

국내산 중하(*Metapenaeus joyneri*) 내 주알레르겐 규명: 가열 및 소화액에 의한 변화

아주대학교 의과대학 알레르기·류마티스 내과¹, 서울대학교 의과대학 내과²

윤성호¹·김현아¹·김현미¹·최정희¹·서창희¹·남동호¹·김윤근²·민경업²·박해심¹

Identification of the Major Allergen in the Shrimp (*Metapenaeus Joyneri*): Effects of Heating and Digestive Enzymes

Sung-Ho Yoon¹, Hyun-Ah Kim¹, Hyun-Mi Kim¹, Jeong-Hee Choi¹, Chang-Hee Suh¹, Dong-Ho Nahm¹, Yoon-Keun Kim², Kyung-Up Min² and Hae-Sim Park¹

¹Department of Allergy and Rheumatology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea, ²Department of Internal Medicine, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Background: Shrimp is one of the major causative food allergens in this country. We reported IgE-prevalence and its IgE binding components of the home made shrimp (*M. joyneri*) extracts in allergy patients in this country. The Property of food allergens can be changed by heat or digestion enzymes. We observed the changes of IgE binding components of *Metapenaeus joyneri* with exposure to heating and digestive enzymes in *ex vivo* system.

Method: IgE immunoblot was applied to analyze the changes of IgE binding components within the fresh and boiled shrimps in sera from five patients with allergy showing strong positive reactions (A/H $\geq 2+$) to the skin prick test and high serum specific IgE (≥ 100 A.U) to the shrimp. To evaluate heating and enzyme effects, heating, SGF (gastric fluid, simulated) and SIF (intestinal fluid, simulated) were treated for 10, 30 and 90 minutes and

SDS-PAGE and IgE-immunoblot were repeated. To identify the major allergens, 2-D electrophoresis and IgE-immunoblot were followed by amino acid sequence analysis using MALDI-TOF and FASTF program.

Result: The 45 kDa band was resistant to heating in three of five patients. In the fresh shrimp, 36~45 kDa bands remained after SGF treatment, while minimal changes were noted after SIF treatment. The 2D-immunoblot of 45 kDa demonstrated two spots (pI 5.1, 4.75), and one (pI 5.1) was identified as an arginine kinase having 100% homology with European lobster by amino acid analysis.

Conclusion: The major allergen of *M. joyneri* was identified as an arginine kinase which was resistant to heating and digestion enzymes. (Korean J Asthma, Allergy Clin Immunol 2004;24:211-216)

Key words: Shrimp, Arginine kinase, Allergen, Heating, Digestive enzyme

서론

국내 환자들에서 주요 음식물 알레르겐으로 해산물이 있으며, 그중에서 갑각류, 특히 새우는 대표적인 원인 음식물이다. 새우 내 알레르겐 성분에 관한 연구를 살펴보면 근단백질인 트로포마이오신이 알레르겐으로 작용한다고 알려져 있고, 이는 다른 갑각류와 그 외 다른 여러 종에서도 존

재한다.^{1,2)} Hoffman 등³⁾은 새우 내 열에 내성을 지닌 알레르겐을, Leung 등⁴⁾도 34 kDa의 열에 안정한 알레르겐을 보고하였으며, Daul 등^{5,6)}은 아미노산 서열 분석으로 알레르겐이 트로포마이오신이며, *pen a 1*이라 명명하였다. 최근 트로포마이오신뿐 아니라 알지닌 카이나제(AK)가 새로운 새우 알레르겐으로 작용한다는 보고도 있는데,⁷⁾ 이는 새우의 게나 가재 등 갑각류와 꿀벌, 편모충 등 여러 종에 존재하는 인산이동기이다.⁸⁻¹¹⁾ 또한 음식물 알레르겐은 열과 소화 효소에 내성을 지니며, 이러한 특성과 구조가 비슷한 단백질로 인하여, 같은 계통의 종뿐 아니라 다른 종과도 교차 반응을 나타낸다고 알려져 있다.¹²⁾ 본 연구에서는 가열하였을 때와 소화액과 동일한 용액인 SGF (gastric fluid, simulated)와 SIF (intestinal fluid, simulated)를 각각 첨가하여 시간대별 알레르

본 연구는 2001년 KISTEP(M1012401008)의 연구비 보조로 이루어진 것임.

