

Malassezia 효모균 동정에 26S rDNA PCR-RFLP 기법의 적용

건국대학교 의학전문대학원 피부과학교실

이양원 · 임상희 · 안규중

= Abstract =

The Application of 26S rDNA PCR-RFLP in the Identification and Classification of *Malassezia* Yeast

Yang Won Lee, Sang Hee Lim and Kyu Joong Ahn

Department of Dermatology, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea

Background: *Malassezia* yeast are lipophilic fungi that are found in 75~80% of healthy adults. The yeast are known to be associated with pityriasis versicolor, seborrheic dermatitis, *Malassezia* folliculitis, and recently its pathogenicity is being expanded to other various skin disorders, such as atopic dermatitis and acne vulgaris. Up to present, mycological studies on *Malassezia* yeast have been carried out mostly through morphological analysis and biochemical analysis. Recently however, various molecular biological techniques are being preferred over morphological analysis, which is not a suitable method for establishing taxonomic relationship between species, and more or less time-consuming.

Objective: We sought to implement novel molecular biology technique, namely 26S rDNA PCR-RFLP method in identifying and classifying *Malassezia* yeast, and assess its clinical applicability.

Methods: Eleven standard strains and eight clinical isolates were thoroughly examined with special attention to the shape of the colonies, size and change in media. Subsequently, the colonies were classified according to Guého classification. For molecular analysis, RFLP analysis was carried out after DNA was isolated from each organism and 26S rDNA was amplified through PCR. The results of identification were confirmed by 26S rDNA sequencing.

Results: In PCR analysis to amplify the 26S rDNA, a 580bp PCR band was seen in all of eleven standard colonies. On analysis of PCR-RFLP of 26S rDNA using restriction enzymes *Hha*1 and *Bst*F51, all of the database in the restriction pattern of each species was attained. On analyzing eight clinical isolates, a restriction pattern which was interspecifically distinguishable, was identified, and the result was in accord with the pattern obtained from 26S rDNA PCR-RFLP of standard colonies. Out of eight, seven clinical isolates colonies was in accord with the result of 26S rDNA PCR-RFLP. In order to assess the precision of 26S rDNA PCR-RFLP, 26S rDNA sequencing was performed, whose result was in accord with 26S rDNA PCR-RFLP analysis.

Conclusion: As evidenced above, 26S rDNA PCR-RFLP analysis could provide a sensitive and rapid identification system for *Malassezia* species, which may be applied to epidemiological surveys and clinical practice. [Kor J Med Mycol 2006; 11(3): 141-153]

Key Words: *Malassezia*, 26S rDNA PCR-RFLP

†별책 요청 저자: 안규중, 143-729 서울특별시 광진구 화양동 4-12, 건국대학교병원 피부과
전화: (02) 2030-5170, Fax: (02) 2030-5179, e-mail: kjahn@kuh.ac.kr

서 론

Malassezia 효모균은 지질친화성 균종으로 피부의 정상 균총에 속하는 진균이며 건강한 성인의 75~98%에서 발견된다^{1,2}. 본 효모균은 1889년 소개된 이후³ 현재까지 전풍 (pityriasis versicolor), 지루피부염 (seborrheic dermatitis), *Malassezia* 모낭염 (*Malassezia* folliculitis) 등의 피부질환과 관련되어 있다고 알려져 왔으며, 최근 아토피 피부염과 심상성 여드름 및 건선에 이르기까지 그 원인균으로서 병원성이 점차 대두되고 있다⁴. 1996년 Guého 등⁵은 형태학적, 생물학적으로 *Malassezia* 효모균을 새로 분리하여 총 7개 균종 (*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*)으로 재분류한 이후 *Malassezia* 효모균의 진균학적 연구는 배양 후 *Malassezia*의 colony 크기, 표면상태, 색깔, 모양 등 형태학적 특징에 의한 분석 (morphological analysis)과 효소반응의 유무를 관찰하는 생화학적 분석 (biochemical analysis)을 통해 이루어져 왔다⁶. 그러나 형태학적인 분류는 곰팡이를 분류하고 동정하는 목적으로 적합하지만 계통학적인 요소가 결여되어 이들 간의 유연관계를 밝히기에는 적합하지 않고, 분류를 위해 여러 가지 실험법들을 거쳐게 되어 많은 시간이 소요되며, 새로운 균주를 동정하고 분류함에 있어 많은 한계점을 가지고 있다. 이러한 한계점을 극복하고자 최근 연구에서는 polymerase chain reaction (PCR)⁷, pulsed field gel electrophoresis (PFGE)⁸, amplified fragment length polymorphism (AFLP)⁹⁻¹¹, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)¹⁰, random amplification of polymorphic DNA (RAPD)^{10,11}, single strand conformation polymorphism (SSCP)¹², terminal fragment length polymorphism (tFLP)¹³, restriction fragment length polymorphism (RFLP)¹⁴⁻¹⁸, sequencing analysis¹⁹ 등 다양한 분자생물학적 기법을 적용하고 있다. 그러나 아직 국내에서는 *Malassezia* 효모균의 동정 및 분류에 있어 분자생물학적 적용에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자는 *Malassezia* 효모균의 동정 및 분류에 신속하고 정확한 분자생물학적 방법을 적용함으로써

써 기존의 형태학 및 생화학적 동정의 한계를 극복한 연구방향을 제시하고, 이를 연구하는데 필요한 기초적인 자료를 제시하고자 한다. 이를 위해 11개 *Malassezia* 효모균의 표준균주를 대상으로 26S rDNA 부분을 증폭한 후 PCR-RFLP를 이용하여 분석하고 실험 조건 및 분석방법을 표준화하고자 한다. 또한 임상분리균주의 분류 및 동정에 26S rDNA PCR-RFLP 방법과 형태학적 동정의 결과를 비교 분석함으로써 임상적용 가능성 여부 및 유용성을 평가하고자 한다.

대상 및 방법

1. 표준균주 (Standard strains)

Malassezia 효모균의 표준균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에서 분양 받은 *Malassezia furfur* (KCTC 7743), *M. obtusa* (KCTC 7847), *M. pachydermatis* (KCTC 17008), *M. restricta* (KCTC 7848), *M. slooffiae* (KCTC 17431), *M. sympodialis* (KCTC 7985) 과 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)에서 분양 받은 *M. globosa* (CBS 7966), *M. yamatoensis* (CBS 9725), Japanese Collection of Microorganisms (JCM)에서 분양 받은 *M. dermatitis* (JCM 11348), *M. nana* (JCM 12085), *M. japonica* (CBS 9432) 총 11개 *Malassezia* 표준균주를 대상으로 하였다 (Table 1, 2).

2. 임상분리균주 (Clinical isolate)

임상분리균주는 정상 성인의 두피, 안면부, 전흉부, 지루피부염 병변, 전풍 병변, 그리고 정상 외이도에서 분리한 8개 *Malassezia* 균주를 대상으로 하였다 (Table 3).

3. 진균학적 분석

1) Leeming과 Notman배지의 준비

증류수 1 l에 glycerol monoesterate (BDH, Poole, UK) 0.5 g, bacteriological peptone (Oxoid, Hampshire, UK) 20 g, glucose (Oxoid, Hampshire, UK) 5 g, yeast extract (Oxoid, Hampshire, UK) 0.1 g, ox bile (Merck, Darmstadt, Germany) 4 g, agar No.1 (Oxoid, Hampshire, UK) 12 g, Tween 60 (Yakuri, Osaka, Japan) 0.5 ml, glycerol (Tedia, Fairfield, USA) 1 ml을 넣고 잘 녹인

후 121°C에서 20분간 멸균 소독하였다. 멸균 후 cycloheximide (Sigma, St Louis, MO, USA) 200 mg, chloramphenicol (Sigma, St Louis, MO, USA) 50 mg을 첨가하고 이어 초고온 멸균 비탈지 우유 (Konkuk Dairy, Seoul, Korea) 5 ml을 첨가하였다. 잘 혼합한 후 즉시 petri dish에 분주하고 사용 시까지 냉장 보관하였다.

