

한국산 집먼지진드기 주알레르겐의 분리 및 합성

연세대학교 의과대학 생화학·분자생물학교실 유전과학 연구소,

내과학교실**, 관동대학교 의과대학 생화학교실*

김경섭·박상욱*·박중원**·홍천수**·오상환

Purification of the major allergens from Korean Dermatophagoides pteronyssinus and production of the recombinant antigens

Kyung Sup Kim, Sahng Wook Park*, Jung Won Park**,

Chein Soo Hong**, and Sang Hwan Oh,

*Department of Biochemistry & Molecular Biology, Internal Medicine**,*

College of Medicine, Yonsei University, Department of Biochemistry,*

College of Medicine, Kwandong University

Background : Purified major allergens of house dust mite are essential for evaluation of the allergic mechanism in molecular basis and development of new modalities of immunomodulation.

Objective : In this study, we aimed to purify group 1 and group 2 allergens from Dermatophagoides pteronyssinus (Dp). In addition, cDNAs corresponding to Der pI and II in Korean Dp were isolated and recombinant Der pI and Der pII were synthesized.

Materials and method : Der pI allergen was purified by ammonium sulfate precipitation, anion-exchange column chromatography, and gel filtration chromatography. Der pII allergen was purified by anion exchange chromatography, gel filtration chromatography, and a preparative isoelectric focusing method.

Results : Eight hundred μg of Der pI and 50 μg of Der pII were obtained from 100 g of culture medium and 1 g of mite bodies, respectively. The purities of these allergens were confirmed by SDS-PAGE and the strong reactivity to the patient sera was identified. In order to produce a recombinant allergens, poly(A) RNA from house dust mites were isolated and used for cDNA synthesis by RT-PCR. The cDNA was inserted into prokaryotic expression vector and the vectors were transformed into *E. coli*. A little amount of recombinant Der pI protein was produced due to the low solubility, and 1.2 mg of recombinant Der pII was produced from 1 L of *E. coli* culture medium. The antigenicity of Der pI was relatively weak, however, Der pII showed a strong antigenicity. Amino acid sequence of the amplified cDNA deduced from DNA sequences of Der pII showed 6 different variants. The variation of amino acid sequences suggests the possibility of high incidence of mutation of Der pII protein.

Conclusion : A simplified method for the purification of Der pI and Der pII was developed.

본 연구과제는 한국과학재단의 목적기초(KOSEF 과제번호 93-04-0015-02) 연구과제의 일환으로 수행되었음.

통신저자 : 연세의대 생화학·분자생물학교실 김경섭

Recombinant allergens will be useful for the diagnosis and treatment of allergy with lower costs.

Key words : house dust mite, *Dermatophagoides pteronyssinus*, recombinant protein allergen, purification

시 론

우리나라의 많은 호흡기 알레르기 질환 환자에서도 집먼지진드기 항원에 대한 피부반응 검사 양성을 나타내며¹⁻⁷⁾, 이들 집먼지 진드기의 생태 조사 결과 우리나라 집먼지 중에 *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp)와 *dermatophagoides farinae*가 많은 양으로 검출된다고 보고된 바 있다. 이들 집먼지진드기 알레르겐으로 최고 30여 개의 항원이 보고되어 있다^{8,9)}. 이러한 다양한 종류의 알레르겐 중에 두 가지, 즉 group I(Der pI, Der fI)과 group II(Der pII, Der fII)는 주요 알레르겐으로서 cDNA의 cloning 및 염기 서열이 밝혀졌으며¹⁰⁻¹²⁾, group I 알레르겐은 cysteine protease으로¹³⁾ 그리고 group II 알레르겐은 생식기계통에서 분비되는 물질로 추정되고 있다¹⁴⁾.

최근 알레르기 질환의 기전에 대한 연구는 분자단위에서 이루어지고 있고, 이를 위해서는 주 알레르겐의 순수 분리 혹은 유전자재조합 공법에 의한 주알레르겐의 생산이 필수적이며, 일부연구자의 경우에는 알레르기 질환의 진단에 활용하고자 하는 시도가 있다. 따라서 분자생물학적 단계에서의 집먼지진드기 알레르기의 기전 연구와 효과적이고 신뢰성 있는 진단 및 치료법의 개발을 위해서는 좋은 역가의 주알레르겐의 확보가 선행되어야 한다.

본 실험에서는 우리나라산 집먼지진드기에서 주된 알레르겐을 분석하고 집먼지진드기 항원중 현재까지 잘알려진 group I, II에 해당되는 단백질을 비교적 간단한 실험 방법으로 분리하고자 하였다. 또한 우리나라산 집먼지진드기의 group I과 group II 항원에 대한 cDNA를 분리하고

유전자재조합공법에 의해서 group I 및 II 알레르겐을 생산하고자 하였다.

