

탄저균 *pagA* 유전자의 분자적 다양성

김성주 · 조기승 · 최영길¹ · 채영규*

한양대학교 생화학 및 분자생물학과, ¹한양대학교 생명과학과

탄저(anthrax)는 그람양성이고 포자형성 세균인 탄저균(*Bacillus anthracis*)으로부터 발병되어진다. 탄저독소는 세 가지 요소로 구성되어 있으며, 방어항원(PA)은 숙주세포 표면에서 탄저 독소단백질 및 이중단백질을 세포질 내로 이동시키는 역할을 한다. 본 연구에서는 PA의 분자적 다양성과 국내에서 탄저균의 진화를 이해하고 확인하기 위해 국내에서 발견된 탄저균 4 균주와 기존에 보고된 탄저균 26 균주로부터 2,294 bp의 PA유전자(*pagA*)의 DNA 염기서열을 분석하였다. 탄저균 30 균주로부터 PA유전자의 염기서열을 비교 분석한 결과, 8개 부위에서 돌연변이를 확인하였다. 돌연변이가 일어난 부위에 따라서 탄저균을 10 종류의 PA 유전자형과 4 종류의 PA 표현형으로 구분하였다. 한국 경주에서 분리된 *B. anthracis* BAK는 600번째 아미노산 alanine이 valine으로 바뀌어서 *B. anthracis* ATCC 14185 보다 LF와 PA의 결합 위치를 근접하게 하였다. 탄저균의 *pag*의 염기서열을 통한 계통분석학적인 분석 결과는 염색체상에서의 분류와 일치하여 탄저균사이에서 pXO1 플라스미드의 수평적인 이동은 없는 것으로 사료된다.

Key words □ *Bacillus anthracis*, protective antigen, molecular diversity

탄저(anthrax)는 그람양성 세균인 탄저균(*Bacillus anthracis*)으로부터 생성된 독소에서 기인하며, 독소는 poly-D-glutamic acid capsule, edema toxin 및 lethal toxin 등으로 구성되어 있다(19, 20). 이중 부종을 일으키는 edema toxin은 edema factor (EF)와 protective antigen (PA)으로 구성되어 있고(8), lethal toxin은 lethal factor (LF)와 PA로 구성되어 있다(4). 즉, PA는 EF나 LF와 결합하기 위하여 수용체로 작용하며, EF 혹은 LF를 위한 공통적인 수용체 부위를 가지고 있다(15).

탄저균의 분자적 다양성은 발견되어지는 대상이나 지리적 여건에 관계없이 거의 차이가 없는 것으로 알려져 있다(3,6,8). 탄저균들 간에 유전형의 차이를 밝혀내는 것은 발병학적인 분포, 전염병학적인 문제, 탄저균의 변이, 그리고 생물지리학적인 연구에 적용할 수 있다(9,16). 16S RNA 염기서열분석과 16S와 23S rDNAs 또는 *gyrA*와 *gyrB* 유전자 사이의 염기서열 분석을 통하여 탄저균의 DNA의 분자적 분석이 이루어졌다(5). 1995년 Henderson 등(6)은 18종의 제한효소를 이용한 밴드양상과, arbitrary primer (8~10 bp)를 이용한 PCR을 통하여 *Bacillus*속에서 탄저균 35 균주를 분류하였다.

1999년 Liang과 Yu(11)는 중국에서 84종의 탄저균을 분리하여 variable number tandem repeat (VNTR) 분석을 시도하였다. Smith (16)는 남아프리카공화국에서 VNTR 분석을 통해 탄저균을 2가지 형태로 분석하였다. 이러한 분석은 탄저균의 염색체 상에서 얻어진 DNA의 차이를 확인한 것이다. Price 등(14)은 1997년 Keim 등(8)이 AFLP DNA marker를 이용한 변이 연구에서 얻어진 결과를 토대로 탄저균의 염색체의 변이와 플라스미드 변

이와의 연관 관계를 밝히고자 *pagA* 유전자의 DNA 염기서열을 분석하여 탄저균을 계통분류학적으로 분류하였다. 연구 결과, 탄저균에서 염색체 변이가 일어난 균주와 pXO1 플라스미드의 *pagA* 유전자에서 변이가 발생한 균주와는 연관 관계가 있었다. 이러한 결과를 통해 병원성 요인인 pXO1 플라스미드의 탄저균들에서 수평적 이동은 없다고 보고하였다.

