

□ 원 저 □

pncA 유전자의 염기 서열 결정에 의한 결핵균의 Pyrazinamide 내성 진단

부산대학교 의과대학 내과학교실, 임상병리학교실*

황지윤, 곽경록, 박혜경, 이지석, 박삼석, 김윤성
이정유, 장철훈*, 이민기, 박순규

= Abstract =

Detection of Pyrazinamide Resistance in Mycobacterium Tuberculosis by Sequencing of pncA Gene

Jee Yoon Hwang, M.D., Kyung Rok Kwak, M.D., Hye Kyung Park, M.D.,
Ji Seok Lee, M.D., Sam Seok Park, M.D., Yun Seong Kim, M.D., Jung Yoo Lee, M.D.,
Chul Hun Chang, M.D.*, Min Ki Lee, M.D., and Soon Kew Park, M.D.

Department of Internal Medicine and Clinical Pathology*
College of Medicine, Pusan National University, Pusan, Korea

Background : Examining the biological susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA) *in vitro* is very difficult as PZA is inactive under normal culture conditions. The biological susceptibility test, an enzyme assay for Pzase activity, and a genetic test for *pncA* gene mutations, were performed in order to predict PZA resistance.

Methods : 28 cultured clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were tested. The biological susceptibility was performed by the absolute concentration method using Lowenstein-Jensen media. The PZase activity was tested by means of Wayne's method. A 710-bp region includes the entire open reading frame of *pncA* was amplified and sequenced.

Results : All six strains with positive PZase activity exhibited no *pncA* mutations with one strain showing a false resistance in the biological susceptibility test. Among the 22 strains with no PZase activity, 21 exhibited

Address for correspondence :

Jee Yoon Hwang, M.D.

Department of Internal Medicine, Pusan National University Hospital

Ami Dong 1-10, Suh Gu, Pusan, 602-739, Korea

Phone : 051-240-7225 Fax : 051-2541-3127 E-mail : jy3424@hanmail.net.

showed *pncA* mutations. In the biological susceptibility test, 20 strains were resistant, and one was susceptible, and the other failed to test. The mutation types varied with ten missense, one silent and one nonsense mutation 1 slipped-strand mispairing, and 6 frameshift mutations. Three strains had an adenine to guanine mutation at position -11 upstream of the start codon.

Conclusion : The mutation at the *pncA* promoter region is frequent at -11 upstream position. Automatic sequencing of *pncA* is a useful tool for rapid and accurate detection of PZA resistant *M. tuberculosis*, and for demonstrating the epidemiological relatedness of the PZA-resistant *M. tuberculosis* strains. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2001, 50 : 94-105)

Key words : *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamide resistance, Automatic sequencing, Mutation of *pncA*.

서 론

우리 나라에서 다제약제 내성 결핵의 검출율이 5.3%, 특히 치료력이 있는 환자에서는 18%에 이른다고하며 다제약제 내성결핵균에서 pyrazinamide(PZA)에 내성을 보이게 되면 치료가 어렵기 때문에 Isoniazid, Rifampin의 내성 뿐만 아니라 PZA의 내성에 대한 연구도 매우 중요하다. 약제 내성 결핵균의 출현과 더불어 결핵 환자와 관련된 또 다른 중요한 변화는 질병의 진행 양상이다. 1980년대 후천성 면역결핍증 환자의 증가가 결핵 환자의 급증으로 이어졌고 면역 능력이 저하된 환자가 늘어나면서, 만성 질환인 결핵이 급격하게 진행하는 경우가 많아졌다. 따라서 결핵균의 약제 내성을 조기에 진단하는 것은 환자 개개인의 치료뿐만 아니라 내성 결핵균의 전파 예방에 매우 중요하다². 최근 분자 생물학의 발달로 이를 이용하여 일부 약제에 대해서나마 결핵균의 내성 여부를 조기에 판별할 수 있게 되었다. 그 예로 RMP 내성 결핵균의 97%가 *rpoB* 유전자의 일부 지역에 국한된 돌연변이에 의해서 생기므로 DNA hybridization을 이용하여 쉽게 확인할 수 있게 되었다³. 그러나 PZA의 내성과 관련된 결핵균의 분자유전학적 연구는 많지 않다.

PZA는 대식세포내와 같은 산성환경에서 결핵균의 pyrazinamidase(PZase)에 의하여 활성형인 pyrazinoic acid(POA)로 전환되어 항결핵 효과를 보이지만, 결핵균이 갖고 있는 PZase의 활성이 소실되면

POA가 생성되지 않으므로 그 결핵균은 PZA에 내성을 갖게 된다. 따라서 전통적인 생물학적 검사와 함께 PZase 활성 유무로 PZA에 대한 내성 여부를 판별하는데 이용되고 있다⁴. 그래서 결핵균의 PZA에 대한 감수성 검사로 그 중 전자는 PZA가 결핵균의 성장이 억제되는 산성의 환경에서만 작용하기 때문에 일부 균주는 검사가 불가능한 경우가 있고, 후자는 균주의 집락에 따라 위내성의 결과를 보일 수 있다. 따라서 본 연구에서는 결핵균의 PZA에 대한 생물학적 감수성, PZase의 활성, PZase를 만들어내는 유전자인 *pncA*의 돌연변이 사이의 관계를 알아보면서 각 검사의 한계를 규명하고자 하였다. 또한 자동 염기서열 결정법(automatic sequencing)에 의하여 *pncA* 유전자의 돌연변이 양상을 확인하고자 하였고, 이 방법이 PZA 내성 결핵균의 검출에 유용하다는 것을 확인하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

