

집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*) cDNA expression library로 부터 분리한 group III 알레르기 유전자 정보 분석

김봉진¹, 김선미¹, 유태현², 옥미선¹

고신대학교 의과대학 기생충학교실¹, 이비인후과학교실²

Cloning and sequence analysis of a cDNA from *Dermatophagoides farinae* homologous to group III allergen (trypsin-like protease)

Bong Jin Kim¹, Sun Mi Kim¹, Tai Hyun Yu², Mee Sun Ock¹

Department of Parasitology¹, Otolaryngology², Kosin University College of Medicine, Busan, Korea.

Abstract

Background The house dust mite is one of the most important etiologic risk factors for IgE-mediated allergic respiratory illness throughout the world. Respiratory allergic patients of 50-80% show positive response to house dust mite allergens in Korea. Among many species of mites, *Dermatophagoides farinae* were recorded one of the predominant species in Korea. **Methods** cDNA library was constructed from *D. farinae* mRNA and screened by the perennial rhinitis patients's sera to clone and characterize *D. farinae* allergens in order to better define their role in allergic disease. **Results** A partial cDNA (Df0) was isolated, subcloned, and sequenced. Sequence analysis showed that clone Df0 encodes partial serine protease preproenzyme from *D. farinae*. The selected cDNA clone Df0 codes for 802bps and 240 deduced amino acid sequences. BLAST analysis of the deduced amino acid sequence showed high homology (46-24%) between clone Df0 and serine proteases (group 3 allergens) from domestic dust mites. Both the histidine active site (VTAAHC) and the serine active site (DSCQGDSGGPLV) of serine proteases were highly conserved. **Conclusion** Further study on this gene including full-length sequence and recombinant protein will help determining the role of proteolytic enzymes in the pathophysiology of allergic asthma.

Key words : house dust mite, cDNA library, Immunoscreening, serine protease, group III allergen

서 론

집먼지 진드기는 우리나라뿐만 아니라 세계적으로 중요한 흡입성 알레르겐으로 잘 알려져 있으며¹⁾, 우리나라

라 성인 및 어린이 통년성 알레르기성 비염 환자 및 알레르기 관련 질환자의 80% 이상에서 MAST, RAST 및 피부반응검사에서 집먼지 진드기 항원에 대한 양성반응을 보이고 있다²⁾.

집먼지 진드기는 세계적으로는 149종이 기록되어 있으며, 우리나라에서는 *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus* 및 *Tyrophagus putrescentiae* 3종이 우점종으로 알려져 있다³⁾.

이번 실험에서는 우리나라 집먼지 진드기 알레르기

교신저자 : 옥 미 선
주소: 602-703, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학 기생충학교실
TEL. 051-990-6424
E-mail: msock@ns.kosinmed.or.kr

집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*) cDNA expression library로 부터 분리한 group III 알레르기 유전자 정보 분석

환자의 정확한 진단과 면역학적 치료의 기본 자료로 이용하고자 *D. farinae*의 cDNA library를 만들어 이를 집먼지 진드기 양성 알레르기 환자의 혈청과 반응시켜 cDNA clone Df0를 얻었다. Df0 cDNA는 trypsin-like serine protease와 높은 상동성을 보여, 이 clone의 유전정보를 분석하고, trypsin-like serine protease 계열로 알려진 집먼지 진드기 group III allergen과 비교하였다.

연구대상 및 방법

House dust mite 의 사육 및 분리

집먼지 진드기(*D. farinae*)를 연세대학교 기생충학교실로부터 분양받아 27°C incubator에서 배양하여 배지로 부터 진드기를 순수 분리하였다.⁴⁾

통년성 알레르기성 비염 환자의 혈청으로 immunoscreening

통년성 알레르기성 비염으로 고신대학 부속 복음병원 이비인후과에 내원한 환자 중 집먼지 진드기 항원에 대한 multiple allergosorbent test (MAST) 및 피부단자시험에서 3+ 이나 4+이상으로 판명된 환자 20명의 혈청을 모아서 immunoscreening의 1차 항체로 사용하였다.

