

## *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub> 항균제 내성 유전자의 분자적 진화 및 확산에 IS26 Mobile Element의 개입

단국대학교 의과대학 미생물학교실, 경북대학교 의과대학 미생물학교실<sup>1</sup>

김정민 · 신행섭<sup>1</sup> · 조동택<sup>1</sup>

=Abstract=

### Involvement of IS26 Element in the Evolution and Dissemination of *bla*<sub>SHV-2a</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub>

Jungmin Kim, Haeng-Seop Shin<sup>1</sup> and Dong-Taek Cho<sup>1</sup>

Department of Microbiology, College of Medicine, Dankook University,  
Department of Microbiology, School of Medicine, Kyungpook National University<sup>1</sup>

A clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* K7746 produced the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) SHV-12. A 6.6 kb *Bam*HI fragment containing the *bla*<sub>SHV-12</sub> gene of K7746 strain was cloned into pCRScriptCAM vector resulting in the recombinant plasmid p7746-C1. The restriction map of 3.6 kb inserted DNA and sequences immediately surrounding *bla*<sub>SHV-12</sub> of p7746-C1 were homologous to plasmid pMPA2a carrying *bla*<sub>SHV-2a</sub>. In addition, both *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>SHV-2a</sub> were expressed from a common hybrid promoter made of the -35 region derived from the left inverted repeat of IS26 and the -10 region from the *bla*<sub>SHV</sub> promoter itself. The results indicate that *bla*<sub>SHV-12</sub> and *bla*<sub>SHV-2a</sub> may have evolved from a common ancestor in the sequential order of *bla*<sub>SHV-2a</sub> first, followed by *bla*<sub>SHV-12</sub>. Furthermore, by the PCR mapping method using primers corresponding to the IS26 and *bla*<sub>SHV</sub>, the association between IS26 and *bla*<sub>SHV</sub> was studied in 12 clinical isolates carrying *bla*<sub>SHV-2a</sub>, 27 clinical isolates carrying *bla*<sub>SHV-12</sub>, and 5 reference strains carrying *bla*<sub>SHV-1</sub> to *bla*<sub>SHV-5</sub>. All 39 strains carrying *bla*<sub>SHV-2a</sub> or *bla*<sub>SHV-12</sub> were positive by the PCR, providing confirmative evidence that IS26 has been involved in the evolution and dissemination of *bla*<sub>SHV-2a</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub>. But 5 reference strains carrying *bla*<sub>SHV-1</sub> to *bla*<sub>SHV-5</sub> were negative by the PCR. Therefore, we concluded that the molecular evolutionary pathway of *bla*<sub>SHV-2a</sub> and *bla*<sub>SHV-12</sub> may be different from that of other *bla*<sub>SHV-ESBL</sub>, e.g., *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-3</sub>, *bla*<sub>SHV-4</sub>, and *bla*<sub>SHV-5</sub>.

**Key Words:** *bla*<sub>SHV-2a</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, IS26 mobile element

## 서 론

그람 음성 세균들이 생성하는 extended-spectrum

$\beta$ -lactamase (ESBL)들은 cefotaxime, ceftazidime 등의 제 3세대 cephalosporin 제제와 monobactam 등의 extended-spectrum  $\beta$ -lactam 항균제를 불활화하는 효소들이다<sup>5,7</sup>). 그람 음성 간균에서 ESBL 유전

접수 : 2000년 8월 28일, 게재결정 : 2000년 11월 17일

\*교신저자: 조동택, 700-422, 대구시 중구 동인 2가 101번지, 경북대학교 의과대학 미생물학교실

Tel: 053-420-6951, Fax: 053-427-5664, E-mail: dtcho@knu.ac.kr

본 연구는 1998년 학술진흥재단의 과학기술기초중점연구지원에 의해 이루어졌음.

자가 발현되는 것은 다음과 같은 이유로 임상적으로 지대한 의미를 내포하고 있다. 첫째, 새로 개발되는 cephalosporin과 monobactam들에 대한 그람음성 간균의 내성을 부여하고, 둘째, ESBL은 주로 *Klebsiella* 균주와 *E. coli*에서 발견되는데 ESBL 산생 유전자가 주로 plasmid에 위치하고 있어 쉽게 내성이 전파될 수 있고 또 집단 원내 감염을 발생시킬 수도 있으며, 셋째, ESBL을 산생하는 plasmid의 크기는 80 kb 혹은 그 이상으로 비교적 크면서 다른 여러 항균제의 내성 유전자도 함께 보유하는 것으로 알려지고 있어 치료제의 선택에 상당한 어려움을 주고 있다<sup>7,11,18,24</sup>.

ESBL은 대부분이 Bush 분류<sup>5)</sup>의 group 2b' (2be)에 속하는 효소로서, TEM-1, TEM-2 및 SHV-1을 발현하는 유전자의 점변이 (point mutation)에 의해 한 개 혹은 소수의 아미노산 변이가 단계적으로 일어나고, 이로 인한 구조 단백질의 변화에 의해 여러 효소가 진화된 것으로 알려져 있다<sup>3,13</sup>. 1983년 Europe에서 SHV-2 ESBL이 처음 보고된 이래 현재까지 전세계적으로 70종류 이상의 TEM 및 SHV ESBL이 분리되고 있는데, 국내에서는 Kim 등<sup>9)</sup>과 Pai 등<sup>17)</sup>의 연구에서 *K. pneumoniae*의 경우 SHV형이, *E. coli*의 경우 TEM형이 우세하게 분포하는 것으로 알려졌고, 최근 Kim 등<sup>10)</sup>은 *K. pneumoniae*와 *E. coli* 이외에 *Enterobacter cloacae* 균종에서도 SHV 및 TEM형 ESBL이 분리됨을 보고하였다.

