

메타유전체 시퀀싱을 이용한 항생제 내성 연구

신재홍¹ · 노미나^{1,2}

¹한양대학교 공과대학 컴퓨터소프트웨어학부, ²한양대학교 생명의료정보학과

Human Resistome Study with Metagenomic Sequencing Data

Jae Hong Shin¹, Mina Rho^{1,2}

¹Department of Computer Science and Engineering, College of Engineering, Hanyang University, Seoul, Korea

²Department of Biomedical Informatics, Hanyang University, Seoul, Korea

With the introduction of synthetic antibiotics, many lives including humans and animals have been saved against bacterial infection. An increasing level of antibiotics use, however, raises serious problems of multi-drug resistance and transferring of resistance genes across different environments and countries. Advances in high-throughput sequencing technology and efficient bioinformatics methods allow us to perform a large-scale screening and analysis of resistomes in the human and environmental microbiomes. Recent studies on human microbiomes have revealed a diverse distribution of resistance genes and their transferring activities in the communities. This review discusses recent progresses in metagenomic approaches to identify resistance genes in the human microbiome, including genomic sequence search and functional metagenomics methods. Using Rifampicin ADP-ribosyltransferase as an example, an integrative approach that analyzes the sequences and three-dimensional structures of the proteins derived from resistance genes is also introduced.

Key words: Human microbiome; Metagenome; Antibiotics resistance

Corresponding Author: Mina Rho
Department of Computer Science and Engineering, College of Engineering, Hanyang University, Department of Biomedical Informatics, Hanyang University, 222 Wangsimni-ro, Seongdong-gu, Seoul 04763, Korea
Tel: +82-2-2220-2379
Fax: +82-2-2220-1886
E-mail: minrho@hanyang.ac.kr

Received 3 Apr 2018
Revised 5 May 2018
Accepted 12 Jun 2018

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

인류가 근대 의학의 성과로 항생제를 사용하기 시작한지는 불과 100년이 채 안되었지만 항생제 내성은 오래전부터 존재해 왔던 것으로 알려져 있다. 3만년전의 영구동토층 토양에서도 항생제 내성 유전자가 존재했다는 것이 밝혀졌으며, 4백만년 동안 인위적인 노출이 없었던 동굴에서 채취한 박테리아 샘플에서 14종의 항생제에 내성을 보이는 유전자가 있다는 연구결과도 발표되었다 [1, 2]. 이러한 내성유전자들은 박테리아가 항생제와 같이 독성을 가진 외부 물질로부터 자신을 보호하기 위해 구축한 방어기작으로 알려져 있다 [3].

박테리아로 대표되는 병원균에 의한 감염은 인류의 건강에 심각한 영향을 미쳐 왔으며, 그로 인하여 많은 비용이 지불되고 있다. 항생 물질은 오래 전부터 존재했지만, 20세기 중반 이후 많은 항생제를 발견하고 인공으로 합성하여 처방하면서 감염병의 효과적인 치료가 시작되었으며, 인류의 건강 및 생명연장에 지대한 영향을 미치고 있다. 또한, 항생제 처방을 통해 이전에는 감염 문제로 인해 제한적으로 시행되었던 외과적 수술과 장기이식 등이 가능하게 되었고, 더 나아가서는 항암치료에도 포괄적으로 사용되고 있다 [4]. 이처럼 항생제는 가장 널리 사용되는 처방 약물 중 하나로 분류되고 있다. 2010년 기준으로 7천만 도즈(dose)의 항생제가 전 세계적으로 처방 되었고, 그 사용량도 점차

증가하는 추세에 있다. 2000년에 비해 2010년에는 항생제의 사용량이 36%나 증가했다 [5].

하지만, 항생제의 지속적인 남용 및 오용 때문에 박테리아는 내성을 키우게 되었고, 그 결과 치료에 활용 할 수 있는 항생제의 종류 역시 지속적으로 감소되는 추세에 있다. 그 결과, 박테리아에 의한 감염이 인류 건강을 위협하는 요인으로 자주 거론되고 있다 [6]. WHO에 따르면 2016년 기준 49만명의 결핵 환자가 다중약물내성(multi-drug resistance)을 보이고 있으며, 그 중 54%의 환자만 치료 되었다. 이러한 현실을 극복하기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다. 결핵 치료에 사용되는 항생제인 리파마이신의 내성 메커니즘의 규명과 함께 *arr-ms*, *rpoB*, *rph-lm* 등 관련된 내성 유전자들을 밝혀내는 연구가 대표적 사례이다 [7-10]. 항생제 내성 작용 메커니즘에 대한 체계적인 연구가 성과를 보이고 있는 경우도 있지만, 아직 유효한 약물이 개발되지 못한 병원균에 대해서는 포괄적인 연구가 시급하다. 예를 들어, 메티실린 내성 황색포도상구균(MRSA, methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)은 피부감염, 패혈증, 폐렴과 같은 감염 질환을 일으키는 병원균으로서, 감염 시 사용 가능한 항생제가 거의 없어 현재 치료에 어려움을 겪고 있다. 메티실린은 화학구조적으로는 베타락탐 계열의 항생제이며, 일반적으로 잘 알려진 내성유전자인 베타락탐효소(beta-lactamase)에는 저항성이 있지만, MRSA에서는 페니실린 결합단백질인 PBP의 발현으로 인해 메티실린의 활성이 저해되어 항생제로서 효과가 없다 [11].

