

Next Generation Sequencing을 통한 미생물 군집 분석의 축산분야 활용

김민석* · 백열창 · 오영균
농촌진흥청 국립축산과학원

Application of Next Generation Sequencing to Investigate Microbiome in the Livestock Sector

Minseok Kim*, Youlchang Baek, Young Kyoon Oh

Animal Nutrition and Physiology Team, National Institute of Animal Science, Wanju-gun,
Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea

ABSTRACT

The objective of this study was to review application of next-generation sequencing (NGS) to investigate microbiome in the livestock sector. Since the 16S rRNA gene is used as a phylogenetic marker, unculturable members of microbiome in nature or managed environments have been investigated using the NGS technique based on 16S rRNA genes. However, few NGS studies have been conducted to investigate microbiome in the livestock sector. The 16S rRNA gene sequences obtained from NGS are classified to microbial taxa against the 16S rRNA gene reference database such as RDP, Greengenes and Silva databases. The sequences also are clustered into species-level OTUs at 97% sequence similarity. Microbiome similarity among treatment groups is visualized using principal coordinates analysis, while microbiome shared among treatment groups is visualized using a venn diagram. The use of the NGS technique will contribute to elucidating roles of microbiome in the livestock sector.

(Key words : 16S rRNA gene, Livestock sector, Microbiome, Next-generation sequencing)

서 론

자연계에는 수많은 미생물이 존재하지만 실험실에서 배양 가능한 미생물은 극히 일부 분에 불과하다. 특히 축산분야에 있어서 배양의 어려움 때문에 가축의 분뇨 및 장내미

생물에 대한 연구가 많이 이루어지지 않고 있다 (Kim et al., 2011a). 하지만 16S rRNA 유전자가 사용되기 시작하면서 배양이 불가능한 수많은 미생물의 군집을 확인할 수 있게 되었다 (Woese and Fox, 1977).

초창기에는 미생물 군집 분석에 clone library

*Corresponding author : Minseok Kim, Animal Nutrition and Physiology Team, National Institute of Animal Science, Wanju-gun, Jeollabuk-do 55365, Republic of Korea, Tel: +82-63-238-7459,
E-mail: mkim2276@korea.kr

2015년 7월 9일 투고, 2015년 8월 10일 심사완료, 2015년 8월 12일 게재확정

나 DGGE 방법을 사용하여 16S rRNA 유전자를 전통적 방법인 Sanger sequencing에 의해 분석하였다(Yu and Morrison, 2004a; Kim et al., 2011b). 하지만 clone library나 DGGE로 분석할 수 있는 16S rRNA 유전자 숫자가 한계가 있기 때문에 소수의 우점 미생물만 확인할 수 있었다. Quantitative real-time PCR의 사용은 특정 미생물을 정확하게 정량할 수 있는 장점을 가지고 있지만 다수의 미생물을 동시에 분석할 수 없다(Kim et al., 2012). 이러한 한계들을 극복하기 위해 다수의 미생물의 군집을 동시에 분석할 수 있는 phylogenetic microarray가 사용될 수 있고, 축산 부문에서는 약 1,600종의 반추미생물을 동시에 분석할 수 있는 phylogenetic microarray가 제작되었다(Kim et al., 2014a). 하지만 phylogenetic microarray 방법으로는 새로운 미생물의 군집을 분석하기 어렵다는 한계점을 가지고 있다.

최근에 새로운 미생물을 포함하여 수백만 개의 16S rRNA 유전자를 분석할 수 있는 Next Generation Sequencing (NGS) 방법이 사용되기 시작하면서 우점하지 않는 가축 장내 미생물의 군집까지 분석할 수 있게 되었다(Kim et al., 2014b; Myer et al., 2015). 축산부문에 NGS 기법을 이용한 가축 장내미생물의 연구는 활발하게 진행되고 있지만, 아직까지 NGS 기법을 이용한 가축분뇨 내 미생물 군집에 관한 연구는 거의 수행되지 않았다. 따라서 향후 연구에서 NGS 기법을 사용한다면 가축분뇨 내 미생물 군집을 포괄적으로 이해할 수 있을 것이다. 본 연구에서는 NGS 기법을 이용한 미생물의 군집분석 방법 과정을 정리하였다.

