

비브리오속 균주들에서의 세포외 효소의 분포

김윤희 · 정초록 · 김수광 · 양지영* · 차재호[†]

부산대학교 미생물학과
*부경대학교 식품생명공학부

Distribution of Extracellular Proteases from Various *Vibrio* Species

Yoon Hee Kim, Cho Rok Jung, Soo Kwang Kim, Ji-Young Yang* and Jaeho Cha[†]

Dept. of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

*Div. Food Science and Biotechnology, Pukyung National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

The members of the genus *Vibrio* include harmless aquatic strains as well as strains capable of causing infections in human and fish. Pathogenic mechanisms are only understood for *Vibrio cholerae* O1 and O139 and not for the majority of *Vibrio* species. Twelve clinical and nonclinical strains were examined by *in vitro* and *in vivo* experiments for the importance of extracellular enzymes as a virulence determinant of *Vibrio* species. *In vivo* cytotoxicity assay was performed by injecting approximately 10^8 cells/mL into mice (BALB/c). *V. harveyi* and *V. vulnificus* showed 100% lethality within 3 hr after bacterial injection. *V. fluvialis* and four strains of *V. parahaemolyticus* showed 50% lethality within 4 hr. *V. mimicus*, *V. alginolyticus* and *V. furnissii* revealed 30% lethality within 9 hr. Nonclinical strains, *V. campbellii* and *V. ordalii*, did not show any lethality. *In vitro* protease and hemolytic activities were also good indicators for clinical and nonclinical strains of *Vibrio* species. The clinical strains showed much higher activities than nonclinical strains. The activity of some clinical strains of re-isolates was evidently increased. Most clinical strains had β hemolytic activity. The results demonstrate that the prevalent distribution of extracellular proteases in pathogenic *Vibrio* sp. implies their importance as a virulence determinant.

Key words: *Vibrio*, pathogenicity, extracellular enzymes, hemolysis

서 론

비브리오균은 해수에서 서식하는 세균으로서 어류의 감염과 인간에게 있어서는 콜레라, 장염 비브리오, 그리고 패혈증을 일으키는 유해균으로 알려져 있다(1). 현재 약 40여종 이상이 알려져 있으며, 사람에게 병원성이 있거나 임상 가검물에서 분리된 균은 대표적으로 *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*를 비롯하여 15여종이 있다. 이들 균에 의한 주 질환은 상처감염과 패혈증이지만 그 외에 이염, 복막염, 폐렴, 뇌막염, 자궁 내막염이나 담낭염 등 다양한 질병을 일으킨다(2-4). 비브리오균에 의한 식중독은 전세계에 걸쳐 보고되나, 병인론에 대한 연구는 미국, 일본 등 선진국에서는 우리나라와는 다른 식습관으로 인하여 다른 병원균에 비해 상대적으로 발병률이 낮아 주목받지 못하므로 심층적인 연구가 부진한 실정이다. 미국의 경우 육체품의 소비가 많아 *Salmonella*, *Campylobacter* 등에 의한 사례가 높은 것으로 보고되는 반면, 우리나라의 경우는 수산물의 소비가 많아 *Salmonella* 다음으로 *Vibrio*균에 의한 식중독 발생건수가 높은 비율로 발생하

고 있다. 식중독균들은 장의 상피세포에 부착할 수 있는 장관 독소를 생성하여 장관막의 adenylyl cyclase를 활성화시킴으로써 숙주세포 내 cyclic AMP의 농도를 높이고, 높아진 cyclic AMP가 조직 및 결합 내에서 비정상적인 전해질 이동을 야기시킨다(5,6). 이러한 작용은 세포의 정상적인 조절작용을 방해함으로써 산증을 유발시키거나 순환계로부터 원활한 수분공급을 못하게 한다. 이러한 장관독소는 균이 대수증식기에 이를 때 분비되어 효소작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 이 분비물질이 포유동물의 여러 세포를 파괴할 수 있는 능력을 가지게 된다.

병원성에 대한 연구는 주로 적혈구를 파괴하는 것으로 알려진 용혈소, 특히 hemolysin에 대한 연구가 거의 전부인 실정이다(7-9). 현재 hemolysin은 다양한 병원성 비브리오에서 발견되어지고 있으며, 병원성의 판단 인자로서 이 단백질의 검출에 면역학적 방법(10)이나 DNA probe(11)를 이용하는 방법 등이 널리 이용되고 있다 또한 최근에는 PCR(12)을 이용하여 직접적인 유전자의 확인을 시도하고 있다. 그러나 최근 들어 hemolysin 이외에 다른 병원성인자들에 대한 보고

[†]Corresponding author. E-mail: jhcha@hyowon.pusan.ac.kr
Phone: 82-51-510-2196, Fax: 82-51-514-1778

