

## 붉은지렁이 체액내 Prophenoloxidase 효소활성계

박윤경 · 손영종 · \*조은정 · \*백승렬 · \*\*김유삼 · \*\*\*서정진 · \*장정순

인하대학교 이과대학 생물학과, \*인하대학교 의과대학 생화학교실,

\*\*연세대학교 생화학과, \*\*\*신평제약 중앙연구소

붉은지렁이(*Lumbricus rubellus*)의 체내에 존재하는 prophenoloxidase-phenoloxidase(proPO→PO)의 활성계는 몇 종류의 다른 경로에 의해 활성화 됨을 발견하였다. ProPO는 exogenous trypsin,  $\beta$  1,3-glucan,  $Ca^{2+}$  이온, lipopolysaccharide (LPS) 및 열처리 등에 의하여 활성도가 증가 되었고  $Ca^{2+}$  이온이 나머지 4가지 종류의 처리와 함께 병행되었을 때 그 효과가 더욱 증가하였다. ProPO의 활성도는 LPS나  $Ca^{2+}$  이온의 농도가 각각  $1.5 \times 10^{-9}$  g LPS/ml, 15 mM( $Ca^{2+}$ )의 농도에서 proPO의 최대활성치를 나타냈으나 그 이상의 농도에서는 proPO의 활성이 오히려 감소하였다.

LPS,  $\beta$  1,3-glucan 및  $Ca^{2+}$  이온 등은 trypsin 억제인자인 soybean trypsin inhibitor(STI)가 함께 존재할 경우 전혀 proPO를 활성화 시키지 못하는 것으로 미루어  $\beta$  1,3-glucan 및  $Ca^{2+}$  이온 등은 체내의 trypsin 유사 효소의 활성을 증가시켜 궁극적으로는 proPO→PO의 활성화 반응에 간접적으로 작용한다고 생각되었다. 한편, STI의 존재 하에서도 50°C의 열처리는 proPO의 활성화에 아주 효과적인 물리적 요인으로 작용하였다. 따라서 열처리는  $Ca^{2+}$ 이나 LPS,  $\beta$  1,3-glucan과는 달리 직접적으로 proPO→PO의 활성화 반응에 작용하는 것으로 생각되어 붉은 지렁이의 체내에서 proPO가 활성화되는 과정(proPO-activating system)에는 최소한 2가지 이상의 경로가 있다고 생각된다.

**KEY WORDS: Prophenoloxidase, Earthworm, *Lumbricus rubellus*, ProPO-activating System.**

무척추동물의 경우 생체 방어기작에 관여하는 방어분자에는 lectin(Vasta *et al.*, 1986), lysozyme(Hultmark *et al.*, 1980), prophenoloxidase 등 몇가지의 비자기인식자들이 존재하는데 특히, 절지동물의 경우는 체액내에 존재하는 prophenoloxidase-activating system을 이용하여 인식된 이물질을 제거한다고 알려져 있다(Söderhäll, 1982; Ashida *et al.*, 1982; Ratcliffe *et al.*, 1985).

절지동물에서의 proPO-activating system은 host에 의한 melanin합성의 초기단계에 관여하며 encapsulation(Söderhäll *et al.*, 1984; Persson *et al.*, 1987; Rizki and Rizki, 1990), clotting(Söderhäll, 1981), opsonization(Söderhäll *et al.*, 1979, 1984)

그리고 phagocytosis(Leonard *et al.*, 1985; Brookman *et al.*, 1988) 등에 관여하는 것으로 보고된 바 있다. Phenoloxidase(PO)는 체내에서 전효소(pro-enzyme)인 prophenoloxidase(proPO)로 존재하게 되는데, 이들 proPO는 serine protease(Ashida, 1981; Ashida and Söderhäll, 1984), lipid (Heynemann and Vercauteren, 1968), organic solvents(Preston and Yayler, 1979), heat(Ashida and Söderhäll, 1984) 그리고 PO 자체의 aggregation현상(Mitchell and Weber, 1965) 등에 의하여 활성화된 PO로 전환된다고 알려져 있다. ProPO를 PO로 전환시키는데 직접 관여하는 것으로 알려진 몇 가지의 serine protease는 체액내에서 비활성형으

로 존재하며 이것은  $\beta$  1,3-glucans, peptidoglycan 또는 lipopolysaccharides에 의해 활성형으로 전환되어 궁극적으로는 proPO를 PO로 활성화 시키는 cascade reaction에 관여한다고 보고된 바 있다(Söderhäll and Smith, 1984, 1986; Ratcliffe *et al.*, 1985).

절지동물의 경우와는 달리 환형동물의 경우, 이들의 생체 방어기작에 관여하는 확실한 방어분자들이 확인된 바 없으나 빈모강 신빈모목 낚시지렁이과에 속하는 *Eisenia foetida*(줄지렁이)에서 PO activity가 있음이 보고된 바 있으며(Valembos *et al.*, 1991) 역시 낚시지렁이과에 속하는 *Lumbricus terrestris*에서는 oxidative activity가 존재한다고 보고된 바 있다(Fisher, 1978). *Lumbriscus rubellus*의 경우, 이들의 체내에도 생체 방어기작의 일환으로 proPO-activating system이 어떠한 경로를 거치는지에 대한 연구는 보고된 바 없다. 본 연구에서는 환형동물중 빈모강 신빈모목 낚시지렁이과에 속하는 *Lumbricus rubellus*(붉은 지렁이)에서 proPO의 존재 여부를 확인하고 위의 내용들을 토대로 proPO-activating system에 작용하는 endogenous 또는 exogenous activator와 proPO와의 관계 및 이들 activator 상호간의 연관관계를 밝힘으로써 지렁이 생체 방어기작의 일부에 대한 해석을 시도하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료 및 체액의 채취

본 실험의 재료는 환형동물문 빈모강 신빈모목(지렁이목) 낚시지렁이과에 속하는 *Lumbricus rubellus*(붉은 지렁이)로서 경기도 기흥 소재 지렁이 양식농장으로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

신선한 지렁이를 증류수로 3차례 세척한 후, 10-15 volt의 직류전기로 15분간 자극을 주어 지렁이로부터 체액을 채취하였다. 채취된 체액은

10 mM sodium cacodylate buffer, pH 6.0과 1:1로 혼합하여 4°C에서 5분간 10,000×g로 원심분리(Centrifon T-324, A8.24 rotor)한 후 그 상등액을 -70°C에서 보관하며 실험에 사용하였다.

