

Pseudomonas aeruginosa 세포질외 serine계열 단백질 분해효소의 정제 및 특성

이은실 · 송철용

중앙대학교 이과대학 생물학과

Purification and Characterization of Extracellular Proteinase Produced by *Pseudomonas aeruginosa*

Lee, Eun Sil and Chul Yong Song

Department of Biology, College of Science, Chung-Ang University,
221 Huksuk-Dong, DongJak-ku, Seoul 156-756, Korea

ABSTRACT: A serine proteinase of molecular weight 60 kd was purified from culture supernatant of *P. aeruginosa* using DEAE-Trisacryl M ion-exchange and AcA 54 gel filtration column chromatography, and the properties of serine proteinase were characterized. By means of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, the molecular weight of the enzyme was 55 kd. The optimal pH for the activity of purified enzyme was 7.5. The activity of the purified enzyme was completely inhibited by Di-isopropylfluorophosphate(DFP) and N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone(TLCK) but not by other proteinase inhibitors such as E-64, pepstatin A, 1,10-phenanthroline. The purified enzyme was capable of degrading type I and type IV collagen. Antisera obtained from humans infected with *Pseudomonas aeruginosa* reacted to the purified serine proteinase in immunoblots. These results indicate that the purified enzyme is trypsin-like serine proteinase and this enzyme of *P. aeruginosa* may play an important role in tissue damage as a spreading factor and may be useful for serodiagnosis of *Pseudomonas* infections.

KEY WORDS □ Extracellular proteinase, Serine proteinase, *Pseudomonas aeruginosa*, Trypsin

서 론

최근 여러 종의 미생물에서 세포질과 그들이 생산하는 분비물에 포함되어 있는 단백질 분해효소(proteolytic enzyme)에 관한 연구가 많은 학자들에 의해 진행되고 있다.

Pseudomonas 종이 생성하는 분비물에서 대부분 metallo proteinase계열 단백질 분해효소를 정제하고, 정제된 효소의 생화학적 특성 및 항원성에 관한 연구가 보고되었다(Porzio and Pearson, 1975; Kobayashi *et al.*, 1985; Fairbairn and Law, 1986; Makevitt *et al.*, 1989).

P. aeruginosa(녹농균)가 분비하는 생성물에서 현재까지 분리 정제된 단백질 분해효소는 대부분이 metallo proteinase로 이들의 특성은 alkaline pH에 활성을 나타내는 alkaline proteinase이고(Moriyama *et al.*, 1973; Cryz and Iglewski, 1980), 결합조직의

주성분인 collagen을 분해하는 collagenolytic enzyme이며(Carrick and Berk, 1975; Louis *et al.*, 1986) 그리고 elastin을 분해하는 elastase 등이 보고되었다(Moriyama, 1964; Gerald *et al.*, 1966; Schultz and Miller, 1974; Ian and Constantine, 1979; Zena *et al.*, 1982; Jacquot *et al.*, 1985).

세균들이 생산하는 분비물 중에는 metallo proteinase와 cysteine proteinase(Potempa *et al.*, 1988)도 존재하지만, 많은 양의 serine proteinase가 포함되어 있고, 이들 serine proteinase는 alkaline serine proteinase 또는 neutral serine proteinase의 형태로 존재하며, 이들 효소는 elastin과 collagen을 분해하였다고 보고하였다(Dancer and Mandelstam, 1975; Markaryan *et al.*, 1980; Chung and Goldberg, 1983). 그러나 *P. aeruginosa*가 분비하는 단백질 분해효소에서 serine proteinase를 정제하고, 이들 효소의 생화학적 특성을 관찰한 보고는 아직 발견치

못하였다.

본 연구는 *P. aeruginosa*의 생체에서 serine proteinase를 순수 분리 정제하고, 효소의 생화학적 특성, collagen의 분해능 및 효소 단백질의 항원성을 관찰하였기에 보고한다.

재료 및 방법

1) 균주 배양 및 조효소 추출

Pseudomonas aeruginosa(CUCC 90-9)는 각막염 환자로 부터 분리하였고, 분리된 균주는 100 ml의 용액 속에 glucose(2.0 gm), polypeptone(0.5 gm), NaCl(0.5 gm), CaCl_2 (0.056 gm), K_2HPO_4 (0.1 gm) 등을 넣어 합성한 배지 (pH 6.8)에서 배양하였다(Mori-hara, 1964; Nigam *et al.*, 1981). 그리고 단백질 분해효소의 생성을 위한 포도당 합성 액체배지 100 ml에 균 배양액 1 ml 접종하여 37°C로 고정된 shaking water bath에서 48시간 진탕배양하였다.

조효소(crude extract)는 배양된 *P. aeruginosa* 균액을 냉동 원심분리기 (6,000g×10 min, 4°C)와 metricel membrane filter(0.2 μm , Gelman Science)를 사용하여 균체를 완전히 제거하였다. 그리고 이들 배양액은 90% ammonium sulfate로 침전, 농축하여 조효소로 사용하였다.

