

18S-srRNA 분석에 의한 *Acanthamoeba* 한국 분리주들의 분류 검토

아주대학교 의과대학 미생물학교실, ¹공과대학 생물공학과, ²연세대학교 열대의학연구소

신호준 · 지영진 · 조명수 · 김형일 · 박연희¹ · 임경일²

Molecular Approach on Classification of *Acanthamoeba* Korean Isolates Using 18S-srRNA Analysis

Ho-Joon Shin, Young-Jin Ji, Myung-Soo Cho
Hyung-Il Kim, Yun-Hee Park¹ and Kyung-Il Im²

Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea
¹Department of Biotechnology, Ajou University College of Engineering, Suwon, Korea
²Institute of Tropical Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Acanthamoeba spp., spread in soil, ponds, air and swimming pool, cause a granulomatous amoebic meningitis and amoebic keratitis in human and experimental animals. Their classification had depended upon morphological characteristics and physiological conditions such as thermophilic status and generation times. However, because amoeba species showed the morphological and physiological diversity in isolates, many attempts have been made on identification of *Acanthamoeba* spp. Restriction fragments length polymorphism (RFLP) analysis of 18S-small subunit ribosomal RNA (srRNA) was an useful tool for classification among morphologically and genetically closely-related species. In this study, 18S-srDNAs of amoebae were amplified by PCR with primer encoding 18S-srRNA gene and digested with restriction endonucleases, and RFLP analysis was applied on classification of *Acanthamoeba* Korean isolates (YM-4, YM-5 and YM-7), comparing with reference amoebae, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* and *A. royreba*. Trophozoites of six *Acanthamoeba* spp. had typical acanthopoda, but did not show any morphological differences. Cyst of *Acanthamoeba* sp. YM-7 was similar to that of *A. polyphaga* which was designated as group II *Acanthamoeba*. Morphologically other amoebae belonged to group III *Acanthamoeba*. Digestion of 18S-srDNA with six enzymes, *Dde* I, *Hae* III, *Hind* III, *EcoR* I, *Rsa* I and *Sph* I, resulted in various DNA fragments. Using the method of Nei and Li (1979) for RFLP analysis, genetic divergence was not observed between *A. culbertsoni* and *Acanthamoeba* sp. YM-4. Between *A. culbertsoni* and *Acanthamoeba* sp. YM-5, genetic distance was 0.070, 0.364 between *Acanthamoeba* sp. YM-4 and *A. polyphaga*, and 0.277 between *Acanthamoeba* sp. YM-7 and *A. polyphaga*. In comparison with *A. culbertsoni* and *A. polyphaga*, *Acanthamoeba* sp. YM-7 showed genetic distance of 0.330 and 0.154, respectively. Thus, *Acanthamoeba* sp. YM-7 is a similar species to *A. polyphaga*. *Acanthamoeba* sp. YM-5 is a different species from *A. polyphaga*, but closely-related to *A. culbertsoni*. *Acanthamoeba* sp. YM-4 can be classified as a subspecies or a strain of *A. culbertsoni*. (Ajou Med J 1998; 3(2): 112~121)

Key Words: *Acanthamoeba*, 18S-srRNA, Restriction endonuclease, RFLP

저자연락처: 신호준, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5, 아주대학교 의과대학 미생물학교실
Tel: (0331) 219-5076, Fax: (0331) 219- 5079

*본 연구는 아주대학교 의과대학 교수연구비(96년도)에 의해 수행되었음.

서 론

Acanthamoeba 속(genus)과 *Naegleria* 속에 속하는 자유생활 아메바들은 토양이나 연못 등에 널리 서식하고 있는데 인체나 실험동물들에서 질병을 야기하는 것으로 알려져 있다. 이런 질병은 치명적으로 진행하며, 육아종성 아메바성 뇌염(granulomatous amoebic encephalitis; GAE) 및 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis; PAME)으로 불리는데 대부분이 *Acanthamoeba culbertsoni* 및 *Naegleria fowleri* 등에 의해 야기된다고 알려져 있다.^{1,2,3} 이런 원충들은 여러 환경 속에서 분리되어 병원성이 인정되었음은 물론, 1989년까지 미국에서만 200여의 인체 발병 예가 보고되고 있다.⁴ 우리 나라에서는 1976년 *Acanthamoeba* sp.에 기인한 것으로 추측한 5세 어린이아이에서 수막뇌염의 발병 예만이 보고되었으나,⁵ 하천과 연못 등에서 *Acanthamoeba* spp. 및 *Naegleria* spp.가 분리되어 병원성이 인정되었다.^{6,7} 또한 *A. polyphaga* 등의 가시아메바는 인체에서 아메바성 각막염(amoebic keratitis)을 유발한다고 알려진 이래 1989년까지 미국에서만 60여⁴ 및 일본에서 약 20여⁸가 보고되었으며 우리 나라에서는 93년 첫 보고가 있는 후로 점차 증가하는 추세이다.

자유생활 아메바의 분리 및 종의 동정에 관하여서는 영양형의 유사분열 양상의 차이와 방추체(spindle)의 유무시기로 판정하거나,^{9,10} 포낭(cyst)이나 영양형(trophozoite)의 형태학적 차이로 분류하는 Page¹¹의 분류체계를 일반적으로 따르고 있다. Pussard와 Pons¹³는 *Acanthamoeba* 종들을 포낭형의 형태에 따라 세 가지 group으로 나누었다. Group I는 상대적으로 큰 직경을 가지며(18 μ m 이상), 별 모양의 내포낭(endocyst)을 가지고 있다. 외포낭(ectocyst)은 매끄럽거나 혹은 약간의 구형을 이룬다. 또한 탈포낭공(excystment pore)이 있는 각각의 ray의 끝에 내포낭을 가지고 있다(*A. astronyxis*, *A. comandoni*). Group II와 Group III의 아메바들은 좀더 작으며(18 μ m 미만) Group II *Acanthamoeba*는 다각형의 별모양이나 부정형 혹은 주름진 내포낭을 가지고 있다. 탈포낭공은 탈포낭과정(excystment)에서 침하가 일어나는 동안에 내포낭 벽의 한쪽에서 일어난다(*A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. rhyssodes*, *A. griffini*, *A. lugdunensis*, *A. hatchetti*). Group III의 포낭은 둥글거나 완만한 각의 내포낭으로 구성되며 외포낭은 더 얇고 부드러거나 간단히 주름 접힌 형태이다. 두 wall은 다른 group에 비해 적은 간격으로 분리되어 있으며, 탈포낭공 끝 쪽에 위치하며 외포자낭벽과 접하여 종종 관찰된다(*A. culbertsoni*, *A. royreba*).

