폐진균증으로 의심되는 환자의 임상검체에서 분리한 *Aspergillus* 속 균의 재동정

농업유전자원센터 미생물은행 (KACC)[1], 건양대학교 의과학대학 임상병리학과 한국의진균자원센터[2], 대한결핵협회 결핵연구원[3], 국제결핵연구소[4]

김대호[1] · 김성희[2] · 김영권[2] · 김신옥[3] · 김상재[4] · 홍승범[1]

=Abstract=

Reidentification of *Aspergillus* spp. Isolated from Clinical Specimens of Patients Suspected as Pulmonary Aspergillosis in Korea

Dae-Ho Kim[1], Sung-Hee Kim[2], Young-Kwon Kim[2], Shin-Ok Kim[3], Sang-Jae Kim[4] and Seung-Beom Hong[1]

Korean Agricultural Culture Collection, National Agro-Biodiversity Center, NAAS, RDA, Suwon, Korea[1]
Department of Biomedical Laboratory Science, Medical Science College of Konyang University, Daejeon, Korea[2]
Korean Institute of Tuberculosis, Korean National Tuberculosis Association, Seoul, Korea[3]
International Tuberculosis Research Center, Masan, Korea[4]

Korean Institute of Tuberculosis (KIT) collected 129 strains of *Aspergillus* spp. from clinical specimens of patient suspected as pulmonary Aspergillosis. On the basis of morphological characteristics, these strains were identified as *A. fumigatus* (62 strains), *A. niger* (37), *A. flavus* (26), *A. versicolor* (1), *A. nidulans* (1), *A. clavatus* (1) and *Neosartorya fennelliae* (1). These strains were re-identified according to recent *Aspergillus* classification system which is mainly based on molecular characters. The strains were grouped by Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). The representative strains from each group were sequenced with partial β-tubulin gene and compared with those of reference strains in the *Aspergillus* and were identified by the sequence. The identification was confirmed by morphological examination. As the results, they are reidentified as *A. fumigatus* (58), *A. niger* (11), *A. tubingensis* (26), *A. flavus* (27), *A. sydowii* (3), *A. nidulans* (1), *A. clavatus* (1), *Neosartorya fennelliae* (1), *N. fischeri* (1). This is also the first report of *A. tubuingensis* in clinical field in Korea.

[Kor J Med Mycol 2009; 14(3): 133-144]

Key Words: Plumonary Aspergillosis, *Aspergillus*, Identification, β-tubulin

서 론

*Aspergillus*는 사람이 사는 생활환경 어디서나 분포하며 늘 인체내로 드나들거나 피부나 점막에 편리공생으로 있다가 숙주의 특이 및 비특이적 방어기전에 결함이 있을 때 병을 일으키는 균으로써, 진균증 감수성 인구의 증가와 함께 그 증례가 늘고 있어서 점점 더 큰 문제가 되고 있다[1,2]. 현재 *Aspergillus* 속에는 180종 이상이 존재하는데, 이 중 가장 흔히 분리되는 *A. fumigatus*를

†별책 요청 저자: 홍승범, 441-853 경기도 수원시 권선구 서둔동 88-20, 농업유전자원센터 미생물은행 (KACC)
전화: (031) 299-1866, Fax: (031) 299-1869
e-mail: sbhong@rda.go.kr

포함하여 *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *A. glaucus*, *A. chevalieri*, *A. ustus*, *A. nidulans* 등이 인체에 병을 일으키는 것으로 보고되었다[3~7].

*Aspergillus*에 의한 폐아스페르길루스증의 원인균으로는 *A. fumigatus*가 가장 빈도가 높고, 그 밖에 *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* 등도 보고되어 있다. *Aspergillus*에 의한 호흡기 질환은 대부분이 공기를 통한 흡입에 의해 발생하며 정상인이 흡입하는 경우 질병을 일으키지 않지만 결핵을 앓고 공동이 생긴 환자나 면역기능이 약화된 환자의 경우 아스페르길루스증, 침습성 아스페르길루스증, 만성 괴사성 폐렴, 기관지천식, 과민성 폐장염 등을 유발할 수 있다[6].

