

보 문

Enterococcus faecalis 특이적 박테리오파지의 분리와 특성규명

강희영 · 김석호 · 김정민*

경북대학교 의과대학 미생물학교실

Isolation and characterization of an *Enterococcus faecalis* bacteriophage

Hee-Young Kang, Shukho Kim, and Jungmin Kim*

Department of Microbiology, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu 41944, Republic of Korea

(Received July 8, 2015; Accepted August 10, 2015)

ABSTRACT: *Enterococcus faecalis* is a Gram-positive and facultative anaerobic bacterium that causes many hospital-acquired infections. Novel *E. faecalis* specific bacteriophage [phage] ECP3 that had been isolated from thirty-four environmental samples and characterized phenotypically and genotypically. ECP3 phage belongs to the family *Myoviridae* with contractile tail and lysed *E. faecalis* specifically but other bacteria including *Enterococcus faecium*. The genome was double-stranded linear DNA and its size was 145,518 bp comprising of 220 open reading frames. The GC content was 35.9%. The genome sequence showed 97% identity in 90% coverage region with *Myoviridae* phage PhiEF24C. ECP3 is the first *E. faecalis*-specific *Myoviridae* phage isolated in Korea which can be a promising antimicrobial agent against *E. faecalis* infections.

Key words: *Enterococcus faecalis*, bacteriophage, genome sequence, host specificity

그람 양성 사슬알균인 장알균(*Enterococcus*)은 환경뿐 아니라 사람과 대동물의 장관계에서 정상 세균총으로서 발견되며 일부는 여러 가지 감염질환을 유발하기도 한다(Aarestrup *et al.*, 2000). 장알균은 심내막염(Nallapareddy *et al.*, 2006), 치주감염(Stuart *et al.*, 2006), 장관계 감염(Rinkinen *et al.*, 2003), 요로감염(Guzman *et al.*, 1989), 창상감염 및 균혈증 등 원내감염의 주요 원인균으로 알려지고 있다(Ruiz-Garbajosa *et al.*, 2006). 근래 들어 반코마이신 내성 장알균의 유행으로 항균제 치료가 어려워 졌으며 병원내 감염원 중에서 생명을 위협하는 매우 위험한 세균 중의 하나가 되었다. 약제에 대한 내성은 장알균의 세균막(biofilm) 형성능으로 하여 더욱 강화되고 이에 따른 세균 사멸과 제거가 어려워짐에 따라 보다 효과적인 치료제의 개발이 요구되고 있다(Toledo-Arana *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2010).

박테리오파지(파지)는 세균에 특이적으로 감염하고 용균을 일으키는 세균의 바이러스로 1915년 최초발견 이후 지금까지 다양한 세균성 질병의 치료를 위해 연구되어 왔다(Sulakvelidze

et al., 2001). 항균제에 대한 세균의 다제 내성이 증가함에 따라 박테리오파지는 항균제의 대체제로 주목을 받고 있으며 세균막을 효과적으로 제거하거나, 항균제와 함께 처치하여 병원균을 사멸시킬 수 있다는 보고가 점차로 증가하고 있다(Rahman *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012). 또한 박테리오파지가 가지고 있는 고유한 리신 단백질은 숙주 세균의 세포벽을 파쇄하는 기능이 있어 여러 생명공학 회사들은 리신 단백질을 이용한 항균제제를 개발하려는 노력을 기울이고 있다(Fischetti, 2008, 2010). 그러나, 이러한 연구개발 목표들이 식중독을 일으키는 병원성 장내세균들이나 황색포도상구균에 집중되어 왔으며, 장알균 특이적 파지를 발견하여 항균제로 개발하거나 치료에 응용한 사례는 대한민국뿐 아니라 세계적으로도 매우 제한적인 것이 사실이다.

본 논문은 장알균이 흔히 분리되는 하천이나 하수에서 장알균 특이적인 새로운 박테리오파지를 분리하고 파지의 형상, 숙주특이성과 유전학적 특성을 규명하고자 하였다.

*For correspondence. E-mail: minkim@knu.ac.kr
Tel.: +82-53-420-4845; Fax: +82-53-427-5664

재료 및 방법

장알균 특이 박테리오파지 분리

광주천과 금호강에서 각각 5건씩 총 10건의 액상 환경샘플과 계분장의 침출수 24건 등을 포함하여 총 34건의 환경 샘플을 수집하였다. 환경 샘플은 15,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 부유물을 제거한 후, 상층액을 사용하였다.

