

해수에서 분리한 *Vibrio cholerae* non-O1 CT가 생산하는 용혈독소의 생화학적 특징

김영목·이명숙¹·김영만²·권현주³·김병우³·김광현³·염종화⁴·이은우^{3,*}
 부경대학교 식품공학과, ¹부경대학교 미생물학과, ²동의대학교 식품영양학과,
³동의대학교 생명응용학과, ⁴동의대학교 임상병리학과

Biochemical Properties of Hemolysin Produced by *Vibrio cholerae* non-O1 CT Isolated from Sea Water

Young-Mog KIM, Myung-Suk LEE¹, Young-Man KIM², Hyun-Ju KWON³,
 Byung-Woo KIM³, Kwang-Hyeon KIM³, Jonghwa YEOM⁴ and Eun-Woo LEE^{3,*}
 Department of Food Science and Technology, Pukyong University, Busan 608-737, Korea
¹Department of Microbiology, Pukyong University, Busan 608-737, Korea
²Department of Food Science and Nutrition, Donggeui University, Busan 614-714, Korea
³Department of Life Science and Biotechnology, Donggeui University,
 Busan 614-714, Korea
⁴Department of Clinical Laboratory Science, Donggeui University, Busan 614-714, Korea

The hemolysin of *Vibrio cholerae* non-O1 CT isolated from sea water was purified and characterized. The purified hemolysin displayed an optimum at 37°C and exhibited more than 70% of residual hemolytic activity after incubation at 45°C for 120 min. However, the activity dropped dramatically at temperature above 55°C. The purified protein showed the highest hemolytic activity at pH 7.0, while the activity was completely lost outside of the pH ranges of 5.0 and 10.0. The activity of hemolysin was inactivated by addition of divalent cations, such as Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, and Zn²⁺, however, the activity was not completely inhibited by additions of Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺, Na⁺, and Li⁺.

Key words: Hemolysin, Hemolytic activity, *Vibrio cholerae* non-O1

서론

생선회를 비롯한 어패류의 생식을 즐겨하는 우리나라에서는 병원성 비브리오균에 의한 식중독 사고가 매년 하절기에 발생하며 이에 따라 병원성 비브리오균이 식품위생에 있어 차지하는 위치는 대단히 중요하다고 할 수 있다. 병원성 비브리오균 중 *Vibrio cholerae* non-O1은 콜레라균으로 알려진 *V. cholerae* O1과 형태 및 생화학적 성상은 유사하지만 콜레라균의 O1 항혈청에는 응집하지 않는 일군의 세균을 일컫는다. 이 세균은 콜레라균과 같이 담수와 해수가 합쳐지는 강 하구 등의 기수지역이나 해수, 하천수 및 하수와 같은 환경에서 많이 검출되고, 식품 중에서도 종종 검출되며 인도, 방글라데시 등 아열대지역 뿐만 아니라 유럽, 미국, 일본 및 우리나라 등에서도 분리되고 있다(Oh et al., 1993). 근년에 이 균에 의한 식중독 환자의 발생빈도는 꾸준한 증가추세에 있으며 1982년에는 일본에서 새로운 식중독 원인균으로도 지정되었다(Yotaku et al., 1992). 주로 장관 감염증을 일으키지만 위장염, 이감염증, 균혈증, 패혈증 등 장관 외 감염증을 일으키기도 한다(Honda et al., 1985). 임상증상은 콜레라와 같이 설사가 주된 경우와 설사증과 함께 복통, 발열, 구토 또는 혈변을 병행하는 경우도 있다. 전자의 경우에는 콜레라 독소(cholera