2) 효소활성도 측정 및 기질선택 실험

효소 활성도 측정은 Rege(1989)등의 방법으로 실시하였는데, 효소 10 μl 씩 culture tube에 넣고, 단백질 분해효소의 저분자 합성기질인 amino fluorescent carboxyl terminal leaving group(AFC)이 결합된 carbobenzoxy-arginyl-arginyl-7-amino-4-trifluoromethylcomarin(CBZ-arg-arg-AFC) 또는 carbobenzoxyphenylalanyl-arginyl-7-amino-4-trifluoromethylcomarin(CBZ-phe-arg-AFC; Enzyme System Products, Livermore CA)를 10 μl (10 g)씩 넣어 전체 용량이 500 μl 되도록 0.2 M Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 첨가하였다. 그리고 잘 혼합한 다음 37°C로 고정된 incubator에서 30분간 반응시킨 후 효소의 활성도를 관찰하였다. 효소의 활성도는 Tuner fluorometer Model III (Tuner seqioa Co. CA)를 사용하여 분리된 AFC (excitation wavelength 400 nm; emission wavelength 505 nm)양을 측정하여 산정하였다. 이때 효소 활성도 단위(unit)를 결정하기 위해 AFC를 사용하여 표준곡선 (standard curve)을 작성하였다(unit = n mole AFC/hr · ml).

조효소 활성에 적합한 기질을 선택하기 위해 조효소에 저분자 합성기질인 CBZ-arg-arg-AFC와 CBZ-phe-arg-AFC를 각각 작용시켜 활성이 높게 나타난 기질을 활성도 측정에 사용하였다.

3) 최적 pH

정제된 효소에 미치는 pH의 영향을 관찰하기 위해 완충용액의 pH를 3.0에서 10.0까지 0.5의 간격으로 변화시키면서 효소의 활성을 측정하였다. 이때 pH는 3.0에서 4.0까지는 0.2 M sodium citrate buffer를,

pH 4.0에서 pH 5.0까지는 0.2 M sodium acetate buffer를, pH 5.0에서 pH 7.5까지는 0.2 M sodium phosphate buffer를, pH 7.5에서 pH 9.0까지는 0.2 M Tris-HCl buffer 그리고 pH 9.5에서 pH 10.0까지는 0.2 M sodium carbonate buffer를 각각 사용하여 효소의 활성을 측정하였다. 이때 가장 높은 활성을 보인 pH를 효소의 최적 pH로 선정하였다.

4) 단백질 분해효소의 정제

(1) Ion-exchange chromatography.

조효소로부터 단백질 분해 효소를 정제하기 위해 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0)로 조효소를 투석한 다음 동일 완충용액으로 평형된 DEAE-Trisacryl M column (2.6×15 cm)에 통과시켰다. 이때 흡착된 단백질은 0.0 M에서 0.5 M까지 NaCl 농도구배 (linear salt gradient)로 용출하였다. 각 분획의 단백질 양은 파장 280 nm로 고정된 spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 측정한 다음 효소 활성도를 측정하였다. 이때 활성이 높게 나타난 분획들을 수집하여 냉동 건조기 (EYELA Freeze Dryer FD-1)로 농축하였다. 그리고 이들을 다음 정제단계의 시료로 사용하였다.

부분 정제된 시료는 20 mM sodium phosphate buffer(pH 6.8)로 투석한 후 동일 완충용액으로 평형된 DEAE-Trisacryl M column(2.6×12 cm)에 단백질을 흡착 시킨 다음 동일 완충용액으로 세척하여 unbinding protein을 제거하고, 0 M에서 0.5 M까지 NaCl로 농도구배를 주어 흡착된 단백질을 용출시켰다.

(2) AcA 54 gel filtration column chromatography.

Ion-exchange column chromatography를 실시하여 부분 정제된 시료는 0.2 μM Tris-HCl buffer(pH 7.5)로 투석한 후 동일 완충용액으로 평형된 Ultrogel AcA 54 gel filtration column(1.6×50 cm; LKB)에 통과시켜 정제하였다.

정제된 효소의 분자량을 관찰하기 위해 위와 동일한 조건에 column에 standard marker protein(bovine serum albumin: 66,000, ovalbumin: 43,000, chymotrypsinogen: 25,000, ribonuclease A: 13,000 : Pharmacia)을 통과시킨 후 표준곡선(standard curve)을 작성하였다. 그리고 분획 중 활성이 가장 높은 분획의 K_{av} 값을 산정하여 이들의 분자량을 결정하였다.

5) 단백질 정량

조효소와 각 정제 단계별 시료의 단백질량은 Lowry *et al.*(1951)의 방법에 따라 정량하였다. 이때 표준 단백질로 bovine serum albumin(10-70 μg ; Sigma)을 사용하였다.

6) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

조효소 및 각 정제 단계별 효소의 정제 상태를 서로 비교 관찰하기 위해 Laemmli(1970) 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 즉 0.1% SDS와 0.375 M Tris-

HCl buffer(pH 8.8) 그리고 polyacrylamide의 농도를 7.5%에서 12.5%까지 구배를 준 gel을 사용하였다. sample buffer는 2% SDS, 0.125 M Tris-HCl buffer (pH 6.8), 2% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol 그리고 0.01% bromphenol blue를 포함시켜 각 정제 단계별 시료와 동량으로 혼합하여 95°C에서 3분간 중탕한 후 25 mA로 고정된 전류로 약 4시간 동안 전기영동 하였다.

