

경구투여 백신 후보물질로서의 *Helicobacter pylori* 외막 단백질의 조사

박형배 · 최태부*

건국대학교 공과대학 미생물공학과

Studies on the Outer Membrane Proteins of *Helicobacter pylori* as the Vaccine Antigens for Oral Administration. Hyung-Bae Park and Tae-Boo Choe*. Department of Microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea - *Helicobacter pylori* is a spiral-shaped, microaerophilic human gastric pathogen causing chronic-active gastritis in association with duodenal ulcer and gastric cancer. To investigate the possibility of *H. pylori* outer membrane proteins (OMPs) as the oral vaccine antigens, sarcosine-insoluble outer membrane fraction has been prepared from *H. pylori* NCTC 11637. The major OMPs having apparent molecular masses of 62 kDa, 54 kDa and 33 kDa were detected by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), which were identified as urease B subunit (UreB), heat shock protein (Hsp54 kDa) and urease A subunit (UreA), respectively. Minor protein bands of 57 kDa, 52 kDa, 40 kDa, 36 kDa and 31 kDa were also observed. The antigenicity of *H. pylori* OMPs and antigenic cross-reactivity among the strains were determined by immunoblot analysis using anti-*H. pylori* OMPs antisera or intestinal lavage solutions. The results showed that UreB, Hsp54 kDa, UreA and 40 kDa proteins vigorously stimulated mucosal immune response rather than systemic immunity. From this results, these proteins seemed to be useful as the antigen candidates for the oral vaccine. The immunoblotting results with surface proteins from eight isolated *H. pylori* strains were similar to that of *H. pylori* NCTC 11637. The IgA which had been arised from oral administration of *H. pylori* OMPs, was able to bind *H. pylori* whole-cells.

*Helicobacter pylori*는 나선형(curved or spiral)의 그람 음성 미호기성 세균으로, 1983년 위장 질환 환자의 위 조직 검체에서 최초로 분리됨이 보고되었다(1). 이후 다양한 연구들이 수행되어, 현재에는 위염, 위 십이지장궤양은 물론 위암의 발생과도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(2, 3). 이에 따라 이러한 질병들의 치료방법들도 주로 제산제를 사용하던 증상 치료로부터 *H. pylori* 박멸로 바뀌게 되었다. *H. pylori*의 박멸을 위해 현재 여러 가지 항생물질들이 사용되고 있고, 그 중 일부는 높은 박멸율을 보이고 있지만, 값이 비싸고, 종종 항생물질에 대해 내성이 유발되며, 일단 감염된 후에는 단지 일시적인 치료에 그칠 뿐 재발률이 높아 새로운 치료법이 요구되고 있다(4, 5). 또한 1996년 현재 세계 인구의 1/3~1/2이 감염된 사실에 비해 실제로 질병으로 발전된 경우는 매우 낮은 비율인 경우에서 알 수 있듯이, *H. pylori* 감염은 장기간 동안 증상을 나타내지 않다가 증세가 악화된 후에야 자각 증상이 나타나는 잠복성 질환이므로 치료법의 개선과 더불어 백신 등의 개발이 절실히 필요하다고 하겠다(4, 6).

초기 연구자들은 *H. pylori*에 감염된 환자에서 강한 체액성 면역과 세포성 면역반응이 수행됨에도 불구하고

일생동안 감염 상태가 유지되는 것을 관찰한 후, *H. pylori*에 대한 immunization을 통한 예방 및 치료가 불가능할 것으로 생각했었다. 그러나, 1991년 Czinn과 Nedrud에 의해, *H. pylori* 과쇄액과 경구용 adjuvant인 cholera toxin(CT)을 mouse와 ferret에 경구 투여시 혈청과 위장세척액에서 IgG IgA와 면역반응이 유발됨이 관찰된 이후(7), 동물 model을 사용한 여러 실험 결과 immunization 방법을 통해 *Helicobacter* 감염을 저해시킬 수 있다는 희망적인 결과들이 보고되고 있다(7-9). 그러나 이러한 실험들에 사용된 동물 model은 균의 감염이 부자유스러운 인위적인 model인 관계로 colonization level이 현저하게 떨어지고, *H. pylori*가 실제로 사람의 위에서 진행시키는 결과와는 다른 형태로 관찰되므로 백신 개발에 회의적인 시각들도 여전히 존재하고 있다. 최근 Cuenca 등이, *H. mustelae*와 그 natural host인 ferret을 이용한 therapeutic immunization 실험에서 희망적인 결과를 제시함으로써 예방 백신 개발 가능성에의 논쟁을 줄임과 동시에 치료 백신 개발 가능성도 제시하였다(10).

현재 *H. pylori*의 감염과 위염, 위 십이지장궤양간에 밀접한 상관 관계가 존재한다는 것은 기지의 사실로 받아들여지고 있으나, 아직까지 *H. pylori* 감염이 이들 질환을 유발시키는 기작에 대해서는 확실하게 밝혀지지 않았다. 현재 가장 설득력이 있는 가정에 의하면, *H. pylori*가 감염되어 위점막을 통해 이동하며 생육하거나, 위 상피

*Corresponding author

Tel. 82-2-450-3523, Fax. 82-2-3436-5594

E-mail: tbchoe@kkucc.konkuk.ac.kr

Key words: *Helicobacter pylori*, Outer membrane proteins, Oral vaccine, Antigens.

세포에 부착하는 과정에서 방출되는 다수의 단백질이나 *H. pylori* 표면 단백질 등의 작용으로 인해 위 상피세포 주위로 neutrophils, macrophage 또는 inflammation을 유발시키는 세포들이 모이게 된다. 그러나, 이러한 면역계 세포들은 위의 상피세포를 통과하여 감염 부위에 직접적으로 도달하지 못한 채 그 부위에 집중된 상태에서 면역반응이 계속 진행된다. 결과적으로 위 상피세포 주위에서 polymorphos 등이 수명을 다하게되어 그 내부의 유해한 성분(superoxide radicals 등)이 주위에 배출되고, 그 결과로 위 상피세포와 점막에 손상을 입힌다(Ref. <http://www.helico.com/web/pylorweb.html>). Inflammation에 의해 위 점막면이 손상되면 파괴된 위 상피세포 등의 내용물들이 mucus gel로 배출이 용이해져 *H. pylori*의 또 다른 영양원으로 사용될 수 있다. Inflammation 반응이 장기간 지속될 경우, 만성 위염 등의 질병으로 나타나게 되고, 이러한 반응이 더 지속되어 위 조직이 손상되어 조직이 직접 위산에 노출되게 되면 조직의 괴사가 수반되는 위궤양으로 발전하게 된다. 이처럼 *H. pylori* 감염 자체가 위궤양을 유발시키는 것이 아니고, *H. pylori*에 의한 host의 반응으로 일어나는 inflammation 반응의 결과로 위궤양 등이 유발되는 것으로 추정하고 있다(4, 5, 11, 12).

따라서, *H. pylori*의 경우 백신에 의해 유발되는 host의 면역반응은 한편으로는 위궤양 등의 진행을 도울 수 있으므로, immunization시 투여 경로와 더불어 사용되는 백신 후보 물질의 선택에 신중을 기해야 한다. 균체 자체를 사용할 경우 면역계 조절이 불가능하므로, 현재는 대신 균체의 성분 일부를 재조합 방법으로 생산하여 사용하고 있다. 실제로 urease를 이용한 실험이 가장 활발히 진행되어 현재 임상 실험 중에 있으며, 재조합 urease B subunit(UreB)와 재조합 heat shock protein A(HspA)로 구성된 복합 백신 사용시 동물 실험에서 100% 예방됨이 관찰되기도 했다(13). 감염성 세균의 경우, 외막 단백질(outer membrane proteins, OMPs)을 포함한 표면성분들이 주로 숙주에의 부착(colonization), 지속적 감염 유지(persistence) 및 염증 반응(inflammatory response) 등을 유발시키는 것으로 알려져 있어서 이들을 이용한 백신 개발이 수행되고 있다.

본 연구에서는 *H. pylori* 경구투여 백신 개발의 첫 단계로서, *H. pylori*의 외막 단백질을 분리하고, immunoblotting 방법을 사용하여 항원성 여부, 유도되는 항체의 type 및 *H. pylori* strains 간의 교차 항원성을 관찰하여 경구 투여 백신 후보물질로의 유용 성분을 검색하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 조건

Helicobacter pylori strain NCTC 11637을 ATCC에서 구입하였다. 그 외의 *H. pylori* strains는 서울 중앙병원의 협조로 위궤양 환자들의 위 조직검체(gastric biopsies)에서 분리하여 사용하였다. 모든 균주들은 3% Bovine Calf Serum과 3가지 항생물질(Amphotericin B 2 mg/l, Nalidixic acid 20 mg/l, Vancomycin 6 mg/l)이 첨가된 Brucellar Broth media를 사용하여 37°C, 10% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하여 사용하였으며, 대량 배양에는 spinner flask 혹은 jar fermentor를 사용하였다(14, 15).

