

23S rRNA Monomethyltransferase인 *tlrD*의 클로닝, 이의 대장균에서 대량생산과 활성 검색

진 형 중

수원대학교 자연과학대학 생명공학과

ERM 단백질은 23S rRNA의 A2058에 methylation시킴으로써 macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B)계 항생제의 부착을 저해하여 항생제의 활성을 억제하는 내성인자 단백질로 monomethylase와 dimethylase로 나누어진다. Dimethylase와 비교되는 monomethylase의 특성을 밝히기 위해 dimethylase (ErmSF)와 monomethylase (TlrD)를 동시에 보유한 *Streptomyces fradiae*에서 *tlrD*를 클론하고 대장균에서 최초로 대량생산을 시도하여 37°C에서 세포내 전체 단백질의 55%를 차지할 정도로 대량생산된 불용성 단백질을 얻어내었다. 그러나 ErmSF와는 달리 낮은 온도에서 대량생산된 단백질이 용해성 단백질로 전환되지 않고 불용성 단백질로 남아있었다. Thioredoxin과 샤페론인 GroESL은 모두 ErmSF의 경우와 마찬가지로 용해성 단백질로의 전환에 도움을 주지 않았다. 이러한 차이점은 현재까지 전혀 밝혀지지 않은 단백질내의 구조적 특성에 의한 monomethylase와 dimethylase의 차이점을 밝힐 수 있다는 가능성을 말해주는 것으로 추정된다. 그러나 ErmSF의 경우와 동일하게 SDS-PAGE에서 검색되지 않은 미량의 발현된 용해성 단백질이 TlrD를 함유한 세포에 항생제에 대한 내성을 나타내게 하였고 이렇게 발현된 내성은 monomethylase에 의한 내성에서 기대되는 내성과 일치하였다.

Key words □ *in vivo* activity, minimal inhibitory concentration (MIC), MLS_B (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotic resistance factor protein, overexpression, TlrD

ERM 단백질은 bacteria의 23S rRNA에 존재하는 특정 adenine (A2058, *E. coli* coordinate)에 methylation시킴으로써 macrolide, lincosamide, streptogramin B 항생제 (MLS_B계 항생제)의 부착능을 저해하여 미생물로 하여금 이들 항생제에 대하여 내성을 나타내게 하는 단백질이다(5, 21, 24, 25). ERM 단백질은 크게 monomethylase와 dimethylase로 나누어지고 이들이 나타내는 내성은 각각 type I 과 type II로 불리어 진다 (19). Type I 내성은 A2058에의 monomethylation에 의하여 이루어지며 이로 인하여 lincosamide 항생제에 대하여는 내성을 나타내지만 streptogramin B나 macrolide 항생제에 대하여는 중간정도의 내성 또는 전혀 내성을 나타내지 못한다(14, 19, 25, 28). 반면 type II 내성은 dimethylation에 의하여 이루어지며 위의 모든 항생제에 대하여 강한 내성을 나타내게 되고 거의 모든 ERM 단백질은 dimethylase로 MLS_B 항생제 내성(type II)을 일으키게 된다(19, 25, 27). 이때 일어나는 methylation과정은 S_N2 반응기작에 의하여 이루어지는 것으로 추정되고 있으며(22) monomethylation이 일어난 후에는 기질이 단백질로부터 떨어져 나오게 되고 unmethylation된 기질과 같은 정도의 부착강도를 보이며 다시 단백질에 결합되어 dimethylation이 일어나는 것으로 밝혀져 있다. 이 과정은 two consecutive Random Bi Bi sequential reaction에

의하여 이루어진다(4). 한편 최근의 연구결과에 따르면 MLS_B계 항생제의 내성에 절대적인 역할을 하는 ERM 단백질의 작용을 피하기 위해 즉 내성균에 작용할 수 있는 항생제로 개발된 ketolide인 telithromycin등의 작용범위를 검색한 결과, 이들 항생제는 일부 내성균에는 작용을 하지만 일부의 내성균에는 전혀 작용을 하지 않는 것으로 밝혀졌다. 이 현상을 분석한 결과 23S rRNA dimethylation된 병원균은 부착능이 향상된 ketolide의 경우 도 부착을 억제하여 내성을 나타내는 반면 monomethylation이 된 균주는 ketolide에 대하여 내성을 나타내지 못하는 것으로 밝혀졌다(16). 이 현상은 세포내에 dimethyltransferase를 함유하고 있더라도 세포내의 SAM (S-adenosyl-L-methionine)의 농도가 낮으면 monomethylation만 일어나게 되며(4, 10, 27) 이러한 균주는 새롭게 개발된 ketolide 항생제의 작용에 의하여 성장이 억제되는 것으로 밝혀졌다(16). 따라서 이러한 사실은 ERM 단백질에 의한 내성의 중요성을 다시 한번 입증하는 결과이다. 이 사실들을 종합하여 볼 때 ERM 단백질은 monomethylase와 dimethylase로 나뉘어 있고 dimethylase라도 세포내에 존재하는 cofactor의 농도에 따라 monomethylation 또는 dimethylation을 수행하게 된다. 위의 사실은 충분히 설명될 수 있으나 단백질의 특성에 따른 monomethylase와 dimethylase의 구별은 생화학적 방법 이외에 어떤 방법으로도 이루어지지 않았으며 이들의 차이점에 근거한 작용양식에 대한 완전한 이해는 이 단백질의 억제제의 창출을 도모할 수 있는 계기를 마련할 수 있을 것이다. 이러한 노력의 일환으로 본 연구에서는 ErmSF (dimethylase,

