

지렁이(Redworm*: *Lumbricus rubellus*) 체액내 용혈인자의 특성

손영종** · 이정우 · 장정순

인하대학교 이과대학 생물학과**, 의과대학 생화학교실

지렁이(*L. rubellus*) 체액내의 적혈구용혈능과 단백질분해능을 확인하였다. 지렁이의 체액 0.33 μ l 속에 있는 용혈인자는 9×10^{11} rat RBCs를 2분만에 완전히 용혈시켰으며, 다른 포유류들의 적혈구에도 약간의 차이는 있으나 비슷한 용혈능을 보였고, 이 용혈인자는 지렁이의 혈구가 아닌 몸체조직에서 분비되는 것으로 생각되었다. 용혈인자는 pH 6.5-7.5 사이에서 활성이 가장 강하였고, 63°C로 30분 열처리할 경우 활성이 완전히 없어졌으며, 2-mercaptoethanol은 용혈인자의 활성을 증가시켰다. 이 인자의 활성도는 여러가지의 당류, LPS, cholesterol, phosphatidyl choline, chlorpromazine, sphingomyelin 및 Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} 등의 금속이온에 의하여 활성이 저해되었다. 한편 지렁이 체액내의 단백질 분해인자는 BSA와 IgG를 여러 조각으로 분해시켰으며 이 분해인자는 PMSF 및 TLCK에 의하여 활성이 억제되지 않았다. 지렁이의 체강에는 용혈소를 분비하는 박테리아들이 존재하였으나 이들 박테리아들의 용혈소는 지렁이의 용혈인자와는 전기영동이동도에서 차이가 있었다.

KEY WORDS : Hemolytic factor, Proteolytic factor, Redworm, *Lumbricus rubellus*

무척추동물의 체액에는 포유류의 적혈구를 파괴시키는 용혈인자가 존재하며 줄지렁이(*Eisenia foetida*)의 용혈인자는 특히 강한 활성도를 갖는다고 알려져 있으나(Tuckova *et al.*, 1986; Kauschke and Mohrig, 1987), 이들 용혈인자가 적혈구를 파괴시키는 기작에 대해서는 많은 논란이 있다. 즉, 성게(*Strongylocentrotus drobachiensis*)와 불가사리(*Asterias forbesi*)의 용혈인자는 보체(complement)와 유사한 기능이 있다고 알려져 있는 반면(Bertheussen, 1983; Leonard *et al.*, 1990), 줄지렁이와 해삼(*Hollothuria polii*)의 용혈인자들은 보체저해물질들에 의해서도 활성도가 저해되지 않아 보체계와는 상관없다는 보고도 있으며(Canicatti *et al.*, 1987; Boch *et al.*, 1989), 해삼의 용혈인자가 trypsin과 유사한 activity를 갖고 있다는 주장이 있는가 하면(Canicatti and

Ciulla, 1987), 줄지렁이의 경우에는 protease inhibitor에 의해 용혈능이 저해되지 않는다는 보고도 있다(Tuckova *et al.*, 1986). 또한, 줄지렁이와 해삼의 용혈인자가 opsonin 기능을 갖거나 simple sugars에 의해 활성도가 저해된다는 보고(Tuckova *et al.*, 1986; Canicatti and Parrinello, 1985)가 있는 반면 줄지렁이와 성게의 용혈인자는 그렇지 않다는 연구결과도 제시되어 있다(Bertheussen, 1983; Cenini, 1983). 이와 더불어, 줄지렁이의 용혈인자는 지질의 한 종류인 sphingomyelin에 의하여 활성도가 저해된다는 주장(Roch *et al.*, 1989)과 해삼의 경우에는 sphingomyelin에 의해 저해는 되지만 sphingomyelinase 자체는 아니라는 주장(Canicatti *et al.*, 1987)이 있는 한편, 불가사리의 용혈인자가 phospholipase와는 무관하다는 보고도 있으며(Leonard *et al.*, 1990), 나방(*Galleria mellonella*)의 애벌레와 줄지렁이의 용혈인자는 antibacterial effect에 직접 관여하거나 밀접한 연관이 있다는 보고도 있다(Phipps *et al.*, 1989; Vailler *et al.*, 1985; Kauschke and Mohrig, 1987). 무척추동물의 용혈인자의 성질에 대한 이와 같은 논란은 재

본 연구는 한국과학재단의 지원(일반연구, 891-0301-002-2) 및 인하대학교 독성학연구소 지원 연구비에 의하여 수행된 연구의 일부임.

Redworm*: 미국에서 수입된 품종으로서 한국에도 많이 분포하나 국내고유품종은 아직 분류체계가 정립되지 않았음.

료로 사용한 동물들이 해삼, 성게, 불가사리, 지렁이, 곤충 등 다양했기 때문이기도 하나, 아직 비흡하지만 상대적으로 연구가 많이 된 지렁이 내에서도 용혈인자의 성질에 대한 논란이 있음은 각 성질에 대한 단편적인 실험결과만으로 성급한 결론을 유도한 때문이라 생각된다. 한편, 박테리아의 용혈인자는 인체에 미치는 유독성 때문에 오래 전부터 연구되어 왔고, 적혈구를 용혈시키는 양상에 따라 α -, β - 및 γ -hemolysin으로 분류되며(Bauer, 1982), 이들 hemolysin을 발현하는 gene은 plasmid에 link되어 있다고 알려져 있다(Brock, 1988; Jawetz *et al.*, 1987). 박테리아의 hemolysin은 phospholipase C 또는 D 활성을 발휘하거나(Drobniewski and Ellar, 1989) pore를 형성함으로써 적혈구막을 훼손하여 적혈구를 터뜨리며(Menestrina *et al.*, 1987; Lalonde *et al.*, 1989), 이러한 용혈기작은 용혈성 박테리아의 생존에 필수적이라 보고 되어 있다(Kuhn *et al.*, 1988; Portnoy *et al.*, 1988). 지렁이의 용혈소는 줄지렁이의 경우에는 모든 개체에 존재하나 낚시지렁이의 경우에는 8% 정도만이 용혈소를 지니고 있어(Tuckova *et al.*, 1986), 용혈소가 낚시지렁이 자체가 아닌 다른 요인에 의한 것일 가능성도 있다. 지렁이의 체내에는 지렁이의 생태상 여러 종류의 공생박테리아가 있으리라 여겨지고 이들 박테리아 중에는 hemolysin을 분비하는 것들도 있으리라 생각되며, 또한 폐쇄혈관계인 지렁이에서 박테리아의 영향을 배제하고 지렁이의 혈액만을 순수히 채취하는 것이 용이하지는 않으므로, 지렁이의 용혈소와 박테리아성 용혈소간의 동질성 또는 이질성여부를 확실히 할 필요가 있다고 생각된다.

