



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

감염동물 모델과 분자유전학 분석을 통한
국내 지역사회 획득 메티실린 내성
황색포도알균의 병독성

Virulence of community-associated
methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
by analyzing animal infection model
and molecular genetics

울산대학교 대학원

의학과

송은희

감염동물 모델과 분자유전학 분석을 통한
국내 지역사회 획득 메티실린 내성
황색포도알균의 병독성


지도교수 우준희


이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함

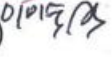
2017년 12월


울산대학교 대학원
의학과
송은희


송은희의 의학박사학위 논문을 인준함

심사위원 김양수 (인) 

심사위원 우준희 (인) 

심사위원 이미숙 (인) 

심사위원 김성한 (인) 

심사위원 정용필 (인) 

울 산 대 학 교 대 학 원

2017년 12월

국문요약

연구목적: 1990년 대 중반부터 빠르게 증가하고 있는 지역사회획득 황색포도알균 (community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, CA-MRSA)는 기존의 병원 내 MRSA 균주와 달리 높은 병독성을 가졌고 각 국가와 지역별로 다른 유전학적 특징을 갖는 것으로 알려져 있다. 국내에서 주로 감염을 일으키는 CA-MRSA 균주는 ST72-MRSA-SCC_{mec} IV 유전자형을 갖는 균주이며, 최근 국내 임상연구로 골관절감염과의 높은 연관성을 보였다. 이러한 CA-MRSA에 의한 감염은 치료제가 제한적이고, 사망률이 높아 보건의료 및 사회, 경제적 부담이 매우 큰 상태이다. 새로운 치료제, 예방 백신 개발을 위해서는 복잡한 감염 발병기전에 대한 연구가 선행되어야 하는데 국내 ST72-MRSA에 대한 감염 병인에 대한 연구는 매우 드물다. 따라서 동물 균혈증 및 골수염모델로 ST72-MRSA 병독성 확인, 실시간 역전사중합효소연쇄반응(real-time RT-PCR)과 액체크로마토그래피(High pressure liquid chromatography, HPLC)를 이용한 전사체 분석으로 병독 인자와 관련된 유전자를 확인하고, 이를 결실시킨 결실 변이주를 만들어 CA-MRSA 병인과 관련된 유전자임을 증명하는 연구를 진행하였다.

연구재료와 방법: 쥐 안와주위 정맥에 10^8 colony forming unit(CFU)의 MRSA를 접종하고(ST72-MRSA: 20마리, ST5-MRSA: 20마리), 160시간까지 감염증으로 인한 쥐 사망률과 신장과 심장의 감염 병리 소견을 관찰하였다(쥐 균혈증 모델). 쥐의 대퇴골 중앙 부위에 10^6 CFU의 여러 MRSA 균주를 접종하고 10일간 감염이 진행되도록 한 후 대퇴골을 분리하여 컴퓨터 단층 촬영 장치인 Micro-Computed Tomography(CT, Skyscan 1172 Aartselaar, Belgium)로 3차원 영상을 얻어 분석하고 골 부피 분석을 시행하였다(쥐 골수염 모델). 채취한 대퇴골의 병리 소견도 관찰하였다. RNA-Seq을 통해 발현이 증가되어 있는 유전자들이 실제 RNA 수준에서도 발현이 증가하는지를 확인하기 위해 정량 real-time RT-PCR과 단백질 수준에서 정량하기 위해 HPLC를 시행하여 병인에 관련되었을 가능성이 있는 유전자를 확인하였다. 특이적 후보 병인인자를 allelic replacement를 이용하여 결실 변이주를 만들어 동물 감염모델을 통해 병독성의 차이를 확인하였다.

결과: 쥐 균혈증 모델에서 ST5-MRSA 균주를 접종한 쥐 20마리는 모두 생존하였으나, ST72-MRSA를 접종한 20마리의 쥐 중 7마리만(35%) 생존했고, 감염 3일

재 신장 및 심장의 병리소견에서 더 심한 염증 반응을 보였다. 쥐 대퇴골 감염 모델에서도 ST72-MRSA 접종 쥐에서 ST5-MRSA 접종 쥐들에 비해 병리소견에서 심한 염증반응을 보였고 대퇴골 3차원 CT영상에서도 심한 골 파괴 및 신생 골 형성 병변을 보임을 확인되었다. RNA-Seq과 real-time RT-PCR을 통한 분석에서 signal transduction protein (TRAP)과 전사조절에 관여하는 유전자(TR, MW2624)의 발현 정도가 유의하게 증가되었으며, 이를 결실시킨 결실 변이주를 이용한 쥐 균혈증 모델과 골수염 모델에서 쥐의 생존율이 늘어나고 병리 염증 소견이 감소하는 것을 관찰하였다.

결론: ST72-MRSA 균주의 골 병독성이 ST5-MRSA 균주보다 높고, ST72-MRSA의 병인에 TRAP, TR (MW2624) 유전자가 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다. 추후 이들의 자세한 기능과 영향을 받는 유전자들에 대한 추가 연구가 필요하다.

중심단어: 메티실린 내성 황색포도알균, 감염동물 모델, 병독성

차례

국문요약.....	iv
표 및 그림목차	vii
서론	1
연구 방법	
1. 연구개요.....	4
2. 실험동물 감염 모델	
가. 쥐 균혈증 모델.....	5
나. 쥐 대퇴골 골수염 모델	5
3. 유전자 분석	
가. RNA-seq.....	7
나. 정량 실시간 역전사중합효소연쇄반응(real-time RT-PCR).....	10
다. 액체크로마토그래피.....	10
4. 유전자 변이주 생성 및 병독성 확인	
가. 유전자 변이주 생성.....	12
나. 병독성 확인 실험.....	12
5. 통계.....	15
결과	
1. 쥐 균혈증 모델을 이용한 병독성 비교 실험.....	16
2. 쥐 대퇴골 골수염 모델을 이용한 골 감염 병독성 비교 실험.....	16
3. 유전자 분석	
가. RNA-seq.....	16
나. 정량 실시간 역전사중합효소연쇄반응(real-time RT-PCR).....	23
다. HPLC & LC-MS를 이용한 PSMs의 발현 정량 분석.....	23
4. 유전자 변이주의 병독성 확인	
가. 동물 감염 모델.....	32
고찰.....	36
결론.....	39
참고문헌.....	40
영문요약.....	43

표 및 그림목차

표 1. 균혈증 및 골수염 모델에 사용한 균주와 실험동물 수.....	6
표 2. RNA-seq 및 real time RT-PCR에 사용된 균주 종류 및 수.....	8
표 3. 결실변이주를 이용한 균혈증 모델에 사용한 균주 및 실험동물 수.....	14
표 4. ST5 <i>agr</i> dysfunction MRSA 균주에 비하여 발현양이 크게 증가하는 ST72 균주들의 유전자들.....	22
그림 1. <i>S. aureus</i> 의 유전적 다양성.....	2
그림 2. 연구개요.....	4
그림 3. Ex-vivo micro CT. (Skyscan 1172, Aartselaar, Belgium).....	7
그림 4. RNA Sequencing experiment Workflow.....	9
그림 5. SYBR green 법을 이용한 real-time RT-PCR 기법.....	11
그림 6. LightCycler ^R 480 instrument and data station.....	11
그림 7. A procedure for pKOR1-mediated allelic replacement	13
그림 8. CA-MRSA의 균혈증 모델.....	17
그림 9. 감염된 쥐의 3일째 신장 및 심장의 병리학적 변화.....	18
그림 10. 감염 MRSA 균주에 따른 쥐 대퇴골 골수염 병리 소견.....	19
그림 11. 감염 MRSA 균주에 따른 쥐 대퇴골 골수염의 3차원 CT 소견.....	20
그림 12. 쥐 대퇴골 골수염에서 3차원 CT를 이용한 골 정량분석.....	21
그림 13. RNA-Seq에서 유의한 차이를 보인 유전자들의 real-time RT-PCR을 통한 발현 비교 분석.	24
그림 14. 정량 real-time RT-PCR을 이용한 global regulator 발현량.....	26
그림 15. 정량 real-time RT-PCR을 이용한 Two-component regulatory system 발현량.....	28
그림 16. 정량 real-time RT-PCR을 이용한 surface protein 발현량.....	30
그림 17. HPLC를 통한 PSMs의 발현량.....	31
그림 18. 결실변이주의 균혈증 모델.....	33
그림 19. 결실 변이주의 쥐 신장의 병리학적 변화....	34
그림 20. 결실변이주를 이용한 대퇴골 골수염 모델에서 관찰된 대퇴골의 병리학적인 변화.....	35

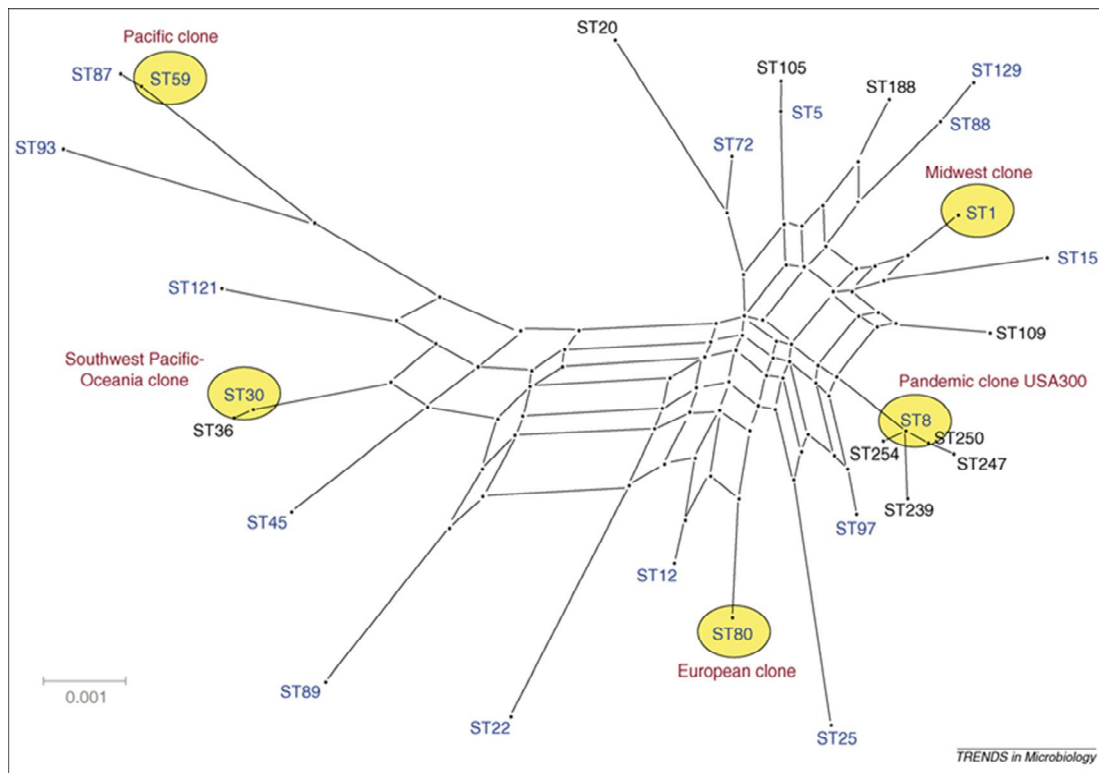
서론

Staphylococcus aureus (황색포도알균, *S. aureus*)는 병원성 인체 병원균이며 전세계적으로 가장 흔한 지역사회감염 및 병원감염의 원인균이다¹⁻²⁾. *S. aureus* 중 메티실린 항생제에 내성을 보이는 균을 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)라고 하며 연부조직 감염, 폐렴, 균혈증, 심내막염, 골관절 감염 등의 중증감염을 포함하여 다양한 감염증을 일으킨다. MRSA에 의한 감염증은 methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) 감염증에 비하여 사망률이 2-3배 이상 높을 뿐만 아니라, 3배 이상의 의료비용이 필요하다³⁾. MRSA 중증감염은 미국 기준으로 인구 10만명 당 32명에서 발생되며, 20-30% 환자가 사망하는 질환으로 매우 중요한 보건학적 문제로 대두되고 있다³⁾. 특히 세계적으로 *S. aureus* 에서 MRSA가 차지하는 비중이 과거에 비해 증가된 상태로 전체 *S. aureus* 병원 감염 검체 중 50% 이상으로 보고되고 있고⁴⁾, 우리나라는 주요 선진국 중에서 60-70%로 그 비중이 매우 높은 수준이다. 그러나 MRSA 감염증 치료에 사용되는 항생제는 매우 제한적으로, 사용 가능한 항생제는 vancomycin, teicoplanin과 linezolid 정도이며, 감염부위에 따라 4-8주 정도의 장기간 입원 치료가 필요하고 항생제 치료성공률은 70% 정도에 불과하다. MRSA는 다양한 세균 병독인자를 가지고 있고, 사람에 대한 다양한 면역회피기전을 가지고 있어 새로운 치료제나 예방 백신 개발이 어렵다. 몇 개의 MRSA 표면항원에 대한 예방 백신이 개발되었지만 사람을 대상으로 한 임상연구에서 효과가 없었고, 도리어 사망률이 증가하는 등 모두 실패하였다⁵⁾.

