

# 결핵균 특이 TB-14 재조합 단백질의 분리 및 세포성 면역반응에 미치는 영향

<sup>1</sup>순천향대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>2</sup>생리학교실, <sup>3</sup>충주성모병원 병리과

송호연<sup>1</sup>, 김영희<sup>1</sup>, 김창환<sup>1</sup>, 민영기<sup>2</sup>, 김대중<sup>3</sup>, 고광균<sup>1</sup>

## The Purification and Immunogenicity of TB-14 Recombinant Protein of *Mycobacterium tuberculosis*

Ho-Yeon Song, M.D.<sup>1</sup>, Young-Hee Kim,<sup>1</sup> Chang-Hwan Kim,<sup>1</sup> Young-Ki Min, M.D.<sup>2</sup>, Dae-Joong Kim, M.D.<sup>3</sup>, Kwang-Kjune Ko, M.D.<sup>1</sup>

Department of <sup>1</sup>Microbiology and <sup>2</sup>Physiology, College of Medicine, Soonchunhyang University, Cheonan, Korea,

<sup>3</sup>Department of Pathology, Cheongju St. Mary Hospital, Cheongju City, Chungbuk, Korea

**Background:** Culture filtrate proteins secreted by mycobacteria are thought to play an important role in inducing protective immunity and to develop new methods for diagnosing tuberculosis.

**Methods:** A culture filtrate protein of *M. avium* that was strongly reactive with goat antiserum against *M. intracellulare* was constructed. Its homologous protein (TB-14) in *M. tuberculosis* was cloned, expressed and purified. The inductions of IFN- $\gamma$  stimulated with 10  $\mu$ g of TB-14 recombinant protein and 10  $\mu$ g PPD were estimated by using whole bloods from seven PPD (-) subjects, seven PPD (+) healthy volunteers and nine tuberculosis patients.

**Results:** *M. avium* culture filtrate protein was confirmed as a hypothetical protein that was termed contig 116. A novel 14-kDa recombinant protein (TB-14) of *M. tuberculosis* was composed of 148 amino acids, including 30 amino acids of the signal peptide, and it showed 78% homology with *M. avium*. In the PPD (+) healthy volunteers, recombinant TB-14 protein strongly induced the secretion of IFN- $\gamma$  in whole blood cultures.

**Conclusion:** These results suggest that TB-14 recombinant protein might play an important role in inducing cell-mediated immunity against tuberculosis. Furthermore, TB-14 protein antigen and its antiserum will be available for the development of new diagnostic tools for tuberculosis. (*Tuberc Respir Dis* 2006; 61: 239-247)

**Key words:** Tuberculosis, TB-14 recombinant protein, IFN- $\gamma$

## 서 론

결핵은 환자의 기침을 통해 나오는 객담 비말에 들어 있는 결핵균을 다른 사람이 흡입함으로써 감염된다. Date of Birth : 10,000 B.C, Date of Death : ?, 세계보건기구(WHO)의 세계결핵프로그램 보고서<sup>1</sup>에 나오는 표현으로 결핵이 인류 역사와 함께 했을 정도로 오랫동안 인간의 생명을 위협하여 왔지만 여전히 결핵 박멸에 대한 미래의 전망은 밝지 않음을 상징적으로 나타내고 있다. 현재 전 세계 인구의 1/3 정도가 결핵균에 감염되어 있고 매년 약 200만 명이 결핵으로

사망할 정도로 단일 질환으로는 매우 높은 사망률을 나타내고 있으며 특히 다제내성 결핵균에 의한 난치성 폐결핵 환자가 증가하고 있어 세계보건기구에서는 1993년에 세계 결핵비상(Global Tuberculosis Emergency)을 선포<sup>2,3</sup> 하기에 이르렀고 최근엔 결핵 시한 폭탄 (Tuberculosis Timebomb)이란 용어가 나올 정도로 여전히 인류 건강에 심각한 위협이 되고 있다.

세포내 기생 세균인 결핵균 감염에 따른 인체의 면역반응은 체액성 면역반응 보다는 세포-매개성 면역 (cell-mediated immunity) 반응이 중요한 역할을 하는데 특히 CD4 T<sub>H</sub>1 세포에 의해 분비된 interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )에 의해 활성화된 대식세포가 결핵균에 대한 방어면역에 가장 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 T-세포 매개성 면역반응을 유도할 수 있는 결핵균 유래 단백질 항원에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있고 특히 결핵균 배양 여과액으로부터 분리된 Antigen 84B 및 CFP29의 경우 T-세포의 증식 및 IFN- $\gamma$  생산을 강력히 유도하는 것으로 보고 되

본 연구는 2002년도 순천향대학교 학술연구비 (과제번호 20020141)의 지원으로 이루어졌음.

Address for correspondence: Ho Yeon Song, MD, Ph.D.

Department of Microbiology, College of Medicine,

Soonchunhyang University, Cheonan, 330-090, Korea

Phone: 041-570-2412, Fax: 041-577-2415

E-mail: songmic@sch.ac.kr

Received: Jul. 19. 2006

Accepted: Aug. 28. 2006

고 있다<sup>4-7</sup>. 따라서 이들 결핵균 배양 여과액으로부터 분리된 단백질들은 결핵에 대한 방어 면역 및 진단법 개발의 후보물질로 중요하다.