본 연구는 줄지렁이와 동일 속(Genus)에 속하는 *Lumbricus rubellus*의 체액에서 강력한 hemolytic activity와 proteolytic activity를 감지하고 이들 사이의 연관성을 밝히며, 또한 지렁이의 용혈인자와 지렁이 체내에 존재하는 박테리아성 용혈인자와의 연관성 및 논란이 되고 있는 무척추동물 체내에 있는 용혈인자의 성질을 규명하고자 시도하였다.

재료 및 방법

1. 지렁이 체액

본 연구의 시료는 환형동물문, 빈모강, 지렁이목, 낚시지렁이과에 속하는 지렁이, redworm (*Lumbricus rubellus*)의 체액으로 지렁이는 신갈농민학교(경기도 용인 소재) 지렁이 양식장에서 구입하여 사용하였고 줄지렁이(*Eisenia foetida*)도 동일 양식장에서 구입하였다. 지렁이체액은 지렁이를 증류수로 다섯차례 세척한 후 그림 2A와 같은 방법으로 채취하여 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 용혈능의 측정

용혈가의 측정에는 microtiter plate법을 이용하였다. 50 μl 씩 생리식염수를 분주한 microtiter plate의 hole에 시료 50 μl 를 two-fold dilution한 후, 각 hole에 2% rat RBC를 50 μl 씩 첨가하고 이로부터 20분 후에 용혈 여부를 육안으로 관찰하여 적혈구가 완전히 용혈되어 투명한 hole의 희석 배수분 용혈가로 하였다.

3. 전기영동 및 chromatography

Non-denatured polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)는 Davis의 방법(Davis, 1964), SDS-PAGE는 Laemmli의 방법(Laemmli, 1970)에 따랐고, 전기영동 후 용혈인자의 간접적관찰은 전기영동이 끝난 gel을 생리식염수에 20분간 담구어 gel의 염농도를 조절한 다음 blood-agarose gel을 overlay하여 RBC가 용혈되는 전기영동 band(s)를 관찰하였으며, blood-agar gel로는 1% agarose(in saline)용액을 45°C 로 온도를 조절한 후 잘 세척된 rat-RBC를 10%가 되도록 첨가하여 전기영동한 gel위에 첨부하고 응고시켰다.

박테리아성 용혈인자의 분리를 위한 크로마토그래피용 gel로는 Bio-gel P-100(Bio-Rad Co.)을 사용하였고, 완충용액으로는 20 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 8.0 용액을 사용하였다.

4. 용혈저해실험

당류, EDTA, TLCK, chlorpromazine 등의 용혈저해반응은 이들을 농도별로 지렁이체액과 섞어 10분간 반응시킨 후 microtiter plate로 용혈가를 측정하여 저해제가 첨가되지 않는 지렁이체액의 용혈가를 기준으로 저해정도를 판정하였고, 저해율은 희석배율의 상대적인 비교치로 산정하였다. PMSF, cholesterol, sphingomyelin, LPS, phosphatidyl choline, o-phenanthroline 및 compound 48/80 등 불용성물질들의 저해반응은 일정량의 저해제와 지렁이의 체액을 섞어 25°C에서 60분 반응시킨 반응액을 원심분리하고 그 상등액을 사용하여 microtiter plate로 용혈가를 측정하였고 저해율의 산정은 상기방법과 동일하게 계산하였다.

결 과

1. 지렁이 체액의 용혈능

지렁이(*L. rubellus*)의 체액에 의한 포유류 적혈구의 용혈효과는 개체별로 약간씩의 차이가 있었다. 임의선별한 체장 8-10 cm의 지렁이 50마리 선체에서 용혈능이 있었고, 2048(2^{11})의 용혈가를 갖는 개체가 40%로 가장 많았으며 평균용혈가는 3256이었다(Fig. 1). 이는 현재까지 지렁이 중에서 포유류 적혈구에 대한 용혈가가 가장 강하다고 알려진 줄지렁이(*Eisenia foetida*)의 체액과 거의 맞먹는 역가였다(동일한 방법으로 처리하여 측정된 8-10 cm의 줄지렁이 20개체의 평균용혈가는 3641이었음). 2048(2^{11})의 역가를 갖는 지렁이 체액을 사용할 경우, 체액(6.3 mg protein/ml)을 1/600로 희석한 용액 0.2 ml(원액 0.33 μ l에 해당됨)은 9×10^{11} rat RBCs를 2분만에 완전히 용혈시켰으며, human "A", "B" 및 "O"형 적혈구, sheep RBC와 rabbit RBC에 대하여서도 거의 유사한 용혈능을 보였다. 동일량의 RBC를 사용할 경우 "O" RBC는 rat RBC와 동일 속도로 용혈되었으며 rabbit RBC에 비하여 약 2배의 용혈시간이 소요되었다(data was not shown).

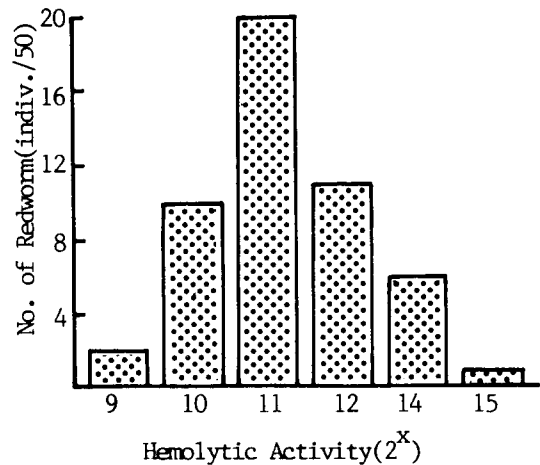


Fig. 1. Individual variation of the hemolytic activity of redworm body fluid. Fifty redworms were tested for hemolytic activity by microtiter plate method.

