

Protein A의 면역학적 연구

오양효, 김영부, 김미경, 김민정, 윤소겸

부산대학교 의과대학 미생물학교실

I. 서 론

면역글로부린의 Fc 부위에 비특이적으로 결합하는 특성을 가지고 있는 단백질로서 면역학 및 면역혈청학 영역에서 상당한 주목을 받았으며 이미 널리 응용되고 있는 protein A는 황색포도구균 세포벽의 peptidoglycan moiety에 운상결합한 벽구축 단백질 복합 진화한 것으로 생각되고 있으며 면역 글로부린의 Fc부위에 결합하는 부분이 3군데가 있는 분자량 42,000의 단백질이다. Jensen 등¹⁾은 coagulase 생산 포도구균주의 항원은 3종류로서 어떤 균주를 막론하고 공통적으로 함유하고 있다고 하여 staphylococcal common antigen이라고 명명하였다. 이들 공통항원 중에 Cowan type 1주의 균체에 특히 다량으로 함유되어 있는 항원을 antigen-A라고 명명하였으며, Lofkvist 등²⁾ 및 Grov 등³⁾은 Jensen의 antigen A가 단백질이라는 것을 증명하고 이를 protein A라고 불렀다. 이 물질의 아미노산 조성 및 물리 화학적 성상에 대해서는 Sjoquest 등⁴⁾이 상세히 보고한 바 있다. Protein A는 거의 대부분의 황색포도구균에 존재하나, 특히 Cowan type 1, phage type 52, 52/52/, A/79/80은 protein A를 많이 보유하고 있으며, wood 46주는 protein A를 보유하지 않는 독특한 균주이다. 이러한 protein A를 응용한 방법의 하나로 Kronval⁵⁾이 protein A보유 균체를 이용하여 최초로 보고한 공동 응집반응(coagglutination : COA)은 진단 미생물학의 새로운 방법으로서 항원의 검출 및 분리 동정에 응용되고 있다. 실제로 *Pneumococci*⁵⁾, *Streptococci*⁶⁾, *E. coli*⁷⁾, *Salmonella*⁸⁾, *Shigella*⁹⁾, *Mycobacteria*¹⁰⁾, *H. influenza type b*¹¹⁾ 및 *Neisseriae* 등^{12,13)}의 많은 세균성 질환과 *Leishmania*¹⁴⁾와 같은 기생충 감염 질환 그리고 *Herpes simplex virus*¹⁵⁾와 같은 virus 감염 질환에서 배양액 혹은 체액으로부터 미생물 항원을 직접 검출하여 원인 미생물 추정을 가능케 함으로

써 조기에 적합한 치료가 가능하게 되었다. 이에 저자는 미생물에서 유리되는 항원 외에 항원성이 낮아서 검출이 까다로운 저분자량의 가용성 항원(초자체)으로 면역하여 얻은 항초 자체 가토 혈청으로 흡수 처리한 *Staphylococcus aureus* Cowan type 1 strain(sensitized SAC)을 이용하여 초자체에 대한 공동응집반응을 실시하고 기존의 침전반응법과 비교하였으며 가장 흔히 사용되고 있는 SAC 한 세균당 약 85,000개의 항체가 부착된다고 알려져 있다¹⁶⁾.

또한 Protein A는 Jensen법에 의하여 *Staphylococcus aureus* Cowan type 1 (SCI)주의 가열균체에서 추출한 단백질로서 최근에는 lysostaphin-chromatography 방법으로 순수분리할 수 있는 natural protein이다. Protein A를 다량 함유한 SCI은 혈청중의 IgG를 흡착하므로 혈청 중에 IgG를 제거할 목적으로 사용할 수 있다^{17,18)}. 저자는 여기에 흥미를 가지고 protein A가 면역적혈구로 면역한 가토 혈청의 적혈구 응집소가 및 용혈소가에 미치는 영향을 기술하고자 한다.

