

국내에서 분리된 다제 내성 결핵균의 *katG* 와 *inhA* 변이 다양성 및 그 빈도

¹서울대학교 의과대학 미생물학교실 및 암연구소, ²의학연구원 감염병연구소, ³서울대학병원 임상의학연구소,
⁴대한결핵협회 결핵연구원
림해화¹, 김희연¹, 윤여준¹, 박찬근¹, 김범준^{1,2,3}, 박영길⁴, 국윤호^{1,2,3}

Mutations of *katG* and *inhA* in MDR *M. tuberculosis*

Hai Hua Lin, M.D.¹, Hee-Youn Kim, M.D.¹, Yeo-Jun Yun, M.D.¹, Chan Geun Park, M.D.¹, Bum-Joon Kim, M.D.^{1,2,3},
Young-Gil Park, M.D.⁴, Yoon-Hoh Kook, M.D.^{1,2,3}

¹Department of Microbiology and Cancer Research Institute, ²Institute of Endemic Diseases, SNUMRC, Seoul National University College of Medicine, and ³Clinical Research Institute, Seoul National University Hospital, Seoul, Korea, ⁴The Korean Institute of Tuberculosis, The Korean National Tuberculosis Association, Korea

Backgrounds: Mutations of *katG* and *inhA* (ORF and promoter) are known to be related to isoniazid (INH) resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Because reports on these mutations in Korean isolates are limited (i.e. only the frequency of *katG* codon 463 was evaluated.), we tried to know the kinds of mutations of two genes and their frequencies in INH resistant Korean *M. tuberculosis* strains.

Methods: PCR was performed to amplify *katG* (2,223 bp), *inhA* ORF (-77~897, 975 bp), and *inhA* promoter (-168~80, 248 bp) from 29 multidrug resistant *M. tuberculosis* (MDR-TB) DNAs prepared by bead beater-phenol method. Their sequences were determined and analyzed by ABI PRISM 3730 XL Analyzer and MegAlign package program, respectively.

Results: All of the isolates had more than one mutation in *katG* or *inhA* gene. Twenty seven (93%) of 29 tested strains had *katG* mutations, which suggests that *katG* is a critical gene determining INH resistance of *M. tuberculosis*. Amino acid substitutions, such as Arg463Leu and Ser315Thr, due to point mutations of the *katG* were the most frequent (62.1% and 55.2%) mutations. In addition, deletion of the *katG* gene was frequently observed (17.2%). Analyzed Korean MDR-TB isolates also had variable *inhA* mutations. Point mutation of *inhA* promoter region, such as -15 (C→T) was frequently found. Substitution of amino acid (Lys8Asn) due to point mutation (AAA→AAC) of *inhA* ORF was found in 1 isolate. Interestingly, 14 point mutated types that were not previously reported were newly found. While four types resulted in amino acid change, the others were silent mutations.

Conclusions: Although it is not clear that the relationship of these newly found mutations with INH resistance, they show marked diversity in Korean MDR-TB strains. It also suggests their feasibility as a molecular target to supplement determining the INH resistance of clinical isolates because of the possible existence of low-level INH resistant strains. (*Tuberc Respir Dis* 2007; 63: 128-138)

Key Words: *M. tuberculosis*, MDR-TB, INH, *katG*, *inhA*, Mutation.

서론

알려진 바로는 전 세계 61억 인구 중 약 20억 명이 결핵균에 이미 감염되어 있고, 매년 전 세계 인구의 약 1%가 새로 결핵균에 감염되어 결핵 감염자군으로 유입되는 상태에 있다고 한다. 또한 이들 감염자 중에

서 매년 7-8백만 명 이상이 신환자로 새롭게 발생하고, 2백만 명 이상의 환자가 결핵으로 사망한다고 알려져 있다¹. 한국은 현재 17만 명에 이르는 활동성 결핵 환자가 있고, 해마다 2만 명 이상의 도말양성인 신환자가 발생하며 사망자도 한 해 3천 명 이상이 발생하고 있어서, 결핵이 여전히 매우 중요한 보건 문제의 하나로 남아있다².

Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB)는 결핵 치료에 가장 기본적인 약제인 isoniazid(INH)와 rifampin(RFP)을 포함하여 2가지 이상 항결핵제에 내성인 결핵균을 말한다³. 세계적으로 MDR-TB에 감염된 사람은 5,000만 내외일 것으로 추정하며⁴, 2002년 보고 된 바로는 2.3% 정도로 추산

Address for correspondence: **Yoon-Hoh Kook, MD, Ph.D.**
Department of Microbiology, Seoul National University
College of Medicine, Yongon-dong, Chongno-gu, Seoul,
110-799, Korea
Phone: 82-2-740-8306, Fax: 82-2-743-0881
E-mail: yhkook@sun.ac.kr
Received: Jul. 9. 2007
Accepted: Jul. 26. 2007

