

세균 외독소 : 병원성 기전과 생화학적 성질

李 泳 南

연세대학교 의과대학 미생물학교실

(Received November 1, 1977)

Young Nam Lee

Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120

Bacterial Exotoxins: Biochemistry and Pathogenic Mechanisms at Subcellular Level

대부분의 병원성 세균은 세균이 生産하는 독소에 의해 숙주의 정상적인 기능을 저해하거나 또는 병원균이 숙주의 세포 안에서 증식함으로써 숙주 세포의 생물학적 기능을 마비시키는 기전에 의해 질병을 야기시킨다. 前者에 좋은 例로는 *Clostridium botulinum* 이 분비하는 보툴리눔 독소에 의한 食中毒과 *Corynebacterium diphtheriae* 가 분비하는 디프테리아 독소에 의한 疾患을 들 수 있으며 후자의 경우에는 *Streptococcus pneumoniae* 가 원인체인 폐렴과 *Mycobacterium tuberculosis* 에 의한 結核등을 들 수 있다. 매우 드문 경우이긴 하지만 두가지 기전작용 모두에 의해 疾患이 야기되는 수도 있다.

대다수의 세균은 대사물질의 하나로, 소위 외독소(exotoxin)이라 불리우는 물질을 뚜렷한 自己溶解가 없이 주위 환경에 분비 배설한다. 이와는 달리 Gram 염색에 陰性을 보이는 균주중, 數種은 주위 환경에 毒性 대사물질을 분비하는 것보다는 이런 毒性 물질을 自己 세포조직의 일부로, 특히 세포질막의 구성성분으로 함유하고 있는데 이런 毒性 물질을 內毒素(endotoxin)이라 한다. 外毒素과 內毒素은 이처럼 외부로 분비된 毒物質이나, 아니면 세포의 구성成分이나의 틀

Table I—Differentiation of exotoxins and endotoxins

Exotoxins	Endotoxins
1. Bacterial metabolites excreted into surroundings	Bacterial cell membrane components
2. Protein	Lipopolysaccharide complex
3. Relatively heat-labile	Relatively heat-stable
4. Highly antigenic	Not quite antigenic
5. Converted into antigenic toxoid	Not converted into toxoid
6. Very potent, highly specific in the pharmacological actions	Weakly toxic, less specific in the pharmacological actions
7. i.e. Diphtheria toxin, tetanus toxin, etc	Endotoxins of gram-negative enterics

린 점 이외에도 여러가지 면에서 틀린 性質을 나타낸다. 예를 들면 이들 두 毒素의 열에 대한 安定性, 산 및 단백 분해 효소에 대한 敏感度, 抗原性, 疾患의 樣相, 毒素의 毒力 등이 현저히 틀리며, 이들 두 毒素의 기본적인 生化學的 性質이 또한 相異하다(Table I).

사람에게 병을 일으키는 수 많은 세균이 분비하는 多數의 外毒素중, 이곳에서는 *Corynebacterium diphtheriae*의 外毒素인 디프테리아 독소와 *Vibrio cholerae*가 분비하는 콜레라 腸內毒素에 관해 주로 論하기로 하며, 디프테리아 독소와 生化學的 病因性 기전이 비슷한 *Pseudomonas aeruginosa*가 분비하는 pseudomonas 外毒素과 콜레라 腸內毒素과 病因性 기전이 유사한 *Escherichia coli*의 腸內毒素에 관하여는 간략하게 언급하고자 한다.

디프테리아 毒素

디프테리아 外毒素은 많은 細菌毒素 가운데 毒素生成력과 박테리오파지의 상관관계 및 유전 기전, 독소의 生化學的 性質, 毒性기전등 여러가지 면에서 많은 研究가 되어 온 대표적인 毒素라 할 수 있다.

1951년 Freeman¹⁾이 *C. diphtheriae*의 毒素生成력이 디프테리아균이 temperate bacteriophage에 의해 감염된 후 야기되는 溶原性和 매우 밀접한 관계가 있음을 관찰한 이래, 곧이어 Barksdale²⁾, Groman 등³⁾ 非毒素生成균주가 Tox⁺ gene을 갖고 있는 phage(이런 phage를 β -phage라 부른다)에 의해 용원화 되면 毒素生成균주로 변환됨을 발견, 독소생성균주는 항상 β -phage에 의해 용원화된 *C. diphtheriae* 균주임을 확증했다. 毒素生成균주 즉 용원화된 균주가 自然的이거나, U.V.조사, 또는 약품처리등에 의한 결과로 phage 감염으로부터 치유됐을 경우, 동시에 毒素生成력을 상실한다. 물론 Tox⁺ gene을 갖고 있는 균주라 할지라도 직접 毒素을 生産키 위해서는 aeration, 낮은 iron의 농도, 배지성분등 적당한, 배양조건이 필요하지만, *C. diphtheriae* 균주의 毒素生成력이 균주의 용원화와 不可分의 상관관계가 있고 Tox⁺ gene이 phage의 DNA의 일부분이 밝혀진 후⁴⁾, 디프테리아 독소는 숙주세균이 phage의 Tox⁺ gene의 조절을 받아 生産하는 phage의 대사물질중의 一種이라 定義할 수 있다.

디프테리아 독소는 分子量 62,000 Dalton 정도의 球型 단백질(globular protein)이다. 이 毒素의 等電點(pI)은 약 4.1로 단백질체가 산성을 나타낸다. 디프테리아 독소는 지질, 당류 또는 금속 등 非단백성 물질이 전혀 함유되어 있지 않은 단순단백으로 열과 산등의 처리에 매우 약하다.

