

최 종  
연구 보고서

누에체액 내의 항 노화성분 특성규명 및 제제를  
통한 기능성 첨가제 제품화

Manufacturing of Functional Additives Through the  
characterization and Formulation of Anti -aging  
Compounds in Silkworm Hemolymph

2008. 4

연구기관 : 서울대학교

농림수산식품자료실



0016233

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "누에체액 내 항노화성분 특성규명 및 제제를 통한 기능성 첨가제 제품화"의  
보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 24 일

주관연구기관명 : 서울대학교

총괄연구책임자 : 박태현

세부연구책임자 : 박태현

연 구 원 : 백승렬

연 구 원 : 박주현

연 구 원 : 이상훈

연 구 원 : 강민석

연 구 원 : 박희호

연 구 원 : 이인환

협동연구기관명 : (주)헨슨바이오텍

협동연구책임자 : 한규범

협동연구기관명 : 농업과학기술원

협동연구책임자 : 강필돈

# 요 약 문

## I. 제 목

누에체액 내의 항 노화성분 특성규명 및 제제를 통한 기능성 첨가제 제품화

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 인구의 고령화가 진행되고 웰빙에 대한 관심이 높아지면서 노화 방지를 위한 기능성 화장품이나 식품들에 대한 관심이 증폭되고 있다. 이에 본 연구팀은 예로부터 민간에서 당뇨 방지 및 강장 효과를 가진다고 알려진 누에에서 유용 성분을 분리해 내고 이것의 효능을 과학적으로 입증하고자 하였다. 이 같은 연구는 새로운 항노화 물질의 발견으로써의 의미 뿐 아니라 쇠퇴하고 있는 국내 잠사 농업의 위상을 제고할 계기가 될 것으로 생각한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 누에체액을 분리하는 공정을 확립하고 분리된 각각의 성분의 효능을 동물세포 사멸 방지와 항산화 기능을 기준으로 찾고자 하였다. 또한 체액 채취의 효율을 높이고자 체액의 산화 정도가 낮은 누에품종을 개량하고자 하였고 체액 대량 채취 방법을 개발하고자 하였다. 이러한 결과를 바탕으로 누에체액을 기능성 화장품 및 건강 보조제의 첨가제로 개발코자 하였다.

## IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 연구에서는 누에체액에서 유용 성분을 분리하고자 먼저 그 분리 공정을 확립하였고 이렇게 분리한 유용 성분을 기존의 30K 단백질 외에 분자량 5,000Da이하의 항산화물을 찾아내었다. 이러한 누에체액의 채취 효율을 높이고자 스크리닝 및 교배를 통해 체액의 산화가 낮은 누에 품종 3종을 개량하였고 원심분리를 이용한 체액 대량 채취기를 개발하였다. 이렇게 채취한 누에체액 및 누에체액 추출물을 기능성 화장품 및 건강보조제로 개발하기 위한 기초 연구를 수행하였고 이를 통해 실제 누에 성분이 함유된 기능성 화장품 및 강장용 건강식품을 개발하였다. 이러한 연구 결과는 국내외 화장품 및 식품 회사를 통해 기술 이전을 하여 높은 부가가치를 창출할 수 있을 것으로 기대되고 이렇게 된다면 본 연구에서 개발한 새로운 3종의 누에 품종은 잠사 농가의 새로운 수입원으로 활용될 수 있을 것이다.

## Summary

### I. Title

Manufacturing of functional additives through the characterization and formulation of anti-aging compounds in silkworm hemolymph

### II. Objective of research development and its necessity

Recent studies show progressively rise in age among the population and higher interest for personal well-beings. This have led to increased interests in anti-aging cosmetic products and good. Since the old times, silkworm was known to have an effect in preventing diabetes and enhancement of sthenia. Here, our research team have separated the useful component from silkworm and wanted to scientifically demonstrate the anti-aging effect. This research will, not only be meaningful from the discovery of the new anti-aging substance, but also provide an opportunity in promoting the declining domestic silk yarn agricultural industry.

### III. Research development details and its extent

This research is to establish the separation process of silkworm hemolymph, and investigate the effect of each separated components on animal cells for anti-apoptosis and anti-oxidant effect. In addition, improvement of late oxidising level of silkworm breed were conducted, in order to increase efficiency of the hemolymph collection. Having these results as a basis, we have decided to develop silkworm hemolymph as an additive to functional cosmetic and health supplement.

### IV. Results of research development and its proposal for application

This research established the separation process of silkworm hemolymph in order to separate the useful components, and through this separation process, other than the existing 30K protein, we have found that the useful component with anti-oxidant effect had a molecular weight of below 5,000 Da. To increase the collection efficiency of the silkworm hemolymph, screening and hybridisation were performed on 3 species of silkworm, and through this, we have improved the hemolymph having late oxidation effect. We have also developed a centrifugation method to collect large quantity of hemolymph. Fundamental research was carried out to have the silkworm hemolymph and silkworm hemolymph extract as a functional cosmetic and health supplement, and in fact, through this we have developed functional cosmetical product and health food for sthenia with silkworm components as ingredient added. With our research results, we believe merits can be achieved through cosmetic products and food industries, both domestically and abroad. If indeed this becomes possible, then it would open the possibility of having it as new revenue for silk yarn agricultural industry through newly developed 3 species of silkworm from our research.

# Contents

Chapter 1	Outline of research development project
Chapter 2	Current status of technology development in home and abroad
Chapter 3	Details and result of accomplished research development
Chapter 4	Objective achievement and contribution to associated field
Chapter 5	Application milestone of research development
Chapter 6	Collection of information on foreign science technology during research development process
Chapter 7	References

# 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발결과의 활용계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌

# 제 1장 개요

## 제 1절 연구개발의 목표

### 1. 목표

누에체액 내 세포사멸을 억제하고 항산화 기능을 가지는 유용 성분을 분리정제하고 그 특성을 규명하여 항노화 화장품첨가제 및 건강보조제를 제품화 함.

### 2. 내용

- 가) 누에체액의 효율적 채취 및 가공방법 개발
- 나) 비산화성 누에 품종 개발
- 다) 누에체액의 세포사멸 억제효과 분석
- 라) 단백질생산증대 효과분석
- 마) 누에체액의 퇴행성 신경질환 관련 단백질  $\alpha$ -synuclein의 단백질 응집 및 세포독성에 미치는 효과 분석
- 바) 누에체액 내 항노화 성분 분리정제
- 사) 항노화 성분의 제제연구
  - 아) 항노화 성분의 효과 확인 동물시험
  - 자) 항노화 성분의 건강보조제 및 화장품첨가제 제품화

## 제 2절 연구개발의 필요성

### 1. 기술적 측면

- 가) 우리농가의 중요한 수입원이 되어왔던 유용한 산업곤충인 누에의 부가가치 창출을 위한 유용 성분분리 및 산업적 응용이 필요하다.
- 나) 누에체액이 인체세포를 비롯한 동물 세포의 프로그램 된 세포 사멸 과정인 apoptosis를 억제하는 효과가 있다는 것이 본 연구진에 의해 발견되었는바, 이에 대한 누에체액 내 유용성분의 분리정제 및 제제 연구가 필요하다.
- 다) 누에체액 성분 분리를 위해, 체액의 대량 채취 공정이 필요하며 채취 시 문제가 되는 체액의 산화를 미연에 방지하기 위해서는 비산화성 누에 품종 개발이 필요하다.
- 라) Apoptosis는 세포형태학적으로 생화학적으로 정의된 형태의 프로그램된 세포사멸과정으로서, 척추동물의 세포가 생리학적으로 사멸하는 주요 메카니즘이다. Apoptosis가 진행되고 있는 세포는 apoptotic body가 세포막에 붙은 형태로 형성되며, endogeneous nuclease가 활성화됨으로써 DNA가 단편들로 잘려진다. Apoptosis는 embryogenesis와 종양의 퇴화 및 T-cell에 의한 바이러스 감염세포 사멸과정에 있어서 중요한 역할을 하는 등 인체의 질병과 관련되어 있어, 누에체액내의 apoptosis에 영향을 미치는 유용성분과 유용유전자는 관련 질병의 치료를 위한 부가가치가 높은 신물질로 개발 될 수 있어 의학적으로도 중요한 기여를 할 것으로 판단된다.
- 마) 세포배양에 의한 재조합 단백질 생산시에도 누에체액이 세포사멸을 억제함으로써 숙주세포의 생존성을 높여 그 생산성이 증대된다는 사실이 본 연구진에 의해 확인되었다. 따라서 누에체액의 유용 성분은 장래시장성의 무한한 생물공학제품의 생산효율을 높이기 위하여도 사용될 수 있으므로 이를 위한 유용성분의 규명, 분리에 대한 연구개발이 필요하다.
- 바)  $\alpha$ -Synuclein은 퇴행성 신경 질환인 파킨슨씨병과 밀접한 관계를 맺고 있는 단백질로서 이들 환자의 뇌에서 관찰되는 비정상적 단백질 침착물인 Lewy body의 주 구성성분으로 알려져 있다. 단백질 침착과정에 대한 분자 수준의 체계적 연구는 노인성 치매, Dementia with Lewy bodies(DLB), Prion disease, Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Huntington's disease등의 다른 퇴행성 신경질환 단백질 침착 형성과정에도 곧바로 적용 될 수 있다. 침착된  $\alpha$ -synuclein에 의해 유도되는 에이파토시스의 누에체액의 의한 저해 효과 분석에 대한 연구는 상기 침착 관련 질환의 예방 및 치료책 개발을 위해 필요하다.
- 사) 항산화 물질은 동, 식물 및 미생물에 이르기까지 자연계에 널리 분포하는 물질로서, 다양한 구조를 가지고 있으나, 공통적으로 산소에 의한 유기물의 산화를 방지하는 역할을 수행한다. 과거 누에체액을 이용하여 활성산소에 의해 유도되는 동물세포의 에이파토시스 억제 효과를 연구하던 중, 누에체액이 활성산소류의 세포 내 활성을 억제하는 결과를 확인하였고, 이를 토대로 항산화 물질로서 누에체액 성분의 분리 및 개발에 대한 연구가 필요하다.
- 아) 이상에서 기술한 바와 같이 누에의 높은 부가가치 창출을 위해, 항산화 물질 및 노화 관련 퇴행성 신경질환의 치료 물질이나 이와 관련한 건강보조식품으로의 개발, 또는 화장품 첨가제로 이용하기 위한 누에의 유용성분의 분리 및 특성분석에 대한 연구개발이 필요하다.

## 2. 경제·산업적 측면

- 가) 누에는 견섬유를 생산하는 유용한 산업곤충으로서 한때는 우리 농가의 중요한 수입원으로 각광을 받았으나, 최근에는 국내의 인건비 상승과 후개발도상국의 값싼 인건비에 밀려 국내잠업은 매우 어려운 실정에 처해있다. 따라서 누에의 고부가가치 창출을 통해 국내 잠업을 활성화시키기 위한 연구개발이 절실히 요구된다.
- 나) 누에 한 마리의 경제성은 누에고치로는 18원에 불과하나, 누에 한 마리 당 0.5 ~1 ml의 체액을 생산할 수 있다. 본 연구를 통해 누에체액내의 apoptosis를 억제하는 성분을 규명하고 분리 정제하여 신물질을 얻는다면 그 경제적 가치는 더 말할 나위 없이 증대하게 된다.
- 다) 오래 전부터 의약품 및 식품의 산화를 방지하고 보존성을 증가시키는 데에 활용되어 왔던 항산화 물질은, 최근 체내 자유 라디칼에 의한 세포 파괴 방지의 역할이 의학적으로 규명되면서부터 노화 방지 물질로서 각광 받고 있다. 기존의 사용되어온 항산화 물질은 대부분이 화학적 합성물이고 안정성이 미흡해서 이러한 생물학적 환경에 적합하지 않아 현재 고가의 천연 항산화 물질 혹은 건강보조식품이 각광을 받고 있다. 본 연구를 통해 천연의 안정적이고 활성이 우수한 항산화 물질을 개발한다면 누에 가격에 비해 높은 가치가 창출된다.
- 라) 미국 국립보건원(NIH)의 보고에 의하면 1996년도를 기준으로 한명의 노인성 치매환자에 소요되는 연간 비용은 \$18,400~\$36,100이며, 현재 미국에서 이들 환자에 대한 전체 관리 비용은 연간 \$100,000,000,000으로 추정되고 있다. 따라서, 보다 적극적인 의미에서 이런 질병에 대한 치료와 예방의 필요성이 제시 되고 있다.
- 마) 따라서 본 연구를 통해 누에고치생산을 누에체액생산으로 전환함으로써 커다란 경제적 효과를 볼 수 있다.

## 3. 사회·문화적 측면

- 가) 현재의 국내 잠업은 국제 경쟁력이 없어 중국산 누에고치가 대량 수입되고 있고 잠업 농가의 도산이 잇따르고 있다. 본 연구를 통해 누에에 대한 새로운 부가가치를 창출하여 잠업농가의 소득을 증대시키고, 어려움에 처해있는 국내 잠업의 활성화가 필요하다.
- 나) 전 세계적으로 인구의 노령화가 진행되면서 사회적 문제가 되고 있는 노화 관련 노인성 질환 및 퇴행성 신경 질환은 이제 국내에서도 그 심각성이 크게 대두되고 있다. 본 연구를 통해 이러한 질환 유도의 핵심적 역할을 담당하는 단백질 침착을 억제하고 항산화 기능 또한 담당하는 다기능 신 물질 및 건강 보조식품의 창출은 국내외의 노령화 문제를 해소하는 사회적 효과를 볼 수 있다.
- 다) 최근 항산화 물질 함유 및 피부노화개선 효과가 있는 신기능성 화장품이 다수 개발되고 있다. 본 연구를 통해 특성 규명된 누에체액 유래 항 노화 성분을 이용한 기능성 화장품 개발이 기대된다.

## 제 2장 국내외 기술 동향

### 제 1절 현 시점에서의 국내외 기술 동향

#### 1. 항산화제 연구 개발 동향

최근의 연구에서 각종 질병 및 노화에 활성산소가 관여한다는 사실이 밝혀지면서 활성산소를 억제하는 식품첨가제 및 치료용 제제를 개발하려는 노력들이 활발히 이뤄지고 있다. 지금까지 개발되어 있는 항산화제로는 tert-butylhydroxytoluene (BHT), tert-butylhydroxyanisol (BHA) 등과 같은 합성 항산화제, α-tocopherol, vitamin C, carotenoids, flavonoids, 탄닌 등과 같은 일부 천연 항산화제 및 SOD와 같은 항산화 효소에 국한되어 있는 실정이다. 그러나 이러한 기존의 항산화제는 인체 독성, 저활성 및 급속한 활성 저하 등의 한계를 지니고 있는 것이 대부분이어서 보다 높은 활용도를 지니는 새로운 항산화제를 천연물로부터 얻고자하는 시도가 세계적으로 이루어지고 있다. 미국의 NIH의 경우에는 1993년 "Oxidative damage, antioxidant defense, and aging" 연구 과제와 함께 1997년 후반기부터 "Linking environmental agents, oxidative damage and disease" 연구 프로젝트를 수행하고 있으며, 미국 내 연구 기관에 연구비를 지원하고 있다.

국내 외 여러 그룹의 연구를 통해 천연물로부터 새로운 항산화제들이 발견되고 있는데 포도의 껍질에서 추출한 resveratrol이나 녹차에서 비롯한 ECGC같은 물질이 대표적이다. 이와 같이 새롭게 발견된 천연 항산화제는 특허를 통해 건강 보조제, 기능성 화장품의 재료로 이용됨은 물론 질병 치료 제제로도 개발되어 큰 부가가치를 창출하고 있다.

#### 2. 누에의 산업적 응용에 관한 연구 동향

이웃 일본의 경우는 잠업 농가의 소득을 높이기 위해 누에에서 새로운 약품을 추출하기도 하고, 비단을 식품으로 개발하여 새로운 시장 개발에 힘쓰고 있어 상당한 성과를 얻고 있다.