포낭 벽의 구조 즉 내포낭 벽과 외포낭 벽의 모양으로 종을 분류하거나 영양형 및 포낭의 크기로 분류하

는 것은 다양하게 분리된 아메바들에 있어서 분류 key 로써는 한계점에 이르렀다. 최근에는 이러한 형태학적 분류의 단점을 보완하기 위하여 여러 연구가 시작되었다. 병원성 및 호열성 정도에 따른 분류와,¹³ 아메바의 생화학적 구성 성분 즉, 효소와 단백질의 구성 양상을 분석하여 분류하기도 하였으며,^{14,15,16} isoenzyme의 주형 양상으로 *Acanthamoeba* sp.를 분류하였다. 또한 Visvesvara 및 Balamuth¹⁷는 면역전기영동법(immuno-electrophoresis)을 시행하여 *Acanthamoeba* 종간의 항원성을 비교 관찰하기도 하였다. 한편,辛등¹⁸은 *Acanthamoeba* 속의 여러 아메바간의 단백질 구성양상을 SDS-전기영동법과 2차원 전기영동법으로 비교 관찰하였으며, 또한 *Acanthamoeba* sp. YM-4에 대한 종-특이성 단일클론 항체를 생산하여 분류학적 접근을 수행한 바 있다.

최근에는 분자생물학 기술들이 발전함에 따라 분자 수준에서의 분류학적 접근이 가능케 되었는데, 핵산 수준에서 유전적인 비교는 계통학적 문제를 해결하기 위한 유효한 기술로써, 리보솜 RNA의 small subunit (18S-srRNA)의 sequencing은 protists 연구에 이미 사용되어지고 있다. 예를 들면, 이 방법을 이용하여 *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Dictyostelium*으로 대표되는 rhizopodan group은 한 계통이 아니라는 것과¹⁹ *Naegleria* 종 사이의 다양성은 포유류와 양서류 사이의 다양성과 유사하다는 것을 밝혀냈다. Ribosomal DNA의 제한효소 패턴 즉, 제한효소 단편길이 다형성 분석(Restriction Endonuclease Fragment Length Polymorphism; RFLP)이 *Naegleria* 종의 유전적 다양성을 확인되도록 했으며, *N. gruberi*는 다계통적으로 복합적인 종임을 확인시켜 주었다. 그와 같은 기술로 *Acanthamoeba* 종을 연구하였는데 *A. castellanii*의 경우 srRNA는 몇 개의 커다란 확장된 부분을 갖는 것으로 특정 지어 졌으며 가장 잘 알려진 srRNA 표본의 하나가 되었다.

이에 본 연구는 기존에 알려진 *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* 및 *A. royreba*와 함께 한국분리주인 *Acanthamoeba* sp. YM-4와 *Acanthamoeba* sp. YM-5 및 *Acanthamoeba* sp. YM-7의 영양형 및 포낭의 형태학적 특징을 비교하였으며 또한, 18S-srRNA를 PCR로 증폭한 후 다양한 제한효소를 처리하여 RFLP를 관찰하여, 한국분리주들인 *Acanthamoeba* sp. YM-4, *Acanthamoeba* sp. YM-5 및 *Acanthamoeba* sp. YM-7의 분자생물학적 분류 동정에 이용함으로써, *Acanthamoeba* spp.의 분류체계에 새롭고 중요한 접근 기술과 제반 정보를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. *Acanthamoeba*의 배양

기존에 배양해오고 있는 *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* (prof. Jardin 제공, Belgium), *A. royreba*(ATCC로 부터 구입)와, 한국분리주 *Acanthamoeba* sp. YM-4, *Acanthamoeba* sp. YM-5 및 *Acanthamoeba* sp. YM-7(YM-4, YM-5, YM-7은 실험실내에서의 일련번호)을 사용하였다(Table 1). 아메바의 배양은 PYG 배지²⁰를 사용하여 37°C 항온기 내에서 무균적으로 계대 배양하여 실험에 사용하였다. 배지의 조성은 Proteose Peptone 20 g, Yeast extract 2 g, Glucose 18 g, MgSO₄·7H₂O 0.98 g, CaCl₂ 0.04 g, Sodium citrate·2H₂O 1 g, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 0.02 g, KH₂PO₄ 0.34 g, Na₂HPO₄·7H₂O 0.67 g, D.W. 957 ml를 넣은 다음 pH 6.5로 맞추고 멸균하여 사용하였다.

2. *Acanthamoeba* 영양형의 형태학적 관찰

Culture flask(25 cm²)에서 *Acanthamoeba*를 37°C에서 2~3일 배양하여 15 ml tube에 *Acanthamoeba* 부유액을 넣고 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후, 침전된 *Acanthamoeba* 영양형을 slide glass위에 놓고 cover glass로 덮은 후 형태학적 특징을 현미경하에서 관찰하였다.

3. *Acanthamoeba* 포낭의 형태학적 관찰

*E. coli*를 영양한천배지(nutrient agar media)에 접종하여 수를 늘린 후 *E. coli* 부유액을 얻어 65°C에서 6시간 살균하였다. 수확 된 *E. coli*를 영양한천배지에 접종하여 냉장보관하며 사용하였다. culture flask(25 cm²)에서 *Acanthamoeba* 영양형을 37°C에서 2~3일 배양한 후, 15

ml tube에 *Acanthamoeba* 부유액을 넣은 후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 버리고 *Acanthamoeba* 영양형을 pipetting하여 미리 *E. coli*을 도포한 영양한천 배지에 접종하여 37°C에서 3~7일 배양하였다. colony가 형성된 *Acanthamoeba*의 포낭들을 생리식염수에 부유시킨 후 slide glass에 놓고 cover glass로 덮은 후 현미경하에서 관찰하였다.

