Chitin Synthase 1 유전자의 염기서열 분석을 통한 피부사상균의 계통발생 및 분류

동국대학교 의과대학 피부과학교실, 계명대학교 의과대학 피부과학교실*,
경북대학교 의과대학 면역학교실**

서무규 · 김병천* · 김정철**

=Abstract=

Phylogeny and Taxonomy of the Dermatophytes Using Sequence Analysis of the Chitin Synthase 1 Gene

Moo Kyu Suh, Byung Chun Kim* and Jung Chul Kim**

Department of Dermatology, College of Medicine, Dongguk University, Kyongju & Keimyung University, Taegu, Korea. Department of Immunology, Kyungpook National University** School of Medicine, Taegu, Korea*

Background: The species of dermatophytes have been identified and classified by morphological and biochemical characterization as well as by mating experiments. But these techniques are either time consuming or lacking specificity. Recently molecular analysis has been introduced to the field of medical mycology.

Objective: We investigated the phylogeny and taxonomy of the dermatophytes using sequence analysis of the chitin synthase 1 (CHS1) gene.

Methods: 15 species of dermatophytes (6 strains of *T. rubrum*, 4 strains of *T. mentagrophytes* subtypes, *M. canis, M. gypseum, E. floccosum, T. verrucosum*, and *T. tonsurans*) were cultured on Sabouraud dextrose broth and their DNA were extracted by bead-beating method. Cloning and sequencing of PCR product were done.

Results: The size of specific bands among dermatophytes was 615 bp in CHS1 gene. Phylogenetic analysis of sequences revealed that 6 strains of *T. rubrum* showed genetically identical pattern in intraspecies, but subtypes of *T. mentagrophytes* were different. The other dermatophytes showed different pattern in interspecies.

Conclusion: The phylogenetic analysis of CHS1 gene provided useful information for classification and understanding the evolution of dermatophytes species.

[Kor J Med Mycol 5(2): 51-59]

Key Words: Dermatophytes, CHS1 gene

서 론

피부사상균 (dermatophytes)은 인간이나 동물의 피부, 모발, 조갑 등의 각화된 조직에 침범하여 피부사상균증 (dermatophytosis)을 일으킨다[1~4]. *Trichophyton*균속 (genus), *Microsporum*균속 및 *Epidermophyton*균속의 피부사상균의 분류 및 동정은 환

†별책 요청 저자: 서무규, 780-350 경북 경주시 석장동 1090-1 동국의대부속 경주병원 피부과

Table 1. Dermatophytes isolated from 15 patients with dermatophytosis

Dermatophyte	No. of strains tested	Source (No.)
T. rubrum	6	Tinea cruris (2)
		Tinea unguium (2)
		Tinea pedis (1)
		Tinea manus (1)
T. mentagrophytes	4	
granular form		Tinea corporis (1)
powdery form		Tinea unguium (1)
persicolor form		Tinea pedis (1)
downy form		Tinea unguium (1)
M. canis	1	Tinea capitis (1)
M. gypseum	1	Tinea faciei (1)
E. floccosum	1	Tinea manus (1)
T. verrucosum	1	Tinea capitis (1)
T. tonsurans	1	Tinea faciei (1)

T: Trichophyton, M: Microsporum, E: Epidermophyton

자의 임상병변, 배양 균집락의 육안적 관찰, 대분생자 및 소분생자 등의 현미경적 관찰, 생화학적 특징, 모발 천공검사, 교배실험 등에 의해 이루어져 왔다[1,3]. 그러나 같은 균종내에서도 형태학적으로 다양한 균집락을 보이며 교배능력이 부족한 균이 있으며 정확한 균종 구분이 어려울 경우가 있어 최근 분자생물학적 분석이 피부사상균에도 적용되어 이용되고 있다[5~12]. 피부사상균의 계통분석 및 분류에 대한 분자생물학적 연구로는 1980년에 Davidson 등[13]이 염색체의 DNA의 G+C 함량을 이용하여 보고한 이후 DNA homology 연구[14], 미토콘드리아 DNA를 제한효소로 처리하는 restriction fragment length polymorphism (RFLP)법[15~17], 18S 또는 28S rRNA나 rRNA 유전자 (rDNA)의 염기서열 분석 (analysis of sequence)법[18,19] 등이 있으나 피부사상균은 계통발생 및 분류학적으로 밀접하게 연관되어 있으므로 상기방법으로 계통발생 관계나 균종에 특이한 염기서열을 알 수 없다. 최근에 chitin synthase를 코딩 (coding)하는 chitin synthase 1 (CHS1) 유전자의 특이한 염기서열이 특정 균종에 다양성을 나타내므로 피부사상균 계통분석 및 분류에 이용되고 있다[20~24]. 이에 저자들은 CHS1 유전자의 염기서열을 분석하여 피부사상균의 계통발생 및 분류에 대해서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

동국대학교 의과대학 부속 경주병원 및 대구가톨릭 피부과의원에 내원한 15명의 피부사상균증 환자 중 임상적으로 피부사상균증이 의심되는 피부병변에서 KOH 도말검사로 균사가 발견되고 진균배양에서 진균이 배양된 15명의 환자에서 분리된 7균종 15주 (*T. rubrum* 6주, *T. mentagrophytes* 4주, *M. canis* 1주, *M. gypseum* 1주, *E. floccosum* 1주, *T. verrucosum* 1주, *T. tonsurans* 1주)의 피부사상균을 대상으로 하였으며 균주의 동정은 진균의 육안적 형태 및 현미경적 소견으로 하였다. 환자들의 임상양상은 Table 1과 같다.