디프테리아 毒素의 역가는 가) guinea pig에 독소를 피하주사를 했을 경우 4~5일 안에 죽음을 초래할 수 있는 최소의 量 즉, 최소 치사량으로 표시하든가, 혹은 나) 토끼나 guinea pig 피부에 근육주사를 했을 경우, 조직피사를 일으키는 量으로 표시하든가, 다) HeLa cell이나 Vero cell 등 조직배양세포에 나타나는 toxic effect로 측정하기도 한다. 라) 또한 독소의 生化學的 性質이 밝혀진 이래로는 단백질성에 미치는 毒素의 영향을 봄으로써 毒素의 力價를 측정하는데 이에 대해서는 후에 자세히 論하기로 한다.

디프테리아 疾患의 死因으로는 흔히 디프테리아 균이 호흡기에 감염되어 증식할때 기관지에 형성하는 偽膜으로 인한 공기 통로의 차단으로 질식사물 들고 있으나, 이보다는 감염장소에서 멀리 떨어진 심장, 신장, 간, 폐, 신경조직등 생명 유지에 매우 重要的 여러 기관들의 조직피사 및 生理기능의 장애 등이 死因의 主要原因이 되고 있는 것이다. 심장기능의 장애가 많은 환자의 死因으로 보고된 경우는 흔히 볼 수 있다⁵⁾.

실험동물에 디프테리아 독소를 투여했을 경우, 동물에 따라 독소에 의한 死因이 조금씩 틀리

긴 하지만 대개는 毒素에 의한 내부기관들의 조직들의 손상 및 生理기능의 異常이 死因으로 알려져 있다.

조직배양세포에 독소를 加했을 경우 세포를 致死케 하는데, HeLa cell의 경우⁶⁾ 독소를 가한 수시간 후에 세포가 과립 모양으로 변하기 시작, 드디어는 원형화(rounding up)되었다가, monolayer로부터 떨어져 나와 죽은 세포가 된다. 이렇듯 모양의 변화뿐만 아니라, 세포내의 기능도 독소에 의해 영향을 받는데, 여러가지 기능 중, 단백질합성기능이 일차적으로 장애를 받게 된다.

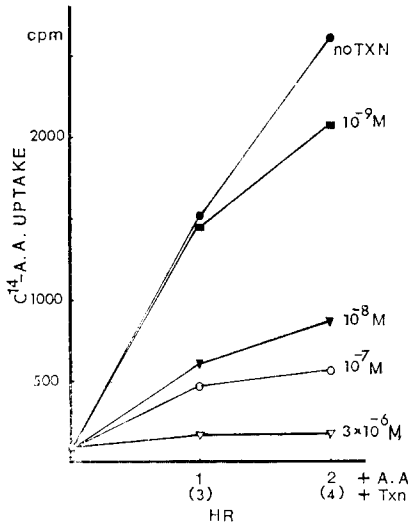
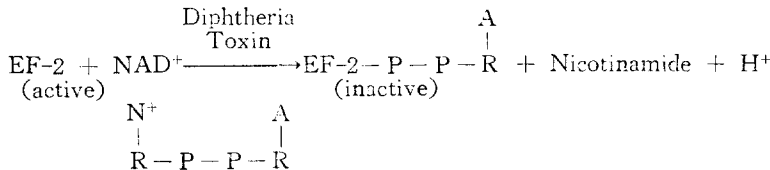


Fig. 1—Effect of diphtheriatoxin on protein synthesis in HeLa cells. Uniformly labeled amino acid was added to cell culture after 2 hours of addition of diphtheria toxin.

세포의 donor site로부터 acceptor site로 옮겨가는 과정과 m-RNA가 한 codon만큼 옮겨가는 과정인 translocation process에 요구되는 효소로 분자량이 약 100,000 Dalton 정도다.

디프테리아 독소는 이 EF-2의 활성을 不活性化 시키는데 이에는 nicotinamide adenine dinucleotide(NAD⁺)가 필요하다. 디프테리아 독소, NAD⁺와 EF-2의 상호작용은



표시 할 수 있으며 이때 diphtheria toxin은 효소로 작용하는 것이다. 이과정의 분석은 radio-labeled 된 NAD⁺를 사용하면 가능한데, 흔히 ¹⁴C-NAD(adenine에 ¹⁴C이 labeled 된 것)와 ³H-NAD⁺(adenine에 ³H이 labeled 된 것)을 사용한다. EF-2(흔히 토끼의 reticulocytes에서 얻는 것), ¹⁴C-NAD⁺ 또는 ³H-NAD⁺와 디프테리아 독소를 25°C에서 15분간 incubate 시킨뒤 5% trichloroacetic(TCA)로 반응을 중단, TCA에 침전되는 물질의 radioactivity을 잴므로 분석이 시

행되고 있다. NAD⁺ 존재하는 디프테리아 독소에 의해 生成되는 EF-2-R-P-P-R(이하

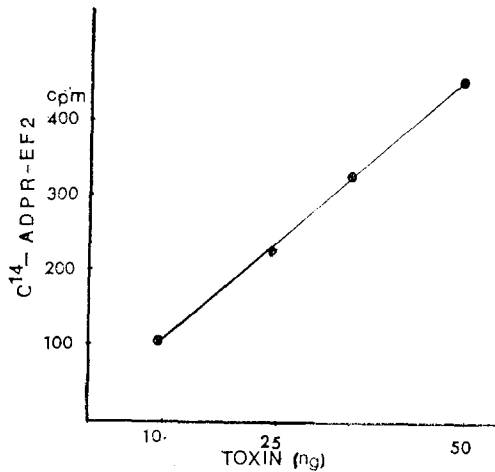


Fig. 2—Correlation of ADP-ribosylation of EF-2 vs concentration of diphtheria toxin.

이라 부른다. 이 nicked toxin을 β -mercaptoethanol이나 dithiothreitol, 또는 기타의 환원상태로 처리하면 두개의 peptides로 나누어 지는데(intact toxin은 환원상태로 처리해도 두개의 peptide로 나누어 지지 않는다), 한 peptide는 분자량 24,000정도로 이를 fragment A라 하고 다른 하나는 39,000 M.W 정도의 peptide로 fragment B라 한다(Fig. 3).