Metagenomic DNA 추출

첫 번째 단계는 가축 분뇨 및 장내 샘플에서 metagenomic DNA를 추출하는 것이다. DNA를 추출하기 위한 여러 가지 방법들이 개발되었지만 미생물 분석을 위한 metagenomic DNA를 추출하기에 가장 효율적인 방법은 bead-beating 방법이다. RBB+C (Repeated Bead Beating Plus Column) 방법은 가축 분뇨 및 장내 샘플에서 metagenomic DNA 추출을 위한 대표적인 bead-beating 방법이다(Yu and Morrison, 2004b). 이러한 RBB+C 방법은 널리 사용되고 있는 QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qiagen, Valencia, CA, USA), FastDNA SPIN Kit(Qbiogene, Carlsbad, CA, USA), phenol-dependent bead-beating 방법과 비교했을 때 더 많은 metagenomic DNA yield를 보여주었다(Yu and Morrison, 2004b).

Next generation sequencing

16S rRNA 유전자는 모든 Bacteria에 존재하며 수백만 년 동안 변이가 거의 일어나지 않았기 때문에 Bacteria taxonomy 분석을 위한 biomarker로 사용될 수 있다(Woese and Fox, 1977). 16S rRNA 유전자의 길이는 1,542 nucleotide bases로 짧아서 빠르고 쉽게 염기서열을 분석할 수 있다. 16S rRNA 유전자는 conserved region과 hyper-variable region으로 구성되어 있다(Fig. 1). Conserved region은 Bacteria의 species가 달라도 16S rRNA 유전자의 염기서열이 거의 동일한 부분으로 universal PCR primer의 binding site이다(Table 1). NGS 방법을 이용한 Bacteria의 16S rRNA

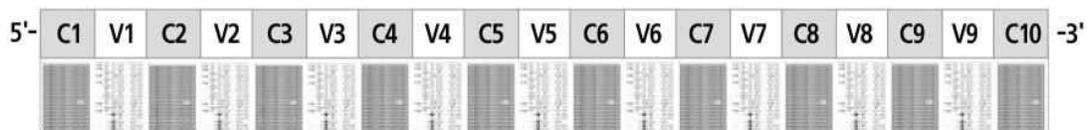


Fig. 1. 16S rRNA gene as a phylogenetic marker. C = conserved region; V = variable region.

Table 1. Bacterial PCR primers for 16S rRNA gene amplicon sequencing

Primer	Sequence (5'→3')	Target	NGS Method	Reference
27f-519r	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	V1	454 pyrosequencing Illumina (2×300 bp)	Eden et al., 1991 Ruff-Roberts et al., 1994 Kim et al., 2011c
	GWATTACCGCGGCKGCTG	-V3		
515f-806r	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	V4	Illumina	Caporaso et al., 2011
	GGACTACNVGGGTWTCTAAT			
27f-1492r	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	V1	Pacific Biosciences	Eden et al., 1991 Mosher et al., 2014
	CGGTTACCTTGTTACGACTT	-V9		

유전자 분석에 주로 사용되는 universal PCR primer는 Table 1과 같다. Hyper-variable region은 미생물의 species가 다르면 염기서열도 달라지는 부분으로서 특정 미생물 분석을 위한 species-specific PCR primer의 binding site이다.

Bacteria의 16S rRNA gene amplicon sequencing을 위해 초창기에는 454 pyrosequencing NGS 방법이 사용되었지만 (Kim et al., 2014b), 최근에는 가격경쟁력이 있고 sequence reads가 우수한 Illumina NGS 방법을 주로 사용되고 있다 (Myer et al., 2015). 그리고 Pacific Biosciences NGS 방법을 사용하여 약 1,500 nucleotide bases의 full-length 16S rRNA 유전자 분석도 시작되고 있다 (Mosher et al., 2014).

