

클로람페니콜 내성 플라스미드 pKH7의 Pre 단백질의 염기서열 결정

문경호* · 박봉동 · 이동석¹ · 이백락¹
경성대학교 약학과, ¹인제대학교 미생물학과

Nucleotide Sequence of Pre Protein in Chloramphenicol Resistance Plasmid pKH7. Moon, Kyung Ho*, Bong Dong Park, Dong Seok Lee¹, and Baek-Rak Lee¹. Department of Pharmacy, Kyung-sung University, Pusan 608-736, Korea, ¹Department of Microbiology, Inje University, Kimhae 621-749, Korea - Partial nucleotide sequence (nt 1-1842) of chloramphenicol resistance plasmid pKH7 has been reported previously and residual nucleotide sequence (nt 1843-4118) of pKH7 was determined and then the complete nucleotide sequence of pKH7 was obtained. pKH7 consists of 4118 bp and has three ORFs. Besides Rep and CAT proteins described in previous paper, Pre protein which mediates site-specific recombination in *Staphylococcus aureus* was found to be on pKH7. RS_A, a site-specific recombination site of Pre protein, and *palA*, a specific lagging-strand conversion signal, was also found in pKH7. Amino acid sequence of Pre protein of pKH7 was compared with those of other antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* plasmids.

Key words: *Staphylococcus aureus*, chloramphenicol resistance plasmid, Pre protein, RS_A, site specific recombination, *palA*.

황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에서 일어나는 특별부위(site-specific) 재조합은 안정한 cointegrate를 만드는데 기여하는데[4] 이 균주들로부터 분리되는 플라스미드 중에서 크기가 작은 플라스미드의 대부분은 RS_A 그리고 RS_B로 불리는 재조합 부위를 한개 혹은 두개를 가지고 있다고 알려져 있다[11]. 30 bp 크기의 RS_B는 pT181, pE194, pC194, pC221, pS194 그리고 pSN2에서 발견되었으며 이들 플라스미드의 경우 cotransduction이 일어난 후에 RS_B cointegrate가 만들어지는 것으로 보아 RS_B 재조합은 파아지의 재조합 기능에 의해서 매개되는 것으로 설명된다[12]. 한편 RS_A는 위의 6개 플라스미드 중에서 pT181과 pE194에서 발견되었는데 이 RS_A는 크기가 70 bp 정도이며 이 중 가운데 있는 24 bp는 염기서열이 잘 보존되어 있는 core sequence로 알려져 있으며 이 두 플라스미드에서 일어나는 RS_A 재조합은 형질도입을 필요로 하지 않는 것으로 보고되었다[12]. RS_A 재조합은 Pre 단백질을 필요로 하는데 현재까지 황색포도상구균의 경우 몇 종류의 플라스미드에서 발견되었다[1].

항생제 다제 내성균 *Staphylococcus aureus* SA2로부터 분리된 클로람페니콜 내성 플라스미드 pKH7은[5] 제한 효소지도를 작성하여 본 결과 크기가 4.14 kb이며 pC221 계열의 플라스미드임이 확인되었다[8]. 그 후 pKH7으로부터 크기가 1842 bp인 *XbaI-MboI* 단편이 클로닝되어 염기서열이 결정되었으며 그 결과 pKH7의 Rep 단백질

과 CAT 단백질의 아미노산서열이 밝혀졌다[16]. 본 연구에서는 pKH7의 나머지 부분의 염기서열과 이 염기서열로부터 유도된 Pre 단백질의 아미노산 서열 그리고 Pre 단백질의 작용 부위인 RS_A 부위 그리고 플라스미드 복제에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 *palA* 부위에 대하여 보고하고자 한다.

Cm 내성 플라스미드 pKH7은 *S. aureus* KH7으로부터 분리하여 사용하였으며[8] Phagemid인 pBluescriptII KS⁺를 클로닝 및 염기서열 결정 벡터로 사용하였다. 클로닝 및 염기서열 결정을 위한 재조합 플라스미드의 수용균주로는 *E. coli* JM83을 사용하였다.

