

*Candida albicans*의 단백질분해효소, 인지질분해효소 및 세포벽 단백질분획으로 면역시킨 생쥐에서의 칸디다증 방어 효과

관동대학교 의과대학 미생물학교실¹, 연세대학교 원주의과대학 미생물학교실 · 기초의학연구소², 연세대학교 원주의과대학 해부학교실³

신운섭¹ · 최선주² · 양영철³ · 박수정² · 박주영² · 김수기² · 이경호²

= Abstract =

Protective Effects of Immunization with Proteinase, Phospholipase and Cell Wall Proteins of *Candida albicans* in Mice Candidosis

Woon-Seob Shin¹, Sun Ju Choi², Young Chul Yang³, Su Jung Park², Joo Young Park², Soo-Ki Kim² and Kyoung-Ho Lee²

Department of Microbiology, Kwandong University College of Medicine, Kangnung, Korea¹

Department of Microbiology, Yonsei University Wonju College of Medicine and

Institute of Basic Medicine, Yonsei University, Wonju, Korea²

Department of Anatomy, Yonsei University Wonju College of Medicine,

Yonsei University, Wonju, Korea³

Background: The opportunistic fungus *Candida albicans* is a major pathogen especially to immunocompromised patients.

Objectives: We examined the protective effect of the active and passive immunizations to evaluate the applicability for the treatment of candidosis in *Candida*-infected mice model.

Methods: *Candida* cell wall components were obtained by treatment of lyticase, proteinase K, and dithiothreitol. The proteinase was purified from the culture filtrates of *C. albicans* using a series of chromatographic steps consisting of DEAE-Sepharose FF, Sephacryl S-200 HR and size-exclusion high performance liquid chromatography. The phospholipase was purified from the culture supernatant of *C. albicans* with DEAE column chromatography, reverse phase column chromatography, reverse phase HPLC and size-exclusion HPLC. Antibodies to cell wall protein components, proteinase and phospholipase were produced by immunization into mice of same strain.

Results: The mean survival times of active and passive immunized mice groups were longer than those of non-immunized groups.

Conclusion: These results showed that immunization with proteinase and its antibody were the most effective to prolong survival time in *Candida*-infected mice. [Kor J Med Mycol 2009; 14(1): 9-15]

Key Words: *Candida albicans*, Proteinase, Phospholipase, Immunization

†별책 요청 저자: 이경호, 220-701 강원도 원주시 일산동 162, 연세대학교 원주의과대학 미생물학교실
전화: (033) 741-0324, Fax: (033) 742-5034, e-mail: leekh@yonsei.ac.kr

서 론

칸디다균은 동물, 식물, 토양 및 해양 등 거의 모든 자연계에 산재하며, 현재 약 190 여종 이상이 알려져 있다. 병원균으로는 Langenbeck이 1839년에 최초로 장티푸스를 앓고 있는 환자의 *aphthae*에서 *Candida albicans*를 발견하였으며, 그 후로 구강과 질의 염증 병변에서 분리되었고 심부 조직에 파종된 칸디다균이 19세기말에 이미 증명되었다. 사람에게서 분리되는 칸디다균 종은 약 20 여종이며, 칸디다증의 주요 원인균은 *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis* 및 *C. guilliermondii* 등이다. 이 중에서 *C. albicans*가 가장 흔히 분리되는 병원체이다^{1,2}.

최근에는 고 연령층과 만성 소모성 질환자, 악성종양치료와 장기 이식 후 면역억제제 투여 등의 원인으로, 후천성 면역 결핍 환자 등 면역력이 저하된 사람이 많아지고 있다. 그리고 광범위 항생제 혹은 항생제의 복합투여 요법 시행이 증가하는 제반 의료 환경으로 칸디다증의 발생 빈도는 더욱 높아지고 있다^{3,4}.

*Candida albicans*의 병원성 결정인자로 단백질 분해효소, 인지질분해효소 등의 칸디다균 분비 효소들과 조직 표면 부착능, 그리고 germ tube 생성능력과 가성균사 전환능력 등이 있다⁵⁻⁹.

