

프로테오믹스 기법을 이용한 피부사상균 배양 여과물내 세포외단백의 분석

연세대학교 의과대학 피부과학교실

이 주 희 · 이 광 훈

=Abstract=

The Proteomic Analysis of Extracellular Proteins from Culture Filtrates of Dermatophytes

Ju Hee Lee and Kwang Hoon Lee

Department of Dermatology, Cutaneous Biology Research Institute,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Proteases from dermatophytes have an important role in pathogenicity of these fungi as they facilitate penetration and colonization in the keratin structures of the stratum corneum, nails, and hair. Since the 1960s, efforts have been made to isolate and purify these enzymes, shedding light on hydrolytic properties and other characteristics of these extracellular proteins. It is now well known that under certain conditions, various proteases are produced which possess the capacity to digest casein, collagen, elastin, bovine serum albumin, hair, and keratin, while specific nature of these enzymes still remains to be elucidated.

Objective: We aimed to draw a proteome map of extracellular proteins from common dermatophytes using 2-dimensional electrophoresis, thus verifying the nature and interspecies differences in composition of extracellular proteins.

Methods: Following strains of dermatophytes were isolated from patients who visited the dermatologic outpatient clinic of Severance hospital and subcultured for 2 weeks on Sabouraud's dextrose agar: 2 strains of *Trichophyton rubrum*, 2 *T. mentagrophytes*, and 2 *Microsporum canis*. For growth media, glucose-peptone broth was added to each strain and 10 ml of media was taken, filtered using a 0.4µm syringe filter and the protein content obtained was concentrated by an ultrafiltration device before electrophoresis on the culture day 0 and 10. Stained with silver nitrate, the gel was scanned and analysed.

Results: 7 spots have increased in intensity including a 16 kDa-spot with isoelectric point at 9.3 from the supernatants of *M. canis* culture media, 4 spots have increased including a 32 kDa-spot with isoelectric point at 6.7, from the supernatants of *T. mentagrophytes*, and 5 spots including a 10 kDa-spot with isoelectric point at 6.3 showed significant increase from the supernatants of *T. rubrum*. *M. canis* and *T. mentagrophytes* subspecies shared 2 spots that increased.

† 별책 요청 저자: 이광훈 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134 연세대학교 의과대학 피부과학교실
전화: (02) 361-5720, Fax: (02) 393-9157, e-mail : kwanglee@yumc.yonsei.ac.kr

* 본 연구는 2002년 안센학술상 연구비와 Yonsei University Brain Korea 21 Project for Medical Science의 한국 안센 산업체 대응자금에 의하여 이루어졌음.

Conclusion: We concluded dermatophyte fungi produce different proteins according to their subspecies, and that proteomics appears to be a useful tool for comparative analysis of dermatophyte extracellular proteins. [*Kor J Med Mycol* 2003; 8(4): 157-168]

Key Words: Proteomics, Extracellular proteins, Dermatophytes

서 론

피부사상균이 주로 피부각질층, 조갑, 모발 등의 각질층에 침입하여 기생하는 것에 착안하여 피부사상균으로부터 단백분해효소를 분리, 정제하려는 노력이 계속되어져 왔다. 그 결과, 여러 균종으로부터 단백질 분해 활성 물질이 분리되는 것이 알려졌다¹. 이러한 피부사상균의 단백분해효소는 피부 질환을 일으키는 병원성에 중요한 역할을 하며 피부사상균의 종, 속에 따라 단백분해효소의 생화학적 성상이 다른 것이 관찰되었다²⁻⁴. 최근까지 casein, collagen, elastin, bovine serum albumin, hair, keratin에 대한 단백분해효소들의 분해 능력에 대해서 알려져 있으나, 그 효소들의 정확한 규명은 이루어지지 않았으며, 분리된 단백질의 성상에 대한 보고는 드물다⁵.

최근 인간 게놈 서열 해독 (human genome sequencing projects)이 완성됨에 따라 이제는 인간 유전체의 기능을 분석하는 기능적 유전체 시대 (functional genomic era)를 맞이하고 있다. 이에 따라 단백질의 기능을 밝히는 데에 가장 적합한 프로테오믹스 (proteomics)가 급부상하고 있다. 프로테오믹스는 이차원 전기영동 (two-dimensional electrophoresis (2-DE))을 이용하여 단백을 분석하고 이를 여러 가지 분석 도구들을 이용하여 단백을 감정하는 일련의 과정을 거치는데, 전기영동의 결과 얻어진 프로테옴 지도는 matrix-assisted laser desorption-ionization mass spectrometry (MALDI-MS) 또는 electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) 등을 이용하여 분석할 수 있다⁶. 이차원 전기영동은 단백질혼합물을 등전점 (isoelectric point)과 분자량에 의해 분리하여 단백을 양적과 질적으로 동시에 분석하는 기술로 최근에는 고해상도 이차원 polyacrylamide gel 전기영동 (high resolution 2D-

PAGE)이 단백질의 구성을 분석하는 정형화된 방법으로 사용되고 있으며, 전기영동의 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석을 하고 이러한 전기영동의 결과에서 자동적으로 단백을 규명하는 새로운 방법들이 소개되고 있다^{7,8}.

저자들은 프로테오믹스 기법을 이용하여 각 피부사상균의 배양 여과액내 단백분해효소 등의 단백질을 분석함으로써 균종 간 세포외단백의 차이를 관찰하고 특성을 파악하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 재료

임상 증상 및 KOH 직접도말검사와 Sabouraud 배지에서 배양 검사 상 피부사상균증으로 진단받은 환자로 부터 분리 동정한 *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* 각각 2주씩을 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 진균 배양

M. canis, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* 2주씩을 각각 300 ml의 2% Sabouraud 액체 배지가 들어 있는 1000 ml 유리 플라스크에 접종하고 섭씨 27도로 고정된 항온 배양기에서 2주간 배양하였다. 세포외단백 합성을 유도하기 위하여 glucose-peptone broth (glucose 40g, bacteriological peptone oxoid 10g, pH 5.4, in 1 L D/W)에 접종시킨 후 섭씨 27도의 항온 배양기에서 5일간 배양한 후 진탕기로 옮겨 5일간 더 배양하였다.

