

GOVP1200101560

638
L2937

최 종
연구보고서

BSAG940M-2000077-4

곤충유래 유용물질 탐색 및 자원화 기술개발

Development of Bioactive Substances from Insects and Its Utilization

연 구 기 관
생 명 공 학 연 구 소

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “곤충유래 유용물질 탐색 및 자원화 기술개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 12. 20

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 박 호 용(생명공학연구소 책임연구원)

연구원 : 박 순 식(" 선임연구원)

신 상 운(" 선임연구원)

박 두 상(" 선임연구원)

정 태 숙(" 책임연구원)

손 광 희(" 선임연구원)

김 미 광(" 연구조원)

신 동 하(" 연구조원)

서 은 영(" 연구조원)

김 정 화(" 연구조원)

위탁연구기관명 : 인하대학교

위탁연구책임자 : 장 정 순

위탁연구기관명 : 서경대학교

위탁연구책임자 : 김 신 덕

여 백

요 약 문

I. 제 목

곤충유래 유용물질 탐색 및 자원화 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

가. 연구의 배경

- 최근 지구 환경생태계 보전 차원의 생물학적 다양성 보전을 위한 세계적인 움직임과 함께, 유전자원의 확보 및 생물소재 개발이라는 산업적, 경제적 측면에서 유용생물자원의 확보를 위한 국가간의 자원확보 경쟁이 세계적으로 치열해지고 있음. 현존하는 지구상의 생물중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충은 인류보다도 훨씬 더 지구학적 선점자이며 환경에 대한 적응력이 매우 뛰어나 전세계의 도처에 광범위하게 분포하고 있음.
- 이러한 관점에서 보다 광범위하고 다양한 곤충자원을 이용한 유용물질 생산, 즉 신기능 생물소재나 생체활성물질을 개발하기 위한 움직임이 현재 선진국에서 매우 활발히 이루어지고 있으며, 특히 일본의 경우 “곤충기능 이용기술 개발연구”를 1993년도부터 국가생명공학 관련연구 최우선 과제의 하나로 산학연 협동체제로 중점 수행하고 있음.
- 또한 상대적으로 좁은 국토면적과 빈약한 부존자원을 지닌 우리나라의 경우, WTO체제 출범 등 세계적인 개방화 흐름에 적극적으로 대응할 수 있는 국내 자생의 유용농림수산자원을 탐색, 발굴하여 자원화 시키는 기술을 개발하여 국가경쟁력을 극대화 시킬 필요성이 절실히 요청되고 있음.
- 우리가 개발해야 할 고유의 농수산자원의 대상은 매우 많을 수 있겠지만, 그 중에서도 우리나라 생물다양성의 압도적 다수를 차지하고 있으며 ('95년 현재 남한에서 약 10,000

여종의 곤충종이 보고 되었습, 한국곤충명감), 우리나라 고유의 기후대와 환경에 적응하며 살고 있는 유용곤충으로부터 새로운 유용물질을 탐색하고 이를 자원화하려는 분야는 타 생물에 비해 상대적으로 커다란 장점을 지니고 있음. 즉, 곤충은 세대가 짧고, 개체가 작은 특징으로 인해 시간적, 공간적 및 인력적인 면에서 자원 확보 및 이용면에서 매우 효율적이고 경제적이기 때문임.

곤충이 고생대때부터 지금까지 타생물들에 비해 압도적으로 번성할 수 있었던 이유는 수분손실이 적고 단단하고 가벼운 몸 구조를 가지고 있어 활동에너지 효율이 높을 뿐만 아니라 유충과 성충간에 섭식요구 먹이가 달라 서로 경쟁이 없고 휴면, 변태 등을 통해 저온, 고온, 건조등 외부환경 및 물리적 장애나 외부침입 병원체에 대해 강한 자체방어능력을 지니고 있기 때문임.

곤충의 이러한 특성을 이용하여 신기능 생물소재나 생체활성물질을 탐색 개발하는 연구가 활발히 진행되어 왔습. 곤충이용 기술 및 산업은 오래전부터 인간이 이용해온 꿀벌이나 누에등 식품이나 섬유소재, 환경오염 지표생물용 등의 분야에서 널리 이용되어 왔습. 최근에는 생명공학기술의 발달과 함께 풍부한 생물다양성으로 인해 초파리등 분자생물학적 연구의 유전자 소재와 거미줄을 이용한 항공우주복 섬유개발, 생체접착제, 인공피부, 화장품용 천연색소, 반딧불 유전자이용 생체발광시스템 개발등에 이용되고 있음. 특히, 곤충유래생체활성물질을 이용한 순환기 질환치료제와 항생제, 소염제, 면역기능조절제, 항암제 개발을 위한 연구도 활발히 진행중이며 곤충세포를 이용한 인슐린, 인터페론, 백신 등의 의약품 생산은 이미 일부가 실용화 되고 있음. 일본의 경우 바이오농약, 곤충이용 의약품생산, 곤충이용 환경정화, 곤충이용 농업 등 곤충산업 시장규모가 97년에는 연간 약 2조 4천억원에 달할 것으로 예상되는 등 세계적으로 곤충이용 기술연구 및 산업개발이 산학연의 체계적인 협동연구 형태로 경쟁적으로 진행되고 있음. 우리나라에서도 극히 최근부터이지만, 유전자원으로서의 곤충자원에 관한 중요성을 인식하고 '유용생물자원사업'과'과학기술 2000 계획'국가기술 분류체계 및 과기처 지원'곤충자원 이용기술 연구회'등을 통해 국가정책차원에서의 관련사업을 지원 또는 수행중에 있고 일부 출연연구소 대학 및 민간기업에서도 관련연구에 참여하는 등 곤충자원 이용기술 분야의 응용잠재력은

곤충이 차지하고 있는 생물다양성 만큼이나 무한히 크게 기대되고 있어 국가정책적 차원에서 범부처적 협력, 지원이 절실히 요청됨.

본 연구에서는 이와 같은 곤충의 서식지 및 행동특성을 고려한 뛰어난 생존능력 및 생체방어 기작을 이용하여 활용가능성이 높은 곤충자원 및 유용물질을 탐색하고, 이러한 물질을 생산하는 유용곤충 및 물질의 대량생산기술을 개발하여 유용자원화 하고자 함. 이를 위해 국내 자생하고 있는 곤충자원 (말벌, 꿀벌, 흰점박이꽃무지 등), 한국산 거미류 (무당거미, 말거미, 말꼬마거미 등) 및 전통생약 이용 곤충 (금붕어, 노봉방, 동충하초, 백강잠, 등에, 원잠아 등)을 유용 탐색 곤충으로 하여 항생물질을 비롯한 유용물질의 분리, 정제, 특성분석 및 대량생산기술 개발을 통하여 곤충자원의 부가가치 증대, 농가소득 향상 및 곤충관련 신기술 산업을 도출하고자 함.

나. 연구개발의 필요성

● 기술적 측면

- 새로운 생체활성물질 탐색, 분리·정제 및 특성분석 기술 개발 필요
- 유용곤충자원 탐색 및 확보기술 확립 요구
- 생물다양성 협약 이행을 위한 국가 생물자원 보전기술 획득, 기반 마련

● 경제·산업적 측면

- 곤충 유래 생체활성물질 산업화로 신농약·신의약 개발 필요성 대두
- 곤충자원 이용 신기술 관련 산업군 도출 움직임.
- 관련 물질특허, 제조특허등 산업재산권 확보로 선진국의 특허 장벽 극복
- 토착 곤충자원 활용 및 부가가치 증대로 농가소득 향상
- 특허, 양봉, 양잠업등 곤충관련 산업의 혁신적 발전 기반 구축.

● 사회·문화적 측면

- 환경친화적 관련 기술개발로 그린라운드(GR)에 효과적으로 대응
- 한국 고유 곤충자원 발굴, 이용으로 세계화에 능동적 대처
- 전통적 곤충산업 (양봉, 양잠 등)의 혁신적 계승, 발전으로 국민정서 부양

III. 연구개발의 내용 및 범위

연구개발목표	연구개발내용 및 범위
<p>유용 곤충 및 곤충유래 유용물질 탐색, 확보</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 정보, 문헌, 자료수집 및 전문가 면담 - 대상곤충 탐색 및 확보 (한국산 곤충자원, 한국산 거미류, 전통생약이용 곤충 자원 등, (예) 말벌, 무당거미, 굽벥이 등) - 유용물질 탐색및 분리 (항생물질, 신기능 단백질 분해효소, 간기능 개선 물질, 혈당강하및 혈압조절물질 등.) - 곤충인공사료 개발, 사육시설 및 조건 구축 (곤충생리, 병리, 유전학적 모니터링 시스템 이용)
<p>유용 곤충 확보 및 유용물질 정제, 특성 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 꿀벌, 말벌의 Venom 및 Propolis로 부터 항생, 소염 활성물질 정제, 특성 연구 - 거미 기관별 효소 정제 및 특성연구 체액, Silk gland, egg, whole body로부터 효소의 완전정제, 특성분석 및 아미노산 서열 결정 - 굽벥이, 백강잠, 원잠아등으로부터 간기능 개선, 혈당강하, 혈압조절 물질 등의 정제, 특성분석 - 실험실내 소규모 곤충인공사육시스템 구축
<p>유용물질 특성분석, 효능 및 안전성 검증</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 흰점박이꽃무지, 흰불나방등으로부터의 항생물질 생물검정, 꿀벌 Venom 및 Propolis의 생물활성 검정 - 거미내 효소의 자연적 억제제 존재 유무 및 기존효소와의 특성 비교, 각 기관별 특정효소에 대한 억제제 분리· 정제, 기존의 대표적 가수 분해 효소와의 특성비교 - 전통 생약 이용 곤충자원의 임상자료 이용, 생체활성물질의 효능 및 독성 검정 - 유용곤충자원의 대량 인공사육 시도
<p>곤충유래 유용물질 대량생산 시스템 및 상업적 최적화 조건 구축</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유용물질 대량생산 시스템 구축 물질특성에 따른 대량생산 시도, 유용곤충의 대량사육, 추출 - 유용곤충유래물질의 응용범위 확대시험 및 관련유전자 발현 시도 - 곤충유래 신물질의 작용기작 규명 동물, 임상시험을 통한 안전성 검정 - 유용곤충의 대량인공사육기술의 농가보급 및 농공단지, 공장생산시 경제적 공정개발 등
<p>유용곤충 및 유용물질의 자원화기술 확 립 및 산업적 생산</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 유용곤충자원화 기술 확립 소득증대목적의 농가보급을 고려한 적용기술 개발 - 유용곤충 및 유용물질의 산업적 생산 곤충 및 유용물질을 신의약, 농약, 식품 및 산업소재로 활용하기 위한 응용시험

VI. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

곤충유래 유용물질 탐색 및 자원화 기술 개발을 위하여 본 연구에서는 다양한 종류의 곤충으로부터 유용 물질의 탐색을 실시하였으며 그 중 다수의 생리활성물질, 항생활성물질 또는 효소를 확보, 생산하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

가. 한국산 곤충유래 항생물질을 포함한 유용물질의 탐색 개발

1) 잣나무넓적잎벌 (*Acantholyda parki*)로부터 항생활성물질 *p*-hydroxycinnamaldehyde의 분리 및 대량생산공정 개발

잣나무넓적잎벌의 유충으로부터 그람양성균, 그람음성균 및 fungi에 대한 항생활성이 우수한 저분자 (분자량 148.05 Da)의 항생활성물질 *p*-hydroxycinnamaldehyde를 분리하였으며 그 구조를 해명하였다. 또 이의 대량생산을 위한 유기화학적인 합성 공정을 개발하였으며 합성된 물질이 천연에서 분리된 물질과 동일한 활성을 나타냄을 확인하였다.

2) 말매미에서 분리된 cryptonin의 작용기작 해명

cryptonin은 말매미에서 분리된 항생활성펩타이드로서 24개의 아미노산으로 구성되어 있으며 그람양성균, 그람음성균 및 일부 fungi에 대한 높은 항생활성을 가지고 있다. cryptonin의 항생활성기작을 해명하기 위하여 N-말단과 C-말단으로부터 deletion을 실시하였으며 양친매성 α -helix가 활성에 중요한 역할을 담당하고 있음을 밝혔다. 또 confocal laser scanning microscope를 이용한 형광표지관찰을 통하여 이 펩타이드의 작용부위가 세포외피에 있음을 조사하였고 FACS를 이용하여 PI의 유입율을 조사하여 cryptonin이 대장균에서 세포막의 투과성을 교란함으로써 그 활성을 나타낸다는 것을 해명하였다.

3) 곤충공생미생물 유래 단백질 분해효소의 분리 및 특성과 대량생산

한국산 무당거미(*Nephila clavata*)의 장으로부터 분리한 단백질 분해효소 생산 미생물은 eubacteria, gamma-subdivision, enterobacteriaceae에 속하는 기존에 전혀 보고된 적이 없는 새로운 미생물인 것이 밝혀 졌으며 (특허균주 기탁 0268BP) 이를 *Aranicola proteolyticus*로 명명하였다. 본 균주로부터 단백질 분해효소 51.5 kDa의 단백질 분해효소를 분리, 정제하였으며 그 구조적 특성분석을 위해 부분 아미노산 서열을 분석한 결과, *Serratia marcescens*로부터 보고된 srralysin(EC. 3. 4. 24. 40)과 높은 상동성을 나타내었다. 또한 단백질 분해효소의 유전자로부터 code되는 단백질의 아미노산 서열을 기존에 알려진 metalloprotease의 아미노산서열과 비교 하였다. 대부분의 metalloprotease에 보존되는 Zn 결합부위와 효소활성 부위의 아미노산 서열이 *A. proteolyticus* HY-3 단백질 분해효소의 유전자의 아미노산 서열에서도 보존되는 것이 확인 되었으며 유전자로부터 code되는 단백질이 Zn를 갖는 metalloprotease임을 알 수 있었다. 또한 생산된 단백질 분해효소를 분리 정제하는 system을 확립할 수 있었으며 효소학적인 특성을 조사해본 결과, 저온에서 상대적으로 높은 활성을 유지하고 있었으며 넓은 범위의 pH에서 단백질 분해활성을 나타내었다. 발효조 대량 배양의 진행과정을 확립하여 산업적으로 이용 가치를 확인하였다.

4) 벌독으로부터 ACAT와 CETP 활성저해물질의 분리

꿀벌독의 추출물이 acyl-CoA : cholesterio acyltransferase (ACAT)와 cholesteryl ester transfer protein (CETP)에 대한 강한 저해활성을 나타내었고, 역상 HPLC를 이용하여 이로부터 ACAT와 CETP의 활성저해물질을 분리하였다. 매트리스보조레이저 탈착 질량분석기를 이용한 이온화법으로 분자량을 측정한 결과, $16,148 \pm 200$ 임을 아 수 있었고, 단백질 서열결정법을 이용하여 분리된 N-말단 아미노산 서열 분석 결과 phospholipase A₂와 높은 상동성을 보였다. 쥐간의 microsomal ACAT와 사람의 CETP를 이용한 효소활성 분석에서 이 물질의 IC₅₀치는 각각 3.9 ug/ml와 1.3 ug/ml 이었다.

5) 흰점박이꽃무지의 대량인공사육 및 신기능 소재로의 활용에 대한 연구

민간생약곤충으로 이용되어지는 흰점박이꽃무지의 실내사육을 위한 인공사육을 개발하였으며 이를 이용하여 실내사육 및 대량사육을 실시하였다. 또 전통생약재료로서의 흰점박이꽃무지의 효능을 검증하기 위하여 간질환과 관련된 동물실험을 실시한 결과 현저한 간보호기능을 확인하였다.

나. 한국산거미류의 신기능성 단백질 분해효소 특성 및 이용

무당거미(*Nephila clavata*)로부터 trypsin유사 단백질분해효소를 정제하기 위하여 acetone fractionation, DEAE-Sepharose 및 SBTI-Sepharose affinity chromatography의 과정을 통하여 정제하였다. 정제된 단백질분해효소의 분자량은 Superose 12HR을 이용한 FPLC와 SDS-PAGE로 확인한 결과 24-25KDa의 single polypeptide였다. 정제된 효소의 최적pH 및 pI값은 각각 pH 8.0 및 pH 4.0 이었고 정제효소의 효소능은 pH8.0 및 30-50 °C에서 안정하였으며 전형적인 serine protease 억제제인 APMSF, benzamidine, LBTI, SBTI 및 TLCK등으로 억제되었다. 이러한 결과로 미루어 정제된 단백질분해효소는 serine protease라고 생각된다.

한편 정제된 효소와 16종류의 synthetic peptide유도체 기질과의 반응결과 Z-Arg-Gly-Arg-pNA(S-2765) 및 Benz-Ile-pyroGlu-Gly-Arg-pNA(S-2222)등에서 기질특이성을 나타냈으며 정제된 효소는 prothrombin을 thrombin으로 매우 원활히 전환시키는 특성을 갖고 있었다.

다. 생약곤충으로부터 생리활성물질 개발

1) 선퇴로부터 CETP 저해제의 분리 및 동정

한방재료로 이용되어지는 선퇴의 아세톤 추출물로부터 CETP에 대한 저해활성을 가진 물질을 분리하였다. 구조분석 결과 분리된 물질은 dioctyl phthalate로 판명되었으며, 이 화합물

과 그 유도체들을 이용하여 CETP 활성에 대한 저해효과를 조사한 결과 dioctyl butalate의 경우 IC₅₀치가 5.7 uM이었으며 dibutyl phthalate, dicyclohexyl phthalate와 benzyl butyl phthalate의 IC₅₀치는 각각 30.8, 36.0, 126.5 μM로 비교적 강한 억제 활성을 나타내었다.

2) Pancreatic lipase 및 α-glucosidase 저해활성물질의 탐색

여러 가지 생약곤충 시료로부터 pancreatic lipase 및 α-glucosidase에 대한 저해활성물질을 탐색하였으며 그 중 전갈과 흰개미의 메탄올추출물에서 α-glucosidase에 대한 활성저해물질을 탐색하여 정제를 실시하였으며, 꿀벌의 독, 백강잠 및 동충하초의 메탄올 추출물로부터 pancreatic lipase 저해활성을 보이는 물질을 탐색하고 특히 꿀벌독으로부터 높은 저해활성물질을 분리하여 구조분석을 시도하였다.

2. 연구개발 결과의 활용 계획

본 연구결과를 통하여 관련 기초연구에 활용 및 유용곤충의 대량 사육등을 통한 농가의 소득 증대, 관련 신 산업군 창출이 가능하며 환경친화적 생물자원 이용기술 개발 효과와 관련 특허 및 결과 이용으로 국가 산업 경쟁력 강화에 활용할 계획이다.

여 백

SUMMARY

I. TITLE

Development of useful substances from insect resources

II. PURPOSE OF THE RESEARCH

Insects constitutes the largest group of extant organism, and perhaps their individual number account for as much as 80% of all known fauna and are important components of the natural ecosystems. Therefore, they are suggested to be a useful source of bioactive substances. At this research we tried to screen some bioactive substances from various insect resources. For this purpose, we used the insect self defense mechanism to isolate a new antibiotic material, isolated and identified some insect symbiotic microorganisms which produce useful enzymes, and screened a lot of insect resourecs which were known as a fork medicine to find a useful substance.

III. RESULTS AND SCOPE OF THE RESEARCH

1) An antibacterial substance was purified from larvae of the saw fly, *Acantholyda parki* S., and identified its molecular structure as p-hydroxycinnamaldehyde. We then synthesized it by reduction of p-hydroxycinnamic acid. The antibacterial activity of the synthetic p-hydroxycinnamaldehyde was equal to that of the authentic substance. This molecule was found to have a broad antibacterial spectrum against not only Gram-negative, but also Gram-positive bacteria. Furthermore, it showed antifungal activity against *Candida albicans*. We suggest that this substance may play a role in the defense system of this insect. This is the first report of p-hydroxycinnamaldehyde of animal origin.

2) We investigated the mechanism of action of cryptonin and compared it with the membrane-active antimicrobial peptide magainin II. The amphipathic α -helix was important for the antimicrobial activity. To monitor the active site of cryptonin in *E. coli*, biotin-labeled cryptonin and magainin II were incubated *E. coli*, and their localization. bacterial cell surface was visualized using streptavidin-FITC. Cell membrane-permeabilizing phenomenon was investigated using flow cytometric analysis. This result suggest that the action mode of cryptonin might be, a membrane-permeabilizing peptide. These results may provide new insight into designing peptides with even higher antimicrobial activity and understanding of molecular mechanism of cell- killing action of antimicrobial peptide.

3) A protease producing insect symbiotic bacteria was isolated from the intestine of *Nephila clavata*. It was identified as a novel strain which classified into enterovacteriaceae (gamma subdivision) and named *Aranicola proteolyticus* (patent strain 0268BP). A novel type of 51.5 kDa protease was isolated and characterized from the strain. The amino acid sequence of the protease was highly homologous to srralysin (EC. 3. 4. 24. 40) which isolated from *Serratia marcescens*. The 51.5 kDa protease was identified as a metalloprotease and showed endo-type cleavage characteristic. The enzyme has relatively high activity at low temperature and showed broad range activity of pH. To optimize the industrial fermentation condition, several medium and growth condition were tested.

4) The extract of honey bee venom showed high inhibition activities of acyl-CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT) and cholesteryl ester transfer protein(CETP). Isolation of ACAT and CETP inhibitor was achieved by reverse phase HPLC. From the MALDI-TOS/MS spectroscopy and the protein sequencing system, the molecular weight

of this compound was determined as $16,148 \pm 200$ and it was a peptide containing 25 amino acids. It seemed to have a similar structure to that of phospholipase A₂. The compound inhibit rat liver microsomal ACAT and human CETP activity *in vitro* assay system with IC₅₀ values of 3.9 $\mu\text{g/ml}$ and 1.3 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

5) Identification and utilization of a new-functional protease from *Nephila clavata*

A protease was isolated and purified from the *Nephila clavata* using acetone fractionation, DEAE-sepharose and SBTI-Sepharose chromatography. Molecular weight of the purified protein was 24-25 kDa in SDS-PAGE and Supreose 12 HR gel chromatography. Optimum pH of the protein was pH 8.0 and the pI value was pH 4.0. The enzyme activity was stable at 30 - 50 °C and inhibited by serine type protease inhibitor PMSF, benzamidine, LBTI, SBTI and TLCK. Substrate specificity of the protease was determined using 16 synthetic peptide analogue.

6) The plasma cholesteryl ester transfer protein (CETP) is a lipid transfer protein, which mediates the transfer of cholesteryl ester and triglyceride between high-density lipoprotein (HDL) and other low-density lipoproteins (VLDL, LDL). Dioctyl phthalate was isolated from acetone extract of *Periostracum Cicadae*, the cast off skin of *Cryptotympana atrata* by SiO₂ column chromatography and reverse phase HPLC. Dioctyl phthalate inhibits the cholesteryl ester transfer activity of CETP from human palsma with an IC₅₀ of 5.7 mM. The phthalate analogs have also inhibitory activities against CETP. This is the first report that the phthalates inhibit the CETP activity.

여 백

CONTENTS

SUMMARY / 3

Chapter 1 INTRODUCTION / 21

Chapter 2 ISOLATION OF BIOACTIVE SUBSTANCE FROM INSECT RESOURCES / 23

1. Isolation of *p*-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki* S. / 23
2. Functional analysis of cryptonin isolated from *Cryptotympana dubia* / 35
3. Identification and mass production of a novel protease isolated from a insect symbiotic microorganism / 54
4. Isolation of ACAT and CETP inhibitor from Honey Bee Vemon / 89

Chapter 3 IDENTIFICATION AND UTILIZATION OF A PROTEASE FROM
NEPHILA CLAVATA / 103

Chapter 4 ISOLATION OF BIOACTIVE SUBSTANCE FROM INSECT RESOURCES
WHICH WERE KNOWN AS A FOLK MEDICINE / 131

1. CETP inhibitory activity of dioctyl phthalate, isolated from *Periostracum Cicadae* / 131
2. Isolation of pancreatic lipase inhibitor and α -glucosidase inhibitor from insect resources / 143

Chapter 5 ACHIEVEMENT AND CONTRIBUTATION / 151

Chapter 6 UTILIZATION OF RESULTS / 153

여 백

목 차

요 약 문 / 3

제 1장 서 론 / 21

제 2장 한국산 곤충유래 항생물질을 포함한 유용물질의 탐색 개발 / 23

제 1절 잣나무뽕적잎벌로부터 항생활성물질 *p*-hydroxycinnamaldehyde의 분리 / 23

제 2절 말매미에서 분리한 항생활성펩타이드 크립토닌의 작용양식 규명 / 35

제 3절 곤충공생미생물 유래 단백질 분해효소의 분리 및 특성과 대량생산 / 54

제 4절 벌독으로부터 ACAT와 CETP 활성저해물질의 분리 / 89

제 3장 한국산 거미류의 신기능성 단백질 분해효소 특성 및 이용 / 103

제 4장 생약곤충으로부터 생리활성물질 탐색, 개발 / 131

제 1절 선퇴로부터 CETP 저해제의 분리 / 131

제 2절 곤충유래 α -glucosidase 저해물질의 분리, 정제 및 특성 / 143

제 3절 곤충유래 pancreatic lipase 저해활성물질 분리, 정제 및 특성 / 146

제 5장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 / 151

제 6장 연구개발결과의 활용계획 / 153

여 백

제 1 장 서 론

곤충은 고생대 때부터 지금까지 다양한 환경의 변화에 적응하여 진화 발달하였으며 그 결과 현재 지구상의 전 지역에서 다양한 생활방식으로 매우 번성하고 있다. 이러한 곤충의 종 다양성에 대한 잠재가치는 매우 크다고 할수 있으며, 최근 이런 관점에서 보다 광범위하고 다양한 곤충자원을 이용한 유용물질 생산, 즉 신기능 생물소재나 생체활성물질을 개발하기 위한 움직임이 주요 선진국에서 활발히 이루어지고 있다. 곤충이용기술 및 산업은 오래전부터 인간이 이용해온 꿀벌이나 누에 등 식품이나 섬유소재, 환경오염 지표생물용 등의 분야에서 널리 이용되어 왔다. 최근에는 생명공학기술의 발달과 함께 풍부한 생물다양성으로 인해 초파리등 분자생물학적 연구의 유전자 소재와 거미줄을 이용한 특수소재, 곤충유래의 생체활성물질의 개발에 대한 연구가 진행, 또는 실용화 되어지고 있으며 또한 매우 성장성이 큰 산업이 될 것으로 예측되어지고 있다.

본 연구에서는 새로운 농수산 자원의 도출을 위하여 우리나라 생물다양성의 압도적 다수를 차지하고 있는 곤충들 중에서 유용자원으로 이용할수 있는 곤충자원을 개발하고자 하는 목적과, 이들 유용곤충자원으로부터 새로운 유용물질을 탐색하고 이를 자원화 하고자 하는 연구를 수행하였다. 그 중 곤충의 생체방어 기작을 이용한 새로운 종류의 항생활성물질의 탐색 및 생산과 곤충공생미생물을 이용하여 유용한 물질을 생산하고자 시도하였으며, 곤충으로부터 유용생리활성물질을 확보함으로써 농가수익증대를 가져올수 있도록 하는 연구를 시도하였다. 그 외에도 곤충이 가지고 있는 단백질 분해효소의 분리와 특성의 규명, 여러 가지 생약곤충으로부터 유용생리활성물질을 개발하고자 하였으며 이를 각 분야로 나누어 그 결과와 이용가능성을 제시하였다.

여 백

제 2 장 한국산 곤충유래 항생물질을 포함한 유용물질의 탐색 개발

제 1 절 잣나무넓적잎벌의 유충으로부터 항생활성물질 *p*-hydroxycinnamaldehyde의 분리

1. 서 설

곤충은 외부 이물질의 침입에 대항하기 위하여 여러 가지 종류의 방어물질들을 합성하는 것으로 알려져 있으며 여러 가지 종류의 항생활성펩타이드와 세포성 면역 및 체액성 면역에 관여하는 다양한 종류의 단백질들이 이러한 방어기작에 이용되어진다 (Boman, 1991; Boman et al., 1987; Dunn, 1986; Natori, 1987). 이러한 단백질들은 각각 독립된 유전자들에 의해 encode 되어 있으며 감염이나 외부이물질의 인식에 의하여 선택적 발현이 일어난다. 이러한 발현은 NF- κ B와 같은 분자의 작용에 의한 Rel family에 속하는 유전자들 및 Tor나 Cactus와 같은 신호전달 체계를 이용하는 것으로 보고되어 있다 (Sun and Faye, 1992; Kobayashi et al., 1993). 곤충은 지구상의 생물종중에 가장 높은 다양성과 종의 수를 가지고 있으며 이러한 곤충의 다양성을 이용한 새로운 생리활성물질을 탐색하는 source로서 인식되어지고 있으며 현재 200여종 이상의 항생활성펩타이드들이 발견되어졌고 이 중 일부는 실제로 새로운 항생제로의 개발이 이루어지고 있다. 그러나 많은 경우에 있어서 곤충의 항생활성펩타이드는 3000Da 이상의 분자량을 가지고 있으며 그로 인한 약제로서의 개발에 제한을 받고 있는 실정이다. 최근 Leem 등은 fresh fly, *Sarcophaga pergrina*로부터 분자량 573 Da의 항생활성물질 5-S-GAD를 분리하고 그 활성을 검정하였으며 이 분자가 tyrosine kinase를 저해한다는 사실을 보고한 바 있다 (Leem et al., 1996; Hijikata et al., 1997; Leem et al., 1998). 잣나무넓적잎벌 (*Acantholyda parki*)은 잣나무를 가해하는 벌목의 곤충

으로서 (Shinohara and Byun, 1996) 국내에서는 전통적인 생약으로서 사용되어졌다. 본 연구에서는 이러한 점에 착안하여 잣나무넓적잎벌을 이용하여 유용한 물질을 탐색하던 중 저분자의 항생활성을 가지는 물질을 발견하여 이를 정제하고 그 특성 규명 및 대량생산을 위한 합성체계를 구축하였다.

2. 재료 및 방법

가. Insect

잣나무넓적잎벌은 강원도와 경기도 일원의 잣나무 밀생지역에서 11월-2월경에 야외채집하여 실험에 이용하였다.

나. Immunization 및 crude extract의 준비

약 1,000여마리의 유충에 대장균 배양액 (*E. coli* K12 594)을 묻힌 바늘로서 상처를 낸 후 이를 27°C에서 24시간 방치한 다음 0.1% trifluoroacetic acid (10 ug/ml aprotinin 함유)에서 homogenize하였다. 이 용액을 35,000 x g에서 30 분간 초원심분리한 다음 그 상등액을 0.45 um filter를 이용하여 filtration하여 분리를 위한 출발물질로 이용하였다.

다. 항생활성물질의 정제

초원심분리를 통하여 얻어진 crude extract를 0.05% TFA로서 평형화된 ODS-AM fresh column에 loading한 다음 10% acetonitril (0.05% TFA)로서 용출하였다. 얻어진 각 분획을 speed-vac으로서 건조한 다음 증류수로 용해하여 항생활성을 측정하였다. 그 결과 항생활성이 나타난 분획을 수집하여 0.1% TFA로 평형화된 YMC-Pack ODS-A reversed=phase column에 loading 하여 acetonitril (0.1% TFA) 0-20%의 linear gradient로서 용출하였다. 얻어진 분획의 항생활성을 측정하여 활성 분획을 수집한 다음 TSK gel Carbon-500 column (150 x 4.6 mm; Tosoh, Toyko, Japan)을 이용하여 normal-phase HPLC를 실시하였다. 0-30%의 acetonitril의 linear gradient로서 용출하였을 때 단일 peak로

서 분리되는 활성분획을 검출하였으며 순수분리여부를 RP-HPLC로서 확인하였다. 분리된 항생활성물질의 정량은 Lowry 등의 방법 (1951)을 이용하였으며 4-hydroxycinnamic acid를 기준물질로 이용하였다. 모든 HPLC 과정은 HP 1050 system (Hewlett-Packard, California, USA)을 이용하였으며 220 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

라. 항생활성의 검정

항생활성의 검정은 *E. coli* K 12 594 (*Str^r*)을 기준균주로 하여 액체배양상태에서 측정하였다. 대장균의 배양에는 antibiotic medium (Difco, Michigan, USA)을 이용하였으며 대수기의 세포를 수집한 후 10 mM phosphate buffer (130 mM NaCl, 0.2% BSA, pH 6.0)로서 2.5×10^8 cell이 되도록 현탁한 다음 이를 동일배지로서 300배 희석하였다. 10 mM phosphate buffer (130 mM NaCl, 0.2% BSA, pH 6.0)를 포함하는 시료를 100 ul의 미생물 현탁액과 섞은 다음 96-well plate에서 37°C에서 5시간 배양한 다음 650 nm에서의 흡광도를 Emax Microplate reader Precision (Molecular Devices Co., California, USA)로서 측정하였다. Positive control로서 cecropin을 이용하였으며 negative control은 동일량의 buffer만을 첨가한 용액으로 정하였다. 항생활성의 specificity 결정을 위하여 사용된 균주들 또한 antibiotic medium을 이용하였으나 fungi의 경우 Sabouraud medium (Difco)을 이용하였다.

마. *p*-hydroxycinnamaldehyde의 동정

시료의 UV spectrum은 Spectronic 3000 ARRAY spectrophotometer (Milton Roy, New York, USA)를 이용하였으며, IR spectrum은 DIP-140 spectrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan)를 이용하였다. 고해상도 mass spectra는 JMS-SX 102A mass spectrophotometer (JEOL, Tokyo, Japan) electron impact (+) mode에서 perfluorokerosene를 internal standard로 이용하여 측정하였다. 모든 NMR spectra는 DMX 600 spectrometer (Bruker, Germany)를 이용하였다.

바. *p*-hydroxycinnamaldehyde의 합성

p-hydroxycinnamaldehyde의 합성은 Duran 등 (1951)의 방법을 이용하였다. 2.79 mg의 *p*-hydroxycinnamic acid에 15 ml의 anhydrous tetrahydrofuran 용액에서 4.27 mg의 dimethyl chloromethylene ammonium chloride를 첨가한 다음 상온에서 30 분간 교반하였다. 그후 33.33 ml의 1 M LiAl(OtBu)₃H를 첨가하고 -78°C에서 반응액을 CuI와 혼합하였다. Reduction의 quenching을 위하여 6 N HCl 4 ml을 반응액에 첨가한 후 TLC로서 합성된 *p*-hydroxycinnamaldehyde를 검출하였다. 이상의 과정을 통하여 얻어진 화합물을 reversed-phase HPLC로서 정제하여 실험에 이용하였다.

