

## 만손열두조충(*Spirometra erinacei*)에서 알칼리성과 산성 인산효소의 특성

곽기훈, 김창환\*

경상대학교 자연과학대학 생물학과

초록: 자연감염된 맴의 체내조직에서 적출한 스파르가눔(s-스파르가눔)을 흰쥐와 고양이에게 인공 경구감염시켜 12주 후에 흰쥐의 피하조직에서 적출한 스파르가눔(r-스파르가눔)과 고양이의 소장에서 회수한 성충(adult)을 재료로 하여 alkaline phosphatase(Alp)와 acid phosphatase(Acp)의 총체조직내 분포 및 동위효소의 특성을 조사하기 위하여 효소조직화학적 방법과 전기영동법 등을 이용하였다. Alp와 Acp의 조직내 분포는 성충과 유충 모두 외피층과 외피하근층에 많이 분포하였으며, 실질근층에서는 거의 분포하지 않았다. 이들 phosphatase는 Acp에 비해 Alp가 더 강하게 양성반응이 나타났다. Alp의 동위효소유형이 s-스파르가눔, r-스파르가눔, 성충에서 각각 2개, 2개, 4개가 분리되었고, 이중 분자량 66 kDa 분획이 유충과 성충에서 공통적으로 존재하는 동위효소였다. Acp 동위효소는 s-스파르가눔, r-스파르가눔, 성충에서 각각 2개, 2개, 3개가 분리되었다. 이중 130 kDa 분획이 유충과 성충에 공통적으로 존재하는 동위효소이면서 유충의 주분획이었다. IEF에 의해 성충에서 등전점 5.3, 6.5, 7.7, 7.9인 동위효소가 분리되었고, 스파르가눔에서는 등전점 7.7, 7.9인 동위효소가 분리되었다. 열에 대한 안정도는 Alp가 90°C에서 40초경과 후에 완전히 불활성화 되었다. 스파르가눔과 성충에 존재하는 Alp 활성의 최적 pH는 10이나 활성범위가 pH 9~10이었고, 최적 온도 활성범위는 40~50°C이며, 50°C 이상에서는 활성이 급격히 감소하였다. Alp의 최대활성도(unit)는 s-스파르가눔, r-스파르가눔, 성충에서 각각 22.0, 25.0, 215.0으로 나타났으며, Alp는 유충에 비해 성충의 조직에 존재하는 동위효소들의 활성도가 월등히 높게 나타났다. 만손열두조충의 스파르가눔과 성충이 숙주와 기생장소를 달리하지만 phosphatase는 외피층과 외피하근층에 주로 분포하고 있어 기생환경의 변화에 따라 Alp와 Acp의 동위효소들의 활성을 달리하므로서 숙주환경에 적응한다는 사실을 알 수 있다.

### 서론

만손열두조충은 생활환 중 유충인 스파르가눔은 중간숙주의 근조직과 피하결합조직과 근조직 사이에 조직 기생 생활을 하며 성충은 종숙주인 고양이나 개의 소화관내에서 기생생활을 한다.

만손열두조충은 전생활환을 통하여 소화기관의 분화가 없기 때문에 숙주의 양분을 직접 체포로 흡수하여 체내 대사활동에 이용하며(Kwa, 1972; Pappas and Read, 1975), 양분흡수기전은 능동수송 및 확산에 의해 이루어지며 흡수된 영양물질이 성충의 조직세포 내에서 분해된 다음 영양소의 상

호전환 과정을 거쳐 최종적으로 포도당과 갈락토오스 형태로 에너지대사에 이용된다(Pappas and Read, 1975; Bryant, 1978). 세포내 분해과정은 주로 영양물질들이 인산화된 형태로 흡수되기 때문에 인산화합물의 분해가 진행되는데 이 과정에 관여하는 각종 가수분해효소들의 효소학적 연구가 많이 보고되었다. 기생충의 생체내에 분포하고 있는 phosphatase는 성충의 신진대사작용에 있어서 탄수화물과 지질의 분해 및 합성에 관여하거나 또는 탄수화물에서 지방생성과정에 중요한 역할을 담당하고 있으며, 또한 인산 에스테르화합물을 가수분해하여 유리인산을 발생하게 하거나 이들 합성하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Chu and Lee, 1963).

조충류에 있어서 효소학적 연구는 *Hymenolepis*를 재료로 한 다수의 보고가 있으나(Pappas and Read, 1975), 본 종에 대한 효소학적 연구는

\* 논문접수 1995년 11월 27일, 게재확정 1996년 1월 16일

\* 책임저자

Fukase et al(1984, 1985)의 가수분해효소 연구를 비롯하여 몇몇 보고가 있으나, 발육에 따른 유충과 성충간에 Acp와 Alp의 효소조직화학적 분포 및 특성의 비교와 동위효소(isozyme)에 관한 연구는 거의 접하지 못한 상태이다.

따라서, 본 연구에서는 인산 에스테르의 가수분해를 촉매하여 충체의 물질대사 및 세포분화에 관여하는 것으로 알려진 alkaline phosphatase(EC. 3. 1. 3. 1)와 acid phosphatase(EC. 3. 1. 3. 2)의 효소 조직화학적 소재를 조사하였다. 또 이들 효소의 동위효소 유형 및 분자량(M.W.), 등전점(PI), 열에 대한 안정도, 최적 pH, 최적온도 등을 중간숙주인 번은동물의 조직환경에 서식하는 s-스파르가눔과 정은동물의 조직환경에 서식하는 r-스파르가눔, 중숙주의 소장 환경에서 기생하는 성충의 발육에 따른 phosphatase의 소재와 분포, 동위효소의 특성 등을 효소조직화학적 방법 및 전기영동으로 비교하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 충체의 준비

스파르가눔: 유혈목이(*Rhabolophis tigrina*)를 해부하여 피하조직에 기생하고 있는 만손열두조충의 유충을 적출한 다음, 두절(scolex)과 경부(neck)가 포함되게 5 mm 길이로 잘라 체중 200 g의 흰쥐(*Wistar immanichi albino*)를 마취시켜 인공 경구감염 시켰다. 감염 후 12주 경과시 흰쥐를 해부하여 피하조직에서 성장한 스파르가눔을 회수하였다. 뱀의 조직에서 적출한 s-스파르가눔과 흰쥐에서 회수한 r-스파르가눔을 유충재료로 사용하였다.