2) 초여과 (ultrafiltration) 및 농축

0.4 μ m의 syringe filter(Advantec MFS, Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 배양 당일과 배양 10일째의 배양액을 각각 균주별로 나누어 여과시킨 용액을 Vivaspin 20 ml(Vivascience AG, Hannover, Germany)

을 사용하여 초여과시키고 농축시켰다.

3) 시료 용해 및 재수화 (rehydration)

농축시킨 여과액 중 2.5 μ l pH 8.0의 1M Tris, 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS), 3% dithiothreitol 이 함유된 용해완충액 50 μ l와 섞은 후 95°C에서 5분간 가열하였다. 전체 시료를 7M urea, 2M thiourea, 2mM tributyl phosphine, 4% 3-(3-cholamidopropyl) dimethyl-ammonio-1-propane-sulfonate, 1.0% carrier ampholyte, 40 mM Tris, 0.002% bromophenol blue dye 등이 함유된 젤 전기영동 시료 완충액 400 μ l로 희석한 후, 20°C, 12,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수집하였다. 재수화 tray에 젤 전기영동 시료 완충액으로 희석하여 원심분리한 시료 400 μ l을 넣고, 18 cm의 pH 3-10 non-linear immobilized pH gradient (IPG) strip (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 공기방울이 생기지 않게 설치하고 24 시간 방치하여 재수화시켰다.

4) 이차원 전기영동

재수화시킨 IPG strip은 IPG-phor (Amersham Pharmacia Biotech)를 이용하여 저전압으로부터 고전압에서 적절한 시간 처리하여 등전화 (isoelectric focusing: IEF)시켰다. IEF 후에 IPG strip은 3.6g의 urea, 2% SDS, 5M Tris 2 ml, 50% glycerol 4 ml, 25% acrylamide 1 ml, 200 mM MTBP 250 μ l가 함유된 동질완충액에서 25분간 동질화 (equilibration)시켰다.

Polyacrylamide gel 제작을 위하여 1.875M Tris buffer가 함유된 9% 완충액 40 ml와 40% stock acrylamide 45 ml, 증류수 115 ml를 혼합하고, 16% buffer 40 ml, 40% stock acrylamide 80 ml, 50% glycerol 80 ml를 혼합하였다. 이렇게 제작된 9-16% gradient polyacrylamide gel (21 cm \times 21 cm \times 1.5 mm)에 0.5% agarose, 0.001% bromophenol blue dye가 함유된 agarose 완충액을 넣고 IPG strip을 embedding시킨 후에 24.8 mM Tris, 192 mM Glycine, 0.1% SDS가 포함된 cathode running buffer를 넣었다. SDS-PAGE는 3 mA/gel의 전류로 2시간 prerun한 후, 15 mA/gel의 일정한 전류하에서 전기영동을 시행하였다.

5) Silver stains

전기영동을 시행한 polyacrylamide gel을 modified silver stain 방법을 이용하여 염색하였다. 먼저, acetic acid 50 ml, methanol 200 ml, 증류수 250 ml로 15분씩 두 번 고정시킨 후, methanol 150 ml, 5% sodium thiosulfate 20 ml, sodium acetate 34g, 증류수 330 ml로 30분간 감작시켰다. 10분간 3번 세척한 후, 2.5% silver nitrate 50 ml와 증류수 450 ml를 가한 다음, 다시 1분씩 두 번 세척하였다. 세척한 gel을 sodium carbonate 12.5g, formaldehyde 200 μ l, 증류수 500 ml로 발색시키고, EDTA 7.3g, 증류수 500 ml로 발색을 중단시킨 후, 증류수 500 ml로 5분씩 세 번 세척하였다.

6) 이미지 비교 분석

염색이 끝난 후 배양 첫날의 배양 여과액과 배양 10일째의 여과액의 이차원 전기영동 젤을 탈색과정을 거치지 않고 GS-800 Calibrated Imaging Densitometer (BIO-RAD, Munich, Germany)를 이용하여 스캐닝한 후 데이터화하였다. PDQuest (BIO-RAD, CA, USA)를 사용하여 단백질 스폿을 양적으로 측정하여 각 균의 프로테오 지도를 얻었다.

7) In gel protein digestion

이미지 분석 상 5배 이상 증감된 protein spot을 해당되는 CBB gel 에서 clean scalpel 로 잘라내어 30% methanol 로 염색액을 상당히 제거 한 후 100 mM ammonium bicarbonate (ABC) / 50% acetonitrile (ACN) 에서 완전히 제거하였다. 100 L ACN으로 2회 이상 완전히 탈수한 후 Speedvac evaporator 에서 완전히 건조한 다음 0.1g trypsin (Promega) 을 함유한 25 L 25 mM ABC 상에서 37°C 에서 16시간 반응시켰다. 50% ACN / 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 로 2회 이상 추출하여 그 혼합된 추출물을 Speedvac evaporator 에서 완전히 건조 시킨후 -20°C 에서 분석시 까지 보관하였다.

8) Peptide fingerprinting using malditof-mass

니트로셀룰로오스가 함유된 포화된 1L의 cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) 와 0.1% TFA 로 추출한 펩타이드 시료 1L를 섞어서 target plate 에 점적 후 상온에서 완전히 건조 시킨 다음 MalDI-Reflectron ToF (Micromass, Manchester, UK)를 이용

하여 평균 40~50 개별적인 레이저 샷으로 질량 스펙트럼을 얻었고, 내부 표준물질로서 소의 트립신 자가분해 펩타이드 피크 (m/z 842.5099 과 2211.1046) 를 이용하여 조정하였다.

