국내 우점종인 안개무늬날개깔따구 (*Chironomus kiiensis*)의 주알레르겐 유전자 클로닝

연세대학교 대학원

의과학사업단

염 혜 영

국내 우점종인 안개무늬날개깔따구 (*Chironomus kiiensis*)의 주알레르겐 유전자 클로닝

지도교수 김 동 수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원
의과학사업단
염 혜 영

염혜영의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

감사의 글

본 연구를 끝까지 마치고 논문이 완성되기까지 도움을 주신 여러 선생님들께 깊은 감사를 드립니다. 학위 과정을 시작할 수 있도록 아낌없이 지원해주신 소아과학 교실의 이기영 교수님, 곤충 알레르기에 대한 많은 경험을 바탕으로 기꺼이 자문을 해주신 기생충학 교실의 이한일 교수님께 진심으로 감사드립니다. 꾸준하게 연구의 진행을 이끌어 주신 지도교수 김동수 교수님, 정확한 비평과 토론으로 도움을 주신 내과학 교실의 홍천수 교수님, 이수곤 교수님, 소아과학 교실의 김규언 교수님에게도 감사의 뜻을 전합니다. 기생충학 교실의 용태순 교수님은 연구 계획을 세워 시행하는 매 단계에서 세심히 지도를 해주셨습니다. 기초 과학의 실험 기법에 취약한 제게 많은 조언을 해 준 기생충학 교실의 정경영 선생님, 소아과학 교실의 이경은 선생님에게 고마움을 전합니다.

늘 이끌어 주시는 하나님께 감사의 기도를 드리며 인내와 사랑으로 지켜봐주시는 부모님들과 사랑하는 가족에게 감사드립니다.

저자 씀

차 례

그림 차례 iii
국문요약 1

I. 서 론 3

II. 재료 및 방법 6
1. 재료 6
가. 안개무늬날개깔따구의 채집과 조항원 제조 6
나. 대상 6
2. 방법 7
가. 마우스 항혈청의 제조 7
나. 안개무늬날개깔따구 항원의 SDS-PAGE와 특이 IgE Immunoblotting 7
다. cDNA expression library의 제조 7
(1) 전체 RNA 및 mRNA의 분리 7
(2) cDNA library 제작 8
라. 항원단백질의 검색 및 확인 9
(1) Immunoscreening 9
(2) In vivo excision 9
마. DNA sequencing 10
바. 안개무늬날개깔따구 재조합 항원의 제조 및 분리 11

(1) 트로포마이오신 유전자의 발현벡터로의 subcloning 11
(2) 재조합 트로포마이오신의 발현 및 순수분리 11
III. 결 과 12
1. 안개무늬날개깔따구 조항원을 이용한 피부단자시험의 결과 12
2. 안개무늬날개깔따구 주알레르겐 유전자 클로닝 12
3. 안개무늬날개깔따구 트로포마이오신 유전자의 subcloning 및 ..... 재조합 단백질의 발현 13
4. 안개무늬날개깔다구 재조합 트로포마이오신에 대한 특이 IgE immunoblotting 13
5. 안개무늬날개깔따구 재조합 트로포마이오신의 교차항원성 13

IV. 고 찰 23

V. 결 론 27

참고문헌 28
영문 요약 34

그림 차례

Fig. 1. A light trap for collection (A) and *C. kiiensis* adults (B) ····· 15

Fig. 2. The results of skin prick test in atopic patients ····· 16

Fig. 3. Nucleotide and its deduced amino acid sequence of *C. kiiensis* tropomyosin ····· 17

Fig. 4. DNA sequence alignment of *C. kiiensis* tropomyosin ····· 18

Fig. 5. Subcloning of *C. kiiensis* tropomyosin cDNA into expression vector. ····· 19

Fig. 6. Mass production of the recombinant protein ····· 20

Fig. 7. IgE-immunoblot analysis of recombinant tropomyosin of *C. kiiensis* ····· 21

Fig. 8. Crossreactivity of *C. kiiensis* tropomyosin ····· 22

국문요약

국내 우점종인 안개무늬날개깔따구(*Chironomus kiiensis*)의 주알레르겐 유전자 클로닝

깔따구는 파리목(Diptera), 깔따구과(Chironomidae)에 속하는 곤충으로 유충은 수서생활을 하는데 엄청난 수의 성충이 발생한다. 성충은 강한 추광성이 있어 주택가로 많이 모여들어 주거생활에 불편을 준다. 성충은 수명이 짧아 2 4일 밖에 생존하지 못하므로 전등밑 또는 창문틀 등에서 죽은 깔따구의 몸이 말라 부스러져 공기 중에 떠다니면서 여러 가지 알레르기 증상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 유충은 높은 교차항원성을 나타내는 헤모글로빈이 주알레르겐으로 알려져 있다. 그러나, 헤모글로빈을 갖고 있지 않은 깔따구 성충에서도 교차항원성을 나타내는 알레르겐을 합성한다는 보고도 있다.

본 연구는 우리나라의 우점종인 안개무늬날개깔따구(*Chironomus kiiensis*)의 주알레르겐을 규명하여 유전자를 클로닝하고 그 특성을 알아보고자 하였다. 깔따구 성충을 채집하여 조항원을 제조하였다. 세브란스 병원의 알레르기클리닉을 찾은 알레르기환자를 대상으로 깔따구 조항원으로 피부단자시험을 실시하여 양성반응을 나타낸 21명의 환자의 혈청을 연구에 이용하였다. 깔따구 조항원을 마우스에 면역시켜 항혈청을 얻었으며 이를 이용하여 본 실험에서 제작한 안개무늬날개깔따구 성충 cDNA library 중에서 주알레르겐의 유전자를 선별하였다. 항원성이 높은 유전자의 클로닝을 시행하여 그 특성을 규명하였으며 재조합 유전자를 합성하여 양성 환자군의 혈청으로 특이 IgE 반응을 검증하고 다른 절지동물들과의 교차항원성을 알아보았다. 그 결과 마우스 항혈청으로 immunoscreening을 수행하여 항원성이 높은 유전자를 클로닝하였다. 주알레르겐은 285개의 아미노산을 암호하는 open reading frame을 가지며 분자량과 등전점은 각각 32,532 Da과 pI 4.58임을 추산할 수 있었다. 유전자 비교검색 결과

안개무늬날개깔따구의 주알레르겐은 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)의 트로포마이오신과 가장 유사함을 알 수 있었다. 또한 절지동물문의 다른 주요 그룹인 바닷가재(*Panulirus stimpson*) 및 세로무늬집먼지진드기(*Dermatophagoides pteronyssinus*)의 알레르겐과도 높은 유사성이 있었다. 본 유전자의 알레르겐으로서의 특성을 조사하기 위하여 재조합 유전자를 *E. coli*에서 발현시킨 다음 Ni-nitrilotriacetic acid resin을 이용한 친화크로마토그래피로 분리하였다. 이 재조합 항원은 IgE Immunoblotting 분석결과, 피부단자시험 양성 환자 혈청의 76%와 특이 IgE 반응을 나타냈다. 이에 대한 마우스 항혈청을 제조하여 immunoblot을 시행한 결과 큰다리집먼지진드기(*Dermatophagoides farinae*), 세로무늬집먼지진드기, 집파리(*Musca domestica*), 작은빨간집모기(*Culex tritaeniorhynchus*), 누에(*Bombyx mori*)의 트로포마이오신간의 교차반응을 확인하였다.

핵심되는 말: 안개무늬날개깔따구, 주알레르겐, 클로닝, 트로포마이오신

국내 우점종인 안개무늬날개깔따구(*Chironomus kiiensis*)의 주알레르겐 유전자 클로닝

<지도교수 김동수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

염 혜 영

Ⅰ. 서 론

깔따구는 분류학적으로 곤충강(Insecta), 파리목(Diptera), 깔따구과(Chironomidae)에 속하는 날벌레로 강, 개울, 호수, 못, 논, 저수지, 하수구, 물웅덩이, 늪, 인공용기 등 모든 수질에서 대량 발생하고, 강한 추광성이 있어 불빛으로 모여들기 때문에 주민의 생활에 여러 면으로 불편을 주거나 건강을 해치는 의용 곤충이다.[1,2] 특히 성충은 수명이 짧아 2 4일 밖에 생존하지 못하며 몸체가 연약하여 죽은 깔따구가 말라 부스러져 먼지나 공기 중에 섞여 있다가 사람이 호흡할 때 비강이나 기관지로 들어와 알레르기 증상을 일으키는 것으로 알려져 있다.[3] 천식, 비염, 아토피피부염 등 알레르기 질환을 야기하는 원인 항원에는 여러 가지 물질이 있으며, 그 중 절지동물인 집먼지진드기의 항원이 가장 주요한 것으로 알려져 비교적 많은 연구가 수행되어 왔다. 그러나 같은 절지동물이며 곤충류에 속하는 깔따구의 항원성에 관한 연구는 많지 않다.

