

大韓癩學會誌 : 第40卷, 第2號 2007
Korean Leprosy Bulletin,
Vol. 40, No. 2, December, 2007

한국에서 분리된 나균의 *rpoB* 유전자 돌연변이에 대한 조사

한국한센복지협회 연구원

김종필*, 김연실

- Abstract -

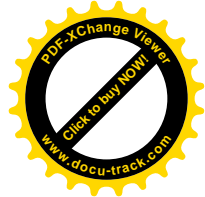
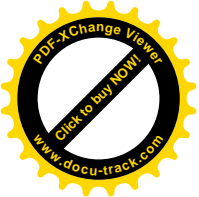
Mutation of *rpoB* gene in *M leprae* isolates from Korea

Jong-Pill Kim. M.D., Yeon-sil Kim, M.D.

Institute for Leprosy Research, Korean Hansen Welfare Association

Global efforts to control leprosy by intensive chemotherapy, including rifampin, have led to a significant decrease in the number of registered patients. But emergence of rifampin-resistant strains of pathogenic mycobacteria has threatened the usefulness of this drug in treating mycobacterial diseases. Mutations in the *rpoB* gene, encoding the β subunit of RNA polymerase, were reported to result in resistance to rifampin in several mycobacterial species, including *M leprae*. To prevent the emergence and transmission of drug-resistant leprosy and to identify and treat existing cases, it is necessary to establish rapid methods for detection of drug resistance in *M leprae*. However, *M. leprae* has not been cultivated on artificial media; therefore, to identify drug susceptibility patterns, bacteria must be tested using Shepard's mouse footpad assay. This in vivo method requires at least 6 months and relatively large numbers of bacteria. Recently, there have been advances in the elucidation of molecular events responsible for drug resistance in mycobacteria. Sequences of the *rpoB* genes were analyzed for 43 isolates of *Mycobacterium leprae* from leprosy patients in Korea. Three isolates (6.98%) showed representative mutations in the *rpoB* genes, suggesting the emergence of rifampin-resistant *M. leprae*.

Key words : leprosy, mutation, *rpoB* gene



서 론

한센병은 나균(*Mycobacterium leprae*)에 의해 발생되고 아시아, 라틴 아메리카, 그리고 아프리카의 몇몇 국가들에서 여전히 주요한 건강상의 문제인 만성 전염성 질병이다. 적극적인 복합화학요법에 의한 한센병 관리의 세계적인 노력으로 등록된 환자들의 수는 현저한 감소를 보이고 있다. 그러나 신환자 경우에는 세계보건기구(WHO)의 년보를 보면 복합화학요법이 도입 후에도 500,000명 이상이다¹⁾. 약제내성 나균의 전파를 막기위해 복합화학요법으로 한센병을 치료하기를 추천하였다. 답슨은 1964년²⁾, 리팜핀은 1976³⁾, 옥프로사신은 1996년⁴⁾ 등 각종 약제에 대한 약제내성 나균이 보고되었다.

다약제내성(multidrug-resistant(MDR)) 한센병의 출현과 전파를 예방하고 기존 약제내성 한센병을 확인하고 치료하기 위해 약제 내성 나균의 발견을 위한 좀더 신속한 방법을 확립하는 것이 필요하다. 그러나 나균은 인공 배지에서는 배양되지 않는다. 그래서 약제에 대한 감수성 양상을 확인하기 위하여 세균을 Shepard 등의 쥐 족저 내접종법⁵⁾을 사용하며 검사하여야 한다. 이 생체내 검사방법은 적어도 6개월이 소요되며 비교적 많은 양의 세균이 필요하다. 최근에 미코박테리움⁶⁻⁹⁾의 약제 내성에 확인

을 위한 의미있는 분자생물학적 진보가 있었다.

이번 연구는 리팜핀에 내성과 관계되는 나균의 *rpoB*의 특정 구역의 DNA 염기서열에 대한 분석을 실시하여 우리나라에서의 현황을 알고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상환자

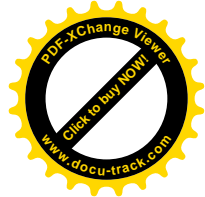
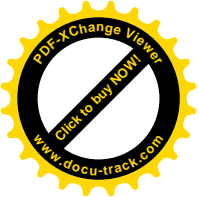
2003년 1월부터 2006년 12월 까지 한국한센복지협회 연구원에 내원하여 진단된 한센병 환자(신환자 및 재발환자 포함) 중 조직생검으로부터 조직 내에서 나균 DNA를 추출에 성공한 43예의 생검 시료를 이용하여 실험을 실시하였다. 43예 중 28예가 신환자이었고, 15예가 재발환자이었다.

