

질편모충으로부터 부분정제한 단백질 분해효소의 특성

민득영*, 류재숙, 현근희

한양대학교 의과대학 기생충학교실

초록: 이 연구에서는 질편모충의 단백질 분해효소를 부분정제하고 그 특성을 관찰하였다. 질염환자에서 얻은 질편모충 분리주 KT-9를 sonicator로 분쇄, 원심분리하여 상청액을 얻어 bacitracin-sepharose affinity chromatography로 부분정제하였고 합성기질인 Bz-Pro-Phe-Arg-Nan로 효소의 활성을 측정하였다. 정제한 효소는 pH 7에서 최적 활성을 보였고 DTT를 넣었을 때에는 pH 6 및 pH 9이었다. 최적 온도는 37°C이었지만 높은 온도에서도 활성이 나타났다. 정제한 효소는 cysteine계열의 저해제인 E-64, antipain, leupeptin에 의해, 그리고 Hg²⁺, Zn²⁺ 이온에 의해 활성이 저해되었고, DTT와 cysteine에 의해서는 효소의 활성이 2~3배 증가하였다. 등전점(pI)은 7.2이었고, gelatin SDS-PAGE에서 정제한 효소는 gelatin을 분해하였으나 cysteine계열 저해제인 E-64, iodoacetic acid(IAA), leupeptin, antipain과 반응한 후에는 gelatin을 분해하지 못하였고, PMSF나 EDTA는 영향을 미치지 못했다. 정제한 효소는 SDS-PAGE에서 분자량이 60 kDa이었고 면역이적법에서 면역 혈청과 반응하여 항원성을 나타내었다. 이상의 결과로 보아 60 kDa의 정제한 단백질 분해효소는 항원성을 갖는 cysteine계열 분해효소로 숙주-기생충 상호 관계에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

서론

기생충 단백질 분해효소는 숙주의 조직 침입시, 숙주 면역 반응으로부터의 회피기전으로, 또는 혈액응고 반응에 대한 방어에 이용되고 있으며 (McKerrow, 1989), 기생충병의 병인(pathogenesis)에서 어떤 역할을 담당할 것이라 생각되어지고 있다. 원충인 람블편모충(*Giardia lamblia*)의 cysteine계열의 단백질 분해효소는 azocasein, hemoglobin을 분해하며(Eckhard *et al.*, 1991), 파울러자유아메바(*Naegleria fowleri*)의 cysteine 단백질 분해효소도 gelatin 및 합성기질을 분해하며 세포독성을 보인다(Kenneth *et al.*, 1994). 흡충류인 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)에서 serine계열 단백질 분해효소가 정제된 바 있으며 이 효소는 gelatin, Azocoll, laminin 등을 분해한다 (James *et al.*, 1985). 또한 단백질 분해효소는 람블편모충의 경우 IgG, IgA 등을 분해하고(David,

1989), 이질아메바(Brian and Jonathan, 1993), 스파르가눔(Kong *et al.*, 1994)등에서 분리된 효소도 면역글로불린을 분해함이 보고된 바 있으며 대부분의 단백질 분해효소는 세포독성이 있는 것으로 알려져 있다.

질편모충의 단백질 분해효소에 관한 연구로는 질편모충에 존재하는 효소원의 azocasein 분해능력(Lockwood *et al.*, 1984; Youn *et al.*, 1994), gelatin 분해능력(Lockwood *et al.*, 1987), HPA (hide powder azure) 및 nitroanilide분해능력(Lockwood *et al.*, 1984)에 대한 연구와 분비물질에 존재하는 효소원의 HPA분해능력(Gary and Laurel, 1989, 1994), 합성기질분해능력(Gary and Laurel, 1994)등이 보고된 바 있다. 그러나 정제된 단백질 분해효소에 대한 연구는 드물다.

이 연구에서는 질편모충 추출물에 존재하는 효소의 일부를 정제하고, 이 단백질 분해효소의 효소학적 실험을 수행하여 특성과 항원성 여부를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 질편모충 배양 및 효소원 제조

질편모충은 우리 나라의 질염 환자로부터 분리하

* 논문접수 1995년 12월 21일, 게재확정 1996년 1월 31일

* 이 논문은 1994년도 교육부 학술연구조성비(기초의학)에 의하여 연구되었음.

* 책임저자

여 계대배양중인 KT-9 분리주를 사용하였다. Early log phase의 질편모충을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 인산완충용액(PBS)으로 3회 세척하고, sonicator로 10초씩 5회 반복으로 분쇄하였다. 분쇄된 질편모충을 4°C 100,000 × g에서 1시간 동안 원심분리하여 상청액을 얻었으며 이것을 -70°C에 냉동 보관하면서 효소원으로 사용하였다. 단백질 함량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법으로 정량하였다.

2. Bacitracin-Sepharose affinity chromatography를 이용한 단백질 분해효소의 정제

Stepanov and Rudenskaya(1983)와 Irvine *et al.*(1993)의 방법을 응용하여 시행하였다. Coupling buffer에 녹인 bacitracin(Aldrich, WI)과 CNBr-activated Sepharose 4B(Pharmacia-LKB, Sweden)를 coupling하여 column(1.6 × 7 cm)에 채운 다음, 20 mM acetate buffer(pH 4.0)로 평형시킨 후 효소원을 부하하였다. 0.1 M Tris buffer(pH 7.0), 1.0 M NaCl, 25% propanol로 추출하여 1.5 ml씩 각 분획을 회수하고 효소활성을 측정하여 활성이 있는 분획만을 모아 농축, 탈염시켜 SDS-PAGE로 정제 정도를 확인한 후 -70°C에 보관하면서 효소특성 실험을 수행하였다.

