

## *Staphylococcus aureus* DH1에서 분리된 Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B 계열 항생물질에 대한 저항성 인자의 특성과 염기서열

권동현·박승문·윤권상·변우현  
강원대학교 자연과학대학 미생물학과

### Nucleotide Sequence and Properties of Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B Resistance Gene from *Staphylococcus aureus* DH1

Kwon, Dong Hyeon, Seung-Moon Park,  
Kwon Sang Yoon and Woo-Hyeon Byeon  
Department of Microbiology, Kangjeon National University

**ABSTRACT:** Two macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS) antibiotic resistance genes, one expressed inducibly and the other expressed constitutively were recognized from a single *Staphylococcus aureus* DH1 strain. The inducible MLS resistance gene was isolated and cloned from the R-plasmid pDE1 (7.4kb) and the constitutive gene was from chromosomal DNA. Base sequence of the inducible MLS resistance gene (1.2kb) was determined and found as same that of pE194. The restriction map of the cloned constitutive MLS resistance gene was compared with that of the inducible gene. Two genes have same restriction map except leader region. In the constitutive gene there is no leader region which is doing major role in inducible expression.

**KEY WORDS:** *Staphylococcus aureus*, R-plasmid, MLS resistance, *erm*.

세균이 macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS) 계열 항생물질에 대하여 저항성을 갖는 현상은 1964년 *Staphylococcus aureus*에서 처음 알려졌으며 (Weaver와 Pattee, 1964) 이러한 저항성 원인은 rRNA 메틸전이효소 (methyltransferase)에 의하여 23S rRNA의 2058번째 adenine 잔기에 디메틸화 (dimethylation)가 일어나고 (Lai와 Weisblum, 1971; Lai 등, 1973; Skinner 등, 1983) 이에 따라 ribosome과 항생물질 사이의 친화력이 감소되기 때문이라고 해석되고 있다 (Shivarkumar 등, 1980; Weisblum 등, 1971).

MLS 계열 항생물질에 대한 저항성 인자 중에서 그 유발성 기작이 가장 먼저 알려진 것은 *S. aureus*에서 분리된 pE194상의 *ermC*로서 이는 *Escherichia coli*의 아미노산 생합성 조절기작인 transcriptional attenuation과 유사하면서도 전사후단계조절 (post-

transcriptional control)을 받는 것으로 주장되고 있다 (Gryczan 등, 1980; Horinouchi와 Weisblum, 1980; Shivarkumar 등, 1980). *ermC*의 mRNA는 erythromycin (Em)이 존재하지 않을 때에는 구조유전자 바로 앞 부위에 위치하는 19개의 이 미노산으로 구성된 leader peptide의 ribosome에 의한 정상적인 해독에 따라 그 2차구조가 구조유전자의 해독이 불가능하도록 조성되는 반면 Em이 존재할 경우에는 leader peptide의 해독 중 mRNA의 일 정장소에서 ribosome의 정체현상 (stalling)이 일어나게 되고 이에 따라 mRNA의 2차구조가 rRNA 메틸화효소 (rRNA methylase) 구조유전자 부위의 해독이 가능한 형태로 변하면서 발현되어 저항성이 나타나게 된다고 알려져 있다 (Dubnau, 1984; Weisblum, 1983; Mayford와 Weisblum, 1989).

현재까지 밝혀진 MLS 계열 항생물질 저항성은 *S.*

**Table 1.** Bacterial strains and plasmids

strain or plasmid	relevant genotype or phenotype	reference or source
<i>S. aureus</i> DH1	Em-r Cm-r Km-r Tc-r Ap-r	Byeon <i>et al.</i> (1985)
<i>B. subtilis</i> BD170	<i>thr trp</i>	B. Weisblum
<i>E. coli</i> MV1190	( <i>lac-proAB</i> ), <i>thi supE44(srl-recA)</i> 406::Tn10( <i>tet-r</i> )	
plasmid		
pDE1	Em-r	present study
pDEB10	Em-r Km-r	present study
pBE110	Em-r Cm-r	present study
pC194	Cm-r	
pUB110	Km-r	