16S rRNA 유전자는 모든 Archaea에도 존재하지만 Bacteria의 16S rRNA 유전자의 염기서열과 전반적으로 다르기 때문에 Bacteria와 다른 universal primer를 사용한다. 하지만 Caporaso et al. (2011)은 Bacteria/Archaea 모두 분석할 수 있는 515f/806r universal primer를 제작하였다 (Table 1). 가축분뇨 및 장내 샘플에서 Archaea는 대부분 메탄을 생성하는 methanogen으로 구성되어 있기 때문에 16S rRNA 유전자 분석은 주로 methanogen을 분석하기 위해 사용된다 (Kim et al., 2011a; Freetly et al., 2015). 그렇지만 가축분뇨 및 장내 샘플에서 methanogen diversity가 낮기 때문에 86f (GCTCAGTAACACGTGG)와 915r (GTGCTCCCCGCCAATTCCT) methanogen

universal primer를 이용한 전통적인 clone library 방법이 여전히 많이 사용되고 있다 (Zhou et al., 2009).

Bioinformatics

NGS에 의해 획득된 16S rRNA 유전자들은 Bioinformatics 프로그램을 사용하여 Bacteria의 군집을 분석할 수 있다. Qiime (Caporaso et al., 2010)과 Mothur (Schloss et al., 2009)은 대표적인 software package로서 다양한 bioinformatics 분석을 종합적으로 수행할 수 있다. 16S rRNA gene sequences는 RDP (Cole et al., 2014), Greengenes (DeSantis et al., 2006), Silva (Yilmaz et al., 2014)와 같은 reference 16S rRNA gene database와 비교하여 taxonomy로 분류될 수 있다. 분류학에서 미생물은 종 (species), 속 (genus), 과 (family), 목 (order), 강 (class), 문 (phylum), 계 (domain)로 분류될 수 있고, species는 가장 하위의 분류이고 domain은 가장 상위의 분류이다 (Fig. 2). 예를 들어 species *E. coli*는 genus *Escherichia*, family *Enterobacteriaceae*, order *Enterobacteriales*, class *Gamma*proteobacteria, phylum *Proteobacteria*, domain *Bacteria*에 속한다. Taxonomy classifier 프로그램은 보통 genus까지 분류할 수 있다.

추가적으로 16S rRNA gene sequences는 97% sequence similarity에서 추정상의 species 그룹인 operational taxonomic unit (OTU)로 분

류될 수 있다(Schloss and Handelsman, 2004). 이러한 OTU 데이터를 사용한 Principal Coordinate

Domain	(ex. Bacteria)
Phylum	(ex. Proteobacteria)
Class	(ex. Gammaproteobacteria)
Order	(ex. Enterobacteriales)
Family	(ex. Enterobacteriaceae)
Genus	(ex. Escherichia)
Species	(ex. E. coli)

Fig. 2. Seven major taxonomic ranks. For example, species *E. coli* is assigned to genus *Escherichia*, family *Enterobacteriaceae*, order *Enterobacteriales*, class *Gammaproteobacteria*, phylum *Proteobacteria* and domain *Bacteria*.

Analysis나 Venn diagram 분석은 미생물의 군집을 도식화하는데 사용될 수 있다 (Fig. 3).

Microbial taxonomy in the livestock sector

지금까지 연구 결과를 종합해보면 소의 장내미생물의 경우 Firmicutes가 가장 우점하는

phylum이었고 Bacteroidetes가 두 번째로 우점하는 phylum이었다 (Kim et al., 2011a; Kim et al., 2014b; Myer et al., 2015). Species 수준에서 소의 장내미생물의 군집은 사료의 변화에 가장 큰 영향을 받았다 (Fig. 3). 돼지와 닭의 장내미생물의 경우에도 Firmicutes와 Bacteroidetes에 속하는 species가 우점하였다 (Wei et al., 2013; Park et al., 2014).

