GOVP1200945157

최 종 연 구 보 고 서

칠게로부터 의약신소재 단백질 개발 및 실용화

Development and application of new pharmaco-medical proteins from the crab *Macrophthalmus japonicus*

중앙대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "칠게로부터 의약신소재 단백질 개발 및 실용화" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 12월 5일

주관연구기관명 : 중앙대학교
주관연구책임자 : 김 하 형
공 동 연 구 원 : 황 광 우

요 약 문

Ⅰ. 제 목

칠게로부터 의약신소재 단백질 개발 및 실용화

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

우리나라 서해안에 서식하는 해양무척추동물 갑각류에 속하는 칠게를 자원으로 하여 단백질을 추출, 개발 후 그 암세포 결합과 항암 효력을 확인하고 이를 의약용 시약 및 기능성 식품소재로 활용, 개발하여 국내 해양자원 소스로서의 중요성을 널리 인식시키고자 함.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

우리나라 자원생물로부터 신규 단백질의 확보를 위하여 칠게를 서해 갯벌에서 채취하고 그 혈림프로부터 새로운 기능의 렉틴이 존재함을 확인하였으며, 이를 단일물질로 분리하고, 그 생리활성에 대해 연구하였음. 또한, 칠게에 존재하는 렉틴을 대량생산하기 위하여 클론닝을 실시하였고, 새로운 항암제 개발등에 응용함과 동시에 세균 방어수단과 암세포와의 결합등에 유용한 물질로 확인된 렉틴의 구조와 기능에 대한 연구 수행을 하였음.

Ⅳ. 연구개발 결과

칠게 혈림프로부터 크로마토그래피법에 의해 렉틴 단백질을 단일 물질로 분리, 정제하고, 이 단백질이 시알산과 결합하는 특성을 가지고 있으며, 최적 안정성, 활성, 구조적 정보와 같은 특성을 규명후, 특히 대장암세포에 대한 사멸효과, 마이토젠 효과, 대장암 세포에 대한 결합력등과 같은 활성을 확인하였음. 또한, RNA를 추출하여 cDNA library를 구축하였으며, 특히, 다양한 생물로부터 c-lectin like domain이 갖는 공통 아미노산을 이용하여 부분 동정에 성공하였고, 이미 동정된 렉틴을 이용하여 HEK293, RAW264.7, Jurkat and Raji cell lines등 여러 면역 세포에 발현시킴으로써 그 기전을 연구하였음. 발현된 RAW264.7에서는 NO 생산과 IL-1β 생산이 증가되는 것을 확인하였으며, 이는 칠게로 부터 얻은 렉틴

이 항암효과를 갖고 있음과 동시에 선천성 면역 증강에 도움을 주는 유용한 의약신소재임을 나타내는 결과로 해석됨.

V. 연구개발 결과의 활용계획

본 연구과제에 의해 얻어진 단백질은 국내특허등록을 받아 신규성, 진보성, 상업성과 국내외 논문발표로 학술적 검증을 받았으며, 렉틴 유전자 확보 기술이 확립되고 산업화의 기초가 되는 렉틴의 대량 생산이 가능하게 되어 항암 활성을 이용하여 새로운 개념의 항암 치료제로서 적용이 가능할 것으로 기대됨.

SUMMARY
(영문요약문)

I. Title

Development and application of new pharmaco-medical proteins from the crab *Macrophthalmus japonicus*

II. Objectives

To investigate the application and usefulness as a new pharmaco-medical or nutraceutical composition of the Korean crabs, crustacean, invertebrate populates in the west coast area, the functional protein that possesses the important biological functions including the binding to cancer cells, mitogenic and anticancer activity was isolated ad investigated.

III. Contents and scope

The present study was performed to assure a new protein source from Korean marine crab. For these, the crab was collected at the west coast of Korea, and used to identify a new protein. We tried to purify and characterize a novel lectin for the investigation of its biological functions. To elucidate the physiological function, RNA extracted from the hemolymph of the crab and primers designated according to the conservative regions of lectins. From using these methods and results, a protein with an anticancer activity as well as structural information was investigated.

IV. Results

In the present study, a lectin has been isolated by using chromatographic methods from the crab. The stability, function, structure of a lectin with a sialic acid-binding specificity was investigated. Especially, this lectin exhibited a strong anticancer activity against human colon cancer cells and mitogenic effect. The partial sequences of the lectin was investigated, which were used consensus sequences of c-lectin like domain from several different species. In order to confirm the possibility of the effect on immune system, we tried to

express lectin on HEK293, RAW264.7, Jurkat and Raji cell lines. RAW264.7 expressed TL-P has more produced NO and IL-1β than wild type. It will be possible for cloned lectin from crab to increase the innative immunity against various pathogens and cancers.

V. Practical use

The present lectin was granted a domestic patent that must be new, inventive, and industrial applicable as well as published in scientific research papers. In addition, the new protein and the development method was established for the research on the industrial use. The present lectin will be used as one of the positive anticancer-candidate drug.

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1 Introduction

Chapter 2 Status and Information

Chapter 3 Methods and Results

Chapter 4 Achievement and Contribution

Chapter 5 Practical use

Chapter 6 References

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요
* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술정보
* 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구개발결과의 활용계획
* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

제 6 장 참고문헌
* 보고서 작성시 인용된 모든 참고문헌을 열거

별 첨 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절 목적

○ 해양자원은 해양생물자원, 해양광물자원, 해양천연가스, 해양에너지로 분류할 수 있으며, 그 중 해양생물자원은 전 세계의 동물성 단백질 공급의 약 1/6 을 차지할 정도로 세계 식량자원으로서 매우 중요한 부분을 차지하고 있음.

○ 해양생물은 인체에 유용한 가공 식품으로 이용되고 있으며, 해양생물이 갖는 특수한 대사기능과 생태물질 등을 공업 또는 의약품 원료로 사용하고자 최근 새로운 시도가 이루어지고 있음.

○ 세계적 해양생물자원의 수급전망은 개발도상국의 인구증가 등에 의해 더욱 어려워 질 것으로 예상되어, 미래에 대비한 안정공급 확보책 등의 강구가 시급하며, 이를 위해 해양생물자원은 재생산 가능한 자원으로 적절한 관리를 한다면 영속적 이용이 가능하다는 인식하에 기르는 어업의 적극 추진 등 해양생물자원의 증대를 위한 자원배양, 관리기술개발, 시설정비, 어장정비 등을 광범위하게 추진해 나가는 것이 필요함.

○ 해양생물은 단순한 식량자원으로 이용하는 차원을 넘어 생명공학과 정밀화학의 핵심분야로서 21세기 국가 첨단산업으로 해양생물공학을 육성하여야 하며, 해양생물은 신물질의 원천으로서 해양생물자원을 확보하려는 국가간의 경쟁이 치열해지고 있어 자원선점을 위해 각국은 활발하게 연구를 전개하고 있음.

○ 해양에는 다양한 생물종이 존재하며 이들에 대한 연구는 막 시작 단계로 그 활용도는 무궁무진함.

○ 국내의 해양신물질 개발은 육상생물 유래 신물질 개발에 비해 기술적 격차가 매우 크며, 다양한 해양생물로부터 생리 활성물질을 추출, 개발하

여 항암, 항노화, 비만치료제 등 신의약품과 무공해 살충제, 세제, 화장품 등 신기능성 산업용 소재 개발이 필요함.

○ 현재 우리나라는 인적, 물적 자원 규모가 미비하며 개발 목표도 의약품 등 고부가가치 제품보다는 건강보조식품이나 식품첨가제에 치중되어 있는 실정이나, 해양생물을 이용한 신물질 실용화분야는 그 역사가 짧기 때문에 체계적인 운영과 집중적 연구비 지원이 보장될 경우 단시일내에 경쟁력 확보가 가능한 분야로 사료됨.

○ 칠게는 우리나라 서, 남해안의 비교적 진 펄갯벌에 살며 전국적으로 갯벌에 제일 많은 종으로, 지역에 따라 게장을 담궈 먹기도 하고 남해안의 일부지역에서는 낙지잡이용 미끼로 이용되는등 극히 초보적인 활용도에 지나지 않으며, 생물자원으로서의 중요성은 거의 무시되고 있는 실정임.

○ 칠게의 학명은 Macrophthalmus japonicus로 몸 길이와 너비가 1:1.5 정도이며 앞이 조금 넓은 사다리꼴로, 큰 것은 몸의 너비가 약 6-7센티미터에 달하고 짙은 녹색을 띄고 있음.

○ 칠게의 집게발은 하늘색이 짙은 것과 분홍색이 나는 것이 있으며 수놈의 집게발은 크고 암놈은 아주 작으며, 걷는 다리에 털이 많이 나 있고, 매년 4-5월 짝짓기철에는 수놈 집게발을 하늘높이 들었다 내렸다 하는 동작을 반복하여 암놈을 유혹하고, 맑은날 오후 2-3시경 구멍밖으로 나와 몸을 말리는 행동을 함.

○ 본 과제에서는 우리나라 서해안에 서식하는 해양생물중 칠게를 자원으로 하여 유용 단백질을 추출, 분리후 그 효능성을 확인하고 해양자원 소스로서의 중요성을 널리 인식시키고자 함.

2 절 필요성

○ 생체를 구성하고 있는 세포는 막을 사이에 두고 세포자신과 외부와를 구별하고 있으며, 세포막에는 여러 세포간 접착분자가 존재하고 있고, 이를 통하여 여러 생물학적인 정보가 외부로부터 세포내에 전해지게 되는데, 이 세포간 접착분자의 중요한 일례로 렉틴을 들 수가 있음.

○ 렉틴은 단당 혹은 올리고당과 특이적으로 결합하는 단백질의 총칭으로 주로 식물에서 많이 발견되고 있으며, 일부 무척추동물, 미생물, 바이러스 등에서도 발견되는데, 적혈구를 응집시켜 침강시키는 작용이 잘 알려져 있고, 혈액형을 분류하기도 하며, 최근에는 암세포를 특이적으로 응집시키는 기능이 밝혀지는 등 다양한 기능을 갖고 있음.

○ 즉, 렉틴은 특정한 구조를 갖고 있는 당과 결합할 수 있게 되며, 렉틴성 물질을 갖고 있는 세포와 그것에 결합하는 당을 가지고 있는 세포간의 선택적 정보교환을 성립하게 함.

○ 이와 같은 점으로부터 렉틴에 관한 연구는 '분자인식'을 통한 세포간의 정보전달에 관한 연구를 해석하는데 중요한 과제로 선택할 수 있으며, 현재, 이와 같은 분자인식 기구를 해명하고자 하는 연구의 흐름으로서는, 분자 및 세포레벨에서의 인식을 중심으로 신경계, 면역계, 염증반응 등을 중심으로 이루어지고 있고, 감염, 암, 류머티즘 등 질병에 있어 당의 역할 등이 연구되어 지고 있음.

○ 암세포는 정상세포가 변형된 것으로 다른 세포에 뚫고 들어가는 단백질의 분비를 증가시키고 절대 죽지 않고 계속적으로 증식하며 전이하여 세포 골격을 와해시키기도 하므로, 암을 제어하기 위해서는 암의 특징만큼 종합적인 대책이 필요함.

○ 암의 발생과 증식에 가장 큰 원인이 환자 몸 속 면역계의 결함에 있다는 것이 밝혀지면서 생체반응조절물질(biological response modifier)을 통해서 면역기능을 조절해줌으로서 면역계로 하여금 암을 제거하게 하려 함.

○ 미꾸라지, 상기생, 강낭콩, 산수유 등에서 추출한 렉틴은 임파구 자극 분열 효과를 가지고 있다고 알려져 있으며, 이들 렉틴은 T 림프구 자극 분열이나 B 림프구를 자극하여 면역활성을 높이기도 하고, 암세포를 응집시키는 항종양 효과를 갖는다고 보고됨.

○ 본 연구에서는 세포가 암화가 진행된 경우 그 분포비율의 극적인 변화가 보고된 시알산을 인식하는 렉틴을 해양 무척추동물 갑각류에 속하는 칠게에서 분리·정제하여 그 성상을 밝히고, 유전자 클로닝에 의하여 구조 해석을 실시하여 생리화학적 기능을 해석함과 동시에 시알산과 렉틴과의 결합양식을 연구하여 분자인식기구를 규명한 의약 신소재를 발굴하고자 함.

3 절 범위

○ 본 연구에서는 우리나라 해양자원생물로부터 신규 시알산 결합 렉틴의 확보를 위하여 해양 무척추동물 갑각류에 속하는 칠게를 서해 갯벌에서 채취하고 그 혈림프로부터 새로운 기능의 렉틴이 존재함을 확인하며, 이를 단일물질로 분리하기 위한 방법을 시도하고, 그 생리활성에 대해 연구하였음.

○ 또한, 칠게에 존재하는 시알산 결합 렉틴의 양을 대량생산하기 위하여 동정 및 클론닝을 실시하고, 클로닝한 렉틴을 여러 생체내 방어기전인 림프구에 발현시킴으로써 새로운 항암제등에 응용함과 동시에 세균 방어수단과 암세포와의 결합 등에 유용한 물질로 확인된 렉틴의 기능에 대한 연구를 수행 하였음.

○ 렉틴의 대량 생산을 위하여 칠게의 혈림프에서 렉틴을 동정하고 cDNA library를 확보하여 렉틴을 생산하는 목표 유전자를 클로닝함. 시알산 결합 렉틴의 염기 서열을 이용한 단백질 발현 시스템을 구축하고 몇 가지 면역 세포주에 transfection하여 클로닝한 렉틴을 발현시킴.

○ 렉틴을 발현하는 면역 세포주의 생리 활성을 연구하여 병원균에 대한 방어 수단, 암세포와의 결합 및 암세포 사멸 능력에 대한 렉틴의 기능과 영향을 확인함.

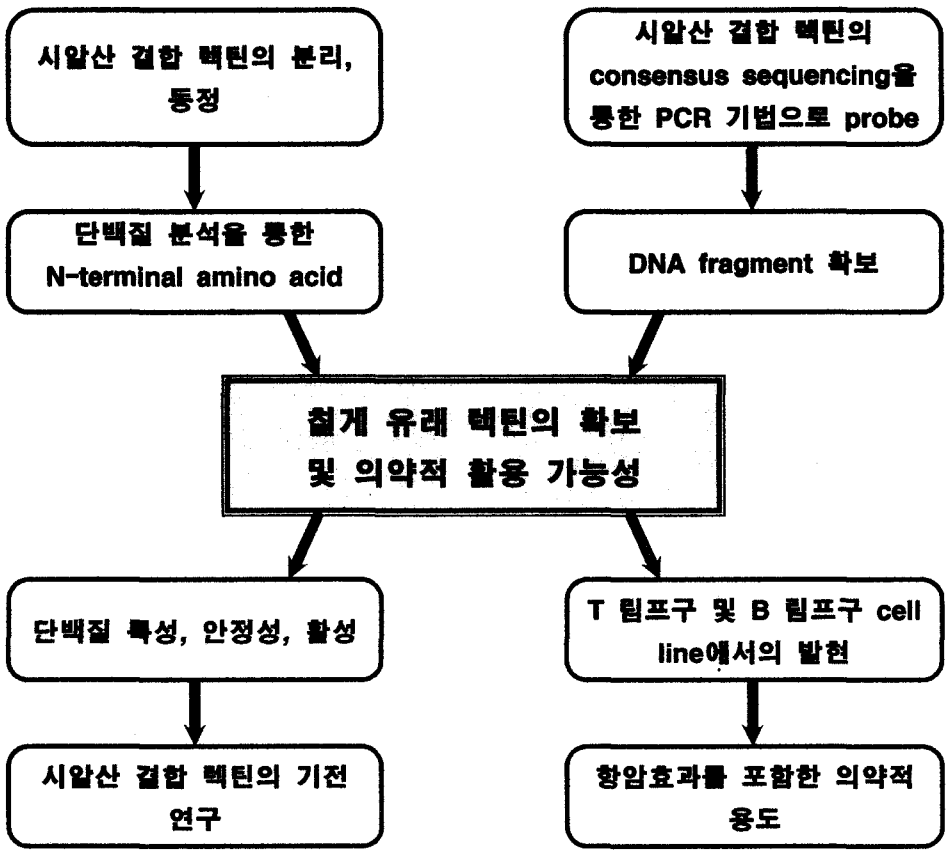
○ 자연계에 널리 존재하는 렉틴은 단백질 또는 당단백질로 구성되어 있으며 세포막 표면에 있는 특이한 탄수화물 구조에 항원과 항체 사이의 친화력과 비슷하거나 그 이상의 친화력을 가지고 결합한다는 성격이 알려져 있고, 당단백질의 당은 보통 단백질의 asparagine, hydroxylysine, serine, threonine에 부착하며 이러한 당에는 glucose, glusoamine, galactose, galactosamine, mannose, sialic acid 등이 있음.

○ 시알산은 N-acetylneuraminic acid (NeuAc)나 N-glycosylylneuraminic acid (NeuGc)와 같은 20개 이상의 유도체를 포함하며, 대부분의 시알산은 C-4, C-7, C-9에서 하나 이상의 O-acetyl 치환체를 가지며, 각종 조직 및 세포에서 발견되는데, 사람의 sialoproteins과 gangliosides에서는 NeuAc가 가장 흔하게 발견되며 신경세포에서는 변형된 시알산이 발견되고, 악성 melanoma는 9-O-acetyl-NeuAc와 같은 시알산을 가지며 colon carcinoma는 NeuGc를 가진다고 보고됨.

○ 현재까지 알려진 렉틴의 대부분은 D-mannose, D-galactose를 특이적으로 인식하며, 몇 가지 렉틴만이 구조적, 기능적으로 중요한 역할을 하는 시알산을 특이적으로 인식한다고 알려져 있으며, 시알산을 특이적으로 인식하는 렉틴 중 대량 생산할 수 잇는 것은 매우 한정적임.

○ 무척추 동물 중 갑각류는 시알산을 합성하지는 못하지만 다양한 sialoconjugate를 발현하는 시알산 결합 렉틴을 만들어 내며, 이러한 렉틴은 9-O-NeuAc와 4-O-NeuAc를 특이적으로 인식하는 것으로 알려짐.

○ 또한, 시알산 결합 렉틴의 양이 제한되어 있으므로 이 물질의 항암효과 및 적용을 위해서는 클로닝을 통한 대량 생산이 필요하며, 대량 생산된 렉틴을 사용하여 항암 효과의 기전 연구 및 각종 림프구에서 발현시킴으로서 새로운 항암제 개발에 기여할 수 있음.


시알산 결합 펙틴의 분리, 동정
시알산 결합 펙틴의 consensus sequencing을 통한 PCR 기법으로 probe
단백질 분석을 통한 N-terminal amino acid
DNA fragment 확보
첨게 유래 펙틴의 확보 및 의약적 활용 가능성
단백질 특성, 안정성, 활성
T 림프구 및 B 림프구 cell line에서의 발현
시알산 결합 펙틴의 기전 연구
항암효과를 포함한 의약적 용도

<연구 최종 목표의 흐름도>

제 2 장 국내외 기술개발 현황 및 과학기술 정보

1 절 국내외 기술개발 현황

○ 해양생물 관련 구조분석, 기술 분야의 경우 단백질 및 펩타이드 개량 기술이 선진국의 85% 수준인 것으로 나타나 가장 선진국에 근접하였으며 그 다음으로는 탄수화물 유래 개질 기술(75%), 지질 개질기술 및 기능성 물질의 구조결정기술이 각각 선진국의 70% 수준인 것으로 알려져 있음.