장알균에 특이적인 박테리오파지 분리를 위한 기질속주로 경북대학교 병원 임상에서 분리된 *E. faecalis* 5주와 *E. faecium* 5주를 사용하였다. Tryptic soy broth (TSB)에 균주를 접종하고 하룻밤 동안 배양한 후 다음 날 일정 균액을 취하여 새로운 TSB에 접종 후, 대수증식기에 도달할 때까지 배양한 균주를 기질 속주로 사용하였다.

장알균에 특이적인 파지의 증폭을 위하여 4 ml의 샘플, 0.5 ml의 10X TSB와 0.5 ml의 기질 속주를 혼합하여 하루 동안 37°C 배양기에서 정체 배양하였다. 혼합 배양액에 chloroform을 10% (v/v)되게 첨가하여 세균을 사멸시키고, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 0.45 µm syringe filter에 통과시켜 박테리오파지 lysate를 확보하였다.

각 박테리오파지 lysate내의 용혈성 박테리오파지의 존재 유무를 확인하기 위하여, 기질 속주로 사용한 균액을 고형배지에 도말한 후, 각각의 박테리오파지 lysate로 spot test를 실시하여 장알균에 대한 사멸능을 판정하였다.

Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR을 통한 파지의 유전형별 구분

박테리오파지의 유전적 동일성 또는 유전형의 비교를 위하여 분리된 파지를 대상으로 randomly amplified of polymorphic DNA-PCR을 시행하였다. Phage DNA Isolation Kit (Norgen)를 사용하여 박테리오파지의 genomic DNA를 분리한 후, 추출한 DNA를 주형으로 하고 OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3'), RAPD5 (5'-AACGCGCAAC-3'), P1 (5'-CCGAGCCAA-3'), P2 (5'-AACGGGCAGA-3') 등 네 종의 단일 primer를 이용하여 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다[94°C 45초, 30°C 120초, 72°C 60초(4회 반복), 94°C 5초, 36°C 30초, 72°C 30초(26회 반복), 75°C 10분(1회)]. PCR 산물은 1% 한천 겔을 준비하여 전기영동하고 ethidium bromide 수용액으로 염색한 후, 겔도큐먼트 시스템(Gel Doc, Bio-Rad)을 사용하여 관찰하고 이미지를 저장하여 DNA 밴드 양상을 서로 비교하였다(Gutiérrez *et al.*, 2011).

박테리오파지의 순수분리와 숙주범위 확인

RAPD-PCR 결과에서 서로 다른 밴드 양상을 나타낸 박테리오파지를 대상으로 파지의 장알균 사멸능을 확인하기 위하여 plaque assay를 실시하였다(Rahman *et al.*, 2011). 먼저 3 ml의 0.6% TSB soft agar에 100 µl의 파지 lysate와 100 µl의 숙주 균주를 혼합하여 TSB 고형 배지에 부어 균한 후, 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 plaque의 형성을 확인한 후, plaque을 취하여 0.5 ml의 기질 속주 균 배양액과 함께 4.5 ml의 TSB에 배양하였다. 하룻동안 정체배양 후 배양액에 chloroform을 10% (vol/vol)되도록 첨가하여 세균을 사멸시키고, 15,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 0.45 µm syringe filter을 이용하여 순수 박테리오파지 lysate를 확보하였다. 위 단계를 3-4번 반복하여 순수 박테리오파지를 분리하였다. 순수 분리된 파지의 숙주범위를 확인하기 위하여 장알균, 포도알균 등의 그람양성균과 녹농균, 아시네토박터, 장내세균 등의 그람 음성균들을 대상으로 spot test를 실시하였다.

