

(S1-A)

호기성 운동성 구균의 계통분류학적 연구

(Chemosystematic and Phylogenetic Studies of Aerobic Motile Cocci)

박 진속

한남대학교 이과대학 미생물학과

서 론

구균이란 세포가 구상이며 세포분열시 cross septa를 형성하는 세균의 총칭으로 운동성이 알려져 있는 구균은 극히 적다. 운동성 구균은 Ali-cohen에 의해 1889년 해수로 부터 처음 분리되어 1990년 Migula에 의해 비운동성 구균과 구별하여 *planococcus*라는 속명으로 기재되었다. 그러나 그 후 몇몇 분리 예가 보고 되었으나 (Adametz, 1889; Menge, 1892), 비교적 분리의 예가 적고, 따라서 이 일군의 세균에 대한 분류학적 연구는 극히 적어 세균의 분류와 동정의 분야에서 널리 이용되고 있는 Bergy's manual의 초판(1923)부터 7판(1957)까지 운동성 구균은 독립된 속으로 기재되지 않았다. 그때까지 사용되어온 주된 분류학적 방법인 형태 및 생리 생화학적 성질로 부터는 하나의 속(genus)으로 독립시키는데 충분한 정보를 얻을 수 없었던 것이다.

1960년대에 이르러 냉동식품 등으로 부터 운동성 구균이 분리 보고 되었으며 (Komagata et al, 1962; Leifson, 1964), 특히 Komagata 등은 운동성 구균인 *Planococcus*속이 Tm법을 이용한 GC함량 조사에서 *Micrococcus*속이나 *Staphylococcus*속 등의 구균과는 구별됨을 보고하였고 (Komagata, 1965), 세포벽의 구조 (Schleifer and Kandler, 1970), 혈청학적 유연 (Oeding, 1971) 등의 연구에 의해 운동성이외의 점에서도 구별됨이 지적되어 Bergy's manual 제 8판 (1974년)에는 *Planococcus*속의 부활이 이루어졌다. 또한 Hao 등은 운동성 구균을 분리, 수집하여 동정한 결과, 신종 *Marinococcus* 를 발표하기도 하였다 (Hao et al., 1984).

이들 운동성 구균종 *Sporosarcina*는 일부의 *Bacillus*속 세균과 요소의 분해능, 포자의 형성능 등에 있어 유연관계가 보고 되어 있어, (Silva et al, 1973; Fahmy et al, 1985), 구균으로서는 드물게 운동성을 갖는다는 특징과 함께 세균의 진화학상 극히 흥미 깊은 세균군이다.

최근 분자 생물학의 발전과 더불어 분기년대를 추정하여 보다 정량적으로 생물의 진화를 분자 레벨에서 고찰할 수 있게 되었으며 이러한 대상의 하나인 5S rRNA는 전생물에 공통적으로 존재하며 전생물을 통해 구조상 기능상 커다란 변화가 없고 치환율이 낮고 1차 배열의 결정이 비교적 용이하다는 점에서 분자진화를 논하는데 뛰어난 재료로 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 운동성 구균을 광범위하게 수집하여 생리, 생화학적 성질을 조사하고 퀴논 profile, 세포벽의 아미노산 조성 및 균체 지방산의 분석, DNA의 GC함량의 측정, DNA-DNA hybridization 등 화학 분류학적 방법 (Chemosystematic method)을 이용하여 운동성 구균내의 분류학적 특성을 검토하고 그 결과에 근거하여 5S rRNA 염기배열을 결정하고 계통수를 작성하여 운동성구균 및 간균의 상호 유연 관계 및 분자 진화학상의 위치를 고찰하였다.

생리, 생화학적 성상 및 화학분류학적 특징

공시균주의 형태적, 생리 생화학적 성질의 시험결과, 공시균주는 모두 cross septa를 형성하는 Gram 양성의 구균으로 편모를 갖고 운동성을 나타내었다. 또, *Sporosarcina urea* 및 *Sporosarcina halophila*는 포자를 형성하였다. 일반적으로 생리, 생화학적 활성은 약하며 이용하는 탄수화합물의 종류도 한정적이었다. 식염에 대한 내성도 균종에 따라 다르며 *Sporosarcina halophila* 및 *Marinococcus* 속의 종은 식염농도 5-12%에서 잘 생육하였다. 세포벽의 아미노산 조성은 peptidoglycan을 정제한 후 아미노산까지 가수분해하여 아미노산 자동분석기로 조사하였으며, DNA의 GC함량은 열변성시킨 DNA를 nuclease P1 및 Bacterial alkaline phosphatase를 이용하여 nucleoside로 가수분해하여 HPLC로 분석하였다. 퀴논 profile은 추출 후, TLC에 의해 Quinone 종별로 분리정제 후, HPLC에 의해 isoprenoid chine의 길이를 동정하였다.

