

어류 기생성 선충 *Anisakis simplex* sensu stricto와 *Anisakis pegreffii* 유충의 excretory-secretory products 및 somatic extracts의 가수분해효소 활성 비교

전찬혁·위 성·김정호[†]

강릉원주대학교 해양자원육성학과

A comparison of the hydrolase activities of excretory-secretory products and somatic extracts from fish parasitic nematodes, *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii* larvae

Chan-Hyeok Jeon, Seong Wi and Jeong-Ho Kim[†]

Department of Marine Bioscience, Gangneung-Wonju National University, Gangneung, 210-702, Korea

Hydrolase activities of excretory-secretory products (ESP) and somatic extracts (SE) from *Anisakis simplex* sensu stricto (s.s.) and *Anisakis pegreffii* larvae were investigated by using API ZYM kit. In esterase group, acid phosphatase showed high activity from both of *A. simplex* (s.s.) and *A. pegreffii*. Esterase (C4) showed activity only from SE and *A. simplex* (s.s.) showed higher activity than *A. pegreffii*. Alkaline phosphatase, acid phosphatase and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase showed higher activity in 3rd stage larvae than in 4th stage larvae of both species. In aminopeptidase group, only leucine arylamidase showed remarkable activity in SE of both anisakid species, and *A. simplex* (s.s.) SE showed higher activity than *A. pegreffii* SE. In glycosidase group, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, α -fucosidase showed higher activity in *A. simplex* (s.s.) than *A. pegreffii*, and 4th larvae showed higher activity than 3rd larvae. These differences in hydrolase activity of anisakid nematodes larvae are thought to be due to different metabolism such as growth, moulting, digestion and feeding.

Key words: *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii*, Hydrolase activities, API ZYM

해양 생물을 매개로 하여 인간에 감염되는 인수 공통질병 중 기생충을 원인으로 하는 질병으로는 조충류에 속하는 *Diphyllobothrium* sp., 흡충류에 속하는 *Clonorchis* sp.와 *Opisthorchis* sp., 선충류에 속하는 *Anisakis* spp.와 *Gnathostoma* sp. 감염에 의한 질병 등이 알려져 있다(Chai, 2010). 이 중 아니사키

스속(Genus *Anisakis*) 선충의 유충에 감염된 어류나 두족류를 생식하거나 조리가 덜된 상태에서 섭취하였을 때, 사람에게 아니사키스증이 일어날 수 있으며 구토, 설사, 복통 등의 증세를 수반하는 것으로 알려져 있다(Smith and Wootton, 1978). 이러한 감염증은 형태학적으로 *Anisakis* Type I (*Anisakis simplex* sensu stricto, *A. pegreffii*, *A. simplex* C, *A. typica*, *A. physeteris*)에 속하는 기생충에 의해 발생한다고 알려져 있다(Audicana and Kennedy, 2008).

[†]Corresponding author: Jeong-Ho Kim
Tel: +82-33-640-2851, Fax: +82-33-640-2340
E-mail: jhkim70@gwnu.ac.kr

Anisakis Type I에 속하는 각각의 유충은 형태적으로 매우 유사하여 각각을 동정하는데 어려움이 있어 이전의 대부분의 연구들은 *A. simplex* (s.s.)를 대표종으로 표기하거나 *A. simplex* (s.s.)를 대상으로 하여 연구가 진행되어 왔다. 하지만 single-strand conformation polymorphism(SSCP), multiplex PCR, PCR-RFLP, direct sequencing 등의 분자생물학적 방법이 도입되면서 유충을 보다 신속 정확하게 동정할 수 있게 되었고, 특히 PCR-RFLP 방법을 이용하여 몇 개의 제한효소만으로도 아니사키스속 선충 유충을 대부분 중 수준에서 동정할 수 있게 되었다(D'Amelio et al., 2000; Nadler et al., 2005; Umehara et al., 2008a; Zhu et al., 2007).

최근 일본에서는 분자생물학적 방법을 사용하여 아니사키스증 환자에서 분리한 유충을 동정한 결과 *A. simplex* (s.s.)인 것으로 확인되어, 아니사키스증을 유발하는 주요 원인종이 *A. simplex* (s.s.)인 것으로 보고하였다(Arizona et al., 2012). 그러나, 우리나라와 일본에서 아니사키스속 선충 유충을 동정한 몇몇 연구 결과에 따르면, 연근해산 어류 및 오징어 (*Todarodes pacificus*)에서 *A. simplex* (s.s.)뿐만 아니라 근연종인 *A. pegreffii*가 높은 비율로 발견되어 (Kim et al., 2012; Setyobudi et al., 2013, Umehara et al., 2008b), 두 근연종간의 지리적 분포와 실제 두 근연종의 감염에 의한 아니사키스증의 유행을과는 차이가 있다.

