대한의진균학회지 제 7권 제 1호 2002

■ 초청 원고 ■

피부사상균에 대한 분자생물학적 연구 동향

서울대학교병원운영 시립보라매병원 피부과

김 정 애

=Abstract=

Molecular Biological Approaches to the Study of Dermatophytes

Jeong Aee Kim

Department of Dermatology, Seoul Municipal Boramae Hospital Affiliated to Seoul National University Hospital, Seoul, Korea

Dermatophytes are keratinophilic fungi responsible for superficial infections called dermatophytoses and composed of three anamorphic genera, *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. The identification of these species by mycological methods is sometimes difficult and time-consuming. Moreover, suitable methods for subtyping of these species are not established yet. Therefore, several approaches using molecular biological methods have been proposed to identify dermatophyte species and to clearly define their taxonomic and phylogenetic relationship to the teleomorphs and to other dermatophyte species. For identification, distinction among isolates to the species level was easily performed using molecular biological methods, particularly for atypical isolates. In contrast, in all but a few cases, distinction between dermatophyte strains failed. The development of new techniques to reveal molecular polymorphisms in dermatophytes is required. **[Kor J Med Mycol 7(1): 1-5]**

Key Words: Dermatophyte, Identification, Subtyping, Molecular biology

서 론

근래 AIDS 환자, 장기 이식환자 및 항암제 투여 환자와 같은 면역 억제 상태의 환자가 늘어남에 따라 이러한 환자에게서 발생하기 쉬운 심재성 진균질환에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되어 왔다. 상대적으로 표재성 진균질환에 대한 연구는 그 동안 별다른 관심을 받지 못하였는데 이에 따라 이 질환은 아직도 매우 흔하게 발생하여 많은 사람들에게 고통을 주고 있다. 미국의 예를 들면, 피부과 관련 투약료의 약 40%가 표재성 진균질환을 치료하기 위하여 사용되고 있다고 한다. 다행히 표재성 진균질환에 대한 연구가 중요하다는 사실을 연구자들이 최근 다시 인식하기 시작하였다. 2000년 5월 아르헨티나에서 열린 제 14차 세계의진균학회 총회에서 영국의 Evans 교수는 "표재성 진균질환 – 잠에서 깨어나고 있는 거인"이라는 제목의 개회 연설을 통하여 표재성 진균질환은 아직 극복되지 않은 질환이며 이에 대한 연구가 더욱 필요함을 강조하였다. 또한 그는 표재성 진균질환의 연구에 있어서 분자생물학적인 방법이 크게 기여하고 있으며, 앞으로도 많은 성과가 기대된다고 하였다[1]. 본 논문에서는 표재성 진균질환을 일으키는 원인균 중 가장 중요한 원인균인 피부사상균에 대하여 분자생물학적인 연구 방법을 통하여 현재까지 밝혀진 사실과 앞으로의 추구하여야 할 연구 과제에

†별책 요청 저자: 김정애, 156-707 서울시 동작구 신대방 2동 395번지 보라매병원 피부과
전화: (02) 840-2190, Fax: (02) 831-0714
e-mail: jakim@snu.ac.kr

대하여 알아보고자 한다[2].

