

대단위 염기서열 분석법을 이용한 인체 장내 미생물의 군집 및 기능 분석 기술

Diversity and Functionality Analysis of Human Gut Microbiota
by Massive Sequencing Techniques

남영도 | 전통식품연구단

Young-Do Nam | Traditional Food Research Group

지구상의 생명체 중에서 가장 많은 수를 차지하는 미생물은 바다, 토양과 같은 일반적인 환경뿐만 아니라, 인간이 살수 없는 극지, 심해저 등과 같은 거의 모든 환경에 서식한다. 그 중에서도 인간을 비롯한 동물의 몸속은 미생물이 이용할 수 있는 영양분이 풍부하고 온도 및 pH와 같은 환경 조건이 비교적 일정하게 유지되기 때문에 가장 많은 수의 미생물이 서식하는 환경 중에 하나이다. 사람의 경우 대장만해도 10^{11-12} /ml의 미생물이 존재하고, 인체의 장내에 존재하는 미생물 총수는 한 사람의 전체 cell 수보다 10~20배 정도 많은 것으로 알려져 있다. 또 한 사람의 몸속에는 1,000종 이상의 미생물이 존재하는 것으로 추정되며, 이들 미생물의 전체 genome 크기는 사람의 유전자 크기와 맞먹고, 전체 유전자 수는 사람의 것보다 100배나 많다. 이렇게 다양하고 많은 수의 장내 미생물은 자신이 숙

주로부터 서식할 수 있는 환경을 제공받는 대신에 숙주의 장관 표피세포의 손상을 막아주고 장관세포의 증식을 촉진시키며, 지방 축적을 조절하고 다양한 대사적 특성으로 영양소의 흡수성을 증가시키는 등의 역할을 통해 숙주의 건강을 유지하는데 기여한다. 하지만 반대로 장내 미생물이 인간을 비롯한 숙주 생명체에 다양한 질병원이 되기도 하는데, 최근의 연구들은 장내에 서식하는 미생물의 변화가 암(intestinal cancer)이나 염증성 장질환(inflammatory bowel disease, IBD)¹⁾ 뿐만 아니라, 비만(obesity), 당뇨병(diabetes), 천식(asthma) 등과 같은 다양한 질병의 발생과 밀접한 연관이 있다고 보고하고 있다. 본고에서는 인체의 장내 미생물 구성에 영향을 주는 여러 요인들과 장내 미생물 분석을 위해 사용되는 분자생물학적 방법들, 그리고 최근에 개발된 next generation sequencing(NGS)의 종류와 이를 이

1) 소장이나 대장에 만성적으로 염증이 생겨 설사나 통증 등이 유발되며 암으로 진행되기도 한다. 통상적으로 궤양성 대장염(Ulcerative Colitis, UC)과 크론병(Crohn's Disease, CD)이 이에 해당된다. IBD는 주로 북유럽과 북미 지역에서 호발하는 것으로 알려져 있지만 우리나라에서도 빠른 속도로 발병률이 증가하고 있으며 아직까지 정확한 원인이 밝혀지지 않았지만 자기면역성, 감염성, 유전성, 환경성 및 정신적 요인들이 IBD의 유발원으로 검토되고 있다.

용한 장내 미생물 연구법 등에 대해 기술하고자 한다.

장내 미생물 구성에 영향을 주는 요인들

인체의 장내 미생물은 인간이 태어남과 동시에 장내에 정착되기 시작한다. 모체의 몸속에서 무균 상태에 있던 태아의 장내는 출산 과정을 거쳐 지구 상에 존재하는 수많은 미생물과의 접촉을 통해 점차 다양하고 수많은 미생물로 채워지게 된다. 신생아의 분변 시료에서 확인한 장내 미생물 균총은 모체 질에 존재하는 미생물과 유사한 형태를 보이는 것으로 보아, 신생아 초기의 장내 미생물은 주로 모체에서 유래하는 것으로 생각된다. 이후 신생아가

자라고 생활하는 환경에 존재하는 미생물들은 장내 미생물 균총에 영향을 주는 것으로 보고되고 있다. 인체 장내 미생물 균총은 출산과 동시에 이루어지며 초기에는 비교적 빠른 변화 양상을 보이다가 이유식을 시작할 정도의 시기가 되면 안정기에 접어들게 된다. 이 과정에서 유전형(genotype), 식이(diet), 생균제(probiotics), 항생제(antibiotics), 미생물 간의 상호작용 등의 영향으로 각 개인마다 지문과도 같은 특이적인 장내 미생물 상이 생성된다(그림 1).

유전형(Genotype)

부모에게서 전달된 미생물 군집은 유전자형이라는 요소가 더해짐으로써 더욱 복잡해지는데, 장내에는 면역에 관계된 유전자가 매우 다양하게 발현

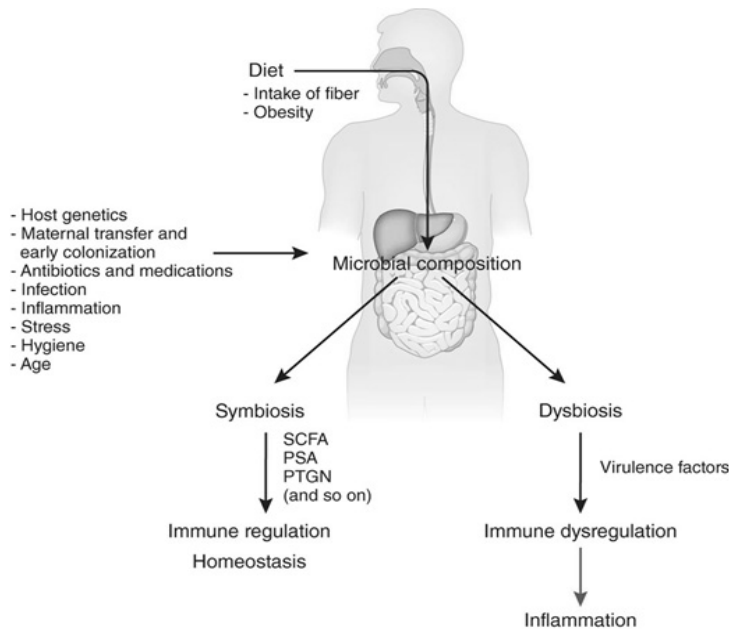


그림 1. 장내 미생물 형성에 영향을 주는 요인들과 장내 미생물이 인체에 미치는 영향. (Maslowski K.M *et al.*, Nature immunology, 12(1), 5-9, 2011)

되기 때문에, 숙주의 유전형질이 장내 미생물의 다양성에 영향을 주는 것으로 생각된다. 우리가 생각하는 것과는 달리 장관 점막은 미생물과 면역체계의 상호작용을 차단하는 것이 아니라 오히려 이 둘 간의 정보(물질) 교류를 돕는다. 또한 숙주의 유전자형은 부착부위와 숙주유래 자원의 가용성을 높여 줌으로써 미생물의 다양성에 영향을 줄 수 있다. 예를 들어 사람과 쥐의 장내에 공생하는 *Bacteroides thetaiotaomicron*의 경우, 성장요소로서의 fucose를 생산하기 위해 장내 표피세포의 도움을 받아 fucosylated glycan의 생성을 조절한다.

