대 한 의 진 균 학 회 지 제 2 권 제 1 호 1997
Kor J Med Mycol Vol 2, No 1, p.51~58, 1997

■원 저■

*Trichophyton rubrum*으로부터 세포외 단백분해효소의 분리 정제 및 특성 연구

국립보건원 세균질환부 병원감염과, 서울대학교 의과대학 피부과학교실*

김동한 · 이영선 · 유재일 · 최연화 · 주형렬 · 김봉수 · 김기상 · 김정애*

=Abstract=

Purification and Characterization of Extracellular Proteinase from *Trichophyton rubrum*

Dong Han Kim, Yeong Seon Lee, Jae Il Yoo, Yeon Hwa Choi, Hyung Yeul Joo, Bong Su Kim, Ki Sang Kim and Jeong Aee Kim*

Laboratory of Nosocomial Pathogens, Department of Microbiological Diseases, National Institute of Health, and Department of Dermatology, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background: *Trichophyton rubrum* is the most common dermatophyte isolated from human and has ability to invade the tissues such as stratum corneum, nail and hair. The potential role of proteinases as virulence factors of *T. rubrum* has been discussed at length.

Objective: As a first step towards assessing its virulence role, we report on the purification and characterization of proteinase from *T. rubrum* isolate culture filtrates.

Methods: An extracellular serine proteinase has been purified from culture filtrates of *Trichophyton rubrum* HP-9 by ultrafiltration, gel filtration chromatography, and affinity column chromatography. Azocoll and keratin azure were employed as the substrates of enzyme activities. Peak of proteolytic activity was analyzed by gelatin co-polymerized gel electrophoresis.

Results: The molecular weight of the purified enzyme was approximately exhibited to 14.0 kDa on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The optimum pH and molality of 14.0 kDa proteinase activity was 6.0 and 100mM, respectively. The activity was inhibited by serine proteinase inhibitor, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The proteinase degraded gelatin, collagen type VI, and keratin from human epidermis but not hemoglobin.

Conclusion: The 14,000 Mr extracellular serine proteinase purified from *T. rubrum* NP-9 culture filtrates has neutral pH optimum 6.0 and activities against gelatin, collagen type VI, and keratin.

Key Words: *Trichophyton rubrum*, Serine proteinase

서 론

*Trichophyton (T.) rubrum*은 백선의 가장 빈번한 원인균으로 전세계적으로 광범위하게 분포하고 있으며[1], 국내에서 발생하는 표재성 진균증의 60~80%를 차지하고 있다[2]. 이 진균증의 발생 요인으로는 피부 사상균이 케라틴 조직인 손톱이나

†별책 요청 저자: 김동한, 122-020 서울 은평구 녹번동 5 국립보건원 세균질환부 병원감염과

피부에 기생하여 단백질 분해효소인 proteinase를 분비하여 숙주의 각질을 분해함으로서 가용성 영양원으로 사용할 뿐 아니라 숙주 조직을 쉽게 침입할 수 있는 것으로 알려졌다[3~4]. 따라서 *Trichophyton* 속의 배양액으로 부터 proteinase 분리 정제 및 이들 효소의 병원성에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다[5~10]. *T. rubrum*이 생산하는 대부분의 proteinase는 중성 또는 알칼리에서 최적 pH를 가지며 casein, bovine serum albumin (BSA), collagen, elastin, keratin 등에 분해능을 나타내었고, 34,700[11], 44,000[12], 27,000[3]의 alkaline serine proteinase 및 분자량 23,000, 25,000, 53,000, 124,000의 proteinase가 보고[13]되어 있다. 최근 Lambkin 등[13]은 serine proteinase (Mr. 235,000)를 분리 정제하여 이 효소의 특성 및 병원성에 대하여 기술한 바있다. 본 연구에서는 국내 표재성 진균증을 유발시키는 임상 분리주 중에서 proteinase 활성이 높은 *T. rubrum*를 선별하여 이 분리주에서 proteinase을 분리 정제하고 효소의 생화학적 특성 및 분해능을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

본 실험에 사용한 균주는 칠곡 가톨릭 피부과 의원에서 피부 사상균증 환자로부터 분리 동정된 *T. rubrum* 9주, *T. mentagrophyte* 8주, *T. tonsurans* 5주, *Microsporum (M.) canis* 5주, *Epidermophyton (E.) floccosum* 3주 등 총 31주를 수집하여 이중 단백질 분해능이 가장 높은 가칭 *T. rubrum* NP-9을 단백질 분해효소 생산 균주로 사용하였다. Proteinase 생산을 유도하기 위한 배지는 yeast carbon base에 질소원으로 bovine serum albumine 5mg/ml을 여과멸균, 첨가하여 28℃에서 21일동안 진탕배양 후 원심분리한 상청액을 proteinase 조효소로 사용하였다.