책임저자 : 박해심, 경기도 수원시 영통구 원천동 산 5

아주대학교 의과대학 알레르기·류마티스 내과, 우: 443-721

Tel: 031) 219-5150, Fax: 031) 219-5154

E-mail : hspark@madang.ajou.ac.kr

접수: 2003년 12월 18일, 통과: 2004년 5월 10일

겐의 변화 양상을 관찰하였으며, 또한 알레르겐의 특성을 규명하기 위해 주알레르겐의 아미노산 서열 분석을 시행하였다.

대상 및 방법

1. 새우에 감작된 환자 혈청

중하에 대한 피부단자시험에서 양성 반응(A/H 비 $\geq$ 2+)을 보이면서, 새우 섭취 경우 증상이 있으면서 혈청 특이 IgE가 높은 (IgE $\geq$ 100 A.U) 환자 3명과 증상은 없지만 혈청 특이 IgE가 높은 환자 2명의 혈청을 사용하였다. 중하를 끓였을 때는 5명의 혈청 각각을 끓인 중하 추출물과 반응시켰으며, 소화액에 의한 영향을 평가하기 위한 실험에서는 5명의 혈청을 동량으로 섞어 이용하였다.

2. 새우 단백질의 추출

수산물 시장에서 구입한 중하를 믹서기로 잘게 간 것과 물에 10분간 끓인 후 같은 새우로 두 부류로 나누어서, PBS(phosphate buffered saline, pH 8.0)에 각각 혼합한 후 4°C에서 24시간 추출하였다. 혼합물을 12,000 rpm에서 20분간 원심분리시킨 후, 상층액을 따로 담고 3 mm filter paper에 걸러서 6,000~8,000 Da 크기의 셀로판 튜브에 넣어 48시간 동안 투석시켰다. 투석이 끝난 후, 무균처리를 위해 0.2 μ m syringe filter에 거른 다음 생 새우와 끓인 새우 추출물 내 단백질 농도를 측정하고 분주하여 -20°C에 보관하였다.

소화효소에 의한 알레르겐의 변화를 관찰하기 위하여, 471 unit/mg의 pepsin (Sigma Co., Louis, MO)을 포함하는 SGF (gastric fluid, simulated)를 37°C에 보관하였고, 이 SGF 200 μ l를 생새우 추출물(3.2 mg/ml) 200 μ l와 10분, 30분, 90분간 각각 반응시킨 후, 시간대별로 50 μ l씩 샘플 완충액 12 μ l와 중화 완충액 1M NO₂CO₃ 1 μ l가 있는 튜브로 분주하였다. Pancreatin (Sigma Co., Louis, MO)을 포함하는 SIF (intestine fluid, simulated)의 경우 같은 방법으로 샘플과 SIF를 동량으로 섞은 후 분주하였다. 끓인 새우는 추출물(1.76 mg/ml) 200 μ l를 100 μ l의 SGF와 섞고 시간대별로 75 μ l씩 샘플 완충액 20 μ l와 1M NO₂CO₃ 1 μ l가 포함된 튜브로 분주하였다. SIF 역시 같은 양을 섞은 후, 분주하였다.