1990년대 이전만 해도 MRSA는 병원감염의 주요원인균으로만 여겨졌는데 1990년대 중반부터 미국을 시작으로, 병원 입원력이 없는 건강한 사람에서 MRSA 감염증이 증가하기 시작하였고, 이후 빠르게 증가하여 현재에는 전 세계적인 문제가 되고 있다⁶⁾. 지역사회 획득 MRSA 균주는 병원 내 균종과 유전학적으로 전혀 다른 새로운 균주였고, 지역사회에 적응하여 병원 밖의 건강한 사람들을 중심으로 빠르게 퍼져나갔다. 이러한 기저질환이 없는 사람에게 감염을 일으키는, 지역사회에서 발생하는 MRSA 균종을 지역사회획득 MRSA (community-associated MRSA, CA-MRSA)라고 한다. CA-MRSA는 기존의 병원 내 MRSA 균주와 달리 높은 병독성을 가졌고, 정상인의 피부에 잘 집락하여 주로 연부조직감염을 잘 일으

키고 중증의 괴사성 폐렴과도 연관성이 잘 알려져 있다⁷⁾. 미국에서 CA-MRSA 비
 중은 매우 높아, 응급실로 오는 연부조직감염의 59% (15-74%) 정도를 차지하고
⁸⁾, 한 인구역학적 조사 연구에서는 CA-MRSA 감염증이 인구 10만명 당 243명에
 서 발생하는 흔한 감염증으로 보고되고 있다⁹⁾.

*S. aureus*는 유전학적으로 다른 특성을 갖는 수 백 종류의 균주(strain)으로
 분류될 수 있으며, 일반적으로 유전자 염기 서열 분석을 통한 분자생물학적 분
 류(molecular typing)가 시행되고 있다. 분자 생물학적 분류로는 multilocus
 sequence typing (MLST), pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), spa
 typing 이 사용되고 있다. CA-MRSA는 기존의 병원 내 MRSA와 다른 유전학적 특
 성을 갖는 균주로, 전 세계적으로 하나의 균주가 파급된 것이 아니라 각 국가,
 지역별로 다른 유전학적 특징을 갖는 균주가 그 지역사회 내에서 파급되어 발
 생하는 것으로 확인되고 있다¹⁰⁾(그림1).



From Diep et al. Trends Microbiol 2008;16:361-9¹⁰⁾

그림 1. *S. aureus*의 유전적 다양성. 5개의 우세한 CA-MRSA 클론(빨간색)에는 모
 두 Pantone Valentine leukocidin을 암호화하는 lukPV 유전자 오페론이 있다.

미국의 CA-MRSA는 MLST sequence type ST8과 ST1이 주된 균주이며, 이들은 methicillin 내성 유전자로 SCCmec type IV를 가지며, 특징적 병독인자인 Panton-Valentine leukocidin (PVL)을 갖는 균주이다. 이 균주들은 유전자형으로 ST8-MRSA-SCCmec IV, ST1-MRSA-SCCmec IV이라고 하며 PFGE typing으로는 각각 USA300, USA400 이다⁷⁾.

국내 CA-MRSA는 2000년대 중반부터 증가가 확인되었으며 ST72-MRSA-SCCmec IV 유전자형을 갖는 균주이며, 미국이나 유럽과 달리 PVL 병독인자가 없는 것이 특징이다¹¹⁻¹²⁾. *S. aureus* 균혈증 전향적 코호트 연구에서 국내 지역사회획득 *S. aureus* 균혈증의 18%가 CA-MRSA에 의한 감염이었고, 외국과 달리 골관절 감염증(bone and joint infection)이 주된 감염이었다¹³⁾. 최근에는 병원 내에도 유입, 정착되어 병원 내 MRSA 균혈증의 20% 정도를 차지하고 있다¹⁴⁾. 국내 ST72 CA-MRSA는 외국의 CA-MRSA나 국내 병원감염의 주된 원인 균주인 ST5-MRSA와 다른 감염발생 병리기전을 가질 가능성이 높으나, 지금까지의 CA-MRSA 연구는 주로 미국 CA-MRSA 균주인 USA300 (ST8 균주)에 대한 연구가 대부분이었다. 반면에 국내의 대표적인 CA-MRSA 균주인 ST72-MRSA에 대한 연구는 주로 역학조사나 분자생물학적 분류에 대한 것으로 감염 병인에 대한 연구는 거의 없다. 몇 개의 연구를 통해 국내 ST72-MRSA만의 특이적인 병독인자는 없었고, 특정 병독인자에 의해 병독성이 결정되기 보다는 병독인자들의 발현 정도를 조절하는 global regulator의 활성도에 따라 달라질 것이라고 예상하는 정도이다¹⁵⁻¹⁷⁾. 그러나 우리나라의 역학에 맞는 CA-MRSA의 치료제나 예방 백신 개발을 위해서는 국내 유행 중인 ST72-MRSA를 타겟으로 한 연구가 반드시 필요하다.

본 연구에서는 국내 병원 감염의 대표균주인 ST5-MRSA 균주와 비교하여 국내 CA-MRSA에서 가장 흔한 ST72-MRSA의 병독성과 병독인자를 확인하기 위해 동물 실험모델과 유전자 분석을 이용한 연구를 진행하였다. 동물 감염 모델을 이용하여 ST72-MRSA와 ST5-MRSA 두 균주의 병독성 차이를 확인하고, RNA-seq, 정량 real time RT-PCR 과 액체크로마토그래피(High pressure liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 주요 병독 유전자의 발현 정도를 비교하고, ST72 CA-MRSA 병인에 기여하는 후보 유전자를 선정하였다. 이 후보 유전자를 결실시킨 변이주를 개발하여 쥐 균혈증 감염 모델과 대퇴골 감염 모델을 통해 병인 유전자임을 규명하고자 한다.

연구방법

1. 연구 개요

2013년에 발표된 국내 *S. aureus* 균혈증 연구를 보면 CA-MRSA 균주의 대부분은 ST72-SCCmec IV-*agr* I MRSA with *agr* function 이었고, 병원 내 MRSA 균주의 대부분은 ST5-SCCmec II-*agr* II MRSA with *agr* dysfunction 이었다¹⁸⁾. 그러므로 본 연구에서는 국내 CA-MRSA의 병독성을 확인하기 위해 가장 흔한 균주인 ST72 with *agr* function과 병원 내에서 가장 흔한 ST5 with *agr* dysfunction 균주의 특성을 비교하여 ST72 with *agr* function 의 병독인자를 확인하였다. 그러나 중요한 global regulator인 *agr* function 여부가 병독인자 발현에 영향을 주어 병독성 차이를 나타낼 수 있으므로 ST5 with *agr* function 균주 와 ST72 with *agr* dysfunction 균주를 추가하여 비교하였다. 또한 일부 연구에서는 미국 내 CA-MRSA 유행 균주인 ST8-MRSA (USA300) 균주와의 차이도 확인하였다. MRSA 균주는 국내 대학병원의 MRSA 균혈증 연구에서 얻어진 임상검체 중 임의로 선정하여 이용하였고 USA300은 표준 균주를 이용하였다(그림 2).

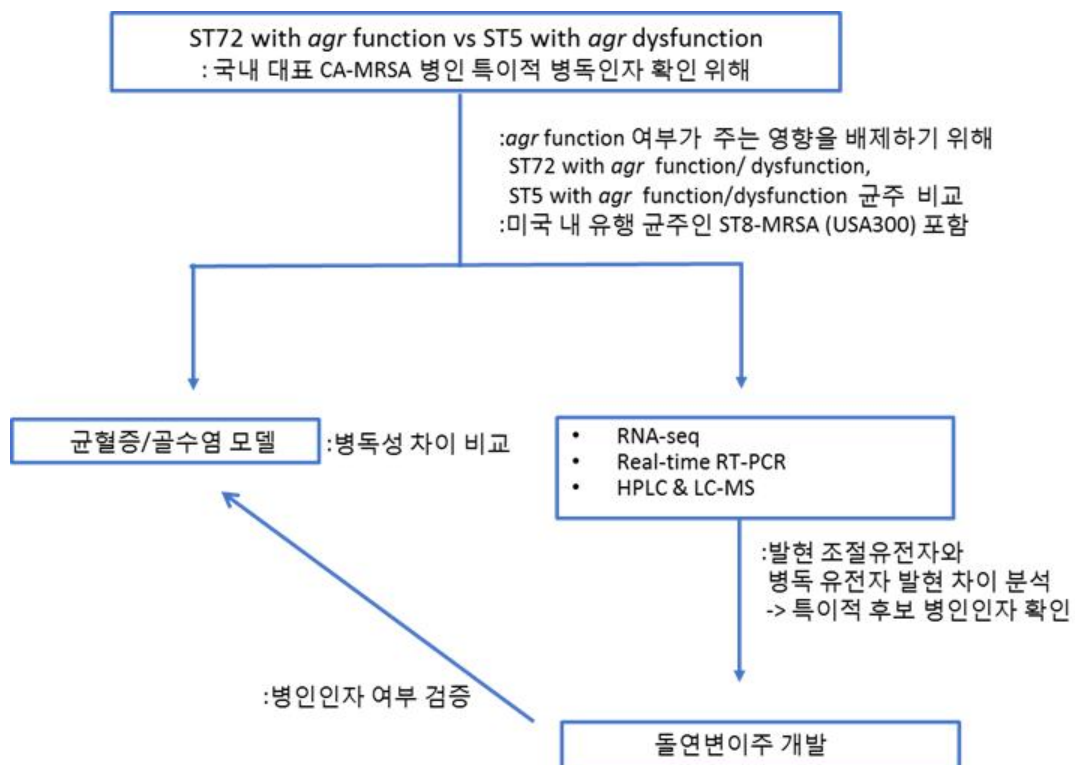


그림 2. 연구 개요.

2. 실험동물 감염 모델

가. 쥐 균혈증 모델

(1) 실험 균주와 쥐

ST5 *agr* dysfunction, ST72 *agr* function을 보이는 균주 중 대표 균주 1주 씩 선정하여 각각 20마리의 쥐에 감염시켰다(표 1).

(2) 실험방법과 분석

실험동물은 outbred immunocompetent CD1 Swiss female mice, 6주령 나이를 사용하여 쥐 안와주위 정맥에 10^8 CFU의 MRSA를 접종하고, 160시간까지 감염증으로 인한 쥐 사망률과 H & E 염색을 이용하여 신장과 심장의 감염 병리 소견을 관찰하였다.

나. 쥐 대퇴골 골수염 모델

(1) 실험 균주와 실험동물

ST72-MRSA (*agr* function), ST5-MRSA (*agr* dysfunction), ST5-MRSA (*agr* function) 중 대표 균주 1주를 선정하여 각각 5마리 씩 감염시키고, USA300 균주도 3마리의 쥐에 감염시켰다(표 1).

(2) 실험방법과 분석

Outbred immunocompetent CD1 Swiss female mice 6주령 쥐의 대퇴 근육을 무균적으로 절개하여 대퇴골을 노출시키고 대퇴골 중앙 부위에 21G needle을 이용해 구멍을 내어, 10^6 CFU의 MRSA 균주를 접종하고 수술적 방법으로 봉합한 후 10일간 감염이 진행되도록 하였다. 감염이 되지 않은 대조군으로 2마리의 쥐에는 균이 아닌 phosphate-buffered saline (PBS) 를 주입하였다. 대퇴골 균 접종 10일 후 각 대퇴골을 수술적으로 분리 한 후 컴퓨터 단층 촬영 장치인 Micro-Computed Tomography(CT, Skyscan 1172 Aartselaar, Belgium)(그림 3)로 $5.0 \mu\text{m}$ 의 voxel size로 작은 이미지까지 촬영하여 3D 영상을 얻었고, 3D 영상 분석은 NRECON(Skyscan) software 사용하였다.

표 1. 균혈증 및 골수염 모델에 사용한 균주와 실험동물 수

		실험동물 수(N)	집중균주 수 (CFU)
균혈증모델	ST72 <i>agr</i> function	20	10 ⁸
	ST5 <i>agr</i> dysfunction	20	10 ⁸
골수염모델	control	2	PBS*
	ST72 <i>agr</i> function	5	10 ⁶
	ST5 <i>agr</i> function	5	10 ⁶
	ST5 <i>agr</i> dysfunction	5	10 ⁶
	ST8 (USA300)	3	10 ⁶

*phosphate-buffered saline

골 부피의 분석은 CTAn software (Skyscan, Aartselaar, Belgium) 사용하였고 이때 grayscale은 100-255사이로 잡아 골 소실과 신생골 형성 부피를 측정하였다. 또한 분리한 대퇴골의 병리 조직 슬라이드를 만들어 H & E 염색을 하여 골 수염 진행된 부위를 olympus microscope로 관찰하여 각 균주별 차이를 비교하였다.



