

남조세균 *Anabaena* 종 구분을 위한 RNA Polymerase Beta Subunit (*rpoB*) 유전자 염기서열 분석

천주용 · 이민아 · 기장서*
상명대학교 그린생명과학과

Analysis of RNA Polymerase Beta Subunit (*rpoB*) Gene Sequences for the Discrimination of Cyanobacteria *Anabaena* Species

Ju-Yong Cheon, Min-Ah Lee, and Jang-Seu Ki*

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

(Received August 29, 2011 / Accepted September 28, 2011)

Anabaena (Cyanobacteria, Nostocales) are important for water quality controls, because they are often responsible for freshwater green tides; moreover, some species are reported to produce hepatotoxin. In this study, we sequenced RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene of *Anabaena*, and evaluated their sequences for the potential use of a molecular taxonomic marker in this taxon. *Anabaena rpoB* showed low DNA similarity and high genetic divergences when compared those of 16S rRNA, and the molecular differences were statistically significant (Student t-test, $p < 0.01$). Parsimony analyses showed the *rpoB* gene evolves 4.8-fold faster than 16S rRNA. In addition, phylogeny of the *rpoB* gene separated each *Anabaena* strain more clearly compared with a 16S rRNA tree. These results suggest that the *rpoB* gene is a useful marker for the molecular phylogenetics and the species discrimination of *Anabaena*.

Keywords: *Anabaena*, cyanobacteria, DNA similarity, genetic distance, *rpoB* gene

남조세균 *Anabaena* (Nostocales; Nostocaceae)는 엽록소를 가지고 있어 광합성을 통해 자가영양을 하며 여름철 고수온기에 주로 출현한다. 세포는 직사각형 또는 타원형으로 세포들이 엮여처럼 길게 한 줄로 연결되어 있으며, 일부의 세포는 부풀어오른 형태의 이형세포(heterocyst)를 형성한다(23). 이형세포는 생활사에서 산소에 민감한 반응을 보이는 혐기성이고, 높은 대사작용으로 질소 고정능력을 갖고 있다(14). 따라서 수중에 질소 영양소가 고갈된다 하더라도 계속해서 번식할 수 있으며, 오래 전부터 *Anabaena*의 질소고정 기작에 관한 연구가 진행되어 왔다(2). 또한 남조류(예, *Anabaena*, *Microcystis*)는 여름철에 대량 증식하여 담수 생태계에서 녹조(綠潮) 현상을 유발하기도 한다. 남조세균 녹조 원인생물로는 *Microcystis*, *Aphanocapsa*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria* 등이 있는데, 이들은 anatoxin, microcystin, nodularin과 같은 간독소

(hepatotoxin)를 갖고 있으며 이취미 물질을 생성하여 음용수 및 수질관리 차원에서 오랫동안 주목 받아 왔다(8). 따라서 가축이나 야생동물들이 유해 남조세균이 발생한 곳의 물을 마셨을 경우, 소화기 계통 및 간장 질환이 발생하거나 심할 경우 사망하기도 한다(9). 우리나라에서는 대청호, 소양호, 낙동강 등지에서 여름철에 *Anabaena*가 대발생한 사례가 있다(4, 18, 20).

*Anabaena*의 대표적인 종으로는 *A. cylindrica*, *A. doliolum*, *A. iyengarii*, *A. laxa*, *A. oscillarioides*, *A. sphaerica*, *A. variabilis* 등이 있으며, 세포의 형태적 특징(이형세포 위치, 세포의 모양, 사상체의 모양, 등)에 의해 종을 구분한다. 하지만 세포의 크기가 매우 작기 때문에(약 10 μm 내외) 현미경 관찰에 의해 종을 정확하게 구분하기 곤란하며, 실제 현장시료 모니터링과정에서 종명을 파악하기 위해 많은 시간과 노력이 요구된다. 더욱이, 같은 종이라고 하더라도 서식 환경에 따라 다양한 형태적 변이가 있으며 동일한 속(genus)에 속하는 종들

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

은 형태적으로 매우 유사하여 종 식별이 매우 난해하다(6, 16). 최근에는 형태적 특징에 의한 분류와 분자 생물학적 기법을 결합하여 남조세균의 분류동정에 활용하고 있다(16, 22).