결핵연구원에서는 1990년부터 1996년까지 폐진균증이 의심되는 환자의 임상검체에서 *Aspergillus* 속 균을 분리하여 주로 형태적 특성에 근거하여[1] *A. fumigatus* 62 균주, *A. niger* 37 균주, *A. flavus* 26 균주, *A. versicolor*, *A. nidulans*, *A. clavatus*, *Neosartorya fennelliae* 각각 1 균주로 동정하였다. 근래에 들어 *Aspergillus* 속의 분류체계는 크게 변하고 있으며 특히 *Aspergillus* section *Fumigati*에서는 *A. fumigatus*와 형태적으로는 구분되지 않으나 분자적으로 매우 다른 종들이 많이 보고되었다[8]. 따라서 본 연구에서는 결핵연구원에서 폐진균증이 의심되는 환자의 임상검체에서 분리하여 형태적으로 동정하였던 균주들을 분자생물학적인 방법에 의하여 재동정을 실시하였다. 먼저 RAPD를 실시하여 유전적으로 유사한 균주들끼리 그룹핑하고 이들의 대표균주를 선발하여 β-tubulin 유전자 염기서열을 분석하였다. 이들을 유사도가 높은 종과 유연관계도를 작성하여 동정하고 형태적으로 동정을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

실험에 사용한 국내 분리균 및 국외 도입균에 대한 자세한 내용은 Table 1에 요약되어 있다. 균주들은 MEA (Malt Extract Agar) 사면배지에 배양하여 4℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

2. RAPD에 의한 균주들의 유전적 다양성 조사

균주들을 MEB (Malt Extract Broth)에 접종하고 25℃에서 3일간 진탕배양하여 균사체를 수확하였다. 1.5 ml microtube에 수확한 균사체를 넣고 동결건조하여 마쇄한 뒤 DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany; 69106)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다.

분리균주들의 유전적 다양성을 알아보기 위해 PELF와 URP1F primer를 사용하여 홍 등[8]이 사용한 방법으로 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 1.2% agarose gel에 전기영동하여 UV하에서 관찰하였다.

3. β-tubulin 유전자 염기서열 분석에 의한 계통도 작성

선발된 17 균주들의 β-tubulin 영역을 증폭하기 위해 βt2a와 βt2b primer를 사용하였다[8]. 증폭을 위한 혼합액은 홍 등[8]이 사용한 방법과 같고 PCR 조건은 95℃에서 predenaturation 4분 후에 95℃에서 denaturation 1분, 65~70℃에서 annealing 1분, 72℃에서 extension 2분을 35회 반복하고 최종 72℃에서 extension 7분하여 일부의 exon 3 ~ Intron 6과 일부의 exon 6을 포함하는 약 370~510 bp의 밴드를 증폭시켰다.

PCR 생성물의 염기서열을 분석하기 위해 PCR_{96} Cleanup Plates (Millipore Corp. Bedford., MA 01730)를 사용하여 정제하고 염기서열을 결정하기 위하여 정제된 PCR 생성물을 Solutions for Generic Technologies (Solgent) co. Ltd.에 의뢰하여 염기서열을 해독하였다. 해독한 염기서열은 Lasergene사의 DNASTAR software (SeqMan Pro)를 이용하여 정리한 후에 MEGA v4.0의 Neighbor-Joining (NJ)[9]의 방법으로 β-tubulin 영역의 exon 3 ~ Intron 6과 일부의 exon 6 영역을 이용하여 계통수를 작성하였으며 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였다. 국내균주의 분류

Table 1. List of *Aspergillus* strains used in this study

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this Study	RAPD Group	Isolated Year	Source / Geographical Origin	β-tubulin Sequence [*1]
KIT 1059	*Aspergillus flavus*	*Aspergillus flavus*	RP1		Sputum / Seoul	−
KIT 1091	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1996	Sputum / Seoul	−
KIT 1092	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1994	Sputum / Seoul	−
KIT 1093	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1996	Sputum / Seoul	−
KACC44329 (KIT 1094)	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1991	Unknown / Seoul	KA007455
KIT 1096	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1992	Sputum / Seoul	−
KIT 1097	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1998	Sputum / Seoul	−
KIT 1098	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1		Sputum / Seoul	−
KIT 1099	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1998	Sputum / Seoul	−
KACC44330 (KIT 1100)	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1994	Sputum / Seoul	KA007456
KACC44331 (KIT 1115)	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1998	Sputum / Seoul	KA007457
KIT 1116	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1992	Sputum / Seoul	−
KIT 1117	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1998	Sputum / Seoul	−
KIT 1118	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1996	Sputum / Seoul	−
KIT 1119	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1996	Sputum / Seoul	−
KIT 1120	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1		Sputum / Seoul	−
KIT 1130	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1993	Sputum / Seoul	−
KIT 1150	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1151	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1994	Sputum / Seoul	−
KIT 1152	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1154	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1200	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1	1992	Sputum / Seoul	−
KIT 1201	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1		Sputum / Seoul	−
KIT 1202	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1		Sputum / Seoul	−
KIT 2070	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1		Sputum / Seoul	−
KIT 2071	*A. flavus*	*A. flavus*	RP1		Sputum / Seoul	−
ATCC 9643	*A. flavus*		RP1		Shoe sole / New Guinia	−
ATCC 9170	*A. flavus*		RP1		Unknown / Unknown	−
KACC44333 (KIT 1103)	*A. niger*	*A. niger*	RP2	1994	Sputum / Seoul	KA007459
KIT 1210	*A. niger*	*A. niger*	RP2	1996	Sputum / Seoul	−
KIT 2078	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Sputum / Seoul	−
KIT 2079	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Sputum / Seoul	−