본 연구에서는 국내 홍성과 경주에서 각각 분리한 *B. anthracis* BAK와 *B. anthracis* BAH, 그리고 *B. anthracis* ATCC14185와 *B. anthracis* ATCC14578의 *pagA* 유전자의 DNA 염기서열을 밝히고, 기존에 보고된 국외의 *pagA* 유전자 DNA 염기 및 아미노산 서열 등과 비교 분석함으로써 국내에서 발견되어진 탄저균에서의 변이를 확인하고자 하였다. 또한 얻어진 *pagA*의 염기서열을 통하여 탄저균을 계통분류학적으로 분석하고자 하였으며, *pagA*의 변이를 토대로 탄저균을 유전자형과 표현형으로 분류하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양방법

탄저균의 *pagA* 다양성 분석에 사용한 균주는 한국 경주와 홍성에서 발견된 탄저균(BAK와 BAH)과, *B. anthracis* ATCC14185, *B. anthracis* ATCC14578, 등은 수의과학검역원(VRI, RDA, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 일반적인 탄저균의 배양조건은 조 등(2)이 사용한 방법에 따라 brain heart infusion (BHI, Difco Co.) 배지와 한천평판배지에 접종하고 37°C에서 18~20시간 진탕(100 rpm) 또는 정체 배양하였다.

탄저균의 total DNA의 추출

*To whom correspondence should be addressed.
Tel : 031-400-5513, Fax : 031-406-6316
E-mail : ygchai@email.hanyang.ac.kr

pagA 유전자를 얻기 위한 탄저균의 total DNA 분리는 Hunter의 방법(7)을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 각각의 *B. anthracis* 균주를 10 ml의 BHI 배지에 접종하여 37°C에서 20시간 동안 배양하였다. 배양액을 4°C에서 5,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후, TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)로 2회 세척하였다. 얻어진 균체에 10 mg의 lysozyme을 포함한 10 ml의 TE buffer를 넣고 완전히 용균이 될 때까지 30°C에서 처리하였다. 용균된 용액에 1 ml의 20% SDS를 넣고 서서히 혼합한 다음 1.5 ml의 5 M NaCl과 10 ml의 페놀을 넣고 20분 동안 상온에서 서서히 흔들여 준 후, 7,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 취하여 동량의 chloroform을 넣고 10분 동안 서서히 흔들여 준 다음, 상층액을 멸균된 50 ml의 시험관에 옮긴 후 동량의 isopropanol을 넣었다. 이를 상온에서 5분 정도 방치한 후, 두 층 사이에 형성된 염색체 DNA를 감아 올렸다. 얻어진 DNA를 건조 후, 소량의 TE buffer에 녹인 다음 RNase(20 µg/ml)를 넣고 50°C에서 1시간 반응시키고 protease K(100 µg/ml), NaCl (100 mM)과 SDS (0.4%)를 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 위의 페놀 처리 이후 과정부터 TE buffer로 녹이는 과정까지 반복한 후, 260 nm의 흡광도를 측정하여 DNA 농도를 정량하였다.

Oligonucleotide primer의 합성

Oligonucleotide primer는 pXO1 플라스미드 염기서열의 *pagA* 유전자(GenBank accession No. M22598)를 대상으로 ClonTech 회사의 프로그램(primer detective Ver. 1.01)을 사용하여 고안하였다. 필요한 primer는 제노텍(GenoTech, Korea)에 의뢰하여 합성하였다. 사용된 각각의 primer의 염기서열의 upstream은 5'-GAAGTTAAACAGGAGAAC-3', downstream은 5'-TTATCCTATCTCATAGCCTTT-3'이었다. 얻어진 primer 염기서열은 BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)을 이용하여 순수하게 각각의 원하는 DNA 절편만을 얻을 수 있는 가를 검증하였다.

pagA DNA의 증합효소연쇄반응

pagA 유전자를 얻기 위한 PCR 반응액의 최종량은 25 µl로 하고 ExTaq DNA 증합효소(Takara Co.)와 주형 DNA를 제외한 PCR 반응액(25 pmol 각각의 primer, 0.2 mM dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 3 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100)은 사전에 준비하고 분주하여 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다. 분주된 PCR 용액에 1U ExTaq DNA 증합효소와 주형 DNA로 50 ng의 주형 DNA를 넣고, 대조균은 주형 DNA가 없는 증류수만을 각각 넣은 후, DNA thermal cycler TC-1 (Perkin-Elmer Co.)을 사용하여 증합효소연쇄반응을 수행하였다.

