

Human Microbiota Project (HMP)의 최신 연구 동향

Current research of Human Microbiota Project (HMP)

이영경 | 공정기술연구단

Young Kyoung Rhee | Processing Technology Research Group

사람의 몸에는 사람 몸을 구성하고 있는 세포수에 10배 이상이 되는 미생물이 살고 있으며, 특히 이 중 대다수의 미생물이 소화기관(GI tract)에 살면서 인체 건강과 밀접한 상관관계를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 이런 점에 관심을 갖고 2008년 미국의 NIH는 건강한 사람과 질병 상태의 사람 간에 미생물군집의 특징을 규명하고자 5년간 총 1억 천오백만 달러의 예산을 투입한 Human Microbiota Project(이하 HMP)를 시작하였다. Project의 목표는 첫째, 최소 250명 이상의 정상인 자원 참여자로부터 다양한 부위의 human microbiome을 얻어 효율이 높은 분석 기술을 통해 충분한 연구 정보를 얻고자함에 있다. 둘째, 여러 가지 다양한 의학 연구를 통해 정상 상태와 질병 상태에서의 microbiome의 차이를 확인코자하며, 셋째는 표준화된 data와 광범위하게 이용 가능한 새로운 기술적 접근법을 관련 분야에 제공하는데 있다.

2012. 6. 16 ~ 6. 19, 4일간 Sanfrancisco에서 개최된 미국 미생물학회(ASM, America society for microbiology)의 2012년도 annual meeting에서는 project 시작 5년째를 맞아 Science지와 Nature지에서 핫 이슈로 주목받는 human microbiome의 최신 연구 내용에 대한 세션이 마련되어 뜨거운 호응을 얻은 바 있다. 본 원고에서는 현지에서 수집한 자료를 바탕으로 GI tract의 microbiome을 중심으로 간략한 최신 정보를 정리코자한다.

NIH HMP 진행 현황 (Brief overview of the NIH Human Microbiome Project / L. Proctor, NIH)

2012년 현재 The Human Microbiome Proj-

ect Consortium에는 sequencing center 10곳과 Canada의 기술 개발 연구 2곳을 포함해 총 49개의 연구단위가 참여하고 있다. 현재까지 242명의 건강한 사람의 15~18가지 부위로부터 3배수 이상의 시료를 채취해 분석하였으며, 그 결과 16S RNA gene에서 5,177가지의 microbial taxonomic profile을 얻었고, 3.5 terabase의 metagenomic sequence를 확보하였다. 이러한 기초 연구 작업을 통해 얻어진 풍부하고 다양한 database는 현재는 물론 미래에 계속 될 연구들에 유익한 자료를 제공하게 될 것이다(Fig. 1).

심화 연구를 위한 HMP 자료 통합 연구 (Integrating the HMP Healthy Cohort with Other Populations to Gain Insight into Health, Disease, and Technical Variation / R.Knight, Univ. of Colorado)

지금까지 300명의 정상인을 대상으로 남자는 15군데, 여자는 18군데로부터 17,000개 이상의 시료를 얻었고 50M 이상의 16S 데이터 리드, 4.6 Tbp metagenomic sequences, 1,400개 이상의 reference genomes 등의 방대한 자료를 확보할 수 있었다. 이렇듯 방대한 양의 데이터를 통합하여 경