아니사키스증은 아니사키스 선충 유충이 사람의 소화관을 뚫고 들어갈 때 나타나는 질병이다 (Oishi and Hiraoki, 1973). Audicana and Kennedy (2008)는 *A. simplex* 3기 유충이 사람의 위장 점막으로 침투하기 위해서는 세포의 기질(extracellular matrix)을 분해할 수 있는 강력한 단백질분해효소들을 분비하여 조직을 붕괴시키는 메커니즘을 가질 것이라고 기술하였다. 또한, 기생충의 단백질분해효소들은 숙주조직을 붕괴시키는 병원성 뿐만 아니라 숙주면역반응에 대한 회피작용과도 관련된 것으로 보고되고 있다(Sakanari et al., 1989). 기생충의 가수분해효소는 esterases, peptidases, proteases 그리고 glycosidases 등으로 구분되는데, 주로 숙주조직을 뚫고 들어갈 때 분비되는 단백질분해효소와 숙주조직 내로 이동 및 생장할 때 사용되

는 대사작용과 관련된 효소들을 포함하고 있어 (Ondrovics et al., 2013), 아니사키스 선충 유충의 병원성 및 대사작용과 관련된 메커니즘을 이해하기 위해서는 단백질분해효소 뿐만 아니라 이를 포함하는 가수분해효소 활성화에 대한 연구 또한 필요하다.

아니사키스속 선충의 병원성 및 대사작용에 관련된 연구로는 Suzuki et al.(2010)이 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*를 대상으로 한천배지 위에서 물리적 침투력을 비교하였을 때, *A. pegreffii* 보다 *A. simplex* (s.s.)에서 더 높은 침투력을 확인할 수 있어 *A. pegreffii* 보다 *A. simplex* (s.s.)가 사람에게 아니사키스증을 유발시킬 확률이 더 높을 것이라 추정하였다. 아니사키스과 선충의 단백질분해효소에 관한 연구는 *A. simplex*와 *Hysterthylacium aduncum*을 대상으로 이루어졌는데 *A. simplex*의 경우 serine proteases가, *H. aduncum*의 경우 metallo proteases가 숙주조직을 분해하고 숙주로 침투하는 과정에 주로 관여한다고 보고하였다(Malagón et al., 2011; Morris et al., 1994). 한편, 단백질분해효소를 포함한 가수분해효소 활성화에 관한 연구는 *A. simplex*, *Contraeaecum rudolphii*에서 보고되었다. *A. simplex*는 섭이특성의 차이에 의해 3기 유충과 4기 유충에서 가수분해효소 활성화 차이가 나타난다고 보고되었으며(Dziedońska et al., 2003), *C. rudolphii* 성충의 분비배설산물(excretory-secretory products)은 숙주의 상피조직에 손상을 줄 수 있으며, 대부분의 선충에서 나타나는 몸체 추출물(somatic extracts)의 glucosidases 활성화는 탄수화물 유래 에너지원으로 작용한다고 알려져있다(Dziedońska et al., 2005).

따라서, 본 연구에서는 아니사키스증을 유발하는 주요 원인종인 *A. simplex* (s.s.)와 아니사키스증을 유발하는 증례는 극히 드물지만 다양한 해산어류와 오징어에서 *A. simplex* (s.s.)와 함께 흔하게 발견되는 *A. pegreffii*를 대상으로 각각의 유충을 배양하여 3기 유충과 4기 유충의 분비배설산물(excretory-secretory products)과 몸체 추출물(somatic extracts)을 얻은 후, 아니사키스속 선충의 대사작용과 관련된 가수분해효소의 활성을 측정, 두 종 사이에서 어떤 가수분해효소가 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*에서 활성화 차이를 나타내는지 비교하였다.

재료 및 방법

*Anisakis*속 선충의 수집

A. simplex (s.s.) 3기 유충은 2011년 10월 양양 남대천으로 회귀하는 연어(*Oncorhynchus keta*) (평균체장 : 69.3 cm, 평균체중 : 3.04 kg)의 근육 (belly flaps)으로부터, *A. pegreffii* 3기 유충은 2012년 1월 부산 자갈치 시장에서 구입한 고등어(*Scomber japonicus*) (평균체장 : 28.08 cm, 평균체중 : 264.16 g)의 복강에서 각각 분리하였다.

Excretory-secretory products의 회수

연어의 근육에서 분리된 아니사키스속 선충 100마리와 고등어의 복강에서 분리된 아니사키스속 선충 100마리를 3기 유충과 4기 유충의 ES products 회수를 위해 50마리씩 나누는 후, Iglesias et al. (2002)의 방법에 따라 배양 하였다. 즉, 외관상으로 손상을 입지 않은 유충을 PBS로 2~3회 세척한 후, 20% FBS(Lonza, Switzerland), antibiotic solution (Sigma, USA), 1% commercial pepsin(Sigma, USA) 이 포함된 RPMI-1640(Sigma, USA) 배지를 pH 4.0 으로 조절한 후 12 well plate에 각각의 유충을 옮긴 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 각각 1일과 6일 배양하였으며, 배지는 매일 교환하였다. 1일간 배양한 유충의 배양액은 3기 유충의 ES products으로, 6일간 배양한 유충의 배양액은 4기 유충의 ES products로 사용하였으며, 4기 유충으로의 탈피는 꼬리 부분의 mucron이 없어진 것을 현미경으로 확인하여 결정하였다. 각각의 분리된 배양액은 -80°C에 보관하였으며, 사용시 종류별로 나눠 배양액을 pooling 한 후, Bradford(1976)의 단백질 정량법에 따라 100 ug/mL로 적정하여 가수분해효소 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다.