PCR 반응조건은 94°C에서 5 분간 가열한 후, 94°C에서 20 초, 58°C에서 40 초, 72°C에서 1분 30초 동안 반응을 25 회 반복시키고 최종적으로 72°C에서 8 분간 반응시켰다. PCR 산물의 확인은 Tris-acetate (TAE) 완충액을 사용하여 1.5% agarose gel 전기영동을 행한 후, 관찰하였다.

pagA 유전자의 염기서열 결정

확인되어진 PCR 산물은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Co.)를 이용하여 정제한 후, (주)Solgent에 의뢰하여 분석하였다. 염기서열분석은 capillary방식의 ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Perkin-Elmer Co.)를 사용하였으며 분석에 사용된 sequencing kit는 ddNTP 에 형광물질 lable방식인 Bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit를 사용하였으며, 반응조건은 PCR reaction; 96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분(25 cycle)로 하였다. 반응 후, sequencing 반응에 참여하지 않는 형광물질로 lable된 ddNTP 제거는 DyeEX kit (QIAGEN Co.)를 사용하였다.

계통분류학적 분석

유전자 염기서열 분석에 의하여 얻은 염기서열은 BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)을 이용하여 기존에 밝혀진 염기서열과 비교 분석하였다. 계통분류학적인 분석(cladistic analysis)은 Multalin version 5.4.1 (copyright I.N.R.A., France) 프로그램을 이용하였다.

단백질 3차 구조의 분석

얻어진 염기서열결과는 Multalin version 5.4.1 프로그램을 이용하여 아미노산 염기서열을 결정한 후 비교 분석하였고, PA의 단백질 3차 구조는 이미 밝혀져 있는 NCBI Entrez 3D database (MMDB no. 6980) (13)를 이용하여 분석하였다.

결 과

염기서열 결정 및 분석

탄저균의 *pagA* 유전자를 이용하여 탄저균들의 유전적 변이와 다양성을 조사하고자 하였다. 한국에서 발견된 *B. anthracis* BAK와 *B. anthracis* BAH 그리고 *B. anthracis* ATCC14185 및 *B. anthracis* ATCC14578의 *pagA* 유전자의 DNA 염기서열을 분석한 후(Fig. 1), BLAST 프로그램을 사용하여 기존에 밝혀진 염기서열과 비교 분석하였다(Fig. 2). 그리고 Price 등(14)이 분석하여 얻은 *pagA* 유전자 염기서열과 비교하여 유전적 변이를 분석하였다. 분석시 표준 염기서열로 사용한 것은 탄저균 pXO1의 *pag* 전체 유전자 염기서열(21)을 나타낸 NCBI Entrez (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez>) accession no. M22589를 이용하였으며, 염기서열 변이를 표시한 번호는 이를 근거로 하였다(Table 1). 얻어진 결과는 *B. anthracis* BAK의 *pagA* 유전자는 1891(G⇒C), 1998(C⇒T) 및 3602((C⇒T)번째 염기에 변이가 나타났고, *B. anthracis* BAH는 변이가 나타나지 않았다. *B. anthracis* ATCC14185는 변이를 보이지 않았으나 *B. anthracis* ATCC14578은 3602((C⇒T)번째 염기에 변이가 나타났다(Table 1). 변이가 일어난 빈도는 1998(21/30), 3602(20/30)번째 염기에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과를 분석하였을 때 탄저균 PA유전자에 있어 domain 1에서 1 부위, domain 2에서 1부위, domain 3에서 5 부위에 변이가 일어난 것으로 나타났고, HAR(highly antigenic region)에서 1부위에 변이가 일어난 것으로 나타났다(Fig. 3).

