

*Pasteurella multocida*의 외막 단백질 H에 의해 유도되는 방어적 항체와 면역

권무식 · 김영봉¹ · 이정민^{1,2,*}

성균관대학교 유전공학과, ¹건국대학교 동물생명공학과

²성균관대학교 생명공학연구소

*Pasteurella multocida*는 돼지에서 위축성 비염, 폐렴을 비롯한 다양한 호흡기 질환을 일으키는 병원균이다. 본 연구에서는 돼지 위축성 비염에 대한 효과적인 순수 정제 백신을 개발하고자 하는 기초 연구로서 *P. multocida*의 외막 단백질 H에 의해 유도되는 방어적 항체와 면역을 확인하였다. *P. multocida*의 외막 단백질을 포함하는 분획은 호흡기 질병 혼합 백신에 대한 항혈청과 불활화된 사균 세포에 대한 항혈청 모두에서 면역학적으로 검출 가능하였다. 선행 연구에서 분리한 외막 단백질 H 유전자는 재조합 발현 벡터 제작에 이용되어 대장균으로부터 재조합 외막 단백질 H를 정제하였다. 실험 동물 면역과 항혈청의 교차 반응, ELISA를 통한 항체 역가의 측정 및 공격접종을 통하여, 재조합 외막 단백질 H는 높은 항원성을 가지며, 지속적인 체액성 면역을 유도하는 것을 확인하였다. 외막 단백질 H는 순수 정제 항원으로서 *P. multocida*에 의한 호흡기 질환에 대한 효과적인 방어를 유도할 수 있는 단위 백신 후보 단백질로 여겨진다.

Key words □ atrophic rhinitis, outer membrane protein H, *Pasteurella multocida*, protective antibodies

*Pasteurella multocida*는 그람 음성의 병원성 미생물로서 120여 년 전 파스퇴르가 이 병원균을 발견한 이후 여러 호흡기 질환을 유발하는 병원체로서 연구되어 왔다. *P. multocida*는 A부터 F까지의 다양한 혈청형에 따라 감염성과 병변이 다르게 나타나는데, 소와 들소에서 출혈성 패혈증(haemorrhagic septicaemia)을, 닭과 오리 등에서 가금 콜레라(fowl cholera)를, 돼지에서는 위축성 비염(atrophic rhinitis)과 파스튜렐라 폐렴(pneumonia)을 일으키는 주요 병원균이다(4, 8, 17). 특히 돼지에 있어서 이 병원균은 거의 모든 양돈 국가에 널리 퍼져있어서 돼지의 사료효율과 증체율을 감소시키는 등 많은 경제적 피해를 주고 있다(2). 돼지 위축성 비염은 기침, 재채기, 비루, 비출혈, 비갑개골 위축, 상악골 발육 부전에 의한 안면변형 등을 특징으로 하며, 유전적 요인, 영양, 병원체, 사육 환경, 화학물질에 의한 자극 등 다양한 인자들에 의해서 발생된다(1, 2). 위축성 비염을 일으키는 다른 주요 병원체로는 *Bordetella bronchiseptica*가 알려져 있다. *B. bronchiseptica*의 감염에 의해 유발되는 위축성 비염은 *P. multocida*에 의한 것 보다 상대적으로 병원성이 약하며, 두 병원균의 복합 감염은 병변을 더욱 악화시키는 것으로 알려져 있다(18).

외막 단백질 H (outer membrane protein H; OmpH)는 *P. multocida*의 세포막 존재하는 여러 주요 단백질 중 하나로, 물질 수송을 담당하는 porin의 일종이다. 외막 단백질 H는 동중량체(homotrimer)로서 일량체(monomer)의 분자량은 균주의 혈청형과

전기영동에 따라서 34 kDa부터 42 kDa까지 다양하게 나타난다(12, 21). 외막 단백질 H의 막 통과 구조는 유전자 및 아미노산의 1차, 2차 구조가 종 내에서 비교적 잘 보존되어 있어서 높은 상동성을 나타낸다(12). *P. multocida* 종 내에서 각 균주 간의 외막 단백질 H의 차이는 특이적인 항원기로 작용하는 loop 부위의 염기서열의 다양성 및 길이의 다양성에 기인하는 것으로 보인다(13). 그러므로 외막 단백질 H는 매우 효과적인 백신 후보로서, 다양한 혈청형의 *P. multocida*에 대한 저항성 면역을 부여할 수 있을 것으로 여겨지고 있다(3, 5, 13).

본 연구에서는 돼지의 위축성 비염 등 *P. multocida*에 의한 호흡기 질환에 대하여 효과적으로 방제할 수 있는 백신을 개발하고자, 상용 위축성 비염 혼합 백신 및 사균 백신에서 나타나는 외막 단백질 H의 항원성을 확인하였다. 또한 이 외막 단백질 H 유전자를 이용하여 재조합 외막 단백질의 항원성을 확인하고, 단위 백신으로서의 활용 가능성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 재료 및 균주 배양 조건

P. multocida serogroup D균주는 서울대학교 수의과대학 면역학교실로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 균주의 배양은 Bacto Brain-Heart Infusion (BHI) (Difco, USA) agar plate, 또는 5% sheep blood가 첨가된 Blood Agar plate에서 37°C에서 배양하였으며, genomic DNA의 추출을 위하여 균주를 BHI 액상 배지에 접종한 후 37°C에서 12시간 동안 현탁 배양 하였다(10).