*T. rubrum*균주로는 배양된 균집락이 다양한 모양 및 색깔을 나타내는 6주를 이용하였고, *T. mentagrophytes*균주로는 서[25]와 김 등[26] 분류에 따라 과립형 (granular form), 분말형 (powdery form), 도실형 (persicolor form) 및 융모형 (downy form)으로 나누어서 실험에 이용하였다.

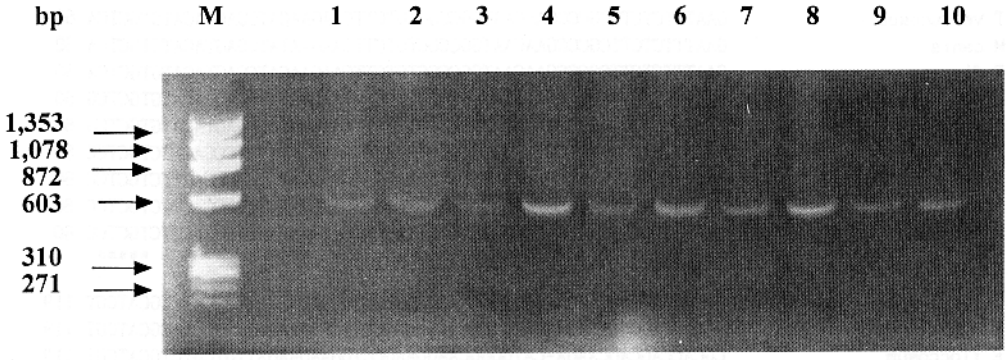

Fig. 1. Gel image of PCR products of CHS1 gene fragments. Lanes: M, *Φ*X174/*Hae*III size marker; 1, *T. mentagrophytes-1* (granular form); 2, *T. mentagrophytes-2* (powdery form); 3, *T. mentagrophytes-3* (persicolor form); 4, *T. mentagrophytes-4* (downy form); 5, *M. canis*; 6, *M. gypseum*; 7, *E. floccosum*; 8, *T. verrucosum*; 9, *T. tonsurans*; 10, *T. rubrum*.

2. 방 법

1) 균배양

피부사상균은 삼각 플라스크에 250 ml의 Sabouraud 액체배지에 접종하여 25℃에서 1~2주간 진탕 배양하였다.

2) DNA 분리

피부사상균에서 DNA 분리는 최 등[5]이 이용한 방법인 glass bead법에 따라 추출하였다. 균사를 채취하여 증류수로 2번 씻은 후 0.5 mm의 glass bead와 phenol: chlorform: isoamylalcohol (25 : 24 : 1)을 섞은 후 Mini-bead-beater (Biospec Products, Bartlesville, USA)로 5분간 흔들었다. 실온에서 7분간 원심분리 후 상층을 분리하여, 3 M sodium acetate 0.1배 용적과 무수알코올 3배 용적을 가하고 -20℃에서 12시간 방치하여 DNA를 침전시킨 후 진공건조 후 증류수로 용해시켜서 -20℃에서 보관하였다.

3) 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)

Kano 등[22]의 보고에 따라 primer 1은 5'-CTG AAG CTT ACT(ACG) ATG TAT(C) GAG(A) GAT (C)-3', primer 2는 5'-GTT CTC GAG(C) TTT(A) GTA(C) TTC(A) GAA(A) GTT(T) CTG-3'을 사용하였다. 10 X reaction buffer (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 5 μl, 0.66 mM $MgCl_2$, 6.66 mM dNTPs, 70 pM primer, 2.5 U Taq polymerase (Promega, Madison, USA), 진균 DNA용액 4 μl 등을 포함한 반응 화합물이 50 μl가 되도록 하여 PCR을 시행하였다. 반응조건은 1차로 denaturation은 94℃에서 1분, annealing은 50℃에서 2분, extension은 72℃에서 3분으로 5회 반복하고, 2차로 denaturation (94℃, 1분), annealing (53℃, 2분), extension (72℃, 3분)의 반응회수를 20회 실시한 후 마지막에 extension (72℃, 10분)을 시행하였다. 증폭된 DNA는 2% agarose gel에서 전기영동 시킨 후 ethidium bromide로 염색하여 자외선 발광기로 관찰하였다.

4) PCR 산물의 유전자 클로닝 (cloning) 및 염기서열 결정법 (sequencing)

PCR 산물은 Jetsorb Kit (Genomed, USA)를 사용하여 정제한 후 pGEM-T easy vector (Promega)에 클로닝 하였다. Plasmid DNAs는 Wizard Plus Miniprep plasmid DNA Isolotion Kit (Promega)로 추출한 후 Auto Read Sequency Kit (Pharmacia)로 사용하여 dideoxy chain termination method로 염기서열을 결정하였다.

5) 계통발생 분석 (phylogenetic analysis)

염기서열은 Clustal W 프로그램으로 배열하였으며 계통발생 계도 (phylogenetic tree)는 neighbor-joining (NJ) 방법으로 구축하였다.

