

Pyrosequencing 방법을 이용한 *Malassezia* 효모균의 분자생물학적 동정

건국대학교 의학전문대학원 피부과학교실

송영찬 · 임상희 · 정보라 · 이양원 · 최용범 · 안규중

=Abstract=

The Application of Pyrosequencing Method in the Identification and Classification of *Malassezia* Yeasts

Young Chan Song, Sang Hee Lim, Bo Ra Jung, Yang Won Lee,
Yong Beom Choe and Kyu Joong Ahn

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

Background: *Malassezia* yeasts are lipophilic fungi that are found in 75~80% of healthy adults. Recently, various molecular biological techniques are being preferred to identify and classify the *Malassezia* yeasts. Pyrosequencing is a real-time DNA sequencing technique. This technology has the potential advantage of accuracy, ease-of-use, high flexibility and is now emerging as a popular platform for microbial typing.

Objective: We sought to implement novel molecular biology technique, namely pyrosequencing method in identifying and classifying *Malassezia* yeasts, and assess its clinical applicability.

Methods: We obtained ribosomal RNA sequences of 11 *Malassezia* standard strains from NCBI database. Primers for the initial PCR amplification of the target region (ITS2) and sequencing primers within the regions amplified by the PCR primers were designed using Pyrosequencing Assay Design Software (Biotage AB, Uppsala, Sweden). We obtained PCR amplifying fragments of genomic DNA isolated from the *Malassezia* yeasts. And pyrosequence reactions were performed using reagents provided with the PSQ 96 Sample Preparation kit.

Results: In the PCR analysis, all of 11 standard strains are shown at the 130 bp levels. In the pyrosequencing analysis, *M. obtusa* and *M. furfur* sequences were corresponded among 11 *Malassezia* standard strains. But, in 4 cases, *Malassezia* strains mismatched with expected *Malassezia* strain and in rest of 5 *Malassezia* strains, pyrosequencing was failed.

Conclusion: As evidenced above, pyrosequencing analysis could provide a sensitive and rapid identification system for *Malassezia* species. But it still has many limitation to be applied to epidemiological surveys and clinical practice. [Kor J Med Mycol 2007; 12(4): 189-197]

Key Words: ITS2, *Malassezia*, Pyrosequencing

†별책 요청 저자: 이양원, 143-729 서울시 광진구 화양동 4-12, 건국대학교병원 피부과
전화: (02) 2030-5170, Fax: (02) 2030-5179, e-mail: 20050078@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 이후 현재까지 어루러기, 지루피부염, *Malassezia* 모낭염 등의 피부 질환과 관련되어 있다고 알려져 왔으며, 최근 아토피 피부염 및 건선과의 관련성이 보고되고 있다^{3,4}. 이외에도 융합성 망상 유두종증 (confluent and reticulated papillomatosis)^{5,6}과 *Malassezia* 조갑진균증⁷이 *Malassezia* 효모균과의 연관성 있는 새로운 피부 질환으로 보고되었고^{7,8}, 지방산이 함유된 수액제제를 정맥 내 카테터로 투여받는 미숙아나 면역능력이 저하된 성인에서 *Malassezia* 효모균에 의한 전신 감염증이 보고됨으로써 그 병원성이 점차 대두되고 있다^{9,10}.

1996년 Guého 등¹¹은 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 본 효모균에 대한 관심이 증가되고 있으며, 신체 부위에 따른 효모균의 종류나 관련된 피부 질환에서 주로 배양되는 효모균의 종류에 대한 연구가 많이 행해져 왔다. 그리고 *Malassezia* 효모균의 동정에 다양한 분자생물학적 기법을 적용하고 있으며, 이러한 분자생물학적 기법을 토대로 유전형을 분석함으로써 새로운 4 가지 균종 *M. dermatis*¹², *M. japonica*¹³, *M. nana*¹⁴, *M. yamatoensis*¹⁵가 추가로 보고되었다. 뿐만 아니라 이러한 분자생물학적 기법을 이용하여 아토피 피부염, 지루피부염, 어루러기와 같은 피부 질환에서 *Malassezia*의 분포를 분석하거나 특정 균주에 대해 subtyping하는 연구가 진행되고 있다.

