

조직기생 선충류 유충에서 분리한 단백 분해 효소의 특성 및 항원성 검토

고려대학교 의과대학 기생충학교실 및 열대풍토병연구소

계명대학교 의과대학 기생충학교실*

임한중 · 주경환 · 최성아 · 이해정 · 주종윤* · 정명숙*

Determination of Antigenicity and Characterization of Proteinase from Tissue Invading Nematode Larvae

Han-Jong Rim, Kyoung-Hwan Joo, Sung-A Choi, Hye-Jeong Lee,

Chong-Yoon Joo* and Myung-Sook Chung*

Department of Parasitology, College of Medicine and the Institute for Tropical Endemic Diseases, Korea University, Seoul, 136-705, Korea ; Department of Parasitology, School of Medicine, Keimyung University, Taegu, 700-301, Korea *

= ABSTRACT =

In case of tissue invading nematode, proteolytic enzyme was required at their parasitic life. Proteinases obtained from these parasites(*Toxocara canis*, *Ansakis* spp. and *Trichinella spiralis*) were extracted, isolated and further purified. And then the analysis for activity and inhibitory effect of proteinases was performed by appropriate substrate. Determination of protein as a circulating antigen was done in use of infected animal serum with above parasites, respectively. For above experimental objects, following procedures were performed.

First, enzymatic activity was measured in use of azocasein and inhibitory effect of porteinase were studied by various inhibitors. Second, partially purified proteins containing enzymatic activity were obtained by ion exchange chromatography, ultrafiltration and electrophoretic elution. Third, role of the partially purified protein as a circulating antigen

The results obtained were as follows:

1. Enzymatic activity of each nematode proteinase was varied according to pH. Optimal pH of *Toxocara canis*, *Ansakis* spp. and *Trichinella spiralis* were pH 6.0, pH 5.5 and pH 6.5, respectively. The optimal molarity of buffer was 0.1 M phosphate buffer. Although little difference between these

proteinases was observed, temperature stability was at least maintained at 4 °C until 5 days.

2. In case of *Ansakis* spp. and *Toxocara canis*, enzymatic activity of these proteinases was considerably inhibited by Leupeptin and EDTA. For maximum enzymatic activity of above proteinases, it was required that cysteine residue of enzyme should be protected. And it was suggested that metallo type was contained in enzyme active site. Proteinase of *Trichinella spiralis* contained metallo type also.

3. Although partial purification was performed in *Ansakis* spp. and *Toxocara canis*, proteins maintaining enzymatic activity were identified as a circulating antigen. From SDS-PAGE and immunoblot, 25 kDa was presented in *Ansakis* spp.. Specific antigen of *Toxocara canis* was 110 kDa protein fraction. 55 and 42 kDa proteins were reacted with normal serum. *Trichinella spiralis* 60 kDa protein fraction was successfully purified from excretory materials in culture. As a result of immune-reaction with *Trichinella spiralis* infected serum, highly purified 60 kDa protein was maintained antigenicity until final purification step.

“본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비에 의하여 연구되었음”

1. 서 론

조직을 뚫고 들어가서 감염이 되거나 조직에 기생하는 선충류 기생충은 상당히 많다. 개회충(*Toxocara canis*) 유충의 체내移行(visceral larva migrans, VLM), 십이지장충(*Ancylostoma duodenale*) 유충의 체내移行(cutaneous larva migrans), 고래회충(*Ansakis* spp.) 유충이 위나 장점막을 뚫고 들어가는 경우를 들 수 있으며, 조직에 기생하는 선충류로는 *Capillaria hepatica*, 선모충(*Trichinella spiralis*)을 꼽을 수 있다.

전세계적으로 약 2백만 마리의 많은 개들이 개회충에 감염되어 있으며, 우리나라 농촌에서 키우는 개의 대부분이 개회충에 감염되어 있다고 알려져 있다. 인체에 나타나는 개회충증은 개회충 유충의 移行에 의한 전신성 기생충 감염으로, 유충의 移行은 visceral larva migrans(VLM)와 ocular toxocarasis의 원인이 된다. VLM은 발열, 호산구증다증, 간비대증 및 호흡장애등의 증상을 나타내며, ocular toxocarasis는 눈에 염증을 일으켜 망막에 손상을 주거나, 시각장애등을 일으키지만 이러한 조직 기생충은 정확히 진단하기가 매우 어렵다.

어촌지역에 많은 환자가 있고 바다생선을 날것으로 먹어 감염되는 고래회충 유충증은 바다포유동물에 기생하는 고래회충과(*Ansakidae*)의 유충

이 인체의 소화관 특히, 위나 장점막을 뚫고 들어가서 발생하는 질병이다. 감염이 되는 경우 뚜렷한 증상 없이 호산구증다증, 급성 복통 그리고 구토 등을 일으킨다. 급성 위 고래회충 유충증은 급성 상복부통을 호소하는 환자에서 통상 위내시경 검사나 방사선학적 검사로 비교적 쉽게 진단, 적출할 수 있는 반면 만성인 경우는 충체가 위내벽에서 육아종을 형성하거나 퇴화되기 때문에 진단이 어렵다. 돼지고기를 날것으로 먹을 때 감염되기 쉬운 선모충은 피부유충 섭취후 24시간 이내에 설사, 오심, 심한 복통과 같은 증상이 나타나므로 식중독과 증상이 비슷하나 유충이 근육을 침범하여 횡문근에 염증이 오면 일시적인 호흡곤란이 나타나기도 하며 가장 심할 경우 심근염을 일으키거나 중추신경계 침범으로 인한 여러 가지 증상으로 사망하기도 한다.

현재 이들의 진단은 면역학적 진단법에 의존하고 있으나 상호 교차반응이 심해 어떤 질환인지 정확히 진단하기 어려운 상태에 있다.

인체 기생충 감염의 혈청학적 진단법은 시험관내 배양으로 얻은 유충의 분비배설물(ES)이나 근육내 유충(Strobel 1991) 또는 충란을 항원으로 사용한 ELISA법을 주로 이용하여 진단한다. 최근에는 항체와 순환항원을 검출하는 방법이 개발되었으며(Robertson 등 1988), 항원들의 생리화학적 성질에 대한 연구도 진행되었다 (Badley 등 1987,

Maizels 등 1984, 1987; Moghji 와 Maizels 1986; Robertson 등 1988). 또한, 여러 종류의 윤충류에서 분비액물에 존재하는 활성 효소에 대한 조사도 시행되었다. 예를 들면 acetylcholinesterase (AChE)에 대하여 연구하였으며(Yeates와 Ogilvie 1976; Rathaur 등 1987; Robertson 등 1988), 분비액물에 있는 단백분해 효소의 활성도도 연구되었다(Chappell 과 Dresden 1986; Lindquist 등 1986; Knox와 Kennedy 1988; Robertson 등 1988; White 등 1992).

