
약제내성 *Mycobacterium tuberculosis*의 *rpoB* 유전자 분석과 클로닝 발현

최은경* · 권태동** · 배선준*** · 조해선**** · 홍성갑*****

Analysis and Expression of Cloning of *rpoB* Gene of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*

Eun Kyeong Choi* · Tae-Dong Kweon** · Sun-Joon Bai*** · Hae Sun Cho**** · Seong-Karp Hong*****

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업
지원을 받아 수행된 것임(2011-0014780과 2011-0024912).

요 약

마산병원과 결핵연구원에서 rifampin 내성균주를 확보하여 기존의 전통방법으로 검사된 항결핵제 내성균의 rifampin 내성관련 유전자인 *rpoB* (RNA polymerase beta subunit)의 변이를 DNA 염기서열 분석방법에 의하여 분석하였다. 그 결과 국내에서 분리되는 결핵균에서는 기존에 보고된 *rpoB* 변이부위와는 다른 위치의 DNA 염기 변이가 확인되었고 국내에서 여러 내성 결핵균주에서 변이가 발견되고 있지만 이러한 변이가 리팜핀 내성을 실제로 유발하는지 실험적으로 검증된 바는 없었다. 따라서 이러한 특이 부위의 *rpoB* 변이들이 실제로 리팜핀 내성을 유발하는가를 확인하기 위하여 내성 결핵균주들의 *rpoB* 변이유전자를 polymerase chain reaction(PCR)으로 증폭하고 이것을 리팜핀 감수성 결핵균주에 cloning(클로닝)하고 발현시켜 *rpoB* 변이가 리팜핀에 대한 내성을 발생시켰음을 실험적으로 확인하였다.

ABSTRACT

Using DNA sequencing method, we analyzed mutations of *rpoB* (RNA polymerase beta subunit) rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains which were identified by conventional test at Masan National Hospital and The Korean Institute of Tuberculosis. Though it has been reported different mutations of *rpoB* region of rifampin-resistant *M. tuberculosis* strains in the south of Korea, it is not confirmed whether these mutations of *rpoB* region actually express rifampin resistance through experiment. We confirmed experimentally these mutations of *rpoB* region of *M. tuberculosis* strains induced rifampin-resistance through amplified *rpoB* by polymerase chain reaction (PCR) and cloning of mutant *rpoB* into rifampin sensitive-*M. tuberculosis* strain.

키워드

결핵균, 약제내성, 유전자, *rpoB*

Key word

gene, *Mycobacterium tuberculosis*, rifampin-resistance, *rpoB*

-
- * 정회원 : 연세대학교 의과대학 마취통증의학과
** 정회원 : 연세대학교 의과대학 마취통증의학과
*** 정회원 : 연세대학교 의과대학 마취통증의학과
**** 정회원 : 연세대학교 의과대학 마취통증의학과
***** 종신회원 : 목원대학교 바이오건강학부(교신저자, karp@mokwon.ac)

접수일자 : 2013. 03. 26
심사완료일자 : 2013. 04. 04

Open Access <http://dx.doi.org/10.6109/jkiice.2013.17.4.1005>

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright © The Korea Institute of Information and Communication Engineering.

I. 서 론

세계 보건기구가 2003년을 기준으로 추정된 바에 따르면 매년 약 880만 명의 환자가 새로 발생하고, 연간 약 170만 명이 결핵으로 사망하는 것으로 보고되고 있고 이들 환자 대부분이 사회경제적으로 어려운 환경에 있는 후진국에 주로 있기 때문에 결핵은 대표적인 후진국 병이다. 우리나라는 보건의료수준의 향상과 사회경제적 발전으로 결핵환자수가 많이 줄어들기는 했지만, 결핵은 여전히 우리나라에서 가장 중요한 전염병으로 남아 있으며 전체 국민의 1/3이 이미 결핵에 감염되어 있는 실정이다. 2009년 한 해 동안 새로 발견되어 보고된 결핵환자 수는 대략 국민 1000명 당 1명꼴인 3만 5845명, 2008년 결핵으로 인한 사망자 수는 2323명으로 OECD 가입국 중 가장 높은 수준을 보이고 있다. 또한, 한 가지 중요한 문제점은 바로 20-30대 젊은 층에 결핵환자가 많다는 것이다. 젊은 층 결핵환자들은 다른 사람과의 접촉이 적은 노인층 결핵환자에 비해 결핵을 전염시킬 가능성이 훨씬 높을 뿐 아니라, 비록 결핵이 완치되었다 하더라도 나이가 들어 면역력이 약해지면 결핵이 다시 재발할 수 있다는 문제점이 있다.