2. 지렁이 용혈인자의 기원

지렁이를 마쇄한 후 원심분리하여 체액을 채취하는 과정에서, 상등액인 체액을 채취한 후 침전물에 생리식염수를 첨가하여 방치할 경우 상당한량의 용혈소가 잔존함을 발견하고, 그 원인을 규명하기 위하여 지렁이를 그림 2와 같이 처리하였다. 지렁이를 원심분리하여 체액을 채취한 후, 채취된 체액과 동일량의 생리식염수를 첨가하고 24시간 방치한 다음 지렁이 몸체에 잔존하는 용혈소를 재채취하였고, 동일한 방법으로 마지막 11단계(10일 경과)까지의 상등액을 채취하였다(Fig. 2A). 상기와 같이 채취된 시료들의 용혈활성도는 단계를 거침에 따라 점차 저하되었으나 마지막 11단계의 시료까지도 상당량의 용혈인자가 잔존하였다(Fig. 2B).

본 실험의 경우 지렁이로부터 시료의 채취는 지렁이의 혈액만을 순수히 채취하는 것은 어려운 일이라고 생각되어 지렁이 동체를 마쇄한 후 원심분리하여 체액전체를 채취하였으며, 그림 2와 같이 용혈인자가 침전물에 잔존하는 현상을 보여 동체에 있을 박테리아에 의한 영향을 배제할 수 없었다. 박테리아에 기인한 지렁이 체액의 용혈능여부를 판정하기 위하여, 우선 지렁이의 체액을 멸균한 스포이드로 채취하여 체액내에 있는 박테리아 중에서 용혈소를 배출하는 박테리아를 선별 동

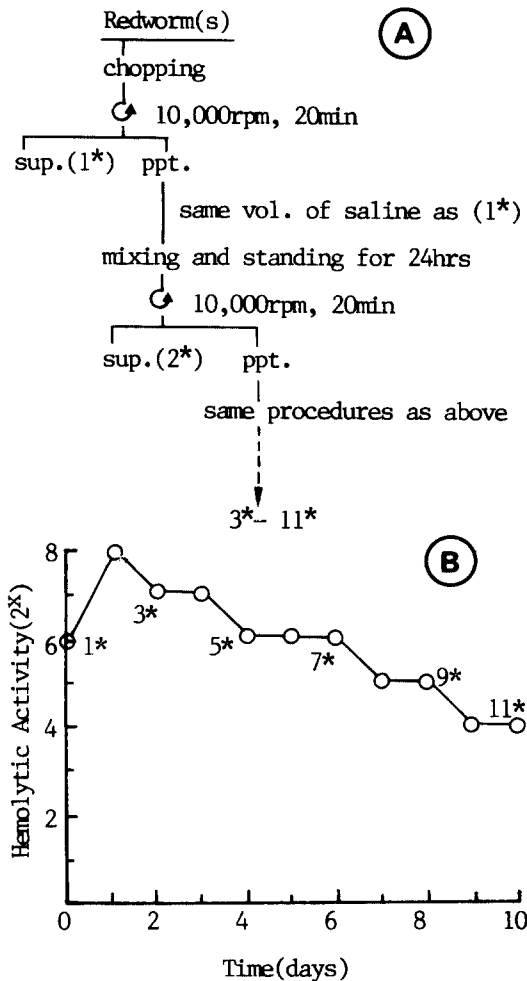


Fig. 2. General schematic representation for continuous collection of redworm body fluid (A), and the hemolytic activity of each body fluid (B). Each sample was stored at -20°C , and the hemolytic activities were measured at 10th day.

성하였다. 이 선별과정에서 사용한 배지는 Blood agar base였고, 채취된 지렁이체액을 배지에 접종하고 용혈소를 분비하여 주위의 적혈구를 깨뜨려 배지를 투명하게 만드는 colony들을 선별한 후, 수차례 계대배양하여 순수한 박테리아 strain(s)를 선별하였다. 박테리아의 분류는 인천 길병원과 한국의학연구소(KMI)에 의뢰하여 API 20E 또는 API 20A system (Analytab Products, Plainview, NY 11803)에 의한 여러가지 생화학적 검사를 하여 각 strain을 동정하였다. 지렁이체액

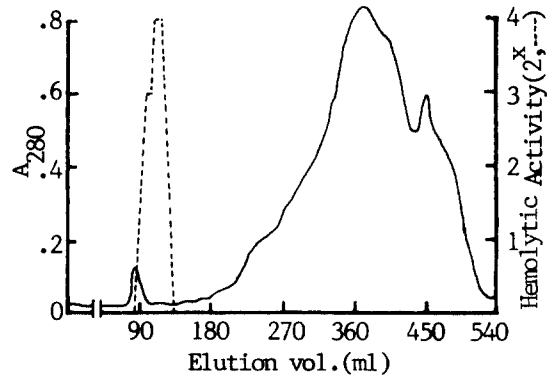


Fig. 3. Elution profile of the medium in which bacteria (*A. hydrophila*) was cultured on Bio-gel P-100 (2.0×80 cm). Each fraction was tested for hemolytic activity by microtiter plate method.

에서 채취된 박테리아 중에서 용혈성 박테리아로는 *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter agglomerans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Vibrio fluvialis* 등이 확인되었으며, 이들 중에서 *A. hydrophila*가 우점종(90% 이상)이었고 용혈성도 가장 강하였다. 각각 박테리아를 broth culture한 후 원침하여 박테리아를 제거한 배지를 농축하여 박테리아가 배출한 용혈인자를 크로마토그래피로 가정제하였다. 이들 중에서 대표적인 *A. hydrophila* 배양액의 크로마토그래피분리상은 그림 3과 같았으며 다른 균주들의 경우들도 이와 유사하였고 상기와 같은 방법으로 가정제된 박테리아의 용혈인자를 지렁이 체액내의 용혈인자와 비교하였다. 전기영동 (Non-denatured PAGE)한 후 RBC-agarose gel을 overlay한 결과 지렁이 체액내의 용혈인자와 박테리아로부터 유래된 용혈인자는 전기영동 이동도에서 서로 차이가 났으며 (Fig. 4), 다른 박테리아들의 용혈인자도 그림 4의 박테리아와 동일한 양상을 보여 지렁이 체액에 있는 용혈인자는 박테리아로부터 기인된 것이 아니라고 생각된다.