cDNA library 구축 및 Immunoscreening

Uni-ZAPTM XR expression vector (Stratagene, USA)를 이용하여 *D. farine*의 cDNA library를 만들었다⁵⁾. 간단히 기술하면 *D. farinae* 5g에서 total RNA를 분리한 후 Stratagene Poly(A) Quick mRNA Isolation Kit (USA)를 사용하여 mRNA를 분리하였다. MMLV-reverse transcriptase 50unit를 사용하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 후 RNase H와 DNA polymerase를 사용하여 second-strand를 합성하였다. cDNA termini를 blunting 한 후 *EcoR* I adaptor ligation 및 *EcoR* I phosphorylation을 시행하였다. Sepharose CL-2B gel filtration을 이용하여 400bp 이하의 insert들을 제거하고 정제된 cDNA insert를 Uni-ZAPTM XR vector arms에 ligation한 다음 in vitro packaging extracts (Stratagene, USA)에 배양하였다.

염기서열 분석

알레르기 환자의 혈청을 일차 항체로 (희석비율 1:2 - 1:10), alkaline phosphatase-labeled goat anti-human IgE (1:500)을 2차 항체로 하여 양성반응을 보이는 plaque을 얻은 다음 2-3차 까지 재차 screening하여 positive plaque을 얻었다. positive plaque의 phage들을 phagemid상태로 전환한 다음 LB-ampicillin plate에서 colony를 확인하고 insert 크기를 확인하기 위하여 *Xho* I 및 *EcoR* I으로 처리한 후 1% agarose gel에 4V/cm으로 전기영동하였다. Double-stranded cDNA를 분리한 다음 염기서열 분석을 시행하였다 (Macrogen, DNA sequencing service, Seoul, Korea)

BLAST search

확인된 cDNA의 염기 및 단백질 서열의 상동성 (homology) 은 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) search에서 확인하였으며 이미 알려진 여러 trypsin-like protease와의 multiple alignment는 Clustal W program (version 1.82)으로 작성하였다. 또 conserved domain을 확인하기 위해서는 National Center for Biotechnology Information의 Conserved Domain Database (CDD)를 조회하였다.

결 과

cDNA library 구축 및 Immunoscreening

집먼지 진드기 cDNA library를 agarose gel에서 확인한 결과 2kbp - 0.2kbp까지 다양한 분포를 보이고 있었다. 또 집먼지진드기 알레르기 환자의 혈청을 1차 항체로 사용하여 cDNA library를 immunoscreening하여 얻은 positive plaque의 insert 크기는 4kbp - 1kbp내에 위치하고 있었다.

Df0 clone의 gene sequencing 및 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) seach

Mass *in vivo* excision으로 phagemid를 phage에서 분리한 다음 총 8개의 clone을 sequencing하여 BLAST search를 한 결과 Df0 clone이 초파리 (*Drosophila melanogaster*)를 비롯한 여러 종의 곤충류 trypsin precursor들과 높은 상동성을 보였으며 나머지 7종의

clone중 3 clone은 여러 유전자와 낮은 상동성을 보였으며 4 clone의 유전자는 아직 밝혀지지 않은 유전자였다.

Df0 clone은 802bp로 구성되어 있었으며(Fig. 1), sequencing한 염기서열을 기초로 아미노산 서열을 추정 한 결과 240 개의 아미노산으로 구성된 유전자로 3' 쪽의 TAA 종결코돈과 AATAAA의 poly(A) signal 은 확인 할 수 있었으나 5' 쪽의 개시코돈이 없는 partial gene 이었다. BLAST search에서 이 유전자는 말라리아 매개 모기(*Anopheles gambiae*) trypsin 1 (GenBank Accession number: P35035), 2 (P35036), 3 (P35037), 4 (P35038), 7 (P35041) precursor 및 배추흰나비 (*Bombyx mori*) 의 Vitellin-degrading protease precursor (Q07943), 초파리의 trypsin alpha (P54624), beta (P35004), delta (P42276) precursor와 49-38%의 상동성을 보였다. Df0 clone에서 추론된 단백질 서열은 histidine active site (VTAAHC) 와 serine active site (DSCQGDSGGPLV)가 잘 보존되어있었 으며 serine protease의 catalytic triad의 일부인 H (histidine) 및 substrate binding sites 인 D (aspartic acid), S (serine), G (glycine)도 확인 할 수 있었다 (Fig. 1).