재료 및 방법

1. Der pI 알레르겐의 분리

Der pI은 연세대학교 의과대학 기생충학교실에서 사육한 Dp에서 분리하였다. 먼저 Dp 총체와 배지가 섞여 있는 혼합체 100g을 1L의 borate buffer, pH 8.0을 넣어 부유되는 총체를 제거하였다. 이 용액을 하룻밤동안 진탕하고 용해되지 않는 고형물질을 원심분리하여 제거하였다. 이 용액에 ammonium sulfate를 첨가하여 50% 포화용액으로 만들어 침전물을 얻었다. 이 침전물을 50ml의 완충용액에 다시 녹인 후 50mM borate buffer, pH 8.0으로 하룻밤동안 투석하였다. 투석된 시료는 DEAE-Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotec, Uppsala, Sweden) ion exchange column chromatography를 시행하여 NaCl 농도가 100mM과 200mM에서 두개의 분획을 모았다. 200mM NaCl 분획은 투석한 후 Sephadex G75 gel filtration을 시행하였다. 유출된 각각의 분획은 280nm에서의 흡광도를 측정 한 후 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)을 시행하고 Coomassie brilliant blue로 염색하였으며 western blotting을 시행하였다.

2. Der pII 알레르겐의 분리

집먼지진드기 총체 1g을 동결시킨 후 액체질소를 첨가하여 막자사발에서 분쇄한 후 100ml의 50mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액에 부유시켰다. 다시 polytron homogenizer(Omni In-

ternational, CT, USA)를 사용하여 최고 속도에서 1분간씩 2차례 균질화하였다. 4도에서 3일간 진탕한 후 고형물질을 원심분리하여 제거하였다. 상층액을 YM10 disc membrane(Amicon, MA, USA)을 사용하여 ultrafiltration을 시행하여 용량을 10ml로 줄인 후 50mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 투석하였다. 투석한 시료를 동일한 완충용액으로 평형시킨 DEAE-Seph-
arose CL-6B column에 가하고 column에 결합하지 않고 유출되는 분획을 모아 50mM Tris-HCl, pH 8.0, 50mM NaCl 완충용액으로 투석한 후 Sephacryl S-100 gel filtration을 시행하였다. 환자의 혈청과 반응하는 분자량 15kDa 크기의 band가 유출되는 분획을 모아 증류수로 투석한 후 Rotofor cell(BioRad, CA, USA)을 사용하여 isoelectric focusing을 시행하였다. 분리된 분획은 26mM Tris-HCl, 190mM glycine 완충용액으로 투석한 후 SDS-PAGE를 시행하였다.

3. 분리한 알레르겐의 western blotting 실험

각각의 분획을 SDS-PAGE 시행한 후 gel을 20% methanol, 25mM Tris-HCl, 190mM glycine 완충용액에 수분간 평형시키고 nitrocellulose membrane에 300mA로 전이하였다. Western blotting에 사용한 일차 항체로는 연세의료원 알레르기 클리닉에 내원한 환자중 집먼지진드기 항원에 대한 피부반응검사에 3⁺ 이상의 양성 반응을 보인 20명의 환자의 혈청을 TBST 완충용액(25mM Tris-HCl, pH 8.0, 140mM NaCl, 2.7mM KCl)으로 200배 희석한 후 사용하였다. 일차 항체와의 결합 반응은 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 충분한 양의 TBST 완충용액으로 5분간 4차례 세척한 후 이차 항체와 결합시켰다. 이차항체는 anti-human IgE-peroxidase conjugate(Sigma Chemical, MO, USA)를 TBST 완충용액(25mM Tris-HCl, pH 8.0, 140mM NaCl, 2.7mM KCl)으로 200

배 희석한 후 상온에서 1시간동안 결합시켰으며 일차항체의 경우와 동일하게 세척한 후 ECL kit (Amersham International, UK)를 사용하여 X-ray film에 노출시켜 signal을 관찰하였다.

4. Der pI 및 Der pII cDNA의 합성

집먼지진드기로부터 poly(A) RNA를 분리하여 역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction: RT-PCR)을 시행하여 Der pI 및 Der pII의 cDNA를 합성하였다. PCR에 사용한 primer는 Der pI의 경우 5'ACTGGATCCTGCAGTATCAA3' 및 5'AGAGGTCGACAACATATGGA3'¹⁰⁾이었으며 Der pII의 경우 5'CGGAATTCAGTCGATGTCAA3' 및 5'GATGTCGACATGAGTAGCAA 3'¹²⁾이었다. 이들 primer의 일부 염기서열은 vector로의 삽입을 용이하게 하기 위하여 제한효소 절단부위의 염기서열로 변환된 부위를 함유하도록 고안하였다. 중폭합성한 cDNA는 pGEM-4Z plasmid vector(Promega Biotec, WI, USA)에 삽입하고 T7 DNA sequencing kit(Pharmacia)를 사용하여 염기서열을 결정하였다.