가 발표되고 있으나 대부분 자세한 병원성 기작에 대한 연구는 미비한 실정이다. 그 중에서 세포외 단백질 분해효소들이 대표적인 인자로서 인간 또는 어패류의 pathogenicity에 관련되어 있다는 보고가 있으며(13,14) 몇몇 다른 병원균인 *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Clostridium perfringens* 등에 의해 야기되는 질병에 있어서 주요한 독성 인자로 작용하는 것으로 알려져 있다(15-17). 비브리오에서는 *Vibrio cholerae* O1이 생산하는 hemagglutinin/protease 이 숙주세포의 장 상피점막의 보호층인 mucin, fibronectin, lactoferrin 등을 파괴함으로써 콜레라 장관독소의 활성을 증강시키는 것으로 알려져 있으며, 이 효소를 생산하지 못하는 돌연변이체의 경우 감염력이 현저히 떨어지는 것으로 밝혀져 있다(18,19). 창상감염과 패혈증을 일으키는 원인균인 *V. vulnificus*도 elastase activity를 보이는 protease를 생산하여 조직 내로 균이 침투하는 것을 돕는다(20,21). 이외에 어패류에 병을 일으키는 *V. anguillarum*도 역시 protease를 분비하며(13), 기존의 *V. cholerae*, *V. vulnificus*와 아미노산 서열의 상동성을 보이며, 역시 elastolytic activity를 나타냄으로서 숙주세포의 침입에 관여하는 것으로 추측하고 있다(22).

본 연구에서는 임상과 환경에서 분리된 다양한 비브리오균이 생산하는 세포외 효소를 조사하고 병원성 균에서 특이적으로 발현되는 효소들을 검색, 분리하여 특이성을 조사하고 병원성에 관여한다고 추정되는 인자를 탐색하는 연구를 수행하는데 기초실험으로써 실험동물을 사용하여 비브리오균들의 병원성을 검사하고 이들이 분비하는 다양한 세포외 효소들을 검사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양 조건

12개의 사용된 균주 중 *V. parahaemolyticus* O4와 *V. furnissii*는 부산대학교 미생물학과에 보관 중인 균주를 사용하였고, *V. parahaemolyticus* 분리균주 1, 2와 ATCC J7802는 부경대 식품생명공학과에서 분양 받아 사용하였다. *V. alginolyticus*는 피조개에서 분리하였고, 그 외의 *V. vulnificus* ATCC 27562, *V. mimicus* ATCC 33653, *V. Harveyi* KCTC 2717, *V. ordalii* KCTC 2724, *V. fluvialis* KCTC 2473, *V. campbellii* KCTC 2716은 한국 균주 보관센터(KCTC)에서 공인된 균주를 구입하여 사용하였다. 사용 균주의 배양은 NaCl이 1.5% 첨가된 brain heart infusion(BHI, Difco, USA)배지와 tryptic soy broth(TSB, Difco, USA) agar 배지를 사용하였으며, 배양 온도는 30~37°C에서 진탕 배양(rpm 180~200)하였다.

세포외 효소의 활성 측정

Protease: BHI agar 매지 상에서 다양한 기질을 첨가하여 활성을 측정하였다(23). 기질로는 bovine serum albumin(BSA), skim milk, casein, 그리고 gelatin 등을 최종 농도 1% 되게 첨가하여 사용하였다. BSA는 BHI agar를 멸균해서 50°C까

지 식힌 뒤 여과 살균된 기질을 무균적으로 첨가하여 배지를 만들었다. Skim milk, casein, 그리고 gelatin은 BHI agar와 기질을 혼합하여 함께 멸균하고 50°C까지 식힌 뒤 배지를 조제하였다. 그 뒤 균을 접종한 뒤 37°C에서 24 hr 배양하고 평판 매지에 12.5% HgCl₂-1 M HCl 용액을 부어 생긴 투명환으로 기질 분해능을 확인하였다.

Mucinase: 기질은 porcine stomach mucine type II (Sigma, USA)를 1% 되게 phosphate buffer(0.7 M, pH 6.0)에 녹여 사용하였다. BHI agar를 멸균해서 50°C까지 식힌 뒤 무균적으로 기질을 혼합하여 배지를 만들고, 균을 접종한 뒤 37°C에서 24 hr 배양하고 평판매지에 12.5% HgCl₂-1 M HCl 용액을 부어 생성된 투명환으로 기질의 분해능을 검사하였다(24,25).