결 과

1. PCR 산물의 band

CHS1 primers를 사용하여 피부사상균으로부터 분리된 PCR 산물은 ethidium bromide로 염색된 agarose gel에서 모두 1개의 동일한 band가 615 bp에서 보였다 (Fig. 1).

```
T. verrucosum              GAATTTCTCTTCGCCCGAACAATGGCCGGTGTCTTCAAGAACATCGAGTACATGTGCTCA 60
M. canis                   GAATTTCTCTTCGCCCGAACAATGGCCGGTGTCTTCAAGAATATCGAGTACATGTGCTCA 60
E. floccosum               GAATTTCTCTTCGCCCGAACAATGGCCGGTGTCTTCAAGAACATCGAGTACATGTGCTCA 60
T. mentagrophytes-2, 3     GAGTTCCTCTTCGCCCGAACTATGGCCGGTGTCTTTAAGAATATCGAGTACATGTGCTCG 60
T. rubrum                  GAGTTCCTCTTCGCCCGAACTATGGCCGGTGTCTTCAAGAACATCGAGTACATGTGCTCG 60
T. mentagrophytes-1        GAAATCGACTTCACCCGTTCGATGCATGGAATCATGAGGAACATCTCCCACTTCTGCTCC 60
T. mentagrophytes-4        GAAATCGACTTCACCCGTTCGATGCATGGAATCATGAGGAACATCTCCCACTTCTGCTCC 60
T. tonsurans               GAAATCGACTTCACCCGTTCGATGCATGGAATCATGAGGAACATCTCCCACTTCTGCTCC 60
M. gypseum                 GAAATTGACTTCACCCGTTCGATGCATGGAATCATGAGAAACATTTCCCACTTCTGCTCC 60
                           **  *   **** ****  * ***   **  ** * *  ** **     ** * *****

T. verrucosum              CGCACCAGCAGCAAGA-CATGGGGCAAGGAAGCCTGGAAGAAGATTGTCGTCTGCATCGT 119
M. canis                   CGCACCAGCAGCAAGA-CATGGGGCAAGGAAGCCTGGAAGAAGATTGTCGTCTGCATCGT 119
E. floccosum               CGCACCAGCAGCAAGA-CATGGGGCAAGGAAGCCTGGAAGAAGATTGTCGTCTGCATCGT 119
T. mentagrophytes-2, 3     CGCACCAGCAGCAAGA-CATGGGGTAAAGAAGCCTGGAAGAAGATTGTCGTTTGTATCGT 119
T. rubrum                  CGCACCAGCAGCAAGA-CATGGGGTAAAGAAGCCTGGAAGAAGATTGTCGTTTGTACTGT 119
T. mentagrophytes-1        AGAACCAA-ATCACGAACTTGGGGAAAAGATGGATGGAAGAAAATTGTCGTCTGCATTAT 119
T. mentagrophytes-4        AGAACCAA-ATCACGAACTTGGGGAAAAGATGGATGGAAGAAAATTGTCGTCTGCATTAT 119
T. tonsurans               AGAACCAA-ATCACGAACTTGGGGAAAAGATGGATGGAAGAAAATTGTCGTCTGCATTAT 119
M. gypseum                 AGAACCAA-GTCACGAACATGGGGAAAGGATGGATGGAAGAAAATCGTTGTTTGCATCAT 119
                            * ****    ** ** * ***** ** ** *  ******** ** ** ** ** *   *

T. verrucosum              CTCAGACGGCCG-TGGAAAGATCAACCCACGCACGAGAGCTGTCCTTGCCGGTCTGGGTG 178
M. canis                   CTCAGACGGCCG-TGGAAAGATCAACCCACGCACGAGAGCTGTCCTTGCCGGTCTGGGTG 178
E. floccosum               CTCAGACGGCCG-TGGAAAGATCAACCCACGCACGAGAGCTGTCCTTGCCGGTCTGGGTG 178
T. mentagrophytes-2, 3     CTCAGACGGTCG-TGCAAAGATAAATCCGCGTACGAGAGCTGTCCTTGCCGGTCTAGGCG 178
T. rubrum                  CTCAGACGGTCG-TGCAAAGATAAACCCACGTACAAGAGCTGTCCTTGCCGGTCTAGGTG 178
T. mentagrophytes-1        TGCTGATGGACGACACAAAG-TCCATCCTCGCACATTGAACGCTCTAGGAGCCATTGGTG 178
T. mentagrophytes-4        TGCTGATGGACGACACAAAG-TCCATCCTCGCACATTGAACGCTCTAGGAGCCATTGGTG 178
T. tonsurans               TGCTGATGGACGACACAAAG-TTCATCCTCGCACATTGAACGCTCTAGGAGCCATTGGTG 178
M. gypseum                 TGCTGATGGAAGACACAAAG-TTCATCCTCGCACCTTGAATGCGCTAGGTGCCATTGGCG 178
                             * ** **  *    **** *  * ** ** **       *  ** *  *   * ** *

T. verrucosum              TCTATCAAGACGGCATTGCCAAACAGCA-GGTCAATGGTAAAGATGTCACCGCCCACATA 237
M. canis                   TCTATCAAGACGGCATTGCCAAACAGCA-GGTCAATGGTAAAGATGTCACCGCCCACATA 237
E. floccosum               TCTATCAAGACGGCATTGCCAAACAGCA-GGTCAATGGTAAAGATGTCACCGCCCACATA 237
T. mentagrophytes-2, 3     TTTACCAAGATGGCATTGCCAAACAGCA-GGTCAACGGTAAAGACGTCACTGCGCACATC 237
T. rubrum                  TTTACCAAGATGGCATTGCTAAGCAGCA-GGTTAACGGTAAAGACGTCACTGCTCACATC 237
T. mentagrophytes-1        TGTACCAAGACGGCATTGC-AAAGAACATAGTCAACCAGAAGGAAGTTACTGCTCATTTG 237
T. mentagrophytes-4        TGTACCAAGACGGCATTGC-AAAGAACATAGTCAACCAGAAGGAAGTTACTGCTCATTTG 237
T. tonsurans               TGTACCAAGACGGCATTGC-AAAGAACATAGTCAACCAGAAGGAAGTTACTGCTCATTTG 237
M. gypseum                 TATATCAAGACGGCATTGC-AAAGAACATCGTCAATCAGAAAGAAGTCACGGCCCATCTG 237
                           * ** ***** ******** **  * **  ** **    ** ** ** ** ** **  *

T. verrucosum              TACGAGTATACCACCCAGAT------------AGGCATGGAGGTTAAGGGAACCCAAGTC 285
M. canis                   TACGAGTATACCACCCAGAT------------AGGCATGGAGGTTAAGGGAACCCAAGTC 285
E. floccosum               TACGAGTATACCACCCAGAT------------AGGAATGGAGGTTAAGGGAACCCAAGTC 285
T. mentagrophytes-2, 3     TACGAATATACCACCCAGAT------------AGGCATGGAGGTCAAGGGCACCCAGGTT 285
T. rubrum                  TACGAATATACCACCCAGAT------------AGGCATGGAGGTCAAGGGCACCCAGGTT 285
T. mentagrophytes-1        TACGAATACACAACCCAAGTCTCTTTGGATCCGGATTTGAAGTTCAAGGGTGCTGAAAAG 297
T. mentagrophytes-4        TACGAATACACAACCCAAGTCTCTTTGGATCCGGATTTGAAGTTCAAGGGTGCTGAAAAG 297
T. tonsurans               TATGAATACACAACCCAAGTCTCTTTGGATCCGGATTTGAAGTTCAAGGGTGCCGAAAAG 297
M. gypseum                 TACGAATACACAACCCAGGTCTCTCTAGATCCAGACTTGAAGTTCAAGGGTGCCGAAAAG 297
                           ** ** ** ** *****  *             *   ** ** * *****  *  *
```