단백분해 효소(McKerrow 1985)는 조직기생 윤충류에 있어서 감염시 피부 침투, 영양분 획득(Chappell 과 Dresden 1986; Zerda 등 1988)과 같은 중요한 역할을 한다. 심지어장충 유충들이 숙주의 피부로 침투하여 감염될 때, 숙주의 fibrinogen을 소화하여 영양분의 획득시 metalloproteinase가 그 역할을 한다고 알려져 있다. 한편, 숙주의 조직에 배출되는 단백 분해효소는 면역성이 있어 감염신란시 지표로 사용되며(Ruppel 등 1985, Chappell 과 Dresden 1988), 일부 단백분해 효소는 면역글로불린을 파괴하여 기생충의 면역 회피기전에 관여하기도 한다. 이들 단백분해 효소는 종특이성이 있어서 이를 이용한 혈청학적 진단에 대한 연구도 보고되어 있다(Ruppel 등 1985; Chappell 등 1989, 1990).

본 연구에서는 우리나라 농·어촌지역에서 문제가 될 것으로 생각되는 개회충 및 고래회충과 아직 발견 예는 없으나 우리나라에도 감염자 발생의 가능성이 높은 선모충에 대하여 단백 분해 효소를 추출하고, 이 효소들의 특성(활성도, 저해 작용등)을 조사하며, 진단의 난점을 극복하기 위해, 실험동물을 이용하여 혈청학적 진단시 특이항 원으로서의 작용에 대하여 검토하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1) 선충류의 유충 수집

본 연구에서 사용된 고래회충 유충은 시중에서 구입한 붕장어(*Astroconger myriaster*) 등의 내장

에서 분리, 수집하여 사용하였으며 개회충 성충은 경기도 파주에서 구입하여 사용하였다. 실험 쥐의 근육에서 분리한 선모충 유충들을 실험 쥐 30 마리에 1,000개씩 각각 경구 감염시키고 7주 후 실험 쥐 근육조직에 존재하는 선모충으로 부터 유충만을 모으기 위하여 근육에 소화액(Pepsin-HCl)을 처리후 homogenizer로 균질화 시킨 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고, PBS 완충액을 사용하여 세척과 원심분리 과정을 반복하여 선모충 유충만을 분리 수집하였다.

2) 유충의 조효소

고래회충 유충과 배양된 증란을 Baermann장치를 이용하여 분리한 개회충 유충을 85%식염수로 3-4회 세척하고 수집한 유충을 sodium phosphate buffer(0.01M, pH 7.4)에서 glassteflon homogenizer로 균질화 시킨 다음, 30초 동안 minimum power에서 2번 sonicate하였다. 균질액을 15,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리한 후 상층액을 분주한 뒤 사용시까지 -70°C에 보관하였다. 선모충 유충은 배양된 선모충 유충을 10 mM Tris-HCl (pH 7.4)로 2회 세척한 후 원심분리 하였다. 침전 물을 1 mM EDTA가 포함된 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액에 부유 시키고 초음파 분쇄기로 수 초간 분쇄한 다음 원심분리하여 상층액을 추출하였다. 배설항원은 선모충 유충을 RPMI 1640 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C의 무균 상태에서 배양하였다. 이 때 선모충은 비교적 짧은 생활사를 가진으로 이를 고려하여 1, 3일에 각각 배지를 교환하면서 배양액 내에서 배설항원을 수집하였다. 수집된 배설 항원을 0.2 μm 크기의 여과기로 통과시킨 후 냉동 건조법으로 농축하고 0.01M PBS buffer로 투석하였다. 모든 단백질양은 bovine serum albumin을 표준 단백질로 하여 Bio-Rad (DC) protein assay 방법으로 측정하였다.

3) 혈청

고래회충 유충과 선모충 유충의 혈청은 쥐에 각각 5마리와 1,000마리씩을, 개회충은 토끼에 500마리씩을 감염시킨 후 얻은 혈청을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 단백질해 효소의 부분정제

(1) ion exchange chromatography

효소를 정제하기 위해 1.6x10 cm의 column

(Pharmacia, Sweden)에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.0, 8.0)로 평형된 anion exchanger인 DEAE Sepacel (Pharmacia, Sweden)을 채우고 각각의 시료를 통과시켰다. 이 때 유속은 24 ml/hr이었고 분획당 2.5 ml씩 얻었으며 동일한 완충액에 적당한 NaCl 농도 구배(0-1 M)를 이용하여 흡착된 단백질을 용출 시키고 fraction collector를 이용하여 모았다. 이와 같이 얻은 가분획을 파장 280 nm에서 단백질 흡광도를 측정하고 각 분획에서 효소 활성도를 측정하여 효소 활성이 있는 분획만을 모아 농축, 투석하고 SDS-PAGE로 확인하였다.

(2) ultrafiltration

원하는 단백질분획을 모아서 분자량의 cut off value가 30,000인 centriplus(Amicon co.)도 4°C에서 65분간 4,000 rpm으로 원심분리 하였다.

2) 단백질해 효소의 특성 관찰

(1) 효소의 활성도 측정

McKerrow 등(1985)의 방법을 이용하였다. 조효소를 포함하여 각 정제 단계에서 얻은 효소 분획을 기질인 azocasein과 반응시켰다. 인산 완충액(0.1 M, pH 6) 50 μ l와 1%(W/V) azocasein 100 μ l, 그리고 50 μ l 효소(5 μ g 단백질)로 구성된 반응 혼합물을 만들고 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응은 50% trichloroacetic acid를 첨가함으로써 중단 시켰으며 실온에서 10분간 방치하였다. 10,000g에서 15분간 원심분리한 후 그 상층액만을 모아 0.5 N NaOH 2.1 ml을 첨가한 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 효소의 존재하에서 1 cm의 light pathway를 지나면서 흡광도를 0.1 증가시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

(2) 완충용액의 최적 pH 및 최적 mole'농도

조효소의 최적 pH는 50mM의 각각의 완충용액에서 pH 3.0에서 pH 11.0까지 변화시킴으로서 활성도를 측정하였다. 50mM의 각각의 완충용액은 pH 3.0과 3.5는 glycine-HCl buffer, pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5는 citrate-phosphate buffer, pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5는 sodium phosphate buffer, pH 8.0, 8.5, 9.0, 10.0, 10.5, 11.0은 tris-HCl buffer로 하였다. 최적 mole'농도는 선정된 최적 pH하에서 완충용액 0.05M에서 0.4M까지 변화시키면서 활성도를 측정하였다. 모든 효소 활성도 측정은 3번씩 실행하였고 각 실험마다 blank를 사용하여 표준으로 하였다.

(3) 효소활성에 대한 온도의 영향

조효소 100 μ l (20 μ g 단백질)를 0, 2, 4, 6, 8, 10, 11일 동안 4°C에서 방치한 후 활성도를 측정하였다.