3. SDS-PAGE 및 Immunoblot

생 새우와 끓인 새우 추출물을 샘플 완충액과 섞어서 5분간 가열하고 well당 20 μ g의 농도로 10% SDS gel에 loading한 후, 125 v로 1시간 30분간 전기영동하였다. 표지자(4 to 250 kDa, Invitrogen, San Diego, CA)는 5 μ l를 넣었다. Gel의 고정과 염색은 Coomassie Brilliant blue R-250을 사용하였다. 전기

영동을 한 후, PVDF membrane (Millipore Co., Bedford, MA)에 200 mA로 105분간 전이시켰다. 비특이적 결합을 방지하기 위하여 PVDF membrane에 5% BSA-5% skim milk TBST (Tween-20 Tris-buffered saline)를 첨가하고 1시간 가량 반응시켰다. 그 후 TBST로 20분간 3회 세척한 다음 환자 5명 및 대조군의 혈청을 넣어 4°C에서 12시간 이상 작용시켰다. 다시 TBST로 세척한 다음 alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgE 항체 (Sigma Co., St. Louis, MO)를 3% BSA-3% skim milk-TBST와 1 : 3,000으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 작용시켰다. 이후 TBST로 20분씩 3회 세척, TBS로 5분씩 2회 세척 후 membrane에 BCIP/ NBT alkaline phosphatase substrate (Sigma Co., Louis, MO) 용액에 넣은 후 단백대가 나올 때까지 반응시켰다. 소화액과 섞은 생 새우 샘플을 완충액과 혼합하여 5분간 가열한 후, 10%의 SDS gel에 loading하였다.

4. 알레르겐의 아미노산 배열 분석

생 새우 추출물을 IEF 완충액과 동량으로 섞은 후, 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후, IEF ready gel (Bio-rad laboratories, Hercules, pH 3~10)에 well당 50 μ l씩 넣은 후 100v 1시간, 200v 1시간, 500v 30분간 전기 영동하였다. 전기 영동이 끝난 후, gel을 fixing solution에 30분간 담가 놓고, 2개 well을 잘라서 각각 1.5 mm 두께의 spacer를 사용하는 10% SDS gel에 가로로 넣고, 125v 1시간 30분간 전기 영동하였다. 이 과정이 끝난 후, 하나는 stain solution으로 염색을 하였고, 나머지 gel은 위와 같은 방법으로 immunoblot을 시행하여 알레르겐의 pI 값과 분자량을 확인하였다. 사용한 혈청은 효소 시험 때 사용한 혈청과 동일하였다. 그 후 아미노산 서열 분석을 위하여 IEF gel을 SDS-PAGE를 한 후, glacial acetic acid가 없는 stain solution으로 30분간 염색을 하고, 역시 glacial acetic acid가 없는 destain solution으로 2시간 30분간 탈색을 하여 원하는 부위의 spot을 잘라서 internal sequence를 하였다(한국기초과학지원 연구원).

결 과

1. 생 새우와 끓인 새우의 단백질 변화

생 새우와 끓인 새우 추출물을 이용하여 5명의 환자 혈청으로 immunoblot을 시행한 결과 5명 중 3명의 혈청에서 같은 양상의 단백질대가 나타났다. 끓이기 전과 후에 다른 단백질대와는 다르게 45 kDa의 단백질대가 계속 존재하였고, 이 단백질대가 주알레르겐임을 알 수 있었다(Fig. 1).

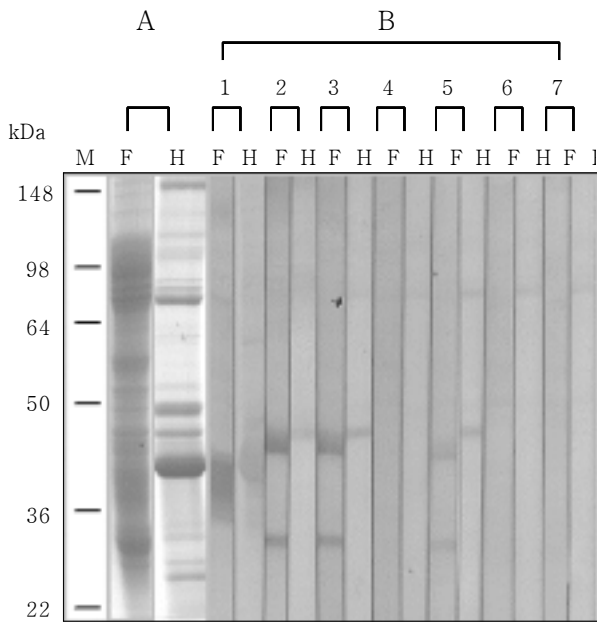


Fig. 1. Effect of boiling on shrimp allergenicity analyzed by 10% SDS-PAGE (A), and IgE binding components (B). M = marker; lane 1~3 = symptomatic subjects; lane 4~5 = asymptomatic subjects; lane 6 = negative control; lane 7 = buffer control; F = fresh shrimp extracts; H = heated shrimp extracts.

