. coli</i> HJP	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJP1-71	this work
<i>E. coli</i> AHJ101	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pAHJ101	this work
<i>E. coli</i> EHJP1-71 +AHJ101	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJP1-71 and pAHJ101	this work
Plasmids		
pET 23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His ₆ -tag at C-terminal end	Novagen
pACYC184	Small, low copy-number <i>E. coli</i> cloning vector	NEB
pHJJ105	pET23b containing <i>ermSF NdeI-HindIII</i> gene cartridge	11, 12
pHJP1-71	pET23b containing <i>NTED1-71 a.a NdeI-XhoI</i> gene cartridge	this work
pAHJ101	pACYC184 containing <i>ermSF with pET23b expression system BamHI - EcoRV</i> gene cartridge	this work

발견되는 내성 작용 기작이 모두 관찰되고 있다(5, 17). 그러나 MLS 항생제에 대한 내성 중에서 임상적으로 가장 문제가 되고 있는 내성은 *erm* (erythromycin resistance methylation) 유전자의 생성물, 즉 Erm 단백질이 23S rRNA의 특정 nucleotide의 염기, 즉 A2058에 mono-, dimethylation 시킴으로써 항생제가 부착되는 것을 억제하여 항생제의 항생작용이 일어나지 못하게 함으로써 내성을 나타내는 target site modification에 의한 것으로 나타나 있다(4, 26). Erm 단백질은 현재 항생제 생산 균주, 병원균 뿐만 아니라 이외의 다양한 미생물들에서도 지속적으로 발견되고 있으며 내성에 있어서의 그 중요성이 더욱 부각되고 있다(16). 이들 단백질은 아미노산 서열에 있어서의 유사성과 동등성이 높고 그 작용이 동일하므로 유사한 구조를 가진 것으로 생각되고 있으며, 하나의 단백질 family로 분류되어 있다(2, 16, 17, 26). ErmSF (TlrA)는 가축에 사용되는 항생제인 tylosin의 생산 균주인 *Streptomyces fradiae*에서 발견되는 단백질(4, 11, 23)로 현재 ErmS로 재분류되어 있다(17). 앞에서 기술한대로 MLS 항생제에 대한 내성인자로서의 중요성에 근거하여 최근 Erm 단백질에 대한 억제제 개발의 중요성이 자주 언급되어 왔다(2, 13, 21). ErmSF는 다른 Erm 단백질과는 달리 매우 긴 N-terminal end region (NTER)를 가지고 있으며 여기에는 RNA와 상호작용을 잘하는 것으로 알려진 arginine이 약 25%를 차지하고 있어 기질 RNA와의 상호작용을 예상할 수 있었다. 뿐만 아니라 이를 점차적으로 제거하였을 때 그 활성이 점진적으로 소실되어서 이 부분은 기질 RNA와의 부착에 영향을 주는 것으로 사료되었

다(12). 더욱이 이 NTER을 궁극적으로 모두 제거하였을 때 ErmSF의 경우는 야생형 단백질에 비하여 약 2%만의 활성을 보유하고 있는 것으로 밝혀져 있다(9). 뿐만 아니라 NTER의 끝 쪽에는 활성에 중요한 역할을 담당하는 아미노산을 보유한 것으로 밝혀져 있다(8, 9, 12). 따라서 한 세포 내에서 활성에 중요한 역할을 하는 아미노산을 포함하는 NTER 함유 펩타이드와 ErmSF를 동시에 발현하여 *in vivo*에서 NTER 펩타이드가 ErmSF의 활성을 저해 할 수 있는지를 검색하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리하였다. 그리고 사용된 올리고뉴클레오타이드들은 Table 2에 정리하였다.

재료 및 시약

제한 효소들과 DNA 변형 효소들은 New England Biolabs (Beverly, MA)에서 구입하여 제공된 방법으로 처리하였다. 세균 배양을 위한 LB 배지와 Bacto agar 등은 Difco Laboratories (Detroit, MI)에서 구입하였다. PCR을 위한 *Taq* polymerase와 nucleotides는 TaKaRa Shuzo Co. (Otsu, Shiga, Japan)에서, His-Bind resin은 Novagen (Mercurus, CA)에서 각각 구입하였다. 전기영동을 위한 acrylamide, bis-acrylamide, ammonium persulfate, TEMED 등과 같은 것들은 Bio-Rad

Table 2. Primers

Oligonucleotide primer	Sequence and description
Oligo-1	5' <u>ggaattccatatggctcgtgcaccgcgttctccgac</u> 3' (37-mer) upstream (forward) PCR primer for <i>NTED1-71 a.a</i> coding DNA fragment
Oligo-2	5' <u>ggcgagctccctccgcccggctcgct</u> 3' (27-mer) downstream (reverse) PCR primer for <i>NTED1-71 a.a</i> coding DNA fragment
Oligo-3	5' <u>cgggatccataatagactactatag</u> 3' (26-mer) upstream (forward) PCR primer for <i>ermSF</i> gene with pET expression vector system
Oligo-4	5' <u>ggatatccaaaaaacctcaagacc-3'</u> (27-mer) downstream (reverse) PCR primer for <i>ermSF</i> gene with pET expression vector system

Note. The underlined sequence in oligo-1, -2, -3 and -4 was introduced for *NdeI*, *XhoI*, *BamHI* and *EcoRV* restriction site, respectively. The italicized sequence in each oligonucleotide was added at the end of DNA fragment for cleavage to occur more easily.