Hyaluronidase, Chondroitin sulfatase: BHI agar를 멸균한 뒤 50°C까지 식히고 filter를 이용해 멸균한 기질인 hyaluronic acid(Sigma, USA)와 chondroitinase ABC(Sigma, USA)를 1% bovine albumin과 섞어서 배지를 만들었다. Hyaluronic acid와 chondroitinase ABC는 각각 400 µg/mL의 농도로 맞추어 첨가하였다. 균을 접종한 뒤 37°C에서 24 hr 배양하고, 2N acetic acid를 배지에 부어 생기는 투명환으로 균의 기질 분해능을 검사하였다(26-29).

Elastase: 효소의 활성측정은 Kothary와 Kreger의 방법(30)을 수정하여 측정하였다. 20 mg/mL 농도의 elastin-congo red(Sigma, USA) 1 mL을 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 1 mL에 녹이고 배양한 균 상등액 1 mL을 첨가한 후, 반응물을 37°C에서 1 hr 동안 반응시키고 0.7 M phosphate buffer(pH 6.0) 2 mL을 첨가하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리시킨 뒤, 침전물을 제거하고 그 상등액을 회수하였다. 495 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하여 효소의 활성을 검사하였다.

Hemolytic activity: 5% sheep erythrocytes를 함유한 blood agar plate에 균을 접종한 뒤, 37°C에서 24 hr 배양해서 생기는 투명환으로 효소 활성을 측정하였다(31).

Fibrinolytic activity: Leitao 등의 방법(32)을 수정하여 이 효소의 활성 측정에 사용하였다. 0.3% fibrinogen(Sigma, USA)을 barbital buffer(pH 7.0)에 녹여서 여과 살균하고 멸균한 BHI agar와 혼합한 후에 여과 살균된 thrombin(Sigma, USA) unit를 첨가하여 배지를 조제하였다. 균을 접종한 후 37°C에서 24 hr 배양하고 생성되는 투명환으로 기질의 분해능을 관찰하였다.

마우스에 대한 치사율 측정

12개 *Vibrio* species를 37°C에서 24 hr 동안 전배양한 후, 1.5% NaCl이 포함된 BHI 매지에 1% 되게 접종하여 600 nm에서 OD=1.0(약 10⁸ CFU)에 도달할 때까지 배양하였다. 배양액을 12,000 rpm으로 10 min 동안 원심분리 하였다. 침전된 균체를 0.5 mL PBS(0.9% NaCl)로 현탁시켜 6~10주된 실험용 쥐(BALB/c, 약 20 g)의 복강에 주사하여 치사 여부와 운동성으로써 균의 생존여부를 관찰하였다.

재분리된 균주로부터 세포의 효소의 활성 측정

치사된 실험용 쥐의 spleen으로부터 접종된 균을 다음 같이 분리하였다. 무균적으로 spleen을 적출하여, 5 mL의 PBS (0.9% NaCl) 용액을 첨가하고 spleen을 잘게 부순 뒤, 원심분리하였다. 그 상등액을 3% NaCl이 첨가된 BHI 배지에 최종 농도 2%로 맞추어 37°C에서 3 hr 배양시키고, 위에서 언급한 효소의 역가 측정 방법에 따라 세포의 효소의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

비브리오 균주간의 마우스 치사율 비교

사용된 12종류의 병원성과 비병원성으로 알려진 비브리오 균주를 사용하여 6~10주된 실험용 쥐 (BALB/c, 약 20 g)에 대한 치사율을 비교하였다. 각 균주에 대하여 6마리의 마우스군으로 실험을 수행하였고, 생리식염수를 주사한 3마리의 마우스군을 대조군으로 사용하였다. *V. harveyi*와 *V. vulnificus*가 균 접종 3시간 후에 100%의 치사율을 나타내었다. *V. parahaemolyticus* 분리균주 1, *V. mimicus*가 균 접종 후 9시간만에 70%의 치사율을 나타내었으며, *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802가 50%의 치사율을 나타내었다. *V. parahaemolyticus* 분리균주 2, *V. parahaemolyticus* 04, *V. furnissii*는 접종 9시간 후에 30%의 치사율을 보였다. 그러나 *V. alginolyticus*, *V. campbellii*와 *V. ordalii*는 24시간 경과 후에도 생존하였다(Fig. 1). 위와 같은 결과는 기존에 알려진 실험결과(33)와 잘 일치한다고 볼 수 있다. 일반적으로 폐혈증을 일으키는 것으로 알려진 *V. vulnificus*는 상당한 치사율을 나타낸다. 특이한 점은 일반적으로 사람에게 비병원성 비브리오로 알려진 *V. harveyi*가 마우스 실험에서 높은 치사율을 나타내었는데 이와 같은 결과는 차후 더 자세한 실험을 통하여 검사해 보아야 할 것으로 사료된다.