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-2-450-3674, Fax: 82-2-455-1044
E-mail: jlee@konkuk.ac.kr

*P. multocida*의 외막 분획 분리

*P. multocida*의 외막 분획은 Simons 등(19)의 방법에 따라 초음파 분쇄와 원심분리를 통하여 분리하였다. 배양 세포를 원심분리하여 모은 후 0.5% sodium-N-lauroylsarcosine이 포함된 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)에서 추출하였으며, 불용성의 외막 분획을 원심분리를 통하여 모았다.

외막 단백질 H 유전자의 발현 및 재조합 외막 단백질 H의 정제

외막 단백질 유전자는 본 연구진이 수행한 이전의 연구를 통하여 분리한 유전자(GenBank accession number AY603962)를 사용하였다(10). 염기서열이 확인된 외막 단백질 H 유전자는 안정적인 유전자의 발현을 위하여 signal sequence를 제거한 부위를 대장균 발현 벡터인 pET32에 삽입하였다. 이 재조합 유전자 발현 벡터를 대장균 BL21 (DE3)에 도입하고 Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG) induction을 통하여 유전자의 발현을 유도하였다. 먼저 5 ml의 LB 배지에 하룻밤 동안 배양한 재조합 균주 세포를 접종한 다음 600 nm에서 흡광도가 0.5가 될 때까지 37°C에서 현탁 배양 하였다. 최종농도가 0.8 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 다시 37°C에서 12시간 동안 현탁 배양하여 유전자의 발현을 유도하였다. 이렇게 배양한 세포를 원심분리(5,000 × g, 20분, 4°C)하여 수거한 뒤, 침전물을 다시 lysis buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 8.0)에 현탁 시키고 상온에서 1시간 동안 용해 시켰다. 이를 다시 원심분리(10,000 × g, 20분, 4°C) 한 후 상층액을 취하여 재조합 균주 전체 단백질을 분리하였으며, 이를 시료로 하여 NTA Ni-affinity column chromatography (Qiagen, Germany)를 수행하였다. 시료 10 ml를 2 ml 부피의 Ni-resin column에 적하한 후, 20 ml의 wash buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 6.4)로 세 번 반복하여 세척하였다. elution은 10 ml의 elution buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 4.5)로 2번 반복하여 수행하였다. 이상과 같이하여 분리한 단백질의 농도는 Bradford method를 이용하여 측정하고 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다(10).

실험동물 면역 및 항혈청 생산

분리한 *P. multocida*의 외막 분획 및 단백질이 항원성을 갖는지 여부를 알아보기 위하여 각 실험구 당 10마리의 생쥐(CD-1)를 이용하여 면역 접종을 수행하고 항혈청을 확보하였다. 실험동물 면역시 PBS를 음성 대조구로 사용하였으며, 실험구로는 본 연구에 사용한 *P. multocida*의 불활화된 사균 세포(formalin-killed whole cell; inactivated bacterin), 상업적으로 사용되고 있는 호흡기 질병 혼합 백신(*B. bronchiseptica*, *P. multocida* 및 *Actinobacillus pleuropneumoniae*의 불활화 사균 백신, Daesung microbiological lab. Co., LTD, Korea), 본 연구에서 분리한 *P. multocida*의 외막 분획, 그리고 본 연구에서 정제한 *P. multocida*의 재조합 외막 단백질 H를 항원으로 하여 각각 실험동물 면역을 수행하였다. 면역는 각 실험군의 항원 50 µg을 100 µl의 PBS

에 녹인 후, 동량의 Freund's Complete Adjuvant (FCA; Sigma, USA)와 함께 실험동물 면역시 피하주사 하였다. 상업용 백신의 경우, 제조사의 방법에 따라 수행하되 실험동물의 중량을 감안하여 1/20 분량의 백신을 접종하였다. 첫 번째 면역을 수행한 후 15일 간격으로 1회 더 면역을 하였으며, 2차 면역 후 15일째 되는 날에 채혈하였다. 채혈한 혈액은 4°C에서 하룻밤 동안 응고를 시킨 후, 원심분리(2000 × g, 20 min, 4°C)하여 항혈청을 수거하였다.