최근 들어 결핵의 심각성이 다시 주목받는 이유는 기존 항생제에 대한 다제내성균의 출현이다. 결핵세균에는 치료에 사용해 오던 항생제에 대해 내성을 가지는 내성결핵균이 돌연변이에 의해 발생될 수 있는데 결핵의 대표적인 치료제인 아이나와 리팜핀을 포함한 2가지 이상의 약에 대해 내성을 가지는 다제내성결핵균이 대표적인 경우이다.

과거의 연구보고에 의하면 리팜핀 내성 결핵균은 대부분이 다른 항결핵제에 대해서도 내성을 보이기 때문에 항결핵제 내성의 marker로 잘 알려져 있다. 이 리팜핀 내성은 RNA polymerase beta subunit인 *rpoB* 유전자의 특정 부위에 변이가 생겨 나타나는 것으로서 이미 알려진 몇몇 부위로 한정되어 있다. 그러나 본 연구실에서는 국내에서 분리되는 결핵균들에서는 예상외로 알려진 바와 같은 대장균이나 결핵균의 해당 부위 변이와는 다른 위치, 즉 예를 들어 codon 505, 507 또는 533과 같은 위치에서도 변이가 있다는 것을 DNA 염기서열 분석에 의하여 발견하였다. *rpoB* codon 516, 531 등은 대장균에서도 mutagenesis(돌연변이생성)에 의해 확인된 것들이지만, 이후 논문으로 보고된 비교적 흔치 않은 변이들은 과연

리팜핀 내성을 유발하는 것인지에 대한 검증이 없었다. 즉, 내성 검사에서 내성이 확인되었고 genotype(유전자형)을 분석하여 변이가 있었으면 내성과 관련되었다는 추정 보고만이 있었던 것이다.

본 연구에서는 이러한 국내에서도 특이하게 발견된 *rpoB* 변이들이 리팜핀 내성을 유발하는가를 검토할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 그 방법은 이미 유전자 분석을 통해 특이한 변이를 보이는 결핵균주들을 확보 하였으므로, PCR을 통해 해당 내성균의 *rpoB* 전체 유전자를 벡터에 클로닝 한 다음, 리팜핀 감수성균주인 *M. smegmatis*에 transformation(형질전환)하여 리팜핀 내성 검사를 시험하는 것이다. 이러한 과정의 시험결과로부터 결핵내성균의 *rpoB* 유전자 변이와 리팜핀 내성과의 유발연관성을 확인할 수 있었다.

II. 재료 및 방법

국내에서 분리되는 결핵균에서는 기존에 국외에서 연구 보고된 *rpoB* 변이 부위와는 다른 위치의 DNA 염기 변이가 여러 내성균주에서 발견된 바 있다. 그러나 이런 변이가 실제로 리팜핀 내성을 유발하는지에 대하여서는 실험적으로 검증된 바 없었다. 따라서 이러한 특이 부위의 *rpoB* 변이들이 실제로 리팜핀 내성을 유발하는가를 실험실적으로 확인하기 위하여 내성균주들의 *rpoB* 유전자를 PCR로 증폭하여 리팜핀 감수성 균주에 클로닝 하였다(그림 1).