칸디다증 병인 과정에서 이런 병독인자 중 단백질과 인지질을 분해하는 가수분해효소들은 숙주 감염 후 집락 형성을 촉진하고 조직을 파괴하여 감염을 확산시키는 역할을 한다. 즉 단백질 분해효소는 항체, 보체, cytokine 등의 면역계 구성 성분과 collagen, keratin, mucin 등의 조직 단백질을 분해할 수 있으며 인지질분해효소는 세포막 손상으로 칸디다균의 조직 침습을 촉진한다¹⁰⁻¹².

이 연구에서는 마우스에 *C. albicans*의 세포벽 단백질 분획과 순수 분리한 단백질분해효소, 인지질분해효소로 면역하고 마우스 생존을 조사하였다. 그리고 면역원을 직접 제공하는 능동 면역

과 면역원에 대한 항체를 전달하는 수동 면역을 시행하여 그 효과를 함께 검사하였다. 특히 칸디다균 병독인자인 가수분해효소들을 면역원으로 사용함으로써 이 효소에 대한 면역이 조직 침습 과정의 억제 효과를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 균주 및 동물

실험 균주로 질병관리본부에서 분양 받아 본 실험실에서 계대 배양하고 있는 *C. albicans* (ATCC No., 10231)를 사용하였고 실험 동물은 생후 8~10주된 BALB/c 마우스 (Orient Bio, Korea)를 사용하였다.

2. 세포벽 성분 분리

원침된 칸디다균 시료를 인산완충액으로 희석하여 현탁액을 만들고 lyticase (최종농도, 125 units/ml; Sigma, St. Louis, MO, USA), proteinase K (최종농도, 500 µg/ml; Sigma), dithiothreitol (최종농도, 10 mM; Sigma)을 처리하여 37°C에서 2시간 동안 반응시키어 세포 표면 구조물을 분리하였다. 각각의 혼합물을 원심 분리하여 상층액을 수거하였다. 이 상층액에 80% ethanol을 처리하여 침전시키고 원심 분리로 침전물을 얻어 세포벽 성분 분획으로 사용하였다. 총 단백질 양은 Bradford 방법¹³으로 측정하였다.

3. 단백질분해효소 분리

효소 분리는 Lee 등¹⁴의 방법에 따라 시행하였다. 단백질분해효소 생산을 위하여 BSAB (증류수 1 리터당 YCBWO 11.4 g, yeast extract 0.2 g, glucose 10 g, BSA 2 g)를 Erlenmeyer 플라스크에 준비된 균을 접종하고, 37°C에서 진탕 배양하였다. 일정한 시간마다 1 ml씩 배양액을 수거하여 효소의 활성을 측정하였으며, 효소 활성이 높게 나타났을 때 배양을 중지하였고, 고속원심기 (Sorvall RC-5B refrigerated superspeed centrifuge, Du Pont Co., CT, USA)로 4°C에서 5,000×g로 15분간 원

심 분리하여 그 상등액을 회수, 조효소 (crude enzyme)로 사용하였다. 단백질을 분해효소를 DEAE-Sephacryl S-200 (Pharmacia AB Biotechnology, Uppsala, Sweden) 그리고 size-exclusion HPLC (YMC-Pack Diol-120 column: YMC Co., Kyoto, Japan)로 구성된 일련의 chromatography 과정을 거쳐 최종 분리하였다.

분리된 효소의 분자량을 측정하기 위해 위에 제시된 size-exclusion HPLC법에 따라 column에 표준 표지 단백질 (standard marker protein; BSA 66 kDa, ovalbumin 43 kDa, chymotrypsinogen 25 kDa, ribonuclease 13 kDa, Pharmacia, Sweden)을 주입, 통과시킨 후, 표준선을 작성하여 분자량을 산정하였다.

4. 인지질분해효소 분리

효소 분리는 Shin 등¹⁵의 방법에 따라 시행하였다. Sabouraud (Difco, Sparks, MD, USA) 배지가 담긴 삼각 플라스크에 균을 접종한 후 37°C에서 진탕 배양하였다. 배양액을 원심 분리하여 균체를 제거하고 한외 여과막 (ultrafilter)으로 배양액을 농축하였다. 인지질분해효소를 DEAE-Sephacryl S-200 (Sigma), C18 silica gel (Sigma) chromatography와 reverse phase HPLC (Microsorb-MV C18, 250×4.6 mm, 5 µm, 100Å, Varian, Canada), size-exclusion HPLC (YMC-Pack Diol-120 column: YMC Co., Kyoto, Japan)로 구성된 일련의 chromatography 과정을 거쳐 최종 분리하였다.