4. *Acanthamoeba*의 genomic DNA의 분리

*Acanthamoeba*의 genomic DNA의 분리는 McLaughlin등²¹의 방법을 약간 수정하여 시행하였다. 배양된 각 아메바의 영양형을 모아 PBS(phosphate buffered saline)로 1회 세척한 후 300 g에서 5분간 원심침전 하였다. 원심 침전된 각 영양형을 digestion solution(10%SDS 125 µl, 20 mg/ml proteinase K 6.25 µl, TE buffer[pH 8.0] 500 µl)에 부유시키고, 37°C 항온기에서 30분간 배양한 후 4°C에서 12,000 g로 5분간 원심 침전하였다. 상층액을 모아 새로운 eppendorf tube로 옮긴 후 동량의 phenol의 용액을 첨가한 후 4°C에서 12,000 g로 10분간 원심침전하고, 상층액을 모아 새로운 eppendorf tube로 옮긴 후 동량의 chloroform을 첨가한 후 4°C에서 12,000 g로 5분간 원심 침전하고, 침사에 1.0 ml의 absolute ethanol과 20 µl의 3M sodium acetate 용액을 첨가하고 -20°C에서 40분간 보관하였다. 이것을 다시 4°C에서 12,000 g로 10분간 원심침전시켰다. 상층액을 모아 여기에 1 ml 70% ethanol을 넣고 4°C에서 12,000 g로 5분간 원심침전 시켰다. 상층액을 원심침전 증발기(centrifuge evaporator)를 이용하여 42°C에서 3분 정도 증발시키고, 침전물을 25 µl의 TE완충액(pH 8.0, 5 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)에 용해시켜 -20°C에서 저장하여 실험에 사용하였다.

5. PCR를 이용한 *Acanthamoeba*의 18S-srRNA의 증폭

*Acanthamoeba*의 18S-srRNA를 coding하는 유전자의 증폭은 Medlin등²²의 방법을 약간 수정하여 시행하였는데 분리된 genomic DNA 10 µg을 1 mM의 표식자(primer: 5' AACCTGGTTGATCCTGCCAGT 3', 3' TTGATCCTTCTG-CAGGTTACCTAC 5')를 포함한 PCR 완충액(10 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 µl in dNTPs)에 넣은 다음에, DNA의 denature를 위해 95°C에서 5분간 가열을 하였다. 0.1 unit(0.5 µl)의 Taq DNA polymerase를 넣은 후 잘 혼합하고 Thermal cycler(PCR System 2400, PERKIN ELMER)에 넣고, 95°C에서 denaturation를 1분간, annealing을 위해 55°C에서 1.5분간 그리고 72°C에서 extension을 위해 2분간 반응을 시켜 35

Table 1. Profiles of *Acanthamoeba* spp. used in this study

Species & isolates	Source	Isolated in	Pathogenicity*
<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-4	fish's gill	1976	medium
<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-5	sewage	1993	medium
<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-7	corneal swap	1994	medium
<i>A. culbertsoni</i>	human GAE	1976	high
<i>A. royreba</i>	cell culture	1977	low
<i>A. polyphaga</i>	human cornea	1977	medium

* Reference : 6, 7 and 25

cycles를 시행하였다. 마지막으로 72°C에서 5분간 정리 과정을 거친 다음 Thermal cycler에서 꺼내어 1% agarose gel에서 전기영동을 한 후 DNA여부를 확인하였다. 확인된 tube는 위의 방법처럼 ethanol를 이용하여 침전 농축하여 다음 실험에 사용하였다.

6. 제한 효소들을 이용한 18S-srDNA의 절단

사용한 제한효소(restriction endonuclease)는 *Dde* I, *Eco*R I, *Hind* III, *Hae* III, *Hinf* I, *Spb* I, *Rsa* I 및 *Taq* I(Sigma Co., USA) 등이다. 각각의 아메바들로부터 분리한 0.15 μl의 18S-srDNA를 5~10 unit의 제한효소와 혼합하고 전체 용량이 50 μl가 되게 효소완충액(Sigma CO., USA)으로 조정된 뒤 37°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. Horizontal 전기영동장치를 이용하여 1% agarose gel를 만들고 사료들을 조심스럽게 넣은 뒤 TBE 완충액(89 mM Tris, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA)에서 3 V/cm으로 6시간 전

기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 gel을 ethidium bromide로 염색을 하고, 단 파장 자외선 투과기로 분석을 관찰하였다. Size standards로써는 λ phage의 *Hind* III digests 를 각 gel에 넣고 전기영동하였다.

7. 아메바간의 유전적 유연관계 관찰

한국 분리주인 *Acanthamoeba* sp. YM-4, *Acanthamoeba* sp. YM-5 및 *Acanthamoeba* sp. YM-7과 *A. culbertsoni* 및 *A. polyphaga*의 18S-srDNA 단편들을 얻어 그 크기를 측정하였으며, Nei 및 Li²³의 방법에 따라 Phylip 3.5 program을 이용한 제한효소 단편길이 다형성 분석(RFLP)을 통해 각 아메바간의 유연관계 즉, 유전적 거리(genetic diversity)를 관찰하였으며, UPGMA를 이용하여 세 종간의 dendrogram을 작성하였다.