국내에서는 전통적으로 비단의 생산을 위해 누에를 키워왔으나 최근에는 값싼 중국산 비단 때문에 시장성이 많이 줄어들은 실정이다. 하지만 최근 누에 자체가 가지고 있는 긍정적인 효과에 대한 연구가 본 연구진 외에 여러 연구팀에 의해 밝혀지면서 누에를 이용한 의약품 및 건강보조제 개발 연구가 활발히 진행되고 있다. 실제로 당뇨를 개선하기 위한 식품 첨가제로 누에를 말려서 제조한 가루가 이용되고 있고 농촌진흥청과 부경대학교 공동연구팀은 누에에서 cAMP 생성을 촉진하는 단백질을 발견, 이것이 남성의 성기능을 향상시킨다는 사실에 착안하여 "누에그라"라는 상품을 만들어 근화제약을 통해 2001년부터 시장에서 판매하고 있다.

#### 3. 현 기술개발현황에서 본 연구결과가 차지하는 위치

앞서 언급했듯이 최근 천연물로부터 항산화 등의 유용한 기능을 가지는 물질을 찾아내는 연구가 크게 각광받고 있는 상황인데 우리는 이번 연구를 통해 누에로부터 유용한 물질을 찾아내고 이를 실제 산업적으로 이용해보고자 했다. 이전부터 누에가 인체에 주는 긍정적인 효과들은 동의보감 등의 고서를 통해 이미 알려져 있었지만 정확한 성분과 기작은 밝혀지지 않았었다. 본 연구팀은 기존의 연구를 통해 누에체액이 동물세포의 에이파토시스를 억제한다는 사실을 알아내었고 그 중에서도 30K단백질이 그와

같은 기능을 가진다는 것을 밝혀왔다. 이번 연구에서는 30K단백질의 에이파토시스 억제 기작을 밝히고 이것을 산업적으로 응용하고자함은 물론 기존에 보고하지 않은 누에체액 내의 새로운 유용물질을 찾고자 하였다.

이와 같은 연구는 누에가 인체에 유익하다는 현상만을 알아내는데 그쳤던 기존의 연구보다 한 발 나아가 누에에서 유용 성분을 찾아 그것을 characterization하고 분자생물학적인 기법을 이용해 그 기작을 밝힘으로써 누에의 효능에 대한 보다 더 깊은 이해를 줄 수 있을 것으로 기대한다. 나아가 이런 기초적인 이해를 바탕으로 누에 유용 성분의 건강 보조제 및 화장품 첨가제로써의 활용을 위한 동물 실험 및 시제품 개발을 수행함으로써 누에를 이용하려는 연구 분야에 하나의 방향을 제시함을 물론 우리나라 잠사 산업의 상품성 재고에도 이바지 할 수 있을 것으로 예상된다.

## 제 3장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1절 누에체액 내 항산화 성분의 분리 및 효과 분석

#### 1. 누에체액 내 항산화물의 존재 여부 확인

가) Ethanol 추출법과 열수(熱水)추출법을 이용한 누에체액 추출

##### 1) Ethanol 추출법

5령 누에의 3번째 다리에 상처를 내어 추출한 체액을 산화방지를 위해 60도에서 30분간 열처리하고 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 이것을 95% ethanol과 45:55의 부비피로 섞어 55도에서 30분간 반응시키고 14,000rpm에서 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 최종적으로 speed vacuum drier를 이용해 분말 형태의 추출물을 얻을 수 있었다.

##### 2) 열수 추출법

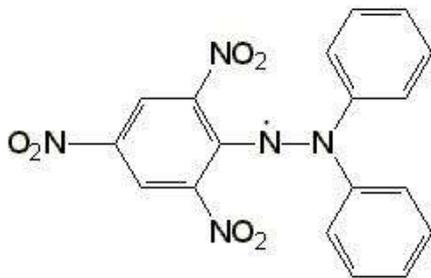
누에로부터 추출한 체액을 다른 전처리없이 바로 100도에서 물증탕을 하여 30분간 열을 가하고 마찬가지로 14,000rpm에서 원심 분리하여 얻은 상층액을 말려서 분말 형태의 추출물을 얻었다.

나) 누에체액 추출물(Silkworm Hemolymph EXtract, 이하 SHEX)의 in vitro anti-oxidative activity 테스트

##### 1) DPPH radical scavenging assay

항산화능을 테스트하는데 널리 이용되는 방법인 DPPH radical scavenging assay를 수행하였다. 이 assay는 517nm에서 흡광도를 가지는 DPPH radical이 항산화제를 만나면 안정한 DPPH-H가 되며 색이 변하는 성질을 이용한 분석 방법이다.

A



B

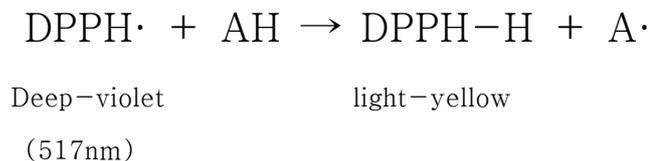


그림 1. DPPH의 분자구조(A)와 항산화 측정 원리(B)

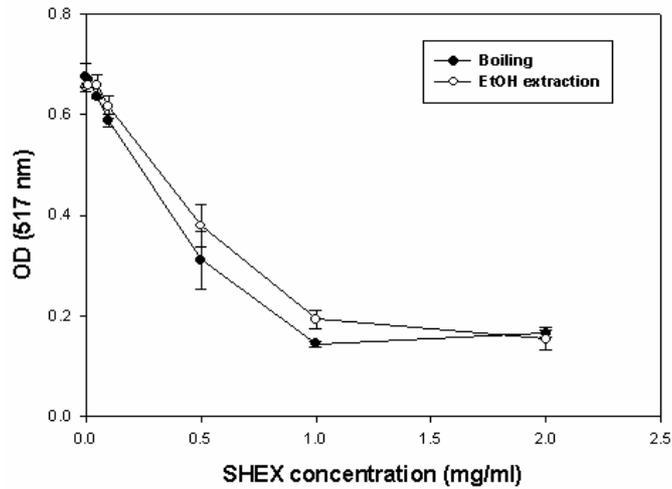


그림 2.. 누에체액을 열수 추출법 혹은 ethanol 추출법을 이용하여 단백질 부분을 제거하였다. 두 방법으로 추출한 SHEX는 거의 비슷한 정도로 DPPH radical scavenging 효과를 보였다. 추후엔 과정이 간단한 열수 추출법으로 SHEX를 추출하였다.

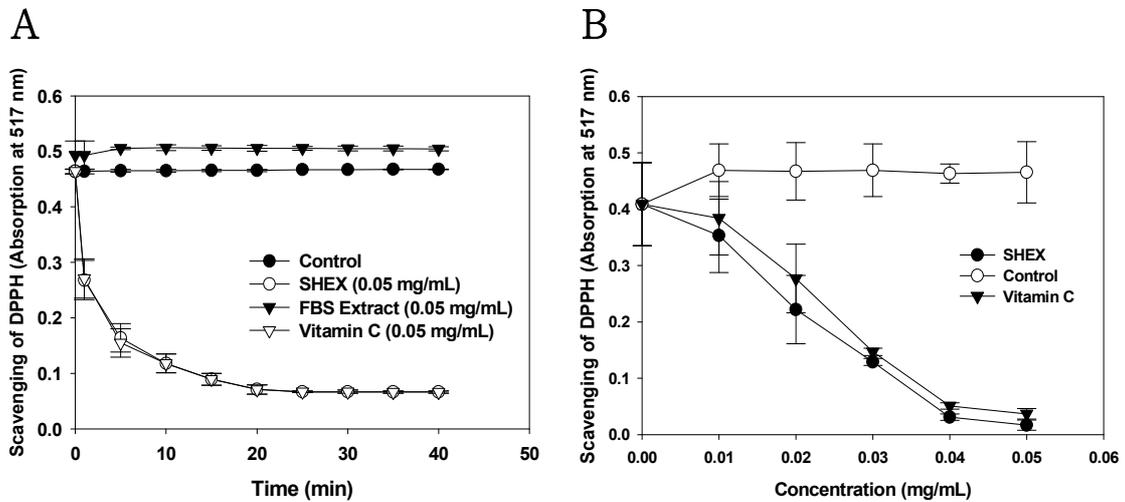


그림 3. 누에체액 추출물(SHEX)와 일반적인 동물세포 배양 첨가제인 FBS의 추출물을 DPPH radical scavenging assay를 한 결과 FBS 추출물은 거의 효과가 없었으나(A) SHEX는 잘 알려진 항산화제인 vitamin C와 거의 비슷한 수준의 항산화 효과를 보였다.(B)

## 2) SHEX의 항산화능 비교

SHEX의 항산화능을 기존의 연구를 통해 많이 알려진 유명한 항산화제들과 비교해 본 결과 astaxanthine 보다는 약 2배 이상, 항산화능이 가장 우수하다는 vitamin C와 비교해도 거의 유사하거나 약간 더 높은 효과를 보였다. 특히 SHEX의 경우엔 누에체액으로부터 추출하는 과정에서 빛과 열에 많이 노출된 상태임에도 이 같은 높은 항산화능을 보였기 때문에 빛과 열에 쉽게 활성을 잃어버리는 vitamin C에 비해서도 실제 산업적 응용을 하기에 훨씬 유용할 것으로 기대한다.

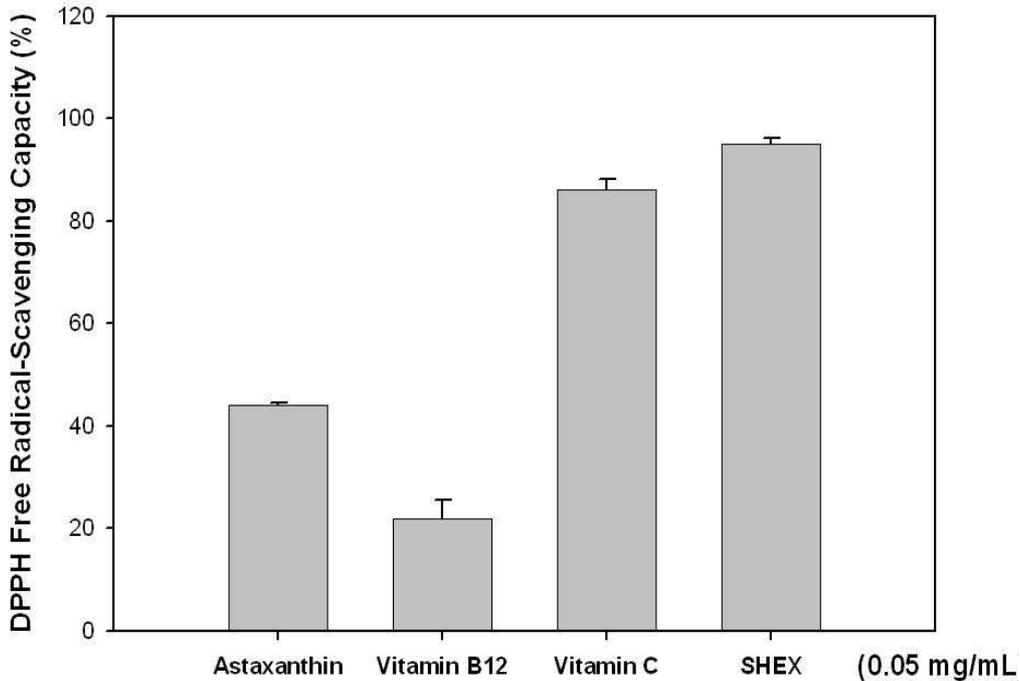


그림 4. DPPH radical scavenging assay를 통한 SHEX와 다른 항산화물의 항산화 효과 비교

## 2. 자외선에 의해 유도되는 피부세포 사멸에 미치는 SHEX의 효과

### 가) 자외선과 피부노화

인체의 피부에 태양으로부터 도달하는 자외선이 가해지면 표피층의 keratinocyte와 진피층의 fibroblast에서 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS)가 형성되고 이것에 의해 진피층의 collagen과 elastin같이 피부조직에 탄력을 주는 섬유 성 단백질의 합성량이 줄고 피부조직을 파괴하는 효소인 Matrix Metalloproteinase(MMP)의 발현량이 올라간다. 이와 같은 현상이 지속되면 결국 피부세포 및 조직은 사멸 및 파괴되고 이것은 피부의 노화 현상을 초래한다. 이러한 피부 노화 현상을 나이가 들어감에 따라 자연스럽게 이뤄지는 자연노화와 구분하여 광노화라 일컫는다.



그림 5. 광노화의 예시. 장시간 햇빛에 노출된 목 주위의 부위가 상의를 입고 있어 자외선에 노출되지 않은 어깨 주위 부위에 비해 현저히 주름이 생기고 노화의 정도가 심한 것을 알 수 있다.

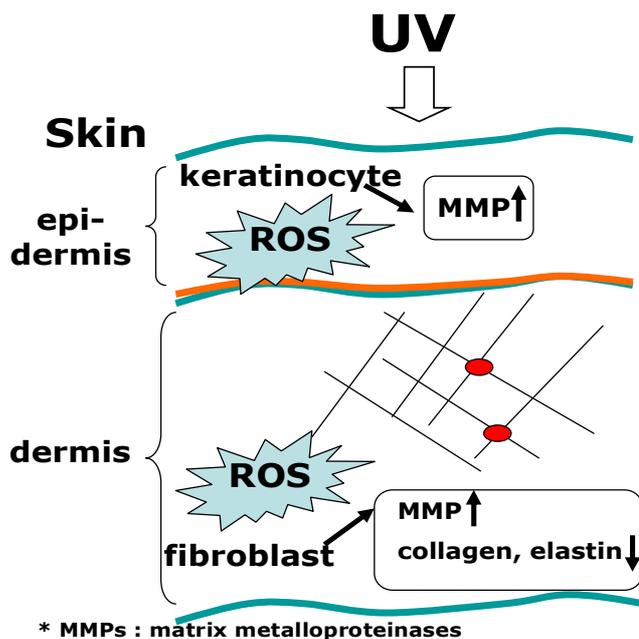


그림 6. 자외선이 피부에 도달했을 때 일어나는 광노화의 기작. 자외선에 의해 유도되는 피부세포에서의 활성산소 발생이 광노화 기작에서 매우 중요하다.

나) 자외선으로부터 유도된 피부세포의 활성산소 생성에 누에체액이 미치는 영향

1) 피부세포에 누에체액 처리 및 자외선 조사

Immortalized human keratinocyte인 HaCaT cell을 DMEM 90% / FBS 10% 배지로 키우다가 누에체액(Silkworm Hemolymph, SH)가 5% 함유된 DMEM 90% / FBS 5% / SH 5%배지로 교체해 하루간 incubation한 뒤 자외선 발생기(UV illuminator, Vilber Rambert)로 파장이 365nm인 UVA를  $20\text{J}/\text{cm}^2$  만큼 조사하였다.

2) DCF assay를 통한 세포내의 활성산소 발생 측정

세포 내 활성산소 발생, 그 중에서도 대표적 활성산소류의 하나인 과산화수소의 발생을 측정하기 위해 세포 안으로 들어가 과산화수소와 반응하여 형광을 나타내는 물질인 DCFH-DA를 이용한 DCF assay를 수행하였다.

누에체액이 포함된 배지에서 하루 동안 HaCaT cell을 배양하고 여기에 UVA를 조사한 뒤 6시간 후에  $20\mu\text{M}$ 의 DCFH-DA로 incubation한 뒤 형광을 측정한 결과 누에체액이 포함되지 않은 배지에서 incubation한 대조군은 UVA 조사 후 과산화수소 생성이 증가하였지만 누에체액이 포함된 경우에는 그 생성이 현저히 줄어드는 것을 관찰하였다.