3. 단백질 분해효소 활성 측정

단백질 분해효소의 활성은 North *et al.*(1983)과 Lockwood *et al.*(1984)의 방법을 수정하여 측정하였다. 여러가지 합성기질 중 가장 적당한 기질을 찾기 위하여 N-benzoyl-L-prolyl-L-phenylalanyl-L-arginine- ρ -nitroanilide(Bz-Pro-phe-Arg-Nan), N- ρ -tosyl-glycyl-L-prolyl-L-arginine- ρ -nitroanilide(Tos-Gly-Pro-Arg-Nan), N-benzoyl-L-phenylalanyl-L-valyl-L-arginine- ρ -nitroanilide(Bz-Phe-Val-Arg-Nan), N-benzoyl-L-valyl-glycyl-L-arginine- ρ -nitroanilide(Bz-Val-Gly-Arg-Nan), N-benzoyl-L-arginine- ρ -nitroanilide(Bz-Arg-Nan), N-benzoyl-L-isoleucyl-L-glutamyl-glycyl-L-arginine- ρ -nitroanilide(Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-Nan) 등의 합성기질을 Sigma사(Mo, USA)로부터 구입하여, 전체부피 450 μ l 반응 혼합물 내에 단백질 분해효소 20 μ l, 10 mM dithiothreitol(DTT, Sigma) 45 μ l를 넣고 5분간 반응시킨 후, 1 mM 기질 45 μ l, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 6.0)를 넣어 37°C에서 1시간 30분 동안 반응을 시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하여 효소활성을 확인하였다. 각 기질은 1 mM이 되도록 증류수에 녹였고, Bz-Arg-Nan, Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-Nan은 dimethyl formamide에 먼저 녹여 최종 농도가 dimethyl foramide 5%, 기질 1 mM이 되게 하였다.

4. 단백질 분해효소의 특성

(1) 효소활성 최적 수소이온농도지수(pH) 측정

정제된 단백질 분해효소의 최적활성 pH를 알아보기 위하여 0.1 M citrate buffer(pH 3~pH 4), 0.1 M acetate buffer(pH 5~pH 6), 0.1 M phosphate buffer(pH 7), 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8), 0.1 M carbonate buffer(pH 9~pH 11)를 사용하였다. 그리고 10 mM DTT를 넣어 효소활성을 측정하기도 하였다.

(2) 효소활성 최적 온도 측정

정제된 단백질 분해효소의 활성 최적 온도를 알아보기 위하여 4°C, 15°C, 25°C, 37°C, 50°C 및 60°C 등 각각의 온도에서 1시간 동안 반응시킨 후 효소활성을 측정하였다.

(3) 단백질 분해효소 저해제의 영향

정제된 단백질 분해효소가 어떤 종류인지 알아보기 위하여 여러 종류의 단백질 분해효소 저해제를 사용하였다. Amino-peptidase 계열의 저해제로는 bestatin과 puromycin을, aspartic-계열은 pepstatin A를, serine-계열은 phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF), N- β -tosyl-L-phenylethyl chloromethyl ketone(TPCK), N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone(TLCK) 및 trypsin inhibitor를, metallo-계열은 ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 및 1,10-phenanthroline을, cysteinyl-계열은 trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido-(4-guanidino) butane(E-64), N-ethylenemaleimide(NEM), iodoacetic acid(IAA), leupeptin, iodoacetamide, chymostatin 및 antipain을 사용하였고 DTT와 cysteine의 영향도 같이 조사하였다. 저해제는 증류수에 녹였고, pepstatin, antipain, chymostatin, PMSF, TLCK, TPCK, 1,10-phenanthroline은 methanol에 녹였다. 모든 시약은 Sigma사(Mo, USA)로부터 구입하였으며, E-64만 Boehringer Mannheim(Germany)에서 구입하였다. 정제한 단백질 분해효소와 각 단백질 분해효소 저해제를 넣고 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 기질을 넣어 활성을 측정하였으며, 대조군은 저해제 대신에 증류수를 넣어 활성을 측정하였다.

(4) 금속이온이 효소활성에 미치는 영향

금속이온의 효소활성에 대한 영향을 알아보기 위하여 정제한 단백질 분해효소 20 μ l와 1 mM의 Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺ 등의 금속이온 45 μ l를 실온에서 40분 반응시킨 후 기질을 넣어 효소 활성을 측정하였으며 대조군은 금속이온 대신에 증류수를 넣어 측정하였다.

