대한의진균학회지 제 3권 제 2호 1998

■원 저■

피부사상균에서 각질분해효소의 분리정제 및 특성비교

연세대학교 의과대학 피부과학교실

이상주 · 이광훈 · 이원재* · 이정복

=Abstract=

Isolation and Characterization of Keratinases from Different Kinds of Dermatophytes

Sang-Ju Lee, Kwang Hoon Lee, Won Jae Lee* and Jung Bock Lee

*Department of Dermatology, Laboratory of Immunology, Medical Research Center**
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Several groups of workers have isolated and purified the keratinolytic proteinases from some species of dermatophytoses. But it is not efficient to compare the interspecies of dermatophytosis because the separation and purification are done by different conditions.

Objective: To compare the characteristics and difference of the keratinases which are isolated and purified from *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum canis* in the same conditions.

Methods: Proteinases elaborated from *T. rubrum, T. mentagrophytes* and *M. canis* were purified by precipitation using ammonium sulfate and by SMART. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out, and the effect of various inhibitors was investigated. A variety of substrates for KPase were tested.

Results: 1. The keratinases were isolated and purified 17.3, 22.0, 17.6-fold from *T. rubrum, T. mentagrophytes* and *M. canis*. 2. Each molecular weight of the keratinolytic proteinases isolated and purified from *T. rubrum, T. mentagrophytes* and *M. canis* was 53 kDa, 65 kDa, 77 kDa. 3. Phenylmethylsulfonylfluoride inhibited the keratinase activity in *T. rubrum, T. mentagrophytes* and *M. canis*. 4. The keratinases from *T. rubrum* and *T. mentagrophytes* digested much more human stratum corneum and human nail than human scalp hair, but keratinase from *M. canis* digested much more human scalp hair than human stratum corneum and human nail.

Conclusion: The results show keratinases from *T. rubrum, T. mentagrophytes*, and *M. canis* were different each other, but they may be a kind of serine proteinase. The keratinases from *T. rubrum, T. mentagrophytes* may play an important role in tinea pedis and tinea unguis by affecting the human stratum corneum and human nail, and the keratinase from *M. canis* may play an important role in tinea capitis by affecting the human hair.

[Kor J Med Mycol 3(2): 95-106]

Key Words: Keratinase, *Trichophyton rubrum, Trichophyton mentagrophytes, Microsporum canis*, SMART

본 연구는 연세대학교 의과대학 1996년도 교수연구비에 의하여 이루어졌음. (과제번호: 1996-20호)

*본 논문의 요지는 제5차 대한의진균학회 학술대회에서 발표하였음

†별책 요청 저자: 이정복, 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 피부과학교실

서 론

피부사상균은 피부 질환 중 비교적 흔한 백선의 원인균으로서 세계적으로 약 30여종이 인체에 병원성을 갖는 것으로 보고되어 있다. 피부사상균은 주로 피부각질층, 조갑 및 모발 등의 각질조직에만 기생하여 병변을 유발하는데 대부분의 단백분해효소에 강한 저항성을 갖는 각질조직을 이 균이 어떻게 파괴하여 그들의 생존에 필수적인 질소공급원으로 이용하는지 그 기전에 관해서는 아직도 확실히 밝혀져 있지 않다. 근래에 피부사상균으로부터 만들어지는 화학물질에 의해 각질성분이 분해될 수 있다는 근거가 전자현미경 검사와 면역형광현미경 검사로 제시된 후, 여러 피부사상균종에서 단백분해효소가 분리정제되었다[1~7]. 피부사상균의 단백분해효소들은 균종에 따라 생화학적 성상이 다소 다른 것으로 알려져 있으며, 이 효소의 역할은 진균 자신의 성장과 증식에 관여할 뿐 아니라, 피부사상균 감염에 대한 숙주의 면역반응에도 관여하는 것으로 보고되었다[8,9]. 또한 단백분해효소는 피부질환을 유발하는 피부사상균의 병원성을 결정하는데 중요한 인자로 작용할 가능성이 큰 것으로 알려져 있다.

*Trichophyton rubrum*은 전세계적으로 피부사상균 중에서 가장 흔한 원인균으로 *T. rubrum*에서 분비되는 단백분해효소들에 대해서는 오랫동안 연구가 이루어져 왔다. 또한 주목할만한 것은 각질분해능이 약한 단백분해효소도 피부사상균의 감염에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 또 *T. rubrum*에서 이합체의 형태로 존재하는 90 kDa의 단백분해효소가 존재함이 보고되었고[10], 최근 다른 보고에서 *T. rubrum*으로부터 각질 분해능이 매우 약한 분자량 235 kDa의 단백분해효소가 분비되는 것을 관찰하였다[11].

*T. mentagrophytes*도 매우 흔한 피부사상균으로서 한 연구에서 10주의 *T. mentagrophytes*균주로부터 28~65 kDa에 해당하는 각질을 분해하는 단백분해효소들을 분리하고 동일한 균종에서도 다양한 각질분해효소가 존재함을 보고하였다[12]. 또 다른 연구들에서는 *T. mentagrophytes*로부터 보고자에 따라 각각 38 kDa과 65 kDa의 각질분해효소를 분리한 바 있다[13,14].

*Microsporum canis*는 두부백선을 일으키는 주원인균의 하나이며, 국내에서도 1970년대 후반부터 발생빈도가 급격히 증가하였다. 이는 *M. canis*가 동물기호성 진균 (zoophilic fungi)으로서 전에는 주로 개나 고양이 같은 동물에 기생하였으나 최근 감염동물의 이동증가, 애완동물의 사육증가, 부신피질홀몬제의 남용 등에 의해 인체에도 흔히 감염되기 때문인 것으로 추정되고 있다[15,16]. 국내에서도 *M. canis*로부터 각질분해효소를 분리정제한 바가 있으며[7,9,17], 실험적으로 유발시킨 피부사상균증 병변에서 면역조직화학검사와 면역전자현미경 검사로 조직내 각질분해효소를 관찰한 바 있다[18,19].

