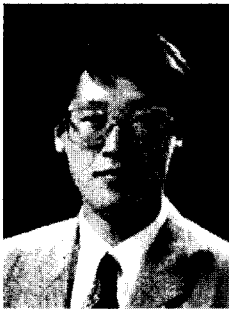


## 동물학논단

### 곤충의 Prophenoloxidase Activating System



강창수

1982년 고려대학교 이과대학 생물학과 (이학사)  
 1984년 고려대학교 이과대학 생물학과 (이학석사)  
 1989년 고려대학교 이과대학 생물학과 (이학박사)  
 1990~현재 호서대학교 자연과학대학 생명과학과 교수

무척추동물 특히 곤충은 종 수가 다양하고 지구상에서 그 분포가 널리 퍼져 있으며, 다양한 환경하에서 나름대로 적응하여 살고 있는 성공적인 생물체중의 하나로 볼 수 있다. 이러한 곤충들은 대개 그들의 서식환경이 생존에 위협을 주는 여러 종류의 미생물과 parasites에 노출되어 있다. 그러나 척추동물이 지니는 생체 방어수단인 항체를 가지지 않기 때문에 생존을 위해서는 그들 나름대로의 매우 효과적인 방어체계를 가져야 한다.

곤충의 생체 방어체계중 1차적인 구조물로는 cuticle이 있는데, cuticle은 wound healing과 molting process에 깊이 관여되고 있다. parasites의 침입에 의한 2차적 생체 방어 기작은 주로 체액(hemolymph) 내에서 일어나게 되는데 여기에는 혈림프내의 방어인자나 혈구세포(hemocytes)에 의한 체액성과 세포성 면역과정이 포함된다. 혈림프에서는 미생물의 감염에 따른 항균단백질(antimicrobial peptides)과 lysozymes 등이 존재하여 면역반응을 일으키며, 혈구세포에 의해서는 phagocytosis, nodule formation, encapsulation 등의 반응이 일어난다. 이와 같은 1차 및 2차의 모든 생체 방어기작 과정에 관련된 주요 효소로는 prophenoloxidase (PPO)

가 알려져 있으며, 생물학적 활성을 나타내는데 있어서 중요한 작용을 한다.

Prophenoloxidase는 이의 활성형인 phenoloxidase로 확인되며 곤충의 체액, 혈구 및 cuticle에 존재하는데 크게 tyrosinase type과 laccase type으로 구분되며 cooper-containing enzyme으로 알려져 있다. 면역반응에 관여하는 이 효소는 proenzyme의 형태로 존재하다가 peptidoglycan, lipopolysaccharide,  $\beta$ -1,3-glucan 및 zymosan등의 parasitic components에 대응한 PPO-activation system에 의해 활성형의 효소로 전환된다. non-self molecules의 유입에 대한 곤충의 면역반응 결과로 형성되는 antimicrobial peptide를 비롯한 여러 가지 세포성, 체액성 면역과정들이 이러한 PPO-activating system에 의한 induce activation에 의해 진행된다. PPO-activating system에는 proteinases, proteinase inhibitors, recognition molecules 등의 여러 단백질들이 포함되고 있으며, 이 계의 활성화에 따라서 단계적인 성분(최종적으로는 phenoloxidase)의 생물학적인 활성이 나타나고 그 결과 host에 대한 방어체계가 작동된다. 따라서 본 논문에서는 곤충의 면역계와 이의 활성화 과정중 중요한 역할을 담당하는 phenoloxidase와 PPO-activating system을 곤충의 생체 방어전략이라는 차원에서 체계적으로 살펴보고자 한다.

#### 1. (Pro)phenoloxidase와 Prophenoloxidase-activating System

PPO는 외부자극시 hemocytes에서 방출되는 serine protease에 의한 proteolysis에 의해 plasma내에서 활성화된다. 이러한 PPO의 활성화는 체액성 면역뿐만 아니라 phagocytosis, nodule formation, melanin encapsulation과 같은 세포성 면역기작에도 매우 중요한 역할을 하고 있다. 이 세포성 면역기작은 외부물질의 non-self recognition과 immobilization

과정의 두 단계로 일어난다. 외부로부터 침입된 세균은 혈구표면이나 plasma에 있는 p47 단백질의 부착에 의해 인식되고 이 세균들이 서로 응집되거나 혈구표면에 부착되는 등의 고정화과정은 p47, phenoloxidases, PPO activators, tyrosine 등에 의하여 일어난다. 체내의 p47은 두 가지 형태로 존재함이 알려져 있는데, membrane-bound p47은 phagocytosis나 nodule formation을 위한 effector molecule로 작용하며, 분비된 soluble p47은 humoral killing에 기여하는 것으로 알려져 있다. 이는 p47이 PO의 작용으로 생긴 tyrosine 유도체와 결합되어 세균의 표면에 결합한다는 가설을 이끌어 내는 기초가 되었다. 즉 세포성 면역기작의 과정중에는 LPS-tyrosine derivatives-p47의 crosslinking에 의해 생긴 복합체가 중요한 역할을 하고 있음을 의미한다.