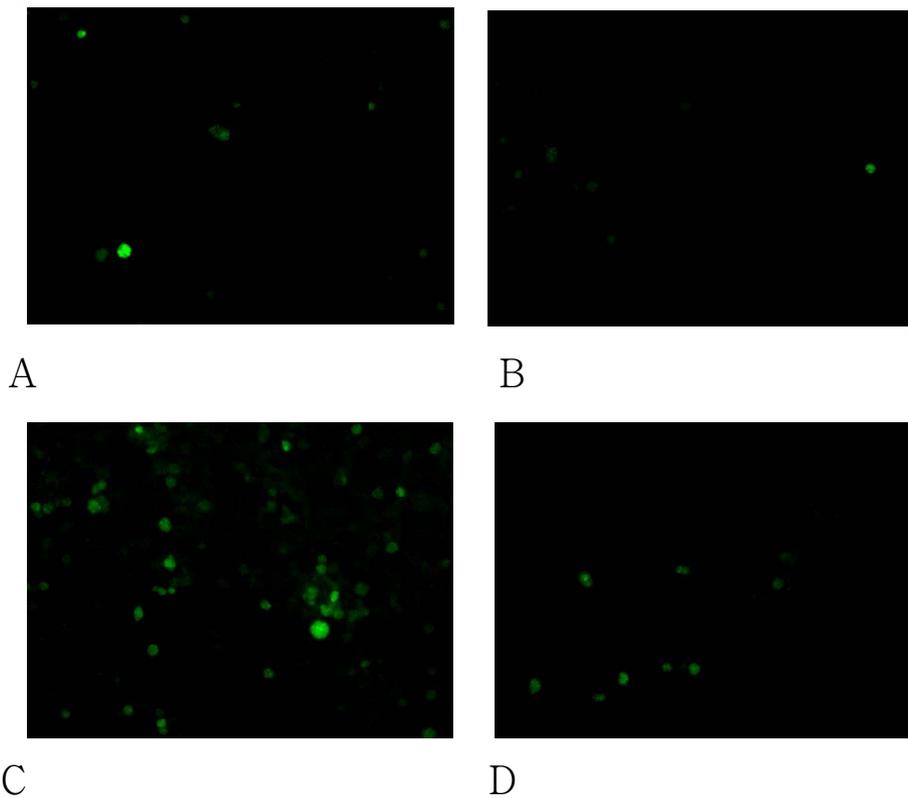


그림 7. 10%FBS 배지와 (A,C) 5%FBS / 5%SH 배지에서 incubation한 세포를 DCF assay한 그림. UV가 조사되지 않은 경우(A,B)와 조사된 경우(C,D)를 비교해 볼 때 대조군에서는 과산화수소 생성이 증가하지만 누에체액이 첨가된 경우에는 그 증가정도가 현저히 낮은 것을 알 수 있다.

다) 자외선으로부터 유도된 피부세포의 사멸에 SHEX가 미치는 영향

1) SHEX의 세포 독성 테스트

SHEX 자체가 가지는 세포 독성을 테스트하고 최적 첨가 농도를 찾기 위해 HaCaT cell 배양 중에 FBS를 제거하고 각 농도의 SHEX를 첨가하여 18시간동안 incubation하였다. 그 후 MTT assay로 세포 활성을 측정해 본 결과, 1mg/ml 이상의 SHEX가 첨가되었을 때 현저한 세포 독성이 관찰되었다. 이 후 실험에서는 1mg/ml 이하의 농도로 SHEX를 첨가하여 실험을 진행하였다.

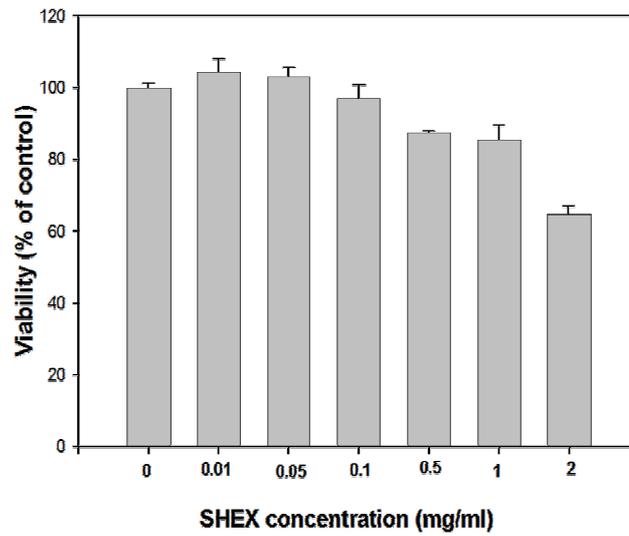


그림 8. HaCaT cell에 대한 SHEX의 세포 독성 테스트. MTT assay결과 1mg/ml 이상의 고농도에서는 세포 독성이 나타났다.

2) UVB에 의해 유도된 피부세포 사멸에 누에체액 추출물이 미치는 영향

피부에 노출되면 홍반 및 염증 반응을 유도하고 장시간 노출 시에는 피부암을 유발하는 UVB의 세포 독성에 대한 SHEX의 억제 효과를 보기 위해 각기 다른 농도의 SHEX를 FBS가 제거된 상태에서 18시간동안 처리한 뒤 60mJ/cm<sup>2</sup>의 UVB(315nm)를 처리하였다. 그 후 24시간 동안 growth medium에서 배양하고 MTT assay를 수행한 결과 0.1mg/ml정도만 첨가된 경우에도 세포 생존률이 20% 이상 증가하였고 첨가 농도가 증가 할수록 더 높은 세포 생존률을 보였다.

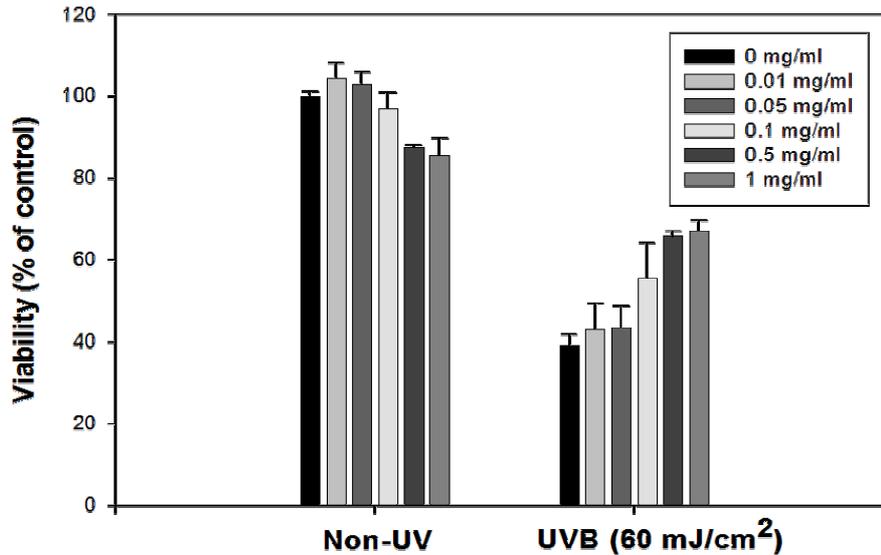


그림 9. UVB에 의해 유도된 피부세포 사멸을 억제하는 SHEX의 효과. 첨가농도가 0.5mg/ml이 넘어가면 SHEX incubation 동안에 세포 성장이 억제되어 UVB가 없는 상황에서의 MTT 수치가 줄어들지만 UVB에 세포가 사멸된 상황에서는 오히려 훨씬 높은 수치를 보이는 것을 알 수 있다.

3) UVA에 의해 유도된 피부세포 사멸에 누에체액 추출물이 미치는 영향

지표에 도달하는 대부분의 자외선으로써 피부 광노화의 주된 원인인 UVA를 피부세포에 조사했을 때의 세포 활성 저해를 억제하는 SHEX의 효과를 알아보았다. 앞선 UVB의 경우와 똑같이 실험을 설계하고 20J/cm<sup>2</sup>의 UVA(365nm)를 조사하고 역시 24시간 후에 MTT assay를 수행하였다. 역시 마찬가지로 높은 농도의 SHEX를 첨가한 경우엔 incubation 기간 동안 세포 성장 저해로 UV가 없는 상황에서는 MTT 수치가 약간 낮지만 UV에 의해 세포 활성이 크게 저하된 상황에서는 오히려 현저히 수치가 증가하였다.

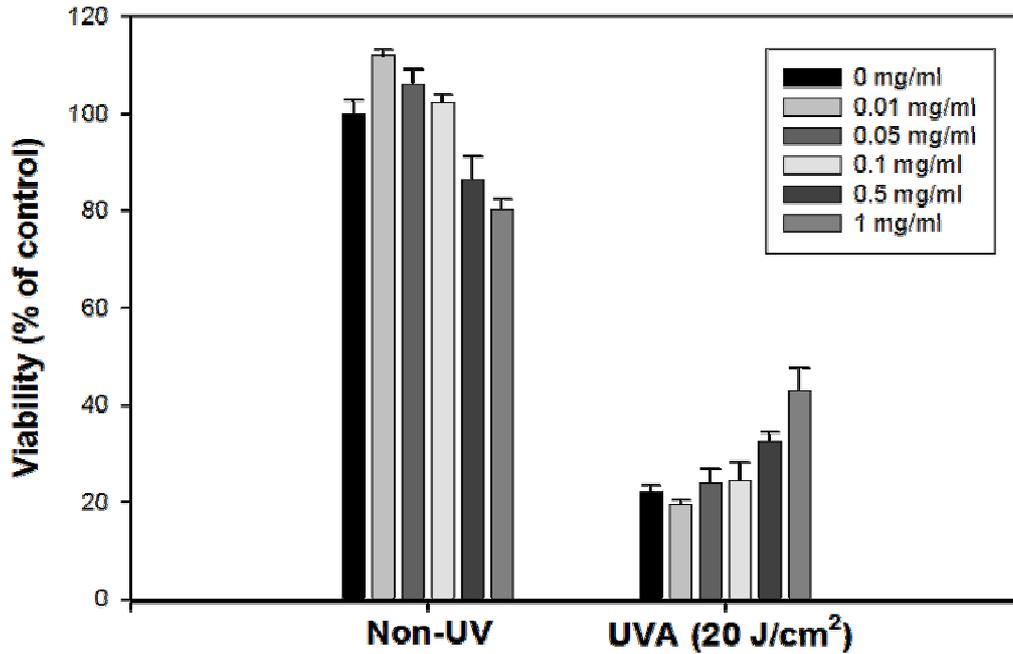


그림 10. UVA를 조사하였을 때의 SHEX의 세포 활성 저해 억제 효과. UVB의 경우와 마찬가지로 SHEX가 첨가되었을 때 UVA에 의해 유도되는 세포 활성 저해가 현저히 줄어드는 것을 알 수 있다.

### 3. 크로마토그래피를 이용한 SHEX의 분리와 각 분획의 효과 비교 분석

#### 가) Gel Permeable Chromatography (GPC) 를 이용한 SHEX의 분리

SHEX를 분리하기 위한 GPC column은 Sephadex LH-20 (GE Healthcare) 을 XK16 (GE Healthcare) 에 packing하여 제작하였고 이것을 통해 분리를 수행한 결과 그림 11과 같은 7개의 peak를 가지는 profile을 얻을 수 있었고 각각의 fraction을 prep하여 피부세포에서의 효과를 알아보려고 하였다.

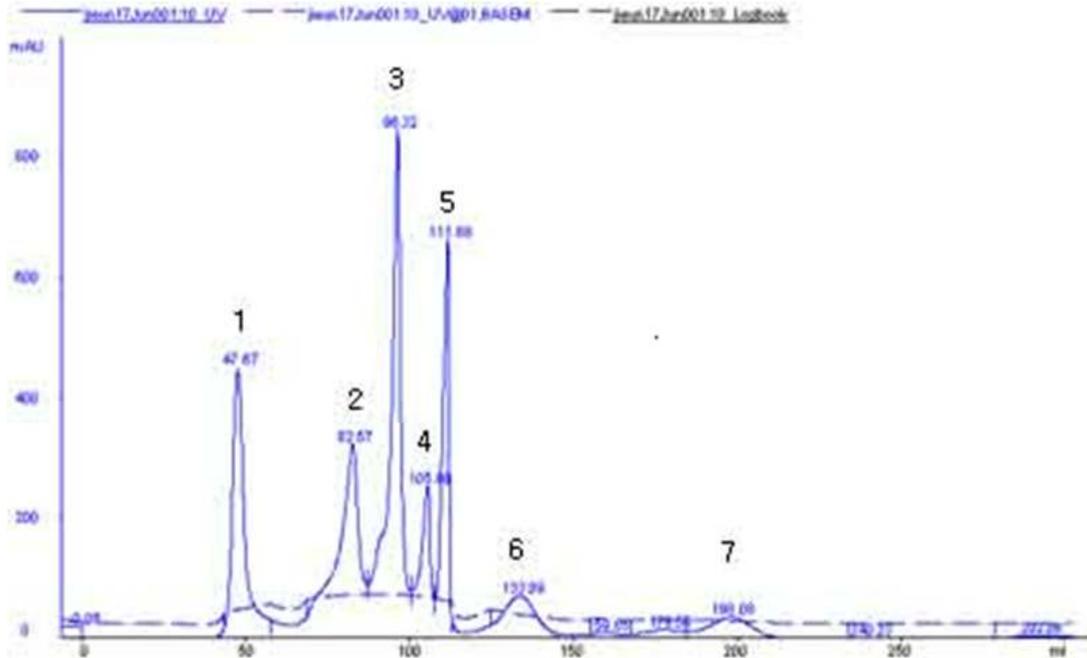


그림 11. GPC를 이용해 SHEX를 분리한 결과. 총 7개의 분획을 얻을 수 있었다.

나) SHEX를 분리한 각 분획의 항산화능 및 피부세포에서의 효과 분석

1) 7개의 분획의 DPPH radical scavenging activity

각 분획의 항산화능을 보기 위해 DPPH assay를 수행한 결과 1번과 7번 분획은 아무것도 넣지 않은 control과 거의 같은 수치를 보였지만 2,3,4,5,6번 분획은 DPPH가 많이 scavenging되는 것을 관찰하였다.

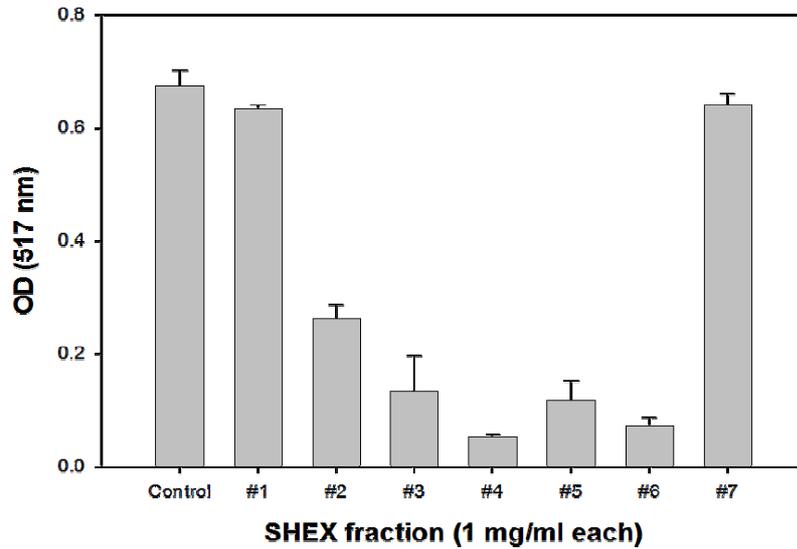


그림 12. SHEX 분리 분획의 DPPH radical scavenging activity 비교. 2,3,4,5,6번 분획이 대조군에 비해 현저히 많이 항산화능을 가지는 것을 알 수 있다.

2) UV에 의해 유도되는 피부세포 사멸을 억제하는 SHEX 분리 분획의 효과

DPPH assay에서 항산화능이 높은 것을 알아낸 2,3,4,5,6번 분획을 HaCaT cell 배지에 첨가하고 UVA를 조사한 후에 MTT assay를 한 결과 그림 13에서처럼 5번 분획이 가장 높은 효과를 나타내었다.

