大韓獸醫學會誌(2007) 第47卷 第1號
Korean J Vet Res(2007) 47(1) : 59~65

돼지 위축성 비염 단위 백신 개발을 위한 재조합 파스튜렐라 독소 단백질의 면역원성 검정

이 정 민*

성균관대학교 생명공학연구소

(게제승인: 2006년 10월 10일)

Immunogenicity of the recombinant *Pasteurella multocida* toxin for development of subunit vaccine against swine atrophic rhinitis

Jeongmin Lee*

Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Accepted: October 10, 2006)

Abstract : *Pasteurella multocida* D:4 producing *Pasteurella multocida* toxin (PMT) is a causal pathogen in atrophic rhinitis in pigs. To investigate the protective immunity and vaccination effect of recombinant PMT, the gene for PMT was isolated from the infective *P. multocida* D:4. The 2.3 kb XhoI/PstI fragment (PMT2.3) of PMT gene was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using the induced expression vector system. The recombinant protein of PMT2.3 having molecular weight of 84 kDa was purified by Ni-affinity column chromatography. The PMT2.3 raised slightly less anti-PMT antibody titer than formalin-killed whole cell, however, it showed more protective immunity against *P. multocida* D:4 infection in vaccination and challenge.

Key words : atrophic rhinitis, immunogenicity, *Pasteurella multocida* toxin, subunit vaccine

서 론

*Pasteurella multocida*는 그람 음성의 토양 미생물로서 백여 년 전 Louis Pasteur가 면역화(immunization)에 관한 연구재료로 사용한 후 그 이름이 명명된 병원성 미생물이다. 오랜 기간 동안 이 병원균에 대한 면역화, 균주의 다양성, 감염성 및 병원성 기작 등에 대해 연구되어져 왔지만, 실제로 분자 수준에서의 탐구는 최근에 이루어지고 있으며, 안전하고 효과적인 백신의 개발은 *P. multocida*의 연구에 있어서 아직까지 가장 큰 연구 영역이 되고 있다 [2, 7]. *P. multocida*는 돼지에서 위축성 비염(atrophic rhinitis), 토끼에서 코막힘(snuffling), 소, 양, 염소 등에서 폐렴(pneumonia), 닭에서 가금 콜레라(fowl cholera)를 일으키며, 닭, 칠면조 등의 가금류에 치명적인 조류 파스튜렐라 병(avian pasteurellosis)을 일으키는 것으로 알려져 있다 [7].

1881년 이 병원균이 처음 분리된 이후, *P. multocida*의 검출, 동정, 특성 등은 형태적 특성, 에너지 대사 특면에서의 탄수화물 발효 경향, 혈청학적 특성 등과 같은 표현형적 특성에 따라 분리되고 있다. 현재 *P. multocida*는 somatic lipopolysaccharide(LPS) 항원성에 따라 serotype 1부터 serotype 16의 16가지로, capsular antigen에 따라 5가지(serogroup A, B, D, E, F)로 분리되고 있으며, 각 serotype 또는 serogroup에 따라 서로 다른 기주생물에 서로 다른 병원성을 나타내는데, 가금 콜레라의 경우에는 serotype 1, 3, 4가, 위축성 비염의 경우에는 serogroup D, serotype 4가 주로 병원성을 나타내는 것으로 보고되고 있다 [4, 6, 15].

파스튜렐라 병을 예방하기 위해서 이미 오래전부터 백신 접종(vaccination)에 의한 예방법이 시행되어져 왔

*Corresponding author: Jeongmin Lee
Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea
[Tel: +82-31-290-5269, Fax: +82-31-290-5270, E-mail: jlee@skku.edu]

다. 일반적으로 널리 이용되는 사독 균주인 whole-cell bacterin의 경우에는 포르말린으로 고정하거나 heat inactivation의 과정을 거쳐서 사용되는 세균백신으로서, 특정한 혈청형에 대한 방어, 즉 serotype-specific protection을 보이므로 다양한 종류의 *P. multocida*에 대한 저항성을 부여하기에는 어려움이 있다. 반면에 attenuated strains을 이용한 생균 백신(live vaccine)은 서로 다른 혈청형의 균주에 대한 방어효과는 높일 수 있으나, 변이에 의한 병원성 획득이라는 위험성으로 인해 완벽한 백신 접종에 의한 예방에는 어려움이 있다 [2, 7].