그림 2에서의 지렁이 동체에 잔존하는 용혈인자의 기원이 박테리아가 아니라면 지렁이의 혈구 또는 몸체의 조직에서 기인될 것이므로, 그림 5와 같이 지렁이의 혈액, 혈구 및 몸체를 분리하였으며, 그 각각을 초음파로 마쇄 (sonication)한 후 원심분리하여 그 상등액인 시료를 채취하였다 (Fig. 5). 상기와 같이 채취된 분획중 혈구로부터 기인된 시료는 용혈능이 없었으며, 지렁이의

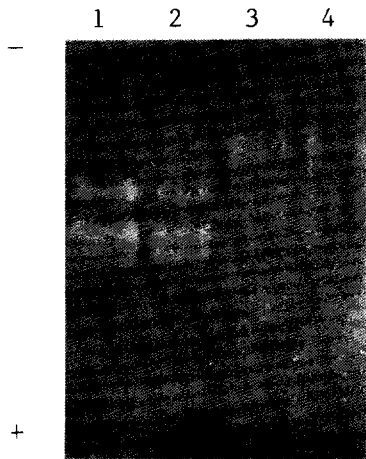


Fig. 4. Hemolytic activities of redworm body fluids and bacterial secretions. Non-denatured PAGE (7.5%) was done, and blood-agarose gel was overlaid on the acrylamide gel. Redworm body fluid 1* from Fig. 2 (1); Redworm body fluid 2* from Fig. 2 (2); *A. hydrophila* originated hemolysin (3); *E. agglomerans* originated hemolysin (4).

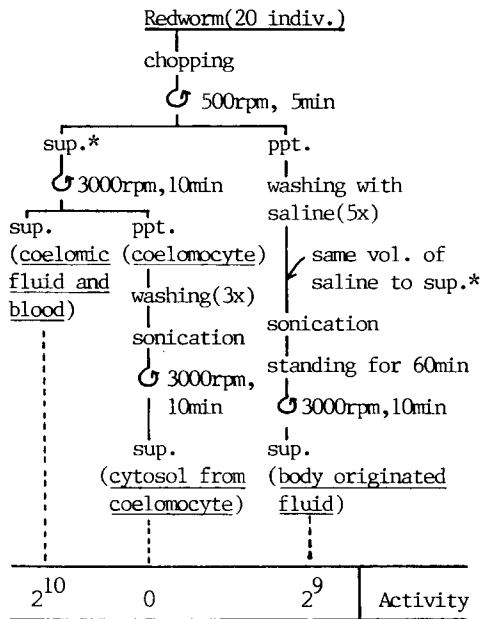


Fig. 5. Hemolytic activities of coelomic fluid, coelomocyte and body originated fluids of redworm.

모체로부터 기인한 시로는 지렁이 체강액에 근접하는 적혈구 용혈능을 보여 지렁이 체액에 존재하는 용혈인자는 그 기원이 몸체조직이라고 생각되

었다.

3. 2-mercaptoethanol(2-MSH)과 ammonium sulfate가 용혈인자에 미치는 영향

지렁이의 체액을 보관할 때 2-MSH를 첨가하면 용혈인자의 활성도가 오랫동안 안정되나 ammonium sulfate를 처리하면 그 활성도가 급격히 저하됨을 발견하였는데, 그림 6은 2-MSH 또는 ammonium sulfate를 처리했을 때와 체액을 재취한 그대로 보관했을 때의 용혈활성도의 지속여부를 관찰한 결과이다. 체액을 그대로 -20°C , 4°C 및 20°C 로 보관하였을 때, -20°C 및 4°C 에서는 비교적 오래 용혈활성도가 유지되었으나 실온에서는 활성도가 급격히 떨어져 12일째만에 활성도가 완전히 소실되어 활성도의 유지가 실험상의 큰 문제로 대두되었다. 일반적으로 단백질에 작용하여 그 용해도를 저하시켜 단백질을 침전시키며 단백질을 안정시키는 기능을 하기도 하는 ammonium sulfate를 80%로 처리한 체액은 정상체액보다 오히려 더 불안정하여 -20°C 에서도 활성이 계속 유실되며 실온에서는 9일만에 활성이 완전히 소실되었다. 이와 반대로 2-MSH를 1 mM로 처리할 경우 지렁이 체액의 용혈활성도가 오히려 상당히 증가하였으며, 이 증가된 활성도는 -20°C 에서는 물론 4°C 에서도 활성도가 12일까지 완전

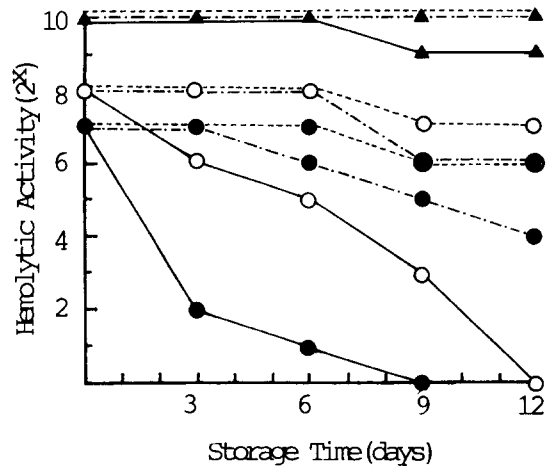


Fig. 6. Stability of redworm hemolytic factor which was treated with 2-mercaptoethanol (2-MSH) or ammonium sulfate. 1 mM 2-MSH treated (▲); 80% ammonium sulfate treated (●); crude body fluid (○); -20°C (---); 4°C (----); 20°C (—).

히 유지되었으며 실온에서도 6일까지는 활성도가 완전히 보존되었다(Fig. 6). 이때, 1 mM의 2-MSH 자체는 적혈구에 대한 용혈능이 전혀 없으며, 2-MSH를 처리한 체액을 그림 5와 동일한 방법으로 전기영동 이동도를 비교해 보았으나 2-MSH의 처리여부에 따른 용혈인자의 이동도에는 아무런 차이도 없어 2-MSH의 용혈인자에 대한 작용기작은 짐작하기 어려웠다(data was not shown).

