결핵 진단액(Purified Protein Derivative)의 단백질체 분석

Proteomic Dissection of Diagnostics (Purified Protein Derivative) for Tuberculosis

조 윤 상
(국립수의과학검역원 질병연구부 세균과)

세계적으로 결핵은 사람에서 매초마다 새로운 감염이 일어나고, 10만 명당 28명(0.028%)의 폐사율을 보이며, 넓은 숙주범위를 갖는 인수공통전염병이다. Purified protein derivative (PPD)-S는 국제적인 표준 피피디로 현재까지 60여 년간 피내검사에 의해 결핵을 진단하는 데 사용되고 있다. 최근 들어 결핵균에 대한 유전체 분석이 완성됨에 따라, 결핵균과 관련된 산물에 대한 단백질체를 분석할 수 있게 되었다. 따라서, 본 연구에서는 질량분석기와 최신 분석 프로그램을 이용하여 피피디 튜버클린의 단백질체를 규명하였다. 피피디의 단백질체는 402개의 단백질로 구성되었으며, 중간대사와 호흡과 관련된 단백질들이 35%를 차지하였다. 한편, 동정된 펩타이드들 중 heat shock protein (GroES, GroEL2, HspX, DnaK)에 해당되는 펩타이드들이 56%를 차지하였고, 피피디는 기존에 알려진 결핵균 T 세포항원의 91%를 포함하고 있었다. ICAT을 통하여 각각의 단백질체를 분석한 결과, PPD-S와 PPD-RT23 및 한국결핵연구원 PPD의 단백질체는 서로 유사한 양상을 보였으나, 각 피피디 고유의 특이 펩타이드들도 관찰할 수 있었다. 앞으로 피피디 단백질체의 질적 및 양적 분석은 결핵 진단의 진단효율 향상과 표준화에 있어 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

Introduction

Mycobacterium 속균은 그람 양성, 항산성 (acid-fast) 세균이며 주요한 사람과 동물 병원체를 포함하고 있다(Falkinham 1996; Raviglione et al. 1995; Smith 2003). 사람 결핵이 주로 *M. tuberculosis*에 원인이 있다고 하더라도, 소결핵의 원인체인 *M. bovis*도 또한

사람 결핵을 일으킬 수 있으므로, *M. bovis*는 중요한 인수공통전염병 원인체이다 (34, 120). *M. bovis*는 동물과 축산물의 국제간 거래에 있어 중대한 제한사항이 되며, 농장에서 주요한 경제적 손실을 일으킨다. *M. tuberculosis complex*에 속하는 *M. bovis*는 국제수역사무국 (the Office International des Epizooties; OIE)에 의해 list B 질병으로 분류되어 왔으며, 감염이 있는 나라에서 국제간 동·축산물 교역상의 중요성과 함께 사회경제적 또는 공중보건적 측면에서 상당한 영향을 갖고 있다.

결핵의 사람 감염은 aerosols 흡입 또는 오염된 우유를 섭취하는 것에 의해 일어날 수 있다. Aerosols은 동물 분비물로부터 생성되지만, 또한 결핵병변이 있는 사체를 취급할 때 발생될 수 있다 (*Neill et al.* 1989). 결핵감염의 이러한 경로는 폐결핵을 유도한다. 만약 잠복 감염된 숙주가 면역 결핍된 상태가 되면, 사람대 사람 전파가 가능하다 (Grange and Yates 1994). *M. tuberculosis* 또는 *M. bovis*에 의해 유발되는 사람 결핵은 임상적, 방사선학적 및 병리학적으로 구별할 수 없다(Wedlock et al. 2002). 소결핵이 방제되지 않고 있는 많은 나라들에서, 또는 엄격한 방제 프로그램과 우유 저온살균을 시행하기 전의 선진국에서, 사람 결핵예는 대부분 어린이에서 일어나며, 오염된 우유를 마셔서 발생한다. 이런 장관을 통한 감염은 결핵의 폐이외 감염을 유도하며, 경부와 드물게는 겨드랑이 림프절에 감염되어 만성 피부결핵을 유도한다(*Moda et al.* 1996). 직업적으로 위험에 노출되는 성인, 즉 수의사 뿐 아니라 특히, 목부 또는 도축장 근무자들은 일반적으로 감염된 소로부터 aerosols을 통하여 호흡기계로 *M. bovis*에 감염되어 전형적인 폐결핵으로 발전한다.