5. 항체 생산

위의 방법으로 준비한 세포벽 단백질분해효소, 인지질분해효소를 각 250 µg/ml의 농도로 인산완충용액에 녹이고 동량의 complete Freund's adjuvant와 혼합하였다. 마우스의 복강에 0.4 ml 그리고 피하에 0.2 ml씩 주사하여 면역하였고 15일 후 같은 방법으로 다시 주사하여 추가 면역을 하였다. 이차 면역 후 10일째 마우스의 꼬리를 절단하여 혈액을 채취하고 ELISA을 시행, 항체가를 측정하고 수동 면역 시 항혈청으

로 사용하였다.

6. 능동 면역, 항혈청 처리와 치사능 측정

능동 면역는 마우스에 세포벽 단백질분해효소, 인지질분해효소를 각각 250 µg/ml의 농도로 인산완충용액에 녹이고 동량의 complete Freund's adjuvant (Sigma)와 혼합하여 피하에 0.2 ml씩 두 곳에 주사하여 면역하였다. 또한 동종의 마우스에서 얻은 이들 물질에 대한 항혈청은 마우스마당 0.2 ml씩 (ELISA 항체가, 1:2000) 꼬리 정맥에 주사하여 수동 면역하였다. 능동 면역는 칸디다균 감염 1, 3주 전에 두 번, 항혈청 주입은 감염 후 하루가 지난 다음날 한 번 시행하였다.

면역 효과를 판정을 위해 칸디다균을 인위적으로 감염시켜 마우스 치사 능을 측정하였다. 즉 생리식염수로 희석하여 5×10^5 cells/ml 농도로 칸디다균 부유액을 준비하여 마우스마당 칸디다균 부유액 0.2 ml (주입 세포수, 1×10^5)을 꼬리 정맥에 주사하였고 이 후 매일 60일 동안 마우스 생존을 관찰하였다.

결 과

1. 가수분해효소의 분리

단백질분해효소를 분리하기 위하여 ion exchange chromatography, gel filtration, size-exclusion HPLC를 순차적으로 시행하였고 size-exclusion HPLC상에서 최종 분리된 물질의 분자량은 43 kDa이었다. 또한 ion exchange chromatography, reverse phase chromatography, reverse phase HPLC, size-exclusion HPLC를 순차적으로 시행하여 분자량 82 kDa의 인지질분해효소를 분리하였다 (Fig. 1).

2. 능동 및 수동 면역 효과

면역 효과를 판정을 위해 마우스 치사율을 적용하였다. 능동 면역는 마우스에 세포벽 단백질분해효소, 인지질분해효소를 칸디다균 감염 1, 3주 전에 두 번 시행하였고 세 가지 물질

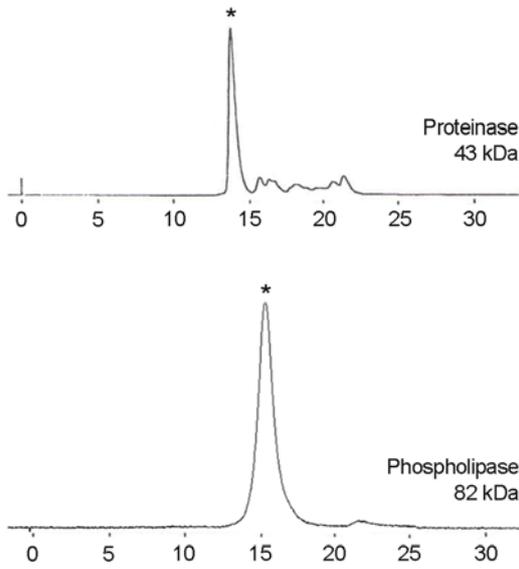


Fig. 1. Chromatographic profiles of the proteinase and phospholipase from culture filtrate of *C. albicans*. The pooled proteinase fractions through DEAE-Sepharose FF and Sephacryl S-200 column chromatography were applied to size-exclusion HPLC. The pooled phospholipase fractions through DEAE-Sepharose column and Reverse phase column and Reverse phase HPLC were applied to size-exclusion HPLC. The YMC-Pack Diol-120 column was equilibrated with 20 mM SCB, pH 6.3. HPLC was performed with the same buffer at a flow rate of 1.0 ml per min. The peak fractions monitored by absorbance at 280 nm were collected and measured for proteolytic activity. Star symbol (*) represents the proteinase and phospholipase peak, respectively.