국내에 분포하고 있는 SHV ESBL의 경우 현재까지는 SHV-12와 SHV-2a가 주된 것으로 밝혀져 있는데<sup>9,10</sup>, 이들은 지금까지 극히 소수에서 보고되었을 뿐만 아니라 SHV-12의 경우 1997년에 스위스에서 분리되어 1997년에 Nuesch-Inderbinen 등<sup>16)</sup>이 처음으로 보고한 바 있다. 현재까지 보고된 바에 의하면 SHV ESBL의 경우 프랑스 지역에서는 주로 SHV-3 또는 SHV-4가 분포하고, 미국을 비롯한 대부분의 경우 SHV-2 또는 SHV-5가 우세한 것으로 알려져 있다<sup>4,6,21</sup>. 그러나, 우리나라의 경우 SHV-12와 SHV-2a가 우세한 것으로 나타나 있을 뿐만 아니라, 지금까지 SHV-2, 3, 4, 또는 SHV-5형은 보고되지 않고 있다. 이러한 사실들은 국내에 분포하고 있는 SHV-12와 SHV-2a 효소 산생 유전자의 진화적인 유래가 다른 SHV-ESBL 산생 유전자와 다를 가능성이 높음을 시사한다.

본 연구에서는 국내에서 가장 흔히 분리되는 SHV-ESBL 아형인 SHV-12 효소 산생 유전자의 진화적 유래를 추적하기 위하여 SHV-12 효소 산

생 임상 분리 균주 (*K. pneumoniae* K7746)를 대상으로 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자와 그 주변 부위를 cloning하여 유전자 지도를 작성하고 sequencing을 실시하였다. 또한, SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 산생 표준 균주, SHV-2a 산생 임상 분리 균주 12주, 그리고 SHV-12 산생 임상 분리 균주 27주를 대상으로 상기의 K7746 균주와 동일한 구조로 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자가 존재하는지를 조사하고 그 결과를 비교 분석하여 *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자의 발생학적 유래를 추적하였을 뿐만 아니라 *bla*<sub>SHV-ESBL</sub>의 분자적 진화 model을 제시하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상 균주

*bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자의 cloning과 유전자 지도 작성을 위해 1997년 대구 소재 대학병원의 임상 가검물에서 분리하여 SHV-12 효소 산생균으로 확인된 *K. pneumoniae* K7746을 사용하였다. 또한 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자와 IS26 insertion sequence의 상관성을 조사하기 위하여 Kim 등<sup>9)</sup>의 연구에서 보고된 SHV-ESBL 산생 임상 분리 균주 39주 (SHV-2a 산생주 12주와 SHV-12 산생주 27주)와 SHV-1 (R1010), SHV-2 (pMG229), SHV-3 (pUB18), SHV-4 (pUD21), SHV-5 (pAFF2) 산생 표준 균주를 사용하였다.

### 2. Cloning of *bla*<sub>SHV-12</sub> gene

Maniatis의 방법<sup>23)</sup>에 따라 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자의 cloning을 시도하였다. 먼저 *K. pneumoniae* K7746 균주의 plasmid DNA를 분리한 다음 BamHI 제한 효소로 처리하여 pCRScriptCAM SK(+) cloning vector (Stratagene)에 ligation하여 *E. coli* XL1-blue에 형질 전환시킨 후 aztreonam이 32 µg/ml 함유된 LB 한천 배지에 도말하여 하룻밤 배양시킨 후 배지 상에서 증식한 집락에 nitrocefin (500 µg/ml, Glaxo Co.) 용액을 도포시켜 발색된 집락을 1차 선별하고 선별된 집락을 대상으로 isoelectric focusing을 실시하여 등전점 8.2의 β-lactamase 산생 집락을 선별하였다.

### 3. 제한 효소 지도 작성

상기의 방법에 따라 선별된 집락으로부터 cloned plasmid (p7746-C1)의 DNA를 분리하여 아래의 제한 효소들로 처리한 다음 절단된 단편의 양상을 종합하여 제한 효소 지도를 작성하였다. 제한

효소 지도 작성에 사용한 제한 효소는 *Hind*III, *Bgl*II, *Stu*I, *Sal*I, *Cla*I, *Xho*I, *Pvu*II, *Sma*I, *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Sal*I, *Kpn*I, *Hpa*I, *Xba*I, *Sty*I, *Bgl*II, *Aoc*I, *Apa*I, *Asp*I, *Asp*718, *Ava*I, *Ava*II, *Bln*I, *Bsi*WI, *Hinc*II, *Nhe*I, *Not*I, *Pvu*I, *Sac*I, *Sfi*I, *Sna*BI, *Spe*I, *Srf*I, *Swa*I 등이었다.

4. 염기서열 분석과 상동성 유전자 검색

*bla*<sub>SHV</sub> 유전자에 특이적인 primer를 사용하여 cloned DNA (p7746-C1)의 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자와 그 주변 영역의 염기서열을 OmniBase sequencing system (Promega)을 사용하여 지시된 방법에 따라 PCR direct sequencing을 시행하고 그 결과를 분석하였다. 염기서열이 확인된 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자와 주변 영역의 상동성 유전자 검색은 GenBank (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/Options/blast.html>)와 EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/blast2>)의 database를 이용하였다.

