

염전위충(*Haemonchus contortus*) 생식기관의 DNase 활성에 관한 연구

곽 동 미*

워싱턴주립대학교 수의과대학
(게재승인: 2004년 6월 30일)

Study on DNase activity specific from *Haemonchus contortus* reproductive tissue

Dongmi Kwak*

Department of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine,
Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA

(Accepted: June 30, 2004)

Abstract : DNase activity in *Haemonchus contortus* reproductive tissue was characterized and compared to that in whole worm. DNase activity in reproductive tissue was detected throughout pHs 4-10 with high activity under acidic conditions. The activity was not inhibited by 10 mM EDTA at pH 5.0, but largely inhibited by pH 7.0. The activity produced DNA fragments with mixtures of 3'-hydroxyls (OH) and 3'-phosphates (P) at each pH. Three distinct DNase activities were identified and had M_r s of 34, 36 and 38.5 kDa in zymograms, which were distinguished according to pH requirement and sensitivity to EDTA. Among them, the 36 kDa reproductive tissue DNase had predominant activity at pH 5.0, but very weak at pH 7.0, and this activity was not inhibited by EDTA at pH 5.0. These characteristics of the 36 kDa reproductive tissue DNase resemble those of classic acidic DNases. In contrast, 36 kDa whole worm DNase activity had high activity at both pH 5.0 and 7.0. While the 36 kDa DNase activity at pH 5.0 was similar in both reproductive tissue and whole worm samples, the activity at pH 7.0 was predominantly detected in whole worm sample. This suggests that the 36 kDa whole worm DNase at pH 5.0 differs from that at pH 7.0. Thus, results indicate that the EDTA-insensitive 36 kDa DNase at pH 5.0 is specific for *H. contortus* reproductive tissue.

Key words : reproductive tissue, DNase, activity, *Haemonchus contortus*, parasite

서 론

염전위충(*Haemonchus contortus*)은 세계적으로 분포하고 있으며 반추수의 제4위에 기생하는 선충으로 반추수의 기생충 중 가장 병원성이 심한 기생충 중의 하나이다 [12]. 이 기생충으로 기인하는 병원성은 흡혈에 의한 빈혈이 대표적이다. 특히, 어린 동물에는 자주 치명적이기도 하며 그렇지 않은 동물에는 생산성의 손실 등이 나타난다. 이들에 대한 치료는 주로 화학약제를 사용

하였으며 그동안 성공적으로 이용되어 왔다. 그러나 최근 이들 약제에 대한 내성이 염전위충 및 다른 선충류에서 심각한 상태에 이르고 있으며 현재 사용되고 있는 대부분의 약제에 대한 내성을 나타내고 있다 [8]. 치료를 어렵게 만드는 다른 이유는 현재까지 효과적으로 사용되는 백신이 없다는 것이다. 유일하게 백신으로 적용되는 것은 자충(larvae)을 방사선으로 조사하여 사용하는 것인데 소폐충(*Dictyocaulus viviparus*)과 십이지장충 등에 극히 제한적으로 그리고 일부 지역이나 나라에서만

*Corresponding author: Dongmi Kwak

Department of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA

[Tel: 1-509-335-6332, Fax: 1-509-335-8529, E-mail: dmkwak@vetmed.wsu.edu]

사용하고 있는 실정이다 [6, 7]. 그러므로 이들 기생충에 대한 기본적인 연구가 더욱 필요하며 약제 내성을 극복할 새로운 치료 목표를 찾는 것이 중요한 과제이다.

새로운 치료 목표를 찾기 위해서는 기존에 알려진 약의 기전을 잘 이해함으로써 다른 치료 목표를 찾는 것도 한 방법이 될 수 있다. 현재 가장 많이 사용되고 있는 약제의 하나는 benzimidazole 계열인데 약리 기전은 기생충의 소화관(intestine)에서 β -tubulin과 결합하여 microtubule 형성을 저해하여 기생충에 해를 준다고 알려져 있다 [1]. 그러나, Jasmer 등 [4]의 연구에서 염전위충에 감염된 양에 benzimidazole 계열인 fenbendazole을 투여한 결과 이들 기생충의 소화관에서 microtubule 형성이 저해됨과 이어서 일련의 변화를 발견하였다. 먼저, 배설 소포들(secretory vesicles)의 배설기전이 억제되어 이들 소포들이 소화관 안에 축적이 되는 것이며 그 다음으로 배설 소포안의 성분들이 소화관 세포 전체로 확산되는 것이었다. 이들의 세포확산은 소화관의 핵에 있는 DNA가 약 180 bp 크기로 분해되는 현상이 일어났으며 마지막으로 소화관의 조직에서 육안적인 해리가 발견되었다. 소화관 조직의 육안적인 해리의 원인에 대한 추측은 명확하지 않으나, DNA 분해는 세포내에 있는 DNase에 의한 것으로 보여진다. 여기서 소화관의 DNA를 분해하는 DNase들을 찾고 그 기전을 밝힌다면 이 기전 가운데 한 단계를 목표로 삼아 기생충을 치료할 새로운 방법을 찾을 수 있을 것으로 추측된다.

