

## *Vibrio fluvialis* 유래의 hemolysin 정제와 생화학적 특성

이종희 · 한정현 · 안선희 · 김선희 · 이은미 · 공인수\*

부경대학교 생물공학과

### Purification and characterization of biochemical properties of hemolysin from *Vibrio fluvialis*

Jong-Hee Lee, Jeong-Hyun Han, Sun-Hee Ahn, Sun-Hoi Kim, Eun-Mi Lee and In-Soo Kong\*

Department of Biotechnology and Bioengineering, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

#### Abstract

Hemolysin (VFH) of *V. fluvialis*, which is a pathogenic bacteria, causing watery diarrhea with vomiting, abdominal cramp, was purified. *V. fluvialis* was cultivated in BHI medium and the culture supernatant was precipitated by ammonium sulfate. The protein was purified by chromatographies on columns of DEAE-cellulose and Mono-Q. Molecular weight of the purified VFH was estimated as 79kDa by SDS-PAGE. The optimal temperature for a maximum hemolytic activity was at around 35°C and the activity was decreased at 40°C. Cytotoxicity of VFH was also investigated using RTG-2 cell line. LDH assay study showed that 50µg/ml of VFH release 80% of total cellular LDH (lactate dehydrogenase) from RTG-2 cell and microscopic observation also showed the morphological change of cell.

**Key words** – *Vibrio fluvialis*, Hemolysin, VFH, Cytotoxicity, RTG-2 cell

#### 서 론

*Vibrio* sp.는 해수 및 담수에서 발견되는 대표적 병원성 미생물로 어패류, 인체의 장에서 발견되는 gram 음성 세균이다. 인체에 감염되는 것으로 알려진 12종의 *Vibrio* sp. 가운데 잘 알려진 것이 *Vibrio cholerae* 이며[1,14], 장염, 식중독 및 패혈증의 원인균으로 알려져 있는 *V. parahaemolyticus* [9], *V. mimicus*[6], *V. vulnificus*[2,19], *V. fluvialis*[17] 등이 잘 알려져 있다. 이들 *Vibrio*로부터 여러 병원성 인자들이 발견 보고 되어 있고, 특히 심한 탈수가 주요 증상인 콜레

라를 일으키는 *V. cholerae*와 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*에 관한 연구에 집중되어 왔다. 탈수와 설사 등의 공통성을 가지고 있는 이들 병원균에서 여러 공통적인 pathogenic factor가 발견되어 왔으며, phospholipase[8,13, 20], protease[16], hemagglutinin[3,7], TDH (Thermostable direct hemolysin)[10], TRH (TDH related hemolysin)[11], Cholera Toxin (CT)[14] 등의 세포 상해성 인자들이 보고 되었다.

*V. fluvialis*는 1978년 Lee 등[17]에 의해 보고된 병원성 세균으로 감염시의 증상이 열, 탈수, 복통, 설사 등의 *V. cholerae*와 유사한 증상을 일으키며, 면역학적으로 *V. cholerae*의 CT와 동일한 독성이 보고된 바 있다[5]. *V. fluvialis*도 pathogenic에 관여하는 것으로 생각되는 여러 독성물질들

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 051-620-6185, Fax : 051-620-6180  
E-mail : iskong@mail.pknu.ac.kr

생산하고 있으나[21], 본 연구에서는 병원성의 지표로 여겨지는 hemolysin에 관하여 연구하였다. 일반적으로 hemolysin은 *V. parahaemolyticus*의 존재 유무를 확인하는 KP (Kanagawa phenomenon)의 지표로 사용되며[18] 환자의 검체에서 발견된 KP-negative *V. parahaemolyticus*에서도 TRH (TDH related hemolysin)가 발견되어서 이는 중요한 세포상해성 인자로 연구 보고된 바 있다[11].

*V. fluvialis* hemolysin 역시 이 균이 유발하는 증상으로 미루어 다른 *Vibrio sp.*에서와 같은 역할을 할 것으로 기대된다. 이러한 사실을 증명하기 위해 *V. fluvialis*로부터 hemolysin인 VFH를 정제하였고, 이를 무지개 송어 유래 RTG-2 세포주에 처리하여 세포 형태와 세포에 미치는 영향을 조사하였다.

#### 사용 균주 및 plasmid

Hemolysin을 분리정제하기 위해 ATCC 균주인 *V. fluvialis* (ATCC 33809)를 유전자 은행(KCTC : Korean Collection of Type Culture) 으로부터 분양을 받아 실험에 사용하였다. 사용 균주의 보관은 20% glycerol을 첨가하여 70°C에서 보관하였으며, 평판에 배양하여 37°C에서 12시간 배양후 액체배양의 종균으로 사용하였다.