3. 결 과

가. 잣나무넓적잎벌로부터 항생활성물질의 정제

잣나무넓적잎벌로부터 5-S-GAD와 유사한 저분자의 항생활성물질을 분리하기 위하여 *Sarcophaga*로부터 이를 분리했던 방법을 도입하여 분리과정을 시도하였다 (Leem et al., 1996). 그 결과 C18 ODS-AM column 크로마토그래피의 10% acetonitril의 용출분획으로부터 항생활성분획을 검출할수 있었으며 계속된 정제과정을 통하여 저분자의 정제된 분획을 획득하였다 (Fig. 1). 각 정제과정에서의 회수율은 Table 1에서 보는 바와 같다.

나. 항생활성분획의 분자구조 결정

정제된 항생활성분획의 UV 최대흡광도는 233-325 nm에서 나타났으며, IR absorption 은 3120, 1645, 1600-1500, 970 cm⁻¹에서 검출되었으며 이는 phenolic OH, conjugated carbonyl, olefinic double bond, aromatic nucleus, *trans* form의 olefinid double bond 등이다. 이 물질의 mass 값이 148.0521로 나타났으며 ¹H NMR과 ¹³C NMR결과 (Table 2)들을 종합 하여 C₉H₈O₂의 분자식을 가지는 3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenal로 결정하였다 (Fig. 2). 이 물질은 plant *Alpinia galanga* (Barik et al., 1987)와 *Sarcophyta sanguinea* (Naidoo et al., 1992)의 뿌리에서 이미 보고된 물질로서 *p*-hydroxycinnamaldehyde라고도 하며 동물에서 이 연구결과가 최초의 보고이다.

다. *p*-hydroxycinnamaldehyde의 합성

잣나무잎적잎벌에 존재하는 *p*-hydroxycinnamaldehyde를 분리 정제하는데는 여러 단계의 정제 과정 및 수율의 감소로 인한 어려움이 있다. 이러한 방법을 극복하기 위하여 이를 화학적으로 합성하였으며 (Fig. 3) TLC 분석 시 반응 초기물질인 *p*-hydroxycinnamic acid의 band가 줄어들고 이에 대응하여 Rf치 0.32의 새로운 band가 나타나는 것을 확인하였으며 이 band가 더 이상 커지지 않는 시점을 반응종결점으로 결정하여 반응을 종결시켰다. 반응 결과 얻어진 산물을 추출과 세척과정을 통하여 흰색의 분말을 얻었으며 TLC를 통해 생성물을 확인하고 HPLC로서 이를 정제하였다. 정제된 *p*-hydroxycinnamaldehyde는 HPLC와

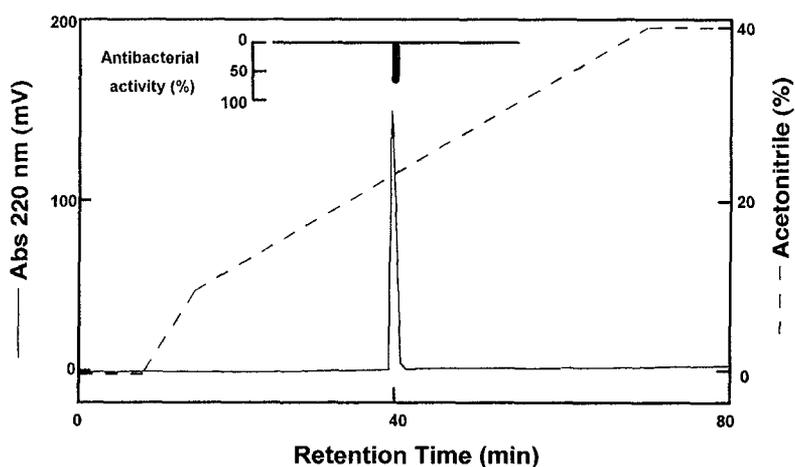


Fig 1. Reverse-phase HPLC profile of antibacterial substance. The UV absorption at 220 nm was monitored (*solid line*). Fractions were concentrated and assayed for antibacterial activity (*inset*). Chromatographic conditions were: column, YMC-Pack ODS-A, S-5, 120A, C18 250 × 4.6 mm; solution A, 0.1% trifluoroacetic acid; solution B, 0.1% trifluoroacetic acid in 40% acetonitrile; linear gradient of 0-50% solution B in solution A (*dotted line*) ; flow rate, 1 ml/min.

Table 1. Summary of purification of the antibacterial substance

Purification step	Total activity ^a (units)	Total amount ^b (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Whole body extract	ND ^c	ND	ND	
C18 chromatography	3592	945.3	3.8	100
1st-C18 HPLC	2430	40.5	60.0	68
Carbon 500 HPLC	725	5.8	125.0	20

a One unit of antibacterial activity was defined as the amount causing 50% inhibition of bacterial growth relative control.

b Total amount of antibacterial substance was determined by the method of Lowry *et al.* with 4-hydroxycinnamic acid as the standard.

c Not determined

Table 2. Summary of ¹³C AND ¹H NMR spectral data for the antibacterial substance in D₂O
The proton signal multiplicity and coupling constant (*J*=Hz) is given in parentheses.

Position	δ C	δ H
olefinic CH-2	126.1	6.69 (1H,dd, <i>J</i> = 15.7 Hz)
Aromatic CH-3,5	117.6	6.96(2H, d, <i>J</i> = 8.6 Hz)
Aromatic CH-2,6	132.8	7.66(2H, d, <i>J</i> = 8.7 Hz)
Olefinic CH-1	158.2	7.74(1H, d, <i>J</i> = 15.6 Hz)
Aromatic C-4	161.1	-
-CHO	199.5	9.51(1H, d, <i>J</i> = 8.2 Hz)

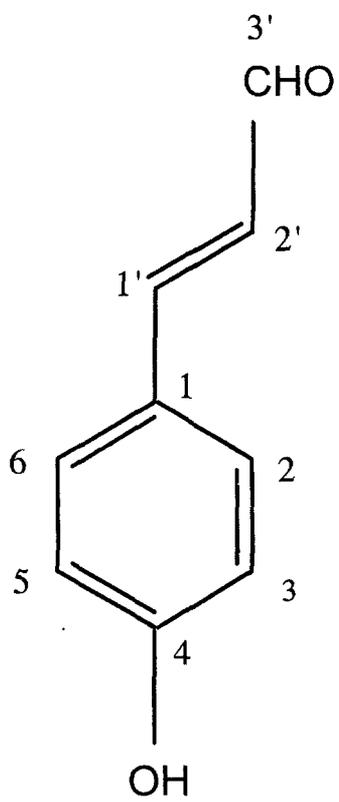
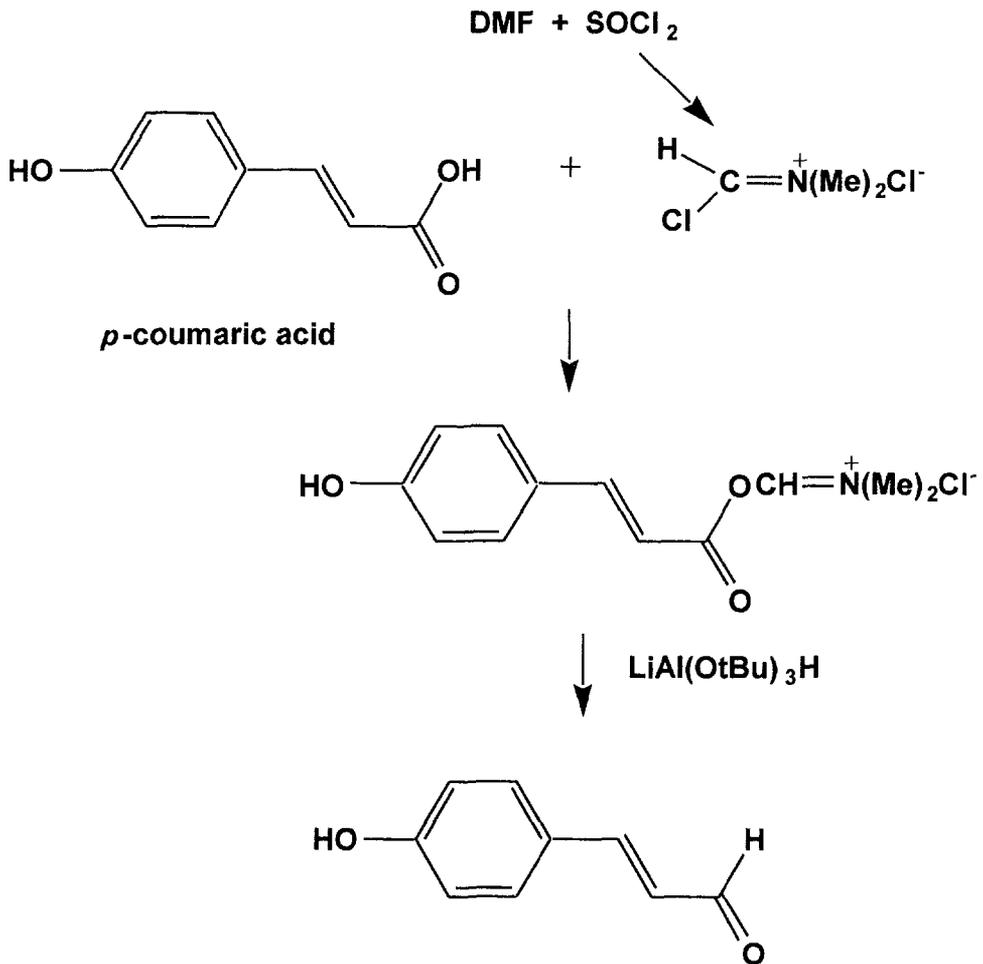


Fig. 2. Structure of *p*-hydroxycinnamaldehyde



Scheme of synthesis of *p*-coumaraldehyde

Fig. 3. Scheme of synthesis of *p*-hydroxycinnamaldehyde

수소-핵자기공명 분석에 의해 정성을 실시한 결과 잣나무넓적잎벌에서 정제된 물질과 동일한 물질로 판명되었다. 합성된 *p*-hydroxycinnamaldehyde의 대장균에 대한 항생활성을 조사하여 본 결과 천연에서 분리된 물질과 동일한 항생활성을 가지는 것으로 판명되었다.

라. *p*-hydroxycinnamaldehyde의 항생활성

p-hydroxycinnamaldehyde는 그람양성균과 그람음성균에서 넓은 항생활성을 가지는 것으로 판명이 되었으며 이들의 IC₅₀ value는 Table 3에 나타나 있다. 이 물질은 그 외에도 fungi에 대해서도 효과적인 항생활성을 가지는 것으로 나타났으며 *C. albicans*에 대한 IC₅₀ 값은 0.06 mM로서 이는 *p*-hydroxycinnamaldehyde의 항진균활성을 보고한 첫 번째 사례이다.

4. 고 찰

p-hydroxycinnamaldehyde는 이 보고 이전 곤충을 포함한 어떠한 동물에서도 그 존재가 보고되지 않았다. 그러나 ethyl *trans*-cinnamate는 나비목 곤충의 hairpencil에서 페로몬으로의 역할을 하고 있음이 보고되어 있다 (Baker et al., 1981). 이 화합물은 이들 곤충들의 hairpencil에서 방출되는 페로몬의 전구체로서 많은 경우에 식물체의 과실물과 열매로부터 유래되는 것으로 알려져 있다. 그러나 잣나무늪적잎벌의 먹이가 되는 잣나무 잎이나 또는 유충의 장내에서 *p*-hydroxycinnamaldehyde를 검출할수 없었다. 더욱이 이 곤충은 9월경에 땅에 떨어져서 겨울을 보내게 되며 이 기간동안 섭식활동을 중단한다. 이러한 사실들을 종합하여 볼 때 잣나무늪적잎벌에서 분리된 *p*-hydroxycinnamaldehyde는 섭식과정중에서 식물체로부터 섭취한 것일 확률은 매우 낮으며 곤충의 섭식을 통해 얻어진 어떤물질이 체내에서 대사과정을 통해 합성되어진 것이라고 볼수 있다. 또는 식물에서 *p*-hydroxycinnamaldehyde가 L-phenylalanine로부터 합성되어 lignin의 전구체가 되어 식물이 pathogen에 대한 방어기작에 이용되어 지는 것과 같이 그와 유사한 경로를 통해 합성되었을 가능성 또한 남아있다 (Freudenberg, 1959; Mackay et al., 1997; Vance et al., 1980). 5-S-GAD는 곤충의 방어물질로서 이용되어지며 H₂O₂에 의해 활성화 되어질 뿐만 아니라 세균의 침입에 의해서도 그 합성이 증가되어지는 것으로 알려져 있다. *p*-hydroxycinnamaldehyde의 경우 미생물의 침입을 받은 시료의 경우 정상의 상태보다 4배

Table . Antimicrobial activity of *p*-hydroxycinnamaldehyde

Microbes	IC50 (mM)
<i>Aeromonas hydrophilia</i> KCTC 2358	0.15
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 3069	0.08
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 1913	> 0.43
<i>Micrococcus luteus</i> KCTC 1056	0.04
<i>Mycobacterium smegmatis</i> KCTC 2002	0.20
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	0.17
<i>Enterobacter aerogenes</i> KCTC 2190	> 0.43
<i>Citrobacter freundii</i> KCTC 2006	0.19
<i>Escherichia coli</i> K12 594	0.05
<i>Escherichia coli</i> O157 H7 993	0.04
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	> 0.43
<i>Proteus vulgaris</i> KCTC 2512	0.11
<i>Salmonella enteritidis</i> ACTC 13076	0.04
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	0.21
<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	0.06

이상의 함유량을 가지는 것으로 조사되었으며 이러한 점들로 볼 때 이 물질 또한 곤충의 방어물질로 작용할 가능성이 매우 높으나 이러한 부분에 대한 보다 확실한 자료가 필요하다. 유기화학적 합성방법에 의해 얻어진 화합물은 천연에서 분리된 물질과 동일한 정성분석 결과 및 대장균에 대한 동일한 항생활성을 가지고 있다는 점으로 보아 이 화합물을 대량으로 획득할 수 있는 방법을 확립하였다. 이 물질을 이용하여 세포독성과 안정성에 대한 연구, 항종양활성연구 및 유도체의 합성이나 다른 활성물질과의 결합체 연구등을 통하여 보다 안정하며 높은 활성을 가지는 물질을 획득하기 위한 연구가 가능할 것이다.

5. 참고 문헌

Baker, T. C., R. Nishida and W. Roelofs. *Science* 214 (1981), pp. 1359-1360.

Barik, B. R., A.B. Kundu and A.K. Dey. *Phytochemistry* 26 (1987), pp. 2126-2127.

Boman, H. G. and D. Hultmark. *Annu. Rev. Microbiol.* 41 (1987), pp. 103-126.

Boman, H. G., *Cell* 65 (1991), pp. 205-207.

Dunn, P. E., *Annu. Rev. Entomol.* 31 (1986), pp. 321-339.

Duran, E., L. Gorrichon, L. Cazaux and P. Tisnes. *Tetrahedron Lett.* 25 (1984), pp. 2755-2758.

Freudenberg, K. *Nature* 183 (1959), pp. 1152-1155.

Hijikata, M., A. Kobayashi, J.Y. Leem, H. Fukazawa, Y. Uehara and S. Natori. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 237 (1997), pp. 423-426.

Kobayashi, A., M. Matsui, T. Kubo and S. Natori. *Mol. Cell. Biol.* 13 (1993), pp. 4049-4056.

Leem, J. Y., C. Nishimura, S. Kurata, I. Shimada, A. Kobayashi and S. Natori. *J. Biol. Chem.* 271 (1996), pp. 13573-13577.

Leem, J. Y., H.Y. Park, H. Fukazawa, Y. Uehara and S. Natori. *Biol. Pharm. Bull.* 21 (1998), pp. 784-785.

Lowry, O. H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. *J. Biol. Chem.* 193 (1951), pp. 265-275.

Mackay, J. J., D.M. O'Malley, T. Presnell, F.L. Booker, M.M. Campbell, R.W. Whetten and R.R. Sederoff. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), pp. 8255-8260.

Naidoo, L. A. C., S.E. Drewes, J.V. Staden and A. Hutchings. *Phytochemistry* 31 (1992), pp. 3929-3931.

Natori, S., *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol. New Ser.* 49 (1987), pp. 369-378.

Shinohara, A. and Byun, B. K. (1996) *Insect. Koreana* 13, 91-104

Sun, S. C. and I. Faye. *Eur. J. Biochem.* 204 (1992), pp. 885-892.

Vance, C. P., T.R. Kirk and R.T. Sherwood. *Annu. Rev. Phytopathol.* 18 (1980), pp. 259-288.

제 2절. 말매미에서 분리한 항생활성물질 cryptonin의 작용양식 규명

1. 서 설

크립토닌은 말매미의 성충 (*Cryptotympana dubia*)으로부터 분리된 신규의 항생활성물질로서 그람양성균, 그람음성균 뿐만 아니라 일부 fungi에 대해서도 높은 항생활성을 가지고 있다. 본 연구실 (생명공학연구소 곤충자원실)에서 분리 정제된 크립토닌은 24개의 아미노산으로 이루어져 있었으며 그 2차구조에 대한 연구 결과 양친매성의 선형 펩타이드로서 무척추동물에서 보고된 최초의 magainin 계열의 항생활성펩타이드이다. 펩타이드내에 존재하는 항생활성 필수영역의 동정과 이 항생활성펩타이드의 미생물에 대한 항생활성 작용양식에 대한 연구를 수행하였다.

본 연구에서는 분리된 크립토닌을 보다 효과적인 항생제로의 개발을 시도하기 위한 전 단계로서 크립토닌을 화학적으로 합성하여 그람양성균, 그람음성균 및 곰팡이 대한 항생활성의 측정 및 그 항생 작용기작을 규명하기 위하여 유도체 (truncated analogue) 의 합성 및 그의 항생 활성과 구조와의 관계를 조사하였으며 현미경적 관찰과 염색시약을 이용하여 대장균에 대한 크립토닌의 예상되는 작용부위를 (target site) 조사하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 공시 항균펩타이드

공시 항균펩타이드는 말매미 (*Cryptotympana dubia*)로부터 분리정제한 신규 항생물질 크립토닌(Cryptonin)의 아미노산 염기서열을 바탕으로 (주) 켈트론에 합성 의뢰하여 화학적으로 대량 합성한 크립토닌을 본실험에 사용하였다 (순도 95%이상) (Fig. 1).

1. Gly Leu Leu Asn Gly Leu Ala Leu Arg Leu
2. Gly Lys Arg Ala Leu Lys Lys Ile Ile Lys
3. Arg Leu Cys Arg

Fig. 1. Amino acid sequence of cryptonin.

Table. 1. List of microorganism strain

	Strain	KCTC No	
Gram-positive	<i>Bacillus subtilis</i>	3068	Rec ^r
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1928	Sm ^r , Pen ^r , Km ^r , Cm ^r , Tc ^r Su ^r
	<i>Micrococcus luteus</i>	3063	
	<i>Mycobacterium smegamatis</i>	2002	
	<i>Enterococcus lactis</i>	2012	
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i> K12-594		Ser ^r
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2208	Phe ^r Tyr ^r
	<i>Salmonella typhimuri</i>	1925	
Fungi	<i>Candida albicans</i>	7965	Phe ^r Tyr ^r
	<i>Candida tropicalis</i>	7221	

나. 공시 균주

공시 균주는 그람 양성·그람 음성 세균, 그리고 곰팡이 등 11종으로 생명 공학연구소 유전자은행 (Korean Collection for Type Culture ; KCTC)에서 분양 받아 계대 배양 후 사용하였다 (Table 1).

다. 배지 및 사용시약

1) 사용 배지

1. Bacto-trypton : DIFCO Laboratories. (USA)
2. Yeast extract : DIFCO Laboratories. (USA)
3. Bacto-pepton : DIFCO Laboratories. (USA)
4. Malt extract : DIFCO Laboratories. (USA)
5. Bacto-agar : DIFCO Laboratories. (USA)
6. Potato dextrose broth premix : DIFCO Laboratories. (USA)
7. Tryptic Soy Broth premix : DIFCO Laboratories. (USA)
8. Glucose : Sigma Chemical Co. (USA)

2) 사용 시약

1. Magainin : Sigma Chemical Co. (USA)
2. Ala^(8,13,18) Magainin II - Amide : Sigma Chemical Co. (USA)
3. Melittin : Sigma Chemical Co. (USA)
4. Propidium iodide (PI) : Sigma Chemical Co. (USA)
5. Strpetavidin-FITC : Sigma Chemical Co. (USA)
6. Heparin : Sigma Chemical Co. (USA)
7. Sodium dihydrogen phosphate dihydrate : Junsei Chmical Inc. (Japan)
8. Disodium hydrogen phosphate 12-water : Junsei Chemical Inc. (Japan)
9. Sodium Chloride : Sigma Chemical Co. (USA)
10. Potassium dihydrogen phosphate dihydrate : Junsei Chmical Inc. (Japan)
11. Hydrochloric acid : Junsei Chmical Inc. (Japan)
12. Potassium chloride : Junsei Chmical Inc. (Japan)
13. Dimethylsulferoxide : Sigma Chemical Co. (USA)
14. Ethyl alcohol : Hyman Limited Co, GP^국 (England)

15. Methyl alcohol : Hyman Limited Co, GP급 (England)
16. Nusieve 3:1 agarose : FMC bioproducts. (USA)
17. Triton X-100 : Sigma Chemical Co. (USA)
18. 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) : Sigma Chemical Co. (USA)

라. 사용 기기

1. Confocal laser scanning microscope :
Carl Zeiss LSM 410, Carl Zeiss Oberkochen, (Germany)
2. Circular dichroism(CD) spectroscopy :
Jasco 720 spectrometer, Jasco. (Japan)
3. Fluorescence-activated cell sorter (FACS) :
Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
4. Microplate Reader : S/N E10277, Molecular Devices. (USA)
5. Ultraviolet/visible spectrophotometer :
SmartSpec™ 3000, Bio-RAD. (USA)
6. Centrifuge : Microspin MS0149007, Han-il Co. (Korea)
7. Incubator : 37°C ID 450-94, Jeio Tech. (Korea)
30°C BI 600M, Jeio Tech. (Korea)
8. Shaking Incubator : 37°C KMC-84805F, Vision Co. (USA)
30°C KMC-8480SR2 Korea Manhattan Co. (Korea)
9. Clean bench : HDSCB-V, Dea-jin Co. (Korea)
10. Autoclave : SS-320, Tomy. (Japan)
11. Deep freezer : DF-9017, Il-shin Lab. (Korea)

마. 크립토닌과 유도체의 아미노산 합성 설계

크립토닌은 천연에서 분리된 펩타이드의 아미노산 서열을 바탕으로 화학적 합성하였으며, 유도체는 아미노산 서열에서 N-terminal 말단과 C-terminal 말단을 규칙적으로 결실함으로써 다음과 같이 설계하였다 (Park et al., 1998).

C-terminal 결실로는 CRY(4-24), CRY(4-22), CRY(4-20), CRY(4-18) N-terminal 결실로는 CRY(1-22), CRY(4-22), CRY(6-22), CRY(8-22), CRY(10-22), CRY(12-22)이었다 (Table 2).

바. 펩타이드 합성

크립토닌과 그의 유도체, Biotin 표지 크립토닌과 마가이닌의 합성은 (주)펩론에 의뢰하였다. 각 단계의 Fmoc amino acid의 합성은 NMP(*N*-methylpyrrolidone)에 용해한 DCC/HOBT를 이용하였으며 탈보호(deprotection)는 20% piperidine/NMP에 20분간 처리하였다. Kaiser ninhydrin 반응으로 합성종결을 확인하였으며, 미완결 합성물은 negative kaiser 반응결과가 나올 때까지 재합성을 하거나 DMF (*N,N*-dimethylformamide)에 용해한 benzoic anhydride에 일정시간 처리하여 아세틸화 하였다. 펩타이드 잔기의 신장 완결 후 잔기 보호를 위하여 TFE/EDT/TIS(95/2.5/2.5 v/v/v) 혼합용액에 2시간 동안 처리하였다. 합성된 펩타이드는 RP-HPLC (Waters delta pre 4000 Vydac ODS-2, 32.0×250mm)로 정제하였으며 MAILD-TOP로 분자량을 확인하였다.

Table 2. Peptide sequence of cryptonin and analogue

Peptide	Amino acid sequence	Residue	M.W. ¹	
Cryptonin	GLLNGLALRLGKRALKKIIKRLCR	24	2703.7	
C-terminal deletion	CRY(4-24)	NGLALRLGKRALKKIIKRLCR	21	2420.1
	CRY(4-22)	NGLALRLGKRALKKIIKRL	19	2146.8
	CRY(4-20)	NGLALRLGKRALKKIIK	17	1891.7
	CRY(4-18)	NGLALRLGKRALKKI	15	1650.9
N-terminal deletion	CRY(1-22)	GLLNGLALRLGKRALKKIIKRL	22	2445.2
	CRY(4-22)	NGLALRLGKRALKKIIKRL	19	2146.8
	CRY(6-22)	LALRLGKRALKKIIKRL	17	1990.7
	CRY(8-22)	LRGKRALKKIIKRL	15	1806.4
	CRY(10-22)	LGKRALKKIIKRL	13	1537.4
	CRY(12-22)	KRALKKIIKRL	11	1368.0

사. 항생활성의 측정

그람 양성균, 그람 음성균 및 곰팡이를 포함한 11종의 병원성 균주를 LB agar 배지 (1% bacto-pepton, 0.5% yeast extract, 1% sodium Chloride, 1.2% agar) 곰팡이는 potato dextrose agar 배지(30% dice potatoes, 2% Glucose, 1.2% agar)에 계대 배양한 후 single colony를 취하여 24시간 37°C(곰팡이 30°C)의 조건으로 액체배양을 하였다. 배양액 일부를 다시 3~6시간 액체 배양하여 mid-logarithmic 상태 (OD₆₅₀. 0.3) 유지하여 사용하였다. 최저생육저해농도 측정은 broth microdilution법 (Shin et al., 2000)에 준하여 행하였다. Microtiter plate에 100 μ l의 균주 희석액 (10⁵CFU/1mlmedia)에 1% bacto-peptone으로 희석한 (최종농도 100 μ g/ml ~ 0.37 μ g/ml) 크립토닌 100 μ l 첨가하여 10시간 동안 37°C(곰팡이, 식물 병원성 균주 30°C)의 조건에서 배양하였다. MIC는 배양 후 650nm에서 흡광도를 측정하여

배양 전과 비교하였을 때 OD 값의 변화가 없는 가장 낮은 처리농도로 정하였다.

아. 펩타이드의 2차 구조 분석

1) α -helix 측정

50mM sodium phosphate buffer (NAPB, pH7.4)와 40%(V/V) TFE (trifluoroethanol)/50mM NAPB에 각각 최종 농도를 $50\mu\text{M}$ 로 크립토닌과 그 유도체를 첨가하였다. CD-Ord cell에 위 시료 $400\mu\text{l}$ 넣은 다음 circular dichroism (CD) spectroscope를 이용하여 190nm~240nm파장에서의 helicity를 측정하였다. (Roberto et al., 1992, Park et al., 2000, David et al 1990).

2) % helicity의 산출

Chen, Yang 등의 방법(Chen et al., 1974, 1971)을 이용하여 % helicity 값을 산출하였다.

$[\theta]_{222}$: 222nm 에서의 각 잔기 당 ellipticity의 평균값

$[\theta]_{222}^0$: random coil 일 때의 값 ($-1000\text{ deg} \cdot \text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$)

$[\theta]_{222}^{100}$: 100% helicity일 때의 값 ($-36500\text{ deg} \cdot \text{cm}^2\text{dmol}^{-1}$)

$\% \text{helix} = 100([\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0) / [\theta]_{222}^{100}$

자. Confocal laser scanning 현미경 관찰

Mid-logarithmic 상태의 *E. coli* K12 594 균주를 $1200 \times g$ 에서 3분간 원심분리 한 다음 침전물을 취하여 10mM sodium phosphate buffer NAPB (pH7.4)로 세척하여 사용하였다. $100\mu\text{l}$ 의 *E. coli* K12 594 균주희석액 ($10^7\text{CFU}/1\text{ml}$ 10mM NAPB)에 biotin으로 표지한 크립토닌을 DMSO (Dimethylsulferoxide)에 용해하여 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도가 되도록 첨가한 다음 37°C 에서 30분 간 반응시키고, 이를 NAPB로 세척하여 크립토닌을 제거하였다. 위의 반응물을 poly-L-Lysine으로 도포된 슬라이드 글라스에 30분간 고정을 시킨 후 0.1% TritonX-100으로 표면처리 하였다. 여기에 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 streptavidin-FITC $200\mu\text{l}$ 를 처리하여 음지에서

형광반응을 유발시킨 다음 confocal laser scanning 현미경을 이용하여 세포 단층면을 주사 (optical section) 관찰 하였다.(Park et al., 1998)

차. Fluorescence-activated cell sorter 관찰

Mid-logarithmic 상태의 *E. coli* K12 594 균주를 $1200\times g$ 에서 3분간 원심분리 한 다음 침전물을 취하여 phosphate buffered saline (PBS, pH7.4)로 세척하여 사용하였다. $100\mu l$ 의 *E. coli* K12 594 균주희석액 (10^8 CFU/PBS)에 크립토닌 $100\mu g/ml$, propidium iodide (PI)를 $1mg/ml$ 농도가 되도록 첨가하여 상온 음지에서 30분간 반응시켰다. 위의 반응물을 FACS 시험관에 옮기고 PBS로 최종부피가 $2ml$ 이 되도록 희석한 다음 fluorescence-activated cell sorter (FACS)로 PI가 염색된 *E. coli* K12 594 을 분석하였다.(Cox et al., 2000, Maso et al 1997).

(Propidium iodide : excitation : $536nm$, emission $617nm$) (Brul et al. 1997).

3. 결 과

가. 기준 펩타이드의 선정

본 실험을 통해 대조구로 사용된 펩타이드는 크립토닌과 유사한 아미노산의 조성, 구조 및 항생활성을 가지며, 미생물에서의 작용기작이 알려져 있는점 등을 고려하여 선정하였다. 그 결과 양친매성(amphipathic) α -helix 구조를 가지며 시스테인(cystein) 잔기가 없는 선형의 펩타이드인 magainin II (Matsuzaki et al, 1998, Zasloff et al., 1987, Michael et al.,1987)과 그 활성을 증가시킨 유도체 Ala^(8,13,18) magainin II-amide(Hans et al., 1995) 선정하였다.

나. 크립토닌 유도체의 합성 및 최저생육 저해농도 측정 (MIC 측정)

크립토닌의 아미노산 서열을 random 조건에서의 2차 구조를 *DNA*sis modeling 프로그램(Park et al., 1994)으로 조사 한 결과, N-terminal로부터 sheet, random coil, extended helix, sheet, turn으로 구성됨을 알 수 있었다. α -helical well diagram 분석 결과 크립토닌은 C-terminal 말단부분의 친수성, 소수성 아미노산 잔기들이 α -helix의 축을 중심으로 하여 대칭적으로 양분되어 있는 양친매 (amphipathic)의 α -helix 구조를 하고 있다. 이러한 결과를 바탕으로 크립토닌의 활성에 결정적인 영역을 확인하기 위하여 양 말단으로부터 단계적인 결실을 통하여 truncated analogue를 제작하였다 (Table 2). 크립토닌 유도체의 최저생육저해농도는 N-말단과 C-말단을 결실하여 잔기의 수가 감소됨에 따라 활성도 감소되었다. 같은 아미노산 잔기수를 결실시킨 유도체의 항생 활성은 N-말단보다 C-말단의 결실하였을 때 활성도가 급감함을 보였다. 특히 CRY(4-18), CRY(12-22)에서는 항생활성이 급격히 낮아짐을 관찰할 수 있었다 (Table 3).

Phosphate buffer의 친수성 환경과 TFE (trifluoroethanol)의 소수성 환경하에서 크립토닌 분자의 α -helix를 측정 한 결과 소수성의 조성 비율이 높아감에 따라 α -helix를 형성하는 빈도가 증가됨을 알 수 있었다. 소수성 환경에서 크립토닌이 2차 구조인 α -helix로 변화하는 비율인 % helicity는 친수성 환경인 phosphate buffer일 때는 비교적 낮게 나타난 반면 소수성 환경인 40% TFA에서는 증가함을 볼 수 있었다. 4~22 유도체로부터 결실되는 잔기가 늘어날수록 40% TFE에서 C-terminal 결실보다 N-terminal 결실의 경우가 더 높은 감소 폭을 보여 주었다 (Table 4).

Table 3. Antimicrobial peptide of cryptonin and analogue

Microorganism	Minimal inhibitory concentration (MIC $\mu\text{g}/\text{mL}$)										
	CRY	C 4-24	C 4-22	C 4-20	C 4-18	C 1-22	C 4-22	C 6-22	C 8-22	C 10-22	C 12-22
<u>Gram positive bacteria</u>											
<i>Bacillus subtilis</i>	3.12	6.25	25	25	>100	3.12	25	12.5	12.5	25	>100
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	50	>100	>100	>100	25	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Micrococcus luteus</i>	2.5	6.25	3.12	25	>100	3.12	3.12	3.12	3.12	12.5	>100
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	6.25	6.25	12.5	>100	>100	6.25	12.5	>100	>100	>100	>100
<u>Gram negative bacteria</u>											
<i>Escherichia coli</i>	3.12	6.25	6.25	25	>100	3.12	6.25	6.25	6.25	25	>100
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.12	3.12	6.25	>100	>100	3.12	6.25	>100	>100	>100	>100
<i>Salmonellatyphimuri</i>	6.25	12.5	50	>100	>100	6.25	50	>100	>100	>100	>100
<u>Fungi</u>											
<i>Candida albicans</i>	50	50	>100	>100	>100	50	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Candida tropicalis</i>	3.12	1.56	3.12	6.25	>100	1.56	3.12	6.25	6.25	6.25	>100

Table 4. Percent α -helicity of cryptonin and its analogues

Peptide	Buffer		40%TFE	
	$[\theta]_{222}$	α -helix(%)	$[\theta]_{222}$	α -helix(%)
Cryptonin	-83305	6.70	-399946	42.9
CRY(4-24)	-48555	3.53	-295627	35.0
CRY(4-22)	-18570	0.60	-260232	34.7
CRY(4-20)	-3435	0.30	-147002	24.1
CRY(4-18)	-14500	0.40	-143383	20.3
CRY(1-22)	-33597	1.51	-275461	31.0
CRY(4-22)	-18570	0.60	-260232	34.7
CRY(6-22)	-22167	0.83	-165765	23.9
CRY(8-22)	-9029	1.09	-106933	16.7
CRY(10-22)	-19342	1.30	-96831	17.6
CRY(12-22)	-12553	0.30	-42700	7.9

The α -helicity of the peptide were calculated with the equation

$$\% \text{helix} = 100([\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0) / [\theta]_{222}^{100}$$

다. Confocal laser-scanning microscope 관찰

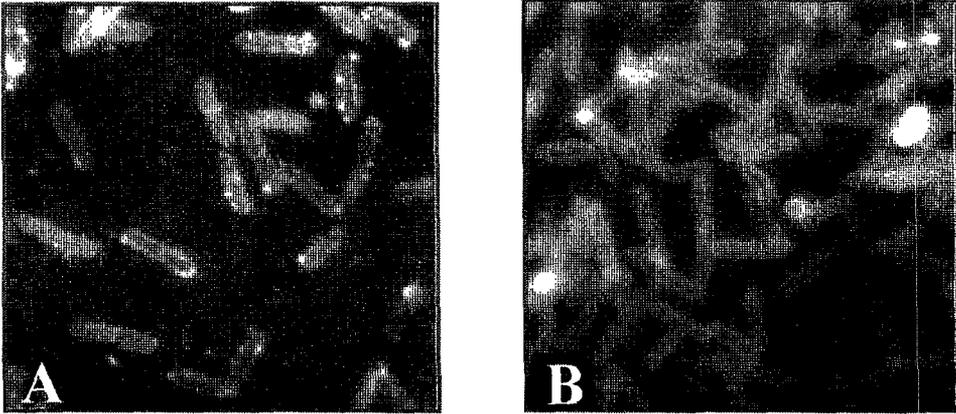


Figure 5. Confocal fluorescence microscopic image of *E. coli* K12 594.