2. 효소 활성도 측정 및 기질의 선택

효소 활성도는 Eppendorf tube에 정제 단계별 효소 50~100μl씩 넣고 기질로서 azocoll (Sigma A 9049) 4mg을 첨가한 후 100 mM phosphate buffer (pH 6.0)를 가하여 잘 혼합한 다음 37℃에서 24시간 반응시킨 상청액으로 측정하였다. Keratin 분해능은 keratin azure (Sigma, chemical Co., St, Louis, Mo, U.S.A.) 4mg을 100mM glycine buffer (pH 9.0)에 넣어 37℃에서 48시간 반응시킨후 흡광도 595nm에서 측정하였다[12]. 효소 활성 단위는 이상의 실험 조건에서 azocoll은 시간당 생성되는 흡광도 0.1, keratin은 흡광도 0.01이 생성되는 양으로 하였다.

3. 효소 활성에 미치는 최적 pH 및 mole 농도

단백질 분해효소의 최적 pH결정은 pH 4.0에서 pH 9.0까지 0.5 간격으로 변화시키면서 효소 활성을 측정하였다. 이때 사용한 완충 용액은 pH 4.0~6.0까지는 0.1M sodium citrate, pH 6.0~8.0까지는 0.1M sodium phosphate로 pH 7.0~9.0까지는 Tris-HCl로 완충 용액을 제조하여 활성도를 각각 측정한 결과 가장 높은 pH의 완충 용액에 mole 농도 (0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5M)를 변화시켜 가장 높은 활성을 보인 mole을 효소의 최적 mole농도로 결정하였다.

4. Proteinase 의 정제

T. rubrum NP-9 임상 분리주의 배양 상청액을 YM-10 membrane filter (Amicon., Lexington, Mass.)로 농축한 후 Sephacryl S-200 HR molecular sieve chromatography와 arginine sepharose 4B affinity column chromatography를 실시하여 분리 정제 하였다. 1mM EDTA가 함유된 100mM Tris-HCl (pH8.0) 완충 용액으로 농축된 조효소를 투석한 다음 동일 완충 용액으로 평형된 Sephacryl S-200 HR column (1×45cm)에 1ml을 loading 하고 동일한 완충용액을 사용하여 시간당 10ml의 유속으로 용출 시켰다. azocoll을 기질로 사용하여 proteinase 활성을 측정하여 효소 활성이 있는 분획을 모아 농축하여 affinity column chromatography용 시료로 사용하였다. 20mM Tris-HCl (pH 8.0) 완충용액으로 농축된 조효소를 투석한 다음 동일 완충 용액으로 평형된 arginine sepharose 4B (1×7cm) column chromatography를 실시하였고 유속은 시간당 20ml로 하고 1ml씩 분획하였다. 이때 흡착된 단백질 유출은 0~0.5M NaCl로 농도 구배를 주어 얻은 분획을 흡광도 280nm에서 단백질 양을 측정하였고[14], 효소 활성도를 측정한 다음 활성 있는 분획을 모아 농축하여 정제된 proteinase로 사용하였다.

5. 효소의 단계별 정제도

각 정제 단계별 정제도 관찰은 Laemmil (1970)

[15]의 방법을 약간 변형시켜 실시하였는데, polyacrylamide농도를 4~15% phast gradient gel과 7~15% gradient gel을 만들어 사용하였고, 이들 gel을 15℃에서 25mA로 전기영동 하였다. 영동이 끝난 gel은 0.125% Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)로 염색한 후 gel 에 나타난 단백질 band로 정제 상태를 관찰하였다. 이때 표준 단백질도 전기영동하여 그들의 상대적 이동 거리 (relative mobility; Rf)를 산출한 후, 표준곡선을 작성하고 정제된 proteinase band의 Rf 값을 대응시켜 이들 효소의 분자량을 산정하였다. 표준단백질 (Pharmacia-LKB, Sweden)은 phosphorylase B (94,000), albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100), α-lactalbumin (14,400) 등을 사용하였다.

6. Substrate gel electrophoresis

단백질 분해효소를 탐지하기 위해 gelatin copolymerized substrate gel electrophoresis를 실시하였다[16]. 정제된 proteinase를 sample buffer (×2)와 동량으로 혼합한 후 0.1% gelatin을 첨가한 10% Tris-glycine gel을 사용하여 전기 영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 2.5% Triton X-100용액으로 실온에서 1시간 처리하여 SDS를 제거한 후 developing buffer (Tris Base 10mM, Tris HCl 40mM NaCl 200mM, $CaCl_2$ 5mM, Brij 0.02%)에 넣어 37℃ 항온기에서 24시간 동안 반응시킨 후 0.5% Coomassie Blue R-250으로 염색하여 활성이 나타난 위치를 확인하였다.