5. Analysis of the association between *bla*<sub>SHV</sub> and IS26

SHV-1 (R1010), SHV-2 (pMG229), SHV-3 (pUB18), SHV-4 (pUD21), SHV-5 (pAFF2) 산생 표준 균주, SHV-2a 산생 임상 분리주 12주, SHV-12 산생 임상 분리주 27주를 대상으로 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자와 IS26의 관계를 알아보하고자 PCR mapping을 시행하

였다. PCR mapping에 사용한 primer sequence는 SHV-2a 산생 균주 (KPZU-3, GenBank Accession No.: X84314)의 염기서열을 기초로 IS26 유전자에 상보적인 primer로 5'-GCGTTCAGCCAGCATC-3', (1272-1287)와 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자에 상보적인 primer로 5'-GGCCAGATCCATTTCTATCA-3' (1646-1665)를 선택하여 Bioneer에 제작을 의뢰하여 사용하였다. PCR 반응은 18 µl의 PCR master mixture (1.25 U *Taq* polymerase; 1X PCR buffer; 100 µM each dNTPs; 0.2 µM each primer)에 DNA template 2 µl를 넣고 20 µl mineral oil로 증첩하여 Thermal cycler (GeneCycler, Bio-Rad)에서 다음의 조건으로 시행하였다. 변성 반응은 94°C에서 30초, 결합 반응은 56°C에서 30초, 중합 반응은 72°C에서 30초씩 30주기를 반복하였고, 30주기 이후 마지막 중합 반응을 10분간 연장하여 반응시켰다. PCR 반응이 끝난 반응액 5 µl를 취하여 2% agarose gel에서 50 V에서 1시간 영동하여 ethidium bromide로 염색한 후 UV light에서 관찰하여 증폭된 DNA (394 bp)를 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. Construction of recombinant clone (p7746-C1) carrying *bla*<sub>SHV-12</sub>

SHV-12 효소 산생 임상 분리 균주 (*K. pneumo-*

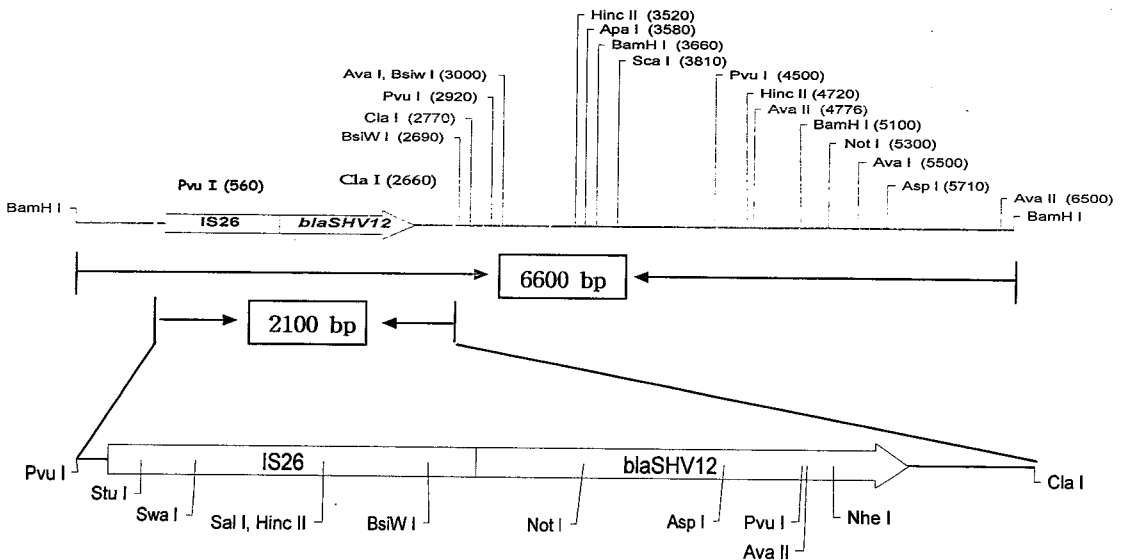


Figure 1. Restriction map of *Bam*HI fragment (6.6 kb) including *bla*<sub>SHV-12</sub>, and IS26 of pK7746-C1

*niae* K7746)를 대상으로 *bla<sub>SHV-12</sub>* 유전자의 cloning을 시도하여 6.6 kb의 *Bam*HI 절편이 삽입된 recombinant clone (p7746-C1)을 획득하였다. 이어서 p7746-C1 clone의 삽입 DNA 6.6 kb region에 대한 제한 효소 지도를 작성하고 *bla* 유전자와 그 주변의 염기서열을 분석하였다 (Fig. 1, 2). 염기서열 분석 결과, *bla<sub>SHV-12</sub>* 유전자의 바로 인접 상부에 insertion sequence IS26이 인접해 있음을 확인하였고, 유전자 상동성 검색에서 *bla* 유전자 주변의 염기서열이 *bla<sub>SHV-2a</sub>* (EMBL accession no.: X84314, pMPA2a)와 *bla<sub>SHV-11</sub>* 유전자의 주변 염기서열 (EMBL accession no.: Y18299, pmK105)과 동일한 것으로 나타났다. 뿐만 아니라, 본 연구의 p7746-C1 clone의 *bla<sub>SHV-12</sub>*와 IS26 유전자 부위를 포함하는 3.6 kb region의 제한 효소 지도와 pMPA2a clone (3660 bp)의 *bla<sub>SHV-2a</sub>* 유전자를 포함한 그 주변 염기서열을 기준으로 추측한 제한 효소 지도

가 동일함을 확인하였다. 따라서 p7746-C1 clone의 *bla<sub>SHV-12</sub>* 유전자가 포함된 3.6 kb region과 pMPA2a clone의 *bla<sub>SHV-2a</sub>* 유전자가 포함된 3.6 kb region은 거의 동일한 것으로 생각되어진다.

