



Diphtheria 독소 생산 기전에 관한 연구*

Studies on the Mechanism of Toxin Production in *Corynebacterium Diphtheriae*

서울대학교 의과대학 미생물학교실

장 우 현 · 신 용 우

서 론

diphtheria 독소는 *C. diphtheriae*가 산출하는 강력한 체외독소로 디프테리아 병인에서 가장 중요한 역할을 하는 요소이다. 이 독소는 분자량이 72,000이고, 정제한 독소는 mg 당 3,200Lf에 해당하는 일종의 단백질이다. 순수 정제하여 결정이 가능한 것으로¹⁾ 1MLD는 10^{-5} Lf에 해당한다. 또 항원성이 있으며, 무독화시켜 예방 접종액으로 사용된다.

디프테리아의 병적기전을 이해하는데 있어서 균체가 어떻게 극소부위에 정착하여 증식하며, 어떤조건하에서 독소가 합성되고 방출되며, 또 독소분자의 성질과 독소에 의한 숙주조직세포의 파괴등을 연구하는것은 중요한 문제점들이다. 따라서 diphtheria 독소 생산기전에 대한 연구는 여러 학자들에 의해 많이 진행되어 왔다. 즉 Freeman²⁾ 및 Growman³⁾ 등은 *C. diphtheriae*가 특종 phage의 lysogenic 상태에서만 독소가 생산된다는것을 증명하였고, Pappenheimer⁴⁾는 배지내의 철분함량이 독소생산과 밀접한 관계가 있다고 하였다. Barksdale⁵⁾ 등은 독소가 많이 방출되는 시기에 생균수의 감소와 성숙 phage의 증가가 온다고 하였다. van Hemert⁶⁾ 등은 계속적으로 공기를 공급하면서 배양하여 2배나 더 많은 독소를 얻었다. Raynaud⁷⁾ 및 Van Hemert⁸⁾는 독소가 대수증식기에 방출되기 시작하여 증식최퇴기에 이르기까지 계속 방출된다고 지적하였다. 그러나 Hirai⁹⁾ 등은 특수 배지 환경에서 세균의 증식없이 3시간동안 계속 독소가 합성됨을 관찰하였다.

본 실험에서는 diphtheria 독소 생산기전을 이해하기 위하여 철분을 가한 배지와 가하지 않은 배지에서 세균 증식에 따른 독소생산과 세포형질내 독소의 변화를 관찰하였다.

실험재료 및 방법

1. 균 주

C. diphtheriae P.W. 8를 사용하였다.

2. 배 지

Mueller 및 Miller¹⁰⁾의 Casein 가수분해 배지를 Barksdale¹⁰⁾ 등이 개량한 Calcium Pantothenate-Glutamate-Tryptophan(이하 PGT로 약기함) 액체배지를 사용하였다.

3. 세균배양

*C. diphtheriae*를 3일 계대 배양하여 1회 신선 PGT로 씻은 것을 평균으로 사용하였다. pH 지시약으로 phenol red를 배지에 최종농도가 0.001%(W/V)가 되게 넣고 배양기간중 계속 중성을 유지하기 위하여 1-N NaOH로 수정하였다. 배지를 1,000ml Erlenmyer Flask에 230ml 넣고 O.D.가 1.5 혹은 1.65(590nm)가 되게 식균하고 35°C에서 240 RPM으로 회전진탕배양하였다.

4. 세포형질제조

배양 5시간마다 20ml씩 검체를 취하여 원침하여 얻은 균체를 M/15 Phosphate buffer pH7.4로 3회 씻고 5~6ml phosphate buffer로 다시 부유액을 만들었다. 이것을 Bronson sonifier로 초음파(10kc)를 6~10회 2분간씩 작용시켜 세균을 파괴하였다. 이것을 0°C에서 12100×g로 40분간 원심 침전시켜 그 상청을 세포형질로 사용하였다.

5. Diphtheria 독소 측정

가) Ramon Flocculation법¹¹⁾에 의해서 측정하고 Lf치로 표시하였다.

표준항독소는 Michigan Department of Health에서 분양받은 Diphtheria antitoxin, enzyme treated horse origin, Lot No. B492 10,000unit를 M/15 PBS pH7.2로 100unit/ml이 되게 희석하여 사용하였다.