Table 1. Continued

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this Study	RAPD Group	Isolated Year	Source / Geographical Origin	β-tubulin Sequence [*1]
KIT 2086	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Sputum / Seoul	−
KIT 2087	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Sputum / Seoul	−
KIT 2089	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Sputum / Seoul	−
KIT 2097	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Sputum / Seoul	−
KIT 2099	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Sputum / Seoul	−
KIT 2102	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Sputum / Seoul	−
KIT 2112	*A. niger*	*A. niger*	RP2		Unknown / Seoul	−
ATCC 22343	*A. niger*		RP2		Induced mutant / Unknown	−
ATCC 6273	*A. niger*		RP2		Unknown / Unknown	−
ATCC 32656	*A. niger*		RP2		Unknown / Unknown	−
KACC44334 (KIT 1104)	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3	1995	Sputum / Seoul	KA007460
KIT 1205	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KACC44335 (KIT 1209)	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3	1996	Sputum / Seoul	KA007461
KIT 2073	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2074	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2075	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2076	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2077	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2080	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2081	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2082	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2083	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2084	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2085	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2088	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2090	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2091	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2093	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2094	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2095	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2096	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2098	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−

Table 1. Continued

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this Study	RAPD Group	Isolated Year	Source / Geographical Origin	β-tubulin Sequence [*1]
KIT 2100	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2101	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2106	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Sputum / Seoul	−
KIT 2114	*A. niger*	*A. tubingensis*	RP3		Unknown / Seoul	−
KACC44336 (KIT 1007)	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1990	Sputum / Seoul	KA007462
KIT 1084	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1993	Sputum / Seoul	−
KACC44337 (KIT 1177)	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	KA007463
KIT 1178	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1179	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1180	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1182	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1183	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1184	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1185	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1186	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1187	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1188	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 1191	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1997	Sputum / Seoul	−
KIT 1192	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1993	Horse / Seoul	−
KIT 1193	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4	1995	Sputum / Seoul	−
KIT 2004	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2005	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2006	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2008	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2011	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2018	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2019	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2020	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2021	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2022	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2023	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2024	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2025	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−

Table 1. Continued

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this Study	RAPD Group	Isolated Year	Source / Geographical Origin	β-tubulin Sequence [*1]
KIT 2026	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2027	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2029	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2033	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2034	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2035	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2036	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2037	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2038	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2041	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2042	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2044	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2045	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2046	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2047	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2049	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2051	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2052	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2054	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2056	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2059	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2062	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2063	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2065	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2066	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2067	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KIT 2072	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	−
KACC44338 (KIT 2110)	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Sputum / Seoul	KA007464
KIT 2113	*A. fumigatus*	*A. fumigatus*	RP4		Unknown / Seoul	−
ATCC 42202	*A. fumigatus*		RP4		Sputum / USA	−
KACC44332 (KIT 1214)	*A. fumigatus*	*A. flavus*	RP1	1996	Sputum / Seoul	KA007458
KACC44340 (KIT 1070)	*A. fumigatus*	*A. sydowii*	RP6	1992	Sputum / Seoul	KA007466

Table 1. Continued

Strain No.	Morphological Identification (KIT)	Reidentified in this Study	RAPD Group	Isolated Year	Source / Geographical Origin	β-tubulin Sequence [*1]
KACC44341 (KIT 1073)	*A. fumigatus*	*A. sydowii*	RP6	1993	Sputum / Seoul	KA007467
KACC44345 (KIT 2060)	*A. fumigatus*	*Neosartorya fischeri*	RP10		Sputum / Seoul	KA007471
KACC44342 (KIT 1175)	*A. nidulans*	*A. nidulans*	RP5	1996	Horse / Seoul	KA007468
ATCC 10074	*A. nidulans*		RP5		Unknown / Belgium	−
KACC44339 (KIT 1051)	*A. versicolor*	*A. sydowii*	RP6	1995	Sputum / Seoul	KA007465
ATCC 11730	*A. versicolor*		RP7		Cellophane gas mask / India	−
KACC44343 (KIT 1102)	*A. clavatus*	*A. clavatus*	RP8	1994	Sputum / Seoul	KA007469
KACC44344 (KIT 1137)	*N. fennelliae*	*N. fennelliae*	RP9	1974	Unknown / Unknown	KA007470
NRRL 1^T	*Aspergillus clavatus*				Unknown / Unknown	EF669802
NRRL 163^T	*A. fumigatus*				Chicken, lung / USA	EF669791
NRRL 187^T	*Emericella nidulans*				Unknown / Belgium	EF652251
NRRL 238^T	*A. versicolor*				Unknown / Unknown	EF652266
NRRL 250^T	*A. sydowii*				Unknown / Unknown	EF652274
NRRL 326^T	*A. niger*				Tannin-gallic acid fermentation / USA	EF661089
NRRL 1957^T	*A. flavus*				Cellophane diaphragm of an optical mask / South Pacific	EF661485
NRRL 5535^T	*Neosartorya fennelliae*				Rabbit eye / USA	EF669850

