

제 1 차 년 도 최 종 보 고 서

홍합유래 생물접착제의 유전학적 대량생산 및
실용화 연구

Genetical Mass-production of Mussel Bioadhesive

연 구 기 관
포항공과대학교

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 ‘홍합유래 생물접착제의 유전학적 대량생산 및 실용화 연구’
과제의 보고서로 제출합니다.

2003. 3. .

주관연구기관명 : 포항공과대학교
주관연구책임자 : 차 형 준
연 구 원 : 조 남 준
 구 자 경
 Basappa Johnvesly
 김 범 수
 노 승 완
연 구 조 원 : 황 동 수
 김 영 환
 강 동 균
 엄 호 섭
 서 정 현
 김 영 수
 조 은 경
 배 진 우
 허 은 실

최종(단계)보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2002.6.~ 2003.2.	단계 구분	1/6
연구사업명	해양생물로부터 유용신물질 연구개발				
연구과제명	홍합유래 생물접착제의 유전학적 대량생산 및 실용화 연구				
연구책임자	차형준	해당단계 참여연구원수	총 : 15명 내부 : 8명 외부 : 7명	해당단 계 연구비	정부: 90,000 천원 기업: 10,000 천원 계: 100,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	포항공과대학교 화학공학과		참여기 업명	그린텍21(주)	
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 : 한국기술교육대학교		연구책임자 : 조남준		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	63
<ul style="list-style-type: none"> ○ 서열이 알려진 Mgfp-1의 decapeptide를 총 6번 반복되는 cDNA의 클로닝 ○ Mgfp-5와 Mgfp-1의 모델펩타이드가 동시발현될 수 있는 재조합 조합형 생물접착제 변이체 3가지의 유전학적 설계 및 제작 ○ 3가지 재조합 조합형 생물접착제 변이체의 대장균에서의 유전학적 발현 ○ 재조합 Mgfp-5 홍합 생물접착제의 유전학적 생산 ○ 대장균에서 생산되는 재조합 Mgfp-5 홍합 생물접착제의 분리정제 ○ 재조합 Mgfp-5 홍합 생물접착제의 접착능력 측정 ○ 재조합단백질을 대량으로 발현시킬 수 있는 Mgfp-5 및 Mgfp-1 모델 펩타이드 발현용 벡터의 제작 ○ 홍합유래 생물접착제 구성 주요 작용기 포함하는 모델 펩타이드들의 합성 ○ 생물접착제의 실제 작용환경과 동일한 수환경 접착기질 제조를 위한 AgNO₃ 및 KAuCl₄ 수용액의 환원 ○ 거대분자인 생물접착제의 접착특성을 분자수준에서 이해하기 위한 micro-Raman과 SERS를 이용한 모델 펩타이드 주요 작용기들의 접착특성 측정 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	홍합, 접착단백질, 조합형 접착제, 대장균, 유전학적 생산			
	영어	Mussel, <i>Mytilus galloprovincialis</i> , Adhesive protein, Mgfp-5, Combinaroty adhesive, <i>Escherichia coli</i> , Genetic production			

요 약 문

I. 제 목

(국문) 홍합유래 생물접착제의 유전학적 대량생산 및 실용화 연구

(영문) Genetical Mass-production of Mussel Bioadhesive

II. 연구개발의 목적 및 필요성

해양생명체인 홍합(mussel)은 접착단백질(adhesive protein)을 생산, 분비함으로써 홍합 자신을 바다 속의 바위와 같은 젖은 고체표면에 단단히 부착할 수 있도록 하여 강한 파도의 충격이나 바닷속의 부력 효과에 대하여도 저항할 수 있다. 홍합접착단백질은 현재 알려진 어떠한 화학합성 접착제보다도 강력한 자연적인 접착제로 알려져 있으며 대부분의 에폭시 수지보다 두 배 정도의 커다란 인장강도를 지니고 있으면서도 휘어질 수 있는 유연성을 가지고 있는 혁신적인 물질이므로 접착제 산업계에서 매우 커다란 관심을 끌고 있다. 홍합 접착단백질은 플라스틱, 유리, 금속, 테플론 및 생체물질 등의 많은 종류의 표면에 접착할 수 있는 능력을 가지고 있다. 또한 다습한 곳이나 물에서 접착력이 떨어지는 기존 화학접착제와 달리 홍합 생물접착제는 물에 젖을수록 더욱 강력한 접착 능력을 자랑하므로 수중 공사에 획기적인 재료로 응용될 수 있다. 생체에 사용시 인간세포를 공격하거나 면역반응을 일으키지 않아 수술시 실로 꿰맬 필요 없이 생체조직의 접착에 이용할 수 있으며 부러진 치아의 접착 등과 같은 의학분야 및 치과용으로 커다란 응용이 가능하다.

현재 홍합접착제는 추출에 의해 주로 생산되며 1그램당 일만마리의 홍합이 필요하고 7만5천불 이상의 매우 높은 시장 가격대를 형성하여 실용화가 제한되고 있다. 국외적으로는 홍합접착단백질이 발견된 후 20여년 동안 홍합접착단백질에 대한 유전정보 및 물성연구가 계속 진행되어 여러 접착단백질들의 염기서열이 밝혀지고 있다. 홍합 접착단백질의 그 응용에 대하여 연구들이 수행되어 가고 있는 가운데 이의 상용화를 위하여서는 값싸고 손쉽게 대량으로 생산할 수 있는 기술의 개발이 절실하다. 이를 위하여 유전자 재조합 기술을 이용한 대량생산 연구가 시도되고 있으나 주로 target하였던 FP(foot protein)-1 접착단백질의 유전학적 발현이 거의 불가능하며 일부분만을 모방한 모델 펩타이드는 발현에는 성공적이거나 접착능력이 거의 없다는 문제점을 안고 있어 상용화에 필수불가결한 기술인 대량생산 기술이 아직 개발되고 있지 못하므로 홍합 생물접착제의 이용이 제한이 되고 있는 현실이다. 국내의 경우도

모델 펩타이드를 발현하는 연구만이 보고되고 있다. 그러므로 환경적인 문제를 수반할 뿐만이 아니라 여러가지의 기능에 제한이 있어 많은 문제점을 지니고 있는 현재의 화학접착제를 대체할 수 있는 생물접착제로서의 홍합접착단백질의 성공적인 실용화를 위하여서는 기존의 접근을 벗어난 다른 홍합접착단백질들의 응용가능성을 탐색하고 이들의 조합적인 변이체들을 이용한 새로운 방식의 생물접착제 설계, 제작 및 생산 연구가 필요하다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구개발의 최종 목표는 해양생명체인 홍합유래 접착단백질의 재설계를 통한 조합형 생물접착제의 구축과 이들 변이체들의 유전학적 대량생산기술 개발 및 이를 통한 실용화 기술의 연구이다. 본 연구그룹에서 이미 수행한 홍합 *Mytilus galloprovincialis*에서 클로닝한 두 가지의 중요 접착단백질인 Mgfp-1과 Mgfp-5는 홍합 생체 내에서 각각 접착에 중요한 역할을 하고 있다. 이에 본 연구에서는 현재까지의 대부분의 연구그룹들의 접근방식과 달리하여 이미 대장균에서 성공적으로 발현생산이 확인된 Mgfp-5를 중심으로 Mgfp-1의 가교화(cross-linking) 기능을 부여하는 조합형 변이체들을 유전학적으로 설계하여 구축하고, 대장균에서 생산된 재조합 단백질 Mgfp-5의 접착가능성을 조사하는 것을 이번 연도의 단기 목표로 하였다.

IV. 연구개발결과

본 과제를 1년 동안 수행함으로써 얻어진 결과는 크게, Mgfp-5를 대장균 내에서 대량생산 한 것과, 대장균에서 생산된 재조합 단백질을 분리정제를 수행한 것 그리고 Mgfp-1의 decapeptide와 Mgfp-5를 조합하여 생산할 수 있는 대장균용 발현 벡터를 설계한 것 세 가지로 크게 정리 할 수 있다.

먼저 Mgfp-5의 cDNA를 가진 발현용 벡터가 형질전환된 대장균으로, 대장균에서의 Mgfp-5의 시간과 배지 구성에 따른 발현양을 조사하였다. 또한, 대장균 내에서 생산된 Mgfp-5를 대장균으로부터 분리 정제를 Immobilized metal affinity chromatography(IMAC)을 이용하여, Native한 조건과, Denaturing condition에서 수행하였다. Native한 상태에서 분리정제를 수행하였을 경우, 분리정제된 단백질의 순도는 높은 반면에, 수득율은 감소하였다. 반대로 Denature한 상태에서 분리정제를 수행하였을 경우, 순도는 native한 상태에서 분리정제를 수행했을 경우와 비슷하지만, 정제수율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

분리정제된 재조합 Mgfp-1을 tyrosinase로 수정을 해준 후에, Bio-AFM을

이용하여 접착능력을 측정함으로써 접착력을 가짐을 확인하고 시중에서 판매하는 홍합에서 자연 추출된 홍합접착단백질의 접착력을 비교하였다. 또한, Mgf-1과 Mgf-5를 동시에 생산하기 위해서, 서열이 알려진 Mgf-1의 decapeptide를 총 6번 반복 발현 시킬수 있는 model peptide의 cDNA를 클로닝하였으며, 클로닝된 Mgf-1의 model peptide cDNA를 이미 본 연구 그룹에서 발견한 Mgf-5의 cDNA와 함께 조합하여 크게 3가지의 홍합접착단백질들을 대장균 내에서 발현시킬 수 있는 대장균용 발현 vector를 제작하였다. 발현된 벡터들은 대장균에 형질전환 되었고, 발현 여부 및 성상을 SDS-PAGE와 Western Blot을 통해서 확인 할 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1차 년도에 대장균내에서 생산하고 분리정제한 Mgf-5가 어느 정도의 접착능력을 가짐을 알 수 있었기 때문에, 앞으로의 연구도 순조롭게 진행된다면 본 과제 목표인 접착력을 가지는 홍합접착단백질을 대장균내에서 생산 가능성이 높아졌다고 할 수 있다. 또한, 1차 년도 동안에, 다음 년도의 연구를 할 수 있는, 형질전환된 균주를 완성하였고, 분리정제 방법 및, 바이오 분자 현미경을 이용한 접착능력 측정 방법등을 터득하였기 때문에, 다음 년도의 연구 수행에 있어서 많은 도움이 될 것으로 여겨진다.

S U M M A R Y

Mussel adhesive proteins have been studied as a water-resistant, environmental-friendly, and medical adhesive. In this research, cDNA for novel mussel adhesive protein, *Mytilus galloprovincialis* foot protein-5 (Mgfp-5), was obtained by RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) from total RNA that was isolated from foot of mussel *M. galloprovincialis* and genetically expressed in *Escherichia coli* expression system. cDNA of Mgfp-5 with 357 bp was cloned from *M. galloprovincialis* for the first time in this research and its nucleotide sequence was almost elucidated except a few signal sequence part. Recombinant Mgfp-5 which is fused with (His)₆ tag was successfully expressed as a soluble form in *E. coli*. Recombinant Mgfp-5 was purified with high purity using one step immobilized metal affinity chromatography (IMAC) in native and denaturing condition. Through amino acid composition analysis of the purified same, we confirmed that the expressed and purified protein was recombinant Mgfp-5. Purified recombinant Mgfp-5 was modified by mushroom tyrosinase and its adhesion force was tested by bio-atomic force microscope (Bio-AFM) and coating on slide glass. Adhesion force of recombinant Mgfp-5 was similar to that of extracted mussel adhesive proteins.

C O N T E N T S

CHAPTER 1. Introduction	1
Section 1. Research Overview	1
Section 2. Research Objectives and Detailed Goals	4
CHAPTER 2. Current R&D Status	5
CHAPTER 3. Research Topics and Results	9
Section 1. Results from previous research	9
Section 2. Material and Methods	12
1. Expression, Seperation, and purification of Mgf _p -5	12
2. Measuring adhesive ability of purified Mgf _p -5	13
3. Fusion expression system of Mgf _p -5 and Model peptide of FP-1 development	14
4. Synthesis of model peptide	18
5. Synthesis of adhesion substrate	18
6. Evaluation of adhesion characteristic of Mussel adhesive protein	18
Section 3. Results and discursssion about This year research	19
1. Expression, Seperation, and purification of Mgf _p -5	19
2. Measuring adhesive force of purified Mgf _p -5	32
3. Fusion expression system of Mgf _p -5 and Model peptide of FP-1 development	32
4. Synthesis of model peptide and adhesion surface	40
5. Evaluation of adhesion characteristic of Mussel adhesive protein	40
6. Database construction to measure characteristic of Mussel adhesive protein	48
CHAPTER 4. Degree of Achievement and Contribution	51
1. Degree of Achievement	51
2. Contribution of the Results from This Year	53
CHAPTER 5. Future Applications	55
CHAPTER 6. References	58

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구 개발의 중요성	1
제 2 절 연구 개발의 목표	4
제 2 장 국내외 기술개발 현황	5
제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과	9
제 1 절 본 기관의 선행연구	9
제 2 절 연구 수행 방법	12
1. Mgfp-5의 대장균에서의 발현 및 분리 및 정제	12
1.1. Mgfp-5의 대장균에서의 발현	12
1.2. Mgfp-5의 분리 및 정제	12
1.2.1 Native 조건	12
1.2.2 Denaturing 조건	13
2. Mgfp-5의 접착능력 측정	13
2.1 분리정제된 Mgfp-5의 확인	13
2.2. Mgfp-5의 생물학적 화학적 수정	13
3. FP-1과 Mgfp-5의 동시 발현 시스템 설계 및 제작	14
3.1. FP-1의 모델 펩타이드 유전자 합성	14
3.2. FP-1의 Model peptide와 Mgfp-5의 유전자 동시 발현 시스템 설계	15
4. 접착단백질의 모델 펩타이드 합성	18
5. 접착 기질의 합성	18
6. 융합접착단백질의 접착 특성 평가	18
제 3 절 당해연도 연구 수행 내용 및 결과	19
1. Mgfp-5의 대장균에서의 발현 및 분리 및 정제	19
1.1. Mgfp-5의 대장균에서의 발현	19
1.2. Mgfp-5의 분리 및 정제	23
2. Mgfp-5의 접착가능성 시험	32
2.1 분리정제된 Mgfp-5의 확인	32
2.2. Mgfp-5의 생물학적 화학적 수정	32
3. FP-1과 Mgfp-5의 동시 발현 시스템 설계 및 제작	35
4. 모델 펩타이드 합성 및 기질 제작	40
5. 모델 펩타이드의 접착 특성 평가	40
6. 생물접착제 접착특성 해석기초구축	48

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외 기여도	51
제 1 절 연구 개발 목표 달성도	51
제 2 절 대외 기여도	53
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	55
제 6 장 참고문헌	58

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 중요성

해양생명체인 홍합(mussel)은 접착단백질(adhesive protein)을 생산, 분비함으로써 (그림 1 참조) 홍합 자신을 바다 속의 바위와 같은 젖은 고체표면에 단단히 부착할 수 있도록 하여 강한 파도의 충격이나 바닷속의 부력 효과에 대하여도 저항할 수 있다[1,2]. 홍합접착단백질은 현재 알려진 어떠한 화학합성 접착제보다도 강력한 자연적인 접착제로 알려져 있으며 대부분의 에폭시 수지보다 두 배 정도의 커다란 인장강도를 지니고 있으면서도 휘어질 수 있는 유연성을 가지고 있는 혁신적인 물질이므로 접착제 산업계에서 매우 커다란 관심을 끌고 있다. 홍합접착단백질은 플라스틱, 유리, 금속, 테플론 및 생체물질 등의 많은 종류의 표면에 접착할 수 있는 능력을 가지고 있다[3]. 또한 다습한 곳이나 물에서 접착력이 떨어지는 기존 화학접착제와 달리 홍합 생물접착제는 물에 젖을수록 더욱 강력한 접착 능력을 자랑하므로 수중 공사에 획기적인 재료로 응용될 수 있다. 생체에 사용시 인간세포를 공격하거나 면역반응을 일으키지 않아 수술시 실로 꿰맬 필요 없이 생체조직의 접착에 이용할 수 있으며 부러진 치아의 접착 등과 같은 의학분야 및 치과용으로 커다란 응용이 가능하다[4].

현재 홍합접착제는 추출에 의해 주로 생산되며 1그램당 일만마리의 홍합이 필요하고 7만5천불 이상의 매우 높은 시장 가격대를 형성하여 실용화가 제한되고 있다. 국외적으로는 홍합접착단백질이 발견된 후 20여년 동안 홍합접착단백질에 대한 유전정보 및 물성연구가 계속 진행되어 여러 접착단백질들의 염기서열이 밝혀지고 있다[12]. 홍합 접착단백질의 그 응용에 대하여 연구들이 수행되어 가고 있는 가운데 이의 상용화를 위하여서는 값싸고 손쉽게 대량으로 생산할 수 있는 기술의 개발이 절실하다. 이를 위하여 유전자 재조합 기술을 이용한 대량생산 연구가 시도되고 있으나 주로 target하였던 FP(foot protein)-1 접착단백질의 유전학적 발현이 거의 불가능하며 일부분만을 모방한 모델 펩타이드는 발현에는 성공적이거나 접착능력이 거의 없다는 문제점을 안고 있어 상용화에 필수불가결한 기술인 대량생산 기술이 아직 개발되고 있지 못하므로 홍합 생물접착제의 이용이 제한이 되고 있는 현실이다[2]. 국내의 경우도 모델 펩타이드를 발현하는 연구만이 보고되고 있다. 그러므로 환경적인 문제를 수반할 뿐만 아니라 여러가지의 기능에 제한이 있어 많은 문제점을 지니고 있는 현재의 화학접착제를 대체할 수 있는 생물접착제로서의 홍합접착단

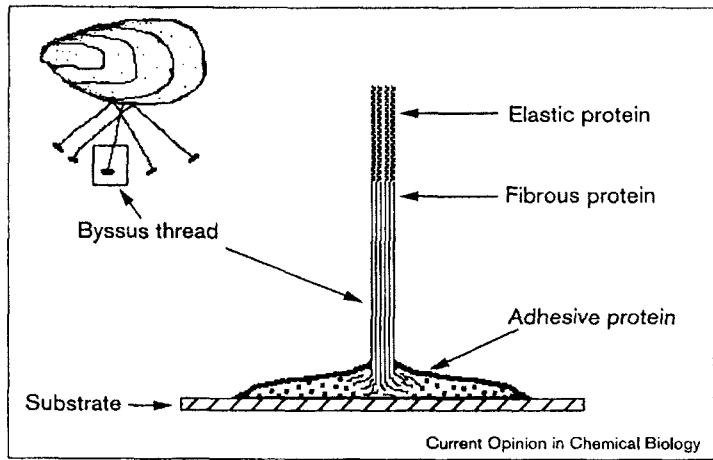
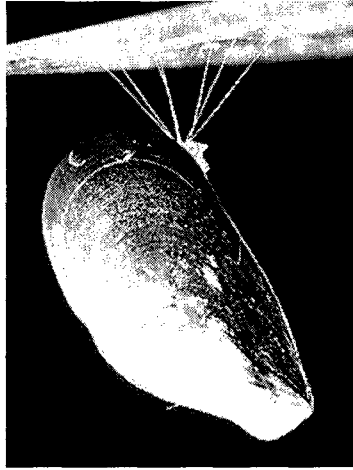


그림 1. 홍합의 접착단백질 분비에 의한 표면 부착

백질의 성공적인 실용화를 위하여서는 기존의 접근을 벗어난 다른 혼합접착단백질들의 응용가능성을 탐색하고 이들의 조합적인 변이체들을 이용한 새로운 방식의 생물접착제 설계, 제작 및 생산 연구가 필요하다. 생물접착제로서의 혼합접착단백질의 성공적인 실용화를 이루어야 하는 이유는 다음과 같다.