○ 지난 30여년의 기간에 11,000종 이상의 신물질이 해양생물에서 발견되었으며 강력한 활성을 가진 20여종의 물질은 산업적 개발이 완료되었거나 진행 중에 있고 유기물질 이외에 유용효소, 다당류 등의 고분자물질도 개발 중으로, 대표적인 해양생물 추출물질은 산호의 소염진통제 수도테로선(pseudoterosins), 갑각류의 외피에서 추출되는 키토산(chitosan), 멍게의 면역억제제 디뎀닌 B(didemnin B), 이끼벌레의 항암제 브리오스타틴(bryostatins) 등이 널리 알려짐

○ 우리나라의 해양신물질 개발은 선진국에 비하여 낙후되어 있으나 최근 공공연구기관과 학계를 중심으로 기술적 기반이 조성되고 있으며 100여종의 신물질이 이미 추출되어 산업계의 관심도 점차 증가하고 있음.

○ 한국해양연구소에서는 남극, 열대해역에 진출하여 생리활성물질과 유용미생물 균주를 분리 실험 중이며, 최근에 국내에서 추진되고 있는 천연소재를 이용한 기능성 제품의 개발은 최첨단의 생명 공학적 기술을 이용하여 부가가치의 창출과 그 기능성을 극대화하려는 방향으로 진행되고 있음.

○ 미지의 유전자를 검색하고 규명하는 기법들을 연구하고 응용하여, 렉틴 뿐 아니라 새로운 유전자를 확보하기 위한 기본 개념 및 실험 방법이

도입되었음.

○ 인간과 실험 동물들의 DNA 및 각 유전자 mRNA는 대부분 연구되어 공개되어 있으나, 갑각류를 포함한 해양 생물의 유전 정보는 아직 많은 부분이 밝혀져 있지 않음. 따라서 본 연구 성과는 미개척 분야에 대한 기술 향상이며 해양 생물을 연구하는 연구자들에게 구체적인 단서를 제공함.

○ 생물의 대사작용에 의하여 생성되는 단백질등을 산업적으로 개발하는 것은 대표적인 고부가가치 산업인 생물산업, 정밀화학 및 의약산업의 핵심분야이며, 미국, 일본 등에서는 21세기 생명공학의 핵심분야에 해양천연물을 포함시켜 국가적인 차원에서 연구개발을 적극 추진하고 있음.

2 절 과학기술정보

○ 우리나라는 갯벌이 잘 발달되어 있는 세계적으로 몇 안 되는 나라 중의 하나로 이 곳에 서식하는 동물의 자원 개발은 앞으로 석유 등의 광물자원 개발에 뒤지지 않는 경제적 파급효과를 가져올 것으로 예상됨.

○ 최근에는 중국, 인도 등 개도국에서도 이 분야의 기초연구가 활발히 진행되고 있으며 제약산업과 화학산업 분야의 거대 민간기업에서도 연구투자의 상당부분을 해양생물로 이전하는 추세임.

○ 산업적 개발은 의약품 분야에서 가장 활발하며 농약, 기능성화장품, 건강보조제, 환경친화적 화학소재 등도 포함되며, 개발의 대상에는 무척추동물, 저서동물과 해조류를 포함하여 극지, 심해에 이르기까지 전세계의 주요 해역이 모두 포함됨.

○ 최근 일부 선진국은 신물질의 탐색 단계를 벗어나 대량생산 등 산업화에 비중을 두고 있으며 미국의 국립암연구소(NCI)에서는 항암제를 생산하는 해면과 이끼벌레를 해저에서 대규모로 양식하여 해당물질을 대량으로

확보하는 단계에 돌입하였음.

○ 현재 산업화되어 있는 해양생명공학 제품으로는 파단, 잡종 줄무의 농어, 육종언어 신품동, 한천 및 아가로스, 소염물질(Pseudoteropsin)을 이용한 화장품 개발등이며, 각각 미국시장규모로 5천만 달러에서 3억 달러내외의 수요가 있는 것으로 알려져 있음.

○ 우리나라의 해양신물질 개발은 선진국에 비하여 낙후되어 있으나 최근 공공연구기관과 학계를 중심으로 기술적 기반이 조성되고 있으며 100여종의 신물질이 이미 추출되어 산업계의 관심도 점차 증가하고 있음.

○ 해양생물을 대상으로 한 해양생명공학기술은 이상과 같은 해양생물의 다양성과 서식환경의 특성 등으로 인하여 육상 바이오산업에 비하여 신물질 또는 신기능성 유전자의 개발 성공 가능성이 높으며, 시장 성장속도가 더욱 빠를 것으로 예상됨, 특히, 해양 바이오산업시장의 경우 1998년 세계시장규모는 약 8억달러에 달하나 2010년경에는 약 163억달러 규모로 성장할 것으로 예상되고 있음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

연 구 내 용	연구결과	연구수행방법 (이론적 · 실험적 접근방법)	비 고
렉틴의 분리	단백질원액 추출및 적혈구 응집반응, 크로마토그래피에 의한 렉틴의 분리	혈림프로부터 단백질원액을 추출하고 적혈구 응집반응에 의해 렉틴의 존재 확인각종 컬럼에 의한 크로마토그래피에 의해 렉틴성분의 분리	
시알산 결합 특성	당결합특성 확인, 당단백질에 대한 결합 특성	단당에 대한 결합특성 확인, 시알산이 결합된 당단백질에 대한 결합 특성확인	
렉틴의 특성	금속이온이 렉틴활성에 미치는 영향, 온도, pH 변화에 대한 렉틴의 활성	렉틴활성에 금속이온이 미치는 영향 확인, 온도, pH 변화에 대한 렉틴의 활성의 변화	
Total RNA로부터 mRNA전환 및 first strand DNA/second strand DNA 합성	Oligo dT가 coating 되어 있는 beads를 사용하여 분리	Dynabeads Oligo(dT)$_{25}$와 Dynal MPC-S (Dynal Biotech)를 이용하여 total RNA sample에서 mRNA를 분리	
cDNA library 제작	Column chromatography를 이용한 cDNA purification	합성된 cDNA를 size fraction하여 cloning에 필요한 큰 size의 DNA만을 얻어냄	
렉틴의 안정성 장기보관과 단백질 안정을 위한 연구	조건변화에 따른 최적 활성 유지 조건 검토	완충액의 조건, 방부제, 효소저해제, 2-mercaptoethanol첨가와 금속이온, pH, 온도에 따른 활성을 비교	
기존 렉틴과의 활성비교 이미 보고된 렉틴과의 기능비교	당결합력을 당단백질에 대해 비교검토함	적혈구응집저해반응을 통해 기존의 렉틴과 활성을 비교하고 당단백질에 대한 반응을 비교함.	
렉틴의 구조	구조적 특징과 수식에 따른 활성연구	Circular dichroism에 의해 2차구조를 확인하고 아미노산의 수식에 의해 활성부위의 아미노산 파악	
암세포 독성을 통한 기능	대장암, 위암세포에 대해 세포 사멸효과 확인	암세포에 대해 사멸효과를 확인하고 특히 사람 대장암, 위암의 증식을 억제함을 확인	
마이토젠 효과에 의한 면역계 영향	사람 림프구와 마우스 비장세포에 대해 마이토젠 효과 확인	기존의 렉틴과 마이토젠 효과를 BrdU incorporation assay법을 통해 확인함.	
렉틴의 아미노산 서열로부터 primer 제작	렉틴의 아미노산 서열로부터 예상되는 mRNA 염기서열을 확보하고 이를 이용하여 PCR primer를 제작함.	Vector NTI advanced 10의 back translation 기술은 아미노산의 서열을 분석하여, 이를 합성하기 위해 필요한 mRNA 염기 서열 중 확률 높은 후보들을 제시해 줌.	

연 구 내 용	연구결과	연구수행방법 (이론적 · 실험적 접근방법)	비고
primer을 이용하여 PCR, TA 클로닝 및 염기서열 확인	얻어진 primer를 이용하여 cDNA library를 주형으로 PCR 반응을 수행하고 DNA band들을 TA 클로닝하여 염기 서열을 확인함	NCBI Web BLAST을 이용하여 Genebank에 등록되어 있는 염기 서열들과 본 실험에서 얻어진 DNA의 염기 서열을 비교함.	
다양한 종의 생물에서 발현되는 렉틴 유전자로부터 primer 제작	다양한 종의 생물에서 발현되는 렉틴 유전자의 염기 서열을 비교하고 유사성이 높은 부분의 양쪽 말단을 PCR primer로 제작함.	Vector NTI advanced 10 의 align 기술은 여러 개의 염기 서열을 비교한 후 각 염기 서열마다 다른 것들과의 유사성을 검토함.	
목표 유전자 후보 DNA fragment 확보 및 염기 서열 확인	제작한 primer을 이용하여 cDNA library를 주형으로 PCR 반응을 수행함. 결과물을 TA cloning하고 염기 서열을 확인하여 목표 유전자 후보 DNA fragment를 확보함.	여러 종의 렉틴 유전자들 가운데 유사성있는 부분으로 제작한 primer로 수행한 PCR 결과이므로 목표 유전자를 만들어내는 유전자로 평가됨.	
암세포 결합력	렉틴의 암세포 결합에 대한 반응성의 차를 형광표지한 렉틴을 이용하여 대장암에 대해 확인함.	렉틴의 암세포 결합에 대한 반응성의 차를 확인하기 위해 FITC 결합 렉틴을 제조후 현광현미경으로 관찰	
암세포에 대한 사멸효과	대장암, 위암세포이외의 간암, 폐암세포에 대한 세포독성 및 대장암에 대한 사멸효과 확인	대장암, 위암, 간암, 폐암세포를 배양하면서 렉틴을 가하여 암세포에 대한 독성확인. FACS에 의해 세포사멸효과 확인	
암세포인식에 대한 당화의 영향	당구조의 변화에 따른 대장 암세포 결합양식의 변화를 확인	당가수분해효소 처리한 암세포와 처리하지않은 암세포의 결합력을 형광을 이용하여 비교	
단백질 발현 시스템 구축	Transfection host 세포주에 목표 유전자를 발현하는 vector를 transfection하여 시알산 결합 렉틴의 염기서열을 이용한 단백질 발현 시스템을 구축함.	Transfection host 세포주에 목표 유전자를 발현하는 vector를 transfection하여 시알산 결합 렉틴의 염기서열을 이용한 단백질 발현 시스템을 구축함.	
면역 세포 활성에 미치는 영향	단백질 발현 시스템을 T 림프구와 B 림프구를 포함한 몇 가지 면역 세포주에 transfection하고 ELISA를 통한 cytokine 생성을 확인하여 면역 세포 활성에 미치는 영향을 연구함.	단백질 발현 시스템을 T 림프구와 B 림프구를 포함한 몇 가지 면역 세포주에 transfection하고 ELISA 방법으로 이들의 cytokine 생성을 확인하여 면역 세포 활성에 미치는 영향을 연구함. 기능성 식품 개발 가능성 제시	
항암 활성에 미치는 영향	pcDNA3.1-TL-P cDNA를 이용한 단백질 발현 시스템을 T lymphoma 세포주인 Jurkat 및 B lymphoma 세포주인 Raji cell-line에 적용하여 림프종에 대한 lectin의 항암활성을 확인함	Jurkat 및 Raji cell-line에 Lipofectamine을 이용하여 pcDNA3.1-TL-P cDNA 및 음성 대조군으로 empty vector (pcDNA3.1 only)을 각각 transfection한 후 세포수를 동일하게 보정하고 24시간 후 MTT assay를 수행하여 세포의 생존률을 확인함.	

○ 적혈구 응집반응

대부도 갯벌에서 채취한 칠게 118마리의 혈림프에서 약 18㎖의 단백질 원액을 얻었으며, 이는 마리당 약 0.15㎖에 해당한다. 단백질원액에 대해 적혈구 응집반응을 실시한 결과, 사람 ABO 형에 대해서는 각각 음성반응을 나타냈으나, 토끼, 랫트, 흰쥐에서는 양성반응을 나타냈다(Table 1). 특히, 토끼 적혈구는 256배, 랫트 적혈구는 32배, 흰쥐 적혈구는 16배로 희석한 경우까지 양성반응을 나타냈다. 사람의 적혈구에는 주로 NeuAc가 존재하며 토끼, 랫트, 흰쥐의 경우에는 NeuAc 이외에 NeuGc, O-acetylsialic acid 등이 존재하는 보고로부터 칠게 원액에는 렉틴이 존재할 가능성이 높은 것으로 확인되었다.

Table 1 - Hemagglutination of erythrocytes by M. Japonicus lectin

Erythrocytes[a]	Common species of sialic acid	Hemagglutination titer[b]
human A	NeuAc	-
human B	NeuAc	-
human O	NeuAc	-
rabbit	NeuAc/NeuGc/50%O-AcSia	256
rat	NeuAc/NeuGc/25%O-AcSia	32
mouse	NeuGc/20%O-AcSia	16

a. Erythrocytes were prepared for 2% suspension in 0.15M NaCl.
b. Hemagglutination titer was defined as the maximum dilution fold causing agglutination.

○ 적혈구 응집저해반응

적혈구 응집반응 결과로부터 당 결합특성을 보다 정확히 확인하고자 적혈구 응집저해반응에 의해 각종 단당, 이당류 및 당단백질과의 반응성을 확인하였다(Table 2). 적혈구 응집저해반응 결과, 단백질원액에서는 단당 및 이당류에 대해서는 저해반응을 나타내지 않았으나 시알산에서 저해반응을 나타냈으며 시알산이 결합된 당단백질에 대해서도 저해반응을 나타냈다. 특히 bovine thyroglobulin의 경우 최소 저해농도가 1.95㎍/㎖로 가장 낮은 결과를 나타냈다. 일반적으로 최소저해농도가 낮을수록 당단백질에 대한 렉틴의 특이성이 높다고 보고되어 있는 점으로부터 현재 보고된

렉틴 중 S. serrata 유래 렉틴과 Paratelphusa jacquemontii 유래 렉틴의 thyroglobulin에 대한 최소저해농도가 각각 2.4㎍/㎖, 625㎍/㎖인 것과 비교하면 매우 낮은 값으로 thyroglobulin에 대한 결합력이 특히 높은 것을 알 수 있었다. Thyroglobulin에서 시알산을 제거한 asialothyroglobulin의 경우에는 최소 저해농도가 62.5㎍/㎖로 1.95㎍/㎖의 thyroglobulin에 비해 60배나 증가하는 것을 확인하였다. 또한 bovine submaxillary mucin은 62.5㎍/㎖으로 thyroglubulin에 비해서는 약한 결합을 나타냈으나, 시알산을 제거한 경우에는 125㎍/㎖으로 최소저해농도가 2배 증가하였다.

이 결과로부터 칠게 유래의 단백질원액에는 시알산을 특이적으로 인식하는 렉틴이 존재함을 확인하였으며, 당 결합력은 일반적인 렉틴의 특성과 비슷하게 단당 보다는 당단백질을 특이적으로 인식하고 그 중에서도 bovine thyroglubulin에 대한 결합성이 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 2 - Inhibition of hemagglutination activity of M. japonicus lectin

Inhibitors	Minimal inhibition concentration
D-(+) glucose	NI[a]
sucrose	NI[a]
maltose	NI[a]
methyl α-D-gluco-pyranoside	NI[a]
α-lactose	NI[a]
β-lactose	NI[a]
D-lactose	NI[a]
D(+)-mannose	NI[a]
D(+)-raffinose	NI[a]
D(+)-cellobiose	NI[a]
D(+)-galactose	NI[a]
L(-)-fucose	NI[a]
Sialic acid(N-acetylneuraminic acid)	20mM
thyroglobulin	1.95㎍/㎖
asialothyroglobulin	62.5㎍/㎖
bovine submaxillary mucin	62.5㎍/㎖
bovine asialosubmaxillary mucin	125㎍/㎖

2% rabbit erythrocytes was used for this assay.

a. No inhibition activity was exhibited at 100mM.

○ 단백질원액의 분리 및 렉틴의 정제

단백질원액으로부터 렉틴을 분리하기 위하여 먼저 원액을 22,000×g, 4℃에서 원심분리한 후 10mM PBS(pH 7.3)를 완충액으로 하여 Sephacryl S-200 컬럼으로 분리하여 1㎖씩 분취후 280nm에서 흡광도를 측정하고 전 분획에 대해 적혈구 응집반응을 실시였다. 그 결과, 분획 8-14에서는 흡광도값이 높으면서 적혈구 응집반응에 양성 반응을 나타냈으나, 그 외의 분획에서는 응집반응을 나타내지 않았다. 특히 분획 8, 9는 64배 희석한 경우까지 양성반응을 나타냈다 (Fig. 3).

적혈구 응집저해반응에 의해 thyroglobulin과 결합하는 결과를 응용하여 Sephacryl S-200 컬럼으로 분리한 분획 8-14에 대해 thyroglobulin-affinity 컬럼을 이용한 정제를 시도하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 컬럼에 결합하지 않은 물질인 분획 1-15까지는 제거하였으며, 비특이적으로 결합된 물질을 제거하기 위해 HSB(high salt buffer, 50mM Tris-HCl(pH 7.5), 1M NaCl, 10mM $CaCl_2$), LSB(low salt buffer, 50mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.3M NaCl, 10mM $CaCl_2$)순으로 세척하였으나 흡광도값이 높은 분획이 없는 것으로부터 분획 36부터는 0.3M NaCl, 10mM EDTA가 포함된 50mM Tris-HCl (pH 7.5)를 이용하여 1㎖씩 분획을 받은 후 100mM $CaCl_2$ 100㎕를 가하였다 (Fig. 4).

모든 분획에 대해 적혈구 응집반응을 실시한 결과 분획 37-41에서 양성반응을 나타내어 렉틴이 정제되었음을 확인하고 이를 MJL(M. Japonicus lectin)로 명명하였다. 정제된 MJL,을 이용하여 적혈구 응집저해반응을 실시하고 단백질원액에서의 결과와 동일한 결과를 얻어, 단백질원액에서 나타낸 당결합특성이 MJL에 의한 것임을 확인하였다.

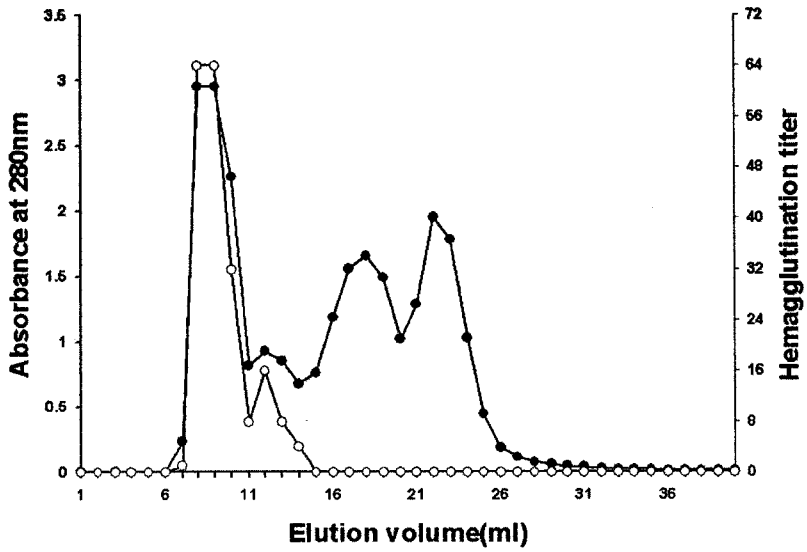


Fig 3. Elution profile of the crude protein extract obtained from the hemolymph of M. Japonicus on the Sephacryl S-200 column. ●, absorbance at 280nm.; ○, hemagglutination titer against rabbit erythrocytes.