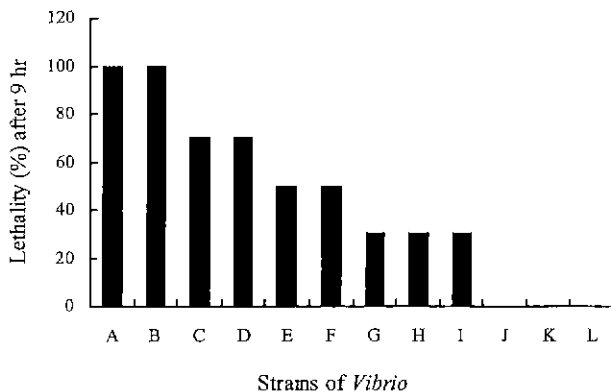


Fig. 1. Comparison of mouse lethality after *Vibrio* injection. Mice (BALB/c, n=6, 20±2 g) was infected by various *Vibrio* sp. (CFU=10⁸) A, *V. vulnificus*; B, *V. harveyi*; C, *V. parahaemolyticus* isolates 01; D, *V. mimicus*; E, *V. fluvialis*; F, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; G, *V. parahaemolyticus* serotype 04; H, *V. parahaemolyticus* isolates 02; I, *V. furnissii*; J, *V. ordalii*; K, *V. alginolyticus*; L, *V. campbellii*.

세포의 효소의 활성 검색

일반적으로 병원성 세균들에서 세포의 효소는 병원성 인자로서 늘 주목받아 왔다. *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* 등과 더불어 *Vibrio vulnificus*, *V. cholerae*에 의해 야기되는 질병에 주요 독성인자로서 알려져 왔다 (13-16) 그러나 세포의 효소는 그 범위가 상당히 넓으며 효소의 활성을 측정하는 방법들이 전부 알려져 있지 않기 때문에 어떤 종류의 효소들이 존재하는지 그 본포에 대하여서는 자세한 조사가 되어있지 못하여 실질적인 병원성에 추정되는 인자임에도 불구하고 체계적인 연구가 미비한 실정이다. 본 실험에서는 병원성으로 알려진 비브리오 균주와 비병원성 균주들을 대상으로 어떠한 종류의 세포의 효소들이 존재하고 병원성과 비병원성 균주간의 차이점이 있는지 알아보기 위하여 세포의 효소들의 생산능을 검토하여 보았다. 각각의 세포의 효소의 기질에 대한 분해능을 균주위의 투명환(halo zone)의 크기로 측정하였다. 한 예로 casein을 기질로 하였을 경우 비브리오 균주들이 생산하는 세포의 효소의 분해능을 Fig. 2에 나타내었다. 투명환이 0.3 cm 이상이면 강한 분해능을 가진 것으로 평가하였으며 활성이 없는 것은 투명환을 보이지 않았다. 비브리오 균주간의 세포의 효소의 생산능에 대한 결과는 Table 1에 요약되어 있다. 대부분의 균들이 1개 이상의 세포의 효소를 분비하고 있었으며, 병원성 균주로 알려진 균주들에서 비병원성 균주에 비해 더 다양한 종류의 효소를 생산하였으며, 효소의 활성 또한 높음을 알 수 있었다.

BSA를 기질로 사용했을 때 *V. vulnificus*, *V. harveyi*같은 높은 치사율을 보인 균주들의 활성이 대체로 높게 나타났다. *V. harveyi*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802

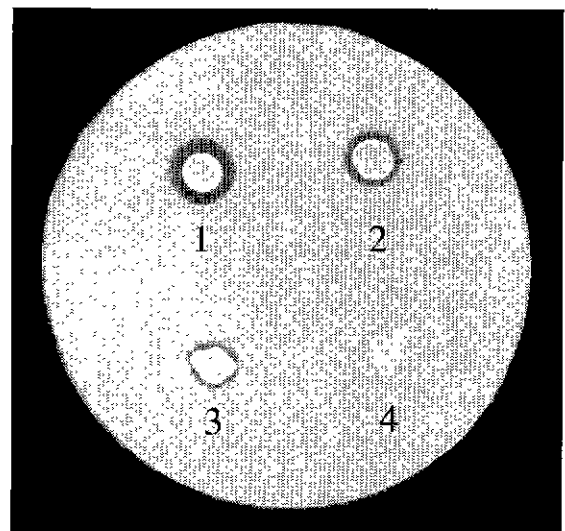


Fig. 2. Level of proteolytic activity of *Vibrio* sp. in casein agar plate.