표면 단백질 분리

외막 단백질의 분리 *H. pylori* 배양액을 6,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 회수한 균체를 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 3회 세척한 후 20 ml의 동 buffer에 균체를 현탁시켰다. 30초씩 4회(매 경우마다 20초씩 휴지) 초음파처리(Ultra sonicator model 4710, Cole-Parmer Instrument Co)로 균체를 파쇄한 후, DNase(0.1 mg)와 RNase(0.5 mg)를 첨가하여 실온에서 30분간 반응시켰다. 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 파쇄되지 않은 균체를 제거한 후, 회수한 상등액을 100,000×g로 30분간 초원심분리(Centrifuge T-1170, Kontron Instruments)하여 total membrane을 침전시켰다. 얻어진 membrane은 2% sodium laurylsarcosine이 함유된 20 mM Tris-HCl buffer(pH 7.5) 20 ml로 현탁시킨 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 최종적으로 외막 단백질은 100,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 침전시킨 후, 증류수에 현탁시켜 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다(16-18).

Water extract solution 준비 *H. pylori* 배양액을 Eppendorf microtubes에서 6,000 rpm, 5분간 원심분리하여 균체를 침전시킨 후, 0.1 ml의 증류수로 현탁시킨다. 1분간 강하게 vortex mixing한 뒤, 10분간 bath type sonication(Bransonic ultrasonic cleaner 2210R-DTH)한다. 10,000 rpm에서 30초간 원심분리 후 상등액을 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다(19).

Urease activity 측정

H. pylori urease에 의한 urea의 가수분해 결과로 생성되는 ammonia의 양을 spectrophotometric assay 방법으로 측정하였다. 10 µl의 시료에 200 µl의 urease activity test solution(3 mM sodium phosphate, pH 6.8, containing 7 µg/ml Phenol red and 110 mM Urea)을 첨가 후, 23°C에서 일정 시간동안 반응시킨 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다(20).

항 혈청 및 장내 IgA 생산

복강투여 면역 Female BALB/c mice(6주령)에 *H. pylori* OMP 10 µg을 동 부피의 complete Freund's adjuvant(FA)로 유화시켜 복강주사했다. 7일 후에 incomplete Freund's adjuvant로 유화된 10 µg의 *H. pylori* OMP를 복강주사한 후, 다시 7일 후에 10 µg의 *H. pylori* OMP로 boosting을 실시하였다. 최종 boosting 후 11일째 희생시켜 혈액 채취 및 장세척을 시도하였다. *H. pylori* whole-cell immunization을 위하여 *H. pylori*를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후, 0.02 M formalin(in PBS)에 3일간 suspending 시켰다. Inactivation(killed)된 균체를 일정 농도로 PBS에 현탁시킨 후 mouse 1마리당 1×10^8 bacteria를 위의 OMP 경우와 동일한 방법으로 3회 복강주사 하였다(21).

구강투여 면역 Female BALB/c mice(6주령)에 *H. pylori* OMP 100 µg을 10 µg의 cholera toxin(CT)과 함께 4회(1, 8, 15, 22일) 구강투여 후, 29일째 혈액 채취 및 장세척을 시도하였다(7-9, 21). Whole-cell immunization을 위하여 mouse 1마리당 1×10^9 개의 0.02 M formalin-fixed(in PBS) *H. pylori* 균체를 위의 OMP 경우와 동일한 방법으로 4회 구강 투여하였다.

장세척 방법 Mice를 희생시킨 후 위십이지장 접합부에서 맹장까지의 소장을 절개하고 양쪽 끝부분을 봉합한 뒤 PBS로 2회 표면을 세척하였다. 제조한 장 세척액(25 mM NaCl, 40 mM Na₂SO₄, 10 mM KCl, 20 mM NaHCO₃, 50 mM EDTA, 0.1 mg/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 162 mg/ml Polyethylene glycol(MW 4,000)) 2 ml을 27-gauge 주사기를 사용하여 소장의 2~3부위에 주입하였다. 실온에서 10분 정도 방치시킨 후 소장 내용물을 압착하여 원심분리관에 짜낸 다음 강하게 교반한 후 4°C, 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 분리된 상등액에 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride(PMSF)를 첨가하고 4°C, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리를 수행하였다. 다시 상등액을 취한 후 1 mM PMSF를 첨가하고 얼음 상에서 15분간 방치한 후 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다(22).

Immunoblotting

OMPs를 전기영동한 SDS-PAGE gel을 electroblotter(Hoefler Scientific Instruments, San Francisco)를 사용하여 nitrocellulose paper에 electroblotting하였다. 이 때 transfer buffer로는 48 mM Tris base, 39 mM Glycine, 20% methanol(pH 8.3)을 사용하고, 30 V에서 하루동안 blotting을 수행하였다. Blotting이 끝난 nitrocellulose paper를 20% methanol에 세척 후, 5% skim milk로 실온에서 30분간 blocking하였다. Blocking이 끝난 후 PBS로 희석한 항 혈청(1:100 dilution)과 장세척액(1:10 dilution)으로 실온에서 1시간동안 교반

하면서 반응시켰다. 0.2% Triton X-100(or 0.02% Tween 20)이 함유된 PBS로 3회 세척 후 1,000배 희석한 anti-mouse IgG(or IgA) Alkaline phosphatase conjugate로 실온에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 5회 세척한 후에 100mM Tris(pH 9.5)로 가볍게 세척하였다. 발색시키기 위해 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate(BCIP)와 Nitro Blue Tetrazolium(NBT) mixture(in 100 mM Tris, pH 9.5)를 반응시켰다. 발색반응을 중단시키기 위해서는 증류수로 2회 세척하고, 건조시킨 상태로 장기간 보관할 수 있었다(23, 24).

ELISA

96-well plate의 각 well에 50 µl의 *H. pylori* whole-cell suspension(A630=1.2)을 가한 후, 37°C에서 하루동안 건조시켰다. 각 wells을 0.2% Triton X-100(or 0.02% Tween 20)이 함유된 PBS로 세척한 후, 1% Bovine serum albumin(in PBS, pH 7.5, 200 µl per well)으로 37°C에서 1시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝난 후 wells을 0.2% Triton X-100(or 0.02% Tween 20)이 함유된 PBS로 3회 세척하고, PBS로 희석한 장세척액(1:10 dilution)을 각 well에 단계적 희석하여 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Wells을 3회 세척한 뒤 3,000배 희석한 anti-mouse IgA Alkaline phosphatase conjugate로 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 5회 세척하고 1 mg/ml p-nitrophenyl phosphate(in 0.2 M diethanolamine buffer, pH 9.8)를 well당 200 µl씩 첨가하고 37°C에서 발색시킨 후, 405 nm에서 측정하였다(16).

결과 및 고찰

H. pylori 외막 단백질의 분리

본 실험에서 외막 단백질 분리에 사용한 sodium laurylsarcosine은 음이온계 계면활성제로, Filip 등이 *E. coli*의 cytoplasmic membrane을 선택적으로 용해시킨다는 사실을 보고한 이후(25), 현재 *Helicobacter* 속을 포함한 Gram 음성 세균의 외막 단백질 분리에 사용되고 있다(15, 20). 본 실험에서는 Blaser 등과 같이 radioiodination 방법이나 2-keto-3-deoxyoctonate 농도 측정 등을 사용하여 직접적으로 외막 단백질임을 규명하지는 않았지만, 최종적으로 얻은 sarcosine-insoluble fraction의 단백질 band pattern이 이전 분리단계와 차이를 보이며, 본 실험과 동일한 방법으로 수행한 Doig 등의 실험 결과(16)와 유사한 band pattern을 보임으로서 외막 단백질로 사료되어 실험에 사용하였다. Fig. 1을 보면 분리한 sarcosine-insoluble fraction에는 분자량 62 kDa, 54 kDa과 33 kDa으로 보이는 3개의 major band와 57