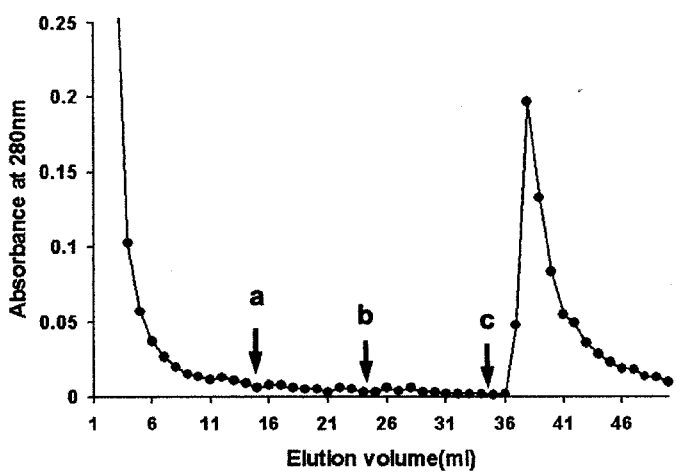


Fig 4. Elution profile of M. Japonicus lectin on the thyroglobulin-agarose affinity column. Elution buffer was used as (a),

50mM Tris-HCl, 1M NaCl, 10mM CaCl2; (b), 50mM Tris-HCl, 0.3M NaCl, 10mM CaCl2; and (c), 50mM Tris-HCl, 0.3M NaCl, 10mM EDTA.

○ 전기영동

정제된 MJL의 순도와 분자량을 확인하기 위하여 12% polyacrylamide gel상에서 전기영동을 실시하였다(Fig. 5). 그 결과 MJL은 65kDa 부근에서 97% 이상의 순도를 가지는 단일밴드를 나타냈다(Lane 3). 분자내 disulfide bond의 존재여부를 확인하기 위해 2-mercaptoethanol로 MJL을 처리하여 전기영동 상에서 밴드를 확인한 결과 동일한 위치에서 밴드를 나타냈다. 이 결과로부터 MJL은 분자간에 disulfide bond를 갖지 않는 분자량 65kDa의 단백질임을 확인하였다.

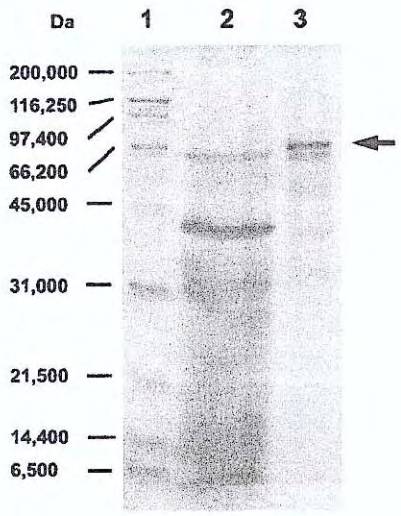


Fig 5. SDS-PAGE of M. Japonicus lectin. Lane 1, molecular weight standard; lane 2, crude protein extract from M. japonicus hemolymph; lane 3, purified MJL. Myosin(200kDa), β-galactosidase(116kDa), phosphorylase b(97.4kDa), bovine serum albumin(66.2kDa), ovalbumin(45kDa), carbonic anhydrase(31kDa), soybean trypsin inhibitor(21.5kDa), lysozyme(14.4kDa), aprotinin (6.5kDa) were used as molecular weight standards.

○ 단백질 정량 및 회수율

정제된 MJL에 대해 Bradford 법을 이용하여 각 단계별로 단백질 정량과 회수율을 확인하였다. M. japonicus 혈림프로부터 얻은 단백질원액에서 Sephacryl S-200 컬럼과 thyroglobulin-agarose affinity 컬럼을 순차적으로 거치면서 최종적으로 비활성(specific activity)이 170.7로 증가된 렉틴 1.5㎎을 얻었고 회수율은 5.6%로 나타냈다(Table 3). 이 회수율은 P. jacquemontii으로부터 affinity 컬럼을 이용하여 렉틴을 정제한 회수율 0.1%와 비교하면 5.6%로 50배 이상 높은 회수율을 나타낸다. 이는 강한 결합을 나타낸 thyroglobulin에 의한 친화성 컬럼이 분리과정에서 효율적인 방법이었음을 나타내는 결과이다.

Table 3 - Summary of purification of M. japonicus lectin

Purification step	Hemagglutination titer[a]	Total protein(㎎)	Specific activity[b]	Recovery (%)
crude protein extract	128	27	4.7	100
Sephacry S-200 fr.	128	18	7.1	66.8
thyroglobulin agarose affinity fr.	256	1.5	170.7	5.6

a. 2% rabbit erythrocytes was used for this study.

b. Specific activity is expressed as the ratio of hemagglutination titer/protein mg.

○ 금속이온이 활성에 미치는 영향

일반적으로 금속이온은 렉틴의 활성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, Cajanus cajan 렉틴의 경우 Ca2+과 Mg2+의 농도가 증가 할수록 활성이 증가하는 것으로 보고되고 있다. 반면에 Artocarpus integer 렉틴은 금속이온에 의해 활성이 영향을 받지 않는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 금속이온이 MJL의 활성에 미치는 영향을 확인한 결과, 렉틴을 EDTA 처리한 경우에는 반응이 급격히 감소되었으나 6.25mM Ca2+을 첨가한 경우 활성이 100% 유지되었으며 Mn2+ 이온의 경우에는 25% 유지

되는 결과를 얻었다(Fig. 6). 이 결과로부터 MJL은 단백질 중에 금속이온이 존재하며 이를 제거시 활성이 없어지나 금속이온을 첨가함에 따라 다시 활성이 부활하는 것으로 확인되었다.

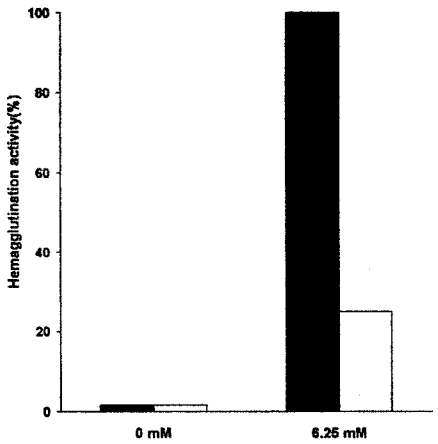


Fig 6. Effect of CaCl2 (■)and MnCl2 (□)on the hemagglutination activity of MJL.

○ 온도, pH 변화가 활성에 미치는 영향

칠게 렉틴은 온도는 20℃이하, pH는 7.3-8.0에서 가장 안정한 활성을 나타냈다(Fig. 7, 8).

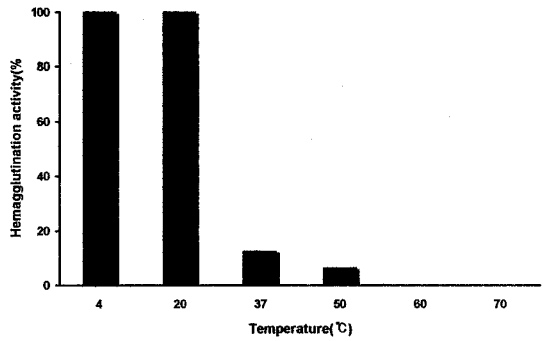


Fig 7. Effect of temperature on the hemagglutination activity of MJL.

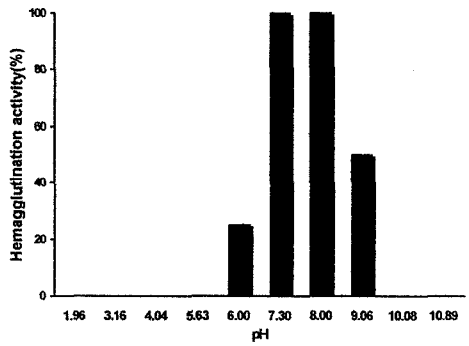


Fig 8. Effect of pH on the hemagglutination activity of MJL.

○ 혈림프로 부터 total RNA 분리

혈림프에 β-ME가 포함된 Buffer RLT 1.4ml을 넣고 vortex 및 pipetting 하여 잘 섞고 부유액을 균질화시켜주기 위해 350μl 씩 4개로 나누어 collection tube에 얹은 QIAshredder spin column에 넣어 원심분리하였다. 컬럼을 통과한 여액에 70% ethanol 350μl를 각각 넣고 collection tube에 얹은 RNeasy mini column에 넣고 원심분리후 silca-gel membrane을 건조시켰다. RNA를 녹이기 위해 RNeasy column을 RNA tube로 옮기고 RNase-free water 50μl를 column에 넣은 후 뚜껑을 닫고 10000rpm에서 1분간 원심분리하고 RNeasy Mini Kit과 QIAshredder (QIAGEN)을 이용하여 혈림프에서 total RNA를 분리하였다. RNA 용액을 2μl씩 1.0% agarose gel에 전기영동한 결과 3번, 4번시료에서 18S와 28S rRNA band가 확인되었다 (Fig. 9).

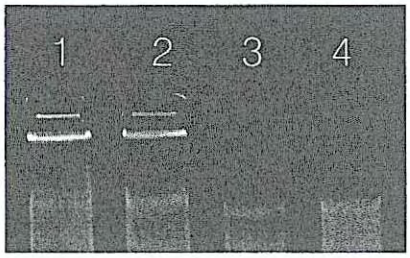


Fig. 9. 전기영동으로 total RNA 확인

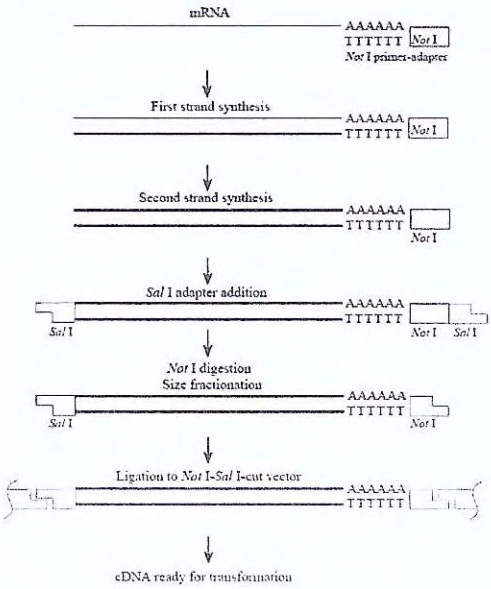
○ Total RNA에서 mRNA 분리

Dynabeads Oligo(dT)25와 Dynal MPC-S(Dynal Biotech)를 이용하여 total RNA 3번 시료에서 mRNA를 분리하였다. mRNA 용액 1μl을 전기영동한 결과 smear-shape의 mRNA가 확인되었다(Fig. 10).

Fig. 10. 전기영동으로 mRNA 확인.

○ First strand로부터 second strand 합성

SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen)을 이용하여 first strand로부터 second strand를 합성하였다. 2μl를 first strand와 함께 전기영동하여 확인한 결과, First strand는 smear-shape으로 관찰된 반면, second strand는 육안으로 식별할 만큼 밝은 band가 관찰되지 않았다(Fig. 11).



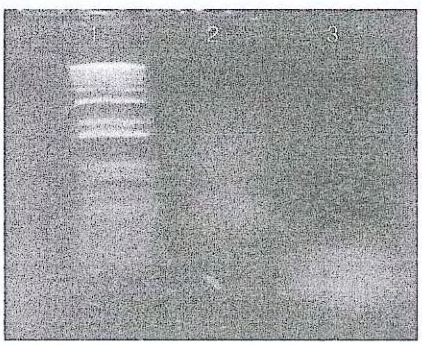


Fig. 11. First strand 및 second strand의 전기 영동.
Lane 1. Marker; Lane 2. First strand; Lane 3. Second strand

○ Not I Digestion

SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen)을 이용하여 합성된 cDNA 말단의 Not I site를 digestion하였다. 반응액에 TE buffer 270μl를 넣고 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) 320μl를 넣어 vortex로 잘 섞은 후 4℃에서 15분간 14000rpm으로 원심분리후 맑은 상층액 300μl를 조심스럽게 새로운 tube에 옮겼다. Glycogen 3μl와 7.5M NH4OAc 100μl 및

100% ethanol 1000μl를 넣고 vortex하여 잘 섞은 후 deep freezer에서 30분간 반응시키고 4℃에서 15분간 14000rpm으로 원심분리하고 cDNA를 실온에서 10분간 건조시켜 ethanol을 모두 제거한 후 TEN buffer 102μl에 완전히 녹인고 2μl를 전기영동하여 확인한 결과, cDNA의 농도가 매우 낮으므로 육안으로 식별 가능한 band는 관찰되지 않았고, 불필요한 작은 size의 DNA 절편 및 primer들만이 확인되었다(Fig. 12).

Fig. 12. Sal I ligation 및 Not I digestion 반응 후 cDNA의 전기영동.

○ 컬럼 chromatography

SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning (Invitrogen)을 이용하여 합성된 cDNA를 size fraction하여 cloning에 필요한 큰 size의 DNA만을 얻어냈다. 각 tube에서 2μl씩 취하여 agarose gel에서 전기영동한 결과, 12번부터는 불필요한 작은 size의 DNA, ligation되지 않은 adapter 및 Not I digetion 후 떨어져 나온 primer-adapter이므로 사용하지 않고, 1번부터 11번까지의 fraction을 한 tube에 합쳤다(Fig. 13).

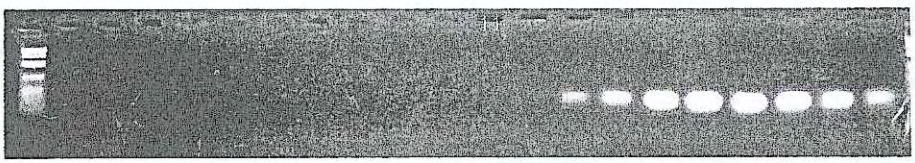
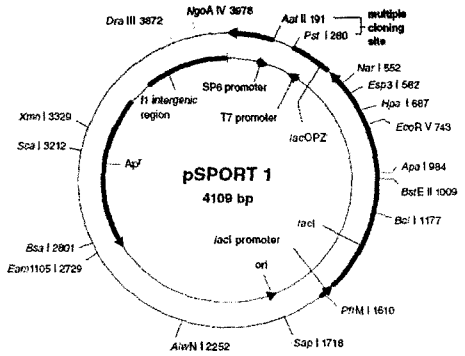


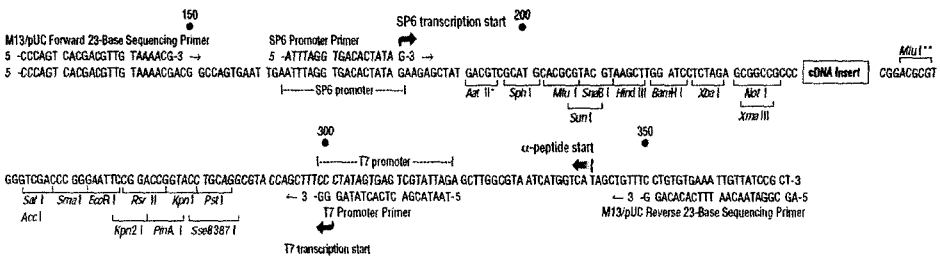
Fig. 13. Column fraction 1번부터 20번까지 전기영동.

○ Plasmid cDNA library ligation 확인

Not I과 Sal I (Takara)을 이용하여 plasmid를 digestion하고 Master Mix (Promega)를 이용하여 PCR을 수행함으로 cDNA ligation을 확인하였다. Agarose gel에 전기영동한 결과 pSPORT 1 vector가 가장 진한 band로 관찰되었고, cDNA library들은 다양한 size로 ligation된 것이 확인되었다(Fig. 14).



pSPORT 1 multiple cloning site and primer binding regions: 125-372



*Requires increased enzyme:DNA for complete digestion.

* The *Mlu* I restriction site is contained within the *Sal* I adapter introduced into the vector upon ligation of the cDNA insert.

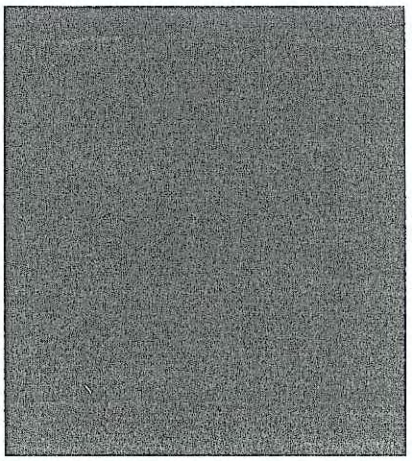


Fig. 14. Restriction enzyme으로 digestion한 plamid cDNA library. Lane 1. Marker; Lane 2. cDNA library

○ Plasmid cDNA library ligation 확인

Not I과 Sal I을 이용하여 plasmid를 digestion하고 Master Mix를 이용하여 PCR을 수행함으로 cDNA ligation을 확인하였다. Agarose gel에 전기영동한 결과 smear-shape이 관찰되므로 cDNA library들은 다양한 size로 ligation된 것이 확인되었다(Fig. 15).

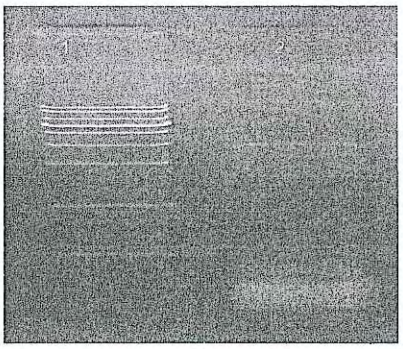


Fig. 15. PCR을 이용한 ligation 확인. Lane 1. Marker; Lane 2. PCR product

○ 목표 유전자 탐색을 위한 PCR primer 제작

Vector NTI advanced 10 (Invitrogen)을 이용하여 amino acid sequence로부터 mRNA sequence를 예상하여 primer를 제작하였다. Amino acid sequence 중 Glu-Ala-Ser-Ile-Leu-Ala를 Vector NTI advanced의 Back Translation에 입력하여 발현률이 높은 codon을 얻어 primer로 제작하였다(Table 4).

Table 4. Back Translation을 이용하여 얻은 mRNA sequence 및 primer.

Amino acid	Glu	Ala	Ser	Ile	Leu	Ala
Back Translation	GAA	GCS	AGC	ATY	CTG	GCS
Primer #1	GAA	GCC	AGC	ATC	CTG	GCC
Primer #2	GAA	GCG	AGC	ATC	CTG	GCC
Primer #3	GAA	GCC	AGC	ATT	CTG	GCC
Primer #4	GAA	GCG	AGC	ATT	CTG	GCC
Primer #5	GAA	GCC	AGC	ATC	CTG	GCG
Primer #6	GAA	GCG	AGC	ATC	CTG	GCG
Primer #7	GAA	GCC	AGC	ATT	CTG	GCG
Primer #8	GAA	GCG	AGC	ATT	CTG	GCG

○ 목표 유전자 탐색을 위한 PCR 및 Gel Extraction

Library cDNA를 주형으로 한 PCR 반응(PCR Master Mix, Promega)을 수행함으로 목표 유전자로 추측되는 cDNA들을 증폭한 후 MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)으로 정제하였다. Vector의 M13 forward 영역을 5′ primer로 하고 앞서 amino acid로부터 back transcription하여 제작한 primer #1-8을 3′으로 한후 agarose gel에 전기영동하여 PCR 생성물을 얻었다(Fig. 16).

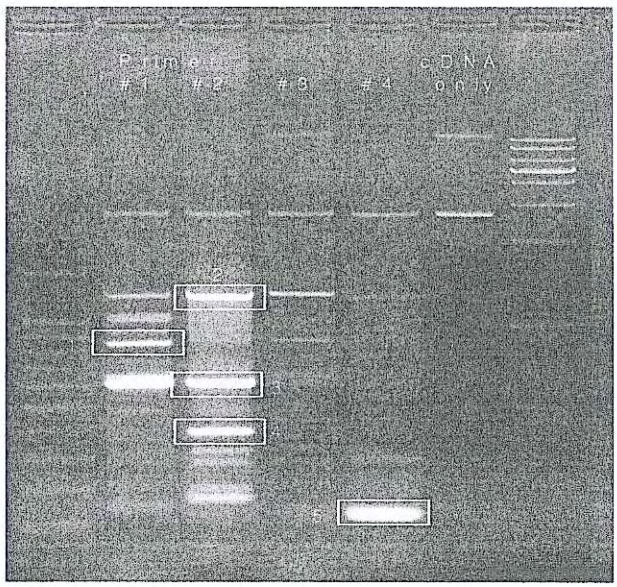


Fig. 16. PCR을 이용한 목표 유전자 후보 cDNA 증폭.