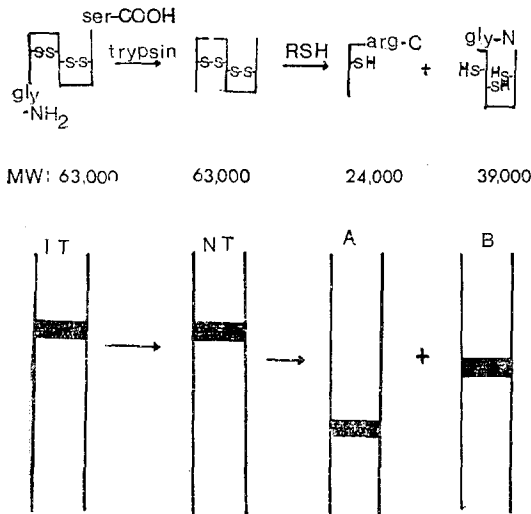


Fig. 3—Schematic picture of intact toxin, nicked toxin, fragment A and B of diphtheria toxin and their migrating pattern by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. RSH means any reducing environment.

ADPR-EF-2)의 량은 가한 독소량에 의존하는 것으로(concentration dependent) Fig. 2에서 보는 바와 같다. EF-2의 NAD⁺존재하, 디프테리아 독소에 의한 ADP-ribosylation에 관한 kinetics는 문헌^{8,9,10}을 참조하기 바란다.

디프테리아 독소는 분리 정제되어 그 물리적, 화학적 성질이 어느 정도 알려져 있다. 디프테리아균주에 의해 분리되는 독소는 한개의 polypeptide로 된 단백질로 두개의 disulfide bridges를 갖고 있는데(free sulfhydryl이 없다), 이를 intact toxin이라 부른다. 이 intact toxin은 동물에는 毒性을 나타내지만 cell-free system에서 EF-2를 不活性化시키는 효소활성은 결여되어 있는 것으로, 이 intact toxin을 trypsin 같은 단백질분해 효소로 처리시에는, 동물에 대한 독성도, 효소 활성도 보유하고 있는 form으로 變型되는데 이를 nicked toxin

ribosylation하는 enzymatic activity를 갖고 있는데 비해 fragment B는 효소활성이 없다. 또한 fragment A는 산, 알칼리에 대해 비교적 안정하지만 fragment B는 실온에서도 不安定하여 白色 침전물로 되는데 fragment B를 용액화시키려면 높은 농도의 urea나 guanidine 또는 detergents를 첨가해 주어야 한다. 이러한 연유로 fragment B 보다는 fragment A에 대한 연구가 좀더 많이 진행되었다. fragment A의 amino acid sequence를 보면 N-terminal이 glycine이고 C-terminal은 arginine으로 밝혀졌다¹¹. fragment A의 C-terminal 쪽의 amino acid의 순서는 trypsin이 작용하는 부위에 따라 다른데, asparagine-arginine, asparagine-arginine-valine-arginine과 asparagine-arginin-valine-arginine이 그 主流를 이루고 있다. 이에 대한 자세한 것은 문헌¹²을 참고하기 바란다.

fragment B의 生化學的 기능에 대해서는

뚜렷히 밝혀진 것이 없으나, HeLa cell에 fragment A를 가했을 경우, HeLa cell의 morphology나 protein synthesis에 아무런 이상이 없으나 이 HeLa cell에서 cell-free extract을 얻어 cell-free extract의 단백질합성능을 검토시 fragment A만으로도 cell-free extract의 단백질합성과정을 저해하는 것이 알려진 고로 fragment B는 디프테리아 독소분자가 세포내에 도달하는데 꼭 필요로 되는 것이 아닌가 하는 추측을 할 수 있다. 즉 fragment B가 독소 분자가 세포막을 통과하는데 주요한 역할을 하지 않나 하는 생각인데 이에 대한 직접적인 실험적 증명은 아직 되어 있지 않다. 이렇듯 intact toxin, nicked toxin, fragment A와 fragment B는 각기 다른 양상의 생리활성을 보여 주는데 이를 요약하면 Table II에서 보는 바와 같다.

Table II—Comparison of biological activities of diphtheria toxin, fragment A and fragment B of diphtheria toxin

	Toxicity ¹	Inhibition of Protein Synthesis ²	ADP-Ribosylation of EF-2
Intact Toxin	+	+	-
Nicked Toxin	+	+	-(+) ³
Fragment A	-	-	+
Fragment B	?	?	?

1: Toxicity was tested in guinea pigs

2: Inhibition of protein synthesis was measured in HeLa cells

3: No ADP-ribosylation of EF-2 by nicked toxin in absence of β -mercaptoethanol and ADP-ribosylation of EF-2 in presence of β -mercaptoethanol.

디프테리아 독소에 관하여 독소의 물리적, 생화학적 성질, 독소의 생리적 기전 작용에 대해서는 비교적 많은 연구가 되어 왔으나 독소가 독력을 나타내기 위해 세포내에 도달되는 과정 즉 entry 및 transport에 대해서는 좀더 많은 연구가 필요로 되고 있다. 또 세포내에 이른 독소분자가 어떤 과정을 거쳐 어떻게 변하는지에 대해서도 알려진 것이 없다.

이상으로 디프테리아 독소에 대해 독소의 생화학적 성질 및 기전작용을 중심으로 살펴보았는데 최근 디프테리아 독소에 관한 일반적인 문헌으로는 Pappenheimer의 논문을 들고 싶다¹³⁾.