최근에 주목받고 있는 분자생물학적 기법인 pyrosequencing은 labeled primer가 필요하지 않으며 젤 전기영동 과정이 없이, DNA의 염기 서열을 30~40 base pairs (bp) 정도만을 염기 서열 분석

Table 1. GenBank accession number for 11 standard strains of *Malassezia* yeasts used in this study

Species	Standard Strains	Accession No. rRNA
<i>M. dermatis</i>	JCM 11348	AY390285
<i>M. furfur</i>	KCTC 7743	AY743634
<i>M. globosa</i>	CBS 7966	AY743630
<i>M. japonica</i>	CBS 9432	EF140669
<i>M. nana</i>	JCM 12085	EF140666
<i>M. obtusa</i>	KCTC 7847	AB105158
<i>M. pachydermatis</i>	KCTC 17008	AY743637
<i>M. restricta</i>	KCTC 7848	AY743636
<i>M. slooffiae</i>	KCTC 17431	AY743633
<i>M. sympodialis</i>	KCTC 7985	AY743632
<i>M. yamatoensis</i>	CBS 9725	AB125261

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

함으로써 신속하고 정확하게 균주를 동정할 수 있는 방법이다. 그래서 최근에는 *Candida* 종과 *Aspergillus* 종 등의 진균류 동정과 *Helicobacter pylori*와 같은 병원성 미생물의 진단에 유용하게 이용하고 있다^{16~24}. 그러나 아직 *Malassezia* 효모균의 동정 및 분류에 있어 pyrosequencing 방법을 적용한 연구는 보고된 바 없다.

이에 저자들은 pyrosequencing 방법을 *Malassezia* 효모균 동정에 적용하여 *Malassezia* 효모균으로 인한 질병의 신속한 진단 및 치료에 있어서 임상적용 가능성 여부 및 유용성을 평가하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

1) 표준 균주 (Standard strains)

본 연구에서는 현재 보고된 11종의 *Malassezia* 효모균의 표준 균주를 대상으로 하였다 (Table 1). *M. furfur* (KCTC 7743), *M. obtusa* (KCTC 7847), *M. pachydermatis* (KCTC 17008), *M. restricta* (KCTC

7848), *M. slooffiae* (KCTC 17431), *M. sympodialis* (KCTC 7985) 6종은 한국생명공학연구원 생물자원 센터로부터 *M. globosa* (CBS 7966), *M. yamatoensis* (CBS 9725) 2종은 Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS)로부터 *M. dermatitis* (JCM 11348), *M. nana* (JCM 12085), *M. japonica* (CBS 9432) 3종은 Japanese Collection of Microorganisms (JCM)로부터 각각 분양 받았다.

2. 방법

1) Leeming과 Notman배지의 준비와 배양
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℃에서 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. 그리고 본 실험에 이용할 11종의 *Malassezia* 표준 균주는 Leeming과 Notman배지에 접종한 후 34℃에서 2주간 배양하였다.

2) Genomic DNA의 분리

Malassezia 효모균으로부터 genomic DNA를 분리하기 위해 glass beads 방법을 사용하였다. 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 흔들어 주었다. 다시 400 µl P/C/I (phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1, v/v)을 섞은 후 0.5 mm 직경의 glass beads 400 mg을 혼합한 후 실온에서 10분간 흔들어 주었다. 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 eppendorf tube에 옮긴 후 C/I

(chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1, v/v)를 이용하여 다시 추출하였다. 상등액과 동량의 isopropanol 을 첨가한 후 -20℃에서 20분간 DNA를 침전시킨 후 15분간 15,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 70% ethanol로 세척하고 건조시킨 후 증류수로 용해시켜서 -20℃에서 보관하였다.