○ 목표 유전자 후보군 cDNA vector의 ligation 확인 및 sequencing

EcoR I (Takara)을 이용하여 plasmid를 digestion하여 DNA ligation을 확인한 후 염기 서열을 확인하였다. 특히 1B7, 2A5, 2A6, 3A1, 4A2, 5A7, 6B1, 6B8, 7A1, 7A7, 8A6, 8B2 plasmid DNA의 sequencing을 실시하였다 (Fig. 17).

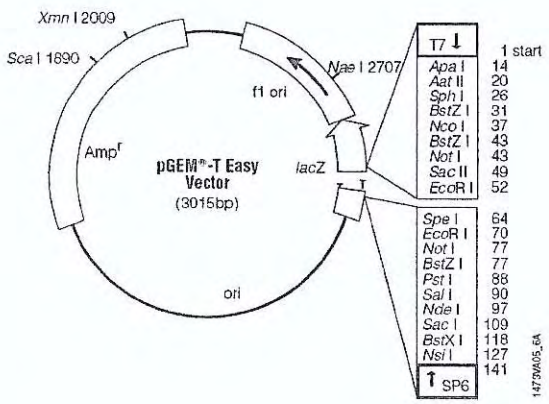


Fig. 17. EcoR I으로 digestion한 목표 유전

○ 렉틴의 안정성

1차 년도에 분리된 렉틴에 대해 조건변화에 따른 안정성을 확인하였다. 먼저 정제된 렉틴을 3차 증류수로 투석을 한 후 20mM phosphate buffer(pH 7.4), Tris-HCl(pH8.0)에 용해후 활성을 확인한 결과 활성에는 차이가 없었다. 여기에 NaCl을 0.1-0.2M 첨가한 한 후에도 활성의 변화가 없었다. Sodium azide와 같은 방부제 0.05%, serine protease inhibitor의 첨가에도 활성에 변화가 없었으나 0.1% 2-mercaptoethanol 첨가시에는 활성이 50%로 감소하였다. 일반적으로 금속이온은 렉틴의 활성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며, Cajanus cajan 렉틴의 경우 Ca2+과 Mg2+의 농도가 증가 할수록 활성이 증가하는 것으로 보고되고 있다. 반면에 Artocarpus integer 렉틴은 금속이온에 의해 활성이 영향을 받지 않는 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서 금속이온이 MJL의 활성에 미치는 영향을 확인한 결과, 렉틴을 EDTA 처리한 경우에는 반응이 급격히 감소되었으나 6.25mM Ca2+을 첨가한 경우 활성이 100% 유지되었으며 Mn2+ 이온의 경우에는 25% 유지되는 결과를 얻었다. 이 결과로부터 단백질 중에 금속이온이 존재하며 이를 제거시 활성이 없어지나 금속이온을 첨가함에 따라 다시 활성이 부활하는 것으로 확인되었다.

○ 렉틴의 2차구조 해석

정제된 렉틴의 2차구조를 circular dichroism에 의해 확인하였다. 그 결과 Yang et al.의 방법에 의해 계산하여 α-helix 43.1%, β-sheet 15.6%, random coil 41.3%로 구성되어 있음을 확인하였다(Fig. 18).

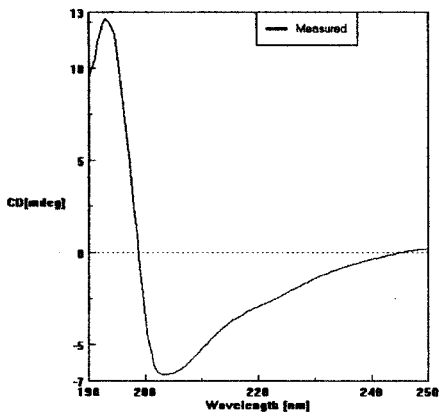


Fig 18. CD spectrum of lectin

○ 렉틴의분자량 확인

1차년도에 SDS-PAGE에 의해 분자량 65kDa의 단백질임을 확인하였으며 gel-filtration (Superdex)에 의한 HPLC에 의해 용액상태에서의 분자량을 확인하였다. 그 결과 렉틴은 130kDa에서 단일 피크를 나타내 65kDa의 monomer 단백질 2개가 결합된 dimer의 형태임을 확인하였다.

○ 기존 렉틴과의 활성비교

적혈구 응집저해반응 결과, 단백질원액에서는 단당 및 이당류에 대해서는 저해반응을 나타내지 않았으나 당단백질에 대해서는 저해반응을 나타냈다. 특히 bovine thyroglobulin의 경우 최소 저해농도가 1.95㎍/㎖로 가장 낮은 결과를 나타냈다. 일반적으로 최소저해농도가 낮을수록 당단백질에 대한 렉틴의 특이성이 높다고 보고되어 있는 점으로부터 현재 보고된 렉틴 중 S. serrata 유래 렉틴과 Paratelphusa jacquemontii 유래 렉틴의 thyroglobulin에 대한 최소저해농도가 각각 2.4㎍/㎖, 625㎍/㎖인 것과 비교하면 매우 낮은 값으로 thyroglobulin에 대한 결합력이 특히 높은 것

을 알 수 있었다.

○ 아미노산 치환에 의한 활성

렉틴의 당 결합부위에 특이적으로 결합하여 활성을 잃게 하거나, 잃게 할 가능성이 있는 시약을 렉틴에 작용시켜 결합 활성의 유무를 조사하고, 표적으로 한 아미노산의 수식량과 결합 활성 저하의 상관관계를 조사하였다. 특히 histidine잔기의 수식에는 diethylpyrocarbonate, lysine잔기의 아미노기의 수식에는 dicarboxylic acid anhydride나 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate, aspartic acid와 glutamic acid잔기들의 수식에는 N,N-dicyclohexylcarboxyimide나 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl) carboxyimide, arginine잔기의 수식에는 phenylglyoxal, tryptophan잔기의 수식에는 N-bromosuccinimide, tyrosine잔기의 수식에는 N-acetylimidazole, cystein잔기의 수식에는 N-ethylmalimide 등을 사용하였다. 수식반응이 가역적인 시약의 경우에는 활성을 잃은 렉틴으로부터 도입한 원자단을 이탈시켜, 결합 활성의 회복실험을 행하였으며, 렉틴의 당 결합부위에 특이적으로 결합하여 활성을 잃게 하거나, 잃게 할 가능성이 있는 시약을 재조합 렉틴에 작용시켜 결합 활성의 유무를 조사하고 표적으로 한 아미노산의 수식량과 결합 활성 저하의 상관관계를 조사하였다. 그 결과, diethylpyrocarbonate를 사용하여 재조합 렉틴에 있는 histidine 잔기를 수식하였으나, 렉틴의 활성 변화가 거의 없었다. 즉, 히스티딘은 렉틴의 당 인식부위에 포함되어 있지 않는 것이 시사되었으니, 트립토판을 수식한 경우에는 활성이 25%로 저하되어 활성발현에 중요한 아미노산으로 동정되었다.

○ 암세포 사멸효과

렉틴의 암세포에 대한 독성은 사람 대장암(HCT-116), 위암(SNU-1, Korean Cell line bank)세포에 대해 실시하였다. 37℃, 5% CO2에서 배양한 암세포(1×105cells/ml)에 렉틴 농도를 달리하여 50㎕를 96well culture plate(Nunc)에 첨가 후 72시간 동안 배양하고 살아있는 암세포의 비율은 CCK-8(Dojindo) assay법에 의해 제조회사의 메뉴얼에 따라 계산하였다. 렉틴 100㎍/㎖에서의 대장암세포에 대한 활성을 조사한 결과 54.0±2.9%, 위암세포에 대해서는 39.2±2.2%의 세포사멸효과를 나타냈다(Table 5).

Table 5 - Cancer cell viability

Cancer cell	General name	Medium	Inhibition %
Human colon cancer	HCT-116	RPMI 1640 90%, FBS 10%	54.0±2.9 %
Human stomach cancer	SNU-1	RPMI 1640 90%, FBS 10%	39.2±2.2 %

○ 사람 림프구와 마우스 비장세포에 대한 마이토젠 활성

사람 림프구와 마우스 비장세포에 대한 마이토젠 효과를 확인하기 위하여 nucleotide인 5-bromo-2-deoxyuridine(BrdU) 의 노출된 양을 측정하였다. 5-Bromo-2-deoxy-uridine labeling and detection kit III (Roche Diagnostics Mannheim, Germany) 으로 실험하였으며 마우스 splenocyte는 다음과 같이 분리하였다. 4주에서 6주된 BALB/c mouse에서 비장을 취하고 60㎜ petri dish안에 lysis buffer (Sigma)와 1분간 넣어 두었다. 5cc syringe로 비장을 부순 뒤에 2% fetal bovine serum (FBS) 가 첨가된 PBS로 세척하고 2분간 3000rpm으로 원심분리 하였다. 다시 한 번 세척과 원심분리를 하고 상층액을 제거한 후에 10% FBS RPMI 1640으로 세포를 배양하였다. 사람의 lymphocyte는 다음과 같이 분리하였다. 항응고제와 함께 건강한 피실험자에서 뽑은 혈액에 PBS를 가하여 희석하였다. 희석된 혈액에 Ficoll(Amersham Biosciences) 을 가한 후 400×g에서 15분간 원심분리를 한 후에 buffy coat층만을 취하여 RPMI 1640에 넣고 100×g에서 10분간 원심분리를 하고 상층액을 제거하고 10% FBS RPMI 1640으로 세포를 배양하였다.

먼저 mouse splenocyte에 대해 세포 배양 시간과 렉틴과 세포의 반응 시간을 각각 달리하여 실험하였다. Mouse에서 비장을 취한 후, 세포를 3,4,5일을 배양하였다. 그 결과 세포 배양시간은 3일 (72시간)이 가장 적당하였고 마찬가지로 렉틴과 세포의 반응 시간도 3일 (72시간)이 가장 적당하였다. 또한 식물유래 렉틴이며 mitogen으로 잘 알려진 ConA (Sigma) 보다는 그 활성이 약하게 나왔으나 가능성이 있음을 확인하였다. 특히 칠게 렉틴은 BALB/c mouse splenocyte와 사람 림프구에 대해 분열유도 활

성을 나타냈다. 이것은 세포내에 작용하여 림프구의 증식에 영향을 주는 나타내는 결과이다(Table 6). 또한 칠게 렉틴이 희석됨에 따라 활성이 농도의존적으로 감소하였다.

Table 6 - Stimulation index of lectin

	Human lymphocyte		Mouse splenocyte	
	Conc.	Stimulation index	Conc.	Stimulation index
Lectin	100	5.21	100	2.70
	10	4.02	10	1.55
Control (Con A)	100	4.85	100	3.11
	10	3.92	10	1.97

○ 목표 유전자 후보군 cDNA sequencing

1년차 과제에서 얻은 칠게의 cDNA library를 주형으로 하고, amino acid sequence로부터 back translation하여 얻은 mRNA sequence를 primer로 사용하여 PCR을 수행함으로 목표 유전자 후보군의 cDNA를 증폭하였다. 이 cDNA를 TA cloning하여 얻어진 1B7, 2A5, 2A6, 3A1, 4A2, 5A7, 6B1, 6B8, 7A1, 7A7, 8A6, 8B2 시료에 대하여 DNA sequencing을 실시하였고, NCBI Web BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)에 DNA sequence를 확인한 결과 렉틴 또는 그와 유사한 단백질을 만들어내는 유전자는 검색되지 않았다.

○ 목표 유전자 탐색을 위한 새로운 primer 제작

Amino acid sequence로부터 얻어진 primer로 수행한 PCR 결과물 DNA에서 렉틴 또는 유사 단백질을 만들어내는 유전자가 검색되지 않으므로, 새로운 PCR primer 제작이 필요하게 되었다. 따라서 다양한 종의 생물에서 발현되는 렉틴의 유전자 sequence를 GeneBank에서 검색한 후 Vector NTI advanced 10 (Invitrogen)을 이용하여 유사성을 비교하였다. 소 (Bos taurus, NM_001010994), 무지개송어 (Oncorhynchus mykiss, AM041212), 생쥐 (Rattus norvegicus, NM_012599, NM_022704), 돌기해삼 (Stichopus japonicus, AY625513), 금화조 (Taeniopygia guttata, EF191733)

의 유전자를 비교한 결과, Fig 19서 보는 바와 같이 해양 생물인 돌기해삼과 무지개송어의 유사성이 가장 높으므로 이 두 유전자에서 특별히 유사성이 높은 부분을 이용하여 새로운 primer를 제작하였다(Table 7).

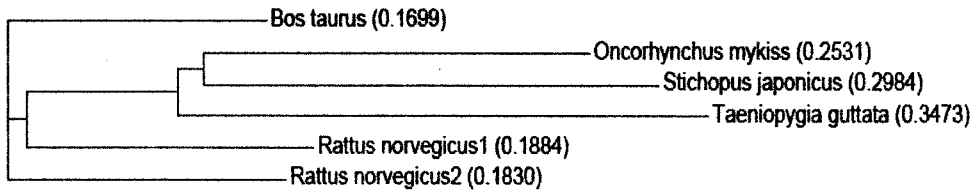


Fig 19. Phylogenetic tree showing the relation between various MBLs.

Table 7 - Primer sequences for lectin.

Species	Primer Sequence
Stichopus japonicus	5′ cag tca ttg cca tca ctg ata aa 3′ (forward)
	5′ cta acg tcg att cta ctc c 3′ (reverse)
Oncorhynchus mikiss	5′ cag ttc atg caa gca cta aca aa 3′ (forward)
	5′ gtg aag tag act gtt gac ccc 3′ (reverse)

○ 새로운 primer를 이용한 PCR 및 TA cloning

칠게의 cDNA library를 주형으로 하고 새롭게 제작한 primer를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 이 때 돌기해삼과 무지개송어에서 얻은 primer를 서로 교차시켜 반응시킨 군까지 포함하여 총 4가지 종류의 실험군을 반응시켰고(Table 8), 그 결과 2번과 3번 두 lane에서 약 350 bp 부근의 밝은 band가 확인되었다(Fig 20).

Table 8 - Primer sets for lection from cDNA library.

Primer Orientation	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4
Forward	*Stichopus japonicus*	*Oncorhync hus mikiss*	*Stichopus japonicus*	*Oncorhync hus mikiss*
Reverse	*Stichopus japonicus*	*Oncorhync hus mikiss*	*Oncorhync hus mikiss*	*Stichopus japonicus*

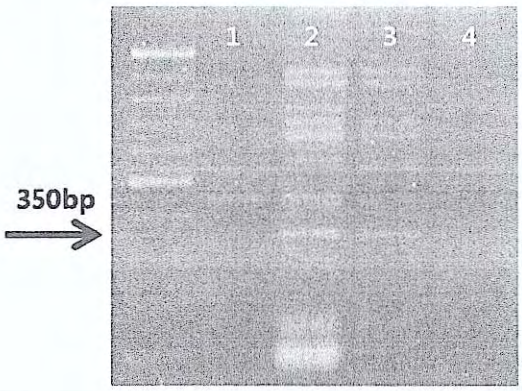


Fig 20. Target gene PCR products from cDNA library.

비특이적 band들을 제거하기 위하여 MgCl2의 농도를 조정하며 PCR을 수행한 결과, 무지개송어 primer를 사용한 실험군 가운데 0.75 mM 농도의 MgCl2를 사용한 군에서 가장 뚜렷한 350 bp 부근의 band를 얻을 수 있었다(Fig 21). 이에 무지개송어 primer를 이용하여 annealing 온도 및 DNA polymerase를 변경하며 PCR을 수행한 결과, 일반 Taq Polymerase를 사용하여 58℃에서 반응시켰을 때 가장 밝고 깨끗한 band를 얻을 수 있었다(Fig 22). 따라서 Fig 4에서 세 번째 lane의 DNA band를 gel extraction하여 pGEM T-easy vector (Promega)에 ligation하여 TA cloning하였다.

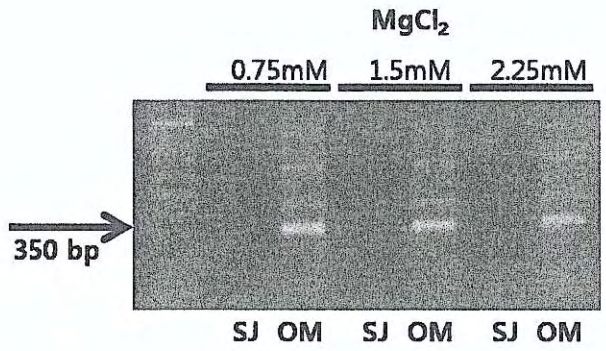


Fig 21. Target gene PCR products that was react with various MgCl2 concentration. SJ : primer for Stichopus japonicus, OM : primer for Oncorhynchus mikiss.

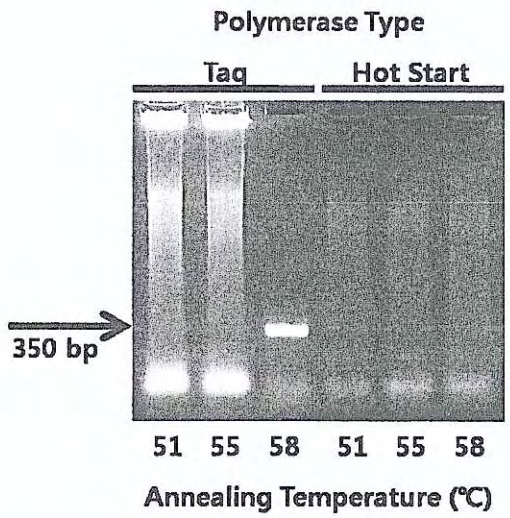


Fig 22. Target gene PCR products using primer for Stichopus japonicus.

○ 목표 유전자의 DNA sequence 확인

앞서 TA cloning한 DNA를 transformation하여 생성된 colony 가운데 14개를 선정하여 배양한 후 miniprep하여 plasmid DNA를 얻었다. 이를 제한효소 EcoR I으로 digestion하여 cloning이 제대로 되었음을 확인하였

고(Fig 23), sequencing을 실시하여 목표 유전자의 DNA sequence를 얻었다(Fig 24).