본 연구에서는 *Mycobacterium avium* LR114F 균주의 배양 여과액 내에서 항혈청을 이용하여 새로운 *M. avium* 특이 단백질을 찾아내어 아미노산 서열을 확인하였고 *M. avium* 특이 단백질과 상동성을 보이는 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 유전자를 클로닝하여 약 14-kDa의 결핵균 재조합 단백질(TB-14)을 분리 정제하였다. 따라서 분리된 결핵균 재조합 단백질의 특성을 밝히고 결핵에 대한 인체의 방어기전에서 이 단백질이 어떤 역할을 하는지를 규명하고자 혈청요인과 더불어 세포 간 상호작용이 가능하여 인체의 면역상태를 잘 반영할 수 있는 전혈 배양(whole blood culture)<sup>8-11</sup>를 통해 TB-14 단백질에 의한 IFN- $\gamma$  분비 유도능을 PPD와 비교 관찰하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 결핵 균주 및 배양

본 실험에 사용된 균주는 *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), *Mycobacterium* H37Ra 및 *Mycobacterium avium* LR114F를 7H9 액체배지(7H9 broth, 0.05% Tween 80, 2% Bacto Middlebrook ADC enrichment)에서 37°C, 2-3 주간 진탕 배양하여 사용하였다.

### 2. *Mycobacterium avium* 배양 여과액내 새로운 특이 단백질 규명

*M. avium* LR114F 균주의 배양 여과액 내 특이 단백질 규명을 위해 사용된 항혈청은 Wallis 교수(UMDNJ, USA)로부터 제공 받았다. 즉 염소에 살아있는 *Mycobacterium intracellulare* 균을 면역 접종한 다음 *M. intracellulare* 배양 여과액으로 추가 접종하여 만들어진 항혈청(goat antiserum)으로 *M. avium* 배양 여과액에 분리된 *M. avium* 특이 단백질을

규명하고자 항혈청을 *M. tuberculosis* 배양 여과액으로 흡착(pre-absorption) 시켜 mycobacteria의 공통 단백질과 반응하는 항체들을 제거한 뒤 *M. avium* 배양 여과액과 western blot을 실시하였다. 확인된 *M. avium* 특이 단백질이 어떤 단백질인지를 확인하기 위하여 2-D gel electrophoresis 와 simultaneous 2 color western blot/protein 염색법을 이용하여 해당 단백질을 분리한 뒤 N-terminal 아미노산 서열을 확인하였고 상동성 검사 (TIGR Database)를 통해 *M. avium* 특이 단백질과 상동성을 보이는 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*) 유전자를 확인하고 본 연구의 표적 단백질로 정하여 클로닝을 시도 하였다.

### 3. 결핵균의 chromosomal DNA 추출<sup>12</sup>

액체 배양된 결핵균을 80°C에서 20분간 열처리 한 다음 3,000 rpm에서 20분간 원심 침전하면서 TE(Tris-HCl pH 8.0, 10 mM ; EDTA 1 mM) buffer로 2회 세척하였다. 1% Triton-X를 포함하는 포화 cesium chloride 용액을 동량 넣어 10분간 정치 한 뒤 osmotic shock을 주기 위해 30배의 멸균된 증류수를 넣어 원심분리 하였다. 0.5 ml의 lysozyme(1 mg/ml)으로 1시간 처리 한 뒤 SDS(final conc. 0.5%) 와 proteinase K(100  $\mu$ g/ml)로 55°C 수조에서 4시간 동안 반응시켰다. 1 ml 의 4M GIT Cocktail(0.5 g/ml guanidium thiocyanate 0.053 M Tris-HCl, pH 7.5 / 12 mM EDTA, pH 8.0 / 0.2 M NaCl / 2.12% N-lauroyl sarcosine / 0.15 M 2-mercaptoethanol) 과 1% CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide)를 넣어 65°C에서 30분간 반응 시킨 뒤 phenol : chloroform : isoamylalcohol 과 RNase A (50  $\mu$ g/ml) 처리에 의해 DNA를 추출하였다.

### 4. 결핵균 TB-14 유전자의 클로닝

*M. avium* 특이 단백질과 상동성을 보이는 *M. tuberculosis* 유전자를 클로닝하기 위한 PCR primer (5'-CGCGGATCCGACTCCACGGAAGACTTT-3',

5'-CCCAAGCTTACTTAGGCCAGTTCCA-3')는 pQE-32 vector(QAIGEN)에 클로닝하기 위해 제한효소 BamH I (N-terminal) 과 Hind III (C-terminal) 인식 부위를 넣어 합성하였고 PCR 조건은 95°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분으로 30 cycle을 시행하였다. PCR로 얻은 유전자(TB-14이라 명명)는 signal peptide를 제외한 mature protein(118 아미노산 잔기)을 발현하는 부위로 PCR로 얻은 다량의 TB-14 유전자와 발현 벡터인 pQE-32 vector를 제한효소인 BamH I 과 Hind III로 처리 한 뒤 ligation 시켜 *E. coli* M15에 transformation 시켰다. 형질전환된 *E. coli* M15를 LB-kanamycin(25 µg/ml)-ampicillin(100 µg/ml) 한천배지에 배양하여 증식된 단일 집락들을 LB-kanamycin-ampicillin 액체배지에 배양하여 증균 시킨 뒤 plasmid를 분리하여 제한효소인 BamH I 과 Hind III로 처리한 뒤 전기영동을 통해 TB-14 유전자가 삽입된 단일 집락들을 확인하였다.

