

한국 독사독으로부터의 혈전 용해제 개발에 관한 연구 II. 살모사(*A. blomhoffi brevicaudus*) 사독 Protease의 특성과 혈전 용해능에 관한 연구

김병재 · 이문한* · 임종섭¹ · 이 항 · 이혜숙 · 김종호 · 채창수
서울대학교 수의과대학, ¹존스홉킨스 의과대학

Studies on the Development of a Thrombolytic Agent from Korean Snake Venom II. Characterization and Thrombolytic Activity of a Protease from the Venom of *A. blomhoffi brevicaudus*

Byoung-Jae KIM, Mun-Han LEE*, Jong-Seop RIM¹, Hang LEE, Hye-Suk LEE, Jong-Ho KIM, Chang-Su CHAI

College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea
¹Department of Physiology, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, USA

(Received June 7, 1995; accepted June 20, 1995)

Abstract—The biochemical properties of the fibrinolytic protease of 50,800 Da isolated from the venom of *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus* were characterized. The enzyme hydrolyzed the carboxyl side of arginine in the synthetic chromogenic peptides, N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA and N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA, and the enzyme activity was inhibited by phenylmethylsulfonylfluoride indicating that the enzyme belongs to the serine protease family. The protease showed maximum activity at pH 7.5 and inhibited by ZnCl₂, CuSO₄, but not by soybean trypsin inhibitor, pepstatin A, 2-mercaptoethanol and EDTA. The Km value determined with N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA was 0.2 mM. The thrombolytic activity of the purified enzyme was evaluated by platelet aggregation test in rabbits. While the platelet count ratio in blood of the rabbits injected with thrombin alone declined from 1.0 to 0.6 within 7 min and maintained around 0.6 for 24 hours thereafter, the ratio rapidly recovered from around 0.6 to 0.8 in 1 hr, to 1.0 in 24 hrs when the rabbits were sequentially treated with thrombin and the purified enzyme. The result showed that the serine protease from *A. blomhoffi brevicaudus* of 50,800 Da had a thrombolytic activity *in vivo* and the enzyme might be developed as a therapeutic agent for the treatment of thrombic disease.

Keywords □ Korean snake venom, *A. blomhoffi brevicaudus*, serine protease, fibrinolysis, thrombolysis

Viperidae와 Crotalidae 그리고 Elapidae과에 속하는 독사들의 독에는 혈전용해와 관련된 효소 단백질들이 존재하고 있으며 이들 중 많은 단백질들이 fibrinogen과 fibrin을 분해하는 효소활성을 가지고 있다(Markland, Jr., 1991). 이러한 효소들은 임상에서 혈전에 의한 심맥관계 질병의 치료에 응용될 수 있는 커다란 잠재성을 지니고

있기 때문에 세계적으로 광범위한 연구의 대상이 되고 있다(Markland, Jr., 1991).

지금까지 독사독에 의한 혈전 용해에 관한 연구에 사용된 독사들 중 Crotalidae과에 속하는 독사들은 *Agkistrodon acutus*(Chao와 Huang, 1977), *Agkistrodon rhodostoma*(Chao 등, 1983), *Agkistrodon contortrix contortrix*(Retzios와 Markland, 1988; Guan 등, 1991), *Agkistrodon contortrix laticinctus*(Toom 등, 1970), *Agkistro-*

* To whom correspondence should be addressed.

don contortrix mokasen(Moran과 Geren, 1981), *Crotalus atrox*(Bajwa 등, 1980; Nikai 등, 1984; Pandya와 Budzynski, 1984; Komori 등, 1985; Willis와 Anthony, 1988; Chiou 등, 1992), *Crotalus basiliscus basiliscus* (Retzois와 Markland, 1992), *Crotalus adamanteus*(Markland와 Damus, 1971), *Crotalus molossus molossus*(Rael 등, 1992), *Lachesis muta*(Diniz와 Oliveira, 1992)와 *Trimeresurus mucrosquamatus*(Chaoho 등, 1977; Nikai 등, 1985) 등이다. 그리고 Viperidae에 속하는 독사들로는 *Bitis gabonica*(Bajwa 등, 1982)와 *Cerastes cerastes*(Daoud와 Anthony, 1986) 등이 있고, Elapidae과에 속하는 독사들로는 *Naja nigricollis*(Evans, 1984) 등이 있다. 이 연구들은 대부분 단백질분해효소의 정제로부터 시작하여 혈전 용해제로서의 가능성을 조사하는 것까지를 다루고 있다.