여러가지 제한효소나 T4 DNA ligase, 플라스미드 분리를 위한 WizardTM DNA purification systems, 결실돌연변이를 위한 Erase-a-Base system 그리고 염기서열 결정을 위한 SilversequenceTM DNA sequencing systems, T3 promotor primer, T7 promotor primer를 Promega에서 구입하여 사용하였다.

pBluescriptII KS⁺에 subcloning된 pKH7의 여러 단편들의 염기서열은 SilversequenceTM DNA sequencing systems를 사용한 Sanger법에 의해서 수행하였으며[15] 얻어진 염기서열의 분석은 GenBank의 Blast 프로그램을 이용하였다.

전보[16]에서 염기서열이 결정된 앞부분(nt 1-1842)이 후의 염기서열과 여기에 들어 있는 Pre 단백질의 아미노산 서열이 Fig. 1에 나와 있다. pKH7의 전체 염기서열은 4118 bp로 나타났는데 이것은 제한효소지도를 통하여 나타난 pKH7의 길이 4.14 kb와 잘 맞음을 확인할

*Corresponding author
Tel. 82-51-620-4885, Fax. 82-51-628-6540
E-mail: hkmun@star.kyungsung.ac.kr

1843 ATAAATTTTGAACATTAGCACCAACATTTTGGTGTGCTGTTTGTATTGTAATTT
 1903 GCTTTTGAACCTATGGCAGTCACTTGTTCAGTCCATTTTGTGCTTGCACAAAAACATGT
 1963 TTTAGCCTCGCAGGACATACCGTTTAATGACTATTGTAATAAGCTCTAGTAGTGTAGA
 RS_A
 2023 CTTAAATATTAATGACCGTGAATCATATGCTTAGGAGTGATTTTATATGCTTAT
 2083 TCCATTGTTAGAGTTTCAAAGTAAATCTGGAACAAATACAACAGGTATTCAA AACAT
 S I V R V S K V K S G T N T T G I Q K H
 2143 GTTCAAAGAGAAAATAAATAATGAAAACGAGATATAGACCATAGTAAAACACATTTA
 V Q R E N N N Y E N E D I D H S K T H L
 2203 AATTATGCTTTAGTAAATGACAAATAACGAACTTTAATACTTGATGATGAAAAATA
 N Y A L V N D N K R N F N N L I D E K I
 2263 GAACAGAATTATACAGTAAAAGAAAATAAGAACAGACCGCAGTTAAACATATTGATGGC
 E Q N Y T G K R K I R T D A V K H I D G
 2323 TTGATAACGTCAGATAGTGTGTTTTGATAATCAAACCTCCAGAAAGTACAAGCAGTTT
 L I T S D S E F F D N N Q T P E D T K Q Y
 2383 TTTGAACACGCTAAAGAAFTTTTGAACAAGAACTAGCGTAAAGATAAATTTGCTATATGCA
 F E H A K E F L E Q E Y G K D N L L Y A
 2443 ACGTGTGATATGAGCAAAAACACCAATGATGCAATTTGCTGCTTCCAATAAAGTAT
 T V H M D E K E T P H M H Y G V V P I T D
 2503 GACGGTCTTTAAGTGTCAAGAAAGTGTAGTAAATAAAAAGTCTTAAACAGGTTTCAG
 D G R L S A K E E V G N K K V L T E F Q
 2563 GATAGATTAACGAATATGTTAATCAACGCTGTTATGATGCTGGAACGCTGGCAATCAAGA
 D R F N E Y V N Q R G I D L E R G Q S R
 2623 CAAGTTACAATGCAAGCATGAGCAATAAGTCAGTATAAGCAGAAAACAGAAATATCAT
 Q V T N A K H E Q I S Q Y K Q K T E Y H
 2683 AAACAAGAAATAGCGCTGAGAGCCAAAACAGACTATATAAGCAAAAAACAGATAAA