(4) 단백질해 효소 저해인자의 효과

조효소에 serine proteinase inhibitor인 PMSF, acid proteinase inhibitor인 Pepstatin A, metalloproteinase inhibitor인 EDTA, cysteine proteinase inhibitor인 Leupeptin의 각각의 억제인자를 첨가하여 그 억제 효과를 조사하였다. 조효소 20 μ g이 들어 있는 단백질 용액 100 μ l에 억제인자 2mM(final conc.) 100 μ l을 함께 혼합한 후 37°C incubator에서 1시간 동안 반응 시킨 다음 azocasein(1%) 100 μ l을 첨가하여 다시 1시간 동안 37°C incubator에서 반응 시켰다.

3) 형원성 검토

(1) 전기영동(SDS-PAGE)

Electrophoresis system을 사용하여 정제 단계마다 얻은 단백질분획을 전기영동하였다. 시료와 표준단백질을 각각 2.5% β -mercaptoethanol이 포함된 SDS sample buffer와 섞어서 100°C에서 3분 동안 가열하여 4-20% gradient gel에 loading하고 이것을 20mA/gel이 전류를 흘려 전개시켰다. 전기영동후 gel의 단백질은 Coomassie brilliant blue R-250와 silver stain으로 염색하였고 47%

methanol도 탈색하였다.

(2) Immunoblot

Immunoblot은 20 V DC, constant current 150 mA로 2시간 동안 polyvinylidene difluoride (PVDF)와 nitrocellulose paper(NC)에 선이한 후 membrane을 incubation tray에 넣고 3% BSA로 blocking시켰다. 그 다음 0.05% Tween 20이 첨가된 PBST용액으로 1:100희석한 1차 항체인 실험 혈청을 각각 넣어 3시간 반응시킨 후 다시 peroxidase conjugate된 2차항체인 goat anti-rat 또는 anti-rabbit IgG를 1:1,000으로 희석하여 2시간 반응시켰다. H₂O₂가 첨가된 침전성 기질인 3,3'-diaminobenzidine(Sigma)로 발색시켜 확인한 후 증류수로 반응을 중지 시켰다.

III. 실험성적

1. 완충용액의 최적 pH와 mole농도

각 선충류 유충의 조효소에서 효소 활성이 최적 pH와 mole농도를 조사하였다. 활성도는 완충용액의 pH와 mole농도의 변화에 따라 효소활성이 변화되었다. 최적 pH의 경우 고래회충은 pH 6.0, 개회충은 pH 5.5 그리고 선모충은 pH 6.5에서 최고 활성을 보였으며 강산과 강염기에서는 이들 선충류 모두에서 효소 활성이 매우 낮았다. 최적 mole 농도의 경우에는 고래회충과 개회충 모두 0.1M 인산완충 용액에서 최고 효소 활성을 나타내었고 이는 0.05-0.2M 사이에서 효소 활성이 어느 정도 유지되었으나 0.2M 이상에서는 활성이 감소되었다(Fig. 1).

2. 온도 안정성

선충류 유충 조효소를 100 μ l(20 μ g 단백질)씩 분주하여 4 $^{\circ}$ C에서 아무 처리 없이 2, 4, 6, 8, 11 일 동안 방치한 후 효소의 활성을 측정함 결과 고래회충과 개회충이 효소 활성은 4 $^{\circ}$ C에서 가가 적어도 5일과 6일 동안 50% 이상의 효소 활성을 유지하였으며 6일과 8일 부터 활성은 현저히 감소하기 시작하였다(Table 1).

Table 1. Stability of proteinase from *Anisakis* and *Toxocara canis* worm extracts.

Periods (day)	Remaining activity(% ^a) of proteinase	
	<i>Anisakis</i>	<i>Toxocara canis</i>
0	100.0	100.0
2	98.7	89.9
4	80.2	62.8
6	35.5	50.8
8	20.1	41.9
11	15.7	32.7

a) Activity is expressed as relative percent.

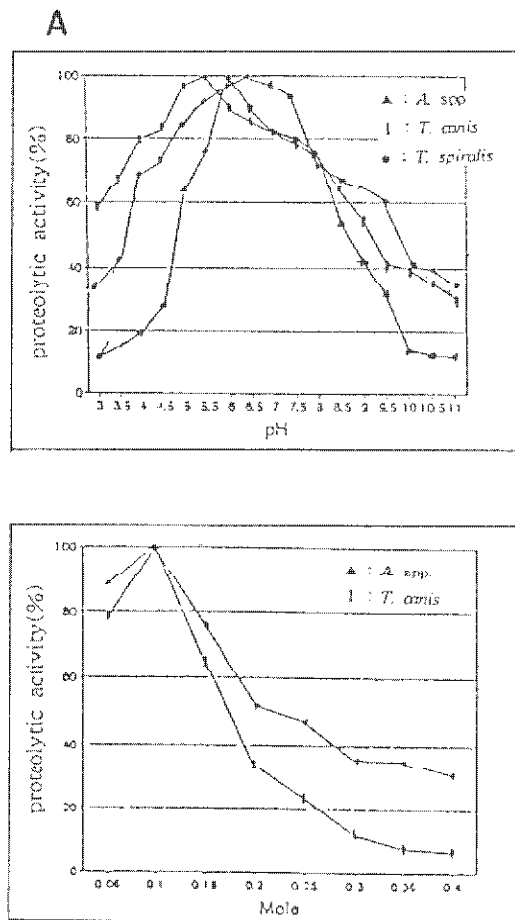


Fig. 1. The optimal pH and molarity for proteolytic activity in nematode worm extracts. A: optimal pH, B: optimal molarity