식이(Diet)

장내 미생물 군총이 완전히 정착되지 않은 유아의 경우 미생물 군총은 모유나 분유 그리고 고형식의 섭취에 따라 크게 변화할 수 있다고 알려져 있다. 신생아가 섭취하는 모유와 분유는 신생아 장내에 형성되는 초기 미생물을 결정지어 주는데, 모유를 먹은 아이는 *Bifidobacterium*²⁾을 우점으로 하여 *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Lactobacillus* 등의 박테리아 그룹이 장내 군총을 형성하는데 기여하는 반면 분유를 먹은 아이에게선 *Bacteroides*가 초

기에 활발한 증식을 보인다. 식이가 장내 미생물 군총의 변화에 영향을 줄 수 있는 잠정적 요소 중의 하나이지만 동양식과 서양식처럼 폭넓게 구분된 식이는 몇 속 정도의 미생물에 적은 변화만을 유도할 뿐 장내 군총에 큰 변화는 주지 못한다. 반대로 화학적으로 특정한 식이를 섭취하였을 경우에는 미생물 군집에 영향을 주기도 한다. 예를 들면 황산염 복합물을 섭취하였을 경우에는 sulfate-reducing 세균³⁾과 methane 생성 고세균⁴⁾의 성장이 두드러지고, 인슐린과 유사 식이섬유는 비피도박테리아의 성장을 촉진시킨다. 다른 특정한 식이 화합물의 선택적 효과는 아직까지 잘 밝혀지고 있지 않지만, 미생물 군집 변화에 대한 식이의 효과는 크지 않은 것으로 예상된다. 이러한 이유는 장내 미생물들은 다양한 기질을 분해하고 한 기질을 여러 미생물이 경쟁적으로 이용할 수 있어 특정한 대사 특성이 같은 종류의 미생물들(특히 *Firmicutes*⁵⁾)에게서 넓게 나타나기 때문이다.

생균제(Probiotics)

Probiotics는 숙주의 건강에 이로운 영향을 줄 수 있는 생균제로, 사람이나 동물에게 투여 시 장내 미생물

2) *Bifidobacterium*은 액티노박테리아(Phylum *Actinobacteria*)에 속하는 미생물로서 이눌린이나 스타치의 분해자이다. 이 속(genus)에 속하는 미생물은 뮤신 역시 분해시키며 분해 산물로는 락테이트(lactic acid)를 생성하고 생성된 락테이트는 뷰티레이트(butyric acid)로 전환되거나 다른 미생물에 의해 이차 대사된다.

3) Sulfate-reducing 세균은 델타 프로테오박테리아(Phylum delta-proteobacteria)의 다섯 개의 다른 속에서 발견되는데, H⁺를 이용하는 Sulfate-reducing 세균은 두개의 속에서 발견되며, 나머지 세 속은 락테이트와 같은 부분적으로 분해된 물질을 이용하여 황산염을 황화물로 환원시킨다.

4) 고세균은 생물 분류군의 하나로서 1977년 미국의 칼 우즈(Carl R. Woese) 박사가 16S rRNA의 염기서열 비교를 통해 세균과 구분하였다. 일반적으로 고세균은 메탄생성균, 극호염성균, 호열성균, 초고온성균 등과 같이 극한환경에서 발견되는 것이 많지만 일반적인 환경에서도 많은 수가 존재하는 것으로 알려져 있다.

5) 인체의 장내에서 가장 많이 발견되는 미생물 군으로 모든 유산균, *Clostridium*, *Bacillus* 등이 펠미규즈(Phylum *Firmicutes*)에 속한다.

균총이 변화하는 것으로 알려져 있다. Probiotics로 이용하고 있는 여러 종류의 미생물은 대부분 *Bifidobacterium* spp.와 *Lactobacillus* spp.로 요구르트와 같은 발효유에 널리 이용되고 있다. *Lactobacillus casei*는 현재 액상 요구르트의 제조에 가장 많이 사용되는 미생물로 항암효과를 가지고 있으며, 소장 점막에 IgA를 증가시켜 면역력을 강화시킨다. *Lactobacillus acidophilus*는 소장에 잘 정착하는 미생물로 혈중 콜레스테롤 감소, 면역강화 및 변비를 개선하는 기능이 있고 담즙산과 산성에 저항성이 뛰어나며, 항균물질을 생산하므로 유제품을 위한 산업용 probiotics로 가장 많이 사용된다. 과민성대장증후군(irritable bowel syndrome)을 앓고 있는 환자를 대상으로 한 probiotics 실험에서 probiotics를 투여하는 동안에는 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*의 미생물이 장내에서 수적으로 증가하면서 환자의 증상이 호전되는 것이 보고되었으며, probiotics로써 *Streptococcus aureus*를 섭취하면 이 미생물에 의해 다른 유해한 미생물의 장내 균총 형성이 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있다.

항생제(Antibiotics)

항생제 치료는 미생물 군집의 연속성에 큰 영향을 미친다. 페니실린(penicillin)과 세팔로스포린(cephalosporin)과 같은 베타락탐(β -lactam)계 항생제들은 그람 양성세균의 세포벽 생성을 억제시키고, 클로람페니콜(chloramphenicol)은 그람

음성세균의 단백질 합성을 제한하며, 아미노글리코사이드 항생제 중의 하나인 스트렙토마이신(streptomycin)은 그람 양성 음성의 모든 세균에 폭넓게 작용한다. 사람에게 항생제를 투여하게 되면 장내 생태계가 매우 불안정해지는데, 이것은 항생제가 다량의 미생물 군집의 활성을 직접적으로 억제하기 때문이다. 투여된 항생제가 장내 환경의 모든 미생물을 억제하여 생태계를 파괴하는 것이 아니라 일부 특별한 미생물 집단만을 억제하지만, 장내 생태계를 구성하는 미생물 간의 상호작용으로 인하여 다른 미생물의 활성과 구성에도 영향을 주고, 이로써 장내 미생물 간의 균형이 깨지면서 장내 환경이 무너지는 것이다. 이러한 항생제의 영향은 비단 며칠의 짧은 기간 동안만 영향을 주는 것이 아니라 몇 달이나 몇 년에 걸쳐 미생물 군집에 영향을 주게 된다.

미생물 상호작용(Microbial Interaction)

Niche construction 이론⁶⁾에 따르면 미생물 자신이 그 군집의 다양성과 개체 간의 변화에 영향을 끼칠 수 있다고 하였는데, 이는 미생물 간의 상호작용이 자원 경쟁과 더불어 장내 미생물 군집을 결정짓는 요소 중의 하나임을 말한다. 성장요소를 교환하는 등의 미생물 종간 협력은 복잡한 탄수화물이 분해되는 동안에도 나타나며, 복잡한 구조의 복합당류의 순차적인 분해에서도 나타난다. 미생물이 서로의 생장에 도움을 주기도 하지만, 자신의 증식을 위해 다른 미생물의 생장을 방해하기도 한다.

6) 틈새 구성 이론. 유기체는 진화를 통해 주변 환경에 영향을 미치게 되는데, 이는 결국 주변 환경도 함께 진화하게 되는 결과를 가져오게 된다는 이론이다.

이러한 저해 작용으로는 독성물질의 생산과 박테리옌(bacteriocin)⁷⁾과 같은 특별한 항균물질의 생성을 통한 미생물 생장억제가 있다. 박테리옌은 가깝게 연관된 미생물의 생육을 억제시키는 미생물 억제 단백질이지만 넓은 범위에서는 미생물의 생장을 억제시키는 경우도 있다. 박테리옌(박테리옌)(bacteriophage)⁸⁾의 경우에도 인간의 장내에 많은 수가 다양하게 존재하며 그 숙주에 따라 균종이 달라진다.

장내 미생물 연구를 위해 사용되는 분자생물학적 기법

인간을 비롯한 동물의 장관에서 복잡한 생태계를 구성하고 있는 장내 미생물에 대한 연구는 약 130년 전 ‘질병의 원인균 이론(germ theory of disease)’을 제시하였던 루이스 파스퇴르(Lois Pasteur)로부터 시작되었으며 초기에는 agar plate를 이용한 배양법을 기반으로 *Salmonella*나 *E. coli* 등의 병원균 분리를 통한 질병 판별이나 유산균이나 비피더스균을 분리해 probiotics를 개발하는 것에 집중되었다. 하지만 현미경에서 관찰 가능한 대부분의 미생물 중 현재의 배양법으로 분리해 낼 수 있는 미생물은 단 1%에도 미치지 못하기 때문에 배양법에 기반을 둔 장내 미생물 연구는 한계를 가질 수밖에 없었다

(The great plate count anomaly). 따라서 1980년 대부터 모든 미생물에서 가장 보존이 잘 되어 있는 16S rRNA gene을 타겟으로 하는 Fluorescent In Situ Hybridization(FISH), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE), Temperature Gradient Gel Electrophoresis(TGGE), Quantitative PCR(Q-PCR), T-RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), 16S rRNA gene cloning, plasmid profiling 등과 같은 분자생물학적 기법들로 장내 미생물을 연구하게 되었으며 주요 분자생물학적 분석기법들은 표 1에 나타낸 것과 같다.