9) Target identification using database search

펩타이드 질량은 NCBI의 검색 알고리즘인 University of California San Francisco (UCSF) 에서 제공 되는 MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml3.2/msfit.htm>)를 이용하여 정보검색을 시행하였으며 오차 한계 50 ppm 을 사용하였다.

결 과

1. *M. canis* 배양 여과물의 프로테오 지도 비교

M. canis 의 배양 첫날과 배양 10 일째의 배양 여과물의 이차원 전기영동을 시행한 후 PDQuest를 이용하여 표준 젤을 얻었다 (Fig. 1). 10일째 증가한 단백질은 산성과 염기성 단백질이 고루 분포하고 있었으며, 분자량이 높은 단백질은 주로 산성에 배열하는 것을 알 수 있었다. 분석한 결과 배양 첫날에 비해 배양 10 일째에 7 개의 스팟 (spot)이 의미 있게 증가하거나, 새롭게 나타났다 (Fig. 2, Table 1). 증가한 스팟 중 가장 많이 증가한 스팟은 분자량 16 kDa과 등전점 9.3을 가진 염기성 단백질이었다.

2. *T. mentagrophytes* 배양 여과물의 프로테오 지도 비교

T. mentagrophytes 배양 여과물의 이차원 전기영동 후 얻은 이미지의 분포는 *M. canis*와 마찬가지로 산성과 염기성 단백질이 분포하는 패턴을 보였으며 *M. canis*보다는 적은 수의 단백질 스팟이 관찰되었다 (Fig. 3). 배양 첫날에 비해 10 일째에 4 개의 스팟이 통계학적으로 유의하게 증가하거나 새롭게 나타났다 (Fig. 4, Table 2)

3. *T. rubrum* 배양 여과물의 프로테오 지도 비교

T. rubrum 배양 여과물의 표준 젤의 분포를 보면 *M. canis* 나 *T. mentagrophytes* 에 비해 저분자량의 단백질 스팟이 많이 나타나는 것을 알 수 있었으며 주로 산성과 중성의 등전점을 갖는 단백질 스팟이 나타났다 (Fig. 5). 배양 첫날과 비교했을 때 배

양 10 일째에 5 개의 스팟이 의미 있게 증가하거나 새롭게 나타났다 (Fig. 6, Table 3).

4. *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*

세 균주의 배양 여과물의 프로테오 지도 비교

세 균주의 배양 여과물내 세포외단백을 비교한 결과, *M. canis*와 *T. mentagrophytes* 에서 분자량 33 kDa과 등전점 6.7을 갖는 단백질 스팟과 분자량 8 kDa과 등전점 6.9를 갖는 단백질 스팟이 공통되게 나타났다. 그러나, *T. mentagrophytes* 와 *T. rubrum* 의 배양 여과물내 세포외단백에서 의미있게 증가한 단백질 스팟 중 공통되게 나타난 단백질 스팟은 없었다.

Table 1. The protein spots that is increased on 10th day of *M. canis* culture compare to 0 day of culture.

Protein Spot	Molecular Weight (kDa)	Isoelectric Point (pI)
1	5	7.3
2	8	6.9
3	10	5.3
4	13	6.7
5	15	7.0
6	16	9.3
7	33	6.7

Table 2. The protein spots that is increased on 10th day of *T. mentagrophytes* culture compare to 0 day of culture.

Protein Spot	Molecular Weight (kDa)	Isoelectric Point (pI)
1	8	6.9
2	23	5.5
3	32	6.7
4	50	5.8

Table 3. The protein spots that is increased on 10th day of *T. rubrum* culture compare to 0 day of culture.

Protein Spot	Molecular Weight (kDa)	Isoelectric Point (pI)
1	5	5.3
2	5.5	7.1
3	6	5.2
4	9	3.4
5	10	6.3

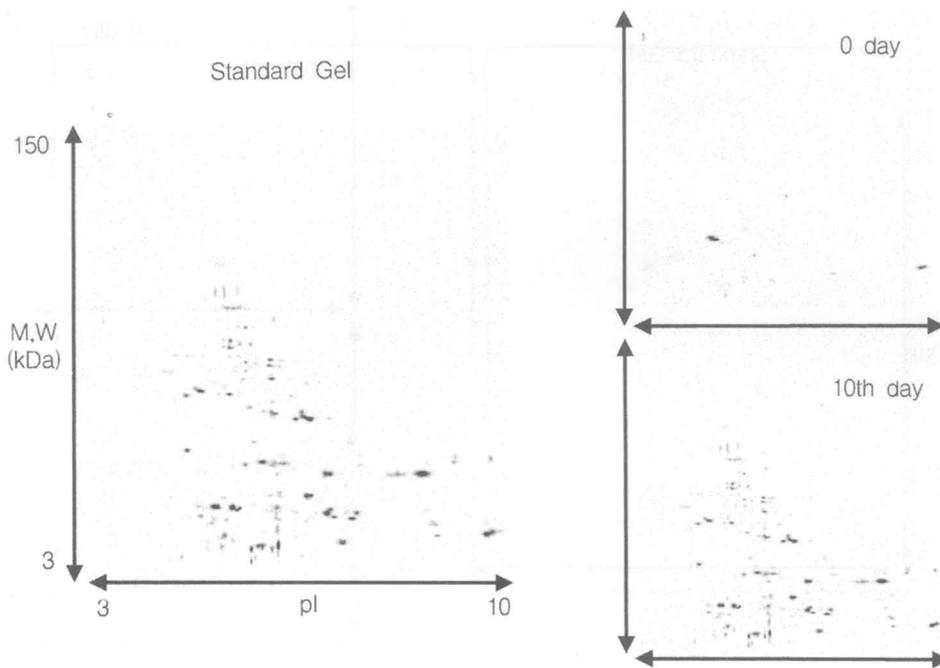


Fig. 1. The proteome map of culture filtrate of *M. canis*. The standard gel shows increased or newly appeared proteins in 10th day of culture compare to 0 day.