효소들의 분자량을 산정하기 위하여 standard marker protein (phosphorylase B; 94,000, bovine serum albumin; 67,000, ovalbumin; 43,000, carbonic anhydrase; 30,000, trypsin inhibitor; 20,100, α -lactalbumin; 14,400; Pharmacia)을 같은 조건하에서 전기영동하여 이들의 상대적 이동거리 (relative mobility; Rf)를 산출하였으며, 이것으로 표준곡선(standard curve)을 작성하고 정제된 효소의 Rf 값을 대응시켜 분자량을 산정하였다.

7) 정제된 효소에 대한 억제인자의 효과

억제인자(inhibitor)가 효소활성에 미치는 효과를 관찰하기 위해 일정량의 억제인자를 사용하여 효소의 활성을 측정하였다. 이때 억제인자를 첨가하지 않은 대조군의 활성도를 100%로 하고, 억제인자와 반응시켜 나타난 효소활성도를 비교하였다. 사용된 억제인자의 종류는 serine proteinase의 억제인자인 diisopropylfluorophosphate (DFP 10^{-4} M; Sigma), N- α -p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK 10^{-4} M; Sigma), N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK 10^{-4} M; Sigma) 등을, cysteine proteinase의 억제인자인 L-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amide (4-guanidino) butan (E-64 10^{-5} M; Enzyme System Product, Livermore; CA), iodoacetic acid (1 mM Wako Pure Ind. Co., Japan), N-ethylmaleimide (NEM 10 mM; Sigma) 등을, metallo proteinase의 억제인자인 ethylene diamine-tetraacetic acid (EDTA 10 mM; Yakuri CO., Japan), 1,10-phenanthroline (10^{-4} M; Sigma) 등을, aspartic proteinase의 억제인자인 pepstatin A (10^{-5} M; Peninsula Lab., INC, CA)를 각각 사용하였다. 그리고 serine과 cysteine proteinase의 일반 억제인자인 leupeptin (10^{-5} M; Peninsula Lab., INC., CA)을 사용하였다.

8) Collagen 분해능 관찰

정제된 효소의 collagen 분해능을 관찰하기 위해 정제된 효소 20 μ l (1.3 μ g)에 collagen Type I (calf skin, Sigma)과 collagen Type IV (Human placenta, Sigma)을 각각 80 μ g씩 혼합하여 37°C incubator에 각각 24, 48, 72시간 반응시켰다. 그리고 이들은 Laemmli (1970) 방법에 따라 전기영동한 후 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 collagen의 분해 상태를 관찰하였다. 대조군은 정제된 효소액을 첨가하지 않고 collagen만을 사용하였다.

9) 항원성 관찰

조효소와 정제된 효소의 항원성을 조사하기 위해

Towbin *et al.* (1979)의 방법에 따라 관찰하였다. 조효소와 정제된 효소를 전기영동한 후 transfer electrophoresis unit를 이용하여 80 volt에서 3시간 동안 nitrocellulose membrane (NCM)에 transfer하였다. 그리고 NCM은 18시간 동안 blocking buffer (3% skim milk in PBS, containing 0.05% Tween 20)로 blocking하였다. 이들을 *P. aeruginosa*에 감염된 환자 혈청(primary antibody)과 blocking buffer를 1:100으로 희석하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응이 끝난 NCM은 secondary antibody인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-human Ig와 blocking buffer를 1:1000으로 희석하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 그리고 0.05% 3,3-diaminobenzidine (DAB; Sigma)와 0.001% hydrogen peroxide (H_2O_2)이 포함된 PBS를 5-15분 동안 반응시켜 항원성을 확인하였다. 이때 정상인의 혈청을 대조군으로 사용하여 비교 관찰하였다.

결 과

1) 기질 선택 실험

조효소와 합성기질인 CBZ-phe-arg-AFC와 CBZ-arg-arg-AFC의 활성도를 비교한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 조효소의 활성은 CBZ-arg-arg-AFC가 CBZ-phe-arg-AFC 보다 약 13배 높은 활성을 보였다. 그러므로 효소의 활성을 측정하기 위한 기질로 CBZ-arg-arg-AFC를 선정하였다.

2) 최적 pH

완충용액의 pH를 일정한 간격으로 변화시켜 정제된 효소의 활성을 측정한 결과, pH 6.5부터 활성이 증가하기 시작하여 pH 7.5에서 최고의 활성을 나타냈으며, pH 8.0 이상에서는 활성이 급격히 감소되었다 (Fig. 1).

3) 단백질 분해효소의 정제

조효소를 DEAE-Trisacryl M column chromatography (1차)를 실시하여 각 분획의 단백질량과 효소 활성을 측정한 결과 효소의 활성이 분획 57-68에서 크게 나타나 이들 분획들을 수집하여 농축하였다 (Fig. 2). 그리고 다시 DEAE-Trisacryl M column chromatography (2차)를 실시하였는데, 효소의 활성이 분획 68-78에서 높게 나타나 역시 이들을 수집, 농축하여 다음 정제의 시료로 사용하였다 (data not shown). 또한 이들 부분 정제된 시료는 AcA 54 gel filtration column chromatography (3차)를 실시하였

Table 1. Activity of the extracellular proteinase of *Pseudomonas aeruginosa* against synthetic substrate.

