

생명정보학 기반 열대열 말라리아 특이 진단 타겟 단백질 선정 Selection of plasmodium falciparum (Pf) malaria specific diagnosis target proteins based on bioinformatics

서 승 환, 김 학 용
충북대학교 생화학과

Seung Hwan Seo, Hak Yong Kim
Chungbuk National University

요약

말라리아는 인체에 감염되는 열원충의 종류에 따라 크게 열대열 원충, 삼일열 원충, 사일열 원충, 난형열 원충으로 구분된다. 말라리아는 감염 후 치료시기를 놓칠 경우 사망에 이를 수 있는 위험한 질병이므로 초기 진단을 위한 Rapid Diagnostic Test (RDT) 키트가 중요하다. 기존의 진단키트의 경우, 열대열 말라리아와 삼일열 말라리아를 동시에 검출하여 치료법이 다름에도 불구하고 구분하여 진단하기가 어렵다. 이러한 이유로 본 연구에서는 열대열 말라리아에 특이적인 RDT키트 개발을 위해, PlasmoDB에서 열대열 말라리아 항원 단백질을 얻고 BLAST를 이용하여 열대열 말라리아에 특이적인 항원 단백질 후보군을 얻었다. 이후 감염단계에 따라 우선순위를 정하고 SPpred에서 제공하는 protein solubility prediction을 통해 실험적으로 단백질 발현 가능 여부를 확인한 결과, 최종적으로 histidine-rich protein II, histidine-rich protein III, glycoporphin binding protein을 선정하였다. 이들 단백질을 이용한 열대열 말라리아 진단키트 제작은 열대열 말라리아 특이적 진단을 효과적으로 할 수 있다.

I. 서론

인체의 감염을 유발하는 4종류의 말라리아 중, 열대열 말라리아와 삼일열 말라리아는 가장 넓은 지역과 높은 감염률을 나타낸다[1]. 기존의 진단키트의 경우, 이 두 말라리아를 구분하여 진단하기가 어렵기 때문에 치료에 어려움이 있다. 따라서 우리는 열대열 말라리아 특이 진단 키트 개발의 일환으로 BLAST를 이용하여 plasmoDB에서 제공하는 열대열 말라리아 단백질들 간의 아미노산 서열 분석 및 감염 단계 우선순위에 따라 열대열 말라리아에 특이적인 항원 단백질들을 선별하고, solubility 예측 프로그램인 SPpred 통해 실험적인 단백질 발현 가능 여부를 확인함으로써 최종 선정된 항원 단백질의 열대열 말라리아 특이 진단 키트 제작 가능성을 제시하고자 한다.

II. 본론

1. 열대열 원충 관련 단백질 추출

열대열 원충에서 발현되는 단백질 정보는 말라리아 관련 정보를 제공하는 plasmoDB(www.plasmodb.org/plasmo/)를 통해 총 5,777개의 단백질 중, unknown function, putative와 같은 불확실한 정보를 가진 단백질을 제거하여 1,026개의 단백질 리스트를 얻었다(표 1).

2. Blast를 통한 열대열 말라리아에 특이적인 단백질 후보군 선별

PlasmoDB에서 얻은 1,026개의 단백질들은 NCBI blast를 통해 아미노산서열 분석으로 정상사람에게는 존재하지 않으며 열대열 원충을 제외한 나머지 3 종류의 열원충에도 존재하지 않는, 즉 열대열 말라리아에 특이적인 항원 단백질 후보군 28개를 얻었다(표 1).

표 1. NCBI blast를 이용한 열대열 말라리아 특이 단백질 후보군 선별

<i>P.v(-), P.o(-), P.m(-), H. sapiens(-)</i>
28 proteins *
<i>P.v(+), or P.o(+), or P.m(+), or H. sapiens(+)</i>
514 proteins
etc.(unable to check)
484 proteins

Total 1,026 proteins; P. f, plasmodium falciparum; P. v, plasmodium vivax; P. o, plasmodium ovale; P. m, plasmodium malarae; (+), exist; (-), none; *, P. f specific proteins

3. 말라리아 감염 단계에 따른 항원 단백질 존재 여부 확인 및 scoring

말라리아 감염 여부를 조기에 진단하기 위해서는 열원충의 감염 단계가 중요하다[2]. 따라서 plasmoDB에서 제공하는 감염단계 별 단백질의 존재 여부 정보를 이용하

여 총 7단계 중, 앞서 얻은 28개 후보 단백질들이 어느 단계에 속하는지 확인 하고, 각 단계별 포함된 후보 단백질들 간의 우선순위를 결정하기 위해 merozoite단계(4 점), early-ring/late-ring단계(각 3점), early-trophozoite/late-trophozoite단계(각 2점), early-schizont/late-schizont 단계(각 1점)로 감염 단계 초기에 가까울수록 높은 점수를 부여하는 방식의 scoring을 진행하였다. 이후 총 16점을 기준으로 10점 이상의 단백질 후보 7개를 선별하였다(표 2).