DGGE

1993년 Muyzer가 복잡한 환경으로부터 미생물의 다양성을 분석하기 위하여 DGGE 기술을 접목시키면서, 환경 생태의 분자적 기술의 중요성이 부각되었다. 이 방법은 다양한 미생물의 16S rDNA를 PCR로 증폭시킨 후 polyacrylamide gels에 한꺼번에 로딩하여 패턴을 분석함으로써 미생물을 분석하는 방법이다. 분석은 전기영동 시 gel 내에 존재하는 Denaturants(변성제; Urea와 Formamide)의 농도구배에 따라 핵산의 이중나선 구조와 변성구조, 즉 염기서열이 가지는 T_m 값의 차이에 의해 핵산의 이동 속도가 달라져 gel의 특정 위치에서 이동을 중단하면서 밴드를 형성하는 원리를 이용한 것

7) 미생물이 생산하는 천연의 항균성 단백질로 기존의 항생제가 2차 대사산물인데 비해 박테리옌은 미생물 자신의 유전자로부터 직접 생합성 되는 것이 특징이다. 주로 자신과 생장 조건이나 이용 영양소가 유사한 미생물의 생장을 억제하는 narrow spectrum을 보인다.

8) 미생물에 감염하는 바이러스로 주로 한 종에 속하는 미생물만을 감염시킬 정도로 그 감염 특이성이 높다. 박테리옌과 미생물에 감염되게 되면 두 가지 경로, 즉 미생물의 DNA안에 잠복해 있는 lysogenic cycle을 택하든지, 아니면 감염 즉시 증식을 시작해 미생물을 죽이고 밖으로 나오는 lytic cycle을 택한다.

표 1. 인체 미생물체(human microbiome) 분석을 위한 분자생물학적 방법 및 특징

Methods	사용목적 및 장점	기술의 한계	정량성	속도	Coverage	경제성
 Cultivation	미생물 분리 및 생리학적 연구 가능	많은 시간 및 노력 요구, 재현성 결여, 최적의 배양조건을 찾기 어려움	*	*	*	*****
 16S rDNA PCR-Cloning	특정 샘플에 대한 미생물 조성 분석에 가장 많이 이용됨. 미배양 미생물에 대한 높은 coverage 미생물 주요 구성원에 대한 정보 제공	PCR biases에 의한 반정량적 분석, 많은 시간 및 sequencing 비용 Sample의 true diversity를 다 반영하지 못할 수 있음	***	**	*****	**
 DGGE/TGGE	16S rDNA PCR을 통한 집단 구성원의 변화 모니터링, 많은 수의 샘플을 동시 비교 가능	PCR biases에 의한 반정량적 분석, 각 구성원 동정을 위해 sequencing 요구	**	***	**	***
 T-RFLP	16S rDNA PCR을 통한 집단 구성원의 빠른 동정과 샘플간의 비교분석 가능. population dynamics 분석 가능	PCR biases, DGGE보다 낮은 resolution, 샘플 내 unknown 미생물은 검출 불가능	***	****	**	****
 FISH	특정 그룹 미생물에 대한 probe 제작 및 반응을 통해 실제 생태계에서 직접 미생물 검출하여 시각화 가능	제작된 probe의 낮은 specificity. gram-positive cell wall의 검출을 위한 최적의 조건 형성 미흡	****	***	****	**
 FCM	일반적으로 FISH법과 함께 이용됨. 특정 종만을 검출 및 분리 가능. 미배양 미생물의 계능 확보 가능	FISH와 같은 단점 존재, 일부 정확하지 못한 cytometry 발생	****	***	****	*
 Q-PCR	특정 그룹 미생물에 대한 specific primer를 이용하여 정량적 PCR. 매우 민감하고 정량적인 분석 가능	각 primer에 대한 정량선 필요, 목표 미생물마다 다른 primer 제작 요구, 별도의 실험 필요함	*****	**	****	**
 Microarray	High-throughput, 최고 10만 개의 probe에 대해 한 번의 반응으로 전체 생태계 분석 가능, 16S rDNA의 기능 유전자 분석 가능	고비용, specific probe 제작의 어려움, 생태계 적용 시 Q-PCR 보다 민감도 감소	****	*****	***	**

(Rittmann BE *et al.*, Nature reviews Microbiology, 6(8), 604-12, 2008)

이다. 미생물 집단의 구성에 관한 좀 더 구체적인 연구를 위해 기존에 알려져 있는 장내 우점종을 대상으로 specific primer를 합성하여 DGGE를 수행하기도 한다. DGGE를 이용한 장내 미생물 분석의 장점은 여러 명의 샘플을 동시에 비교 분석할 수 있고, 시간의 흐름에 따른 복잡한 미생물 집단의 관계를 간단히 모니터링할 수 있다는 점이다. 하지만 타 미생물 그룹에 비해 상대적으로 적은 양이 포함된 미생물 집단은 그만큼 증폭 산물이 적기 때문에 검출에 제한이 있을 수 있으며, PCR bias에 의해 검출된 DGGE의 밴드들이 정량적으로 처리하기 어렵고 (진하다고 해서 더 많은 미생물이 존재함을 나타내지 못함), primer 합성 시 mismatch가 있어 검출에 오류가 있을 수 있는 등의 단점이 있다.

Q-PCR

Q-PCR 기술은 target 미생물의 유전자만을 특이적으로 증폭함으로써, 이 증폭량을 실시간으로 확인하는 기술이다. Q-PCR은 PCR 증폭 시 형광물질 (Ethidium bromide, SYBR green 등)을 같이 넣어 주어 증폭시키면 이들이 증폭된 target의 double strand DNA와 결합하여 강한 형광을 발산하는 원리를 이용한다. 이 방법은 빠른 검출 속도와 형광 인자를 이용한 민감한 검출 방법이며 높은 감도로 증폭이 가능하며 오염률을 줄일 수 있는 장점을 가지기 때문에 샘플에 검출하고자 하는 target이 미량으로 존재하여 FISH나 일반 PCR로 검출하기 어려운 경우라도 사용이 가능하다는 장점이 있다. 하지만 매 PCR당 standard를 만들어 비교해야 하고, 분석하고자 하는 미생물의 종류가 많을 경우 각각의

미생물 그룹마다 특이적인 primer를 실제 검증해야 하기 때문에 많은 양의 샘플을 처리하기에는 많은 시간과 노력이 드는 단점이 있다.

FISH

FISH는 target이 되는 미생물의 DNA나 RNA에 직접 형광물질(Cy3TM, Cy5TM, AMCE 등)이 부착된 probe를 붙여 이들이 발산하는 신호를 검출하여 분석하는 방법이다. 기존에 알려져 있는 sequence 정보를 토대로 15~23 nucleotides 정도 길이의 probe를 제작하고, 이 probe의 5'-end 에 형광 표지인자를 붙여 target cell에 반응을 시키면 형광현미경을 통해 육안으로 관찰이 가능하다. 이 방법은 인간의 장과 같이 복잡한 환경에서 특정 미생물 집단을 검출하기 위한 유용한 기술이며, 배양 기술에서 벗어나 환경에서 직접 single cell의 동정이 가능한 기술이다. 이렇게 배양 방법에서 벗어나 환경에서 직접 target을 검출할 수 있다는 장점 때문에 목적하는 미생물의 probe를 제작하여 간편하게 미생물을 분석할 수 있지만, 이렇게 제작한 probe는 oligo-nucleotide mismatch와 기존에 알려진 sequence정보의 부정확성으로 인해 정확한 target cell만을 검출할 수 없다는 단점이 있다.