기술적 측면

접착제는 두 물체를 접합시키는 물성을 가짐으로써 매우 다양한 분야에 이용되고 있는 중요한 물질이다. 그러나 현재의 대부분을 차지하고 있는 화학적으로 합성된 접착제는 수분에 약하고 인체에 해가 된다는 문제점을 가지고 있으므로 이를 해결하고자 많은 기술들의 개발이 이루어지고는 있으나 화학 접착제로는 궁극적인 해결은 불가능하다고 인식되고 있다. 그러므로 수중접착, 고 인장성, 유연성 등의 고기능성을 가지면서도 인체에 사용할 수 있는 대체 접착제의 개발이 필요하며 이러한 대안으로서 가장 각광을 받는 물질이 혼합접착단백질이다. 그러므로 혼합 생물접착제를 실용화하기 위하여서는 경제적으로 대량생산할 수 있는 기술의 개발이 절실하다.

경제·산업적 측면

현재 전 세계의 접착제 시장은 빠르게 성장하고 있어, 1997년에 200억 달러 규모의 시장으로 성장하였고 2003년에는 280억 달러 규모의 시장으로 성장할 것으로 예상된다 (Frost & Sullivan 컨설팅의 세계 접착제 시장에 관한 보고서 인용). 접착제는 매년 6.5%의 정도의 생산 증가를 보이고 있는데, 개발도상국의 경제 발전과 중국 안에서의 무한한 수요 그리고 계속되는 투자를 통해서 계속적으로 시장이 커질 것이라고 전망되고 있다. 그러나 현재 세계 접착제 시장은 미국, 유럽, 일본 등의 선진국이 85% 이상을 차지하고 있는 상황이며, 우리나라의 기술 수준은 선진국과 어느 정도의 격차를 보이고 있다. 혼합유래 생물접착제를 대량 생산할 수 있는 기술을 개발하게 된다면, 의료용 접착제의 기존 시장에 영향력을 줄 수 있을 뿐만 아니라, 수중 접착제 시장이라는 새로운 시장도 개척할 수 있게 된다. 접착제 시장이 계속 성장하고 있는 상황에서, 뛰어난 물성의 접착제를 생산하는 기술의 확보는 반드시 필요하리라 사려된다.

사회·문화적 측면

현재의 대부분의 화학합성 접착제는 포름알데히드와 같은 독성을 가지는 화학물질을 용매로 사용하므로 환경에 대한 규제가 점점 강화되어 가고 있는 상황에서 그 수요가 점점 줄어들 전망이다. 이에 따라 환경 친화적인 접착제에 대한 수요가 증가될 전망이다. 혼합 생물접착제는 환경오염을 일으키지 않는 천연의 접착제이므로 환경보전에 기여를 하고 인체에 무해하므로 의료용으로 사용이 가능함으로써 인류복지에 크게 기여할 것이다.

제 2 절 연구개발의 목표

본 연구개발의 최종 목표는 해양생명체인 홍합유래 접착단백질의 재설계를 통한 조합형 생물접착제의 구축과 이들 변이체들의 유전학적 대량생산기술 개발 및 이를 통한 실용화 기술의 연구이다. 본 연구그룹에서 이미 수행한 홍합 *Mytilus galloprovincialis*에서 클로닝한 두 가지의 중요 접착단백질인 Mgfp-1과 Mgfp-5는 홍합 생체 내에서 각각 접착에 중요한 역할을 하고 있다. 이에 본 연구에서는 현재까지의 대부분의 연구그룹들의 접근방식과 달리하여 이미 대장균에서 성공적으로 발현생산이 확인된 Mgfp-5를 중심으로 Mgfp-1의 가교화(cross-linking) 기능을 부여하는 조합형 변이체들을 유전학적으로 설계하여 구축하고 이들의 접착능력을 비교 측정하며 응용가능 분야를 탐색한다. 또한 생물접착제의 접착능력을 극대화하고 다양한 기질에 응용하기 위해서는 분자수준에서 접착단백질의 구성 작용기들의 기능과 역할을 이해하고 접착 메커니즘을 규명하여, 이를 우수한 접착특성을 지니는 생물접착제의 분자설계와 효율적 수정방법에 활용하고자 한다. 최종적으로는 최적의 접착능력을 가지는 생물접착제를 대장균시스템에서 대량생산하고 분리정제하는 최적화된 공정의 개발을 수행한다.

1. 연구개발의 최종목표

- ▷ 조합형 홍합 생물접착제 변이체의 설계 및 구축
- ▷ 홍합 생물접착제의 응용 분야 탐색 및 적용기술 개발
- ▷ 홍합 생물접착제의 접착특성 평가 및 접착력 향상 기술개발
- ▷ 홍합 생물접착제의 유전학적 대량생산을 위한 최적화된 공정 개발

2. 연구개발의 1차년도 목표

- Mgfp-5을 기본으로 하여 Mgfp-1의 가교화 기능이 첨가되는 조합형 홍합 생물접착제 변이체들의 설계 및 구축
- 대장균에서의 홍합 생물접착제 변이체들의 발현
- 홍합 생물접착제 Mgfp-5의 분리정제 및 접착능력 연구
- 홍합 생물접착제 구성 작용기들의 접착특성 해석 기초 구축

제 2 장 국내외 기술개발 현황

홍합접착단백질의 발견 및 물성 연구는 미국의 University of California, Santa Barbara의 J. Herbert Waite 교수 팀이 주도적으로 수행하고 있으며, *Mytilus edulis*라는 홍합 종으로부터 접착물질에 함유되어 있는 7가지 단백질들의 염기서열 및 유전자 서열을 규명하였다. 여러 가지의 다른 홍합 종에서도 홍합접착단백질이 추출되었는데, *Mytilus edulis*의 것과 비슷한 종류의 홍합접착단백질들이 비슷한 염기 서열로 규명되었다. 서로 성질이나 존재 위치가 비슷하기 때문에, 각각의 비슷한 계열의 홍합접착단백질들을 FP(foot protein)라는 용어를 사용하여 명명하고 있다[2]. 홍합 생체 내에서는 여러 개의 접착단백질들이 동시에 발현되고 화학적으로 수정된 후 분비 혼합되어 접착능력을 가지게 되며 이때 tyrosine residue에 -OH가 첨가되어 수정된 DOPA residue들이 접착능력을 띄게 하는 핵심적인 물질이다[5,6]. 연구현황은 주로 홍합에서 접착단백질을 추출하여 분자생물학적, 생화학적 특성 및 접착 특성을 연구하는 것이 주를 이루고 있으며 홍합 생물접착제는 홍합 자체에서 만드는 양이 매우 미미하고 생물접착제의 구조를 모방하여 실험실 수준에서 합성하는 경우에는 그 생산 단가가 매우 비싸게 되므로 상용화를 위하여 유전공학기술에 의한 대량생산의 시도가 이루어지고 있다[7]. 현재 미국 국방부 주관의 국방과학연구소를 비롯해 몇몇의 연구 그룹들과 벤처 회사들이 홍합접착단백질의 대량생산 기술 개발에 착수했으나 아직 진정한 의미의 대량 생산기술이 개발되지는 않고 있다. 홍합접착단백질 중에서 대부분의 연구자들이 관심을 가지고 연구를 수행하고 있는 홍합접착단백질은 FP-1계열의 Mefp-1으로 구조는 Ala-Lys-Pro-Ser-Tyr-Hyp-Hyp-Tyr-Dopa-Lys의 decamer로 대표되며 이러한 decapeptide 구조는 약 75번 정도 반복되어 100 kDa 이상의 고 분자량을 가진다[1]. Allied Signal과 같은 회사 및 몇몇의 연구그룹에서 대장균과 같은 박테리아 시스템에서의 홍합 접착단백질의 발현 연구를 시도하였으나 접착단백질들이 특정한 DNA 코돈을 반복하여 사용하기 때문에 원래 크기의 완전한 분자량의 접착단백질의 발현에는 성공하지 못하였다. 이에 다른 접근방법으로 미국 및 일본의 몇몇 그룹에서 Mefp-1의 유전자를 유전학적으로 설계하여 일부분만을 이용하는 모델 펩타이드를 제작하여 생산 및 접착 능력을 측정하였으나 대장균시스템에서는 발현된 접착단백질이 서로 뭉치고 기능을 가지지 않는 inclusion body 형태로 발현되며 거의 접착 능력이 없는 것으로 알려지고 있다 [7,11]. 그러므로 이러한 대장균시스템의 여러 가지 문제점으로 인하여 진핵세포 시스템들이 현재는 주목을 받고 있다. 바이오 벤처 회사인 Genex와 미국 에너지부의 Idaho National Engineering and Environmental Lab에서는 홍합 접착단백질 유전자를 클로닝하여 효모에서 발현시켰으며 비록 원래 크기의 접착단백질을 얻지는 못하였으나 만들어진 접착단백질이 접착능력을 가짐을 보고하

였다. 그러나 효모시스템의 단점은 재조합 단백질의 생산수율이 높지 않아 생산단가의 커다란 절감을 기대하기 어렵다고 생산된 접착단백질의 접착 능력이 예상외로 낮다는 것이다[8]. 최근에는 영국의 University of York의 Dr. Mcqueen-mason 그룹에서 Mgf-1의 cDNA를 담배에 형질 전환시켜서 접착 능력을 가진 원래 크기의 홍합 접착 단백질을 생산했다고 보고하였으나 식물 시스템의 경우는 생산 수율이 매우 낮아서 실제적인 대량생산에는 적합하지 않다는 문제점을 수반하고 있다[9]. 현재 홍합접착단백질을 연구하고 있는 연구자들을 표 1에 요약하였다. BD Pharmingen, Enzon labs, BioPolymers, Kaiyo Bio Technology, US Surgical Corp. 등의 회사에서 홍합접착단백질을 대량 생산을 위한 연구가 수행 중에 있으나 (표 2 참조) 현재 상용화되고 있는 것은 홍합에서 직접 추출하여 제품화한 BD Pharmingen의 Cell-Tak™이라는 제품이 유일하며 1mg당 90불의 비싼 가격에 시판되고 있다.

국내에서는 KAIST에서 연구가 수행되었으나 이는 홍합 접착단백질을 모방한 모델 펩타이드를 생산하는 대장균 균주를 고농도 배양하여 inclusion body로 생산하는 기초연구에 머물고 있으며 현재는 더 이상 연구를 수행하지 않고 있는 것으로 알고 있다. 또한 모델 펩타이드는 기초연구를 위한 모델일 뿐 실제적인 접착능력은 뛰어나지 않은 것으로 알려져 있으므로 홍합 접착단백질에 대한 국내의 연구는 본 연구팀을 제외하고는 거의 수행되고 있지 않다고 볼 수 있다.

표 1. 현재 종합접착단백질을 연구하는 연구그룹대표

<p>Dr. J. Herbert Waite : Dept. of Chemistry/Biochemistry, UC Santa Barbara Previously at Univ. of Delaware & Univ. of Connecticut characterization of MAP and Genetic sequence Leading researcher for MAP (studied for about 19 years) First isolated MAP's component in 1985 at Univ. of Connecticut</p> <p>INEEL (Idaho National Engineering Environmental Laboratory) Genetic production of MAP Co-work with Dr. Waite</p> <p>Dr. Simon McQueen Mason : Univ. of York, UK Genetic production of MAP precursor in tobacco plant & <i>in vitro</i> modification</p> <p>Dr. Robin L. Garrell : Dept. of Chemistry, UC Los Angeles Characterization of interactions of biological molecules with surfaces</p> <p>Dr. Robert Baier : Industry/University Center for Biosurfaces, State Univ. of New York (SUNY) Buffalo</p> <p>Dr. Carol Taylor : Auckland University in New Zealand : Assembling the chain of 10 amino acids that compose MAP upto 80 repeats</p> <p>Dr. Jonathan J. Wiker : Dept of Chemistry, Purdue Univ. Characterization of natural and synthetic MAP</p> <p>Dr. Koji Inoue : Ocean Research Institute, University of Tokyo, Japan Co-work with Dr. Waite</p> <p>Dr. Hiroyuki Yamamoto : Institute of High Polymer Research, Shinshu Univ, Japan surface chemistry using synthetic MAP analogs</p>

표 2. 홍합접착단백질을 상용화하거나 연구하고 있는 회사들

BD Pharmingen : Cell-Tak™ : Originally production by BioPolymers Corp.
also selling by Sigma (#A2707)
A company in Sweden : Extract MAP from Mussel
Enzon Labs Inc. : Gaithersburg, Maryland 208, USA
<http://www.enzon.com/>
Subsidiary of Enzon Inc
Formerly known as Genex Corporation (1st MAP firm)
5 patents ('91, '92, '93) for genetic production of MAP precursor
analogs in *E. coli* and *Saccharomyces* system
Product : AdheraCell
BioPolymers Corp. : Farmington, Connecticut, USA
founded in 1985 by Dr. Benedict who was a Postdoc. of Dr. Waite
2nd MAP firm
Production of Cell-Tak™
1 patent ('91) for several composition of MAP (synthetic analog)
Kaiyo Bio Technology : 3 patents ('95, '96) for other MAP genes
Dr. Inoue Hiroshige
Surgical Sealants, Inc. : Woburn, MA 01801, USA
<http://www.surgicalsealants.com/>
Founded in 1997
SurgiSeal™ Collagen Vascular Sealant
US Surgical Corp. : 1 patent ('00) for in vivo modification (by hypertonic media) of
Pro to Hyp in MAP precursor analog using *E. coli* system

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 본 연구기관의 선행연구

기초연구로서 홍합접착단백질에 관련된 문헌 및 특허 조사가 이루어졌으며, 체계적인 연구 데이터들이 정리되었다. 또한 선도적으로 연구를 수행하고 있는 UC Santa Barbara의 Herbert Waite 교수와의 교류(방문연구를 수행하였음)와 문헌조사과정을 통하여, 가장 많이 연구되고 있는 홍합의 종류인 *Mytilus edulis*의 경우 홍합접착단백질들 중에서 접착에 중요한 역할을 하는 핵심 단백질이 Mefp-1과 Mefp-5일 것으로 확신하였다[10]. 포항 죽도시장에서 수집한 국내의 대부분을 차지하는 홍합종류인 *Mytilus galloprovincialis*의 foot 부위에서 total RNA를 추출한 후, 역전사효소반응(RT-PCR)을 통해서 Waite 교수팀이 밝혀낸 Mefp-1과 Mefp-5와 단백질 서열이 거의 일치하며 기능이 같은 접착단백질 Mgfp-1과 Mgfp-5의 유전자 서열을 클로닝 하였다 (그림 2 참조).

이중에서 Mgfp-5 유전자 서열은 아직까지 보고되지 않은 본 연구팀에서 처음으로 밝혀낸 서열이라는데 의의가 있으므로 원천기술로서 특허를 출원하였다[13]. 유전자 재조합기술을 이용하여 Mgfp-1과 Mgfp-5 유전자를 발현하기 위한 대장균용 재조합 발현벡터 pDJ01과 pMDG05를 구축하였다. 이 중에서 재조합 Mgfp-5의 발현은 확인하였으나 재조합 Mgfp-1의 경우 다른 기존의 연구결과들과 같이 발현은 이루어지지 않았다. 이는 Mgfp-1 거대 단백질이 10개의 아미노산이 75번 이상 반복되는 특수한 구조이고 또한 홍합과 대장균간의 유전자 코돈 사용방식이 틀리기 때문이었다[7,11]. Mgfp-5는 대장균 내에서 Soluble한 상태로 발현이 되었고, 대장균이 Mgfp-5를 생산을 시작한 후에 세포 성장이 멈추는 것이 관찰되었다 (그림 3 참조).

