

*Orientia tsutsugamushi*의 유핵세포내 감염능 분석 및 기전

서울대학교 의과대학 미생물학교실

인경수 · 한승훈 · 김항래 · 성승용 · 김익상 · 최명식*

=Abstract=

Infectivity of *Orientia tsutsugamushi* to Various Eukaryotic Cells and Their Cellular Invasion Mechanism

Kyung-Soo Ihn, Seung-Hoon Han, Hang-Rae Kim, Seung-Yong Seong,
Ik-Sang Kim and Myung-Sik Choi*

Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine,
110-799, Korea

Orientia tsutsugamushi is obligate intracellular bacterium that grows within the cytoplasm of the eukaryotic host cells. Therefore capability of the attachment, entry into the host cell and intracellular survival should be critical process for oriental infection. In this study we investigated the cellular invasion mechanism of *Orientia tsutsugamushi* and the role of transmembrane heparan sulfate proteoglycan, which binds diverse components at the cellular microenvironment and is implicated as host cell receptors for a variety of microbial pathogens. First of all *Orientia tsutsugamushi* can invade a wide range of nonprofessional phagocytic cells including fibroblast, epithelial cells and endothelial cells of various host species, including B and T lymphocytes. Thus, it was postulated that the attachment of *O. tsutsugamushi* requires the recognition of ubiquitous surface structures of many kinds of host cells. Treatments with heparan sulfate and heparin inhibited the infection of *Orientia tsutsugamushi* in dose-dependent manner for L cell, mouse fibroblast, whereas other glycosaminoglycans such as chondroitin sulfate had no effect. Collectively, these findings provide strong evidence that initial interaction with heparan sulfate proteoglycan is required for the oriental invasion into host cells.

Key Words: *Orientia tsutsugamushi*, Invasion, Heparan sulfate proteoglycan

서 론

*Orientia tsutsugamushi*는 절대 세포내 기생세균으로 간균 혹은 단간균 형태를 취하고 있으며, 크기는 0.5~0.7 μm 의 직경과 길이가 1.2~2.5 μm

정도이며, 세포표면의 구조는 그람음성균과 유사하여 세포외막과 세포내막에 싸여 있다. 펩티도글리칸이나 lipopolysaccharide를 가지고 있지 않다⁵⁾ 다른 *Rickettsia* 속세균과는 달리 페니실린계 항생제에 내성을 나타낸다¹³⁾. 16S rRNA의 염기서열 분석 결과 다른 종들이 모두 98% 정도의 상

접수 : 1999년 10월 28일, 게재결정 : 1999년 11월 3일

*Corresponding author: Myung-Sik Choi, Department of Microbiology, Seoul National University College of Medicine, Yon-Gon Dong, Jong-Ro Gu, Seoul, 110-799, Korea. e-mail: Myung@plaza.snu.ac.kr.

이 연구는 98년도 서울대학교병원 임상연구비(O119980590) 지원에 의한 결과임

동성을 나타내는데 비하여 *O. tsutsugamushi*는 90% 정도의 상동성만을 보여 최근 이러한 차이점 때문에 예전의 *Rickettsia*속에서 *Orientia*속으로 새로이 분류되었다¹⁵⁾.

*O. tsutsugamushi*는 감염된 절지동물의 일종인 털진드기의 유충이 사람의 조직액을 흡입시 인체 내로 전파되어 급성 열성질환인 쯤쯤가무시병 (scrub typhus)을 유발한다¹⁶⁾. 쯤쯤가무시병은 한국을 비롯하여 일본, 중국, 러시아 동부, 인도, 파키스탄, 말레이시아, 스리랑카, 필리핀, 인도네시아, 호주 등, 아시아 태평양 국가에서 빈발하고 있다²⁾. 쯤쯤가무시병은 우리 나라의 경우 남한 전 지역에서 발생하고 있으며 매개체인 털진드기 유충이 많이 출현하는 4월과 10~11월에 많이 발생하고, 가을철 열성질환의 약 40%를 차지하고 있어 발생빈도는 신증후군 출혈열이나 렙토스피라 증보다 훨씬 높으며, 2중 법정 전염병으로 관리되고 있다¹³⁾.

쯤쯤가무시병은 6~21일 정도의 잠복기를 거친 뒤 심한 고열과 오한, 두통이 발생하며, 가피, 발진, 기침 및 림프절 종창이 특징적으로 관찰된다. *O. tsutsugamushi*는 혈관내피세포에 침입하여 전신 미세 혈관염을 일으킨다. 혈액 내로 들어온 *O. tsutsugamushi*는 능동 탐식작용에 의하여 혈관내피세포내로 탐식되며¹⁹⁾, 세포에서 세포질로 탈출한 *O. tsutsugamushi*는 세포질내에서 이분법으로 증식한다¹³⁾. 감염된 혈관내피세포는 *O. tsutsugamushi*의 증식으로 파괴되어 미세 혈전과 혈관주위 염증을 유발한다.