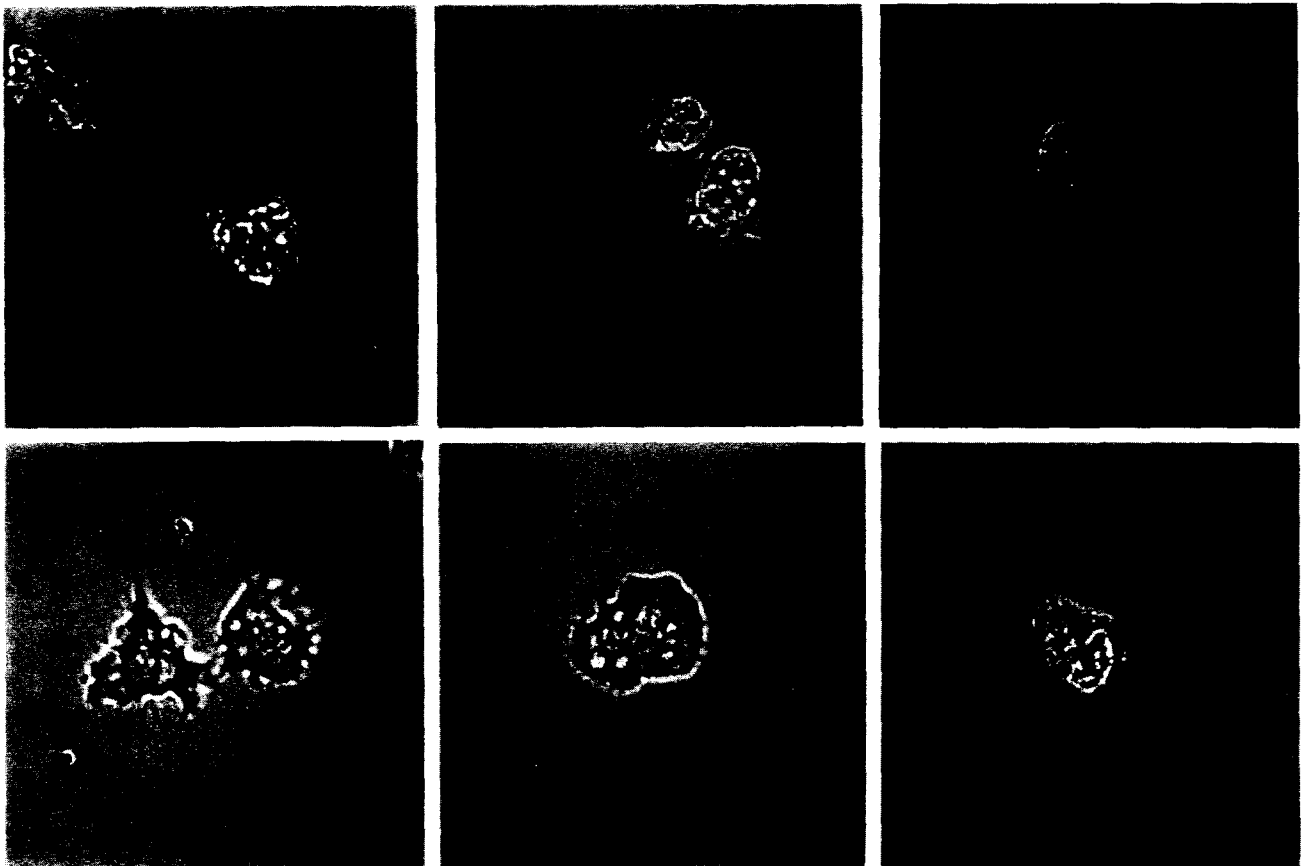


Fig. 1. Morphological findings of trophozoites of *Acanthamoeba* spp.(x400). They showed same morphological features such as acanthopoda. C, *A. culbertsoni*; R, *A. royreba*; P, *A. polyphaga*; 4, *Acanthamoeba* sp. YM-4; 5, *Acanthamoeba* sp. YM-5 and 7, *Acanthamoeba* sp. YM-7.

결 과

1. *Acanthamoeba*의 형태학적 관찰

무균배지에서 배양된 *Acanthamoeba*의 영양형들을 광학 현미경으로 관찰한 결과 모든 종에서 크기를 비롯하여 차이점을 관찰할 수 없었으며 특징적으로 방사위족 (acanthopoda)을 내는 것이 관찰되었다(Fig. 1). 무영양한 천배지를 이용하여 포낭을 얻은 다음 각 아메바의 포낭의 특징을 관찰한 결과 대체적으로 2중막의 뚜렷한 낭벽을 갖고 있었다(Fig. 2). *A. polyphaga*와 *Acanthamoeba* sp. YM-7의 외포낭 벽은 불규칙한 정도가 뚜렷하고 내포낭벽과의 구분이 확실하여 Group II에 속함을 알 수 있었다. *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *Acanthamoeba* sp. YM-4 및 *Acanthamoeba* sp. YM-5의 포낭은 대체로 포낭내벽과 외벽사이의 공간이 적었으며 또한 일반적으로 외포낭 벽이 등근 형태를 한 것이 많이 관찰되어 Group III에 속하였다(Fig. 2).

2. PCR을 이용한 *Acanthamoeba*의 18S-srRNA의 증폭

각 *Acanthamoeba*의 영양형을 모아 genomic DNA를 분리한 결과 6종의 아메바 모두에서 약 23 kbp(kilo base pair) 크기의 genomic DNA가 분리되었으며, 분리된 각 아메바의 genomic DNA를 주형으로 하고 18S-srRNA를 증폭하는 primer를 이용하여 PCR을 시행한 결과 *A. royreba*만 제외하고 2.1~2.3 kbp에서 DNA가 분리되었다(Fig. 3).

3. 제한 효소를 이용한 18S-srDNA의 단편길이 다형성 분석

PCR로 증폭된 18S-srDNA에 여러 가지 제한효소를 처리하여 얻은 DNA 단편들의 길이를 측정하여 다형성 분석을 하였다(Fig. 3 및 Table 2). 제한효소에 따라 하나에서 여러 개의 단편들로 절단되었는데 절단되지 않는 몇 가지 제한효소와 너무 많이 절단된 *Taq* I 및 *Hinf* I