3) Primer의 설계 및 제작

NCBI로부터 얻어낸 *Malassezia* 표준 균주의 ribosomal DNA의 염기 서열을 Vector NTI software (Vector NTI version 6.0 Informax, Inc., North Bethesda, MD, USA)를 이용하여 정렬하여 염기 서열을 분석하고 11종의 *Malassezia* 효모균을 동정 및 분류 할 수 있는 염기 서열 부위를 결정하였다 (Fig. 1). Pyrosequencing을 실행할 염기 서열 부위는 전통적으로 염기 서열 상의 변이가 높다고 알려져 있는 ITS2 부위로 11종의 *Malassezia* 표준 균주 가 30 bp 염기 서열 상에서 서로 보존되지 않아 짧은 염기 서열의 분석을 통한 균의 동정에 적용 가능하였다. 또한, 완전한 유전체 서열 (genome sequence)이 밝혀지지 않은 *Malassezia* 효모균에 있어서 pyrosequencing을 위한 염기 서열 부위는 앞뒤로 충분한 염기 서열 정보를 가지고 있어 PCR 증폭을 시행하기 위한 primer를 설계하기에 적합하였다.

이 염기 서열 부위를 증폭하기 위해 Pyrosequencing Assay Design Software (Biotage AB, Uppsala, Sweden)를 이용하여 primer (*M*-SE, *M*-AS)를 설계하였으며 antisense primer (*M*-AS)는 biotin¹ 표식 되도록 제작하였다. Pyrosequencing을 적용할 sequencing primer (*M*-seq)는 PCR primer (*M*-SE, *M*-AS)를 이용하여 증폭된 산물 (ITS2 부위)의 염기 서열 상에서 *Malassezia* 효모균 동정 가능한 염기 서열 부위 (target region-30 bp)를 sequencing 할 수 있도록 설계하였다 (Table 2).

4) Ribosomal DNA의 PCR

0.25 mM deoxynucleoside triphosphate (dNTPs), 10 × PCR buffer, 5 × Q buffer, 20 pmol primer, 1 U Hot StarTaq polymerase (Qiagen, Qiagen GmbH,

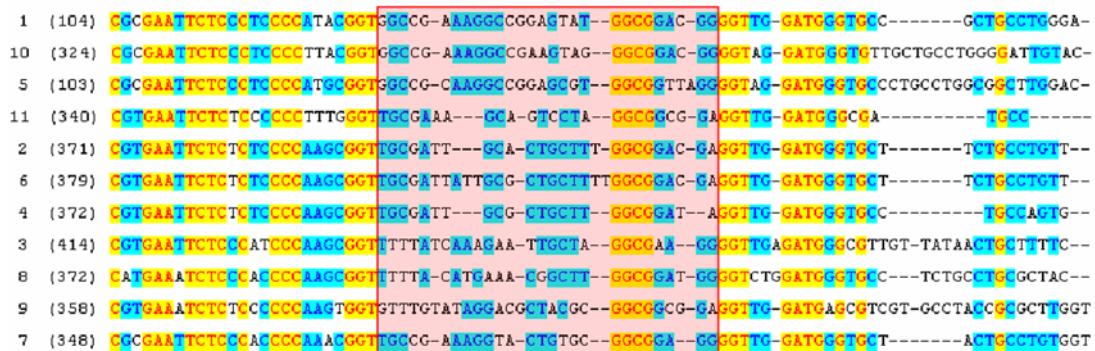


Fig. 1. Sequence alignment of the ribosomal RNA variable regions (ITS2) of 11 *Malassezia* standard strains. The ribosomal RNA sequences were aligned using Vector NTI software (Vector NTI version 6.0 Informax, Inc., North Bethesda, MD, USA). Box indicates the target region (variable site of ITS2) for *Malassezia* yeasts typing with pyrosequencing (Lane 1; *M. dermatis* (JCM 11348), Lane 2; *M. furfur* (KCTC 7743), Lane 3; *M. globosa* (CBS 7966), Lane 4; *M. japonica* (CBS 9432), Lane 5; *M. nana* (JCM 12085), Lane 6; *M. obtusa* (KCTC 7847), Lane 7; *M. pachydermatis* (KCTC 17008), Lane 8; *M. restricta* (KTCT 7848), Lane 9; *M. slooffiae* (KCTC 17431), Lane 10; *M. sympodialis* (KCTC 7985), Lane 11; *M. yamatoensis* (CBS 9725)).

