

유해 남조세균 *Microcystis aeruginosa*의 16S rRNA 및 *rpoB* 유전자 염기서열 변이 분석

기장서

상명대학교 그린생명과학과

Divergence Analysis of 16S rRNA and *rpoB* Gene Sequences Revealed from the Harmful Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*

Jang-Seu Ki

Department of Green Life Science, Sangmyung University, Seoul 110-743, Republic of Korea

(Received July 28, 2010/Accepted September 14, 2010)

Microcystis (Cyanobacteria, Chroococcales) is one of the green tide-causing organisms in freshwaters, and some species produce microcystin that is hepatotoxin. In the aspects of freshwater quality controls and health concerns, therefore it is necessary to manage the harmful organisms. In the present study, RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences of *Microcystis* were determined and characterized in order to use a potential marker for the molecular detections of the species. *Microcystis rpoB* showed high divergences of DNA similarity and genetic distances when compared with those of 16S rRNA, and the molecular differences were statistically significant (Student t-test, $p < 0.05$). Parsimony analyses showed the *rpoB* gene evolves more than 2-fold faster than 16S rRNA. In addition, phylogeny of the *rpoB* gene separated each *M. aeruginosa* strain more clearly compared with a 16S rRNA tree. This study found that the order Chroococcales, including *Microcystis*, has approximately two rRNA operons and single copy of the *rpoB* gene in their chromosomes. These results suggest that the *rpoB* gene is a useful marker for the molecular phylogenetics and the detection of *Microcystis*.

Keywords: Cyanobacteria, DNA similarity, genetic distance, *Microcystis*, *rpoB* gene

담수 녹조(綠潮) 현상은 호수, 강, 저수지, 연못 등에 cyanobacteria가 대량으로 증식해 물이 녹색으로 변하는 것으로, 원 인생물로는 *Anabaena*, *Aphanocapsa*, *Microcystis*, *Nostoc*, *Oscillatoria* 등이 있다. 여름철에 전세계 담수에서 cyanobacteria 대량증식이 빈번하게 발생하고 있으며, 이에 따른 생태계의 영향과 산업적 피해가 매우 크다(11). 대표적 유해조류인 *Microcystis*는 담수에 널리 분포하며, microcystin이라는 간 독소(hepatotoxin)를 가지고 있어 음용수 및 수질관리 차원에서 주목 받아 왔다. *Microcystis* 속은 균체의 형태, 세포 배열 방법 및 성장 등에 따라 각각의 종으로 구분되며(23), 대표적인 종은 *M. aeruginosa*로 전세계에 보편적으로 분포한다(33). 세계보건기구(WHO)는 담수 cyanobacteria (예, *Anabaena*, *Microcystis*)로부터 수자원을 안전하게 확보하기 위하여 유해 조류 관리방침을 수립하였으며(2), 또 다른 cyanobacteria 연구로 유해조류의 현장 모니터링, 정수과정의 cyanobacteria 독성

검출, 녹조발생 시기에 황산동과 같은 화학제제를 이용한 구제 방법에 관한 것이 있다(14, 41). *Microcystis*와 관련된 연구는 microcystin 생합성 기작(32), microcystin검출(25, 40), microcystin에 의한 생태계 영향(16, 21, 22, 26, 27), 독성을 함유한 *Microcystis* 검출(5, 24), microcystin synthetase (*myc*) 유전자에 의한 독성(9), cyanobacteria 제어를 위한 살조물질(algicide active compounds) 개발(14) 등이 있다.

우리나라에서도 여름철 고수온기에 호수, 하천, 연못에서 cyanobacteria 녹조현상이 빈번히 발생하고 있다(4). 우리나라의 경우 많은 댐, 저수지, 하천을 상수원으로 이용하고 있어 유해생물 cyanobacteria에 의한 녹조발생은 음용수의 위해성 관리 측면에서 많은 문제점과 안전에 대한 경각심을 불러일으키고 있다(21). 정부는 cyanobacteria 발생에 따른 음용수 오염과 산업적 피해를 대처하기 위하여 주요하천을 중심으로 조류예보제를 실시하고 있다(28). 조류예보는 현미경으로 cyanobacteria (예, *Anabaena*, *Aphanocapsa*, *Nostoc*, *Oscillatoria*) 개체수(cell abundance)를 파악하여 기준에 따라 발령한다. 조

* For correspondence. E-mail: kiji@smu.ac.kr; Tel: +82-2-2287-5449; Fax: +82-2-2287-0070

Table 1. Origins of *Microcystis* and relative generic (Cyanobacteria; Chroococcales) strains, and DNA sequence GenBank accession numbers