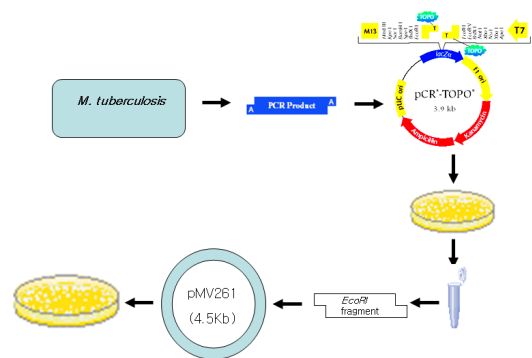


그림 1. *rpoB* 유전자의 클로닝 및 발현전략
Fig. 1 Strategy of cloning and expression of *rpoB*

2.1. Mycobacteria

결핵연구원과 마산결핵병원 그리고 서울대학병원 임상병리과로부터 분양받아 시행하였다.

2.2. PCR amplification

각 분리균으로부터 Bead-beater/phenol법을 사용하여 genomic DNA를 추출하여 TE buffer 60 µl로 용해시켜 농도측정 후 염기서열 분석과 PCR 분석을 위한 template DNA로 사용하였다[1]. PCR은 상용으로 구입할 수 있는 AccuPower Pre-Mix Top (Bioneer 사)을 사용하였으며 각각의 primer (MF-MR)의 20 pmol 씩과 template DNA 50 ng을 첨가한 뒤 증류수로 최종 용적 20 µl로 하여 PCR 기기(Cetus 사, Model 9600 Thermocycler)로 30 cycle (95°C 30 초, 60°C 30 초, 72°C 45 초, 72°C 5 분)을 시행하였다[2].

2.3. 염기서열 결정

PCR 산물은 3% agarose gel에 전기영동 후, Qiaex을 이용하여 정제하고, 이 정제된 DNA를 template DNA로 하여 ABI automatic sequencer(자동 DNA 염기서열 분석기)로 염기서열을 결정하였다[3].

2.4. *rpoB* 유전자 클로닝과 발현

먼저 리팜핀 내성 *M. tuberculosis*의 유전체 DNA로부터 *rpoB* (약 3.5 kb)를 PCR로 증폭하여 TA 클로닝 vector(벡터)인 TOPO 벡터에 삽입한 다음, *E. coli*에 형질전환하였다. 이로부터 다시 벡터를 분리하여 *rpoB*가 포함된 *EcoRI*절편을 mycobacteria 벡터인 pMV261[4]에 삽입한 후, *M. smegmatis* LR222[4, 5]에 형질전환하였다. 이렇게 얻은 균주들과 대조균인 *M. smegmatis* L222의 성장을 리팜핀 함유 액체 배지에서 비교하였다. 계속하여 다른 변이 부위를 갖는 균주들을 사용하여 실험하였다.

결핵병원에서 분리한 균주는 약제내성 결핵균이 12주였으며 2균주는 비결핵균주로 확인되었다. 2개의 비결핵균주는 모두 *M. intracellulare*로 동정되었다.

결핵균주는 *rpoB* 유전자 분석 방법을 시행하여 변이 여부를 염기서열분석으로 분석한 결과 2 균주의 경우 *rpoB* 유전자의 526 (*E. coli* numbering) 위치에서 CAC→TAC로 변이되었고 1균주의 경우 510 위치에서 CAG→CAC로 526 위치에서 CAC→CGC로 2 부위에 변이가 일어났다 또한 1균주에서는 531 위치에서 CAC→TAC로 변이가 일어났고 이러한 변이에 의해 예상되는 아미노산에서도 변이가 일어났다(표 1).