Fig. 2. Alignment of CHS1 gene fragment sequences of the common human pathogenic dermatophytes. The CHS1 gene sequences were aligned by using the Clustal W program. Hyphens designate gaps added to permit alignment; asterisks indicate conserved bases (*T. mentagrophytes-1*; granular form, *T. mentagrophytes-2*; powdery form, *T. mentagrophytes-3*; persicolor form, *T. mentagrophytes-4*; downy form).

Fig. 2. Continued

```
T. verrucosum            ATTCTCAAGCCTCGGCCAGGGATGCCAGTGCAGCTCCTCTTCTGTCTCAAGGAGAAGAAC 345
M. canis                 ATTCTCAAGCCTCGGCCAGGGATGCCAGTGCAGCTCCTCTTCTGCCTCAAGGAGAAGAAC 345
E. floccosum             ATTCTCAAGCCTCGGCCAGGGATGCCAGTGCAGCTCCTCTTCTGTCTCAAGGAGAAGAAC 345
T. mentagrophytes-2, 3   ATTCTCAAGCCGCGGCCGGGAATGCCGGTCCAGCTCCTCTTCTGTCTTAAAGAGAAGAAC 345
T. rubrum                ATCCTCAAGCCGCGGCCAGGAATGCCAGTCCAGCTTCTCTTCTGTCTTAAAGAGAAGAAT 345
T. mentagrophytes-1      GGTATTGTGCCTTG-CCAA--ATG-----ATA--T-----TCTGTCTCAAGGAACGAAAC 342
T. mentagrophytes-4      GGTATTGTGCCTTG-CCAA--ATG-----ATA--T-----TCTGTCTCAAGGAACGAAAC 342
T. tonsurans             GGTATTGTGCCTTG-CCAG--ATG-----ATA--T-----TCTGTCTCAAGGAACGAAAC 342
M. gypseum               GGTATTGTGCCTTG-CCAG--ATG-----ATG--T-----TCTGTCTCAAGGAGCGAAAT 342
                             *   ***  * **    ***          *     **** ** ** **    **

T. verrucosum            CAGAAGAAGATCAACTCCCACAGATGGTTCTTCCAGGCCTTTGGCCGTGTCCTCGACCCC 405
M. canis                 CAGAAGAAGATCAACTCCCACAGATGGTTCTTCCAGGCCTTTGGCCGTGTCCTCGACCCC 405
E. floccosum             CAGAAGAAGATCAACTCCCACAGATGGTTCTTCCAGGCCTTTGGCCGTGTCCTCGACCCC 405
T. mentagrophytes-2, 3   CAGAAGAAGATCAACTCTCACAGATGGTTCTTCCAAGCCTTTGGTCGCGTCCTCGACCCC 405
T. rubrum                CAGAAAAAGATCAACTCTCACAGATGGTTCTTCCAAGCCTTTGGCCGTGTCCTCGACCCC 405
T. mentagrophytes-1      CAGAAGAAGCTCAATTCTCATAGATGGTTCTTCAATGGGTTTGGCCGTGCATTGAACCCC 402
T. mentagrophytes-4      CAGAAGAAGCTCAATTCTCATAGATGGTTCTTCAATGGGTTTGGCCGTGCATTGAACCCC 402
T. tonsurans             CAGAAGAAGCTCAATTCTCATAGATGGTTCTTCAATGGGTTTGGCCGTGCATTGAACCCC 402
M. gypseum               CAGAAGAAGCTCAATTCCTATAGATGGTTCTTTAATGGGTTCGGCCGTGCATTGAACCCT 402
                         ***** *** **** **  * ***********  * *  ** ** ** *   *  ****

T. verrucosum            AACATCTGTGTTCTCCTCGACGCCGGAACAAAACCAG-GCAGACAGAGTATATACCAGCT 464
M. canis                 AACATCTGTGTTCTCCTCGACGCCGGAACAAAACCAG-GCAGACAGAGTATATACCAGCT 464
E. floccosum             AACATCTGTGTTCTCCTCGACGCCGGAACAAAACCAG-GCAGACAGAGTATATACCAGCT 464