- 1: +++ (*Vibrio fluvialis* KCTC 2473)
- 2: ++ (*Vibrio vulnificus* ATCC 27562)
- 3: + (*Vibrio mimicus* ATCC 33653)
- 4: - (*Vibrio campbellii* KCTC 2716)

Table 1. Production of extracellular enzymes and lethality in *Vibrio* species

Organism	Protease				Mucinase	Chondroitin sulfatase	Hyaluronidase	Fibrinolysis	Elastase	Hemolysis	Lethality ³⁾
	BSA	Gelatin	Casein	Skim milk							
<i>V. vulnificus</i> ATCC27562	++ ¹⁾	++	++	++	+++	+	+	++	++	β	++++
<i>V. harveyi</i> KCTC2717	++	++	+	-	-	++	++	-	-	β	++++
<i>V. parahaemolyticus</i> environmental strain 1	+	++	++	++	++	+	+	+	+	β	+++
<i>V. mimicus</i> ATCC33653	++	+	+	+	++	++	+-	+	+	β	+++
<i>V. fluvialis</i> KCTC2473	+	++	+++	+	+++	+	+	+	+	β	++
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802	++	++	+	+	++	+-	-	+	+-	β	++
<i>V. parahaemolyticus</i> 04	+	++	+	+	++	-	+	+	+	β	+
<i>V. parahaemolyticus</i> environmental strain 2	+	+	-	+	++	++	+	+	-	β	+
<i>V. furnissii</i>	-+	+	-	+	+	-	+	-	-	α	+
<i>V. alginolyticus</i>	- ²⁾	+	-	-	-	-	-	+	-	α	-
<i>V. ordalii</i> KCTC2724	+	-	+	-	+	+	+	-	-	α	-
<i>V. campbellii</i> KCTC2716	+	-	-	-	-	+	+	-	-	α	-

¹⁾ +~++++, level of extracellular enzyme activity (size of transparent hole) +++, above 0.3 cm, ++ 0.2-0.3 cm; + below 0.1 cm.

²⁾ - : no extracellular enzyme activity.

³⁾ +~+ level of lethality, +++++, 100%; +++ 70%, ++, 50%, +, 30%; -, 0%; see the results and discussion part for details.

는 마우스에 접종하여 균주를 숙주세포 내에서 활성화시킨 후, 재분리 하였을 때 활성이 증가되는 것을 볼 수 있었고, *V. furnissii*는 초기에 미약하였던 효소 활성이 숙주세포를 통과하면서 크게 유도되었다. 한편 Oliver 등(33)은 native serum albumin이 protease의 활성에 대한 기질로서 병원성과 비병원성 균들간의 구별에 중요한 인자로서 언급하였으나 본 실험의 결과는 활성에서의 차이는 보이나 두 종류의 비병원성 균인 *V. ordalii*와 *V. campbellii* 모두 약한 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. Skim milk에 대한 protease 활성은 치사율이 높은 *V. vulnificus*와 *V. parahaemolyticus* 분리균주 1에서 높은 활성을 보였다. *V. furnissii*는 BSA에서와 같이 *in vitro*에서는 미약하였던 활성이 생체 내를 통과하면서 크게 활성이 유도되었다. Casein에 대한 protease 활성은 *V. vulnificus*와 *V. fluvialis*에서 가장 높은 기질 분해능을 보였고, *V. ordalii*, *V. furnissii*, *V. alginolyticus*, 그리고 *V. campbellii*는 거의 활성을 보이지 않았다. Gelatin을 기질로 사용하였을 경우, 역시 마찬가지로 병원성 균에서는 모두 높게 나타나고, 비병원성으로 알려진 균주에서는 활성이 나타나지 않았다. 일반적으로 비병원성으로 알려진 *V. harveyi*는 다른 비병원성 균에 비해서 protease의 활성을 유지하는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과가 마우스에서 나타난 이 균의 높은 독성과 연관이 있다고 생각되어진다. 결론적으로 extracellular protease 활

성은 마우스에 대한 독성실험과 비례하여 나타나고 있으며, 이는 병원성과 비병원성 비브리오균주간의 구분을 명확히 하는데 유용한 인자로 사용될 수 있음을 나타내는 것으로 판단된다.

비브리오 균주들의 용혈소 분비활성은 병원성 균과 비병원성 균간의 구분을 더욱 명확히 해주었다. *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* 분리균주 1, *V. mimicus*가 모두 sheep blood agar 배지에서 투명환이 크게 뚫리면서 강한 β 완전용혈소를 분비하는 것을 볼 수 있었다. *V. harveyi*와 그 외의 *V. parahaemolyticus* 균주들도 역시 β 완전용혈소를 분비했다. 그러나 비병원성 균주로 분류되는 *V. ordalii*와 *V. campbellii*와 함께 미약한 protease 활성을 보인 *V. furnissii*와 *V. alginolyticus*는 모두 α 불완전 용혈소를 분비했다. *V. fluvialis*는 *in vitro*에서는 α 불완전 용혈소를 분비했으나, 마우스 접종 후 활성이 증가되어 β 완전 용혈소를 분비하였다. 이는 protease 활성과 함께 hemolysis가 병원성 비브리오의 탐색에 중요한 인자로 작용함을 알 수 있다.