*O. tsutsugamushi*가 세포에 침투 (penetration)하기 위하여 우선 숙주세포에 특이적으로 결합하게 되고, 결합한 균주가 세포 내로 이동하기 위해서는 균주와 숙주세포 양측의 능동적인 참여가 필요하다. Walker는 *R. prowazekii*의 경우 균주나 세포 어느 한 쪽의 불활성화를 통해 균주의 감염이 억제됨을 증명하였고, 특히 cytochalasin의 작용을 통해 감염이 억제되는 현상을 관찰하여 이들의 감염에 actin filament가 관여함을 보여주었다²⁰⁾. *O. tsutsugamushi*의 경우에 있어서도 정상적인 형태를 유지하고 있는 세균만이 세포에 붙어 탐식작용을 통해 세포 내로 들어간 뒤 세포에서 세포질로 탈출하는 것이 전자현미경으로 관찰되었다²⁾.

그러나 *O. tsutsugamushi*의 감염시 작용하는 숙주세포측 인자에 대해서는 아직 알려진 바가 없

다. 본 연구에서는 이러한 숙주세포측 인자를 확인하기 위하여 우선 *O. tsutsugamushi*의 감염이 숙주별, 혹은 조직별로 특이한 경향이 있는지 여부와, 감염이 시간별로 어떻게 이루어지는지를 분석하여 보았다. 또한 단백질 분해효소인 트립신을 세포주에 처리한 후, *O. tsutsugamushi*를 감염시켜 봄으로서 단백질로 구성되어 있거나, 단백을 포함한 물질이 수용체로 작용할 수 있는 가능성에 대하여 알아보았다.

또한 본 연구에서도 최근 많은 연구결과에서 감염성 세균의 병리에 관여하는 것으로 밝혀지고 있는, 세포외 기질의 주요 구성성분인 glycosaminoglycan들이 *O. tsutsugamushi*의 감염에 관여할 가능성에 대하여도 함께 분석하였다.

재료 및 방법

1. 대상 세포주

3종의 유래된 숙주가 서로 다른 섬유아세포주 CCL1 (L929), CCL10 (BHK-21), CCL75 (WI-38)을 사용하였고, 5종의 상피세포주로 CCL2 (HeLa), CCL9.1 (NCTC1469), CCL-22 (MDBK), CCL-34 (MDCK), CCL-61 (CHO-K1), 2종의 혈관 내피세포주 CCL209 (CPAE), CCL1998 (ECV304), B 림프구계 세포주 V653 및 2종의 T 림프구계 세포주 EL4, TIB48를 사용하였다. 또한 신경계 세포인 1종의 glioblastoma 세포주인 U327MG와 sarcoma CCL8 (sarcoma180) 및 adenocarcinoma CCL142 (RAG) 및 testicular tumor 세포주도 각각 1주씩 사용하였다.

2. *Orientia tsutsugamushi*

L929 세포를 5% 우태아혈청을 포함한 EMEM 배지를 사용하여 5% CO₂ 존재하에서 배양하여 80% 이상의 세포가 감염되었을 때 배양상청액을 회수하여 *O. tsutsugamushi*의 감염원으로 사용하였다.

3. 감염시간에 따른 *O. tsutsugamushi*의 침투능 분석

*O. tsutsugamushi*를 L929 세포주에 감염시킨 후 각각 3, 6, 12, 18, 24시간 후에 수확하여 *O. tsutsugamushi*의 감염율을 판정하였다. 5×10^4 세포/ml 되게 조정된 각 세포부유액에 100 μ l의 *O. tsutsugamushi*를 접종하고 실온에서 20분간 회전시

키면서 반응을 시킨 후, 이를 8-well chamber slide에 각 well 당 300 μ l씩 분주하여 5% CO₂ 존재 하에 24시간 배양하였으며 각 실험은 3회 반복 시행하였다.

판정은 기존에 보고된 'infected-cell counting method'를 사용하였다¹⁵⁾. 즉 배양이 끝난 슬라이드를 3회 Phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후, 건조하고 10분간 아세톤으로 고정한 뒤, *O. tsutsugamushi* 특이 마우스 단세포균항체 (KI-37)와 fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-mouse IgG를 사용하여 간접형광염색한 후, Evans blue (30 mg/L) 염색액으로 1분간 대조염색하여 형광현미경으로 400배 하에서 검경하였다. 감염율은 400배 하에서 300개의 세포를 세어 1개의 *O. tsutsugamushi*가 감염된 경우라도 감염된 세포로 판정하였으며, 이와 더불어 감염된 세포당 감염된 *O. tsutsugamushi*의 수도 동시에 산정하여 분석하였고 이는 3회 반복하였다.