7. 정제된 효소 활성에 대한 억제 인자 (inhibitor)의 효과

억제 인자가 정제된 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 eppendorf tube에 억제인자와 정제된 효소액 10μl를 넣고 전체 용량이 100μl가 되도록 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) 를 넣고 잘 혼합한 다음 37℃에서 1시간 반응시킨후 azocoll 4mg을 각각 첨가하여 잘 혼합하여 37℃ incubator에서 24시간 반응시킨 후 효소의 활성을 측정하였다. 이때 억제 인자를 첨가하지 않은 것을 대조군으로 사용하였으며 사용한 억제 인자는 cysteine proteinase 억제 인자인 L-trans-epoxy-succinyl-leucyamide (4-gluanidino) butane (E-64, 10^{-5}M; Sigma), serine proteinase 억제인자인 phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF; 1mM, Sigma), metallo proteinase 억제인자인 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 10mM, Sigma)를 사용하였다.

8. Collagen 분해능 관찰

정제된 효소의 collagen 분해능 여부를 관찰하기 위해 acid soluble calf skin collagen type VI (Sigma)을 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0)에 용해시켜 (4mg/ml) 4℃에 보관하여 제반 실험에 사용하였다. 효소액 10μl와 collagen 20μl (80μg)을 첨가한 후 전체 반응용량이 100μl가 되도록 0.1M phosphate buffer (pH 6.0)을 첨가하여 37℃ incubator에서 반응시켰다. 반응시간에 따른 collagen 분해 정도를 관찰하기 위해 기술한 조건하에서 반응시간을 12시간, 19시간, 36시간 각각 반응시킨 후 Laemmli (1970)방법을 변형하여 전기영동한 후 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 collagen의 분해상태를 관찰하였다. 이때 대조군으로 효소액을 첨가하지 않은 collagen을 사용하였다.

9. Gelatin 분해능 관찰

정제된 효소의 gelatin분해능은 Rege 등 (1989)의 방법에 따라 사용하였다. gelatin (Sigma) 5mg을 PBS buffer 1ml로 용해시켜 4℃에 보관하였다. 분해능 관찰은 효소액 10μl, gelatin 10μl (50μg)을 첨가하고 전체 반응용량이 100μl가 되도록 0.1M phosphate buffer (pH6.0)를 첨가하여 각각 12, 19, 36시간씩 37℃ incubator에서 반응시킨 후 collagen 분해능 관찰과 같은 방법으로 실시하였다.

10. Keratin 분해능 관찰

정제된 효소의 keratin분해능을 관찰하기 위해 keratin (from human epidermis, Sigma) 5mg을 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0) 1ml로 용해시켜 4℃에 보관하였다. 분해능 관찰은 효소액 10μl, keratin 20μl (80μg)을 첨가하고 전체 반응용량이 100μl가 되도록 0.1M phosphate buffer (pH6.0)를 첨가하여 각각 12, 19시간씩 37℃ incubator에서 반응시킨 다음 관찰하였다.

결 과

1. 효소 활성 및 기질 선택

효소 활성도를 관찰하기 위한 기질 선택 실험은 Table 1에서 보는 바와 같다. azocoll (Sigma A

Table 1. Activities of proteinase purified from *T. rubrum* NP-9 against azocoll and keratin azure

Substrates	Enzyme activity (Umg^{-1}protein)*
Azocoll	64.6
Keratin azure	58.0

*One unit of azocoll degrading activity was defined by the increase of 0.1 in OD under the conditions described. For keratin the increase of 0.01 was used.

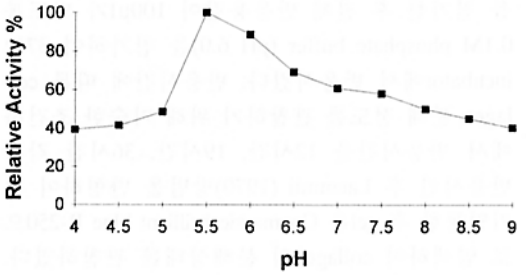

Fig. 1. Effect of pH on the activity of purified proteinase from *T. rubrum* NP-9.