우유의 저온살균과 함께 소 근절정책의 수행은 *M. bovis*로 인한 사람 결핵이 지금 선진국에서 드물다는 결과를 보았을 때, 인수공통전염병 방제에 중요한 영향을 끼쳐왔다.

동물에서 위험요소는 연령, 행동, 환경, 일반적인 농장시설들이 중요한 영향을 줄 수 있다(Mezies and Neill 2000). 영양적인 결핍은 소결핵에 대한 저항성을 감소시킨다 (Griffin 1993). 소결핵과 면역기능이상의 관계가 조사된 적은 없지만, 소의 면역학적인 기능이상은 소결핵 감염을 증가시킬 수 있다.

사람에서는 마이코박테리아 감염의 위험요소는, 특히 *M. tuberculosis*에 대해 잘 묘사되어졌듯이, 노출 정도, 연령, 면역체계, HIV 감염, 유전적 요인, 백신 상태, 그리고 또한 사회경제적인 요인을 포함한다. *M. bovis*가 사람 결핵의 원인체로 작용할 때 직업적인 노출과 생활 형태도 또한 위험요인으로 고려되어질 수 있다. 잠복상태에서 마이코박테리아가 숙주체계에 의해 덜 엄중한 방제에 놓여질 수 있기 때문에, 결핵은 스트레스 또는 노령에서 재발된다. 사람이 population내에서 능동적으로 감염을 전파시키기 시작할 수 있기 때문에, 가축 또는 야생동물에서의 질병과, 특히 HIV에 감염된 사람과 접촉하는 지방병적인 성질은 심각한 보건문제를 제기한다. 또 다른 위험은 사람과 감염된 야생동물과의

접촉의 증가에서 올 수 있으므로, 소결핵은 "레저" 인수공통전염병이 될 수 있다 (Biet 2005). 이것은 동물사체를 다루면서 감염성 있는 작은 방울에 심하게 오염될 수 있는 사냥꾼에게 가능성이 있다.

Florence B. Seibert는 1890년에 Robert Koch의 old tuberculin (OT)이 많은 양의 단백질과 다당류를 함유하며, 그 단백질들은 결핵 진단시 유용함을 확인하였다. Purified protein derivative (PPD)는 결핵의 생체내 진단을 위해 1941년 Seibert와 Glenn에 의해 제조되었다 (Seibert and Glenn 1941). 각기 다양하게 제조된 PPD는 신뢰할만하고 재현성있는 피내반응 결과를 내는 것이 중요하다. 따라서, PPD는 생물학적 역가에 의해 정량되어왔으나, 여러 가지 PPD 사이에서의 화학적 차이에 대한 정확한 분자구성성분은 상당부분 알려져 있지 않았다.

M. tuberculosis 유전체의 규명과 이에 대한 주석 (Cole et al. 1998; Camus *et al.* 2002)은 PPD와 같은 다양한 *M. tuberculosis* 유래 물질의 복잡한 단백질체를 밝힐 수 있는 기회를 제공한다. 본 연구에서는 면역특이적인 항원을 찾아낼 목적으로 PPD의 단백질체를 정의하기 위해 PPD를 2차원 액체크로마토그래피로 분획하고 직렬 질량분석기에 의해 분석하였으며, ICAT 기법을 이용하여 각기 다른 PPD들 사이의 단백질체를 정량적으로 비교분석하였다.

Preliminary analysis of purified protein derivative (PPD)