(5) 단백질 분해효소의 gelatin 분해능력

정제된 단백질 분해효소의 gelatin 분해능을 알아보기 위하여 Lockwood *et al.*(1987)의 방법으로

gelatin SDS-PAGE를 시행하였다. Gelatin(Sigma, Mo, USA)이 들어 있는 polyacrylamide gel에 단백질 분해효소를 부하하여 전기영동한 후 37°C에서 2.5%(v/v) Triton X-100(LKB, Sweden)에 30분간 담가두어 SDS를 제거하고, 0.1 M phosphate buffer(pH 6.0), 5 mM DTT에 gel을 넣어 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 Coomassie brilliant blue R-250(Merck, Germany)으로 염색하여 gelatin 분해정도를 관찰하였다. 단백질 분해효소 저해제에 의해 gelatin분해가 억제되는지 알아보기 위하여 정제한 단백질분해효소 10 µl(5 µg)와 저해제 E-64(0.1 mg/ml), antipain(0.1 mg/ml), leupeptin(0.1 mg/ml), IAA(1 mM), PMSF(1 mM) 및 EDTA(2 mM) 10 µl를 20분간 반응시킨 후 gel에 부하하여 관찰하였다.

(6) Isoelectric focusing(IEF)

정제된 단백질 분해효소의 IEF는 Mini IEF Cell kit(Bio-Rad, Model III)를 이용하여 pH 3~10의 isoelectric focusing gel에서 시행하였다. 각 well에 5~10 µg의 단백질 분해효소를 부하하였고, focusing이 끝난 gel은 고정 후 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다.

5. 단백질 분해효소의 항원성 분석

SDS-PAGE는 7.5-15% gradient gel과 12% gel을 사용하여 시행하였고, 전기영동된 gel은 Coomassie brilliant blue-R 250에 염색하거나 Towbin et al.(1979)과 Tsang et al.(1983)의 방법에 따라 면역이적법을 시행하였다. 전기영동된 gel은 nitrocellulose paper(pore size 0.45 µm: Amersham, UK)에 밀착시켜 전이시켰으며, 전이시킨 gel을 Coomassie blue로 염색하여 전이되었는지를 확인하였다. 표준단백질이 전이된 nitrocellulose paper는 Amido black 10B(Pharmacia-LKB, Wis, USA)로 염색한 다음 분자량 환산에 이용하였다. 가토 항혈청은 1:500, HRP-goat antirabbit IgG(Cappel, Pa, USA)는 1:1000으로 희석하여 반응시켰고, 기질용액(DAB 50 mg, 30% H₂O₂ 10 µl, PBS 100 ml)에서 반응시켜 항원-항체 반응을 관찰하였다. 이때 사용한 가토의 면역 혈청은 질편모충 KT-9 분리주의 마쇄항원으로 면역시킨 가토로부터 분리하여 항체생산이 확인된 혈청으로 -70°C에 보관하면서 사용하였다.

결 과

1. 단백질 분해효소 정제

Bacitracin-Sepharose affinity chromatography를 시행하여 각 분획을 1.5 ml씩 회수하여 활성을 측정하였을 때 한 개의 활성 peak가 있었고(Fig. 1) 이 활성 peak를 모아 실험에 사용하였다. 12%

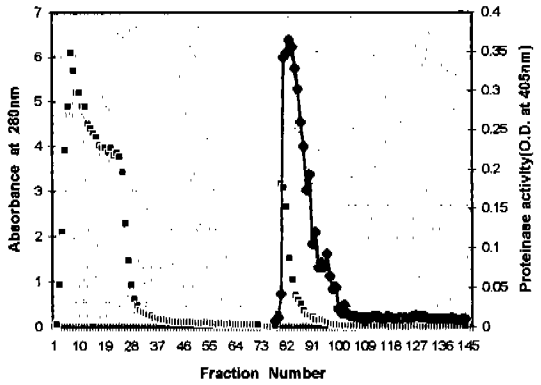


Fig. 1. Bacitracin-Sepharose affinity chromatography of proteinases from *T. vaginalis* cell lysates supernatants. Proteinase activity was determined using Bz-Pro-Phe-Arg-Nan. Activity peaks were pooled, concentrated, desalted and assayed. Absorbance at 280 nm (■), proteinase activity (—●—).

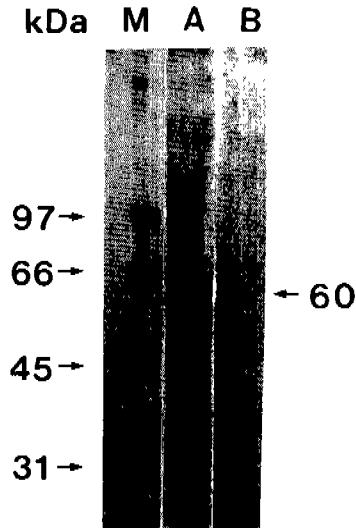


Fig. 2. SDS-PAGE profile of the purified proteinase from *T. vaginalis* cell lysate supernatants. Lane A, *T. vaginalis* cell lysate supernatants; Lane B, purified proteinase; M, molecular weight marker.

SDS-PAGE 결과 60 kDa에서 한 개의 띠가 관찰되어 정제되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Bacitracin-Sepharose affinity chromatography에 의한 정제 결과는 Table 1에 요약해서 나타내었는데 효소활성은 약 60배 정도 정제되었고 회수율은 1.92%이었다.