*aureus*에서 분리된 pE194상의 *ermC*, Tn554상의 *ermA* (Murphy, 1985) 및 Tn551상의 *ermB* (Novick 등, 1979)가 있으며 *Bacillus licheniformis*로부터의 *ermD* (Gryczan 등, 1984), *Bacillus sphaericus*로부터의 *ermG* (Monod 등, 1987), *Staphylococcus epidermidis*로부터의 *ermM* (Lampson과 Parisi, 1986), *Streptococcus sanguis*로부터의 *ermAM* (Horinouchi 등, 1983) *Bacteroides fragilis*로부터의 *ermF* (Rasmussen 등, 1986) 및 *Streptomyces erythraeus*로부터의 *ermE* (Uchiyama와 Weisblum, 1985) 등이 있다. 이들 중 *ermF*, *ermE* 및 *ermM*의 세 인자는 지속성 발현을 하는 것으로도 밝혀져 있으며 나머지는 유발성 발현을 하는 것으로 알려져 있다.

본 논문에서는 Byeon 등 (1985)에 의해 발표된 바 있는 Em 저항성 인자의 염기서열 결정과 동일 균주의 염색체 DNA로부터 분리된 지속성 발현인 Em 저항성 인자의 제한효소를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 균주와 plasmid

실험에 사용한 균주와 plasmid는 Table 1에 나타난 바와 같다.

### 제한효소 및 시약

실험에 사용된 제한효소들 중 *EcoRI*, T4 ligase 등은 New England Biolabs, Inc.에서 [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] dATP는 Amersham에서, Tris, antibiotics들, lysozyme, IPTG, X-gal, acrylamide 등은 Sigma Chemical Co.에서 각각 구입하여 사용하였

으며 균배양을 위한 배지는 모두 Difco lab. 제품을 사용하였고 배지조성 및 buffer 조성은 Maniatis 등 (1982)의 방법에 따랐으며 제한효소 반응조건은 제조 회사의 천거에 따랐다.

### 전기영동 및 DNA 절편의 추출

재조합 DNA와 DNA 절편을 확인하기 위한 agarose gel 전기영동은 Maniatis 등 (1982)의 방법에 따라 시행하였으며 agarose gel로부터의 DNA 절편의 추출은 International Biotec, Inc.의 electroeluter를 사용하였다.

### DNA 분리

Plasmid 및 염색체 DNA는 Guerry 등 (1973)의 CsCl-EtBr 농도구배 초원심분리법에 따라 분리하여 사용하였다.

### *Bacillus subtilis*의 형질전환

*S. aureus*에서 분리된 plasmid pDE1 및 재조합 plasmid를 사용한 *B. subtilis*의 형질전환은 Dubnau 등의 방법 (1971)에 의해 제조된 competent cell을 이용하여 수행되었다.

### Plasmid의 curing

Byeon 등 (1985)의 방법에 따라 ethidium bromide (2  $\mu$ m/ml) 혹은 acridine orange (20-100  $\mu$ g/ml)를 사용하여 시행하였다.

### Minimal inhibitory concentration 값과 유발성 발현 실험

세균에 대한 항생물질의 최소저해농도 (minimal inhibitory concentration, MIC) 결정과 저항성 인자의 항생물질에 의한 유발성, 지속성 발현 여부 확인은 Byeon 등 (1985)의 방법에 따랐다.

### DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열 결정은 M13mp8과 M13mp9에 subcloning하여 Sanger 등 (1977)의 dideoxy chain termination 방법을 사용하였다.

