

***gyrA* and *gyrB* Mutations in Quinolone-resistant Strains of Enterobacteriaceae Isolated from General Hospitals in Busan**

Yun-Tae Kim and Tae-Un Kim[†]

*Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences,
Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea*

We determined the sequences of the quinolone resistance-determining region (QRDR) of *gyrA* and *gyrB* for 21 clinical strains of Enterobacteriaceae resistant to ciprofloxacin, norfloxacin and levofloxacin. The clinical strains were isolated from the specimens of three general hospitals in Busan. In the present study, we found mutations in type II topoisomerase (DNA gyrase) genes for all strains. We confirmed that some genera of Enterobacteriaceae of clinical specimen exhibited decreased sensitivity to fluoroquinolone due to changes in Ser-83→Leu and Asp-87→Asn types on *gyrA* and alterations in Glu-465→Arg and Ser-492→Asn type on *gyrB*. All the twenty-one strains had a missense mutation in *gyrA* (codon 83 and 87). Three of them had an additional mutation in *gyrB* (codon 465 or 492), but one of them had an additional mutation in *gyrB* (codon 426, 427, 491, 495 and 496). The strains which had two mutations in type II topoisomerase genes (*gyrA* and *gyrB*) were significantly more resistant to fluoroquinolones than those with a single mutation in *gyrA* (mean MICs of ciprofloxacin: $\geq 8 \mu\text{g/ml}$, mean MICs of levofloxacin: $\geq 16 \mu\text{g/ml}$). Interestingly, the examination of silent nucleotide changes in the *gyrA* and *gyrB* genes revealed six different patterns of DNA polymorphism, respectively. Fifteen strains of the twenty-one strains bearing the gyrase A mutation shared the same polymorphism and eleven strains of the twenty-one strains bearing the gyrase B mutation shared the same polymorphism.

Key Words: Quinolone resistance-determining region (QRDR), Type II topoisomerase, Mutation, *GyrA*, *GyrB*, Polymorphism

서 론

세균의 항균제에 대한 내성은 지역이나 나라에 따라서 정도의 차이가 있지만 이제는 세계적인 문제로 대두되었다. 항균제 내성 세균의 출현은 항균제의 불필요한 사용 또는 필요한 투여량보다 적은 양의 사용, 장기간의 투여 등의 이유로 증가하고 있다. 항균제 내성 세균의 출현은 항균제 사용 때문인 것은 모두가 인정하고 있다. 하지만 항균제는 감염 증의 가장 중요한 치료제이므로 사용하지 않을 수는 없다. Fluoroquinolone 항균제는 그람양성과 음성 세균 감염 모두에 널리 사용되고 있으며, 폐렴구균 등 그람양성 구균에 대한 항균력이 강화된 새로운 제제들이 사용되고 있다 (Cambau et al., 1995).

초기의 quinolone 제제인 nalidixic acid는 1960년대에 개발되었고, 그람음성 간균으로 인한 요로 감염 치료에 많이 사용되었다 (Leshner et al., 1962). Fluoroquinolone은 이러한 quinolone 구조의 6번 위치에 fluorine이 첨가되어서, 항균범위가 넓어졌다 (Wolfson and Hooper, 1989). 이렇게 개발된 많은 fluoroquinolone계 항생제가 최근 호흡기계 감염, 비뇨기계 감염, 외상 감염, 생식기 감염 등의 많은 감염성 질환에 임상적으로 사용되고 있다 (Akasaka et al., 2001).

최근에 이러한 fluoroquinolone계 항생제에 내성을 일으키는 세균의 증가가 두드러지고 이에 대한 보고가 많이 있다. Quinolone계 항생제는 살균작용을 나타내는 농도일 때 단백질 합성이나 RNA 합성에 영향을 주지 않고, DNA 합성을 특이적으로 저해한다. Quinolone 항균제의 세균에서의 주 표적은 DNA gyrase이다. DNA gyrase는 DNA 복제를 위하여 DNA의 초라선 (supercoil) 구조를 풀어주는 역할을 담당하며, subunit A와 subunit B 각 2분자로 구성된 4량체 구조를 하고 있다 (Gellert et al., 1977). Subunit A는 DNA의 절단과 재결합을 촉진하는 활성이 있으며, DNA를 초라선화하는 활성을 나타낸다. 한편, DNA의 절단과 재결합에는 에너지가 필요하다. Subunit B는 adenosine triphosphate (ATP)를 가수분해하여

*논문 접수: 2007년 4월 13일

수정재접수: 2007년 6월 1일

[†]Corresponding author: Tae-Un Kim, Department of Clinical Laboratory Science, College of Health Sciences, Catholic University of Pusan, Busan 609-757, Korea.