에 대한 항혈청 전달 수동 면역은 균 감염 1일 후에 1회 시행하였다.

세 가지 물질로 능동 면역한 마우스의 생존율은 단백질분해효소 면역 마우스군 85%, 인지질분해효소 면역군 80%, 세포벽 단백질분해 효소 면역군 75%로 생리식염수를 주입한 대조군 30%보다 매우 높았으며 평균 생존일수는 순차적으로 55.7일, 52.5일, 51.0일, 27.9일 이었다 (Fig. 2) ($p < 0.01$, student's t-test).

면역 혈청 (ELISA 항체가, 1:2000)으로 수동 면역을 시행한 마우스 생존율은 단백질분해효소 면역 마우스군 30%, 인지질분해효소 면역군 40%, 세포벽 단백질분해 효소 면역군 20%, 대조군 20%이었으며 평균 생존일수는 순차적으로 27.4일, 38.3일,

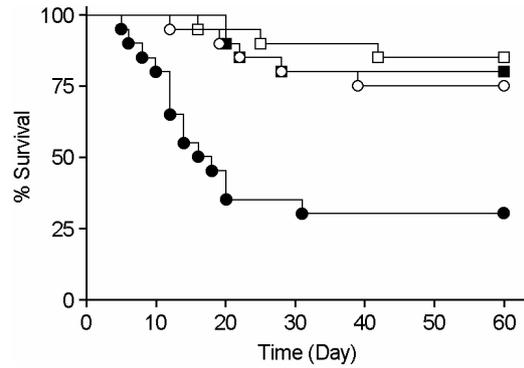


Fig. 2. Protective effect of active immunization with proteinase and phospholipase in experimental candidosis mice. *C. albicans* (1×10^5 cells/mouse) were injected into the tail veins of BALB/c mice on day 0. Mice ($n=20$) were treated twice with proteinase (■), phospholipase (□), cell wall protein components (○), and saline (●) on days -7 and -21.

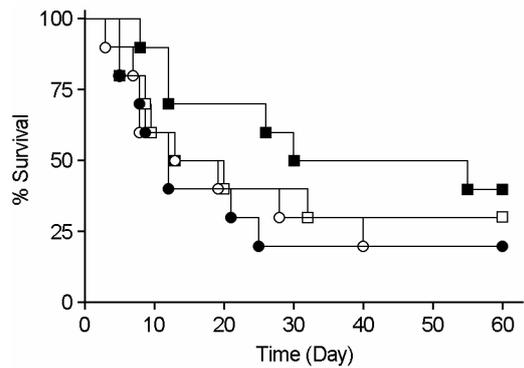


Fig. 3. Protective effect of passive immunization with proteinase and phospholipase in experimental candidosis mice. *C. albicans* (1×10^5 cells/mouse) were injected into the tail veins of BALB/c mice on day 0. Mice ($n=10$) were treated with anti-proteinase (■), anti-phospholipase (□), anti-cell wall protein components (○), and saline (●) on day 1.

24.6일, 21.7일 이었다 (Fig. 3).

고 찰

현재까지 알려져 있는 *C. albicans*의 병원성 결정인자로는 단백질분해효소, 인지질분해효소 등의 감염 확산인자와 숙주 상피 세포와 칸디다균 adhesin-receptor와의 상호관계를 통한 부착능 그리고 germ tube를 생성하고 가성균사 형태로 전

환하는 능력 등을 들고 있다⁵⁻⁹. 또한 세포 표면의 소수성이 높게 발현되는 균이 병원성도 높다는 보고¹⁶⁻¹⁸와 *C. albicans*가 분비하는 mycotoxin을 추정 병독인자로 추천하는 보고도 있다¹⁹. 최근에는 다른 미생물과 마찬가지로 biofilm 형성이 칸디다증 성립에 불가결한 단계로 인식하여 biofilm 형성능을 칸디다균 병원성의 중요한 요인으로 인식되고 있다²⁰⁻²².