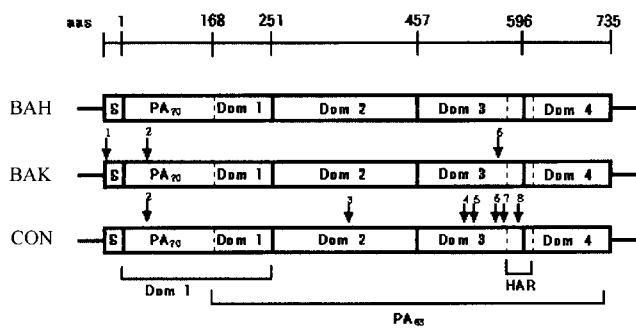


Fig. 3. Mutation of *pagA* from *B. anthracis* BAK and *B. anthracis* BAH. *pagA* is cleaved by a furin-like protease into PA₂₀ (a 20 kDa N-terminal fragment of PA) and PA₆₃ (a 63 kDa C-terminal fragment of PA). S, region of gene that codes for cleaved signal region; vertical arrows, mutations (1~9, described in Table 1); HAR, highly antigenic region important to LF binding (12,13); aas, amino acid sequence (amino acid positions are based on the 735 amino acid sequence PA from Sterne strain, accession no. 2914135); Dom, domain; CON is taken from Price *et al.* (14).

아미노산서열 결정 및 분석

B. anthracis BAK와 *B. anthracis* BAH 그리고 *B. anthracis* ATCC14185 및 *B. anthracis* ATCC14578의 *pagA* 유전자의 DNA 염기서열(Fig. 1)과 아미노산 분석을 한 결과, *B. anthracis* BAK에서 *pagA*의 아미노산서열(NCBI Entrez, accession no. P13423)의 30번(Glu⇒Gln), 600번(Ala⇒Val) 아미노산에서 그리고 *B. anthracis* ATCC14578는 600번(Ala⇒Val) 아미노산에서 변이가 확인되었다(Table 1). 특히, Price 등(14)의 결과에서 나타나듯 *B. anthracis* BAK와 *B. anthracis* ATCC14578에서 PA단백질과 LF단백질이 결합하는 중요한 부위인 domain 3에서 600번째 아미노산인 Ala이 Val으로 대체됨으로써 HAR 부위와 약 19.0 Å 정도 접근하도록 하는 것으로 나타났다(13).

유전자형(genotype)에 의한 protective antigen의 분류

Table 2에서 보여진 결과처럼 *pagA* 유전자에서 변이가 일어난 염기서열을 토대로 10가지 그룹으로 *pagA*의 유전자형을 결정하여 탄저균을 분류하였다. 즉 *pagA*에서 변이가 일어난 8 부위(Fig. 3)를 중복이 되지 않게 배열하여 분류하였다(Table 2). *B. anthracis* BAK는 group IX, *B. anthracis* BAH는 group I 그리고 *B. anthracis* ATCC14578은 group X으로 기존의 Price 등(14)에 의해서 분류된 유전자형과 일치하지는 않았으나, *B. anthracis* ATCC14185는 genotype group I과 일치하였다(Table 2).

표현형(phenotype)에 의한 protective antigen의 분류

Table 1에서 보여진 변이가 일어난 8 부위 중 다양한 탄저균에서 변이가 나타난 4, 5, 6번째 염기서열부위의 아미노산을 기준으로 *pagA*에서의 표현형을 결정하여 탄저균을 분류하였다. 즉, 변이 빈도수가 높은 4, 5, 6번째의 변이 염기를 아미노산으로 나타낸 후, 아미노산을 한 개 글자로 표기하여 3개의 아미노산을 가지고 표현형을 나타냈다. *B. anthracis* BAK와 *B. anthracis* ATCC14578은 FPV, 그리고 *B. anthracis* BAH와 *B. anthracis* ATCC14185는 FPA로 나타났다. Price 등(14)의 결과와 본 실험의 결과로 FPA는 6/30, FPV는 14/30 그리고 FSV는 3/30의 빈도수로 나타났다(Table 2).