1999년 1월부터 6월 사이에 부산대학교 병원에 입원한 폐결핵 환자의 객담에서 분리된 균주와 대한결핵 연구원에 감수성 검사가 의뢰된 균주 중 Accuprobe culture confirmation kit(Gen-Probe Inc., USA)를 이용한 동정 결과 결핵균으로 확인된 23예의 균주

를 대상으로 하였다. 절대농도법에 의한 PZA의 감수성 검사는 Lowenstein-Jensen(L-J) 배지를 이용하여 검사하였으며 PZase의 활성 검사는 Wayne⁵의 방법에 따라 실시하였다. 결핵균의 DNA 추출은 균주들을 Ogawa 배지에서 배양시킨 후 집락 1 loop를 따서 microcentrifuge tube에 넣고 InstaGene matrix(Bio-Rad, USA)를 200 μ l 를 가하여 56°C에서 30분간 방치한 후 10초 동안 잘 혼합하여 100°C에서 8분간 열처리하였다. 다시 10초간 잘 혼합하여 12,000 rpm에서 3분간 원심 침전한 상층액을 새 tube로 옮겨 -20°C에 보관하였으며, 그 중 1 μ l 를 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응 혼합액은 500 mM KCl, 100 mM Tris HCl(pH 9.0), 1% Triton X-100, 0.2 mM deoxynucleoside triphosphates(dATP, dGTP, dTTP and dCTP), 1.5 mM MgCl₂, 각각 10 pmol의 시발체 두 종류, 1 U *Taq* DNA polymerase(BioBasic Inc. Korea)로 구성되었고, template DNA 1 μ l 와 함께 총 50 μ l 가 되게 한 후 mineral oil을 25 μ l 증충하였다. 시발체는 Korea Biotech사에 의뢰하여 제조한 *pncA*-F (5'-GCTGGT-CATGTTCGCGATCG-3')와 *pncA*-R (5'-GCTT-TGCGGCGAGCGCTCCA-3')을 사용하여 *pncA* 유전자의 open reading frame 전체 561 bp를 포함하는 710 bp 크기의 유전자를 선택적으로 증폭하도록 고안하였다. 이 혼합액을 Mastercycler Gradient™ thermal cycler(Eppendorf, Germany)로 94°C에서 3분간 가열하여 충분히 변성시킨 후, 94°C에서 1분, 62°C에서 1분, 72°C에서 1분간씩 30주기를 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 연장 반응을 완료시켰다. 반응이 끝난 후 2% 한천 겔에 전기영동하여 710 bp의 PCR 산물을 확인하였다. *pncA*의 직접 염기서열 결정은 PCR 증폭 산물을 전기영동시켜 분리한 후 증폭 산물이 위치한 띠 부분을 잘라내어 PCR purification kit (QIAGEN, USA)을 이용하여 정제하여 직접 염기서열 결정에 이용하였다. 염기서열의 결정은 ABI prism 377 sequencer DNA 자동염기서열분석기(Perkin ELMER Corp., Foster

City, Calif, USA)를 이용하여 4 pM *pncA*-F와 4 pM *pncA*-R을 사용하여 dye terminator법으로 실시하였다. 염기서열은 발표된 결핵균 야생주(wild strain)의 *pncA* 염기서열(GenBank accession no. U59967)을 기준으로 하여 CLUSTAL-W(생명공학 연구소) 프로그램을 이용한 다중서열분석으로 돌연변이 여부를 확인하였다. 또한 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 프로그램으로 *pncA* 유전자의 염기서열을 PZase 아미노산 서열로 번역하였다. PZase의 아미노산 서열은 CLUSTAL-W를 이용한 다중염기서열분석으로 야생주의 아미노산 서열과 비교하였다.

결 과

1. PZA에 대한 감수성, PZase 활성 및 *pncA* 돌연변이 (Table 1)

총 28균주 중 절대농도법에 의한 감수성 검사 결과 감수성 6균주, 내성 21균주였으며 1균주는 검사 불능으로 감수성 여부를 확인할 수 없었다. 감수성인 균주 중 1균주(case no. 15)는 약제가 첨가되지 않은 산성 L-J 배지에서 증성 L-J 배지에서보다 적은 수의 집락이 자랐기 때문에 HCl에 의한 억제 가능성을 완전히 배제하지 못하였다.

PZase 활성 검사 결과 5균주에서 활성을 보였고, 23균주에서는 활성이 없었다.

pncA 유전자의 염기서열 결정 결과 7균주중에서 돌연변이가 없었으며, 21 균주에서 돌연변이가 있었다.