그 결과 운동성 구균은 5group으로 분류되었다.

제 1 group(*Planococcus* 속) : 세포벽의 Peptidoglycan은 lysine형으로, 가교 (cross linkage)는 D-Glu, DNA의 GC함량은 40-50%, 주요 quinone 조성은 MK-7 (Menaquinone-7), MK-8(Menaquinone-8)이었다. 제 2 group (*Marinococcus* 속): 호염성 group으로 Peptidoglycan은 m-A2pm 형으로 가교는 direct linkage 이며 GC 함량은 46-48%, Quinone계는 MK-7 이었다. 제 3 group(*Sporosarcina ureae*): 포자를 형성하고, Peptidoglycan은 lysine형으로 가교는 Gly-D-GLU 이었다. GC함량은 40-44%, Quinone은 MK-7이었다. 제 4 group (*Sporosarcina halophila*): 호염성으로 포자를 형성하며 Peptidoglycan 은 ornithine형으로 가교는 D-Asp, GC함량은 40-45%, Quinone계는 MK-7이었다. 제 5 group (*Micrococcus* 속): 세포벽의 Peptidoglycan 은 lysine 형으로 가교는 L-Thr-L-Ala₂ 혹은 L-Thr-L-Ala₂₋₃ 이었다. GC 함량은 64-68%, Quinone계는 MK-8(H₂) 혹은 MK-9(H₂)이었다. 또 균체 지방산은 anteiso-C₁₅ acid가 주요 지방산이었다.

DND-DNA 상동성

운동성 구균 및 관련 세균 42군주에 대해서 Membrane filter 법에 의해 DNA상동성(homology)을 조사하였다. *Micrococcus agilis*를 제외하고, 종내의 상동성은 60-100%이며 상동성은 약간 낮으나 같은 cluster에 들어 homologous한 종임을 나타내었다. 동일 속 간에는 14-20%의 상동치를 보였다. 한편 *Micrococcus agilis*는 생리적 성질 및 균체 지방산 조성을 비롯하여 GC함량, Quinone계가 동일함에도 불구하고 DNA 상동치가 30-100%이상으로 heterogous한 group이어서 금후 더욱 연구가 필요함이 밝혀졌다. *Sporosarcina ureae* 와 *Sporosarcina halophila*는 세포벽의 주요 아미노산의 차에서 나타난 바와같이 DNA 상동치에 있어서도 5% 전후로 별개의 속으로 독립시키는 것이 타당하다. *Planococcus*속, *Sporosarcina*속, *Maninococcus*속은 상호 3-8%, 이들 속과 *Micrococcus*속은 1-3%의 상동치를 나타냈으며, *Sporosarcina ureae*와 *Bacillus pasteurii*는 9-11%의 상동치를 나타내어 이들 group은 DNA level에서 명확히 구별되었다.

5S rRNA 염기배열에 근거한 운동성구균의 분자진화학적 고찰

운동성구균과 관련세균 중에서 대표적인 11균주에 대하여 5S rRNA 염기배열을 결정한 결과, 공시균주의 5S rRNA는 114-120개의 염기로 구성되며, 2차구조는 세균의 5S rRNA의 일반적 구조와 동일하였다. 분자진화계통수는 Kimura(1980)의 식에 의해 그 상위도를 구하여 group average method로 작성하였다. 그 결과, 운동성구균에는 크게 2개의 group이 존재하였다. 즉, *Planococcus*속, *Maninococcus*속, *Sporosarcina*속 및 *Bacillus pasteurii*와같은 중간형의 GC함량을 갖는 group과 *Micrococcus agilis*를 포함하는 높은 GC함량 group으로 대별되었다. *Planococcus*속, *Micrococcus*속은 각각 subcluster를 형성하고, *Bacillus pasteurii*는 다른 *Bacillus*속 세균과 하나의 subcluster를 형성했으며, *Sporosarcina ureae*와 *Sporosarcina halophila*도 다른 하나의 subcluster를 형성하였다. 이와같은 결과는 균종에 따른 5S rRNA의 특이성을 나타내는 것으로, 화학분류학적 정보와 상응하는 것이다. 또 이러한 중간형 GC함량의 구균은 *Bacillus* subcluster와 함께 하나의 cluster를 형성하여 낮은 GC함량의 그람양성 group에 속했다. *Micrococcus* sp. JCM 2588은 *Arthrobacter globiformis*와 대단히 유사한 유연관계를 나타냈으며 GC함량이 높은 group에 속하여 계통적으로 *Planococcus*등과는 다른 진화경로를 거쳤음을 시사했다. 즉, 운동성구균에는 진화적으로 계통이 서로다른 2개의 group이 존재함이 밝혀졌으며, 더우기 운동성구균은 간균과 진화적으로 비교적 근년 분기한 것으로 추정되었다.

