



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0035330
(43) 공개일자 2017년03월30일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0120005</p> <p>(22) 출원일자 2016년09월20일
심사청구일자 2016년09월20일</p> <p>(30) 우선권주장
1020150134067 2015년09월22일 대한민국(KR)
1020150134129 2015년09월22일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
김희남
서울특별시 영등포구 의사당대로 127, 102동 805호 (여의도동, 롯데캐슬엠플라이어)</p> <p>(74) 대리인
특허법인 무한</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 9 항

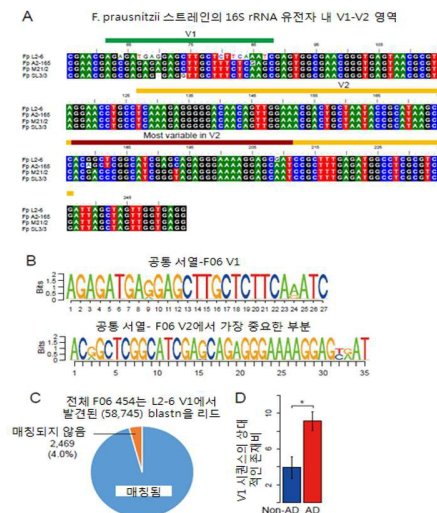
(54) 발명의 명칭 **바이오 마커 조성물, 진단용 키트, 및 정보제공방법**

(57) 요약

본 발명은, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물, 이러한 조성물을 포함하는 진단용 키트, 및 *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 진단용 정보 제공 방법에 관한 것이다.

본 발명을 이용하면, 특정 염기서열을 갖는 *F. prausnitzii*의 아종(F06)의 유무를 유용하게 판별할 수 있고, 특히, 아토피 피부염이 발병하기 이전에도 손쉽게 정확하게 발병 가능성 여부를 진단할 수 있어, 아토피 피부염이 발생하기 전과 후의 개체 모두에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는, 바이오마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 아토피 피부염 진단용인, 바이오마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

서열번호 1 또는 서열번호 2와 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 진단용 키트.

청구항 6

분리된 핵산 시료를 제공하는 단계; 및

서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계를 포함하는, 정보 제공 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계는, *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 단계를 포함하는, 정보 제공 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계는, 아토피 피부염을 진단하기 위한 것

인, 정보 제공 방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열은,

서열번호 1 또는 서열번호 2와 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열인, 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물, 이러한 조성물을 포함하는 진단용 키트, 및 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계를 포함하는 정보 제공 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아토피 피부염(Atopic dermatitis; AD)은 전세계적으로 증가하고 있는 질병의 하나로, 만성적인 염증성 피부 질환이다. 아토피 피부염은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부 질환으로, 가려움증과 피부건조증, 혹은 습진을 동반한다.

[0004] 아토피 피부염의 증상은 나이가 들면서 변화하지만, 병변부는 가려움증을 동반한다. 유아기 초기에는 뺨이나 이마, 머리에 증상이 나타나고, 몸통이나 팔, 다리에 나타나기도 하고, 유아기 후반에는 컷볼, 팔, 다리의 접히는 부위를 중심으로 나타나기도 한다.

[0005] 미국 내 통계에 의하면, 25%에 이르는 소아와 2~3%에 이르는 성인이 아토피 피부염으로 인해 고통을 받고 있다. 그러나, 아토피 피부염의 발병 원인은 아직까지 확실하게 알려져 있지 않은 상태이다. 발병 원인을 정확하게 설명할 수는 없지만, 최근 산업화가 이루어진 국가들을 중심으로 증가해 오고 있는 것으로 비추어 보면, 환경적인 요인과 유전적인 요인 등이 주된 원인으로 여겨지고 있다.

[0006] 아토피 피부염을 진단하기 위한 특정 검사가 존재하지는 않지만, 아토피 피부염을 악화시키는 원인을 찾기 위한 검사를 시행하고 있다. 아토피 피부염의 원인이 되는 알레르겐을 찾기 위한 검사로는 피부단자검사, 혈청 내 특이 면역글로블린 E 검사가 있으며, 음식물 경구유발검사, 세균 배양검사 등이 있다.

[0007] 아토피 피부염의 직접적인 원인과 발병과정은 아직 불분명하지만, 환자들의 피부 손상은 주로, TH 2 타입의 면역반응이 일반적인 항원에 과민하게 반응하여 염증을 일으키는 사이토카인이 과량으로 생산되는 기작에 의한 것이라고 여겨진다. 이때 피부에 있는 미생물 커뮤니티가 단순화되고, *Staphylococcus aureus* 군이 증가하는 등의 특징적인 문제가 생기는 것이 관찰되었다. 반면에 장내의 특정 세균들이 아토피 질환과 관련이 있을 것이라는 결과도 보고되어 왔다.

[0008] 하지만, 이러한 연구 결과들이 나오고 있음에도 불구하고 아토피의 근간이 되는 염증 조절 실패를 초래하는 미생물학적 원인은 아직 밝혀지지 않았다. 따라서, 아토피의 발병 원인이 되는 생물학적 원인을 밝혀내서 아토피의 발병 여부를 검진하는 것은 본 기술 분야에서 매우 중요한 기술적 과제이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

- [0011] 구체적으로는, *Faecalibacterium prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 보다 상세하게, 아토피 피부염 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 또한, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 포함하는 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0016] 구체적으로는, *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 바이오마커 조성물을 포함하는 진단용 키트, 보다 상세하게, 아토피 피부염 진단용 바이오마커 조성물을 포함하는 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0017] 또한, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 포함하는 진단용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은, 분리된 핵산 시료를 제공하는 단계; 및 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계를 포함하는, 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.
- [0020] 구체적으로는, 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계는, *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 단계를 포함하는, 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0021] 보다 상세하게는, 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계는, 아토피 피부염 진단하기 위한 것인, 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0022] 또한, 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열은, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열인, 정보 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0024] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 구성을 나타낸다.
- [0025] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태를 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0026] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0027] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0028] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0030] 이하에서는 본 명세서에서 사용되는 용어를 설명한다.

- [0031] 본 명세서에서 사용하는 "바이오마커"란, 일반적으로 단백질이나 DNA, RNA, 대사물질 등을 이용하여 체내의 변화를 알아낼 수 있는 지표를 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용하는 "게놈"은 인체 자체의 모든 유전정보를 포함하는 유전자 집합체를 의미하고, "마이크로바이옴"이란, 세컨드 게놈이라고도 부르며 체내에 공존하는 미생물의 총체적인 유전 정보를 의미한다. 특히, "장내 마이크로바이옴"이란, 체내, 특히 장 내에 존재하는 미생물의 총체적인 유전 정보를 말한다. 최근, 인체 내의 각종 미생물이 생체 대나 조절 및 소화능력이나 각종 질병에 영향을 미치고, 환경 변화에 따른 유전자 변형 등 인체의 모든 기능에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있어, 장내 마이크로바이옴에 대한 관심이 증가되고 있다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 "진단"은 개체의 상태 또는 결과의 예측 또는 진단, 상태 또는 결과, 진행, 또는 특정 치료에 대한 반응의 예측을 포함한다. 본 발명의 실시는 달리 지시하지 않는 한, 관련 기술분야의 기술 내에 있는 면역학, 생화학, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 게놈 및 재조합 DNA의 통상적인 기술을 채용한다. 본 발명에서 사용되는 "개체", "환자", 또는 "대상체"는 인간뿐만 아니라 다른 포유 동물도 포함한다.
- [0034] 본 명세서 및 도면에 기재된 "AD"란 아토피 피부염(Atopic Dermatitis)을 의미하고, "SCFA"란 단쇄 지방산(short chain fatty acid)를 의미하고, "OTU"란 조작분류단위(Operational taxonomic units)를 의미하고, "GalNAc"란 N-아세틸갈락토오스아민(N-acetylgalactosamine)을 의미하고, "KO"란 교토 대학의 유전자와 게놈의 데이터 베이스(KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) Orthology)를 의미한다.
- [0036] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태에 따르면, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0037] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물은, 질환을 갖고 있거나 의심되는 다양한 개체의 시료로부터 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 다양한 질병의 존재 여부를 조사할 수 있다.
- [0038] 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열은 다음과 같다(도 4 참조).
- [0040] 서열번호 1 - AGAGATGAGGAGCTTGCTCTCAAATC
- [0041] 서열번호 2 - ACGGCTCGGCATCGAGCAGGGGAAAAGGAGTGAT
- [0043] 도 4의 B를 참고하면, F06 V1 영역의 염기서열은 서열번호 1에 한정되지 않고, 각각 염기 위치 9에서 G 또는 A를, 염기 위치 13에서 C 또는 T를, 염기 위치 24에서 A 또는 G를 가질 수 있다(position 9(G, A), position 13(C, T), position 24(A, G)). 한편, 도 4의 B를 참고하면, F06 V2 영역의 염기서열은 서열번호 2에 한정되지 않고, 각각 염기 위치 3에서 G 또는 A를, 염기 위치 5에서 C 또는 G를, 염기 위치 16에서 G 또는 C를, 염기 위치 20에서 A 또는 G를, 염기 위치 32에서 T 또는 C를, 염기 위치 33에서 G 또는 A를 가질 수 있다(position 3(G, A), position 5(C, G), position 16(G, C), position 20(A, G), position 32(T, C), position 33(G, A)).
- [0045] 본 발명의 일 예로, 바이오마커 조성물은, *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 바이오마커 조성물이다.
- [0046] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열은, 마이크로바이옴에서 *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 바이오마커 조성물이다. *F. prausnitzii*의 아종(F06)과 관련된 질병이라면, 질병의 종류와 무관하게 상기 바이오마커 조성물을 이용할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 일 예로, 바이오마커 조성물은 아토피 피부염 진단용 바이오마커 조성물이다.
- [0049] 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 나타내는 V1-V2 시퀀스에 기반했을 때, 아토피 피부염 마이크로바이옴에서 크게 증가된 것을 확인할 수 있었다(도 3 참조). 특히, 아토피 피부염 마이크로바이옴에서 F06의 증가