지금까지 *Anabaena*의 다양한 유전자 염기서열을 이용하여 분자계통분류적 연구가 실시되어 왔으며, 실제로 16S-23S rRNA, internal transcribed spacer (ITS), ribulose 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit (*rbcL*), nitrogen fixation (*nif*) gene, RNA polymerase beta subunit (*rpoB*), gyrase beta subunit (*gyrB*), polyphosphate kinase (*ppk*) 등이 분류학적 유전자 마커로 연구되었다(5, 10, 24, 26). 일반적으로 16S rRNA 염기서열을 분류학적으로 가장 많이 이용하고 있지만, 이들 유전자의 염기서열은 유사한 종간에 변이가 매우 적고, 세포 내에 여러 개의 16S rRNA operon을 갖고 있어 종 구분을 위한 마커로는 부적합한 것으로 알려져 왔다(15, 16). 따라서 16S rRNA를 대신할 수 있는 유전자 마커에 대한 연구가 진행되고 있으며, 대안적으로 *rpoB* 유전자가 제기 되어 왔다(5, 16, 17). 기존 연구에 의하면 *rpoB* 유전자는 염기서열이 16S rRNA보다 2배정도 길고, 2~3배의 염기서열 변이가 있는 것으로 알려져 있다(16, 17). 또한 *rpoB* 유전자는 세포 안에 하나의 copy로 존재하여, 분자생물학적인 방법을 이용한 현장시료의 모니터링과정에서 *rpoB* 유전자의 개수만 측정할 수 있다면, 물속의 단위 부피당 존재하는 특정 생물(예, *Anabaena*)의 개체수를 정확하게 계산할 수 있다는 장점이 있다. 최근 남조세균 *Microcystis rpoB* 유전자를 대상으로 염기서열 변이에 관한 연구가 실시되었다(16). 본 연구는 담수 남조세균 *Anabaena*의 *rpoB* 및 16S rRNA 유전자 염기서열 규명하였으며, *Anabaena rpoB* 유전자의 분류 및 분자

검출을 위한 유전자 마커의 유용성을 평가하였다.

재료 및 방법

Anabaena 균주 및 세포 배양

Anabaena 균주는 국내외 균주은행으로부터 분양 받아 사용하였다(Table 1). 우리나라 균주(AG 10008, AG 10064, AG 1001)는 미생물자원센터(Korean Collection for Type Culture)에서 분양 받았으며, 해외 균주(ATCC 22664)는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 분양 받았다. 분양받은 균주는 BG-11 배지(25)에 접종한 후, 25°C, 혼합주기 120 rpm, 12:12시간 명:암 주기, $65 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^1$의 빛 조건에서 배양하였다.

Anabaena 16S rRNA 및 rpoB 유전자 염기서열 결정

Anabaena genomic DNA 추출을 위해 배양중인 세포 (50 ml)를 3,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 농축하였다. 농축된 세포는 200 μl 1 \times TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 희석하여 -20°C에서 DNA를 추출하기 전까지 보관하였다. Genomic DNA는 DNeasy Plant mini kit (Qiagen, USA)를 이용하여 추출하였다.

Anabaena 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 PCR 증폭은 기존에 보고된 남조세균 특이적 PCR primer를 이용하였다. 16S rRNA 대상 primer는 CYA106F (5'-CGGACGGGTGAGTAA CGCGTGA-3')와 CYA784R (5'-GACTACAGGGGTATCTA ATCC C-3')를 사용하였으며(21), 남조세균 *rpoB* PCR primer는 Ma-rpoBF1026 (5'-CATTCCGGGAACGGACC-3'), Ma-

Table 1. Origins of *Anabaena* strains, including an outgroup *Microcystis*, and DNA sequence GenBank accession numbers

Species	Strain	Isolation locality	GenBank accession nos.	
			16S	<i>rpoB</i>
<i>Anabaena affinis</i>	AG 10008	Korea: Paddy/ Yusung, Daejeon	JN607242#	JN607246#
<i>Anabaena cylindrica</i>	XP6B	Finland: Gulf of Finland, Baltic Sea	AJ630414	AJ628074
<i>Anabaena flos-aquae</i>	ATCC 22664	USA: Wisconsin	JN607243#	JN607247#
<i>Anabaena flos-aquae</i>	202A1	Finland: Lake Vesijarvi	AJ133159	AJ628125
<i>Anabaena oscillarioides</i>	BECID22	Finland: Gulf of Finland, Baltic Sea	AJ630426	AJ628086
<i>Anabaena oscillarioides</i>	BECID32	Finland: Gulf of Finland, Baltic Sea	AJ630427	AJ628087
<i>Anabaena variabilis</i>	AG 10064	Korea: ?	JN607245#	JN607249#
<i>Anabaena variabilis</i>	ATCC 29413	-	NC_007413	NC_007413
<i>Anabaena</i> sp.	AG 10011	Korea: Reservoir/ Daechung, Chungbuk	JN607244#	JN607248#
<i>Anabaena</i> sp.	Otu39s7	Finland: Lake Tuusulanjarvi	AJ630439	AJ628099
<i>Anabaena</i> sp.	1tu34s7	Finland: Tuusulanjarvi	AJ630437	AJ628097
<i>Anabaena</i> sp.	PCC 7108	USA: ?	AJ133162	AJ628128
<i>Anabaena</i> sp.	18B6	Finland: Lake Vaaranlampi	EU151901	EU151904
<i>Anabaena</i> sp.	BO HINDAK 1984/ 43	Canada: ?	AJ630428	AJ628088
<i>Anabaena</i> sp.	SCHMIDKE JAHNKE/4a	Germany: Rostock	AJ630458	AJ628118
<i>Anabaena</i> sp.	Otu37s9	Finland: Lake Tuusulanjarvi	AJ630438	AJ628098
<i>Anabaena</i> sp.	90	Finland: Lake Vesijarvi	AJ133156	AJ628124
<i>Microcystis aeruginosa</i>	NIES-843	Japan: Lake Kasumigaura Ibaraki	AP009552	AP009552#