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-220-2290, Fax: 82-31-220-2290
E-mail: hjjin@mail.suwon.ac.kr

reclassified as Erm(S), 20)를 함유하고 macrolide 항생제인 tylosin 생산균주인 *S. fradiae*로부터 대표적인 monomethylase인 TlrD [reclassified as Erm(N), 20]를 코딩하는 유전자를 클로닝하고 이를 대장균에서 대량생산을 시도하고 그 활성을 세포내에서 측정하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 올리고뉴클레오타이드

본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드는 Table 1에 정리하였다.

thrD 유전자의 클로닝

thrD 유전자의 클로닝은 이전에 발표된 방법대로 분리된(8) *S. fradiae* DNA를 사용하여 올리고뉴클레오타이드-1 (5'-catatgccgtctcgtccgcgtaccgattccgcccccaccggcagcagggg-3', 47-mer: 밑줄친 뉴클레오타이드는 *NdeI* 제한효소 인식 염기서열을 나타냄)와 올리고뉴클레오타이드-2 (5'-ctcgaggcgcctccgctcggcgagatgcg-3', 30-mer: 밑줄친 뉴클레오타이드는 *XhoI* 인식 염기서열을 나타냄)를 각각 전방향, 역방향 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하여 얻었다. 이렇게 얻어진 DNA 절편을 *XcmI*으로 절단한 T vector인 pDK101(9)에 접합시킨 후 클로닝하여 pHJJ201으로 명명하였다. 이렇게 얻어진 플라스미드를 *NdeI*과 *HindIII*으로 절단한 후 얻어진 DNA 절편을 같은 제한효소로 처리한 표현 담체(expression vector)인 pET23b (Novagen, Madison, USA)에 접합한 후 T7 RNA 합성효소 유전자를 함유한 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환하였다. TlrD 단백질을 표현하는 DNA 절편이 reading frame

에 맞게 담체에 끼워진 클론을 플라스미드 분리 및 제한효소 절단과 dideoxy chain termination sequence analysis에 의하여 선별하였다. 여기서 얻어진 플라스미드를 pHJJ202로 명명하였다. 그리고 이 플라스미드를 함유한 대장균을 *E. coli* HJJ202로 명명하였다.

thrD 유전자의 발현

표현 담체에 적절히 끼워진 thrD 유전자의 발현은 이미 발표된 ermSF 유전자의 발현 방법에 근거하여(10) 약간의 변형과 함께 다음과 같이 수행하였다. 하룻밤 동안 배양한 *E. coli* HJJ202를 새로운 배지에 transfer하고 A₆₀₀이 0.8-1.0이 되도록 37°C에서 배양한 후 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하고 37°C, 18°C에서 24시간 배양하였다. 그리고 용해성 단백질의 양을 증가시키는 방법의 하나로 샤페론(chaperone)으로 작용하는 GroESL 또는 일반적인 단백질 disulfide bond 산화환원 효소인 Thioredoxin (26)과 동시에 발현하여 위와 같은 온도에서 같은 시간만큼 배양하고 그 발현되는 정도를 SDS-PAGE (11)로 확인하였다. 그리고 IPTG의 농도를 0.1, 0.5 mM로 낮추어 유전자의 발현을 각 세포 중에 대하여 유도하고 그 발현양상을 분석하였다.

발현된 단백질의 정제

TlrD 단백질의 정제는 기존에 발표된 ErmSF 단백질 정제 방법을 사용(7), 약간 변형하여 실시하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 원심분리(8,000×g)하여 얻어진 세포를 lysozyme (5 mg/ml)을 함유하는 buffer A [20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl, 5 mM Imidazole]에서 분산시킨 후 상온에서 20분간 배양

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain or plasmid	Description	Reference or source
Bacterial strains		
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Host for plasmid expression vectors that utilize the T7 promoter: possesses T7 RNA polymerase gene under <i>lac</i> control	Novagen
<i>E. coli</i> Trx	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pT-Trx	25
<i>E. coli</i> GroESL	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pT-GroESL	25
<i>E. coli</i> HJJ105	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ105	9
<i>E. coli</i> HJJ202	<i>E. coli</i> BL21(DE3) carrying plasmid pHJJ202	this work
<i>S. fradiae</i> NRRL 2702	Source of DNA template for obtaining <i>thrD</i> by PCR	2
Plasmids		
pET 23b	Vector for high-level expression under T7 promoter, with His ₆ -tag at C-terminal end	Novagen
pDK101	T vector for direct cloning of PCR products: purified from <i>E. coli</i> ATCC 77406	8
pT-Trx	pACYC containing gene encoding <i>E. coli</i> thioredoxin(Trx)	25
pT-GroESL	pACYC containing gene encoding <i>E. coli</i> chaperonins GroES and GroEL	25
pHJJ105	pET23b containing <i>ermSF NdeI-HindIII</i> gene cartridge	9
pHJJ201	pDK101 containing <i>thrD NdeI-XhoI</i> gene cartridge	this work
pHJJ202	pET23b containing <i>thrD NdeI-XhoI</i> gene cartridge	this work