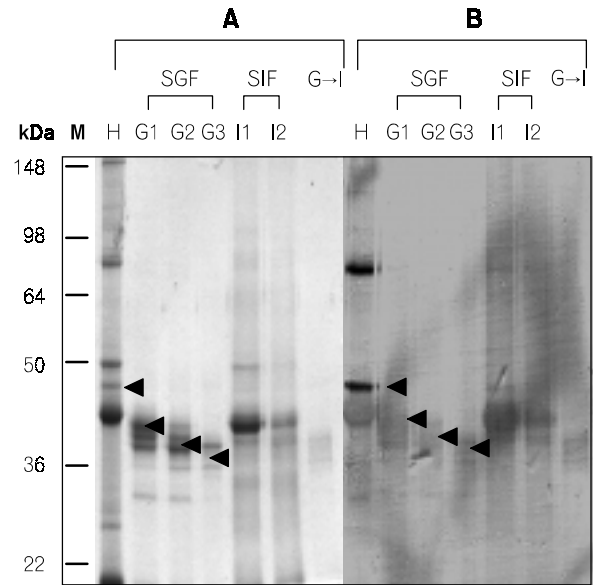


Fig. 3. Effect of gastric (SGF) and intestinal fluid (SIF) treatment on SDS-PAGE (A) and IgE binding components (B) of boiled shrimp extracts. M = marker, H = boiled shrimp extract G1 (10 min); G2 (30 min) and G3 (90 min) of SGF treatment, I1 (4 hr), I2 (16 hr) of SIF treatment. SGF and SIF treatment (GI). Arrow indicates major allergen of 45 kDa.

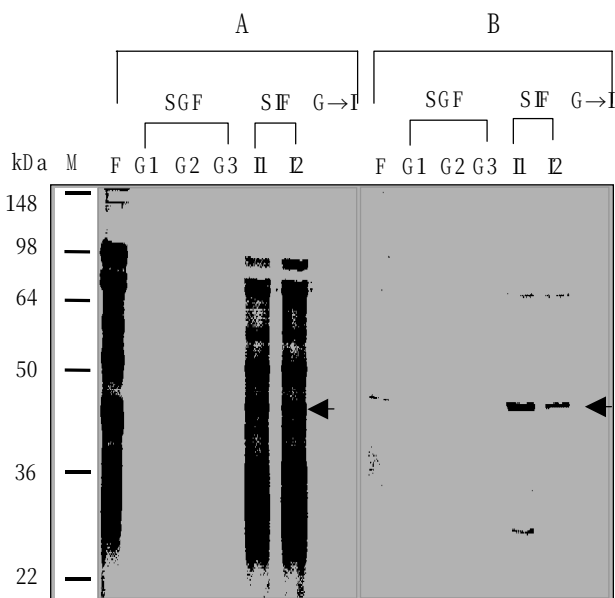


Fig. 2. Effect of gastric (SGF) and intestinal fluid (SIF) treatment on SDS-PAGE (A) and IgE binding components (B) of the fresh shrimp extracts. M = marker; F = fresh shrimp extracts; G1 (10 min), G2 (30 min) and G3 (90 min) of SGF treatment, I1 (10 min), I2 (30 min) of SIF treatment, SGF and SIF treatment (GI). pH of SGF = 1.2; pH of SIF = 7.5. Arrow indicates the major allergen, 45 kDa.