Table 1. *Malassezia* species used as standard strains

Species	Standard Strains
<i>M. dermatis</i>	JCM 11348
<i>M. furfur</i>	KCTC 7743
<i>M. globosa</i>	CBS 7966
<i>M. japonica</i>	CBS 9432
<i>M. nana</i>	JCM 12085
<i>M. obtusa</i>	KCTC 7847
<i>M. pachydermatis</i>	KCTC 17008
<i>M. restricta</i>	KCTC 7848
<i>M. slooffiae</i>	KCTC 17431
<i>M. sympodialis</i>	KCTC 7985
<i>M. yamatoensis</i>	CBS 9725

KCTC, Korean Collection for Type Cultures; CBS, Centraalbureau voor Schimmelcultures; JCM, Japanese Collection of Microorganisms; *M.*, *Malassezia*

2) 배 양

표준균주와 임상분리균주를 Leeming과 Notman 배지에 접종한 후 34°C에서 2주간 배양하였다.

3) 생화학 및 형태학적 분류

배양된 *Malassezia* 표준균주를 분류하기 위하여 형성된 집락의 형태, 크기 및 배지의 변화 등 형태학적 소견을 관찰하였고, 집락의 일부를 병리용 슬라이드 상에서 Parker Q ink와 15% KOH 용액을 1:1로 혼합한 용액으로 염색하여 효모균의 형태학적 소견을 관찰하였다. 또한, 형태학적 소견과 함께 30% H₂O₂ catalase 검사, 0.5% Tween 60와 0.1% Tween 80만을 첨가한 2% glucose/1% peptone 배지에서의 성장여부를 분석하였다.

4. 분자생물학적 분석

1) Genomic DNA의 분리

Genomic DNA 분리는 Glass beads 방법을 사용하였다²⁰. 균체를 채취하여 400 µl의 lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.0% SDS, 2.0% Triton X-100, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl)를 첨가한 후 10초간 vortexing하였다. 다시 400 µl phenol/chloroform/isoamyl alcohol (phenol: chloroform: isoamyl alcohol= 25:24:1, v/v)을 섞은 후 0.5 mm 직경의 glass beads 400 mg을 혼합한 후 실온에서 10분간 vortexing하였다. 10분 간 15,000 rpm으로 원심분리 후 상등액을

Table 2. Morphologic and biochemical characterization of standard *Malassezia* species

Species	Cell Morphology	Tween 60	Tween 80	Catalase
<i>M. dermatis</i>	Ellipsoidal, globose	+	+	+
<i>M. furfur</i>	Globose, Ellipsoidal	+	+	+
<i>M. globosa</i>	Globose	-	-	+
<i>M. japonica</i>	Globose, Ellipsoidal	+	-	+
<i>M. nana</i>	Ellipsoidal	+	-	+
<i>M. obtusa</i>	Ellipsoidal, cylindrical	-	-	+
<i>M. pachydermatis</i>	Ellipsoidal	+	+	+
<i>M. restricta</i>	Globose, Ellipsoidal	-	-	-
<i>M. slooffiae</i>	Ellipsoidal, cylindrical	+	-	+
<i>M. sympodialis</i>	Ellipsoidal	+	+	+
<i>M. yamatoensis</i>	Ellipsoidal	+	+	+

M., *Malassezia*

Table 3. Clinical isolates used in this study

Strain No	Source	Identification Method			% Homology (to DBJ/EMBL/GenBank Accession number)
		Phenotypic Method	PCR-RFLP	26S rDNA Sequencing	
1	NS	<i>M. furfur</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	100% (AY743627)
2	NS	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	99% (AY743604)
3	NS	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	100% (AY743607)
4	NS	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. slooffiae</i>	<i>M. slooffiae</i>	100% (AY743606)
5	NS	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	<i>M. sympodialis</i>	99% (AY743627)
6	SD	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	<i>M. restricta</i>	99% (AY743607)
7	PV	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	<i>M. globosa</i>	99% (AY743604)
8	EW	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	100% (AY743602)

NS, Normal subject; PV, Pityriasis versicolor; SD, Seborrheic dermatitis; EW, Ear wax; *M.*, *Malassezia*

eppendorf tube에 옮긴 후 동량의 chloroform/isoamyl alcohol (chloroform: isoamyl alcohol=24:1, v/v)을 넣고 실온에서 10분간 vortexing 후 10분 간 15,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상등액과 동량의 isopropanol을 첨가한 후 -20℃에서 20분간 DNA를 침전시킨 후 15분 간 15,000 rpm으로 원심분리 하였다. 상등액을 제거한 후 70% ethanol로 세척하고 37℃에서 20분 건조시킨 후 증류수로 용해시켜서 -20℃에서 보관 하였다.

2) 26S rDNA의 PCR

26S rDNA을 증폭하기 위해 primer는 11종의 표준균주를 한 번에 증폭이 가능한 염기서열을 선택 하였고, 그 염기서열은 forward 5'-TAACAAGGA-TTCCCCTAGTA, reverse 5'-ATTACGCCAGCATCC-TAAG이었다¹⁸. 0.25 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 10X PCR buffer, 5X Q buffer, 0.5 M primer, 1.25 U Hot StarTaq polymerase, Genomic DNA 용액 1 µl을 포함하여 PCR amplification 반응 혼합물이 40 µl가 되도록 하였다. PCR은 Mastercycler 5333 (Eppendorf, Hamburg, Germany)을 사용하였다. 반응 조건은 pre-denaturation 단계 95℃에서 14분, denaturation 단계 94℃에서 45초, annealing 단계 55℃에서 45초, 72℃에서 1분간 extension을 35회 반복하였고 마지막 extension은 72℃에서 7분간 시행하였다. 증폭된 DNA는 TAE buffer상에서 1.5% (w/v) agarose gel을 100 volt로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하

여 UV 투과조명기 (UV transilluminator)로 관찰하였다.

3) PCR 산물의 정제와 RFLP 분석

증폭된 26S rDNA의 확인 후 PCR 산물을 Accu-Prep PCR purification kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 정제하였다. *Malassezia* 호모균의 26S rDNA의 RFLP 분석을 위해 두 가지 제한효소 *Hha1* (Takara Biomedicals, Otsu, Japan)과 *BstF51* (SibEnzyme, Novosibirsk, Russia)을 이용하였다. 제한효소반응은 10X PCR buffer, 10 U *Hha1*, PCR 산물 7.5 µl을 포함한 반응 혼합물이 20 µl가 되도록 하였고 37℃에서 3시간 반응 후 TAE buffer 상에서 3.5% (w/v) NuSieve GTG agarose gel (FMC, Rockland, ME, USA)을 100 volt로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 투과조명기로 DNA 분절의 크기와 수를 확인하여 RFLP pattern을 분석하였다.