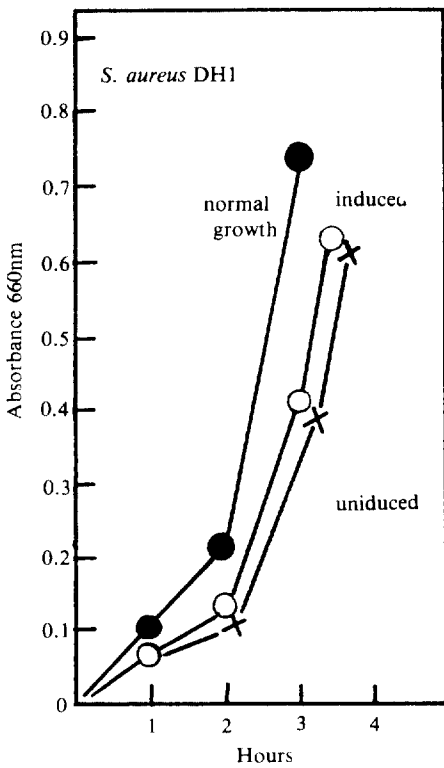
## 결과 및 고찰

### *S. aureus* 내에서의 Em 저항성 인자의 확인 및 *B. subtilis*의 형질전환 및 발현

Byeon 등 (1985)에 의해 보고된 *S. aureus* DH1 균주의 MLS 계열 항생물질 erythromycin (Em), lincomycin (Lin), clindamycin (Cln) 및 tylosin (Tyl)에 대한 저항성 정도는 Table 2에 나타난 바와 같다. 어느 항생물질에 대해서나 그 저항성 정도는 저항성을 갖지 않은, 대조균으로 사용한 *S. aureus* ATCC 6538 균주에 비해 300-1000배 이상 높았으며 그 발현은 지속성이었다 (Fig. 1). 이어 저항성의 소재 (plasmid 혹은 염색체 DNA)를 알아보기 위한 실험에서 plasmid DNA의 curing에 의한 저항성의 소

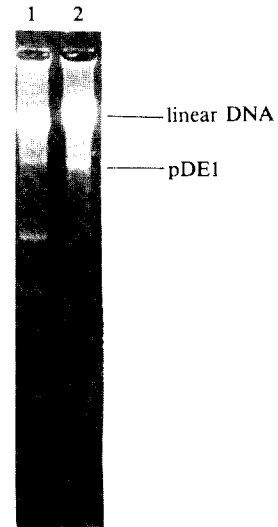
**Table 2.** Minimal inhibitory concentrations (MIC) of MLS (macrolides, lincosamides, and streptogramin B) antibiotics against *Em-s* (*S. aureus* ATCC 6538, *B. subtilis* BD170) and *Em-r* (*S. aureus* DH1, *B. subtilis* BD170-pDE1) strains

Strain	MICs (in $\mu\text{g}/\text{ml}$ )			
	Em	Lm	Cln	Tyl
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1.25	3	3	1
<i>S. aureus</i> DH1	1000	1000	1000	1000
<i>B. subtilis</i> BD170	2	50	50	2
<i>B. subtilis</i> BD170 (pDE1)	1000	1000	1000	10



**Fig. 1.** Induction of *S. aureus* DH1 measured by growth. Induction with  $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$  of erythromycin for 30 min followed by challenge with  $100 \mu\text{g}/\text{ml}$  of erythromycin. 'Normal growth' describe uninduced and unchallenged growth, 'uninduced' describe uninduced but challenged growth, and 'induced' describe induced and challenged growth.

실여부확인을 수차례 시도하였으나 Em 저항성이 없어진 균주를 얻지 못하였었는데 이러한 결과는 *S. aureus* DH1 균주의 지속성 MLS 저항성 유전자



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis profile of plasmid DNA from *S. aureus* DH1 (1) and from *B. subtilis* BD170 transformed by plasmid pDE1 isolated from *S. aureus* DH1 (2).

적어도 염색체 DNA 상에 존재할 가능성을 제시하여 준다고 볼 수 있다. Curing 방법에 의한 MLS 저항성 인자의 소개 파악과는 별도로 *S. aureus* DH1에서 확인된 4개의 plasmid를 CsCl-EtBr 초원심분리법으로 분리하여 *B. subtilis*를 형질전환시켰을 때 Em 저항성을 나타내는 colony는 4개의 plasmid 중 가장 큰 7.4 kb plasmid(pDE1)에 의해 형질전환된 것을 뿐임이 밝혀졌고 더구나 이 형질전환된 *B. subtilis*의 Em 저항성은 유발성 발현을 하는 것으로 확인되었다(Fig. 3). 이 유발성 Em 저항성 인자의 plasmid 상에서의 발견은 예측밖의 결과로서 *S. aureus* DH1내에 Em 저항성 인자가 두개, 즉 유발성인 plasmid 상의 인자와 지속성인 염색체 DNA 상의 인자가 동시에 한 세포내에 존재한다는 것을 의미하며 이어 시도된 염색체 DNA를 대상으로 한 shot-gun cloning 결과 예상했던 바 대로 *Hind*III 단일절편으로 지속성 Em 저항성 인자가 cloning 되었다(Fig. 4, 5).