1 togaacttaataagacotacatagggaaacaaaagctggagotcccacggctgggagggagot
1 X L I R L T I G N K S W S S T A V A A A
63 ctagaactagtggatccccgggctgcaggaaattoggacagagatggagagttcatgtgt
21 L E L V D P P G C R N S A R D G S L M C
123 ggtgtgtcccatcatcagcaacgactgggttgtgacagcagatcaatgtgttgaacggagtg
41 G A P I I S N D W V V T A A (H) C V D G V
183 totgcagatgaagacatattccgtgtgtggagcagcagcagagggcagcgggtgggtcagta
61 S A D E A S F R A G S S S R G S G G S V
243 catcaagcctccaaactgagtgccaaacccacagtaagaatactggacattgaatttgaac
81 H Q A S Q L S A N P Q Y D Y W T I D F (D)
303 attgtgttgtgcagggtatctacacccctcagttttggagcggagtgccagggcatctot
101 I A V A R V S T P F S F G A G V Q A I S
363 ctcaacccacagcgaacccagtgctggagagtagctacagtcagcgggttatggtaacact
121 L T T S E P S A G E V A T V S G Y G T T
423 tottttggaggatctcttcccaatcaacttcaggtcgtccagtaacccatttgttgataga
141 S S G G S L P N Q L Q V V Q V P I V D R
483 caaacagtgtaaagagattaagtgaattatgaaggacatcagtcgaacatgatctggcgc
161 Q Q C N E A Y A D Y D G I T A N M I C A
543gtgtttccagcagggaagggaagctcttgcacagggaacotctggcgggtcctcttgttgtt
181 A V P E G G K (D) S C Q G D (S) G G P L V V
603 ggtggaaaactggtgtgaactcgtctcatggggagttgggtgtgtgtttctcctgtgtatcct
201 G G K L A G I V (S) W (G) V G C G S P Q Y P
663 ggaagtgtatccacgttgtccacccctgggggaattcgttgtttctgaacctggagtgaa
221 G V Y S N V A T L R D F V V S E T G V N
723 taatttttgtatattttacatttttcaaaataaaaaatacaaatataaatttaa
241 - I F V Y I L H F Q N K K - T K Y N F K
783 aaaaaaaaaaaaaaact

Fig. 1. Nucleotide sequence of the *Dermatophagoides farinae* trypsin cDNA. The deduced amino acid sequence of the protein is shown in single letter code below the nucleotide sequence. The Df0 gene was consisted of 802 bp and 240 amino acids. Stop codon (TAA) and polyadenylation signal (AATAAA) are underlined. Underlined protein sequences mean the histidine active site (VTA¹AHC) and serine active site (DSCQGD¹SGGPLV). Red and circled amino acids and green, boxed amino acids represent catalytic triad for serine protease and substrate binding sites, respectively.

또 이 clone의 conserved domain은 Tryp-SPc (trypsin-like serine protease)를 가진 motif로 확인되었다 (Fig. 2).