## 5. TB-14 재조합 단백질의 발현 및 순수 분리

Colony blotting 법(QIAGEN)을 이용하여 6xHis-tagged TB-14 재조합 단백질을 발현하는 단일 집락들을 확인하였다. 즉 LB-kanamycin(25 µg/ml)-ampicillin(100 µg/ml) 한천배지에 배양된 *E. coli* M15 집락에 nitrocellulose membrane을 올려놓아 찍어 낸 뒤 1 mM ITPG가 들어 있는 새로운 LB-kanamycin-ampicillin 한천배지에 nitrocellulose membrane을 얹어 37°C에서 4시간 동안 재조합 단백질의 발현을 유도하였다. 제거된 nitrocellulose membrane은 RGS-His 항체(QIAGEN)와 alkaline phosphate(AP) conjugated rabbit anti-mouse IgG 처리에 이은 AP 발색 반응에 의해 TB-14 재조합 단백질을 발현하는 단일 집락을 확인하였다. 확인된 단일 집락은 LB-kanamycin-ampicillin 액체배지에서 ITPG 유도 하에 다량 배양하여 원심 침전시킨 뒤 8M urea(pH 8)를 처리하여 세포를 용해시켰다. 재조합 단백질의 N-말단에 부착된 6xHis과 Ni-NTA(nickel-nitrilotriacetic acid) 결합의 원리를 이용한 Ni-NTA chromatography (QIAGEN)를 이용하여 재조합 단백질을 분리한 뒤 SDS PAGE

와 western blot에 의해 확인하였다. 분리된 재조합 단백질 TB-14는 소량이라도 대장균 단백질의 오염 가능성을 배제하기 위해 Prep Cell 장치 (Bio-Rad)를 이용한 continuous-elution electrophoresis법을 이용하여 이들 단백질을 다시 한번 순수 분리 하였으며 대장균의 내독소(LPS)를 제거하기 위해 Ditoxi-gel affinity column(Pierce)에 통과 시킨 뒤 Limulus Amebocyte Lysate assay(BioWhittaker)를 시행해서 내독소가 10 unit/mg 미만임을 확인한 뒤 항혈청 제작을 위한 항원과 세포성 면역 반응 연구에 사용하였다.

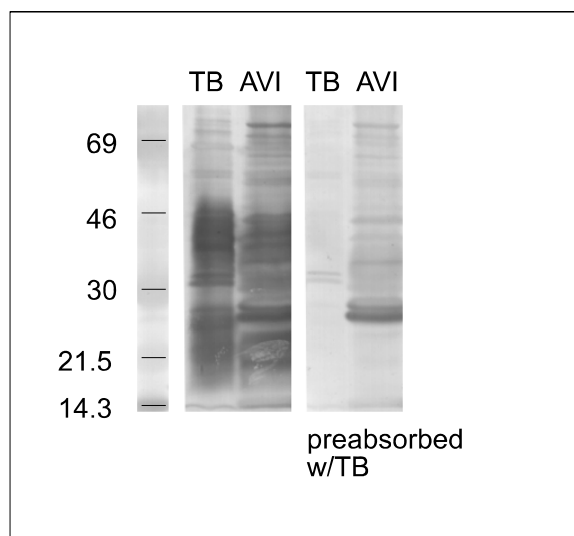
## 6. 재조합 단백질 TB-14의 IFN-γ 분비 유도

CD4 T<sub>H</sub> 세포에 의해 분비되어 대식세포를 활성화시키는 IFN-γ는 결핵에 대한 인체의 방어기전에서 가장 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 TB-14 단백질이 혈액 배양 세포 내에서 IFN-γ 분비를 얼마나 유도하는지를 결핵 연구의 대조 단백질로 많이 이용되는 PPD와 비교하였다. 결핵 환자(9명), PPD 양성 정상인(7명) 및 PPD 음성 정상인(7명)들로부터 얻은 전혈(whole blood)를 RPMI로 10배 희석한 뒤 1 ml씩 24-well plate에 분주하였다. 희석된 혈액에 10 µg의 PPD와 TB-14 단백질을 각각 넣어준 뒤 2일 후에 상층액으로부터 IFN-γ를 ELISA로 측정하여 대조군과 비교 관찰하였다.

## 결 과

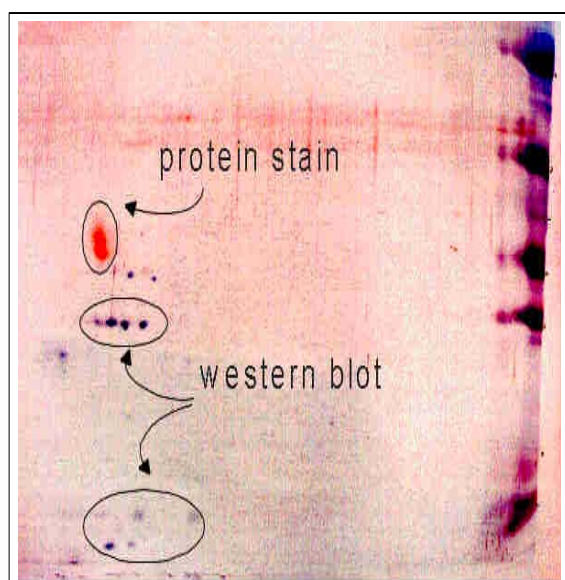
### 1. 항혈청과 반응하는 *M. avium* 배양 여과액 내의 단백질 분석