가축의 분뇨에서는 많은 연구가 되어 있지 않지만 돼지 분뇨 슬러리의 경우 Firmicutes와 Bacteroidetes에 속하는 species가 우점하였다 (Hwang et al., 2014; Kumari et al., 2015).

결 론

최근 고도화된 NGS 기법이 다양한 분야에서 이용되고 있으나, 축산분야에서의 NGS 기법 활용은 아직 초기단계이다. 그러므로 NGS 기법의 장점을 살려 배양이 불가능했던 가축분뇨 및 장내 주요미생물연구에 활용할 때 축산분야 미생물기전 구명에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

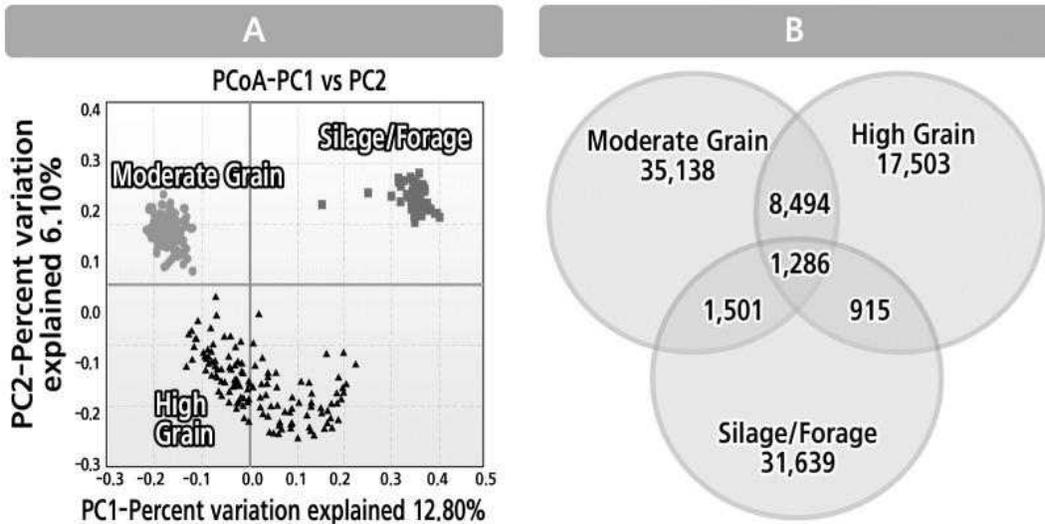


Fig. 3. Examples of principal coordinate analysis (A) and a venn diagram (B). Bovine fecal microbiome was compared among 3 diet groups (Kim et al., 2014b).

사 사

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업 (세부 과제명 : 양돈 관련 축산시설의 온실가스 배출 특성 연구, 세부과제번호: PJ01014602)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인 용 문 헌

1. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods.* 7, 335-336.
2. Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., Fierer, N., Knight, R., 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 Suppl 1, 4516-4522.
3. Cole, J.R., Wang, Q., Fish, J.A., Chai, B., McGarrell, D.M., Sun, Y., Brown, C.T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C.R., Tiedje, J. M., 2014. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic. Acids. Res.* 42, D633-D642.
4. DeSantis, T.Z., Hugenholtz, P., Larsen, N., Rojas, M., Brodie, E.L., Keller, K., Huber, T., Dalevi, D., Hu, P., Andersen, G.L., 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 5069-5072.
5. Eden, P.A., Schmidt, T.M., Blakemore, R. P., Pace, N.R., 1991. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 324-325.
6. Freetly HC, Lindholm-Perry AK, Hales KE, Brown-Brandl TM, Kim M, Myer PR, Wells JE. 2015. Methane production and methanogen levels in steers that differ in residual gain. *J. Anim. Sci.* 93, 2375-2381.
7. Hwang, O.H., Raveendar, S., Kim, Y.J., Kim, J.H., Choi, J.W., Kim, T.H., Choi, D.Y., Jeon, C.O., Cho, S.B., Lee, K.T., 2014. Deodorization of pig slurry and characterization of bacterial diversity using 16S rDNA sequence analysis. *J. Microbiol.* 52, 918-929.
8. Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., 2011a. Status of the phylogenetic diversity census of ruminal microbiomes. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 76, 49-63.
9. Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., 2011b. Phylogenetic diversity of bacterial communities in bovine rumen as affected by diets and microenvironments. *Folia. Microbiol.* 56, 453-458.
10. Kim, M., Morrison, M., Yu, Z., 2011c. Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J. Microbiol. Methods.* 84, 81-87.
11. Kim, M., Yu, Z., 2012. Quantitative comparisons of select cultured and uncultured microbial populations in the rumen of cattle fed different diets. *J. Anim. Sci.*

- Biotechnol. 3, 28.
12. Kim, M., Wang, L., Morrison, M., Yu, Z., 2014a. Development of a phylogenetic microarray for comprehensive analysis of ruminal bacterial communities. *J. Appl. Microbiol.* 117, 949-960.
 13. Kim, M., Kim, J., Kuehn, L.A., Bono, J.L., Berry, E.D., Kalchayanand, N., Freetly, H.C., Benson, A.K., Wells, J.E., 2014b. Investigation of bacterial diversity in the feces of cattle fed different diets. *J. Anim. Sci.* 92, 683-694.
 14. Kumari, P., Choi, H.L., Sudiarto, S.I., 2015. Assessment of Bacterial Community Assembly Patterns and Processes in Pig Manure Slurry. *PLoS. One.* 10, e0139437.
 15. Mosher, J.J., Bowman, B., Bernberg, E.L., Shevchenko, O., Kan, J., Korlach, J., Kaplan, L.A., 2014. Improved performance of the PacBio SMRT technology for 16S rDNA sequencing. *J. Microbiol. Methods.* 104, 59-60.
 16. Myer, P.R., Smith, T.P., Wells, J.E., Kuehn, L.A., Freetly, H.C., 2015. Rumen microbiome from steers differing in feed efficiency. *PLoS One.* 10, e0129174.
 17. Park, S.J., Kim, J., Lee, J.S., Rhee, S.K., Kim, H., 2014. Characterization of the fecal microbiome in different swine groups by high-throughput sequencing. *Anaerobe.* 28, 157-162.
 18. Ruff-Roberts, A.L., Kuenen, J.G., Ward, D.M., 1994. Distribution of cultivated and uncultivated cyanobacteria and Chloroflexus-like bacteria in hot spring microbial mats. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 697-704.
 19. Schloss, P.D., Handelsman, J., 2004. Status of the microbial census. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68, 686-691.
 20. Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., Lesniewski, R.A., Oakley, B.B., Parks, D. H., Robinson, C.J., Sahl, J.W., Stres, B., Thallinger, G.G., Van Horn, D.J., Weber, C. F., 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537-7541.
 21. Wei, S., Morrison, M., Yu, Z., 2013. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *92*, 671-683.
 22. Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088-5090.
 23. Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Priesse, E., Quast, C., Schweer, T., Peplies, J., Ludwig, W., Glöckner, F.O., 2014. The SILVA and “All-species Living Tree Project (LTP)” taxonomic frameworks. *Nucleic. Acids. Res.* 42, D643-D648.
 24. Yu, Z., Morrison, M., 2004a. Comparisons of different hypervariable regions of rrs genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4800-4806.
 25. Yu, Z., Morrison, M., 2004b. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques.* 36, 808-812.
 26. Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E., Guan, L.L., 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6524-6533.