4) Cloning and sequencing of 26S rDNA

Malassezia 임상분리균주 8종의 26S rDNA를 PCR 하여 얻어진 산물을 pGEM-T easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝 하였다. *E. coli* DH5에 형질전환하기 위해, 37℃에서 흡광도가 600 nm에서 0.5Au가 될 때까지 50 ml의 LB broth에서 *E. coli* DH5를 배양하였다. *E. coli* DH5를 3,500 rpm에서 5분간 원심분리 후 pellet을 0.1 M CaCl₂ 3 ml로 용해시켜 competent cell을 준비하였다. Competent cell 200 µl에 pGEM-T easy vector와 26S rDNA의 liga-

tion mixture를 첨가한 후 얼음물에서 30분간 두었다가 42°C에서 50초간 heat shock을 준 후 곧바로 얼음물에서 1분간 두었다. 여기에 800 µl의 LB broth를 첨가한 후 37°C에서 1시간 두었다가 미리 준비한 ampicillin (50 µg/ml)을 포함한 LB agar에 분주한 후 37°C에서 16~18시간 배양하였다. 염기서열의 분석을 위해 여기에서 얻어진 형질전환체를 plasmid extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)을 이용하여 정제한 후 염기서열을 분석하였다 (Macrogen, Seoul, Korea). 26S rDNA sequencing 결과를 토대로 GenBank에 확보된 데이터베이스 내의 서열과 일치여부를 확인하기 위해 GenBank의 BLAST program을 이용하여 기존에 밝혀져 있는 염기서열들과 비교하였고 상동성이 가장 높은 염기서열을 찾아 동정하였다.

결 과

1. *Malassezia* 표준균주 (Standard strains of *Malassezia* yeast)

1) 진균학적 검사결과

Malassezia 효모균 11개 표준균주를 대상으로 형태학적 및 생화학적 분석의 결과 *M. furfur* (KCTC 7743), *M. obtusa* (KCTC 7847), *M. pachydermatis* (KCTC 17008), *M. restricta* (KCTC 7848), *M. slooffiae* (KCTC 17431), *M. sympodialis* (KCTC 7985), *M. globosa* (CBS 7966)는 Guého 등⁵의 분류지표에 합당한 소견이 관찰되었다 (Table 2).

M. yamatoensis (CBS 9725)와 *M. dermatis* (JCM 11348)는 catalase에 양성반응을 보였고, 0.5% Tween

60와 0.1% Tween 80만을 첨가한 2% glucose/1% peptone 배지에서 모두 성장하였다. *M. yamatoensis* (CBS 9725)는 약간 광택이 있으며, 백색 또는 노란색을 띠면서 버터 같은 집락을 형성하였고 현미경적으로 좁은 기저면을 형성하는 타원형 효모세포가 관찰되었다. *M. dermatis* (JCM 11348)는 약간 광택이 있고, 부드러운 버터양상의 원형 집락을 형성하였으며, 현미경적으로 원형 또는 타원형 효모세포와 효모세포의 아포형성 (budding)이 관찰되어 *M. furfur*, *M. sympodialis*와 유사한 현미경적 소견이 관찰할 수 있었다.

M. nana (JCM 12085)와 *M. japonica* (CBS 9432)는 catalase에 양성반응을 보였고, 0.5% Tween 60을 첨가한 2% glucose/1% peptone 배지에서 성장하였으나 0.1% Tween 80만을 첨가한 2% glucose/1% peptone 배지에서는 성장하지 않았다. *M. nana* (JCM 12085)는 광택이 있고 부드러운 표면을 가진 노란색 용기된 집락을 형성하였고 현미경적으로 작은 원형에서 타원형의 작은 효모세포가 관찰되었다. *M. japonica* (CBS 9432)는 약간 광택이 있으며, 주름이 있는 창백한 노란색을 띠는 버터 같은 집락을 형성하고 있었으며, 현미경적으로 원형 또는 타원형의 효모세포가 관찰되었으며 sympodial budding이 관찰되었다 (Table 2).

2) 분자생물학적 결과

배양한 *Malassezia* 표준균주 균체를 Glass beads 방법을 사용함으로써 Genomic DNA의 분리를 성공적으로 수행하였다. 26S rDNA 부위를 증폭하기 위해 PCR을 실행한 결과 11가지 표준균주에서 모두

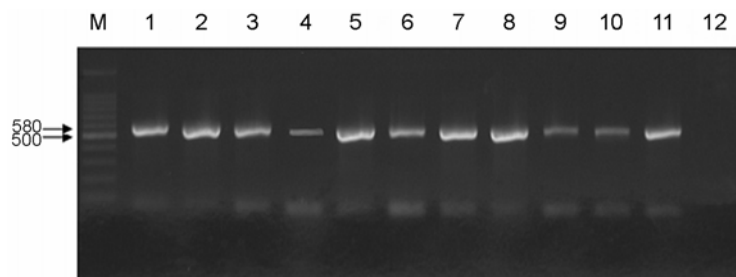


Fig. 1. 26S rDNA PCR products of 11 *Malassezia* standard strains (Lane M; 100 bp DNA ladder, Lane 1; *M. furfur*, Lane 2; *M. sympodialis*, Lane 3; *M. globosa*, Lane 4; *M. restricta*, Lane 5; *M. slooffiae*, Lane 6; *M. pachydermatis*, Lane 7; *M. japonica*, Lane 8; *M. nana*, Lane 9; *M. dermatis*, Lane 10; *M. obtusa*, Lane 11; *M. yamatoensis*, Lane 12; negative control).

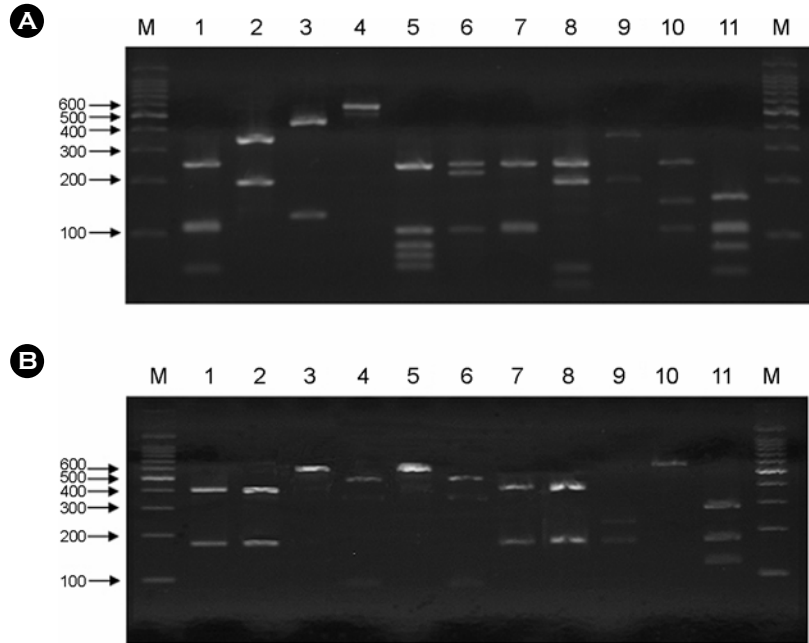


Fig. 2. PCR-RFLP patterns of 26S rDNA PCR digested with *HhaI* (A), *BstF51* (B) of *Malassezia* standard strains (Lane M; 100 bp DNA ladder, Lane 1; *M. furfur*, Lane 2; *M. sympodialis*, Lane 3; *M. globosa*, Lane 4; *M. restricta*, Lane 5; *M. slooffiae*, Lane 6; *M. pachydermatis*, Lane 7; *M. japonica*, Lane 8; *M. nana*, Lane 9; *M. dermatis*, Lane 10; *M. obtusa*, Lane 11; *M. yamatoensis*).

580 bp 크기의 PCR band를 확인하였다 (Fig. 1).

