

버섯 추출물로부터 *Acanthamoeba castellanii*의 세포외 Serine 단백질분해효소 저해제 탐색

이승은¹ · Sandesh Sancheti¹ · Shruti Sancheti¹ · 최미영² · 서승엽^{1,3*}

¹공주대학교 자연과학대학, ²선문대학교 건강과학대학, ³(주) 약용자원콜렉션

Screening of Inhibitors of Extracellular Serine Protease of *Acanthamoeba castellanii* from Mushroom Extracts

Seung-Eun Lee¹, Sandesh Sancheti¹, Shruti Sancheti¹, Mieyoung Choi² and Sung-Yum Seo^{1,3*}

¹College of Natural Science, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

²College of Health Sciences, SunMoon University, Asan 336-708, Korea

³Korean Collection of Herbal Extracts, Inc., Kongju 314-701, Korea

(Received November 26, 2008. Accepted December 18, 2008)

ABSTRACT: Although the number of patients with *Acanthamoeba* keratitis has increased dramatically since the widespread use of contact lens, it is still very hard to cure the disease. The proteases from the *Acanthamoeba* were reported to play important role in the pathogenesis of keratitis. In this study, the inhibitors for extracellular serine proteases of *A. castellanii* were screened from the extracts of 230 mushroom samples collected from various regions of Korea. The mushrooms were extracted with methanol and water (65°C). Filtered and concentrated extracts (0.3 mg/ml) were preincubated with proteases before addition of peptide substrate N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-anilide. The selected extracts showing strong inhibitory effects were characterized. Although inhibition with single extract was not so high enough, the complete inhibition was achieved with combination of two extracts. The selected extract showed little effect on other serine proteases such as thrombin (human and bovine) and on general protease such as protease K.

KEYWORDS : *Acanthamoeba castellanii*, Inhibitor, Keratitis, Mushrooms, Protease

각막염은 실명을 가져올 수 있는 파괴적인병인데 *Acanthamoeba castellanii*는 이 병의 중요한 발병원인들 중 하나이다. *Acanthamoeba*에 의한 각막염은 1974년에 발생이 보고된 후 최근 콘택트렌즈의 착용이 증가하면서 그 발생빈도가 괄목하게 증가한다고 보고되었다(Beatie *et al.*, 1990; Davis *et al.*, 1987; Gatti *et al.*, 1998; Ishibashi, 1997; Logar and Kraut, 1997; Murdoch *et al.*, 1998, Schaumberg *et al.*, 1998). 그러나 아직도 *A. castellanii*에 의한 각막염은 치료가 상당히 어려운 실정인 데, 이는 *Acanthamoeba* 균주에 따라 항생제에 대한 감수성에 차이가 많고 각막에서 이 아메바를 사멸시킬 수 있는 농도를 얻기가 어렵기 때문이다(Illingworth and Cook, 1998).

*Acanthamoeba*에 의해서 생긴 각막염은 herpes 바이러스에 의한 각막염으로 오진되기 쉽고(Wang *et al.*, 1997), 아픈 통증이 특징이며 (Larkin and Easty, 1990; McCulley *et al.*, 1995), 병증은 *A. castellanii*에서 나오는 대사산물로 인해 세포내 칼슘의 농도가 높아져 생긴다(Mattana *et*

al., 1997). 각막염은 한 때 물리적인 용해과정이라고 생각되었지만 이런 관점이 세포외 세포간질(matrix)을 분해하는 활성이 궤양이 일어난 각막으로부터 보고된 후 바뀌게 되었고 그 후의 연구를 통해 matrix metalloprotease family가 궤양과정의 시작, 용해, 재생 단계에 깊이 관여한다는 사실이 알려졌다(Fini *et al.*, 1998; He *et al.*, 1990).