계통발생학적 분석(cladistic analysis)

탄저균의 계통발생학적 분석을 위하여 본 실험에서 얻은 *B. anthracis* BAK, *B. anthracis* BAH, *B. anthracis* ATCC14185 및 *B. anthracis* ATCC14578의 *pagA* 유전자 염기서열(Fig. 1)과 기존의 NCBI GenBank database의 AF268967, AF306783, AF306782, AF306781, AF306780, AF306779 및 AF306778에 보고된 *B. anthracis*의 *pagA* 유전자의 염기서열(자료생략)은 Multalin version 5.4.1 프로그램을 사용하여 분석하였다(Fig. 2). 그리고 AF306783, AF306781, AF306780 및 AF306779는 Price

Table 2. PA genotypes and phenotypes identified in this study

| PA genotype | PA phenotype ^a | Genotypic frequency ^d | Mutation ^b | | | | | | | |
|-------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------|---|---|------|------|------|---|---|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| I | FPA | 6/30 | G | C | G | T(F) | C(P) | C(A) | T | A |
| II | FPA | 1/30 | G | C | G | T(F) | C(P) | C(A) | C | A |
| III | FPA | 2/30 | G | T | A | T(F) | C(P) | C(A) | T | A |
| IV | FPA | 1/30 | G | T | G | T(F) | C(P) | C(A) | T | A |
| V | FPV | 14/30 | G | T | G | T(F) | C(P) | T(V) | T | A |
| VI | FSV | 3/30 | G | T | - | C(L) | T(S) | T(V) | T | A |
| VII | LPA | NA ^c | - | - | - | T(F) | C(P) | C(A) | T | A |
| VIII | FPA | NA | - | - | G | T(F) | C(P) | C(A) | T | G |
| IX | FPV | 1/30 | C | T | G | T(F) | C(P) | T(V) | T | A |
| X | FPV | 1/30 | G | C | G | T(F) | C(P) | T(V) | T | A |

^aDesignated by the single-letter designation of the three amino acids shown to vary.

^bDescribed in Table 1.

^cNA, not applicable

^dTotal frequency contains Price *et al.*'s(14) data and those of this study.

Table 3. Classification of *Bacillus anthracis* strains

| Strain | Geographic origin or description | Diversity group ^a | PA genotype ^b | PA phenotype ^c | Source |
|-----------|----------------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| BA0052 | Jamaica | Sterne-Ames | I | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1087 | Scotland | Sterne-Ames | I | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| J611 | Indonesia | Sterne-Ames | I | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1031 | South Africa | Sterne-Ames | I | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1043 | South Africa | Sterne-Ames | I | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| 28 | Ohio | Sterne-Ames | II | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| MOZ-3 | Mozambique | Southern Africa | III | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1035 | South Africa | Southern Africa | III | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| 33 | South Africa | Southern Africa | IV | FPA | Price <i>et al.</i> (14) |
| A24 | Slovakia | Southern Africa | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| K20 | South Africa(Kruger) | Kruger | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| 26/05/94 | Zambia | Kruger | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1033 | South Africa | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1017 | Haiti | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1015 | Maryland | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| 93-194C | Canada | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| 93-195C-8 | Canada | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1040 | Colorado | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1007 | Iowa | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| 2/6 | Turkey | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| Pak-2 | Pakistan | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| STI-1 | Russian vaccine strain | WNA | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| F-1 | South Korea | Vollum | V | FPV | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1024 | Ireland | Vollum | VI | FSV | Price <i>et al.</i> (14) |
| ASC-3 | United Kingdom | Vollum | VI | FSV | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA1009 | Pakistan | Vollum | VI | FSV | Price <i>et al.</i> (14) |
| BA14185 | ATCC | - | I | FPA | This study |
| BA14578 | ATCC | - | X | FPV | This study |
| BAK | South Korea | - | IX | FPV | This study |
| BAH | South Korea | - | I | FPA | This study |

^aDiversity designations are consistent with those described by Keim *et al.* (1997).

^bDescribed in Table 2.

^cDesignated by the single-letter designations of the three amino acids shown to vary in this study.

WNA, Western North America

등(14)이 탄저균의 다양성 분석에 사용한 *B. anthracis* BA1024, 33, BA1035 및 28 균주의 *pagA* 유전자 염기서열을 비교하였다 (Table 3).

계통발생학적으로 *B. anthracis* ATCC14185와 *B. anthracis* BAH는 매우 근접되어 있어 유사성이 높으며, *B. anthracis* 28과 *B. anthracis* ATCC14578과도 근접한 것으로 나타났다. *B. anthracis* BAK는 *B. anthracis* BA1024와 근접한 것으로 결과가 나타났다(Fig. 4).