튜버클린의 주요 구성성분은 단백질인데, 처음 도입된 1800년대 후반이래로, 계속적으로 그 조성, 표준화 및 사용의 개선이 있어왔다. 현재 국제적인 표준품은 PPD-S1, S2 그리고, RT23이며, 국제적으로 알려진 대량생산 PPD는 PPD-CT68 (Connaught Medical Laboratories, University of Toronto, Toronto, Canada)과 IP48 (Institut Pasteur, Paris, France) 등이 있다. 이것들은 많은 lots의 PPD를 합쳐서 만들었는데, 그 이유는 제조 lot 별로 분자량 차이에 의한 생물학적 역가의 차이를 극복하기위한 것이다. PPD를 BCA 단백질 검사법 (Pierce)으로 측정한 결과, 약 86%가 단백질로 구성되어있었는데, SDS-PAGE에 의해 나타난 단백질 양상은 명확하고 잘 분리되지 않았다. 이는 PPD 제조과정에서 고온처리에 의한 결핵단백질의 변성과 화학성분에 의한 단백질침전 때문이다. SDS-PAGE상에서 PPD의 좋지 않은 해상도 때문에 액체크로마토그래피가 단백질 분획기법으로써 전기영동 대신에 사용되었다. 질량분석기에 의한 동정에 공시할 PPD의 환원, 알킬화, 트립신분해 및 키모트립신분해 처리는 상대적으로 높은 분자량의 단백질들을 유의성 있게 많이 감소시켰다. 그러나, 트립신 분해 후 분명하게 분해되지 않은 산물들이 25 kDa이하에서 관찰되었고, 키모트립신 분해 후 10, 14, 15, 25, 50 kDa에 해당하는 단

백질들이 분해되지 않은 것으로 관찰되었다. 트립신과 키모트립신으로부터 분해된 펩타이드들을 완전한 PPD 단백질체를 분석하는 데 적용되어졌다. PPD의 2차원 전기영동상은 1차원 전기영동상에서 예상되었던 것처럼 in-gel digestion으로 분석하기위한 분명한 스팟을 보이는데 실패했다.

Separation of PPD peptides

더욱 완전한 PPD 단백질체를 얻기 위해 1차원 또는 2차원 전기영동대신에 다차원 액체 크로마토그래피 (multi-dimensional liquid chromatography; MDLC)에서 얻은 펩타이드 분획들에 대해 질량분석기로 분석하였다. 환원, 알킬화, 트립신 처리 PPD (RAT)와 환원, 알킬화, 키모트립신 처리 PPD(RAC)를 강양이온 교환 크로마토그래피(strong cation exchange chromatography; SCX) 처리하여 각각 6개와 14개 분획을 얻었다. 이들 각각의 분획을 reverse phase (RP)-HPLC로 더욱 세분하여 분획하였다. 2차원 액체크로마토그래피에 의해 RAC로부터는 149 분획을, RAT로부터는 208 분획을 얻었다.

Analysis of MS data

RAT와 RAC로부터 2차원 액체크로마토그래피 펩타이드 분획은 LC-MS/MS분석으로 각각 22,724와 10,520 펩타이드에 해당하는 것으로 나타났다. 이 분석은 SEQUEST™을 이용하였으며, 이때 Xcorr의 cutoff치는 2.0이상이었다. RAT와 RAC로부터 얻어진 펩타이드는 결핵 유전체로부터 발현이 예상되는 3,999 단백질 (http://genolist.pasteur.fr/TubercuList) 중 각각 3,321 (83%)개와 2,825 (71%)개 단백질들에 해당되었다.

Peptide probability and identified peptides

동정된 단백질들을 공표하기위해서는 각각의 동정된 단백질들의 진위를 검증하는 과정이 필수적이다. 검증하는 전형적인 방법은 질량분석기로부터 얻어진 각각의 스펙트럼을 일일이 육안적으로 스펙트럼의 질을 확인하여 적절한 최소의 cutoff치의 판단기준으로 한다. 이를 통하여 펩타이드와 단백질 동정을 수정할 수 있다. 그러나, 실제적으로 똑같은 경험있는 사용자라도 두번째 육안조사에서 대량의 데이터에 있는 모든 스펙트럼에 대해 정확하게 똑같은 판단을 할 것 같지 않다.

이렇게 SEQUEST™에 의한 많은 수의 부정확한 펩타이드때문에 펩타이드의 유효성을 검증하기위하여 각각의 스펙트럼을 일일이 조사해 왔는데, 이제 통계적인 모델인 PeptideProphet™과 ProteinProphet™을 적용하여 그 과정의 노동력과 시간을 상당히 줄일