본 연구실에서는 Crotalidae과에 속하는 한국산 독사인 *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*의 독으로부터 약 50,800의 분자량을 가지고 fibrin과 fibrinogen 분해능이 있는 새로운 단백질분해효소를 정제하여 보고하였다(김 등, 1995). 본 연구에서는 이 단백질분해효소의 생화학적 특성을 조사하였고, 정제된 효소가 토끼에서 응집된 혈소판을 분해하는 능력이 있는지를 조사하였다.

실험방법

실험동물

혈전용해 능력을 알아보기 위한 혈소판 응집억제 실험에는 3개월령의 토끼(New Zealand White, 삼육실험동물육종연구소)를 자유 급식시키면서 실험에 사용하였다.

시약

본 실험에 사용된 synthetic chromogenic substrates, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), soybean trypsin inhibitor, pepstatin A는 Sigma사에서 구입하여 사용하였으며 기타 시약은 특급 이상을 사용하였다.

사독의 정제

경기도 용문산에서 구입한 *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*(살모사, 평지 살모사)로부터 사독을 채취하여 김 등(1995)의 방법에 의하여 *p*-aminobenzamidinium affinity chromatography와 DEAE ion-exchange chromatography를 이용하여 50,800 Da의 단백질분해효소를 정제하였으며, 정제된 단백질은 SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 의하여 그 균질성을 확인하였다.

정제효소의 기질 특이성 조사

정제효소의 기질 특이성을 조사하기 위하여 9가지의 synthetic chromogenic peptide substrates를 사용하여 효소활성을 측정하였다. 20 mM phosphate buffer (pH 8.0) 800 μ l를 Eppendorf tube에 넣고 다음과 같이 준비된 synthetic chromogenic peptide를 3 mM이 되게 20 mM

Table I. Chromogenic substrates and their solvents

Chromogenic substrate	Solvent	Stock conc.
N-succinyl-Ala-Ala-Ala- <i>p</i> NA*	DMF**	20 mM
N-Benzoyl-Phe-Val-Arg- <i>p</i> NA	Methanol	10 mM
N-Benzoyl-DL-Arg- <i>p</i> NA	DMF	30 mM
<i>p</i> Glu-Gly-Arg- <i>p</i> NA	Phosphate buffer	10 mM
N-Benzoyl-L-Tyr- <i>p</i> NA	Acetone	30 mM
<i>p</i> Glu-Phe-Leu- <i>p</i> NA	DMF	20 mM
N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val- <i>p</i> NA	Ethanol	20 mM
N- <i>p</i> -Tosyl-Gly-Pro-Arg- <i>p</i> NA	Methanol	20 mM
N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg- <i>p</i> NA	Methanol	10 mM

**p*NA, para-nitroanilide; **DMF, N,N-dimethylformamide.

phosphate buffer로 희석하여 각각의 tube에 100 μ l씩 넣고 잘 섞어 37°C에 유지시킨 후 정제 효소(15 μ g/ml) 100 μ l를 넣고 반응시켜 405 nm에서의 1분간의 흡광도 변화를 측정하였다.

정제효소의 최적 pH 측정

정제효소의 최적 pH를 측정하기 위하여 pH 4.0에서 9.5까지의 완충액을 다음과 같이 만들었다. pH 4.0에서 6.0까지는 50 mM citrate buffer를, pH 6.0에서 8.0까지는 20 mM phosphate buffer를, 그리고 pH 8.0에서 9.5까지는 50 mM Tris-HCl buffer를 pH 차이가 0.5가 되게 만들어 각각의 완충액 880 μ l에 10 mM N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*NA 20 μ l를 넣고 정제효소(13 μ g/ml) 100 μ l를 더하여 섞어서 37°C에서 30분간 incubation하였다. Incubation 후 50% acetic acid 100 μ l를 더하여서 반응을 정지시키고 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