Table 2. Primers set used for amplification and pyrosequencing

PCR Primer	Application	Position in rRNA of <i>Malassezia</i> Yeast (<i>M. furfur</i>)	Sequence (5' to 3' orientation)
<i>M</i> -SE	PCR Primer	363~384	TTGAGTGCCGTGAATTCTCTCT
<i>M</i> -AS	PCR Primer	490~473	Biotin-TCCCAAAGGCGCTAATGC
<i>M</i> -seq	PCR/sequencing primer	378~392	TCTCTCTCCCCAAGC

M., *Malassezia*; SE, sense; AS, antisense; seq, sequencing

Hilden, Germany), genomic DNA 용액 1 μ l을 포함하여 PCR 증폭 반응 혼합물이 50 μ l가 되도록 하였다. PCR은 DNA Engine Dyad (MJ Research Inc, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 반응 조건은 pre-denaturation 단계 95°C에서 14분, denaturation 단계 94°C에서 45초, annealing 단계 50°C에서 35초, 72°C에서 30초간 extension을 35회 반복하였고 마지막 extension은 72°C에서 7분간 시행하였다. 증폭된 DNA는 TAE buffer 상에서 1% (w/v) agarose gel을 100 volt로 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 투과조명기 (UV trans-illuminator)로 관찰하였다.

5) Pyrosequencing 분석

20 μ l의 biotinylated PCR 산물에 10 μ l의 Dynabeads M280-streptavidin (Dynal, Oslo, Norway)와 25 μ l의 2 \times BW buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM

EDTA, 2 M NaCl, 0.1% Tween 20) 용액을 혼합한 후 65°C에서 15분 동안 흔들어 주었다. PSQ 96 Sample Prep Tool (Pyrosequencing AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 0.5 M NaOH (well당 50 μ l)에서 1분간 biotinylated PCR product-streptavidin Dynabeads의 복합체로부터 single strand DNA를 얻어내었다. 각 well에 100 μ l의 1 \times annealing buffer (200 mM Tris-acetate, 50 mM Mg-acetate)로 세척한 후 44 μ l의 1 \times annealing buffer와 1 μ l sequencing primer (15 pmol)를 첨가한 후 2분간 80°C에서 가열하고 천천히 식힌 후 PSQ 96 SQA Reagent kit (enzyme와 substrate mixture, dATP, dCTP, dGTP, dTTP)을 사용하여 pyrosequencing을 시행하였다. Pyrosequencing data와 pyrogram은 PSQ 96MA version 2.0.2 software를 이용하여 분석하였다^{16~19}.

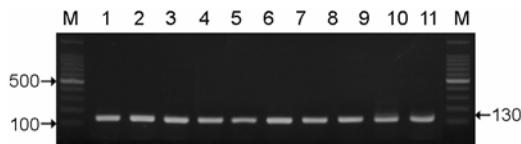


Fig. 2. Ribosomal DNA PCR products of 11 *Malassezia* standard strains. The primers successfully amplified the target part of ribosomal DNA from all *Malassezia* strains tested, providing a single PCR product of the expected size (approximately 130 bp). (Lane M; 100 bp DNA ladder, Lane 1; *M. dermatis* (JCM 11348), Lane 2; *M. furfur* (KCTC 7743), Lane 3; *M. globosa* (CBS 7966), Lane 4; *M. japonica* (CBS 9432), Lane 5; *M. nana* (JCM 12085), Lane 6; *M. obtusa* (KCTC 7847), Lane 7; *M. pachydermatis* (KCTC 17008), Lane 8; *M. restricta* (KTCT 7848), Lane 9; *M. slooffiae* (KCTC 17431), Lane 10; *M. sympodialis* (KCTC 7985), Lane 11; *M. yamatoensis* (CBS 9725)).

결 과

1. *Malassezia* 효모균의 Pyrosequencing을 위한 PCR 결과

Glass beads 방법을 사용하여 11종의 *Malassezia* 표준 균주의 genomic DNA를 성공적으로 분리하였다. Pyrosequencing을 실행할 염기 서열 부위를 증폭하기 위해 소프트웨어를 통하여 설계된 ribosomal DNA의 primer (*M*-SE, *M*-AS)를 이용하여 genomic DNA를 주형으로 한 PCR을 실행하였다. 그 결과 11가지 표준 균주 모두에서 130 bp 크기의 PCR bands를 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

2. Pyrogram 결과 비교 분석

Pyrosequencing으로 30 bp의 염기 서열 분석을 통하여 얻은 pyrogram 자료와 NCBI로부터 얻은 염기 서열 정보를 비교 분석하였다. 그 결과 11 개 *Malassezia* 표준 균주 중 *M. obtusa*와 *M. furfur* 2가지 균주만 올바르게 동정되었고, *M. obtusa*는 100%, *M. furfur*는 93%의 일치율을 보였다 (Table 3).