는 모든 연령에 공통적으로 나타났지만, 1살 이하 그룹에서 특히 두드러지는 것을 보면, *F. prausnitzii* 아종 (F06)이 아토피 피부염 질환의 발병에 관여하고 있음을 보여준다. 이와 같이 아토피 피부염 질환의 진단에 적절한 것으로 확인되었으나, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 나타내는 질병의 진단에 이용될 수 있는 것이라면, 아토피에 한정되지 않는다.

- [0051] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 바이오마커 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물이다.
- [0052] 실제로 한국인에서, 서열번호 1의 염기 위치 9, 13, 24 및 서열번호 2의 염기 위치 3, 5, 16, 20, 32, 33의 염기에서 다양성이 발견되었다. 따라서, 서열번호 1의 염기 위치 9, 13, 24 및 서열번호 2의 염기 위치 3, 5, 16, 20, 32, 33의 염기는 각각 다양하게 대체될 수 있다. 바람직하게는, 서열번호 1 또는 서열번호 2는 각각 전체 서열의 97% 이상의 서열 동일성을 갖고 대체될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 염기 위치 9의 G는 A로, 염기 위치 13의 C는 T로, 염기 위치 24의 A는 G로 대체될 수 있고, 서열번호 2의 염기 위치 3의 G는 A로, 염기 위치 5의 C는 G로, 염기 위치 16의 G는 C로, 염기 위치 20의 A는 G로, 염기 위치 32의 T는 C로, 염기 위치 33의 G는 A로 각각 대체될 수 있다. 즉, 바이오마커 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 통상적인 세균 16S rRNA 유전자의 동질적 다양성 범위 내인 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 포함한다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 포함하는 진단용 키트를 제공한다.
- [0055] 개체로부터 분리된 핵산 시료를 제공하는 경우, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 조성물을 진단하는 진단용 키트, 바람직하게는 아토피 피부염 진단을 위한 진단용 키트를 제공한다. 한편, 진단용 키트는 *F. prausnitzii*의 아종(F06)과 관련된 질병이라면, 질병의 종류와 무관하게 이용할 수 있다. 그리고, 아토피 피부염 질환의 진단에 적절한 것으로 확인되었으나, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 나타내는 질병의 진단에 이용될 수 있는 것이라면, 아토피에 한정되지 않는다.
- [0056] 한편, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 각각 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 포함하는 진단용 키트를 제공한다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 분리된 핵산 시료를 제공하는 단계; 및 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계를 포함하는, 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0059] 개체로부터 분리된 핵산 시료를 제공한 후, 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하여 다양한 질병의 조기 진단 및 예후 진단에 필요한 유용한 정보, 바람직하게는 아토피 피부염 진단에 필요한 유용한 정보를 제공할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 일 예에 따르면, 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하는 단계는, *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 단계를 포함하는, 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0062] 개체로부터 분리된 핵산 시료를 제공한 후, 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열을 인식하여 *F. prausnitzii*의 아종(F06)을 검출하는 정보 제공 방법, 특히 이 세균이 관련된 아토피 피부염을 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일 예에 따르면, 서열번호 1 또는 서열번호 2를 포함하는 염기서열은, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열인, 정보 제공 방법이다.
- [0065] 실제로 한국인에서, 서열번호 1의 염기 위치 9, 13, 24 및 서열번호 2의 염기 위치 3, 5, 16, 20, 32, 33의 염기에서 다양성이 발견되었다. 따라서, 서열번호 1의 염기 위치 9, 13, 24 및 서열번호 2의 염기 위치 3, 5, 16, 20, 32, 33의 염기는 각각 다양하게 대체될 수 있다. 바람직하게는, 서열번호 1 또는 서열번호 2는 각각

전체 서열의 97% 이상의 서열 동일성을 갖고 대체될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1의 염기 위치 9의 G는 A로, 염기 위치 13의 C는 T로, 염기 위치 24의 A는 G로 대체될 수 있고, 서열번호 2의 염기 위치 3의 G는 A로, 염기 위치 5의 C는 G로, 염기 위치 16의 G는 C로, 염기 위치 20의 A는 G로, 염기 위치 32의 T는 C로, 염기 위치 33의 G는 A로 각각 대체될 수 있다. 즉, 바이오마커 조성물은 서열번호 1 또는 서열번호 2와 통상적인 세균 16S rRNA 유전자의 동질적 다양성 범위 내인 97% 이상의 서열 동일성을 갖는 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물을 포함한다.

발명의 효과

[0067] 본 발명의 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 유효성분으로 포함하는 바이오마커 조성물, 이러한 조성물을 포함하는 진단용 키트는, 전 세계적으로 높은 발병률을 보이고 있는 아토피 피부염의 진단 및 치료에 효과적으로 이용될 것으로 보인다.

[0069] 본 발명을 이용하면, 특정 염기서열을 갖는 *F. prausnitzii*의 아종(F06)의 유무를 유용하게 판별할 수 있고, 특히, 아토피 피부염이 발병하기 이전에 손쉽게 정확하게 발병 가능성 여부를 진단할 수 있어, 아토피 피부염이 발생하기 전과 후의 개체 모두에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0071] 도 1은, 장내 마이크로바이옴의 다양성 프로파일을 나타내는 도면이다.
- 도 2는, RFE-SVM 분석을 수행한 결과를 나타낸다.
- 도 3은, 아토피 환자와 비환자를 구분할 수 있는 조작분류단위(Operational taxonomic unit, OTU)를 선별하기 위한 A. *F. prausnitzii* OTUs의 계통도, B. OUT 존재량, C. F06의 존재량을 나타낸다.
- 도 4는, A. *F. prausnitzii* 스트레인의 16S rRNA 유전자 내 V1-V2 영역, B. F06 V1의 공통서열, C. 전체 F06 454 분석, D. V1 시퀀스의 상대적인 존재비를 나타낸다.
- 도 5는, *F. prausnitzii*의 5개의 strain인 A2-165, M21/2, L2-6, S3L/3, KLE1255의 유전자의 시퀀스를 나타낸다.
- 도 6은, 실험군 및 대조군의 SCFAs의 분석을 나타내는 그래프이다.
- 도 7은, *F. prausnitzii*의 기능장애와 관련된 AD의 제안 모델을 나타낸다.
- 도 8은, 다섯 개의 HMP *F. prausnitzii*의 팬게놈(pan-genome)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0072] 이하, 본 발명을 실시예를 기초하여 상세히 설명한다.
- [0073] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 본 발명의 발명자는 장내의 특정 세균들이 아토피 질환과 관련이 있을 것이라고 추정하고, 오랜 기간 동안 장내 세균과 아토피의 관련성을 연구하였다. 이러한 관련성을 증명하기 위하여, 아토피 환자 90명(실험군)과 아토피 증상이 없는 42명(대조군)이 연구에 참여하였고, 총 132명의 장내 미생물 군집의 16S rRNA 유전자와 메타게놈을 분석했다. Human Microbiome Project의 참고유전자 데이터와 KEGG Orthology 데이터베이스가 메타게놈 분석에 이용되었다. 아토피 환자들은 SCORAD 시스템을 통해 중증도가 미리 평가되었고, 대조군은 아토피 피부염을 앓은 적이 없는 사람들로 구성되었다. 실험군과 대조군은 모두 대변 샘플을 제공하기 6개월 전 이내에 항생제에 노출되지 않았다. 본 실험의 실험군은 고려대학교 안암병원 외래환자들로부터 제공되었으며, Ethics Committee에서 본 연구를 승인하였다. 실험군과 대조군으로부터 약 5g의 대변 샘플을 얻었고, DNA를 분리하기 전까지 -80℃에서 보관하였다. 대변 샘플들의 단쇄 지방산(SCFAs; Short-chain fatty acids)은 가스 크로마토그래피