5. 재조합 Der pI 및 Der pII 알레르겐의 합성

합성된 Der pI 및 Der pII cDNA를 pGEX-4T3 vector(Pharmacia) 및 pET21a vector(Novagen, WI, USA)의 multiple-cloning site에 codon 배열을 맞추어 삽입하여 각각 glutathione S-transferase(GST)와 결합된 융합 단백질(GST-DpI 및 GST-DpII) 및 6개의 연속된 histidine이 결합된 융합 단백질(His-DpI 및 His-DpII)이 발현되도록 다시 삽입하였다. 융합 단백질이 용해된 상태로 발현되도록 배양 조건을 결정하였다. pGEX-4T3 vector에 삽입된 경우 glutathione-agarose column(Pharmacia)를 사용하였으며 pET21a vector에 삽입된

경우 Ni^{2+} -NTA agrose bead(Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하였다. 분리된 GST-DpII 용합 단백질은 thrombin을 처리하여 GST가 제거된 재조합 Der pII 단백질 부위만을 순수정제하였다.

결 과

1. Der pI 항원 분리

집먼지진드기의 알레르겐의 분리 정제 중 Der pI은 배양 배지에서 분리할 때 분리과정이 쉽고 수확률이 높았으며, Der pII는 집먼지 총체로부터 추출한 단백질 용액내에 많이 존재하기 때문에 총체로부터 분리하였다.

집먼지진드기의 배지 100 g을 1L의 완충용액으로 추출한 후 salting-out하여 얻은 침전물을 동일한 완충용액으로 용해시켜 전기영동을 한 결과 분자량 65, 30, 28 및 23kDa의 주된 단백질 band와 그외에 다양한 크기의 여러 단백질들이 관찰되었다. 이 용액을 50mM borate buffer로 투석한 후 DEAE ion exchange chromatography를 시행한 결과 NaCl 농도 100mM과 200mM에서 두개의 분획을 얻었다. 100mM NaCl 분획에는 300kDa와 18kDa이하의 여러 단백질 band가 관찰되었으며, 200mM NaCl fraction에는 65, 28, 23kDa 및 18kDa 이하의 여러 단백질이 관찰되었다. 200mM NaCl fraction은 다시 Sephadex G-75 gel filtration을 시행한 결과 65 kDa와 23kDa 단백질이 먼저 용출되어 나왔으며, 후에 28kDa 단백질이 용출되었다(Fig. 1). 28kDa 단백질은 완전히 순수 분리되어 100g의 배지로부터 0.8mg이 분리되었으며 이 단백질은 환자의 IgE와 잘 반응하였으며, Der pI항원에 대한 단클론항체와도 잘 반응하였다.

2. Der pII 항원 분리

DP 배양 배지로부터 추출한 용액에는 Der

pII에 해당하는 단백질이 소량밖에는 없어서 DP 총체에서 분리하고자 하였다. 50mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액에 추출한 총체시료를 DEAE-Sephrose CL-6B를 사용하여 ion-exchange chromatography를 시행한 결과 column에 결합하지 않고 유출되는 분획에 분자량 15kDa의 주된 단백질이 western blotting 실험에서 관찰되었다(Fig. 2). 단백질 염색상 이 위치에는 여러 가지 진한 band가 존재하였으나(Fig. 2 B) western blotting 결과에서 나타난 15kDa 크기

Fig 1. Isolation of Der p I by gel filtration chromatography. Panel A shows the elution profile of Sephadex G-75 coulumn chromatography(1.5×100cm). The sample applied were the eluated at 200 mM NaCl from DEAE-Sephrose CL-6B. The fractions showing the peak absorbance were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (B). The lane E and M represent the applied eluate from ion-exchange chromatography and molecular weight marker, respectively. The numbers on the lanes denotes the fraction numbers.

의 band는 매우 적은 양으로 존재하는 band로 추정되었다(Fig. 2 C). 또한 이 분획에는 50, 30 및 20 kDa 등 여러가지 크기의 단백질이 환자의 혈청과 반응하였다. 주된 15kDa 크기의 band가 함유된 유출액을 Sephacryl S-100 gel filtration chromatography를 시행한 결과 분자량 50, 30 및 20kDa 크기의 band가 제거된

15kDa 크기의 band가 주로 존재하는 분획을 얻을 수 있었다(Fig. 3 B). 이 분획은 거의 대부분 15 kDa 크기의 단백질을 함유하고 있었으며 환자의 혈청과 가장 강하게 반응하였다 (Fig. 3 C). 또한 33kDa와 20kDa 크기의 단백질도 적은 양으로 함유하고 있었다. 이 분획을 증류수로 투석한 후 preparative isoelectric focusing을 시행한 결과 pH 7에서 9 사이의 분획에서 순수

Fig 2. Isolation of Der p II by ion-exchange chromatography. (A) Anion-exchange chromatography of crude homogenate of Der p on DEAE-sepharose CL-6B column(column volume 10 ml) equilibrated with 20 mM Tris-HCl, pH 7.6 and 10 mM NaCl. The fractions(4ml ea) eluted unretarded and eluted at 100, 200 and 300mM of NaCl was pooled and analyzed on 15% SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue(B). Lane M indicates the molecular weight marker(105, 82, 49, 33, 3, 28, 6, 19, 4kDa from the top) and Lane Unretarded contains the unretarded flow-through of sample, Lane 0.1M, 0.2M, 0.3M indicate the peak fraction eluted at 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M of NaCl, respectively. The separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane and immunostained with pooled allergic patients serum and peroxidase conjugated anti-IgE polyclonal antibody as described in the "Methods"(C).