### 2. Phenoloxidase(PO) assay

PO activity는 Horowitz와 Shen(1952)의 방식을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.1 ml의 체액(조효소액)에 0.1 ml의 증류수를 첨가한 후 37°C에서 30분간 처리시킨 뒤 2.8 ml의 10 mM sodium cacodylate buffer, pH 6.0을 첨가한 후 기질로써 1 ml의 20 mM L-dopa(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)을 첨가하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. PO의 활성도는 위의 조건에서 1분당 흡광도 값이 0.001 증가 하는 것을 1 unit로 정하였다.

### 3. 단백질 분해능의 측정

단백질 분해능은 trypsin, chymotrypsin, plasmin 등의 활성을 측정할 때 일반적으로 사용되는 기질인 N- $\alpha$ -Benzoyl-DL-arginine p-nitroanilide(BApNA)로 측정하였으며, BApNase 활성은 Söderhäll과 Hall(1984)의 방식을 변형하여 측정하였다. 즉, 0.1 ml의 체액에 0.1 ml의 증류수를 첨가한 후 37°C에서 20분간 preincubation 시킨 다음, 2 ml의 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0과 0.2 ml의 1 mM BApNA를 첨가시켰다. 이 혼합액을 37°C에서 10분간 반응 시킨 후 0.3 ml의 50% acetic acid를 첨가하여 반응을 정지시키고 유리된 p-nitroanilide의 양을 405 nm에서의 흡광도로 측정하였다. Protease activity는 위의 조건에서 10분당 흡광도 값이 1 증가하였을 때를 1 unit로 정하였다.

### 4. CaCl<sub>2</sub> 및 LPS 농도별 실험

1) 500 mM CaCl<sub>2</sub>를 2배수 연속 희석법으로 만든 각각의 희석 용액들을 0.1 ml 체액에 각각 0.1 ml씩 첨가하여 PO activity를 측정하였다.

2)  $3 \times 10^{-4}$  g/ml lipopolysaccharide(LPS,

*E. coli* 026:B6)를 10배수 연속 희석법으로 만든 각각의 희석액들을 0.1 ml 체액에 각각 0.1 ml씩 첨가하여 PO activity를 측정하였다.

#### 5. 온도변화에 따른 PO activity 실험

0.1 ml의 체액에 0.1 ml의  $\text{CaCl}_2$  (30 mM)를 첨가하여 4°C, 16°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C에서 각각 20분씩 처리한 후 PO activity를 측정하였다.

#### 6. $\text{Ca}^{2+}$ 와 다른 activator간의 관계실험

1) 0.1 ml의 체액에 0.1 ml의 증류수를 첨가한 후 trypsin, LPS 그리고  $\beta$  1,3-glucan (laminarin)을 최종농도가 각각 3 mg/ml,  $10^{-8}$  g/ml, 6 mg/ml이 되도록 한 것과 50°C에서 열처리한 것을 하나의 group으로 정하고, 각각의 조건에 증류수를 대신하여  $\text{CaCl}_2$ 를 최종농도가 15 mM이 되도록 첨가한 것을 또 하나의 group으로 정한 다음 각 group을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 PO의 활성도를 측정하였다.

#### 7. Protease inhibitor와 activator들의 관계 실험

0.1 ml의 체액에 0.1 ml의 증류수를 첨가한 후 LPS,  $\text{CaCl}_2$  그리고  $\beta$  1,3-glucan을 0.1 ml씩 각각의 최종농도가  $10^{-8}$  g/ml, 15 mM 그리고 6 mg/ml이 되도록 첨가한 것과 50°C에서 열처리한 것을 하나의 group으로 정하고, 각각의 조건에 증류수 대신 soybean trypsin inhibitor (STI, Type II-S, 2 mg/ml) 0.1 ml를 첨가한 후 PO의 활성도를 측정하였다.

#### 8. 파랑의 LPS농도와 $\beta$ 1,3-glucan의 관계실험

0.1 ml의 체액에  $3 \times 10^{-4}$  g/ml의 LPS를 0.1 ml 첨가하여 LPS의 농도를  $1.5 \times 10^{-4}$  g/ml로 조절한 후 0.1 ml의 증류수를 첨가한 것과 증류수 대신  $\beta$  1,3-glucan을 최종농도가 6 mg/ml이 되도록 첨가한 두 조건에서 protease와 PO의 활성도를 측정하였다.

#### 9. 단백질 정량

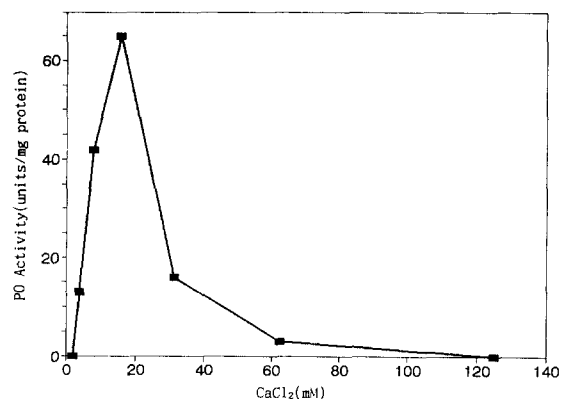
단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준으로 Bradford의 방법(1976)을 이용하여 측정하였다.

## 결과

#### 1. $\text{Ca}^{2+}$ 농도가 proPO 활성화에 미치는 영향

일반적으로 절지동물의 proPO 활성화계의 초기 단계에 작용하는 activator로 알려진  $\text{Ca}^{2+}$  이온이 붉은지렁이의 체내에서도 proPO 활성화에 영향을 미치는지를 실험하였다.