(USA)에서 구입하였다. 그 외에 일반적인 염류와 완충용액 시약, agarose와 항생제 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

NTER 을 함유하는 펩타이드(1-71 amino acids)를 coding 하는 DNA 절편의 획득과 발현 담체 제작

야생형 *ErmSF* 유전자가 cloning 되어있는 pHJJ105 (7)를 주형으로 하여 올리고뉴클레오타이드, oligo-1과 oligo-2를 각각 forward 그리고 reverse primer로 사용, PCR을 수행함으로써 *ErmSF*의 NTER을 포함하는 펩타이드(1-71 amino acids)를 코딩하는 DNA 절편을 얻어내었다. 각 올리고뉴클레오타이드에는 *NdeI* 제한효소 인식부위 (CATATG)와 DNA 절편 말단에 덧붙여져서 제한효소가 충분히 작용할 수 있도록 넣은 7개의 nucleotides 그리고 *XhoI* 제한효소 인식자리(GAGCTC)와 역시 DNA 절편 말단에 적절한 제한효소 작용을 위해 덧붙여 넣은 3개의 nucleotides가 포함되어 있다. 얻어진 DNA 절편을 *NdeI*과 *XhoI*로 처리하고 같은 제한효소를 작용시킨 pET23b 플라스미드(24, 25)에 직접 넣어 접합하였다. 결과적으로 *ErmSF*의 1번 아미노산으로부터 71번 아미노산과 6개의 histidine 꼬리를 포함한 펩타이드를 발현하는 담체를 제조하였다.

Low copy number 플라스미드(pACYC184)를 이용한 *ErmSF* 발현 담체의 제작

야생형 *ermSF* 유전자의 발현을 위한 클로닝은 다음과 같이 수행하였다. 야생형 *ermSF* 유전자를, 유전자 발현 체계 (gene expression system)을 전혀 갖추지 않은 pACYC184 (3, 18, 22)에서 발현하기 위해 pET 단백질 발현 체계(pET gene expression system)가 모두 포함되도록 하여 DNA 절편을 얻어내었다(결과의 자세한 설명 참조). 즉 pHJJ105를 주형으로 하여 oligo-3와 oligo-4를 각각 forward 그리고 reverse primer로 사용하여 PCR을 수행함으로써 단백질 발현체계를 모두 갖춘 *ermSF* 유전자를 포함하는 DNA 절편을 얻어내었다. Forward primer에는 *BamHI* 제한효소 인식부위(GGATCC)와 원활한 제한효소의 작용을 위하여 2개의 nucleotide를 더 붙여 주었다. Reverse primer에는 *EcoRV* 제한효소 인식부위 (GATATC)가 포함되었고 제한효소가 잘 작용하도록 1개의 nucleotide를 더 붙여주었다. 이렇게 얻어진 DNA 절편을 제한효소 *BamHI*과 *EcoRV*로 처리하고 같은 제한효소를 사용하여 절단한 pACYC184에 직접 넣어 접합하였다.

얻어진 발현 담체의 대장균으로의 형질전환

NTER을 함유하는 펩타이드를 코딩하고 있는 DNA 절편이 접합된 플라스미드를 *E. coli* DH5 α (1)에 형질 전환하였고 그 대장균으로부터 플라스미드를 순수 분리하여 각 유전자의 염기서열을 dideoxy chain termination법에 의해 확인하였다. 이렇게 얻어진 발현 담체를 pHJP 1-71로 명명하였다. 이 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환한 후 ampicillin (50 μ g/ml)을 포함한 LB agar plate에 도말하여 형질 전환된 것

로 믿어지는 *E. coli*를 선별하였다. 이 대장균을 *E. coli* HJP 1-71로 명명하였다.

*ErmSF*를 코딩하고 있는 DNA 절편이 접합된 플라스미드를 위와 동일한 방법으로 확인하였다. 이렇게 얻어진 발현 담체를 pAHJ101로 명명하였다. 이 발현 담체를 *E. coli* BL21 (DE3)에 형질 전환한 후 chloramphenicol (35 μ g/ml)을 포함한 LB agar plate에 도말하여 형질 전환된 것으로 믿어지는 *E. coli*를 선별하였다. 이 *E. coli*를 *E. coli* AHJ101로 명명하였다.

대장균에서 NTER 함유 펩타이드와 *ErmSF*의 발현 확인

발현 담체에 적절히 끼워진 NTER 함유 펩타이드를 코딩하는 DNA 절편과 *ermSF* 유전자의 발현은 이미 발표된 방법에 근거하여(6, 7) 약간의 변형과 함께 다음과 같이 수행하였다. NTER 함유 펩타이드의 발현을 위해서 *E. coli* HJP 1-71를 Ampicillin (50 μ g/ml)이 함유된 LB 배지에 하룻밤 동안 배양하고 여기서 얻어진 대장균을 동일한 항생제를 함유한 새로운 배지에 전이하였다. NTER 함유 펩타이드가 *E. coli* HJP 1-71에서 발현되는지 여부와 그 발현 양을 알아보기 위하여 IPTG 유도발현을 시도하였다. 즉 새로 전이된 배지를 37°C에서 1-1.5시간 배양하여 A₆₀₀에서 흡광도가 0.8-1이 되었을 때 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 첨가하고 18시간 교반 배양한 후 펩타이드의 발현되는 정도를 SDS-PAGE (10)로 확인하고 아래항의 “발현된 펩타이드의 순수 분리”항에서와 같이 실험하여 NTER 함유 펩타이드의 발현 양을 확인하였다. 뿐만 아니라 위의 과정 중 IPTG 첨가를 제외하고 대장균을 배양하여 leaky 발현 여부를 확인하였다.

ermSF 유전자의 발현은 위와 동일한 방법으로 수행하여 IPTG 유도에 의한 발현과 IPTG 유도 없이 일어나는 leaky 발현을 확인하였다. 다만 *E. coli* AHJ101을 chloramphenicol (35 μ g/ml)을 함유한 LB 배지에 접종하였고 *ErmSF*의 발현 정도를 SDS-PAGE를 통하여 관찰하였다. 여기에 덧붙여 생체 내 활성 검색을 통하여 IPTG의 유도 없이 일어나는 발현을 재차 확인하였다(결과의 자세한 설명 참조).