성충: 유혈목이에서 해부 적출한 스파르가눔을 고양이에게 인공 경구감염시켜 변경사를 통해 충란의 배출을 확인하고 감염 후 12주에 고양이를 해부하여 소장에서 성충을 회수하였다. 회수된 성충은 해부현미경하에서 생식기관의 발육 및 충란 발생상태를 확인하여 미성숙편절(immature proglottid), 성숙편절(mature proglottid), 수태편절( gravid proglottid)로 구분해서 실험재료로 사용하였다.

뱀과 흰쥐에서 얻은 스파르가눔의 체부와 인공감염시켜 고양이에서 얻은 성충의 각 편절을 냉동절편으로 만들고 일부는 0.01 M PBS(pH 7.4)에 넣어 -70°C 냉동실에 보관한 후 전기영동용 재료로 사용하였다.

#### 2. 효소 조직화학적 염색

냉동절편의 제작: 살아 있는 성충을 -25°C 조건의 냉동절편기(Reichert Histo Stat)에서 -25°C로 냉동시켜 포매기질(embedding matrix)로 포매하여 8 μm 두께로 냉동절편을 만들어 -30°C 냉동실에 보관하였다가 효소 검정재료로 사용하였다.

효소의 검정: Alkaline phosphatase는 fast red TR salt 50 mg을 녹인 0.2 M Tris-HCl(pH 8.5) 50 ml에 naphthol AS-MX phosphate 20 mg을 첨가하여 용해시킨 다음 여과시킨 용액에 실온에서 30분간 조직절편을 정온반응(incubation)시켜 효소를 검정하였다.

Acid phosphatase는 michaelis solution에 naphthol AS-BI phosphate를 용해시킨 용액 18 ml에 pararosanilin hydrochloride와 HCl을 가한 용액 1.6 ml과 4% NaNO<sub>2</sub> 1.6 ml를 희석하여 1 N NaOH로 pH 5.0으로 맞춘 후 여과시킨 용액에 실온에서 30분간 정온반응시켜 효소를 확인하였다. 반응이 끝난 조직절편은 후처리하여 canada balsam으로 봉입하고 광학현미경으로 관찰 후 사진 촬영 하였다. 성충 조직에 발색된 효소의 분포는 Hotta(1978)의 방법에 따라 외피층(tegument), 외피하근층(subtegumental musculature), 실질근층(parenchymal musculature)으로 구분하여, 발색 반응의 상대적 강도에 따라 강양성반응(+++), 중양성반응(++), 약양성반응(+), 음성반응(-)으로 구분 판정하였다.

#### 3. 전기영동에 의한 동위효소 검정

냉동시킨 유충과 성충을 막자바위(mortar and pestle)와 초음파분쇄기(ultrasonicator)로 균질화한 후 15,000 rpm으로 4°C에서 2회 원심분리하여 상정액(supernatant)을 취했다. 이 상정액을 4°C에서 24시간 동안 0.01 M PBS(pH 7.4)로 투석하였고, 시료액에 포함된 단백질 함량을 정량한 다음, 단백질 200 μg씩 똑같이 함유된 시료로 만들어서 각 시료를 주입구(well)에 주입하였다. 전기영동은 7.5-15% polyacrylamide gradient gel을 이용해서 전기영동을 전개하였다.

분자량 측정을 위해 native M.W. marker(Sigma)를 사용하였고 0.01%(w/v) bromophenol blue 수용액을 tracking dye로서 사용하였다. 4°C에서 3 mA로 13시간 동안 전개시킨 후 겔(gel)을 다음과 같은 방법으로 발색 반응시켰다.

알칼리성 인산효소: Allen and Hyncik(1963)의 방법에 따라 alkaline phosphatase는 0.033 M Tris-HCl buffer(pH 9.5) 10 ml에 α-naphtyl sodium phosphate 10 mg과 fast-red TR salt 10 mg을 가하여 정온반응시켜 확인하였다.

산성 인산효소: Lawrence et al(1960)의 방법에 따라 0.1 M acetate buffer 20 ml(pH 4)를 37°C에서 15분간 정온반응한 다음 α-naphtyl sodium phosphate 100 mg과 10% magnesium chloride 2 방울을 희석시킨 기질용액에 37°C에서 30분간 겔을 정온반응시켰다. 이어서 fast-violet B salt 50 mg을 녹인 염색액 10 ml를 첨가시켜 계속해서 30분간 더 정온반응시켜 발색하였다.

4. 열에 대한 효소의 안정도

성충의 상징액을 90°C에서 각각 10초 간격으로 열처리(10초, 20초, 30초, 40초)한 다음 대조구를 포함한 5개의 시료를 겔에 주입하여 12.5% native PAGE를 이용하여 3 mA로 14시간 전개시켰다. 90°C로 열처리된 sample gel을 Allen and Hyncik (1963)의 방법에 따라 fast blue RR salt를 반응액으로 사용하여 Alp를 발색하였다.