2. 방 법

1) DNA 추출

대상환자의 병변 부위에서 조직생검을 실시하여 시료는 실험 전까지는 액화질소탱크속에서 보관하였다. QIAamp DNA Mini Kit를 이용하여 조직 내에서의 나균 DNA추출하고 사용하기 전까지는 20℃에서 보관하였다.

* 교신저자 : 김종필
 전자우편 : dr_jpkim@hotmail.com
 주 소 : 경기도 의왕시 오전동 산86
 한국한센복지협회 연구원
 전 화 : 031-452-7094
 팩 스 : 031-455-6592



한국에서 분리된 나균의 *rpoB* 유전자 돌연변이에 대한 조사 : 김종필, 김연실

2) PCR

시발체는 나균의 *rpoB* (Z14314) 유전자의 염기서열에 대해 새로이 설계하였다. 시발체는 *rpoB*-F (5'-AGATCCGGGTCGGTATGTC-3') and *rpoB*-R(5'-CCTCGTCACCGGTCAAGTA-3') 을 사용하였다.

PCR 조건은 95°C에서 5분 간 denaturation 시킨 후 95°C에서 30초, 60.5°C에서 30초, 72°C에서 30초 간 반응시키는 cycle을 40 회 반복하고 72°C에서 10분간 반응시켰다.

PCR 후 증폭된 PCR product는 4% Metaphor gel에서 100V 하에서 1시간 간 전기영동하여 확인하였으며, 염기서열의 정확한 분석을 위해 시퀀싱을 외부기관(바이오닉스)으로 의뢰하여 그 결과를 확인하였다.

3) Reverse hybridization

Honore 등⁹⁾에 의한 방법으로 reverse hybridization을 실시하였다. (Fig.1, Table 1)

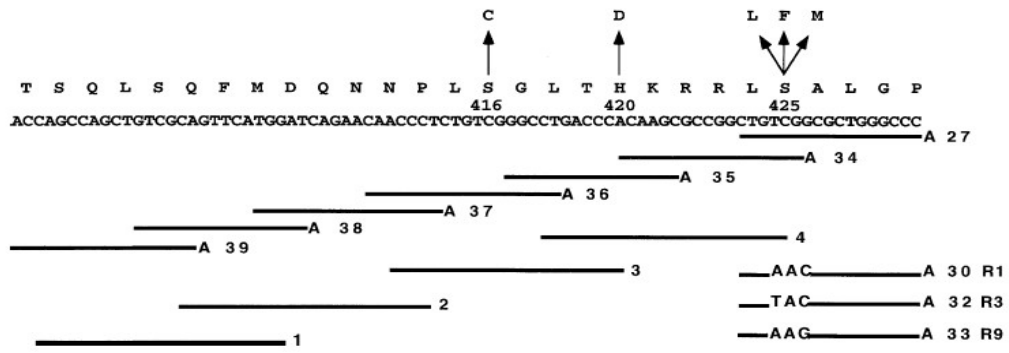


Fig. 1. reverse hybridization에서 사용한 capture probe 위치

For PCR and sequencing

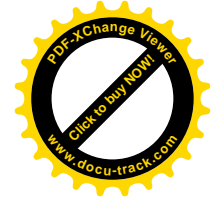
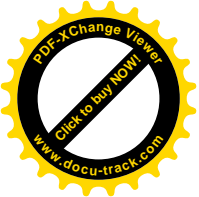
| | |
|-------|-----------------------|
| Bpo22 | bCAGGACGTCGAGGCGATCAC |
| rpo32 | TCCTCGTCAGCGGTCAAGTA |
| rpo46 | TCGATCGGGCACATCCGGC |