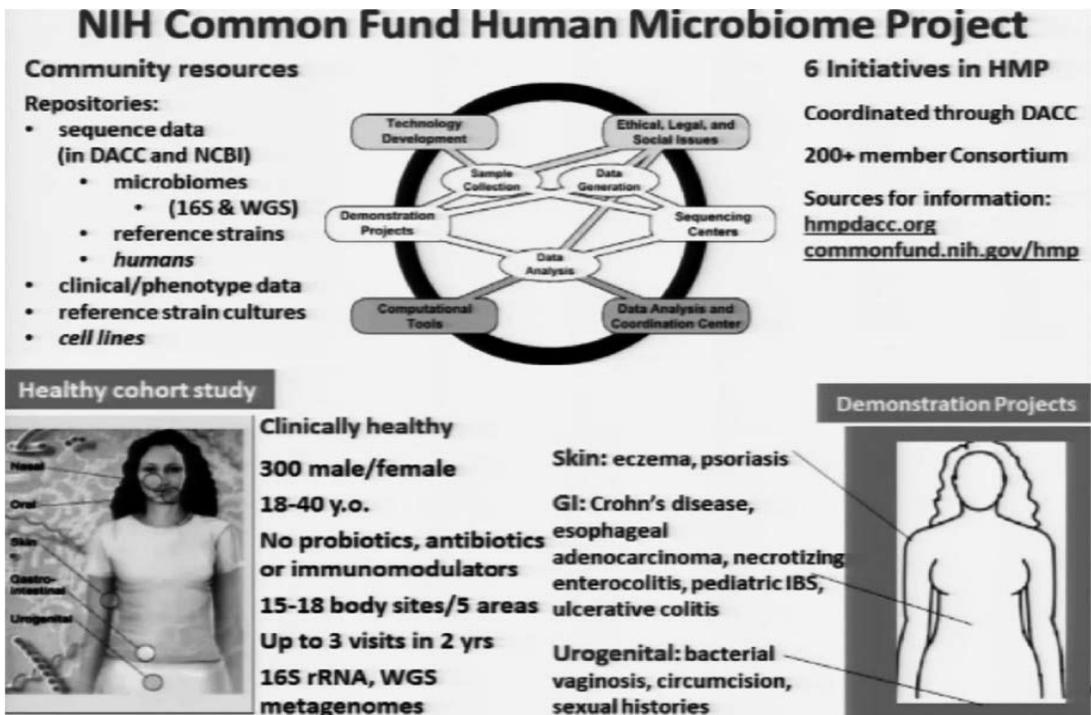


Fig. 1. The recent research of HMP (ASM, <http://gm.asm.org>, 2012)

향을 분석하는 소프트웨어로 QIIME(Quantitative Insights Into Microbial Ecology)이 사용되고 있다. 이 소프트웨어를 활용하면 통계분석은 물론 광범위한 microbial community 분석을 가능하게 하고 그 결과를 시각화 해주는 장점이 있다. 먼저 hmpdacc.org/HMR16S에서 얻은 16S sequence data와 metadata를 QIIME을 사용하여 역다중화(demultiplex)시킨다. 여기에 에러 수정, chimera checking 등을 통해 임의의 분류단위(Operational Taxonomic Unit, OTU)가 설정되고, Data merging과 data filtering을 반복하면서 정상인부터 질병상태의 개체에 이르기까지 여러 미생물 군집의 패턴을 특정화할 수 있게 해준다 (Fig. 2). 지난 5년간 축적된 HMP의 data가 질병에 의한 영향을 확인할 수 있는 기초 자료였다면, Cloud (DACC에서 가능 예정)상에서의 QIIME protocol은 다양한 data의 통합을 가능케 할 전망이다.

Microbiome을 형성하는 미생물과 그 역할 (Identifying Species, Strains, and Functional Roles in the Microbiome / C. Huttenhower, Harvard School of Public Health)

현재 Integrated Microbial Genomes (IMG) system에만 3,100종의 bacterial genome과 100종의 archaeal, 100종에 달하는 eukaryotic genome, 몇 천종의 virus의 genome이 포함되어 있다. 수집된 유전정보는 계통발생상의 분류를 거쳐 계통상의 핵심 유전자(core gene)가 규명되고, 여기서 얻어진 unique marker genes DB는 metagenome 자료와 함께 metagenomic phylogenetic analysis(MetaPhiAn)의 빠른 정보 해석을 가능하게 해준다. 또한 지금까지 발전된 유전 정보 해석 방법에 의해 건강한 사람이라 하더라도 군집을 구성하는 미생물 종은 크게 차이가 있음이