이 기생충 소화관의 DNA를 분해하는 DNase를 찾기 위하여 저자 등은 먼저 이 기생충에 있는 DNase를 밝히기 시작하였다 [5]. 연구를 시작하였을 때 포유류에서 알려진 전통적인 DNase들의 범주(중성 또는 산성 DNase)에서 맞추어 DNase 분류를 하였다. 중성 DNase(예, DNase I)는 활성을 위해 중성 pH(약 pH 7.0)와 금속 이온(Ca^{++} 혹은 Mg^{++})을 필요로 하며 DNA를 분해할 때 3'-OH를 만든다 [2]. 반면, 전통적인 산성 DNase(예, DNase II)는 산성 pH(약 pH 5.0)를 요구하며 금속이온을 필요로 하지 않으며 DNA를 분해할 때 3'-P를 만든다 [2]. 이들의 특성이 포유류에서 알려진 전통적인 DNase들의 분류이다. 하지만 연구를 시작한 후 예상보다 훨씬 복잡한 특성의 DNase들을 염전위충에서 확인하였다 [5]. 기생충 전체 균질액(whole worm lysate)과 소화관에서 3 M_r의 DNase들(34, 36 및 38.5 kDa)의 활성이 확인되었다. 그러나, 이들 중 어떤 DNase들의 생화학적 특성은 전통적인 DNase들의 특성과 다름이 밝혀졌으며 전체적으로 염전위충에서 7가지의 다른 DNase들이 확인되었다 [5]. 그 중 흥미로운 것은 여러 DNase들이 포유동물에서 알려진 전통적인 DNase들의 범주에서 벗어난다는 것이었다. 특히, 기생충 전체 균질액에서

밝혀진 36과 38.5 kDa DNase들은 pH 5.0과 7.0에서 금속이온의 chelator인 EDTA(10 mM)에 영향을 받지 않았다. 반면, 소화관의 DNase들은 EDTA의 존재 하에서 대부분의 활성이 억제되었다. 따라서, 기생충 전체 균질액에서 활성이 뛰어난 대부분의 DNase들은 세포분열이 왕성한 생식기관(reproductive tissue)에서 유래하였다고 가정되었다.

이 연구는 생식기관 특이의 DNase를 밝히고 그 특성을 전체 균질액의 DNase와 비교분석하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

기생충 샘플

염전위충의 성충은 실험실에서 유지되어온 염전위충의 자충을 양에 감염한 후 25일 후에 도달하여 제 4위에서 얻었다 [3]. 생식기관은 성충으로부터 현미경 하에서 추출하였다. 모든 과정은 얼음 위에서 수행하였다. 추출된 생식기관은 용해용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 10 μ M E-64, 1 μ M pepstatin A)에서 유리 균질기(glass homogenizer)로 용해되었다. 이 용해액은 10,000 g에서 원심분리하여 상청액을 실험에 사용하였다. 양성 대조군으로 기생충 전체를 사용하였으며 위의 언급된 용해 용액으로 균질액을 만들었다. 음성 대조군으로 양의 제 4위 내용물, 용해용액 및 양의 혈청이 사용되었다.

플라스미드 DNA 분해 실험

DNase 활성을 조사하기 위하여 먼저 plasmid DNA 분해 실험을 하였다 [5]. 이를 위하여 기생충 샘플(400 ng)을 plasmid DNA(400 ng)와 여러 조건(pH 및 이온) 하에서 배양하였으며 20 μ l 반응으로 실행하였다. DNase 활성에 있어 pH 영향을 보기 위하여 pH 4.0에서 10.0까지(20 mM Tris-HCl) 사용하였으며 2 mM $CaCl_2$ 와 2 mM $MgCl_2$ 의 존재 하에서 배양하였다. 배양은 37°C에서 1시간(기생충 전체 균질액), 혹은 4시간(생식기관과 음성 대조군)동안 하였다. 배양한 후 70°C에서 10분간 처리함으로써 DNase를 불활화하였다. 모든 샘플들을 agarose gel(0.8%)에서 전기영동하였으며 ethidium bromide로 염색하여 자외선광으로 plasmid DNA 분해정도를 확인하였다. 양성 대조군과 음성 대조군도 동일하게 처리하였다.

DNase 활성에 대한 억제제의 영향을 보기 위하여, 실험은 pH 5.0과 7.0에서 실시하였으며 금속이온의 필요성을 보기 위하여 10 mM EDTA를 사용하였고, 또한 비특이적인 DNase 억제제인 aurintricarboxylic acid(ATA, 100 μ M)를 사용하였다.