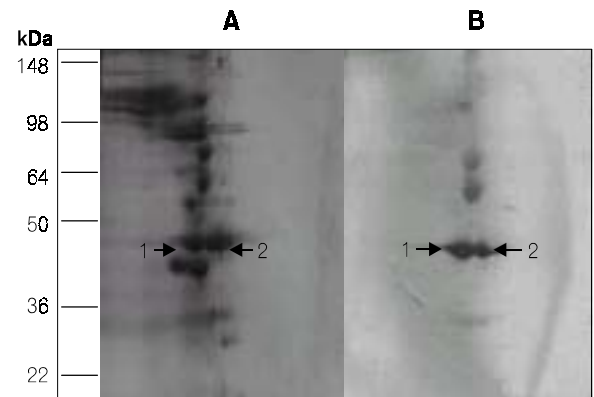


Fig. 4. Two dimensional PAGE (A) and IgE binding components (B) using pooled sera of five patients with serum high specific IgE. spot 1 = pI-5.1, spot 2 = pI-4.75.

2. 소화액에 대한 생 새우와 끓인 새우 알레르겐의 변화 양상

생 새우의 경우 SGF에서는 36~45 kDa 부위의 단백질이 존재하였고 SIF에서는 단백질의 변화가 거의 없는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 끓인 새우는 SGF 처리 후 시간이 지남에 따라 단백질이 36 kDa 부위까지 강등이 되었고, SIF 처리 후에도 4시간 이후부터 단백질이 강등되어, 시간이 흐름에 따라 진행되었다(Fig. 3).

3. 알레르겐의 아미노산 서열 분석

2D gel을 통하여 45 kDa 부위에서 2개의 spot을 확인하였고(Fig. 4), 그 중 pI값이 약 5.1 부위(spot 1)의 spot을 internal sequencing을 하여 나온 3개의 fraction의 아미노산 서열을 분석하였고(Table 1), data base 검색(National Center for Biotechnology Information) 결과, 유럽산 바닷가재의 AK와는

Table 1. Amino Acid Sequence of the 45 kDa Allergen of *M. Joyneri*

	Amino acid sequence	pI
Peptide 1	Gly-Ile-Tyr-His-Asn-Asn-Asp-Asn-Lys	5.1
Peptide 2	Leu-Gly-Phe-Leu-Thr-Phe-Pro-Thr-Asn-Leu-Gly-Thr-Thr-Val-Arg	
Peptide 3	Glu-Lys-Leu-Glu-Glu-Val-Ala-Gly-Lys	