하였다⁷. INH 내성은 주로 *katG*의 특정 부위(47-58% 빈도)와 *inhA*의 특정 부위(21-24% 빈도)의 변이와 관련 된다고 알려져 있다. *M. tuberculosis*의 *KatG*는 KatG 즉, catalase-peroxidase를 부호화하여 비활성 INH를 활성화 INH로 전환시킨다⁸. Zhang 등은 많은 INH 내성 MDR-TB 분리주들의 catalase 활성이 낮아졌다는 것을 발견하였으며, 그 중에서 고도 내성 (MIC>50 ug/ml)인 분리주는 catalase 음성, 즉 *katG* 결실이 있다는 것을 발견하였다⁹. 이어 *katG*를 INH에 내성인 *M. smegmatis* 유전자에 접합시켜 INH 감수성(8-32 ug/ml)을 얻음으로써 *katG*가 MDR-TB의 INH 내성과 연관성이 있음을 입증하였다^{9,10}. *katG* 완전결실 발생률은 INH 내성 임상 분리주의 20% 이내이며, 대부분의 INH 내성 임상 분리주는 여전히 *katG*를 갖고 있는데 이는 MDR-TB INH 내성 기전 중, *katG* 완전결실 외에도, 기타 변화가 있다는 것을 의미하는 것이다. 최근 보고에 의하면, MDR-TB의 INH 내성 원인으로는 *katG* 점 돌연변이가 완전결실보다 더 흔하며, 그 가운데서 코돈 463(CGG→CTG)의 점 돌연변이가 가장 빈번하다고 한다^{11,12}. 한편, Banerjee 등은 INH의 표적 유전자로서 *inhA*를 제시하고 *inhA*의 Ser94Ala 변이에 의한 INH 내성을 증명한 바 있다¹³. 활성화 된 INH의 중요한 표적은 InhA 즉, NADH-dependent enoyl-ACP reductase로서 *inhA*가 부호화 하며¹⁴, *inhA* open reading frame(ORF)^{13,15-17} 혹은 *inhA* promoter¹⁶⁻²² 변이가 INH 내성과 관련된다 는 것이다. 또한 PCR-SSCP로 INH 내성 결핵균주의 약 78%에서 *katG*와 *inhA*의 결실 혹은 점 돌연변이가 발견됨을 확인한 보고도 있었으며²³, 기타 산화억제 작용을 하는 환원효소인 alkyl hydroperoxide reductase를 부호화 하는 *ahpC*^{24,25}, *kasA*(ketoacyl-ACP synthetase)와 *ndh*(NADH dehydrogenase) 등도 INH 내성과 연관이 있다고 발표된 바 있다^{26,27}.

국내에서도 MDR-TB의 INH 내성 관련 유전자에 대한 연구보고가 있었다^{5,6}. 그러나 국내의 높은 결핵 감염률과 항결핵제 내성균 발현율 등 제반 여건을 고려할 때, 이들 유전자의 다양한 변이가 있을 것으로 예상됨에도 불구하고, 이 보고들은 외국에서 이미 확인된 유전자의 특정 부위의 변이여부에 대한 연구결

과들이었다. 따라서 본 연구에서는 국내 임상검체로부터 배양-동정된 다제 내성 결핵균의 *katG*와 *inhA* ORF의 전체 염기서열 및 *inhA* promoter의 부분 염기서열을 확인하여, 아직도 비교적 높은 항결핵제 내성률을 보이는 국내 분리 균주들이 갖는 각 유전자 변이의 다양성과 그 빈도를 분석하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 균 주

2004년 1월과 2월 사이에 대한결핵협회 결핵연구원 에서 약제감수성 검사결과, MDR-TB로 판명된(전부 INH 내성균주) 결핵균 29주를 제공받아 사용하였다.

2. 핵산 추출 및 종합효소 연쇄반응

배양균주의 핵산 추출은 bead beater-phenol 추출법을 이용하였다²⁸. 2.0 ml의 screw-cap microcentrifuge tube에 각 배양균을 200 ul TEN 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl; pH 8.0)에 부유시키고 200 ul glass beads(직경, 0.1 mm; Biospec Products; Bartlesville, Okla)와 200 ul phenol-chloroform-isopropyl alcohol(50:49:1)을 넣어 Mini-Bead Beater(Biospec Products)로 1 분간 진탕한 후, 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 하였다. 상층액을 깨끗한 새 tube에 옮기고 냉각 에탄올 250 ul와 3M sodium acetate 10 ul를 넣고, -70°C에 10분간 방치하였다가 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. DNA 침전물은 70% 에탄올로 세정하고 말린 후, 60 ul TE 완충액(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0)에 용해시켜 핵산증폭의 주형으로 이용하였다.

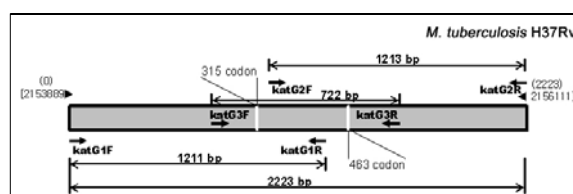


Figure 1. Location of the primers on the *katG* gene

Table 1. Primers used for the amplification of *katG* and *inhA* DNA

Target	Primers (5'→3')	Nucleotides within target	Product size(bp)	Annealing temperature(°C)	Tm (°C)	Reference
<i>katG</i>	katG1F, GTGCCGAGCAACACCCACC *	1~20	1211	60	65.5	(31)
	katG1R, CAATTCCTCGGGGTGTTCCAGC *	1211~1190			64	
	katG2F, CGGCTACGAGTGGGAGCTGACG *	1011~1032	1213	60	67.7	
	katG2R, TCAGCGCACGTGGAACCTGTC *	2223~2202			63.7	
	katG3F, CTTTCGGTAAGACCAATGGCG	812~832	722	60	59.8	
	katG3R, GTCGGGGTCGTTGACCTCCCA	1533~1513			65.7	
<i>inhA</i>	inhA1F, GCGAGCTATATCTCCGGTGCG *	-78~-58	975	60	63.7	(26)
	inhA1R, TAAGTTCTCCAGGAACGGCC *	897~877			61.8	
	inhA2F, ATGACAGGACTGCTGGACGG *	1~20	810	60	61.4	
	inhA2R, CTAGAGCAATTGGGTGTGCG *	810~791			59.4	
	inhA3F, GAACTCGACGTGCAAAAC	184~201	207	50	53.7	
	inhA3R, CATCGAAGCATACGAATA	390~373			49.1	
	inhA4F, CCTCGCTGCCAGAAAGGGA	-168~-149 (mabA)	248	65	63.4	
	inhA4R, ATCCCCGGTTTCTCCGGT	80~61 (mabA)			63.4	

*The primer coordinates refer to the positions in the *M. tuberculosis* H37Rv genome (GenBank accession number, NC 000962).