500 mM  $\text{CaCl}_2$ 를 2배 연속 희석법으로 만든 각각의 희석액들을 일정량의 체액에 넣어 PO activity를 측정하였다(Fig. 1). 이 실험에서는  $\text{Ca}^{2+}$  이온을 넣지않은 대조군의 값을 각각의 실험군에서 뺀 후의 값을 최종 PO activity로 정하였다. 실험결과,  $\text{Ca}^{2+}$  이온이 2.0 mM의 농도로 존재할 때 proPO가 PO로 전환되기 시작하였으며  $\text{Ca}^{2+}$  이온의 농도가 15.6 mM이 되었을 때 PO activity는 평균 64.6 unit로 증가되어 최고를 이루었다. 그 후  $\text{Ca}^{2+}$  이온의 농도가



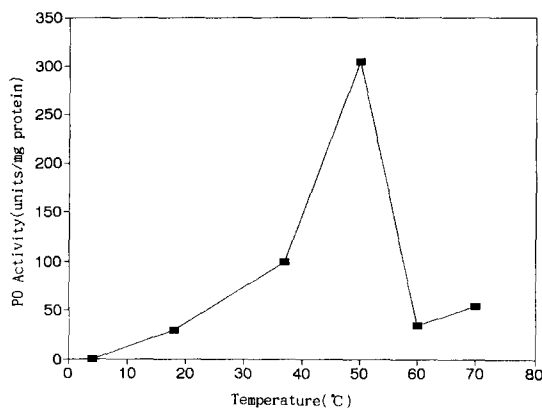
**Fig. 1.** Effect of  $\text{CaCl}_2$  on activation of ProPO to PO. PO activity was measured at each final concentration of  $\text{CaCl}_2$  indicated. The mixture (200  $\mu$ l) of  $\text{CaCl}_2$  and coelomic fluid (v:v = 1:1) was preincubated at 37°C for 30min. The substrate, 20 mM L-DOPA, was added to the mixture at final concentration of 5 mM with 10 mM sodium cacodylate, pH 6.0.

125 mM이 될때까지 PO activity가 급작히 저하되었다. 즉, 비교적 낮은  $Ca^{2+}$ 이온의 농도인 15.6 mM까지 급속히 증가 하였던 proPO에서 PO로의 활성화가 15.6 mM부터 125 mM까지는 급속히 낮아지며 125 mM 이상에서는 proPO의 전환에 대한  $Ca^{2+}$  이온의 효과가 전혀 나타나지 않았다.

## 2. 온도가 proPO활성에 미치는 영향

일반적으로 proPO activating system에서 proPO에 직접 작용하는 activator로 알려진 열처리를 이용하여 붉은지렁이 체액내의 proPO활성을 실험하였다.

효소용액을 4°C, 16°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C 등 각각의 온도에서 15 mM  $Ca^{2+}$ 의 존재하에 20분씩 처리한 후 proPO활성을 측정하였고(Fig. 2) 4°C의 조건을 control로 하여 PO activity를 정하였다. 실험결과 PO activity는 16°C에서 평균 32.34, 37°C에서 평균 96.8 unit의 활성증가효과를 나타냈으며 50°C의 열로 처리할 경우 PO activity가 평균 303.2 unit로 최고치를 나타냈다. 그 후 60°C에서는 37.1 unit의 PO activity증가가 있었으나 70°C에서는 PO activity가 57.5 unit로



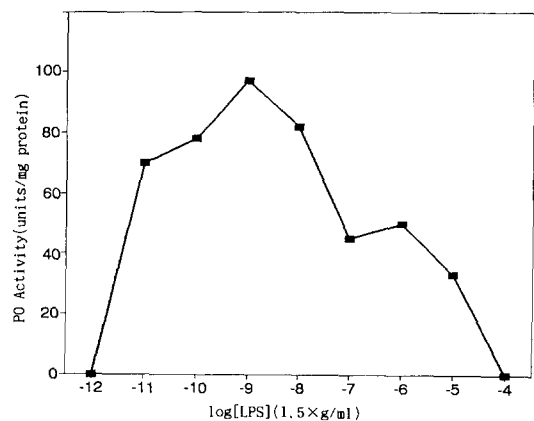
**Fig. 2.** Temperature effect on prophenoloxidase activation. The coelomic fluid was preincubated with 30 mM  $CaCl_2$  at various temperatures indicated for 20 min. in total 200  $\mu$ l reaction volume. The phenoloxidase activity was measured after additions of 2.8 ml sodium cacodylate buffer (10 mM, pH 6.0) and 1 ml L-DOPA (20 mM).

나타났다. 즉, 50°C로 열처리할 경우 proPO는 PO로 가장 빨리 전환되었으며 60°C 이상의 온도에서는 proPO의 전환률이 현저히 저하되었다. 한편, proPO는 70°C의 경우 16°C보다도 높은 activity를 나타내어 높은 온도에서도 비교적 안정된 특성을 나타내었다.

## 3. LPS의 농도가 proPO의 활성에 미치는 영향

Gram negative bacteria의 cell wall 주성분인 lipopolysaccharide의 존재시 proPO의 활성화를 조사하였다.

즉,  $3 \times 10^{-4}$  g/ml의 LPS를 10배수 연속 희석법으로 만든 각각의 희석액들을 조효소용액인 체액에 첨가하여 PO activity를 측정하였고(Fig. 3) LPS를 넣지않은 것을 control로 하여 각각에 대한 PO activity를 측정하였다. 실험결과 LPS의 농도가  $1.5 \times 10^{-11}$  g/ml,  $1.5 \times 10^{-10}$  g/ml에서 평균 71.0, 77.4 unit로 PO activity가 증가되었다.  $1.5 \times 10^{-9}$  g/ml의 농도의 경우 평균 96.8 unit의 증가효과를 나타내어 최고치를 이루었던 PO activity는 그 후  $1.5 \times 10^{-8}$  g/ml,  $1.5 \times 10^{-7}$  g/ml,  $1.5 \times 10^{-6}$  g/ml,  $1.5 \times 10^{-5}$  g/ml의 LPS농도에서 각각 평균 80.7, 45.2, 47.8, 32.2 unit로 PO activity의 증가는 감소하였으며  $1.5 \times 10^{-4}$



**Fig. 3.** Conversions of ProPO to PO in the presence of various LPS concentrations. LPS from *E. coli* 026:B6 (100  $\mu$ l) was preincubated with an equal volume of coelomic fluid at the final concentrations indicated for 30 min. at 37°C. The Phenoloxidase activity was measured with the substrate and the buffer.

g/ml의 LPS 농도에서는 PO activity는 증가되지 않았다. 즉, 지렁이 체내의 proPO-activating system은 LPS에 매우 민감하게 반응하여  $1.5 \times 10^{-11}$  g/ml 정도의 낮은 LPS농도하에서도 proPO가 PO로 전환된 반면에,  $1.5 \times 10^{-4}$  g/ml 정도의 비교적 높은 농도에서는 proPO가 PO로 전환되지 않았다.