FCM

FCM은 전자에 설명한 FISH 기술과 같이 cell에 직접 fluorescent tag를 붙이는 과정을 수반한다. 형광물질을 붙인 cell을 특정 형광 검출기에 통과시키면서 target만을 검출하게 되는데 기계에서 전자를 쏘면 형광의 유무에 따라 다른 charge를 띄게 함으

로써 target만을 골라낼 수 있다. 이렇게 해서 전체 장내 미생물 집단에서 특정 미생물의 수를 산정하는 것이 가능하다. FCM은 다른 어떤 분자생물학 기술보다 빠르고 정확한 미생물 동정 능력을 보여준다고 알려져 있어 사람에게서 감염된 병원균을 빠른 시간 내에 보다 쉽게 검출할 수 있지만 target하는 미생물이 염기서열을 정확히 알고 있어야하기 때문에 현재의 미생물 유전자 database만을 가지고는 특정 질병을 일으키는 종 이하 레벨의 미생물⁹⁾을 검출하기는 쉽지 않다.

Microarray

최근 다루게 되는 유전자의 수와 연구 범위가 넓어지면서 high-throughput 기술이 각광받기 시작하였고, microarray¹⁰⁾를 이용한 기술이 각 분야에 적용되고 있다. 수백 개 내지 수천 개의 유전물질(oligonucleotides, cDNA, genomic DNA 등)을 slide glass 상에 고정시키고, 분석하고자 하는 환경에서 추출한 DNA 혹은 RNA를 증폭시켜 형광 물질을 붙인 후 microarray 상에 고정되어 있는 염기서열과 혼성화(hybridization)하여 그 존재 유무를 정량적으로 측정하는 방법이다. microarray 기술은 2000년부터 장내 미생물 연구에서 상당히 폭넓게 사용되고 있는데, 한 번의 실험으로 많은 유전자 정보를 얻을 수 있기 때문에 장내와 같은 복잡한 환경 상태를 연구하기에 매우 유용하다. 하지만 microarray

는 slide 상에 집적되어 있는 염기서열과 분석하고자 하는 유전물질의 혼성화(hybridization)에 기초하고 있기 때문에 80~90% 정도의 유사성을 가지는 유전물질 분석에서는 특이성이 낮아지는 단점이 있다. 또한 현재의 기술로는 장내에 미량(1/1000 수준)으로 존재하는 미생물의 유전자는 검출할 수 없다는 단점이 있다.

NGS를 이용한 장내 미생물 연구

다양한 분자생물학적 분석 기법들의 개발로 이전의 배양법으로는 밝혀내지 못했던 수많은 종류의 새로운 미배양 미생물의 정보를 알아낼 수 있었고 이들 미생물이 인체와의 상호작용을 통해 건강과 질병에 중요한 영향을 미친다는 것을 확인 할 수 있었지만 이들 분석법은 장내에 주종으로 존재하는 미생물만을 확인할 수 있다든지(DGGE & TGGE, T-RFLP, Q-PCR 등), 아직 염기서열이 밝혀지지 않은 미생물은 분석할 수 없다든지(FISH, FCM, microarray 등) 하는 단점이 있기 때문에 우리 몸속에 존재하는 1,000종 이상의 미생물을 면밀히 분석하는 데는 한계가 있다. 이에 반해 환경에 존재하는 모든 유전정보를 해독하는 것은 지금까지 개발된 여러 분자생물학적 방법들 중에서 인체 장내에 존재하는 미생물과 그 역할을 가장 효과적으로 분석할 수 있는 방법이기 때문에 하나의 환경에서 우

9) 같은 종의 미생물이라 할지라도 그 미생물이 가지는 유전적 특성에 의해 병원성의 유무가 결정된다. 일례로 인체의 장내를 비롯하여 해수, 토양과 같은 다양한 환경에 존재하는 대부분의 *E.coli*의 경우 병원성이 전혀 없으며 *E.coli* Nissle strain 1917 같은 경우는 오히려 probiotics로서 이용되기도 한다.

10) 일반적으로 DNA chip이라 알려져 있는 microarray기술은 micro하게 array했다는 뜻으로 한 장의 유리 슬라이드 표면위에 이론상 10만 개의 작은 spot을 늘어놓을 수 있으며 이는 한 번에 10만 개의 유전자 혹은 염기서열을 분석할 수 있다는 뜻이다.

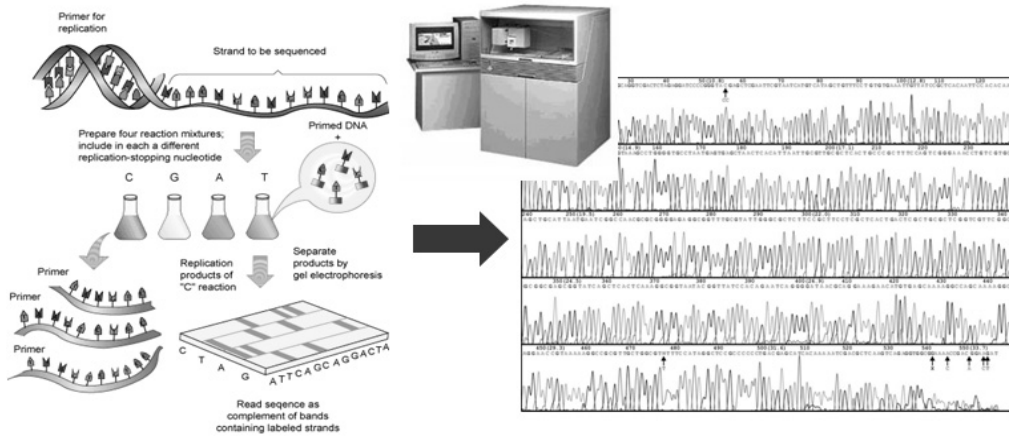


그림 2. Capillary sanger sequencing(ABI 3700 sequencer)의 염기서열 분석. (Winnick E, The Scientist, 18(18), 44, 2004)

점하고 있는 미생물뿐만 아니라 소수로 존재하는 미지의 미생물을 분석하는데도 유용하다. 일례로 비교적 적은 수(18,000개)의 sequence를 분석하였던 Eckburg의 연구에서 발견된 미생물 중 80%가 아직까지 한 번도 배양되지 않았던 것이었다. 하지만 기존의 sequencing 방법(Sanger sequencing)¹¹⁾은 각 DNA의 염기서열 해독을 위해 DNA를 작은 조각으로 자르고, vector에 삽입시키고 host cell에 transformation시켜 clone library를 만듦으로서 각각의 DNA 조각을 증폭한 후 이들 DNA 조각을 해독하는 일련의 고된 작업들을 필요로 하기 때

문에 이 역시 수억에서 수조 단위로 존재하는 미생물을 분석하기에는 많은 노동력과 비용이 든다(그림 2).