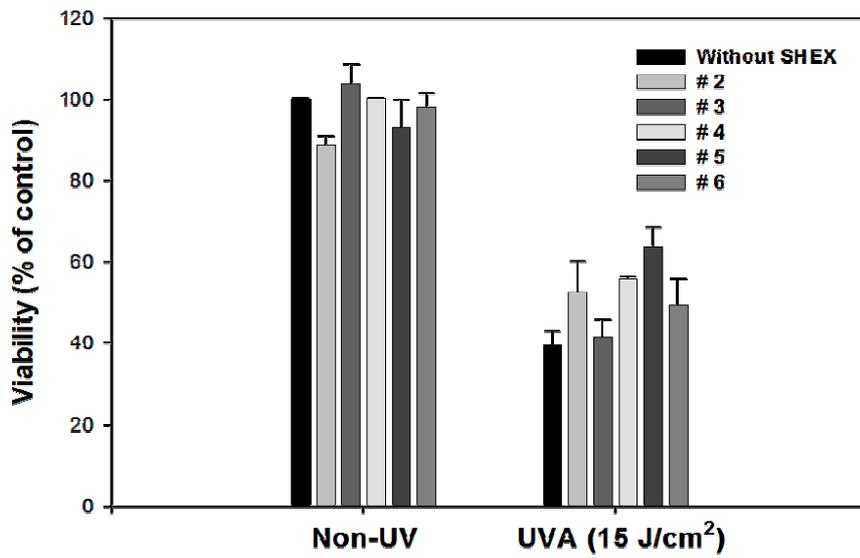


그림 13. UVA에 의한 피부세포의 활성 저하에 SHEX 분리 분획이 미치는 영향. 5번 분획이 가장 높은 효과를 보이는 것을 알 수 있다.

5번 분획을 다양한 농도로 HaCaT cell 배양에 첨가한 뒤 UVA 및 UVB를 조사하여 세포 활성 저하를 억제하는 효과를 분석한 결과 각 경우에서 모두 농도에 따라 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 결과를 미루어 볼 때 5번 분획에 높은 항산화능을 가지면서 실제 피부세포에 대한 적용에도 유리한 유용 물질이 있을 것으로 여겨진다. 이것은 누에체액의 추출물을 주름 개선을 위한 기능성 화장품 첨가제로의 응용에 대한 가능성을 열어주는 결과라 할 수 있겠다.

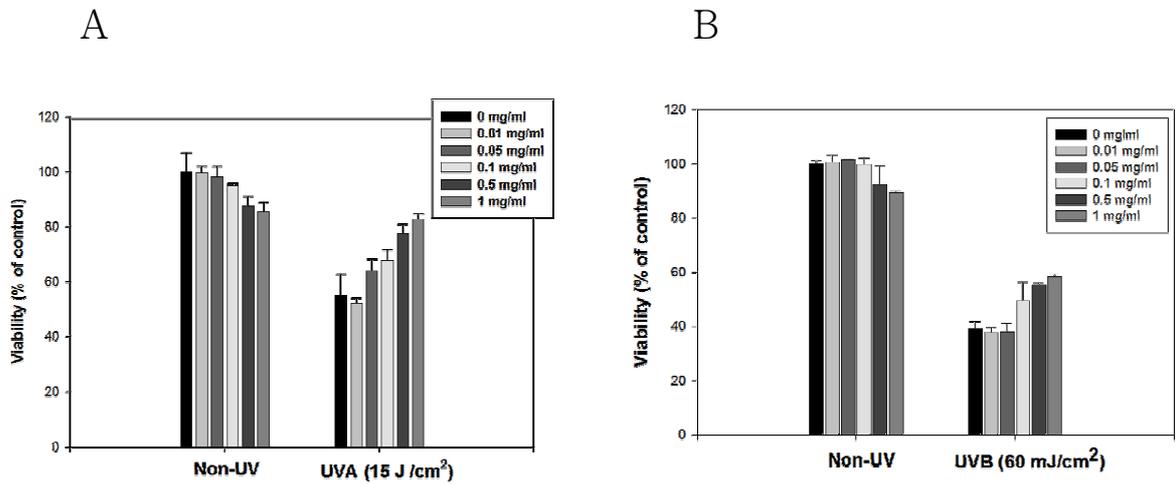


그림 14. UVA(A) 및 UVB(B)에 의해 유도된 세포 활성 저하를 억제하는 SHEX 분리 분획 5번의 효과

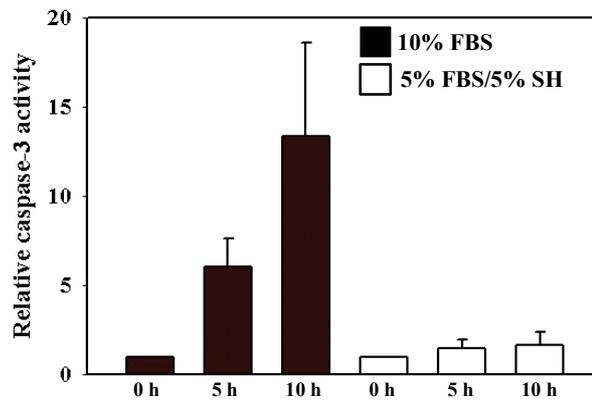
## 제 2절 누에체액의 세포 사멸 억제 기작 연구 및 동물 세포를 이용한 생물의약품 생산에의 응용, 그리고 아밀로이드 형성 인자 탐색

### 1. 누에체액의 에이파토시스 억제 기작 분석

#### 가) 누에체액의 caspase 활성화 저해 효과

인간 자궁경부암 세포주인 HeLa cell에 kinase inhibitor인 staurosporine을 첨가하고 인위적으로 에이파토시스가 유도되는 상황에서 누에체액이 세포생물학적으로 에이파토시스의 하위 단계인 caspase-3와 caspase-9의 활성화를 현저히 억제하는 것을 확인하였다.

A



B

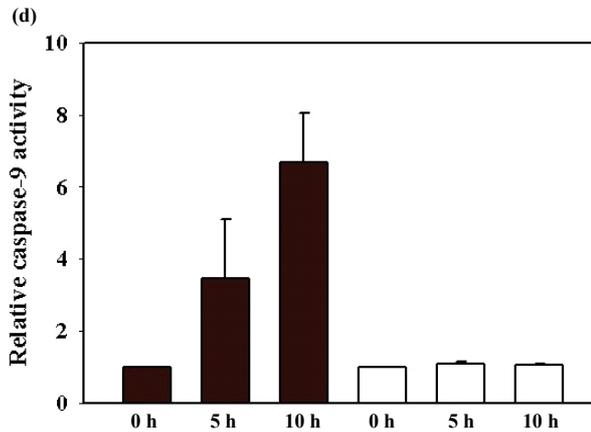


그림 15. HeLa cell에 staurosporine으로 에이파토시스를 유발시켰을 때 누에체액이 첨가된 경우 caspase-3(A)와 caspase-9(B) 활성도가 억제되었다.

나) 누에체액이 cytochrome C의 분출에 미치는 영향

누에체액이 caspase 활성화보다 앞 단계에서 에이파토시스를 억제한다는 사실을 확인하고 그 전 단계인 mitochondria로부터 cytochrome C가 분출되는 기작에 누에체액이 미치는 영향을 분석해보고자 하였다.

마찬가지로 HeLa cell에 staurosporine으로 에이파토시스를 유도하였을 때 그림 16에서처럼 누에체액이 Cyt C의 release를 억제하였는데 이는 이보다 상위단계에서 누에체액이 영향을 주는 것임을 시사한다.

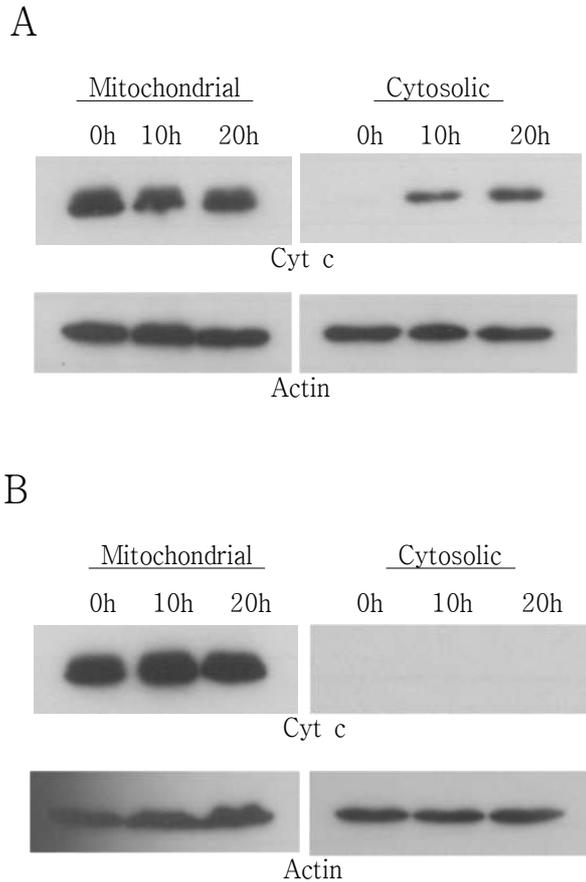


그림 16. HeLa cell에 staurosporine으로 에이파토시스를 유발시켰을 때 Cyt c가 mitochondria에서 cytosol로 이동하는 현상을 western blot을 통해 분석한 그림. 일반적인 10% FBS 첨가 배지에서 배양한 경우엔 에이파토시스가 유발되고 시간이 흐를수록 cytosol의 Cyt c 양이 증가하는 것을 볼 수 있지만(A), 5% FBS / 5% 누에체액 첨가 배지에서 배양한 경우엔 이것이 억제되고 있음을 알 수 있다 (B).

2. 30K 단백질의 유전자를 이용한 Chinese Hamster Ovary 세포주에서의 재조합 단백질 생산성 증가  
 가) 30Kc6 유전자 도입을 통한 EPO 생산 CHO cell에서의 생산성 증가

이미 알려진 5개의 30K 단백질 중에서 30Kc6 단백질의 유전자를 pcDNA3 벡터에 넣고 이것은 EPO를 생산하는 CHO cell(C135-50)에 transfection하였다. G418을 이용하여 2주간 selection하고 살아남은 cell 들을 하나씩 isolation하여 각각의 clone을 stock으로 보관하였다. 이 중에서 세포 성장과 morphology가 좋았던 cell line을 하나 선별하고(C135-50-30Kc6) 이것을 control cell line과 비교하였다.

혈청이 포함된 배지에서 3일간 키운 뒤, 무혈청 배지인 Ex-cell 301(JRH)로 교체하고 세포의 성장과 생존률을 관찰한 결과 최대 세포 농도는 약 4배 이상, EPO 생산량은 10배 가까이 증가하는 것을 알 수 있었다. 세포의 생존률을 Trypan blue exclusion 방법으로, EPO 생산량은 ELISA kit(R&D system)으로 측정하였다.

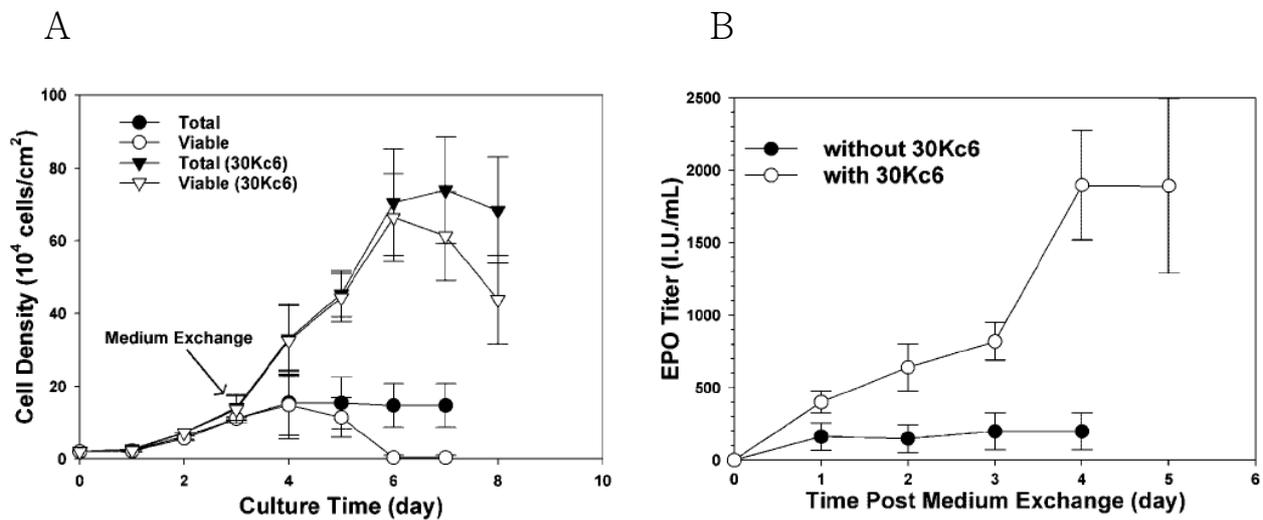


그림 17. 30Kc6의 유전자를 도입한 EPO 생산 CHO cell line의 무혈청배지에서의 세포 성장 및 생존률  
 과(A) EPO 생산량(B)

나) 30Kc6 유전자 재조합 단백질 생산을 위한 무혈청 배양에서 숙주 CHO cell line의 사멸 방지  
 재조합 단백질 의약품 생산을 위한 숙주 세포로서 많이 사용되는 DUXX CHO cell line에 30Kc6 유전자를 앞선 결과에서와 마찬가지로 도입하고 시판되는 다양한 종류의 무혈청 및 무단백질 배지에서 효과의 관측하였다. 앞선 연구와 달리 초기 seeding 단계부터 무혈청 배지를 사용하여 혈청에 의한 영향을 완전히 배제하였다.

앞선 연구와 같은 Ex-cell 301 배지는 물론 ProCHO4CDM(Cambrex), CHO medium(Sigma) 등의 다양한 배지에서 모두 30Kc6 유전자를 도입한 cell line의 사멸이 억제되고 더 높은 세포 생존률을 보임을 알 수 있었다.

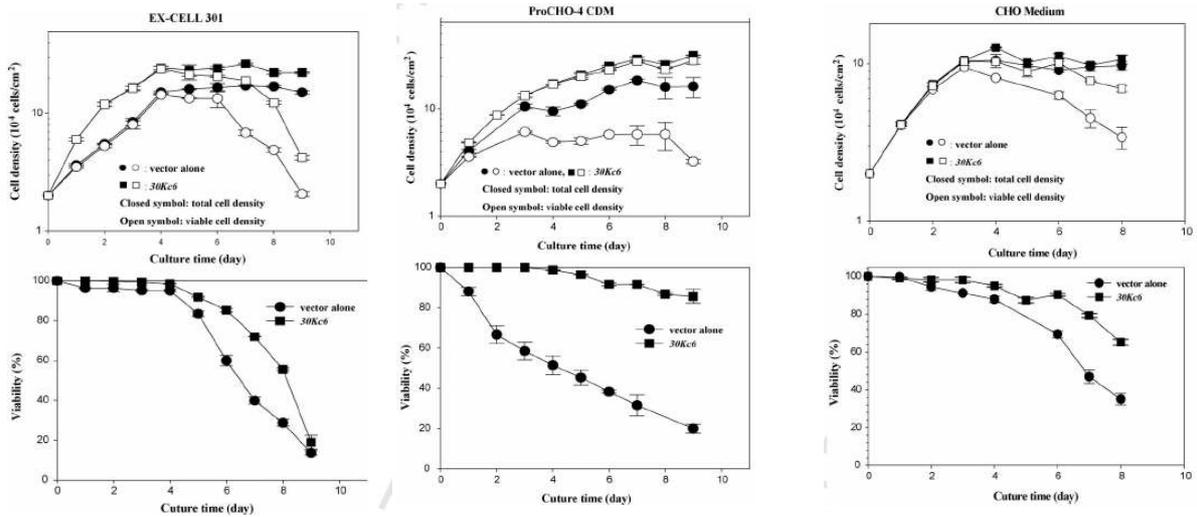


그림 18. DUXX CHO cell line에 30Kc6 유전자를 도입한 세포주와 control 세포주와의 무혈청 배지에서  
 의 세포 성장 및 생존률 비교

이러한 결과는 30Kc6 유전자를 도입함으로써 재조합 단백질 생산을 위한 숙주 세포의 기능을 좀 더 강화할 수 있음을 보여주는 것이다. 이는 최근 크게 성장하고 있는 동물세포를 이용한 생물 의약품 생산 산업 분야에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대된다.