toxin)가 병원인자로 추정되고 있으며, 후자는 콜레라 독소 이외에도 용혈독소(hemolysin)에 의한 장관독성이 병원인자로 보고되고 있다. Gyobu 등(1992)은 rabbit ligated intestinal loop test와 suckling mouse test를 통해 용혈독소가 장관의 fluid accumulation을 유도하며, 용혈독소가 병원성의 주요 인자임을 밝혔다. 적혈구를 파괴하여 헤모글로빈을 용출시키는 용혈독소는 장염 비브리오 *V. parahaemolyticus*를 비롯한 여러 가지 병원성 비브리오들이 생산하는 세포의 분비효소로 알려져 있다(Iida and Yamamoto, 1990). 인체의 건강과 관련이 깊은 여러 가지 비브리오균 중에서 우리나라에서 자주 발병하여 문제가 되는 균은 장염 비브리오 *V. parahaemolyticus*와 패혈증 비브리오 *V. vulnificus* 그리고 *V. cholerae* non-O1 등이 있는데, 실제로 우리나라에서 장염 비브리오나 패혈증 비브리오에 관한 연구는 많으나(Kim et al., 1987; Chang and Shinoda, 1994; Lee et al., 1998) *V. cholerae* non-O1과 이 균이 생산하는 용혈독소에 관한 연구보고는 상대적으로 많이 적은 편이다. 한편 우리나라의 해수에서 분리된 *V. cholerae* non-O1 중에서 콜레라 독소를 생산하는 균주도 발견되었다는 보고가 있으며(Seong, 2003) 우리나라에서의 *V. cholerae* non-O1의 검출빈도는 꾸준한 증가추세에 있어 이 균과 이 균이 생산하는 용혈독소에 대한 연구가 시급하다고 하겠다. 따라서 본 연구에서는

*Corresponding author: ewlee@deu.ac.kr

해수로부터 분리된 *V. cholerae* non-O1 CT가 생산하는 용혈독소를 정제하고 정제된 용혈독소의 생화학적인 특성을 조사하였기에 보고한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양

본 연구에 사용된 *V. cholerae* non-O1 CT 균주는 인제대학교 부속 부산백병원에서 부산광역시 광안해수욕장의 해수로부터 분리한 균주를 분양 받았다. 균주의 배양 및 용혈독소 생산 배지는 Brain Heart Infusion broth (BHI, Difco Lab., U.S.A)에 식염농도를 최종 1%에 맞추어 사용하였다.

용혈독소의 정제

V. cholerae non-O1 CT가 생산하는 용혈독소의 정제는 Oh 등의 방법 (1993)을 변형하여 사용하였다. 간략하면, 400 mL의 BHI broth에 37°C에서 16시간 진탕배양한 배양액을 6,000×g에서 20분간 원심분리한 상층액에 ammonium sulfate를 70% 포화도로 첨가하여 천천히 교반하면서 4°C에서 하루밤 방치한 다음, 6,000×g에서 30분간 원심분리하여 단백질 침전물을 모았다. 멸균된 70% ammonium sulfate 용액으로 침전물을 1회 세척한 후, 6,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻어진 침전물을 10 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)에 현탁시킨 후, 다시 6,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 조독소액으로 사용하였다. 조독소액은 소수성 Phenyl Sepharose column (HiLoad 16/10, Pharmacia LKB)을 장착한 FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography)로 정제하였다. Column은 100 mM Tris-HCl 완충액 (pH 7.0)으로 평형화하여 사용하였으며, 시료주입 후에는 동일 완충액으로 column에 흡착되지 않은 단백질을 용출한 후 20 mM glycine 완충액 (pH 10.0)을 사용하여 column에 흡착된 단백질을 용출하였다. FPLC의 유속은 1 mL/min으로 고정하였으며 10 mL씩 분취하였다.

용혈활성의 측정

용혈활성 측정은 Oh 등의 방법 (1993)에 따랐다. 먼저 면양적혈구를 생리식염수에 현탁한 후 700×g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 다시 생리식염수에 현탁하는 과정을 3회 반복한 후, 얻어진 면양적혈구를 생리식염수에 최종농도 1% (v/v)로 맞춘 것을 적혈구 현탁액으로 사용하였다. 용혈독소의 활성측정용액은 0.85% NaCl, 0.01% BSA (bovine serum albumin, Sigma) 및 0.04% NaN₃를 포함하는 Tris-HCl 완충액 (pH 7.5)을 사용하였다. 활성측정용액에 단계별로 희석한 독소 1 mL와 1% 면양적혈구 현탁액 1 mL를 혼합해서 37°C에서 1시간 반응시켜 원심분리 (1,000×g, 5 min)한 후, 상층액을 취하여 파괴된 적혈구로부터 용출된 헤모글로빈의 양을 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 완전용혈 대조구로는 용혈독소의 첨가 없이 증류수와 1% 면양적혈구 현탁액을 혼합한 것을, 비용혈 대조구로는 용혈독소의 첨가 없이 활성측정용액과 1% 면양적혈구 현탁액을 동량 혼합한 것을 사용하였다.