綠膿菌의 外毒素

녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)이 생산, 분비하는 數種의 extracellular substances 중 독력(virulence)이 가진 강한 물질이 trypsin과 열에 약한 단백질의 外毒素, 즉 녹농균 외독소(PA exotoxin)이다¹⁴⁾. PA exotoxin은 매우 적은 양으로 개, 원숭이 등에 쇼크를 일으키며, 귀를 致死하며¹⁵⁾ 조직 배양 세포의 RNA 합성 및 단백질 합성을 저해함이 보고되었다¹⁶⁾.

PA exotoxin은 membrane ultrafiltration, hydroxylapatite, ion-exchange cellulose chromatography 및 gel filtration chromatography 방법에 의해 분리, 순수 정제하는데 정제된 독소는 핵산, 색소, lipopolysaccharide 등이 함유되어 있지 않는 단백질로 약 54,000 M.W의 분자량과 5.0 정도의 등전점을 가졌다. 이 PA exotoxin을 SDS-gel electrophoresis를 했을 경우, 분자량이 서로 비슷한 약 6개의 peptides로 나누어 진다. 정제된 독소를 정맥 주사 했을 경우 쥐의 치사량은 (20g의 쥐에 대해) 4~6 μ g 정도로 알려져 있다¹⁷⁾.

PA exotoxin의 生化學的 기전은 디프테리아 독소나 또는 fragment A와 유사해 매우 흥미롭다. reticulocyte의 cell-free system을 이용해 단백 합성에 미치는 PA exotoxin의 영향을 살펴본 결과 PA exotoxin이 NAD^+ 의 존재하 elongation factor-2의 ADP-ribosylation을 촉매시켜 polypeptide의 elongation step을 방해, 결과적으로 단백질 합성을 저해하는 것이다¹⁸⁾. PA exotoxin에 의한 EF-2의 ribosylation은 열에 약한 과정으로 PA exotoxin을 열로 처리한 후 이 반응을 유도시키면 PA exotoxin이 효소 활성을 잃어버리는 것이 디프테리아 독소의 fragment A와는 다른 점이다(Chung, D.C. personal communication). PA exotoxin의 효소 활성은 이 독소의 항체(항독소)에 의해 그 능력을 상실해 버리는데 비해 디프테리아 독소의 fragment A의 항체에 의해서는 아무런 영향도 받지 않는다. 이는 PA exotoxin과 fragment A 사이에 면역학적 상관성이 없는 것을 증명하는 것으로 두 물질의 화학적 구조가 비슷하지 않음을 간접적으로 제시하는 것이다.

이외에도 디프테리아 독소와 PA exotoxin의 유사성, 상이성이 여러면에서 연구 검토되고 있다(Collier, R.J. personal communication).

왜 디프테리아 독소와 PA exotoxin이 같은 기전에 의해 단백질 합성을 저해하는데 대해서 미생물 진화론적 입장에서 여러가지 추측이 있으나 이는 어디까지나 추측 가설일뿐, 正說은 확립되어 있지 않다.

콜레라균의 腸毒素

콜레라균(*Vibrio cholerae*)은 Gram 陰性的의 comma 型的의 작은 桿菌으로 콜레라 疾患의 病原體로 널리 알려져 있는데, 실제로는 이 균 자체보다는 균이 생산, 분비하는 腸內外毒素(enterotoxin)가 cholera 疾患의 실질적인 원인으로 이 毒素가 腸粘膜에 미치는 生理的 結果에 의해 심한 설사가 야기되는 것이다.

콜레라 장독소 역시 熱과 酸에 대단히 약한 단백질로 분자량이 82,000~84,000 Dalton 정도로 알려져 있다¹⁹⁾.

콜레라 장독소를 一名 cholera 素이라 하는데 이는 cholera 균 자체보다는 균의 대사 물질의 일종인 독소가 cholera 疾患의 직접적인 原因體이기에 붙여진 이름이다.

사람, 토끼, 개등이 콜레라 균에 감수성이 큰 동물인고로 콜레라 장독소에 대한 일반적인 실험동물로는 주로 토끼나 개를 사용하나 경우에 따라서는 독소에 의한 guinea pig이나 토끼 피부의 모세혈관의 침투성의 變化를 관찰함으로써 독소의 역가를 측정한다.

직접 실험 동물을 사용해 역가를 측정하는 법보다는 erythrocyte²⁰⁾, human platelet²¹⁾, 지방세포²²⁾ 등에 미치는 독소의 生理的 變化를 관찰함으로써 좀더 쉽게 독소의 역가를 측정하기도 한다. 콜레라 장독소는 이들 세포들의 cyclic AMP(cyclic 3'5'-adenosine monophosphate)의 量을 증가, C'-AMP에 의해 매개되는 모든 생리현상에 영향을 준다. 예를 들면 콜레라 장독소를 조직 배양세포에 加했을 경우, 세포내의 C'-AMP의 量이 상당히 증가되며 이로써 C'-AMP에 의해 phosphorylase-kinase가 活性化됨에 phosphorylase b가 phosphorylase a로 變換되며 phosphorylase a의 작용에 의해 glycogenolysis가 進行된다²³⁾. 쥐에서 유래된 Y-1 adrenal tumor cell에 콜레라 장내독소를 加했을 경우 역시, 세포내 C'-AMP의 量이 급증, 그 결과 steroid 生成力(steroidogenesis)이 進行된다²⁴⁾.

콜레라 장내독소가 소장 점막에 미치는 영향 역시, 장점막세포의 adenylylase를 活性化시켜

ATP가 cyclic 3', 5'-AMP로 變型되는 과정을 촉매시켜 결과적으로 세포내의 C'-AMP량을 증가시킴으로 장점막으로부터 수분과 전해질의 excretion을 촉진시킨다. 이 모든 과정의 총결과가 심한 설사로 나타나는 것이다.