박테리아의 항생제 내성은 크게 네가지 메커니즘으로 분류할 수 있다: 1) 박테리아 세포의 바깥막단백질(outer membrane protein)이나 유출펌프(efflux pump)를 통한 항생제 침투 방지; 2) 유전자 변이(mutation)를 통한 항생제 표적의 구조적 변형; 3) 항생제 표적 분자의 변형; 4) 항생제의 화학적 구조 변형을 통한 항생제의 비활성화 [12]. 이들 메커니즘에 관여하는 내성 유전자는 일반적으로는 박테리아에서 박테리아로 빈번히 전파된다. 이 과정은 박테리아가 자신의 생태학적 지위(ecological niche)를 획득하기 위한 과정으로 간주될 수도 있다 [3].

항생제의 내성유전자는 인간뿐 아니라 가축이나 농작물에도 광범위하게 분포되어 있다. 항생제에 민감하게 반응해 왔던 병원균에서도 지속적인 항생제 노출을 통해 내성이 생기며, 환경 내 잔류항생제가 환경미생물의 항생제 내성을 키우는 데에도 영향을 미친다 [13]. 박테리아에서 박테리아로 수평적 유전자 이동(horizontal gene transfer)을 통해 내성유전자는 박테리아 군집 사이에 빠르게 확산된다 [3,14]. 최근 연구에 의하면 이종간(inter species) 뿐 아니라 다른 속(inter genus) 있는 박테리아 사이에서도 유전자 이동(gene transfer)이 일어난다. 예를 들어, *Bacteroides*는 인간의 소장 내에 있는 미생물 사이의 내성유전자 이동에 중요한 역할을 한다 [15]. 유전자는 다양한 매개체를 통해 박테리아 사이에서 이동한다. 메타유전체 연구에 의하면 국가 간 여행 이후에 내성유전자의 획득률이 더욱 높아진다. 예를 들어,

항생제 내성유전자 중 하나인 베타락탐효소(beta-lactamase)의 활성도가 여행 전후에 9 %에서 37 %로 늘어난 사례가 최근 발표되었다 [16]. 내성유전자의 확산으로 인한 병원균 감염의 위험성은 이처럼 높아지고 있는데 반해, 이에 맞설 수 있는 항생제의 사용범위는 갈수록 제한받고 있다 [17,18]. 이러한 상황에서 새로운 항생제의 개발은 더욱 더디게 진행되고 있기 때문에, “항생제 내성 위기”(Antibiotics Resistance Crisis)에 대한 우려가 높아지는 실정이다 [19,20].

본 종설에서는 “항생제 내성 위기”의 시대에 필요한 보다 포괄적인 관점을 견지하고 내성관련 연구동향 및 연구방법을 소개하고자 한다. 임상에서 발견되는 다수의 항생제 내성유전자들은 그 근원이 환경미생물들에서 진화되었다고 여겨진다 [19]. 이러한 이유로 최근 항생제 내성유전자 관련 연구는 인간 뿐 아니라 인간에 서식하는 미생물, 가축, 환경메타유전체로 범위를 확장하여 내성유전자들의 분포, 동정, 작용 메커니즘의 규명을 포함하여 포괄적으로 시도되고 있다 [19-22]. 따라서 본 종설에서는 인간 마이크로바이옴과 환경 마이크로바이옴에서 발견되는 항생제 내성유전체(resistomes)에 관련된 연구를 주로 소개하고자 한다. 구체적으로는 항생제 내성관련 메타유전체 데이터베이스와 기능 메타유전체(functional metagenomics) 방법을 활용한 메타유전체에서의 항생제 내성유전자 연구에 대해서 살펴보고, 메타유전체 데이터로부터 결핵 치료제인 리팜피신의 내성작용기전과 단백질 3차원구조와 단백질서열의 통합적인 분석을 이용한 내성유전자 동정도 간략히 다루고자 한다.