질량 분석계 (gas chromatographic mass spectrometer)를 사용하여 비교 분석 하였다.

[0077] **실시예 1 : DNA 분리**

[0078] 샘플은 막자와 막자사발(mortar와 pestle)로 액화질소상에서 분쇄하였고, 400mg의 분쇄된 샘플을 네 개의 마이크로 원심분류 튜브(microcentrifuge tube)에 나누어 옮겨 담았다. 각각의 튜브에는, 0.1mm 직경의 지르코니아/실리카 비드(BioSpec 제품, Bartlesville, OK, USA))가 들어 있는 500 μ l 용액, 추출 버퍼 500 μ l(200 mM Tris [pH 8.0], 200 mM NaCl, 20 mM EDTA), 20% SDS의 210 μ l, 및 페놀: 클로로포름: 이소아밀알코올 혼합물 (25:24:1, pH 7.9)이 들어 있다.

[0080] 샘플을 상온에서 2.5분간 비드 비터(Bead beater)로 분쇄하였고, 세균 껍질이 파괴되면서 세균 성분이 흘러 나왔다. DNA는 상층액(supernatant)으로부터 페놀(phenol)/클로로포름(chloroform)/이소아밀 알코올(isoamyl alcohol)(25:24:1, pH 7.9)을 이용해 분리해 내었고 이소프로판올과 침전되었다. DNA 펠렛(pellet)을 건조시킨 후, TE 버퍼(10mM Tris[pH 8.0], 1mM EDTA)에 용해시켜 농도를 100 ng/ μ l로 맞추었다.

[0082] **실시예 2 : 16S rRNA 유전자의 V1-V2 지역 염기서열 분석**

[0083] 16S rRNA 유전자의 V1-V2 지역을 타겟으로 하는 PCR 반응은, 템플릿 DNA (template DNA) 100 ng, 5 μ l의 HotStar PCR buffer(키아젠 사(Qiagen), Germantown, MD, USA), 1U의 HotStarTaq DNA polymerase(키아젠 사), 그리고 전사와 역전사 프라이머(reverse primer)를 각각 0.4 μ mol/l의 포함하는, 25 μ l 반응혼합물(reaction mixture)을 포함하는 각각의 DNA 샘플에서 수행되었다. 정방향 프라이머(forward primer), 5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGNNNNNNNNTCAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 는 454 티타늄 어댑터 A(454 Titanium adapter A)(밀줄 그은 뉴클레오티드), 유니크 8-base barcode(8Ns로 표시), linker(디뉴클레오티드 TC), 유니버설 박테리아 프라이머 8F(universal bacterial primer 8F)로 구성되어 있다. 역방향 프라이머 (Reverse primer), 5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGNNNNNNNNCATGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'는, 454 티타늄 어댑터 B(Titanium adapter B)(밀줄), 유니크 8-base barcode(Ns), linker(CA), 넓은 범위의 박테리아 프라이머 338R(이텔릭체)로 구성되어 있다.

[0084] DNA 증폭은, 95 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 이루어졌고, 계속해서 95 $^{\circ}$ C에서 30초 동안, 그리고, 52 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 34 cycle, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 동안, 마지막 연장 72 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 이루어졌다. PCR 생산물은, QIAquick PCR Purification Kit(키아젠 사)를 사용하여 얻었다. 증폭산물(amplicon)들은 피코그린 어세이(PicoGreen Assay)를 이용하여 정량하였고, TE 버퍼에서 1×10^9 molecules/ μ l로 희석되었다. 454FLX 티타늄 피로시퀀싱(454FLX Titanium pyrosequencing)을 위해 같은 양의 산물을 사용하여 시퀀싱 라이브러리(sequencing library)가 만들어 졌다.

[0086] **실시예 3 : 454 sequencing reads 분석**

[0087] 바코드 태그가 붙어 있는 16S rRNA 유전자 V1-V2 영역 시퀀스 리드(V1-V2 region sequence reads)는 QIIME 파이프라인을 사용하여 분석하였다. 5' 이나 3' 끝쪽의 시퀀스가 없거나 1개 이상의 불분명한 염기서열이 있는 시퀀스는 제외시켰다. 그 후 모든 프라이머 시퀀스를 제거하였고, 250 bp가 안 되는 트림 시퀀스(trimmed sequence)도 제외시켰다. 나머지 시퀀스들은 조작분류단위(OTUs)로 CD-HIT를 이용해서 97% 시퀀스 동일성(sequence similarity)을 기준으로 분류되었고 RDP 분류기(RDP classifier)를 이용해서 0.5% 컨피던스 스코어(confidence score)를 기준으로 계통분류 되었다. 키메라 시퀀스(Chimera sequence)들은 QIIME 파이프라인의 키메라 슬레이어(ChimeraSlayer)와 블래스트 단편(BlastFragment)을 이용해서 제거하였다. 샤논 인덱스(Shannon index)는 장내 미생물(microbiota)의 α -다양성(α -diversity)을 알기 위하여 계산되었고, β -다양성(β -diversity) 분석을 위한 비가중치 UniFrac(unweighted UniFrac) 이나 브레이-커티스 거리 매트릭스(Bray-Curtis distance metrics)는 QIIME 스크립트(QIIME scripts)를 이용해 만들어졌다.

[0089] 엔테로 타입(Enterotype) 분석은, 젠슨-샤논 다양성 알고리즘(Jensen-Shannon divergence algorithm)을 통해

만든 유전자 레벨 거리 매트릭스(genus-level distance matrix)를 사용하였고, PAM 클러스터 알고리즘(partitioning around medoids clustering algorithm)을 이용해서 수행했다. 엔테로 타입 클러스터(Enterotype cluster)의 최적 숫자를 알기 위해 칼린스키-하라바츠 인덱스(Calinski-Harabasz index)가 계산되었다(도 1 참조).

[0090] 454 시퀀싱 리드(454 sequencing reads)는 CD-HIT을 이용하여 OTU 분석을 하거나 별도로 에스프리트(ESPRIT)을 이용하여 분류군 비의존적인 OTU(taxon-independent OTU)를 만들어 분석하기도 했다. 이러한 OTU로 만든 OTU 함량 매트릭스(OTU abundance matrix)는 RFE-SVM(recursive feature elimination support vector machine)을 사용하여, 아토피 환자와 비환자 사이에서 가장 특징적인 OTU를 찾는 데에 이용하였다. 최소한 30%의 샘플에서 존재하지 않는 OTU는 노이즈 레벨을 줄이기 위해 데이터에서 제외시켰다. 선택된 특징적인 OTU set을 이용해서, 아토피 마이크로바이옴(AD-microbiota)를 구분하는 예측 정확도(prediction accuracy)를 측정하기 위해서 리브 원 아웃 교차 검증(leave-one-out cross-validation)을 사용하였다.