발현된 펩타이드의 순수 분리

NTER 함유 펩타이드의 순수분리는 기존에 발표된 방법을 사용(7), 약간 변형하여 실시하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 원심분리(8,000 \times g)하여 얻어진 세포를 lysozyme (5 mg/ml)을 함유하는 완충용액 A (20 mM Tris-HCl; pH 7.0, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole)에서 분산시킨 후 상온에서 20분간 배양하고 -80°C에서 얼린 후 녹여서 세포를 분쇄하였다. 여기에 DNase I (2.5 μ g/ml) 및 RNase A (2.5 μ g/ml)를 넣고 반응시킨 후 얻어진 분쇄액을 39,000 \times g에서 원심분리하여 inclusion body를 포함하는 불용성 세포분쇄물을 제거하였다. 얻어진 상등액에서 단백질 분리는 공급자(Novagen)가 제공한 과정에 근거, Ni²⁺ affinity column chromatography법에 의하여 분리하였다. 완충용액 A로 평형을 이룬 His-bind resin이 충전된 컬럼에 위에서 얻어진 용액을 충전한 후 완충용액

B (20 mM Tris-HCl; pH 7.0, 500 mM NaCl, 100 mM imidazole)을 사용하여 컬럼에 부착되지 않거나 잘못 부착된 단백질을 씻어낸 후 원하는 단백질을 300 mM imidazole이 함유된 완충용액 B를 사용하여 얻어내었다. 최종적으로 얻어진 정제된 단백질은 BCA법(Pierce, USA)을 사용하여 정량하였다.

E. coli에서 ErmSF와 NTER 펩타이드의 동시 발현

NTER 함유 펩타이드와 ErmSF의 동시 발현을 위해서 E. coli AHJ101에 pHJP 1-71 플라스미드를 형질전환 한 후 chloramphenicol (35 µg/ml)과 ampicillin (50 µg/ml)을 동시에 함유한 LB 배지에 도말하여 두 종류의 플라스미드를 모두 포함한 E. coli를 선별하고 이를 E. coli EHJP+AHJ101로 명명하였다. E. coli EHJP+AHJ101에서 ErmSF와 NTER 펩타이드가 IPTG의 유도 없이 동시에 발현되는지를 알아 보기 위해서 chloramphenicol (35 µg/ml)과 ampicillin (50 µg/ml)을 함유한 LB 배지에 E. coli EHJP+AHJ101을 접종한 후 하룻밤 동안 배양하고 여기서 얻어진 E. coli 를 동일한 항생제를 함유한 새로운 배지에 전이한 후 37°C에서 18시간 배양하고 각각의 발현 정도를 SDS-PAGE로 확인하였다.

발현된 단백질의 생체 내 활성 검색(항생제 내성 검사)

생체 내 활성검사는 이미 발표된 방법을 사용하여 디스크 방법을 사용하여 결정하였다(6, 7). 간단히 기술하면 다음과 같다. pHJP1-71과 pAHJ101를 모두 함유한 E. coli (E. coli EHJP+AHJ101)와 pET23b, pACYC184를 모두 함유하고 있는 E. coli를 각각 ampicillin과 chloramphenicol을 넣은 LB 배지에 접종하여 하룻밤 동안 배양하였다. 잘 자란 세균 배양액을 ampicillin과 chloramphenicol을 넣은 LB agar 배지에 면봉을 이용하여 agar plate를 절반씩 차지하도록 각각 도말하였다. 거름종이(6 mm diameter paper disc, Whatmann 3M)에 25 mg/ml 농도의 erythromycin 용액을 각 disc당 5, 10, 50 µg이 되도록 점적한 후 대기 중에서 말린 다음 도말된 각 E. coli 경계선위에 놓고 37°C에서 하룻밤 동안 배양하여 그 성장억제지역을 관찰하였다. 또는 이외의 비교하고자 하는 균주에 대하여도 위와 같이 배양하고 적절한 항생제를 함유한 agar plate에 도말하고 erythromycin을 함유한 거름종이 주변에서의 성장을 측정함으로써 그 내성을 판별하였다.

결과

NTER 함유 펩타이드의 발현을 위한 담체 제작 및 발현

ErmSF는 현재까지 밝혀진 다른 Erm 단백질과는 달리 약 60여 개의 아미노산으로 구성된 긴 NTER을 가지고 있다. 특히 이 부분은 RNA와 잘 binding하는 것으로 알려진 arginine이 약 25%를 차지하고 있다(Fig. 1). 따라서 이 부분의 기질 RNA와의 상호작용을 예상할 수 있다. 그리고 이 부분을 점차적으로 제거하였을 때 그 활성도 점차적으로 소실하였으며 또 이를 완전히 제거하였을 때 활성의 98%를 소실하는 것으로 밝혀졌다(8, 9, 12). 뿐만 아니라 NTER의 C말단에 이어서 활성에 중요한 것으로 이미 밝혀진 60RR61을 비롯한 다른 아미노산이 존재하고 있다(9). 따라서 NTER과 이미 활성에 중요한 것으로 밝혀진 60RR61을 비롯한 다른 아미노산을 포함하는 ErmSF의 1번부터 71번 아미노산을 coding하는 DNA 절편을 얻고 이를 세포 내부에서 펩타이드의 개수가 충분히 많이 발현되도록 높은 copy 수를 갖는 pET23b 플라스미드에 삽입하고 E. coli BL21(DE3)에 형질 전환하여 E. coli HJP 1-71을 얻었다. 이렇게 제작된 발현 담체는 IPTG의 유도 없이도 그 발현이 관찰되었고 1 mM의 IPTG로 발현을 유도하였을 경우는 리터 배양액당 약 7 mg 정도를 순수 분리하여 얻을 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과 즉 높은 대량 생산물(7 mg/L culture)과 IPTG 유도 없이 단백질 발현이 유도된다는 사실은 계획한대로 ErmSF와 동시에 발현하였을 때 copy수에 따른 발현이 이루어져 ErmSF보다 많은 수의 NTER 함유 펩타이드가 발현되어 억제제로서의 가능성을 판가름할 수 있는 실험적 기반이 조성되었다는 것을 말해준다.