T. mentagrophytes-2, 3   AATATCTGTGTTCTCCTCGACGCGGGAACAAAACCAG-GCGGCCGAAGTATATACCAACT 464
T. rubrum                AATATCTGTGTTCTCCTCGATGCTGGAACAAAACCAG-GCGGGCGAAGTATATACCAGCT 464
T. mentagrophytes-1      AATGTTTGCATCTTGCTTGATGTTGGAACTAAGCCGGAGCCAACTGCCT-TGTACCATCT 461
T. mentagrophytes-4      AATGTTTGCATCTTGCTTGATGTTGGAACTAAGCCGGAGCCAACTGCCT-TGTACCATCT 461
T. tonsurans             AATGTTTGCATCTTGCTTGGTGTTGGAACTAAGCCGGAGCCAACTGCCT-TGTACCATCT 461
M. gypseum               AATGTCTGTATCTTGCTTGATGTTGGAACAAAGCCGGAACCAACTGCCT-TGTACCATCT 461
                         **  * **  *  * ** *  *  ***** ** ** *  *   *    * * ***** **

T. verrucosum            CTGGCGTGCCTTTGACCTCGAACCCA-TGTGCGGTGGCGCCTGCGGTGAGATCAAGGTCA 523
M. canis                 CTGGCGTGCCTTTGACCTCGAACCCA-TGTGCGGTGGCGCCTGCGGTGAGATCAAGGTCA 523
E. floccosum             CTGGCGTGCCTTTGACCTCGAACCCA-TGTGCGGTGGCGCCTGCGGTGAGATCAAGGTCA 523
T. mentagrophytes-2, 3   CTGGCGTGCTTTTGACCTCGAGCCCA-TGTGCGGTGGTGCCTGCGGTGAAATCAAGGTCA 523
T. rubrum                CTGGCGTGCTTTTGACCTCGAACCCA-TGTGCGGCGGTGCCTGCGGTGAAATCAAGGTCA 523
T. mentagrophytes-1      TTGGAAGGCATTCGATCAGGACTCTAACGT-TGCTGGTGCTGCTGGAGAGATCAAAG-CC 519
T. mentagrophytes-4      TTGGAAGGCATTCGATCAGGACTCTAACGT-TGCTGGTGCTGCTGGAGAGATCAAAG-CC 519
T. tonsurans             TTGGAAGGCATTCGATCAGGACTCTAACGT-TGCCGGTGCTGCTGGAGAGATCAAAG-CT 519
M. gypseum               TTGGAAAGCATTTGATCAGGACTCTAACGT-TGCTGGCGCTGCCGGGGAAATCAAAG-CA 519
                          ***   ** ** ** *  **  * *  **  *  ** **    ** ** ***** * *

T. verrucosum            TGTTGTCCCATGGCAAGA----AACTGCTCAATTCGCTCGTTGCCGGC 567
M. canis                 TGTTGTCCCATGGCAAGA----AACTGCTCAATCCGCTCGTTGCCGGC 567
E. floccosum             TGTTGTCCCATGGCGAGA----AACTGCTCAATCCGCTCGTTGCCGGC 567
T. mentagrophytes-2, 3   TGTTGTCCCACGGCAAGA----AACTGTTGAACCCGCTCGTTGCCGGT 567
T. rubrum                TGTTATCACACGGCAAGA----AACTGTTCAACCCGCTCGTTGCTGGC 567
T. mentagrophytes-1      GGTAAAGGAAAGGGATGGGTTGGACTACTCAATCCTTTGGTTGCATCT 567
T. mentagrophytes-4      GGTAAAGGAAAGGGATGGGTTGGACTACTCAATCCTTTGGTTGCATCT 567
T. tonsurans             GGTAAAGGAAAGGGATGGGTTGGACTACTCAACCCTTTGGTTGCATCT 567
M. gypseum               GGCAAAGGAAAGGGATGGGTCGACCTACTTAACCCCTTGGTTGCCTCT 567
                         *       * **   *       **  * **  *  * *****
```

2. 염기서열 분석

피부사상균 7균종 15주의 염기서열은 615 뉴클레오타이드로 보였다 (Fig. 2). *T. rubrum* 균주간에 염기서열 차이는 없었다. *T. mentagrophytes* 분말형 및 도실형 균주간에는 염기서열 차이가 없었으며, 과립형, 융모형과 분말형 및 도실형 두 군