용혈독소활성의 최적 온도 측정

정제된 용혈독소의 반응최적온도를 알아보기 위해 4, 20, 37, 50, 60°C에서 면양적혈구 희석액과 1시간 반응 시킨 후에 용혈활성을 측정하여 최대치를 100으로 하였을 때의 상대활성으로 나타내었다. 온도에 의한 용혈능의 영향 여부를 확인하기 위하여 용혈독소 무첨가구를 control로 사용하였다.

용혈독소활성의 최적 pH 측정

정제된 용혈독소를 pH 3-12의 각각의 완충액으로 희석하여 각각의 pH 완충액으로 37°C에서 1시간 동안 정치한 후, 용혈활성을 측정하였다. pH 3-6은 10 mM citrate buffer, pH 6-7은 potassium phosphate buffer, pH 7-9는 Tris-HCl buffer, 그리고 pH 9-12는 glycine buffer를 사용하였다. pH에 의한 용혈능의 영향 여부를 확인하기 위하여 각 pH 완충액에 용혈독소 무첨가구를 control로 사용하였다.

용혈독소활성의 열안정성 측정

용혈독소액을 4, 20, 37, 45, 55, 60°C에서 정치하면서 각각의 시간대별로 시료를 채취한 후에 용혈활성을 측정하였다. 초기의 용혈활성을 100으로 하였을 때의 잔존용혈 활성을 백분율로 나타내었다.

용혈독소활성의 양이온의 영향

Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺의 2가 양이온과 K⁺, Na⁺, Li⁺의 1가 양이온을 각각 5 mM씩 첨가한 용혈독소 활성 측정용 완충액으로 37°C에서 1시간 동안 용혈활성을 측정하였다. 모든 양이온은 염화물을 사용하였으며, 잔존 활성은 양이온 무첨가구의 용혈활성을 100으로 하였을 때의 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

용혈독소의 최적 활성 온도

정제된 용혈독소의 활성에 가장 적합한 온도를 알아보기 위해 4, 20, 37, 50, 60°C에서 각각 1시간 동안 면양적혈구 희석액과 반응시킨 후에 용혈활성을 측정할 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 최적온도는 37°C로 나타났으며 최대활성을 보인 37°C의 값을 100%로 계산 하였을 때의 상대활성이 4, 20, 50°C에서 각각 0, 9, 77%로 나타났다. *V. vulnificus* (Oh et al., 1993), *V. mimicus* (Miyoshi et al., 1997)와 *V. cholerae* non-O1 FM3 (Kim et al., 1997)가 생산하는 용혈독소가 모두 온도 비의존적으로 적혈구막에 부착하며 온도 의존적으로 적혈구막에 소공을 형성함으로써 용혈을 일으킨다는 보고로 미루어 볼 때, *V. cholerae* non-O1 CT가 생산하는 용혈독소 또한 4°C나 20°C의 낮은 온도에서는 적혈구막에 부착하지만 용혈활성은 나타내지 못하는 것으로 판단된다. *V. cholerae* non-O1 CT의 용혈독소는 비교적 높은 온도인 50°C에서도 77%의 활성을 나타내었다. 이는 *V. mimicus*의 용혈독소가 47°C에서 60분 배양 후에 90%의 용혈활성을 나타내었다는 보고와 유사하다 (Ju and Ju, 1996). 60°C에서 비활성이 떨어지

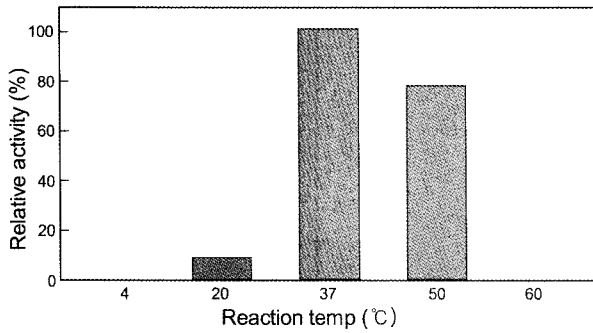


Fig. 1. Effect of temperature on the hemolytic activity of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 CT. Hemolysin was mixed with erythrocyte and incubated at various temperature for 1 hr and then hemolytic activity was measured as described in Materials and Methods. Data are the average of duplicate experiments.

는 것은 용혈독소의 열에 의해 불활성화에 의한 것으로 판단 된다.