4. 유핵세포 종류에 따른 부착 및 침투력 비교

상피세포, 섬유아세포, 혈관내피세포, 림프구 등 총 19주의 세포주에 따른 침투력 비교 실험을 다음과 같이 시행하였다.

5×10^4 세포/ml 되게 조정된 각 세포부유액에 100 μ l의 *O. tsutsugamushi*를 접종하고 실온에서 20분간 회전시키면서 반응을 시킨 후, 이를 8-well chamber slide에 각 well 당 300 μ l씩 분주하여 5% CO₂ 존재 하에 24시간 배양하였으며 각 실험은 3회 반복 시행하였다. 판정은 상기 3. 방법과 동일하게 시행하였다.

5. 트립신처리된 세포주에서의 부착억제 실험

대상 세포주로는 침투가 잘되는 세포주로 밝혀진 L929 세포주를 사용하였다. L929 세포주는 세포배양용기에 부착하여 자라므로 먼저 PBS-EDTA를 처리하여 세포배양 용기에서 떼어낸 후 사용하였다. 이어 15분간 0.25% 트립신을 37°C에서 처리하였으며 대조군은 PBS로 15분간 처리하여 37°C에 15분간 방치하였다.

5×10^5 세포/ml 되게 세포부유액을 제작한 후 chamber slide에 well당 400 μ l씩 분주하였다. 분주한 각 well에 10% FBS-DMEM 배지 400 μ l와 *O. tsutsugamushi* 균액 400 μ l를 각각 분주한 후 상온에서 30분간 회전시키면서 반응을 시킨 후 37°C에서 1시간 배양하였으며 각 실험은 3회 반

복 시행하였다. 판정은 상기 3.의 방법과 동일하게 시행하였다.

6. 세포외기질인 glycosaminoglycan의 감염억제능 분석

96-well 세포배양용기에 5% calf serum과 0.4 μ l/ml 농도의 daunomycin을 포함한 DMEM배지로 5×10^5 /ml 농도로 조절된 L929 세포주를 100 μ l씩 분주하여 24시간 배양한 후, glycosaminoglycan에 속하는 chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B, chondroitin sulfate C, keratan sulfate, hyaluronic acid, colomic acid, heparan sulfate 또는 heparin 200 μ g/ml과 15분간 반응한 균을, glycosaminoglycan의 최종농도가 200 μ l/ml가 되게 첨가된 세포에 감염시켜 8시간 배양하였다. PBS로 5회 세척 후 트립신을 처리하여 세포를 수확한 후 spot slide에 coating하여 간접형광염색법을 실시하였다. Glycosaminoglycan들이 감염억제능이 있는지를 분석하기 위하여 대조군에 대한 상대적 감염율을 이용 비교하였다.

$$\text{감염율} = \frac{\text{No. of total infected } O. \text{ tsutsugamushi}}{\text{No. of infected cells}} \times \frac{\text{No. of infected cells}}{\text{No. of total cells}}$$

7. 농도에 따른 Heparin과 heparan sulfate의 감염억제능의 변화

heparin과 heparan sulfate를 25, 50, 100, 150, 200 μ g/ml의 농도가 되도록 균과 반응시킨 후 6.과 동일한 방법으로 L929 세포주에 감염시켜 감염억제능을 확인하였다.

결 과

1. 감염시간에 따른 *O. tsutsugamushi*의 부착 및 침투의 양상

감염시간에 따른 *O. tsutsugamushi*의 부착 및 침투의 양상을 분석한 결과 *O. tsutsugamushi*와 유핵세포주가 접촉한 후 3시간부터 24시간까지 *O. tsutsugamushi*의 감염율은 크게 증가하지 않는 양상을 보였다.

이는 *O. tsutsugamushi*의 세대시간이 9~18시간임을 미루어 볼 때¹⁷⁾ 24시간까지의 부착 및 침투의 증가는 이 균의 세포내 분열의 결과라기 보다

는 *O. tsutsugamushi*와 유핵세포주 간의 부착 및 침투의 역동에 의한 것으로 판단되어 세포주 종류 및 숙주에 의한 감염을 측정시 배양시간을 24시간으로 결정하였다 (Fig. 1).