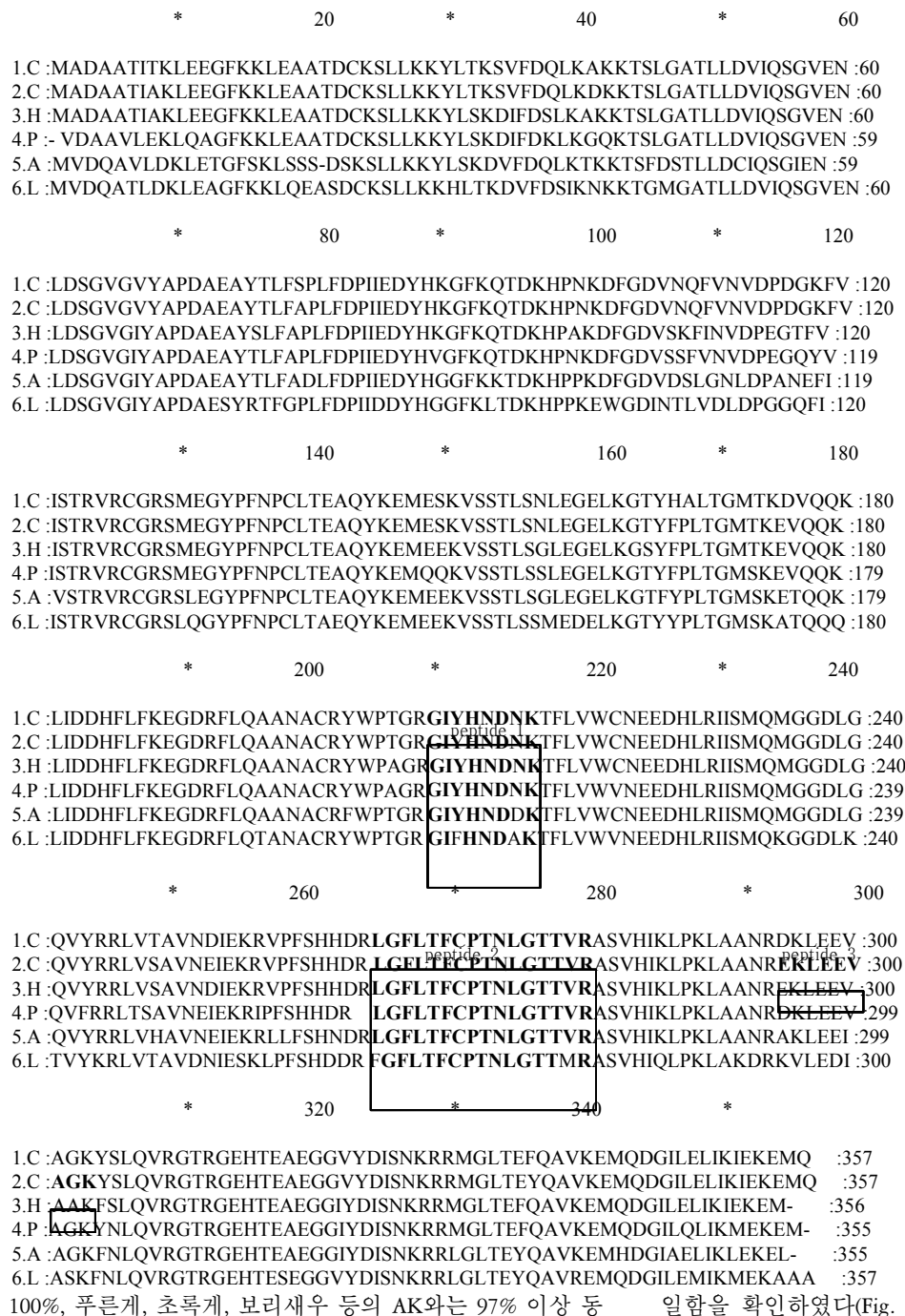


Fig. 5. Arginine kinase amino acid sequences with six arthropod: *Carcinus maenas* (1.C), *Callinectes sapidu* (2.C), European lobster *Homarus gammarus* (3.H), shrimp *Penaeus japonicus* (4.P), honeybee *Apis mellifera* (5.A), horseshoe crab *Limulus polyphemus* (6.L).

100%, 푸른게, 초록게, 보리새우 등의 AK와는 97% 이상 동일함을 확인하였다(Fig. 5).

고 찰

새우 알레르겐에 관한 연구는 전 세계적으로 많이 진행되어 보고되어 왔다. 국내에서는 윤 등¹³⁾이 국내산 중하에서 주알레르겐을 보고한 바 있고, Hoffman 등³⁾이 열에 내성인 새우 알레르겐을 분리한 이래, 이후 Leung,⁴⁾ Daul,^{5,6)} Nagpal 등¹⁴⁾이 트로포마이오신의 isoform 이라 추측되는 알레르겐을 여러 새우 종을 이용한 실험을 통하여 보고하였다. 또한 트로포마이오신에 대한 단일 클론항체를 이용하여 다른 종들과의 교차 항원성을 비교하여 그 증거를 뒷받침하였다.⁴⁾ 한편 Yu 등⁷⁾은 *Penaeus monodon*에서 트로포마이오신 이외 다른 주알레르겐으로서 알지닌 카이나제(AK)를 보고하였는데, 이는 포스포젠 카이나제 그룹에 속하며, 고에너지의 인산을 알지닌 인산기에 주어 ADP를 ATP로 전환한다(Arginine phosphate+MgADP+qH⁺=Arginine+MgATP).