마우스에서 치사율을 높게 나타낸 균주들이 hyaluronidase와 chondroitin sulfatase의 활성 측정에서도 비교적 높은 것으로 나타났다. *V. harveyi*, *V. mimicus* 균주에서 위의 효소 활성이 높은 것으로 나타났으나, *V. vulnificus*는 다른 세포외 효소들에 비하여 활성이 낮게 나타났다. 반면, *V. ordalii*, *V.*

campbellii 등은 마우스의 치사율은 없었지만, 효소활성은 있는 것으로 나타났다. Elastase에 대한 비브리오 균주들의 활성은 protease 활성과 마찬가지로 병원성과 비병원성의 구분을 명확히 나타내었다. 치사율이 높은 균주들에서 활성이 높게 나타났다. 특히, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802에서 높은 활성을 보여주었다. 그러나, *in vitro*에서는 *V. vulnificus*, *V. mimicus*, *V. furnissii*의 나머지 균주들은 거의 활성을 보이지 않았고 마우스에 접종한 후, 다시 분리하였을 때에는 효소의 활성이 회복됨을 알 수 있었다. Desmond 등(34)과 Oliver 등(33)의 실험에서도 이 효소에 대한 활성은 큰 차이를 보이고 있는데 이는 이 효소의 유전자가 숙주세포의 인자에 의하여 조절되는 것으로 사료된다. Fibrin에 대한 분해능은 *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* 균주들에서 높은 활성을 보이며, 치사율이 낮고, 병원성을 유발하지 않는 균주들에서는 거의 활성을 보이지 않는다. 예외적으로 병원성 균에서 분비하는 세포의 효소들을 대부분 분비하는 *V. harveyi*는 활성을 거의 보이지 않았다. 이는 병을 유발시키는 기작과 연관성이 있는 것으로 생각되며 아마도 이 균에 의한 마우스 독성은 다른 병원성 균과는 다른 형태에 의할 것으로 생각된다. Mucin은 장점막에 존재하는 당단백질의 종류로서 일반적으로 병원균이 숙주세포의 장점막에 부착할 때 mucinase의 활성이 중요한 것으로 알려져 있다. 이 mucinase의 활성은 장에 감염을 일으키는 *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* 균주들에서 높은 활성을 보이며, 치사율이 낮고, 병원성을 유발하지 않는 균주들에게서는 거의 활성을 보이지 않는다. 또한 장관의 감염을 일으키는 *V. alginolyticus*와 비병원균인 *V. ordalii*와 *V. campbellii*에는 활성이 없었다. 인간에게 비병원성으로 알려진 *V. harveyi* 또한 활성을 거의 보이지 않았다. *V. mimicus*와 *V. parahaemolyticus* 분리균주 2에서는 *in vitro*에서 보다 생체 내를 통과하면서 활성이 증가되었다. Oliver 등(33)은 elastase와 mucinase의 경우 인간에게 병원균으로 알려진 균종에서만 활성이 있다고 보고하였는데 이는 우리의 실험결과와도 어느 정도 일치하는 것을 알 수 있었다. *V. harveyi*의 경우 마우스 실험에서 강한 독성을 나타내었지만 두 효소의 활성은 나타나지 않았다.

최근 들어 병원성 인자로서 세포 외로 분비되는 효소들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 아직은 특별한 중요성에 대한 보고가 발표된 적은 없으나 이미 hemolysin이 *V. parahaemolyticus*에서 가장 중요한 병원성 인자로서 밝혀져 있고 여러 exoenzyme들이 독성 인자로 추정되어 있다. 본 실험의 결과는 비브리오가 생산하는 다양한 protease와 β hemolysin가 병원성에 주요인자로서의 가능성을 보여주었다. 그러나 또한 mucinase, elastase, fibrin 분해 효소 등의 활성도 비브리오의 병원성에 관여하는 인자로서 간과할 수는 없다. 보다 체계적인 연구를 위해서는 각각의 세포의 효소에 대한 분리와 정제를 통한 병원성 연구가 수행되어야 될 것으로 생각되며, 실험동물 및 어류에서의 세포의 효소의 병리 기작을

분자수준에서 연구하고 이 효소들이 작용하는 표적 기관에 대해서도 심도 있는 연구가 필요하리라 판단된다. 또한 이미 알려진 용혈소 등의 다른 병원성 인자와의 연관관계를 분석하게 되면 식중독에 원인이 되는 중요한 요소를 밝힐 수 있리라 생각되어지며, 원천적으로 식중독을 유발하는 비브리오균들의 침입을 억제할 수 있는 방법을 찾을 수 있을 것으로 기대된다. 세포의 효소들에 의한 병원성을 유발하는 기작의 이해는 결국 이 효소들의 저해제의 개발을 가능하게 하여 식중독에 걸린 환자들의 치료에 대해 보다 적극적인 방법의 시도가 가능하리라 생각되어진다.

