

□ 원 저 □

결핵균 *katG* 유전자내 463 Codon 돌연변이와 Isoniazid내성 관계

대한결핵협회 결핵연구원

박영길 · 심명섭 · 조상현 · 배길한 · 김상재

The Relationship between Isoniazid Resistance and 463 Codon Mutation of *katG* Gene in *Mycobacterium Tuberculosis*

Young-Kil Park, Myung-Sup Shim, Sang-Hyun Cho, Gill-Han Bai, and Sang-Jae Kim

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

= Abstract =

Background: The 463 codon mutation of *katG* gene has been reported as an useful marker for the detection of isoniazid(INH) resistant strains of *M. tuberculosis*. This study aimed to elucidate relationship between 463 mutation in *katG* gene and INH resistance in *M. tuberculosis*.

Method: DNA was extracted from 28 INH susceptible strains(MIC \geq 0.2 μ g/ml on the Löwenstein Jensen media) and used for amplification of 189bp fragment containing 463 codon by PCR. Amplified fragments were digested by restriction enzyme *Msp* I, analyzed by single strand conformation polymorphism(SSCP) in the MDE gel and sequenced to prove mutation.

Result: Only 7(25%) out of 28 were digestible by restriction enzyme *Msp* I. The SSCP pattern of 21 strains were distinctly different from that of *M. tuberculosis* H37Rv. *Msp* I undigestible PCR fragment was substituted at 463 codon from Arg(CGG) to Leu(CTG).

Conclusion: This finding clearly indicate no relationship between 463 codon mutation of the *katG* gene and INH resistance.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid, *katG* gene

서 론

고농도 isoniazid(INH)에 대해 내성을 나타내는 균은 catalase-peroxidase 활성을 잃어버린 경우가 많다¹⁾. 1992년 Zhang이 이 효소를 생산하는 *katG* 유전자를 분리하였고, 이 유전자에 결실된 균은 INH에 내성을

나타냈다는 사실을 밝혔다^{2,3)}. 그리고 1994년 Banerjee 등이 *inhA* 유전자를 찾아내어 이 유전자가 INH와 Ethionamide(ETH)내성과 관련이 있는 것으로 보고하였다⁴⁾. 이 두 유전자내의 돌연변이가 INH의 내성과 관계가 있을 것으로 생각됨에 따라 이들 유전자내의 돌연변이에 대한 연구가 많이 이루어졌다^{5~9)}. 보고에 따르면 *katG* 유전자 내에서 가장 많은 돌연변이를 일으킨

부위는 463 codon인 Arg 이다. 본 연구의 목적은 이 부위의 돌연변이가 INH 내성과 peroxidase 활성에 영향을 미치는지 관찰하는 것으로서 INH감수성 균주를 대상으로 실시하였다. *katG* 유전자의 463 codon Arg 부위는 제한효소 *Msp* I 으로 절단되므로 돌연변이가 발생하면 제한효소에 의해 절단 되지 않는다. 그러므로 INH 감수성 균주 28주에 대하여 이 부위를 포함하는 지역을 polymerase chain reaction(PCR)을 실시한 다음 제한효소 *Msp* I으로 처리하여 절단되는지 여부를 관찰하였고, single strand conformation polymorphism(SSCP) 실험으로 표준균주와 다른 양상을 나타내는 INH 감수성 균주의 빈도를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 균주선정

결핵연구원에 검사 의뢰된 인형결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 중 약제 감수성 검사 결과에서 모든 항결핵약제에 대해 감수성인 균주 28주와 표준균주 *M. tuberculosis* H37Rv를 본 연구에 사용하였다.

사용된 모든 균주가 Löwenstein-Jensen(LJ) 배지 내에서는 INH 0.2 µg/ml 농도에 감수성을 나타내었고 Middlebrook 7H10 agar 배지에서도 INH 0.1 µg/ml 농도에 감수성을 나타내었다.

2. Peroxidase 활성도 측정

결핵균은 catalase와 peroxidase가 하나의 효소인 것으로 알려져 있으므로 본 실험에서는 peroxidase 활성을 관찰하였다. Peroxidase 활성 측정법은 Devi 방법을 수정하여 사용하였다^{10,11)}. 간단히 설명하면, glass bead와 증류수를 100 µl씩을 가한 1.5ml screwcap tube에 균을 1 loop 취하여 첨가하였다. 얼음에 20분간 두었다가 bead beater로 20초간 진탕하여 균을 파쇄하였다. 즉시 얼음에 5분간 두었다가 원심분리기로 10,000 Xg로 1분간 원심시켰다. 기질인 20 mM H₂O₂(50 mM phosphate buffer, pH 7.0)을 100 µl 첨가하고, 발색제인 o-dianisidine(4 mg/ml)을 100 µl 첨가하였다. 20분간 실온에서 반응시킨 후 황갈색의 발색 여부를 관찰하였다.