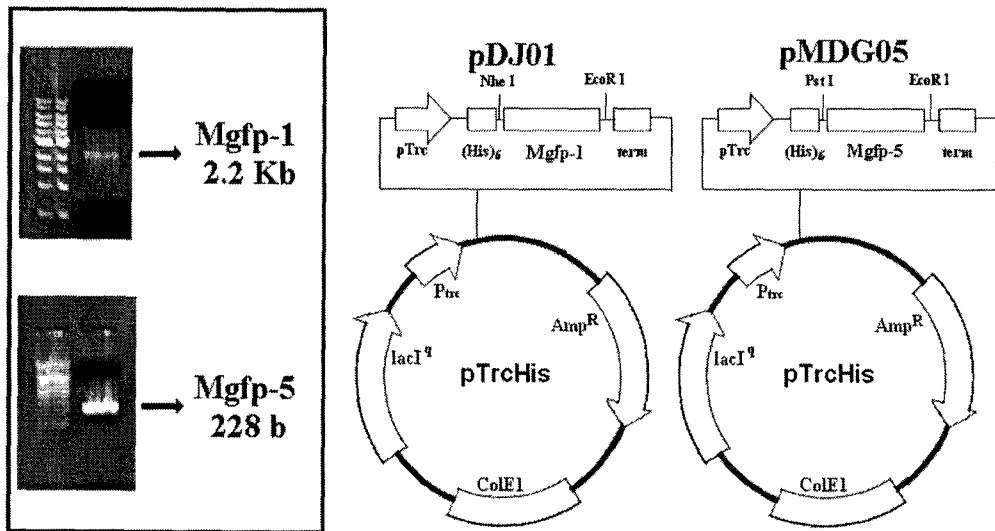


그림 2. Mgfp-1과 Mgfp-5 융합접착단백질 유전자의 클로닝

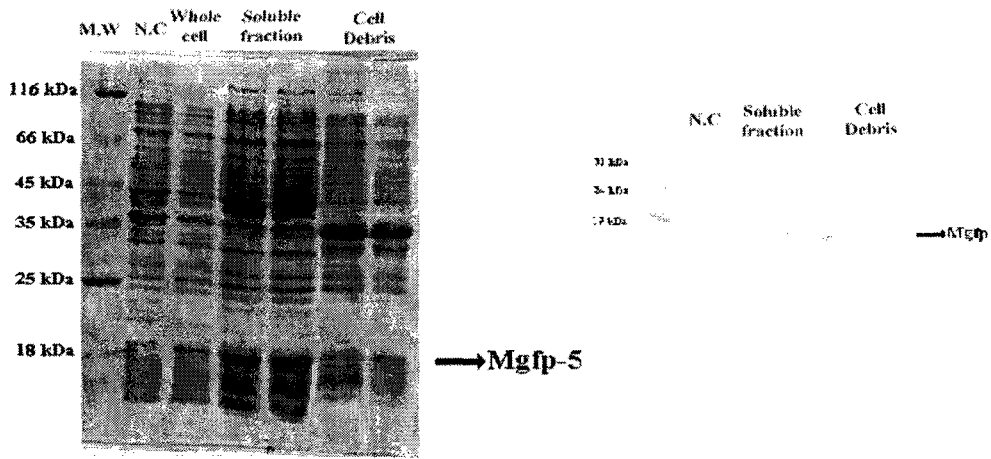


그림 3. Mgfp-5 단백질의 대장균에서의 발현 및 성상

제 2 절 연구수행 방법

당해연도에 수행한 연구 내용은 크게, Mgfp-5의 대장균에서의 발현 및 분리정제, 분리정제된 Mgfp-5의 접착 가능성 시험, 그리고 Mgfp-1과 Mgfp-5를 동시에 발현시킬 수 있는 대장균용 발현 시스템 설계 등의 3가지로 분류해 볼 수 있다.

1. Mgfp-5의 대장균에서의 발현 및 분리 및 정제

가. Mgfp-5의 대장균에서의 발현

Mgfp-5를 발현시킬 수 있는 벡터 pMDG05가 형질전환된 BL21균주와 negative control인 벡터 pTrcHis A가 형질전환된 BL21을 같은 시간에 배양하여, 1mM IPTG 유도 전후의 cell optical density의 변화정도를 600nm에서 UV-vis spectrometer (UV-1601PC, Shimadzu Corp)를 이용해서 측정하였다. 또한, 매시간, 샘플을 배양액에서 뽑아 낸 후에, 단백질 발현 현상을 SDS-PAGE 및 Western Blot을 이용하여 밝혀내었다. 또한, 배지의 조성 변화로 인한 단백질 생산 양과 cell optical density의 변화 정도를 Casamino acid와 Mgfp-5 많이 사용하는 아미노산들을 배지에 직접 첨가해 줌으로서, 발현 양상의 변화도 조사하였다.

나. Mgfp-5의 분리 및 정제

(1) Native 조건

1) Cell 파쇄

pMDG05가 형질전환된 대장균 BL21을 배양한 후에, OD₆₀₀=1.5 일 때 1mM IPTG로 유도되어서 4시간동안 더 배양 된 후에, 세포를 4°C, 4000rpm에서 원심분리하여 수확하였다. 수확된 cell은 lysis buffer (50mM Sodium Phosphate, 300mM NaCl, pH 8.0)에 50배 농축된 후에, 1 mg/mL의 lysozyme (Bio Basic Inc, Ontario, Canada)와 함께 4°C에서 20분 동안 반응하였다. 반응한 시료는, sonicator (200W, 30 times for 10 sec burst with a 15 sec period between each burst)를 통해서 파쇄되었고, 파쇄된 sample을 4°C, 14,000 rpm에서 20 분 동안 원심 분리한 후, 상층액 부분만 취하였다.

2) Immobilized metal affinity purification

정제는 Acta prime 단백질 정제 시스템 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 통해서 상온에서 1mL/min의 속도로 수행되었다. 칼럼은 Hi Trap™ Cheating 5mL HP(Amersham Biosciences)에 0.1M NiSO₄가 충전되어 있는 상태로 단백질 정제가 수행되었다. 먼저, 2 칼럼 부피의 binding buffer (20mM Sodium Phosphate, 500mM NaCl, pH 7.4)로 equilibration해 준 후, 10mL의 세포 파쇄액이 칼럼에 주입된 후, binding buffer로 충분히 씻어준 후에, 20mL의 500mM의 Imidazole을 사용하여, gradient 조건에서 elution해주었다.

(2) Denaturing 조건

1) Cell 파쇄

pMDG05가 형질전환된 대장균 BL21을 배양한 후에, OD₆₀₀=1.5 일 때 1mM IPTG로 유도되어서 4시간동안 더 배양된 후에, 세포를 4°C, 4000rpm에서 원심분리하여 수확하였다. 수확된 cell은 Buffer B(100mM Sodium Phosphate, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 8.0)에 50배 농축된 후에, 상온에서 20 분 동안, 흔들며 줌으로써, cell을 파쇄하고, denaturing해주었다. 파쇄된 시료를 25°C, 14,000 rpm에서 20 분동안 원심 분리 한 후, 상층액 부분만 취하였다.

2) Immobilized metal affinity purification

정제는 Acta prime 단백질 정제 시스템 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 통해서 상온에서 1mL/min의 속도로 수행되었다. 칼럼은 Ni-NTA™ resin 15mL (Qiagen)를 칼럼에 충전한 후, 0.1M NiSO₄가 충전되어 있는 상태로 단백질 정제가 수행되었다. 먼저, 5 칼럼 부피의 Buffer B로 칼럼을 equilibration 해 주었고, 그 후, 10mL의 세포 파쇄액이 칼럼에 주입된 후, Buffer B로 단백질 정제 시스템의 AU값이 세포 파쇄액을 넣어 주기 전의 값으로 내려갈때까지 충분히 씻어준 후에, Buffer C(100mM Sodium Phosphate, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 6.3)mL, Buffer D(100mM Sodium Phosphate, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 5.9)로 시스템의 AU값이 세포 파쇄액을 넣어 주기 전까지의 값으로 내려갈때까지 충분히 씻어준 후에, Buffer E(100mM Sodium Phosphate, 10mM Tris-Cl, 8M Urea, pH 4.5)로 elution해주었다.

2. Mgf_p-5의 접착능력측정

가. 분리정제된 Mgf_p-5의 확인

분리정제된 시료는 SDS-PAGE 및 (His)₆ rabbit polyclonal IgG (Santa cruz biotech)을 이용한 Western Blot을 통하여 먼저 확인 한후, 아미노산 조성 분석을 통해서 최종 확인하였다. 아미노산 분석 조건은 150°C, 6N HCl에서 24시간 반응 시킨 후, HPLC를 통해서 분석하였다.

나. Mgfp-5의 생물학적 화학적 수정

분리 정제된 Mgfp-5는 Tyrosinase (Sigma)와 H₂O₂(삼진)를 이용하여 수정하였고, Bio-AFM 및 coomassie blue 염색법을 사용하여, 유리 위에서의 접착능력을 측정하였다.

3. FP-1과 Mgfp-5의 동시 발현 시스템 설계 및 제작

가. FP-1의 model peptide 유전자의 합성

FP-1계열의 단백질은 10개의 아미노산이 75번 이상 반복되는 특수한 구조이고 또한 홍합과 대장균간의 유전자 코돈 사용방식이 틀리기 때문에, 대장균 내에서 FP-1계열의 단백질이 전체적으로 발현이 이루어지지 않았다. 하지만, FP-1계열의 10개 아미노산이 반복되는 단백질의 유전자(Decapeptide)를 대장균 내에서 6번 정도 반복 발현시킬 수 있도록, 유전자를 재설계해 준 후에, 대장균에서 FP-1 계열의 단백질의 발현이 되었다는 연구 결과는 두 건이 보고가 되어있다 [7,11]. 이중에서 본 연구 그룹은 1998년에 일본의 그룹이 수행한 연구 결과를 참조하여, 대장균에서 6번 연속 FP-1의 decapeptide를 발현시킬 수 있는 model peptide 유전자를, klenow fragment 효소 반응을 이용하여 합성하였다(그림 4 참조).

5' 끝쪽이 인산화 되어 있는 올리고머 KD-1(65 mer), KD-2(57 mer), KD-3 (68 mer) 그리고, KD-4 (54 mer)를 각각 화학합성 한 후에, KD-1과 KD-2를 각각 100 pmol, 20 nM dNTP를 넣고 30 μ l의 reaction buffer에 넣은 다음 95 °C에서 5분 동안 denaturing을 시켜준 후, KD1과 KD2의 annealing을 위해서 1시간 동안 상온에서 방치 하였다. 그 후에, 4 unit의 Klenow fragment(MBI) 를 넣고 20분 동안 37°C에서 반응시켜 주었다. 반응 후의 DNA fragment는 purified 된 후에, pUC 18을 Sma I으로 자른 site로 ligation 되었고, X-Gal/IPTG를 이용한 Blue/White colony selection 방법을 사용하여, 반응된 DNA 조각이 들어간 것을 선택 한 후, sequencing으로 확인 하고, KD-1과 KD-2가 ligation되어 들어간 대장균 클로닝 벡터를 pKM-1으로 표시하였다. KD-3와 KD-4도 같은 방법으로 반응되어, pUC18에 들어갔으며, 제작된 vector를 pKM-2라고 명명하였다. pKM-1과 pKM-2를 Eco RI/Sna BI 을 이용하여 잘라준 후에 다시 ligation 해주어, pUC18의 lacZ 유전자의 반

대방향으로 FP-1의 model peptide가 들어가 있는 pKMgfp-1을 합성하였다.

나 .FP-1의 Model peptide와 Mgfp-5의 유전자 동시 발현 시스템 설계

그림 5에서 볼 수 있듯이 FP-1 계열의 모델펩타이드와, Mgfp-5를 동시에 발현시킬 수 있는 대장균용 발현 벡터 4가지를 설계하고 제작하였다. 모든 발현 벡터는 pMDG05를 바탕으로 제작하였다. 제작된 벡터들은 대장균 BL21 균주에 형질전환되어서 LB 배지하에서, 37°C에서 배양되었고, IPTG로 단백질 발현이 유도되었다. 유도된 후 단백질의 발현 여부는 SDS-PAGE와 (His)₆ rabbit polyclonal IgG (Santa cruz biotech)을 이용한 Western Blot에 의해 조사되었다.

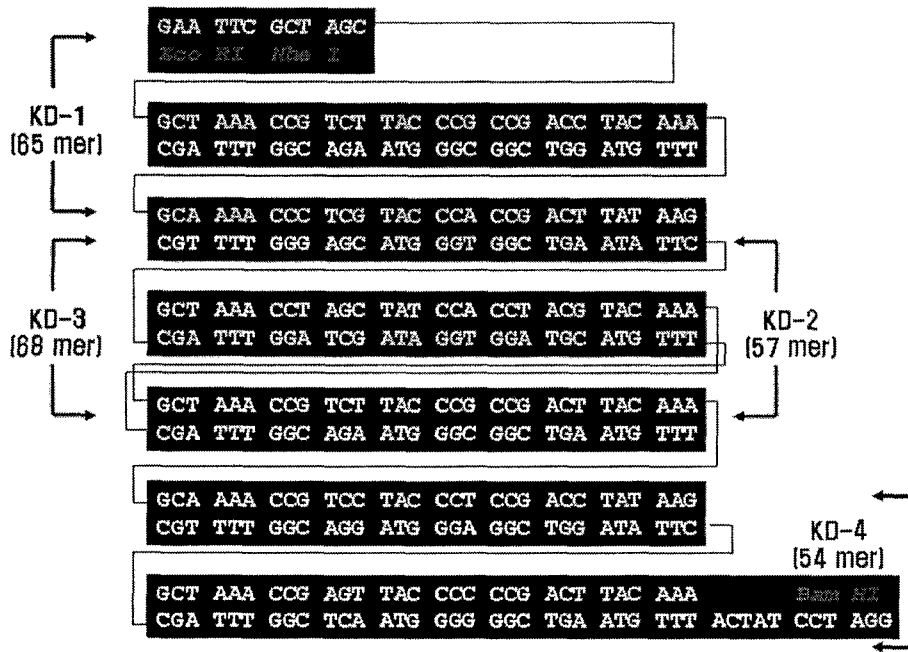


그림 4 Model peptide의 제작 도면

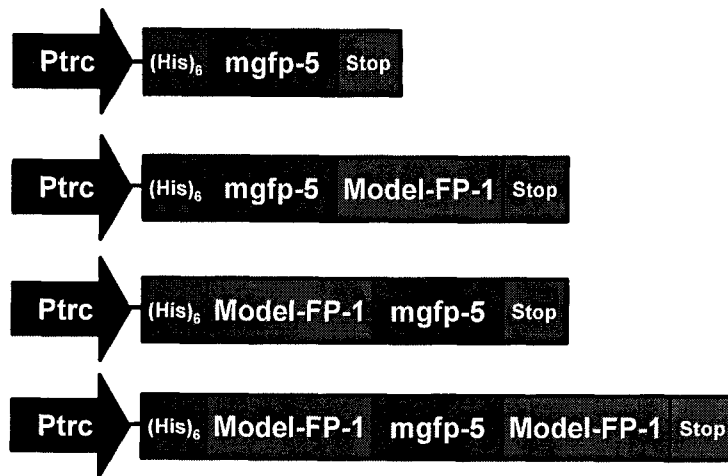


그림 5. 조합형 융합 홍합접착단백질의 유전학적 설계

4. 접착단백질의 모델 펩타이드 합성

홍합접착단백질들 중에서 접착에 핵심적인 접착단백질인 FP-1계 단백질 MeFp-1과 Mgfp-1는 그 아미노산 서열이 규명되었으며 AKPSYHypHypT Δ K (Δ =DOPA)의 decapeptide가 75번정도 반복되는 구조를 가지고 있다. 이들의 표면 접착 특성을 이해하기 위해서는 생물접착제를 구성하는 주요 아미노산 작용기들의 표면접착 특성에 대한 자료축적이 필요하며 각 작용기들의 기능과 역할에 대한 이해가 필수적이다. 따라서 본 연구에서는 먼저 생물접착제의 표면 접착에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 주요 작용기를 포함하는 모델 펩타이드들을 합성 정제하였다.

생물접착제 (Mgfp-1)의 아미노산 서열과 정확히 일치하는 모델 Peptide 합성하기 위하여 Solid-Phase FMoc Peptide Synthesis를 이용하였으며, 합성결과 얻은 생성물 중의 미반응 monomer 및 불순물 제거 위해 Prep용 C18-RP Radial-Pak HPLC Column을 이용하여 분리 정제하였다. 분리 정제 방법은 H₂O/CH₃CN를 용리액으로 gradient elution을 사용하였으며 UV-Vis 검출기를 사용 280nm의 흡수띠로 검출하였다.

5. 접착기질의 제조

홍합의 접착 단백질의 표면 접착 과정은 해수에서 wet environment 상태에 있는 접착기질 표면과의 물리 화학적 상호작용에 의해 진행되므로 이러한 상황을 모사하기 위한 수환경 접착기질의 제조가 필요하다. 이러한 흡착기질로 주로 사용되는 것으로는 Silver 또는 Gold의 Colloid 또는 전기화학적 방법으로 roughening 된 disk 전극이나 Silver 또는 Gold를 mica glass 위에 sputtering 또는 증착시킨 금속박막을 이용하여 표면증강 라만신호 (SERS)를 측정하는 방법과 Germanium window를 이용한 ATR-IR 방법 등이 있다. 본 연구에서는 접착표면의 분자신호를 크게 증강시켜주는 표면 증강 Raman 분광법 (SERS)을 이용하기 위해 비교적 기질의 제조가 용이하고 또한 신호증강 효과가 큰 Ag 및 Au Colloid를 제조하였다.

6. 홍합 접착단백질의 접착특성 평가

현재까지 접착에 대한 이해는 주로 접착제와 기질 계면의 오류를 조사하는 거시적 측정방법과 stress와 failure 전후의 접착계면의 micromorphology 등의 특성을 조사하는 미시적 측정 등에 의존하였다. 또한 잘 정의된 표면에 작은 분자들의 흡착에 관해서는 LEED, XPS, SSDIA, EELS, STM 및 AFM 등과 같은 high vacuum surface science 기술들을 이용하여 흡착분자와 표면간 또는 접착계면의 상호작용에 대한 좀더 상세한 정보를 얻을 수 있다. 그러나 홍

합의 접착성 단백질의 실제 접착계면에서 일어나는 여러 가지 물리·화학적 상호작용은 이러한 기술들로부터 얻을 수 있는 계보다 훨씬더 복잡하고 wet environments에서 진행된다. 따라서 본 연구에서는 접착계면의 수 micron 또는 sub-micron의 분자층에서 수용액 환경에서 일어나는 실제적인 상호작용을 조사할 수 있는 confocal micro-Raman 및 Surface Enhanced Raman (SERS)의 표면분석 기술을 주로 사용하였다. SERS(Surface Enhanced Raman Spectroscopy)은 고체표면에 흡착된 분자의 흡착양식 및 구조, 표면화학반응 등을 분자수준에서 연구하는데 가장 성공적으로 이용되고 있다. 측정방법은 합성된 모델 펩타이드 수용액의 Raman 스펙트럼과 표면에 흡착된 분자의 SERS를 비교분석하여 표면흡착에 주요기능을 하는 작용기와 그 기능을 해석하였다.