요 약

병원성 비브리오와 비병원성 비브리오 사이의 세포의 효소 활성 차이점을 비교하기 위하여 마우스를 이용하였다. 각 균주들을 마우스에 약 10^8 CFU로 복강 주사한 다음 다시 분리하여 세포의 효소 활성을 비교 검토하였다. 병원성 비브리오의 세포의 효소 탐색은 protease(BSA, casein, skim milk, gelatin), mucinase, hemolysin, hyaluronidase 및 chondroitin sulfatase 활성을 측정하여 수행하였다. 그리고 elastase 활성, fibrinolysis 활성을 측정하는 방법을 본 연구에 맞게 확립하였다. 치사율이 높게 나타나는 균주에서는 시험 대상의 세포의 효소의 활성이 모두 높게 나타났으며, 치사율이 낮아질수록 세포의 효소의 활성은 낮게 나타났다. 치사율에 비례하여 활성을 높게 보이는 효소는 대부분의 proteases, hemolysin이 뚜렷하였으며, 그 외의 대부분의 세포의 효소들도 병원성 균주에서 높은 활성을 보였다. Hemolysis의 경우는 치사율이 높은 *V. vulnificus*, *V. parahemolyticus* 등의 균주에서는 β 완전 용혈소의 분비가 뚜렷하게 관찰되는 반면, 치사율이 낮은 균주에서는 α 불완전 용혈소의 분비를 관찰할 수 있었다. *V. harveyi*는 비병원성 균으로 알려졌음에도 불구하고 병원성 균에서 분비하는 세포의 효소들을 대부분 분비하고 치사율도 매우 높음을 보여주었다. 결론적으로 병원성 비브리오균의 높은 세포의 효소의 활성은 이 효소의 생산이 비브리오균들의 pathogenicity에 깊은 연관성이 있음을 시사한다고 볼 수 있다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부에서 시행한 2000년도 보건의료기술 연구개발사업의 연구비 지원(HMP-00-B-22000 0142)으로 수행된 연구결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1 Hady, W G. and Klontz, K C : The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida. *J. Infect. Dis* 173, 1176-1183 (1996)