pACYC184 플라스미드에서의 ErmSF 발현을 위한 담체 제작 및 발현

기존 연구에서는 ErmSF의 대량 발현을 위하여 세포 내에서의 copy수가 높은 pET23b 플라스미드를 이용하여 단백질을 대량 발현하였다(7-9, 12). 그러나 본 실험에서는 NTER 함유 펩타이드의 억제활성을 높이기 위해, p15A 복제 원점을 가져서 copy수가 적고(약 15 copies/cell, 20), NTER 함유 펩타이드의 발현에 사용되는 pET23b와 한 세포에 함께 존재할 수 있는 pACYC184 플라스미드를 사용하여 ErmSF를 발현하였다. pACYC184 플라스미드에는 유전자 발현 체계(gene

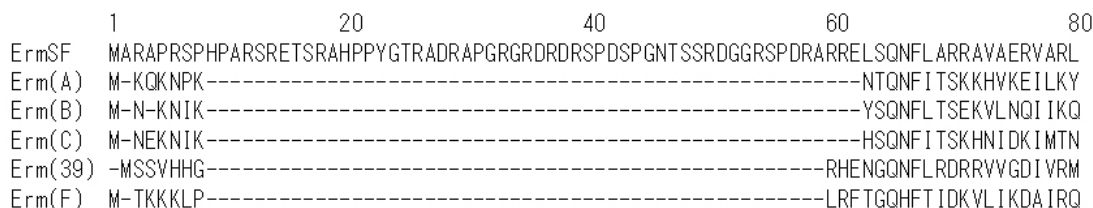


Fig. 1. Amino acid sequence alignment of N-terminal end region of several Erm proteins. Unlike the other homologous proteins, ErmSF harbors long N-terminal end region and it contains 18 arginine residues which account for around 25% of NTER amino acids.

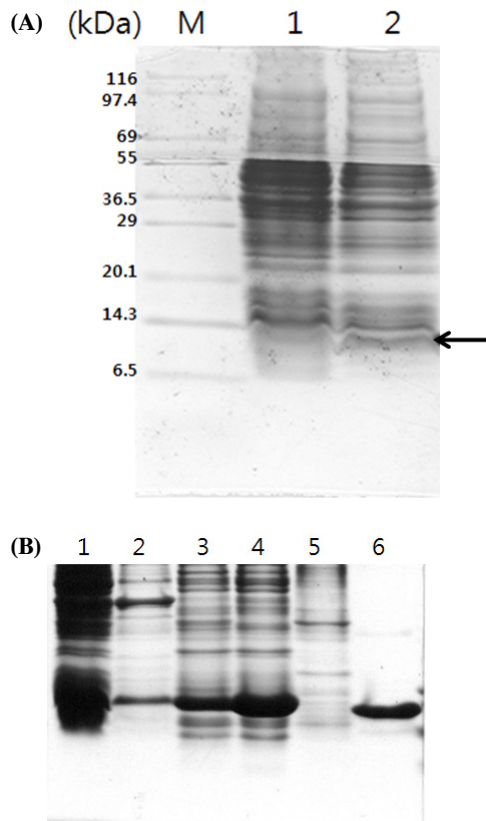


Fig. 2. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the expressed NTER 1-71 peptide and its purification. *E. coli* BL21 (DE3) was transformed with plasmid pHJLP 1-71. Overnight grown *E. coli* cells were transferred to new LB medium containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin and incubated for 1 to 1.5 h at 37°C to reach an A_{600} of 0.8-1.0. In order to induce the NTER 1-71 expression, IPTG was added to the final concentration of 1 mM (but for leaky expression, IPTG was not added) and incubation continued for another 18 h at 37°C. 50 μl of cell culture was removed and denatured in 20 μl 6 \times sample buffer, resolved on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel and then stained with Coomassie brilliant blue. (A) NTER1-71 peptide expression. Lanes: M, molecular size marker; 1, cells harboring pHJP1-71 which was not induced with IPTG; 2, cells harboring pHJP1-71 which was induced with IPTG. (B) Purification of overexpressed NTER 1-71. Lanes: 1, total cellular proteins; 2, inclusion body fraction; 3, supernatant fraction of lysate; 4, affinity run-through; 5, imidazole buffer column wash; lane 6, purified NTER1-71 peptide.

expression system)가 전혀 갖추어져 있지 않으므로 기존에 사용하였던 ErmSF 유전자가 클로닝 되어있는 pHJJ105의 유전자 발현 체계 즉 T7 promoter, terminator 서열 그리고 ribosome binding site 및 ErmSF 유전자 모두를 포함한 DNA 절편을 PCR 증폭하여 pACYC184에 클로닝하였다. 따라서 pACYC184에서 *E. coli* BL21 (DE3)의 chromosome 유전자에서 발현되는 T7 RNA polymerase (15, 19)에 의해, ErmSF 유전자가 전사 및 종결되고 또 리보솜에 의해 번역되어 ErmSF