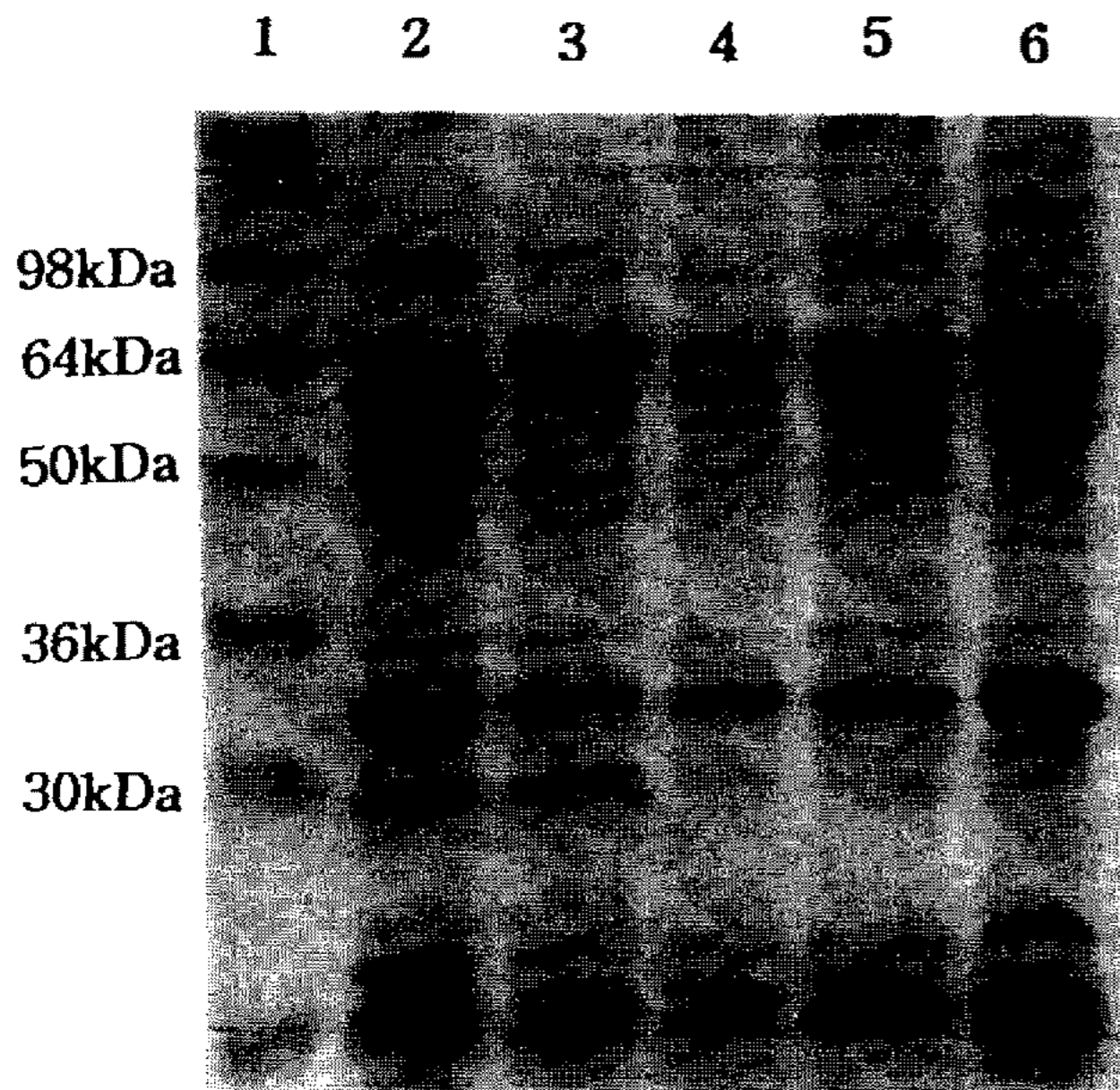


Fig. 1. SDS-PAGE of several preparations of proteins of *H. pylori* NCTC 11637.

Each lanes contained 7 μ g of proteins and the gel contained 15% acrylamide. (1) molecular weight marker (2) whole cell (3) 12,000 rpm supernatant (4) crude membrane (5) sarcosine-soluble membrane (6) sarcosine-insoluble membrane.

kDa, 52 kDa, 40 kDa, 36 kDa과 31 kDa인 minor band 등이 관찰되었다.

H. pylori 외막 단백질의 성분

*H. pylori*는 표면에 urease가 존재하여 urea의 가수분해로 생성된 ammonia에 의해 균체 주위의 낮은 pH를 중화시켜 생육에 적당한 환경을 조성하는 것으로 알려져 있다(4, 11, 19, 20, 26). 일반 미생물들의 경우 urease가 cytoplasm 내에 존재하는 것과는 달리 *H. pylori*에서는 균체 표면에서 urease activity를 보이는 것이 관찰되었다. 이는 cytoplasm 내에 존재하던 urease가 밖으로 분비되는 것으로 추정하고 있는데 그 방법에 대해서는 아직 논쟁 중에 있다(26). *H. pylori* urease는 분자량 380~680 kDa의 multimeric, high molecular weight enzyme으로 SDS-PAGE에서 61~64 kDa과 29~33 kDa의 2가지 subunit가 1:1의 비로 나타난다(19, 20). Dunn 등이 urease를 정제하는 동안, urease activity를 보이는 fraction에서 62 kDa과 30 kDa 단백질 외에 54 kDa 단백질이 존재하는 것이 관찰된 이후(19), 이 단백질이 heat shock protein임이 밝혀졌다(27). 이후 연구가 진행되어 현재는 *H. pylori*에 54 kDa, 62 kDa의 Hsp60 family와 Hsp70이 존재하는 것으로 보고되었다(28). Dunn 등의 실험 결과(19, 20, 27)와 비교하여 볼 때, 본 실험에서 관찰된 major protein bands는 urease subunit B(UreB, 61~64 kDa), heat shock protein 54 kDa(Hsp54 kDa)과 urease subunit A(UreA, 29~33

kDa)로 추정되는데, 실제로 urease activity에 차이가 있는 2가지 분리균주의 표면 단백질을 전기영동으로 확인해 본 결과 62 kDa과 33 kDa의 bands가 urease activity가 큰 쪽에서 더 굵게 나타남을 확인할 수 있었고, 또한 42°C에서 10분간 heat shock 후 37°C에서 배양할 경우 90분 이후에 54 kDa 부위의 band가 굵어지는 것이 관찰되었는데 이러한 결과는 Huesca 등이 보고한(28) heat shock protein 결과와 유사하므로, 3가지 major bands는 각각 UreB, UreA와 Hsp54 kDa과 일치하는 것으로 확인되었다(Data not shown).

Porin protein은 외막에 존재하여 cell과 외부간에 작은 수용성 물질들의 출입을 용이케하는 channel을 형성하며, 정상적으로는 25~50 kDa의 monomer로 구성된 trimer 형태로 존재한다. Doig 등에 의해 현재까지 *H. pylori*에 30~31, 48, 49, 50, 51, 60, 67, 80 kDa 등의 porin이 존재함이 밝혀졌다(16-18). *H. pylori* porin proteins는 항생제 내성 균주인 *Pseudomonas aeruginosa*의 경우처럼 상대적으로 작은 channel size를 보이는데, 이러한 성질이 *H. pylori*의 *in vivo* antibiotic insensitivity에 관련될 것으로 현재 추정하고 있다(17). Porin proteins는 일반적으로 다수의 β -sheet 구조를 함유하여, membrane을 가로질러 tightly packed β -barrel organization을 형성하는데, 이러한 구조는 낮은 온도에서 SDS에 의한 denaturation에 대해 상대적으로 resistance를 부여해 준다. 그렇지만, 고온에서는 denaturation이 정상적으로 수행되어 결과적으로 SDS-PAGE 상에서 다른 이동 거리를 보여준다(17). 본 실험에서는 *H. pylori* NCTC 11637을 water extract 방법과 외막 단백질 분리 방법에 의해 표면 단백질을 준비한 후, 각각 열처리하지 않은 것과 열처리한 것을 동일한 gel 상에서 전기영동 하였다. Fig. 2에서 보이는 것과 같이 water extract 방법에서 사용한 vortexing이나 bath type sonication으로는 cell이 파쇄되지 않으므로, membrane을 가로질러 존재하는 porins이 용출되지 않을 것으로 생각되었고, 실제로 gel 상에서 band의 이동 변화도 관찰되지 않았다. 그러나, 외막 단백질 경우 열처리 전후에 상당한 band 차를 보임으로서 다수의 porins이 존재하는 것으로 사료되었다. 특히 40 kDa과 52 kDa 사이와 30 kDa 상에서 열처리 후에 band가 굵어지는 것은, 60, 51, 50, 49, 48 kDa과 31, 30 kDa porin proteins를 보고한 Doig등의 결과와 관련 있을 것으로 사료된다(16-18).