*A. castellanii*의 감염기작에 대한 연구를 통해 이 아메바가 각막 표면에 부착된 다음 각막을 뚫고 들어가 손상을 일으키는 것이 밝혀졌으며(Niederkorn *et al.*, 1992), *in vitro*에서 각막에 부착하는 과정은 온도에 민감하여 35, 25°C에서는 부착되지만, 4°C에서는 부착되지 않는다는 사실이 밝혀졌다(Morton *et al.*, 1991). 또한 각막에서의 부착기작에 대한 연구 결과 *Acanthamoeba*의 mannose 결합 단백질과 각막의 mannose 사이의 상호작용으로 이 아메바가 각막에 부착되며(Cao *et al.*, 1998), 손상된 각막에서는 mannose가 더 많이 노출되어 아메바의 침입을 용이하게 되며(Jaison *et al.*, 1998), 인위적으로는 methyl- α -D-galactoside가 *Acanthamoeba*의 부착을 억제할 수 있음이 밝혀졌다(Yang *et al.*, 1997). 특히 콘택트렌즈에 의한 감

*Corresponding author <E-mail : dnalove@kongju.ac.kr>

염에 대한 연구 결과 수성렌즈에는 아메바가 덜 부착되며 또 적절한 세척액을 사용하면 *Acanthamoeba*의 오염을 효과적으로 저감시킬 수 있음이 밝혀졌다(Kilvington and Larkin, 1990).

아직까지 완전한 치료제는 개발되지 않았으나 새로운 치료제를 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되는 중이다(Linquist, 1998; Tahara *et al.*, 1997). 각막염의 치료에는 초기치료가 가장 중요하며, 초기진단을 위해서는 최근 polymerase chain reaction(PCR) 방법이 사용되고 있다(Lehmann *et al.*, 1998).

Amebicidal 활성을 나타내는 물질이 식물 추출물 중에서 탐색되어 그 결과가 보고되어(Chu *et al.*, 1998), 본 연구에서는 국내 자생 버섯의 추출물로부터 *A. castellanii*의 세포의 serine 단백질분해효소의 저해제를 탐색하였다.

재료 및 방법

버섯의 채집

1997년 7월부터 1998년 10월까지 비온 뒤 2~3일간 충청남도의 여러 지역과 강원도 강원대 연습림 및 전남 지리산에서 여러 차례에 걸쳐서 230종의 버섯을 채집하였다.

버섯 표본의 보존

버섯 채집 후 즉시 버섯의 특징을 기술하고 사진 촬영하였으며, 휴지에 싸서 45°C에서 건조시켜 작은 봉지에 넣어서 실온에서 보관하였다.

시약 및 균주

실험에 사용한 N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-anilide(*Acanthamoeba*의 단백질분해효소의 기질), N-p-tosyl-gly-pro-arg p-nitroanilide(사람과 소 트롬빈의 기질), 사람과 소의 thrombin, protease K, casein 그 외 시약들은 Sigma 사로부터 ACS급 이상을 구입하여 사용하였고 추출에 사용된 메탄올은 덕산화학에서 구입하였다. 실험에 사용된 균주 *A. castellanii*는 경희대학교 자연대 생물학과 나병국 박사로부터 분양 받았다.

버섯 추출물의 준비

버섯을 분류 동정한 후 버섯이 충분히 잠길 만큼 메탄올을 넣어 한 달간 그늘진 곳에서 침지시킨 후 추출액을 여과하여 진공농축하였다. 메탄올을 다시 첨가한 후 위와 같이 침지, 여과, 농축하여 위의 농축액과 합쳤다. 메탄올로 2번 추출된 샘플에다 다시 물을 첨가한 후 65°C에서 24시간 동안 침지시킨 후 추출액을 여과 농축시켰으며, 농축된 모든 추출물은 -20°C 냉동실에 보관하였다.

*A. castellanii*의 배양

1리터 플라스크에 200 ml의 PGY배지(proteose peptone

2%, yeast extract 2%, NaCl 1%, 5 mM sodium phosphate dibasic, 5 mM potassium phosphate monobasic)를 넣고 *A. castellanii*를 접종하여 7일간 배양하여 배양액을 만들고 이 배양액을 동일한 배지에 1%로 접종하여 실온에서 5~7일 동안 정치배양 하였다.