하고 -80°C에서 얼린 후 녹여서 세포를 분쇄하였다. 여기에 DNase I (2.5 µg/ml) 및 RNase A (2.5 µg/ml)을 넣고 반응시킨 후 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 얻어진 상등액으로부터의 단백질 분리는 공급자 (Novagen)가 제공한 과정에 근거, Ni²⁺ affinity column chromatography법에 의하여 분리하였다. buffer A로 평형을 이룬 Hisbind resin이 충전된 컬럼에 위에서 얻어진 용액을 loading한 후 60, 80, 100 mM imidazole을 포함한 buffer B [20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 500 mM NaCl]을 사용하여 컬럼에 부착되지 않거나 잘못 부착된 단백질을 씻어낸 후 원하는 단백질을 300 mM imidazole이 함유된 buffer B를 사용하여 얻어내었다.

발현된 단백질 중에서 용해성 단백질과 inclusion body의 분리

발현된 단백질 중에서 용해성으로 발현된 단백질의 정도를 알아보기 위하여 다음과 같이 실험하였다. 배양액 2 ml에서 얻은 세포를 800 µl 완충용액 A에 재분산시켜서 위와 같이 분쇄한 후 원심분리(20,000×g, 30 min)하여 용해성 단백질 분획을 얻고 침전물을 다시 동일한 양의 완충용액에 분산시켜 inclusion body 분획을 얻은 후 SDS-PAGE로 분석하여 발현된 단백질의 양상을 분석하였다.

발현된 단백질의 생체 내 활성 검색(항생제 내성 검사)

생체 내 활성검사는 이미 발표된 방법을 사용하여 디스크 방법을 사용하여 결정하였다 (7). 간단히 기술하면 다음과 같다. 원형의 거름종이 (Whatmann 3M)에 25 mg/ml의 erythromycin 용액 또는 lincomycin을 250 µg이 되도록 점적한 후 말린 다음 새롭게 배지위에 도포된 미생물위에 올려 하루 동안 배양하여 그 성장억제지역을 관찰하였다. 이 때 대조군으로 발현 담체만을 함유한 대장균과 dimethylase인 ErmSF를 발현하는 담체를 함유한 대장균을 사용하여 항생제의 억제 정도를 비교 관찰하였다.

TlrD 단백질을 발현하는 대장균에 대한 항생제의 최소 억제 농도(Minimal inhibitory concentration) 조사

하루 밤 동안 배양한 균을 새로운 배지에 transfer하고 A₅₅₀이 0.7이 되도록 배양한 후 200 cells/ml가 되도록 희석한 다음 5 µl 즉 1,000개의 세포를 0-5,120 µg/ml 농도의 erythromycin 또는 0-8,000 µg/ml 농도의 lincomycin을 함유한 고체배지에 점적하고 수분이 증발할 때 까지 기다린 다음, 37°C에서 18-20시간 배양한 후 세포의 성장을 관찰하고 완전히 세포의 성장이 관찰되지 않는 농도를 최소억제농도(MIC)으로 정하였다. 여기서도 위와 같은 대조군을 사용하였다.

결 과

tlrD 발현을 위한 발현 플라스미드의 제작

ERM 단백질은 monomethylase와 dimethylase로 나뉘어져 있다. 이들의 차이점을 규명하기위해 monomethylase로 작용하는 *tlrD* 유전자를 얻은 다음 DNA 염기서열을 결정하여 변이가 유도되지

않았음을 확인하고 이를 T7 promoter가 장착된 발현 담체에 끼워 넣었다. 여기서 얻어지는 단백질은 발현 담체인 pET23b에 의하여 제공되는 6개의 histidine꼬리를 표현하는 DNA 염기서열을 3' 말단에 갖게 되고 이를 분리 정제에 이용하였다.

