

고래회충 유충의 총체 및 분비 배설 단백질의 가수분해효소 활성 분석

옥미선

고신대학교 의과대학 기생충학교실·의과학연구소

Hydrolases Activity of Excretory-Secretory Proteins and Crude Extract from *Anisakis simplex* Larval Stages

Mee-sun Ock

Department of Parasitology, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background and Objectives : *Anisakis simplex* L3 (third-stage larva) is the most prevalent species causing anisakidosis which is associated with consumption of raw or insufficiently processed fish or cephalopods. Adult worm of *A. simplex* inhabits in the stomach of cetaceans and pinnipeds such as whales, porpoises, and seals. Eggs, passed in the feces of the adult worm in marine mammals, hatch to liberate larvae, which then can be ingested by marine crustaceans. The third-stage larvae in the crustaceans are eaten by various species of fish or cephalopods of paratenic or transport hosts. Anisakidosis can cause not only direct tissue damage but also severe allergic response caused by larvae as well as by excretory-secretory (ES) products. The objectives of this study was to check the pattern of hydrolase activity from extracts of L3, L4 stages and ES products of *A. simplex* larvae.

Materials and Methods : *A. simplex* L3 were collected from mackerels (*Scomber japonicus*). The third and fourth-stage larval extracts were obtained by homogenising and centrifugation. After *A. simplex* L3 were kept in PBS for 9 consecutive days, the supernatant was used as the excretory-secretory products. To identify the hydrolase activity in larval extract and ES products, SDS-PAGE and API ZYM method were carried out.

Results : Six common positive enzymes were detected in L3, L4 and ES products belonging to four general groups as follows: (1) phosphatase group: alkaline phosphatase, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; (2) esterase group: esterase lipase (C8); (3) protease group: leucine arylamidase; and (4) glucosidase group: α -glucosidase. ES products was relatively rich in trypsin and α -chymotrypsin, apart from the common positive hydrolases.

Conclusions : *A. simplex* L3, L4 extract and ES products contain several kinds of hydrolases of phosphatase, esterase, protease and glucosidase group, which appear to be important in larval development and host-parasite interaction.

Key words : *Anisakis simplex*, Third and Fourth-stage larva, Excretory-secretory products, Hydrolases,

서 론

고래회충(*Anisakis simplex* Rudolphi, 1809)은 종숙주인 고래, 돌고래, 바다표범, 물개 등의 바다 포유류 소화관에 기생한다. 종숙주의 분변으로 배출된 충란은 충란내에서 자충(embryo)으로 부화되고 성장하여 제2기 유충으로 자란다. 이를 제1중간숙주인 바다 갑각류들이 섭취하면

탈피와 성장을 거쳐 제3기 유충으로 발육한다. 제3기 유충은 먹이사슬을 따라 이동할 때 더 이상 발육하지 않으므로 바다 갑각류를 먹이로 섭취하는 해산어류나 두족류들은 운반숙주 또는 연장숙주(paratenic host)로 작용한다.

식용으로 사용되는 대부분의 해산어류 및 두족류들이 고래회충 제3기 유충에 감염되어 있으며 우리나라를 비롯하여 일본 등 생선회를 즐겨먹는 나라에서는 매년 많은 환자가 보고되고 있다.¹⁻⁴⁾ 고래회충유충증은 감염된 해산어류나 두족류를 섭취한 수 시간 후 급성 복통, 구토, 오심등의 증상을 보이며 만성으로 진행된 경우에는 조직에 침입한 유충을 중심으로 농양이나 호산구성 육아종을

교신저자 : 옥 미 선
주소 : 602-702 부산광역시 서구 압남동 34번지
고신대학교 의과대학 기생충학교실
TEL : 051-990-6424, FAX : 051-990-3081
E-mail : mssock@ns.kosinmed.or.kr