깔따구류는 현재 10,000여종이 지구상에 서식하고 있으며 우리와 생태적 조건이 유사한 일본에서는 500여종이 기록되어 있으나 우리 나라에서는 극히 최근에 조사가 시작되어 겨우 50여종이 확인되어 있을 뿐이다. 깔따구류는 거의 모

든 종류의 물에서 발생하고 있으나 수질에 따라 각기 다른 종이 서식하며, 종이 매우 다양하고 지역에 따라 우점종이 다르게 나타나는 것이 특색이다. 일본에서는 *Chironomus yoshimatsui*, *C. plumosus*, *Tokunagayusurika akamushi* 등이 전국적으로 우점종이지만 이들 종의 국내분포는 극히 제한되어 있고 개체군 밀도가 낮아 오히려 희귀종에 속한다.[4] 국내에서는 주로 논에서 발생하는 안개무늬날개깔따구(*C. kiiensis*)와 유기물질에 오염된 하수에서 발생하는 노랑털깔따구(*C. flaviplumus*)가 우점종으로 전자는 농촌에서 후자는 주로 도시에서 많이 발생한다.[5]

깔따구가 알레르기 질환의 원인 항원으로 주목받게 된 것은 1970년대 후반에 들어서이다. 아프리카 수단의 나일강에 거대한 댐을 건설한 후 인근주민 가운데 알레르기 천식 환자가 다수 발생하였는데, 그 원인으로 댐에서 집단 발생한 깔따구를 의심하게 되었고,[6,7] 그 후 *Cladotanytarsus lewisi*라는 깔따구가 주 항원으로 작용한다는 사실이 확인되었다.[8-11] Baur[12]는 독일에서 어류사료가 되는 *C. thummi* 유충을 취급하는 수족관 및 사료공장 종사자 중에서 알레르기 질환이 다수 발생하였음을 보고하였고, Kagen 등[13]은 미국 위스콘신에 위치한 저수지에서 발생하는 *C. plumosus* 항원에 의한 아토피 질환의 발생을 보고하였다. Igarashi 등[14]은 일본의 Toyama 지방의 기관지천식아동 119명을 대상으로 피부시험을 실시한 결과 *Polypedilum kyotoensis*, *C. yoshimatsui*와 *Tokunagayusurika akamushi*에 대하여 각각 23.5%, 17.6% 및 7.6%의 양성반응을 보였다고 보고하였고, Toshiya 등[15]은 Kyoto 지방의 천식환자 56명 중 32명(57.1%)이 *C. yoshimatsui* 조항원에 피부시험 양성반응을 나타냈다고 하였다. Murakami 등[16]은 일본의 10개 도시의 천식아동 697명의 27.4%가 *C. plumosus* 추출물에 피부시험 양성반응을 나타냈다고 보고하였고, Ishii 등[17]도 소아천식 환자의 16.3%가 *C. yoshimatsui*에 양성반응을 보였다고 하였다. Brasch 등[18]은 공기 중에 떠도는 깔따구 항원이 얼굴에 접촉하여 알레르기 피부증상을 야기한 환자를 처음으로 보고하였다. Kimura 등[19]은 호수 부근의 대기와 흙 또는 실내먼

지에 깔따구 항원이 널리 분포되어 있음을 보고하였고, Matsuno 등[20]도 대기중에 장소에 따라 0.3-6.8ng/㎡의 깔따구 항원을 측정 보고한 바 있다. 한국에서는 아직 깔따구류가 알레르기 질환을 야기하는데 어느 정도 관여하고 있는지 조사된 바가 별로 없다. Park 등[21]은 *C. plumosus*와 *Tokunagayusurika akamushi*에 대해 양성반응을 보인 2명의 기관지천식 환자를 보고한 바 있고, Kim 및 Park[22]은 475명의 호흡기계 알레르기 환자의 20.4%와 20.6%가 상기 2종에 각각 양성반응을 보여 우리 나라에서도 깔따구가 중요한 항원 중의 하나임을 보고하였다. 그러나 위의 두 조사에서 사용한 2종의 깔따구 항원은 일본산으로 일본에서는 가장 흔한 우점종이지만 우리 나라에서는 극히 제한된 지역에서 소수 발생하는 것으로 알려져 있고,[23] 우리 나라에서 가장 흔한 우점종은 안개무늬날개깔따구와 노랑털깔따구 2종인 것으로 보고되었다.[5] 따라서 상기 두 조사 결과는 깔따구 유사종 간의 교차반응의 결과라 생각된다. 국내 아토피 환아 456명을 대상으로 노랑털깔따구 항원을 이용한 피부시험의 결과 7.8%의 양성율을 보여 외국의 보고나 국내 성인의 조사결과와는 다른 양상을 나타냈다.[24]

본 연구에서는 우리 나라에서 서식하는 깔따구 중 우점종인 안개무늬날개깔따구의 조항원을 제조하여 IgE 항체와 주로 반응하는 알레르기 항원 단백질을 밝히고, 분자생물학적인 방법을 응용하여 주 알레르겐 항원의 유전자를 클로닝한 뒤 다량 생산하여 그 특성을 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

가. 깔따구의 채집과 조항원 제조

수답에서 번식하는 깔따구 성충을 다수 채집하기 위하여 경기도 고양시 덕양구에 있는 논가에 유문등을 3개 설치하여 깔따구를 비롯하여 날아든 곤충들을 채집하였다(Fig. 1 A). 이 중에서 안개무늬날개깔따구의 성충을 해부현미경 하에서 골라내어 -70℃에 냉동 보관하였다(Fig 1 B).[5] 냉동 보관된 성충은 해동 후, 100% ether를 깔따구 1g당 1 ml로 첨가한 후 16시간 증발시켜서 지질을 제거하였다. 여기에 phosphate buffered saline (137 mM NaCl, 1.8 mM KH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4, 27 mM KCl, pH 7.4)을 첨가한 다음 마쇄기를 이용하여 균질액을 만든 후 10,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 조항원으로 사용하였다.

나. 대상

위의 방법으로 제작한 조항원을 동결건조하고 Coca 용액(0.9% NaCl, 0.25% $NaHCO_3$ 0.4% phenol)으로 추출한 후 증류수에 1:40(w/v)으로 희석하여 피부단자시험용 시약으로 사용하였다. 1998년 9월 11일부터 1999년 2월 11일 사이에 알레르기 증상 즉 천식, 두드러기, 비염, 아토피피부염으로 연세대학교 세브란스 병원의 알레르기 클리닉을 찾은 환자 275명을 대상으로 깔따구 조항원을 포함하여 50종의 항원으로 피부단자시험을 실시하였다. 남:녀 비는 1:1이였고 평균 연령은 36.2세였다.

2. 방법

가. 마우스 항혈청의 제조

4주된 BALB/c 마우스를 조항원(2 μg)과 alum adjuvant의 혼합물로 면역시키고, 4주와 8주 후에 각각 동량의 조항원을 다시 주사하였다. 면역하는 기간 동안 2주에 한 번씩 마우스 안와정맥총에서 채혈하여 ELISA법을 수행하여 깔따구 특이 IgE치가 최고로 생성된 혈청을 얻었다.