### 3. 아밀로이드 형성 조절 인자 탐색

가) Dequalinium(DQ)에 의해 유도된 protofibril이 cell growth에 미치는 영향

알츠하이머 병이나 파킨슨 씨 병과 같은 퇴행성 신경질환의 주요 원인으로 여겨지는 단백질의 아밀로이드 반응을 조절하는 물질을 스크리닝한 결과 DQ를 유력한 후보로 선정하고  $\alpha$ -synuclein을 발현시킨 yeast에 DQ를 첨가했을 때의 cell growth와 세포 독성을 살펴보았다.

그 결과  $\alpha$ -synuclein을 발현시킨 경우에는 DQ에 의해 세포의 성장이 크게 저해 받으며(그림 19) 이것을 Hoechst staining으로 chromatin의 condensation을 본 결과 에이파토시스가 진행되었음을 알 수 있었다. (그림 20)

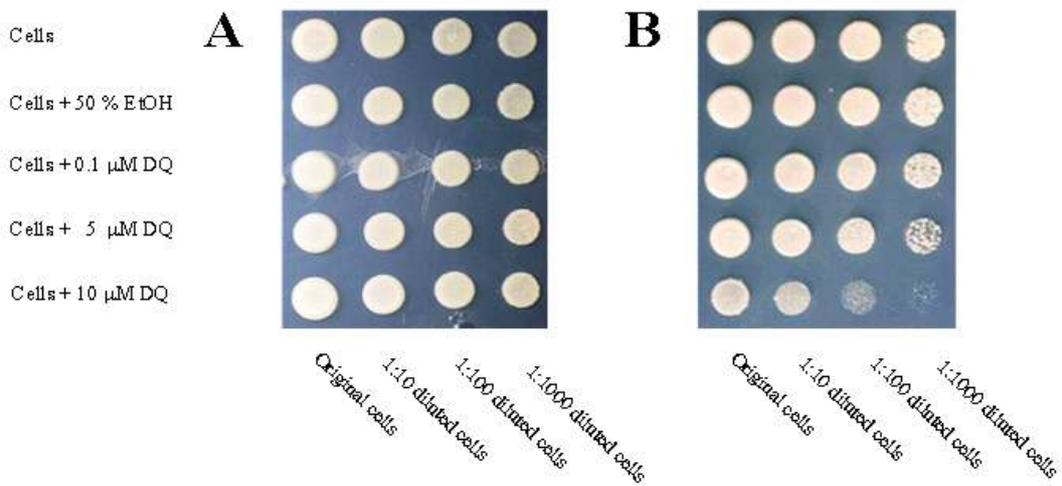


그림 19.  $\alpha$ -synuclein을 발현시키지 않은 cell과(A) 발현시킨 yeast(B)에서의 독성 테스트

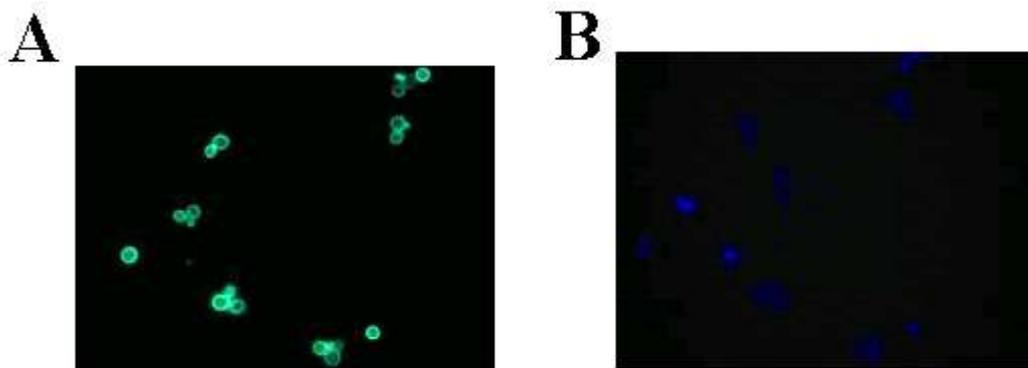
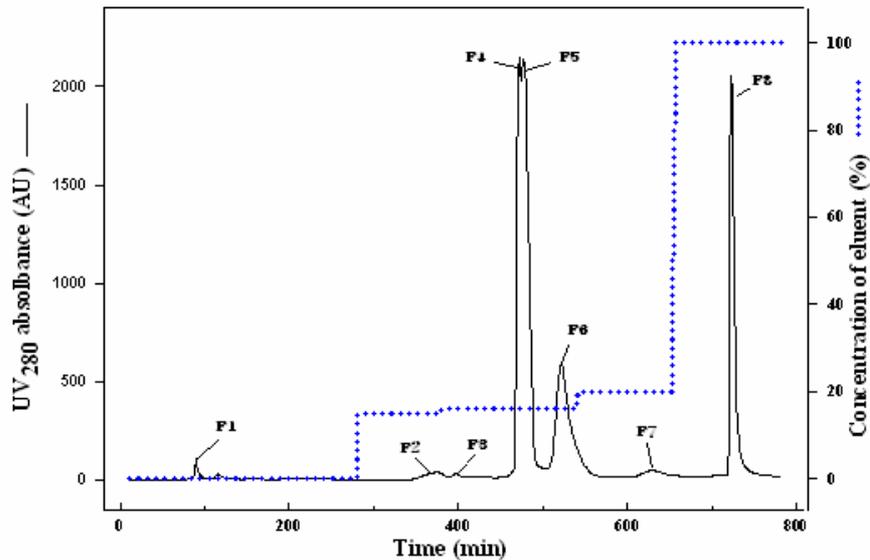


그림 20. Hoechst staining.  $\alpha$ -syn-GFP 단백질을 발현시킨 yeast cell(A) hoechst staining을 통하여 관찰된 yeast cell(B). Chromatin condensation으로 인해 작고 파랗게 빛나는 spot이 확인되었다.

## 제 3절 누에체액의 분리 공정 확립을 통한 항노화 단백질 분리와 이것의 기능성 화장품 첨가제로의 응용

### 1. 누에체액의 분리를 통한 30K 단백질 분리

Ion exchange column인 Q-sepharose FF에 누에체액을 loading하고 NaCl의 농도를 1M까지 높여가며 elution한 결과 그림 17과 같이 대략 8개의 peak를 얻을 수 있었고 거의 하나의 peak로 나온 4번과 5번 분획을 같이 N-terminal sequencing한 결과 이 중 가장 다량 포함된 단백질의 N-terminal 말단의 아미노산 서열이 A-D-S-D-V로 30K 단백질 중 가장 함량이 많은 30Kc19임을 확인하였다.



Stepwise gradient ion-exchange chromatography of silkworm hemolymph on Q-Sepharose FF in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 9.0) with 1 M NaCl. F4 and F5 were eluted from the column at condition of 0.16 M NaCl.

그림 21. Ion exchange column을 이용한 누에체액의 분리

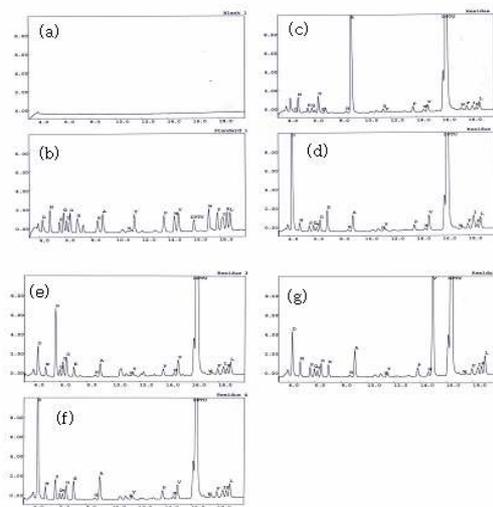


그림 22. 위의 그림에서 4번과 5번 분획을 N-terminal sequencing한 결과

2. 누에체액에서 정제한 30K 단백질을 기능성 화장품 첨가제로 개발

가) 30K 단백질의 피부세포 증식 효과

정제하여 얻은 30K 단백질을 동결건조하여 보관하고 얻어진 동결건조 단백질을 피부각질세포 (표피 세포, keratinocyte) 및 피부섬유아세포 (fibroblast) 배양에 첨가하여 효과 확인을 위한 예비시험을 수행한 결과 피부각질세포 성장에 어느 정도 효과가 있음을 확인하였다. 화장품 원료로 사용되는 Sodium Hyaluronate 1% 용액을 제조하여 얻어진 단백질 샘플을 첨가하여 Compatible 함을 하였고 미생물 시험을 실시하여 Sodium Benzoate를 방부제로 선정하였다.

순번	배지조건	5일 배양 후 각질세포수( $\times 10^4$ )	
		CuCl <sub>2</sub> 무처리	CuCl <sub>2</sub> 처리
Contol A	KBM	0.97	0.08
Test A-1	KBM + 0.5% 30K (C6)	0.66	0.04
Test A-2	KBM + 1.0% 30K (C6)	1.00	0
Test A-3	KBM + 2.0% 30K (C6)	1.00	0
Test A-4	KBM + 4.0% 30K (C6)	0.48	0
Contol B	KGM	5.00	5.00
Test B-1	KGM + 0.5% 30K (C6)	7.00	5.00
Test B-2	KGM + 1.0% 30K (C6)	6.00	6.00
Test B-3	KGM + 2.0% 30K (C6)	8.00	7.00
Test B-4	KGM + 4.0% 30K (C6)	9.00	7.00

표 1. 사람에게서 추출한 피부각질세포를 다양한 배지조건에서 배양하며 누에체액에서 정제한 30K단백질을 배지에 첨가했을 때 세포수의 변화. KBM배지에서 30K단백질은 세포 성장 효과를 보이지 않았지만 KGM배지에서는 CuCl<sub>2</sub>와 상관없이 약 80%의 세포 성장 효과를 보였다.

이 같은 결과를 바탕으로 누에체액 분석 및 화장품 원료로서 누에체액의 Certificate of Analysis를 완성하였다.



## Certificate of Analysis

Product Name: Silkworm (*Bombyx mori*) Extract  
 Product Code: HSC-DBM  
 Lot No: HSB-DBM-05-001

Exp. Date June, 2006

Test	Specification	Results
Appearance	Yellowish solution	Pass
pH	4.0 - 6.0	5.3
Density (20°C)	0.97 - 1.03	1.00
Refractive Index (20°C)	1.310 - 1.350	1.345
Identification	Purplish red ~ Purplish blue	Pass
Assay (Protein)	≤ 50 mg/ml	18 mg/ml

[Storage] Keep at below 20°C, protecting from direct sunlight  
 [Warning] Unscaled product should be used immediately

Park, Ilsoo-sub  
 Quality Control  
 Document Date: Aug 9<sup>th</sup> 2005

Hanson Biotech Co., Ltd  
 451-5, Heonmi-dong, Tulseong-gu,  
 Gyeonggi, Korea 035-371

Tel: +82-42-867-7000  
 Fax: +82-42-867-7006  
 e-mail: gfbac@hansonbio.com



Http://www.hansonbio.com

나) 누에체액 항 노화 성분 제제 연구 및 함유 화장품 3종 제조 (2006년 9월 출시)

히알인 어드밴스트 모이스처 실키 에멀전 (기초), 히알인 인텐시브 링클 디클라인 실키 크림(주름개선 기능성 화장품), 히알인 듀얼 액티브 포어 컨트롤 모이스처 실키 세럼 (모공조절)의 각기 다른 용도의 화장품 3종을 개발하여 본 연구의 참여기관인 (주)헨스바이오텍을 통해 출시하였다.

No	CODE.No	원 료 명
1	2481641	정제수
2	2371002	친유형글리세릴스테아레이트
3	2141003	글리세릴스테아레이트/피이지-100스테아레이트
4	2161005	소르비탄모노스테아레이트
5	2481010	폴리소르베이트60
6	2111048	세테아릴알코올
7	2461601	세틸옥타노에이트
8	2461648	하이드로제네이티드폴리데센
9	2113002	디메치콘
10	2111083	토코페릴아세테이트
11	2461516	세테아릴알코올/세테아릴글루코사이드
12	2111049	스테아릭에씨드
13	2461811	라놀린오일
14	2111017	프로필파라벤
15	2461620	유채꽃유
16	2461710	디-피피지-3미리스틸에테르아디페이트
17	2111056	디소듐이디티에이
18	2481629	디포타슘글리시리제이트
19	2461511	슈크로오스페티에씨드에스터
20	2481526	히드로라이즈드실크파우더
21	2161001	부틸렌글라이콜
22	2111006	글리세린
23	2111020	피이지/피피지-17/6 코폴리머
24	2481506	소듐히아루로네이트 (1%-히알루론산)
25	2111016	메칠파라벤
26	2111022	글리세린/워터/나트륨/폴리아크릴레이트/피브이엠/엠에이 코폴리머
27	2161014	카보머
28	2111087	트리에탄올아민
29	2481028	글루타믹 에씨드 (콩발효보습제)
30	2481528	카모마일추출물
31	2481962	모린다 시트폴리아 추출물 (노니추출물)
32	2481031	소듐히아루로네이트 (5%-6K 히알루론산)
33	2481961	누에추출물 (누에체액 30K 단백질)
34	2441667	조합향료

표 2. 30K 단백질을 첨가한 기능성 화장품의 성분표



그림 23. 30K 단백질을 첨가한 기능성 화장품의 사진

## 제 4절 산화지연 누에 품종 개발과 누에체액 대량 채취 방법 확립

### 1. 체액 채취용 누에 사육 및 채취시기 결정

품종이 백옥잠인 누에를 기존의 사육 표준에 의거하여 사육하다가 4령 3일, 5령 1일, 3일, 5일, 7일까지 날짜별로 체액을 채취하여 측정한 결과 5령 5일째에 체액이 가장 많았다.

Developmental stage	Amounts of hemolymph (ml/capital)
4th instar 3rd day	0.102±0.0079
5th instar 1st day	0.208±0.0049
5th instar 3rd day	0.403±0.0225
5th instar 5th day	0.710±0.0071
5th instar 7th day	0.693±0.0295
pupa 4th day	0.328±0.0148

표 3. 누에 령수에 따른 체액 채취량 비교. 5령 5일째에 가장 많은 누에체액을 얻을 수 있었다.

### 2. 체액 산화지연 계통 선발

#### 가) 선발 방법 및 선발 결과

장려품종 원종 및 육성계통 51계통과 자체 유전자원 341계통, 총 392계통의 누에를 대상으로 체액 산화지연 계통을 1차 선발하기 위하여 5령 3일에서 5일 사이의 누에 유충 배반을 절단하여 1.5ml eppen tube에 체액을 수집한 후 산화정도를 육안으로 검정으로 하였으며, 산화지연 시간은 30분으로 하여 선발하였다. 1차 선발에서 8개의 계통을 선별하였고 이를 대상으로 산화지연 시간을 60분으로 하여 2차 선발을 하여 최종적으로 3개의 계통을 선별하였다.