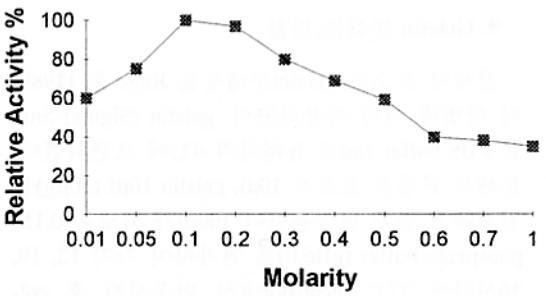

Fig. 2. Effect of molarity on the activity of purified proteinase from culture filtrates of *T. rubrum* NP-9.

Table 2. Effects of inhibitors on the proteolytic activity of the purified enzyme

Inhibitors	Relative activity (%)
None	100
PMSF (1mM)	5
E-64 (10^{-5}M)	105
EDTA (10μM)	80

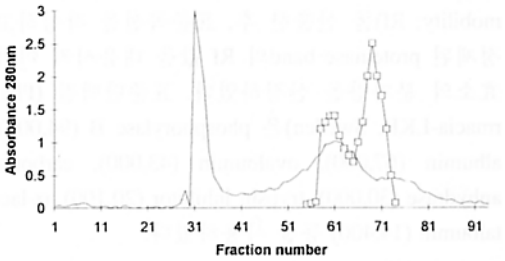

Fig. 3. Elution profile of proteinase on the sephacryl S-200 HR molecular sieve chromatography.
—— : protein content at 280nm
—□— : activity on azocoll

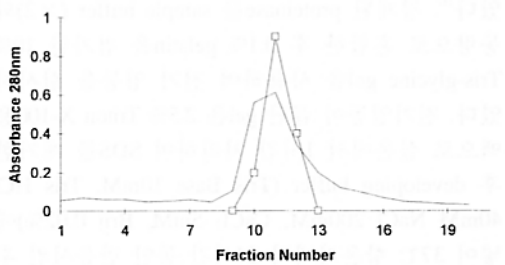

Fig. 4. Elution profile of proteinase on the arginine sepharose 4B affinity chromatography.
—— : protein content at 280nm
—□— : activity on azocoll

9049)과 keratin azure (Sigma 8500)을 이용해 효소의 활성을 비교한 결과 azocoll에 대한 활성이 64.6, keratin이 58.0 unit로 나타나 효소 활성은 keratin 보다 azocoll에 더 높은 것으로 나타났다. 이후 모든 실험의 효소 활성도 측정은 azocoll을 사용하여 측정하였다.

2. 최적 pH 및 최적 mole 농도

완충 용액의 최적 pH를 결정하기 위해 pH 4.0에서 부터 pH 9.0까지 변화를 시켜 효소의 활성을 측정한 결과 pH 4.5부터 효소활성이 점차 증가하기 시작하여 pH 6.0에서 최고의 활성을 보였으며 (Fig. 1) pH 6.0에서 pH 9.0까지는 효소의 활성이 대체적으로 안정성을 나타내어 최적 pH는 6.0으로 나타났다. 최적 pH의 완충용액인 phosphate buffer pH 6.0으로 mole 농도를 변화시켜 효소의 활성을 관찰한 결과 0.1M에서 가장 높은 활성도를 나타내고 0.2M부터는 활성이 감소하기 시작하여 (Fig. 2) 최적 mole농도는 0.1M임을 알 수 있었다.

3. 단백질 분해효소의 정제

효소의 정제를 위해 Sephacryl S-200 HR chromatography를 실시하여 (Fig. 3) 단백질양과 효소 활성도를 측정한 결과 효소 활성이 높은 분획 64-73번을 모아 투석, 농축하여 Arginin Sepharose 4B affinity chromatography (1×8cm)을 실시하였다 (Fig. 4). 흡착된 단백질은 0.5M NaCl로 농도

[15]의 방법을 약간 변형시켜 실시하였는데, polyacrylamide농도를 4~15% phast gradient gel과 7~15% gradient gel을 만들어 사용하였고, 이들 gel을 15℃에서 25mA로 전기영동 하였다. 영동이 끝난 gel은 0.125% Coomassie brilliant blue R-250 (Sigma)로 염색한 후 gel 에 나타난 단백질 band로 정제 상태를 관찰하였다. 이때 표준 단백질도 전기영동하여 그들의 상대적 이동 거리 (relative mobility; Rf)를 산출한 후, 표준곡선을 작성하고 정제된 proteinase band의 Rf 값을 대응시켜 이들 효소의 분자량을 산정하였다. 표준단백질 (Pharmacia-LKB, Sweden)은 phosphorylase B (94,000), albumin (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100), α-lactalbumin (14,400) 등을 사용하였다.