나. 안개무늬날개깔따구 항원의 SDS-PAGE와 특이 IgE Immunoblotting

조항원이나 재조합 항원을 loading buffer(60 mM Tris-HCl, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)에 녹인 후, 끓는 물에 5분간 반응시켰다. 10% 혹은 12% SDS-polyacrylamide gel에 50V/100V으로 전기영동(Small mighty, Hoeffer, San Francisco, CA, USA)을 실시하여 단백질 항원을 분석하였다. SDS-PAGE gel을 25V로 60분간 nitrocellulose membrane (NC, pore size 0.45 μm, Amersham, Buckinghamshir, UK)에 전이(X cell II, Novex, Carlsbad, CA, USA) 시켰다. NC membrane은 필요시 4 mm 간격으로 절단하여 실험에 이용하였다. IgE immunoblot을 위해서 NC membrane을 4℃에서 16시간 동안 3% skim milk-TBS-T(25 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.5) 용액으로 반응시켜 비특이적 단백질 결합을 차단하였다. 1:2로 희석한 환자 혈청 (PBS)으로 4℃에서 16시간 동안 반응시켰다. 그후 alkaline phosphatase가 결합된 goat polyclonal anti-human IgE(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 1:2,000으로 희석 후 상온에서 1시간 반응시켰으며, nitroblue tetrazolium/bromochloro-indolyl phosphate(NBT/BCIP; Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 발색시켰다.

다. cDNA expression library의 제조

(1) 전체 RNA 및 mRNA의 분리

깔따구 충체에 denaturing 용액(5 M guanidium thiocyanate, 10 mM EDTA, 2% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 7.6)을 넣어 용해시킨 후, phenol/chloroform을 이용하여 단백질을 제거하였다. Isopropyl alcohol을 첨가한 후 Resin Tack을 이용하여 RNA를 침전시키고, 이를 건조하여 DEPC를 처리한 증류수에 녹여 1분간 원심침전하여 상청액을 분리하였다. 전체 RNA 용액을 oligo-dT가 부착된 Dynabead의 Magnetic particle collection kit를 이용하여 bead와 결합한 mRNA를 모아 DEPC를 처리한 증류수에 녹여 -70℃에 보관하였다.

(2) cDNA library 제작

ZAP-cDNA Synthesis kit (Stratagene, La Jolla, Ca, USA)를 이용하여 directional cloning하였으며, 방법은 제공되는 실험방법을 따랐다. 위에서 기술한 방법으로 얻어 보관한 깔따구의 mRNA 4 μg을 사용하여 먼저 first strand를 합성하였다. DTT, first strand methyl nucleotide mixture, linker-primer, RNase block들을 적정 농도가 되도록 넣고, poly A mRNA 5 μg을 넣고 잘 섞었다. 여기에 M-MLV reverse transcriptase를 넣고 37℃에서 반응시켰다. 이렇게 얻은 first strand에 DTT, second strand nucleotide mixture, dNTP, RNase H, DNA polymerase를 넣고 16℃에서 2.5시간 반응시켜 second strand를 합성하였다. Phenol/chloroform를 첨가하고 상층액을 분리한 후 얻어진 double stranded DNA를 alcohol precipitate 시켰다. Klenow fragment 및 dNTP mix를 사용하여, cDNA termini를 blunting시키고, *Eco*R I adaptors를 ligation 시켰다. T4 polynucleotide kinase 및 rATP들을 섞어 *Eco*R I ends를 kination 시키고, Xho I으로 소화시켰다. 이렇게 준비한 cDNA를 Uni-ZAP XR vector에 T4 DNA ligase 등을 사용하여 ligation 시켰다. Gigapack II Gold packaging extract를 사용하여 *in vitro* packaging 시켰다. XL 1-Blue MRF' bacteria를 host cell로 길러 plating과 titering에 사용하였다.

라. 항원단백질의 검색 및 확인

(1) Immunoscreening

0.2% maltose, 10 mM $MgSO_4$를 첨가하여 만든 LB 배지에 숙주세포인 XL 1 blue MRF'을 37℃, 200 rpm으로 16시간 배양시켰다. SM 완충액에 1/4,000으로 희석한 phage와 숙주세포 100 ㎕씩 섞고 37℃에서 15분간 숙주세포가 감염되도록 하고, 50℃로 미리 데워놓은 3 ㎖ top agarose (10 g NaCl, 10 g tryptone, 5 g yeast extract, pH 7.0 per liter)와 혼합하여 즉시 미리 만들어 놓은 NZY plate (5 g NaCl, 2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 5 g yeast extract, 10 g NZ amine, 15 g agar, pH 7.5 per liter) 위에 고르게 폈다. 42℃에서 plaque가 보일 때까지 (약 4시간) 키우고, 10 mM IPTG (isopropyl β-D-thiogalactopyranoside)에 적신 nitrocellulose membrane (Bio-Rad Lab. Inc, Hercules, CA, USA)을 덮은 다음 3.5시간 37℃에서 키워 단백질의 발현을 유도하였다. Membrane을 TBST 용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20)으로 세척하고 3% skim milk를 포함한 TBST로 비특이적 반응을 차단시켰다. 1차 항체로 안개무늬날개깔따구 조항원을 면역한 mouse serum을 500:1로 희석하여 1시간 동안 반응시키고 membrane을 TBST로 10분간 3회 세척하였다. 2차 항체로 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG1(Sigma)을 1:2,000으로 희석하여 1시간 반응시키고, membrane을 Western blotting과 동일한 방법으로 BCIP/NBT를 기질로 이용하여 반응시켰다. 이 중 가장 강한 반응을 보이는 것들 중에서 수 개의 clone들을 선별하였다.

(2) In vivo excision

ZAP Express vector에 있는 phagemid를 분리하기 위하여 숙주 세포 SOLR과 ExAssist helper phage를 이용하여 in vivo excision을 수행하였다. 3차

screening을 통하여 최종적으로 분리된 phage (1×10^5 pfu/ml) 250 ㎕를 XL1-Blue MRF' (O.D. $_{600}$= 1.0) 200 ㎕와 1㎕의 ExAssist helper phage (1×10^6 pfu/ml)에 섞어서 15분간 37℃에서 반응하였다. 3 ml의 NZY broth를 첨가한 뒤 3시간 동안 배양하여 single clone excision이 일어나도록 하였다. 그 다음 70℃에서 20분간 열처리한 후 원심분리 (1,000 g, 15분)를 하여 상층액 100 ㎕를 취한 다음 100 ㎕의 SOLR (O.D. $_{600}$= 1.0)과 섞어 15분간 37℃에 배양하여 형질전환시켰다. 300 ㎕의 NZY broth를 첨가한 후 37℃에서 45분간 더 배양하여 그 중 50 ㎕를 LB/kanamycin (50㎕/ml) agar plate에 고르게 폈다. 16시간 배양하여 생성된 colony에서 다시 plasmid를 추출하여 재조합 DNA의 크기를 확인한 후 *E. coli*에 다시 형질전환하여 이후의 실험에 사용하였다.

마. DNA sequencing

형질전환된 *E. coli*에서 plasmid를 QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA)를 이용하여 얻은 후 제한효소 EcoR Ⅰ과 Xho Ⅰ으로 37℃에서 1시간 절단 후 cDNA insert 크기를 1% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다. 염기서열 결정은 Sanger등의 dideoxy chain termination 방법을 기초로 한 T7 Sequenase version 2.0 DNA sequencing kit (Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA)를 사용하였으며 insert에 대해 5'과 3'양쪽으로 동시에 시행하였다.[26] Sequencing primer로는 T3(5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3')와 T7(3'-CGGGATACCACTCAGCATAATG-5')을 사용하였다. 5 ㎍의 plasmid DNA를 ssDNA로 변성시킨 후 각각의 primer를 상보적인 DNA에 결합시켰다. 이를 상온에서 약 5분간 [^{35}S]dATP로 표지시키고 각각의 dideoxy NTP가 들어있는 tube에 옮겨 37℃에서 5분간 반응시켰다. 각각의 반응산물을 6% polyacrylamide gel에 전기영동한 후 X-ray film에 감광시켜 판독하였다. 판독한 DNA 염기서열 자료는 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 사용하여 GenBank, EMBL의 database들과 비교하여 유전자의 유사성과 특성을 분

석하였다.

바. 안개무늬날개깔따구 재조합 항원의 제조 및 분리

(1) 트로포마이오신 유전자의 발현벡터로의 subcloning

*Bam*H Ⅰ과 *Xho* Ⅰ site를 포함하는 primer인(upstream primer: atctggatccatggatgccatc (*Bam*H Ⅰ)와 downstream primer: gaagctcgagttattctttgaggata (*Xho* Ⅰ)을 제작하고 excision한 plasmid를 template로 이용하여 PCR 증폭한 후, 제한 효소를 처리하여 expression vector인 pET 28a (Novagen, Madison, WI 53711, USA)에 삽입하였다.