나) MRD, 체중 2kg 내외되는 백색 토끼를 탈모제로

* 본 연구의 소요경비의 일부는 1972년도 서울대학교 학술재단 연구조성비 및 CMB Research Grant 71-210 #2 389/71로 충당되었음

(wheat starch 180gm, Zinc oxide 105gm, barium sulfide 180gm 을 물로 갠것) 털을 제거한 피부에 세포형질을 0.5% pepton phosphate buffer pH7.4로 희석하여 0.1ml씩 주사하였다. 세포형질을 주사하고 3시간 30분 후에 diphtheria 항독소 3,000unit 를 귀정맥에 주사하고 판독은 세포형질 주사후 44시간에 하였다. 피부에 붉은 발적반응이 생긴것을 양성으로 판독하고, 직경 3-4mm 이하의 반응은 음성으로 판독하였다.¹²⁾ MRD는 세포형질단백 1mg 당으로 표시하였다.

6. 단백질 측정

Lawry 등¹³⁾의 방법을 개량한 Vance¹⁴⁾법에 준하였다.

실험 결과

1. *C. diphtheriae*의 증식과 *diphtheriae* 독소 생산 배양시간에 따르는 세균의 증식양상과 *diphtheria* 독소 생산과의 관계를 관찰하기 위하여 PGT+Fe⁺⁺ 5r/ml

및 PGT 배지에 phenol red 를 가하고 배양기간중 pH를 계속수정하여 증식을 유지한것과 pH를 수정하지 아니한것에 *C. diphtheriae* PW 8의 농도가 O.D. 1.5~1.65가 되게 식균하여 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 및 45시간 배양액을 각각 채취하여 세균의 증식 및 배양액내의 독소를 측정하였다.

1) PH 를 수정한 PGT 에서는 OD가 1.65에서 5시간에 5, 10시간에 8.1로 급격히 상승하고 15시간에는 O.D.가 9.3, 20시간에는 10으로 되어 증식이 완만해지고, 25시간부터는 10.7 내지 10.8로 OD의 증감이 없었다. (도 1 참조) *diphtheria* 독소 생산은 5시간에는 3Lf/ml 이하였다가 30 Lf/ml, 50 Lf/ml로 배양시간에 따라 증가하여 35시간에 70 Lf/ml로 되어 45시간까지 변동이 없었다. (도 1 참조)

2) pH 를 수정한 PGT+Fe⁺⁺ 5r/ml 배양에서는 O.D.가 1.5에서 5시간에 4.6, 10시간에 7.3으로, 15시간에

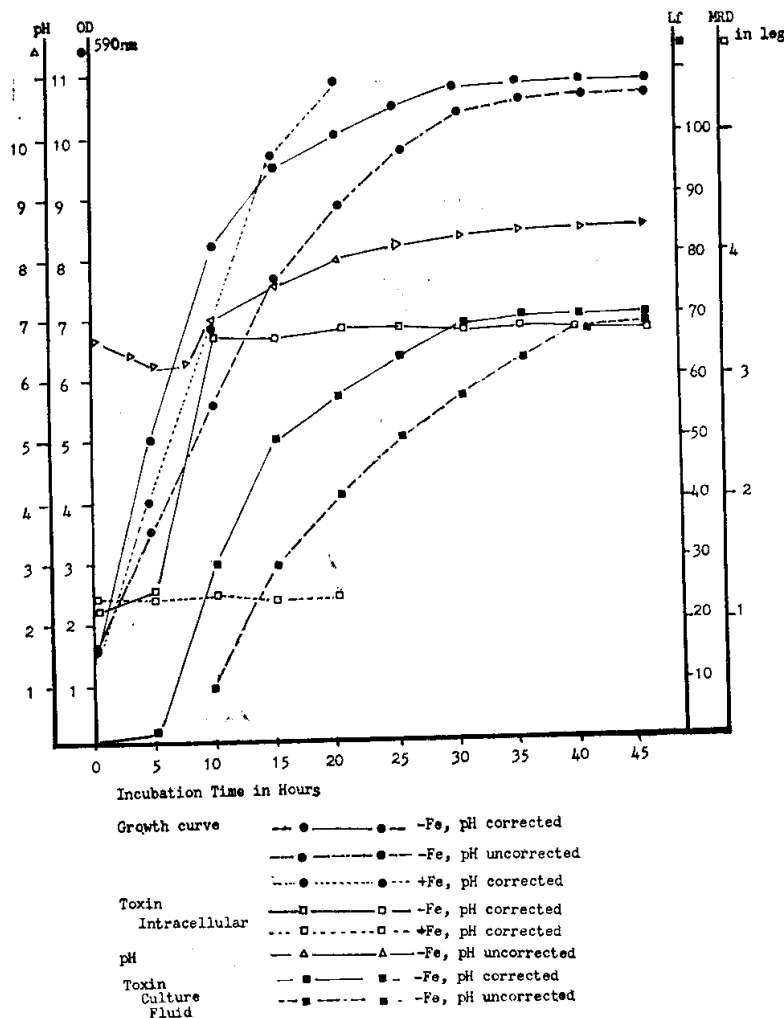


Fig. 1. The Growth, pH change and Toxin Production of *C. diphtheriae*, PW 8.