[*1]: The sequences of KA numbers can be obtained from KACC homepage (http://kacc.rda.go.kr) and those of EF and AY numbers can be obtained from NCBI GenBank.

적 위치를 비교하기 위해서 NCBI GenBank의 염기서열을 획득하여 함께 유연관계도를 작성하였다.

결 과

1. RAPD에 의한 균주들의 유전적 다양성 조사

PELF, URP1F primer를 사용한 RAPD-PCR 결과 다양한 밴드를 형성하였고 총 10개 그룹으로 분리되었다 (Fig. 1, Table 1). 먼저 기존에 *Aspergillus fumigatus*로 동정되었던 62 균주는 58 균주가 RAPD band pattern group (RP) 4에 위치하였고 나머지 4 균주는 RP 1, RP 6, RP 10에 위치하였다. 기존에 *A. niger*로 동정되었던 37 균주는 11 균주가 RP 2에 26 균주가 RP 3에 위치하였다. 또한 기존에 *A. flavus*로 동정된 26 균주는 모두 RP 1에 위치하였다. 그리고 *A. nidulans*, *A. versicolor*, *A. clavatus*, *Neosartorya fennelliae* 등은 각각 RP 5, RP 6, RP 8, RP 9에 소속되어 서로 다른 밴드양상을 보였다.