3. PCR-SSCP

SSCP 실험을 위하여 사용된 primer는 Rouse가 사용한 것으로 그염기서열은 다음과 같다⁷⁾. *kat* F: 5'-TGG CAGGATCCGGTCCCTGCG-3' *kat* R: 5'-CTGCAG GCGGATGCGACCACC-3' PCR반응 조건은 일반적으로 사용하는 반응액에 96℃에서 DNA를 분리하였고, 70℃에서 annealing과 extension을 시켰다¹²⁾.

본 실험에서 사용한 SSCP 실험은 Cai의 방법을 약간 수정하여 사용하였다¹³⁾. 즉 1.5 ml tube에 PCR산물 15 µl와 buffer(95% formamide, 0.05% bromo-phenol-blue, 0.05% xylene cyanole, 20 mM EDTA) 15 µl 첨가하고, 끓는 물에 10분간 두어 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 두께가 1 mm인 MDE gel(AT Biochem)에서 0.5X TBE 완충액을 사용하여 100V 전압으로 30시간 이상 전기영동을 실시하였다. 전기영동후 silver stain을 실시하여 SSCP 양상을 관찰하였다.

4. 제한효소 *Msp* I 처리

PCR산물을 2% agarose에 전기영동으로 확인한 후 제한효소 *Msp* I 처리를 하였다. 제한효소 처리는 PCR fragment DNA용액 10 µl에 *Msp* I(Promega)를 20U(1 µl), 10× buffer 2 µl, 증류수 7 µl를 첨가한 다음 37℃ 수조에서 5시간 이상 반응 시켰다.

5. 염기서열분석

제한효소로 절단되지 않으면서 SSCP 양상도 표준균주와 다른 균주가 많았으므로 이균주의 *katG* 유전자에 돌연변이가 발생했는지 확인하기 위하여 염기서열을 분석하였다. 먼저 PCR산물을 pCR™II vector(Invitrogen)에 삽입하여 대장균에 형질전환시켰다. 형질전환된 균은 ampicillin 75 µg/ml과 X-Gal 40 µg/ml이 함유된 nutrient agar배지에서 선택하여 PCR 실시와 *Eco* RI 처리로 원하는 fragment가 삽입되었는지를 확인하였다. DNA fragment의 염기서열분석은 한국생공의 Top DNA sequencing system을 이용하여 Sanger의 dideoxy termination 방법으로 실시하였다¹⁴⁾. 염기서열 분석은 자동 DNA 분석기(ABI)를 사용하였고, 염기서열이 밝혀지면 정상적인 *katG* 유전자와 비교하여 돌연

변이 부위를 확인하였다.

결 과

1. 제한효소 *Msp* I 처리 및 SSCP

제한효소 *Msp* I에 대해 인식되는 *katG* 유전자의 463 codon(Arg, CGG)에 발생하는 돌연변이가 INH 내성 발현과 관련이 있다는 보고가 있어서 본 실험을 통해 이를 재확인 하고자 하였다. INH 감수성 균주 28 주를 선정하여 primer *katF*와 *katR*로 PCR을 실시한 결과 예상한 189 bp fragment가 합성되었다. 모든 시험 균주의 PCR 산물을 agarose내에 전기영동으로 확인한 다음 제한효소 처리 또는 SSCP를 실시하였다. PCR 산물을 제한효소 *Msp* I 절단한 결과 7 균주(25%)의 PCR 산물에서는 189 bp가 114 bp와 75 bp로 절단 되었고 나머지(75%)는 절단되지 않았다. 절단되지 않았던 균들의 PCR 산물로 관찰된 SSCP 양상을 *Msp* I으로 절단되었던 것과 비교해 본 결과분명하게 달랐다(Fig. 1). 즉 제한효소로 절단되지 않았던 PCR 산물은 절단되었 것보다 더 많이 이동 되었음을 관찰할 수 있었다.

2. 염기서열 분석

제한효소 *Msp* I으로 절단되지 않았으면서 SSCP 양상에서도 표준균주와 다른 균주의 DNA염기서열을 분석한 결과, 463 codon Arg 부위의 CGG가 CTG(Leu)로 치환되어 있었다(Fig. 2). 이러한 염기서열은 이미 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있는 내성균주의 돌연변이 염기서열과 일치한다. 따라서 감수성 균주 중에서 463 codon 돌연변이가 발생한 균주가 많다는 사실은 INH 내성과 463 codon 돌연변이와 무관하다는 사실을 말해주고 있다.