Somatic extracts의 회수

3기 유충과 4기 유충의 배양에 사용된 배양액을 제거하고, PBS로 2~3회 washing 한 후, 남은 유충을 따로 회수하여 각각의 층체들을 절반으로 잘라 절반은 -80°C에 보관 하였다가 *A. simplex* (s.s.) somatic extracts과 *A. pegreffii* somatic extracts으로 나눠 층체를 pooling 하였다. 각각의 pooling된 시료

들은 on ice 상태에서 PBS 1mL을 첨가한 후, homogenizer(PT 1200, Switzerland)와 sonicator(VCX 130, USA; 50% amplitude, 1min)를 사용하여 마쇄한 후, 18,000 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 회수된 상등액은 Bradford(1976)의 단백질 정량법에 따라 100 ug/mL로 적정하여 가수분해효소 활성 측정을 위한 시료로 사용하였다

*Anisakis*속 선충의 동정

3기 유충과 4기 유충의 somatic extracts으로 사용하고 남은 200 마리의 아니사키스속 선충 유충은 Wasko et al.(2003)의 방법에 따라 핵산을 추출한 후, D'Amelio et al.(2000)이 rDNA의 ITS region (ITS1-5.8S-ITS2)을 타겟으로 제작한 A (5'-GTC GAA TTC GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA-3') 와 B (5'-GCC GGA TCC GAA TCC TGG TTA GTT TCT TTT CCT-3') primer를 사용하여 PCR을 실시하였으며, 증폭된 산물은 *Hha* I (NEB, UK)과 *Hinf* I (NEB, UK) 제한효소로 처리한 후, 2% agarose gel을 사용하여 결과물을 전기 영동하고 UV transilluminator 상에서 분절 패턴을 확인하였다.

API ZYM

연어에서 분리된 *A. simplex* (s.s.)와 고등어에서 분리된 *A. pegreffii*의 3기와 4기 유충의 ES products 및 somatic extracts를 19종의 가수분해효소 기질을 포함하고 있는 API ZYM kit (Biomérieux, France)를 사용하여 각각의 strips에 65 μl씩 분주한 후, 37°C에서 4시간 반응시켜 각각의 가수분해효소 활성을 반복구를 두어 비교하였다. 활성치는 판독표를 기준으로 0~40 nM 까지 순차적으로 기록하였으며, somatic extract의 경우 PBS를, ES products의 경우 배양에 사용된 RPMI-1640배지를 분주한 실험구를 대조군으로 사용하였다.

결 과

PCR-RFLP

증폭된 PCR product를 제한효소 *Hha* I 과 반응시켰을 때, 연어에서 분리한 아니사키스 선충 유충

과 고등어에서 분리된 아니사키스 선충 유충 모두 550, 430 bp의 분절을 확인할 수 있었다. *Hinf*I 제한 효소를 이용하여 각각의 패턴을 비교해 본 결과에서는 연어에서 분리한 아니사키스속 선충 유충의 경우 620, 250 bp의 분절을 확인할 수 있었으며, 고등어에서 분리한 아니사키스속 선충유충의 경우 370, 300, 250 bp의 분절을 확인할 수 있어, 각각 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*로 동정하였다(Fig. 1).

API ZYM

A. simplex (s.s.)와 *A. pegreffii*의 L3와 L4 ES products 및 somatic extracts의 가수분해효소 활성 데이터는 Table 1에 요약하였다.

3기 유충 ES products에서는 *A. simplex* (s.s.)에서 4종, *A. pegreffii*에서 5종의 가수분해효소에서 활성이 나타났다. N-acetyl- β -glucosaminidase와 α -mannosidase에서는 30 nmol과 20 nmol로 비교적 높은 활성을 나타냈지만 esterase lipase (C 8), naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에서는 두 종 모두에서 10 nmol 이하의 비교적 낮은 활성이 나타났다. acid phosphatase의 경우 *A. simplex* (s.s.)에서는 활성이 나타나지 않았지만, *A. pegreffii*에서는 5 nmol의 활성을 확인할 수 있었다.

3기 유충 somatic extracts의 경우 *A. simplex* (s.s.)

와 *A. pegreffii*에서 각각 7종의 가수분해효소에서 활성이 확인되었다. *A. simplex* (s.s.)는 esterase (C 4), leucine arylamidase 그리고 acid phosphatase에서 *A. pegreffii* 보다 10 nmol 높은 활성을 나타냈지만, *A. pegreffii*는 N-acetyl- β -glucosaminidase와 α -fucosidase에서 *A. simplex* (s.s.) 보다 높은 활성이 나타났고, 특히 N-acetyl- β -glucosaminidase의 경우 *A. simplex* (s.s.)에서 활성이 나타나지 않은데 반해, *A. pegreffii*에서는 20 nmol의 비교적 높은 가수분해효소 활성이 나타났다.