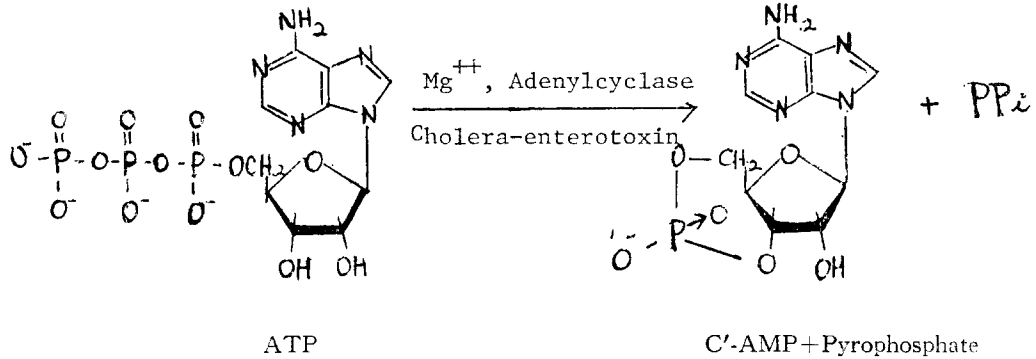


Table III—Cyclic AMP accumulation in chinese hamster ovary cells in presence of cholera-enterotoxin and its antitoxin

Cholera-toxin ng/ml	C'-AMP (p moles/mg protein)
0	50
0.001	50
0.01	50
0.1	50
1.0	200
10.0	500
100.0	600
1000.0	580
10(heated)	—
50(heated)	50
10+Anti-toxin	—
100+Anti-toxin	50

실제 어떤 기전 작용에 의해 콜레라 장독소가 세포내의 adenyl cyclase의 活性化를 유발시키는 지는 잘 밝혀져 있지 않으나, 콜레라 장독소가 장세포의 上皮막의 GM₁ ganglioside와 대단한 친화력이 있고, cholera-enterotoxin과 세포막의 GM₁ ganglioside와의 결합이 우선적으로 이루어져야 adenylcyclase의 活性化가 이루어짐은 이미 잘 알려진 것이다²⁵⁾. 콜레라 장독소에 의한 活性化된 adenylcyclase의 活性化도는 ATP로부터 生成되는 C'-AMP의 量으로 表示되는데 콜레라 장독소의 量과 生成된 C'-AMP의 量과는 농도상관관계가 있는 것으로 이는 Table III에서 보는 바와 같다.

콜레라 장독소는 그 化學成分이 단백질이긴 하지만, 단백 분해효소의 一種인 trypsin에 대해서는 耐性이 있는 것으로 알려져 있다.

콜레라 장독소는 약 84,000 Dalton의 분자량을 갖고 있는데 콜레라 균주를 배양한 상등액에서 이 毒素을 分離 정제시, 이온 교환 크로마토그래피와 Gel-electrophoresis를 많이 利用한다²⁶⁾. 이 독소는 sodium dodesyl sulfate-gel electrophoresis에 의해 2개의 peptides로 나누어 지는데 그 하나는 분자량이 약 29,000 Dalton이고, 다른 peptide는 분자량이 약 53,000이다. 분자량 29,000의 peptide를 "A" subunit라 하며 53,000정도의 peptide를 "B" subunit라 하는데 "A" subunit는 분자량 23,000 Dalton의 "A₁"과 5,000 Dalton의 "A₂"로 나누어질 수 있다. "B" subunit는 분자량 10,5000정도의 적은 peptide가 5개 모여 이루어진 aggregate로 알려져 있다²⁷⁾.

순수 콜레라 장독소에 脂質이나 탄수화물등 이물질이 함유되어 있지 않은 것으로 알려져 있다. 순수 정제되어 結晶화된 毒素의 전자현미경 그림은 독소의 subunit들이 5~6개의 disulfide

band로 연결되어 集合을 이룬 모양을 보여 주는데 中心에 한개의 peptide가 위치하고 그 peptide를 中心으로 주위에 5개의 다른 peptide가 환상을 이루며 서로 연결된 모양을 보여준다²⁸⁾.

콜레라 장내독소의 "A" subunit와 "B" subunit는 그 크기에 다른 것 이외에도 자기 틀린 生化學의 기능을 갖고 있다. "A" subunit는 전 콜레라 장내독소처럼 세포내의 adenylyclase를 活性化시켜 세포내의 cyclic AMP 量을 증가시키지만 "B" subunit는 이런 기능을 갖고 있지 않다. 한편 "B" subunit는 세포막에 결합이 잘되며 GM₁ ganglioside에 대해 전 콜레라 장내독소와 결합을 한다. "B" subunit를 一名 choleraegenoid라 하는데 이는 "B" subunit가 콜레라 장내독소의 抗原성에 크게 기여하기 때문이다. 전 콜레라 장내독소, "A" subunit 및 "B" subunit의 生化學의 기능을 요약하면 Table IV에서 보는 바와 같다.

Table IV—Biochemical properties of cholera-enterotoxin and its subunits

Property	Whole cholera-toxin	"A" subunit	"B" subunit
Stimulation of adenylyclase	+	+	-
Binding to cell membrane	-	-	+
Affinity to GM ₁ ganglioside	+	-	+

실제 실험실에서 콜레라균주의 독소생성균주를 골라 내는 방법(정성방법)으로는 조직 배양된 세균을 많이 쓰는데 이는 먼저 언급한 바와 같이 콜레라 독소가 체내부 cyclic AMP의 量을 증가시키기에, 이 증가된 cyclic AMP에 따라 수반되는 여러가지 反應을 관찰함으로써 가능한 것이다. 널리 알려진 조직배양세균로는 쥐의 Y-1 adrenal cell line이나 chinese hamster ovary cell line을 들 수 있는데 Y-1 adrenal cell에서는 콜레라 장독소 존재하 야기되는 cell의 圓형화(rounding)를²⁹⁾, chinese hamster cell에서는 콜레라 장독소 존재하 야기되는 cell의 장형화(elongation)³⁰⁾로 독소의 유무 존재를 확인 한다.