(2) 재조합 트로포마이오신의 발현 및 순수분리

Subcloning한 plasmid를 *E. coli* BL21에 형질전환하여 과발현을 유도하였다. 50 μg/ml의 kanamycin을 포함한 LB broth에 37℃에서 배양하다가 OD_{600} 값이 0.5일 때 1 mM IPTG를 첨가하고 5시간 더 배양한 후 bacteria를 모았다. 이를 LB broth 2 ℓ에 배양하여 초음파 분쇄기로 1분씩 5회 반응시킨 다음 10,000 g에서 1시간 원심분리하여 상층액을 모았다. 20 mM imidazole 용액으로 평형시킨 4 ml의 Ni-NTA agarose (QIAGEN, Valencia, Ca, USA)와 20분 동안 상온에서 교반시켜 결합시킨 후, 60 mM imidazole 용액으로 세척하고 250 mM imidazole 용액 3 ml로 추출하였다. 이렇게 얻은 용액을 phosphate buffer, pH 7.4로 투석하고 정량하여 사용하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 깔따구 조항원을 이용한 피부단자시험의 결과

채집한 안개무늬날개깔따구의 조항원을 제조하여 1998년 9월 11일부터 1999년 2월 11일 사이에 알레르기 증상 즉 천식, 비염, 두드러기, 아토피 피부염으로 연세대학교 세브란스병원의 알레르기 클리닉을 찾은 성인 환자 275명을 대상으로 피부단자시험을 실시하였다. 두 종의 집먼지진드기(*Dermatophagoides pteronyssinus*와 *Dematophagoides farinae*)가 가장 흔한 알레르겐(60.4%와 66.9%)으로 나타났으며 다음으로 바퀴 (35.3%)로 나타났다. 안개무늬날개깔따구는 14.2%로 집먼지진드기와 바퀴다음의 빈도를 보였다 (Fig. 2).

2. 깔따구 주알레르겐 유전자 클로닝

조항원으로 면역한 마우스는 5주 후에 IgE가 최고치에 도달하는 것을 알 수 있었으며, 2번의 boosting을 한 후에 채혈하여 PBS에 500:1로 희석한 혈청을 이용하여 cDNA library를 immunoscreening하였다. 항원성이 높은 클론을 6개 선별하여 DNA sequence를 분석한 결과 모두 같은 서열을 갖는 유전자임을 알 수 있었다 (Fig. 3). 855-bp의 open reading frame을 DNASIS version 2.5로 분석한 결과 분자량은 32,531.52 Da이며 pI는 4.58로 추정되었다.

클로닝한 유전자를 BLAST 탐색한 결과 기존에 알레르겐으로 밝혀진 트로포마이오신과 높은 유사성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 본 유전자의 아미노산 서열을 연역한 결과 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)와 89.1%, 이질바퀴(*Periplaneta americana*)와 86.3%, 바닷가재(*Panulirus stimpson*)와 78.9%, 그리고 세로무늬집먼지진드기(*D. pteronyssinus*)와 76.5%의 유사성을 가지고 있음을

알 수 있었다 (Fig. 4).

3. 안개무늬날개깔따구 트로포마이오신 유전자의 subcloning 및 재조합 단백질의 발현

클로닝한 트로포마이오신 유전자의 항원성을 조사하기 위하여 재조합 단백질을 합성하였다. 제한효소를 포함하는 upstream primer: atctggatccatggatgccatc (BamHⅠ)와 downstream primer: gaagctcgagttattctttgaggata (XhoⅠ)을 제작하여 PCR을 수행하였다. 각각의 제한 효소를 처리한 후 pET 28a에 접합시켜 *E. coli* BL21에 형질전환 시켰다 (Fig. 5).

형질전환체를 1ℓ배양하여 600 μg의 재조합 단백질을 분리할 수 있었다. 트로포마이오신은 urea gel에서 이동력이 감소하는 것으로 알려져 있으므로 재조합 단백질의 이동력을 확인하였다 (Fig. 6). 깔따구 트로포마이오신은 32.5 kDa이지만 Ni-affinity chromatography를 수행하기 위해 6개의 histidine을 포함하는 34개의 아미노산이 N-terminus에 결합된 형태로 발현을 하였다. Tris-glycine SDS-PAGE에서도 자신의 분자량(36 kDa)에 비해 이동력이 감소하는 것(42 kDa)으로 나타났으며, urea gel에서는 자신의 분자량보다 두 배 이상인 74 kDa의 이동력을 보였다.

4. 안개무늬날개깔따구 재조합 트로포마이오신에 대한 특이 IgE immunoblotting

피부단자시험에서 양성반응을 나타내는 환자혈청으로 재조합 트로포마이오신에 대한 반응을 조사하였다. 21명의 환자혈청 중에서 16명인 76%의 환자가 트로포마이오신에 대한 특이 IgE 반응을 보였다. 이로써, 안개무늬날개깔따구의 트로포마이오신이 주알레르겐(major allergen)임을 확인할 수 있었다 (Fig. 7).

5. 안개무늬날개깔따구 재조합 트로포마이오신의 교차항원성

안개무늬날개깔따구 재조합 트로포마이오신의 교차항원성을 조사하기 위하여 실내에서 쉽게 접할 수 있는 곤충 및 진드기의 조항원을 제조하여 10 μg 씩 전기영동을 실시한 후, 안개무늬날개깔따구 트로포마이오신 면역혈청으로 immunoblot을 수행하였다. 톡톡이(*Sinella curviseta*)를 제외한 대부분의 곤충 및 집먼지진드기에 교차항원을 나타내는 트로포마이오신이 존재함을 알 수 있었으며 또한 이량체 형태로 존재하는 트로포마이오신도 반응을 하는 것으로 사료되었다 (Fig. 8).

(A) (B)

Fig. 1. A light trap for collection (A) and *C. kiiensis* adults (B).