1) *katG* 유전자 증폭

① 2,223 bp인 *katG*를 두 부분으로 나누어 증폭하였다(Figure 1). 앞부분은 *M. tuberculosis* H37Rv 염기서열(GenBank accession number, NC 000962, *katG*)을 기준으로 1~20번째 염기부위(katG1F)와 1211~1190번째 염기부위(katG1R)를 primer로 사용하였고, 뒷부분은 1011~1032번째 염기부위(katG2F)와 2223~2202번째 염기부위(katG2R)를 primer로 사용하였다(Table 1). 총 20 ul의 반응액에 50 ng 핵산과 10 pmol의 각 primer(Genotech, Daejeon, Korea)를 PCR premix(Bioneer, Daejeon, Korea)에 첨가하여 PCR을 시행하였다(95°C, 5분간 변성; 95°C, 30초; 60°C, 30초; 72°C, 45초; 35회, 최종 신장은 72°C, 5분).

② 증폭산물이 없는 검체는 *M. tuberculosis* H37Rv 염기서열(GenBank accession number, NC 000962, *katG*)에 근거하여 812~832번째 염기부위(katG3F)와 1533~1513번째 염기부위 (katG3R)를 primer로 사용하여 추가 PCR을 수행하여 완전결실 여부를 최종적으로 확인하였다(Table 1). 총 20 ul의 반응액에 50 ng 핵산과 10 pmol의 각 primer(Genotech, Daejeon, Korea)를 PCR premix(Bioneer, Seoul, Korea)에 첨가하여 시행하였다(95°C, 5분간 변성; 95°C, 30초; 60°C, 30초; 72°C, 45초; 35회, 최종 신장은 72°C, 5분). 모든

PCR 산물은 1% 아가로즈 겔에서 100 V로 25분간 전기영동 하여 확인하였다.

2) *inhA* 유전자 증폭

inhA ORF 전체 부위와 *inhA* promoter 부분적 부위를 증폭하였다. *inhA* ORF를 증폭하기 위하여 유전자 바깥 부위를 primer를 사용하여 증폭하였고, 이때 증폭되지 않는 검체만 다시 *inhA* ORF 앞뒤 부분을 참고하여 만든 다른 primer들로 증폭하였다(Figure 2).

(1) *inhA* ORF 유전자 증폭

① *M. tuberculosis* H37Rv 염기서열(GenBank accession number, NC 000962, *inhA*)을 기준으로 -77~-57 번째 염기부위 (inhA1F)와 897~877 번째

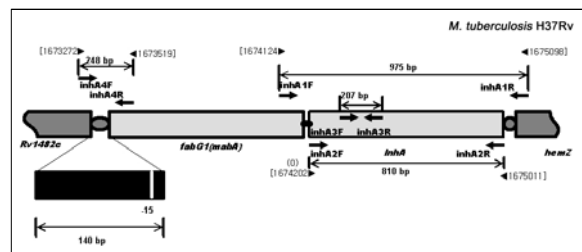


Figure 2. Location of the primers on the *inhA* gene

염기부위(inhA1R)를 primer로 사용하였다(Table 1). 총 20 ul의 반응액에 50 ng 핵산과 10 pmol의 각 primer(Genotech, Daejeon, Korea)를 PCR premix (Bioneer, Seoul, Korea)에 첨가하여 PCR을 시행하였다(95°C, 5분 변성; 95°C, 30초; 60°C, 30초; 72°C, 45초; 35회, 최종 신장은 72°C, 5분).

② 상술한 *inhA* 증폭과정에서 증폭산물이 없었던 검체는 *M. tuberculosis* H37Rv 염기서열(GenBank accession number, NC 000962, *inhA*)을 기준으로 1~20번째 염기부위(inhA2F)와 810~791번째 염기부위 (inhA2R)를 primer로 하는 추가 PCR를 시행하여 위음성 여부를 최종적으로 확인하였다(Table 1). 총 20 ul의 반응액에 50 ng 핵산과 10 pmol의 각 primer (Genotech, Daejeon, Korea)를 PCR premix(Bioneer, Seoul, Korea)에 첨가하여 PCR을 시행하였다(95°C, 5분 변성; 95°C, 30초; 60°C, 30초; 72°C, 45초; 35회, 최종 신장은 72°C, 5분).

③ 상술 증폭과정에서 증폭산물이 없었던 검체는 다시 *M. tuberculosis* H37Rv 염기서열(GenBank accession number, NC 000962, *inhA*)을 기준으로 184~201번째 염기부위(inhA3F)와 390~373 번째 염기부위(inhA3R)를 primer로 하는 추가 PCR를 진행하여 확인하였다(Table 1)²⁵. 총 20 ul의 반응액에 50 ng 핵산과 10 pmol의 각 primer(Genotech, Daejeon, Korea)를 PCR premix(Bioneer, Seoul, Korea)에 첨가하여 PCR을 시행하였다 (95°C, 5분 변성; 95°C, 30초; 50°C, 30초; 72°C, 45초; 35회, 최종 신장은 72°C, 5분).