4기 유충 ES products에서는 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii* 모두 5종의 동일한 가수분해효소에서 활성이 확인되었다. 두 종 모두 acid phosphatase와 N-acetyl- β -glucosaminidase에서 30 nmol 이상의 높은 활성을 나타냈다. *A. simplex* (s.s.)는 alkaline phosphatase에서 *A. pegreffii* 보다 높은 활성을 나타냈지만, *A. pegreffii*는 acid phosphatase와 α -mannosidase에서 *A. simplex* (s.s.) 보다 높은 활성을 나타냈다.

4기 유충 somatic extracts에서는 *A. simplex* (s.s.)에서 7종, *A. pegreffii*에서 6종의 가수분해효소에서 활성이 확인되었다. *A. simplex* (s.s.)는 alkaline phosphatase, esterase (C 4) 그리고 leucine arylamidase에서 *A. pegreffii* 보다 높은 활성이 나타났고, *A. pe-*

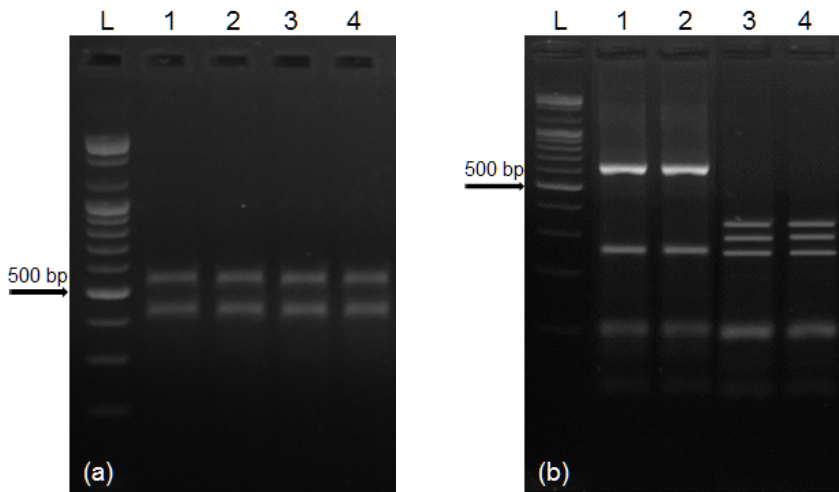


Fig. 1. PCR-RFLP profiles of *Anisakis* sp. obtained by digestion of PCR-amplified ITS region with *Hha*I (a) and *Hinf*I (b) restriction enzymes, respectively (L: 100 bp DNA ladder, 1-2: *A. simplex* (s.s.), 3-4: *A. pegreffii*).

Table 1. The hydrolase activities in excretory-secretory (ES) products and somatic extracts from third-stage larvae (L3) and fourth-stage larvae (L4) of *Anisakis simplex* (s.s.) and *A. pegreffii*.

ENZYME	Classification	con trol	<i>Anisakis simplex</i> (s.s.)				<i>Anisakis pegreffii</i>			
			L3		L4		L3		L4	
			ESP ^a	SE ^b	ESP	SE	ESP	SE	ESP	SE
Esterases										
Alkaline phosphatase	3.1.3.1	0	0	0	10	5	0	0	5	0
Esterase (C 4)	3.1.1.6	0	0	20	0	20	0	10	0	10
Esterase Lipase (C 8)	3.1.1.3	0	10	10	0	10	10	10	0	10
Lipase (C 14)	3.1.1.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	3.1.3.2	0	0	30	30	40	5	20	40	40
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	3.1.3.31	0	5	5	10	5	10	5	10	10
Peptidases and Proteases										
Leucine arylamidase	3.4.11.14	0	0	20	0	20	0	10	0	10
Valine arylamidase	3.4.11.14	0	0	5	0	5	0	0	0	0
Cystine arylamidase	3.4.11.14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Trypsin	3.4.4.4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -chymotrypsin	3.4.4.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glycosidases										
α -galactosidase	3.2.1.22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β -galactosidase	3.2.1.23	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β -glucuronidase	3.2.1.31	0	0	0	0	0	0	0	0	0
α -glucosidase	3.2.1.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
β -glucosidase	3.2.1.21	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-acetyl- β -glucosaminidase	3.2.1.50	0	30	0	30	0	30	20	30	5
α -mannosidase	3.2.1.24	0	20	0	10	0	20	0	20	0
α -fucosidase	3.2.1.51	0	0	5	0	0	0	10	0	0

^a: excretory-secretory products

^b: somatic extracts

*greffii*는 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase와 N-acetyl- β -glucosaminidase에서 *A. simplex* (s.s.) 보다 높은 활성을 나타냈다.