 K Q E Y E R E S Q K T D Y I K Q K N D K
 2743 TTGATGCAAGAGTATCAAAAATCATTAAATACGCTTAAAAGCCTATAAATGTTCCGAT
 L M Q E Y Q K K S L N T L K K P I N V P Y
 2803 AAGCAAGAACTGAAAAGTGTGTTTTGTTAGCAAGAAAACAGAACTGGAAT
 K Q E T E K V G G L F S K E T Q E T G N
 2863 GTTGTAAAGCCAAAGATTTGATGCTTTCAGAAGCAATAGAAGCAGCACAATG
 V V I S Q E D F D A F Q K Q I E A A Q L
 2923 GTAACAGAAGTATGAGTATTAAGTCAGAAAAGCTTTAAATGACCTTAAAACGGAA
 V T E D Y E Y I K S E K A L N D L K N E
 2988 AATAGTGACCTTAAAGAAAGAAATGAAATTTATCTGAGAATCTTGAACAAATAAAGCAT
 N S E L K E E N R N L S E N L E Q I N D
 3043 ATTGCTAAAGAACAGCAAAAGCAACTTAAAGAGGAAATAAATTTAATGATTTATAA
 I A K E Q Q K L E Q A I G R K S Y I T L M N
 3103 GAGTTCTTAAAGAACTCGAACAGCCATGGCAGAAATCATATATAACTTTAATGAAE
 E F L K K L E Q A I G R K S Y I T L M N
 3163 GATGTTACTAAGATATAATCAATGAAAGAGCTATTAAGGGGATAGATAAGCAGATA
 D V T K D N N Q M K M D V L R G I D K Q I
 3223 AATCCAGAAAATCAAGAAAACAAACATGATTAAGAAAGATAGAGGTCATGAAAGA
 N P E N Y Q E Q K H D I K K D R G H E R
 3283 TAAAAAAGTCTTAAATGACGAGCTTAAATCTGATAACAGCAGCTTCAAACTCATCAA
 END
 3343 AGAGTATTGGTATATTATAACAGAACACCGCTTTTTTAAAGTAACTTATTGGTGGGA
 3403 ATAATGAAGTCTGTAGTACTTCTTAAACGCTTGGTGGGCTTGAATGGGATTAATCC
 3463 CAAGAAAGTACCAACTCAACACACAGAAATTTAGGTTCCGACCAATAAGGAAATTA
 3523 AAAAAATCAGTAAAGTGTACTTAAATAGTTCGTAATATAGTTTGCAGCTATTCT
 3583 CTATGATTAAGCTATTAATATTGCTTAACTATTATTTCTCTCATGATGATTTT
 3643 CAAGCCTAATATAAATAAAGCTTTGAGCTTACGTTATTTACTAAAATAAATCTGATC
 3703 ACTTTTGGTTCGGGAGTCTTTAATTTCTTTTGAATTAAGGCTTTGATAATGTATGT
 3763 AAAACCTTGTATATAACTGACAGTTTTAAATTTTATTTAATGATAAAGCGGCTG
 3823 CTAATAATGACTGAATATAAATAACGACTGACGATACATAGCTCAAAATGTTAATGATG
 3883 AATTAGAAAAAATAGCTAAGAAAAGGATGAGTAAATCTGCAATCTTACAATGCTAT
 3943 TCGAAGAAATAAATAAGGGCAGAAAGATATATAAATAAGTACTAGCATATTATACAA
 4003 TCATTGATAGTCTTATATAATAAACAATAAAGAAAGCAGTGTACTCTCCCAAAAGT
 4063 TTGTAACGACTTACTTAAAGAAAAGATGTGTCATGTTTTTAAATTTTGTATA 411E

Fig. 1. Partial nucleotide sequence of pKH7. The amino acid sequence of Pre protein is shown. Core sequence of RS_A site and SD sequence are underlined.

