

< Original Article >

전북지역 한우에서 분리한 기종저 균의 유전학적 특성 규명

김철민* · 정재명 · 최기영

전라북도축산위생연구소 정읍지소

Genetic characterization and phylogenetic analysis of *Clostridium chauvoei* isolated from Hanwoo in Jeonbuk

Chul-Min Kim*, Jae-Myong Jeong, Ki-Young Choi

Jeongeup-Branch, Jeonbuk Institute of Livestock & Veterinary Research, Jeongeup 590-230, Korea

(Received 10 June 2014; revised 4 August 2014; accepted 20 August 2014)

Abstract

Clostridium chauvoei is the etiologic agent of blackleg, a high mortality rated disease infection mainly cattle. In the present study, the partial sequences of 16S rRNA and flagellin gene of *C. chauvoei* isolated in Jeonbuk, Korea were determined and compared with those of reference strain. Oligonucleotide primers were designed to amplify a 811 bp fragment of 16S rRNA gene and 1229 bp fragment of flagellin gene. Sequencing analysis of 16S rRNA gene showed high homology to the reference strains ranging 82.3% to 100%, while flagellin gene were different from published foreign clostridia, showing 98.7% to 72.0% nucleotide sequence homology. Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene revealed the close phylogenetic relationship of *C. chauvoei* and *C. septicum* in cluster I, which includes *C. carnis*, *C. tertium*, *C. quinii*, *C. celatum*, *C. perfringens*, *C. absonum*, *C. botulinum* B. Phylogenetic analysis also revealed that flagellin gene formed a single cluster with *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* A, *C. novyi* B, *C. tyrobutylicum*, *C. acetobutylicum*. The genetic informations obtained from this study could be useful for the molecular study of *C. chauvoei*.

Key words : *Clostridium chauvoei*, Blackleg, 16S rRNA gene, Flagellin gene, Phylogenetic analysis

서 론

기종저는 *Clostridium chauvoei* 감염에 의한 급성열성 전염병으로 국내에서는 1909년 처음 발생 보고(강, 1998)가 있었고 1986년부터 1994년까지 발생이 없다가 최근에 강원, 경기, 경북, 충남, 전북 등지에서 산발적으로 발생되고 있다(KAHIS, 2014). 특히 소의 경우, 품종에 관계없이 경구 및 창상 감염에 의하여 주로 생후 6~24개월령에 다발하며 저습한 지대 및 홍수 후 흔히 발생하는 산발성, 지방성 질병이다(Blood와 Henderson, 1974; 이, 1986; 최 등, 1997). 주요 임상증상은 갑작스런 식욕결핍, 보행장애, 기립불

능 및 근육부위의 염발성 종창, 1~2일 후 폐사되는 것으로 알려져 있으며, 이병율은 낮으나 치사율이 높은 제2종 법정 전염병이다(강, 1998; Kim 등, 1999). 발병기전은 균체와 독소의 공동작용에 의한 것으로 알려져 있고(Kim, 1968), 기종저 균의 생성 독소는 조직침화성 histotoxin이며, oxygenstable hemolysin (α), DNase (β), hyaluronidase (γ), labile hmolysin (δ), neuroaminidase 등 최소 5개 이상의 용해성 독소 항원이 병원성을 유발하거나 면역원 역할을 한다(Cortinas 등, 1999).

Clostridium 속균은 혐기성으로 아포를 형성하고, 대부분의 균종이 균체외 독소를 산생하는 그람 양성 간균으로 동물의 장내나 토양에 널리 분포되어 있다. 병원성 *Clostridium* 속균은 독소만으로 발증하는 독소

*Corresponding author: Chul-Min Kim, Tel. +82-63-290-6540,
Fax. +82-63-290-6563, E-mail. vetgene@korea.kr

생성형 *C. tetani*와 *C. botulinum*, 조직 침습성 가스괴저균인 *C. chauvoei*, *C. septicum* 및 *C. novyi*, 장내세균에서 생성된 독소에 의한 장독혈증을 유발하는 *C. perfringens* 등이 있다(Allen 등, 1999; Quinn 등, 1994).

기종저의 진단방법은 병리해부소견, 원인세균의 분리 동정 및 실험동물 접종 등이 있다(Timoney 등, 1988). 병리해부소견으로 피하직의 암적색조의 장액성 출혈성 삼출물이 저류되어 있고 삼출액에 기포가 섞여 있으며, 병변부의 근육은 암적색조로 습윤하거나 또는 갈색조로 건조한 것이 특징이다. 기포형성이 심할 경우 병변부의 근육을 물에 넣으면 가라앉지 않고 뜨게 된다. 병변부의 근육을 직접 도말 염색하여 아포를 형성한 무협막의 간균을 확인하고 기종저균을 분리 동정함으로써 확진하게 된다(Blood와 Henderson, 1974; 강, 1998; Kim 등, 1999; 우, 2001). 실험동물 접종법으로 조직 유체를 기니픽의 근육 또는 피하에 접종하여 폐사한 기니픽의 간 표면을 직접 도말 Giemsa 염색하여 기종저균을 확인하기도 한다(강, 1998). 최근에는 유전자 진단방법인 PCR에 의해서 *C. chauvoei* 특이 유전자를 직접 증폭시키거나 제한효소처리 및 단백질 분석을 통하여 감별진단에 이용한다(Kojima 등, 2001; Sasaki 등, 2001).