고 찰

탄저균 PA의 변이와 단백질을 암호화하고 있는 유전자의 변이에 대한 연구는 탄저균의 병원성과 진화를 이해하는데 있어 중

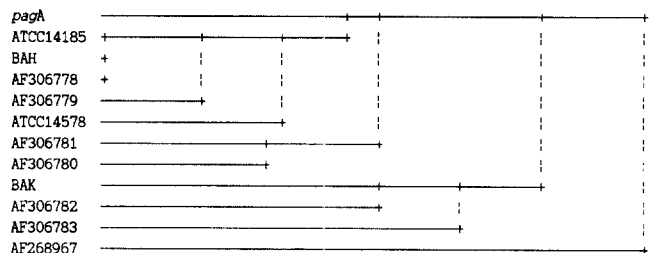


Fig. 4. Comparison of the DNA sequence for protective antigen. AF268967, AF306783, AF306782, AF306781, AF306780, AF306779 and AF306778 are based on the *pagA* sequence from known strains, NCBI database accession number; BAH, *B. anthracis* isolated in Hongsung; BAK, *B. anthracis* isolated in Kyeongju; ATCC14185 and ATCC14578, ATCC catalog number for *B. anthracis*.

요하다.

본 연구에서는 Price 등(14)의 연구 결과를 근거로 하여 한국에서 발견된 *B. anthracis* BAK와 *B. anthracis* BAH 그리고 *B. anthracis* ATCC14185 및 *B. anthracis* ATCC14578의 2,294 bp의 *pag* 유전자의 DNA 염기서열을 분석한 후, 기존의 밝혀진 탄저균 26 균주와 비교 분석하여 표현형과 유전자형으로 탄저균을 분류하였다.

탄저균 30 균주로부터 8 종류의 점돌연변이(point mutation)가 분석되었고, 이들은 4 종류의 missense mutation과 4 종류의 silent mutation이 일어난 것으로 확인되었다(Table 1). Missense mutation은 대부분 LF 결합부위와 highly antigenic region (HAR) 가까이 위치하였다(Fig. 3). 1996년 Little 등(12)은 단클론항체 연구에서 PA 아미노산 Ile-581과 Asn-601 사이의 epitope 이 저해(blocking)되어질 경우에 PA와 LF가 효과적으로 결합하지 못한다고 보고하였는데, 이 부위에서 missense mutation이 주로 일어났다(Fig. 3). 이 부분의 돌연변이는 탄저균의 병원성에 영향을 줄 것으로 사료되어진다. *B. anthracis* BAK의 경우 *pag* 유전자 3062번째 염기의 점돌연변이가 발생하여 아미노산 600번째의 alanine이 valine으로 변화되었는데, 이러한 구조적 변화로 인해 숙주 내에서 LF와 PA의 결합에 영향을 주는 것으로 보인다(12,14). *B. anthracis* BAH는 type strain인 *B. anthracis* ATCC14185와 비교하여 변이가 없는 것으로 분석되었다. Price 등(14)이 한국에서 분리한 *B. anthracis* F-1의 *pag* 유전자 3496번째 염기에서 점돌연변이(C → T)는 PA 아미노산 566번째의 proline을 serine으로 바꾸어 missense mutation이 일어났다(Table 3). 이 균주에서처럼 단백질 접힘(folding)에 밀접하게 관련되어진 소수성 아미노산인 proline이 친수성 아미노산인 serine으로 missense mutation이 일어난 균주는 PA단백질의 domain 3의 3차 구조에 영향을 줄 것으로 생각된다(18).