(2) *inhA* promoter 부분적 유전자 증폭

M. tuberculosis H37Rv 염기서열(GenBank accession number, NC 000962, Rv1482c와 *mabA*)을 기준으로 -168~-149번째 염기부위 (inhA4F)와 80~61번째 염기부위(inhA4R)를 primer로 사용하였다(Table 1)²². 총 20 ul의 반응액에 50 ng 핵산과 10 pmol의 각 primer(Genotech, Daejeon, Korea)를 PCR premix (Bioneer, Seoul, Korea)에 첨가하여 PCR을 시행하였다(95°C, 5분 변성; 95°C, 30초; 65°C, 30초; 72°C, 45초; 35회, 최종 신장은 72°C, 5분). 모든 PCR 산물은 1.5% 아가로즈 젤에서 100 V로 25 분간 전기영동 하여 확인하였다.

3. 염기서열 결정 및 분석

PCR 산물은 QIAEX II gel extraction kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하고²⁸ ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits(Applied Biosystems)을 이용하여 염기서열을 결정하였다. PTC-225 Peltier Thermal Cycler(MJ Research)를 사용하여 핵산 증폭 반응을 진행하고, 에탄올을 이용하여 반응에 사용되지 않은 dNTP와 반응물을 분리해 내었으며, 정제된 PCR 산물은 3차 증류수에 다시 녹여 ABI PRISM 3730 XL Analyzer로 분석하였다. 염기서열은 MegAlign package (Windows version 3.12e; DNASTAR, Madison, Wis.)의 multiple-alignment algorithm을 이용하여 정렬하였으며, GenBank의 *M. tuberculosis* 표준균주 염기서열과 비교하여 변이 부위를 확인하였다²⁸.

결 과

1. 변이 빈도

사용한 모든 MDR-TB 균주들은 분석 표적인 세 유전자들(*katG*, *inhA* ORF, 및 *inhA* promoter) 중에서 적어도 한 개 유전자 부위에 변이가 있었다. *katG*

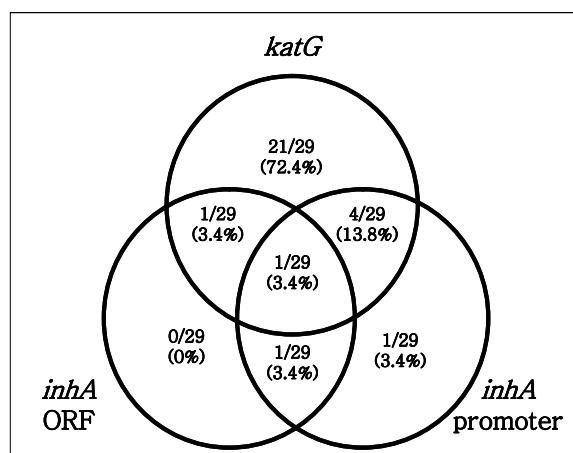


Figure 3. Diagram showing the distribution of mutant strains and their frequencies

의 변이(결실 포함)는 93.1%(27/29)이고, *inhA*(*inhA* ORF와 promoter 포함)의 변이(증폭되지 않은 2개 검체 포함)는 27.6%(8/29)였다. 그 중 *katG* 변이만 있는 경우는 72.4%(21/29)였으며, *inhA* 변이만 가진 경우는 6.9%(2/29)였다. *katG*와 *inhA* 두 부위에 모두 변이가 있는 것은 20.7%(6/29)에 달하였다(Figure 3).

*inhA*의 경우 ORF와 promoter를 구분하여 보면, 7.1%(2/29)가 *katG*와 *inhA* ORF 두 부위에 변이가 있었고, 17.5%(5/29)가 *katG*와 *inhA* promoter 두 부위에 변이가 있었으며, 그 중 한 주는 세 부위에 전부 변이가 있음을 알 수 있었다. *inhA* promoter -15(C→T) 점 돌연 변이가 있는 7개 분리주 중에서 71.4%(5/7)가 *katG*의 결실이 있거나 아미노산 서열 변이가 있었다

(Table 5).

2. *katG* 유전자 변이

katG PCR(1~2,223 nucleotide) 결과 실험에 사용한 *M. tuberculosis* 29 주 가운데 8주에서는 증폭되지 않았으며, 추가 증폭과정(812~1,533 nucleotide)에 의해 이들 중 5주 (5/29, 17.2%)는 완전결실임을 확인할 수 있었다(Table 2). 증폭된 24 주 *katG* 염기서열에서는 모두 12곳에서 아미노산 변화를 초래하는 여러 돌연변이들을 확인하였다. 가장 흔한 것은 Arg463Leu 변화를 유발한 CGG→CTG 변이로서 62.1%(18/29)를 차지하였다. 그 다음은, Ser315Thr로 55.2%(16/29)였

Table.2. Results of PCR to amplify *katG*, *inhA* ORF, and *inhA* promoter in Korean multidrug resistant *M. tuberculosis* isolates.

Isolate No.	<i>katG</i>			<i>inhA</i> ORF			<i>inhA</i> promoter
	<i>katG</i> 1 1~1211*	<i>katG</i> 2 1011~2223*	<i>katG</i> 3 812~1533*	<i>inhA</i> 1 -77~-897*	<i>inhA</i> 2 1~810*	<i>inhA</i> 3 184~390*	<i>inhA</i> 4 -168~80*
1	+	+		+			+
2	-	-	-	-	-	-	+
3	+	+		+			+
4	+	+		+			+
5	+	+		+			+
6	+	+		+			+
7	+	+		+			+
8	+	+		+			+
9	+	+		+			+
10	+	+		+			+
11	+	+		+			+
12	+	+		-	+		+
13	+	+		+			+
14	+	+		-	+		+
15	-	-	+	+			+
16	+	+		-	+		+
17	-	-	+	+			+
18	-	-	-	-	-	-	+
19	+	+		-	+		+
20	+	+		-	+		+
21	+	+		+			+
22	-	-	-	-	+		+
23	+	+		+			+
24	+	+		+			+
25	-	-	-	+			+
26	-	-	+	+			+
27	+	+		+			+
28	+	+		+			+
29	-	-	-	+			+

*Number of nucleotides in each gene.