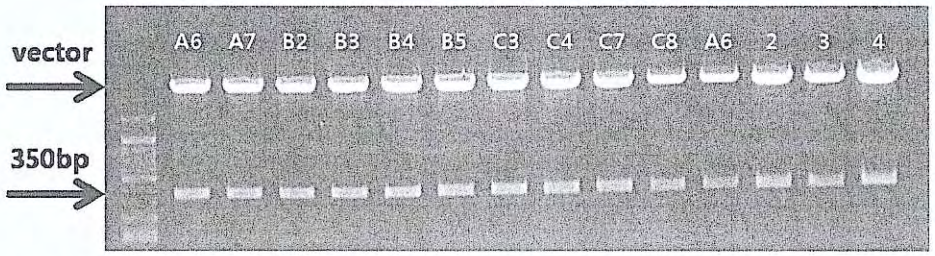


Fig 23. EcoR I digestion of plasmid DNA containing target gene.

```
   1  CCCCACAAAC AGACTTCACG CTCAATCTCA CCACGAGTCA TCAGGCCTTT
      GGGGTGTTTG TCTGAAGTGC GAGTTAGAGT GGTGCTCAGT AGTCCGGAAA

  51  CCATTGCTTA CCGCCAGCGT ATGTCCAGCG ACGCAGCTGA TCACATGCGC
      GGTAACGAAT GGCGGTCGCA TACAGGTCGC TGCGTCGACT AGTGTACGCG

 101  CTTTGATATC GCCCTGGTTT ATTTTGCGAA GAAGCGTCGA TGTTCTAAAA
      GAAACTATAG CGGGACCAAA TAAAACGCTT CTTCGCAGCT ACAAGATTTT

 151  TTGCCAGCAC CCACGTTGTA TACGAATGAG TAAAGAGCGC CGCGCGTTGT
      AACGGTCGTG GGTGCAACAT ATGCTTACTC ATTTCTCGCG GCGCGCAACA

 201  TTCCGGTATA TCGACTTTGA TATACGGGTT ATTTTGTCTG GCGACAGTGG
      AAGGCCATAT AGCTGAAACT ATATGCCCAA TAAAACAGAC CGCTGTCACC

 251  CAAGGTCTTT ATTCAAGAGT GCTTTGCATT CTGCTTTGTT AGTGCTTGCA
      GTTCCAGAAA TAAGTTCTCA CGAAACGTAA GACGAAACAA TCACGAACGT

 301  TGAACTG
      ACTTGAC
```

Fig 24. DNA sequence of partial target gene.

○ 목표 유전자의 전체 sequence 탐색

목표 유전자의 전체 sequence를 파악하기 위하여, 칠게 cDNA library의 어느 부분에 목표 유전자가 존재하는지 확인하여야 한다. 따라서 PCR을 통해 sequence를 밝혀낸 DNA 일부분을 probe로 사용하여 Southern blot을 실시하였다. cDNA library는 pSPORT1 vector의 제한효소 Not I - Sal I 영역에 ligation되어있으므로 Not I과 Sal I으로 digestion하여 사용하였다. Southern blot 결과 약 4300 bp 크기의 DNA fragment에 목표

유전자가 존재하는 것으로 확인되었다(Fig 25).

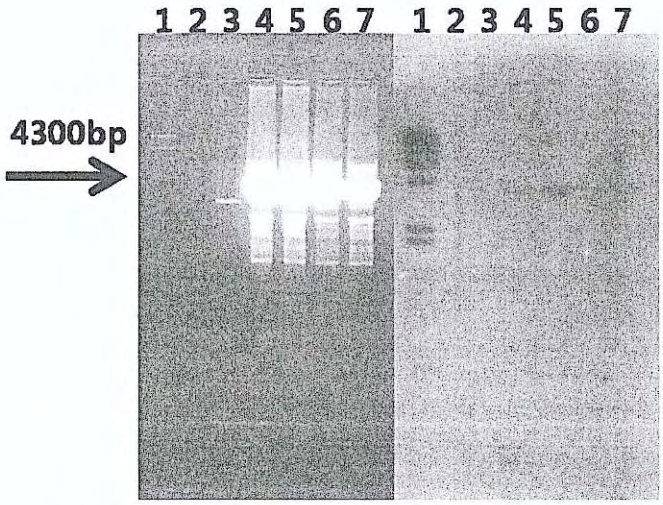


Fig 25. Southern blotting of cDNA library. Lane 1. λDNA-Hind III digest ; Lane 2. Probe (positive control) ; Lane 3. pGEN T-easy vector (negative control) ; Lane 4-7. cDNA library

목표 유전자를 cloning하기 위하여 Not I과 Sal I으로 digestion한 cDNA library를 전기영동하고 (Fig 26), 약 4300 bp 부근의 band를 gel extraction한 후 동일한 제한효소로 digestion한 T-easy vector에 ligation 하였다. 이 DNA를 transformation하였으나 colony가 생성되지 않았으므로 목표 유전자 cloning이 제대로 되지 않은 것으로 판단하였다.

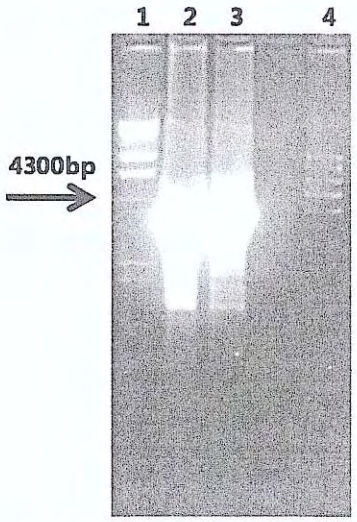


Fig 26. Digestion of cDNA library with Not I and Sal I. Lane 1. λ DNA-Hind III digest ; Lane 2-3. cDNA library ; Lane 4. 1000bp marker

○ Probe 검증을 위한 RT-PCR 및 Southern blot

Not I과 Sal I으로 digestion한 칠게 cDNA library의 4300 bp fragment가 cloning되지 않았으므로, Southern blot에서 사용된 probe가 정확하게 제작된 것인지 검증이 필요하게 되었다. 따라서 칠게의 체액에서 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)을 이용하여 total RNA를 추출하고(Fig 27), reverse transcription하여 cDNA를 합성하였다. 이 DNA를 주형으로 하여 무지개송어 primer로 PCR을 수행한 후 cDNA library를 주형으로 한 PCR 결과와 비교하였다. Fig 28에서 보는 바와 같이 동일한 크기의 band를 얻을 수 있었고, cloning하여 DNA sequence를 한 결과 cDNA library로부터 PCR하여 얻은 DNA와 체액에서 추출한 RNA를 직접 RT-PCR하여 얻은 DNA의 sequence도 동일하였다. 따라서 probe는 올바르게 제작되었음을 확인할 수 있었다.

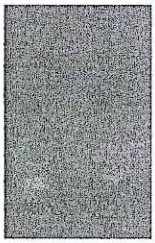


Fig 27. Gel analysis of total RNA from Macrophthalmus japonicus.

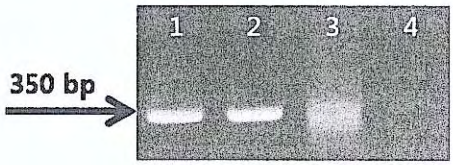


Fig 28. Target gene PCR product using Oncorhynchus mikiss primer of cDNA library and cDNA reverse-transcribed. Lane 1. cDNA library ; Lane 2. cDNA from crab ; Lane 3. pSPORT1 vector using M13 primer (positive control) ; Lane 4. pSPORT1 vector using Oncorhynchus mikiss primer (negative control)

더 정확한 확인을 위하여 cDNA library 및 체액 RNA를 RT-PCR하여 얻은 DNA로 southern blot을 수행하였다(Fig 29, 30). 그 결과 제한효소로 digestion한 cDNA library, cDNA library를 주형으로 한 PCR 생성물, 체액 RNA에서 RT-PCR하여 얻은 결과물 모두에서 band가 검출되어 probe가 정확하게 결합하고 있음을 확인할 수 있었다. 하지만 negative control로서 사용된 pSPORT1 vector에서 검출되지 않던 band가 이 vector를 주형으로 한 PCR 결과물에서는 검출되었다.

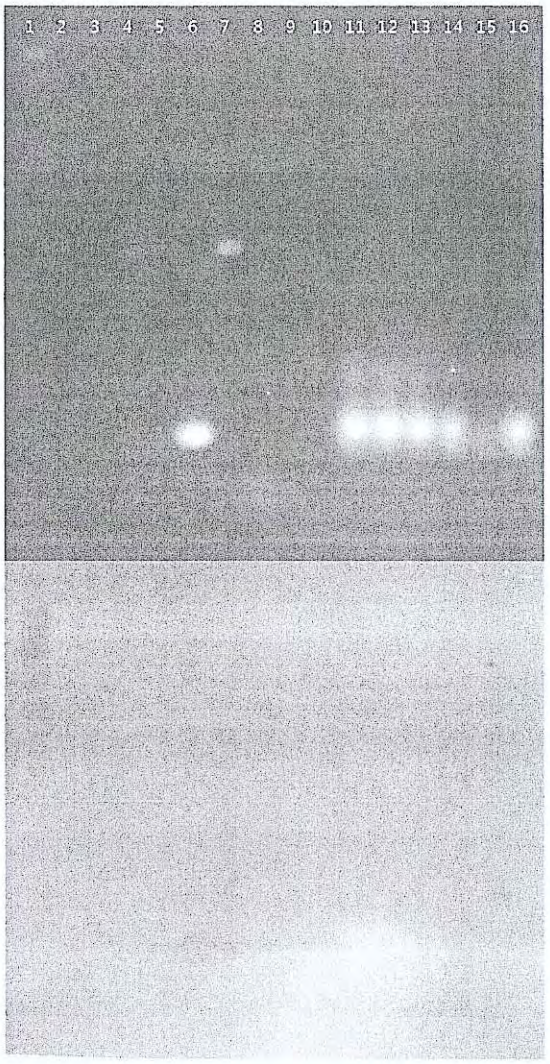


Fig 29. Southern blotting of cDNA library and cDNA reverse-transcribed. Lane 1. λDNA-Hind III digest ; Lane 2. probe (positive control) ; Lane 3. pSPORT1 vector (negative control) ; Lane 4-7. cDNA library PCR (Oncorhynchus mikiss primer) ; Lane 8-9. RT-PCR of crab RNA (Oncorhynchus mikiss primer) ; Lane 10. pSPORT1 vector PCR (Oncorhynchus mikiss primer) ; Lane 11-13. cDNA library PCR (M13 primer) ; Lane 14-15. RT-PCR of crab RNA (M13 primer) ; Lane 16. pSPORT1 vector PCR (M13 primer).

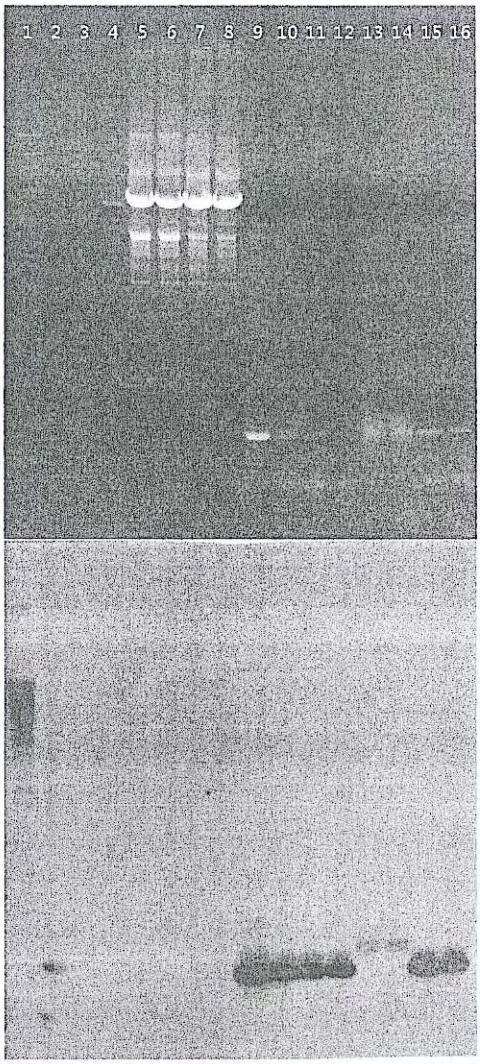


Fig 30. Southern blotting of cDNA library and cDNA reverse-transcribed. Lane 1. λDNA-Hind III digest ; Lane 2. probe (positive control) ; Lane 3. pSPORT1 vector (negative control) ; Lane 4. pBluescript vector (negative control) ; Lane 5-6. Not I cut of cDNA library ; Lane 7-8. Sal I cut of cDNA library ; Lane 9-10. cDNA library PCR (Oncorhynchus mikiss primer) ; Lane 11-12. pSPORT1 vector PCR (Oncorhynchus mikiss primer) ; Lane 13-14. pSPORT1 vector PCR (M13 primer) ; Lane 15-16. RT-PCR of crab RNA (Oncorhynchus mikiss primer).

○ 암세포 결합력

렉틴의 암세포 결합에 대한 반응성을 확인하고 기존 렉틴과 비교하였다. 분리된 렉틴을 이용하여 암세포관련 실험 방법을 실시하고 각종 암세포와의 결합력을 확인하였으며, 이때는 한 종류의 암이라도 유래가 다른 다수의 세포를 한국세포주은행으로부터 구비하여 성장조건을 면밀히 검토한 후 안정적인 배양조건을 확립하고 세포레벨에서의 결합력 및 선택성을 확인하였다. 그 결과, 형광(FITC)을 결합시킨 렉틴을 제작하여 형광현미경으로 확인한 경우, 대장암에 대해 세포주위에 결합하여 apoptotic body를 형성하여 암세포에 대한 결합능력을 가지고 있음을 확인하였다 (Fig. 31).

Fig. 31. Fluorescence microscope of lectin-FITC in colon cancer cell

○ 암세포에 대한 사멸효과

대장암, 위암세포이외의 암세포에 대한 사멸효과 확인

암세포 결합과 함께 렉틴자체에 항암특성이 있는지 여부를 확인하여야 하며, 현재 대장암(●), 위암(◆) 외에 간암(▲), 폐암(■), 유방암, 자궁암등의 세포에 대한 실험을 실시하였으며, 특히 CCK assay와 암세포 이식후 암세포 증식 억제효과를 확인한 결과 간암,폐암에 대해서도 세포독성을 나타냈으나 대장암에서 가장 강한 독성을 나타냈다(Fig. 32). 또한, FACS 분석을실시하여 대장암세포에 대해 necrosis와 apoptosis를 일으키는 현상을 확인하였다(Fig. 33).

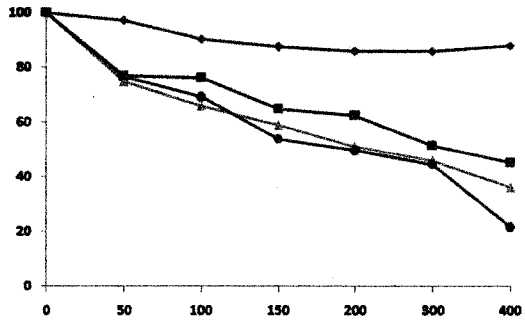


Fig. 32 Cell viability of lectin on various cancer cells

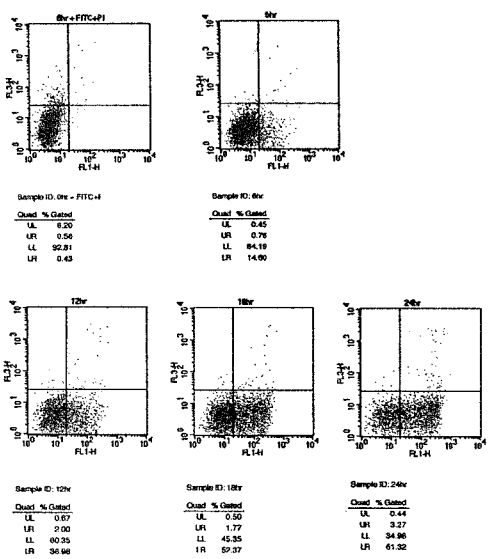


Fig. 33 Flow cytometric detection of lectin-FITC binding to colon cancer cell

○ 암세포인식에 대한 당화의 영향

칠계 혈림프중 하나이상의 렉틴의 존재 가능성이 제기될 수 있으므로, 이에 대한 분리, 정제가 필요하며, 이 새로운 단백질도 세포의 암화와 관련이 깊은 탄수화물을 인식할 가능성이 있는지 여부를 확인하였으나 그 외에는 렉틴 단백질의 확인할 수 없었다. 단, 시알산이 제거된 적혈구에서는 반응이 현저히 저하는 하는 현상을 확인하였다.

○ 단백질 발현 시스템 구축을 위한 cloning

렉틴의 염기서열을 이용한 단백질 발현 시스템을 구축하고 transfection host인 HEK293 세포주 및 CHO 세포주에 lipofectamine으로 transfection 시키기 위해서는 칠게로 부터 타겟이 되는 gene을 cloning 하여야 함. 먼저 칠게로부터 얻은 일부분의 아미노산 배열을 이용하여 cloning을 시도하였음.

A. 칠게의 얻은 부분 아미노산 서열을 이용한 cloning

Protein purification 후 amino acids sequencing을 통해 얻은 data를 이용하여 칠게 내의 lectin(약 3409bp의 ORF) cloning을 위한 primers를 제작하였음.

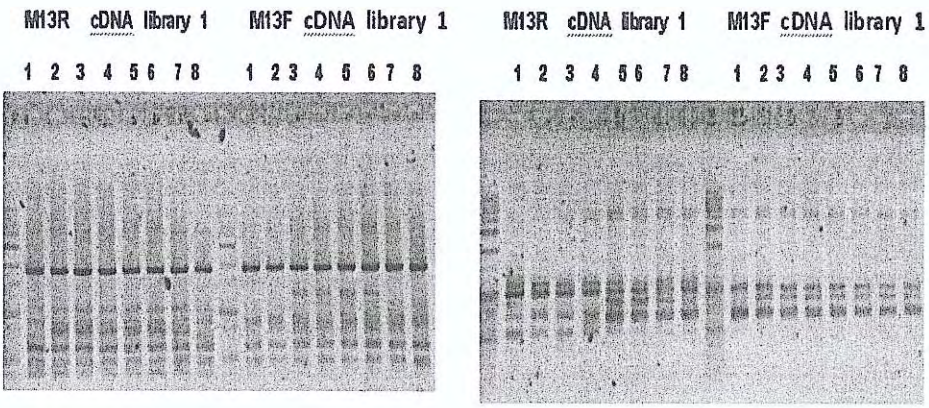
일부 찾은 amino acid sequence인 "Glu-Ala-Ser-Ile-Leu-Ala"이므로 IUB code name을 이용하여 primers를 8개 set을 제작하였음.

EASILAS 1	5'-GAR GCN TCN ATH TTR GCN TCN-3'
EASILAS 2	5'-GAR GCN AGY ATH TTR GCN TCN-3'
EASILAS 3	5'-GAR GCN TCN ATH CTN GCN TCN-3'
EASILAS 4	5'-GAR GCN AGY ATH CTN GCN TCN-3'
EASILAS 5	5'-GAR GCN TCN ATH TTR GCN AGY-3'
EASILAS 6	5'-GAR GCN AGY ATH TTR GCN AGY-3'
EASILAS 7	5'-GAR GCN TCN ATH CTN GCN AGY-3'
EASILAS 8	5'-GAR GCN AGY ATH CTN GCN AGY-3'

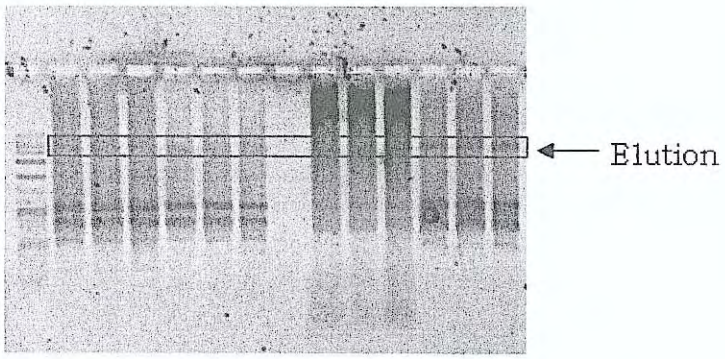
IUB Code Name

Mixed Base	Code Name	Mixed Base	Code Name	Mixed Base	Code Name
A+G	R	C+T	Y	A+C	M
G+T	K	G+C	S	A+T	W
A+T+C	H	G+A+T	D	G+T+C	B
G+A+C	V	A+G+C+T	N		

이미 제작한 털게의 cDNA library 로부터 maxi prep 이 후 제작된 primer와 M13F&R을 이용하여 PCR을 수행하였음.