돼지의 위축성 비염은 *Bordetella bronchiseptica*와 *P. multocida*의 복합 감염에 의해 비염과 비갑개의 위축병변을 특징으로 하는 돼지의 만성 호흡기 질병으로, 주로 1개월령 이하의 어린 돼지에 감염된다. 폐사율은 아주 낮지만 감염율은 매우 높은 돼지 질병으로, 양돈장에 만연하면 발육저하, 사료 효율 저하로 경영에 큰 문제를 야기한다 [1, 17]. 주 원인균의 하나인 *B. bronchiseptica*는 비강 점막 상피에 자극을 줌으로써, *P. multocida* D형 균의 정착을 허용케 하는 정도의 역할을 한다. 주요한 병원성은 *P. multocida* D형의 독소에 의해 발현되는데 이 파스튜렐라 독소(*P. multocida* toxin; PMT)는 dermonecrotic toxin으로서, 비염과 더불어 간장과 신장에 병변을 일으킨다 [2, 7, 16]. 그러므로 위축성 비염의 원인이 되는 *P. multocida* D형 독소를 정제하여 불활화한 톡소이드(toxoid) 백신으로 제작하여 근래에 위축성 비염에 대한 백신으로 사용하고 있다 [7, 11, 12].

본 연구에서는 돼지의 위축성비염에 대하여 효과적으로 방제할 수 있는 백신을 개발하고자, 위축성비염에 감염된 돼지에서 분리한 *P. multocida*의 야외주가 나타내는 파스튜렐라 독소 단백질의 유전자를 분리, 대장균 내에서 과발현을 유도하고 재조합 단백질을 정제하고, 이 재조합 파스튜렐라 독소의 항원성 및 면역원성을 검정하여, 이를 백신 개발의 재료로 사용 가능성에 대해 고찰하고자 하였다. 본 연구의 결과는 돼지의 위축성 비염을 예방하는 백신 개발에 필수적인 항원의 대량 생산을 위한 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

공시 재료 및 균주 배양

연구에 사용할 *P. multocida* 균주는 서울대학교 수의과대학 면역학교실로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 균주의 배양은 Bacto brain-heart infusion(BHI) (Difco, USA) agar plate, 또는 5% sheep blood가 첨가된 blood agar plate에서 37°C에서 배양하였으며, genomic DNA의 추출을 위하여 균주를 BHI 배지에 접종한 후 37°C에서 12시간 동안 현탁 배양 하였다 [9]. *P. multocida*는 통성 혐기성 균으로 분리되며, 액체 배지하에서 aeration이 되는 현탁 배양시에도 좋은 생장을 보이나, 고체 배지(agar plate) 하에서의 생장에서는 혐기성 미생물의 특성을 나타내어 액체 배지에서 보다 낮은 생존율을 나타내었다. 이러한 특성을 고려하여 균주의 분리시에는 고체 배지를 사용하였으나, 유전자의 클로닝을 위한 배양시에는 액체 배지에서 현탁 배양하여 사용하였다.

파스튜렐라 독소 유전자의 분리

*P. multocida*의 genomic DNA는 G-DEX^{TM}(Intron Co., Korea)를 이용하여 분리하였으며 제조사의 방법을 따라 수행하였다. 먼저 12시간 현탁배양한 균주 배양액 5 ml을 원심분리(10,000 × g, 2분, 4°C)하여 세포를 모은 후, 600 µl의 lysis buffer에 현탁시켰다. 이를 65°C에서 10분간 배양한 후 20 µg의 RNaseA를 37°C에서 20분간 처리하였다. 200 µl의 protein precipitation buffer를 넣고 1분간 교반한 후 4°C에서 10분간 반응하였다. 이를 원심분리(10,000 × g, 5분, 상온) 한 후 상층액을 취하여 600 µl의 isopropanol과 혼합한 뒤 상온에 10분간 방치하였다. 원심분리(10,000 × g, 10분, 4°C)하여 genomic DNA를 침전시키고 건조 후 100 µl의 증류수에 용해하였으며 0.8% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다 [8, 9].

기존의 보고된 파스튜렐라 독소 유전자는 National Center for Biotechnology Information(NCBI, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, MD)에서 제공하는 Genbank database에서 검색하여 염기 서열 정보를 확인하였고, 이 중 X51512로 등록된 염기 서열을 분석하여 PMT 유전자를 클로닝 할 수 있는 PCR primers인 PMT-F(5'-CCCAAACACTGCG AATGTTTGGGG-3')와 PMT-R(5'-TTCCACTGCATCC ACAGCCCTTCT-3')을 제작하였다 [3, 14].