Determined in this study.

rpoBF2013 (5'-CTTCGTAGTTATAGCCTTCC-3')을 이용하였다(16). PCR은 추출한 genomic DNA 2 µl와 16S, *rpoB* primer를 넣은 PCR 반응액(23 µl)을 각각 혼합하여 실시하였다. PCR 반응액은 1×PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.5 mM forward-reverse primer, 1 unit Ex Taq polymerase (TaKaRa Bio, Japan)를 사용하였다. PCR 반응은 MyCycler™ (BioRad, USA)를 이용하여 초기 94°C 4 분간 DNA를 변성시키고, 이후 94°C 20 초, 50°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 젤에서 전기영동하여 관찰하였다.

DNA sequencing은 PCR 산물을 PCR purification kit (Bionics Co., Korea)로 정제하여, PCR primer (CYA106F, CYA784R, 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 Sequencher 4.1.4 (Gene Codes, USA)을 이용하여 contig된 단일 염기서열로 만들고, 염기서열을 GenBank에 등록하였다(Table 1).

16S rRNA, *rpoB* 유전자 염기특성 분석

Anabaena 16S rRNA 및 *rpoB* 유전자 특성은 염기 유사도 (DNA similarity)와 유전거리(genetic distance)로 분석하였다. 본 연구를 통해 규명한 염기서열과 National Center for Biotechnology Information (NCBI) database로부터 확보한 염기서열을 이용하여 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기서열 data matrix를 만들고, 각각의 염기서열을 Clustal W 1.8 (28)를 이용하여 alignment하였다. 유전거리 분석은 alignment된 염기서열의 양 끝을 같은 영역으로 자른 후, MEGA 4.0 (27)에서 Kimura 2-parameter 모델을 이용하여 계산하였다. 또한 MEGA 4.0을 이용하여 parsimony 분석(예, conserved site, variable site, parsimony-informative site)을 실시하였다. 통계분석은 SPSS 10.0.7 (SPSS, USA)을 이용하였다.

Anabaena 분자계통분석

Anabaena 균주의 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기서열을 이용하여 Bayesian tree 분석을 실시하였다. 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기서열을 Clustal W 1.8로 alignment하고 이후 양 끝을 동일한 크기로 자르고 불확실하게 alignment된 염기서열을 제거하여 dataset을 준비하였다(16S rRNA, 1,512 sites에서 728 sites 선택; *rpoB*, 988 sites에서 531 sites 선택). MrBayes 3.1.2 (13)을 이용하여 Markov chain Monte Carlo (MCMC)과정을 100만 번 실시하여 Bayesian tree를 만들고, 각각의 clade에 대한 posterior probability (PP) 신뢰도 값을 구하였다. 또한 MEGA 4.0을 이용하여 동일한 dataset으로부터 neighbor-joining (NJ), maximum parsimony (MP) Bootstrap proportions (BP)을 계산하였다.

