

실크 피브로인 유래 펩타이드에 의한 RAW 264.7 Macrophage의 Nitric Oxide 생성 촉진

박금주 · 현창기^{1,*}

한동대학교 대학원 생명공학과, ¹생물식품공학부

Stimulation of Nitric Oxide Production in RAW 264.7 Macrophages by the Peptides Derived from Silk Fibroin. Park, Kum-Ju and Chang-Kee Hyun^{1,*}. Graduate school of Biotechnology, ¹School of Bioscience and Food Technology, Handong University, Pohang 791-708, Korea – It was found that the peptides originated from the hydrolysates of silk fibroin have *in vitro* immunostimulating effects in murine macrophage RAW264.7 cells. The stimulation effects on nitric oxide (NO) production resulted from treatments of acid or enzymatic hydrolysates were measured. The silk fibroin preparation isolated from cocoon was most efficiently digested by acid hydrolysis. Even though the sole treatment of acid hydrolysate stimulated the NO production in dose-dependent pattern, a part of its activity was found to be caused by the contaminated endotoxin, LPS. When each endotoxin-free hydrolysates obtained by filtering it through an ultrafiltration membrane of molecular weight (MW) cut-off 10,000 to eliminate LPS was used, the peptic hydrolysate with lowest degree of hydrolysis showed the highest activity. The fractions of peptic hydrolysate with MW ranges of 1,000~10,000, 500~1,000 and below 500 also showed a higher MW-higher activity correlation. From the analyses of amino acid composition of each hydrolysate, it was found that the contents of arginine, lysine, alanine and glycine residues affected the activity level of hydrolysate. The results of this study showed a possibility of utilizing fibroin as a source for immunostimulating (chemopreventive) functional peptides.

Key words: Silk fibroin, Peptides, RAW 264.7 macrophages, Nitric oxide production

누에(*Bombyx mori*)로부터 생산되는 실크는 섬유상 단백질인 피브로인(fibroin)과 이들을 부착시키는 고무상 단백질 세리신(sericin)으로 구성되어 있다. 이 중 실크 피브로인은 최근 생화학 및 의학적 용도로의 응용이 활발히 연구되고 있어 새로운 biomaterial로 주목을 받고 있다. 독특한 물리 화학적 특성으로 인해 [1] 세포배양 matrix [2], 고정화 효소 membranes [3], 약물의 경구투여를 위한 gel [4] 등 다양한 분야에서의 활용이 시도되고 있다. 또한 실크 피브로인의 여러 가지 생리활성이 보고되어 왔다. 실크 피브로인을 급여한 쥐에서 혈중 콜레스테롤치와 혈당치가 낮아지고 알코올 흡수가 저해되는 효과가 밝혀졌으며 [5,6], sulfate기로 반응시킨 피브로인의 경우에는 anti-HIV 활성을 나타내기도 하였다 [7]. 한편 실크 피브로인의 산 또는 효소적 가수분해를 통해 얻어지는 가수분해물은 기능성 식품, 화장품, 의약품 등에 응용되고 있다 [8-11]. 또한 이들 가수분해물들에 대해서도 제2형 당뇨병에 대한 혈당강하효과와 [12] 알코올 흡수 저해효과 [10] 등 생리활성 규명 연구가 보고된 바 있다. 1970년대 이래 각종 단백질로부터 생리활성 펩타이드들이

생산되어 nutraceutical로서의 이용 가능성이 제시되어 왔다. 펩타이드의 생리활성으로는 opioid agonist 또는 antagonist, angiotensin I-converting enzyme 저해, 면역조절, 항균, 항혈전, 지질산화억제, mineral 결합 활성 등이 보고되어 왔다 [13,14]. 현재까지는 우유, 대두, 어류 근육, 밀 등으로부터 얻을 수 있는 식품 단백질들이 주로 이용되었으나 실크 피브로인으로부터 유도된 생리활성 펩타이드는 아직 보고된 바 없다.

숙주의 생체방어기구가 종양을 제어한다는 사실은 종양 조직내에 침투하는 T세포, NK세포 및 macrophage의 존재에 의해 입증되었으며, 생체내에는 이러한 면역담당세포들에 의하여 종양에 대한 면역감시기구(immune surveillance)가 작용하고 있다. 생체의 면역감시기구에서 제 1선을 담당하는 macrophage는 바이러스 감염세포, 미생물 및 종양에 대하여 중요한 방어기구로 알려져 있다 [15]. 종양세포에 대한 macrophage의 선택적인 살해능은 종양세포의 특이 항원(tumor-specific antigen), cell cycle time 및 종 특이적 항원(species-specific antigen) 등의 인식과 같은 macrophage 고유의 기능과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 활성화된 macrophage의 세포 살해능에 대한 또 하나의 기능으로서 IL-1, IFN- γ 등의 cytokine은 물론 tumor necrosis factor(TNF) 및 반응성 질소종인 nitric oxide(NO) 등을 분비하여 [16,17] 종양세포에 대항하는 가장 중요한 기구의