PCR은 반복 수행을 통하여 조건을 확립하고 수행하였다. PCR의 총 반응액은 50 µl로 하여 4 µl(0.5 µg)의 genomic DNA, 2.5 µl의 10 × Reaction buffer I, 2.5 µl의 10 × Reaction buffer II, 1 mM dNTPs, 각 20 pmole의 PMT-F 및 PMT-R primers을 혼합한 후, SuperTaq DNA polymerase(Super-Bio. Co., 한국) 2.5 U을 첨가하였다. 먼저 95°C에서 5분간 주형 DNA를 변성시킨 후 95°C 1분, 60°C 1분, 72°C 2분 40초의 반응 사이클을 32회 반복 시행하였으며, 마지막에 72°C에서 10분간 반응하였다. 이 PCR 절편을 pGERM-T 벡터에 클로닝하고 염기서열을 결정하였다.

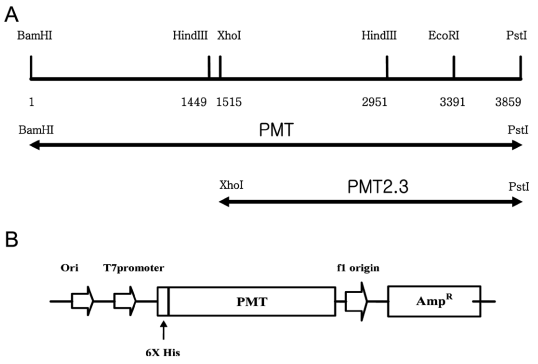

Fig. 1. Physical map of *Pasteurella multocida* toxin gene and expression vector. A. PMT (3.9 kb full length of BamHI-PstI fragment), PMT-A (1.5 kb BamHI-HindIII fragment), PMT-B (1.5 kb HindIII-HindIII fragment), PMT-C (0.9 kb HindIII-PstI fragment), and PMT2.3 (2.3 kb XhoI-PstI fragment) were ligated into pRSET expression vectors, respectively. B. Schematic diagram of vector for hyperexpression of the gene in *E. coli*. under the control of T7 promoter.

파스튜렐라 독소 유전자의 발현

3,858 nts에 해당하는 파스튜렐라 독소 유전자 중에서 5'쪽 1.5 kb가 제거된 XhoI/PstI 2.3 kb 절편(PMT2.3)을 pRSET 발현 벡터에 클로닝 하였다(Fig. 1). 이들 재조합 유전자 발현 벡터를 대장균 BL21(DE3)에 도입하고 IPTG induction을 통하여 유전자의 발현을 유도하였다. 먼저 5 ml의 LB 배지에 하룻밤 동안 배양한 재조합 균주(PMT-A, PMT-B, PMT-C, PMT2.3 각각을 포함하는 대장균 BL21(DE3)) 세포를 접종한 다음 OD_{600}값이 0.5가 될 때까지 37°C에서 현탁 배양 하였다. 최종농도가 0.8 mM이 되도록 Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside(IPTG)를 첨가하고 다시 37°C에서 12시간동안 현탁 배양 하여 유전자의 발현을 유도하였다. 원심분리로 세포를 수거하고 전체 단백질을 추출하여 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동(SDS-PAGE)을 수행하였다. 재조합 벡터를 포함하지 않는 대장균 세포, 발현 벡터(pRSET)만을 포함하는 균주도 동일한 방법으로 배양하여 재조합 파스튜렐라 독소 유전자 발현의 대조구로서 사용하였다.

재조합 파스튜렐라 독소의 정제

재조합 발현 벡터를 50 μg/ml ampicillin이 포함된 5 ml의 LB broth에서 하룻밤 동안 배양한 후, 이를 다시 50 μg/ml ampicillin을 함유한 500 ml LB broth에 접종하여 37°C에서 OD_{590} = 0.7 될 때까지 현탁 배양 했다. 최종농도가 0.8 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고, 이를 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양한 세포를 4°C에서 5,000 × g로 20분간 원심분리하여 수거한 뒤, pellet을 다시 lysis buffer(100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 8.0)에 현탁시키고 상온에서 1시간 동안 용해 시켰다. 이를 4°C에서 10,000 × g로 20분간 원심분리 한 후 상층액을 취하여 재조합 균주로부터 전체 단백질을 분리하였으며, 이를 시료로 하여 Ni-NTA affinity column chromatography (QIAGEN, Germany)를 수행하였다. 시료(10 ml)를 2 ml 부피의 Ni-resin column에 적하한 후, 20 ml의 wash buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 6.4)로 세 번 반복하여 세척하였다. elution은 10 ml의 elution buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 4.5)로 2번 반복하여 수행하였다. 이상과 같이하여 분리한 단백질의 농도는 Bradford method를 이용하여 측정하였다 [9].