No	Variety	No	Variety	No	Variety	No	Variety	No	Variety	No	Variety
1	N6	31	Bakdu	61	Ntiope	91	C 10	121	Soyang	151	SA 6
2	N9	32	BN	62	Bagdad	92	C 11	122	Sammyunho ng	152	SA 7
3	N12	33	Bibakjam	63	B-1	93	C 12	123	S C	153	SA 8
4	N13	34	BakanEB kwainggi	64	Romogua	94	C 14	124	4056	154	SA 10
5	N15	35	Bukak	65	Shansuria n	95	C 16	125	Urokbakran	155	SA 16
6	N18	36	Sulak	66	SK-2	96	C 17	126	Usungrokgyun	156	SA 17
7	N19	37	34	67	se215	97	C 18	127	Woongjinhi	157	HM
8	N24	38	SK-1	68	Ubak	98	C 25	128	Yonggakjam	158	Kyunsakjuk
9	N26	39	4051	69	Youlkukjam	99	C 26	129	U R	159	TBO
10	N27	40	Usungroke ui	70	IJPE	100	C 27	130	R Hwang	160	PR
11	N28	41	Usungjukei	71	Ihenalig	101	C 31	131	L Y	161	Chuhwa
12	N29	42	Woosuk	72	AKT	102	C 42	132	Jam 104	162	Hoknuwe
13	N32	43	Il9ho	73	LT	103	C 44	133	Jam 116	163	Y4
14	N39	44	Il83ho	74	E58	104	C 45	134	Chung 14	164	ZO
15	N43	45	Y54yu	75	E56	105	C 46	135	Chung 17	165	KH
16	N44	46	141	76	Q	106	C 48	136	Chung 112	166	Hinode
17	N50	47	RHS	77	PK	107	C 51	137	Chungjong	167	Hansang 2ho
18	N59	48	W109	78	Pedts	108	C 53	138	Chungchun	168	Qoichuk
19	N63	49	W il2	79	Huka	109	C 57	139	Chunmun	169	N 30
20	N64	50	Jam103	80	Hojam	110	C 60	140	Crimson	170	Jamsang 1ho
21	N65	51	Jam109	81	Hansungh ojam	111	Tuk C60	141	QHibakran	171	Jamsang 2ho
22	N69	52	Jam115	82	Kumkang	112	C 61	142	Hansung hukran	172	Suwon 10ho
23	N71	53	J95	83	Kwasulpy ung	113	C 66	143	Hansung banmun	173	11
24	N74	54	JIN	84	Gal H	114	C 68	144	Hangang	174	Il 111
25	N76	55	NHibakra n	85	Galwon	115	C 70	145	Hansammyu n	175	JF
26	N80	56	Hwangyu	86	Nakdong	116	C 76	146	Sammyunja m	176	Jam 107
27	Mudung	57	Heukjam	87	Daedong	117	C 78	147	Sammyunho nghwibak	177	Rok 191
28	Moran	58	Ku17ho	88	C 3	118	C 79	148	Sun 3ho	178	Rok 1042
29	Myun49	59	Ku27	89	C 5	119	C Hibakran	149	SA 2	179	AP
30	Myohyan g	60	Lemon	90	C 7	120	Sinchung 102	150	SA 5	180	Z3

표 4. 누에계통표

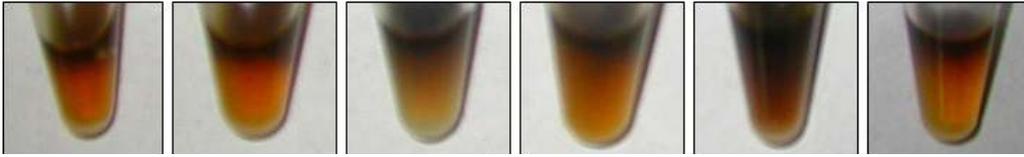


그림 24. 누에 유전자원 품종 중 체액이 빨리 산화되는 품종의 혈액

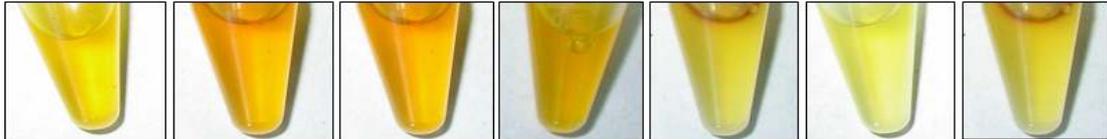


그림 25. 누에 유전자원 품종 중 1차 선발 (8품종)



그림 26. 1차 선발에서 선별된 것 중 2차 선발을 수행하여 3품종을 최종적으로 선별하였다.

나) 산화지연 계통 작성

교잡종(유전자원 혈액지연품종× 육성원종) 과 2차 선발 계통을 비교한 결과 교잡종보다 유전자원 2차 선발 계통이 혈액지연이 우수하였다.

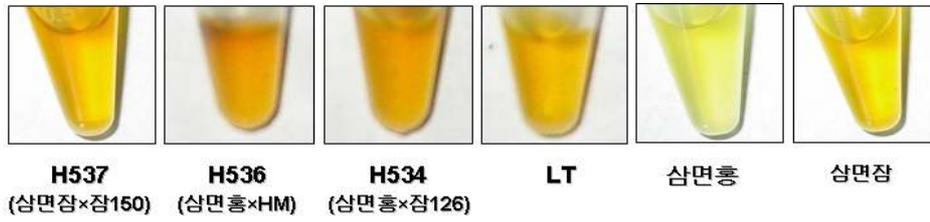


그림 27. 교잡종과 유전계통 자원 중 2차 선발종과의 체액 산화 지연 정도 비교

### 3. 누에 채액 대량 채취기 개발

#### 가) 분리기의 제원 및 구조

넓이 430 mm, 길이 830 mm, 높이 900 mm이며 무게는 60 kg, 전원은 AC220 V 단상으로 전체적인 재질은 알루미늄으로 설계도를 작성하였다. 이동형태는 360°회전이 자유로운 바퀴를 부착하여 손쉽게 이동이 가능 하도록 하였다.

누에 생실샘 분리는는 상단에 시료(누에) 투입구, 1차적으로 누에 피부조직을 터트리는 장치인 핀이 부착된 1차 압착롤러, 2차 압착롤러, 생실샘을 분리하는 임펠라 회전장치, 동력장치, 바퀴부착 형태로 제작하였다. 동력은 단상(220 V) 1마력(HP)의 모터를 사용하였고, 산화를 방지하기 위한 저온 수집통 부착 등 일괄 시스템으로 제작하였다.

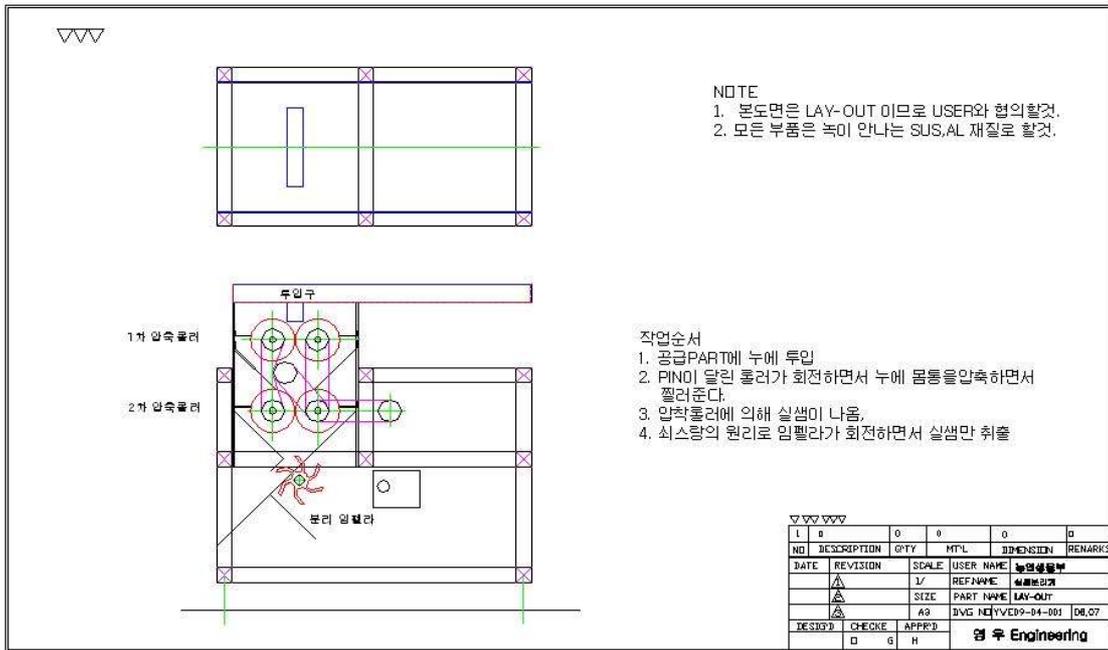


그림 28. 누에채액 대량 채취기의 설계도면

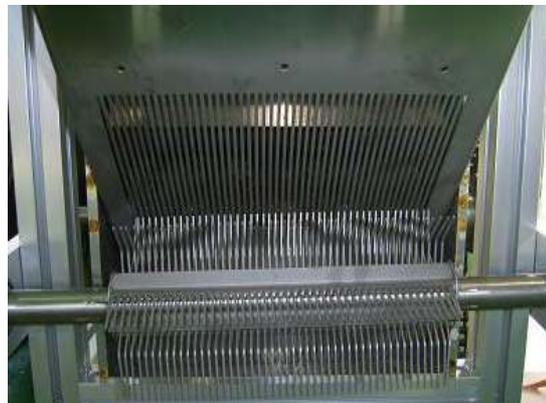


그림 29. 누에채액 채취기의 사진

나) 누에 체액 분리기 성능시험

- 1) 수집기는 무게를 경량화하고 동력 및 바퀴를 부착하여 누에 투입 및 수집 작업 시 편리성을 제고하였다.
- 2) 기본원리는 상단에서 누에를 투입하여 1, 2차 압착롤러에 의해 누에가 터지면 하부의 임펠라 회전으로 인해 이물질을 걸러내며 누에체액을 분리하는 것이다.
- 3) 누에가 터지면서 누에혈액이 공기의 접촉으로 인한 산화가 일어나며, 기계내부 단면에 묻어 누에혈액의 손실이 많았다. 그런 이유로, 기계보완을 위하여 산화지연을 하면서 누에혈액손실을 줄일 수 있는 기계 내부구조 개선에 대한 연구가 진행 중이다.

## 제 5절 누에체액 성분의 건강보조제로의 응용

### 1. 동물 실험을 통한 누에체액 및 추출물의 강장 효과 관찰

#### 가) 실험 protocol

- 1) 태어난 지 4주 된 SD Rat에게 sonde를 이용하여 각 rat의 체중에 맞게 하루에 한 번씩, 총 2주간 구강 투여하였다. 자세한 protocol은 그림 30과 같다.
- 2) Rat의 스테미나 증진 효과를 보기 위해 여러 학술 논문을 참고하여 다음과 같은 실험을 설계하였다.
  - 그림 31과 같은 원통형의 수조를 준비한다.
  - 수조 높이에 절반에 해당하는 물을 넣고 그 안에 rat를 빠뜨린다.
  - 물에 빠진 rat는 일정 시간 허우적거리다가 이내 움직임을 멈추게 된다. 물에 빠뜨리고 rat이 멈출 때까지의 시간을 통해 스테미나의 정도를 측정한다.

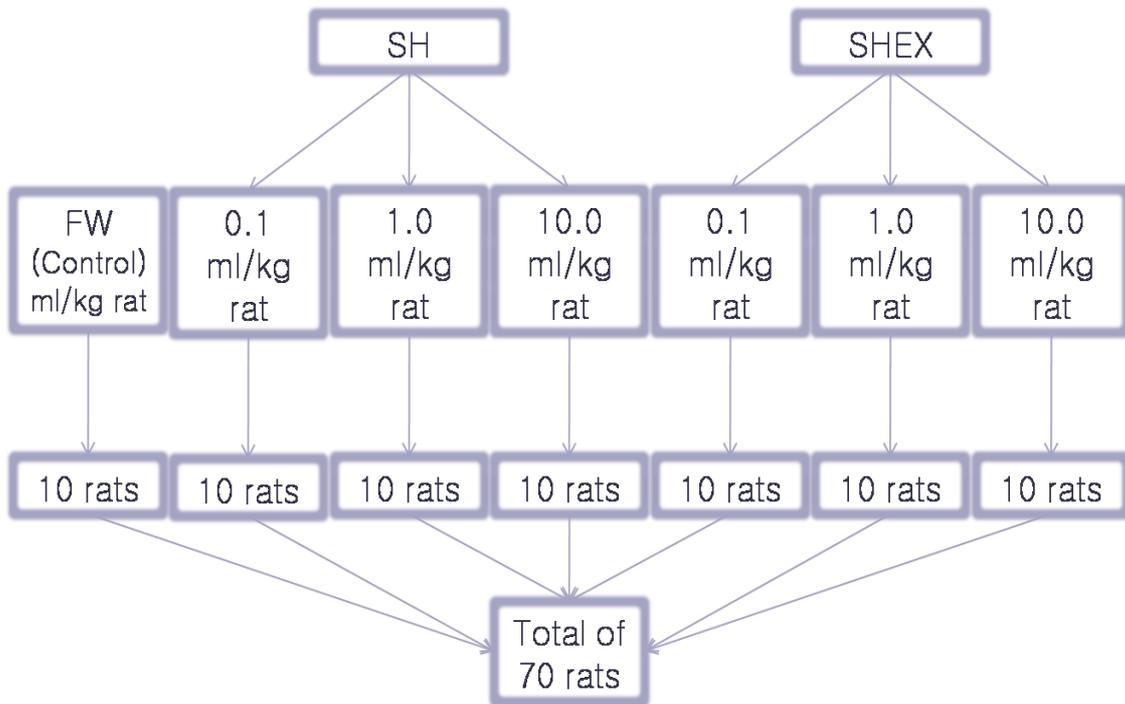


그림 30. 누에체액 및 SHEX의 feeding protocol

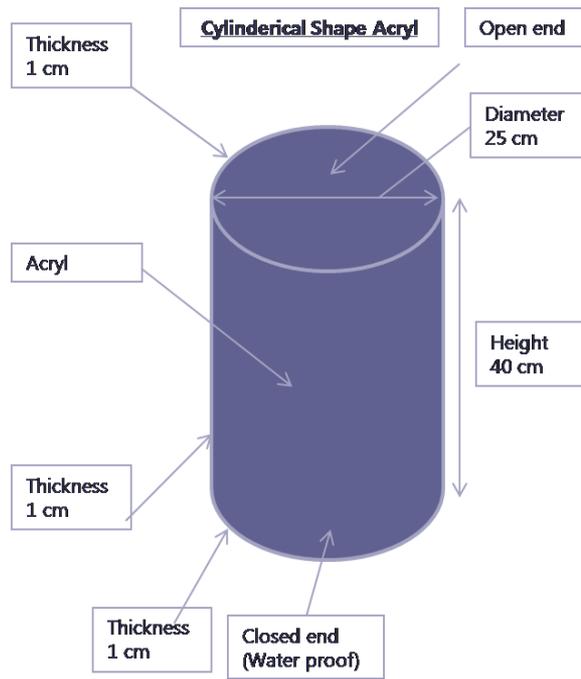


그림 31. 실험에 사용한 원형 수조

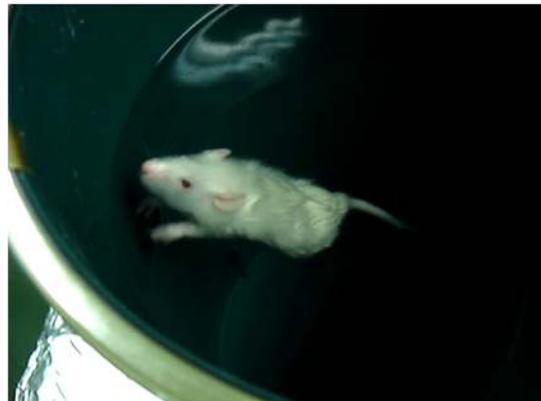


그림 32. Rat을 수조에 넣고 허우적거리게 했을 때 일정시간이 지나 스테미나가 떨어지면 그림과 같이 움직임을 멈추게 된다.

나) Forced-Swimming Test

Rat을 수조에 넣고 허우적거림을 멈출 때까지의 시간을 측정하는 Forced-Swimming Test를 수행한 결과 누에체액과 누에체액 추출물의 두 가지 경우 모두에서 feeding 양이 많았을수록 물에서 허우적거린 시간이 증가하는 것을 알 수 있었다. 이는 rat가 물에서 버틸 수 있는 스테미나가 많이 증가하였음을 의미한다.

특히 누에체액과 SHEX 모두의 경우에서 rat 몸무게 1kg당 10ml를 먹었을 때는 아무것도 먹이지 않았을 때와 비교하여 swimming 시간이 2배 이상 증가하는 것을 볼 수 있었는데 이는 다른 참고 문헌에서 밝힌 여타 스테미나 증진 물질의 경우보다 현저히 높은 수치라 할 수 있겠다.