우리나라에서의 기종저의 발생역학을 살펴보면 1909년에 최초 발생보고가 된 이래, 1916년부터 1932년까지 연간 1,000~2,000두에 달하는 폭발적인 발생을 하였으나, 이후 지속적으로 감소하여 1971년에서 1985년까지는 매년 10여두 남짓 발생하였다. 1986년부터 1994년까지 발생이 없다가 1994년 12월 강원도에서 재발생한 이후 매년 꾸준히 발생 보고가 되고 있다(우, 2001). 특히, 최근 정읍지역 한우에서 2012년 3건이 발생한 후 무주, 고창, 김제 등에서 산발적으로 발생하고 있다(KAHIS, 2014).

세계적으로 기종저에 대한 유전학적 연구는 16S rRNA, 16~23S rRNA spacer region과 flagellin 유전자 등이 활발히 연구되었다(Collins 등, 1994; Kuhnert 등,

1996; Kojima 등, 2000; Sasaki 등, 2001; Sathish와 Swaminathan, 2008). 최근에 Vilei 등(2011)은 기종저의 NanA sialidase 유전자를 클로닝하여 유전학적 및 기능적 특성을 규명하였다. 이와 같이 최근 국외에서 기종저에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만, 국내에서는 유전학적 보고는 전혀 없는 실정이다. 따라서 이 연구에서는 전북지역에서 기종저로 폐사한 소에서 균을 분리하여 16S rRNA 유전자와 flagellin 유전자 염기서열을 규명하고 얻어진 결과를 국외 분리주와 비교 분석하여 분자생물학적 기초자료를 획득하기 위한 일련의 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

2012년 4월에 정읍지역 한우에서 기종저로 진단한 소에서 병변을 채취하여 검사재료로 사용하였다.

균분리 동정

가검물로부터 원인균을 분리하기 위하여 근육, 비장, 간장, 림프절 등의 조직을 무균적으로 채취하였다. 채취한 조직으로부터 백금이를 이용하여 BHI broth에 접종하여 37°C에서 36시간 혐기배양하였다. 증균된 배양액을 혈액배지에 희석 도말하여 37°C에서 48시간 혐기배양하였다. 배지위에 형성된 균체 집락 중 창백한 β -hemolysis 집락을 선택하여 PCR법으로 확인하였다(농림축산검역본부, 2013).

PCR

순수 분리한 균주는 BHI broth에 접종하여 37°C에서 36시간 혐기 배양된 균을 ExiPrep 16 automated

Table 1. Primers for DNA sequencing of *C. chauvoei* 16S rRNA and flagellin gene

Target gene	Primer	Sequence (5'-3')	Product (bp)	Reference
16S rRNA	Cchau16S_1F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	811	This study
	Cchau16S_811R	TGATACCTCCCACACCTAGT		This study
Flagellin	FlachFF	GTCTAATTTAAAAATCAAGGAGG	523	Sasaki (2002)
	Cchau_R523	GCAGCACTCATGTTTCCGA	726	This study
	Cchau_F504	ATCGGAAACATGAGTGCTGC		This study
	Cchau_R1229	CCAAGCATAGCTTGAGCTGC		This study

nucleic acid extraction system (Bioneer, Korea)을 이용하여 DNA를 추출하였다. 균 동정을 위한 PCR은 동물질병표준검사법(농림축산검역본부, 2013)에 의해 실시하였고, 기종저 유전자염기서열 분석을 위한 primer 설계 및 PCR 반응은 Table 1과 같이 실시하였다. PCR 반응을 위해 PCR Premix (Cosmo Genetech, Korea)를 사용하여 추출한 template DNA를 1 μ L, 각 10 pmol/ μ L의 primer 1 μ L를 첨가하고 최종 부피는 DW로 최종부피가 20 μ L되게 첨가하였다. PCR 반응 조건은 TProfessional basic (Biometra, Germany) 기기를 사용하여 초기 denaturation은 95°C에서 5분간하였고, 95°C에서 40초, 55°C에서 60초, 72°C에서 1분간의 사이클을 35회 반복한 후, 72°C에서 7분간 더 반응시켰다. PCR을 수행한 후 ethidium bromide (0.5 μ g/mL)가 함유된 1% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 자외선을 조사하여 band의 유무를 확인하였으며 size marker로는 100 bp ladder (iNtRoN Biotechnology, Korea)를 사용하였다.