1. 피부사상균의 계통 (phylogeny) 및 분류 (taxonomy)에 대한 연구

피부사상균은 같은 균종 내에 여러 가지 다양한 표현형을 가진 균주를 포함하고 있으며, 또한 어떤 균주의 표현형은 배양 조건에 따라 쉽게 변화하거나 소실될 수도 있다. 따라서 표현형을 기준으로 하여 이루어진 기존의 피부사상균의 분류는 복잡하고 체계적이지 않았다. 피부사상균에 대한 분자생물학적 연구는 1980년, 피부사상균 34종의 chromosomal DNA의 base composition을 알아보는 연구에서부터 시작되었다[3]. 연구 결과 34종의 피부사상균의 G+C molar fraction은 48.7% 내지 50.3%로 *Aspergillus* spp.의 경우에 G+C molar fraction이 48% 내지 61%인 것과 비교하여 매우 좁은 범위에 속하였다. 이는 피부사상균이 균종에 따라 그 표현형 및 생태학적 특징은 아주 다양하지만 유전적으로는 매우 동일하다는 것을 나타내는 것이었다. 한편 1980년대 말에는 mitochondrial DNA를 restriction endonuclease로 처리하여 나온 DNA 절편의 pattern을 가지고 연구를 하는 방법인 mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism (RFLP)에 의한 연구가 활발하게 이루어졌다. 이 방법에 의한 주요 연구 결과로는 과거 피부사상균의 완전형으로 알려졌던 *Nannizia*와 *Arthroderma* (*A.*)가 동일하다는 것과, 불완전형의 피부사상균을 *Trichophyton*(*T.*), *Microsporum*(*M.*) 및 *Epidermophyton*의 3가지 균속으로 나누고 있는데 이들은 모두 같은 조상에서 유래되었다는 사실 (congeric), 또한 아직 그 완전형이 알려져 있지 않은 *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*는 *T. mentagrophytes*의 완전형의 일종인 *A. vanbreuseghemii*와 동일한 유전형을 가지고 있다는 결과 등이 있다. 그러나 mitochondrial DNA RFLP에 의한 DNA 절편의 pattern은 매우 단순하여 균속 이하의 상세한 정보를 알기가 어려웠다. 따라서 1990년대 초반부터는 nuclear ribosomal RNA gene의 핵산서열을 알아내어 이를 이용하여 진균들 사이의 유전적인 관계 여부를 알아내고자 하는 시도를 하게 되었다. 처음에는 large ribosomal subunit인 25S rDNA의 염기서열을 분석하여 보았으나 이 결과로서는 각 균속 간의 차이도 확실하게 알 수 없었는데, 이는 피부사상균이 최근에 진화의 과정을 가졌음을 의미하는 것이다. 이어서 small ribosomal unit인 18S rDNA의 염기서열을 분석하였으며 이 부분은 25S rDNA 보다 균종 별로 좀더 다양한 결과를 알 수 있으므로 이를 이용하여 대부분의 균종을 감별할 수 있었다. 그러나 18S rDNA 염기서열 결과로도 여전히 감별이 되지 않는 균종들이 있었으며, 이러한 결과를 종합하여 볼 때 피부사상균은 유전적으로 하나의 조상에서부터 진화하였으며 (monophyletic), 약 5000 만년 전부터 포유류의 진화와 함께 진화하여 여러 가지 균종으로 나누어 졌다고 결론을 낼 수 있었다.

이와 같이 25S rDNA 및 18S rDNA의 유전 정보만으로는 각 균종에 특이한 염기서열을 알 수 없었으며, 따라서 각 균종간의 계통학적인 관계를 잘 알 수 없었으므로 1990년대 중반부터는 좀더 많은 다양성을 나타내는 부분인 internal transcribed spacer region (ITS)의 염기서열을 분석하기 시작하였다. Grãser 등은 기존에 *T. mentagrophytes* complex로 알려진 균종들과 *T. tonsurans*를 포함하는 총 24종의 유사한 피부사상균에 대하여 이들의 ITS 부분의 염기서열을 분석하여 본 결과 이들을 단지 5개의 균종, 즉 *T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* (related to *A. vanbreuseghemii*), *T. erinacei* (related to *A. benhamiae*), *T. simii* (anamorph of *A. simii*) 및 *T. tonsurans*로 분류할 수 있다고 보고하였다[4]. 이들의 주장은 mitochondria DNA의 RFLP pattern, chitin synthetase 1(*CHS1*) gene 염기서열분석 및 ITS1 부분의 염기서열분석 결과[5]와 일치하는 것으로 기존의 표현형에 의한 분류와도 상충되는 것은 아니었다. 이들은 최근 *T. rubrum*, *T. violaceum* 및 이들의 유사 균종 (총 15 균종 및 variety)에 대하여 ITS 부분의 염기서열을 분석한 결과 이들을 모두 *T. rubrum*이나 *T. violaceum*에 포함시킬 수 있었다고 보고하였다[6]. 한편 Summerbell 등[7]은 *T. rubrum*과 유사 균주들의 ITS 부분의 염기서열을 분석하여 본 결과, *T. rubrum*의 염기서열은 *T. raubitschekii*, *T. fischeri* 및 *T. kanei*의 염기서열과 동일하였고, *T. soudanense* 및 *T. megninii*의 염기서열과는 거의 동일함을 발견하였다. 그럼에도 불구하고 Summerbell 등은 이들 균종들의 생태학적인 특징이 서로 매우 다르기 때문에 이들을 계속 독립된 균종으로 유지시