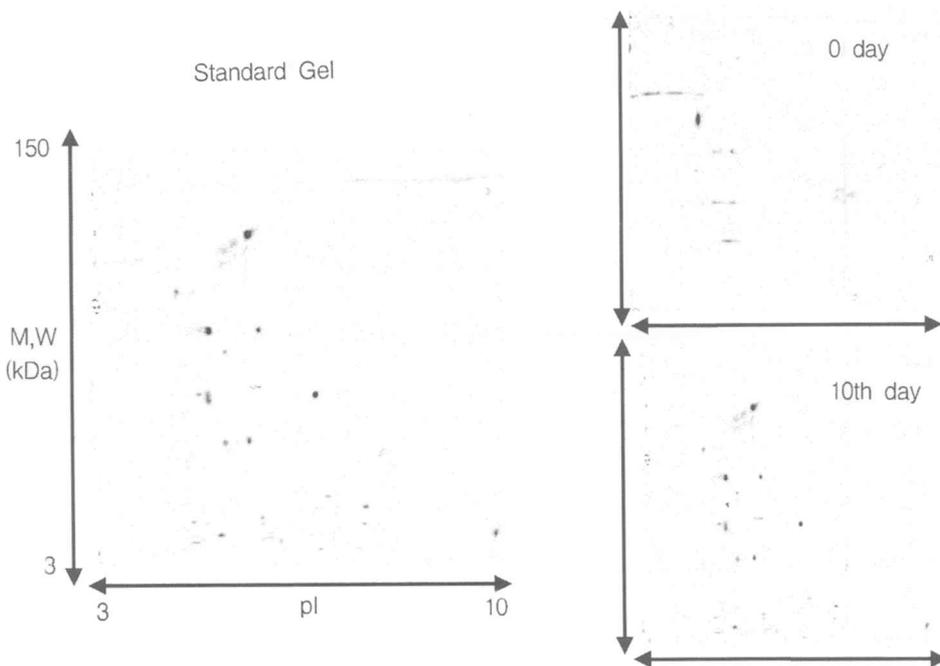


Fig. 2. Comparison of the increased spots in two-dimensional electrophoresis of culture filtrates of *M. canis*. The arrows show 7 spots that are significantly increased or newly appeared in 10th day of culture.

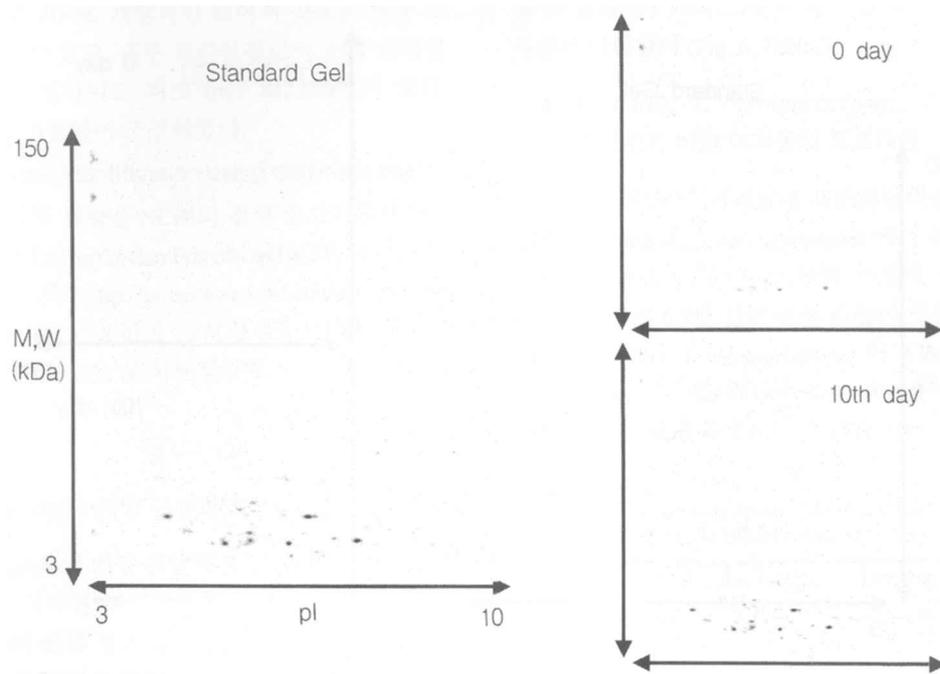


Fig. 3. The proteome map of culture filtrate of *T. mentagrophytes*. The standard gel shows increased or newly appeared proteins in 10th day of culture compare to 0 day.

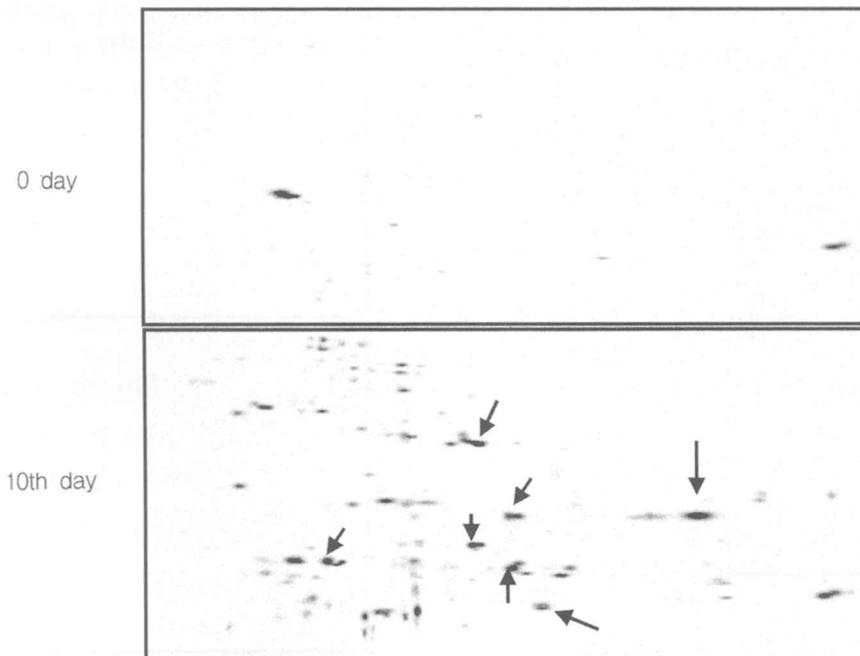


Fig. 4. Comparison of the increased spots in two-dimensional electrophoresis of culture filtrates of *T. mentagrophytes*. The arrows show 3 spots of total 4 spots that are significantly increased or newly appeared in 10th day of culture.