Species	Strain	Isolation locality	GenBank accession nos.		References
			16S	rpoB	
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIER-10024	Korea: Hapcheon Reservoir	-	HM991458	This study
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIER-10001	Korea: Daechung Reservoir	AY065975	HM991459	This study
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES-107	Japan: Lake Kawaguchi Yamanashi	U40333	HM991460	This study; (30)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES-298	Japan: Lake Kasumigaura Ibaraki	FJ461749*	HM991461	This study
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES-843	Japan: Lake Kasumigaura Ibaraki	AP009552#	AP009552#	(17)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	UTEX 2388	Canada: Bruno, Saskatchewan	DQ648030*	HM991462	This study
<i>Microcystis aeruginosa</i>	PCC 7806	Netherlands: Water, Braakman reservoir	AF139299	AM778948#	(10, 40)
<i>Cyanothece</i> sp.	ATCC 51142	USA: Intertidal area near Port Aransas	NC_010546#	NC_010546#	(42)
<i>Synechococcus elongatus</i>	PCC 7942	USA: Fresh water, California	NC_007604#*	NC_007604#	
<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	BP-1	Japan: ?	NC_004113#	NC_004113#	(29)

Genome sequence; * Direct GenBank submission.

류예보는 *Microcystis*의 세포 농도에 의해 주로 발령되며, 이때 *Microcystis*의 정확한 종(species)을 파악하지 않는다. 이것은 cyanobacteria 세포의 크기가 매우 작고(1-10 μm 이하), 사상체 또는 군체(colony)를 형성하므로 현미경으로 종을 파악하기 위해서는 많은 분류학적 지식과 시간, 노력이 요구되기 때문이다. 또한, 각각의 종이 형태적으로 유사하고 환경 조건에 따라 쉽게 변화되기 때문에 정확한 동정이 어렵다(7).

이에 대한 대안으로 분자생물학적 기법을 이용한 방법이 있으며, 여기에는 16S rRNA 분석, 16S-23S ITS (Internal Transcribed Spacer) 분석, 색소체 phycocyanin의 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) 등이 있다(27, 30, 35). 최근에는 cyanobacteria의 독소 생합성에 관여하는 *mcy* 유전자를 이용하여 *Microcystis*를 검출하려는 연구가 시도되기도 했다(5, 40).

일반적으로 유전자 마커로서 16S rRNA 유전자가 이용되고 있으나, cyanobacteria의 경우 근연종간(closely related species) 염기서열 유사도가 높기 때문에 *Anabaena* 속 또는 *Microcystis* 속에 속하는 종들을 구분하기 매우 어렵다. 또한, 세균의 16S rRNA는 multiple rRNA 오페론(operon)으로 구성되어 있으며(20), cyanobacteria의 경우 게놈(genome)내에 대략 5개 정도의 16S rRNA 유전자 오페론이 있을 것으로 추정하고 있다. 같은 유전체내(intragenomic)에 존재하는 16S rRNA 유전자의 염기서열은 대체로 같으나, 간혹 복사본(copy)간 차이가 발견되기도 한다. 이와 같은 16S rRNA 변이는 염기서열 기반의 cyanobacteria 분류를 난해하게 하며, 특히 동일 염색체내에 다수의 16S rRNA 유전자가 여러 개 존재하는 경우, 16S rRNA-기반으로 정량적인 검출을 하는데 문제가 되기도 한다(20). 또한, *Microcystis*의 경우에는 microcystin을 코딩화(coding)하고 있는 유전자 집단(*mcyA-N*)을 대상으로 유전자 탐색자(probe)가 제작되었으나, 독성을 갖고 있는 종과 갖지 않는 종 일부에서 polymerase chain reaction (PCR) 산물이 검출되어

유독 *Microcystis* 균만을 감지하기 위한 유전자 탐색자로서 적용의 한계가 있다(40).

16S rRNA 대체할 수 있는 다른 유전자(예, DNA gyrase, RNA polymerase, ATP synthase, recombinase, alginate biosynthesis gene, DNA topoisomerase, heat shock protein, elongation factor G) 마커에 대한 많은 연구가 병원성 미생물을 대상으로 실시되어 왔다. 이들 중에서 RNA polymerase beta subunit (*rpoB*)와 gyrase beta subunit (*gyrB*) 유전자에 대한 연구가 활발하게 진행 되고 있다(6, 18, 34). *rpoB* 유전자는 세포안에 한 개의 복사본으로 존재하기 때문에, 이들 유전자의 개수를 정량한다면, 물 중에 존재하는 특정 세균의 농도를 정확하게 환산할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 본 연구에서는 *Microcystis*의 *rpoB* 유전자 염기서열을 규명하여 유전자 변이를 조사하였다. 또한 *Microcystis* 16S rRNA의 염기서열과 비교하여, *rpoB* 유전자의 분류 및 분자검출용 마커의 유용성을 평가하였다.