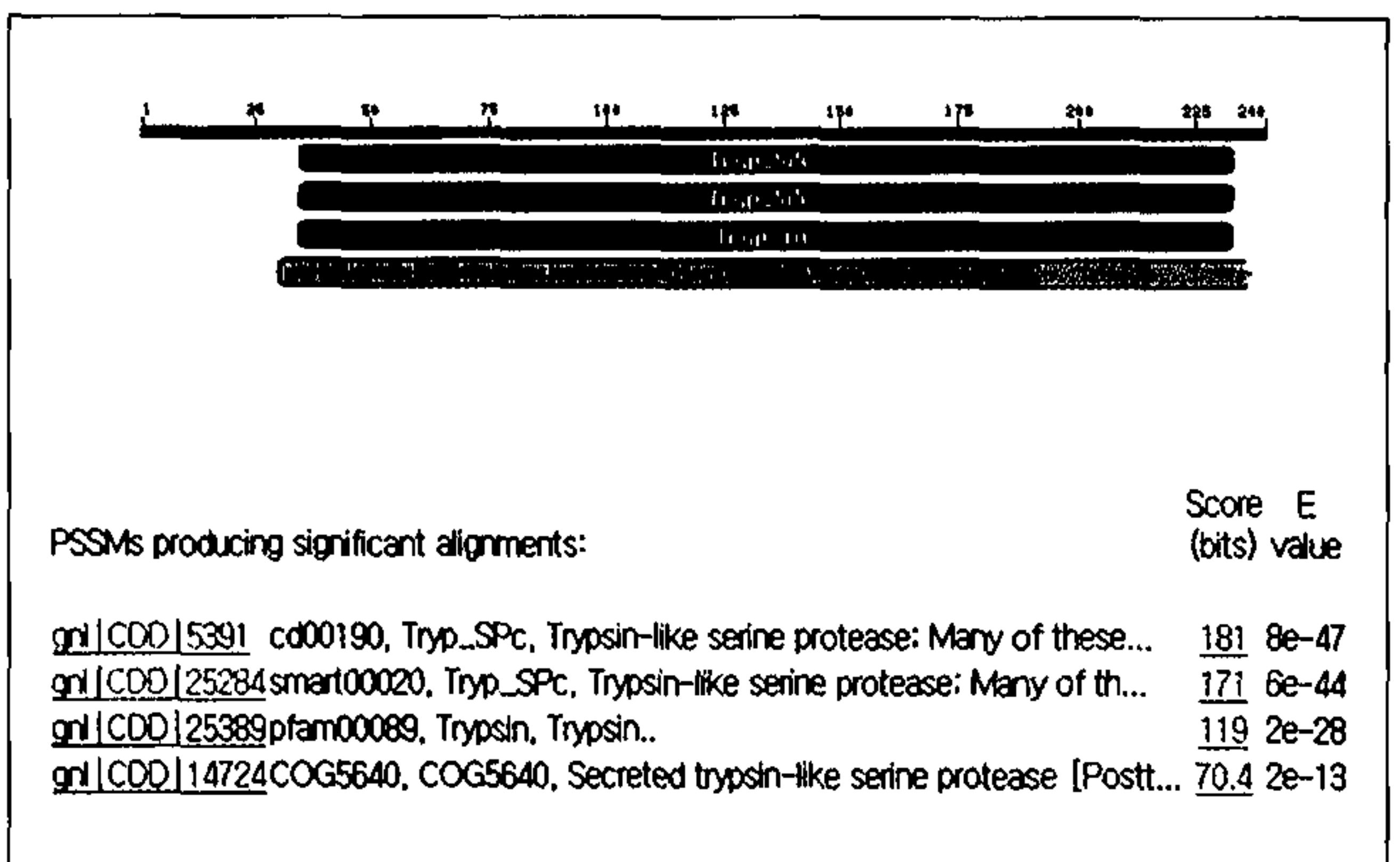


Fig. 2. The conserved domain of Df0 gene. This gene has conserved domain of Tryp-SPc (Trypsin-like serine protease). black bar means Df0 gene, cyan represents low complexity; red and gray color mean trypsin-like serine protease domain.

Df0)의 sequence를 Allermatch server(<http://allermatch.org/>)에서 비교한 결과, 사람을 비롯한 많은 종의 serine계 단백질분해효소 계열의 allergen과 높은 상동성을 보였으며 (46-24%), 그 중 집먼지 진드기의 일종인 *Blomia tropicalis* serine protease 계열의 allergen 과 46%의 가장 높은 상동성을 보였다 (Fig. 3). 그러나 Clustal W로 작성한 계통도에서는 집먼지 진드기 group VI allergen 의 일종인 Der f6 와 가장 밀접한 근연관계를 나타내었다 (fig. 4)