A. castellanii 단백질분해효소의 분리

배양된 *A. castellanii*(1리터)를 원심분리하여(3000 g, 4°C, 10분) 상등액을 분리하고 이 상등액에 ammonium sulfate를 80%가 되게 천천히 첨가한 후 원심분리하여(30,000 g, 4°C, 30분), 침전된 단백질분해효소를 얻었다. 침전된 단백질을 투석용액(0.05 M sodium phosphate, 0.1% PEG, pH 8.0)에 녹인 후 투석막에 넣어 한 시간 간격으로 1리터의 투석용액을 세 번 바꾸며 투석했다. 효소활성을 확인한 후 얻은 효소를 소형 원심분리관에 300 μ l씩 넣어서 -20°C에서 냉동보관하였다.

A. castellanii 단백질분해효소의 활성측정

단백질분해효소의 활성은 Rottenberg 등(26)의 방법으로 측정하였다. 반응용액(0.05 M sodium phosphate, 0.1% PEG, pH 8.5) 0.4 ml에 5% DMSO에 녹인 발색기질 N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-anilide를 40 μ l을 넣고(최종농도 58 μ M) 37°C 수조에서 5분간 배양한 후 60 μ l의 효소액(원액의 농도, 단백질 30 mg/ml)을 혼합하고 1시간 반응시킨 뒤 반응정지용액(0.11 M trichloroacetic acid, 0.22 M acetic acid, 0.33 M sodium acetate) 0.5 ml를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 바로 흡광도(405 nm, Ab₄₀₅)를 측정하여 활성을 조사하였다.

저해제 스크리닝

0.4 ml의 효소 반응용액에 효소액 60 μ l을 혼합한 후 추출물을 최종 농도가 0.3 mg/ml 되도록 첨가하여 37°C에서 5분간 배양하고 기질을 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후 활성을 조사하여 버섯추출물을 넣지 않은 대조구의 활성과 비교하여 억제효과가 좋은 버섯 추출물을 선별하였다. 또한 선별된 추출물의 농도를 달리하면서 억제효과를 조사하였다.

트롬빈의 활성조사

사람과 소의 트롬빈 활성은 Rottenberg 등(1981)의 방법을 약간 수정하여 조사하였다. 1 ml의 트롬빈 반응용액(0.05 M sodium phosphate, 0.1% polyethylene glycol 8000)에 기질 N-p-Tosyl-gly-pro-arg p-nitroanilide(0.1 mM)과 트롬빈(10 unit)을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응을 진행시키고 HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 Ab₄₀₅를 측정하여 활성을 조사하였다. 또한 0.5 mg/ml의 버섯 추출물과 효소를 혼합하고 5분간 배양하고 기질을 첨가한 후 활성을 조사하여 추출물이 효소에 미치는 영향을 조사하

었다.

Protease K의 활성

Reimerdes와 Klostermeyer(1976)의 방법에 따라 활성을 조사하였다. 0.3 mg/ml의 버섯 추출물과 효소를 혼합하고 5분간 배양한 후 기질인 casein을 첨가하여 활성을 조사하여 추출물이 효소에 미치는 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

*A. castellanii*에 의해서 생기는 각막염은 실명을 가져오는 무서운 질병이지만 아직까지 치료제가 없으며, 더욱이 최근 contact 렌즈의 사용이 늘면서 이 아메바에 의한 각막염이 급증하고 있는 추세이다. *A. castellanii*에 의한 각막염의 발병에는 이 아메바가 분비하는 세포의 serine 단백질분해효소가 깊이 관여한다는 사실이 밝혀져(Cao *et al.*, 1998; Leher *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2000), 본 연구에서는 *A. castellanii*의 단백질분해효소를 억제하는 물질을 국내에 자생하는 버섯의 추출물로부터 선별하고자 하였다.