탄저균의 계통분석학적인 분석 결과는 국내에서 발견되어진 *B. anthracis* BAK와 *B. anthracis* BAH의 *pagA* 유전자 DNA 염기서열은 동일하지 않았다. 이러한 결과는 *B. anthracis* BAK와 *B. anthracis* BAH 염색체 DNA의 RAPD 분석으로 두 균주의 DNA 밴드 양상의 차이가 있음을 밝힌 것(1)과 비교하였을 경우, 국내에서 발견되어진 탄저균에서 pXO1 플라스미드의 수평적인 이동은 없는 것으로 생각된다. 즉, *B. anthracis* BAK와 *B. anthracis* BAH 두 균주의 RAPD 분석을 통하여 genomic DNA의 차이를 확인하였고, 이들 균주의 pXO1에서 *pagA*의 변이를 밝힌 것은 현재까지 발견된 지역에 상관없이 가장 분자생물학적 변이가 없는 것으로 알려진 탄저균에서 변이가 확인한 것이고, 탄저균 간의 플라스미드의 이동은 없다고 판단된다. 더욱이 탄저균 병원성 요소 중 가장 중요하다고 알려진 PA에서의 변이는 서로 간의 병원성 차이를 나타낼 것으로 사료된다.

B. anthracis BAK, *B. anthracis* BAH 및 *B. anthracis* F-1은 missense mutation으로 인해 서로 다른 PA 단백질 구조를 가졌다(Table 3). 이러한 탄저균 PA의 변이 분석은 탄저균 PA에서 missense mutation이 나타난 아미노산과 *pag* 유전자에서 점돌연변이가 일어난 부위를 기준으로 표현형 및 유전자형으로 탄저균을 분류하는 것이 가능하다고 판단하였다. 탄저균을 표현형으로

분류하였을 경우, Price 등(14)의 결과와 같은 4 그룹으로 나타났고, FPA(9/30)에서 FPV(16/30)보다 FSV(3/30)으로 변이가 5배 이상 적은 빈도로 발생하였으며(Table 2), 유전자형은 10 그룹으로 Price 등(14)의 8 그룹보다 많이 분류되었다. 이 결과는 탄저균을 다른 종(species)으로부터 분류시 이용한 16S와 23S rDNA 염기서열 분석(5)과 arbitrary primer를 이용한 PCR과는 탄저균 분류에서 차이가 있으며, Smith 등(17)이 VNTR 분석으로 탄저균을 2 그룹으로 나눈 것 보다 다양하게 탄저균을 분류할 수 있다고 판단된다.

참고문헌

1. 박경현. 1999. 한국에서 분리한 탄저균의 분자적 다양성 연구. 한양대학교 박사학위논문.
2. 조성근, 박정문, 권준현, 최영길, 채영규. 1996. 탄저균 galactose-N-acetylglucosamine 다당류에 대한 단일클론 항체의 생성 및 특성. 대한미생물학회지. 31, 405-411.
3. Anderson, G.L., J.M. Simchok, and K.H. Wilson. 1996. Identification of a region of genetic variability among *Bacillus anthracis* strains and related species. *J. Bacteriol.* 178, 377-384.
4. Bragg, T.S. and D.L. Wilson. 1989. Nucleotide sequence and analysis of the lethal factor gene (*lef*) from *Bacillus anthracis*. *Gene*. 81, 45-54.
5. Harrell, L.J., G.L. Andersen, and K.H. Wilson. 1995. Genetic variability of *Bacillus anthracis* and related species. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1847-1850.
6. Henderson, I., D. Yu, and P.C.B. Turnbull. 1995. Differentiation of *Bacillus anthracis* and other '*Bacillus cereus* group' bacteria using IS231-derived sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 113-118.
7. Hunter, I.A. 1985. Gene cloning in *Streptomyces*. In Glover D.M. (ed.), *DNA Cloning*. Vol. II. p. 19-44, IRL Press Ltd. England.
8. Keim, P., A. Kalif, J. Schupp, K. Hill, S.E. Travis, K. Richmond, D.M.M. Adair, D.M.C.R. Hugh-Jones, Kuske, and P. Jackson. 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J. Bacteriol.* 179, 818-824.
9. Keim, P., A.M. Klevytska, L.B. Price, J.M. Schupp, Zinser, G., Smith, K.L., M.E. Hugh-Jones, R. Okinaka, K.K. Hill, and P.J., Jackson. 1999. Molecular diversity in *Bacillus anthracis*. *J. Appl. Microbiol.* 87, 215-217.
10. Leppla, S.H. 1988. Production and purification of anthrax toxin. *Methods Enzymol.* 165, 103-116.
11. Liang, X. and D. Yu. 1999. Identification of *Bacillus anthracis* strains in China. *J. Appl. Microbiol.* 87, 200-203.
12. Little, S.F., J.M. Novak, J.R. Lowe, S.H. Leppla, Y. Singh, K.R. Klimpel, B.C. Lidgerding, and A.M. Friedlander. 1996. Characterization of lethal factor binding and cell receptor binding domains of protective antigen of *Bacillus anthracis* using monoclonal antibodies. *Microbiology.* 142, 707-715.
13. Petosa, C., R.J. Collier, K.R. Klimpel, S.H. Leppla, and R.C. Lidgerding. 1997. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. *Nature.* 385, 833-838.
14. Price, L.B., M. Hugh-Jones, P.J. Jackson, and P. Protein. 1999. Genetic diversity in the protective antigen gene of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 181, 2358-62.
15. Singh, Y., K.R. Klimpel, N. Arora, M. Sharma, and S.H. Leppla. 1994. The chymotrypsin-sensitive site, FFD315, in anthrax toxin