항원 투여 경로에 따른 면역 반응

H. pylori whole-cell과 OMPs를 각각 경구투여와 복강 투여 방법으로 immunization 시킨 후 혈액과 장세척액으로 부터 생성된 IgG와 IgA pattern을 ELISA와 immunoblotting으로 확인하였다.

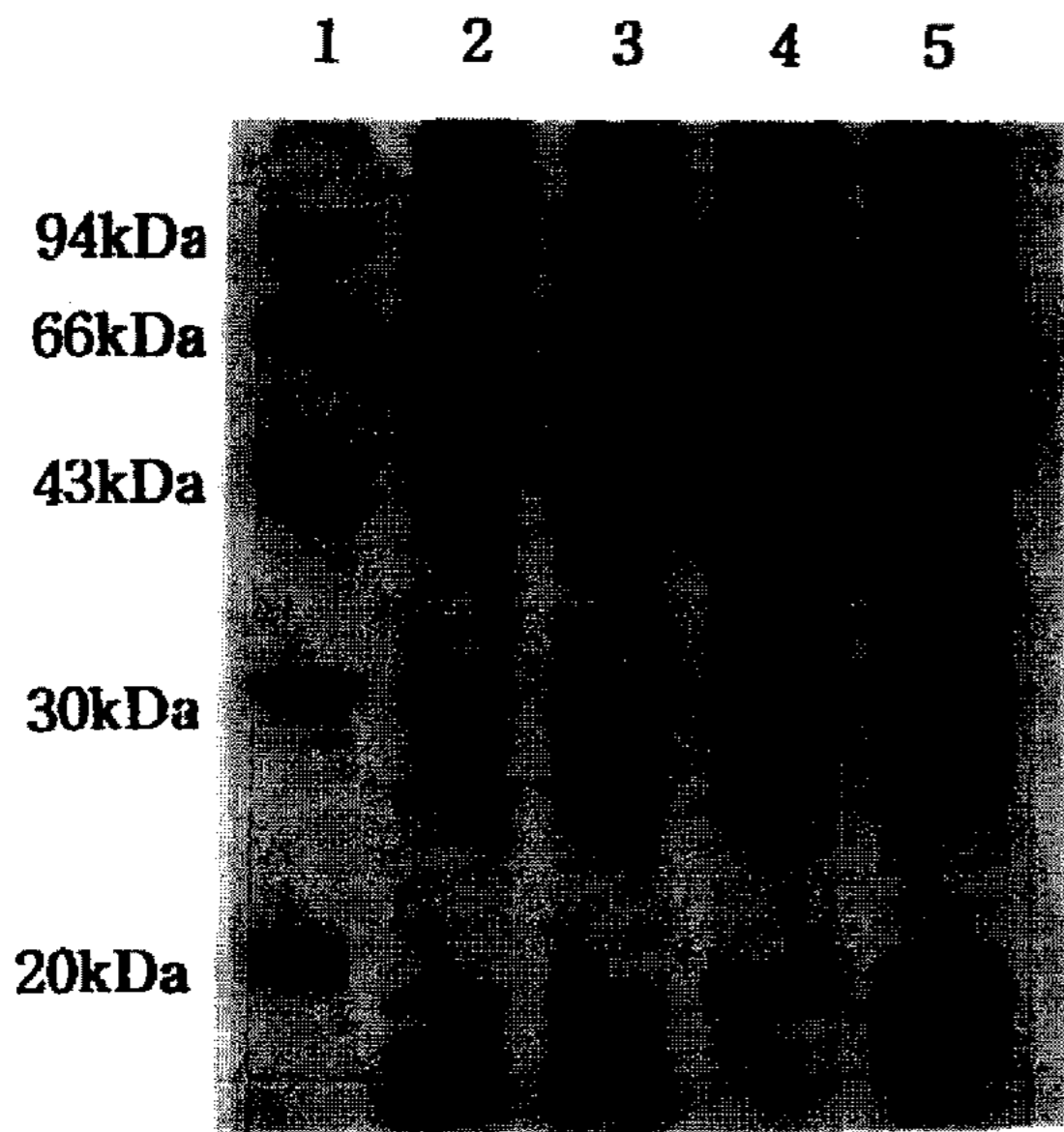


Fig. 2. Influence of heating on migration characteristics of water extracts and OMP of *H. pylori* NCTC 11637.

Each lanes contained 10 µg of protein and the gel contained 12% acrylamide. (1) molecular weight marker (2) water extract protein, no-heating (3) water extract protein, heating (100°C, 3min) (4) OMP, no-heating (5) OMP, heating (100°C, 3min).

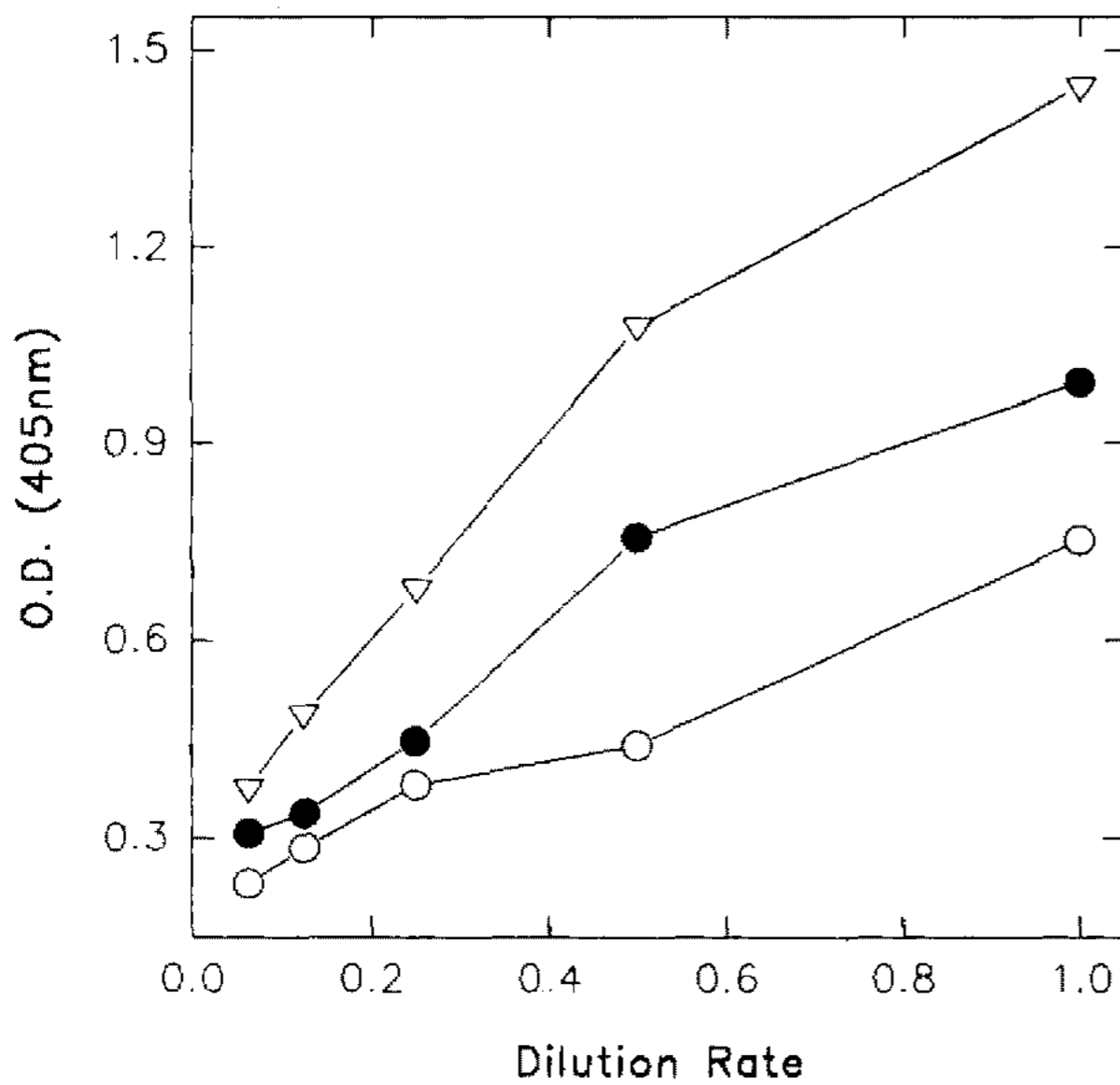


Fig. 3. Production of IgA against *H. pylori* OMPs by various administration routes.

○ : non-feeding, ● : intraperitoneal injection with OMP and FA, ▽ : OMP and CT feeding.