무기이온과 단백질분해효소 활성억제 물질이 정제효소활성에 미치는 영향

무기이온과 단백질분해효소 억제제들이 효소 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 최종 농도 2.0 mM씩의 MgSO₄, CaCl₂, KCl, NaCl, CuSO₄, ZnCl₂ 및 EDTA와 최종농도 0.3 mM 씩의 pepstatin A, 2-mercaptoethanol 및 3.0 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)와 0.7 M soybean trypsin inhibitor (STI)를 사용하여 효소활성을 측정하였다. 20 mM phosphate buffer(pH 7.5) 825 μ l에 최종농도 보다 10x 농축된 각 이온들과 억제제 용액 100 μ l씩을 가하고 정제효소(10 μ g/ml) 50 μ l씩을 섞어 37°C에서 10분간 incubation하였다. Incubation 후에 chromogenic substrate인 2 mM N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*NA 25 μ l를 넣어 37°C에서 20분간 다시 incubation한 다음 50% acetic acid 150 μ l로 반응을 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

정제효소의 Kinetics

정제효소의 Km값과 Vmax를 측정하기 위하여 chromogenic substrate인 N-*p*-Tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*NA를 최종농도 0.1, 0.125, 0.2, 0.3, 0.5, 그리고 1.0 mM로 하여

초기반응속도를 측정하고 Lineweaver-Burk plot으로 도 시하였다.

토끼에서 정제효소의 응집 혈소판 분해능 측정

혈전의 한 요소인 응집 혈소판에 대한 정제효소의 분해능을 토끼에서 측정하기 위한 실험을 Wu와 Hoak의 방법(1974)에 의하여 3반복 실시하였다. 두마리의 토끼에는 thrombin을, 한마리의 토끼에는 saline을 5 ml/min의 속도로 ear vein에 주입하였다. 주입시 thrombin의 농도는 0.1 unit/ml이었고, 총용량은 토끼의 체중 kg당 1 unit이 되게 하였다. 주입전 그리고 주입후 7분과 12분에 3.8% sodium citrate가 0.2 ml 들어있는 주사기를 사용하여 각각의 토끼의 경정맥으로부터 혈액을 채취하여 2 ml이 되게 하였다. 이어서 thrombin을 주입한 두마리 토끼 중 한마리에 정제효소를 4 ml/min의 속도로 ear vein에 주입하였다. 주입시 효소의 농도는 2 µg/ml이었고, 총용량은 혈액 ml당 200 ng이 되게 하였다. 효소 주입후 1시간, 6시간, 12시간과 24시간 후에 각각의 토끼로부터 전과 동일하게 혈액을 채취하였다. 채취한 각각의 혈액을 바로 EDTA/formalin buffer(pH 7.4) 2 ml이 들어있는 polystyrene tube와 EDTA buffer(pH 7.4) 2 ml이 들어있는 tube에 각각 0.5 ml씩 넣어 섞은 후 실온에서 15분간 정치시켰다. 정치후 platelet rich plasma (PRP)를 얻기 위해 150×g에서 8분간 원심분리한 후, PRP 0.5 ml을 1% ammonium oxalate와 5분간 섞어 혈구 계산판을 이용하여 혈소판 수를 세고, 이를 이용하여 platelet count ratio를 계산하였다.

EDTA/formalin buffer(pH 7.4)는 Wu와 Hoak의 방법(1974)에 의해 0.077 M EDTA 3 ml, 4% formalin 5 ml, 10×PBS solution 2 ml에 증류수 10 ml의 비율로 섞어 만들었으며, EDTA buffer(pH 7.4)는 0.077 M EDTA 3 ml, 10×PBS solution 2 ml에 증류수 15 ml의 비율로 섞어 만들어 사용하였다. 이는 응집된 혈소판이 EDTA에 의해 분리되는 반면 EDTA/formalin에 의해서는 분리되지 않는다는 사실을 이용한 것이다. Platelet count ra-

tio를 구하는 식은 다음과 같다.

$$2\text{Platelet count ratio} = \frac{\text{Platelet-count in EDTA/formalin PRP}}{\text{Platelet-count in EDTA PRP}}$$

실험결과

정제효소의 특성 조사

9가지의 synthetic chromogenic peptide substrate를 사용하여 정제 효소의 기질 특이성을 조사한 결과 N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA와 N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA가 정제효소에 대해 가장 특이적으로 반응하였다(Table I). 따라서 이후의 실험에서는 이 두 chromogenic peptide를 기질로 사용하였다. 정제효소의 최적 pH를 N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA를 기질로 사용하여 살펴본 결과 pH