독소의 정량法으로는 토끼의 회장시험 방법(rabbit ileal loop test)을 채택하는데 이는 토끼의 회장을 얻어 일정한 길이로 양끝을 동여 맨 후 그 속에 일정량의 박테리아의 배양 상등액을 주사, phosphate buffered saline 속에 약 18시간 방치한 후, 회장 속에 모인 saline의 量(ml)과 회장길이(cm)의 비율을 구한 후 배양 상등액 속의 단백질의 量(mg)에 대한 비율을 독소의 역가 단위로 정하는 것이다³¹⁾.

콜레라 장내 독소와 유사한 장내 外毒素(Cholera-alike Enterotoxin)

近來에 이르러 콜레라 疾患과 유사한 증후인 심한 설사를 일으키는 세균 독소에 대한 보고가 많아지고 있다. *Shigella dysenteriae*가 生産하는 여러 毒素중의 하나인 *Shiella* enterotoxin은 분자량이 약 55,000~60,000 Dalton 정도의 단백질로 알려져 있는데, 이 독소 역시 열과 단백 분해효소에 不安定하며 콜레라 독소처럼 심한 설사를 일으키는 原因物質로 알려져 있다³²⁾. *Klebsiella pneumoniae*가 분비하는 毒素³³⁾, *Clostridium perfringens*의 enterotoxin^{33,35)}, *Aeromonas hydrophila*의 enterotoxin³⁶⁾ 및 *E. coli*의 enterotoxin 등이 콜레라 장독소와 病因기전 및 化學的 性質面에서 유사성이 있는 毒素로 현재 알려져 있는데 이 가운데 大腸菌 장독소에 관해 논하고자 한다.

대개는 비병원성균으로 알려진 *E. coli* 가 근래에는 소아, 병약자, 노인 뿐만 아니라³⁷⁾, 건강한 성인에게서 흔히 볼 수 있는 급성 설사의 原因菌으로 주목을 받고 있다^{38,39)}. 실제로 *E. coli* 는 二種의 enterotoxin 을 生産하는데 그 중 하나는 콜레라 장내독소와 유사한, 열에 약한 장내독소(heat-labile enterotoxin)이고 다른 하나는 열에 의해 毒力에 큰 변화가 없는 적은 분자량(1,000~10,000 Dalton)의 단백질의 장내독소(heat-stable enterotoxin)이다. heat-stable enterotoxin 은 주로 유아 설사의 原因체로 알려졌는데⁴⁰⁾, heat-labile enterotoxin 은 건강한 성인 특히 여행자에게서 많이 볼 수 있는 성인 설사의 原因體로 알려져 있다⁴¹⁾.

E. coli 의 heat-labile enterotoxin(이하 LT)는 아직 순수하게 분리되지 못하고 있으나 분자량을 heat-stable toxin(이하 ST)에 비해 상당히 큰 것으로 알려져 있다. Schenkein *et al*⁴²⁾의 보고에 의하면 *E. coli* LT 는 분자량 180,000~200,000정도로 SDS-ge! electrophoresis 에 의해 68,000~70,000 M.W 의 peptide 와 15,000 M.W 정도의 적은 peptide 로 나누어 지며 68,000~70,000 M.W 의 peptide 는 SDS-열처리에 의해 40,000 M.W 의 peptide 로 쪼개어 진다고 했으나, Wishnow group 은 이에 대해 약간 다른 의견을, 즉 80,000 M.W 의 peptide 는 관찰할 수 있으나 180,000~200,000 M.W 는 볼 수 없다고 한다(personnal communication).

E. coli LT 를 分離 정제하는데, 콜레라 장독소를 分離 정제할 때 처럼 특수한 ganglioside-agarose affinity column 이 有用한 것으로 보아⁴³⁾, *E. coli* LT 역시 GM₁ ganglioside 와 친화력이 있음을 간접적으로 알 수 있다. 또한 *E. coli* LT 와 콜레라 장독소 사이에 면역학적 연관성(immunological relatedness)이 있음이 알려져 있다⁴⁴⁾. *E. coli* LT 의 GM₁ ganglioside 에 대한 친화力, 그리고 콜레라 장내독소과의 면역학적 연관성 등으로 이루어 보아 *E. coli* LT 와 콜레라 장내독소 사이에 구조적 유사성이 있음을 쉽게 추측할 수 있다.

E. coli LT 를 생산하는 균주를 검색하는 방법으로는 콜레라 장독소를 생산하는 균주를 검색할 때 처럼 adrenal tumor cell 이나⁴⁵⁾ chinese hamster ovary cell 같은 조직배양된 세포를 사용하는데³⁰⁾ 이는 *E. coli* LT 가 세포내의 adenylyclase 를 活性化시켜 세포내의 C'-AMP 량을 증가, 이로써 여러가지 세포의 성질을 변화시킴으로 가능한 것이다. 콜레라 장독소의 경우처럼 토끼의 회장을 사용해 *E. coli* LT 의 定量이 가능하다⁴⁷⁾. 이렇듯 콜레라 장독소와 *E. coli* LT 는 여러가지 면에서 유사성이 있는데 이들의 성질을 비교해 보면 Table V에서 보는 바와 같다⁴⁷⁾.