Substrate	Activity*
CBZ-phe-arg-AFC	2.720
CBZ-arg-arg-AFC	36.650

는데, 그 결과 효소의 활성이 분획 23과 24에서 높게 나타났는데, 이들 분획들을 농축하여 모든 실험의 시료로 사용하였다.

효소의 활성이 높은 분획 중 가장 높은 활성을 보인 23번의 분획을 표준곡선에 적용한 결과 이들 효소의 분자량은 약 60 Kd이었다(Fig. 3).

4) 정제 단계별 정제도 비교

각 정제 단계별 총 단백질(total protein), 총 활성도(total activity), 비 활성도(specific activity) 및 정제도(purification fold)를 산출한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다.

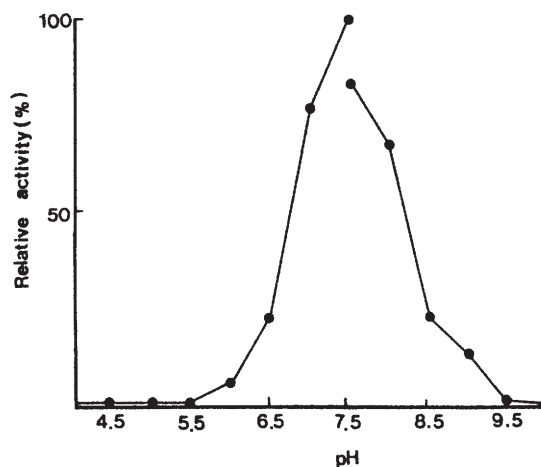


Fig. 1. Relative activity of the serine proteinase of *P. aeruginosa* different pH.

조효소의 총 단백질은 306 mg이었으나 최종 정제 단계인 Ultrogel AcA 54를 거친 것은 0.0612 mg으로 크게 감소되었다. 총 활성도에서 조효소는 604,800 unit이었으나 정제된 효소는 41,504.4 unit로 역시 감소되었다. 그러나 비활성도에서 조효소는 1,976.5 unit/mg이었으나 정제된 효소는 678,176.5 unit/mg로 크게 증가하였다. 이 결과 정제된 효소는 조효소에 비해 343.1배 정제되었다.

5) 정제된 효소의 영동상 관찰

각 정제 단계별 시료의 정제 상태를 관찰한 결과 (Fig. 4), 조효소(lane B)는 전 구간에 걸쳐 많은 단백질 band들이 나타났고, 1차 DEAE-Trisacryl M을 통과시켜 부분 정제된 시료(lane C)는 그 수가 조효소보다 감소되었다. 또한 2차 DEAE-Trisacryl M을 통과시켜 부분 정제한 시료는 분자량이 높은 단백질 band들이 1차 정제된 시료보다 현격히 감소됨이 관찰되었고(lane D), 최종 정제단계인 ultrogel AcA 54를 거친 시료(lane E)는 단 하나의 단백질 band가 나타나 효소가 순수 정제되었음을 관찰할 수 있었다. 그리고 전기 영동상에서 순수 정제된 효소의 분자량을 산출한 결과 55 Kd이었다(Fig. 4).

6) 억제인자(inhibitor)의 효과

정제된 효소에 여러 종류의 억제인자를 작용시켜 효소의 활성을 관찰한 결과 Table 3에서 보는 바와 같다. cysteine proteinase의 특이 억제인자 (specific inhibitor)인 E-64, iodoacetic acid 및 NEM에서는 효소의 활성이 거의 억제되지 않았다. 그리고 aspartic proteinase의 특이 억제인자인 pepstatin A와 metallo proteinase의 일반 억제인자인 EDTA 및 1, 10-phenanthroline에서는 활성이 거의 억제되지 않

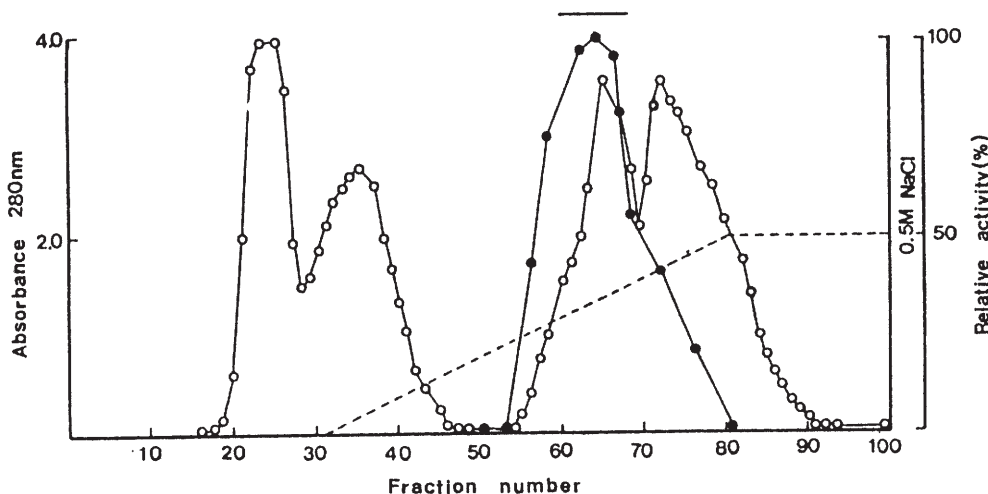


Fig. 2. First DEAE-Trisacryl M ion-exchange column(2.6×15 cm) chromatography of crude extract in 20 mM Tris-HCl buffer pH 8.0.