2. 세포주 종류에 따른 부착 및 침투력 비교

*O. tsutsugamushi*의 혈청학적진단에 표준방법으로 이용되는 간접형광염색법에서 항원제작에 사용하는 섬유아세포인 L929 세포와 각 세포주와의 감염을 및 감염세포당 *O. tsutsugamushi* 수를 비교하였다. 그 결과 감염율의 경우에는 L929 세포주의 경우 55.9%였으며, 상피세포주인 Hela 세포주

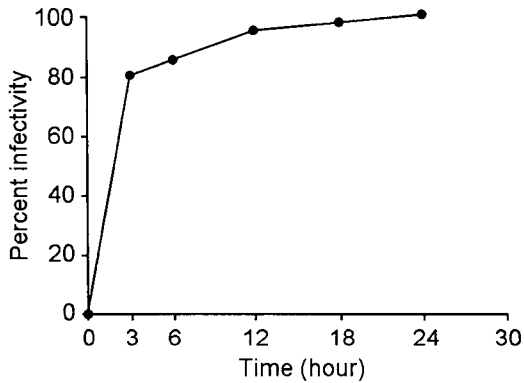


Figure 1. *O. tsutsugamushi* infectivity through incubation time. Infectivity was the percent infectivity (relative value of maximum).

및 NTCC 1469 세포주는 각각 46.2%와 46.7%로 감염율에서는 별 차이를 보이지 않았으며, 혈관내피세포주인 CAPE 세포주는 57.3%의 감염율을 보여 큰 차이를 보이지 않았다. 반면 림프구계열 세포주중 B 림프구 계열 V653 및 RPMI 8226 세포주와 T 림프구 계열인 EL4 및 TIB48 세포주 모두에서는 2.2%에서 6.9%의 낮은 감염율을 나타내었다.

한편 감염세포당 균수에서는 L929 세포의 경우 평균 균수는 3.3개 였으나, 혈관내피세포주인 CAPE에서 4.6개로 약간 높았으며, 림프구 세포주에서는 2.3개에서 1.5개로 낮았으나 통계적 유의성은 관찰되지 않았다 (Table 1).

한편 상피세포주인 CHO-K1 및 MDBK 세포주에서 60% 정도의 높은 감염율을 나타내었으며 암세포주인 Sarcoma 80이나 RAG 세포주에서 모두 암세포의 병리학적 종류에 관계없이 65% 이상의 높은 감염율을 나타내었다. 특히 신경세포의 하나인 glioblastoma 세포인 U327MG 세포주에서는 74.1%의 높은 감염율을 나타내었다 (Table 2).

3. 숙주에 따른 부착 및 침투력 비교

L929 세포주가 속한 섬유아세포계 세포주의 경우 마우스 유래 세포주인 L929 세포주에 비해 사람 유래 세포주인 WI-38 세포주의 경우 감염율은 66.7%였으며, 감염세포당 세균수도 10개로 모두 높았다. 반면 햄스터 유래 세포주인 BHK-21

Table 1. *Orientia tsutsugamushi* infectivity to different cell type and origin

Kind of cell line	Name of cell line (ATCC No.)	Host originated	No. of Infected/ No. of Count (%)	No. ± SD of orientia*
Fibroblast	L929 (CCL 1)	Mouse	224/401 (55.9%)	3.3 ± 3.03
	BHK-21 (CCL 10)	Hamster	138/686 (20.1%)	2.5 ± 1.77
	WI-38 (CCL 75)	Human	246/369 (66.7%)	10.0 ± 8.08
Epithelial	Hela (CCL 2)	Human	416/900 (46.2%)	2.7 ± 1.64
	NTCC1469 (CCL 9.1)	Mouse	353/756 (46.7%)	2.5 ± 1.74
Endothelial	CPAE (CCI 209)	Bovine	344/600 (57.3%)	4.6 ± 3.86
Lymphocyte	V653 (B cell)	Mouse	43/900 (4.8%)	2.1 ± 2.09
	RPMI8226 (CCL 155)	Human	20/900 (2.2%)	2.3 ± 1.62
	EL 4 (T cell)	Mouse	62/900 (6.9%)	1.5 ± 1.16
	TIB48 (T cell)	Mouse	50/900 (5.6%)	2.0 ± 1.67

*Mean number and standard deviation of *Orientia tsutsugamushi* per infected cell

Table 2. *Orientia tsutsugamushi* infectivity to different cell type and origin

Kind of cell line	Name of cell line (ATCC No.)	Host originated	No. of Infected/ No. of Count (%)	No. ± SD of orientia*
Fibroblast	L929 (CCL 1)	Mouse	536/900 (59.6)	2.8 ± 2.6
Epithelial	CHO-K1 (CCL61)	Hamster	534/900 (59.3)	2.4 ± 1.9
	MDCK (CCL34)	Canine	245/900 (27.3)	1.9 ± 1.3
	MDBK (CCL22)	Bovine	557/900 (61.9)	2.8 ± 2.1
Epithelial-like	PK15 (CCL33)	Porcine	488/900 (54.2)	2.0 ± 1.4
Endothelial	ECV304 (CCL-1998)	Human	606/900 (67.3)	4.1 ± 3.5
Fibroblast-like	Sarcoma 180 (CCL8)	Mouse	409/600 (68.2)	2.9 ± 2.1
Epithelial	LC540 (CCL43)	Rat, Testis	535/900 (59.4)	1.9 ± 1.1
Glioblastoma	U327MG	Human	667/900 (74.1)	6.1 ± 5.9
Adenocarcinoma	RAG (CCL142)	Mouse	589/900 (65.4)	2.5 ± 1.6