[0092] 실시예 4 : 전체 유전체 시퀀싱과 시퀀스 분석

[0093] 8개의 샘플(실험군과 대조군 각각 4개의 샘플)로부터 일루미나 HiSeq2000 (Illumina HiSeq2000)를 이용해서 전체 유전자 시퀀스(whole-genome sequence)를 얻었다. 약 400 bp의 조각으로 이루어진 DNA 라이브러리(DNA library)를 만들어서, 101 bp의 페어드 엔드 리드(paired-end reads)를 얻었다.

[0094] CLC 게놈 워크벤치(CLC Genomic Workbench)를 이용해서 시퀀스 분석을 했다. 로우 퀄리티 리드(Low-quality reads)는 다음의 기준에 의해 제외되었다: 퀄리티 스코어(quality score) 0.05 미만인 모든 시퀀스 또는 2개 이상의 불분명한 염기서열이 있는 시퀀스, 15 bp보다 짧은 시퀀스도 제외되었다. 메타게놈(Metagenome)의 기능 분석은, HUMAnN v0.99를 사용하여 수행하였다. 모든 *Bacteroides*와 *Faecalibacterium* genome(bfg, bhl, bsa, bxy, bdo, bdh, bacc, fpr, 및 fpl)은 KEGG Orthology (KO) database v54에 포함시켜서 분석에 사용하였다. 일루미나 리드(Illumina reads)를 USEARCH v8.0을 사용하여 KO 데이터베이스에 번역 블래스트 서치(translated BLAST search)를 하였다. 결과는 HUMAnN으로 정리하였고, 실험군과 대조군의 평균화된 이중상동성 유전자군 함량(normalized orthologous gene family abundances)을 비교하였다.

[0096] 실시예 5 : 5개의 *F. prausnitzii* 스트레인의 pangenome 분석

[0097] 5개의 *F. prausnitzii* 스트레인의 게놈 시퀀스는 Human Microbiome Project (HMP) website (<http://www.hmpdacc.org/>)에서 다운로드 받아서 pan-genome 비교분석을 하였다. 각 스트레인으로부터 얻은 코딩 시퀀스(coding sequence, CDS)는 BLASTP를 사용하여 비교하여 아미노산 유사성과 매칭 영역 70% 이상을 기준으로 분별 오솔로그(discrete ortholog)로 정리하였다. CDS들은 1e-5의 BLASTP 히트 e-밸류 컷오프(BLASTP hit e-value cutoff of 1e-5)를 기준으로 KO 데이터베이스를 이용해서 정리했다.

[0098] 일루미나(Illumina) HiSeq2000 전체 메타 게놈 리드는 CLC 게놈 워크벤치를 이용해서 5개의 *F. prausnitzii* genome에 맵핑하였다. 모두 10.14%의 일루미나 리드가 *F. prausnitzii* genome에 맵핑되었다.

[0100] 실시예 6 : 샘플내의 SCFA 측정

[0101] 샘플은 액화질소와 함께 막자와 막자 사발로 분쇄한 후, 약 0.1g을 2 ml 마이크로 원심분리 튜브(microfuge tube)에 옮겼다. 분쇄한 샘플이 담긴 튜브에 내부 표준(60 μ l의 0.25 mmol/l 4-메틸발레르산)을 넣어 SCFAs 측정에 사용하였다. 샘플들을 20 μ l의 33% 염화수소(HCl)로 산 처리한 후, 디에틸 에테르(diethyl ether)를 가하고 10분간 와류시켰다. 디에틸 에테르 층을 원심 분리한 후 새 튜브로 옮겼다. 동일한 과정을 한 번 더 반복한 후, 두 개의 추출물로부터 디에틸 에테르 상을 혼합하였다. 60 μ l의 추출물과 20 μ l의 N-tert-부틸디메틸실리리-N-메틸트리플루오로아세트아마이드(N-tert-butyltrimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide)를 가스 크로마토그래피 오토샘플러 바이알(gas chromatography autosampler vial)의 유리 인서트(glass insert)에서 섞은 후 상온에서 2시간 방치하였다. 이렇게 준비된 샘플들에 가스 크로마토그래피 중량 분석을 수행하였다. D-락테이트(D-lactate)와 L-락테이트(L-lactate)의 비율은 메가자임 효소 키트 (Megazyme, Ireland)를 사용하여 구했다.

- [0102] 동결 샘플(0.1g)은 0.1M 트리에탄올아민 버퍼(pH 9.15) 1ml에서 녹이고 4℃에서 10분간 14,000으로 원심 분리하였다. 상층액은 6.1N 트리클로로아세트산(10% 최종 농도)으로 침전시켜 4℃에서 10분간 4500g으로 원심 분리하였다. 침전된 상층액은 젖산 레벨을 측정하기 위해 사용되었다.
- [0104] **실시예 7 : Promoter 활성 분석**
- [0105] 5개의 *F. prausnitzii* 스트레인(FP2_20620 for strain L2-6, FAEPRAA2165_01575 for strain A2-165, HMPREF9436_00973 for strain KLE1255, FPR_29560 for strain SL3/3 and FAEPRAM212_02812 for strain M21/2)에서 Butyryl CoA:acetate CoA-transferase 유전자의 프로모터 활성을 비교하기 위해서, 프로모터 프루브 벡터 pLKC481을 사용해서 각 유전자의 프로모터에 *lacZY* fusion을 만들었고, 플라스미드 구성물(plasmid construct)을 *Escherichia coli* DN5 α로 옮겼다. 서로 다른 pLKC481 구성물을 함유하는 *E. coli* 스트레인은, LB 배지(broth)에서 미드 로그 상(mid-log phase) (OD600 = 0.7)까지 배양시킨 후, 얼음 위에 20 분간 방치해 두었다. 각 샘플을 2 ml씩 취하여, 펠렛을 얻고 Z 버퍼에 다시 풀었다. 프로모터 활성도를 나타내는 β-갈락토시다아제 활성(β-galactosidase activity)은 0-니트로페닐-β-D-갈락토시드(0-nitrophenyl-β-D-galactoside)를 기제로 사용하여 측정하였고, 아래 수식을 이용해서 밀러 유닛(Miller unit)을 계산 하였다.
- [0106]
$$1000 \times (OD420 - 1.75 \times OD550) / (\text{인큐베이션 시간}[\text{min}] \times \text{용량}[\text{ml}] \times OD600)$$
- [0108] 이하에서는, 도면을 기초로 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0110] 도 1은, 장내 마이크로바이옴의 다양성 프로파일을 나타내는 도면이다.
- [0111] 90명의 실험군 및 43명의 대조군으로부터 장 마이크로바이옴의 DNA를 샘플에서 분리하였고, 16S rRNA 유전자의 V1-V2 부분을 증폭시켜 454 테크놀로지를 통해 염기 서열을 분석하였다. 시퀀스 리드는, 로우 퀄리티 시퀀스를 제거한 후, 평균 시퀀싱 뎁스(sequencing depth)가 6,604 인 것으로 확인되었다. 아토피 환자와 비환자의 마이크로바이옴에서는 미생물 알파 다양성(α-diversity)에서 큰 차이점이 발견되지 않았다(도 1의 A 그래프 참조). 미생물 베타 다양성(조성)(β-diversity)에서도 환자와 비환자 사이에 큰 차이가 없었다 (도 1의 B 그래프 참조). 마이크로바이옴은, 주류 세균 그룹에 기초하여 특정 엔테로 타입으로 지정될 수 있다. 132개의 마이크로바이옴은 둘 중의 한 엔테로 타입, 즉 *Bacteroides* 또는 *Prevotella* type으로 구분되었으나, 아토피 피부염은 어느 한 쪽으로 치우치지는 않았다(도 1의 C 그래프 참조). 결론적으로, 아토피 피부염에 있어서 마이크로바이옴의 전반적 변화는 두드러지게 나타나지 않았다. 그러나, 특정 세균 그룹이 연령별로 나눈 그룹에서 실험군과 대조군 사이에 유의미한 차이를 보였다(도 1의 B 그래프 참조). 장내 세균(Enterobacteriaceae)에 속하는 세균들의 증가와 락토바실러스, 비피도박테리아(*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) 세균들의 감소가 아토피 피부염 환자들에게 나타났다는 점이 보고된 바가 있으나, 본 실험에서는 이러한 경향이 나타나지 않았다. 이전 연구를 통해 아토피와 관련성이 있다고 보고된 세균들 중에는, 아토피와 직접적으로 관련이 있다기 보다는 건강하지 않은 장내 환경에서 기회적으로 성장이 증가된 균들이 포함되어 있을 수 있다. 아토피와 관련이 있는 세균들 중에는 직접적으로 병원성을 갖고 있을 수도 있고, 단순히 손상된 장 환경이 성장에 유리하게 작용하는 경우가 있을 수 있다. 아토피에 중요한 역할을 하는 병원성 세균은, 한 종이거나 특정 세균이 군집된 형태일 수 있고, 모든 아토피 환경에서 증가되어 있을 수 있다. 반면에, 질환환경을 단순히 잘 활용하는 세균에는 다양한 종류가 포함될 수 있다. 이들은 종합적으로는 아토피 환경에서 증가된 것으로 보일 수 있으나, 개별 샘플에는 존재하지 않을 수도 있다. 이런 패턴을 고려할 때, 아토피 마이크로바이옴에서 늘어난 대부분의 세균들 (도 1 그래프 참조)은 아토피 환경을 단순히 활용하는 균들일 가능성이 높다. 설령 아토피 원인균들이 이들 중에 있더라도, 그들은 적은 수일 것이므로, 많은 다른 세균들에 묻혀져 있어 구분해 내기가 어려울 수 있다.
- [0113] 도 2는, RFE-SVM 분석을 수행한 결과를 나타내고, 도 3은, 아토피 환자와 비환자를 구분할 수 있는 조작분류단위(Operational taxonomic unit, OTU)를 선별하기 위한 A. *F. prausnitzii* OTUs의 계통도, B. OUT 존재량, C. F06의 존재량을 나타낸다.