집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*) cDNA expression library로 부터 분리한 group III 알레르기 유전자 정보 분석

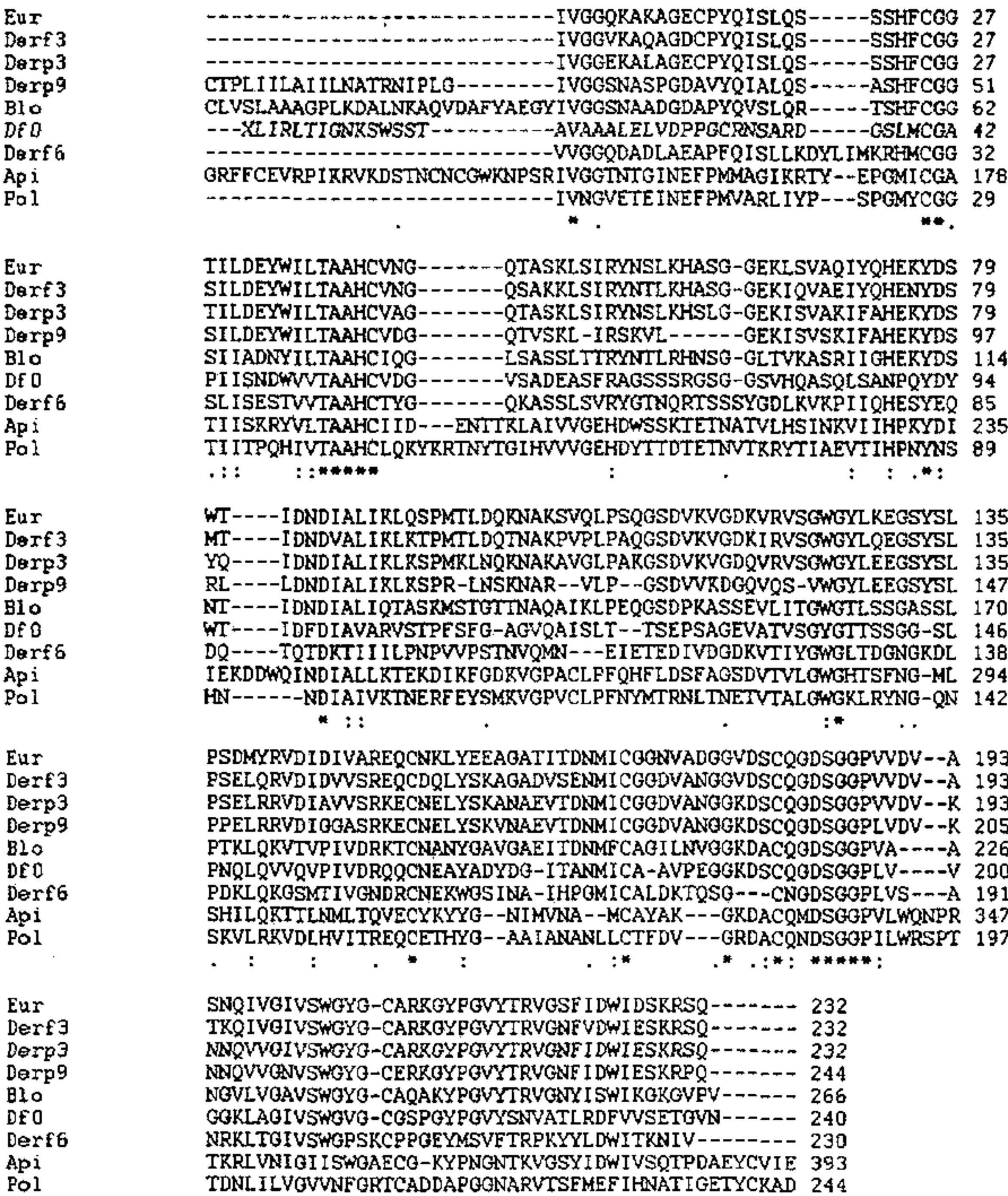


Fig. 3. Multiple alignment of *Dermatophagoides farinae* Df0 deduced amino acid sequence with different kinds of trypsin-like serine proteases. Df0 gene showed 49% - 38% sequence identity with others. The alignment was performed with Clustal W programme (version 1.82). Highly and relatively conserved amino acid sequences are indicated by asterisks and dots, respectively. Eur (*Euroglyphus maynei*, GenBank Accession number O97370), Derf3 (*Dermatophagoides farinae* 3, P49275), Derp3 (*D. pteronyssinus*, P39675) Derp9 (*D. pteronyssinus* 9, AAN02510), Blo (*Blomia tropicalis* Q8I916), Derf6 (*D. farinae* 6, P49276), Api (*Apis mellifera* 7, AAN02286), Pol (*Polistes dominulus* 4, AAP37412).