본 실험에서는 세포의 단백질을 80% Ammonium sulfate로 침전하여 얻어진 세포의 단백질을 효소로 사용하였다. Peptide 기질 N-succinyl-ala-ala-pro-phe p-anilide를 사용하여 효소의 활성을 측정하였을 때 효소활성이 serine 단백질분해효소 저해제인 0.1 mM diisopropyl fluorophosphate에 의해 98% 이상, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride에 의해 100% 저해되어서 이 효소가 이미 보고된 대로 serine 단백질 분해효소인 것을 뒷받침하였다(Cho *et al.*, 2000).

버섯 추출물 중에서 단백질분해효소 억제 활성이 뛰어난 추출물을 선별하기 위하여 채집된 버섯 230종의 메탄올 추출물이 활성에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였고 그 중에서 억제력이 우수한 버섯 추출물을 선별하였다. 선별된 버섯의 메탄올과 물 추출물이 활성에 어떤 영향을 미치는지 조사하여 Table 1에 나타내었다. 선별된 메탄올 추출물은 단백질분해효소의 활성을 55~93% 저해하였고 *Mycena polygamma*가 가장 높은 저해도를 보였다. 물 추출물은 이 보다 낮게 32~79% 저해하였고 *Mycena sp.*가

Table 1. Inhibition of protease activity of *A. castellanii* by different solvent extracts^a

Mushroom	Inhibition ^b (%)	
	methanol extract	water extract
<i>Mycena polygamma</i>	92±3	32±3
<i>Boletellus emodensis</i>	66±2	40±4
<i>Collybia confluence</i>	55±3	77±2
<i>Mycena sp.</i>	93±4	79±3

^aAll experiments were carried out in triplicates.

^bExtract was added to 0.3 mg/ml.

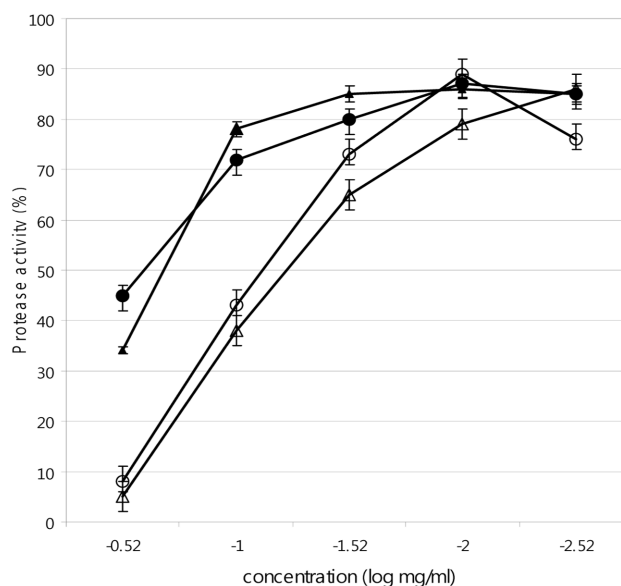


Fig. 1. The values of IC₅₀ were determined for each extract. Different amounts of *Mycena polygamma* (○), *Mycena sp.* (△), *Boletellus emodensis* (▲), or *Collybia confluence* (●) extracts were preincubated with protease and then protease activity were determined. All experiments were carried out in triplicates.

가장 높은 저해도를 보였다. 조사된 버섯 중 *Mycena polygamma*와 *Boletellus emodensis*는 메탄올 추출물에서 활성이 높은 반면 *Collybia confluence*는 물 추출물에서 활성이 높았으며 *Mycena sp.*는 물 추출물과 메탄올 추출물에서 비슷한 저해 활성을 나타내었다.

선별된 메탄올 추출물의 특성을 조사하기 위하여 추출물의 농도를 변화시키면서 효소활성에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었고 이 그림을 이용하여 IC₅₀을 결정하였는데, IC₅₀이 이중에서 높은 활성을 보이는 *Mycena polygamma*와 *Mycena sp.*에서는 각각 0.07, 0.06 mg/ml 이었고, 활성이 낮은 *Boletellus emodensis*에서는 0.2 mg/ml이며 *Collybia confluence*에서는 0.25 mg/ml 이었다(Fig. 1).