6. Substrate gel electrophoresis

단백질 분해효소를 탐지하기 위해 gelatin copolymerized substrate gel electrophoresis를 실시하였다[16]. 정제된 proteinase를 sample buffer (×2)와 동량으로 혼합한 후 0.1% gelatin을 첨가한 10% Tris-glycine gel을 사용하여 전기 영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 gel은 2.5% Triton X-100용액으로 실온에서 1시간 처리하여 SDS를 제거한 후 developing buffer (Tris Base 10mM, Tris HCl 40mM NaCl 200mM, $CaCl_2$ 5mM, Brij 0.02%)에 넣어 37℃ 항온기에서 24시간 동안 반응시킨 후 0.5% Coomassie Blue R-250으로 염색하여 활성이 나타난 위치를 확인하였다.

7. 정제된 효소 활성에 대한 억제 인자 (inhibitor)의 효과

억제 인자가 정제된 효소의 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 eppendorf tube에 억제인자와 정제된 효소액 10μl를 넣고 전체 용량이 100μl가 되도록 0.1M phosphate buffer (pH 6.0) 를 넣고 잘 혼합한 다음 37℃에서 1시간 반응시킨후 azocoll 4mg을 각각 첨가하여 잘 혼합하여 37℃ incubator에서 24시간 반응시킨 후 효소의 활성을 측정하였다. 이때 억제 인자를 첨가하지 않은 것을 대조군으로 사용하였으며 사용한 억제 인자는 cysteine proteinase 억제 인자인 L-trans-epoxy-succinyl-leucyamide (4-gluanidino) butane (E-64, 10^{-5}M; Sigma), serine proteinase 억제인자인 phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF; 1mM, Sigma), metallo proteinase 억제인자인 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; 10mM, Sigma)를 사용하였다.

8. Collagen 분해능 관찰

정제된 효소의 collagen 분해능 여부를 관찰하기 위해 acid soluble calf skin collagen type VI (Sigma)을 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0)에 용해시켜 (4mg/ml) 4℃에 보관하여 제반 실험에 사용하였다. 효소액 10μl와 collagen 20μl (80μg)을 첨가한 후 전체 반응용량이 100μl가 되도록 0.1M phosphate buffer (pH 6.0)을 첨가하여 37℃ incubator에서 반응시켰다. 반응시간에 따른 collagen 분해 정도를 관찰하기 위해 기술한 조건하에서 반응시간을 12시간, 19시간, 36시간 각각 반응시킨 후 Laemmli (1970)방법을 변형하여 전기영동한 후 gel은 Coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 collagen의 분해상태를 관찰하였다. 이때 대조군으로 효소액을 첨가하지 않은 collagen을 사용하였다.

9. Gelatin 분해능 관찰

정제된 효소의 gelatin분해능은 Rege 등 (1989)의 방법에 따라 사용하였다. gelatin (Sigma) 5mg을 PBS buffer 1ml로 용해시켜 4℃에 보관하였다. 분해능 관찰은 효소액 10μl, gelatin 10μl (50μg)을 첨가하고 전체 반응용량이 100μl가 되도록 0.1M phosphate buffer (pH6.0)를 첨가하여 각각 12, 19, 36시간씩 37℃ incubator에서 반응시킨 후 collagen 분해능 관찰과 같은 방법으로 실시하였다.

10. Keratin 분해능 관찰

정제된 효소의 keratin분해능을 관찰하기 위해 keratin (from human epidermis, Sigma) 5mg을 0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0) 1ml로 용해시켜 4℃에 보관하였다. 분해능 관찰은 효소액 10μl, keratin 20μl (80μg)을 첨가하고 전체 반응용량이 100μl가 되도록 0.1M phosphate buffer (pH6.0)를 첨가하여 각각 12, 19시간씩 37℃ incubator에서 반응시킨 다음 관찰하였다.

결 과

1. 효소 활성 및 기질 선택

효소 활성도를 관찰하기 위한 기질 선택 실험은 Table 1에서 보는 바와 같다. azocoll (Sigma A

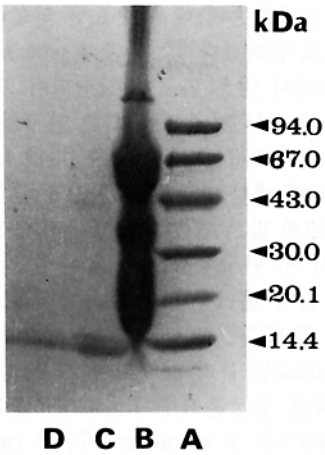

Fig. 5. SDS-PAGE analysis of purified proteinase from culture filtrate of *T. rubrum* NP-9.
Lane A; standard marker protein
Lane B; crude extract
Lane C; active peak from gel filtration
Lane D; active peak from arginin Sepharose 4B

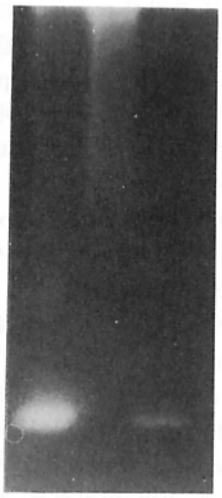

Fig. 6. Substrate gel electrophoresis of purified proteinase from filtrate of *T. rubrum* NP-9.
Lane A; crude extract
Lane B; gel filtration
Lane C; purified proteinase

구배를 주어 용출하여 단백질양과 효소 활성을 측정하여 가장 활성도가 높은 분획 10-12번을 모아 투석, 농축하였다.