Cuticle에도 phenoloxidases의 작용에 의해 tyrosine 유도체와 복합체를 형성하여 *E. coli*를 immobilization시키는 과정과 관련된 integumental proteins이 존재한다고 알려져 있는데, 이러한 단백질이 어디에서 합성되며 혈단백질과는 어떤 연관성이 있는지에 대해서는 아직 밝혀지지 않은 상태이다. Hemolymph에는 LPS clearance에 기여하는 또 하나의 단백질이 존재하는데, 이는 lipophorin (Lp)으로써 Lp는 LPS와 결합하여 유입된 LPS의 체내에서의 농도감소에 기여한다. 따라서 Lp는 LPS의 유입으로 유발되는 humoral immune response의 정도를 줄여주는 역할을 하기도 하는데 이는 Lp-LPS complex가 cecropin B mRNA의 유도되는 양을 줄여준다는 사실로써도 확인되었다.

Foreign molecules을 인식하는 recognition factors가 PPO system을 활성화시키는데, PO는 phenol을 quinone으로 전환시키는 oxidoreductase이며 tyrosine을 산화시키는 과정의 중간산물이나 melanin과 같은 최종산물이 침입한 미생물에는 toxic하게 작용한다. PO는 혈림프내에서 PPO의 형태로 존재하는데, 이들의 분자량은 대개 70~80 kDa의 monomer로 되어있으며 proteolytic activation이 일어난 후의 PO는 60~70 kDa의 분자량을 갖게 된다. Cockroach의 일종인 *Blaberus*속에서 PPO계는 endogenous lectin에 의해 활성화된다고 알려져 있다. PPO는 signal peptide sequence를 가지지 않으며

두 개의 기능적인 구리이온에 대한 결합부위를 갖는다. 또한 여러 종류 (*Manduca sexta*, *Drosophila melanogaster*, *Bombyx mori*)에서 정제된 PPO의 sequence는 전체적으로는 약 40% 정도, cooper binding site주위는 약 60~70%의 homology를 보이고 있다. 한편 곤충의 종류에 따라서는 PPO polymorphism이 나타나기도 하나 그의 중요성은 아직 밝혀지지 않고 있다.

PPO는 native proteinase에 의한 proteolytic cleavage에 의해 활성화된다. Serine protease인 PPO-activating enzyme (PPO-AE)은 *D. melanogaster*와 *B. mori* 등에서 발견되었는데, 그 분자량이 대략 30 kDa 정도로 서로 비슷하다고 알려져 있다. 그러나 지금까지 어떤 PPO-AE도 아직 cloning되어 있지 않고 있다.

## 2. Prophenoloxidase-related Proteins

지금까지 미생물 성분과 결합할 수 있는 여러 recognition proteins이 곤충을 포함한 절지동물에서 발견되었는데, 이들 중에서 일부는 서로 다른 방어기작을 유도할 뿐만 아니라 PPO-activating system에도 관여되는 것으로 알려져 있다. 이 중 LPS binding protein은 여러 종에서 발견되었는데 이들 각각은 매우 상이한 구조를 갖고 있다. Hemolin은 LPS와 결합하여 hemocytes의 aggregation을 방지하고 opsonising factor로써의 역할도 한다. 또한 아직 특성규명은 되어있지 않으나 hemocyte 표면에는 LPS receptor가 존재한다고 보고된 바 있다.