2. Oliver, J.D. : *Vibrio vulnificus* In *Foodborne Bacterial Pathogens*, Doyle, M.P. (ed.), Marcel Dekker, New York, p.569-599 (1989)
3. Farmer, J.J., III., Hickman-Brenner, F.W. and Kelly, M.T. *Manual of Clinical Microbiology*, 4th ed., American Society for Microbiology, Washington D.C. (1985)
4. Todd, E.C.D. Preliminary estimates of costs of foodborne disease in the U.S. *J. Food Protect.*, **52**, 595-601 (1989)
5. Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. *Enteric gram negative microorganisms*, 14th ed., Lange-Medical Co. Los Altos, California (1980)
6. Pelczar, M.J., Chan, E.C.S. and Krieg, N.R. : Host-microbe interactions: The process of infection. In *Microbiology*, 5th ed., McGraw-Hill, New York (1986)
7. Myoshi, S., Fujii, S., Tochika, K. and Shinoda, S. : Some properties of nicked *Vibrio vulnificus* hemolysin. *Microb. Pathog.*, **23**, 235-239 (1997)
8. Honda, T., Abad-Lapuebla, M.A., Ni, Y.X., Yamamoto, K. and Miwatani, T. : Characterization of a new thermostable direct hemolysin produced by a Kanagawa-phenomenon-negative clinical isolate of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 253-259 (1991)
9. Nishibuchi, M., Khaeomaneer-iam, V., Honda, T., Kaper, J.B. and Miwatani, T. : Comparative analysis of the haemolysin genes of *Vibrio cholerae* non-O1, *V. mimicus* and *V. holisae* that are similar to the *tdh* gene of *V. parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **67**, 251-256 (1990)
10. Okada, K., Mitsuyama, M., Miake, S. and Amako, K. : Monoclonal antibodies against the haemolysin of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 2279-2284 (1987)
11. Nishibuchi, M., Ishibashi, M., Takeda, Y. and Kaper, J.B. : Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infect. Immun.*, **49**, 481-486 (1985)
12. Lee, C. and Pan, S.F. : Rapid and specific detection of the thermostable direct haemolysin gene in *Vibrio parahaemolyticus* by the polymerase chain reaction. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 3225-3231 (1993)
13. Norqvist, A., Norrman, B. and Wolf-Watz, H. : Identification and characterization of a zinc metalloprotease associated with invasion by the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Infect. Immun.*, **58**, 3731-3736 (1990)
14. Kreger, A., De Chatelet, L. and Shirley, P. : Interaction of *Vibrio vulnificus* with human polymorphonuclear leukocytes: association of virulence with resistance to phagocytosis. *J. Infect. Dis.*, **144**, 244-248 (1981)
15. Liu, P.V. : Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.*, **130**, 94-99 (1974)
16. Molla, A., Matsumoto, K., Oyamada, L., Katsuki, T. and Maeda, H. : Degradation of protease inhibitors, immunoglobulins and other serum proteins by *Serratia* protease and its toxicity to fibroblasts in culture. *Infect. Immun.*, **53**, 522-529 (1986)
17. Awad, M.M., Ellemor, D.M., Bryant, A.E., Matsushita, O., Boyd, R.L., Stevens, D.L., Emmens, J.J. and Rood, J.I. : Construction and virulence testing of a collagenase mutant of *Clostridium perfringens*. *Microbial Pathogen.*, **28**, 107-117 (2000)
18. Naka, A., Yamamoto, K., Miwatani, T. and Honda, T. : Characterization of two forms of hemagglutinin/protease produced by *Vibrio cholerae* non-O1. *FEMS Microbiol. Lett.*, **77**, 197-200 (1992)
19. Finkelstem, R.A., Boesman-Finkelstein, M., Chang, Y. and Hasc, C.C. : *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect. Immun.*, **60**, 472-478 (1992)
20. Kothary, M.H. and Kreger, A.S. : Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, **50**, 534-540 (1985)
21. Jeong, K.C., Jeong, H.S., Rhee, J.H., Lee, S.E., Chung, S.S., Starks, A.M., Escudero, G.M., Gulig, P.A. and Choi, S.H. : Construction and phenotypic evaluation of a *Vibrio vulnificus* vvpE mutant for elastolytic protease. *Infect. Immun.*, **68**, 5096-5106 (2000)
22. Milton, D.L., Norqvist, A. and Wolf-Watz, H. : Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.*, **174**, 7235-7244 (1992)
23. Morris, Jr., J.G., Wright, A.C., Simpson, L.M., Wood, P.K., Johnson, D.E. and Oliver, J.D. : Virulence of *Vibrio vulnificus*: association with utilization of transferrin-bound iron, and lack of correlation with levels of cytotoxin or protease production. *FEMS Microbiol. Lett.*, **40**, 55-59 (1987)
24. Schneider, D.R. and Purker, C.D. : Purification and characterization of the mucinase of *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, **145**, 474-482 (1982)
25. Stewart-tull, D.E.S., Ollar, R.A. and Scobie, T.S. : Studies on the *Vibrio cholerae* mucinase complex I. Enzymic activities associated with the complex. *J. Med. Microbiol.*, **22**, 325-333 (1986)
26. Hynes, W.L. and Ferretti, J.J. : Assays for hyaluronidase activity. *Meth. Enzymol.*, **235**, 606-616 (1994)
27. Shimizu, M.T., Jorge, A.O., Unterlarcher, C.S., Fantinato, V. and Paula, C.R. : Hyaluronidase and chondroitin sulfatase production by different species of *Candida*. *J. Med. Vet. Mycol.*, **33**, 27-31 (1995)
28. Sato, N., Shimada, M., Nakajima, H., Oda, H. and Kimura, S. : Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding the *Proteus vulgaris* chondroitin ABC lyase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 39-46 (1994)
29. Osano, E., Ilibi, E., Ozeki, M., Fujii, Y. and Moriyama, T. : Chondroitin sulfate-depolymerizing activity in *Streptococcus intermedius* and other *Streptococci*. *Microbiol. Immunol.*, **31**, 1127-1130 (1987)
30. Kothary, M.H. and Kreger, A.S. : Purification and characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus*. *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 1783-1791 (1987)
31. Takeda, Y. : Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharmacol. Ther.*, **19**, 123-146 (1983)
32. Leitao, D.P.S., Polizello, A.C.M. and Rothschild, Z. : Coagulation and fibrinolysis in capybara, a close relative of the guinea-pig. *Comp. Biochem. Physiol. part A*, **125**, 113-120 (2000)
33. Oliver, J.D., Wear, J.E., Thomas, M.B., Warner, M. and Linder, K. : Production of extracellular enzymes and cytotoxicity by *Vibrio vulnificus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **5**, 99-111 (1986)
34. Desmond, E.P., Janda, J.M., Adams, F.I. and Bottone, E.J. : Comparative studies and laboratory diagnosis of *Vibrio vulnificus*, an invasive *Vibrio* sp. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 122-127 (1984)

(2001년 1월 19일 접수)