*V. fluvialis*에서 hemolysin을 정제하기 위한 배지는 Difco사의 BHI (Brain Heart Infusion) 배지를 사용하였다.

#### Hemolysin의 정제

*V. fluvialis*로부터 hemolysin을 정제하기 위해 1L의 BHI에 전배양액을 약 1% 접종한 후 37°C에서 140cycle/min의 조건에서 24시간동안 진탕 배양하였다. 균체를 배양액에서 분리하기 위해 7,000×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 분리하였으며, 분리된 상층액에 591g/L의 황산 암모늄을 첨가하여 80% 포화도에서 8시간동안 정치한 후 다시 7,000×g에서 30분간 원심분리하여 침전된 단백질을 회수하여 약 60ml의 10mM Tris-HCl (pH7.5)에서 하루동안 투석을 실시하였다. 투석한 시료는 동결건조를 통해 농축하여 분말상태의 시료로 만든 후 -20°C에서 다음 실험까지 보관하였다. 분말 시료를 10mM Tris-HCl (pH7.5)로 미리 평형시켜둔 DEAE-cellulose (2×5cm)에 주입하여 흡착시키고 비흡착된 시료는 같은 완충용액으로 충분히 씻어주었다. 이 column을 NaCl이 함유된 Tris-HCl (pH7.5) 완충용

액을 사용하여 단계적으로(0~0.5M NaCl)로 용출하여 hemolysin 활성이 있는 분획을 모아 투석하여 농축하였다. 농축된 시료는 다시 같은 완충액으로 평형화되어 있는 Mono Q HR 10/10 column (Pharmacia)를 이용하여 0~0.5M NaCl을 linear gradient로 용출시켰다. 활성측정은 BBL사의 TSA II (5% sheep blood)에 paper disk를 사용하여 용출된 분획을 주입한 후 37°C에서 12시간 후 나타나는 hemolytic zone으로 판정하였고, 정제된 단백질의 양은 BSA를 표준물질로 사용하여 Bradford법[4]을 이용하여 측정하였다.

#### Hemolytic activity 측정

정확한 hemolytic 활성측정은 Honda 등[12]의 방법을 이용하여 정량하였다. 평판에서 활성이 확인된 분획을 모아 10mM Tris buffered saline (TBS: pH 7.5)로 세척한 토끼 적혈구세포를 4% (v/v)농도로 맞추어 hemolysin과 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1000×g에서 5분간 원심분리하여, 적혈구의 파쇄시 발생하는 hemoglobin의 양을 spectrophotometer를 이용하여 540nm에서 측정하였다. 0.1% Triton X-100 처리시에 적혈구로부터 방출되어 나오는 hemoglobin의 양을 100% 파쇄로 정의하고, 50%의 hemoglobin이 방출시의 흡광도를 1HU (hemolytic unit)로 정의하였다.

#### SDS-PAGE의 측정

정제된 단백질의 정제도와 분자량을 측정하기 위해 Laemmli의 방법으로 SDS-PAGE를 실시하였다[15]. Standard protein marker는 Amersham Biotech사로부터 구입하여 사용하였으며, 12%의 separating gel을 사용하여 120 voltage에서 약 2시간동안 전기영동을 실시한 후 Comassie brilliant R-250으로 염색 후 탈색하여, 전기영동된 단백질 band를 확인하였다.

#### 온도에 대한 영향

VFH의 hemolytic 활성에 대한 온도의 영향을 조사하기 위해, 여러 온도에서의 활성을 측정하였다. TBS 완충액에 4% (v/v)가 되게 토끼 적혈구세포를 조제하고 조제된 적혈구 현탁액과 2HU의 VFH용액을 각각 0.2ml 씩 혼합하여 20°C~40°C에서 5~60분간 반응을 시켰다. 그 후 위에 기

술한 방법과 동일한 방법으로 파쇄된 적혈구로부터 방출되어 나온 hemoglobin의 양을 540nm에서 측정하였다.