켜야 한다고 주장하였다. 이와 같이 형태학적 또는 생태학적으로 뚜렷한 차이점이 있는 균종들의 유전형이 동일하다고 밝혀진 경우에 이들을 하나의 균종으로 통합하여야 할 지, 아니면 서로 다른 균종으로 유지시켜야 할 지는 앞으로 더 많은 연구가 필요하다고 생각된다.

2. 피부사상균의 진단 및 역학적 연구

1) 피부사상균의 동정

피부사상균의 동정은 대개 집락의 모양 및 현미경하에서 균사와 포자의 형태학적 특징을 관찰하여 내리고 있다. 그러나 피부사상균의 형태는 한가지 균종 내에서도 다양하며 배양 조건에 따라 달라질 수가 있고, 특히 계대 배양을 오래 할 경우는 융모 변성을 일으켜서 전형적인 모습을 상실하게 된다. 형태학적 특징의 관찰로 동정이 어려운 경우 urease 생성 검사, 비타민 요구성 검사, 모발 천공 검사 및 교배 실험과 같은 진균학적 검사를 시행하게 되는데 이러한 검사들을 시행하기 위해서는 경험이 필요하고 시간이 오래 걸리며, 때로 이러한 검사를 실시한 후에도 동정이 확실하지 않을 수 있다. 1990년대 초부터 피부사상균의 동정에도 여러가지 분자생물학적 기법이 시도되어 왔는데, 이중 특히 random amplification of polymorphic DNA (RAPD) 또는 arbitrarily-primed PCR (AP-PCR) 방법은 원인 진균의 염기서열을 모를 경우에도 적용할 수 있으므로 매우 편리하게 이용할 수 있다[8~11].

RAPD 법을 이용하면 대개 2~3일 정도의 짧은 시간 내에 정확하게 피부사상균을 동정할 수 있으며, 한번에 약 25종 정도의 피부사상균을 동정할 수 있다. 그러나 RAPD 법은 random primer를 사용하여 PCR을 하여야 하므로 annealing 온도를 40℃ 이하로 낮게 설정하여야 하고, 따라서 재현성의 문제가 있을 수 있다. 또한 다른 실험실 간의 data를 서로 비교하여 볼 수 없다는 단점이 있다. 따라서 근래에는 ITS1 부분의 염기서열 정보를 진균의 동정에 많이 이용하고 있다[5,12,13]. 결론적으로 분자생물학적인 방법을 이용한 피부사상균의 동정은 이미 균종 단계 (species level)까지 잘 확립이 되어 있으며, 이러한 방법은 특히 비전형적인 모습을 보이는 분리주의 동정에 매우 유용하게 사용될 수 있다[11].

