

메밀의 알레르기 항원성에 관한 연구

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 내과학교실, 알레르기연구소
정병주 · 류정우 · 염혜영 · 김규언 · 박종원* · 홍천수* · 이기영

Identification and characterization of buckwheat allergen

Byeung Ju Jeoung, Jeung Woo Ryu, Hae Yung Yum, Kyu Earn Kim,

Jung Won Park, Chem-Soo Hong, and Ki Young Lee

Department of Pediatrics, Internal Medicine, Institute of Allergy,

Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background and Objective : Buckwheat is considered one of the most important food allergens in Korea. Although a very small amount is ingested or inhaled, it can cause serious allergic reactions. However, the major allergens of buckwheat still remain to be elucidated. The aim of our study was to identify and characterize the major allergen of buckwheat seed.

Material and method : Dialysis membrane with a cut-off MW 1kD was used for the preparation of crude buckwheat seed allergen extract. SDS-PAGE under reducing conditions and IgE immunoblotting were performed using sera from 15 buckwheat sensitive subjects. Isoelectric focusing and lectin blotting assay were done.

Result : Western blot analysis showed more than 15 IgE-reactive buckwheat proteins. Among them, a 24kD protein was shown to be the most frequently bound to sera from allergic subjects (54%). Isoelectric point of 24kD protein was around 5.9. In lectin blotting assay, 24kD protein did not bind to Con A nor five other lectins.

Conclusion : A 24kD protein was the most frequently recognized allergenic component in buckwheat seed. Isoelectric point was around 5.9. Glycosylation was not detected in 24kD of buckwheat protein.

Key words : buckwheat, major allergen, glycosylation

서 론

메밀(*Fagopyrum esculentum*)은 우리나라를 비롯한 동북아 뿐 아니라 세계 도처에서 경작되고 냉면, 막국수 및 메밀묵 등 식용으로 애용되며 메밀겉질은 침구류로 사용된다. 서구에서는

건강식으로 알려져서 케익이나 팬케익을 만드는데 이용되며 gluten에 불내성인 환자에서 밀가루의 대용식으로 섭취된다¹⁾.

메밀은 알레르기성이 매우 강해서 소량을 섭취 혹은 흡입하여도 위중한 임상증상을 유발할 수

* 본 연구는 1997년도 연세의대 교수연구비로 이루어졌음.

통신저자 : 연세의대 소아과 정병주

있다. 일본에서 169명의 메밀알레르기 환자들을 분석한 바에 의하면 메밀은 식품알레르기의 가장 흔한 원인이며, 약 10%의 환자에서 메밀을 섭취한 후 전신적인 속이 유발되었다²⁾. 우리나라에서는 1984년 강 등³⁾이 성인에서 메밀 알레르기 3례를 보고하였고, 소아에서는 1985년 권 등⁴⁾이 식품 경구 유발시험으로 확진된 2례를 보고하였다. 또한 최근 이 등⁵⁾이 3,000여명의 소아알레르기 환자들을 대상으로 경구 유발시험을 실시한 결과 메밀이 가장 흔한 원인식품이었고, 천식이나 아나필락시 속 등 임상증상이 위중한 경우가 60%나 되었다.

지금까지 메밀 알레르겐에 대한 기초연구는 외국에서도 매우 미흡한 상태인데, 알레르겐 연구의 가장 우선이 되는 주알레르겐에 관해 논란이 있고^{6,7)} 그 특성도 아직 규명되지 않은 상태이다. 이에 저자 등은 메밀의 주알레르겐을 밝히고 그 특성을 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

대상 및 방법

1. 대상환자

연세의대 소아 알레르기클리닉에 내원하여 경구유발시험을 실시하여 메밀 알레르기로 진단된 15명의 환자를 대상으로 하였다.

