

16S ribosomal DNA sequence를 이용한 생물무기금지협약 목록물질 중 병원성 미생물 두 종의 계통도 분석

이수민, 임윤택, 최형기

산업자원부 기술표준원 생물환경과

Tel. 02-509-7250 Fax. 02-507-1922

Burkholderiales에 속하는 미생물 중 풋마름병을 유발하는 *Ralstonia solanacearum*과 인·수에 공통으로 적용되는 위트모어씨 병(whitmores disease)을 유발하는 *Burkholderia mallei*는 생물무기금지협약 목록물질에 포함되어있다. 생물무기금지협약은 생물무기 및 독소무기의 개발·생산·비축의 금지와 그 폐지와 관한 국제협약으로 1974년 발효되어, 현재 144개국에 가입되어 있다. 여기서는 생물무기금지협약 대상 목록물질 내에서 두 종의 병원성 미생물을 대상으로 16S ribosomal DNA 유전자 수준에서의 차이를 살펴보고자 하였다. 이를 위해 Ralstoniaceae에 해당되는 몇 종의 미생물과 Burkholderiaceae에 속하는 몇 종의 미생물에서 가장 보존적인 부분으로 알려져 있는 16S ribosomal DNA 염기서열을 대상으로 하여 multiple alignment를 수행하고, 이를 기반으로 계통도를 분석하여 보았다.^{1),5)}

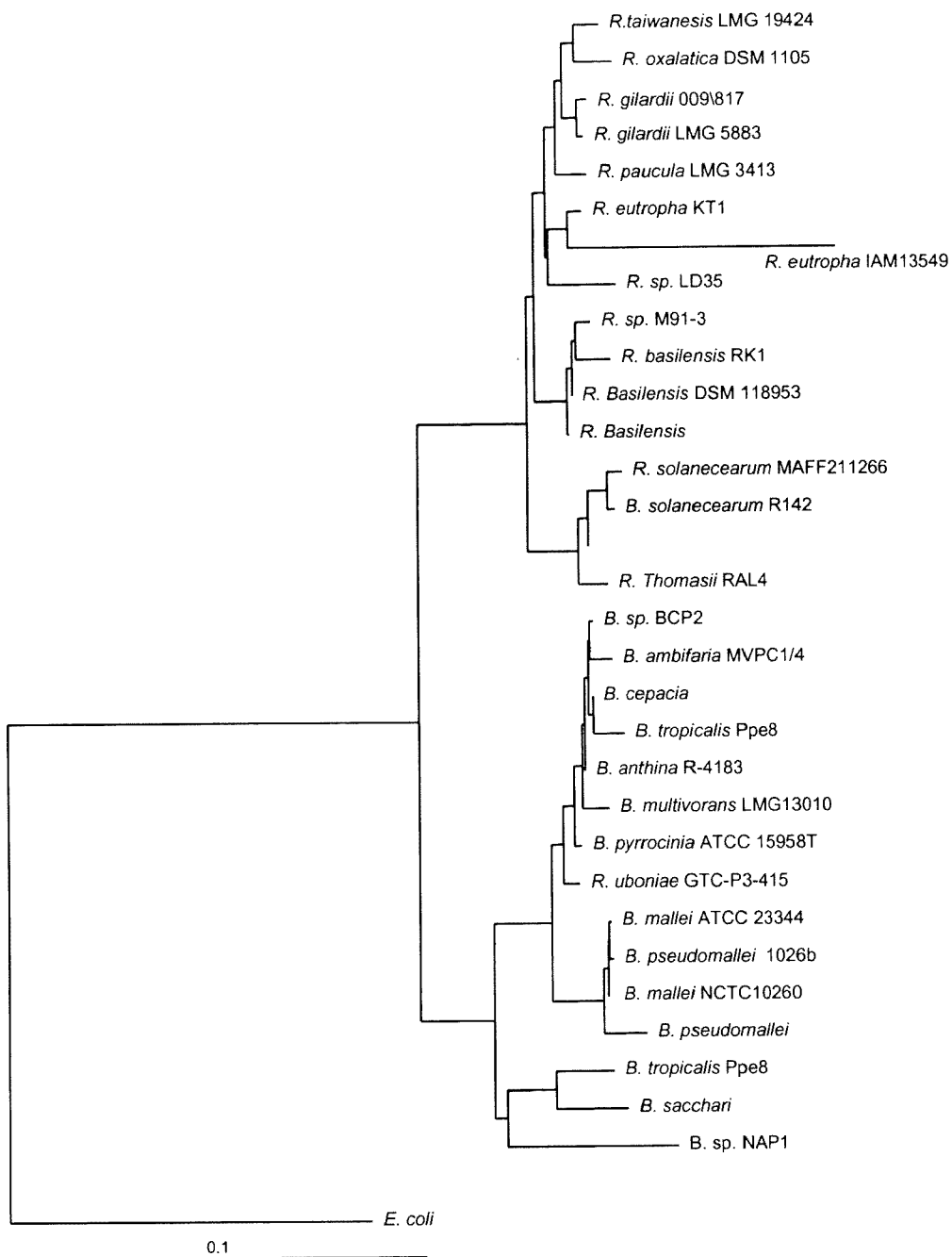
이들의 16S ribosomal DNA 염기서열의 확보는 NCBI Genbank database를 통해 확보하였다. 계통도 분석을 위해 사용된 NCBI Genbank database는 table 1.에서 제시하였으며, 이들을 대상으로, 먼저 일본의 DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>)에서 CLUSTAL W를 이용하여 multialignment를 수행하였고, 계통도를 분석하기 위해 PHYLIP(ver 3.5)²⁾를 사용하였다. 프로그램 사용 조건으로는 seqboot에서 bootstrap을 100회 반복 수행한 결과를 대상으로 DNAdist 프로그램의 distance 계산결과를 Maximum likelihood 방법을 사용하였으며, transition state를 2.0으로 유지하였다. 계통도를 분석하기 위해 outgroup으로 E. coli의 16S ribosomal DNA 염기서열을 사용하였으며, 계통도 작성시에 neighbor joining 방법³⁾을 이용하여 consense 프로그램을 구동하였다. PHYLIP으로부터 얻어진 결과를 시각화하기 위해 treeview(ver 1.6.6)을 사용하였다.