Table 1. Proteinase purification from *T. vaginalis* lysates by bacitracin-sepharose affinity chromatography

	Total protein (mg)	Total activity (unit) ^{a)}	Specific activity (unit/mg)	Purification Fold	Recovery (%)
Crude extract ^{b)}	245.0	1151.5	4.7	1	100.0
Bacitracin-Sepharose ^{c)}	4.7	1316.0	280.0	60	1.92

^{a)}One unit of enzyme is defined as an absorbance change of 0.1/h with Bz-Pro-Phe-Arg-Nan as substrate. ^{b)}Supernatant from ultracentrifuge of sonicated cell lysate. ^{c)}Bacitracin-Sepharose affinity chromatography.

Table 2. Activity of purified proteinase towards various synthetic substrates^{a)}

Synthetic substrate	Concentration	Enzyme activity (O.D. at 405nm)
Bz-Pro-Phe-Arg-Nan	1 mM	0.389 ± 0.031
Tos-Gly-Pro-Arg-Nan	1 mM	0.106 ± 0.009
Bz-Phe-Val-Arg-Nan	1 mM	0.085 ± 0.019
Bz-Val-Gly-Arg-Nan	1 mM	0.020 ± 0.001
Bz-Arg-Nan	1 mM	0.022 ± 0.001
Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-Nan	1 mM	0.021 ± 0.003

^{a)}Assays were performed in the presence of 10 mM DTT.

2. 효소활성 측정

질펀모충에 존재하는 효소활성 측정에 적합한 기질을 찾기 위하여 사용된 Bz-Pro-Phe-Arg-Nan, Tos-Gly-Pro-Arg-Nan, Bz-Phe-Val-Arg-Nan, Bz-Val-Gly-Arg-Nan, Bz-Ile-Glu-Gly-Arg-Nan, Bz-Arg-Nan 등의 기질중 Bz-Pro-Phe-Arg-Nan의 활성이 가장 높아 이후 실험에 이 기질을 사용하였다 (Table 2).

3. 정제된 단백질 분해효소의 특성

(1) 효소활성 최적 pH

정제된 단백질 분해효소의 최적 pH를 알아보았을 때 pH 7에서 활성이 가장 높게 나타났고, DTT를 넣어 활성을 측정한 경우에는 pH 6과 9에서 활성이 높게 나타났으며, pH 5~9의 넓은 범주에서 활성이 다 높게 나타났다(Fig. 3).

(2) 효소활성 최적 온도

최적 온도를 알아보기 위하여 정제한 단백질 분해효소를 4°C, 15°C, 25°C, 37°C, 50°C 및 60°C에서 반응을 시켰을 때 37°C에서 활성이 가장 높게 나타났고, 전체적으로 37°C 이상에서 효소 활성이 높게 나타났다(Fig. 4).

(3) 단백질 분해효소 저해제의 영향

정제한 단백질 분해효소가 어떤 계열인지 알아보기 위하여 여러 종류의 저해제를 사용하여 활성을 측정하였는데 cysteine계열 저해제인 E-64, antipain, chymostatin, NEM, iodoacetamide, IAA

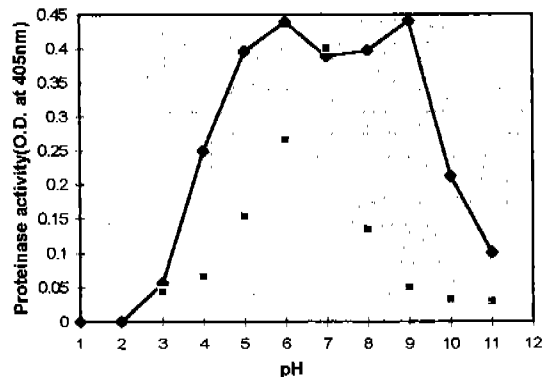


Fig. 3. Effect of pH on purified proteinase activity of *T. vaginalis* cell lysate supernatants. Assays were carried out without DTT (■) or with 10 mM DTT (—●—).

에 의해서는 활성이 유의적으로 억제되었다(Table 3). 또한 serine계열의 TPCK와 TLCK에서도 유의하게 억제되었고 Aspartyl계열의 pepstatin, Metallo계열의 1.10-phenanthrolin, serine계열의 PMSF에서는 약간 억제되었다. DTT와 cysteine에 의해서는 효소활성이 2~3배 정도 증가하여 이 효소는 cysteine계열임을 알 수 있었다.

(4) 금속이온의 영향

여러가지 금속이온에 대하여 효소가 어떤 영향을 받는지 알아보기 위하여 Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺,

Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Fe³⁺, Hg²⁺ 등의 이온을 첨가하여 효소활성을 측정된 결과 Zn²⁺, Hg²⁺에 의해 활성이 95% 이상 유의적으로 억제되었고 다른

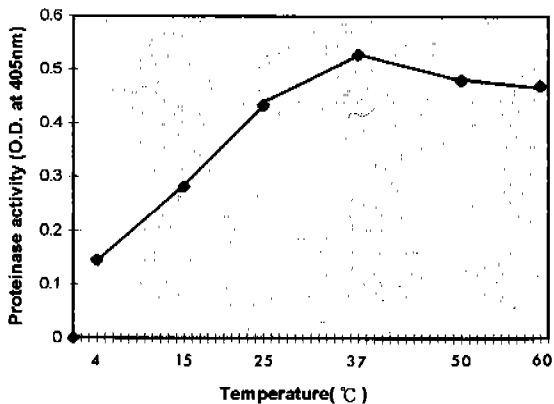


Fig. 4. Effect of incubation temperature on purified proteinase activity of *T. vaginalis* cell lysate supernatants.