항원성 검정

대장균에서 발현, 정제한 재조합 파스튜렐라 독소 단백질의 항원성과 저항 면역성을 알아보기 위하여 실험동물인 생쥐(CD-1)를 이용한 면역 접종 실험을 수행하였으며, 각 실험구 당 10마리를 이용하였다. 음성 대조구로 PBS를 사용하였으며(그룹 1), 양성 대조구은 상업적으로 사용되고 있는 호흡기 질병 혼합 백신(*B. bronchiseptica, P. multocida,* 그리고 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 inactivated whole cell 백신; Daesung microbiological lab. Co., LTD, 한국)을 그룹 2로, 연구에 사용한 *P. multocida* D:4의 formalin-killed whole cell (inactivated bacterin)을 그룹3으로 사용하였다. 실험구로는 정제한 재조합 파스튜렐라 독소(PMT2.3)를 PBS에 희석하여 사용하였다. 먼저 각 실험군의 생쥐에서 혈액을 채취한 후 면역전 혈청으로 사용하였다. 면역은 각 실험군의 항원 100 μg을 100 μl의 PBS에 녹인 후, 실험동물 면역시 피하주사 하였다. 상업용 백신의 경우, 제조사의 방법에 따라 수행하되 실험동물의 중량을 감안하여 1/20 분량의 백신(100 μg)을 접종하였다. 첫 번째 면역을 수행한 후 2주 후에 2차 면역을 수행하였으며, 2차 면역 후 10일째 되는 날에 실험동물로부터 혈액을 채혈하였다. 채혈한 혈액은 4°C에서 하룻밤 동안 응고를 시킨 후, 원심분리(2,000 × g, 20 min, 4°C)하여 항혈청을 수거하였다.

항체의 역가를 측정하기 위하여 ELISA를 실시하였다. 먼저 파스튜렐라 균주의 전체 단백질을 10 ug/ml가 되도록 carbonate buffer로 희석 후 96-well plate에 50 ul/well로 분주하고 4°C에서 하루 동안 보관하여 항원 coating을 실시하였다. 0.05% Tween 20가 포함된 PBS(PBS-T)로 3번 세척한 후, 3% BSA가 첨가된 PBS-

T를 200 μl씩 분주하여 실온에서 3시간 동안 blocking을 실시하였다. 이를 다시 3번 세척한 후, 각 항혈청을 PBS로 1000배 희석하여 1차 항체로 사용하여 100 μl씩 분주한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이를 PBS-T로 3번 세척한 후, 2차 항체로 anti-mouse IgG peroxidase conjugated(Sigma, USA)를 3% BSA가 첨가된 PBS-T로 4,000배 희석하여 100 μl씩 분주한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 3번 세척 후, 반응 기질로 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹아있는 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine(TMB) 시약을 phosphate-citrate buffer와 1 : 10 비율로 혼합한 뒤, 각 well 당 10 μl씩 분주하고, 빛을 차단한 후 20분간 반응시켰다. 발색 반응 후 650 nm의 필터가 있는 ELISA 측정기로 흡광도를 측정하였다. Western blot의 경우, 재조합 PM2.3 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane에 100V로 3시간 동안 전이하였으며, 이후의 항체와의 반응 과정은 ELISA와 동일하게 수행하였다. 항체에 의한 단백질의 검출은 암실에서 chemiluminescence reagent(Bio-Rad, USA)를 이용하여 발색 반응으로 확인하였다.

방어적 면역성 검정

면역과 채혈이 끝난 후, 실험 동물의 방어적 면역성(protective immunity)을 알아보기 위하여, 본 연구에서 사용한 위축성 비염 병원균인 *P. multocida* D:4를 LD_{50} (5×10^4 cfu)의 10배 양으로 복강 내 공격접종 하였다. 공격접종 후 72시간동안 실험동물의 생존을 측정하여 백신으로서의 효과, 즉 저항성 면역을 확인하였다.

결 과

파스튜렐라 독소 유전자의 분리, 발현 및 재조합 단백질의 정제

파스튜렐라 독소 단백질은 1,285개의 아미노산으로 구성되어 있으며 3,858 nt의 toxA 유전자가 암호화하고 있다. 본 연구에서는 이 중 N-말단의 약 500여 아미노산 부위를 제거하고, 중앙 domain부터 C-말단까지 potent mitogen으로서의 독성에 관련 된 부위인 아미노산 581부터 아미노산 1,285까지를 포함하는 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3의 발현 벡터를 제작하였다(Fig. 1). 이 PMT2.3은 대장균 내에서 IPTG 유도를 통하여 약 84 kDa의 재조합 단백질로서 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3는 N-말단 부위에 발현 벡터에서 제공하는 6개의 Histidine을 가지고 있으므로, Ni-affinity column chromatography를 통하여 정제할 수 있었다.