Effect of SH and SHEX on forced-swimming-test-induced immobility behaviour in SD rats

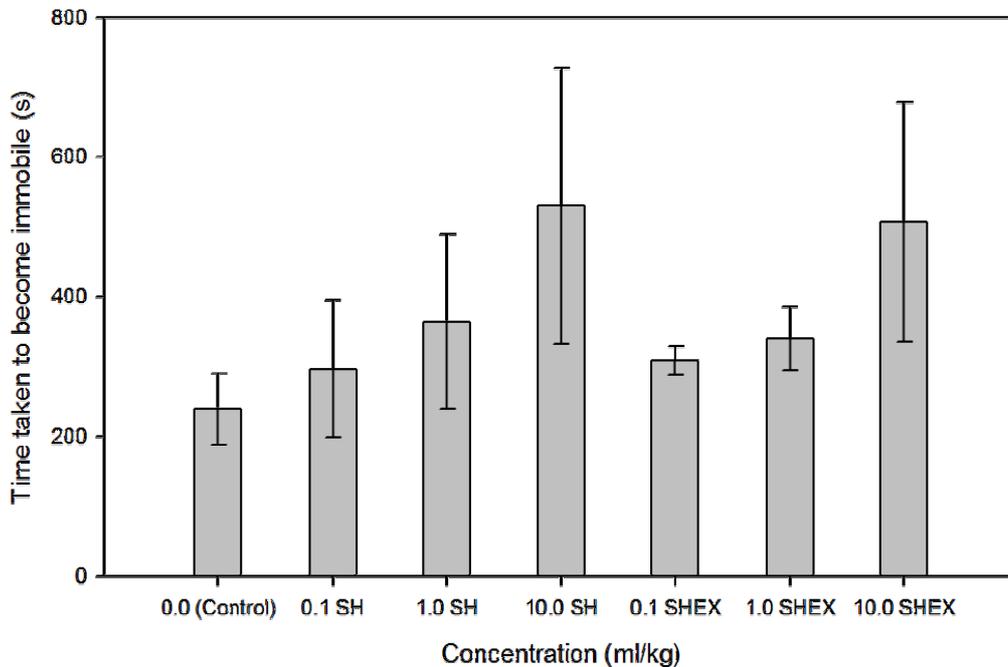


그림 33. 누에체액과 SHEX를 먹인 rat의 forced-swimming test 결과. 누에체액(SH)와 SHEX의 투여량이 많은 rat일 수록 물에서 좀 더 오래 허우적거린 것을 확인하였다. 이는 누에체액과 SHEX에 의해 rat의 스테미나가 크게 증가하였음을 의미한다.

## 2. 누에체액이 함유된 건강 보조 식품 개발

가) 앞선 동물 실험 결과를 바탕으로 누에체액이 함유된 건강 보조 식품을 개발코자 하였다. 이것의 제체화를 위해 다음과 같은 연구를 수행하였다.

### 1) 누에체액 채취

살아있는 누에를 멸균된 바늘로 찔러서 체액을 채취한다. 누에 체액은 공기 중에서 쉽게 산화하여 색이 변하기 때문에 산화 방지제로 비타민 C를 첨가한다.



그림 34. 50ml 튜브에 담겨있는 누에체액

## 2) 누에체액 동결건조 전 단계

누에 체액을 분말로 만들기 위한 동결건조를 실시하기 전 단계이다. 누에 체액을 비커에 담아 Deep freezer에서 동결시킨다.



그림 35. Deep freezer에서 동결시킨 누에체액

## 3) 동결건조 단계

완전한 수분 제거를 위해 동결 건조기에서 2일씩 3번 반복하여 동결건조를 진행하였다. 동결 건조 과정을 거친 누에 체액은 부스러지기 쉬운 형상이 된다.



그림 36. 동결건조가 진행 중인 누에체액

## 4) 동결건조 후

동결건조 된 누에체액은 공기를 만나면 수분을 흡수하여 다시 끈적거리지게 되므로 짧은 시간 안에 캡슐에 넣어 포장한다.

나) 누에체액 함유 건강 보조제 개발

누에체액이 함유된 건강 보조제를 실제로 개발하기 위해 본 연구의 협동 기관인 (주)헨슨바이오텍의 기존의 노하우를 바탕으로 한 방법대로 인체에 유익한 다양한 성분들을 첨가하여 캡슐로 만들어진 누에체액 함유 건강 보조제를 개발하였다. 추후에 이것에 대한 동물 실험을 수행하고 양산화 단계를 거쳐 실제 상품화 하려는 노력을 수행할 예정이다.



그림 37. 누에체액 함유 건강 보조제 캡슐

성분	배합률	총 배합량
재료 명칭	%	180 g 제조 예시
누에분말	20	36 g
흑마늘	26.6	48 g
흑삼	33.3	60 g
Vitamin B1	4.2	8 g
Vitamin B2	1.7	3 g
Vitamin B6	1.5	3 g
Vitamin C (생가루)	12.7	23 g

표 5. 누에체액 함유 건강보조제 성분표

## 제 6절 연구 성과

### 1. 논문 게재

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국내외 구분	SCI 구분	비고
		주저자	교신저자	공동저자					
2006	Enhancement of sialyltransferase-catalyzed transfer sialic acid onto glycoprotein oligosaccharides using silkworm hemolymph and its 30K protein	S.S.Choi	T.H.Park		Journal of Molecular Catalysis B	43, 128-132	국외	SCI	
2006	Calpain-resistant fragment(s) of $\alpha$ -synuclein regulates the synuclein-cleaving activity of 20S proteasome	H.J.Kim	S.R.Paik	D.K.Lee, C.H.Lee, K.C.Chung, J.S.Kim	Archives of Biochemistry and Biophysics	455(1), 40-47	국외	SCI	Basic Research Program Grant (R01-2004-000-01673-0) of Korea Science and Engineering Foundation에서 공동으로 연구지원 받았음
2007	Enhancement of cell growth and viability of CHO cells in serum-free media by <i>30Kc6</i> gene expression	J.G.Park	T.H.Park	S.S.Choi	Process Biochemistry	42, 8-15	국외	SCI	
2007	Novel method for quantitative determination of amyloid fibrils of $\alpha$ -synuclein and A $\beta$ by using resveratrol	J.S.Ahn, J.H.Lee	S.R.Paik	J.H.Kim	Analytical Biochemistry	367, 259-265	국외	SCI	Basic research program grant (R01-2004-000-01673-0) from Korea Science and Engineering과 Seoul R&BD Program에서 공동으로 연구지원 받았음
2007	Seed-dependent accelerated fibrillation of $\alpha$ -synuclein induced by periodic ultrasonication treatment	H.J.Kim	S.R.Paik	Chatani Eri, Yuji Goto	Journal of Microbiology and Biotechnology	17(12), 2027-2032	국내	SCI	Basic Research Program Grant (R01-2004-000-01673-0) of the Korea Science and Engineering Foundation에서 공동으로 연구지원 받았음
2007	Control of morphology and subsequent toxicity of Ab amyloid fibrils through the dequalinium-induced seed modification	Jina Kim	S.R.Paik	E.K.Myung, I.H.Lee	Bulletin of Korean Chemical Society	28(12), 2283-2287	국내	SCI	Seoul R&BD Program (10538)에서 공동으로 연구지원 받았음
2007	Expression of recombinant human growth hormone in a soluble form in Escherichia coli by slowing down the protein synthesis rate	T.Y.Koo	T.H.Park		Journal of Microbiology and Biotechnology	17, 4: 579-585	국내	SCI	
2008	Dequalinium-induced cell death of yeast expressing $\alpha$ -synuclein-GFP fusion protein	I.H.Lee, H.Y.Kim	S.R.Paik	MH.Kim, J.S.Hahn	Neurochemical Research	In press (accepted : 15 January 2008)	국외	SCI	Basic research program grant (R01-2007-000-20089-0) from Korea Science and Engineering과 Seoul R&BD Program에서 공동으로 연구지원 받았음

## 2. 특허

특허 출원				
출원 연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2006	DNA encoding anti-apoptotic protein and recombinant 30K protein	박태현, 김은정, 박혜정	미국	No.11/435,756
2006	제조합 단백질의 당쇄 결합도 향상 방법	박태현, 최신식, 박주현	대한민국	10-2006- 0102255
2006	Method for enhancing glycosylation of recombinant protein	박태현, 최신식, 박주현	PCT	No.PCT/KR2/006/004523
2006	누에체액을 함유하는 항 염증제	김은정, 박태현, 장미라	대한민국	10-2006- 111613

## 3. 국내 외 학술대회 발표

발표 연도	제목	저자	학회명
2005. 5.	Anti-apoptosis engineering for mammalian cell culture using <i>30K gene</i> originating from <i>Bombyx mori</i>	박태현, 최신식, 이원중	APBioChEC 2005 (제주, 대한민국, 국제학회)
2005. 8.	Anti-apoptosis engineering with the <i>30K gene</i> obtained from silkworm	최신식, 이원중, 박태현	European Congress on Biotechnology (코펜하겐, 덴마크)
2005. 10.	Effect of silkworm hemolymph on oxidative stress induced by UVA and hydrogen peroxide in cultured human keratinocytes	박주현, 이원중, 최신식, 이지은, 박태현	한국분자세포생물학회 (서울, 대한민국)
2005. 10.	Effect of silkworm hemolymph on oxidative stress induced by UVA and hydrogen peroxide in fibroblasts	박주현, 이원중, 최신식, 이지은, 박태현	한국생물공학회 (진주, 대한민국)
2005. 10.	Effect of <i>30Kc6</i> expression on cell death and recombinant protein productivity in serum-free CHO cell culture	박준건, 최신식, 박태현	한국생물공학회 (진주, 대한민국)
2005. 10.	Anti-apoptosis engineering of CHO cell system	박태현, 최신식, 박주현	YABEC 05 (베이징, 중국)
2006. 3.	Anti-apoptosis engineering using <i>30K genes</i> of silkworm	박태현	The 1st international symposium on advanced biological engineering and science (베이징, 중국)
2006. 5.	Promotion Effect of 30K Proteins on FSH Glycosylation in CHO Cell System	박주현, 최신식, 박태현	한국생물공학회 (청주, 대한민국)
2006. 9.	Protective effects of SHEX on UVA-induced cell damage	이지은, 박주현, 박태현	한국생물공학회 (서울, 대한민국)
2007. 4.	Effect of Silkworm Hemolymph Extract on Oxidative Stress Induced by UV in HaCaT Keratinocytes	박주현, 이지은, 박태현	한국생물공학회 (인천, 대한민국)

### 3. 사업화 현황

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			
화장품 제품화	항노화 누에 체액 함유 화 장품 3 종 출 시	(주)헨슨 바이오텍	한규범/손 상혁	36	참여기업 개 발 품목 제품 화	NA	1억원	1억원

## 제 4장 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

### 제 1절 연구 목표 달성도

#### 1. 누에체액의 효율적 채취 및 가공방법 개발

원심 분리를 이용한 자동 채취기를 개발했는데 기존의 수작업으로 이뤄질 때보다 인력 및 시간의 소비가 현저히 줄어들었으나 채취 중에 일어나는 체액의 산화와 체액 손실 등의 문제가 있었다. 약간의 기술적 보완이 필요하다 여겨진다. (달성도 95%)

#### 2. 비산화성 누에 품종 개발

총 392종의 누에에서 체액의 비산화성이 높은 8종을 골라내었고 그것들간의 교잡을 통해 산화 지연 정도가 기존에 비해 2배 정도 높은 3종의 새로운 개량종을 개발하였다. (달성도 100%)

#### 3. 누에체액의 세포사멸 억제 기작 및 누에 단백질의 재조합 단백질 생산 증대 효과 분석

에이파토시스가 유도되는 상황에서 누에체액이 mitochondria에서 cytochrome c가 분출되는 단계를 억제한다는 사실을 밝혀내었고 누에 단백질 중 30Kc6 단백질의 유전자를 재조합 단백질을 생산하는 CHO cell에 도입했을 때 EPO와 같은 재조합 단백질의 생산성이 향상되는 것을 관찰하였다. (달성도 95%)

#### 4. 퇴행성 신경질환 관련 단백질 $\alpha$ -synuclein의 단백질 응집에 관여하는 인자 탐색 및 이에 의해 유발되는 세포 독성에 누에체액이 미치는 영향 탐구

여러 개 후보 물질의 스크리닝을 통해 dequalinium이라는 물질이  $\alpha$ -synuclein의 fibril형성을 조절하여 이것이 세포 독성을 가지게 한다는 사실을 밝혀내었다. 차후에 이로 인해 유도된 신경 세포의 사멸을 누에체액 및 30K 단백질, SHEX가 억제할 수 있는지를 알아볼 예정이다. (달성도 95%)

#### 5. 누에체액 내 항노화 성분 분리정제 및 제제연구

Gel permeable chromatography와 ion exchange chromatography를 이용하여 항 에이파토시스 효과를 가지는 30K 단백질을 동정하였고 누에체액을 열수 추출하여 분자량 5,000Da 이하의 항산화물질을 찾아내었다. 이를 vitamin C를 넣어 동결 건조하고 캡슐에 넣은 방법으로 제제화 하였다. (달성도 100%)

#### 6. 항노화 성분의 효과 확인 동물시험

누에체액 및 SHEX를 SD rat에 먹이고 forced-swimming test로 스테미나 증진 효과를 보았다. 그 결과 먹인 양이 많을수록 물에서 멈추지 않고 움직인 시간이 증가하였고 10ml/kg으로 먹인 경우엔 그 시간이 2배 이상 증가하는 결과를 보였다. (달성도 100%)

## 7. 항노화 성분의 건강보조제 및 화장품첨가제 제품화

누에체액에서 항 에이파토시스 성분인 30K 단백질을 분리하여 기능성 화장품의 첨가하였고 이를 제품화하여 협동 기관인 (주)헨슨바이오텍을 통해 시판하였다. 또한 누에체액을 동결 건조한 것을 흑마늘과 vitamin C와 같은 유용 성분과 섞어 캡슐을 만들었다. 이것을 차후 항노화, 자양강장 효과를 가지는 기능성 건강식품으로 개발, 시판코자 한다. (달성도 100%)

## 제 2절 관련분야에의 기여도

### 1. 누에체액에서의 유용 성분 분리 및 공정 개발

본 연구에서 누에체액으로부터 기존에 알고 있던 30K 단백질 외에 분자량 5,000Da 이하의 항산화능을 가지는 small molecule군이 있음을 알아내었다. 또한 크로마토그래피법을 이용해 누에체액 내 단백질 및 small molecule을 분리하는 공정을 개발함으로써 누에체액을 산업적으로 이용하고자 하는 여타 연구 분야에 기여를 하였다.

### 2. 비산화성 누에 품종 개발

본 연구에서는 다양한 스크리닝 및 교잡을 통해 체액의 산화 정도가 매우 낮은 3개의 새로운 누에 품종을 개발하였다. 이는 누에의 산업적 이용의 가능성을 한층 향상시킨 결과로써 누에를 키우는 잠사 농업 분야에 기여를 할 수 있을 것으로 기대한다.

### 3. 기능성 화장품 및 건강 보조제 개발

본 연구에서는 누에체액 성분이 함유된 기능성 화장품 및 건강 보조제의 시제품을 개발하고 실제 제품을 생산하였다. 이는 최근 각광받고 있는 천연물로부터 유래한 첨가제 개발 분야에 새로운 가능성을 제시한 결과라 하겠다.

## 제 5장 연구결과의 활용 계획

### 제 1절 추가연구의 필요성

#### 1. 누에체액의 세포 사멸 억제 기작 분석

현재 누에체액이 동물세포의 에이파토시스에서 mitochondria에서 cytochrome c의 유출을 억제한다는 사실을 알아내었지만 그로부터 상위에 있는 어떤 단계에서 영향을 주는지를 정확히 알아내지는 못했다. 이를 위한 추가 연구가 필요하다.

#### 2. 아밀로이드로부터 유도되는 신경 세포의 사멸에 누에체액이 미치는 영향 연구

알츠하이머나 파킨슨씨 병같은 퇴행성 신경질환의 원인으로 생각되는 단백질의 아밀로이드 형성 기작에 영향을 주는 dequalinium을 발견하였지만 이로 인해 유도되는 신경 세포 사멸을 누에체액 및 그 성분들이 억제할 수 있는지 여부를 확인하지는 못했다. 이것에 대한 추가 연구가 필요하다.