Capture probes

| | |
|-------|----------------------------|
| S1 | aCCATGAAC T GCGACAGCTGGCTG |
| S2 | aGGGTTGTTCTGATCCATGAAC TG |
| S3 | aTGGGTCAGGCCGACAGAGGGT |
| S4 | aGACAGCCGGCGCTGTGGGTCAG |
| A27 | aAAAGGGCCAGCGCCGACAG |
| A30R1 | aAAAGGGCCAGCGCCAACAG |
| A32R3 | aAAAGGGCCAGCGCCATCAG |
| A33R9 | aAAAGGGCCAGCGCGAACAG |
| A34 | aAAACGACAGCCGGCGTTGT |
| A35 | aAAAAGCTTGTGGGTCAGGCC |
| A36 | aAAAAGGCCGACAGAGGGTT |
| A37 | aAAAAGGGTTGTTCTGATCCA |
| A38 | aAAAGATCCATGAACTGCGAC |
| A39 | aAAATGCGACAGCTGGCTGTT |

a, denotes the position of the 5'-amino link group; b, denotes biotin.

Table 1. reverse hybridization에서 사용한 primer 및 capture probe



결 과

1. 대상환자의 평가

대상환자 43예 중 28예가 신환자이었고, 15예가 재발환자이었다. 27예는 남자이고 16예가 여자이었으며, 이 중 5예은 외국인(방글라데쉬, 태국, 필리핀, 인도네시아 등)이었으며, 평균 나이는 57.91세(표준편차 18.08685)이었다. 이들의 병형은 LL 7예, BL 30예, BB 3예, BT 3예이었다.

신환자 28예 중 15예가 남자이고 12예가 여자이었으며, 이 중 5예은 외국인(방글라데쉬, 태국, 필리핀, 인도네시아 등)이

었으며, 평균 나이는 55.59세(표준편차 21.26257)이었다. 이들의 병형은 LL 4예, BL 18예, BB 3예, BT 2예이었다.

재발환자 16예 중 12예가 남자이고 4예가 여자이었으며, 평균 나이는 61.81세(표준편차 10.31645)이었다. 이들의 병형은 LL 3예, BL 12예, BT 1예이었다.

reverse hybridization과 염기서열의 정확한 분석을 위해 시퀀싱의 그 결과에서 3예에서 변이를 확인하였다. 3예가 모두가 재발환자로 확인되었으며, 2예은 Ser531가 Leu로, 1예는 His526가 Tyr로 확인되었다. (Table 2, Table 3).