제 3 절 당해연도 연구 수행 내용 및 결과

당해연도에 수행한 연구 내용은 크게, Mgfp-5의 대장균에서의 발현 및 분리정제, 분리정제된 Mgfp-5의 접착 가능성 시험, 그리고 Mgfp-1과 Mgfp-5를 동시에 발현시킬 수 있는 대장균용 발현 시스템 설계 등의 3가지로 분류해 볼 수 있다.

1. Mgfp-5의 대장균에서의 발현 및 분리 정제

가. Mgfp-5의 대장균에서의 발현

pMDG05/BL21 과 pTrcHis A/BL21을 OD₆₀₀ 값이 1.0~1.5 사이에서 IPTG로 유도해 주었을 때에, pTrcHis A/BL21에서는 OD₆₀₀ 값이 4정도 될 때까지 증가하는 것을 보였으나 pMDG05/BL21에서는 OD₆₀₀값이 1.5정도에서 세포의 성장이 멈추어 버렸다 (그림 6 참조). 이는, pMDG05/BL21을 통해서 생산되는 Mgfp-5가 대장균 세포내에서 녹아있는 상태이기 때문에 세포 자체에 안 좋은 영향을 주는 단백질 역할을 하거나, Mgfp-5가 특정한 4가지 아미노산이 전체 아미노산의 60% 이상을 차지하는 특이한 조성을 가지고 있음으로 말미암아, 세포내 특정 아미노산 고갈로 인한 세포 대사의 정체를 통한 것으로 여겨졌다. Mgfp-5의 시간에 따른 발현양의 변화를, SDS-PAGE 및 Western Blot 후에 Gel-Pro라는 프로그램을 이용하여, 조사하였다. 그 결과, 1mM의 IPTG유도 후 4.5시간에 가장 많은 단백질 생산량을 보였으며, 대략 세포 전체 단백질의 10(w/w)%가 Mgfp-5로 발현 되었음을 알 수 있었다 (그림 7).

세포의 성장이 너무 낮았기 때문에, 단백질의 발현량이 적다고 여겨져, 단

그림 6. pMDG05/BL21의 세포 성장 패턴

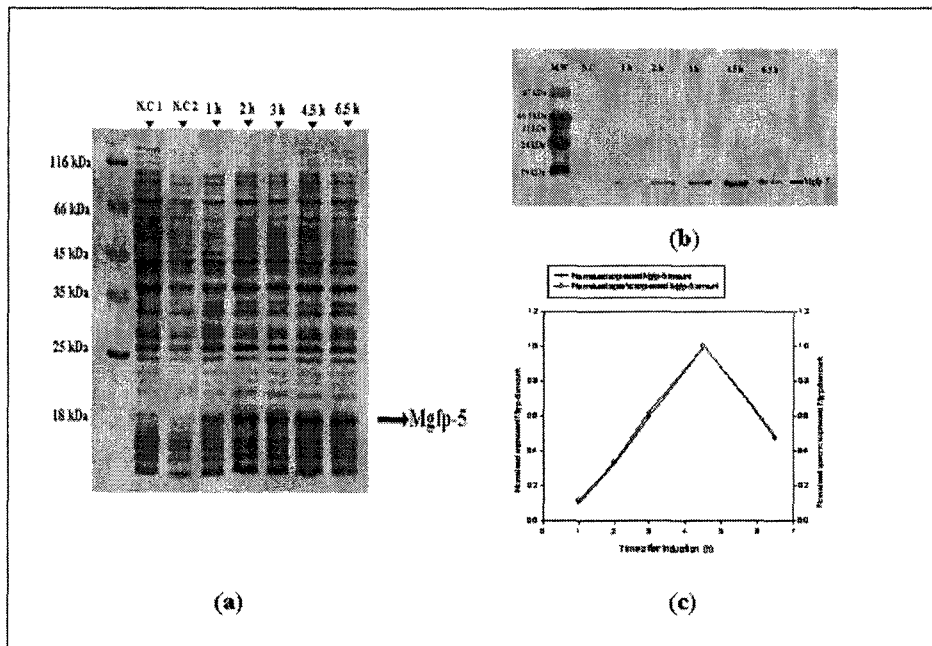
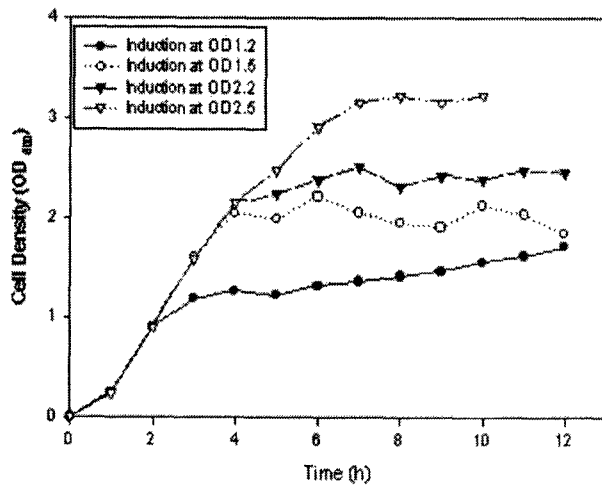
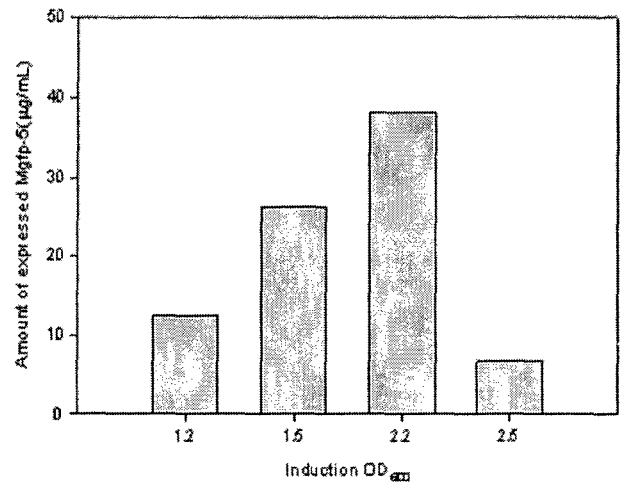


그림 7. 형질 전환된 대장균 BL21에서의 시간에 따른 Mgfp-5의 발현 패턴

- (a) SDS-PAGE 상에서의 Mgfp-5의 발현 패턴
- (b) Western Blot 상에서의 Mgfp-5의 발현 패턴
- (c) 시간에 따른 Mgfp-5 단백질 발현량 계산



(a)



(b)

그림 8. 1mM IPTG 유도 조건 변화에 따른 Mgfp-5 단백질 발현패턴
 (a) 대장균 성장의 변화
 (b) 세포내의 Mgfp-5 발현량의 변화

백질의 발현을 최적화시키기 위해서 1mM IPTG 유도 OD₆₀₀를 0.6~2.5까지 변화시켜 가면서, 세포 성장 패턴 및 단백질 생산량의 최적화를 시도하였다. 그 결과, 그림 8에서 볼 수 있듯이, 어떤 유도조건에서든지, 유도 후에는 세포 성장이 거의 멈춰버리는 결과를 관찰 할 수 있었다. 또한, OD₆₀₀이 2.2일 때, 최대량의 Mgf-5 단백질을 대장균이 생산하는 것을 관찰 할 수 있었다 (그림 8). 하지만, IPTG로 유도하는 OD₆₀₀가 2.5이상에 되었을 때는, 아예 단백질 생산이 거의 되지 않는 것을 관찰 할 수 있었다.

pMDG05에서 생산되는 Mgf-5는 tyrosine, glycine, serine 그리고, lysine 이 전체 아미노산의 60% 이상을 차지하는 서열을 가지고 있다. 그 결과로서, 세포내 전체 아미노산 중에 특정한 4가지 아미노산의 결핍이나 부족으로 인해, IPTG 유도 후에, 세포 성장이 멈추지 않을까라는 가정 하에, 배지 성분에 아미노산 소스인, casamino acid를 1%(w/w) 첨가하거나, 직접 4가지 아미노산, tyrosine, glycine, serine 그리고, lysine 각각 배지에 1%(w/w)정도 첨가한 후에, 대장균 내에서 Mgf-5의 생산량 변화를 관찰하였다. 하지만, 배지에, 특정 아미노산 소스를 첨가한 경우, 약간의 단백질 생산량의 증가는 가져왔지만, 세포 성장 및 단백질 생산량 변화에 큰 변화를 관찰할 수는 없었다(그림 9).

나. Mgf-5의 분리정제

과제가 시작된 이후에, 대장균에서 생합성된 재조합 홍합접착단백질 Mgf-5를 Immobilized metal affinity chromatography(IMAC)를 이용하여, native 조건에서 분리 및 정제하였으며, 최종적으로 얻어진 단백질이 재조합 홍합접착단백질임을 아미노산 조성 분석 방법을 통하여 확인하였다. 대장균으로부터 생합성된 재조합 홍합접착단백질을 IMAC를 이용하여 분리 및 정제를 수행하였을 때에, 분리된 접착단백질의 순도는 90%이상으로 만족할 만한 결과를 얻었으나, yield가 3% 미만으로 매우 적은 양의 재조합 홍합접착단백질만이 회수되었다 (그림 10, 그림 11, 표 3 참조).

홍합접착단백질의 화학적 수정과 그 후의 접착능력측정을 위해서는 많은 양의 홍합접착단백질의 회수가 필수적이므로 이 문제를 해결하기 위해서 재조합 홍합접착단백질 Mgf-5가 다른 여타의 단백질보다 높은 pI 값을 지니고 있는 성질을 이용하여, Ion-exchange chromatography와 gel-filtration chromatography를 같이 사용하여 분리정제를 시도하고 있다. 이를 통해서 purity는 전의 공정과 비슷하지만, yield는 훨씬 높은 결과를 얻을 수 있을 것으로 여겨지며, 분리 정제된 홍합접착단백질의 화학적 및 생물학적 수정과 접착능력측정 실험도 대규모로 수행할 수 있을 것으로 여겨진다. 최근에는, 홍합 접착단백질은 접착에 관여하기 때문에, 단백질의 구조가 큰 영향을 미치지는

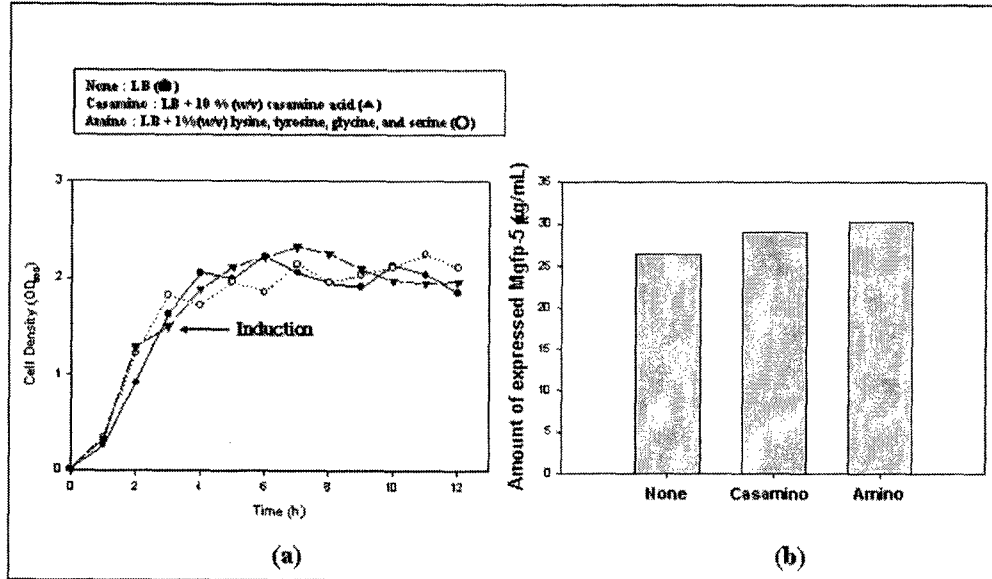


그림 9. 배지 성분 변화에 따른 Mgfp-5 단백질 발현 패턴
 (a) 세포 성장 패턴
 (b) Mgfp-5 생산 패턴

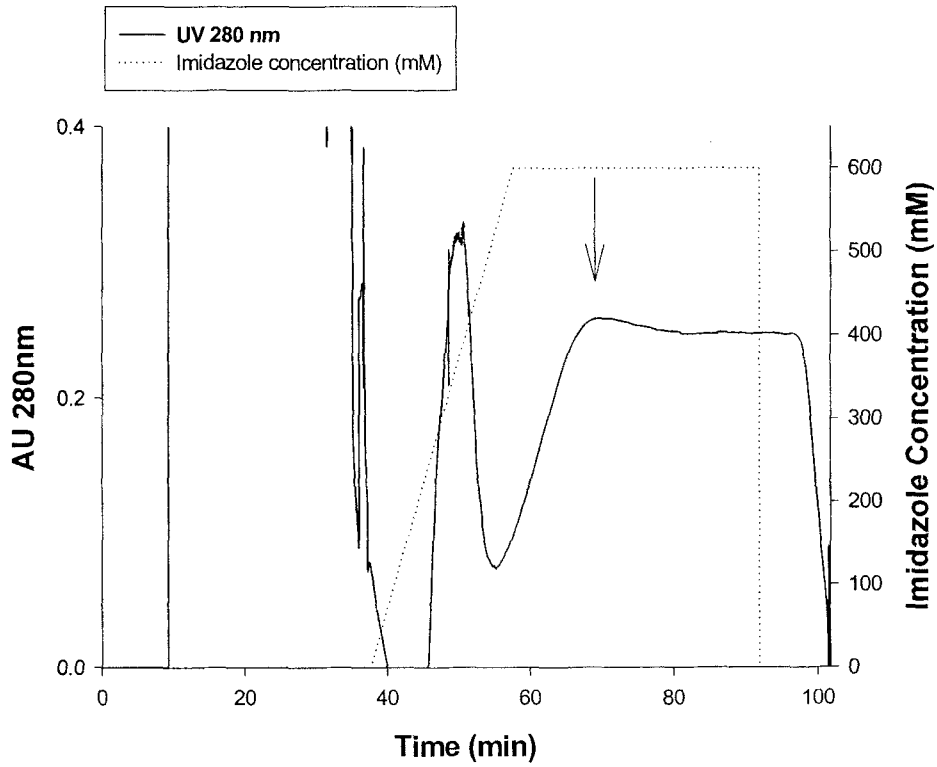


그림 10. Native 조건에서 IMAC을 이용한 Mgfp-5 정제

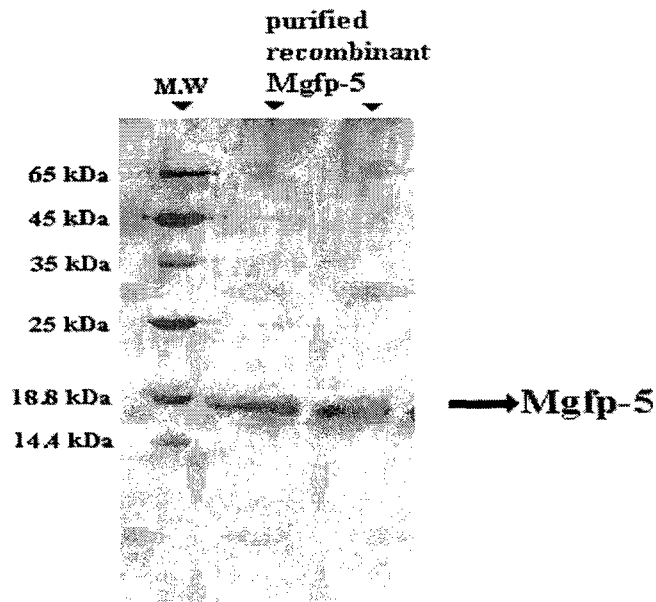


그림 11. Native 조건에서 정제한 Mgfp-5의 SDS-PAGE Silver 염색사진

여 백

표 3. Mgf_p-5의 Native 조건에서의 정제

Purification Step	Volume (ml)	Target protein (mg)	Total Protein (mg)	Yield (%)	Purity (%)	Purification (fold)
After Cell Lysis	20	47.53	348	100	13.66	1
Ni-NTA Agarose	14	0.699	0.736	1.47	94.89	6.94

