

***Perkinsus* sp.에 감염된 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)에서 단백질 분해효소의 분리 및 특성 연구**

강운석, 정영배¹⁾, 조문제*

제주대학교 의과대학 생화학교실, ¹⁾기생충학교실 및 의과학연구소

Purification and Characterization of proteinase from *Ruditapes philippinarum* infected with *Perkinsus* sp.

Yoon-Suk Kang, Young-Bae Chung¹⁾, Moon-Jae Cho*

Departments of Biochemistry, ¹⁾Parasitology, College of Medicine and Institute of Medical Science,
Cheju National University, Jeju 690-756, Korea

Abstract: In this study, we characterized a proteinase from marine bivalve *Ruditapes philippinarum* (Manila clam) infected with the protozoan parasite *Perkinsus* sp. When infected with *Perkinsus* sp., Manila clam produced a proteinase, which was not appeared in non-infected manila clam and *Perkinsus* hypnospore. A clear band of 45 kDa was detected on 0.2% gelatin containing gel SDS-PAGE. The proteinase was inhibited by phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) known as a serine proteinase inhibitor. Using Mucin-Sepharose CL-6B affinity chromatography, proteinases were eluted by Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 20 mM EDTA. Like lectins, N-acetyl-D-galactosamine also could elute proteinases. Based on these results, isolated *Ruditapes philippinarum* proteinase belonged to the class of serine protease and may have lectin activities or may be associated with lectin

Key words: *Ruditapes philippinarum*, proteinase, lectin

서론

당 결합 단백질인 lectin은 생물체내 당 인식 부위의 다양함으로 인해 종류가 매우 많으며, 그에 연관된 생물학적 기능 역시 매우 다양한 것으로 알려져 있다. 지금까지 많은 수의 lectin이 혈액응집반응에

의해 분리되고 그 특성이 밝혀졌다 (1). 대부분의 무척추동물과 마찬가지로, 이매패류에서의 면역기작은 조직내에서의 혈구의 작용에 의해 일어나는 비특이적 반응이다 (2). 특히, 혈장내에서의 감염특이 lectin은 감염원의 침입에 대한 1차 방어기작으로 자가면역과 타가면역으로 구분되어진다. lectin과 감염원 사이의 상호작용은 다른 면역반응을 유발하게 하여, 결국은 감염원을 제거하는 결과를 가져온다 (3).

*Corresponding author: moonjcho@cheju.ac.kr

이매패류에 *Perkinsus* sp.의 감염은 조직파괴와 피사 등의 결과를 가져오게 된다 (4). 특히 *P. marinus*는 미국 동부해안과 멕시코만에 걸쳐 심각한 굴의 폐사를 유발하였으며 (5), 포르투갈과 스페인 (6, 7)에서는 *Perkinsus* sp.가 비단 조개 (*Ruditapes decussatus*)와 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)의 감염을 일으키며, 일본과 우리나라에서는 바지락의 감염을 일으킨다고 보고되었다 (8, 9). 숙주의 방어기작을 피하기 위해 대부분의 감염원은 숙주의 침투와 감염에 필요한 단백질 분해 효소를 생산하며, La peyre와 Faisal (10)는 *Perkinsus* sp.의 serine protease가 혈장 단백질을 포함한 여러 단백질을 분해함을 밝혀냈다. *Perkinsus marinus*의 경우, 세포의 대사산물과 protease가 굴의 혈구 기능을 저해하였으며 (11), *Pseudoperkinsus tapetis*는 in vitro에서 여러 단백질 분해효소를 분비하였다 (4).

지금까지의 연구를 통해 우리는 *Perkinsus* sp.에 감염된 바지락은 감염되지 않은 바지락과 달리 lectin을 생산함을 알 수 있었다. 본 연구는 *Perkinsus* sp.에 감염된 바지락과 감염되지 않은 바지락에서 protease의 발현 유무를 알아보고, lectin 활성과의 관계를 알아보고자 실시하였다.