그림 3. Ex-vivo micro CT. (Skyscan 1172, Aartselaar, Belgium)

3. 유전자 분석

가. RNA-seq

(1) 분석 균주

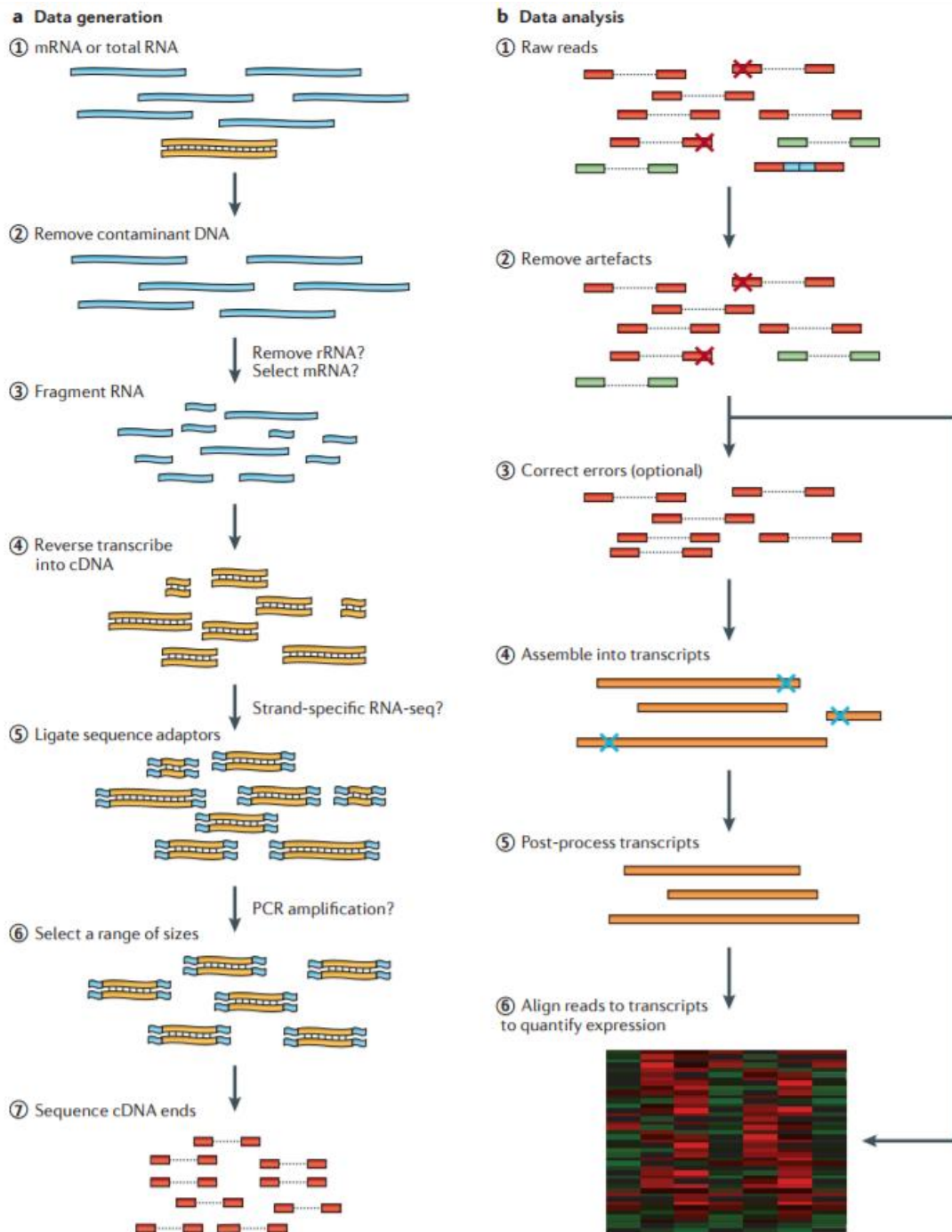
대조군인 ST5 *agr* dysfunction MRSA 균주(2개)를 기준으로 ST72 *agr* function인 균주(2개), ST5 *agr* function 균주(2개) 및 ST72 *agr* dysfunction 균주(2개)의 유전자의 발현 정도 차이(fold change)를 확인하였다(표 2).

(2) 실험방법

RNA-seq은 이전 발표된 실험기법을 이용하였다¹⁹⁾. 균주로부터 전체 RNA를 분리하고 DNase를 이용하여 DNA 오염을 제거하였다. Ribo-Zero rRNA removal Kit 과 TruSeq RNA sample Prep Kit(Illumina, San Diego,CA)을 이용하여 RNA를 정제하여 임의로 잘게 쪼갬 후 역전사 과정을 통해 cDNA를 만들었다. 만들어진 cDNA 양쪽 끝에 서로 다른 아답터(adapter)를 붙이고 이를 결찰(ligation)하였다. Sequencing이 가능한 정도의 양으로 PCR 증폭 시킨 후 200-400bp의 삽입 크기를 확보하고 분석하였다(그림 4).

표 2. RNA-seq 및 real-time RT-PCR에 사용된 균주 종류 및 수

		분석균주 수(N)
RNA-seq	ST72 <i>agr</i> function	2
	ST72 <i>agr</i> dysfunction	2
	ST5 <i>agr</i> function	2
	ST5 <i>agr</i> dysfunction	2
Real-time	ST72 <i>agr</i> function	10
	ST5 <i>agr</i> function	5
RT-PCR	ST5 <i>agr</i> dysfunction	10
	ST8 (USA300)	5
HPLC & LC-MS	ST72 <i>agr</i> function	10
	ST5 <i>agr</i> dysfunction	10



From Jeffrey et al. Nat Rev Genet.2011¹⁹⁾

그림 4. RNA Sequencing experiment Workflow

나. 정량 실시간 역전사중합효소연쇄반응(real-time RT-PCR)

(1) 분석 균주

ST72-MRSA (*agr* function)와 ST5-MRSA (*agr* dysfunction)을 각각 10 균주씩 선정하였으며, 비교를 위해 *agr* dysfunction인 ST72-MRSA, *agr* function인 ST5-MRSA도 각각 5 균주씩 선정하였다(표 2).

(2) 실험방법

RNA-Seq 결과 분석을 통해 ST72와 ST5 두 균주 간에 유의한 차이를 보이는 병독인자를 도출하여 실제 mRNA level에서 이러한 외독소(exotoxin)와 조절유전자들의 발현 차이를 ST72-MRSA와 ST5-MRSA에서 비교 분석하였다. 또한 ST72-MRSA의 병독성 및 병인에 관여하는 여러 global regulator, two-component regulatory system, surface proteins 발현도 정량 real-time RT-PCR로 비교하였다.

MRSA 균주의 RNA를 추출하고 random hexamer primer을 사용하여 cDNA를 합성한 후 cDNA가 완성이 되면 SYBR green 법으로 RT-PCR을 실시하였다. SYBR green은 이중가닥 DNA에 결합하여 형광을 발하는 물질로서, 변성(denaturation) 단계에서의 단일가닥 DNA에서는 결합하지 않고 있다가 결합(annealing) 후 연장(extension)되면서 형성된 이중가닥 DNA에 결합하여 형광을 나타내게 된다(그림 5). 이 형광강도를 측정함으로써 샘플(이중가닥 DNA)의 양을 정량할 수 있다. RT-PCR 장비는 Roche사의 LightCycler480를 사용하였다(그림 6). 본 연구는 특정유전자의 발현양상의 변화 또는 차이를 분석할 때 쓰이는 상대정량 법으로 분석을 하였으며 결과 분석을 위해 *gyrB* 라는 house keeping gene을 reference gene으로 사용하였다. mRNA transcript level은 reference gene (*gyrB*) Ct값에 대한 각 gene의 Ct값을 나타내는 값으로, $2^{(\text{reference Ct} - \text{target Ct})}$ 으로 나타내었다.

다. 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC) & 질량분광법(Liquid chromatograph-Mass Spectrometry, LC-MS)

CA-MRSA 병독성에 중요하다고 알려져 있고 ST72-MRSA에서 발현이 현저히 증가되어 있음을 확인한 phenol soluble modulins (PSMs)을 단백질 수준에서 정량하기 위해 reverse phase HPLC를 시행하였다. 5ml의 tryptic soy broth (TSB)에서

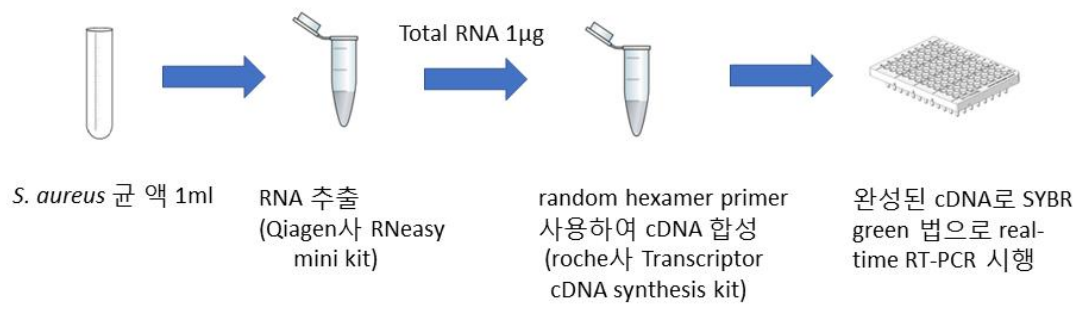


그림 5. SYBR green 법을 이용한 real-time RT-PCR 기법



그림 6. LightCycler[®] 480 instrument and data station

각각의 MRSA 균주를 배양한 다음 원심분리하여 상층액만 따로 모았다. 그 다음 상층액을 evaporator를 이용하여 건조 시킨 후 건조된 pellet을 1ml의 40% acetonitrile 용액에 -70°C 에 얼렸다. 이 시료를 녹여 원심분리하여 상층액을 분리한 후 다시 evaporator를 이용하여 건조시켰다. 이를 다시 물에 녹인 후 reverse phase HPLC로 분석하였다. 액체 크로마토그래피 질량분광법(LC-MS)를 이용하여 PSMs의 subtype을 검출하고 각각의 단백질 양을 정량하였다.

4. 유전자 변이주 생성 및 병독성 확인

가. 유전자 변이주 생성

(1) 실험균주 및 타겟 유전자

RNA-seq으로 분석한 대상균주인 ST72-MRSA with *agr* function 두 균주와 미국에서 유행하는 대표적인 CA-MRSA 균주인 USA300을 대상으로 주요 병독 인자로 선정된 TRAP(MW2529), putative transcriptional regulator (MQ2624:TR) 및 PSM α 유전자 결실 변이주를 구축하였다.

(2) 실험방법

MRSA에서 특정 유전자의 knock-out mutation은 이전에 발표된 allelic replacement 방법을 이용하였다²⁰⁾. Non-permissive 조건(43°C)에서 homologous recombination을 통해 chromosome 내로 plasmid pKOR1가 integration되고, single cross-over recombination으로 형성된 wild-type과 mutant allele가 permissive 조건(30°C)에서는 plasmid의 rolling circle replication이 촉진되고 recombination과 plasmid excision된다(그림 7).

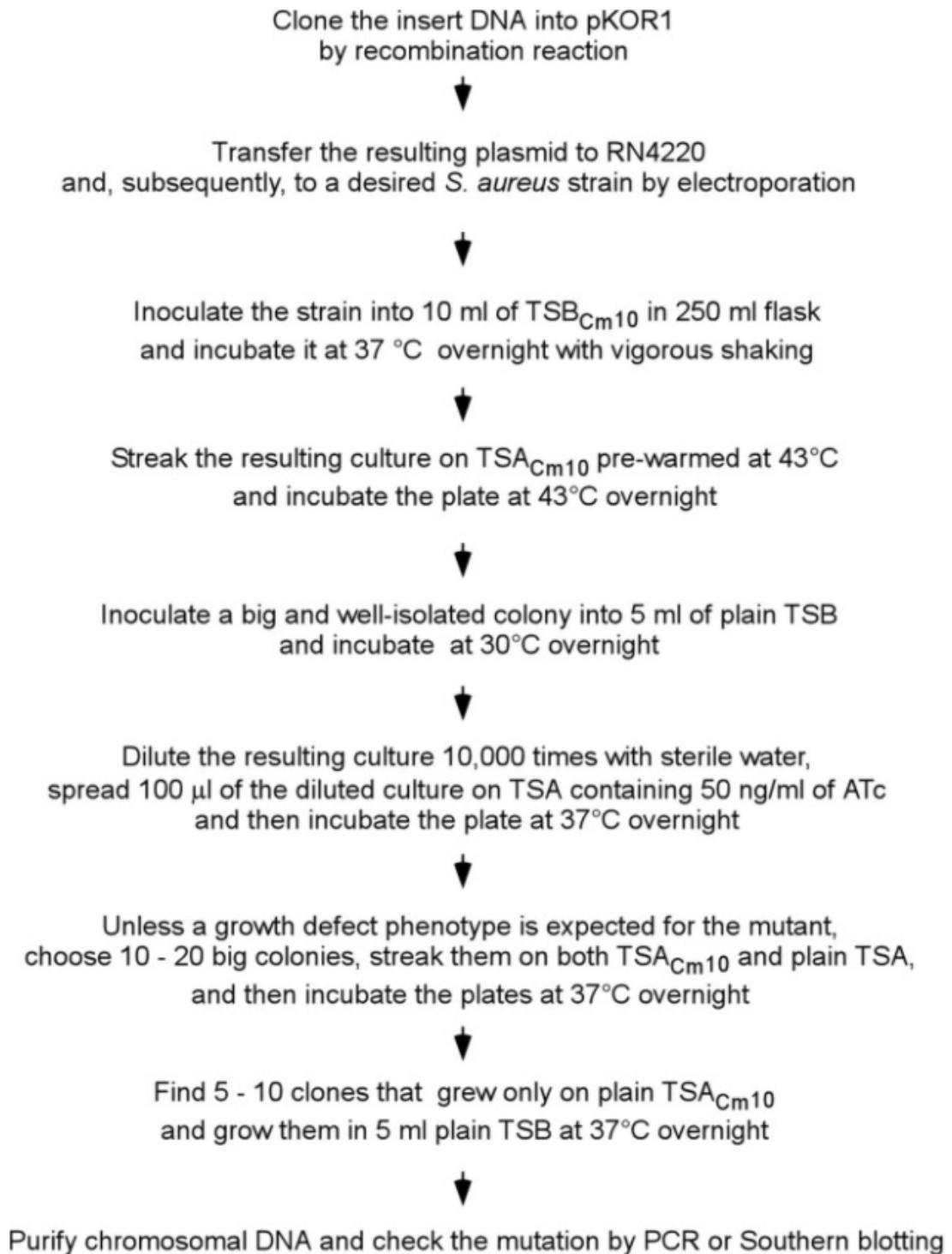
결실변이주가 잘 형성되었는지는 증폭 산물의 염기서열분석을 통해 확인하였다.