Fig 3. Isolation of Der p II by gel filtration chromatography. Panel A shows the elution profile of Sephadex G-75 column chromatography(1.5×100cm). The sample applied were the unretarded eluate DEAE-Sephacryl S-100. The fractions(numbers on the top of the lanes) showing the peak absorbance were analysed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and stained with Coomassie Brilliant Blue(B). After electrophoresis the proteins were electroblotted on to the nitrocellulose membrane and immunostained with pooled allergic patient's serum and peroxidase conjugated anti-IgE polyclonal antibody. The lane M represents molecular weight marker. After The numbers on the lanes denotes the fraction numbers.

한 15kDa 크기의 단백질을 얻을 수 있었다 (Fig. 4 A). 이 15 kDa 크기의 단백질은 양은 매우 적었으나 환자의 혈청과는 매우 강하게 반응하고 있었다(Fig. 4 B). 총 1g의 총체로부터 약 50 μ g의 Der pII를 얻을 수 있었다.

3. 재조합 Der pI 알레르겐 합성

Chua 등¹⁰⁾이 발표한 cDNA 염기서열을 기초로 RT-PCR 방법으로 coding region의 cDNA를 증폭하였으며(Fig. 5.), 그 결과 Der pI cDNA는 약 660bp 크기인 cDNA가 합성된 결과를 얻었다. 이들 증폭된 cDNA는 pGEM-4Z vector에 subcloning한 후 염기서열을 결정하여 확인하여 정확하게 올바른 cDNA가 합성되었는지를 확인하였다.

Der pI cDNA는 다시 pGEX-4T3 plasmid에 삽입하여 GST-융합 단백질 *E.coli*에서 합성하였다. 여러 조건에서 융합 단백질을 발현시켰

Fig 5. Amplification of cDNA of Der pI and Der pII. The cDNA was synthesized by RT-PCR using poly(A) RNA isolated from *D. pteronyssinus* as the template. The Der pI cDNA (667 bp) and Der pII cDNA (384 bp) were amplified, using the respective primer sets. The amplified products were subjected to electrophoresis on 1% agarose gel and visualized by staining with ethidium bromide. Lane 1, M, and 2 indicate the amplified cDNA of Der pI, 1 kb size marker, cDNA of Der pII.

Fig 4. Isolation of Der pII by preparative isoelectric focusing. Panel A show the SDS-PAGE of mite homogenate(lane 1), unretarded eluate from DEAE-Sephrose(lane 2), fraction of pH between 5 and 6 after isoelectric focusing(lane 3), and fraction of pH between 7 and 8(lane 4). Lane M indicates the molecular weight size marker. After electrophoresis the proteins were electroblotted onto nitrocellulose membrane and immunostained with pooled allergic patients serum and peroxidase conjugated anti-IgE polyclonal antibody. The lane M represents molecular weight marker. After The numbers on the lanes denotes the fraction numbers.

Fig 6. Purification of GST-DpI fusion protein. Inclusion body(lane 1) was isolated from *E. coli* transfected with pGEX4T3 containing DpI cDNA. The fusion protein was isolated from inclusion body with electroelution(lane 3 and 3). The protein was subjected to electrophoresis on SDS polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Lane M contains the molecular weight marker, The size of molecular marker was indicated on the left of the lane M.

으나, 수용성(soluble) 단백질로 발현되지 못하고 inclusion body로 발현되었다(Fig. 6). 따라서 inclusion body로 융합 단백질을 분리하여, 8M urea로 용해시킨뒤 renaturation을 시켰다. 용해된 형태의 융합 단백질은 DEAE anion exchange를 거쳤다. 그러나 융합 단백질이 Der p I 항원성을 회복하는데는 100mM Tris-HCl, pH 8.0 용액에 용해된 상태에서 적어도 이틀 이상 걸렸다. GST-DpI 융합 단백질을 분리하는 과정에서 단백질 용해의 어려움이 있었기 때문에 pET21a vector에 삽입한 후 6개의 histidine이 C-말단에 존재하는 재조합 단백질을 *E. coli*에서 합성한 후 세포용해액(cell lysate)을 니켈(Ni^{2+})을 함유한 affinity column에 결합시킨 후 유출한 결과 histidine이 결합된 재조합 Der p I이

Fig 7. Purification of GST-DpII fusion protein. A. Solubilized lysate of *E. coli* (lane 1) was isolated from *E. coli* transfected with pGEX4T3 containing Der p II cDNA. The fusion protein(lane 2) was isolated from solubilized lysate with glutathione-agarose bead. The recombinant Der p II (lane 3) was isolated from GST-DpII fusion protein by digestion with thrombin. The protein was subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Lane M contains the molecular weight marker. The size of molecular marker was indicated on the left side of the lane M. Panel B. shows the western blotting of the fusion protein with pooled allergic patients' serum.