- protective antigen is required for translocation of lethal factor. *J. Biol. Chem.* 269, 29039-29046.
16. Smith, H. 2000. Discovery of the anthrax toxin: the beginning of *in vivo* studies on pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* 8, 199-200.
 17. Smith, K.L., V. De, H.B. Bryden, M.E. Hugh-Jones, A. Klevytska, L.B. Price, P. Keim, and D.T. Scholl. 1999. Meso-scale ecology of anthrax in southern Africa: a pilot study of diversity and clustering. *J. Appl. Microbiol.* 87, 204-207.
 18. Stryer, L. 1995. Biochemistry, W. H. *Freeman and Company New York*, 4th. Ed. 421-433.
 19. Turnbull, P.C.B., R. Bohm, O. Cosivi, M. Doganay, M.E. Hugh-Jones, D.D. Joshi, M. K. Lalitha, and V. de Vos. 1998. Guidelines for the surveillance and control of anthrax in Human and Animals. *WHO/EMC/ZDI* 3rd Ed.
 20. Uchida, I., J.M. Hornung, C.B. Thorne, K.R. Klimpel, and S.H. Leppla. 1993. Cloning and characterization of a gene whose product is a trans-activator of anthrax toxin synthesis. *J. Bacteriol.* 175, 5329-5338.
 21. Welkos, S.L., J.R. Lowe, F. Eden-McCutchan, M. Vodkin, S.H. Leppla, and J.J. Schmidt. 1988. Sequence and analysis of the DNA encoding protective antigen of *Bacillus anthracis*. *Gene* 69, 287-300.

(Received February 27, 2001/Accepted March 8, 2001)

ABSTRACT: Molecular Diversity of *pagA* Gene from *Bacillus anthracis*

Seong-Joo Kim, Key-Sung Cho, Yong-Keel, Choi¹, and Young-Gyu Chai*(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hanyang University, 1271, Sa-1 Dong, Ansan 425-791, ¹Department of Biology, Hanyang University, Haengdang-dong, Sungdong-gu, Seoul 133-791, Korea)

Bacillus anthracis is a gram-positive spore-forming bacterium that causes the disease anthrax. The anthrax toxin contains three components, including the protective antigen (PA), which binds to eucaryotic cell surface receptors and mediates the transport of toxins into the cell. In this study, the entire 2,294-nucleotide protective antigen gene (*pag*) was sequenced from 4 of *B. anthracis* strains to identify potential variation in the toxin and to further our understanding of *B. anthracis* evolution in Korea. Sequence alignment of the entire PA gene from 30 strains representative of the four *B. anthracis* diversity groups revealed mutations. The mutation of *B. anthracis* BAK are located adjacent to a highly antigenic region crossing the junction between PA domains 3 and 4 shown to be critical to LF binding. The different mutational combinations observed in this study give rise to 11 PA genotypes and 4 PA phenotypes. Three-dimensional analysis of all the amino acid changes (Ala to Val) observed in *B. anthracis* BAK indicated that these changes are not only close sequentially but also very close in three-dimensional space to the antigenic region important for LF binding. Phylogenetic (cladistic) analysis of the *pag* corresponded with previous strain grouping based on chromosomal variation, suggesting that plasmid evolution in *B. anthracis* has occurred with little or no horizontal transfer between the different strains.