2. 조항원의 제조

삶은 메밀을 Waring blender(Waring Products Div., New Hartford, Conn, USA)로 분쇄한 뒤 ether로 지방을 제거하고 Coca용액(NaCl 5gm, NaHCO₃ 2.75gm, phenol 4gm, millipore water 1,000ml, pH 8.0)에 담구어 냉장실에 3일간 보관하였다. 이 추출물을 18,000g로 30분간 2회 원심 분리하여 상층액을 여과공의 크기가 1kD인 투석막을 이용하여 1일간 millipore water에 투석하였다. Lowry 방법⁸⁾으로 정량한 메밀 조항원의 단백질 농도는 180ug/ml이었다.

3. SDS-PAGE, immunoblot 및 immunostain Laemmli 방법⁹⁾을 변형하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Staking gel의 농도는 3%, separating gel은 15%로 제조하여 메밀 조항원을 reducing sample buffer를 첨가하여 100°C에서 5분간 끓인 후 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 Towbin 방법¹⁰⁾으로 nitrocellulose(NC) membrane으로 이행시켰다. 이 막을 TBS/tween with 1% bovine serum albumin(BSA)로 차단한 뒤 메밀 알레르기 환자의 혈청과 실온에서 1일간 결합시켰다. 여기에 alkaline phosphatase labeled goat antihuman IgE(Sigma chemical Co., Saint Louis, MO, USA)를 실온에서 1시간 반응시킨 뒤 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate(BCIP)와 4-nitro blue tetrazolium chloride(NBT)(Sigma chemical Co., Saint Louis, MO, USA)로 발색시켰다. 메밀의 주알레르겐은 메밀 알레르기로 확진된 환자들의 혈청과 50% 이상에서 결합하는 메밀 단백질로 결정하였다.

4. 이차원 SDS-PAGE

메밀조항원 4mg에 isoelectric focusing sample buffer(20mM arginine, 20mM lysine, 15% glycerol) 1ml를 첨가한 후 pH 3-10인 isoelectric focusing gel(Novex, San Diego, CA)에 loading하였다. 100V 및 200V에서 각각 1시간, 500V에서 30분 전기영동을 실시한 후 gel을 equilibrium buffer(5% 2-mercaptoethanol, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2.3% SDS)에 30분간 담구어 평형화시킨 뒤 4%/16% 이차원 SDS-PAGE gel에 삼입시켜서 위에 기술한 방법과 동일하게 SDS-PAGE를 실시하였다.

5. Lectin blotting assay

Lectin blotting assay¹¹⁾는 digoxigenin이 결

합된 concanavalin-A(Con A)와 Glycan differentiation kit내에 포함된 5종의 lectins (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)를 이용하여 실시하였다. 메밀 조항원을 western blot한 뒤 NC membrane을 30분간 차단한 뒤 digoxigenin이 결합된 Con A(1:100), galanthus nivalis(GNA, 1:1,000), sambucus nigra(SNA, 1:1,000), maackia amurensis(MAA, 1:200), peanut agglutinin(PNA, 1:100)을 TBS(50mM Tris-HCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, pH 7.5)로 희석하여 상온에서 각각 1시간 동안 반응시켰다. 그후 alkaline phosphatase가 결합된 antidigoxigenin을 상온에서 1시간 결합시킨 뒤 BCIP/NBT로 발색시켰다.

결 과

1. 대상 환자

대상환자 15례는 모두 알레르기 피부시험에서 메밀 항원에 양성이었으며 경구유발시험시 나타나는 임상 증상은 두드러기 14례(93%), 호흡기 증상 6례(40%), 위장관 증상 3례(20%)였으며 심한 전신증상인 아나필락시 속도 1례에서 관찰되었다.

2. SDS-PAGE, westernblot 및 immunostain

Immunostain 상 환자들의 혈청 IgE는 분자량이 6, 7, 8, 11, 13, 17, 19, 22, 24, 31, 35, 45, 47, 55 및 67kD인 15개의 메밀 단백질과 결합하였다. 이중 24kD 메밀단백은 54%의 환자 혈청들과 결합하여 메밀의 주알레르겐으로 추정되었으며, 그외에도 17, 19, 22, 31, 35, 및 55kD 단백질이 각각 41, 35, 35, 41, 41 및 35%의 환자 혈청과 결합하여 메밀 항원중 중요한 알레르겐으로 추정되었다(Fig. 1).

