

동양달팽이(*Nesiohelix samarangae*)에서의 Serpin  
유전자 클로닝 및 Serpin 단백질의 기능 규명  
Cloning and characterization of Serpin in  
*Nesiohelix samarangae*

조용훈 · 이용석 · 정계현 · 변인선 · 한연수\* · 김선임\* · 노주영\* · 노미  
영\*

순천향대학교 · \*전남대학교

서론

동물체 내의 여러 생리대사 특히 생체 방어와 관련된 다양한 생리반응들은 단백질 분해과정을 통해 특정 단백질들이 활성화되는 방식으로 진행된다. 이러한 과정에 있어 serine proteases는 매우 중요한 역할을 담당하게 되는데, 이러한 효소들 역시 C-terminal엔 catalytic domain을 N-terminal엔 regulatory domain을 지니는 zymogen 형태의 구조를 가지고 있어 다른 효소에 의해 N-terminal domain이 잘려지면서 활성화된다. 이제까지 밝혀진 serine protease의 생체 방어 기능은 hemolymph coagulation, antimicrobial peptides의 합성 유도 및 prophenoloxidase(PPO) cascade 활성화 과정이 수반되며 일어나는 세포성 면역 반응 등을 볼 수 있다.

Serine protease는 절족동물 특히, 곤충의 면역과정에 매우 중요한 요인으로 간주할 수 있겠으나 이들은 실제 곤충 체내에서 여러 종류의 inhibitor들에 의해 활성이 조절되고 있다.

Serpins는 serine protease inhibitors로서의 기능을 하는 proteins의 superfamily를 말한다. 이들은 대개 400개 이상의 아미노산들을 지닌 단일 chain으로 구성되어 있는데, 사람의 혈장에서 발견된 serpins에 대한 연구가 가장 많이 수행되어 왔다. 사람 혈장에서의 serpins는 주로 염증, 혈액응고와 보체활성화 등에 관여하는 것으로 알려져 있다.

본 보고는 동양달팽이에서 serpin 유전자의 cloning하고, serpin proteins의 기능을 규명하고자 하는 일련의 연구과정에서 얻은 일차적 결과이다.

재료 및 방법

복족강 병안목에 속하는 동양달팽이(*Nesiohelix samarangae*)를 서해안 태안반도

부근 섬인 가의도 인가 주변에서 채집하여 상추와 당근, calcium carbonate powder를 먹이로 주어 사육하였다.

*Anopheles gambiae*와 *Drosophila melanogaster*의 high conserved protein regions으로 제작한 degenerate primer로 RT-PCR (Reverse transcription- polymerase chain reaction) 기법을 이용하여 동양달팽이의 serpin 유전자를 분리하였다. template로는 동양달팽이의 total RNA를 사용하였다. 동양달팽이의 serpin fragment DNA를 TA cloning vector에 넣어 세포배양을 한 후 plasmid DNA를 뽑아 serpin fragment DNA를 sequencing 하였다. serpin fragment DNA를 이용하여 동양달팽이의 gene specific serpin primer를 제작하였다.

## 결과 및 요약

동양달팽이를 재료로 total RNA를 분리하였다. Serpin degenerate primer로 RT-PCR기법으로 cDNA 제작하였다. 이때 degenerate serpin primer가 template에 붙는 annealing temperature를 찾기 위해 40℃, 43.6℃, 47.2℃, 50.8℃, 56.2℃, 60℃에서 gradient PCR을 돌려 적정 annealing temperature(47.2℃)를 찾았다. PCR purification을 하여 원하는 sequence를 정제한 후 TA-cloning vector에 넣은 후 세포배양을 하여 세포를 expression시킨 후 Plasmid DNA를 isolation하였고, sequencing 하였다. 확인 된 sequence를 이용하여 *Nesiohelix samarangae* gene specific serpin primer 제작하였다.

## 참고문헌

- 이인희. 절족동물의 면역기전에 기여하는 Serine Protease Inhibitor에 대한 고찰. 2003. BioWave Vol. 5 No. 7
- Kenneth R. Stark and Anthony A. James. Isolation and Characterization of the Gene Encoding a Novel Factor Xa-directed Anticoagulant from the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. 1998. J. BIOLOGICAL CHEMISTRY. 273(33): 20802-20809
- Miura, Y., Kawabata, S., and Iwanaga, S. (1994) A *Limulus* intracellular coagulation inhibitor with characteristics of the serpin superfamily. Purification, characterization, and cDNA cloning. J. Biol. Chem. 269, 542-547.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. Cell 86, 973-83.
- Ashida, M. (1990) The prophenoloxidase cascade in insect immunity. Res. Immunol. 141, 908-910.