박테리오파지의 숙주 부착능(adsorption rate)과 증식능(burst size) 측정

박테리오파지의 숙주 부착능과 증식능의 결정을 위하여 Rahman 등(2011)의 방법을 사용하였다. 숙주 균주로는 *E. faecalis* 10K28 균주를 사용하였으며, 숙주세균과 박테리오파지 농도는 0.0001 MOI (multiplicity of infection)가 되도록 하였다. 간단히 기술하면, 숙주 부착능 결정은 Luria Bertani broth (LB)에 배양한 지수기의 숙주 세균(5×10^9 CFU/ml)에 0.0001 MOI의 파지를 감염시킨 후, 5분 간격으로 샘플을 회수하여 13,000 rpm에서 1분간 원심분리 후 상층액으로 plaque assay를 수행하였다. 파지의 증식능 5×10^9 CFU/ml 농도의 숙주 세균에 0.0001 MOI의 파지를 감염시킨 후, 4°C에서 30분간 두어 파지가 세균에 흡착되도록 한 후, 13,000 rpm에서 5분간 원심분리를 시행하고, 침전물을 10 ml의 LB에 부유시킨 후 37°C에 넣어 두고, 5분 간격으로 샘플을 취하여 plaque assay를 실시하였다(Rahman *et al.*, 2011).

파지의 게놈 DNA 분리와 염기서열 분석

증폭된 파지 lysate를 회수하여 Phage DNA Isolation Kit (Norgen)를 사용하여 파지의 게놈 DNA를 확보하였다. 파지의 전체 게놈 염기서열은 (주)천랩에 의뢰하여 실시하였다. 전체 염기서열 분석방법은 454 (GS Assembler 2.6)와 Illumina sequencing platforms (CLC genomics workbench 5.5)의 혼합 방법을 이용하였으며, CodonCode Aligner 3.7.1.을 사용하여

분석하였다.

파지의 전자현미경 관찰

약 10¹² pfu/ml의 순수 분리된 파지를 탄소로 코팅된 구리판에 바른 후, 2% 우라닐 아세테이트로 음성 염색하고 주사전자현미경(Hitachi-7000)을 사용하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

환경샘플로부터 분리된 *E. faecalis* 특이 ECP3의 특성

광주천 샘플, 금호강 샘플 및 계분장 침출수를 대상으로 여러 차례의 파지 증폭을 시도한 결과, 장알균을 기질 숙주로 하는 박테리오파지는 계분장의 침출수에서만 분리되었으며, 이 중 10개의 순수 파지 lysate를 확보하였다. 순수 분리된 파지의 동일성 여부를 확인하기 위하여 파지의 숙주 범위 확인과 계분 DNA의 RAPD-PCR을 시행하였다. OPL5 primer로는 a1과 a2, RAPD primer로는 b1 ~ b4, P1 primer로는 c1 ~ c3, 그리고 P2 primer로는 d1과 d2 밴드 패턴으로 구별되었다(Fig. 1). 이러한 결과를 조합하니 10개의 파지를 4그룹으로 나눌 수 있었다(a1b1c1d1, a2b2c2d1, a1b3c3d2, a1b4c3d2). RAPD PCR 결과에 의해 분류된 4종류의 파지 그룹 별로 한 개씩 선택된 4종(ECP3, ECP4, ECP6, ECP8)의 파지를 대상으로 파지의 숙주 범위와 형태를 확인하였다. 4종의 파지 모두 *E. faecalis*에만 사멸능을 보였으며, *E. faecium* (14주), 포도알균(11주), 및 그람 음성 세균(녹농균, 아시네토박터, 대장균, 크렙시엘라, 엔테로박터, 시트로박터, 세라티아, 살모넬라 등 총 15주)은 사

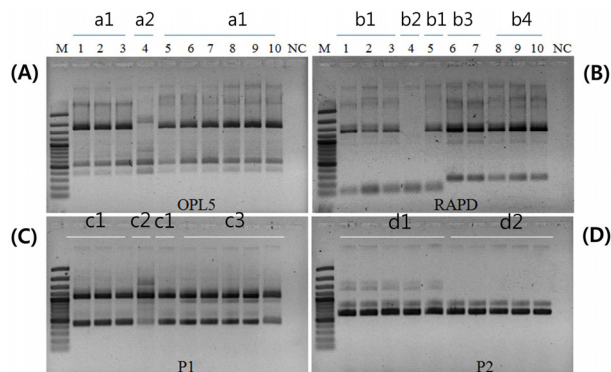


Fig. 1. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) typing result. RAPD typing reactions were performed by using four single primers, OPL5 (A), RAPD (B), P1 (C), and P2 (D), respectively. Each indistinguishable band pattern was assigned for the differentiation of ten isolated bacteriophages (ECP1 ~ ECP10). M stands for DNA size marker and NC for negative control without primer.