염기서열 분석

기종저의 유전자염기서열 분석은 16S rRNA 유전자 단편과 flagellin 유전자를 대상으로 실시하였다. 유전자염기서열 결정은 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA)으로 반응한 후 ABI PRISM 3130X1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 이용하여 수행하였다. 분석한 유전자염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 네트워크 서버의 BLAST 검색을 이용하여 유사성 행렬을 구하였다. 이 연구에서 비교한 16S rRNA 유전자들은 총 18주로 다음과 같다. *C. chauvoei*(NR_013), *C. septicum*(NR_026020), *C. quinii*(X76745), *C. celatum*(X77844), *C. absolum*(X77842), *C. perfringens*(M59103), *C. botulinum B*(X68173), *C. botulinum C*(X68315), *C. novyi*(X68188), *C. sporogenes*(X68189), *C. botulinum A*(X73844), *C. carnis*(M59091), *C. botulinum non-proteol*(X68186), *C. histolyticum*(M59054), *C. limosum*(M59096), *C. proteolyticum*(NR_029250), *C. tertium*(JX267105), *C. difficile*(X73450). 또한, flagellin 유전자를 비교·분석하기 위한 국외 분리주는 다음과 같다. *C. chauvoei*(AB058931), *C. septicum*(AB058933), *C. haemolyticum*(AB058939), *C. novyi A*(AB058936), *C. novyi B*(AB058938), *C. tyrobutylicum*(AJ242662), *C. acetobutylicum*(AF064086),

Borrelia burgdorferi(X16833), *Brachyspira hyodysenteriae*, *Treponema phagedenis*(M94015). 염기서열분석 및 유사한 염기서열들은 Clustal W 연산을 이용하여 다중정렬 하였으며 MEGA version 5 (Tamura 등, 2011)를 이용하여 계통수를 작성하였다. 유전적 계통도 (phylogenetic tree)는 Neighbour-joining algorithm (Saitou와 Nei, 1987)을 이용하여 추론하였고 진화적 거리 행렬은 Tamura 등(2004)의 Maximum Composite Likelihood method를 이용하여 구하였다. 작성한 tree의 위상은 MEGA version 5의 SEQBOOT과 CONSENSE option을 이용하여 neighbour-joining method의 1,000회 resampling을 통한 bootstrap 분석으로 평가하였다 (Felsenstein, 1985).

결 과

C. chauvoei 국내분리주의 유전학적 특성을 규명하고자 기종저 감염으로 폐사한 한우에서 DNA를 추출하여 16S rRNA gene과 flagellin gene을 증폭하여 염기서열을 결정·분석 하였고 국외 분리주와 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

PCR 결과

염기서열 분석을 위하여 설계한 1쌍의 16S rRNA gene 프라이머를 이용하여 양성대조시료(탄저·기종저 혼합백신, 중앙백신연구소) 및 야외 분리주를 대

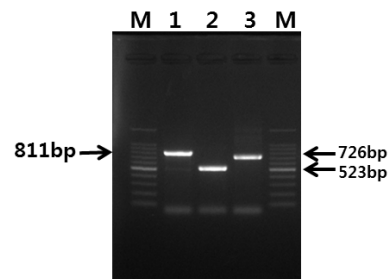


Fig. 1. Amplification of 16S rRNA and flagellin gene of *C. chauvoei* for the sequence analysis by PCR using three pairs of primers. Lane 1: *C. chauvoei* 16S rRNA gene (Cchau16S_IF and Cchau16S 811R primers, 811 bp), lane 2: *C. chauvoei* flagellin gene (FlachFF and Cchau_R523, 523 bp), lane 3: *C. chauvoei* flagellin gene (Echau_F504 and Cchau_R1229, 726 bp), M: 100 bp DNA ladder marker. Arrow and number on the right and left indicate the expected size of amplified 16S rRNA and flagellin gene.

Table 2. Homology comparison of *Clostridium* 16S rRNA gene fragment (811 bp) sequences