는데, AGC→ACC 점 돌연변이는 51.7%(15/29)이고, AGC→ACA 점 돌연변이는 3.4%(1/29)였다. 그 외의 코돈에서 발견된 점 돌연변이들로는 코돈 140(AGC→AGA), 191(TGG→CGG), 238(AAC→AAG), 295(CAG→CCG), 372(GGC→AGC), 444(GCG→ACG), 462(ATC→ACC), 502(CAA→CAT), 551(GCC→GGC) 등이 있었으며, 이들은 각각 아미노산 변화를 초래하였다(Table 6). 한편, 코돈 98(TAC→TGC), 378(CTG→TTG), 560(GGC→GGG), 611(CTC→CTT) 등에서 점 돌연변이가 각각 하나씩 있었지만 이들은 모두 아미노산 변화가 없는 침묵 돌연변이였다(Table 3).

이 *katG* 변이들 가운데 아미노산 변이를 초래하는 9개 코돈(140, 191, 238, 295, 372, 444, 462, 502, 551)의 점 돌연변이 및 4개 코돈(98, 378, 560, 611)의 침묵 돌연변이 등, 13종류의 변이들은 본 연구를 통해 처음

확인된 것들이다.

3. *inhA* ORF 유전자 변이

inhA 의 ORF(810 bp)를 증폭한 결과, 총 29주 중에서 8주는 증폭되지 않았다. 이들의 전체 *inhA* 부위(1~810 nucleotide)를 직접 증폭한 결과 6주에서는 증폭 되었지만 나머지 2주는 역시 증폭되지 않았다. 이 2주는 추가 증폭과정(184~390 nucleotide)에서도 증폭산물이 없었다. 증폭된 *inhA* DNA 염기서열들을 확인한 결과, 26주(89.7%)는 변이가 없었으나, 1주(3.4%)는 24(A→C) 변이 즉, 아미노산 서열로는 Lys 8Asn(AAA→AAC) 변화를 나타냈다(Table 4). 이 변이는 *inhA* ORF 부위에서 이전에는 보고된 적 없는 것이다.

Table 3. The mutations found in the *katG* of Korean multidrug resistant *M. tuberculosis* isolates.

Isolate No.	codon 463	codon 315			codon 140	codon 191	codon 238	codon 295	codon 372	codon 444	codon 462	codon 502	codon 551	codon 98	codon 378	codon 560	codon 611	DEL*
	CGG→CTG	AGC→ACC	AGC→ACA	AGC→AGA	TGG→C GG	AAC→A AG	CAG→C CG	GGC→A GC	GCG→A CG	ATC→ACC	CAA→CAT	GCC→G GC	TAC→T GC	CTG→T TG	GGC→G GG	CTC→C TT		
	Arg463 Leu	Ser315 Thr	Ser315 Thr	Ser140 Arg	Trp191A rg	Asn238L ys	Gln295P ro	Gly372S er	Ala444T hr	Ile462T hr	Gln502 His	Ala551G ly	N	N	N	N		
1		+		+														
2																		+
3	+	+																
4	+		+															
5	+	+					+											
6	+	+																
7	+	+																
8		+																
9		+																
10	+	+																
11	+																	
12					+								+			+	+	
13	+	+																
14	+																	
15	+								+		+	+						
16									wild type									
17	+	+																
18																		+
19															+			
20	+							+										
21	+	+																
22																		+
23	+	+																
24	+	+																
25																		+
26	+								+									
27	+	+																
28	+	+																
29																		+
% of strains with mutation	62.1%	51.7%	3.4%		3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	3.4%	17.2%

*Deletion.

Table 4. The mutations found in the *inhA* of Korean multidrug resistant *M. tuberculosis* isolates

Isolate No.	<i>inhA</i> ORF		<i>inhA</i> promoter		
	Nucleotide No. 24 (A→C)	NA* WT†	Nucleotide No. -15 (C→T)	WT	WT
1				+	+
2		+			+
3				+	+
4				+	+
5				+	+
6				+	+
7				+	+
8				+	+
9				+	+
10				+	+
11				+	+
12				+	+
13				+	+
14				+	+
15				+	+
16	+			+	+
17				+	+
18		+		+	+
19				+	+
20				+	+
21				+	+
22				+	+
23				+	+
24				+	+
25				+	+
26				+	+
27				+	+
28				+	+
29				+	+
% of strains with mutation	3.4%	6.9 %	89.7 %	24.1%	75.9 %

*Not applicable, † Wild type.

4. *inhA* promoter 유전자 변이

inhA promoter 부위를 증폭한 결과 29주 전부 산물이 있었으며(Table 2), 이 가운데 24.1%(7/29)는 염기 서열 -15 위치 염기의 변이(C→T)가 있었다(Table 4).

