

열대어종인 틸라피아로부터 시스테인계 단백질분해효소 저해제의 활성조사 및 분리

권준영 · 권혁추 · 김주영 · 김상훈 · 김은희 · *김기숙 · *최성희
선문대학교 해양생명과학과 · *식품과학과

서론

Cystatin은 papain을 포함한 많은 cysteine계열 단백질분해효소의 활성을 저해하는 단백질로서, 포유동물에서는 지금까지 수십여 종류가 밝혀져 있고 체계적으로 분류되어져 있다. 그러나 어류에서는 소수의 cystatin만이 연구되어져 있으며(Li *et al.*, 1998; Synnes 1998; Yamashita and Konagaya 1996), 특히 열대성 어종에 대한 cystatin 연구는 현재 까지 전무한 상태이다. 본 연구에서는 열대어종인 틸라피아로부터 cysteine proteinase저해물질인 cystatin계 단백질중 하나를 분리/동정하고 생화학적 특징을 조사하였다.

재료 및 방법

Cysteine proteinase inhibitor를 tilapia로부터 분리 정제하기 위해 papain과 α -N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide (BANA)를 이용하여, 각 틸라피아 단백질 샘플로부터 cystatin 활성을 구하였다. BANA 분해 산물을 Mersalyl-Brij 및 Fast Garnet GBC와 반응시켰으며, 흡광광도계 (520 nm)를 이용하여 흡광도를 측정 한 후 다음과 같은 식에 의해 cystatin 활성을 계산하였다.

$$\text{Inhibitory activity} = \text{OD}_0 - \text{OD}_i / \text{OD}_0 \times 0.0405 \times F$$

OD₀: A₅₂₀ for reactant solution without inhibitor;

OD_i: A₅₂₀ for reactant solution with inhibitor.

Cystatin을 분리정제하기 위해 일차적으로 affinity chromatography (CNBr-activated sepharose 4B)를 통해 cystatin 활성을 갖는 fraction을 얻어내고, 이어서 ion-exchange (Mono Q) 및 gel filtration (superose 6)을 통해 cystatin 활성을 갖는 최종 분획을 얻어냈다. Gel filtration과 SDS-PAGE 전기영동을 통해 cystatin의 분자량을 예측하였으며, 전기영동상의 밴드를 추출하여 부분적인 아미노산 서열 분석을 실시하였다. 그리고 얻어진 아미노산 서열을 protein database에 있는 자료와 비교하여 이들이 cystatin 계열의 한 단백질임을 확인하였다.

결과 및 요약

틸라피아의 혈액, 간, 근육, 심장, 신장, 난의 조단백질(crude proteins)로부터 cystatin activity를 조사한 결과, 혈액에서 다른 조직에 비해 훨씬 높은(4-25배) 활성이 나타났다. 본 연구에서는 활성이 높은 혈액과 활성은 낮지만 개발 가능성이 있다고 판단되는 난을 대상으로 cystatin을 정제하기 위한 chromatography를 진행하였다. 분리 정제를 진행해 나가면서 난의 경우 cystatin 활성이 혈액에서 보다 훨씬 쉽게 사라진다는 사실을 발견하였으며, 그 이유를 구명하기 위해 난 및 혈액에 존재하는 cystatin 활성의 열 및 pH에 대한 안정성을 조사하였다. 그 결과 연구과정에서 관찰된 것처럼 난의 cystatin 활성은 혈액의 cystatin 활성에 비하여 안정성이 낮은 것으로 밝혀졌다. 난에서의 cystatin 활성은 대조구에 비해 35℃에서 80.2±6.3%로, 50℃에서는 5.9±1.8%로 감소한 반면, 혈액에서는 35℃에서 100% 활성을 유지하였고 50℃에서도 97.6±2.0%를 나타냈다. 난의 cystatin은 또한 낮은 pH (pH4)에서 불안정하여 혈액과 대조를 이루었다. 이상의 결과는 난에 존재하는 cystatin과 혈액에 존재하는 cystatin이 공통된 기능을 갖기는 하지만 다른 단백질일 것이라는 점을 시사한다. 본 연구에서는 안정성이 높은 혈액내 cystatin을 분리정제하였다.

신선한 틸라피아의 혈청을 뽑아내어, 준비된 papain-coupled CNBr-activated sepharose 4B column을 이용하여 단백질을 분리하였다. Unbound protein과 non-specifically bound protein을 제거한 후, 20 mM tri-sodium phosphate buffer (pH 10.5)를 이용하여 ligand와 특이적으로 결합한 단백질 분획들을 elution 시켰다. 여기서 얻어진 분획들의 cystatin 활성을 측정하여 높은 활성을 나타내는 분획들을 gel filtration 및 ion-exchange column에 통과시켜 분자량을 파악하였으며, single protein 분획을 얻어내었다. Standard protein과 sample protein을 각각 gel filtration한 결과 틸라피아 혈청내에 cystatin 활성을 나타내는 단백질의 분자량은 45-66 kDa의 범위에 속하는 것으로 나타났다. Ion exchange column (mono Q)으로 cystatin 활성을 갖는 단백질 분획을 분리한 결과, NaCl 농도 0.2M과 0.3M에서 해리된 두 분획에서 가장 높은 cystatin 활성이 관찰되었다. 이들을 SDS-PAGE 전기영동하자 각각 분자량 약 60kDa의 single band 및 분자량 약 54kDa와 100kDa의 두 band가 얻어졌다. 이들중 gel filtration 결과에서 예측된 분자량 범위에 해당되는 60Kda와 54Kda band를 잘라내어 아미노산 서열분석을 하였다. 분석 결과 두 protein band 모두 cystatin superfamily에 속하는 kininogen인 것으로 밝혀졌다.

참고문헌

- Li, F., An, H., Seymour, T.A., Bradford, C.S., Morrissey, M.T., Bailey, G.S., Helmrich, A., Barnes, D.W., 1998. Molecular cloning, sequence analysis and expression distribution of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cystatin C. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 121, 135-143.
- Synnes, M., 1998. Purification and characterization of two cysteine proteinase inhibitors from the skin of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 121, 257-264.
- Yamashita, M., Konagaya, S., 1996. A novel cysteine protease inhibitor of the egg of chum salmon, containing a cysteine-rich thyroglobulin-motif. *J. Biol. Chem.* 271, 1282-1284.