Sequence	% identity or No. of nucleotide differences																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1		100	99.0	96.1	93.0	94.4	92.2	92.9	90.0	90.6	91.0	90.6	98.3	90.6	89.7	91.4	91.2	98.3	85.3
2	0		99.0	96.1	93.0	94.4	92.2	92.9	90.0	90.6	91.0	90.6	98.3	90.6	89.7	91.4	91.2	98.3	85.3
3	7	7		96.5	93.0	94.3	91.4	92.9	90.3	90.8	91.1	90.4	97.7	90.7	89.7	91.0	90.6	97.6	85.2
4	28	28	0.965		95.0	95.5	91.3	93.9	90.4	91.1	90.3	89.6	96.4	89.9	90.1	91.5	91.2	96.4	84.9
5	51	51	51	36		92.0	88.1	90.1	87.0	87.4	87.3	86.7	92.9	86.9	87.3	88.8	88.2	93.1	82.5
6	40	40	41	32	58		92.5	95.0	90.3	90.0	91.3	90.6	95.4	90.8	89.2	91.7	91.1	95.1	83.4
7	56	56	62	63	87	54		90.8	88.7	88.6	88.9	88.5	92.9	88.5	87.8	89.9	89.3	92.2	82.3
8	51	51	51	44	72	36	66		90.2	90.0	91.0	90.4	93.6	90.6	89.3	90.3	89.9	93.2	83.3
9	72	72	70	69	95	70	82	0.9		97.6	90.9	90.2	90.2	90.4	90.4	91.4	90.4	91.0	83.8
10	68	68	66	64	92	72	82	0.9	17		90.6	89.9	90.4	90.1	90.7	91.4	91.1	91.0	84.3
11	65	65	64	70	93	63	80	65	66	68		99.3	90.8	99.5	90.3	92.5	91.5	91.2	83.4
12	68	68	69	75	97	68	83	69	71	73	5		90.4	99.4	89.9	92.1	91.1	90.6	83.5
13	12	12	16	26	52	33	51	46	71	69	66	69		90.4	89.6	91.4	91.2	98.3	85.2
14	68	68	67	73	96	66	83	68	69	71	3	4	69		89.9	92.1	91.1	90.8	83.5
15	74	74	74	71	93	78	88	77	69	67	70	73	75	73		95.2	93.7	90.1	82.8
16	62	62	65	61	82	60	73	70	62	62	54	57	62	57	34		95.9	92.4	83.8
17	63	63	68	63	86	64	77	73	69	64	61	64	63	64	45	29		91.8	83.1
18	12	12	17	26	50	35	56	49	65	65	63	68	12	66	71	55	59		85.0
19	106	106	107	109	128	120	128	121	117	113	120	119	107	119	124	117	122	108	

Percentages of identity between *tet(M)* gene fragment sequences are shown in the upper matrix. The lower matrix shows numbers of nucleotide differences. The following sequences were compared: 1. *C. chauvoei* (Jeonbuk), 2. *C. chauvoei*(NR_026013), 3. *C. septicum*(NR_026020), 4. *C. quinii* (X76745), 5. *C. celatum*(X77844), 6. *C. absoum*(X77842), 7. *C. perfringens*(M59103), 8. *C. botulinum* B(X68173), 9. *C. botulinum* C(X68315), 10. *C. novyi*(X68188), 11. *C. sporogenes*(X68189), 12. *C. botulinum* A(X73844), 13. *C. carnis*(M59091), 14. *C. botulinum* non-proteol(X68186), 15. *C. histolyticum*(M59054), 16. *C. limosum*(M59096), 17. *C. proteolyticum*(NR_029250), 18. *C. tertium*(JX267105), 19. *C. difficile*(X73450).

상으로 PCR을 실시한 결과 811bp의 증폭산물을 확인할 수 있었고, 2쌍의 flagellin gene primer로 실시한 PCR에서는 523 bp와 726 bp의 증폭산물을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이 실험에서 분리된 각각의 유전자 단편을 Dye terminator cycle sequencing법에 의해서 염기서열을 결정하여 기존에 검출된 국외 분리주와 비교 분석하였다.

16S rRNA gene의 염기서열 분석 결과

2012년 국내에서 분리된 기종저의 16S rRNA 유전자 단편(811 bp)을 기존에 검출된 18개의 국외 분리주와 비교 분석하였다. 국내 분리주는 *C. chauvoei* ATCC10092(NR_026013)와 100%의 상동성을 나타내었다. 다른 *Clostridium*종과 비교한 결과, *C. septicum* (NR_026020)과 7개의 부위에만 서로 다른 염기서열에서는 99.0% 상동성보여 가장 유사한 염기서열을 가진 것으로 확인 되었고, *C. quinii*부터 *C. difficile*까지 96.1~85.3%의 염기서열 상동성을 나타내었다 (Table 2).

16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 계통수 분석 결과는 2개의 큰 그룹으로 분류되었다. 국내 분리주는 *C. chauvoei*(NR_023013), *C. septicum*(NR_026020), *C. carnis*(M59091), *C. tertium*(JX267105), *C. quinii*(X76745), *C. celatum*(X77844), *C. perfringens*(M59103), *C. absoum* (X77842), *C. botulinum* B(X68173)와 같은 계열에 속하였으며 유전적으로 밀접한 근연관계를 나타내었다. 특히, 이들 중 *C. chauvoei*은 *C. septicum* (NR_026020)와 가장 밀접한 근연관계를 형성하였다(Fig. 2).