항혈청을 이용한 외막 단백질 H의 항원성 검정

항혈청 내에 존재하는 외막 분획 또는 외막 단백질 H에 대한 항체의 역가를 측정하기 위하여 indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 실시하였다. 항원(정제된 *P. multocida* 독소, 외막 분획, 재조합 외막 단백질 H) 각각을 10 µg/ml가 되도록 carbonate buffer로 희석 후, 96-well plate에 50 µl/well로 분주하고 4°C에서 하루 동안 보관하였다. 0.05% Tween 20가 포함된 PBS (PBS-T)로 3번 세척한 후, 3% BSA가 첨가된 PBS-T를 200 µl씩 분주하여 실온에서 3시간 동안 blocking을 실시하였다. 다시 PBS-T로 3번 세척한 후, 각 항혈청을 PBS로 1000배 희석하여 1차 항체로 사용하여 100 µl씩 분주한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 이를 PBS-T로 3번 세척한 후, 2차 항체로 anti-mouse IgG peroxidase conjugated (Sigma, USA)를 3% BSA가 첨가된 PBS-T로 4000배 희석하여 100 µl씩 분주한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. PBS-T로 3번 세척 후, 반응 기질로 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹아있는 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 시약을 phosphate-citrate buffer와 1:10 비율로 혼합한 뒤, 각 well 당 10 µl씩 분주하고, 빛을 차단한 후 20분간 반응시켰다. 발색 반응 후 650 nm의 필터가 있는 ELISA 측정기로 흡광도를 측정하였다(10). Western blot의 경우, 재조합 PM2.3 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후, nitrocellulose membrane에 100V로 3시간 동안 전이하였으며, 이후의 항체와의 반응 과정은 ELISA와 동일하게 수행하였다. 항체에 의한 단백질의 검출은 암실에서 chemiluminescence reagent (Bio-Rad, USA)를 이용하여 발색 반응으로 확인하였다.

공격접종과 방어적 면역성

면역과 채혈이 끝난 후, 실험 동물의 체액성 면역에 의한 항체 생성과 방어적 면역성을 알아보기 위하여, 2차 면역이 끝난 10일 후 본 연구에서 사용한 위축성 비염 병원균인 *P. multocida* (5×10⁴ CFU)를 복강 내 공격접종 하였다. 공격접종 후 72시간 동안 실험동물의 생존을 측정하여 백신으로서의 효과, 즉 방어적 면역을 확인하였다.

결과 및 고찰

외막 단백질 H의 아미노산 서열과 상동성 분석

*P. multocida*의 감염에 의한 피해를 줄이고자, 지금까지 이 병원균에 대한 분자 수준에서의 연구와 다양한 백신의 개발 연구가 지금까지 진행되어 왔다(3, 9). *P. multocida* 혈청형 D의 경우 주

로 돼지의 위축성 비염의 병원균으로 작용하며, 병원성에 중요하게 작용하는 요소인 독소(*P. multocida* toxin; PMT)를 생산하는데, 이 독소는 조골세포의 생성을 억제하는 dermonecrotic toxin으로 작용한다. 그러므로 이 불활화한 사균 백신 외에, 이 독소를 정제, 불활화하여 변성독소인 독소이드(toxoid) 백신으로 돼지 위축성 비염의 방제에 사용하고 있으며, 근래에는 유전자 재조합 기술을 이용하여 재조합 독소 및 독소 유도체(toxin derivatives)를 생산하여 백신으로 활용하고 있는 추세이다(11, 14, 20).

*P. multocida*의 외막 단백질 H는 이 병원균에 많이 존재하는 주요 외막 단백질 중의 하나이다. 다양한 미생물의 외막 단백질 및 그에 연결된 다당류들이 미생물에 대한 숙주의 항원성을 나타내는 것으로 알려져 있으므로, 구조적 유사성을 갖는 외막 단백질 H의 경우, 백신 개발에 있어서의 중요성이 크다고 할 수 있다. 실제로 *Haemophilus influenzae*에서 외막 단백질을 순수 분리하여 백신으로 사용한 경우, 실험 동물 면역에서 80% 이상의 저항성 면역을 확인한 예가 보고되어 있다(3, 15). 본 연구에 사용된 외막 단백질의 아미노산 서열(GenBank accession number AY603962)은 porin으로서의 구조적 특징을 가지고 있으면서, 종 내에서 서로 다른 균주 간에 90%에 가까운 상동성을 보이고, 특히 방어적 표면 단백질로 알려진 *H. influenzae*의 P2 단백질과도 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 1). 이러한 높은 상동성은 서로 다른 혈청형의 균주에 대한 교차 방어적 면역성(cross-protective immunity)을 유도할 수 있는 좋은 백신의 후보로 추정된다(3, 5,

13). 두 군데 이상의 비교적 상동성이 낮은 부위 또한 존재하는데, 이들 부위는 각 균주마다 서로 다르게 나타나는 외막 단백질의 항원성을 나타내는데 있어서 작용하는 항원 결정기 부분이 될 수 있을 것으로 추정된다.

재조합 외막 단백질 H의 발현 및 재조합 단백질의 정제

본 연구에서는 외막 단백질 H 유전자가 숙주 내에 안정적으로 높은 발현을 나타낼 수 있도록 하기 위하여, signal sequence에 해당하는 20개의 아미노산 부위의 유전자가 제거된 외막 단백질 H 유전자를 pET32a 벡터에 도입하였다. 이 절단된 형태의 외막 단백질 H 유전자는 ORF가 966 nts로 322개의 아미노산을 암호화하며 생성되는 단백질은 분자량이 약 36 kDa에 해당된다. pET32a 벡터는 유전자 삽입 부위 앞에 약 17 kDa의 thioredoxin (Trx) 유전자가 있으므로, 유전자 발현시 도입된 유전자와 함께 융합(fusion) 단백질을 생산함으로써 안정적으로 재조합 단백질 유전자를 발현시킬 수 있었다(10). 재조합 단백질의 정제는 재조합 단백질의 N-말단에 있는 6×His에 결합하는 Ni-NTA affinity column을 이용하여 Trx가 융합된 약 53 kDa의 재조합 외막 단백질 H를 분리하였다(Fig. 2). Western blot의 결과로도 정제된 재조합 외막 단백질 H를 확인할 수 있었다(Fig. 2, lane 4).