Table 1. Toxin Lf/OD/hour in each 5 hours interval of incubation.

Time incubated (hours)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Toxin Lf/OD/hour	0	0.4	3.48	2.15	0.8	0.57	0.37	0.18	0	0

9.4로 20시간에 10.8로 각각 증가하였다. diphtheria 독소는 모든 배양액에서 Flocculation 법으로는 측정할 수 없었으나 5시간 배양후에 10^3 MRD/ml 이 생산되어 20시간까지 독소생산량에는 별 변동이 없었다.

3) pH를 수정하지 아니한 PGT에서는 O.D.가 1.65에서 5시간에 3.4, 10시간에 5.5, 15시간에 7.6으로 20시간에는 8.1, 25시간에는 9.5로, 30시간에는 10.2로 증가되고 35, 40 및 45시간에는 큰 변동없이 10.5였다. diphtheria 독소 생산은 10시간 배양액에서 10 Lf/ml였으며 차차 증가하여 40시간에 70Lf/ml에 달하였다. (도 1 참조)

배양 기간중 C. diphtheria가 생산하는 독소량을 시간별로 O.D.당 diphtheria 독소를 계산해보면 제 1표와 같다.

즉 균의 증식이 시작되면서 독소가 생산되었으며 가장 많이 독소가 생산되는 시기는 10시간 배양때로 3.48 Lf/OD/hr였으며 그후부터 점차 감소되어 40시간배양 이후부터는 독소가 생산되지 않았다. 배양액에서 측정되는 누적독소량은 35시간 이상 배양에서 최고에 달하였다.

2. pH의 변화

C. diphtheriae의 배양중 pH의 변화는 배양 7시간에 pH6.0으로 떨어졌다가 서서히 상승되기 시작하며 25시간에 pH 8로 되고 그후는 별로 변동이 없었다. (도 1 참조) 즉 C. diphtheriae의 증식이 가장 왕성한 기간에 pH가 떨어졌다가 증식이 완만해 짐에 따라 다시 pH의 상승이 있고, 균의 증식이 거의 정지되면 pH의 변화도 없는 것으로 보였다.

3. 세포형질내의 독소량

Sonicator로 배양한 균을 파괴하여 얻은 세포형질내 diphtheria 독소는 PGT pH수정배지에서는 5시간까지는 3×10^2 MRD/mg protein이었으며, 10시간이후부터는 45시간까지 배양시간의 차이 없이 2×10^3

MRD/mg protein내외였다. 한편 PGT+Fe⁺⁺57/ml pH수정배지에서는 20시간 배양까지 거의 변동없이 3×10^2 MRD/mg protein였다. (도 1 및 표 2참조) 즉 철분을 가한 배지에서 발육한 C. diphtheriae의 세포형질은 철분을 가하지 않은 배지에서 발육한 C. diphtheriae세포형질과 비교하여 diphtheria 독소의 함량이 약 1/10이었으나 배양시간에 따르는 세포형질내 독소량의 차이는 모두 없는 것으로 해석되었다.

고 안

Diphtheria toxin은 C. dipheniae가 특종 phage에 lysogenic^{27, 3)} 상태이고 배지내 철분농도가 일정량이 이하⁴⁾ 생산된다.

Van Hemert⁶⁾ 등은 배양시에 공기의 공급을 1l/min 했을때가 0.25 l/min 했을때 보다 약 2배 더 많은 diphtheria 독소가 생산된다고 하였다. Righelato¹⁵⁾ 등은 배지내에 과량의 glucose가 함유되었을때는 균의 증식은 높으나, 독소 생산량은 glucose의 양을 제한했을때 보다 소량 생산된다고 하였다.