수 있다. 이러한 완전히 자동화되고 신속한 방법은 주관적인 전문가의 판단에 의존하지 않는 객관적인 프로그램으로 자료분석이 일관되고 투명하여진다. 이 프로그램은 대량 자료들의 필터링을 통하여 다른 상황의 결과들을 예상하는 민감성(sensitivity)과 의양성 오동정율(error rate)을 비교하는 방법을 제공한다. PeptideProphet™은 SEQUEST™결과로부터 얻은 많은 의양성 결과를 제거할 수 있는 데, 이를 이용하면 MS 스펙트럼의 수동적 판단방법과 달리 객관적으로 단백질체를 분석할 수 있다는 큰 장점을 가지고 있다. 이 소프트웨어로 각각의 MS 스펙트럼은 고유의 p값을 가지는데, p값은 여러 파라미터로 계산된다. 그 파라미터들은 상호관계 (cross correlation; Xcorr)값, ΔCn, 예비적 SpRank, 트립틱 말단의 수 등이다. PeptideProphet™를 통하여 SEQUEST™로 동정된 각각 RAT와 RAC 유래 22,724와 10,520 펩타이드들로부터 의양성 펩타이드들을 제거하여 진양성인 4,541과 1,643 펩타이드를 얻었다. 이렇게 진양성으로 동정된 펩타이드들에 대해 ProteinProphet™은 해당되는 단백질을 동정하였다.

Protein probability and identified proteins

ProteinProphet™은 각각의 단백질의 실재 가능성을 계산하는데, 이러한 가능성은 의양성 가능성이 있는 동정결과를 줄이는 방향으로 그 동정결과를 줄여나간다. 그것은 단하나의 펩타이드 동정으로 확인된 단백질들을 배제하지는 않지만 불리하게 함으로써 이루어진다. 이를 통하여 중요성을 가진 어떤 자료가 희생되지 않으며, 오동정율(error rate)과 민감성(sensitivity)이 결정된다. 우리가 단백질 자료를 제한시켜서 오로지 가장 신뢰할 만한 동정 (p = 0.95) 목록을 얻었을 때, 오동정율이 RAT의 경우 0.8%, RAC의 경우 0.7% 이었다. 그러나, RAT는 86%, RAC는 61%의 상대적으로 낮은 동정율을 이끌어 낼 수 있었다. 그리하여, 그것들의 판단에서 해석하거나 더 나아가 이용할 수 있는 가장 완전한 자료를 얻기 위해서, 본 연구에서는 p값을 0.2로 하여 단백질 동정결과를 필터하였다. 이로 인하여 상대적으로 실제 100% 정확한 일치를 이끌어내는 대신에 RAT는 7.2%, RAC는 27%의 높은 의양성율을 보였다.

PPD의 더욱 완전한 단백질체는 키모트립신으로 처리하고 난 후, 얻을 수 있었다. ProteinProphet™은 RAT는 260개, RAC는 213개의 단백질들을 동정하였다. RAT와 RAC 결과를 비교했을 때, RAT와 RAC로부터 동정된 총 388개의 단백질들 중 22%가 두 단백질분해효소로부터 공통으로 동정되었다. 트립신 처리한 PPD로부터 얻어진 것과 다른 142개의 단백질들이 키모트립신 처리한 PPD로부터 동정되었다. 이렇게 단백질분해효소에 따라 동정되는 단백질에 차이를 보이는 것은 트립신과 키모트립신의 특이절단부위 아미노산차이에 기인하는 것으로 사료된다. 이와 더불어, 1차원 SDS-PAGE상에서 RAC

PPD를 전기영동한 후 나타난 5 개의 분명한 밴드를 in-gel 소화분해와 LC-MS/MS에 의해 분석하였다. 118 펩타이드가 이들 단백질 밴드로부터 동정되었는데, RAT와 RAC에서와 마찬가지로 PeptideProphet™과 ProteinProphet™으로 분석되었다. 이들 118개 펩타이드는 18개의 단백질에 해당되었으며, RAT와 RAC 와는 4개의 단백질이 공통이었으며, 14개의 새로운 단백질들이 동정되었다.