표 1. 내성결핵균주로부터 *rpoB* 유전자의 변이 분석
Table. 1 Analysis of *rpoB* mutation from resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains

<i>rpoB</i> codon	Mutation (DNA)	Mutation (amino acid)
510	CAG→CAC	Q →H
526	CAC→TAC	H →Y
	CAC→CGC	H →R
531	CAC→TAC	H →Y

3.2. 리팜핀 내성 결핵균 유전자 클로닝 및 발현

slowly growing mycobacteria인 *M. tuberculosis*의 *rpoB* 유전자의 531 위치에 변이된 *rpoB* 유전자를 클로닝하여 rapidly growing mycobacteria인 *M. smegmatis*에 형질전환하고 *rpoB* 유전자가 발현되는 것을 관찰하였다. Rapidly growing mycobacteria는 *rpoB*의 특정 아미노산이 slowly growing mycobacteria와 차이를 보이는데 이러한 *rpoB*의 부위가 균주 성장에 영향을 미치는지 알아보기 위함이다. 먼저 *M. tuberculosis*의 genomic DNA로부터 *rpoB* (약 3.5 kb)를 PCR로 증폭하여 TA 클로닝 벡터인 TOPO 벡터에 삽입한 다음, *E. coli*에 형질전환 하였다. 이로부터 다시 벡터를 분리하여 *rpoB*가 포함된 *EcoRI*절편을 mycobacteria 벡터인 pMV261에 삽입한 후 *M. smegmatis* LR222에 형질전환하여 클로닝 되었음을 확인하였다(그림2).

III. 결과 및 토론

3.1. 리팜핀 내성 결핵균 유전자 검사

마산결핵병원, 결핵 연구원과 서울대학병원 내과 및 정형외과로부터 얻은 환자 분리 결핵균 및 검체중 마산

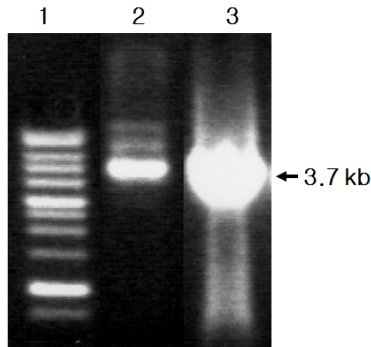


그림 2. 클로닝된 *M. smegmatis* LR222에서 변이 *rpoB* 유전자가 있는 벡터를 확인하고 PCR 증폭으로 변이 *rpoB* 유전자의 존재를 확인(1: 1 kb Marker, 2: 변이 *rpoB*가 포함된 pMV261, 3: *rpoB* PCR 증폭)
 Fig. 2 Identification of vector containing mutated *rpoB* from cloned *M. smegmatis* LR222 and mutated *rpoB* using PCR amplification (1: 1 kb Marker, 2: pMV261 containing mutated *rpoB*, 3: PCR amplification of *rpoB*)

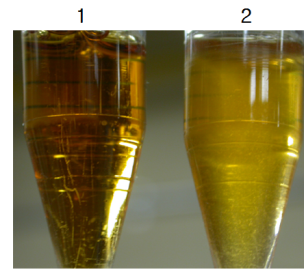


그림 3. Middlebrook 7H9 액체배지(리팜핀 40µg/ml)에서 *M. smegmatis* LR222(대조군)와 변이 *rpoB*가 클로닝된 *M. smegmatis* LR222의 성장비교(1: *M. smegmatis* LR222, 2: *rpoB*를 포함한 *M. smegmatis* LR222)
 Fig. 3 Comparison of growth of *M. smegmatis* LR222 (control) and *M. smegmatis* LR222 cloned *rpoB* from Middlebrook 7H9 (40µg/ml of rifampin) (1: *M. smegmatis* LR222, 2: *M. smegmatis* LR222 cloned *rpoB*)

변이 *rpoB*가 클로닝된 *M. smegmatis* LR222가 예상대로 리팜핀 내성을 나타낼 수 있는가를 리팜핀액체배양으로 확인하였다. 내성결핵균주의 *rpoB*가 클로닝된 균주는 대조군인 *M. smegmatis* LR222과 다르게 리팜핀이 40 µg/ml의 농도로 들어있는 Middlebrook 7H9 액체배지 상에서 사멸하지 않고 성장을 보여 리팜핀에 내성을 갖고 있음을 나타내었다. 이는 리팜핀 내성균주의 *rpoB* 유전자가 pMV261 벡터에 성공적으로 클로닝되어 발현되었다는 것을 의미하며, 이는 내성결핵균주의 *rpoB*의 DNA변이가 실제로 리팜핀 내성을 유발한다는 것을 확인한 것이다(그림 3).