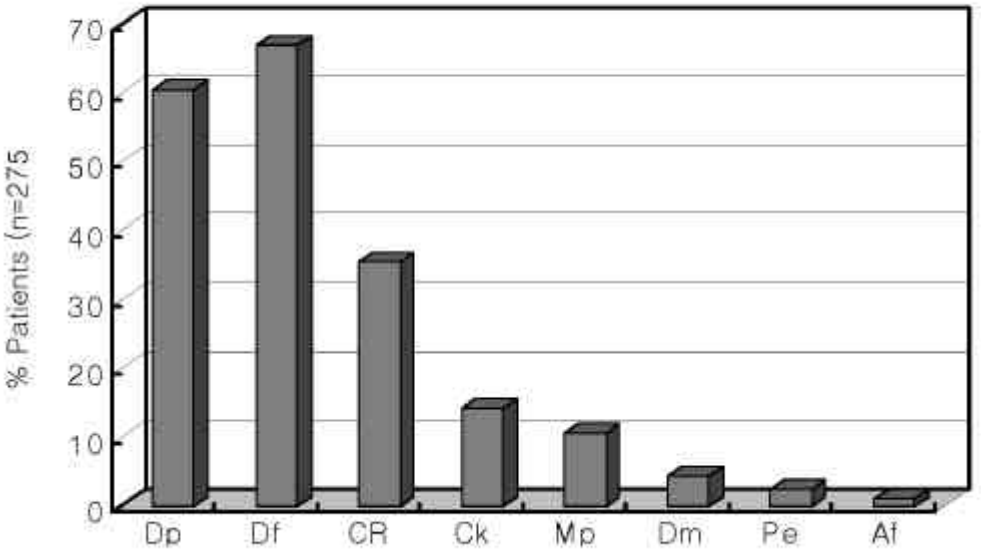

Fig. 2. The results of skin prick test in atopic patients. The skin prick test with *C. kiiensis* crude extract was performed to the patients, who visited the allergy clinic of Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea. Sera of the skin test positives were collected from 11 September 1998 to 11 February 1999, and kept frozen at -20℃. Dp: *D. pteronyssinus* (60.4%); Df: *D. farinae* (66.9%); CR: *Blattella germanica* and *Periplaneta americana* (35.3%); Ck: *Chironomus kiiensis* (14.2%); Mp: *Momomorium pharaonis* (10.5%); Dm: *Drosophila melanogaster* (4.4%); Pe: *Penicillum* sp. (2.5%); Af: *Aspergillus fumigatus* (1.1%)

```
   1 cgcggattcagattcaagttttacagtttgagtatttaattgtgaaagttatcgaataa
  61 atctgccaacatggatgccatcaagaaaaagatgcaagcgatgaagcttgagaaggataa
                M  D  A  I  K  K  K  M  Q  A  M  K  L  E  K  D  N
 121 tgccttagatcgtgccctctctgtgaaaatcaagctcgtgatgctaacttgcgtgctga
      A  L  D  R  A  L  L  C  E  N  Q  A  R  D  A  N  L  R  A  E
 181 aaaggctgaagaagaagcccgcacattgcaaaagaagatccaaactattgaaaacgattt
      K  A  E  E  E  A  R  T  L  Q  K  K  I  Q  T  I  E  N  D  L
 241 ggatcaaacacaaggacaagaaactcttgtcaatggcaaactcgaaggaaaggaaaaggc
      D  Q  T  Q  G  Q  E  T  L  V  N  G  K  L  E  G  K  E  K  A
 301 tctccaaaatgctgaatcagaagtcgctgctttgaaccgtcgtatccaattgttgggaga
      L  Q  N  A  E  S  E  V  A  A  L  N  R  R  I  Q  L  L  G  E
 361 agatcttgaccgttcagaagaacgtttggcttcagcaacagcaaaattgtcagaagcatc
      D  L  D  R  S  E  E  R  L  A  S  A  T  A  K  L  S  E  A  S
 421 agctgctgctgatgagtctgaacgtgcacgtaaaattcttgaaaatcggtcactcgctga
      A  A  A  D  E  S  E  R  A  R  K  I  L  E  N  R  S  L  A  D
 481 tgaagaacgtatggatgccctcgaaaatcaattgaaggaagcacgcttccttgcagaaga
      E  E  R  M  D  A  L  E  N  Q  L  K  E  A  R  F  L  A  E  E
 541 agcagacaaaaaatacgatgaggttgcacgtaaattggctatggttgaggctgatcttga
      A  D  K  K  Y  D  E  V  A  R  K  L  A  M  V  E  A  D  L  E
 601 acgtgctgaagaacgtgcagaggctggtgaagctaaaattgttgaacttgaagaagaact
      R  A  E  E  R  A  E  A  G  E  A  K  I  V  E  L  E  E  E  L
 661 ccgtgttgtaggcaacaacttgaaatcattagaagtctcagaagaaaaggcaaaccaacg
      R  V  V  G  N  N  L  K  S  L  E  V  S  E  E  K  A  N  Q  R
 721 tgaagaagaatacaaaaatcaaatcaaaaccctcacaacccgtcttaaggaggctgaagc
      E  E  E  Y  K  N  Q  I  K  T  L  T  T  R  L  K  E  A  E  A
 781 ccgcgcagaattcgctgaacgttccgttcagaaattgcagaaggaagtcgacagacttga
      R  A  E  F  A  E  R  S  V  Q  K  L  Q  K  E  V  D  R  L  E
 841 agacgaactcgtttccgaaaaggaaaagtacagagaaattggagacgatctcgacaccgc
      D  E  L  V  S  E  K  E  K  Y  R  E  I  G  D  D  L  D  T  A
 901 attcgtggaacttatcctcaaagaataagcaaatcttcatcgcaaatcaaaatggaaatg
      F  V  E  L  I  L  K  E
 961 agcacttatggatattttctattattctcaaaaatattcatttgttataaaattccgtc
1021 ttttactt actacaaaaaaacacacacacacacaaatcactaattggatcaccctacaa
1081 atgatactttataattttcatttttgactattattcactcaatttttaatttcaatccac
1141 atgtaattataacggttaagttattaaaaaaattatcatatttcctaaaacctgtgcc
1201 ttgaaactgaaacatcaacaaggaacatactttttaattgaaaactgcagattgataatt
1261 ttttaaaaacaactttacgatcgaaatttgtcgtttttttgtttatttattattattat
1321 ggttgaaaacatacattcaatgattgtcgtagtcgagaattatttgcaaacatatttta
1381 tggaataaagggaaagaagtttttattattgaacattttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1441 a
```

Fig. 3. Nucleotide and its deduced amino acid sequence of *C. kiiensis* tropomyosin

```
                    10        20        30        40        50
Midge       MDAIKKKMQAMKLEKDNALDRALLCENQARDANLRAEKAEEEARTLQKKT  [50]
Fruitfly    ............VD..G..E...V..QE.....T..........Q....  [50]
Cockroach   ..................MC.....Q...............S.....  [50]
Lobster     ..................M..DTL..Q.NKE..I....S...VHN...RM  [50]
Mite        .E...N...........I...EIA.QK.........S...V.A.....  [50]

                    60        70        80        90       100
Midge       QTIENDLDQTQQQETLVNGKLEGKEKALQNAESEVAALNRRIQLLGEDLD  [100]
Fruitfly    ..V..E.....EAL...T....E.N...................E...E  [100]
Cockroach   .Q........ME.LMQ..A..DE.D.....................E...E  [100]
Lobster     .QL......V.ESLLKA.TQ..E.D...S...G............E...E  [100]
Mite        .Q...E...V.E.LSAA.T...E......T..GD..........IE...E  [100]
                   110       120       130       140       150
Midge       RSEERLASATAKLSEASAAADESERARKLENRSLADEERMDALENQLKE   [150]
Fruitfly    .......G.........Q..............A................  [150]
Cockroach   .......T.....A...Q.V..........SKG................  [150]
Lobster     ......NT..T..A...Q.......M.V......S..............  [150]
Mite        ......KI.....E...QS......M.M.H..IT.....EG.......  [150]
                  160       170       180       190       200
Midge       ARFLAEEADKKYDEVARKLAMMEADLERAEERAEAGEAKTVELEEELRVV  [200]
Fruitfly    ...................................Q..N...........  [200]
Cockroach   ...M...............................S..S...........  [200]
Lobster     ........R......................T..S...........  [200]
Mite        ..MM.D..R......................T..S...........  [200]
                   210       220       230       240       250
Midge       GNNLKSLEVSEEKANQREEEYKNQLKTLTTRLKEAEARAEFAERSVQKLQ  [250]
Fruitfly    .............S..............N.....................  [250]
Cockroach   ...............L......Q.........................  [250]
Lobster     ...................A..E.....ANK..A...............  [250]
Mite        ..............Q...AHEQ..RIM.K...................  [250]
                  260       270       280
Midge       KEVDRLEDELVSEKEKYREIGDDLDTAFVELILKE   [285]
Fruitfly    ........D..L...R.KD...............    [285]
Cockroach   ...........H.....KF.C....MT.T..AGY-   [284]
Lobster     ...........N.....KS.T.E..QT.S..SGY-   [284]
Mite        ...G.......H.....KS.S.E..QT.A..TGY-   [284]
```

Fig. 4. DNA sequence alignment of *C. kiiensis* tropomyosin. BLAST search showed that *C. kiiensis* tropomyosin has the highest homology with insect tropomyosins (*Drosophila melanogaster*, 89.1%; *Periplaneta americana*, 86.3%). It also has high sequence identities those of other two major arthropod groups, which are known as major allergens, such as lobster (Crustacea, *Panulirus stimpson*, 78.9%) and mite (Chelicerata, *Dermatophagoides pteronyssinus*, 76.5%).

(A) (B)

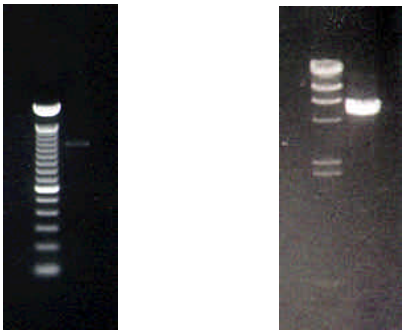

Fig. 5. Subcloning of *C. kiiensis* tropomyosin cDNA into expression vector. Tropomyosin-encoding cDNA (A) was subcloned into the BamH I and Xho I sites of the expression vector pET-28a (B).