#### 4. $Ca^{2+}$ 와 다른 activator와의 관계

##### 1) 15 mM $CaCl_2$ 존재시

앞의 실험에서  $Ca^{2+}$ 이온은 proPO를 PO로 전환시키는 효과를 보인 것과 같이 proPO활성화의 최적 농도인 15 mM의  $Ca^{2+}$ 이온과 LPS, exogenous trypsin,  $\beta$  1,3-glucan, 그리고 열처리 등 다른 활성 인자들간의 상호 연관관계를 알아보기 위하여,  $Ca^{2+}$ 이온과 각 활성인자들을 동시에 체액에 첨가하여 proPO의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

0.1 ml 체액에 0.1 ml 증류수를 첨가한 후 trypsin, LPS 그리고  $\beta$  1,3-glucan을 각각 최종 농도가 3 mg/ml,  $10^{-8}$  g/ml, 6 mg/ml이 되도록 한 것과  $50^\circ C$ 에서 열처리한 것을 하나의 group으로 하고 각각의 조건에 증류수를 대신하여  $CaCl_2$ 를 최종농도가 15 mM이 되도록 첨가한 것을 다른 하나의 group으로 한 다음 두 group의 PO activity를 측정하였다(Table 1). 그 결과,  $CaCl_2$ 를 첨가하지 않은 경우라도

trypsin이나 LPS, 열처리 그리고  $\beta$  1,3-glucan 등이 첨가된 경우 각각 98.3, 68.1, 101.9, 85.6 unit 등 일정수준의 PO 활성의 증가효과를 나타내었다. 반면,  $CaCl_2$ 를 최종농도가 15mM이 되도록 첨가한 경우 trypsin, LPS, heating, 1,3-glucan이 첨가되었을 때 PO activity가 각각 223.8, 156.7, 303.2, 176.8 unit의 활성증가효과를 나타내었다. 그러나  $50^\circ C$ 에서 열처리한 시료는  $CaCl_2$ 의 첨가유무에 관계없이 PO 활성증가효과가 가장 높았으며 trypsin을 처리한 시료 역시 상당한 PO 활성증대효과를 보였다. 즉, 열처리 및 trypsin 등의 인자는 다른 활성인자에 비하여 proPO를 PO로 더욱 빠르게 전환시키는 것으로 생각되었다.

##### 2) 과량의 $CaCl_2$ 존재시

$Ca^{2+}$ 의 농도실험결과 125 mM 이상의  $Ca^{2+}$  존재하의 체액에서는 proPO의 활성화가 억제되었기 때문에 이 실험에서는 과량의  $Ca^{2+}$  존재하의 체액에 다른 activator를 첨가시켰을 때 proPO활성화에 대한  $Ca^{2+}$ 와 다른 activator들간의 연관성을 실험하였다.

0.1 ml 체액에 500 mM  $CaCl_2$ 를 0.1 ml 첨가한 후, 여기에 0.1 ml의 증류수, LPS,  $\beta$  1,3-glucan을 각각 첨가하여 LPS와  $\beta$  1,3-glucan의 최종농도가  $1.5 \times 10^{-8}$  g/ml, 6 mg/ml이 되도록 한 후 위의 세가지 조건에서

**Table 1.** Activation of prophenoloxidase by trypsin, LPS, heat and  $\beta$  1,3-glucan.

Treatment	Conc. of $CaCl_2$	PO <sup>a</sup> activity
CF <sup>b</sup> + D.W.	0	0.00
CF + D.W.	15 mM	64.6 ± 3.2
CF + Trypsin (3 mg/ml)	0	98.3 ± 24.7
CF + Trypsin (3 mg/ml)	15 mM	223.8 ± 16.3
CF + LPS <sup>c</sup> ( $10^{-8}$ g/ml)	0	68.1 ± 9.9
CF + LPS ( $10^{-8}$ g/ml)	15 mM	156.7 ± 20.9
CF + Heating ( $50^\circ C$ )	0	101.9 ± 20.9
CF + Heating ( $50^\circ C$ )	15 mM	303.2 ± 19.3
CF + $\beta$ 1,3-glucan (6 mg/ml)	0	85.6 ± 9.1
CF + $\beta$ 1,3-glucan (6 mg/ml)	15mM	176.8 ± 10.6

Experimental procedures for prophenoloxidase activation are described in Materials and Methods. The results are shown as mean ± SD of 3 separate experiments. <sup>a</sup>Phenoloxidase, PO activity: units/mg protein <sup>b</sup>Coelomic Fluid <sup>c</sup>Lipopolysaccharide (*E. coli* 026:B6)

protease 활성과 PO 활성증가효과를 측정하였다(Table 2). 그 결과 250 mM의  $\text{CaCl}_2$ 이 첨가된 경우 protease 활성은 평균 1.5 unit로서 PO의 활성은 증가되지 않았다. 그러나 같은 조건에서 LPS를  $1.5 \times 10^{-8}$  g/ml 첨가하였을 때는 protease와 PO의 활성증가효과가 각각 평균 3.8, 64.2 unit를 보였다. 또  $\beta$  1,3-glucan을 6 mg/ml 첨가하였을 경우에는 protease와 PO의 활성증가효과가 각각 평균 6.0, 103.2 unit를 나타냈다. 즉, 지렁이 체내에는  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의해 활성화되는 proPO 활성경로와 LPS나  $\beta$  1,3-glucan에 의해 활성화되는 proPO 활성경로가 따로 존재하며 과량의  $\text{CaCl}_2$ 농도에 의해 한쪽 경로가 작용을 못하더라도 다른 경로에는 큰 영향을 끼치지 못하는 것으로 생각되었다.

#### 5. Protease inhibitor와 activator들의 관계

LPS,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\beta$  1,3-glucan과 열처리 등의 활성인자들이 지렁이 체내의 endogenous

protease와의 연관관계를 규명하기 위하여 각 반응액에 트립신억제인자를 첨가한 다음 proPO 활성증가효과를 측정하였다.