Fractions(F. No.) were assayed for activity with CBZ-arg-arg-AFC (●) and monitored for protein content(○) absorbance at 280 nm. Bar indicated pooled fractions containing proteolytic enzyme activity.

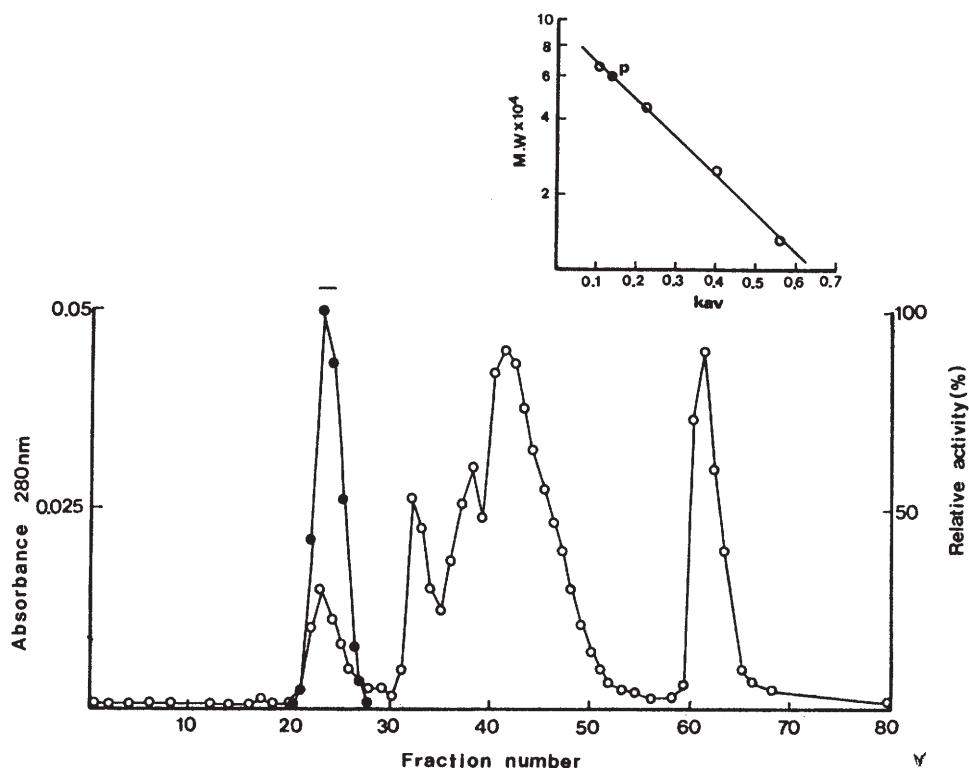


Fig. 3. Ultrogel AcA 54 molecular sieve column chromatography of proteinase.

P. aeruginosa proteinase prepared by 1st and 2nd DEAE-Trisacryl M ion-exchange column chromatography were further purified by ultrogel AcA 54 gel filtration. The insert shows a calibration standard curve of the column using proteins of known molecular weight (BSA., 66,000; Ovalbumin, 43,000; Chymotrypsinogen, 25,000; Ribonuclease A, 13,700); the peak of activity as indicated (p). Symbols are as in Fig. 2.

Table 2. Summary of purification of the extracellular proteinase in *Pseudomonas aeruginosa*

Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)*	Specific activity (unit/mg)	Purification fold	Recovery (%)
Crude extract	306.00	604,800	1,976.5	1.0	100.0
1st DEAE-Trisacryl M	31.54	313,728	9,947.0	5.0	51.9
2nd DEAE-Trisacryl M	4.48	291,102	64,978.1	32.9	48.1
Ultrogen AcA 54	0.061	41,504	678,176.5	343.1	6.9

았다. 그러나 serine proteinase의 특이 억제인자인 DFP에서는 활성이 완전히 억제되었으며, 또한 trypsin-like serine proteinase의 억제인자인 TLCK에서도 활성이 거의 억제된 반면 chymotrypsin-like serine proteinase의 억제인자인 TPCK에서 억제효과가 전혀 나타나지 않았다. 그리고 serine proteinase와 cysteine proteinase의 일반적인 억제인자인 leupeptin에서는 활성이 억제되었다. 이상의 결과들을 종합하면 정제된 효소는 trypsin-like serine proteinase임을 알 수 있었다.

7) Collagen분해능 관찰

정제된 효소가 collagen Type I과 IV를 분해할 수 있는가를 관찰한 결과, 정제된 효소는 collagen Type I (lane A, B, C and D)과 IV (lane E, F, G and H)의 α , β -component를 완전히 분해하여 새로운 분해산물의 band (I, II, III)가 영동상에 관찰되었다. 이상의 결과로 정제된 trypsin-like serine proteinase는 collagen의 triple-helical region과 non-helical region의 peptide bond를 분해할 수 있다고 생각된다(Fig. 5).