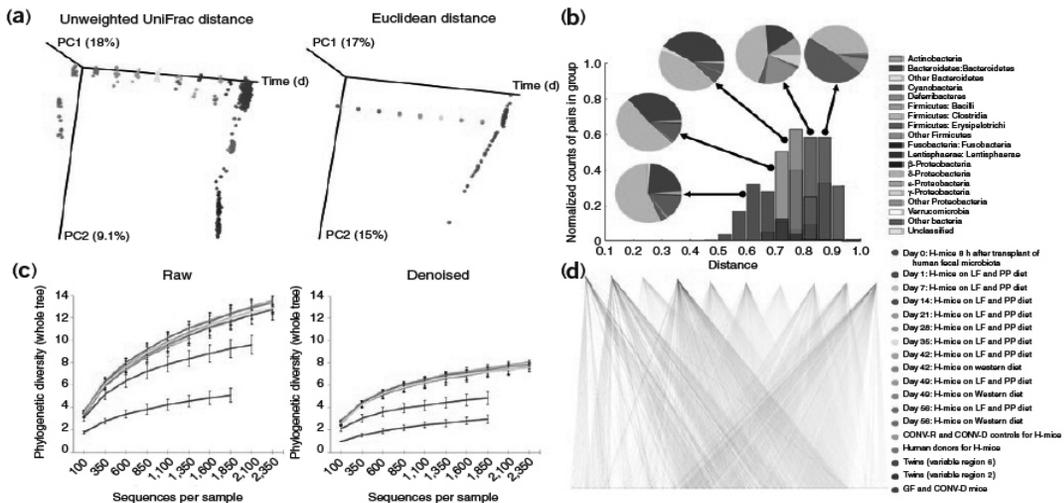


Fig. 2. Example of QIIME analysis for animal model or human (JG Caporaso *et al.*, Nature Methods, 2010)

밝혀졌다. 차이가 나는 원인은 아직까지 정확히 규명된 바 없으나, 식습관, 환경, 사람(host)의 유전 형질, 어린시절 노출된 미생물 환경 등이 그 원인으로 제시되고 있다. 좀 더 세부적으로 확인된 미생물 분류를 살펴보면 자궁-*Prevotella amnii*, 소화기관-*Prevotella copri* 같은 독특한 marker가 되는 미생물을 발견할 수 있었다. NIAID(National Institute of Allergy and Infectious Disease)에서 분류하는 class A-C의 pathogene 유무를 판정하는 것도 건강한 사람의 미생물 군집과의 차이로 질병 상태를 판단하는 한 예라고 할 수 있다. 또한 프로젝트에 의해 건강한 서양인에서 발견될 수 있는 81~99%의 미생물 속(genera), 효소, 군집 구성 등에 대한 정보를 이용하여 미생물 군집과 정상 대사 기능 활성화에 대한 연구가 진행되고 있다. 현재까지의 조사에 의하면 신체 부위에 따른 미생물 군집의 구성 또는 인종적 다양성에도 불구하고 주요 대사경로의 활성화는 안정적인 형태를 유지하고 있다(Fig. 3). 반면 건강한 정상인과 IBD(Inflammatory Bowel Disease) 환자의 대사

경로 활성화 정도를 비교해보면 당 분해, 아미노산 분해능이 저하되는 등의 차이를 보이고 있어 이를 설명할 수 있는 다양한 연구가 진행 될 예정이다.

사람 유래의 'most wanted bacteria'

(The Most Wanted Bacteria from the Human Microbiome / A. Earl, Broad Inst. of MIT and Harvard)

HMP에 의하여 밝혀진 genome은 606종 1,654개의 bacteria이고, non-HMP bacteria에 의해 밝혀진 bacteria는 370종 2,777개에 달하고 있다. 이 중 sequencing된 사람 유래 bacteria의 70%를 public reference genome data로 제공하고 있다. 아래의 4단계 표준운영절차를 통해 이 정보를 활용하면 개체차를 설명해 줄 'most wanted bacteria'를 밝혀낼 수 있다.

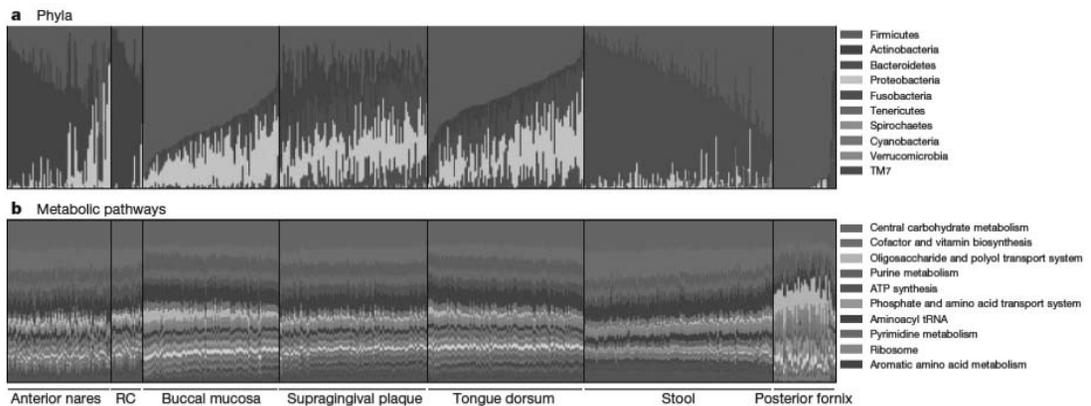


Fig. 3. The distribution of health human microbiota and their metabolic activity on each human sites (The Human Microbiome Project Consortium, Nature, 2012)