2) 임상 검체에서 피부사상균의 DNA의 검출

임상 검체에서 원인 진균을 배양하는데는 최소 1주일 이상의 시간이 소요되므로, 검체에서 직접 진균의 DNA를 추출하여 분자생물학적인 방법을 이용하여 진균을 동정을 한다면 매우 신속하게 진단을 할 수 있을 것이다. 실제로 균종에 특이한 olgonucleotide를 이용하여 hybridization을 하는 방법, RFLP를 실시하는 방법[14] 등을 이용한 논문이 있다. 그러나 이러한 방법은 피부나 모발, 조갑 등에 진균이 오염된 경우와 실제로 감염된 경우를 구별하지 못한다는 것과, 실제로 환자 검체에 적용하기에는 비용이 너무 많이 든다는 문제점이 있다. 이러한 문제점들이 해결되어야 실제로 임상에서 활용될 수 있을 것이다.

3) 역학적 연구에의 응용

어떤 원인균의 감염 경로를 알고자 하거나, 또는 어떤 질환이 재발된 경우 같은 균에 의한 재발 (treatment failure)인지 아니면 다른 균에 의한 감염 (reinfection)인지 등을 알고자 할 때, 즉 역학적 연구를 수행하기 위한 전제 조건은 같은 균종 내에 속하는 서로 다른 균주를 감별할 수 있는 방법이 확립되어 있어야 한다는 것이다. 따라서 많은 연구자들이 피부사상균의 균주 간 감별법 (형별 판정법, subtyping)을 개발하기 위하여 노력하여 왔으며, 최근 들어 그 유전형이 가장 동질한 것으로 알려진 인체기호성 피부사상균도 subtyping에 성공하였다는 연구 결과가 보고되고 있다. Kac 등은 *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* 46주에 대하여 RAPD를 실시하여 23 pattern의 유전형을 관찰하였다[15]. 한편 Jackson 등은 *T. rubrum*의 nontranscribed spacer (NTS) 부분을 증폭한 후 RFLP를 실시하여 14개의 서로 다른 DNA band pattern을 관찰할 수 있었다[16]. 또한 그들은 *T. rubrum*의 NTS 부분에서 중복하여 나타나는 염기서열을 발견하여 이를 증폭하기 위한 specific primer를 고안하였는데, 이 primer를 사용하여 101개의 *T. rubrum* 임상 검체에서 23개의 DNA pattern을 관찰할 수 있었다[17]. 또한 band pattern 별로 그 검출 빈도가 달랐는데, 검출 빈도가 높은 균주들은 숙주에 대한 적응력이 높을 것으로 생각되었으며, 균주의 숙주에 대한 적응력은 균주의 독성이나 감염력과 관계가 있을 것으로 추측하여 볼 수 있었다. 이와 같이 유전적인 동질성이 가장 높으면서도 현재 표재성 진균질환의 가장

중요한 원인균이 되고 있는 *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* 및 *T. rubrum*에 대하여도 분자생물학적인 방법을 이용하여 subtyping을 할 수 있게 되었으며, 이는 향후 피부사상균증의 역학적 연구 및 발병기전의 연구에 획기적인 발전이 있을 것이라는 것을 의미한다. 이를 위하여 향후 균주에 따른 다양한 DNA band pattern을 균주의 표현형, 즉 집락의 모양이나 항진균제에 대한 반응, 검체가 검출된 병변의 종류 및 검출 지역 등과 같은 특징과 연결하기 위한 연구가 더욱 필요하다고 생각된다.

결 론

피부사상균은 형태학적으로는 아주 다양함을 나타내는 진균이지만 여러 가지 분자생물학적인 방법을 이용하여 연구하여 본 결과 유전적으로는 매우 동질한 진균이라는 것을 알 수 있었으며, 하나의 조상으로부터 유래하여 약 5000만년 전부터 포유류와 함께 진화되어 왔다는 것이 밝혀졌다. 또한 분자생물학적인 방법을 통하여 분류가 애매 모호하였던 여러 가지 피부사상균들의 분류학적인 위치도 명확하게 알 수 있었다. 한편 분자생물학적인 방법을 이용한 피부사상균의 동정은 이미 균종 단계까지 잘 확립이 되어 있으나 이를 일상적인 검사 방법으로 실용화하기는 아직 어렵다고 할 수 있다. 최근 피부사상균에 대하여도 분자생물학적인 방법을 이용한 형별 판정법이 개발되고 있으며 이는 향후 피부사상균증의 역학적 연구 및 발병 기전의 연구에 많은 발전이 있을 것이라는 것을 의미한다.