4. 열과 pH의 영향

지렁이 용혈인자의 열에 대한 내성을 알아보고자 체액을 각 온도에서 30분간 열처리하여 적혈구에 대한 용혈능을 본 결과, 45°C까지에서는 활성도가 완전히 유지되었으며 60°C 이상에서 용혈가는 급격히 저하되어 63°C에서 30분 열처리한 체액의 용혈활성도는 완전히 상실되었다(Fig. 7).

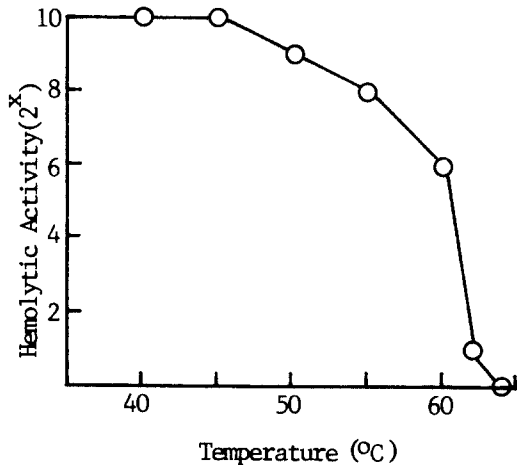


Fig. 7. Heat stability of the hemolysin of redworm body fluid. The body fluid was incubated for 30 min at each temperature and reacted with 2% rat RBC for hemolytic activity.

pH에 따른 용혈인자활성도의 변화는 그림 8과 같았으며, 이에 사용한 완충용액으로는 citric acid/Na₂HPO₄(pH 3.0-6.5), Tris/HCl(pH 6.0-9.0) 및 glycine/NaOH buffer(pH 8.5-10.5)를 사용하였고 각 완충용액의 NaCl 농도는 140 mM로 조절하였다. Rat-RBC에 대한 지렁이 체액의 용혈능은 pH 6.5-7.5에서 가장 높았으며,

이 범위에서 벗어날수록 활성도는 저하되었다. pH 3.0에서는 용혈인자의 활성도가 전혀 없었으며(반응시간 5분) pH 3.5 이하에서는 적혈구가 완충용액 자체에 의하여 10분정도 경과하면 깨어져버렸기 때문에 용혈가를 정확히 측정할 수 없었고(Fig. 8), 이때 시료로 사용한 crude 지렁이 체액의 pH는 6.8이었다.

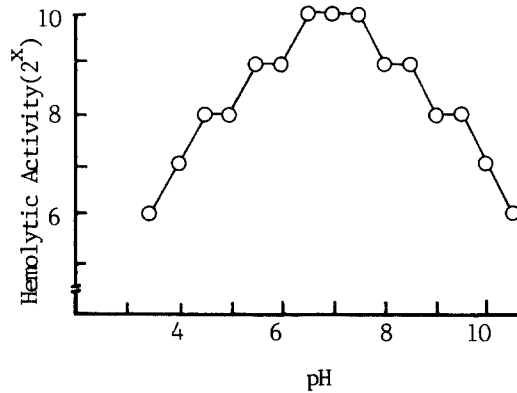


Fig. 8. Effect of pH on the hemolytic activity of Redworm body fluid. The body fluid was diluted with same volume of each buffer and the hemolytic activity of each body fluid was determined after incubation for 10 min at 20°C.

5. Metal ions, sugars, protease inhibitors, lipids 및 complement-related molecules 등이 용혈인자의 활성도에 미치는 영향

지렁이 용혈인자의 구체적 작용기작을 밝히기 위한 기초실험으로 각종 당류, 금속이온, 단백질 분해효소의 저해제 및 지질 등을 사용하여 이들이 용혈현상에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 1 및 Table 2와 같았다. 50 mM fucose, 50 mM maltose, 100 mM glucose, 25 mM mannose, 25 mM lactose 및 12.5 mM galactose등에 의해서 50%의 용혈반응이 저해되었으며, 저해능을 보인 fucose, maltose, glucose 및 lactose는 그 농도를 200 mM까지 높여도 더 이상의 저해효과가 없었으며, mannose와 galactosamine의 경우에도 75%이상의 저해효과를 발휘하지는 못하였다. 지렁이 체액내의 당류를 HPLC로 분석한 결과 0.5 mM fucose, 8 mM glucose 및 9 mM의 maltose 등이 측정되었는데(data was not shown), 이로 미루어 보아 당류가 지렁이 용혈인자의 활성도에

Table 1. Inhibition effects of some simple sugars and metal ions on the hemolytic factor in redworm body fluid. The body fluid was reacted with each substance for 60 min at 25°C, and then the hemolytic activity was determined.

Substance	Conc. (mM)	Inhib. (%)
Fucose	50.0	50.0
Maltose	50.0	50.0
Glucose	100.0	50.0
Mannose	25.0	50.0
Lactose	25.0	50.0
Galactosamine	12.5	50.0
MnCl ₂	100.0	0.0
CaCl ₂	50.0	0.0
MgCl ₂	50.0	0.0
FeCl ₂	2.0	75.0
FeCl ₂	0.5	50.0
FeCl ₃	0.25	75.0
FeCl ₃	0.03125	50.0
CuCl ₂	0.25	50.0
CuCl ₂	0.125	0.0
ZnCl ₂	0.125	50.0

영향을 미칠 가능성은 매우 희박하다고 생각되었다. 금속이온이 지렁이 용혈인자에 미치는 영향을 본 결과 Fe²⁺, Fe³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ 등은 각각 0.5 mM, 0.03 mM, 0.25 mM, 0.125 mM의 농도로 50%의 용혈저해작용을 보였고, Mg²⁺ 및 Ca²⁺ 이온은 그 농도가 100 mM 이상이 되어야만 저해능을 보였으며 Mn²⁺ 이온은 저해능이 전혀 없었다(Table 1). 각종 효소의 억제물질들이 지렁이 용혈소의 활성에 미치는 영향은 Table 2와 같았다. Protease inhibitor인 PMSF와 TLCK는 지렁이 용혈소의 용혈능을 전혀 저해하지 못하였고, complement inhibitor 중에서는 0.5 mg/ml의 sphingomyelin이 93.75%의 활성을 저해하여 억제율이 가장 강하였고 1.0 mg/ml의 cholesterol과 lipopolysaccharide도 50%의 용혈억제능을 보였다. Phospholipase A₂ inhibitor인 0.5 mg/ml의 phosphatidyl choline과 1.25 mM chlorpromazine은 지렁이 체액의 용혈능을 87.5% 및 50% 저해하였고, chlorpromazine은 농도를 상향조절하여도 50% 이상의 저해작용은 없었다. Phospholipase C inhibitor인 o-phenanthroline,

Table 2. Inhibition effects of some protease-, complement- and phospholipase-inhibitors on the hemolytic factor in redworm body fluid.