II. Protein A의 성상

초자체는 대체로 결합조직의 구조로 되어있으며, 99%가 물과 용해되어 있는 단백질 및 염으로 되어 있고, 그 외 1% 정도가 2가지 biopolymer (collagen hyaluronic acid)로 불용성의 가는 fibril의 network를 형성하여 투명한 유리질 형태로 되어있다. 이 중에서 수용성인 물질로는 단백질 성분 중 고분자 단백질은 거의 존재하지 않고, acidic glycoprotein과 albumin등의 저분자 단백질이 주로 분포하여, plasma protein과는 질적인 면에서 많은 차이를 나타내며 또한 그 양적인 면에서도 plasma의 1%정도 밖에 되지 않는다. 단백질성분 이외의 저분자 물질은 ascorbic acid를 제외하고는 plasma와 유사하며, galactose, glucose,

mannose, fructose, glucuronic acid, 및 glucosamine 등의 sugar 성분 및 sodium, potassium, chloride, bicarbonate, calcium, phosphate, 및 lactic acid 등의 electrolyte 성분으로 되어있다. 이러한 초자체의 생화학적 특징으로 인하여 항원성이 혈청에 비하여 단순하고 미약하다. 따라서 초자체에 대한 항체형성이 힘들며, 그 검출법에 있어서도 많은 시간과 시료를 필요로 한다.

본 실험에서는 우초자체로 면역한 가토로부터 얻은 항초자체 가토혈청을 이용하여 초자체 항원을 검출하는 방법에 있어서 일반적으로 적은 분자량의 가용성 항원을 검출하는 방법으로 주로 사용되는 침강반응법은 많은 시간과 까다로운 기술을 요하여 검사법의 신속성, 경제성, 숙련된 요구성 및 장비의 준비면에서 많은 문제점을 나타내었다.

공동응집반응(coagglutination : COA)은 IgG의 Fc부분에 대한 수용체에 검출코자하는 항원에 대한 특이항체가 비특이적으로 결합하므로, 특이항체의 항원결합부인 Fab 부분은 남아있게 된다. 따라서 검체 중에 특이항체에 반응하는 항원이 존재하면, 포도구균에 부착되어 있는 항체의 Fab 부분에 결합하게 되어 포도구균을 핵으로 하는 항원과 항체의 격자(lattice)가 형성됨으로서 육안적으로 응집상을 관찰할 수 있게 된다.

본지에서는 항초자체 가토 혈청으로 조제한 sensitized SAC를 이용하여 COA법으로 초자체 항원을 검출하여 본 결과, 단시간에 손쉽게 초자체 항원을 검출할 수 있었으며 반응의 특이성도 확인할 수 있었다(표1).

Table 1. Detection of vitreous body antigen by the coagglutination test

Reagent	Vitreous body	
	Pretreated*	Nonpretreated
Sensitized SAC**		
Viable SAC	+	+
Formalinized SAC	+	+
Nonsensitized SAC		
	-	-

* pretreated : Heat treated in 100°C boiling water for 3 minutes to prevent nonspecific agglutination.

** Sensitized SAC : Anti vitreous antibody coated *Staphylococcus aureus* Cowan type 1 strain

따라서 여타의 항원성이 미약하고 검출이 까다로운 적은 분자량의 항원을 검출하는데 있어서, COA 법이 별다른 장비 없이도 누구나가 보다 신속하고 정확한 결과를 얻을 수 있는 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

이상에서 살펴본 공동응집반응을 이용한 항원의 검출 뿐만 아니라, protein A를 응용한 일련의 성과들은 면역 글로부린의 분리정제, 세포분리, lymphocyte의 식별, B cell에 대한 mitogen 작용, 악성종양의 치료, 혈중 면역복합체의 정량측정, IgG 항체의 subclass결정 등, 수없이 많으며, 유전자 조작에 의한 새로운 용도를 가진 변이 균주의 등장으로 더욱더 많은 부분에서 실용화 될 것으로 사료된다.