8) 항원성 관찰

*P. aeruginosa*가 분비하는 조효소 및 정제된 효소의

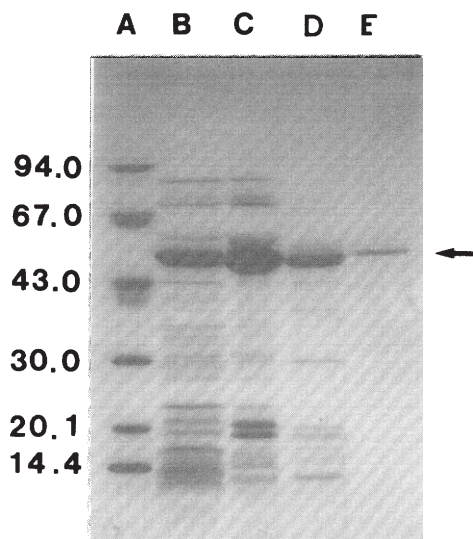


Fig. 4. 7.5%-12.5% gradient SDS-PAGE analysis of *P. aeruginosa* proteinase at various stages of purification.

Lane B, crude extract; Lane C, active peak from 1st DEAE-Trisacryl M; Lane D, active peak from 2nd DEAE-Trisacryl M; Lane E, active peak from Ultrogel AcA 54; Lane A, molecular weight protein markers: phosphorylase B(94,000), bovine serum albumin(67,000), ovalbumin(41,300), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor(20,100) and α -lactalbumin(14,400). Arrow indicated purified enzyme.

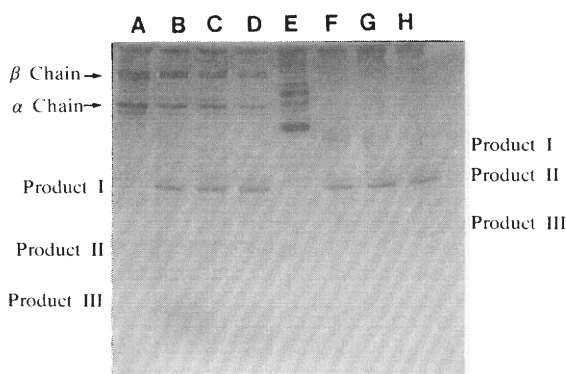


Fig. 5. Collagenolysis of type I and IV by the purified enzyme. Collagen type I and IV were incubated at 37°C with a serine proteinase purified from *P. aeruginosa*.

Lane A, collagen type I control; Lane B-D, incubated for 24, 48, 72 hrs. with collagen type I; Lane E, collagen type IV control; Lane F-H, incubated for 24, 48, 72 hrs. with collagen IV. Degradation is indicated by the disappearance of band (arrow) from 7.5%-12.5% SDS-PAGE.

Table 3. Effects of various inhibitors on the activity of purified extracellular proteinase from *Pseudomonas aeruginosa*

Inhibitors	% Relative activity*
None	100.0
E-64(10^{-5} M)	124.7
Iodoacetic acid(1 mM)	118.5
N-ethylmaleimide(NEM; 10 mM)	122.6
Pepstatin A(10^{-5} M)	126.7
Ethylendiaminetetra-acetic acid(EDTA; 10 mM)	136.0
1,10-phenanthroline(1 mM)	88.7
Diisopropylfluorophosphate (DFP; 10^{-4} M)	1.5
TLC(10^{-4} M)	3.5
TPCK(10^{-4} M)	144.3
Leupeptin(10^{-4} M)	39.2

The concentration of inhibitors tested is shown in parentheses.

*The activity against CBZ-arg-arg-AFC substrate in the absence of inhibitor was taken as 100%.

E-64: L-trans-epoxysuccinyl-leucylamide(4-guanidino) butane.

TLCK: N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone.

TPCK: N- α -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone.

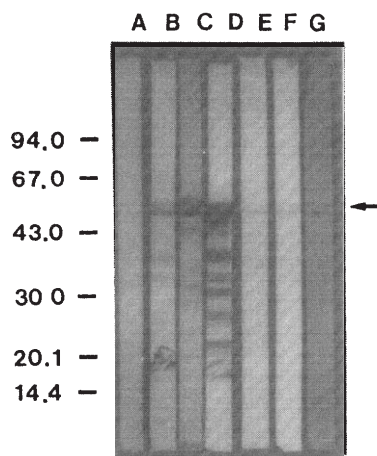


Fig. 6. Immunoblot analysis of crude extract and purified serine proteinase from *P. aeruginosa* under denaturing conditions. 7.5%-12.5% polyacrylamide gel electrophoresis and electrophoretic transfer of crude extract and purified proteinase onto nitrocellulose membrane was performed as described in Materials and Methods.

Lane B-D, human antiserum infected *P. aeruginosa* with crude extract from *P. aeruginosa*; Lane E-G, human antiserum infected *P. aeruginosa* with purified enzyme; Lane A, normal human serum. Molecular weight standards are indicated. Arrow indicated purified enzyme.