재료 및 방법

Microcystis 세포 배양

Microcystis 균주는 국내외 균주은행으로부터 분양 받았다(Table 1). 우리나라 균주는 국립환경과학원(NIER: National Institute of Environmental Research Culture Collection for Environmental Microorganism, Korea)에서 분양받았으며, 해외 균주는 NIES (National Institute for Environmental Studies, Japan), PCC (Pasteur Culture Collection of Cyanobacteria, France), UTEX (Culture Collection of Algae at the University of Texas at Austin)로부터 분양 받았다. 분양받은 균주는 BG-11 배지(36)에 접종한 후, 25°C, 혼합주기 120 rpm, 12:12 시간 명:암 주기, $100 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^1$의 빛 조건에서 배양하였다.

rpoB 유전자 증폭 및 염기서열 결정

Microcystis 균주의 genomic DNA 분리를 위해 배양중인 세포(50 ml)를 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 농축하였다. 농축된 세포는 TE buffer (10 mM Tris-HCl; pH 8.0, 1 mM EDTA) 200 µl에 희석한 후 DNA를 추출하기 전까지 -20°C에서 보관하였다. Genomic DNA는 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 추출하였다.

*Microcystis*의 *rpoB* 유전자 PCR 증폭을 위해, GenBank에 등록된 cyanobacteria *rpoB* 유전자 정보(*Anabaena variabilis*, NC_007413; *Cyanothece* sp., NC_011729; *Microcystis aeruginosa*, NC_010296; *Nostoc punctiforme*, NC_010628; NC_003272; *Prochlorococcus marinus*, NC_008820; *Synechococcus elongatus*, NC_007604)를 이용하였다. Cyanobacteria 총 6개의 *rpoB* 유전자 염기서열을 CLUSTAL W 1.8 (39)로 alignment 하였으며, 담수 cyanobacteria인 *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc*에서 보존적으로 나타나는 영역을 대상으로 PCR primer로 Ma-rpoBF1026 (5'-CAT TCG GGA ACG GAT GAC C-3')과 Ma-rpoBF2013 (5'-CTT CGT AGT TAT AGC CTT CC-3')를 제작하였다. PCR은 추출한 genomic DNA 2 µl와 PCR 반응액(23 µl)을 혼합하여 실시하였다. PCR 반응액은 1× PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 mM forward-reverse primers, 1 unit Ex Taq polymerase (TaKaRa Bio, Japan)를 사용하였다. PCR 반응은 MyCycler™ (Bio-Rad, USA)를 이용하여 초기 95°C 5분간 DNA를 변성시키고, 이후 95°C 20초, 52°C 30초, 72°C 60초를 35회 반복하여 대상 유전자 영역을 증폭하였다. PCR 증폭 반응이 종료되면 추가로 72°C 5분간 유지하여 반응을 종결하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 관찰하였다.

DNA sequencing은 PCR 산물을 PCR purification Purification kit (Bionics Co., Korea)로 정제하여, PCR primers (Ma-rpoBF2013, Ma-rpoBF2013)와 ABI PRISM® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (PE Biosystems, USA)를 이용하여 실시하였다. DNA sequencing 단편은 자동 DNA 분석기 (Model 3700, Applied Biosystems, USA)로 분석하였다.

각각의 균주로부터 얻은 염기서열 단편을 Sequencer 4.1.4 (Gene Codes, USA)을 이용하여 contig된 단일 염기서열로 만들고, 염기서열을 GenBank에 등록하였다(Table 1).

16S rRNA, *rpoB* 유전자 염기서열 유사도 및 parsimony 분석

Microcystis 16S rRNA 및 *rpoB* 유전자 특성은 염기 유사도 (DNA similarity)와 유전거리(genetic distance)로 분석하였다. 본 연구를 통해 규명한 염기서열과 GenBank로부터 확보한 염기서열을 이용하여 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기서열 data matrix를 만들고, 각각의 염기서열을 CLUSTAL W 1.8 (39)를 이용하여 alignment하였다. 유전거리 분석은 alignment된 염기서열의 양 끝을 같은 영역으로 자른 후, MEGA 4.0 (38)에서 Kimura 2-parameter 모델을 이용하여 계산하였다. 동일한 프