수 있었다. 이번에 염기서열이 밝혀진 부분의 ORF를 조사한 결과 아미노산 403개로 구성된 한 개의 ORF가 있음을 알 수가 있었는데 이 ORF를 GenBank의 Blast 프로그램을 통하여 분석한 결과 Pre 단백질임을 알 수 있었다(Fig. 2). Fig. 2에 알 수 있듯이 pKH7의 Pre 단백질은 pKH6와 가장 상동성 및 유사성이 높았는데 pKH6는 한국에서 분리 동정되고[7] 전체 염기서열이 밝혀진 테트라사이클린 내성 플라스미도로서[9] 전 세계적으로 Tc 내성 플라스미드로 가장 잘 알려진 pT181과 염기배열에 있어 99% 이상의 동일성을 갖고 있는 pT181 계열의 플라스미드이다[6]. 또한 pKH7의 Pre 단백질은 한국에서 *S. aureus*로부터 분리된 클로람페니콜 내성 플라스미드 pSBK203[13]과도 상동성 및 유사성을 보였으며 Horinouchi에 의하여 염기서열이 밝혀진 에리스로마이

pKH7 1 MSYS1VRVSKVSGTNTTGIQKHVQRENNNYENEDIHDKSTHLYALVNDNKRNFNNLID 60
 pKH6 MSYS1VRVSKVSGTNTTGIQKHVQRENNNYENEDIHDKSTHLYALVNDNKRNFNNLID
 pSBK203 WAYS11RVAKVSKSTNKG1QKHVQRENNNYENEDIHDKSTHLYALVNDNKRNFNNLID
 pE194 MSHS1LRVARVKSSNTNG1QRHNQRENNNYENEDIHDKSTHLYALVNDNKRNFNNLID
 61 EKIEQNYTGKRRIRTDVAKHIDGLITSSEFFDNDQTPEDTKQFFEHAKEFLQEYKQDNL 120
 pKH6 EKIEQNYTGKRRIRTDVAKHIDGLITSSEFFDNDQTPEDTKQFFEHAKEFLQEYKQDNL
 pSBK203 EKIEQNYGKRRIRKDAVKHIDGLITSSEFFDNDQTPEDTKQFFEHAKEFLQEYKQDNL
 pE194 ETIDENYSGKRRIRSDAIRHVDGLVTSKDFDLSGEEIERFFKDSLEFLNEYKQDNL
 121 LYATVHMDKTPMHYGVVPI1DDGRLSAKEVGNKVALTEPDRFNEYVNRQGYDLERG 180
 pKH6 LYATVHMDKTPMHYGVVPI1DDGRLSAKEVGNKVALTEPDRFNEYVNRQGYDLERG
 pSBK203 LYATVHMDKTPMHYGVVPI1DDGRLSAKEVGNKVALTEPDRFNEYVNRQGYDLERG
 pE194 LYATVHLDERVPHMHGFVPLTEDGRLSAKEVGNKVALTEPDRFNEYVNRQGYDLERG
 181 QSRQVTNAKHEQISQYKQTEYHKQEFYERESOKTDYIKQKNDKLMQEQYKSLNTLKKPIN 240
 pKH6 QSRQVTNAKHEQISQYKQTEYHKQEFYERESOKTDYIKQKNDKLMQEQYKSLNTLKKPIN
 pSBK203 JTRGVTPRRHEQISRYKNTDYHKEEYHESRKLDRKQESSEVMEQYQNALDVLKPPIN
 pE194 TSKEVTEREHAMQYKDDVTFHKQLQ 208
 241 VPYQETEKVGGFLSKETQETGVNVISQDFDFAQKQIEAAQVLTDEYIYKSEKALNDL 300
 pKH6 VPYQETEKVGGFLSKETQETGVNVISQDFDFAQKQIEAAQVLTDEYIYKSEKALNDL
 pSBK203 VPYELEIEKVGGLFNKETQETGVNVISQDFDFAQKQIEAAQVLTDEYIYKSEKALNDL
 pE194 EETGRKILTADEFERLQETISSAERIVDDYENIKS 297
 248 282
 301 KNENSELKEENRNLENLEQINDIAKEQQKQLNEGKLIKVKFELKLEQAIGRKSYYT 360
 pKH7 343
 pKH6 361 LMNDVTKDNNQMDVLRGIDKQINPENYQEQKHDIKDRGHER 403
 pKH6 361 RVNKLTEDEPKLNLGAGLNLDKMNPELYSEFERLQEQKQKQRDRGMHL 413