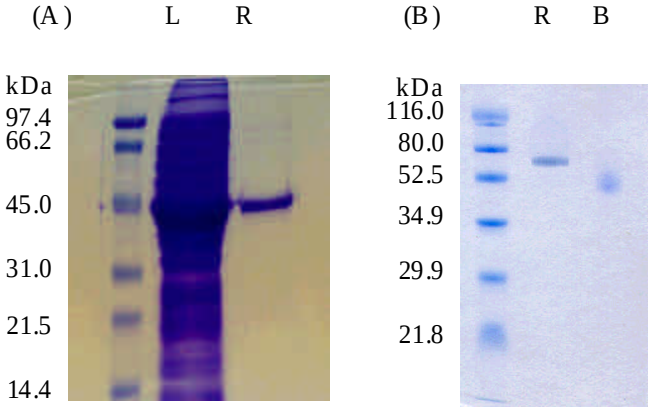

Fig. 6. Mass production of the recombinant protein. Recombinant tropomyosin was expressed in *E. coli* BL21 and purified by affinity column chromatography using Ni-nitrilotriacetic acid agarose (QIAGEN, Valencia, CA) according to the manufacturer's manual (A). Electrophoretic mobility of recombinant tropomyosin was confirmed on urea gel (B). Lane L: Cell lysate; R: Recombinant tropomyosin; B: BSA fraction Ⅴ.

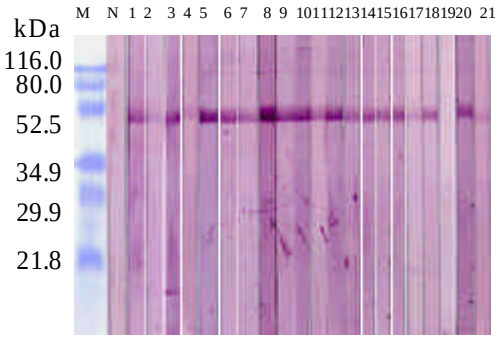

Fig. 7. IgE-immunoblot analysis of recombinant tropomyosin of *C. kiiensis*. After SDS-PAGE, protein of recombinant tropomyosin of *C. kiiensis* were electrophoretically transferred onto the nitrocellulose membranes and reacted with 1:2 diluted human sera overnight at room temperature. After washing five times, the membranes were incubated with 1:1,000 diluted alkaline phosphatase labelled anti-human IgE (Sigma, St. Louis, MO, USA) for one hour at room temperature. Color was developed with 758 ng/ml of 3-bromo-4chloro-5-indolly-phosphate and 379 ng/ml of nitro blue tetrazolium in 100 mM Tris-Cl, pH 9.5, 100 mM NaCl, and 5 mM $MgCl_2$). Lane M: molecular standard, N: skin test negative serum, 1-21: individual sera of skin test positives.

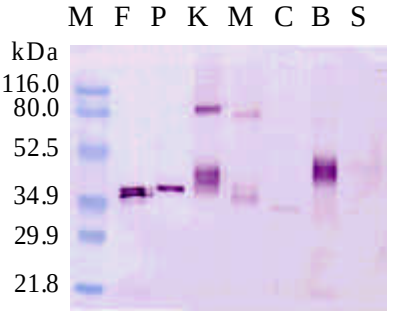

Fig. 8. Crossreactivity of *C. kiiensis* tropomyosin. Ten μg of crude extract of mites and domestic insects were run onto SDS-PAGE and immunoblotting was performed with the mouse sera immunized with recombinant tropomyosin of *C. kiiensis*. M; Molecular standard; F: *Dermatophagoides farinae*; P: *Dermatophagoides pteronyssinus*; K: *Chironomus kiiensis*; M: *Musca domestica*; C: *Culex tritaeniorhynchus*; B: *Bombyx mori*; S: *Sinella curviseta*.

Ⅳ. 고 찰

현재까지 알레르기 환자에 대한 깔따구류의 항원성에 대한 연구 보고는 국내외적으로 극히 미약한 실정이며, 대부분은 깔따구 유충의 헤모글로빈에 관한 것들이다. Baur 등[27]은 *Chironomus thummi thummi* 유충의 주항원(allergen)이 cell-free hemoglobin이라 하였고, Goodman 등[28]은 *Chironomus thummi thummi* 헤모글로빈에는 단량체(monomeric)인 것과 이량체(dimeric)인 것이 있다고 하였으며, Baur 등[29] 은 이들 헤모글로빈에는 면역학적으로 종간 교차반응을 일으키는 공통항원 결정기(common antigenic determinant)를 가진다고 보고하였다. Baur 등[30]과 Mazur 등[31]은 *Chironomus thummi thummi*(CTT)가 최소한 12개의 단량체 또는 이량체의 헤모글로빈을 가지고 있음을 발견하였고, CTT Ⅱ, Ⅲ, Ⅳ 등 주항원의 아미노산 서열을 밝혔으며, 단량체는 15-16 kDa, 이량체는 30-32 kDa의 분자량을 가진다고 보고하였다. 그러나 깔따구 성충의 알레르기 항원성에 관한 연구결과는 더욱 빈약하다. Kawai 및 Konishi[32]는 여러 종의 깔따구 성충 항원의 용출물로 P-K 피부반응검사를 실시하여 15 18 kDa의 항원 단백질이 가장 강하게 알레르기를 유발시키는데, 이것은 유충 헤모글로빈에 해당한다고 하였다. 깔따구의 헤모글로빈은 유충시기에 생성되고 생리적 기능을 가지지만 성충으로 우화한 후에는 소량의 헤모글로빈이 잔존하여 있고 점차 분해되어 완전히 소실하는 것으로 알려져 있다.[33] Prelicz 등[34]은 *Camptochironomus tentans* 성충의 항원이 유충 헤모글로빈과 면역학적으로 동일한 특성을 보인다고 하였고, Mazur 등[36]은 깔따구 성충의 주항원도 성체 내에 잔존하는 헤모글로빈이라고 주장하였다. 그러나, Matsuoka 등[37]은 깔따구 성충과 유충 항원을 각각 기관지천식 아동의 혈청과 반응시켜 본 바, 성충에는 강한 양성반응을 보인데 반해 유충항원에 대해서는 매우 낮은 반응을 보였다고 하였다. Matsuoka 등[38]도 *Chironomus yoshimatsui* 유충이나 갓 부화한 성충에 비하여 완전히 성숙한 성충의 항원이 10배나 강하게 기관지천식아동의 혈청과 반응한다고 하였으며 암놈

체내에 존재하는 500 kDa 이상의 거대한 단백질인 vitellogenin이 주항원일 것이라고 추측하였다. Kawai 및 Konishi[39]는 여러 종의 깔따구 조항원을 크로마토그래피로 분획한 단백질을 P-K 피부반응검사로 항원성을 관찰하여 헤모글로빈도 아니고 고분자 단백질도 아닌 항원단백질의 존재를 보고하였다. Kampen 등[40]은 일본인(229명), 대만인(17명)과 스웨덴인(92명)의 기관지천식 환자를 대상으로 조사한 결과 40%의 환자가 *Crictopus sylvestris* 조항원에 양성반응을 보였는데, 이 깔따구는 헤모글로빈이 존재하지 않는다. 따라서 헤모글로빈이 아닌 항원단백질이 관여한다는 사실을 알 수 있었다. 특히 스웨덴인의 경우 *Chi t* Ⅰ에 10.9%, *Cricotopus sylvestris* 조항원에 29.4%의 양성률을 보였는데 스웨덴에는 이 종이 서식하지 않으며 *Chi t* Ⅰ은 *Chironomus thummi* 조항원을 용출하여 얻은 단백질인데 98%가 헤모글로빈이다. 이와 같은 사실은 *Chi t* Ⅰ에 함유하는 미량의 다른 단백질과 *Cricotopus sylvestris* 항원의 일부가 공통항원일 가능성을 시사하고 있다. 최근 Ree 등[41]은 마우스를 사용하여 연구한 결과, 국내 우점종인 노랑털깔따구 성충의 알레르기 주항원 단백질이 15, 35, 52 및 65kD의 4개이라고 밝힌 바 있다. 그러나, 현재까지 안개무늬날개깔따구의 항원성에 대하여는 Yong 등[42]이 마우스를 사용하여 110, 80, 73, 46, 40, 37, 34, 31 kDa의 단백질이 주요 알레르겐이라고 보고한 것이 유일한 연구 결과이다.