4. 정제된 효소의 영동상 관찰

각 정제 단계별 시료들의 정제 상태를 전기영동 (SDS-PAGE)을 실시한 결과 조효소에서는 전

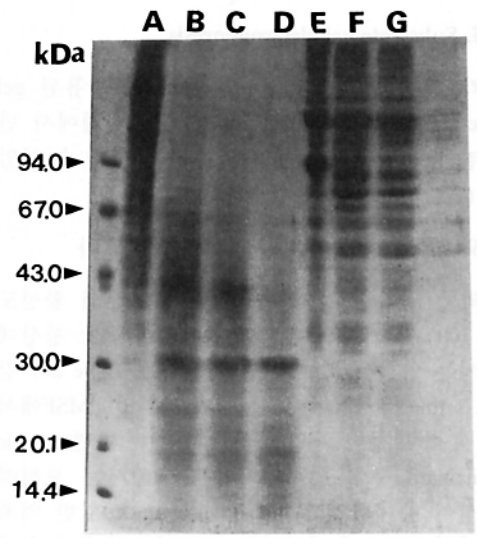

Fig. 7. Degradation of hemoglobin and collagen TypeVI substrates by serine proteinase from crude extract of *T. rubrum* NP-9.
Lane A; control hemoglobin
Lane B-D; incubated for 12, 19, 36 hrs
Lane E; control collagen TypeVI
Lane F-H; incubated for 12, 19, 36 hrs

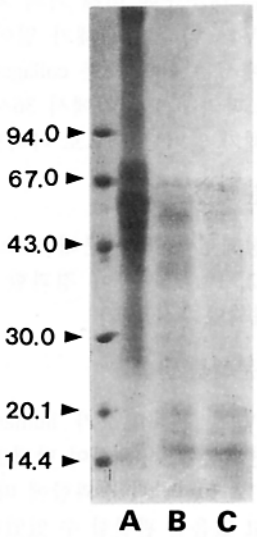

Fig. 8. Degradation of keratinVI substrates by serine proteinase from crude extract of *T. rubrum* NP-9.
Lane A; control keratin
Lane B-C; incubated for 12, 19hrs

체적으로 여러 단백질 band가 나타났으며 Sephacryl S-200 HR chromatography와 affinity chromatography를 차례로 실시한 결과 약 14.0kDa의 단백질이 정제되었다 (Fig. 5).

5. Substrate gel electrophoresis

각 정제 단계별로 0.1% gelatin이 함유된 gel electrophoresis를 실시한 결과 최종 단계에서 단백질 분해효소가 정제 되었음을 확인할 수 있었다 (Fig. 6).

6. 효소활성에 미치는 억제인자의 효과

억제 인자를 첨가하지 않은 대조군의 활성도를 100%로 기준하여 억제 인자들이 효소 활성에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과는 Table 2와 같다. serine proteinase 특이 억제 인자인 PMSF에서는 효소 활성이 거의 나타나지 않는 반면 cystein proteinase 특이 억제인자인 E-64에서는 오히려 활성이 증대되었고 metallo proteinase 일반 억제인자인 EDTA에 대해서는 80% 정도의 활성이 나타나 *T. rubrum* NP-9에서 정제된 단백질 분해효소는 serine proteinase임을 확인 할 수 있었다.

7. Collagen 분해능 관찰

정제된 효소와 collagen을 반응시킨 결과 반응 12시간 에서는 대조군에 비해 거의 차이가 없었으나 19시간부터 약간의 분해가 일어나기 시작하여 36시간에서는 거의 모든 collagen이 분해되었다 (Fig. 7). 따라서 19시간에서 36시간 사이에 대부분의 분해가 일어난 것으로 나타났다.

8. Gelatin 분해능 관찰

Gelatin과 정제된 단백질 분해 효소의 반응 결과 시간이 12, 19, 36시간이 경과할 수록 점차 gelatin이 분해되었다 (Fig. 7).