반면에 *M. restricta*, *M. sympodialis*, *M. japonica*, 그리고 *M. yamatoensis* 4가지 균주의 경우 전혀 다른 균주와 일치하는 것으로 나타났다. *M. restricta*는 *M. obtusa*와 94%, *M. sympodialis*, *M. japonica*,

Table 3. The result of pyrosequencing for 11 standard strains of *Malassezia* yeasts used in this study

Species	Result	Identities (%)
<i>M. obtusa</i>	<i>M. obtusa</i>	100
<i>M. furfur</i>	<i>M. furfur</i>	93
<i>M. restricta</i>	<i>M. obtusa</i>	94
<i>M. japonica</i>	<i>M. furfur</i>	90
<i>M. sympodialis</i>	<i>M. furfur</i>	91
<i>M. yamatoensis</i>	<i>M. furfur</i>	83
<i>M. dermatis</i>	No hits found	0
<i>M. globosa</i>	No hits found	0
<i>M. nana</i>	No hits found	0
<i>M. pachydermatis</i>	No hits found	0
<i>M. slooffiae</i>	No hits found	0

그리고 *M. yamatoensis*는 모두 *M. furfur*와 일치한다는 결과를 얻었고, 일치율은 각각 91%, 90%, 그리고 83%이었다 (Table 3). 또한 나머지 *M. dermatis*, *M. globosa*, *M. nana*, *M. pachydermatis*, 그리고 *M. slooffiae* 5가지 균주는 어떤 균주와도 일치하지 않아 pyrosequencing을 통한 균주 동정은 실패하였다. 즉 *M. obtusa*와 *M. furfur*를 제외한 9가지 균주에서 pyrogram 결과로 얻은 표적 부위의 염기 서열과 NCBI로부터 얻은 염기 서열 정보가 일치하지 않았다. 따라서 pyrosequencing을 통한 *Malassezia* 효모균 동정은 2가지 균주를 제외하고 실패하였다 (Table 3).

고 칠

Malassezia 효모균은 건강한 성인의 75~98%에서 발견되는 정상 균무리이나 다양한 피부 질환과 관련되어 있다고 알려지면서 피부 질환과의 상관관계를 발견하기 위해 정상 및 병적 피부에서의 본 효모균의 양적 성상에 대한 평가와 분포 차이에 대한 연구가 이루어져 왔다. 그러나 과거 많은 *Malassezia* 효모균의 진균학적 연구는 배양 후 *Malassezia* colony의 크기, 표면상태, 색깔, 모양 등 형태학적 특징에 의한 분석과 효소 반응의

유무를 관찰하는 생화학적인 분석을 통해 이루어져 왔다. 이는 많은 시간이 소모되고, 동일한 형태학적 소견에 대하여 학자마다 다른 견해가질 수 있으며, 객관적인 기준설정이 모호하고, 새로운 균주에 대한 동정 및 분류에 명확한 근거를 제시하는데 한계를 가지고 있다. 뿐만 아니라 형태 및 생화학적으로 동일한 특징을 가졌다 하더라도 유전형이 다른 균종이 존재하기 때문에 분류함에 있어서 많은 한계점을 가지고 있다.