PZA에 대한 생물학적 감수성, PZase 활성, *pncA* 유전자의 돌연변이 검사 사이에 불일치를 보인 5균주(case no. 3, 11, 14, 15 and 21)에 대해서 각각을 재검사한 결과, 처음에 PZase 활성 음성이었던 1균주(case no. 14)에서 PZase 활성을 보였다. 따라서 본 실험에 이용된 균주는 PZA 감수성 균주 6균주, 내성 균주 22균주로 판단하고, 각 검사의 성적

Table 1. Comparison of the results of three tests to predict susceptibility to PZA in *M. tuberculosis* isolates

Case No.	PZase Activity	Resistance to PZA by absolute concentration method	Mutation of <i>pncA</i> [†]	Consistency of Three Results
1	+	S	-	Yes
2	+	S	-	Yes
3	+	R	-	Discrepancy
4	+	S	-	Yes
5	+	S	-	Yes
14	- → +*	S	-	Yes after retest
6	-	R	+	Yes
7	-	R	+	Yes
8	-	R	+	Yes
9	-	R	+	Yes
10	-	R	(+)	Yes
11	-	Unknown	+	Discrepancy
12	-	R	(+)	Yes
13	-	R	+	Yes
15	-	S [#]	(+)	Discrepancy
16	-	R	+	Yes
17	-	R	+	Yes
18	-	R	+	Yes
19	-	R	+	Yes
20	-	R	+	Yes
21	-	R	-	Discrepancy
22	-	R	+	Yes
23	-	R	+	Yes
24	-	R	+	Yes
25	-	R	+	Yes
26	-	R	+	Yes
27	-	R	+	Yes
28	-	R	+	Yes

*Case no. 14 showed negative PZase activity in the initial test, but confirmed to be positive finally.

[#]growth in drug-free Lowenstein-Jensen media of acid pH, but less than in L-J media of neutral pH.

[†] -, no mutation ; +, mutation ; (+), mutation in the promoter region, not in the open reading frame of *pncA*.

Table 2. *pncA* nucleotide and amino acid changes in PZA-resistant *M. tuberculosis*

Case No.	Mutations in		Type of mutation
	<i>pncA</i>	PZase	
6	C180T	Gly60 → Gly	Silent
6	C425T	Thr142 → Met	Missense
9	A212G	His71 → Arg	Missense
17	G395T	Gly132 → Val	Missense
18	G395T	Gly132 → Val	Missense
20	T172C	Phe58 → Leu	Missense
23	C227T	Thr76 → Ile	Missense
24	T190G	Tyr64 → Asp	Missense
26	A407G	Asp136 → Gly	Missense
27	G41A	Cys14 → Tyr	Missense
28	A403C	Thr135 → Pro	Missense
22	C421T	Gln141 → Termination	Nonsense
10	A to G mutation at position -11		Mutation in promotor
12	A to G mutation at position -11		Mutation in promotor
15	A to G mutation at position -11		Mutation in promotor
8	Nucleotide TCG insertion at position 23		slipped-strand mispairing
7	Nucleotide CT insertion at position 317		Frame shift
13	Nucleotide T insertion at position 393		Frame shift
19	Nucleotide GT insertion at position 393		Frame shift
25	Nucleotide AG insertion at position 382		Frame shift
11	234-bp deletion at position 56		Frame shift
16	Nucleotide GC deletion at position 513		Frame shift

을 분석하였다.

PZA에 대한 생물학적 감수성 검사는 감수성 6균주 중 1균주를 내성으로 판단하여 16.7%의 major error를 보였고, 내성 22균주 중 1균주를 감수성으로 판단하여 4.5%의 very major error를 보였다. 그리고 총 28균주 중에서 1균주(3.6%)를 검사 불능으로 판단하였다. 여기서 major error라 함은 감수성을 내성으로 잘못 판단한 것을 말하고, very major error란 내성을 감수성으로 판단한 경우를 정의한다.

PZase 활성 검사는 감수성 6균주 중 1균주를 내성으로 판단하여 16.7%의 major error를 보였고,

very major error는 보이지 않았다.

*pncA*의 돌연변이 검사는 major error는 보이지 않았고, 내성 22균주 중 21균주(95.5%)에서 돌연변이가 관찰되었고, 1균주에서 돌연변이가 관찰되지 않아서 4.5%의 very major error를 보였다.

2. *pncA* 유전자의 돌연변이 양상

PZase 활성이 있는 6균주에서는 모두 *pncA* 유전자의 돌연변이가 관찰되지 않았다. PZase 활성이 없는 22균주 중 21균주(95.5%)에서 *pncA* 유전자의 돌