나. 병독성 확인 실험

(1) 균혈증모델

1) 실험균주

국내 CA-MRSA인 ST72 wild-type 균주와 Δ TRAP, Δ TR, 및 Δ PSM α 결실변이주 및 USA300 균주와 Δ TR 및 Δ TRAP 결실변이주를 이용하였다(표 3).



From Bae et al. *plasmid*.2006²⁰⁾

그림 7. A procedure for pKOR1-mediated allelic replacement

표 3. 결실변이주를 이용한 균혈증 모델에 사용한 균주 및 실험동물 수

		실험동물 수(N)	접종균주 수 (CFU)
ST72	Wild type	14	7.0×10^7
	$\Delta\text{psm}\alpha$	9	7.0×10^7
#1533 strain	ΔTR	11	8.0×10^7
	ΔTRAP	6	8.0×10^7
USA300 (FPR3757) strain	Wild type	6	7.0×10^7
	ΔTRAP	7	7.0×10^7
	ΔTR	7	8.0×10^7

2) 실험방법

Outbred immunocompetent CD1 Swiss female mice의 안와 주위 정맥에 $7-8 \times 10^7$ CFU의 균을 주입하고 14일 동안 생존여부를 관찰하고 14일 째는 살아있는 쥐를 대상으로 심장 채혈과 심장, 신장을 적출하여 병리학적인 변화를 H & E 염색을 통해 확인하였다.

(2) 골수염 모델

1) 실험균주

Wild type ST72균주와 Δ TR 를 이용하였다.

2) 실험방법

앞서 언급한 골수염모델을 이용하였다.

5. 통계

Real-time RT-PCR을 통해 유전자의 발현량을 정량화하고 이를 비교할 때 Kruskal-Wallis test를 이용하였다.

연구결과

1. 쥐 균혈증 모델을 이용한 병독성 비교 실험

ST72-MRSA를 접종한 20마리의 쥐 중 7마리만(35%) 생존했으며, ST5는 20마리 모두 생존하였다(그림 8). 사망 시 또는 5일째 혈액배양을 시행하였을 때 ST72 접종 쥐의 80%에서 MRSA 균혈증이 있었고, ST5 접종 쥐에서는 전혀 균혈증이 관찰되지 않았다. 또한 감염 3일째 신장 및 심장의 병리학적 변화를 관찰했을 때 ST72-MRSA 균주에서 더 심한 염증 반응을 보였다 (그림 9)

2. 쥐 대퇴골 골수염 모델을 이용한 골 감염 병독성 비교 실험

ST5-MRSA (*agr* dysfunction)을 감염시킨 5마리 쥐 중 1마리는 수술 후 합병증으로 조기 사망하였고, 1마리는 대퇴골 채취 상의 문제로 병리결과 및 3D CT 결과에 나타내지 못하였다. 균 접종 10일 후 대퇴골을 분리하여 시행한 병리 검사에서 CA-MRSA 대표균주인 ST72-MRSA (*agr* function)가 ST5-MRSA 균주보다 더 심한 염증 반응을 보이고 골 소실과 신생골 형성이 두드러졌다(그림 10). 3D CT를 이용하여 초기 바늘로 대퇴골을 천자한 부위를 중심으로 감염으로 인해 피질골이 파괴되는 것과 새로운 골이 형성되는 것을 3차원 소견으로 나타냈을 때 ST72-MRSA (*agr* function)가 감염으로 인한 변화 정도가 가장 심했다(그림 11). 또한 골 부피분석을 통해 피질골 파괴와 새로운 골 형성 정도를 정량적으로 비교했을 때 ST72-MRSA가 ST5-MRSA 균주보다 골 파괴와 신생골 형성을 심하게 일으켰다(그림 12).

3. 유전자 분석

가. RNA-seq

기준이 되는 ST5 *agr* dysfunction 균주에 비하여 ST72 균주들에서 높은 발현 차이를 보이는 유전자들을 정리하고 *agr* 유전자의 역할을 확인하기 위해 ST5 *agr* function 균주와의 유전자 발현 차이도 같이 나타내었다(표 4). ST72 균주는 MRSA의 cytolytic toxin으로 알려진 PSMs와 *set* (staphylococcal enterotoxin like proteins) 유전자군 발현이 증가되어 있고, 여러 exotoxin 발현 조절에 관여하는 signal transduction protein (TRAP)과 전사조절인자의 발현이 유의하게 증가되어

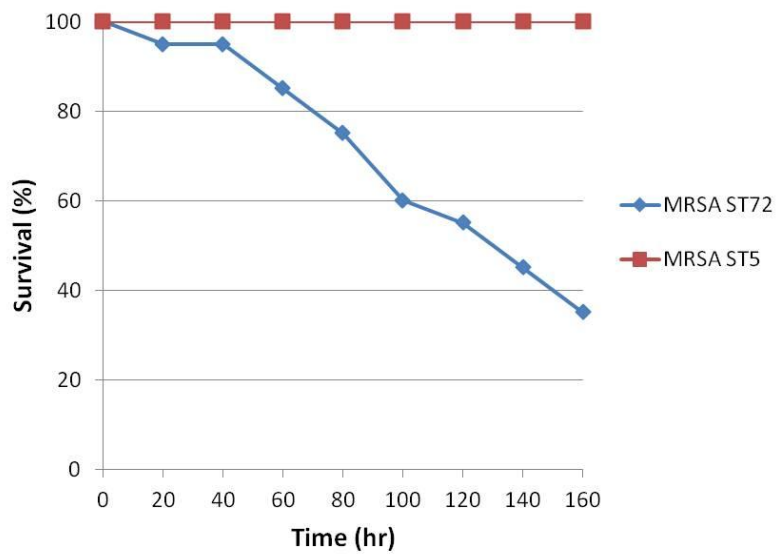


그림 8. CA-MRSA의 균혈증 모델. 쥐 안와 정맥에 ST72-MRSA (*agr* function)와 ST5-MRSA (*agr* dysfunction)균주를 감염 시킨 후 쥐의 생존을 비교함.

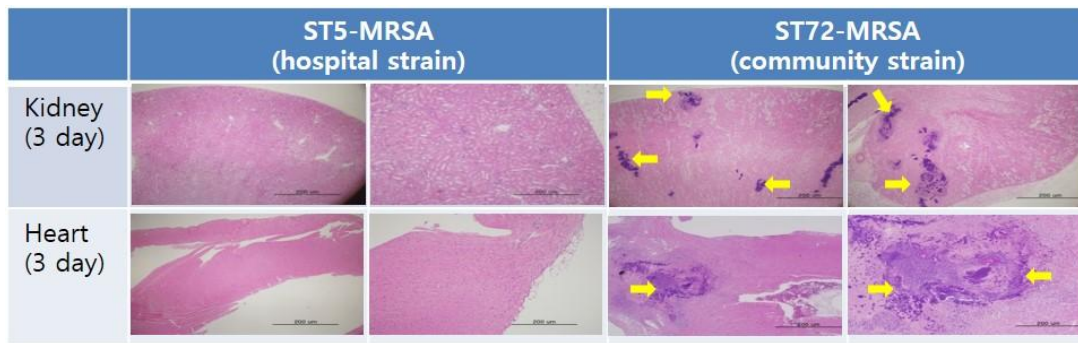


그림 9. 감염된 쥐의 3일째 신장 및 심장의 병리학적 변화. 감염 부위에 호중구가 침윤되어 농양을 형성함(노란 화살표 부위): ST72-MRSA (*agr* function)에서 더 심한 감염 소견 보임. (x40, x100 배율, H & E 염색).

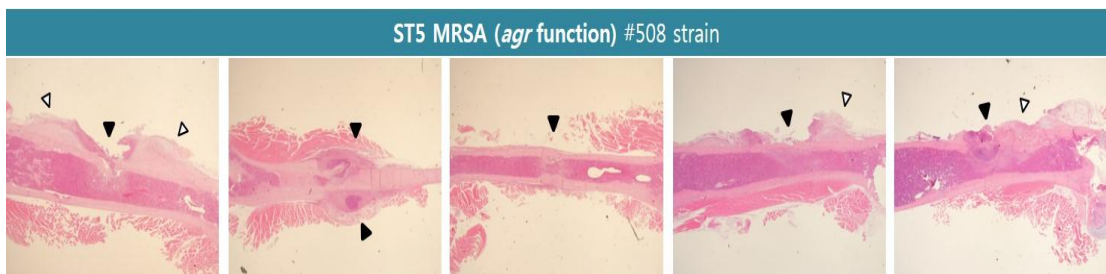
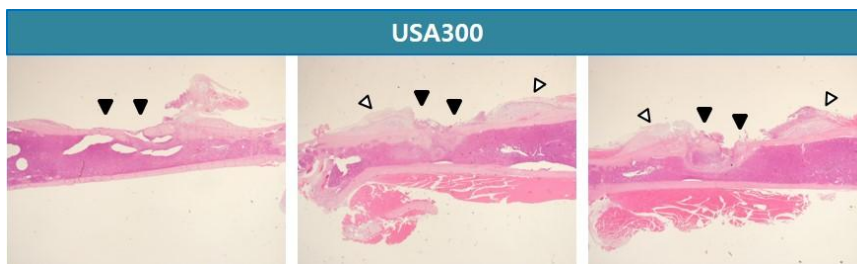
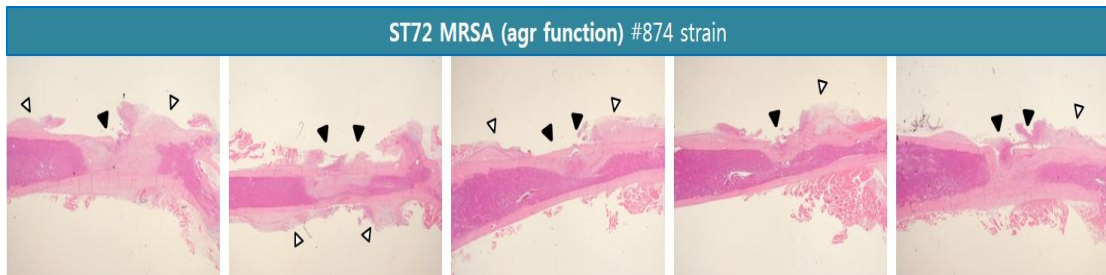
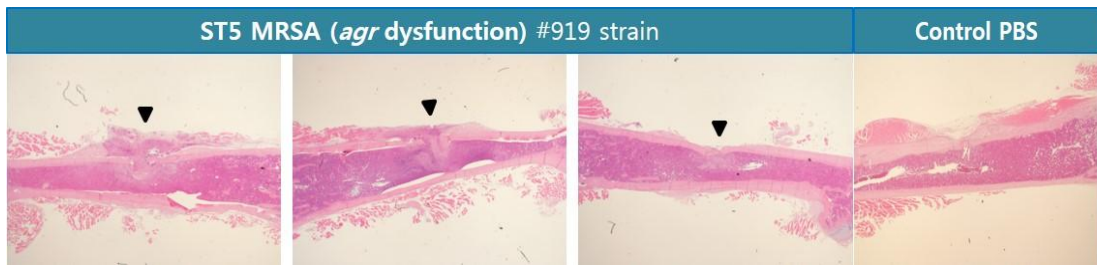
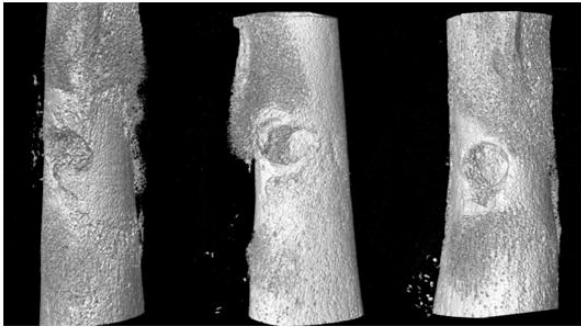