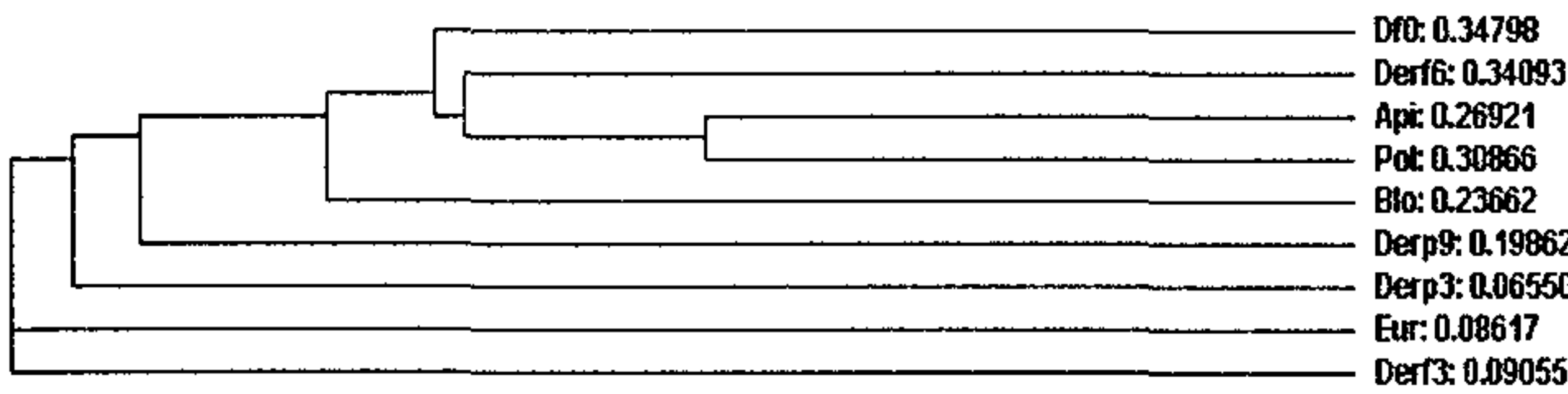


Fig. 4. Phylogenetic relationships of *D. farinae* Df0 with different kinds of trypsin-like serine protease: *D. farinae* trypsin gene showed the closest relationship with Der f6 (*Dermatophagoides farinae* group VI allergen). The phylogenetic tree was constructed using the Clustal W programme.

고찰

우리나라 알레르기 환자의 50 - 70%를 차지하는 것으로 알려진 집먼지 진드기 알레르겐에 대한 유전정보를 알아보기 위하여 집먼지 진드기 (*D. farinae*) 로 cDNA library를 만들어 알레르기 환자의 혈청과 반응하는 clone Df0를 얻었다. Df0 clone의 cDNA를 sequencing하여 BLAST search한 결과 말라리아 매개모기 (*Anopheles gambiae*), 초파리를 비롯한 여러 종의 trypsin precursor와 49-38%의 높은 상동성을 보이는 serine계 단백분해효소의 일종인 것으로 밝혀졌다. trypsin은 무척추동물 및 척추동물 모두에서 흔히 발견되는 소화효소로써, 집먼지 진드기의 분변에 다량 포함되어 있으며, 강력한 알레르겐으로 작용하는 것으로 잘 알려져 있다^{6),7)}.