5. 등전점(Isoelectric point)

IEF(isoelectric focusing)는 Hames et al.(1990)이 기술한 방법을 변형하여 2.7% pH 3.5-10 native gel을 이용하여 30 V, 50 V, 80 V의 전압을 차례로 1시간, 1시간, 15시간 동안 공급하여 전기영동한 다음 r-스파르가눔과 성충에 존재하는 Alp의 등전점을 Allen and Hyncik(1963)의 방법을 이용하여 확인하였다.

6. Spectrophotometer를 이용한 효소활성 측정

r-스파르가눔과 성충을 0.01 M 인산완충액(pH 7.4)에서 막자바위와 초음파분쇄기로 균질화하여 17,000 rpm으로 원심분리한 상징액에 포함된 단백질량을 정량하였다.

pH의 영향: Alp의 효소활성은 pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11의 7종류로 pH를 달리한 기질용액을 만들어 37°C에서 상징액과 반응시켰다.

온도의 영향: 0.033 M Tris-HCl(pH 9.5)의 Alp의 기질액을 만들어 온도 20°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C 하에서 30분간씩 정온반응한 다음 상징액과 반응시켜 O.D값을 측정하였다.

활성도의 측정: Alp 활성을 측정하기 위해 phosphatase 기질(p-nitrophenyl phosphate, disodium, hexahydrate) 0.2 mg과 0.033 M Tris-HCl buffer(pH 9.5) 1 ml를 혼합한 기질액을 여과하였다. 이 기질액에 총 단백질 함량 100 µg이 되는 상징액을 혼합하여 spectrophotometer로 37°C에서 10분간 paranitrophenol의 생성량을 400 nm에서 측정하였다. 측정된 O.D값을 표준곡선에서 생성량으로 환산하여 총단백질 10 µg 속에 들어있는 효소가 37°C에서 1분 동안에 기질을 분해한 생성물 1 ng을 1 unit로 정의하여 활성도(activity)를 비교하였다.

결 과

조직학적 효소 분포

알칼리성 인산효소: 성충의 조직에 분포하는 Alp는 fast-red TR salt에 염색되어 적색(red)으로 나타났는데, 유충과 성충 모두 외피층과 외피하근층 조직

에서 높은 활성을 나타내었다. 실질근층에서는 아주 미약한 반응을 보여 음성(negative: -)으로 판정되었다. r-스파르가눔의 조직에서 s-스파르가눔의 조직에서보다 다소 많이 분포하였으며(Fig. 1a-d), 성충에서는 편절에 따른 차이는 없었으나, 외피하근층에 비해 외피층에서의 활성분포가 다소 많았다. 생식기관 중에서도 정소에서 약간의 활성이 관찰되었다(Fig. 1, e-j; Table 1).

산성 인산효소: Acp는 pararosanilin hydrochloride에 의해 붉은색(reddish brown)으로 염색되었다. 유충 시기에는 s-스파르가눔과 r-스파르가눔 모두 실질근층에 비해 외피층과 외피하근층에 많이 분포

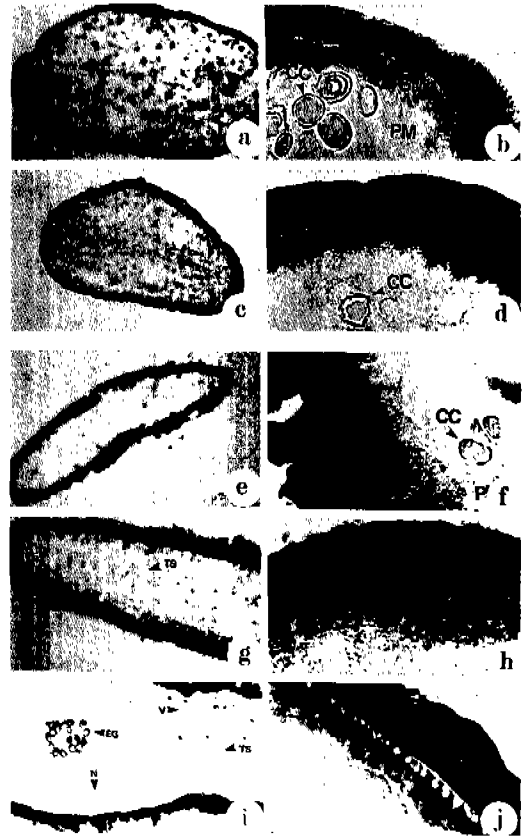


Fig. 1. Histochemical localization of alkaline phosphatase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. a. Snake sparganum (80 ×) b. Snake sparganum (400 ×) c. Rat sparganum (80 ×) d. Rat sparganum (400 ×) e. Immature proglottid (80 ×) f. Immature proglottid (400 ×) g. Mature proglottid (80 ×) h. Mature proglottid (400 ×) i. Gravid proglottid (80 ×) j. Gravid proglottid (400 ×) T, tegument; SM, subtegumental musculature; PM, parenchymal musculature; CC, calcareous corpuscles; TS, testis; V, vitelline gland; EG, egg; N, nerve trunk.

**Table 1.** Relative amount of alkaline phosphatase activity on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*.

Tissue	Sparganum		Adult		
	Snake	Rat	Immature proglottid	Mature proglottid	Gravid proglottid
T	++	+++	+++	+++	+++
SM	++	+++	++	++	++
PM	-	-	-	-	-

T, tegument; SM, subtegumental musculature; PM, parenchymal musculature; +++, intensively stained; ++, moderately stained; +, slightly stained; -, not stained.