이온에 의해서는 약간 억제되었다(Table 4).

(5) Gelatin 분해능력

정제한 단백질 분해효소가 gelatin을 분해하는지 알아보기 위하여 gelatin SDS-PAGE를 시행하였는데 질편모충 용출액과 정제한 단백질 분해효소 둘다 gelatin을 분해하였다(Fig. 5A). Cysteine계열 저해제인 E-64, IAA, leupeptin 및 antipain과 정제한 단백질 분해효소를 반응시킨 후 전기영동하였을 때에는 효소활성이 억제되어 gelatin을 분해하지 못하였고, 다른 종류의 억제제인 EDTA, PMSF와 반응시킨 것은 효소 활성이 억제되지 않아 gelatin이 분해되었다(Fig. 5B).

(6) IEF

정제한 단백질 분해효소를 IEF gel에 부하하여 등전점 (pI)을 알아보았는데 pI값은 7.2였다(Fig. 6).

4. 정제한 단백질 분해효소의 항원성

정제한 단백질 분해효소와 면역 가토 혈청을 반응시킨 바 면역 혈청과는 특이한 반응으로 60 kDa에서 띠가 관찰되었으나 정상 가토 혈청과는 반응하지 않아 이 분획은 항원성을 갖고 있었다(Fig. 7).

Table 3. Effects of inhibitors on purified proteinase of *T. vaginalis*

	Concentration	Enzyme activity (O.D. at 405 nm)	Percent of activity (%)
Control		0.152 ± 0.038	100
<Amino-peptidase>			
Bestatin	1 mM	0.153 ± 0.041	101
Puromycin	1 mM	0.157 ± 0.057	103
<Aspartic-proteinase>			
Pepstatin A	0.1 mg/ml	0.146 ± 0.056	96
<Metallo-proteinase>			
1,10-phenanthroline	1 mM	0.059 ± 0.007	39
EDTA	2 mM	0.228 ± 0.019	150
<Serine-proteinase>			
PMSF	1 mM	0.113 ± 0.007	74
Trypsin inhibitor	1 mM	0.172 ± 0.004	113
TPCK	1 mM	0.033 ± 0.00	22 ^{a)}
TLCK	1 mM	0.027 ± 0.002	17 ^{a)}
<Cysteine-proteinase>			
E-64	0.1 mg/ml	0.023 ± 0.00	15 ^{a)}
Leupeptin	0.1 mg/ml	0.033 ± 0.00	22 ^{a)}
Antipain	0.1 mg/ml	0.024 ± 0.007	16 ^{a)}
Chymostatin	0.1 mg/ml	0.029 ± 0.007	19 ^{a)}
Iodoacetamide	1 mM	0.049 ± 0.009	32 ^{a)}
Iodoacetic acid	1 mM	0.033 ± 0.004	22 ^{a)}
N-Ethylenemaleimide	5 mM	0.037 ± 0.008	24 ^{a)}
DTT ^{c)}	5 mM	0.389 ± 0.019	256 ^{b)}
Cysteine ^{c)}	5 mM	0.303 ± 0.049	199 ^{b)}

^{a)}p < 0.01; ^{b)}p < 0.005; ^{c)}Activators of cysteine proteinase; assays were performed in the phosphate buffer (pH 6.0).

Table 4. Effects of metal ions on purified proteinase of *T. vaginalis*

	Concentration	Enzyme activity (O.D. at 405 nm)	Percent of activity (%)
Control		0.060 ± 0.019	100
Ca ²⁺	1 mM	0.056 ± 0.016	93
Mg ²⁺	1 mM	0.054 ± 0.015	90
Zn ²⁺	1 mM	0.002 ± 0.001	3 ^{a)}
Mn ²⁺	1 mM	0.058 ± 0.003	97
Fe ²⁺	1 mM	0.048 ± 0.015	80
Co ²⁺	1 mM	0.037 ± 0.003	62
Fe ³⁺	1 mM	0.035 ± 0.011	58
Hg ²⁺	1 mM	0.001 ± 0.000	2 ^{a)}

Assays were performed in the presence of 10 mM DTT. ^{a)}p < 0.005

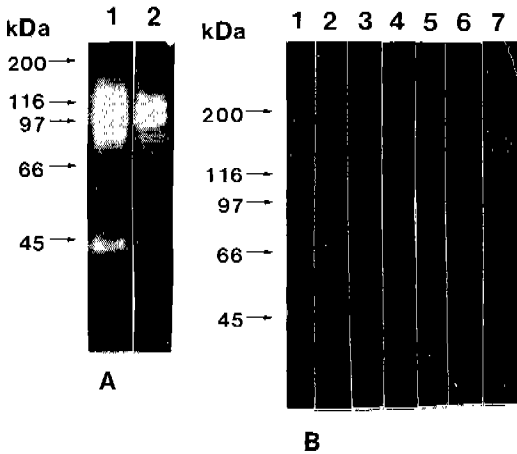


Fig. 5. Gelatin-containing SDS-PAGE analysis of the purified proteinases from *T. vaginalis* cell lysates supernatants. Each sample was loaded into 7.5% acrylamide gel. After electrophoresis and Triton X-100 treatment, the gel was incubated at pH 6.0 phosphate buffer with 5 mM DTT. **A:** Lane 1. purified proteinase 10 µg; Lane 2. *T. vaginalis* cell lysates supernatant 10 µg. **B:** Lane 1. purified proteinase 5 µg; Lane 2. purified proteinase 5 µg + E-64; Lane 3. purified proteinase 5 µg + IAA; Lane 4. purified proteinase 5 µg + leupeptin; Lane 5. purified proteinase 5 µg + antipain; Lane 6. purified proteinase 5 µg + EDTA; Lane 7. purified proteinase 5 µg + PMSF; Arrows indicate molecular weight of marker.