재료 및 방법

시료의 준비

실험에 사용된 바지락 중 *Perkinsus* sp.에 감염되지 않은 바지락은 제주도 내의 김녕에서 썰물 때, 조간대를 중심으로 채취하였고, *Perkinsus* sp.에 감염된 바지락은 동문 재래 시장에서 구입하였다. 채집된 시료는 조직 파쇄기를 이용하여 분쇄한 후, 동량의 증류수를 첨가하고 4°C에서 4시간 배양하여 얻은 시료를 원심분리 (388 × g, 20 min)하여 상등액을 얻은 후, 냉동실 (-20°C)에 보관하면서 사용하였다.

시료의 분리

준비된 시료를 분리하기 위해 Sepharose CL-6B

(Sigma Chemical Co., St. Louis., USA)에 mucin을 흡착시킨 Mucin-Sepharose CL-6B 친화성 크로마토그래피를 사용하였다. 먼저, 시료 50 ml를 column에 주입한 후, 0.5% Triton X-100이 함유된 Tris buffered saline (TBS)-Calcium 동량을 흘려보내주고, 세척 용액인 TB-Calcium을 시료의 2배양으로 흘려 보내면서 흡착되지 않은 이 물질들을 제거하였다. 추출용액으로는 20 mM EDTA가 함유된 TB를 사용하여 column에 흡착된 물질들을 추출하였다. 여기서 추출한 물질들에 대해 젤라틴 전기영동을 통해 원하는 부분을 얻은 후 농축하였다. 원하는 물질의 분리를 위해 겔 여과 크로마토그래피인 Sephacryl S-200을 사용하고 추출용액으로는 Phosphate buffered saline (PBS)를 사용하였다.

기질 전기영동

크로마토그래피를 통해 얻어진 시료에서 protease의 유무와 분자량을 알아보기 위해 젤라틴 전기영동을 실시하였다. 젤라틴은 running gel에 최종 0.2 %의 농도로 첨가하였고 (12), 전기영동은 23 mA에서 시행하였다. 전기영동이 끝난 후, gel은 2.5% Triton X-100에서 2시간 동안 넣어주고 0.1 M Tris-HCl 용액에서 3번 씻어주었다. 같은 용액에서 15시간 동안 gel을 넣어준 후, Coomassie blue 용액으로 gel을 염색하였다.

결과 및 고찰

해양 기생충인 *Perkinsus* sp.에 감염된 바지락 (*Ruditapes philippinarum*)과 감염되지 않은 바지락에서 생성되는 protease를 분리하고 그 특성을 알아보았다. 실험에 들어가기에 앞서 감염된 바지락에서 *Perkinsus* sp.를 분리하고 얻은 휴면포자에서 시료를 추출하여 gelatin 전기영동을 실시하여 *Perkinsus* sp.가 원래 가지고 있던 proteinase를 관찰한 결과 뚜렷한 3개의 protease를 관찰할 수 있었다 (Fig. 1). *Perkinsus* sp.에 감염된 바지락과 감염되지 않은 바지락에서 시료를 추출하여 gelatin 전기영동을 실시한 결과 감염된 바지락에서는 다양한 분자량을

가진 proteinase들을 관찰할 수 있었고, 감염되지 않은 바지락에서는 proteinase를 관찰할 수 없었다 (Fig. 1).

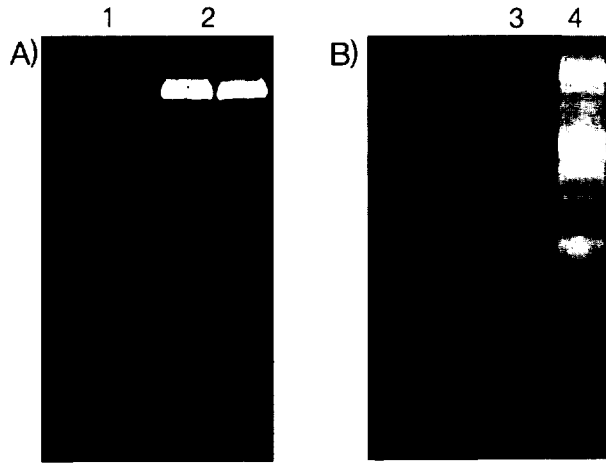


Fig. 1. Identification of proteinases from *Perkinsus* sp.(A) and *Ruditapes philippinarum* (B) crude extracts by 0.2% gelatin SDS-PAGE. Lane 1. The protein markers; phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa); 2, *Perkinsus* sp.; 3, Non-Infected Manila clams; 4, Infected Manila clams.