항혈청(goat antiserum)은 염소에 살아있는 *M. intracellulare* 균으로 접종한 뒤 *M. intracellulare* 배양 여과액으로 추가 접종하여 만들어진 항혈청으로 western blot에 의하면 *M. tuberculosis* H37Rv 와 *M. avium* LR114F의 배양 여과액에 들어 있는 많은 결핵 단백질과 반응함을 관찰할 수 있었다(Figure 1, left two lane). 그러나 항혈청을 *M. tuberculosis* 배양 여과액으로 미리 흡착(pre-absorption) 시켜 mycobac-



**Figure 1.** Western blot of culture filtrates of *M. tuberculosis*(TB) and *M. avium*(AVI) using *M. intracellulare* antiserum. Left two lanes: antiserum before pre-absorption with *M. tuberculosis* culture filtrates, Right two lanes: antiserum after pre-absorption.

teria의 공통 단백질과 반응하는 항체들을 제거한 뒤 시행한 western blot에서는 *M. avium* 배양 여과액에서 항혈청과 강하게 반응하는 한 단백질이 확인되었다(Figure 1, right lane).



**Figure 2.** Simultaneous two color protein stain (red) and western blot (blue) following preparative IEF and 2-D gel electrophoresis of *M. avium* filtrate.

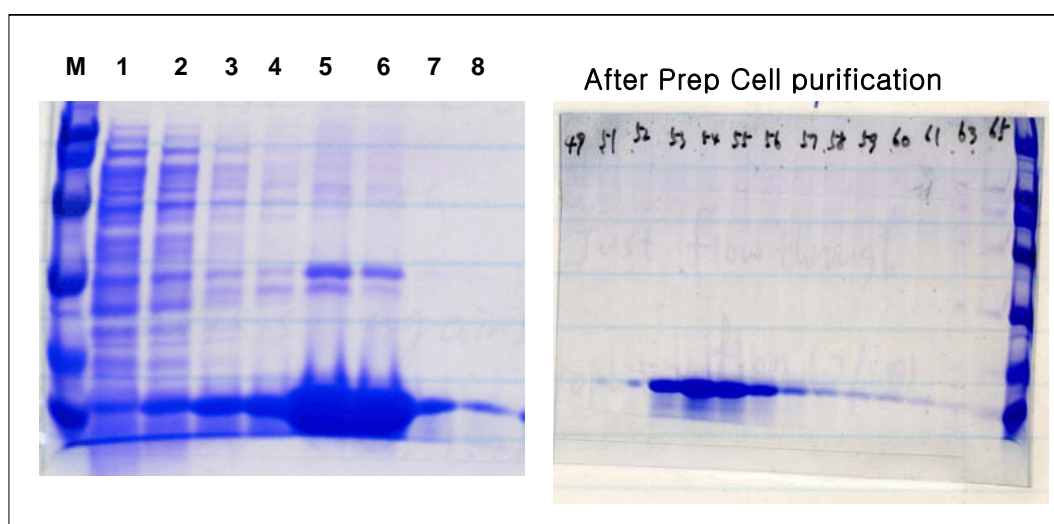
이 단백질의 N-terminal 아미노산 서열을 확인하기 위해 preparative isoelectric focusing 과 2-D gel electrophoresis를 실시 한 뒤 simultaneous 2 color western blot/protein 염색법을 시행한 결과 항혈청과 강한 반응을 나타내는 14 kDa와 30 kDa의 두 단백질을 확인하였고(Figure 2) 이들의 N-terminal 아미노산 서열을 분석한 결과 30 kDa 단백질은 기존에 알려진 alpha antigen (85 B)임이 확인되었고 14 kDa 단백질은 상동성 검사 결과 DSTEDFPI PRRMINT로 시작되는 아직 알려지지 않은 새로운 단백질 (hypothetical protein contig 116)임이 밝혀졌다. 또한 이 단백질은 *M. tuberculosis* CDC1551 (designated MT0471) 및 *M. tuberculosis* H37Rv (designated MT0516)등의 한 유전자와 높은 상동성을 나타내고 있어 동일한 기능을 하는 단백질이 *M. tuberculosis*에도 존재함을 추측할 수 있었다(Figure 3). 이들 단백질의 아미노산 서열이 갖는 특성을 분석해 본 결과 *M. avium*은 150개, *M. tuberculosis*는 148개의 아미노산으로 구성되어 있고 두 단백질 간에 78%의 상동성을 보였는데 두 단백질 모두 30개의 아미노산으로 이루어진 signal peptides를 가지고 있었으며 SAAA - DSTED 사이에서 분리(cleavage)가 일어남을 확인하였다.

## 2. TB-14 재조합 단백질의 클로닝 및 발현

처음에는 TB-14 단백질을 발현시키는 유전자의 전체 염기서열을 클로닝하여 재조합 단백질을 분리하는 대장균 집락을 찾으려고 여러 번 시도하였으나 실패하였다. 이는 이들 단백질이 hydrophobic inclusion을 갖고 있어 signal sequence와 mature protein 사이에서 분리가 일어나기 때문으로 추측되어 signal sequence를 제외한 mature protein 부분만을 클로닝하였다. 즉 forward 와 reverse primer에 BamHI 과 Hind III 부위를 넣어 설계한 뒤 유전자를 PCR로 증폭하여 단백질 발현 벡터인 pQE-32 (Qiagen)의 BamHI 와 Hind III 부위 사이에 삽입한 뒤 competent M15 *E. coli*로 transformation 시켰다. pQE-32 vector는 N-terminal에 6개의 histidine이 삽입되어 있어 분리되는 모든 재조합 단백질의 N-terminal에는