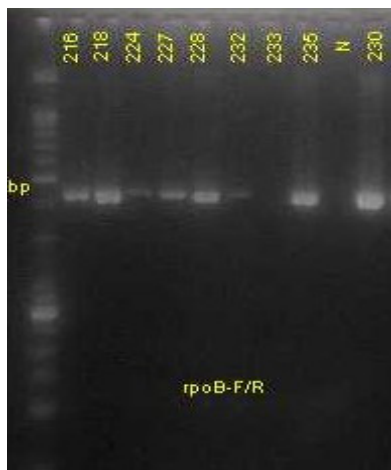


Fig. 2. 전기영동 예

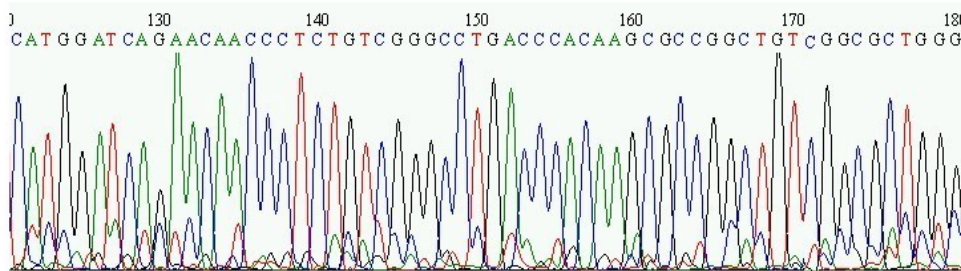


Fig. 3. 시퀀싱 예(1) no mutation

한국에서 분리된 나균의 *rpoB* 유전자 돌연변이에 대한 조사 : 김종필, 김연실

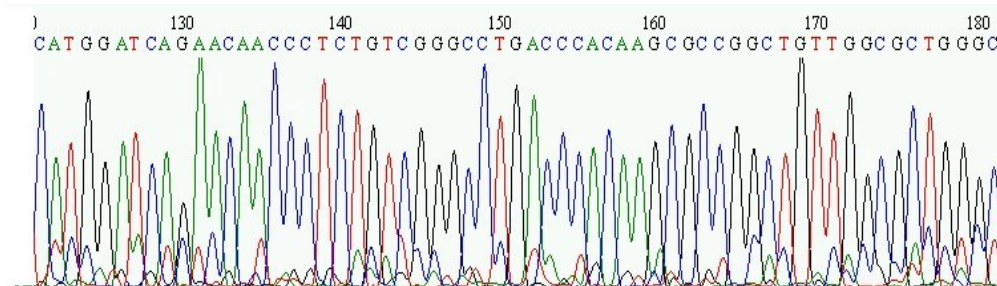


Fig. 4. 시퀀싱 예(2) mutation

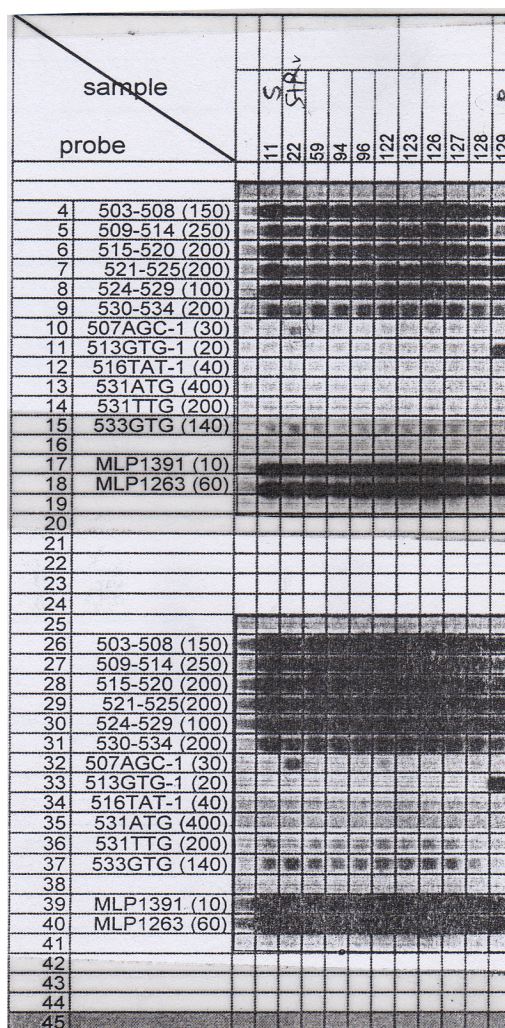


Fig. 5. reverse hybridization 예

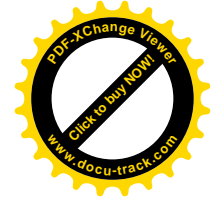
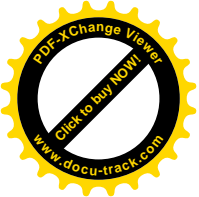
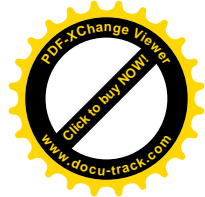
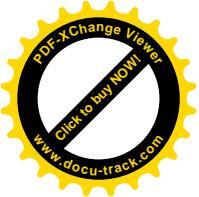


Table 2. 신환자 결과

| ID | 성별 | 나이 | 병형 | seq. | R.H. | 기타 |
|-----|----|----|----|-------------|-------------|----|
| 233 | M | 23 | BB | no mutation | no mutation | F |
| 67 | M | 77 | BL | no mutation | no mutation | |
| 134 | M | 15 | BL | no mutation | no mutation | |
| 177 | M | 23 | BL | no mutation | no mutation | F |
| 202 | M | 65 | BL | no mutation | no mutation | |
| 205 | M | 62 | BL | no mutation | no mutation | |
| 206 | M | 22 | BL | no mutation | no mutation | F |
| 224 | M | 31 | BL | no mutation | no mutation | F |
| 225 | M | 61 | BL | no mutation | no mutation | |
| 227 | M | 73 | BL | no mutation | no mutation | |
| 235 | M | 68 | BL | no mutation | no mutation | |
| 251 | M | 67 | BL | no mutation | no mutation | |
| 276 | M | 64 | BL | no mutation | no mutation | |
| 223 | M | 25 | BT | no mutation | no mutation | F |
| 200 | M | 69 | LL | no mutation | no mutation | |
| 77 | F | 66 | BB | no mutation | no mutation | |
| 144 | F | 72 | BB | no mutation | no mutation | |
| 93 | F | 66 | BL | no mutation | no mutation | |
| 123 | F | 64 | BL | no mutation | no mutation | |
| 175 | F | 12 | BL | no mutation | no mutation | |
| 218 | F | 75 | BL | no mutation | no mutation | |
| 228 | F | 72 | BL | no mutation | no mutation | |
| 230 | F | 76 | BL | no mutation | no mutation | |
| 131 | F | 71 | BT | no mutation | no mutation | |
| 185 | F | 61 | LL | no mutation | no mutation | |
| 199 | F | 64 | LL | no mutation | no mutation | |
| 231 | F | 57 | LL | no mutation | no mutation | |