2. β−tubulin 유전자 염기서열 분석에 의한 계통도 작성

균주들의 분자적 동정을 위하여 β-tubulin 영

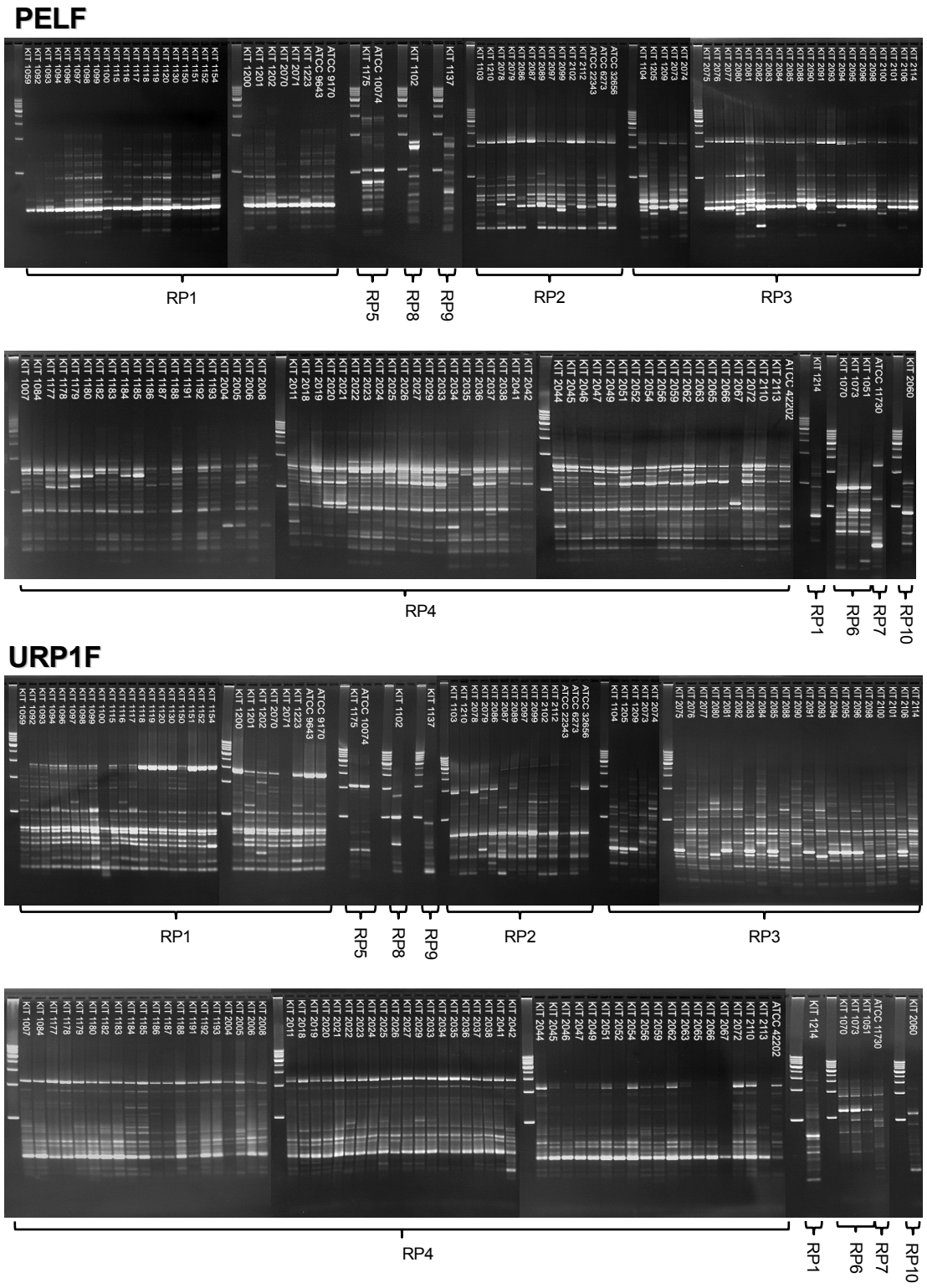

Fig. 1. RAPD patterns of *Aspergillus* strains by primers, PELF and URP1F.