Flagellin gene의 염기서열 분석 결과

2012년 국내에서 분리된 기종저의 flagellin 유전자 단편(1229bp)을 기존에 검출된 10개의 국외 분리주와 비교 분석하였다. 국내 분리주는 *C. septicum* 일본 분리주(AB058933)와 98.7%의 상동성을 나타내었다. 다른 *Clostridium*과 비교한 결과, *C. novyi* (AB058936)와 52개의 부위에서 서로 다른 염기서열에서는 81.7% 상동성을 가진 것으로 확인 되었다. 그 다음으로는 *C. septicum*부터 *Treponema phagedenis*까지 80.0~

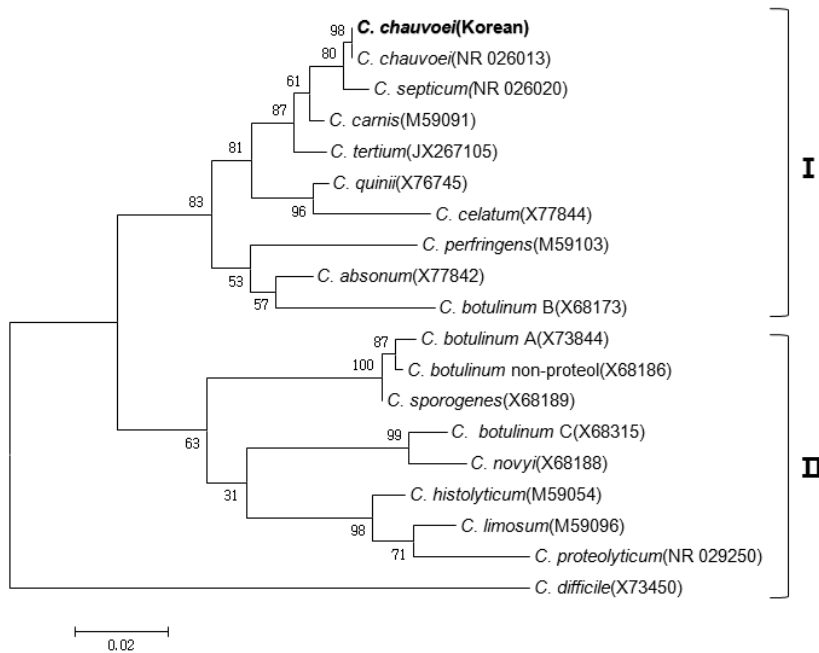


Fig. 2. Phylogenetic relationships of *C. chauvoei* to other clostridia based on 16S rRNA gene sequences. The GenBank accession numbers of the sequences of flagellin genes of the organisms are given in parentheses. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Jukes-Cantor model. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

Table 3. Homology comparison of *Clostridium* flagellin gene fragment (1229 bp) sequences

Sequence	% identity or No. of nucleotide differences										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		98.7	80.0	71.3	81.7	78.1	72.0	68.4	59.4	60.9	56.7
2	5		80.3	71.6	82.0	78.3	71.8	68.4	59.2	61.1	57.2
3	82	81		76.2	81.7	78.8	69.6	67.7	58.7	59.2	57.7
4	118	117	98		75.4	75.0	71.3	67.9	62.3	62.3	59.9
5	75	74	75	101		87.3	73.3	73.0	60.1	61.6	58.2
6	90	89	87	103	52		68.2	69.6	58.7	60.6	59.2
7	115	116	125	118	110	131		71.1	57.0	59.7	53.1
8	130	130	133	132	111	125	119		58.9	59.4	53.6
9	167	168	170	155	164	170	177	169		59.9	55.3
10	161	160	168	155	158	162	166	167	165		66.0
11	178	176	174	165	172	168	193	191	184	140	

Percentages of identity between *tet*(M) gene fragment sequences are shown in the upper matrix. The lower matrix shows numbers of nucleotide differences. The following sequences were compared: 1. *C. chauvoei* (Jeonbuk), 2. *C. chauvoei*(AB058931), 3. *C. septicum*(AB058933), 4. *C. haemolyticum*(AB058939), 5. *C. novyi* A(AB058936), 6. *C. novyi* B(AB058938), 7. *C. tyrobutylicum*(AJ242662), 8. *C. acetobutylicum* (AF064086), 9. *Borrelia burgdorferi*(X16833), 10. *Brachyspira hyodysenteriae*, 11. *Treponema phagedenis*(M94015).

56.7%의 염기서열 상동성을 나타내었다(Table 3).