- Step 1. Reference data 설정 정의 (Fig. 4)
현재까지 200명 이상으로부터 8,000개 이상의 시료를 얻어 55,000,000의 16S reads로 reference data를 설정
- Step 2. 단순화
임의 분류단위(OTU)로 클러스터화
- Step 3. Data filtering
UCHIME를 활용하여 비정상적인 HMP OTUs를 data에서 제거
- Step 4. 특성화
RDP(Ribosomal Database Project)를 이용한 분류학상의 정리
신체부위에서의 분포도 및 상대적인 분포 빈도 측정
- Step 5. 기타 16S data를 이용한 결과 조정
SILVA, GOLD genomes, HMP genomes, 배양 미생물, 그 밖의 다른 정상인 대상 연구 등

그러나 reference data는 아직 불완전 하고, 이 그림을 완성시키기 위해 찾아야할 우선순위의 ‘most wanted bacteria’가 아직 남아있다. 현재는 ‘most wanted bacteria’가 119종으로 좁혀졌고, 과학자들이 새로운 배양 세포와 단일 세포기반의 방법을 사용하여 전체 genome sequencing을 실현해가고 있다. 이러한 연구를 통해 미생물 다양성에 대한 접근이 더욱 용이해지고, 이전에는 미확인 상태였으나 점차 숙주의 건강에 미치는 영향이나 항생제 내성 등 여러 특성에 대해 이해할 수 있게 될 것이다.

인체 소화기관 내 virome 연구
(Dynamics of the Human Gut Virome / R. Bushman, Univ. of Pennsylvania)

흔히 장내 미생물 관련 연구는 세균류를 위주

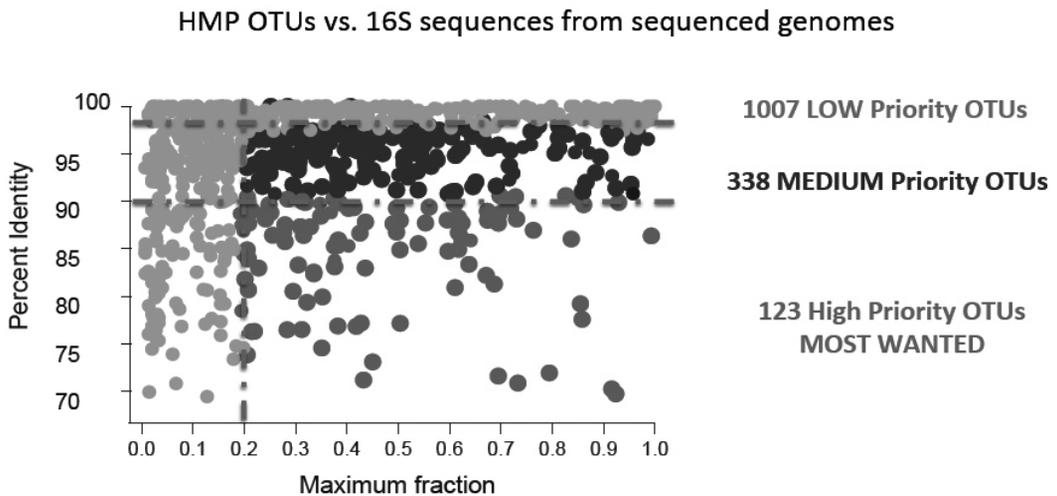


Fig. 4. The narrowing priority group to select ‘most wanted bacteria’ from human microbiome (ASM, <http://gm.asm.org>, 2012)

로 이뤄지기 때문에 장내에는 세균만이 존재한다고 이해하기 쉽다. 그러나 사람의 분변 1g로부터 $10^{10} \sim 10^{11}$ 의 virus 유사 particles를 얻을 수 있으며, 이 virus들은 식이 변화에 따라 그 수 역시 변하면서 세균류와 마찬가지로 숙주인 사람의 건강과 밀접한 영향을 갖는 것으로 알려져 있다. 연구진은 12명의 건강한 사람의 분변으로부터 40억개의 base pair를 분리해 virus metagenom(virome)을 분석한 결과, 대부분의 경우 bacteriophages인 것을 확인하였다. 이 연구에서 51개의 고도가변영역(hypervariable region)을 발견하였으며, 고도가변영역이 역전사 효소 유전자와 관련이 있다는 것 또한 확인하였다(Fig. 5). 연구팀이 새로 발견한 고도가변영역은 human virome이나 microbiome과 같은 분류가 가능하고, 다른 한 편으로 역전사 효소계의 분석은 DNA phages의 고도가변성을 밝히는 데 크게 기여하게 될 것이다.