*A. castellanii*는 두 종류의 serine 단백질분해효소를 세포외로 방출하고 각막염 유발에는 두 효소가 다 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다(Mitra *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1998; Leher *et al.*, 1998; Cho *et al.*, 2000; Kahn *et al.*, 2000). 두 효소의 활성을 효과적으로 억제하는 물질이 가장 우수한 치료제로 개발될 수 있을 것임으로 본 연구에서는 두 효소를 동시에 억제하는 효소저해제의 탐색에 주안점을 두었지만, 본 연구에서 선별된 버섯 추출물은 완전히 활성을 억제하는 경우는 없었다. 이런 결과는 두 효소가 서로 다른 성질을 가져서 한 가지 추출물로 두 효소의 활성을 동시에 억제할 수 없음을 시사하는데, DEAE-cellulose 이온교환 크로마토그래피를 하면 한 효

Table 2. Inhibition of protease activity by two combined methanol extracts^a

Mushrooms		Inhibition ^b (%)
<i>Collybia confluence</i>	<i>Mycena polygamma</i>	85±2
	<i>Mycena</i> sp.	98±2
	<i>Boletellus emodensis</i>	60±3
<i>Mycena polygamma</i>	<i>Mycena</i> sp.	98±2
	<i>Boletellus emodensis</i>	78±3
<i>Mycena</i> sp.	<i>Boletellus emodensis</i>	96±2

^aAll experiments were carried out in triplicates.

^bEach extract was added to 0.15 mg/ml.

소는 이 컬럼에 붙지 않고 그대로 빠져 나오고 다른 한 효소는 강하게 붙어서 1.0 M NaCl로 떼어 낼 수 있다는 사실은 이를 뒷받침 한다.

한 추출물로 *A. castellanii*의 두 효소의 활성을 완전하게 저해하는 전략을 수정하여 두 버섯 추출물을 동시에 처리하여 두 효소의 활성을 억제하는 정도를 조사하여 두 효소의 활성을 완전히 저해할 수 있는 추출물 조합을 선별하였다(Table 2). Table 1에서 사용한 양의 반(0.15 mg/mg)의 메탄올추출물을 혼합하여 저해정도를 조사하였다. 이 농도에서 한 추출물만 사용한 경우에 저해정도는 *Mycena polygamma*에서는 64%, *Mycena* sp.에서는 68%, *Boletellus emodensis*에서는 25%, 그리고 *Collybia confluence*에서 32%의 저해를 보였다. 각각의 억제 정도가 약한 경우에도 두 버섯을 동시에 처리하면 효소의 활성을 완전하게 억제하였다(예 *Collybia confluence*와 *Mycena polygamma* 사이의 조합). 이 실험결과는 두 효소의 성질이 다르고 서로 다른 추출물에 의하여 달리 저해받는 것을 나타낸다. 그러나 더 정확하게 실험하려면 두 효소를 정제하여 실험하는 것이 필요할 것으로 생각된다.

Serine protease인 *A. castellanii*의 세포의 단백질분해효소를 저해하는 활성이 우수하여 선별된 버섯추출물이 다른 serine protease에도 같은 효과를 보이는 지를 조사하기 위하여 이 추출물이 인간과 소의 thrombin의 활성에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 선별된 모든 버섯은 인간과 소의 thrombin에 거의 영향을 미치지 않았다. 또 이 버섯 추출물이 다른 단백질분해효소인 protease K에 대하여 어떤 영향을 미치는지 조사한

Table 3. Effects of selected extracts on human and bovine thrombin activity and protease K activity^a

Mushrooms	Thrombin activity ^a (%)		Protease K ^b (%)
	human	bovine	
<i>Collybia confluence</i>	87±2	73±5	87±4
<i>Boletellus emodensis</i>	103±3	96±3	105±3
<i>Mycena polygamma</i>	103±4	81±4	103±4
<i>Mycena</i> sp.	98±3	70±2	107±5

^aAll experiments were carried out in triplicates.

^bExtract was added to 0.3 mg/ml.