고 찰

INH는 1950년대 초부터 항결핵 치료에 사용되기 시작하였으나 얼마 지나지 않아 내성 *M. tuberculosis* 균주가 나타났다. INH의 완전한 활성모드와 내성기전은 지금까지 명확히 밝혀지지 않은 상황이지만 몇 가지 유전자가 관련된 것으로 알려져 있다^{8-27,29}. 이들 중 *katG*는 catalase-peroxidase를 부호화하여, INH 항결핵 작용기전에서 결정적인 역할을 하고²⁹, 특정 부위의 변이가 다른 부위들보다 빈번하게 나타나고 있다는 것이 확인된 바 있다^{19-21,31-34}. 그간 국내 균주들에 대한 INH 내성 관련 유전자 연구 보고가^{5,6} 있었으나, 모두 가장 흔하다는 변이를 확인하는 단계로 그쳤고 국내 분리 균주에서 볼 수 있는 변이 양상과 빈도에 대한 결과가 보고된 것은 없어 이에 대한 자료를 얻고자 본 연구를 시행하였다. 그 결과 사용한 균주의 93.1%(27/29)에서 아미노산 서열상에 변이(결실 포함)가 있음을 확인하였다. 이는 이미 발표된 결과들보다 현저히 높은 빈도이다. 또한 변이 양상도 상당히 다양한 것을 확인하였다. 국내 INH 내성 분리균들도 역시 *katG*의 Arg463Leu와 Ser315Thr 변이가 가장 흔하게 관찰되었다. 그러나 이들의 빈도는 모두 외국의 보고보다 훨씬(>18%) 높았지만, 국내 타 논문 결과와는 비슷한 수준이었다^{5,6,36}. 한편 *katG* 완전결실도 17.2%나 되어 완전결실의 내성 연관성도 무시할 수 없을 것으로 보이며, 또 다른 성과는 *katG*의 9부위에서 새로운 변이(Ser140Arg, Trp191Arg, Asn238Lys, Gln295Pro, Gly372Ser, Ala444Thr, Ile462Thr, Gln502His, Ala551Gly)를 발견한 것이라 할 수 있다(Table 6). 이들은 보고된 적이 없던 것들이나, INH 내성과 직접 연관되어있는가의 여부는 현재로서는 알 수 없고 관련 실험을 추가로 진행하여 확인해야 할 것으로 사료된다.

INH 내성에 관련된 것으로 알려진 또 다른 유전자는 *inhA*가 있다^{13-26,28}. *inhA* ORF 변이는 *katG*와는 달리 특정 부위의 점 돌연변이가 주도적인 역할을 하는 것이 아니라, 전체 유전자 부위에 걸쳐 임의의 부위에 나타나며^{19,20}, Ser94Ala 변이에 의한 INH 내성이

증명된 바 있다¹³. 본 연구에서 분석한 국내 균주들 가운데는 Ser94Ala 변화를 보인 균주는 없었으나 Lys8Asn의 변이가 3.4%에서 발견되었다. 이 변이와 INH 내성의 확실한 연관성을 설명할 수 없고 *inhA* ORF 유전자 변이의 우세 변이 유무는 확인할 수 없었지만, 확실한 것은 6.9%가 *inhA* ORF의 증폭산물이 아예 없을 정도로 사용한 각 primer 부위에 심각한 염기서열 변화가 있음을 짐작할 수 있었다. 한편, *inhA* promoter 부위에서는 -15(C→T) 점 돌연 변이가 24.1%로서 13.5%인 리투아니아³⁵나 4.3%인 스페인³⁶에 비하여 높았다. 이로서 국내 MDR 균주들의 INH 내성과 *inhA* promoter -15(C→T) 점 돌연 변이 사이에 밀접한 연관 가능성을 예상해 볼 수 있었다.

또한 사용한 모든 INH 내성 균주가 *katG* 혹은 *inhA* promoter 부위에 변이가 있었고, *inhA* promoter -15(C→T) 점 돌연변이가 있는 8개 분리주 중에서 71.4%(5/7)가 *katG* 부위의 결실이 있거나 아미노산 서열 변이가 있었던 것으로 미루어보아 INH 내성은 *katG* 혹은 *inhA* promoter 부위의 변이와 확실한 연관성이 있는 듯하며, *katG* 변이와 *inhA* promoter 변이는 동시 발생할 가능성이 높음을 알 수 있다. 그 외, 본 연구에서 새로이 발견한 14 종류의 변이들은 RFP 저 농도 내성균에 드물게 나타나는 *rpoB* 변이가 존재 하듯이³⁸⁻⁴¹, INH 저 농도 내성균에 존재할 가능성이 있으므로 염기서열 분석에 의한 INH 내성 여부 판단에 기존 알려진 변이 외에 보조 자료로 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

요 약

연구배경: INH 내성은 *katG* 와 *inhA*(ORF와 promoter)의 변이에 의한 것으로 알려져 있다. 유전자 변이는 지역적으로 종류와 빈도가 다르게 나타날 수 있는데 기존 국내의 연구보고들은 혼하다고 알려진 *katG*의 463 코돈만을 추적한 것들이었다. 따라서 본 연구는 국내에서 분리된 INH 내성균들의 두 유전자에서 나타날 수 있는 변이의 종류와 빈도를 확인하고자 하였다.

연구방법: 대한결핵협회 결핵연구원에서 MDR-

Table 5. The mutations found in *katG*, *inhA* ORF and *inhA* promoter region in Korean multidrug resistant *M. tuberculosis* isolates

Isolate No.	Amino acid		Nucleotide No.
	<i>katG</i>	<i>inhA</i> ORF	<i>inhA</i> promoter
1	Ser140Arg Ser315Thr	WT	WT
2	DEL*	NA‡	WT
3	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
4	Ser315Thr Arg463Leu Asn238Lys	WT	WT
5	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
6	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
7	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
8	Ser315Thr	WT	WT
9	Ser315Thr	WT	WT
10	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
11	Arg463Leu	WT	WT
12	Trp191Arg Ala551Gly	WT	-15 (C→T)
13	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
14	Arg463Leu Gly372Ser	WT	-15 (C→T)
15	Ile462Thr Arg463Leu Gln502His	WT	-15 (C→T)
16	WT† Ser315Thr	Lys8Asn	-15 (C→T)
17	Arg463Leu	WT	WT
18	DEL	NA	-15 (C→T)
19	WT	WT	-15 (C→T)
20	Gln295Pro Arg463Leu	WT	WT
21	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
22	DEL	WT	WT
23	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
24	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
25	DEL	WT	-15 (C→T)
26	Ala444Thr Arg463Leu	WT	WT
27	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
28	Ser315Thr Arg463Leu	WT	WT
29	DEL	WT	WT
% of strains with mutation	93.10%	10.30%	24.10%

*Deletion, † Wild type, ‡ Not applicable.