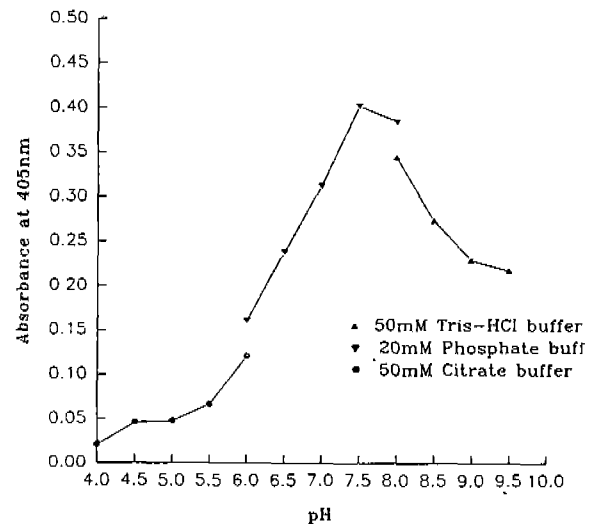


Fig. 1. Effect of pH on enzyme activity of the fibrinolytic protease purified from *A. bromhoffi brevicaudus*. The purified 50,800 Da enzyme (1.3 µg/ml) was incubated with synthetic substrate N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA (0.2 mM) in the buffers of different pH as described in Materials and Methods. *p*-Nitroaniline released by the amidolytic enzyme activity was measured by the absorbance change at 405 nm.

Table II. Hydrolysis of synthetic chromogenic substrates by the fibrinolytic protease from *A. bromhoffi brevicaudus*

Synthetic substrates (0.3 mM)*	Activity ($\Delta A_{405}/\text{min}$)
N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-pNA	0
N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA	0.041
N-Benzoyl-DL-Arg-pNA	0.001
pGLU-Gly-Arg-pNA	0.001
N-Benzoyl-L-Tyr-pNA	0
pGLU-Phe-Leu-pNA	0
N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-pNA	0.001
N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA	0.038
N-Benzoyl-Pro-Phe-Arg-pNA	0.005

*Each synthetic substrate was incubated in 20 mM phosphate buffer(pH 8.0) with the purified enzyme(1.5 µg/ml). The initial rate of absorbance change was measured at 405 nm.

Table III. Effects of inorganic ions on the purified enzyme activity

Ion (2 mM)	Enzyme activity (% of control)
Control	100
MgSO ₄	100
CaCl ₂	91.3
KCl	94.4
NaCl	94.4
ZnCl ₂	73.6
CuSO ₄	45.4
EDTA	94.4

Table IV. Effects of protease inhibitors on the purified enzyme activity

Inhibitor (final concentration)	Enzyme activity (% of control)
Control	100
Pepstatin A (0.3 mM)	100
2-Mercaptoethanol (0.3 mM)	99.1
Phenylmethylsulfonylfluoride (1.0 mM)	93.7
(3.0 mM)	20.6
Soybean trypsin inhibitor (0.7 μM)	94.8

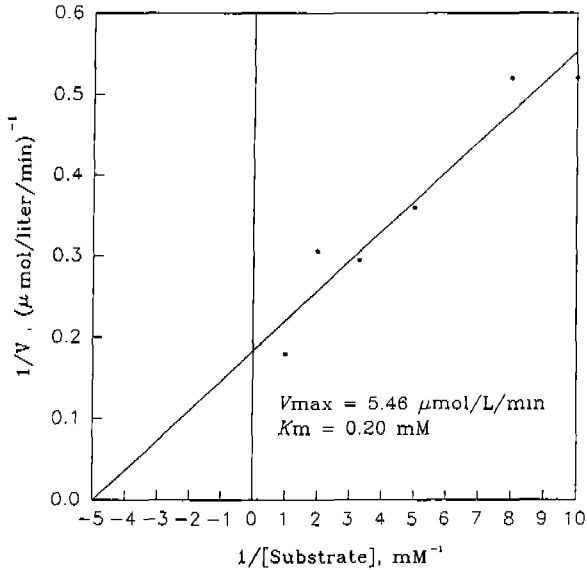


Fig. 2. Lineweaver-Burk plot of the kinetics of fibrinolytic enzyme from *A. bromhoffi brevicaudus*. The purified enzyme (1.0 μg/ml) was incubated with various concentrations of the chromogenic substrate, N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA, in 20 mM phosphate buffer, pH 7.5 at 37°C. The initial velocity of releasing p-nitroaniline was measured by the absorbance change at 405 nm.