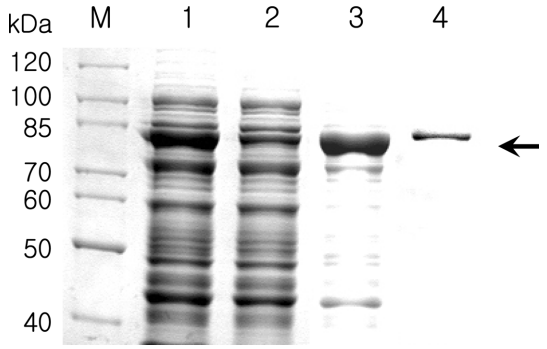

Fig. 2. Expression and purification of recombinant PMT2.3 protein. 2.3 kb XhoI/PstI fragment of PMT gene was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) using pRSET B vector. M, protein molecular weight marker; lane 1, total proteins extracted from *E. coli* BL21 (DE3) having recombinant expression vector for PMT2.3; lane 2, flow-through of the loaded samples; lane 3, first elution; lane 4, second elution.

항원성 검정

대장균을 이용하여 발현, 정제된 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3의 항원성을 알아보기 위하여 실험동물(생쥐)를 이용한 면역 실험을 수행하였다. 음성 대조구로 PBS를 사용하였으며, 양성 대조구로는 일반적으로 사용되고 있는 호흡기 질병 혼합 백신(inactivated whole cell)과 본 연구에 이용된 *P. multocida* D:4의 formalin-killed whole cell(inactivated bacterin)을 이용하였다. 실험구는 정제한 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3를 PBS에 희석하여 사용하였다. 2차에 걸친 면역화를 수행한 후 얻어진 혈액에서 혈청을 분리하고 재조합 PMT2.3을 항원으로 하여 Western blot을 수행한 결과, 대조구인 PBS를 항원으로 면역한 항혈청에서는 PMT2.3에 대한 항체가 검출되지 않았으나, 상업용 호흡기 질병 혼합 백신, 불활화한 파스튜렐라 사균, PMT2.3을 면역한 항혈청에서는 PMT2.3에 대한 항체가 검출되었으며, 특히 재조합 PMT2.3을 면역한 항혈청에서 가장 높게 검출된 것으로 보아, 재조합 PMT2.3에 의하여 항체 생성이 효과적으로 유도됨을 알 수 있었다(Fig 3). 또한 파스튜렐라 전체 단백질을 항원으로 하여 각 항혈청에 대한 ELISA를 수행하여 항원성을 검정하였다. Fig. 4의 결과와 같이, 음성 대조구로서 PBS만을 접종한 경우에는 2차에 걸친 면역 후에도 항체역가가 거의 나타나지 않았으나, 상업용 호흡기 질병 혼합 백신, 불활화한 *P. multocida* D:4, 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3을 항원으로 면역한 경우, 모두 항원성을 가지며, 항체를 유도하는 것으로 나타났다. 항체 역가는 호흡기 질병 혼합 백신의 경우가 비교적 낮게 나타났으며, 불활화한 *P. multocida* D:4의 항체의 역가가 재조합

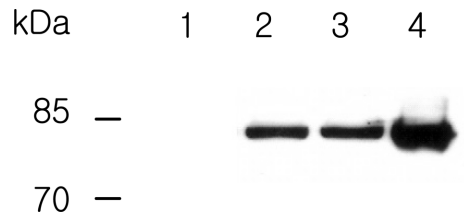

Fig. 3. Immunoblot analysis of the PMT2.3. Antigenicity of the recombinant PMT2.3 was tested by western blot analysis using anti-PMT2.3 antisera. The PMT2.3 (0.1 μg) was loaded on the 10% polyacrylamide gel. The proteins were detected by antisera from mice vaccinated with PBS (lane 1), commercial vaccine (lane 2), formalin-killed whole cell (lane 3), and recombinant PM2.3 (lane 4), respectively.