Zymogram에 의한 DNase의 M_r 결정

기생충 샘플에 있는 DNase의 M_r 을 알기 위하여 그리고 각 DNase의 생화학적 특성(pH 및 이온)을 알기 위하여 zymogram gel 분석을 실행하였다 [6]. Zymogram은 기존의 SDS-PAGE에 DNase의 기질인 salmon sperm DNA(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)가 첨가되었다. 먼저, 샘플을 loading buffer(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bovine serum albumin, 0.01% bromophenol blue)와 37°C에서 10분간 처리한 후 전기영동하였다. 전기영동 후 변성된(denatured) DNase의 활성을 회복하기 위하여 zymogram gel을 renaturation buffer(40 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% casein)로 2시간 동안 세척하면서 SDS를 제거하였다. 그리고 나서 gel을 pH 5.0 혹은 7.0(40 mM Tris-HCl, 0.02% sodium azide)에서 배양하였으며, 이때 각각의 pH에서 2 mM CaCl_2 과 2 mM MgCl_2 존재 하에서 혹은 10 mM EDTA 존재 하에서 배양하였다. Ethidium bromide 존재 하에서 40시간을 배양한 후 자외선광으로 DNA 분해를 확인하였으며 DNase 활성이 존재하는 곳에는 자외선광에서 검게 나타나며 DNA가 분해되지 않은 곳에는 ethidium bromide에 염색된다. DNase의 M_r 은 표준 분자량(Rainbow molecular mass standards, 14.3-220 kDa, Amersham, Piscataway, NJ)을 이용하여 결정하였다.

Plasmid DNA 3'-말단 확인

DNase에 의해 분해된 plasmid DNA의 3'-말단(3'-OH 혹은 3'-P)을 확인하기 위하여 다음의 일련의 실험을 실시하였다 [5]. 먼저, plasmid DNA(1 μg)가 위에서 언급한 것처럼 DNase가 있는 샘플(0.4 μg)에 의해 pH 5.0 혹은 7.0에서 2 mM CaCl_2 과 2 mM MgCl_2 존재 하에서 분해되었다. 분해된 plasmid DNA는 두 부류로 나뉘어 졌는데(각각 400 ng plasmid), calf intestinal alkaline phosphatase(4 U)를 처리한 군과 처리하지 않은 군이었다. 여기서 phosphatase는 3'-P DNA 말단을 3'-OH로 전환시키며 3'-OH를 지닌 말단에는 영향을 미치지 않는다. Phosphatase를 처리함으로써 각 샘플에 존재하는 모든 3'-말단(3'-OH와 3'-P)을 확인할 수 있다. Phosphatase 처리는 50 μl 반응으로 37°C에서 1시간동안 진행하였으며, 그 후에 70°C에서 10분간 처리함으로써 phosphatase를 불활화하였다. 다음으로, phosphatase 처리된 군과 그렇지 않은 군의 각각 20 μg plasmid(2.5 μl)가 6 U terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT, Indianapolis, IN, USA)와 10 μl 반응으로 37°C에서 1시간동안 진행하였다. TdT는 3'-OH를 가진 DNA 말단에 nucleotides를 연결한다. 그러나 이 효소는 3'-P를 가진 DNA 말단에는 영향을 미치지 못한다. 여기서 사용된 nucleotides는 biotinylated

dideoxyadenosine triphosphate (Bt-ddATP, 250 pmol, PerkinElmer, Boston, MA, USA)였다. 이들은 TdT 용액(200 mM potassium cacodylate, pH 6.6, 5 mM CoCl_2 및 phosphatase 억제제인 10 mM sodium orthovanadate)에서 10 μl 반응으로 37°C에서 1시간동안 반응하였고, 그 후 70°C에서 10분간 처리함으로써 반응을 멈추었다. 각각의 반응들은 agarose gel(0.8%)에서 전기영동되었으며, 그 후 DNA 단편들은 nylon membrane(Roche)으로 옮겨졌다. 그 membrane은 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase(1:1000 희석, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)로 처리되었다. 반응의 확인은 enhanced chemiluminescence detection system(Amersham biosciences, Piscataway, NJ, USA)으로 하였고 신호는 X-ray film에 녹음되었다. 그리고, 각 반응의 신호를 chemilmager 4000(Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)으로 정량하였으며 phosphatase 처리된 것(3'-OH와 3'-P)의 신호를 처리되지 않은 것(3'-OH)의 신호로 나누어 비율을 얻었으며 그 비율로 분해된 DNA 3'-말단이 3'-OH인지 혹은 3'-P인지, 아니면 혼합되어 있는지를 확인하였다. 비율은 두 번의 반복실험에 의한 평균으로 표시되었다. 중성 DNase I의 3'-말단 비율은 1.0이었다 [5]. 이것은 모든 3'-말단이 3'-OH임을 말하는 것이며 산성 DNase II의 3'-말단 비율은 34.0이었다 [5]. 이것은 모든 3'-말단이 3'-P임을 말하는 것이다. 그리고, 비율의 값이 1.0과 34.0 사이에 있으면 3'-말단이 3'-OH와 3'-P가 같이 섞여 있음을 의미한다.