0.1 ml 체액에 0.1 ml의 증류수를 첨가한 후 LPS,  $\text{CaCl}_2$  그리고  $\beta$  1,3-glucan을 0.1 ml 씩 각각 최종농도가  $10^{-8}$  g/ml, 15 mM 및 6 mg/ml이 되도록 첨가한 것과  $50^\circ\text{C}$ 에서 열처리한 조효소용액에 각각 soybean trypsin inhibitor(Type II-S, 2 mg/ml) 0.1 ml 첨가 존재유무시의 proPO 활성증가효과를 측정하였다(Table 3). 그 결과 soybean trypsin inhibitor(STI)를 첨가하지 않은 경우 LPS,  $\text{CaCl}_2$  그리고  $\beta$  1,3-glucan이 첨가되거나 열처리를 하였을때 각각 평균 68.1, 64.2, 85.6, 101.9 unit의 PO 활성증가효과를 나타내었다. 반면에, 위의 조건에서 soybean trypsin inhibitor를 첨가한 경우에는 LPS,  $\text{CaCl}_2$  그리고  $\beta$  1,3-glucan을 첨가했을때 PO activity가 나타나지 않았으며, 열처리의 경우에는 102.0

**Table 2.** The effect of prophenoloxidase activation by LPS and  $\beta$  1,3-glucan in the presence of excess  $\text{Ca}^{2+}$ .

Treatment	Activator	Protease activity	PO activity
CF + $\text{Ca}^{2+}$ (250 mM)	-	1.5 $\pm$ 0.2	0.0
CF + $\text{Ca}^{2+}$ (250 mM)	LPS	3.8 $\pm$ 0.2	64.2 $\pm$ 4.1
CF + $\text{Ca}^{2+}$ (250 mM)	$\beta$ 1,3-glucan	6.0 $\pm$ 0.4	103.2 $\pm$ 27.5

Experimental procedures are described in Materials and Methods. The results are given as mean  $\pm$  SD of 3 separate experiments. Protease activity: units/mg protein Concentration of LPS:  $1.5 \times 10^{-8}$  g/ml Concentration of  $\beta$  1,3-glucan: 6 mg/ml

**Table 3.** Effect of soybean trypsin inhibitor on prophenoloxidase activation by various activators in coelomic fluid.

Treatment	nhibitor STI <sup>a</sup>	PO activity
CF + LPS ( $10^{-8}$ g/ml)	0	68.1 $\pm$ 9.9
CF + LPS	100 $\mu$ l	0
CF + $\text{Ca}^{2+}$	0	64.2 $\pm$ 3.2
CF + $\text{Ca}^{2+}$	100 $\mu$ l	0
CF + $\beta$ 1,3-glucan	0	85.6 $\pm$ 9.1
CF + $\beta$ 1,3-glucan	100 $\mu$ l	0
CF + Heating ( $50^\circ\text{C}$ )	0	101.9 $\pm$ 20.9
CF + Heating ( $50^\circ\text{C}$ )	100 $\mu$ l	102.0 $\pm$ 3.7

Procedure for assaying phenoloxidase is described in Material and Methods. The results are expressed as mean  $\pm$  SD of 3 separate experiments. PO activity: units/mg protein <sup>a</sup>Soybean Trypsin Inhibitor Type II - S

**Table 4.** The effect of prophenoloxidase activation by  $\beta$  1,3-glucan in the presence of LPS in excess.

Treatment	Activator	Protease activity	PO activity
CF + LPS	-	2.3 $\pm$ 0.5	0.0
CF + LPS	$\beta$ 1,3-glucan	9.5 $\pm$ 1.1	44.4 $\pm$ 4.2

Experimental procedures are described in Materials and Methods. The results

are given as mean  $\pm$  SD of 3 separate experiments. Concentration of LPS:  $1.5 \times 10^{-4}$  g/ml Concentration of  $\beta$  1,3-glucan: 6 mg/ml

unit의 PO activity가 나타났다. 이상의 결과에 대한 control 실험으로서 trypsin에 대하여 바로 STI를 첨가했을때와 50°C에서 20분간 STI를 처리한 후 이것을 trypsin에 첨가했을때의 trypsin에 대한 inhibition 정도를 비교하였다. 그 결과 STI는 50°C의 열처리에 안정했으며 열처리를 하지 않은것과 비슷한 inhibition 효과를 나타냈다. 이와 같이 STI가 첨가될 경우 활성인자인 LPS,  $Ca^{2+}$ ,  $\beta$  1,3-glucan의 proPO에 대한 활성효과가 없어지는 것으로 미루어보아 LPS,  $Ca^{2+}$ ,  $\beta$  1,3-glucan 등은 proPO에 직접적으로 작용하는 것이 아니라 이들은 지렁이 체내의 트립신유사 효소를 활성화 시키고 활성화된 효소가 proPO를 활성화 시키는 것으로 생각된다. 또한, 열처리를 할 경우에는 트립신억제인자의 첨가여부와 관계없이 proPO의 활성화가 이루어지는 점으로 미루어 보아, 열처리는 다른 활성물질들과는 또 다른 경로를 통하여 proPO를 활성화시킨다고 생각되었다.

#### 6. 과량의 LPS농도와 $\beta$ 1,3-glucan의 관계

LPS의 proPO에 대한 활성화농도 실험결과  $1.5 \times 10^{-4}$  g/ml 이상의 LPS 존재시 체액내의 proPO는 활성화되지 않음을 알았다. 이 실험에서는 과량의 LPS가 존재하는 체액에  $\beta$  1,3-glucan을 첨가하여 두 activator간의 proPO 활성경로에 대한 연관성을 조사하였다.

0.1 ml 체액에 0.1 ml의 LPS( $3 \times 10^{-4}$  g/ml)을 첨가한 후, 0.1 ml 증류수 또는  $\beta$  1,3-glucan을 첨가하여  $\beta$  1,3-glucan의 최종농도가 6 mg/ml이 되도록 하여 위의 두 조건에서 protease와 PO의 활성증가효과를 측정하였다 (Table 4). 그 결과, 과량의 LPS만이 첨가된

조건에서는 protease activity는 평균 2.3 unit가 나타났고, PO 활성증가효과는 측정되지 않았다. 반면에, 위의 조건에  $\beta$  1,3-glucan을 첨가한 경우에는 protease activity는 평균 9.5 unit였고 PO activity는 평균 44.4 unit로 증가되었다. 즉, 과량의 LPS는  $\beta$  1,3-glucan에 의한 proPO의 activation에는 큰 영향을 끼치지 못하는 것으로 추측되며 LPS와  $\beta$  1,3-glucan은 proPO activating system내에서 서로 binding하는 factor가 다르거나 또는 다른 pathway를 가지는 것으로 생각된다.