Raynaud⁷⁾ 및 Van Hemert⁶⁾는 세균이 증가함에 따라 독소생산도 증가하여 잠복기를 지나 대수증식기에 diphtheria 독소가 방출되기 시작하여 증식최퇴기에 이르기까지 계속 방출된다고 지적하였다. 그러나 Hirai⁸⁾ 등은 특수배지환경에서 세균의 증식없이 3시간동안 계속 diphtheria 독소가 방출됨을 관찰하였다.

Barksdale¹⁴⁾은 독소생산이 가장 왕성한 시기에 생균수의 감소가 심하고 성숙 phage의 배출이 증가한다고 하였다. 그러나 Pappenheimer¹⁰⁾는 독소는 아미노산에서 de novo 합성되는 것이며 세균체외로 방출되는것과 세균의 용균과는 별관계가 없을것이라고 하였다. 본 실험에서 보면 pH를 수정한 PGT 배지에서는 세균의 대수증식기에 독소 생산율이(Lf/OD/hour) 3.4로 가장 높았으며 세균증식이 정지한 40시간에서는 독소 생산율은

Table 2. Intra-and Extra cellular toxin of C. diphtheriae PW 8. cultured in pH corrected PGT medium

Time incubated	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Extracellular toxin (Lf/ml)	2	30	50	58	64	68	70	70	70
Intracellular toxin (MRD/mg protein)	3.84×10^2	2.02×10^3	2.02×10^3	3.12×10^3	3.27×10^3	2.08×10^3	3.44×10^3	2.36×10^3	2.15×10^3

0이었다.

PGT+Fe⁺⁺5r/ml에서는 PGT에서보다 세균증식은 좋았으나 독소생산은 10³내지 10⁴ MRD/ml였다. 또 pH를 수정하지 아니한 PGT 배양에서는 세균의 증식속도가 pH를 수정한 배지에서 보다 늦었으나 40시간이후에서는 같아졌고 여기에 따라 독소 생산도 저조하였으나 35 내지 40시간의 배양액내 총독소량은 동일하였다. 즉 배지의 pH를 세균증식에 따라 중성으로 유지하여 주는 것은 세균의 분열증식시간을 단축시켜주고 따라서 세균의 독소생산시기를 단축시켜 주는 것으로 해석되었다. 실제로 pH의 변화는 배양 6내지 9시간까지는 계속 산성으로 떨어지며 이때 세균은 O. D 1.5에서 4.5로 급격한 증식을 보였다. pH는 다시 상승하여 10시간만에 pH7.0으로 되며, 그후부터는 계속 상승하여 25시간후부터는 pH8.0을 유지하였다. 세균증식도 정지기에 들어갔으며 독소생산율은 0.57 내지 0.37로 저하되었다.

Raynaud⁽²⁾는 세포형질내 독소함량은 전체독소량의 0.05%에 불과하다고 하였다. 이는 독소가 합성되는데로 즉시 거의 완전히 방출되기 때문에 세균체내에는 거의 없을것이라고 하였다. 실제로 세균체를 초음파처리하여 얻은 세포형질내 독소량은 10시간 배양후부터는 45시간까지 2×10³ MRD/mg protein 정도로 거의 변동이 없었다. 한편 PGT+Fe⁺⁺5r/ml에서 배양된 균의 세포형질내에 3×10³MRD/mg protein 정도의 독소는 함유하고 있었으나 시간에 따른 변동은 없었다.

총 관

Corynebacterium diphtheriae PW8가 독소를 생산하는 기전을 이해하기 위하여 PGT 배지 및 PGT+Fe⁺⁺5r/ml 배지에 균을 배양하여 다섯시간 간격으로 검체를 채취하여 균의 증식, 독소량, 및 pH 등을 측정하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

1. pH를 계속 수정한 PGT에서의 독소생산은 10시간 배양때가 가장 활발하였으며 독소생산율은 3.4Lf/OD/hr였다.

2. pH를 수정하지 아니한 PGT에서는 독소생산은 늦었으나 35시간 후부터는 pH를 수정한것과 동일하였다.

3. PGT+Fe⁺⁺5r/ml 배지에서도 10³MRD/ml의 독소를 생산하였다.

4. 세포형질내 독소량은 철분을 가한 배지에서는 3×10³MRD/mg protein 이었고 철분을 가하지 않은 배지에서는 2×10³MRD/mg protein 이었으며 배양시간에 따라 별차이가 없었다.