경성 각질의 모발, 조갑과 연성 각질의 표피는 각질의 구성성분이 다르며, 모발, 조갑, 표피에 따라 피부사상균증의 원인균종의 분리빈도에 차이가 있다[20]. 이것은 모발, 조갑, 표피의 각질 구성성분에 따라 피부사상균의 각질분해능력이 균종에 따라 다를수 있음을 시사하는 소견이다. 따라서 피부사상균의 단백분해효소의 생화학적 특성이나 면역학적 특성을 비교해 보는 것은 피부사상균의 병원성 측면에서 중요한 과제이다. 피부사상균의 단백분해효소에 대한 연구는 여러 학자들에 의해 많이 시도되었으나[5,6,21], 아직 사람의 각질을 대상으로 기질특이성을 관찰한 연구는 거의 없다. 그리고 현재까지 대부분 보고들은 피부사상균 중 단일 균종을 대상으로 각기 다른 조건에서 분리정제를 시행하였으므로 균종별 성상을 직접적으로 비교하기엔 무리가 있다. 본 연구에서는 피부사상균 중 피부사상균증의 원인으로서 가장 흔한 *T. rubrum, T. mentagrophytes*와 *M. canis* 3균종을 대상으로 배양여과액에서 각질분해효소를 분리정제하여 이들의 기질특이성을 비롯한 생화학적 성상을 비교 관찰함으로써 피부사상균의 균종별 병원성의 차이와 연관하여 병인에 끼치는 각질분해효소의 역할을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 사용된 피부사상균

연세대학교 의과대학부속 세브란스병원 피부과 외래에서 임상증상 및 KOH 직접도말검사에 의해 피부사상균증으로 진단 받은 환자의 병변부위로부터 수집한 가검물을, Sabouraud 배지 배양검사, corn meal 배지 배양검사, slide 배양검사

등에 의해 조갑백선 환자의 조갑에서 분리 동정한 *T. rubrum,* 족부백선 환자의 족저에서 분리 동정한 *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*와 두부백선 환자의 모발에서 분리 동정한 *M. canis* 각각 2주를 실험에 사용하였다.

2. 각질분해효소의 분리정제

1) 진균 배양 방법

각질분해효소의 분리는 Takiuchi 등 (1982)의 방법을 수정하여 다음과 같이 시행하였으며 모든 실험은 무균상태에서 시행하였다[22]. *T. rubrum, T. mentagrophytes, M. canis* 각각 2 균주 (TR1, TR2, TM1, TM2, MC1, MC2)를 1,000 ml 삼각 유리용기에 담겨있는 300 ml의 2% Sabouraud 포도당 액체배지에 접종하고 섭씨 27도로 고정된 항온배양기에서 2주간 배양한 후 균사체를 여과지에 걸러서 28 mM phosphate완충용액 (pH 7.8)에 넣어 전체량을 100 ml로 하고 Waring blender로 최대속도에서 2분간 진탕하여 균질액을 만들었다. 이 균질액을 2,000 ml의 삼각 유리용기에 담겨있는 900 ml의 각질배지에 접종하고 섭씨 27도로 고정된 항온배양기에서 5일간 배양한 후 섭씨 27도로 고정된 항온수욕진탕기로 옮겨 5일간 더 진탕배양하였다. 각질배지는 28 mM phosphate 완충용액 (pH 7.8), 1,000 ml에 glucose 0.5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g; inositol 0.05 g; pyridoxin · HCl 0.01 g; thiamine · HCl 0.01 g; human hair 2.6 g이 함유되도록 만들었으며, 3~4 mm 길이로 자른 건강한 사람의 머리털을 비누로 세척한 후 재증류수로 10회 이상 세척하여 공기중에 건조시킨 후 기질로 사용하였다. 이후 효소분리에 관한 모든 실험을 섭씨 4도에서 시행하였다. 접종 후 10일간 자란 배양물을 여과지로 걸러 남아있는 사람의 모발과 균사체를 제거하고 여기서 얻은 여과액을 모아서 다음 실험을 진행하였다.

2) 효소활성 측정

효소활성은 Yu 등 (1968)의 방법을 수정하여 다음과 같이 측정하였다[4]. 효소기질로서 사용하기 위해 기니픽 모발을 1~2 mm 길이로 잘라서 50% chloroform-methanol로 세척하여 섭씨 42도의 같은 용액에 12시간 담근 후 재증류수로 10회 세척하고 공기중에 건조하여 준비하였다. 28 mM phosphate 완충용액 (pH 7.8)으로 희석한 총 용량 5 ml의 효소용액에 50 mg의 기니픽 모발을 첨가하여 섞은 후 섭씨 37도로 유지시킨 항온수욕진탕기에서 12시간 진탕한 다음 남아있는 모발을 여과하여 제거하고 Bradford 시약 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, U.S.A.)을 넣은 후 파장 595 nm에서 여과액의 흡광도 변화를 측정하여 효소의 양을 측정하였다[23]. 대조용액으로서 섭씨 100도에서 10분간 끓인 효소용액을 사용하였다. 효소특이활성도는 단백질 1 mg에 대한 효소활성 unit로 표시하였다.

3) Ammonium sulfate를 이용한 침전

여과액 200 ml내의 단백질을 100% 침전 시키기 위해 ammonium sulfate 141.4 g을 준비한 후 4℃에서 천천히 여과액에 ammonium sulfate를 주입하였다. 그후 3000 g에서 40분간 원심분리 시켰다. 원심분리후 상층액을 제거한 다음 침전물만을 모아 28 mM phosphate 완충용액 (pH 7.8)에 넣어 녹인후 총량을 1 ml로 만들었다. Bradford법을 이용해 단백질양을 측정하였고 동시에 효소활성도를 측정하였다[23].

4) SMART를 이용한 효소 분리정제

Mono Q 이온교환 column (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden)에 재료 및 방법 2. 3)항에서 얻은 용액 100 μl를 사용하였고, Buffer A로 28 mM phosphate 완충용액 (pH 7.8)을, Buffer B로 28 mM phosphate 완충용액 (pH 7.8)과 1 M NaCl를 섞은 용액을 사용하였으며 SMART system® (Pharmacia Biotechnology, Uppsala, Sweden)을 통해 분당 100 μl씩 유출되도록 하면서 각 시험관에 100 μl씩 받은 유출액의 흡광도를 280 nm에서 측정하였다. 이와 함께 유출액의 단백질양을 그래프로 얻었고 효소의 양도 측정하였다.