[0115] 아토피 환자와 비환자를 구분할 수 있는 탑 선별 OTU(top discriminatory OUT)를 선별하기 위해서 RFE-SVM 분석을 수행하였다. 이 분석에는 분류 독립적인 계층 분류(taxonomy-independent hierarchical classification)기반인 ESPRIT으로 작성된 OTU (보통 종에 해당하는 0.03 distance level로 작성)이 사용되었다. 전체 데이터 중 임의로 선택한 절반이 특징적인 OTU를 선별하기 위한 RFE-SVM 분석의 트레이닝 세트로 사용되었다. 나머지 절반의 데이터는 이 OTU의 아토피 구분능력을 테스트하는 데 사용되었다. 이 OTU들은, 임의로 선택된 OTU의 79.92%에 비해 구분능력에서 88.14%의 높은 정확도를 나타냈다(도 2의 A 참조). 탑 선별 OTU 중, 많은 수가 단지 몇 개의 클래드(clade)에 속해 있고, 이들이 모든 연령에 공통적이라는 점을 발견하였다(도 2의 B 참조). 이들 중 특히, *Faecalibacterium*은 아토피 마이크로바이옴에서 매우 증가하는 것으로 나타났다(도 1의 D 그래프 참조). *Faecalibacterium*은 생리학적으로 상이한 두 가지 계통형(phylogroup)이 존재하지만, 현재 모두 *F. prausnitzii*라는 한 종으로 그룹되어 있다.

[0117] **아토피 관련 *F. prausnitzii* 아종**

[0118] *F. prausnitzii*가 아토피 마이크로바이옴에서 두드러지게 나타났다. 이것은, RFE-SVM 모델에서도 제일 중요한 종 중의 하나이고, 인간 장내 마이크로바이옴에서 제일 많이 존재하는 종 중의 하나로서, 인체생리에 중요한 역할을 할 것이라고 추측할 수 있고, 아토피 피부염에도 중요한 역할을 할 것이라고 추측하여 실험을 진행하였다. 더욱이, *F. prausnitzii*는 단일 종이기 때문에, 클래드(clade)의 구성을 연구하는데 비교적 용이하였다. 아토피 피부염과의 관련성은, 종 전체보다 특정 아종과 관련이 있을 것이라는 가능성을 염두에 두고 연구를 진행하였다. *F. prausnitzii*로 언급된 ESPRIT OTU는 계통주(phylogenetic tree)에 모두 7개의 클래드로 나타났다. 이 계통주는 V1-V2 시퀀스에만 기반한 것이기 때문에, 각 클래드는 전체 16S rRNA 유전자 시퀀스를 적용했을 때에는 더욱 나누어 질 가능성이 있다. 이 클래드 중 F06가 아토피 피부염 마이크로바이옴에서 크게 증가된 것을 확인할 수 있었다(도 3 참조). 아토피 피부염 마이크로바이옴에서 F06의 증가는 모든 연령에 공통적으로 나타났다지만, 1살 이하 그룹에서 특히 두드러졌다 (도 3 참조). 아토피 피부염은 1세 이전에 많이 시작되므로, 이 결과는 *F. prausnitzii* 아종이 이 질환의 발병에 관여하고 있음을 보여주는 것이다.

[0120] 도 4는, A. *F. prausnitzii*스트레인의 16S rRNA 유전자 내 V1-V2 영역, B. F06 V1의 공통서열, C. 전체 F06 454 분석, D. V1 시퀀스의 상대적인 존재비를 나타낸다.

[0121] *F. prausnitzii*의 5개의 스트레인인 A2-165, M21/2, L2-6, S3L/3, KLE1255의 유전체는 HMP (Human microbiome project)를 통해 시퀀스 되었다. 이 중 L2-6 스트레인은 나머지 4개의 스트레인과 비교했을 때 매우 독특한 V1-V2 영역, 특히 V1 영역을 갖고 있으며, F06 클래드와 잘 매칭되었다(도 4 참조). V1-V2 영역은 16S rRNA 유전자의 일부에 불과하지만, 서로간의 거의 완벽한 매칭 (도 4 참조)을 하는 것은, L2-6와 F06 세균들이 매우 가까운 관계임을 나타내는 것이다. *F. prausnitzii* 5개 스트레인의 15,825개 예측 단백질 시퀀스를 BLASTP를 이용해 서로 비교해서 겹쳐지는 유전자들을 제거한 결과, *F. prausnitzii* pangenome에 총 7,253개의 유전자가 있음이 밝혀졌다 (도 8 참조). L2-6 strain에는 855개의 특정 유전자(unique gene)가 있고, 다른 스트레인에도 비슷한 수가 있는 것으로 나타났다. 장내 마이크로바이옴과 *F. prausnitzii* pangenome을 비교하기 위해, 샘플 중 8개(실험군과 대조군 각각 4개의 샘플)를 선별하여 일루미나 HiSeq 2000 플랫폼(Illumina HiSeq 2000 platform)을 사용하여 전체 게놈 샷건 시퀀싱(whole genome shotgun sequencing)을 수행 하였고, 샘플당 평균 552 Mb의 시퀀스를 얻었다. 이 8개의 샘플은 서로 비슷하게 높은 비율의 *F. prausnitzii* 함량을 기준으로 선택되었다(19-36%). 일루미나 분석(Illumina reads)을 *F. prausnitzii* pangenome에 맵핑했을 때, 대부분(87.4%)의 L2-6 특정 유전자가 대조군의 분석보다 아토피 분석에 잘 매칭되는 것을 볼 수 있었다(도 8 참조). 반면에, A2-165와 KLE1255 특정 유전자는 일반인의 분석 결과에 더욱 잘 매칭되었다. 종합해 볼 때, F06 에 속하는 세균들이 L2-6의 V1-V2 뿐 아니라, 유전체상에서도 높은 유연관계가 있음을 알 수 있다.