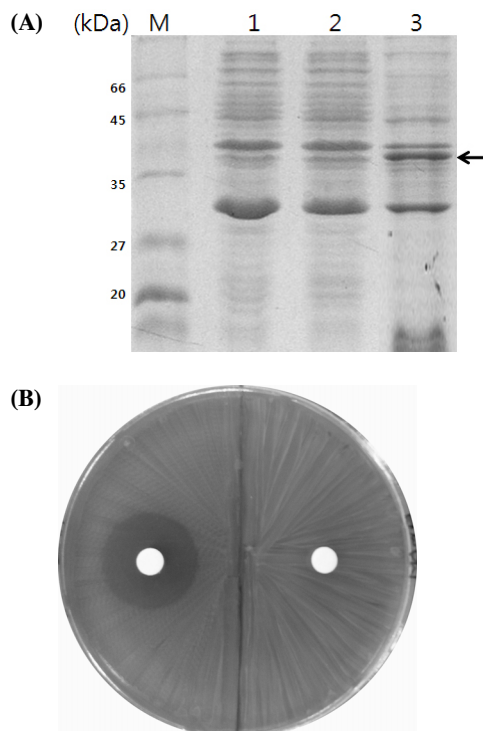


Fig. 3. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the expressed ErmSF in *E. coli* AHJ101 and its antibiotic susceptibility assay. *E. coli* BL21(DE3) was transformed with plasmid pAHJ101. The procedure for SDS-PAGE was the same as Fig. 2 except that added antibiotic was 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chloramphenicol instead of 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ampicillin. For antibiotic susceptibility assay, two kinds of *E. coli* cells were used which were expressing ErmSF (harboring pAHJ101) and contained only empty vector. Erythromycin stock solution (25 mg/ml) was dropped on a paper disc to reach the final amounts of 100 μg erythromycin. On the agar plate, *E. coli* cells were spread with cotton swabs and then paper discs containing erythromycin were placed in the center and incubated overnight at 37°C. Cells containing ErmSF grew in the presence of erythromycin, whereas control cells harboring empty pACYC184 did not. (A) Expression of ErmSF. Lanes: M, molecular size marker; 1, cells harboring pACYC184, empty vector; 2, cells harboring pAHJ101 which was not induced with IPTG; 3, cells harboring pAHJ101 which was induced with IPTG. (B) Antibiotic susceptibility assay. *E. coli* cells expressing ErmSF (containing pAHJ101, right part of agar plate) and without ErmSF in it (harboring empty pACYC184, left part of agar plate).

를 발현 할 수 있는 pAHJ101이 제조되었다. 이렇게 만들어진 발현 담체에서 기존에 pET23b 발현담체 체계에서 볼 수 있었던(6, 7) IPTG에 의해 유도된 ErmSF의 대량발현이 관찰되었으며 IPTG의 첨가 없이 즉 leaky expression에 의한 ErmSF의 발현도 관찰되었다(Fig. 3A). IPTG의 첨가 없이 이루어지는 발현을 *in vivo*에서 확인하기 위해 항생제 내성 검사를 수행한 결과, pACYC184만을 포함한 *E. coli*는 내성을 나타내

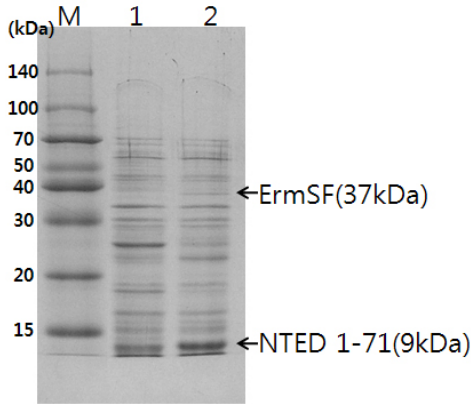


Fig. 4. SDS-PAGE of the co-expressed NTER 1-71 peptide and ErmSF in non-induced condition. The samples were prepared in the same way as Fig. 2 except that LB medium contained both ampicillin (50 µg/ml) and chloramphenicol (25 µg/ml). Lanes: M, molecular size marker; 1, cells harboring empty pET23b and pACYC184; 2, cells harboring pAHJ101 and pHJP1-71 which is expression vector for ErmSF and NTER 1-71 peptide, respectively.

지 못하여 erythromycin 디스크 주변에 성장 억제 지역을 나타내었으나 *E. coli* AHJ101는 내성을 나타내어 성장 억제 지역이 나타나지 않았다. 따라서 이 발현 담체에서 IPTG의 첨가 없이 즉 유도 없이 ErmSF가 발현되고 있음을 SDS-PAGE에 이어서 다시 한번 확인 할 수 있었다(Fig. 3B). 이러한 결과는 이제까지 개발된 두 발현 담체 체계 즉 pHJP 1-71과 pAHJ101가 동시에 한 세포에서 발현될 때에도 동시에 잘 발현되고 또 IPTG의 유도 없이도 그 발현이 잘 이루어져서 새로운 두 단백질의 발현 체계가 완성될 수 있음을 강하게 시사하고 있다.

NTER 함유 펩타이드와 ErmSF의 동시 발현

NTER 함유 펩타이드를 발현하는 *E. coli* HJP 1-71과 ErmSF를 발현하는 *E. coli* AHJ101는 각각 IPTG로 그 발현을 유도하거나 또는 IPTG의 유도 없이도 각각 펩타이드와 ErmSF를 잘 발현하였다. 이러한 결과는 각각의 발현 담체를 같은 대장균에 넣어도 계획대로 각 담체의 copy수에 따라 펩타이드와 ErmSF가 잘 발현될 수 있는 가능성을 제공하고 있다.

따라서 NTER 함유1-71번째 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 발현할 수 있는 pHJP1-71과 ErmSF를 발현할 수 있는 pAHJ101을 동시에 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환하여 *E. coli* EHJP+AHJ101를 얻어내었다. 이렇게 얻어진 *E. coli* EHJP+AHJ101는 기존에 각각의 발현 담체를 보유한 대장균이 나타내었던 것처럼(Figs. 2 and 3) IPTG 유도 없이 액체배지에서 NTER 1-71 펩타이드와 ErmSF, 두 가지가 모두 대량 생산되고 있는 것을 확인하였다(Fig. 4). 일반적으로 SDS-PAGE상에서 동일한 농도의 두 단백질을 전개하였을 때 분자량이 큰 단백질이 coomassie blue에 의해서 더 진하게 염색된

다. 그러나 Fig. 4에서 관찰된 바에 의하면 분자량이 상대적으로 적은 NTER 함유 펩타이드가 더 진하게 보이는 것을 보면 예상했던 바와 마찬가지로 copy수의 차이에 의하여 NTER 함유 펩타이드가 ErmSF 보다 더 많이 발현되었다는 것을 알 수 있다. 더욱이 이러한 현상은 IPTG의 첨가에 의해서 문제를 발생시키는 고체 배지의 단백질 발현을 잘 할 수 있는 IPTG의 첨가 없이 이루어졌다. 따라서 NTER 함유 펩타이드의 억제 활성을 검색할 수 있는 동시 발현 체계가 완벽하게 완성되었음을 알 수 있었다.