5) 전기영동을 이용한 단백분해효소의 순수도 검정

SMART system을 통해 얻은 단백분해효소의 순수도를 polyacrylamide slab gel 전기영동으로 검정하였다[24]. 28 ml의 monomer용액, 18.1 ml의 1.5 M Tris-HCl완충용액 (pH 8.8), 0.7 ml의 10% SDS, 70 μl의 TEMED, 75 μl의 20% ammonium persulfate와 23 ml의 재증류수를 섞은 후 이 용액을 중합시켜 분리 gel을 만들었다. 1.38 ml의 monomer 용액, 1.25 ml의 0.5 M Tris-HCl완충용액 (pH 6.8), 100 μl의 10% SDS, 10 μl의 TEMED, 50 μl의 20% ammonium persulfate, 50 μl의 riboflavin-5-monophosphate와 7.35 ml의 재증류수를 섞어 이 용액을 중합시켜 누적 gel을 만들었다. 각 분리과정에서 얻어진 단백질 50 μg이 포함된 시료

완충액 0.05 ml를 섭씨 100도에서 2분간 열처리한 후 상청액을 각 well에 넣고 120 volt로 섭씨 4도에서 전기영동을 실시하였다. Gel을 silver stain® (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, U.S.A.)으로 염색하였다. 은염색은 우선 고정촉진용액으로 20분간 고정시킨 후 증류수로 20분간 세척하였다. 20분간 은염색약으로 염색 후 5% acetic acid로 염색반응을 중지시켰다.

3. 단백분해효소 억제제의 각질분해효소 효소활성 억제능

Cocktail solution, phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), N-tosy-L-phenylalanine chloromethyl keton (TPCK), N-ethyl-maleimide (NEM), dithiotreitol, pepstatin, EDTA (이상 Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.) 등의 단백분해효소 억제제를 실험에 사용하였다. 28 mM phosphate 완충용액 (pH 7.8)으로 희석한 효소용액 100 μl에 10~100 μg/ml 또는 1~10 mM 농도의 억제제 100 μl를 넣고 섭씨 37도에서 30분간 반응시킨 후 재료 및 방법 2. 2)항에 기술한 방법에 따라 효소활성을 측정하였다. 대조용액으로 섭씨 100도에서 10분간 끓인 효소용액을 사용하였다.

4. 사람의 각질준비

사람의 모발, 조갑, 및 족저로부터 박리한 피부각질을 다음과 같이 준비하였다. 사람의 각질을 재증류수로 10회 세척하고 소량의 재증류수를 첨가한 후 균등분산기를 사용하여 균질액을 만들었다. 이 균질액을 섭씨 4도에서 Sorvall 원심분리기를 이용하여 39,000xg로 30분간 원심분리하였다. 침전물중 수용성 단백질을 제거하기 위해 상기와 동일한 방법으로 4회 더 시행한 후 상층액을 제거하고 침전물을 동결건조하여 기질로서 사용하였다.

5. 단백질 기질에 대한 각질분해효소의 가수분해 능력

상기의 4항에서 준비된 사람의 모발, 조갑, 및 족저로부터 박리한 피부각질과 ovalbumin, bovine hemoglobin, bovine serum albumin (BSA) 등을 기니픽 모발대신 기질로 사용하여 재료 및 방법 2. 2)항에 기술한 방법에 따라 효소활성을 측정하였다.

6. BSA 분해능 관찰

정제된 효소의 BSA 분해능 여부를 관찰하기 위해 효소액 10 μl와 BSA 20 μl를 첨가한 후 전체 반응용량이 100 μl가 되도록 0.1 M phosphate 완충용액을 첨가하여 37℃에서 24시간 반응시킨 후 상청액을 수집한 다음 전기영동을 실시한 후 gel을 Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.)으로 염색하여 BSA의 분해상태를 관찰하였다.

결 과

1. 기질에 따른 균종별 효소활성도의 비교

Sabouraud 포도당 액체배지에서 2주 자란 *T. rubrum* (TR1, TR2), *T. mentagrophytes* (TM1, TM2), *M. canis* (MC1, MC2) 각각 두 균주씩을 각질배지에 10일간 배양한 배양용액을 여과한 후 균종별 효소특이활성도 (specific activity) 차이를 Bradford 법으로 측정하였다[23]. 기질에 따른 효소활성도의 차이를 보면 TR1, TM2, MC1에서는 기니픽 모발을 기질로 사용시 각각 192, 268, 280 units/mg로 효소특이활성도가 높은 반면 TR2, TM1, MC1에서는 발바닥에서 얻은 피부각질을 사용시에 효소특이활성도가 각각 70, 31, 20 units/mg로 조금 높게 나타났다. 효소활성도는 발바닥에서 얻은 피부각질보다 기니픽 모발을 사용한 경우에 더 높은 것으로 나타나 이후 모든 실험의 효소활성도 측정에는 기니픽 모발을 사용하였다. 균종별로 두 균주중 효소활성이 높은 것을 실험에 사용하였다.

2. 각질분해효소 분리정제

*T. rubrum*의 배양용액을 여과지에 여과한 용액 800 ml에는 총 단백질양이 5,524.0 mg에 효소활성은 209,140.0 units로 효소특이활성도는 37.9 units/mg이었다. 이 효소용액을 ammonium sulfate를 이용해 침전시킨 후 얻은 균질액 4 ml에는 총 단백질양이 1,152.3 mg에 효소활성은 173,346.4 units로 효소특이활성도는 150.4 units/mg이었다. 그리고 이 용액을 SMART를 실시한 결과 여러개의 단백질 정점이 관찰되었고 이 중 단백질 정점과 효소의 정점이 일치한 1번에서 5번 분획의 유출액의 총 단백질량은 249.2 mg, 총 효소활성은 163,128.0 units, 효소특이활성도는 654.5 units/mg

로 각질분해효소는 17.3배 정제 되었다 (Fig. 1).

*T. mentagrophytes*의 배양용액을 여과지에 여과한 용액 800 ml에는 총 단백질양이 8,055.6 mg에 효소활성은 89,825.6 units로 효소특이활성도는 11.2 units/mg이었다. 이 효소용액을 ammonium sulfate를 이용해 침전시킨 후 얻은 균질액 4 ml에는 총 단백질양이 556.6 mg에 효소활성은 24,920.0 units로 효소특이활성도는 49.2 units/mg이었다. 그리고 이 용액을 SMART를 실시한 결과 초기 분획인 1번에서 5번 분획에서 단백질과 효소활성 정점이 일치하여 나타났다 (Fig. 2). 1번에서 5번 분획의 유출액의 총 단백질량은 78.8 mg, 총 효소활성은 19,282.4 units, 효소특이활성도는 244.8 units/mg으로 각질분해효소는 22.0배 정제 되었다.