**Plasmid pDE1 및 염색체 DNA 상에 존재하는 Em 저항성 인자의 제한효소 인식부위 결정과 subcloning**

*S. aureus* DH1 균주로부터 분리된 pDE1은 *Pvu*II, *Eco*RI, *Nru*I, *Hind*III, *Bcl*I, *Pst*I 및 *Cla*I에 의하여 각각 단일절편으로 절단되었고 그 외에 *Bgl*I과 *Bst*NI 등의 제한효소 인식부위가 존재하였다(Fig. 6). *Bst*NI과 *Eco*RI으로 절단된 pDE1 절편을 pUB110의 *Eco*RI과 *Pvu*II 부위에 삽입시킨

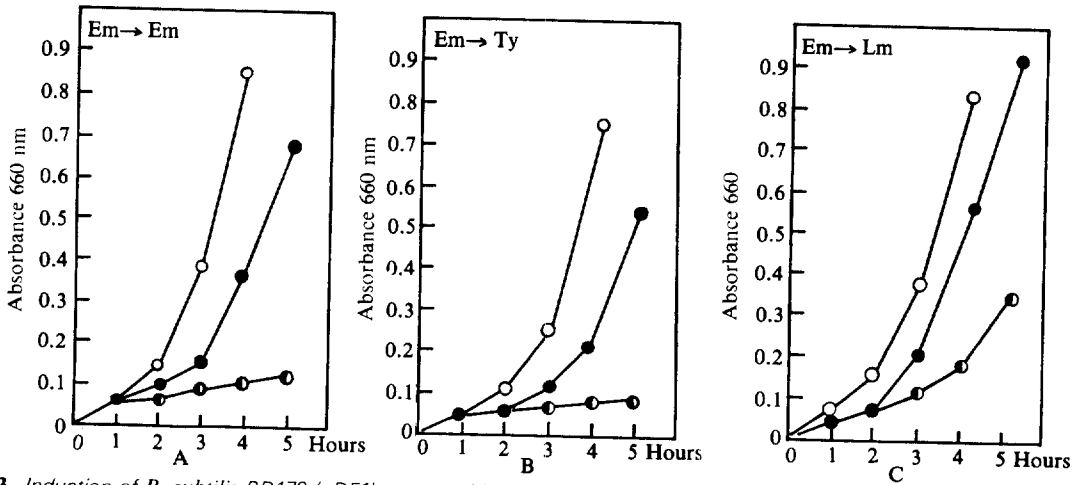


Fig. 3. Induction of *B. subtilis* BD170 (pDE1) measured by growth.

Induction with 0.1 μg/ml of erythromycin followed by challenge with 100 μg/ml of erythromycin (A), challenged with 100 μg/ml of tyrosine (B), and challenged with 100 μg/ml of lincomycin (C). 'Control' (O-O) describe uninduced and unchallenged, 'uninduced' (●-○) describe uninduced but challenged, and 'induced' (●-●) describe induced and challenged.

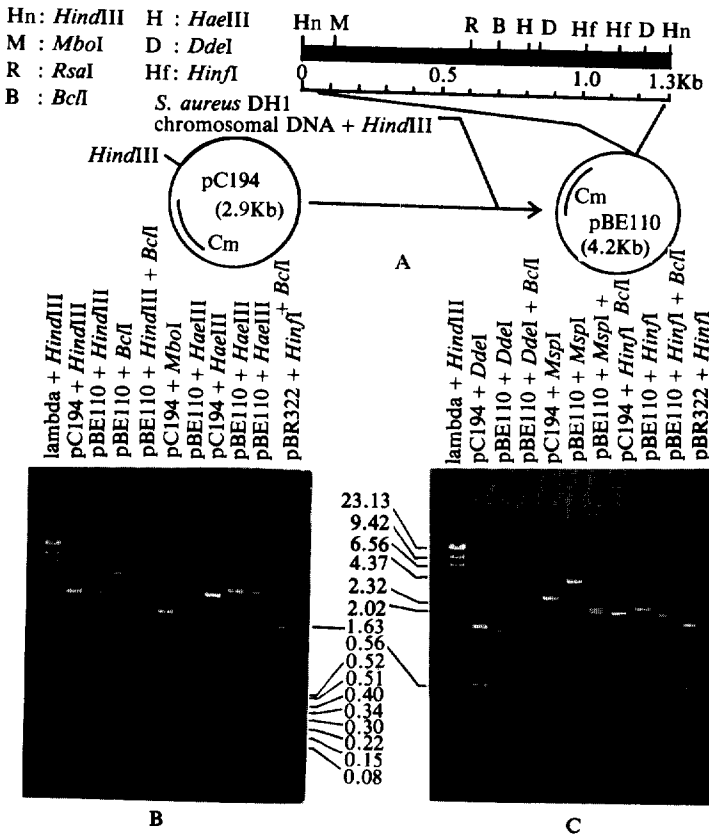


Fig. 4. Construction scheme and agarose gel electrophoresis profiles of restriction enzyme digest of pBE110. (A) Cloning of constitutively expressing erythromycin resistance gene from the chromosomal DNA of *S. aureus* DH1 using pC194 as vector and the restriction map of the cloned fragment. (B) and (C) Agarose gel electrophoresis profiles of restriction enzyme digest of pBE110.

