

닭에서 저급 분자량 항원의 면역원성

Immunogenicity of Low Molecular Weight Immunogens in Laying Hens

이 경 애

순천향대학교 자연과학대학 식품영양학과

Lee, Kyong Ae

Dept. of Food Science and Nutrition, Soonchunhyang Univ.

Abstract

The immunogenicity of low molecular weight ($MW \leq 30,000$) immunogens in laying hens was investigated. Immunogens were insulin derivatives and β -lactoglobulin(β -Lg). Insulin derivatives were reduced- carboxymethylated(RCM) insulin, and RCM-A and RCM-B chain of insulin. The yolk antibodies against RCM-A chain of insulin appeared after the first immunization. The yolk antibodies against RCM-B chain of insulin were elicited 5 weeks after the third booster injection. Although the anti-RCM-B chain yolk antibodies recognized native insulin, the anti-RCM-A chain yolk antibodies didn't native insulin. The anti-RCM insulin yolk antibodies were induced after the second booster injection and showed cross-reactivities with native insulin. On the other hand, β -Lg showed stronger immunogenicity than insulin derivatives. The anti- β -Lg yolk antibodies were produced after the second booster injection and the peak titer was reached 3 weeks after the third booster injection.

I. 서론

특정물질의 검출이나 정량을 위한 수단으로 감도가 높은 효소면역측정법(ELISA)이 널리 이용되고 있다. ELISA에 보편적으로 이용되고 있는 polyclonal 항체는 mouse, rat, rabbit, goat, horse 같은 포유동물의 항혈청에서 분리, 정제된 것이다. 그러나 항혈청을 이용한 특이항체의 대량조제는 어려운 실정이다.

최근 닭의 면역계를 자극하여 얻어진 계란에서 특이항체의 대량조제가 가능하다는 보고에 따라(Losch 등, 1986), 항체의 대량 공급원으로서의 이용이 기대되고 있다. 닭의 혈액 중에는 IgG, IgM 및 IgA와 같은 세 종류의 면역글로블린이 존재하는데, IgG만이 receptor를 통해 선택적으로 난황에 이행되어 축적된다(Patterson 등, 1962; Rose 등,

1981; Loeken 등, 1983). 난황에는 약 1%의 IgG가 존재하므로 1개의 계란에서 약 100-150mg의 crude IgG의 분리가 가능하다(Losch 등, 1986). 또한 난황은 식품이므로 항혈청에 비해 매우 위생적이고 우수한 항체의 공급원이다.

닭의 면역기구는 포유동물의 면역기구와 동일한 것으로 알려져 있으나, 닭의 IgG는 포유류 보체(complement)의 활성화 능력, 면역글로블린의 다양화 기구 등이 포유류 IgG와 다른 특성을 갖는다(Higgins, 1975; Benedict, 1979; Thompson 등, 1987; Parvari 등, 1988; Reynaud 등, 1989). Leslie 등(1969)은 난황 중의 항체란 의미로 닭의 IgG를 IgY(immunoglobulin in yolk)로 명명하고 있다.

IgY는 지금까지 포유류 IgG가 이용되어 왔던 것과 같은 분야, 즉 면역연구용시약, 임상

검사분야, 감염병 예방 등에서의 응용이 기대되고 있다. 특히 포유류에서 항원성이 낮은 단백질이나 미량성분에 대해 높은 면역 응답성을 나타낼 것으로 생각된다. IgY는 효소, 호르몬 및 바이러스 등 주로 고분자량 항원에 대한 면역원성이 검토되어 왔으며 (Devergne 등, 1981; Fertel 등, 1981, Carrol 등, 1983; Otake 등, 1991), 저분자량 항원에 대한 면역원성에 대해서는 아직 일치된 보고가 되어 있지 않은 실정이다. 즉, Polson 등(1980)은 분자량 30,000이하의 항원에 대한 IgY의 유도가 어렵다고 하였다. 그러나 Vieira 등(1984)은 32잔기 및 34잔기의 파라타이로이드(parathyroid) 호르몬 합성 펩티드를 3회 면역함으로써 임상검사 가능한 IgY가 유도되었다고 보고하였다. 따라서 비교적 손쉽게 대량조제 가능한 난황항체의 실용화를 위해 비교적 분자량이 작은 항원에 대한 면역 응답성이 검토되어야 한다고 생각된다.