본 론

1. 내성유전자 동정방법

박테리아 또는 박테리아 군집으로부터 어떤 내성유전자가 존재하는지 동정하기 위해서는 일반적으로 박테리아를 배양하여 그로부터 PCR (polymerase chain reaction)이나 WGS (whole genome sequencing)등의 방법으로 유전정보를 추출해 내고 있다. 이러한 방법은 내성유전자를 찾는 연구 뿐 아니라 병원균의 모니터링이나 병원에서 감염환자의 진단에도 일상적으로 적용되고 있다 [21]. 하지만 박테리아가 배양되어야만 유전정보를 얻을 수 있을 뿐 아니라 배양하는데에만 경우에 따라 며칠이 소요되기도 한다. 더욱이 배양 기반의 내성유전자 동정은 배양되는 박테리아만을 대상으로하는 제약이 있으며 배양이 되지 않는 많은 박테리아에 대해서는 다른 방법을 적용해야 한다.

박테리아를 배양하지 않고도, 타겟기반으로 PCR이나 DNA 마이크로어레이 기술을 사용하여 내성유전자를 대량으로 찾는 방법이 널리 적용되고 있으나 [22], 사용되는 프라이머 시퀀스(primer sequence)에 의해 결과가 달라질 수 있다는 것과 프로브(probe)들 간의 cross-talk에 따른 제약이 있다. 이러한 문제점에도 불구하고 배양을 하지 않는 장점으로 인하여 성공적인

연구사례들이 있다. 예를 들어, vancomycin 내성 유전자에 특화된 프라이머 시퀀스를 사용하여 유럽의 하수도 샘플에서 내성 유전자를 동정하였고, 수생생태에서 tetracycline 내성 유전자를 PCR 방법으로 스크리닝하였다 [23]. 또한 배양에 의존하지 않는 시퀀싱에 기반한 기술은 패러다임 변화를 이끌었으며 내성유전체(resistomes) 연구에 중요한 역할을 했다 [24-26].

시퀀싱한 염기서열은 다중서열정렬(MSA, multiple sequence alignment) 방법과 서열상동성(sequence homology) 기반의 BLAST 검색을 통하여 기존의 알려진 박테리아 유전체나 내성유전자 데이터베이스와 비교하여 예측하거나 동정할 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 검색결과가 이미 알려져있는 데이터베이스에 존재하는 내성유전자 내에서만 국한된다는 단점이 있다. 또한, 염기서열상동성 기반의 방법에서는 다음과 같은 두가지 사항을 고려해야 한다. 첫째로, 거짓양성(false positive)의 비율을 낮추는 것이다. 두번째로는 최대한 다양한 염기서열을 갖게하는 결과를 도출하기 위하여 서열 유사성(sequence similarity)에 대한 임계값(threshold)을 정하는 것이다. 위의 두가지 사항을 보완하고자 다중서열정렬이 필요없는 k-mer 분석 기반의 내성유전자 예측이나 [27], MSA와 상호보완적으로 단백질의 3차원 구조정보를 이용하기도 한다 [28]. 단백질의 3차원 구조정보를 통해 항생제와 항생제 표적간의 상호작용을 분자 수준에서 분석할 수 있다. 특히, 단백질 서열의 보존성은 낮지만, 수소결합이나 수소성 상호작용 등 항생제-표적 간의 분자적 상호작용에 중요한 역할을 하는 아미노산을 찾아낼 수 있기 때문에, 다중서열 정렬방법에서 간과될 수 있는 기능성 모티프를 발굴하는 새로운 대안이 될 수 있다.

Phillippon과 연구자들은 베타락탐분해효소의 3차원 구조정보 및 서열정보를 이용하여 Class A의 베타락탐 분해효소들을 분류하였다 [29]. 이 연구에서는 단백질의 3차원구조 비교를 통하여 PER-1, KPC-2, TEM-1의 Ω -loop와 함께 기질이 결합하는 부위의 차이를 분석하였다.

시퀀싱 데이터 분석을 통한 내성유전자의 연구는 획기적인 진전이 있었지만, 대부분 기존에 찾은 유전자의 시퀀스 유사도가 중요한 요소로 역할을 한다. 이를 극복하기 위하여, 기능메타유전체적(functional metagenomic)인 연구가 시도되어 새로운 내성요소와 유전정보 간의 직접적인 검증이 가능한 결과들을 도출해내고 있다.