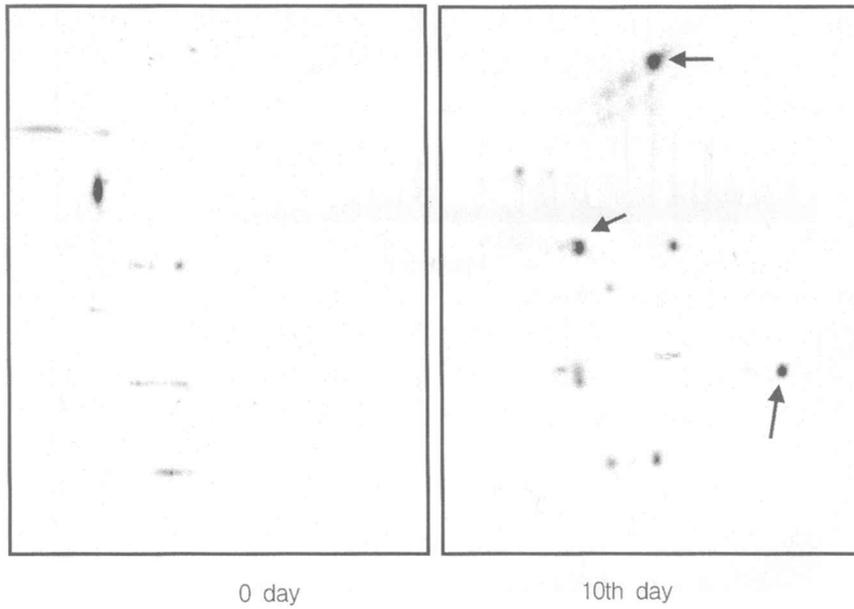


Fig. 5. The proteome map of culture filtrate of *T. rubrum*. The standard gel shows increased or newly appeared proteins in 10th day of culture compare to 0 day.

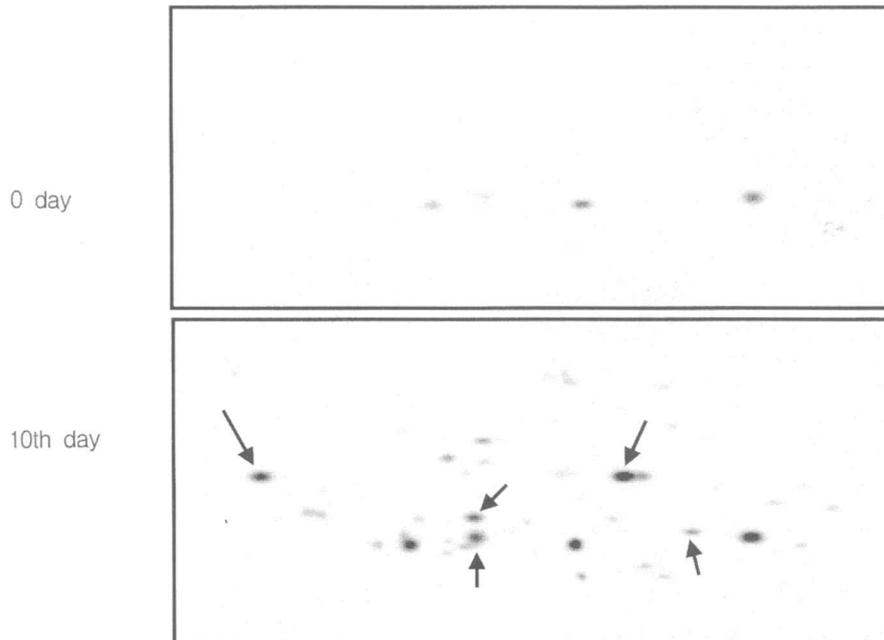


Fig. 6. Comparison of the increased spots in two-dimensional electrophoresis of culture filtrates of *T. rubrum*. The arrows show 5 spots that are significantly increased or newly appeared in 10th day of culture.