이러한 이유로 human genome 해독¹²⁾의 숨은 공로자였던 ABI sequencer¹³⁾를 대신할 genome sequencer들이 2004년부터 속속 개발되기 시작했으며 이들 Next Generation Sequencer(NGS)들은 이전의 ABI 기기가 생산해 냈던 데이터의 수백에서 수천 배에 달하는 양의 정보를 단 몇 일만에 생산해 내고 있다. 실제로 기존의 ABI sequencer를 이용한 인간 게놈 분석은 1990년에 시작되어 2001

- 11) Sanger sequencing 방법은 원래의 DNA를 주형으로 삼아 표지된 DNA를 합성해 나가며 염기서열을 분석하는 방법으로, DNA ribose의 3번 탄소에 OH 대신 H⁺가 붙어있기 때문에 더 이상 염기를 붙일 수 없는 ddNTP(ddGTP, ddATP, ddTTP, ddCTP)를 사용해 염기서열을 분석한다. Frederick Sanger는 이 염기서열 분석법으로 1980년에 노벨화학상을 받았다.
- 12) 인간게놈프로젝트는 인간 게놈의 모든 염기 서열을 해석하는 프로젝트로서, 1990년에 시작되어 2003년에 완료되었다. 이 프로젝트는 원래 15년 계획으로 잡혀 있었지만 그 동안 생물학 기술이 발전하면서 13년 만에 완료할 수 있었다. 이 프로젝트에는 세계 각국의 유전자 센터나 대학 등에 의한 국제 인간게놈서열 컨소시엄에 의해 조직되었으며, 현재까지도 프로젝트를 보완하는 발표가 계속 이루어지고 있다.
- 13) Sanger sequencing 방법은 염기서열 해독을 위해 방사성 동위원소를 이용하였으나 현재는 ddNTP에 각각 다른 형광표지를 한 뒤 레이저로 확인하는 방식의 자동화된 염기서열 분석기기를 사용한다.

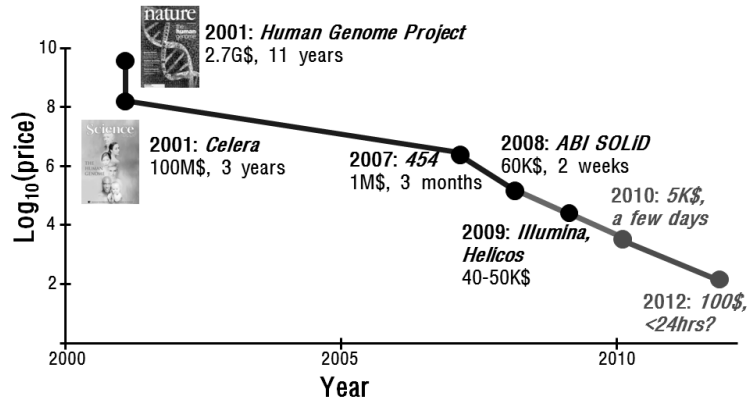


그림 3. Sequencing 기술의 발전: 한 사람의 게놈을 해독하는데 드는 시간과 금액. (Mardis ER, Nature, 470(7333), 198-203, 2011, Green ED, Nature, 470(7333), 204-213, 2011)

년 염기 서열 분석이 완료될 때까지 11년이라는 시간과 27억 불이라는 엄청난 비용이 소요됐지만, 2007년에는 100만 달러(3개월), 2008년에는 6만 달러(2주), 그리고 오늘날의 NGS 기술로는 5천 달러의 비용으로 삼 일만에 한 사람의 전체 유전체를 해독할 수 있으며, 일 년 내로는 백 달러로 하루 안에 인간게놈을 해독할 수 있는 수준으로 기술이 진보할 것이라 예상된다(그림 3). 현재의 대표적인 NGS 기기로는 Roche 454 Genome sequencer, Illumina genome analyzer, ABI SOLiD Sequencer 등이 있다.

Roche(454) GS FLX Sequencer

차세대 염기서열 분석기 개발에 뛰어든 여러 회사 중 454 Life science사는 2004년에 가장 먼저 ‘pyrosequencing’이라는 원리에 기반한 genome sequencer를 개발하였으나 2007년에 회사가 Roche

에 인수되면서 현재는 Roche의 454 Life science에서 기기를 생산, 판매하고 있다. Pyrosequencing이란 DNA 중합효소가 dNTP를 붙일 때 생성되는 pyrophosphate(PPI)를 인식하여 sequence를 해석하는 기술이다. Pyrophosphate는 adenosine 5'phosphosulfate(APS)와 반응하여 adenosine triphosphate(ATP)를 만들어 내고, 생성된 ATP는 luciferase를 활성화하여 luciferin을 빛을 내는 oxyluciferin으로 전환시키는데 이 빛을 CCD 카메라로 검출해 염기서열을 분석한다. A, C, G, T의 연속된 dNTP를 주입 및 제거하는 일련의 반응을 통해 염기서열이 분석되지만 동일한 염기서열이 연속으로 존재하는 경우에도 검출되는 빛의 세기를 통해 동일 염기서열의 개수를 판단하여 해독이 가능하다(그림 4)¹⁴⁾. 454 sequencer는 기존의 Sanger sequencing 방법이 개개의 DNA마다 cloning을 통한 증폭과정이 필요했던 것과는 다르게 microbead

14) A, C, G, T의 네 가지 dNTP는 순차적으로 주입과 제거를 반복하며 원본 DNA와 반응하며 구체적인 반응 순서는 다음과 같다: ATP 주입-CCD 카메라-ATP 제거-CTP 주입-CCD 카메라-CTP 제거-GTP 주입-CCD 카메라-GTP 제거-TTP 주입-CCD 카메라-TTP 제거의 cycle을 400~500회 반복.

를 이용한 emulsion PCR 이라는 방법을 통해 각각의 DNA를 증폭시킨다. 증폭된 각각의 DNA fragment들은 수백만 개의 미세한 구역으로 나뉘어져 있는 picoliter에 loading되며, 이때 하나의 방(reactor)에는 한 개의 DNA fragment를 가진 bead만 loading될 수 있도록 reactor의 반경이 최적화되어 있다. 염기서열 해독과정이 진행되는 동안 하나의 reactor에서 검출되는 빛은 single DNA fragment로부터 유래한 것이며 CCD 카메라를 이용한 빛의 검출로 인해 동시에 수백만 개의 reactor에 나뉘어져 있는 개개 DNA의 염기서열의 분석이 가능하다. 현재의 454 FLX titanium 모델은 동시에 약 100~120만 개의 sequence를 분석할 수 있으며, 이를 통해 약 400 Mbp의 염기서열을 분석할 수 있다. 또한 800 bp를 분석할 수 있는 당 모델의 upgrade가 예정되어 있기 때문에 올해 안에 한 번 reaction으로 800 Mbp의 염기서열을 분석하는 것이 가능하게 될 것이라 예상된다. 454 FLX titanium 기기의 가장 큰 장점은 다른 기기들에 비해 긴 길이의 sequence를 해독할 수 있다는 것이다. 따라서 다른

기기들이 미생물을 비롯한 효모, 식물, 인간과 같은 동물의 전체 genome 해독에 유리한 반면, 454 FLX titanium은 genome 해독뿐만 아니라 미생물의 16S rRNA gene 분석을 통한 군집 분석 등에 유용하다.

Illumina Genome Analyzer

Illumina사에서 2006년 출시한 Genome Analyzer는 Illumina사가 next-generation sequencer 시장에 뛰어들기 위해 Solexa사를 인수하여 Solexa사가 가지고 있던 1G Genome Analyzer의 후속 모델로서 개발한 것이다. Illumina genome analyzer는 DNA의 증폭을 위해 454 GS FLX에서와 같은 emulsion PCR을 이용하는 것이 아닌 bridge amplification이라는 방법을 이용한다. 이 방법은 DNA를 적절한 길이로 잘게 자른 (fragmentation) 후, primer 역할을 하는 adaptor를 양 DNA 말단에 접합시킨다(ligation). 후에 이를 DNA chip과 같은 glass flow cell에 올려 주면 표면에 고정되어 있는 primer에 결합하게 되고, 이 상태로 PCR을 하면 고정된 DNA fragment가