Biotinylated cryptonin treatment(A), and biotinylated magainin II treatment(B).

미생물 내에서의 작용위치 (Target site)를 알아보기 위해 biotin으로 표지 한 크립토닌을 *E. coli*에 반응시킨 다음 형광표지물인 FITC(fluorescein isothiocyanate)로 biotin을 2차 표지하여 세포 단층면을 주사(optical section) 관찰하였다. 그 결과 *E. coli* 세포의 외층에서 높은 밀도의 형광이 검출되는 반면 세포질에서는 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 1)

라. Propidium iodide(PI) 유입을 관찰

Propidium iodide(PI)는 정상상태의 세포막에 대한 투과도는 매우 낮은 반면 세포막의 손상이나 구조의 약화가 발생하였을 때 투과도가 증대되어 세포질로 투과가 활발히 일어나며 또 세포질에서 핵산과 결합이 가능한 DNA염색물질이다. 크립토닌의 처리에 의한 PI의 *E. coli*에 대한 유입율을 FACS를 이용하여 조사한 결과 정상세포의 경우 17.95인 반면 크립토닌 처리구의 경우 337.11로 18배의 증가 양상을 나타내었다.

또한 세포막에 pore를 형성하여 항생활성을 나타낸다고 알려진 마가이닌과 비교하였을 때 같은 처리농도에서 PI의 유입량이 크립토닌의 처리구의 1.1배정도 더 높게 나타났다 (Fig. 2).

4. 고 찰

크립토닌은 말메미의 성충(*Cryptotympana dubia*)으로부터 분리된 항생 활성 펩타이드로

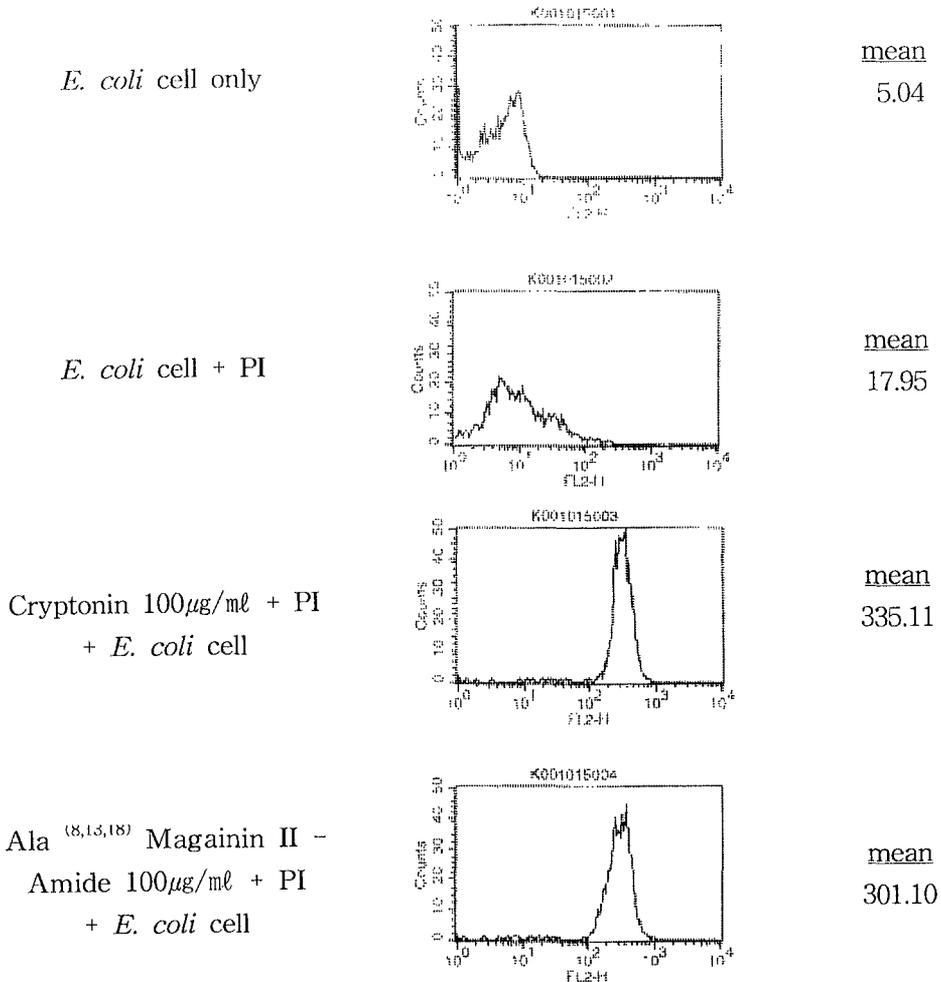


Figure 6. Influx of Propidium iodide (PI) of *E. coli* cell treated with cryptonin and Ala^(8,13,18) magainin II - Amide.

서 분자량은 2703 Da이며 24개의 아미노산 잔기로 구성되어 있다. 크립토닌의 항생 활성을 여러 가지 그람양성·그람음성 세균, 그리고 일부 fungi에 대하여 조사하였을 때 항생 활성의 보고가 마가이닌에 비해 높은 항생 활성을 나타내었다.

α -helical wheel diagram에 의해 크립토닌의 아미노산 서열을 조사하여 보았을 때, helix에서 대칭적으로 분포되는 친수성 (9.Arg, 10.Leu, 12.Lys, 13.Arg, 16.Lys, 17.Lys)과 소수성 아미노산 잔기(7.Ala, 8.Lue, 14.Ala, 15.Leu, 18.Ile, 19.Ile, 22.Leu)에 의해 양친매성 α -helix 구조를 가지는 것으로 관찰되었으며 이러한 특징은 기존에 알려진 여러 가지 종류의 linear antimicrobial peptide (bombinin, magainin, Cecropin 등)의 특성과 유사함을 알 수 있었다. 크립토닌의 아미노산 서열의 상동성을 조사하여 보았을 때 개구리에서 분리된 항생 활성 펩타이드인 마가이닌등과 부분적인 상동성을 가지는 등으로 보아 크립토닌이 선형의 Cation antimicrobial peptide 계열에 속하는 것으로 추론이 된다 (Fig. 3).

크립토닌의 구조는 random한 환경에서는 N-말단으로부터 sheet, random coil, extended helix, sheet, turn으로 구성되었으며 α -helical wheel diagram 분석시 C-말단 부분에서 친수성(hydrophilic)과 소수성 (hydrophobic) 한 아미노산 잔기들이 대칭적으로 양분되어 있는 양친매(amphipathic)한 α -helix 구조를 이루고 있었다. 이러한 양친매한 α -helix 구조가 보고된 선형의 펩타이드인 마가이닌, 세크로핀 등에서 활성화에 중요한 역할을 나타낸다고는 사실에 기인하여 크립토닌에서 활성화에 필수적인 잔기를 동정하기 위하여 유도체를 합성하였다. 아미노산의 N-말단과 C-말단을 규칙적으로 결실 하였을 때 항생 활성도가 감소되었으며, 이러한 결실을 통한 아미노산 잔기수의 변화는 아미노산의 2차 구조인 α -helix로의 변화를 감소시킨다. 더불어 선형의 아미노산이 α -helix로 구조를 변화하는 비율인 %-helicity도 따라서 감소가 된다. 한편 N-말단이 결실되었을 때와 C-말단이 결실되었을 때의 α -helix와 %-helicity를 비교하면 C-말단 결실이 더 높게 나타났지만 활성도에 있어서는 먼저 감소됨을 보였다. 이는 N-말단에서는 친수성과 소수성의 아미노산 잔기들 8번 아미노산 잔기부터 시작이 되지만 C-말단에는 22번부터 시작을 하는 구조적 차이점을 가지고 있다. 규칙적으로 존재하고 있는 이들 아미노산의 잔기의 특성에 의해 형성된 α -helix가 항생 활성화에 중요한 역할을 한다는 것을 시사해 준다.

항생 활성화에 증감을 유도하는 α -helix는 친수성환경 보다는 소수성 환경에서 그 생성비율이 증가하였다. 여기서 소수성 환경은 미생물 세포막과 같은 조건으로 제시된 것으로 위의 결과는 크립토닌이 인지질이 풍부한 소수성 미생물세포막에서 α -helix로 구조 변화를 한다는 것을 유추할 수 있으며 그 항생작용 지점은 세포막이라는 것을 간접적으로 알 수 있다.²⁸⁾ 또한 이러한 결과는 선형의 cation 항생 활성 펩타이드의 활성이 단지 α -helix의 형

성비율보다는 활성화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 양친매성 α -helix의 존재유무 및 양친매성의 강도가 활성화에 중요한 영향을 미친다는 것을 보여주었다.

위의 결과를 뒷받침하고자 크립토닌의 항생 작용기작을 현미경을 이용한 직접적인 관찰과 염색시약을 이용한 실험을 수행하였다. Biotin으로 표지한 크립토닌을 *E. coli*에 반응시킨 다음, streptavidin-FITC로 2차 표지하여 confocal laser scanning 현미경 이용, 세포 단층면을 주사관찰하면, FITC의 streptavidin과 크립토닌의 biotin이 결합을 하여 *E. coli*에서의 크립토닌의 작용위치를 효과적으로 알아볼 수 있다. 관찰 결과 형광표지물인 FITC의 검출 빈도가 세포질과 비교하였을 때 세포막 주위에서 집중적으로 존재함을 확인할 수 있었다. 이 결과로 크립토닌을 미생물에 처리하였을 때 부분에 집중적으로 존재한다는 것을 알 수 있다. 또한 정상적인 세포막을 가진 미생물의 세포질에는 들어가기 어렵지만 세포막에 pore나 막 유동성의 변화 등의 손상이 생기면 그 부위로 유입해 들어가 세포질내의 핵산을 염색하는 propidium iodide(PI)을 크립토닌과 함께 반응시켰다. 그 결과 크립토닌으로 처리한 세포를 정상세포와 비교하였을 때 PI의 유입량이 18배 증가함을 측정하였다. 이것은 크립토닌이 항생활성을 나타낼 때 세포막에 존재 혹은 결합하면서 막에 손상을 준다는 것을 실험적으로 확인한 것이다.

이것으로 종합해 볼 때 크립토닌의 항생 작용기작은 친수성과 소수성의 아미노산 잔기들에 의해 형성된 양친매(amphipathic)한 α -helix가 소수성의 미생물 막에 결합 pore 형성하거나 혹은 세포막의 안전성의 감소로 막투과성을 교란시킴으로 항생 작용을 나타내는 것으로 추측된다 (Katsumi et al., 1998).

크립토닌의 아미노산 구조변화에 따른 항생 활성의 변화를 관찰 한 결과 항생 활성의 증감은 친수성과 소수성이 규칙적으로 배열되어 있는 아미노산 잔기에 따른 α -helix에 의존적이었으며 이 α -helix 구조는 세포막에서의 항생 작용기작에 영향을 주는 것이 확인되었다. 항생펩타이드의 아미노산을 친수성과 소수성의 대칭성을 가지는 양친매(amphipathic) α -helix 구조로 잔기를 치환하여 %-helicity를 증가시키면 항생 활성을 증진시킬 수 있으며 이로 인해 저농도 처리로 고효율의 효과를 나타내는 효력 증진의 방안으로 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

Magainin 1	GIGKFLHSA-GKFG-KAFVGEIMKS
Magainin 2	GLGKFLHSA-KKFG-KAFVGEIMNS
Bombinin 2	GIG-AL-SA--KGALKGLAKGLAQHFAN*
Bombinin-related peptide 1	GIGGALLSA-GKSALKGLAKGLE-HFAN*
Bombinin-like peptide 1	GIGASILSA-GKSALKGLAKGLE-HFAN*
Cryptonin	GLLNGLALRLGKRAIKKIIKRLCR

Fig. 3. Sequence alignment with several cationic antimicrobial peptide.

5. 참고 문헌

- Brul S., Nussbaum J., Dielbandhoesing S. K. 1997. Fluorescent probes for wall porosity and membrane integrity in filamentous Fungi. *J. Microbiological Methods*, 169-178.
- Chen. Y. H., Yang J. T., Chau K. H. 1974. Determination of the helix and β from of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochem.*, **13**:3350-3359.
- Chen Y. H., Yang J. T. 1971. Determination of the helix of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Proc. Natl Acad.Sci. USA.*, **44**:1285-1296.
- Cox S. D., ManC. M., Markham J. L., Bell H. C., J. E. Gustafson J. R Warmington, S. Wylie. 2000. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microb.*, **88**:170-175.
- David W., Boman A., Wahlin B., C. M. Drain, David Andreu, Hans G. Boman, R. B. Merrified, 1990. All amino acid-contatining channel-forming antibiotic peptide. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **87**:4761-4765.
- Hans, V. Westerhoff, Michael zasloff, etc. 1995. Functional synergism of magainins PGLa and Magainin-II in *escherichia coli*, tumor cell and liposomes. *J. Biochaem.*, **288**:257-264.
- Maso D. J., Richard Dybowski, James W. Larrick, V. A. Gant. 1997. Antimicrobial action of rabbit leukocyte CAP18₁₀₆₋₁₃₇. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.*, Mar:624-629.

- Matsuzaki Katsumi. 1998. Magainins as paradigm for mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys. Acta.*, **1376**:391-400.
- Michael Cannon. 1987. Antimicrobial peptides: A family of wound healers. *Nature.*, **328**:478
- Park C. B., Yi K. S., M. S., Katsumi Matsuaki, Kim S. C. 2000. structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, **97**:8245-8250.
- Park C. B., Yi K. S., M. S., Kim S. C. 1998. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochim. Biophys. Res. Commune.*, **244**:253-257.
- Park J. M., Jung J. E., Lee B. J., 1994. Antimicrobial peptide from the skin of korean frog, *RANA RUGOSA*. *Biochim. Biophys. Res. Commune.*, **205**:948-954.
- Roberto B., Hava H., Alfred G.. 1992. Augmentation of the antibacterial activity of magainin by positive-charge chain extension. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.*, Feb. 313-317.
- Shin S. Y., Kang J. H., Jung S. Y., Kim Y. M., Haham K. S. 2000. Effects of the hinge region of cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), a synthetic antimicrobial peptide, on liposomes, bacterial and tumor cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1463**:209-218.

Zasloff, M. 1987. Magainins, class of antimicrobial peptide from *Zenopus* skin: Isolation, Characterization of two active form, and partial cDNA sequence of precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**:5449-5453.

제 3절. 곤충공생미생물 유래 단백질분해효소 분리 및 특성과 대량생산

1. 서 설

단백질 분해효소는 인간이 오랫동안 접해왔던 효소로서 식품의 연화, 조미료 생산, 치즈 숙성과 같은 식품산업, 소염제 및 소화제와 같은 제약산업, 가죽의 연화를 위한 피혁 가공산업, 유기물 분해용 환경처리제 등의 용도제 및 음식물 쓰레기 처리를 위한 제제 등의 용도가 있는 환경산업, 그리고 세제산업 등 다방면의 산업에 이용되어 왔으며, 오늘날 전체 공업용 효소시장의 약 70% 이상을 차지하고 있다 (Aunstrup, K., et al 1974).

단백질 분해효소는 단백질 또는 펩타이드 (peptide)에서 펩타이드 결합의 가수분해를 촉매하는 효소로, 모든 생명체에 존재하며 다양한 생리화화적인 기능을 수행한다. 미생물의 단백질 분해효소는 대부분이 세포외로 분비되며, 그 특이성을 기초로 하여 다양하게 구분되고 각각의 특성에 따라 산업적 용도도 달라진다. 예를들어, 펩타이드 결합의 내부를 무작위적으로 가수분해하는 endo-protease와 펩타이드 결합의 말단부터 순차적으로 가수분해하는 exo-protease로 나눌 수 있다. 온도에 따라 내열성, 중온성, 고온성 단백질 분해효소로 구분하며, 효소의 최적 pH에 따라 산성, 약산성, 중성 그리고 염기성 단백질 분해효소로 분류한다. 활성부위(active site)의 잔기에 따라서는 serine 잔기를 가지는 serine 단백질 분해효소, thiol (-SH) 잔기를 갖는 cysteine 단백질 분해효소, aspartic acid 잔기를 가지는 aspartic 단백질 분해효소, 그리고, 이가 금속 양이온의 존재에 의하여 효소의 활성에 영향을 받으며, 대부분이 Zn을 포함하는 단백질로 효소활성을 위해 Zn^{2+} 을 필요로 하는 metalloprotease로 분류한다 (Hasecc et al. 1993)

단백질 분해효소들은 예전에는 식물의 줄기나 동물의 위 등 비교적 효소가 풍부한 부위를 이용해서 분리하여야 했기 때문에 많은 어려움이 있었으나, 미생물학이 발달함에 따라, 다양한 특징을 가진 우수한 단백질 분해효소를 생산하는 미생물을 동정하여 그로부터 효소를 분리하게 되었고 (Stowe RA., et al 1996) 이들 미생물을 이용한 대량 생산이 가능하게

되어 다양한 산업 분야에 이용을 할 수 있게 되었다. 다양한 미생물로부터 여러 가지 특정한 단백질 분해효소를 생산 할 수 있었으며, 이로부터 미생물의 분리 동정, 생산된 효소 관련 유전자의 분석과 과발현 system을 위한 분자생물학, 효소 생산 산업화에 필요한 발효 공학 및 간편한 정제·농축과정의 개발과 scale-up이 용이하게 되었다. 또한 이런 개발로 인해 상대적으로 생산가격이 저렴한 점 등 기존의 동식물을 이용한 효소 생산방법과는 차별화된 여러 가지 장점이 있기 때문에 본격적인 산업화가 가능하였다.

산업화한 단백질 분해효소의 대부분의 경우 자연계 특히, 폐수 및 토양에서 분리된 미생물이 생산한 단백질 분해효소를 이용하였으며 이렇게 분리된 단백질 분해효소를 이용하는 곳으로는 덴마크의 NOVO사와 미국의 Genencor사의 2개의 거대 효소생산업체가 있다. 이 2개사를 포함한 대부분의 산업용 효소를 생산하는 업체는 신균주로부터 단백질 분해효소를 개발하는 경쟁이 치열해지고 있다. 특히 Gram 양성 및 음성 균주, 방선균, 그리고 곰팡이 등 매우 다양한 범위의 미생물을 대상으로 하고 있다 (Rao, M. A., et al 1998, Wilkes, M., et al 1978). 그러나 곤충에서 분리된 단백질 분해효소는 극히 드물며 곤충으로부터 분리한 미생물에 의해 생산된 단백질 분해효소의 대표적인 예로는, 누에 장에서 분리된 *Serratia marcescens* ATCC 21074에서 생산되는 serrapeptase가 있다. 이 효소는 fibrin 분해능 및 inflammatory peptide 인 bradykinin, histamin에 대한 가수분해능 때문에 소염효소제로 사용되고 있다 (Henriette, C., et al 1993).

거미의 먹이 습식 mechanism은 거미줄에 걸린 먹이가 되는 곤충 등 작은 동물들의 체내에 마취액과 거미 자체의 소화액을 주입하게 된다. 거미의 먹이는 순식간에 마취가 되어 움직이지 못하게 되고 짧은 시간안에 내부는 거미 자체의 소화액에 의해서 분해되어 버리고 이런 상태에서 거미는 분해된 체액을 섭취하게 된다. 이런 거미의 먹이 습식 mechanism을 생각한다면 거미 장내에 거미 자체의 단백질 분해효소와 또한 장내에 분해를 도와주는 단백질 분해효소를 생산하는 공생미생물이 있을 것으로 예측하여 동물성 생물을 주 먹이원으로 하는 한국산 무당거미 (*Nephila clavata*)를 채집하여 실험재료로 사용하였으며 단백질 분해효소를 생산하는 새로운 미생물을 분리하고, 그 미생물이 생산하는 효소의 특성을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 미생물분리 및 특성 조사

1) 미생물의 분리 및 동정

한국산 무당거미(*Nephila clavata*)를 먼저 머리 부분을 제거한 다음 몸통 부분만을 70% ethanol에 10분간 방치 하여 표면을 살균하였다. 살균된 거미의 몸통 부분에서 배를 절개하여 체표 부분을 제외한 장을 취하여 균질화한 다음 균질액을 1% skim-milk를 첨가한 고체 배지 상에 도말하여 37°C에서 2일 배양 후 투명환을 형성하는 콜로니를 선별하여 단백질 분해 활성을 나타내는 균주를 획득하였다.

2) 분리된 균주의 특성 조사

획득한 단백질분해효소를 생산하는 균주의 동정 실험 및 *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*에 따라 형태학적 특성, 생리·생화학적 특성, 균체화학적 특성, 그리고 16S rDNA의 염기서열을 분석하였다.

형태학적 특성은 gram staining, spore staining, 그리고 전자현미경학적 형태를 조사하였으며, 생리·생화학적 특성은 단당류 및 다당류의 이용성을 조사하였다. 균체 화학적 특성은 균체를 회수하여 균체내의 지방산 조성, (G+C) 함량 및 isoprenoid quinone의 형태를 분석하였다. 리보솜 소단위 유전자(16S rDNA)는 균체로부터 DNA를 분리후 Lane이 추천하는 primer(8F, 1492R)를 사용하여 Taq DNA 중합효소 PCR(연쇄중합반응)법에 의해 합성하였다. 합성된 16S rDNA를 순수 분리하여 pGEM-T 벡터(Promega Co.)에 클로닝한 후, *E. coli* JM109 세포에 형질전환시키고, 청색 클론 함유 균주를 선별하여 tag Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystem Co.)를 사용하여 그 염기서열을 결정하였다.

나. 분석방법 및 전기영동

1) 분석방법

조효소액은 배양액을 3000g에서 30분간의 원심분리 또는 0.2 μ l 막여과 (microfiltration, Fall Microza Hollow fiber, USA)를 통하여 획득하였다.

Protease의 분석은 azo-casein (sigma, USA)을 이용한 Braun과 Schmitz의 방법 (Braun, V. and G. Schmitz. 1980.)을 행하여 분석하였다. 24mg의 Azo-casein을 1mL의 50mM phosphate 용액(pH7.6)에 녹이고 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 전처리를 하였다. 전처리를 한 azo-casein용액 300 μ l에 조효소액 100 μ l를 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응을 한 다음 300 μ l의 10% trichloroacetic acid 용액을 넣어 반응을 종결시킨후 1시간동안 정치 시켰다. 정치시킨 용액을 원심분리 (13000g, 5분) 후 15 μ l 10% NaOH를 첨가하고 405 nm에서의 흡광도 값을 측정하였다. 효소 역가는 405 nm에서 흡광도 값이 1.0 증가하는 값을 1unit로 정의 하였다.

세포 농도 측정은 흡광도 값이 0.5를 넘지 않도록 희석을 하여 600nm에서의 흡광도 값으로 측정하였으며 단백질 정량은 BSA(bovine serum albumin; Sigma Co.)를 표준 곡선으로 Bradford 방법을 변형시킨 Bio-Rad protein assay kit (USA)를 사용하였다.

2) 분자량 측정 및 활성측정

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 Laemmli방법에 준하여 행하였다. 상용한 polyacrylamide gel의 농도는 10%였으며 mini-Protein kit (Bio-rad)를 사용하여 실험을 행하였다. 사용한 분자량측정 marker로는 Phosphorylase(97.4 kDa), Serum albumin(66.2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carbonic anhydrase (31.0 kDa), Trypsin inhibitor (21.5 kDa), 그리고 Lysozyme (14.4 kDa)을 사용하였다. 시료는 5% β -meccaptoethanol이 포함되어 있는 sample buffer에 3분간 끓인 후 Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Co.)에 염색을 하였다. 단백질분해효소의 활성염색은 gelatin이 함유된 10% zymogram read gel(Bio-Rad, catalog No:161-113)을 사용하여 행하였다. 전기영동후 실온에서 30분 동안 renaturation buffer에 방치시킨후 development buffer에 37 $^{\circ}$ C, 1시간동안 반응을 시켰다. 반응이 끝나고 난 전기영동 겔은 0.5% coomassie blue R-250에 염색을 행하였다.

다. 기본 배양배지 및 배양환경

1) 기본 배지 및 배양환경

기본적으로 사용한 배지로는 TY 배지(Bacto-tryptone 5g, yeast-extract 5g, NaCl 1g, KCl 0.5g, CaCl₂ 0.2g, and MgSO₄·7H₂O 0.2g per liter)를 사용하였으며 배양 환경은 28℃, 교반속도 200 rpm에서 행하였다. 플라스크배양은 500mL 삼각 플라스크(Erlenmeyer flask 또는 Baffled flask, working volume 100mL)로 28℃, 180-200 rpm에서 24-48 시간 배양하였다.

회분배양을 통한 발효조 배양은 5L 발효조(NBS Bioflo III (New Brunswick Scientific Co.))에서 working volume은 3.5L, 초기 pH는 6.8로 하였고 배양 온도는 환경결정을 위하여 22-30℃로 행하였다. 또한 교반속도는 200-400rpm, 통기 속도는 0.14-0.89 vvm으로 수행하였다. 배양중의 pH 조절은 3N HCl을 사용하였으며 거품이 발생시에는 거품 방지제 (Antifoam A solution(Sigma Chemicals))를 첨가하였다.

2) 배지 최적화

배지 최적화를 위해서 Plackett-Birman법을 이용하여 12가지의 실험법을 행하였다 (Table 1). 모든 실험은 계획된 배지를 1L 삼각 플라스크(baffled flask, working volume 100mL)에서 2반복으로 행하였다. 3가지의 유형(three dummies)에서는 실험적인 오차를 포함하였다. 변화 효과 (variance of effect; Veff) 그리고 기본 오차 (standard error; SE)는 $V_{eff} = \sum (Ed)^2/n = (SE)^2$ 에 의해 계산이 되었다. Ed는 dummy effect를 그리고 n은 dummies의 수로 계산을 하였다 (Monaghan, R, L., et al 1981, Son KH., et al 1996).

3) 탄소원 및 질소원에 의한 단백질 분해효소의 생산

단백질분해효소의 생산에 영향이 있는 탄소원 그리고 질소원을 선택하기 위해, 기본 배지 (TY media)에 37가지의 다른 탄소원 또는 질소원을 첨가하여 배양을 하였다. 모든 실험의 탄소원 그리고 질소원은 3%를 첨가하였으며 28℃, 200 rpm에서 24시간 배양을 하였다 (Lakshmi, B.S., et al 1999, Obradors. N., et al 1993).

라. 단백질 분해효소의 분리 및 정제

조효소액은 배양액을 3000g에서 30분간의 원심분리 또는 0.2 μ l 막여과 (microfiltration, Fall Microza Hollow fiber, USA)를 통하여 획득하였다. 획득한 조효소액에 대해서는 미리 50mM potassium phosphate buffer 완충 용액 (pH 7.6)에 평형화시킨 DEAE-Cellulose column (7 X 15 cm)에 조효소액을 가하고 NaCl를 0 M에서 0.5M의 농도구배를 만들어 1

Table. . Patial factorial design set with 12 experiments to produced protease HY-3 from *A. proteolyticus* (Son KH., et al 1996).

Variables and concentration (%)	Experimental trials											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Glucose 0.5/ glycerol 0.5	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Sucrose 0.5/ soluble starch 0.5	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Dummy	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Cornsteep solid 0.5/ NZ-amine 0.5	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-
Yeast extract 0.95/ tryptone 0.95	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
Dummy	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
NaNO ₃ 1.0/ (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.0	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
ZnSO ₄ 0.02/ FeSO ₄ 0.02	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
Dummy	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
MgSO ₄ 0.05/ MgSO ₄ 0.01	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-
NaCl 0.1/ KCl 0.1	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-

시간당 400mL의 유속으로 용출하였다. 효소활성을 나타내는 분획을 모아서 10KD Cassette membrane (Fall Microza Hollow fiber, USA)으로 농축하여 2mM potassium phosphate buffer 완충 용액 (pH 7.6)에 평형화시킨 Sephadex G-75 column에 가하여 동일완충용액으로 시간당 20mL의 유속으로 chromatography를 수행하였다. 단백질 분해활성을 나타내는 분획들은 10KD Cassette membrane로 농축 후 Freeze dry한후 -20℃에 저장하였다. 정제 정도는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하여 확인하였다.

마. 단백질 분해효소의 아미노산 조성 분석

순수분리된 51.5 kDa 단백질 분해 효소를 SDS-PAGE하여 Immobilon-P^{SQ}(Millipore)막에 blotting 한 후 CBB 염색되는 단일 band를 잘라 상법에 의해 elution 하였다. 이를 6N HCl로 가수분해하여 millipore 아미노산 자동분석기로 분석하였다. 또한 그 N-terminal의 아미노산 서열을 알기 위해 Immobilon-P^{SQ}막에 blotting한 후 CBB 염색되는 51.5kDa 부근의 단일 band를 잘라 그대로 ABI 아미노산 서열 분석기로 분석하였다.

단백질분해효소의 내부 아미노산 서열을 분석하기 위해 클리브랜드 방법에 의해 endoprotease Glu-C(EC. 3, 4, 21, 19) V8 protease(Sigma Co.)와 함께 SDS-PAGE상에서 단편화 한 후 Immobilon-P^{SQ}막에 blotting하여 단편화 된 band들을 각각 ABI의 아미노산 서열 분석기로 분석하였다.

바. HY-3 단백질분해효소 관련 유전자의 분리

PCR방법에 의해 51.5kDa 단백질 분해 효소의 유전자를 분석하기 위해 먼저 template로 사용할 genomic DNA를 분리하였다. 즉, 한국산 무당거미의 장으로부터 분리한 *Aranicola proteolyticus*를 LB 배지에 28℃에서 24시간 배양한 후, 6,000 rpm에서 원심분리하여 얻어진 세포로부터 Murray(1980)의 방법에 의해 다음과 같이 genomic DNA를 분리하였다. 세포를 TE 완충용액의 9.5mL에 녹인 후, 10% SDS와 protease K(200mg/mL)를 각각 0.5mL, 50 μ l 첨가하여 잘 섞은 후 37℃에서 1시간동안 반응시켰다. 반응 후 5M NaCl을 1.8mL 첨

가하고 CTAB/NaCl 용액을 1.5mL 첨가하여 65°C에서 20분간 반응 시킨 후 chloroform : isoamyl alcohol을 동량 가하여 잘 섞은 후 7,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 분리한 상등액에 isopropanol을 0.6배 가하여 원심분리한 후, 침전된 DNA를 70% 에탄올로 세척하여 TE 완충용액에 녹였다. CsCl/TE 완충용액과 섞고, ethidium bromide (10mg/mL)를 200 μ l 첨가하여, 40,000rpm에서 40시간동안 초원심분리하였다. 원심분리 후 DNA 층을 분리하고 ethidium bromide를 다음과 같이 제거 하였다. CsCl로 포화된 1-butanol를 4배 첨가하여 잘 섞은 후 1,500rpm에서 15분간 원심분리하여 수용액층을 추출 하였으며 이 조작은 ethidium bromide가 완전히 제거될 때까지 반복하였다. Ethidium bromide를 제거한 DNA에 에탄올을 첨가하여 4°C 15분간 방치한 4°C, 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 침전된 DNA를 70% 에탄올로 세척하여 TE 완충용액에 녹였다 (Wei, H.L., et al 1998).

51.5 kDa 정제된 단백질분해효소로부터 얻어진 부분 아미노산서열 AEQQQA와 IGHALG를 이용하여 sense primer 5'-GCGGAACAGCAGCAGCAGGC와 antisense primer 5'-GCCCAACGCATGGCCAAT를 제작하였고, 위에서 분리한 genomic DNA를 template로 하여 다음과 같이 PCR 반응을 수행하였다. PCR의 반응온도는 초기에 94°C에서 5분간 가열 하여 변성시킨 후, 30회 동안 94°C에서 1분간 denaturation시키고 55°C에서 1분간 annealing 시킨 후 72°C에서 40초간 extention을 수행시켰다. PCR의 반응 결과, 원하는 크기의 DNA 절편을 확인할 수 있었다. 이 절편을 PT7Blue T-Vector (Novagen)에 도입하여 염기서열을 결정하였다. 또한 결정된 유전자 절편을 이용하여 Inverse-PCR을 위한 PCR probe(5'-ATAATGGCCGGACGATCCTGGCTGTAGTTAC와 5'-CTTACGCCTTCCTGCCGAACACCATTTATCAG)를 수행하였다.

사. HY-3 단백질분해효소 특성

1) 기질특이성

HY3 단백질 분해효소의 여러 가지 기질에 대한 분해능을 알아보기 위해 albumin,

casein, collagen, elastin, gelatin, 그리고 hemoglobin (sigma Co.)을 기질로 사용하여 실험을 행하였다 (Long, S., et al 1981). 각각의 기질 혼합액 (20mg/mL)에 조효소액 (2 Unit)을 첨가하고 37°C에서 24시간 동안 반응을 시킨 후 10% TCA를 1mL 첨가한 후 반응을 종결시켰다. 1시간동안 정치시킨 후 상등액으로부터 나온 TCA-soluble protein을 BSA (bovine serum albumin)을 기본 정량으로 잡은 Bradford 방법을 이용하여 단백질 양을 측정하였다.