결과 이 추출물은 다른 protease K에 대하여서도 영향을 미치지 않았다. 이런 결과는 본 연구에서 선별된 추출물이 다른 단백질분해효소에 대하여서는 큰 영향을 미치지 않으나 *A. castellanii*의 세포의 serine protease에는 특별히 억제작용을 할 수 있어, 본 연구에서 선별된 추출물이 각막염을 치료할 수 있는 물질로 개발될 수 있는 가능성이 있다.

적 요

콘택트렌즈의 착용이 증가하면서 알칸사아메바에 의한 각막염이 급증하지만 아직도 이병을 치료하기가 매우 어려운 실정이다. 이 아메바에서 나오는 serine 단백질분해효소는 각막염의 유발에 중요한 역할을 하고 있다고 알려졌다. 본 연구에서는 *A. castellanii*의 세포의 serine 단백질분해효소의 활성을 저해하는 능력이 우수한 추출물을 230종 버섯의 메탄올 추출물로부터 선별하였다. 버섯을 메탄올과 물(65°C)로 추출한 후 여과·농축하여 이 추출물을 0.3 mg/ml의 농도로 효소와 반응시킨 후 기질 N-succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-proline p-anilide을 넣고 효소의 활성을 측정하여 우수한 저해능을 가진 추출물을 선별하였다. 이렇게 선별된 추출물을 가지고 성질을 연구하였는데, 한 추출물로 활성이 완전하게 억제되지 않았으나 두 추출물을 조합하여 사용하면 활성을 완전하게 억제할 수 있었다. 이 추출물은 다른 serine 단백질분해효소인 인간과 소의 트롬빈과 일반적인 단백질분해효소인 Protease K에는 영향을 미치지 않았다.

감사의 글

버섯의 동정을 도와준 농업기술과학연구소의 김양섭, 석순자 박사, *Acanthamoeba castellanii*의 분양을 해 준 경희대학교의 나병국 박사와 버섯의 분류, 건조, 표본제작, 조직배양, 추출물제작, 도표제작을 도운 실험실원들에게 감사드린다.

참고문헌

- Beattie, A. M., Slomvic, A. R., Rootman, D. S. and Hunter, W. S. 1990. *Acanthamoeba* keratitis with two species of *Acanthamoeba*. *Can. J. Ophthalmol.* 25:260-262.
- Cao, Z., Jefferson, D. M. and Panjwani, N. 1998. Role of carbohydrate-mediated adherence in cytopathogenic mechanisms of *Acanthamoeba*. *J. Biol. Chem.* 273:15838-15845.
- Cho, J. H., Na, B. K., Kim, T. S. and Song, C. Y. 2000. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Acanthamoeba castellanii*. *IUBMB Life* 50:209-214.
- Chu, D. M., Miles, H., Toney, D., Ngyuen, C. and Marciano-Cabral, F. 1998. Amebicidal activity of plant extracts from Southeast Asia on *Acanthamoeba* spp. *Parasitol. Res.* 84:746-752.