제작한 EASILAS primer가 random primer의 형태를 띄고 있어 위 사진에서 non-specific 한 band가 많이 보였음. 맞는 size의 band를 선택하기 위해 125KDa(=1136AA=3409bp)의 protein이라는 것에 착안하여 2,000bp 이상의 밴드를 우선 선택하였음. M13F를 이용한 PCR 결과에서는 큰 사이즈의 밴드가 보이지 않아 우선 M13R를 이용하였음.



결과 ELAIS 8-M13R(1), ELAIS 4-M13R(2)을 이용하여 수행한 곳에서 3,000bp 이상의 PCR product를 얻을 수 있었으며, 이를 pGEM T easy vector에 cloning 하여 sequencing을 해 보았으나, mannose binding lectin(MBL) 관련한 정보를 얻을 수 없었으며, 이 후 약 500~ 1500bp 사이에서 나오는 PCR product의 sequencing 결과도 마찬가지로 MBL와 연관된 것은 없었음. (Sequencing data는 Zip file 로 첨부하였음.) 위의 방

법으로는 cloning이 되질 않았기 때문에 다음과 같은 방법으로 재 시도를 하였음.

B. c-lectin like domain 을 이용한 cloning

렉틴이 다양한 생물에서 발견된다는 점에 기인하여 NCBI에서 MBL과 관련된 유전자를 확인해 본 결과, c-lectin like domain이 대부분의 MBL에서 나타난다는 점을 이용하여 칠게의 MBL에서도 c-lectin like domain이 있는 것으로부터 이 domain에 대한 primer를 제작하였음.

EKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQLVva-knEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESGEPNDDggSEDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
NKFFLTNGEIMTFEKVKALCVKFQASVATPRNAAENGAIQNLIk----EEAFLGITDEKTEGQFVDLTGNFGEPNNAgsDEDCVLLLKNGQWNDVPCSTSHLAVCEF
KKFFVTNHERMPFSKVKALCSELRGTVAIPRNAEENKAIQEVAk----TSAFLGITDEVTEGQFMYVTGGFDEPNDHgsGEDCVTIVDNGLWNDISCQASHTAVCEF
EKIFKTAGFVKPFTEAQLLCTQAGGQLASPRSAAENAALQQLVva-knEAAFLSMTDSKTEGKFTYPTGESGEPNDDggSEDCVEIFTNGKWNDRACGEKRLVVCEF
DKVFSTNGQSVNFDTIKEMCTRAGGNIAVPRTPEENEAIASIAkk-ynNYVYLGMIEDQTPGDFHYLDGASGEPRGQg-KEKCVEMYTDGTWNDRGCLQYRLAVCEF
DKVFSTNGQSVNFDTIKEMCTRAGGNIAVPRTPEENEAIASIAkk-ynNYVYLGMIEDQTPGDFHYLDGASGEPRGQg-KEKCVEMYTDGTWNDRGCLQYRLAVCEF
KKYFMSSVRRMPLNRAKALCSELQGTVATPRNAEENRAIQNVAk----DVAFLGITDQRTENVFEDLTGNFGEPNNVgsGENCVVLLTNGKWNDVPCSDSFLVVCEF
KKFFVTNHERMPFSKVKALCSELRGTVAIPRNAEENKAIQEVAk----TSAFLGITDEVTEGQFMYVTGGFDEPNDHgsGEDCVTIVDNGLWNDISCQASHTAVCEF
EKFYYIVQEEKNYRESLTHCRIRGGNLAMPKDEAANTLIADYVaksgfFRVFIGVNDLEREGQYMFTDNTFGEPSDPygHEDCVEMLSSGRWNDTECHLTMYFVCEF
TKIYLLVKEEKKYIDAQDYCQGRGGTLSMPKDEATNSLIASYInhaglSRVFIGINDLEREGHFVYSDRSFAEPNNAydEEDCAEMVSSGGWNDVSCLITMYFICEF

확인한 결과 c-lectin like domain의 아미노산 서열이 위와 같으며, 그 중 가장 conserve하게 나타난 부분이 칠게에서도 어느 정도 있는 아미노산 서열과 비슷할 것으로 예상하여 선택 하였씀. (녹색 글자) 그 이후, 선택한 아미노산 서열이 가지는 핵산 서열을 분석 하여 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었음.

A

1 MBL2. Hor PRNAAE CCCAGGAATGCTGCAGAGAAT
Mbl2, Mus PRNAEE CCCAGGAATGCTGAGGAAAAC
Mbl2, Ratt PRNAEE CCCAGGAATGCTGAGGAAAAT
MBL2. Par PRNAAE CCCCCAGGAATGCTGCAGAGA
MBL2, Gal PRNEAE CCTAGGAACGAGGCTGAGAAT

2 LOC46612 PKNAEE CCCAAGAATGCCGAGGAAAAT
LOC47926 PKSAEE CCTAAGAGTGCTGAGGAGAAC
Mbl1. Mus PRNAEE CCCAGGAATGCTGAAGAGAAC
Mbl1, Ratt PRNAEE CCCAGGAATGCTGAGGAGAAC

B

1 MBL2. Hor LAVCEF CTGGCCGTCTGTGAGTTC
MBL2. Par LAVCEF CTGGCCGTCTGTGAGTTC
Mbl2, Mus LAICEF TTGGCAATCTGTGAATTC
Mbl2, Ratt LVVCEF TTGGTAGTTTGTGAATTC

2 LOC46612 IAVCEF ATTGCCGTCTGTGAGTTT
LOC47926 LAVCEL CTGGCCGTCTGTGAACTC
Mbl1. Mus KAVCEF AAGGCTGTCTGCGAGTTC
Mbl1, Ratt IAVCEF ACGGCTGTCTGCGAGTTC

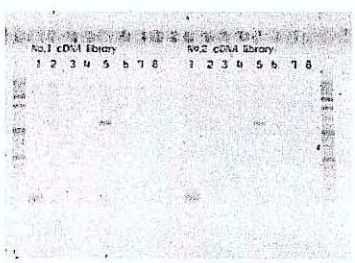
이 정보를 바탕으로 하여 총 8종의 primer를 제작하였음.

Foward		Reverse	
PR1-1	5'-CCCAGGAATGCTGARGA-3'	CEF1-1	5'-GGCHGTCTGYGARTTC-3'
PR1-2	5'-TCYTCAGCATTCCTGGG-3'	CEF2-1	5'-GAAYTCRCAGACDGCC-3'
PR2-2	5'-TCCTCVGCATTCTTRGG-3'	CEF2-2	5'-AAYTCACAGACDGC-3'

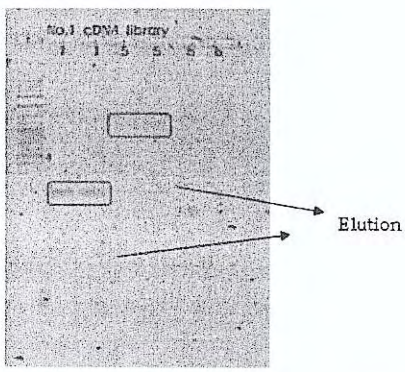
제작한 primer 중 PR 그룹과 CEF 그룹을 각각 forward, reverse primer로 사용하여 cDNA library에서 PCR를 수행하였음.

Elution DNA fragments를 cloning 하여 DNS sequencing을 수행하여 blast를 통하여 확

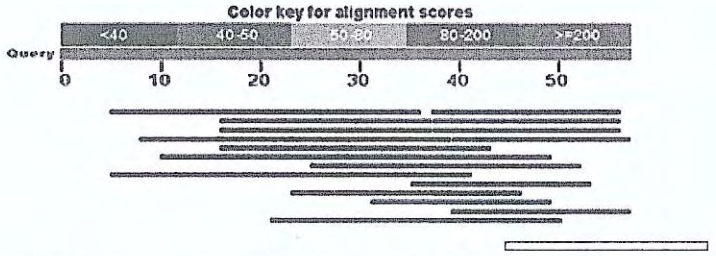
인 한 결과 Nucleotide Blast 위의 조건일 때 Equus caballus mannose-binding lectin (LOC100034103)의 일부 mRNA sequences를 얻을 수 있었음.



Forward primers Reverse primers
1;PR1-1, CEF1-2
2;PR1-1, CEF2-2
3;PR2-1, CEF1-2
4;PR2-1, CEF2-2
5;PR1-2, CEF1-1
6;PR1-2, CEF2-1
7;PR2-2, CEF1-1
8;PR2-2, CEF2-1



"GAATTCGCAGACTGCCGTTGTGATCATGTCATCGGATGGCTCTTCAGCATTCCTGGG"



>ref|NM_001081916.1| Equus caballus mannose-binding lectin (LOC100034103), mRNA
gb|DQ372924.1| Equus caballus mannose-binding lectin mRNA, complete cds
Length=747

GENE ID: 100034103 LOC100034103 | mannose-binding lectin [Equus caballus]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 33.7 bits (36), Expect = 4.3
Identities = 18/18 (100%), Gaps = 0/18 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 40 CTCTTCAGCATTCCTGGG 57
||||||||||||||||||
Sbjct 507 CTCTTCAGCATTCCTGGG 490

Query 와 sbjct 비교한 결과를 볼 때 match sequence 부분은 primer 부분이많이 포함 되어 있었음.

GAATTCGCAGACTGCCGTTGTGATCATGTCATCGGATGGCTCTTCAGC ATTCCTGGG

Primer seq. Primer seq.

보다 자세한 sequence를 얻기 위해, primer 부분을 제외한 부분만을 primer로 제작하였음.
이렇게 제작된 primer "5′-GCCATCCGATGACATGATCACAAC-3′"를 gene specific primer로 사용하여 RACE를 수행하기로 하였음.
RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)는 세포 내에서 전사된 mRNA의 전체 염기서열을 파악하기 위하여 사용되는 기술로서, mRNA를 역전사하여 합성된 cDNA에서 이미 부분적으로 알고 있는 염기서열 정보를 바탕으로 전체 cDNA의 서열을 확인할 수 있는 PCR 방법임. 5′과 3′ RACE 두 종류가 있으며 실험 방법에 약간 차이가 있는데, 5′ RACE는 전체 서열을 알고자 하는 gene에서 이미 서열이 알려진 짧은 일부분을

gene specific primer로 제작하여 PCR을 수행하며, 3′ RACE는 진핵세포 mRNA의 특징인 3′ 말단의 poly A tail을 이용하는 방법으로 oligo-dT primer를 사용하여 DNA를 증폭함으로 원본 RNA의 염기 서열을 확인할 수 있음.

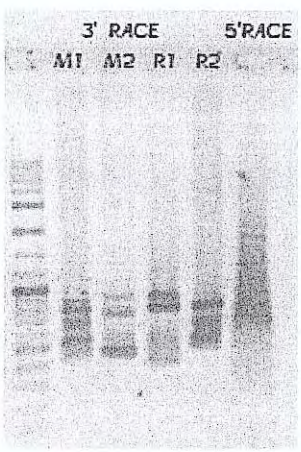
RACE using GSP pimer

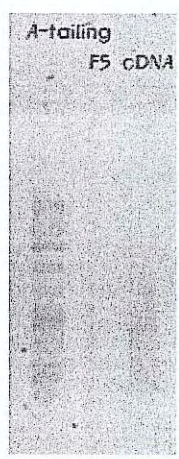
5'-GCCATCCGATGACATGATCACAAC-3'

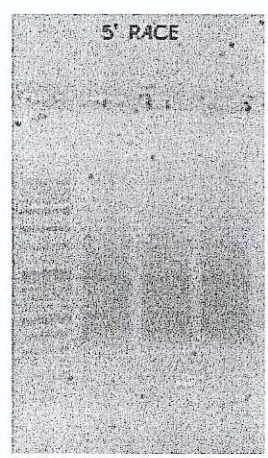
5'-GTTGTGATCATGTCATCGGATGGC-3'

또한, 3′RACE에서 FS (first strand) cDNA를 만들기 위한 primer를 oligodt를 사용하였음. 5′RACE에서도 termianl deoxyribose transferase 이용하여 FS (first strand) cDNA의 3′ 말단에 poly(A) tailing 이후 oligodt를 이용 PCR을 수행하였음.

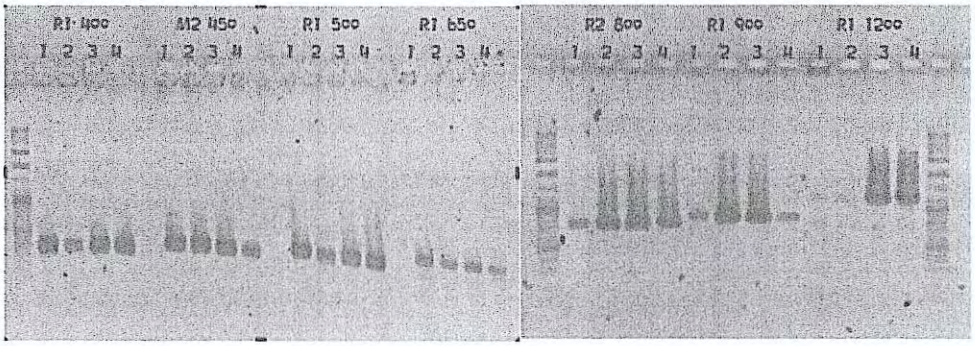
3′ 및 5′ RACE는 specific 하나 enzyme tagging oligodt가 아니라서 band size가 다양하게 보이는 것으로 보이며 이 후 band elution을 거쳐 cloning을 수행하여 sequencing 하였으며 3′ 및 5′ RACE에서 나온 partial sequence를 이용하여 full length sequence를 얻을 수 있을 것으로 사료됨.



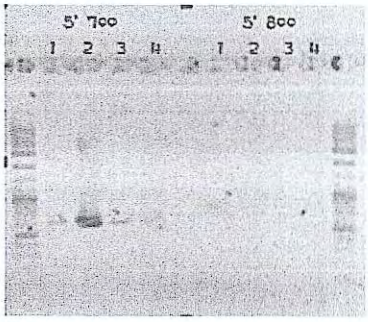




3′ RACE colony PCR



5'RACE colony PCR



○ 면역 세포 활성에 미치는 영향

Lectin이 면역 세포 활성 및 항암 활성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 각종 세포주에 이미 mRNA 전체 염기 서열이 밝혀진 lectin gene을 transfection하여 발현시켰음. 투구게 (Horseshoe crab, Tachypleus tridentatus)에서 발견된 tachylectin-P (TL-P)의 mRNA 전체 염기 서열이 이미 밝혀져 있으므로 TL-P의 cDNA를 Dr. Sugita (the University of Tsukuba)로부터 얻었음 (Fig. 34). 진핵 세포주에서 단백질로 발현시키기 위하여 pcDNA3.1 vector에 TL-P cDNA를 ligation하고 (Fig. 35), transfection host cell-line인 HEK293에 lipofectamine을 이용하여 transfection 후 Southern blot 방법으로 성공여부를 확인함 (Fig. 36).

```
  1 caatggcacc agatccctgg taaacttatg cacattacag caacacccca cttcctttgg
 61 ggagtgaaca gtaaccagca aatctattta tgtagacaac cttgctatga cggccagtgg
121 acccaaatat ccggttcact gaaacaggtc gacgctgatg accacgaggt ttggggagtg
181 aatcgtaacg atgatattta caaacggcct gtggatggca gcggaacttg ggttcgtgtc
241 tcaggtaaac tgaaacatgt tagcgcttca ggttacggct acatttgggg tgttaactcg
301 aatgaccaaa tttacaaatg tccaaagcct tgtaatggag cgtggacaca agtgaatgga
361 cgtctgaagc agatagatgg tggtcaatct atggtttatg gggtcaacag cgccaacgca
421 atttatcgtc gtccagtaga tggaagcggt tcctggcaac agatttcagg tagcctaaag
481 catataaccg ggtcgggcat ttccgaagtt ttcggagtta attctaacga ccagatttac
541 cgttgcacta aaccttgttc tggccaatgg tcactaatag atggaaaact gaagcagtgc
601 gacgcaac
```

Fig. 34 TL-P mRNA의 전체 염기 서열

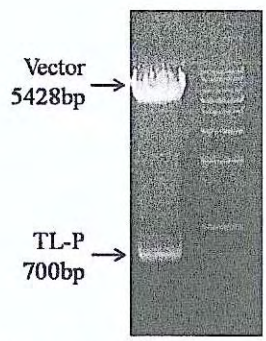


Fig. 35 Cloning된 lectin인 TL-P를 pcDNA3.1에 ligation함.

Fig. 36 TL-P gene이 transfection되었는지 확인하기 위하여 Southern blot 실험을 수행함. Lane 1. Positive control ; Lane 2. TL-P gene transfection ; Lane 3. Empty vector trasfection.

진핵세포주인 HEK293 cell-line에서 pcDNA3.1-TL-P cDNA의 transfection이 올바로 수행되는 것을 확인하였으므로, 면역 세포의 활성에 대한 lectin의 영향을 알기 위하여 murine macrophage 세포주인 RAW264.7에 TL-P cDNA를 transfection 함. Lipofectamine을 이용하여 RAW264.7 cell-line에 실험군인 pcDNA3.1-TL-P cDNA 및 음성 대조군으로 empty vector (pcDNA3.1 only)을 각각 transfection한 후, macrophage를 활성화시키는 lipopolysaccharide (LPS) 1μg/ml과 함께 24시간 동안 배양하고 nitric oxide (NO) 생성 및 pro-inflammatory cytokine인 IL-1β의 생성을 확인함. NO는 Griess reagent를 이용하여 측정하였으며 Fig. 37에서 보이는 것과 같이 vector 또는 TL-P cDNA를 transfection한 군에서는 생성되지 않으나, LPS를 처리한 군에서는 NO가 생성되었으며 특히 TL-P cDNA를 transfection하여 lectin 단백질을 발현하는 RAW264.7에서 empty vector 군에 비해 높은 수준으로 생성하였음. IL-1β의 경우 ELISA 방법을 사용하여 측정하였으며 NO와 마찬가지로 LPS를 처리하지 않은 군에서는 생성되지 않으나 LPS와 함께 배양한 군에서 NO가 생성되었고, TL-P 단백질을 발현하는 군에서 그렇지 않은 군에 비하여 높은 수준으로 생성됨 (Fig. 38). 따라서 lectin은 그 자체만으로 macrophage를 활성화시키지 않으나, LPS와 같은 염증 유발 물질에 의한 세포의 반응을 더욱 증가시킴.