항혈청을 이용한 외막 단백질 H의 체액성 면역검정

외막 단백질 H의 항원성 및 체액성 면역을 확인하기 위하여,

	1	80
OmpH	MKKTI VALAVAATAAATVYNQDGTQVDVNGSVRL IL -----KKEKDKRGDLVDNGSRVSFKASHDLGEGLSAL	
P-1059	MKKTI VALAVAATAAATVYNQDGTQVDVNGSVRL IL -----KKEKNERGDLVDNGSRVSFKASHDLGEGLSAL	
X-73	MKKTI VALAVAATAAATVYNQDGTQVDVNGSLRL IL -----KKEKNERGDLVDNGSRVSFKASHDLGEGLSAL	
P2	MKKTLAAL I VGAF AASANA AAVVYNNEGTVKVELGGVSI I AEQSTSNRKQKHQHGSLRNQGSRFNI KVTHNLGDGYIAL	
Consensus	MKKTI vLaVaLaAAtsANAAtVYNqdGTkVdngsvr l l l -----KkeK--rGdLvdnGSRvsfKashdLGeGlsAL	
	81	160
OmpH	AYAE LRFSTKEEV-----TQNKVVVRKYKVER I GNDVHAKRL YAGFAYEGLGTLTFGNQLTI GDDVGVS-DYTYFLGG INN	
P-1059	AYAE LRFSTKNEKVEVDAGNQVVRKYEVER I GNDVHVKRL YAGFAYEGLGTLTFGNQLTI GDDVGVS-DYTYFLGG INN	
X-73	AYTELRFSTKNVPVQVQDQGG-----VVREYEVKLGNNVHVKRL YAGFAYEGLGTLTFGNQLTI GDDVGLS-DYTYFNSG INN	
P2	GYETRF INKDI DG-----NEKNI GSGFGS I TTKLAYAGLGNKELGEATFGLQKTI ADKI STAEKKEYGVI EKNS	
Consensus	aY-E l Rfs-k--v-v-----q--vvrey-ve--gn-vh-Kr l YAGfayegLGt l TFgnQl Tl gDdvg-s-DytYf--g l Nn	
	161	240
OmpH	LLSSGEKA I NFKA EFNFTFGGAYVFSA-GADKQAARDGRGFVAGLYNRKMGDVG LAL EAGYSQEYVETATAKQ-----	
P-1059	LLSSGEKA I NFKA EFNFTFGGAYVFSA-DADKQAPRDGRGFVAGLYNRKMGDVG FAL EAGYSQKYVTAATAKQ-----	
X-73	LLSSGEKA I NFKA EFNFTFGGAYVFSA-DADKQALRDGRGFVAGLYNRKMGDVG FAFEAGYSQKYVVKQVEQNPPAA	
P2	YIPTGNAI AYTYKGI EGLTLGASYVFGGRNFSDEI TDGKVSNAVQVGA KYDANNI VAGFAYGRITNYKAQQAQT-----	
Consensus	l l ssgekA l nfksaefnGfTfGgaYVFsa--adkqa-rDGrGfVvag l ynr kmgdvg-A-eAgysq-Yv-q-akq-----	
	241	320
OmpH	-----EKEKAFMVGTELSYAGLALGV DYAQSKVTNVDGKKRA-----LEVGLNYDLNDKAKVYTDL I WAKKGP--KGATTR	
P-1059	-----EKEKAFMVGTELSYAGLALGV DYAQSKVTNVEGKKRA-----LEVGLNYDINDKAKVYTDL I WAKEGP--KGATTR	
X-73	QKVFKEKEKAFMVGAE LSYAGLALGV DYAQSKVTNVDGKKRA-----LEVGLNYDLNDRAKVYTDI I WEKEGP--KGDVTR	
P2	-----QQVNGALATLG YHFDLGLL I SLD SGYAKTKNKADKHEKRYFVSPGFQYELMEDTNLYGNLKYER INSDQGEKVR	
Consensus	-----ekekafmvG-e l syaGLal gvDyaqsKvtNv-gKkra-----levGlnYdlnd-akvYtdl i wek--gp--kg--tR	
	321	372
OmpH	DRAI I LGAGYKLHKQVETFEVGGWGR-----KKAAGVTTKDNKVGVL RVHF	
P-1059	DRS I I LGAGYKLHKQVETFEVGGWGRE-----KDANGVTTKDNKVGVL RVHF	
X-73	NRT I AVGFGYKLHKQVETFEAAWGRE-----KDS DGVTTKNNVVGTLRVHF	
P2	EHA VLFGI DHKLHKQVLT Y I EGAYARTRTNDKGKTEKEKSVGVGLRVYF	
Consensus	-ra-----G-gyKLHKQVeTfVegawGr-----K---gvTtK-n-VGvGLRVHf	

Fig. 1. Comparison of deduced amino acid sequences between OmpHs from *P. multocida* strains and P2 protective surface antigen from *H. influenzae*. Sequences were analyzed by SwissPort data bank and GenBank (AY603962 for *P. multocida* OmpH in this study, AAC02244 for *P. multocida* P-1059, AAC02243 for *P. multocida* X-73, CAA51810 for *H. influenzae*). Conserved amino acid sequences are indicated in capital letters in consensus sequence. Relatively variable sequence regions are underlined.

