

홍합 *Mytilus galloprovincialis*에서 클로닝한 접착단백질 Mgfp-5의 유전학적 생산연구

차형준 · 황동수

포항공과대학교 화학공학과 및 분자생명과학부

서론

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



그림 1. 홍합의 접착단백질 분비에 의한 표면 부착

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

결과 및 요약

포항 죽도시장에서 수집한 국내의 대부분을 차지하는 홍합종류인 *Mytilus galloprovincialis*의 foot 부위에서 total RNA를 추출한 후, 역전사효소반응(RT-PCR)을 통해서 접착단백질 Mgfp-1와 Mgfp-5의 유전자 서열을 클로닝 하였다. 이 중에서 Mgfp-5 유전자 서열은 아직까지 보고되지 않은 본 연구팀에서 처음으로 밝혀낸 서열이라는데 의의가 있다. 유전자 재조합기술을 이용하여 Mgfp-1과 Mgfp-5 유전자를 발현하기 위한 대장균용 재조합 발현벡터 pDJ01과 pMDG05를 구축하였다. 이 중에서 재조합 Mgfp-1의 경우 다른 기존의 연구결과들과 같이 발현은 이루어지지 않았다. 이는 Mgfp-1 거대 단백질이 10개의 아미노산이 75번 이상 반복되는 특수한 구조이고 또한 홍합과 대장균간의 유전자 코돈 사용방식이 틀리기 때문이었다. Mgfp-5는 대장균 내에서 Soluble한 상태로 발현이 되었고, 대장균이 Mgfp-5를 생산을 시작한 후에 세포 성장이 멈추는 것이 관찰되었다. 1mM의 IPTG유도 후 4.5시간에 가장 많은 단백질 생산량을 보였으며, 대략 세포 전체 단백질의 10(w/w)%가 Mgfp-5로 발현되었음을 알 수 있었다. Affinity chromatography를 이용하여 효율적인 분리정제를 수행하였다. 분리 정제된 단백질이 재조합 Mgfp-5인지 확인하기 위해서 아미노산 조성 분석을 수행하였으며, Western Blot 데이터와 더불어, 분리 정제된 단백질이 재조합 Mgfp-5인 것을 확인 할 수 있었다. 분리 정제된 홍합접착 단백질을 tyrosinase로 화학수정을 해 준 다음, 유리판 위에 놓은 후에, Bio-AFM으로 접착능력을 측정하고, coomassie 염색 방법을 이용하여 접착이 되는 것을 시각화함으로써, 접착 가능성을 측정해 보았다. 비교물질로는 Bovine serum albumin(BSA)과 홍합에서 직접 추출되어 상업적으로 팔리는

BD Cell-Tak을 사용하였다. 그 결과로서, Bio-AFM을 사용하여 접착능력을 측정한 경우, control로 사용한 BSA 보다는 4배 정도 접착능력이 증가했으며, 실제로 자연추출 홍합접착단백질인 BD Cell-Tak™ 사용의 결과에 거의 근접하는 것을 알 수 있었다.

참고문헌

- 차형준, 황동수, 2002. 홍합 접착단백질 Mgfp-5 및 이의 생산방법. 대한민국. 특허출원번호 2002-0047815.
- Waite J.H. 1983. Adhesion in byssally attached bivalves, *Biology Review*, 58: 209-231.
- Deming T.J. 1999. Mussel byssus and biomolecular materials, *Current Opinion in Chemical Biology*, 3: 100-105.