참 고 문 헌

1. Evans EGV. Superficial mycoses: The reawakening giant. Abstract's book of the 14th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, 2000 May 8-12; Buenos Aires, Argentina
2. Kac G. Molecular approaches to the study of dermatophytes. Med Mycol 2000; 38: 329-336
3. Davison FD, Mackenzie DWR, Owen RJ. Deoxyribonucleic acid base compositions of dermatophytes. J Gen Microbiol 1980; 118: 465-470
4. Grãser Y, Kuijpers AFA, Presber W, et al. Molecular taxonomy of *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*. Med Mycol 1999; 37: 315-330
5. Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, et al. Phylogenetic classification of *Trichophyton mentagrophytes* complex strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Clin Microbiol 1998; 36: 2629-2633
6. Grãser Y, Kuijpers AFA, Presber W, De Hoog GS. Molecular taxonomy of the *Trichophyton rubrum* group. J Clin Micobiol 2000; 38: 3329-3336
7. Summerbell RC, Haugland RA, Li A, Gupta AK. rRNA gene internal transcribed spacer 1 and 2 sequences of asexual, anthropophilic dermatophytes related to *Trichophyton rubrum*. J Clin Microbiol 1999; 37: 4005-4011
8. Kim JA, Takizawa K, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M. Identification and genetic homogeneity of *Trichophyton tonsurans* isolated from several regions by random amplified polymorphic DNA. Mycopathologia 1999; 145: 135-141
9. Kim JA, Norma BG, Okuda K, Takaki GMC, Fukushima K, Nishimura K, et al. Identification of *Trichophyton tonsurans* by random amplified polymorphic DNA. Ann Dermatol 1999; 11: 135-141
10. Kim JA, Takahashi Y, Tanaka R, Fukushima K, Nishimura K, Miyaji M. Identification and subtyping of *Trichophyton mentagrophytes* by random amplified polymorphic DNA. Mycoses 2001; 44: 157-165
11. 김정애, 김상덕, 문상은 등. 진균학적 검사 및 random amplified polymorphic DNA analysis에 의한 피부사상균의 동정과 미동정 원인에 대한 분석. 대피지 2001; 39: 168-175
12. Makimura K, Mochizuki T, Hasegawa A, et al. Phylogenetic classification and species identification of dermatophytes strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. J Clin Microbiol 1999; 37: 920-924
13. 김정애, 임종현, 문상은, 김규한, 조광현. 애완동물로부터 감염된 환자 및 애완동물에서 분리된 *Trichophyton mentagrophytes*의 internal transcribed

spacer 1 (ITS1) 염기서열 분석. 대피지 2001; 39: 1086-1093

14. 채희재, 백승철, 조백기. 중합효소연쇄반응과 제한효소분석을 이용한 조갑진균증 원인 진균의 진단. 대한의진균학회지 1999; 4: 6-14

15. Kac G, Bougnoux ME, Feuilhade M, et al. Genetic diversity among *Trichophyton mentagrophytes* isolates using random amplified polymorphic DNA method. Br J Dermatol 1999; 140: 839-844

16. Jackson CL, Barton RC, Evans EGV. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. J Clin Microbiol 1999; 37: 931-936

17. Jackson CL, Barton RC, Kelly SL, Evans EGV. Strain identification of *Trichophyton rubrum* by specific amplification of subrepeat elements in the ribosomal DNA nontranscribed spacer. J Clin Micorbiol 2000; 38: 4527-4534