Fig. 2. Alignment of the amino acid sequence of the pKH7-encoded Pre protein with the sequences of Pre variants from other *S. aureus* plasmids.

pKH7 1769	TCGCAGGACATACCGTTTAAATGACTT-ATTG--TA--	AAATAAGTCTAGTATGTTAGACTT
pKH6 1783	TCGCAGGACACACGTTTAAACGACTT-ATT--AA--	AAATAAGTCTAGTGTGTTAGACTT
pE194 3041	TCGTAGAGCACACGTTTAAACGACTTAAATACGAAGT	AAATAAGTCTAGTGTGTTAGACTT

pKH7 411E
 pKH6 411E
 pE194 411E

Fig. 3. Sequence comparison of the RS_A site in pKH7, pKH6, and pE194. A 24-nucleotide sequence of identity, referred to as core sequence, is represented by open box. Different nucleotide sequence is indicated by asterisk.

신 내성 플라스미드 pE194[3]의 Pre 단백질과도 상동성 및 유사성을 보여 주었다. 전체적으로는 C 말단에 비하여 N 말단에서 높은 상동성이나 유사성을 보여주었다. Pre 단백질의 앞부분에서 SD를 확인 할 수 있었으며 또한 Pre 단백질의 작용 부위인 RS_A의 core sequence를 확인할 수 있었다. pKH7의 RS_A의 염기서열을 다른 플라스미드의 RS_A의 염기서열과 비교한 결과가 Fig. 3에 나와 있다. 전체적으로 pKH6의 RS_A와 유사성이나 상동성이 제일 높음을 알 수 있었다. RS_A에 있어서 염기서열의 보존이 잘 되어있는 core sequence의 염기서열을 pKH6와 pE194의 core sequence의 염기서열과 비교해 본 결과 전체 24 bp 중에서 1개의 염기서열에서 차이를 보였다. Pre 단백질의 ORF 이 후의 염기서열을 조사해 본 결과 lagging strand의 복제에 관여하는 palA의 구조를 볼 수가 있었는데(Fig. 4) 이 palA 구조는 *S. aureus*의 다른 플라스미드에서도 관찰되어 보고되었다[2, 10, 14]. 한편 pKH7에서는 cotransduction 후에 일어나는 coin-tegrate 형성에 관여하는 RS_B 구조는 확인할 수 없었다. 일반적으로 *S. aureus*에서 발견되는 적은 크기의 플라스미드들은 그 플라스미드내에 복제에 관여하는 단백질 내성에 관여하는 단백질, 그리고 플라스미드 재조합에 관여하는 단백질이 순서적으로 배열되어 있는 구조를 하

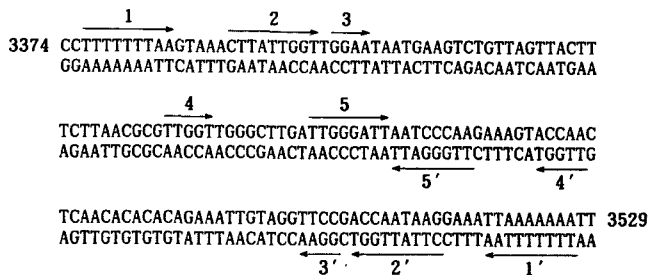


Fig. 4. *PalA* sequence of pKH7. Each subsequence and its complementary counterpart are indicated by numerals and their primed counterparts, respectively.