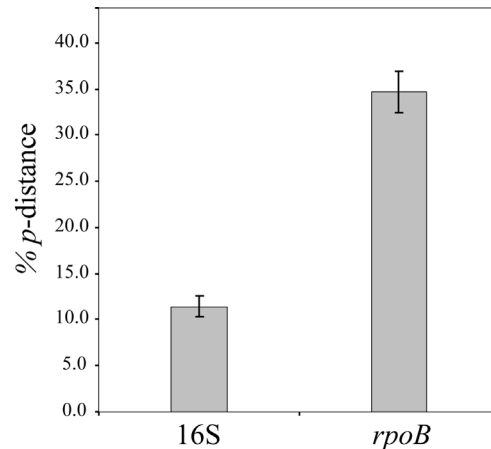


Fig. 1. Inter-generic nucleotide divergences of the 16S rRNA and the *rpoB* gene based on corrected *p*-distances. Genetic distances of each paired sequence between *Microcystis* (Strain NIES-298, NIES-843, UTEX 2388, PCC 7806) and the relatives (*Cyanothece* sp. #ATCC 51142, *Synechococcus elongatus* #PCC 7942, *Thermosynechococcus elongatus* #BP-1) were calculated by the Kimura 2-parameter model. Statistical analysis showed that the divergences of the *rpoB* gene sequences were significantly different against those of the 16S rRNA (Student t-test, $p < 0.05$, $N = 12$).

로그그램을 이용하여 parsimony 분석(예, conserved site, variable site, parsimony-informative site)을 실시하였다. 통계분석은 SPSS 10.0.7 (SPSS, USA)을 이용하였다.

Microcystis 분자계통분석

Microcystis 균주의 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기서열을 이용하여 Neighbor-Joining (NJ) 계통분석을 실시하였다. 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기서열을 CLUSTAL W 1.8로 alignment 하고 이후 양 끝을 동일한 크기로 자르고 불확실하게 alignment 된 염기서열을 제거하여 dataset을 준비하였다(16S rRNA, 1,495 sites에서 1,300 sites 선택; *rpoB*, 941 sites에서 939 sites 선택). NJ 계통분석은 Kimura 2-parameter 모델을 이용하여 MEGA 4.0으로 실시하였다.

결과 및 고찰

*M. aeruginosa*의 *rpoB* 유전자 특성

본 연구에서 제작한 *rpoB* 유전자 primer를 이용하여, *M. aeruginosa*의 각각의 균주들로부터 938 bp (amino acid 312 개)의 염기서열을 얻었다(Table 1). 이들 염기서열은 NCBI database에서 BLAST-X 검색을 한 결과, *M. aeruginosa* #NIES-843 (GenBank No. AP009552)과 가장 높은 유사도를 나타내었다(99% DNA similarity). *M. aeruginosa* 균주 NIES-843과 PCC 7806의 *rpoB* 유전자 염기서열은 해독된 유전체 염기서열 상에서 3,336 bp와 3,312 bp로 존재하였으며(10, 17), 이중 *rpoB* 유전자 중간 영역을 대상으로 분석하였다.

M. aeruginosa 균주의 *rpoB* 유전자 및 16S rRNA 염기서열 간의 유사도 분석결과는 Tabel 2와 같이, 16S rRNA의 경우

균주 간에 매우 높은 염기 유사도를 보였다[99.3%, Standard deviation (SD)=0.5, N=15], 최고값 99.9%, 최저값은 98.4% (NIER-10001과 NIES-107)이었다. 반면, *rpoB* 유전자 비교에서 균주간에 평균 97.0% 염기 유사도(SD=1.2, N=21)를 보였다. 따라서 *M. aeruginosa*의 유전자의 염기서열 유사도는 16S rRNA에 비해 *rpoB* 유전자가 낮은 것으로 나타났다. 염기 유사도를 분석한 dataset을 Kimura-2 parameter로 계산하여 유전거리(*p*-distance)를 측정하였다. 유전거리는 16S rRNA에서 0.0056 (SD=0.0039, N=15)이고, *rpoB* 유전자에서는 0.0307 (SD=0.0125, N=21)로 조사되었다. 유전거리는 *rpoB* 유전자가 16S rRNA보다 5.5배 높았고, 두 유전자 간의 거리는 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Student t-test, *p*<0.05).

rpoB 유전자 염기서열로부터 추론된 단백질의 아미노산 서열을 비교하였다. 본 연구에서 총 312개의 아미노산을 비교하였는데 *M. aeruginosa* 균주의 *rpoB* 유전자는 평균 99.6% (SD=0.40, N=21) 유사도를 보였고, 균주간도 유사도가 매우 높은 것으로 나타났다.