2) 효소 저해제

HY-3 단백질 분해효소에 대한 저해제의 영향을 조사하기 위해 저해제인 antipain, phosphoramidon, pepstatin, chymostatin, E-64, leupeptin, pefabloc SC, EDTA, aprotinin (Bio-Rad, protease inhibitor set), PMSF (Sigma), 그리고 phenathroline (Merck)를 사용하였다. 각각의 protease inhibitor 0.01-10mM의 농도에 HY3 단백질분해효소를 37°C에서 5분간 전처리를 한 후 단백질분해효소의 역가를 측정하였다.

3) 온도의 영향

HY-3 단백질 분해효소의 최적 온도를 알아보기 위해 10, 20, 30, 37, 50, 60, 70, 그리고 80°C의 각각의 온도에 대해서 전처리한 24mg/mL Azo-casein (50mM phosphate, pH7.6) 용액에 37°C에서 30분간 반응을 행하여 단백질분해효소의 역가를 측정하였다. 측정한 실험 곡선을 $1000/T$ 를 x변수로 한 Arrhenius plot으로 재구성하여 azo-casein을 분해하기 위한 E_a (Arrhenius 상수)를 구하였다.

또한 온도에 대한 안정성을 측정하기 위하여 10, 20, 30, 37, 50, 60, 70, 그리고 80°C의 각각의 온도의 조건에서 최장 180분까지 각 온도에 효소액을 노출시키고 남은 효소 활성을 조사하여 시간별 실험도를 알아보았다.

4) pH의 영향

HY3 단백질분해효소의 최적 온도를 알아보기 위해 citrate-phosphate (pH 3.0 ~ 7.0), Sodium phosphate (pH 7.0 ~ 9.0), Tris-hydrochloric acid (pH 7.0 ~ 10.0), Glycin-caustic soda (pH 9.0 ~ 12.0) 등의 완충액에 기질을 녹여 용액을 제조하고 HY3 단백질분해효소를 첨가하여 37°C에서 30 분간 반응시킨 후 효소의 역가를 측정하였다.

또한 pH의 안정성을 측정하기 위해서 상기의 완충액을 이용하여 pH 3-12의 조건에서 최저 30분에서 최장 120분간 37°C에서 30분간 전처리를 한 다음에 남은 효소의 활성을 조사하여 pH별 실효도를 알아보았다.

3. 결과 및 고찰

가. 미생물의 분리 및 특징

한국산 무당거미(*Nephila clavata*)의 장으로부터 분리한 단백질분해효소 생산 미생물 (HY-3)의 균주적 특성, 형태적, 생리적 및 균체화학적 특성을 조사한 결과, 포자를 생성하지 않는 그람 음성균이며, 0.3~0.5 μ m의 세포 크기와 0.7~1.2 μ m의 세포 길이를 갖는 막대형의 세포로서, 운동성이 강하여 장내 세균류 (Enterobacteriaceae)와 유사한 형태적 특징을 갖는 것으로 나타났으며(Fig. 1.), β -galactosidase, urease 및 o-dicarboxidase를 생산하였다. Guaric acid, mannitol, inositol, sorbitol등의 알콜성 탄수화물로부터 산을 생성하고, 질산염을 아질산염으로 환원하고 oxidase 음성을 나타내는 생리·생화학적특성을 가져 장내 세균류의 일반적인 특성과는 차이가 있었다. 균체내 지방산 조성은 탄소수 16개의 포화 지방산(32%) 및 탄소수 17개의 고리형 포화 지방산(12%), 그리고 탄소수 16개 및 15개 복합체(20%)가 주지방산으로 존재하였다.

형태학적, 생리·생화학적 및 균체화학적 특성으로는 미생물의 정확한 동정은 불가능하였다. 장내 세균 (family Enterobacteriaceae)에 속하는 *Serratia* sp. 또는 *Rhanella* sp. 으로 분류되었으나, 보다 정확한 동정을 위하여 16s rDNA의 염기서열을 조사하여 이를 분석하기

위하여 미국 국립보건원 (NIH)에서 운영하는 GenBank 및 16S rDNA만을 모아서 계통수와 함께 ribosome Database (RDP, 미국 일리노이 대학교)의 자료와 비교분석한 결과, 본 발명의 미생물 균주는 진딧물 (*Acyrtosiphon pium*)과 98%, *Rahnella aquatilis*와 96%의 상동성을 가지고 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2 3, 4) (White, D., 1995, Yang, F.C., et al 1998). 이상의 분자계통학적 분류를 실시한 결과, Eubactria, Proteobacter, gama-subdivision, Enterobacteriaceae에 속하는, 기존에 전혀 보고된 적이 없는 새로운 미생물인 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 미생물 균주는 학명의 명명체계에 따라 거미에서 유래된 단백질분해효소를 생산하는 세균이라는 뜻으로 *Aranicola proteolyticus* HY-3라 명명하고, 1996년 8월 1일자로 생명공학연구소내 유전자 은행에 기탁되어 수탁번호 KCTC 0268BP를 부여 받았다 (Park HY., et al 1997).

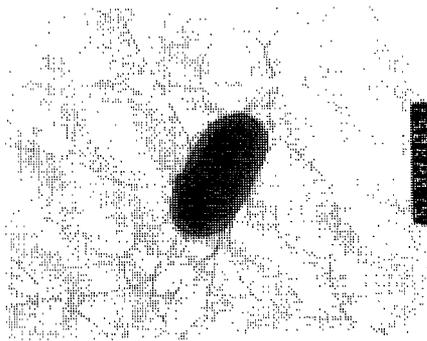


Fig. 1. Morphology of spider, *Nephila clavata*(upper) and electron micrograph of the microbe HY-3.

Unknown	2.31%	2.51	(12:0 Alde ?, 10.928 unknown)
12:0 anteiso	-	0.13%	
12:0	2.85%	2.63	
12:0 2OH	0.87%	1.14	
Unknown	0.90%	0.97	(13.961)
14:0	5.22%	5.50	
Unknown	1.15%	0.97	(14.503)
15:0	0.54%	0.59	
14:0 2OH	0.95%	1.56	
14:0 3OH/16:1 iso I	7.90%	8.12	
16:1 w7c/ 15:0 iso 2OH	20.56%	21.35	
16:0	31.97%	31.68	
17:1 w7c	-	0.16	
17:0 cyclo	2.15%	8.57	
17:0	0.44%	0.48	
18:1 w7c/w9t/w12t	11.15%	11.25	
18:0	0.74%	0.70	
19:0 iso	-	0.73	
19:0 cyclo w8c	0.30%	0.23	

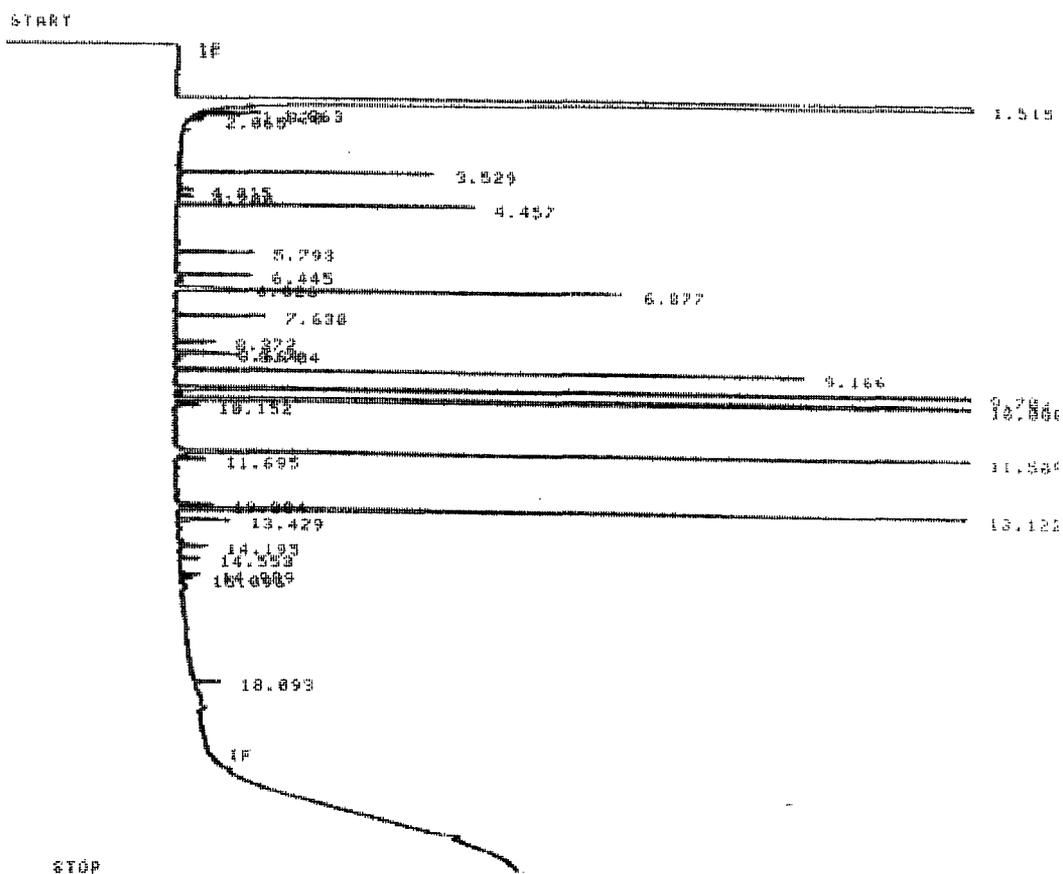


Fig. 2. Cellular fatty acid profile from the microbe HY-3

```

1  AGAGTTTGAT  CCTGGCTCAG  ATTGGACGCT  GGCGGCAGGC  CTAACACATG
51 CAAGTCGAGC  GGTACACAGG  AGAGCTTGCT  CCTGGGTGAC  GAGCGGCGGA
101 CGGGTGAGTA  ATGTCTGGGA  AACTGCCTGA  TGGAGGGGGA  TAACTACTGG
151 AAACGGTAGC  TAATACCGCA  TAACGTCTAC  GGACCAAAGT  GGGGGACCTT
201 CGGGCCTCAT  GCCATCAGAT  GTGCCAGAT  GGGATTAGCT  AGTAGGTGGG
251 GTAATGGCTC  ACCTAGGCGA  CGATCCCTAG  CTGGTCTGAG  AGGATGACCA
301 GCCACACTGG  AACTGAGACA  CGGTCCAGAC  TCCTACGGGA  GGCAGCAGTG
351 GGGAAATATTG  CACAATGGGC  GCAAGCCTGA  TGCAGCCATG  CCGCGTGTGT
401 GAAGAAGGCC  TTCGGGTTGT  AAAGCACTTT  CAGCGAGGAG  GAAGGGTAGT
451 GTGTTAATAG  CACATTGCAT  TGACGTTACT  CGCAGAAGAA  GCACCGGCTA
501 ACTCCGTGCC  AGCAGCCGCG  GTAATACGGA  GGGTGCAAGC  GTTAATCGGA
551 ATTACTGGGC  GTAAAGCGCA  CGCAGGCGGT  TTGTTAAGTC  AGATGTGAAA
601 TCCCCGCCCT  TAACGTGGGA  ACTGCATTTG  AAACGGCAA  GCTAGAGTCT
651 TGTAGAGGGG  GGTAGAATTC  CAGGTGTAGC  GGTGAAATGC  GTAGAGATCT
701 GGAGGAATAC  CGGTGGCGAA  GGCGGCCCCC  TGGACAAAGA  CTGACGCTCA
751 GGTGCGAAG  CGTGGGGAGC  AACAGGATT  AGATACCCTG  GTAGTCCACG
801 CTGTAACCGA  TGTCGACTTG  GAGGTTGTGC  CCTTGAGGCG  TGGCTTCCGG
851 AGCTAACCG  TTAAGTCGAC  CGCCTGGGGA  GTACGGCCGC  AAGGTTAAAA
901 CTCAAATGAA  TTGACGGGG  CCCGCACAAG  CGGTGGAGCA  TGTGGTTTAA
951 TTCGATGCAA  CGCGAAGAAC  CTTACCTACT  CTTGACATCC  AGAGAATTCG
1001 CTAGAGATAG  CTTAGTGCC  TCGGGAACTC  TGAGACAGGT  GCTGCATGGC
1051 TGTGTCAGC  TCGTGTGTG  AAATGTTGG  TTAAGTCCCG  CAACGAGCGC
1101 AACCCTTATC  CTTTGTGGC  AGCGCGTAAG  GCGGGAACTC  AAAGGAGACT
1151 GCCGGTGATA  AACCGGAGGA  AGGTGGGGAT  GACGTCAAGT  CATCATGGCC
1201 CTTACGAGTA  GGGCTACACA  CGTGCTACAA  TGGCGTATAC  AAAGAGAAGC
1251 GAACTCGCGA  GAGCAAGCG  ACCTCATAAA  GTACGTCGTA  GTCGGGATCG
1301 GAGTCTGCAA  CTCGACTCCG  TGAAGTCGGA  ATCGTAGTA  ATCGTAGGTC
1351 AGAATGCTAC  GGTGAATACG  TTCCCGGGCC  TTGTACACAC  CGCCCGTCAC
1401 ACCATGGGAG  TGGGTTGCAA  AAGAAGTAGG  TAGCTTAACC  TTCGGGAGGG
1451 CGCTTACCAC  TTTGTGATT  ATGACTGGGG  TGAAGTCGTA  ACAAGGTAAC

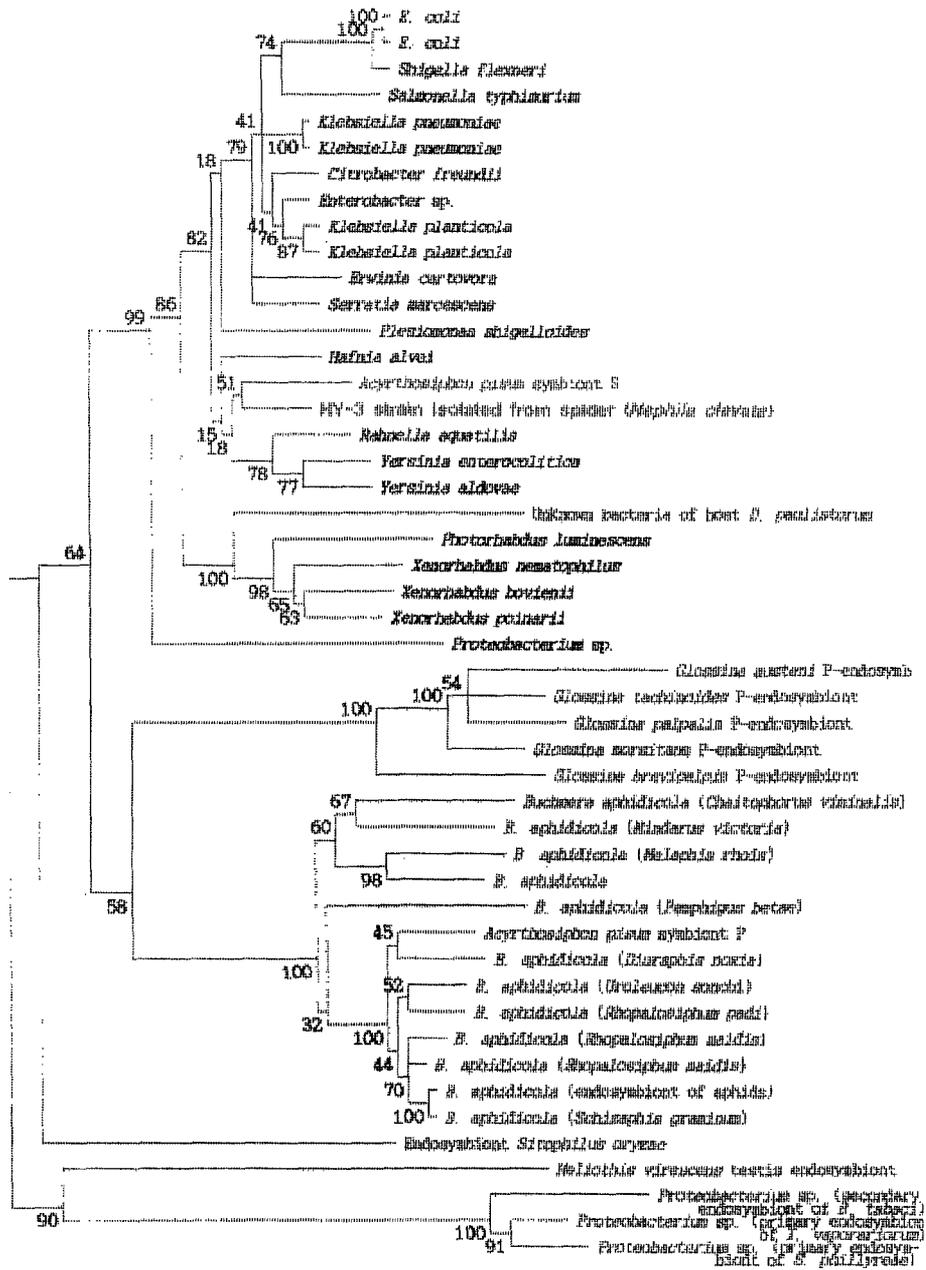
```

```

primer #1 : 8P 20-mer for full gene(1.6kb)
primer #2 : 1492R 19-mer(Lane,1991)
primer #3 : SRV3-1 19-mer for V3 region(220bp)
primer #4 : SRV3-2 19-mer(Lee et al.,1996)

```

Fig. 3. 16S ribosomal RNA sequence of HY-3



Scale: each -- is approximately equal to the distance of 0.002257

Fig. 4. Phylogenetic analysis of HY-3

나. 단백질분해효소의 아미노산 분석

순수분리된 51.5 kDa 단백질 분해효소의 아미노산조성 분석결과 Table 2에 나타난 바와 같으며 이 결과를 바탕으로 *Serratia marcescens*로 부터 분리 보고된 분자량 66 kDa의 extracellular serine protease를 비롯한 몇 개의 protease들과 유사성이 관찰되었다. N-terminal 아미노산서열 분석결과 어떤 아미노산의 signal도 관찰되지 않았으므로 N-terminal의 blocking을 추정할 수 있었다. 다음으로 그 내부의 아미노산 서열분석을 시도해 보았다.

단백질분해효소를 Glu-C를 특이적으로 절단하는 V8 protease와 함께 SDS-PAGE하여 단편화된 band에 대해 그 아미노산 서열을 분석하였다. 그 결과 얻어진 fragment들을 바탕으로 SWISS PROT database에서 검색한 결과 *Serratia marcescens*로부터 분리 보고된 아미노산 486개의 serralysin(E.C. 3. 4. 24. 40)과 높은 상동성을 나타내었다. 특히 serralysin precursor의 99번째(A)부터 110번째까지(Q) 또한 194번째(I)부터 203번째까지(P)의 두 부분과 90% 이상의 상동성을 나타냄을 확인하였다(Fig. 5).

다. HY-3 단백질 분해효소 관련 유전자의 분리

단백질분해효소의 일부 분석된 아미노산서열을 이용하여 Primer를 제작하여 *Aranicola proteolyticus* HY-3로 분리된 genomic DNA를 template로 하여 PCR을 수행, DNA 절편을 확인하였다. 이 절편을 PT7Blue T-Vector (Novagen)에 도입하여 염기서열을 결정된 결과, 양쪽 primer를 합친 염기서열의 수가 303개로 나타났다(Fig. 6.). Primer를 제외한 265개의 염기서열은 *Serratia* sp. E-15의 metalloprotease 유전자의 염기서열의 89%의 상동성을 나타냈으며, *Serratia marcescens* SM6의 metalloprotease 유전자와는 88%의 상동성을 나타냈다. 유전자의 아미노산서열을 비교하면 각각 93%로 나타나 단백질분해효소의 일부분임을 알 수 있었다. 이 유전자 절편을 이용하여 inverse-PCR을 수행하였다. 그 결과 1,461개의 염기가 open reading frame을 구성하고 있으며, 이 open reading frame은 487개의 아미노산으로 구성된 단백질 분해효소로 전사될 수 있는 염기서열을 갖는다는 것을 알 수 있었다 (자료 미제시). Open reading frame의 upstream에 16개의 염기를 사이에 두고 -35 region

(TGTGCA)과 -10 region(TATAAT)의 염기서열이 보존되어 있으며, 리보솜 결합부위로 알려진 Shine-Dalgarno(SD) 염기서열이 개시 코돈 앞에 존재한다. 또한, downstream에 전사 terminator로 보이는 palindromic 염기서열이 나타난다.

Table 2. Amino acids composition of 51.5 kDa protease.

Amino acid	Composition ratio (%)
Asp	14.6
Glu	4.5
Ser	8.2
Gly	16.2
His	4.5
Arg	6.2
Thr	7.8
Ala	11.3
Pro	3.5
Val	5.7
Met	0.8
Ile	5.7
Leu	5.9
Phe	5.1
Total	100

		▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼		▼	▼	
Serralysin	99	A	E	Q	Q	Q	Q	Q	K	L	S	L	Q	110
단백질분해효소	1	A	E	Q	Q	Q	Q	Q	K	L	X	L	Q	12
		▼	▼	▼	▼	▼	▼		▼			▼		
serralysin	194	I	G	H	A	L	G	L	S	H	P		203	
단백질분해효소	1	I	G	H	A	L	G	A	S	Y	P		10	

Fig. 5 . Similarities of 51.5 kDa protease fragment

GCGGAACAGC	AGCAGCAGGC	TAAGCTGTGC	CTGCAGTCCT	GGTCTGACGT	50
GGCCAATATC	ACCTTTACCG	AAGTTTGGTGC	CGGCCAGAAG	GCCAATATCA	100
CCTTCGGTAA	CTACAGCCAG	GATCGTCCCG	GCCATTATGA	CTACGATACC	150
CAGGCTTACG	CCTTCCTGCC	GAACACCATT	TATCAGGGCC	AAACCTGGG	200
CGGGCAGACT	TGGTACAACG	TCAACCAGTC	CAACGTGAAA	CATCCGGCCA	250
GCGAAGACTA	CGGCCGCCAG	ACCTTTACCC	ACGAGATTGG	CCATGCGCTG	300
GGT					350

Fig. 6. Nucleotide sequence of PCR fragment from *Aranicola proteolyticus* genomic DNA.

라. 배지 최적화

단백질 분해효소의 생산을 증대시키기 위해 Plackett-Buman의 방법을 이용한 15가지 배지 조성 가지고 실험을 하였다. 탄소원, 질소원 그리고 무기물을 포함하여 비교 실험을 하였다 (Table 3). 단백질 분해효소를 생산하기위한 질소원에서는 corn-steep solid, tryptone, 그리고 sodium nitrate 보다 NZ-amine, yeast extract 그리고 ammonium sulfate가 보다 좋은 효과를 보였다. 그러나 glucose, glycerol, sucrose, 그리고 souble starch를 포함한 모든 탄소원에서는 효과를 보이지 않았다 (Oreilly T., et al 1983, Frankena, T., et al 1985).

마. 탄소원 및 질소원에 의한 단백질 분해효소의 생산

단백질 분해효소의 생산에 영향을 주는 탄소원 및 질소원을 찾기 위해서 교반기에서 시험관 배양을 통해서 실험을 하였다 (Table 4) (Giecke UE., et al 1991, Kole, M.M., et al 1988). TY 배지에 탄소원, 질소원, 계면활성제, 그리고 복합 배지를 혼합하여 실험을 하였다. 27가지의 첨가제 중에서 lactose, galactose, olive oil, 그리고 linseed oil와 같은 탄소원은 단백질 분해효소의 활성화에 증가를 보였다. 또한, 계면활성제인 Tween-80에 의해서 단백질 분해효소의 활성화는 168%의 증가를 보였다. 특히 30%의 탄수화물을 포함하고있고 복합

질소원으로 알려져 있는 soybean meal (Fermentation media ingredient analysis table, Traders Protein, Southern Cotton Oil Co., USA)에서는 306배나 높은 증가를 보였다.

탄소원 중 galactose를 포함하고 있는 lactose, raffinose 그리고 galactose 같은 경우에 모두 활성이 증가하는 양상을 보였다. 그러나, glucose를 포함하고 있는 탄소원인 maltose, trehalose, soluble starch, carboxymethyl cellulose, 그리고 sucrose같은 경우에는 낮은 활성을 나타냈다. 진탕 배양의 실험결과 glucose를 1%, 그리고 3% 첨가해 줌에 따라서 각각 20.2%와 76.9%의 감소함을 보였다 (Table not shown). 단백질 분해효소의 저해는 glucose의 농도와 시간에 의존함을 알 수 있었다 (Sunitha. K., et al 1999, Bierbaum G., et al 1994).

바. 최적 배양 조건의 확립

Aranicola proteolyticus HY-3 protease의 발효 환경 및 대량 배양을 결정하기 위해서 발효조 배양을 행하였다 (Moon, S.H., et al 1991, Moon S.H., et al 1993). 발효조는 NBS Bioflo III (New Brunswick Scientific Co.)를 사용하였으며 총 5L 배양조에 3.5L 배양을 통하여 발효 환경과 대량 배양을 하기 위한 조건 실험을 행하였다. 또한 사용한 배지는 TY 배지로 0.5% Bacto-tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.1% NaCl, 0.05% KCl, 0.02% CaCl₂, 그리고 0.02% MgSO₄ · 7H₂O를 사용하였으며 배양환경 조건을 위한 배지 상의 pH 조절은 2N HCl을 사용하여 조절을 하였다.

기본 배양 조건 (28°C, 0.5vvm 그리고 400rpm)을 통해 70시간 동안 배양을 해 보았다. *A. proteolyticus* HY-3의 성장은 12 시간에 최대에 이르렀으며 protease의 생산은 미생물의 성장과 함께 생산되는 growth-associate 형태를 보였다. 또한 protease의 생산은 15시간에 11.8 unit/mL로 최대 생산을 보였으며 18 시간 이후부터는 protease의 자가 분해 (autolysis) 등으로 인해 급격히 감소 하는 양상을 보였다 (Fig. 7).

A. proteolyticus HY-3의 성장과 protease의 안정성 및 생산을 고려하여 몇 가지 환경 요인을 바꾸어 주면서 생산 양상을 조사해 보았다. 먼저 온도에 의한 변화를 알아보기 위해 온도를 22, 25, 28 그리고 30°C로 바꾸어서 실험을 해 보았다. 온도의 변화에 의해서 *A.*

proteolyticus HY-3의 성장은 큰 차이를 보이지는 않았으나 protease의 생산에는 많은 변화를 보였다. 30, 28°C의 높은 온도에서는 protease의 생산하는 시기는 22, 25°C 보다 4시간 정도 빠른 양상을 보였다. 그러나 생산된 protease의 안정성 및 최대 생산은 비교적 낮은 온도인 22°C에서 높게 나타났다. 배양하는 중의 생산된 protease의 자가 분해 및 안정성 그리고 미생물의 성장을 고려해서 22°C를 최적 배양온도로 행하였다.

배양 최적 pH를 정하기 위해서 pH 조절을 하지 않은 환경과, pH 7.0, 8.5로 조절을 하여 배양을 해 보았다. pH 8.5로 조절을 했을 때 pH 조절을 하지 않은 것과 pH 7.0으로 조절을 한 것은 각각 1.23배, 1.58배의 protease 활성 증가를 보여 pH 7.0으로 조절을 했을 때 protease 생산의 향상을 알 수 있었다.

실험에서 결정된 조건 (22°C, pH7.0 control)을 바탕으로 배양기의 0.14, 0.50, 0.89 vvm의 통기 속도를 바꾸어 비교 실험해 보았다. 비교해 본 결과 0.14 vvm은 낮은 미생물 농도와 protease 생산에 비교해서 0.5vvm의 통기 속도는 높은 protease의 생산, 0.89 vvm은 높은 미생물 농도를 보였다.

A. *proteolyticus* HY-3의 성장 속도, protease의 최대 생산과 안정성 및 최대 생산 시기를 고려해서 배양 온도 22°C, pH 7.0으로 조절, 배양 통기 속도 0.50 vvm을 최적 배양 환경으로 결정하였다. 결정된 배양 환경은 기본 배양 조건과 비교해서 A. *proteolyticus* HY-3의 농도는 OD₆₀₀에서 5.18에서 12.49로 2.4배 그리고 protease의 활성은 11.76 unit/mL에서 23.43 unit/mL로 2배 정도의 증가와 배양 중에도 지속적인 protease 활성의 안정성을 보였다 (Table 5).

산업적 이용을 위한 대량 배양의 전 실험을 위해서 기본 배지에서 5배 농축한 배지를 이용하여 배양을 실행 해 보았다. 즉 사용한 배지는 Bacto-tryptone 25g/L, Yeast extract 25g/L, NaCl 10g/L, KCl 5g/L, CaCl₂ 2g/L, 그리고 MgSO₄ · 7H₂O 2g/L로 농축을 하지 않았을 때 보다는 2.2배의 미생물 농도 그리고 2.3배의 protease 활성의 증가를 보임을 알 수 있었다.

대량 배양을 위한 scale-up 조건으로 3.5L 배양 (5L fermenter 발효조)에서 37배 scale-up시킨 130L 배양(300L 발효조)를 통해서 발효를 하였다. 발효 조건은 앞에 결정된

사항 즉, 5배 농축한 기본 배지, 배양 온도 22°C, pH 7.0으로 조절 그리고 배양 통기 속도 0.50 vvm을 이용하였다. 발효 배양 시간은 20 시간 동안 하였으며 세포 농도는 12 시간에 최대로 OD₆₀₀에서 29.9를 보였으며 대수 증식기 동안의 specific growth rate (μ_{max})는 0.901 h⁻¹를 보였다. 또한 protease는 6시간부터 생산하기 시작하여 20시간 까지 지속적인 생산 양상을 보여 주었으며 20시간에 43 unit/mL을 보였다.

300L 발효조를 이용한 130L 대량 배양에서도 5L 발효조를 이용한 3.5L 배양과 비교해 볼 때 *A. proteolyticus* HY-3의 성장과 protease의 생산 및 배양 기간중의 안정성 측면에서 큰 차이를 보이지 않아 대량 배양을 위해 배지의 commercial 배지로의 전환 그리고 대량 배양 중의 경제적인 측면 등을 고려 한다면 대량 배양을 위한 산업적 이용이 가능한 것으로 생각된다.

Table 3. Nutritiation variables and their effect on HY-3 protease production.

Variable	t-value	Significant level
glucose / glycerol	0.713	
sucrose / soluble starch	0.720	
cornsteep solid / NZ-amine	-1.260	> 75%
Yeast extract / tryptone	2.230	> 90%
NaNO ₃ / (NH ₄) ₂ SO ₄	-1.490	> 75%
ZnSO ₄ / FESO ₄	-1.940	> 90%
MGSO ₄ / MGSO ₄	-0.140	
NaCl / KCl	0.258	

Table. 4. Nutritional variables and their effects on the production of portease HY-3.

Media ingredients	Protease, U/mL	Relative activity (%)
Control	5.51	100
glucose	3.02	55
maltose	1.19	22
trehalose	10.88	65
soluble starch	2.01	36
carboxymethyl cellulose	4.21	76
mannose	10.39	62
arabinose	4.38	26
fructose	17.52	106
galactose	8.25	150
lactose	16.29	296
raffinose	23.39	425
chitin	5.63	34
galactosamine	7.80	47
sucrose	3.89	71
glycerol	1.57	28
mannitol	1.54	28
sorbitol	1.27	23
xylose	0.25	5
tween-80	9.23	168
olive oil	11.97	217
sunflower oil	6.18	112
corn oil	4.03	73
linseed oil	15.59	283
soybean flour	16.87	306
soybean oil	16.30	98
soytone	15.66	94
cotton seed flour	5.49	100

사. HY-3 단백질분해효소 특성

1) 기질특이성

단백질 분해효소의 여러 가지 기질에 대한 분해능을 알아보기 위해서 기본이 되는 단백질 분해능 실험을 수행하였다. 30분 동안 반응을 행하였을 경우 collagen의 분해능이 가장 우수한 편이 있으며 gelatin에 대해서는 다른 비교 단백질 보다 낮은 분해능을 보였다. 그러나 2시간 정도 반응이 진행 되면서 모든 단백질의 분해 양상이 보였으며, 24시간 후에는 albumin이 가장 많은 분해율을 보이고 24시간 후의 albumin의 분해율을 100으로 보았을 때 다른 모든 단백질에서 40 이상의 분해함을 확인 할 수 있었다.

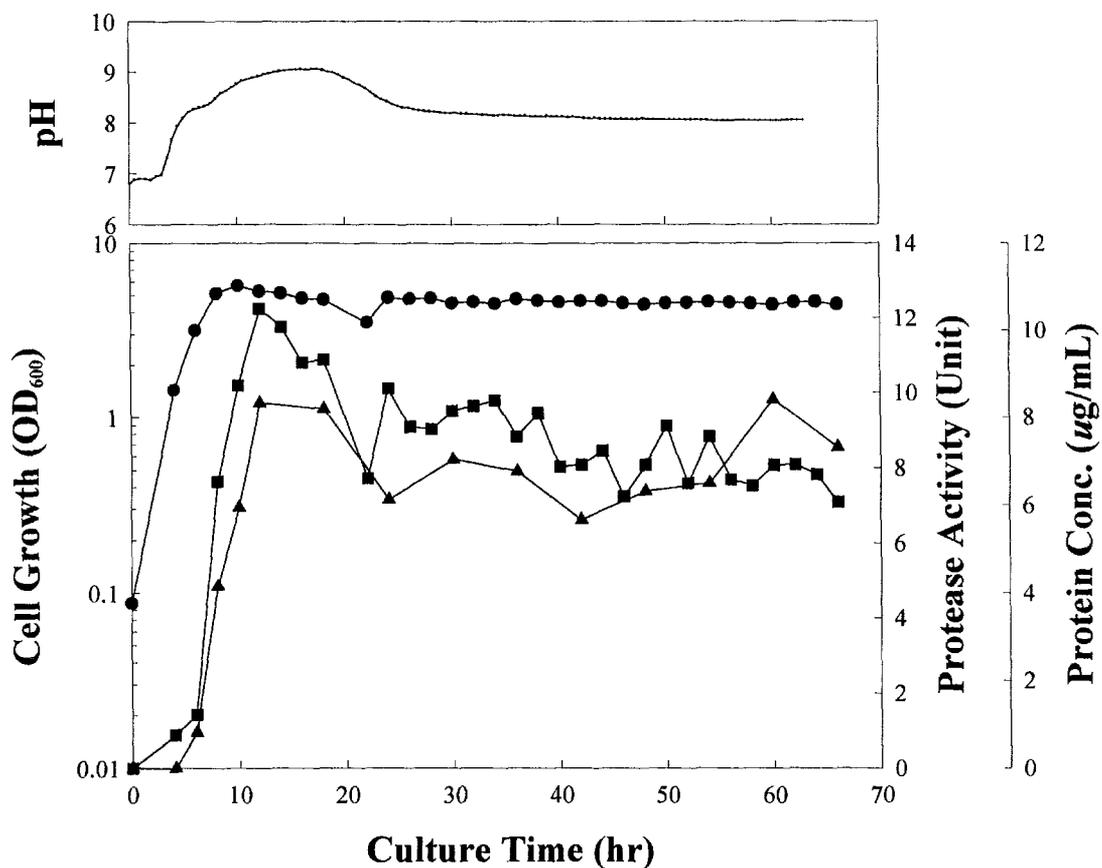


Fig. 7. Time profiles of cell growth (OD₆₀₀), protease production by batch fermentation of *Aranicola proteolyticus* HY-3 on TY medium. Culture condition are 28°C, 400 rpm, 0.5 vvm and pH uncontrolled.