Table 6. Mutations newly found in this study

Isolate No.	<i>katG</i>		<i>inhA</i> ORF		<i>inhA</i> promoter
	Codon No.	Amino acid	Nucleotide No.	Amino acid	Nucleotide No.
1	140 (AGC→AGA)	Ser140Arg	WT	WT	WT
	315 (AGC→ACC)	Ser315Thr			
	238 (AAC→AAG)	Asn238Lys			
5	315 (AGC→ACC)	Ser315Thr	WT	WT	WT
	463 (CGG→CTG)	Arg463Leu			
11	98 (TAC→TGC)	WT	WT	WT	WT
	463 (CGG→CTG)	Arg463Leu			
	191 (TGG→CGG)	Trp191Arg			
12	551 (GCC→GGC)	Ala551Gly	WT	WT	-15 (C→T)
	560 (GGC→GGG)	WT			
	611 (CTC→CTT)	WT			
	372 (GGC→AGA)	Gly372Ser			
15	462 (ATC→ACC)	Ile462Thr	WT	WT	-15 (C→T)
	463 (CGG→CTG)	Arg463Leu			
	502 (CAA→CAT)	Gln502His			
16	WT*	WT	24 (A→C)	Lys8Asn	-15 (C→T)
19	378 (CTG→TTG)	WT	WT	WT	-15 (C→T)
20	295 (CAG→CCG)	Gln295Pro	WT	WT	WT
	463 (CGG→CTG)	Arg463Leu			
26	444 (GCG→ACG)	Ala444Thr	WT	WT	WT
	463 (CGG→CTG)	Arg463Leu			

*Wild type.

TB로 판명된 INH 내성 결핵균 29주로부터 bead beater-phenol법으로 DNA를 추출하여 *katG*(2,223 bp), *inhA* ORF(-77~897, 975 bp) 및 *inhA* promoter(-168~80, 248 bp) 염기서열 결정 및 분석은 ABI PRISM 3730 XL Analyzer 및 MegAlign package를 사용하였다.

결 과: 모든 균주들은 분석 표적으로 사용한 세 유전자 부위 중에서 적어도 한 개 이상의 유전자 부위에 변이가 있었다. INH 내성균은 거의 대부분(>93%) *katG*의 변이를 갖고 *inhA* 유전자 변이만 있는 경우는 드물어 INH 내성을 결정하는 중요한 요인은 *katG*의 변이 인 것을 확인할 수 있었다. *katG* 부위에서 Arg463Leu 변이와 Ser315Thr 변이가 높은 빈도 (62.1% 및 55.2%)로 발견되었고, *katG* 완전결실과 *inhA* promoter-15(C→T) 변이도 일정한 빈도로 나타남을 볼 수 있었다. 그 외 *inhA* ORF 변이도 1주에서 1종류의 변이가 발견되었다.

결 론: 기존 연구결과에서는 보고되지 않고 본 연구에서 처음으로 확인된 변이들도 14 종류나 있어서, INH 내성은 주로 *katG* 혹은 일부 *inhA* 특정 부위의 변이가 주도하지만 이들 외에도 다양한 변이가 존재

한다는 것을 알 수 있었다. 이들 새로이 확인된 변이들은 염기서열 분석에 의한 INH 내성 여부 판단 시, 기존 알려진 변이 외에 보조 자료로 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임. (01-PJ10-PG6-01 GIM03-0002)

참 고 문 헌

1. Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA 1999;282:677-86.
2. Bai GH. Anti-tuberculosis drug resistance in Korea. Communicable Diseases Monthly Report 2005;16: 101-7.
3. Crofton J, Chaulet P, Maher D, Grosset J, Harris W, Norman H, et al. Guidelines for the management of