*Corresponding author

Tel. 054-260-1361, Fax. 054-261-4603

E-mail: ckhyun@handong.edu

하나로 인정되고 있다[18]. 한편 지금까지 단백질의 가수분해를 통해 면역조절 생리활성을 갖는 펩타이드 성분들을 얻어내는 여러 연구들이 진행되어 왔다. Casein 및 lactalbumin 등 우유 단백질 유래 펩타이드들이 phagocytosis를 증진시키거나[19] lymphocyte의 분화를 조절하는 기능을 나타내었고[20], 대두 단백질로부터도 면역조절 펩타이드가 얻어지는 등[21] 펩타이드의 면역조절활성에 대한 결과들이 보고되었다. 특히 glycinin 단백질의 효소적 가수분해물로부터 분리된 HCQRPR 및 QRPR 등의 펩타이드들은 macrophage의 phagocytosis를 활성화시킬 뿐 아니라 세균감염에 대한 방어작용 및 TNF 분비를 촉진시키는 면역조절활성을 나타내었다[22].

본 연구에서는 실크 피브로인으로부터의 생리활성 펩타이드 생산 가능성을 타진하고 동시에 면역활성증진 펩타이드의 개발을 위하여 실크 피브로인의 가수분해물에 대하여 면역작용의 최종 효과를 나타내게 하는 대표적인 물질인 nitric oxide의 생성이 펩타이드 성분들에 의해 촉진되는지를 관찰하고 활성에 미치는 펩타이드의 특성들을 조사함으로써 암예방 기능성 소재로의 활용 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

누에고치의 정련 및 피브로인의 용해

정선된 누에고치를 (주)아미노젠(충남 연기군 소정면 소재 공장)으로부터 공급받아 실크 피브로인의 원료로 사용하였다. 우선 누에고치 10g에 5%(w/v) 농도의 Na_2CO_3 수용액 500 ml을 처리하여 1시간 동안 가열하고 여과지로 여과하여 용해된 sericin을 제거하였다. 잔사를 열수를 이용하여 수차례 세척함으로써 잔여 sericin과 Na_2CO_3 을 제거하였다. 이로써 sericin이 제거되어 피브로인만 남아있는 피브로인 견사를 얻었다. 이 피브로인 견사는 산 가수분해물 제조에 직접 이용하거나 효소적 가수분해물 제조를 위해 CaCl_2 에 의한 피브로인 용해를 실시하였다. 피브로인 견사 35g에 CaCl_2 226.4 g, 증류수 346 g, ethanol 280 ml을 혼합하고 90°C로 1시간 동안 가열하는 방법으로 $\text{CaCl}_2\text{-H}_2\text{O}$ -Ethanol 3성분 용액을 사용하여 용해시켰다. 용해된 피브로인 용액은 투석막에 넣어 증류수에 3일간 투석한 후 동결건조하여 분말상태의 피브로인을 얻어 실험에 사용하였다.

산 및 효소적 가수분해물의 제조

피브로인 견사에 2N HCl 용액을 견사 중량의 80배 용량으로 첨가하여 100°C에서 4시간 동안 가열하면서 피브로인을 가수분해하였다. 제조된 가수분해물은 진한 암갈색을 나타내었고, 여기에 2N NaOH를 첨가하며 중화시켜 pH 7.4가 되도록 하였다. 중화된 가수분해물에는 활성탄을 전체 용액 용량의 6%가 되도록 첨가하여, 60분 동안 교반함으로써 각종 비용해 물질 및 이취 등을 제거한 후 여과하