Human microbiome의 변화 (Impact of Perturbations on the Human Microbiome / J. Jansson, UC Berkeley)

장내 미생물은 최초 미생물이 정착되는 시점에서 2~3년이 경과하면 장내 세균총은 안정화기에 접어들고, 그 후 정착된 장내 세균총을 변화시키는 요인으로는 숙주인 사람의 genotype과 라이프 스타일, 항생제 섭취와 식이, 질병 등을 들 수 있다. 예를 들면 항생제(clindamycin)를 7일간 섭취하게 되면 항생제 섭취와 함께 균총의 다양성이 급격하게 감소하는 반면 antibiotics 내성에 관한 gene expression은 크게 증가한다(Fig. 6(A)). 이

렇게 변화된 gene expression은 관찰기간인 2년간 원래의 상태로 돌아가지 않았다. 또한 서양인의 0.1%가 앓고 있는 Crohn's disease환자의 경우, 회장(ileum)과 결장(colon)의 미생물 총이 건강한 사람 또는 궤양성 대장염 환자와는 확연한 차이를 보이고 있다(Fig. 6(B)). 그 결과 유익한 영향을 주는 butyrate 생산 균주인 *Faecalibacterium prausnitzii*의 경우 건강한 사람과는 큰 차이를 보이는데 특히, 회장에서 그 수가 급격히 감소하여 최종적으로 butyrate의 생성까지 감소하는 것으로 관찰되었다. 그 외에도 Crohn's disease의 발병으로 bacterial outer membrane proteins와 human digestive enzymes, bile salt metabolites 등이 증가하였다.

직접적으로 장내균총의 구성에 영향을 미치도록 하기 위해 비정상 균총에 정상 균총을 이식하는 bacteriotherapy 역시 임상연구에서 시도되고 있다. 항생제 복용이나 염증으로 유발되는 것으로 알려진 *Clostridium difficile*-Associated Diarrhea(CDAD) 환자에게 정상인의 균총을 이식한 결과, 항생제 치료에도 반응이 없던 이 환자는 이식 후 14일째에는 제공된 정상 균총과 유사한 구성을 보였고, 환자의 통증도 해결되는 것으로 나타났다. 균총의 변화를 유도하는 것으로 비정상 장내 균총과 관련하여 발생하는 질병의 치료 또한 가능할 수 있다는 것을 보여주는 결과라 하겠다.

사람 제2의 genome을 연구하는 것으로 평가받는 human microbiota project는 단순히 개체간의 미생물 군집의 차이를 쏟아내는 data 발견의 단계에서, 지금껏 나온 data를 통합하여 가능성 있는 차이점을 유추하고 있으며, 군집 구조를 해명하는 수준이 아니라 단백질 발현이나 효소 생산 등 다양한 인자를 관찰하는 수준까지 발전해 있다. 그러나 HMP의 data는 아직 인종이나 식습관에서 우리와