고 찰

우리나라의 회충, 편충, 구충 등의 장내 기생충 감염율은 집단검진과 투약으로 크게 감소하고 있으나, 어류를 생식하는 식습관이 보편화되면서 어류매개성 질환은 크게 증가하고 있는 추세이다. 어류 매개성 질환은 크게 선충류, 조충류, 흡충류 등에 의한 감염증을 들 수 있는데, 조충류와 흡충류의 경우 Praziquantel로 구제가 가능한 반면, 선충류의 경우 tiabendazole과 albendazole 등에서 약제활성이 있는 것으로 알려져 있으나 유효한 치료제는

아직 개발되어 있지 않다(Chai, 2010; D'Amelio et al., 2010). 하지만, 치료법 개발에 앞서 아니사키스 선충 유충이 사람에게 감염되는 메커니즘과 이들 유충의 대사작용과 관련된 화학적 특징에 대해 이해하는 것도 중요하다.

일반적으로 기생충의 단백질분해효소는 숙주의 혈액응고를 억제하고, 숙주면역 반응에서 기생충을 보호하며, 유충의 부화와 탈피능력을 증가시킬 뿐만 아니라 섭이작용에 중요한 역할을 하는 등 여러 기생충들의 생활사와 숙주관계에 있어 중요한 역할을 하며, 특히 유충의 숙주 침투력과도 관련되어 있다고 알려져 있다(Dziekońska et al., 2003; Malagón et al., 2011).

Suzuki et al.(2010)에 따르면, 아니사키스 선충에 감염된 환자에서 아니사키스 선충 유충을 분리·동

정한 결과 *A. pegreffii*가 우점하는 지역에서도 *A. simplex* (s.s.)에 의한 감염이 더 높은 것으로 확인되었고, 한천배지 위에 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*를 올려 놓고 배지 내로 침투하는 침투력을 확인해 보았을 때 *A. simplex* (s.s.)가 *A. pegreffii* 보다 더 높은 침투력을 가지는 것으로 확인되어, 근연종인 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*에서 물리적 침투력과 관련된 병원성에 차이가 있을 것이라 보고하였다. 한편, 단백질분해효소와 가수분해효소의 활성에 관한 연구는 아니사키스과 (Family Anisakidae) 선충 중 *A. simplex*, *Contracaecum rudolphii* 그리고 *Hysterothylacium aduncum*에서만 보고되어 있다 (Dziekońska et al., 2003 and 2005; Malagón et al., 2011). 따라서, 본 연구에서는 아니사키스증을 유발하는 주요 원인종인 *A. simplex* (s.s.)와 아니사키스증을 유발하는 증례는 적지만 다양한 해산어류와 오징어에서 *A. simplex* (s.s.)와 함께 흔하게 발견되는 *A. pegreffii*를 대상으로 사람에게 감염될 수 있는 유충단계인 3기 유충과 4기 유충의 분비배설산물(excretory-secretory products)과 몸체 추출물(somatic extracts)을 사용하여 아니사키스속 선충의 대사작용과 관련된 가수분해효소의 활성을 측정, 두 종 사이에서 어떤 가수분해효소가 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*에서 활성 차이를 나타내는 지 비교해보았다.

본 연구에서 비교한 총 19종의 가수분해효소 중 9종에서 각기 다른 가수분해효소 활성차이가 확인되었다. Esterase 그룹의 가수분해효소 활성은 acid phosphatase, esterase (C 4), alkaline phosphatase 그리고 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에서 나타났다. acid phosphatase의 경우 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*의 3기 유충의 ES products를 제외한 모든 그룹에서 활성이 높게 나타났으며, alkaline phosphatase와 esterase (C 4)의 경우 *A. pegreffii* 보다 *A. simplex* (s.s.)에서 다소 높은 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었지만, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 경우 *A. simplex* (s.s.)보다 *A. pegreffii*에서 같거나 좀 더 높은 활성을 확인할 수 있었다. Ruitenbergh and Loendersloot(1971)는 acid phosphatase는 *Anisakis* sp.의 체벽과 내장에서 높은 활성을 나타내며, phosphatase는 대사작용의 제어에 있어

중요하다고 보고하였다. 본 실험에 사용된 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*가 성충이 아닌 3기 유충과 4기 유충이므로 ES products와 somatic extracts에서 각각 높은 활성이 나타났다고 생각되며, 체벽과 내장에 높은 활성이 나타난다고 보고되었으므로 ES products 보다 somatic extracts에서 다소 높은 가수분해효소 활성을 나타내는 것으로 생각된다. 또한, 3기 유충보다 4기 유충에서 더 높은 가수분해효소 활성을 나타내는 것은 3기 유충에서 4기 유충으로 성장, 탈피하는 것 보다 4기 유충에서 성충으로 성장, 탈피하는데 더 많은 에너지원이 필요하기 때문이라고 생각된다. naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 활성은 *A. simplex* (s.s.), 돼지회충 (*Ascaris suum*), 그리고 sheep botfly (*Oestrus ovis*) 에서도 보고된 바 있으나 기능에 대해서는 보고된 바 없다(Dziekońska et al., 2003; Dziekońska, 2006; Tabouret et al., 2003). Liew et al.(2012)은 그람 음성균인 *Burkholderia pseudomallei*에서 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 높은 활성은 세균의 생장에 있어 필수적으로 필요한 housekeeping enzyme의 역할을 할 것으로 추측하였는데, *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*에서도 이와 비슷한 역할을 할 것으로 추정된다.