9. Keratin 분해능 관찰

정제된 단백질 분해효소가 human epidermis keratin을 천연 기질로 사용하여 단백질 분해능을 관찰한 결과 12, 19시간이 경과함에 따라 빠른 속도로 분해되고 있음을 관찰할 수 있었다 (Fig. 8).

고 찰

*Trichophyton*속을 비롯한 피부 진균속의 배양액에 존재하는 단백질 분해효소에 관한 연구들이 수행되어 그 특성들에 관한 연구 보고가 발표되면서 이들 단백질 분해효소들은 피부진균의 숙주 체내 이행, 영양 섭취 및 숙주의 병리학적 증상을 유발하는데 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려졌다[17,18]. 진균의 proteinase는 *Candida*균속에서 많은 연구가 시작되어 *Trichophyton*을 비롯한 피부 진균속에 대한 연구가 진행되어 왔으나 국내에서는 *M. canis*로 부터 keratinolytic proteinase 에 대한 연구 보고가 있을 뿐[19-23] 피부 진균속에 대한 많은 연구는 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 국내 피부 진균증을 일으키는 임상 분리주를 수집하여 proteinase 활성이 높은 분리주를 선별하고 이 분리주가 생산하는 proteinase를 분리 정제하여 그 특성을 조사하였다. 국내 임상분리주 *T. rubrum* 9주, *T. mentagrophyte* 8주, *T. tonsurans* 5주, *M. canis* 5주, *E. floccosum* 3주 등 총 31주를 대상으로 yeast carbon base에 bovin serum albumin을 질소원으로서 5mg/ml농도로 첨가하여 proteinase 활성을 조사해 본 결과 *T. rubrum* NP-9가 가장 높아 이 분리주에 대한 proteinase 분리 정제를 시도하였다.

*T. rubrum*에서 분리한 proteinase는 분자량이 약 44,000, 14,000의 두가지 proteinase를 생산하는 것으로 나타났으나 분자량 44,000의 proteinase는 이전에 보고된 바 있어[11] 그동안 밝혀지지 않은 것으로 추정되는 분자량 14,000 proteinase에 대한 특성을 조사하였다.

분자량 14,000의 proteinase는 azocoll에 활성을 나타내었고 최적 pH 6.0이었으며 저해제에 대한 억제효과는 serine proteinase 특이 억제 인자인 PMSF에 강하게 억제되는 것으로 보아 serine proteinase로 나타났다.

지금까지 *Trichophyton*속에서 분리된 대부분의 proteinase 활성은 중성이나 알칼리에서 최적 pH를 나타났고 serine proteinase로 알려져 이들 proteinase의 특성과 거의 일치하는 것으로 나타났다. *T. rubrum*에서 분리된 proteinase의 분자량은 44,000, 36,000, 34,700[11], 27,000[3], *T. menatagrophytes*에서 Mr. 30,000, 48,000[5], *T. gramulosum*에서 34,300 등이 각각 보고된 바 있고[18] *M. canis*에서 45,000이 분리되었으나[9] 분자량 14,000 정도의 proteinase는 아직 보고된 바 없어 이에 대한 특성연구가 주목된다. 위의 보고에서 대부분의 proteinase 분자량은 50KDa 이하로 이들 proteinase가 숙주 침입, 체내 이행과 영양 섭취에 관여하는 것으로 생각되어 왔으나 최근 Lambkin[13] 등이 *T. rubrum*으로부터 Mr. 235,000 proteinase를 분리하여 발표한 바에 의하면 이 고

분자량의 proteinase가 얼리고 녹이는 과정에서 53,000, 27,000, 25,000의 저 분자량의 proteinase가 생성된 것으로 보고하고 있어 저분자량의 proteinase가 고분자량의 proteinase의 분해 산물인지에 대한 연구 및 이들 효소 활성의 특성 차이 등에 대한 자세한 특성 연구가 요구되어 진다. 또한 proteinase에 대한 보고가 거의 발표되지 않은 *T. tonsurans* 임상 분리주에서도 azocoll에 대한 proteinase 활성이 높은 것으로 나타나고 있어 앞으로 *T. rubrum* 이외에도 다른 균종에 대한 proteinase를 조사하여 그 효소의 종류 및 특성에 대한 비교 및 병원성에 관한 연구가 계속 진행되어야 한다고 본다.

결 론

국내 피부 진균증을 일으키는 임상 분리주 31주를 대상으로 azocoll에 대한 proteinase활성을 비교하여 활성이 가장 높은 *Trichophyton rubrum* NP-9을 proteinase 생산 균주로 선별하고 이 분리주를 yeast carbon base에 질소원 BSA를 첨가하여 21일동안 배양한 배양액을 조효소로 사용하여 분리 정제하여 그 특성을 조사한 결론은 다음과 같다.