Symbols are : (●), Cell growth (OD₆₀₀) ; (■), Protease activity (unit/mL); (▲), Protein concentration (μg/mL)

Table 5. Comparison of maximum protease production time, cell growth and protease activity on different fermentation condition.

Fermentation condition			Time (h)	Cell growth (OD ₆₀₀)	Protease activity (Unit/mL)	Relative activity (%)
pH	Temperatur e (°C)	vvm				
without	28	0.50	14	5.18	11.76	100
7.0	28	0.50	22	9.14	15.05	128
8.5	28	0.50	16	4.66	9.55	81
7.0	22	0.50	21	12.49	23.43	199
7.0	25	0.50	28	5.90	19.38	164
7.0	30	0.50	18	5.90	23.37	198
7.0	22	0.89	18	11.24	20.53	180
7.0	22	0.14	42	3.23	8.65	74

2) 효소 저해제

단백질 분해효소의 저해제의 영향을 조사하기 위하여 효소액을 amino peptidase 저해제인 antopain, metalloendopeptidase의 저해제인 phosphoramidon, aspartate protease 저해제인 pepstatin, trypsin 저해제인 antipain dihydrochloride, cysteine 저해제인 E-64 (L-trans-exoxysuccinylleucylleucylamido(4-fuanidino)butane), chymotrypsin 저해제인 chymostatin, serine protease 저해제인 leupeptin, pefabloc SC, aprotinin, PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride), metalloprtease 저해제인 EDTA(Ethylene diamine

tetraacetic acid), phenanthroline들을 각각 1 mM의 동일 농도로 5 분간 37°C에서 전처리를 한 다음 상대 활성을 측정한 결과 금속성 단백질 분해효소의 저해제인 EDTA와 phenanthroline에서 각각 39, 30 %의 상대적인 활성의 저해를 보였다 (Table 6).

3) 온도의 영향

효소활성에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과 Fig. 9.과 같이 37°C에서 최대 활성을 보였으나 45°C 이상에서 급격히 효소활성이 감소하였다. 45°C에서 70°C까지 24~16%의 상대적인 활성을 유지하였으나 80°C에서는 거의 실활하였다. 그러나 저온 즉, 4°C에서 15°C 사이에서는 상대적으로 40~50%의 상대적으로 높은 상대활성을 나타냈으며, 20°C 에서 37°C 사이에서도 80% 이상의 상대적인 효소활성을 보유하고 있었다.

열에 대한 안정성 실험에서는 30°C 까지 180분간 80% 이상의 열의 안정성을 보인 반면 37°C에서는 60분후에 60%의 상대적인 활성을, 그리고 180분에서는 40%의 상대적인 활성을 보였다. 50°C가 증가 함에 따라 열에 안정성은 급격히 실활이 되어 60분 후에는 활성을 거의 모두 잃어버렸다. 열의 안정성에 대한 Arrhenius plot을 해 보았을 경우 도표상에 일직선을 만들 수 있는 부분은 4~37°C 로서 azo-casein을 기질로 사용하였을 경우의 E_a 는 2.432 kcal/mol을 보였다.

4) pH의 영향

단백질 분해효소의 pH에 대한 영향은 Fig. 10. 에서와 같이 최적 pH가 8.0~8.5로 약 알칼리성을 보여 염기성 protease인 것으로 나타났다. 또한 pH가 5~12까지 80%정도의 상대적인 활성을 보이고 있어 pH에 대한 범위가 넓은 것으로 나왔다. 또한, pH에 대한 안정성의 실험에서는 pH8.0에서의 안정성이 최고로 나왔으며 pH 6~11까지는 60% 이상의 안정성을 보였다.

Table. 6. Product of TCA-soluble protein at 24h incubated by protease HY-3

	Relative activity (%)					
	albumin	casein	collagen	elastin	gelatin	hemoglobin
0.5 h	11	6	17	12	2	7
2.0 h	28	22	23	23	22	10
24 h	100	63	56	41	40	42

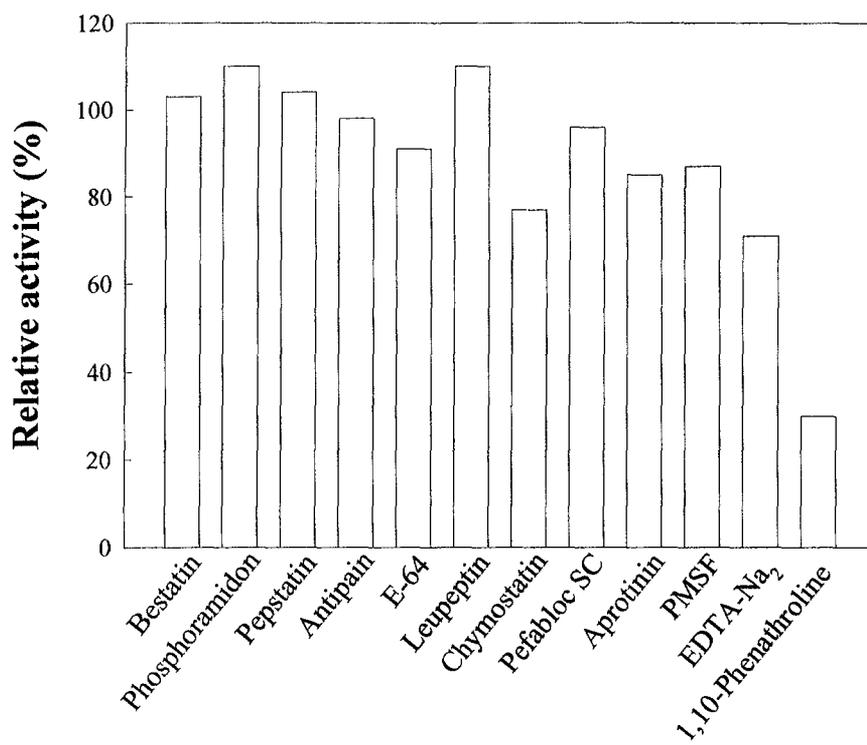


Fig .8. Proteolytic activity of protease from *A. proteolyticus* HY-3 in the presence of protease inhibitor.

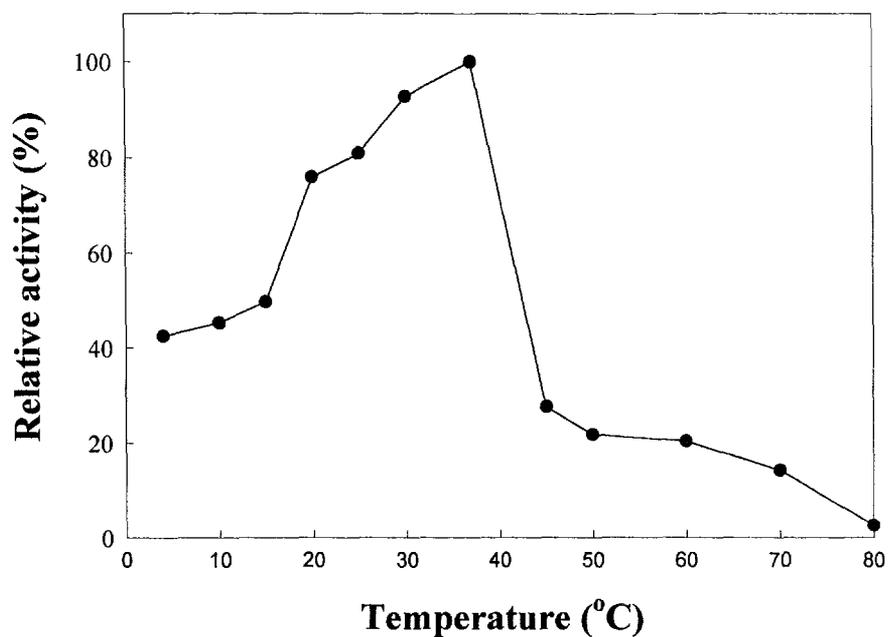


Fig. 9. Effect of optimum temperature on the activity of protease HY-3.

Relative activity was determined at pH 7.6 and at different temperature by a standard activity assay. The values obtained at 37°C were taken as 100%. Relative activities are the range for two independent experiments.

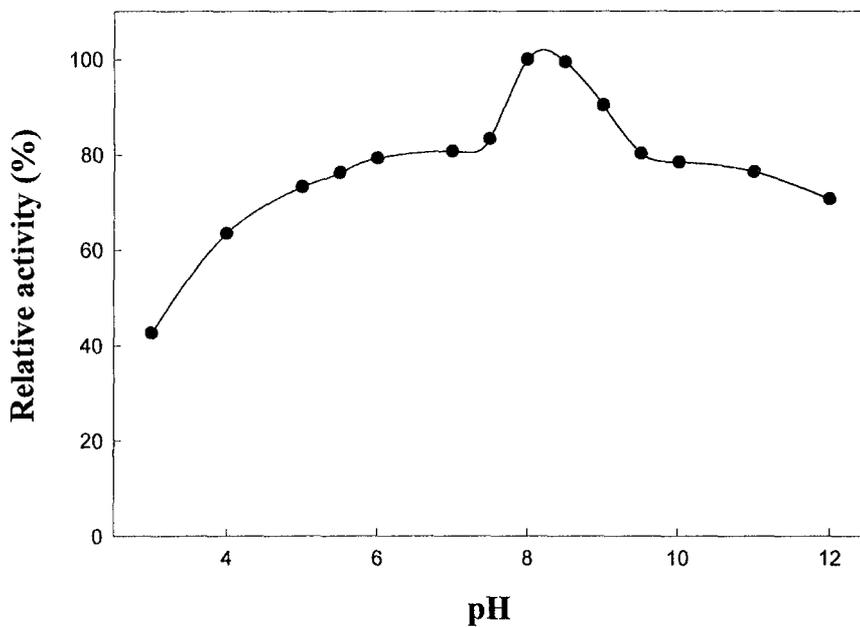


Fig. 10. Effect of Optimum pH of HY-3 protease on the activity of protease. The activity at pH 8.0 was taken as 100% activity.

4. 참고 문헌

Aunstrup, K., Andresen, O. 1974. Enzyme products. U.S. Patent 3,827,933.

Braun V and Schmitz G (1980) Excretion of a protease by *Serratia marcescens*. *Archiv. Microbiol.* **124**: 55-61.

Bierbaum. G., M. Karutz, D. Weuster-Botz, and C. Wandrey, 1994. Production of protease with *Bacillus licheniformis* mutants insensitive to repression of exoenzyme biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol.* **40**: 611-617

Frankena, J., H.W. van Verseveld, and A. H. Stouthamer, 1985. A continuous study of the bioenergetic aspects of growth and production of exocellular protease in *Bacillus licheniformis*. *App. Microbiol. Biotchnol.* **22**:169-176.

Giecke UE, Bierbaum G, Rudde H, Spohn U, Wandrey C. 1991 Production of alkaline protease with *Bacillus licheniformis* in a controlled fed-batch process. *Appl Microbiol Biotechnol.* **35**: 720-724

Hase CC and Finkelstein RA (1993) Bacterial extracellular Zinc-containing metalloproteases. *Microbiol. Rev.* **57**: 823-837.

Henriette, C., S. Zinbi, M. F. Aumaitre, E. Petitedmang, H. Petitedmange, 1993. Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens* (532S). *Industrial Microbiol.* **12**:129-135

- Kole, M.M., Draper, I., Gerson, D. F. 1988. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **41**: 197-206.
- Lakshmi, B.S., P. Kanguane, B. Abrham and G. Pennathur, 1999. Effect of vegetable oils in the secretion of lipase from *Candida rugosa* (DSM 2031). *Letter. Appl. Microbiol.* **29**: 68-70
- Leammi UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head. *Nature.* **227**: 680-685.
- Long, S., m. A. Mothibeli, F. T. Robb, and D. R. Woods. 1981. Regulation of extracellular alkaline protease activity by histidine in a collagenolytic *Vibrio alginolyticus* strain. *General. Microbiol.* **127**:193-199
- Monaghan RL and Koupal LR (1989) Use of Plackett & Burman technique in a discovery program for new natural products. In: *Novel Microbial Products for Medicine and Agriculture*, AL Demain, GA Somkuti, JC Hunter-Cevera and HW Rossmore, eds. pp 25-32, Netherlands: Elsevier.
- Moon, S.H., and S.J. Parulekar 1993. Some observations on protease production in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnol and Bioeng.* **41**: 43-54
- Moon, S.H., and S.J. Parulekar 1991. A parametric study of protease production in batch and fed-batch culture of *Bacillus firmus*. *Biotechnol and Bioeng.* **37**: 467-483

- Obradors N., J. L. Montesions, F. Valero, F. J. Lafuente, and C. Sola, 1993. Effect of different fatty acid in lipase production by *Candida rugosa*. *Biotech. Lett.* **15**: 357-360.
- Oreilly. T., and D. F. Day, 1983. Effects of cultural condition on protease production by *Aeromonas hydrophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1132-1135
- Park HY, Lim JY, Han CH, Park SS, Oh HW, Bae KS, Lee DH, Lee MS, Lee KH, Son KH (1997) Korea Patent 97-6150.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS and Deshpande VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 597-635.
- Son KH, Kim YK, Lee HY, Lee WS, Kim SU, Jeong TS, Kwon BM and Bok SH (1996) Amplification of farnesyl protein transferase inhibitory activity from *Aspergillus fumigatus* F93 by Plackett-Burman design. *Biotech. Lett.* **18**: 1297-1300.
- Stowe RA and Mayer RP (1966) Efficient screening of process variables. *Ind. Eng. Chem.* **58**, 36-40.
- Sunitha. K., Y.S. Park, T.K Oh, and J. K Lee, 1999. Synthesis of alkaline protease by catabolite repression-resistant *Thermoactinomyces* sp. E79 mutant. *Biotechnology. Lett.*, **21**: 155-158

- Wilkes, M., and W. Harder. 1978. A continuous culture study of the regulation of extracellular protease production in *Vibrio SAI*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **44**: 141-155
- White, D. 1995. *The physiology and biochemistry of prokaryotes*. Oxford University press, Oxford, UK
- Wei, M.L., D.A. Webster, and B.C. Stark, 1998. Metabolic engineering of *Serratia marcescens* with the bacterial hemoglobin gene: Alteration in fermentation pathways. *Biotechnol. Bioeng.* **59**: 640-646
- Yang, F.C., and I.H. Lin, 1998. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Technol.* **23**: 397-402.

제 4절 벌독으로부터 ACAT와 CETP 활성저해물질의 분리

1. 서 설

Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT, EC 2.3.1.26)은 cholesterol의 에스터화를 통한(Mahley et al. 1984) 동맥에서의 cholesterol ester 축적(Bell 1986)과 장으로부터 cholesterol 흡수 및 간에서의 지단백질 형성(Heider 1986)에 중요한 역할을 하는 효소이다. ACAT 활성화에 의해 form cell이 cholesterol로부터 유도된 다량의 cholesteryl ester를 포함하기 때문에, 실험적, 임상적인 측면에서 macrophages와 smooth muscle cell로부터 유도된 form cell의 형성은 매우 중요하다. 혈관벽내의 form cells의 증식은 ACAT 활성증가와 직접적으로 연관되어 있기 때문에(Kathawala and Heider 1991), 강력한 항동맥경화제로써 ACAT 저해제의 개발은 바람직하다.

최근의 여러 가지 임상적 시도는 혈장 cholesterol의 낮은 수치가 관상심장질환에 유리하다는 것을 증명하고 있다. 사람혈장의 cholesteryl ester transfer protein(CETP)는 고밀도지단백질(HDL)과 저밀도지단백질(LDL) 사이에서 cholesteryl ester와 triglyceride의 교환을 촉진한다(Tall 1986). 또한 CETP는 혈중 cholesterol을 간을 통해 체외로 제거하는 유일한 기작인 콜레스테롤 역수송 경로(reverse cholesterol transport pathway)에서 각 지단백질의 지질구성을 조절하는 유효효소로서, 동맥경화증의 발병에 있어 매우 중요한 인자로 알려져 있다(Assmann 1990). 혈중 CETP 활성이 거의 없는 것으로 보고된 pig나 rat에서는 동맥경화증의 유발이 거의 없다고 보고되어 있다(Ha 1982). 좀 더 직접적인 증거로는 일본에서 발견된 혈중 CETP 결핍 가계의 경우, 혈중 LDL치는 현저히 낮아지고, HDL치는 현저히 높으며 혈중 총 cholesterol치는 정상인에 비해 2-3배 가량 높으나, 동맥경화는 발병하지 않는 것으로 보고하였으며(Koizumi et al. 1985), 다른 group에서 발견한 CETP deficiency family에서도 같은 결과를 보여 주었다.

혈장 CETP 저해제와 ACAT 저해제는 동맥경화성 심장순환계질환의 효과적인 치료제 개발의 좋은 후보대상이다. 따라서 곤충자원으로부터 ACAT와 CETP 저해제 탐색 연구를

통해, 꿀벌독의 추출물로부터 분리된 ACAT 저해활성과 CETP 저해활성을 동시에 나타내는 물질에 관하여 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

가. 시약 및 시료

[1-¹⁴C]oleoyl-CoA(CFA 634, 54 mCi/mmol)과 CETP-[³H]SPA(scintillation proximity assay) kit는 Amersham Life Science(Buckinghamshire, England)에서 구입하였으며, HPLC column(YMC-pack ODS-C18)은 YMC Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하였고, 모든 reagent grade chemical들은 Sigma, Aldrich, Merck Co.등에서 구입하였다.

시료인 꿀벌독은 한국과학기술연구원 생명공학연구소 곤충자원실에서 유지보존되고 있는 이탈리아계 꿀벌(*Apis mellifera*)로부터 수집하였다.

나. ACAT의 부분 정제

ACAT 효소원으로는 흰 쥐(male Sprague-Dawley 150~200 g)의 간조직을 분리하여 (Erickson *et al.* 1980) 생리식염수로 세척하고 4배 용량의 완충액 A (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.01 M Tris, pH 7.4)를 가한 다음 ice bath 에서 Teflon homogenizer 로 균질화하였다. 균질액을 14,000 x g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후 100,000 x g 에서 1시간동안 초원심분리하였다. 이 침전물을 완충액 B (0.25 M sucrose, 0.01 M Tris, pH 7.4)로 수세하고 분쇄시킨 후 1시간동안 100,000 x g 에서 다시 초원심분리를 행하였다. 2차로 얻은 침전물을 4 mL 의 완충액 B에 현탁시킨 후 bovine serum albumin 을 표준단백질로 사용하여 Lowry와 Rosebrough 방법(1951)에 따라 단백질을 정량하고 단백질 농도가 8~10 mg/ml 가 되도록 희석하여 200 μ l씩 분취한 후 -80 $^{\circ}$ C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. ACAT의 활성 측정

ACAT 활성의 측정은 [$1-^{14}\text{C}$] oleoyl-CoA를 기질로 하여 Brecher & Chan (1980)의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. 10 μl 발효 상등액, 4.0 μl microsomal enzyme, 20.0 μl assay buffer (0.5 M KH_2PO_4 , 10 mM DTT, pH 7.4), 40 mg/ml BSA (지방산이 제거된 것, Sigma A6003) 15.0 μl , 20 mg/ml cholesterol 2.0 μl , 41.0 μl H_2O 를 가하여 37°C 에서 15분간 예비반응시켰다. 이 반응액에 [$1-^{14}\text{C}$] oleoyl-CoA (0.02 μCi , 최종농도 10 μM) 8 μL 를 첨가하여 다시 37°C 에서 15분간 반응시킨 후 isopropanol-heptane (4:1 ; v/v) 1 ml을 가하여 반응을 정지시키고, heptane 0.6 ml와 5배로 희석한 assay buffer 0.4 ml를 첨가한 후 원심분리를 행하였다. 효소활성의 측정은 원심분리하여 얻은 상층액 100 μl 에 cocktail(Lipoluma, Lumac Co.) 4 ml를 첨가한 후 liquid scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

라. CETP의 부분정제

CETP은 적십자 혈액원으로부터 구입한 신선한 human plasma로부터 이미 보고된 방법 (Pattnaik *et al.* 1978; Kato *et al.* 1989; Rehberg *et al.* 1994)들을 종합하여 부분정제하였다. Human plasma 920 ml(5 pack)에 MnCl_2 (final conc. 0.2 M)와 Na-dextran sulfate 10% 용액(final conc. 1.2%)을 첨가한 후, 10,000 x g(Sorvall RC5C, GS-3 rotor, 8,000 rpm)에서 30분간 원심분리하여 침전된 lipoprotein을 제거한 상등액을 얻었다. 이 상등액에 최종농도가 70 mM이 되도록 BaCl_2 를 첨가한 후 10,000 x g에서 30분간 2차 원심분리를 하여 Na-dextran sulfate의 잔여물이 제거된 lipoprotein deficient plasma(LPDP)를 얻었다. 이 lipoprotein deficient plasma에 고체 NaCl을 첨가하여 용액농도가 4 M이 되도록 만든다음, 200 ml의 phenyl-sepharose CL-4B에 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 교반함으로써 단백질을 resin에 흡착시킨 후, fritted-glass funnel을 이용하여 4 M NaCl 용액 200 ml로 세척하고, 연이어 500 ml의 완충용액 A(50 mM Tris · HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4)로 세척한 다음 glass column(2.5x50 cm)에 충전하였다. 완충용액 A로 280 nm에서의 흡광도가 0.3 이하가 되도록 세정하고, 0.02% NaN_3 를 포함하는 H_2O 를 이용하여 CETP를 용출하였다. CETP 용

출분획에 0.5 M Na-acetate 완충용액을 1/9분획 부피만큼 첨가하여 용출액의 pH를 4.5로 맞추는 다음 10,000 x g에서 30분간 원심분리하여, 생성된 침전물을 제거한 상등액으로부터 CM-cellulose ion exchange column을 이용하여 CETP를 부분정제하였다. 완충용액 B(50 mM Na-acetate, pH 4.5, 1 mM Na₂EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol)로 평형된 CM-cellulose column (1.6x20 cm)에 그 상등액을 적용하고 완충용액 C(90 mM NaCl을 포함하는 완충용액 B)로 세정한 후, 90 mM에서 400 mM로 NaCl 농도를 증가시키면서 용출, 분획하였다. CETP 분석에 의해 얻은 활성분획을 1 mM Na₂EDTA, 10 mM β-mercaptoethanol, 0.02% NaN₃를 포함하는 완충용액 A로 투석하고, bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry 등의 방법에 따라 단백질을 정량하고 단백질 농도가 0.13~0.15 mg/ml가 되도록 희석하여 소량씩 분획한 후 -80℃ 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

마. CETP의 활성 측정

콜레스테릴 에스테르 전이단백질(CETP)의 활성 측정은 [³H]-CETP 섬광근접 분석방법(scintillation proximity assay: Hart & Greenwald 1979; Bosworth & Towers 1989)을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. [³H]-cholesteryl ester가 HDL로부터 Biotin과 결합된 LDL로 운반되고, 이 Biotin-LDL은 Avidin과 결합된 scintillation molecule (fluomicrosphere)와 결합함으로써 수용액상에서 ³H의 β-emitter가 scintillant molecule과 아주 가까운 거리에 인접함으로써 energy(빛)를 내게되며, 이 빛의 강도를 측정함으로써 CETP의 활성을 검색하게 된다.

CETP 활성 측정 전에 모든 시약을 얼음물로 냉각하였다. 1 ml 짜리 원심분리튜브에 10 μl의 분석완충액 (50 mM Hepes, 0.15 M NaCl, 0.1%(w/v) NaN₃, pH 7.4), 10 μl의 [³H] cholesteryl ester HDL, 10 μl의 biotin LDL을 혼합한 후 10 μl의 CETP (사람의 혈장으로부터 분리된 것, 1.3~1.5 μg)을 첨가하여 반응을 시작하였다. 이때 공시료는 10 μl의 CETP 대신에 10 μl의 물을 첨가하였으며, 대조구로는 10 μl의 시료 대신에 물이나 메탄올을 첨가하여 같은 조건에서 반응시켰다. 37℃에서 4 시간 동안 반응시킨 후, 200 μl의

SPA beads를 첨가하여 반응을 정지시키고, 평형에 도달하도록 실온에서 1 시간동안 정치시켰다. CETP 활성 측정은 반응시킨 원심분리튜브를 액체섬광계수기 (Liquid scintillation counter)를 이용하여 HDL로부터 LDL로 전이된 cholesteryl ester의 양을 CPM (count per minute)의 단위로 결정하였다.

ACAT 및 CETP 활성저해율은 다음 식으로부터 구하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{Sample (cpm)} - \text{Background (cpm)}}{\text{Control (cpm)} - \text{Background (cpm)}} \right]$$

3. 결과 및 고찰

가. 꿀벌독로부터 ACAT 및 CETP 활성저해물질의 분리·정제

이탈리안계 꿀벌(*Apis mellifera*)로부터 독낭을 해부, 적출하고 이를 슬라이드글라스에서 독액을 압출시킨 후 상온에서 건조하였다. 100 mg의 건조상태 벌독을 10 mg/ml의 농도가 되도록 증류수에 용해시킨 후, 역상 silica-gel column chromatography(30 idx30 mm, C-18, 40-63 μ m, Merck)를 행하였으며, 용출액으로는 H₂O, 9:1, 7:3, 5:5, 3:7 H₂O/MeOH, MeOH을 각각 60 ml씩 이용하였다. 효소활성 저해물질이 함유된 분획(Fr. 1 & 2)을 모아서 진공농축한 후, preparative HPLC column(YMC-PACK ODS-18, 20x250 nm, YMC Co.)을 이용하여 분리하였다. HPLC column을 0.1% TFA/acetonitrile (80:20, v/v)로 평형시킨 후, acetonitrile의 농도를 linear gradient (20-70%)로 증가시키면서 역상 HPLC (4 ml/min, detection 225 nm)를 수행하였다. HPLC를 이용하여 분리된 양상을 Fig. 1에 나타내었으며, 각각의 분획에 대하여 재료 및 방법에서 제시한 방법에 의해 활성을 조사한 결과 ACAT와 CETP에 대해 강한 저해활성을 보이는 분획(Rt=29.5 min)을 얻었고, 이 분획을 감압하에서 농축하여 acetonitrile과 TFA를 날려보낸 후 동결건조 (Freeze Dry-System, Il Sin Engineering Co.)하여 약 10 mg의 건조된 시료를 얻을 수 있었다.

나. ACAT 및 CETP 저해활성물질의 구조분석

매트리스보조 레이저 탈착 질량분석기 (MALDI-TOF/MS)를 이용하여 가장 최근에 개발된 이온화법 (Kontos Kompact MALDI 2)으로 측정된 결과, 분자량이 16148 (오차범위: ± 200) 임을 알 수 있었고 (Fig. 2), Protein sequencing system (Miligen 6600B)을 이용하여 분리된 peptide의 N말단 아미노산 서열분석의 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같으며, phospholipase A₂ (E.C. 3.1.1.4)와 높은 상동성을 보였다.

다. 벌독 유효성분의 ACAT 및 CETP 활성 저해효과

벌독으로부터 분리한 phospholipase A₂ 유사물질을 순차적으로 회석하여 *in vitro* rat microsomal 효소계에서의 ACAT 활성 및 human plasma로부터 분리한 CETP의 활성을

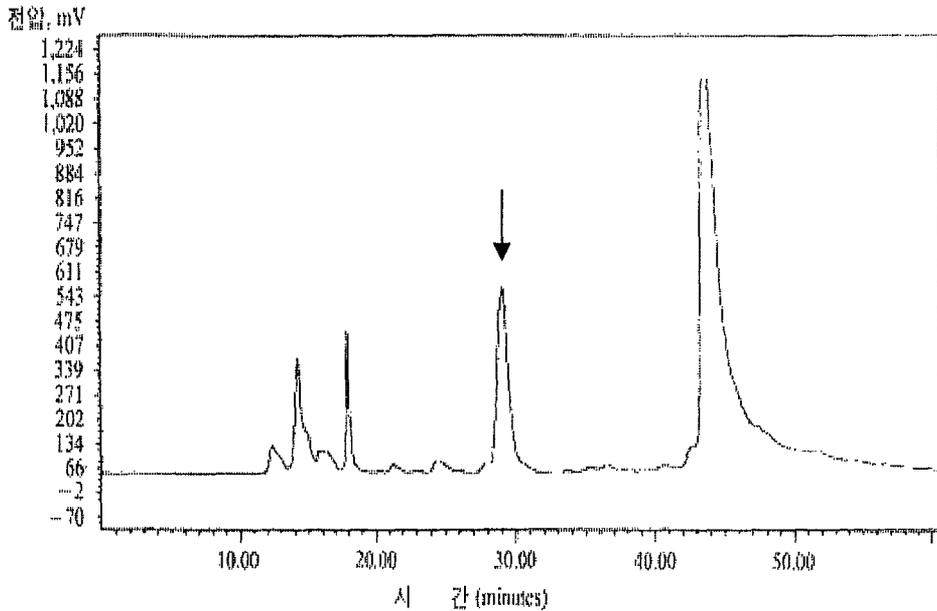


Fig. 1. HPLC chromatogram of crude honeybee venom. Column : YMC-Pack ODS-18 (20 x 250 mm); Mobile phase : TFA/acetonitril gradient (20%-70, v/v); Flow rate : 4 ml/min; Detection; 225 nm.

Data: Skribb0001.3 3 Apr 96 15:05 Cal: Siney 11 Jan 95 16:08
 Kratos Compact MALDI 2 V4.0.0: + Linear High Power: 140
 %Int. 100% = 12 mV [sum= 370 mV] Shots 1-30 Smooth Av 30
 16148.0

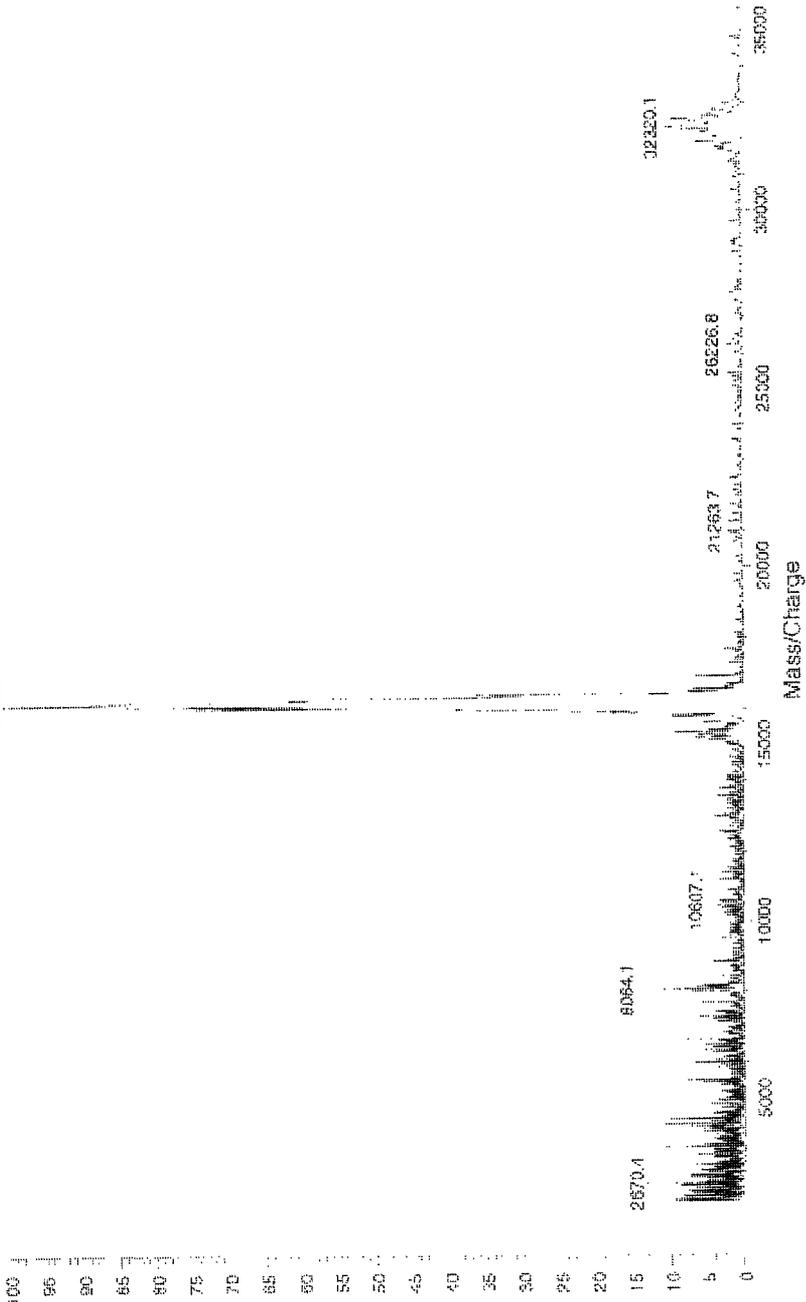


Fig. 2. Kratos Compact MALDI 2 spectrum of the HPLC Fr. Of honeybee venom having ACAT and CETP inhibitory activity

조사하였다. ACAT 및 CETP 활성에 대한 IC₅₀치는 각각 3.9 $\mu\text{g/ml}$ 와 1.3 $\mu\text{g/ml}$ 이며, Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. 본 연구를 통하여 꿀벌독으로부터 ACAT 및 CETP 활성을 저해하는 물질을 처음으로 분리 할수 있었으며, 이러한 결과는 곤충이 생산하는 유용물질의 탐색 및 자원화의 측면에서 꿀벌독을 이용한 새로운 의약 및 식품소재를 개발할수 있는 가능성을 매우 높게 제시하고 있다. 따라서 N-말단 아미노산 서열뿐만 아니라 phospholipase A₂와 유사한 특성을 보이는 본 물질의 전체구조 분석 등의 후속연구가 크게 기대되고 있다.