*Mean number and standard deviation of *Orientia tsutsugamushi* per infeced cell

Table 3. Effects of trypsin treatment on *Orientia tsutsugamushi* infection

Cell line	No. of Infected / No. of Count (%)	No. ± SD of orientia*
L cell	516/900 (57.3%)	2.2 ± 1.5
L cell treated with trypsin	213/900 (23.7%)	1.7 ± 1.1

*Mean number and standard deviation of *Orientia tsutsugamushi* per infected cell

세포주의 경우에는 감염율 20.1% 및 감염세포당 *O. tsutsugamushi* 균체수도 2.5개로 모두 낮았다 (Table 1). 반면 상피세포 계통의 세포주인 경우 개에서 유래된 세포주인 MDCK 세포주를 제외하고는 사람, 마우스, 햄스터 및 소 유래 상피세포 계통 세포주 모두에서 부착 및 침투가 잘 일어나는 것을 관찰하였다.

또한 내피세포 계통의 세포주인 경우 사람이나 소 유래 내피세포 계통의 세포주 모두에서 부착 및 침투가 잘 일어났다. 그러나 림프구 계통의 세포주인 경우에는 사람 및 마우스 유래 림프구 세포주 모두에서 부착 및 침투가 다른 세포주에 비해 낮게 일어났다 (Table 1, 2).

4. 트립신처리된 세포주에서의 부착억제 실험

*O. tsutsugamushi*의 배양에 표준 세포주로 사용하는 L 세포주를 트립신 처리하여 *O. tsutsugamushi*의 부착 및 침투에 미치는 영향을 분석한 결과 L 세포주의 경우 감염율은 57.3%였고 감염된

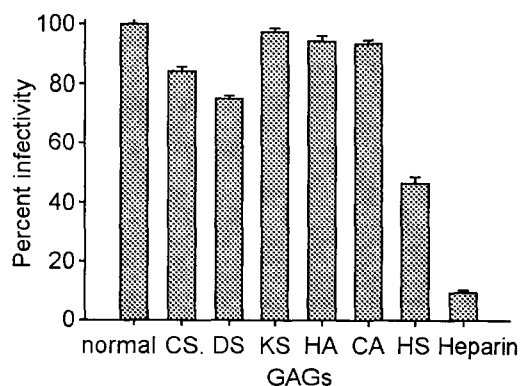


Figure 2. Effects of various glycosaminoglycans on infection of *O. tsutsugamushi*. CS, chondroitin sulfate A; DS, Dermatan sulfate; KS, keratan sulfate; HA, hyaluronic acid; CA, colomic acid. Infectivity was determined by 'infected cell counting method'.

세포내 존재하는 세균수는 2.2개였으나, 트립신으로 처리한 L 세포주는 23.7%의 감염율과 감염

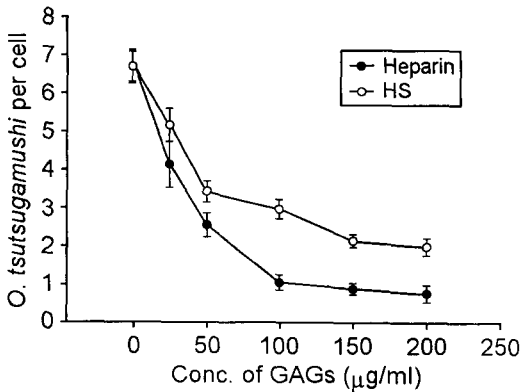


Figure 3. Effects of heparin and heparan sulfate at various concentrations. *O. tsutsugamushi* were preincubated with increasing concentrations of heparin and heparan sulfate, and added to L929, and infectivity was analyzed by 'infected cell counting method'.

된 세포내의 *O. tsutsugamushi*는 1.7개로 감염을 및 세포내 감염 *O. tsutsugamushi* 수가 모두 감소하였다 (Table 3).