3. Peroxidase 활성도

463 codon의 돌연변이가 peroxidase활성에 영향을 미치는지를 알아보기 위해 INH감수성인 28 주의 peroxidase 활성을 관찰한 바 모두 황갈색을 나타내어 peroxidase를 생산하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 *katG* 유전자의 463 codon에 돌연변이가 발생하여도 peroxidase 활성에 거의 영향을 주지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

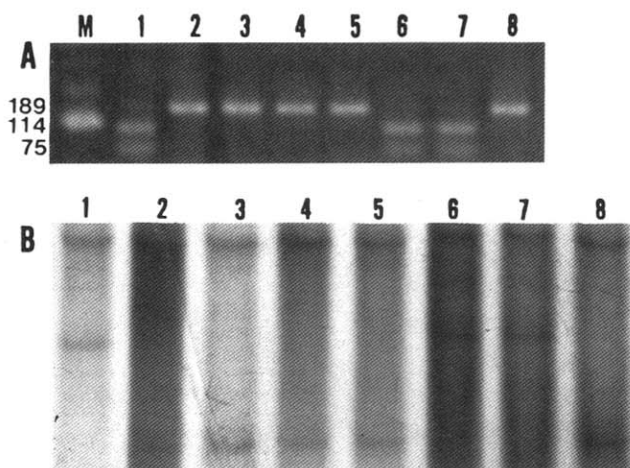


Fig. 1. Characterization of *katG* gene of INH susceptible strains. PCR fragments were digested by restriction enzyme *Msp* I(panel A) and analyzed by SSCP in the MDE gel(panel B). PCR fragments of INH susceptible strains(lane 2-lane 8) were compared with that of *M. tuberculosis* H37Rv(lane 1). 123 bp DNA ladder was used as a size marker(lane M).

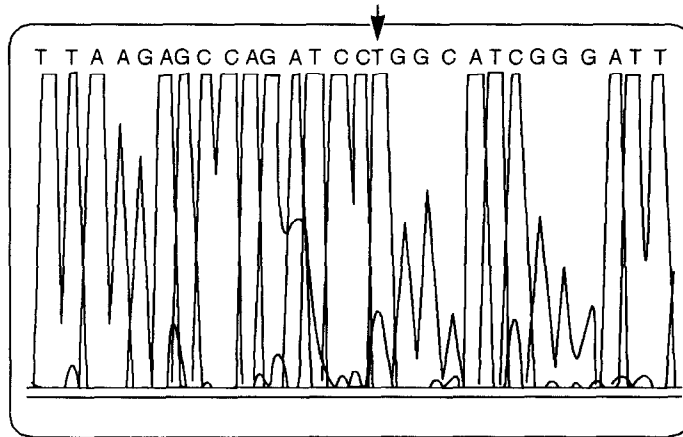


Fig. 2. Sequencing of *Msp* I undigestible PCR fragment of *katG* gene. The 463 codon Arg(CGG) was substituted to Leu(CTG, arrow).

고 찰

고농도의 INH에 대해 내성 결핵균 가운데 catalase-peroxidase 활성이 없는 균주가 있다는 사실은 오래 알려져¹⁾. 따라서 catalase-peroxidase 활성여부와 INH 내성과의 관련에 대한 연구들이 많이 이루어졌다. 1992년 Zhang이 이효소를 생산하는 *katG* 유전자를 발견한 이후 이 유전자의 돌연변이에 대하여 집중적으로 탐색이 이루어졌고²⁾, 그 결과 여러곳의 점돌연변이(point mutation)를 비롯하여 삽입 또는 결실 등 여러형태의 돌연변이가 발견 되었다⁶⁾. 그중 가장 많이 관찰된 돌연변이는 463 codon의 Arg이 Leu으로 치환되는 것이었다.

본 실험에서는 INH 내성균에서 약 40%이상 관찰된⁶⁾고 보고 된 463 codon 돌연변이가 INH 감수성 균에서도 나타나는지를 관찰하였다. INH의 내성기준 농도는 0.2 µg/ml로 알려졌다¹⁵⁾. 그러나 INH 0.1 µg/ml를 함유시킨 7H10 배지에서 감수성을 재확인한 균주로 본 연구에 이용하였다. INH에 내성을 나타내는 요인 중의 하나로 알려졌던 *katG* 유전자의 아미노산 서열 463 codon의 돌연변이는(CG → CT), 75%의 감수성 균주에서도 관찰되었다. Uhi 등은 감수성균주 7균주 중에서 1 균주가 이 부위에 돌연변이가 있었다⁹⁾는

발표보다 훨씬 많은 비율로 관찰되었다. 한편 결핵연구원에 의뢰된 INH 내성균주 중에서 어느정도가 제한 효소 *Msp* I으로 절단되지 않는지를 알아 보기 위하여 실험한 결과 내성균주 53균주 중에서 42균주(79.2%)가 제한효소로 절단되지 않아 한국의 결핵균주는 463 codon 돌연변이가 매우 높은 빈도로 관찰되는 것으로 추정되었다(not published).