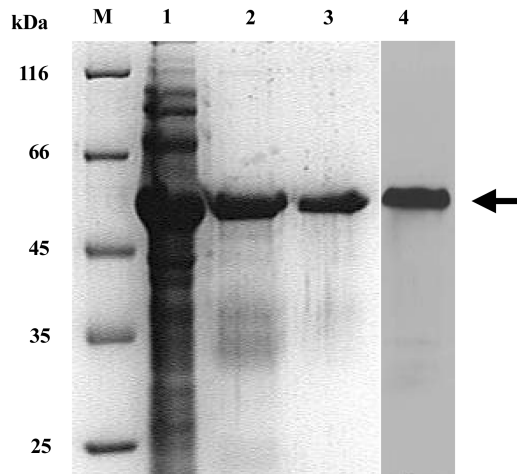


Fig. 2. Expression and purification of the recombinant OmpH. The expression of recombinant fusion protein OmpH was analyzed by SDS-PAGE and Western blot assay. M, protein molecular weight standard marker; lane 1, crude extracts from the cell lysate of the host harboring pET32 with OmpH; lane 2, purified recombinant OmpH using Ni-NTA column; lane 3, desalted OmpH for immunization; lane 4, immunoblotting for the purified protein using OmpH antisera.

*P. multocida*의 불활화된 사균 세포, 상업적으로 사용되고 있는 호흡기 질병 혼합 백신, 본 연구에서 분리한 *P. multocida*의 외막 분획, 정제된 제조합 외막 단백질 H 각각에 대한 실험동물

면역을 수행하였다. 2차에 걸친 면역 후 실험동물로부터 얻어진 항혈청 내에 존재하는 정제된 독소 단백질, 외막 분획, 외막 단백질 H 각각에 대한 항체 존재와 그 역가를 ELISA를 통하여 확인하였으며 그 결과는 Fig. 3과 같다.

먼저 *P. multocida*의 불활화된 사균 세포에 대한 항혈청에서 *P. multocida* 독소인 PMT에 대한 항체를 검출할 수 있었으며, 외막 분획 및 제조합 외막 단백질 H에 대한 항체도 검출할 수 있었다(Fig. 3A). 이는 *P. multocida*에 존재하는 여러 항원 중에서 일반적으로 병원성에 작용하는 PMT와 같이 외막 분획이나 외막 단백질 H도 주요한 항원으로 작용함을 알 수 있다. 또한 일반적으로 사용되는 돼지 호흡기 질병 혼합 백신에 대한 항혈청의 경우, 외막 분획이나 외막 단백질 H에 대한 항체 역가(0.323 ± 0.0152 , 0.309 ± 0.0167)가 PMT에 대한 항체 역가(0.257 ± 0.0166) 보다 높게 나타났다(Fig. 3B). 외막 부위에 존재하는 구조들은 미생물 간에 비교적 공통적인 구조들이 많이 존재하며, 외막 단백질 H는 구조적으로 매우 잘 보존되어 있으므로, 다른 외막 단백질과의 높은 상동성으로 인해 호흡기 질병 혼합 백신과 불활화된 *P. multocida* 사균 세포의 항혈청에서도 모두 항체 역가가 나타난 것으로 사료된다(6, 9, 10). 외막 분획에 대한 항혈청의 경우, 백신 항원으로 사용한 외막 분획에 대한 높은 항체 역가(1.252 ± 0.0344)와 마찬가지로 외막 단백질 H의 항체 역가(0.623 ± 0.0262) 역시 높게 나타났다(Fig. 3C). 이는 외막 단백질 H가 외막 분획에 존재하는 주요한 항원기 중의 하나로서 작용함을 나타낸 것이라 사료된다. 이는 제조합 외막 단백질 H를 항원