항원성을 관찰한 결과, 조효소 분획(lane B, C and D)에서는 수 많은 항원성을 갖는 band를 관찰할 수 있었으며, 특히 분자량 55 Kd 부위에서 가장 뚜렷한 항원성을 보였다. 그리고 순수 정제된 효소의 분획(lane E, F and G)에서도 강력한 항원성이 관찰되었다. 그러므로 정제된 효소는 숙주 체내에서 강한 항원성을 갖고 있는 것으로 생각된다(Fig. 6).

논 의

*P. aeruginosa*의 extracellular proteinase에 관한 연구는 Morihara (1963)에 의해 처음으로 연구되었으며, 그 후 여러 학자들에 의해 단백질 분해효소의 특성에 관한 연구가 진행되어 왔다.

*P. aeruginosa*의 단백질 분해효소 생산은 배지의 양이온 농도와 배지의 복합 성분에 따라 영향을 받는데(Bjorn *et al.*, 1979; Cryz and Iglewski, 1980), 특히 합성 배지에서 Ca^{++} ion은 효소의 생산에 필수적인 것으로 보고하였다(Willson, 1930). 본 연구에서도 배지에 $CaCl_2$ (0.056 gm/liter)을 첨가하므로 효소의 생성이 왕성한 것으로 나타났다(data not shown).

*P. aeruginosa*에서 정제된 elastase의 최적 pH는 8.0이며(Morihara, 1964), alkaline proteinase의 최적 pH는 10.0으로 보고한 바 있다 (Morihara *et al.*, 1973). 그러나 본 실험에서 정제된 trypsin-like serine proteinase의 최적 pH는 7.5로 나타났다. 그리고 분자량에서도 elastase는 39.5 Kd이고, alkaline proteinase는 48 Kd이었으나, 본 실험에서 전기영동상에 나타난 trypsin-like serine proteinase의 분자량은 55 Kd으로 나타났다. 그러므로 이들 효소들은 그 특성이 다른 것으로 생각된다.

P. cepacia, *P. fragi*, *P. fluorescens* 등에서 metallo

proteinase를 정제하고 그들의 특성을 보고하였다(Porzio and Pearson, 1975; Fairbair and Law, 1986; Makevitt *et al.*, 1989). 그리고 Morihara(1964)가 *P. aeruginosa*에서 정제한 단백질 분해효소는 serine proteinase의 특이 억제자인 DFP에 효소 활성이 억제되지 않으며, metallo proteinase의 일반 억제자인 1.10-penanthroline과 EDTA에 억제되는 metallo proteinase를 정제하고 이들 효소의 특성을 보고하였다(Kessler *et al.*, 1982; Zena *et al.*, 1982).

본 실험에서 분리 정제된 효소는 serine proteinase의 특이 억제자인 DFP와 trypsin-like serine proteinase의 특이 억제자인 TLCK에 의해 효소의 활성이 완전히 억제되어 정제된 효소는 trypsin-like serine proteinase로 판명 되었다.

*P. aeruginosa*에서 정제된 trypsin-like serine proteinase가 결합조직 성분 중 collagen을 분해할 수 있는 가를 관찰한 결과, 조직 구성 성분의 일종인 collagen Type I과 basement membrane의 주 성분인 Type IV를 모두 분해할 수 있는 것이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 *P. aeruginosa*에서 분리되는 alkaline proteinase의 특성과 같은 양상을 보였다(Gerald *et al.*, 1966; Carrick and Berk, 1975; Zena *et al.*, 1982; Louis *et al.*, 1986). 그러므로 이들 세균이 분비하는 여러 물질 가운데 alkaline proteinase와 trypsin-like serine proteinase는 collagen을 분해하여 여러 증상의 병원성을 일으키는 원인이 된다고 생각된다.

그리고 정제된 trypsin-like serine proteinase는 아주 강한 항원성이 있음을 immunoblot 실험에서 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Makevitt 등 (1989)이 *P. cepacia*에서 정제한 metallo proteinase도 항원성을 갖고 있다는 보고와 일치하였다.

적 요

Pseudomonas aeruginosa 균주가 분비하는 분비물에서 DEAE-Trisacryl M과 AcA 54 gel filtration column chromatography를 이용하여 trypsin-like serine proteinase를 순수 정제하고 그들의 생화학적 특성, collagen 분해능 및 항원성을 관찰하였다. 조효소 및 순수 정제된 효소의 최적 pH는 7.5이었고, 조효소의 활성은 저분자 합성기질인 CBZ-arg-arg-AFC에서 높게 나타났다. 정제된 효소의 활성은 serine proteinase의 특이 억제자인 DFP와 trypsin-like serine proteinase의 특이 억제자인 TLCK에 의해 완전히 억제되었다. 그리고 정제된 효소의 분자량은 전기 영동상에서 55 Kd으로 나타났고, AcA 54 gel filtration에서는 60 Kd이었다. 또한 정제된 효소는 collagen type I과 IV를 분해하였으며, immunoblot 실험에서 강한 항원성을 나타냈다. 이 성질을 통하여 *P. aeruginosa*는 trypsin-like serine proteinase를 생산하여 조직 손상과 침습에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Bjorn, M.J., Sokol, P.A. and Iglewski, B.H., 1979. Influence of iron on yields of extracellular products in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J. Bacteriol.*, **138**, 193-200.
2. Carrick, L.Jr. and Berk, R.S., 1975. Purification and partial characterization of collagenolytic enzyme from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **391**, 422-434.
3. Chung, C.H. and Goldberg, A.L., 1983. Purification and characterization of protease So. a cytoplasmic serine protease in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, **154**, 231-238.
4. Cryz, S.J. and Iglewski, B.H., 1980. Production of alkaline proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, **12**, 131-133.
5. Dancer, B.N. and Mandelstem, J., 1975.