3. 이차원 electrophoresis 및 lectin blotting assay

이차원 electrophoresis로 측정된 24kD 메밀 알레르겐의 등전기점은 약 5.9로 약산성이었다(Fig. 2). 일반적인 당단백(glycoprotein)을 염색하는 periodic acid/schiff 염색이나 alcian blue염색에 24kD 메밀 단백질은 염색되지 않았고, 보다 특수한 염색인 lectin blotting assay에서도 28과 38kD 메밀단백만 Con A와 결합하는 소견을 보였을 뿐 24kD 메밀단백은 Con A, galanthus nivalis, sambucus nigra, maackia amurensis, 및 peanut agglutinin 등과 같이 당단백과 결합하는 lectin들과 결합하지 않았다(Fig. 3, 4).

고 찰

일반적으로 알레르겐의 기초연구는 알레르기를 유발하는 근원물질(예; 메밀) 내에 존재하는 무수히 많은 단백질중 주로 알레르기를 유발하는 단백질(주 알레르겐)들을 찾아내고, 이들 주알레르겐 내부에서 B임파구, T임파구 및 MHC class II와 결합하는 미세구조를 규명하여 알레르기 질환의 진단과 치료에 유용한 기초지식을 얻으려는 방향으로 진행된다.

주알레르겐의 분리와 특성 규명은 알레르겐 연구에서 가장 우선적으로 실시하는 것으로, 메밀의 경우에는 Urisu 등⁶⁾은 분자량이 13.5, 14,

분자량은 10-70kD 사이라는 가정하에서 조항원 내의 불순물 제거를 위해 여과공의 크기가 10kD인 투석막을 이용하는 것이 일반적인 방법이다. 이렇게 제조된 조항원은 분자량이 10kD 이상인 물질만이 존재하게 된다.

그러나 최근 보고에 의하면 벌독의 주알레르겐인 mellitin peptide는 분자량이 약 2kD 임에도 비만세포나 호염기구에서 IgE와 가교를 형성하여 히스타민을 유리시키는데 이는 mellitin peptide가 서로 뭉쳐져 여러개의 항원결정기가 생겼을 것으로 추정되었다¹²⁾. 분자량이 10kD 이하의 단백질도 알레르겐이 될 수 있다는 보고는 메밀의 주 알레르겐은 8-9kD 단백질이라는 주장⁷⁾도 설득력이 있어, 저자들도 투석막의 여과공의 크기가 1kD으로 투석하여 IgE immunoblotting을 실시한 바, 10kD 이하의 메밀 단백질도 IgE와 결합하는 것을 알 수 있었다. 그러나 메밀의 주알레르겐은 24kD 단백질으로 Urisu 등⁶⁾의 결과와 일치하였다.

Isoelectric focusing은 산성도에 따라서 등전기점으로 단백질이 이동하는 특성을 이용하여 단백질을 분리하고 등전기점을 규명하는 기법인데, isoelectric focusing과 electrophoresis를 동시에 실시한 이차원 electrophoresis상 24kD 단백질의 등전기점이 약 5.9인 약산성으로 대부분의 알레르겐과 유사하였다.