한국에서 분리된 나균의 *rpoB* 유전자 돌연변이에 대한 조사 : 김종필, 김연실

Table 3. 재발환자 결과

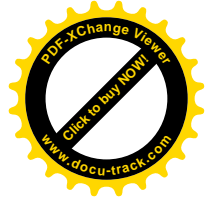
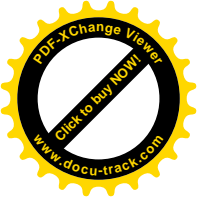
| ID | 성별 | 나이 | 병형 | seq. | R.H. |
|-----|----|----|----|-------------|-------------|
| 5 | M | 66 | BL | no mutation | no mutation |
| 11 | M | 37 | BL | no mutation | no mutation |
| 129 | M | 66 | BL | His526 | His526 |
| 171 | M | 76 | BL | no mutation | no mutation |
| 186 | M | 66 | BL | no mutation | no mutation |
| 198 | M | 70 | BL | Ser531 | Ser531 |
| 208 | M | 69 | BL | no mutation | no mutation |
| 212 | M | 49 | BL | no mutation | no mutation |
| 216 | M | 45 | BL | no mutation | no mutation |
| 56 | M | 65 | LL | no mutation | no mutation |
| 92 | M | 59 | LL | no mutation | no mutation |
| 196 | M | 59 | LL | no mutation | no mutation |
| 122 | F | 64 | BL | no mutation | no mutation |
| 215 | F | 64 | BL | no mutation | no mutation |
| 280 | F | 73 | BL | Ser531 | Ser531 |
| 124 | F | 61 | BT | no mutation | no mutation |

고 찰

1982년까지 다균나를 위한 표준 치료법은 답손을 이용한 단독요법을 평생 동안 시행하는 것이었다^{11,12)}. 복합 화학요법은 1982년¹³⁾에 세계보건기구(WHO)에 의하여 권고되었는데, 이 치료법에는 다른 약제에 비해 나균에 대한 살균력이 강한 리팜핀이 포함되어 있다^{14,15)}. 리팜핀의 약제 내성이 RNA 폴리메라아제의 서브유닛을 부호화하는 *rpoB* 유전자의 돌연변이가 있는 나균을

포함하는 여러 마이코박테리움에서 보고되었다^{16,17)}. 리팜핀 내성 한센병이 리팜핀 단독요법으로 치료받던 환자에서 발견되었다^{18,19)}.

나균은 시험관 내에 아직 배양되지 않았던 서서히 증식하는 마이코박테리움(세대기간:11-14일)이다. 40년 전 Shepard는 쥐 족저 내 접종실험²⁰⁾와 약제 감수성검사²¹⁾ 등을 생체 내 실험법으로 표준화하였다. 이



는 환자로부터 분리된 나균을 쥐에게 접종하여 약제를 투여함으로써 약제가 세균의 증식을 억제하는 가를 알아보는 방법으로 시간이 많이 소요되는 방법이고, 12개월이 필요하며 비용이 많이 드는 시설과 전문가 등이 필요하며 검사의 성공여부는 조직검사 후 접종 시까지의 관리 및 경과시간 등이 중요하다. 이러한 이유들 때문에 일부 실험실에서만 나균에 대한 약제 내성검사를 수행하고 있다.