Fig. 3에서 보이는 것처럼 점막 면역반응(mucosal immune response)의 지표로 사용되는 IgA의 경우 복강투여 방법으로는 생성량이 적은 반면, 경구투여시 다량 생성됨이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 immunoblotting 실험에서도 동일하게 관찰되는데, Fig. 4에서 볼 수 있는 것처럼 IgA의 경우 전반적으로 생성되는 양이 IgG에 비해 적지만 whole-cell과 OMPs 모두에서 복강주사보다 경구투여시 높은 항체 생성을 보이고, 혈액 내 IgG

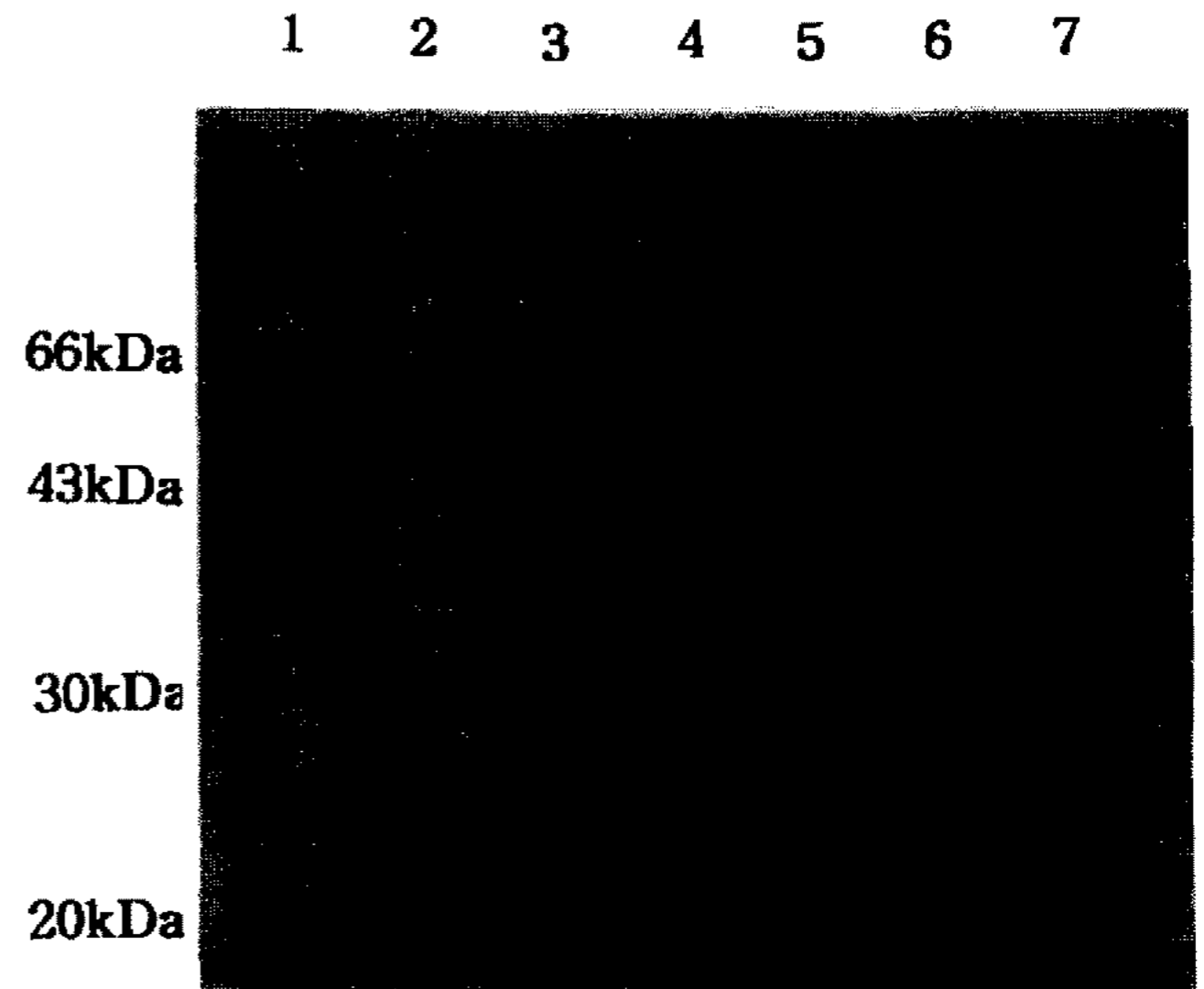


Fig. 4. Western immunoblots of *H. pylori* NCTC 11637 water extract solution probed with various mouse intestinal lavage solutions.

(1) molecular weight marker (2) non-feeding mouse (3) CT only feeding (4) intraperitoneal (i.p.) injection with whole-cell plus FA (5) whole-cell plus CT feeding (6) i.p. injection with OMP plus FA (7) OMP plus CT feeding.

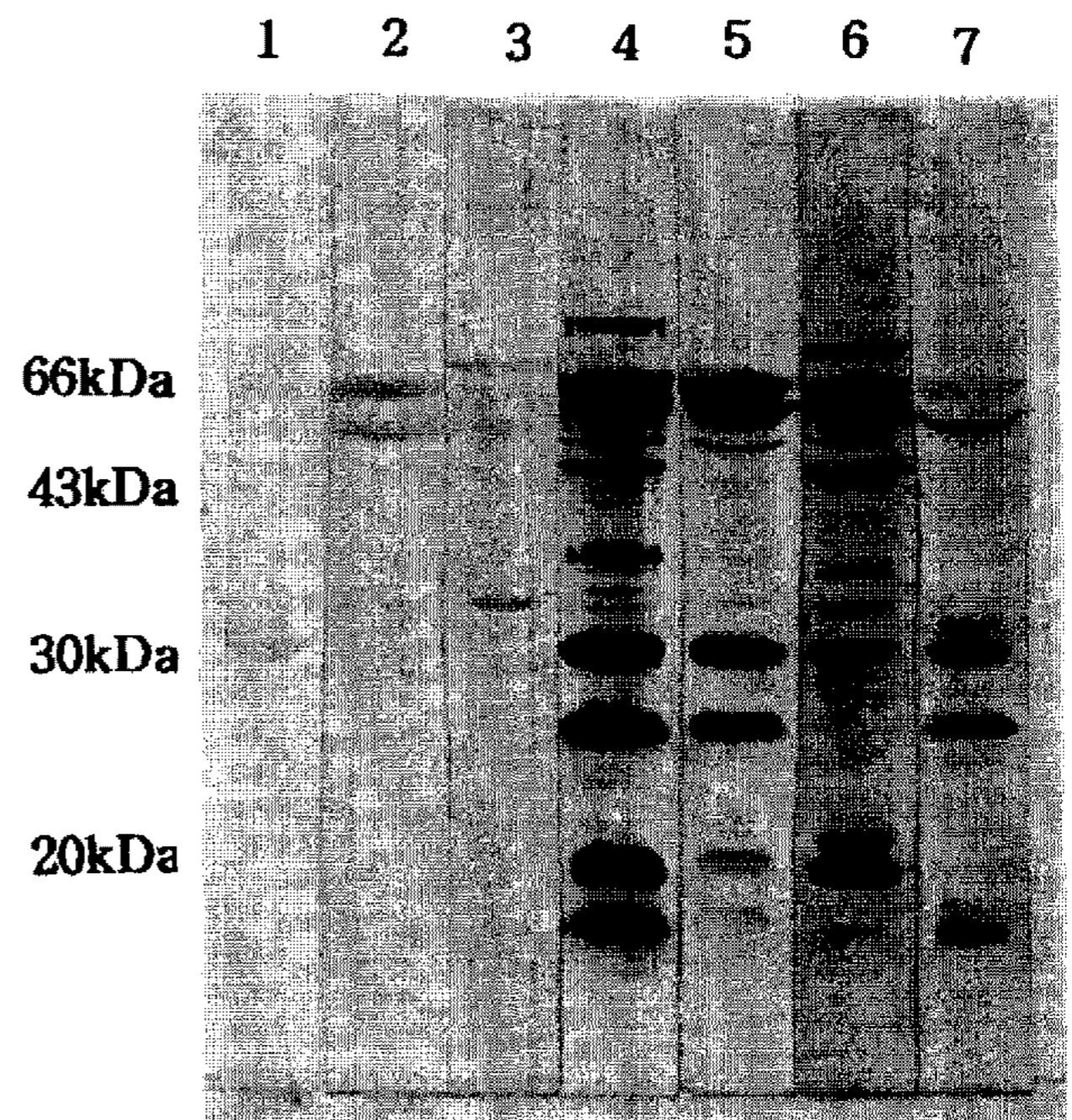


Fig. 5. Western immunoblots of *H. pylori* NCTC 11637 water extract solution probed with various mouse antiserum.