PCR 산물을 제한효소 *HhaI*로 절단하여 각 분절의 수와 크기를 확인한 결과 이용하여 *M. furfur*, *M. pachydermatis*, *M. globosa*, *M. obtuse*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. nana*, *M. japonica*, 그리고 *M. yamatoensis*는 균종간 구별이 가능한 restriction pattern이 관찰되었다 (Fig. 2A). 그러나 제한효소 *HhaI*로 절단했을 때 *M. sympodialis*와 *M. dermatis*는 동일한 pattern을 보였다. 두 균주를 구분하기 위해 추가적으로 제한효소 *BstF51*로 절단한 결과 *M. sympodialis*와 *M. dermatis*는 다른 restriction pattern을 보여 두 종이 다른 균종임을 확인하였다 (Fig. 2B). 따라서 제한효소 *HhaI*과 *BstF51*을 이용하여 26S rDNA의 PCR-RFLP pattern을 분석함으로써 모든 *Malassezia* 표준 균주를 구분할 수 있었고, 각 균주가 가지는 고유한 restriction pattern에 대한 database를 확보할 수 있었다.

2. 임상분리균주 (Clinical isolate)

26S rDNA PCR-RFLP 방법을 이용하여 임상분리

균주의 분류 및 동정방법의 적용가능성을 확인하고 형태학적 동정과 분자생물학적 동정방법의 결과를 비교 분석하기 위해 정상 성인의 두피, 안면부, 전흉부에 분리한 5개 임상분리균주, 지루피부염 병변, 전흉 병변, 그리고 정상 외이도에서 분리한 3개 임상분리균주, 총 8개 *Malassezia* 임상분리균주를 대상으로 진균학적 검사와 분자생물학적 검사를 시행하였다.

1) 진균학적 검사결과

임상분리균주를 Guého 등⁵의 분류지표에 따라 동정한 결과 정상 성인 피부의 두피에서는 *M. restricta*, 안면부에서는 *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, 전흉부에서는 *M. globosa*, *M. furfur*가 동정, 분리되었고, 지루피부염 병변에서 *M. restricta*, 전흉 병변에서는 *M. globosa*, 정상인의 외이도에서는 *M. furfur*가 동정, 분리되었다 (Table 3).

2) 분자생물학적 결과

배양한 *Malassezia* 임상분리균주를 대상으로 26S rDNA 부위를 증폭하기 위해 PCR을 실행한 결과 580 bp 크기의 PCR band이 확인되었다 (Fig. 3A).

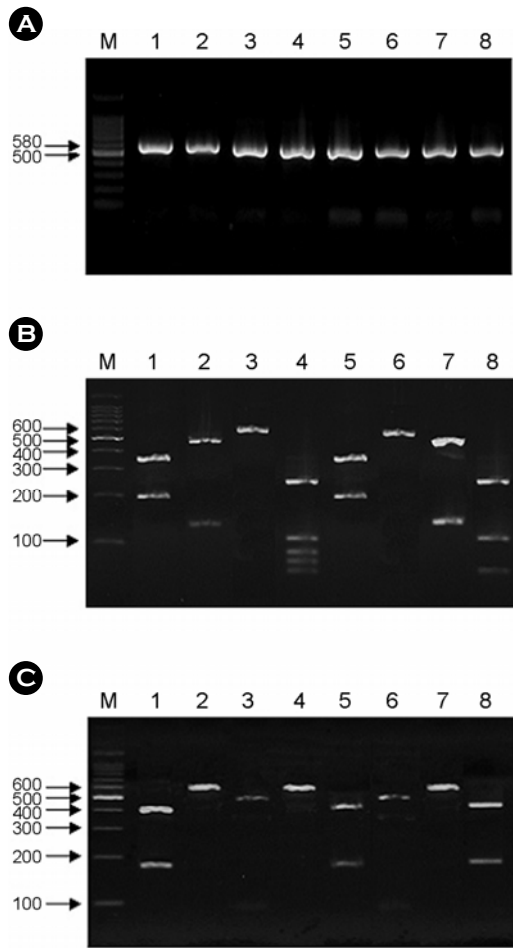


Fig. 3. PCR-RFLP patterns of 26S rDNA PCR digested with *Hha1* (B), *BstF51* (C) of *Malassezia* clinical isolates. 26S rDNA PCR product before (A) (Lane M; 100 bp DNA ladder, Lane 1; *M. sympodialis* isolated form normal subject, Lane 2; *M. globosa* isolated form normal subject, Lane 3; *M. restricta* isolated form normal subject, Lane 4; *M. slooffiae* isolated form normal subject, Lane 5; *M. sympodialis* isolated form normal subject, Lane 6; *M. restricta* isolated form seborrheic dermatitis patient, Lane 7; *M. globosa* isolated form pityriasis versicolor patient, Lane 8; *M. furfur* isolated form ear wax) and after digestion with *Hha1* (B) (match the lane with figure A) and after digestion with *BstF51* (C).

PCR 산물을 제한효소 *Hha1*, *BstF51*로 절단하여 각 분절의 수와 크기를 확인한 결과 정상 성인 피부에서 분리한 임상균주 *M. globosa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*와 지루피부염 병변에서 분리된 *M. restricta*, 전풍 병변에서 분리된 *M. globosa*, 정상인의 외이도에서 분리된 *M. furfur*는 균종간 구별이

가능한 restriction pattern을 확인하였고 표준균주의 26S rDNA PCR-RFLP에서 산출한 pattern과 일치하는 소견을 보였다 (Fig. 3B, C).

Guého 등의 분류지표를 근거로 시행한 형태학적 분석과 26S rDNA PCR-RFLP 분석의 동정결과를 비교한 결과 7개 임상분리균주에서 일치하였다 (Table 3). 그러나 정상 성인 피부에서 분리된 균주 중 형태학적 동정에서 *M. furfur*로 동정되었던 균종은 26S rDNA PCR-RFLP 분석에서 *M. sympodialis*로 동정되었고, 정확한 동정을 위해 26S rDNA sequencing을 시행한 결과 *M. sympodialis*로 동정되었다. 나머지 7개 임상분리균주에 대해서 추가 분석한 결과 26S rDNA sequencing 결과와 26S rDNA PCR-RFLP 분석에 의한 동정결과가 모두 일치하였다 (Table 3, Fig. 4).

고 찰

Malassezia 효모균은 피부의 정상 균총에 속하는 진균이며 건강한 성인의 75~98%에서 발견된다¹. 1996년 Guého 등⁵은 형태학적, 생물학적으로 *Malassezia* 효모균을 새로 분리하여 총 7개 균종 (*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*)으로 재분류한 이후 *Malassezia* 효모균의 진균학적 연구는 배양 후 *Malassezia* colony의 크기, 표면상태, 색깔, 모양 등 형태학적 특징에 의한 분석 (morphological analysis)과 효소반응의 유무를 관찰하는 생화학적 분석 (biochemical analysis)을 통해 이루어져 왔다⁶. 그러나 최근 유전형을 분석하기 위한 분자생물학적 기법들이 진균간의 분류 및 감별에 이용되고 있고, 이를 토대로 최근 일본에서는 새로운 4가지 균종 *M. dermatitis*²¹, *M. japonica*²², *M. nana*²³, *M. yametoensis*²⁴를 보고하였다.

형태학적인 분류는 진균을 분류하고 동정하는 목적으로 적합 하지만 많은 시간이 소모되며, 형태관찰에 숙달된 소수의 연구자에 의하여 주도되어 왔고 그 분류체계는 학자마다 견해를 달리하여 객관적인 기준을 설정하기 어렵다. 또한 새로운 균주에 대한 동정 및 분류에 명확한 근거를 제시하는데 한계를 가지고 있고, 계통학적인 요소가 결여되어 이들 간의 유연관계를 밝히기에는 적합하지 않다. 진

Fig. 4. Sequences of 26S rDNA amplification products of clinical isolates of *Malassezia* species.