NTER 함유 펩타이드의 생체 내에서의 ErmSF 활성 저해 검색

높은 비율로 arginine을 함유하여 RNA와 잘 결합할 것으로 예상되고 또 제거하였을 때 98%의 활성소실을 야기하며 또 활성에 중요한 아미노산을 함유하고, NTER을 포함하는 펩타이드의 ErmSF 활성 저해를 검색하기 위하여 NTER 함유 펩타이드와 ErmSF를 각각 발현하는 pHJP1-71과 pAHJ101 플라스미드를 동시에 가지고 있는 *E. coli* EHJP1-71+AHJ101의 항생제 내성 정도를 빈 담체인 pET23b와 pACYC184를 동시에 가지고 있는 *E. coli*와 비교하였다. 두 종류의 빈 플라스미드를 함유한 *E. coli*의 경우는 10, 50, 100 µg 항생제를 함유한 디스크 주위에서 모두 성장이 저해되어 억제지역 (inhibition zone)이 명확하게 관찰되었다. 반면 NTER 펩타이드와 ErmSF를 동시에 발현하는 *E. coli* EHJP1-71+AHJ101의 경우에는 전혀 저해를 받지 않았다(Fig. 5).

고찰

23S rRNA methyltransferase인 ErmSF는 다른 Erm 단백질과는 다르게 독특하게 긴 N-terminal end region을 가지고 있으며 또한 이 부분은 RNA와 잘 결합하는 것으로 알려진 arginine이 25%를 차지함으로써 활성에 큰 영향을 미칠 것으로 기대되었다. 실질적으로 이 부분을 제거하였을 때 ErmSF 활성에 큰 저해를 가져왔다(8, 9, 12). 여기서 더 나아가 NTER 1-71 펩타이드는 NTER을 포함하고 이외에 이미 활성에 중요한 것으로 밝혀진 60RR61을 비롯한 다른 아미노산을 포함하고 있어서 세포 내에서 ErmSF 단백질과 동시에 발현이 될 경우는 ErmSF의 활성을 억제할 가능성이 높은 것으로 사료되었다. 이러한 사실에 근거하여 생체 내에서 이 펩타이드와 ErmSF를 동시에 발현하여 NTER 함유 펩타이드가 ErmSF의 활성을 저해할 수 있는지 확인하였다. 이를 위해서 세포 내에서 높은 copy수로 존재하는 pET23b (약 40 copies/cell, 15, 19, 25)를 이용하여 NTER 함유 펩타이드를 발현하였고, 상대적으로 세포 내에서 낮은 copy수(약 15 copies/cell, 20)를 보이고 pET23b와는 다른 복제 원점을 가지고 있어서 한 세포 내에 동시에 존재할 수 있는 pACYC184를 이용하여 ErmSF가 발현되도록 하였다. 특히 각 플라스미드에 함유된 promoter, transcriptional terminator와 ribosome binding site는 동일 유전자 발현 체계 즉 pET23b가 갖는 체계를 갖도록 하였고 이

체계에서 두 유전자를 발현하였다. 따라서 ErmSF와 NTER 함유 펩타이드의 발현양은 대부분 프라스미드의 copy수에 의하여 결정될 것으로 기대되었다. 그러므로 발현되는 분자의 개수는 ErmSF 보다 NTER 함유 펩타이드가 상대적으로 많을 것으로 믿어졌고 NTER 함유 펩타이드가 억제활성을 가지고 있다면 그 활성을 나타내는데 충분한 환경이 조성되었다고 믿어졌다. 그러나 아무리 좋은 단백질 발현 체계를 적용하여도 발현이 계획된 대로 잘 이루어지지 않는 경우가 많다. 따라서 이를 극복하기 위한 여러 가지 전략이 제시되었고(14) 또 그 성공여부는 대상 단백질에 따라 다양한 것으로 밝혀져 있다. ErmSF의 경우는 이미 pET 발현 체계에서 리터 배양액당 110 mg이라는 양으로 대량생산될 수 있는 것이 밝혀져 있어서 계획대로 발현이 될 것으로 믿어졌다(7). 그러나 NTER을 포함하는 아미노산 1-71 펩타이드는 그 발현이 시도되어 본 적이 없다. 따라서 1 mM IPTG를 사용하여 대량 생산을 유도한 후 순수 분리한 결과 리터 배양액당 7 mg (Fig. 2)이라는 높은 대량 생산물을 보여서 계획된 대로 발현 즉 담체의 copy수에 따른 발현이 이루어질 것으로 믿어졌다. 한편 본 연구에서 사용된 *E. coli* BL21 (DE3)는 chromosome에 존재하는 lac regulatory system을 이용하여 그 downstream에 존재하는 T7 RNA polymerase 유전자로부터 T7 RNA polymerase를 발현한다. 여기서 생성된 T7 RNA polymerase가 발현 담체에 존재하는 T7 promoter에 작용하여 목적유전자를 발현시킨다. 따라서 전체적인 유전자의 발현은 IPTG의 첨가로 이루어지게 되어있다. 그러나 IPTG를 함유한 고체배지에서의 발현은 두 대장균 모두 내성을 보이지 않아 단백질이 활성화된 형태로 발현되지 않는 것으로 사료되었다(자료 미제시). 따라서 lac regulatory system의 leakiness를 이용한 유전자의 발현 즉 발현 유도 물질인 IPTG를 첨가하지 않고 발현을 유도한 결과 SDS-PAGE상에서도 그 발현을 관찰할 수 있었으며(Fig. 4) 세포 내에서의 단백질 활성을 나타내는 지표인 항생제 내성검사에서도 두 개의 빈 프라스미드를 함유한 대장균은 감수성을 보인 반면 *E. coli* EHJP1-71+ AHJ101은 내성을 나타내어 의도한대로 ErmSF가 leaky하게 잘 발현되는 것으로 관찰되었다(Fig. 5). 그리고 NTER 함유 펩타이드의 경우도 동일한 발현 체계를 사용하였고 또 액체배지에서 계획대로 IPTG의 유도 없이도 담체의 copy수에 따라 ErmSF 보다 더 많이 발현되는 것이 관찰되었으므로(Fig. 4) 고체배지에서도 IPTG 없이 ErmSF와 마찬가지로 잘 발현되고 또 그 양도 액체 배지에서와 마찬가지로 ErmSF 보다 더 많을 것으로 추정되었다. 이렇게 온화한 조건에서 단백질을 발현시켰을 경우는 이중단백질의 발현이 세포의 성장에 영향을 미치지 않을 뿐만 아니라 또 소량 발현됨으로써 활성화 형태로 발현되어 단백질의 활성을 *in vivo*에서 잘 검색할 수 있는 장점이 있는 것으로 밝혀져 있다(24). 결국, 이렇게 생리학적 영향까지 고려된 서로 다른 단백질의 한 세포 내 발현 체계가 완벽하게 완성되었다. 그러나 이렇게 완벽히 계획된 조건에서 두 단백질을 동시에 발현하는 *E. coli* EHJP1-71+AHJ101은 erythromycin에 저항성을 나타내었지만 두 개의 빈 프라스미드를 가진 세포는 내성을 나타