Honeybee venom	IIYPG TLWXG HGNKS SGPNE LGRFK
Phospholipase A ₂	IIYPG TLWIG HGNKS SGPNE LGRFK

Fig. 3. N-terminal amino acid sequence of the purified fraction of honeybee venom having ACAT and CETP inhibitory activity

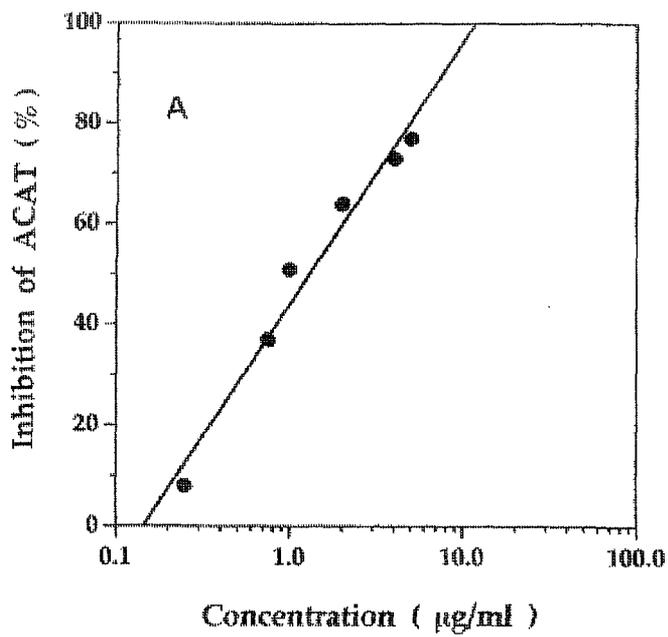


Fig. 4. ACAT inhibitory activity by the HPLC fraction of honeybee venom having ACAT and CETP inhibitory activity. ACAT assay conditions are described in Materials and Methods. Experimentals were performed in triplicate.

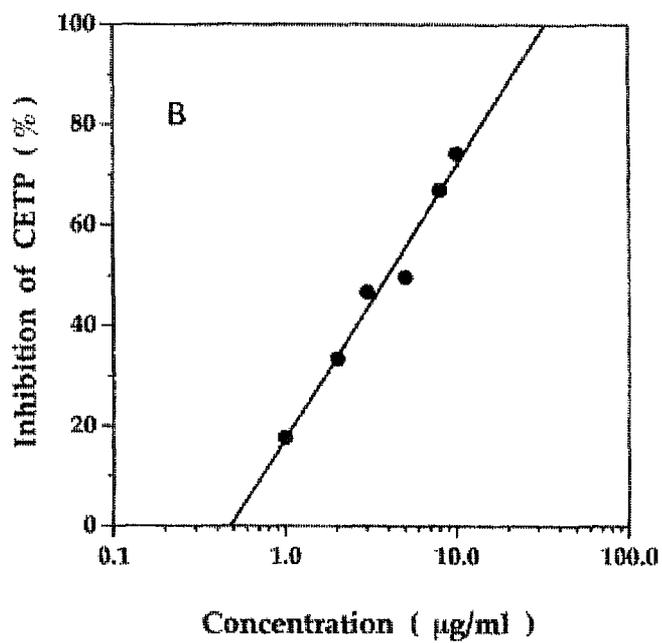


Fig. 5. CETP inhibitory activity by the HPLC fraction of honeybee venom having ACAT and CETP inhibitory activity. CETP assay conditions are described in Materials and Methods. Experimentals were performed in triplicate.

4. 참고 문헌

- Mahley, R. I., T. L. Innerarity, S. C. Jall, Jr. & K. H. Weisgraber. 1984. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J. Lipid Res.* 25:1277-1294.
- Bell, F. P. 1986. Arterial cholesterol esterification by acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, its possible significance in atherogenesis and its inhibition by drugs. pp.409-422. *In* J. R. Prous[ed.], Pharmacological control of hyperlipidemia, Science Publishers.
- Heider, J. G. 1986. Agent which inhibit cholesterol esterification in the intestine and their potential value in the treatment of hypercholesterolemia. pp.423-438. *In* J. R. Prous[ed.], Pharmacological control of hyperlipidemia, Science Publishers.
- Kathawala, F. G. & J. G. Heider. 1991. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors and lipid-lipoprotein metabolism, pp.159-195. *In* Witiak, D. T., H. A. I. Newman & D. R.[eds.], Feller Pharmacochimistry libraly 17: Antilipidemic drugs.
- Tall, A. R. 1986. Plasma lipid transfer proteins. *J. Lipid Res.* 27:892-900.
- Assmann, G. 1990. Genes and dyslipoproteinaemias. *Eur. Heart J.* 11(suppl 11):4-8.
- Ha, Y. C. & P. J. Barter. 1982. Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comp. Biochem. Physiol.* 71B:265-269.
- Koizumi, J., H. Mabuchi, A. Yoshimura & R. Takeda. 1985. Deficiency of serum cholesteryl ester transfer protein activity in patients with familial hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* 58:175-186.
- Erickson, S. K., M. A. Shrewsbury, C. Brooks & D. J. Meyer. 1980. Rat liver acyl-CoA: cholesterol acyltransferase: its regulation *in vivo* and some of its properties *in vitro*. *J. Lipid Res.* 21:930-945.
- Lowry, O. H. & N. T. Rosebrough. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.

- Brecher, P. & C. Chen. 1980. Properties of acyl CoA:cholesterol acyltransferase in aortic microsomes from atherosclerotic rabbit. *Biochim. Biophys. Acta* 617:458-471.
- Pattnaik, N. M., A. Montes, L. B. Hughes & D. B. Zilvermit. 1978. Cholesteryl ester exchange protein in human plasma isolation and characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. 530:428-438.
- Kato, H., T. Nakanishi, H. Arai, H. I. Nishida & T. Nishida. 1989. Purification, microheterogeneity, and stability of human lipid transfer protein. *J. Biol. Chem.* 264:4082-4087.
- Rehberg, E. F., K. A. Greenlee, G. W. Melchior & K. R. Marotti. 1994. Purification of human cholesteryl ester transfer protein by affinity chromatography on immobilized triazine dyes. *Protein Expression & Purification*. 5:285- 290.
- Hart, H. E. & E. B. Greenwald. 1979. Scintillation proximity assay(SPA)-a new method of immunoassay. Direct and inhibition mode detection with human albumin and rabbit antihuman albumin. *Mol. Immunol.* 16:265-267.
- Bosworth, N. & P. Tower. 1989. Scintillation proximity assay. 341:167-168.

제 5 절 흰점박이꽃무지의 대량인공사육 및 신기능 소재로의 활용에 대한 연구

1. 재료 및 방법

가. 실험곤충

실험에 이용된 곤충은 최초로 야외에서 채집한 흰점박이꽃무지 (*Protaetia brevitarsis*) 3령유충을 실내에서 사육하여 다수의 egg를 확보하였으며 이를 인공사료와 벧짚등을 이용하여 사육수를 증가하며 사용하였다.

나. 인공사료의 제조

전통생약자원인 흰점박이꽃무지 유충의 대량사육을 위한 인공사료를 개발하고 이를 이용하여 실험실내에서의 대량사육을 실시하였다. 대량사육을 위한 인공사료의 개발은 다음과 같은 방법으로 실시하였다. 먼저 적당히 숙성된 벧짚 (약 1년 이상)에다 쌀겨를 1:1정도의 비율로 섞은 다음 수분을 가하여 25 °C - 30 °C의 온도로 약 20일간 발효시켰다. 이때 고온의 발생에 의해 부패할 우려가 있으므로 2-3일 간격으로 뒤집어서 골고루 섞어 주어야 한다. 약 20일 경과후 발효사료의 온도가 실온에 이르면 이를 말린 후 분쇄기에서 곱게 분쇄하여 위의 방법으로 약 14일간 2차 발효를 시켰다. 완전히 발효된 사료는 적당량의 증류수를 첨가하여 반죽을 만들어 유충의 사료로 사용하였다.

다. 사료의 급여 방법

사료의 급여 방법은 1,2령 유충의 경우 2-3일에 1회, 3령유충은 2일에 1회씩 급여하였다. 인공사료의 급여량은 1령 유충의 경우 1두당 약 0.64 g, 2령 유충은 1두당 4.5-5 g, 3령 유충의 경우 1두당 약 30-40 g의 사료를 공급하였다

라. 동물실험

흰점박이꽃무지 유충을 동결건조한 다음 이를 막자사발에서 곱게 분쇄한 다음 랫드에 경구투여하는 방법에 의해 간보호작용에 대한 효능을 조사하였다.

2. 결과 및 고찰

전통생약자원인 흰점박이꽃무지 유충의 대량사육을 위한 인공사료를 개발하고 이를 이용하여 실험실내에서의 대량사육을 실시하였다. 대량사육을 위한 인공사료의 개발결과 실패사육효율성이 우수한 사료를 개발하였으며 이를 이용하여 실험실에서 누대사육에 성공하였다. 사료의 급여 방법은 1,2령 유충의 경우 2-3일에 1회, 3령유충은 2일에 1회씩 급여하였다. 인공사료의 급여량은 1령 유충의 경우 1두당 약 0.64 g, 2령 유충은 1두당 4.5-5 g, 3령 유충의 경우 1두당 약 30-40 g의 사료를 공급하였다. 이때 유충의 생존율은 각 령기당 유사하게 90 - 95 %의 높은 생존율을 나타내었다. 이러한 기술을 농가보급을 고려한 생산 시스템의 개발을 위한 연구를 진행중에 있다.

전통생약재료로서의 흰점박이꽃무지의 효능을 검증하기 위하여 간질환과 관련된 동물실험을 실시한 결과 10일간 시험기간을 이용한 반복 경구투여는 농도의존성을 보였으며 수컷 랫드의 간손상 모델실험에서 현저한 간보호 효능이 입증된 바 직접적인 효능물질 분리작업과 추후 기타기전연구를 수행하고 있다 (data not shown).

제 3 장 한국산 거미류의 신기능성 단백질 분해효소 특성 및 이용

제 1 절 서 론

거미는 곤충과 같이 절지동물문(arthropoda)에 屬하는 5개의 class(綱)중의 하나인 蛛形綱(class arachnida)에 속하며 이 중 毒거미류는 避日目(order Solifuga)에 屬하고 一般的인 거미류는 蜘蛛目(order Araneae)에 속하는 群집성 혹은 社会성 곤충으로 알려져 있다.

현재까지 우리 나라의 경우 총 45科 211屬 577種의 거미가 서식하는 것으로 보고되었으며 이 중에서도 가장 많은 수를 차지하고 있는 것으로는 환경오염 지표 생물로 알려진 무당거미가 있고 한국 특산 신종인 땅거미도 1985년도에 보고되어 기재된 바 있다.

국내의 경우 거미에 대한 연구는 전무한 상태였으나 과거서부터 뜻 있는 몇몇 선배 학자들에 의하여 채집, 분류, 형태적 특징, 지리적 분포 등 가장 중요한 기초분야에 대하여 계속적인 연구를 하고 있으며 최근에는 거미연구를 전담하는 사설 “한국 거미 연구소”가 운영되고 있다. 그러나 거미에 대한 생리·생화학적 연구는 없었으며 이에 대한 체계적이고도 계속적인 연구가 그 어느 때 보다도 강력히 요구되고 있다.

거미의 연구는 거미의 生活史 및 이들의 주위 환경과 생태계와의 연관등 많은 것을 관찰로부터 시작된다고 하여도 과언이 아니다. 일반적으로 거미는 육식성으로 먹이를 포획하기 위하여 거미의 종류에 따라 다양한 형태의 거미줄을 만들어 먹이인 各種 소형 곤충류 등을 포획하고 포획된 곤충들은 거미의 中장에서 분비되는 各種 단백질 분해효소를 위시한 各種 효소들을 먹이의 체내로 찢러 넣은 후 매우 빠른 시간 내에 체외소화(體外消化)과정을 거친 다음 결과로 生成된 분해육즙을 인두(fang)를 이용하여 섭취하는 특이한 方法을 取하고 있다. 위의 현상은 매우 중요하고 특이한 현상으로 30℃내외의 실온에서 효소학적으로는 불가능할 정도의 빠른 시간내에 먹이의 단백질을 분해시켜 즙액(육즙)상태로 만든다는 사실에 주목해

야 될 것으로 생각된다.

효소반응論的 觀點으로 볼 때 열악한 조건下에서 먹이를 빠른 시간內에 소화시켜야만 하게 진화된(혹은 진화 산물인) 거미 체내의 강력하고도 특이성을 갖고 있는 소화효소에 대하여 구체적인 分析과 해석을 시도하고 아울러 생활상이나 생태현상에서 독특한 습성을 갖고 있는 한국산 땅거미 외 몇 종류의 거미류로부터 위와 같은 과학적 해석과 추구를 행할 경우 기대하였던 것보다도 의외의 기능과 특성을 보유하고 있는 단백질 분해효소에 대한 정보를 파악할 수 있으며 아울러 이들의 활용방안에 대하여서도 구체적인 방안이 모색되리라고 생각된다. 1945년 서울농대의 전신인 수원고농의 일본인 학자 T. Okamoto는 한국산 거미류중 말꼬마거미가 사람의 종기나 발진의 고름제거에 약효가 있고 산왕거미의 경우 치질약의 특효라고 보고한 바 있다.

거미의 생리·생화학적 현상 중 체외소화 현상은 체내로부터 분비되는 강력한 분해물질들에 기인하리라 사료되며 여기에는 단백질 가수분해효소뿐만 아니라 lipase, glycosidase, nuclease등 생체거대분자를 분해시키는 다양한 효소군이 포함되리라 생각된다. 본 연구에서는 왕거미과(*Araneidae*)에 속하는 무당거미(*Nephila clavata*)를 재료로 각 기관에 특이적으로 존재하는 효소를 분리·정제하여 특성을 알아보고 가능하다면 이들의 산업적 응용성을 타진하고자 한다.

본 연구에서 주 초점을 맞추게될 효소로써는 단백질 가수분해효소와 그와 연관된 억제제 및 활성제를 포함하는 자연적 조절인자(endogenous natural regulating molecules)들이다. 이들의 응용범위는 매우 다양하여 농축산업의 가축사료 및 작물비료에 응용할 수 있고 산업적으로는 세제첨가제 및 식품산업으로의 응용을 기대할 수 있다. 특히 거미로부터 기대되는 강력한 단백질 가수분해효소는 주방폐기물의 사료 화와 퇴비 화에 매우 유용하게 사용되리라 생각된다.

이외에도 본 연구의 대상인 단백질 분해효소는 사료에 첨가시켜 사료효율을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 음식물 찌꺼기를 이용, 이들의 퇴비 화에도 큰 역할을 담당할 수 있리라 생각된다. 최근에 이르러 생체 내 단백질 가수분해현상을 재조명 후 해석하고 있으며 이는 생명체에 필수적으로 매우 다양한 기능을 수행하고 있는 결과가 아닌가 생각된다. 즉

새로운 단백질분해효소의 발견 및 그 조절인자에 대한 연구는 예를 들어, 혈액응고과정과 그 외 다양한 혈액연관 각종과정에 영향을 주므로써 의학학적 측면으로도 매우 중요한 역할을 하리라 생각된다.

본 위탁연구에서는 거미의 체내에 존재하는 단백질가수분해효소를 대상으로 효소의 물리적 및 화학적 특성과 활성억제 등을 실험하여 특이하다고 판단되는 효소 및 기타 유용물질을 분석하여 의료용 또는 산업용으로 응용가능성이 있는지를 타진함을 장기목표로 설정하였다. 상기한 장기적인 목표를 수행하기 위하여 1 차 년도에서는 한국산 거미류 중에서 무당거미의 단백질분해효소의 종류를 분석하는 연구를 중점적으로 수행하였다. 이와 더불어 본 연구의 주관연구기관인 생명공학연구소 연구팀에서 거미로부터 분리한 공생박테리아의 단백질분해효소가 활성이 매우 높고 특이하여 유의성이 있다고 인정되어, 이 효소를 집중적으로 실험하여 정제를 완료하였고 대략적인 특성을 검사하였다.

연구 2 차 년도에서는 무당거미의 유용물질에 대한 보다 심도있는 분석을 실시하여 무당거미의 단백질분해효소의 종류를 파악하였으며, 몸체부분에서 추출된 효소의 경우에는 정제실험이 현재 90% 정도 진척되어 순수정제가 거의 완료단계에 있다. 이와 더불어 무당거미의 머리부위에 단백질분해효소에 작용하는 활성유발인자(activator)가 존재함을 확인하였으며, 연구 3 차 년도에는 무당거미의 단백질분해효소의 성상을 파악하여 그 중 한 효소를 확인하였으며, 그 특성을 분석하였다. 이외에도 무당거미 체내에 존재하는 endogenous protease inhibitor를 screening하여 chymotrypsin이나 plasmin등에 매우 효과적인 물질을 확인하였다.

제 2 절 연구재료 및 방법

1. 실험재료

실험에 사용된 무당거미(*Nephila clavata*)는 경기도 남양주시에 있는 천마산의 동쪽 사면과 서쪽 사면에서 9월 및 10월에 걸쳐 채집하였으며, 산채로 연구실로 운반하여 냉동보관(-70℃)하면서 실험에 사용하였다. 수컷은 체구가 암컷의 1/10 이하로써 너무 작아 채취 가능한 채액의 양이 너무 적었기 때문에 본 실험에는 암컷만을 사용하였다. 냉동된 무당거미를 해동시켜 머리부위와 몸통부위를 절단한 후에 몸통을 절개하여 알(eggs)을 분리하였으며 분리된 머리부분, 몸통부분 및 알에서 각각 채액을 추출하였다. Insect physiological saline (130mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂)을 시료 무게의 4배액을 첨가하여 머리와 몸통부분은 잘게 분쇄한 혼합액을 만들었고 또한 egg의 경우는 마쇄한 혼합액을 4℃에 2시간 보관하여 채액이 용해되어 나오도록 한 다음 원심분리(15,000 rpm, 20 min)하여 얻은 상등액을 실험용 시료로 사용하였다.

2. 효소활성 측정

강력한 활성도와 기질 특이성이 밝혀지지 않은 상태의 protease의 활성도는 chromogenic 단백질인 azocasein을 기질로 이용하여 측정하였다. 50mM Tris-Cl, pH8.0에 녹여 만든 2% azocasein 250 μ l와 효소용액150 μ l를 25℃에서 반응시키고 시간에 따라 1.2ml의 10% trichloroacetic acid로 정지시킨 후 15분간 상온에서 방치하여 반응하지 않은 기질을 충분히 침전시켰다. 다음8000 \times g에서 5분 동안 원심분리 하여 상등액을 취하고 이를 1.4ml of 1.0M NaOH와 혼합한 후 440nm에서의 흡광도를 측정하였다. 1 Unit의 정의는 1cm cuvette을 사용하여 O.D. 1.0의 변화를 나타내게 하는 효소의 양으로 정하였다.

3. 효소의 정제

가. 시료의 분류 및 처리

채집된 왕거미과 무당거미속인 *Nephila clavata* 를 20 마리를 1개의 batch로하여 머리를 제거, 몸통 부분만을 모으고 50 ml 의 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer를 가하여 4 시간 동안 stirring 하여 거미의 body protein 을 추출한 후 20,000 rpm (45,5000 × g) 에서 1 시간 동안 원심 분리하여 상층액을 취하였다. 회수한 상층액에 0.5 배 부피의 cold acetone 을 stirring 하면서 서서히 가하여 준 후 20,000 rpm (45,5000 × g) 에서 1 시간 동안 원심 분리하여 불용성 물질을 제거하고 그 상층액을 취하였다. 이 상층액에 다시 2 배 부피의 cold acetone 을 stirring 하면서 서서히 가하여 준 후 20,000 rpm (45,5000 × g) 에서 1 시간 동안 원심 분리하여 상층액을 버리고 침전물을 회수하였다. 회수한 침전물에 존재하는 acetone을 날려버린 후 25 ml 의 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer 에 녹여 crude sample (33~60% acetone 침전물)로 사용하였다.

나. DEAE-Sepharose chromatography

50 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer로 미리 평형시킨 DEAE-Sepharose column (2.5×10 cm) 에 위의 과정에서 얻은 33~60% acetone 침전물을 loading 하고 같은 완충용액으로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 충분히 씻어 준 후 0.2 M NaCl 을 포함하는 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer 로 DEAE resin 에 결합하고 있는 단백질을 용출 하였다. 이 때 flow rate 는 시간당 50 ml 이었으며 각 분획은 10 ml 씩 모은 다음 각 분획으로 부터 protease 활성을 측정하고 active fraction을 pooling 하였다.

다. SBTI-Sepharose affinity chromatography

0.5 M NaCl 을 포함하는 100 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer로 미리 평형시킨 SBTI-Sepharose column (1.0×10 cm) 에 위의 과정에서 얻은 protease active fraction 을 loading 하고 같은 완충용액으로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 충분히 씻어

준 후 0.5% acetic acid 로 binding된 protease를 용출 하였다. 이 때, flow rate 는 시간당 20 ml 이었으며, 용출액이 산성 pH 에 오랫동안 노출되는 것을 방지하기 위하여 1 M Tris-HCl, pH 9.0 buffer 를 가하여 용출액의 pH 를 중성으로 조절하였다. 용출액은 Amicon YM10 을 이용하여 농축한 후 -20℃에서 보관하였다.

4. 단백질 정량 및 전기영동

단백질 정량은 Bradford method (1977) 에 따라 BSA로 표준곡선을 정하고 이를 이용하여 거미 시료의 단백질 정량을 실시하였다. Protease의 정제도와 분자량을 측정하기 위하여 Lamlli method (1970) 를 이용한 15% polycarylamide gel을 사용하였고 표준단백질은 phosphorylase b (97 kDa), BSA (66 kDa), ovalbumin (45 6kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21 kDa), lysozyme (14.4 kDa) 을 사용하였고 전기영동이 끝난 gel은 CBB 로 염색하여 효소를 구분하였다.

5. 효소의 특성 규명

가. 온도, pH, salt effect

온도의 변화에 따른 활성도를 thermostated spectrophotometer로 알아보고 그 범위를 정제효소 선택의 기준으로 삼았다. 효소의 pH효과는 각각 20mM의 acetic acid, Tris, borate 로 구성된 pH6.0에서 10까지의 complex buffer를 이용하여 위에서 알아본 최적 온도에서 측정하였다. 최적pH가 결정되면 다른 pH에서 preincubation한 후 다시 최적 pH로 조건을 바꾸어 효소 활성도를 측정함으로써 pH의 비가역적 억제범위를 알아보고 가역적 범위내에서 효소의 활성도를 최소화 시키는 pH를 이용하여 단백질정제과정의 protease autolysis를 가능한 한 억제시켰다. 그 외 다양한 monovalent 또는 divalent cation존재시의 효소활성도를 측정하여 효소의 특성을 분석하였고 그 정보를 단백질 정제에 이용하였다. 특히 정제과

정에서 사용될 salt gradient에는 활성도의 억제를 최소화시키는 salt를 이용하였다.

나. Chromogenic substrate를 사용한 효소의 기질 특이성 분석

p-nitroaniline으로 label된 기질들을 이용하여 기질 특이성을 알아보았다. 반응조건은 DMSO에 녹인 10 μ l의 기질을 150 μ l의 효소액과 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켜 p-nitroaniline으로 label된 기질을 400~410nm에서 ELISA reader를 이용, 시간별로 활성도를 측정하였다. 형광물질인 β NA와 AMC로 label된 기질은 각각 335nm와 380nm에서 excitation시키고 410nm와 460nm에서 발생하는 fluorescence를 luminescence spectrophotometer로 측정 활성도를 알아보았다.

다. 억제제를 이용한 단백질 가수 분해 효소의 분류

가역적·비가역적 억제제를 이용, 활성도의 감소를 측정하고 이를 통하여 효소를 serine계, cysteine계, aspartate계와 metalloprotease로 분류하여 정제효소 선택에 이용하였다. 특히 비가역적 억제제는 효소와 preincubation을 하여 측정하고 가역적 억제제는 preincubation 유무에 따라 측정하였으며 그 밖에 생체 기질에 대한 특이성을 조사하였다.

제 3 절 연구 결과

1. 부위별 단백질분해효소

무당거미 20 개체를 증류수 또는 곤충생리 식염수를 첨가하여 체액을 추출한 후 protease 활성을 측정한 결과는 표 1 과 같았다. 전반적으로 증류수로 추출한 시료와 식염수로 추출한 시료간의 활성의 차이가 없었다.

Table 1. Proteolytic activity of *N. clavata*. The samples were extracted form body or head using distilled water or insect physiological saline solution as an extraction solution. The activity was determined by skim milk plate (Casein) and fibrin plate (Fibrin). Numbers (1-20) were the spider sample number.

	DW extraction										Insect saline extraction										
Head	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Case	-	+++	++	+	+++	++	+	++	+	++++	+	+++	+++	+	++	+	-	++	+	+	
Fib	-	++	+	-	+++	+++	-	+	-	+++	-	++	++	-	+	-	-	++	-	-	
Body	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
Case	-	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	-	++	++	++	+++	++	+++	++	++	+	++	+++
Fib	++	+++	+++	-	+	+++	+++	-	+++	++	++	++	+++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++

거미류는 곤충 등 작은 동물들의 체내에 독액이나 소화효소를 주입하여 분해된 체액을 섭취한다고 알려져 있기 때문에, 머리부위와 몸통부위를 분리하여 각각에 있는 단백질분해 활성 및 종류를 비교, 분석하였다. 40 개체의 무당거미의 머리와 몸통을 분리하여 각각으로부터 체액을 추출한 다음, 개체별로 카제인분해활성을 측정한 결과는 표 2 과 같았다. 개체 변이가 심한 편이었으나 전체적으로 머리부위보다는 몸통부위에서의 단백질분해효소활성이 높았으며, 머리부위는 활성이 평균 1217로써 평균치가 4535인 몸통부위에 비하여 약 27%의 활성을 보였다 (Table 2).

Table 2. Individual variation of *N. clavata* protease activity. The activity was determined by the caseinolytic assay described in Materials and Methods using azocasein as a substrate. Numeral value($\Delta A_{440} \times 10000$) represented the caseinolytic activity of each prepared sample.

Sample	Individual activity($\Delta A_{440} \times 10000$)										Average
Head	1089	1411	766	2810	995	480	1596	580	1924	1492	1217 (26.8% by Body)
	394	1400	1009	764	1150	1286	379	1076	886	1403	
	1397	1698	1750	1318	1819	1305	824	1154	601	1071	
	1174	914	2163	2160	433	1419	866	1028	1055	1643	
	6011	4491	9367	10298	2363	6894	9476	3669	8449	920	
Body	2904	5285	5863	3091	6386	1960	593	2077	3659	7530	4535
	4171	1176	1088	2243	1919	4821	1566	8817	2903	5924	
	9107	6011	3886	997	3508	4076	7791	5899	2635	1562	

Table 3. Proteolytic activity and protein concentration of *N. clavata* tissue. Each tissue was isolated from *N. clavata* and the tissue fluid was extracted from each tissue. Normal value, which was ΔAbs determined by specific reaction, represents the relative proteolytic activity for each substrate or protein concentration.

BAPNA : N α -benzoyl-arginine-p-nitroanilide

TAME : N α -tosyl-arginine methyl ester

Substrate	Tissue			
	Mouth	Silk gland	Egg	Body
BAPNA	0.315	0.0769	0.625	0.938
TAME	0	0	0	0
S-2222 (factor Xa)	0.0115	0	0.077	0
S-2238 (thrombin)	0	0	0	0
S-2266 (factor XIa)	0	0.016	0.146	0.154
S-2444 (urokinase)	0	0	0.078	0
Protein conc (mg/ml)	44.86	1.29	53.6	56.75

이상의 결과에서 보듯이 거미의 각 부위별로 protease 활성을 측정한 결과 body 부분에서 가장 많은 protease 활성이 측정되었으며 따라서 본 연구에서는 protease는 거미의 body로부터 정제를 하였다.

2. 거미 protease 의 정제

가. Acetone fractionation

거미의 몸통 부분으로부터 body protein 을 추출한 후 acetone fractionation을 실시하였다. 먼저 회수한 상층액에 최종 농도가 33%가 되게끔 cold acetone 을 가하여 saturation 시킨 후 20,000 rpm 에서 원심 분리하여 생성된 침전물을 회수하고 상층액을 회수하였다. 이 상층액에 다시 최종 농도가 60%가 되게끔 cold acetone 을 가하여 saturation 시킨 후 20,000 rpm 에서 원심 분리하여 생성된 침전물을 회수하였다. 각각의 회수된 침전물에 최소 부피의(25 ml) 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer로 녹인 후 protease 활성을 측정한 결과는 표 4 에 나타내었다.

Table 4. Acetone fractionation of crude extract from *N. clavata*.

sample	protease
33% ppt	-
33~60% ppt	2046.8 A ₄₀₅
60~80% ppt	305.1 A ₄₀₅

위의 표에서 보듯이 거미의 protease 는 33~60% acetone 침전물에서 대부분의 protease 활성이 회수되었다. 또한 acetone fractionation 에서 33% acetone 침전물은 대부분이 buffer 에 용해되지 않는 불용성 물질로서 protease 활성은 거의 detect 되지 않았다. 따라서 33~60% acetone 침전물을 protease 정제에 사용하였다.

나. DEAE-Sephrose chromatography

거미 protease 정제를 위한 첫 단계로 DEAE-Sephrose anion exchange chromatography를 사용하였다. DEAE-Sephrose column (2.5×10 cm)을 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer로 미리 평형시킨 후 위의 과정에서 얻은 33~60% acetone 침전물을 전개하고 같은 완충용액으로 280 nm에서 흡광도가 0.01 이하가 될 때까지 충분히 씻어 준 다음 0.2 M NaCl 을 포함하는 50 mM sodium phosphate (pH 7.5) buffer로 DEAE resin 에 결합하고 있는 protease를 용출하였으며 그 결과는 그림 1 에 나타내었다.

그림에서 보듯이 DEAE-Sephrose column 에서 거미 protease 는 DEAE resin 에 binding 하지 않고 flow-through fraction 에서 대부분의 protease 활성이 detect 되었으며 이 fraction으로부터 protease를 더 정제하였다.

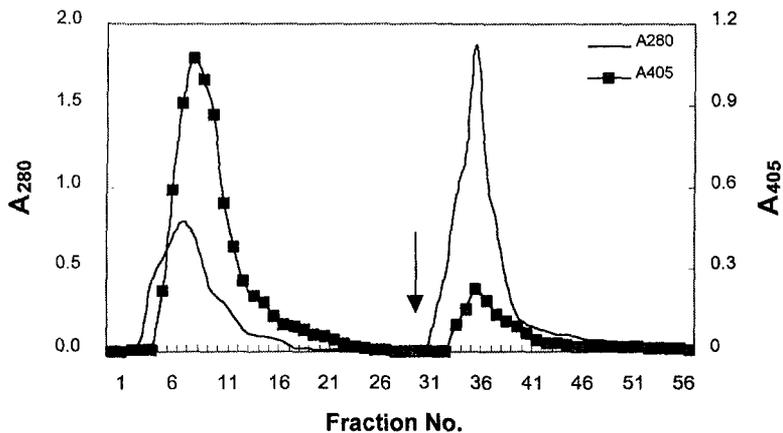


Fig. 1. Elution profile from DEAE-Sephrose.

The arrow indicated the elution point.

다. SBTI-Sepharose affinity chromatography

Soybean trypsin inhibitor (SBTI) 는 trypsin을 포함하는 serine protease 의 강력한 inhibitor로 알려져 있다. 따라서 SBTI의 이러한 serine protease 에 대한 친화성을 이용하여 거미에 존재하는 serine protease를 빠르고, 순수하게 정제하고자 SBTI를 CNBr-activated Sepahrose 4B 에 coupling 하여 affinity resin을 제조하였고 그림 2 에 SBTI-Sepharose affinity chromatography 의 profile을 나타내었다. 전 단계의 DEAE-Sepharose 의 flow-through fraction을 0.5 M NaCl을 포함하는 0.1 M sodium phosphate buffer로 미리 평형시킨 SBTI-Sepharose 에 전개한 후 같은 완충 용액으로 충분히 column을 씻어 주었다. 이 때 flow-through fraction 에서는 protease 활성이 검출되지 않았다. 0.5% acetic acid 로 resin 에 binding 되어 있는 protease를 elution 하였으며 이 때 elution 된 protease 가 산성 pH 에 오랫동안 노출되어 inactivation 되는 것을 방지하기 위하여 1/10 volume 의 1 M Tris-HCl buffer, pH 9.0를 가하여 주어 즉시 pH를 중성이 되게 하였다. Elution 된 protease는 Amicon Centriprep PM 10 으로 농축하였으며 사용 할 때 까지 -30°C 에 보관하였다.

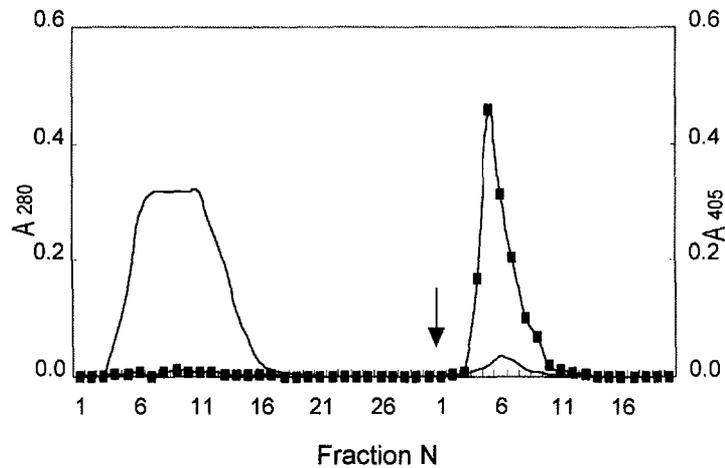


Fig. 2. Elution profile from SBTI-Sepharose.
The arrow indicated the elution point.

3. 효소의 특성 규명

가. 정제한 protease 의 순도 측정

거미의 몸통 부분으로부터 acetone fractionation, DEAE-Sepharose anion exchange chromatography 및 SBTI-Sepharose affinity chromatography 법을 이용하여 serine protease 를 정제하였으며 표 5 에 그 정제 과정을 요약하였다.

Table 5. Purification table of purified protease from *N. clavata*.

	Total unit (A ₄₀₅)	Total protein (mg)	Specific activity (A ₄₀₅ /mg)	purification fold	yield (%)
Acetone ppt	2046.8	150.0	13.6	1.0	100.0
DEAE, effluent	1180.5	55.2	21.4	1.6	57.7
SBTI, eluent	399.8	0.03	14487.0	1061.7	19.5

표 5 에서 보듯이 최종 회수율 약 20% 이었으며 그 specific activity 는 14,487 Uni/mg protein 이며 purification fold 는 1061 배로 순수하게 정제 되었음을 의미한다. 높은 purification fold 는 아마도 거미에 존재하는 inhibitor 들이 정제 과정 중에 제거되었을 것으로 생각되며 이러한 사실은 현재 더 연구 중이다. 정제된 protease 의 순도를 알아보기 위하여 15% SDS-PAGE를 수행한 결과 약 24 kDa 위치에서 하나의 band 만을 나타냄으로써 순수하게 정제되었음을 알 수 있었다 (그림 3).