Table V—Comparison of properties of cholera-enterotoxin and *E. coli* heat-labile toxin

Property	Cholera-enterotoxin	<i>E. coli</i> LT
Time of maximal effect on gut	3~12 hours	less than 15 min.
Mucosal histological damage	—	—
Increase capillary permeabilty of rabbit skin	+	+
Steroidogenesis on adrenal cell	+	+
Ileal loop fluid accumulation	+	+
Neutralized by cholera antitoxin	+	partially +
Neutralized by ganglioside	+	partially +
Competative inhibition by choleraenoid	+	—
Stimulation of adenylyclase	+	+
Molecular weight	84,000	68,000~70,000

현재 왜 콜레라 장내독소와 *E. coli* LT 사이에 生化學的 및 면역학적 유사성이 있는지는 밝혀지고 있지 않으나, 腸內細菌群에 속하는 *Vibrio cholerae*와 *E. coli* 사이에 독소생산에 관여하는 유전인자(Tox^+ gene)가 세균의 유전학적 기전작용에 의해, 균주사이에 Tox^+ gene의 평행이동이 일어난 것이 아닌가, 그리고 이렇듯 이동한 Tox^+ gene이 새로운 균주에 들어간 후 정착되어 균주 특유의 독소를 생성하는 것이 아닌가 하는 것을 쉽게 추측할 수 있다.

結 語

세균 외독소에 대한 연구는 오래 전부터 되어 왔고 외독소에 의한 疾患의 예방은 독소를 화학적으로 처리하여 얻은 toxoid의 vaccination으로 가능하게 되었다. 外독소에 의해 야기되는 疾患은 치료보다는 예방이 훨씬 더 중요하며, 일단 이들 毒素을 生成하는 균에 의해 疾患이 발생했을 경우, 특히 毒素가 혈류를 통해 전신으로 퍼졌을 때에 다량의 antitoxin을 투여함으로써 치료의 효과를 도모할 수 있으나, 실제 이를 행함에는 난관이 많고, 많은 경우에는 독소증(toxemia)에 의해 생명을 잃는다.

디프테리아 독소에 의한 分子生物學的 면에서의 生化學的 기전은 지난 10여년 동안에 잘 밝혀졌다. 콜레라 장독소의 生化學的 기전 역시 많은 연구가 되어오고 있다. PA exotoxin은 그 化學的 기전이 디프테리아 toxin의 것과 유사해 흥미로우며 *E. coli* enterotoxin 및 기타 최근에 보고되는 여러가지 enteropathogen(장내 병원균)의 장내독소는 콜레라 장내독소와 비슷해 여러학자의 관심을 끌고 있다.

간혹 디프테리아 환자가 발생하긴 하나 예방법이 우수한 고로 임상면에서 크게 문제되고 있지 않지만 *Pseudomonas*에 의한 감염은 hospital infection으로 큰 문제가 되고 있는데 PA exotoxin의 여러 성질을 잘 연구 검토함으로써 PA exotoxin의 toxoid나 antitoxin이 *Pseudomonas*에 의한 hospital infection의 예방에 이용될 수 있는가를 생각해 봄직도 하다.

東南亞 諸國에서는 아직도 장내질환이 큰 문제로 남아 있다. 콜레라 疾患의 면역성은 단기로 cholera 疾患의 예방법으로 vaccination이 큰 효과를 보지 못하고 있다. vaccination에 의한 예방보다는 주위의 위생환경을 개선함이 좀 더 효과적인 것이다.

우리나라에서는 콜레라균이외에 장내병원균에 의해 야기되는 급성 설사에 대한 연구가 초보적인 단계에서 벗어나지 못하고 있는 듯하다. 특히 여름에 많은 이 疾患에 대해 좀더 많은 사람의 관심과 인식 그리고 체계적인 연구가 요구되고 있는 것이다.

REFERENCES

1. V.J. Freeman. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bact.*, **61**, 675-688 (1951).
2. W.L. Barksdale, and A.M. Pappenheimer, Jr. Phage-host relationships in non-toxigenic and toxigenic diphtheria. *J. Bact.*, **67**, 220-232 (1954).
3. N.B. Groman. Evidence for the active role of bacteriophage in the conversion non-toxigenic *Corynebacterium diphtheria* to toxin production. *J. Bact.*, **69**, 9-15 (1955).
4. D.M. Gill, M.T. Uchida and R.A. Singer. Expression of diphtheria toxin genes carried by integrated and non-integrated phage beta. *Virology*, **50**, 664-668 (1972).
5. K.Y. Chin and C.H. Huang. Myocardial necrosis in diphtheria. *Am. Heart J.*, **22**, 690-701 (1941).