***M. sympodialis* 26S rDNA amplification product of 578bp isolated form normal subjects**

TAA CAA GGA T TCCCT AGT AA CGGCGA GCGA AGCGGGAA GAGCTCAA TTT GAA A GCT GG 60
CACCTCCGGT GT CCGCGT T GT AAT CTCGAGA DST GT TTT CCGT GCGGCT CT A TGGACA AG 120
TCCCTT GGA A CAGGGCAT CGT A GAGGT GA A AA TCCCGT ACT T GCCAT GGA T GT A CCGTG 180
CTT TGT GAT A CACGCT CT A AGAGT CGA GTT GTT T GGGAT T GCA GCT CA A AA T GGGTGGTA 240
GACT CCA TCT AAA GCT AAA TA TCGGGGA GAGCCGA T AGCGA A CA A GT ACCGTGA GGGAA 300
AGA TGA AAGCACTT T GGA AA GAGA GT T AA A AGT ACGTGA AA T TGT OSA AA GGGAA AGCAC 360
T TGA AGT CA GCA TGCTGCTT GAGA CT CAGCCCT GACT GACT GGT AT T TCCAGCAG 420
CAA GTCA GCA TGGAT T TGGAT CGCCGGA GA A GGGTGGGA GGA A TGT GGCACCCT CCGGTG 480
T GT T AAGCCT CCT ACT GGA TA CGGCGA T T T GGA T CCA GGA ACGCAGTGT GCTCT GCGCG 540
GTCCTCGGACACCTT CACA CT TAGGAT GCT GCGTAAT 578

***M. restricta* 26S rDNA amplification product of 581bp isolated form normal subjects**

TAA CAA GGA T TCCCT AGT AA CGGCGA GCGA AGCGGGAA GAGCTCAA TTT GAA A GCT GG 60
CGT CTT CCGCGT CCGCGT T GT A AT CTCGAGA DST GT TTT CCGT GCGGCT CT A TGGACA AG 120
TCCCTT GGA A CAGGGCAT CGT A GAGGT GA A AA TCCCGT ACT T GCCAT GGA A GT A CCGTG 180
CTT TGT GAT A CACGCT CCA AGA GT CGA GTA GTT T GGGAT T GCT GCT CA A AGT GGGTGGTA 240
GACT CCA TCT AAA GCT AAA TA TCGGGGA GAGCCGA T AGCGA A CA A GT ACCGTGA GGGAA 300
AGA TGA AAGCACTT T GGA AA GAGA GT T AA A AGT ACGTGA AA T TGT OSA AA GGGAA AGCAC 360
T TGA AGT CA GCA TGCTGCTT GAGA CT CAGCCCT GACT TTT T GCT TGGTGT AT T TCT CGGTA 420
GCA A GT CAGCAT T GGT TT GTGT DST CCGGGA AGCGT A TGGGSA AT GTGGCA T CCT OSGAT 480
GTGT TA T AAGCCT GT GCA GGA T ACGACGACGTA GACCAA GGA A OSGAGT GT GDCCTCT GG 540
GCGGCT CTT CCGA CACCT T CACACT TAGGAT GCT GCGTA A 581

***M. sympodialis* 26S rDNA amplification product of 578bp isolated form normal subjects**

TAA CAA GGA T TCCCT AGT AA CGGCGA GCGA AGCGGGAA GAGCTCAA TTT GAA A GCT GG 60
CACCTCCGGT GT CCGCGT T GT AAT CTCGAGA DST GT TTT CCGT GCGGCT CT A TGGACA AG 120
TCCCTT GGA A CAGGGCAT CGT A GAGGT GA A AA TCCCGT ACT T GCCAT GGA T GT A CCGTG 180
CTT TGT GAT A CACGCT CT A AGAGT CGA GTT GTT T GGGAT T GCA GCT CA A AA T GGGTGGTA 240
GACT CCA TCT AAA GCT AAA TA TCGGGGA GAGCCGA T AGCGA A CA A GT ACCGTGA GGGAA 300
AGA TGA AAGCACTT T GGA AA GAGA GT T AA A AGT ACGTGA AA T TGT OSA AA GGGAA AGCAC 360
T TGA AGT CA GCA TGCTGCTT GAGA CT CAGCCCT GACT GACT GGT AT T TCCAGCAG 420
CAA GTCA GCA TGGAT T TGGAT CGCCGGA GA A GGGTGGGA GGA A TGT GGCACCCT CCGGTG 480
T GT T AAGCCT CCT ACT GGA TA CGGCGA T T T GGA T CCA GGA ACGCAGTGT GCTCT GCGCG 540
GTCCTCGGACACCTT CACA CT TAGGAT GCT GCGTAAT 578

***M. globosa* 26S rDNA amplification product of 584bp isolated form pityriasis versicolor**

TAA CAA GGA T TCCCT AGT AA CGGCGA GCGA AGCGGGAA GAGCTCAA TTT GAA A GCT GG 60
CACCTCCGGT GT CCGCGT T GT AAT CTCGAGA DST GT TTT CCGT GCGGCT CT A TGGACA AG 120
TCCCTT GGA A CAGGGCAT CGT A GAGGT GA A AA TCCCGT ACT T GCCAT GGA A GAA CCGTG 180
CTT T GCGAT A CAGCCT CT A AGAGT CGA GTT GTT T GGGAT T GCA GCT CA A AA T GGGTGGTA 240
GACT CCA TCT AAA GCT AAA TA TCGGGGA GAGCCGA T AGCGA A CA A GT ACCGTGA GGGAA 300
AGA TGA AAGCACTT T GGA AA GAGA GT T AA A AGT ACGTGA AA T TGT OSA AA GGGAA AGCAC 360
T TGA AGT CA GCA TGCTGCTT GAGA CT CAGCCCT GACT T TGGCT T GGT GT AT T TCT CCG 420
TGGCAAGCAGCA TT GGT T TGGT DST CCGGGA A GCGCAT A GGGAA TGT AGCCTCT CCGG 480
ACGT GT T AT AGCCTT A TGCAGGAT ACGA CGA OCT GSA TCA AGGAACGCA GT GTGCCCT CT 540
GCGCGGCTCT CCGA CACCTT CACA CT TAGGAT GCT GCGTAAT 584

***M. globosa* 26S rDNA amplification product of 584bp isolated form normal subjects**

TAA CAA GGA T TCCCT AGT AA CGGCGA GCGA AGCGGGAA GAGCTCAA TTT GAA A GCT GG 60
CACCTCCGGT GT CCGCGT T GT AAT CTCGAGA DST GT TTT CCGT GCGGCT CT A TGGACA AG 120
TCCCTT GGA A CAGGGCAT CGT A GAGGT GA A AA TCCCGT ACT T GCCAT GGA A GAA CCGTG 180
CTT T GCGAT A CACGCT CT A AGAGT CGA GTT GTT T GGGAT T GCA GCT CA A AA T GGGTGGTA 240
GACT CCA TCT AAA GCT AAA TA TCGGGGA GAGCCGA T AGCGA A CA A GT ACCGTGA GGGAA 300
AGA TGA AAGCACTT T GGA AA GAGA GT T AA A AGT ACGTGA AA T TGT OSA AA GGGAA AGCAC 360
T TGA AGT CA GCA TGCTGCTT GAGA CT CAGCCCT GACT T TGGCT T GGT GT AT T TCT CCG 420
TGGCAAGCAGCA TT GGT T TGGT DST CCGGGA A GCGCAT A GGGAA TGT AGCCTCT CCGG 480
ACGT GT T AT AGCCTT A TGCAGGAT ACGA CGA OCT GSA TCA AGGAACGCA GT GTGCCCT CT 540
GCGCGGCTCT CCGA CACCTT CACA CT TAGGAT GCT GCGTAAT 584