2. 기능메타유전체 방법

기능메타유전체는 배양이나 시퀀싱에서 일어날 수 있는 편향성을 배제할 수 있다 [30]. 미생물 군집에서 메타게놈 DNA를 직접 추출하고, 추출된 DNA는 다시 일정한 크기로 자른다. 이렇게 작은 크기로 만든 시퀀스를 이용하여 스크리닝 벡터(vector)를 구성하여 메타유전체 라이브러리를 만든다. 이렇게 구축된 메타유전체 라이브러리를 원하는 다양한 표현형을 갖는 이중의 호

스트에 주입하여 wild-type과 비교하여 변화를 측정한다 [31]. 그 중 원하는 표현형을 보이는 시료를 선택하여 시퀀싱하고, 서열분석을 통하여 유전정보를 얻어 유전형(genotype)과 표현형(phenotype)간의 연관성을 연구한다. 이 방법은 특히 환경에 존재하는 새로운 내성유전자를 동정하는데 유용하다 [30,32].

몇가지 초기 연구사례를 살펴보면, Sommer와 연구자들은 기능메타유전체 방법을 이용하여 95개의 내성유전자를 발굴하였다. 새로 발견된 95개의 내성유전자를 GenBank와 비교했을 때, DNA서열의 유사도는 100%에서 40%, 아미노산 서열의 유사도는 100%에서 20% 수준의 다양한 내성유전자염이 밝혀졌다 [33]. 2000년도 초반에 Riesenfeld와 연구자들은 메타기능유전체 방법을 적용하여 토양미생물에 다양한 항생제 내성유전자가 존재한다는 사실을 밝혔다 [34]. 또다른 기능메타유전체방법의 연구에서는 항생제 노출이 없었을 것으로 추정되는 알래스카 토양에서 항생제 내성유전자인 베타락탐 분해효소(beta-lactamase)의 존재를 밝혔다 [35]. 이 유전자는 단일유전자로서는 처음으로 베타락탐분해효소 중 Class C와 D에 동시에 속하는 것으로 규명되었다. 이 사실은, 내성유전자의 진화는 선택압력(selective pressure)과 무관하거나, 알래스카 토양에 존재하는 베타락탐 분해효소는 진화 초기의 효소에 더 가깝게 연관되어 있다는 점을 시사한다.

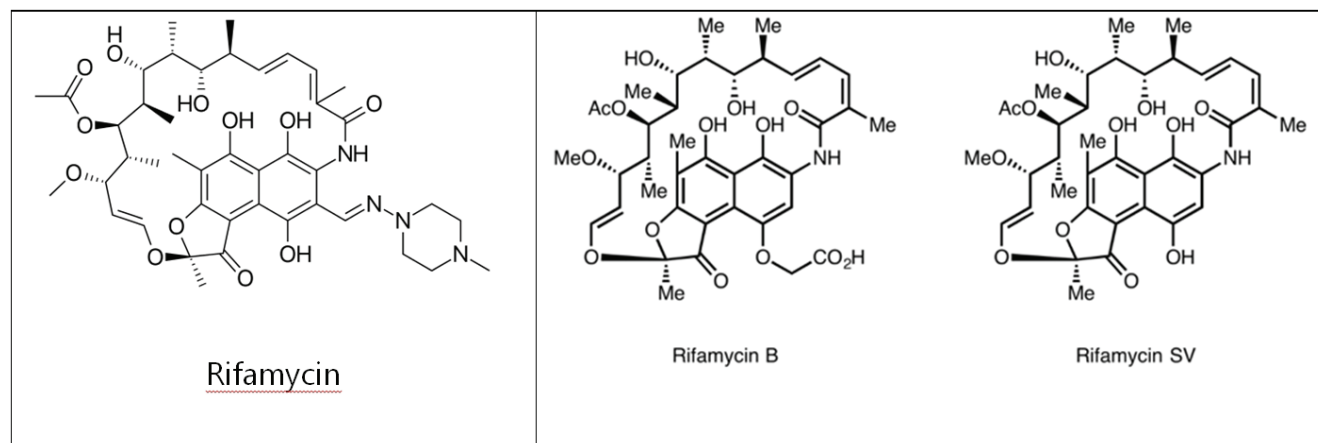
토양 뿐 아니라 민물(fresh water)이나 하수침전물(sludge)에서 채취한 시료를 기능메타유전체 방법으로 분석한 사례도 있다. 이를 통해 어떤 종류의 항생제 내성유전자가 환경에 얼마나 분포하고 있는지 알 수 있다(Table 1). 박테리아는 배양이 어렵기 때문에 전장유전체에 대한 정보는 상대적으로 제한적이며, 따라서 항생제 내성 유전자에 대한 정보 역시 제한적이다. 그럼에도 불구하고 여러 연구 그룹에서 다양한 알고리즘을 적용하여 항생제 내성 유전자의 데이터베이스를 구축하였으며, 항생제 내성연구에 활발히 이용하고 있다.