Guého 등¹¹은 분자생물학을 기본으로 하고 형태학, 미세구조학 및 생리학을 이용하여 *Malassezia* 효모균을 총 7개 균종 (*M. furfur*, *M. obtusa*, *M. globosa*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis*, *M. pachydermatis*, *M. restricta*)으로 재분류하였으나, 최근에는 다양한 분자생물학적 기법을 적용하여 새로운 4가지 균종 *M. dermatitis*¹², *M. japonica*¹³, *M. nana*¹⁴, *M. yamatoensis*¹⁵가 추가로 보고하여 *Malassezia* 효모균은 총 11균종으로 분류할 수 있다. 그러나 새로 보고된 균종은 기준에 보고된 7가지 균종과 형태 및 생화학적으로 동일하거나 유사한 특징을 가지나 유전형이 다르기 때문에 기준의 많은 *Malassezia* 효모균의 분포와 관련된 연구결과를 정확하다고 단정 지을 수 없다. 따라서 최근 연구에서 *Malassezia* 효모균의 동정 및 분류는 형태, 생리, 생화학적 특징을 이용하는 고전적인 방법보다 분석 기술과 분자생물학의 발달로 유전자의 구조 및 특징을 이용하는 분자계통학적 연구가 진행되고 있으며, 이를 분석하는 장비와 소프트웨어가 개발되고 있다^{24~33}.

최근 *Malassezia* 효모균의 동정 및 분류를 위해 시도되는 다양한 분자생물학적 방법에는 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)²⁴, amplificated fragment length polymorphism (AFLP)^{25,26}, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)²⁶, random amplification of polymorphic DNA (RAPD)^{26,27}, single strand conformation polymorphism (SSCP)²⁸, terminal fragment length polymorphism (tFLP)²⁹, restriction fragment length polymorphism (RFLP)^{30~33}, sequencing analysis³⁴ 등이 있다. 이러한 분자생물학적

방법 중 sequencing analysis (Sanger's method)는 DNA를 주형으로 삼아 표지된 DNA를 합성해 나가는 방식으로서 500 bp 전후의 염기 서열을 분석하는 방법이다. 이 방법은 균 동정, 다형성 (polymorphism), 계통학적 분석이 가능하지만 결과를 도출하기까지 시간이 많이 소모되고 방법이 매우 복잡하다. 반면에 본 연구에서 *Malassezia* 효모균의 동정 기법으로 시도한 pyrosequencing은 4개의 효소 (DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase, apyrase)와 기질을 사용하여 DNA 주형에 상보적으로 하나의 뉴클레오티드가 결합될 때마다 빛이 발생하도록 하여, 합성을 해 나가면서 DNA 염기 서열을 정확하고 빠르게 분석하는 방법이다^{35,36}. 따라서 labeled primer가 필요하지 않으며 젤 전기영동 과정 없이, DNA의 30~40 bp 정도만을 염기 서열 분석함으로써 신속하고 정확하게 균주를 동정할 수 있다. 또한 한번에 96 개의 표본을 처리할 수 있으며 수동 설정은 15 분 정도 소요되며, 총 pyrosequencing에 소요되는 시간은 90분 정도이다. Gharizadeh 등²⁸은 2003년 *Candida*와 *Aspergillus*의 동정에 pyrosequencing을 적용하여 pyrosequencing이 진균 동정 및 임상적 적용에 있어 재현성과 신뢰성 있는 유전자 서열 분석 방법 (sequencing technique)임을 밝혔다. 그리고 Nilsson 등²⁹은 2005년 담석에서 *Helicobacter* 균종을 분류하는데 pyrosequencing을 적용하여 병원성 미생물의 진단에 유용하게 이용하였다.

본 연구에서 11개 *Malassezia* 효모균의 표준 균주를 pyrosequencing으로 분석한 결과 11개 *Malassezia* 표준 균주 중 *M. obtusa*와 *M. furfur* 2 가지 균주만 각각 100%와 93%의 일치율을 보이면서 올바르게 동정되었다 (Table 3). 반면 나머지 9가지 균주 중 4가지 균주는 전혀 다른 균주와 일치하는 것으로 나타났으며, 5가지 균주는 어떤 균주와도 일치하지 않았다. 이는 *Malassezia* 효모균의 분석에 있어서 pyrosequencing 방법은 한계가 있음을 의미 한다. 본 연구에서 분석한 한계점을 정리하면 다음과 같다. (i) 첫째, *Malassezia* 효모균의 염기 서열 정보가 충분하지 않으면