(1) molecular weight marker (2) non-feeding mouse (3) i.p. injection with FA only (4) i.p. injection with whole-cell plus FA (5) whole-cell plus CT feeding (6) i.p. injection with OMP plus FA (7) OMP plus CT feeding.

는 Fig. 5과 6에서처럼 이와 반대 양상을 보이고 있다. 이는 경구투여시에는 장내 점막 면역계인 Peyer's patch와 M cells에서 일차적 면역반응이 일어난 후 이에 따른 2차적 전신면역계가 활성화되는데 반해, 복강투여시에는 전신면역계만이 활성화되기 때문이다. Whole-cell과

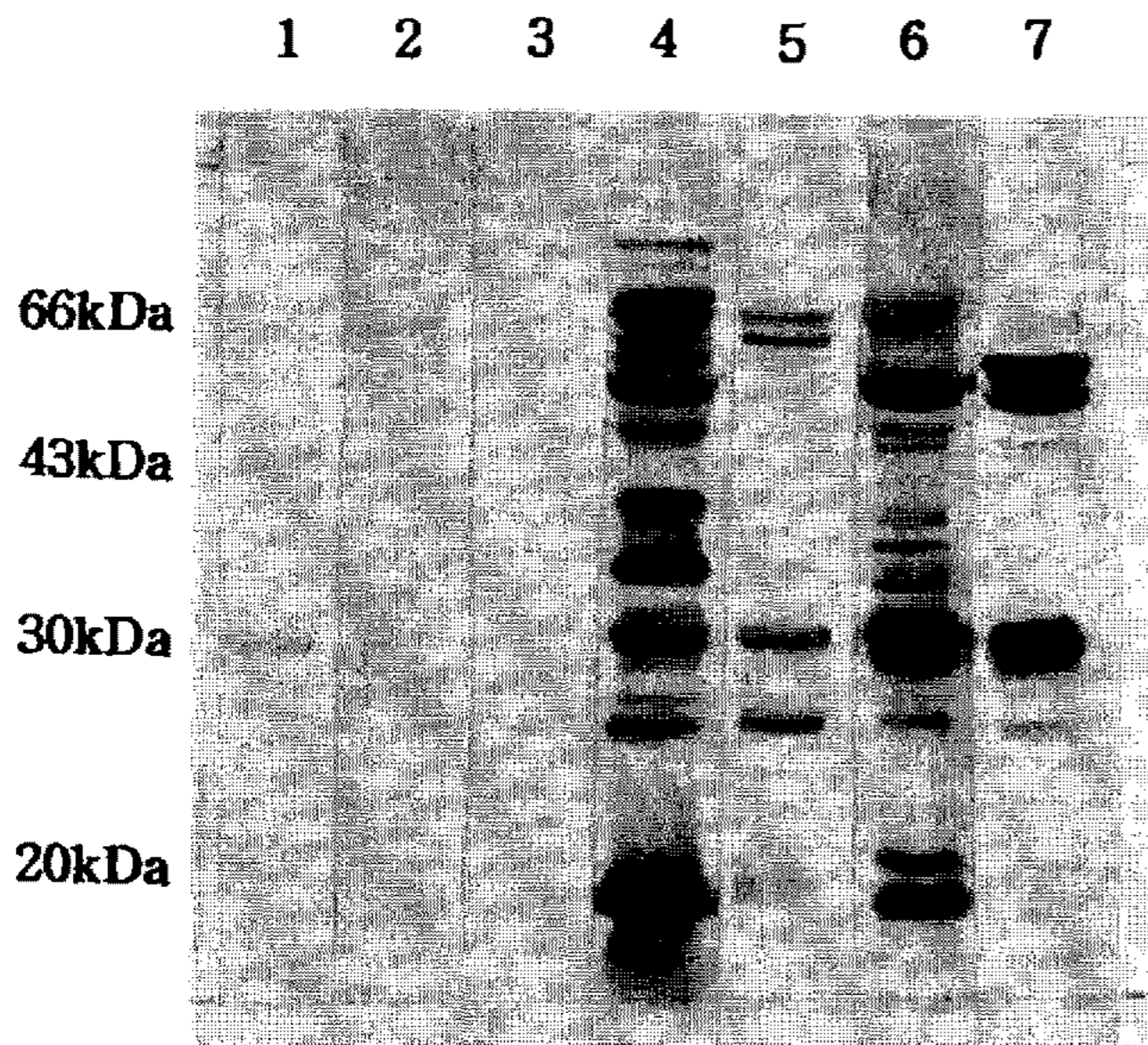


Fig. 6. Western immunoblots of *H. pylori* NCTC 11637 OMP probed with various mouse antiserum.

(1) molecular weight marker (2) non-feeding mouse (3) i.p. injection with FA only (4) i.p. injection with whole-cell plus FA (5) whole-cell plus CT feeding (6) i.p. injection with OMP plus FA (7) OMP plus CT feeding.

OMPs의 경우 IgA의 생성에는 차이를 보이지 않은 반면, IgG 경우는 whole-cell에서 더 높은 면역반응을 보이는 것으로 관찰되었다.

백신 후보 물질의 검색

*H. pylori*에 의해 유발되는 것으로 알려진 위염, 위 십이지장궤양 등은 병이 진행되는 과정에서 체내 면역계에 의한 inflammation 반응이 관여한다는 사실이 밝혀진 까닭에 백신 개발시 사용할 항원 선택에 신중함이 요구되어진다(11). Whole-cell의 경우, 면역계를 활성화시키는 능력은 분리된 항원에 비해 상당히 높게 나타나지만, 면역계 조절이 곤란한 관계로 *H. pylori* 백신으로 개발되지는 않고 있는 것이 현실이다. 또한 복강투여나 근육주사의 경우 IgA 생산이 거의 일어나지 않아 *H. pylori* 백신으로 사용하기에 적절하지 않을 것으로 사료된다.

경구투여 백신으로 사용할 수 있는 항원을 검색하기 위해 경구투여시 IgA 생성을 유발시키는 band를 확인한 결과 Fig. 4에서 보이는 것처럼 UreB(61~64 kDa), 60 kDa, Hsp54 kDa, 40 kDa, UreA(29~33 kDa), 31 kDa 등으로 관찰되었다. 이 중 60 kDa과 31 kDa 단백질은 점막면역계 외에 전신면역계도 강하게 활성화시키는 것으로 관찰되어(Fig. 5) 경구투여 백신 후보 물질로의 사용에 적절치 않을 것으로 사료된다.

Urease 자체를 백신으로 사용시 urea의 가수분해로 생성되는 ammonia는 위 상피세포에 독성을 나타내는 것으로 알려져있다(29). 이러한 까닭으로 현재 *H. pylori*에 의 경구투여 백신으로는 urease enzymatic activity가

부족한 UreA와 UreB를 재조합 방법으로 준비하여 사용하고 있다(9, 13, 30). 본 실험에서는 Fig. 4와 5에서 보이는 것처럼 UreB는 높은 IgA 생성을 유도하는 반면 IgG 생성은 매우 낮았고, UreA 경우는 IgA 생성은 UreB에 비교하여 낮았고 IgG 생성은 오히려 UreA보다 높게 나타났는데 이러한 결과는 Michetti 등의 실험 결과와 유사한 양상을 보이고있다(9).

Hsp54 kDa에 대한 IgG가 생성되지 않은 것으로 보아 경구투여 백신으로 유용하리라 사료된다. 실제로 Ferrero 등은 Hsp을 경구투여함으로써, *H. felis* 감염을 완전하게 방어할 수 있음을 보고하였다(13). 그렇지만 Hsp 54kDa은 Hsp60 family에 속하고, Hsp60 family는 원핵세포와 진핵세포 모두에서 생성되며 highly conserved proteins이기 때문에 백신에 의해 형성된 항체가 위점막의 상피세포와 교차 반응할 가능성도 존재한다(31).

40 kDa protein의 경우 구체적으로 성분을 규명하지는 못했지만 본 실험의 결과 경구투여 백신 후보 물질로 사용될 수 있는 또다른 유효한 성분으로 사료된다.

Porin proteins의 경구투여 백신 항원으로서의 사용 가능성을 알아보기 위해 *H. pylori* OMP를 사용하여 Fig. 5의 경우와 같은 방법으로 immunoblotting을 수행하였다. Fig. 6의 IgG band pattern을 Fig. 5과 비교한 결과 50 kDa과 30 kDa 부위에서 짙은 band가 새로 나타나는 것이 관찰되는데, 이 부분은 Fig. 3에서 볼 수 있는 porin proteins과 일치한다. 실제로 Tufano 등은 실험을 통해(18) *H. pylori* porins이 체내 면역계의 polymorphonuclear leukocytes의 기능을 변화시키고, IFN- γ , GM-CSF, IL-3와 IL-6 등의 생산을 통해 inflammation을 유도한다는 사실을 보고하였다. Porin protein에 의해 전신 면역계가 강하게 활성화된다는 Fig. 6의 결과는 Tufano 등이 보고한 결과와 서로 연결될 수 있고, 결과적으로 porins는 경구투여 백신 물질로 사용하기 어렵다고 사료된다.