Substance	Conc.	Inhib. (%)	Note
PMSF*	10.0 mM	0.0	Pro*
TLCK*	10.0 mM	0.0	“
EDTA	12.5 mM	50.0	Com*
EDTA	1.0 mM	0.0	“
Cholesterol	1.0 mg/ml	50.0	“
Cholesterol	0.5 mg/ml	0.0	“
Sphingomyelin	0.5 mg/ml	93.75	“
LPS*	1.0 mg/ml	50.0	“
LPS*	0.5 mg/ml	0.0	“
Phosphatidylcholine	0.5 mg/ml	87.5	PA ₂ *
Chlorpromazine	1.25 mM	50.0	“
Chlorpromazine	0.625 mM	0.0	“
Compound 48/80	0.5 mg/ml	0.0	PLC*
o-phenanthroline	5.0 mM	0.0	“
ZnCl ₂	0.125 mM	50.0	“
FeCl ₃	0.03125 mM	50.0	PLD*

PMSF*: phenylmethane sulphony fluoride

TLCK*: tosyl lysine chloromethyl ketone

LPS*: lipopolysaccharide from *E. coli*

Pro*: protease inhibitor

Com*: complement inhibitor

PA₂*: phospholipase A₂ inhibitor

PLC*: phospholipase C inhibitor

PLD*: phospholipase D inhibitor

compound 48/80 및 Zn²⁺ 이온 중에서 o-phenanthroline과 compound 48/80은 저해작용이 전혀 없었으나, Zn²⁺ 이온은 0.5 mM의 농도로 75%, 0.125 mM의 농도로 50%의 용혈저해능을 보였다. Phospholipase D의 inhibitor인 Fe³⁺ 이온은 0.25 mM의 농도로 75%, 0.03 mM의 농도로 50%의 용혈저해능을 보였다(Table 2).

6. 용혈인자와 protease의 연관성

지렁이의 체액에는 단백질을 분해시키는 활성이 있음이 확인되었다. 그림 9는 알부민(20 mg/ml bovine serum albumin; BSA)과 면역글로블린(20 mg/ml) 30 μl를 지렁이체액 10 μl와 실온에서 10분 반응시킨후 전기영동하여 분해양상을 관찰한 것으로 lane 1은 반응시킨후 동일량의 지렁이체액 10 μl를 동시에 전기영동한 대조군이였다. BSA의 경우 지렁이 체액에 의하여 여러 조각

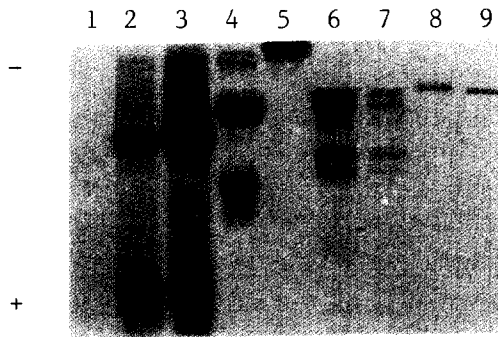


Fig. 9. Proteolytic activity of Redworm body fluid. SDS-PAGE (12.5%) was done after human IgG or BSA was treated with Redworm body fluid (BF) or 2-mercaptoethanol (2-MSH). Body fluid only (1); IgG + BF (2); IgG + BF (3); IgG + 2-MSH (4); IgG only (5); BSA + BF (6); BSA + BF (7); BSA + 2-MSH (8); BSA only (9). 2-MSH containing samples were heated for 3 min at 70°C.

의 peptides로 분해되었음을 알 수 있었고(lane 6 and 7), IgG의 경우에는 2-mercaptoethanol에 의하여 disulfide bond(s)가 깨어져 H- 및 L-chain으로 분리되는 양상(lane 4)과는 달리 지렁이 체액과 반응한 IgG는 그 깨어진 양상으로 보아 상당히 여러군데의 peptide bond(s)가 절단되었음을 짐작할 수 있었다(lane 2 and 3). 이때 lane 2와 6은 lane 3과 7에 비하여 2배의 반응액을 전기영동하여 보다 면밀하게 관찰한 것이었고, lane 8과 9의 BSA의 경우 이동도에서 미세한 차이를 보이는 것은 2-mercaptoethanol 및 열에 의한 영향때문으로 생각되었다.

Table 2에서 본 바와 같이 광범위한 protease inhibitor인 PMSF와 TLCK는 지렁이의 용혈인자의 활성에 아무런 영향을 끼치지 않는바 그림 9의 lane 2, 3, 6 및 7에서 작용한 protease와 지렁이 용혈인자는 서로 다른 물질일 가능성이 크다고 생각되어 PMSF 또는 PLCK와 반응시킨 지렁이 체액에도 단백질 분해능이 있는지를 조사하였다. 지렁이 체액에 PMSF 또는 TLCK를 처리하여 그림 9에서와 동일한 방법으로 BSA, IgG와 반응시킨 후 전기영동으로 확인한 결과 BSA와 IgG는 그림 9에서와 유사하게 분해되었다(data was not shown). 이로 미루어보아 지렁이 체액에는 PMSF 및 TLCK에 의하여 활성이 저해되지 않

는 성질의 protease가 있다고 생각되었고, 이 protease와 용혈인자는 공히 PMSF 또는 TLCK에 의하여 영향을 받지 않으므로 현재의 결과만으로는 서로 다른 물질인지의 여부를 판정하기 어렵다고 생각되었다.