Proteinase를 분리하기 위해 친화성 크로마토그래피인 Mucin-Sepharose CL-6B를 이용하여, lectin을 분리할 때와 같은 조성의 용액들을 사용하였다. 그 결과 용출 용액인 TB-EDTA에서 2-3개의 proteinase가 분리됨을 확인할 수 있었다. 그러나, serine proteinase의 저해제로 알려진 PMSF를 첨가한 용출용액에서는 어떠한 proteinase도 관찰할 수 없었다 (Fig. 2). EDTA로 용출된 proteinase의 특성을 더 알아보기 위해 용출용액에 lectin과 친화력이 좋은 N-acetyl-D-galactosamine을 첨가하여 크로마토그래피를 행한 결과 EDTA에서 용출된 proteinase 중 약 45 kDa의 분자량을 가진 단백질이 용출됨을 확인할 수 있었고 (Fig. 2), 이 proteinase 분리를 위해 Mucin-Sepharose CL-6B 크로마토그래피를 통해 얻은 시료를 농축한 후, 겔 여과 크로마토그래피인 Sephacryl S-200를 사용하여 원하는 부위의 proteinase를 분리할 수 있었다 (Fig. 2).

지금까지의 연구를 통해 *Perkinsus* sp.에 감염된 바

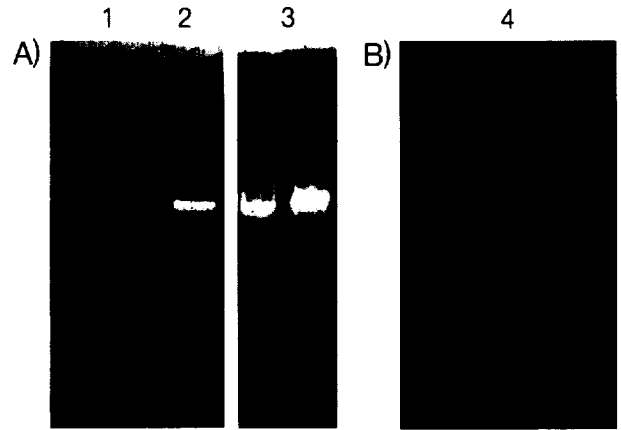


Fig. 2. Identification of proteinases eluted by Affinity chromatography (A) and Gel filtration chromatography (B). Lane 1, treatment with PMSF; 2, non-treatment with PMSF; 3, eluted with N-acetyl-D-galactosamine; 4, Sephacryl S-200.

지락이 lectin을 생성하는 것을 증명하였다. 그러나, 숙주에 침입한 감염원 역시 숙주의 방어기작에 대항하기 위해 여러 세포의 대사산물을 분비하게 되며, 그 중 가장 연구가 많이 이루어진 부분이 숙주의 면역 활동에 필요한 단백질을 분해하는 단백질 분해효소들이다. 이러한 단백질 분해효소는 숙주의 방어기작을 붕괴시키며, 감염원의 숙주로의 침입을 더욱 용이하게 함이 보고되었다 (13). 본 연구 결과에서도 *Perkinsus* sp.는 여러 단백질 분해효소들을 생산하였고, 감염된 바지락에서는 방어기작의 일환으로서 lectin이 형성됨을 확인할 수 있었다. 그러나, 흥미있는 것은 lectin이 감염원의 단백질 분해 효소들에 의해 크게 영향을 받지 않은 것이었다. 즉, 이러한 결과는 *Perkinsus* sp.에 감염된 바지락에서는 lectin외에 다른 보조 방어기작이 작용하고 있음을 보여주는 것이다. 이에 lectin 분리 과정과 같은 방법으로 감염된 바지락 추출액을 가지고 친화성 크로마토그래피 과정을 통해 EDTA에 의해 용출되는 단백질 분해효소를 확인할 수 있었고, 이 단백질 분해 효소가 감염원이 아닌 바지락에서 생성되어짐을 관찰할 수 있었다. 분리된 단백질의 특성을 파악하기 위해 serine 단백질 분해효소의 저해제인 PMSF를 처리하고, lectin과 친화력이 좋은 N-acetyl-D-galactosamine을 첨가하여 시