집먼지진드기 알레르겐은 cysteine계 단백분해효소인 group I allergen (Der P I, Der f I), serine계 단백분해효소인 group III allergen (Der P III, Der f III) 및 group II allergen이 IgE-binding 빈도가 80-100%에 달하는 major allergen으로 분류되고 있다⁸⁾. 그러나 이 이외에도 amylase (group IV), chymotrypsins 및 elastase-like enzyme 인 group VI 도 밝혀져 있다. 이번 실험에서 밝혀진 Df0의 cDNA sequence도 집먼지 진드기의 주 알레르겐 group으로 알려진 세 group 가운데 serine계로 알려진 Der III group의 알레르겐으로 분류되는 *Blomia tropicalis* (집먼지 진드기)와 가장 많은 sequence가 일치하는 것으로 나타났다 (46%). 또 Der III group의 Em 3 (*Euroglyphus maynei*)와는 41%, Df 3와 Dp 3 및 group IX의 Dp 9와는 각각 40%의 상동성을 보이고 있다. 그러나 아미노산 서열을 기초로 작성한 계통도에서는 chymotrypsin 계열로 알려진 Der f VI group과 가장 가까운 것으로 나타나 Df0 전체 염기 및 아미노산 서열을 비롯한 부차적인 연구가 필요한 것으로 보인다.

serine계 단백분해효소는 아미노산 서열 및 3차 구조를 달리하는 포유류 serine계 와 박테리아 serine계 두 family로 구분된다. 포유류의 serine계 단백분해효소는 pancreatic trypsin, chymotrypsin등이 있으며, 이들의 active site는 catalytic triad인 Asp 102, His 57, Ser 195로 되어있다.⁹⁾ Df0 clone의 amino acid sequence는 알려진 active site 및 substrate binding site가 잘 보존되어 있었다.

trypsin의 정상적인 작용은 3차 구조에 의해 이루어지므로 아미노산 서열은 상당한 변화를 보일수도 있는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾ Smith 등¹¹⁾은 *D. pteronyssinus*의 cDNA를 screening하여 아미노산 서열 몇 개만이 다른 clone들을 분리 동정하여 isoform일 것으로 추정하였다¹²⁾. 본 실험의 Df0 clone도 상동성 비교결과로는 Der III group의 isoform일 가능성이 높다. 그러나 이러한 isoform의 human IgE나 IgG에 대한 흡착능력은 매우 다양한 것으로 보고되어 있다.^{13),14)}

진드기 체내에서 enzyme의 분포는 효소의 특성에 따라 달라지며 진드기의 사육방법에 의해서도 차이가 나는 것으로 알려져 있다.^{15),16)} serine 계열의 allergen은 진드기의 분변 추출물에서 주로 검출되나 trypsin이나 elastase-like enzyme은 충체 추출물에서 주로 검출되는 것으로 보고되고 있다.¹⁷⁾ 이러한 차이는 배양조건에 따른 것으로 일부 설명할 수 있을 것으로 보여 진다. 또, 집먼지 진드기의 지리적 분포의 차이로 인한 major allergen의 isoform들도 알레르기 환자의 면역세포 인지 능력에 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 그러므로 우리나라 알레르기 환자의 혈청과 반응하는 진드기 알레르겐 유전자에 대한 정보 분석이 필요할 것으로 보여 진다.

본 실험에서 밝혀진 Df0 clone의 cDNA는 partial segment로써 5' 쪽의 개시코돈 및 modification을 확인할 수 없어 Dp0의 full-length sequence를 찾기 위한 실험이 앞으로 수행되어야 할 것이다. 이 clone의 재조합 단백질 산물에 의한 과민반응유발 여부는 알레르겐 단백질의 구조에 대한 이해 뿐 만 아니라 진단 및 치료제로 활용할 수 있는 기본 자료가 될 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

우리나라에 서식하고 있는 집먼지 진드기의 알레르겐으로 작용하는 유전자의 정보를 알아보기 위하여 *Dermatophagoides farinae* cDNA를 집먼지진드기 알레르기 환자의 혈청과 반응시켜 clone Df0를 얻었다. Df0 clone의 cDNA는 BLAST search에서 serine계 단백질효소로 동정되었다. 이 유전자의 총길이는 802bp였고, deduced한 아미노산은 240개였으며 3'의 종결코돈

(TAA)과 poly(A) signal (AATAAA)은 확인할 수 있었으나 5'의 개시코돈 및 modification은 찾아 볼 수 없었다. 그러나 trypsin-like serine protease의 histidine active site 및 serine active site는 잘 보존되어 있었다.