용혈독소의 최적 활성 pH

정제된 용혈독소를 pH 3-12의 각각의 완충액으로 37°C에서 1시간 동안 정치한 후에 용혈활성을 측정된 결과, pH 7에서 최대의 활성을 보였으며 pH 6과 pH 8에서도 각각 약 70%와 50%의 상대활성을 나타내었으나 pH 5 이하나 pH 10 이상에서는 그 활성이 완전히 소실됨을 알 수 있었다 (Fig. 2). 이와 같은 결과는 해수에서 분리된 *V. cholerae* non-O1 FM3의 용혈독소가 pH 6과 pH 7에서 안정하였고 그 외의 범위에서는 급격한 감소를 보였다는 보고와 유사하였다 (Kim et al., 1997). 한편 *V. mimicus* ATCC 33653의 용혈독소는 pH 4.0-8.0에서 95% 이상의 안정성을 보였다는 보고 (Ju and Ju, 1996)와 비교 하면, 중성영역에서는 최대활성을 나타낸다는 점은 유사하였으나, pH 5 이하의 산성영역에서는 *V. mimicus*의 용혈독소에 비해 *V. cholerae* non-O1 CT의 용혈독소는 상당히 불안정한 것을 알 수 있었다.

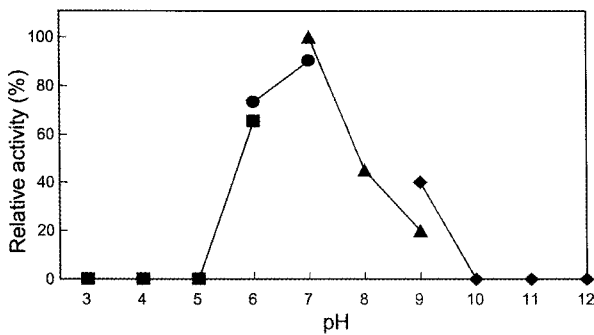


Fig. 2. Effect of pH on the hemolytic activity of the hemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 CT. Hemolysin was incubated at various pH for 1 hr. Then, the residual activity of hemolysin was measured. ■-■, citrate buffer (pH 3-6); ●-●, phosphate buffer (pH 6-7); ▲-▲, Tris-HCl buffer (pH 7-9); ◆-◆, glycine buffer (pH 9-12). Data are the average of duplicate experiments.

정제된 용혈독소의 열 안정성

정제된 용혈독소를 각각의 온도대 (4, 20, 37, 45, 55, 및 60°C)에서의 용혈독소의 열안정성을 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 37°C에 보관하였을 때에는 3시간 경과할 때까지 처음의 활성을 잃지 않았으며, 4, 20, 45, 50°C의 경우는 3시간 경과 후에도 잔존활성이 각각 100, 88, 81, 49%로 안정한 것으로 나타났다. 이는 그림 1의 최적온도 실험결과와 일치한다. 그러나 55°C와 60°C의 경우에는 15분 경과 후에 활성이 전부 소실되었다. 이 결과로 미루어 볼 때, *V. cholerae* non-O1 CT가 생산하는 용혈독소는 55°C 이상의 온도에서 불안정한 것을 알 수 있다. 이 결과는 *V. cholerae* non-O1 FM3이 생산하는 용혈독소의 열안정성과 유사하였으나, *V. cholerae* non-O1 FM3의 용혈독소가 50°C 배양에서 60분 후에 완전 실패 되는 것으로 볼 때 (Kim et al., 1997), *V. cholerae* non-O1 CT의 용혈독소가 조금 더 열안정성이 있음을 나타낸다. 한편 두 균주의 용혈독소는 공통적으로 60°C에서는 15분 및 30분 후에 활성이 완전 소실되었다.

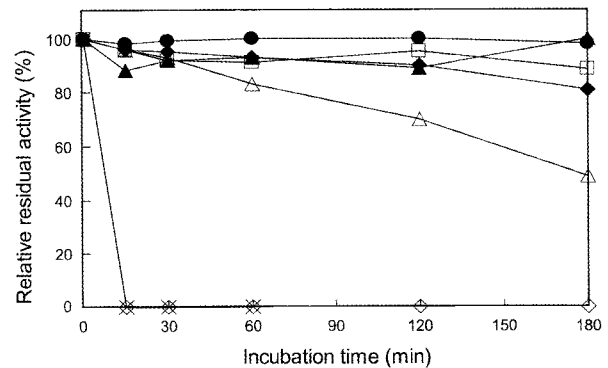


Fig. 3. Thermal stability of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 CT. Hemolysin was incubated at various temperature. Then, the residual activity of hemolysin was measured at the indicated time. ▲-▲, 4°C; □-□, 20°C; ●-●, 37°C; ◆-◆, 45°C; △-△, 50°C; ◇-◇, 55°C; ×-×, 60°C. Data are the average of duplicate experiments.