고 찰

단백질 분해효소는 단백질을 작은 peptide로 자르는 분해효소로 여러가지 기준에 따라 분류되는데, 최근에 가장 많이 사용하는 분류방법은 Hartley

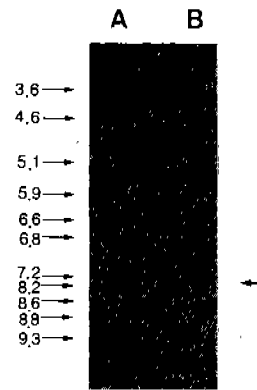


Fig. 6. Isoelectric focusing analysis (pH range 3-10) of the purified proteinase. Isoelectric point markers included the following proteins: amyloglucosidase (3.6), trypsin inhibitor (4.6), β-lactoglobulin A (5.1), carbonic anhydrase II (5.9), carbonic anhydrase I (6.6), myoglobin (6.8, 7.2), lentil lectin (8.2, 8.6, 8.8), trypsinogen (9.3). Lane **A**, Markers; Lane **B**, purified proteinase.

(1960)가 제안한 것으로 여러가지 효소저해제들에 대한 민감도와 단백질 분해효소의 활성 부위에 존재하는 활성 아미노산 잔기의 차이에 따라 aspartyl (carboxyl), cysteinyl(thiol), metallo, serine-proteinase 등으로 나눈다.

질편모충의 단백질 분해효소에 관한 연구는 크게 두가지 방향, 질편모충에 존재하는 효소와 질편모충이 분비하는 효소로 나뉘어져 수행되고 있으며, 둘다 cysteine계열이라고 보고되었으나(Lockwood et al., 1984; Gary and Laurel, 1989; North et al., 1990; Gary and Laurel, 1994), 정제하여 그 특성을 연구한 것은 별로 없다. 이 연구에서는 질편모충에 존재하는 효소를 부분정제하여 정제된 효소가 어떤 특성을 갖고 있는지 알아보았다.

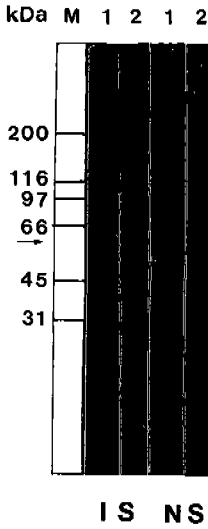


Fig. 7. Immunoblot analysis of purified proteinase under denaturing conditions. Lane 1, *T. vaginalis* cell lysate supernatant; Lane 2, purified proteinase (arrow). (IS, immunized rabbit serum; NS, normal rabbit serum)

이 실험에서 bacitracin-Sepharose affinity chromatography를 이용하여 정제한 결과 Bz-Pro-Phe-Arg-Nan을 분해하는 60 kDa 정도의 효소가 존재하였고, 용출액에 비해 60배 정도가 정제되었다. 이는 쇠세모편모충(*Tritrichomonas foetus*)의 단백질 분해효소를 bacitracin으로 정제하였을 때에 2개의 주요 띠가 나타났고 126배 정제된 결과와 비슷하다(Irvine et al., 1993). 합성기질인 nitroanilide계열은 원충류 단백질 분해효소의 활성 측정에 널리 사용되고 있는데(North et al., 1983; Lockwood et al., 1984) 이 실험에서는 여러가지 nitroanilide 중에서 Bz-Pro-Phe-Arg-Nan을 제일 많이 분해하여 모든 실험에 이를 기질로 사용하였다.

Bz-Pro-Phe-Arg-Nan을 분해하는 정제된 단백질 분해효소의 pH 의존성에 있어서 최적 pH는 pH 7.0에서, DTT를 넣었을 경우에는 pH 6.0과 9.0에서 나타났다. 편모충류의 단백질 분해효소 활성에서 Lockwood et al.(1984)은 DTT가 없는 상태에서 nitroanilide를 기질로 사용하였을 때에는 질편모충 및 *Trichomonas batrachorum*의 최적 pH는 pH 7.0이고 쇠세모편모충인 경우에는 pH 6.0이며, Azocasein을 기질로 사용하였을 때에는 질편모충은 pH 5.0, *Trichomonas batrachorum*은 pH 6.0, 쇠세모편모충은 pH 6.5라고 보고한 바 있어 이들의 결과와 유사함을 알 수 있다. 또 IEF에서도 pI 값이 7 정도여서 이 단백질 분해효소는 중성임을 알 수 있고 DTT에 의해 pH 5~9 범주에서 활성이 중

가함을 알 수 있었다.