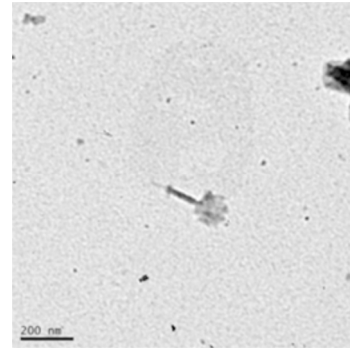


Fig. 2. ECP3 bacteriophage morphology observed using transmission electron microscope.

멸시키지 못하는 것으로 확인되었다. 전자현미경을 이용하여 파지 모양을 관찰한 결과, 4개의 파지 모두가 각이 진 머리와 수축성을 가진 꼬리를 가지고 있어서 미오비리과에 속하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

4개의 파지가 서로 유사한 것으로 판단됨에 따라, 그 중 가장 사멸능이 좋은 것으로 나타난 ECP3 파지를 선택하여 장알균, 포도알균 등의 그람 양성균과 녹농균, 아시네토박터, 장내세균 등의 그람 음성균들을 대상으로 spot test를 실시하여 숙주 범위를 재확인하였다. 43주의 *E. faecalis* 중 40주에 대해서 사멸능을 나타내었으며, *E. faecium*을 포함한 다른 모든 균종에 대해서는 사멸능을 나타내지 않았다(Table 1). 앞선 보고에

Table 1. The host range of ECP3 bacteriophage as determined by spot test

Species*	No. of strains tested	No. of ECP3-susceptible strains
Gram-positive bacteria		
<i>Enterococcus faecalis</i>	43	40
<i>Enterococcus faecium</i>	14	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4	0
Gram-negative bacteria		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	0
<i>Escherichia coli</i>	2	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0
<i>Serratia marcescens</i>	1	0
<i>Salmonella gallinarum</i>	1	0

* The clinical bacteria were isolated and identified by Kyungpook National University Hospital.

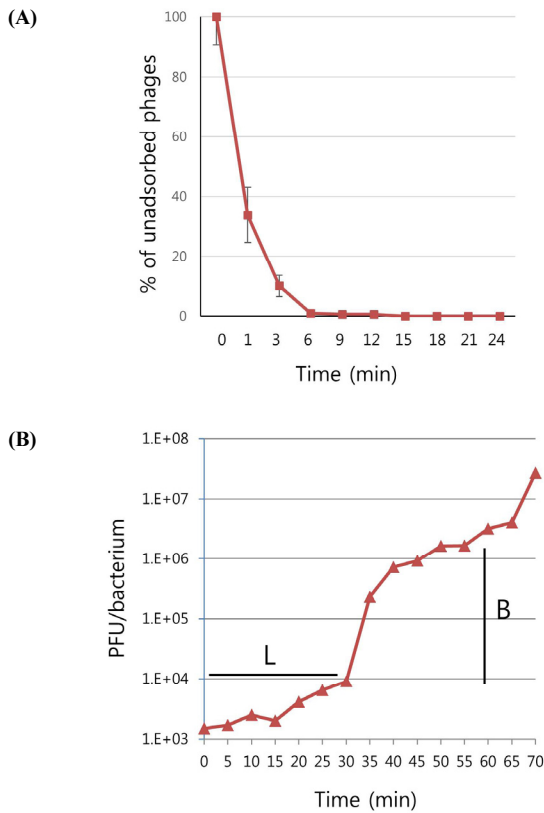


Fig. 3. Adsorption rate (A) and burst size of ECP3 bacteriophage against *E. faecalis* (B). L stands for the latent period and B the burst size (B). The experiments were done 3 times independently.

서도 *E. faecalis* 특이적 파지인 IME-EF1과 PhiEF24C는 장알균의 다른 종인 *E. faecium*을 사멸시키지 못하였음을 볼 때, *E. faecalis*의 파지는 매우 좁은 숙주특이성을 갖고 있다고 생각된다. 그러나, 이들 파지의 세포벽 파쇄 효소인 endolysin은 *E. faecium*을 포함한 광범위 기질을 가지기 때문에 향후 ECP3의 endolysin에 대한 연구가 수행되어야 할 것이다(Uchiyama *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2013).