Microcystis와 근연속(closely related genus)간의 16S rRNA, *rpoB* 유전자 변이

*Microcystis*가 속한 *Chroococcales* 목의 *rpoB* 유전자 변이를 Kimura 2-parameter 모델을 이용하여 분석하였다(Fig. 2). *Cyanothece*, *Microcystis*, *Synechococcus*, *Thermosynechococcus* 속간의 16S rRNA 변이는 0.1141 (SD=0.0112, N=12)로 계산되었으며, *rpoB* 유전자 변이는 0.3468 (SD=0.0229, N=12)였다. *Chroococcales* 목의 *rpoB* 유전자 변이는 16S rRNA 염기 변이와 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Student t-test, *df*=31, *p*=0.00). 유전자 변이를 진화속도로 계산하기 위하여 parsimony 분석을 실시하였다(Table 3). 본 연구에서 분석한 *Chroococcales* 목의 16S rRNA 염기서열은 82%가 보존되어 있는 것으로 조사되었으며, *rpoB* 유전자 염기서열은 56%가 보존되어 있는 것으로 분석되었다. Parsimony informative site (PI)는 16S rRNA가 9.9%를 보였으며, *rpoB* 유전자는 21.0%로 계산되었다. PI값을 이용하여 유전자 변이(또는 진화) 속도를 계산하였는데, *rpoB* 유전자가 16S rRNA 유전자에 비해

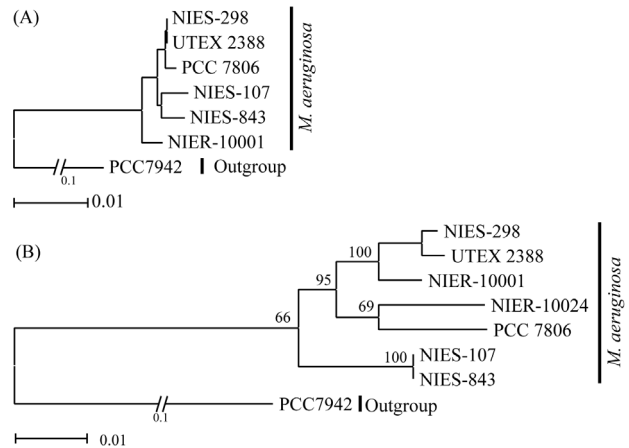


Fig. 2. NJ trees inferred from *Microcystis aeruginosa* (A) 16S rRNA and (B) *rpoB* gene sequences. The NJ trees were constructed using the Kimura 2-parameter model in MEGA 4.0. Branch lengths are proportional to the given scale. The numbers at the nodes are bootstrap values greater than 50% with 1,000 replications. The Firmicute *Synechococcus elongatus* #PCC 7942 was used as the outgroup.

2.12배 빠르게 변하는 것으로 분석되었다. 다른 세균의 *rpoB* 유전자 변이와 비교하여 *Chroococcales* 목의 유전자 변이는 느리게 진행되는 것으로 판단된다. 예를 들어, γ -*Proteobacteria* 강인 *Vibrio* 속의 경우, *rpoB* 유전자가 16S rRNA보다 3.23배 빠르게 변하는 것으로 보고되었으며(19), *Firmicutes* 문의 *Bacillus*의 경우 4.42배였다(18).

***M. aeruginosa* 균주 관련성**

본 연구를 통해 *Microcystis*를 포함하는 *Chroococcales* 목의 *rpoB* 유전자는 16S rRNA와 비교하여 2배 이상의 phylogenetic 해상도(resolution)를 갖는 것으로 조사되었다(Table 3). 이와 같은 *rpoB* 유전자 특성을 이용하여 *M. aeruginosa* 균주의 계통관계를 분석하였고(Fig. 2), 이 결과를 16S rRNA 유전자와 비교하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열을 이용한 NJ tree의 경우 해상도가 낮아 균주 간 grouping의 양상을 파악하기 어려웠다(50% 이하의 bootstrap 값). 그러나 *rpoB* 유전자들

Table 2. Similarity scores of 16S rRNA (above diagonal) and *rpoB* gene (below diagonal) sequences between each pair of seven *Microcystis aeruginosa* strains.

No.	Strain	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]
16S-1,331 compared sits								
[1]	NIER-10001*	-		98.4	99.4	98.9	99.4	99.3
[2]	NIER-10024	96.9	-					
[3]	NIES-107	97.2	95.8	-				
[4]	NIES-298	98.6	97.0	96.8	-			
[5]	NIES-843	97.2	95.8	100	96.8	-		
[6]	UTEX 2388	98.5	96.5	96.4	99.4	96.4	-	
[7]	PCC 7806	96.5	97.0	95.5	96.2	95.5	96.4	-
<i>rpoB</i> -938 compared sites								

* The 16S rRNA sequence of NIER-10001 was used at 595 bp in the 16S rRNA comparisons.

Table 3. Independent parsimony analyses of partial 16S rRNA and *rpoB* genes. These were calculated from DNA sequences of cyanobacteria Chroococcales: *Microcystis aeruginosa* (NIES-298, NIES-843, UTEX 2388, PCC 7806), *Cyanothece* sp. (ATCC 51142), *Synechococcus elongatus* (PCC 7942), *Thermosynechococcus elongatus* (BP-1).