한편, 포유동물의 적혈구로 면역하여 얻은 항체의 적혈구 응집소가 및 용혈소가의 고저는 면역에 사용된 실험동물의 개체 자체에도 관계하겠지만 사용된 적혈구의 종류에 따라서 더욱 큰 영향을 받는다고 한다. 김²¹⁾은 면양적혈구를 가토에 감작한 항혈청의 용혈소가가 적혈구 응집소가 보다 높았다고 하였는데, 이는 저자의 성적과 같은 결과였다. 저자는 항면양적혈구 가토혈청에 대하여 적혈구 응집소가 및 용혈소에 protein A가 미치는 영향을 관찰한 실험성적을 여러 문헌과 비교 고찰하고자 한다. Protein A는 포유동물 유래의 면역 globulin과 비면역학적으로 결합하는 특이한 활성물질로서 최근에 많은 관심을 끌어 연구자가 늘어나고 있다. Sweden의 Lofkvist와 Sjoquist²²⁾, Norway의 Grov 등³⁾에 의하여 명명된 protein A는 포도구균에 있는 5종류의 항원물질(A-1,A-2,A-3,B,C) 중 A-1으로 사람의 γ -globulin과 결합하는 단백이라는 것이 판명되었다. 이러한 protein A와 γ -globulin과의 결합이 항원항체 반응에 유래하는 것이 아니고 IgG의 Fc 부위와의 비특이적인 결합이라는 것이 명백해져, Forsgren과 Sjoquist¹⁹⁾는 protein A와 포유동물 유래의 IgG와의 결합 반응을 pseudoimmune reaction이라고 부르는 것이 좋다고 하였다. Jensen은 protein A를 가지고 있는 포도균의 균체 항원을 분석한 결과 세포벽 중에 공유형태로 존재하는 단백질의 하나이며, 그 추출 방법으로 포도구균을 100°C에서 2시간 가열하였다고 하였다. 현재까지 알려진 protein A의 물리화학적 성상은 분자량 42,000의 단순 단백질로 등전점이 5.1이며, 한 분자내에 4개의 활성부위를 갖고 있다. protein A의 함유량은 차이가 있으나 거의 대부분

의 황색포도구균 세포벽에 공통적으로 들어있다. Fc 부위를 가진 면역 globulin과 protein A가 비특이적으로 결합하는 성질은 면역반응의 발생과 분화의 해명에도 유용한 방법을 가져다 줄 것으로 보이며, SCI 균주의 균체는 혈청 중의 IgG를 흡착하므로 혈청 중에 IgG를 제거할 목적으로 사용할 수 있다. 바이러스에 대한 항체역가의 측정에 SCI 균주와 Wood-46 균주로 각각 흡수처치한 혈청의 적혈구 응집저지 시험 역가를 무처치의 대조혈청과 비교하는 방법으로 풍진바이러스에 대한 7S 항체가 SCI주 균체에 흡수제거됨을 관찰하고, 풍진의 감염시기를 추정하는데 있어서 임상학적으로 대단히 유용한 혈청진단법을 제공하고 있다^{17,18)}. 또한 toxoplasmosis 이환자와 항핵항체 보

유자의 혈청진단에 응용하여, 임상 혈청진단법에 있어서 protein A 보유균체의 사용이 높이 평가되고 있다^{17,18)}. 최근에는 연쇄구균의 군별 감정도 SC1으로 혈청 중에 IgG를 흡수시킨 간접 응집반응을 사용하고 있다¹⁹⁾.

저자는 항면양적혈구 가토혈청에 protein A가 적혈구 응집소가와 용혈소가에 미치는 영향을 관찰하였던 바, 무처치 SC1과 formalin 처치한 SC1으로 처리한 것과 같은 비율로 감소함을 관찰할 수 있었다(표2, 3). 그리고 SC1과 2-Mercaptoethanol 두가지 모두 처리한 항혈청에 있어서는 두 항체가 현저히 감소됨을 관찰할 수 있었다(표 4).

Table 2. Hemolysin and hemagglutinin titers of rabbit anti-SRBC serum treated with *Staphylococcus aureus* Cowan 1 strain

Test	Titers*										
	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	control***	
Hemolytic reaction	++++**	++++	++++	++++	+++	++	-	-	-	-	-
Hemagglutination	++++	++++	++++	++	-	-	-	-	-	-	-

Table 3. Hemolysin and hemagglutinin titers of rabbit anti-SRBC serum treated with formalinized *Staphylococcus aureus* Cowan 1 strain

Test	Titers*										
	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	control***	
Hemolytic reaction	++++**	++++	++++	+++	+	-	-	-	-	-	-
Hemagglutination	++++	++++	++++	+	-	-	-	-	-	-	-

Table 4. Hemolysin and hemagglutinin titers of rabbit anti-SRBC serum treated with formalinized *Staphylococcus aureus* Cowan 1 strain and 2-mercaptoethanol

Test	Titers*										
	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	control***	
Hemolytic reaction	++++**	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemagglutination	++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Titers : Reciprocal value

** +++++, +++++, +++, and + : Degree of reaction

*** Hemolytic and hemagglutination reaction without serum

면양적혈구로 가토에 감작 30여일 만에 채혈한 혈청인 만큼 IgM과 가공유해 있으리라 생각되어, SC1 혹은 2-Mercaptoethanol로 처리한 항혈청의 IgG와 IgM 두가지

면역 globulin을 정량해 본 결과, SC1에 의하여 IgG가 현저히 감소되었으며 2-Mercaptoethanol에 의하여 IgM이 완전히 소실되었다. 그런데 SC1의 경우 viable한 것이나

formalin 처치한 것이나 Ig G의 감소 정도는 동일하였으나 (표5), 용혈소가와 응집소가의 감소에는 차이를 보였다.