고 있는데 이상에서와 같이 한국에서 분리 동정된 클로람페니콜 내성 플라스미드 pKH7도 위와 같은 전형적인 배열을 하고 있음을 알 수 있었다. pKH7은 rep 단백질이나 CAT 단백질의 경우 클로람페니콜 내성 플라스미드인 pUB112와 염기배열의 유사성이 가장 높았으며[16] 플라스미드 재조합에 관여하는 Pre 단백질의 경우 pUB112의 전체 염기 서열이 밝혀지지 않아서 직접 비교할 수 없었으나 염기서열이 밝혀진 다른 플라스미드와 비교해 본 결과 한국에서 발견된 다른 클로람페니콜 내성 플라스미드 pSBK203보다 테트라사이클린 내성 플라스미드인 pKH6와 더 높은 유사성을 보여주었다(Fig. 2). pKH6와 pKH7은 두 플라스미드 모두 Pre 단백질과 RS_A 부위를 가지고 있을 뿐 만아니라 동일한 항생제 다제 내성균 *S. aureus* SA2로부터 분리된 플라스미드임으로 인해 향후 *S. aureus* SA2 내에서 RS_A 부위를 매개로 하여 cointegrate를 형성할 가능성을 제시하여 준다.

REFERENCES

- Gennaro, M. L., J. Kornblum, and R. P. Novick. 1987. A site-specific recombination function in *Staphylococcus aureus* plasmids. *J. Bacteriol.* **169**: 2601–2610.
- Gruss, A., H. F. Ross, and R. P. Novick. 1987. Functional analysis of a palindromic sequence required for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 2165–2169.
- Horinouchi, S. and B. Weisblum. 1982. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamycin, and streptogramin type B antibiotics. *J. Bacteriol.* **150**: 804–814.
- Iordanescu, S. 1975. Recombinant plasmids obtained from two different, compatible staphylococcal plasmids. *J. Bacteriol.* **124**: 597–601.
- Kang, J. S. and K. H. Moon. 1990. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolated in Pusan. *Yakhak Hoeji* **34**: 122–125.
- Khan, S. A. and R. P. Novick. 1983. Complete nucleotide sequence of pT181, a tetracycline resistance plasmid from *Staphylococcus aureus*. *Plasmid* **10**: 251–259.
- Kim, K. H., J. M. Kim, and K. H. Moon. 1992. Characterization of tetracycline resistant plasmid in *Staphylococcus aureus* by restriction enzyme mapping. *Yakhak Hoeji* **36**: 255–258.
- Lee, D. W. and K. H. Moon. 1993. Characterization of chloramphenicol resistant plasmid of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yakhak Hoeji* **37**: 621–624.
- Lee, D. W., S. J. Yoon, W. K. Kim, C. K. Shin, S. H. Im, B. R. Lee, and K. H. Moon. 1996. Complete nucleotide sequence of pKH6, a tetracycline-resistance plasmid from multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* SA2. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 423–426.
- Novick, R. P. 1989. Staphylococcal plasmids and their replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**: 537–565.
- Novick, R. P., S. Iordanescu, M. Surdeanu, and I. Edelman. 1981. Transduction-related cointegrate formation between staphylococcal plasmids: A new type of site-specific recombination. *Plasmid* **6**: 159–172.
- Novick, R. P., S. J. Projan, W. Rosenblum, and I. Edelman. 1984. Staphylococcal plasmid cointegrates are formed by host- and phage-mediated general *rec* systems that act on short regions of homology. *Mol. Gen. Genet.* **195**: 374–377.
- Park, S. M., D. H. Kwon, and W. H. Byeon. 1993. Cloning and base sequence determination of replication gene (*rep*) isolated from *Staphylococcus aureus* DH1 R-plasmid pSBK203. *Kor. J. Microbiol.* **31**: 44–47.
- Projan, S. J. and R. Novick. 1988. Comparative analysis of five related staphylococcal plasmids. *Plasmid* **19**: 203–221.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463–5467.
- Yoon, S. J., D. W. Lee, W. K. Kim, C. K. Shin, S. H. Im, and K. H. Moon. 1995. Nucleotide sequences of Rep and CAT proteins encoded by chloramphenicol-resistant plasmid pKH7. *Yakhak Hoeji* **39**: 676–680.

(Received July 2, 1998)