

□ 원      저 □

# 결핵균 *katG* 유전자내 463 Codon 돌연변이와 Isoniazid내성 관계

대한결핵협회 결핵연구원

박영길 · 심명섭 · 조상현 · 배길한 · 김상재

## The Relationship between Isoniazid Resistance and 463 Codon Mutation of *katG* Gene in *Mycobacterium Tuberculosis*

Young-Kil Park, Myung-Sup Shim, Sang-Hyun Cho, Gill-Han Bai, and Sang-Jae Kim

Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea

= Abstract =

**Background:** The 463 codon mutation of *katG* gene has been reported as an useful marker for the detection of isoniazid(INH) resistant strains of *M. tuberculosis*. This study aimed to elucidate relationship between 463 mutation in *katG* gene and INH resistance in *M. tuberculosis*.

**Method:** DNA was extracted from 28 INH susceptible strains(MIC  $\geq$  0.2 $\mu$ g/ml on the Löwenstein Jensen media) and used for amplification of 189bp fragment containing 463 codon by PCR. Amplified fragments were digested by restriction enzyme *Msp* I, analyzed by single strand conformation polymorphism(SSCP) in the MDE gel and sequenced to prove mutation.

**Result:** Only 7(25%) out of 28 were digestible by restriction enzyme *Msp* I. The SSCP pattern of 21 strains were distinctly different from that of *M. tuberculosis* H37Rv. *Msp* I undigestible PCR fragment was substituted at 463 codon from Arg(CGG) to Leu(CTG).

**Conclusion:** This finding clearly indicate no relationship between 463 codon mutation of the *katG* gene and INH resistance.

**Key Words:** *Mycobacterium tuberculosis*, isoniazid, *katG* gene

### 서      론

고농도 isoniazid(INH)에 대해 내성을 나타내는 균은 catalase-peroxidase 활성을 잃어버린 경우가 많다<sup>1)</sup>. 1992년 Zhang이 이 효소를 생산하는 *katG* 유전자를 분리하였고, 이 유전자에 결실된 균은 INH에 내성을

나타냈다는 사실을 밝혔다<sup>2,3)</sup>. 그리고 1994년 Banerjee 등이 *inhA* 유전자를 찾아내어 이 유전자가 INH와 Ethionamide(ETH)내성과 관련이 있는 것으로 보고하였다<sup>4)</sup>. 이 두 유전자내의 돌연변이가 INH의 내성과 관계가 있을 것으로 생각됨에 따라 이들 유전자내의 돌연변이에 대한 연구가 많이 이루어졌다<sup>5~9)</sup>. 보고에 따르면 *katG* 유전자 내에서 가장 많은 돌연변이를 일으킨

부위는 463 codon인 Arg 이다. 본 연구의 목적은 이 부위의 돌연변이가 INH 내성과 peroxidase 활성화에 영향을 미치는지 관찰하는 것으로서 INH감수성 균주를 대상으로 실시하였다. *katG* 유전자의 463 codon Arg 부위는 제한효소 *Msp* I 으로 절단되므로 돌연변이가 발생하면 제한효소에 의해 절단 되지 않는다. 그러므로 INH 감수성 균주 28주에 대하여 이 부위를 포함하는 지역을 polymerase chain reaction(PCR)을 실시한 다음 제한효소 *Msp* I으로 처리하여 절단되는지 여부를 관찰하였고, single strand conformation polymorphism(SSCP) 실험으로 표준균주와 다른 양상을 나타내는 INH 감수성 균주의 빈도를 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 균주선정

결핵연구원에 검사 의뢰된 인형결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 중 약제 감수성 검사 결과에서 모든 항결핵약제에 대해 감수성인 균주 28주와 표준균주로 *M. tuberculosis* H37Rv를 본 연구에 사용하였다.

사용된 모든 균주가 Löwenstein-Jensen(LJ) 배지 내에서는 INH 0.2 µg/ml 농도에 감수성을 나타내었고 Middlebrook 7H10 agar 배지에서도 INH 0.1 µg/ml 농도에 감수성을 나타내었다.