5. 세포외기질의 glycosaminoglycan의 감염억제능 분석

수용체로서의 heparan sulfate proteoglycan의 역할을 확인하기 위해, 침투 실험시 heparan sulfate 나 heparin을 첨가하여, 이 분자가 *O. tsutsugamushi*에 먼저 부착하여 heparan sulfate proteoglycan에 부착하는 것을 억제하는지를 알아보았다. 이 결과 heparan sulfate를 *O. tsutsugamushi*에 처리한 경우 대조군의 약 47%, heparin을 처리하였을 경우는 약 12%, 그 외의 glycosaminoglycan를 처리한 경우는 감염율에 큰 변화가 없었다 (Fig. 2, 3). 이러한 결과는 heparin과 heparan sulfate가 *O. tsutsugamushi*의 세포표면물질 (ligand)과 세포와의 결합을 차단하여 나타난 것으로 사료되는 결과이다. 또한 keratan sulfate 등은 *O. tsutsugamushi*의 부착에 영향을 주지 못하므로 heparan sulfate는 특이적으로 *O. tsutsugamushi*의 부착에 영향을 미치는 것으로 해석하였다.

6. 농도에 따른 heparin과 heparan sulfate의 감염억제능의 변화

5)번의 결과에서 확인된 heparin과 heparan sulfate의 *O. tsutsugamushi*에 대한 감염억제능이 이들의 농도에 의존적으로 나타나는지를 확인하여

보았다. Heparin과 heparan sulfate 모두 농도에 의존적으로 감염을 억제하였다 (Fig. 3). 이러한 사실은 heparin과 heparan sulfate가 *O. tsutsugamushi*와 어떤 형태의 상호작용을 함으로서 감염에 관여할 것임을 강하게 시사한다.

고 찰

*O. tsutsugamushi*는 절대세포내 기생세균으로 유핵세포내에서만 자랄 수 있고 박테리아가 일단 숙주세포에서 배지로 방출되면 빠른 속도로 죽어가기 시작한다. 따라서 *O. tsutsugamushi*는 빠른 시간 내에 재차 숙주세포에 감염되어 세포질 내에서 증식을 하여야 한다.

병원성 미생물과 숙주세포와의 첫 번째 특이적 상호작용은 병원성 미생물의 숙주세포표면의 부착으로, 이러한 것에는 여러 가지 형태가 있다. 많은 경우 박테리아의 pili가 이러한 부착에 관여하게 되며, 다른 경우는 숙주세포표면의 수용체에 일반적으로 adhesion이라고 하는 미생물 촉진자가 부착하게 되며, 많은 경우 이러한 수용체-리간드 상호작용이 세포에 기생하는 병원성 미생물 감염과정에서 일어나게 된다.

절대 기생세균인 *O. tsutsugamushi*는 대식세포 같은 식세포에서 증식할 수 있을 뿐만 아니라, 본 연구의 결과에서 알 수 있듯이 섬유아세포, 상피세포, 내피세포 등을 포함한 여러 종류의 세포에 감염될 수 있고 숙주의 범위도 사람뿐만 아니라 마우스, 개, 원숭이 등의 세포주에도 감염될 수 있다. 이러한 사실은 *O. tsutsugamushi*의 감염에 관여하는 숙주세포촉진 인자가 여러 종류의 세포주에 공통으로 존재하는 것을 시사한다.

*O. tsutsugamushi*의 배양에 사용하는 섬유아세포 계통의 세포주인 L 세포주와 비교할 때 상피세포주, 내피세포주 및 신경세포인 신경교세포주 모두에서 차이는 있지만 모두 *O. tsutsugamushi*가 잘 부착 및 침입하는 결과를 얻었다. 또한 sarcoma cell line이나 carcinoma cell line에도 부착 및 침투가 잘 일어났다.

이에 반해 림프구계통의 세포주에서는 B 림프구 세포주와 T 림프구 세포주 모두에서 부착 및 침투가 거의 일어나지 않았다.

숙주에 따른 부착 및 침투력 비교에서 보면 섬유아세포 계통의 세포주에서는 Hamster 유래 세포주인 BHK-21 세포주에는 비교적 부착 및 침투가

잘되지 않았으며 Mouse나 Human 유래 섬유아세포주에서는 비교적 부착 및 침투가 잘 일어났다.

반면 상피세포 계통의 세포주인 경우 개에서 유래된 세포주인 MDCK 세포주를 제외하고는 사람, 마우스, 햄스터 및 소 유래 상피세포 계통 세포주 모두에서 부착 및 침투가 잘 일어나는 것을 관찰하였다. 또한 내피세포 계통의 세포주인 경우 사람이나 소 유래 내피세포 계통의 세포주 모두에서 부착 및 침투가 잘 일어났다. 그러나 림프구 계통의 세포주인 경우에는 Human 및 Mouse 유래 림프구 세포주 모두에서 부착 및 침입이 일어나지 않았다.