형성하며 충수염, 십이지장 궤양, 염증성 위장질환으로 발전하기도 한다. 최근에는 고래회충유충의 분비배설물이나 충체 부산물이 알레르기 반응을 유발한다는 것이 밝혀짐에 따라 식품 알레르기의 한 원인으로 주목받고 있다.⁵⁾ 이러한 고래회충유충 알레르기는 열에 안정한 분자량이 작은 물질들이 항원으로 작용하여 두드러기, 혈관 부종 등을 비롯하여 아나필락시스를 유발하며, 유전적 소인을 가진 환자에서 두드러지는 것으로 보고되고 있다.⁶⁻⁷⁾

고래회충 유충에 의한 알레르기 반응의 원인 물질로 추정되는 분비 배설 단백질과 충체 단백질을 시기별로 구분하고 기생충과 숙주의 상호관계에 중요한 여러 가지 역할을 담당하는 가수분해효소의 종류 및 활성 정도를 확인해 보고자 하였다.

대상 및 방법

A. *Simplex* L3 수집 및 확인

부산공동어시장에서 구입한 고등어 (*Scomber japonicus*)의 장, 간, 장간막, 체강 등에서 확보한 *A. Simplex* L3를 증류수로 수차례로 씻어낸 후 4°C, 증류수에서 하룻밤 둔 후 실험에 사용하였다. *A. simplex* L3 유충의 확인은 구기의 boring tooth와 세부분으로 된 구순(lips), 꼬리쪽의 mucron 및 게실 (ventriculus)의 형태등을 근거로 하였다 (Fig. 1).

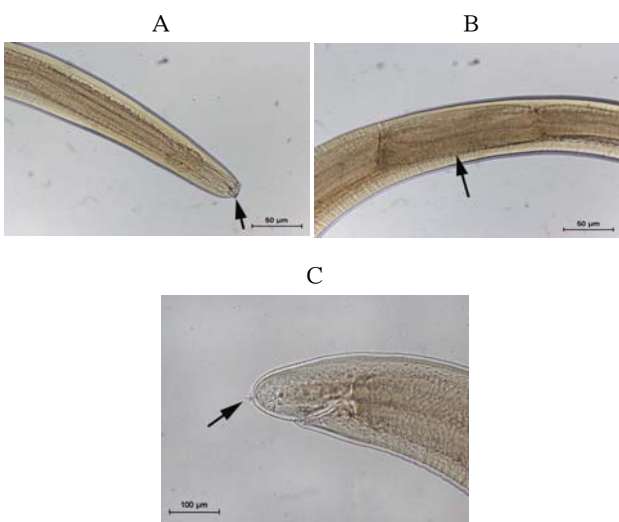


Fig. 1. Identification of *Anisakis simplex* third-stage larva. A, B and C show the boring tooth and lips of anterior portion, ventriculus, and mucron of posterior part, respectively.

A. *Simplex* L3 배양 및 분비배설단백질 준비

고래회충 제3기 유충을 4°C, 증류수에서 하룻밤 둔 후 마리당 0.2ml의 PBS (phosphate-buffered saline, pH 2.0, 1% glucose, gentamycin 150µg/ml, vancomycin 10µg/ml)를 넣어 37°C, 5% CO₂ incubator에서 9일간 배양하였다. 배양 상층액은 Amicon (Millipore Corporation, Bedford, USA)으로 농축하고 PBS로 24시간 투석한 후(DispoDialyzer, Spectrum Laboratories, USA) syringe filter (0.20µm Corning, USA)를 통과시켜 분비배설단백질로 사용하였다.

A. *Simplex* L3 및 L4 충체 단백질 분리

A. Simplex L3를 배양(9일)하는 동안 mucron과 boring tooth가 완전히 소실되어 L4로 성장한 유충 및 L3 유충에서 Protein Extraction kit (Intron Biotechnology, USA)를 이용하여 충체 단백질을 분리하였다. 분비배설단백질과 충체 단백질의 정량은 Bradford법으로 시행하였다.