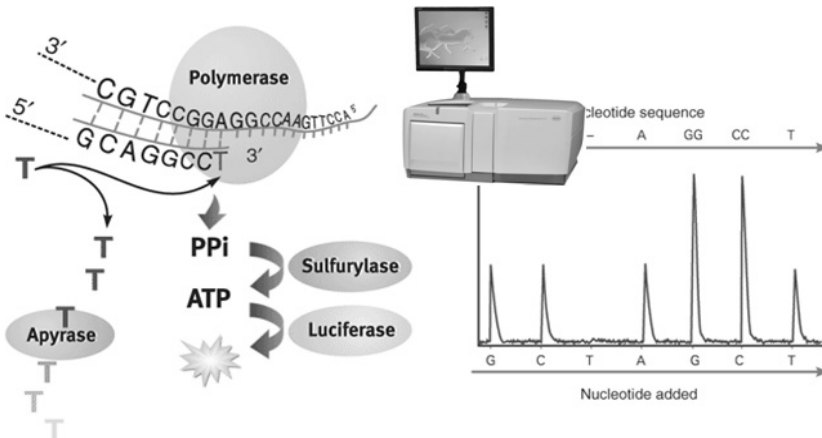


그림 4. Roche 454 Genome sequencer를 이용한 염기서열 분석. (454 life science (<http://454.com/>))

구부러져 주변에 존재하는 free primer에 반대쪽 끝의 adaptor가 결합하여 증폭이 이루어진다. 이러한 과정을 통해 최초의 single DNA fragment는 동일한 sequence를 가지는 하나의 cluster를 형성하게 되며, 처음 DNA에 붙었던 adapter에 sequencing primer를 부착하여 A, C, G, T의 합성을 통한 cyclic sequencing이 진행된다. 이때 DNA polymerase가 붙어나가는 nucleotide의 3'-OH는 한 cycle에 하나의 nucleotide만 붙일 수 있도록 설계되어 있으며, 각각의 nucleotide에는 adenosine(A), cytosine(C), guanine(G), thymine(T) 각각에 다른 색의 형광 tag가 부착되어 있다. 이 방법으로 읽을 수 있는 sequence의 길이는 100~150 bp이며 한 번의 run을 통해 총 4 Gbp 이상의 sequence를 읽어낼 수 있다(그림 5).

Applied Biosystems SOLiD Sequencer

2007년 가장 늦게 출시된 ABI 사의 SOLiD

sequencer는 Roche 454 GS FLX나 Illumina genome analyzer와는 달리 DNA ligase를 이용한 독특한 sequencing 방법을 이용한다. Clonal amplification 방법으로 emulsion PCR을 이용하는 것은 454 GS FLX와 같지만 microbead를 glass slide의 표면에 붙이고 4가지 색의 형광 dye가 부착된 8 bp의 oligonucleotide를 template DNA에 ligation 시켜 형광을 detection하는 방법을 사용한다. Ligation 되는 8 bp oligonucleotide는 첫 번째와 두 번째 혹은 네 번째와 다섯 번째 base만 정해져 있고 나머지는 random하게 제작되어 있어서 각 cycle을 통해 첫 번째, 두 번째 혹은 네 번째, 다섯 번째의 sequence를 읽을 수 있다. 이러한 과정을 통해 각 형광 signal이 두 개의 sequence 정보를 알려주게 되어 sequencing 과정 내에서 한 번 filtering된 정보를 얻을 수 있다(그림 6). 이러한 2-base encoding system이 error correcting 기능을 하여 현재까지 개발된 NGS 중 가장 높은 정확도를 가지기 때문에

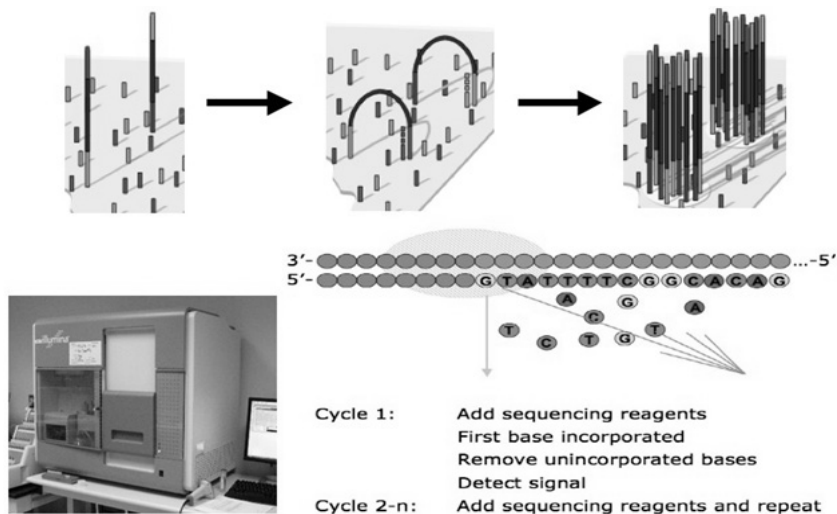


그림 5. Illumina genome analyzer를 이용한 염기서열 분석. (Illumina (http://www.illumina.com/systems/genome_analyzer))

(정확도 99.94%) 정확도를 요구하는 SNP나 삽입, 결실 등의 변이정보를 확인하는데 유용한 기기이다. ABI SOLiD는 한번 run에 7일 정도가 소요되며 평균 read length는 50 bp 정도로 총 7G bp를 읽어 낼 수 있다.

2005년 이후 개발된 NGS 기기들을 기존의 분자 생물학적 분석 방법들이 가지고 있던 단점들을 극복하여 장내에 존재하는 미생물을 연구하는 쉽고 효과적인 방법을 제시하였으며, 이전까지 과학자들이 쌓아 올린 연구 결과들 보다 훨씬 많고 중요한 결과들을 생산해 내고 있다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 Roche 454 Genome sequencer, Illumina genome analyzer, ABI SOLiD Sequencer의 주요 특성과 이용분야 등을 표 2에 나타내었다. 특히 454 GS FLX 모델과 Illumina genome analyzer는 이러한 장내 미생물 연구 분야에서 폭넓게 사용되어 미생물의 marker 유전자를 이용한 커뮤니티 분석뿐만 아니라 메타게놈 분석을 통한 장내 미생물 유전자의 종류와 양, 그리고 이들 유전자의 기능 등

에 대한 핵심 정보들을 제공하고 있으며 NGS 기술을 이용한 장내 미생물 연구의 주요 성과들을 살펴 보면 다음과 같다.

2009년 제프리 고든은 NGS 기술을 이용하여 약 150명의 쌍둥이와 그 모체의 장내 미생물을 분석하였으며, 이를 통해 유전형이 동일한 일란성 쌍둥이의 장내 미생물 군집은 그 자신의 모친이나 연관성이 없는 타인에 비해 더 유사한 것으로 나타났다. 하지만 이란성 쌍둥이의 경우에도 일란성 쌍둥이와 비슷한 정도의 장내 미생물 군집 연관성을 가지는 것으로 보아 장내 미생물 군집의 연관성은 비단 인간 숙주의 유전형뿐만 아니라 인체가 살아가는 환경에 의해서도 영향을 받는다는 것을 보여주었다. 또한 이제까지는 인체의 장내에 존재하는 Firmicutes와 Bacteroidetes의 양이 비만과 연관 있다고 알려져 있었지만 비만한 쌍둥이들의 메타게놈을 분석한 결과 위의 두 phylum보다는 Actinobacteria에서 유래한 유전자들이 비만한 사람에게서 더욱 많이 존재하는 것으로 나타났다.