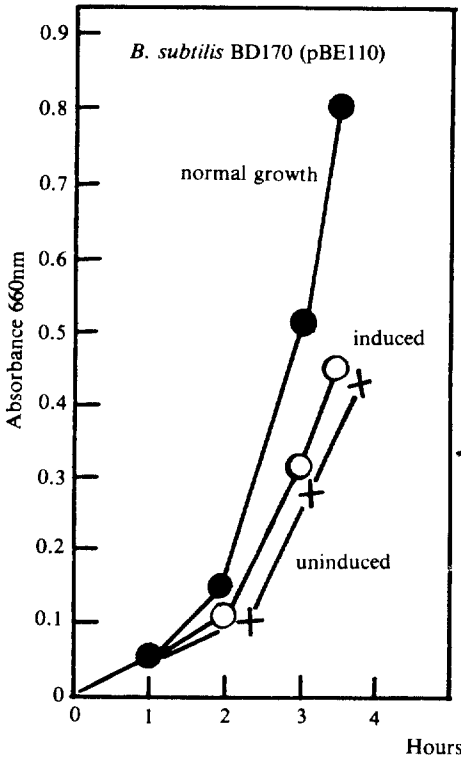


Fig. 5. Induction of *B. subtilis* BD170 (pBE110) measured by growth.

Description is same as that of Fig. 1.

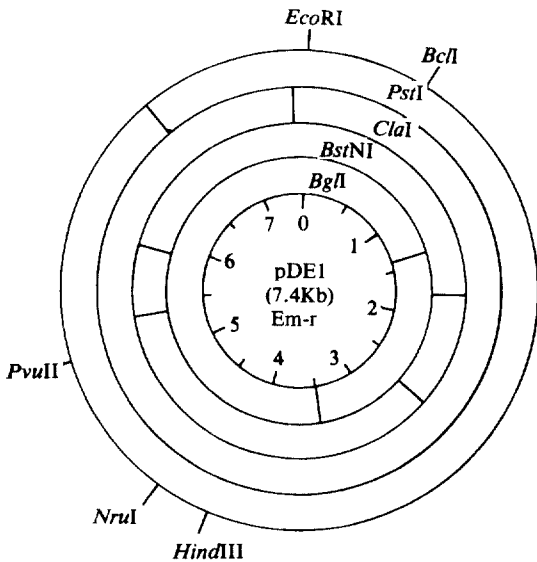


Fig. 6. Restriction endonuclease cleavage map of plasmid pDE1 (7.4Kb) from *S. aureus* DH1.

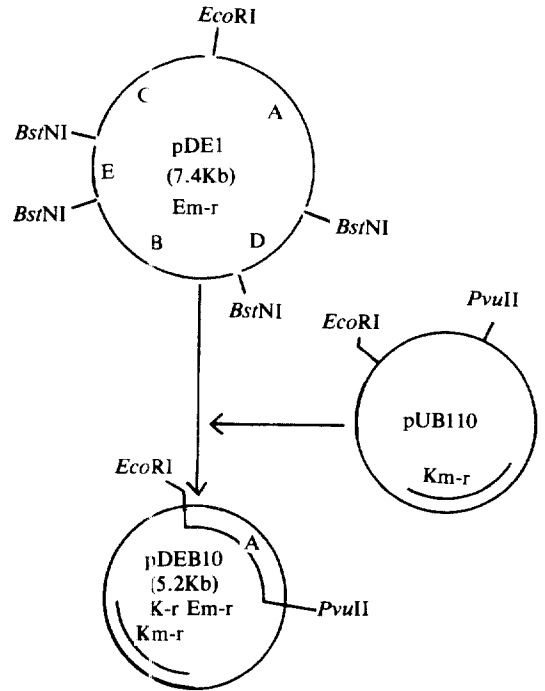


Fig. 7. Cloning of *Em* resistance gene from pDE1 using pUB110 as vector.