깔따구는 대량으로 발생하여 집단을 이루기 때문에 도시에서는 성충에 의해 감작되었을 가능성이 더 높으므로 성충에서의 알레르겐을 찾고자 하였다. 본 연구에서는 안개무늬날개깔따구 성충의 조항원을 BALB/c mice에 면역하여 얻은 항혈청을 이용하여 cDNA expression library를 면역선별한 결과, 트로포마이오신 유전자를 클로닝하였다. Immunoscreening을 수행하기 위한 사람의 IgE를 충분히 확보하기가 어려워 마우스 혈청을 이용하였다. 마우스 IgG1은 interleukin-4에 의한 알레르기반응인 type 2 반응에 의해 만들어지는 항체이므로 알레르겐 선별에 이용하였다. 여섯 개의 클론을 선별하였으나, 5개는 부분적 염기서열로 구성되고 나머지 하나는 전체 염기서열을 포함하는 것으로 모두 트

로포마이오신 유전자였다. 이는 원핵생물에서 발현되는 유전자를 선별했다는 점을 고려하여야하며, 발현된 유전자 중에서 트로포마이오신의 항원성이 상대적으로 높기 때문인 것으로 사료된다.

알레르기환자의 14.2%가 피부단자시험에서 깔따구 조항원에 양성반응을 보였다. 이는 집먼지진드기와 바퀴를 제외한 실내 알레르겐과 비교했을 때 가장 높은 비율을 차지하며, 깔따구 유충은 물 속에서 서식하므로 도시가 아닌 호수나 저수지 인근 지역에서는 더 높은 비율로 발생할 것으로 생각된다. 재조합 트로포마이오신은 urea gel에서 이동력이 감소하는 것으로 트로포마이오신의 특성을 나타내고 있음을 확인하였으며, 깔따구 감작 환자 혈청의 76%에서 IgE 면역반응을 나타냈다. 트로포마이오신은 연체동물과 갑각류[43], 집먼지진드기[44]와 미국바퀴[45, 46]의 중요한 알레르겐으로 보고되었다. 또한 트로포마이오신은 아미노산 서열이 매우 잘 보존되어 있어서 교차반응을 일으키는 것으로 알려져 있다.

또한 실험에 사용한 환자 혈청 중에 깔따구에만 양성반응을 보이는 환자가 한 명 있었는데 트로포마이오신과 강한 반응을 보였으며, 트로포마이오신 양성반응 환자 중에서 바퀴나 집먼지진드기에 깔따구보다 강한 반응을 보이는 환자는 네 명밖에 없었다. 따라서 교차반응이 아닌 깔따구에 직접 감작되었을 가능성이 높다고 생각할 수 있었다. 그렇지만 집먼지진드기, 바퀴, 새우 등의 주요 알레르겐과 교차 감작의 가능성을 완전히 배제할 수는 없었다. 다시 말하면, 집먼지진드기 등의 트로포마이오신에 감작된 환자가 깔따구 항원에 알레르기 반응을 나타낼 가능성도 있다고 볼 수 있다. 피부단자시험에서 깔따구에 양성반응을 보인 환자들 중 단 한 사람을 제외하고는 집먼지진드기, 바퀴, 모기, 초파리 등에서도 양성반응을 나타냈는데, 이는 교차감작의 가능성을 시사한다고 볼 수 있다. 본 실험에서는 재조합 트로포마이오신 면역혈청으로 immunoblot을 수행하여 집먼지진드기, 집파리, 누에 등에서도 교차항원성이 있는 단백질이 존재함을 알 수 있었다. 특히 무척추동물의 트로포마이오신은 아미노산서열이 잘 보존되어 있고 교차항원성이 있어서 pan-allergen이라고 제기되고 있다.[47] 따라서 교차반응에

관한 연구가 더 진행되어야할 것이다.

V. 결 론

우리 나라에 분포하는 깔따구 중 우점종인 안개무늬날개깔따구의 주알레르겐을 규명하고 그 유전자를 클로닝한 후 유전적 특성을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 안개무늬날개깔따구의 성충에서 cDNA library를 제조한 후, 조항원으로 면역한 마우스의 항혈청을 이용한 immunoscreening을 시행하였다. 선별된 클론의 염기서열을 조사하여 트로포마이오신 유전자임을 밝혔다. 이는 855-bp의 open reading frame을 가지고 있었고, 분자량은 32,532 Da, pI는 4.58로 추산되었으며, 285개의 아미노산을 coding하는 것으로 판명되었다.
2. 안개무늬날개깔따구 조항원으로 시행한 피부단자시험에 양성인 환자의 혈청을 이용하여 이 깔따구 트로포마이오신이 환자 혈청의 76%과 반응하는 주 알레르겐임을 밝혔다.
3. 집먼지진드기 및 주가성 곤충들은 안개무늬날개깔따구의 트로포마이오신과 교차항원성을 나타내는 단백질을 포함하고 있음을 알 수 있었다.

안개무늬날개깔따구 주알레르겐의 규명과 특성에 관한 본 연구 결과는 깔따구 알레르기의 임상영역 및 분자면역학적 연구의 기초자료로 널리 활용될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Krüger F. Eine parthenogenetische Chironomide als Wasserleitungsschadling. Naturwissenschaften 1941; 29: 556-8.
2. Beck EL, Beck WM. The Chironomidae of Florida **II**. The nuisance species. Fla Ent 1969; 52: 1-11.
3. Ree HI. Medical entomology. 3rd ed.: Komoonsa; 1999.
4. **이한일. 한국산 절지동물의 분류학적 연구** V. **깔따구과. 생물학연구연보** 1983; 4: 95-104.
5. Ree HI. Breeding places of non-biting midges (Chironomidae, Diptera) in Korea. Korean J Entomol 1993; 23: 169-76.
6. Freeman P. A species of chironomid (Diptera) from Sudan suspected of causing asthma. Proc Rent Soc London(B) 1950; 19: 58-9.
7. Lewis DJ. Chironomidae as a pest in the Northern Sudan. Acta Trop 1956; 13: 142-58.
8. Kay AB, Gad EL, Rab MO, Stewart J, Erwa HH. Widespread IgE-mediated hypersensitivity in Northern Sudan to the chironomid *Cladotanytarsus lewisi*. Clin Exp Immunol 1978; 34: 106-10.
9. Gad EL, Rab MO, Kay AB. Widespread immunoglobulin E-mediated hypersensitivity in the Sudan to the green nimitti midge, *Cladotanytarsus lewisi* (Diptera: Chironomidae). J Allergy Clin Immunol 1980; 66: 190-7.
10. Cranston PS, Gad MO, Rab EI, Kay AB. Chironmid midges as a cause of allergy in Sudan. Trans R Soc Trop Med 1981; 75: 1-4.
11. Cranston PS, Gad MO, Tee RD, Kay AB. Immediate-type skin reactivity to extracts of the "green nimitti" midge (*Cladotanytarsus*

lewisi), and other chironomids in asthmatic subjects in the Sudan and Egypt. Ann Trop Med Parasitol 1983; 77: 527-33.

12. Baur X. Hemoglobine von chironomiden (Zuckmuiken): Bisher unbekannte aggressive Inhalations-Antigene für den Menschen. Klin Wochenschr 1980; 58: 1163-4.
13. Kagen SL, Yunginger JW, Johnson R. Lake fly allergy; incidence of chironomid sensitivity in an atopic population. J Allergy Clin Immunol 1984; 73: 187.
14. Igarashi T, Murakami G, Adachi Y, Matsuno M, Saeki Y, Okada T, et al. Common occurrence in Toyama of bronchical asthma induced by chironomid midges. 1987; Jpn J Exp Med 57: 1-9.
15. Toshiya K, Chihara J, Fukuda K, Sasaki Y, Shogaki Y, Oshima S. Allergy to insects in Japan. Ⅲ. High frequency of IgE antibody responses to insects (moth, butterfly, caddis fly, and chironomid) in patients with bronchial asthma and immunochemical quantitation of the insect-related airborne particles smaller than 10㎛ in diameter. J Allergy Clin Immunol 1987; 79: 857-66.
16. Murakami G, Igarashi T, Adachi YS, Matsuno M, Adachi A, Sawai M, et al. Common occurrence in Toyama of bronchial asthma induced by chironomid midges. International Symposium on mite and midge allergy. Tokyo, Univ of Tokyo Press, 1988, pp 32-3.
17. Ishii A, Miyamoto T, Shibuya T, Igarashi. Chironomid midges in the recent environment: A possible role as causative agent in allergenic disease. Res Rep Nitsan Kagaku Sinkou Jaidan 1988; 11: 79-88.
18. Brasch J, Bruning H, Palke E. Allergic contact dermatitis from chironomids. Contact Dermatitis 1992; 26: 317-20.