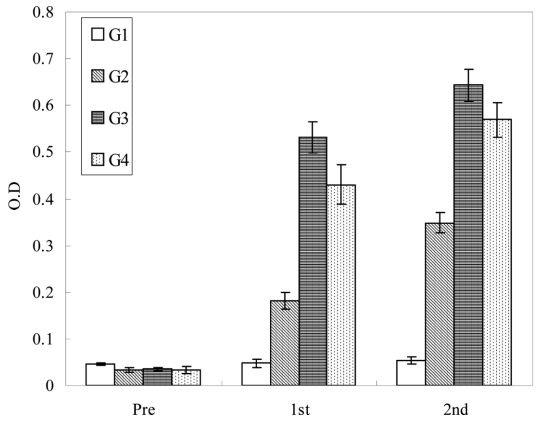

Fig. 4. Antibody titers in vaccinated mice sera. Immunizations were performed twice in two-week intervals. The antisera were collected ten days after second immunization. Titrations of antibody were measured by ELISA using total proteins of *P. multocida* as a antigen.

파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3에 비해 다소 높은 것으로 나타났다.

방어적 면역성 검정

재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3의 항원성 검정 후, 이 재조합 단백질에 의해 유도된 항체에 의하여 방어적 면역성이 생성되는지 확인하기 위하여, 위에서 면역화한 실험동물을 대상으로, 본 연구에서 사용한 위축성 비염 병원균인 *P. multocida* D:4를 복강 내 접종한 후, 72시간동안 실험동물의 생존을 측정하였다. 그 결과를 요약하면 Table 1과 같다.

PBS로 면역화한 음성 대조구의 경우에는 모든 실험동물이 폐사하여 생존율이 0이었으며, 상업적으로 이용되는 호흡기 질병 혼합 백신을 사용한 경우에는 5마리의 실험동물이 폐사하여 생존율이 50%, 불활화한 *P. multocida* D:4를 면역화한 경우에는 2마리가 폐사하여 생존율 80%를 나타냈다. 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3을 단독 면역화한 실험동물은 1마리만 폐사하여 생존율 90%를 나타냈다.

Table 1. Evaluation of protective immunity of the recombinant PMT vaccinated mice against *P. multocida* challenge

Immunization group	Number of dead mice / total mice	Survival rate (%)
PBS	10 / 10	0
Commercial vaccine	5 / 10	50
Formalin-killed whole cell	2 / 10	80
Recombinant PMT2.3	1 / 10	90

고 찰

P. multocida 중 serogroup D는 위축성 비염을 일으키는 파스튜렐라 독소를 생산하는데, 이 독소의 유전자(*toxA*)는 146.5 kDa의 단백질을 생산한다[12]. 본 연구에서는 이 유전자를 분리하여 N-말단이 제거된 형태의 재조합 파스튜렐라 독소 유전자를 대장균에서 과발현을 유도하였다.

재조합 파스튜렐라 독소유전자의 발현을 유도한 결과, 다양한 유전자 발현 조건 실험에도 불구하고 재조합 파스튜렐라 독소 유전자의 크기가 4 kb 내외의 비교적 큰 크기로 인하여 발현율이 매우 낮으며, 130 kDa 가까운 큰 분자량으로 인하여 분리 효율 또한 매우 떨어지는 것을 확인하였다(data not shown). 단백질에 있어서 항원성을 나타내는 단백질의 부위는 비교적 작은 부위가 항원 결정기(antigenic determinant)로서 작용하게 되는 것이므로, 전제 단백질을 항원으로 사용하는 것 보다는 epitope으로서 작용하여 높은 항체가 및 방어적 면역원성을 유도하는 하는 부위만을 선별적으로 사용하는 것이 백신의 제작 및 정제, 백신 효과를 높일 수 있을 것으로 사료된다[7]. 본 연구에서 제작된 PMT2.3은 파스튜렐라 독소 단백질 중 N-말단의 1.5 kb 부위를 제거한 2.3 kb의 절단된 파스튜렐라 독소 유전자의 형태로, 대장균 내에서 84 kDa의 재조합 파스튜렐라 독소 단백질을 생산하며, 이는 대장균 내에서도 높은 수준으로 안정적으로 발현됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

면역원성을 확인하기 위한 항원성 검정에서 호흡기 질병 혼합 백신, 불활화한 *P. multocida* D:4와 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3 모두 항원성을 가지며, 항체를 유도하는 것으로 나타났다. 그러나 항체의 역가는 호흡기 질병 혼합 백신의 경우 다소 낮게 나타났는데,