SDS-PAGE 전기영동

분비배설항원 및 L3, L4 stage의 충체 단백질을 10% gel에서 전기영동한 후 0.1% Coomassie Brilliant blue로 염색하였다.

API ZYM test

A. Simplex L3와 L4 및 분비 배설 단백질 가운데 가수분해효소들의 활성을 확인하기 위하여 API ZYM kit (Bio Merieux SA, Lyon, France)를 사용하였다. 각 샘플의 농도를 0.5µg/µl로 희석하여 cupule당 65µl씩 샘플을 분주한 다음 37°C에서 4시간 동안 배양한 후 활성 정도를 제조사의 방법에 따라 판독하였다.

결 과

SDS-PAGE

분비 배설 단백질 및 제3, 4기 유충 충체 발현 단백질들은 (Fig. 2) 6KDa - 200KDa에 걸쳐 다양하게 분포하고 있었으며 특히 분비 배설 단백질에서는 40KDa 이하의 낮은 농도에서 많은 밴드를 확인할 수 있었다. 제3, 4기 충체 단백질의 분포는 거의 유사한 양상을 보였으나 10KDa 정도의 단백질은 L4에서만 발현되었다.

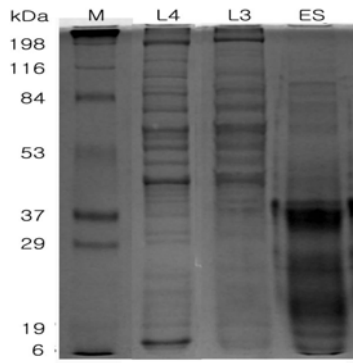


Fig. 2. SDS-PAGE protein pattern of the *Anisakis simplex* third-stage (L3), fourth-stage (L4) extract and excretory-secretory products (ES).

API ZYM test

분비 배설 단백질 및 제3, 4기 충체 단백질의 API ZYM test 결과는 Table 1과 같았다. 제3기, 4기 충체 및 분비배설단백질에서 공통적으로 확인된 효소는 alkaline phosphatase, esterase lipase(C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -glucosidase의 6종이었다.

제3기 유충의 충체 단백질에서는 공통적으로 나타난 효소와 더불어 esterase와 β -glucosidase 활성을 확인할 수 있었으나 활성 정도는 높지 않은 것으로 나타났다

(medium and low). 제3기 유충에서는 alkaline phosphatase, leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 반응이 강하게 나타났다 (high).

제4기 유충의 충체 단백질은 esterase와 valine arylamidase의 활성이 추가로 확인되었으며 활성은 낮거나 중간정도였다 (low and medium). 활성이 높은 효소는 leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase로 나타났다 (high).

분비 배설 단백질의 효소 활성은 공통적으로 볼 수 있었던 6종류의 효소 외에 valine arylamidase, cysteine arylamidase, trypsin, α -chymotrypsin의 4종의 가수분해효소가 확인되었으며 이들의 활성 정도도 중간 정도이거나 낮았다 (medium and low). 활성을 나타낸 효소 가운데 leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 활성이 높았다(high).

고 찰

본 실험에서 L3, L4 및 분비배설단백질에서 공통으로 확인된 alkaline phosphatase, esterase lipase(C8), leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -glucosidase의 6종의 가수분해효소들은 많은

Table 1. Activity of hydrolyze from excretory-secretory and third, and forth stage larvae of *Anisakis simplex*.