Gene	Characteristics			
	Nn	Nc	Nv	PI (%PI)
16S rRNA	1,425	1,174	250	117 (9.9)
<i>rpoB</i>	941	536	402	198 (21.0)

Nn, total number of sites compared; Nc, total number of conserved sites; Nv, total number of variable sites; PI, parsimony informative site.

이용한 NJ 분석에서 각각의 군주가 뚜렷하게 분리되었다(Fig. 2B; 66% 이상 bootstrap 값). *rpoB* 유전자 NJ tree에서 NIES-107과 NIES-843은 자매관계(sister relationship)를 형성하였으며, NIES-843과 같은 호수에서 분리된 군주 NIES-298은 캐나다에서 분리된 군주 UTEX 2388과 자매관계를 형성하였다. 우리나라에서 분리된 NIER-10001(대청호)와 NIER-10024(합천호)는 서로 뚜렷하게 분리되었다.

Microcystis의 *rpoB* 유전자 유용성

일반적으로 16S rRNA 유전자 염기서열은 cyanobacteria를 포함하여 세균의 분자계통관계 규명, 병원균 검출, 생물다양성 분석을 위한 수단으로 이용되어왔다(1, 3, 12, 13). 앞에 기술하였듯이 세균의 rRNA (*rrn*) 유전자는 multiple copy로 존재하고 이들 유전자의 heterogeneity 한 성질로 인하여(20), 16S rRNA 기반의 미생물 다양성 연구는 미생물 상 및 개체수가 실제보다 과도하게 측정될 수 있다(8). 또한 16S rRNA 유전자는 동일 속내의 중간 그리고 동일 종내 군주를 구별하기 어려운 단점이 있다(Table 2). 본 연구를 통해 *Microcystis rpoB* 유전자 염기서열 특성이 규명되었다. 특히 parsimony 분석을 통해 *rpoB* 유전자가 2배 이상의 속도로 빠르게 진화하고 *rpoB* phylogeny가 *Microcystis*를 명확하게 구분하는 것을 확인하였다. 본 연구결과는 *rpoB* 유전자가 *Microcystis*의 분자계통분류 및 분자검출을 위한 유용한 마커라는 것을 제시해 준다. 본 연구에서 *M. aeruginosa rpoB* 유전자 변이가 독성을 갖는 군주를 구분할 수 있는지 확인되지 않았으며, 이를 규명하기 위하여 neurotoxic, non-toxic, hepatotoxic한 다양한 군주를 대상으로 추가적으로 *rpoB* 유전자 연구가 필요하다.

본 연구에서 GenBank에 공개된 *M. aeruginosa* #NIES-843의 계통 염기서열을 이용하여 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 복사본 개수를 분석하였다. 조사 결과 NIES-843 군주는 16S rRNA 오페론 2개와 *rpoB* 유전자 1개를 가지고 있었다. 또한 근연속인 *Cyanothece* sp. #ATCC 51142 (NC_010546)와 *Synechococcus elongatus* #PCC 7942는 각각 16S rRNA 오페론 2개와 *rpoB* 유전자 1개를 갖고 있었다. 하지만 *Thermosynechococcus elongatus* #BP-1 (NC_004113)의 경우 16S rRNA 오페론 1개와 *rpoB* 유전자 1개를 갖고 있었다. Chroococcales 목의 경우 2개 내외의 16S rRNA 오페론이 있

는 것으로 추정되며, *rpoB* 유전자는 모두 1개인 것으로 조사되었다. 본 연구에서 나타났듯이 *rpoB* 유전자 염기서열의 변이가 크고 세포안에 단일 복사본으로 존재하기 때문에 정량적 분자검출(예, quantitative real-time PCR)을 적용할 때 매우 유용할 것으로 판단되었다.

적 요

남조세균 *Microcystis* (Cyanobacteria, Chroococcales)는 담수 녹조원인 생물의 하나로써 일부 종은 microcystin이라는 간독소를 분비한다. 따라서 담수 수질관리 및 보건위생 측면에서 이들에 대한 관리가 필요하다. 본 연구는 *Microcystis* 분자검출을 위한 신규 마커로 RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) 유전자 염기서열을 분석하여 이들의 분자적 특성을 규명하였다. *Microcystis rpoB* 유전자는 16S rRNA보다 염기 유사도와 유전거리에서 큰 변이가 있는 것으로 조사되었으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Student t-test, $p < 0.05$). Parsimony 분석을 통해 *rpoB* 유전자가 16S rRNA 유전자보다 2배 이상 빠르게 진화하는 것으로 파악되었다. 또한 *rpoB* 유전자 phylogeny 분석에서 16S rRNA tree 보다 *M. aeruginosa* 군주를 명확하게 구분해 주었다. *Microcystis*가 속하는 Chroococcales 목은 염색체 안에 2개 정도의 rRNA 오페론이 있고 *rpoB* 유전자는 1개 있는 것으로 조사되었다. 본 연구결과는 *rpoB* 유전자가 *Microcystis*의 분자계통분류 및 분자검출 마커로 유용하다는 것을 제시해 준다.