이러한 결과로 *O. tsutsugamushi*의 침투는 숙주의 종류보다는 세포주가 속한 조직에 따라 결정된다는 사실을 알 수 있으며 이러한 조직들에 속하는 세포에 특이적으로 존재하거나 많이 발현되는 분자를 통해 침투가 이루어지는 것으로 추측할 수 있다.

*O. tsutsugamushi*의 배양에 표준 세포주로 사용하는 L 세포주를 트립신 처리하여 *O. tsutsugamushi*의 부착 및 침투에 미치는 영향을 분석한 결과 트립신으로 처리한 L 세포주의 경우 처리하지 않은 L 세포주에 비해 *O. tsutsugamushi*의 부착 및 침투가 약 50% 이상 감소하는 결과를 얻었다. 이러한 결과에 따라 유핵세포에 존재할 것으로 생각되는 *O. tsutsugamushi*의 부착 및 침투에 관여하는 분자는 트립신에 의해 분해되는 단백질을 포함한 분자일 것으로 사료된다.

Proteoglycans는 대부분의 유핵세포에서 생산되며 세포외기질과 세포막에 걸쳐 존재한다. 일반적으로 세포질과 세포막을 거쳐 세포외기질까지 걸쳐서 존재하는 단백질에 당류가 결사슬로 존재하는 형태이다.

세포외기질에 존재하는 proteoglycan의 기능은 일반적으로 두 가지로 알려져 있다. 즉 세포외기질을 구성하는 물질이면서 세포표면에서 세포의 성장을 조절하고 병원성 미생물의 수용체와의 상호작용을 통한 병리에 관여하는 것으로 생각된다. Proteoglycan은 핵심단백에 heparan sulfate, chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate B (dermatan sulfate), chondroitin sulfate C, keratan sulfate 등의 glycosaminoglycan들이 결합되어 있는 구조를 가지고 있다. 이러한 proteoglycan들 중, heparan sulfate는 대부분의 동물세포에 heparan sulfate proteoglycan (HSPG)의 형태로 존재하는 것으로 알려져 있으

며, 특히 adherent cell에 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있다.^{6,12)} HSPG는 유핵세포에서 바이러스, 원충류, 박테리아와의 상호작용에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 박테리아에서는 *Listeria monocytogenes*, *Nisseria. gonorrhoea*, *Clamidia trachomatis*, *Borrelia burgdorferi*, *Staphylococcus aureus*의 감염시 HSPG가 초기 부착에 관여하는 것이 보고되었다.^{4,18)}

본 연구의 결과는 이러한 HSPG가 *O. tsutsugamushi*의 감염에도 관여할 가능성을 강하게 시사하고 있다. 결과에서 보듯이 heparin과 heparan sulfate만이 다른 glycosaminoglycan과는 달리 경쟁적으로 *O. tsutsugamushi*의 감염을 억제하였으며, 이러한 경쟁적 감염억제는 heparin과 heparan sulfate 모두에서 농도에 의존적으로 일어났다.

이러한 결과들이 *O. tsutsugamushi*의 감염을 매개하는 수용체를 직접 증명하지는 못하였지만 어떠한 형태든 유핵세포 표면의 heparan sulfate가 감염에 관여한다는 것을 보여주고 있다. 또한 트립신처리가 일반적으로 proteoglycan의 핵심단백 중 세포막에 가까운 위치를 절단하는 것으로 알려져 있으므로 숙주세포의 트립신처리가 *O. tsutsugamushi*의 감염을 억제하는 것도 이러한 사실을 뒷받침하고 있다.

이러한 실험결과는 heparan sulfate proteoglycan이 유핵세포의 수용체로서, 혹은 보조수용체로서의 역할을 할 가능성을 시사하고 있으며, 따라서 *O. tsutsugamushi*의 외막에 존재하는 단백질들의 리간드 규명 및 heparan sulfate를 통한 세포내 침투시 관여하는 신호전달과정 등에 대한 연구가 좀 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

*Orientia tsutsugamushi*는 쯤쯤가무시병 (scrub typhus)의 원인균으로 대식세포 등의 전형적 식세포뿐만 아니라 혈관내피세포를 포함하는 다른 종류의 세포에도 감염되어 기생하는 절대세포내 기생세균이다. 본 연구에서는 *O. tsutsugamushi*의 유핵세포내 침투기전에 관한 연구의 일환으로, 숙주 및 조직의 종류별로 선정된 세포주들을 대상으로 *O. tsutsugamushi*에 의한 감염능을 간접면역형광법을 시행하여 분석하였다. 그 결과 *O. tsutsugamushi*의 감염은 숙주의 종류와는 연관성이 없고, 숙주세포의 조직별로 차이를 나타내는

것으로 나타났으며, 일반적으로 부착해 자라는 세포의 경우는 부착 및 침투가 잘 일어났으나, 본 연구에 사용한 림프구에서는 침투가 잘 일어나지 않는 결과를 얻었다. 또한 숙주세포를 트립신으로 처리한 경우 감염율이 현저히 낮아지는 결과를 얻어 *O. tsutsugamushi*의 감염에 숙주세포의 단백질이 관여할 것이라는 결과를 얻었다.