VFH의 세포독성 측정

Hemolysin이 어류유래세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여, rainbow trout gonadal fibroblast cell인 RTG-2 세포주(*Oncorhynchus mykiss*: CCL-55 ATCC)를 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, 0.2% fungizone, 0.035% sodium bicarbonate/L 가 함유된 Eagle's MEM 배지에서 전배양하였다. 300 μl (3×10<sup>5</sup> cell)의 세포를 48 well multiplate에 다시 배양한 후 정제된 VFH를 최종농도가 10~50 μg/ml되게 첨가하여 9시간 동안 반응 시키고, 이후 파쇄된 세포로부터 나오는 LDH의 양을 Vitros DT II chemistry system (Johnson & Johnson)을 이용하여 측정하였다. 대조구로 Triton X-100을 사용하여 RTG-2 세포가 모두 파쇄시킨후 LDH의 양과 비교 측정하였다. 또한 50 μg/ml의 VFH를 RTG-2 세포주에 혼합하여 4시간 후에 세포의 형태 변화를 독립현미경(Olympus IX70)으로 100배 배율에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

*V. fluvialis*의 hemolysin (VFH)의 정제

*V. fluvialis*로부터 hemolytic 활성을 가지고 있는 단백질을 순수 분리하였으며, VFH로 명명하였다. *V. fluvialis* 배양 상층액으로부터 황산 암모늄을 이용한 염석법, DEAE-cellulose ion exchange column과, Mono Q column을 이용하여 정제하였다. 배양 상층액에서 약 170mg의 단백질을 회수하였으며, 전체 용혈 활성은 33,660 (HU)를 나타내었고, 마지막 Mono Q column을 통하여 20 μg의 순수한 VFH를 정제할 수 있었다. 정제된 단백질의 비활성은 10,000HU/mg을 나타내었으며, 정제도(purification yield)는 49.3배였다.

정제된 단백질은 SDS-PAGE를 통해 순수도와 분자량을 측정하였으며, 이를 Fig. 1에 나타내었다. SDS-PAGE를 통해 확인된 hemolysin의 분자량은 약 79kDa의 크기를 보이는 것으로 나타났다. 이전에 보고된 바에 따르면 *V. cholerae* 유래의 hemolysin의 경우 82kDa의 크기로 세포 내에서 발현된 후 두 단계의 과정을 거쳐 약 65kDa의 크기

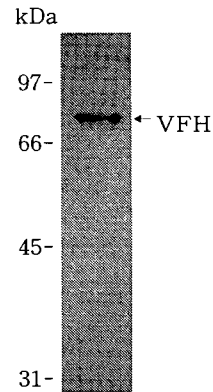


Fig. 1. SDS-PAGE of the purified hemolysin from culture supernatant of *V. fluvialis*. Arrow indicates the purified VFH.

로 세포 밖으로 분비되는 것으로 알려져 있으며, *V. mimicus*의 hemolysin의 경우도 이와 같은 유사한 경로를 거쳐 51kDa의 크기로 세포 밖으로 분비되는 것으로 보고되었다. 이러한 결과들과 비교해 볼 때 VFH는 다른 *Vibrio* sp. 유래의 hemolysin에 비해 비교적 큰 크기를 가지는 것을 알 수 있다.

온도가 VFH의 활성에 미치는 영향

온도에 따른 VFH의 용혈 활성을 측정한 결과 Fig. 2에서 보는 것과 같이 35℃에서 최대활성을 보였으며 20℃에서 35℃까지의 온도 변화시에는 상승하는 온도와 더불어

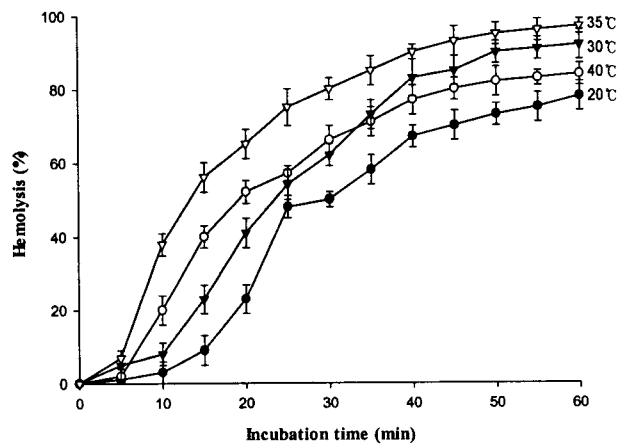


Fig. 2. Hemolytic activity by VFH with different temperature.

Washed rabbit erythrocytes were incubated hemolysin of 2 HU for 5 to 60 min and hemolysis was determined by absorbance at 540 nm.

용혈 활성이 비례하여 상승하였으나, 40℃에서는 용혈 활성이 감소 하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 VFH가 열 안정성이 없다는 것을 보여주는 것이며, 4℃에서 2시간 반응후 혈구세포를 세척하고 다시 35℃에서 재반응시에 용혈현상이 일어나는 것으로 보아 용혈현상 과정은 온도에 대하여 영향을 받으며, 용혈현상이 일어나기 전에 hemolysin이 적혈구 세포막에 결합하는 과정을 필요로 하는 것으로 생각된다. 이러한 현상은 이전에 보고된 *V. cholerae* E1 Tor의 hemolysin과 유사한 것으로 VFH 역시 같은 용혈기작을 가지고 있는 것으로 추정된다.