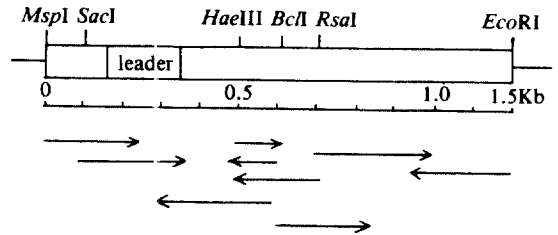


Fig. 8. Sequencing strategy for the pDE1 *MLS* resistance determinant.

재조합 plasmid 중에서 *Em* 저항성 인자를 갖는 pDEB10이 얻어짐으로써 subcloning이 수행되었으며 (Fig. 7) 염기서열 결정을 위하여 세부적인 제한효소 지도가 작성되었다 (Fig. 8).

염색체 DNA 상에서 분리된 지속성 *Em* 저항성 인자는 *HindIII* 절편내에 *MboI*, *BclI*, *RsaI*, *HaeIII*, *HinfI* 및 *DdeI* 등의 인식부위를 나타내어 pDE1상의 *EmI* 저항성 인자 인식부위와 부분적으로 상동성이 존재함을 볼 수 있었다 (Fig. 4, 9).

**유발성 *Em* 저항성 인자의 염기서열 분석**

염기서열 결정을 위한 소단위 절편의 분리 및 그 서열 결정방향은 Fig. 8에 나타난 바와 같다. 244개의 아미노산으로 구성된 단백질에 해당하는 총 980 염기

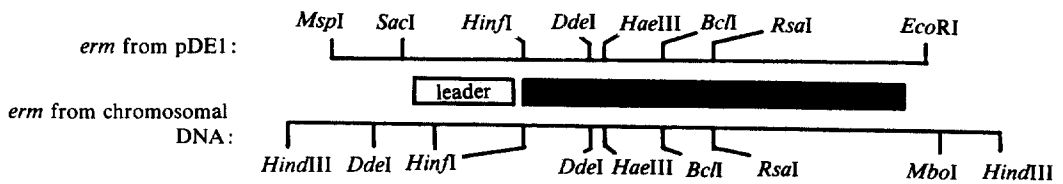


Fig. 9. Restriction endonuclease map of the *erm* from pDE1 and the *erm* chromosomal DNA.

GAGCTCTGGCTATAATTATACTAATTTTATAA GGAGG AAAAAAT ATG GGC ATT TTT  
Met Gly Ile Phe

AGT ATT TTT GTA ATC AGC ACA GTT CAT TAT CAA CCA AAC AAA AAA TAA  
Ser Ile Phe Val Ile Ser Thr Val His Tyr Gln Pro Asn Lys Lys TER

GTGGTTATAATGAATCGTTAATAAGCAAATTCATATAACCAAATTAAG GAGG GTTATA

ATG AAC GAG AAA AAT ATA AAA CAC AGT CAA AAC TTT ATT ACT TCA AAA  
MET Asn Glu Lys Asn Ile Lys His Ser Gln Asn Phe Ile Thr Ser Lys

CAT AAT ATA GAT AAA ATA ATG ACA AAT ATA AGA TTA AAT GAA CAT GAT  
His Asn Ile Asp Lys Ile MET Thr Asn Ile Arg Leu Asn Glu His Asp

AAT ATC TTT GAA ATC GGC TCA GGA AAA GGC CAT TTT ACC CTT GAA TTA  
Asn Ile Phe Glu Ile Gly Ser Gly Lys Gly His Phe Thr Leu Glu Leu

GTA AAG-AGG TGT AAT TTC GTA ACT GCC ATT GAA ATA GAC CAT AAA TTA  
Val Lys Arg Cys Asn Phe Val Thr Ala Ile Glu Ile Asp His Lys Leu

TGC AAA ACT ACA GAA AAT AAA CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC CAA GTT  
Cys Lys Thr Thr Glu Asn Lys Leu Val Asp His Asp Asn Phe Gln Val

TTA AAC AAG GAT ATA TTG CAG TTT AAA TTT CCT AAA AAC CAA TCC TAT  
Leu Asn Lys Asp Ile Leu Gln Phe Lys Phe Pro Lys Asn Gln Ser Tyr