19. Kimura JY, Matsuoka H, Ishii A. ELISA inhibition method in detection of mite and chironomid antigens in environmental samples of dust, soil and air. Allergy 1990; 45: 167-73.
20. Matsuno M, Murakami G, Adachi YI, Adachi YK, Kayahara M, Okada T, et al. Immunological quantification of the airborne chironomid allergens. Jpn J Allergol 1991; 40: 51-9.
21. Park HS, Rhu NS, Cho DI, Kim JW. Two cases of bronchial asthma induced by *Chironomus plumosus* and *Tokunagayusurika akamusi*. J Korean Soc Allergol 1991; 11: 362-7.
22. Kim YJ, Park HS. Skin reactivity and specific IgE antibody to two nonbiting midges in Korean respiratory allergy patients. J Korean Med Sci 1994; 9: 21-8.
23. Ree HI, Kim HS. Studies on Chironomidae (Diptera) in Korea I. Taxonomical study on adults of Chironomidae. Proc Coll Nat Sci SNU 1981; 6: 1-126.
24. Lee KY, Kang HY, Kim DS, Kim KY, Jeong BU, Ree HI. Immunological response to *Chironomus flaviplumus* in atopic children, J Korean Soc Allergology 1995; 15(2): 250-61
25. Hirano K, Yamakawa N, Miyajaki H, Maeda K, Takai S, Ueda A, et al. An improved method for the detection of IgE antibody of defined specificity by ELISA using rat monoclonal anti-rat IgE antibody. J Immunol Methods 1989; 119: 145-50.
26. Tabor S. Richardson CC. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 4761-71.
27. Baur X, Dewair M, Fruhmann G, Aschauer H, Pfletschinger J,

Braunitzer G. Hypersensivity to chironomids: localization of the antigenic determinants within certain polypeptide sequences of hemoglobins of *Chironomus thummi*. J Allergy Clin Immunol 1982; 69: 66-76.

28. Goodman M, Braunitzer G, Kieinschmidt T, Aschauer H. The analysis of a protein polymorphism, evolution of monomeric and homodimeric hemoglobins of *Chironomus thummi thummi*. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1983; 364: 205-17.
29. Baur X, Dewair M, Haegele K, Prelicz H, Scholl A, Tichy H: Common antigenic determinants of hemoglobin as bases of immunological cross reactivity between chironomid species (Diptera, Chironomidae): Studies with human and animal sera. Clin Exp Immunol 1983; 54: 599-607.
30. Baur X, Aschauer H, Mazur G, Dewair U, Prelicz H, Steigemann W. Structure, antigenic determinants of some clinically important insect allergens: Chironomid hemoglobins. Science 1986; 223: 351-354.
31. Mazur G, Beker WM, Baur X. Epitope mapping of major insect allergens(chironomid hemoglobins) with monoclonal antibodies. J Allergy Clin Immunol 1987; 80: 867-83.
32. Kawai K, Konishi K. Fundamental studies on chironomid allergy **III**. Allergen analyses of some adult Japanese chironomid midges (Chironomidae, Diptera). Jpn J Allergol 1988; 37: 944-51.
33. Schin K, Poluhowich JJ, Gamo T, Laufer H. Degradation of haemoglobin in *Chironomus* during metamorphosis. J Insect Physiol 1974; 20: 561-571.
34. Prelicz H, Baur X, Dewair M, Tichy H, Kay AB, Tee R, et al. Persistence of hemoglobin allergenicity and antigenicity during

metamorphosis of Chironomidae(Insecta: Diptera). Int Arch Allergy Appl Immunol 1986; 79: 72-76.

35. Mazur G, Becker WM, Bauer X. Epitope mapping of major insect allergens (chironomid hemoglobins) with monoclonal antibodies. J Allergy Clin Immunol 1987; 80: 876-83.
36. Mazur G, Baur X, Modrow S, Beker WM. A common epitope on major allergens from non-biting midges (Chironomidae). Mol Immunol 1988; 25: 1005-10.
37. Matsuoka H, Ishii A, Noono S. Detection of IgE antibodies to larvae and adults of chironomids by enzyme-linked immunosorbent assay. Allergy 1988; 43:425-9.
38. Matsuoka H, Ishii A, Kimura Y, Noono S. Developmental change of chironomid allergen during metamorphosis. Allergy 1990; 45: 115-20
39. Kawai K, Konishi K. Fundamental studies on chironomid allergy **III**. Allergen analyses of some adult Japanese chironomid midges (Chironomidae, Diptera). Jpn J Allergol 1988; 37: 944-51.
40. Kampen van V, Liebers V, Czuppon A, Baur X. Chironomidae hemoglobin allergy in Japanese, Swedish, and German populations. Allergy 1994; 49: 9-12.
41. Ree HI, Lee SH, Kim YK, Jeon SM, Chang JK, Kim YS. Identification and characterization of allergens of *Chironomus flaviplumus* adults (Chironomidae, Diptera) in mice. Korean J Parasitol 1996; 34: 35-47.
42. Yong TS, Lee JS, Lee IY, Park SJ, Park GM, Ree HI, et al. Identification of *Chironomus kiiensis* allergens, a dominant species of non-biting midges in Korea. Korean J Parasitol 1999; 37: 171-9.
43. Chu KH, Wong SH, Leung PSC. Tropomyosin is the major allergen:

Reverse transcription polymerase chain reaction, expression and reactivity. Mar Biotechnol 2000; 2: 499-509.

44. Asturias JA, Arilla MC, Goméz-Bayón N, Martínez A, Martínez J, Palacios R. Sequencing and high level expression in *Escherichia coli* of the tropomyosin allergen (Der p 10) from *Dermatophagoides pteronyssinus*. Biochim Biophys Acta 1998; 1397: 27-30.
45. Asturias JA, Arilla MC, Goméz-Bayón N, Arilla MC, Martínez A, Palacios R, et al. Molecular characterization of American cockroach tropomyosin (*Periplaneta americana* allergen 7), a cross-reactive allergen. J Immunol 1999; 162: 4342-8.
46. Santos ABR, Chapman MD, Aalberse RC, Vailes LD, Ferriani VPL, Oliver C, et al. Cockroach allergens and asthma in Brazil: Identification of tropomyosin as a major allergen with potential cross-reactivity with mite and shrimp allergen. J Allergy Clin Immunol 1999; 104: 329-37.
47. Reese G, Ayuso R, Lehrer SB. Tropomyosin: an invertebrate pan-allergen, Int Arch Allergy Immunol 1999; 119: 247-58.

Abstract

Cloning of major allergen of *Chironomus kiiensis*, a dominant species of non-biting midges in Korea

Hye-yung Yum

Brain Korea 21 Project for Medical Sciences
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dong Soo Kim)

Non-biting midges are one of the major insect families, which are distributed worldwide. They are known to contain potent inhalant allergens. To identify and characterize the major allergen of *Chironomus kiiensis*, which is widely distributed in Korea, crude extracts from adult *C. kiiensis* were immunized to mice and anti-sera were obtained. Skin prick test with crude extracts was performed on atopic patients. The sera of 21 patients who showed positive reaction to *C. kiiensis* were used in this study. The cloning of *C. kiiensis* has been achieved and then immunoscreening with the antisera was implemented. Recombinant protein was produced in *E. coli* and specific IgE response with the patient sera and cross-antigenicity with other arthropods were checked. As the result of cDNA library production from *C. kiiensis* adults and immunoscreening with mouse antisera, the antigen had an open frame of coding for 285 aminoacids, molecular weight and PI were 32,532Da and 4.58, respectively. This protein showed high homology with other arthropod tropomyosins, especially with *Drosophila melanogaster* and *Periplaneta americana*. The recombinant antigen showed specific IgE reactivity in 75% of skin test positive patients. This study confirmed cross activity with invertebrate animal crude extracts by mouse antisera to the recombinant protein.

Key Words: *Chironomus kiiensis*, major allergen, cloning, tropomyosin