그림 10. MRSA 균주에 따른 쥐 대퇴골 골수염 병리 소견. ST72-MRSA (*agr* function)가 ST5-MRSA 균주보다 더 심한 염증 반응을 보이고 골 소실과 신생골 형성이 두드러짐. ▲는 감염에 의해 cortex bone이 파괴되는 부위 △는 감염에 의해 새로이 골이 형성되는 부위임. (x40 배율, H & E 염색)

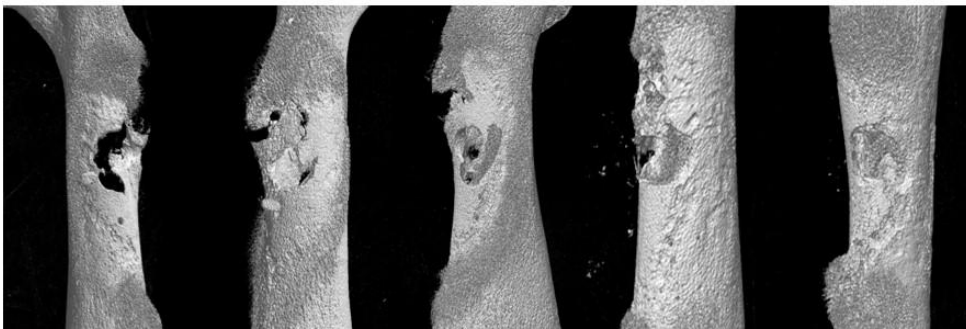
ST5 MRSA (*agr* dysfunction) #919 strain



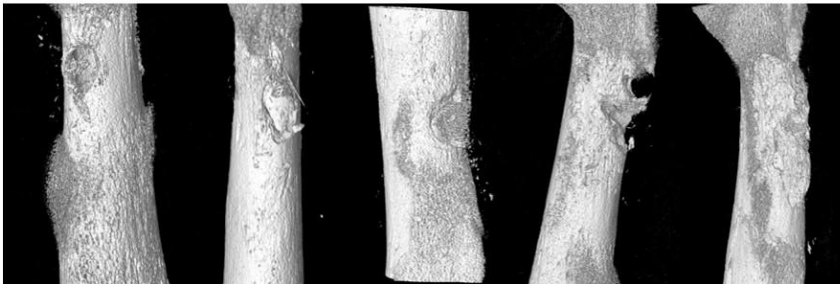
Control



ST72 MRSA (*agr* function) #874 strain



ST5 MRSA (*agr* function) #508 strain



USA300 strain

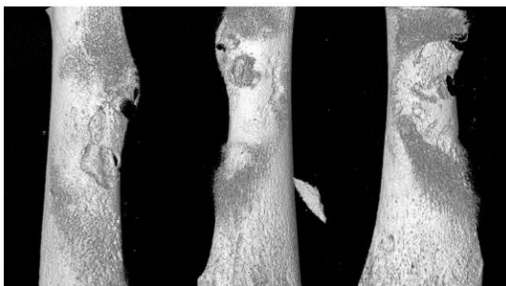


그림 11. 감염 MRSA 균주에 따른 쥐 대퇴골 골수염의 3차원 CT 소견. 초기 바늘로 대퇴골을 천자한 부위를 중심으로 피질골 파괴와 새로운 골이 형성되는 것을 3차원 소견으로 나타냄. ST72-MRSA (*agr* function)가 감염으로 인한 변화 정도가 가장 심함. Control은 phosphate-buffered saline 사용.

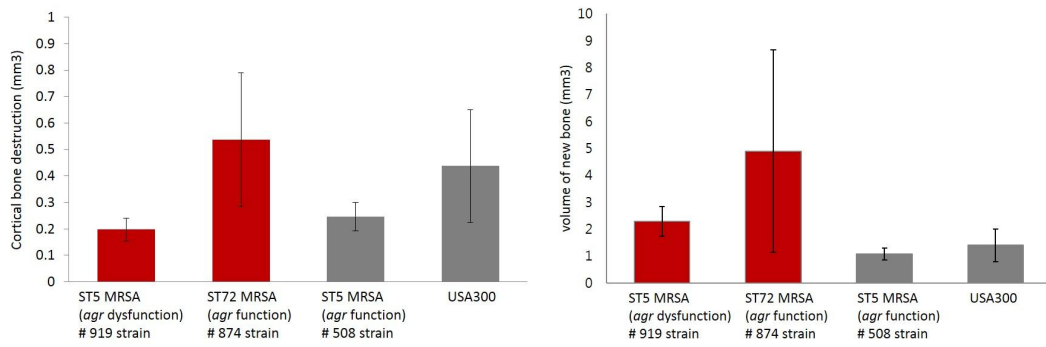


그림 12. 쥐 대퇴골 골수염에서 3차원 CT를 이용한 골 정량분석. MRSA 균주에 따른 피질골 파괴와 새로운 골 형성 정도를 정량적으로 비교하였는데 ST72-MRSA가 골 파괴 및 골 형성의 정도가 높음.

표 4. ST5 *agr* dysfunction MRSA 균주에 비하여 발현양이 크게 증가하는 ST72 균주들의 유전자들

Locus_tag	Gene	ST5 MRSA 균주		ST72 MRSA 균주			Product
		<i>agr</i> function		<i>agr</i> function		<i>agr</i> dysfunc.	
		AMC508	AMC871	AMC230	AMC1533	AMC483	
SAKOR_01099	psmβ1	2.1	5.5	1026.2	749.9	-1.3	Phenol-soluble modulin beta1
SAKOR_01100	psmβ2	2.8	4.4	852.1	620.2	1.0	Phenol-soluble modulin beta2
SAKOR_05000	psmα4	-1.1	1.3	370.4	392.8	2.2	Phenol-soluble modulin alpha4
SAKOR_05001	psmα3	1.1	1.3	448.6	512.4	3.0	Phenol-soluble modulin alpha3
SAKOR_05002	psmα2	-1.0	-1.2	600.9	542.9	2.2	Phenol-soluble modulin alpha2
SAKOR_05003	psmα3	1.2	-1.3	278.1	272.1	2.0	Phenol-soluble modulin alpha1
SAKOR_00404	set6	2.1	1.2	57.4	24.5	14.8	Exotoxin
SAKOR_00411	set12	1.6	1.2	6.9	3.6	2.5	Exotoxin
SAKOR_00412	set13	-1.6	-1.6	3.8	4.4	2.9	Exotoxin
SAKOR_02000	agrB	1.3	1.0	128.1	123.3	2.0	Accessory gene regulator protein B AGRB
SAKOR_02002	agrC	2.6	2.3	41.9	28.1	-1.4	Sensory transduction histidine kinase AgrC
SAKOR_02003	agrA	2.7	2.3	30.4	17.6	-2.2	Accessory gene regulator protein A AGRA
SAKOR_02603		1.6	2.2	25.9	15.6	9.9	Signal transduction protein TRAP
SAKOR_02706		-2.2	-2.7	29.8	49.3	57.1	Transcriptional regulator
SAKOR_00323		1.2	1.6	12.4	3.3	2.1	Putative aldehyde reductase-NAD dependent epimerase/dehydratase family protein
SAKOR_00346		-1.1	1.1	15.0	6.1	30.2	ABC transporter permease protein
SAKOR_00561		-4.8	-4.2	13.6	49.7	35.8	Putative haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein
SAKOR_00984	NIFR3	-1.6	-1.1	84.8	74.9	73.4	Nitrogen regulation protein NIFR3
SAKOR_01431		2.3	-1.3	9.4	7.1	11.5	Putative cytosolic protein
SAKOR_02174		1.9	4.0	15.3	15.2	10.8	Alpha-acetolactate decarboxylase
SAKOR_02175	alsS	2.1	3.8	30.8	25.2	26.0	Acetolactate synthase
SAKOR_02362		2.4	2.5	37.6	24.0	17.5	General stress protein 26
SAKOR_02415		1.8	1.8	27.9	17.2	8.4	Monosaccharide translocase (flippase type)
SAKOR_02456		1.7	3.8	94.2	38.3	35.8	Glucose 1-dehydrogenase

표시된 숫자는 기준 균주에 대비한 발현양의 fold change 값임

있었다. ST72-MRSA 균주의 경우 *agr* function과 관계없이 PSMs 발현이 증가되었고, ST5-MRSA 는 *agr* 유전자 발현이 증가되어도 PSMs 발현이 증가되지 않았다.

나. 정량 실시간 역전사중합효소연쇄반응(real-time RT-PCR)

정량 real-time RT-PCR을 이용하여 RNA-seq. 결과 차이를 보이는 유전자들의 실제 mRNA 발현 정도를 30개 균주에서 확인하였다. ST72-MRSA에서 PSM α , PSM β , TRAP, putative transcription regulator (MW2624)가 *agr* functionality에 관련 없이 증가되어 있음을 확인하였고, ST5-MRSA에서는 *agr* functionality에 상관없이 *set* genes의 발현이 증가되어 있음을 확인하였다(그림 13). 또한 ST72-CA-MRSA의 병독성 및 병인에 관여하는 여러 global regulator, two-component regulatory system, surface proteins 발현을 정량 real-time RT-PCR로 비교하였다. Global regulator인 *agr*, *sarA*, *sigB* 중 *agr*은 ST72 CA-MRSA가 *agr* function을 가지므로 ST72에서 증가되어 있음을 재차 확인하였고 *sarA*, *sigB* 발현량에 유의한 차이는 없었다(그림 14). Two-component regulator system인 *graSR*, *walKR*, *saeRS*, *vraSR*의 발현량에는 균주 간에 유의한 차이는 없었고 ST5-MRSA에서 *walR*, *vraSR*의 발현량이 감소한 경향을 보였다(그림 15). Surface protein 중 *spa*, *clfB*는 ST72-MRSA에 비해 ST5-MRSA에서 발현량이 증가되어 있었지만 *clfA*는 ST72-MRSA에서 발현량이 증가되었다. *fib*, *ebps*, *sdrC*, *sdrD*, *sdrE*의 발현량의 유의한 차이는 없었고, *fnbA*는 ST5-MRSA에서 발현량이 증가되어 있었다. Bone-sialoprotein-binding protein인 *bbp*는 ST72-MRSA에서 더 많이 발현되는 경향이 확인되었다(그림 16).

다. HPLC & LC-MS를 이용한 PSMs의 발현 정량 분석

mRNA level을 측정한 real-time RT-PCR에서는 ST72 MRSA에서의 PSMs 발현량이 높아 보이지 않았으나 HPLC를 통한 정량 검사에서는 PSM α 1, PSM α 2, PSM α 3, PSM α 4, PSM β 1, PSM β 2 모두 ST72 MRSA에서 매우 높게 발현되고 있음을 확인하였고 단백질 발현량이 ST5에 비해 ST72 균주에서 10^{3-4} 배 정도 증가되어 있음이 확인되었다(그림 17).