7.5에서 최고의 활성을 나타내어(Fig. 1) 역시 이후의 실험은 pH 7.5 조건에서 실시 하였다. 정제효소는 ZnCl₂에 의해 25% 이상, CuSO₄에 의해 50% 이상 활성이 억제되었으나 MgSO₄, CaCl₂, KCl, NaCl, EDTA 등은 효소활성에 거의 영향을 주지 못하였다(Table III). 또한 정제된 효소는 serine protease inhibitor인 PMSF 3.0 mM 농도에서 80%정도 활성이 억제되었으나 1.0 mM에서는 거의 억제가 되지 않았고 soybean trypsin inhibitor, pepstatin A, 2-mercaptoethanol에 의하여도 거의 억제 되지 않았다(Table IV). N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA를 기질로 사용하여 측정된 Km값은 0.20 mM이었고 Vmax는 5.46 mol/L/min이었다(Fig. 2).

정제효소의 혈소판 분해능 시험

혈전의 한 요소인 혈소판의 응집에 대한 정제효소의 분해능 시험을 토끼를 이용하여 *in vivo*에서 실시하였다.

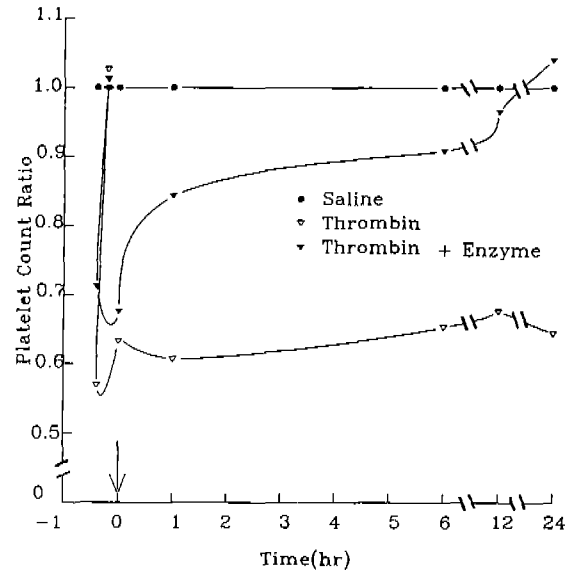


Fig. 3. Thrombolytic activity of the purified protease from *A. bromhoffi brevicaudus*. New Zealand White rabbits were injected with saline, thrombin, or thrombin plus the fibrinolytic enzyme, and the platelet count ratio was determined at designated times for each animal as described in Materials and Methods. Each symbol represents mean value of triple experiments. The arrow points the injection time of the purified enzyme.

Saline만을 주입한 토끼의 platelet count ratio를 1.0으로 보정하였을 때 thrombin만을 주입한 토끼의 platelet count ratio는 thrombin을 주입 전 1.0에서 주입 7분 후 0.6까지 떨어져 24시간 후에도 그 수준을 유지하였다. 반면에 thrombin을 주입한 12분 후 정제효소를 주입한 토끼에서는 효소 주입 직전에 platelet count ratio가 0.7 이하였으나 정제효소를 주입한 후 1시간 안에 0.8까지 회복하였고, 6시간 후에는 0.9까지 그리고 24시간 후에는 1.0까지 회복되었다(Fig. 3).

고 찰

한국산 독사의 일종인 *A. blomhoffi brevicaudus*(평지 살모사)로부터 fibrinogen과 fibrin을 분해할 수 있는 새로운 성질의 단백분해효소를 분리하여 그 특성을 조사 하였다. 정제효소의 기질 특이성을 조사하고 이를 이용하여 효소를 분류하기 위해 재료 및 방법에 제시한 9가지 기질을 사용하여 효소활성을 측정하였던 바, 특이성을 나타내는 기질은 trypsin substrate로 사용되는 N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-pNA와 plasmin-like activity를 갖는 단백분해효소들에 대한 기질(Rael 등, 1992)로 사용되는 N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-pNA이었다. 이것은 분리된 효소가 arginine의 carboxyl side를 분해시킨다는 것을 나타내는데, 이와 같은 arginine esterase 활성은 serine proteases의 특징이다(Guan 등, 1991). 정제효소는

PMSF에 의하여 억제되었는데 이러한 결과는 이 50,800 Da의 이 효소가 serine protease에 특이한 가역적 억제제인 *p*-aminobenzamidine affinity column에 의하여 분리되었고 arginine esterase 활성을 가진다는 사실과 함께 새로 분리된 단백분해 효소가 serine protease에 속하는 효소임을 강력히 시사한다.