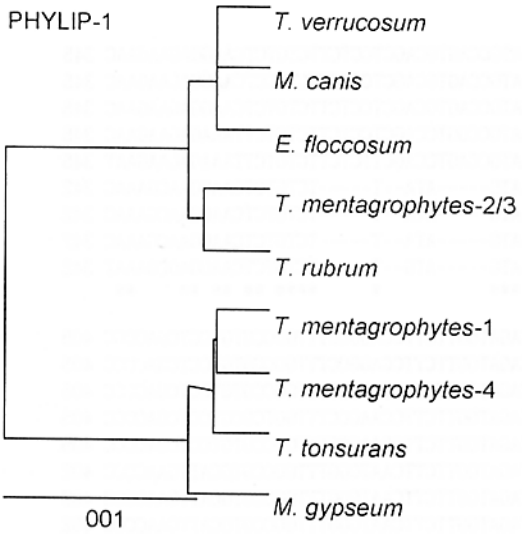

Fig. 3. A tree showing phylogenetic relationships of CHS1 gene fragments of the common human pathogenic dermatophytes. The DNA sequences were compared by Clustal W multiple sequence alignment programs, and a phylogenetic tree was constructed by the TREEVIEW displaying phylogenies program (*T. mentagrophytes-1*; granular form, *T. mentagrophytes-2*; powdery form, *T. mentagrophytes-3*; persicolor form, *T. mentagrophytes-4*; downy form).

간에 차이가 있었다. *T. mentagrophytes*를 제외한 나머지 6균종간에도 차이를 보였다.

3. 계통발생 분석

NJ법에 의해 계통발생 계도가 구축되었으며 균주 사이에 진화 정도는 수평분지 길이로 나타내었다 (Fig. 3). *T. mentagrophytes* 과립형과 융모형; *T. mentagrophytes* 분말형 및 도실형과 *T. rubrum*; *T. verrucosum, M. canis*와 *E. floccosum*의 균주간에는 염기서열의 유사성이 높았다. 전체적으로 2군으로 나누어졌으나 *Trichophyton*균속, *Microsporum* 균속, *Epidermophyton*균속으로 나눌 수는 없었다.

고 찰

피부사상균은 현재까지 세계적으로 43종의 균종이 밝혀져 있으며 자연 활동범위가 토양, 동물 혹은 사람에 따라 토양선호성 (geophilic), 동물선호성 (zoophilic), 또는 인체선호성 (anthropophilic) 등으로 3가지 생태학적 군으로 나누지만 3군 모두 인체에 감염을 일으킬 수 있다[3]. 또한 피부사상균의 일부는 sexual stage를 가지는 유성세대 (teleomorph)를 가지는데 *Microsporum*은 *Nannizzia, Trichophyton*은 *Arthroderma*로 분류하였는데 최근에는 Weitzman 등[27]이 *Arthroderma*로 통일하였다. 피부사상균의 분류는 주로 배양소견, 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특징에 의해 나누었으나 분류내에 상당한 변이 (variation)와 다형 현상 (polymorphism)을 보여 분류가 만족스럽지 못하다[28]. 김 등[26]은 *T. rubrum*을 형태학적으로 다양한 균집락을 보이므로 배지의 뒷면에 포도주 빛을 나타내는 전형적인 형 (portwine type), 집락위 표면이 약간 거친 가루를 뿌려 놓은 것 같은 과립형 (granular type), 집락 주위로 진한 갈색의 배지착색을 보이는 배지착색형 (pigmented type), 배지의 뒷면의 색깔이 진한 황색인 황색형 (yellow type), 그리고 배지의 뒷면이 연한 황색 또는 무색을 나타내는 무색형 (nonpigmented type)으로 5가지 아형 (subtype)으로 분류하였고, 서[25]와 김 등[26]은 *T. mentagrophytes*를 배양된 균집락 형태에 따라 배지의 전면에 담황색의 과립상의 표면을 보이는 과립형, 배지의 전면에 편평한 분말이 보이는 분말형, 배지의 전면에 편평한 융모와 미세한 과립이 융합되고 배지의 뒷면이 자주색을 나타내는 도실형 및 배지의 전면이 전체적으로 흰색의 융모상으로 뒤덮히는 융모형으로 4가지 아형으로 분류하였다. 본 연구에서는 상기와 같이 배양 균집락이 다양한 형태를 보이는 *T. rubrum* 6균주와 *T. mentagrophytes*를 4가지 아형으로 구분하여 실험하였다.

피부사상균의 변이 및 다형 현상의 문제를 해결하기 위해 최근 몇가지 분자생물학적 접근이 피부사상균에 보완적으로 시도되고 있다. 1980년에 Davidson 등[13]은 핵 DNA (nDNA) 염기 구성을 조사하였지만 균종사이에 구분이 잘 안되어 유용하지 않았고, nDNA 보합결합 (hybridization)을 이용하여 진균을 연구하기도 하였고[14], 미토콘드리아 DNA RFLP법[15~17]은 전통적인 방법에서 큰 차이를 보이는 약간의 균종에서 구분이 안되어 분류에 실패하였다. 작고, 큰 subunit의 부분적 ribosomal DNA 염기서열 분석[18,19]은 균종의 분류체계에 불충분한 변이를 보여 주었다. 이러한 결점을 보완하기 위해 본 연구에서는 더 변이가 심한 CHS1 유전자를 이용하여 피부사상균의 계통분석 및 분류를 조사하였다.