결 과

pH 영향

기생충 생식기관의 DNase 활성은 pH 4.0에서 10.0까지 넓은 범위에서 나타났으나, 산성 pH에서 DNase 활성이 높게 나타났(Fig. 1). 생식기관 자체에서 genomic DNA가 어느 정도 있는지를 알기 위하여 plasmid DNA 없이 생식기관만으로 전기영동을 하였는데(Fig. 1, lane S), 확인할 수 없을 정도의 아주 미량의 genomic DNA가 확인되었다. 그러므로 ethidium bromide에 염색된 것은 plasmid DNA에 기인한 것임을 알 수 있었다.

양성 대조군으로 기생충 전체 균질액을 사용하였다. 이 샘플에서도 DNase 활성은 pH 4.0에서 10.0까지 넓은 범위에서 나타났으나 산성 pH에서 활성이 높게 나타났다. DNase 활성은 전체 균질액에서 생식기관보다 높게 나타났다. Fig. 1은 전체 균질액이 1시간 그리고 생식기관이 4시간 배양된 결과를 보여 준다.

음성 대조군으로 양의 제 4위 내용물과 샘플이 없는 용해용액을 사용하였다. Fig. 1에서 나타난 것과 같이

plasmid DNA의 분해는 일어나지 않고 분해되지 않은 2.5와 4 kbp의 두 plasmid DNA만 보여진다. 그러므로

기생충의 샘플에서 확인된 DNase 활성은 기생충에서 기인한 것임을 나타낸다.

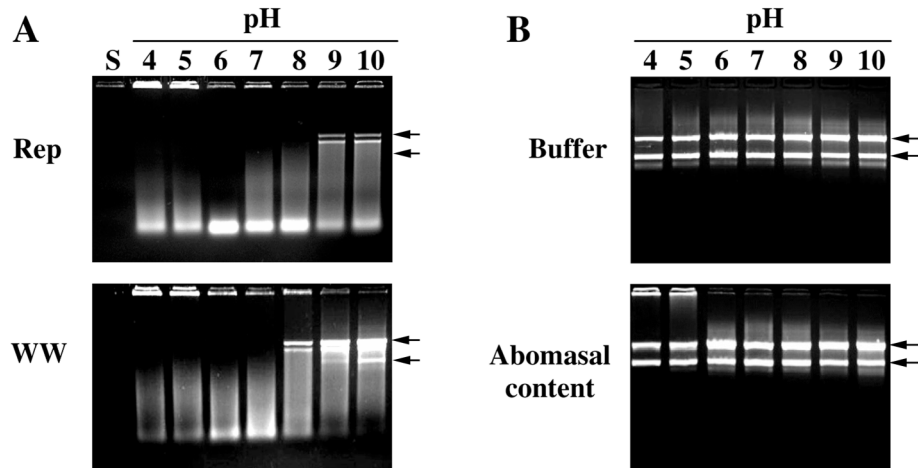


Fig. 1. pH effects on *Haemonchus contortus* DNase activities. Panel A. Samples (400 ng protein) from *H. contortus* reproductive tissue (Rep) or whole worm (WW) were incubated with plasmid DNA (400 ng) at 37°C for 4 hr (Rep) or 1 hr (WW) in buffers at pH 4.0 to 10.0 containing 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂. S, samples of reproductive tissue or whole worm without plasmid. Panel B. Lysis buffer without sample or abomasal contents (400 ng) were incubated as in Panel A for 4 hr as negative controls. The digested products were analyzed in agarose gel (0.8%) and visualized by ethidium bromide staining. Arrows on the right refer to estimated sizes of two forms of DNA in uncut plasmid at 4 (upper) and 2.5 (lower) kilo base pairs, respectively.