미생물에 의한 병인 과정에서의 집락 형성은 우선 미생물이 숙주 세포에 부착하고 세포 점막 분비물에 의하여 탈락 과정이 방지된다. 그 결과 숙주 조직에서 미생물의 분열 증식이 가능하게 되어 집락이 형성되는데 칸디다균에서도 유사한 양상으로 나타난다. 이 때 조직분해효소로 작용하는 칸디다균의 단백질분해효소와 인지질분해효소가 숙주 조직의 물리적 장벽을 파괴하여 집락 형성과 조직 침습을 쉽게 함으로써 전신성 혹은 침습성 칸디다증으로 진행하게 하는데 중요한 역할을 한다.

본 연구에서는 칸디다균 감염 동물에 순수 분리된 *C. albicans*의 단백질분해효소와 인지질분해효소를 가지고 면역함으로써 실제 칸디다균 감염 확산이 억제될 수 있는지를 알아보았다. 또한 능동 면역 외에도 항혈청으로 항체를 제공하는 수동 면역 효과도 조사하였고 이런 효과들을 칸디다균 세포벽 단백분획으로 면역한 마우스 생존검사와 비교하였다.

조직 확산 인자인 인지질분해효소와 인지질분해효소 그리고 세포벽 단백질로 마우스를 면역시키고 그 효과를 측정하였을 때 단백질분해효소와 인지질분해효소로 면역한 실험 동물군이 대조군보다 마우스 생존율과 평균 생존일수가 큰 차이로 높게 나타났으며 세포벽 단백분획 면역군보다도 높게 나타났다 (Fig. 2). 이는 두 가지 가수분해효소의 항원제공이 숙주 조직의 파괴 방어에 영향을 주었다고 보여지며 전신성 혹은 침습성 칸디다증 진행을 억제하는데 효과를 보였다고 판단할 수 있다. 나아가 이런 면역 효과는 두 효소에 대한 항혈청을 주입한 수동 면역 실험에

서도 같은 경향으로 나타났다 (Fig. 3).

일반적으로 수동 면역 방법은 항원 노출 초기에 목적하는 항원과 결합하는 항혈청 즉 항체를 투여하여 면역 복합체 형성을 통한 중화, 흡소닌화를 통한 탐식작용 증강, 보체계의 활성화 등을 이용하는 것이다. 이는 체액성 면역반응은 물론 세포성 면역반응도 함께 유도하는 능동 면역 효과와는 차이를 보일 것이다. 따라서 본 실험에서 능동 면역 시행군이 수동 면역 시행군보다 마우스 생존율이 높고, 평균 생존일수를 연장시키는 결과는 위에서 설명한 기전의 차이에 기인한다고 여겨진다. 덧붙여서 이런 유추의 확인을 위하여 역가 (ELISA 항체가, 1:2000)를 더욱 높은 항혈청 사용이나 보다 많은 마우스 주입 횟수 등을 통한 실험이 필요할 것이다.

흥미로운 것은 세포벽 단백분획을 통한 면역 효과보다는 단백질분해효소와 인지질분해효소에 대한 면역 효과가 크게 나타난 점이다. 이는 칸디다균 감염 시 생체 내에서 유발되는 세포벽 단백분획에 대한 면역반응보다 단백질분해효소와 인지질분해효소에 대한 면역반응이 칸디다증 방어에 보다 효과적임을 보여준다. 혹은 단백질분해효소와 인지질분해효소에 대한 면역반응이 숙주 조직에 집락을 형성하고 조직을 파괴하여 침습, 확산을 방지한 결과로 해석할 수도 있다. 다만 그 차이가 크지 않아 세포벽 단백분획에 대한 분석과 순수 물질을 사용한 보완된 실험과 실험 동물의 개체 수를 늘리거나 반복적 실험을 통한 보완된 연구의 진행이 필요할 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 칸디다균 감염 동물에 순수 분리된 *C. albicans*의 단백질분해효소와 인지질분해효소를 가지고 면역함으로써 실제 칸디다균 감염 확산의 억제 효과를 살펴보았다. 그리고 이 효소들에 대한 능동 면역 (2회)과 수동 면역 (1회) 효과를 조사하였으며 칸디다균의 세포벽 단백분획으로 면역한 효과를 마우스 생존검사로 비교하여

다음의 결과를 얻었다.