[0123] **아토피 마이크로바이옴의 대사기능의 변화**

[0124] 아토피 피부염 마이크로바이옴의 대사적 변화는, 일루미나 분석(Illumina reads)을 *F. prausnitzii* pangenome과 KO 데이터 베이스에 맵핑해 보는 방법으로 확인하였다. *F. prausnitzii* pangenome 어프로치는, 메타게놈에 *F. prausnitzii* 함량이 높기 때문에 (19-36%) 효과적이었다. *F. prausnitzii* pangenome은 단지 5개의 스트레인으로 만들어 졌지만, 크론 병(Crohn disease)에서 위축되는 것이 알려진 A2-165와 본 연구에서 아토피 연관

성이 드러난 L2-6등 생물학적으로 중요한 두 스트레인인 포함되어 있다는 점이 중요하다. Mapping 결과를 해석하기 위해서, *F. prausnitzii* pangenome 은 KO 데이터베이스로 분석했고, 아토피 실험군과 대조군에서 매칭 분석(matching reads) 수가 다른 ($P < 0.05$) KO들을 찾았다. 팬게놈의 총 1,332 KO 중에 415 KO가 아토피 실험군과 대조군 사이에 통계적으로 유의하게 차이가 있었으며, 이 중 122 KO가 실험군에서 늘어나고, 293 KO가 대조군에서 늘어난 것을 확인하였다 (도 5 참조).

[0125] 아토피 피부염의 마이크로바이옴에서 늘어난 KO는, 산화 스트레스(oxidative stress; peroxiredoxin, DMSO reductase, and *sufBC* operon 등)에 대응하기 위한 대사기능과 다양한 경로(pathway)인 전이금속 수송체(transition metal transporters; Fe, Ni, Zn, and Mn 등), 및 뮤신(mucin)의 주요 구성물인 GalNAc를 수송하고 분해 대사할 수 있는 기능이다(도 5 참조). 반면에, 아토피 마이크로바이옴에서 줄어든 유전자들은, 각종 아미노산(amino acids), 뉴클레오티드(nucleotides), 펩티도글리칸(peptidoglycan), 코팩터(cofactors)의 생합성 유전자들이었다(도 5 참조). 손상된 장 환경은 숙주로부터 흘러 나온 아미노산, 코팩터, 코엔자임과 같은 일반적 영양소와 함께, 뮤신 성분인 GalNAc와 같은 특수한 영양물질이 증가되어 있을 수 있다. 일반 영양소의 증가는 마이크로바이옴 내의 생합성 유전자의 감소를 초래하고, GalNAc와 같은 특수 영양소의 증가는 이들 물질을 활용할 수 있는 영양 요구성 종(auxotrophic specialists)이나 유해 균주(pathobionts)의 선택적 증가를 초래할 수도 있다. 이런 장내 환경은 다시 장 표면의 손상을 촉진하고, 주기를 형성하며 장 마이크로바이옴의 부조화(dysbiosis)를 가속화시킬 수 있다. *F. prausnitzii* 5개의 스트레인 중에 유독 L2-6 만이 GalNAc를 활용하는 유전자 클러스터를 갖고 있다 (도 5 참조).

[0126] KO 데이터 베이스에 일루미나 분석(Illumina reads)을 맵핑하는 두 번째 방법에서는, 총 5,832 KO 중에 122 KO가 아토피 실험군의 메타게놈과 일반인 대조군의 메타게놈 사이에 차이를 보였다. 아토피에서는 66 KO, 대조군 메타게놈에서는 56 KO가 각각 증가되었다. KO 분석은, *F. prausnitzii* 팬게놈 분석에 비해 결과도가 낮지만, *F. prausnitzii* 외의 메타게놈을 포함하기 때문에 가치가 있는 결과이다. *F. prausnitzii* 팬게놈 분석과 마찬가지로 KO 분석은, 아토피 메타게놈에서 금속 수송체, GalNAc 이용, 산화 스트레스 대응기능의 증가와, 아미노산, 뉴클레오티드, 코팩터의 생합성 기능의 감소를 나타냈다. 그러나, L-fucose의 이용(L-fuculokinase and L-fucose isomerase)과 관련된 유전자들과 같이, 새로운 유전자들의 증가도 나타났다. L-fucose는 뮤신 글리코프로테인(mucin glycoprotein)에서 방출되며, GalNAc와 함께 *Bacteroides thetaiotaomicron*와 같은 장내 세균에 중요한 영양 성분으로 사용된다. 글루타티온 S-트랜스퍼라아제 군(glutathione S-transferase family), 글루코오스-6-포스페이트 1-디하이드로게나아제(glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase), 글루타메이트 디카복실라아제(glutamate decarboxylase), 글리옥실레이트(glyoxylate)와 디카복실레이트 메타볼리즘(dicarboxylate metabolism) 관련 유전자들의 증가가 새롭게 발견되었다. 글루타티온(Glutathione)은 시스테인과 글루타메이트의 트리 펩타이드이고, 세균들이 염증성 캐스케이드(inflammatory cascades) 과정에서 발생하는 활성 산소와 질소 대사산물(nitrogen metabolites)이 유발하는 산화 스트레스(oxidative stress)를 세균들이 견디며 항상성(homeostasis)을 유지할 수 있도록 한다. 글루타티온 S-트랜스퍼라아제(Glutathione-S-transferase)는 환원된 글루타티온과 퍼옥사이드 지질(peroxidized lipids)등과 같은 내인성 화합물을 퀴누게이트시켜서 해독 과정으로 가도록 한다. *E. coli*에서 글루코오스-6-포스페이트 1-디하이드로게나아제 레벨(glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase level)이 산화 스트레스 하에서 증가하여 글루타티온과 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)의 항산화 물질(antioxidant molecules)의 증가로 이어진 것이 보고된 바 있다. 글루타메이트 디카복실라아제(Glutamate decarboxylase)는 *E. coli* 0157:H7과 *Saccharomyces cerevisiae*에서 항산화 물질로 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 또한, 글리옥실레이트(glyoxylate)와 디카복실레이트 메타볼리즘(dicarboxylate metabolism)이 항산화 과정(antioxidation process)에 관여 하는 것으로 알려져 있다. 종합적으로 볼 때, 이러한 유전자 존재 패턴은 아토피 피부염 환자의 장 표면이 염증으로 인한 조직 손상이 많다는 것을 더욱 확실시 하는 증거이다(도 5 참조).

[0127] 다양한 영양 요구체(auxotroph)와 유해균(pathobiont)들이 아토피 피부염 마이크로바이옴에서 증가된 것으로 판단되어, 이들이 보유한 PTS system의 GalNAc-specific IIA component 유전자 (*agaF*, K02744)의 다양성을 살펴 보았고, 그 결과 이 유전자가 매우 다양한 형태로 존재함이 밝혀졌다. 다양한 종들에서 뮤신 이용 유전자들이 증가한다는 것은 아토피 피부염의 장 환경이 L2-6 타입 세균들 외에 다양한 영양 요구체(auxotroph)와 유해균(pathobiont)이 번성한다는 것을 나타내고, 이것은 아토피 질환의 진행과 만성화와 관련이 있다고 볼 수 있다.

[0129] 도 6은, 실험군 및 대조군의 SCFAs의 분석을 나타내는 그래프이다.

[0130] *F. prausnitzii* F06 아종의 증가와 뷰틸레이트와 프로피오네이트의 감소

[0131] 장 마이크로바이옴에서의 SCFAs 생산은 큰 건강상 이점을 갖고 있다. 아토피 피부염의 실험군과 대조군 마이크로바이옴 사이의 SCFAs 생산량 차이를 보기 위해서 가스 크로마토그래피-질량 분석(gas chromatographic-mass spectrometric)을 실시하였다(도 6 참조). 주요 SCFAs인, 아세테이트, 프로피오네이트, 뷰틸레이트, D와 L-락테이트를 *F. prausnitzii*의 총량은 비슷하지만, F06 OTU level에서 차이가 많이 나는 실험군과 대조군 샘플들을 골라서 짝을 이루어 비교하였다(도 6 참조). 이 샘플들은 모두 *F. prausnitzii*의 양이 *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii*, *Rosburia*등의 다른 SCFAs 생산 세균들의 총합에 비해 월등히 높아서, 다른 균들의 적은 영향은 무시할 수 있는 정도이고, *F. prausnitzii*의 영향인 것으로 해석할 수 있다. 12개의 쌍을 비교 분석한 결과, F06 레벨이 낮은 샘플이 F06 레벨이 높은 샘플보다 뷰틸레이트(butyrate)와 프로피오네이트(propionate)의 양이 높게 나왔다(도 6 참조). 이러한 SCFAs에서의 양이 크게 차이 나는 것은, 실험군과 대조군 사이의 장 환경이 매우 다를 것을 시사하는 것이어서 중요한 데이터이다. 연령과 같은 아토피 피부염 외의 차이점은 SCFAs 프로파일에 큰 영향이 없었고, 이 결과는 F06 level이 가장 중요한 요인임을 알 수 있다.