*M. canis*의 배양용액을 여과지에 여과한 용액 800 ml에는 총 단백질양이 8,469.2 mg에 효소활성은 114,594.4 units로 효소특이활성도는 13.5 units/mg이었다. 이 효소용액을 ammonium sulfate를 이용해 침전시킨 후 얻은 균질액 4 ml에는 총 단백질양이 1,091.6 mg에 효소활성은 91,986.4 units로

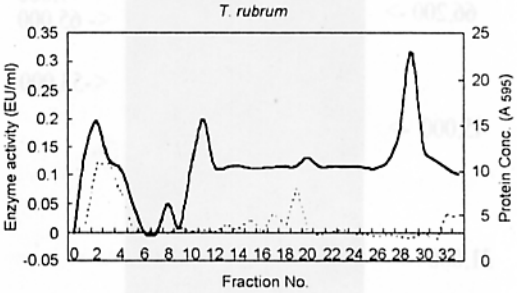

Fig. 1. SMART finding and enzyme activity of *T. rubrum* culture filtrate
(——: protein content at 595 nm, – – –: enyme activity).

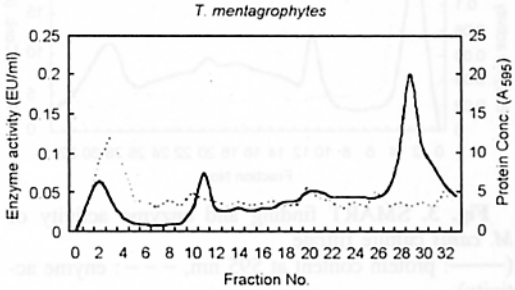

Fig. 2. SMART finding and enzyme activity of *T. mentagrophytes* culture filtrate
(——: protein content at 595 nm, – – –: enyme activity).

Table 1. Separation and purification of keratinase from *T. rubrum, T. mentagrophytes* and *M. canis*

Separation & purification step	Total amount (ml)	Enzyme activity (unit)	Protein amount (mg)	Specific activity (units/mg)	Purification rate (fold)	Recovery rate (%)
TR1 culture filtrate	800	209140.0	5524.0	37.9	0	100
TR1 ammonium precipitation	4	173346.4	1152.3	150.4	4.0	82.9
TR1 SMART	1.2	163128.0	249.2	654.5	17.3	78.0
TM2 culture filtrate	800	898225.6	8055.6	11.2	0	100
TM2 ammonium precipitation	4	24920.0	506.6	49.2	4.4	27.7
TM2 SMART	1.2	19282.4	78.8	244.8	22.0	21.5
MC1 culture filtrate	800	114594.4	8469.2	13.5	0	100
MC1 ammonium precipitation	4	91986.4	1091.6	84.3	6.2	80.3
MC1 SMART	1.2	72387.2	303.3	238.6	17.6	63.2

TR: *T. rubrum*, TM: *T. mentagrophytes*, MC: *M. canis*

효소특이활성도는 84.3 units/mg이었다. 그리고 이 용액을 SMART를 실시한 결과 *T. mentagrophytes*와 같이 1번에서 5번 분획에서 단백질과 효소활성 정점이 일치하여 나타났다 (Fig. 3). 1번에서 5번 분획의 유출액의 총 단백질량은 303.3 mg, 총 효소활성은 72,387.2 units, 효소특이활성도는 238.6 units/mg으로 각질분해효소는 17.6배 정제되었다 (Table 1).

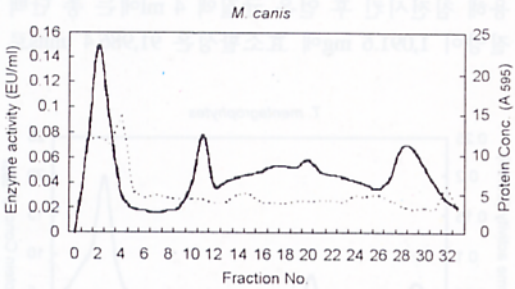

Fig. 3. SMART finding and enzyme activity of *M. canis* culture filtrate
(——: protein content at 595 nm, – – –: enyme activity).

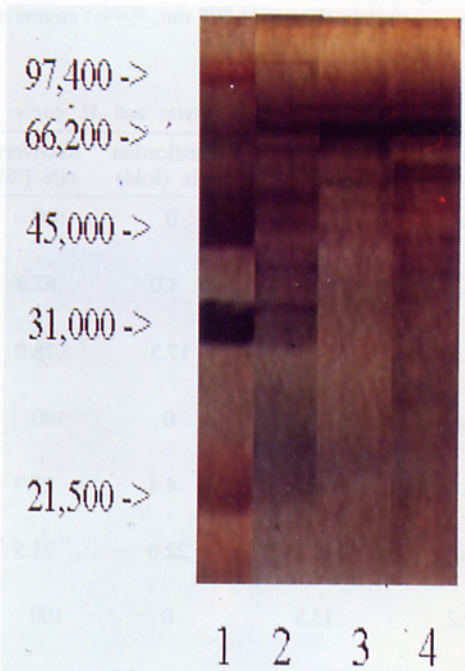

Fig. 4. Electrophoresis of culture filtrates from *M. canis, T. rubrum*, and *T. mentagrophytes* after ammonium sulfate precipitation (lane 1: standard molecular weight, lane 2: *M. canis*, lane 3: *T. rubrum*, lane 4: *T. mentagrophytes*).