Aminopeptidase 그룹의 가수분해효소 활성은 leucine arylamidase와 valine arylamidase에서 *A. pegreffii*보다 *A. simplex* (s.s.)의 somatic extracts에서 활성이 높게 나타났으며, ES products에서는 활성이 나타나지 않았다. Aminopeptidase는 *A. suum*이 부화와 탈피를 하는 동안 호르몬과 효소 전구체의 촉매제로 매우 중요한 것으로 알려져 있으며 (Rhoads et al., 1997), 성숙한 *A. suum*의 체벽, 난소, vulva, 내장 그리고 체강액에서 발견되어 소화와 섭이작용과 관련된 것으로 생각된다(Lee, 1962; Rhodes et al., 1966). 본 연구에서 *A. simplex* (s.s.)에서 *A. pegreffii* 보다 높은 활성이 나타난 이유는 *A. simplex* (s.s.)가 *A. pegreffii* 보다 유충의 체강과 ventriculus의 길이가 길기 때문에(Quiazon et al., 2008), 그에 따른 소화와 섭이작용이 더 많이 이루어지기 때문이라고 추정된다.

Glycosidase 그룹의 가수분해효소 활성은 N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase 그리고 α -fu-

cosidase에서 나타났다. N-acetyl- β -glucosaminidase의 경우 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*의 ES products에서 30 nmol의 비교적 높은 가수분해효소 활성이 나타났으며, somatic extracts의 경우 *A. simplex* (s.s.)에서는 가수분해효소 활성이 나타나지 않았지만, *A. pegreffii*의 3기 유충 (20 nmol)과 4기 유충 (5 nmol)에서 가수분해효소 활성이 나타났다. α -mannosidase와 α -fucosidase는 *A. simplex* (s.s.) 보다 *A. pegreffii*에서 같거나 좀 더 높은 활성이 확인되었는데, α -mannosidase는 ES products에서, α -fucosidase는 somatic extracts에서만 각각의 활성이 나타났다. glycosidase 그룹의 가수분해효소 중 가장 높은 활성을 나타낸 N-acetyl- β -glucosaminidase는 hyaluronic acid 소화물의 가수분해에서 중요한 역할을 하며, 결합조직의 주요 성분 중 하나로서 기생충이 숙주로 침투하는 과정을 돕는 것으로 알려져 있다 (Hotez et al., 1994). Nisbet and Billingsley(2000)는 닭진드기 (*Dermanyssus gallinae*)와 flour mite (*Acarus siro*)의 추출물에서 30 nmol 이상의 높은 가수분해효소 활성을 확인하였고, 다른 두 종의 진드기(*Psoroptes ovis*, *Tetranychus urticae*)에서도 5 nmol 이상의 가수분해효소 활성을 확인하였는데, N-acetyl- β -glucosaminidase는 모든 무척추동물의 탈피과정에 있어 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 또한 *A. suum*이 돼지에 감염되었을 때 근육, Perienteric fluid, 내장기관, 내장벽 추출물에서 동일하게 높은 활성이 보고되었다(Dziekońska, 2006). N-acetyl- β -glucosaminidase는 대부분 ES products를 통하여 소화기관에서 분비되며 유충의 탈피와 관련되어 있을 것이라 판단되지만, *A. pegreffii*의 3기 유충의 somatic extracts에서 나타난 가수분해효소 활성에 대해서는 좀 더 추가적인 연구가 필요할 것이라 판단된다.

본 연구에서는 API ZYM kit를 사용하여 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*의 가수분해효소의 활성을 비교해 본 결과 6종의 Esterase 그룹의 가수분해효소 중 5종의 가수분해효소에서 활성이 나타났는데, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase를 제외한 4가지의 가수분해효소에서 *A. pegreffii* 보다 *A. simplex* (s.s.)에서 유사하거나 더 높은 가수분해효소 활성이 확인되었고, Aminopeptidase 그룹의 가수분해효

소에서는 활성이 나타나지 않은 cystine arylamidase를 제외한 2 종류의 가수분해효소에서 *A. pegreffii* 보다 *A. simplex* (s.s.)에서 높은 가수분해효소 활성이 확인되었다. 그리고 Glycosidase 그룹의 가수분해효소의 경우 대부분 활성이 확인되지 않았지만, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase 그리고 α -fucosidase에서 *A. simplex* (s.s.) 보다 *A. pegreffii*에서 더 높은 활성이 확인되었다.