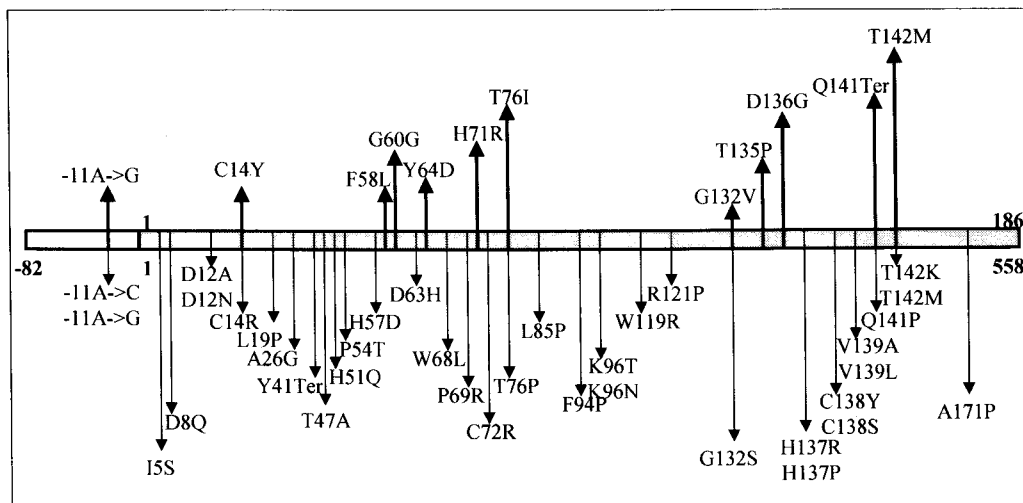


Fig. 1. Representations of single point mutations associated with the loss of PZase activity in the 558-bp *pncA* gene of *M. tuberculosis* complex members. Above the horizontal bar indicates the results of the present study ; below, those quoted from the literature (Ref. 10, 31 and 33). Abbreviations : A, alanine ; C, cysteine ; D, aspartic acid ; F, phenylalanine ; G, glycine ; H, histidine ; I, isoleucine ; K, lysine ; L, leucine ; M, methionine ; N, asparagine ; P, proline ; Q, glutamine ; R, arginine ; S, serine ; T, threonine ; V, valine ; W, tryptophan ; Y, tyrosine ; Ter, termination codon.

연변이가 관찰되었다. 돌연변이의 양상은 한 균주에서 중복된 돌연변이를 포함하여, 단일 염기의 치환에 의한 silent mutation 1개, missense mutation 10개, nonsense mutation 1개, 3염기가 삽입된 insertion 1개, 1~3개의 염기가 삽입된 frame shift mutation 4개, 그리고 2~234개의 염기가 결실된 frame shift mutation 2개였다. Case no. 6의 균주는 silent mutation과 함께 missense mutation이 동시에 발견되었다. 그리고 나머지 3균주에서 모두 *pncA* 유전자의 open reading frame 상부의 11번째 염기가 똑같이 adenine에서 guanine으로 치환되어 있었다(Table 2, Fig. 1, 2). 돌연변이가 발생한 위치는 불특정하고, *pncA*의 전 open reading frame에 걸쳐서 있었다. PZase 활성이 없는 22균주 중 2균주는 *pncA* 유전자의 open reading frame 전체 561 bp를 포함하는 710 bp 크기의 유전자 염기 서열이 야생주와 일치하였다.

고 찰

본 연구에서 절대 농도법에 의한 PZA 감수성 검사의 결과는 두 가지 문제점을 지적해준다. 첫째, 위내성의 문제이다. 결핵균이 특정 약제에 대해서 획득하는 내성은 그 약제에 노출되는 것과는 무관하며, 자연적으로 우연하게 일어나기 때문에 감수성이 있는 균일지라도 하나의 항결핵제에 의해서 결핵균이 100% 완벽하게 제거되지는 않는다. 그리고 환자의 임상 검체에서 분리된 균주 중에서 항결핵제에 의해 억제되지 않는 내성균의 비율이 야생 균주에 비해서 훨씬 높으면 임상적으로 그 약제는 효과가 없다. 이와 같은 개념에 바탕을 두고 결핵균에 대한 약제 감수성 검사를 실시한다. 검사 방법 중 과거에 많이 사용되었으며, 일부의 검사실에서는 아직도 사용하고 있는 방법인 L-J media를 이용한 절대농도법은 약제를 넣어 균힐 때의 온도가 너무 높아서 약물의 역가를 보충할 수 없고 약

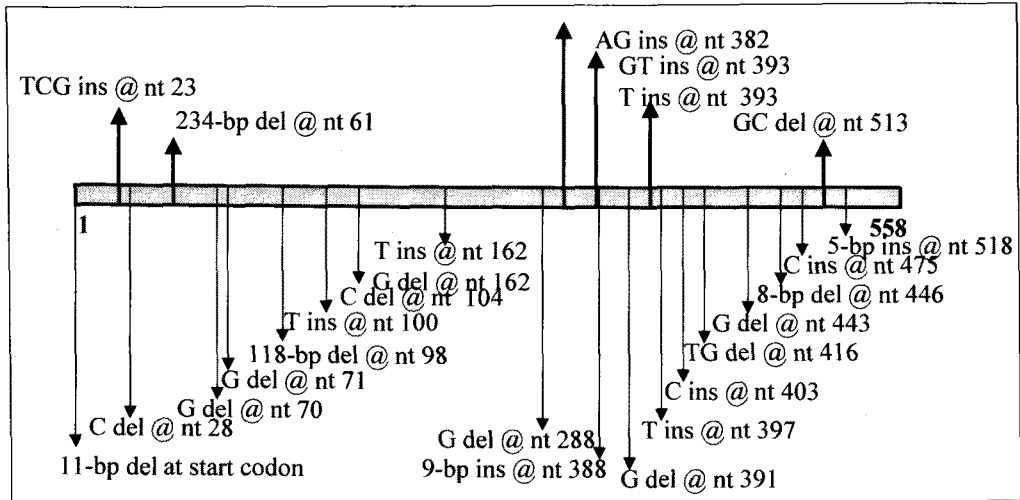


Fig. 2. Representations of the deletions or insertions associated with the loss of PZase activity in the 558-bp *pncA* gene of *M. tuberculosis* complex members. Above the horizontal bar indicates the results of the the present study ; below, those quoted from the literature (Ref. 10, 31 and 33). Abbreviations. del, deletion ; ins, insertion ; nt, nucleotide.