- Production and possible function of serine proteinase during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **121**, 406-410.
6. Fairbairn, D.J. and Law, B.A., 1986. Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Pseudomonas fluorescences* NCDO 2086. *J. Dairy. Res.*, **53**, 457-466.
 7. Gerald, D.S., Ricardo, B., Victor, F. and Leena, J., 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 279-313.
 8. Gerald, G.J., Joanne, M.M. and Richard, S.B., 1966. The extracellular proteinase from *Pseudomonas aeruginosa* exhibiting elastase activity. *Can. J. Microbiol.*, **13**, 711-719.
 9. Ian, A.H. and Constantine, G.H., 1979. Experimental studies of the pathogenesis of infects due to *Pseudomonas aeruginosa*: extracellular protease and elastase as *in vivo* virulence factors. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 593-599.
 10. Jacquot, J., Tournier, J. and Puchelle, E., 1985. *In vivo* evidence that human airway lysozyme is cleaved and inactivated by *Pseudomonas aeruginosa* elastase and not by human leukocyte elastase. *Infect. Immun.*, **47**, 555-560.
 11. Kessler, E., Israel, M., Landshman, N., Chechick, A. and Blumberg, S., 1982. *In vivo* inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* elastase by metal-chelating peptide derivatives. *Infect Immun.*, **38**, 716-723.
 12. Kobayashi, T., Ogasawara, A., Ito, S. and Saitoh, M., 1985. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 693-698.
 13. Laemmli, V.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, **227**, 680-685.
 14. Louis, W.H., Morihara, K., William, B.M. and Edward J.M., 1986. Specific cleavage of human Type III and IV collagens by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Infect. Immun.*, **51**, 115-118.
 15. Lowry, O.H. Rosebrough, N.J., Farr, S.L. and Randall, R.J., 1951. protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 16. Makevitt, A.L., Bajaksouzian, S., Klinger, J.D. and Woods D.E., 1989. Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas cepacia*. *Infect. Immun.*, **57**, 771-778.
 17. Markaryan, A.N., Ostoslavskaya, V.I., Svyadas, V. K., Yakusheva, L.D., Lyublinskaya, L.A., Strongin, A.J. and Stepanov, V.M., 1980. The specificity of the *Bacillus amyloliquefaciens* intracellular serine protease: A comparison with the specificity of secretory subtilisins. *Int. J. Biochem.*, **13**, 201-206.
 18. Morihara, K., 1963. *Pseudomonas aeruginosa* proteinase. I. Purification and general properties. *Biochim. Biophys. Acta.*, **73**, 113-124.
 19. Morihara, K., Inove, H. and Nokagawa, T., 1963. *Pseudomonas aeruginosa* proteinase. II. Molecular weight and molecular dimension **73**, 125-131.
 20. Morihara, M., 1964. Production of elastase and proteinase by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, **88**, 745-757.
 21. Morihara, M. Tsuzuki, H. and Oka, T., 1973. On the specificity of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline proteinase with synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Acta.*, **309**, 414-429.
 22. Nigam, J.N., Dillai, K.R. and Baruah, J.N., 1981. Effect of carbon and nitrogen sources on neutral proteinase production by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.*, **26**, 358-363.
 23. Porzio, M.A. and Pearson, A.M., 1975. Isolation of an extracellular neutral proteinase from *Pseudomonas fragi*. *Biochem. Biophys. Acta.*, **384**, 235-241.
 24. Potempa, J., Dubin, A., Korzus, G. and Travis, J., 1988. Degradation of elastin by a cysteinyl proteinase from *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, **263**, 2664-2667.
 25. Rege, A.A., Song, C.Y., Bos, H.J. and Dresden, M.H., 1989. Isolation and partial characterization of a potentially pathogenic cysteine proteinase from adult *Dictyocaulus viviparus*. *Vet. Parasitol.*, **34**, 95-102.
 26. Schultz, D.R. and Miller, K.D., 1974. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: Inactivation of complement components and complement derivated chemtactic and phagocytic factors. *Infect. Immun.*, **10**, 128-135.
 27. Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J., 1979. Eletrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA.*, **76**, 4350-4354.
 28. Wilson, E.D., 1930. Studies in bacterial proteases. I. The relation of protease production to the culture medium. *J. Bacteriol.*, **20**, 41-59.
 29. Zena, W., Michael, J.B., James, H.M. and Robert, A.S., 1982. Elastases and elastin degradation. *J. Invest. Dermatol.*, **79**, 154S-159S.

(Received October 9, 1991)

(Accepted November 23, 1991)