Markland, Jr(1991)의 분류에 의하면 α -chain fibrin (ogen)에 특이한 fibrinogen 분해효소는 주로 23,000~33,500의 분자량을 가지는 metalloproteinase이며 β -chain을 특이적으로 분해하는 효소는 주로 약 31,000의 분자량을 가지는 serine protease 종류이다. 본 실험실에서 분리한 분자량 50,800의 효소는 α -chain과 β -chain을 모두 분해하나 주로 β -chain을 더 선택적으로 분해하였다. 그러므로 이 효소는 지금까지 외국의 사독에서는 보고되지 않은 종류의 fibrin(ogen) 분해효소로 생각이 된다. 그러나 Chung과 Kim(1993)은 *A. halys*의 독에서 분자량 51,000의 fibrin 분해효소를 분리하여 보고하였으며 이 효소는 여러가지 면에서 본 실험에서 보고된 효소와 유사한 성질을 보이고 있다. 즉 그 분자량이 51,000으로써 본 실험의 효소와 거의 일치하며 같은 serine protease에 속하여 비슷한 기질 특이성을 보였다. 두 효소가 모두 N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*NA와 N-*p*-Tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*NA에 대하여 높은 활성을 보였으며 MgSO₄, CaCl₂, KCl, NaCl 등의 이온이나 EDTA에 의하여 효소활성이 영향을 받지 않았으며, pepstatin A, soybean trypsin inhibitor와 같은 protease inhibitor에 의하여도 저해를 받지 않았다. 이것은 두 효소가 모두 trypsin과는 다른 구조의 active site을 가지고 있음을 시사한다. 그러나 두 효소의 성질에는 중요한 차이점도 존재하는데, 첫째 두 효소가 모두 fibrinogen A α -chain과 B β -chain에 작용하나 본 실험의 효소는 주로 B β -chain을 먼저 분해한 반면 Chung과 Kim(1993a, b)의 효소는 A α -chain을 먼저 분해하였다. 또한 Chung과 Kim이 보고한 효소는 2 mM ZnCl₂에 의하여 85% 억제되었으며 30 μ M 2-mercaptoethanol에 의하여는 100% 억제되었으나 본 실험의 효소는 동일농도의 ZnCl₂에 의하여는 26.5%만이 억제되었고 0.3 mM 2-mercaptoethanol에 의하여도 거의 영향을 받지 않았다. Chung과 Kim의 효소는 30 mM의 PMSF에 의하여 완전히 억제되었으나 본 실험의 효소는 1.0 mM에서는 억제되지 않았고 3.0 mM에서는 약 80% 억제되어 PMSF에 대한 감수성에도 차이가 있음을 보여주었다. 이러한 차이점들은 두 효소가 연관성이 있지만 서로 다른 구조를 가지고 있는 효소임을 시사한다. Km값은 두 효소가 모두 비슷한 범위에 들어 있었으나(0.2 mM와 0.36 mM) 비슷한 효소농도에서 Vmax값은 본 실험의 효소가 10배 이상 낮았다.