C. chauvoei flagellin 유전자 염기서열에 의한 계통수 분석 결과는 2개의 큰 그룹으로 분류되었다. 국내 분리주는 *C. chauvoei*(AB058931), *C. septicum*(AB058933), *C. novyi* A(AB058936), *C. novyi* B(AB058938), *C. tyrobutylicum*(AJ242662), *C. acetobutylicum*(AF064086)과 같은 계열에 속하였으며 유전적 밀접한 근연관계를 나타내었다. 특히, 이들 중 16S rRNA 유전자 염기서열분석 결과와 유사하게 *C. chauvoei*은 *C. septicum*

(NR_026020)와 가장 밀접한 근연관계를 형성하였다 (Fig. 3).

고 찰

기증자의 원인체인 *C. chauvoei*에 관한 연구가 세계 각국에서 활발히 수행되고 있다. 이번 연구에서는 국내 분리주의 유전학적 특성과 외국 분리주의 상관

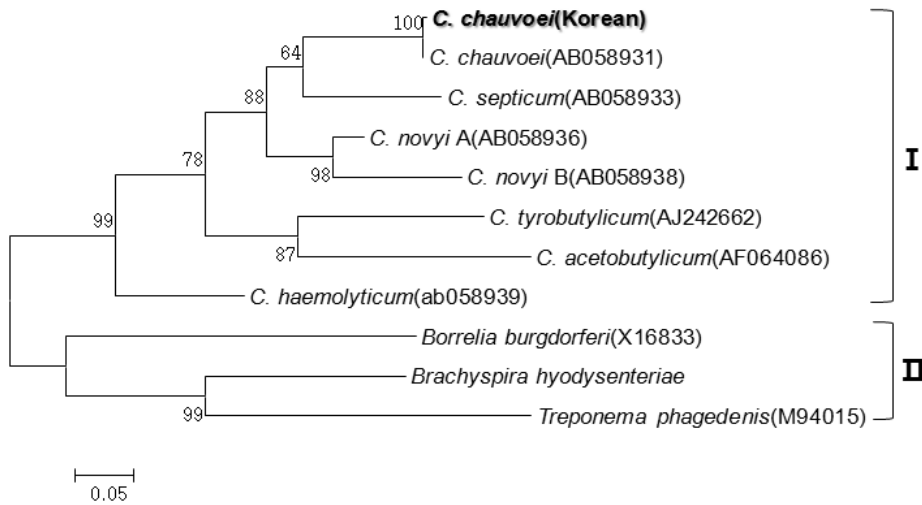


Fig. 3. Phylogenetic relationships of *C. chauvoei* to other clostridia based on flagellin gene sequences. The GenBank accession numbers of the sequences of flagellin genes of the organisms are given in parentheses. The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Jukes-Cantor model. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site.

성 여부를 알아보고자 기종저 발병우의 시료에서 분리된 균주에 대한 유전자의 염기서열 및 유전적 근연 관계를 분석하였다.

세균의 중간 분류 및 계통에 세포질내 유전물질인 미토콘드리아 유전물질이 진화나 계통분석에 널리 이용되고 있다. 특히 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 분자생물학적 연구는 분자계통학 연구에 있어 매우 중요한 도구로 사용될 수 있는 커다란 잠재력과 실용성이 입증되었다(Johnson과 Francis, 1975; Woese, 1987). 이 RNA의 서열은 대부분 상당히 보존되어 있어서 동종간에는 다양성이 거의 없는 반면에 타 종간에는 다양성이 나타나므로 생물동정에 사용되곤 한다. 이번 연구에서도 먼저 국내에서 분리한 16S rRNA 유전자염기서열을 분석하여 *C. chauvoei*와 의 일치성을 확인한 결과, 국제생물자원센터 표준균주(*C. chauvoei* ATCC 10092)와 100% 일치함을 확인할 수 있었고, 종내 개체변이와 지역별 변이는 일어나지 않은 것으로 확인하였다. 또한 *C. chauvoei*는 가스괴저균인 *C. septicum*과 가장 유사한 99.3%로 나타났다. 이들 균의 계통학적인 연관성은 표현형의 유사성의 유전학적 반영으로 판단된다. 또한 *C. septicum*은 기종저 증상과 매우 유사하기 때문에 감별 진단에 어려움이 있으나, 국내에서도 16S rRNA 유전자를 활용한 PCR 또는 제한효소처리법으로 감별 진단에 쓰여 질 수 있을 것으로 판단된다.