알레르겐은 단백질 혹은 단백질에 당이 결합되어있는 당단백이다. 당단백은 당이 단백질에 결합하는 위치에 따라 N-glycosylation과 O-glycosylation으로 구분하며, N-glycosylation은 asparagine, O-glycosylation은 serine, threonine 같은 아미노산에서 주로 일어난다¹³⁾. 상기 당화반응은 rough endoplasmic reticulum이나 Golgi apparatus에서 일어나는데 당화되는 정도가 항상 일정하지 않을 수 있다. 그러므로 당화 정도가 심한 당단백은 분자량이 다소 유동적일 수 있다. 또한 당이 단백질에 결합하게 되면 단백질

15-16, 20, 24, 26, 27.5, 28, 31-33, 34-37, 41-44, 53, 67-70 및 100kD인 메밀 단백질이 환자의 혈청과 결합하며, 그중 24kD 단백질은 환자 전례에서 관찰되어 이 단백질이 메밀의 주알레르겐이라고 보고하였으나 Yano 등⁷⁾은 8-9kD이 주알레르겐이 된다고 상반되게 보고되었다. 주 알레르겐을 밝히기 위해서는, 우선 근원물질을 이용해서 조항원을 제조하는데 이과정 중 알레르겐의

의 삼차원적인 구조가 변형이 되어 알레르기성에 영향을 줄 수 있다¹⁴⁾. 재조합 항원을 제조할 때 expression vector로 무핵세포(예; E. coli)와 유핵세포(예; yeast, insect cell)를 사용할 수 있는데, 무핵세포는 당화와 같은 posttranslational modification이 일어나지 않음으로 당단백은 알레르기성이 강한 재조합항원을 제조하기 위해서는 유핵세포를 이용하여야 한다¹⁵⁾. 다행스럽게 24kD 메밀단백은 lectin blotting assay에서 당단백이 아닌 것으로 추정되어 재조합항원을 제조시에 무핵세포도 이용할 수 있겠고, SDS-PAGE상 분자량도 일정할 것으로 추정된다.

결 론

메밀의 주알레르겐은 분자량이 24kD이며 등전기점은 5.9로 약산성이며 당화는 되어있지 않은 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

- 1) Wieslander G: Review on buckwheat allergy. *Allergy* 51:661-5, 1996
- 2) Nakamura S, Yamaguchi M: Study on the buckwheat allergose. Report 2: Clinical investigation on 169 cases with the buckwheat allergose gathered from whole country of Japan. *Allergie Immunol* 20/21:457-65, 1974/1975
- 3) 강석영, 민경업: 메밀 알레르기 3례. *대한의학협회지* 27:765-8, 1984
- 4) 권용백, 이기영: 경구 유발시험으로 확진된 소아 메밀 알레르기 2례. *소아과* 28:82-6, 1985
- 5) 이기영, 김규언, 정병주: 경구 유발시험으로 확진된 속발형 식품알레르기: 병력 및 알레르기 피부시험의 진단적 의의. *소아 알레르기 및 호흡기* 7:173-86, 1997
- 6) Urisu A, Kondo Y, Wada E, Tsuruta M, Yasaki T, Yamada K, Kuzuya H, Suzuki M, Titani K, Kurosawa K: Identification of

a major allergen of buckwheat seeds by immunoblotting methods. *Allergy Clin Immunol News* 6:151-5, 1994

- 7) Yono M, Nakamura R, Hayakawa S, Torii S: Purification and properties of allergenic protein of buckwheat seed. *Agric Biol Chem* 53:2387-92, 1989
- 8) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-9, 1951
- 9) Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5, 1970
- 10) Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc North Acad Sci USA* 76:4350-4, 1979
- 11) Haselbeck A, Schickaneder E, Eltz H, Hosel W: Structural characterization of glycoprotein carbohydrate chains by using Digoxigen-labelled lectins on blots. *Anal Biochem* 191:25-30, 1990
- 12) King TP, Coscia MR, Kochoumian M: Structure-allergenicity relationship of peptide allergen-mellitin. In Kraft D, Schon A (ed.): *Molecular biology and immunology of allergen*. p11-20, CRC press, Boca Raton, 1995
- 13) Cooper CM: *The cell; a molecular approach*. p273-311, ASM press, Washington DC, 1997
- 14) Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: *Cellular and molecular immunology*. 3rd ed. p195-212, WB Saunders Co., Philadelphia, 1997
- 15) Brown TA: *Gene cloning; an introduction*. 3rd ed. Chapman and Hill Co, London, 1996