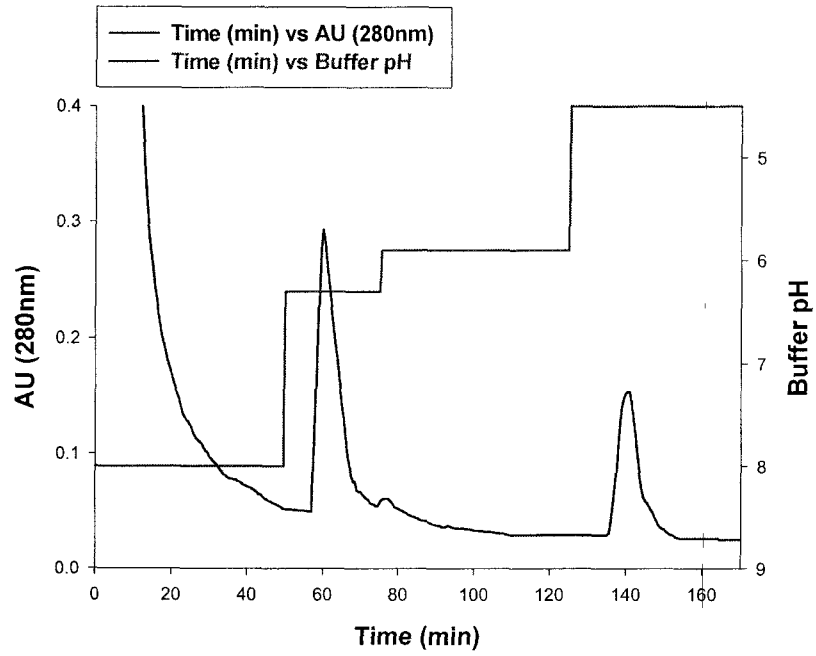


그림 12. Denaturing 조건에서의 IMAC을 이용한 Mgfp-5의 정제

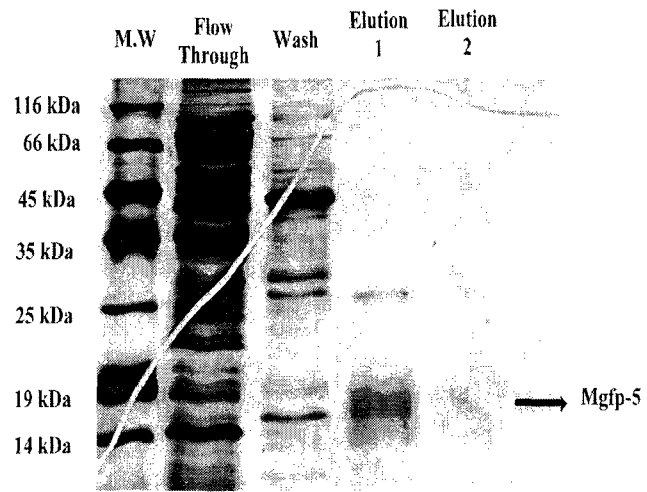


그림 13. Denaturing 조건에서 정제된 Mgfp-5의 SDS-PAGE Silver 염색 사진

표 4. Mgfp-5의 Denaturing 조건에서의 정제

Purification Step	Volume (ml)	Target protein (mg)	Total Protein (mg)	Yield (%)	Purity (%)	Purification (fold)
After Cell Lysis	40	37.37	289.47	100	13.66	1
Ni-NTA Agarose	20	2.55	2.77	6.83	92.41	6.76
Dialysis & Concentration	0.35	1.03	1.11	2.95	92.41	6.76

표 5. 분리정제된 Mgfp-5의 아미노산 조성분석

Amino Acid	Predicted composition (%)	Experimental composition (%) ($\pm 30\%$)
Ala (A), Pro (P)	3.39	0
Arg (D), Asn (N)	6.78	9.06
Glu (E), Gln (Q)	5.08	5.89
Cys (C)	0.85	0
Gly (G)	18.64	26.34
His (H)	9.32	9.23
Iso (I)	0.85	2.15
Leu (L)	2.54	2.35
Lys (K)	14.41	12.44
Met (M)	3.39	3.77
Phe (F)	0	0
Ser (S)	11.02	8.49
Thr (T)	1.69	1.81
Trp (W)	0.85	0
Tyr (Y)	16.95	14.28
Val (V)	0	0
Arg(R)	3.39	4.19
Total	100	100

않을 것이라는 가정 하에, IMAC을 이용하여, denaturing 조건에서 분리정제를 시도해 보았다. 그 결과를 IMAC을 이용하여 native한 조건에서 분리 정제를 수행한 것에 비해 볼 때에, 순도는 유지하면서, 5% 정도로 정제수율도 증가하는 결과를 얻었으며, 최적화를 하면, 더 많은 융합접착단백질을 고순도로 얻을 수 있을 것 같다 (그림 12, 그림 13, 표 4 참조). 또한, denaturing조건속에서 분리 정제된 단백질이, 어느 정도의 접착능력을 가지는 것을 확인함으로써, denaturing 조건에서 분리 정제를 수행하는 것이 큰 문제를 발생시키지 않을 것으로 보인다.(소제목 2번 연구 결과 참조).

분리 정제된 단백질이 재조합 Mgf-5인지 확인하기 위해서 아미노산 조성 분석을 수행하였으며, Western Blot 데이터와 더불어, 분리 정제된 단백질이 재조합 Mgf-5인 것을 확인 할 수 있었다 (표 5).

2. 분리정제된 Mgf-5의 접착 가능성 시험

Denaturing 조건에서 분리 정제된 융합접착 단백질을 tyrosinase와 과산화수소수로 화학적 수정을 해 준 다음, 유리판 위에 놓은 후에, Bio-AFM으로 접착능력을 측정하고, coomassie 염색 방법을 이용하여 접착이 되는 것을 시각화함으로써, 접착 가능성을 측정해 보았다. 대조군으로는, 미국 UC. Santa barbara의 Dr. Waite교수로부터 얻어온 Mefp-1 단백질, Bovine serum albumin(BSA), 융합으로 직접 추출되어 상업적으로 팔리는 BD Cell-Tak™을 사용하였다. Bio-AFM을 이용해서 접착능력을 측정하기 위한 시료는 tyrosinase 사용 시에는 sample μ 당 20unit, 25°C, 3hr 조건에서 실험을 수행하였으며, 과산화수소수를 이용해서 실험을 수행했을 때는 sample μ 당 과산화수소수 μ 로 실험을 수행하였다. 그 결과로서, Bio-AFM을 사용하여 접착능력을 측정한 경우, control로 사용한 BSA 보다는 4배 정도 접착능력이 증가했으며, 실제로 자연추출 융합접착단백질인 BD Cell-Tak™ 사용의 결과에 거의 근접하는 것을 알 수 있었다 (그림 14). 또한 그림 15에서 볼 수 있듯이, 추출된 Mefp-1과, BSA, 분리정제된 Mgf-5의 유리 표면 위에, tyrosinase 20unit으로, 24hr 동안 25°C에서 incubation해준 후에, glass를 강한 shaking washing으로 세척해 준 후에, 유리표면 위에 접착해서 남아 있는지 여부를 coomassie 염색 방법을 이용하여 시각화 해 주었을 때에, 그림 15에서 보듯이, BSA는 씻겨나가서, 존재하지 않는데, 융합접착단백질들은, 유리 표면 위에 접착해서 남아 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 분리 정제된 Mgf-5가 자연적으로 추출된 Mefp-1에는 못 미치지만, 유리 표면 위에 남아 있는 것도 시각화 할 수 있었다.

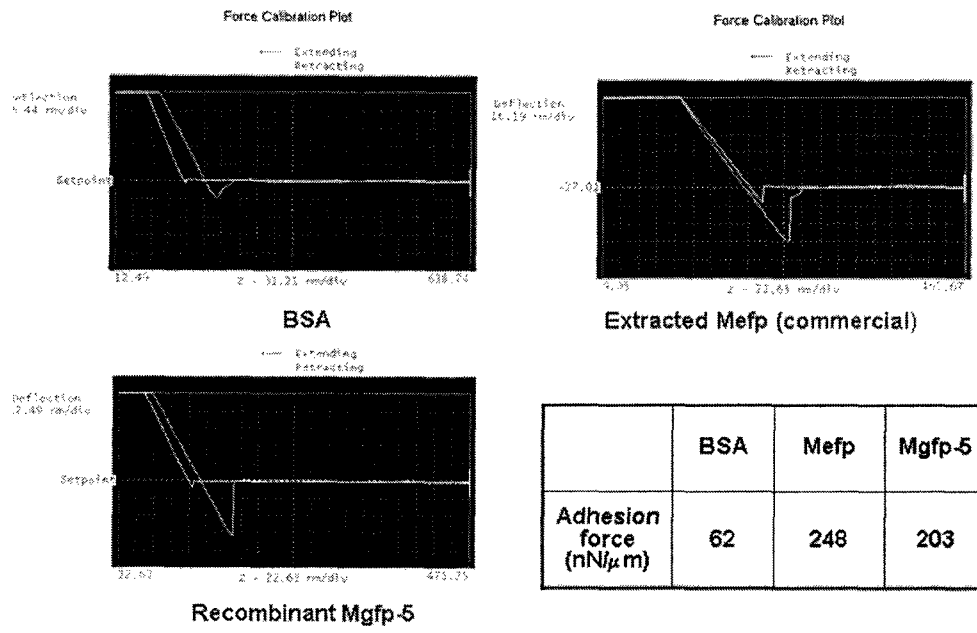


그림 14. AFM을 이용한 홍합접착단백질의 접착능력 측정

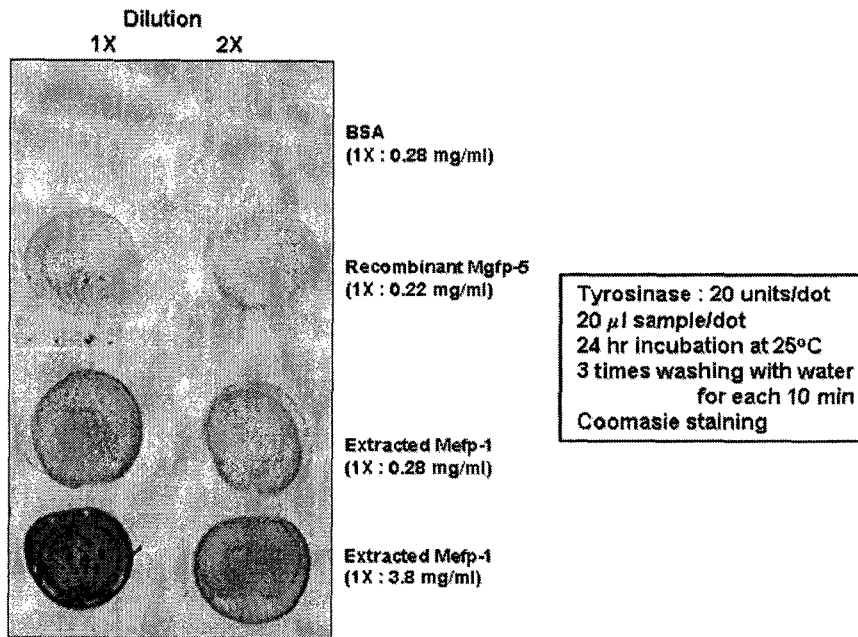


그림 15. 유리 표면위의 홍합접착단백질의 접착력 측정

3. Mgfp-5와 Mgfp-1을 동시에 발현시킬 수 있는 대장균용 발현 시스템의 설계

재조합 융합접착제의 생산을 시도했었던, 기존의 연구그룹과는 달리, 본 연구 그룹에서는 FP-1의 decapeptide를 6번 반복할 수 있는 model peptide를 본 연구 그룹에서 클로닝한 Mgfp-5 와 함께 동시에 발현시키는 시스템을 여러 조합으로 설계 한후, 대장균에 형질 전환 시켜서 발현을 시도해 보았다. 먼저, klenow fragment를 이용하여, FP-1의 decapeptide를 6번 반복 발현시킬 수 있는, model peptide의 DNA를 생합성하여, model peptide의 유전자가 pUC 18의 lac Z 유전자 속에 lac Z 유전자의 역방향으로 들어가 있는 pKFP-1을 합성하였다. FP-1의 model peptide를 생합성하는 단계마다, pUC18의 MCS의 양끝에 붙을 수 있는, M13 /pUC18 정방향 염기서열 분석 primer와 M13 /pUC18 정방향 염기서열 분석 primer를 이용하여, 설계된 염기 서열과 일치하는 지 분석하였고, 최종적으로 pKFP-1의 lac Z 유전자 속에 들어가 있는 FP-1의 model peptide 유전자는 본 연구 그룹에서 설계한 유전자와 동일함을 확인하였다.(그림 16).

그 후, 총 3가지 조합의 FP-1의 model peptide와 Mgfp-5의 동시 발현 시스템이 설계가 되었고, 대장균 내에서 이 3가지의 발현용 벡터의 발현 여부를 조사한 결과, 3가지 시스템 모두 다, 형질 전환된 대장균이 목적 단백질을 생산하는 것을 알 수 있었다. FP-1의 model peptide가 Mgfp-5의 유전자 앞으로 들어간 것은 pMDG150, 뒤로 들어간 것은 pMDG051, FP-1의 model peptide가 Mgfp-5의 유전자의 앞 뒤에 들어간 pMDG151 라고 명명하였다. 지금까지의 연구 결과를 보면, Mgfp-5는 대장균 내에서 soluble하게 발현이 되고, FP-1의 model peptide는 inclusion body로 발현되었다. 흥미롭게도, FP-1의 model peptide 유전자와 Mgfp-5가 일 대 일로 들어간 pMDG150과 pMDG051은 soluble한 것과, insoluble한 것이 엇비슷하게 대장균 내에서 발현되었고, FP-1의 model peptide 유전자가 Mgfp-5의 유전자의 양끝에 들어가도록 설계된 pMDG151은, 많은 양의 단백질이 insoluble한 부분에서 검출이 되었다. 또한, 세포 성장의 경우에도, pMDG150이나 pMDG051을 대장균 BL21에 형질 전환 시켜서 발현을 시도하였을 때, pMDG051에서 Mgfp-5를 생산할 때와 유사하거나 약간의 증가됨을 관찰 할 수 있었으나, FP-1의 model peptide가 Mgfp-5의 유전의 앞뒤에 들어간 pMDG151의 경우에는, IPTG 유도 후에도 증가하는 다른 형태가 관찰되었다(그림 17, 18, 19).

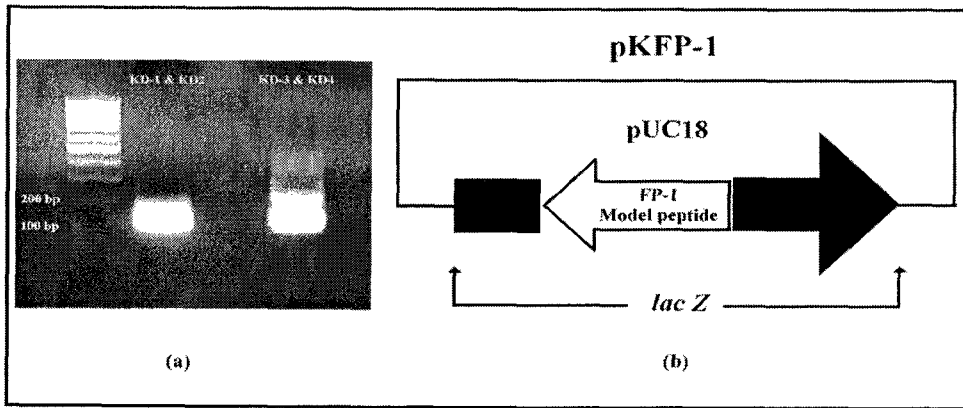


그림 16.(a) Klenow fragment를 이용한 FP-1 model peptide 유전자의 합성

(B) FP-1의 model peptide 유전자를 포함하는 vector pKFP-1

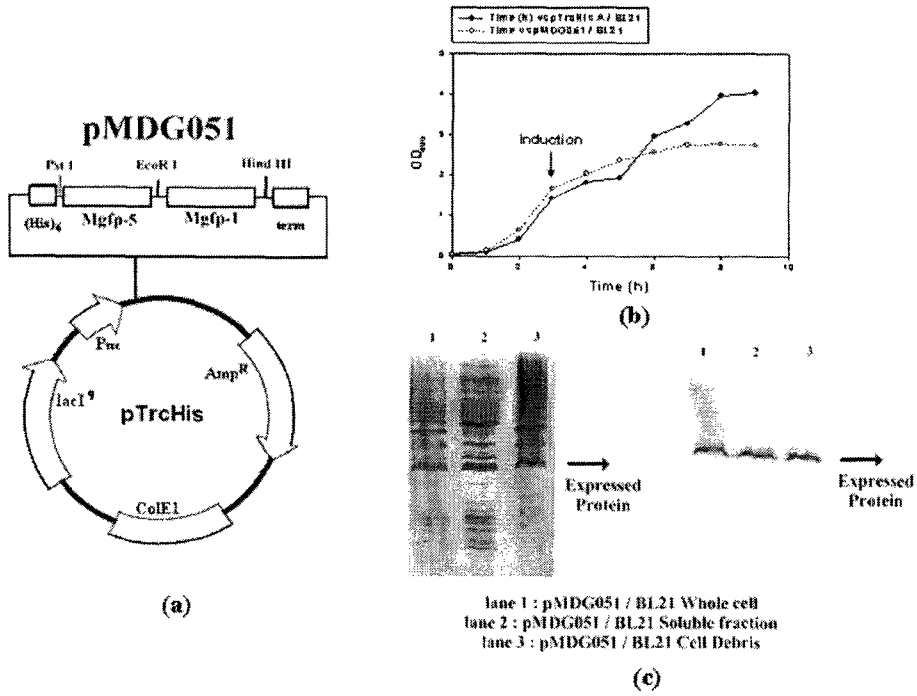


그림 17. pMDG051의 대장균에서의 발현 및 성장

(a) pMDG051 벡터 맵

(b) pMDG051의 세포 성장 양상

(c) pMDG051에서 발현된 단백질의 대장균에서의 성장

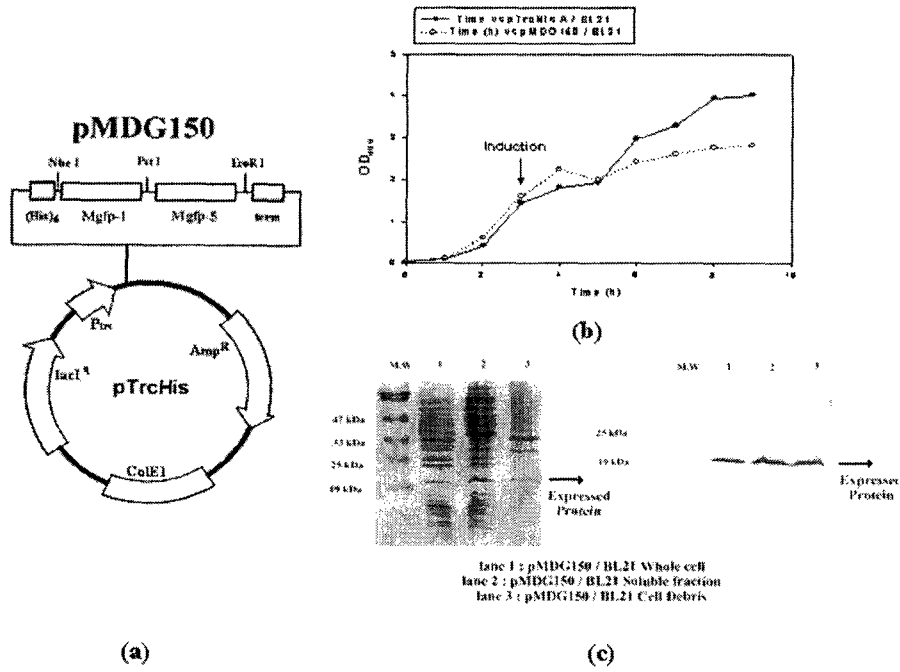
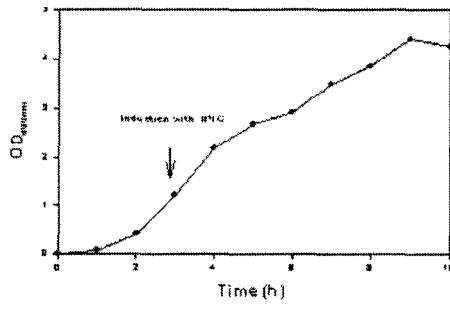
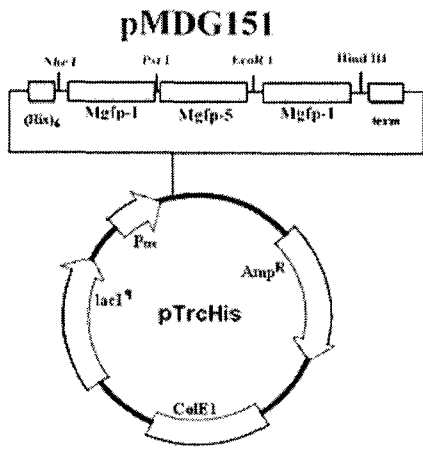
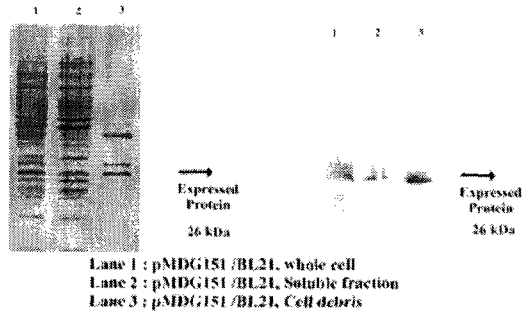