본 연구를 수행한 결과, *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii*간의 성장, 탈피, 섭이 및 소화작용과 관련된 가수분해효소 활성 차이가 확인이 되었으나, 실제 사람의 아니사키스증의 유병율과 관련된 두 종간의 가수분해효소 활성 차이의 특별한 경향은 찾아볼 수 없었다. 차후 다양한 단백질분해효소의 활성을 비교함으로써, 두 종간의 병원성 및 대사작용과 관련된 매커니즘을 이해하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

요 약

*Anisakis simplex sensu stricto*와 *A. pegreffii*의 3기 유충과 4기 유충에서 얻은 excretory-secretory (ES) products 및 somatic extracts의 가수분해효소 활성을 API ZYM kit를 이용하여 비교하였다.

Esterase 그룹의 가수분해효소 중 acid phosphatase는 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii* 모두에서 높은 활성을 나타냈으며, esterase (C 4)의 경우 somatic extracts에서만 가수분해효소 활성이 나타났는데 *A. simplex* (s.s.)가 *A. pegreffii*와 비교하여 3기와 4기 유충 모두에서 2배 가량 높은 활성을 나타냈다. alkaline phosphatase, acid phosphatase 그리고 naphthol-AS-BI-phosphohydrolase의 경우 *A. simplex* (s.s.)와 *A. pegreffii* 모두 3기 유충보다 4기 유충에서 더 높은 가수분해효소 활성이 확인되었다. Aminopeptidase 그룹의 가수분해효소 활성은 leucine arylamidase에서 관찰되었는데, somatic extracts의 경우 *A. pegreffii* 보다 *A. simplex* (s.s.)에서 가수분해효소 활성이 두 배 가량 높게 확인되었으며, 대부분의 다른 효소들에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. Glycosidase 그룹의 가수분해효소 활성은 N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase 그리고 α -

fucosidase에서 확인되었는데, *A. simplex* (s.s.) 보다 *A. pegreffii*에서 높은 가수분해효소 활성을 확인할 수 있었으며, 대부분 4기 유충보다 3기 유충에서 더 높은 가수분해효소 활성이 확인되었다. 이러한 아 니사키스속 선충의 종과 유충단계에 따른 가수분해 효소의 활성 차이는 선충의 성장, 탈피, 소화, 섭이 등의 대사과정의 차이에 기인한 것으로 생각된다.

감사의 글

"이 논문은 2013년 해양수산부의 재원으로 한국 해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었습니다. (장기해양생태계 연구: 해양환경변화와 생태계 반응, 동해시계열관측 및 생태환경진단(EAST-1))"

References

- Arizono, N., Yamada, M., Tegoshi, T and Yoshikawa, M.: *Anisakis simplex* sensu stricto and *Anisakis pegreffii*: Biological characteristics and pathogenetic potential in Human anisakiasis. *Foodborne. Pathog. Dis.* 9: 517-521, 2012.
- Audicana, M.T. and Kennedy, M.W.: *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21: 360-379, 2008.
- Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254, 1976.
- Chai, J.Y.: Fish-borne parasitic diseases. *Hanyang. Med. Rev.*, 30: 223-231, 2010 (In Korean with english summary)
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, S.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanco, M. and Paggi, L.: Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda; Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-base restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.*, 30: 223-226, 2000.
- D'Amelio, S., Busi, M., Ingrassio, S., Paggi, L and Giuffra, E.: *Anisakis*. In: Liu D.Y. (eds) *Molecular detection of foodborne pathogens*. CRC press, pp. 757-768, 2010.
- Dziekońska-rynko J., Rokicki, J. and Jabłonowski, J.: Activity of selected hydrolases in excretion-secretion products and homogenates from L₃ and L₄ larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) parasitising herring. *Acta. Ichthyol. Piscat.*, 33: 125-135, 2003.
- Dziekońska-rynko J. and Rokicki, J.: Activity of selected hydrolases in excretion-secretion products and extracts of adult *Contracaecum rudolphii*. *Wiad. Parasitol.* 51: 227-231, 2005.
- Dziekońska-rynko J.: The activity of selected hydrolases of adult female *Ascaris suum*, Goeze 1782. *Helminthologia.*, 43: 59-63, 2006.
- Hotez P.J., Cappello M., Hawdon J., Beckers C., Sakanari J.: Hyaluronidases of the gastrointestinal invasive nematodes *Ancylostoma caninum* and *Anisakis simplex*: possible functions in the pathogenesis of human zoonoses. *J. Infect. Dis.* 170: 918-926, 1994.
- Iglesias, L., Valero, A., Benitez, R. and Adroher F.J.: *In vitro* cultivation of *Anisakis simplex*: pepsin increases survival and moulting from fourth larval to adult stage. *Parasitology.*, 123: 285-291, 2001.
- Kim, W.S., Jeon, C.H., Kim, J.H. and Oh, M.J.: Current status of anisakid nematode larvae infection in marine fishes caught from the coastal area of Korea between 2010 and 2012. *J. Fish. Pathol.*, 25: 189-197, 2012. (In Korean with english summary)
- Lee D.L.: The histochemical localization of leucine aminopeptidase in *Ascaris lumbricoides*. *Parasitology.* 52: 533-538, 1962.
- Liew, S.M., Tay, S.T., Wongratanacheewin, S. and Puthuchery, S.D.: Enzymatic profiling of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *Trop. Biomed.*, 29: 160-168, 2012.
- Malagón, D., Benitez, R., Adroher F.J. and Díaz-López, M.: Proteolytic activity in *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae), a fish gastrointestinal parasite of worldwide distribution. *Vet. Parasitol.*, 183: 95-102, 2011.
- Morris, S.R. and Sakanari, J.A.: Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J. Biol. Chem.* 269: 27650-27656, 1994.
- Nadler, S.A., D'Amelio, S., Dailey, M.D., Paggi, L., Siu, S. and Sakanari, J.A.: Molecular phylogenetics and diagnosis of *Anisakis*, *Pseudoterranova*, and *Contracaecum* from northern Pacific marine mammals. *J. Parasitol.*, 91: 1413-1429, 2005.