이는 이 혼합백신이 3종의 호흡기 질환 병원균에 대한 혼합백신이기 때문에, 항원으로 사용한 파스튜렐라 단일 균주에 대해서는 다소 낮은 항체 역가를 나타낸 것으로 추정된다. 불활화한 *P. multocida* D:4의 항체의 역가의 경우, 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3의 항혈청의 항체 역가에 비해 다소 높은 것으로 나타났다. 항원으로 파스튜렐라 단백질을 사용하였으며, 단일 재조합 단백질 보다 불활화한 병원균이 더 많은 항원성을 나타내는 분자들을 가지므로, 보다 많은 항체를 유도해 내는 것으로 여겨진다. 또한 다양한 항원에 의해 유도된 항혈청은 다양한 항체를 포함하게 되므로 항원-항체의 교차반응(cross reactivity)에 의하여 단일 항원에 의해 유도된 항혈청 보다 높은 항체 역가를 나타내는 것으로 사료된다 [7, 18].

방어적 면역성 검정을 통하여 백신으로서의 효과를 확인하기 위한 실험에서는 결과적으로 재조합 파스튜렐라 독소 PMT2.3를 백신으로 사용한 경우, 불활화한 병원균을 사용한 것과 동일 이상의 백신효과를 볼 수 있었으며, 오히려 상업용 호흡기 질병 혼합백신의 경우는 항원의 간섭현상으로 인해 *P. multocida* D:4에 대한 면역 저항성은 다소 떨어지는 것으로 확인되었다(Table 1). PMT2.3은 항체의 역가가 불활하한 사균백신 보다 낮음에도 불구하고 동일 이상의 저항성 면역을 유도하였다. 이는 파스튜렐라의 병원성 유발의 주요 원인인 PMT에 대한 높은 항체 역가로 인해 공격접종시 높은 방어력을 나타낸 것으로 여겨진다. 이상의 결과를 종합하면 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3은 *P. multocida* D:4에 대한 저항을 나타내는 항원으로서 효과적인 백신 소재가 될 수 있다고 사료된다. 항체역가와 방어적 면역성은 일치하는 경우도 있으나, Gatto 등의 연구 [5]에서와 같이 병원균에 널리 존재하는 항원으로서 높은 항원성을 가지나 방어적 면역성은 낮은 경우도 있다.

단위 백신(subunit vaccine)은 한가지 또는 그 이상의 순수하거나 일부 정제된 항원으로 제조된 백신으로 정의할 수 있으며, 본 연구에서 사용된 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3도 단위 백신의 일종이다. 이러한 단위 백신을 사용하면 안전성이 향상되며, 불필요한 단백질에 기인되는 항원 경쟁성이 적어져서 면역이 요구되는 부위에 백신을 적용할 수 있고, 또한 감염동물과 백신접종동물을 구별할 수 있는 등 여러 가지 장점이 있다 [10, 13]. 후자의 감별진단이 가능한 백신의 장점은 동물체내에서 장기간 지속 감염을 할 수 있는 특정 질병을 박멸하고자 하는 국가에서는 매우 중요하다. 그러나 아직까지 단위 백신을 이용하여 상품화된 동물 백신은 극히 드물고 대부분 병원균을 불활화한 백신을 사용하고 있으므로, 높은 항체 유도에도 불구하고 낮은 면역저항성을 보이게 된다 [7, 14, 18].

위축성비염은 *P. multocida*의 감염에 의해서 돼지에서 발생하는 질병으로서 국내 일반농장에서 약 74.9%, 종돈 농장에서 약 66%의 감염율을 나타내고 있으며 2001년 기준으로 위축성 비염에 의한 경제적 손실은 약 500억원 수준 이상으로 추산되고 있다 [1]. 또한 *P. multocida*에 대한 백신은 수입제품이 전체 시장의 70% 가량을 차지하고 있으며, 그나마 병원균을 멸균하여 백신으로 사용하는 사균 백신 또는 병원균으로부터 직접 독소를 분리하고 독성을 제거하여 백신으로 사용하는 톡소이드 백신이 주종을 이루고 있다. 따라서 *P. multocida*의 감염에 의한 위축성 비염의 방역에 있어서 대장균으로부터 대량 생산이 가능한 재조합 파스튜렐라 독소 단백질의 활용은, 순수 정제 항원을 이용함으로서 다른 여러 항원의 간섭 현상 없이 체액성 면역 반응을 유도할 수 있기 때문에 모체 이행 항체에 의존할 수밖에 없는 자돈의 질병 예방에 큰 도움이 될 것으로 기대되며, 불필요한 단백질로 인한 항원경쟁성을 줄이고, 감염동물과 백신동물을 구분할 수 있는 단위 백신 개발을 위한 연구로서 중요하다고 사료된다.