*bla<sub>SHV</sub>* 유전자 상부의 IS26의 존재는 소수의 다른 연구에서도 보고된 바 있다. Lee 등<sup>12)</sup>은 pBWH 77 plasmid에서 *aphA7* 유전자와 *bla<sub>SHV-2a</sub>* 유전자의 상부에 IS26 transposase 유전자가 위치한 operon (IAB)을 발견하였으며, IAB operon의 promoter는 일부가 IS26 element의 IRS (inverted repeat)로 이루어진 hybrid promoter이며 *aphA7* 유전자 operon과 *bla<sub>SHV-2a</sub>* 유전자 operon이 합해지는 과정에서 각 operon의 고유 promoter는 소실되고 hybrid IS26 promoter가 형성된 IAB operon이 파생되었을 것으로 보고하였다. 또, Naas 등<sup>14)</sup>은 *P. aeruginosa* 균주의 pPa-1 plasmid에서 역시 *bla<sub>SHV-2a</sub>* 유전자의 상부에 IS26이 인접한 2.9 kb 삽입 DNA의 염기서열이

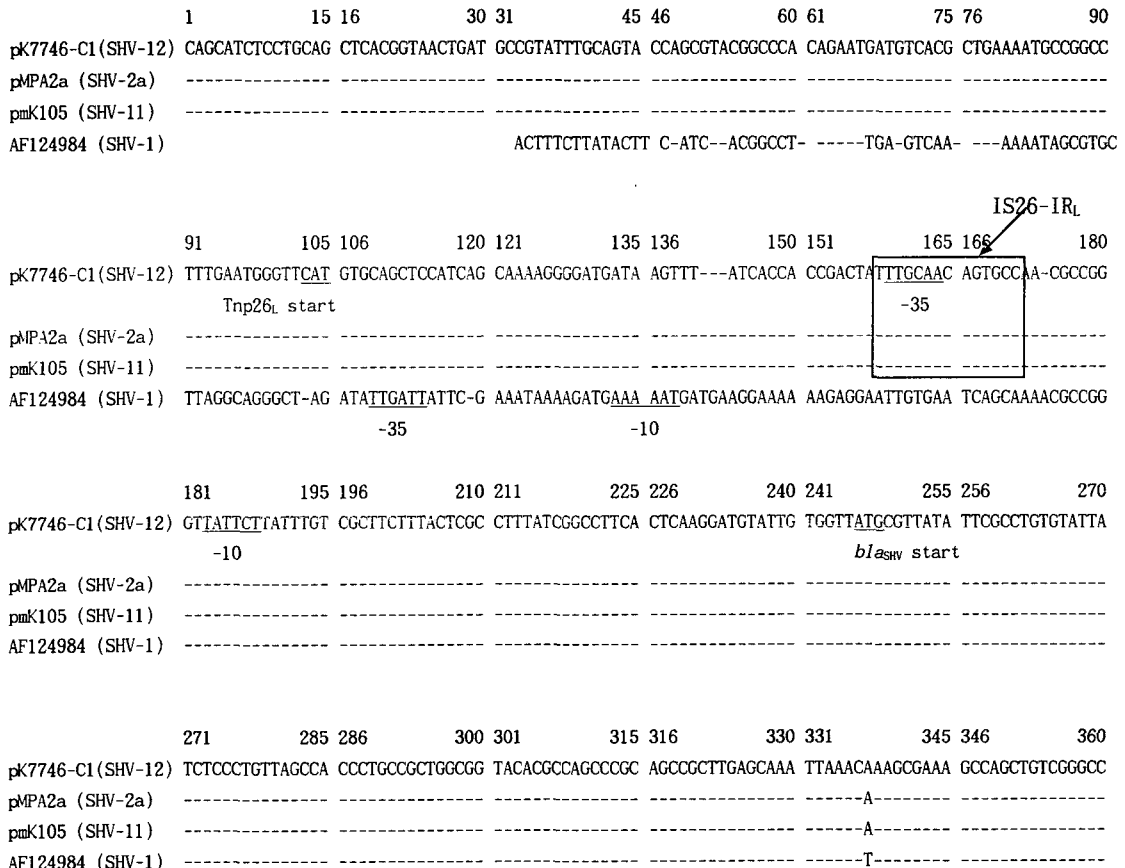


Figure 2. Continued

Nuesch-Inderbinen 등<sup>15)</sup>이 보고한 pMPA2a clone의 해당 부위의 동일함을 보고하였으며, promoter 역시 native *bla*<sub>SHV-2a</sub> promoter의 -10 sequence에 IS26-IR 유래의 -35 sequence가 삽해진 hybrid promoter임을 보고하였다. *bla*<sub>SHV-2a</sub> 뿐만이 아니라 최근 Ahamed 등<sup>1)</sup>에 의해 *Shigella dysenteriae*에서 분리된 *bla*<sub>SHV-11</sub> 유전자의 염기서열 분석에서도 -10 sequence 상류 영역이 *bla*<sub>SHV-1</sub>과 유사성이 거의 없고 -35 sequence가 Podbielski 등<sup>20)</sup>이 보고한 *bla*<sub>SHV-2a</sub>의 -35 promoter와 동일하다고 보고하였다. 본 연구에서 밝힌 p7746-C1의 *bla*<sub>SHV-12</sub> 역시 -35 promoter sequence (5'-TTGCAA)가 *bla*<sub>SHV-2a</sub><sup>19)</sup>와 *bla*<sub>SHV-11</sub><sup>1)</sup>의 것과 동일하였고 *bla*<sub>SHV-1</sub><sup>22)</sup>, *bla*<sub>SHV-2</sub><sup>19)</sup>와 *bla*<sub>SHV-5</sub><sup>19)</sup>의 -35 promoter sequence (5'-TTGATT)와는 달랐다 (Fig. 2). 이와 같이 *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>의 *bla* 유전자 인접 상류 영역의 IS26의 존재와 세 유

전자의 promoter가 동일한 사실은 *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>이 동일한 분자적 발생 경로에서 단계적으로 발생되었음을 강력히 시사한다.