물이 인지질이나 단백질과 결합함으로써 활성이 감소할 수도 있기 때문에 감수성 검사에 적당하지 않다. 따라서 Centers for Disease Control & Prevention(CDC)와 The National committee for clinical laboratory standards(NCCLS)에서 모두 Middlebrook 7H10 agar를 이용해서 비율법으로 검사하는 것을 표준 방법으로 삼고 있다. 본 연구에서 PZase 활성이 있고 *pncA* 유전자의 돌연변이도 없는 1균주에서, L-J media를 이용한 절대농도법으로 실시한 PZA 감수성 검사상 내성으로 판정된 것은 그와 같은 검사 방법의 한계 때문에 기인한 것이 아닌가 생각된다. 특히 절대농도법은 고체 배지의 표면에 자란 균 집락수로 감수성 여부를 판단하기 때문에 접종량의 차이가 결과에 결정적인 영향을 미칠 수 있다. 이와 같이 결핵균의 PZA에 대한 감수성 검사에서 보이는 오류는 비교적 흔한 문제이며, 이로 인해 감수성 균이 내성으로 잘못 판단될 가능성은 다른 연구자들도 언급하고 있다⁴⁻⁷. Scorpio등⁸은 BACTEC radiometric method에 의해서 PZA 내성으로 확인된 38균주 중 5균주에서 *pncA* 유전자의 돌연변이가 관찰되지 않

았고, 이중 4균주는 다시 BACTEC과 Middlebrook 7H9 액체 배지를 이용하여 재확인한 감수성 검사 결과 “감수성”으로 밝혀졌다. 그리고 Chang등⁹은 L-J media를 이용한 절대농도법에서 PZA 내성을 보인 결핵균의 36%만이 *pncA* 유전자의 돌연변이를 보였음을 보고하고 있으며, 다른 보고자들보다 그 비율이 현저하게 낮은 이유가 일부 균주의 PZA에 대한 위내성에 기인할 것으로 추정하였다. 둘째, 산성 pH에서 결핵균이 사멸하는 문제이다. PZA는 산성 환경, 초기의 급성 염증 부위, 또는 감염된 탐식 세포의 phagosome 내에서 휴지 상태에 있는 결핵균에 작용하기 때문에, 정상적인 배양 환경이 아닌 산성 배지 (pH 5.5) 또는 숙주의 탐식 세포 안에서만 활성을 보인다¹⁰. 따라서 실험실 내에서 감수성 검사를 하고자 할 때에는 배지의 pH를 적어도 6.0 이하로 낮추어 주어야 한다. BACTEC PZA method는 배지의 pH를 6.0으로 맞추고 있다¹¹⁻¹². 그러나 절대 농도법을 포함한 전통적인 생물학적 감수성 검사 방법들은 PZA의 작용이 왕성하도록 배지의 pH를 5.5로 맞추며, 이런 상태에서는 결핵균의 성장이 심하게 억제되거나 균주

에 따라서는 자라지 않을 수도 있다. 본 연구에서도 1 균주(3.6%)는 약제가 첨가되지 않은 산성 L-J 배지에서 균주가 전혀 자라지 않아서 감수성을 확인할 수 없었다. 1 균주(4.5%)는 약제가 첨가되지 않은 산성 L-J 배지에서 균주가 일부 자랐으나 중성 L-J 배지에서보다는 집락의 수가 적었으며 PZA가 50 mg/L와 100 mg/L가 들어 있는 배지에서는 집락이 자라지 않아서 PZA에 대해서 감수성으로 판단했으나, 산 때문에 결핵균이 억제된 것일 가능성을 완전히 배제하지 못하였다. 따라서 절대농도법에 의한 결핵균의 감수성 검사 결과는 전적으로 신뢰하기는 곤란하며 특히 PZA에 대한 감수성 검사는 더욱 그러하기 때문에, 전통적인 생물학적 방법에 의한 감수성 검사와 더불어 BACTEC radiometric method나 MGIT antimicrobial susceptibility test 등을 이용한 방법과 분자생물학적인 방법등의 결과를 참조해야 할 것으로 생각한다¹²⁻¹⁴.