Flagellin은 세균 편모를 구성하는 단량체 단백질로써 역학적 또는 계통학적 연구에 유용하게 사용되고 있다(Tasteyre 등, 2000; Kojima 등, 2001; Sasaki 등, 2002). Kojima 등(2000)은 오키나와에서 분리한 *C. chauvoei*의 염색체 위에 위치해 있는 flagellin 유전자

의 염기서열 분석하여 유전적 변이 없이 잘 보존되어 있는 것으로 보고하였다. 하지만 Sasaki 등(2002)은 *C. chauvoei* flagellin 유전자가 염색체 위에 적어도 2개 이상 존재한다는 것을 증명하였고 N-말단과 C-말단 아미노산 염기서열은 잘 보존되어 있지만 가운데 염기서열은 변이가 많이 일어난 것을 밝혀냈다. 과거 연구에서는 flagellin 유전자를 기초로 한 계통수 작성 시 rRNA 비교분석 결과와 많은 부분 일치하는 것으로 나타났다(Sasaki 등, 2002). 이번 연구에서도 16S rRNA 염기서열 분석과 유사하게 *C. chauvoei*는 가스괴저균인 *C. septicum*과 가장 유사한 것으로 나타났다. 하지만 flagellin 유전자 계통수에서 한가지 흥미로운 차이점을 발견할 수 있었다. 먼저 16S rRNA 계통수에서는 그룹 2로 분류되었던 *C. novyi*가 flagellin 유전자 계통수에서는 그룹 1로 분류되었고 *C. chauvoei*와 *C. septicum*이 형성하고 있는 하위 그룹이 *C. novyi*와 가장 근접해 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 과거 연구결과에서 나타났듯이 flagellin 유전자가 염색체 위에 2개 이상 존재함으로써 16S rRNA 유전자 보다 진화적 변이가 많이 나타난 결과로 판단되어 진다(Sasaki 등, 2002). 이와 같은 사실은 염기서열 비교에서도 확연히 보여지고 있다. *Clostridium* 16S rRNA 유전자 동일성 비교에서 99.0~82.3%의 차이를 나타냈으나, flagellin 유전자에서는 98.7~72.0% 동일성을 나타내 변이가 심한 것으로 보여지고 있다. 특히, 중심부의 변이는 중간 유사성을 찾아볼 수 없을 정도의 차이점을 나타냈으며 이 결과는 Sasaki 등(2002)의 결과와 유사한 것으로 나타났다. 이번 연구에서도 flagellin 염기서열 분석을 위하여 과거 논문에 실려 있는 프라이머를 인용하여 PCR을 실

시한 결과 증폭된 산물을 얻지 못하였다. 이는 국내 분리주의 프라이머 염기서열 부위에서 변이가 일어난 것으로 확인되었다. 따라서 *Clostridium*내 변이가 적은 부위를 선택하여 프라이머를 다시 제작하였고, 증폭을 실시한 결과 목적 단편을 확보할 수 있었다. 아쉽게도, *Clostridium flagellin* 유전자는 16S rRNA 유전자에 비해 세계적으로 연구가 많이 이루어지지 않아 계통학적 연구에 제한적일 수밖에 없었다. *C. chauvoei*를 포함한 다양한 *Clostridium*에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한 국내와 국외 분리주 간의 유전적 차이가 virulence 차이를 나타낼 수 있는지에 대해서는 향후 보다 많은 원인의 규명이 필요할 것으로 생각된다.

기종저는 아포를 형성하는 토양성 세균이므로 일단 오염되면 근절하기가 어렵기 때문에 주기적인 철저한 소독과 함께 농가의 자율적인 차단방역을 통해 사전에 질병예방을 하는 것이 가장 좋은 방법으로 알려져 있다(강, 1998). 또한 기종저가 발생한 지역에서는 질병 발생시기인 봄 이전에 6개월령 이상의 소에 대한 백신접종을 실시하여 한다. 이 질병은 증상 발현 후 폐사에 이르기까지의 소요시간이 12~36시간 정도로 매우 빠른 임상경과를 취하고 높은 치사율 때문에 빠른 진단과 대처가 필요한 실정이다. 이번 연구는 국내에서 처음으로 시도한 기종저의 염기서열 분석과 특성규명으로 이 질병의 정확한 진단 및 역학 조사 등의 연구에 기초 자료가 될 것으로 판단되며, 추후 *C. chauvoei*를 포함한 다른 종류의 국내 *Clostridium*종에 대해서도 종합적인 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

결 론

C. chauvoei 국내 분리주의 유전적 특성을 규명하고자 기종저로 진단받은 한우로부터 분리한 국내 분리주와 이전에 검출된 외국 분리주간의 유전자 염기와 계통수 분석을 하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

16S rRNA 유전자는 *C. chauvoei* ATCC10092(NR_026013)와 100%의 상동성을 나타내었다. 다른 종류의 *Clostridium*과는 99.0~85.3%의 염기서열 상동성을 나타내었다. 유전자 염기서열에 의한 계통수 분석으로 유전적 근연관계를 분석한 결과 2개의 주요한 그룹으로 분류됨을 확인할 수 있었고 *C. septicum*(NR_026020)이 가장 밀접한 근연관계를 형성하였다.