- Davis, R. M., Schroeder, R. P., Rowsey, J. J., Jensen, H. G. and Tripathi, R. C. 1987. *Acanthamoeba* keratitis and infectious crystalline keratopathy. *Arch. Ophthalmol.* 105:1524-1527.
- Fini, M. E., Cook, J. R. and Mohan, R. 1998. Proteolytic mechanism in corneal ulceration and repair. *Arch. Dermatol. Res.* 290 Suppl:S12-23.
- Gatti, S., Cevini, C., Bruno, A., Penso, G., Rama, P. and Scaglia, M. 1998. *In vitro* effectiveness of povidone-iodone on *Acanthamoeba* isolates from cornea. *Antimicrob. Agent Chemother.* 42:2232-2234.
- He, Y. G., Niederkorn, J. Y., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Silvany, R. and Dogherty, J. 1990. *In vivo* and *in vitro* collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31:2235-2240.
- Illingworth, C. D. and Cook, S. D. 1998. *Acanthamoeba* keratitis. *Surv. Ophthalmol.* 42:493-508.
- Ishibashi, Y. 1997. *Acanthamoeba* keratitis. *Ophthalmologica* 211 Suppl 1:39-44.
- Jaison, P. L., Cao, Z. and Panjwani, N. 1988. Binding of *Acanthamoeba* to mannose-glycoproteins of corneal epithelium: effect of injury. *Curr. Eye Res.* 17:770-776.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L., Panjwani, N., Cao, Z. and Paget, T. A. 2000. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J. Clin. Microbiol.* 38:2858-2861.
- Kilvington, S. and Larkin, D. F. 1990. *Acanthamoeba* adherence to contact lenses and removal by cleaning agents. *Eye* 4:589-593.
- Larkin, D. F. and Easty, D. L. Experimental *Acanthamoeba* keratitis. 1990. I. Preliminary findings. *Br. J. Ophthalmol.* 74:551-555.
- Leher, H., Silvany, R., Alizadeh, H., Huang, J. and Niederkorn, J. Y. 1998. Mannose induces the release of cytopathic factors from *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* 66:5-10.
- Lehmann, O. J., Green, S. M., Morlet, N., Kilvington, S., Keys, M. F., Matheson, Dart, J. K., McGill, J. I. and Watt, P. J. 1998. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:1261-1265.
- Lindquist, T. D. 1998. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 17:11-6.
- Logar, J. and Kraut, A. 1997. *Acanthamoeba* corneal infection in a contact lens wearer. *J. Infect.* 35:237-240.
- Mattana, A., Bennatdini, F., Usai, S., Franconi, F. and Cappuccinelli, P. 1997. *Acanthamoeba castellanii* metabolites increase the intracellular calcium level and cause cytotoxicity in wish cells. *Microb. Pathol.* 23:85-93.
- McCulley, J. P., Alizadeh, H. and Niederkorn, J. Y. 1995. *Acanthamoeba* keratitis. *CLAO J.* 21:73-76.
- Morton, L. D., McLaughlin, G. L. and Whiteley, H. E. 1991. Effects of temperature, amebic strain, and carbohydrates on *Acanthamoeba* adherence to corneal epithelium *in vitro*. *Infect. Immun.* 59:3819-3822.
- Murdoch, D., Gray, T. B., Cursons, R. and Parr, D. 1998. *Acanthamoeba* keratitis in New Zealand, including two cases with *in vivo* resistance to polyhexamethylene biguanide. *Aust. J. Ophthalmol.* 26:231-236.
- Niederkorn, J. Y., Ubelaker, J. E., McCully, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Mellon, J. A., Silvany, R. E., He, Y. G., Pidherney, M. and Martin, J. H. 1992. Susceptibility of corneal from various animal species to *in vitro* binding and invasion by *Acanthamoeba castellanii*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 33:104-112.
- Reimerdes, E. and Klostermeyer, H. 1976. Determination of proteolytic activity on casein substrates. *Methods in Enzymology* 45:26-28.
- Rottenberg, R., Christensen, U., Jackson, C. and Coleman, P. 1981. Assay of coagulation proteases using peptide chromogenic and fluorogenic substrates. *Methods in Enzymology* 80:341-361.
- Schaumberg, D. A., Snow, K. K. and Dana, M. R. 1998. The epidemic of *Acanthamoeba* keratitis: where do we stand? *Cornea* 17:3-10.
- Tahara, K., Asari, S., Shimomura, Y., Endo, T. and Yanagihara, T. 1997. Evaluation of effective treatment drugs against *Acanthamoeba* cyst. *Kansenshogaku Zasshi* 71:1025-1030.
- van Klink, F., Alizadeh, H., Stewart, G. L., Pidherney, M. S., Silvany R. E., He, Y., McCulley, J. P. and Niederkorn, J. Y. 1992. Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratitis. *Curr. Eye Res.* 11:1207-1220.
- Wang, I. J., Hong, J. P. and Hu, F. R. 1997. Clinical features and outcome of *Acanthamoeba* keratitis. *J. Formos. Med. Assoc.* 96:895-900.
- Yang, Z., Cao, Z. and Panjwani, N. 1997. Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: carbohydrate-mediated host-parasite interactions. *Infect. Immun.* 65:439-445.