*tlrD*의 발현 및 순수 분리

tlrD 유전자 절편을 함유한 pET23b를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환 한 후 IPTG 존재 하에 18°C와 37°C에서 배양하여 그 발현 정도와 양상을 SDS-PAGE를 사용하여 분석하였다(Fig. 1A). Fig. 1A에서 보여지는 대로 빈 벡터만을 함유한 세포내에

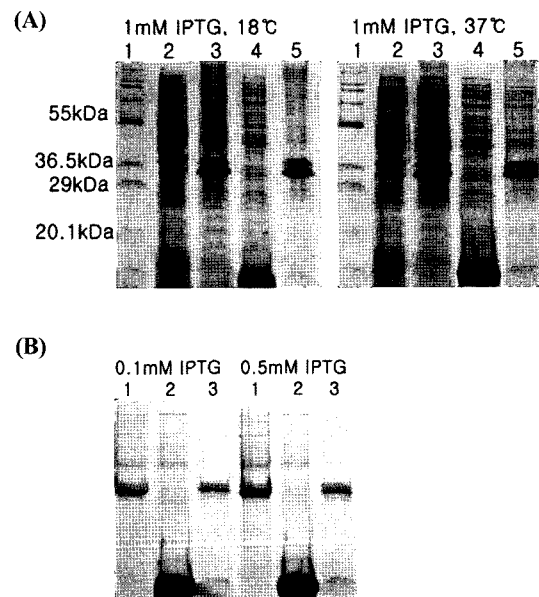


Fig. 1. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the expressed TlrD and its solubility. (A) *E. coli* HJJ202 transferred to new LB medium was incubated at 37°C to reach an A₆₀₀ of 0.8-1.0. After addition of 1 mM IPTG, incubation continued for 18 hr at 18°C or 37°C. At this point, SDS-PAGE was performed to assess the overexpression of TlrD. TlrD accumulated to 55% of the total cell protein as judged by the program Multi Gauge version 3.0 (Fujifilm). To check the solubility of overexpressed TlrD, cell pellets of 2 ml culture dissolved in 800 µl buffer A was disrupted by freezing and thawing method. The resultant lysate was treated with DNase I, RNase A and centrifuged (20,000×g, 30 min). The resultant supernatant (soluble protein fraction) and particulated material (inclusion body fraction) dissolved in the same volume as lysate was denatured in 6× sample buffer, and resolved on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. Almost all of the expressed protein resided in inclusion body fraction. Lane 1, molecular size marker in kDa: bovine serum albumin 69; glutamic dehydrogenase 55; lactic dehydrogenase, porcine muscle 36.5; carbonic anhydrase, bovine liver 29; trypsin inhibitor, soybean 20.1; 2, total cell protein in *E. coli* harboring empty pET23b vector; 3, total cell protein in *E. coli* HJJ202; 4, soluble protein fraction; 5, inclusion body fraction. (B) Solubility of TlrD induced with low concentration IPTG (0.1 and 0.5 mM). Lane 1, total cell protein in *E. coli* HJJ202; 2, soluble protein fraction; 3, inclusion body fraction.

서 발현된 단백질의 양상(lane 2)과는 달리 *tlrD* 유전자 절편을 함유한 발현담체에서는 SDS-PAGE상에서의 이동정도가 lactic dehydrogenase (36.5 kD)과 carbonic anhydrase (29 kD)사이에 나타나는 단백질의 대량 발현(lane 3)이 관찰되었다. TlrD의 염기서열로부터 추정된 단백질의 분자량은 33.8 kDa임으로 발현된 단백질은 TlrD임을 알 수 있었다. 그리고 이렇게 생산된 TlrD는 세포내 총 단백질의 55%를 차지하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 용해성 단백질 분획(lane 4)에서는 TlrD에 해당하는 단백질 밴드를 확인할 수 없었고 발현된 대부분의 단백질은 불용성 단백질 분획(lane 5, inclusion body fraction)에서 관찰되었다. 이러한 현상은 IPTG의 농도와 관계없이 지속적으로 관찰되었다. 즉 낮은 0.1 mM이나 0.5 mM의 IPTG 농도에서도 용해성 단백질의 발현양은 전혀 증가하지 않았다(Fig. 1B). 단백질의 용해도를 증가시키는 것으로 밝혀진 GroESL과의 공동발현을 통하여 용해성 단백질의 양의 증가를 시도하여 TlrD와 유사한 이동거리를 보이는 미량의 단백질 밴드를 확인하였고(Fig. 2A) 이를 다음과 같이 순수분리 하였다. 대량생산된 단백질을 함유하는 세포를 분쇄한 후 원심분리를 사용하여 세포분쇄 물 및 불용성 단백질(inclusion body)를 포함하는 불용성물질을 제거하고 용해성 단백질을 함유하는 상등액을 얻었다(Fig. 2B, lane 3). 이렇게 얻어진 단백질용액을 Ni^{2+} 이 고정화된 resin이 있는 컬럼에 넣고 100 mM imidazole이 함유된 완충용액을 사용하여 씻어낸 후(Fig. 2B, lane 6) 300 mM이 함유된 완충용액을 사용하여 용해성 단백질로 발현된 분획을 얻어내고자 하였으나 밴드를 확인할 수 없었다(Fig. 2B, lane 7). 또한 imidazole의 량을 감소시킨 완충용액으로 컬럼을 씻은 후 분획을 실시한 경우에서도 같은 결과(자료 미제시)를 나타내어, TlrD와 유사한 이동거리를 보이는 미량의 단백질 밴드는 TlrD가 아닌 것으로 확인되었다. 또한 GroESL과 함께 단백질의 용해도를 증가시키는 것으로 밝혀진 Thioredoxin과의 공동 발현에서도 같은 결과를 나타내었다(자료 미제시). 이