AV116	SLLMGACSETDYEPCLRPASRRPKSATVTTMSRLSSILRAGAAFLVLGIAAATFPQSAAA
TB516	SLLMGACSETDYEPCLRPASRRPKSATVTTMSRLSSILRAGAAFLVLGIAAATFPQSAAA
TB471	MGACSETDYEPCLRPASRRPKSATVTTMSRLSSILRAGAAFLVLGIAAATFPQSAAA
AV116	DSTEDFPIPRRMINTTCDAEQILAATRDTSVPVYQRYMIDFNNHPNVQQATIDKAHWFYA
TB516	DSTEDFPIPRRMIAATTCDAEQYLA AVRDTSPVYQRYMIDFNNHANLQQATINKAHWFFS
TB471	DSTEDFPIPRRMIAATTCDAEQYLA AVRDTSPVYQRYMIDFNNHANLQQATINKAHWFFS
AV116	LSPQDRRNYSENFYAPQADPLWEAWPNHMKIFWNNKGVVAKATDIGNQYPPGDMSVWNWS
TB516	LSPAERRDYSEHFYNG..DPLTFWVNHMKIFFNNKGVVAKGTEVCNGYPAGDMSVWNWA
TB471	LSPAERRDYSEHFYNG..DPLTFWVNHMKIFFNNKGVVAKGTEVCNGYPAGDMSVWNWA

Figure 3. The amino acid sequences of three homologs.

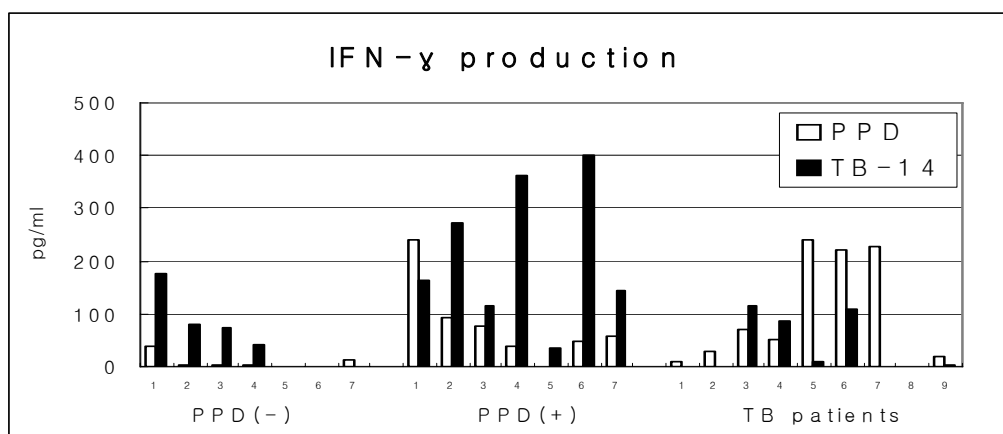


**Figure 4.** Expression of 6His-tagged TB-14 protein was induced with 1 mM IPTG. Proteins were visualized by Coomassie stain. M: marker, 1: flow-through, 3: wash, 3-8: TB-14 elutes(left). After Prep Cell purification, only single protein bands are shown around 14 kDa (right).

6-His이 붙어 있는데 anti-His antibody(Qiagen)를 이용한 colony blotting으로 재조합 단백질을 분리하는 양성의 *E. coli* 집락을 찾을 수 있었다.

20L 이상의 LB-kanamycin(25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )-ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 액체배지에서 증균된 양성의 *E. coli* pellet을 8M urea로 분쇄한 뒤 Ni-NTA chromatography를 이용하여 10 mg 이상의 6-His tagged TB-14 재조합 단백질을 순수 분리하였고 SDS-

PAGE를 이용하여 예상되는 단백질 밴드를 확인하였다. 분리된 단백질 내에 오염된 대장균 단백질들을 완전히 제거하기 위해 Prep Cell 장치(Bio-Rad)를 이용한 continuous elution electrophoresis를 시행하여 약 14 kDa의 단일 밴드 재조합 단백질을 순수 분리할 수 있었다(Figure 4). Detoxigel affinity column을 통과 시킨 TB-14 재조합 단백질은 4 unit/mg 미만의 대장균 내독소(LPS)를 포함하고 있어 항혈청 제작이나



**Figure 5.** The concentrations of IFN- $\gamma$  induced by PPD and TB-14 recombinant protein in the supernatant of diluted whole bloods from PPD(-), PPD(+) healthy volunteers, and TB patients.

세포성 면역반응 연구에 이용될 수 있는 순수 정제된 단백질임이 확인되었다.