하였으나, 발색 상태는 Alp에 비해 다소 미약하였다(Fig. 2a-d). 성충에서는 편절간의 차이는 없었고, 외피하근층에 비해 외피층의 활성이 다소 높게 나타났다. 유충과 성충 모두 실질근층에는 음성반응을 나타내었다(Fig. 2e-j; Table 2).

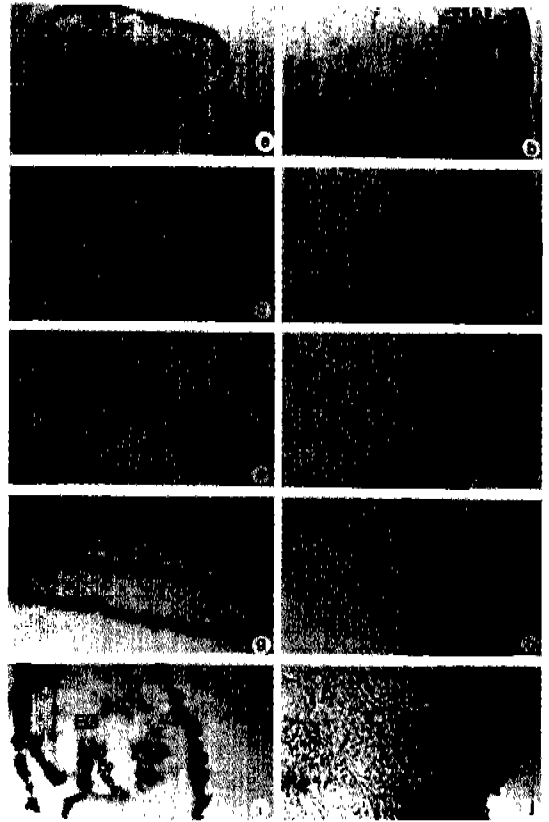
**전기영동에 의한 동위효소유형**

**알칼리성 인산효소:** Alp 동위효소의 분획유형(banding pattern)은 s-스파르가눔과 r-스파르가눔, 성충에서 각각 2개(66 kDa, 48 kDa), 2개(66 kDa, 55 kDa), 4개(270 kDa, 66 kDa, 55 kDa, 48 kDa)의 분획이 분리되었고, 이중 66 kDa의 분자량을 가진 동위효소 분획이 유충과 성충에서 공통적으로 나타났다. s-스파르가눔에서는 48 kDa 분획이 주분획을 이루었고, r-스파르가눔에서는 55 kDa 분획, 성충에서는 48 kDa 분획이 주분획이었다. 유충에 비해 성충에 존재하는 동위효소의 활성이 훨씬 높게 나타났다(Fig. 3).

**산성 인산효소:** 성충의 조직에 존재하는 Acp의 동위효소유형은 s-스파르가눔에서 2개(250 kDa, 130 kDa)와 r-스파르가눔에서도 2개(250 kDa, 130 kDa)의 분획이 분리되었고, 성충에서는 3개(285 kDa, 130 kDa, 52 kDa)의 분획이 분리되었다. 이 중에서 s-스파르가눔과 r-스파르가눔에서는 똑같이 130 kDa 분획이 주분획을 이루었으며, 성충에서도 분리되었으나, 스파르가눔에서와는 다르게 발색반응이 약하였다. 성충에서는 52 kDa 분획이 주분획이었다. 스파르가눔과 성충 모두 공통적으로 가지는 동위효소 분획은 130 kDa 분획이었다(Fig. 4).

**등전점(PI)**

IEF를 통해서 성충에 존재하는 Alp 동위효소는 각각 6.3, 6.5, 7.7, 7.9 등 4개의 등전점을 갖는 동위효소가 분리되었으며, 유충에서는 7.7, 7.9의 등전점을 가진 2개의 동위효소가 분리되었다. 유충에서는 존재하지 않고 성충만이 갖는 Alp의 특이 동위효소는 등전점(PI) 6.3, 6.5인 분획이었으며,

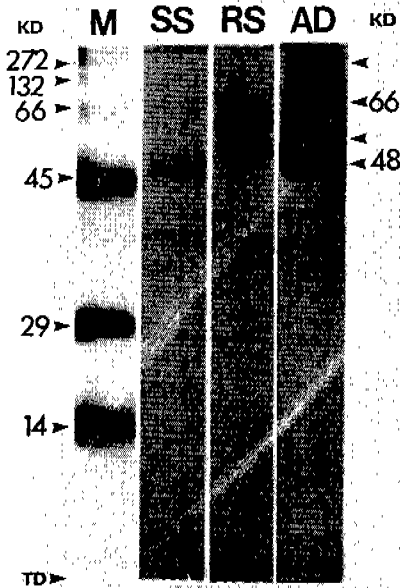


**Fig. 2.** Histochemical localization of acid phosphatase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. **a.** Snake sparganum (80 ×) **b.** Snake sparganum (400 ×) **c.** Rat sparganum (80 ×) **d.** Rat sparganum (400 ×) **e.** Immature proglottid (80 ×) **f.** Immature proglottid (400 ×) **g.** Mature proglottid (80 ×) **h.** Mature proglottid (400 ×) **i.** Gravid proglottid (80 ×) **j.** Gravid proglottid (400 ×) T, tegument; SM, subtegumental musculature; PM, parenchymal musculature; CC, calcareous corpuscles; EG, egg.