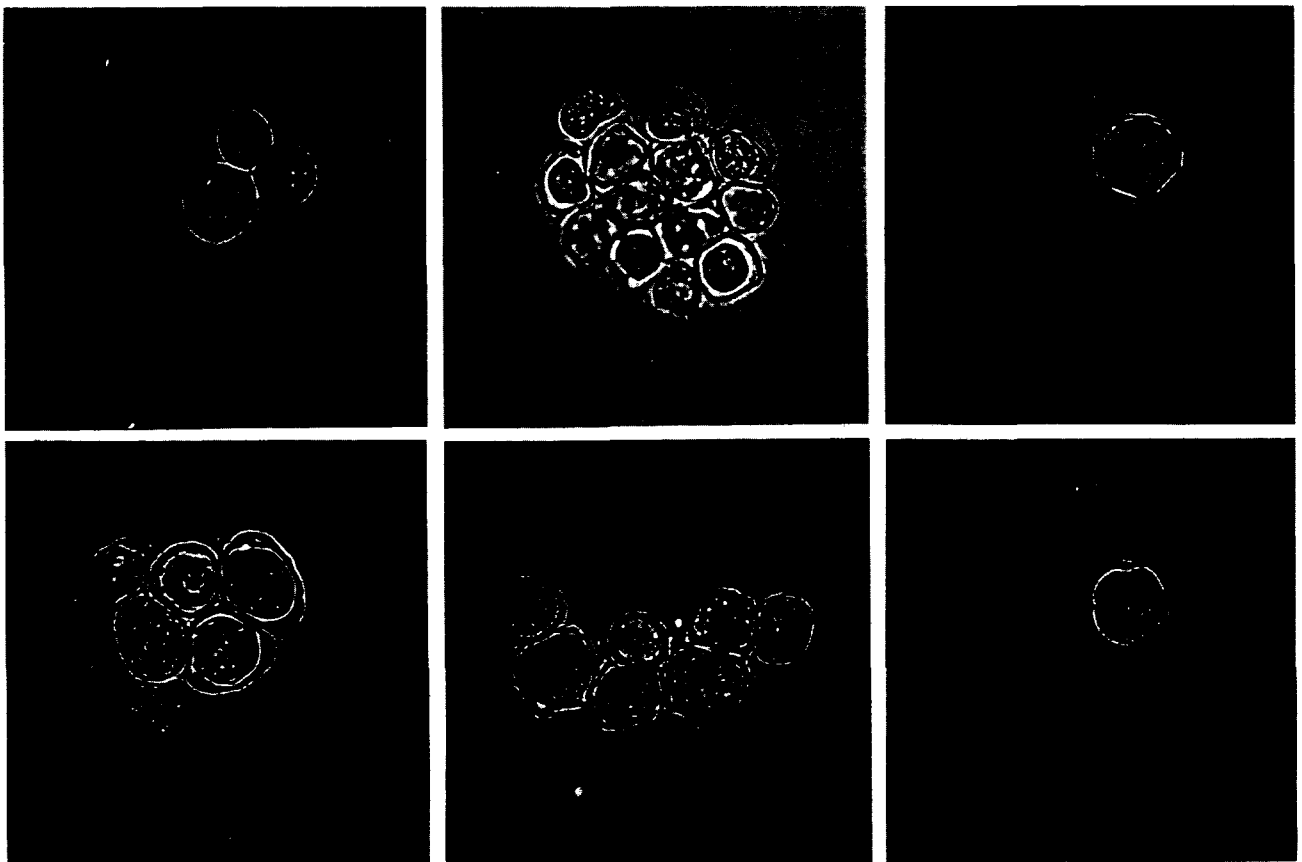


Fig. 2. Morphological findings of cysts of *Acanthamoeba* spp.(x400). P and 7 showed stellate endocyst. Others showed oval shape. C, *A. culbertsoni*; R, *A. royreba*; P, *A. polyphaga*; 4, *Acanthamoeba* sp. YM-4; 5, *Acanthamoeba* sp. YM-5 and 7, *Acanthamoeba* sp. YM-7.

등은 결과 분석에서 제외하였다. DNA 단편길이 다형성이 관찰된 *Dde* I, *Hae* III, *Hind* III, *Eco*R I, *Rsa* I 및 *Sph* I의 6개의 제한효소로 절단된 다섯 종류의 *Acanthamoeba*의 18S-srDNA 단편들을 관찰한 결과, *Dde* I 처리시 *Acanthamoeba* sp. YM-7에서 다른 아메바에서는 없는 분획이 관찰되었다(Fig. 3). *Hae* III 처리시 *A. polyphaga*, *Acanthamoeba* sp. YM-5 및 *Acanthamoeba* sp. YM-7에서 서로 다른 분획이 관찰되었으며, *Sph* I 제한효소로 처리했을 때는 *A. polyphaga*에서만 특이한 분획이 관찰되었다(Fig. 3). *Eco*R I 제한효소 처리시는 *A. polyphaga* 및 *Acanthamoeba* sp. YM-7에서 다른 아메바에서는 없는 분획이 관찰되었으며, *Hind* III 제한효소 처리시 *Acanthamoeba* sp. YM-7에서만 다른 분획이 관찰되었다(Fig. 3). *Rsa* I 제한효소 처리시에는 *Acanthamoeba* sp. YM-7에서만 특이한 분획이

관찰되었다(Fig. 3).

4. 18S-srDNA 단편길이 다형성분석을 통한 *Acanthamoeba*의 유연관계

6가지 제한효소로 절단된 각 아메바의 18S-srDNA의 단편길이의 자료를 토대로 Nei 및 Li(1979)등²³의 방법과 유전적 유연관계 즉 유전적 거리를 분석한 결과 *A. culbertsoni*를 기준으로 *A. polyphaga*와 *Acanthamoeba* sp. YM-7 사이에는 유전적 거리가 0.364 및 0.333으로 관찰되었으며, *Acanthamoeba* sp. YM-4 및 *Acanthamoeba* sp. YM-5와는 각각 0과 0.070으로 측정되었다(Table 2, Fig. 4). 특징적으로 *A. culbertsoni*와 *Acanthamoeba* sp. YM-4사이에는 유전적 거리가 관찰되지 않았다. *A. polyphaga*와 비교하여