PZase 검사는 원래 mycobacteria의 균종을 동정하기 위한 검사로, *M. tuberculosis*(양성)와 *M. bovis*(음성)의 감별, *M. avium complex*(양성)와 niacin 음성 *M. bovis*의 감별, *M. marinum*(양성)과 *M. kansasii*(음성)의 감별에 이용되는 검사이다. 그러나 PZA가 결핵의 초치료에 사용되면서 결핵균의 PZA에 대한 내성이 증가되었고, PZA의 작용 기전이 결핵균 자신이 갖고 있는 PZase에 의하여 PZA를 POA로 분해하면 이 POA가 산성 조건에서 항결핵 효과를 나타내는 것이기 때문에, PZA 내성 결핵균을 검출하는데 PZase 활성 검사를 이용하기도 한다⁴. 실제로 PZA 내성 결핵균의 대부분은 PZase 활성이 소실되어 있다¹⁵⁻¹⁷. 본 검사에서는 PZase 활성이 있는 6균주 중 1균주는 절대 농도법에 의한 PZA 내성이었으나, 모두 *pncA*의 돌연변이가 관찰되지 않은 것으로 보아 절대 농도법에 의한 감수성 검사의 위내성으로 추정할 수 있다. 그리고 PZA 활성이 없는 22균주 중 2균주는 산에 의한 억제 때문에 절대농도법에 의한 PZA 감수성 여부가 불확실하였다. PZase 검사의 문제점은, PZase 양성인 6균주

중 1균주는 처음의 검사에서 PZase 활성 음성의 결과를 보여서, PZase 검사의 위음성의 가능성에 주의 기울여야 함을 알 수 있다. 실제로 PZase의 활성이 있는지를 조기에 판단하기 위해서는 대사 활동이 왕성한 집락을 다량의 배지에 접종해야 하며, 또한 정제기 또는 균 사멸기에 있는 균을 접종하였을 경우 위음성이 나타날 수 있다. 따라서 PZase 활성 검사의 수기에 주의를 기울인다면 절대 농도법에 의한 생물학적인 감수성 검사보다 정확하게 결과를 예측할 수 있을 것으로 생각된다.

본 연구에서 PZase 활성 음성인 22균주 중 21균주(95.5%)에서 *pncA*의 돌연변이가 관찰되었다. 다른 연구자들^{8,18,19}에 의하면, 생물학적 감수성 검사상 PZA 내성을 보인 균주의 72~87%와 PZase 활성이 없는 균주의 97%에서 *pncA*의 돌연변이를 보고하고 있으며, 이는 본 연구의 결과와 유사하나 PZA에 대한 생물학적 감수성 검사보다는 PZase의 활성 검사가 *pncA* 유전자의 돌연변이와 더욱 관련이 높음을 보여준다.

본 연구에서 확인된 22개(21균주)의 돌연변이 중에서 단일 염기의 치환이 15개로 많은 부분을 차지하였다. 단일 염기의 치환은 결핵균이 약제에 대해서 내성을 획득하는 주요 기전이며²⁰, 이는 선행 연구자들의 PZA에 대한 연구에서도 확인되었다^{8,18,19,21}. 그러나 본 연구의 결과에서 특히 단일 염기 치환에 의한 돌연변이 중 promotor부분에서 일어난 것에 주목할 필요가 있을 것으로 생각한다. Scorpio 등⁸의 연구에서는 *pncA*의 돌연변이를 보인 33균주 중에서는 promotor 지역의 돌연변이가 하나도 없었고, in vitro에서 유도된 PZA 내성 결핵균 8균주 중의 하나에서만 *pncA*의 시작 codon의 상부 11번째 염기가 adenine에서 cytosine으로 치환되어 있음을 보고하였다. Sreevatsan¹⁹등은 *pncA*의 돌연변이를 보인 48균주 중에서 2균주가 promotor 지역의 같은 부위인 adenine에서 guanine으로 치환된 것을 보고하였다. 본 연구에서도 3균주가 Sreevatsan 등과 똑같은 부위에서 같은 염기의 치환이 있었다. *pncA*의 돌연변이

이에 대한 보고를 종합하여 분석해 보면 promotor 지역에서 돌연변이가 생긴 것으로 보고된 6균주가 모두 동일한 부위에서 일어났고, 그 중 5균주가 똑같은 염기로 치환된 것은 매우 의미있는 결과이다. 일반적으로 세균의 보존적인 promotor는 전사 개시 부위로부터 -10 및 -35 자리에 있는데, 본 연구 결과에서 나타난 돌연변이의 위치와 거의 일치하며, -11 위치의 돌연변이로 인한 PZase 활성의 소실은 이 부위가 *pncA* 유전자의 "-10 box" 또는 "Pribnow box"에 해당하는 promotor 부위일 가능성을 보여주고 있다. 즉, 이 부위의 mutation이 RNA polymerase에 의한 *pncA* 유전자의 전사를 억제하는 "down mutation"으로 작용하였을 경우 PZase의 발현 장애로 인하여 활성을 가진 효소의 부족을 초래하고, 이로 인하여 PZA에 대한 내성이 획득되었을 것으로 생각된다. 그러나 가장 널리 알려진 -10 box 인 "TATAAT"와는 구조가 다른 점으로 보아 이 부위가 promotor로서 중요한 부위임을 보다 명확히 하기 위해서는 in vitro mutagenesis 등의 실험을 통하여 직접 증명해야 할 필요가 있으며, 앞으로 promoter 지역의 돌연변이, 특히 -11 위치의 adenine이 guanine으로 치환되는 것과 결핵균의 PZase의 활성의 소실 또는 PZA에 대한 생물학적 내성의 획득과의 관계를 보다 명확하게 규명하기 위한 노력이 필요할 것으로 생각한다.