그러므로 본 연구는 분자량 30,000 이하의 저분자량 항원에 대한 면역 응답성을 검토하였다. 저분자량 항원의 기준은 Polson 등(1980)의 보고에 따라 분자량 30,000 이하로 하였다. 저분자량 항원으로는 임상적으로 중요한 호르몬인 인슐린의 유도체와 포유류의 우유에만 존재하는 β -lactoglobulin(β -Lg, MW=18,000)을 사용하였다. 인슐린 유도체로는 reduced-carboxymethylated (RCM) insulin, 인슐린의 RCM-A chain(MW=2,350) 및 RCM-B chain(MW=3,400)을 사용하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

RCM-insulin, 인슐린의 RCM-A chain 및 RCM-B chain, β -Lg의 면역에 의해 생산된 면역계란 및 항혈청을 실험재료로 사용하였다.

2. 닭의 면역

Rhode island red계의 닭(28-week-old, female)을 이용하여 RCM-insulin, 인슐린의

RCM-A chain 및 RCM-B chain, β -Lg를 각각 adjuvant와 함께 1주 간격으로 4회 근육주사하였다. Adjuvant로서는 초기면역에는 complete Freund's adjuvant(Difco)를, 추가면역에는 incomplete Freund's adjuvant(Difco)를 사용하였다. 각 면역원의 1회 면역량은 10^{-1} μ mole이었다.

3. RCM-insulin의 조제

RCM-insulin은 전보(이경애, 1993)에서와 같이 2-mercaptoethanol을 사용하여 인슐린의 disulfide결합을 환원시키고 이때 생성된 SH기를 carboxymethylation하였다.

4. 난황항체의 분리

난황 중의 항체는 γ -cargeenan을 사용하여 Hatta 등의 방법(1990)에 따라 분리하였다.

5. 인슐린의 RCM-A chain 및 RCM-B chain의 분리

인슐린의 RCM-A chain 및 RCM-B chain은 전보(이경애, 1993)에서와 같이 HPLC를 이용하여 RCM-insulin에서 분리, 정제하였다.

6. Noncompetitive ELISA (Engvall 등, 1972)

항혈청과 난황 중의 항체가 noncompetitive ELISA에 의해 측정하였고, 모든 반응은 실온에서 실시하였다. Microtiter plate(Nunc, Maxisorp)에 항원용액(0.01% in carbonate buffer, pH9.6)을 100 μ l/well첨가하여 2시간 동안 고상화하였다. 0.02% tween을 함유한 phosphate-buffered saline(PBST) 용액으로 well을 씻은 후, PBST로 적당히 희석한 항체 용액을 100 μ l/well첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. PBST로 well을 씻은 후, alkaline-phosphatase rabbit anti-chicken IgG(H+L) conjugate(Zymed)를 100 μ l/well 첨가하여 2시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 well을 씻은 후 0.1% sodium p-nitrophenyl phosphate (in diethanolamine HCl buffer, pH 9.8)를 100 μ l/well 첨가하

여 발색시키고, 5N NaOH를 첨가하여 반응을 정지시켰다. ELISA reader를 사용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 인슐린의 RCM화

RCM-insulin을 HPLC에 의해 분리한 결과 그림1과 같이 두 개의 peak가 나타났다. 두 peak의 아미노산 조성을 검토한 결과, peak 1 및 peak 2는 각각 인슐린의 A chain 및 B chain이었고(data not shown), 미변성 인슐린(native insulin)은 검출되지 않았다. 그러므로 반응에 사용된 미변성 인슐린은 모두 RCM화되었음이 확인되었다. 한편 RCM-insulin에서는 미변성 인슐린에 존재하는 3개의 disulfide 결합이 RCM화 된 상태로 존재하므로(Wu 등, 1981) HPLC에 의해 분리된 두 chain은 각각 RCM-A chain 및 RCM-B chain으로 생각된다.

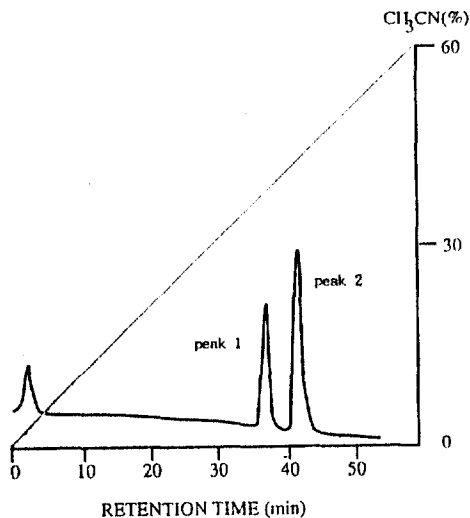


Fig 1. HPLC pattern of reduced and arboxymethylated insulin

2. 인슐린의 RCM-A chain에 대한 IgY의 유도

RCM-A chain의 면역에 의해 유도된 IgY의 항체가 변화를 검토한 결과(그림.2), 인슐린의 RCM-A chain에 대한 항체는 1회 면역