일반적으로 진핵세포에 존재하는 단백질 분해효소의 공통적인 특징이 열에 대해 안정하다는 것이다. 효소활성도의 온도에 대한 의존성은 효소 단백질 분자의 3차원적 구조변화와 관련해서 단백질 변성과 밀접한 연관성이 있기 때문에 저온에서는 분자들의 활동도가 낮아서 효소에 대한 활성도가 낮으며 고온에서는 구조변화와 관련해서 효소의 활성도가 급격히 감소되는 것이 일반적인 현상이다. 그래서 온도에 민감한 효소인 경우에는 안정제로 albumin이나 glycerol 등을 첨가하여 안정도를 높이기도 한다. 이 실험에서 반응온도에 대한 영향을 본 결과 37°C에서 최고 활성을 보였고 37°C 이상의 높은 온도에서도 어느 정도의 활성이 유지되었다.

단백질 분해효소 저해제에 대한 영향을 조사하였을 때 정제된 단백질 분해효소는 주로 cysteine계열에 속하는 효소저해제들에 의해 효소활성이 유의적으로 억제되었으며, E-64, antipain, chymostatin에 의한 저해효과가 가장 컸다. 이러한 결과로 미루어 이 실험에서 bacitracin-Sepharose affinity chromatography를 통해 정제된 질편모충의 단백질 분해효소는 cysteine계열임을 알 수 있었다. 또한 amino-peptidase, aspartic-, metallo-, serine-계열의 저해제에 의한 억제 효과는 거의 없었고 단지 serine계열인 TPCK, TLCK에 의한 억제와 metallo계열인 1,10-phenanthroline에 의한 억제효과가 약간 관찰되었는데, 이런 억제는 Song and Kim (1994)에서도 관찰되며, 이것은 다른 단백질 분해효소가 소량으로 존재하고 있어서 나타난 결과라 생각된다. North(1982)에 의하면 cysteine계열의 단백질 분해효소는 DTT, cysteine과 같은 환원제에 의해 활성이 증가되며 EDTA에 의해서도 활성이 증가된다고 하였는데, 이 실험에서도 정제된 단백질 분해효소는 DTT, cysteine에 의해 활성이 약 2~3배 증가하였고 EDTA에 의해서도 활성이 증가하여 같은 결과를 보였다. 또한 금속이온의 영향을 조사한 결과 Hg²⁺, Zn²⁺ 이온에 의한 감소가 현저하였는데 이러한 결과로 이 실험에서 정제된 단백질 분해효소가 cysteine계열이라는 것을 알 수 있었다.

Gelatin을 함유한 polyacrylamide gel을 이용하여 질편모충 분리주 사이의 단백질 분해효소를 분석하기도 하였는데(Lockwood et al., 1987; Shim et al., 1993) 이 실험에서도 gelatin-SDS-PAGE를 이용하여 정제한 단백질 분해효소가 gelatin을 분해하는지 관찰하였는데 활성띠가 200-66 kDa 사이에서, 45 kDa 부근에서 띠가 관찰되었으나, SDS-PAGE에서 나타난 60 kDa의 활성띠는 관찰되지 않았다. 정제된 단백질 분해효소의 경우 gelatin SDS-PAGE와 SDS-PAGE의 띠가 일치된다는 보고가 있는 반면(McKerrow et al., 1985) Kenneth et al (1994)는 파울러자유아메바의 정제된 단백질 분해

효소의 SDS-PAGE와 gelatin SDS-PAGE 사이에서 띠의 숫자와 분자량 사이의 연관성이 없어 이 실험의 결과와 같았다. 이 둘 사이의 관계에 대해서는 Gel filtration을 통한 분자량 확인 등으로 좀 더 연구되어야 하고, 저해제 영향에서와 마찬가지로 다른 종류의 효소가 존재하고 있다는 가능성도 고려되어야 할 것이다. Cysteine계열 저해제인 E-64, IAA, leupeptin, antipain에 의해 효소활성이 저해되어 활성띠가 없어졌으나 EDTA, PMSF에 의해서는 활성띠가 그대로 나타나 정제된 단백질 분해효소가 cysteine계열이라는 것을 알 수 있었다.

면역이적법을 통해 정제된 단백질 분해효소의 항원성을 관찰한 바 정제된 단백질 분해효소는 면역혈청과 특이적으로 반응하여 이 실험에서 정제된 단백질 분해효소가 숙주-기생충간의 면역학적 반응에서 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 질편모충 환자를 혈청학적으로 진단할때 사용될 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 저자들은 질편모충 막원형 분리 후 EITB를 통해 60 kDa의 표면 단백질분획이 항원성이 있음을 보고한 바 있으며 (Min et al., 1994), 이 실험에서도 항원성이 있는 60 kDa의 단백질 분해효소가 분리 정제되었는데 이 둘이 같은 것인지에 대해서는 추후에 면밀히 연구되어야 할 것이다. 또한 이 연구에서 정제된 단백질 분해효소의 vaccine target으로써의 가능성, 질 상피세포에 대한 역할, 체액성 면역계에 대한 역할, 생화학적 구조 등에 관한 연구가 폭 넓게 이루어져야 할 것이다.

REFERENCES

Brian LK, Jonathan IR (1993) Degradation of human IgA by *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* **168**: 1319-1322.