No.	Enzyme Assayed For	Classification	Substrate	pH	Hydrolyze activity		
					ES	L3	L4
1	Alkaline phosphatase	3.1.3.1	2-naphthyl phosphate	8.5	L*	H*	M*
2	Esterase(C4)	3.1.1.6	2-naphthyl butyrate	6.5	-	M	L
3	Esterase Lipase(C8)	3.1.1.3	2-naphthyl caprylate	7.5	M	M	M
4	Lipase(C14)	3.1.1.3	2-naphthyl myristate	7.5	-	-	-
5	Leucine arylamidase	3.4.11.14	L-leucyl-2-naphthylamide	7.5	H	H	H
6	Valine arylamidase	3.4.11.14	L-valyl-2-naphthylamide	7.5	M	-	M
7	Cystine arylamidase	3.4.11.14	L-cystyl-2-naphthylamide	7.5	L	-	-
8	Trypsin	3.4.4.4	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	8.5	M	-	-
9	α -chymotrypsin	3.4.4.5	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	7.5	L	-	-
10	Acid phosphatase	3.1.3.2	2-naphthyl phosphate	5.4	H	H	H
11	Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	3.1.3.31	Naphthol-AS-BI-phosphate	5.4	H	H	H
12	α -galactosidase	3.2.1.22	6-Br-2-naphthyl- α D-galactopyranoside	5.4	-	-	-
13	β -galactosidase	3.2.1.23	2-naphthyl- β D-galactopyranoside	5.4	-	-	-
14	β -glucuronidase	3.2.1.31	Naphthol-AS-BI- β D-glucuronide	5.4	-	-	-
15	α -glucosidase	3.2.1.20	2-naphthyl- α D-glucopyranoside	5.4	M	L	M
16	β -glucosidase	3.2.1.21	6-Br-2-naphthyl- β D-glucopyranoside	5.4	-	-	-
17	N-acetyl- β -glucosaminidase	3.2.1.50	1-naphthyl-N-acetyl- β D-glucosaminide	5.4	-	-	-
18	α -mannosidase	3.2.1.24	6-Br-2-naphthyl- α D-mannopyranoside	5.4	-	-	-
19	α -fucosidase	3.2.1.51	2-naphthyl- α L-fucopyranoside	5.4	-	-	-

*H: High-level activity, M: Medium-level activity, L: Low-level activity, -: Negative

종의 기생충 충체나 충체 분비 배설물 또는 침샘에서 흔히 발견되는 가수분해효소들로 숙주 조직의 용해를 촉진하고 숙주내로의 침입을 용이하게 하여 기생충의 생존, 발육 및 숙주-기생충 상호관계에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.⁸⁻¹²⁾

분비배설단백질을 비롯하여 제3기, 4기 유충 시기에 분비 정도가 높은 가수분해효소는 alkaline phosphatase, acid phosphatase(AP), naphthol-AS-phosphohydrolase 및 leucine arylamidase였다. Phosphatase는 대사과정을 조절하는 중요한 효소로써, AP는 위장관내 기생선충류에서 많은 양이 분비되며 lysosome marker로써 소화 진행 정도에 대한 정보를 제공한다.¹³⁾ 조충류(Cestode)에서도 체질의 성숙도와 AP 분비 정도는 정확히 일치하고 있다.¹⁴⁾ AP는 개심장사상충(*Dirofilaria immitis*), 광동주혈선충(*Angiostrongylus cantoniensis*) 및 돼지회충(*Ascaris suum*)의 큐티클층이나 소화기내에서 높은 활성을 보이는 것으로도 알려져 있다.¹⁵⁻¹⁶⁾ 또 항연충제 첨가시 배양액내에서 AP의 농도가 유의하게 감소함으로써 배양액내 AP 활성 정도로 기생충의 생존력을 추정하여 선충류 구충제로써의 가능성도 논의되고 있다.¹³⁾