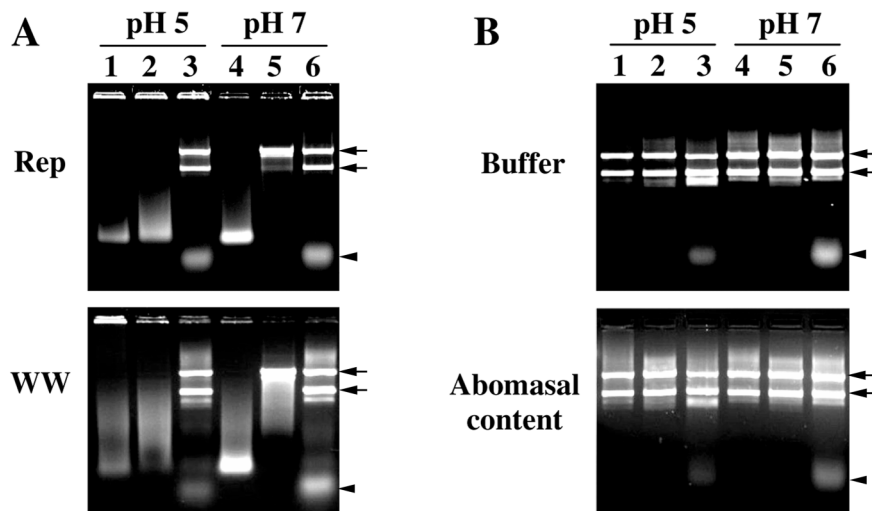


Fig. 2. Effects of EDTA and aurintricarboxylic acid (ATA) on *Haemonchus contortus* DNase activities. Panel A. Samples (400 ng protein) from *H. contortus* reproductive tissue (Rep) or Whole worm (WW) were incubated plasmid DNA (400 ng) at 37°C for 4 hr (Rep) or 1 hr (WW) in buffers at pH 5.0 (lanes 1-3) or 7.0 (lanes 4-6) containing 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ (lanes 1 & 4), 10 mM EDTA (lanes 2 & 5) or 100 μM ATA with 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ (lanes 3 & 6). Panel B. Buffer without sample or abomasal contents (400 ng) were incubated as in Panel A for 4 hr as controls. The digested products were analyzed in agarose gel (0.8%) and visualized by ethidium bromide staining. Arrows on the right refer to estimated sizes of two forms of DNA in uncut plasmid at 4 (upper) and 2.5 (lower) kilo base pairs, respectively. The arrow head points to background staining that was caused by ATA.

DNase 활성에 대한 억제제의 영향

DNase 활성에 대한 억제제들의 영향은 Fig. 2에서 보여진다. 생식기관의 DNase 활성은 pH 5.0에서 10 mM EDTA에 억제되지 않았지만 pH 7.0에서 EDTA에 거의 대부분의 활성이 억제되었다. 알려진 거의 모든 DNase의 활성을 억제하는 ATA에 대해서는 생식기관에서 보여진 활성이 pH 5.0과 7.0에서 거의 모두 억제되었다.

양성 대조군인 전체 균질액에서는 DNase 활성이 pH 5.0에서 EDTA에 거의 영향을 받지 않았으나, pH 7.0에서 활성이 EDTA에 부분적으로 억제되었다. 그리고 ATA에 대해서는 거의 모든 활성이 억제되었다.

음성 대조군으로 양의 제 4위 내용물과 샘플이 없는 용해용액을 사용하였으며 plasmid DNA의 분해는 거의 보여지지 않았다.

Zymogram gel 분석

Zymogram gel(200 µg/ml의 salmon sperm DNA를 포함하는 10% SDS-PAGE)에서 분리된 기생충 샘플의 DNase의 M_r 를 결정하고 각각에 대한 생화학적 특성을 결정하였다(Fig. 3). 기생충의 생식기관에서 DNase 활성이 3 M_r (34, 36 과 38.5 kDa)에서 나타났다. 2 mM $CaCl_2$ 와 2 mM $MgCl_2$ 존재하의 pH 5.0에선 34와 36 kDa DNase가 확인되었으며 38.5 kDa DNase는 아주 미약하게 나타났다. 더 오랜 시간의 배양으로 38.5 kDa DNase는 선명히 확인되었다. 확인된 DNases중 36 kDa DNase의 활성이 가장 높게 나타났다. pH 7.0에선 34와 36 kDa

DNase 활성이 약하게 확인되었고, 이 중 36 kDa DNase 활성은 pH 5.0에 비하여 현저하게 약화되었다.

전체 기생충 균질액의 DNase는 34, 36과 38.5 kDa에서 확인이 되었고, 이들의 활성은 pH 5.0와 7.0에서 비슷하게 나타났다. 특이한 것은 pH 5.0에서 확인된 생식기관의 36 kDa DNase 활성은 기생충 전체 균질액의 pH 5.0에서 확인된 36 kDa DNase 활성과 거의 비슷함을 보여 주었다는 것이다. 그러나 생식기관의 36 kDa DNase 활성이 pH 7.0에선 확인이 되지 않았으며, 기생충 전체 균질액에서 확인된 36 kDa DNase 활성은 pH 7.0에서도 확인되었다.

다음으로, 각 DNase의 활성에 금속이온이 필요한지를 알기 위하여 10 mM EDTA 존재하에서 배양을 하였다. 생식기관은 EDTA 존재하의 pH 5.0에선 36 kDa DNase가 유일하게 확인되었다. 이것은 36 kDa DNase는 활성을 위하여 금속이온을 필요로 하지 않음을 나타낸다. 그러나 34와 38.5 kDa DNase는 활성을 위해 금속이온이 필요함을 보여준다. 반면, EDTA 존재하의 pH 7.0에선 어떤 DNase도 확인되지 않았다. 이것은 pH 7.0에서 확인된 모든 DNase들이 활성을 위해 금속이온을 필요로 함을 보여준다. 반면, 기생충 전체 균질액의 DNase에서는 36과 38.5 kDa DNase의 활성이 pH 5.0와 7.0에서 EDTA에 의해 활성이 억제되지 않았다.

반면, 음성 대조군으로 사용된 양의 제 4위 내용물과 양의 혈청에는 DNase 활성이 확인되지 않았다. 그러므로 위에서 확인된 DNase들은 기생충 특이적임을 나타낸다.