료를 추출한 결과, 분리된 단백질 분해효소는 약 45 kDa의 serine 단백질 분해효소임을 알 수 있었다. 이 proteinase가 lectin의 성격을 갖는 단백질 (lectin 유사 단백질)인지 혹은 lectin과 결합하여 행동하는 proteinase 인지는 더 연구해야 할 대상이다. 이미 mannose specific lectin 유사 단백질이 포유류의 세포에 존재하고 있음이 이미 보고되었고, mannose 말단 당단백질에 결합할 수 있는 단백질 분해효소가 인간, 토끼, 소, 쥐 등에서 분리되어졌고 (14), 이 들이 innate immunity의 새로운 요소로서 인정 받고 있으며 이는 제 3의 complement pathway를 이루는 것으로 알려 졌다. 이러한 MASP (mannose associated serine protease)의 존재는 개방 혈 관계를 가진 이매패류에 존재하는지는 아직 보고되어 있지 않다. 이번 연구를 통해 분리한 단백질이 lectin 유사 단백질인 mannose binding lectin (MBL)인지의 여부는 더 많은 연구를 통해 알아보아야겠지만, *Perkinsus* sp.에 감염된 바지락의 초기 면역 기작에 관여하고 있음은 확인할 수 있었다.

참고 문헌

1. Suzuki T, Mori K. Hemolymph lectin of the pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*: A possible non-self recognition system, *Devel Comp Immunol* 1990;14: 161-173.
2. Cheng TC. Hemocytes; forms and functions. In *The Eastern Oyster, Crassostrea virginica* (V. S. Kennedy, R. I. E. Newell, and A. E. Eble, Eds.), 1996; 299-333. Maryland Sea Grant, College Park, MD
3. Allam B, Paillard C, Auffret M. Alterations in Hemolymph and Extrapallial Fluid Parameters in the Manila Clam, *Ruditapes philippinarum*, Challenged with the Pathogen *Vibrio tapetis*. *J Invert Pathol* 2000;76:63-69.
4. Ordas MC, Beatriz N, Mohamed F, Shawn M, Antonio F. Proteolytic activity of cultured *Pseudoperkinsus tapetis* extracellular products. *Comp Biochem Physiol part B*, 2001;130:199-206.
5. Soniet TM. Epizootiology of *Perkinsus marinus* disease of eastern oysters in the Gulf of Mexico. *J Shellfish Res* 1996;15:35-43.
6. Azevedo C. Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea), parasite of the clam *Ruditapes decussatus* from Portugal. *J Parasitol* 1989;75:627-635.
7. Figueras A, Robledo JAF, Novoa B. Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *J Shellfish Res* 1996;15:363-368.
8. Hamaguchi M, Suzuki N, Usuki H, Ishioka H. Perkinsus protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. *Fish Pathol* 1998;33: 473-480.
9. Park KI, Choi KS. Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. *Aquaculture* 2001; 203: 26:9-22.
10. La Peyre JF, Faisal M. *Perkinsus marinus* produces extracellular proteolytic factor(s) in vitro. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 1995;15:28-31.
11. Garreis KA. *Perkinsus marinus* extracellular proteases: modulation of production by environmental factors and effects on the host defense parameters of the eastern oyster (*Crassostrea virginica*). Master's Thesis. 1996, The College of William and Mary, VA, USA
12. Mckerrow JH, Pino-Heiss S, Lindquist R, Werb Z. Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 1985;260:3703-3707.
13. McKerrow JH. Parasite proteases. *Exp Parasitol* 1989; 68:111-115.
14. Malcolm WT. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today* 1996;17:532-540.