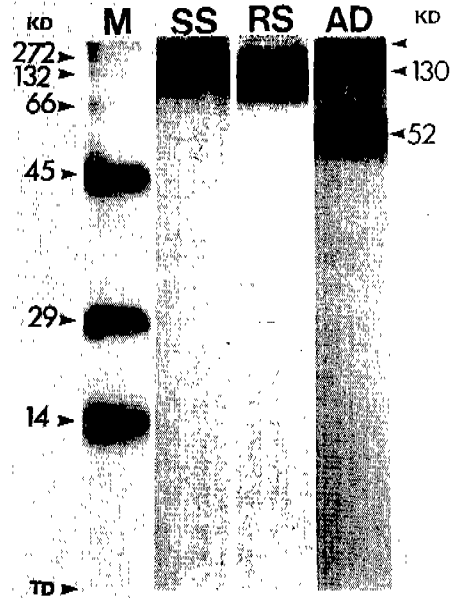
**Table 2.** Relative amount of acid phosphatase activity on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*.

Tissue	Sparganum		Adult		
	Snake	Rat	Immature proglottid	Mature proglottid	Gravid proglottid
T	++	++	+++	+++	+++
SM	++	++	++	++	++
PM	-	-	-	-	-

T, tegument; SM, subtegumental musculature; PM, parenchymal musculature; +++, intensively stained; ++, moderately stained; +, slightly stained; -, not stained.



**Fig. 3.** Isozyme patterns of alkaline phosphatase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. SS, snake sparganum; RS, rat sparganum; AD, adult; TD, tracking dye; kDa, kilo-dalton; M, marker protein.



**Fig. 4.** Isozyme patterns of acid phosphatase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei*. SS, snake sparganum; RS, rat sparganum; AD, adult; TD, tracking dye; kDa, kilo-dalton; M, marker protein.

PI 6.3 분획이 주분획이었다(Fig. 5).

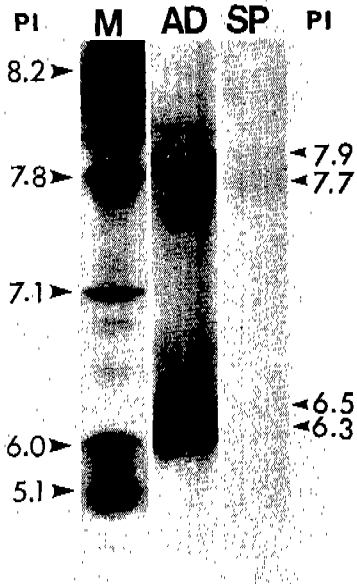
**열에 대한 안정도(thermostability)**

성충에 존재하는 alkaline phosphatase의 열에 대한 안정성을 조사한 결과 Fig. 6에서와 같다. 90 °C에서 열처리한 alkaline phosphatase는 1번 분획이 10초 처리에서 활성을 잃었으며, 3번 분획은 30 초에 활성이 급격히 감소하였고, 4번 분획이 40초 후에 최종적으로 변성되어, 성충에 존재하는 모든 Alp의 동위효소는 90 °C에서 40초간 열처리하였을 경우 완전히 불활성화 되었다(Fig. 6).

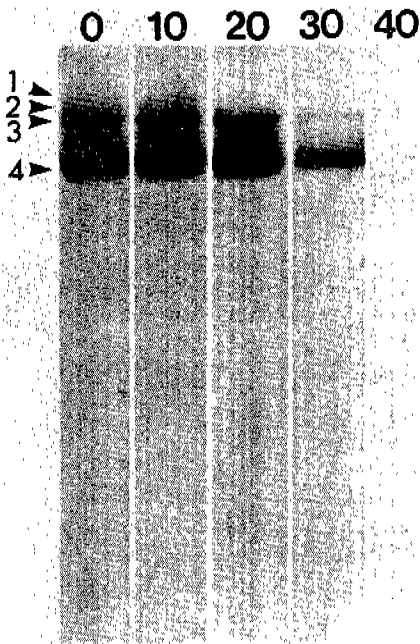
**Spectrophotometer를 이용한 활성도 측정**

**pH의 영향:** 유충과 성충에 존재하는 Alp 활성의 적정 pH는 pH 5~11 사이의 7개 실험구 중 pH 9~10 사이에서 활성도가 높았으며, pH 10에서 최고 활성이 나타났고, 그 이상의 pH에서는 활성이 급격히 하강하였다. 따라서 최적 pH는 9~10이다. 또한 pH 변화에 따른 활성도 차이는 현저한 수준은 아니었으나, 성충과 유충인 스파르가눔간의 차이는 컸다(Fig. 7).

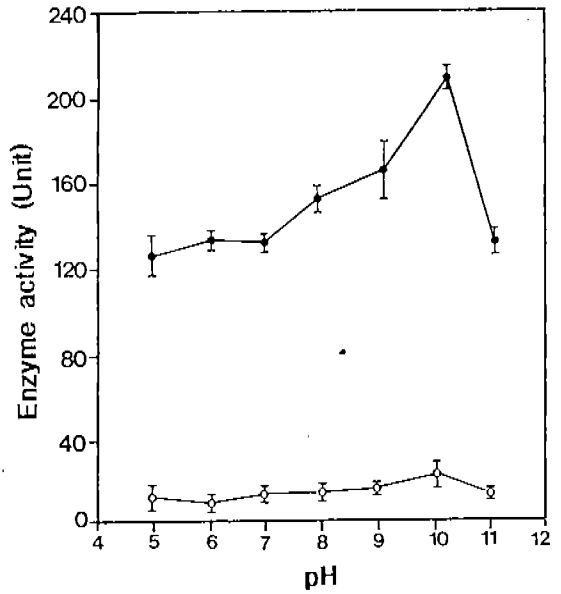
**온도의 영향:** Alkaline phosphatase의 최적온도는 20 °C~80 °C 사이의 7개 실험구 중에서 유충과 성