그림 18. pMDG150의 대장균에서의 발현 및 성장
 (a) pMDG150 벡터 맵
 (b) pMDG150의 세포 성장 양상
 (c) pMDG150에서 발현된 단백질의 대장균에서의 성장



(b)



(c)

그림 19. pMDG151의 대장균에서의 발현 및 성장
 (a) pMDG151 벡터 맵
 (b) pMDG151의 세포 성장 양상
 (c) pMDG151에서 발현된 단백질의 대장균에서의 성장

4. 모델 펩타이드의 합성 및 기질제작

Solid-Phase FMoc Peptide Synthesis를 이용하여 홍합유래 생물접착제 구성 주요 작용기 포함하는 모델 Peptide들을 다음과 같이 합성하였다. AK, AKPS, SY, AKPSY, PSY, PTY, T Δ KA, PT Δ KA, PPT Δ KA 등 거대분자 생물접착제의 접착특성 이해를 위해 필요한 주요작용기 포함하는 모델 Peptide 들을 성공적으로 합성 정제하였다.

또한 구조 및 작용기 변조에 따른 접착특성 및 기능의 변화를 이해하기 위해 변형 Peptide로 AKGSY/AKPSY, PTY/PSY, AKPTY/AKPSY 및 AKHypS/AKPS를 성공적으로 합성 정제하였다.

Ag와 Au Colloid의 제조방법은 silver colloid 경우는 silver nitrate (AgNO₃) 용액을 sodium borohydride (NaBH₄) 또는 sodium citrate로 환원하여 콜로이드 입자를 얻었으며, gold 콜로이드는 KAuCl₄ 용액을 sodium borohydride 또는 sodium citrate를 이용해 금속 Colloid로 환원하였다. 이런 방법으로 얻어진 콜로이드 입자의 직경은 약 20nm 정도이며 큰 표면증강 산란신호의 특성을 나타내었다. NaBH₄ 및 sodium citrate로 환원하여 얻은 Ag 및 Au의 콜로이드를 접착특성 평가에 사용해본 결과 두 경우 모두 성공적으로 제조되었음을 확인하였으며, 보관성 및 장기 안정성에 있어서는 Ag와 Au 모두 sodium citrate로 환원하여 얻은 colloid가 우수하였다.

5. 모델펩타이드의 접착특성 평가

합성된 모델 펩타이드들을 생물접착제의 작용환경과 같은 wet 환경에서 접착기질에 흡착시키고 접착에 핵심작용을 하는 작용기들을 선택적으로 조사할 수 있는 SERS 즉 표면증강 Raman 분광법을 사용하여, 접착표면에서 작용기들의 물리화학적 변화, 구조 또는 Orientation 등을 조사 분석하였다. 그림 20은 AKPSY의 수용액 Raman spectrum과 표면에 흡착된 SERS 및 PSY의 SERS를 보여주고 있다.

그림 20에서 보는 바와 같이 AKPSY의 Raman 스펙트럼은 825, 846, 1176, 1207, 1250, 1598, 1614 cm⁻¹ 등의 주로 Tyr의 ring mode에 해당하는 봉우리와 1435 cm⁻¹의 메틸렌의 굽힘진동 (deformation) 봉우리의 세기가 지배적이다. 그러나 기질표면에 흡착된 경우인 SERS는 1391, 990 및 786 cm⁻¹의 카르복실기 관련 봉우리와 1176, 1207, 1580 및 1605 cm⁻¹의 Tyr ring의 진동모드가 크게 증강된다. 특히 -COO 기의 대칭신축에 해당하는 봉우리는 1405에서 1391 cm⁻¹로 약 15 cm⁻¹ 정도 주파수 감소를 보이며 기질표면에 화학흡착

하는 것으로 해석된다. Tyr의 ν_{8a} 및 ν_{8b} 에 해당하는 1605 및 1580 cm^{-1} 의 봉우리 역시 1614 및 1598 cm^{-1} 에서 각각 10 cm^{-1} 또는 18 cm^{-1} 의 주파수 감소를 보이며 deprotonation 되는 것으로 보이며, 또한 Tyr의 ring $\nu(\text{C-H})$ 에 해당하는 3065 cm^{-1} 봉우리가 증강되는 것으로 보아 Tyr ring이 기질표면에 수직방향으로 약간 경사진 배향을 하고 있는 것으로 추정된다. PSY의 SERS는 AKPSY의 SERS와 거의 동일하다. 이는 AKPSY에서 AK 잔기들이 표면에서 떨어져 있음을 의미하며, 이는 Pro의 conformational constraint 때문인 것으로 추정된다. 결국 AKPSY의 경우 카르복실 말단기와 Tyr ring의 $-\text{CO}$ 기가 표면흡착에 주요 역할을 하는 것으로 요약된다. 그림 21은 이러한 스펙트럼 자료를 바탕으로 AKPSY의 표면 흡착양상을 모델 Kit로 구성해 본 것이다. 그림에서 왼쪽의 공중에 떠있는 부분이 AK에 해당하며 오른쪽 끝부분이 Tyr의 ring과 카르복실 말단기가 표면에 접촉하고 있는 양상을 보여준다.

위에서 기술한 바와 같이 AKPSY 모델 펩타이드에서 Pro의 구조적 기능을 확인하기 위해 Pro를 Gly로 대체한 AKGSY와 AK의 SERS를 측정 비교하였다 (그림 22). 그림에서 보는 바와 같이 AKGSY에서는 AKPSY와는 달리 Pro에 의한 conformational constraint가 없어지면서 AK 펩타이드의 A와 K의 C-C 신축진동에 해당하는 peak 들이 $800 \sim 950\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타나며 카르복실기와 Tyr의 ring 신축진동에 해당하는 봉우리 세기가 크게 감소된다. 이는 Pro에 의한 구조적 제한이 사라지면서 전체 펩타이드의 구조가 카르복실기와 Tyr의 oxygen기가 표면에 흡착하기에 불리한 구조로 변형되었음을 의미한다. 즉 Tyr과 carboxyl기의 표면흡착기능이 크게 약화되었음을 의미한다. 이러한 자료로부터 유추할 수 있는 것은, Mefp-1 이나 Mgfp-1에서 10개의 아미노산 반복 구조중 3개를 차지하는 Pro기는 거대분자인 홍합의 접착단백질이 기질표면의 접착에 유리한 구조를 유지할 수 있도록 전체 단백질 구조를 결정하는 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다.

그림 23는 DOPA (*l*-3,4-dihydroxy phenyl alanine)의 수용액 Raman스펙트럼과 Au 콜로이드 표면에 흡착한 스펙트럼 (SERS)를 비교한 것이다. DOPA 수용액의 Raman 스펙트럼에서 $719, 783, 848, 1292$ 및 1613 cm^{-1} 등의 센 봉우리들은 주로 DOPA의 quinoline ring 신축에 관련된 진동모드에 기인한다. 한편 DOPA가 Au 표면에 흡착한 SERS에서는 1276 cm^{-1} 와 1592 cm^{-1} peak의 세기가 크게 증강된다. 이 두 peak는 각각 수용액에서 1292 및 1613 cm^{-1} 에 해당하는 DOPA ring의 $\nu(\text{CO})$ 및 ν_{8a} 의 진동모드로 표면 흡착에 따라 약 16 cm^{-1} 및 11 cm^{-1} 정도 주파수 감소를 보여준다. 이러한 주파수 감소는 흡착시 DOPA의 catechol의 hydroxyl기가 deprotonation을 의미하며, catecholate의 C-O 작용기가 기질에 화학흡착 된 것으로 추정된다. 한편, AKPSY의 흡착에서 주요기능을 하였던 carboxyl기의 1391 cm^{-1} peak이 거의 나타나지 않는 것으로 보아 DOPA 존재시에는 카르복실기가 표면접착에 주요작용을 하지 못하는 것으로 보인다. 기타 DOPA를 포함하는 T Δ KA, PT Δ

KA, PPT Δ KA 등의 모델 펩타이드에서도 역시 이 스펙트럼과 유사하게 DOPA ring의 $\nu(\text{CO})$ 및 ν_{8a} 진동모드에 해당하는 1276 및 1592 cm^{-1} peak가 지배적인 것으로 보아 DOPA의 catecholate CO기가 표면흡착에 주요역할을 하는 것으로 생각된다. 그림 24는 이러한 자료들을 토대로 DOPA residue 중 catecholate 작용기의 표면접착 양상을 도식화한 것이다.

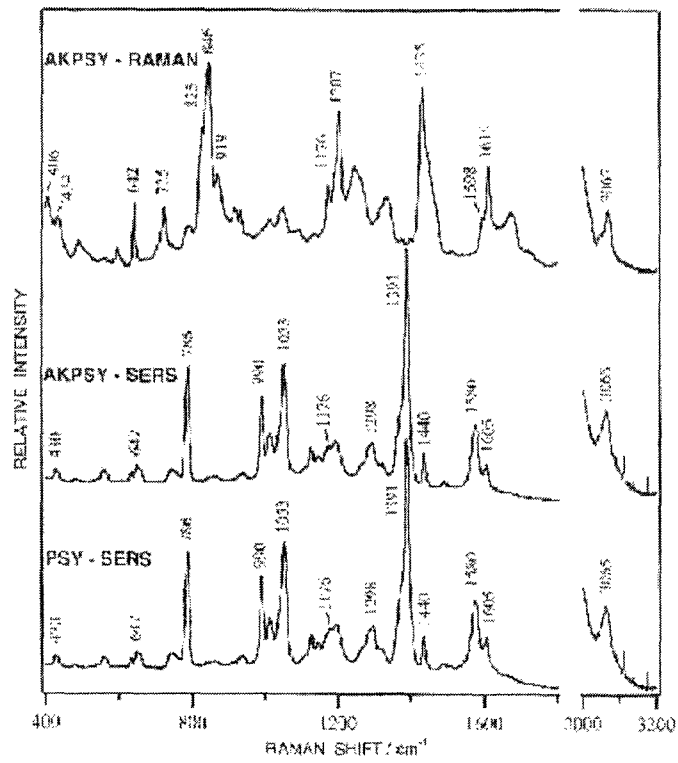


그림 20. AKPSY(aq) Raman Spectrum과 AKPSY-SERS 및 PSY-SERS의 비교

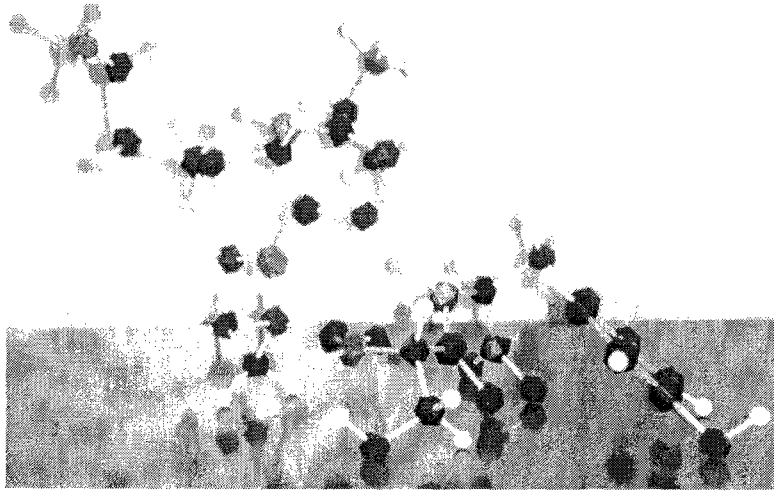


그림 21. AKPSY의 표면흡착 모델.

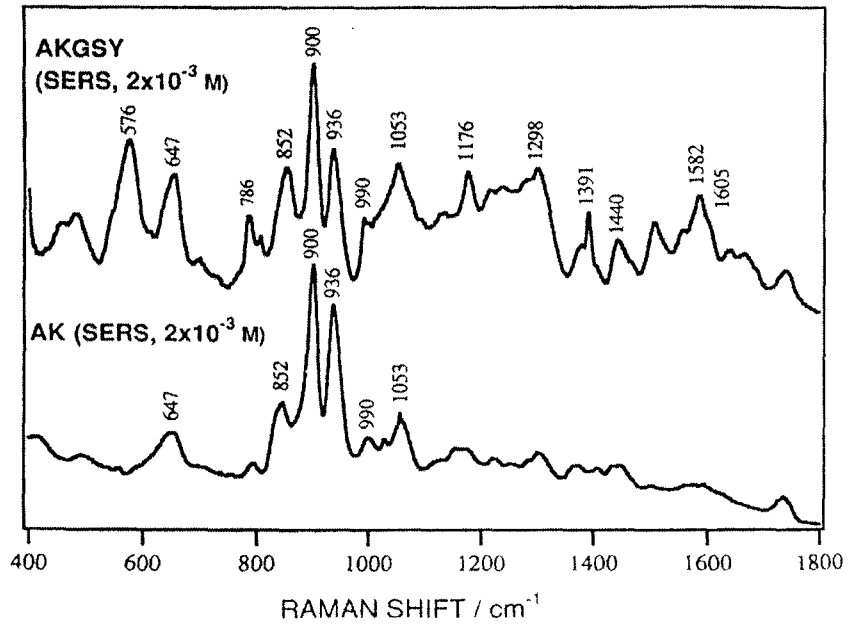


그림 22. AKGSY 및 AK의 SERS 비교

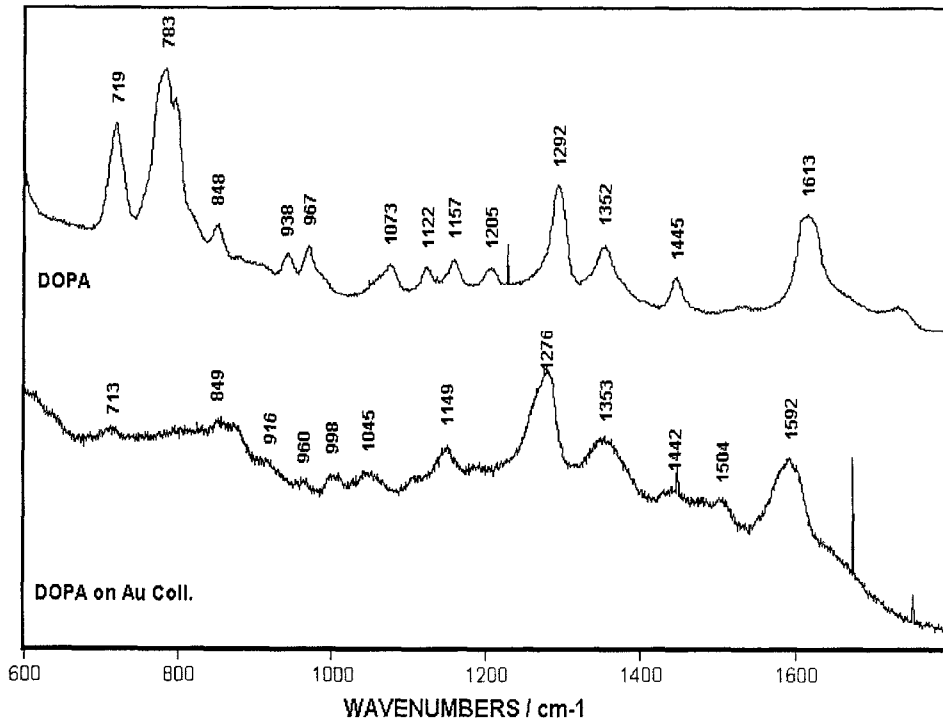


그림 23. DOPA(aq) Raman 과 DOPA SERS의 비교

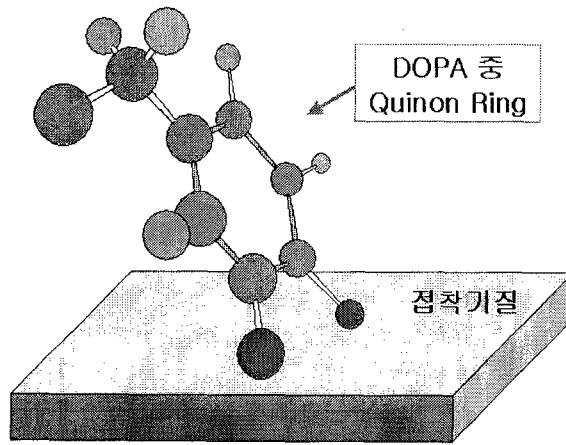


그림 24. DOPA의 표면 접착양식

6. 생물접착제 접착특성 해석기초 구축

거대분자인 생물접착제의 접착특성을 분자수준에서 이해하기 위해서는 그 구성 아미노산 및 작용기들의 접착특성에 대한 이해와 해석자료의 축적이 요구된다. 따라서 micro-Raman과 표면증강라만분광법 (SERS)을 이용하여 합성된 모델펩타이드들의 접착특성을 측정하였으며, 주요 작용기들의 표면에서의 물리화학적 변화와 표면에서의 구조 및 orientation 등을 해석하여 주요사항만 아래에 요약하였다.