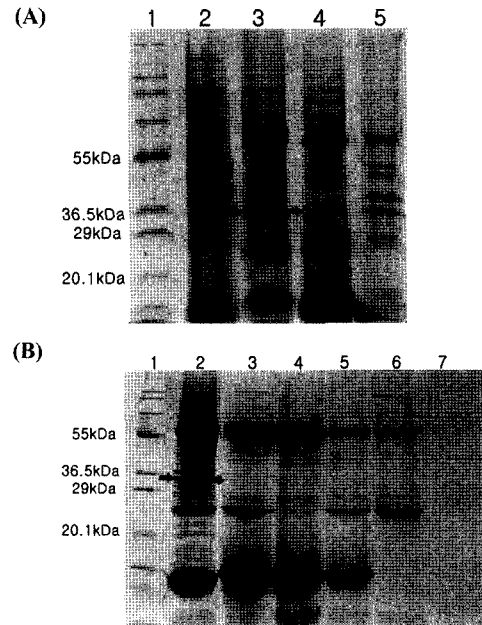


Fig. 2. Expression of TlrD with coproduction of GroESL and its purification. (A) pHJJ202 was transformed into *E. coli* cells producing GroESL. Incubation and SDS-PAGE analysis was performed as described in Fig. 1. Arrow indicates expressed protein whose molecular weight appeared to be same as that of TlrD. Lane 1, molecular size marker: refer to Fig. 1; 2, *E. coli* harboring empty pET23b vector; 3, *E. coli* cotransformed with pT-GroESL and pHJJ202; lane 4, supernatant fraction; 5, inclusion body fraction. (B) Purification of the expressed TlrD in the presence of GroESL. The growth condition of *E. coli* and the cell lysis was performed as described in Fig. 1. The resultant supernatant was loaded onto the 4 ml immobilized Ni^{2+} affinity column. Lane 1, molecular size marker: refer to Fig. 1; 2, total cell protein; 3, supernatant fraction of lysate; 4, affinity run-through; 5, 5 mM imidazole column wash; 6, 100 mM imidazole column wash; 7, 300 mM imidazole elute.

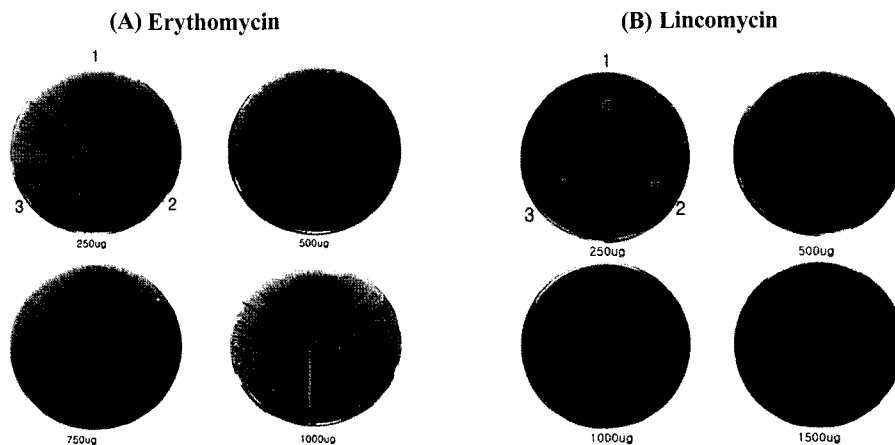


Fig. 3. Antibiotic susceptibility assay. Erythromycin and lincomycin stock solution was dropped on Whatmann 3 M paper circle to reach the final amount of 250, 500, 750, 1000 μg of erythromycin and 250, 500, 1000, 1500 mg of lincomycin, respectively. In each section of agar plate, *E. coli* cells containing empty vector, TlrD and ErmSF expression vector was spread with cotton swab. In the center of each section, paper circle containing erythromycin or lincomycin was placed, and the resulting agar plate was incubated overnight at 37°C. Section 1, *E. coli* cells harboring empty pET23b vector; section 2, *E. coli* cells harboring pHJJ202 (TlrD); section 3, *E. coli* cells harboring pHJJ105 (ErmSF).

러한 양상은 배양온도를 낮추어 배양한 세포를 이용한 순수분리에서도 전혀 개선되지 않았다(자료 미제시).