Fig 8. Purification of recombinant Derp I
The six-histidine tagged Dpl was purified from the lysate (lane 1) of JM 109(DE3) transfected with pET21a containing Dpl cDNA, using Ni-NTA agarose beads. The protein was subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, 2, 3, and 4 contain the crude lysate, lysate passing through the column, eluate at pH 6.3, and eluate at pH 5.9, respectively. Lane 5 and 6 contains 1 and 2 μ l after eluate at pH 4.3

Fig 9. Purification of recombinant Der p II
The six-histidine tagged DpII was purified from the lysate(lane 1) of JM 109(DE3) transfected with pET21a containing DpII cDNA, using Ni-NTA agarose beads. The protein was subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel and stained with Coomassie brilliant blue. Lane 1, 2, 3, and 4 contain the crude lysate, lysate passing through the column, eluate at pH 6.3, and eluate at pH 5.9, respectively. Lane 5 and 6 contains 1 and 2 μ l of the eluate at pH 4.3, Lane M indicates the molecular weight marker.

pH 4.5에서 pH 6.3 사이에서 용이하게 유출되었다(Fig. 8).

4. 재조합 Der pII 알레르겐 합성

Chua 등¹²⁾이 발표한 cDNA 염기서열을 기초로 RT-PCR 방법으로 Der pII coding region의 400bp의 cDNA를 증폭 합성하였다(Fig. 5). 이 cDNA를 pGEM-4Z plasmid에 삽입하여 11개의 subclone의 염기서열을 결정하여, 아미노산 서열을 비교한 결과 11개중 6종류의 subclone이 아미노산 서열에 차이가 있었다(Fig. 10).

Der pII cDNA 역시 pGEX-4T3 expression vector에 다시 codon 배열이 맞도록 삽입하여 GST-DpII 융합 단백질을 *E.coli*에서 합성하였다. 융합 단백질이 용해된 형태로 발현되도록 조건을 맞춘 결과 2% glucose, 10% glycerol이 함유된 terrific broth로 30°C에서 4시간 발현시켰을때 가장 높은 수확을 얻을 수 있었다. 이 융합 단백질은 glutathione Sepharose 4B

로서 쉽게 분리할 수 있었으며, 그 분자량은 42kDa이었다(Fig 7). 다시 이를 thrombin으로 처리하여 GST와 Der pII 단백질을 절단하고 GST를 제거한 결과 15 kDa의 Der pII 만을 순수 분리할 수 있었다. 이 분리된 재조합 Der pII 단백질은 환자의 IgE와 잘 반응을 하였다(Fig. 7). 수확율은 1 L 박테리아 배양에서 약 1.2mg의 재조합 Der pII를 얻을 수 있었다. GST-DpII의 경우 GST-DpI과 같은 용해도의 문제는 해결하였으나 보다 용이한 단백질 분리를 위하여 pET21a vector에도 cDNA를 삽입하여 histidine이 결합된 재조합 단백질을 합성하고 His-DpI과 동일한 방법으로 재조합 His-Der pII를 분리할 수 있었다(Fig. 9). Histidine이 C-말단에 결합된 재조합 Der pII도 pH 4.5에서 pH 6.3 사이에서 Ni²⁺-NTA agarose로부터 용이하게 유출되었다.

고 찰

지금까지 여러 연구자에 의해서 집먼지진드기

	10	20	30	40	50	60	70
	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *
	DQVDVKDCAN	HEIKKVLVPG	CHGSEPCIIH	RGKPFQLEAV	FEANQNTKTA	KIEIKASIDG	LEVDVPGIDP
1.S...>
2.T....>
3.LS...>
4.LS...>
5.LS...>
6.T....Y....>
	80	90	100	110	120	129	
	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* * * *	* *	
	NACHYMKDPL	VKGQQYDIKY	TWNPVKIAPK	SENVVVTVKV	MGDDGVLACA	IATHAKIRD	
1.	L..N.....	
2.	
3.	L.....	
4.	L..N.....	
5.S.....	L..N.....	
6.>	

Table 10. Polymorphism of Der pII cDNA. Der pII cDNA were generated from Der pII mRNA by RT-PCR. The translated sequences were aligned for comparison with that reported by Chua et al(1990). The top line is used as a prototype and alteration in the lower line were indicated by the capital letter representing the amino acids. The dots represent the same amino acid.

의 주요 알레르겐을 분리하는 방법이 보고되었으나 그 방법이 매우 복잡하고 오랜 시간을 필요로 하여 진보된 분자생물학 분야의 실험실이 아니면 대량의 알레르겐을 분리하기에는 현실적으로 불가능한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 보다 간단하게 집먼지진드기의 주요 알레르겐을 분리하는 방법을 고안하고자 하였다.