pyrosequencing을 적용하는데 한계가 있다. (ii) 둘째, NCBI에 나타나 있는 sequence와 현재 본 연구에서 대상으로 한 표준 균주의 sequence가 완전하게 일치하지 않을 가능성도 고려해 볼 수 있다. (iii)셋째, DNA fragment를 최대 100 unit까지만 읽을 수 있기 때문에 보통 30~40 bp 안에서 균주를 분류 및 동정할 수 있어야 하므로 분석하고자 하는 균주에는 가변 영역이 반드시 필요하다. 그러나 본 연구에서 표적으로 분석했던 가변 영역이 11개 표준 균주를 동정할 수 있는 부분으로써 적절하지 않았을 가능성이 있다. (iv) 넷째, 똑같은 염기 서열이 5 base 이상 연속으로 존재할 경우 pyrosequencer가 이를 감지하는데 종종 오류가 발생할 수 있다. 따라서 11개 표준 균주를 pyrosequencing을 이용하여 분석하는 과정에서 이러한 오류의 가능성을 배제할 수 없다. 그 외에도 실험 과정에 필요한 software와 pyrosequencer, 그리고 소요되는 kit 등이 너무 비싸기 때문에 비용적인 문제가 있다.

본 연구에서 시도한 pyrosequencing은 *Malassezia* 효모균의 분석 방법으로서 새로운 시도로 가능성을 관찰하였다. 앞으로 임상적으로 적용하기 위해서는 본 효모균의 전체 유전자 서열을 밝히는 노력이 필요하다. 또한 유사한 유전자 구조를 갖고 있는 *Malassezia* 효모균사이에 서로 다른 가변 영역의 염기 서열을 표적으로 하는 pyrosequencing을 통하여 동정하는 추가 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결 론

본 연구에서는 pyrosequencing 방법을 *Malassezia* 효모균 동정에 적용하여 *Malassezia* 효모균으로 인한 질병의 신속한 진단 및 치료에 있어서 임상적용 가능성 여부 및 유용성을 평가하고자 하였다. 따라서 11개 *Malassezia* 표준 균주를 대상으로 pyrosequencing을 시행하였고, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Glass beads 방법을 사용하여 11종의 *Mal-*

ssezia 표준 균주의 genomic DNA를 성공적으로 분리하였고, 그 결과 11가지 표준 균주 모두에서 130 bp 크기의 PCR bands를 확인할 수 있었다.

2. 11개 *Malassezia* 표준 균주를 pyrosequencing으로 30 bp의 염기 서열 분석을 통하여 얻은 pyrogram 자료와 NCBI로부터 얻은 염기 서열 정보를 비교 분석한 결과 *M. obtusa*와 *M. furfur* 2가지 균주만 각각 100%, 93%의 높은 일치율을 보이면서 동정되었다.

3. 그러나 *M. restricta*, *M. sympodialis*, *M. japonica*, 그리고 *M. yamatoensis* 4가지 균주의 경우 전혀 다른 균주와 일치하는 것으로 나타났으며, 나머지 *M. dermatis*, *M. globosa*, *M. nana*, *M. pachydermatis*, 그리고 *M. slooffiae* 5가지 균주는 어떤 균주와도 일치하지 않아 pyrosequencing을 통한 균주 동정은 실패하였다.

참 고 문 헌

1. Klenk AS, Martin AG, Heffernan MP. Yeast infections: 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. Ljubojevic S, Skerlev M, Lipozencic J, Basta-Juzbasic A. The role of *Malassezia furfur* in dermatology. Clin Dermatol 2002; 20: 179-182
4. Kanda N, Tani K, Enomoto U, Nakai K, Watanabe S. The skin fungus-induced Th1- and Th2-related cytokine, chemokine and prostaglandin E2 production in peripheral blood mononuclear cells from patients with atopic dermatitis and psoriasis vulgaris. Clin Exp Allergy 2002; 32: 1243-1250
5. Ginarte M, Faberiro JM, Toribio J. Confluent and reticular papillomatosis (Gougerot-Carteaud) successfully treated with tacalcitol. J Dermatol Treat 2002; 13: 27-30