세 가지 물질로 능동 면역한 마우스의 생존율은 단백질분해효소 면역 마우스군 85%, 인지질분해효소 면역군 80%, 세포벽 단백질분해 효소 면역군 75%로 생리식염수를 주입한 대조군 30%보다 높았으며 평균 생존일수는 순차적으로 55.7일, 52.5일, 51.0일, 27.9일 이었다.

면역 혈청 (ELISA 항체가, 1:2000)으로 수동 면역을 시행한 마우스 생존율은 단백질분해효소 면역 마우스군 30%, 인지질분해효소 면역군 40%, 세포벽 단백질분해 효소 면역군 20%, 대조군 20%이였으며 평균 생존일수는 순차적으로 27.4일, 38.3일, 24.6일, 21.7일 이었다.

결과적으로 *C. albicans*가 생산하는 단백질분해효소와 인지질분해효소를 이용한 능동 면역과 수동 면역이 숙주 조직 파괴 방어와 전신성 혹은 침습성 칸디다증 진행 억제에 효과가 있음을 보여준다.

REFERENCES

1. Odds FC, Disseminated candidosis (*Candida* septice-mia). In: Odds FC, ed. *Candida* and candidosis. 2nd ed. London: WB Saunders, 1988: 206-230
2. Hurley R, de Louvois J, Mulhall A. Yeasts as human and animal pathogens. In: Rose AH, Harrison JS, eds. *The yeasts*. 2nd ed. London: Academic Press INC, 1987: 212-239
3. Enoch DA, Ludlam HA, Brown NM. Invasive fungal infections: a review of epidemiology and management options. *J Med Microbiol* 2006; 55: 809-818
4. Pagano L, Caira M, Candoni A, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* 2006; 91: 1068-1075
5. Monod M, Borg-von Zepelin M. Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*. *Chem Immunol* 2002; 81: 114-128
6. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 327-335
7. Agabian N, Odds FC, Poulain D, Soll DR, White TC. Pathogenesis of invasive candidiasis. *J Med Vet Mycol* 1994; 32: 229-237
8. Odds FC. *Candida* species and virulence. *ASM News* 1994; 60: 313-318
9. Cutler JE. Putative virulence factors of *Candida albicans*. *Annu Rev Microbiol* 1991; 45: 187-218
10. De Bernardis F, Sullivan PA, Cassone A. Aspartyl proteinases of *Candida albicans* and their role in pathogenicity. *Med Mycol* 2001; 39: 303-313
11. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67: 400-428
12. Ghannoum, MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 122-143
13. Bradford MM. A rapid, sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
14. Lee KH, Shin WS, Park HS, Park JY, Koh CM. Seroreactivities of proteinases of *Candida albicans*, *C. tropicalis*, and *C. parapsilosis* in sera from various *Candida* species-infected mice. *Yonsei Med J* 1997; 38: 178-186
15. Shin WS, Kim DH, Lee KH, Park JY, Koh CM. Purification and characterization of extracellular phospholipase B from *Candida albicans*. *J Korean Soc Microbiol* 1999; 34: 31-36
16. Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. The involvement of physico-chemical interactions in the adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to epithelial cells. *Mycoses* 2007; 50: 391-396
17. Glee PM, Cutler JE, Benson EE, Bargatze RF, Hazen KC. Inhibition of hydrophobic protein-mediated *Candida albicans* attachment to endothelial cells during physiologic shear flow. *Infect Immun* 2001; 69: 2815-2820
18. Lee KH, Shin WS, Park HS, Park JY, Koh CM.

- Relationship between cell surface hydrophobicity and virulence in *Candida albicans*. J Korean Soc Microbiol 1990; 25: 511-520
19. Ogawa H, Nozawa Y, Rojanavanich V, et al. Fungal enzymes in the pathogenesis of fungal infections. J Med Vet Mycol 1992; 30: 189-196
20. Cateau E, Beriejeaud JM, Rodier MH, Imbert C. Fungal biofilm inhibition by a component naturally produced by *Candida albicans* yeasts growing as a biofilm. Int J Antimicrob Agents 2008; 31: 166-170
21. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol 2006; 9: 588-594
22. Mukherjee PK, Zhou G, Munyon R, Ghannoum MA. *Candida* biofilm: a well-designed protected environment. Med Mycol 2005; 43: 191-208
-