Heat shock protein(HSP)에 해당하는 펩타이드들이 RAT로부터 58%, RAC로부터 45%가 동정되었다. 더욱이, RAT로부터 57%, RAC로부터 45%의 펩타이드들은 GroES, GroEL2, HspX, DnaK에 해당하는 펩타이드인 것으로 나타났다. 질량분석기의 다양한 이온화효율과 각각의 단백질분해효소 고유의 특이 절단 아미노산 차이 때문에, 통계학적 분석이나 정량분석자료가 없는 단백질체 분석결과로는 동정된 단백질의 그 양적인 풍부함을 항상 논할 수 있는 것은 아니다. 두가지 단백질 분해효소를 사용한 본 연구에서는 RAT와 RAC 결과를 분석했을 때, GroES, GroEL2, HspX, DnaK 등에 해당하는 펩타이드들이 우세함을 보여 PPD 내의 HSP의 양적인 우세함을 확인할 수 있었다. 한편, 이들 HSP는 각각의 단클론항체를 이용한 Western blotting으로 확인할 수 있었으나, PPD 생산시 그 처리과정에서 많은 양이 degradation되었음을 확인하였다. 덧붙여, GroEL1은 RAC에 의한 분석보다 RAT에 의한 분석에서 낮게 동정되었으며, 이는 GroEL1의 키모트립신 특이 절단부위 아미노산수가 트립신의 특이절단부위 아미노산수보다 더 낮았기 때문인 것으로 사료된다. 다른 HSP들, 예를 들면, ClpB, GrpE, HtpG 등도 본 연구의 PPD 단백질체분석에서 동정되었다. RAT와 RAC에서 동정된 펩타이드 중 공통적으로 다수의 펩타이드는 4가지의 주요 HSP들 (GroES, GroEL2, HspX, DnaK), Tuf, AcpM, CFP10, ModD, TrxC, SahH, MPT63 등이었으며, 이들 11 개의 펩타이드들은 동정된 펩타이드들 중 RAT에서는 70%, RAC에서는 62%를 차지하였다. CFP(culture filtrate protein)의 단백질체는 PPD만큼 많은 HSP는 관찰되지 않는 등, PPD 단백질체와 차이를 보이는데, 이러한 결과는 PPD가 제조과정에서 고온처리에 의한 생리적 상태의 변화에 기인하는 것으로 사료된다. 동정된 주요 HSP들 중 GroEL2, HspX, DnaK는 세포벽, 세포막 및 세포질내에 존재하고 GroES는 세포벽과 세포질 내에 존재하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 결핵단백질의 위치를 알아보기 위한 이 실험결과는 PPD생산시와는 다른 균주와 배양조건, 생산조건으로 수행하였다. 따라서, PPD내에 HSP가 많이 동정된 다른 한 원인은 PPD 단백질들이 PPD 제조중 고온처리과정에서 세포질 내와 세포벽에 있던 단백질들이 배양액으로 배출되는 것이 원인일 수 있다. PPD내에 많은 부분을 차지하는 것으로 동정된 4 가지 주요 HSP는 다른 마이코박테리아와 그 유사성을 살펴보았을 때, *M. paratuberculosis*와는 94% 이상이며, 다른 마이코박테리아와도 상당한 유사성을 보여 이들 마이코박테리아와 면역학적인 교차반응을 일으킬 가능성이 많은 것으로 밝혀졌다. 그러므로, 각각의 HSP는

튜버클린 피내반응을 통하여 그 교차반응성이 평가되어져야 하며, 앞으로 피내반응 진단액을 이용한 결핵의 생체내 진단을 개선시키는 데 이러한 생물학 정보들이 핵심적인 역할을 할 수 있을 것으로 사료된다.

Functional grouping

결핵균에서 open reading frame의 기능적 분류는 11개의 카테고리로 분류될 수 있다 (http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/). 결핵의 표준화된 단백질체중 가장 많은 부분은 conserved hypothetical protein들이다. 그러나, PPD중 가장 많은 수의 단백질들은 intermediary metabolism과 호흡에 관여하는 단백질들이었다. 중간대사와 호흡 그리고, 세포벽과 세포 변화와 관련 있는 단백질들이 과도하게 표현되어졌음을 알 수 있었다. Insertion sequences and phages에 관련된 단백질을 제외한 다른 단백질들의 카테고리 분포는 표준화된 단백질체의 카테고리 분포와 같은 양상을 보였다. 결핵균 단백질들은 11개의 카테고리로 나눌 수 있다. 0, virulence, detoxification, adaptation; 1, lipid metabolism; 2, information pathways; 3, cell wall and cell processes; 5, insertion sequences and phages; 6, PE and PPE proteins; 7, intermediary metabolism and respiration; 8, proteins of unknown function; 9, regulatory proteins; 10, conserved hypothetical proteins; 16, conserved hypotheticals with an orthologue in M. bovis (http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/). 표준화된 단백질체보다 더 많이 표현된 단백질들은 카테고리 0, 1, 2, 7 및 8 등인 반면, 더 적게 표현된 단백질들은 카테고리 3, 5, 9, 10 및 16 등이었다. PPD에서 동정된 단백질들의 주요 기능적인 카테고리의 분포는 세균 배양상층액 단백질에서 동정된 단백질들의 카테고리의 분포와 유사하였다. 세균 배양상층액 단백질들은 주로 small-molecule metabolism, conserved hypothetical proteins 및 macromolecule metabolism 등과 관련된 단백질이었다. 이와 더불어, 배양상층액 단백질에서 동정된 7 개의 HSP는 PPD에서도 동정되었다. 그러나, PPD에서 conserved proteins은 표준화된 결핵균 단백질체와 비교했을 때 상대적으로 낮게 나타났다. 이러한 단백질 발현양상은 conserved hypothetical proteins의 기능에 관한 더욱 자세한 정보를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