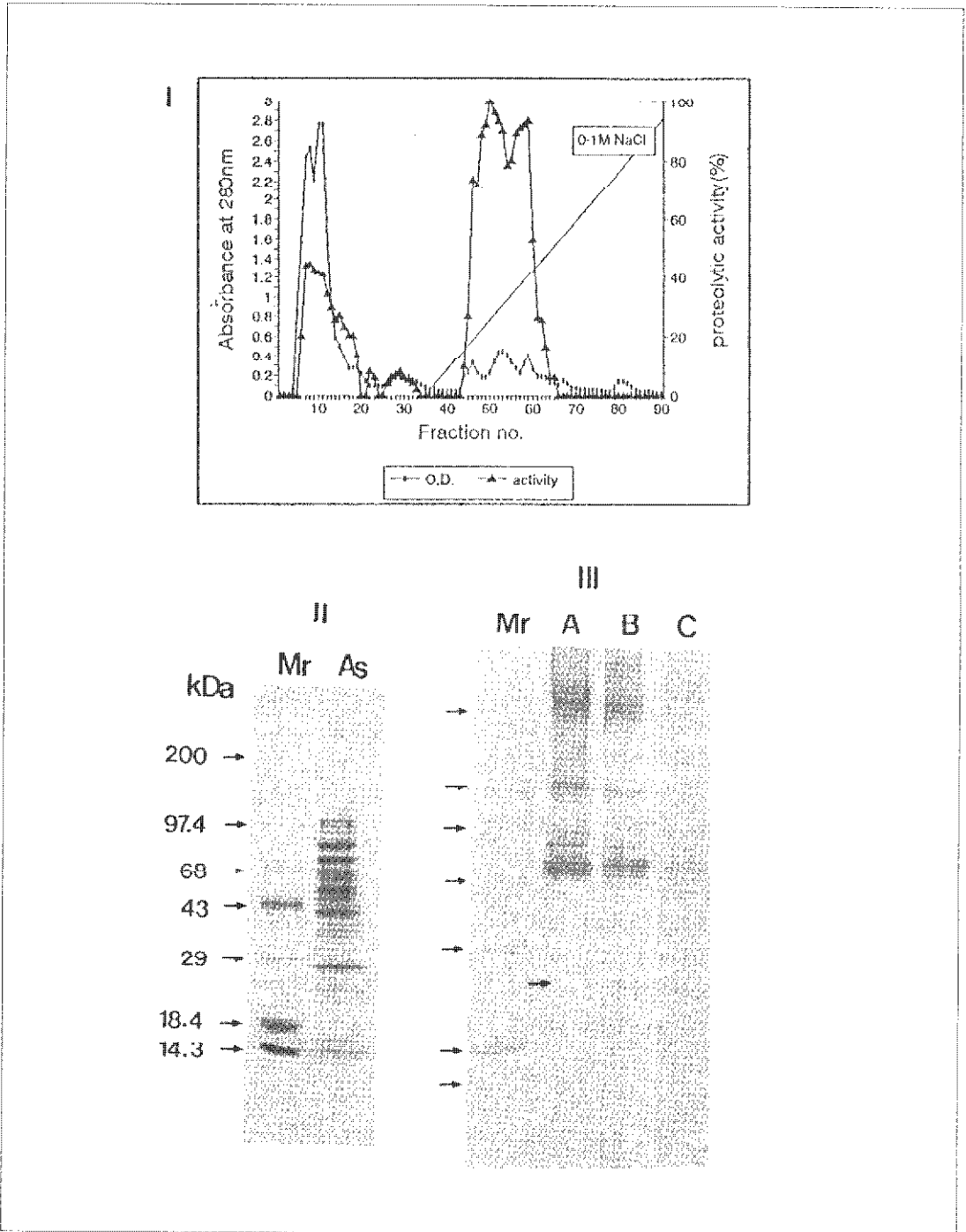


Fig. 2. Partial purification of proteinase from *Anisakis*

I : elution profile of proteinase obtained from anion exchange chromatography, Each fraction was assayed for activity on azocasein(▲) and monitored for protein content(—) at 280nm. II and III ; SDS-PAGE(II) and immunoblot(III) of proteinase(P4, 5, 6, fractions) obtained from I. Mr ; molecular weight standards: As: P4, 5, 6, fractions: A and B; infected serum: C; non-infected serum. Arrow is 25 kDa.

3. 효소 억제인자의 효과

serine proteinase inhibitor인 PMSF, acid proteinase inhibitor인 Pepstatin A, metalloproteinase inhibitor인 EDTA, cysteine proteinase inhibitor인 Leupeptin의 각각의 억제인자를 사용하여 효소의 활성을 관찰하였을 때 Leupeptin과 EDTA에 의해 억제 효과가 나타났다. 그 중에서 고래회충의 경우 Leupeptin은 EDTA의 약 3.48배, 개회충은 약 1.97배 정도 더 억제효과가 나타났다. 그러나 PMSF와 Pepstatin A이 억제 인자에 의해서는 활성이 전혀 억제되지 않았다(Table 2).

Table 2. The effect of various inhibitors on proteinase from *Anisakis* and *Toxocaracanis* worm extracts

Inhibitors (2mM)	Remaining activity(%) of proteinase ^{a)}	
	<i>Anisakis</i>	<i>Toxocara canis</i>
Control	100.0	100.0
PMSF	112.9	116.5
Pepstatin A	116.8	123.9
Leupeptin	15.6	44.6
EDTA	54.4	87.8

a) Activity is expressed as relative percent.

또한, ion exchange chromatography(Fig. 4, I)에 의해 부분 정제된 선모충의 배설항원(F5+F6)에서 효소의 활성도를 억제시켜 본 결과 EDTA의 경우 그 활성도가 현저히 저하되었으나 serine 잔기를 선택적으로 저해하는 PMSF나 thiol group을 보호하는 DTT의 경우는 여전히 그 활성도가 측정되었다(Table 3).

4. 단백질효소이 부분 정제

고래회충과 개회충의 조효소를 각각 pH 6.0과 8.0의 인산 완충용액에서 DEAE-Sephacel을 이용한 anion exchange chromatography를 실시하였다. 고래회충의 경우 unbound에서 4개의 peak와 bound된 단백질로부터 5개의 peak를 얻었고 이들을 tube no. 5~15를 P1, 16~24를 P2, 25~35를 P3, 44~49를 P4, 50~56를 P5, 57~63를 P6, 64

Table 3. The effect of various inhibitors on proteinase of *T. spiralis* protein fraction (F5+F6).

Inhibitors	Remaining activity(%) of proteinase ^{a)}	
	2mM	5mM
Control	100	100
EDTA	67	65
PMSF	98	104
DTT	105	106

a) Activity is expressed as relative percent.

~70를 P7, 79~84를 P8로 나누었다. 각 분획의 효소 활성을 측정한 결과 P4, P5, P6에서 활성이 크게 나타났으며(Fig. 2, I) 이들 분획은 조효소보다 약 1.43배 정제되었다(Table 4).

개회충의 경우에도 unbound와 bound에서 각각 4개의 peak를 얻었으며 이들을 tube no. 5~9를 P1, 10~16를 P2, 17~24를 P3, 25~36를 P4, 41~45를 P5, 46~57를 P6, 58~66를 P7, 67~77를 P8로 하였다. 각 분획의 효소 활성을 측정한 결과 P7 peak의 분획에서 활성이 크게 나타났고(Fig. 3, I) 이 분획은 조효소보다 약 2.89배 정제되었다(Table 4).