Tel: 82-051-510-0562, Fax: 82-051-510-0568

e-mail: tukim@cup.ac.kr

에너지를 얻는 ATPase 활성을 가지고 있다. 이렇게 세균은 DNA gyrase의 subunit A와 subunit B 2분자의 유기적인 작용 기전에 의하여 복제되고 있다 (Maxwell and Gellert, 1984). Quinolone계 항생제는 주로 DNA gyrase의 subunit A와 subunit B의 활성을 저해한다. DNA gyrase의 작용이 억제되면 DNA의 초라선 구조를 이완하는 작용도, DNA 이중나선구조를 푸는 작용도 못하게 되고, 결국 DNA의 복제가 정지되며 세균은 죽게 된다. 현재까지 알려진 quinolone계 항생제의 내성기전으로는 DNA gyrase의 변이로 인한 quinolone과의 친화력이 감소되거나, 그람음성균의 경우 세포외막의 투과력을 떨어뜨려 quinolone이 균의 내부에 들어오는 것을 막거나, efflux pump를 가동시켜 일단 유입된 quinolone을 균 외부로 내보내는 기전들이 발견되고 있다 (Cohen et al., 1989; Yoshida et al., 1990).

이에 본 연구는 2006년 부산시내 3개 종합병원에 입원한 환자의 검체에서 검출한 369개의 장내세균 중에서 fluoroquinolone계 항생제에 내성을 일으키는 세균 21균주를 선택하여 우리나라에서 분리되는 세균에 대한 quinolone계 항생제의 내성양상에 대해서 연구하고자 하였으며, DNA gyrase의 *gyrA* gene과 *gyrB* gene이 QRDR (quinolone resistant deter-

mining region) 내에서의 DNA 서열 변화를 확인하여 보고하고자 하였다. 그리고 이러한 DNA 서열 변이가 fluoroquinolone 제제에 내성인 균주에서 어떠한 역할을 하며, 또한 항생제 내성과는 어떤 연관성을 갖고 있는지를 분석함으로써 quinolone 항균제의 작용기전과 내성기전 연구에 도움이 되고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험균주

본 실험에 사용된 균주는 2006년 10월부터 2007년 1월까지 부산시내 500병상 이상을 가진 3개 종합병원 임상검체에서 분리된 369개의 장내세균과 균종으로부터 다약제 내성이며 특히, fluoroquinolone 제제에 내성을 나타내는 세균 21균주를 실험대상으로 하였다. 실험대상 21균주 중에서 *E. coli*가 19균주, *Citrobacter freundii*가 1균주, *Serratia marcescens*가 1균주였다 (Table 1). 검체에서 분리된 실험대상 균주는 요에서 15주 (71.4%), 담즙에서 2주 (9.5%), 객담, 농, 복수액, 기타에서 각각 1주씩 검출되었으며 요 검체에서 분리한 균주가 가장 많았다 (Table 1). 임상 병동별 분리율은 비뇨기과 병동이 가장 많았으며 그 다음으로는 내과 병동, 외과 병동이다 (Table 1). 동일 환자의 검체에서 반복 분리된 균주는 연구대상에서 제외하였다.

2. 균주의 동정과 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)

균주의 동정과 최소억제농도의 측정은 Vitek System (bioMerieux, Inc., Hazelwood, MO, USA)과 MicroScan System (American MicroScan, Mahwah, NJ)의 자동화 분석기를 이용하였다. 정도관리를 위해서 표준균주인 *E. coli* ATCC 25922를 시험균주와 같은 방법으로 동시에 시험하였다.

3. Gyrase gene detection by PCR (polymerase chain reaction)

GyrA, *gyrB* 유전자를 검출하기 위하여 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 시험균주를 TSB (tryptic soy broth) 배지에 접종하고 37°C에서 18시간 배양하였으며, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 침전물을 AccPrep® plasmid extraction kit (Bioneer, Seoul Korea)를 이용하여 plasmid DNA를 추출하여 template로 사용하였다. Primer는 *E. coli* K-12 균주의 *gyrA*와 *gyrB* 유전자의 QRDR (quinolone resistance determining region)로 알려진 부위로부터 염기서열을 고안하여 제작하였다 (National Center for Biotechnology Information GenBank). *GyrA*는 *E. coli* K-12의 gyrase A gene nucleotide 2,628 bp 중에서 40 bp에서 707 bp까지의 668 bp 부분을 증폭하기 위하여

Table 1. The source of clinical isolates in this study

No. of strains	Strain names	Source		
		Specimen	Hospitals	Department
60075	<i>E. coli</i>	pus	B	URO
60076	<i>E. coli</i>	bile	B	GS
60077	<i>E. coli</i>	ascitic fluid	B	MED
60078	<i>E. coli</i>	urine	B	URO
60079	<i>E. coli</i>	urine	B	URO
60081	<i>E. coli</i>	urine	B	URO
60082	<i>E. coli</i>	urine	B	URO
60087	<i>E. coli</i>	others	B	MED
60088	<i>E. coli</i>	urine	M	URO
60089	<i>E. coli</i>	urine	M	URO
60090	<i>E. coli</i>	bile	M	GS
60091	<i>E. coli</i>	urine	M	MED
60092	<i>E. coli</i>	urine	M	MED
60093	<i>E. coli</i>	urine	M	NS
70317	<i>E. coli</i>	urine	M	PED
70318	<i>E. coli</i>	urine	C	ER
70319	<i>E. coli</i>	urine	C	GS
70320	<i>C. freundii</i>	urine	C	NS
70321	<i>E. coli</i>	urine	C	URO
70324	<i>E. coli</i>	urine	C	URO
70326	<i>S. marcescens</i>	sputum	C	NS