[0132] F06 클레드와 관련이 있는 L2-6 스트레인과 다른 4개의 스트레인들도 모두 같은 뷰틸레이트(butyrate) 생합성 경로를 갖고 있기 때문에, 경로의 발현에 차이가 있는지를 알아보기 위해, 키 엔자임 뷰티릴 CoA: 아세테이트 CoA-트랜스퍼라아제(key enzyme butyryl CoA:acetate CoA-transferase)의 유전자를 조사해 보았다. 각 스트레인에 있는 이 유전자의 프로모터를 합성해서 프로모터-프루브 벡터(promoter-probe vector)에 *lacZ* reporter 앞쪽으로 클론(clone)해서, *E. coli*에서 유전자 표현형(gene expression)을 비교 하였다(도 6 참조). 비록 *F. prausnitzii* host에서 비교한 것은 아니지만, 모두 같은 조건으로 비교하였기 때문에 상대적 프로모터 세기(promoter strength)는 비교가 가능하다. 결과적으로 A2-165 스트레인의 프로모터가 L2-6와 그 밖의 스트레인에 비해 상당히 강력하다는 것이 밝혀졌다(도 6 참조). 실제로, 이러한 결과는 A2-165와 L2-6 스트레인의 뷰틸레이트 생산성 차이를 발표한 논문과 결과가 일치하였다. 이 결과들은 샘플의 뷰틸레이트 레벨이 *F. prausnitzii* 아종 구성에 의해 정해진다는 것을 보여준다. 따라서, 아토피 피부염과 관련해서, *F. prausnitzii*의 부조화(dysbiosis)가 A2-165 타입의 세균들처럼 높은 뷰틸레이트 생산자(high butyrate producer)를 위축시켜서 결국 뷰틸레이트 생산성(butyrate production)을 낮추는 결과를 초래한 것이라고 볼 수 있다.

[0134] 도 7은, *F. prausnitzii*의 기능장애와 관련된 AD의 제안 모델을 나타낸다.

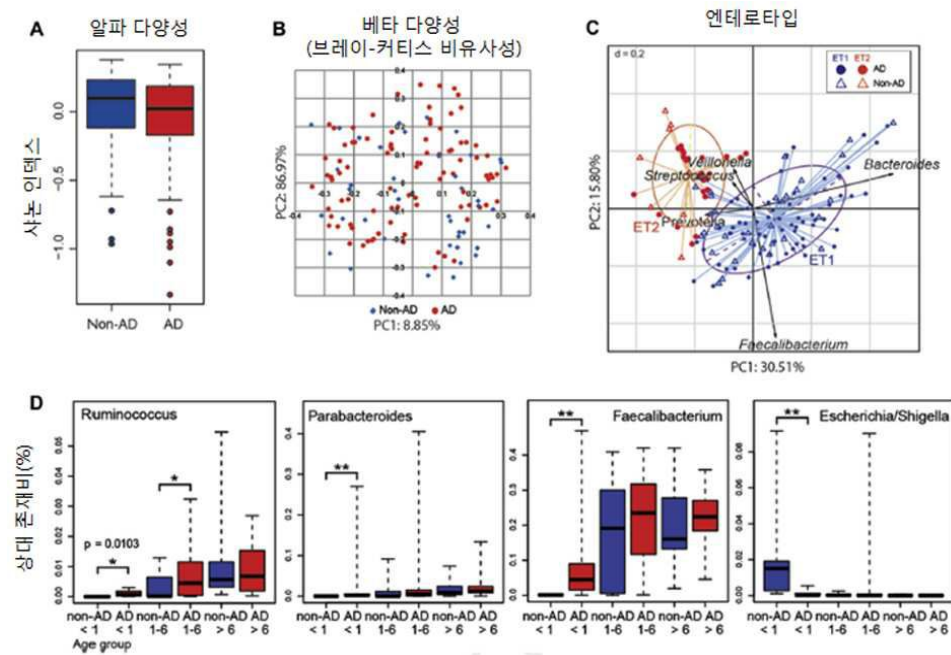
[0135] 인간의 장내 미생물 중 우점종인 *F. prausnitzii*는 SCFAs생산을 통해 장 건강에 좋은 역할을 하는 세균으로 알려져 왔다. 특히, 뷰틸레이트는 항염증 기능이 있고, 장 표면 세포에 직접적인 에너지로 쓰인다. *F. prausnitzii* 레벨과 SCFAs 생산성의 감소는 크론 병(Crohn disease)과 관련이 있다. *F. prausnitzii* 아종 간의 균형, 특히, L2-6와 A2-165타입 세균들 간의 변화가 SCFAs 생산성에 영향을 준다는 것이 밝혀졌다. 아토피 피부염 메타게놈에는 GalNAc와 L-fucose와 같은 뮤신의 구성요소와 손상된 장 표피 세포에서 흘러나올 수 있는 다양한 영양물질을 활용하는 유전자들의 증가가 나타났다(도 5 참조). 이는, 장 표피세포에 염증이 증가한 것을 의미하며, 포괄적으로 "leakey gut syndrome"에 해당한다. 장 표면에 이런 손상이 *F. prausnitzii*의 부조화나 다른 원인으로 인해 생기면, *F. prausnitzii*의 부조화를 촉진하고 동시에 다양한 영양 요구체(auxotroph)와 유해균(pathobiont)의 성장을 촉진하게 된다. 결국, *F. prausnitzii*의 부조화와 장 표피세포 염증의 조절장애(dysregulation) 간에 피드백 루프가 형성된다.

[0137] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

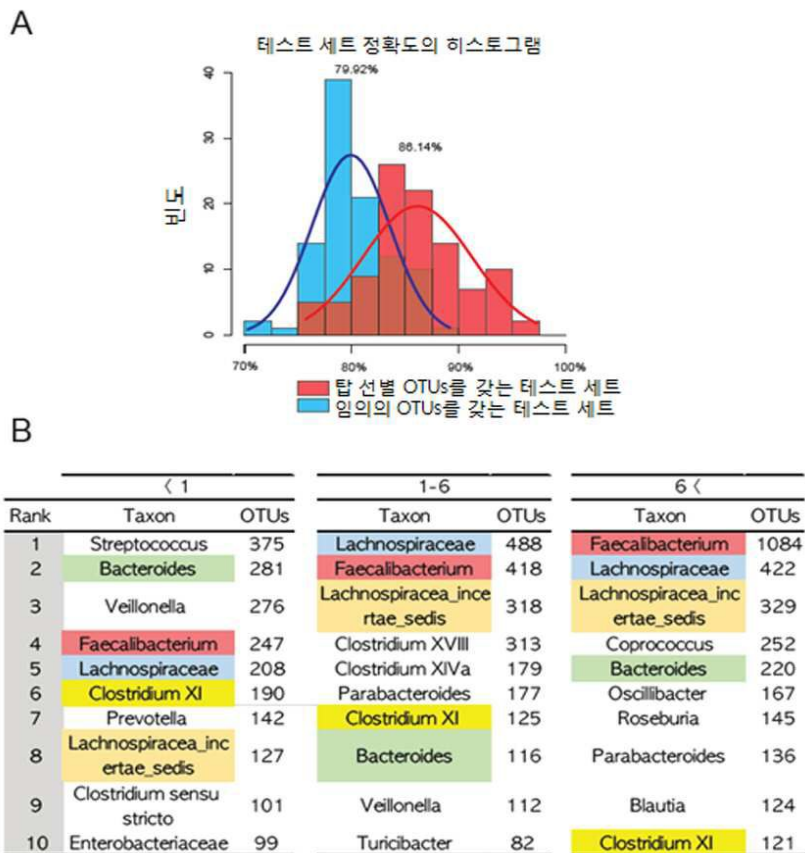
[0138] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