#### 고찰

일반적으로 무척추동물중 곤충을 포함한 절지동물에 존재하는 prophenoloxidase 효소활성계는 세균이나 fungi중 병원성인 이물질이 침입하였을 때 host를 보호하기 위하여 활성화되는 생체자기방어기작의 하나로 보고되고 있다 (Söderhäll and Smith, 1986). 따라서 절지동물문의 경우 proPO 활성화계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 주로 proPO의 정제 및 분석, proPO 활성화계에 관여하는 여러 activator들의 역할과 관계 그리고 활성화된 PO의 phagocytosis(식작용), encapsulation, opsonization 등과의 연관관계에 관한 연구가 주축을 이루고 있다. ProPO의 정제에 관한 보고는 silkworm(Ashida, 1971), crayfish (Aspán and Söderhäll, 1991), blowfly (Munn and Bufton, 1973) 그리고 hornworm(Aso *et al.*, 1985) 등에서 보고된 바 있으나 proPO의 정제는 PO의 aggregation

현상 등의 요인에 의해 정계에 많은 어려움이 있는 것으로 알려져 있다. 환형동물인 붉은지렁이의 경우도 계통분류학적 측면이나 발생면역학적인 측면으로 고찰하여 볼 때 절지동물이 이들로 부터 진화되었고 특히 절지동물의 경우 proPO 활성화경로가 매우 중요한 자기방어 수단의 일종으로 인식되고 있으며 이러한 관점에서 환형동물의 경우 역시 절지동물에서와 같이 강력한 활성화경로의 존재유무와 혹은 이와 매우 유사하거나 혼적적인 현상이라도 존재할 가능성이 크다고 생각된다.

절지동물의 proPO활성계에 강력하게 작용하는 것으로 알려진 각종 활성인자인 LPS,  $Ca^{2+}$ ,  $\beta$  1,3-glucan 및 열처리 등이 환형동물인 붉은지렁이의 경우 역시 매우 효과적으로 proPO 효소활성에 관여하므로써 환형동물에서도 자기방어 기작의 한 종류로 proPO 효소활성계를 갖고 있다고 생각된다.

위에 언급한 각종 활성인자인 LPS,  $Ca^{2+}$ ,  $\beta$  1,3-glucan 및 열처리 등을 지렁이의 체액을 이용하여 proPO의 활성도를 측정한 결과 proPO의 활성도는 전반적으로 절지동물에 비하여 매우 낮았으나 충분히 인지될 정도의 proPO 활성계를 갖고 있음을 알 수 있었으며 절지동물에 비하여 각종 활성인자의 종류에 따라 활성정도는 상당히 큰 차이점을 나타냈다.

Gram negative bacteria의 cell wall의 구성성분인 LPS(lipopolysaccharide)와 fungi의 cell wall의 구성성분인  $\beta$  1,3-glucan을 활성인자로 사용하였을때 proPO 활성도가 급격히 증가됨을 알 수 있었으며 이 결과로 보아 지렁이 체내에 존재하는 proPO의 경우 이 효소의 활성형인 PO가 정확히 어떠한 역할을 하는가에 대한 연구는 보고되어 있지 않았지만 gram negative bacteria나 fungi 등의 이물질이 침입하였을때 proPO가 PO로 전환되어 지렁이 체내에서 진행되는 어떠한 방어기작에 직접 또는 간접적으로 중요한 영향을 끼치리라고 생각된다.

절지동물의 예에서  $Ca^{2+}$  이온은 외부로부터 이물질의 침입이 없을때도 proPO가 PO로 활성화될 수 있도록 하는 중요한 activator로 알려

져 있으며 5 mM 정도의 낮은 농도에서도 proPO를 활성화 시킬 수 있으나 100 mM 이상의  $Ca^{2+}$  농도에서는 proPO를 활성화 시키는 능력을 상실하는 것으로 보고되어 있다(Ashida and Söderhäll, 1984; Söderhäll and Hall, 1984).

본 실험의 결과, 붉은지렁이의 체액에 첨가된  $Ca^{2+}$ 이온은 약 15 mM 정도의 낮은 농도에서 proPO에서 PO로 변화되는 양상이 가장 강하게 나타났으며, 이 조건하에서 proPO에 대한 다른 활성인자들의 활성화에도 큰 도움을 주는 것으로 생각되었다.

반면에,  $Ca^{2+}$ 의 농도가 125 mM을 넘었을 때 proPO의 활성증가효과는 나타나지 않았으나 이 조건에서 LPS와  $\beta$  1,3-glucan을 첨가하여 주었을때 proPO의 활성증가효과가 나타났다. 즉,  $Ca^{2+}$ 는 외부 이물질이 존재하지 않은 경우에도 proPO를 PO로 활성화 시킬 수 있는 스스로의 활성화경로를 가지고 있으며 bacteria나 fungi 등 이물질이 침입하였을 때 이들이 참여하게 되는 proPO-activating pathway에도 큰 영향을 주는 것으로 생각된다.

위에서와 같이 과량의  $CaCl_2$ 의 농도하에서도 LPS와  $\beta$  1,3-glucan을 첨가하였을 경우, protease activity와 PO activity가 증가하게 되는데 이것으로 보아 지렁이 체내에는  $Ca^{2+}$ 만으로 활성화되는 것과 침입된 이물질에 의해 활성화되는 서로 다른 proPO-activating pathway가 존재할 가능성이 있다고 생각된다.