이것은 pMV261 벡터에 성공적으로 *rpoB* 유전자가 클로닝 되었다는 것을 의미하며, 향후 계속하여 여러 다양한 리팜핀 내성 결핵균주들로부터 다양한 위치의 변이 *rpoB* 유전자를 클로닝하여 리팜핀 감수성인 *M. smegmatis* LR222에 형질전환한 후 리팜핀액체 배지에서 성장유무를 시험한다면 변이 *rpoB*가 리팜핀 내성을 유발시킬 수 있는지 없는지를 확인할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말

이 논문은 2011년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업 지원을 받아 수행된 것임(2011-0014780과 2011-0024912).

참고문헌

- [1] B. J. Kim, S. H. Lee, M. A. Lyu, S. J. Kim, G. H. Bae, S. J. Kim, G. T. Chae, E. C. Kim, C. Y. Cha, and Y. H. Kook, "Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*)", *J. Clin. Microbiol.* vol. 37, pp. 1714-1720, 1999.
- [2] S. K. Hong, B. J. Kim, Y. J. Yun, K. H. Lee, E. C. Kim, E. M. Park, Y. G. Park, G. H. Bai, and Y. H. Kook, "Identification of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-linked reverse hybridization using specific *rpoB* oligonucleotide probes", *J. Microbiol. Methods.* vol. 59, pp. 71-79, 2004.

- [3] S. J. Bai, J. S. Eum, Y. D. Park, S. H. Chung, Y. H. Kook and S. K. Hong "PCR-linked reverse DNA hybridization using oligonucleotide-specific probes of *rpoB* for identification of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*", *J. Microbiol. Methods*. vol. 83, pp. 291-292, 2010.
- [4] L. P. Miller, J. T. Crawford, and T. M. Shinnick, "The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* vol. 38, pp. 805-811, 1994.
- [5] V. Donnabella, F. Martiniuk, D. Kinney, M. Bacerdo, S. Bonk, B. Hanna, W. N. Rom, "Isolation of the gene for the beta subunit of RNA polymerase from rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* and identification of new mutations", *Am J Respir Cell Mol Biol* vol. 11, pp. 639-643, 1994.



조해선 (Hae Sun Cho)

현재 연세대학교 의과대학
마취통증의학과 전공의
서울아산병원 수련의 수료
2008년 영남대학교 의과대학 졸업

※주관심분야: 바이오생물정보, 나노생물



배선준(Sun-Joon Bai)

1993년 - 현재 연세대학교 의과대학
마취통증의학과 전임강사
-교수
2010년 연세대학교의과대학
마취통증의학과 박사

2005년 연세대학교의과대학 마취통증의학과 석사
※주관심분야: 바이오생물정보, 나노생물

저자소개



최은경(Eun Kyeong Choi)

현재 강남세브란스병원
마취통증의학과 강사
2009년 - 2013년 신촌 세브란스
병원 전공의

2007년 연세대학교 의과대학졸업
※주관심분야: 바이오생물정보, 나노생물



홍성갑(Seong-Karp Hong)

2000년 - 현재 목원대학교 바이오
건강학부 겸임교수
2003년 - 2009년 가톨릭대학교
의과대학 연구교수

1997년 고려대학교 이학박사
※주관심분야: 바이오생물정보, 나노생물



권태동(Tae-Dong Kweon)

2007년 - 현재 연세대학교의과
대학 마취통증의학과
조교수
2010년 연세대학교의과대학
마취통증의학과 박사

2005년 - 2006년 연세대학교의과대학 마취통증
의학과 연구강사
※주관심분야: 바이오생물정보, 나노생물