MED, medicine; NS, Nerve surgical; GS, General surgical; PED, pediatric department URO, Urinary department

Table 2. Oligonucleotides used for PCR and DNA sequences determination

Name	Oligonucleotide sequences (5' to 3')	Product size	Amplified region	<i>E. coli</i> K-12 Gyrase gene size
EcGyrA-F	5'-GAGGAAGAGCTGAAGAGCTCT-3'	668 bp	40 to 707	2,628 bp
EcGyrA-R	5'-CCGGTACGGTAAGCTTCTTCAA-3'			
EcGyrB-F	5'-GGACAAAGAAGGCTACAGCA-3'	880 bp	891 to 1770	2,415 bp
EcGyrB-R	5'-CGTCGCGTTGTACTCAGATA-3'			

F, forward; R, reverse

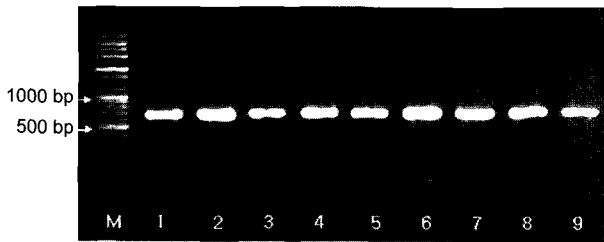


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR products (668 bp) amplified using EcGyrA-F and EcGyrA-R primers. M, 100 bp ladder maker; Lane 1-9, PCR products from clinical isolates (lane 1, 60075; lane 2, 60076; lane 3, 60077; lane 4, 60078; lane 5, 60079; lane 6, 60081; lane 7, 60082; lane 8, 60087; lane 9, 60088).



Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the PCR products (880 bp) amplified using EcGyrB-F and EcGyrB-R primers. M, 100 bp ladder maker; Lane 1-9, PCR products from clinical isolates (lane 1, 60091; lane 2, 60092; lane 3, 60093; lane 4, 70317; lane 5, 70318; lane 6, 70319; lane 7, 70320; lane 8, 70321; lane 9, 70324).

forward와 reverse primer를 design하였고, *gyrB*는 *E. coli* K-12의 *gyrase B gene nucleotide* 2,415 bp 중에서 891 bp에서 1,770 bp까지의 880 bp 부분을 증폭하기 위하여 forward와 reverse primer를 design하였다. 각 oligonucleotide들의 염기서열은 Table 2에 나타내었다. PCR의 시약은 AccuPower[®] PCR Premix kit (Bioneer, Seoul Korea)를 사용하였다. Primer (10 pmol)를 각각 1 μ L, template DNA 8 μ L, 3차 증류수 10 μ L를 가하여 총량이 20 μ L 되게 맞춘 후 사용하였다. PCR 기기는 GeneAmp PCR system 2400 (Perkin-Elmer Centus Corp., Norwalk, Ct., USA)를 사용하였다. PCR 반응 조건은 *gyrA* 유전자는 pre-denaturation 93 $^{\circ}$ C에서 5분간 시행 후 denaturation 93 $^{\circ}$ C에서 1분, annealing 55 $^{\circ}$ C에서 1분, extension 72 $^{\circ}$ C에서 2분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72 $^{\circ}$ C에서 3분으로 하였다. *gyrB* 유전자는 pre-denaturation 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 시행 후 denaturation 94 $^{\circ}$ C에서 15초, annealing 53 $^{\circ}$ C에서 20초, extension 72 $^{\circ}$ C에서 1분으로 하여 30 cycle을 중합하였다. Final extension은 72 $^{\circ}$ C에서 3분으로 하였다. 반응이 끝난 PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 100 volt로 30분 간 전기영동한 후 EtBr로 염색하여 UV transilluminator로 생성분획을 확인하였다 (Fig. 1 and 2).

4. DNA purification and sequencing

DNA purification은 QIAGEN사의 QIAquick gel extraction kit를 사용하여 제조사의 사용법에 따라 DNA를 분리하였다. 먼저, 전기영동 후 생성분획을 확인한 gel에서 원하는 크기

의 band를 잘라 1.5 ml e-tube에 넣고 gel 무게의 3배 부피에 해당하는 QG buffer를 첨가하여 50 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하였다. Gel 조각이 완전히 녹은 후에 column으로 옮겨 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 column을 통과한 하층액을 버리고 다시 QG buffer 500 μ L를 첨가하여 같은 방법으로 원심분리한 후 하층액을 버렸다. Washing 단계로 PE buffer 750 μ L를 첨가하여 1분간 원심분리한 후 하층액을 버리고 PE buffer를 완전히 제거하기 위하여 다시 1분간 원심분리하였다. Column을 새로운 e-tube로 옮긴 후 멸균 증류수 20 μ L를 넣고 마지막으로 원심분리 한 뒤, -20 $^{\circ}$ C에서 사용할 때까지 보관하였다.