6. Yesudian P, Kamalam S, Razack A. Confluent and reticulated papillomatosis (Gougerot-Carteaud). An abnormal host reaction to *Malassezia furfur*. *Acta Derm Venereol* 1973; 53: 381-384
7. Chowdhary A, Randhawa HS, Sharma S, Brandt ME, Kumar S. *Malassezia furfur* in a case of onychomycosis: colonizer or etiologic agent? *Med Mycol* 2005; 43: 87-90
8. Gupta AK, Batra R, Bluhm R, Boekhout T, Dawson TL Jr. Skin disease associated with *Malassezia* species. *J Am Acad Dermatol* 2004; 51: 785-798
9. Devlin RK. Invasive fungal infections caused by *Candida* and *Malassezia* species in the neonatal intensive care unit. *Adv Neonatal Care* 2006; 6: 68-77
10. Curvale-Fauchet N, Botterel F, Leprand P, et al. Frequency of intravascular catheter colonization by *Malassezia* spp. in adult patients. *Mycoses* 2004; 47: 491-494
11. Guého E, Midgley G, Guillot J. The genus *Malassezia* with description of four new species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 69: 337-355
12. 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
13. Sugita T, Takashima M, Kodama M, et al. A 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
14. 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
15. Sugita T, Tajima M, Takashima M, et al. A new yeast, *Malassezia yamatoensis*, isolated from a patient with seborrheic dermatitis, and its distribution in patients and healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2004; 48: 579-583
16. Gharizadeh B, Norberg E, Loffler J, et al. Identification of medically important fungi by the Pyrosequencing technology. *Mycoses* 2003; 47: 29-33
17. Nilsson I, Shabo I, Svanvik J, Monstein HJ. Multiple displacement amplification of isolated DNA from human gallstones: Molecular identification of *Helicobacter* DNA by means of 16S rDNA-based pyrosequencing analysis. *Helicobacter* 2005; 10: 592-600
18. Jonasson J, Olofsson M, Monstein HJ. Classification, identification and subtyping of bacteria based on pyrosequencing and signature matching of 16S rDNA fragments. *APMIS* 2002; 110: 263-272
19. Trama JP, Mordechai E, Adelson ME. Detection and identification of *Candida* species associated with *Candida* vaginitis by real-time PCR and pyrosequencing. *Mol Cell Probes* 2005; 19: 145-152
20. Trama JP, Mordechai E, Adelson ME. Detection of *Aspergillus fumigatus* and a mutation that confers reduced susceptibility to itraconazole and posaconazole by real-time PCR and pyrosequencing. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 906-908
21. Hjalmarsson S, Alderborn A, Fock C, et al. Rapid combined characterization of microorganism and host genotypes using a single technology. *Helicobacter* 2004; 9: 138-145
22. Jordan JA, Butchko AR, Durso MB. Use of pyrosequencing of 16S rRNA fragments to differentiate between bacteria responsible for neonatal sepsis. *J Mol Diagn* 2005; 7: 105-110
23. Verri A, Focher F, Tettamanti G, Grazioli V. Two-step genetic screening of thrombophilia by pyrosequencing. *Clin Chem* 2005; 51: 1282-1284
24. Gupta AK, Boekhout T, Theelen B, et al. 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; 42: 4253-4260
25. 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
26. Gandra RF, Simao RC, Matsumoto FE, et al. Genotyping by RAPD-PCR analyses of *Malassezia furfur* strains from pityriasis versicolor and seborrhoeic dermatitis patients. *Mycopathologia* 2006; 162: 273-280
27. 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
28. Gemmer CM, DeAngelis YM, Theelen B, Boekhout T, Dawson Jr TL Jr. Fast, noninvasive method for molecular detection and differentiation of *Malassezia* yeasts species on human skin and application of the method to dandruff microbiology. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3350-3357
29. 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
30. 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
31. 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
32. 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
33. Lee YW, Lim SH, Ahn KJ. The application of 26S rDNA PCR-RFLP in the identification and classification of *Malassezia* yeasts. *Kor J Med Mycol* 2006; 11: 141-153
34. Sugita T, Kodama 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
35. Ahmadian A, Ehn M, Hofer S. Pyrosequencing: History, biochemistry and future. *Clinica Chimica Acta* 2006; 363: 83-94
36. Ronaghi M, Elahi E. Pyrosequencing for microbial typing. *J Chromatogr B* 2002; 782: 67-72