절지동물의 경우, 58°C로 열처리를 하였을때 proPO가 가장 빠르게 활성화 되었으며 45°C 이하와 65°C 이상에서는 proPO가 활성화되지 않는다고 보고된 바 있다(Ashida and Söderhäll, 1984). 지렁이 체액에 대한 열처리 실험의 결과, 50°C로 처리했을 경우 proPO에서 PO로 가장 빠르게 전환되는 것을 관찰할 수 있었다. 그러나 절지동물과는 다르게 70°C 정도에서도 proPO의 활성화가 유지되므로써 온도에 의한 proPO의 활성화는 다른 활성인자와는 다르게 protease inhibitor의 영향을 전혀 받지 않는 것으로 생각된다. 이상의 결과로 볼 때,



proPO-activating system에서 열처리과정은 다른 활성인자들처럼 protease의 활성을 거치는 cascade반응이 아니며 직접 proPO에 작용하여 proPO를 PO로 전환시키는 direct activating factor로 생각된다.

절지동물의 경우, LPS는  $10^{-10}$  g/ml 정도의 낮은 농도에서 proPO를 활성화시키나  $10^{-4}$  g/ml 정도의 농도로 존재할 경우에는 proPO를 활성화 시키지는 못하나 과량의 LPS농도하에서  $\beta$  1,3-glucan을 첨가할 경우 proPO의 활성화가 다시 증가된다(Söderhäll and Hall, 1984). 이외에도 체액에는  $\beta$  1,3-glucan이 binding하는 factor가 서로 다를 것으로 추측되고 있다(Ochiai and Ashida, 1988; Söderhäll *et al.*, 1988). 한편, 지렁이 체액의 경우 LPS는 낮은 농도( $1.5 \times 10^{-9}$  g/ml)에서는 proPO의 activation에 작용하나 높은 농도( $1.5 \times 10^{-4}$  g/ml)에서는 proPO의 activation을 inhibition시킴을 알 수 있었다. 그러나 LPS가 과량 존재하는 경우에도  $\beta$  1,3-glucan을 첨가시켜 주었을 경우에는 protease와 PO activity가 증가되는 것으로 보아 활성인자인 LPS와  $\beta$  1,3-glucan은 지렁이 체내에서 상기 두가지 활성인자가 binding하는 factor가 서로 다른 것으로 생각된다.

이상의 몇가지 결과를 토대로 분석하여 볼 때 지렁이 체내에 존재하는 proPO activating system은 외부 이물질의 작용없이  $Ca^{2+}$ 에 의해서 일어나는 pathway. gram negative bacteria나 fungi 등 외부 이물질의 침입에 의하여 proPO의 activation이 일어나는 pathway 그리고 열처리에 의해 직접적으로 proPO의 activation이 일어나는 pathway 등 적어도 3가지 이상의 pathway로 구성되어 있다고 생각된다.

최근의 보고에 의하면 절지동물에서의 경우 proPO활성화 단계에 깊이 관여하는 것으로 알려진 cell adhesion protein과  $\beta$  1,3-glucan binding protein을 crayfish로부터 정제 시킨 바 있고(Johansson and Söderhäll, 1988; Duvic and Söderhäll, 1992). 이 두가지

protein들과 관련된 절지동물 blood cell에서의 intracellular signaling(Johansson and Söderhäll, 1993)과 opsonic activity (Thörnqvist *et al.*, 1994) 등이 보고되고 있다. 환형동물인 붉은지렁이의 경우 역시  $\beta$  1,3-glucan에 의한 proPO의 활성화가 나타나며 예비실험의 결과이긴 하지만 이미  $\beta$  1,3-glucan에 대한 binding factor의 존재를 확인한바 있다(unpublished personal data). 본 연구의 경우 위에 언급된  $\beta$  1,3-glucan binding factor에 대한 정제 및 이들의 환형동물내에서의 방어기작과 역할에 대한 연구가 계속되어야 한다고 생각된다.

## 감사

이 연구는 선도기술개발사업(G-7)인 구인으로 부터 의약품 효소제 개발사업비 및 일부의 인하대 교내지원 연구비('93, '94학년도)의 지원으로 이루어졌음.

본 연구에 사용된 지렁이 공급에 많은 도움을 주신 기흥소재 신갈농민 학교의 고재경 선생께 깊은 감사를 드립니다.

## 인용문헌

- Ashida, M., 1971. Purification and Characterization of Prephenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. Biochem. Biophys.* **144**: 749-762.
- Ashida, M., 1981. A cane suger factor suppressing activation of prophenol-oxidase in haemolymph of the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **11**: 57-65.
- Ashida, M., R. Iwama, H. Iwama, and H. Yoshida, 1982. Control and function of the prophenoloxidase activating system. In: *Proceedings of the 3rd International Colloquium on Invertebrate Pathology*. Univ. Sussex, Brighton, pp. 81-86.
- Ashida, M. and E. Ohnishi, 1967. Activation of prophenoloxidase in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Arch. Biochem. Biophys.* **122**: 411-416.
- Ashida, M. and K. Söderhäll, 1984. The