ABSTRACT

Studies on the Mechanism of Toxin Production in Corynebacterium Diphtheriae

Woo-Hyun Chang and Yong-Woo Cinn

Department of Microbiology, College of Medicine,
Seoul National University

Corynebacterium diphtheriae produces potent exotoxin which acts a major role in the pathogenesis of diphtheria. To understand the pathogenesis of diphtheria, we must explain how the organisms become established in the local lesion, understand the conditions under which toxin is synthesized and released by the C. diphtheriae and elucidate the nature of the toxin molecule and the mechanism by which it kills the susceptible host.

Diphtheria toxin is only synthesized by the strains of C. diphtheriae which are lysogenic for particular bacteriophage and which are growing under conditions of limiting iron content in the culture media. The toxin is released into the external culture media as it is formed during the growth and only trace can be detected from the bacteria themselves.

Barksdale and his co-worker suggest that under certain conditions induction of prophage to the vegetative state by ultraviolet radiation may accelerate the release of toxin and enhance its yield several fold. Pappenheimer and his co-worker showed that toxin protein was synthesized de novo from amino acid by growing organisms.

In the present work we have followed intracellular and extracellular toxin production, pH change, and growth of C. diphtheriae PW 8 growing in iron free and iron containing medium. The results are summarized as follows.

1. The highest toxin production was obtained at 10 hour culture in pH corrected iron free medium. The toxin production rate at 10 hour was 3.4 Lf/OD/hour.

2. In the pH uncorrected iron free medium toxin production was slow but accumulated toxin value was the same as that in pH corrected iron free medium after 35 hour culture.

3. 10³ MRD/ml of toxin was detected in iron containing culture fluid.

4. Intracellular toxin of iron free culture was 2×10³ MRD/mg protein and that of iron containing culture was 3×10² MRD/mg protein.

REFERENCES

1. Pope C. G., and Stevens, M. F.: *The purification of diphtheria toxin and the isolation of crystalline toxin-protein*. *Brit. J. Exp. Path.* 39:139-149, 1958.
2. Freeman V. J.: *Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol* 61:675, 1951.
3. Growman N.: *Evidence for the induced nature of the change from nontoxigenicity to toxigenicity in corynebacterium diphtheriae as results of exposure to specific bacteriophage*. *J. Bacteriol* 66:184, 1953.
4. Pappheimer, A. M. Jun.: *The pathogenesis of diphtheria* *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* 5:40, 1955.
5. Barksdale W. L., and M. Matsuda: *Phage-directed synthesis of diphtherial toxin in nontoxicogenic corynebacterium diphtheriae*, *Nature* 210. 5039:911-913, 1966.
6. Van Hemert, P. A. and A. L. Van Wezel: *International symposium, on Biotechnical Developments in Bacterial Vaccine Production, Stockholm 1965; Symp. Series Immunobiol. Standard, vol. 3, 221-228, 1966.*
7. Raynaud M.: *Relation between growth and toxin synthesis, symp. Series Immunobiol Standard 3: 183, 1966.*
8. Hirai, T. Uchida, Y. Shinmen, and M. Yoneda: *Toxin production by Corynebacterium diphtheriae under growth-limiting conditions* *Biken Journal* 9:19-31, 1966.
9. Mueller, J. H., and P. A. Miller: *Production of diphtheria toxin of high potency (100Lf) on a reproducible medium* *J. Immunol.* 40:21-32, 1941.
10. Barksdale, W. L., and A. M. Pappenheimer Jr., *phage-host relationships in nontoxicogenic and toxicogenic diphtheria bacilli* *J. Bacteriol.* 67:220-232, 1954.
11. Ramon G.: *Floculation dans un milange neutre de toxin-antitoxin diphtherique*, *C. R. Soc.* 86:661, 1922.
12. Jerne, N. K.: *A study of avidity based on rabbit skin responses to diphtheria toxin-antitoxin mixture* *Acta. Path. Microbiol. Scand. Suppl.* 24-45, 1951.
13. Lowry, O. H.: *J. Biol. Chem.* 193:265, 1951.
14. Vance I, Oyama and Harry Eagle, : *Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol Reagent, Proc. Exp. Biol. Med.* 91:305-307, 1956.
15. Righelato, R. C. and P. A. Van Hemert: *Growth and toxin synthesis in Batch and Chemostats culture of Corynebacterium diphtheriae*, *J. Gen. Microbiol.* 58:403-410, 1969.
16. Pappenheimer A. M. Jun, P. A. Miller, and M. Yoneda: *Kinetics of diphtheria toxin formation*, *J. Gen. Microbiol.* 28:539, 1962.