고 찰

지렁이 체액의 박테리아에 대한 bacteriostatic 효과와 용혈인자와의 연관성은 Vaillier등(1985), Stein등(1986) 및 Anderson(1988)등에 의해 보고된 바 있다. 이들은 시료로서 지렁이의 coelomic fluid를 사용하였는데 지렁이는 폐쇄혈관계이므로 이들이 채취한 coelomic fluid의 용혈인자는 박테리아의 영향을 전혀 받지 않는다고 할 수 없으며, Stein등(1986)은 실제로 남지렁이(*L. terrestris*)의 체강에서 *E. coli*, *A. hydrophila*, *Bacillus sp.* 등을 분리동정한 바 있다. 이들 박테리아들은 용혈인자를 분비하는 능력이 있고, 본 실험에서도 여러 종의 용혈성 박테리아를 지렁이 체액에서 분리한 결과 *A. hydrophila*가 포유류 적혈구에 대해 가장 강한 용혈소를 분비하였다. 그러나, 박테리아가 분비한 용혈소와 지렁이의 용혈인자는 전기영동상에서 차이가 나는 것으로 미루어 보아(Fig. 4), 이들은 서로 다른 물질로 생각되지만 이들의 분자생물학적 구조나 그 작용기작이 유사할 가능성은 배제할 수 없고, 또 이들 사이에 연관성이 있을 가능성도 배제할 수는 없다고 생각한다.

무척추동물 용혈인자의 연구에는 흔히 coelomic fluid 및 coelomocyte를 시료로 사용하였으나, 본 실험결과 지렁이의 coelomocyte는 용혈인자를 보유하고 있지 않다고 생각되었고(Fig. 5), coelomocyte를 시료로 한 해삼의 용혈인자(Canicatti *et al.*, 1988)와 지렁이 용혈인자와는 동일한 성질의 물질이 아닐 가능성이 크다고 생각된다. 그러나, 유사한 해산 무척추동물인 불가사리(Leonard *et al.*, 1990)와 성게(Bertheussen, 1983) 등에서 coelomic fluid를 시료로 용혈인자가 보고된 바 있어 지렁이 용혈인자와의 연관성은 좀 더 구체적인 연구가 있어야 가능하다고 생각된다.

무척추동물의 용혈인자가 열에 견디는 성질은 실험동물에 따라 또 연구자에 따라 약간의 차이가 있다. 해삼의 용혈소는 56°C에서 불활성화 되는 것과 100°C에서도 안정한 2종류가 있으며 (Canicatti and Ciulla, 1987), 성계의 경우에는 37°C에서 완전히 불활성화되고 (Bertheussen, 1983), 불가사리의 용혈인자는 56°C에서 완전히 활성을 잃는다고 보고된 바 있다 (Leonard *et al.*, 1980). 지렁이의 경우, *E. foetida* 용혈소는 70°C에서도 안정하기 때문에 단백질이 아니라는 보고 (Cenini, 1983)가 있는 반면, *L. terrestris*의 용혈소는 56°C로 45분간 가열하여도 활성이 30%가량 잔존한다는 보고도 있다 (Anderson, 1988). 본 연구의 시료인 redworm은 분류학적으로 상기 2종과 동일한 속에 속하며 실험결과 60°C부터 활성이 급격히 저하되고 63°C에서 활성이 완전히 상실되어 Anderson(1988)의 결과와 거의 일치하였다. 이로 미루어 보아 지렁이 용혈소는 단백질일 가능성이 크다고 생각되며, 해삼의 경우 100°C에도 견디는 용혈소는 지렁이, 성계 및 불가사리 등의 용혈소와는 그 성상이 전혀 다른 물질로써 단백질이 아닐 가능성이 크다고 생각된다.

무척추동물 용혈인자의 성격에 관해서는 여러 가지 주장이 있다. Leonard 등(1990)은 zymosan, pronase, trypsin, PMSF 등이 불가사리 용혈인자의 활성을 저해하며 phospholipase 활성도가 없다는 근거로, 또 Bertheussen(1983)은 성계 용혈인자가 Ca^{2+} , cobra venom factor, zymosan 및 hydrazine등에 의해 활성이 저해된다는 근거로 complement와 유사한 물질이라고 하였으며, 해삼 용혈인자는 trypsin과 유사한 기능을 갖는 protease라는 견해 (Canicatti and Ciulla, 1987)와 opsonin 기능, phospholipase기능 등 서론에서 언급한 바와 같이 그 가능성을 다양하게 보고한 바 있다. Fucose, lactose, galactose, maltose, mannose, galactosamine 등 당류는 낚시지렁이 (Tuckova *et al.*, 1986)와 같이 본 연구에서도 redworm의 용혈인자에 대하여 용혈저해능을 보였다 (Table 1). Bertheussen(1983)에 의하면 성계의 용혈소는 simple sugars에 의해 활성도가 저해되지 않고, 결과에서 언급했듯이 지렁이의 용혈인자는 몸체조직에서 유래하며, 해삼의 용혈인자가

coelomocyte에서 분비되는 점 (Canicatti *et al.*, 1988) 등을 고려할 때, 지렁이의 용혈인자와 해삼 무척추동물의 용혈인자는 그 성질이 상당히 다른 물질일 가능성이 크다고 생각된다. 이와 같은 추론은 금속이온의 영향에 의해서도 뒷받침되는데, 해삼과 성계의 경우 그 용혈인자의 활성도는 Ca^{2+} 의 농도(2~10 mM)에 민감하게 영향을 받지만 (Canicatti *et al.*, 1988; Bertheussen, 1983), 본 연구 (Table 1)와 줄지렁이에서의 결과 (Roch *et al.*, 1989)와 같이 지렁이의 용혈인자는 Ca^{2+} 의 농도에 거의 영향을 받지 않는다. 한편, redworm의 용혈인자가 상기의 당류들에 의하여 활성이 저해되기는 하나 당류의 농도를 과다하게 증가시켜도 75% 이상의 억제능을 보이지는 않았기 때문에 Tuckova 등(1986)이 opsonin 기능이 있을 것이라는 추정은 좀 더 면밀한 검토가 필요하다고 생각된다. cholesterol, sphingomyelin, LPS 등이 redworm 용혈인자의 활성을 억제하는 결과로 미루어 보아 이 인자가 보체 유사물질일 가능성도 있으나, coelomocyte가 아닌 지렁이 몸체에서 기인하는 점을 고려하면 실사 활성은 보체와 유사할 지라도 생리적으로는 보체계와는 다른 기능을 수행하리라고 짐작된다. Phospholipase의 가능성은 phospholipase A₂ 저해물질인 compound 48/80에는 전혀 저해되지 않았으나 phosphatidyl choline 등에는 저해되지 않았으나 Zn^{2+} 에 의해서는 활성이 억제되었으므로 그 가능성을 배제할 수는 없다고 생각된다.