*bla*<sub>SHV</sub> 유전자의 염기서열 분석에서도 *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>는 *bla*<sub>SHV-1</sub>의 35번 아미노산 leucine이 glutamine으로 치환되는 염기서열의 점변이를 공통적으로 보유하고 있다<sup>16,20)</sup>. 1997년 Nuesch-Inderbinen 등<sup>16)</sup>에 의해 처음으로 밝혀진 *bla*<sub>SHV-11</sub> 유전자는 *bla*<sub>SHV-1</sub>에 35 아미노산의 glutamine 변이가 첨가되어 있으며, *bla*<sub>SHV-2a</sub> 유전자는 *bla*<sub>SHV-1</sub> 유전자의 238 아미노산이 serine으로의 변이 (*bla*<sub>SHV-2</sub>)에 35 아미노산의 glutamine 변이가 첨가되어 있고, *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자는 *bla*<sub>SHV-1</sub> 유전자의 238 아미노산 serine 변이, 240 아미노산 lysine 변이 (*bla*<sub>SHV-5</sub>)에 35 아미노산의 glutamine 변이가 첨가되어 있다. *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>의 35번 아

	361	375 376	390 391	405 406	420 421	435 436	450
pK7746-C1 (SHV-12)	CGGTAGGCATGATAG	AAATGGATCTGGCCA	GCGGCCGCACGGTGA	CCGCCTGGCGCGCCG	ATGAAOCGTTTCCCA	TGATGAGCACCTTTA	
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
pmK105 (SHV-11)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
AF124984 (SHV-1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	451	465 466	480 481	495 496	510 511	525 526	540
pK7746-C1 (SHV-12)	AAGTAGTGTCTCTCGG	GCGCAGTGCTGGCGC	GGGTGGATGCCGGTG	ACGAACAGCTGGAGC	GAAAGATCCACTATC	GCCAGCAGGATCTGG	
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
pmK105 (SHV-11)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
AF124984 (SHV-1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	541	555 556	570 571	585 586	600 601	615 616	630
pK7746-C1 (SHV-12)	TGGACTACTCGCCGG	TCAGCGAAAAACACC	TTGCCGACGGCATGA	CGGTCCGGCAACTCT	GCGCCCGCCGTCATTA	CCATGAGCGATAACA	
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
pmK105 (SHV-11)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
AF124984 (SHV-1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
	631	645 646	660 661	675 676	690 691	705 706	720
pK7746-C1 (SHV-12)	GCGCCGCCAATCTCG	TGCTGGCCACCGTCG	GCGGCCCGCAGGAT	TGACTGCCTTTTTCG	GCCAGATCGCGACA	ACGTACCCCGCCTTG	
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----	
pmK105 (SHV-11)	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----	
AF124984 (SHV-1)	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----	
	721	735 736	750 751	765 766	780 781	795 796	810
pK7746-C1 (SHV-12)	ACCGCTGGGAAACGG	AACTGAATGAGGCGC	TTCCCGCGCAGCGCC	GCGACACCACTACCC	CGGCCAGCATGGCCG	CGACCTTGGCGAAGC	
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
pmK105 (SHV-11)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	
AF124984 (SHV-1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	

Figure 2. Continued

김정민 등: *bla*<sub>SHV-12</sub>의 분자적 진화와 IS26

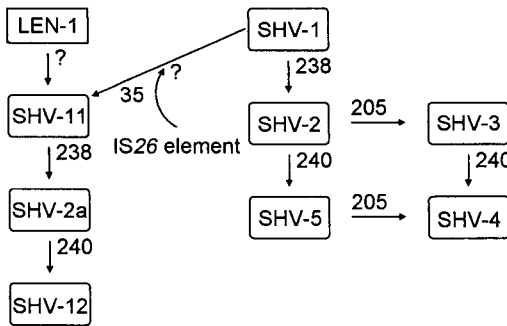
	811	825 826	840 841	855 856	870 871	885 886	900
pK7746-C1 (SHV-12)	TGCTGACCAGCCAGC	GTCTGAGCGCCCGTT	CGCAACGGCAGCTGC	TGCAGTGGATGGTGG	ACGATCGGGTCGCCG	GACCGTTGATCCGCT	
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pmK105 (SHV-11)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF124984 (SHV-1)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	901	915 916	930 931	945 946	960 961	975 976	990
pK7746-C1 (SHV-12)	CCGTGCTGCCGCGCG	GCTGGTTTATCGCCG	ATAAGACCGGAGCTA	GCAAGCGGGTGGCG	GCGGGATTGTCGCC	TGCTGGCCCGAATA	
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-----	-----	-----A	-----G	-----	-----
pmK105 (SHV-11)	-----	-----	-----	-----G	-----G	-----	-----
AF124984 (SHV-1)	-----	-----	-----	-----G	-----G	-----	-----
	991	1005 1006	1020 1021	1035 1036	1050 1051	1065 1066	1080
pK7746-C1 (SHV-12)	ACAAAGCAGAGCGCA	TTGTGGTGATTATC	TGCGGGATACGCCGG	CGAGCATGGCCGAGC	GAAATCAGCAAATCG	CCGGATCGCGCGG	
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-----	-----	-----G	-----	-----	-----
pmK105 (SHV-11)	-----	-----	-----	-----G	-----	-----	-----
AF124984 (SHV-1)	-----	-----	-----	-----C	-----	-----	-----
	1081	1095 1096	1110 1111	1125 1126			
pK7746-C1 (SHV-12)	CGTGATCGAGCACT	GGCAACGCTAAGCCG	GCGGTGGCCGCGCG	GTTATCCGG			
		<i>bla</i> <sub>SHV</sub> end					
pMPA2a (SHV-2a)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
pmK105 (SHV-11)	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
AF124984 (SHV-1)	-----	-----	-----	-----C	-----	-----	-----