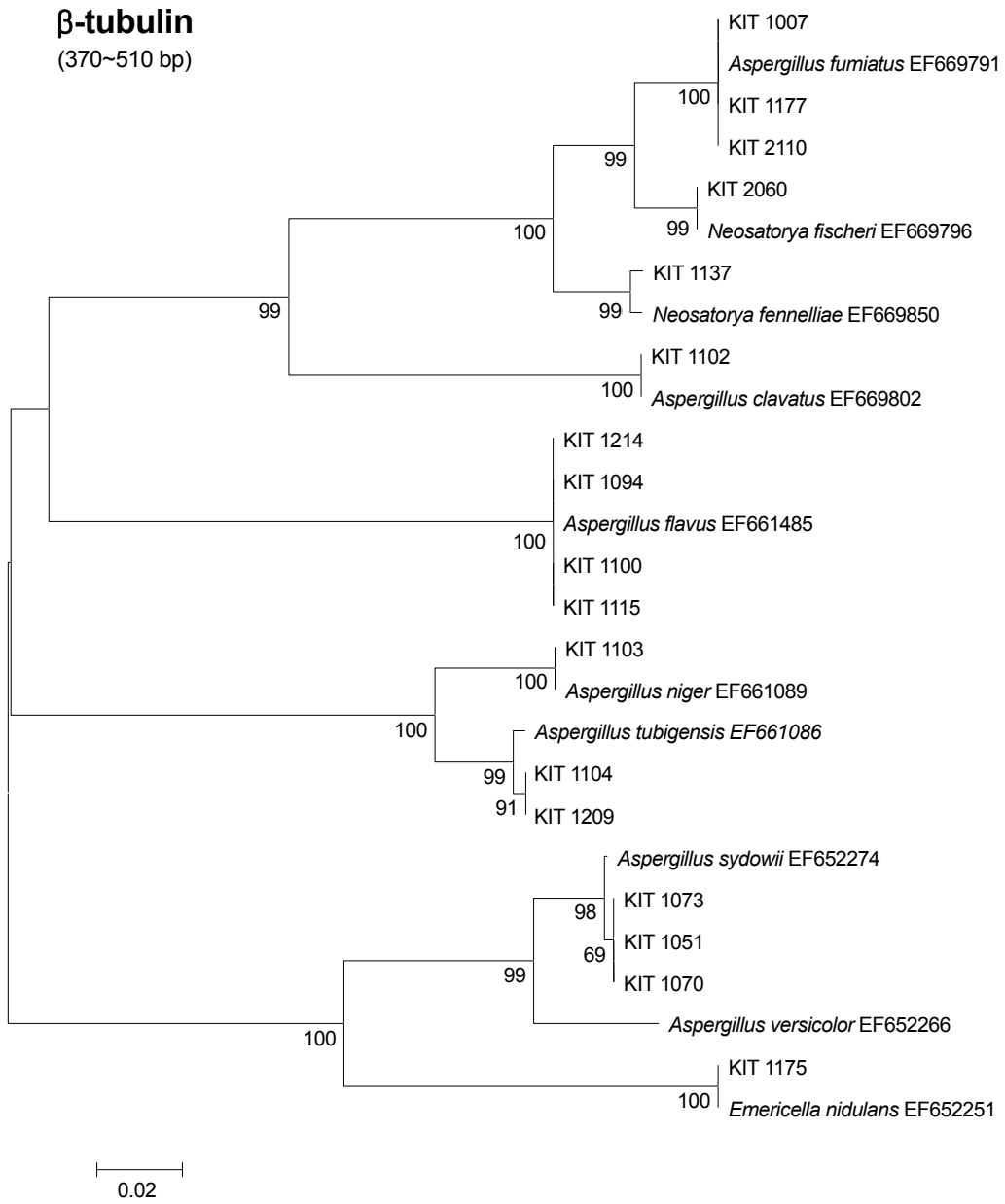

Fig. 2. Phylogenetic tree of *Aspergillus* spp. isolated from sputum of patient suspected as pulmonary aspergillosis in Korea. The tree was constructed from Neighbor-Joining analysis of β-tubulin sequence. The numbers above the nodes represent bootstrap values (out of 1,000 bootstrap replication).

역의 염기서열을 분석을 실시하였는데 두 개의 primer를 이용한 RAPD 결과와 균주들의 분리원, 분리연도, 등을 기준으로 17 균주를 선발하여 실시하였다 (Table 1). 선발된 17 균주의 계통도 (Fig. 2)에서 KIT 1007, KIT 1177, KIT 2110은 *A. fumigatus*와, KIT 1094, KIT 1100, KIT 1115, KIT 1214 균주는 *A. flavus*와, KIT 1103 균주는 *A. niger*와 그리고 KIT 1104, KIT 1209 균주는 *A. tubingensis*와 하나의 그룹을 형성하였다. 또한 KIT 1051, KIT 1070, KIT 1073은 *A. sydowii*와,

KIT 1102는 *A. clavatus*와, KIT 1175은 *Emericella nidulans*와, KIT 1137은 *Neosartorya fennelliae*와, KIT 2060은 *N. fischeri*와 동일그룹을 형성하여 해당 종으로 동정될 가능성을 보였다.

3. *Aspergillus* 속 균의 동정

β-tubulin 유전자 염기서열 계통도에서 *A. fumigatus*와 같은 그룹을 형성한 RP 4의 대표균주인 KIT 1007, KIT 1177, KIT 2110 균주들은 형태적으로 확인한 결과 *A. fumigatus*와 유사한 특징을 보여 RP 4에 속한 균주들은 *A. fumigatus*로 동정되었다. 그리고 *A. flavus*와 같은 β-tubulin 유전자 그룹을 형성한 KIT 1094, KIT 1100, KIT 1115, KIT 1214가 속한 RP 1의 균주들은 형태적으로도 *A. flavus*와 유사하여 *A. flavus*로 동정되었다. 또한 *A. niger*의 β-tubulin 유전자 그룹에 속한 RP 2의 KIT 1103 균주와 *A. tubigensis*의 β-tubulin 유전자 그룹에 속한 RP 3의 KIT 1104, KIT 1209 균주들은 형태적 특징 확인결과 두 그룹이 유사하였지만 유전적 특징에 의해 각각 *A. niger*와 *A. tubigensis*로 동정되었다. 그 밖에 β-tubulin 유전자 염기서열 계통도에서 *A. sydowii*와 같은 그룹에 속한 KIT 1051, KIT 1070, KIT 1073 균주들, *E. nidulans*와 같은 그룹에 속한 KIT 1175 균주, *A. clavatus*와 같은 그룹에 속한 KIT 1102 균주, *N. fennelliae*와 같은 그룹에 속한 KIT 1137 균주, *N. fischeri*와 같은 그룹에 속한 KIT 2060 균주는 각각 형태적 특징으로도 동일 결과를 보여 각각 β-tubulin 유전자 그룹과 같은 종으로 동정되었다.

고 찰

최근 *Aspergillus*의 분류체계가 DNA 염기서열을 이용한 방법으로 바뀌고 있다. DNA 염기서열을 이용한 방법 중 흔히 쓰이는 방법으로는 Internal Transcribed Spacer (ITS)와 β-tubulin, calmodulin, actin, LSU rDNA 영역 등이 있다[8,10~14]. 이 중 β-tubulin 영역은 종간 분별력이 높고 비교 염기서열의 획득이 용이한 유전자 중 하나다.