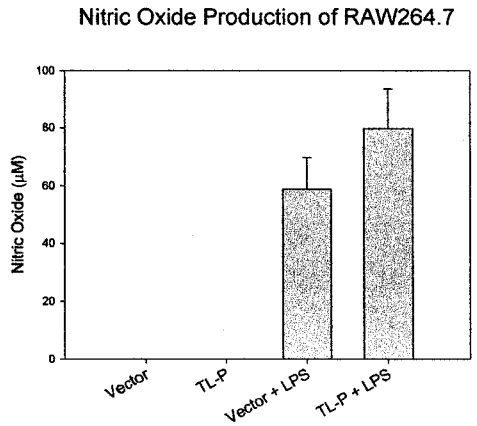


Fig. 37 TL-P 단백질을 발현하는 macrophage 세포주 RAW264.7에서 LPS에 의한 nitric oxide 생성

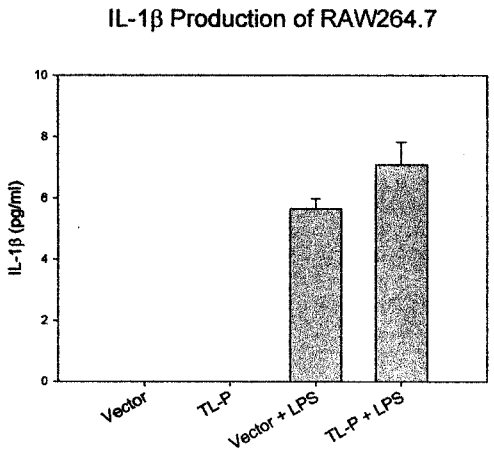


FIg. 38 TL-P 단백질을 발현하는 macrophage 세포주 RAW264.7에서 LPS에 의한 IL-1β 생성

○ 항암활성에 미치는 영향

앞서 사용된 pcDNA3.1-TL-P cDNA를 이용한 단백질 발현 시스템을 T lymphoma 세포주인 Jurkat 및 B lymphoma 세포주인 Raji cell-line에 적용하여 림프종에 대한 lectin의 항암활성을 확인함. Jurkat 및 Raji cell-line에 Lipofectamine을 이용하여 pcDNA3.1-TL-P cDNA 및 음성 대조군으로 empty vector (pcDNA3.1 only)을 각각 transfection한 후 세포수를 동일하게 보정하고 24시간 후 MTT assay를 수행하여 세포의 생존률을 확인함. 실험 결과 T 림프종 세포주 Jurkat에서는 pcDNA3.1 vector만 transfection한 군에 대하여 TL-P를 발현하는 군의 생존률이 83% 수준으로 나타났고, B 림프종 세포주 Raji에서도 유사하게 대조군에 비하여 lectin 단백질을 발현시킨 군에서 85%의 생존률을 나타냄. 따라서 lectin 단백질은 림프종 세포의 생존률을 감소시키므로 항암활성, 특히 혈액암종에 대한 활성이 있는 것으로 사료됨(Fig. 39).

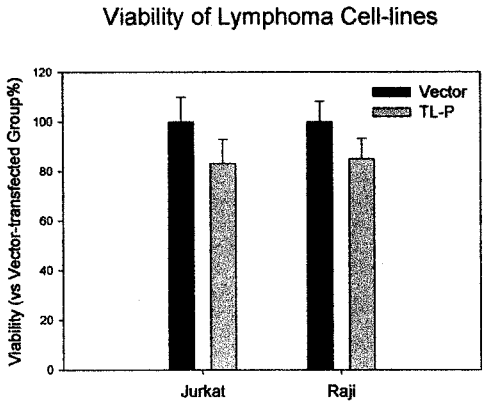


Fig. 39 림프종 세포인 Jurkat과 Raji의 세포 생존률.

제 4 장 연구개발 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에의 기여도 등을 기술

1 절 연구목표 달성도

○ 본 연구에서는 우리나라 해양자원생물로부터 신규 시알산 결합 렉틴의 확보를 위하여 해양 무척추동물 갑각류에 속하는 칠게를 서해 갯벌에서 채취하고 그 혈림프로부터 새로운 기능의 렉틴이 존재함을 확인하였으며, 이를 단일물질로 분리하기 위한 방법을 시도하였고, 그 생리활성에 대해 연구함.

○ 또한, 칠게에 존재하는 시알산 결합 렉틴의 양을 대량생산하기 위하여 동정 및 클론닝을 실시하고, 클로닝한 렉틴을 여러 생체내 방어기전인 림프구에 발현시킴으로써 새로운 항암제등에 응용함과 동시에 세균 방어수단과 암세포와의 결합 등에 유용한 물질로 확인된 렉틴의 기능에 대한 연구 수행을 하였음.

○ 렉틴의 대량 생산을 위하여 칠게의 혈림프에서 렉틴을 동정하고 cDNA library를 확보하여 렉틴을 생산하는 목표 유전자를 클로닝함. 시알산 결합 렉틴의 염기 서열을 이용한 단백질 발현 시스템을 구축하고 몇 가지 면역 세포주에 transfection하여 클로닝한 렉틴을 발현시킴.

○ 렉틴을 발현하는 면역 세포주의 생리 활성을 연구하여 병원균에 대한 방어 수단, 암세포와의 결합 및 암세포 사멸 능력에 대한 렉틴의 기능과 영향을 확인함.

○ 본연구에 의해 분리된 렉틴을 이용하여 암세포관련 실험 방법을 실시하고 각종 암세포와의 결합력을 확인하며, 이때는 한 종류의 암이라도 유

래가 다른 다수의 세포를 한국세포주은행으로부터 구비하여 성장조건을 면밀히 검토한 후 안정적인 배양조건을 확립하고 세포레벨에서의 결합력 및 선택성을 확인하였음.

○ 암세포 결합과 함께 렉틴자체에 항암특성이 있는지 여부를 확인하였으며, 대장암, 위암이외에 간암, 폐암, 유방암등의 세포에 대한 실험을 실시하고, 특히 CCK(MTT) assay와 암세포 증식 억제효과를 확인함.

○ 칠게 혈림프중 하나이상의 렉틴의 존재 가능성이 제기될 수 있으므로, 이에 대한 분리, 정제가 필요하며, 이 새로운 단백질도 세포의 암화와 관련이 깊은 탄수화물을 인식할 가능성이 있는지 여부를 확인하였음.

○ 시알산 결합 렉틴 발현 시스템을 293 cell line에 발현을 확인 후 T 림프구 세포주인 Jurkat cell, B 림프구 세포주인 Raji cell, macrophage 세포주인 Raw264.7 cell에 각각 transfection하여 시알산 결합 렉틴 발현 면역세포주들을 확립함. Raw264.7은 IL-1β 생성과 NO 생성이 증가됨을 확인하였음.

○ 시알산 결합 렉틴의 발현에 의해 면역 세포의 항암 활성이 증가하는지 확인하기 위하여 렉틴 발현 T 림프구 세포주 Jurkat cell과 B 림프구 세포주에 발현을 시켜 MTT assay를 통해 viability가 감소함을 확인함.

○ 현재, 암세포에 대한 T 림프구의 공격 능력을 증대시키기 위하여 co-stimulatory molecule을 이용한 anti-CTLA4 antibody, B7-Ig등의 재조합 단백질들이 주목을 받고 있음. 렉틴도 이와 유사하게 항암 치료에 있어서 vaccine이나 adjuvant 더 나아가 치료 물질로의 가능성을 타진해 볼 수 있음. 또한 항암 치료 시 감염성 합병증의 예방 및 치료에도 적용할 수 있음.

2 절 관련분야에의 기여도

○ 삼면이 바다로 둘러 쌓여 있고 갯벌, 다도해 등 특성이 있는 해역들을 보유한 우리나라의 해양생물자원을 활용하여 고부가가치 생명공학 제품을 생산할 수 있는 기반이 조성됨.

○ 해양분야 연구에 구조화학적인 방법과 유전공학적인 방법을 도입함으로서 관련 산업을 활성화시켜 전통산업인 수산업과 양식업을 고부가가치 첨단산업으로 전환시킬수 있음

○ 생물의 대사작용에 의하여 생성되는 단백질등을 산업적으로 개발하는 것은 대표적인 고부가가치 산업인 생물산업, 정밀화학 및 의약산업의 핵심분야이며, 미국, 일본 등에서는 21세기 생명공학의 핵심분야에 해양천연물을 포함시켜 국가적인 차원에서 연구개발을 적극 추진하고 있음.

○ 렉틴은 독특한 생리 활성으로 인하여 연구 및 산업화의 가치가 높은 물질임. 하지만 일부 렉틴의 경우 희귀한 종에서 소량 존재하므로 연구가 제한적임. 따라서 클로닝을 통해 렉틴을 대량 생산함으로 활발한 연구가 가능하고, 산업화의 첫 단계를 시작할 수 있음.

○ 오늘날 의료기술의 급속한 발전에도 불구하고 암은 여전히 불치병 중의 하나로 여겨지고 있음. 뇌혈관 질환, 심장 질환등을 포함한 사망 원인 가운데 몇 년째 암으로 인한 사망이 1위를 차지하고 있고 지속적인 증가 추세에 있음.

○ 렉틴은 항암 치료에 있어서 vaccine이나 adjuvant 더 나아가 치료 물질로의 가능성을 타진해 볼 수 있으며 항암 치료시 감염성 합병증의 예방 및 치료에도 적용할 수 있으므로 성공적으로 연구가 종료되고 전임상 및 임상시험을 통해 전량 수입에 의존하는 항암제를 일부 대체할 수 있는 가능성이 있음.

○ 갑각류에서 분리·정제하여 얻어지는 특정 당에 결합하는 단백질인 렉틴은 먼저 세포표면에 존재하는 특정 당을 인식하게 되고, 이와 같은 인식의 과정으로부터 암세포에 있어서 당이 렉틴에 의해 인식되어지는 과정을 추정해 나갈 수 있으며, 특히 본 연구자의 현 단계의 예비실험에서 얻어진 렉틴은, 이미 보고된 바와 같이 암세포에 특이적인 galactose 및 lactosamine을 인식하는 렉틴을 이용하여 얻어진 암전이와의 관련성을 해석할 수 있는 중요한 결과로 해석될 수 있음.

○ 암세포에 대한 monoclonal antibody에 렉틴을 결합시켜 만든 immunotoxin을 이용하여 암세포에 작용시키면 암세포의 단백질 합성이 저해되고 종양세포의 성장이 저하된 보고와 macrophage와 같은 effector cell이 렉틴 공존하에서 암세포를 파괴시키는 작용의 보고로부터, 항암작용을 갖는 신물질의 개발로 이어 질 수 있을 것임.

○ 렉틴에 의한 당 인식이 당단백질의 체내에서의 거동에 큰 영향을 주는 것으로부터, 약물의 효율적인 전달을 위한 drug delivery system에도 유용하게 이용될 수가 있을 것으로 기대됨.

○ Transfection 기술을 이용하여 원래 세포에서 발현하지 않거나 발현량이 적은 단백질을 대량으로 발현할 수 있게 되며, 면역 세포의 활성을 연구함으로 병원균의 침입 및 인체의 방어 기전에서 렉틴의 기능을 확인할 수 있고, 항암 활성을 연구함으로 렉틴이 종양 면역에 미치는 영향 및 그 기전에 대하여 확인할 수 있음.

○ 생체의 면역 반응은 크게 선천면역 (innate immunity)과 적응면역 (adaptive immunity)으로 나눌 수 있으며 선천 면역에서 가장 중요한 부분을 차지하는 것은 보체계임. 보체는 혈액 내에 존재하는 단백질의 일종으로 면역 세포를 염증부위로 유도하고, 병원균을 옵소닌하여 면역 세포의 대식 작용을 도우며, 병원균을 직접 사멸시키기도 함 (Fig 1).

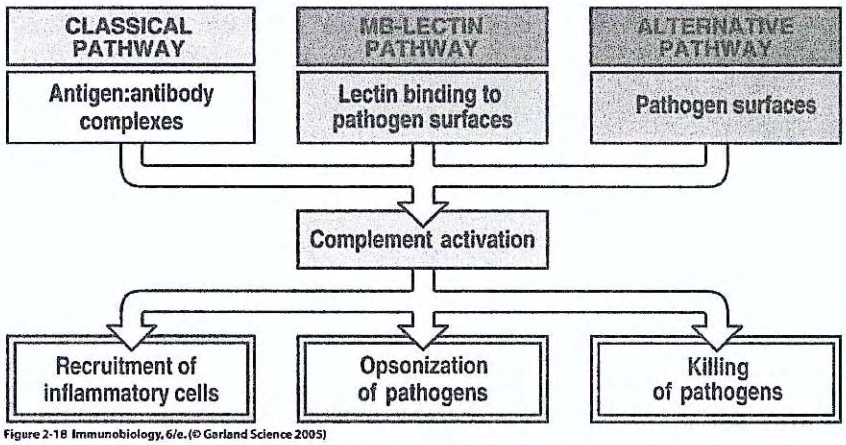


Fig 1. Schematic overview of the complement cascade.

○ 렉틴이 결핍된 사람의 경우 마이코플라즈마 감염에 쉽게 노출되었다는 보고가 있고, 사스의 원인이 되는 코로나 바이러스를 렉틴과 결합시킴으로 감염을 억제할 수 있다는 보고도 존재함. 또한 항암 치료를 위해 화학요법을 사용함으로 호중성구가 감소하여 면역력이 저하된 환자들에 있어 렉틴의 결핍은 감염성 합병증의 위험을 증가시키는 것으로 알려짐. 따라서 렉틴은 면역계와 밀접한 관련이 있음.

○ 오랜 기간 동안, 암의 발생과 증식에 있어서 생체의 면역계가 효과적인 방어를 수행하지 못하는 것은 암 세포에서 종양 특이적 항원 (tumor specific antigen)의 발현이 부족하기 때문이라 생각되어져 왔음. 하지만 근래의 연구들을 통하여 면역계의 기능 실패는 인식 가능한 종양 항원의 부재뿐 아니라 종양 세포에 면역 반응을 일으킬 수 있는 능력이 결핍되어 있다는 사실이 밝혀짐.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ 해양생물은 인체에 유용한 가공 식품으로 이용되고 있으며, 해양생물이 갖는 특수한 대사기능과 생태물질 등을 공업 또는 의약품 원료로 사용하고자 최근 새로운 시도가 이루어지고 있음.

○ 세계적 해양생물자원의 수급전망은 개발도상국의 인구증가 등에 의해 더욱 어려워 질 것으로 예상되어, 미래에 대비한 안정공급 확보책 등의 강구가 시급하며, 이를 위해 해양생물자원은 재생산 가능한 자원으로 적절한 관리를 한다면 영속적 이용이 가능하다는 인식하에 기르는 어업의 적극 추진 등 해양생물자원의 증대를 위한 자원배양, 관리기술개발, 시설정비, 어장정비 등을 광범위하게 추진해 나가는 것이 필요함.

○ 해양에는 다양한 생물종이 존재하며 이들에 대한 연구는 막 시작 단계로 그 활용도는 무궁무진함.

○ 렉틴이 결핍된 사람의 경우 마이코플라즈마 감염에 쉽게 노출되었다는 보고가 있고, 사스의 원인이 되는 코로나 바이러스를 렉틴과 결합시킴으로 감염을 억제할 수 있다는 보고도 존재함. 또한 항암 치료를 위해 화학요법을 사용함으로 호중성구가 감소하여 면역력이 저하된 환자들에 있어 렉틴의 결핍은 감염성 합병증의 위험을 증가시키는 것으로 알려짐. 따라서 렉틴은 면역계와 밀접한 관련이 있음.

○ 오랜 기간 동안, 암의 발생과 증식에 있어서 생체의 면역계가 효과적인 방어를 수행하지 못하는 것은 암 세포에서 종양 특이적 항원 (tumor specific antigen)의 발현이 부족하기 때문이라 생각되어져 왔음. 그러나 근래의 연구들을 통하여 면역계의 기능 실패는 인식 가능한 종양 항원의 부재뿐 아니라 종양 세포에 면역 반응을 일으킬 수 있는 능력이 결핍되어 있다는 사실이 밝혀짐.

○ 렉틴은 항암 치료에 있어서 vaccine이나 adjuvant 더 나아가 치료 물

질로의 가능성을 타진해 볼 수 있음. 또한 항암 치료 시 감염성 합병증의 예방 및 치료에도 적용할 수 있음.

○ 현재 관련 렉틴의 연구용시약으로서의 시약수가는 미리그램(mg)당 약 20만원이며, 칠게로부터 얻어진 단백질은 시알산을 인식하는 희귀성으로 인해 미리그램당 30만원 가량을 예상하며, 이는 그램(g)당 3억원을 예상할 수 있고, 년간 필요 양은 전세계적으로 약 40그램정도이며, 이는 120억원 정도에 해당하는 매출발생 효과를 기대할 수 있음.

○ 예상수익은 단백질 신약은 물질의 발견, 작용기전, 제품화등에 많은 시간과 비용이 들지만, 그 부가가치는 대단히 크며, 년간 예상매출액인 120억원중 60%에 해당하는 약 72억원을 기대할 수 있다. 또한, 비용절감, 고용창출, 수입대체, 수출기대효과로 그동안 외국에서 수입해 왔던 시장의 상당부분을 대체하여 비용절감과 생산시설 구비로 인한 고용창출, 수입대체 및 수출효과를 기대할 수 있음. 특히, 당해 사업의 시장성 및 활용분야로는 연구용시약과 진단시약, 항암제로 활용가능할 것으로 기대됨.

○ 시알산은 각종 연구분야에 많이 활용되는 당으로 이를 인식하는 칠게 유래의 렉틴은 그 활용가능성이 크며 먼저 바이오 의약용 시약으로서의 활용을 위해 실험을 실시하였음.

○ 세포간의 인식은 세포표면의 당을 통하여 이루어지게 되는데, 그러기 위하여서는 당을 인식하는 분자가 세포표면에 존재하여야 하고, 그 예로서 세포표면에 렉틴과 같은 당인식 단백질의 존재가 필요로 하게 됨.

○ 대표적 고부가가치 산업인 생명공학 산업 활성화로 21세기 지식기반 경제의 기반 구축이 강화될 수 있으며, 특허 출원된 해양신물질의 상업화를 지원하여 로열티 확보와 수입대체 효과를 창출할 수 있음.

○ 화학, 의약, 식품, 환경, 자원 등 관련 산업에의 응용 범위 확대를 통한 파급효과가 크게 유발될 것으로 기대되며, 국내 미개척 해양생물자원의 경제적 가치 극대화를 도모함.

○ 최근에는 중국, 인도 등 개도국에서도 이 분야의 기초연구가 활발히 진행되고 있으며 제약산업과 화학산업 분야의 거대 민간기업에서도 연구투자의 상당부분을 해양생물로 이전하는 추세임.

○ 산업적 개발은 의약품 분야에서 가장 활발하며 농약, 기능성화장품, 건강보조제, 환경친화적 화학소재 등도 포함되며, 개발의 대상에는 무척추동물, 저서동물과 해조류를 포함하여 극지, 심해에 이르기까지 전세계의 주요 해역이 모두 포함됨.

○ 최근 일부 선진국은 신물질의 탐색 단계를 벗어나 대량생산 등 산업화에 비중을 두고 있으며 미국의 국립암연구소(NCI)에서는 항암제를 생산하는 해면과 이끼벌레를 해저에서 대규모로 양식하여 해당물질을 대량으로 확보하는 단계에 돌입하였음.

○ 현재 산업화되어 있는 해양생명공학 제품으로는 파단, 잡종 줄무의 농어, 육종언어 신품동, 한천 및 아가로스, 소염물질(Pseudoteropsin)을 이용한 화장품 개발등이며, 각각 미국시장규모로 5천만 달러에서 3억 달러내외의 수요가 있는 것으로 알려져 있음.

○ 렉틴은 독특한 생리 활성으로 인하여 연구 및 산업화의 가치가 높은 물질임. 하지만 일부 렉틴의 경우 희귀한 종에서 소량 존재하므로 연구가 제한적임. 따라서 클로닝을 통해 렉틴을 대량 생산함으로 활발한 연구가 가능하고, 산업화의 첫 단계를 시작할 수 있음.

○ 본 연구결과는 국제학술지에 그 결과가 게재되어 학술적으로 검증을 받았으며 또한 특허취득으로 인해 신규성, 기술성, 상업성을 검증받은 점과 결과보고서를 바탕으로 총 3년에 걸친 연구계획이 순조롭게 진행된 것으로 판단되며 산업화에 응용 가능한 것으로 사료됨.

○ 해양생물은 비교적 연구가 타분야에 비해 적은 편이나 연구책임자는 이미 2001년 해양 밤게로 부터 유용물질을 추출하여 국내특허, 국제(미국) 특허를 등록한 경험이 있으며 이를 기반으로 산업화를 위한 연구를 지속

적으로 진행하고 있음. 또한 그 결과는 KBS뉴스와 각종 언론에 소개되어 암환자와 일반인들의 많은 관심을 받은바 있고 학술발표와 학회발표로 지속적으로 해양생물을 포함한 의약신소재연구를 실시하고 있음. 또한 국내모 바이오벤처와 현재 기술이전을 위한 협의 중에 있어 올해 안에는 먼저 시알산과 결합하는 물질의 특성을 갖는 바이오 연구용 시약으로서 상용화할 예정임.