3. 항생제 내성 유전자 데이터 베이스

기존에 밝혀진 항생제 내성유전자의 경우 데이터베이스가 구축되어 있으며, 웹사이트를 통해 공개되어 있다. 항생제 내성에 관련된 화학구조, 내성유전자의 염기서열, 단백질 서열 정보는 BLAST 검색 또는 키워드 검색기능 등을 통하여 이용할 수 있으며, 데이터베이스 구축에 사용된 데이터를 제공하기도 한다 [36-38]. 그 중 CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database)는 항생제내성 온톨로지 구축을 통해 통합적인 내성 유전자 검색 서비스를 제공하고 있는데, 3,907개의 온톨로지와 2,492개의 대표서열을 포함하고 있다 [39]. 또한 BALST 검색과 함께 상동성 검색을 통해 염기서열이나 DNA서열 정보만으로 내성유전자를 예측하는 기능을 제공한다. Resfams는 pHMM (profile Hidden Markov Model) 방법론을 적용한 모델을 구축하여, 기존의 pairwise sequence similarity 기반의 서열유사

Table 1. Summary of microbiome studies characterizing human and environmental resistomes

Site	Samples	Country	Dominant resistance determinant	Ref.
Gut	162 fecal samples	85 Danish, 39 Spanish, and 38 Chinese	Aminoglycoside, bacitracin, tetracycline, glycopeptide	[49]
Gut	275 fecal samples	92 American, 85 Danish, 39 Spanish, 30 Chinese, 13 Japanese, 8 French, 6 Italian, and 2 Indian	Tetracycline, bacitracin, vancomycin	[50]
Gut	1,267 fecal samples	139 American, 368 Chinese, 401 Danish, and 359 Spanish	Tetracycline, glycopeptide, macrolide-lincosamide-streptogramin, beta-lactam	[51]
Gut	70 fecal samples	35 Swedish	Aminoglycoside, beta-lactam, sulfonamide, tetracycline, trimethoprim (significant changes after travel)	[52]
Gut	401 fecal samples	84 American	Beta-lactam, amphenicols, tetracyclines	[53]
Gut	19 fecal samples	4 German	Aminoglycoside, bacitracin, tetracycline	[54]
Skin	291 skin samples	15 American	Beta-lactam, aminoglycoside, quinolone	[55]

**Fig. 1.** Chemical structure of rifamycin families.

도에서 상대적으로 낮은 유사도를 보이는 시퀀스에 대한 제한적 탐색을 극복하였다 [40].

최근에는 항생제내성유전자 예측에 초점을 맞춘 연구들이 발표되고 있으며, 온라인으로도 서비스를 제공하고 있다 [41–43]. ResFinder의 경우 2,175종의 항생제 내성유전자를 포함하는 데이터베이스로 상동성 검색을 제공한다 [41]. ARG-ANNOT (Antibiotic Resistance Gene-ANNOTation)은 1,689종의 큐레이션된 항생제 내성유전자를 보유하고 있으며, BLAST를 적용하여 박테리아 유전체에 대하여 알려져 있는 항생제 내성유전자 뿐 아니라 항생제 내성이 있을 것이라 추정되는 유전자에 대해서도 유전자 변이에 대한 정보를 제공한다 [42].

4. 단백질 서열분석과 3차원구조를 이용한 내성 유전자의 통합분석

내성을 일으키는 표적 단백질의 3차원 구조정보가 있는 경우

에는 항생제와 내성을 일으키는 표적 단백질간의 상호작용을 분석함으로써 분자 수준의 내성 메커니즘을 이해할 수 있다. 또한 이 과정에 관여하는 주요 아미노산 시퀀스의 차이를 비교 분석할 수 있다. 이 방법은 서열분석을 기반으로 하는 전통적인 모티프 분석방법과 상호보완적으로 사용될 수 있다. 또한 서열기반의 다중서열정렬을 이용하는 방법은 서열 보존이 높은 모티프에 대한 정보에 치중하게 되는데, 서열 보존이 낮더라도, 기질이나 항생제가 결합하는 3차원 정보가 있는 경우 중요한 잔기들에 대한 정보를 얻을 수 있다.