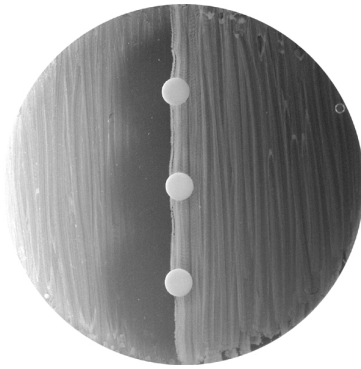


Fig. 5. Antibiotic susceptibility assay using *E. coli* cells expressing ErmSF and NTER 1-71 peptide (containing both pHJLP 1-71 and pAHJL101, right part of agar plate) and without ErmSF and NTER 1-71 peptide in it (harboring empty pACYC184 and pET23b, left part of agar plate). Erythromycin stock solution (25 mg/ml) was dropped on a paper discs to reach the final amounts of 10, 50, and 100 μ g erythromycin. Cells containing ErmSF and NTER 1-71 peptide grew in the presence of erythromycin, whereas control cells harboring empty pACYC184 and pET23b did not.

내지 않았다(Fig. 5). 이러한 현상은 erythromycin을 증가시키도 지속적으로 나타날 뿐만 아니라 ErmSF만을 발현시키는 대장균과 비교하여도 그 차이를 관찰할 수 없었다(자료 미제시). 뿐만 아니라 IPTG로 유도하지 않은 액체 배지에서 높은 copy수를 가진 담체에서 발현한 NTER 함유 펩타이드는 낮은 copy수를 가진 담체에서 발현된 ErmSF에 비하여 많은 양으로 발현되었기 때문에(Fig. 5) 고체배지에서도 같은 양상이 이루어졌을 것으로 믿어졌다. 이러한 모든 상황을 종합하여 볼 때 생체 내에서 발현된 NTER 1-71 펩타이드가 ErmSF의 활성을 저해하지 못하고 있다는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 여러 가지로 해석할 수 있을 것이다. 즉 NTER와 ErmSF protein body의 부착부위가 상이하여, 다량 발현된 NTER 함유 펩타이드가 ErmSF의 NTER 부착부위에 부착하였지만 ErmSF는 protein body 부착부위에 부착되어 A2058에 dimethylation을 성공적으로 시킴으로써 내성을 나타냈을 가능성이 있다. 그리고 또 다른 가능성은 그 부착부위가 동일하더라도 NTER과 protein body의 부착이 cooperativity를 일으켜서 NTER의 단독 부착에 비해 이를 포함한 ErmSF의 부착 강도가 월등히 강하여 둘간의 경쟁에서 ErmSF가 NTER을 물리치고 부착하였을 가능성이 있다. 이 경우에는 각각의 부착 비율은 최종적인 Kd값에 의존할 것이나 결국은 내성을 나타내는 균주가 감수성이 있는 균주를 outgrowth하여 전체적으로는 내성균주로 보여질 것이다. 본 연구실에서 행하여진 다른 실험결과들에 따르면 ErmSF의 단백질 본체(protein body)와 NTER의 부착이 서로 겹쳐지는 것을 암시하고 있다(Lee and Jin, unpublished results). 그러나 구체적인 상호작용 양식이 밝혀져 있지 않으므로 단백질과 RNA의 복합구조와 이에 근거한 생화학적 실험이 행하여져서 구체적인 부착과 상호작용

양식이 밝혀지면 본 연구에서 행하여진 시도의 성공가능성을 구체적으로 예견할 수 있을 것이다. 물론 NTER 1-71 펩타이드와 함께 좀 더 적절한 범위 내에서 기질과의 부착 강도를 강하게 나타낼 수 있는 펩타이드를 선정하여 ErmSF와의 경쟁을 유발시킴으로써 이러한 시도가 성공적으로 수행될 가능성을 배제할 수는 없다. 이러한 연구는 항생제 내성 유발 단백질 작용 기작 및 그 단백질의 저해제 특히 펩타이드 의약 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