○ 본 연구결과의 최종적인 활용방안은 해양분야 연구에 단백질공학적인 방법을 도입하여 관련 산업을 활성화시키고, 전통산업인 수산업과 양식업을 고부가가치 첨단산업으로 전환시킬수 있는 계기로 활용이 가능하며, 향후 지속적인 연구개발의 추진과 지원으로 국내 미개척 해양생물자원의 경제적 가치의 극대화가 이루어 지는 계기가 기대됨.

* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함

제 6 장 참고문헌

1. Goochee, C. F., Gramer, M. J., Andersen, D. C., Bahr, J. B. and Rasmussen. The oligosaccharides of glycoproteins : bioprocess factors and affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. Bio/technology 9, 1347-1355 (1991).
2. Sharon, N. and Lis, H. Carbohydrates in cell recognition. Scientific American 1, 74-81 (1993).
3. Toone, E. Structure and energetics of protein-carbohydrate complexes Current Biology 4, 719-728 (1994).
4. Martinez-Menarguez, J A., Aviles, M., Madrid, J., Castells, M. and Ballesta , J. Glycosylation in golgi apparatus of early spermatids if rat. A high resolution lectin cytochemical syudy. E. J. Cell. Biol. 61, 23-33 (1993).
5. Sato, T., Furukawa, K., Autero, M., Gahmberg, C. G. and Kobata, A. Structural study of the sugar chains of human leukocyte common antigen CD45. Biochemistry 32, 12694-12704 (1993)
6. Parekh, R., Isenberg, D., Rook, G., Roitt, I., Dwek, R. A. and Rademacher, T. A comparative analysis of disease-associated changes in the galactosylation of serum IgG. J. Autoimmu. 2, 101-114 (1989)
7. Nakano T, Matsui T, Ota T Benzyl-alpha-GalNAc inhibits sialylation of O-glycosidic sugar chains on CD44 and enhances experimental metastatic capacity in B16BL6 melanoma cells. Anticancer Res 16(6B) 3577-3584 (1996)
8. Rini, J.M. Lectin structure. Annu. Rev. Biophys. 24, 551-577 (1995).
9. Weis, W.I. & Drickamer, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. Annu. Rev. Biochem. 65, 441-473 (1996).
10. Lis, H. & Sharon, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. Chem. Rev. 98, 637-674 (1998).
11. Gabius, H.J. & Gabius, S. Editors of Glycosciences, Status and

Perspectives, Chapman & Hal, Weinheim. (1997).
12. Hamelryck, T.W., Dao-Thi, M., Poortmans, F., Chrispeels, M.J., Wyns, L. & Loris, R. The crystallographic structure of Phytochemagglutinin-L. J. Bio. Chem. 271, 20479-20485 (1996).
13. Cavada, B.S., Moreira, R.A., Oliveira, J.T.A. & Grangeiro, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. Rev. Bras. Fistol. Veg. 5, 193-201 (1993).
14. Sharon, N. & Lis, H. Legume lectins-a large family of homologous proteins. FASEB J. 4, 3198-3208 (1990).
15. Hamelryck, T.W., Dao-Thi, M., Poortmans, F., Chrispeels, M.J., Wyns, L. & Loris, R. The crystallographic structure of Phytochemagglutinin-L. J. Bio. Chem. 271, 20479-20485 (1996).
16. Banerjee, R., Mande, S.C., Ganesh, V., Das, K., Dhanarai, V., Mahanta, S.K., Suguna, K., Surofia, A. & Vijayan, M. Crystal structure of peanut lectin, a protein with an unusual quaternary structure. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 227-231 (1994).
17. Chrispeels, M. J. and Raikhel. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense The Plant Cell 3, 1-9 (1991).
18. Weitzhandler, M., Pohl, C., Rohrer, J., Narayanan, L., Slingsby, R. and Avdalovic, N. Eliminating amino acid and peptide interference in gigh-performance anion-exchange pulsed amperometric detection glycoprotein monosaccharide analysis. Anal. Biochem. 241, 128-134 (1996).
19. Kondo, A., Hasegawa, A., Kato I. Separation of pyridylamino oligosaccharide by high-performance liquid chromatography on an amine-bearing silica column. Anal. Biochem. 219, 21-25 (1994)
20. Bordo, D. & Argos, P. Suggestions for 'safe' residue substitutions in site-directed mutagenesis. J. Mol. Biol. 217, 721-729 (1991).
21. Kunkel, T.A. Rapid and efficient site-directed mutagenesis without phenolype selection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492 (1985).
22. Park, SY., Woo j., Jung Y., Won T., Huh Y., Lee C., Kim H., Joo S., Lee D., Hwang KW. (2008) Anti-inflammatory Effects of UDCA

on Slenocytes Exposed to PMA/Ionomycin. (2008) Biomolecules & Therapeutics 16; 126-131

23. Park, SY., Woo j., Jung Y., Won T., Huh Y., Lee C., Kim H., Joo S., Lee D., Hwang KW. (2008) Anti-inflammatory Effects of UDCA on Slenocytes Exposed to PMA/Ionomycin. (2008) Biomolecules & Therapeutics 16; 126-13
24. Sul D, Kim H, Oh E, Phark S, Cho E, Choi S, Kang HS, Kim EM, Hwang KW, Jung WW. (2007) Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde. Archives Toxicology 81:589-59
25. An, J., J. Z. Liu, et al. (2006). "Anti-HIV I/II activity and molecular cloning of a novel mannose/sialic acid-binding lectin from rhizome of Polygonatum cyrtonema Hua." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 38(2): 70-8.
26. Bao, J., C. Wu, et al. (2004). "[Molecular cloning and analysis of a monocot mannose-binding agglutinin from Zephyranthes grandiflora (family Amaryllidaceae)]." Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi 21(5): 812-8.
27. Chai, Y., Y. Pang, et al. (2003). "Molecular cloning and characterization of a mannose-binding lectin gene from Crinum asiaticum." J Plant Physiol 160(8): 913-20.
28. Chen, Z., G. Kai, et al. (2005). "cDNA cloning and characterization of a mannose-binding lectin from Zingiber officinale Roscoe (ginger) rhizomes." J Biosci 30(2): 213-20.
29. Chen, Z., Y. Pang, et al. (2005). "Molecular cloning and characterization of a novel mannose-binding lectin cDNA from Zantedeschia aethiopica." Biocell 29(2): 187-93.
30. Chen, Z., X. Sun, et al. (2005). "Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-binding lectin from Dendrobium officinale." Toxicon 45(4): 535-40.
31. Kai, G., J. Zheng, et al. (2003). "Molecular cloning of a new lectin gene from Z. grandiflora." DNA Seq 14(4): 335-8.

32. Lin, J., X. Zhou, et al. (2005). "Cloning and characterization of an agglutinin gene from Arisaema lobatum." Biosci Rep 25(5-6): 345-62.
33. Lin, L., J. Lu, et al. (2007). "Molecular cloning and characterization of a mannose-binding lectin gene from Pinellia cordata." Mol Biol Rep.
34. Liu, Y. C., F. H. Li, et al. (2007). "Molecular cloning, characterization and expression analysis of a putative C-type lectin (Fclectin) gene in Chinese shrimp Fenneropenaeus chinensis." Mol Immunol 44(4): 598-607.
35. Yao, J. H., X. Y. Zhao, et al. (2003). "Cloning and molecular characterization of a novel lectin gene from Pinellia ternata." Cell Res 13(4): 301-8.
36. Zhao, X., J. Yao, et al. (2003). "Molecular cloning and characterization of a novel lectin gene from Lycoris radiata." DNA Seq 14(3): 223-6.
37. Zhu, Y. R., J. Wang, et al. (2006). "Molecular cloning of a lectin cDNA from Alocasia macrorrhiza and prediction of its characteristics." Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao 32(6): 634-42.

별 첨 자체평가의견서

자체평가의견서

1. 과제현황

			과제코드	F10703307A210000110	
사업구분	수산특정연구개발사업				
과제구분	(총괄,세부,단위)	(주관,협동)	과제성격	(기초,응용,개발)	
총괄과제명	칠게로부터 의약신소재 단백질 개발 및 실용화				
주관기관	중앙대학교		주관연구책임자	김 하 형	
과 제 명	칠게로부터 의약신소재 단백질 개발 및 실용화				
연구기관	중앙대학교		연구책임자	김 하 형	

연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2005.06.14.-2006.06.13.	45,760,000	15,000,000	60,760,000
	2차년도	2006.09.15.-2007.09.14.	45,760,000	7,500,000	53,260,000
	3차년도	2007.11.01.-2008.10.31.	45,760,000	-	45,760,000
	4차년도				
	5차년도				
	계		137,280,000	22,500,000	159,780,000

참여기업	(주)마이진		
상 대 국		상대국연구기관	

2. 평가일 : 2008. 12. 05.

3. 평가자(연구책임자)

소속	직위	성명
중앙대학교 약학대학	교수	김하형

4. 평가자(연구책임자) 확인

o 본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본자료가 전문위원회 및 사업조정관 평가시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	김 하 형

Ⅰ. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수,우수,보통,미흡,불량)

본 연구결과는 우리나라 서해안에서 서식하는 칠게를 대상으로 신규 기능성 시알산 결합 렉틴 단백질을 분리후 사람 대장암, 위암세포에 대한 항암 효능을 확인하고 이를 대량생산하기 위한 실험을 실시하여 그동안 식용 혹은 낙지잡이용 미끼로만 활용되던 게로 부터 생물자원으로 활용 가능한 중요한 결과를 얻어 의약신소재로서의 가능성을 제시하였으며 그 연구개발결과가 우수한 것으로 평가된다.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수,우수,보통,미흡,불량)

해양생물은 그동안 식품자원으로 주로 이용되어 왔으나 최근 제약산업과 화학산업의 글로벌 기업에서도 연구투자의 상당부분을 해양생물로 이전하고 있는 추세이며, 미국 국립암연구소는 항암제를 생산하는 이끼벌레를 대규모로 양식하고 있다. 본 연구 결과는 우리나라 생물자원인 칠게로부터 결과가 얻어져 앞으로 수산 양식업과 더불어 의약산업, 기능성 식품개발에 응용가능성이 클 것으로 기대된다.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수,우수,보통,미흡,불량)

전세계적으로 해양생물에서 약 20여종의 물질이 개발되어 산업적 개발이 완료된 상태이며, 우리나라에서는 선진국에 비해 해양신물질 개발이 낙후된 실정이나 본 결과를 바탕으로 천연 소재를 이용한 기능성 의약 제품 개발이 가능하게 되었으며, 최첨단 생명공학적 기법으로 고부가가치의 창출과 함께 그 기능성이 극대화 될 것으로 평가된다.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수,우수,보통,미흡,불량)

한국해양수산기술진흥원에서 주관하여 해양한국발전프로그램 연구개발사업으로 2005년에 3년간의 계획으로 시작된 본 과제는 3차년도에 수산특정연구개발사업으로 이관되었으며 해양수산부가 농림수산식품부로 변경되었으나, 계획서상에 언급한 내용 이상의 결과를 얻어 연구자들이 성실하게 연구를 수행 한 것으로 평가되며 추후 학술적 가치와 더불어 산업화의 가능성이 큰 것으로 평가된다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 산업재산권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수,우수,보통,미흡,불량)

그동안 본 과제에 의해 얻어진 결과는 국제학술지로는 Archives of Pharmacal Research에 2편, Protein & Peptide Letters에 1편 게재되었으며, 국내학술지인 약학회지에 2편, 학회(대학약학회, 한국생화학분자생물학회, 한국당과학회)에서 학술발표를 6회 하였고, 박사 1명, 석사 2명을 배출하였다. 또한, 2007년 7월 30일 <한국산 해양 칠게로부터 추출된 렉틴 단백질의 제조방법 및 용도>의 제목으로 국내특허(10-0761003)가 등록되었고, 현재도 국제학술지에 논문을 투고중이어서 연구결과가 비교적 우수한 것으로 평가된다.

Ⅱ. 연구목표 달성도

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	단백질원액 추출및 적혈구 응집반응	칠게 혈림프를 취하여 사람, 토끼, 랫트, 마우스 적혈구에 대해 응집반응을 확인하여 렉틴존재를 파악함	100
2	크로마토그래피에 의한 렉틴의 분리	Sephacryl S-200 컬럼과 Thyroglobulin-affinity 컬럼에 의한 최적방법에 의해 분자량 65kDa의 단일 렉틴 분리에 성공	100
3	당결합특성 확인	시알산이 결합된 당단백질에 대해서 반응을 확인하고 시알산이 제거된 당단백질에서 반응성이 60배 감소	100
4	렉틴의 순도확인	전기영동과 겔여과 HPLC에 의해 단일물질임을 확인	100
5	렉틴활성에 미치는 영향	금속이온, 온도, pH 변화에 의한 활성을 확인	100
6	혈림프 분리 및 total RNA, mRNA 분리	RNeasy Mini Kit과 QIAshredder을 이용하여 혈림프에서 total RNA를 분리	100
7	First strand 와 second strand 제작	Dynabeads Oligo(dT)$_{25}$와 Dynal MPC-S (Dynal Biotech)를 이용하여 mRNA 분리했으며 SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning을 이용하여 mRNA로부터 first strand를 합성하고 first strand로부터 second strand 합성	100
8	DNA 말단에 제한효소 정착한 cDNA 제작	Sal I ligation 과 Not I digestion 을 통한 cDNA 제작	100
9	Column chromatography를 통한 cDNA 분리 및 pSPORT1에 ligation	SuperScript Plasmid System with Gateway Technology for cDNA Synthesis and Cloning을 이용하여 합성된 cDNA를 size fraction하여 cloning에 필요한 큰 size의 DNA만을 얻어냄. pSPORT 1 *Not* I-*Sal* I-Cut vector에 제작된 cDNA ligation 시킴	100
10	후보 유전자 발굴을 위한 PCR primer 제작	Amino acid N-terminal sequencing을 통해 얻은 Glu-Ala-Ser-Ile-Leu-Ala를 Vector NTI advanced의 Back Translation에 입력하여 발현률이 높은 codon을 얻어 primer로 제작	100
11	후보 유전자 발굴을 위한 PCR 및 Gel extraction	Library cDNA를 주형으로 한 PCR 반응을 수행함으로 목표 유전자로 추측되는 cDNA들을 증폭한 후 MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN)으로 정제	100
12	TA vector를 이용한 cloning	분리된 DNA 조각을 TA vector 인 pGEM T-easy vector에 ligation을 한 후 E.coli에 transformation을 시켜서 수백개의 colonies를 얻었으며 reandom하게 colonies를 선택하여 master plate를 만든 후 다시 plasmid를 분리하여 확인	100
13	렉틴의 안정성	조건변화에 따른 최적 활성 유지 조건 검토완료	100

번호	세부연구목표 (연구계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도(%)
14	기존 렉틴과의 활성비교	당결합력과 활성을 비교하였음	100
15	렉틴의 구조적 정보	2차구조적 특징과 아미노산 수식에 따른 활성연구 확인	100
16	암세포 사멸효과, 마이토젠 효과	대장암, 위암세포 사멸효과 확인, 정상세포에 대한 마이토젠 효과 확인	100
17	칠게에서 동정한 렉틴의 아미노산 서열로부터 primer 제작	아미노산 서열로부터 예상되는 mRNA 염기 서열을 확인하고 PCR primer 제작함.	100
18	다양한 종의 생물에서 발현되는 렉틴 유전자로부터 primer 제작	다양한 종의 생물에서 발현되는 렉틴 유전자의 염기 서열을 비교하고 유사성이 높은 부분의 양쪽 말단을 PCR primer로 제작함.	100
19	목표 유전자 후보 DNA fragment 확보 및 염기 서열 확인	제작한 primer를 이용하여 PCR 반응을 수행함. 염기 서열을 확인하여 목표 유전자 후보 DNA fragment를 확보함.	100
20	3‘ and 5' RACE를 이용한 full length DNA 확보	후보 DNA fragment를 이용하여 3'RACE 와 5'RACE 용 primers를 제작하여 5‘ end 와 3'end 까지의 ORF을 확보 중임.	75
21	암세포 결합력	렉틴의 암세포 결합에 대한 반응성의 차를 확인하고 기존 렉틴과 비교	100
22	암세포에 대한 사멸효과	대장암, 위암세포이외의 암세포에 대한 사멸효과 확인	100
23	암세포인식에 대한 당화의 영향	당구조의 변화에 따른 암세포 인식의 변화	100
24	단백질 발현 시스템 구축	Transfection host 세포주에 목표 유전자를 발현하는 vector를 transfection하여 시알산 결합 렉틴의 염기서열을 이용한 단백질 발현 시스템을 구축함.	85
25	면역 세포 활성에 미치는 영향	단백질 발현 시스템을 T 림프구와 B 림프구를 포함한 몇가지 면역 세포주에 transfection하고 ELISA 및 RT-PCR 방법으로 이들의 cytokine 생성을 확인하여 면역 세포 활성에 미치는 영향을 연구함. 기능성 식품개발 가능성을 제시함.	80
26	항암 활성에 미치는 영향	단백질 발현 시스템을 T 림프구와 B림프구 세포주에 transfection시키고 viability를 확인 하고 항암효과를 검증함.	80

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

본 연구결과는 국제학술지에 그 결과가 게재되어 학술적으로 검증을 받았으며, 또한 특허취득으로 인해 신규성, 기술성, 상업성을 검증받은 점과 결과보고서를 바탕으로 총 3년에 걸친 연구계획이 순조롭게 진행된 것으로 판단되며, 산업화에 응용 가능한 해양생물 연구의 좋은 과제로 평가 된다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

해양생물은 타분야에 비해 비교적 연구가 적은 편이나 연구책임자는 이미 해양 밤게로 부터 유용물질을 추출하여 국내특허, 국제(미국)특허를 등록한 경험이 있고, 이를 기반으로 산업화를 위한 연구를 지속적으로 진행하고 있다. 또한 그 결과는 KBS뉴스와 각종 언론에 소개되어 암환자와 일반인들의 많은 관심을 받은바 있고, 학술, 학회발표, 특허등록을 지속적으로 하면서 해양생물에 대한 의약신소재 및 기능성 식품 개발 관련 연구를 실시해 오고 있다. 또한 국내 바이오벤처와 현재 기술이전을 위해 협의 중에 있어 시알산과 결합하는 물질의 특성을 갖는 바이오 연구용 시약으로 조만간 상용화할 예정이다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

본 연구결과의 활용방안은 해양분야 연구에 단백질공학적인 방법을 도입하여 관련 산업을 활성화시키고 전통산업인 수산업과 양식업을 고부가가치 첨단산업으로 전환시킬 수 있는 계기로 활용이 가능하며 향후 지속적인 연구개발의 추진과 지원으로 국내 미개척 해양생물자원의 경제적 가치의 극대화가 이루어 지는 계기가 될 것으로 기대된다.

Ⅳ. 보안성 검토

o 해양수산연구개발사업보안관리지침에서 정하는 바에 따라 작성

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

1. 연구책임자의 의견

본 연구는 해양수산부, 농림수산식품부의 지원하에 수행되었으며 모든 결과는 특허와 논문으로 이미 공개되어 있고, 일부 추가 연구결과는 현재 논문투고 및 일부는 작성중이라 보안 필요가 있으나 연구의 보안성에 대해서는 한국해양수산기술진흥원과 해양수산연구개발사업보안관리지침에서 정하는 바에 전적으로 따르고자 합니다.

2. 연구기관 자체의 검토결과

연구책임자의 의견에 따라 본 연구의 보안성에 대해서는 한국해양수산기술진흥원과 해양수산연구개발사업보안관리지침에서 정하는 바에 따르고자 합니다.