본 종설에서는 결핵 치료에 사용되는 리팜피신의 내성유전자를 이용하여 시퀀스와 단백질 3차원 구조 정보를 통합적으로 분석한 연구 사례를 소개한다. 리팜피신은 결핵 치료에 사용되는 항생제로서, 1960년대 후반에 박테리아에서 추출된 리파마이신이라는 천연물과 유사한 구조를 가지고 있다(Fig. 1). 리팜피신에 대해 내성을 갖는 결핵균의 다양한 유전자가 알려졌는데, 2016년

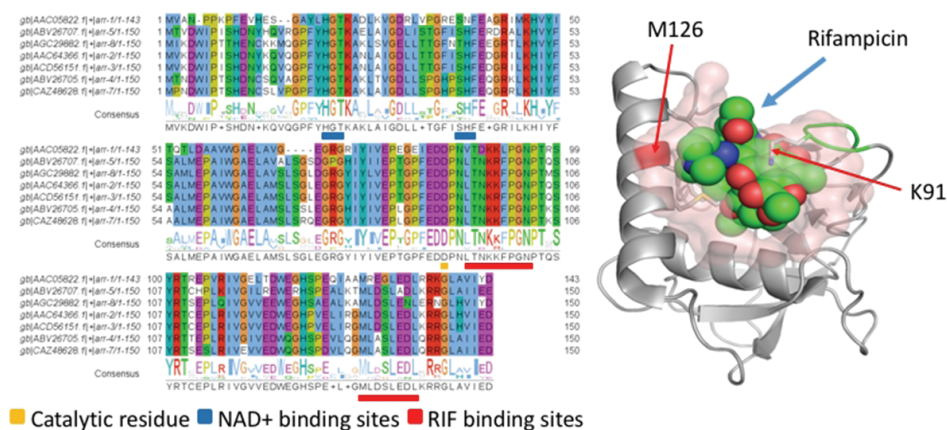


Fig. 2. Multiple sequence alignment of rifampicin ADP-ribosyltransferase sequences and three-dimensional X-ray structure of Arr-ms and rifampicin (PDBID: 2HW2).

WHO의 보고에 따르면 새로운 결핵환자의 4.1%가 리팜피신 내성을 보이며, 이전에 결핵에 걸렸던 환자에서는 19%가 리팜피신 또는 다중약물내성을 보이는 것으로 보고되어 있다.

결핵 박테리아의 RNA 중합효소의 단백질 구조가 밝혀지면서 리팜피신의 작용 메커니즘이 규명되었다. 리팜피신은 DNA-dependent RNA polymerase (RNAP)의 beta subunit에 결합하여 RNA 전사를 방해함으로써 단백질 생성을 저해하고, 그 결과 박테리아는 사멸한다 [44]. 표적단백질인 RNAP의 변이와 더불어, 리팜피신의 화학구조 자체를 변형시키는 내성 메커니즘도 밝혀졌다. 박테리아가 발현하는 특정 단백질은 리팜피신과 결합하여 화학반응을 일으킨다 [45]. 그 결과, 리팜피신의 구조가 변형되고, 변형된 리팜피신은 표적 단백질(결핵의 경우 RNAP)과 결합하지 못하여 항생제로서의 활성을 잃게 된다. 이러한 단백질을 발현시키는 내성유전자로는 *arr*와 *rph* 등이 알려졌다 [46,47]. *Arr* 유전자가 발현하는 단백질은 Rifampicin ADP-ribosyltransferase 기능을 가지고 있으며, NAD⁺을 보조기질로 이용하여 ADP-ribose와 리팜피신의 화학결합을 촉진한다 [48]. Wright를 비롯한 학자들이 Arr-ms 단백질의 구조를 규명함으로써, 리팜피신과 단백질 사이의 상호작용과 내성 작용 메커니즘을 분자수준에서 이해할 수 있게 되었다 [47].

리팜피신 내성유전자로 알려진 8종의 Rifampicin ADP-ribosyltransferase를 CARD 데이터베이스에서 수집하여, 다중서열정리를 통해 서열을 정리해 보면, NAD⁺ 결합부위인 HGT와 SHF 모티프, 촉매 활성부위로 알려진 D84이 속한 모티프들이 높은 서열보존을 보인다. X-선 결정구조 실험을 통해 얻은 Arr-ms 단백질의 3차원구조를 Protein Data Bank (PDB)에서 얻어(PDBID: 2HW2) 분석하면, 리팜피신과 Arr-ms 사이의 상호작용을 예측할 수 있다(Fig. 2). 단백질 구조분석을 통해 얻은 NAD⁺ 결합부위와 리팜피신 결합부위를 다중서열정리 결과와 함께 매핑함으로써, 위에서 언급한 모티프 이외에 리팜피신 결합에 참여하는 아미노산의 위치 정보도 얻을 수 있다. 8개의 서열은 높은 서열 유사성에도 불구하고, 상대적으로 낮은 서열보존으로

다양성을 보인다. 이 결과는 항생제 결합부위에서 아미노산 서열의 다양성으로 인해 활성의 차이가 있는 것으로 해석할 수 있다.