부착하여 자라는 유핵세포의 세포외기질과 세포막에 일반적으로 존재하며 최근 바이러스와 세포내 기생세균의 수용체로 작용하는 것으로 알려진 proteoglycan들이 *O. tsutsugamushi*의 세포측 수용체로 작용하는지의 여부를 확인하기 위해 8종류의 glycosaminoglycan들을 대상으로 *O. tsutsugamushi*의 감염억제능을 분석하여 본 결과 heparin과 heparan sulfate만이 유의적으로 감염을 억제하였으며, 이러한 경쟁적 감염저해는 처리한 농도에 비례함을 확인하였다. 이러한 사실은 heparin과 heparan sulfate가 *O. tsutsugamushi*에 대한 유핵세포의 부착 및 침입에 관여함을 시사하며, heparan sulfate에 부착하는 *O. tsutsugamushi*의 결합분자의 규명 및 heparan sulfate와의 결합 후 유핵세포에서 일어나는 신호전달기전을 규명함으로써 유핵세포내 침투기전에 대한 이해를 넓힐 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) 장우현: 쯔쯔가무시병. 감염 27: 387-393, 1994.
- 2) 장우현: 한국의 쯔쯔가무시병. 서흥출판사 1994.
- 3) 장우현, 최명식, 기선호: 1989년에 한국에서 발생한 쯔쯔가무시병의 혈청학적 조사. 대한미생물학회지 25: 227, 1990.
- 4) Alvarez-Dominguez C, Vazquez-Boland JA, Carrasco-Marin E, Lopez-Mato P, Leyva-Cobran F: Host cell surface proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparin sulfate receptor recognition. *Infect Immun* 65(1): 78-82, 1997.
- 5) Amano K, Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Kaya S, Fukushi K: Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 55(9): 2290-2292, 1987.
- 6) Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ: Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol* 8: 365-393, 1987.
- 7) Bernfield M, Sanderson RD: Syndecan, a developmentally regulated cell surface proteoglycan that binds extracellular matrix and growth factors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 12; 327(1239): 171-186, 1990.
- 8) Compton T, Nowlin DM, Cooper NR: Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193(2): 834-841, 1993.
- 9) Geuijen CAW, Willems RJ, Mooi FR: The major fimbrial subunit of *Bordetella pertussis* binds to sulfated sugars. *Infect Immun* 64(7): 2657-2665, 1996.
- 10) Lam K, Rao VS, Qasba PK: Molecular modeling studies on binding of bFGF to heparin and its receptor FGFR1. *J Biomol Struct Dyn* 15(6): 1009-1027, 1998.
- 11) Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V, Srivastava A: Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5(1): 71-77, 1999.
- 12) Rostand KS, Esko JD: Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* 65: 1-8, 1997.
- 13) Silverman DJ, Wissenman CL. Jr: Comparative ultrastructural study on the cell envelopes of *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, and *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 21: 1020-1023, 1978.
- 14) Tamura A: Invasion and intracellular growth of *Rickettsia tsutsugamushi*. *Microbiol Sci* 5(8): 228-232, 1988.
- 15) Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S: Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 45(3): 589-591, 1995.
- 16) Tamura A, Urakami H: Easy method for infectivity titration of *Rickettsia tsutsugamushi* by

- infected cell counting. *Jpn J Bacteriol* **36**: 783-785, 1981.
- 17) Urakami H, Tsuruhara T, Tamura A: Penetration of *Rickettsia tsutsugamushi* into cultured mouse fibroblasts (L-cells): an electron microscopic observation. *Infect Immun* **27**: 251-263, 1983.
- 18) Van Putten JPM, Paul SM: Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosal cells. *EMBO J* **14**: 101-111, 1995.
- 19) Walker JS, Cadigan FC, Vosdingh RA, Chye CT: The silvered leaf monkey of Malaysia, *Presbytis cristatus*: disease model for human scrub typhus. *J Infect Dis* **128**: 223-226, 1973.
- 20) Walker TS: Rickettsial interactions with human endothelial cells *in vitro*: Adherence and entry. *Infect Immun* **44**: 205-217, 1984.
- 21) Weiss E, Elisberg BL, Bozeman FM, Ormsbee RM, Phillip CB, Weissman CL Jr, Fiset P, Downs CM, Vinson WJ: *Rickettsiae* and rickettsial diseases, *Science*. **2**; 159(814): 553-556, 1968.
-