6. T.J. Moehring, J.M. Moehring, R.J. Kuchler and M. Solotorovsky. The response of cultures of mammalian cells to diphtheria toxin. I. Amino acids transport, accumulation and incorporation in normal and intoxicated sensitive cells. *J. Exp. Med.*, **126**, 407-422 (1967).
7. R. J. Collier and T. Traugh. Inactivation of aminoacyltransferase II by diphtheria toxin. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **34**, 589-594 (1969).
8. T. Honjo, Y. Nishizuka, I. Kato and O. Hayaishi. Adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis by diphtheria toxin. *J. Biol. Chem.*, **246**, 4251-4260 (1971).
9. D.M. Gill, A.M. Pappenheimer, Jr. R. Brown and J.J. Kurnick. Studies on the mode of action diphtheria toxin. VII. Toxin stimulated hydrolysis of nicotinamide adenine dinucleotide in mammalian cell extracts. *J. Exp. Med.*, **129**, 1-21 (1969).
10. R.J. Collier, Diphtheria toxin. Mode of action and structure. *Bacteriol. Rev.*, **139**, 54-85 (1975).
11. A. Michel, J. Zanen, C. Monier, C. Crispeels and J. Dirks. Partial characterization of diphtheria toxin and its subunits. *Biochem. Biophys. Acta*, **257**, 249-256, (1972).
12. R.J. DeLange, R. Drazin and R.J. Collier. Amino acid sequence of fragment A, an enzymatically active fragment from diphtheria toxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, **73**, 69-72 (1972).
13. A.M. Pappenheimer, Jr. Diphtheria toxin. *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 69-94 (1977).
14. P.V. Liu. The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis II. Effects of lecithinase and pronase. *J. Infect. Diseases*, **116**, 112-116 (1966).
15. O.R. Pavlovskis and A.H. Shackelford. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin in mice: Localization and effect on protein synthesis. *Infect. Immunity*, **2**, 540-546 (1974).
16. O.R. Pavloskis and F.B. Gordon. *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin: Effect on cell cultures. *J. Infect. Diseases*, **125**, 631-636 (1972).
17. L.T. Callahan. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin. *Infect. Immunity*, **2**, 113-118 (1974).
18. B.H. Iglewski and D. Kabat. NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 2284-2288 (1975).
19. P. Cuatrecasas. Interaction of *Vibrio cholerae* enterotoxin with cell membranes. *Biochemistry*, **12**, 3547-3557 (1973).
20. S. Van Heyningen and C.A. King. Subunit A from cholera toxin is an activator of adenylate cyclase in pigeon erythrocytes. *Biochem. J.*, **146**, 269-271 (1975).
21. P.D. Zreve, N.F. Pierce and W.B. Greenough, III. Stimulation of glycogenesis by purified cholera enterotoxin in disrupted cells. *Johns. Hopkins. Med. J.*, **129**, 299-303 (1971).
22. W.B. Greenough, III. N.F. Pierce and M. Vaughan. Titration of cholera enterotoxin and antitoxin in isolated fat cells. *J. Infect. Diseases*, **121**, S111-114 (1970).
23. M. Rodbell. Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormone on glucose metabolism and liposis. *J. Biol. Chem.*, **239**, 375-380 (1964).
24. S.T. Donta, M. King and K. Slaper. Cholera enterotoxin: Induction of steroidogenesis in tissue cultures. *Nature (London)*, **243**, 246-247 (1973).
25. P. Cuatrecasas. Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin. *Biochemistry*, **12**, 3558-3566 (1973).
26. R.C. Duhamel, P. Tulbot and C.F. Grady. Production, purification and assay of cholera entero-

- toxin. *J. Infect. Diseases*, **121**, S 85-91 (1970).
27. S. Van Heyningen. Cholera toxin: Interaction of subunits with ganglioside GM₁. *Science*, **183**, 656-657 (1974).
 28. R.A. Finkelstein, M. Eoesman, S.H. Neoh, M.K. LaRue and R. Delanley. Dissociation and recombination of its subunits of the cholera enterotoxin (Choleraeagen). *J. Immunology*, **113**, 145-150 (1974).
 29. C.N. Kwan and R.M. Wishnow. *Escherichia coli* enterotoxin induced steroidogenesis in cultured adrenal tumor cells. *Infect. Immunity*, **10**, 146-151 (1974).
 30. R.L. Guerrant, L.L. Brunton, T.C. Schnaitlman, L.I. ReBhur and A.G. Gilman. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid sensitive *in vitro* assay for the enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immunity*, **10**, 320-327 (1974).
 31. G.J. Kasai and R. Burrows. The tiration of cholera toxin and antitoxin in the rabbit ileal loop. *J. Infect. Diseases*, **116**, 606-614 (1966).
 32. G.T. Keusch. G.F. Grady. L.T. Mata and J. McIver. Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1. *J. Clin. Invest.*, **51**, 1212-1218 (1972).
 33. F.V. Klipstein and R.F. Engert. Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxins. *Infect. Immunity*, **13**, 373-381 (1976).
 34. C.L. Duncan, O.H. Strong. Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-free products of *Clostridium perfringens*. *J. Bact.*, **100**, 86-94 (1969).
 35. R. Skjelkvålé and C.L. Duncan. Enterotoxin formation by different toxigenic types of *Clostridium perfringens*. *Infect. Immunity*, **11**, 563-565 (1975).
 36. A. Ljungh, M. Popoff and T. Waltröm. *Aeromonas hydrophila* in acute diarrheal disease: Detection of enterotoxin and biotyping of strains. *J. Clin. Microbiol.*, **6**, 96-100 (1977).
 37. S.L. Gorbach, C.M. Khurana. Toxigenic *Escherichia coli*: A cause of infantile diarrhea in Chicago. *New Engl. J. Med.*, **287**, 791-794 (1972).
 38. R.B. Sack. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.*, **29**, 333-353 (1975).
 39. R.B. Sack. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. An emerging pathogen. *New Engl. J. Med.*, **295**, 893-984 (1976).
 40. I.K. Wachsmuth, S. Falkow and R.W. Ryder. Plasmid-mediated properties of a heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Infect. Immunity*, **14**, 403-407 (1976).
 41. B. Rowe, J. Taylor and K.A. Bettleheim. An investigation of traveller's diarrhea. *Lancet*, **1**, 1-5 (1970).
 42. I. Schenkein, R.F. Green, D.S. Santos and W.K. Maas. Partial purification and characterization of a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immunity*, **13**, 1710-1720 (1976).
 43. P. Cuatrecasas, I. Parikh and M. Hollenberg. Affinity chromatography and structural analysis of *Vibrio cholerae* enterotoxin-ganglioside agarose and the biological effects of ganglioside-containing soluble polymers. *Biochemistry*, **12**, 4253-4281 (1973).
 44. N.W. Smith and R.B. Sack. Immunological cross-reactions of enterotoxin from *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Disease*, **127**, 164-170 (1973).

45. H.W. Moon and S.C. Whipp. Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 183, 334-335 (1974).
46. H.W. Smith and C.L. Gyles. The effect of cell-free fluids prepared from cultures of human and animal enteropathogenic strains of *E. coli* on ligated intestinal segments of rabbits and pigs. *J. Med. Microbiol.*, 3, 403-409 (1970).
47. C.C.J. Carpenter. Cholera and other enterotoxin related diarrheal disease. *J. Infect. Disease*. 126, 551-564 (1972).