DNA sequencing은 DNA auto sequencer (ABI PRISM 310; Applied Biosystems)를 사용하여 Big Dye-terminator 기법의 방법에 따라서 실시하였다. PCR tube에 template DNA 4 μ L와 forward 또는 reverse primer를 2 μ L, Big Dye 4 μ L, 멸균 증류수 10 μ L를 넣어 total volume 20 μ L로 맞춘 후 sequencing PCR을 실시하였다. PCR 조건은 *gyrA* fragment는 96 $^{\circ}$ C에서 5분간 pre-denaturation, 25 cycles (denaturation 96 $^{\circ}$ C, 10초; annealing 53 $^{\circ}$ C, 5초; extension 60 $^{\circ}$ C, 4분), 60 $^{\circ}$ C에서 5분간 final incubation하였다. PCR product에 각각 ethanol 50 μ L와 3 M sodium acetate (pH 4.6) 2 μ L를 첨가하여 -70 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 ethanol 침전시킨 후 15,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 25분간 원심분리하여 pellet을 말리고 TSR (template suppression reagent) 25 μ L에 pellet을 녹여 94 $^{\circ}$ C에서 4분간 incubation시킨 후 바로 열음에 쫓아 반응을 정지시킨 다음 DNA auto sequencer로 분

Table 3. MICs of three fluoroquinolones for clinical isolates of Enterobacteriaceae

No. of strains	Strain names	MIC (μg/ml)		
		Ciprofloxacin	Norfloxacin	Levofloxacin
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	≤1	≤4	≤2
60075	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60076	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60077	<i>E. coli</i>	≥8	≥16	≥16
60078	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60079	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60081	<i>E. coli</i>	≥8	≥16	≥16
60082	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60087	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60088	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60089	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60090	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60091	<i>E. coli</i>	≥8	≥16	≥16
60092	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
60093	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
70317	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
70318	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
70319	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
70320	<i>C. freundii</i>	≥4	≥16	≥8
70321	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
70324	<i>E. coli</i>	≥4	≥16	≥8
70326	<i>S. marcescens</i>	≥4	≥16	≥8

MIC, minimum inhibitory concentration

석하였다. Computer 분석은 310 Genetic Analyzer를 통하여 분석하여 *E. coli* K-12의 *gyrA*와 *gyrB* sequence와 비교하여 mutation을 확인하였다.

결 과

1. 균주의 동정과 항생제 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration; MIC)

Vitek System과 MicroScan System의 자동화 분석기를 사용하여 균주의 동정과 항생제 최소억제농도시험을 실시한 결과는 Table 3과 같다.

2. *GyrA*, *gyrB* 유전자의 PCR 결과

EcGyrA, EcGyrB primer를 이용하여 임상검체에서 분리된 장내세균과 균종 21균주에서 분리한 DNA를 주형 DNA로 하여 증폭한 결과 *gyrA* 668 bp, *gyrB* 880 bp 크기의 DNA 단편들을 얻을 수 있었다. PCR 생산물을 전기영동한 결과는 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다.

Table 4. QRDR amino acid substitutions in *gyrA* and *gyrB* genes

No. of strains	Amino acid at indicated position		
	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>
60075	S83L	D87N	-
60076	S83L	D87N	-
60077	S83L	D87N	Q465R
60078	S83L	D87N	-
60079	S83L	D87N	-
60081	S83L	D87N	S492N
60082	S83L	D87N	-
60087	S83L	D87N	-
60088	S83L	D87N	-
60089	S83L	D87N	-
60090	S83L	D87N	-
60091	S83L	D87N	S492N
60092	S83L	D87N	-
60093	S83L	D87N	-
70317	S83L	D87N	-
70318	S83L	D87N	-
70319	S83L	D87N	-
70320	T83I	D87G	H426L, F427S, Q491H, M495I, I496M
70321	S83L	D87N	-
70324	S83L	D87N	-
70326	S83L	D87N	-

3. *GyrA*, *gyrB* 유전자의 QRDR (quinolone resistance determining region)에서의 mutation 확인