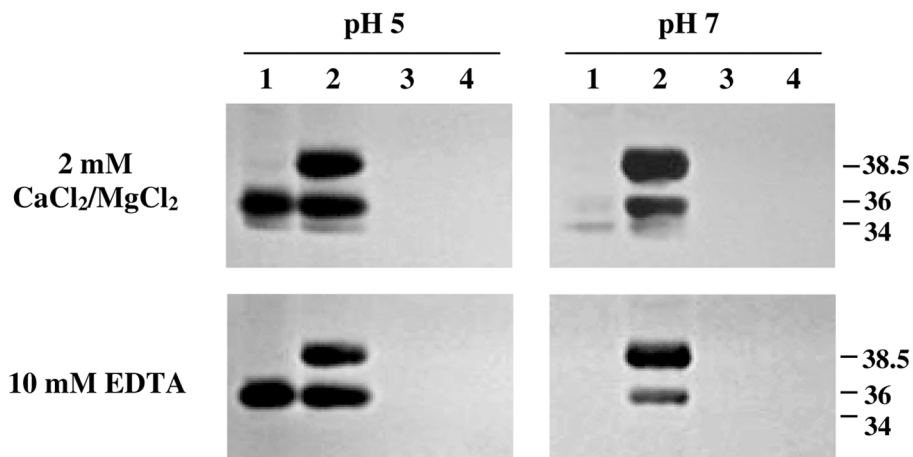


Fig. 3. Zymographic analysis of DNase activity in *Haemonchus contortus*. Samples (50 µg protein) of reproductive tissue (lane 1), whole worm (lane 2), abomasal contents (lane 3) or sheep serum (lane 4) were separated by SDS/PAGE (10% gel containing 200 µg/ml salmon sperm DNA) and incubated in buffers (pH 5.0 or 7.0) containing 2 mM $CaCl_2$ and 2 mM $MgCl_2$ or 10 mM EDTA. M_r s of DNases were estimated by staining the gel with ethidium bromide and visualizing by UV illumination. Molecular markers are indicated in kDa on the right.

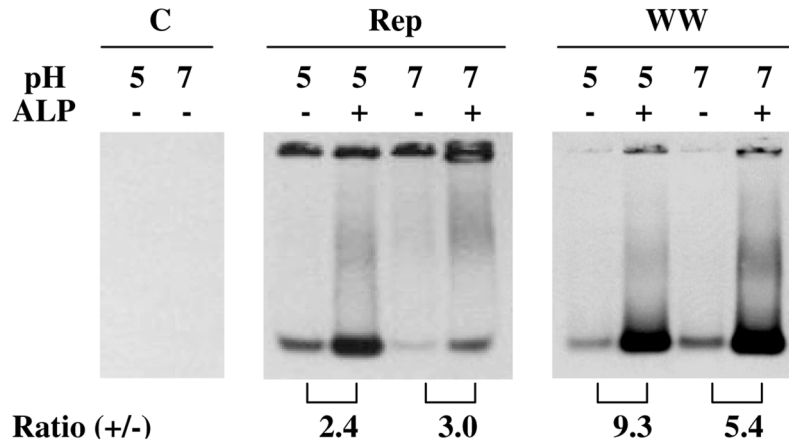


Fig. 4. 3'-End labeling of DNA fragments produced by *Haemonchus contortus* DNase activities. Plasmid DNA was digested by *H. contortus* lysates (400 ng protein) from reproductive tissue (Rep) or whole worm (WW) as described in Fig. 1. Fragments were treated with (+) or without (-) alkaline phosphatase (ALP) at 37°C for 1 hr. Samples were then subjected to 3'-end labeling with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). DNA (20 ng) separated on an agarose gel (0.8%) was transferred to nylon membranes. Labeled ends were detected as described in methods. Lane C, reactions lacking worm lysates. Densitometric measures were done on exposures that produced detectable signal in each lane used to generate end labeling ratios (see methods; average of duplicate results) of densitometric signal for samples treated with (+) or without (-) ALP.

Plasmid DNA 3'-말단 확인

생식기관의 DNase가 어떤 3'-말단(3'-OH 혹은 3'-P)을 생산하는지를 확인하기 위하여 3'-말단 확인 실험을 하였다(Fig. 4). 기생충의 생식기관의 3'-말단은 phosphatase 처리하지 않았을 때에 표시가 있었다. 이것은 3'-말단에 3'-OH가 있다는 것을 나타낸다. DNase에 의해 생성된 3'-OH가 pH 5.0과 7.0에서 어느 정도인지를 수치적으로 표시하기 위하여 phosphatase를 처리하지 않은 신호를 처리한 신호로 나누어 백분율(%)을 구하였다. 각 신호의 비율은 두 번의 반복 실험한 결과의 평균으로 표시하였다. 생식기관에서의 3'-말단 비율은 pH 5.0과 7.0에서 각각 2.4와 3.0이었다. 비율 2.4와 3.0은 존재하는 3'-말단이 3'-OH와 3'-P가 혼합되어 있다는 것을 의미하며, 비율 2.4는 약 42%의 3'-말단이 3'-OH임을 나타내고 비율 3.0은 약 33%가 3'-OH임을 나타낸다.

기생충 전체 균질액의 비율은 pH 5.0과 7.0에서 각각 9.3과 5.4이었다.