백신 후보 물질의 유용성 확인

이상에서 제시한 성분들이 실제로 *H. pylori* 백신으로 사용 가능한지 그 유용성을 알아보았다.

백신 후보 물질로 추정된 UreB, Hsp54 kDa, 40 kDa 과 UreA에 의해 생성된 IgA가 분리 균주에도 결합할 수 있는지 알아보기 위해, 분리 균주 8주를 배양하여 water extract 방법으로 표면 단백질을 분리한 뒤 immunoblotting을 시도하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보이는 것처럼 4가지 band 모두에 IgA가 결합할 수 있는 것으로 관찰되었고, 결과적으로 이들 4가지 단백질이 모두 백신 성분으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

본 실험에서 항원 검색에 사용한 immunoblotting 방법에서는 target proteins이 SDS나 환원제(2-mercapt-

요 약

H. pylori NCTC 11637을 배양 후 계면활성제인 laurylsarcosine을 사용하여 외막 단백질을 분리하였다. *H. pylori* 외막 단백질에는 62 kDa의 urease B subunit, 54 kDa의 heat shock protein, 33 kDa의 urease A subunit와 43~52 kDa과 30 kDa 근방의 porin protein이 존재하였으며, 이 외에도 57 kDa, 40 kDa, 36 kDa과 31 kDa 등의 단백질이 존재하는 것으로 확인되었다.

경구투여시 점막 면역계를 활성화시켜 IgA의 분비를 촉진시키면서 전신 면역계의 활성화에 의한 IgG 생성은 떨어지는 성분을 경구투여 백신 후보 물질로 사료하여 immunoblotting 방법으로 확인하였다. 결과적으로 UreB (61~64 kDa), Hsp54 kDa, 40 kDa과 UreA(29~33 kDa) protein이 경구투여 백신 항원으로 사용 가능할 것으로 확인되었다.

H. pylori NCTC 11637에서 확인한 4가지 경구투여 백신 후보 물질은 8가지 분리 균주에 대해서도 동일한 반응을 보였다. 또한, 외막 단백질을 경구투여하여 얻은 IgA가 *H. pylori* whole-cell에도 거의 같은 정도로 결합하는 것으로 관찰되어 실제 *H. pylori* cell에 작용할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 교육부 생물화공 연구비 및 건국대학교 학술 진흥 연구비의 지원을 받아 수행되었습니다.

참고문헌

1. J. R. Warren, B. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* i: 1273-1275.
2. Martin. J. Blaser. 1987. Gastric *Campylobacter*-like organisms, gastritis and peptic ulcer disease. *Gastroenterology*. **93**: 371-383.
3. S. J. Jiang *et al.* 1987. *Campylobacter*-like organisms in chronic gastritis, peptic ulcer and gastric carcinoma. *Scand. J. Gastroenterol.* **22**: 553-558.
4. Martin J. Blaser. 1996. The bacteria behind Ulcers. *Scientific American*. February 104-107.
5. Adrian. Lee. 1994. Future research in Peptic Ulcer disease. *Scand. J. Gastroenterol.* **29** Suppl **205**: 51-58.
6. John L. Telford *et al.* 1994. Unravelling the pathogenic role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer: Potential new therapies and vaccines. *Tibtech*. **12**: 420-426.
7. Steven J. Czinn, Jong G. Nedrud. 1991. Oral immunization against *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **59**: 2359-2363.
8. Adrian Lee, Minhu Chen. 1994. Successful immunization

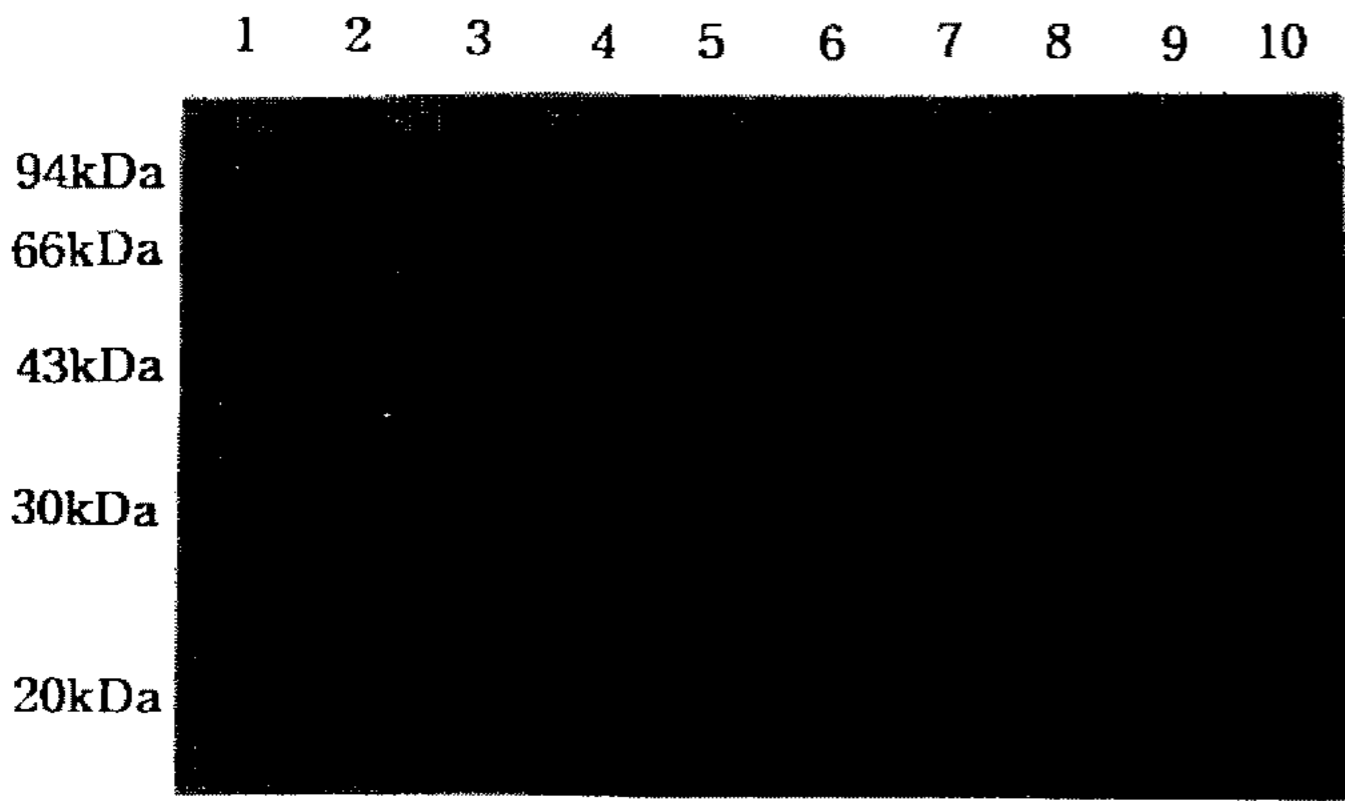


Fig. 7. Western immunoblots of water extract proteins of *H. pylori* isolated from 8 patients, probed with intestinal lavage solution from immunized with *H. pylori* OMP plus CT. (1) molecular weight marker (2) *H. pylori* NCTC 11637 (3-10) isolated *H. pylori* strains.