### 2. Peroxidase 활성화도 측정

결핵균은 catalase와 peroxidase가 하나의 효소인 것으로 알려져 있으므로 본 실험에서는 peroxidase 활성을 관찰하였다. Peroxidase 활성 측정법은 Devi 방법을 수정하여 사용하였다<sup>10,11</sup>. 간단히 설명하면, glass bead와 증류수를 100 µl씩을 가한 1.5ml screwcap tube에 균을 1 loop 취하여 첨가하였다. 얼음에 20분간 두었다가 bead beater로 20초간 진탕하여 균을 파쇄하였다. 즉시 얼음에 5분간 두었다가 원심분리기로 10,000 Xg로 1분간 원침시켰다. 기질인 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(50 mM phosphate buffer, pH 7.0)을 100 µl 첨가하고, 발색제인 o-dianisidine(4 mg/ml)을 100 µl 첨가하였다. 20분간 실온에서 반응 시킨 후 황갈색의 발색 여부를 관찰하였다.

### 3. PCR-SSCP

SSCP 실험을 위하여 사용된 primer는 Rouse가 사용한 것으로 그염기서열은 다음과 같다<sup>7</sup>. *kat* F: 5'-TGG CAGGATCCGGTCCCTGCG-3' *kat* R: 5'-CTGCAG GCGGATGCGACCACC-3' PCR반응 조건은 일반적으로 사용하는 반응액에 96℃에서 DNA를 분리하였고, 70℃에서 annealing과 extension을 시켰다<sup>12</sup>.

본 실험에서 사용한 SSCP 실험은 Cai의 방법을 약간 수정하여 사용하였다<sup>13</sup>. 즉 1.5 ml tube에 PCR산물 15 µl와 buffer(95% formamide, 0.05% bromo-phenol-blue, 0.05% xylene cyanole, 20 mM EDTA) 15 µl 첨가하고, 끓는 물에 10분간 두어 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA를 두께가 1 mm인 MDE gel(AT Bio-chem)에서 0.5X TBE 완충액을 사용하여 100V 전압으로 30시간 이상 전기영동을 실시하였다. 전기영동후 silver stain을 실시하여 SSCP 양상을 관찰하였다.

### 4. 제한효소 *Msp* I 처리

PCR산물을 2% agarose에 전기영동으로 확인한 후 제한효소 *Msp* I 처리를 하였다. 제한효소 처리는 PCR fragment DNA용액 10 µl에 *Msp* I(Promega)를 20U(1 µl), 10× buffer 2 µl, 증류수 7 µl를 첨가한 다음 37℃ 수조에서 5시간 이상 반응 시켰다.

### 5. 염기서열분석

제한효소로 절단되지 않으면서 SSCP 양상도 표준균주와 다른 균주가 많았으므로 이균주의 *katG* 유전자에 돌연변이가 발생했는지 확인하기 위하여 염기서열을 분석하였다. 먼저 PCR산물을 pCR<sup>TM</sup>II vector(Invitrogen)에 삽입하여 대장균에 형질전환시켰다. 형질전환된 균은 ampicillin 75 µg/ml과 X-Gal 40 µg/ml이 함유된 nutrient agar배지에서 선택하여 PCR 실시와 *Eco*RI 처리로 원하는 fragment가 삽입되었는지를 확인하였다. DNA fragment의 염기서열분석은 한국생공의 Top DNA sequencing system을 이용하여 Sanger의 dideoxy termination 방법으로 실시하였다<sup>14</sup>. 염기서열 분석은 자동 DNA 분석기(ABI)를 사용하였고, 염기서열이 밝혀지면 정상적인 *katG* 유전자와 비교하여 돌연

변이 부위를 확인하였다.