***M. slooffiae* 26S rDNA amplification product of 584bp isolated form normal subjects**

TAA CAA GGA T TCCCT AGT AA CGGCGA GCGA AGCGGGAA GAGCTCAA TTT GAA A GCT GG 60
CACCTCCGGT GT CCGCGT T GT AAT CTCGAGA DST GT TTT CCGT GCGGCT CT A TGGACA AG 120
TCCCTT GGA A CAGGGCAT CGT A GAGGT GA A AA TCCCGT ACT T GCCAT GGA A GGT A CCGTG 180
CTT T GCGAT A CACGCT CCA AGA GT CGA GTA GTT T GGGAT T GCT GCT CA A AA T GGGTGGTA 240
GACT CCA TCT AAA GCT AAA TA TCGGGGA GAGCCGA T AGCGA A CA A GT ACCGTGA GGGAA 300
AGA TGA AAGCACTT T GGA AA GAGA GT T AA A AGT ACGTGA AA T TGT OSA AA T GGA AGCAC 360
T TGA AGT CA GCA TGCGGCTGGGACT CACCTT GCGCTCT CCGCTGA GGGTA TTT CTTCCAG 420
T AGCAA GTCA GCA TT GGT T TGGCGCGCGGA GA A GGGTCCAGGGA A GGT GGCACCCT CCG 480
GTGT GT T AT AGCCTT GACTGGAT ACGGCGCGCGGA CCA AGGAACGCA GT GTGCCCT CG 540
TGGCGGCTCT CCGA CACCTT CACA CT TAGGAT GCT GCGTAAT 584

***M. restricta* 26S rDNA amplification product of 581bp isolated form seborrheic dermatitis**

TAA CAA GGA T TCCCT AGT AA CGGCGA GCGA AGCGGGAA GAGCTCAA TTT GAA A GCT GG 60
CGT CTT CCGCGT CCGCGT T GT A AT CTCGAGA DST GT TTT CCGT GCGGCT CT A TGGACA AG 120
TCCCTT GGA A CAGGGCAT CGT A GAGGT GA A AA TCCCGT ACT T GCCAT GGA A GT A CCGTG 180
CTT TGT GAT A CACGCT CCA AGA GT CGA GTA GTT T GGGAT T GCT GCT CA A AGT GGGTGGTA 240
GACT CCA TCT AAA GCT AAA TA TCGGGGA GAGCCGA T AGCGA A CA A GT ACCGTGA GGGAA 300
AGA TGA AAGCACTT T GGA AA GAGA GT T AA A AGT ACGTGA AA T TGT OSA AA GGGAA AGCAC 360
T TGA AGT CA GCA TGCTGCTT GAGA CT CAGCCCT GACT TTT T GCT TGGTGT AT T TCT CGGTA 420
GCA A GCGACCAT T GGT TT GTGT DST CCGGGA AGCGT A TGGGSA AT GTGGCA T CCT OSGAT 480
GTGT TA T AAGCCT GT GCA GGA T ACGACGACGTA GACCAA GGA A OSGAGT GT GDCCTCT GG 540
GCGGCT CTT CCGA CACCT T CACACT TAGGAT GCT GCGTA A 581

***M. furfur* 26S rDNA amplification product of 582bp isolated form ear wax**

TAA CAA GGA T TCCCT AGT AA CGGCGA GCGA AGCGGGAA GAGCTCAA TTT GAA A GCT GG 60
TACCTT CCGT AT CCGCGT T GT A AT CTCGAGA CA CGT TTT CCGT GCGGCT CT A TGGACA AG 120
TCCCTT GGA A CAGGGCAT CGT A GAGGT GA A AA TCCCGT ACT T GCCAT GGA T GT A CCGTG 180
CTT T GCGAT A CCGTCT CT A AGA GT CGA GTT GTT T GGGAT T GCA GCT CA A AA T GGGTGGTA 240
GACT CCA TCT AAA GCT AAA TA TCGGGGA GAGCCGA T AGCGA A CA A GT ACCGTGA GGGAA 300
AGA TGA AAGCACTT T GGA AA GAGA GT T AA A AGT ACGTGA AA T TGT OSA AA GGGAA AGCAC 360
T TGA AGT CA GCA TGCGGCTCA GGA CT CAGCCCT GACT T T GCT TGGTGT AT T TCCGCGG 420
AGCAAGT CA GCA T TGGT T TGA TCGTGGGA GGA GCA T AGT OSGAA TGT GCGGCTCT CCGG 480
CGT GT T AT AGCCTT CT AT T GSA TACGACGA T CT A GACCA A GGA ACGCA GCGGCTCT AT G 540
GCGGCT CTT CCGA CACCTT CCGCCT TAGGAT GCT GCGTAAT 582

균의 분류 및 동정은 형태, 생리, 생화학적 특징을 이용하는 고전적인 방법보다 분석기술과 분자생물학의 발달로 유전자의 구조 및 특징을 이용하는 분자계통학적 방법이 전 세계적으로 보편화 되어 있으나 국내의 현실은 아직도 대부분 고전적인 방법에 의존하고 있는 실정이다. 2006년 이 등²⁵은 우리나라 정상인에 있어서 *Malassezia* 효모균의 분포에 대한 개괄적인 기초 자료를 제시하였으나 이 또한 고전적인 방법에 의존했기 때문에 정확한 *Malassezia* 동정에 많은 한계를 가지고 있다. 이러한 한계점을 극복하고자 최근에는 *Malassezia* 효모균의 동정 및 분류함에 있어 PCR, PFGE, AFLP, DGGE, RAPD, SSCP, tFLP, RFLP 등 다양한 분자생물학적 기법을 이용한 새로운 접근들이 시도되고 있고, 이를 분석하는 장비와 소프트웨어가 개발되고 있다⁷⁻¹⁹.

Senczek 등⁸은 PFGE 방법으로 *Malassezia* 종의 7가지 유전자형을 산출해 냈고 이 종들 간에 구별을 가능하게 하였다. PFGE 방법은 균종의 아형분류에 적합하고 재현성과 변별력이 뛰어난 분자생물학적 방법이나, 전문 장비가 필요하고, 시간과 비용이 많이 소요되며 고도의 숙련된 기술을 요구하기 때문에 임상적으로 적용하기에는 제한점이 많다.

Theelen 등¹⁰은 종간의 다양성과 계통학적 유연관계를 분석하기 위해 AFLP, RAPD, DGGE를 적용하여 *Malassezia* 동정을 시도하였다. AFLP는 재현성이 높아서 실험결과에 대한 신뢰성이 높으며, 실험대상에 대한 염기서열 정보가 없어도 가능하며, 동일한 primer에 대해 응용성이 높고, 실험의 방향에 따라 장비와 비용의 이점을 가지고 올 수 있다²⁶. 그러나 다른 유전자 분석법들과 비교할 때 많은 *Malassezia* 계통간에 아형분류를 분석하는데 유용한 방법이나 결과들이 너무 복잡하고 해석이 난해하므로 이를 해석할 수 있는 소프트웨어가 필요하다. RAPD는 한 개의 임의의 primer를 이용하여 증폭된 DNA의 단편들의 다형성을 관찰하는 방법으로, 분자 역학적인 형별구분 방법으로서 이용될 수 있는 방법이다²⁷. RAPD 방법은 PFGE에 비해 검사 시간이 짧고 특별한 장비가 필요하지 않으며 사용하는 primer에 따라 300 bp에서 3 kb까지의 분자량을 가진 DNA band가 나타나 균주간의 변별력이 높다. 그러나 다소 분석방법이 복잡하고 난해하기 때문에 임

상적으로 분리된 효모균을 쉽게 동정하기 어렵다. DGGE는 염기서열이 다르고 크기가 같은 DNA의 단편을 농도구배가 있는 gel 상에서 전기영동시킴으로써 DNA의 염기서열 차이에 따라 2차 구조의 변화 또는 이중나선의 구조적 변화가 발생되고 전기영동시 이동 속도가 달라져 일정한 전기영동 pattern을 보이게 하는 원리를 이용한 방법이다¹⁰. 그러나 PFGE처럼 전문장비와 많은 시간이 소모되며 고도의 기술이 필요하므로 임상적 적용에 한계를 가진다. 실험결과에 대한 가장 신뢰성 있는 결과를 산출하는 DNA sequencing은 어떠한 방법보다 확실한 방법이나 비용과 시간적인 면에서 효율성이 떨어져 임상적 적용에 어려움이 있다.