T cell antigens in PPD

결핵 진단에 있어 PPD의 양성 피내반응 가치는 감소되고 있다. 왜냐하면, 결핵 피내진단액에 대한 면역반응이 마이코박테리아와 교차반응하기 때문이다. 따라서, 특이한 T 세

포 항원을 이용한 더욱 개선된 결핵 피내진단액이 개발되어야 할 것으로 사료된다. PPD는 몇몇의 공통적이고 특이적인 항원의 혼합물이다. 그 항원들 중에서 가치 있는 항원들은 마이코박테리아의 각기 다른 종에 특이적일 수 있다. 본 연구에서 PPD는 결핵균의 이미 알려진 35개의 T 세포 항원 중 32개를 가지고 있음이 확인되었다. 따라서, 상당한 특이성을 가진 PPD 항원을 얻기 위한 연구가 결핵의 피내진단 항원의 개선을 위하여 지속되어야 할 것으로 사료된다.

Unique proteins in *M. tuberculosis*, not in *M. bovis* BCG

M. tuberculosis H37Rv의 16 개로 나뉘어지는 유전체부위 (RD1 ~ RD16)가 몇몇 M. bovis와 M. bovis BCG 균주에서는 소실되어있다. 예를 들면, CFP10을 암호화하는 ORF는 *M. tuberculosis* H37Rv의 RD1 소실부위에 위치해 있다. 따라서, CFP10은 병원성 *M. tuberculosis* H37Rv와 wild-type M. bovis에는 존재하나, 모든 약독화 *M. bovis* BCG에는 소실되었음이 알려져 있다. *M. bovis* BCG의 단백질체와 비교했을 때, PPD는 25개의 유일한 단백질을 가지고 있음이 확인되었다. 이는 *M. bovis* BCG의 단백질체와 소실된 RD 부위와의 비교를 통하여 알 수 있었는데, CFP10, ESAT6, MPT64, Rv2346c, Rv3620c, Ald, FabG4, FadA2, FbpB, FixA, GroES, HemL, HspX, NusG, Tuf, Rv1198, Rv0020c, Rv3046c, Rv3881c, CFP21, Rv3400, LeuA, PyrH, Rv2557, NadC 등이었다. 이러한 결핵 특이적인 단백질들 중 CFP10, ESAT6, MPT64, FbpB, FixA, GroES, HspX, CFP21등은 강력한 T 세포 항원으로 알려져 있다. 그러므로, 이러한 T 세포 항원은 결핵을 진단하는 특이한 항원으로 쓰일 수 있으며, 결핵 환자로부터 BCG 접종개체를 구별하는데도 활용할 수 있다.

Comparison between PPDs through ICAT technology

PPD의 생물학적 역가는 제조 lot별로 상당히 차이가 있을 수 있다는 것이 알려져 왔으며, 이는 결핵단백질의 상대적인 분자량의 차이 때문이다. PPD의 정량비교분석을 위해서, isotope-coded affinity tag technology (ICAT)는 질량분석기와 서로 잘 양립할 수 있는 방법이며, 정량비교분석에 많이 쓰이고 있다. 결핵균의 유전체에 기초하면, 단백질의 81%는 ICAT 기법을 적용하는 데 필수적인 아미노산인 cysteine을 적어도 하나는 가지고 있음을 알 수 있다. 다만, 본 연구에서 4개의 주요 HSP들 (GroES, GroEL2, HspX, DnaK)이 동정되었는데, 이들 4개의 주요 HSP들은 cysteine을 가지고 있지 않아 ICAT 기법으로는 정량 분석할 수 없었다. Statens Serum Institut의 PPD-RT23와 한국결핵연구원