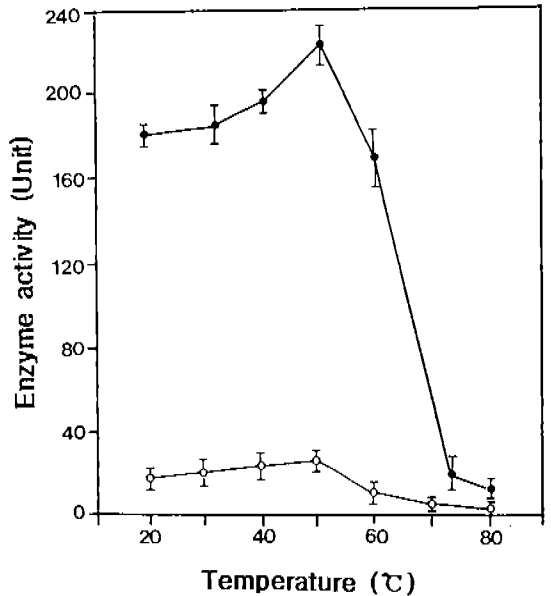
**Fig. 5.** Isozyme patterns of alkaline phosphatase by IEF in adult worm. SP, rat sparganum; AD, adult; M, marker protein; PI, isoelectric point.



**Fig. 6.** The stability against heat treatment on the isozyme of alkaline phosphatase in adult worm, heating at 90°C for 10, 20, 30, 40 second, respectively. 0, control; 10, 10 sec.; 20, 20 sec.; 30, 30 sec.; 40, 40 sec.



**Fig. 7.** The effect of pH on the activity of alkaline phosphatase in r-sparganum and adult worm. ●—●, adult; ○—○, sparganum.



**Fig. 8.** The effect of temperature on the activity of alkaline phosphatase in r-sparganum and adult worm. ●—●, adult; ○—○, sparganum.

충에 존재하는 Alp 활성의 최적 온도는 50°C였다. 60°C부터 활성이 떨어져, 80°C에서는 거의 완전히 변성되었으며, 60°C 이하에서는 온도가 상승함에 따라 활성도도 증가하였으나, 활성차가 아주 적었다

**Table 3.** Enzyme activities of alkaline phosphatase on the sparganum and adult worm of *S. erinacei* (mean  $\pm$  SE)

Enzyme	Snake sparganum	Activity (Unit <sup>a)</sup> Rat sparganum	Adult
Alp	22.0 $\pm$ 0.5	25.0 $\pm$ 2.1	215.0 $\pm$ 8.7

<sup>a)</sup>One unit: The enzyme activity was defined as 1 ng of substrate produced per min. at 37°C with 10  $\mu$ g crude protein of the worms.

(Fig. 8).

활성도의 측정: Alkaline phosphatase의 최고활성도(unit)는 성충에서는 215.0, r-스파르가눔은 25.0, s-스파르가눔에서는 22.0으로 성충에서 스파르가눔보다 훨씬 높게 나타났으며, 변온동물을 숙주로 한 스파르가눔에서보다 정온동물을 숙주로 한 스파르가눔에서 약간 높았다(Table 3).

### 고찰

만손열두조충은 전생활환을 통해 소화관계의 분화가 없기 때문에 체표를 통해 양분을 흡수한다(Kwa, 1972; Pappas and Read, 1975).

Saraki(1961)는 만손열두조충의 조직화학적 연구에서 성충의 외피층과 외피층 하부세포에서 Acp와 Alp가 다량 분포한다고 보고하였다. 본 실험 결과에서 외피층과 외피하근층에 Alp와 Acp가 높은 활성을 보인 사실과 일치한다. Kwa(1972)는 만손열두조충의 유충인 스파르가눔에 존재하는 Acp가 외피층과 외피하근층에 많이 분포하였으며 Alp는 외피층에 많이 분포한 반면 외피하근층에는 분포가 적었다고 보고하여, 본 실험에서 나타난 스파르가눔의 Acp분포와는 일치하였으나, 외피층과 외피하근층에 Alp가 다량 분포된 사실과는 다소 차이를 보였다. Hague and Saddigi(1984)은 막투과와 삼투압조절에 phosphatase가 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 또한 phosphatase는 생체내에서 다양한 인산 에스테르를 가수분해시키는 효소로 pH 9.0 부근에서 최대활성을 나타내는 alkaline phosphatase와 pH 5.0에서 최대활성을 나타내는 acid phosphatase로 대별된다고 하였다(Malcolm and Webb, 1979). Larsson and Hasselgren(1979)에 의하면, 여러 가지 Alp 종류가 있고, 그 기능도 다르며 조직의 종류에 따라 Alp가 상이하게 분포한다고 하였다. Benham et al(1977)은 Alp가 두종의 효소 group이며, 보통 세포 표면에 존재하고, 그 기능은 세포에 있어서 물질의 수송, 세포의 증식과 분화에 관여하며, 또 세포의 대사과 유전자 전사의 조절자로서의 역할을 수행한다고 보고하였다.

Vengesa and Hopfer(1979)는 Alp가 세포막에 활성을 나타내는 것은 여러 가지 동위효소의 결과이며, 세포의 막과 마찬가지로 세포 내에서도 활성이

나타난다고 하였다. 세포 내에서 이 효소의 활성은 동물조직의 종류, 발생시기 및 호르몬분비 상태에 따라서 다양하게 존재하며, 이러한 다양성 때문에 동물의 종과 각각의 조직에 따른 활성을 확인하는 것이 중요하다고 하였다.