결과 및 고찰

남조세균 *Anabaena* 16S rRNA, *rpoB* 유전자 염기서열

본 연구에서 남조세균 *Anabaena* 4개 균주(AG 10008, AG 10011, AG 10064, ATCC 22664)의 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기서열을 규명하였다(Table 1) 16S rRNA 염기서열로 BLAST-N 검색을 실시하여, 본 연구에서 사용한 모든 균주가 기존에 NCBI database에 등록된 *Anabaena*와 일치하는 것을 확인하였다. *rpoB* 염기서열의 경우 ATCC 22664와 AG 10064는 *A. variabilis* # ATCC 29413 (GenBank No. NC_007413)와 가장 높은 유사도로 일치하였다(100% DNA similarity). 하지만, AG 10008, AG 10011은 BLAST-X 검색에서 *Nostoc azollae* #0708 (GenBank No. NC_014248)와 *Nostoc punctiforme* #PCC 73102 (GenBank No. NC_010628)와 가장 높게 일치하였으며, 아미노산의 유사도는 각각 86%와 96%를 갖는 것으로 조사되었다. 이것은 NCBI에 등록된 *Anabaena*의 염기서열이 상대적으로 적기 때문에 *Anabaena*와 근연 관계에 있는 *Nostoc* (Nostocales; Nostocaceae)의 *rpoB* 유전자와 BLAST-X에서 가장 높은 값으로 hitting된 것으로 파악된다.

16S rRNA와 *rpoB* 유전자의 phylogenetic trees

일반적으로 같은 종에 속하는 경우라도 균주가 다른 경우 유전자 변이가 있다. 따라서 *Anabaena* 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 사이의 변이를 정확하게 파악하기 위하여, 동일한 균주로부터 규명된 염기서열을 대상으로 해야 한다. 본 연구에서는 *Anabaena* 17개 균주(Table 1)를 대상으로 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기서열 특성을 비교하였다. *Anabaena* 16S rRNA와 *rpoB* 특성을 Bayesian trees를 이용하여 분석하였다 (Fig. 1). 16S와 *rpoB* Bayesian trees의 branch 형태는 전체적으로 유사한 분지양상을 보였다. 하지만 16S Bayesian tree의 경우 분자계통학적 해상도(phylogenetic resolution)가 낮은 균주 상호간의 분지양상을 명확하게 파악하기 어려웠지만, *rpoB* tree의 경우 각각의 균주가 뚜렷하게 분리되는 것을 확인하였다. *Anabaena rpoB* 유전자를 이용한 분자계통분석에서 *A. cylindrical*, *A. flos-aquae*, *A. oscillarioides* 하나의 clade를 형성하였다(16S tree에서 0.93 PP, *rpoB* tree에서 1.00 PP). 또한 두 개의 *A. variabilis* 균주(AG 10064, ATCC 29413)는 *A. flos-aquae* #ATCC 22664와 같은 clade를 형성하였다(16S와 *rpoB* trees, 1.00 PP). 본 연구에서 사용한 균주 ATCC 22664 (*A. flos-aquae*)는 16S, *rpoB* trees 모두에서 *A. variabilis*와 같은 clade를 형성하였다. *A. flos-aquae*는 *A. variabilis*와 분자유전학적으로 뚜렷하게 구분되며(22), 최근 연구에 의하면 *A. variabilis*를 *Trichormus variabilis*으로 다른 속명이 제안되기도 하였다(19). 이것은 본 연구에서 분석한 ATCC 22664이 *A. variabilis*이라는 것을 제시하고 있고 있다. 본 연구에서 16S tree보다 *rpoB* tree에 의해 각각의 *Anabaena* 종이 명확하게 구분되는 것을 확인하였다. 또한 *rpoB*, 16S trees의 sum of branch length (SBL) 비교에서 *rpoB* tree가 2.5배정도 더 긴 것으로 조사되었으며, 이것은 *rpoB* 유전자가 분류학적 마커