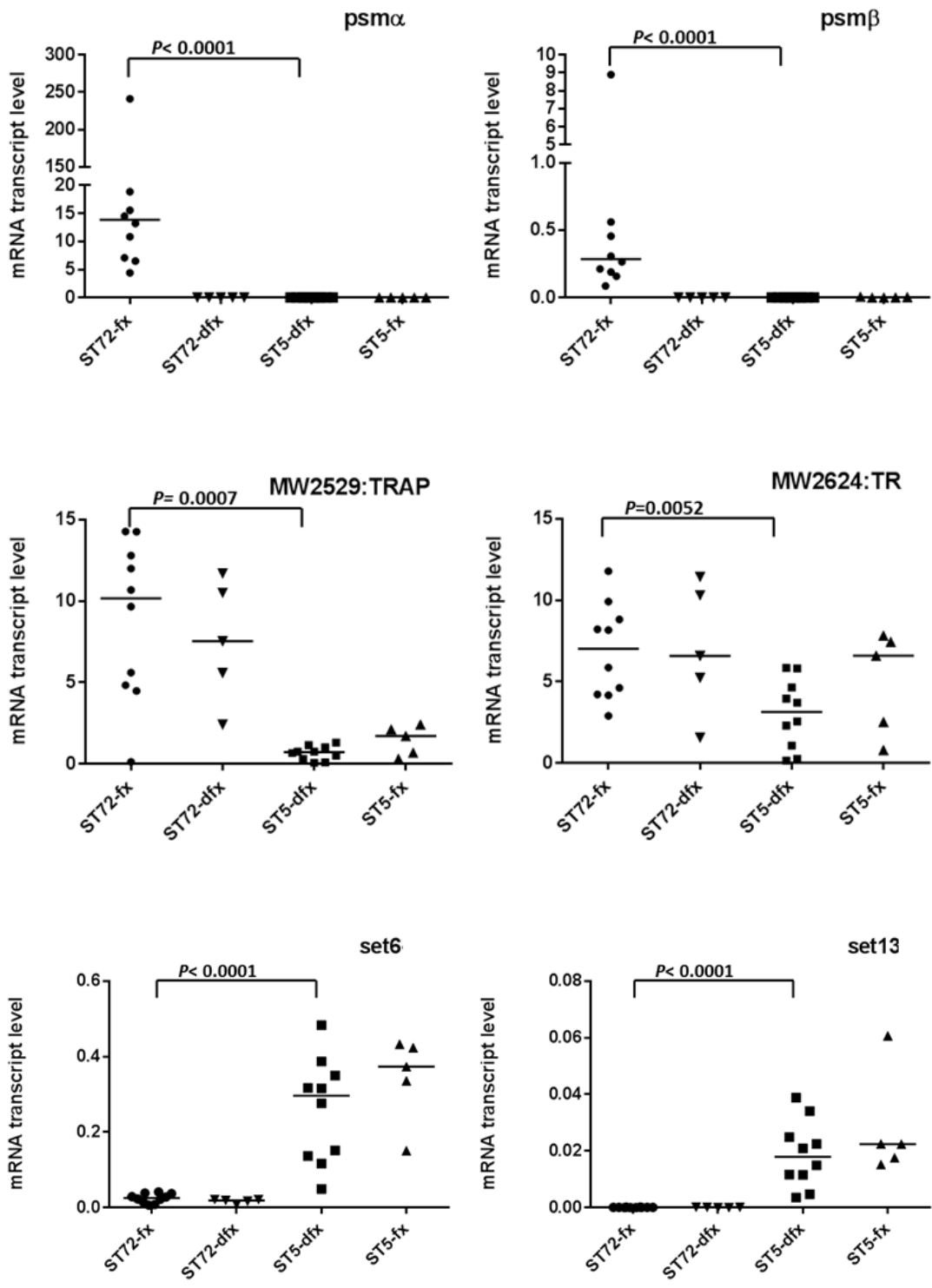


그림 13. RNA-Seq에서 유의한 차이를 보인 유전자들의 real-time RT-PCR을 통한 발현 비교 분석. ST72 MRSA에서 *agr* function과 관련없이 PSM, MW2529 (signal transduction protein [TRAP]), MW2624 [transcriptional regulator]가 증가하는

-----> continued

것을 확인함. mRNA transcript level 은 reference gene (gyrB) Ct값 에 대한 각 gene의 Ct값 을 나타내는 값으로, $2^{(\text{reference Ct} - \text{target Ct})}$ 으로 나타냄. ST72-fx: ST72 with *agr* function, ST5-dfx: ST5 with *agr* dysfunction, ST5-fx: ST5 with *agr* function, ST72-dfx: ST72 with *agr* dysfunction.

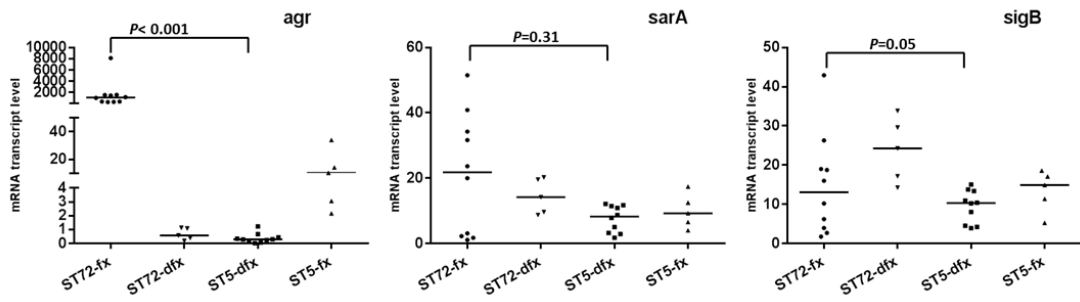
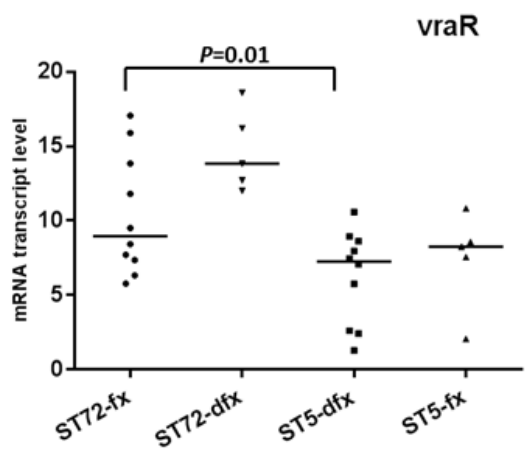
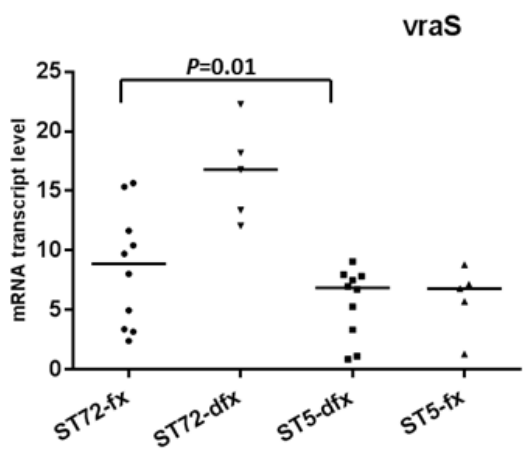
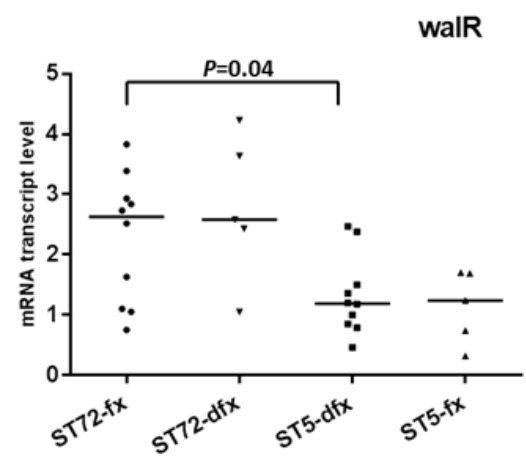
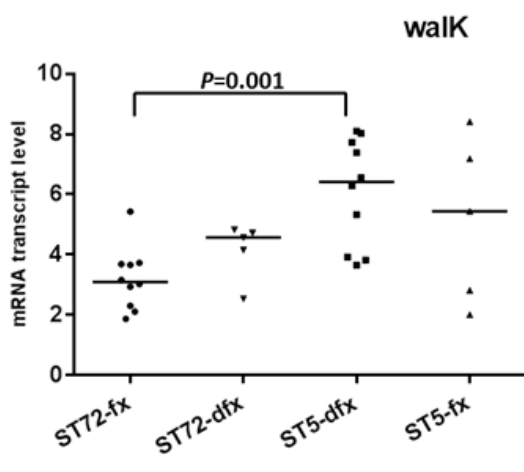
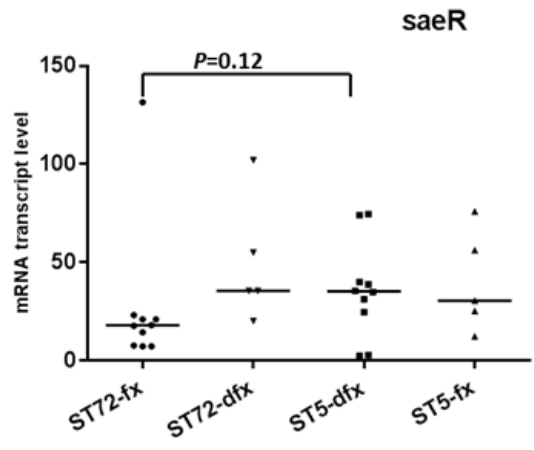
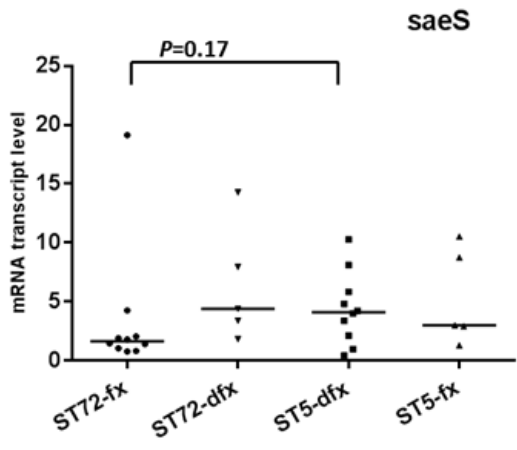


그림 14. 정량 real-time RT-PCR을 이용한 global regulator 발현량.

mRNA transcript level 은 reference gene (*gyrB*) Ct값 에 대한 각 gene의 Ct값 을 나타내는 값으로, $2^{(\text{reference Ct} - \text{target Ct})}$ 으로 나타냄. ST72-fx: ST72 with *agr* function, ST5-dfx: ST5 with *agr* dysfunction, ST5-fx: ST5 with *agr* function, ST72-dfx: ST72 with *agr* dysfunction.



--->continued

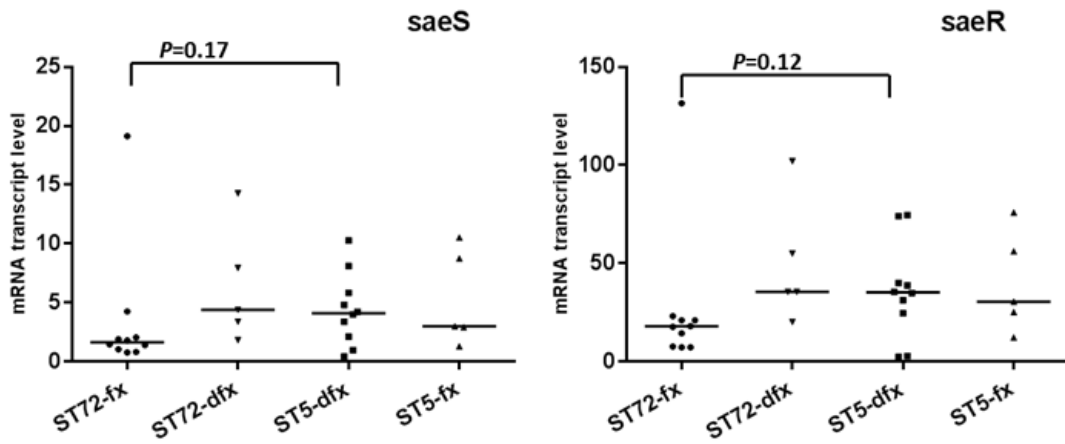
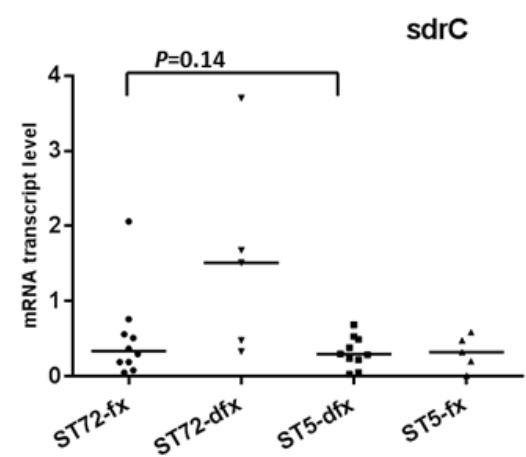
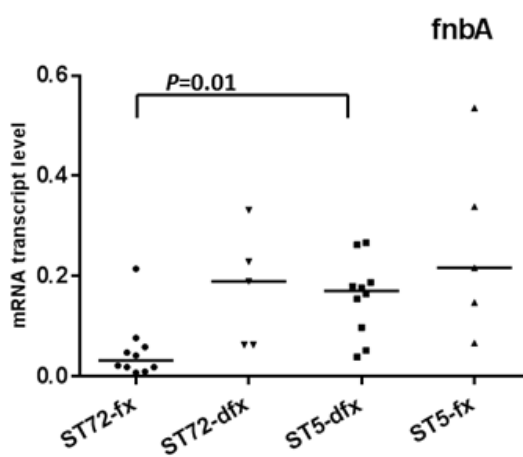
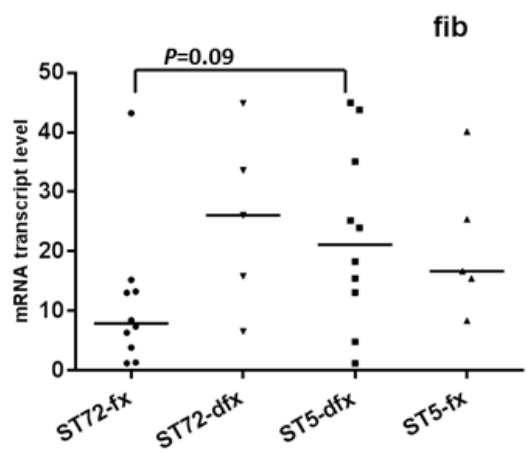
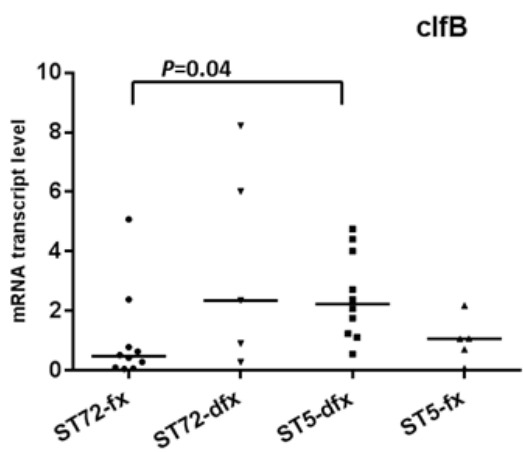
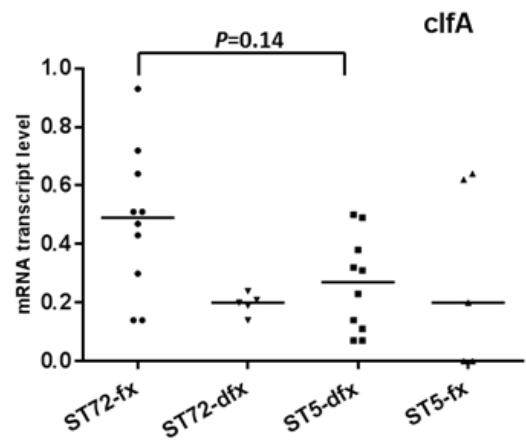
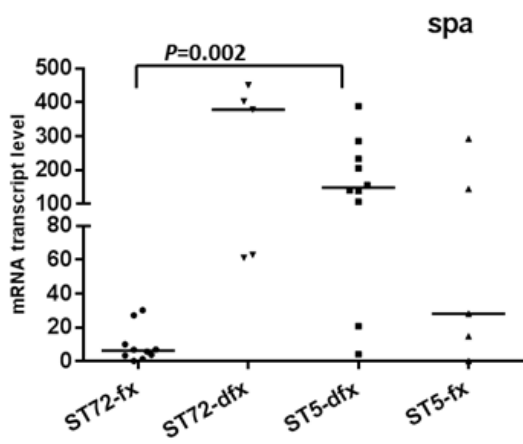