- AKPSY 및 PSY의 표면증강라만스펙트럼 (SERS)은 동일하였으며 Y의 -OH기와 말단 carboxyl 작용기가 표면흡착에 핵심역할을 하였다.
- 표면 흡착시 Tyr의 aromatic ring 평면은 흡착표면에 대해 세로방향의 배향을 가지며 Tyr-OH기와 말단 carboxyl기는 표면흡착시 deprotonation 된다.
- Pro의 conformational constraint로 인해 AKPSY에서 AK residue는 표면에서 멀리 위치하였다.
- AKPSY의 Pro가 Gly로 치환된 AKGSY의 경우 접착특성이 크게 변하였으며, Tyr의 Hydroxyl기 및 말단 Carboxyl기의 기능이 크게 감소되었다. 따라서 Pro는 생물접착제의 3차원 구조유지와 접착능력에 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다.
- DOPA 및 DOPA가 존재하는 PT△KA 등의 Peptide에서는 DOPA의 catecholate 기가 접착에 주요역할을 하였으며 말단 carboxyl 기의 역할은 크게 감소되었다.

측정결과 얻은 자료를 비교 분석하여 각 작용기들의 marker band를 확인하였고, 거대분자 생물접착제의 접착특성 해석을 위한 기초자료를 정리하여 표 5과 표 4에 요약 정리하였다.

표 5. Mefp-1 및 Mgfp-1 관련 펩타이드의 Raman 및 SERS 스펙트럼의 Peak Assignments

Raman Aqueous			SERS Colloidal Gold			Assignment
AKPSY/PSY	PTY	AKGSY	AKPSY/PSY	PTY	AKGSY	
434 m	434 m	434 m	430 w	430 w		
492 w	492 w	492 w	485 w	485 w	485 w	v16b (oop?)
576 m	576 m	576 m	576 m	576 m	576 m	ω (COO-) ?
598 w	598 w	598 w				
642 m	642 m	642 m	647 w	647 m	647 s	
792 w	792 w	792 w	786 s	786 s	786 s	δ (COO-) ?
825 sh	825 sh	825 sh	830 sh	830 sh	830 sh	
846 vs	846 vs	846 vs	852 w	852 m	852 m	(v1 + 2v16b) + ρ (CH2)
900 sh		900 sh		900 m	900 vs	v(Ca-Cb) A + v(C-C) P
936 w	936 w	936 w	936 vw	936 m	936 s	v(C-C) K + v(C-C) T
990 sh	990 sh	990 sh	990 s	990 s	990 w	v(C-COO-)
1015 m	1015 sh		1015 m	1015 sh		δ (C-O-H) ?
1035 sh	1035 sh		1035 sh	1035 sh		
1050 w	1050 w	1050 w	1053 s	1053 s	1053 m	v(C-O) S + v(C α -N) ?
1076			1076			
	1097	1097		1097	1097	
1130 m	1130 m	1130 w	1130 m	1130 m	1130 w	τ (NH2)
1176 m	1176 m	1176 m	1176 m	1176 m	1176 m	v9a
1238-1303	1238-1303	1238-1303		1238-1290	1238-1290	Amide III
1298 m	1298 m	1298 m	1298 m	1298 m	1298 m	
1375	1375	1375	1375	1375	1375	
1405 vw	1405 vw	1405 vw	1391 vs	1391 vs	1391 m	vs(COO-)
1440 m	1440 m	1440 m	1440 m	1440 m	1440 m	δ as(CH3) + δ (CH2)
1598 w	1598 w	1598 w	1580 s	1580 s	1582 m	v8b
1614 m	1614 m	1614 m	1605 m	1605 m	1605 sh	v8a
1669 m	1669 m	1669 m	1669 vw	1669 w	1669 w	Amide I
1720 w	1720 w	1720 w				v(C=O)

표 6. Mefp-1 및 MgfP-1 관련 펩타이드의 Raman 및 SERS 스펙트럼의 Peak Assignments

Raman Aqueous			SERS Colloidal Gold			Assignment
T\$KA	PT\$KA	PPT\$KA	T\$KA	PT\$KA	PPT\$KA	
364 m	366 m	368 m				δ CCC
406 m	406 m	407 m				β CCC
440 m	441 m	441 m	446 w	445 w	444m	ν_{16b} (\$)
490 sh	484 sh	487 sh	490 s	491 m	489 m	ν_{16a} (\$)
596 w	598 w	593 w	587 m	586 m	590 m	Amide V
730 m	731 m	735 m	735 vw	735 vw	731w	Ring mode (\$)
840 s	841 m	841 m	836vw		828 vw	ν_{10a} , ν_{10b} (\$)
	896 m	895 m				Ring breathing (P)
				922 w	915 w	Ring breathing (P)
			991 vw	995 m	994 m	Ring stretch (P)
1046 sh	1046 w	1044 w	1042 m			ω CH ₂
1107 w	1101 vw	1101 vw				τ NH ₂
			1114 w	1109 w	1115 w	τ NH ₂
			1143 m	1147 m	1150 sh	ν_{15} (\$)
1202 s,b	1203 s,b	1200 s,b	1197 w	1201 sh	1208 s	ν_{9a} , ring mode (P)
			1240 sh	1235 sh	1250 s	Ring mode (\$, P)
	1297 vw	1292 vw	1294 s	1281 s,b	1288 s	ν CO (\$)
1320 w	1328 w	1326 w				
			1348 vw		1343 m	τ CH ₂ , ν_3 (\$), amide III
1381 vw	1379 vw	1380 vw	1370 w	1372 s	1374 sh	τ CH ₂
1434 s	1438 m	1437 m	1424 w	1429 w	1443 w	δ CH ₂ , ν_{19a} (\$)
			1507 w		1488 w	ν_{19b} (\$)
1617 w	1611 w	1620 w	1594 m	1590 s	1578 m	ν_{8a} (\$)
					1637 s	Amide I
1685 sh	1686 sh	1685 sh				

* 참고 : 표에서 \$는 DOPA를 의미함.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

제1차 년도의 연구개발 목표는 해양생명체인 홍합유래 접착단백질의 재설계를 통한 조합형 생물접착제들의 설계 및 구축과 이들 변이체들의 유전학적 발현 확인하는 것이다. 이를 달성하기 위한 세부 연구개발목표로는 첫째, Mgfp-5을 기본으로 하여 Mgfp-1의 가교화 기능이 첨가되는 조합형 홍합 생물접착제 변이체들의 설계 및 구축과 둘째, 대장균에서의 홍합 생물접착제 변이체들의 발현 셋째, 홍합 생물접착제 Mgfp-5의 분리정제 및 접착능력 연구 넷째, 홍합 생물접착제 구성 작용기들의 접착특성 해석 기초 구축이다. 각각의 연구개발 목표에 대한 달성도는 다음과 같다.

1. 조합형 홍합 생물접착제의 설계, 제작 및 유전학적 발현 확인

- Mgfp-5를 기본으로 하여 가교화기능을 첨가할 수 있는 Mgfp-1 모델 펩타이드가 동시발현될 수 있는 변이체들의 설계
일본의 연구 그룹의 결과를 바탕으로 하여, FP-1의 모델 펩타이드 유전자를 대장균에서 발현 할 수 있도록 설계하였으며, 이를 바탕으로, FP-1의 모델 펩타이드와 Mgfp-5의 유전자를 동시에 발현 시킬 수 있는 대장균용 발현 벡터 pMDG051, pMGD150, pMDG151들을 설계하였다.
- 조합형 홍합 접착단백질 변이체 발현시스템의 제작
FP-1의 모델 펩타이드 유전자를 Klenow fragment 기법을 이용하여, 생합성 하였으며, 이를 바탕으로 계획하고 설계한 대로, pMDG051, pMGD150, pMDG151을 제작 한 후, 염기 분석을 통해서 확인하였다.
- 조합형 홍합 접착단백질 변이체들의 유전학적 발현
3가지 조합의 홍합접착단백질 변이체들을 대장균 BL21 균주에 형질 전환 시킨 후, 유전학적 발현 여부를 조사 하였고, 3 가지 모든 조합이 대장균 내에서 발현을 확인하였다. 그리고, 세 가지 조합의 홍합접착 단백질의 유전자가 시간에 따른 발현수율 및 성장 측정하였다.

위에 기술한 바와 같이 FP-1의 모델 펩타이드를 성공적으로 생합성 하였고, 그 유전적 변이체를 발현시킬 수 있는 대장균의 발현 벡터 구축 및 대장균 내에서 발현을 모두 수행하였으므로, 100% 연구목표를 달성하였다고 생각된다.

2. 재조합 홍합 생물접착제 Mgfp-5의 분리정제 및 접착능력 연구

○ 재조합 Mgfp-5 홍합접착단백질의 대장균에서의 유전학적 생산

재조합 Mgfp-5의 유전학적 생산을 위하여 플라스크 배양 및 발효조 배양을 수행하여 발현 양상을 조사하였으며 이때 발현수율은 약 12 mg/L이었으며, 재조합 Mgfp-5는 대장균에서 수용성으로 발현이 되었으나 발현이 시작되면서 대장균의 세포성장이 멈추는 문제점을 발견하였고, Mgfp-5의 생산을 최대화하기 위하여 유도시기의 최적화 연구를 수행하여 late exponential phase의 OD 2.2 정도에서 발현을 유도하는 것이 좋음을 알아내어 3배이상 (약 40 mg/L)의 생산수율의 증대를 이끌어 내었다.

○ 재조합 Mgfp-5 홍합접착단백질의 분리 정제

Affinity chromatography를 사용하여 재조합 Mgfp-5를 분리정제함으로써 94%정도의 높은 순도를 획득하였으나, Affinity chromatography의 경우 native 조건에서는 분리수율이 매우 낮은 단점이 있어서, denaturing 조건에서 분리정제를 수행한 결과 어느 정도는 이러한 문제를 해결할 수 있었다. 또한, 높은 pI값을 가지는 Mgfp-5의 특성을 이용한 분리정제단가가 저렴한 ion-exchange chromatography를 이용한 분리정제 기술을 함께 개발 중에 있다.

○ 분리정제된 재조합 Mgfp-5 홍합접착단백질의 접착능력 측정

분리 정제된 재조합 Mgfp-5의 Bio-AFM을 이용한 접착력 측정을 시도하였고, 자연적으로 추출된 홍합접착단백질에는 못 미치지만, 어느 정도 가능성이 있는 결과를 얻었다. 또, 유리 표면에 두 가지의 비교물질과 함께 tyrosinase가 함께 첨가된 Mgfp-5를 loading 한 후 25°C에서 24시간의 incubation 후에 남아있는 접착단백질을 Coomassie staining을 통하여 측정하여 접착능력이 있음을 확인하였다.

3. 생물접착제의 모델 펩타이드 합성

○ 생물접착제의 주요 작용기를 지닌 모델 펩타이드들의 합성 및 정제

홍합유래 생물접착제, Mefp-1 및 Mgfp-1은 10개 아미노산 서열이 반복되는 구조를 가지며, 이 10개의 아미노산 서열, AKPSYPPT Δ K에 대한 모델 Peptide로 AK, PSY, AKPSY, AKPS, AKHypS 등 전반부와 PTY, T Δ KA, PT Δ KA, PPT Δ KA 등 후반부에 해당하는 대부분의 주요 작용기를 포함하는 Peptide를 합성 정제하였다.

○ 구조/기능 관계이해 위한 변형 펩타이드의 합성 정제

구조/기능 상관관계를 이해하기 위해 아미노산 서열중 일부의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 변형 Peptide로 AKPSY/AKGSY,

AKPSY/AKPTY, PSY/PTY 등을 성공적으로 합성 정제하였다.

위에 기술한 바와 같이 거대분자 생물접착제의 접착특성 이해를 위해 필요한 대부분의 구성 작용기를 포함하는 모델 Peptide 들을 성공적으로 합성 취득하였으며, 100% 연구목표를 달성하였다고 생각된다.

4. 모델펩타이드 작용기들의 접착특성 규명

- 위에 기술한 바와 같이 생물접착제의 반복구조에 나타나는 10개의 아미노산 서열을 포함하는 모델펩타이드를 합성하여, 모든 모델 펩타이드들의 접착특성을 측정 분석하였다. 특히 생물접착제의 표면접착에 핵심적인 기능을 하는 작용기들의 표면흡착특성, 표면에서의 물리화학적 변화 및 접착표면과의 상대적 배향 등을 상세히 해석 규명하였다.
- 또한 일부 아미노산을 치환하여, 구조변형에 따른 접착특성 변화를 비교 해석하였으며, 모든 모델 펩타이드들의 접착특성을 측정 취득한 자료를 분석하여 상기한 표 1과 표 2에 정리 수록하였다. 거대분자 생물접착제의 접착특성을 평가해석하기 위해 필요한 대부분의 기초자료가 구축되었다고 생각되나, 단지 10개의 아미노산 서열이 2회 이상 반복될 경우의 구조적 변화로 인한 접착특성의 변화여부는 추후 확인이 필요할 것이다. 따라서 생물접착제 모델펩타이드의 각 작용기들의 접착특성 규명은 95% 이상 달성되었다고 생각된다.

제 2 절 관련분야 기술발전의 기여

홍합접착단백질은 여러 가지의 단백질이 함께 작용하여, 접착 기질에 접착을 이루게 된다. 본 연구는 여러 종류의 홍합접착단백질 중에서 가장 홍합의 접착력에 기여할 것으로 여겨지는 2가지의 홍합접착단백질을 선정하고, 두 단백질을 대장균 내에서 발현시키는 연구를 수행하였다. 먼저, 본 연구 그룹에서 추출해 낸 Mgf-5는 FP-5계열의 단백질의 서열 및 구조가 유사할 것이라는 가능성을 보여주고 있으며, 홍합접착단백질의 접착 기작을 이해하는데 큰 기여를 할 것으로 여겨진다. 또한, 2가지의 홍합접착단백질의 유전학적 동시 발현은 처음 시도되는 것이므로, 이 연구의 결과는 홍합접착단백질 연구에 있어서, 큰 영향을 미칠 것으로 기대 된다. 또한, Mgf-5의 접착능력을 Bio-AFM으로 측정함으로써, 생체 접착성 물질의 접착 능력을 연구하는데도, 소중한 결과가 될 것으로 여겨진다.

또한 Peptide나 단백질의 생체재료에의 흡착에 관한 연구는 의료용 이식재료나 devices들의 생체 적합성 등을 평가 또는 조절하는데 매우 중요하다. 예

를 들면, 단백질이 생체재료의 표면에 흡착하는 것은 혈액응고와 같은 생체에 부적합한 결과를 초래할 수도 있고, 동시에 생체재료의 표면을 보호하고 생리적 부작용 즉, 이식재료에 의한 혈액응고나 염증유발 등의 부작용을 방지하는 결과를 초래할 수도 있다. 따라서 bio-materials의 생체적합성을 향상시키기 위해서는 생분자들의 흡착이나 접착의 메카니즘에 대한 이해와 흡착 화학종의 구조 및 활성에 대한 평가, 또한 향상되고 조절된 계면특성을 지닌 biomaterials의 제조 등이 요구된다. 따라서 본 연구의 결과로 얻어진 여러 모델 펩타이드들의 흡착특성에 대한 분자수준의 이해는 통합 생물접착제의 접착 특성 및 메카니즘에 대한 이해와 접착특성 향상에 응용될 뿐만 아니라, 아래에 열거한 여러 관련분야에도 크게 기여할 것으로 기대된다.