결 론

P. multocida D:4는 파스튜렐라 독소를 생산하여 돼지의 위축성 비염을 야기하는 병원균이다. 본 연구에서는 재조합 파스튜렐라 독소 단백질의 방어적 면역성과 백신으로서의 가능성을 검정하고자 하였다. *P. multocida* D:4로부터 파스튜렐라 독소 단백질 유전자를 분리하고 2.3 kb의 절단된 형태의 유전자를 대장균 내에서 발현, 84 kDa에 해당하는 재조합 파스튜렐라 독소 단백질 PMT2.3을 분리하였다. 생쥐를 이용한 면역 실험에서 상업용 호흡기 질병 혼합 백신보다 불활화한 사균 백신과 PMT2.3이 보다 높은 항체 역가를 나타냈으며, 공격접종을 통한 방어적 면역 실험에서 PMT2.3은 불활화한 사균 백신에 비해서 항체의 역가는 낮았으나, 보다 높은 백신 효과를 나타내었다.

참고문헌

1. **지영철, 로승, 한정희, 한태욱.** 돼지 위축성 비염 백신의 효과에 관한 연구. 대한수의학회지 2000, **40**, 707-717.
2. **Adler B, Bulach D, Chung J, Doughty S, Hunt M, Rajakumar K, Serrano M, van Zanden A, Zhang Y, Ruffolo C.** Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. J Biotechnol 1999, **73**, 83-90.
3. **Busch C, Orth J, Nabil D, Klaus A.** Biological

activity of a C-terminal fragment of *Pasteurella multocida* toxin. Infect Immun 2001, **69**, 3628-3634.

4. **Carter GR.** Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. Adv Vet Sci Comp Med 1967, **11**, 321-379.
5. **Gatto NT, Dabo SM, Hancock RE, Confer AW.** Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA-equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A : 3 (Omp28). Vet Microbiol 2002, **87**, 221-235.
6. **Heddleston KH, Gallagher JE, Rebers PA.** Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. Avian Dis 1972, **16**, 925-936.
7. **Hunt ML, Adler B, Townsend KM.** The molecular biology of *Pasteurella multocida*. Vet Microbiol 2000, **72**, 3-25.
8. **Kim H, Hwang H, Lee S, Park ES, Yoo SD, Lee J, Yang JS, Kwon M.** Molecular cloning and expression of a gene for outer membrane protein H in *Pasteurella multocida* (A : 3): production of antisera against the OmpH. Kor J Microbiol Biotechnol 2005, **33**, 274-280.
9. **Lee J, Kang S, Park SI, Woo HJ, Kwon M.** Molecular cloning and characterization of the gene for outer memebrane protein H in a *Pasteurella multocida* (D : 4) isolate from pigs with atrophic rhinitis symptomes in Korea. J Microbiol Biotechnol 2004, **14**, 1343-1349.
10. **Liao CM, Huangb C, Hsuan SL, Chenb ZW, Lee WC, Liu CI, Winton JR, Chien MS.** Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. Vaccine 2006, **24**, 27-35.
11. **Nielsen JP, Foged NT, Sorensen V, Barfod K, Bording A, Petersen SK.** Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant *Pasteurella multocida* toxin derivative. Can J Vet Res 1991, **55**, 128-138.
12. **Petersen SK, Foged NT.** Cloning and expression of the *Pasteurella multocida* toxin gene, *toxA* in *Escherichia coli*. Infect Immun 1989, **57**, 3907-3913.
13. **Petersen SK, Foged NT, Bording A, Nielsen JP, Riemann HK, Frandsen PL.** Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. Infect Immun 1991, **59**, 1387-1393.
14. **Rajeev S, Nair RV, Kania SA, Bemis DA.** Expression of a truncated *Pasteurella multocida* toxin antigen in *Bordetella bronchiseptica*. Vet Microbiol 2003, **94**, 313-323.
15. **Rhoades KR, Rimler RB.** Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. Avian Dis 1987, **31**, 895-898.
16. **Rutter JM.** Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. Res Vet Sci 1983, **34**, 287-295.
17. **Rutter JM, Rojas X.** Atrohpic rhinitis in gnobiotic piglets: differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infections with *Bordetella bronchiseptica*. Vet Res 1982, **110**, 531-535.
18. **To H, Someno S, Nagai S.** Development of a genetically modified nontoxigenic *Pasteurella multocida* toxin as a candidate for use in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. Am J Vet Res 2005, **66**, 113-120.