정제효소가 생체내에서도 혈전을 분해시킬 수 있는지를 알아보기 위해 토끼에서의 혈소판 분해 실험을 실

시하였다. 혈소판은 혈전을 형성하는 주요인자이며 counter counter나 혈구 계산판에 의해 비교적 정확하게 수를 측정할 수 있다. 또한 Wu와 Hoak(1974)의 보고에 따르면 응집된 혈소판은 EDTA만 들어있는 buffer에서는 쉽게 분해되어지지만, EDTA와 formalin이 모두 들어있는 buffer에서는 응집된 채로 고정되어 분해되지 않기 때문에 150 \times g에서 8분간 원심분리에 의해 분해된 혈소판과 응집되어있는 혈소판을 분리할 수 있다. 따라서 이 방법에 의해 thrombin을 주입하여 혈소판을 응집시킨 토끼에서 채취한 혈액과 여기에 다시 정제효소를 주입하여 응집되지 않은 유리 혈소판 수를 측정하여 platelet count ratio를 계산하고 정제효소를 주사한 것과 비교 하였다. Thrombin만을 주입한 토끼에서의 ratio가 0.6까지 떨어져 24시간 지속되는 반면, 정제된 효소를 주입한 토끼에서의 ratio는 24시간 후에 정상 수준인 1.0까지 회복되어 정제된 효소가 응집된 혈소판을 완전히 분해시킬 수 있음을 알 수 있었고, 특히 1시간 안에 0.8까지, 6시간 안에 0.9까지 회복됨을 보여 혈전 형성으로 인해 발생할 수 있는 급성 질환에의 적용 가능성을 보여 주었다. 이렇게 뚜렷한 혈소판 분해능으로 보아 비록 실험은 시행하지 않았지만 분리된 효소가 fibrinogen을 fibrin으로 변환시켜 혈전을 형성하는 작용은 없을 것으로 생각된다. 그러므로 날로 늘어가고 있는 심맥관계의 혈전으로 인한 질병에 대처할 다양한 도구를 찾기 위하여 이 50,800 Da의 단백분해효소의 더 자세한 특성과 임상에서의 적용 가능성에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

한국산 독사인 *Agkistrodon blomhoffi brevicaudus*로부터 분리된 50,800 Da의 fibrin 분해능을 가진 단백분해효소의 생화학적 특성을 조사하였던 바, N-Benzoyl-Phe-Val-Arg-*p*NA와 N-*p*-Tosyl-Gly-Pro-Arg-*p*NA에 대하여 높은 기질특이성을 나타내었으며 PMSF에 의하여는 억제되었으나 EDTA에 의하여는 억제되지 않아 정제효소가 serine protease에 속하는 효소임을 시사 하였다. 이 정제효소의 생체 내에서의 혈전분해능을 보기위하여 토끼에서 응집혈소판 분해능 시험을 실시하였다. Thrombin만을 주입한 토끼에서는 platelet count ratio가 1.0에서 0.6으로 급속히 떨어져 24시간 지속되었으나, thrombin과 정제효소를 연속하여 주사하였을 때는 platelet count ratio가 0.6에서 1시간 안에 0.8로, 6시간 안에는 0.9로, 그리고 24시간 후에는 1.0으로 회복되었다. 그러므로 정제된 50,800 Da의 효소가 *in vivo*에서 응집된 혈소판을 분해할 수 있음을 보여 주었고, 따라서 임상에서 혈전으로 인한 질병의 치료제로의 개발 가능성을 제시하였다.

감사의 말씀

본 연구를 수행하는데 소요된 경비의 일부는 1993년도 학술진흥재단(자유공모과제)의 연구비 지원에 의하여 수행하였기에 감사드립니다.