사 사

본 연구를 위하여 지렁이를 제공하여 주신 신갈 농민학교 고재경선생님께 심심한 사의를 포함.

인용문헌

- Anderson, R. S., 1988. Bacteriostatic factor(s) in the coelomic fluid of *Lumbricus terrestris*. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 189-194.
- Bauer, J. D., 1982. Gram-positive cocci, and Gram-negative cocci. In "Clinical Laboratory Methods", 9th

- ed., pp. 835-869, Mosby Co.
- Bertheussen, K., 1983. Complement-like activity in sea urchin coelomic fluid. *Dev. Comp. Immunol.* **7**: 21-31.
- Brock, T. D. and M. T. Madigan, 1988. Host-parasite relationships. In "Biology of Microorganisms", 5th ed., pp. 391-427, Prentice Hall Inc.
- Canicatti, C. and D. Ciulla, 1987. Studies on *H. polii* (Echinodermata) coelomocyte lysate. I. Hemolytic activity of coelomocyte hemolysins. *Dev. Comp. Immunol.* **11**: 705-712.
- Canicatti, D., D. Ciulla, and E. Farinalipari, 1988. The hemolysin producer coelomocytes in *H. polii*. *Dev. Comp. Immunol.* **12**: 729-746.
- Canicatti, C. and N. Parrinello, 1985. Hemagglutinin and hemolysin levels in the coelomic fluid from *Holothuria polii* (Echinodermata) following sheep erythrocyte injection. *Biol. Bull.* **168**: 175-181.
- Canicatti, C., N. Parrinello, and V. Arizza, 1987. Inhibitory activity of sphingomyelin on hemolytic activity of coelomic fluid of *H. polii*. *Dev. Comp. Immunol.* **11**: 29-35.
- Cenini, P., 1983. Comparative studies on haemagglutinins and haemolysins in an Annelid and a primitive crustaceans. *Dev. Comp. Immunol.* **7**: 637-640.
- Davis, B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427.
- Drobniewski, F. A. and D. J. Ellar, 1989. Purification and properties of a 28-kilodalton hemolytic and mosquito-cidal protein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73-E 10-2. *J. Bacteriol.* **176**: 3060-3067.
- Jawetz, J. L. Melnick, and E. A. Adelberg, 1987. The streptococci; Hemolysins. In *Review of Medical Microbiology* 7th ed, pp. 223-232; Appleton & Lange Co.
- Kauschke, E. and W. Mohrig, 1987. Comparative analysis of hemolytic and hemagglutinating activities in the coelomic fluid of *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris*. *Dev. Comp. Immunol.* **11**: 331-341.
- Kuhn, M., S. Kathariou, and W. Goebel, 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity* **56**: 79-82.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lalonde, G., T. V. McDonald, P. Grander, and P. D. O'Hanley, 1989. Identification of a hemolysin from *Actinobacillus pleuroneumoniae* and characterization of its channel properties in planar phospholipid bilayers. *J. Biol. Chem.* **264**: 13559-13564.
- Leonard, L. A., J. D. Strandberg, and J. A. Winkelstein, 1990. Complement-like activity in the sea star *Asterias forbesi*. *Dev. Comp. Immunol.* **14**: 19-30.
- Menestrina, G., N. Mackman, I. B. Holland, and S. Bhakdi, 1987. *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **905**: 109-117.
- Phipps, D. J., J. S. Chadwick, R. G. Leeder, and W. P. Aston, 1989. The hemolytic activity of *Galleria mellonella* hemolymph. *Dev. Comp. Immunol.* **13**: 103-111.
- Portnoy, D. A., P. S. Jacks, and D. J. Hinrichs, 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *L. monocytogenes*. *J. Exp. Med.* **167**: 1459-1471.
- Roch, P., C. Canicatti, and P. Valembois, 1989. Interaction between earthworm hemolysins and sheep red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **983**: 193-198.
- Stein, E. A., S. Younai, and E. L. Cooper, 1986. Bacterial agglutinins of the earthworm. *lumbricus terrestris*. *Comp. Biochem. Physiol.* **84B**: 409-415.
- Tuckova, L., J. Rejnek, P. Sima, and R. Ondrejova, 1986. Lytic activities in coelomic fluid of *Eisenia foetida* and *Lumbricus terrestris*. *Dev. Comp. Immunol.* **10**: 181-189.
- Vailler, J., M. A. Cadoret, P. Roch and P. Valembois, 1985. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. III. Isolation and characterization of several bacteriostatic molecules from *Eisenia foetida Andrei*. *Dev. Comp. Immunol.* **11**: 11-18.

(Accepted August 20, 1990)

Characteristics of the Hemolytic Factor in the Body Fluid from Redworm, *Lumbricus rubellus*

Young Jong Son*, Jeong Woo Yi, and Chung Soon Chang (Department of Biology*, College of Science and Department of Biochemistry, College of Medicine, Inha University)

The hemolytic and proteolytic activities were identified in the body fluid of redworm, *Lumbricus rubellus*. Several bacteria which secreted bacterial hemolysin were detected in the coelomic fluid of redworm. However, the bacterial hemolysin(s) was distinct from redworm's hemolytic factor electrophoretically. The hemolytic factor in 0.33 μ l of body fluid lysed 9×10^{11} rat RBCs within 2 min completely and was also active against rabbit-, sheep- and human-RBCs, and it was guessed that the hemolytic factor was not originated from coelomocytes but from the body tissue of redworm. The hemolytic factor had a maximum activity at pH 6.5-7.5, and the activity was completely inactivated by heat-treatment at 63°C for 30 min, and 2-mercaptoethanol not only increased the activity but also stabilized the factor. The hemolytic activity was inhibited by several simple sugars, LPS, cholesterol, phosphatidyl choline, chlorpromazine, sphingomyelin, Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} and Cu^{2+} . Meanwhile, the proteolytic factor in the body fluid clove BSA and human IgG in several fragments, and the proteolytic activity was not inhibited by PMSF and TLCK.