3. 정제된 효소의 전기영동 소견

Ammonium sulfate 침전 후 시행한 전기영동 결과 세 균종 모두에서 여러 단백질대가 관찰되었다. *T. rubrum*은 65 kDa, 61 kDa, 53 kDa의 단백질

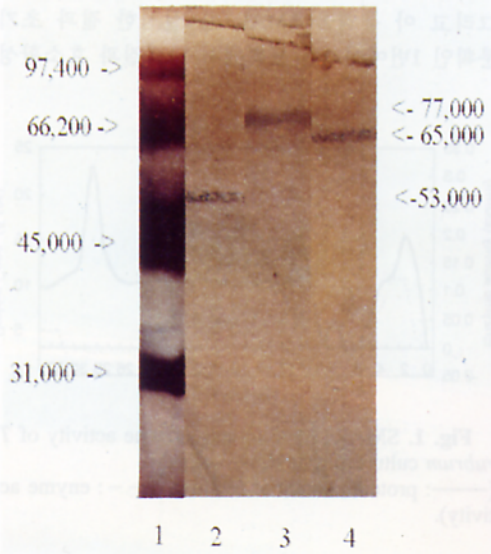

Fig. 5. Electrophoresis of culture filtrates from *M. canis, T. rubrum*, and *T. mentagrophytes* after SMART (lane 1: standard molecular weight, lane 2: *T. rubrum*, lane 3: *M. canis*, lane 4: *T. mentagrophytes*).

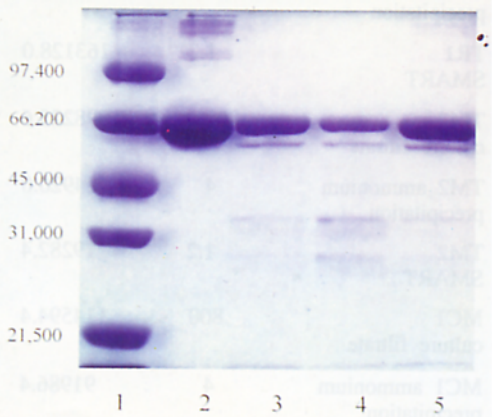

Fig. 6. Resolution of BSA by keratinase (lane 1: standard molecular weight, lane 2: BSA, lane 3: *M. canis*, lane 4: *T. rubrum*, lane 5: *T. mentagrophytes*).

Table 2. Inhibitor's effects to keratinases from *T.rubrum, T.mentagrophytes* and *M.canis*

Inhibitor	Concentration	Inhibition rate[1]		
		T.rubrum	*T.mentagrophytes*	*M.canis*
Control	100 μg/ml	0.0	0.0	0.0
Cocktail sol.		38.2	59.1	78.5
PMSF	100 μg/ml	32.7	58.6	70.3
TPCK	100 μg/ml	2.8	2.2	2.2
Dithiothreitol	100 μg/ml	1.6	–	–
Pepstatin	100 μg/ml	–	–	2.9
EDTA	10 mM	2.4	–	1.6

1: %

Table 3. Substrate hydrolytic activities of keratinases from *T. rubrum, T. mentagrophytes* and *M. canis*

Substrate	Relative enzyme activity[1]		
	T. rubrum	*T. mentagrophytes*	*M. canis*
Guinea pig	100.0	100.0	100.0
Human hair	57.1	32.2	106.8
Human nail	475.8	443.2	147.6
Keratin from human sole	135.6	121.3	41.2
Ovalbumin	98.9	43.0	78.6
Bovine hemoglobin	83.7	55.3	74.1
Bovine serum albumin	41.7	29.0	39.2

1: %

대를, *T. mentagrophytes*는 74 kDa, 65 kDa, 58 kDa, 48 kDa의 단백질대를 보였으며, *M. canis*는 77 kDa, 65 kDa, 64 kDa, 56 kDa, 51 kDa, 36 kDa, 23 kDa의 단백질대를 나타내었다 (Fig. 4). SMART 후 정제한 효소용액으로 시행한 전기영동상 *T. rubrum*은 53 kDa의 단백질대를 나타내었고, *T. mentagrophytes*의 효소용액은 65 kDa의 단백질대를, 그리고 *M. canis*의 효소용액은 77 kDa의 단백질대를 나타내었다 (Fig. 5).

4. 단백분해효소 억제제가 각질분해효소의 효소활성에 미치는 영향

Serine 단백분해효소 억제제인 PMSF는 100 μg/ml농도에서 *T. rubrum, T. mentagrophytes, M. canis*의 각질분해효소의 효소활성을 각각 58.6%, 32.7%, 70.3% 억제하였다. Thiol 단백분해효소 억제제인 TPCK는 *T. rubrum, T. mentagrophytes, M. canis*의 각질분해효소 효소활성을 각각 2.2%, 2.8%, 2.2% 억제하였고, dithiothreitol은 각질분해효소 효소활성에 거의 영향을 주지 않았다. 또 carboxyl 단백분해효소 억제제인 pepstatin은 *M. canis*의 각질분해효소를 2.9% 억제한 것 외에 효소활성에 영향을 주지 않았다. 그리고 metal 단백분해효소 억제제인 EDTA도 효소활성에 영향을 주지 않았다 (Table 2).

5. 단백질 기질에 대한 각질분해효소의 가수분해 능력

모든 균종의 각질분해효소는 효소활성 측정에 기질로 사용한 기니픽 모발 뿐 아니라 사람 모발, 조갑, 사람의 족저에서 얻은 피부각질, ovalbumin, bovine hemoglobin, BSA 등을 가수분해하였다. 기니픽 모발을 사용할 때의 효소활성을 100%로 정하였고, 각 기질에 대한 상대적 효소활성을 이에 대한 백분율로 표시하였다. Bovine hemoglobin의 *T. rubrum, T. mentagrophytes, M. canis* 각질분해

효소의 상대적 효소활성 백분율은 각각 83.7%, 55.3%, 74.1%이었고, ovalbumin에 대한 *T. rubrum, T. mentagrophytes, M. canis* 각질분해효소의 상대적 효소활성 백분율은 각각 98.9%, 43.0%, 78.6%이었다. BSA에 대한 *T. rubrum, T. mentagrophytes, M. canis* 각질분해효소의 상대적 효소활성 백분율은 기니픽 모발에 비해 각각 41.7%, 29.0%, 39.2%로 가장 낮았다. 인체의 피부각질중에는 조갑에 대해서 모든 균종의 각질분해효소의 효소활성이 가장 높았다. 인체의 피부각질중 모발에 대해서는 *T. rubrum*과 *T. mentagrophytes*에 비해 *M. canis*의 각질분해효소가 106.8%로 가장 높은 분해능을 보였다. 조갑에 대한 상대적 효소활성률은 *T. rubrum, T. mentagrophytes*의 각질분해효소가 각각 475.8%, 443.2%로 현저히 높았던 반면 *M. canis*의 각질분해효소의 효소활성은 상대적으로 낮았다. 반면, 사람 족저에서 분리한 피부각질에 대해서는 *T. rubrum*과 *T. mentagrophytes*의 각질분해효소의 효소활성이 135.6%, 121.3%로 *M. canis*의 41.2%보다 현저하게 높았다 (Table 3).