Ma(1964)는 흡충류 *Clonorchis sinensis*에 대한 효소조직화학적 연구에서 Acp가 성충의 외피층에 많이 분포하였고, Alp는 소량 분포하였다고 보고했으며, 또한 Chu and Lee(1963)는 선충류인 회충조직에서 Acp가 Alp보다 많이 분포함을 보고하였다. 본 실험에서는 만손열두조충의 외피층과 외피하근층에 분포하는 Alp가 Acp에 비하여 더 많은 활성을 나타내어 흡충류와 선충류와는 다른 차이를 나타냈다. Halton(1967)의 연구에 따르면 기생충의 조직에 분포하는 Alp는 Acp와는 달리 체내 합성보다는 외부로부터 흡수되어 존재하는 것이 더 많다고 보고하였다.

본 연구에서 나타난 Alp의 높은 활성분포는 이 효소가 숙주체내에 다량 분포된 상태에서 성충으로 많이 흡수된 것인지 아니면 성충이 흡수한 영양물질에 알칼리성 인산화합물이 많아 다량으로 분비한 것인지는 보다 깊은 연구가 요구된다. 한편, s-스파르가눔에서 보다 r-스파르가눔의 조직에서 Alp활성이 높게 나타났는데, 정온동물인 흰쥐의 조직에 기생하는 유충이 변온동물인 뱀에 기생하는 유충보다 알칼리성 인산화합물 분해대사를 더 활발히 진행하고 있음을 알 수 있었으며, 실제로 예비실험에서 나타난 결과를 볼 때 r-스파르가눔이 훨씬 빠른 성장을 하였다. 이러한 차이는 숙주환경의 영양물질 함유량, pH, 체온 등에 기인된 것이 아닌가 생각되나 더 추구해 볼 필요가 있다.

Davis et al.(1969)은 흡충류 *Haematoloechus mediplexus*에서 다른 기관에 비해 소화관에 phosphatase(esterase)가 많이 분포함을 보고하였다. Halton(1967)은 흡충류 간질에서 생식기관에 phosphatase가 많이 분포함을 보고하여 Alp와 Acp가 성충 편질의 생식기관에서 활성을 나타낸 본 실험의 결과와 일치하였다.

이상의 결과에서, 발육에 따라 동위효소분획이 뚜렷한 차이가 있고 효소활성이 높은 Alp의 동위효소 특성을 알아보기 위하여 열에 대한 안정성의 검사에서는 성충에서 주분획을 나타낸 2번(66 kDa)

과 4번(48 kDa) 분획이 다른 동위효소에 비해 상대적으로 열에 안정된 편이었다.

한편, Alp와 Acp는 동물의 종 및 조직에 따라 최적 pH가 서로 다른 동위효소가 존재하고 있음이 밝혀졌으며, 또한 기질 특이성 및 양이온에 대한 효과도 서로 다르게 나타낸다고 보고하였다(MeComb et al., 1979; Kang et al., 1990). Kang et al. (1990)은 생쥐의 뇌세포 조직에서 부분정제한 Alp의 최적 pH를 7.8로 보고하였으며, Kim and Kim (1993)은 *Fibricola seoulensis*(*Neodiplostomum seoulens*)에 존재하는 Alp는 pH 8에서 최대활성을 나타내었다고 보고하였고, Indra and Mali(1986)는 *P. egretti*(trematode)에 존재하는 Acp와 Alp활성의 최적 pH를 각각 pH 5.0, 10.0으로 보고하였다.

본 종에서도 Alp의 최적 pH가 10.0으로 나타나 Indra and Mali(1986)의 보고와 일치하였다. 최적온도에 대한 실험 결과에서는 Alp가 50°C에서 최대활성을 보였으며, Alp의 활성이 50°C 이하에서는 활성 차이가 없어 열에 대하여 안정됨을 알 수 있었다.

최대활성도는 유충에 비해 성충조직에서 Alp의 활성도가 높게 나타났으며, 유충에 비해 기관이 형성되는 성충에서 발육대사가 활발히 수행된다고 추정할 수 있고, 변온동물인 뱀에 기생하는 s-스파르가눔에서보다 항온동물인 흰쥐에 기생하는 r-스파르가눔에서 활성이 높은 것은 온도의 영향이라고 생각된다. 만손열두조충의 스파르가눔과 성충이 숙주와 기생장소를 달리하지만 phosphatase는 주로 외피층과 외피하근층에 주로 분포하고 있어 기생환경의 변화에 따라 Alp와 Acp의 동위효소들의 활성을 달리하므로서 숙주환경에 적응한다는 사실을 알 수 있다.

REFERENCES

Allen JM, Hyncik GJ (1963) Localization of alkaline phosphatases in gel matrices following electrophoresis. *J Histochem* **11**: 169-175.

Benham F, Cottell DC, Franks LM, Wilson PD (1977) Alkaline phosphatase activity in human bladder tumor cell lines. *J Histochem Cytochem* **25**: 266-274.

Bryant C (1978) The regulation of respiratory metabolism in parasitic helminths. *Adv Parasitol* **16**: 311-331.

Chu JK, Lee HS (1960) Histochemical studies on the relationship between the *Ascarides* of man and pig. *Korean J Parasitol* **1**(1): 15-21. (in Korean)

Davis DA, Bogitsh BJ, Nunnally DA (1969) Cytochemical and biochemical observations on the digestive trematodes III. nonspecific

esterase in *Haematoloechus medioplexus*. *Exp Parasitol* **24**: 121-129.

Fukase T, Matsuda Y, Akihama S, Itagaki H (1984) Some hydrolyzing enzymes, especially arginine amidase, in plerocercoids of *Spirometra erinacei* (cestoda; diphylobothriidae). *Jpn J Parasitol* **33**: 283-290.

Fukase T, Matsuda Y, Akihama S, Itagaki H (1985) Purification and some properties of cysteine protease of *Spirometra erinacei* plerocercoid (cestoda; diphylobothriidae). *Jpn J Parasitol* **34**: 351-395.