AK는 근육에서, 순간적으로 움직이거나 수축할 때 ATP를 일시적으로 유지시키거나 농도를 유지시키는 기능을 하며,¹⁵⁾ 새우, 게, 가재뿐만 아니라 꿀벌, 나방, 편모충에까지 다양하게 존재한다. 각각의 종에 존재하는 AK의 cDNA를 이용한 아미노산 서열 분석 결과 펩타이드 잔기가 약 355~357a.a이며, 90% 이상의 아미노산 서열이 서로 동일하였고¹⁶⁾, Binder 등¹⁷⁾은 AK가 무척추 동물에서도 교차 반응을 일으키는 새로운 알레르겐으로 보고하였다. 본 연구에서도 2-D Immunoblot을 통하여, pI 값이 약 5.1인 45kDa 부위의 spot을 분리하였고, 이를 gel digestion을 시행하여 나온 3개의 펩타이드 절편들의 아미노산 서열 분석을 시행한 결과, 유럽산 바닷가재의 AK와는 100%, blue crab, green crab과 보리새우와는 약 97%가 동일함을 관찰할 수 있어, 국내 새우 알레르기 환자에서 국내산 중하의 주알레르겐이 AK로 생각되었다.

음식물 알레르겐은 열이나 효소, 가공방식에 의해 새로운 알레르겐이 생성될 수 있고, 대부분의 음식 알레르겐은 단백질 분해 요소에 대한 저항성이 있거나, 효소와 같은 활성을 지니고 있어 면역 세포를 자극하는 특성을 가지고 있다.¹⁸⁾ Helbling 등¹⁹⁾은 소화액에 내성을 지닌 알레르겐과 음식물 알레르기와의 연관성을 보고하였고, Yagami 등¹²⁾은 식물에서 여러 야채들과 교차반응을 보이는 고무 라텍스 알레르겐이 소화 요소에 대한 저항성이 있고, Fernandez 등²⁰⁾은 과일과 야채에서 교차반응을 일으키는 알레르겐 중 하나인 lipid transfer protein이 열과 효소에 내성이 있음을 보고하였다. Crespo 등²¹⁾은 끓인 애플란타 새우와 독일 바퀴 사이에 공통적으로 IgE 항체에 반응하는 단백질이 있다고 보고하였다. 본 연구에서는 음식물 알레르겐 중 국내산 중하에

서 열과 소화 효소에 대한 알레르겐의 변화 양상과 서열 분석을 통하여 알레르겐을 확인하였다. 앞서 보고한 중하의 주알레르겐에 대한 연구 결과에서 31, 32, 45 kDa의 단백질대가 새우의 주알레르겐으로 나타났지만, 열에 의한 효과로, 끓인 새우에서 45 kDa의 단백질은 변하지 않았다. 또한 SGF와 SIF 처리시 시간대별로 저분자로 강등되는 약간의 변화는 있었지만 45 kDa 단백질대가 사라지지 않고 유지되었다. 따라서 새우의 주알레르겐은 45 kDa의 단백질이라 생각하며, 여러 음식물 알레르겐과 마찬가지로 열과 소화 효소에 대한 저항성이 있었다.

앞으로의 연구에서는 AK가 다른 종의 음식물 섭취시 교차반응 유무를 확인하는 연구가 필요하며, 이는 새우 알레르기의 발병기전을 밝히고 진단법 개발에 기초자료가 되리라 생각한다.