Gram(-) bacteria binding protein (GNBP)이 *B. mori*에서 발견되었고 분자량은 50 kDa로 bacterial  $\beta$ -1,3-glucanase와 유사성을 가지고 있다. 특히 이 효소의 활성부위와의 비교 시에는 63% 가량의 homology를 보이고 있으므로 이 단백질은  $\beta$ -1,3-glucan과 결합하는 특성을 가지고 있는 것으로 생각된다. Horseshoe crab에서 분리된  $\beta$ -1,3-glucan binding protein (BGBP: Factor G)은 두 종류의 구성 소단위로 존재하는데, large subunit는 glucanase domain, small subunit는 serine protease domain을 각각 가지고 있다. *P. leniusculus*의 glucan-binding protein은 100 kDa의 단량체이며 glucanase-like

motif를 지나나 glucanase activity는 없으며, Factor G와 silkworm GNBP와는 완전히 다르다. 흥미롭게도 *P. leniusculus*의 BGBP는 새우류의 LP1과 매우 유사하다. BGBP에  $\beta$ -1,3-glucans을 처리하면 이 단백질은 혈구 표면에 결합한다.

PPO-AS의 components가 immune factor로써 직접 작용하는 경우에 관한 보고는 그리 많지 않다. *Manduca sexta*에서 interleukin-1-like molecule이 PPO와 PO에 결합되어 혈림프내에서의 interleukin-1을 수송하기 위한 carrier로 작용한다. 가재의 hemocytes에 존재하는 cell-adhesion molecule은 76 kDa의 분자량을 지닌 peroxidase이므로 peroxinectin이라고 명명되었으나 사실은 이 효소의 활성 그 자체는 단백질의 부착성과 관련이 없다.

### 3. Prophenoloxidase-activating System의 조절

활성형의 phenoloxidase는 곤충체내에서 매우 toxic한 intermediate를 생성하게 되므로 대부분의 PPO는 zymogen으로 혈구내에서 vesicles에 존재한다. 곤충에서는 저분자량의 protease inhibitor가 PPO의 활성을 효과적으로 저해하고 있다. *Locusta migratoria*에서는 세 가지의 inhibitors가 발견되었는데, 이 중 두 개 (LICM I과 LICM II)가 밝혀져 있다. Inhibitor들은 한 종류의 mRNA에 의해서 encode된 두개의 domain precursor로부터 비롯되고 있다. Crayfish에서는 155 kDa의 proteinase inhibitor (pacifacitin)가 발견되었고, 이들은 PPO-AE를 1:1의 농도비로 저해한다. Pacifacitin은 두 개의 mRNA에서 encode되며 light chain은 9 proteinase domain으로, heavy chain은 세 개의 transferrin domains을 지닌다. Pacifacitin light chain domain (PLDs)은 LICM I, II와 homology를 가지며, 다른 종류의 transferrin처럼 antimicrobial activity를 나타낸다. 이들 pacifacitin과 locust의 inhibitor들은 새로운 형태의 proteinase inhibitor인 것으로 여겨지고 있다. *Manduca sexta*에서는 단일의 유전자로부터 여러 splicing과정을 거쳐 생성되는 12 serpins이 발견되었는데, 이들 중 하나가 PPO-AS의 효과적인 inhibitor인 것으로 간주되고 있다. 또한 *Musca domestica*에는 4.2 kDa의 dopa-containing peptide가

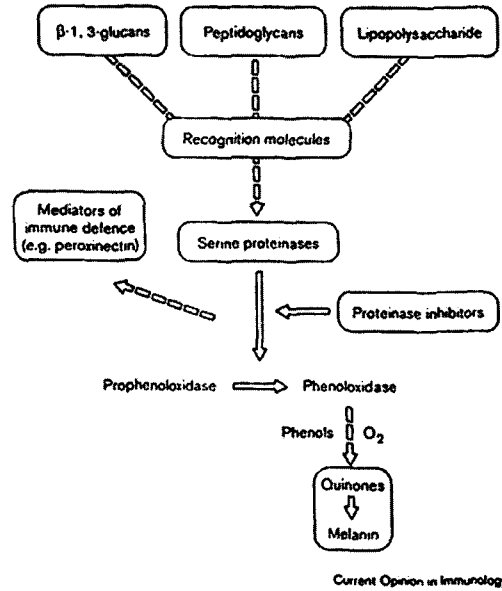


Fig. 1. A scheme for prophenoloxidase-activation in arthropods.

PO의 competitive inhibitor로써 역할 하는 것으로 보고된 바 있다.