David MP (1989) Characterization of a thiol proteinase in *Giardia lamblia*. *J Infect Dis* **160**: 1076-1080.

Eckhard W, Alfred F, Holger H, Yahya A (1991) Purification and substrate specificity of two cysteine proteinases of *Giardia lamblia*. *J Protozool* **38**: 378-383.

Gary EG, Laurel TL-F (1989) Characterization and purification of extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Can J Microbiol* **35**: 903-909.

Gary EG, Laurel TL-F (1994) Analysis of the extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* **80**: 361-365.

Hartely BS (1960) Proteolytic enzymes. *Ann Rev Biochem* **29**: 45-72.

Irvine JW, Coombs GH, North MJ (1993) Purification of cysteine proteinases from trichomonads using bacitracin-Sepharose.

FEMS Microbiol Lett **110**: 113-120.

James HM, Stephanie PH, Robert L, Zena W (1985) Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* **260**: 3703-3707.

Kenneth A, Harry H, Jacques B, James M (1994) *Naegleria fowleri*: Characterization of a secreted histolytic cysteine protease. *Exp Parasitol* **78**: 230-241.

Kong Y, Chung YB, Cho SY, Kang SY (1994) Cleavage of immunoglobulin G by excretory-secretory cathepsin S-like protease of *Spirometra mansoni* plerocercoid. *Parasitology* **109**: 611-621.

Lockwood BC, North MJ, Coombs GH (1984) *Trichomonas vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, and *Trichomitus batrachorum*: Comparative proteolytic activity. *Exp Parasitol* **58**: 245-253.

Lockwood BC, North MJ, Scott KI, Bremner AF, Coombs GH (1987) The use of a highly sensitive electrophoretic method to compare the proteinases of trichomonads. *Mol Biochem Parasitol* **24**: 89-95.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

McKerrow JH (1989) Minireview: Parasite Proteases. *Exp Parasitol* **68**: 111-115.

McKerrow JH, Stephanie PH, Robert L, Zena W (1985) Purification and characterization of an elastinolytic proteinase secreted by cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* **260**: 3703-3707.

Min DY, Leem MH, Ahn MH, Ryu JS (1994) Identification of surface antigen of *Trichomonas vaginalis*. *Korean J Parasitol* **32**: 243-248.

North MJ (1982) A study of the proteinase activity released by *Dictyostelium discoideum* during starvation. *J Gen Microbiol* **128**: 1653-1659.

North MJ, Coombs GH, Barry JD (1983) A comparative study of the proteolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, *T. vivax*, *Leishmania tarentolae* and *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol* **9**: 161-180.

North MJ, Robertson CD, Coombs GH (1990) The specificity of trichomonad cysteine proteinases analysed using fluorogenic substrates and specific inhibitors. *Mol Biochem Parasitol* **39**: 183-194.

Shim YK, Park KH, Chung PR, Im KI (1993) Proteinase activity in the isolates of

- Trichomonas vaginalis* according to their pathogenicity. *Korean J Parasitol* **31**: 117-127 (in Korean).
- Song CY, Kim TS (1994) Characterization of a cysteine proteinase from adult worms of *Paragonimus westermani*. *Korean J Parasitol* **32**: 231-241.
- Stepanov VM, Rudenskaya GN (1983) Proteinase affinity chromatography on bacitracin-sepharose. *J Appl Biochem* **5**: 420-428.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some application. *Proc Natl Acad Sci* **76**: 4350-4354.
- Tsang VCW, Peralta JM, Simon AR (1983) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot technique (EITB) for studying the specificities on antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol* **92**: 377-391.
- Youn KB, Son HJ, Ryu JS, Min DY (1994) Characterization of the azocaseinase in *Trichomonas vaginalis*. *J Hanyang Med Coll* **14**: 113-122 (in Korean).

=Abstract=

Characterization of the partially purified proteinase from *Trichomonas vaginalis*

Duk-Young MIN*, Jae-Sook RYU, and Keun-Hee HYUN

Department of Parasitology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

Characterization of a purified proteinase from *Trichomonas vaginalis* was carried out using bacitracin-sepharose affinity chromatography. *Trichomonas vaginalis* KT-9 isolate was used as a source of enzyme study. Proteinase activity was determined using Bz-Pro-Phe-Arg-Nan as the substrate. Optimum pH for the purified proteinase activity was 7.0 and 6.0, 9.0 with DTT. Optimum temperature was 37°C and isoelectric point was 7.2. Activity of this proteinase was inhibited by E-64, antipain, leupeptin, Hg²⁺ and Zn²⁺ and activated by DTT and cysteine. Activity of the purified proteinase was visualized by gelatin SDS-PAGE. The gelatinolytic activity of the purified proteinase was inhibited by E-64, antipain, leupeptin, and IAA, but not by PMSF and EDTA. On SDS-PAGE, the molecular weight of the purified proteinase was 60,000 daltons. Sera of rabbits infected with *T. vaginalis* reacted specifically in immunoblots with this proteinase. These results indicate that 60 kDa of purified proteinase was cysteine proteinase with antigenicity.

Key words: *Trichomonas vaginalis*, bacitracin-sepharose affinity chromatography, cysteine proteinase

[*Korean J. Parasitol.* **34**(1): 49-57, March 1996]

*Corresponding author