TlrD의 생체 내에서의 활성 검색

TlrD는 monomethylase이므로 lincosamide 항생제에는 내성을 보이고 그 밖의 macrolide나 streptograminB 항생제에 대하여는 중간 정도의 내성을 보인다. 따라서 lincosamide 항생제인 lincomycin과 macrolide 항생제인 erythromycin을 이용하여 발현된 TlrD의 활성을 검색하였다. 항생제가 점적된 여지(filter paper)를 사용한 내성 검사에서는 TlrD가 발현된 세포는 높은 농도의 lincomycin에 대하여도 내성을 나타내었지만(Fig. 3B) erythromycin의 경우에는 농도가 높아지면서 항생제에 의해 피해를 받았다. 높은 양의 erythromycin (750 µg)이 존재할 때는 dimethylase인 ErmSF를 함유한 대장균도 피해를 받았으나 TlrD의 경우 보다는 그 저해 정도가 훨씬 작았다(Fig. 3A). 이러한 현상을 좀 더 정량화하기 위해 lincomycin과 erythromycin에 대한 최소억제농도를 측정하였다. 담체만을 함유한 대장균은 320 µg/ml 농도의 erythromycin에서 이미 그 성장을 보이지 않았고 100 µg/ml 농도의 lincomycin에서 피해를 받기 시작하여 1,000 µg/ml의 농도에서는 성장이 완전히 저해 되었다. 이에 비해 TlrD를 발현하는 세포는 3,200 µg/ml의 농도의 erythromycin 존재 하에 성장이 저해되다가 3,520 µg/ml의 농도에서는 완전히 성장이 멈추었다. 그러나 lincomycin을 함유한 배지에서는 8,000 µg/ml의 농도에서도 성장이 멈추지 않았다. 이에 반해 dimethylase인 ErmSF를 발현하는 세포는 5,120 µg/ml 농도의 erythromycin과 8,000 µg/ml 농도의 lincomycin에서도 그 성장 억제력을 관찰할 수 없었다 (Fig. 4). 이러한 특성은 monomethylase와 dimethylase의 특성을 잘 나타내주는 것으로 사료된다.

고 찰

ERM 단백질은 monomethylase와 dimethylase로 나누어진다. 이들은 unmethylated RNA를 기질로 사용하나 monomethylase는

1개의 methyl 기를 전이한 후 더 이상의 반응을 수행하지 않으나 dimethylase는 monomethylated RNA를 사용하여 또 한 번의 methylation 반응을 일으킨다. 이러한 차이점을 나타내는 ERM 단백질의 특성을 알아내는 것은 기초적인 측면에서나 또 억제제의 창출을 위한 응용적인 측면에서도 매우 중요한 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에서는 본 연구실에서 대량생산되고 또 생화학적 특성이 어느 정도 밝혀진 dimethylase인 ErmSF 단백질을 함유하는 *S. fradiae*가 가지고 있는 또 다른 ERM 단백질로 monomethylase인 TlrD를 대장균에서 대량생산을 최초로 시도하고 그 특성을 세포 내에서 검색하였다. 대량생산된 단백질의 대부분은 불용성 단백질로 밝혀졌고 ERMSF의 경우도 37°C에서 배양하였을 경우는 대부분 불용성 단백질로 대량발현이 되었다. 두 단백질 모두 GroESL이나 Thioredoxin이 단백질의 용해에 도움을 주지 못하였다(1). 그러나 ErmSF의 경우는 배양온도를 22°C로 낮추었을 때 그 용해도가 증가하여 126 mg/L culture의 높은 용해성 단백질을 얻어낼 수 있었으나(8) TlrD의 경우는 배양온도의 저하도 용해성 단백질로의 전환이 전혀 도움을 주지 못하였다. 이러한 접근은 배양온도를 낮춤으로써 단백질의 발현을 늦춰 적절한 접힘을 위한 충분한 시간을 주어 용해성 단백질의 발현에 도움을 주기위한 방법으로 현재까지 많은 단백질의 용해도 증가에 사용된 방법이다(17). 또 다른 유사한 접근법으로 유전자 발현 유도제(inducer)인 IPTG의 농도를 줄임으로써 단백질의 접힘이 잘 못되는 단백질의 양을 줄여서 용해성 단백질의 양을 늘리려는 시도(17)도 성공적이지 못하였다. 그러나 두 단백질 모두 대부분의 단백질이 불용성 단백질로 발현되었을 때 소량의 단백질이 용해성 단백질로 발현이 되어 세포내에서의 활성을 나타내었다. 여기서 얻어진 TlrD의 특성(최소 억제 농도, MIC)은 monomethylase의 특성을 잘 나타내었고 이전에 얻어진 결과와 비슷하였다(15). 그러나 본 연구에서의 결과는 좀 더 높은 최소 억제농도를 나타내었는데 이는 TlrD를 발현한 *E. coli*의 균주의 차이에 기인한 것으로 추정된다. 즉 본 연구에서는 *E. coli* BL21(DE3)로 그람 음성 균의 물질투과 장벽을 모두 가지고 있는 균주이고 이 전의 결과에서는 *E. coli* AS19이라는 균주로 막