### 4. PPO-AS의 생화학적 특성

지금까지 PPO system과 그 activating system에 관해서 많은 연구가 진행되어 왔지만 이와 관련된 기작은 상세히 밝혀져 있지 않다. 최근 10여 년 동안 PPO system의 한 성분이거나 이 효소계와 관련된 많은 단백질이 분리, 정제되면서 활발한 연구가 있어왔음에도 불구하고 이에 대한 내용은 몇몇 곤충의 종류에 국한된 실정이므로 구체적인 PPO system을 설명하기에는 미흡하다고 보아진다. 하지만 이들 개개의 종류를 이해함으로써 보다 진보된 개념으로의 접근이 가능하리라 생각되어 밝혀진 종을 중심으로 그 특성을 비교하고자 한다.

#### 1) 누에 (*Bombyx mori*)의 PPO System

80 kDa의 분자량을 가지며 dimer인 PPO와  $\beta$ -1,3-glucan binding protein이 혈림프로부터 정제되었고, PPO는 commercial protease에 의해 active

PO로 전환된다. Plasma의 PPO는 cuticles의 serine proteinase에 의하여 activation되기도 하는데, 이 과정에서 5 kDa의 peptide가 새로이 나타난다고 알려졌다. 그러나 이 cuticular proteinase가 실제로 plasma PPO의 natural activator는 아니며, plasma에는 PPO activation에 관여하는 serine proteinase가 따로 존재하고 있다. *B. mori*의 active PO의 분자량은 70 kDa인 것으로 알려져 있다.

## 2) 갑각류(Crustaceans)에서의 PPO System

곤충류에서는 PPO system이 혈구와 plasma에 존재하지만 갑각류에서는 혈구에 주로 존재한다. 그러므로 혈액내에서의 host defense를 위해서는 혈구로부터 이 효소가 방출되어야 하는데, 이 과정은 LPS와  $\beta$ -1,3-glucan에 의해 유도된다. 이때 두 종류의 단백질이 관여하는데 76 kDa 단백질과  $\beta$ -1,3-glucan binding protein이다. 이들 단백질은 갑각류에서 cell-to-cell communication에 직접 관여한다. 담수가재의 혈구로부터 분자량이 76 kDa이며 monomer인 PPO가 정제되고, 이 효소를 활성화형 PO로 전환시키는 serine proteinase (PPA)는 36 kDa의 분자량을 지는 것으로 보고된 바 있다. 이 ppA를 PPO와 반응시켰을 때 76 kDa의 PPO는 60, 62 kDa의 물질로 전환되는데, 이를 commercial trypsin으로 처리하면 60 kDa의 단백질만 형성된다. PPO를 활성화시키는 효소(ppA)는 혈구내에 3종류(36, 38, 50, 67 kDa)가 존재하는데 이 중 36 kDa가 실제로 세포내에서 ppA로써의 기능을 하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 혈구내에서 ppA는  $\beta$ -1,3-glucan, LPS와 같은 PPO system의 활성화를 위한 elicitor가 첨가되지 않으면 효소활성을 가지지 않는 것으로 나타난다. 이는 ppA가 원래 세포내에서 불활성형으로 존재하고 있음을 시사하는 것이다.

## 5. PPO System에 관련된 Factors의 생물학적 기능

### 1) PO 활성화계 대사산물에 의한 Antifungal Activity

PPO 계의 terminal component는 PPO인데 이의

활성형인 PO는 phenol을 quinones으로 산화시키는 효소이다. quinone은 이후의 반응에 의해 melanin으로 되는데, melanin이나 melanin 생성과정의 중간산물인 quinonic compounds는 몇몇 기생성 fungi의 성장과 proteinase 활성을 저해한다.

### 2) Crustaceans의 76 KDa Protein

76 KDa protein은 혈구세포로부터 PPO system의 exocytosis를 유발시킨다. 이 단백질은 혈구세포로부터 정제되었는데, inactive상태로 존재하다가 PPO system의 activation과 동시에 활성을 갖게 되며 이는 76 KDa 단백질의 conformational change에 의한 것으로 추측된다. 76 KDa protein은 cell adhesion, degranulation, encapsulation 등의 세 가지 기능을 가지고 있다.

### 3) $\beta$ -1,3-glucan Binding Protein (BGBP)

BGBP는 PPO 활성화계의 초기 단계에서 작용한다. 이 단백질은 두 종의 곤충과 한 종의 갑각류에서 확인, 정제되었는데 *B. mori*에서 62 kDa, *B. cranifer*에서는 92 KDa와 *P. leniuscus*에서는 100 KDa의 단백질이 발견되었다. BGBP는 fungal  $\beta$ -1,3-glucan에 결합하여 ppA와 PO의 활성을 증가시킴으로써 PPO system을 활성화시키는데, 최근의 결과에 의하면 BGBP는 plasma에 보다 많은 양으로 존재하여 혈구세포들 사이의 communication에도 관여한다고 알려지고 있다.