Hague M, Saddigi AH (1984) Esterase activity in some digenetic trematodes. *Jpn J Parasitol* **33**: 275-282.

Halton DW (1967) Studies phosphatase activity in trematoda. *J Parasitol* **53**: 46-54.

Hames BD, Rickwood D (1990) Gel electrophoresis of protein(second edition). Oxford University Press NY pp. 30-44.

Hotta H, Chiba K, Hasegawa H (1978) Studies on the diphylobothriid cestodes in the Northern Japan. (1) Plerocercoids recovered from several species of fishes and their adult forms. *Dept of Med Zool Niigata Univ of Med* **4**: 357-368.

Indra R, Mali KL (1986) Biochemical and histochemical studies of alkaline and acid phosphatases in a digenetic trematode, *Pegosomum egretti*. *J Helminthol* **60**: 293-298.

Kang CG, Lee YS, Cho KS (1990) The characteristics of acid and alkaline phosphatases from mouse brain cytosol fraction. *Korean Biochem J* **23**(3): 356-362.

Kim HJ, Kim CH (1993) Localization and isozyme pattern of phosphatase in *Fibricola seoulensis*. *Korean J Parasitol* **31**(4): 353-361.

Kwa BH (1972) Studies on the sparganum of *Spirometra erinacei*. I. the histology of the sparganum scolex. *Int J Parasitol* **2**: 23-28.

Larsson A, Hasselgren G (1979) Potential inhibitors of rat tooth alkaline phosphatase studied by means of different histochemical techniques. *J Histochem Cytochem* **27**: 982-988.

Lawrence SH, Melnick PJ, Weimer HE (1960) A specise comparison of serum proteins and enzymes by starch gel electrophoresis. *Proc Soc Exp Biol Med* **105**: 572-575.

Ma L (1964) Acid phosphatase in *Clonorchis sinensis*. *J Parasitol* **50**: 235-240.

Malcolm D, Webb EC (1979) Enzymes, third edition. Academic press Inc New York pp. 635.



- McComb RB, Bowers GN, Posem S (1979) Alkaline phosphatase. Prentice Hall, NY pp. 375.
- Pappas PW, Read CP (1975) Membrane transport in helminth parasites; a review. *Exp Parasitol* **37**: 469-530.
- Saraki T (1961) A histochemical study on the maleic acid in manson's tapeworm. *Acta Sch Med Univ Gifu* **9**: 176-189. (in Japanese)
- Vengesa PB, Hopfer U (1979) Cytochemical localization of alkaline phosphatase and Na<sup>+</sup>-pump sites in adult rat colon. *J Histochem Cytochem* **27**: 1231-1235.

### =Abstracts=

## Characteristics of alkaline and acid phosphatase in *Spirometra erinacei*

Kee-Hoon KWAK and Chang-Hwan KIM\*

*Department of Biology, College of Natural Sciences Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea*

This study was done to investigate the enzyme-histochemical localization and characteristics of alkaline and acid phosphatase related with metabolism in sparganum and adult of *Spirometra erinacei*. By the enzyme-histochemical assay, the alkaline and acid phosphatases were localized in the tegument and subtegumental musculature of sparganum and adult, but not in the parenchyma. The activities of alkaline phosphatase were stronger in the tegument than in the subtegumental musculature, and activities of acid phosphatase were stronger in the tegument of adults than those of sparganum. The 2 isozymes of alkaline and acid phosphatases were separated from s-sparganum (from snake) and r-sparganum (from experimentally infected rats) respectively, but 4 isozymes of Alp and 3 isozymes of Acp were separated from adult worms by electrophoresis. In isozyme Alp, the 66 kDa was the common isozyme, but 130 kDa isozyme of Acp was the common isozyme in spargana and adult worms. By isoelectrofocusing, 4 isozymes (PI 7.9, 7.7, 6.5 and 6.3) and 2 isozymes (PI 7.9 and 7.7) of alkaline phosphatase were separated from adults and spargana, respectively. In the stability against heat, activity of alkaline phosphatase was denatured perfectly after heating at 90°C for 40 seconds. The optimum pH and temperature for activity of alkaline phosphatase were about pH 10 and 50°C, respectively. The maximum activity (unit) of alkaline phosphatase was 22.0 in s-sparganum, 25.0 in r-sparganum and 215.0 in adult worms, so that the maximum activity was revealed higher in adults than spargana. As the result from above, we observed that alkaline and acid phosphatases were functioned mainly in the tegument and subtegumental musculature, and the isozymes of phosphatase were activated differently according to habitat of the parasites. The spargana and adult worms carry out the parasitism by adapting themselves to parasitic circumstance with these enzymes.

**Key words:** alkaline phosphatase, acid phosphatase, isozyme pattern, isoelectrofocusing, optimum pH, optimum temperature

[Korean J. Parasitol., 34(1): 69-77, March 1996]

---

\*Corresponding author

정정기사(Erratum)

기생충학잡지 제33권 제4호 396쪽에 게재된 "간질증 초기 침습기에 발견한 간농양 예" (김진봉, 김동준, 허선, 조승열) 논문의 그림이 거꾸로 인쇄되었기에 아래와 같이 바로 잡습니다.

The Fig. 2 on page 396, Vol. 33, No. 4, the Korean Journal of Parasitology was printed reversed. It is revised as printed below. The figure was included in the paper "A human case of invasive fascioliasis associated with liver abscess" authors of which were Jin-Bong Kim, Dong-Joon Kim, Sun Huh, and Seung-Yull Cho.



**Fig. 2.** Endoscopic retrograde cholangiography showing multiple contrast collection (arrows) in the right lobe.