ECP3 파지의 *E. faecalis* 10K28 숙주에 대한 흡착 속도 측정 결과, 약 90% 이상의 ECP3 파지가 3분 내에 흡착되었다(Fig. 3A). 파지의 증식능을 측정한 결과는 잠복기(latent period, L)가 약 30분이었고 하나의 세균으로부터 약 103개의 파지가 터져 나오는 것(burst size, B)으로 나타났다(Fig. 3B). 이 결과는 같은 미오비리대 과에 속하는 PhiEF24C와 상당히 유사한 수치를 보여준다(L ≈ 30분, B ≈ 110~120)(Uchiyama *et al.*, 2008).

ECP3의 전장 유전자 염기서열 결정

ECP3 파지의 전장 유전자 염기서열 분석 결과, 파지 유전체

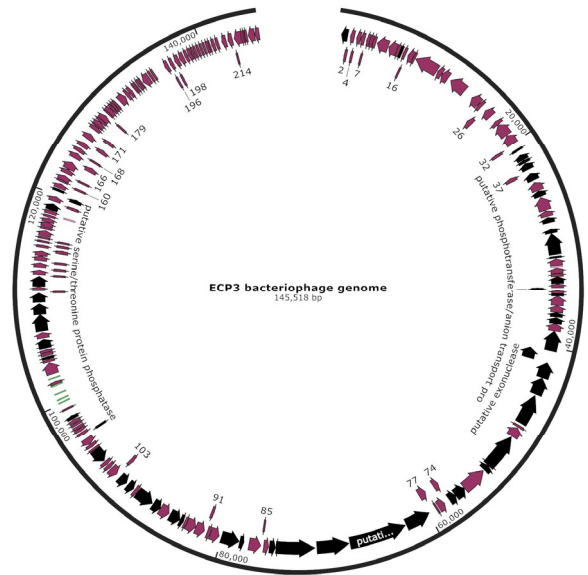


Fig. 4. Predicted protein coding sequences map (total 220 ORFs) of ECP3 bacteriophage. Black arrows stand for function-predicted sequences and green arrows show tRNA coding sequences. Hypothetical protein-coding sequences are reddish brown.

는 크기가 145,518 bp의 이중가닥 DNA로 GC 함량이 35.9% 이었다. 다섯 개의 tRNA 유전자를 포함하여 220개의 open reading frame (ORF)으로 구성되어 있었다(Fig. 4). 220개의 ORF 중 36개가 유전자 산물의 기능을 유추할 수 있었으나 나머지는 기능을 알 수 없는 hypothetical protein이었다. 기능이 추정되는 단백질로는 전사 조절자, sigma factor, DNA 중합효소, RNA 중합효소, primase, exonuclease, ribonucleotide reductase, recombinase, helicase, dUTPase, thymidylate synthase, phosphoesterase, serine/threonine protein phosphatase 등 유전자 합성 및 전사에 관여하는 단백질이며 파지의 구조단백질인 tail protein, tail fiber, tail lysin, tail sheath protein, portal protein과 숙주의 세포벽을 뚫고 파쇄하는 holin과 endolysin이 있었다. 전체 염기서열을 미국 NCBI의 BLAST 검색을 한 결과, ECP3 파지는 현재까지 국내에서 보고된 *Enterococcus* phages와는 다르고, 일본에서 보고된 *E. faecalis* 특이 파지인 미오비리대 과의 PhiEF24C 파지와 염기서열이 상당히 유사하였다(query cover 90%, identity 97%)(Uchiyama *et al.*, 2008). 따라서, ECP3 파지는 국내에서 분리된 첫번째 미오비리대 과에 속하는 *E. faecalis* 특이 파지라고 할 수 있겠다.

염기서열의 accession number

ECP3의 전체 게놈 서열 145,518 bp은 GenBank accession number KJ801817.1으로 등재되었다.