나. 정제한 protease 의 분자량 측정

정제한 효소는 15% SDS-PAGE 와 Superose 12HR을 이용한 Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)를 이용하여 분자량을 결정하였다. 15% SDS-PAGE 분자량을 측정한 결과를 그림 4 에 나타내었다. 사용한 protein marker 는 phosphorylase b (94,000), BSA (67,000), ovalbumin (43,000), carbonic anhydrase (30,000), trypsin inhibitor (20,100)

및 α -lactalbumin(14,400)등 이었다. 그림 4 에서 보듯이 정제한 protease 의 subunit 의 분자량은 24 kDa 로 계산되었다. 또한 Superose 12HR을 이용하여 gel filtration 결과를 그림 5 에 나타내었다. 사용한 protein marker 는 apoferritin (443,000), α -amylase (200,000), BSA (66,000), chicken egg albumin (45,000), carbonic anhydrase (29,000) 및 cytochrome c (12,400) 이었다. Superose 12HR을 이용한 분자량 측정시 25.7 kDa 로 계산되었으며, 이 결과로부터 무당 거미로부터 정제한 protease 는 약 25 kDa 의 분자량을 갖는 single polypeptide 임을 알 수 있었다.

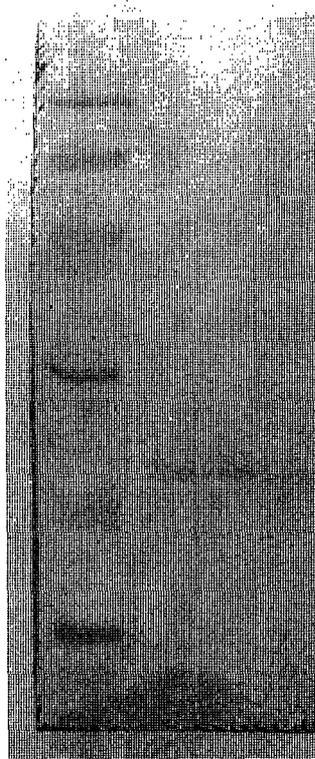


Fig. 3. SDS-PAGE of purified protease from *N. clavata*.

lane M, molecular weight marker

lane 1, purified protease

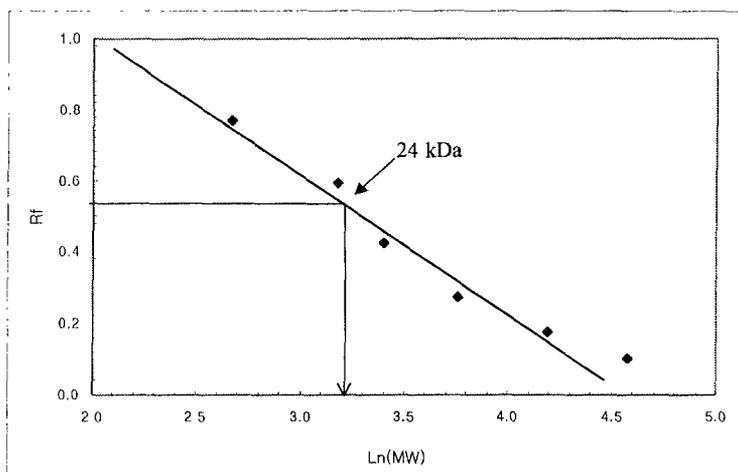


Fig. 4. Molecular weight determination of the purified protease by SDS-PAGE

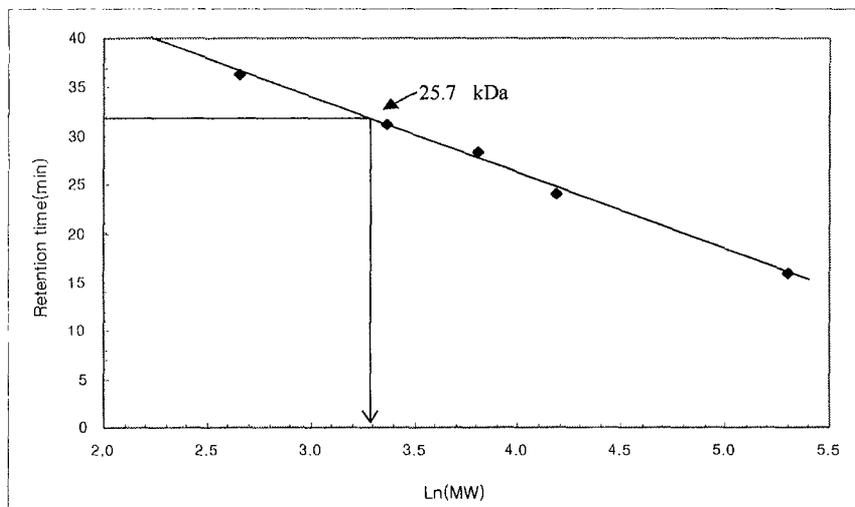


Fig. 5. Molecular weight determination of the purified protease by Superose 12

다. 정제한 Protease 의 특성 규명

1) Optimum pH

정제한 protease 의 반응 최적 pH를 알아보기 위하여 pH 4~12 의 범위에서 protease 활성능을 측정하였다. 사용한 buffer 는 0.1 M sodium acetate (pH 4.0~5.5); 0.1 M sodium phosphate (pH 6.0~7.5); 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0~9.0); 0.1 M glycine-NaOH (pH 9.5~11); 0.1 M sodium carbonate (pH 11.5~12.0) 이었으며 그 결과를 그림 6에 나타내었다.

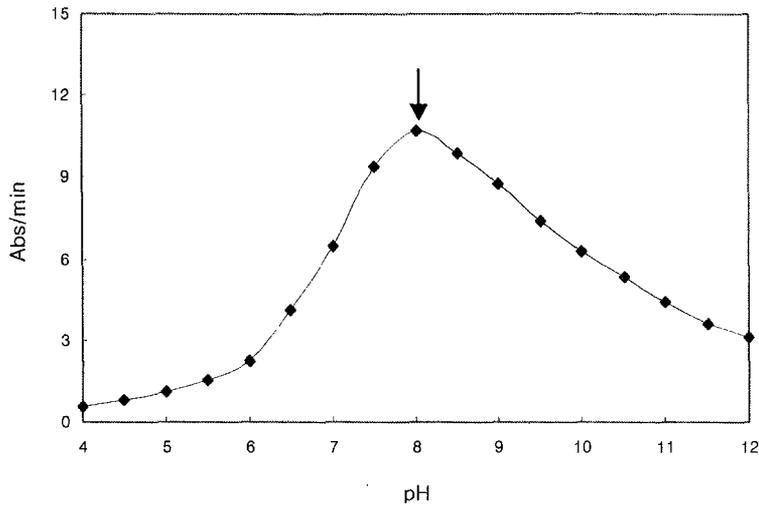


Fig. 6. Optimum pH of the purified protease.

위의 그림에서 보듯이 정제한 protease 의 반응 최적 pH는 pH 8 이었다. 정제한 protease 는 acidic pH, pH 6 이하에서는 최대 활성의 약 20% 이하로 감소되는 경향을 나타내었다. 반면에 alkaine pH, pH 10 에서도 약 40% 정도의 활성을 유지하고 있음을 알 수 있었다.

2) Heat stability

정제한 protease 의 반응 최적 pH를 알아보기 위하여 30~70℃ 의 범위에서 protease 활성능을 측정하였다. 그림 7 에 그 결과를 나타내었다.

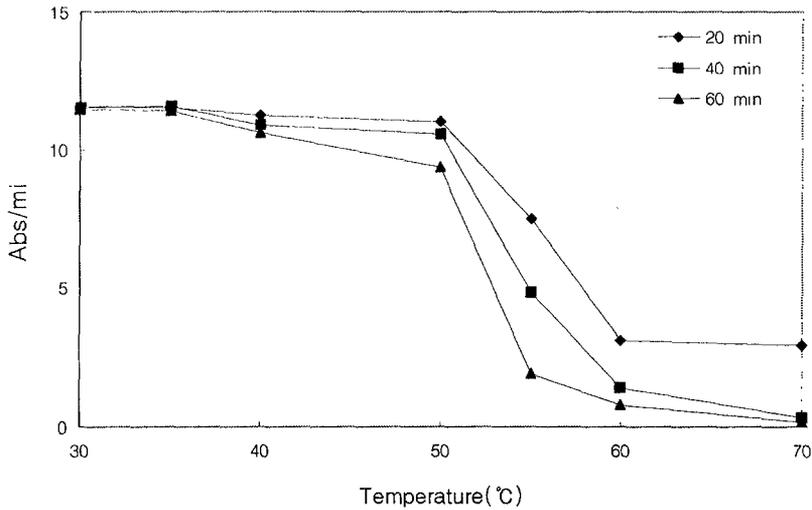


Fig. 7. Heat stability of the purified protease.

그림 7에서 보듯이 정제된 protease 는 50°C에서 1 시간 incubation 하여도 그 활성이 전혀 영향을 받지 않았다. 그러나 55°C 이상에서는 heating 에 의하여 시간 의존성으로 그 활성이 급격하게 감소함을 알 수 있었으며 60°C 이상에서는 20 분간 incubation 에 의해서 약 70% 정도 의 활성의 감소를 나타내었다. 이 결과로부터 정제한 효소는 열에는 다소 안정한 효소임을 알 수 있었다.

3) Synthetic substrate를 이용한 특성 규명

여러 가지 synthetic substrate를 이용하여 정제한 protease 의 기질 특이성을 규명하였다. 여러 가지 합성 기질의 stock solution 은 사용하기 직전에 4 mM 이 되게끔 제조하여 ice 상에서 보관하였다. 10 ng 의 protease 와 assay buffer를 잘 mixing 한 후 이 mixture 에 각각의 4 mM 의 기질 용액을 10 ul 씩을 첨가한 후 37°C에서 40 분간 반응한 후 405 nm 에서 그 흡광도를 측정하였다. Glandular kallikrein 과 factor XIa 의 합성 기질인 S-2266 (Val-Leu-Arg-pNA)를 standard 로 하여 100% activity 로 하였다. 그 결과를 표 6 에 나타내었다.

Table 6. Substrate specificity of purified protease from *N. clavata*.

Substrate	Protease
S-2266 (Val-Leu-Arg-pNA)	100.0
S-2222 (Ile-Glu(γ -OR)-Gly-Arg-pNA)	93.8
S-2238 (Phe-Pip-Arg-pNA)	91.0
S-2251 (Val-Leu-Lys-pNA)	11.9
S-2302 (Pro-Phe-Arg-pNA)	23.3
S-2366 (pyroGlu-Pro-Arg-pNA)	103.3
S-2390 (Val-Phe-Lys-pNA)	13.1
S-2403 (pyroGlu-Phe-Lys-pNA)	29.8
S-2444 (pyroGlu-Gly-Arg-pNA)	34.5
S-2765 (Arg-Gly-Arg-pNA)	140.2
BAPNA (Benz-ArgArg-Gly-Arg-pNA)	8.3
Leu-pNA	0.2
Benz-Pro-Phe-Arg-pNA)	24.8
Boc-Leu-Ser-Thr-Arg-pNA)	65.7
CBZ-Gly-Gly-Lys-pNA)	36.0
Suc-Ala-Ala-Ala-pNA)	0.2
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA)	1.2
Suc-Ala-Ala-Val-pNA)	2.4
Tos-Gly-Pro-Lys-pNA)	31.4

표 6 에서 보듯이 무당거미 (*Nephila clavata*)로부터 정제한 protease 는 cleavage site 에 Arg 이나 Lys 과 같은 basic amino acid 가 존재하는 substrate를 비교적 잘 가수 분해 하였지만, cleavage site 에 non-polar amino acid 가 존재하는 substrate 는 가수 분해를 잘 하지 못하였다. 사용한 synthetic substrate 들 중에서 factor Xa 의 기질인 S-2765 (Arg-Gly-Arg-pNA) 에 대하여 가장 강한 활성을 나타내고 있다. 따라서 이러한 특성을 더 연구하기 위하여 factor Xa 의 natural substrate 인 factor II (Prothrombin, Calbiochem 사) 을 기질로하여 factor Xa 의 활성을 측정하였다.

4) 정제한 protease 의 inhibitor에 의한 영향

여러 가지 synthetic 또는 natural inhibitor 들이 정제된 protease 에 미치는 영향을 연구하였다. 10 ng 의 protease, assay buffer 및 각각의 inhibitor 를 잘 mixing 한 후 37°C 에서 10 분간 preincubation 하여 protease 와 inhibitor 간에 반응을 시킨 후 이 mixture 에 4 mM 의 S-2765 용액을 10 ul 씩을 첨가한 후 37°C 에서 40 분간 더 반응한 후 405 nm 에 서 그 흡광도를 측정하였다. 이 때 inhibitor를 가하여 주지 않은 reaction을 100% activity 로 하였으며 그 결과를 표 7 에 나타내었다.

표 7 에서 보듯이 정제된 protease 는 APMSF (4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride), benzamidine, LBTI (linabean trypsin inhibitor), SBTI (soybean trypsin inhibitor), PMSF (Phenylmethrylsulfonyl fluoride) 및 TLCK ($N\alpha$ -tosyl-L-lysine chloromethyl ketone) 와 같은 전형적인 serine protease inhibitors 에 의하여 그 활성이 억제되었지만 cystein protease inhibitor 인 cystatin 과 aminopeptidase 의 inhibitor 인 bestatin 에 의하여 억제되지 않았다. 또한 정제한 protease 는 chymotrysin inhibitor 인 chymostatin 과 chymotrysin 의 선택적인 inactivator 인 TPCK ($N\alpha$ -tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone) 에 의하여 억제되지 않았다. 따라서 위의 결과로부터 정제한 효소는 serine protease 중 trypsin 유사한 protease, 즉 trypsin-like serine protease 임을 알 수 있었다.

Table 7. Effect of various inhibitor on the purified protease activity

Inhibitor (Concentration)	Inhibition (%)
None	100.0
APMSF (1 mM)	3.6
Benzamidine (1 mM)	12.4
Bestatin (1 mM)	89.2
Cystatin (50 μ g/ml)	94.5
Leupeptin (1 mM)	23.0
PMSF (1 mM)	14.1
TLCK (1 mM)	18.3
TPCK (1 mM)	88.2
Anti-thrombin III (0.1 IU/ml)	58.5
Anti-trypsin (100 μ g/ml)	64.2
Aprotinin (25 mIU/ml)	49.9
Chymostatin (50 μ g/ml)	91.3
LBTI (50 μ g/ml)	23.3
SBTI (50 μ g/ml)	12.7

5) Protease 활성의 Calcium 의존성

많은 protease 들은 그 활성을 나타내기 위하여 calcium을 필요로 하는 것으로 보고 되어 있다. 본 연구에서 정제한 protease 의 calcium 의존성을 그림 8에 나타내었다.

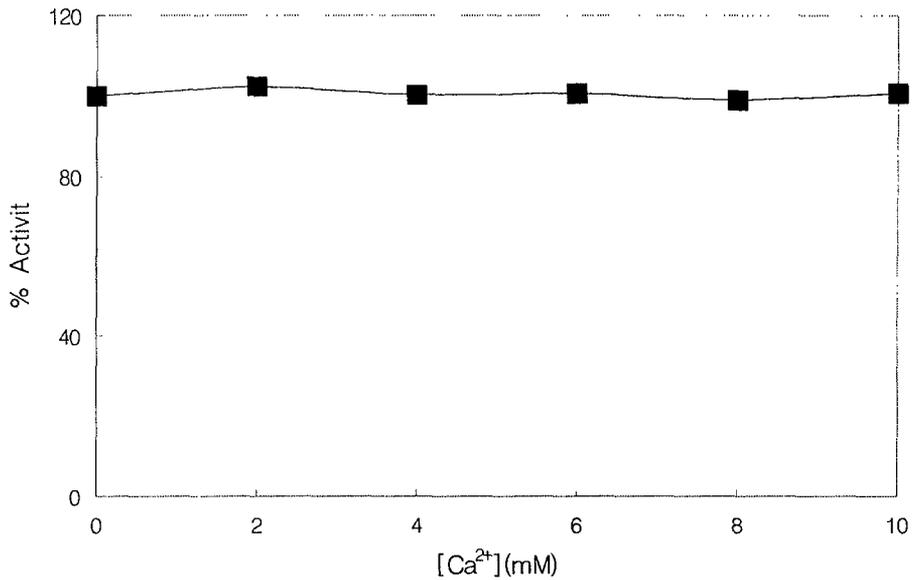


Fig. 8. Requirement of Ca²⁺ for the protease activity.

그림 8에서 보듯이 정제한 protease 활성에는 calcium을 필요로 하지 않음을 알 수 있었다. 즉 Ca²⁺-independent prothrombin activator 임을 알 수 있었다.

6) Prothrombin activation test

Factor Xa 는 prothrombin 에 작용하여 thrombin 을 생성함으로써 fibrinogen을 기질로 하여 fibrin clot 을 형성하는 blood clotting 에 관여하는 중요한 효소이다. Prothrombin 및 Factor Xa 의 농도는 다음과 같다.

Factor Xa : 2 unit/ml(4 ug/ml), Sigma

Prothrombin : 1mg/ml, Calbiochem

Assay buffer : 0.1 M Tris-HCl, pH 8.0

Assay buffer 20 ul, 5 ul prothrombin (5 ug), 5 ul 의 정제한 protease (10 ng) 를 잘 섞어 준 후 37°C 에서 5 시간 동안 반응하였다. 이 때 positive control 로는 10 mU 의 factor Xa (Sigma 사) 를 사용하였다. 반응이 끝난 후 15% SDS-PAGE 로 thrombin 의 형성을 확인하였을 때, positive control 인 factor Xa를 처리하였을 때처럼 43 kDa 의 thrombin band 와 30 kDa 의 prothrombin fragment 1을 생성함으로써 prothrombin activator 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다 (그림 9).

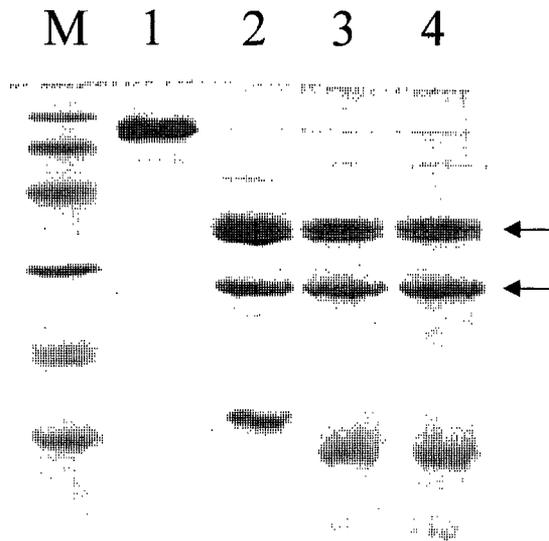


Fig. 9. SDS-PAGE analysis of prothrombin activation by the purified proteases. The reaction mixture was incubated at 37°C for 4 hr.

lane M; molecular weight marker

lane 1; prothrombin

lane 2; 20 mU(40 ng) factor Xa-treated prothrombin

lane 3; 10 ng protease-treated prothrombin with 5 mM CaCl₂

lane 4; 10 ng protease-treated prothrombin without 5 mM CaCl₂

7) Fibrin clotting assay

Prothrombin activation 에 의하여 thrombin 이 정확하게 생성되어 biological activity 를 갖는 thrombin 이 생성되는지를 확인하기 위하여 fibrinogen 을 기질로 하여 fibrin clot 이 형성되는지를 확인하였다. 먼저 1.5% agarose를 만들어 50°C 가 되게끔 하여 충분히 식혀 주었으며 이 agarose 용액에 50°C 까지 서서히 warming 된 fibrinogen 용액을 잘 섞어 주어 bubble 이 생기지 않도록 하여 82 mm plate 에 부어 상온에서 약 1 시간 정도 방치하여 fibrinogen-agarose plate (0.7% agarose, 2% fibrinogen) 를 만들었다. 10 ng 의 protease 를 처리한 prothrombin sample 과 positive control 로는 factor Xa를 처리한 prothrombin 용액 각 20 ul 를 well 에 점적한 후 37°C 에서 24 시간 동안 incubation 하여 fibrin 형성으로 인한 turbid zone 을 확인하였으며 (그림 10), 각 turbid zone 의 직경을 측정하였다 (표 9).

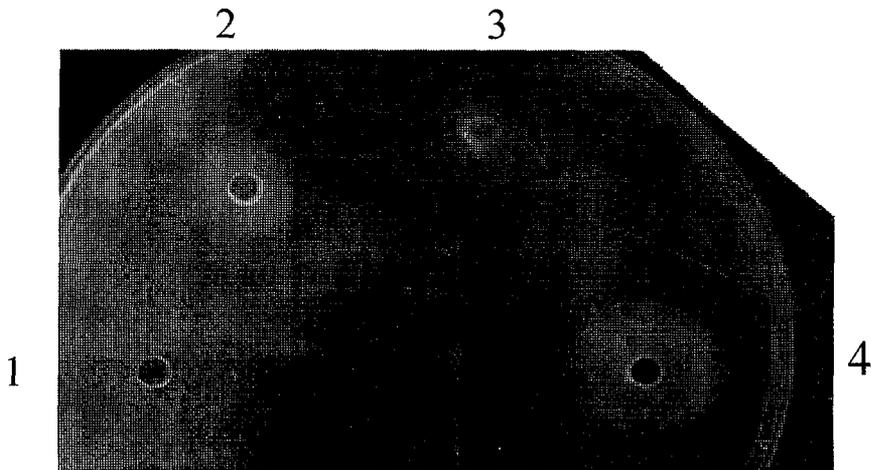


Fig. 10. Formation of fibrin from fibrinogen by the purified protease. The reaction mixture was incubated at 37°C for 16 hr.

Well 1; Prothrombin only

Well 2; 20 mU(40 ng) factor Xa-treated prothrombin

Well 3; 10 ng of purified protease only

Well 4; 10 ng protease-treated prothrombin

위의 그림에서 보듯이 정제한 protease 는 factor Xa-treated prothrombin에서 처럼 (Well 2) prothrombin을 thrombin 으로 활성화시키어 fibrinogen 으로부터 fibrin을 생성함을 알 수 있었다 (Well 4). 따라서 *Nephila clavata* 에서 정제한 protease 는 prothrombin activator 의 활성을 가짐을 알 수 있었다. 그러나 정제한 protease 자체로는 fibrin clotting 활성이 없었다 (Well 3).

Table 8. Diameter of fibrin turbid zone formed by the proteases

sample	diameter(mm)
control (prothrombin only)	4
20 mU factor Xa-treated	16
10 ng protease-treated	24
10 ng protease (no prothrombin)	2

표 8에서 보듯이 정제한 protease를 처리한 prothrombin 에 의하여 생성된 turbid zone 의 직경은 20 mU 의 factor Xa를 처리하여 생성된 turbid zone 의 직경 보다 훨씬 큼을 알 수 있었다. 따라서 정제한 protease 는 최소한 20 mU/10 ng protein, 즉 20,000 U/mg protein 이상의 specific activity 의 factor Xa 활성을 가짐을 알 수 있었다.

제 4 절 결 론

한국산 무당거미인 *Nephila clavata* 의 body 로 부터 acetone fractionation, DEAE-Sepharose ion exchange chromatography 및 SBTI-Sepharose affinity chromatography를 이용하여 trypsin-like serine protease를 순수하게 정제하였다. 정제한 protease 의 분자량은 SDS-PAGE 상에서 24 kDa, Superose 12HR를 이용한 FPLC 상에서는 25.7 kDa 로 계산되었는데 이 결과로부터 *Nephila clavata* 의 protease 는 single polypeptide 임을 알 수 있었다. 정제한 protease 의 optimum pH 는 pH 8.0 이었으며 protease 활성은 30~50°C에서 안정하게 유지되었다. 정제한 protease 는 활성을 나타내기 위해서 Ca^{2+} ion을 필요로 하지 않는 Ca^{2+} -independent protease 이었으며 APMSF, benzamidine, LBTI, SBTI, PMSF 및 TLCK 와 같은 전형적인 serine protease inhibitors 에 의하여 그 활성이 억제되는 전형적인 serine protease 의 한 종류임을 알 수 있었다. 정제한 protease 는 cleavage site 에 Lys 과 Arg 과 같은 basic amino acid 가 존재하는 synthetic substrate를 비교적 우수한 가수분해 능력을 보였으며 이들 synthetic substrate 들 중 factor Xa 의 합성 기질인 S-2765 (Arg-Gly-Arg-pNA)를 가장 잘 분해하였다. 또한 prothrombin을 기질로 하여 thrombin 이 생성하는 지를 확인한 결과 SDS-PAGE 상에서 prothrombin으로부터 thrombin을 형성함을 확인하였으며, fibrinogen-agarose plate로부터 정제한 protease를 처리한 prothrombin 으로부터 thrombin 이 형성되어 turbid 한 fibrin 이 형성함을 확인하였다. 따라서 이러한 결과로부터 *Nephila clavata* 에서 Ca^{2+} -independent prothrombin activator 활성을 갖는 serine type 의 protease를 순수하게 정제하였음을 알 수 있었다.

여 백

제 5 절 참 고 문 헌

- 김주필, 김상득, 1996. 거미류의 턱이속독에 관한 고찰. 한국거미 12(1);129-139.
- Bradford, M. M., 1977. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Davis, B. J., 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121 : 404-427.
- Govers-Riemslog, J.W.P., Knapen, M.J.H., Tans, G., Zwaal, R.F.A. and Rosing, J. (1987) Structural and functional characterization of a prothrombin activator from the venom of *Bothrops neuwidi*. *Biochim. Biophys. Acta* 916, 388-401.
- Hofmann, H. and Bon, C. (1987) Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 1. Identification, purification, and properties of a prothrombin activator. *Biochemistry* 26, 772-780.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* 227 : 680-685.
- Rosing, J. and Tans, G. (1992) Structural and functional properties of snake venom prothrombin activators. *Toxicon* 30, 1515-1527.
- Sarath, G., R.S.DE LA Motte, and F.W. Wagner, 1989. Protease assay methods. in "Proteolytic enzymes : a practical approach" Edited by R.J. Beynon & J.S. Bond, IRL Press, Oxford, England.
- Siigur, E. and Siigur, J. (1991) Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (snake) venom. *Biochim. Biophys. Acta* 1074, 223-229.
- Terra, W.R. and Ferreira, C. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Chem. Biochem. Physiol.* 109B, 1-62.

여 백

제 4 장 생약곤충으로부터의 생리활성물질 탐색 개발

제 1 절 선퇴로부터 CETP inhibitor의 분리

1. 서 설

동맥경화는 cholesterol과 같은 lipid material이 지속적으로 혈관벽에 축적됨으로서 발생하는 질병이다 (Robison, 1994; Myant, 1990). 동맥에서의 cholesterol ester의 축적은 심장 질환의 중요한 원인으로 세계적으로 이 질병에 의한 높은 사망률을 가져오고 있다. 사람 혈장의 cholesteryl ester transfer protein (CETP)은 분자량 74 kDa의 소수성 당단백질로서 고밀도지단백질(HDL)과 저밀도지단백질(LDL) 사이에서 cholesteryl ester와 triglyceride의 교환을 촉진한다(Larrost, 1994; Tall 1986). 또한 CETP는 혈중 cholesterol을 간을 통해 체외로 제거하는 유일한 기작인 콜레스테롤 역수송 경로(reverse cholesterol transport pathway)에서 각 지단백질의 지질구성을 조절하는 유효효소로서, 동맥경화증의 발병에 있어 매우 중요한 인자로 알려져 있다(Assmann 1990; Brown, 1989). 혈중 CETP 활성이 거의 없는 것으로 보고된 pig나 rat에서는 동맥경화증의 유발이 거의 없다고 보고되어 있다(Ha 1982). 좀 더 직접적인 증거로는 일본에서 발견된 혈중 CETP 결핍 가계의 경우, 혈중 LDL치는 현저히 낮아지고, HDL치는 현저히 높으며 혈중 총 cholesterol치는 정상인에 비해 2-3배 가량 높으나, 동맥경화는 발병하지 않는 것으로 보고하였으며(Koizumi et al. 1985), 다른 group에서 발견한 CETP deficiency family에서도 같은 결과를 보여 주었다.

이러한 이유에서 CETP 저해제는 동맥경화성 심장순환계질환의 효과적인 치료제 개발의 좋은 후보대상이 되고 있다. 본 연구에서는 여러 가지 생약곤충으로부터 CETP 저해제 탐색연구를 수행하던 중 오랜동안 한방약제로서 사용되어온 매미 (*Cryptotympana atrata*)의 탈피각 (Periostracum Cicadae)인 선퇴추출물로부터 dioctyl phthalate를 분리하였으며 이 물질의 CETP 저해제로의 활성과 그 유도체 물질의 저해활성등을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 시약 및 시료

[1-¹⁴C]oleoyl-CoA(CFA 634, 54 mCi/mmol)과 CETP-[³H]SPA(scintillation proximity assay) kit는 Amersham Life Science(Buckinghamshire, England)에서 구입하였으며, HPLC column(YMC-pack ODS-C18)은 YMC Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하였고, 모든 reagent grade chemical들은 Sigma, Aldrich, Merck Co.등에서 구입하였다. 시료인 선회는 대전지역의 한약방에서 대량으로 구입하여 사용하였다.

나. CETP의 부분정제

CETP은 적십자 혈액원으로부터 구입한 신선한 human plasma로부터 이미 보고된 방법(Pattnaik *et al.* 1978; Kato *et al.* 1989; Rehberg *et al.* 1994)들을 종합하여 부분정제하였다. Human plasma 920 ml(5 pack)에 MnCl₂(final conc. 0.2 M)와 Na-dextran sulfate 10% 용액(final conc. 1.2%)을 첨가한 후, 10,000 x g(Sorvall RC5C, GS-3 rotor, 8,000 rpm)에서 30분간 원심분리하여 침전된 lipoprotein을 제거한 상등액을 얻었다. 이 상등액에 최종농도가 70 mM이 되도록 BaCl₂를 첨가한 후 10,000 x g에서 30분간 2차 원심분리를 하여 Na-dextran sulfate의 잔여물이 제거된 lipoprotein deficient plasma(LPDP)를 얻었다. 이 lipoprotein deficient plasma에 고체 NaCl을 첨가하여 용액농도가 4 M이 되도록 만든다음, 200 ml의 phenyl-sepharose CL-4B에 첨가하여 4°C에서 1시간 동안 교반함으로써 단백질을 resin에 흡착시킨 후, fritted-glass funnel을 이용하여 4 M NaCl 용액 200 ml로 세척하고, 연이어 500 ml의 완충용액 A(50 mM Tris · HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4)로 세척한 다음 glass column(2.5x50 cm)에 충전하였다. 완충용액 A로 280 nm에서의 흡광도가 0.3 이하가 되도록 세정하고, 0.02% NaN₃를 포함하는 H₂O를 이용하여 CETP를 용출하였다. CETP 용출분획에 0.5 M Na-acetate 완충용액을 1/9분획 부피만큼 첨가하여 용출액의 pH를 4.5로 맞춘 다음 10,000 x g에서 30분간 원심분리하여, 생성된 침전물을 제거한 상등액으로부터 CM-cellulose ion exchange column을 이용하여 CETP를 부분정제하였다. 완충용액 B(50

mM Na-acetate, pH 4.5, 1 mM Na₂EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol)로 평형된 CM-cellulose column (1.6x20 cm)에 그 상등액을 적용하고 완충용액 C(90 mM NaCl을 포함하는 완충용액 B)로 세정한 후, 90 mM에서 400 mM로 NaCl 농도를 증가시키면서 용출, 분획하였다. CETP 분석에 의해 얻은 활성분획을 1 mM Na₂EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.02% NaN₃를 포함하는 완충용액 A로 투석하고, bovine serum albumin을 표준단백질로 사용하여 Lowry 등의 방법에 따라 단백질을 정량하고 단백질 농도가 0.13~0.15 mg/ml가 되도록 희석하여 소량씩 분획한 후 -80°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

다. CETP의 활성 측정

콜레스테릴 에스테르 전이단백질(CETP)의 활성 측정은 [³H]-CETP 섬광근접 분석방법(scintillation proximity assay: Hart & Greenwald 1979; Bosworth & Towers 1989)을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. [³H]-cholesteryl ester가 HDL로부터 Biotin과 결합된 LDL로 운반되고, 이 Biotin-LDL은 Avidin과 결합된 scintillation molecule (fluomicrosphere)와 결합함으로써 수용액상에서 ³H의 β -emitter가 scintillant molecule과 아주 가까운 거리에 인접함으로써 energy(빛)을 내게되며, 이 빛의 강도를 측정함으로써 CETP의 활성을 검색하게 된다.

CETP 활성 측정 전에 모든 시약을 얼음물로 냉각하였다. 1 ml 짜리 원심분리튜브에 10 μ l의 분석완충액 (50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.1%(w/v) NaN₃, pH 7.4), 10 μ l의 [³H] cholesteryl ester HDL, 10 μ l의 biotin LDL을 혼합한 후 10 μ l의 CETP (사람의 혈장으로부터 분리된 것, 1.3~1.5 μ g)을 첨가하여 반응을 시작하였다. 이때 공시료는 10 μ l의 CETP 대신에 10 μ l의 물을 첨가하였으며, 대조구로는 10 μ l의 시료 대신에 물이나 메탄올을 첨가하여 같은 조건에서 반응시켰다. 37°C에서 4 시간 동안 반응시킨 후, 200 μ l의 SPA beads를 첨가하여 반응을 정지시키고, 평형에 도달하도록 실온에서 1 시간동안 정치시켰다. CETP 활성 측정은 반응시킨 원심분리튜브를 액체섬광계수기 (Liquid scintillation counter)를 이용하여 HDL로부터 LDL로 전이된 cholesteryl ester의 양을 CPM (count

per minute)의 단위로 결정하였다.

ACAT 및 CETP 활성저해율은 다음 식으로부터 구하였다.

$$\% \text{ Inhibition} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{Sample (cpm)} - \text{Background (cpm)}}{\text{Control (cpm)} - \text{Background (cpm)}} \right]$$

라. 선회로부터 CETP 저해제의 분리

마쇄한 선회 1.4 kg을 acetone 용액에 3일간 추출한 후 이물 감압건조하여 silica gel chromatography를 실시하였다. 그 중 활성이 나타나는 분획을 농축한 다음 silica gel chromatography와 reversed-phase HPLC등을 반복함으로써 최종 정제하였다 (Fig. 1). 분리된 물질의 구조해명을 위하여 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT등을 수행하였으며 보고된 data들과 비교하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 선회로부터 CETP 활성저해물질의 분리

선회 (1.4 Kg)를 분쇄하여 5 L의 acetone으로 상온에서 5일간 추출한 후, 추출물을 여과와 농축과정을 거쳐 Silica gel column에 충전하고 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ Gradient를 이용하여 활성성분을 용출하였으며 그중 얻어진 활성분획을 다시 Hexane/EtOAc Gradient로 2차 Silica gel column을 행하였다. 2차 Silica gel column에서 얻은 활성분획을 HPLC로 분리하여 단일 peak의 순수한 활성물질 11 mg을 얻었다 (Fig. 2).