음성 대조군으로 사용된 기생충 샘플이 없는 plasmid DNA에서는 신호가 거의 확인되지 않았다.

고 찰

염전위충의 생식기관 특이의 DNase를 조사하기 위하여 생식기관 균질액과 기생충 전체 균질액의 DNase이 활성을 비교 분석하였다. 생식기관의 DNase 활성은 넓

은 pH 영역에서 나타났으며 산성 pH에서 비교적 높게 나타났다. 또한, 이 활성은 산성 pH에서 EDTA에 억제되지 않았으나 중성 pH에선 EDTA에 억제되었다. 생식기관의 DNase 활성이 나타낸 3'-말단의 비율은 pH 5.0과 7.0에서 각각 3'-OH와 3'-P가 혼합되어 있음을 나타내었으며 이것은 서로 다른 특성의 DNase에 기인한 것으로 보여진다. 생식기관에서 세 개의 다른 DNase 활성이 확인되었다. 그 활성은 산성과 중성 pH에서 활성의 정도는 다르지만 34, 36, 그리고 38.5 kDa DNase에서 나타났다. 특히, 36 kDa DNase는 산성 pH에서 지배적인 활성으로 나타났으며 그 활성이 EDTA 존재 하에서도 억제되지 않았다. 그러나, 중성 pH에서 36 kDa DNase 활성은 현저하게 줄었다. 위의 특성으로 볼 때 생식기관의 36 kDa DNase는 포유동물에서 나타난 전통적인 산성 DNase II의 특성과 비슷함을 나타내었다. 반면, 기생충 전체 균질액에서 나타난 36 kDa DNase는 산성과 중성 pH에서 활성이 나타났으며 그 활성은 EDTA 존재 하에서도 억제되지 않았다. 위의 특성으로 볼 때 전체 균질액의 산성 pH에서 확인된 36 kDa DNase는 생식기관 유래의 DNase로 보여지나 중성 pH에서 확인된 36 kDa DNase는 생식기관 이외의 다른 조직에서 유래했음을 의미한다.

이 연구를 통하여 염전위충에서 조직 특이의 DNase를 연구한 결과 전체 균질액의 36 kDa DNase는 산성과 중성 pH에서 두 개의 다른 DNase활성에 의한 것임을

보여 주었다. 이 발견은 지난 연구 [5]에서 발견된 7개의 다른 염전위충의 DNase에 새로운 하나를 더 추가하게 되었다. 이것은 기생충 체내에서 각각의 DNase들이 다양한 역할을 할 것임을 추측하게 한다. 동물체내에서 다양한 DNase들이 존재할 수 있다는 것은 자유생활 기생충인 *Caenorhabditis elegans*에서도 밝혀졌으며 모두 6개의 DNase 유전자들이 보고되었다 [9, 10, 13]. 각 DNase에 대한 생화학적 특성은 연구되지 않았으나, 알려진 모든 DNase 유전자들은 programmed cell death(apoptosis)에 관여하는 것으로 알려져 있으며 확인되지 않은 더 많은 DNase가 이 기전에 관여하고 있음이 보고되었다. 따라서 염전위충에서 지금까지 확인된 8개의 다른 DNase는 뜻 밖의 많은 발견은 아닌 것으로 추정된다.

기생충 전체 균질액의 EDTA에 저항성을 나타내는 38.5 kDa DNase는 위에서 언급한 것과 같이 생식기관에서도 확인되지 않았으며 소화관 [5]에서도 확인되지 않았다. 이것은 36 kDa DNase가 DNase의 활성이 활발하지 않을 것으로 추측되는 기생충의 외피(cuticle)나 근육(muscle)조직에서 유래했을 것으로 추정된다. 이 38.5 kDa DNase는 산성과 중성 pH에서 EDTA에 활성이 억제되지 않았다. 이것이 하나의 DNase에서 유래한 것인지 아니면 두 개 이상의 것에서 유래한 것인지 아직 밝혀지지 않았으나, 이 DNase가 중성 pH에서 EDTA에 활성이 억제되지 않았다는 것은 이 기생충 특이의 발견으로 보여지며 다른 생물체에선 보고되지 않은 새로운 특성의 DNase임을 나타낸다. 포유류에서 밝혀진 대부분의 DNase들은 산성 혹은 중성 DNase로 분류된다. 산성 DNase(DNase II)는 산성 pH를 요구하며 금속이온을 필요로 하지 않으며 3'-P를 생산하며 중성 DNase(DNase I)는 중성 pH를 요구하며 금속이온을 필요로 하며 3'-OH를 생산한다 [2, 5]. 그러나, 포유류에서 알려진 비전통적인 DNase의 유일한 예로는, 산성 pH에서 EDTA에 활성이 억제되는 DNase가 3'-OH를 지배적으로 생산하는 DNAS1L2가 사람에서 보고되었다 [11]. DNAS1L2는 DNase I과 단백질 구조에서 71% 유사성을 지니고 있으며 DNA에 결합하는 부위와 촉매작용을 하는 부위와 금속이온과 결합하는 아미노산 부위가 DNase I과 완전히 일치 하지만 산성 pH를 요구하며 EDTA에 활성이 억제되고 3'-OH를 생산한다 [11]. 이 DNase가 어떻게 산성 pH를 요구하는지는 알려져 있지 않다. 기생충 전체 균질액의 비율은 pH 5.0과 7.0에서 각각 9.3과 5.4이었는데, 비율 9.3과 5.4는 존재하는 3'-말단이 3'-OH와 3'-P가 섞여 있다는 것을 의미하며, 비율 9.3은 약 11%가 3'-OH이고 비율 5.4는 약 19%가 3'-OH 임을 나타낸다. 그러므로 이 결과는 기생충 전체 균질액의 DNase가 생식기관의 DNase보다 3'-OH를 더 적게 생산함을 의미한