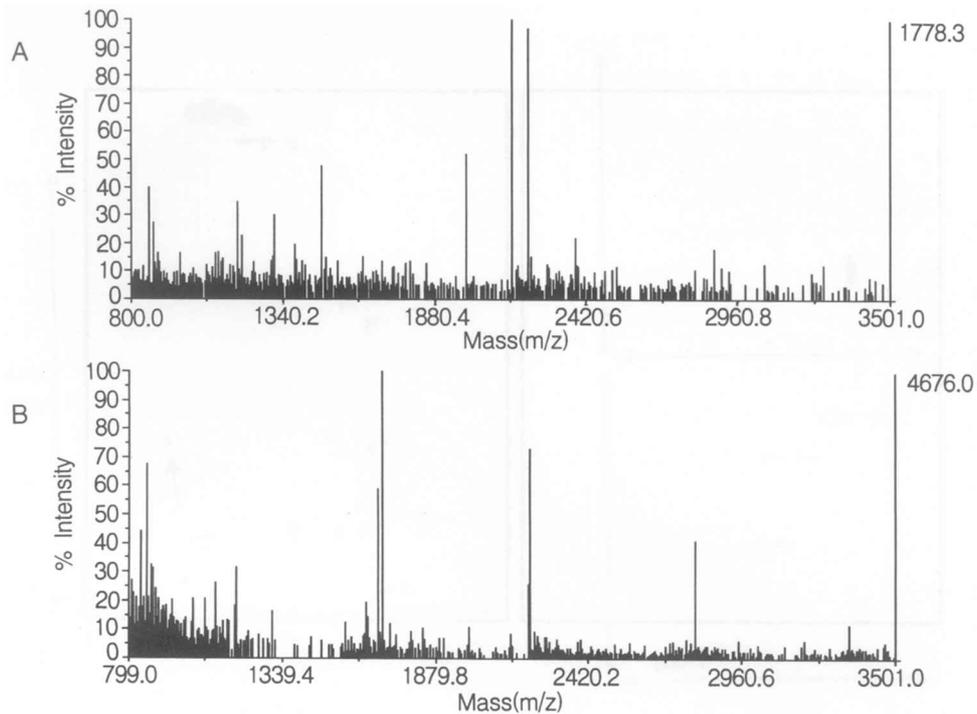


Fig. 7. Peptide fingerprinting obtained by mass spectrometry of protein spots that showed remarkable increase in 10th day of culture. A: The peaks shown on the peptide fingerprint correspond to ribonuclease, B: The peaks shown on the peptide fingerprint correspond to double-headed protease inhibitor.

5. MALDI-MS를 이용한 단백질 동정

세 균주에서 가장 의미있게 증가한 분자량 16 kDa과 등전점 9.3을 갖는 단백을 잘라내어 질량 분석기를 이용하여 펩타이드 지문을 얻었다 (Fig. 7A). NCBI 검색 알고리즘인 MS-Fit 및 MASCOT를 이용한 펩타이드 지문에 대한 정보 검색 결과, 이는 ribonuclease로 동정되었다. 그 외 분자량 13 kDa과 등전점 6.7을 갖는 단백을 잘라 펩타이드 지문을 얻어 동정한 결과 double-headed protease inhibitor와 유사성이 관찰되었다 (Fig. 7B).

고찰

피부사상균은 피부각질층에 침입하여 기생함으로써 병변을 유발하게 되는데, 이들의 분비하는 세포외단백 및 단백분해효소가 병원성과 관련된 것으로 추정되어 1960년대 초부터 이러한 세포외단

백을 정제, 분리하려는 노력이 시작되었으나, 아직까지는 피부사상균이 어떻게 피부의 각질층을 파괴하고 생존에 필수적인 요소인 질소공급원으로 각질을 이용하는 지 정확히 알려진 바는 없다. Verma⁹가 피부사상균에서 분비되는 화학물질에 의해 각질 성분이 분해될 수 있다는 근거를 면역형광현미경을 통하여 제시한 이후, 여러 피부사상균의 종류에서 단백분해효소가 분리, 정제되었고 이들은 보고마다 종류와 특성이 다른 것으로 알려져 있으나, 각 균종별의 차이를 언급한 논문은 드물다.

M. canis 는 두부백선을 유발하는 원인균 중 하나로 국내에서 발생빈도가 증가하는 양상을 보이고 있다. *M. canis*에서 분비하는 단백분해효소로 44 kDa¹⁰, 33 kDa¹¹, 31.5 kDa¹², 43.5 kDa¹³의 단백질이 분리, 정제되었으나 아직까지 이들 단백질의 정확한 성상은 밝혀지지 않았다. 다만 이전의 연구에서 분리, 정제된 각질분해효소가 피부사상균에 감염

된 피부에 존재하고 이에 대한 항체가 발견된 보고가 있었으며, 기능적인 연구는 아직 미미한 실정이다¹⁴⁻¹⁷. *T. mentagrophytes*도 흔한 피부사상균 중 하나로 Yu¹⁸ 등이 기니픽의 모발을 기질로 사용하여 65 kDa의 각질 분해효소를 발견하였고, Siesenop¹⁹ 등은 10 주의 *T. mentagrophytes* 균주로부터 28 ~ 65 kDa의 각질분해효소가 존재함을 보고하였다. 최근에는 *T. mentagrophytes*의 41 kDa의 각질분해효소의 효소 활성이 산성의 pH에서 가장 높다는 보고도 있었다²⁰. *T. rubrum*은 세계적으로 가장 흔한 피부사상균으로 *T. rubrum*의 각질분해 능력이 낮은 단백질분해효소도 피부사상균증을 유발하는데 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다²¹. 그동안 알려진 단백질분해효소로 분자량이 27 kDa²², 36 kDa²³, 44 kDa²³, 235 kDa²¹ 등의 단백질이 있으며, 이 중 235 kDa의 단백질분해효소는 지금까지 알려진 피부사상균의 단백질분해효소 중 가장 분자량이 큰 것으로 보고되었으며, 이는 glycosylation과 관계있다는 가설이 있다. 이들 단백질이 모두 단백질분해 활성이 크지는 않으나, 몇몇은 이미 다른 단백질분해효소에 의해 분해된 각질에 작용하여 가수분해를 일으키는 것도 있다.

이미 보고된 바와 같이 각 균종에서 분비되는 세포외단백의 종류가 종, 속에 따라 다르므로 각 균종의 특이적인 단백을 찾아내는 것은 피부사상균이 각질층에 침입하는 기전을 알아냄과 동시에 피부사상균의 진단과 치료에 매우 중요하다^{24,25}. 이제까지 피부사상균이 분비하는 세포외단백을 검출하고 분리, 정제하는 연구가 많이 보고되어 왔으나, 지금까지는 분리법으로 크로마토그래피(chromatography)나 침전법, SMART, 및 단순한 전기영동법이 사용되어 각각의 단백질을 따로따로 분리하여 정제하는 방법이 이용되어져 왔다²⁶. 한 균종에서 분비되는 세포외단백의 수가 많으며 여러 균종을 비교하기 위해선 이러한 고전적인 방법으로는 시간도 많이 걸리고 비교 자체가 어렵기 때문에 새로운 분석 방법의 필요성이 대두되었다. 지금까지 프로테오믹스를 피부사상균의 세포외단백을 규명하는데 적용시킨 예는 없었으며, 여러 단백을 동정하기 위하여 프로테오믹스 기법을 분석 방법으로 이용하였다.