선모충 유충의 배설항원을 투석하고 농축한 다음 ion exchange chromatography를 이용하여 분리시킨 결과 Fig. 4, I와 같은 용리 곡선을 얻었다. 즉 tube no. 3-14를 F1, 15-21를 F2, 50-63를 F3, 64-72를 F4, 73-78를 F5, 79-88를 F6, 89-94를 F7, 95-101를 F8 그리고, 102-110를 F9로 나누었다. F1부터 F9까지의 분획을 각각 농축한 다음 SDS-PAGE한 결과 F5와 F6의 분획에서 원하는 60 kDa 단백분획을 확인하였다(자료 미기재). 또한, RPMI 1640 배지에서 20시간 동안 배양된 선모충 유충이 배설한 항원은 대략 60, 55, 45, 16 kDa의 분자량을 갖는 단백질이 확인되었으며 선충류의 공통 항원으로 간주되는 45 kDa 이외에도 선모충의 특이 항원이라고 알려진 60 kDa의 뚜렷한 단백분획이 확인되었다. 한편, 농축과 부분 정제를 목적으로 centriplus를 사용한 결과 45 kDa 이상의 단백분획이 확인되었다. 이들 단백분획에서 60 kDa의 부분만을 정제하기 위해

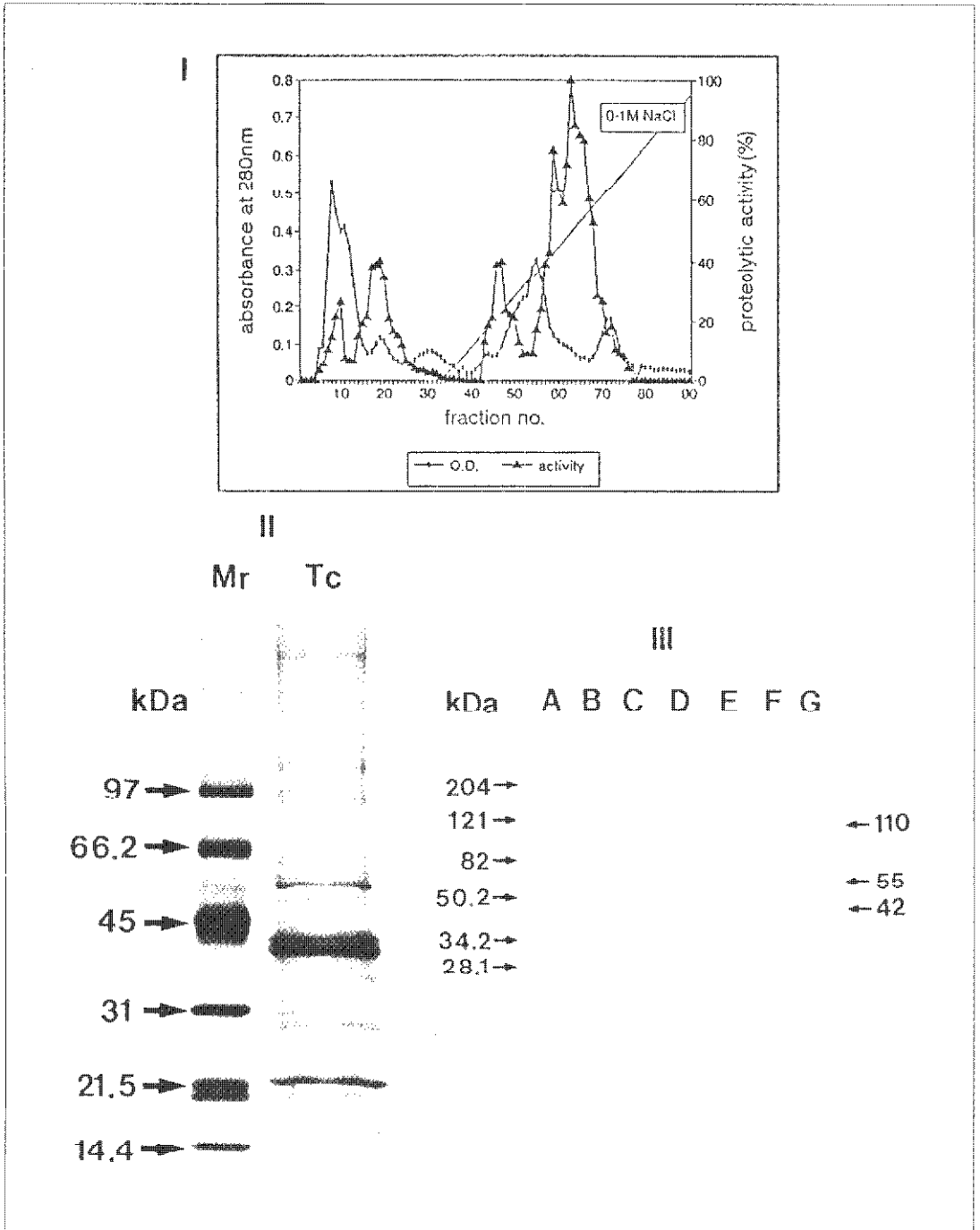


Fig. 3. Partial purification of proteinase from *Toxocara canis*.

I : elution profile of proteinase obtained from anion exchange chromatography, Each fraction was assayed for activity on azocasein(▲) and monitored for protein content(—) at 280nm. II and III ; SDS-PAGE(II) and immunoblot(III) of proteinase(P7 fractions) obtained from I. Mr : molecular weight standards: Tc: P7 fraction: A, B, C, D, E, and F: 5, 10, 12, 14, 18, and 22 weeks after infection, respectively: G: non-infected serum