- prophenoloxidase activating system in crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.* **77B**: 21-26.
- Aso, Y., K.J. Kramer, and T.L. Hopkins, 1985. Characterization of haemolymph protyrosinase and a cuticular activator from *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* **15**: 9-17.
- Aspán, A. and K. Söderhäll, 1991. Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem.* **21**: 363-373.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 245-254.
- Brookman, J.L., N.A. Ratcliffe, and A. F. Rowley, 1988. Optimization of a monolayer phagocytosis assay and its application for studying the role of the prophenoloxidase system in the wax moth, *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* **34**: 337-345.
- Duvic, B. and K. Söderhäll, 1990. Purification and characterization of a  $\beta$  1,3-glucan binding protein from plasma of the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* **265**: 9327-9332.
- Fischer, E., 1978. DOPA peroxidase activity in the chloragen cells of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. *Acta Histochem.* **63**: 210-223.
- Heyneman, R.A. and R.E. Vercauteren, 1968. Evidence for lipid activator of prophenoloxidase in *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.* **14**: 409-415.
- Horowitz, N.H. and S.C. Shen, 1952. Neurospora tyrosinase. *J. Biol. Chem.* **197**: 513-520.
- Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson, and H.G. Boman, 1980. Insect immunity. Purification and properties of three inducible bacterial protein from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora ceropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**: 7-16.
- Johansson, M.W. and K. Söderhäll, 1988. Isolation and purification of a cell adhesion factor from crayfish blood cells. *J. Cell Biol.* **106**: 1795-1803.
- Johansson, M.W. and K. Söderhäll, 1993. Intracellular signaling in arthropod blood cells: involvement of protein kinase C and protein tyrosine phosphorylation in the response to the 76-kDa protein or the  $\beta$  1,3-glucan-binding protein in crayfish. *Dev. Comp. Immunol.* **17**: 495-500.
- Leonard, C.M., N.A. Ratcliffe, and A.F. Rowley, 1985. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. *J. Insect Physiol.* **31**: 789-799.
- Mitchell, H.K. and U.M. Weber, 1965. Drosophila phenoloxidase. *Science* **148**: 964-965.
- Munn, E.A. and S.F. Bufton, 1973. Purification and properties of phenol oxidase from the blowfly *Calliphora erythrocephala*. *Eur. J. Biochem.* **35**: 3-10.
- Ochiai, M. and M. Ashida, 1988. Purification of a  $\beta$ -1,3-glucan recognition protein in the prophenoloxidase activating system from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* **263**: 12056-12062.
- Persson, M., A. Vey, and K. Söderhäll, 1987. Encapsulation of foreign particles in vitro by separated blood cells from crayfish, *Astacus leptodactylus*. *Cell Tissue Res.* **247**: 409-415.
- Preston, J.W. and R.L. Taylor, 1970. Observations on the phenoloxidase system in the haemolymph of the cockroach, *Leucophaea maderae*. *J. Insect Physiol.* **16**: 1729-1744.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.N. Fitzgerald, and C.P. Rhodes, 1985. Invertebrate immunity-basic concepts and recent advances. *Int. Rev. Cytol.* **97**: 183-349.
- Riziki, R.M. and T.M. Rizki, 1990. Encapsulation of parasitoid eggs in phenoloxidase-deficient mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **36**: 523-529.
- Söderhäll, K., 1981. Fungal cell wall  $\beta$ -1,3-glucans induce clotting and phenoloxidase attachment to foreign surfaces of crayfish hemocyte lysate. *Dev. Comp. Immunol.* **5**: 565-573.
- Söderhäll, K., 1982. Prophenoloxidase activating system and melanization a recognition system of arthropods? A review. *Dev. Comp. Immunol.* **6**: 601-611.
- Söderhäll, K., A. Vey, and M. Ramstedt, 1984. Hemocyte lysate enhancement of fungal spore encapsulation by crayfish hemocytes. *Dev. Comp. Immunol.* **6**: 23-29.
- Söderhäll, K. and L. Hall, 1984. Lipopolysaccharide-induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. *Biochem. Biophys. Acta.* **797**: 99-104.
- Söderhäll, K., L. Hall, T. Unestam, and L. Nyhlen, 1979. Attachment of prophenoloxidase to fungal cell walls in arthropod immunity. *J. Invertebr. Pathol.* **34**: 285-294.
- Söderhäll, K. and V.J. Smith, 1984. The prophenoloxidase activating system: a complement like pathway in arthropods? In: Infection Processes of Fungi (Roberts D.W. and J.R. Aist eds). The Rockefeller Foundation, New York, pp. 160-167.
- Söderhäll, K. and V.J. Smith, 1986. The prophenoloxidase activating system: The biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity with special reference to crustaceans. In: Immunity in Invertebrates (Brehelin M. eds). Springer, Berlin, pp. 208-223.

- Söderhäll, K., W. Rögener, I. Söderhäll, R.P. Newton, and N.A. Ratcliffe, 1988. The properties and purification of a *Blaberus craniifer* plasma protein which enhance the activation of haemocyte prophenoloxidase by a  $\beta$  1,3-glucan. *Insect Biochem.* **18**: 323-330.
- Thörnqvist, P.O., M.W. Johansson, and K. Söderhäll, 1994. Opsonic activity of cell adhesion proteins and  $\beta$  1,3-glucan binding proteins from two crustaceans. *Dev. Comp. Immunol.* **18**: 3-12.
- Valembois, R., J. Seymour, and P. Roch, 1991. Evidence and Cellular Localization of an Oxidative Activity in the Coelomic Fluid of the Earthworm, *Eisenia foetida*. *J. Inverteb. Pathol.* **57**: 177-183.
- Vasta, G.R., J.C. Hunt, J.J. Marchalonis, and W.W. Fish, 1986. Galactosyl-binding lectins from the tunicate *Didemnus candidum*. *J. Biol. Chem.* **261**: 9174-9181.

(Accepted December 20, 1994)

---

**Prophenoloxidase Activating System in the Coelomic Fluid of the Redworm,  
*Lumbricus rubellus***

Yun-Kyung Bahk, Young-Jong Son, \*Eun-Jeong Cho, \*Seung R. Paik, \*\*Yu-Sam Kim, \*\*\*Jung-Jin Suh, and \*Chung-Soon Chang (Department of Biology, College of Sciences and \*Department of Biochemistry, College of Medicine, Inha University, Incheon 402-751, Korea; \*\*Department of Biochemistry, College of Sciences, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea; \*\*\*Shinpoong Pharmaceutical Co., Ansan 425-100, Korea)

Prophenoloxidase-activating system was found and studied from the coelomic fluid of *Lumbricus rubellus*. The prophenoloxidase was converted to an active form by treatment of several activators such as exogenous trypsin,  $\beta$  1,3-glucan,  $\text{Ca}^{2+}$ , lipopolysaccharide (LPS) and heat. The conversions were more effective in the presence of  $\text{Ca}^{2+}$ .

The converted phenoloxidase activity was continuously increased as concentrations of LPS and  $\text{Ca}^{2+}$  raised to  $1.5 \times 10^{-9}$  g/ml and 15 mM, respectively. The enzyme exhibited its maximum activity at the concentrations and decreased thereafter. The activators, however, were not effective in the presence of soybean trypsin inhibitor (STI). This fact indicates that the activators might influence a trypsin-like enzyme or serine protease which has been suspected to be involved in the prophenoloxidase activating system.

In addition, heat treatment of the coelomic fluid at 50°C for 20 min. was found to be a very efficient physical factor for the activation. This may suggest that prophenoloxidase activation by the heat could have an entirely different mechanism compare to the activations by serine protease (s).

Some other properties of the activators and the serine protease also have been described in terms of their involvements in the activation.