Flagellin 유전자는 *C. chauvoei* 일본 분리주(AB058933)와 98.7%의 상동성을 나타내었다. 다른 종류의 *Clostridium*과는 81.7~72.0%의 염기서열 상동성을 나타내었다. 유전자 염기서열에 의한 계통수 분석에서는 16S rRNA 유전자와 마찬가지로 2개의 주요한 그룹으로 분류됨을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로 볼 때 국내에서 분리한 *C. chauvoei* 16S rRNA 유전자는 국외 분리주와 동일함을 알 수 있었고, flagellin 유전자는 유전적 변이가 심하게 진행 중인 것으로 확인되었다.

참 고 문 헌

- 강영배. 1998. 기종저: 발생정보 및 방역대책. 대한수의사회지 34: 253-257.
- 농림축산검역본부. 2013. 동물질병 표준검사법. 국립수의과학 검역원 예규 제2013-22호.
- 우계형. 2001. 수의과학검역정보 11: 34-35.
- 이현범. 1986. 가축전염병학. 유한문화사 서울: 355-388.
- 최원필, 송희중, 김순재. 1997. 수의전염병학. 경북대학교출판부. 대구: 63-65.
- Allen SD, Emery CL, Siders AA. 1999. Manual of clinical microbiology. 7th ed. pp 654-671, ASM Press, Washington DC.
- Blood DC, Henderson JA. 1974. Veterinary medicine. 4th ed. pp 603-605, Bailliere Tindall, London.
- Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, Cai J, Hippe H, Farrow JA. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. Int J Syst Bacteriol 44: 812-826.
- Cortinas TI, Mattar MA, Guzman AMS. 1999. Alpha and beta toxin activities in local strains of *Clostridium chauvoei*. Anaerobe 5: 297-299.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Johnson JL, Francis BS. 1975. Taxonomy of clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. J Gen Microbiol 88: 229-244.
- KAHIS. 2014. 국가동물방역통합시스템, www.KAHIS.go.kr
- Kim DS. 1968. Studies on the biological assay of Black leg vaccine and antiserum. Korean J Vet Serv 8: 125-146.
- Kim ST, Kim S, Kim WH, Gwon Gwon HI. 1999. Resistance on disinfectants of *Clostridium chauvoei* isolated from Kyongbuk porvince. Korean J Vet Serv 22: 85-92.
- Kojima A, Uchida I, Sekizaki T, Sasaki Y, Ogikubo Y, Kijima M, Tamura Y. 2000. Cloning and expression of a gene encoding the flagellin of *Clostridium chauvoei*. Vet Microbiol. 76: 359-372.
- Kojima A, Uchida I, Sekizaki T, Sasaki Y, Ogikubo Y, Tamura Y. 2001. Rapid detection and identification of *Clostridium chauvoei* by PCR based on flagellin gene sequence. Vet

- Microbiol 78: 363-371.
- Kuhnert P, Capaul SE, Nicolet J, Frey J. 1996. Phylogenetic positions of *Clostridium chauvoei* and *Clostridium septicum* based on 16S rRNA gene sequences. Int J Syst Bacteriol 46: 1174-1176.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4: 406-425.
- Sasaki Y, Kojima A, Aoki H, Ogikubo Y, Takikawa N, Tamura Y. 2002. Phylogenetic analysis and PCR detection of *Clostridium chauvoei*, *Clostridium haemolyticum*, *Clostridium novyi* types A and B, and *Clostridium septicum* based on the flagellin gene. Vet Microbiol 86: 257-267.
- Sasaki Y, Yamamoto K, Kojima A, Norimatsu M, Tamura Y. 2001. Rapid identification and differentiation of pathogenic clostridia in gas gangrene by polymerase chain reaction based on the 16S-23S rDNA spacer region. Res Vet Sci 69: 289-294.
- Sathish S, Swaminathan K. 2008. Molecular characterization of the diversity of *Clostridium chauvoei* isolates collected from two bovine slaughterhouses: analysis of cross-contamination. Anaerobe 14: 190-199.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. PNAS 101: 11030-11035.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28: 2731-2739.
- Tasteyre A, Karjalainen T, Avesani V, Delmée M, Collignon A, Bourlioux P, Barc MC. 2000. Phenotypic and genotypic diversity of the flagellin gene (fliC) among *Clostridium difficile* isolates from different serogroups. J Clin Microbiol 38: 3179-3186.
- Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, Barlough JE. 1988. Hagan and Brunner's Microbiology and infectious disease of domestic animals. pp. 233-235. Comstock Pub Ass, Ithaca and London.
- Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. 1994. Clinical veterinary microbiology. pp. 191-208. Mosby-Wolfe, London.
- Vilei EM, Johansson A, Schlatter Y, Redhead K, Frey J. 2011. Genetic and functional characterization of the NanA sialidase from *Clostridium chauvoei*. Vet Res 42: 2.
- Woese CR. 1987. Bacterial evolution. Microbiol Rev 51: 221-271.