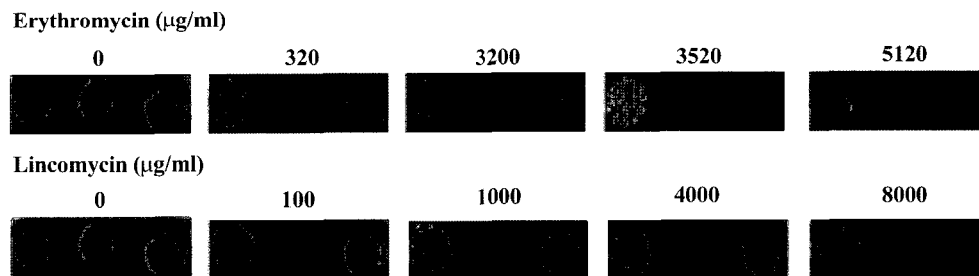


Fig. 4. Determination of MIC (minimal inhibitory concentration) with erythromycin and lincomycin. Overnight grown *E. coli* HJJ105, HJJ202 and harboring empty pET23b vector transferred to new LB medium was incubated for 1.5 hr at 37°C to reach an A_{550} of 0.7. And the culture was diluted to be 200 cells/µl. 5 µl of diluent (1,000 cells) was dropped onto the agar plate containing erythromycin of 0 - 5,120 µg/ml or lincomycin of 0 - 8,000 µg/ml and incubated for 18-20 hr at 37°C. MIC was determined at the concentration where no bacterial growth could be observed. From the left, *E. coli* HJJ105, *E. coli* harboring empty vector and *E. coli* HJJ202 was placed.

투과성 장벽이 많이 손상된 균주로 항생제에 대한 감수성이 증가되어 낮은 내성을 나타낸 것으로 사료된다. 그러나 이들이 발현한 TlrD의 발현정도, 용해성 그리고 순수분리에 대한 정보는 전혀 발표되지 않았고 단지 클론된 trD에 의해 나타난 최소억제 농도만이 발표되었다(16).

TlrD를 포함한 현재까지 밝혀진 모든 monomethylase와 dimethylase를 database에서 취합하여 sequence alignment 및 phylogenetic analysis를 하여본 결과(A. K. Park and H. J. Jin, unpublished result) 어떠한 경우에도 monomethylase와 dimethylase를 구분 지을 수 있는 특징을 발견할 수 없었다. 그러나 본 실험에서는 동일한 균주에 존재하는 두 ERM 단백질 중 dimethylase (ErmSF)의 용해성 단백질로 대량생산하는데 성공한 방법을 monomethylase (TlrD)에 적용하였을 때 동일한 성공을 이루지 못하였다. 단백질의 접힘은 열역학적으로 가장 안정한 상태로 가는 과정으로 이 과정을 거쳐 삼차원구조를 이루는데 필요한 모든 정보는 아미노산 배열에 있다는 것이 밝혀져 있다 (18). 따라서 단백질내의 구조적 특성이 이러한 접힘에서의 차이점을 가져다준다는 것이 자명하다. 특히 동일한 균주에서 얻어진 같은 종류의 ERM 단백질에서 이러한 현상이 관찰되었다는 것은 이를 뒷받침하여 주는 것으로 사료된다. 즉, 현재까지 개발된 단백질간의 아미노산 배열의 정확성을 도모하는 배열 프로그램과 이를 이용하여 진화역사(phylogenesis)를 밝히는 프로그램도 이들의 차이점을 밝히지 못하고 있지만 용해성 단백질로의 대량생산 과정은 분명한 차이점을 보여주고 있어서 이를 구분하여 주는 것으로 추정할 수 있다. 이러한 사실로부터 실험적인 방법을 통한 ERM 단백질의 monomethylase와 dimethylase의 구조적 측면에서의 구별은 가능할 것으로 사료되고 이의 확인은 억제제의 창출을 위하여도 매우 중요한 단계일 것으로 믿어진다. 그리고 불용성 단백질로의 대량생산에 성공하였다는 것은 단백질의 대량생산에 있어서 넘어야 할 많은 부분이 극복되었다는 것이다 (17). 그리고 소량의 용해성 단백질이 생산되어 항생제 내성을 가져다주었다는 것은 용해성 단백질로의 전환이 전혀 불가능한 것은 아니라는 것을 암시하고 있다. 따라서 TlrD의 용해성 단백질로의 대량생산은 매우 필요하고 가능할 것으로 믿어지고 현재까지 밝혀진 용해성 단백질로의 대량생산 방법 중 TlrD의 경우에 적용될 수 있는 방법들 즉 fusion 단백질로의 발현(12), sorbitol 또는 glycyl betaine을 사용하여 삼투압적인 스트레스를 주는 것(3), periplasm으로의 발현된 단백질의 이동(23), DnaK와 DnaJ등의 다른 샤페론의 공동 발현(6), guanidine-HCl 또는 urea 등을 이용한 불용성 단백질의 용해와 재접합(refolding, 13)등을 적용하여 대량발현을 시도할 것이다.