프로테오믹스는 2-DE를 이용하여 언어 스캐닝한 프로테오믹스 지도를 PDQuest나, Melanie 등의 여러 소프트웨어를 이용하여 이미지를 분석한 후 MALDI-MS 또는 ESI-MS 등을 이용하여 그 성상을 분석하는 방법으로 최근 들어 매우 빠르게 기술이 개발되어 이차원 전기영동 없이 시행하는 Non-gel 기반 프로테오믹스 분석기술도 발전하고 있다. 프로테오믹스는 세포마다 동일한 계층과는 달리 단백질 발현의 시기, 장소, 상태에 따라 달라지며 한 유전자에서도 환경에 따라 여러 가지 전사후 변형(post-translational modification)이 일어남으로써 다양하게 존재할 수 있으므로 단순한 방법으로는 분리, 정제하는 것은 별 의미가 없다고 할 수 있다. 프로테오믹스 기법은 이러한 전사후 변형과 각 단백질 간의 상호작용을 분석하는 것이 용이하며 정제 과정이 필요 없이 시료에 존재하는 단백을 분산시킴으로써 동시에 여러 단백을 동정할 수 있는 장점을 지닌다²⁷.

본 연구에서는 프로테오믹스 기법을 이용하여 피부사상균 중 흔한 세 균주를 대상으로 배양액 내 존재하는 세포외단백을 분석하였으며, 그 결과 배양 10일째에 많은 단백질이 의미 있게 증가함을 알 수 있었다. 특히 *M. canis*에서 가장 많은 세포외단백들이 의미 있게 증가하였는데 이러한 단백질이 단백질분해효소 활성을 가지고 있는 지에 대해서는 향후 모든 스팟에 대한 MALDI-MS나 ESI-MS 등의 기술을 이용한 단백질의 기능, 구성, 변형, 서열 등 자세한 특성의 파악이 필요할 것으로 사료된다. 본 실험의 결과에서 관찰된 세포외단백들은 저분자량이 많았는데 이 중 분자량 33 kDa의 단백질은 이전 보고와 유사한 분자량으로 각질분해효소로 추정되었다. *T. rubrum*의 배양액 여과물에서 본 실험에서는 주로 저분자량의 단백질이 관찰되었는데 주로 고분자량이 분리된 이전의 보고와는 차이를 보였다. 이는 배양 조건의 차이로 인한 결과일 수도 있고 이전의 실험이 여러 단백질의 합체가 완전 분리되지 않았을 가능성도 있을 것으로 생각된다. 앞으로 더 많은 균주의 *T. rubrum*을 배양하여 같은 결과가 도출되는 지 확인하는 것이 필요하겠다.

또한, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* 각각 세 균주간의 분비되는 세포외단백의 종류가 다르며 *M. canis*와 *T. mentagrophytes*에서는 2 가

지의 단백질이 공통되어 증가하는 것으로 나타났는데 이로써 각각의 균주에 특이한 단백을 알아낼 수 있었다. 그 중 *M. canis*의 배양 여과물에서 MALDI를 이용하여 ribonuclease와 double-headed protease inhibitor를 동정해 내었다. Ribonuclease는 분비되는 단백질로 분류되어 있으며 분자량 16377 Da과 등전점 9.3으로 single-, double-stranded RNA를 모두 가수분해하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다²⁸. Double-headed protease inhibitor도 역시 분비되는 성상을 보이며 분자량 13 kDa과 pI 7.0을 갖는 단백질로 2개의 동일한 부분이 있어 한쪽은 트립신 (trypsin)을 한쪽은 탄력소분해효소 (elastase)를 억제하는 기능을 한다²⁹. 이 두 단백질과 피부사상균과 관계된 보고는 아직까지 없어 이들이 피부사상균에서 어떠한 역할을 하는 지 확실하지 않으나, 피부사상균이 ribonuclease을 분비한다면 피부 및 조직을 침투하는 기전에 역할을 할 것으로 추정된다. 향후 이 단백질들이 피부사상균의 침투에 어떤 기능을 하는지에 대해서 *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* 이외의 다른 균종에서 분비되는 세포외단백과 비교하고 균종마다 특이한 단백을 동정하여 유전자 클로닝 (cloning)이나 특이항체를 이용하여 그 단백질의 유용성을 실험함으로써 그 기능을 규명하는 것이 필요하겠다.

최근 여러 악성 종양, 세균성 질환, 백신 개발, 치료제 개발에 프로테오믹스 기법을 이용하고 있으며, 이를 다양한 질환에 이를 적용시켜 진단과 치료에 응용을 하고 있다³⁰⁻³¹. 따라서, 프로테오믹스 기법을 이용하여 피부사상균의 세포외단백 성상과 기능을 규명한다면, 피부사상균의 정확한 병인의 이해 및 규명된 단백을 이용한 피부사상균의 면역학적 혹은 분자생물학적 동정 kit의 개발과 규명된 단백을 표적으로 하는 치료와 예방법 개발에 많은 도움이 될 것으로 생각한다.

결 론

피부사상균종으로 진단받은 환자로부터 분리 동정한 *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* 세 균종을 배양한 후 배양액의 여과물을 이용하여 이차원 전기영동을 시행하여 프로테오믹스 지도를 얻어

분석한 결과는 다음과 같다.

1. *M. canis*의 배양 첫날에 비해 배양 10 일째의 배양 여과물의 프로테오믹스 지도에서 7 개의 스팟 (spot)이 의미 있게 증가하거나, 새롭게 나타났다.