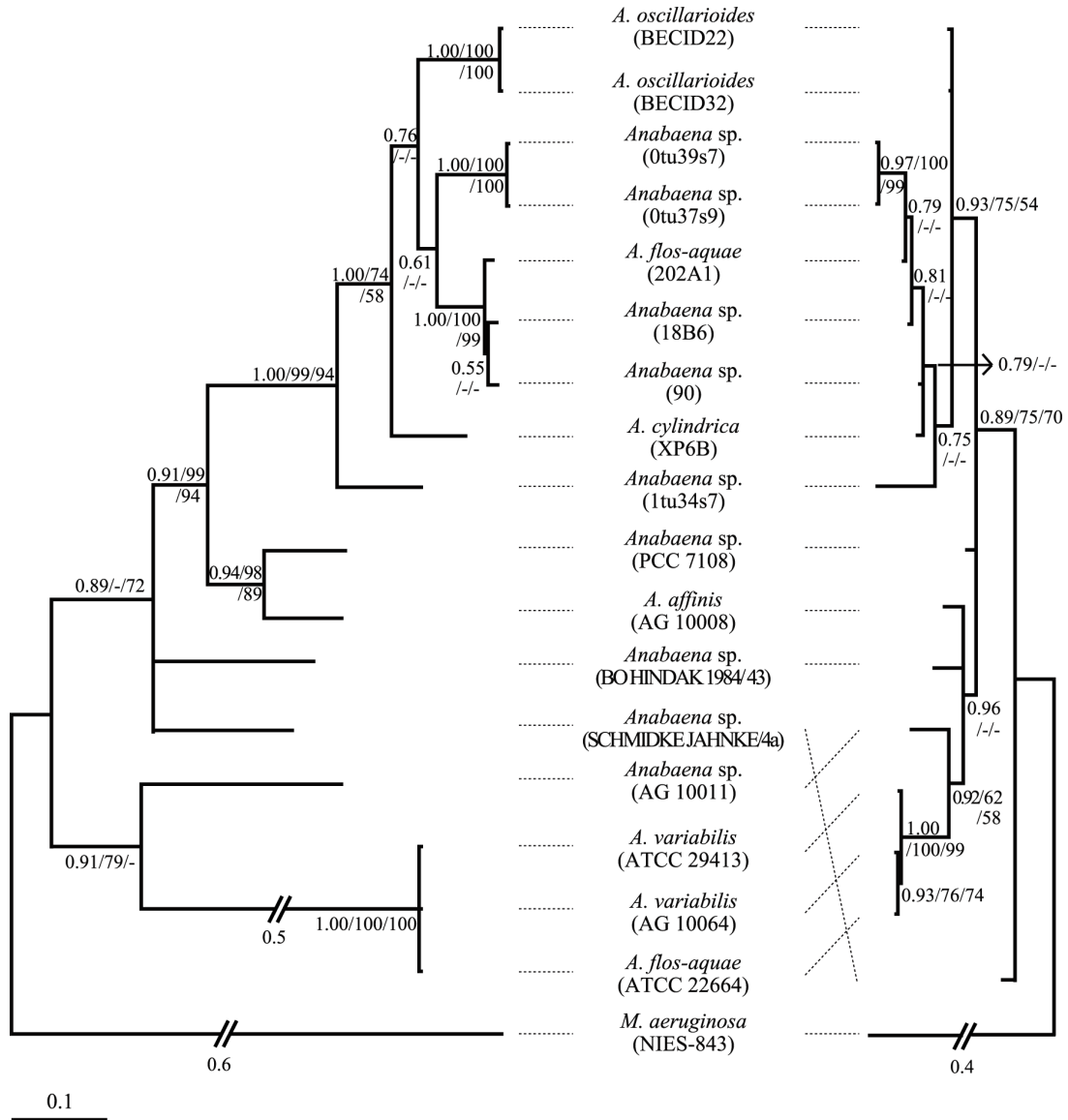


Fig. 1. Bayesian trees inferred from *Anabaena* species *rpoB* gene (left) and 16S rRNA (right) sequences. Analyses were made use of the nucleotide substitution model of GTR+I+G in 16S rRNA, GTR+G in *rpoB* gene. Bayesian likelihood scores of tree was calculated at $-\ln L = 2292.4$ in 16S rRNA, $-\ln L = 3802.3$ in *rpoB* gene. Additional MP and NJ analyses generated similar topologies of the tree compared with the Bayesian tree. Bootstrap proportions (BP) from both analyses were incorporated into the Bayesian tree. The first, second, and third numbers at the nodes display PP (>0.50) in Bayesian, BP (>50%) in NJ, and BP (>50%) in MP, respectively. *Microcystis aeruginosa* (strain NIES-843) was used as the outgroup.

로 더 적합하다는 것을 제시해 준다.

Anabaena 16S rRNA 와 rpoB 유전자 염기 유사도

본 연구에서 종 이름이 알려진 균주(AG 10008, *A. affinis*; XP6B, *A. cylindrica*; 202A1, *A. flos-aquae*; BECID32, *A. oscillarioides*; AG 10064, *A. variabilis*)와 Fig. 1 계통분석을 통해 기존의 종과 뚜렷이 구분되는 분지형태를 갖는 균주 (0tu39s7, 1tu34s7, BO HINDAK 1984/ 43, SCHMIDKE JAHNKE/4a, AG 10011)를 대상으로 16S rRNA와 *rpoB* 유전자 염기 유사도(DNA similarity)를 비교하였다(Table 2). 결

과는 *Anabaena* 균주의 16S rRNA 간에 높은 염기 유사도를 보였다(평균 95.5% 유사도, Standard deviation (SD)=1.45, N=45]. 가장 높은 값은 *A. cylindrica* #XP6B와 *A. flos-aquae* #202A1 사이에 98.9%이고, 가장 낮은 값은 *A. variabilis* #AG 10064와 *Anabaena* sp. #1tu34s7 사이에 92.1%로 조사되었다. 반면, *rpoB* 유전자 비교에서 가장 높은 값은 89.0%이고, 가장 낮은 값은 55.9%로 조사 되었다(평균 74.6% 염기 유사도, SD=9.3, N=45). 유사도 비교를 통해 *Anabaena*의 *rpoB* 유전자가 16S rRNA보다 매우 큰 유전자 변이가 있다는 것이 파악되었다.