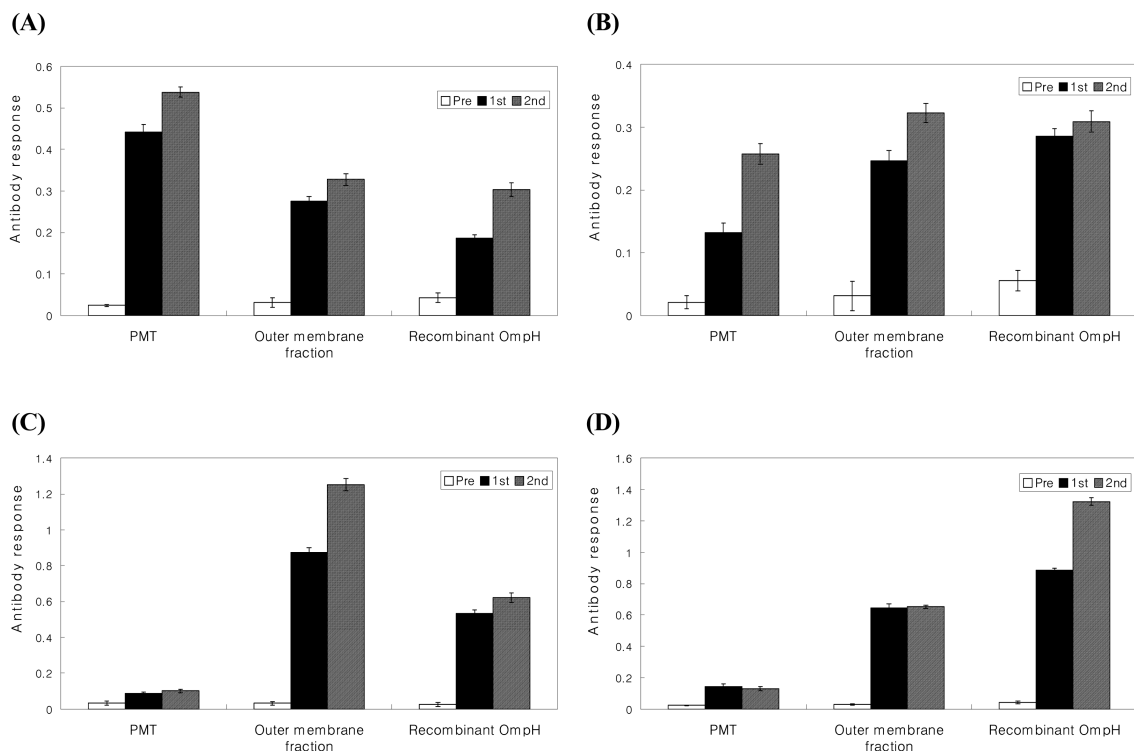


Fig. 3. ELISA reactivity of antisera induced by vaccination with formalin-killed whole cell (A), commercial vaccine (B), outer membrane fraction (C), and recombinant OmpH (D), respectively. The antisera of the groups were pooled and measured by ELISA (OD₆₅₀) at two times independently.

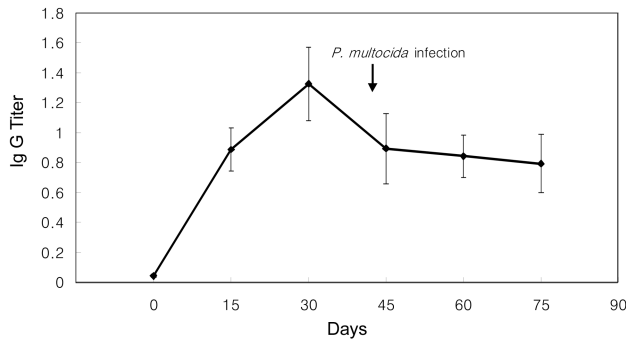


Fig. 4. Kinetics of the antibody response elicited after immunization with the recombinant OmpH. Mice were immunized with recombinant OmpH in incomplete Freund's adjuvant and bled retroorbitally on the indicated days. Specific antibody responses against recombinant OmpH were evaluated by ELISA. The arrow indicates the time of *P. multocida* infection.

으로 면역을 실시한 경우, 외막 단백질 H에 대한 높은 항체 역가(1.324 ± 0.0246)와 함께 외막 분획에 대한 높은 항체 역가(0.652 ± 0.0113)가 나타난 결과(Fig. 3D)를 통해서도 확인할 수 있었다. 이러한 항원-항체의 반응을 통한 결과 및 아미노산 염기 서열을 바탕으로 한 구조적 특징 등을 고려할 때, 외막 단백질 H는 호흡기 질병을 유발하는 병원균에 공통적 구조를 가지며 존재하는 단백질로서, 높은 항원성을 가진다고 할 수 있다.

재조합 외막 단백질 H의 체액성 면역 유도

재조합 외막 단백질 H를 2차에 걸쳐 면역하고 *P. multocida* 균주를 공격접종한 후, 실험동물 내의 항체 역가를 ELISA를 통하여 지속적으로 확인한 결과, 1차 면역 후 높게 나타나기 시작한 항체의 역가는 지속적으로 높게 유지 되었으며, 2차 면역 후 가장 높게(1.324 ± 0.0246) 나타났다(Fig. 4). 2차 면역 후 10일이 지난 후에 *P. multocida*를 공격접종하고 사망하지 않은 실험동물의 혈액에서도 항체의 역가는 약간 감소한 채 지속적으로 유지(0.893 ± 0.235 , 0.841 ± 0.142 , 0.792 ± 0.195)되는 것을 확인하였다. 이는 재조합 외막 단백질 H가 체액성 면역을 유도하여 항체가 지속되는 것으로 사료되며, 이러한 체액성 면역으로 인해 공격접종에서 살아남은 것으로 사료된다.