적 요

*Enterococcus faecalis*는 그람 양성균의 조건 혐기성 세균으로 원내감염의 주요 원인균 중의 하나이다. *E. faecalis*에 특이적인 신규 박테리오파지 ECP3를 환경에서 분리하여 형태와 유전적 특성을 규명하였다. ECP3 파지는 형태적으로 수축성 꼬리를 갖는 미오비리대 과에 속하며 *E. faecalis*를 특이적으로 사멸하지만 *Enterococcus faecium*를 포함한 다른 세균은 사멸시키지 않았다. ECP3 파지의 게놈은 이중 선형 DNA로 GC 함량이 35.9%이었으며 크기가 145,518 bp이며 220개의 구조유전자로 구성되어 있었다. ECP3 게놈과 가장 유사한 염기서열은 미오비리대 PhiEF24C 파지이었으며 전체 게놈 90%의 영역에서 97%의 유사도를 보였다. ECP3 파지는 한국에서 처음 분리된 *E. faecalis* 미오비리대 파지이며 *E. faecalis* 감염에 대한 신규 항균제로서 유망하다.

감사의 말

본 논문은 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(과제고유번호: A110642)과 경북대학교 학술연구비(2012)에 의하여 연구되었음. 본 연구는 경북대병원 병원체자원은행에서 제공한 병원체 자원을 이용하여 수행되었음.

References

- Aarestrup, F.M., Agero, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M., and Jensen, L.B. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 127-137.
- Fischetti, V.A. 2008. Bacteriophage lysins as effective antibacterials. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**, 393-400.
- Fischetti, V.A. 2010. Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 357-362.
- Gutiérrez, D., Martín-Platero, A.M., Rodríguez, A., Martínez-Bueno, M., García, P., and Martínez, B. 2011. Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiol. Lett.* **322**, 90-97.
- Guzmán, C.A., Pruzzo, C., LiPira, G., and Calegari, L. 1989. Role of adherence in pathogenesis of *Enterococcus faecalis* urinary tract infection and endocarditis. *Infect. Immun.* **57**, 1834-1838.
- Kim, S., Kim, M.J., Kang, H.Y., Seol, S.Y., Cho, D.T., and Kim, J. 2010. A simple colorimetric method for testing antimicrobial susceptibility of biofilmed bacteria. *J. Microbiol.* **48**, 709-711.
- Kim, S., Rahman, M., Seol, S.Y., Yoon, S.S., and Kim, J. 2012. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage PA10 requires type IV pili for infection and shows broad bactericidal and biofilm removal activities. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6380-6385.
- Nallapareddy, S.R., Singh, K.V., Sillanpää, J., Garsin, D.A., Höök, M., Erlandsen, S.L., and Murray, B.E. 2006. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* **116**, 2799-2807.
- Rahman, M., Kim, S., Kim, S.M., Seol, S.Y., and Kim, J. 2011. Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-26 and its anti-biofilm activity with rifampicin. *Biofouling* **27**, 1087-1093.
- Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S., and Ouwehand, A.C. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens: a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization?. *Vet. Microbiol.* **92**, 111-119.
- Ruiz-Garbajosa, P., Bonten, M.J., Robinson, D.A., Top, J., Nallapareddy, S.R., Torres, C., Coque, T.M., Cantón, R., Baquero, F., Murray, B.E., *et al.* 2006. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecalis* reveals hospital-adapted genetic complexes in a background of high rates of recombination. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2220-2228.
- Stuart, C.H., Schwartz, S.A., Beeson, T.J., and Owatz, C.B. 2006. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J. Endod.* **32**, 93-98.
- Sulakvelidze, A., Alavidze Z., and Morris Jr., J.G. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 649-659.
- Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., Amorena, B., Leiva, J., Penadés, J.R., and Lasa, I. 2001. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4538-4545.
- Uchiyama, J., Rashed, M., Maeda, Y., Takemura, I., Sugihara, S., Akechi, K., Muraoka, A., Wakiguchi, H., and Matsuzaki, S. 2008. Isolation and characterization of a novel *Enterococcus faecalis* bacteriophage ϕ EF24C as a therapeutic candidate. *FEMS Microbiol. Lett.* **278**, 200-206.
- Zhang, W., Mi, Z., Yin, X., Fan, H., An, X., Zhang, Z., Chen, J., and Tong, Y. 2013. Characterization of *Enterococcus faecalis* phage IME-EF1 and its endolysin. *PLoS One* **8**, e80435.