감사의 말

본 연구는 2003년도 한국과학재단 목적기초연구사업 중 특정 기초 연구비 지원(R01-2003-000-11734-0)에 의하여 수행된 연구 결과의 일부로 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 진형중. 2001. MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) 항생제 내성인자 단백질인 ErmSF의 domain 발현. 한국미생물학회지 37, 245-252.
2. Birmingham, V.A., K.L. Cox, J.L. Larson, S.E. Fishman, C.L. Hershberger, and E.T. Seno. 1986. Cloning and expression of a tylosin resistance gene from a tylosin-producing strain of *Streptomyces fradiae*. *Mol. Gen. Genet.* 204, 532-539.
3. Blackwell, J.R. and R. Horgan. 1991. A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* 295, 10-12.
4. Denoya, C. and D. Dubnau. 1989. Mono- and dimethylating activities and kinetic studies of the ermC 23S rRNA methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 264, 2615-2624.
5. "Frontiers in Biotechnology : Antibiotic Resistance" 1994. *Science* 264, 317-476.
6. Georgiou, G. and P. Valax. 1996. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 190-197.
7. 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.
8. 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.
9. Kovalic, D., J.H. Kwak, and B. Weisblum. 1991. General method for direct cloning of DNA fragments generated by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Res.* 19, 4650.
10. Kovalic, D., R.B. Giannattasio, H.J. Jin, and B. Weisblum. 1994. 23S rRNA domain V, a fragment that can be specifically methylated *in vitro* by the ErmSF(TlrA) methyltransferase. *J. Bacteriol.* 176, 6992-6998.
11. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227, 680-685.
12. LaVallie, E.R. and J.M. McCoy. 1995. Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 501-506.
13. Lee, H.J. and H.J. Jin. 2003. Renaturation of recombinant ErmSF and its refolding behavior. *Mol. Cells* 16, 187-193.
14. Liu, M. and S. Douthwaite. 2002. Methylation at nucleotide G745 or G748 in 23S rRNA distinguishes gram-negative from gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 44, 195-204.
15. Liu, M. and S. Douthwaite. 2002. Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99, 14658-14663.
16. Liu, M. and S. Douthwaite. 2002. Activity of the ketolide telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1629-1633.
17. Makrides, S.C. 1996. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 60, 512-538.
18. Matthews, C.R. 1993. Pathways of protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 653-683.
19. Poehlsgaard, J. and S. Douthwaite. 2005. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 870-881.
20. Roberts, M.C., J. Sutcliffe, P. Courvalin, L.B. Jensen, J. Rood, and H. Seppala. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosaminyl-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrob.*

- Agents Chemother.* 43, 2823-2830.
21. Roberts, M.C. 2004. Resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, ketolide, and oxazolidinone antibiotics. *Mol. Biotechnol.* 28, 47-62.
 22. 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.
 23. Skerra, A. 1993. Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr. Opin. Immunol.* 5, 256-262.
 24. 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.
 25. Weisblum, B. 1995. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 577-585.
 26. Yasukawa, T., C. Kanei-Ishii, T. Maekawa, J. Fujimoto, T. Yamamoto, and S. Ishii. 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 270, 25328-25331.
 27. Zalacain, M. and E. Cundliffe. 1989. Methylation of 23S rRNA by *tlrA(ermSF)*, a tylosin resistance determinant from *Streptomyces fradiae*. *J. Bacteriol.* 171, 4254-4260.
 28. Zalacain, M. and E. Cundliffe. 1991. Cloning of *tlrD*, a fourth resistance gene, from the tylosin producer, *Streptomyces fradiae*. *Gene* 97, 137-142.

(Received August 17, 2007/Accepted September 17, 2007)

ABSTRACT : Cloning of *tlrD*, 23S rRNA Monomethyltransferase Gene, Overexpression in *Escherichia coli* and Its Activity

Hyung Jong Jin (Department of Bioscience and Biotechnology, College of Natural Science, The University of Suwon, Kyunggi-Do 445-743, Korea)

ERM proteins transfer the methyl group to A₂₀₅₈ in 23S rRNA, which reduces the affinity of MLS (macrolide-lincosamide-streptogramin B) antibiotics to 23S rRNA, thereby confer the antibiotic resistance on microorganisms ranging from antibiotic producers to pathogens and are classified into monomethyltransferase and dimethyltransferase. To investigate the differences between mono- and dimethyltransferase, *tlrD*, a representative monomethylase gene was cloned in *Escherichia coli* from *Streptomyces fradiae* which contains *ermSF*, dimethylase gene as well to overexpress the TlrD for the first time. T7 promoter driven expression system successfully overexpress *tlrD* as an insoluble aggregate at 37°C accumulating to around 55% of the total cell protein but unlike ErmSF, culturing at temperature as low as 18°C did not make insoluble aggregate of protein into soluble protein. Coexpression of Thioredoxin and GroESL, chaperone was not helpful in turning into soluble protein either as in case of ErmSF. These results might suggest that differences between mono- and dimethylase could be investigated on the basis of the characteristics of protein structure. However, a very small amount of soluble protein which could not be detected by SDS-PAGE conferred antibiotic resistance on *E. coli* as in ErmSF which was expected from the activity exerted by monomethylase in a cell.