### 3. 재조합 단백질 TB-14의 IFN- $\gamma$ 분비 유도

IFN- $\gamma$ 는 결핵에 대한 세포성 면역반응에서 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 TB-14 단백질이 전혈 배양(whole blood culture) 혈액 내에서 IFN- $\gamma$  분비를 얼마나 유도하는지를 결핵연구의 대조 단백질로 많이 이용되는 PPD와 비교하였다. RPMI로 희석된 결핵 환자, PPD 양성 및 음성 정상인들로부터 얻은 전혈에 PPD와 TB-14 단백질을 넣어준 뒤 48시간 후에 상층액 으로부터 IFN- $\gamma$ 의 양을 ELISA로 측정하여 아무것도 넣지 않은 대조군과 비교하였다. PPD 음성 정상인에서는 TB-14 단백질로 자극된 군에서 소폭의 IFN- $\gamma$  분비 증가가 관찰 되었으나 PPD의 자극에 의한 IFN- $\gamma$ 의 분비 증가는 관찰할 수 없었다. 반면, PPD 양성인의 전혈배양에서는 IFN- $\gamma$ 의 농도가 PPD 음성 정상인에 비해 전체적으로 많이 증가하였는데 특히 TB-14으로 자극된 군에서 PPD로 자극된 군보다 월등히 높은 IFN- $\gamma$  분비를 나타내었다. 결핵 환자에서는 질환의 양상이나 치료 정도에 따라 IFN- $\gamma$ 의 분비가 일정하지 않았지만 대체적으로 TB-14 보다는 PPD로 자극된 군에서 오히려 IFN- $\gamma$  분비가 높게 나타났다(Figure 5). 한편 아무것도 넣지 않은 대

조군에서는 결핵환자나 정상인 모두에서 IFN- $\gamma$  분비를 거의 유도하지 못하였다. 따라서 재조합 단백질 TB-14 이 결핵에 대한 인체 내 세포성 면역반응 유도에 중요한 역할을 할 수 있는 단백질 항원이라 사료된다.

## 고 찰

결핵균 감염에 따른 인체의 면역반응은 체액성 면역반응(humoral immunity)보다는 세포성 면역반응(cellular immunity)이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 체내로 들어온 결핵균은 대부분 결핵균에 감염된 CD4 림프구에서 분비되는 IFN- $\gamma$ 에 의해 활성화된 대식세포 등의 숙주 면역 방어기전에 의해 제거되지만 일부의 결핵균이 폐포 대식세포나 단핵구내에서 증식하거나 잠복감염상태로 오랫동안 생존할 수 있고 숙주의 면역기전이 감소하면 재 활성화하여 질환을 유발한다. 일반적으로 결핵 감염자를 확인하기 위해선 tuberculin 피부 반응 검사가 이용되고 있는데 전 세계 인구의 1/3이 양성을 보이고 이들 감염자 중 약 10% 정도가 일생 중 어느 시기에 결핵 환자로 진행되는 것으로 알려져 있다.

결핵환자의 객담, 흉막액, 뇌척수액등의 체액 및 결핵균 배양 여과액에 분비되는 단백질들은 결핵에 대한 세포성 면역반응 및 진단법 개발 연구에 이용되고 있는데 이들 중 alpha antigen (30 kD, 85B), antigen

5 (38 kD), MPT 64 (23 kD), ESAT-6 (6 kD) 등은<sup>13-15</sup> 결핵균에 특이적인 epitope을 가지고 있어 결핵에 대한 세포성 면역반응을 유도하는 것으로 보고 되고 있으나 이들의 항원성은 다른 결핵균(*M. avium*, *M. smegmatis*) 및 *nocardia*, *corynebacterium*, *staphylococcus* 등과의 교차반응을 보이고 있고<sup>16-18</sup> 특이도와 민감도에 문제가 있어 아직 실용화되지 못하고 있다. 특히 ESAT-6의 경우 유전자가 클로닝되어 단세포균 항체까지 만들어 졌으나<sup>19</sup> 단백질의 분자량이 작고 아주 소량만이 결핵균으로부터 분비되기 때문에 실제 결핵의 백신 후보 물질로 활용되기에는 문제가 있으나 결핵균에만 특이적으로 존재하는 단백질이기 때문에 Cellestis사에 의해 OuantiFERON<sup>®</sup>-TB 검사법<sup>23</sup>으로 미국식약청의 승인 하에 잠복결핵의 진단에 이용되고 있다.

본 연구에서는 *M. avium* 배양 여과액에서 항원성과 강하게 반응하는 새로운 *M. avium* 특이 단백질을 확인하여 아미노산 서열을 규명한 뒤(Figure 1, 2) 이 단백질과 높은 상동성을 나타내는 *M. tuberculosis* 유전자를 클로닝하여 다량의 결핵균 재조합 단백질(TB-14)을 분리 정제하였다(Figure 3, 4). 일반적으로 결핵균에서 분리된 단백질 항원은 결핵균에 감염된 림프구의 IFN- $\gamma$  분비능을 증가시키는 것으로 알려져 있어 림프구에서 분비된 IFN- $\gamma$ 의 농도를 측정함으로써 결핵균 특이 항원에 대한 세포성 면역반응 뿐 만 아니라 결핵 감염자 또는 결핵 환자의 진단을 위한 연구에도 많이 이용되고 있다<sup>23,24</sup>. 본 연구에서는 TB-14 단백질이 정상인, 결핵균 잠복 감염자 및 결핵 환자의 인체 내 세포성 면역반응에 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 PPD 음성, PPD 양성 및 결핵환자의 전혈 (whole blood)을 이용하여 IFN- $\gamma$  분비를 측정하였다. 인체가 결핵에 대한 적절한 방어력을 나타내기 위하여서는 혈청요인과 더불어 다양한 세포간의 상호반응이 중요한 역할을 하는데 전혈은 이러한 모든 인자를 다 포함하고 있으므로 인체의 면역상태를 반영하기 위한 좋은 모델이라 할 수 있다<sup>8-11</sup>.