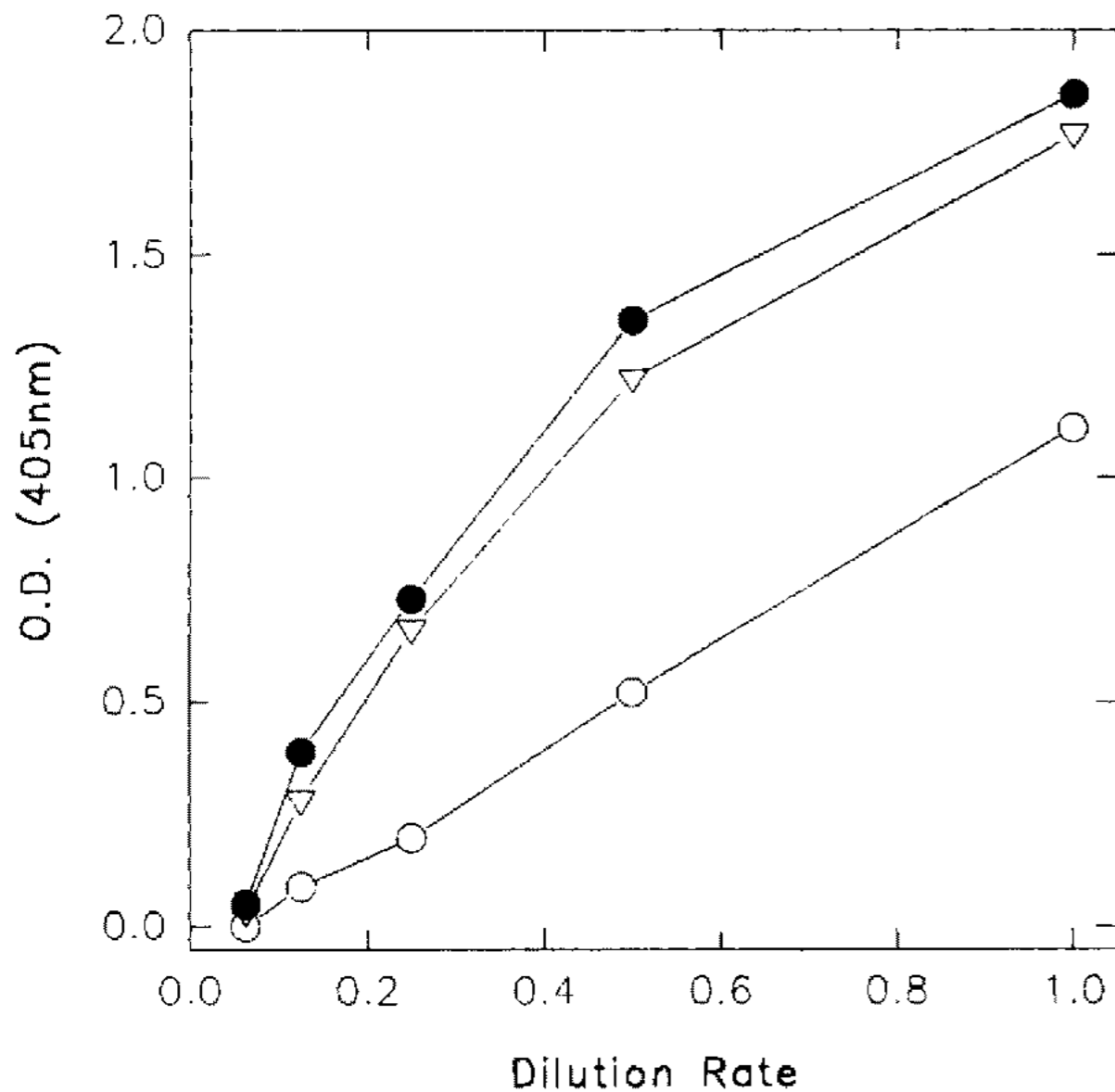


Fig. 8. Binding ability of various intestinal lavage solutions to *H. pylori* whole-cell.

○ : non-feeding. ● : *H. pylori* whole-cell feeding. ▽ : *H. pylori* OMP feeding.

oethanol, dithiothreitol 등)로 denaturation된 상태의 epitopes 형태를 갖으므로, 이들에 결합하는 IgA가 실제로 whole-cell 표면상에 존재하는 native conformation의 epitopes에도 결합할 수 있을지는 의문이다. 이를 확인하기 위해 *H. pylori* whole-cell을 항원으로 96-well에 고정된 후, whole-cell과 OMP를 각각 경구투여하여 얻은 장세척액 내 IgA를 primary antibody로 하여 ELISA로 결합되는 IgA의 양을 비교하였다. Fig. 8에서 보이는 것처럼, OMP를 경구투여시 생성된 IgA는 whole cell을 경구투여하는 경우보다는 결합하는 양이 떨어지지만 커다란 차이를 보이지는 않는다. 그러므로 *H. pylori* protein 성분을 이용한 백신 개발이 가능할 것으로 사료된다.

- against gastric infection with *Helicobacter* species: Use of a cholera toxin B-subunit-whole-cell vaccine. *Infect. Immun.* **62**: 3594-3597.
9. Pierre Michetti *et al.* 1994. Immunization of BALB/c mice against *Helicobacter felis* infection with *Helicobacter pylori* urease. *Gastroenterology.* **107**: 1002-1011.
 10. Cuenca R *et al.* 1996. Therapeutic immunization against *Helicobacter mustelae* in naturally infected ferrets. *Gastroenterology.* **110**: 1770-1775.
 11. Martin J. Blaser. 1992. Hypotheses on the pathogenesis and natural history of *Helicobacter pylori*-induced inflammation. *Gastroenterology.* **102**: 720-727.
 12. Adrian Lee *et al.* 1993. Pathogenicity of *Helicobacter pylori*: a perspective. *Infect. Immun.* **61**: 1601-1610.
 13. Ferrero RL *et al.* 1995. Immunisation with *H. pylori* heat shock protein A(HspA) and urease subunit B(UreB) affords total protection against *H. felis* infection in mice. *Gut.* **37**(suppl 1): A203.
 14. Peter Nedenskov. 1994. Nutritional requirements for growth of *Helicobacter pylori*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 3450-3453.
 15. E. Gabriella Kehler *et al.* 1994. Evaluation of three commercially available blood culture systems for cultivation of *Helicobacter pylori*. *J. Clin. Microbiol.* **32**: 1597-1598.
 16. Peter Doig, Trevor J. Trust. 1994. Identification of surface-exposed outer membrane antigens of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **62**: 4526-4533.
 17. Maurice M. Exner *et al.* 1995. Isolation and characterization of a family of porin proteins from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **63**: 1567-1572.
 18. Maria Antonietta Tufano *et al.* 1994. Immunobiological activities of *Helicobacter pylori* porins. *Infect. Immun.* **62**: 1392-1399.
 19. Bruce E. Dunn *et al.* 1990. Purification and characterization of urease from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **265**: 9464-9469.
 20. Li-Tai Hu *et al.* 1990. Purification and N-terminal analysis of urease from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **58**: 992-998.
 21. Shahida Baqar *et al.* 1995. Safety and immunogenicity of a prototype oral whole-cell killed *Campylobacter* vaccine administered with a mucosal adjuvant in non-human primates. *Vaccine.* **13**: 22-28.
 22. Charles O. Elson *et al.* 1984. A lavage technique allowing repeated measurement of IgA antibody in mouse intestinal secretions. *J. Immunol. Met.* **67**: 101-108.
 23. Bruce E. Dunn *et al.* 1989. Two-dimensional gel electrophoresis and immunoblotting of *Campylobacter pylori* proteins. *Infect. Immun.* **57**: 1825-1833.
 24. J. P. Burnie *et al.* 1988. Immunoblot fingerprinting of *Campylobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **27**: 153-159.
 25. Filip *et al.* 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* **115**: 717-722.
 26. Suhas H. Phadnis *et al.* 1996. Surface localization of *Helicobacter pylori* urease and a heat shock protein homolog requires bacterial autolysis. *Infect. Immun.* **64**: 905-912.
 27. Dunn B. E. *et al.* 1992. Identification and purification of a cpn60 heat shock protein homolog from *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **60**: 1946-1951.
 28. Mario Huesca *et al.* 1996. Acidic pH changes receptor binding specificity of *Helicobacter pylori*: a binary adhesion model in which surface heat shock(stress) proteins mediate sulfatide recognition in gastric colonization. *Infect. Immun.* **64**: 2643-2648.
 29. Megraud F *et al.* 1992. Further evidence of the toxic effect of ammonia produced by *Helicobacter*. *Infect. Immun.* **60**: 1858-1863.
 30. Ferrero R. L *et al.* 1994. Recombinant antigens prepared from the urease subunits of *Helicobacter* spp: evidence of protection in a mouse model of gastric infection. *Infect. Immun.* **62**: 4981-4989.
 31. Riccardo Negrini *et al.* 1991. *Helicobacter pylori* infection induces antibodies cross-reacting with human gastric mucosa. *Gastroenterology.* **101**: 437-445.
 32. K. A. Eaton *et al.* 1995. Virulence of coccoid and bacillary forms of *Helicobacter pylori* in gnotobiotic piglets. *J. Infect. Dis.* **171**: 459-462.
 33. Mohammed Benaissa *et al.* 1996. Changes in *Helicobacter pylori* ultrastructure and antigens during conversion from the bacillary to the coccoid form. *Infect. Immun.* **64**: 2331-2335.

(Received 28 November 1996)