SSCP는 DNA의 염기서열 차이에 따라 2차구조의 변화 또는 이중나선의 구조적 변화를 발생시킨 후 전기영동시 이동 속도가 달라지게 하여 일정한 전기영동 pattern을 보이게 한다¹². SSCP 방법은 DNA의 polymorphism을 검출할 수 있으며 진균 동정에 적합한 방법이나 시간이 오래 걸리고 숙련된 실험 기술이 필요하고 single-stranded DNA가 온도와 pH에 영향을 쉽게 받기 때문에 실험 동안 온도와 pH 유지가 어려워진다면 결과에 영향을 미칠 수 있다.

tFLP는 매우 적은 양의 검체로부터 *Malassezia* species를 확인하는데 매우 빠르고 신뢰성이 높은 방법이다¹³. Fungal DNA로부터 1차적으로 ribosomal gene을 목표로 PCR하고, fluorescently labeled primer 이용하여 2차적으로 ITS1, ITS2 region을 nested PCR한 후 fluorescent-DNA sequencer를 이용하여 fragment length를 분석함으로써 *Malassezia* 균주를 동정하는 방법이다. 각 균주마다 size가 다른 고유의 ITS1, ITS2 sequence를 가지고 있기 때문에 이를 fluorescent-DNA analysis를 통해 각 균주를 동정할 수 있다. 이 방법은 restriction digestion 단계가 생략되므로 단시간에 동정할 수 있는 장점을 지니나 고가의 fluorescent labeling PCR primer와 이를 분석하기 위해 fluorescent-DNA sequencer가 필요하다는 단점이 있다.

본 연구에서 *Malassezia*의 동정기법으로 적용한 RFLP 방법은 증폭된 DNA를 제한효소로 분절시킨 후 잘려진 절편의 크기와 수에 따른 pattern을 분석하는 방법으로 유전적 다양성을 확인할 수 있으며

신속, 정확하고, 비용적으로 경제적이며 특별한 장비가 필요하지 않아 진균의 빠른 진단과 함께 역학적 조사에 이용될 수 있다¹⁵⁻¹⁷.

Gaitanis 등¹⁸은 지루피부염 병변, 진풍 병변, 동물검체로부터 직접 인설을 채취하여 DNA를 추출하고 ITS1 ITS2에 nested PCR을 시행한 후 3가지 제한효소 *AluI*, *HinfI*, *MspI*을 사용하여 PCR-RFLP 분석을 시행하였다. 그러나 이들 연구는 *M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. restricta* 7가지 제한된 균주에 대해서 시행하였고 새로 동정, 분리된 *M. dermatitis*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. yametoensis*에 대한 분석은 이루어지지 않았다. 또한 3가지 제한효소를 가지고 분석하였으므로 본 연구에서 시행한 방법보다 다소 복잡하고 오랜 시간이 소요된다. Mirhendi 등¹⁹은 11개 *Malassezia* 표준균주와 13개 임상분리균주를 대상으로 26S rDNA에 대한 PCR-RFLP 분석을 시행하였고 균종 간에 구별이 가능한 restriction pattern을 확인하고 이를 토대로 동정하였다. 그러나 형태학적인 분석은 시행하지 않고 26S rDNA PCR-RFLP 분석과 ITS1 sequencing 결과를 비교하여 분자생물학적 방법만을 분석하였다.

본 연구에서는 8개 임상분리균주를 대상으로 형태학적 동정과 분자생물학적 동정을 시행하였고, 2가지 방법으로부터 얻은 결과를 비교 분석하였다. 8개 임상분리균주 중 7개 균주가 Guého 등⁵의 분류지표에 근거한 형태학적 분석결과, 26S rDNA PCR-RFLP, 26S rDNA sequencing 분석결과 모두 일치하였다. 그러나 Guého 등⁵의 분류지표에 근거한 형태학적 분석결과 *M. furfur*로 동정되었던 균주는 26S rDNA PCR-RFLP 분석에서 *M. sympodialis*로 동정되었고, 정확한 동정을 위해 26S rDNA sequencing을 시행한 결과 *M. sympodialis*로 동정되었다. 추가적으로 모든 임상분리균주를 대상으로 26S rDNA sequencing을 시행한 결과 26S rDNA PCR-RFLP 분석결과와 100% 일치함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 26S rDNA PCR-RFLP 방법이 26S rDNA sequencing 방법만큼 정확한 분자생물학적 분석법임을 입증할 수 있었다. 또한 실험방법이 신속하고, 정확하다는 점을 고려해볼 때 26S rDNA PCR-RFLP 방법은 *Malassezia* 효모균에 의한 질병의 진단 검사방

법으로써 유용할 것으로 생각된다.

본 연구에서 *M. sympodialis*를 *M. furfur*로 동정 오류를 범한 이유는 첫째, 두 종간이 Guého 분류지표에서 유사한 생화학적 특징을 가지고 있기 때문에 구분하기 어려우며, 둘째, 형태학적 분석 당시 *M. sympodialis*에서 관찰 가능한 sympodial budding이 관찰되지 않았을 가능성이 있고, 셋째 실제 Tween 20을 지질성분으로 10% 첨가한 배지에서의 성장여부를 확인을 하지 않았기 때문에 정확한 균주로 분석하는데 한계가 있었을 것이다. 또한 형태학적 분석은 형태관찰에 숙달된 연구자에 의하여 이루어지므로 숙련되지 않은 연구자에 의한 동정 오류 가능성도 배제할 수 없다.

Sugita 등²¹에 의해 처음 동정된 *M. dermatitis*는 phylogeny tree상 *M. sympodialis*와 cluster를 이루나 Tween utilization과 catalase test와 같은 방법으로 분석할 때 *M. furfur*와 유사한 특징을 가지기 때문에 형태학적 방법 및 생화학적 방법으로 두 균주를 구분할 수 없다고 보고하였다. 이러한 점을 미루어 볼 때 형태학적 분석은 동일한 형태학적 소견에 대하여 학자마다 다른 견해 가질 수 있으며, 객관적인 기준 설정이 모호하고, 새로운 균주에 대한 동정 및 분류에 명확한 근거를 제시하는데 한계를 가지고 있음을 알 수 있다.

본 연구에서 목표로 정한 26S rDNA는 적절한 염기서열 정렬을 위해 유용하고 고도로 보존된 염기서열을 포함하고 있고, 종 특이적인 제한효소분석을 위한 표지로 이용할 수 있는 충분한 염기서열의 변이성을 포함하고 있다¹⁸. 그러므로 26S rDNA PCR-RFLP 방법은 새로운 형태분류법과도 잘 일치할 이루면서 현재 밝혀진 *Malassezia* 종의 동정에 적용될 수 있다. 또한 본 연구에서 적용한 26S rDNA PCR-RFLP 방법은 단지 PCR과 *HhaI*, *BstF51* 두 개의 제한효소만 필요로 하며, 기술적으로 대부분의 다른 분자생물학적인 접근법보다 간단하며 정확함을 확인할 수 있었다.