Table 5. Concentration of Ig G and Ig M in rabbit serum

	Ig G(mg/ml)	Ig M(mg/ml)
Before immunization	27.5	3.15
Rabbit anti-SRBC serum	33	3.6
After SCI* treatment	6	2.5
After 2-ME** treatment	21.75	0

* SCI : *Staphylococcus aureus* Cowan 1.

** 2-ME : 2-mercaptoethanol.

이는 살아있는 균체 자체가 protein A에 의한 혈청 중의 Ig G 흡착에는 다른 영향이 없으나, 응집반응과 용혈반응에 대하여는 어떤 영향을 미치는 것으로 생각된다. 또한 SC1에 의하여 IgM도 약간 감소하는 것으로 보아 protein A의 IgM에 대한 영향도 배제할 수 없는 것으로 생각된다. 그리고 2-Mercaptoethanol과 같은 chelate 제 처리에서는 Ig M의 aggregation을 방해하여 혈청내 IgM이 제거되었으며, IgG도 일부 제거되었다. 이러한 두가지 처리후 각각의 응집반응과 용혈반응 결과가 유사한 것으로 보아, 항면양적혈구 가토혈청의 적혈구 응집소 및 용혈소는 IgG과 IgM 두가지의 공동작용인 것으로 사료된다.

최근 protein A가 lymphocyte의 감별과 mitogen으로 사용된다고 하며, coagglutination법을 위시하여 SC1균체를 사용하여 항원분리 정제에 널리 쓰이고 있으며, 악성종양의 치료법으로 사용하고 있어 protein A에 대한 연구가 앞으로 크게 발전할 것으로 본다. 그러므로 저자도 protein A에 관심을 갖고 연구를 거듭 계속해 볼까 한다.

참 고 문 헌

1. Jensen, K., Thesis, Munksgaard, Kopenhagen (1959).
2. Lofkvist, T. and Sjoquist, J., *Acta. pathol. Microbiol. Scand.*, 56, 295-304(1962).
3. Grov, A., Myklestad, B. and Oeding, P., *Acta.*

pathol. Microbiol. Scand., 61, 588(1964).

4. Sjoquist, J., Meloun, B. and Hjelm, H., *Eur. J. Biochem.*, 29, 572(1972).
5. Kronvall, G., *J. Med. Microbiol.*, 6, 187(1973).
6. Kirkegaard, M.K. and Field, C.R., *J. Clin. Microbiol.*, 6, 266(1977).
7. Hovanec, D.L. and Gorzynski, E.G., *J. Clin. Microbiol.*, 11, 41(1980).
8. Rockhill, R.C., Rumans, L.W., Lesmana, M. and Dennis, D.T., *J. Clin. Microbiol.*, 11, 213(1980).
9. Edwards, E.A. and Hilderbrand, R.L., *J. Clin. Microbiol.*, 3, 339(1977).
10. Juhlia, I. and Winblad, S., *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 81, 179(1973).
11. Suksanong, M. and Dajani, A.S., *J. Clin. Microbiol.*, 5, 81(1977).
12. Danielsson, D. and Kronvall, G., *Appl. Microbiol.*, 27, 367(1974).
13. Zimmerman, S.E. and Smith, J.W., *J. Clin. Microbiol.*, 7, 470(1978).
14. Dishon, T., Sluitzky, G.M., El-On, J. and Greenblatt, C.L., *J. Med. Sci.*, 17, 245(1981).
15. Mogensen, S.C. and Dishon, T., *Acta. Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 89, 427(1981).
16. Kronvall, G., Quie, P.G. and Williams, R.C. Jr., *J. Immunol.*, 104, 273(1970).
17. 양학도, 최귀전, *녹십자의보*, 17(2), 55-69(1989).
18. 益田昭吾, *Modern Media*, 27(4), 32-43(1981).
19. Forsgren, A. and Sjoquist, J., *J. Immunol.*, 97, 822-827(1966).