단백질 가수분해효소중에는 세린계 단백분해효소인 트립신, α -키모트립신과 aminopeptidase 계열의 cysteine arylamidase의 활성을 분비배설단백질에서 확인할 수 있었다. 트립신이나 키모트립신의 활성은 유충의 소화작용과 연관이 있는 것으로 추정되며 소화관내에서 작용 후 분비되어 분비배설물로 나타나는 것으로 여겨진다. Angulo-Valadez 등은 bot fly (*Oestrus ovis*) 유충 침샘에서 acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, esterase (C4), esterase lipase (C8), leucine arylamidase, α -glucosidase 및 N-acetyl- β -glucosaminidase 등의 활성을 확인하고 이들 가운데 세린계 단백분해효소계열이 감염된 숙주와 강력한 항원-항체반응을 보여 숙주의 면역반응에 관여하는 것으로 추정하였다.¹⁷⁾ 본 실험에서도 단백질분해효소 계열의 leucine arylamidase가 강한 활성을 나타내어 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Esterase는 일반적으로 2-4개의 탄소사슬로 구성된 지방산의 ester 기를 분해하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 선충류의 분비배설항원에 존재하는 acetylcholinesterase는 acetylcholine을 분해하므로써 숙주의 연동운동을 억제하여 장내 기생충의 이동과 정착을 돕는 것으로 보고되고 있다.¹⁸⁾ 본 실험에서는 분비배설 단백질에서는 esterase (C4)는 분비되지 않았으나 esterase

lipase (C8)가 활성을 보였고, 제3, 4기 유충 충체산물에서는 esterase (C4)와 esterase lipase (C8)가 모두 활성을 보여 충체내에서의 일정한 역할이 추정되었다.

Glucosidase는 L4 및 분비배설항원에서 높은 활성을 보여 제4기 유충시기에 고래회충 유충이 성충으로 성장하기 위하여 많은 에너지를 필요로 함으로써 탄수화물 대사에 필요한 glucosidase가 높은 활성을 보인 것으로 여겨진다. L3 시기에는 α -glucosidase 및 β -glucosidase의 활성이 낮아 L4에 비하여 낮은 수준의 에너지가 요구되고 있는 것으로 추정되었다.

고래회충유충중에서 확인된 Ani 4, Ani 5, Ani 8, Ani 9 등의 항원은 열에 안정하며 14 KDa, 15 KDa 및 21 KDa 분자량을 갖는다.¹⁹⁻²¹⁾ 이들 항원들은 대부분 분비배설항원에서 발견되는 것으로 밝혀졌다. 본 실험의 전기영동 결과에서도 40 KDa 미만의 많은 단백질들이 확인되어 항원으로서 역할 가능성을 짐작하게 한다.

이상의 결과들은 고래회충 L3, L4 유충기와 분비배설 물질에서 나타나는 가수분해효소 종류와 활성 정도를 개략적으로 제시하며 SDS-PAGE에서는 6 KDa - 200 KDa에 이르는 많은 종류의 단백질이 분비되고 있음을 나타낸다. 또 분비 배설 단백질에는 충체 산물에 비해 낮은 분자량을 가진 많은 분비단백들이 있음을 확인 할 수 있었다.

결 론

고래회충 L3, L4 유충시기의 충체 및 분비배설단백질에서 발견되는 가수분해효소는 alkaline phosphatase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, leucine arylamidase esterase lipase(C8), α -glucosidase 등이 있었으며, 분비배설단백질에서는 충체 산물에서는 검출되지 않은 trypsin 및 α -chymotrypsin 등의 단백분해효소들의 활성이 확인되었다. SDS-PAGE에서는 6 KDa - 200 KDa에 이르는 많은 종류의 단백질을 보이고 있었으며, 분비 배설 단백질은 충체 산물에 비해 낮은 분자량을 가진 많은 분비 단백질들이 있음을 확인 할 수 있었다. 활성이 확인된 가수분해효소들은 유충의 생존, 발육 및 기생충-숙주 상호관계에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다.