다. DNAS1L2와 염전위충의 예에서 보여지듯이 비전통적인 DNase들이 지금까지 알려진 것들보다 훨씬 더 많이 존재할 것으로 추측된다.

이 연구에서 보여지듯이 염전위충은 다양한 특성의 DNase들을 함유하고 있음을 보여주며 비전통적인 특성을 지닌 여러 개의 DNase들도 밝혀졌다. 이 가운데 숙주동물에서 발견되지 않는 기생충 특이의 DNase들은 면역학적인 항원이나 화학약제의 목표로 사용될 수도 있을 것으로 추측이 된다. 또한, 생체 내에서 이렇게 다양한 DNase들의 생물학적 역할을 규명하는 것과 fenbendazole에 기인된 소화관의 DNA fragmentation [4]에 관여하는 DNase를 밝히는 것은 앞으로의 연구과제로 남아 있다.

결 론

염전위충의 생식기관 특이의 DNase 활성을 조사하기 위하여 기생충 전체 균질액의 DNase 활성화와 비교 분석하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) 생식기관에서 34, 36 및 38.5 kDa DNase 활성이 확인되었다.
- (2) 생식기관의 36 kDa DNase는 활성을 위해 산성 pH를 요구하였으며 EDTA에 활성이 억제되지 않았으며, 이 특성은 전통적인 산성 DNase인 DNase II의 활성화와 비슷하였다.
- (3) 전체 균질액의 산성 pH에서 확인된 36 kDa DNase는 중성 pH에서 확인된 것과 다른 DNase로 확인되었다.

참고문헌

1. **Borgers, M., De Nollin, S., De Brabander, M. and Thienpont, D.** Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells. *Am. J. Vet. Res.* 1975, **36**, 1153-1166.
2. **Gasmi, G., Padeloup, M., Pratiel, G., Pitie, M., Bernadou, J. and Meunier, B.** ³¹P NMR characterization of terminal phosphates induced on DNA by the artificial nuclease 'Mn-TMPyP/KHSO5' in comparison with DNases I and II. *Nucleic Acids Res.* 1991, **19**, 2835-2839.
3. **Jasmer, D. P. and McGuire, T. C.** Protective immunity to a blood-feeding nematode (*Haemonchus contortus*) induced by parasite gut antigens. *Infect. Immun.* 1991, **59**, 4412-4417.
4. **Jasmer, D. P., Yao, C., Rehman, A. and Johnson, S.**

- Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000, **105**, 81-90.
5. **Kwak, D. and Jasmer, D. P.** Non-classic characteristics define prominent DNase activities from the intestine and other tissues of *Haemonchus contortus*. *Exp. Parasitol.* 2003, **104**, 131-139.
 6. **McKeand, J. B.** Vaccine development and diagnostics of *Dictyocaulus viviparus*. *Parasitology.* 2000, **120**, S17-S23.
 7. **Miller, T. A.** Vaccination against canine hookworm diseases. *Adv. Parasitol.* 1971, **9**, 153-183.
 8. **Mortensen, L. L., Williamson, L. H., Terrill, T.H., Kircher, R. A., Larsen, M. and Kaplan, R. M.** Evaluation of prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003, **223**, 495-500.
 9. **Parrish, J., Li, L., Klotz, K., Ledwich, D., Wang, X. and Xue, D.** Mitochondrial endonuclease G is important for apoptosis in *C. elegans*. *Nature.* 2001, **412**, 90-94.
 10. **Parrish, J. Z. and Xue, D.** Functional genomic analysis of apoptotic DNA degradation in *C. elegans*. *Mol. Cell.* 2003, **11**, 987-996.
 11. **Rodriguez, A. M., Rodin, D., Nomura, H., Morton, C. C., Weremowicz, S. and Schneider, M. C.** Identification, localization, and expression of two novel human genes similar to deoxyribonuclease I. *Genomics.* 1997, **42**, 507-513.
 12. **Soulsby, E. J. L.** Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. pp. 231-238, 7th ed. Bailliere Tindall, London, 1982.
 13. **Wu, Y. C., Stanfield, G. M. and Horvitz, H. R.** NUC-1, a *Caenorhabditis elegans* DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev.* 2000, **14**, 536-548.