후에 난황에 유도되어 10주째에 최대치를 나타내었고, 그 후 감소되었다. RCM-A chain에 대한 항체는 낮았으나, Polson 등의 보고(1980)와는 달리 분자량 2,350정도의 저분자량 항원에 대한 IgY의 유도가 가능했다. 초기면역 직전의 혈청에 RCM-A chain에 대한 항체가 존재하는 것 같은 현상은 면역하지 않은 다른 닭에서도 나타났다. 그러므로 이 현상은 RCM-A chain과 비슷하거나 동일한 항원구조를 인식하는 항체가 닭의 혈액 중에 존재하기 때문인 것으로 생각된다.

한편 anti-RCM-A chain IgY는 미변성 인슐린과 교차반응(cross-reactivity)을 하지 않았다. 인슐린은 RCM화에 의해 3개의 disulfide결합이 끊어지고 carboxymethylation되며, α-helix 및 β-sheet를 포함하는 고차구조가 거의 파괴된다(Wu 등, 1981). 특히 RCM화에 의해 disulfide 결합에 의해 유지되는 A chain loop의 conformation이 거의 파괴되었을 것으로 생각되어 미변성 인슐린의 주 인식 부위는 A chain loop인 것으로 생각된다.

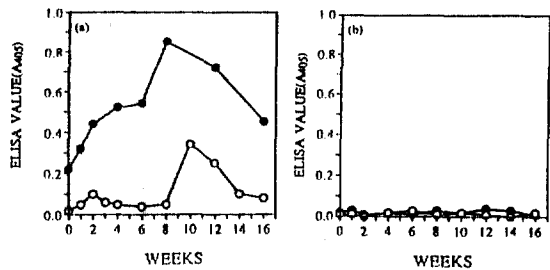


Fig 2. Antibody titers in the serum and egg yolk from hens immunized with RCM-A chain of insulin.

Antibody titers were expressed as ELISA value(absorbance at 405nm) for serum(●)and egg yolk(○) at 1:500 dilution.

Coating antigens were RCM-A chain of insulin(a), or native insulin(b). Two hens were immunized at 0, 1, 2, and 3 week.

3. 인슐린의 RCM-B chain에 대한 IgY의 유도

RCM-B chain의 면역에 의해 유도된 IgY의 항체가 및 미변성 인슐린과의 반응성을 검토한 결과(그림3), Anti-RCM-A chain IgY에

비해 항체가는 높지 않았으나, RCM-B chain에 대한 IgY의 유도도 가능했다. RCM-B chain에 대한 항체는 4주째에 혈액에 유도되어 5주째에 최대치를 나타내었으나, 난황에서는 8주째 부터 검출되었다. 이와같이 혈액에 유도된 RCM-B chain에 대한 항체가 비교적 느린 속도로 난황에 이행되어, 16주째의 항체가가 혈액과 난황에서 큰 차이를 보이는 것으로 생각된다.

한편 유도된 anti-RCM-B chain IgY는 미변성 인슐린을 인식하였고, RCM-B chain 및 미변성 인슐린에 대한 항체가의 변화는 거의 비슷한 양상을 나타내었다. 그러므로 RCM-B chain의 conformation은 미변성 인슐린의 conformation과의 차이가 거의 없거나 또는 거의 차이가 없는 부분에 항원인식 부위가 집중되어 있는 것으로 생각된다

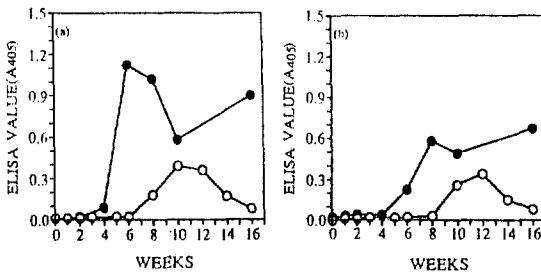


Fig. 3. Antibody titers in the serum and egg yolk from hens immunized with RCM-B chain of insulin.