Table 2. Similarity scores of 16S rRNA (above diagonal) and *rpoB* gene (below diagonal) sequences between each pair of ten *Anabaena* species

No.	Species	Strain	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]
			16S-728 compared sites									
[1]	<i>Anabaena cylindrica</i>	XP6B		98.9	98.6	97.6	95.7	95.9	95.4	97.2	94.7	94.7
[2]	<i>Anabaena flos-aquae</i>	202A1	87.7		98.0	97.9	95.1	94.7	94.2	96.0	93.4	94.1
[3]	<i>Anabaena oscillarioides</i>	BECID32	85.6	87.4		96.7	96.0	96.0	96.0	97.6	95.1	95.0
[4]	<i>Anabaena</i> sp.	Otu39s7	87.9	89.0	86.2		96.0	95.1	93.8	96.1	94.2	93.6
[5]	<i>Anabaena</i> sp.	1tu34s7	85.6	83.4	82.9	85.8		94.4	93.8	95.0	94.2	92.1
[6]	<i>Anabaena</i> sp.	BO HINDAK 1984/ 43	75.0	75.5	76.3	73.9	75.7		95.4	96.7	95.1	95.3
[7]	<i>Anabaena</i> sp.	SCHMIDKE JAHNKE/4a	72.1	75.5	78.0	74.5	75.5	81.9		96.6	94.2	95.3
[8]	<i>Anabaena affinis</i>	AG 10008	78.5	81.5	78.3	78.3	78.2	80.9	79.4		96.0	95.4
[9]	<i>Anabaena</i> sp.	AG 10011	70.9	70.4	67.1	70.7	74.8	71.7	72.7	69.7		95.1
[10]	<i>Anabaena variabilis</i>	AG 10064	55.9	58.3	56.9	56.8	59.6	63.0	63.4	60.7	62.4	
			<i>rpoB</i> -531 compared sites									

또한, 위에서 선별한 10개의 *Anabaena*를 대상으로, 16S rRNA 와 *rpoB* 유전자의 변이를 Kimura 2-parameter 모델로 유전거리를 계산하여 분석하였다(Fig. 2). 그 결과 16S rRNA 염기서열 변이는 0.042 (SD=0.0178, N=45)로 계산되었으며, *rpoB* 유전자 변이는 0.256 (SD=0.1244, N=45)였다. 이것은 *Anabaena rpoB* 와 16S rRNA의 유전거리에서 큰 변이가 있는 것으로 나타내고 있으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Student t-test, $p < 0.01$). 각각의 유전자 염기서열에 대하여

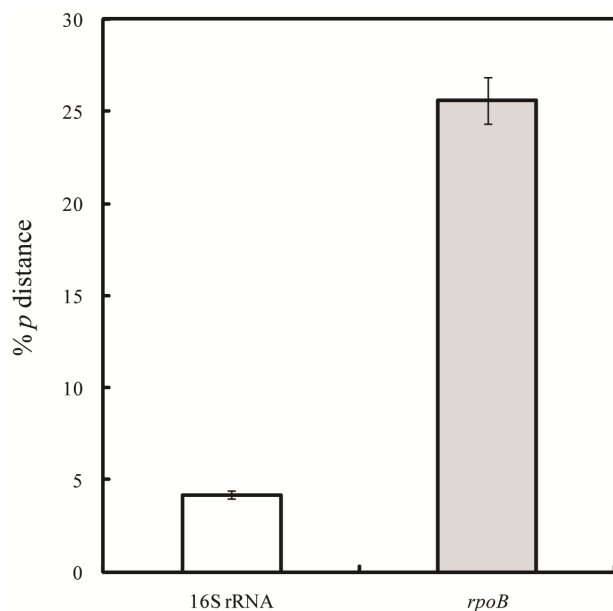


Fig. 2. Inter-species nucleotide divergences of the 16S rRNA and the *rpoB* gene based on corrected *p*-distances. Genetic distances of each paired sequence between 10 *Anabaena* species (Table 2) were calculated by a Kimura two-parameter model. Statistical analysis showed that the divergences of the *rpoB* gene sequences were significantly different against those of the 16S rRNA (Student t-test, $p < 0.01$, N=45).