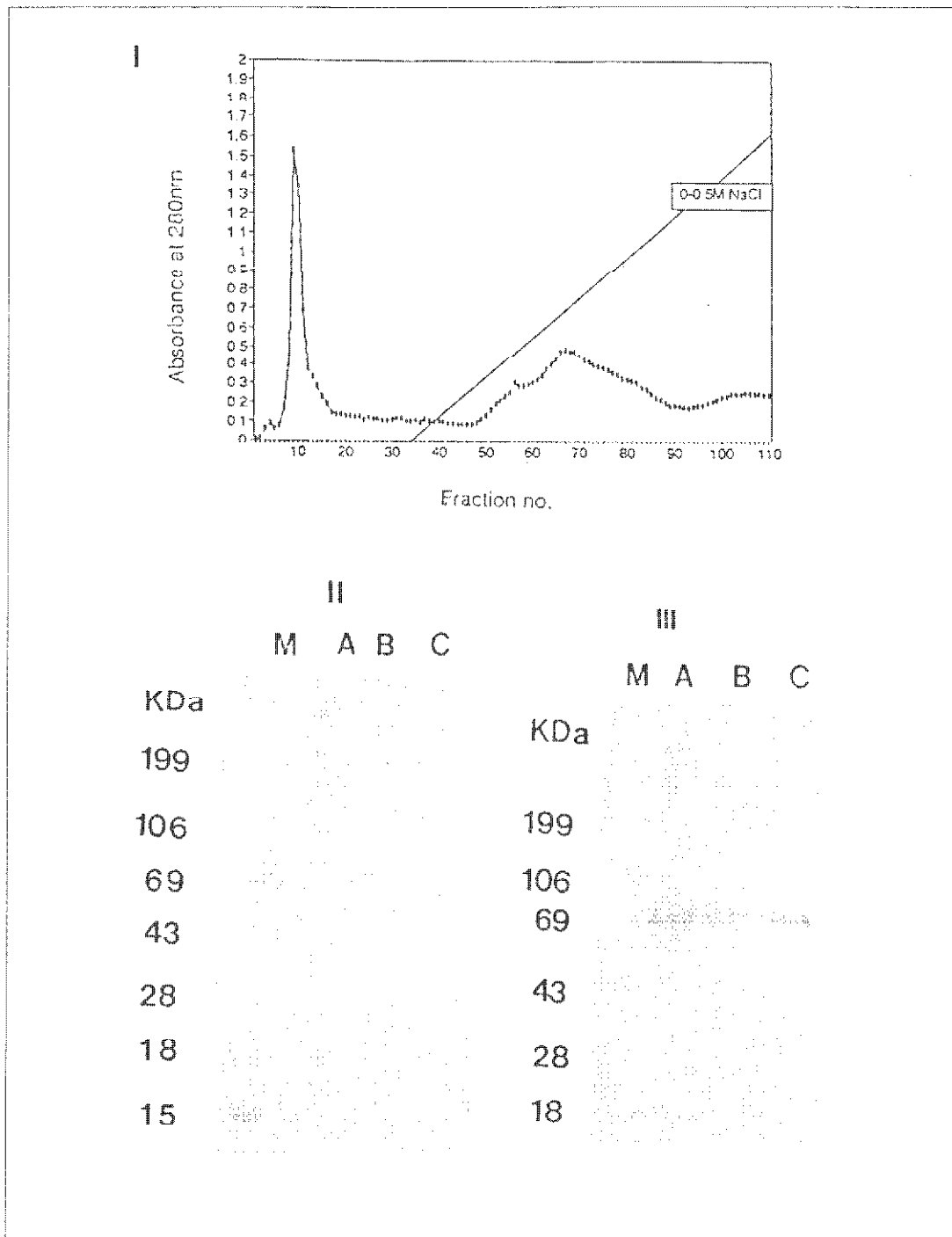


Fig. 4. Partial purification by anion exchange chromatography and ultracentrifugation from *Trichinella spiralis*.

I. elution profile of *T. spiralis* protein by anion exchange chromatography. II and III; SDS-PAGE(II) and immunoblot(III) of final purified protein fraction. M : molecular weight standards; A ; culture supernatant; B; partially purified 60 kDa by ultracentrifugation; C: purified 60 kDa by electrophoretic elution.

electrophoretic elution을 수행하여서 비교적 정제가 잘된 단백분획을 얻었다(Fig. 4,II).

Table 4. Partial purification of proteinase from *Anisakis* and *Toxocara canis* worm extracts.

Purification steps	Total protein (mg)	Total Activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Purification fold
Clude extract <i>Anisakis</i>	20	2,000	100	1
DEAE-Sephacel	3.74	534.29	142.86	1.43
Clude extract <i>T. canis</i>	20	864.4	43.22	1
DEAE-Sephacel	1.26	157.5	125.0	2.89

5. 항원성 검토

각각의 성충류에서 부분 정제된 효소 활성이 있는 분획을 SDS-PAGE와 immunoblot을 실시하였다. 고래회충에서는 전기영동에서 200-14 kDa에 걸쳐 다양한 분자량의 band들을 볼 수 있었으며(Fig. 2,II) 이것을 immunoblot 하였을 때 98-25 kDa의 단백분획이 반응을 하였고 그 중에 98, 97, 62, 52, 51, 48 kDa의 단백분획이 강하게 반응하였다(Fig. 2,III). 대조혈청과 비교하여 공통 항원으로 나타나는 98-41 kDa의 단백분획을 제외한 25 kDa이 고래회충의 특이 항원으로 관찰되었다. 개회충의 경우 SDS-PAGE한 후 silver 염색을 하였다. 12개 이상의 band가 염색되었으며 그 중 110, 55, 42, 26.5, 23, 17.5 kDa의 분획이 강하게 염색되었다(Fig. 3,II). immunoblot을 실시한 결과 110, 55, 42 kDa의 분획이 반응을 나타내었고 그 중 55, 42 kDa의 분획은 감염시키지 않은 혈청에서도 반응을 하였으므로(Fig. 3,III) 110 kDa의 분획이 특이 항원이라 생각된다. 선모충의 경우 정제단계 마다 얻은 단백분획을 SDS-PAGE

와 immunoblot으로 확인 한 결과 조형원에서는 물론 배설항원과 정제의 최종 산물에서도 특이 항원으로 알려진 60 kDa의 항원성(Fig. 4,III)이 관찰 되었다.

IV. 고 찰

조직에 기생하는 유충류에 있어서 이 기생충들은 조직을 뚫을 수 있는 단백분해 효소를 이용하여 감염시 피부를 침투, fibrinogen을 소화하여 영양분을 획득하면서 기생하는 것으로 알려져 있다. 이들 조직 기생성 유충류에 대하여 최근에 이 기생충들의 분비액에 존재하는 활성 효소에 대한 조사가 진행되고 있다. 조직침범에 의해 감염되는 기생충종 흡충류의 주혈흡충 (Chappell과 Dresden 1986; Zerda 등 1988; Chappell 등 1990; Rege 등 1992; Yoshino 등 1993) 및 폐흡충 (Song과 Dresden 1990)의 단백분해 효소에 대한 연구가 있으며, Fasciola hepatica에 대하여도 연구된 바 있다(Simpkin 등 1980; Dalton과 Heffernan 1989; Rege 등 1989). 조충류에 대해서는 Taenia solium metacestode

(White 등 1992), Spirometra mansoni 유충 (Song과 Chappell 1993)의 단백분해 효소에 대한 연구가 있으며, 선충류에 대한 연구로는 Ascaris suum larva(Knox와 Kennedy 1988)에 관한 연구가 보고 되었다.

따라서 본 연구에서는 조직에 기생하는 각 선충류의 조효소에 대한 단백분해능을 알아보고 azocasein을 기질로 하여 분석하였다. 우선 완충액의 최적 pH와 mol 농도 그리고 온도에 따른 활성도를 조사한 결과 완충액의 pH에 따라 활성도가 변화되었으며 고래회충의 경우는 pH 6.0, 개회충의 경우는 pH 5-5.5, 그리고 선모충에 있어서는 pH 6.5-7 사이에서 활성도가 최대치를 나타내고 강염기, 강산의 경우는 세 선충류 모두에서 거의 활성을 나타내지 않는 것으로 보아 이들 효소의 극활성은 약산성에서 이루어지는 것으로 생각되었다. 또한, 효소가 활성을 나타내기 위해 가장 적절한 완충액의 농도는 0.1 M 인산 완충액이었으며 이들 조효소는 약간의 차이가 있