VFH가 RTG-2 cell에 미치는 세포독성

*Vibrio fluvialis*로부터 정제한 hemolysin, VFH가 세포에 미치는 세포독성을 rainbow trout gonadal fibroblast 세포주인 RTG-2 세포주를 이용하여 조사하였다. Fig. 3에서 보듯이 정제된 VFH (50 µg/ml)를 RTG-2에 약 4시간 처리 후에, 세포주가 구형으로 형태가 변형되었음을 알 수 있었다. 또한 VFH가 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 세포 사멸시 방출되어 나오는 LDH의 양을 측정하였으며,

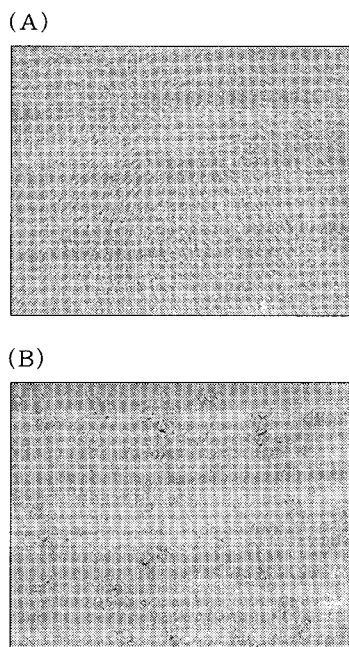


Fig. 3. Morphological changes of RTG-2 cell after treatment with *V. fluvialis* hemolysin. (A) Morphology of normal RTG-2 cells (magnification, × 100). (B) Morphology of cells incubated with VFH (magnification, ×100).

10~50 µg/ml의 정제된 VFH를 배양된 RTG-2 세포주에 처리한 후 4시간 동안 처리한 후에 상층액의 LDH 양을 비교하였다. 10 µg/ml의 VFH 처리시에는 약 16%의 세포 사멸을 나타내었고, 50 µg/ml의 VFH를 처리하였을 때 80%의 세포 사멸을 나타내었다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 세포 사멸율은 첨가된 VFH의 양에 따라 비례적으로 증가하였다. 따라서 *V. fluvialis*의 hemolysin인 VFH는 어류유래세포에 강력한 세포독성은 나타내는 중요한 세포 상해성 인자라고 생각된다. 또한 이러한 결과는 VFH가 강력한 세포독성을 가지고 있는 병원성 인자로서의 가능성을 보여주고 있다.

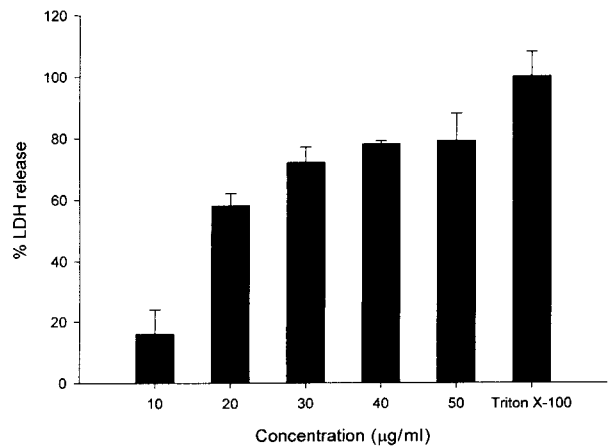


Fig. 4. LDH release on the cytotoxicity of RTG-2 cells after *V. fluvialis* hemolysin treatment.

The percentage of LDH retention by cells incubated with VFH is expressed as the percentage of LDH retained by control cells. Results are expressed as mean ± standard deviation of at least three independent determinations.

요 약

병원성 미생물인 *Vibrio fluvialis*로부터 hemolysin을 분리정제 하였다. 즉, hemolysin의 정제는 균 배양액을 황산암모늄, ion exchange chromatography를 행하였으며 SDS-PAGE를 통해 그 단백질의 크기가 약 79kDa임을 알게 되었다.

정제된 hemolysin (VFH)는 35℃에서 최적활성을 나타내었고, 40℃에서는 그 활성이 감소되었다. RTG-2 어류유래 세포주에 hemolysin (VFH)의 처리로 세포독성을 측정

한 결과 50  $\mu$ g의 VFH가 약 80%의 cell line을 사멸시켰다. 또한 현미경을 통한 관찰에서도 세포의 형태변화를 관찰할 수 있었다.