의 PPD-KIT를 PPD-S2와 비교하였다. 똑같은 두개의 PPD-S2를 정량분석한 결과, 91% 펩타이드가 정상 범위 (H (heavy) to L (light) ratio: 0.7 ~ 1.3)에 해당하였다. PPD-S2와 PPD-RT23를 비교했을 때, PPD-RT23와 S2의 평균 H to L ratio는 1.1이었으나, PPD-RT23에서 분석된 펩타이드중 19%가 정상범위 바깥에 위치했으며, PPD-S2 펩타이드에 비해 11개의 펩타이드가 상대적으로 낮은 수준으로 나타났고, 10개의 펩타이드가 상대적으로 높은 수준으로 나타났다. PPD-S2와 비교하여 PPD-KIT 펩타이드중 17% (17개)가 정상범위를 벗어났는데, 이들 중 16개 펩타이드가 overexpression되었다.

Summary

상당히 성공적인 사람병원체인 결핵균을 Robert Koch가 발견한 이래, 결핵 방제의 상당한 진보에도 불구하고, 결핵의 발생은 현재까지 계속되어오고 있다(Tiruviluamala and Reichman 2002). 그러므로, 완전한 민감성과 특이성을 갖는 신속한 진단방법이 결핵과 결핵의 잠복감염을 진단하는데 요구되어지며(Tiruviluamala and Reichman 2002), 계속적으로 결핵균과 BCG의 유전체와 단백질체 연구를 통하여 결핵 방제수단이 발전되어질 것이다 (Jungblut *et al.* 1999). 본 연구는 PPD가 결핵을 진단하는 특이한 항원만으로 정확하게 조화를 이루고 있지 않다는 것을 보여주었으며, 그것의 역가는 결론적으로 생물학적으로 평가되어져야 하지만, PPD의 제조는 단백질체 분석 기법에 의해 분석되고 표준화될 수 있음을 보여주었다. 이를 통하여 결핵 피내진단의 일관된 결과를 위해 PPD 사용 전에 이와같은 단백질체 분석기법을 적용할 수 있을 것으로 사료되며, 본 연구에서 밝혀진 특이 항원은 새로운 피내진단항원으로 적용될 수 있을 것으로 사료된다.

References

Biet, F. *et al.* Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC). Vet. Res. 36, 411-436 (2005).

Falkinham, J.O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria, Clin. Microbiol. Rev. 9, 177-215 (1996).

Raviglione, M.C. *et al.* Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 273, 220-226 (1995).

Smith, I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin. Microbiol. Rev. 16, 463-496 (2003).

Cosivi, O. *et al.* Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. Emerg. Infect. Dis. 4, 59-70 (1998).

Morris R.S. *et al.* The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections, Vet. Microbiol. 40, 153-177 (1994).

Seibert, F.B. and Glenn, J.T. Tuberculin purified protein derivative. Am. Rev. Tuberc. 44, 9-25 (1941).

Neill, S.D. *et al.* Transmission of tuberculosis from experimentally infected cattle to in-contact calves. Vet. Rec. 124, 269-271 (1989).

Grange, J.M. & Yates, M.D. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet. Microbiol. 40, 137-151 (1994).

Wedlock, D.N. *et al.* Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. Microbes Infect. 4, 471-480 (2002).

Moda, G. *et al.* The zoonotic importance of *Mycobacterium bovis*, Tuber. Lung Dis. 77, 103-108 (1996).

Mezies, F.D. & Neill, S.D. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. Vet. J. 160, 92-106 (2000).

Griffin J.M. *et al.* The association of cattle husbandry practices, environmental factors and farmer characteristics with the occurrence of chronic bovine tuberculosis in dairy herds in the Republic of Ireland. Prev. Vet. Med. 17, 145-160 (1993).

Tiruviluamala, P. & Reichman L.B. Tuberculosis. Annu. Rev. Public Health 23, 403-426 (2002).

Jungblut, P.R. et al. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and Mycobacterium bovis BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. Mol. Microb. 33, 1103-1117 (1999).

Cole, S.T. *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 393, 537-544 (1998).

Camus, J.-C. *et al.* Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology. 148, 2967-2973(2002).