공격접종과 방어적 면역성

재조합 외막 단백질 H에 의해 유도된 체액성 면역에 의하여 방어적 면역성이 생성되는지 확인하기 위하여, 2차에 걸친 면역이 완료된 실험동물을 대상으로 *P. multocida*를 복강 내 공격접종하여 72시간 후의 생존율을 확인하였다. 그 결과를 요약하면 Table 1과 같다. PBS로 면역한 음성 대조구의 경우에는 모든 실험동물이 폐사하여 생존율이 0이었으며, 불활화한 *P. multocida*를 면역한 경우에는 2마리가 폐사하여 생존율 80%를 나타냈다. 상업적으로 이용되는 호흡기 질병 혼합 백신을 사용한 경우에는 5마리의 실험동물이 폐사하여 50%의 생존율을, 균주의 외막 분획을 면역한 경우에는 70%의 생존율을, 그리고 재조합 외막 단백질 H를 단독 면역한 실험동물은 2마리만 폐사하여 80%의 생존율을 나타냈다. 통계적으로 유의할 만한 차이는 아니지만, 재조합 외막 단백질의 경우 불활화한 사균 세포 보다는 낮지만 상업적으로 이용되는 호흡기 혼합백신 보다는 높은 생존율을 나타낸 것으로, 외막 단백질이 병원균의 공격접종 시에도 방어적 면역성을 나타내는 것으로 여겨진다. 상업적으로 이용되는 호흡기 혼합백신의 경우 세 종류의 균주에 대한 혼합백신으로서 복합 항원으로 인한 다양한 항체의 유도에 비해서 방어적 면역성은 다소 떨어지므로 예상보다 낮은 생존율을 보이는 것으로 사료된다. 일반적으로 항체 역가와 방어적 면역성은 일치하는 경우가 많으나, Gatto 등의 연구(6)에서와 같이 병원균에 널리 존재하는 외막 단백질로 높은 항원성으로 항체를 유도하나, 실제 방어적 면역성은 낮은 경우도 있으므로, 항원성을 가지면서 방어적 면역성이 높은 항원을 선택하는 것이 백신 개발에 있어서 중요하다. 또한 본 결과에서는 비교적 낮은 방어능을 나타낸 상업용 호흡기 혼합백신으로 면역한 실험동물에서도 PMT 및 재조합 외막단백질 H에 대한 항체 역가는 높게 나타나, 항체의 역가와 방어능이 일치하지는 않는 것으로 사료된다.

단위 백신(Subunit vaccine)은 한 가지 또는 그 이상의 순수하거나 일부 정제된 항원으로 제조된 백신을 일컫는 것으로, 본 연구에서 사용된 재조합 외막 단백질 H도 단위 백신의 일종이다. 이러한 단위 백신을 사용하면 안전성이 향상되며, 불필요한 단백질에 기인되는 항원 경쟁성이 적어져서 면역이 요구되는 부위에 백신을 적용할 수 있고, 또한 감염동물과 백신접종동물을 구별할 수 있는 등 여러 가지 장점이 있다(7, 11). 후자의 감별진단이 가능한 백신의 장점은 동물체내에서 장기간 지속 감염을 할 수

Table 1. Evaluation of protective immunity of the recombinant OmpH vaccinated mice against *P. multocida* challenge^a

Immunization group	Antibody response to OmpH on day 30 ^b	Number of dead / total challenged	Survival rate (%)
PBS	0.024±0.0023	10 / 10	0
Formalin-killed whole cell	0.303±0.0162	2 / 10	80
Commercial vaccine	0.309±0.0167	5 / 10	50
Outer membrane fraction	0.623±0.0262	3 / 10	70
Recombinant OmpH	1.324±0.0246	2 / 10	80

^aThe mice were challenged with intraperitoneal injection of live virulent *P. multocida* (5×10^4 CFU) on the tenth day after the second immunization, and monitored for 72 hr. ^bAntibody responses were measured by ELISA (OD_{550}) as described in this text.

있는 특정 질병을 박멸하고자 하는 국가에서는 매우 중요하다. 그러나 아직까지 단위 백신을 이용하여 상품화된 동물 백신은 매우 드물고 대부분 병원균을 불활화한 백신을 사용하고 있으며, 복합항원으로 인해 높은 항체 유도에도 불구하고 낮은 면역 저항성을 보이는 경우가 많다(9, 16). 따라서 여러 항원에 의한 간섭 없이 체액성 면역 반응과 그로 인한 저항성 면역을 유도할 수 있는 단위 백신은 돼지에서와 같이 모체 이행 항체에 의존할 수 밖에 없는 자돈의 초기 면역 향상과 질병 예방에 있어서 매우 중요하다고 할 수 있다. 그러므로 PMT 등과 함께 이러한 항원성과 체액성 면역 효과가 높은 항원 2-3가지를 복합체 형태로 백신으로 이용한다면 보다 높은 면역 방어능을 부여할 수 있을 것으로 사료된다.