최근 연구에서 *Malassezia* 균종을 규명하기 위해 새로운 분자생물학적 기법을 적용하고 기존 방법의 단점을 보완하는 다양한 연구가 진행되고 있으나 아직 국내연구는 미비한 실정이다. 향후 *Malassezia* 동정에 있어 높은 정확성과 신뢰성, 그리고 빠르게

분석이 가능한 다양한 방법이 고안되고, 보다 발전된 분자생물학적 기법이 진균의 동정, 분류 및 진단 검사방법으로 적용되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 *Malassezia* 효모균의 동정 및 분류에 있어 분자생물학적 방법을 적용함으로써 기존의 형태학 및 생화학적 동정의 한계를 극복한 연구방향을 제시하기 위해 26S rDNA PCR-RFLP 방법 적용하였고, 본 방법의 임상적용 가능성 및 유용성을 평가하고자 하였다. 11개 표준균주와 8개 임상분리균주를 대상으로 집락의 형태, 크기 및 배지의 변화 등 형태학적 소견과 Guého 분류지표에 의거하여 형태학적 분석을 시행하였고, 26S rDNA PCR-RFLP, 26S rDNA sequencing을 통한 분자생물학적 분석을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 26S rDNA 부위를 증폭하기 위해 PCR을 실행한 결과 11개 *Malassezia* 표준균주에서 모두 580 bp 크기의 PCR band를 확인하였다.

2. 제한효소 *Hha*I과 *Bst*F51을 이용하여 증폭된 26S rDNA의 PCR-RFLP pattern을 분석한 결과 *Malassezia* 표준균주간 구별이 가능한 restriction pattern이 관찰되었다.

3. 11개 *Malassezia* 표준균주를 대상으로 분석한 결과, 1차적으로 제한효소 *Hha*I로 절단했을 때 *M. sympodialis*와 *M. dermatis*는 동일한 pattern을 보였다. 두 균주를 구분하기 위해 추가적으로 제한효소 *Bst*F51로 절단한 결과 *M. sympodialis*와 *M. dermatis*는 다른 restriction pattern을 보여 두 종이 다른 균종임을 확인하였다.

4. 8개 *Malassezia* 임상분리균주를 대상으로 분석한 결과 균종간 구별이 가능한 restriction pattern이 관찰되었고 표준균주의 26S rDNA PCR-RFLP에서 산출한 pattern과 일치하는 소견을 보였다.

5. *Malassezia* 임상분리균주 중 형태학적 분석에서 *M. furfur*로 동정되었던 균주는 26S rDNA PCR-RFLP 분석에서 *M. sympodialis*로 동정되었고, 정확한 동정을 위해 26S rDNA sequencing을 시행한 결과 *M. sympodialis*로 동정되었다.

6. 8개 임상분리균주의 26S rDNA PCR-RFLP와

26S rDNA sequencing에 의한 동정결과는 100% 일치하였다.

본 연구에서 시행한 26S rDNA PCR-RFLP 방법은 *Malassezia* 효모균을 동정 및 분류함에 신속하고 정확한 분석방법임을 확인하였고 *Malassezia* 효모균에 의한 질병의 진단 검사방법으로 유용할 것으로 생각된다. 앞으로 진균동정 및 진균질환의 역학적 조사에 활용될 수 있도록 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Alison SK, Ann GM, Michael PH. Yeast infection: Candidiasis, Pityriasis (Tinea) versicolor. In: Freedberg IM, Eisen AZ, Wolf K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, editors. Fitzpatrick's Dermatology in general medicine. 6th ed. New York: McGraw-Hill, 2003: 2006-2018
2. Ahn KJ. Taxonomy of the genus *Malassezia*. Kor J Med Mycol 1998; 3: 81-88
3. Baillon EH. Traite de botanique medicale cryptogamique, suivi du tableau de droguier de la Faculte de medecine de Paris. Doin, Paris, 1889. Cited from reference 1
4. Ljubojevic S, Skerlev M, Lipozencic J, Basta-Juzbasic A. The role of *Malassezia furfur* in dermatology. Clin Dermatol 2002; 20: 179-182
5. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. Antonie van Leeuwenhoek 1996; 69: 337-355
6. Guillot J, Guého E, Lesourd M, et al. Identification of *Malassezia* species. A practical approach. J Mycol Med 1996; 6: 103-110
7. Makimura K, Tamura Y, Kudo M, et al. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Med Microbiol 2000; 49: 29-35
8. Senczek D, Siesenop U, Bohm KH. Characterization of *Malassezia* species by means of phenotypic characteristics and detection of electrophoretic karyo-

- types by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Mycoses* 1999; 42: 409-414
9. Gupta AK, Boekhout T, Theelen B, Summerbell R, Batra R. Identification and typing of *Malassezia* species by amplified fragment length polymorphism and sequence analyses of the internal transcribed spacer and large-subunit regions of Ribosomal DNA. *J Clin Microbiol* 2004; 38: 1869-1875
 10. Theelen B, Silvestri M, Guého E, Van Belkum A, Boekhout T. Identification and typing of *Malassezia* yeasts using amplified fragment length polymorphism (AFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *FEMS Yeast Res* 2001; 1: 79-86
 11. Aizawa T, Kano R, Nakamura Y, Watanebe S, Hasegawa A. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. *Vet Microbiol* 1999; 70: 67-75
 12. Gaitanis G, Velegraki A, Alexopoulos EC, et al. Distribution of *Malassezia* species in pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis in Greece. Typing of the major pityriasis versicolor isolate *M. globosa*. *Br J Dermatol* 2006; 154: 854-859
 13. Gemmer CM, DeAngelis YM, Theelen B, Boekhout T, Dawson TL. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeast species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3350-3357
 14. Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, et al. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 162-173
 15. Guillot J, Deville M, Berthelemy M, Provost F, Guého E. A single PCR-restriction endonuclease analysis for rapid identification of *Malassezia* species. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31: 400-403
 16. Makimura K, Tamura Y, Kudo M, et al. Species identification and strain typing of *Malassezia* species stock strains and clinical isolates based on the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Med Microbiol* 2000; 49: 29-35
 17. Gaitanis G, Velegraki A, Frangoulis E, et al. Identification of *Malassezia* species from patient skin scales by PCR-RFLP. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 162-173
 18. Mirhedi H, Makimura K, Zomorodian K, et al. A simple PCR-RFLP method for identification and differentiation of 11 *Malassezia* species. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 281-284
 19. Sugita T, Kadama M, Saito H, et al. Sequence diversity of the intergenic spacer region of the rRNA gene of *Malassezia globosa* colonizing the skin of patients with atopic dermatitis and healthy individuals. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3022-3027
 20. Yamada Y, Makimura K, Merhedi H, et al. Comparison of different methods for extraction of mitochondrial DNA from human pathogenic yeasts. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 122-125
 21. Sugita T, Takashima M, Shinoda T, et al. New yeast species, *Malassezia dermatis*, isolated from patients with atopic dermatitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1363-1367
 22. Hirai A, Kano R, Makimura K, et al. *Malassezia nana* sp. nov., a novel lipid-dependent yeast species isolated from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* 2004; 54: 623-627
 23. Sugita T, Takashima M, Kodama M, Tsuboi R, Nishikawa. Description of a new yeast species, *Malassezia japonica*, and its detection in patients with atopic dermatitis and healthy subjects. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4695-4699
 24. Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrhoeic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 579-583
 25. Lee YW, Yim SM, Lim SH, Choe YB, Ahn KJ. Quantitative investigation on the distribution of *Malassezia* species on healthy human skin in Korea. *Mycoses* 2006; 49: 405-410
 26. Savelkoul PHM, Aarts HJM, de Haas J, et al.

이양원 등: *Malassezia* 효모균 동정에 26S rDNA PCR-RFLP 기법의 적용

Amplified-fragment length polymorphism analysis:
the state of an art. J Clin Microbiol 1999; 37: 3083
-3091

modification of CDC definitions of surgical wound
infections. Infect Control Hosp Epidemiol 1992; 14:
780-795

27. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Emori TG. A