으나 적어도 5일까지는 4°C에서 50 % 정도의 효소 활성을 유지하는 것으로 나타났다. 효소 억제 인자의 효과를 보기위해 PMSF, Pepstatin A, EDTA, Leupeptin 등의 억제인자를 사용하였을때 고래회충의 경우 조효소에 5mM 의 DTT를 첨가 하였을 때 효소 활성이 2배로 증가 되었고(자료 미공개) Leupeptin에도 가장 많이 억제되어서 이 조효소에는 thiol - dependent cysteine proteinase 가 존재함을 확인하였다. 또한, EDTA에도 억제 효과를 보이므로 metalloproteinase를 함유함을 알 수 있었다. 개회충의 조효소 활성 역시 Leupeptin 과 EDTA에 가장 많이 억제되었으며 그 중에 Leupeptin은 EDTA의 약 1.97배 정도 더 억제 효과가 나타났다. 고래회충과 마찬가지로 PMSF와 Pepstatin A의 억제 인자에 의해서는 활성이 전혀 억제되지 않은 것으로 보아 이 두 기생충의 효소가 원활한 활성을 나타내기 위해서는 cysteine 잔기가 요구되며 효소의 활성 부위가 metallo type을 포함하고 있음을 제시하였다. 선모충 조효소의 억제효과에 있어서도 EDTA를 저해제로 사용시 그 활성도가 저하되었으므로 이 단백질해 효소의 활성 부위에도 최소한 metallo type의 단백질해 효소가 포함되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 보다 정확한 효소의 active site 잔기를 결정하기 위해서는 상대적으로 특이한 여러 종류의 저해제, 합성 기질 그리고 기질과 유사한 저해제등을 사용해 보아야 할 것으로 생각된다.

조직 기생 유충류에서 숙주의 조직에 배출되는 단백질해 효소가 면역성이 있다고 보고되어 있으며 감염의 지표로 사용이 되고 종특이성도 있어서 혈청학적 진단시 지표로서의 연구도 진행되고 있다. 따라서 특이항원을 만들어 내기 위한 연구가 진행되어 왔으며 선충류에 대하여 Sakamari 와 Mckerrow (1988)는 *Anisakis simplex*의 분비 배설물의 항원성을 보고하였고 개회충 유충의 분비배설물에 항원성이 있음이 Badley 등(1987)에 의하여 밝혀졌다. Takahashi 등(1986, 1987)은 단일 항체를 이용해서 고래유충 유충 항원으로 부터 2가지의 다른 항원을 분리하였는데 그 중 An1은 34 kDa 배설에 관여하는 renette cell로 부터 나온다고 하였으며 다른 An2는 40, 42 kDa의 것이

로서 소화관과 근육세포에 분포한다고 하였다. 또한, 선모충증에 대한 혈청학적 연구에서 근육내 유충으로 만든 조항원을 사용하여 선모충 감염 쥐의 열정과 반응시켜 본 결과 43, 45-50, 59 및 68 kDa이 특이 항원임을 밝힌 바 있다(Denkens 등 1990; Gold 1990).

본 실험에서는 위와 같은 이전의 연구결과를 바탕으로 각 선충류의 조항원에서 단백질해 효소가 함유된 분획을 정제하며 효소의 활성이 유지되고 생체내 순환항원으로서 제시될 수 있는 단백질분획을 찾고자 하였다. 즉 ion exchange chromatography, ultrafiltration, 그리고 electrophoretic elution등을 통하여 분리하였으며 gel과 효소 활성도 측정으로 그 정제 정도를 확인하였다. 정제과정을 거친 다음 효소활성이 가장 높은 분획에서 고래회충의 경우, 14 - 200 kDa에 걸쳐 다양한 분자량의 단백질 분획이 확인되었으며 immunoblot 결과 대조혈청과 반응하는 단백질분획들을 제외한 25 kDa을 순환항원으로 제시할 수 있었다. 개회충의 조항원으로부터는 110, 52, 42, 26.5, 23, 17.5 kDa등 12개 이상의 band가 염색되는 복잡한 양상이 나타났으며, 이중 대조혈청에서 반응하는 55, 42 kDa을 제외한 110 kDa의 분획이 개회충의 특이항원성 단백질분획이라고 생각된다. 고래회충과 개회충의 경우는 부분정제에 그쳤으나 이 상태에서도 항원성을 나타내는 단백질분획들을 확인할 수 있었다. 그러나 이들 각각의 선충류에 대한 특이 항원을 제시하기 위해서는 보다 정제도를 높이면서 다른 선충류와의 교차반응등이 비교되어야 할 것으로 생각된다. 배양된 선모충의 분비물에서는 조항원의 경우보다 정제도가 높은 60 kDa 단백질분획을 얻을 수 있었으나 배양된 분비물에서 얻은 단백질이어서 정제 단계마다 얻은 수득율이 너무 낮아 이 단백질 분획에 대한 지속적인 연구를 하고자 할 때에는 보다 수득율이 높도록 처리가 되어야 할 것으로 생각된다. 정제되어서 단백질분해능을 보인 60 kDa 분획은 생체내에서 순환 항원으로서의 역할이 확인되었으며 선모충 감염혈청과 각 정제 단계마다 얻은 60 kDa을 면역 반응 시켜 본 결과 마지막 정제 단계 까지 그 반응성을 잃지 않고 강하게 유지되었다. 다른 선충류와의 교차반응이 없는 것으로 규명되

있던 60 kDa는 조직 침입시 단백질을 분해할 수 있는 효소적 능력이 있는 것으로 사료된다.

정제된 각 선충류의 항원으로서 제시되는 단백질은 차후 단백질 서열결정과 아미노 산 조성 등을 통한 종특이성의 규명등 단백질 자체에 대한 연구가 절실히 필요하다고 생각되며 이들을 이용한 보다 정확하고 간편한 각각의 면역혈청학적 진단확립을 할 때 항원으로서 매우 유용할 것으로 사료된다.

V. 결 론

조직에 기생시 요구되는 선충류(고래회충, 개회충, 선모충 유충)의 단백질 분해 효소를 추출해서 분리, 정제하여 이 효소들의 특성(활성도, 저해작용 등)을 조사하며, 생체내 순환항원으로서의 작용에 대하여 검토하는 것을 본 연구의 목적으로 하였다. 이를 위해서 첫째, azocasein을 기질로 하여 효소로서의 활성을 측정하였고 PMSF, Pepstatin A, EDTA, Leupeptin의 각각의 억제인자를 사용하여 효소 활성에 대한 억제 효과를 알아 보았다. 둘째, ion exchange chromatography, ultrafiltration, electrophoretic elution 등을 통해 가능한 효소 활성을 잃지 않으면서 정제도가 높은 단백질 분획을 얻었으며 셋째, 실험동물을 이용하여 각각의 선충류에서 분리한 이들 단백질 분획의 생체내에서 순환항원으로서의 역할을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 완충액의 pH에 따라 활성도가 변화되었으며 고래회충의 경우 pH 6.0, 개회충의 경우는 pH 5.5 그리고 선모충의 경우는 pH 6.5에서 최대의 활성을 나타내었으며 이들 효소가 활성을 나타내는 가장 적절한 완충액의 농도는 0.1 M 인산 완충액이었다 또한 이들 효소는 약간의 차이가 있으나 5일까지는 4°C에서 50 % 정도의 효소 활성을 유지하는 것으로 나타났다.