적요

임상에서 가장 문제가 되는 MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 내성은 Erm 단백질에 의하여 23S rRNA의 A2058에 dimethylation시킴으로써 MLS 항생제의 부착능을 저해함으로써 나타내는 내성이다. ErmSF는 다른 Erm 단백질과 달리 매우 긴 N-terminal end region (NTER)을 가지고 있으며 RNA에 잘 부착되는 것으로 알려진 arginine이 25%를 차지하고 있다. 특히 NTER의 점차적인 제거는 이에 따른 점차적인 활성의 감소 그리고 이의 완전한 제거는 98%의 활성소실을 가져다 주는 것으로 밝혀져서 단순 부착에 의한 활성의 기여를 암시하고 있다. 뿐만 아니라 NTER 다음에 붙어 있는 아미노산은 제거되었을 때 활성이 소실되는 매우 중요한 아미노산임이 밝혀졌다. 이러한 사실에 근거, 서로 다른 복제원점을 가짐으로써 동일한 세포 내에 존재할 수 있으며 발현 체계가 동일하나 copy수가 차이가 있어서 단백질 발현 양에 차이를 가져다 주는 새로운 단백질 동시 발현체계를 개발하고 이를 적용하여 NTER 함유 펩타이드를 copy수가 많은 pET23b 체계의 담체에서, ErmSF는 copy수가 적은 pACYC184 담체 체계에서 발현 시킴으로써 펩타이드가 한 세포 내에서 ErmSF 보다 훨씬 더 많이 발현되도록 하여 이 펩타이드가 ErmSF의 활성을 저해할 수 있는지 확인하였다. 계획된 대로 IPTG에 의한 유도 없이도 펩타이드가 ErmSF보다 세포 내에서 훨씬 많이 발현되었다. 그러나 생체 내에서는 그 활성의 저해를 확인 할 수 없었다. 따라서 ErmSF의 활성은 NTER 펩타이드의 단순한 부착에 의해서 이루어지는 것이 아니라 conformational change 등의 역동적인 상호작용을 통하여 이루어지는 것으로 사료되었다. 따라서 ErmSF와 23S rRNA와의 복합체 구조의 규명 그리고 NTER과 ErmSF protein body의 부착양식에 대한 구체적인 생화학적 규명이 이루어지면 이러한 접근법은 이 단백질의 억제제를 창출하는데 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 2010년도 한국연구재단 바이오의료기술개발사업 중 신약타겟발굴 검증 사업(2010-0020470)과 2011년도 한국연구재단 기초연구사업(2011004986)의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bethesda Research Laboratories. 1986. BRL pUC host: *E. coli* DH5a competent cells. *Focus* 8, 9.
- Bussiere, D.E., S.W. Muchmore, C.G. Dealwis, G. Schluckebier, V.L. Nienaber, R.P. Edalji, K.A. Walter, U.S. Lador, T.F. Holzman, and C. Abad-Zapatero. 1998. Crystal structure of ErmC', an rRNA methyltransferase which mediates antibiotic resistance in bacteria. *Biochemistry* 37, 7103-7112.
- Chang, A.C.Y. and S.N. Cohen. 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J. Bacteriol.* 134, 1141-1156.
- Cundliffe, E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* 43, 207-223.
- Frontiers in Biotechnology : Antibiotic Resistance (American Association for the Advancement of Science, Washington, DC, 1994)
- Jin, H.J. 1999. *ermSF*, a ribosomal RNA adenine N6-methyltransferase gene from *Streptomyces fradiae*, confers MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) resistance to *E. coli* when it is expressed. *Mol. Cells* 9, 252-257.
- Jin, H.J. and Y.D. Yang. 2002. Purification and biochemical characterization of the ErmSF macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance factor protein expressed as a hexahistidine-tagged protein in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 25, 149-159.
- Jin, H.J. 2006. Functional role of peptide segment containing 1-25 amino acids in N-terminal end region of ErmSF. *Kor. J. Microbiol.* 42 165-171.
- Jin, H.J. 2008. Functional role of 60RR61 in 23S rRNA methylation, which is in N-terminal end region of ErmSF. *Kor. J. Microbiol.* 44, 193-198.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, C.J., B. Weisblum, S.R. Fahnestock, and M. Nomura. 1973. Alteration of 23S ribosomal RNA and erythromycin-induced resistance to lincomycin and spiramycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Mol. Biol.* 74, 67-72.
- Lee, H.J. and H.J. Jin. 2004. Deletion of N-terminal end region of ErmSF leads to an amino acid having important role in methyl transfer reaction. *Kor. J. Microbiol.* 40 257-262.
- Maravic, G., M. Feder, S. Ponger, M. Fogel, and J.M. Bujnicki. 2003. Mutational analysis defines the roles of conserved amino acid residues in the predicted catalytic pocket of the rRNA:m⁶A methyltransferase ErmC. *J. Mol. Biol.* 332, 99-109.
- Marktrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.
- Moffatt, B.A. and F.W. Studier. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
- Park, A.E., H. Kim, and H.J. Jin. 2010. Phylogenetic analysis of rRNA methyltransferases, Erm and KsgA, as related to antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Lett.* 309, 151-162.
- Roberts, M.C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L.B. Jensen, J. Rood, and H. Seppala. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamin-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2823-2830.
- Rose, R.E. 1988. The nucleotide sequence of pACYC184. *Nucleic Acids Res.* 16, 355.
- Rosenberg, A.H., B.N. Lade, D. Chui, S. Lin, J.J. Dunn, and F.W. Studier. 1987. Vectors for selective expression of cloned

- DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* 56, 125-135.
20. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, NY, USA.
 21. Schluckebier, G., P. Zhong, K.D. Stewart, T.J. Kavanaugh, and C. Abad-Zapatero. 1999. The 2.2 Å structure of the rRNA methyltransferase ErmC' and its complexes with cofactor and cofactor analogs: implications for the reaction mechanism. *J. Mol. Biol.* 289, 277-291.
 22. Selzer, G., T. Som, T. Itoh, and J. Tomizawa. 1983. The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids. *Cell* 32, 119-129.
 23. Skinner, R., E. Cundliffe, and F.J. Schmidt. 1983. Site for Action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *J. Biol. Chem.* 258, 12702-12706.
 24. Studier, F.W. and B.A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189, 113-130.
 25. Studier, F.W., A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, and J.W. Dubendorff. 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* 185, 60-89.
 26. Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577-585.