그림 15. 정량 real-time RT-PCR을 이용한 Two-component regulatory system 발현량. mRNA transcript level 은 reference gene (*gyrB*) Ct값 에 대mRNA transcript level 은 reference gene (*gyrB*) Ct값 에 대한 각 gene의 Ct값 을 나타내는 값으로, $2^{(\text{reference Ct} - \text{target Ct})}$ 으로 나타냄. ST72-fx: ST72 with *agr* function, ST5-dfx: ST5 with *agr* dysfunction, ST5-fx: ST5 with *agr* function, ST72-dfx: ST72 with *agr* dysfunction.



---> continued

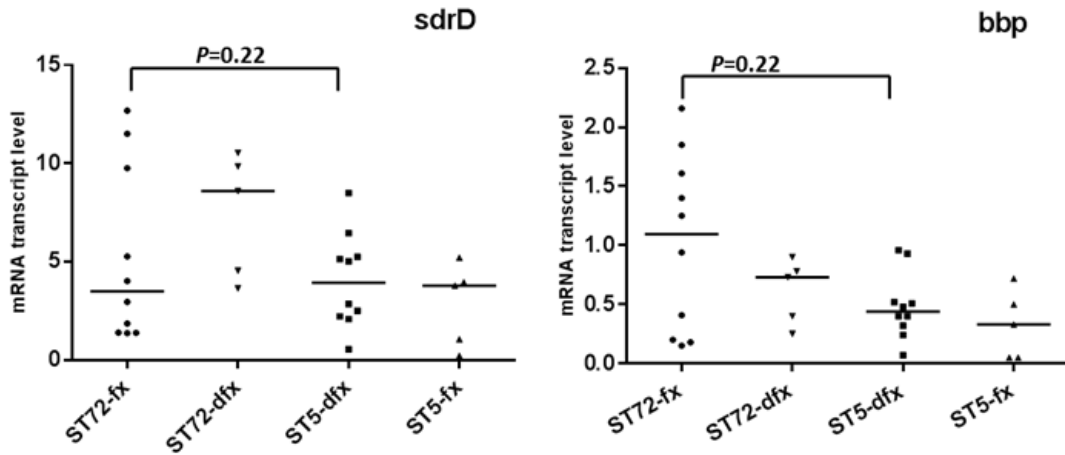


그림 16. 정량 real-time RT-PCR을 이용한 surface protein 발현량. mRNA transcript level 은 reference gene (*gyrB*) Ct값 에 대한 각 gene의 Ct값 을 나타내는 값으로, $2^{(\text{reference Ct} - \text{target Ct})}$ 으로 나타냄. ST72-fx: ST72 with *agr* function, ST5-dfx: ST5 with *agr* dysfunction, ST5-fx: ST5 with *agr* function, ST72-dfx: ST72 with *agr* dysfunction.



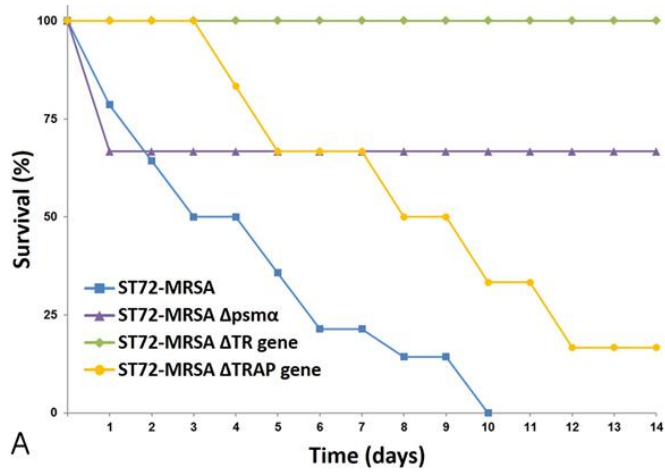
그림 17. HPLC를 통한 PSMs의 발현량. 대표적인 PSM α 1, PSM β 1만 나타냄

4. 유전자 변이주의 병독성 확인

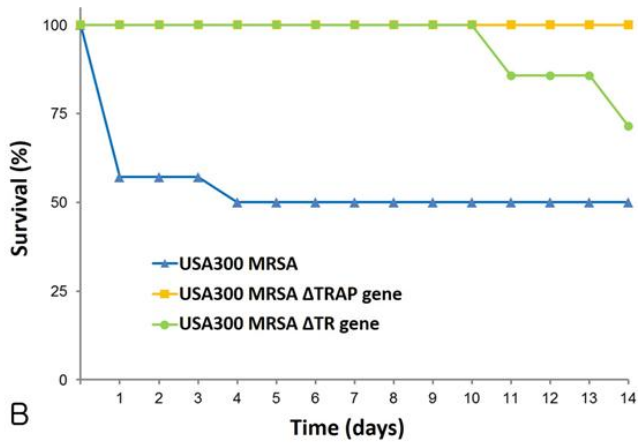
ST72 병인에 관여하는 주요 병독 인자로 선정된 TRAP (MW2529), putative transcription regulator (MW2624;TR) 및 PSM α 유전자를 allelic replacement 방법으로 결실 변이주를 구축하였다. ST72 CA-MRSA 균주와 미국에서 유행하는 CA-MRSA 균주인 USA300 (FPR3757)균주에서 TRAP 및 TR 유전자가 결실된 변이주를 개발하였다. 이후 쥐 균혈증 및 쥐 대퇴골 골수염 모델을 이용하여 유전자 변이주의 병독성을 확인하였다.

가. 동물 감염 모델

ST72 CA-MRSA균주의 경우 Δ TR 변이주에서 사망률이 월등히 감소하였고, Δ TRAP와 Δ PSM α 변이주에서도 사망률이 낮았다. USA300 균주의 경우도 Δ TR, Δ TRAP 변이주 모두에서 야생주에 비해 사망률이 월등히 감소하였다(그림 18). 감염 시킨 후 매일 생존여부를 관찰하고 14일 째는 살아있는 쥐를 대상으로 심장채혈과 심장, 신장을 적출하여 병리학적인 변화를 H & E 염색을 통해 확인하였다. 야생주의 경우 신장에서 미세농양(microabscess)이 빈번히 관찰되지만 결실돌연변이주를 감염시킨 쥐의 신장에서는 농양의 발생이 미미하였는데 특히 Δ TRAP와 Δ PSM α 는 농양이 아주 드물게 발생하였다(그림 19). 심장의 경우 야생주와 결실변이주 사이에 큰 차이가 관찰되지 않았다. 쥐 대퇴골 골수염 모델에서도 실험에 사용된 CA-MRSA 1533 야생주의 경우에는 균 주입부위 주변으로 신생골이 형성되는 것이 관찰되었으나 Δ TR 변이주의 경우에는 신생골 형성이 거의 관찰되지 않았다(그림 20).



A



B

그림 18. 결실변이주의 균혈증 모델. A. ST72 야생주와 Δ TR, Δ TRAP 및 Δ PSM α 변이주 사망률: 야생주에 비해 Δ TR의 사망률이 월등히 감소하였고, Δ TRAP와 Δ PSM α 변이주에서도 사망률은 감소함. B. USA300 야생주와 Δ TR, Δ TRAP 변이주 사망률: Δ TR, Δ TRAP 모두 야생주에 비해 사망률이 감소함.

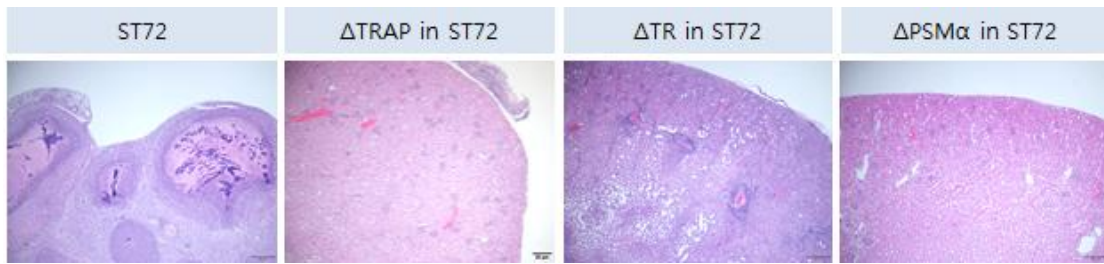


그림 19. 결실 변이주의 쥐 신장의 병리학적 변화. ST72 CA-MRSA 야생주의 경우 신장에서 미세농양의 발생이 잘 관찰되었으나 결실돌연변이주에서는 농양 발생이 적었음. 특히 Δ TRAP와 Δ PSM α 는 농양이 아주 드물게 발생함. (x100 배율, H & E 염색):

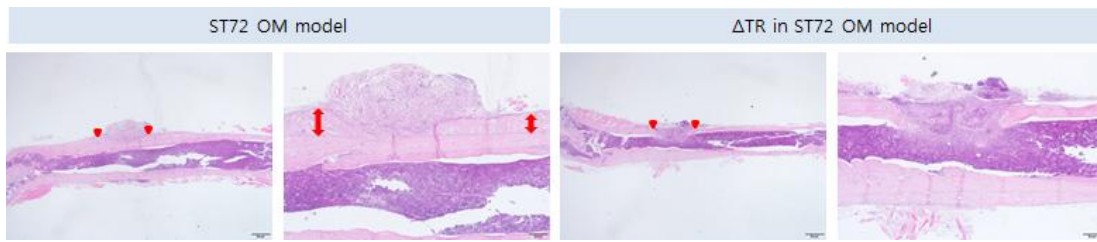


그림 20. 결실변이주를 이용한 대퇴골 골수염 모델에서 관찰된 대퇴골의 병리학적인 변화. ST72 CA-MRSA 야생주는 균 주입부위 주변으로 신생골이 형성되는 것이 관찰되었으나 Δ TR 변이주의 경우에는 신생골 형성이 거의 관찰되지 않음. (x40, X100배율, H & E 염색):