Silent mutation은 22개의 돌연변이 중에서 1균주에서 발견되었다. Kapur 등²²의 보고에서 세계 각지에서 수집된 결핵균의 *rpoB*, *inhA*, *katG* 등 유전자를 조사한 결과 silent mutation이 대단히 드물음을 보고하고 있다. 본 연구를 포함하여 국내에서 조사된 심 등²³에 의해 *pncA*의 돌연변이에서도 총 66균주 중에서도 silent mutation은 본 연구에서 확인된 1균주 뿐으로 매우 드물었다.

한 균주(case no. 8, Fig. 1)에서 3염기가 삽입되어 하나의 아미노산이 첨가되는 돌연변이가 관찰되었다. 이와 같은 3의 배수의 염기의 삽입에 의해 아미노산이 첨가되는 경우를 "slipped-strand mispairing"

이라고 하며, 이의 빈도는 높지 않아서 저자의 1례와 Sreevatsan 등¹⁹의 보고에서 서로 연관된 4균주에서 9염기가 삽입된 예 밖에 보고가 없다. 그러나 "slipped-strand mispairing"은 rifampin 내성 결핵균의 *rpoB* 유전자, isoniazid 내성 결핵균의 *katG* 유전자에서도 드물게 관찰되는 소견²⁵이며, DNA가 진화해 나가는 주요 기전 중의 하나이다²⁴⁻²⁶.

본 연구에서 PZase 활성이 있는 6균주는 모두 *pncA* 유전자의 돌연변이가 없었고, PZase 활성이 없는 결핵균 중 95% 이상에서 *pncA*의 돌연변이가 확인되었다. 이처럼 *pncA* 유전자의 돌연변이는 결핵균의 PZA 내성 결핵균을 예측하는데 매우 우수한 검사로 생각된다.

PZase 검사는 비교적 정확하게 PZA 내성을 예측할 수 있고, 검사 시간이 1주일 정도로 비교적 빠른 시간 내에 결과를 얻을 수 있지만, 검사를 위해서 활발한 대사 활동을 하는 신선한 균 집락이 다량 필요하기 때문에 균이 충분히 성장할 때까지 비교적 많은 시간이 소요되는 것이 문제점으로 지적될 수 있다. 본 연구에서 사용한 자동염기서열분석기는 빠르고, 모호하지 않은 분명한 결과를 보여 주며 판독이 쉬우며, 방사성 동위원소를 사용하지 않고, 비교적 많은 양의 검체도 손쉽게 처리할 수 있다는 점이 장점이다. 그리고 PCR을 이용하여 *pncA* 유전자를 증폭한 후 염기서열 결정에 이용하기 때문에 소수의 균 집락만 있거나, 오래된 집락, 또는 객담에서 균이 다량 배출되는 환자라면 객담을 직접 PCR에 이용하여도 PZA의 내성을 확인할 수 있다. 따라서 자동 염기서열분석을 이용한 *pncA*의 염기서열 결정이 PZA 내성 결핵균 검출에 매우 유용할 것으로 생각한다.

요 약

연구배경 :

Pyrazinamide(PZA)는 결핵의 1차 치료 약제이며, 산성 환경 하에서만 작용하기 때문에 in vitro에서 생물학적인 감수성 검사를 하는 것이 어렵다. *pncA*는

PZase를 생성하는 유전자로 이의 돌연변이가 결핵균의 PZase 활성을 소실시켜 결핵균이 PZA에 대해서 내성을 획득하게 되는 기전으로 추정된다. 본 연구에서는 PZA의 생물학적 감수성, PZase 활성 및 *pncA* 유전자의 돌연변이 사이의 관계를 검토하고, 아울러 결핵균의 *pncA*의 염기서열 결정이 PZA 내성을 예측하는데 이용될 수 있는지를 알아보려고 하였다.

방 법 :

폐결핵 환자의 객담에서 분리된 결핵균 28균주를 대상으로 하여, 절대농도법으로 PZA의 감수성을 검사하고, *pncA* 유전자의 open reading frame 전체 561 bp를 포함하는 710 bp 크기의 유전자를 선택적으로 증폭하였다. PCR 증폭 산물을 직접 염기서열 결정에 이용하였고, GenBank에서 확인한 결핵균 야생주의 *pncA* 염기서열과 비교하여 돌연변이 여부를 확인하였다.

결 과 :

PZase 활성이 있는 6균주 모두 *pncA*의 돌연변이가 없었으나, 1균주(16.7%)는 절대농도법에 의한 감수성 검사에서 위내성으로 나타났다. PZase 활성이 없는 22균주 중 21균주(95.5%)는 *pncA*의 돌연변이가 확인되었고, 생물학적 감수성 검사에서는 20균주가 PZA 내성, 1균주는 검사 불능, 1균주는 감수성을 보였다. *pncA*의 돌연변이의 양상(중복 1에 포함)은 promotor 지역과 *pncA*의 전 open reading frame에 걸쳐서 단일 염기의 치환에 의한 silent mutation 1개, missense mutation 10개, nonsense mutation 1개, 3염기가 삽입된 insertion 1개, 1~3개의 염기가 삽입된 frame shift mutation 4개, 그리고 2~234개의 염기가 결실된 frame shift mutation 2개였다. 그리고 나머지 3균주는 모두 *pncA* 유전자의 open reading frame 상부의 11번째 염기가 똑같이 adenine에서 guanine으로 치환되어 있었다