도면

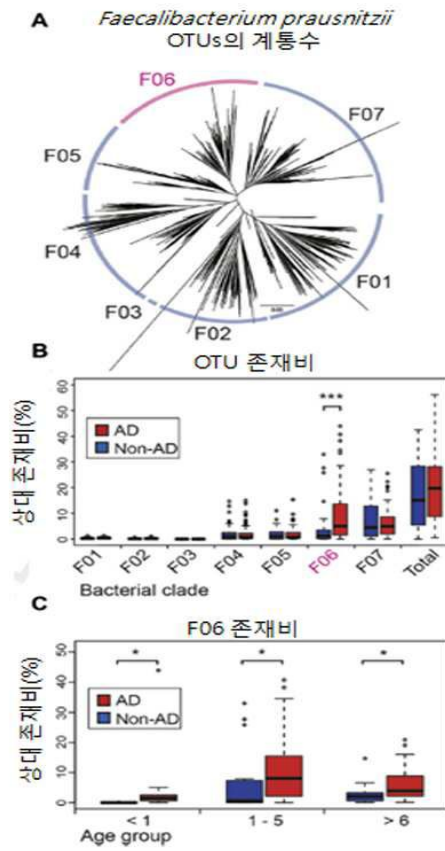
도면1



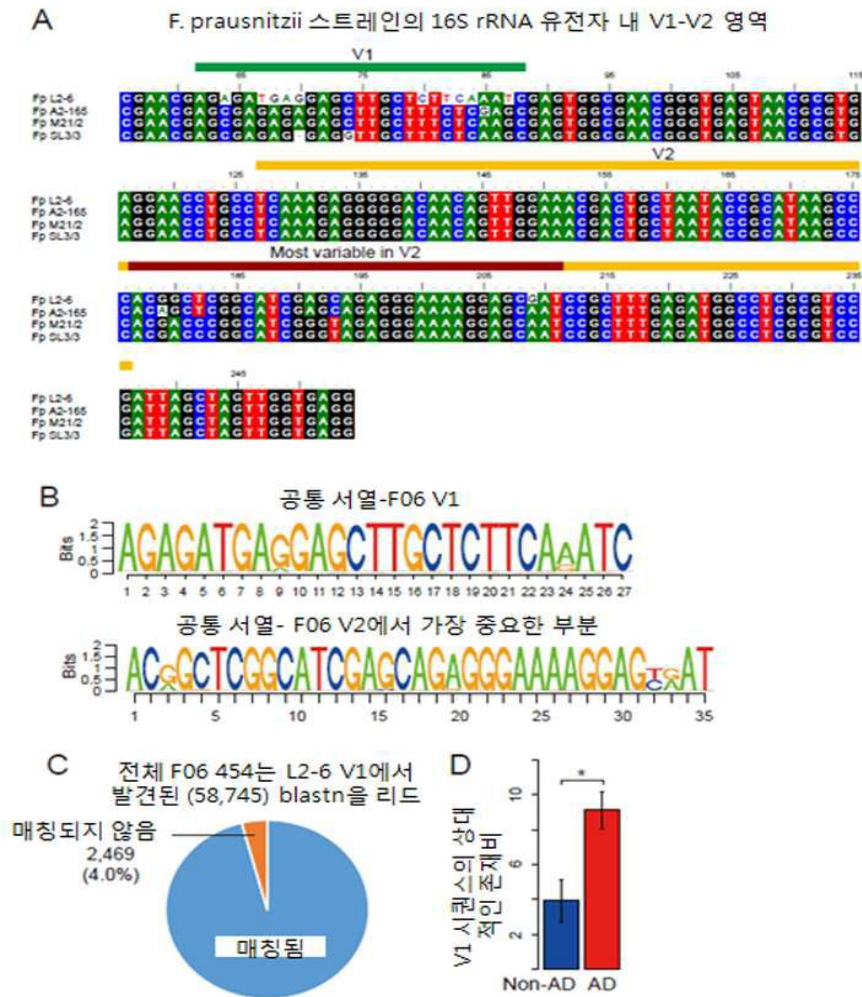
도면2



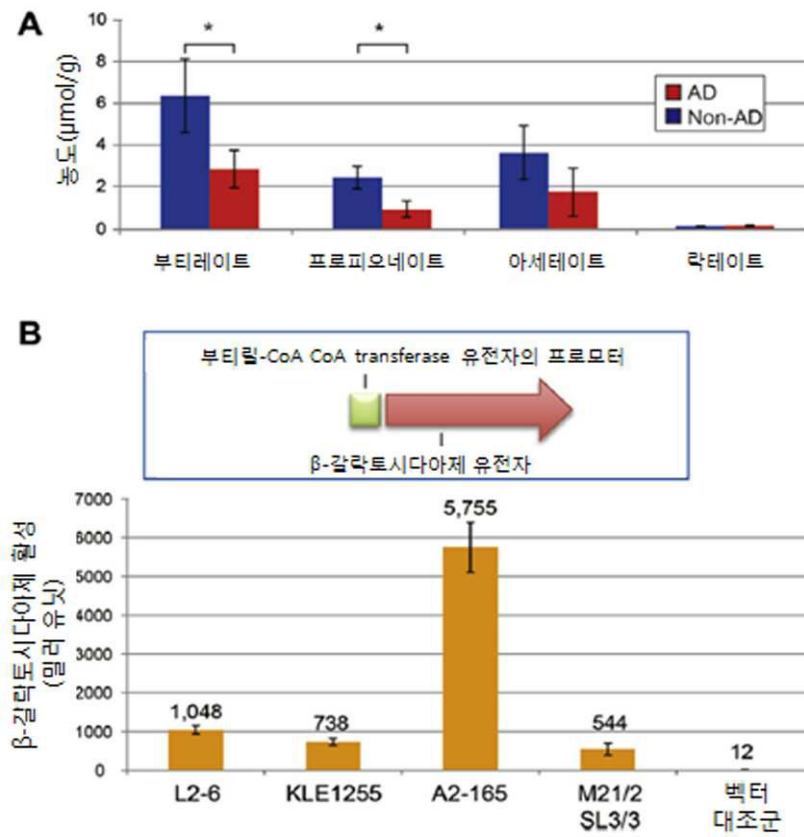
도면3



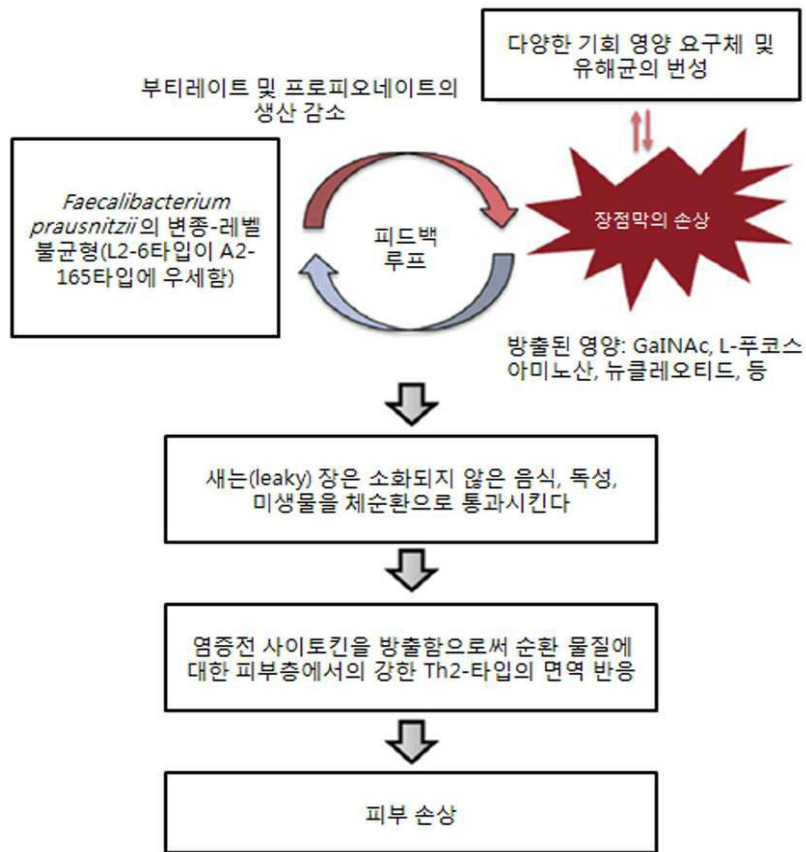
도면4



도면6



도면7



도면8