기존의 분리방법은 Yasueda 등¹⁵⁾의 방법과 Kabasawa 및 Ishii¹⁶⁾가 고안한 방법[일반적]으로 적용되고 있다. Kabasawa 및 Ishii¹⁶⁾가 고안한 방법은 gel filtration chromatography를 가장 먼저 시행하고 anion exchange 및 cation exchange chromatography를 연속적으로 시행한 후 isoelectric focusing을 시행하였다. 이러한 방법의 수행은 본연구에서 시행한 방법보다 한단계 부가적인 ion exchange chromatography를 시행하여야 하며 gel filtration 및 anion exchange chromatography의 시행 순서가 바뀌어 있는 차이점이 있다. 또한 비교적 시행방법의 유사성이 있으나 최종적으로 보고된 단백질의 순도를 가지적으로 보여주지 못하였으며 전기영동의 결과에서 최소 7가지 이상의 알레르겐이 함유되어 있었다. 분석적 isoelectric focusing 방법으로는 대량의 항원 분리가 불가능한 면이 있다. 또한 이들은 단백질 분리의 수율(yield) 혹은 분리배율(purification fold) 등을 전혀 보고하지 않아 어느 정도 효과적인 분리방법인지 보고 하지 못하였다. Yasueda 등²²⁾이 보고한 분리과정은 순수한 형태의 알레르겐을 분리하는 목적에 부합하는 방법이나 집먼지진드기 균등액을 처음 과정에서 ammonium sulfate로 침전시키는 두단계의 과정이 필요하며 두차례에 걸친 cation exchange chromatography의 시행이 필요하여 본 연구에서 시행한 방법보다 매우 복잡한 과정을 거쳐야 한다. 본 연구에서는 Der pI 과 Der pII 알레르겐을 분리시작단계에서 시료의 선택을 달리함으로써 보다 간단하고 효율이

높은 방법을 고안하고자 하였다.

Der pI 알레르겐의 경우 Dp 총체보다 배지에 더욱 많이 존재하고 있을 것으로 사료되어 총체를 제거한 배지를 분리하고자 하는 시료로 선택하였다. 총체를 제거하지 않고 분리과정을 시작할 경우 총체내의 매우 많은 단백질 성분이 순수 분리에 어려움을 주었다. 그러나 배지내의 여러 가지 영양성분을 제거하기 위하여 ammonium sulfate로 50% 포화용액을 만드는 과정을 거치는 것이 필요하였다. 이 과정을 거치지 않았을 경우 집먼지진드기로부터 유래된 단백질보다 배지에 포함되어 있는 여러가지 성분이 과다하게 많았기 때문에 분리의 어려움이 예상되었다. 50% ammonium sulfate로 침전시킨 후 침전물을 동일한 완충 용액으로 용해시켜 전기영동을 시행한 결과 분자량 65, 30, 28 그리고 23 kDa 크기의 주된 4가지 종류의 단백질 band와 여러 가지 다양한 크기의 단백질 band들이 관찰되었다. 이 용액을 DEAE-Sephrose ion-exchange chromatography를 한단계 거칠 경우 세척단계와 100mM NaCl로 유출되는 분획에서 다량의 다른 단백질이 제거되었으며 200mM NaCl로 유출되는 분획에서 분자량 65, 28 그리고 23kDa 크기의 주된 3가지 종류의 단백질 band를 관찰할 수 있었다. 200mM로 용출된 분획을 농축한 후 Sephadex G75 gel filtration을 시행한 결과 65kDa 및 23kDa 크기의 단백질이 먼저 유출되었으며 23kDa 크기의 단백질이 늦게 용출되었다. 23kDa 크기의 단백질이 28kDa 크기의 단백질보다 먼저 용출된 이유는 설명할 수 없으나 아마도 65kDa 크기의 단백질과 결합하거나 affinity를 갖는 단백질이기 때문일 것으로 사료된다. 이 단계에서 나타난 65kDa 및 23kDa 크기의 단백질도 환자의 혈청과 잘 반응하였기 때문에 이들을 순수 분리하여 그 성상을 밝히는 과정을 추가적으로 고안하고 있다. 28kDa 크기의 단백질은 순수분리되어 100g의 배지로부터 0.

8mg의 항원을 분리할 수 있었다. 이 단백질은 환자의 IgE와 잘 반응하였으며 Der pI에 대한 단클론 항체와도 잘 반응하였다.

Der pII 알레르겐의 경우 배지로부터 추출한 용액에는 Der pII에 해당하는 단백질이 소량밖에 존재하지 않으므로 집먼지진드기 총체에서 분리하고자 하였다. Der pII를 분리하는 경우 일반적인 방법인 ammonium sulfate를 이용한 salting-out 과정을 시행하지 않고 직접 ion-exchange chromatography를 시행하였다. Ammonium sulfate 침전을 시행하지 않은 이유는 Der pII를 침전시키기 위하여 ammonium sulfate 포화농도를 약 90%까지 올려도 침전율이 비교적 낮아 분리과정의 손실이 발생하였기 때문이다. 50mM Tris-HCl, pH 8.0 완충용액으로 평형시킨 DEAE-Sepharose column에 총체 균등액을 가한 경우 Der pII는 column에 결합하지 못하고 용출되었다. 이 분획에는 15kDa 크기의 주된 단백질 band가 관찰되었고 분자량 30 및 50kDa 크기의 band가 비교적 환자의 혈청과 강한 반응을 나타냈으며 약한 반응을 보이는 여러 가지 밴드가 관찰되었다. 이 분획을 농축한 후 Sephacryl S-100 gel filtration chromatography를 시행한 결과 가장 먼저 50 kDa 크기의 환자 혈청과 반응하는 단백질 띠가 유출되었으며(분획 12) 30 kDa 크기의 단백질 띠가 유출되었다(분획 24). 가장 늦게 15 kDa 크기의 가장 반응성이 높은 단백질 띠가 유출되었다(분획 34-40). 15 kDa 크기의 단백질 띠는 환자의 혈청과 약하게 반응하는 분자량 약 30 kDa 크기의 단백질 띠와 함께 유출되었으며 이 30 kDa 크기의 단백질은 분획 24에서 유출되었던 단백질과는 다른 별개의 단백질로 사료된다. 또한 분획 34에서 분획 40까지의 유출액에는 단백질 염색상에서는 비교적 순수한 형태로 보였으나 최소한 2가지 이상의 단백질이 섞여 있을 것으로 사료되어 preparative isoelectric