## 결 과

### 1. 제한효소 *Msp* I 처리 및 SSCP

제한효소 *Msp* I에 대해 인식되는 *katG* 유전자의 463 codon(Arg, CGG)에 발생하는 돌연변이가 INH 내성 발현과 관련이 있다는 보고가 있어서 본 실험을 통해 이를 재확인 하고자 하였다. INH 감수성 균주 28주를 선정하여 primer *katF*와 *katR*로 PCR을 실시한 결과 예상한 189 bp fragment가 합성되었다. 모든 시험 균주의 PCR 산물을 agarose내에 전기영동으로 확인한 다음 제한효소 처리 또는 SSCP를 실시하였다. PCR 산물을 제한효소 *Msp* I 절단한 결과 7 균주(25%)의 PCR 산물에서는 189 bp가 114 bp와 75 bp로 절단 되었고 나머지(75%)는 절단되지 않았다. 절단되지 않았던 균들의 PCR 산물로 관찰된 SSCP 양상을 *Msp* I으로 절단되었던 것과 비교해 본 결과분명하게 달랐다(Fig. 1). 즉 제한효소로 절단되지 않았던 PCR 산물은 절단되었 것보다 더 많이 이동 되었음을 관찰할 수 있었다.

### 2. 염기서열 분석

제한효소 *Msp* I으로 절단되지 않았으면서 SSCP 양상에서도 표준균주와 다른 균주의 DNA염기서열을 분석한 결과, 463 codon Arg 부위의 CGG가 CTG(Leu)로 치환되어 있었다(Fig. 2). 이러한 염기서열은 이미 여러 연구자들에 의해 보고된 바 있는 내성균주의 돌연변이 염기서열과 일치한다. 따라서 감수성 균주 중에서 463 codon 돌연변이가 발생한 균주가 많다는 사실은 INH 내성과 463 codon 돌연변이와 무관하다는 사실을 말해주고 있다.

### 3. Peroxidase 활성도

463 codon의 돌연변이가 peroxidase활성에 영향을 미치는지를 알아보기 위해 INH감수성인 28주의 peroxidase 활성을 관찰한 바 모두 황갈색을 나타내어 peroxidase를 생산하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 *katG* 유전자의 463 codon에 돌연변이가 발생하여도 peroxidase 활성에 거의 영향을 주지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

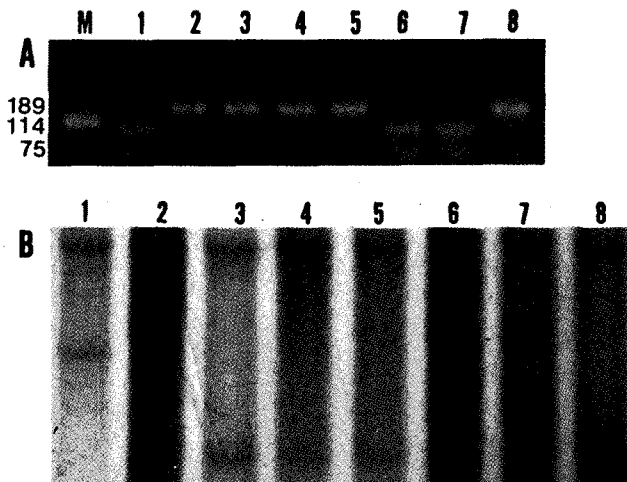


Fig. 1. Characterization of *katG* gene of INH susceptible strains. PCR fragments were digested by restriction enzyme *Msp* I(panel A) and analyzed by SSCP in the MDE gel(panel B). PCR fragments of INH susceptible strains(lane 2-lane 8) were compared with that of *M. tuberculosis* H37Rv(lane 1). 123 bp DNA ladder was used as a size marker(lane M).