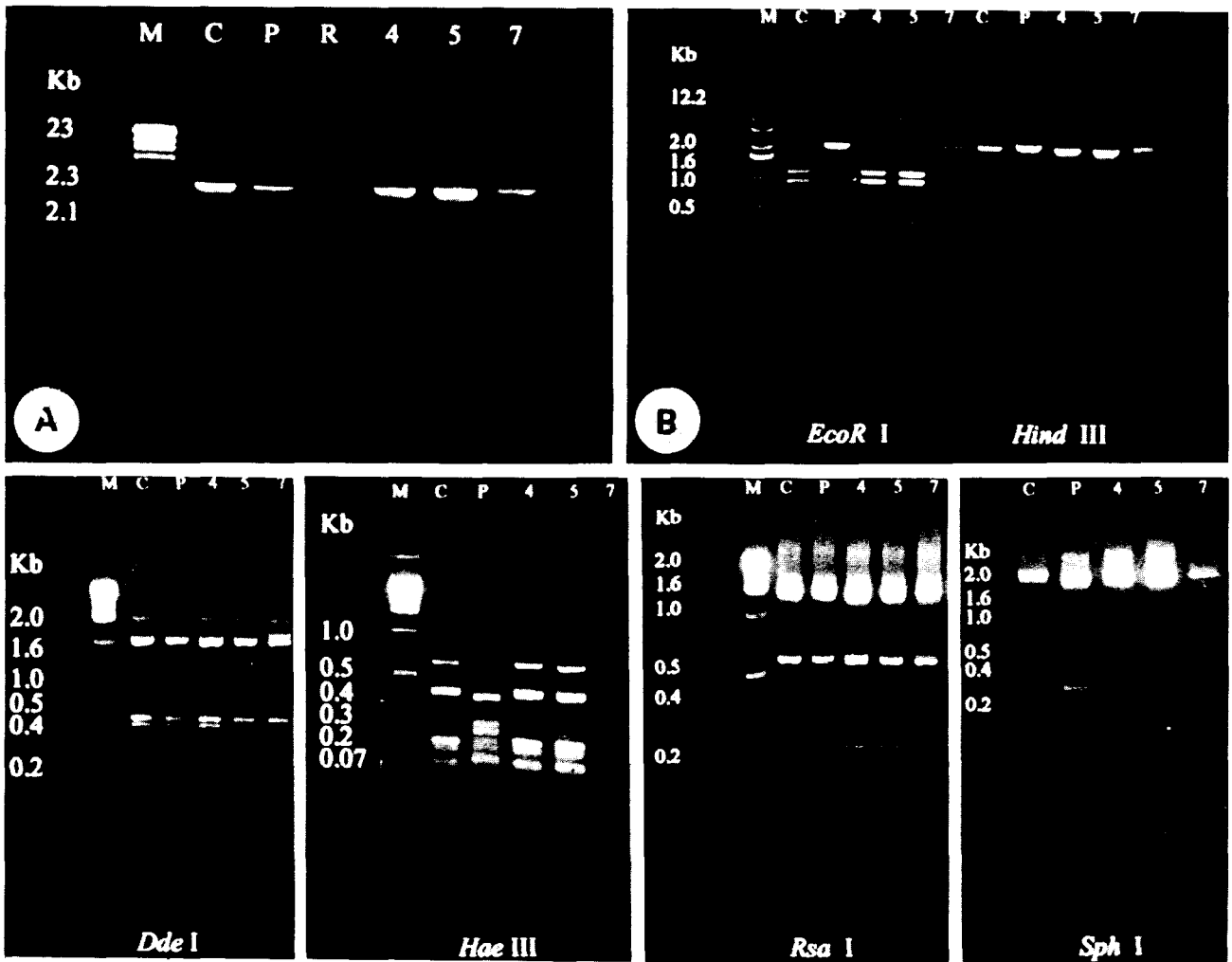


Fig. 3. Photographic findings of genomic sizes of 18S-srDNA of *Acanthamoeba* spp. amplified by PCR (A). B and other figures showed the RFLP patterns of 18S-srDNA of *Acanthamoeba* spp. digested with *Dde* I, *Hae* III, *Hind* III, *Eco*R I, *Rsa* I and *Sph* I, respectively. M, maker; C, *A. culbertsoni*; P, *A. polyphaga*; R, *A. royreba*; 4, *Acanthamoeba* sp. YM-4; 5, *Acanthamoeba* sp. YM-5; 7, *Acanthamoeba* sp. YM-7.

Table 2. Proportions of homologous fragments. Estimates of interspecific genetic divergence in paired comparisons of *Dde* I, *Hae* III, *Hind* III, *EcoR* I, *Rsa* I and *Sph* I digestion fragment patterns*

	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-4	<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-5	<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-7
<i>A. culbertsoni</i>	—	<i>Dde</i> I 5/13 <i>Hae</i> III 4/12 <i>Hind</i> III 0/3 <i>EcoR</i> I 1/5 <i>Rsa</i> I 4/8 <i>Sph</i> 0/3 (14/44)	5/10 5/10 2/4 3/6 4/8 1/2 (20/40)	5/10 5/13 2/4 3/6 4/8 1/2 (20/43)	5/14 5/13 0/3 3/6 3/9 0/3 (16/48)
<i>A. polyphaga</i>	0.364	—	5/13 4/12 0/3 1/5 4/8 0/3 (14/44)	5/13 7/15 0/3 1/5 4/8 0/3 (17/47)	8/17 7/15 1/2 1/5 3/9 2/4 (22/52)
<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-4	0	0.364	—	5/10 5/13 2/4 3/6 4/8 1/2 (20/43)	5/14 5/13 0/3 3/6 3/9 0/3 (16/48)
<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-5	0.070	0.277	0.070	—	5/14 8/16 0/3 3/6 3/9 0/3 (19/51)
<i>Acanthamoeba</i> sp. YM-7	0.333	0.154	0.333	0.255	—

* Fractions, G/F, G equals the number of common fragments and F equals the number of total fragments between pairs of 18S srDNA, provided for six restriction endonucleases. Values to the left of the G/F comparisons are estimates of genetic divergence based on collected data() from six enzymes.

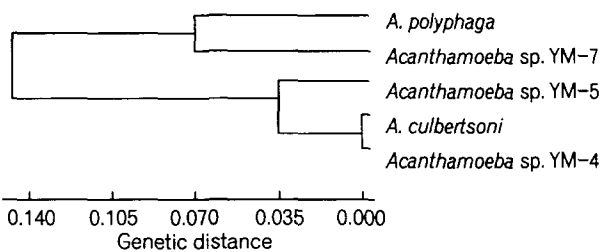


Fig. 4. Dendrogram of estimated genetic distances among *Acanthamoeba* spp. using UPGMA cluster analysis.

Acanthamoeba sp. YM-5와 *Acanthamoeba* sp. YM-7은 각각 0.277 및 0.154로 관찰되었다(Table 2 및 Fig. 4). *Acanthamoeba* sp. YM-5와 *Acanthamoeba* sp. YM-7 사이의 유전

적 거리는 0.255로 관찰되었다(Table 2 및 Fig. 4).

고 찰

Acanthamoeba 속(屬)에 속하는 자유생활 아메바들은 토양이나 연못 등에 널리 서식하고 있는데 생물학적 관심뿐만 아니라, 인체나 실험동물들에서 질병을 야기하는 것으로 알려져 세계 여러 곳에서 연구가 활발히 이루어지고 있다. *Acanthamoeba* 속(屬)에 속하는 아메바들의 분류는 형태학적 및 생리학적 특성 등에 의해 시도되었으나, 여러 환경 속에서 다양하게 분리되고 종의 분화가 다양해짐에 따라 여러 병리학적 소견, 생화학적

및 면역학적 기술들을 이용하여 재분류가 시도되고 있는 실정이다. Culbertson²에 의하면 *A. culbertsoni*는 실험동물에 영양형 1×10^5 개를 접종했을 때 70%의 사망률을 보여주어 강한 병원성을 갖고 있음이 관찰되었다. Park 등²⁴의 실험에 의하면 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 영양형 1×10^5 또는 2×10^4 개를 마우스의 비강 내로 떨어뜨렸을 경우에는 14~22%의 사망률을 보여 주었으며 2×10^3 개를 두개강 내로 접종하였을 때 100% 치사율을 나타내었다. *Acanthamoeba* sp. YM-4와 *A. culbertsoni*를 비교할 때 병원성에 있어서 강약의 차이는 있지만 *A. culbertsoni*와의 상관 관계를 형태학적 특징과 병원성의 정도 차이만으로 구별하기란 어려움이 있다.²⁵ 후등¹⁸의 실험에서도 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 형태학적 특징 즉, 영양형 (11~23 μm) 및 포낭(7~14 μm)의 형태와 크기만으로 두 종간을 구별할 수는 없었으며, 종-특이 단일클론 항체를 생산하여 *A. culbertsoni*와 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 분류에 접근한 바 있다. 본 실험에서도 영양형의 특징으로는 *Acanthamoeba* 간의 종 분류가 거의 불가능하였으며, 포낭의 형태로만 몇 group으로 나눌 수 있었다.