Fig. 1.에서 제시된 계통도를 보면, 비교된 *Ralstonia* 종들을 크게 3가지의 분류를 이루는 것을 확인할 수 있었다. 그 중에서는 *R. solanacearum*과 *B. solanacearum*는 *R. thomasi*를 포함하여 다른 2개의 큰 group과는 별도의 group을 이루어 존재함을 확인하였다. *R. solanacearum*과 *B. solanacearum*는 같은 종류의 organism으로 밝혀졌다.⁴⁾ 또

다른 group에서는 *R. basilensis* 가 분류되었으며, 분석된 기타의 나머지 미생물들이 별도의 group을 이루는 것을 확인하였다. 또한, 계통도에서 *Burkholderia* group에서는 크게 3개의 group으로 구분되는 것을 확인하였다. *B. mallei*,와 *B. pseudomallei* 종들이 별도의 가치를 통해 분류되는 것을 확인하였고, *B. tropicalis* 와 *B. sacchari*의 경우에 다른 group을 구성하였다. 여기에서 생물무기금지협약에 포함되는 미생물 두 종을 대상으로 계통도를 분석하여 병원성을 지니는 미생물들이 별도의 계통 분류를 이루는 것을 확인하였다.

Table 1. NCBI GenBank Accession List & Number of referred bacteria.

Organism	Strain	GenBank Accession No.
<i>B. mallei</i>	ATCC 23344	AF110188
<i>B. mallei strain</i>	NCTC 10260	AF110187
<i>B. pseudomallei</i>		AJ131790
<i>B. pseudomallei</i>	1026b	U91839
<i>B. sp.</i>	BCP2	AF494540
<i>B. cepacia</i>		AF335494
<i>B. tropicalis</i>	Ppe8	AJ420332
<i>B. anthina</i>	R-4183	AJ420880
<i>B. pyrrocinia</i>	ATCC 15958T	AB021369
<i>B. sacchari</i>		AF263278
<i>B. ambifaria</i>	MVPC1/4	AY028444
<i>B. uboniae</i>	GTC-P3-415	AB030584
<i>B. multivorans</i>	LMG 13010	AF148555
<i>B. sp.</i>	NAP1	AF361021
<i>B. sp.</i>	casida	AF226727
<i>R. basilensis</i>	DSM 118953	AF312022
<i>R. taiwanesis</i>	LMG 19424	AF300324
<i>R. sp.</i>	LD35	AF251026
<i>R. gilardii</i>	009\817	RG1306571
<i>R. basilensis</i>		AY047217
<i>R. thomasi</i>	RAL4	RTH270259
<i>R. oxalatica</i>	DSM 1105	AF155567
<i>R. solanacearum</i>	MAFF211266	AF207897
<i>R. paucula</i>	LMG 3413	AF085226
<i>R. gilardii</i>	LMG 5886	AF076645
<i>R. sp.</i>	M91-3	L31650
<i>R. eutropha</i>	KT1	AB15605
<i>R. basilensis</i>	RK1	AJ002302
<i>R. eutropha</i>	IAM13549	D88004
<i>B. solanacearum</i>	R142	U28233



참고문헌

1. Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143-169.
2. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP phylogenetic inference package version 3.5.1. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
3. Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
4. Taghavi, M., C. Hayward, L. I. Sly, and M. Fegan. 1996. Analysis of the phylogenetic relationships of strains of *Burkholderia solanacearum*, *Pseudomonas syzygii*, and the blood disease bacterium of banana based on 16SrRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:10-15.
5. Xiang, L., M. Dorsch, T. Del Dot, L. I. Sly, E. Stackebrandt, and A. C. Hayward. 1993. Phylogenetic studies of the rRNA group II *pseudomonas* based on 16S rRNA gene sequences. *J. Appl. Bacteriol.* 74:324-329.