**Figure 2.** Nucleotide sequences of the flanking and coding regions of the *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub><sup>15</sup>, *bla*<sub>SHV-11</sub><sup>1</sup>, and *bla*<sub>SHV-1</sub><sup>22</sup>. The boxed sequence correspond to the left inverted repeat (IR<sub>L</sub>) of IS26, the -35 and -10 promoter sequences are those described by Podbielski et al.<sup>19</sup>.

미노산 변이는 Podbielski 등<sup>17)</sup>에 의해 active site가 아닌 것으로 보고되었고 실제로 등전점이나 항균제 내성 유형 등에 있어서도 SHV-1과 SHV-11, SHV-2와 SHV-2a, SHV-5와 SHV-12는 서로 유사하여 표현형에 의한 구분은 거의 불가능하다. 그러나, 이 변이는 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자의 발생학적인 유래의 추적과 분자적 진화의 측면에서 중요한데 *K. pneumoniae*의 chromosomal  $\beta$ -lactamases 중의 하나인 *bla*<sub>LEN-1</sub><sup>3)</sup>의 35번 아미노산과 동일하며, *bla*<sub>LEN-1</sub>의 promoter 역시 *bla*<sub>LEN-1</sub>의 상부에 IS26이 삽입되어져 파생된 hybrid promoter로서 *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>의 promoter와 동일하다. 이는 *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>가 *bla*<sub>SHV-1</sub>이 아닌 *bla*<sub>LEN-1</sub>에서 유래하였을 가능성을 시사하고 있으나, 한편으로는 *bla*<sub>SHV-1</sub> 유전자의 상부에 IS26 mobile element가 삽입되면서 *bla*<sub>SHV-11</sub>이 파생되었을 가능성도 배제할 수는 없다. 어떤 경우이던지 *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>는 동일한 발생학적 경로에서 *bla*<sub>SHV-11</sub>에서 G238S 아미노산 변이가 첨가된 *bla*<sub>SHV-2a</sub>가 파생되었고, *bla*<sub>SHV-2a</sub>에서 E240L 아미노산

변이가 첨가된 *bla*<sub>SHV-12</sub>의 순서로 진화되었을 것으로 생각된다.

한편, Lee 등<sup>12)</sup>과 Podbielski 등<sup>19,20)</sup>에 의해 *bla*<sub>SHV-2a</sub>의 hybrid promoter는 매우 강력한 promoter인 것으로 보고되었는데, Podbielski 등<sup>19)</sup>은 비록 SHV-2와 SHV-2a 효소 자체의 cefotaxime에 대한 가수분해 작용은 유사할지라도 promoter 차이에 의해 SHV-2a 산생균이 SHV-2 산생 균주에 비하여 cefotaxime에 대한 MIC가 더욱 높을 수 있음을 보고한 바 있다. SHV-12 역시 SHV-5와 가수분해 능력의 차이는 미미하지만 SHV-12 산생 균주의 ceftazidime이나 aztreonam에 대한 MIC는 SHV-5 산생 균주에 비해 훨씬 높다<sup>9)</sup>. p7746-C1의 *bla*<sub>SHV-12</sub>의 promoter 역시 Podbielski 등<sup>19)</sup>의 *bla*<sub>SHV-2a</sub>의 promoter와 동일하기 때문에 SHV-12와 SHV-5 산생 균주의 MIC 차이 역시 두 효소의 promoter 차이에 의한 것으로 설명될 수 있을 것 같다. SHV-12 산생 균주는 강력한 hybrid promoter에 의한 SHV-12 효소의 과발현으로 ceftazidime이나 aztreonam에 대한 MIC가 SHV-5 산생 균주에 비해 높은 것은



**Figure 3.** A diagram of the evolutionary relationship between members of the SHV family of  $\beta$ -lactamases. The small numbers between boxes indicate the position of the amino acid substitution responsible for the change in characteristics of the individual enzymes. Three *bla* genes of *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>, and *bla*<sub>SHV-12</sub> have the same amino acid substitution of L35Q and are expressed from a common hybrid promoter made of the -35 region derived from the left inverted repeat of IS26 and the -10 region from the *bla*<sub>SHV</sub> promoter itself. Therefore, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>SHV-2a</sub>, and *bla*<sub>SHV-12</sub> were probably evolved from a common ancestor in the sequential order of *bla*<sub>SHV-11</sub> first, *bla*<sub>SHV-2a</sub> second and then *bla*<sub>SHV-12</sub>. While *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-3</sub>, *bla*<sub>SHV-4</sub>, and *bla*<sub>SHV-5</sub> have no IS26 sequence in the upstream noncoding region, suggesting that *bla*<sub>SHV-2</sub> and *bla*<sub>SHV-2a</sub> have a separate evolutionary development.

로 생각된다.