2. 고래회충과 개회충의 경우 효소의 활성이 Leupeptin과 EDTA에 가장 많이 억제되는 것으로 보아 이들 효소는 cysteine type과 metallo type의 단백질 분해 효소를 함유하고 있음을 제시하였다. 또한, 선모충의 경우도 EDTA 저해제로 활성도가 저해되었다.

3. 부분 정제된 단백질 분해 효소를 함유한 분획에서 단백질 분획들의 항원으로서의 역할을 확인한 결과, 고래회충의 경우 대조혈청과 반응한 단백질 분획을 제외한 25 kDa을 순환항원으로 제시 할 수 있었고, 개회충의 경우에서도 110 kDa의 분획이 특히 항원으로 나타났으며 배양된 선모충의 분비물에서 얻은 60 kDa은 감염혈청과 면역반응시켜 본 결과 마지막 단계까지 그 반응성을 잃지 않고 강하게 유지되었다.

참고문헌

1. Badley JE, Grieve RB, Bowman DD, Glickman LT and Rockey JH. Analysis of *Toxocara canis* larval excretory-secretory antigens: Physicochemical characterization and antibody recognition. *J parasit* 1987; 73: 593-600
2. Chappell CL and Dresden MH. *Schistosoma mansoni* : Proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms. *Exp Parasit* 1986; 61: 160-167
3. Chappell CL and Dresden MH. Antibody response to a purified parasite proteinase(SMw32) in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Am J Trop Med Hyg* 1988; 39: 6-73.
4. Chappell CL, Hackel J and Davis AH. Cloned *Schistosoma mansoni* proteinase(hemoglobinase) as a putative serodiagnostic reagent. *J Clin Micro* 1989; 27: 196-198
5. Chappell CL, Gryseis B and Deelder AM. Antibody response to *Schistosoma mansoni* adult worm cysteine proteinases in infected individuals. *AM J Trop Med Hyg* 1990; 42: 335-341
6. Dalton JP and Heffernan M. Thiol proteases released in vitro *Fasciola hepatica*. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 35: 161-166
7. Denkers EY, Wassom DL and Hayes CE. Characterization of *Trichinella spiralis* antigenic sharing an immunodominant, carbo-

- hydrate-associated determinant distinct from phosphorylcholine. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 41(2): 241-249
8. Gold AM, Despommier DD and Buck SW. Partial characterization of two antigens secreted by L1 larvae of *Trichinella spiralis*. *Mol biochem Parasitol* 1990; 41(2): 187-196
 9. Knox DP and Kennedy MW. Proteinases released by the parasitic larval stages of *Ascaris suum* and their inhibition by antibody. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 28: 207-216
 10. Lindquist RN, Senft AW, Petit M and Mckerrow JH. *Schistosoma mansoni* - purification and characterization of the major acidic proteinase from adult worms. *Exp Parasit* 1986; 61: 398-404
 11. Maizels RM, de Savigny DH and Ogilvie BM. Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. *Parasite Imm* 1984; 6: 23-37
 12. Maizels RM, Kennedy MW, Meghji M, Robertson BD and Smith HV. Shared carbohydrate epitopes on distinct surface and secreted epitopes of the parasitic nematode *Toxocara canis*. *J Immunol* 1987; 139 :207-214
 13. Mckerrow JH, Jones P, Sage H and Piano-Heisse H. Proteinase from invasive larvae of the trematode parasite *Schistosoma mansoni* degrade connective tissue and basement membrane molecules. *Biochem J* 1985; 231: 47-51
 14. Meghju M and Maizels RM. Biochemical properties of larval excretory-secretory(ES) glycoproteins of the parasite nematode *Toxocara canis*. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 18: 155-170
 15. Rathaur S, Robertson BD, Selkirk ME and Maizels RM. Secretory acetylcholinesterases from *Brugia malayi* adult and microfilarial parasites. *Mol Biochem Parasitol* 1987; 26: 257-265
 16. Rege AA, Herrera PR, Lopez M and Dresden MH. Isolation and characterization cysteine proteinase from *Fasciola hepatica* adult worms. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 35: 89-96
 17. Rege AA, Wang W and Dresden MH. Cysteine proteinases from *Schistosoma haematobium* adult worms. *J Parasitol* 1992; 78(1): 16-23
 18. Robertson BD, Burkot TR, Gillespie SH, Kennedy MW, Wambai Z and Malzels RM. Detection of circulating parasite antigen and specific antibody in *Toxocara canis* infections. *Clin. Exp Immunol* 1988; 74: 236-241
 19. Ruppel AU, Rother U, Vongerichten H, Lucius R and Diesfeld HJ. *Schistosoma mansoni*: Immunoblot analysis of adult worm proteins. *Exp Parasitol* 1985; 64: 195-206
 20. Sakanari J and Mckerrow JH. Characterization of a protease excreted by the invasive stage of the 'sushi worm' *Ari-sakis simplex*. *J Cell Biochem Suppl* 1988; 12B: 299
 21. Simpkin KG, Chapman CR and Coles GC. *Fasciola hepatica* : A proteolytic digestive enzyme. *Exp Parasitol* 1980; 49: 281-287
 22. Song CY and Dresden MH. Partial purification and characterization of cysteine proteinase various developmental stages of *Paragonimus westermanni*. *Comp Biochem Physio* 1990; 95B: 473-476
 23. Song CY and Chappell CL. Purification and partial chareterization of cysteine proteinase from *Spirometra mansoni* plerocercoides. *J Parasitol* 1993; 79(4): 517-524
 24. Strobel H. Die serodiagnostik der Trichinosis. *Muench. Med Wochenschr* 1991; 58: 672-674

25. Takahashi S, Sato N and Ishikura H. Establishment of monoclonal antibodies that discriminate the antigen distribution specifically found in *Anisakis* larvae (Type I). *J Parasit* 1986; 72(6): 960-962
26. Takahashi S, Sato N, Sato T and Takami T. Monoclonal antibody, intradermal reaction and Sarles' phenomenon. In Ishikura, H (eds) *Gastric anisakiasis in Japan*. Springer-Verlag, Tokyo, 1989
27. White AC, Molinari JL, Pillai AV and Rege AA. Detection and preliminary characterization of *Taenia solium* metacestode proteases. *J Parasitol* 1992; 78: 231-237
28. Yeates RA and Ogilvie BM. Nematode acetylcholinesterases. In "Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships", 1976: 307-310. Elsevier, North-Holland, Amsterdam
29. Yoshino TP, Lodes MJ, Rege AA and Chappell CL. Proteinase activity in miracidia, transformation excretory-secretory products, and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 1993; 79(1): 23-31
30. Zerda KS, Dresden NH and Chappell CL. *Schistosoma mansoni*: Expression and role of cysteine proteinases in developing schistosomula. *Exp Parasitol* 1988; 67: 238-246