고찰

CA-MRSA 는 감염의 중요한 원인균으로, 전 세계적으로 하나의 균주가 파급된 것이 아니라 각 국가, 지역별로 다른 유전학적 특징을 갖는 균주가 그 지역사회 내에서 파급되어 발생하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. 국내의 대표적인 CA-MRSA는 ST72-SCCmec IV-*agr* I MRSA with *agr* function로 외국의 CA-MRSA와 달리 골관절 감염이 주된 감염이다. 따라서 이 균주에 대한 연구가 이루어져야 치료약이나 백신 개발에 도움이 될 수 있다. 그러나 CA-MRSA 연구의 대부분은 미국 CA-MRSA 균주인 USA300 (ST8 균주)를 대상으로 시행되었다. USA300, USA400 CA-MRSA 균주는 건강인의 피부에도 잘 집락되는 특징이 있어, 연부 조직 감염을 잘 일으키고 지역사회 내에서 쉽게 퍼질 수 있는데 이러한 USA300의 피부집락 및 연부조직감염 발생의 기전에는 arginine catabolic mobile element (ACME)가 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌고^{7,21)}, USA300에서 PVL의 병독인자로서의 역할에 대한 논란은 많으나 호중구 용해를 야기하고, 염증반응을 촉진시켜 농양, 중증 괴사성 궤瘍 등을 야기할 수 있음이 알려져 있다. 이에 반해 국내 대표적인 CA-MRSA 균주인 ST72-MRSA의 감염 병인에 대한 연구는 미미한 수준이다. Lee 등¹³⁾은 국내 지역사회 획득 *S. aureus* 균혈증 연구를 통해 CA-MRSA 균과 MSSA 균들의 41개 병독인자를 비교하였으나 유의한 차이를 확인하지 못 했고, Park 등¹⁴⁾이 국내 병원 내 MRSA의 주된 균주인 ST5-MRSA 균과 CA-MRSA 인 ST72-MRSA 균들의 미생물학적 특성과 41개 병독인자 유무를 비교했을 때 세포벽의 부착 단백질인 sdrC, sdrE 유전자 및 superantigen인 *sec*, *sel*, *seo*, *tst* 유전자를 ST72-MRSA 균들이 유의하게 낮은 비율로 가지고 있음을 확인하였으나 ST72-MRSA에 특이적인 병독인자는 확인하지 못했다. Chen 등¹⁷⁾이 2013년 국내 ST72-MRSA 한 균주를 whole genome sequencing하여 미국 CA-MRSA 균주인 USA300, USA400와의 차이를 발표하였는데, ST72-MRSA는 다른 CA-MRSA 균주와 마찬가지로 중요 병독인자는 가지고 있으나 PVL 등의 부가 병독인자나 USA300의 높은 피부집락화 특성에 관여되는 병독인자인 ACME는 가지고 있지 않았다. 2015년에 같은 저자는 ST72-MRSA에만 존재하는 3개의 유전자가 병독성에 영향을 미치지 않고 PSMs, α -toxin, *Agr* 등이 CA-MRSA 병인에 작용함을 발표하였다²¹⁾. 이렇듯 USA300 및 여러 나라의 CA-MRSA 대표 균주(국내의 ST72-MRSA 1 균주 포함)를 이용한 병독인자 비교연구에서 특정 병독인자 유무에 의해 병독성이 결정되기 보다는 다양한 CA-MRSA 균주 모두

에 존재하는 필수적인 병독인자이면서, 세균외부로 분비되는 α -toxin, PSMs, leukotoxins의 발현 정도에 따라 균주 특이적인 병독성이 결정될 수 있음을 제시하였다¹⁵⁻¹⁶. 즉 병독인자들의 발현 정도를 조절하는 global regulator의 활성도 차이가 있을 것으로 예상되는 부분이다. 본 연구에서도 RNA-Seq을 이용한 ST72와 ST5-MRSA의 transcriptomics 분석을 시행했을 때 ST72-MRSA 균주에서 MRSA의 cytolytic toxin으로 알려진 phenol soluble modulins (PSMs)의 발현이 증가되어 있었고, set (staphylococcal enterotoxin like proteins) 유전자군 발현이 증가되어 있고, 여러 exotoxin 발현 조절에 관여하는 signal transduction protein (TRAP)과 전사조절인자(TR)의 발현도 증가되어 있었다. 이들은 Staphylococcal virulence factors 와 다른 accessory gene function을 조절하는 agr 유전자 발현과 상관없이 ST72-MRSA 균주에서 유의하게 증가되어 있었다. 따라서 agr 뿐만 아니라 TRAP이나 TR 도 exotoxin 과발현의 조절인자로 기여할 것으로 예상되었으며, 이러한 가설을 해당 유전자 결실변이주를 구축하여 2개의 동물 균혈증, 골수염 모델을 통해 입증하였다. 그러나 이 연구를 통해서 TRAP과 TR가 ST72 MRSA에서 많이 일어나는 골 감염과 관련된 병인인자인지는 확인할 수 없었다. 앞으로 이들 유전자의 역할과 골 감염과의 연관성에 대해 추가 연구가 진행되어야 하겠다.

본 연구에서 주목할 만한 내용들은 다음과 같다. 첫 번째 유전자의 병독성을 확인하기 위해 만들어진 유전자 결실변이주는 국내 최초의 MRSA 유전자 변이주이다. *S. aureus*는 유전자 조작기술을 적용하기 어려운 병원균으로 지금까지 국내에는 이러한 MRSA 유전자 변이주 개발 기술이 없었다. 국내 최초로 MRSA 유전자 변이주 개발에 성공하였으며 이후 *S. aureus* 감염 병인 연구에 큰 도움이 될 것으로 기대된다. 두 번째 본 연구에서는 국내 최초로 쥐 대퇴골 골수염 모델을 구축하였다. 지금까지 보고된 CA-MRSA 동물 감염 모델은 대부분 균혈증, 피부연조직 감염, 피사성 폐렴과의 연관성을 보기 위해 연구였으며, 이를 확인하기 위해 사용한 MRSA 균주 또한 USA300, USA400 등 외국에서 유행하는 균주였다. 그러나 국내의 대표적인 CA-MRSA 균주인 ST72-MRSA는 다른 MRSA 균주에 비해 골관절염을 유의하게 많이 일으킨다는 보고가 있었는데¹³⁻¹⁴, 쥐 대퇴골 골수염 모델을 통해 실험실적으로 증명하였고, 3D micro-CT시스템을 이용하여 골수염의 감염 정도를 영상학적으로 평가하고 정량화하였다. 이는 향후 다른 연구자들이 쉽게 연구할 수 있는 기반을 마련하고 이후 항생제 치료 효능 평가에도 사용될 수

있을 것으로 보인다. 그러나 이 연구에서 시행된 골수염 모델은 대퇴골에 직접 균을 주입하여 만든 것으로 사람에서 주로 발생하는 혈행성 골수염과 차이가 있어 향후 좀 더 비슷한 모델을 만들기 위해 연구도 진행되어야겠다.

결론

CA-MRSA는 하나의 균주가 전세계로 퍼진 것이 아니라 각 국가, 지역별로 다른 유전학적 특징을 갖는 균주가 그 지역사회 내에서 과급되어 발생하는 것으로 알려져 있다. 이에 국내 주된 CA-MRSA 균주인 ST72-MRSA 균주와 대표적인 병원 내 MRSA 균주인 ST5-MRSA를 선정하여 다양한 방법으로 균주들의 특성을 비교하여 CA-MRSA 병원 연구를 시행하였다. 쥐 균혈증 모델에서 ST72-MRSA와 ST5-MRSA 균주의 각 장기에서의 병리 소견과 사망률을 비교하였는데 ST72-MRSA 균주를 접종한 쥐의 사망률이 더 높고 신장과 심장의 병리소견 상 염증반응이 더 심한 것이 확인되었다. 쥐 대퇴골 감염 모델의 병리학적 소견과 3D CT 결과로 볼 때 ST72-MRSA 균주에 의한 골수염이 가장 염증이 심하고 골 결손과 신생골 형성이 두드러짐을 확인하였다. 또한 정량 real-time RT-PCR 과 HPLC를 통해 균주간의 유전자 발현차이를 분석하여 CA-MRSA 후보 병원 유전자 (TRAP, putative transcription regulator)를 확인하고, 이 유전자를 결손시킨 변이주를 개발하여 2개의 동물 감염 모델을 통해 실제 병인에 있어 중요한 유전자임을 입증하였다. 또한 국내 최초로 쥐 골수염 모델을 확립하고, CA-MRSA 유전자 변이주를 개발하여 이후 *S. aureus* 백신이나 치료제 개발, 치료 효과 확인 등에 사용가능하게 되었다.

참고문헌

1. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med 1998; 339:520-32.
2. Naber CK. *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. Clin Infect Dis. 2009; 48: S231-7.
3. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J, Petit S, Gershman K, Ray S et al. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA. 2007; 298: 1763-71.
4. Otto M. MRSA virulence and spread. Cell Microbiol 2012;14:1513-21.
5. Salgado-Pabón W, Schlievert PM. Models matter: the search for an effective *Staphylococcus aureus* vaccine. Nat Rev Microbiol. 2014; 12: 585-91.
6. DeLeo FR, Otto M, Kreiswirth BN, Chambers HF. Community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 2010;375:1557-68.
7. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. Clin Microbiol Rev. 2010; 23: 616-87.
8. Moran GJ, Krishnadasan A, Gorwitz RJ, Fosheim GE, McDougal LK, Carey RB et al. Methicillin-resistant *S. aureus* infections among patients in the emergency department. N Engl J Med. 2006; 355: 666-74.
9. Liu C, Graber CJ, Karr M, Diep BA, Basuino L, Schwartz BS et al. A population-based study of the incidence and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in San Francisco, 2004-2005. Clin Infect Dis. 2008; 46: 1637-46.
10. Diep BA, Otto M. The role of virulence determinants in community-associated MRSA pathogenesis. Trends Microbiol 2008;16:361-9.
11. Kim ES, Song JS, Lee HJ, Choe PG, Park KH, Cho JH et al. A survey of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Korea. J Antimicrob Chemother. 2007; 60: 1108-14.

12. Song JH, Hsueh PR, Chung DR, Ko KS, Kang CI, Peck KR et al. Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between the community and the hospitals in Asian countries: an ANSORP study. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 1061-9.
13. Lee JY, Chong YP, Kim T, Hong HL, Park SJ, Lee ES et al. Bone and joint infection as a predictor of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a comparative cohort study. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69:1966-71.
14. Park KH, Chong YP, Kim SH, Lee SO, Choi SH, Lee MS et al. Community-associated MRSA strain ST72-SCCmecIV causing bloodstream infections: clinical outcomes and bacterial virulence factors. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70:1185-92.
15. Li M, Diep BA, Villaruz AE, Braughton KR, Jiang X, DeLeo FR et al. Evolution of virulence in epidemic community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106: 5883-8.
16. Li M, Cheung GY, Hu J, Wang D, Joo HS, Deleo FR et al. Comparative analysis of virulence and toxin expression of global community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Infect Dis.* 2010;202: 1866-76.
17. Chen Y, Chatterjee SS, Porcella SF, Yu YS, Otto M. Complete genome sequence of a Pantón-Valentine leukocidin-negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain of sequence type 72 from Korea. *PLoS One.* 2013; 8: e72803.
18. Chong YP, Kim ES, Park SJ, Park KH, Kim T, Kim MN et al. Accessory gene regulator (*agr*) dysfunction in *Staphylococcus aureus* bloodstream isolates from South Korean patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:1509-12
19. Martin JA, Wang Z. Next-generation transcriptome assembly. *Nat Rev Genet.* 2011;12:671-82.

20. Bae T, Schneewind O. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid*. 2006;55:58-63.
19. Thurlow LR, Joshi GS, Clark JR, Spontak JS, Neely CJ, Maile R et al. Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe*. 2013; 13: 100-7.
21. Chen Y, Yeh AJ, Cheung GY, Villaruz AE, Tan VY, Joo HS et al. Basis of virulence in a Panton-Valentine leukocidin-negative community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. *J Infect Dis*. 2015;211:472-80.

Abstract

Virulence of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by analyzing animal infection model and molecular genetics

EUN HEE SONG

Department of medicine

Graduate School of the University of Ulsan

In Korea, community-associated MRSA (CA-MRSA) account for 18% of community-acquired *S. aureus* bacteremia. ST72-MRSA is a dominant CA-MRSA strain in Korea and is significantly associated with bone and joint infection. Our study aim was to find a potential target for antibiotic or vaccine against for CA-MRSA (ST72-MRSA) through a pathogenesis study of ST72-MRSA infection.

I established murine bacteremia model and murine femur osteomyelitis model for pathogenesis study of ST72-MRSA and found that ST72-MRSA strain was more virulent than ST5-MRSA. In transcriptomics analysis, I found that TRAP gene, TR gene, and some virulence factors in ST72-MRSA were significantly more expressed (transcribed) than those in ST5-MRSA. I selected TRAP (signal transduction protein) gene and TR (MW2624) gene as the key pathogenetic factors of ST72-MRSA strain. Using allelic replacement method, I constructed each of TRAP gene and TR gene deletion mutant of ST72-MRSA. Using murine bacteremia model and murine femur osteomyelitis model, I compared the virulence (mortality and pathogenetic changes) between wild type ST72-MRSA and TRAP or TR gene deletion mutant strain. TR gene or TRAP gene deletion caused significant reduction in the virulence. Therefore, TR gene and TRAP gene may be significant pathogenetic factors for ST72-MRSA virulence.