결 론 :

*pncA*의 돌연변이는 결핵균의 PZase 활성의 소실에

의한 PZA 내성의 주요 기전이며, 특히 *pncA* 시작 codon의 상부 11번째 위치의 염기 치환은 promotor의 돌연변이에 의한 PZA 내성의 주요 부위인 것으로 추정된다. Automatic sequencing에 의한 *pncA*의 염기서열 결정은 결핵균의 PZA 내성 진단을 위한 빠르고 효과적인 방법으로 이용할 수 있으며, 또한 PZA 내성 결핵균의 균주간 연관성을 규명하기 위한 역학 조사의 목적으로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. 장철훈, 손한철, 김철민. 다제내성 결핵균과 감수성 검사. 대한화학요법학회지 1998;16(3):187-203.
2. Mycobacteria. In : Koneman *rpoBEW*, Allen SD, et al. eds. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 1997; Philadelphia, Lippincott: p 894-5.
3. de Beenhouwer H, Lhiang Z, Jannes G, Mijs W, Machtelinckx L, Rossau R, et al. Rapid detection of rifampicin resistance in sputum and biopsy specimens from tuberculosis patients by PCR and line probe assay. Tuber Lung Dis 1995;76:425-30.
4. Konno K, Feldmann FM, McDermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am Rev Respir Dis 1967;95(3):461-9.
5. Wayne LG. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1974;109(1):147-51.
6. Hanna BA. Diagnosis of tuberculosis by microbiologic techniques. In : Rom WN, Garay S, eds. Tuberculosis 1996; New York, Little, Brown & Company: 155-7.
7. Hewlett D Jr, Horn DL, Alfalla C. Drug-resistant

- tuberculosis : inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. JAMA 1995;273(12):916-7.
8. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, et al. Characterization of *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(3):540-3.
 9. Chang CH, Son HC, Kim SH, Kim CM, Lee SW, Oh KH, et al. Pyrazinamide resistance and mutations of *pncA* in *Mycobacterium tuberculosis*. The Fifth Asian Conference of Clinical Pathology Abstr O2-44, 1998.
 10. Heifets L and Lindholm-Levy P. Pyrazinamide sterilizing activity in vitro against semidormant *Mycobacterium tuberculosis* bacterial populations. Am Rev Respir Dis 1992;145(5):1223-5.
 11. Mitchison DA. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. 1985;Tubercle 66(3):219-25.
 12. Antimicrobial susceptibility testing : Radiometric (BACTEC) tests for slowly growing mycobacteria. In : Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology procedure handbook. 1995;Washington DC, ASM Press:p5.14.1-25.
 13. Walters SB and Hanna BA. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid and rifampin by mycobacterium growth indicator tube method. J Clin Microbiol 1996;34(6):1565-67.
 14. 이민기, 김윤성, 이효진, 전두수, 윤상명, 박삼석 등. 염기서열 결정과 LineProbe 분석법에 의한 rifampin 내성 결핵균의 *rpoB* 유전자 분석. 결핵 및호흡기질환 1997;44(2):251-63.
 15. Mycobacteriology : Identification tests for mycobacteria. In : Isenberg HD, ed. Clinical Microbiology procedure handbook. 1995;Washington DC, ASM Press:p3.12.17.
 16. Miller MA, Thibert L, Desjardins F, Siddiqi SH, Dascal A. Testing of susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide : comparison of Bactec method with pyrazinamidase assay. J Clin Microbiol 1995;33(9):2468-70.
 17. Trivedi SS and Desai SG. Pyrazinamidase activity of *Mycobacterium tuberculosis* - a test of sensitivity to pyrazinamide. Tubercle 1987;68(3):221-4.
 18. Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis 1997;78(2):117-22.
 19. Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, Kreiswirth BN, Musser JM. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. Antimicrob Agents Chemother 1997;41(3):636-40.
 20. Musser JM. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria : molecular genetic insights. Clin Microbiol Rev 1995;8(4):496-514.
 21. Scorpio A and Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. Nat Med 1996;2(6):662-7.
 22. Kapur V, Whittam TS, Musser JM. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? J Infect Dis 1994;170(5):1348-9.
 23. 심태선, 김영환, 전재용, 임채만, 이상도, 고윤석, 김우성, 김동순, 김원동 : *pncA* 유전자 PCR-SSCP법을 이용한 결핵균 Pyrazinamide 내성의 진단. 결핵 및 호흡기질환 1998;45(6):1178-87.
 24. Kapur V, Li LL, Iordanescu S, Hamrick MR,

- Wanger A, Kreiswirth BN. Characterization by automated DNA sequencing of mutations in the gene(*rpoB*) encoding the RNA polymerase beta subunit in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from New York City and Texas. *J Clin Microbiol* 1994;32(4):1095-8.
25. Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JD. Characterization of the catalase-oxidase gene(*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing : restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis* 1996;173(1):196-202.
26. Levinson G and Gutman GA. Slipped-strand mispairing : a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol* 1987;4(3):203-21.