중심단어 : 고래회충 제3, 4기 유충, 분비 배설 단백질, 가수분해효소

참고문헌

- 1) Ikeda K, Kumashiro R, Kifune T : Nine cases of acute gastric anisakiasis. *Gastrointest Endosc* 35: 304-308, 1989
- 2) Kikuchi Y, Ishikura H, Kikuchi K : Intestinal anisakiasis in Japan. *Infected fish, sero-immunology, diagnosis, and prevention*. Springer, Tokyo Berlin Heidelberg, pp 129-143, 1990
- 3) Ishikura H, Kikuchi K, Nagasawa K, Ooiwa T, Takamiya H, Sato N, Sugane K : Anisakidae and anisakidosis. In: Sun T (ed) *Progress in clinical parasitology*, vol III. Springer, Berlin Heidelberg New York, 1992, 43-102
- 4) Kagei N, Isogaki H : A case of abdominal syndrome caused by the presence of a large number of Anisakis larvae. *Int J Parasitol* 22: 251-253, 1992
- 5) Kasuya S, Hamano H, Izumi S : Mackerel induced urticaria and Anisakis. *Lancet* 335: 665, 1990
- 6) Caballero ML, Moneo I : Several allergens from Anisakis simplex are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol Res* 93: 248-251, 2004
- 7) Anibarro B, Seoane FJ, Mugica MV : Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. *J Investig Allergol Clin Immunol* 17: 168-172, 2007
- 8) Kennedy MW, Tierney J, Ye P, McMonagle FA, McIntosh A, McLaughlin D, Smith JW : The secreted and somatic antigens of the third stage larva of Anisakis simplex, and antigenic relationship with Ascaris suum, Ascaris lumbricoides, and Toxocara canis. *Mol Biochem Parasitol*, 31: 35-46, 1988
- 9) Sakanari JA, McKerrow JH : Identification of the secreted neutral proteases from Anisakis simplex. *J Parasitol* 76: 625-630, 1990
- 10) Morris SR, Sakanari JA : Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode Anisakis simplex. *J Biol Chem* 269: 27650-27656, 1994
- 11) Cesari IM, Ballen DE, Perrone T, Oriol O, Hoebeke J, Bout D : Enzyme Activity in Schistosoma mansoni Soluble Egg Antigen. *J Parasitol* 6: 1137-1140, 2000
- 12) Tabouret G, Bret-Bennis L, Dorchies P, Jacquet P : Serine protease activity in excretory-secretory products of Oestrus ovis (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet Parasitol* 114: 305-314, 2003
- 13) Martínez-Grueiro MM : Acid phosphatase activity in excretion/secretion products from Heligmosomoides polygyrus adults: an indicator of the physiological status of the worms. *Parasitol Res* 88: 946-949, 2002
- 14) Dziekonska-Rynko J, Rocicki J, Jablonowski Z : Activity of selected hydrolases in excretion-secretion products and homogenates from L3 and L4 larvae of Anisakis simplex (Nematoda:Anisakidae). *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 33: 125-135, 2003
- 15) Maki J, Yanagisawa T : Acid phosphatase activity demonstrated in the nematodes, Dirofilaria immitis and Angiostrongylus cantoniensis with special reference to the characters and distribution. *Parasitology* 80: 23-28, 1980
- 16) Van den Bossche H, Borgers M : Subcellular distribution of digestive enzymes in Ascaris suum intestine. *Int J Parasitol* 3: 59-65, 1973
- 17) Angulo-Valadez CE, Cepeda-Palacios R, Ascencio F, Jacquet P, Dorchies P, Romero MJ, Khelifa RM : Proteolytic activity in salivary gland products of sheep bot fly (Oestrus ovis) larvae. *Vet Parasitol* 149: 117-125, 2007
- 18) Opperman CH, Chang S : Nematodes acetylcholinesterase: molecular forms and their potential role in nematode behavior. *Parasitology today* 8: 406-411, 1992
- 19) Shimakura K, Miura H, Ikeda K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shirai T, Kasuya S, Shiomi K : Purification and molecular cloning of a major allergen from Anisakis simplex. *Mol Biochem Parasitol* 135: 69-75, 2004
- 20) Kobayashi Y, Shimakura K, Ishizaki S, Nagashima Y, Shiomi K. Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from Anisakis simplex. *Mol Biochem Parasitol* 155: 138-145, 2007
- 21) Kobayashi Y, Shimakura K, Ishizaki S, Nagashima Y : Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from Anisakis simplex. *Mol Biochem Parasitol* 159: 92-97, 2008