- 생물질의 계면에서의 구조와 특성에 대한 지식은 생체적합성을 지닌 새로운 Implanted materials나 devices를 합리적으로 설계 및 제조하는데 응용될 수 있음.
- drug delivery system의 의약품 전달용 liposome이나 emulsion drop 등에의 단백질 흡착 방지를 위한 coating 또는 분자설계에 기여
- 흡착표면의 펩타이드의 구조 및 배향 또는 작용기의 흡착특성은 마이크로 전자장치나 광학장치에 응용되는 자가조립 단분자막 (SAM)과 같은 나노 scale의 박막의 제조나 설계에 기여할 것임.
- 이 물질의 접착 메카니즘에 대한 분자수준의 이해는 Implanted materials나 devices의 생체 내 고정 및 설치 또는 수술용 접착제(surgical adhesive)는 물론 수중접착제의 분자설계, 금속의 부식방지를 위한 신소재 개발 등에도 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.
- 아미노산, 펩타이드 및 단백질의 분석에 응용될 것이다. Raman 스펙트럼은 펩타이드 및 단백질 수용액에서 아미노산기를 검출 확인하는데 유용하며 SERS는 표면증강 효과에 의한 큰 신호증강으로 수용액 중 미량의 아미노산기 검출에 이용될 수 있다. 본 연구결과로 얻어진 data는 Ag 및 Au 표면에서 아미노산 작용기를 확인 검출하는데 기여할 것이다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 결과의 활용

현재까지 진행된 연구개발은 홍합유래 생물접착제의 유전학적 대량생산 및 실용화를 위한 총 6년의 연구계획 중 1년차에 해당하는 연구로서 접착력이 있는 홍합접착단백질의 유전학적인 대량 생산을 위한 기초적인 연구가 수행되었다. 먼저, 발현에 필요한 홍합접착단백질의 유전자를 계획했던 대로 모두 합성해 내었고, 그를 이용한 유전전 변이체도 모두 제작하였으며, 제작한 발현 벡터들이 대장균 내에서 성공적으로 단백질을 생산하는 것을 알 수 있었다. 또한, 대장균 내에서 발현 패턴 및 성장도 조사하여서, 다음 단계 연구에서 수행하게 될 대장균에서 대량 발현 및 분리 정제 조건을 잡는데 크게 유용할 것으로 생각된다. 그리고, 또한 여러 가지 홍합접착단백질 생산의 유전학적 변이체를 설계 및 제작으로 말미암아, 다양한 시료를 가지고, 홍합접착단백질의 접착능력을 측정해 볼 수 있게 되었다. 1년 동안, Mgf-5의 분리 정제 연구도 수행되었는데, Mgf-5를 높은 순도로 얻어 낼 수 있었기 때문에, 접착능력을 측정하는데 있어서 훨씬 정확한 data를 얻을 수가 있었다. 또한, Bio-AFM을 이용하여, 홍합접착단백질의 접착 능력을 측정하는 방법 및 기술을 획득할 수 있었다.

또한 거대 분자인 생물접착제의 접착특성을 해석 평가하기 위한 기초자료를 획득하였다. 즉, 생물접착제의 구성 작용기를 포함하는 모델 펩타이드를 합성하여 이들의 접착 특성을 측정 해석하고 각 작용기들의 기능과 접착표면에서의 구조 및 물리화학적 변화를 분석하였다. 따라서 1차년도에 획득한 연구결과는 2차년도에 실시할 거대분자 생물접착제의 접착특성 및 메카니즘을 이해하고 해석하기 위한 기초자료로 활용될 것이며, 나아가 유전학적으로 발현된 접착단백질의 접착능력 향상을 위한 분자 설계 및 화학적 수정방법을 개발하는데 중요한 자료로 활용될 것이다.

제 2 절 추가 연구의 필요성

1. 홍합 생물접착제의 유전학적 발현

재조합 Mgf-5의 대장균에서의 발현유도시 대장균의 성장이 멈춰버리는 경향이 있기 때문에, 재조합 Mgf-5가 대장균의 성장에 해를 주는지에 대한 연구조사가 필요하고, Mgf-5를 대장균의 periplasmic space나 배지로 분비해 줄 수 있는 분비서열을 Mgf-5 유전자의 앞에 융합시킴으로써 발현 양상의

변화도 관찰해 보아야 할 것이다. 또한, FP-1의 모델 펩타이드와 Mgf-5를 동시에 발현 시킬 수 있는 변이체들의 대장균에서의 최적 생산조건 및 그에 맞는 분리 정제 방법의 선택도 추가적으로 연구되어야 할 부분이라고 할 것이다.

2. 재조합 융합 생물접착제 Mgf-5의 분리정제 및 접착능력 연구

조합 Mgf-5가 대장균의 세포 내로 생산되는 관계로 분리정제를 위하여서는 세포의 파쇄가 필요하며 세포파쇄의 효율이 단백질 분리정제수율에 영향을 미칠 수 있으므로 세포파쇄의 효율을 증가시킬 필요가 있으며, 좀더 효율적으로 분리 정제 수율을 높여 가는 연구가 지속적으로 필요하다. 또한, 분리정제된 재조합 생물접착제의 양이 적어 접착력 측정에의 어려움이 있으며 적절한 접착력 측정기술의 개발이 필요하다. 현재, Bio-AFM을 이용하여 융합접착단백질의 접착능력을 측정을 시도하고 있으며, 정확하게 융합접착단백질의 접착 능력 측정을 위한, Bio-AFM의 probe 디자인 및 개량 실험도 요구된다 (그림 25).

3. 융합 생물접착제 표면특성 연구

현재까지 개발한 연구결과는 스펙트럼 해석의 어려움을 해결하기 위해 10개 아미노산 반복구조 중 주로 2~6개의 아미노산 단위로 자른 모델 펩타이드를 사용하여 접착특성을 측정 분석하였다. 따라서 10개의 아미노산 반복구조가 2회 이상 반복될 경우의 펩타이드의 구조적 제한으로 인한 접착특성 변화여부는 추후 확인이 필요할 것으로 생각된다. 그 외에 최근 본 연구팀에서 아미노산 서열을 확인한 Mgf-5 또한 우수한 접착력을 지닐 것으로 예측되어 이의 아미노산서열 중 자주 반복되는 YK를 포함하는 펩타이드의 접착특성 측정이 필요할 것으로 생각된다. 따라서 2차년도에 YK를 포함하는 모델 펩타이드를 합성하여 이들의 접착특성을 추가로 측정, 해석할 것이다.

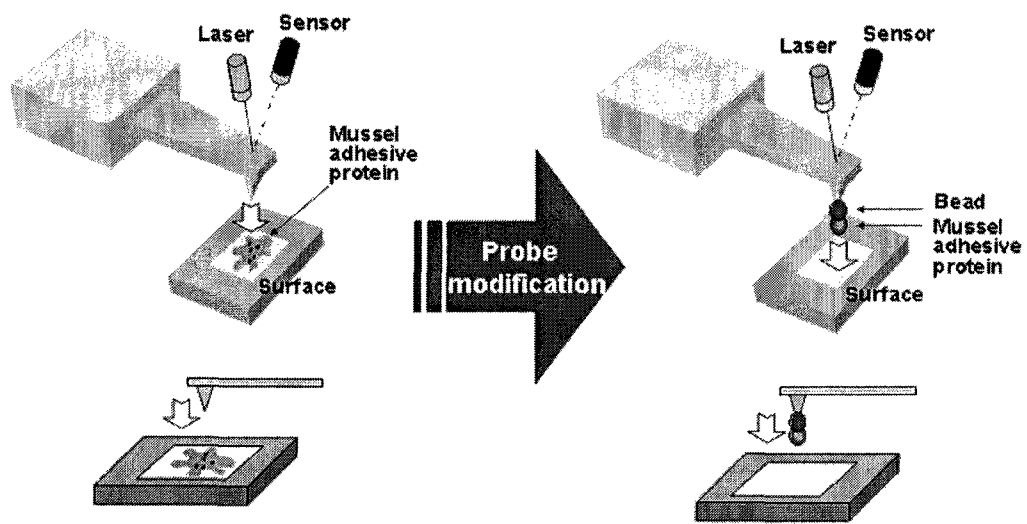


그림 25. 통합접착단백질 측정을 위한 Bio-AFM probe의 개량

제 6 장 참고문헌

1. Waite, J.H., Adhesion in byssally attached bivalves, *Biology Review*, 1983, 58, 209-231
2. Deming, T.J., Mussel byssus and biomolecular materials, *Current Opinion in Chemical Biology*, 1999, 3, 100-105
3. Green, K., Mussel adhesive protein. In *Surgical Adhesives and Sealants. Current Technology and Applications*. Edited by Sierra DH, Saltz R. Lancaster: Technomic, 1995, 19-27
4. Dove, J. and Sheridan, P., Adhesive protein from mussels: possibilities for dentistry, medicine, and industry, *Journal of American Dental Association*, 1986, 112(6), 879
5. Yu, M., Deming, T.J., Synthetic polypeptide mimics of marine adhesive, *macromolecules*, 1998, 31, 4739-4745
6. Yu, M., Hwang, J., and Deming, T.J., Role of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in mussel adhesive proteins, *Journal of American Chemical Society*, 1999, 121, 5825-5826
7. Salerno, A.J. and Goldberg, I., Cloning, expression, and characterization of a synthetic analog to the biadhesive precursor protein of the sea Mussel *Mytilus edulis*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 58, 209-214
8. Filpula, D.R., Lee, S.M., Link, R.P., Strausberg, S.L., and Strausberg, R.L., Structural and functional repetition in a marine mussel adhesive protein. *Biotechnology Progress*, 1990, 6(3), 171-177
9. Article, *Mussel Power*, *Trend in Plant Science*, 2000, vol5, No.1.
10. Waite, J.H. and Qin, X., polyphosphoprotein from the adhesive pads of *Mytilus edulis*, *Biochemistry*, 2001, 40, 2887-2893
11. Kitamura, M., Kawakami, K., Nakamura, N., Tsumoto, K., Uchiyama, H., Ueda, Y., Kumagai, I., and Nakaya, T., Expression of a model peptide of a marine mussel adhesive protein in *Escherichia coli* and characterization of its structural and functional properties, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 1999, 37(6), 729-73611.
12. Morgan, D., Two Firms Race To Derive Profits From Mussels' Glue, *The Scientist*, 1990, 4,1.(20)
13. Cha, H.J. and Hwang D. S., Adhesive protein Mgf-5 isolated from mussel and method of producing same, 2002, Korean Patent Application, 004781513.
14. Issei Harada & Hideo Takeuchi, *Spectroscopy of Biological Systems*, Wiley, Chichester (1986) p. 113-175.
15. R. L. Garrell, *Probing Biomolecule-Surface Interactions with Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, *J. of Bioactive and Compatible Polymers* (1991) Vol. 6, p. 276
16. H.-U. Gremlich & B. Yan (Eds.) *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, Marcel Dekker (2001)
17. D. J. Crisp, G Walker, G. A. Young & A. B. Yale, *J. Coll. Interf. Sci.* (1985) vol. 104, p. 40.
18. J. H. Wait & M. L. Tanzer, *Science* (1981) vol. 212, p. 1038.
19. T. M. Herne, A. M. Ahern & R. L. Garrell, *J. Am. Chem. Soc.* (1991) vol. 113, p. 846.
20. I. R. Nabiev, K. V. Socolov & M. Manfait, *Biomolecular Spectroscopy*, (R. J. H. Clark & R. E. Hester Eds.) Wiley, Chichester (1993) p. 267.

21. G. D. Chumanov, R. G. Efremov & I. R. Nabiev, *J. Raman Spectroscopy* (1990) vol. 21, p.43.
22. I. R. Nabiev, G. D. Chumanov & R. G. Efremov, *J. Raman Spectroscopy* (1990) vol. 21, p.49.
23. M. Kerker & B. J. Thompson (Eds.) *Surface Enhanced Raman Scattering* SPIE, Bellingham (1990)

연구결과 활용계획서

해양수산연구개발사업 연구결과 활용계획서			
사업구분	해양생물로부터 유용신물질 연구개발		
과제명	홍합유래 생물접착제의 유전학적 대량생산 및 실용화 연구		
연구기관	포항공과대학교	연구책임자	차형준
총연구기간	2002년. 6월. 1일. ~ 2003년. 2월. 28일. (9개월)		
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계
	90,000	10,000	100,000
기술분야			
참여기업	그린텍21(주)		
공동연구기관			
위탁연구기관	한국기술교육대학교		
연구결과활용(해당 항목에(√) 표시)	1. 기업화()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(√)
	4. 타사업에 활용()	5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용(교육,연구)()
		7. 활용중단(미활용)	8. 기타()
<p style="text-align: center;">해양수산연구개발사업관리등에관한규정 제33조(연구개발결과의 보고) 제2항에 의하여 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.</p>			

1. 연구목표 및 내용

제1차 년도의 연구개발 목표는 해양생명체인 홍합유래 접착단백질의 재설계를 통한 조합형 생물접착제들의 설계 및 구축과 이들 변이체들의 유전학적 발현 확인하는 것이다. 이를 달성하기 위한 세부 연구개발목표로는 첫째, Mgfp-5을 기본으로 하여 Mgfp-1의 가교화 기능이 첨가되는 조합형 홍합 생물접착제 변이체들의 설계 및 구축 둘째, 대장균에서의 홍합 생물접착제 변이체들의 발현 셋째, 홍합 생물접착제 Mgfp-5의 분리정제 및 접착능력 연구 및 넷째, 홍합 생물접착제 구성 작용기들의 접착특성 해석 기초 구축이다.

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	출원번호	출원일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
홍합접착단백질 Mgfp-5 및 이의 생산방법	0047815	2002. 8. 13.	차형준 황동수	대한민국	

나. 프로그램 등록목록

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문 게재 실적(필요시 별지 사용)

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지 사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행 기관	국명
한국생물공학회 춘계학회	Cloning and expression of novel mussel adhesive protein from <i>Mytilus galloprovincialis</i>	2002년 10월 9일 ~ 10월 12일		한국생물 공학회	한국
Marine Biotechnology : Basics and Applications	Cloning and expression of novel mussel adhesive protein from <i>Mytilus galloprovincialis</i>	2002년 2월 24일 ~ 3월 1일		European Congress of Biotechnology	스페인
계: 2건수					

3. 연구성과

- FP-1의 model peptide 유전자를 합성하였다.
- Bio-AFM과 유리 표면위에 홍합접착단백질들의 접착능력을 측정하였다. 이 중에서 본 연구 그룹이 처음으로 추출한 Mgf-5의 접착능력을 쉽게 확인 할 수 있었으며, 홍합접착단백질의 화학적 수정 가공 방법과 접착능력 측정을 최적화 한다면, Mgf-5가 상업적으로 활용될 수 있을 것으로 여겨진다.
- 2가지의 홍합접착단백질 FP-1의 모델 펩타이드와 Mgf-5를 동시에 발현시킬 수 있는 조합형 형질 전환된 균주를 제작하였고, 이를 통해서, 최적의 접착능력을 갖는 균주를 찾기 위한 기반을 완성하였다.
- Mgf-5를 대장균에서 접착능력을 유지하면서, 분리 정제하는 방법을 개발하였다. 순도는 90%이상으로 매우 높으나, 수득률이 현재 5% 미만으로, 분리정제법의 개량이 필요하다.
- 거대분자인 생물접착제의 접착특성을 분자수준에서 이해하기 위한 micro-Raman과 SERS를 이용한 모델 펩타이드 주요 작용기들의 접착특성 측정함으로써, 홍합접착단백질의 접착 메커니즘 및 홍합접착단백질이 접착하는데 있어서 중요한 위치를 찾는 기반 연구를 수행하였다.

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

- 홍합접착제 유전자, Mgf-5와 , FP-1의 모델 펩타이드를 이용하여, 여러 가지 홍합접착단백질 조합의 접착능력을 측정할 계획을 가지고 있다.
- Bio-AFM을 사용하여, 홍합접착단백질의 접착 능력을 측정할 수 있는 기술을 습득하였다. 앞으로, 다양한 홍합접착단백질의 접착능력을 이 기술을 통해서 측정할 수 있을 것으로 여겨진다.
- 홍합접착단백질의 분리 정제 방법을 부분적으로 정립함으로써, 홍합접착단백질을 생산한 후 분리 정제하는데 있어서 큰 도움이 될 것으로 여겨진다.

5. 기대효과

가. 기술적 측면

본 과제의 성공적인 수행을 통하여 현재까지 성공하지 못한 생물접착제의 유전학적 대량생산이 가능하게 된다는 것에 그 기술적 의의가 크다고 할 수 있다. 많은 장점에도 불구하고 생물접착제를 위한 시스템으로 성공적이지 못

하였던 대장균 시스템을 이용하여 경제적으로 대량생산하는 기술을 개발하는 것은 낮은 생산단가가 가능하게 됨으로써 통합 생물접착제의 실용화를 이룰 수 있는 breakthrough가 될 것이다. 수중접착, 환경친화적인 접착제 그리고 인체에 무해한 접착제의 개발은 접착제 시장에서, 연구자들이 이상적으로 생각하는 중요한 요소들이기 때문에, 통합접착단백질을 싼 가격에 대량생산 할 수 있게 된다면 접착제 시장에 선두 주자로 발돋움할 수 있을 것이다. 또한 통합 생물접착제의 생화학적 접착 특성 및 대량생산 연구를 통하여 통합과 같은 따개비류가 선박의 밑바닥에 붙어 fouling 현상을 일으키는 것에 대한 방지해결책도 제시할 수 있을 것으로 기대한다. 아울러 본 연구에서 개발하는 세포재설계에 의한 개량된 재조합 단백질 생산용 균주는 특허가 끝나 가격 경쟁력이 중요한 1세대 단백질 의약품 및 산업용 효소와 같은 다른 재조합 단백질의 대량생산에도 성공적으로 적용될 수 있다.

나. 경제·산업적 측면

천연 생물접착제의 값싼 대량 생산공정의 개발을 통하여 생물접착제의 경쟁력이 확보되어 지금까지의 접착제 산업의 많은 부분을 환경 친화적이고 고기능의 천연 생물접착제로 대체할 수 있는 기반이 조성됨으로써 경제적으로 매우 커다란 기대효과가 예상된다. 인간에 무해하고 생분해된다는 장점으로 의료 및 치과 분야에 활용되어 매년 수 백억원씩의 전량 수입에 의존하는 의료용 접착제의 수입대체 효과를 가져오게 될 것이다. 세계 접착제 산업에서 대규모 사용분야는 가구 및 건축자재 분야로 접착제 시장의 50% 이상의 수요를 차지하고 있으므로 생물접착제의 성공적인 활용을 통하여 얻을 수 있는 경제적 이득은 매우 크다. 또한 젖은 표면에의 접착과 방수특성 등의 고기능을 가지므로 수중장비 및 선박 산업계에 널리 활용되어 많은 수요가 예상됨으로써 새로운 마켓을 창출할 수 있고 이로 수반되는 커다란 경제적 이득이 기대된다. 현재 세계 접착제 시장은 미국, 유럽, 일본 등의 선진국이 85% 이상을 차지하고 있는 상황이나 고부가가치 고기능성의 생물접착제의 수출을 통하여 우리나라의 접착제 시장 점유율을 점차 높이고 궁극적으로 접착제 시장을 주도하게 될 것이다. 특히 중국은 접착제 수요의 커다란 잠재력을 지니고 있어 수출 전망을 밝게 하고 있다.

6. 문제점 및 건의사항