결 론

본 연구에서는 국내산 중하의 주알레르겐이 AK임을 아미노산 서열 분석을 통해 규명하였고, 이는 열과 소화 효소에 내성이 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Leung PS, Chow WK, Duffey S, Kwan HS, Gershwin ME, Chu KH. IgE reactivity against a cross-reactivity allergy in crustacea and mollusca: Evidence for Tropomyosin as the common allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1996;98:954-61
- 2) Asturias JA, Gmez-Bayn N, Arilla MC, Martinez A, Palacios R, Sanchez-Gascn F, et al. Molecular characterization of American cockroach Tropomyosin(*Periplaneta americana* allergen7), a cross-reactive allergen. *J Immunol* 1999;162:4342-8
- 3) Hoffman DR, Day ED Jr, Miller JS. The major heat stable allergen of shrimp. *Ann Allergy* 1981;47:17-22
- 4) Leung PS, Chu KH, Chow WK, Ansari A, Bandea CI, Kwan HS, et al. Cloning, expression and primary structure of *Metapenaeus ensis* tropomyosin, the major heat stable shrimp allergen. *J Allergy Clin Immunol* 1994;94: 882-90
- 5) Daul CB, Slattery M, Reese G, Lehrer SB. Identification of the major brown shrimp (*Penaeus aztecus*) allergen as the muscle protein tropomyosin. *Int Arch Allergy Immunol* 1994: 105:49-55
- 6) Daul CB, Slattery M, Morgan JE, Lehrer SB. Isolation and characterization of important 36kD shrimp allergen[abstract]. *J Allergy Clin Immunol* 1991;87:192
- 7) Yu CJ, Lin YF, Chiang BL, Chow LP. Proteomics and immunological analysis of a novel shrimp allergen, Pen m 2. *J Immunol* 2003;170:445-53
- 8) Furukohri T, Okamoto S, Suzuki T. Evolution of phosphagen kinase (III). Amino acid sequence of arginine kinase from the

- shrimp *Penaeus japonicus*. *Zoolog Sci* 1994;11:229-34
- 9) Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN, et al. Trypanosoma cruzi arginine kinase characterization and cloning. *J Biol Chem* 2000;275:1495-501
 - 10) Kucharski R, Maleszka R. Arginine kinase is highly expressed in the compound eye of the honey bee, *Apis mellifera*. *Gene* 1998;211:343-9
 - 11) Dumas C, Camonis J. Cloning and sequence analysis of the cDNA for arginine kinase of lobster muscle. *J Biol Chem* 1993;268:21599-605
 - 12) Yagami T, Haishima Y, Nakamura A, Osuna H, Ikezawa Z. Digestibility of allergens extracted from natural rubber latex and vegetable foods. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:752-62
 - 13) Yoon SH, Choi JH, Suh YJ, Suh CH, Nahm DH, Park HS, et al. Specific IgE determination to shrimp (*Metapenaeus joyneri*) and identification of its allergen. *Korean J Med* 2003;65:231-8
 - 14) Nagpal S, Rajappa L, Metcalfe DD, Rao PV. Isolation and characterization of heat-stable allergens from shrimp (*Penaeus indicus*). *J Allergy Clin Immunol* 1989;83:26-36
 - 15) Daul CB, slattery M, Morgan JE, Lehrer SB. Common crustacea allergen. Identification of B cell epitopes with shrimp specific monoclonal antibodies: in kraft D, Schon A (eds.): *Molecular biology and immunology of allergens*, Boca Raton, CRC. p 291-294, 1993
 - 16) Kotlyar S, Weihrauch D, Paulsen RS, Towle DW. Expression of arginine kinase enzymatic activity and mRNA in gills of the euryhaline crabs *Carcinus maenas* and *Callinectes sapidus*. *J Exp Biol* 2000;203:2395-404
 - 17) Binder M, Mahler V, Hayek B, Sperr WR, Scholler M, Prozell S, et al. Molecular and immunological characterization of arginine kinase from the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*, a novel cross-reactive invertebrate pan-allergen. *J Immunol* 2001;167: 5470-7
 - 18) Heyman M: Evaluation of the impact of food technology on the allergenicity of cow's milk proteins. *Proc Nutri Soc* 1999; 58:587-92
 - 19) Helbling A, Bonadies N, Brander KA, Pichler WJ. Boletus edulis: a digestion-resistant allergen may be relevant for food allergy. *Clin Exp Allergy* 2002;32:771-5
 - 20) Fernandez RM. Cross-reactivity between fruit and vegetables. *Allergol Immunopathol* 2003;31:141-6
 - 21) Crespo JF, Pascual C, Helm R, Sanchez-Pastor S, Ojeda I, Romualdo L, et al. Cross-reactivity of IgE-binding components between boiled Atlantic shrimp and German cockroach. *Allergy* 1995;50:918-24