6. BSA 분해능

정제된 효소와 BSA를 반응시킨 결과 반응 24시간 후 BSA가 분해되었다 (Fig. 6).

고 찰

피부사상균이 각질층에만 침입, 기생하는 병원성에 기인하여 1960년대초부터 피부사상균으로부터 단백분해효소를 분리정제하려는 노력이 시작되었다. 그 결과 여러균종으로부터 단백질 분해 활성이 관찰되었으며[1,25], 기니픽 모발을 기질로 사용하여 *T. mentagrophytes*로부터 세포외 각질분해효소를 분리정제한 후 *T. schoenleinii*[26], *M. canis, T. rubrum*[6] 등의 균종에서 각질분해 활성을 갖는 단백분해효소들이 분리정제되었다.

일반적으로 *T. rubrum*은 인체에서 가장 흔히 검출되는 피부사상균으로서 피부각질층에 기생하여 병변을 유발한다. *T. rubrum*의 균사는 각질층내에서 검출되는데 이러한 현상은 세포투과에 관여하는 기전이 있음을 시사하고 있다. 그리고 *T. rubrum*에서 분비되는 다양한 단백분해효소가 보고되고 있으며, 이들이 병원성에 관여하는 것으로 추정되고 있다. *T. rubrum*의 각질 분해능은 방사선 동위원소로 표지한 기질을 이용하여 연구되었으며, Meeyotison과 Niederpureum은 피부사상균의 배양액에 카세인, 콜라겐, 엘라스틴, 난백, 기니픽의 털, 각질 등을 분해하는 분획이 있음을 보고하였다[27]. 이들은 또한 피부사상균의 배양액으로부터 분자량이 34.7 kDa인 alkaline serine 단백분해효소를 순수분리하였고, 특성을 규명하였으며, 이 외에도 44 kDa과 27 kDa의 serine 단백분해효소도 분리하고 특성을 보고한 바 있다. 이러한 단백분해효소들은 공통적으로 각질을 포함하여 몇가지 기질에 대해 가수분해 활성이 있는 것으로 보고 되었으며, 순수분리 되지는 않았으나, 현재 밝혀진 단백분해효소들의 분자량은 대략 23 kDa, 25 kDa, 53 kDa, 124 kDa 등이다. 최근 *T. rubrum*으로부터 235 kDa의 단백분해효소가 순수분리되어 특성이 보고된 바 있다[11]. 이러한 분자량은 피부사상균에서 밝혀진 단백분해효소들 중 가장 큰 것이다. 이는 다른 저자들이 보고한 고분자량의 단백분해효소와 연관성이 있을 것으로 사료된다[28]. 따라서, Lambkin 등[11]이 분리한 235 kDa의 단백분해효소는 효모에 존재하는 바와 같이 proteasome의 형태로 존재할 가능성이 있다.

개털과 동물의 뿔로부터 추출해 낸 각질을 기질로 사용하여 *T. mentagrophytes*로부터 분리되는 각질분해효소에 관한 연구에서 28 kDa~65 kDa에 속하는 다양한 isozyme이 존재함이 보고되었다[12]. 이 isozyme들은 10주의 *T. mentagrophytes* 균주들로부터 분리된 것으로서 *Trichophyton*종에서 분비되는 단백분해효소들에는 일련의 공통점과 동시에 상이한 점이 있을 것으로 추정된다.

*M. canis*로부터는 45 kDa의 각질분해효소가 분비됨이 보고되었는데[29], 국내에서도 *M. canis*로부터 순수분리 정제된 33 kDa의 각질분해효소가 보고되었다[7].

이와같이 피부사상균에서 분비되는 단백분해효소의 특성이 다양하게 보고되어 있으나, 피부사상균의 종, 속에 따라 특이성이 있는지의 여부는 논란의 여지가 많다. 지금까지 이루어진 연구들은 모두 단일 균종들로부터 단백분해효소의 분리와 특성을 규명하는데 그치고 있어 효소들간의 상호 연관성과 피부질환을 일으키는 피부사상균들에 따른 임상적 특징과 단백분해효소의 상호연관성에 대해서는 연구가 미비한 상태이다. 또한 가능성만 제시되어 있을 뿐 단백분해효소가 발병인자로서 작용하는 지의 여부도 명확하지 않다. 이는 각질분해효소 활성이 약한 단백

분해효소들도 피부사상균의 감염과정에서 특정 역할을 수행할 것으로 보이기 때문이다. 따라서 피부사상균증의 원인균으로 가장 흔한 피부사상균인 *T. rubrum, T. mentagrophytes*와 *M. canis*에서 분비되는 각질분해효소를 분리하고 이들의 정확한 특성의 차이를 규명하는 것은 매우 중요하다. 본 연구는 동일 조건에서 세 종류의 균종을 대상으로 각질분해효소를 분리정제하여 이들의 특성을 비교하였다.

*M. canis*의 배양여과액으로부터 DEAE-cellulose 이온교환 chromatography, CM-cellulose 이온교환 chromatography 및 sephadex G-75 gel filtration chromatography에 의해 단백분해효소를 107배 분리정제한 종전의 연구[22]에 비해 본 실험에서는 ammonium sulfate를 이용한 침전법과 SMART를 이용하여 17.6배 분리정제하였다. 그리고 종전의 보고[28]에서는 *T. rubrum*으로부터 affinity chromatography와 음이온 교환법에 의해 효소용액을 31.6배 분리정제한 반면 본 실험에서는 ammonium sulfate를 이용한 침전법과 SMART를 이용하여 단백분해효소를 17.3배 분리정제하였다. *T. mentagrophytes* 단백분해효소는 종전의 연구[4]에서 DEAE-cellulose 이온교환 chromatography와 CM-cellulose 이온교환 chromatography, 및 gel-filtration에 의해 30.1배 분리정제하였는데 본 실험에서는 ammonium sulfate 침전법과 SMART를 이용하여 단백분해효소를 22.0배 분리정제하였다. 본 실험에서 사용한 ammonium sulfate 침전법과 SMART를 이용한 분리정제는 *T. rubrum*과 *T. mentagrophytes*의 배양여과액에서는 이전의 다른 실험과 유사한 정도로 분리정제 되었으나 *M. canis*에서 단백분해효소의 분리정제 정도는 이전의 보고보다는 낮았다[22].