2. *T. mentagrophytes*의 배양 첫날에 비해 10 일째의 배양 여과물에서 4 개의 스팟이 의미 있게 증가하거나 새롭게 나타났다.

3. *T. rubrum*의 배양 첫날에 비해 배양 10 일째의 배양 여과물에서 5 개의 스팟이 의미 있게 증가하거나 새롭게 나타났다.

4. *M. canis*와 *T. mentagrophytes*에서 분자량 33 kDa과 등전점 6.7을 갖는 단백질 스팟과 분자량 8 kDa과 등전점 6.9를 갖는 단백질 스팟이 공통되게 나타났다.

5. 세 균주에서 가장 의미 있게 증가한 분자량 16 kDa과 등전점 9.3을 갖는 단백질은 ribonuclease로, 13 kDa과 등전점 6.7을 갖는 단백질은 double-headed protease inhibitor로 동정되었다.

본 연구를 통해 피부사상균의 종류에 따라 등전점 및 분자량이 다른 세포외단백을 생성함을 알 수 있었고 진균의 세포외단백의 비교분석 연구에 프로테오믹스 기법이 유용하며 향후 기능성 연구로 발전된다면 이러한 결과를 피부사상균의 진단, 치료 및 예방에 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Chattaway FW, Ellis PA, Barlow AJE. Peptides of dermatophytes. *J Invest Dermatol* 1963; 41: 31-37
2. Weary PE, Candy CM. Keratinolytic activity in *Trichophyton schoenleini*, *Trichophyton rubrum*, and *Trichophyton mentagrophytes*. *J Invest Dermatol* 1965; 48: 240-248
3. Takiuchi I, Higuchi D, Sei Y, Koga M. Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporium canis*. *Sabouraudia* 1982; 20: 281-288
4. Sanyal AK, Das SK, Banerjee AB. Purification and partial characterization of an exocellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. *Sabouraudia* 1985; 23: 165-178
5. Meeyotison V, Neiderpureum DJ. Control of exo-

- cellular proteinases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. Sabouraudia 1979; 17: 91-106
6. Anderson JS, Svensson B, Roepstorff P. Electro-spray ionization and matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: powerful analytical tools in recombinant protein chemistry. Nature Biotechnol 1996; 14: 449-457
 7. Klose J. Large-gel 2D electrophoresis. Meth Mol Biol 2000; 112: 147-172
 8. Gevaert K, Vanderkerckhove J. Protein identification methods in proteomics. Electrophoresis 2000; 21: 1145-1154
 9. 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
 10. Takiuchi I, Sei Y, Takagi H, Negi M. Partial characterization of the extracellular keratinase from *Microsporum canis*. Sabouraudia 1984; 22: 219-224
 11. 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
 12. Descamps F, Brouta F, Vermout S, Monod M, Losson B, Mignon B. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5-kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis*. Immunol Med Microbiol 2003; 38: 29-34
 13. Brouta F, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, Mignon B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. Med Mycol 2001; 39: 269-275
 14. 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
 15. Lee KH, Kim YA, Lee MG, Lee JB. Detection of IgG and IgM antibodies to purified keratinolytic proteinase in sera from patients with dermatophytosis by enzyme-linked immunosorbent assay. Ann Dermatol 1989; 1: 1-5
 16. 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: 447-454
 17. Lee KH, Park HW, Lee JB. Localization of keratinolytic proteinase in skin tissue sections of guinea pigs with *Microsporum canis* infection by immunoperoxidase technique in electron microscopy. Ann Dermatol 1991; 3: 1-4
 18. Yu KJ, Harmon SR, Blank F. Isolation and purification of an extracellular keratinase of *Trichophyton mentagrophytes*. J Bacteriol 1968; 96: 1435-1436
 19. Siesenop U, Bohm KH. Comparative studies on keratinases production of *Trichophyton mentagrophytes* strains of animal origin. Mycoses 1995; 38: 205-209
 20. Tsuboi R, Ko IJ, Takamori K, Ogawa H. Isolation of keratinolytic proteinase from *Trichophyton mentagrophytes* with enzymatic activity at acidic pH. Infect Immunol 1989; 57: 3479-3483
 21. Lambkin I, Hamilton AJ, Hay R. Partial purification and characterization of a 235,000 MW extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. Mycoses 1994; 37: 85-92
 22. Apodaca G, McKerrow JH. Purification and characterization of a 27000-Mr extracellular proteinase from *Trichophyton rubrum*. Infect Immunol 1989; 57: 3072-3080
 23. Asahi M, Lindquist R, Fukuyama K, Apodaca G, Epstein WL, McKerrow JH. Purification and characterization of major extracellular proteinases from *Trichophyton rubrum*. Biochem J 1985; 232: 139-144
 24. 이광훈, 박광균. *Microsporum canis* 로부터 분리 정제한 keratinolytic proteinase의 기질 특이성

- 및 inhibitor에 관한 연구. 원주의대논문집 1988; 1:161-169
25. Weary PE, Candy CM. Further investigations on the keratinolytic activity of *Trichophyton schoenleini* and *Trichophyton rubrum*. J Invest Dermatol 1969; 53: 58-63
26. 이상주, 이광훈, 이원재, 이정복. 피부사상균에서 각질분해효소의 분리 정제 및 특성 비교. 대한의진균지 1998; 3: 95-106
27. Brewis IA. The potential importance of proteomics to research in reproduction. Hum Reprod 1999; 17: 121-127
28. Pace NR, Smith D. Ribonuclease: function and variation. J Biol Chem 1990; 265: 3587-3590
29. Yang HL, Luo RS, Wang LX, Zhu DX, Chi CW. Primary structure and disulfide bridge location of arrowhead double-headed proteinase inhibitors. J Biochem 1992 111: 537-590
30. Hanash S. Disease proteomics. Nature 2003; 13: 226-232
31. Nilsson CL. Bacterial proteomics and vaccine development. Am J Pharmacogenomics 2002; 2: 59-65
-