focusing을 시행하였다. 그 결과 pH7에서 9사이에서 환자의 혈청과 가장 강하게 반응하는 15kDa 크기의 단백질(Der pII)이 관찰되었다. 단백질 염색상에서는 pH 5에서 6사이에서 15kDa 크기의 단백질 띠가 더 많이 존재하고 있었으나 western blotting 상에서는 거의 환자의 혈청과 반응하지 않았으며 pH7에서 9사이의 단백질 띠는 양적으로는 극히 적은 양이었으나 환자의 혈청과는 가장 강하게 반응함을 나타내었다. 따라서 gel filtration 결과로 얻은 분획 34에서 40까지의 단백질은 양적인 고려를 할 경우 15kDa 크기의 최소한 두 가지 이상의 단백질이 섞여 있었음을 추정할 수 있었다. 또한 gel filtration chromatography에서 15kDa 크기의 단백질과 함께 유출되었던 반응성이 비교적 약한 30 kDa 크기의 단백질(분획 40)은 pH 5에서 6사이의 분획에서 분리되었다. 총 1g의 총체로부터 약 50 μ g의 Der pII 단백질을 얻을 수 있었으며 총체의 양을 증가시켜 대량의 단백질을 분리할 수 있을 것으로 사료된다. 분리된 Der pII는 순수한 형태로서 10 μ g의 단백질을 SDS-PAGE 전기영동을 시행하였을 경우 다른 단백질을 관찰할 수 없었다. 이러한 Der pI 및 Der pII 단백질을 순수하게 분리하는 방법은 기존의 알레르겐을 분리하는 방법보다 최소한 두 단계 이상의 분리과정을 제거함으로써 보다 신속하고 간단한 방법으로 집먼지진드기의 알레르겐을 분리하는 방법으로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 배지나 총체로부터의 알레르겐 분리는 총체를 배양하는 시설 및 기술을 필수적으로 필요로 한다. 따라서 배지 혹은 총체로부터 알레르겐을 분리하지 않고 시험관내에서 재조합 Der pI 및 재조합 Der pII를 합성하는 방안을 고안하고자 하였다. RT-PCR 방법으로 Der pI 및 Der pII cDNA를 합성한 후 이를 prokaryotic expression vector인 pGEX-4T3 plasmid에 삽

입하여 GST 융합 단백질을 *E.coli* 에서 합성하였다. 그러나 GST-DpI의 경우 여러 조건에서 융합 단백질을 발현시켰으나, 수용성 단백질 형태로 발현되지 못하고 inclusion body로 발현되었다. 따라서 inclusion body의 형태로 융합 단백질을 분리하여, 8M urea로 용해시킨 뒤 renaturation을 시켰다. 용해된 형태의 융합 단백질은 DEAE anion exchange를 거친 후 장시간의 renaturation 과정을 거쳤다. 그러나 융합 단백질이 Der pI 항원성을 회복하는데는 100mM Tris-HCl, pH 8.0 용액에 용해된 상태에서 적어도 이틀 이상 소요되는 문제점이 있었으며 합성된 재조합 알레르겐은 환자 혈청과 반응성이 총체로부터 분리한 Der pI보다 떨어지는 경향이 있었다. 이러한 GST 융합 단백질을 분리하는 과정에 어려움이 있었기 때문에 6개의 histidine이 C-말단에 존재하는 pET21a vector에 삽입한 후 재조합 단백질을 *E. coli*에서 합성한 후 세포용해액 (cell lysate)을 니켈 (Ni^{2+})을 함유한 affinity column에 결합시킨 후 유출하여 분리하였다. Histidine이 결합된 재조합 Der pI 및 Der pII 모두 pH 4.5에서 pH 6.3 사이에서 용이하게 유출되었다. Der pII에 대한 재조합 단백질은 GST 융합 단백질의 경우에도 비교적 용이하게 분리할 수 있었으며 방법의 비교를 위하여 histidine이 결합된 형태로도 합성하여 분리할 수 있었다. 이러한 재조합 단백질의 항원성은 재조합 Der pII의 경우 매우 강하여 집먼지진드기 총체로부터 분리한 Der pII와 유사한 것으로 밝혀졌으나 재조합 Der pI의 경우 항원성이 매우 낮은 것으로 연구되었다. 이러한 결과는 재조합 단백질이 전핵세포인 *E. coli* 내에서 합성된 후 유핵세포에서와 같이 단백질의 posttranslational modification과정 즉 glycosylation 등의 과정이 일어나지 못하였거나 합성된 단백질의 3차구조가 완전히 이루어지지 못하였기 때문일 것으로 사료된다. 따라서 본 연구에 이어 Der pI