최종 정제된 *T. rubrum*의 단백분해효소는 전기영동상 53 kDa의 분자량을 나타내었다. 이는 종전의 연구결과[28]과 일치하는 소견이다. *T. mentagrophytes*의 단백분해효소는 65 kDa의 분자량을 나타내어 Yu 등[4]의 결과와 일치하였다. 또한 *M. canis*의 단백분해효소는 77 kDa의 분자량을 보였는데 이는 *M. canis*에서 이미 알려진 23.0, 25.0, 33.0, 34.7, 53.0, 124, 235 kDa 등의 단백분해효소와는 다른 것이다.

단백분해효소는 촉매 기전 (catalytic mechanism)에 따라 serine 단백분해효소, thiol 단백분해효소, carboxyl 단백분해효소, metal 단백분해효소 등의 4군으로 분류된다[30]. 피부사상균의 각질분해효소에 대해서도 억제제 실험을 통해 여러 균종에서 그 성상이 알려졌다. *M. gypseum*의 각질분해효소는 N-ethyl-maleimide에 의해 효소활성이 억제되는 thiol 단백분해효소군인 것으로[31], *T. rubrum*의 각질분해효소는 phenylmethyl- sulfonylfluoride에 의해 억제되는 serine 단백분해효소군인 것으로 보고되었다[6]. 본 연구에서 *T. rubrum*의 각질분해효소는 N-tosy-L- phenylalanine chloromethyl keton, dithiothreitol, EDTA에서도 약간 억제되었으나 주로 PMSF에 의해 효소활성이 억제되는 것으로 미루어 보아 serine 단백분해효소군에 속할 것으로 추측된다. 이는 Sanyal 등[6]의 연구와 일치하는 결과이다. *T. mentagrophytes*의 각질분해효소도 주로 PMSF에 의해 효소활성이 억제되었고 일부는 TPCK에 의해 억제되는 것으로 미루어 보아 역시 serine 단백분해효소군에 속할 것으로 추측된다. *M. canis*의 각질분해효소도 마찬가지로 주로 PMSF에 의해 효소활성이 억제되는 것으로 미루어 보아 serine 단백분해효소군에 속할 것으로 추측된다. 이는 이광훈과 박광균의 연구결과[17]와 일치하였으나 효소활성의 억제정도는 이전 실험보다 낮았다. 이러한 결과들은 *Candida albicans*의 단백분해효소가 carboxyl 단백분해효소에 속하는 것과는 달리 대다수 피부사상균들의 각질분해효소는 PMSF에 의해 억제되는 serine 단백분해효소군이라는 종전의 보고들과 일치되는 것이다.

인체모발과 같은 각질성분이 기질로서 첨가될 때만 피부사상균들로부터 세포외 각질분해효소의 분리가 가능하다[4,5,7,22]. 이러한 사실은 피부사상균으로부터 분리되는 각질분해효소가 기질의 종류에 따라 특이성을 갖는 것을 의미한다. 정상피부 및 특수형태의 피부인 모발, 조갑 등은 피부 각질의 구성성분에 있어 뚜렷하게 다르며 피부사상균증을 유발하는 원인균종간 분리 빈도도 신체부위에 따라 차이가 있다. 즉 *M. canis*나 *M. gypseum* 등은 두부백선을 잘 일으키나 조갑백선이나 수 · 족부백선의 병변에서는 매우 드물게 분리된다. *T. rubrum*이나 *T. mentagrophytes*는 두부백선보다는 수 · 족부백선 또는 조갑백선을 주로 일으키며, *Epidermophyton floccosum*은 결코 두부백선을 유발하지 않는다[32]. 신체부위에 따라 원인균종의 분리빈도가 다른 피부사상균증의 특징에 착안하여, 본 연구자들은 피부사상균종과 피부사상균증의 호발부위와의 연관성을 관찰하

고자 사람의 각기 다른부위의 각질을 분리하여 각질분해효소의 기질특이성 실험을 시도하였다.

본 실험에서 분리된 *T. rubrum*의 각질분해효소는 인체의 피부 중에서는 조갑각질을 가장 잘 분해하고 족저에서 분리한 피부각질을 잘 분해한 반면, 모발에 대한 가수분해 능력은 뚜렷히 낮았다. *T. mentagrophytes*의 각질분해효소도 *T. rubrum*에서와 같이 조갑과 족저에서 분리한 피부각질을 잘 분해한 반면, 모발에 대한 가수분해 능력은 현저히 낮았다. 반면 *M. canis*의 각질분해효소는 모발을 가장 잘 가수분해한 반면, 조갑에 대한 가수분해 능력은 뚜렷히 낮았다. 이와 같은 결과는 *T. rubrum*이나 *T. mentagrophytes*는 수·족부백선 또는 조갑백선을 잘 일으키는 반면, *M. canis* 감염증이 조갑에는 거의 발생되지않고 체부보다는 두부의 모발에 가장 흔히 호발되는 임상적 양상과 잘 부합하는 것으로 각질분해효소가 피부사상균증의 발병기전에 관여할 것을 시사하는 소견으로 생각된다. 그러나, 이러한 소견을 검증하기 위해서는 앞으로 균종별로 각기 다른 신체부위에서 분리한 여러 균주를 대상으로 동 실험이 시행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 피부사상균들의 각질분해효소의 생화학적 성상을 비교하기 위하여 동일한 조건에서 배양한 *M. canis, T. rubrum, T. mentagrophytes*의 배양여과액으로부터 ammonium sulfate 침전법과 SMART를 이용하여 각질분해효소를 분리정제한 후 순수도 검정을 위해 전기영동을 시행하였고, 단백분해효소 억제제에 대한 실험과 인체의 정상피부, 모발과 조갑각질 등 여러 기질에 대한 효소의 가수분해 능력을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. *M. canis, T. rubrum, T. mentagrophytes*의 배양여과액으로부터 최종적으로 각질분해효소를 각각 17.6배, 17.3배, 22.0배 분리정제하였다. 최종 분리정제된 각질분해효소들은 전기영동에서 주된 효소대 한개만을 나타냈다.