분자 생물학의 진보는 생체의외 방법에 의해 나균의 약제 내성을 진단하는 것을 위한 기회를 제공했다. 리팜핀 내성의 분자생물학적 작용은 대장균²²⁾에 처음으로 기술되었고 나균²¹⁾과 결핵균²²⁾에서 1993년에 밝혀졌다. 리팜핀 내성은 RNA 폴리메라아제의 서브유닛을 암호화하여 쓰는 *rpoB* 유전인자에 변이들과 관련된다. 마이코박테리움에서 약제 내성과 관련되는 모든 변이들은 500-540 영역(대장균 *rpoB*에 대해서 영역 표시를 위해 사용되는 숫자 방식 편제)이다²⁵⁾. 유전학적 분석 및 쥐 족저내 접종실험으로 리팜핀 약제 감수성 실험 등이 있었다^{26, 27, 28)}.

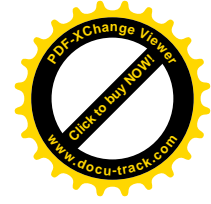
마이코박테리움의 리팜핀 내성 변이의 자리가 모두가 500-540 영역에 위치한 것이 리팜핀 내성 나균 균주에서 관찰되었다¹⁵⁾. His526와 Ser531는 RNA 폴리메라아제의 β 서브유닛에 묶는 리팜핀을 위해 중요한 것으로 보인다^{29, 30)}. 이 두 위치는 지금까지 25개의 분리된 리팜핀내성나균균주에서 23개 (92 %)가 포함되었다^{19, 20, 29, 30, 31)}. 그러므로 나균의 *rpoB* 유전인자 526 및 531영역의 대체 관찰은 리팜핀 내

성을 예측하기 위한 가능성 방법일 수 있다³⁰⁾. Grosset 등⁸⁾ 및 Maeda 연구³¹⁾에 의해 보고된 한센병의 리팜핀 내성 예로 의하면 이차적 리팜핀내성은 56 % (39명의 환자 중 22예) 및 40 % (30명의 환자 12예)로 결핵에서의 발견된 예(20%)보다 더 높기는 하지만 한센병에서는 전체 대상 환자가 매우 낮기 때문에 전체를 설명하기에는 적절하지는 않다. 또한 복합화약요법 이후에 리팜핀에 대한 이차 약제 내성은 보고되고 있지 않다³³⁾.

본 연구에서는 PCR 후 시퀀싱 및 reverse hybridization법을 통하여 우리나라에서 발견된 환자의 시료 43예 중 3예(6.98%)에서 526 및 531영역에서의 내성으로 추정할 수 돌연변이를 발견할 수 있었다. 이는 그 간에 각종 보고에서의 결과와 크게 상이하지 않았다. 향후 우리나라의 한센사업의 성공적 마무리를 위해 각종 약제에 대해 분자생물학적 방법을 통한 내성검사법을 적극적으로 이용하는 노력이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

1. 2003년 1월부터 2006년 12월 까지 한국한센복지협회 연구원에 내원하여 진단된 한센병 환자(신환자 및 재발환자 포함) 중 조직생검으로부터 조직 내에서 나균 DNA를 추출에 성공한 43예의 생검 시료를 이용하여 실험을 실시하였다. 43예 중 28예가 신환자이었고, 15예가 재발환자이었다.

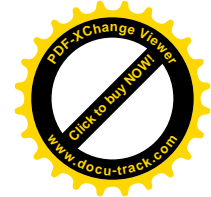
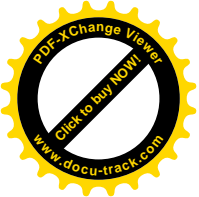


2. reverse hybridization과 염기서열의 정확한 분석을 위해 시퀀싱의 그 결과에서 3예에서 변이를 확인하였다. 3예가 모두가 재발환자로 확인되었으며, 2예는 Ser531가 Leu로, 1예는 His526가 Tyr로 확인되었다. 5예 중 신환자에서는 2예, 재발환자에서는 3예가 확인되었다.

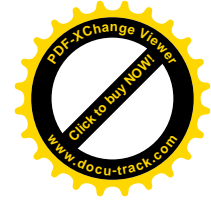
참고문헌

1. World Health Organization. 2000. Leprosy global situation. Wkly. Epidemiol. Rec. 75:226-231
2. Pettit, J. H.S., and R. J.W. Rees. 1964. Sulphone resistance in leprosy. An experimental and clinical study. Lancet ii:673-674.
3. Jacobson, R. R., and R. C. Hastings. 1976. Rifampin-resistant leprosy. Lancet ii:1304-1305.
4. Ji, B., E. G. Perani, C. Petinom, and J. H. Grosset. 1996. Bactericidal activities of combinations of new drugs against *Mycobacterium leprae* in nude mice. Antimicrob. Agents Chemother. 40:393-399
5. Shepard, C. C. 1967. A kinetic method for the study of drugs against *Mycobacterium leprae* in mice. Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis. 35:429-435.