PELF와 URP1F primer를 이용한 RAPD 분석결과 실험에 사용한 *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. tubingensis*, *E. nidulans*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. clavatus*, *N. fennelliae*, *N. fischeri* 등 10종이 다른 유전자 밴드를 형성하여 각 종간의 유전적 분류가 가능하였다. 신 등[4]의 임상검체에서 분리된 63 균주 6종의 *Aspergillus* 속 균에 대한 RAPD 분석결과 실험에 사용한 *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. nidulans*, *A. sydowii* 균주들 중 *A. niger* 2 균주와 *A. nidulans* 1 균주를 제외한 나머지 60 균주가 RAPD 분석으로 종 분류가 가능하여 본 실험과 유사한 결과를 보였다.

의진균 중 가장 흔히 볼 수 있는 *A. fumigatus*의 경우 62 균주 중 대부분의 균주인 58 균주가 *A. fumigatus*로 재동정되었고 2 균주가 *A. sydowii*로 재동정되었으며 나머지 2 균주는 *A. flavus*와 *N. fischeri*로 재동정되었다. 홍 등[14]의 연구에서 국내외에서 수집한 *A. fumigatus* 141 균주를 대상으로 RAPD와 β-tubulin 유전자 분석을 이용한 재동정 결과 6 균주가 형태적으로 유사한 *A. lentulus*, *A. viridinutans*, *Neosartorya nishimurae*, *N. udagawae*로 재동정되었다. 하지만 본 실험에서는 *A. fumigatus* 62 균주의 경우 대부분의 균주들이 *A. fumigatus*로 재동정되었고 1 균주가 형태적으로 유사한 *N. fischeri*로 재동정되었다. 반면, *A. sydowii*, *A. flavus*로 동정된 3 균주들의 경우 오동정된 것으로 생각된다.

형태적으로 *A. niger*로 동정된 37 균주들의 경우 11 균주만이 *A. niger*로 재동정되었고 나머지 26 균주들은 *A. tubingensis*로 재동정되었다. Black *Aspergilli* (*Aspergillus* section *Nigri*)는 형태적으로 유사하여 분류와 동정이 어려운 그룹 중 하나이지만 최근 분자생물학적 특징을 이용한 동정방법이 개발되었을 뿐만 아니라 rDNA-ITS 영역을 이용한 종특이 primer도 개발이 되었다[11]. 이처럼 형태적으로 유사한 특징을 보이는 *A. niger*와 *A. tubingensis*를 구분하기 위해서는 분자생물학적 특징 분석이 필수적인 것으로 생각된다. 그리고 본 실험에서 사용한 RAPD와 β-tubulin 유전자 분

석 또한 두 종을 구분할 수 있는 특징으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

형태적으로 *A. versicolor*로 동정된 1 균주의 경우 *A. sydowii*로 재동정되었는데 두 종의 경우 형태적으로 균총의 색깔이나 conidia의 차이로 구분되지만[15] 이 형태적 차이만으로 종을 구분하기는 쉽지 않다. Peterson[13]의 calmoduln, ITS와 lsu rDNA, RNA polymerase II를 이용한 MLST (Multi Locus Sequence Type) 분석에서 두 종의 구분이 가능하였다. 본 실험에서의 분자생물학적 특징 분석결과 RAPD 분석과 β-tubulin 유전자 분석 모두에서 두 종을 구별할 수 있었다. 이 또한 PELF와 URP1F primer를 이용한 RAPD 분석과 β-tubulin 유전자 분석이 *A. niger*와 *A. tubigensis*의 구분뿐만 아니라 *A. versicolor*와 *A. sydowii* 두 종을 구분할 수 있는 특징으로 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

형태적으로 *A. flavus*로 동정된 26 균주의 경우 분자생물학적 분석결과 모든 균주들이 *A. flavus*로 재동정되어 형태적 동정결과와 동일한 결과를 보였다. 또한 형태적으로 *A. nidulans* (1), *A. clavatus* (1), *N. fennelliae* (1)로 동정된 균주들의 경우 분자생물학적으로도 형태적인 동정과 동일한 결과를 보였다.