참고문헌

1. Platts-Mills TAE, de Weck AL: chairman Report of an international workshop: Dust mite allergens and asthma-A world problem. J Allergy Clin Immunol 83: 416-427, 1989
2. Min YK, Choi BY, Kwon SK, Lee SS, Jung YH, Kim JW, Oh SJ: Multicenter study on the prevalence of perennial allergic rhinitis and allergy-associated disorders. J Korean Med Sci 16: 697-701, 2001
3. Ree H, Jeon SH, Lee IY, Hong CS and Lee DK: Fauna and geographical distribution of house dust mite in Korea. Korean J Parasitol 35: 9-17, 1997
4. Ree HI, Lee IY, Kim TE, Jeon SH, Hong CS: Mass culture of house dust mites, *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). Med Entomol Zool 48(2): 109-116, 1997
5. Ock MS, Kim BJ, Kim SM, Byun KH: Cloning and expression of trypsin-encoding cDNA from *Blattella germanica* and its possibility as an allergen. Korean J Parasitol 43: 101-110, 2005
6. Lind P: Purification and partial characterization of two major allergens from the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. J Allergy Clin Immunol 76: 753-761, 1985
7. Yasueda H, Mita H, Yiu Y, Shida T: Isolation and characterization of two allergens from *Dermatophagoides farinae*. Int Arch Allergy Appl Immunol 81: 214-223, 1986
8. Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM: Characterization and Immunology of house dust mite allergens. Int Arch Allergy Immunol 129: 1-18, 2002
9. Perona JJ, Craik CS: Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold. J Biol Chem 272: 29987-29990, 1997
10. Huang R, Hellman L: Genes for mast-cell serine protease and their molecular evolution. Immunogenetics 40: 397-414, 1994
11. Smith WA, Chua KY, Kuo MC, Rogers BL and Thomas WR: Cloning and sequencing of the *Dermatophagoides pteronyssinus* group III allergen, Der pIII. Clinical and Experimental Allergy 24: 220-228, 1994
12. Smith WA, Thomas WR: Sequence polymorphisms of the Der p3 house dust mite allergen. Clin Exp Allergy 26: 571-579, 1996
13. Nishiyama CH, Yuuki TO, Usui YU, Iwamoto NA: Effects of amino acid variations in recombinant Der f II on its human IgE and mouse IgG recognition. Int Arch Allergy Immunol 105: 62-69, 1994
14. Scheiner O, Bohle B, Breitenbach M. et al.: RAs: Production

집먼지 진드기(*Dermatophagoides farinae*) cDNA expression library로 부터 분리한 group III 알레르기 유전자 정보 분석

and possible clinical implications. In: Goddard P, Bousquet J, Michel FB, editors. Advances in allergology and clinical immunology. Canforth, Park Ridge, United Kingdom: The Parthenon Publishing Group 115, 1992

15. Stewart GA, lake FR, Thompson PJ: Faecally derived hydolytic enzymes from *Dermatophagoides pteronyssinus* - physicochemical characterization of potential allergens. Int Arch Allergy Appl Immunol 95: 248-256, 1991
16. Thompson SJ, Carswell F: The major allergen of the house dust mite, *Dermatophagoides*, is synthesized and secreted into its alimentary canal. Int Arch Allergy Appl Immunol 85: 312-315, 1988
17. Tovey ER, Chapman MD, Platts-Mills TAE: Mite faeces are a major source of house dust mite allergens. Nature 289: 592-593, 1981