Antibody titers were expressed as ELISA value(absorbance at 405nm) for serum(●) and egg yolk(○) at 1:500 dilution. Coating antigens were immunized at 0, 1, 2, and 3 weeks.

4. RCM-insulin 에 대한 IgY의 유도

RCM-insulin에 대한 IgY의 항체가의 변화 및 미변성 인슐린과의 교차반응성을 검토하였다(그림4). RCM-insulin에 대한 항체는 3회 면역 후 난황에 유도되어 5주째에 최대치에 도달하였고, 그 후 감소되었다. RCM-A chain 및 RCM-B chain의 혼합물인 RCM-insulin은 분리된 각 chain을 단독으로 사용한 경우에 비해 빠른 항체의 유도를 나타낸 것은 항체생

산을 도와 주는 helper T cell에 의해 보다 잘 인식되기 때문이라 생각된다. 한편 유도된 anti-RCM insulin IgY는 미변성 인슐린도 잘 인식하였다. RCM-insulin에 미변성 인슐린은 존재하지 않으므로(그림1 참고),

Anti-RCM-insulin IgY와 미변성 인슐린과의 교차반응성은 RCM-B chain에 기인하는 것으로 생각된다.

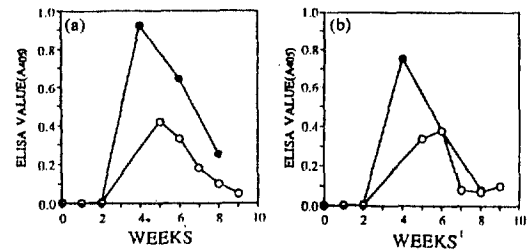


Fig. 4. Antibody titers in the serum and egg yolk from hens immunized with RCM-insulin.

Antibody titers were expressed as ELISA value(absorbance at 405nm) for serum(●) and egg yolk(○) at 1:500 dilution.

Coating antigens were RCM-insulin(a), or native insulin(b).

Two hens were immunized at 0, 1, 2, and 3 week.

5. β -Lg에 대한 IgY의 유도

β -Lg의 면역에 의해 유도된 IgY의 항체가의 변화를 그림5에 나타내었다. 우유 단백질인 β -Lg은 가장 강한 면역원성을 나타내었다. β -Lg에 대한 IgY는 2회 면역 후 혈액 중에서 검출되었으며, 난황에서는 3회 면역 후에 검출되었다. 우유 단백질인 β -Lg은 가장 강한 면역원성을 나타내어 인슐린 유도체에 비해 다량의 항체를 유도하였다. β -Lg은 포유류의 우유에만 존재하는 단백질로서 닭의 경우 인슐린 유도체에 비해 이종성이 크기 때문에 강한 면역 응답성을 보인 것으로 생각된다.

참고 문헌

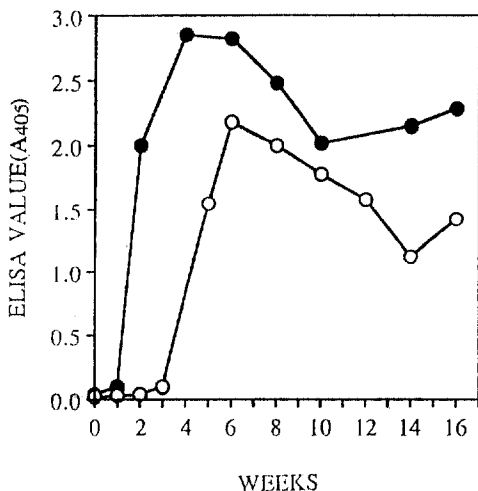


Fig. 5 Antibody titers in the serum and egg yolk from hens immunized with β -lactoglobulin.

Antibody titers were expressed as ELISA value(absorbance at 405nm) for serum(●) and egg yolk(○) at 1:5000 dilution.

Two hens were immunized at 0, 1, 2, and 3 weeks.

IV. 결론 및 요약

저급 분자량 항원(분자량 30,000이하)에 대한 닭의 면역 응답성을 검토하였다. 면역원으로는 RCM-insulin, 인슐린의 RCM-A chain 및 RCM-B chain 등의 인슐린 유도체와 β -lactoglobulin(β -Lg)을 사용하였다. 인슐린 유도체에 대한 항체가는 β -Lg에 대한 항체가에 비해 높지 않았으나 모든 면역원에 대해 난황항체가 유도되었다. 특히 포유류의 유즙에 존재하는 단백질인 β -Lg에 대해 가장 강한 면역 응답성을 나타내었다. 한편 RCM-insulin 및 RCM-B chain에 대한 IgY는 미변성 인슐린을 인식하였으나, RCM-A chain에 대한 IgY는 미변성 인슐린을 인식하지 않았다. 이와같이 저급 분자량 항원에 대한 난황항체의 유도가 가능함에 따라 대량조제의 이점을 고려하여, 포유류 IgG를 대체할 수 있는 항체로 그 이용도가 증가할 것으로 생각된다.