*P. multocida*의 주요한 외막 단백질 중 하나인 외막 단백질 H는 높은 항원성을 가지는 중요 항원으로, 저항성 면역 부여에 중요한 역할을 하는 항원만을 선택적으로 이용하는 단위 백신 개발에 있어서 활용 가능성이 높은 특성을 가진 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 김봉환, 탁연빈, 조길재, 장희경. 1991. 돼지 전염성 위축성 비염의 임상학적 및 세균학적 연구. 대한수의학회지 31, 457-469.
2. 지영철, 로승, 한정희, 한태욱. 2000. 돼지 위축성 비염 백신의 효과에 관한 연구. 대한수의학회지 40, 707-717.
3. Adler, B., D. Bulach, J. Chung, S. Doughty, M. Hunt, K. Rajakumar, M. Serrano, A. van Zanden, Y. Zhang, and C. Ruffolo. 1991. Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J. Biotechnol.* 73, 83-90.
4. Carter, G.R. 1967. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 11, 321-379.
5. Christodoulides, M., B.T. McGuinness, and J.E. Heckels. 1993. Immunization with synthetic peptides containing epitopes of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis*: production of bactericidal antibodies on immunization with a cyclic peptide. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1729-1738.
6. Gatto, N.T., S.M. Dabo, R.E. Hancock, and A.W. Confer. 2002. Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA-equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A:3 (Omp28). *Vet. Microbiol.* 87, 221-235.
7. Harper, M., J. D. Boyce, and B. Adler. 2006. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiol. Lett.* 265, 1-10.
8. Heddleston, K.H., J.E. Gallagher, and P.A. Rebers. 1972. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.* 16, 925-936.
9. Hunt, M.L., B. Adler, and K.M. Townsend. 2000. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* 72, 3-25.
10. Lee, J., S. Kang, S.I. Park, H.J. Woo, and M. Kwon. 2004. Molecular cloning and characterization of the gene for outer membrane protein H in a *Pasteurella multocida* (D:4) isolate from pigs with atrophic rhinitis symptoms in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14, 1343-1349.
11. Liao, C.M., C. Huangb, S.L. Hsuan, Z.W. Chenb, W.C. Lee, C.I. Liu, J.R. Winton, and M.S. Chien. 2006. Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Vaccine* 24, 27-35.
12. Luo, Y., J.R. Glisson, M.W. Jackwood, R.E. Hancock, M. Bains, I.H. Cheng, and C. Wang. 1997. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. *J. Bacteriol.* 179, 7856-7864.
13. Luo, Y., Q. Zeng, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, I.H. Cheng, and C. Wang. 1999. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine* 17, 821-831.
14. Petersen, S.K., N.T. Foged, A. Bording, J.P. Nielsen, H.K. Riemann, and P.L. Frandsen. 1991. Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. *Infect. Immun.* 59, 1387-1393.
15. Poolman, J.T., L. Bakaletz, A. Cripps, P.A. Denoel, A. Forsgren, J. Kyd, and Y. Lobet. 2000. Developing a nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) vaccine. *Vaccine* 19 (suppl 1), S108.
16. Rajeev, S., R.V. Nair, S.A. Kania, and D.A. Bemis. 2003. Expression of a truncated *Pasteurella multocida* toxin antigen in *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Microbiol.* 94, 313-323.
17. Rhoades, K.R. and R. B. Rimler. 1987. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Dis.* 31, 895-898.
18. Rutter, J.M. and X. Rojas. 1982. Atrophic rhinitis in gnotobiotic piglets: differences in the pathogenicity of *Pasteurella multocida* in combined infections with *Bordetella bronchiseptica*. *Vet. Res.* 110, 531-535.
19. Simons, K.R., R.J. Morton, R.W. Fulton, and A.W. Confer. 1992. Comparison of antibody responses in cattle to outer membrane proteins from *Pasteurella haemolytica* serotype 1 and from eight untypeable strains. *Am. J. Vet. Res.* 53, 971-975.
20. To, H., S. Someno, and S. Nagai. 2005. Development of a genetically modified nontoxigenic *Pasteurella multocida* toxin as a candidate for use in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Am. J. Vet. Res.* 66, 113-120.
21. Vasfi, M. and K.R. Mittal. 1997. Role of outer membrane protein H (OmpH)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* 65, 4502-4508.

(Received November 20, 2006/Accepted December 22, 2006)

ABSTRACT : Protective Antibodies and Immunity elicited by Immunization with Outer Membrane Protein H of *Pasteurella multocida* in Mice

Moosik Kwon, Young Bong Kim¹, and Jeongmin Lee^{1,2,*} (Department of Genetic Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea, ¹Department of Animal Biotechnology, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, ²Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea)

Pasteurella multocida is one of the important animal pathogen causing widespread infections in various domestic animals. In swine, it causes severe respiratory diseases such as atrophic rhinitis and pneumonic pasteurellosis. To develop the efficient subunit vaccine against swine atrophic rhinitis, we investigated protective antibodies and humoral immunity of outer membrane protein H (OmpH) which is one of the major outer membrane proteins in *P. multocida*. Outer membrane fraction of *P. multocida* was immunologically detectable using antisera from both mice groups vaccinated by formalin-killed whole cells and by commercial vaccine. The expression vector for production of recombinant OmpH was constructed and the recombinant OmpH was expressed and purified from *E. coli*. Recombinant OmpH showed high antigenic and immunogenic properties in mice vaccination and ELISA with antisera.