AAA ATA TAT GGT AAT ATA CCT TAT AAC ATA AGT ACG GAT ATA ATA CGC  
Lys Ile Tyr Gly Asn Ile Pro Tyr Asn Ile Ser Thr Asp Ile Ile Arg

AAA ATT GTT TTT GAT AGT ATA GCT AAT GAG ATT TAT TTA ATC GTG GAA  
Lys Ile Val Phe Asp Ser Ile Ala Asn Glu Ile Tyr Leu Ile Val Glu

TAC GGG TTT GCT AAA AGA TTA TTA AAT ACA AAA CGC TCA TTG GCA TTA  
Tyr Gly Phe Ala Lys Arg Leu Leu Asn Thr Lys Arg Ser Leu Ala Leu

CTT TTA ATG GCA GAA GTT GAT ATT TCT ATA TTA AGT ATG GTT CCA AGA  
Leu Leu Met Ala Glu Val Asp Ile Ser Ile Leu Ser Met Val Pro Arg

GAA TAT TTT CAT CCT AAA CCT AAA GTG AAT AGC TCA CTT ATC AGA TTA  
Glu Tyr Phe His Pro Lys Pro Lys Val Asn Ser Ser Leu Ile Arg Leu

AGT AGA AAA AAA TCA AGA ATA TCA CAC AAA GAT AAA CAA AAG TAT AAT  
Ser Arg Lys Lys Ser Arg Ile Ser His Lys Asp Lys Gln Lys Tyr Asn

TAT TTC GTT ATG AAA TGG GTT AAC AAA GAA TAC AAG AAA ATA TTT ACA  
Tyr Phe Val MET Lys Trp Val Asn Lys Glu Tyr Lys Lys Ile Phe Thr

AAA AAT CAA TTT AAC AAT TCC TTA AAA CAT GCA GGA ATT GAC GAT TTA  
Lys Asn Gln Phe Asn Asn Ser Leu Lys His Ala Gly Ile Asp Asp Leu

AAC AAT ATT AGC TTT GAA CAA TTC TTA TCT CTT TTC AAT AGC TAT AAA  
Asn Asn Ile Ser Phe Glu Gln Phe Leu Ser Leu Phe Asn Ser Tyr Lys

TTA TTT AAT AAG TAA GTTAAGGGATGCATAAACTGCATCCCTTAACTTGTTTTTCGTG  
Leu Phe Asn Lys TER

Fig. 10. Nucleotide sequence of the inducible expressing *erm* gene from plasmid pDE1 of *S. aureus* DH1.

쌍의 구조 유전자 부위와 그 앞 부위에 19개의 아미노산으로 구성된 leader peptide 해당부위를 가지고 있었는데 (Fig. 10) 이상의 전 염기서열은 Horinouchi와 Weisblum(1980)에 의해 보고된 pE194 (3.7 kb) 상의 *ermC*와 동일한 것으로 밝혀졌다. 염색체 DNA에서 분리된 Em 저항성 인자의 제한효소 지도와 pDE1상의 Em 저항성 인자의 제한효소 지도의 비교에서 나타나는 상동부위는 아미노산 서열상 구조유

전자 부위에 해당되며 염색체 DNA 상의 지속성 Em 저항성 인자는 pDE1상의 leader peptide 부위가 결실된 유전자인 것으로 믿어진다. 같은 *ermC*가 존재하는 pE194와 pDE1의 구성적 차이가 어떻게 다른가와 어떤 기구에 의해 *ermC*가 염색체, pE194 및 pDE1에 분포 혹은 전위될 수 있었는가를 밝히는 것이 다음 과제로서 *ermC*를 포함한 transposon의 존재 가능성도 차후 추궁될 것이다.

## 적 요

지속성 및 유발성 발현의 두 macrolide-lincosamide-streptogramin B 저항성 인자가 한 *Staphylococcus aureus* DH1 균주의 염색체 DNA 및 plasmid pDE1 (7.4 kb)로부터 각각 분리되었다. pDE1상의 유발성 Em 저항성 인자의 염기서열은 이미 보고된 바 있는 pE194상의 *ermC*와 동일하였으며 지속성 Em 저항성 인자의 경우는 그 제한효소 인식부위의 mapping 결과로 보아 *ermC* 유전자에서 유발성 기구에 관여하는 leader peptide 부위가 결여된 인자인 것으로 밝혀졌다.