결론

지난 수년 간의 메타유전체 연구를 통해, 환경 및 인간에 존재하는 세균종 등 다양한 매개체에 항생제 내성유전자가 분포하고 있음이 밝혀졌다. 내성유전자는 박테리아 군집에서 전이되거나, 변이를 통하여 빠르게 내성을 키워가고 있다. 그 결과, 감염에 대한 처방으로서 항생제 사용범위가 점점 제한되고 있으며, 궁극적으로는 인간의 건강이 위협받고 있다. 항생제의 개발은 점점 어려워지고 있으며, 특히 포괄적으로 적용가능한 항생제의 개발은 더욱 어려워지고 있다 [4]. 이러한 위기를 극복하기 위해서는 내성유전자의 동정 및 감시에 기반을 둔 전방위적 연구가 필요하며, 기능메타유전체, 차세대시퀀싱, 그리고 바이오인포메틱스 분야의 유기적인 결합이 필수적이다.

REFERENCES

1. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 2011;477:457-61.
2. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, et al. Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLOS ONE* 2012;7:e34953.
3. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000;405:299-304.
4. Brown ED, Wright GD. Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 2016;529:336.
5. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases*;14:742-50.

6. Spellberg B, Gilbert DN. The future of antibiotics and resistance: a tribute to a career of leadership by John Bartlett. *Clin Infect Dis* 2014;59 Suppl 2:S71-5.
7. Stogios PJ, Cox G, Spanogiannopoulos P, Pillon MC, Waglechner N, Skarina T, et al. Rifampin phosphotransferase is an unusual antibiotic resistance kinase. 2016;7:11343.
8. Qi X, Lin W, Ma M, Wang C, He Y, He N, et al. Structural basis of rifampin inactivation by rifampin phosphotransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2016;113:3803-8.
9. Baysarowich J, Koteva K, Hughes DW, Ejim L, Griffiths E, Zhang K, et al. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:4886-91.
10. Koch A, Mizrahi V, Warner DF. The impact of drug resistance on *Mycobacterium tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerg Microbes Infect* 2014;3:e17.
11. Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science Progress* 2002;85:57-72.
12. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2014;13:42.
13. Knapp CW, Dolfig J, Ehlert PAI, Graham DW. Evidence of Increasing Antibiotic Resistance Gene Abundances in Archived Soils since 1940. *Environmental Science & Technology* 2010;44:580-7.
14. Andersson DI, Hughes D. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:901-11.
15. Shoemaker NB, Vlamakis H, Hayes K, Salyers AA. Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:561-8.
16. von Wintersdorff CJH, Penders J, Stobberingh EE, Lashof AMLO, Hoebe CJPA, Savelkoul PHM, et al. High Rates of Antimicrobial Drug Resistance Gene Acquisition after International Travel, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 2014;20:649-57.
17. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000;406:775-81.
18. Alekshun MN, Levy SB. Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 2007;128:1037-50.
19. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics* 2015;40:277-83.
20. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 2: Management Strategies and New Agents. *Pharmacy and Therapeutics* 2015;40:344-52.
21. Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agerso Y, Lund O, et al. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:771-7.
22. Anjum MF. Screening methods for the detection of antimicrobial resistance genes present in bacterial isolates and the microbiota. *Future Microbiology* 2015;10:317-20.
23. Zhang XX, Zhang T, Fang HH. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009;82:397-414.
24. Rappe MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:369-94.
25. Anantharaman K, Brown CT, Hug LA, Sharon I, Castelle CJ, Probst AJ, et al. Thousands of microbial genomes shed light on interconnected biogeochemical processes in an aquifer system. *Nature Communications* 2016;7:13219.
26. Adu-Oppong B, Gasparrini AJ, Dantas G. Genomic and functional techniques to mine the microbiome for novel antimicrobials and antimicrobial resistance genes. *Ann N Y Acad Sci* 2017;1388:42-58.
27. Antonopoulos DA, Assaf R, Aziz RK, Brettin T, Bun C, Conrad N, et al. PATRIC as a unique resource for studying antimicrobial resistance. *Briefings in Bioinformatics* 2017;bbx083-bbx.
28. Lee D, Das S, Dawson NL, Dobrijevic D, Ward J, Orenge C. Novel Computational Protocols for Functionally Classifying and Characterising Serine Beta-Lactamases. *PLOS Computational Biology* 2016;12:e1004926.
29. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A Structure-Based Classification of Class A β -Lactamases, a Broadly Diverse Family of Enzymes. *Clinical Microbiology Reviews* 2016;29:29-57.
30. Lam KN, Cheng J, Engel K, Neufeld JD, Charles TC. Current and future resources for functional metagenomics. *Front Microbiol* 2015;6:1196.
31. Crofts TS, Gasparrini AJ, Dantas G. Next-generation approaches to understand and combat the antibiotic resistome. *Nat Rev Microbiol* 2017;15:422-34.
32. dos Santos DFK, Istvan P, Quirino BF, Kruger RH. Functional Metagenomics as a Tool for Identification of New Antibiotic Resistance Genes from Natural Environments. *Microbial Ecology* 2017;73:479-91.
33. Sommer MOA, Dantas G, Church GM. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 2009;325:1128-31.
34. Riesenfeld CS, Goodman RM, Handelsman J. Uncultured soil bacteria are a reservoir of new antibiotic resistance genes. *Environ Microbiol* 2004;6:981-9.
35. Allen HK, Moe LA, Rodbumrer J, Gaarder A, Handelsman J. Functional metagenomics reveals diverse β -lactamases in a remote Alas-