양이온의 영향

양이온은 세포막의 소공을 통해서 세포외부의 수분이 세포 내부로 들어오는 것을 막음으로써, 세포내부의 삼투압 증가를 방지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Miyoshi et al., 1997). 몇몇 2가 양이온과 1가 양이온이 정제된 용혈독소의 활성에 미치는 영향을 알아보았다 (Fig. 4). Ca²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺의 2가 양이온과 K⁺, Na⁺, Li⁺의 1가 양이온을 각각 5mM씩 첨가하였을 때의 용혈활성에 미치는 영향을 알아본 결과, 그림 4에서와 같이 Cu²⁺, Fe²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺의 첨가에 의해 용혈활성이 완전히 저해되었으며 Ca²⁺과 Mg²⁺ 등의 2가 양이온과 K⁺, Na⁺, Li⁺의 1가 양이온에 의해서는 약 50% 정도 저해되는 것으로 나타났다. 이는 *V. mimicus* (Miyoshi et al., 1997; Shinoda et al., 1992)와 *V. vulnificus* (Shinoda et al., 1985; Oh et al., 1993; Park et al., 1994), *V.*

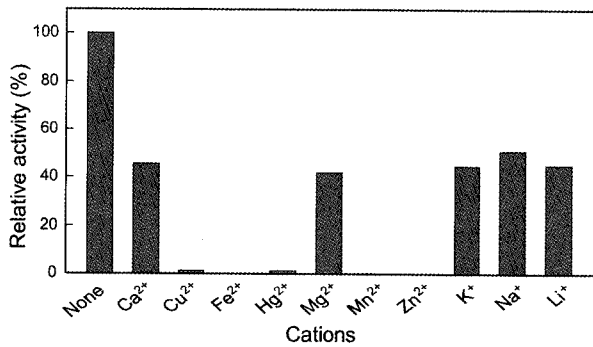


Fig. 4. Effect of cations on the hemolytic activity of the hemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 CT. All of the cations were used with chloride salts and the concentration used was 5 mM. Data are the average of duplicate experiments.

metschnikovii (Miyake et al., 1989), *V. cholerae* El Tor (Zitser et al., 1995) 및 *V. fluvialis* (Han et al., 2002)의 용혈독소의 경우 2가 양이온의 첨가에 의해 용혈활성이 저해된다는 보고와 일치하며, *V. parahaemolyticus*의 용혈작용이 촉진된다는 보고와는 반대의 경향을 보였다 (Iida and Yamamoto, 1990). 한편 같은 *V. cholerae* non-O1 FM3의 용혈독소의 경우에는 K⁺, Na⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺ 등의 양이온 첨가에 의해 용혈활성이 7배 까지도 촉진되었으며 Zn²⁺의 첨가에 의해서는 완전히 저해되었다 (Kim et al., 1997). 이러한 결과의 상이함은 비브리오 균주 별로 생산되는 용혈독소의 특징이 균주별로 많은 차이점이 있으며, 균주가 분리된 분리원의 환경 및 유전적 변이 차이에 기인한다고 추정된다. 비브리오 균이 생산하는 용혈독소 및 용혈독소 유전자에 대한 광범위한 분자생물학적인 특성과 약은 이 용혈독소에 의한 발병 제어 및 식중독 예방과 치료에 중요한 정보를 제공할 수 있다. 현재까지는 주로 *V. cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. mimicus* 등으로부터는 국내외에 몇몇 보고가 있으나, 아직 *V. cholerae* non-O1이 생산하는 용혈독소 유전자에 대한 보고는 거의 없어 이 균의 염색체로부터 용혈독소 유전자를 클로닝 및 유전자 분석, 그리고 단백질 다량발현에 의한 분자생물학적인 특성과 약이 시급하다 하겠다. 이는 다른 비브리오균주의 용혈독소의 염기서열과의 비교분석에 의한 신속동정방법 개발 및 치료용 항체 생산 등으로 이어질 것으로 기대된다. 또한 환경 및 임상 등으로부터의 다양한 분리원으로부터의 균주분리 및 특성과 약이 병행되어야 할 것이다.