결 론

운동성구균의 생리생화학적 성상 및 화학분류학적 성질을 검토하고 그 특징에 근거하여 이 일군의 세균의 진화학상의 위치를 조사하는것을 목적으로하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 생리, 생화학적 성질 및 DNA상동성의 검토에 의하여 운동성 구균의 속 또는 종의 분류를 명확히 하였으며, 5S rRNA 염기배열의 비교결과, 운동성구균은 계통이 서로 다른 2개의 group이 존재하며, 간균과는 진화적으로 비교적 근년 분기한 것으로 판명되었다. 따라서 세균은 간단한 구균으로 부터 진

화했다고 하는 형태적 성질에 근거한 계통수(stanier and Van Niel, 1941)를 부정하는 것이었다. 즉, 세균에 있어 형태적 특징은 진화적으로 큰 의미를 갖지 못하는 것으로 판명되었다. 또한 화학분류학적 정보와 5S rRNA의 염기서열은 일련의 상관관계를 나타내었으며, 그 염기배열은 균종에 따라 특이적이었다. 화학분류학적 방법 및 5S rRNA의 염기배열은 세균의 분류학상의 지표로서 유용하여 금후 이와같은 연구에 의해 계통을 반영한 세균의 분류 및 동정이 가능하리라 사료된다. 운동성 구균은 계통적으로는 다양하였으나 운동성은 이 일군의 세균의 동정에 있어서 유효한 지표(criterion)이다.

Referance

- Adametz, I. (1889): Bakteriologische Untersuchungen über den Reifungsprozess der Kase. Landw, T6. 18:27-270
- Fahmy, F. Mayer, and D. Claus (1985): Endospores of *Sporosarcina halophila* : Characteristics and ultrastruture. Arch. Microbiol. 140:338-342
- Hao, M. V., M. Kocur, and K. Komagata (1984): *Marinococcus* gen. nov., a new genus for motile cocci with mesodiaminopimelic acid in the cell wall: and *Marinococcus albus* sp. nov. and *Marinococcus haliphilus*(Novitsky and Kushner, comb. nov). J. Gen. Appl. Microbiol. 30:449-459
- Hori, H. and S. Osawa (1987): Origin and Evolution of organisms as deduced from 5S ribosomal RNA sequences. Mol. Biol. Evol. 4:445-472
- Komura, I., K. Yamada, and K. Komagata (1975): Taxonomic significance of phospholipid composition in aerobic gram-positive cocci. J. Gen. Microbiol. 21:97-107.
- Leifson, E. (1964): *Micrococcus eucinetus* n. sp., Int. Bull. Bacteriol. Nomen> Taxon. 14:41-44.
- Menge, K. (1892): Über einen *Micrococcus* mit Eigenbewegung, *Micrococcus agilis citreus*. Zbi. Bakt. Anbt. I. 12:49-52.

- Oeding, P. (1971): Serological investigations of *Planococcus* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 21:323-325.
- Park, J. S., H. Hori, and K. Komagata (1988): Nucleotide sequences of 5S ribosomal RNA of *Planococcus citreus*, *Planococcus kocurii* and *Sporosarcina ureae*. *Nuc. Acids Res.* 16:1988
- Schleifer, K. H. and O. Kandler (1970): Amino acid sequence of the murein of *Planococcus* and other Micrococcaceae. *J. Bacteriol.* 103:387-392.
- Silva, J. T., M. P. Lima, A. F. Funseca, and J. C. F. Sousa (1973): In the fine structure of *Sporosarcina ureae* as related to its taxonomic position. *Submicrosc. Cytol.* 5:7-22.
- Stackebrandt, E., et al. (1987): Comparative 16S rRNA oligonucleotide analyses and murin types of round-spore-forming *Bacilli* and non-spore-forming relatives. *J. Gen. Microbiol.* 133:2523-2529.
- Stainer, R.V., and C. B. von Niel (1941): The main outline of bacterial classification. *J. Bacteriol.* 41:437-466.
- Tomaoka, J. and K. Komagata (1984): Determination of DNA base composition by reversed-phase high performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.* 25:125-128.