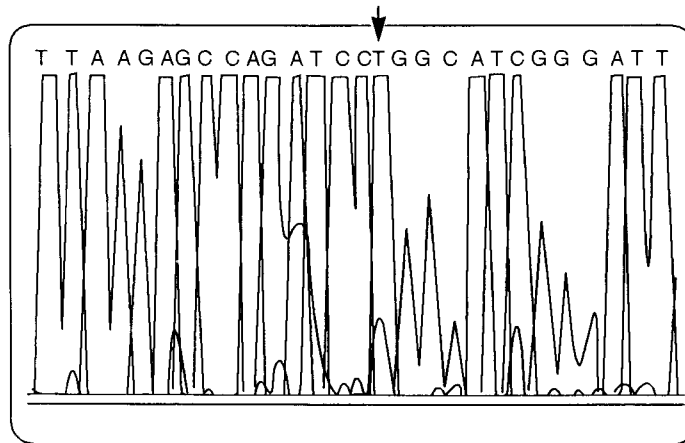


Fig. 2. Sequencing of *Msp* I undigestible PCR fragment of *katG* gene. The 463 codon Arg(CGG) was substituted to Leu(CTG, arrow).

## 고 찰

고농도의 INH에 대해 내성 결핵균 가운데 catalase-peroxidase 활성이 없는 균주가 있다는 사실은 오래 알려졌다<sup>1)</sup>. 따라서 catalase-peroxidase 활성여부와 INH 내성과의 관련에 대한 연구들이 많이 이루어졌다. 1992년 Zhang이 이효소를 생산하는 *katG* 유전자를 발견한 이후 이유전자의 돌연변이에 대하여 집중적으로 탐색이 이루어졌고<sup>2)</sup>, 그 결과 여러곳의 점돌연변이(point mutation)를 비롯하여 삽입 또는 결실 등 여러형태의 돌연변이가 발견 되었다<sup>6)</sup>. 그중 가장 많이 관찰된 돌연변이는 463 codon의 Arg이 Leu으로 치환되는 것이었다.

본 실험에서는 INH 내성균에서 약 40%이상 관찰된다<sup>6)</sup>고 보고 된 463 codon 돌연변이가 INH 감수성 균에서도 나타나는지를 관찰하였다. INH의 내성기준 농도는 0.2  $\mu\text{g/ml}$ 로 알려졌다<sup>15)</sup>. 그러나 INH 0.1  $\mu\text{g/ml}$ 를 함유시킨 7H10 배지에서 감수성을 재확인한 균주로 본 연구에 이용하였다. INH에 내성을 나타내는 요인 중의 하나로 알려졌던 *katG* 유전자의 아미노산 서열 463 codon의 돌연변이는(CGG  $\rightarrow$  CTG), 75%의 감수성 균주에서도 관찰되었다. Uhl 등은 감수성균주 7균주 중에서 1 균주가 이 부위에 돌연변이가 있었다<sup>9)</sup>는

발표보다 훨씬 많은 비율로 관찰되었다. 한편 결핵연구원에 의뢰된 INH 내성균주 중에서 어느정도가 제한 효소 *Msp* I으로 절단되지 않는지를 알아 보기 위하여 실험한 결과 내성균주 53균주 중에서 42균주(79.2%)가 제한효소로 절단되지 않아 한국의 결핵균주는 463 codon 돌연변이가 매우 높은 빈도로 관찰되는 것으로 추정되었다(not published).

*katG* 유전자의 463 codon 돌연변이가 이 유전자의 산물인 peroxidase활성에 영향을 주는지 관찰한 결과 무관하다는 사실을 밝히므로써 INH 내성과의 관계가 없을 뿐 아니라 peroxidase 활성과도 관계가 없음을 알 수 있었다. Stoeckle 등의 보고에 따르면, New York City에서 분리된 균주에서 INH 내성 균주 중 24%만이 *katG* 유전자의 전반부 282 bp내에서 결실을 보였으며 더구나 INH 감수성 균주 중에서도 10%나 이 부위에서 결실을 보였다는 결과<sup>16)</sup>를 보면 *katG* 유전자와 INH 내성과의 연관성에 대해 회의를 갖지 않을 수 없다. 따라서 INH 내성의 분자 유전학적 연구는 *katG* 유전자내 다른 부위 또는 다른 유전자를 대상으로 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

연구배경: 결핵균 *katG*유전자내 463 codon의 돌연

변이는 INH 내성과 관련이 있을 것으로 보고되고 있어서 INH 감수성 균주를 대상으로 *katG* 유전자내 463 codon의 돌연변이 발생빈도를 관찰하여 INH 내성과의 관련성을 밝히고자 하였다.