1) *GyrA* mutation

21균주 모두에서 *gyrA*의 QRDR에서 아미노산 치환이 발견되었다. 21균주 중 20균주가 83번 codon인 serine (TCG)이 leucine (TTG)으로 치환되었고, 87번 codon인 aspartate (GAC)가 asparagine (AAC)으로 치환되었다. 나머지 1균주가 83번 codon인 threonine (AAC)이 isoleucine (ATC)으로 바뀌었고, 87번 codon인 aspartate (GAC)가 glycine (GGC)으로 치환되었다 (Table 4). 그리고 이외에도 아미노산의 치환은 없었지만 대부분의 균주에서 silent mutation이 발견되었는데 85번 valine (GTT→GTC), 91번 arginine (CGT→CGC), 99번 arginine (CGT→CGC), 100번 tyrosine (TAC→TAT), 111번 serine (TCC→TCT), 136번 alanine (GCC→GCT), 147번 aspartate (GAT→GAC), 149번 tyrosine (TAC→TAT), 156번 proline (CCC→CCG), 182번 isoleucine (ATC→ATT), 188번 threonine (ACT→ACC), 198번 isoleucine (ATC→ATT)의 12개의 아미노산 부위에서 1~6가지의 silent mutation이 포함되었다 (Table 5).

2) *GyrB* mutations

21균주 모두가 일반적으로 mutation이 가장 잘 일어나는 464번 codon에서는 mutation이 발견되지 않았으며 21균주 중

Table 5. Patterns of silent nucleotide changes seen in *gyrA* genes from clinical isolates

No. of strains	Position of silent mutations
	<i>gyrA</i>
60075	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60076	-
60077	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60078	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60079	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60081	A136 (GCC→GCT), P156 (CCC→CCG)
60082	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60087	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60088	V190 (GTC→GTT), N224 (AAC→AAT)
60089	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60090	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60091	P156 (CCC→CCG)
60092	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
60093	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
70317	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
70318	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
70319	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
70320	R99 (CGT→CGC), D147 (GAT→GAC) Y149 (TAC→TAT), T188 (ACT→ACC)
70321	V85 (GTT→GTC), R91 (CGT→CGC) Y100 (TAC→TAT), S111 (TCC→TCT) P156 (CCC→CCG), I198 (ATC→ATT)
70324	P156 (CCC→CCG), I182 (ATC→ATT)
70326	V85 (GTT→GTC), R91 (CGT→CGC) Y100 (TAC→TAT), S111 (TCC→TCT) P156 (CCC→CCG), I198 (ATC→ATT)

4균주에서 *gyrB* 상의 아미노산의 mutation이 발견되었다. 한 균주가 465번째 아미노산인 glutamine이 arginine으로 치환되었고, 두 균주가 492번째 아미노산인 serine이 asparagine으로 치환되었다. 나머지 한 균주가 5군데의 아미노산 치환을 보였는데 426번째 아미노산인 histidine이 leucine으로, 427번째 아미노산인 phenylalanine이 serine으로, 491번째 아미노산인 glutamine이 histidine으로, 495번째 아미노산인 methionine이 isoleucine으로, 496번째 아미노산인 isoleucine이 methionine으로 치환되었다 (Table 4).

나머지 17균주는 아미노산의 변화는 없었으며 silent mutation을 가진 균주들이 많이 발견되었는데 308번 valine (GTC→GTT), 334번 serine (TCC→TCA), 347번 serine (TCG→TCA), 358번 alanine (GCA→GCG), 384번 alanine (GCG→GCT), 392번 threonine (ACC→ACT), 414번 aspartate (GAT→GAC), 415번 proline (CCG→CCA), 417번 leucine (CTT→CTC), 418번 serine (TCC→TCT), 420번 leucine (CTG→CTA), 422번 leucine

(CTG→CTA), 453번 valine (GTC→GTT), 470번 leucine (CTT→CTG), 475번 glycine (GGC→GGT), 524번 arginine (CGC→CGT), 540번 glycine (GGC→GGT), 562번 aspartate (GAC→GAT), 571번 serine (AGT→AGC)의 19개의 아미노산 부위에서 4~11가지 이상의 silent mutation을 포함하였다 (Table 6).