표 2. 열대열 말라리아 감염단계에 따른 후보 단백질 발현 여부 및 scoring

ID	Merozoite	Ring		Trophozoite		Schizont		Score*
		ER	LR	ET	LT	ES	LS	
225632127	+	+	+	+	+	-	+	15
225632076	+	+	+	+	+	-	-	14
59797635	+	+	+	-	+	+	-	13
23615661	+	+	+	+	-	-	-	12
23505253	+	+	+	+	-	-	-	12
46362239	+	+	+	-	-	-	-	10
23505254	+	+	+	-	-	-	-	10
23504494	+	-	-	+	+	+	-	9
225631927	+	+	-	+	-	-	-	9
23497049	+	+	-	+	-	-	-	9
23498147	+	+	-	+	-	-	-	9
23495211	+	+	-	-	-	-	+	8
23495956	+	-	-	+	+	-	-	8
225632290	-	+	+	+	-	-	-	8
15375371	+	-	-	+	-	+	-	7
23495212	+	-	-	-	-	+	+	6
46361263	-	+	+	-	-	-	-	6
3845158	+	-	-	-	-	-	+	6
254832737	-	-	-	+	+	+	-	5
23496270	+	-	-	-	-	-	+	5
23615276	+	-	-	-	-	-	+	5
225632191	+	-	-	-	-	-	+	5
23510600	+	-	-	-	-	-	+	5
23495213	+	-	-	-	-	-	+	5
23510631	-	-	-	-	+	-	-	2
23496401	-	-	-	-	-	+	+	2
23503375	-	-	-	-	-	+	+	2
23498303	-	-	-	-	-	-	+	1

ID, NCBI ID; ER, early ring; LR, late ring; ET, early trophozoite LT, late trophozoite ES, early schizont LS, late schizont; score*, merozoite=4, ring(ER/LR)=3, trophozoite (ET/LT)=2, schizont(ES/LS)=1, total score=16

4. Solubility 예측

In vitro에서의 단백질 발현에 있어서 중요한 점이 solubility이다. 단백질의 아미노산 서열 분석을 통해 soluble인지 non-soluble인지 예측하는 프로그램인 SPpred 를 이용하여 soluble한 단백질을 선별한 결과, 7개의 후보 단백질 중 최종적으로 3개의 단백질 histidine-rich protein II(HRP-II), histidine-rich protein III(HRP-III), glycoporphin binding protein(GBP)을 선정 하였다(표 3). 또한 선정 된 3종류 단백질들의 아미노산 서열 multiple alignment를 통해 정상 사람에게는 존재하

지 않으며 열대열 원충을 제외한 나머지 열원충에도 없는 열대열 말라리아에 특이적인 단백질들임을 확인하였다.

표 3. solubility prediction

ID	Prediction (threshold=-0.1)
225632127	soluble protein
225632076	soluble protein
59797635	soluble protein
23615661	Non Soluble Protein
23505253	Non Soluble Protein
46362239	Non Soluble Protein
23505254	Non Soluble Protein

225632127, HRP-II; 225632076, HRP-III; 59797635, Glycophorin Binding Protein

III. 결론

본 연구에서는 열대열 말라리아 관련 단백질을 이용하여 생명정보학을 기반으로 blast를 통한 단백질 아미노산 서열 분석, 말라리아 감염단계 별 발현 여부 확인을 통한 후보 단백질 우선순위 분석, SPpred를 이용한 solubility 예측을 통해 열대열 말라리아 특이 항원 단백질을 선정 하였다. 이들 단백질을 이용한 말라리아 진단키트는 열대열 말라리아와 삼일열 말라리아를 동시에 검출하는 기존의 진단 키트와는 다른, 열대열 말라리아만을 특이적으로 진단할 수 있는 진단 키트로써 말라리아 감염 초기 치료에 보다 효과적 일 것이다.

■ 참고 문헌 ■

- [1] World Health Organization: media centre, Fact sheets, Malaria, 2014
- [2] Philip J. Rosenthal, "Proteases of Malaria Parasites: New Targets for Chemotherapy", Emerg Infect Dis, Vol 4, No. 1, pp. 49-57
- [3] Clinton K. Murray, "Update On Rapid Diagnostic Testing for Malaria", Clinical Microbiology Reviews, Vol 21, No. 1, pp. 97-110