감사의 말

본 연구는 2010년 상명대학교 교내연구비로 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Al-Thukair, A.A., R.M. Abed, and L. Mohamed. 2007. Microbial community of cyanobacteria mats in the intertidal zone of oil-polluted coast of Saudi Arabia. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 173-179.
- Bartram, J. and R. Ballance. 1996. Water quality monitoring, a practical guide to the design and implementation of freshwater quality studies and monitoring programmes. E & FN SPON, London.
- Castiglioni, B., E. Rizzi, A. Frosini, K. Sivonen, P. Rajaniemi, A. Rantala, M.A. Mugnai, and et al. 2004. Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S *rrna* gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7161-7172.
- Cho, H.M. 2005. Emergency measures on algal problems in water resource of the Han River. Seoul Development Institute. Seoul.
- Cho, J.E., S.W. Bang, and M.S. Han. 2004. Development of oligonucleotide primers for the detection of harmful *Microcystis* in water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 655-662.
- Dahllöf, I., H. Baillie, and S. Kjelleberg. 2000. *rpoB*-based microbial community analysis avoids limitations inherent in 16S rRNA gene intraspecies heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.*

- 66, 3376-3380.
7. Doers, M.P. and D.L. Parker. 1988. Properties of *Microcystis aeruginosa* and *M. flosaquae* (Cyanophyta) in culture: taxonomic implications. *J. Phycol.* 24, 502-508.
 8. Fegatella, F., J. Lim, S. Kjelleberg, and R. Cavicchioli. 1998. Implications of rRNA operon copy number and ribosome content in the marine oligotrophic ultramicrobacterium *Sphingomonas* sp. strain RB2256. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4433-4438.
 9. Fischer, W.J., B.C. Hitzfeld, F. Tencalla, J.E. Eriksson, A. Mikhailov, and D.R. Dietrich. 2000. Microcystin-LR toxicodynamics, induced pathology, and immunohistochemical localization in livers of blue-green algae exposed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicol. Sci.* 54, 365-373.
 10. Frangeul, L., P. Quillardet, A.M. Castets, H.F. Humbert, H.C. Matthijs, D. Cortez, A. Tolonen, and *et al.* 2008. Highly plastic genome of *Microcystis aeruginosa* PCC 7806, a ubiquitous toxic freshwater cyanobacterium. *BMC Genomics* 9, 274.
 11. Gilroy, D.J., K.W. Kauffman, R.A. Hall, X. Huang, and F.S. Chu. 2000. Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. *Environ. Health Perspect.* 108, 435-439.
 12. Ha, J.H., T. Hidaka, and H. Tsunos. 2009. Quantification of toxic *Microcystis* and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environ. Sci. Technol.* 43, 812-818.
 13. Harmsen, D. and H. Karch. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *American Soc. for Microbiol. News* 70, 19-24.
 14. Henriksen, P. 1996. Microcystin profiles and contents in Danish populations of cyanobacteria/ blue-green algae as determined by HPLC. *Phycologia* 35, 102-110.
 15. Jaiswal, P., P.K. Singh, and R. Prasanna. 2008. Cyanobacterial bioactive molecules-an overview of their toxic properties. *Can. J. Microbiol.* 54, 701-717.
 16. Jang, M.H., J.M. Jung, J.D. Yoon, Y.J. Lee, and K. Ha. 2007. Changes in microcystin production in *Microcystis aeruginosa* exposed to different concentrations of filtered water from phytoplanktivorous and omnivorous fish. *Korean J. Limnol.* 40, 294-302.
 17. Kaneko, T., N. Nakajima, S. Okamoto, I. Suzuki, Y. Tanabe, M. Tamaoki, Y. Nakamura, and *et al.* 2007. Complete genomic structure of the bloom-forming toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* NIES-843. *DNA Res.* 14, 247-256.
 18. Ki, J.S., W. Zhang, and P.Y. Qian. 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and *rpoB* comparisons and their usefulness for species identification. *J. Microbiol. Methods* 77, 48-57.
 19. Ki, J.S., R. Zhang, W. Zhang, Y.L. Huang, and P.Y. Qian. 2009. Analysis of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences for the discriminative power of marine *Vibrio* species. *Microb. Ecol.* 58, 679-691.
 20. Ki, J.S. 2009. Heterogeneity analysis of the 16S rRNA gene sequences of the genus *Vibrio*. *Korean J. Microbiol.* 45, 430-434.