이경애 (1993). 계란항체의 생산에 있어서 polymerization의 효과, 충북가정학회지, 2(1), 17-24.

Benedict, A.A., (1979). Immunoglobulin characteristics : chicken, in bred and genetically defined strains of laboratory animals, part2, biological handbooks III, New York : Academic Press, 658-661.

Carrol, S.B., and Stollar, B.D., (1983). Antibodies to calf thymus RNA polymerase II from egg yolks of immunized hens, Journal of Biological Chemistry, 258, 24-29.

Devergne, J.C., Cardin, L., Burckard, J., and van Regenmortel, M.H.V.,(1981). Comparison of direct and indirect ELISA for detecting antigenically related cucumoviruses, Journal of Virological Methods, 3, 3-9.

Engvall, E., and Perlmann, P., (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes, Journal of Immunology, 109, 129-135.

Fertel, R., Yetiv, J.Z., Coleman, M.A., Schwarz, R.D., and Greenwald, J.E., (1981). Formation of antibodies to prostaglandins in the yolk of chicken eggs, Biochemical and Biophysical Research Communications, 102, 1028-1033.

Hatta, OH., Kim, M.J., and Yamamoto, T., (1990). A novel isolation method for hen egg yolk antibody, "IgY", Agricultural and Biological Chemistry, 54, 2531-2535.

Higgins, D.A., (1975). Physical and chemical properties of fowl immunoglobulins, Veterinary Bulletin, 45, 139-146.

Leslie, G.A., and Clem. E.W., (1969).

- Phylogeny of immunoglobulin structure and function : Immunoglobulins of the chicken, Journal of Experimental Medicine, 130, 1337-1352.
- Loeken, M.R., and Roth, T.F., (1983). Analysis of maternal IgG subpopulations which are transported into the chicken oocyte, Immunology, 49, 21-28.
- Losch, U., Schraner, I., Wanke, R., and Jurgens, L., (1986). The chicken egg, an antibody source, Journal of Veterinary Medicine B, 33, 609-619.
- Otake, S., Nishimura, Y., Makimura, M., Hatta, H., Kim, M., and Yamamoto, T., (1991). Protection of rats against dental caries by passive immunization with hen-egg-yolk antibody(IgY), Journal of Dental Research, 24, 162-166.
- Parvari, R., Avivi, A., Lentner, F., Tel-Or, S., Burstein, Y., and Schechter, I., (1988). Chicken immunoglobulin G-heavy chains : limited VH gene repertoire, combinational diversification by D gene segments and evolution of the heavy chain locus, EMBO Journal, 7, 739-744.
- Patterson, R., Younger, J.S., Weigle, W.O., and Dixon, F.J., (1962). Antibody production and transfer to egg yolk in chickens, Journal of Immunology, 89, 272-278.
- Polson, A., and von Wechmar, M.B., (1980). Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens, Immunological Communication, 9, 475-493.
- Reynaud, C.A., Dahan, A., Anquez, V., and Weill, J.C., (1989). Somatic hyperconversion diversifies the single VH gene of the chicken with a high incidence in the D region, Cell, 59, 171-183.
- Rose, M.E., and Orlands, E., (1981). Immunoglobulins in the egg, embryo and young chick, Developmental and Comparative Immunology, 5, 15-20.
- Thompson, C.B., and Neiman, P.E., (1987). Somatic diversification of the chicken immunoglobulins light chain gene is limited to the rearranged variable gene segment, Cell, 48, 369-378.
- Vieira, J.G.H., Oliveira, M.A.D., Russo, E.M.K., Maciel, R.M.B., and Pereire, A.B., (1984). Egg yolk as a source of antibodies for human parathyroid hormone (hPTH) radioimmunoassay, Journal of Immunoassay, 5, 121-129.
- Wu, C-S.C., and Yang, J.T., (1981). Conformation of insulin and its fragments in surfactant solution, Biochimica et Biophysica Acta, 667, 285-293.