- drug-resistant tuberculosis. Geneva: World Health Organization; 1997.
4. World Health Organization. Anti-tuberculosis drug resistance in the world: the WHO/IUATLD global project on antituberculosis drug resistance surveillance 1994 - 1997. Geneva: World Health Organization; 1997.
 5. Kim SY, Lee JY, Ryu SR, Kim SJ, Bai GH. Rapid diagnosis of isoniazid resistance by detection of mutations in *katG* and *inhA* of *Mycobacterium tuberculosis* in Korea. *J Bacteriol Virol* 1997;32:569-76.
 6. Park YK, Shim MS, Cho SH, Bai GH, Kim SJ. The relationship between isoniazid resistance and 463 codon mutation of *katG* gene in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Respir Dis* 1996;43:8-13.
 7. Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C, Williams BG. Worldwide incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Dis* 2002;185:1197-202.
 8. Morlock GP, Metchock B, Sikes D, Crawford JT, Cooksey RC. *ethA*, *inhA*, and *katG* loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3799-805.
 9. Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase- peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* 1992;358:591-3.
 10. Heym B, Zhang Y, Poulet S, Young D, Cole ST. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 1993;175:4255-9.
 11. O'Brien KL, Dietz HC, Romagnoli M, Eiden J. Evaluation of *inhA* gene and catalase-peroxidase gene among isoniazid-sensitive and resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Mol Cell Probes* 1996; 10:1-6.
 12. Lee AS, Tang LL, Lim IH, Ling ML, Tay L, Wong SY. Lack of clinical significance for the common arginine-to-leucine substitution at codon 463 of the *katG* gene in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *J Infect Dis* 1997;176:1125-7.
 13. Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, et al. *InhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 1994;263:227- 30.
 14. Larsen MH, Vilcheze C, Kremer L, Besra GS, Parsons L, Salfinger M, et al. Overexpression of *inhA*, but not *kasA*, confers resistance to isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium smegmatis*, *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol* 2002;46:453-66.
 15. Basso LA, Zheng R, Musser JM, Jacobs WR, Blanchard JS. Mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: enzymatic characterization of enoyl reductase mutants identified in isoniazid resistant clinical isolates. *J Infect Dis* 1998;178: 769-75.
 16. Kapur V, Li LL, Hamrick MR, Plikaytis BB, Shinnick TM, Telenti A, et al. Rapid *Mycobacterium* species assignment and unambiguous identification of mutations associated with antimicrobial resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:131-8.
 17. Ristow M, Möhlig M, Rifai M, Schatz H, Feldmann K, Pfeiffer A. New isoniazid/ethionamide resistance gene mutation and screening for multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Lancet* 1995;346: 502-3.
 18. Lee H, Cho SN, Bang HE, Lee JH, Bai GH, Kim SJ, et al. Exclusive mutations related to isoniazid and ethionamide resistance among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea. *Int J Lung Dis* 2000;4: 441-7.
 19. 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* 1995; 171:954-60.
 20. Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JD. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and isoniazid-susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis* 1996;173:196-202.
 21. Rouse DA, Li Z, Bai GH, Morris SL. Characterization of the *katG* and *inhA* genes of isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2472-7.
 22. Gonzalez N, Torres MJ, Aznar J, Palomares JC. Molecular analysis of rifampin and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. *Tuber Lung Dis* 1999;79:187-90.
 23. Heym B, Honore N, Truffot-Pernot C, Banerjee A, Schurra C, Jacobs WR, et al. Implications of multi-drug resistance for the future short-course chemotherapy of tuberculosis: a molecular study. *Lancet* 1994;344:293-8.
 24. Rinder H, Thomschke A, Rüsck-Gerdes S, Bretzel G, Feldmann K, Rifai M, et al. Significance of *ahpC* promoter mutations for the prediction of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998;17:508-11.
 25. Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, et al. Mutations in *katG*, *inhA*, and

- ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2003; 41:4471-4.
26. Lee AS, Lim IH, Tang LL, Telenti A, Wong SY. Contribution of *kasA* analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43: 2087-9.
 27. Lee AS, Teo AS, Wong SY. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2157-9.
 28. Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol* 1999;37:1714-20.
 29. Shim TS, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim YW. Isoniazid resistance and the point mutation of codon 463 of *katG* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Korean Med Sci* 1997;12:92-8.
 30. Marttila HJ, Soini H, Huovinen P, Viljanen MK. *katG* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2187-9.
 31. Altamirano M, Marostenmaki J, Wong A, FitzGerald M, Black WA, Smith JA. Mutations in the catalase-*mp*eroxidase gene from isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *J Infect Dis* 1994;169: 1162-5.
 32. Cockerill FR 3rd, Uhl JR, Temesgen Z, Zhang Y, Stockman L, Roberts GD, et al. Rapid identification of a point mutation of the *Mycobacterium tuberculosis* catalase-*per*oxidase (*katG*) gene associated with isoniazid resistance. *J Infect Dis* 1995;171:240-5.
 33. Heym B, Alzari PM, Honore N, Cole ST. Missense mutations in the catalase-*per*oxidase gene, *katG*, are associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 1995;15:235-45.
 34. Rouse DA, Morris SL. Molecular mechanisms of isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun* 1995;63: 1427-33.
 35. Bakonyte D, Baranauskaite A, Cicinaite J, Sosnovskaja A, Stakenas P. Molecular characterization of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Lithuania. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2009-11.
 36. Torres MJ, Criado A, González N, Palomares JC, Aznar J. Rifampin and isoniazid resistance associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Seville, Spain. *Int J Tuberc Lung Dis* 2002;6:160-3.
 37. Pretorius GS, van Helden PD, Sirgel F, Eisenach KD, Victor TC. Mutations in *katG* gene sequences in isoniazid-resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* are rare. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:2276-81.
 38. Bobadilla-del-Valle M, Ponce-de-Leon A, Arenas-Huerta C, Vargas-Alarcon G, Kato-Maeda M, Small PM, et al. *rpoB* gene mutations in rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* identified by polymerase chain reaction single-stranded conformational polymorphism. *Emerg Infect Dis* 2001;7:1010-3.
 39. Moghazeh SL, Pan X, Arain T, Stover CK, Musser JM, Kreiswirth BN. Comparative antimycobacterial activities of rifampin, rifapentine, and KRM-1648 against a collection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates with known *rpoB* mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40: 2655-7.
 40. Williams DL, Spring L, Collins L, Miller LP, Heifets LB, Gangadharam PR, et al. Contribution of *rpoB* mutations to development of rifamycin cross-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1853 - 7.
 41. Bodmer T, Zürcher G, Imboden P, Telenti A. Mutation position and type of substitution in the β -subunit of the RNA polymerase influence in-vitro activity of rifamycins in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother* 1995;35:345-8.