Chitin은 N-acetylglucosamine의 β1-4-linked 중합체 (polymer)로 피부사상균을 포함하는 많은 진균

균종의 세포벽을 구성하는 섬유성 cellulose-like 다당류 (polysaccharide)이다[22]. CHS1 유전자는 chitin synthase를 코딩하며 *Candida albicans, Aspergillus nidulans, Histoplasma capsulatum, Sporothrix schenckii*에서 cloning 되었고[29~31] 최근 피부사상균에 대한 CHS1 유전자의 계통발생 및 분류도 보고되었다[22~24].

본 실험에서 피부사상균은 최 등[5]과 마찬가지로 고체배지에 비교해 액체배지에서 배양된 균사를 사용하여 더 좋은 반응을 얻을 수 있었으며, 진균 DNA 분리를 위하여 zymolase sodium dodecyl sulfate로 세포벽을 용해시키거나 냉동상태에서 물리적으로 파괴하는 것에 비교해 bead-beating을 이용하는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

본 실험에서 배양 균집락이 다양한 형태를 보이는 *T. rubrum* 6주의 균주간 염기서열 차이는 없어서 균종내 균주간의 차이나 임상형의 차이는 나타나지 않았다. 그러나 *T. mentagrophytes*균주간에는 염기서열에 큰 차이가 있어서 균종내의 차이를 보였고, *T. mentagrophytes*를 제외한 나머지 피부사상균 6균종간에도 염기서열 차이를 보여 균종별 분류가 가능하였다.

CHS1 유전자의 계통발생 분석 결과에서는 *T. mentagrophytes* 과립형과 융모형; *T. mentagrophytes* 분말형 및 도실형과 *T. rubrum*; *T. verrucosum, M. canis*와 *E. floccosum* 균주간에 염기서열의 유사성이 높아서 비슷한 계통발생을 보였다. 그러나 전통적인 분류인 *Trichophyton*균속, *Microsporum*균속, *Epidermophyton*균속의 각각의 균속에 따른 염기서열의 유사성은 발견할 수 없었다.

CHS1 유전자의 계통발생 분석 결과 *T. mentagrophytes* 과립형과 *T. tonsurans*는 비슷한 계통발생을 보여 Nishio 등[17]의 미토콘드리아 DNA를 제한효소로 처리한 RFLP법에 의한 *Trichophyton*균속의 계통분석, Harmsen 등[18]의 small subunit rRNA 분석에 의한 각질친화성 진균의 계통분석 결과와 일치하여 두 균종이 매우 가까운 균종임을 알 수 있었다.

피부사상균의 CHS1 유전자의 염기서열 분석은 전통적인 방법만으로 분류 및 동정이 어려운 경우에도 2~3일내 빠르게 균종 동정과 계통발생 연구를 할 수 있어 전통적인 방법에 보완이 될 수 있으며 균종의 진화를 이해하는데 유용할 것으로 생각된다.

결 론

피부사상균의 분류 및 동정은 형태학적, 생화학적 특징 및 교배실험 등으로 이루어져 왔으나 최근에 분자생물학적 분석들이 보완적으로 사용되고 있다. 이에 저자들은 국내 피부사상균증 환자에서 분리된 피부사상균들을 대상으로 하여 Sabouraud 액체배지에서 배양한 후 진균 DNA를 분리하여 chitin synthase 1 (CHS1) 유전자를 중합효소 연쇄반응으로 증폭하여 염기서열 분석으로 피부사상균의 계통발생 및 분류에 대해 조사하였다.

실험균주는 배양된 균집락이 다양한 형태를 보이는 *T. rubrum* 6주, *T. mentagrophytes* 4주 (과립형, 분말형, 도실형, 융모형 각각 1주), *M. canis* 1주, *M. gypseum* 1주, *E. floccosum* 1주, *T. verrucosum* 1주, *T. tonsurans* 1주로 피부사상균 7균종 15주를 대상으로 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CHS1 primers를 사용한 PCR결과 피부사상균 모두는 염색된 agarose gel에서 615 bp의 1개의 동일한 band 양상을 보였다.

2. CHS1 유전자의 염기서열 및 계통발생 분석 결과 *T. rubrum* 6주는 동일한 염기서열을 보여 같은 균종내에서 균주간의 차이나 임상형에 따른 차이는 나타나지 않았으나 *T. mentagrophytes* 균주간에는 염기서열의 큰 차이가 있었다. *T. mentagrophytes*를 제외한 나머지 균종간에도 차이를 보였다. CHS1 유전자 분석에서는 *T. mentagrophytes* 분말형 및 도실형 균주간에 동일한 염기서열을 보였고, *T. mentagrophytes* 과립형과 융모형; *T. mentagrophytes* 분말형 및 도실형과 *T. rubrum*; *T. verrucosum, M. canis*와 *E. floccosum*의 균주간에 염기서열의 유사성이 높아 비슷한 계통발생을 보였다.

이상의 연구 결과 CHS1 유전자의 염기서열 및 계통발생 분석은 피부사상균의 계통발생과 분류를 이해하는데 유용한 방법으로 생각된다.