고 찰

Quinolone 항균제는 말라리아 치료제인 nalidixic acid가 요로감염증 치료에 사용된 이후부터 꾸준히 개발되어 왔다 (Leshner et al., 1962). 근래에는 이러한 quinolone제가 세균의 감염증 치료에 널리 사용되고 있으며, 보다 항균력이 강화된 새로운 제제들이 사용되기 시작하였거나 연구되고 있다. 초기의 약제인 nalidixic acid, piperimidic acid, oxolinic acid 등의 항생제에서 최근 개발된 fluoroquinolone제제인 ciprofloxacin, enoxacin, ofloxacin, pefloxacin, fleroxacin, sparfloxacin, levofloxacin 등은 항균범위가 *P. aeruginosa* 등에까지 넓어지고 항균력이 강해졌다 (Akasaka et al., 2001). Fluoroquinolone제제란 quinolone 구조의 6번 위치에 fluorine이 첨가되어서, 항균범위가 더욱 넓어졌고 강력해진 quinolone 항균제를 뜻한다. 이러한 광범위한 fluoroquinolone제제는 한때 거의 모든 감염증에 탁월한 치료 효과를 나타내었다. 하지만, 최근 보고에 의하면 ciprofloxacin같은 fluoroquinolone에 대한 감수성의 감소 또는 내성인 균주의 임상적 분리빈도가 증가한다고 나타나 있다 (De Champs et al., 2000). 특히 흔하게 감염증을 일으키는 장내세균과에서 fluoroquinolone제의 내성증가는 감염증 치료에 심각한 결과를 초래할 수가 있다. Quinolone 약제의 작용표적은 세균의 type II topoisomerase 즉, DNA gyrase (topoisomerase II)와 topoisomerase IV이다. DNA gyrase와 topoisomerase IV는 DNA를 negative 초라선화 함으로써 DNA 복제를 가능케 하는 효소인데, quinolone은 이 작용을 방해하여 세균의 증식을 억제한다 (Gellert, 1981). 따라서 세균이 quinolone의 작용표적인 DNA gyrase (topoisomerase II)와 topoisomerase IV의 유전자 mutation을 일으킴으로써 곧 quinolone 약제의 내성이 야기된다. Gyrase A subunit의 아미노산 변화는 Ala67과 Gln106 사이의 한정된 영역에서 일어나며, 이 영역을 QRDR라고 한다 (Mizuuchi et al., 1978).

Escherichia coli, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella* spp. 등의 Enterobacteriaceae 몇몇의 종에서, fluoroquinolones에 대한 감소된 감수성 또는 내성은 *gyrA* 유전자에 특별한 점 변이와 관계된다고 하였다 (Yoshida et al., 1990). 본 연구의 대상 21균주 모두에서 *gyrA* 유전자의 아미노산 변이가 관찰되었다.

GyrA 유전자의 아미노산 변화는 Ser83에서의 변이가 가장 흔한데, 이 잔기가 소수성이고 부피가 큰 아미노산으로 바뀌면 고도의 quinolone 내성을 나타낸다. 대부분의 균종에

Table 6. Patterns of silent nucleotide changes seen in *gyrB* genes from clinical isolates

No. of strains	Position of silent mutations	
	<i>gyrB</i>	
60075	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60076	V308 (GTC→GTT), S347 (TCG→TCA), D562 (GAC→GAT), S571 (AGT→AGC)	
60077	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT)	
60078	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60079	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60081	A358 (GCA→GCG), L417 (CTT→CTC), S418 (TCC→TCT), V453 (GTC→GTT), L470 (CTT→CTG), G475 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60082	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60087	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60088	-	
60089	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60090	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60091	A358 (GCA→GCG), A384 (GCG→GCT), L417 (CTT→CTC), S418 (TCC→TCT), V453 (GTC→GTT), L470 (CTT→CTG), D562 (GAC→GAT)	
60092	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
60093	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
70317	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
70318	A308 (GTC→GTT), S347 (TCG→TCA), D562 (GAC→GAT), S571 (AGT→AGC)	
70319	S334 (TCC→TCA), A358 (GCA→GCG), T392 (ACC→ACT), D414 (GAT→GAC), P415 (CCG→CCA), L420 (CTG→CTA), L422 (CTG→CTA), G475 (GGC→GGT), R524 (CGC→CGT), G540 (GGC→GGT), D562 (GAC→GAT)	
70320	More than 40 silent mutations revealed	
70321	-	
70324	-	
70326	-	

있어서 감수성 균주의 *GyrA* 유전자의 아미노산 83번 위치는 serine이다. 그러나 *Pseudomonas aeruginosa*나 *Citrobacter freundii*에서는 serine 대신에 threonine이 있다 (Fuchs et al., 1996).

본 연구의 대상균주는 대부분이 *E. coli*이고 두 균주만이 각각 *Citrobacter freundii*와 *Serratia marcescens*였다. 실험대상 21균주 중에서 20균주가 *gyrA* 유전자의 83번 serine이 leucine으로, 87번 aspartic acid가 asparagine으로 아미노산의 변이가 나타났다. *Citrobacter freundii* 한 균주만이 아미노산의 변이가 *E. coli*와 *Serratia marcescens*와는 조금 다르게 83번 threonine이 isoleucine으로의 변이와 87번 aspartic acid가 glycine으로 아미노산의 변이가 나타났다. 이는 2004년에 *P. aeruginosa*로 연구한 결과 (Kim and Baik, 2004)와 같은 양상을 나타내었다. 하지만 2004년에는 실험대상 *P. aeruginosa* 10균주 중 절반인 5균주에서만 87번 aspartic acid가 asparagine으로 아미노산의 변이가 나타났었는데 이번 연구에서는 실험대상 21균주 모두가 87번 아미노산의 변이가 나타났다 (Table 4). 이러한 결과는 quinolone 내성균주에서의 *gyrA* 유전자의 변화가 확실히 자리매김하는 것은 아닌가 하는 생각이 든다.