및 Der pII cDNA를 eukaryotic expression vector에 삽입하여 단백질을 합성하는 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

재조합 단백질을 합성하기 위하여 증폭한 cDNA의 염기서열을 결정된 결과 Der pII cDNA의 염기서열은 한가지 종류가 아니고 여러 가지 종류가 존재하고 있었다. 이러한 사실은 Der pII의 경우 유전자의 돌연변이가 잘 일어나기 때문일 수 있으며 이러한 돌연변이를 통하여 항원성의 어떠한 변화가 일어나는 연구를 지속적으로 수행하고 있다. 또한 이러한 다양한 종류의 Der pII가 우리나라 집먼지진드기에서 발현되는 Der pII 알레르겐이 외국산 진드기의 Der pII와의 차이점이 있는지 밝혀야 할 것으로 사료된다.

결론

이상의 결과로 본 연구팀이 고안한 집먼지진드기 항원인 Der pI 및 Der pII의 순수 분리 과정은 기존의 분리방법보다 간단하게 수행할 수 있고 보다 대량의 항원을 분리하는데 기여할 것으로 사료된다. 또한 유전자 재조합 공법으로 Der pI 및 Der pII 알레르겐을 생합성하였으며, 이를 통해 용이하게, 경제적으로 주알레르겐 획득이 가능할 것으로 판단되며, 추후 재조합 알레르겐의 임상적 활용에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) 조성숙, 이혜란, 석정우, 문성호, 손근찬: 소아 알레르기성 질환의 피부반응 검사에 관한 연구. 알레르기 1:83-97, 1981
- 2) 강석영, 최병희, 문희범, 민경업, 김유영: 한국인 호흡기 알레르기 환자에 있어서 피부시험 성적에 관한 연구. 알레르기 4:49-56, 1984
- 3) 조현숙, 이관호, 최연극, 조동규, 김능수: 제1형 과민반응 질환에서의 피부시험 성적. 알레르기 5: 12-22, 1985
- 4) 황순열, 김인숙, 정구석, 김성원, 김길현: 부산,

- 경남지방 소아 호흡기 알레르기 환자에서의 피부시험 성적. 알레르기 7:176-84, 1987
- 5) 윤여운, 이미경, 박해심, 박성삼, 홍천수: 알레르기 환자에서 시행한 피부단자 시험과 혈청 IgE 검사 성적. 알레르기 9:385-98, 1989
- 6) 홍천수: 집먼지진드기에 대한 환자의 감각 상태와 환자 집 먼지의 집먼지진드기의 생태에 관한 연구. 알레르기 11:457-65, 1991
- 7) Hong CS, Lee MK, Oh SH: Identification of major allergens from the house dust mites, *Dermatophgoides farinae* and *Dermatophgoides pteronissinus*, by electroblotting. Yonsei Med J 32:24-32, 1991
- 8) Tovey ER, Baldo BA: Comparison by electroblotting of IgE-binding components in extracts of house dust mite bodies and spent mite culture. J Allergy Clin Immunol 79:93-102, 1987
- 9) Baldo BA, Ford SA, Tovey ER: Towards a definition of the complete spectrum and rank order of importance of the allergens from the house dust mite, *Dermatophagoides pteronussinus*. Adv Biosciences 74:13-31, 1989
- 10) Chua. KY, Stewart GA, Thomas WR, Simpson RJ, Dilworth RJ, Plozza TM, Turner KJ. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der pI. J Exp Med 167:175-82, 1988.
- 11) Thomas WR, Stewart GA, Simpson RJ, Chua KY, Dilworth RJ, Nisbet A, Turner KJ: Cloning and expression of DNA coding for the major house dust mite allergen Der pI in *Escherichia coli*. Int Archs Allergy appl Immun 85:127-9, 1988
- 12) Chua KY, Doyle CR, Simpson RJ, Turner KJ, Stewart GA, Thomas WR: Isolation of cDNA coding for the major allergen Der pII by IgE plaque immunoassay. Int Arch allergy Appl Immunol 91:118-23, 1990
- 13) Ando T, Ino Y, Haida M, Hnma R, Maeda H, Yamakawa H: Isolation of cystein protease in the crude mite extract, *Dermatophagoides farinae*. Int Arch Allergy Appl Immunol 96:199-205, 1991
- 14) Thomas WR, Chua K: The major allergen Der p 2: a secretion of the male mite reproductive tract? Clin Exp Allergy 25:666-9, 1995
- 15) Yasueda H, Mita H, Yui Y, Shida T: Isolation and characterization of two allergens from *Dermatophagoides farinae*. Int Archs Allergy Appl Immun 81:214-23, 1986
- 16) Kabasawa Y, Ishii A: Studies on the physicochemical properties of house dust mite(*Dermatophagoides pteronyssinus*) allergens involved in reaginic reaction. Jap J Exp Med 49:51-7, 1979