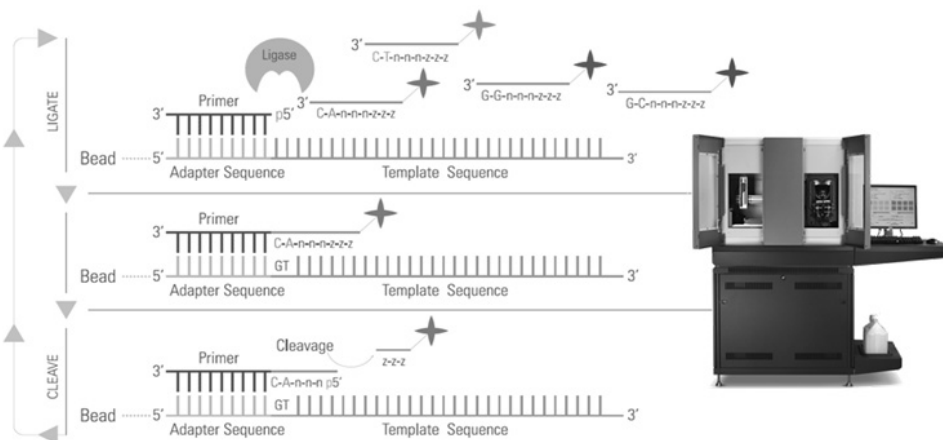


그림 6. Applied Biosystems SOLiD Sequencer를 이용한 염기서열 분석. (AB (<http://www.appliedbiosystems.com>))

표 2. 주요 NGS 기기의 주요 특성 비교

기 술	Roche/454 GS FLX Titanium	Illumina/Genome Analyzer	Life Science/SOLiD
라이브러리 구축 방법	Fragmentation/emPCR	Fragmentation/solid-phase	Fragmentation/emPCR
염기서열 해독 길이	400	100	50
총 분석 염기서열	400 million 이상	4,000 million 이상	7,000 million 이상
분석 시간	8 hr	4 days	7 days
가 격	6억	6억 5천	7억 2천
응용분야	새로운 유전체 분석, resequencing, 발현체 분석, 유전자조절연구, epigenetic changes, 메타지놈 및 미생물 다양성 연구, paleogenomics analysis	Resequencing, 발현체 분석, 유전자 조절 연구, ChIP, 작은 유전체에 대한 새로운 시퀀싱 (paired-end 방법), epigenetic changes	Targeted resequencing, 유전자 발현, microRNA 발굴, ChIP, 전체 유전체 재분석 (resequencing)
장 점	400 bp 이상의 긴 염기서열 해독으로 반복 염기서열 분석에 용이, 분석에 걸리는 시간이 적음	염기서열 분석에 가장 보급된 기기로 장비 운용에 안정성과 효율성이 검증되어 있음	염기서열 분석 과정 자체에 error check 기능이 포함되어 있어 가장 높은 정확도를 보임. SNP와 같은 single point mutation 연구에 탁월함
단 점	시약의 가격이 비쌌. 연속 되는 동일 염기서열분석 시 Error rate가 상대적으로 높음	여러 샘플을 동시에 분석하는데 어려움이 있음	분석시간이 오래 걸림

(Metzker ML, Nature Reviews Genetics, 11, 31-46, 2010)

2010년 이탈리아의 파올로 리오네티(Paolo Lionetti) 박사는 NGS 기술을 이용하여 아프리카 지역의 어린이와 이탈리아 어린이의 대변 속 세균의 비교·분석을 통해 식이가 장내 미생물에 미치는 영향을 분석하였다. 비교 결과 아프리카의 아이들은 Bacteroidetes 계열의 세균을 많이 보유하고 있으며, 이탈리아 아이들은 Firmicutes 계열의 세균을 많이 보유하고 있는 것으로 나타났으며, 아프리

카 아이들에게서는 프레보텔라(Prevotella), 자일라니박터(Xylanibacter), 트레포네마(Treponema) 등의 단쇄지방산(short chain fatty acid, SCFA)¹⁵⁾을 생성하는 미생물을 많이 가지고 있는 것으로 나타났다. SCFA는 인체 장관의 염증 유발을 막아주는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 실제 아프리카 아이들은 염증성 장 질환이 잘 발생하지 않는다. 장내 미생물은 인체가 소화할 수 없는 다당류를

15) 장내에 존재하는 일부 미생물들은 인체로 들어온 polysaccharide를 이용하여 acetic acid, butyric acid, propionic acid 등의 짧은 사슬 지방산을 생성할 수 있다. 이들 SCFA는 장관세포의 주 에너지원으로 작용하기 때문에 이들의 생성량이 많을수록 장관세포가 활성화 되고, 이를 통해 1차적인 면역기능이 강화되는 것으로 알려져 있다.

분해함으로써 숙주의 칼로리 섭취를 도와주는 것으로 알려져 있는데, 2010년 프랑스의 피에르와 마리 퀴리대학의 연구진은 일본인 장내 메타게놈 분석을 통해 해조류에 포함된 해양 미생물의 유전자가 장내세균인 *Bacteroides plebeius*에 전달되어 일본인이 김류의 탄수화물을 이용할 수 있다는 것을 밝혔다. 김의 황산화 다당체인 포피란(porphyrin)을 분해하는 베타포피라네이즈(beta-porphyrinases)는 해양 미생물인 *Zobellia galactanivorans*에서 유래하지만 일본인들이 오래전부터 초밥의 재료로서 김류를 이용하였고 이때 인체로 같이 유입된 *Z. galactanivorans*의 유전자가 장내에 서식하는 *Bacteroides plebeius*로 전달된 것이라 생각된다.

지금까지는 장내에 존재하는 미생물 중 세균에 관한 연구가 주로 이루어 졌지만 실제로 환경에 존재하는 미생물 중 가장 많은 양을 차지하는 것은 바이러스이다. 이들 바이러스는 숙주에 감염되어 숙주 세포 안에서 증식 후 숙주세포를 파괴한다. 2010년 제프리 고든 박사는 NGS 기술을 이용하여 사람의 장내에 존재하는 bacteriophage의 구성을 연구하였는데 그 결과 인체의 장내에 존재하는 bacteriophage의 구성은 사람마다 독특하게 존재하고 시간이 지나도 안정적으로 유지된다는 것을 확인했다. 이러한 bacteriophage의 개인 특이성은 장내 미생물의 구성이 비슷한 일란성 쌍둥이들에게서도 나타났다. 실험에서 한 어머니와 그 어머니에게서 출생한 일란성 쌍둥이들 4쌍의 미생물과 박테리오파지를 분석한 결과 가족끼리는 타인에 비해 연관된 장내 미생물 균총을 보였지만 박테리오파지는 각 개인마다 다른 구성을 보였다. 또한 장내 박테리오파지는 매우 안정적이어서 1년 동안 5% 미만의 변화만을 보였는데 이는 여타의 환경에서 바이러스가 숙

주에 infection되어 숙주 세포를 파괴하는 것과는 다르게 숙주의 게놈 안에 자신의 유전자를 통합시켜 보존한다는 것을 나타낸다.

지금까지 장내 미생물에 대한 연구는 16S rRNA와 같은 marker 유전자의 염기서열 해석에 기반을 두고 진행되어 왔으며, 이들 유전자에 대한 많은 데이터가 축적되어 있다. 하지만 marker 유전자를 이용한 장내 미생물 분석은 단지 장내 미생물의 계통학적 위치만을 설명해 줄 뿐이어서 실제로 장내 환경이 어떻게 움직이고 있는지를 정확히 알 수는 없다. 따라서 앞으로는 NGS를 이용한 장내 미생물 분석에 다양한 접근이 필요하다. 일반적으로 우리가 장내 미생물의 유전정보를 이용할 수 있는 방법은 크게 DNA를 이용하는 방법과 RNA를 이용하는 방법의 두 가지로 나눌 수 있다. DNA를 이용하는 방법은 전체 메타게놈을 추출하고 marker 유전자를 분석함으로써 장내에 존재하는 미생물의 종류와 양을 판별하는 방법과 메타게놈 자체를 전부 sequencing함으로써 장내 미생물이 가지고 있는 유전자들을 찾아 그들의 기능을 예측하는 방법으로 현재까지의 대부분의 분석법은 이 단계에서 이루어지고 있다. RNA를 이용하는 방법은 전체 RNA를 추출한 후 transcription되는 mRNA만을 분석하여 실제로 발현되는 미생물의 유전자를 확인하는 방법으로 이를 통해 특정 질병에서는 장내 미생물의 어떤 유전자가 얼마만큼 발현되는지를 확인 할 수 있다. 또한 RNA를 이용해 marker 유전자를 분석할 경우 특정 식이나 질병 상황에서 active 하게 활동하고 있는 미생물을 확인함으로써 실제적으로 인체로 들어온 물질이나 질병 상황에 반응하는 미생물을 확인할 수 있다(그림 7).