- Nisbet, A. J. and Billingsley P.F.: A comparative survey of the hydrolytic enzymes of ectoparasitic and free-living mites. *Int. J. Parasitol.* 30: 19-27, 2000.
- Oishi, K. and Hiraoki, M.: Food hygienic studies on *Anisakis* larvae-IV On the relation between the mortality and the penetration capacity of the larvae into an agar layer. *Nippon Suisan Gakkaishi.* 39: 1345-1348, 1973.
- Ondrovics, M., Silbermayr, K., Mitreva, M., Young, N.D., Razzazi-Fazeli, E., Gasser, R.B. and Joachim, A.: Proteomic analysis of *Oesophagostomum dentatum* (Nematoda) during larval transition, and the effects of hydrolase inhibitors on development. *Plos. One.* 8: e63955, 2013.
- Quiazon, K.M.A., Yoshinaga, T., Ogawa, K. and Yukami, R.: Morphological differences between larvae and *in vitro*-cultured adults of *Anisakis simplex* (sensu stricto) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitol. Int.* 57: 483-489, 2008.
- Rhoads M.L., Fetterer R.H. and Urban J.F.: Secretion of an aminopeptidase during transition of third- to fourth-stage larvae of *Ascaris suum*. *J. Parasitol.* 83: 780-784, 1997.
- Rhodes M.B., Marsh C.L. and Ferguson D.L.: Studies in helminth enzymology. V. An aminopeptidase of *Ascaris suum* which hydrolyzes L-leucyl- β -naphthylamide. *Exp. Parasitol.* 19: 42-51, 1966.
- Ruitenbergh E.J. and Loendersloot H.J.: Histochemical properties of the excretory organ of *Anisakis* sp. larvae. *J. Parasitol.* 56: 1149-1150, 1971.
- Sakanari, J.A., Staunton, C.E., Eakin, A.E. and Craik, C.S.: Serine proteases from nematode and protozoan parasites: Isolation of sequences homologs using generic molecular probes. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 86: 4863-4867, 1989.
- Setyobudi, E., Jeon, C.H., Choi, K.H., Lee, S.I. and Kim, J.H.: Molecular identification of anisakid nematodes third stage larvae isolated from common squid (*Todarodes pacificus*) in Korea. *Ocean. Sci. J.* 48: 197-205, 2013.
- Smith, J.W. and Wootten, R.: *Anisakis* and Anisakiasis. *Adv. parasitol.* 16: 93-163, 1978.
- Suzuki, J., Murata, R., Hosaka, M. and Araki, J.: Risk factors for human *Anisakis* infection and association between the geographic origins of *Scomber japonicus* and anisakid nematodes. *Int. J. Food. Microbiol.*, 137: 88-93, 2010.
- Tabouret, G., Bret-Bennis, L, Dorchie, Ph and Jacquiet, Ph.: Serine protease activity in excretory-secretory products of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) larvae. *Vet. Parasitol.*, 114: 305-314, 2003.
- Umehara, A., Kawakami Y., Araki, J. and Uchida, A.: Multiplex PCR for identification of *Anisakis simplex* sensu stricto, *Anisakis pegreffii* and the other anisakid nematodes. *Parasitol. Int.*, 57: 49-53, 2008a.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J., Uchida, A. and Sugiyama, H.: Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast. Asian. J. Trop. Med. Public. Health.* 36: 26-31, 2008b.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C and Foresti, F.: Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas.*, 138: 161-165, 2003.
- Zhu, X.Q., Podolska, M., Liu, J.S., Yu, H.Q., Chen, H.H., Lin, Z.X., Luo, C.B., Song, H.Q. and Lin, R. Q.: Identification of anisakid nematodes with zoonotic potential from Europe and China by single-strand conformation polymorphism analysis of nuclear ribosomal DNA. *Parasitol. Res.*, 101: 1703-1707, 2007.

Manuscript Received : November 08, 2013

Revised : December 13, 2013

Accepted : February 14, 2014