- kan soil. The ISME journal 2009;3:243-51.
36. Liu B, Pop M. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. *Nucleic Acids Res* 2009;37:D443-7.
 37. McArthur AG, Wagglechner N, Nizam F, Yan A, Azad MA, Baylay AJ, et al. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:3348-57.
 38. Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *Isme j* 2015;9:207-16.
 39. Jia B, Raphenya AR, Alcock B, Wagglechner N, Guo P, Tsang KK, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res* 2017; 45:D566-d73.
 40. Gibson MK, Forsberg KJ, Dantas G. Improved annotation of antibiotic resistance determinants reveals microbial resistomes cluster by ecology. *The ISME Journal* 2015;9:207-16.
 41. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:2640-4.
 42. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:212-20.
 43. Arango-Argoty G, Garner E, Pruden A, Heath LS, Vikesland P, Zhang L. DeepARG: a deep learning approach for predicting antibiotic resistance genes from metagenomic data. *Microbiome* 2018; 6:23.
 44. Hartmann G, Honikel KO, Knüsel F, Nüesch J. The specific inhibition of the DNA-directed RNA synthesis by rifamycin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 1967;145:843-4.
 45. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology spectrum* 2016;4:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
 46. Stogios PJ, Cox G, Spanogiannopoulos P, Pillon MC, Wagglechner N, Skarina T, et al. Rifampin phosphotransferase is an unusual antibiotic resistance kinase. *Nat Commun* 2016;7:11343.
 47. Baysarowich J, Koteva K, Hughes DW, Ejim L, Griffiths E, Zhang K, et al. Rifamycin antibiotic resistance by ADP-ribosylation: Structure and diversity of Arr. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:4886-91.
 48. Dabbs ER, Yazawa K, Mikami Y, Miyaji M, Morisaki N, Iwasaki S, et al. Ribosylation by mycobacterial strains as a new mechanism of rifampin inactivation. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39: 1007-9.
 49. Hu Y, Yang X, Qin J, Lu N, Cheng G, Wu N, et al. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes in a large cohort of human gut microbiota. 2013;4:2151.
 50. Ghosh TS, Gupta SS, Nair GB, Mande SS. In Silico Analysis of Antibiotic Resistance Genes in the Gut Microflora of Individuals from Diverse Geographies and Age-Groups. *PLOS ONE* 2014;8:e83823.
 51. Yang Z, Guo Z, Qiu C, Li Y, Feng X, Liu Y, et al. Preliminary analysis showed country-specific gut resistome based on 1267 feces samples. *Gene* 2016;581:178-82.
 52. Bengtsson-Palme J, Angelin M, Huss M, Kjellqvist S, Kristiansson E, Palmgren H, et al. The Human Gut Microbiome as a Transporter of Antibiotic Resistance Genes between Continents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2015;59:6551.
 53. Gibson MK, Wang B, Ahmadi S, Burnham C-AD, Tarr PI, Warner BB, et al. Developmental dynamics of the preterm infant gut microbiota and antibiotic resistome. *Nature Microbiology* 2016;1:16024.
 54. Pérez-Cobas AE, Artacho A, Knecht H, Ferrús ML, Friedrichs A, Ott SJ, et al. Differential Effects of Antibiotic Therapy on the Structure and Function of Human Gut Microbiota. *PLOS ONE* 2013;8: e80201.
 55. Oh J, Byrd AL, Deming C, Conlan S, Program NCS, Barnabas B, et al. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. *Nature* 2014;514:59.