참고문헌

- Bajwa, S. S., Markland, F. S. and Russell, F. E. (1980). Fibrinolytic enzyme(s) in western diamondback rattlesnake(*Crotalus atrox*) venom. *Toxicol.* **18**, 285-290.
- Bajwa, S. S., Kirakossian, H., Reddy, K. N. N. and Markland, F. S. (1982). Thrombin-like and fibrinolytic enzymes in the venoms from the gaboon viper(*Bitis gabonica*), eastern cottonmouth moccasin (*Agkistrodon p. piscivorus*), and southern copperhead(*Agkistrodon c. contortrix*) snake. *Toxicol.* **20**, 427-432.
- Chaoho, O. and Huang, T. F. (1977). The properties of the purified fibrinolytic principle from *Agkistrodon acutus* snake venom. *Toxicol.* **15**, 161-167.
- Chaoho, O., Teng, C. M. and Chen, Y. C. (1977). Physicochemical properties of α - and β -fibrinogenases of *Trimeresurus mucroquamatus* venom. *Biochim. et Biophys. Acta.* **481**, 622-630.
- Chaoho, O., Hwang, L. J. and Huang, T. F. (1983). α -Fibrinogenase from *Agkistrodon rhodostoma*(malayan pit viper) snake venom. *Toxicol.* **21**, 25-33.
- Chiou, S. H., Hung, C. C. and Huang, K. F. (1992). Characterization of a protease with α - and β -fibrinogenase activity from the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **187**, 389-396.
- Chung, K. H. and Kim, D. S. (1993a). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from Korean snake(*Agkistrodon halys*) venom. *Korean Biochem. J.* **26**, 363-369.
- Chung, K. H. and Kim, D. S. (1993b). Biochemical and biological properties of a fibrinolytic enzyme from Korean snake(*Agkistrodon halys*) venom. *Korean Biochem. J.* **26**, 370-377.
- Daoud, E. and Anthony, T. T. (1986). Isolation and characterization of an anticoagulant proteinase, cerastase F-4, from *Cerastes cerastes* (egyptian sand viper) venom. *Thrombosis Reserch* **42**, 55-62.
- Diniz, M. R. and Oliveira, E. B. (1992). Purification and properties of a kininogenin from the venom of *Lachesis muta* (buchmaster). *Toxicol.* **30**, 247-258.
- Evans, H. J. (1984). Purification and properties of a fibrinogenase from the venom of *Naja nigricollis*. *Biochim. et Biophys. Acta.* **802**, 49-54.
- Guan, A. L., Retzoi, A. D., Henderson, G. N. and Markland, F. S. (1991). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). *Arch. Biochem. Biophys.* **289**, 197-207.
- Komori, Y., Hagihara, S. and Anthony, T. T. (1985). Specificity of hemorrhagic proteinase from *Crotalus atrox*(western diamondback rattlesnake) venom. *Biochim. et Biophys. Acta.* **829**, 127-130.
- Lee, M. H., Kim, B. J., Rim, J. S., Lee, H., Lee, H. S., Kim, J. H. and Choi, C. S. (1995). Studies on the development of a thrombolytic agent from Korean snake venom. I. Purification of a protease from the venom of *A. bromhoffi brevicadus*. *J. Appl. Pharmacol.* (in press).
- Markland, Jr., F. S. (1991). Inventory of α - and β -fibrinogenases from snake venoms. *Thrombosis and Haemostasis* **65**, 438-443.
- Markland, Jr., F. S. and Damus, P. S. (1971). Purification and properties of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus adamanteus* (eastern diamondback rattlesnake). *J. Biol. Chem.* **246**, 6460-6473.
- Moran, J. B. and Geren, C. R. (1981). Characterization of a fibrinogenase from northern copperhead(*Agkistrodon contortrix mokasen*) venom. *Biochim. et Biophys. Acta.* **659**, 161-168.
- Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Sugihara, H. and Anthony T. T. (1984). Isolation and biochemical characterization of hemorrhagic toxin f from the venom of *Crotalus atrox*(western diamondback rattlesnake). *Arch. Biochim. Biophys.* **231**, 309-319.
- Nikai, T., Mori, N., Kishida, M., Kato, Y., Takenaka, C., Murakami, T., Shigezane, S. and Sugihara, H. (1985). Isolation and characterization of hemorrhagic factor a and b from the venom of the Chinese habu snake(*Trimeresurus mucroquamatus*). *Biochim. et Biophys. Acta.* **838**, 122-131.
- Pandya, B. V. and Budzynski, A. Z. (1984). Anticoagulant proteases from western diamondback rattlesnake(*Crotalus atrox*) venom. *Biochemistry* **23**, 460-470.
- Rael, E. D., Martinez, M. and Molina, O. (1992). Isolation of a fibrinolytic protease, M4, from venom of *Crotalus molossus molossus*(northern blacktail rattlesnake). *Haemostasis* **22**, 41-49.
- Retzoi, A. D. and Markland, F. S., Jr. (1988). A direct-acting fibrinolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon contortrix contortrix*: effects on various components of the human blood coagulation and fibrinolysis systems. *Thrombosis Research* **52**, 541-552.
- Retzoi, A. D. and Markland, F. S. (1992). Purification, characterization, and fibrinogen cleavage sites of three fibrinolytic enzymes from the venom of *Crotalus basiliscus basiliscus*. *Biochemistry* **31**, 4547-4557.
- Toom, P. M., Solie, T. N. and Anthony, T. T. (1970). Characterization of a nonproteolytic arginine ester-hydrolyzing enzyme from snake venom. *J. Biol. Chem.* **245**, 2549-2555.
- Willis, T. W. and Anthony, T. T. (1988). Purification and biochemical characterization of atroxase, a nonhemorrhagic fibrinolytic protease from western diamondback rattlesnake venom. *Biochemistry* **27**, 4769-4777.
- Wu, K. K. and Hoak, J. C. (1974). A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency. *The Lancet* **11**, 924-926.