*A. polyphaga*와 *Acanthamoeba* sp. YM-7은 Pussard 및 Pons¹²의 Group II의 특징을 보여 주었으며, 나머지 *A. culbertsoni*, *A. royreba*, *Acanthamoeba* sp. YM-4 및 *Acanthamoeba* sp. YM-5는 Group III의 특징을 보여 주었다.

최근에는 분자생물학적 기술들이 발달함에 따라 분자 수준에서 분류가 가능해지고 있는데 organelle DNA의 종간의 다양성을 측정 가능케 되었으며, 그 중에서도 18S-srDNA 및 미토콘드리아 DNA에 대한 제한효소 분석기술을 이용하면 비교적 근접관계에 있는 아메바들 사이의 유전적 유연관계를 쉽게 관찰할 수 있게 되었다.^{17,26} *Acanthamoeba*의 18S-srRNA를 coding하는 유전자를 PCR로 증폭하여 18S-srDNA를 얻거나 미토콘드리아 DNA를 제한효소들로 절단하여 제한효소 단편길이 다형성 분석을 통해 유전적 다양성을 비교하는 연구가 행하여 졌는데, 즉, *Entamoeba* 속,^{27,28} *Naegleria* 속²⁹ 등 원충류의 분류 및 동정에 유용하게 적용되어 보고되고 있다.

본 실험에서는 기존에 알려진 종인 *A. culbertsoni* 와 *A. polyphaga*를 기준 아메바로 하고, 한국 분리주인 *Acanthamoeba* sp. YM-4, *Acanthamoeba* sp. YM-5 및 *Acanthamoeba* sp. YM-7의 분류학적 유연관계를 알아보려고 18S-srRNA를 증폭하여 분리한 후 제한효소 단편길이 다형성을 분석하였다. 제한효소에 따라 여러 개의 절편들이 관찰되었으며, *Acanthamoeba* 종간에는 상당한 다형성이 관찰되었다. 본 실험 결과 *A. royreba*는 PCR로 18S-srDNA가 증폭이 되지 않았는데 어떤 intron이 존재하는 것으로 추측되며,³⁰ 나머지 5종에서는 2.1~2.3 kbp에서

18S-srDNA가 증폭되어 계속적인 실험을 진행하였다. 여러 가지 제한 효소를 처리하여 18S-srDNA 단편길이 다형성 분석을 한 결과 *A. polyphaga*와 *Acanthamoeba* sp. YM-7은 유전적 거리가 0.154로 나타나 상당히 근접한 종임을 알 수 있었고, 이것은 포낭의 특징과도 일치하였다. 한편, *A. culbertsoni*와 *Acanthamoeba* sp. YM-4는 유전적 거리가 0으로 나타나 거의 같은 종으로 분리되었는데, 기존의 보고에 의하면 생장률과 마우스에 대한 병원성 정도에 차이를 보여 주었으며²⁵ 미토콘드리아 DNA의 단편길이 다형성 분석을 시행하였던 실험에서는 *A. culbertsoni*와 *Acanthamoeba* sp. YM-4의 미토콘드리아 DNA의 제한효소 단편길이 다형성 분석에서 보면 유전적 거리가 0.102로 측정되어 차이가 있음이 관찰되었다.³¹ 가시아메바를 이용한 미토콘드리아 DNA의 RFLP는 Byers 등³²이 분리주간의 다양성을 이용하여 가시아메바 속의 분류에 이용한 이래 많은 연구들이 진행되었는데, 미토콘드리아 DNA의 RFLP는 분리주들마다 매우 다양하게 나타나 동일 종내의 variation과 종간의 variation의 구별에 문제점이 있으며, 어떤 제한효소에 의해서는 비슷한 양상을 보이는 분리주들이 다른 제한효소들에 의해서는 전혀 다른 양상을 보이는 등의 문제점이 나타나기도 하였다.³³ 그러나 Kong 등³³은 가시아메바의 미토콘드리아 DNA의 RFLP는 분리주들 간의 심한 다양성 때문에 분리주간의 구별과 특성 파악에 적합하다고 주장하기도 하였다.

Acanthamoeba sp. YM-5는 *A. culbertsoni* 및 *A. polyphaga*와 18S-srDNA 단편길이 다형성 분석을 통한 유전적 거리가 각각 0.070 및 0.277로 측정되었고, 포낭의 형태학적 특징으로도 *A. culbertsoni*와 어느 정도 일치하였으므로 *A. culbertsoni*와 근접한 종임이 관찰되었다.

이상의 결과를 토대로 볼 때 18S-srDNA의 제한효소 단편길이 다형성 분석은 *Acanthamoeba* 한국분리주 및 새로운 종의 분류에 유용한 기법이 됨을 확인할 수 있었으며, 앞으로 보다 정확한 분류에 대한 정보를 제공하는 데는 더 많은 종류의 제한효소를 사용하거나 18S-srDNA의 완전한 sequencing이 이루어져 전체의 상동성이 비교된다면 보다 명확한 분류 체계가 확립되리라 사료된다.

결 론

본 실험은 계통분류학상 근접한 유연관계에 있을 것으로 생각되는 한국 분리주인 *Acanthamoeba* sp. YM-4와 *Acanthamoeba* sp. YM-5 및 *Acanthamoeba* sp. YM-7을 기존에 알려진 종인 *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* 및 *A. royreba*와 합

개 18S-srDNA를 분리하여 여러 가지 제한효소를 처리함으로써 *Acanthamoeba* 종간의 제한효소 단편길이 다형성 분석을 통해 *Acanthamoeba* 한국분리주들의 종 동정에 접근하고자 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 여섯 종류의 *Acanthamoeba*의 영양형의 형태학적 차이는 관찰할 수 없었으나, 포낭의 형태는 *A. polyphaga*와 *Acanthamoeba* sp. YM-7이 유사하여 Group II에 속하였고, 나머지 Group III에 속하는 4종류는 별 다른 차이점이 관찰되지 않았다.