1. SDS-PAGE를 실시하여 정제된 proteinase의 분자량을 관찰한 결과 14.0kDa으로 나타났고 활성 band는 gelatin 이 함유된 gel electrophoresis에서 확인하였다.

2. 14.0kDa의 proteinase 활성의 최적 pH는 6.0이었고 최적 몰농도는 100mM이었다.

3. PMSF, EDTA와 E-64 등의 저해제들의 효소 활성에 미치는 영향을 비교한 결과 serine proteinase 특이 억제 인자인 PMSF에서만 효소 활성이 강하게 저해된 것으로 보아 정제된 proteinase는 serine proteinase임을 알수 있었다.

4. 기질 분해능 시험에서는 gelatin, collagen Type VI, human epidermis keratin 등을 분해한 반면 hemoglobin은 분해하지 못하였다.

참 고 문 헌

1. Rippon JW. Medical Mycology. Philadelphia: WB Saunders, 1982: 154-248
2. 김기홍, 박용묘, 김종철, 최종수. 배지에 착색을 보인 *T. rubrum*에 의한 체부백선 1예. 대피지 1991; 29: 529-532
3. Apodaca G, Mckerrow JH. Purification and characterization of a 27,000-M_r extracellular Proteinase form *Trichopyton rubrum*. Infect Immun 1989; 57: 3072-3080
4. Minocha Y, Pasricha JS, Mohapatra LN, Kandhari KC. Proteolytic activity of dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesions. Sabouraudia 1972; 10: 79-85
5. Yu RJ, Harmon DSR, Blank F. Hair digestion by a keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. J Invest Dermatol 1969; 53: 166-171
6. Yu RJ, Harmon SR, Wachter PE, Blank F. Amino acid composition and specificity of a keratinase of *Trichophyton mentagraphytes*. Arch Biochem Biophy 1969; 135: 363-370
7. Yu RJ, Harmon SR, Grappel SF, Blank F. Two cell-bound keratinases of *Trichophyton mentagrophytes*. J Invest Dermatol 1971; 53: 27-32
8. Wawrzkiewicz K, Lobarzewski J, Wolski T. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. J Med Vet Mycol 1987; 25: 261-268
9. Takiuch ID, Sei HY, Koga M. Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *M. canis*. Sabouraudia. 1982; 20: 281-288
10. Takiuch I, Sei Y, Takag H, Negi M. Partial characterization of the extracellular keratinase. J Dermatol 1984 ; 10: 327-330
11. Sanyal AK, DAS SK, Banerjee AB. Purification and partial characterization of an extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. J Med Vet Mycol 1985; 23: 165-178
12. Aschi M, Lindquist R., Fukuyama K, et al. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. Biochem J 1985; 232: 139-144.
13. Lambkin I, Hamilton AJ, Hay RJ. Partial purification and characterization of a 235,000 Mr extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. Mycoses 1995; 38: 151-157
14. Lowry OH, Robough NJ, Farr SL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-275
15. Laemmli DK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head bacteriophage T4.

Nature (Lodon) 1970; 227: 680-685
16. Heuwwen C, Dowdle EB. Electrophoresis analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substances. Anal Bioclem 1980; 102: 196-202
17. Minocha Y, Pasricha JS, Mohapatra LN, Kandhari KC. Proteolytic activity of dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesions. Sabouraudia 1972; 10: 79-85
18. Meevootisom V, Niederpruem DJ. Control of exocellular proteases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia 1979; 17: 91-106
19. Lee KH, Park HW, Lee JB. Detection of keratinolytic proteinase in skin tissues from guinea pigs infected with *M. canis* by an immunoperoxidase technique. J Dermatol Sci 1990; 1: 447-454
20. 이광훈, 박광균. Microsporum canis로부터 분리정제한 keratinolytic proteinase의 기질 특이성 및 inhibitors에 관한 연구. 원주의대논문집 1988; 1: 161-169
21. Lee KH, Lee HW, Lee JB. Localization of keratinolytic proteinase in skin tissue section of guinea pigs with Microsporum canis infection by immunoperoxodase technique in electron microscopy. Annals Dermatol 1991; 3: 1-4
22. Lee KH, Lee JB. Lee MG, Song DH. Detection of circulating antibodies to purified keratinolytic proteinase in sera from guinea pigs infected with Microsporum canis by enzyme-linked immunosorbent assay. Arch Dermatol Res 1988; 280: 45-49
23. Lee KH, Park KK, Park SH, Lee JB. Isolation, purification and characterization of keratinolytic proteinase from Microsporum canis. Yonsei Med J 1987; 28: 131-138