DNA가 복제되기 위해서는 수소결합을 통하여 붙어있는 두 개의 strand가 분리되어야 하며 이때 strand를 끊어주고 다시 결합시키는 과정은 subunit A가 하고, 이때 필요한 에너지를 제공하는 ATPase의 기능을 subunit B가 담당하게 된다 (Maxwell and Gellert, 1984). Subunit B는 *gyrB* 유전자에서 만들어지는데 *gyrB* 유전자의 변이가 quinolone 내성에 영향을 미치지만 얼마나 관련되어 있는 지 명확히 밝혀진 문헌이 상대적으로 부족한 것 같다. 또한 밝혀진 문헌상에 나타난 *gyrB* 유전자의 변이는 *gyrA* 유전자의 변이보다 훨씬 적게 보고되어 있다 (Weigel et al., 2002). 2004년에 보고 (Kim and Baik, 2004)에서는 *P. aeruginosa* 균주에서의 *gyrB* 유전자 변이는 하나도 나타나지 않았고 다만 3균주에서 아미노산의 변화 없이 silent mutation만이 나타났었다. *GyrB* 유전자의 변이에 대한 연구는 아미노산 464번 serine이 phenylalanine 또는 tyrosine으로의 변이를 주로 보고하였고, 아미노산 466번 glutamic acid가 aspartic acid으로 변이를 보고한 것이 많았다 (Weigel et al., 2002).

본 연구에서는 4균주에서 *gyrB* 유전자의 변이를 보였는데 지금까지 보고되지 않았던 부위여서 상당히 특이한 결과였다. 4균주 중 한 균주에서 465번 glutamine이 arginine으로의 변이를 보였고, 두 균주에서 492번 serine이 asparagine으로 변화하였다 (Table 4). 한편, *gyrB* 유전자의 변이를 보인 4균주 중 3균주가 항생제 최소억제농도 측정에서 *gyrA* 유전자의 변이만을 가진 균주와의 차이점을 보였다. Norfloxacin 항생제에서는 변화가 없었으나 ciprofloxacin 항생제와 levofloxacin 항생제에서 *gyrA*의 변이만 보인 균주보다 두 배 가량 최소억제농도가 높게 나타났다. 이는 *gyrB* 유전자의 변이도 quinolone 내성에 관계되어 있다는 것을 추측하게 한다. 나머지 한 균주는 *Citrobacter freundii*인데 무려 다섯 군데의

아미노산 치환부위를 나타내었다 (Table 4). 하지만 최소억제농도의 변화는 보이지 않았다. 본 연구에서의 실험대상 균주 중에서 *Citrobacter freundii*의 *gyrase* 유전자의 변이가 아주 특이하게 나타난 것으로 생각된다. 이에 대한 연구는 향후 더욱 심도 있게 진행해야 할 것으로 사료된다. 또한 본 연구에서 밝혀진 *gyrase* 유전자는 아미노산의 변화와 더불어 silent mutation이 많이 나타났다. Silent mutation이란 침묵 돌연변이라고 말할 수 있는데 이는 단백질의 구조에는 영향을 주지 않는 점변이를 뜻한다. 아미노산의 치환과 함께 silent mutation에 대한 결과도 상세히 보고하였는데 항생제 내성과의 연관성은 밝혀내지 못하였으나 향후 *gyrase* 유전자의 연구를 위해 낱알이 보고하였다 (Table 5, Table 6). *GyrA*에서는 한 균주 (60076)를 제외하고는 모두 silent mutation이 나타났다 (Table 5).

흥미로운 것은 silent mutation도 아미노산의 치환처럼 mutation 부위가 어느 정도 정해져 있는 것을 볼 수가 있었다. *GyrA*에서의 silent mutation이 나타난 균주를 동일한 DNA polymorphism으로 분류하면 6가지의 패턴으로 구분할 수 있었다. 제 1 그룹의 15균주 (60075, 60077, 60078, 60079, 60081, 60082, 60087, 60089, 60090, 60092, 60093, 70317, 70318, 70319, 70324)가 156번 proline (CCC→CCG)과 182번 isoleucine (ATC→ATT)의 두 아미노산에서 동일한 polymorphism 보였다. 제 2 그룹은 1균주 (60088), 제 3 그룹은 1균주 (60091), 제 4 그룹은 1균주 (70320), 제 5 그룹은 1균주 (70321), 제 6 그룹은 1균주 (70320)가 각각 동일한 polymorphism을 보였다 (Table 5). 특히, 21균주 중 15균주에서 156번 proline (CCC→CCG)과 182번 isoleucine (ATC→ATT)의 polymorphism을 기본적으로 나타난 것이 결코 우연한 것은 아닌 것 같다.