## 2. Association between *bla*<sub>SHV</sub> and IS26

상기에서 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자의 인접 상부에 IS26 insertion sequence가 삽입되어져 있음이 확인됨에 따라 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자의 분자적 진화에 있어서 IS26 insertion sequence의 개입 여부를 알아보고자 SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 산생 표준 균주, SHV-2a 산생 임상 분리주 12주, SHV-12 산생 임상 분리주 27주를 대상으로 IS26 유전자에 상보적인 primer와 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자에 상보적인 primer를 이용하여 PCR mapping을 시행하였다. 그 결과 SHV-2a와 SHV-12 산생 임상 분리 균주 39주 모두에서는 K7746 균주와 동일하게 394 bp의 PCR 산물을 확인하였으나, SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 산생 표준 균주에서는 PCR 산물이 증폭되지 않았다. IS26 transposase 산생 유전자에 특이적인 primer를 사용한 또다른 PCR 실험에서도 SHV-1, -2, -3, -4와 SHV-5 산생 표준 균주의 경우 음성 결과를 나타내어, *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-3</sub>,

*bla*<sub>SHV-4</sub>, *bla*<sub>SHV-5</sub> 유전자들은 *bla*<sub>SHV-2a</sub>나 *bla*<sub>SHV-12</sub>와는 달리 *bla*<sub>SHV</sub>의 인접한 상부 영역에 IS26의 삽입이 존재하지 않음이 확인되었다. 이는 IS26 mobile element가 *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자의 분자적 진화에는 중요한 역할을 하였으나 *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-3</sub>, *bla*<sub>SHV-4</sub>나 *bla*<sub>SHV-5</sub> 유전자들의 분자적 진화에는 개입되지 않았음을 시사하는 결과로서, *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>는 다른 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자와 발생학적인 유래가 다를 가능성이 매우 높음을 시사하고 있다.

이는 *bla*<sub>SHV-2a</sub>는 *bla*<sub>SHV-2</sub>에 35 아미노산의 glutamine 변이가 첨가되어 파생되었고, *bla*<sub>SHV-12</sub>는 *bla*<sub>SHV-5</sub>에 35 아미노산의 glutamine 변이가 첨가되어 파생되었을 것이라는 지금까지의 추측이 잘못되었음을 보여주는 중요한 결과이다. 상기에서 설명된 바와 같이 *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>는 *bla*<sub>SHV-11</sub>과 동일한 유래에서 *bla*<sub>SHV-11</sub> → *bla*<sub>SHV-2a</sub> → *bla*<sub>SHV-12</sub>의 순서로 진화되었음이 거의 확실하며, *bla*<sub>SHV-11</sub>은 IS26이 *bla*<sub>SHV-1</sub>의 coding region 바로 상부에 삽입되면서 이때 생긴 점변이로 인하여 *bla*<sub>SHV-1</sub>의 35번 아미노산 leucine이 glutamine으로 치환된 *bla*<sub>SHV-11</sub>이 파생되었을 것으로 생각되나 상기에 지적하였듯이 *bla*<sub>LEN-1</sub>에서 파생되었을 가능성도 배제할 수는 없다.

결론적으로 *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>는 다른 *bla*<sub>SHV</sub>-ESBL 유전자들 (즉, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-3</sub>, *bla*<sub>SHV-4</sub>와 *bla*<sub>SHV-5</sub>)과는 다른 분자적 진화 경로를 통하여 발생되었을 것으로 생각되며, 이상의 결과를 모두 종합하여 Fig. 3에 *bla*<sub>SHV</sub>의 발생학적 유래를 반영하는 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자의 분자적 진화 모델을 제시하였다.

이상의 연구 결과를 종합하여 볼 때 국내에서 흔히 분리되는 SHV형 ESBL로서 SHV-2a와 SHV-12가 압도적인 것은 아마도 *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자가 동일한 발생학적 경로에서 *bla*<sub>SHV-2a</sub>에서 E240L 아미노산 변이가 첨가된 *bla*<sub>SHV-12</sub>의 순서로 진화되었을 뿐만 아니라 다른 *bla*<sub>SHV</sub>-ESBL 유전자와는 다른 분자적 진화 경로에서 유래되었기 때문인 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서는 임상 분리주를 대상으로 *bla*<sub>SHV-2a</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>와 IS26 mobile element의 상관성을 규명함으로써 항균제 내성 유전자의 분자적 진화와 확산에 있어서 IS element의 중요성을 제기하였으며, 본 연구에서 고안한 IS26 유전자에 상보적인 primer와 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자에 상보적인 primer를 이용한 PCR mapping 방법은

임상 분리주에서 *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub>의 존재를 *bla*<sub>SHV-1</sub>, *bla*<sub>SHV-2</sub>, *bla*<sub>SHV-3</sub>, *bla*<sub>SHV-4</sub>나 *bla*<sub>SHV-5</sub>와 구별하여 검색할 수 있는 유용한 방법이 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 결 론

본 연구에서는 국내에서 가장 흔히 분리되는 SHV-ESBL 아형인 SHV-12 효소 산생 유전자의 발생학적 유래를 추적하기 위하여 SHV-12 산생 임상 분리 균주 (*K. pneumoniae* K7746)를 대상으로 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자와 그 주변 부위를 cloning하여 유전자 지도를 작성하고 sequencing을 실시하였다. 또한, SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 산생 표준 균주, SHV-2a 산생 임상 분리 균주 12주, 그리고 SHV-12 산생 임상 분리 균주 27주를 대상으로 상기의 K7746 균주와 동일한 구조로 *bla*<sub>SHV</sub> 유전자가 존재하는지를 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *K. pneumoniae* K7746 균주를 대상으로 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자의 cloning을 시도한 결과 6.6 kb의 *Bam*H1 절편이 삽입된 p7746-C1 plasmid를 획득하였다.