나. CETP 저해제의 구조분석

NMR 분석은 CDCl_3 용매에 녹여서 300 MHz(^1H)와 75 MHz(^{13}C 와 DEPT)에서 측정하였다. 내부 기준물질로 CDCl_3 를 사용하여, ^1H 에 대한 chemical shift는 $\delta = 7.26$, ^{13}C 에 대

한 chemical shift는 $\delta = 77.0$ 이었다. $^1\text{H-NMR}$ COSY 실험으로부터 방향족 고리를 갖으며, C6, C5, C4와 C8, C(이 연결되어 있음을 알 수 있었다. 활성화합물의 ^{13}C NMR로부터 대칭성 화합물이며, DEPT로부터 12개의 탄소에 대해 확인한 결과, 2 개의 quaternary 탄소, 3 개의 methine 탄소, 2 개의 methyl group을 갖는 5 개의 methylene 탄소가 존재함을 알 수 있었다(Table 1). Fig. 3에서 보여지는 것 처럼, 기존에 보고된 결과를 바탕으로 각종 기기분석 결과를 비교하여 Amade et al., 1994), 이 화합물은 dioctyl phthalate(di(2-ethylhexyl)phthalate)로 규명하였다 (Fig. 3).

다. Dioctyl phthalate와 유도체들의 CETP 활성 억제 효과

Dioctyl phthalate와 유도체들의 CETP 활성 억제 효과는 ‘재료 및 방법’에 언급한대로 시행하였다. CETP 활성 억제능은 사람 혈장 CETP의 존재하에서 [^3H]cholesteryl ester를 HDL로부터 biotinylated LDL로 전이하는 정도를 측정한다. 사람 혈장으로부터 부분 정제된 CETP의 활성은 알려진 CETP 저해제인 N,N-dimethylsphingosine을 positive control로 사용하여 확인하였다 (Jeong et al., 1997). Dioctyl phthalate는 CETP 활성을 억제하며, IC_{50} 치가 $5.7 \mu\text{M}$ 이었다 (Table 2). 이 phthalate 유도체인, dimethyl phthalate, dimethyl isophthalate, dipropyl phthalate, dibutyl phthalate, diethyl phthalate, diallyl phthalate, diphenyl phthalate, dicyclohexyl phthalate,와 benzyl butyl phthalate를 Aldrici Chemeical Co.(Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하여, 구조-활성 관계를 규명하기 위하여 CETP 활성 억제능을 측정하였다. Dibutyl phthalate, dicyclohexyl phthalate와 benzyl butyl phthalate의 IC_{50} 치는 각각 30.8, 36.0, 126.5 μM 로 비교적 강한 억제 활성을 나타낸 반면에, diallyl phthalate, dimethyl phthalate, dimethyl phthalate, dipropyl phthalate, diethyl phthalate, diphenyl phthalate는 500 μM 농도에서도 CETP 활성을 억제하지 않았다 (Table 2). Dioctyl phthalate는 yellow sugar (Chernykh and Semenov, 1980)에서 처음으로 추출되었으며, *Streptomyces* sp. (Uyeda et al., 1990), *Penicillium olsonii* (Amade et al., 1994), 물고기 조직 (Karara et al., 1984) 등에서 분리되었다. Dioctyl phthalate는 plasticizer, 세포 응집 요소 (Uyeda et al., 1990), peroxisome 분화제 (Kawashima et al., 1983)로 잘 알려진

물질이기는 하나, CETP 활성 억제능은 본 연구팀이 최초로 보고하는 것이다. 따라서 diethyl phthalate는 혈장 CETP 활성의 조절을 통해 지질대사와 항동맥경화의 연구에 유용한 재료가 될 것이며, 동양 한방 원료인 선태 추출물에 대한 지속적인 연구를 통해 동맥경화 치료제로서의 효능을 밝히고자 한다.

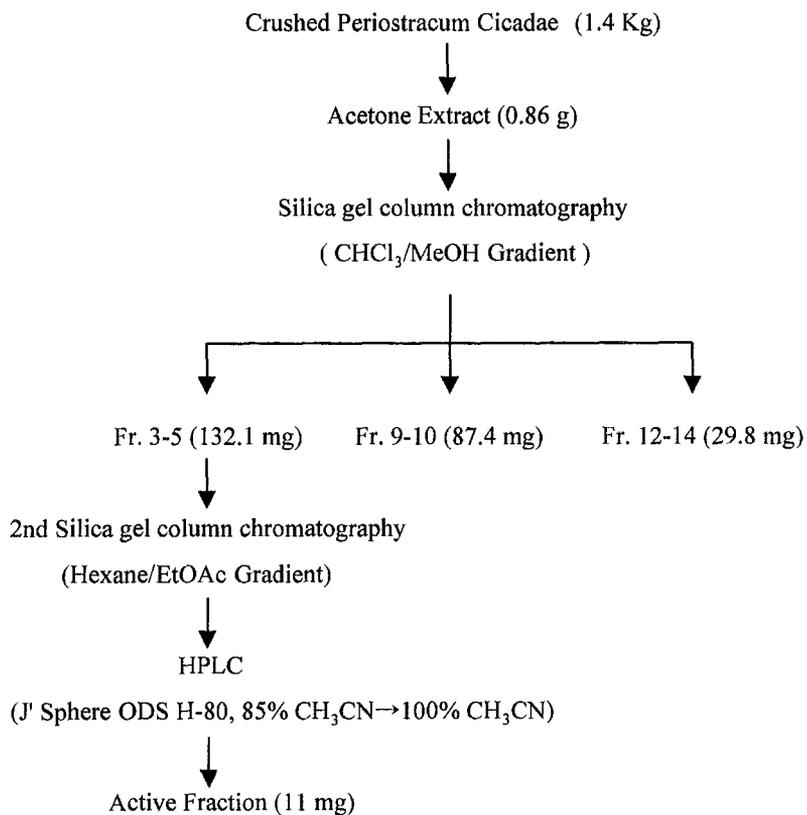


Fig. 1. Purification scheme of CETP inhibitory substance from *Periostracum Cicadae*

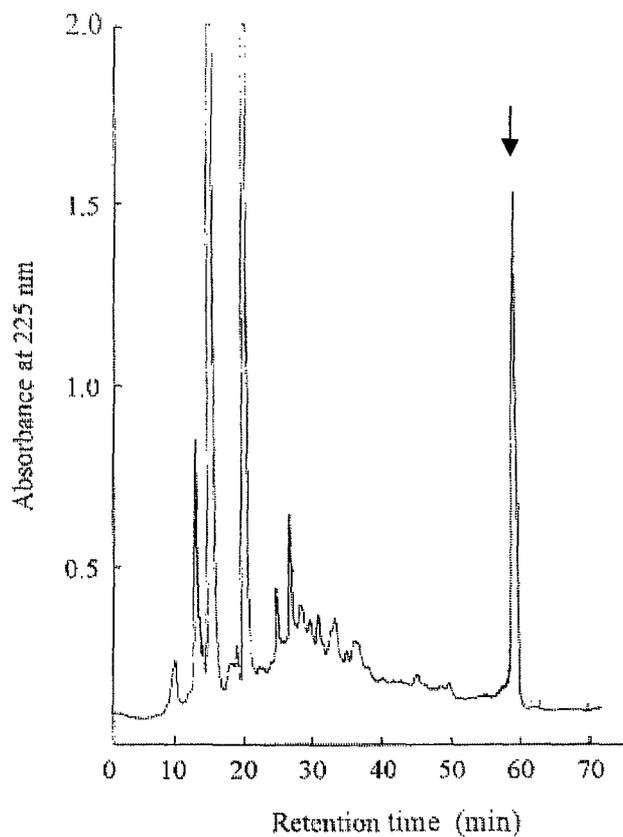


Fig. 2. HPLC chromatography of dioctyl phthalate having CETP inhibitory activity. Column: J Sphere ODS H-80 (250 x 20 mm, 80 Å, YMC Co., Japan); mobile phase CH₃CN-H₂O (85:15) to 100% CH₃CN; flow rate 4 ml/min; detection 225 nm.

Table 1. ^{13}C and ^1H NMR chemical shifts and DEPT data of Dioctyl phthalate.

Carbon Number	^{13}C NMR ^a δ , ppm	Carbon type ^b	^1H NMR ^c δ , ppm (mult, <i>J</i> , Hz)
1	10.94	CH_3	0.94 (t, 5.0)
2	22.97	CH_2	1.29-1.39 (m)
3	23.73	CH_2	1.29-1.39 (m)
4	28.91	CH_2	1.29-1.39 (m)
5	38.71	CH	1.70 (m)
6	68.12	CH_2	4.24 (m)
7	167.72	$\text{OC}=\text{O}$	-
8	30.34	CH_2	1.42 (dq, 4.9, 9.4)
9	14.03	CH_3	0.91 (t, 4.9)
10	132.43	= Cq	-
11	130.85	= CH	7.72 (dd, 2.2, 3.7)
12	128.77	= CH	7.54 (dd, 2.2, 3.7)

^a: 75 MHz in CDCl_3 ; ^b: Based on ^{13}C DEPT; ^c: 300 MHz in CDCl_3 .

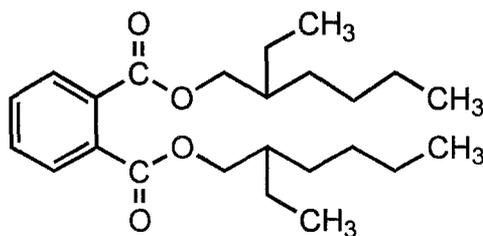
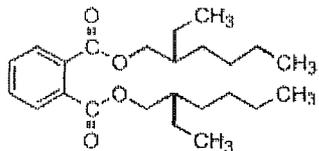
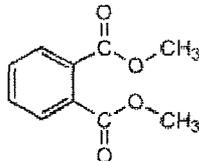
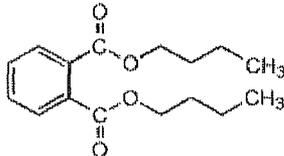
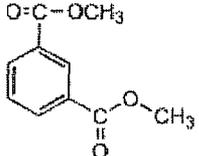
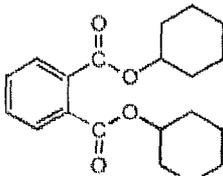
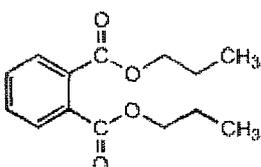
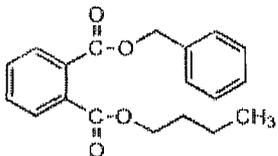
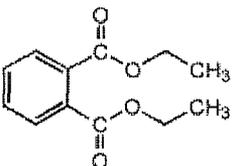
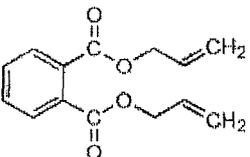
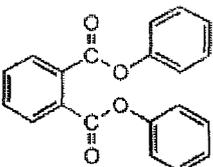


Fig. 3. Structure of Dioctyl phthalate

Table 2. CETP inhibitory activities of dioctyl phthalate and analogs.

Compounds	IC ₅₀	Compounds	IC ₅₀
 <p>Dioctyl phthalate</p>	5.7	 <p>Dimethyl phthalate</p>	>500
 <p>Dibutyl phthalate</p>	30.8	 <p>Dimethyl isophthalate</p>	>500
 <p>Dicyclohexyl phthalate</p>	36.0	 <p>Dipropyl phthalate</p>	>500
 <p>Benzyl butyl phthalate</p>	126.5	 <p>Diethyl phthalate</p>	>500
 <p>Diallyl phthalate</p>	>500	 <p>Diphenyl phthalate</p>	>500

여 백

4. 참고 문헌

- Amade, P., Mallea, M., and Bounaicha, N. (1994) Isolation, structure identification and biological activity of two metabolites produced by *Penicillium olsonii* Bainier and Sartory. *J. Antibiotics* **47**, 201-207.
- Brown, M. L., Inazu, A., Hesler, C. B., Agellon, L. B., Mann, C., Whitlock, M. E., Marcel, Y. L., Milne, R. W., Koizumi, J., Mabuchi, H., Takeda, R., and Tall, A. R. (1989) Molecular basis of lipid transfer protein deficiency in a family with increased high density lipoproteins. *Nature* **342**, 448-451.
- Chernykh, E. A. and Semenov, A. A. (1980) Chemical composition of yellow sugar-1-Isolation of bis(2R(-)2 ethylhexyl)phthalate. *Khim. Prir. Soedin.* **2**, 247-248.
- Coval, S. J., Conover, M. A., Mierzwa, R., King, A., Puar, M. S., Phife, M. S., Pai, J. K., Burrier, R. E., Ahn, H. S., Boykow, G. C., Patel, M., and Pomponi, S. A. (1995) Wiedendiol-A and B, cholesteryl ester transfer protein inhibitors from the marine sponge *Xestospongia wiedenmayeri*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **5**, 605-610.
- Hsieh, M. T., Peng, W. H., Yeh, F. T., Tsai, H. Y., and Chang Y. S. (1991) Studies on the anticonvulsive, sedative and hypothermic effects of *Periostracum Cicadae* extracts. *J. Ethnopharmacol.* **35**, 83-90.
- Jeong, T.-S., Ahn, J.-A., Kim, Y.-K., Bok, S.-H., Kwon, B.-M., Shin, J., and Seo, Y. (1997) CETP inhibitory activity of ceramides, isolated from the Gorgonian *Acabaria undulata*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **7**, 1481-1482.

- Karara, A.H., Hayton, W. L., and Archer, B. G. (1984) A separation and purification procedure for [14C] di-2-ethylhexyl phthalate in fish. *J. Anal. Toxicol.* **8**, 141-145.
- Kawashima, Y., Nakagawa, S., Tachibana, Y., and Kozuka, H. (1983) Effects of peroxisome proliferators on fatty acid-binding protein in rat liver. *Biochim. Biophys. Acta* **754**, 21-27.
- Lagrost, L. (1994) Regulation of cholesteryl ester transfer protein activity; review of *in vitro* and *in vivo* studies. *Biochem. Biophys. Acta* **1215**, 209-236.
- Morton, R. E. and Zilversmit D. B. (1981) The separation of apolipoprotein D from cholesteryl ester transfer protein. *Biochem. Biophys. Acta* **663**, 350-355.
- Myant, N. B. (1990) Cholesterol metabolism, LDL, and the LDL receptor, ix-x, Academic Press, New York.
- Robinson, J. G. (1994) The prevention of cardiovascular disease: emphasis on secondary prevention. *Med. Clin. North Am.* **78**, 69-98.
- Sciarra, G. and Angotzi, G. (1984) Extraction of di-2-ethylhexylphthalate from PVC used in synthetic leather. *G. Ital. Med. Lav.* **6**, 235-238.
- Uyeda, M., Suzuki, K., and Shibata, M. (1990) 3315-AF2, a cell aggregation factor produced by *Streptomyces* sp. Strain No. A-3315. *Agri. Biol. Chem.* **54**, 251-252.
- Tall, A. (1995) Plasma lipid transfer proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 235-257.

제 2 절 곤충유래 α -glycosidase 저해활성물질의 분리, 정제 및 특성분석

1. 재료 및 방법

가. 곤충자원 및 시료조제

여러 가지 시료로부터 α -glucosidase의 저해활성을 탐색하였으며 그 중 저해활성이 관찰되었던 전갈을 포함하여 흰개미를 재료로 하였다.

나. α -glucosidase 저해활성 검정

α -glucosidase 활성은 *p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside을 기질로하여 생성되는 *p*-nitrophenol 농도를 Abs 405nm로 측정하였다. 25mM phosphate buffer (pH 6.8) 450 μ l 에 20mM PNP- α -D-glucopyranoside 20 μ l, α -glucosidase 용액 30 μ l(160munit)와 MeOH 에 조제한 시료용액(대조구로는 MeOH만 첨가) 50 μ l를 혼합하여, 37 $^{\circ}$ C에서 30분 배양시킨 다음, 900 μ l의 NH₄OH용액을 넣어 반응을 정지시킨 후, Abs 405nm를 측정하였다.

다. 흰개미에서 활성물질 분리

흰개미의 MeOH 추출물을 완전히 건조시킨 후 소량의 H₂O 에 녹여, 동량의 BuOH로 추출하여 silica gel 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. BuOH : MeOH (100 : 0 \rightarrow 10 : 90) 으로 gradient elution 시킨 후, silica gel TLC (F₂₅₄, Merck)를 행하여 활성 물질을 분리하였다.

라. 전갈로부터의 활성 물질 분리

전갈을 막자로 곱게 간 후 MeOH로 추출한 후, 추출물을 BuOH로 extraction, silica gel 칼럼 크로마토그래피로 용매조건을 EtoAC : MeOH (80 : 20 \rightarrow 10 : 90)로하여 gradient elution 시킨 후 silica gel TLC를 행한 다음 마지막으로 HPLC를 실시하였다.

2. 결 과

가. 흰개미로부터의 활성물질 분리

Silica gel 칼럼 크로마토그래피 분석결과 미지의 활성분획 I 과 II를 얻었으며 계속해서 활성분획 I에 대해서 용매조건을 EtOH : H₂O (10 : 1)로하여 TLC를 행하였다. 그 결과 활성 band A0(Rf =0.41), A1(Rf = 0.32), A2(Rf = 0.28) 의 3개 band를 분리할 수 있었으며, 계속해서 활성 band A0을 HPLC(reverse phase C₁₈ column, MeOH : H₂O = 10 : 90 isocratic solvent system)을 행한 결과, 단일 peak를 얻었으며 구조결정 및 특성분석을 위해 지속적인 대량 정제가 진행중에 있다.

활성분획 II는 용매조건을 BuOH : MeOH : H₂O (4 : 1 : 2)로하여 TLC를 행한 결과, 활성 band B1(Rf 0.23), B2(Rf 0.31), B3(Rf 0.46), B4(Rf 0.57), B5(Rf 0.74)를 분리하였으며, 각 band의 color reaction을 조사한 결과는 Table 1.과 같다.

나. 전갈에서의 활성물질 분리

Silica gel 칼럼 크로마토그래피를 실시 후 활성분획을 몇 개의 solvent system을 사용한 TLC를 행하여 분리하여 활성 band 4개를 얻을 수 있었다. 각 활성 band들의 다른 solvent system에서의 Rf 와 정색반응 결과를 Table 2.에 나타내었다.

Table 1. Color reaction of α -glucosidase inhibitory active bands from the extracts of Termite

active band	Rf *	positive color reaction
B1	0.23	orcinol-ferric chloride, ninhydrin
B2	0.31	Dragendorff's reagent, orcinol-ferric chloride, bromcresol green
B3	0.46	ninhydrin
B4	0.57	-
B5	0.74	bromcresol green

Development solvent system ; BuOH : MeOH : H₂O (4 : 2 : 1)

Table 2. Color reaction of α -glucosidase inhibitory active bands from the extracts of Scorpion

active band	Rf. (solvent system ^a)	color reaction ^b	
		+	-
S 1-1	0.89 (A) 0.92 (B) 0.97 (C) 0.16 (D)	2, 3, 6	1, 4, 5, 7, 8, 9
S 1-2	0.80 (A) 0.45 (B) 0.82 (C) 0.13 (D)	2, 6, 9	1, 3, 4, 5, 7, 8
S 2	0.69 (A) 0.30 (B) 0.53 (C)	-	1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9
S 3	0.51(A)	2, 3, 6, 7	1, 4, 5, 8, 9

^asolvent System A : BuOH : MeOH : H₂O (4 : 1 : 2)
B : CH₃CN

C : BuOH : MeOH (4 : 1)

D : Hexane : Et₂O : CH₃COOH (80 : 20 : 1)

^bcolor reagent

1. aniline-Diphenylamine
2. anisaldehyde
3. antimony trichloride
4. dimethylaminobenzaldehyde
5. Dragendorff's reagent
6. orcinol-ferric chloride
7. ninhydrin
8. rhodamine B
9. bromcresol green

제 3 절 곤충유래 pancreatic lipase 저해활성물질 분리, 정제 및 특성분석

1. 재료 및 방법

가. 곤충자원 및 시료조제.

꿀벌의 독, 백강잠 및 동충하초를 시료로 MeOH 추출하여 활성물질 분리 및 정제의 출발재료로 사용하였다.

나. pancreatic lipase 저해활성 검정

triolein의 2-monolein으로의 hydrolysis로 pancreatic lipase의 활성을 측정하였다. 25mg의 triolein을 200 μ l hexane에 녹인 후 1.8ml의 1M tris assay buffer (pH 8.0), 5 μ l의 40% aqueous CaCl₂, pancreatic lipase 3 Unit 처리시료 100 μ l을 합하여 vortex mixing 한 후 37 $^{\circ}$ C shaking water bath에서 반응시키면서 일정시간 간격으로 반응액 소량을 취해 1% acetic acid를 포함하는 MeOH을 몇 방울 떨어뜨려 용액을 맑게 한 후 TLC analyses에 의해 triolein의 전환여부를 검정하였다. 또한 저해 정도를 보다 정량적으로 검정하기 위해서 olive oil의 triglyceride를 fatty acids, diglyceride, monoglyceride 그리고 glycerol로 hydrolyze시킨 후, 형성된 fatty acid의 양을 NaOH로 적정하였다. lipase substrate (sigma) 600 μ l에 0.2M tris buffer(pH 8.0) 100 μ l, pancreatic lipase enzyme 0.3 Unit 그리고, 처리시료 100 μ l을 넣은 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 후 thymolphthalein indicator solution 100 μ l을 넣고 0.05N NaOH로 적정하여 명확한 blue color가 나타나는 시점을 end point로 하였다.

2. 결 과

가. pancreatic lipase 저해활성 물질의 분리 및 정제

대조구에서는 triolein이 모두 2-monolein으로 분해된 반면 꿀벌의 독과 백강잠 추출물을 첨가시킨 반응구에서는 triolein의 분해가 전혀 일어나지 않았다. 또한 pancreatic lipase에 의한 lipase substrate의 분해과정에서 생성된 fatty acid를 NaOH로 titration한 결과, 역시 꿀벌의 독에 의한 lipase저해를 확인할 수 있었다. (Fig. 1)

꿀벌 독의 pancreatic lipase 저해 활성분획에 대해서 silica gel TLC 분석을 행하였을 때 행하였을 때 2-Propanol : 10% NH₄OH (2 : 1) 전개용매에서는 Rf 0.34를 나타내었고, BuOH : MeOH : H₂O = 4 : 1 : 2 system에서는 Rf 0.2를 각각 나타내었다. Fig. 2에는 이 band의 UV 스펙트럼 양상을 나타내었다. 이 저해활성 물질의 정색반응을 보면, aniline-diphenylamine, anisaldehyde, antimony trichloride dimethyl amino benzaldehyde, Dragendorff's reagent, orcinol-ferric chloride, rhodamine B, bromcresol green 그리고, fluorescence에 대해 음성반응하였으며, 단지 I₂ Vapor와 ninhydrin에 대해서만 양성으로 나타났다. 꿀벌의 독으로부터 얻어진 활성분획 BV I 과 BV-2에 대한 분리 정제하였으며 이들의 물리화학적 특성분석을 위하여 ¹H-NMR 분석을 수행하였으며 Fig. 3,4), 계속하여 ¹³C-NMR 분석, 질량분석등을 계획하고 있다.

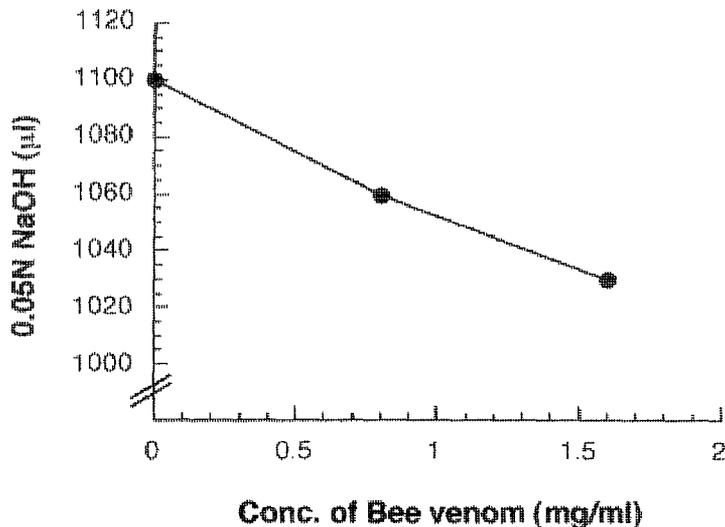


Fig. 1. The inhibitory effects of BV-1 against pancreatic lipase.

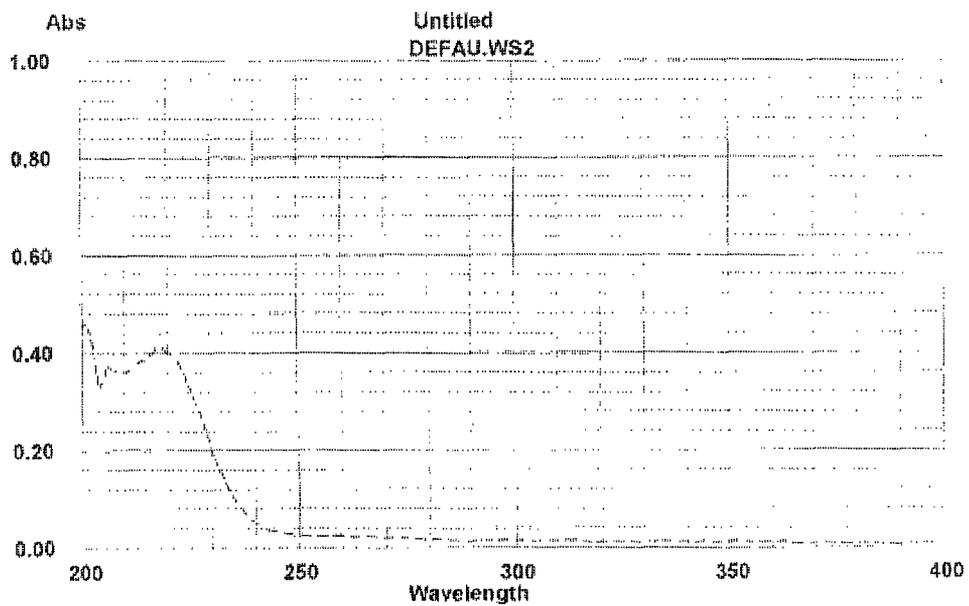


Fig. 2. UV spectrum of pancreatic lipase inhibitory active substance BV1 from the extracts of bee venom.

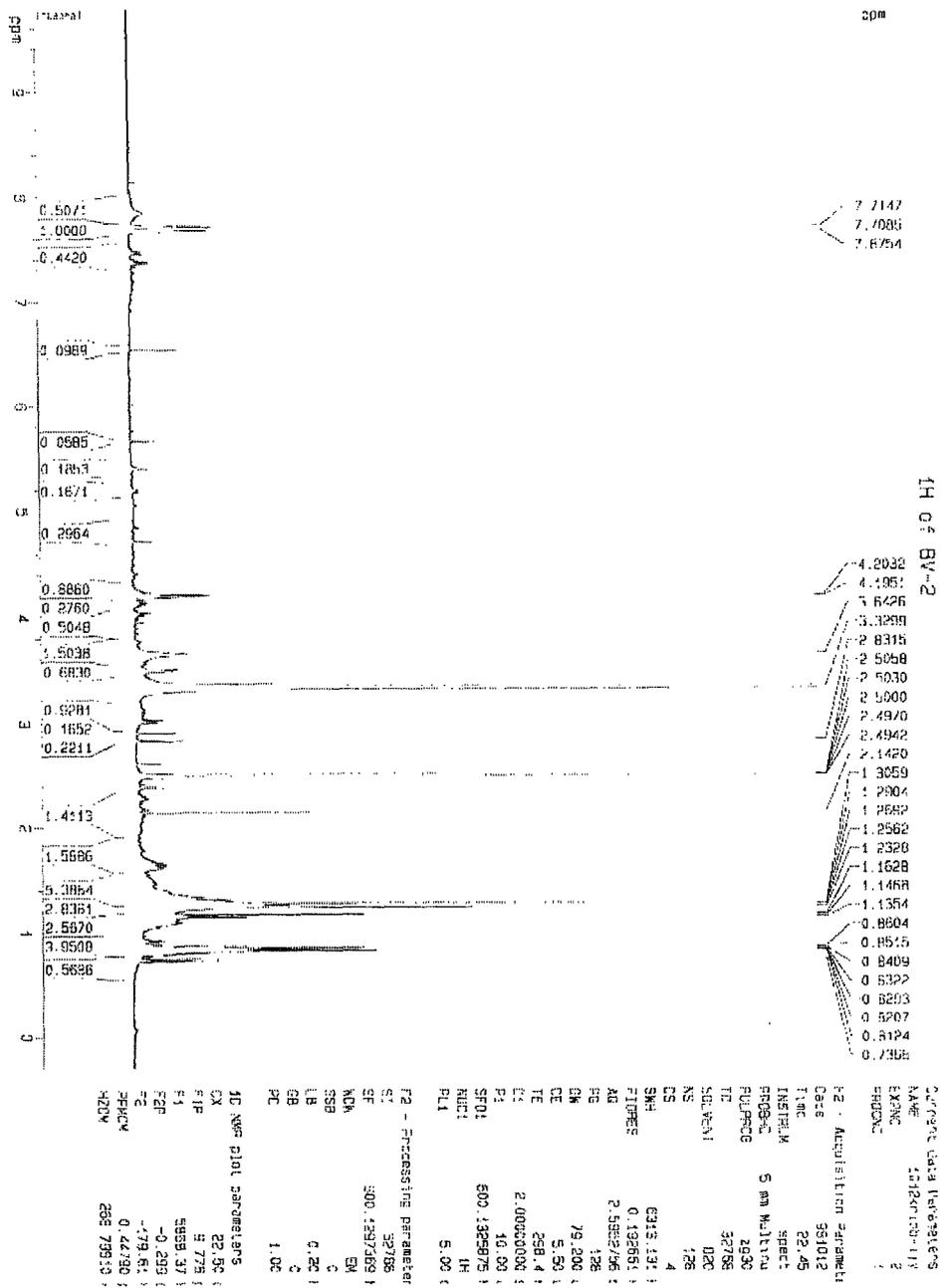


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum of BV-2, as a pancreatic lipase inhibitor

제 5 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

본 연구를 통하여 당초 계획대로 전반적인 목표달성을 하였으며, 곤충유래 유용물질의 동물실험은 본 연구기간내에 모두 끝내지 못해 약간 아쉬우나 현재 진행중이다.

특히, 본 연구의 일부 결과는 벤처기업에 기술이전하고 현재 산업화 완료, 추진중이며, 국내외 학술지에 논문발표 및 특허, 기술이전 등 대외적으로 큰 기여를 한 것으로 평가된다.

논문 발표실적

Jae Yoon Leem, Im Joo Jeong, and Ho Yong Park(1999) Isolation of *p*-hydroxycinnamaldehyde as an antibacterial substance from the saw fly, *Acantholyda parki*. *FEBS Letters* 442, 53-56.

Tae-Sook Jeong, Eun-Sook Lee, Jae-Yoon Leem, Song-Hae Bok and Ho-Yong Park(2000) Isolation of dioctyl phthalate as a cholesteryl ester transfer protein inhibitor from *Periostracum Cicadae*. (submitted)

Dong-Hun Lee, Young-Jin Kim, Yoon-Dong Park, Young-An Bae, Kyung-Sook Bae, and Ho-Yong Park (2000) *Aranicola proteolyticus* gen. nov., sp. nov., a novel proteolytic bacterium isolated from the spider, *Nephila clavata*. *Current Microbiology* (submitted)

J. Y. Leem, D. S. Park, E. Y. Seo and H. Y. Park. Isolation and functional analysis of cryptonin from the adult of *Cryptotympana dubia* Eur. J. Biochem. (in preparation)

정태숙, 안정아, 김미경, 박두상, 장영덕, 박호용 (1997) 벌독으로부터 ACAT 및 CETP 활성 저해물질의 분리 및 특성분석. 한국양봉학회지 12(2), 85-92.

특허출원

- 박호용, 배경숙, 손광희, 이문수, 이강현, 신상운. 한국산 무당거미의 장으로부터 분리된 신규미생물 및 그로부터 생성된 단백질 분해효소(대한민국 특허 제0220091호, 1999.6.18 등록, 1997.2.27 출원, 출원번호 제1997-0006150호)
- 박호용, 손광희, 신상운, 김미광, 박두상. 아라니콜라 프로테오리쿠스에서 분리한 신규 금성 단백질분해효소 및 그의 유전자 (대한민국 특허출원 제2000-5479호, 2000.2.3 출원)
- 박호용, 신상운, 박두상. 말매미로부터 분리한 신규항생활성 펩타이드 (대한민국 특허출원제 2000-5508호, 2000.2.3 출원)

기술이전

“고효율 단백질분해효소 생산기술” (2000. 5), (주)인섹트바이오텍

학회발표

- 임재윤, 박두상, 정임주, 박호용 (1999) 말매미로부터 분리한 항생활성펩타이드 "Cryptonin". 한국곤충학회, 한국응용곤충학회 추계 학술대회
- 서은영, 박두상, 임재윤, 박호용, (2000) 말매미로부터 분리한 항생펩타이드 "크립토닌"의 작용기작. 응용곤충학회 추계 학술대회
- J. Y. Leem, I. J. Jeong and H. Y. Park, (1997) Purification of an antibacterial substance from *Bombyx mori* (Silkworm). 한국곤충학회, 한국응용곤충학회 춘계 학술대회
- J. Y. Leem, Y. J. Kim, K. S. Bae and H. Y. Park, (1998) Purification and characterization of 51.5 kDa protease from *Aranicola proteolyticus* HY-3 KCTC 2390. 한국곤충학회, 한국응용곤충학회 추계 학술대회

제 6장 연구개발결과의 활용계획

본 연구결과를 통하여 관련 기초연구에 활용 및 유용곤충의 대량 사육등을 통한 농가의 소득 증대, 관련 신 산업군 창출이 가능하며 환경친화적 생물자원 이용기술 개발 효과와 관련 특허 및 결과 이용으로 국가 산업 경쟁력 강화에 활용할 계획이다.