*GyrB*의 경우는 4균주가 silent mutation이 전혀 없었으며, 역시나 silent mutation이 나타난 17균주를 동일한 DNA polymorphism으로 분류하면 6가지의 패턴으로 구분할 수 있었다. 제 1 그룹은 11균주 (60075, 60078, 60079, 60082, 60087, 60089, 60090, 60092, 60093, 70317, 70319)가 334번 serine (TCC→TCA), 358번 alanine (GCA→GCG), 392번 threonine (ACC→ACT), 414번 aspartate (GAT→GAC), 415번 proline (CCG→CCA), 420번 leucine (CTG→CTA), 422번 leucine (CTG→CTA), 475번 glycine (GGC→GGT), 524번 arginine (CGC→CGT), 540번 glycine (GGC→GGT), 562번 aspartate (GAC→GAT) 등 11군데의 아미노산에서 동일한 polymorphism을 보였다. 제 2 그룹은 2균주 (60076, 70318), 제 3 그룹은 1균주 (60081), 제 4 그룹은 1균주 (60091), 제 5 그룹은 1균주 (60077)가 각각 동일한 polymorphism을 보였다. 그리고 제 6 그룹의 1균주 (70320)는 40군데 이상의 silent nucleotide 변화를 보였다 (Table 6).

Fluoroquinolone에 대한 내성의 첫 번째 기전은 변이인데

target으로 사용되는 단백질, DNA gyrase와 topoisomerase IV에 변이가 나타나고, 그리고 이러한 변이와 더불어 세포내로 유입된 항균약제의 유출 또는 세포막 단백질의 변화에 의해 세포내 항균약물의 축적을 감소시켜서 내성을 유발시킨다고 하였다 (Conrad et al., 1996). 유입된 항균약제의 유출과 세포내 항균약물의 축적 감소에 대한 내성기전은 향후 연구에서 다루기로 하고, 무엇보다도 quinolone 항생제에 대한 높은 수준의 내성을 나타내는 세균은 gyrase 또는 topoisomerase IV 유전자의 변이를 보이고, 이런 변이는 주로 이 유전자의 보존 부분인 QRDRs에 나타난다고 하였다 (Akasaka et al., 2001). 본 연구에서는 임상에서 검출한 quinolone 내성 장내 세균의 QRDRs 내에서의 gyrase A와 B 유전자에 대한 변이를 보고하였다. 이러한 보고가 quinolone 제제와 내성세균과의 상관관계에 대한 생화학적, 분자유전학적 연구에 매우 중요한 일이라고 생각된다. 향후 topoisomerase IV 유전자의 내성기전과 항균약제의 유출, 세포내 항균약물의 축적 감소에 대한 내성기전을 더욱 더 연구하여 보고함으로써 임상에서의 환자 치료에 큰 도움이 되리라 사료된다.

REFERENCES

- Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated in 1998 and 1999: Role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2001. 45: 2263-2268.
- Cambau E, Perani E, Dib C, Petinon C, Trias J, Jarlier V. Role of mutations in DNA gyrase genes in ciprofloxacin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptible or resistant to imipenem. *J Antimicrob Chemother.* 1995. 39: 2248-2252.
- Cohen SP, McMurry LM, Hooper DC, Wolfson JS, Levy SB. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. *J Antimicrob Chemother.* 1989. 33: 1318-1325.
- Conrad S, Oethinger M, Kaifel K, Klotz G, Marre R, Kern WV. *GyrA* mutations in high-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 1996. 38: 443-455.
- De Champs C, Bonnet R, Sirot D, Chanal C, Sirot J. Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two year survey. *J Antimicrob Chemother.* 2000. 45: 537-539.
- Fuchs LY, Reyna F, Chihu L, Carrillo B. Molecular aspects of fluoroquinolone resistance. In Amabile-Cuvas CF (ed). *Antibiotic resistance: from molecular basics to therapeutic options.* 1996. pp 147. Springer, NY, USA.
- Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976. 73: 3872-3876.
- Gellert M. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 1981. 50: 879-910.
- Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Ito T, Tomizawa J. Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977. 74: 4772-4776.
- Hernandez JR, Martínez-Martínez L, Pascual A, Suarez AI, Perea EJ. Trends in the susceptibilities of *Proteus mirabilis* isolates to quinolones. *J Antimicrob Chemother.* 2000. 45: 407-408.
- Kim YT, Baik HS. Topoisomerase II and topoisomerase IV gene mutations fluoroquinolone resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Biomed Sci.* 2004. 10: 507-514.
- Leshner GY, Froelich E, Gruett MD, Gailey JH, Brundage RR. 1,8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Pharm Chem.* 1962. 91: 1063-1065.
- Maxwell A, Gellert M. The DNA dependence of the ATPase activity of DNA gyrase. *J Biol Chem.* 1984. 295: 14472-14480.
- Maxwell A. DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol.* 1997. 5: 102-109.
- Mizuuchi K, O'Dea MH, Gellert M. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978. 75: 1960-1963.
- Weigel LM, Anderson GJ, Tenover FC. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother.* 2002. 46: 2582-2587.
- Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *Clin Microbiol.* 1989. 2: 378-424.
- Yoshida H, Bogaki M, Nakamura S. Quinolone resistance determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 1990. 34: 1271-1272.