본 연구 결과에 의하면 PPD나 TB-14를 첨가하지 않은 PPD 음성, PPD 양성 및 결핵환자의 전혈배양에서는 IFN- $\gamma$ 의 농도가 ELISA 측정범위 이하로 나왔

는데 이는 실험군에서 증가된 IFN- $\gamma$ 가 PPD나 TB-14의 자극에 의해 증가된 것임을 나타내고 있다. PPD 음성 정상인에서는 PPD의 자극에 의한 IFN- $\gamma$ 의 분비 증가를 관찰할 수 없었고 TB-14 단백질로 자극된 군에서도 IFN- $\gamma$ 의 농도가 대부분 100 pg/ml 이하로 소량 검출되었다. 반면, PPD 양성인의 전혈배양에서는 IFN- $\gamma$ 의 농도가 전체적으로 많이 증가하였는데 특히 TB-14으로 자극된 군에서 PPD로 자극된 군보다 월등히 높은 IFN- $\gamma$  분비를 나타내었다(Fig. 5). 흥미로운 것은 200 종류 이상의 결핵균 단백질들로 이루어진 PPD<sup>20</sup> 보다 한가지로 이루어진 TB-14 단백질이 결핵 감염자의 전혈배양에서 IFN- $\gamma$ 의 분비를 훨씬 많이 유도 한 것으로 매우 보기 드문 현상이다. 따라서 TB-14 단백질은 특히 결핵 감염자에서 인체 내 세포성 면역반응 유도에 중요한 역할을 할 수 있는 단백질이라 생각되며 나아가 충분한 추가적인 연구를 통해 정상인과 결핵 감염자를 감별할 수 있는 IFN- $\gamma$ 의 기준 농도가 정해진다면 전혈배양을 통해 IFN- $\gamma$ 를 측정하여 잠복결핵의 진단에 활용되고 있는 OuantiFERON<sup>®</sup>-TB 검사법과 유사한 결핵 진단법을 개발 할 수도 있을 것으로 사료된다. 한편 결핵 환자의 전혈배양에서는 IFN- $\gamma$ 의 분비 양상이 환자에 따라 매우 다양 하였는데 이는 질환의 양상이나 치료 정도에 따라 외부 항원에 반응하는 면역력에 차이가 있는 것으로 추측된다. 또한 결핵 환자에서는 전체적으로 PPD로 자극된 군에서 TB-14 군 보다 더 높은 IFN- $\gamma$  분비를 나타내었는데 이는 PPD 양성군과는 다른 결과로 결핵을 앓고 있는 동안 수많은 종류의 결핵균 항원에 감염된 T 림프구가 수백 종의 결핵균 항원을 포함하는 PPD와 반응하였기 때문으로 사료된다.

한편 Sippola<sup>21</sup>에 의하면 *M. avium*에 기회 감염된 AIDS 환자들의 소변에 분비되는 단백질을 항원성을 이용하여 dot blotting으로 조사한 결과 86%의 특이도와 65%의 민감도가 있는 것으로 보고 하였고 Choudhry<sup>22</sup>는 *M. tuberculosis* H37Ra 배양 여과액에 대한 항원성을 이용하여 객담검사 양성의 결핵환자 소변에서 ELISA를 이용하여 29명중 22명에서 양성의 결과를 얻었다고 보고하고 있는데 추후 TB-14 단



백질에 대한 항혈청을 제작하여 환자의 객담, 흉막액, 뇌척수액 뿐 만 아니라 환자의 소변 등에 분비되는 결핵균 특이 단백질을 탐색하는 결핵의 진단 연구에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

**연구배경:** Mycobacteria 배양액 여과 단백질은 결핵에 대한 세포성 면역반응 및 진단 연구에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 새로운 결핵균 특이 유전자를 클로닝하여 약 14-kDa의 결핵균 재조합 단백질(TB-14)을 분리 정제 한 뒤 전혈 배양(whole blood culture)을 통해 재조합 단백질 항원의 자극에 따른 IFN- $\gamma$  분비 유도를 PPD와 비교 측정하여 TB-14 단백질이 결핵균에 대한 숙주의 세포성 면역반응 유도에 어떤 역할을 하는 지를 알아보고자 하였다.

**방 법:** *M. avium* 배양 여과액에서 항혈청과 강하게 반응하는 하나의 *M. avium* 특이 단백질을 확인하여 아미노산 서열을 규명한 뒤 이 단백질과 높은 상동성을 나타내는 *M. tuberculosis* 유전자를 클로닝하여 다량의 결핵균 재조합 단백질(TB-14)을 분리 정제하였다. 재조합 단백질 TB-14에 대한 세포성 면역반응 유도를 알아보기 위해 결핵 환자(9명), PPD 양성 정상인(7명) 및 PPD 음성 정상인(7명)들로부터 얻은 전혈(whole blood)를 RPMI로 희석한 뒤 10  $\mu$ g의 PPD와 TB-14 단백질로 48 시간 동안 자극하여 상층액에 분비된 IFN- $\gamma$  농도를 ELISA로 측정하였다.

**결 과:** 1. *M. avium* LR114F 균주의 배양 여과액 내에서 *M. intracellulare* 항혈청에 강하게 반응하는 새로운 *M. avium* 특이 단백질을 규명하여 아미노산 서열을 확인하였다. 2. *M. avium* 특이 단백질과 상동성을 보이는 *M. tuberculosis* 특이 재조합 단백질인 TB-14은 148개의 아미노산으로 구성되어 있고 30개의 아미노산으로 이루어진 signal peptides를 가지며 *M. avium*과 78%의 상동성을 보였다. 3. PPD 양성인의 전혈 배양에서 TB-14 단백질 항원으로 자극된 군에서 PPD로 자극된 군보다 월등히 높은 IFN- $\gamma$  분비를 나타내었다. 반면 결핵환자에서는 질환의 양상이

나 치료 정도에 따라 IFN- $\gamma$ 의 분비 양상이 일정하지 않았다.