parsimony 분석을 실시하여(Table 3), 유전자 변이를 진화속도로 계산하였다. 본 연구에서 분석한 *Anabaena* 16S rRNA는 88%의 보존된 염기서열을 보였으며, *rpoB* 유전자 염기서열은 48%가 보존 되어 있는 것으로 분석되었다. Parsimony informative site (PI)는 16S rRNA가 9.6%를 보였으며, *rpoB* 유전자는 46.0%로 계산되었다. PI값을 이용하여 유전자 변이(또는 진화)속도를 계산하였는데, *rpoB* 유전자가 16S rRNA에 보다 4.79배 빠르게 변하는 것으로 분석되었다. 본 연구 결과는 *Anabaena*의 경우 다른 세균보다 매우 빠르게 *rpoB* 유전자 변이가 진행되었음을 제시해 주고 있다. 예를 들어, 다른 담수 남조세균 *Microcystis aeruginosa*의 경우 *rpoB* 유전자가 16S rRNA보다 2.12배 빠르게 변하는 것으로 알려져 있으며(16), γ -proteobacteria *Vibrio*의 경우 3.23배였다(15).

Anabaena 종 분류를 위한 *rpoB* 유전자 마커

지난 30여 년 동안 남조세균의 분자계통 및 동정을 위해 16S rRNA 유전자를 이용하여 왔다(1, 3, 11, 12, 29). 하지만 16S rRNA 유전자는 같은 속(genus) 내에서는 매우 보존적인 염기서열로 존재하기 때문에, 16S rRNA를 이용하여 *Anabaena*를 종 수준으로 분류하기 위해서는 해상도의 한계가 있다(Table 2). 또한 16S rRNA 유전자는 세포 내에 여러 개의 multi-copy로 존재해서, 이들 유전자를 이용한 현장 시료의 분자적 정량분석(예, real-time PCR)에서 실제 개체수 보다 높은 값으로 측정 될 수 있다(7). 본 연구에서 NCBI database에 공

Table 3. Parsimonious analysis of partial 16S rRNA and *rpoB* genes. These were calculated from DNA sequences of 10 *Anabaena* species (Table 2)

Gene	Characteristics			
	Nn	Nc	Nv	PI (%PI)
16S rRNA	728	638	90	70 (9.6)
<i>rpoB</i>	531	256	275	244 (46.0)

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

개된 *A. variabilis* #ATCC 29413의 제논 염기서열을 이용하여 16S rRNA 와 *rpoB* 유전자 copy수를 분석하였다. ATCC 29413는 16S rRNA operon 4개와 *rpoB* 유전자 1개를 가지고 있었다. 또한 Nostocaceae과에 속하는 *Nostoc punctiforme* #PCC 73102의 제논 염기서열을 조사하였는데, *A. variabilis* #ATCC 29413와 동일하게 4개의 16S rRNA operon이 있는 것으로 분석되었다. 이것은 *Anabaena*속의 경우 다수의 16S rRNA operon이 존재한다는 것을 제시하고 있다. 반면 *rpoB* 유전자의 경우 세포 내에 1개 존재하며, 16S rRNA 보다 매우 높은 유전자 변이를 보였다.

결론적으로 *Anabaena* 유전자 염기서열의 PI 값을 이용한 유전자 변이 속도에서 16S rRNA에 비해 *rpoB* 유전자가 4배 이상의 속도로 빠르게 진화하는 것을 확인하였으며, *rpoB* 유전자 phylogeny 분석에서 16S rRNA tree보다 높은 해상도로 *Anabaena*를 구분하였다. 본 연구는 *rpoB* 유전자가 *Anabaena*의 분자계통관계 및 종 구분을 위한 유용한 유전자 마커라는 것을 제시해준다.

적요

남조세균 *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocales)는 담수 생태계에서 녹조 현상을 유발하거나 일부 종은 간독소 (hepatotoxin)를 갖고 있어 수질관리 차원에서 주목 받아 왔다. 본 연구는 *Anabaena* RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) 유전자 염기서열을 규명하였으며, 분류학적 분자 마커로 사용하기 위하여 이들 염기서열의 특성을 평가하였다. *Anabaena rpoB* 유전자는 16S rRNA 유전자와 비교하여 염기 유사도가 낮으며 유전자 변이가 큰 것으로 분석되었으며, 통계적으로 유의한 차이를 보였다(Student t-test, $p < 0.01$). Parsimony 분석을 통해 *rpoB* 유전자가 4.8배의 속도로 빠르게 진화하는 것으로 파악되었다. 또한 *rpoB* 유전자 phylogeny 분석에서 16S rRNA tree보다 높은 해상도로 *Anabaena* 균주를 명확하게 구분해 주었다. 본 연구 결과는 *Anabaena*의 종 식별, 분자계통 분류, 분자적 검출을 위해 *rpoB* 유전자가 매우 효과적이라는 것을 제시해 준다.