2. *M. canis, T. rubrum, T. mentagrophytes*의 배양여과액으로부터 최종 분리정제된 각질분해효소들의 분자량은 각각 77 kDa, 53 kDa, 65 kDa이었다.

3. *M. canis, T. rubrum, T. mentagrophytes*의 배양여과액으로부터 분리정제한 각질분해효소들의 효소활성은 주로 PMSF에 의해 억제된 반면, 다른 군의 단백분해효소 억제제는 거의 효소 활성에 영향을 주지 않았다.

4. *M. canis, T. rubrum, T. mentagrophytes*의 배양여과액으로부터 분리정제한 각질분해효소들은 여러 기질 중 ovalbumin과 bovine hemoglobin을 가수분해 하였으며, *T. rubrum*과 *T. mentagrophytes*에서 분리정제한 각질분해효소는 조갑과 족저에서 분리한 각질을 잘 분해하는 반면, 모발에 대한 가수분해 능력은 현저히 낮았다. *M. canis*에서 정제한 각질분해효소는 모발을 가장 잘 가수분해한 반면, 조갑에 대한 가수분해 능력은 뚜렷히 낮았다.

이상의 결과로 *M. canis, T. rubrum, T. mentagrophytes*에서 분리정제된 각질분해효소들은 서로 다른 분자량을 보였으나 모두 serine 단백분해효소군에 속하는 것으로 생각되고, 균종간에 각질의 종류에 따라 각질분해능력이 다를수 있음을 시사하는 소견으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Chattaway FW, Ellis PA, Barlow AJE. Peptidases of dermatophytes. J Invest Dermatol 1963; 41: 31-37
2. Mercer EH, Verma BS. Hair digested by *Trichophyton mentagrophytes*. Arch Dermatol 1963; 87: 357-360
3. Verma BS. The use of fluorescence microscopy in the study of in vitro hair penetration by ring worm fungi. Br J Dermatol 1966; 78: 222-224
4. Yu KJ, Harmon SR, Blank F. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. J Bacteriol 1968; 96: 1435-1436
5. Takiuchi I, Higuchi D. Isolation, purification and biochemical properties of keratinase elborated from *Microsporum gypseum*. Jpn J Dermatol 1977; 87: 305-310
6. Sanyal AK, Das SK, Banerjee AB: Purification and partial characterization of an exocellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia 1985; 23: 165-178
7. 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

8. Grappel SF, Blank F. Role of keratinase in dermatophytoses. Immune responses of guinea pigs infected with *Trichophyton mentagrophytes* and guinea pigs immunized with keratinases. Dermatologica 1972; 145: 245-255
9. 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
10. Asahi M, Lindquist R, Fukuyama K, Apodaca G, Epstein W, Hukumori JH. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. Biochem J 1985; 232: 139-144
11. Lambkin I, Hamilton AJ, Hay R. Partial purification and characterization of a 235,000MW extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. Mycoses 1994; 37: 85-92
12. Siesenop U, Bohm KH. Comparative studies on keratinases production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. Mycoses 1995; 38: 205-209
13. Hino H, Ammitsboll T, Svejgaad E, Kobayashi T, Asboe-Hansen G. Acantholysis induced by proteolytic enzymes, II Enzyme fractions produced by *Trichophyton mentagrophytes*. Acta Dermatol 1982; 62: 283-288
14. Tsuboi R, Ko IJ, Takamori K, Ogawa H. Isolation of keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. Infect Immun 1989; 57: 3479-3483
15. 임경진, 김진혁, 신실. 피부사상균증의 임상적 균학적 조사연구. 대한피부과학회지 1978; 16: 435-442
16. 김도원, 오수희, 서순봉. *Microsporum canis*의 만연상태. 대피지 1983; 21: 695-702
17. 이광훈, 박광균. *Microsporum canis*로부터 분리정제한 각질분해효소의 기질 특이성 및 inhibitor에 관한 연구. 원주의대논문집 1988; 1: 161-169
18. Lee KH, Park HW, Lee JB. Detection of keratinolytic proteinase in skin tissues from guinea pigs infected with *Microsporum canis* by an immunoperoxidase technique. J Dermatol Sci 1990; 1: 447-453
19. Lee KH, Park HW, Lee JB. Localization of keratinolytic proteinase in skin tissue sections of guinea pigs with *Microsporum canis* infection by immunoperoxidase techniques in electron microscopy. Ann Dermatol 1991; 3: 1-4
20. Murphy GF.Histology of the skin. In: Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, et al, eds. Lever's histopathology of the skin. 8th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997: 9-19
21. Tsuboi R, Ko IJ, Matsuda K, Ogawa H. A new keratinolytic proteinase from clinical isolates of *Trichophyton mentagrophytes*. J Dermatol 1977; 87: 305-309
22. Takiuchi I, Higuchi D, Sei Y, Koga M. Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporum canis*. Sabouraudia 1982; 20: 281-288
23. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976; 72: 248-254
24. Hahm KS, Tikkanen MJ, Dargar R, Cole TG, Schonfeld G. Limited proteolysis selectively destroys epitopes on apolipoprotein B in low density lipoproteins. J Lipid Res 1983; 24: 877-885
25. Weary PE, Candy CM. Keratinolytic activity in *Trichophyton schonleini, Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. J Invest Dermatol 1965; 48: 240-248
26. Weary PE, Candy CM. Further observations on the keratinolytic activity of *Trichophyton schoenleini* and *Trichophyton rubrum*. J Invest Dermatol 1969; 53: 58-63
27. Meeyotison V, Niederpureum DJ. Control of extracellular proteinases in dermatophytoses and especially *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia 1979; 17: 91-106
28. Apodaca G, Mckerrow JH. Purification and

characterization of a 27,000MW extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. Infect Immun 1989; 57: 3072-3080

29. Takiuchi I, Sei Y, Takagi H, Negi M. Partial characterization of the extracellular keratinase from *Micosporum canis*. Sabouraudia 1984; 22: 219-224

30. Hartley BS. Proteolytic enzymes. Ann Rev Biochem 1960; 29: 45-51

31. Higuchi D, Takiuchi I. Inhibitors of the purified extracellular keratinase of a *Microsporum gypseum strain*. Jpn J Med Mycol 1980; 21: 101-110

32. Rippon JW. Medical Mycology. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, 1982: 154-177