**결 론:** 새로운 결핵균 특이 재조합 단백질 TB-14는 결핵에 대한 인체 내 세포성 면역반응 유도에 중요한 역할을 할 수 있는 단백질이라 생각되며 특히 PPD 양성자에서 높은 IFN- $\gamma$ 의 분비 양상을 보여 정상인과 결핵 감염자의 감별진단에도 활용될 수 있으리라 생각된다. 또한 TB-14 단백질에 대한 항혈청을 제작하여 환자의 가검물에 분비되는 결핵균 특이 단백질을 탐색하는 결핵의 진단 연구에도 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 2002년도 순천향대학교 학술연구비(과제번호 20020141)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. World Health Organization. Global tuberculosis programme: the TB treatment observer. WHO Newsletter 1997.
2. World Health Organization. WHO declares tuberculosis a global emergency. Soz Praventivmed 1993; 38:251-2.
3. World Health Organization. WHO report on the tuberculosis epidemic. Avail from: <http://www.who.ch/>
4. Boesen H, Jensen BN, Wilcke T, Andersen P. Human T-cell responses to secreted antigen fractions of Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1995;63: 1491-7.
5. Orme IM, Andersen P, Boom WH. T cell response to Mycobacterium tuberculosis. J Infect Dis 1993;167: 1481-97.
6. Roberts AD, Sonnenberg MG, Ordway DJ, Furney SK, Brennan PJ, Belisle JT, et al. Characteristics of protective immunity engendered by vaccination of mice with purified culture filtrate protein antigens of Mycobacterium tuberculosis. Immunology 1995;85: 502-8.
7. Young DB, Kaufmann SH, Hermans PW, Thole JE. Mycobacterial protein antigens: a compilation. Mol Microbiol 1992;6:133-45.
8. Ison CA, Anwer N, Cole MJ, Galassini R, Heyderman



- RS, Klein NJ, et al. Assessment of immune response to meningococcal disease: comparison of a whole-blood assay and the serum bactericidal assay. *Microb Pathog* 1999;27:207-14.
9. Miles AA, Misra SS. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J Hyg* 1938;38:732-49.
10. Wallis RS, Lederman HM, Spritzler J, Devers JL, Georges D, Weinberg A, et al. Measurement of induced cytokines in AIDS clinical trials using whole blood: a preliminary report. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:556-60.
11. Wallis RS, Palaci M, Vinhas S, Hise AG, Ribeiro FC, landen K, et al. A whole blood bactericidal assay for tuberculosis. *J Infect Dis* 2001;183:1300-3.
12. Bose M, Chander A, Das RH. A rapid and gentle method for the isolation of genomic DNA from mycobacteria. *Nucleic Acids Res* 1993;21:2529-30.
13. Closs O, Harboe M, Axelsen NH, Bunch-Christensen K, magnusson M. The antigens of *Mycobacterium bovis*, strain BCG, studied by crossed immuno-electrophoresis: a reference system. *Scand J Immunol* 1980;12:249-63.
14. Janicki BW, Chaparas SD, Daniel TM, Kubica GP, Wrigth GL, Yee GS. A reference system for antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am Rev Respir Dis* 1971;104:602-4.
15. Young DB, Kaufmann SH, Hermans PW, Thole JE. Mycobacterial protein antigens: a compilation. *Mol Microbiol* 1992;6:133-45.
16. Azuma I, Yamamura Y, Fukushi K. Fractionation of mycobacterial cell wall: isolation of arabinose mycolate and arabinogalactan from cell wall fraction of *Mycobacterium tuberculosis* strain Aoyama B. *J Bacteriol* 1968;96:1885-7.
17. Chaparas SD, Thor DE, Hedrick SR. Comparison of lymphocyte transformation, inhibition of macrophage migration and skin tests using dialyzable and nondialyzable tuberculin fractions from *Mycobacterium bovis* (BCG). *J Immunol* 1971;107:149-53.
18. Yamamura Y, Onoue K, Azuma I. Biology of the mycobacterioses: chemical and immunological studies on peptides and polysaccharides from tubercle bacilli. *Ann N Y Acad Sci* 1968;154:88-97.
19. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63:1710-7.
20. Chaparas SD, Vandiviere HM, Melvin I, Koch G, Becker C. Tuberculin test: variability with the Mantoux procedure. *Am Rev Respir Dis* 1985;132:175-7.
21. Sippola AA, Gillespie SL, Lewis JA, Daniel TM. *Mycobacterium avium* antigenuria in patients with AIDS and disseminated *M. avium* disease. *J Infect Dis* 1993;168:466-8.
22. Choudhry V, Saxena RK. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* antigens in urinary proteins of tuberculosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:1-5.
23. Mazurek GH, Villarino ME. Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis*. *MMWR Recomm Rep* 2003;52:15-8.
24. Mori T, Sakatani M, Yamagishi F, Takashima T, Kawabe Y, Nagao K, et al. Specific detection of tuberculosis infection an interferon-gamma based assay using new antigens. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:59-64.