2. 18S-srDNA의 RFLP 분석결과, *A. culbertsoni*와 *Acanthamoeba* sp. YM-4는 유전적 거리가 관찰되지 않았으며, *Acanthamoeba* sp. YM-5와는 유전적 거리가 0.070으로 관찰되었다.

3. *A. polyphaga*에 대한 *Acanthamoeba* sp. YM-4 및 *Acanthamoeba* sp. YM-5의 유전적 거리는 각각 0.364 및 0.277로 서로 다른 종임이 관찰되었다.

4. *Acanthamoeba* sp. YM-7은 *A. culbertsoni* 및 *A. polyphaga*와의 유전적 거리가 각각 0.333 및 0.154로 *A. polyphaga*와 근접한 종임이 관찰되었다.

결과를 종합해보면, 한국분리주인 *Acanthamoeba* sp. YM-7은 *A. polyphaga*와 유사한 종이며, *Acanthamoeba* sp. YM-5는 *A. polyphaga*와는 다른 종으로 그리고 *A. culbertsoni*와 근접한 종으로 분류할 수 있으며, *Acanthamoeba* sp. YM-4는 *A. culbertsoni*의 아종(subspecies) 또는 strain으로 분류할 수 있으리라 사료된다.

참 고 문 헌

- Fowler M and Cater RF: Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. A preliminary report. Br Med J 2: 740-742, 1965
- Culbertson CG: The pathogenicity of soil amebas. Ann Rev Microbiol 25: 231-254, 1971
- Wong MM, Karr SL and Balamuth WB: Experimental infections with pathogenic free-living amoeba in laboratory primary host: I. (A) A study on susceptibility to *Naegleria fowleri*. J Parasitol 61: 109-208, 1975
- Visvesvara GS and Stehr-Green JK: Epidemiology of free-living amoeba infections. J Protozool 37(suppl): 25-33, 1990
- Ringsted J, Val Jager B, Suk DS and Visvesvara GS: Probable *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a Korean child. Am J Clin Pathol 66: 723-730, 1976
- 黃濬琦, 尹德鏞, 任敬一, 蘇鎮璋: 자유생활 아메바의 병원성에 관한 실험적 연구. 연세의대 논문집 9: 182-194, 1976
- 黃英南, 閔得映, 蘇鎮璋: 자유생활 아메바(*Acanthamoeba*)의 숙주에 대한 면역학적 반응. 연세의대 논문집 13: 393-407, 1980
- Yagita K and Endo T: Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. J Protozool 37: 570-575, 1990
- Singh BN: Nuclear division in the nine species of small free-living amoeba and its bearing on the classification of the order Amoebida. Phil Trans Roy Soc London 236: 405-461, 1952
- Singh BN and Das SR: Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order Amoebida. Phil Trans Roy Soc London 259: 435-476, 1970
- Page F: Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J Protozool 4: 709-724, 1967
- Pussard M and Pons R: Morphologie de la parokystique et taxonomic du genre *Acanthamoeba*(Protozoa, Amoebida). Protistologica 13: 557-598, 1977
- Stevens AR, De Jonckheere J and Willaert E: *Naegleria lovaniensis* new species: Isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. Int J Parasit 10: 51-64, 1980
- Costas M and Griffiths AJ: Enzyme composition and the taxonomy of *Acanthamoeba*. J Protozool 32: 604-607, 1985
- Jacobson LM and Band RN: Genetic heterogeneity in a natural population of *Acanthamoeba polyphaga* from soil, an isoenzyme analysis. J Protozool 34: 83-86, 1987
- De Johnckheere JF: Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. J Protozool 30: 701-706, 1983
- Visvesvara GS and Balamuth W: Comparative studies on related free-living and pathogenic amoeba with special reference to *Acanthamoeba*. J Protozool 22: 245-256, 1975
- 辛皓俊, 金鍾煥, 任敬一: 면역학적 방법을 이용한 자유생활아메바의 분류학적 접근. 대한기생충학잡지 30(4): 289-298, 1992
- Clark CG, Cross GAM and De Jonckheere JR: Evaluation of evolutionary divergence in the genes *Naegleria* by analysis of ribosomal DNA plasmid restriction pattern. Mol Biochem Parasitol 34: 281-296, 1989
- Willaert E: Recherches immuno-Taxonomiques comparees sur les du groupe "Limax". Acad R Sc Outre-Mem Class Sc Nat sous press, 1975
- McLaughlin GK, Brandt FH and Visvesvara GS: Restriction fragment length polymorphisms of the DNA of selected *Naegleria* and *Acanthamoeba*. J Clin Microbiol 26: 1655-1658, 1988
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S and Sogin ML: The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding region. Gene 71: 491-499, 1988
- Nei M and Li WH: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA 76: 5269-5273, 1979
- Park ES, Kim KM, Ahn MH and Min DY: Study on the pathogenicity of an *Acanthamoeba* species isolated from fresh-

- water fish. J Hanyang Med Coll 8: 225-229, 1989
25. Shin HJ, Ra MS and Im KI: Cytotoxicity of *Acanthamoeba* sp. YM-4 (Korean isolate). Yonsei R Trop Med 24: 31-38, 1993
 26. Milligan SM and Band RN: Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA as an aid in the taxonomy of *Naegleria* and *Vahlkampfia*. J Protozool 35: 198-204, 1988
 27. Clark CG and Diamond LS: The Laredo strain and other 'Entamoeba histolytica-like' amoebae are *Entamoeba moskovskii*. Mol Biochem Parasitol 46: 11-18, 1991
 28. Clark CG and Diamond LS: Ribosomal RNA genes of 'Pathogenic and nonpathogenic' *Entamoeba histolytica* are distinct. Mol Biochem Parasitol 49: 297-303, 1991
 29. De Jonckheere JF: Riboprinting of *Naegleria* spp.: small-subunit versus large-subunit rDNA. Parasitol Res 80: 230-234, 1994
 30. De Jonckheere JF: Evidence for the ancestral origin of group I introns in the SSUrDNA of *Naegleria* spp. J Euk Microbiol 41: 457-463, 1994
 31. Shin HJ and Im KI: Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* sp. YM-4(Korean isolate). Korean J Parasitol 35: 119-125, 1997
 32. Byers TJ, Bogler SA, Zarley CD and Burianek LL: Analysis of mitochondrial DNA variation as an approach to systematic relationship in the genus *Acanthamoeba*. J Protozool 30: 198-203, 1983
 33. Kong HH, Park JH and Chung DI: Interstrain polymorphisms of isoenzyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga*. Korean J Parasitol 33: 331-340, 1995
-