### 감사의 글

본 연구는 약수 학술 진흥재단의 지원으로 수행된 연구로써 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Attride, S. R. and D. Rawley. 1990. Cholera, in principles of bacteriology, viology and immunity, pp. 460-468, In Smith, G. R. and C. S. F. Edward (eds.), Vol. 3, Melbourne Auckland.
2. Blake, P. A., M. H. Merson, R. E. Weaver, D. G. Hollis and P. C. Heublen. 1979. Disease caused by marine *Vibrio*. *N. Engl. J. Med.* **300**, 1-6.
3. Booth, B. A., M. Boesman-Finkelstein and R. A. Finkelstein. 1984. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin. *Infect. Immun.* **45**, 558-560.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
5. Chikahara, M. and K. Hamada. 1998. Enterotoxigenic substance and other toxins produced by *Vibrio fluvialis* and *Vibrio furnissii*. *Jpn. J. Vet. Sci.* **50**, 865-873.
6. Davis, B. R., G. R. Faning, J. M. Madden, A. G. Steigerwatt, H. B. Bradford, H. L. Smith and D. J. Brenner 1981. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus*. *J. Clin. Microbiol.* **14**, 631-639.
7. Dotevall, H. G., G. Jonson-Stromberg, S. Sanyal and J. Holmgren. 1985. Characterization of enterotoxin and soluble hemagglutinin from *Vibrio mimicus*: Identity with *Vibrio cholerae* O1 toxin and hemagglutinin. *FEMS Microbiol. Lett.* **27**, 17-22.
8. Fiore, A. E., J. M. Michalski, R. G. Russel, C. L. Sears and J. B. Kapper. 1997. Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a phospholipase (lecithinase) produced by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **65**, 3221-3117.
9. Fujino, T., Y. Kuno, D. Nakada, A. Aoyama, K. Fukai, T. Mukai and T. Ueno. 1953. On the bacteriological examination of shirasu-food poisoning. *Med. J. Oskaa Univ.* **4**, 229-304.
10. Honda, T. and T. Iita. 1993. The pathogenicity of *Vibrio parahaemolyticus* and the role of the thermostable direct hemolysin and related hemolysin. *Rev. Med. Microbiol.* **4**, 106-113.
11. Honda, T., Y. Ni and T. Miwatani. 1988. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolation of kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin. *Infect. Immun.* **56**, 961-965.
12. Honda, T., Y. Ni, T. Miwatani, T. Adachi and J. Kim. 1992. The thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* is pore-forming toxin. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1175-1180.
13. Kang, J. H., J.H. Lee, J. H. Park, S. H. Huh and I. S. Kong. 1988. Cloning and identification of a phospholipase gene from *Vibrio mimicus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1394**, 85-89.
14. Kaper, J. B., A. Fasano and M. Trucksis. 1994. Toxins of *Vibrio cholerae*, pp. 145-176, In Wachsmuth, I.K. P.A. Blake, and Ø. Olsvik (eds.), *Vibrio cholerae* and cholera; *Molecular Global Perspectives*. ASM Press Inc., Washington, D.C. 145-176
15. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
16. Lee, J. H., G. T. Kim, J. Y. Lee, H. K. Jun, J. H. Yu and I. S. Kong. 1998. Isolation and sequence analysis of metalloprotease gene from *Vibrio mimicus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1384**, 1-6.
17. Lee, J. V., P. Shread and A. L. Furniss. 1978. The taxonomy of group F organism: relationships to *Vibrio* and *Aeromonas*. *J. Appl. Bacteriol.* **45**:ix
18. Miyamoto, Y., Y. Obara, T. Nikkawa, S. Yamai, T. Kato, Y. Yamada and M. Ohashi. 1980. Simplified purification and biophysicochemical characteristics of kanagawa phenomenon associated hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **28**, 567-576.
19. Park, S. D., H. S. Shon and N. J. Joh. 1991. *Vibrio vulnificus* septicemia in Korea: Clinical and epidemiological finding in seventy patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* **24**, 397-403.
20. Shinoda, S. H. Matsuoaka, T. Tsuchie, S. I. Miyoshi,

- S. Yamamoto, H. Taniguich and Y. Mizuguchi. 1991. Purification and characterization of a lecithin dependent hemolysin from *Escherichia coli* transformed by a *Vibrio parahaemolyticus* gene. *J. Gen. Microbial.* **137**, 2705-2711.
21. Wall, V. W., A. S. Kreger and S. H. Richardson. 1984. Production and partial characterization of *Vibrio fluvialis* cytotoxin. *Infect. Immun.* **46**, 773-777.

(Received July 8, 2002; Accepted August 21, 2002)