## 6. 맺음말

PPO activating system에 대한 지금까지의 연구 결과에 의해 부분적으로나마 여러 factor를 찾아내고 그 구조와 기능에 대한 조절역할이 밝혀지기는 하였지만 곤충의 면역계 전반에 걸친 pathway는 완전히 파악되지 않은 실정이다. 항생물질의 유발과 PPO-AS의 상관관계, serine protease에 의한 Toll-signalling pathway 등을 이해하는 것은 척추동물과는 다른 면역구조를 가지면서 환경에 적응하고 사는 다수 종의 곤충을 바르게 알고 응용할 수 있음을 의미하는 것으로 보고, 향후에도 이에 대한 지속적인 관심과 심도 깊은 연구가

PPO-AS를 중심으로 진행되어야 할 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Andersson, K., S. C. Sun, H. G. Boman, H. Steiner, 1989. Purification of the prophenoloxidase from *Hyalophora cecropia* and four proteins involved in its activation. *Insect Biochem.* **19**: 629-637.
- Ashida, M., 1981. A cane sugar factor suppressing activation of prophenoloxidase in haemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **11**: 57-65.
- Ashida, M., Y. Ishizaki, H. Iwahana, 1983. Activation of prophenoloxidase by bacterial cell walls and  $\beta$ -1,3-glucans in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun.* **113**: 562.
- Boman, H. G., D. Huntmark, 1987. Cell-free immunity in insects. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 103-126.
- Brookman, J. L., N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley, 1989. Studies on the activation of the prophenoloxidase system of insects by bacterial cell wall components. *Insect Biochem.* **19**: 47-57.
- Dularay, B., A. M. Lackie, 1985. Haemocytic encapsulation and the prophenoloxidase-activation pathway in the locust *Schistocerca gregaria* Forsk. *Insect Biochem.* **15**: 827-834.
- Gotz, P., 1986. Encapsulation in arthropods, in *Immunity in Invertebrates* (Edited by Brehelin M.), Springer-Verlag, Berlin. pp. 153-170.
- Gotz, P., H. G. Boman, 1985. Insect immunity. In : *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Kerkut GA, Gilbert LI, eds. Pergamon Press, Oxford. **3**: 453-485.
- Iwama, R., M. Ashida, 1986. Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **16**: 547-555.
- Kopacek, P., C. Weise, P. Gotz, 1995. The prophenoloxidases from the wax moth *Galleria mellonella* : purification and characterization of the proenzyme. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25**: 081-1091.
- Leonard, C., N. A. Ratcliffe, A. F. Rowely, 1985. The role of prophenoloxidase activation in non-self recognition and phagocytosis by insect blood cells. *J. Insect Physiol.* **31**: 789-799.
- Leonard, C., K. Söderhäll, N. A. Ratcliffe, 1985. Studies of prophenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes. *Insect Biochem.* **15**: 803-810.
- Morgan, T. D., B. R. Thomas, M. Yonekura, T. H. Czaplá, K. J. Kramer, T. L. Hopkins, 1990. Soluble tyrosinase from pharate pupal integument of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Insect Biochem.* **20**: 251-250.
- Marmaras, V. J., N. D. Charalambidis, C. G. Zervas, 1996. Immune response in insect: The role of phenoloxidase in defence reaction in reaction to melanization and sclerotization. *Arch. Insect Biochem. and Physiol.* **31**: 119-133.
- Ohnishi, E., K. Dohke M. Ashida, 1970. Activation of prophenoloxidase. II. Activation by  $\alpha$ -chymotrypsin. *Archs biochem. biophys.* **139**: 143-148.
- Ratcliffe, N. A., C. Leonard, A. F. Rowely, 1984. Prophenoloxidase activation: nonself recognition and cell cooperation in insect immunity. *Science* **226**: 557-559.
- Saul, S. J., M. Sugumaran, 1987. Protease mediated prophenoloxidase activation in the haemolymph of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archs Insect Biochem. Physiol.* **5**: 1-11.
- Söderhäll, K., 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.
- Sugumaran, M., S. J. Saul, N. Ramesh, 1985. Endogenous protease inhibitors prevent undesired activation of prophenoloxidase in insect haemolymph. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **132**: 1124-1129.