<감 사 문>

본 논문을 쓰는데 많은 자료를 제공해 주신 서울의대 김정애 교수님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Rippon JW. Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. 3rd ed.

Philadelphia: WB Saunders, 1988: 121-275
2. Elewski BE, Hazen PG. The superficial mycosis and dermatophytosis. J Am Acad Dermatol 1989; 21: 655-673
3. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Medical mycology. Philadelphia: Lea and Febiger, 1992: 105-161
4. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 240-259
5. 최종수, 황계영, 김기홍 등. Arbitrarily Primed PCR을 이용한 피부사상균의 동정 및 분류. 대피연지 1996; 3: 39-50
6. 이영선, 유재일, 최연화 등. RAPD PCR분석에 의한 국내 피부 사상균속 분류 및 동정. 의진균지 1998; 3: 107-114
7. Zhong Z, Li R, Li D, Wang D. Typing of Common dermatophytes by random amplification of polymorphic DNA. Jpn J Med Mycol 1997; 38: 239-246
8. Gracer Y, Fari ME, Presber W, Sterry W, Tietz H-J. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. Brit J Dermatol 1998; 138: 576-582
9. Kim JA, de Gusmao NB, Okada K, et al. Identification of *Trichophyton tonsurans* by random amplified polymorphic DNA. Ann Dermatol 1999; 11: 135-141
10. 이영선, 최연화, 유재일 등. Internal transcribed spacer-RFLP 및 염기서열 분석을 통한 피부사상균 분류동정. 의진균지 1999; 4 부록 1: 39
11. Jackson CJ, Barton RC, Evans EGV. Use of the ribosomal RNA genes (rDNA) to differentiate between strains of *Trichophyton rubrum*. Mycoses 1999; 42: 184
12. 최종수, 김기홍, 신동훈, 이순정, 박용묘. DNA probe를 이용한 피부사상균의 동정. 대피지 1999; 37 부록 2: 65
13. Davidson FD, Mackenzie DWR, Owen RJ. Deoxyribonucleic acid base compositions of dermatophytes. J Gen Microbiol 1980; 118: 465-470
14. Davidson FD, Mackenzie DWR. DNA homology studies in the taxonomy of dermatophytes. J Med Vet Mycol 1984; 2: 117-123
15. Kawasaki M, Aoki M, Ishizaki H, et al. Phylogenetic relationships of the genera *Arthroderma* and *Nannizzia* referred from mitochondrial DNA analysis. Mycopathologia 1992; 118: 95-102
16. Mochizuki T, Takada K, Watanabe S, Kawasaki W, Ishizaki H. Taxonomy of *Trichophyton interdigitale* (*Trichophyton mentagrophytes* var *interdigitale*) by restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA. J Med Vet Mycol 1990; 28: 191-196
17. Nishio K, Kawasaki M, Ishizaki H. Phylogeny of the genera *Trichophyton* using mitochondrial DNA analysis. Mycopathologia 1992; 117: 127-132
18. Harmsen D, Schwinn A, Weig M, Brocker EB, Heesemann J. Phylogeny and dating of some pathogenic keratinophilic fungi using small subunit ribosomal RNA. J Med Vet Mycol 1995; 33: 299-303
19. Leclerc MC, Philippe H, Gueho E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons. J Med Vet Mycol 1994; 32: 331-341
20. de Hoog GS, Bowman B, Graser Y, et al. Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. Medical Mycology 1998; 36: 52-56
21. Harmsen D, Schwinn A, Brocker EB, Frosch M. Molecular differentiation of dermatophyte fungi. Mycoses 1999; 42: 67-70
22. Kano R, Nakamura Y, Watari T, et al. Phylogenetic analysis of 8 dermatophytes species using chitin synthase 1 gene sequence. Mycoses 1997; 40: 411-414
23. Kano K, Nakamura Y, Watari T, et al. Molecular analysis of chitin synthase 1 (CHS1) gene sequences of *Trichophyton mentagrophytes* complex and *T. rubrum*. Curr Microbiol 1998; 37: 236-239
24. Kano R, Nakamura Y, Watari T, et al. Species-specific primers of chitin synthase 1 gene for the differentiation of the *Trichophyton mentagrophytes* complex. Mycoses 1999; 42: 71-74
25. 서무규. *Trichophyton mentagrophytes*의 경구용 항진균제에 대한 감수성. 대피지 1992; 30: 769-775

26. 김기홍, 문병천, 최종수. 대구지역 백선 환자에서 분리된 *Trichophyton*속의 진균학적 성상 및 아형의 분류. 의진균지 1997; 2: 129-143
27. Weitzman I, McGinnis MR, Padhye AA, Ajello L. The genus *Arthroderma* and its synonym *Nannizzia*. Mycotaxon 1986; 25: 505-518
28. Graser Y, Fari ME, Vilgalys R, et al. Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. Medical Mycology 1999; 37: 105-114
29. Chen-Wu JL, Zwicker J, Bowen AR, Robbins PW. Expression of chitin synthase gene during yeast and hyphal growth phases of *Candida albicans*. Mol Microbiol 1992; 6: 497-502
30. Bowen AR, Chen-Wu JL, Momany M, et al. Classification of fungal chitin synthases. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 519-523
31. Chua SS, Momany M, Mendoza L, Szanizlo PJ. Identification of three chitin synthase genes in the dimorphic fungal pathogen, *Sporothrix schenckii*. Curr Microbiol 1994; 29: 151-156