이와 같이 형태적인 동정만으로 종 분류를 하는 것은 어려움이 있다. 하지만 RAPD, β-tubulin 등 분자생물학적 특징들을 함께 이용할 경우 보다 정확한 종 분류가 가능할 것이다. 진균 분류에 있어서 형태적인 특징이 중요하긴 하지만 그 비중이 상대적으로 줄어들고 분자생물학적 특징의 역할이 커져가고 있는 실정이다. 뿐만 아니라 분자생물학적인 특징은 형태적인 특징에 비해 연구자들간의 정보공유에 있어서 보다 정확하고 편리하다는 장점을 지니고 있다. 상대적으로 그 중요성이 커지고 있는 분자생물학적 특징뿐만 아니라 형태적 특징을 효과적으로 활용하기 위해서는 균주들의 효과적인 관리가 시급한 상황이다. 본 연구에서 사용한 균주들은 결핵연구원에서 1990~1998 동안 수집한 균주들로 사용하였지만 전문 보존기관이 아닌 일반 연구소에서 많은 균주를 장기간 보존하는 일은 경제적으로나 시간적으로 쉽지 않은 일이다. 국내균주들을 활용한 연구를 위해 전문 보존기관을 이용하는 것이 앞으로의 연구에 많은 도움이 될 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 실험에 사용한 균주들을 한국의진균자원센터 (Korean Collection of Medical Fungi; KCMF)와 한국농업미생물자원센터 (Korean Agricultural Culture Collection; KACC)에 보존하였고 분석한 β-tubulin 유전자 염기서열은 한국농업미생물자원센터에 등록하였다 (http://kacc.rda.go.kr).

결 론

결핵연구원에서 1990~1998년까지 국내 폐진균증이 의심되는 환자의 임상검체에서 분리하여 형태적으로 동정한 129 균주를 최근에 구축된 *Aspergillus* 신분류체계에 따라 재동정하였다. 먼저 Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)를 통하여 균주들을 그룹핑하고 대표균주를 선발하여 β-tubulin 유전자의 염기서열을 분석한 후에 표준 및 참고균주와 비교하여 분자적동정을 하고 형태적으로 확인하였다. 그 결과 기존에 형태적분류에서 *A. fumigatus*로 동정되었던 62 균주는 58 균주가 다시 *A. fumigatus*로 동정되었고 나머지 균주는 *A. sydowi* (2), *A. flavus*, *N. fischeri*로 동정되었다. 또한 *A. niger*로 동정되었던 37 균주는 11 균주만이 *A. niger*로 동정되었고 나머지 26 균주는 *A. tubingensis*로 동정되었다. 반면 기존의 *A. flavus* 26 균주를 포함한 다른 균주들은 분자적 분류에서 기존의 형태적 분류와 같은 결과를 보였다. 결국 *Aspergillus* 속 균 129 균주는 *A. fumigatus* (62 균주), *A. niger* (37), *A. flavus* (26), *A. versicolor* (1), *A. nidulans* (1), *A. clavatus* (1), *Neosartorya fennelliae* (1)로 재동정되었으며, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. tubingensis*, *A. niger* 등이 1990년대 폐진균증이 의심되는 환자의 임상검체에서 분리되는 *Aspergillus*의 주종을 이루었다.

REFERENCES

1. Raper KB, Fennel DI. The genus *Aspergillus*. The Williams and Wilkins Co. Baltmore 1965
2. Emmons CW, Binford CM, Utz JP, Kwon-Chung KJ. Medical Mycology, 3rd ed. Lea and Febiger 1977
3. Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC. Identification of the common food-borne fungi, In: Samson RA, Hoekstra ES, Frisvad JC, editors. Introduction to food- and airborn fungi, 7th ed. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures 2004; 64-97
4. Shin JH, Lee CJ, Lee JY, et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for *Aspergillus* species isolated from clinical specimens. Korean J Med Mycol 2001; 4:33-39
5. Chong YS, Ro BI. Cutaneous Aspergillosis. Korean J Med Mycol 2002; 7:6-13
6. Chang YS, Kim YY. Pulmonary Aspergillosis. Korean J Med Mycol 2002; 7:63-68
7. Shin JH, Park MR, Song JW, Shin DH, et al. In-virto susceptibilities of voriconazole against Korea clinical *Aspergillus* isolates. Korean J Med Mycol 2004; 9: 166-173
8. Hong SB, Go SJ, Shin HD, Frisvad JC, Samson RA. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. Mycologia 2005; 97: 1316-1329
9. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 2004; 5: 150-163
10. Balajee SA, Houbraken J, Verweij PE, et al. *Aspergillus* species identification in the clinical setting. Stud Mycol 2007; 59: 39-46
11. Varga J, Kocsubé S, Tóth B, et al. *Aspergillus brasiliensis* sp. nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. Int J Syst Evol Microbiol 2007; 57: 1925-1932
12. Samson RA, Noonim P, Meijer M, et al. Diagnostic tools to identify black aspergilli. Stud Mycol 2007; 59:129-145
13. Peterson SW. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia 2008; 100: 205-226
14. Hong SB. Re-identification of *Aspergillus fumigatus* sensu lato including 98 clinical strains based on new concept of species delimitation. In: Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* Section *Fumigati* and its Teleomorph, Neosartorya. Ph. D. thesis in Korea University. 2006; 49-69
15. Klich MA. Identification of common *Aspergillus* species. The Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2002