#### 3. 누에체액 추출물의 성분 분석

열수추출을 통한 누에체액 추출물, SHEX가 항산화 효과가 있고 이것을 피부세포에 적용했을 때 자외선으로부터 유도되는 세포 사멸 및 활성산소의 형성을 억제한다는 사실을 알아내었다. 하지만 이것들을 HPLC 등의 정밀 분석 장치로 단일 물질로 분리하여 질량 분석이나 NMR 분석 등을 통해 그것들의 정확한 성분을 알아낼 필요가 있다.

#### 4. 건강 보조제 개발을 위한 추가 동물 실험

본 연구에서 자양강장 효과를 가지는 건강식품의 보조제로서 누에체액을 응용하기 위해 SD rat을 이용한 forced-swimming test를 수행한 결과 누에체액 및 SHEX를 먹인 쥐는 보다 높은 스테미나를 가진다는 사실을 증명했으나 실제 산업화되기 위해 허가를 받을 때는 부작용이 없는지를 봐야하고 또한 젖산이나 포도당 같은 생체 내 물질들의 농도 변화도 측정해야 한다. 이를 위한 추가 동물 실험이 필요할 것이다.

## 제 2절 기업화 추진 방안

### 1. 비산화성 개량 누에 품종 및 체액 대량 채취기 생산

본 연구를 통해 개발한 체액 비산화성 누에는 누에 자체를 이용하고자 하는 다른 산업에서 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 그렇기 때문에 이 누에 품종을 대량 양식하기 위한 제반 시설 설계와 양식 조건 확립 등을 농촌진흥청 잠사곤충사업부가 중심이 되어 개발하고 이것을 잠사 농가에 전수할 수 있을 것이다.

또한 이번에 초기 형태로 개발된 체액 대량 채취기를 보다 많은 양의 누에체액을 효율적으로 채취할 수 있게 개량하여 실제 산업에 응용할 수 있도록 할 것이다.

### 2. SHEX의 기능성 화장품 첨가제로의 개발

SHEX를 실제 누드 마우스 등의 피부에 발라 부작용이 없는지, 실제 피부 재생 및 주름 개선에 효과를 주는지를 동물 실험을 통해 확인하고 효과를 개선하기 위한 제제화 연구를 수행할 것이다. 이는 본 연구의 협동 연구 기관인 (주)헨슨바이오텍에서 단독 진행하거나 국내외 화장품 생산 업체와의 기술 교류를 통해 수행하고 이를 제품화 할 수 있을 것이다.

### 3. 누에체액 성분을 함유한 기능성 건강 보조제의 개발

이 연구는 협동 연구 기관인 (주)헨슨바이오텍을 중심으로 국내 여러 바이오벤처 회사와의 교류를 통해 산업화를 하고자 한다. 제품이 완성되면 TV나 신문, 인터넷 등 다양한 매체를 통해 홍보와 판촉을 수행할 수 있을 것이다.

## 제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외기술정보

### 제 1절 노화와 활성 산소

요 근래 의학의 발달로 선진국을 중심으로 해서 인류의 수명이 급격히 늘게 되었고 그로 인해 예전에는 많이 없던 노화와 관련된 새로운 질병이 많이 생기게 되었다. 그런 이유로 최근 노화의 이유를 찾고 그것을 조절하기 위한 연구가 많이 이뤄지고 있는데 그에 대한 학설은 다음과 같은 2개로 크게 나뉘진다.

하나는 프로그램설로서 애초에 생명체의 유전자 안에 노화를 일으키는 요소가 들어있고 시간이 흐름에 따라 이것의 발현이 증대된다는 것이고 다른 하나는 분자장애설로서 생명체가 오랫동안 유지되다보면 어떠한 이유로 세포의 대사에 필요한 필수 요소가 고장나게 되고 이로 인해 노화가 일어나고 사망한다는 설이다. 최근에는 분자장애설 중 하나인 "free radical"설이 가장 각광받고 있는데 이것은 생체내에서 신호전달이나 세포 보호를 위해 항상 만들어지는 활성 산소가 그 생성 메커니즘에서 문제가 생겨 과도하게 축적되게 되면 세포의 지질 및 핵산 필수 요소를 파괴하여 기능 장애를 유도하고 이는 결국 개체의 노화로 이어진다는 학설이다. Tolmasoff 등은 세포 내 활성 산소를 조절하는 가장 중요한 효소인 SOD(Super Oxide Dehydrogenase)의 활성이 높은 포유동물일수록 수명이 길다는 점을 강조하였고 쥐를 이용한 동물 실험에서 vitamin E등의 항산화 물질을 지속적으로 먹인 집단이 그렇지 않은 일반 집단에 비해 수명이 길어진다는 점이 관찰되면서 노화에 대한 이유로 free radical 설이 주목받고 있다.

나이가 많아질수록 과도하게 생성된 활성 산소에 의한 세포의 피해가 누적되게 되고 이로 인해 노화가 진행된다고 보기 때문에 과도한 활성 산소를 적절히 제거해주면 인간의 수명이 그만큼 길어질 수 있을 것으로 기대된다. 그런 이유로 인체에 잘 맞는 항산화물을 찾는 연구가 최근 크게 각광받고 있다.

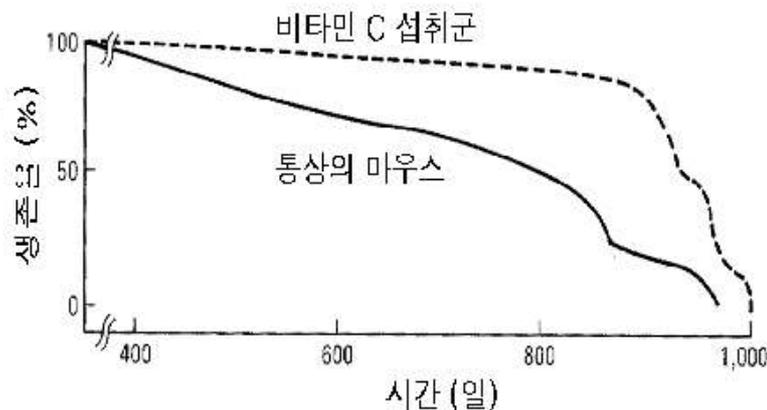


그림 . Vitamin C와 수명. (Massie 등 Gerontology 1984. 인용)

## 제 2절 노화와 에이파토시스

에이파토시스는 프로그램 된 세포의 사멸 기작으로 물리적인 충격에 의해 세포가 밖으로 터지면서 죽는 네크로시스와는 구분된다. 특정한 세포 내 신호에 의해 에이파토시스가 시작되면 세포는 효소들에 의한 연쇄반응으로 신호가 전달되고 최종적으로 caspase 3라는 효소가 활성화 되면 이것에 의해 세포는 핵의 DNA가 절편으로 잘리면서 죽기 시작한다.

에이파토시스의 특이적 징표로는 핵의 응축, DNA의 절편화, 에이파토틱 바디 형성 등이 있는데 네크로시스와는 달리 세포의 내용물이 바깥쪽으로 분출되지 않기 때문에 해당 세포를 제외한 주위의 조직에 영향을 주지 않는다. 이러한 이유로 에이파토시스는 외부 자극을 받았을 때 자극에 노출된 일부 세포만 조속히 자살시켜 제거하여 다른 조직과 나아가 개체 전체를 보호하기 위한 생체의 프로그램 된 메커니즘으로 여겨진다.

개체의 나이가 증가할수록 에이파토시스를 유발하는 요소도 증가하게 되는데 가장 대표적인 경우가 알츠하이머 병이나 파킨슨씨 병과 같은 퇴행성 신경질환이다. 이러한 퇴행성 신경질환은 단백질의 아밀로이드 형성에 의해 유도되는데 아밀로이드화란 태어날 때부터 세포에 있었던 전구체 단백질이 어떠한 신호에 의해 응집되면서 큰 응집체를 만들고 이것이 신경 세포에 독성을 나타내는 현상을 말한다. 젊을 때는 이 전구체 단백질이 그 상태로 유지되지만 나이가 들면 이것이 아밀로이드화 될 가능성이 급격히 증가한다는 연구 결과가 있는데 이는 퇴행성 신경질환이 노화에 의한 질병임을 말해준다.

아밀로이드에 의해 피해를 입은 신경 세포는 어떠한 경로에 의해 에이파토시스가 일어난다는 사실이 여러 연구를 통해 입증되고 있기 때문에 아밀로이드가 어떻게 신경 세포의 에이파토시스를 유도하는지, 또한 이렇게 유도된 신경 세포의 에이파토시스를 어떻게 억제할 수 있는지에 대한 연구가 전 세계적으로 활발히 진행 중이다.

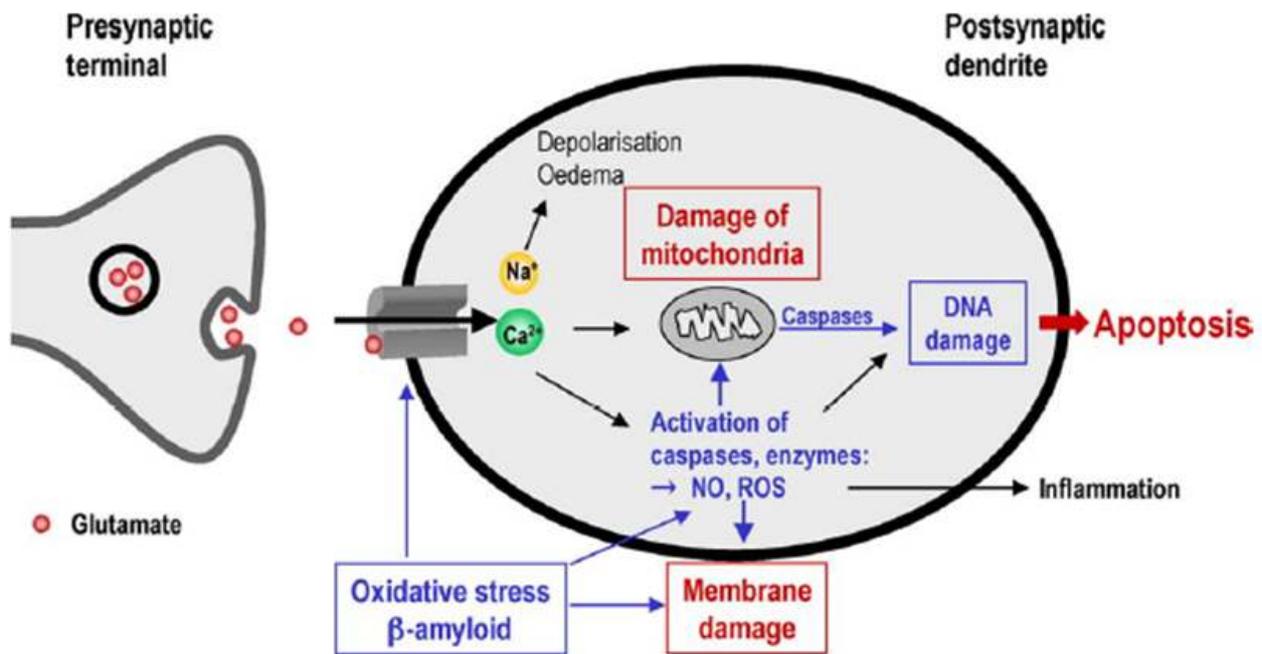


그림 . 아밀로이드 형성에 따른 신경 세포의 에이파토시스 유도 (A. Eckert Biochemical Pharmacology 66 (2003) 1627-1634)

## 제 7장 참고문헌

1. Adelson, R., Saul R.L., and Ames B.N. (1988) Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic and life span. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2706–2708.
2. Bendich, A., Machlin L.J., Scadurra O., Burton G.W. and Wayner D.D.M. (1986) The antioxidant role of vitamin C. Free Radical Biol. Med. 2: 419–444.
3. Frei, B., Stocker R. and Ames B.N. (1988) Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9748–9752.
4. Halliwell, B. and Gutteridge J.M.C. (ed.), (1989) Free radicals in biology and medicine. 2nd ed., Pp. 1–21, Clarendon Press, Oxford
5. Brenneisen, P., Briviba, K., Wlaschek, M., Wenk, J., and Scharffetter–Kochanek, K. (1997) Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) increases the steady–state mRNA levels of collagenase/MMP–1 in human dermal fibroblasts. Free Radic. Biol. Med., 22: 515–524.
6. Ahmed N.U., Ueda M. and Ichihashi M. (1999) Induced expression of p16 and p21 proteins in UVB–irradiated human epidermis and cultured keratinocytes. J Dermatol Sci 19: 175–181.
7. Wang C.B., Yao R.Y., Liu Z.T., Zhong W.Z., Liu X.P. and Wang Y.J. (2002) Protective effects of polypeptide from *Chlamys farreri* on hairless mice damaged by ultraviolet A. Acta Pharmacol Sin 23: 813–818
8. Tyrrell, R.M. (1991) UVA (320–380 nm) radiation as an oxidative stress. In: Sies H., ed. *Oxidative stress.*, London: Academic Press; 57–841.
9. Kondo, S., Mamada, A., Yamaguchi, J and Fukuro, S. (1990) Protective effect of racemic alpha–tocopherol on the cytotoxicity of ultraviolet B against human skin fibroblasts *in vitro*. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 7:173–177.
10. Tobi S.E., Gilbert M., Paul N. and McMillan T.J. (2002) The green tea polyphenol, epigallocatechin–3–gallate, protects against the oxidative cellular and genotoxic damage of UVA radiation. Int J Cancer 102: 439–444
11. Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. Cell 88: 335–365

12. Desagher S. and Martinou J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 10: 369–376
13. Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R.J., Matsuda H. and Tsujimoto Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14681–14686
14. Liu X., Kim C.N., Yang J. and Wang X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86: 147–157
15. Tang D. and Kidd V.J. (1998) Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J. Biol. Chem.* 273: 28546–28552
16. Rhee W.J., Kim E.J. and Park T.H. (1999) Kinetic effect of silkworm hemolymph on the delayed host cell death in an insect cell-baculovirus system. *Biotechnol. Prog.* 15:1028–1032
17. Rhee W.J. and Park T.H. (2000) Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 186–190
18. Kim E.J., Rhee W.J. and Park T.H. (2001) Isolation and characterization of an apoptosis-inhibiting component from the hemolymph of *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 224–228
19. Hardy J. and Selkoe D.J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–356
20. Chun H.S., Gibson G.E., DeGiorgio L.A., Zhang H., Kidd V.J. and Son J.H. (2001) Dopaminergic cell death induced by MPP(+), oxidant and specific neurotoxicants shares the common molecular mechanism, *J. Neurochem.* 76, 1010–1021.
21. MELISA J. BAPTISTA, MARK R. COOKSON, and DAVID W. MILLER. (2004) Parkin and  $\alpha$ -synuclein: Opponent Actions in the Pathogenesis of Parkinson's Disease, *THE NEUROSCIENTIST* 10, 63–72
22. Xu J., Kao S.Y., Lee F.J.S., Song W., Jin L.W. and Yankner B.A. (2002) Dopamine-dependent neurotoxicity of  $\alpha$ -synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nat Med* 8:600.
23. <http://www.kttc.or.kr/>, 한국기술거래소, 기술 및 시장 동향 - 향산화제

24. Ruy S.Y., Oak M.H., Yoon S.K., Cho D.I., Yoo G.S., Kim T.S. and K.M. Kim (2000) Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*, *Planta Med.* 66 (2000) 358-60.
25. Sung Y.H. and Lee G.M. (2005) Enhanced human thrombopoietin production by sodium butyrate addition to serum-free suspension culture of bcl-2-overexpressing CHO cells. *Biotechnol Prog* 21(1):50-7.
26. Lee S.K. and Lee G.M. (2003) Development of apoptosis-resistant dihydrofolate reductase-deficient Chinese hamster ovary cell line. *Biotechnol Bioeng* 82(7):872-6.
27. [http://www.scanbur.eu/products/Lab\\_animals\\_bkl\\_SD.htm](http://www.scanbur.eu/products/Lab_animals_bkl_SD.htm)
28. Porsolt R.D., Bertin A. and Jalfre M. (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *ArchIntPharmacodynTher*, 229:327-336
29. Report of the AVMA Panel on Euthanasia, (2002)