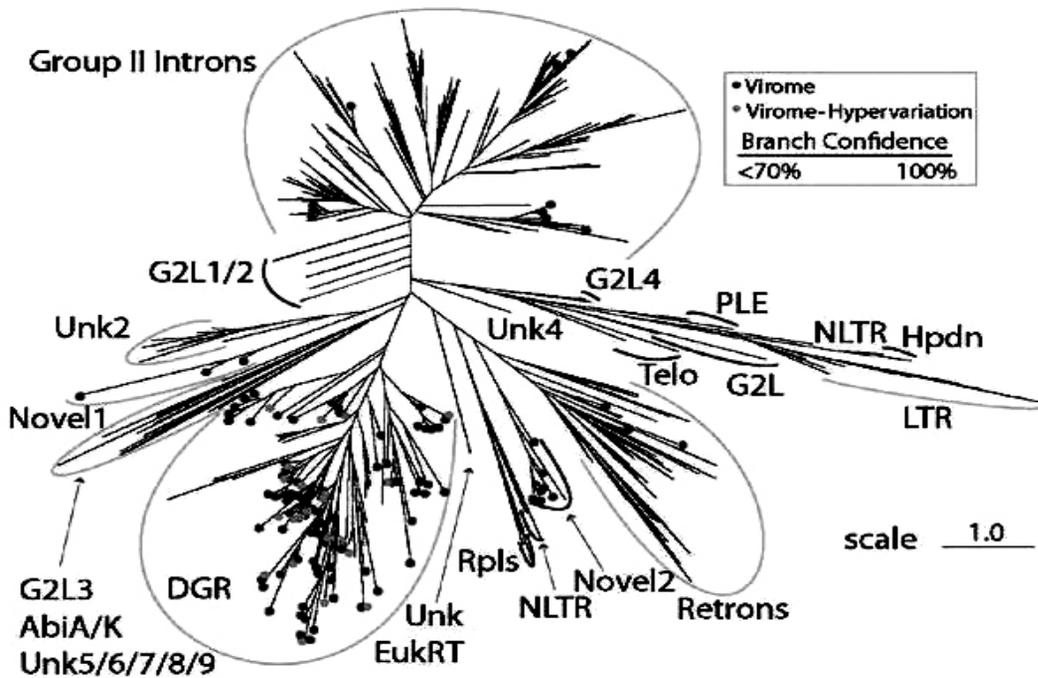
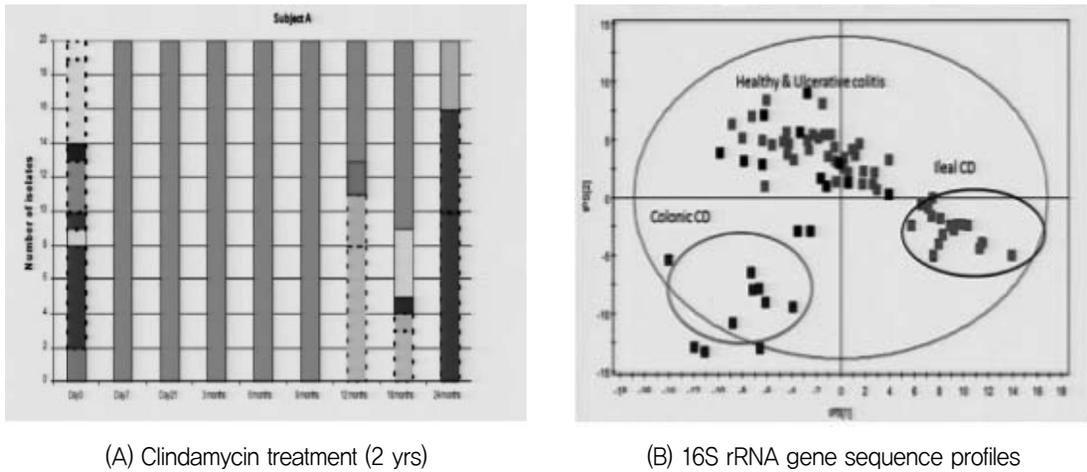


Fig. 5. Phylogenetic tree of reverse transcriptases from human gut bacteriophage (S. Minot *et al.*, Proc. of the Nat. Acad. of Sci, 2012)



(A) Clindamycin treatment (2 yrs)

(B) 16S rRNA gene sequence profiles

Fig. 6. The study of human gut microbiome distribution (A) Effect of Antibiotics (B) The comparion of Crohn's disease patients' microbiome with healthy & ulcerative colitis (ASM, <http://gm.asm.org>, 2012)

많은 차이를 보이는 북미지역의 사람들에 국한된다는 얼마간의 한계가 있다. 이를 보완하기 위해 우리에게 맞는 정보를 확보하는 것이 시급해 보인다.

● 참고문헌 ●

1. American Society for Microbiology. <http://gm.asm.org/index.php/scientific-program/abstracts/abstracts-and-sensitive-issues/308-human-microbiome-project>. Human Microbiome Project, 2012.7.6.
2. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R, QIIME allows analysis of high throughput community sequencing data, *Nature Methods*, **7**(5), 335-336, 2010
3. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome, *Nature* **486**, 207-214, 2012
4. The Human Microbiome Project Consortium. A framework for human microbiome research, *Nature* **486**, 215-221, 2012
5. The NIH HMP Working Group, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Francesco VD, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH, Reed PS, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M, The NIH Human Microbiome Project, *Genome Res*, **19**(12), 2317-2323, 2009
6. Minot S, Grunberg S, Wu GD, Lewis JD, Bushman FD, Hypervariable loci in the human gut virome, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**(10), 3962-3966, 2012

이영경 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 공정기술연구단

전문분야 : 미생물 기능성 연구, 발효

E-mail : ykrhee@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9319