## REFERENCES

1. **Byeon, W.-H., Y.S. Kim, E.H. Cho, D.H. Kwon, H.Z. Lea and S.J. Hong**, 1985. R-Plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Kor. J. Microbiol.* **23**, 282-290.
2. **Dubnau, D.**, 1984. Translational attenuation: the regulation of bacterial resistance to the macrolide, lincosamide, streptogramin B antibiotics. *Crit. Rev. Biochem.* **16**, 103-132.
3. **Dubnau, D. and R. Davidoff-Abelson**, 1971. Fate of transforming DNA following uptake by competent *Bacillus subtilis*. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* **56**, 209-221.
4. **Gryczan, T.J., G. Grandi, J. Hahn, R. Grandi and D. Dubnau**, 1980. Conformational alteration of mRNA structure and the posttranscriptional regulation of erythromycin-inducing drug resistance. *Nucleic Acids Res.* **8**, 6081-6097.
5. **Gryczan, T.J., M. Israeli-Reches, M. Del Bue and D. Dubnau**, 1984. DNA sequence and regulation of *ermD*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance element from *Bacillus licheniformis*. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 349-356.
6. **Guerry, P., D.J. LeBlanc and S. Falkow**, 1973. General method for the isolation of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **116**, 1064-1066.
7. **Horinouchi, S., W.-H. Byeon and B. Weisblum**, 1983. A complex attenuator regulates inducible resistance to macrolides, lincosamides and streptogramin type B antibiotics in *Streptococcus sanguis*. *J. Bacteriol.* **154**, 1252-1262.
8. **Horinouchi, S. and B. Weisblum**, 1980. Post-transcriptional modification of mRNA conformation: mechanism that regulates erythromycin induced resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 7079-7083.
9. **Lai, C.-J. and B. Weisblum**, 1971. Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 856-860.
10. **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.
11. **Lampson, B.C. and J.T. Parisi**, 1986. Naturally occurring *Staphylococcus epidermidis* plasmid expressing constitutive macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance contains a deleted attenuator. *J. Bacteriol.* **166**, 479-483.
12. **Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook**, 1982. Molecular Cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
13. **Mayford, M. and B. Weisblum**, 1989. *ermC* leader peptide: Amino acid sequence critical for induction by translational attenuation. *J. Mol. Biol.* **206**, 69-79.
14. **Monod, M., S. Mohan and D. Dubnau**, 1987. Cloning and analysis of *ermG*, a new macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance element from *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* **169**, 340-350.
15. **Murphy, E.** 1985. Nucleotide sequence of *ermA*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **162**, 633-640.
16. **Novick, R., E. Murphy, T. Gryczan, E. Baron and I. Edelman**, 1979. Penicillinase plasmids of *Staphylococcus aureus*: restriction-deletion maps. *Plasmid* **2**, 109-129.
17. **Rasmussen, J.L., D.A. Odelson and F.L. Macrina**, 1986. Complete nucleotide sequence and transcription of *ermF*, a macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinant from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* **163**, 523-533.
18. **Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson**, 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.

19. **Shivarkumar, A.G., J. Hahn, G. Grandi, G. Kozlov and D. Dubnau**, 1980. Posttranscriptional regulation of erythromycin resistance protein specified by plasmide pE194. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 3903-3907.
20. **Skinner, R., E. Cundliffe and F.J. Schmidt**, 1983. Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. *J. Biol. Chem.* **258**, 12702-12706.
21. **Uchiyama, H. and B. Weisblum**, 1985. N-Methyl transferase of *Streptomyces erythraeus* that confers resistance to the macrolide-lincosamide-streptogramin B antibiotics: amino acid sequence and its homology to cognate R-factor enzymes from pathogenic bacilli and cocci. *Gene* **38**, 103-110.
22. **Weaver, J.R. and P.A. Pattee**, 1964. Inducible resistance to erythromycin in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **88**, 574-580.
23. **Weisblum, B.**, 1983. Inducible resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin type B antibiotics: the resistance phenotype, its biological diversity and structural elements that regulate expression. p.91-121, *Gene Function in Prokaryotes*, Cold Spring Harbor, N. Y.
24. **Weisblum, B., C. Siddhikol, C. Lai and V. Demohn**, 1971. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus* requirement for induction. *J. Bacteriol.* **106**, 835-847.

(Received February 12, 1990)

(Accepted March 2, 1990)