참고 문헌

- Chang, D.S. and S. Shinoda. 1994. Toxin produced by pathogenic *Vibrio* isolated from sea food. J. Kor. Fish. Soc., 27, 107-113.
- Chang, D.S., I.S. Shin, S.T. Choi and Y.M. Kim. 1986. Distribution and bacteriological characteristics of *Vibrio vulnificus*. J. Kor. Fish. Soc., 19, 118-126.
- Gyobu, Y., H. Kodama and S. Sato. 1992. Studies on the enteropathogenic mechanism of non O1 *Vibrio cholerae*. IV. Role of hemolysin. Kansenshogaku-Zasshi, 65, 897-904.
- Han, J.H., J.H. Lee, Y.H. Choi, J.H. Park, T.J. Choi and I.S. Kong. 2002. Purification, characterization and molecular cloning of *Vibrio fluvialis* hemolysin. Biochim. Biophys. Acta., 1599, 106-114.
- Honda, T., M. Arita, T. Takeda, M. Yoh and T. Miwatani. 1985. Non O1 *Vibrio cholerae* produces two newly identified of toxins related to *Vibrio parahaemolyticus* hemolysin and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Lancet, 2, 163-164.
- Iida, T. and K. Yamamoto. 1990. Cloning and expression of two genes encoding highly homologous hemolysins from a Kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* T4750 strain. Gene, 93, 9-15.1.
- Ju, J.W. and S.A. Ju. 1996. Purification and immunological characterization of β -hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. J. Bacteriol. Virol., 31, 433-449.
- Kim, S.H., M.Y. Park, Y.O. Lee, M.H. Cho and D.S. Chang. 1997. Characteristics of hemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 FM-3 Isolated from Sea Water. J. Kor. Fish. Soc., 30, 556-561.
- Kim, Y.M., I.S. Shin and D.S. Chang. 1987. Distribution of *Vibrio vulnificus* the coast of South Korea. J. Kor. Fish. Soc., 20, 591-600.
- Lee, H.K., S.S. Lee, Y.H. Yoon and K.H. Ha. 1998. Biochemical characteristics of *Vibriosis* isolated from cultured shellfish, *Ruditapes philippinarum*, and some species of wild shellfish. J. Bacteriol. Virol., 33, 567-574.
- Miyake, M., T. Honda and T. Miwatani. 1989. Effects of divalent cations and saccharides on *Vibrio metschnikovii* cytolysin-induced hemolysis of rabbit erythrocytes. Infect. Immun., 57, 158-163.
- Miyoshi, S., K. Sasahara, S. Akamatsu, M.M. Rahman, T. Katsu, K. Tomochika and S. Shinoda. 1997. Purification and characterization of a hemolysin produced by *Vibrio mimicus*. Infect. Immun., 65, 1830-1835.
- Oh, E.K., Y. Tamanoi, A. Toyoda, K. Usui, S. Miyoshi, D.S. Chang and S. Shinoda. 1993. Simple purification method for a *Vibrio vulnificus* hemolysin by a hydrophobic column chromatography in the presence of a detergent. Microbiol. Immunol., 37, 975-978.
- Park, J.W., T.A. Jahng, H.W. Rho, B.H. Park, N.H. Kim and H.R. Kim. 1994. Inhibitory mechanism of Ca²⁺

- on the hemolysis caused by *Vibrio vulnificus* cytolysin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1194, 166-170.
- Seong, H.K. 2003. The Distribution of serogroup of *Vibrio cholerae* non-O1 isolated in Korea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 13-17.
- Shinoda, S., I. Akiyama, S. Yasuil, Y.M. Kim and B.I. Ono. 1992. Lateral flagella of *Vibrios* serological classification and genetical similarity. *Soc. Microbiol. Immunol.*, 36, 303-307.
- Shinoda, S., S. Miyoshi, H. Yamanaka and N. Miyoshi-Nakahara. 1985. Some properties of *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Microbiol. Immunol.*, 29, 583-590.
- Yotaku, G., H. Kodama and S. Sato. 1992. Studies on the enteropathogenic mechanism of non O1 *Vibrio cholerae*. III. Production of enteroreactive toxins. *Kansenshogaku-Zasshi*, 65, 781-787.
- Zitzer, A., I. Walev, M. Palmer and S. Bhakdi. 1995. Characterization of *Vibrio cholerae* El Tor cytolysin as an oligomerizing pore-forming toxin. *Med. Microbiol. Immunol.*, 184, 37-44.

2008년 6월 24일 접수

2008년 8월 11일 수리