

Genome Structure of *Orientia tsutsugamushi* and Origin of Type 4 Secretion System

Kim Se-Yoon, Lee Jung-Hee, Choi Myung-Sik, Koh Young-Sang¹, Jang Won-Jong², Park Kyung-Hee², Lee Sang-Joo³, Kim Hang-Rae³, Eah Jae-Young³, Kim In-Jung³, Lee Su-Ui³, Park Eun-Jung³, Kang Jae Seung⁴ and Kim Ik-Sang*

Department of Microbiology, College of Medicine Seoul National University.

¹Department of Microbiology, College of Medicine Cheju National University.

²Department of Microbiology, College of Medicine Kunkook University.

³Molecular Diagnostics Research Center, Bioneer Corporation.

⁴Department of Microbiology, College of Medicine Inha University.

We report about 95% of the genome sequence of *Orientia tsutsugamushi* isolated in Korea. The *O. tsutsugamushi* genome is about 2.1 Mb with G+C ratio of 30.3%. Computer-assisted analysis revealed about 1,959 potential open reading frames (ORFs). The percent coding density is 69.8%, and the average length of each ORF is 668 bp. Although a certain extent of similarity between putative gene products of *O. tsutsugamushi* and corresponding proteins of other rickettsia was revealed, no relationship were detected when their ORF arrangements and coding strategies were compared to each other, suggesting *O. tsutsugamushi* separated from *Rickettsia* in the early stage of evolution. Although the deduced amino acid sequence of the gene products of T4SS show the highest homology to those of spotted fever group rickettsia, their identities are not greater than 50%. A large number of tandem and overlapping repeated sequences were observed in *O. tsutsugamushi* genome.

Genomic analysis of Korean isolates of *Helicobacter pylori*

강현련

경상대학교

1999년 본 연구팀에서는 한국인 십이지장 궤양 환자의 위에서 분리한 *H. pylori* 52 균주의 전체 유전체의 염기서열의 결정한 바 있다. 한국인 위염환자의 위에서 분리한 균주 *H. pylori* 52 유전체의 염기서열 분석을 완료하였다. *H. pylori* 52의 genomic DNA를 sonication으로 절단하고 two-step ligation으로 random library를 제작하여 총 25,056개의 clone의 염기서열을 결정하였다. T7 primer를 이용한 reverse-sequencing을 통해 24,802 reads, M13-21 primer를 이용한 forward-sequencing으로부터 6,878 reads 등 총 31,680 reads의 sequence fragments를 random assembly에 사용하였다. Assembly 결과 총 110 개의 sequence contig가 만들어졌다. *H. pylori* 52의 genomic DNA를 *Hind*III로 부분절단한 후 pBeloBAC11 vector를 사용하여 library를 제조하였다. 제조된 BAC clone은 총 393개였으며 평균 insert의 크기는 평균 40-120 kb였다. 이 중 physical mapping을 위해 138개 BAC clone들을 양방향 end-sequencing을 실시하였다. 양방향 end-sequencing이 BAC clone들과 assembly된 *H. pylori* 52 random shotgun sequence contig의 염기서열과 비교하여 match시킨 결과 총 110 개의 contig중 84 개의 contig가 BAC DNA와 함께 배열되었다. 순서와 방향이 정해진 contig를 재확인하기 위한 총 248군데의 point PCR을 시행하였으며 PCR 산물의 염기서열을 분석하여 BAC end-sequence와 동일한 지를 비교하였다. 순서가 정해진 sequence contig를 토대로 BAC DNA의 배열을 확인하기 위한 sequence-tagged site (STS) PCR을 328 회 시행하였으며, 그 결과 6 개의 BAC contig로 구성된 physical BAC map이 작성되었다. 총 84 개의 BAC DNA로 구성된 contig 길이 합은 약 1,544 kb였다. 방향과 순서가 정해진 각 contig 사이의 physical gap 크기를 측정하기 위하여 총 189 회의 PCR을 시행하였고 BAC DNA를 template로 이용한 총 756회의 primer walking sequencing을 실시하여 physical gap을 모두 연결시켰다. Gap을 모두 연결시킴으로써 고해상도 유전체 물리지도가 완성되었으며 이 세균의 유전체 전체 길이가 1,568,826 bp인 것으로 밝혀졌다. 또한 *H. pylori* 52는 51 균주와는 달리 유전체 외에 cryptic plasmid가 발견되지 않았다. Finishing 작업의 마지막 단계로서 유전체 염기서열내 172 곳의 low depth region의 sequence를 재확인하기 위해 344 회의 PCR과 721 회의 sequencing reaction을 실시하였다. *H. pylori* 52는 *H. pylori* 51보다 22,771 bp 작은 유전체를 보유하고 있다. *H. pylori* 52 유전체를 대상으로 3 균주의 모든 유전자를 TBLASTN으로 검색한 결과 80% 이상의 상동성을 보이는 유전자의 백분율은 51 균주가 95.0%(1,381 ORFs)로서 가장 높았고 다음으로 J99가 90.4%(1,353 ORFs), 26695가 87.6%(1,394 ORFs) 순으로 나타났다. 그리고 이들 유전자들의 평균 상동성 역시 51과의 비교에서 97.18%라는 가장 높은 수치를 나타냄으로써 4 개의 균주중 유전적으로 가장 가까운 균주는 51 및 52의 국내 분리 균주임을 확인할 수 있었다. BLASTN을 이용하여 51과 52의 전체 유전체 염기서열을 pair-wise로 배열해 본 결과 52에서 관찰되는 약간의 deletion (약 40 kb)을 제외하면 대부분의 지역이 동일한 배열상태를 보였다.