katG 유전자의 463 codon 돌연변이가 이 유전자의 산물인 peroxidase활성에 영향을 주는지 관찰한 결과 무관하다는 사실을 밝히므로써 INH 내성과도 관계가 없을 뿐 아니라 peroxidase 활성과도 관계가 없음을 알 수 있었다. Stoeckle 등의 보고에 따르면, New York City에서 분리된 균주에서 INH 내성 균주 중 24%만이 *katG* 유전자의 전반부 282 bp내에서 결실을 보였으며 더구나 INH 감수성 균주 중에서도 10%나 이 부위에서 결실을 보였다는 결과¹⁶⁾를 보면 *katG* 유전자와 INH 내성과의 연관성에 대해 회의의 갖지 않을 수 없다. 따라서 INH 내성의 분자 유전학적 연구는 *katG* 유전자내 다른 부위 또는 다른 유전자를 대상으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

연구배경: 결핵균 *katG*유전자내 463 codon의 돌연

변이는 INH 내성과 관련이 있을 것으로 보고되고 있어서 INH 감수성 균주를 대상으로 *katG* 유전자내 463 codon의 돌연변이 발생빈도를 관찰하여 INH 내성과의 관련성을 밝히고자 하였다.

방법: INH 감수성 균주(MIC \geq 0.2 μ g/ml) 28주를 선정하여 DNA를 추출하여 *katG* 유전자내 463 codon을 포함하는 지역을 PCR로 증폭 합성하였다. PCR산물을 제한효소인 *Msp* I으로 처리하여 절단 여부를 관찰하였고 그리고 SSCP로 표준균주와 차이를 관찰하였다.

결과: INH 감수성 균주 28주 중에서 7주(25%)만이 제한효소 *Msp* I에 의해 절단 되었다. 절단되지 않은 21주(75%)는 SSCP에서도 표준균주와 다른 양상을 나타내었다. 제한효소로 절단되지 않은 균주의 *katG* 유전자를 염기서열 분석한 결과 463 codon Arg(CGG)이 Leu(CTG)으로 치환 되어있었다.

결론: INH내성에 영향을 줄 것으로 추정 되고있던 *katG* 유전자 463 codon 돌연변이는 INH 내성과 무관한 것으로 판명되었다.

참 고 문 헌

- 1) Middelbrook G: Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercule bacilli. Am Rev Tuberc Pulm Dis **69**:471, 1954
- 2) Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature (London) **358**:591, 1992
- 3) Zhang Y, Garbe T, Young D: Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. Mol Microbiol **8**:521, 1993
- 4) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, Lisle G, Jacobs WR Jr: *inhA*, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science **263**:227, 1994
- 5) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs WR Jr, van Embden JDA, Grosset JH, Cole ST: Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: A molecular study. Lancet **344**:293, 1994
- 6) Morris S, Bai GH, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M, Rouse D: Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis **171**: 954, 1995
- 7) Rouse DA, Morris SL: Molecular mechanisms of Isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. Infect Immun **63**:1427, 1995
- 8) Cockerill III FR, Uhl JR, Temesgen Z, Zhang Y, Stockman L, Roberts GD, Williams DL, Kline BC: Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase(*katG*)gene associated with isoniazid resistance. J Infect Dis **171**:240, 1995
- 9) Uhl JR, Kline B, Abukhader L, Zhang Y, Williams D, Roberts G, Stockman L, Cockerill III F: Association of two point mutation in the catalase-peroxidase(*katG*) gene of *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid resistance. 95th ASM general meeting, Session38. novel antimycobacterial drugs and drug resistance. U-46. 124, 1995
- 10) Devi BG, Shaila MS, Ramakrishnan T, Gopinathan KP: The purification and properties of peroxidase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its possible role in the mechanism of action of isonicotinic acid hydrazide. J Biochem **149**:187, 1975
- 11) Manchenko GP: Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC press. 92, 1994
- 12) Park YK, Shim MS, Cho SH, Bai GH, Kim SJ: Comparison of various primers to detect *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain

- reaction. J Kor Soc Microbiol **29**:263, 1994
- 13) Cai QQ, Touitou I: Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. Nuc Aci Res **21**:3909, 1993
- 14) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA **74**:5463, 1977
- 15) Rastogi N, David HL: Mode of action of antituberculosis drugs and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol **144**:133, 1993
- 16) Stoeckle MY, Guan L, Riegler N, Weitzman I, Kreiswirth B, Kornblum J, Laraque F, Riley LW: Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York city. J Clin Microbiol **168**:1063, 1993
-