장내 환경은 미생물과 숙주가 함께 복잡하게 뒤

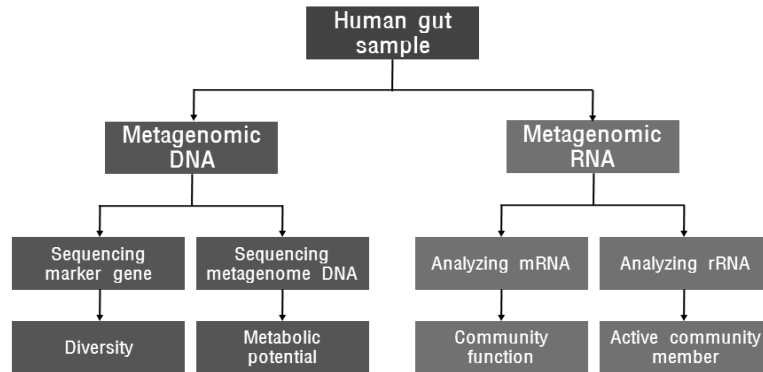


그림 7. NGS를 이용한 장내 미생물 연구의 진행도. (Simon C *et al.*, Applied and Environmental Microbiology, **77**(4), 1153-1161, 2011)

섞여 공생하는 생태계이고, 약 1,000여 종의 다양한 미생물이 10^{14} 의 양으로 존재하고 있다. 여기에 각 개인은 자신이 자란 환경과 유전형 등의 영향으로 개인마다 독특한 장내 미생물을 가지고 있기 때문에 이들의 상호관계에 대한 정확한 이해는 앞으로 도 쉽게 이루어지지는 않을 것이다. 하지만 장내 미생물은 장 표피세포의 차단력을 강하게 하거나 경쟁적으로 표피세포에 결합함으로써 병원성 미생물이 장내에 정착하는 것을 막는 역할을 하며, 장내 면역 시스템과의 상호작용을 통하여 저항성과 같은 면역작용을 조절하는데 도움을 주는 등의 이로운 작용과 크론병(CD), 염증성 장질환(IBD), 대장암 등과 같은 수많은 질병의 원인이 되기도 하기 때문에 우리는 장내 미생물에 대해 많은 연구를 할 필요가 있다. 최근의 NGS 기술 발전은 장내 미생물 연구를 가속화 시킬 것이며 머지않아 인체를 비롯한 동물의 장내에 존재하는 미생물이 숙주의 건강과 질병에 미치는 역할을 규명하고 이들 장내 미생물의 조절을 통해 질병을 극복하고 건강을 유지시킬 수 있는 실마리를 찾을 수 있게 되리라 생각된다.

● 참고문헌 ●

1. Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol Rev*, **59**(1), 143-169, 1995
2. Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterstrom R, Suppression of aerobic and anaerobic faecal flora in newborns receiving parenteral gentamicin and ampicillin, *Acta Paediatr Scand*, **71**(4), 559-562, 1982
3. Bezirtzoglou E, The Intestinal Microflora During the First Weeks of Life, *Anaerobe*, **3**, 173-177, 1997
4. Breitbart M, Hewson I, Felts B, Joseph M, Mahaffy, Nulton J, Salamon P, Rohwer F, Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces, *J Bacteriol*, **185**(20), 6220-6223, 2003
5. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti

- M, Pouillet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P, Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 14691-14696, 2010
6. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA, Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora, *Scienceexpress*, **308**(5728), 1635-1638, 2005
 7. Flint HJ, Polysaccharide breakdown by anaerobic microorganisms inhabiting the Mammalian gut, *Adv Appl Microbiol*, **56**, 89-120, 2004
 8. Franks AH, Harmsen HJM, Raangs GC, Jansen GJ, Frits Schut, Welling GW, Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes, *Appl Environ Microbiol*, **64**(9), 3336-3345, 1998
 9. Green ED, Guyer MS, Charting a course for genomic medicine from base pairs to bedside, *Nature*, **470**(7333), 204-13, 2011
 10. Hehemann JH, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G, Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota, *Nature*, **464**, 908-912, 2010
 11. Holzapfel WH, Haberera P, Snelb J, Schillingera U, Jos HJ, Huis in't Veld, Overview of gut flora and probiotics, *Int J Food Microbiol*, **41**(2), 85-101, 1998
 12. Hooper LV, Xu J, Falk PG, Midtvedt T, Jeffrey I, Gordon, A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**(17), 9833-9838, 1999
 13. Kolida S, Tuohy K, Gibson GR, Prebiotic effects of inulin and oligofructose, *Br J Nutr*, **87** Suppl 2, S193-S197, 2002
 14. Macdonald TT, Monteleone G, Immunity, inflammation, and allergy in the gut, *Science*, **307**(5717), 1920-1925, 2005
 15. Mardis ER, A decade's perspective on DNA sequencing technology, *Nature*, **470**(7333), 198-203, 2011
 16. Maslowski KM, Mackay CR, Diet, gut microbiota and immune responses, *Nature immunology*, **12**(1), 5-9, 2011
 17. Metzker ML, Sequencing technologies-the next generation. *Nature Reviews. Genetics*, **11**, 31-46, 2010
 18. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl Environ Microbiol*, **59**(3), 695-700, 1993
 19. Namsolleck P, Thiel R, Lawson P, Kim H, Rajilic M, Vaughan EE, Lionel RG, Collins MD, de Vos WM, Blaut M, Molecular methods for the analysis of gut microbiota, *Microbial Ecology in Health and Disease*, **16**, 71-85, 2004
 20. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitovet R, Recognition of

- commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis, *Cell*, **118**(2), 229-241, 2004
21. Rittmann BE, Krajmalnik-Brown Rosa, Halden RU, Pre-genomic, genomic and post-genomic study of microbial communities involved in bioenergy, *Nature reviews Microbiology*, **6**(8), 604-12, 2008
 22. Reid G, Jass J, Sebulsky MT, John K, McCormick, Potential uses of probiotics in clinical practice, *Clin Microbiol Rev*, **16**(4), 658-672, 2003
 23. Reyes A, Haynes M, Hanson N, Angly F, Heath A, Rohwer F, Gordon JI, Viruses in the fecal microbiota of monozygotic twins and their mothers, *Nature* **466**, 334-338, 2010
 24. Riley MA, Wertz JE, Bacteriocins: evolution, ecology, and application, *Annu Rev Microbiol*, **56**, 117-37, 2002
 25. Savage DC, Microbial ecology of the gastrointestinal tract, *Annu Rev Microbiol*, **31**, 107-133, 1977
 26. Simon C, Daniel R, Metagenomic Analyses: Past and Future Trends. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(4), 1153-1161, 2011
 27. Sprunt K, Leidy G, The use of bacterial interference to prevent infection, *Can J Microbiol*, **34**, 332-338, 1988
 28. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI, A core gut microbiome in obese and lean twins, *Nature*, **457**, 480-484, 2009
 29. Wang RF, Beggs ML, Erickson BD, Cerniglia CE, DNA microarray analysis of predominant human intestinal bacteria in fecal samples, *Mol Cell Probes*, **18**(4), 223-34, 2004
 30. Winnick E, DNA sequencing industry sets its sights on the future, *The Scientist*, **18**(18), 44, 2004
 31. Xu J, Jeffrey I, Gordon, Inaugural Article: Honor thy symbionts, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**(18), 10452-10459, 2003

남 영 도 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 전통식품연구단
 전문분야 : 식품, 환경, 인체 장내 미생물학 등
 E-mail : youngdo98@kfri.re.kr
 T E L : 031-780-9306