**방법:** INH 감수성 균주(MIC  $\geq$  0.2  $\mu$ g/ml) 28주를 선정하여 DNA를 추출하여 *katG* 유전자내 463 codon을 포함하는 지역을 PCR로 증폭 합성하였다. PCR산물을 제한효소인 *Msp* I으로 처리하여 절단 여부를 관찰하였고 그리고 SSCP로 표준균주와 차이를 관찰하였다.

**결과:** INH 감수성 균주 28주 중에서 7주(25%)만이 제한효소 *Msp* I에 의해 절단 되었다. 절단되지 않은 21주(75%)는 SSCP에서도 표준균주와 다른 양상을 나타내었다. 제한효소로 절단되지 않은 균주의 *katG* 유전자를 염기서열 분석한 결과 463 codon Arg(CGG)이 Leu(CTG)으로 치환 되어있었다.

**결론:** INH내성에 영향을 줄 것으로 추정 되고있던 *katG* 유전자 463 codon 돌연변이는 INH 내성과 무관한 것으로 판명되었다.

## 참 고 문 헌

- 1) Middelbrook G: Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercule bacilli. Am Rev Tuberc Pulm Dis **69**:471, 1954
- 2) Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S: The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature (London) **358**:591, 1992
- 3) Zhang Y, Garbe T, Young D: Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. Mol Microbiol **8**:521, 1993
- 4) Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, Collins D, Lisle G, Jacobs WR Jr: *inhA*, a Gene Encoding a Target for Isoniazid and Ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science **263**:227, 1994
- 5) Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs WR Jr, van Embden JDA, Grosset JH, Cole ST: Implications of multidrug resistance for the future of short-course chemotherapy of tuberculosis: A molecular study. Lancet **344**:293, 1994
- 6) Morris S, Bai GH, Suffys P, Portillo-Gomez L, Fairchok M, Rouse D: Molecular mechanisms of multiple drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Infect Dis **171**: 954, 1995
- 7) Rouse DA, Morris SL: Molecular mechanisms of Isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. Infect Immun **63**:1427, 1995
- 8) Cockerill III FR, Uhl JR, Temesgen Z, Zhang Y, Stockman L, Roberts GD, Williams DL, Kline BC: Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase(*katG*)gene associated with isoniazid resistance. J Infect Dis **171**:240, 1995
- 9) Uhl JR, Kline B, Abukhader L, Zhang Y, Williams D, Roberts G, Stockman L, Cockerill III F: Association of two point mutation in the catalase-peroxidase(*katG*) gene of *Mycobacterium tuberculosis* with isoniazid resistance. 95th ASM general meeting, Session38. novel antimycobacterial drugs and drug resistance. U-46. 124, 1995
- 10) Devi BG, Shaila MS, Ramakrishnan T, Gopinathan KP: The purification and properties of peroxidase in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its possible role in the mechanism of action of isonicotinic acid hydrazide. J Biochem **149**:187, 1975
- 11) Manchenko GP: Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. CRC press. 92, 1994
- 12) Park YK, Shim MS, Cho SH, Bai GH, Kim SJ: Comparison of various primers to detect *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain

- reaction. J Kor Soc Microbiol **29**:263, 1994
- 13) Cai QQ, Touitou I: Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. Nuc Aci Res **21**:3909, 1993
- 14) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA **74**:5463, 1977
- 15) Rastogi N, David HL: Mode of action of antituberculosis drugs and mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Res Microbiol **144**:133, 1993
- 16) Stoeckle MY, Guan L, Riegler N, Weitzman I, Kreiswirth B, Kornblum J, Laraque F, Riley LW: Catalase-peroxidase gene sequences in isoniazid-sensitive and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* from New York city. J Clin Microbiol **168**:1063, 1993