6. Jamal, M. A., S. Maeda, N. Nakata, M. Kai, K. Fukuchi, and Y. Kashiwabara. 2000. Molecular basis of clarithromycin-resistance in *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. Tuberc. Lung Dis. 80:1-4
7. Musser, J. M. 1995. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular insights. Clin. Mol. Microbiol. Rev. 8:496-514.
8. Ramaswamy, S., and J. M. Musser. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberc. Lung Dis. 79:3-29
9. Honore N., Roche PW, Grosset JH et al: A method for rapid detection of rifampicin-resistant isolates of *Mycobacterium leprae*. Lepr Rev. 2001 Dec;72(4):441-8.
10. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, December 2001, p. 3635-3639, Vol. 45, No. 12
11. Pearson J, Rees R, Waters M. Sulphone resistance in leprosy. A review of 100 proven clinical cases. Lancet 1975;2(7924):6972.
12. Ji B. Drug resistance in leprosy: a review. Int J Lepr 1985;56:265-78.
13. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programs. WHO Technical Report Series 675. Geneva: World Health Organization, 1982.



14. Shepard CC, Levy L, Fasal P. Rapid bactericidal effect of rifampin on *Mycobacterium leprae*. *Am J Trop Med Hyg* 1972;221:4469.
15. Levy L, Shepard CC, Fasal P. The bactericidal effect of rifampicin on *M. leprae* in man: (a) single doses of 600, 900 and 1200 mg; and (b) daily doses of 300 mg. *Int J Lepr* 1976;44:1837.
16. Honore, N., and S. T. Cole. 1993. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:414-418
17. Williams, D. L., C. Waguespack, K. Eisenach, J. T. Crawford, F. Postals, M. Salfinger, C. Nolan, C. Abe, V. Sticht-Groh, and T. P. Gillis. 1994. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2380-2386
18. Jacobson R, Hastings R. Rifampin-resistant leprosy. *Lancet* 1976;2 (7998):13045.
19. Grosset JH, Guelpa L, Lauras CC, Bobin P, et al. Study of 39 documented relapses of multibacillary leprosy after treatment with rifampin. *Int J Lep* 1989;57:60714.
20. Shepard C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacillus into footpads of mice. *J Exp Med* 1960;112:44554.
21. Baohong J. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1987;55:S8305.
22. Jin D, Gross C. Mapping and sequencing of mutations in the *Escherichia coli* rpoB gene that lead to rifampin resistance. *J Mol Biol* 1988;202:4558.
23. Honor N, Cole ST. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:4148.
24. Telenti A, Imboden P, Marchesi F, Schmidheini T, Bodmer T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:20548.
25. Musser J. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights. *Clin Microbiol Rev* 1995;8:496514.
26. Cambau E, Perani E, Guillemin I, Jamet P, Ji B. Multidrug resistance to dapsone, rifampicin and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet* 1997;349:1034.
27. Honor N, Perrani E, Telenti A, Grosset J, Cole ST. A simple and rapid technique for the detection of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr* 1993;61:6004.



한국에서 분리된 나균의 *rpoB* 유전자 돌연변이에 대한 조사 : 김종필, 김연실

28. Williams D, Waguespack C, Eisenach K, et al. Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:23806.
29. Miller L, Crawford J, Shinnick T. The *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:80511.
30. Pablo Mndez A, Raviglione MC, Laszlo A, et al. Global surveillance for antituberculosis drug resistance 1994-1997. *N Engl J Med* 1998; 338:16419.
31. Maeda S, Matsuoka M, Nakata N et al: Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Dec;45(12):3635-9.
32. Desikan K. The risk of relapse after multidrug therapy in leprosy. *Lepr Rev* 1997;68:1146.
33. Ji B, Perani E, Petitnon C, Grosset JH. Bactericidal activities of combinations of new drugs against *Mycobacterium leprae* in nude mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:3939.