 21. Kim, B.C., E.K. Kim, D.J. Pyo, H.D. Park, and W.M. Heo. 1995. Toxic cyanobacterial blooms in Korean lakes. *J. KSWQ Sep.* 11, 231-237.
 22. Kim, W.H., A.R. Choi, and J.A. Lee. 1999. The occurrence of microcystins in the Naktong River. *Algae* 14, 319-322.
 23. Komarek, J. 1991. A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to population from Japan. *Arch. Hydrobiol. Suppl.* 92, 115-127.
 24. Lee, H.K., J.H. Kim, S.A. Yoo, T.S. Ahn, C.K. Kim, and D.H. Lee. 2003. Primer evaluation for the detection of toxigenic *Microcystis* by PCR. *Korean J. Microbiol.* 39, 166-174.
 25. Lee, J.W., H.W. Yu, and I.S. Kim. 2004. Application of quantum-dot nanocrystals for cyanobacterial toxin-microcystin detection. *J. Kor. Soc. Water Qual.* 23, 705-711.
 26. Lee, K.L., W.H. Jheong, J.M. Kim, Y.S. Kim, H.J. Choi, and H.S. Kim. 2008. Seasonal variations of cyanobacterial toxins (microcystins) in Yeongchun Reservoir. *Korean J. Limnol.* 41, 264-274.
 27. Lyra, C., S. Suomalainen, M. Gugger, C. Vezie, P. Sundman, L. Paulin, and K. Sivonen. 2001. Molecular characterization of planktic cyanobacteria of *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis* and *Planktothrix* genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 513-526.
 28. Ministry of Environment. 2000. Environmental white paper, Seoul.
 29. Nakamura, Y., T. Kaneko, S. Sato, M. Ikeuchi, H. Katoh, S. Sasamoto, A. Watanabe, and *et al.* 2002. Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res.* 9, 123-130.
 30. Neilan, B.A., D. Jacobs, and A.E. Goodman. 1995. Genetic diversity and phylogeny of toxic cyanobacteria determined by DNA polymorphisms within the phycocyanin locus. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3875-3883.
 31. Neilan, B.A., D. Jacobs, T. Del Dot, L.L. Blackall, P.R. Hawkins, P.T. Cox, and A.E. Goodman. 1997. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus *Microcystis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 693-697.
 32. Nishizawa, T., M. Asayama, K. Fujii, K. Harada, and M. Shirai. 1999. Genetic analysis of the peptide synthetase genes for a cyclic heptapeptide microcystin in *Microcystis* spp. *J. Biochem.* 126, 520-526.
 33. Otsuka, S., S. Suda, S. Shibata, H. Oyaizu, S. Matsumoto, and M.M. Watanabe. 2001. A proposal for the unification of five species of the cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 873-879.
 34. Richert, K., E. Brambilla, and Stackebrandt. 2007. The phylogenetic significance of peptidoglycan types: Molecular analysis of the genera *Microbacterium* and *Aureobacterium* based upon sequence comparison of *gyrB*, *rpoB*, *recA* and *ppk* and 16S rRNA genes. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 102-108.
 35. Rudi, K., O.M. Skulberg, F. Larsen, and K.S. Jakobsen. 1997. Strain characterization and classification of oxyphotobacteria in clone cultures on the basis of 16S rRNA sequences from the variable regions V6, V7, and V8. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2593-2599.
 36. Stanier, R.Y., R. Kunisawa, M. Mandel, and G. Cohen-Bazire. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* 35, 171-205.
 37. Suh, M.Y., B.H. Kim, and M.S. Han. 2005. Distribution of cyanotoxin microcystin-LR in Han River system and ecological park in Seoul and Kyunggi districts. *Korean J. Limnol.* 38, 237-248.
 38. Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
 39. Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1997. Clustal X: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673.
 40. Tillett, D., D.L. Parker, and B.A. Neilan. 2001. Detection of toxigenicity by a probe for the microcystin synthetase A gene (*mcyA*) of the cyanobacterial genus *Microcystis*: comparison of

- toxicities with 16S rRNA and phycocyanin operon (phycocyanin intergenic spacer) phylogenies. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2810-2818.
41. Watanabae, M.F. and S. Oishi. 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1342-1344.
42. Welsh, E.A., M. Liberton, J. Stockel, T. Loh, T. Elvitigala, C. Wang, A. Wollam, and *et al.* 2008. The genome of *Cyanothece* 51142, a unicellular diazotrophic cyanobacterium important in the marine nitrogen cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 15094-15099.