2. p7746-C1 plasmid의 제한 효소 지도를 작성하였으며, *bla* 유전자와 그 주변 염기서열 분석에서 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자의 바로 상부에 insertion sequence IS26이 인접해 있음이 확인되었다.

3. *bla*<sub>SHV-12</sub>와 인접 부위 염기서열에 대한 염기서열의 상동성 검색에서 Nuesch-Inderbilen 등이 보고한 pMPA2a clone의 *bla*<sub>SHV-2a</sub> 유전자를 포함한 그 주변 염기서열과 동일함이 밝혀졌고, p7746-C1 clone의 제한 효소 지도 역시 pMPA2a clone의 염기서열을 기준으로 추측한 제한 효소 지도와 동일함이 확인되었다.

4. IS26 transposase 유전자와 *bla*<sub>SHV-1</sub> 유전자에 각각 상보적인 primer를 이용하여 PCR mapping을 시행한 결과 SHV-2a와 SHV-12 산생 균주는 39주 모두에서 K7746 균주와 동일한 PCR 산물이 증폭되었으나 SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 산생 표준 균주에서는 PCR 음성 결과를 나타내었다.

이상의 결과로서 국내에서 흔히 분리되는 SHV형 ESBL로서 SHV-2a와 SHV-12가 압도적인 것은 아마도 *bla*<sub>SHV-2a</sub>와 *bla*<sub>SHV-12</sub> 유전자가 동일한 발생학적 경로에서 *bla*<sub>SHV-2a</sub>에서 E240L 아미노산 변이

가 첨가된 *bla*<sub>SHV-12</sub>의 순서로 진화되었을 뿐만 아니라 다른 *bla*<sub>SHV-ESBL</sub> 유전자와는 다른 분자적 진화 경로에서 유래되었기 때문이라고 할 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서는 *bla*<sub>SHV-2a</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>와 IS26 element의 상관성을 규명함으로써 항균제 내성 유전자의 분자적 진화와 확산에 있어서 IS element의 중요성을 제기하였다.

## 참 고 문 헌

- 1) Ahamed J, Kundo M: Molecular characterization of the SHV-11  $\beta$ -lactamase of *Shigella dysenteriae*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 2081-2083, 1999.
- 2) Ambler RP: The structure of  $\beta$ -lactamase. *Philos Trans R Soc Lond Ser B* **289**: 321-331, 1980.
- 3) Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Fujii Y, Komatsu T, Kato N: Close evolutionary relationship between the chromosomally encoded  $\beta$ -lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* and the TEM  $\beta$ -lactamase gene mediated by R plasmid. *FEBS Lett* **207**: 69-74, 1986.
- 4) Arlet G, Rouveau M, Casin I, Bouvet PJM, Lagrange PH, Philippon: Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4  $\beta$ -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J Clin Microbiol* **32**: 2553-2558, 1994.
- 5) Bush K: Characterization of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 259-263, 1989.
- 6) French GL, Shannon KP, Simmons N: Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and  $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5  $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol* **34**: 358-363, 1996.
- 7) Jacoby GA, Medeiros AA: More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **35**: 1697-1704, 1991.
- 8) Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A: Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamase conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* **10**: 867-878, 1988.



- 9) Kim J, Kwon YM, Pai HJ, Kim JW, Cho DT: Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J Clin Microbiol* **36**: 1446-1449, 1998.
- 10) Kim J, Lee HJ: Rapid discriminatory detection of genes coding for SHV  $\beta$ -lactamases by ligase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 1860-1864, 2000.
- 11) Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B: Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* **28**: 302-307, 1985.
- 12) Lee KY, Hopkins JD, Syvanen M: Direct involvement of IS26 in an antibiotic resistance operon. *J Bacteriol* **172**: 3229-3236, 1990.
- 13) Livermore DM:  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 557-584, 1995.
- 14) Naas T, Philippon L, Poirel L, Ronko E, Nordmann P: An SHV-Derived Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**: 1281-1284, 1999.
- 15) Nuesch-Inderbinen MT, Hachler H, Kayser FH: New system based on site-directed mutagenesis for highly accurate comparison of resistance levels conferred by SHV  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1726-1730, 1995.
- 16) Nuesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hachler H: Survey and molecular genetics of SHV  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 943-949, 1997.
- 17) Pai H, Lyu S, Lee JH, Kim J, Kwon YM, Kim JW, Choi KW: Survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. *J Clin Microbiol* **37**: 1758-1763, 1999.
- 18) Philippon A, Labia R, Jacoby G: Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **33**: 1131-1136, 1989.
- 19) Podbielski A, Schonling J, Melzer B, Haase G: Different promoters of SHV-2 and SHV-2a  $\beta$ -lactamase lead to diverse levels of cefotaxime resistance in their bacterial producers. *J Gen Microbiol* **137**: 1667-1675, 1991.
- 20) Podbielski A, Schonling J, Melzer B, Warnatz K, Leusch HG: Molecular characterization of a new plasmid-encoded SHV-type  $\beta$ -lactamase (SHV-2 variant) conferring high level cefotaxime resistance upon *K pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **137**: 569-578, 1991.
- 21) Prodinger WM, Bauernfeind FA, Stemplinger I, Amann S, Pfausler B, Lass-Flörl C, Dierich MP: Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5  $\beta$ -lactamase: Parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. *J Clin Microbiol* **34**: 564-568, 1996.
- 22) Rice LB, Carias LL, Hujer AM, Bonafede M, Hutton R, Hoyen C, Bonomo RA: High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 beta-lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**: 362-367, 2000.
- 23) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 24) Sanders CC, Sanders WE:  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* **15**: 824-839, 1992.