감사의 말

본 연구는 2011년 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.
- Allen, M.B. and I.A. Daniel. 1955. Studies on nitrogen-fixing blue-green algae I. Growth and nitrogen fixation by *Anabaena* cylindrical. *Lemm. Plant Physiol.* 30, 366-372.
- Castiglioni, B., E. Rizzi, A. Frosini, K. Sivonen, P. Rajaniemi, A. Rantala, M.A. Mugnai, S. Ventura, A. Wilmoth, C. Boute, 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.
- Choi, A.R., J.H. Park, and J.A. Lee. 2002. Population dynamics and the toxin of *Anabaena* in the Lower Naktong River. *Algae* 17, 95-104.
- Dahllof, 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.
- Doers, M.P. and D.L. Parker. 1988. Properties of *Microcystis aeruginosa* and *M. flos-aquae* (Cyanophyta) in culture: taxonomic implications. *J. Phycol.* 24, 502-508.
- 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.
- 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.
- Gorham, P.R., J. McLachlan, U.T. Hammer, and W.K. Kim. 1964. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lyngb.) de Breb. *Int. Assoc. Theor. Appl. Limnol.* 15, 796-804.
- Gugger, M., C. Lyra, P. Henriksen, A. Coute, J.F. Humbert, and K. Sivonen. 2002. Phylogenetic comparison of the cyanobacterial genera *Anabaena* and *Aphanizomenon*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1867-1880.
- Ha, J.H., T. Hidaka, and H. Tsunos. 2009. Quantification of toxic *Anabaena* and evaluation of its dominance ratio in blooms using real-time PCR. *Environ. Sci. Technol.* 43, 812-818.
- Harmsen, D. and H. Karch. 2004. 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree. *ASM News* 70, 19-24.
- Huelsenbeck, J.P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, C.P. Wolk, T. Kuritz, S. Sasamoto, A. Watanabe, M. Iriguchi, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, and et al. 2001. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* 8, 205-213.
- Ki, J.S. 2009. Heterogeneity analysis of the 16S rRNA gene sequences of the genus *Vibrio*. *Korean J. Microbiol.* 45, 430-434.
- Ki, J.S. 2010. Divergence analysis of 16S rRNA and *rpoB* gene sequences revealed from the harmful cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Korean J. Microbiol.* 46, 296-302.
- Ki, J.S., R. Zhang, W. Zhang, Y.L. Huang, and P.-Y. Qian. 2009a. Analysis of RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene sequences for the discriminative power of marine *Vibrio* species. *Microb. Ecol.* 58, 679-691.
- Kim, Y.J. and J.H. Lee. 1996. Comparison of phytoplankton communities of six dam lakes in the Naktong river system. *Korean J. Limnol.* 29, 347-362.
- Komarek, J. and K. Anagnostidis. 1989. Modern approach to the classification system of Cyanophytes 4 - Nostocales. *Arch Hydrobiol.* 82, 247-345.
- Lee, E.J., B.C. Kim, and K.S. Cho. 1998. Patterns of phytoplankton community structure at inlet site (Sanggul-Ri) in Lake Soyang from 1984 to 1997. *Korean J. Limnol.* 31, 119- 128.

21. Nubel, U., F. Garcia-Pichel, and G. Muyzer. 1997. PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3327-3332.
22. Rajaniemi, P., P. Hrouzek, K. Kastovská, R. Willame, A. Rantala, L. Hoffmann, J. Komárek, and K. Sivonen. 2005. Phylogenetic and morphological evaluation of the genera *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Trichormus* and *Nostoc* (Nostocales, Cyanobacteria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55, 11-26.
23. Rice, D., B.J. Mazur, and R. Haselkorn. 1982. Isolation and physical mapping of nitrogen fixation genes from the cyanobacterium *Anabaena* 7120. *J. Biol. Chem.* 257, 13157-13163.
24. 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.
25. 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.
26. Tamas, I., Z. Svircev, and S.G. Andersson. 2000. Determinative value of a portion of the *nifH* sequence for the genera *Nostoc* and *Anabaena* (cyanobacteria). *Curr. Microbiol.* 41, 197-200.
27. 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.
28. 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.
29. Tomioka, N. and Sugiura, M. 1984. Nucleotide sequence of the 16S-23S spacer region in the *rrnA* operon from a blue-green alga, *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Gen.* 193, 427-430.