여 투명한 액상의 가수분해물을 얻었다. 이 가수분해물 용액을 투석막을 사용하여 증류수로 1일 동안 투석하여 염을 제거하였다. 염이 제거된 가수분해물 용액을 동결건조하여 분말로 얻고 실험에 이용하였다. 한편 피브로인 단백질을 여러 단백질분해효소의 최적반응조건에 따라 분해시켰다. 효소는 trypsin, pepsin과 세균 유래 단백질분해효소 등 대량으로 산업적인 이용이 가능한 것들을 사용하였다. Trypsin과 pepsin은 동물유래의 효소로서 각각 단백질을 분해하는 펩타이드 결합의 위치를 달리한다. 산업용 세균 유래 효소로는 Novo Nordisk사(Denmark)에서 생산해내는 대표적인 산업용 protease로서 현재 국내 식품, 사료, 유가공 산업에서 가장 널리 이용되고 있는 효소로서 *Bacillus licheniformis* 유래의 serine protease인 Alcalase[®]를 이용하였다. 동결건조하여 얻은 피브로인 분말을 trypsin 및 Alcalase의 반응을 위해서는 40 mM 인산완충액(pH 7.5)에, pepsin의 반응을 위해서는 40 mM 초산완충액(pH 4.0 완충액을 1N HCl을 이용하여 pH 2.0로 조정)에 10 mg/ml의 농도가 되도록 용해시켰다. 피브로인 용액 50 ml에 각 효소를 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1%(w/v)의 농도로 첨가하고 각각 trypsin (Sigma, St. Louis, MO)과 pepsin(Sigma)은 37°C, pH 7.5 및 pH 2.0, Alcalase는 55°C, pH 7.5의 조건으로 반응시키되 매 1시간마다 3 ml의 시료를 채취하여 100°C, 5분간의 가열처리로 반응을 정지시키면서 8시간까지 반응시켰다. 이로부터 얻어지는 가수분해물들에 대해 13,000 rpm, 15분 동안 원심분리하여 상등액을 얻은 후 molecular weight (MW) cut-off 10,000 및 5,000짜리 centrifugal ultrafiltration kit (Vivaspin 20, Satorius, Germany)를 이용하여 한외여과시킨 여액에 대하여 각 활성을 측정하였다. 한편 이 여액들에 대해서는 Lowry method를 이용한 단백질 정량에 의하여 생산된 펩타이드를 정량하였다. 이 정량치와 가수분해 이전 단백질 농도와의 차이값으로부터 펩타이드 생산수율, 즉 가수분해도(the degree of hydrolysis)를 계산하였다. 반응시간에 따른 가수분해도가 더 이상 증가하지 않는 최대 가수분해도 조건을 비교하여 효소 및 효소농도를 결정하였다.

Gel chromatography 및 한외여과에 의한 펩타이드 분획 분리

산 및 효소적 가수분해물 시료를 10 mg/ml의 농도가 되도록 증류수에 용해시킨 후 Sephadex G-25(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) gel chromatography column (2×60 cm)에 2 ml loading하여 3차 증류수로 elution시켜 펩타이드의 크기에 따른 분획을 분리하였다. 각 분획의 크기는 약 3 mL로 하고 각 분획의 280 nm에서의 UV 흡광도를 측정하여 chromatogram을 얻었다. 분리된 분획 중에 분자량이 작은 범위의 분획에 대해서는 분자량 분획범위가 1,500 이하인 Sephadex G-15 gel chromatography를 동일한 방법으로 실시하여 보다 세부적으로 분획을 분리시켰다.

단 한외여과에 의해 특정 분자량 범위의 펩타이드들을 얻고자 할 때는 Amicon PM-10(MWCO 10,000), Amicon YMI(MWCO 1,000), Amicon YC05(MWCO 500) 등의 한외여과막을 통과시킨 후 얻은 여액을 각각 동결건조하여 펩타이드 분획별 분말시료로 제조하고 실험에 이용하였다.

Macrophage 배양, nitric oxide 생성능 측정 및 endotoxin 측정

사용된 세포주는 RAW 264.7 macrophage로서 American Type Culture Collection(ATCC) TIB71을 분양받아 사용하였다. 세포를 10% heat-inactivated bovine calf serum, 1% penicillin-streptomycin이 함유된 RPMI 1640 medium을 이용하여 24-well plate에 5×10^5 cells/well의 농도로 넣은 다음, 시료를 첨가하거나 첨가하지 않고 humidified 5% CO₂ incubator 안에서 37°C에서 48시간 동안 배양하여 실험에 이용하였다. macrophage에서 발생하는 nitric oxide의 양은 활성화된 대식세포 배양액에 축적되어 있는 nitrite의 양을 microplate assay[23]를 이용하여 정량함으로써 측정하였다. 먼저 시료를 처리하고 48시간 동안 세포를 배양하고 상등액 50 μ l를 취하여 동일 부피의 Griess 시약(1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H₃PO₄)을 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader(Bio-Tek Instruments, USA)를 이용하여 540 nm의 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 표준물질로는 sodium nitrite를 사용하였으며, NO 생성능의 양성 대조구 물질로는 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하였다. RAW 264.7 세포의 시료에 의한 세포독성은 MTT assay[24]를 이용하여 확인하였다. 한편 실험에 사용된 시료에 함유된 LPS의 양을 측정하기 위하여 kinetic turbidimetric 방법에 의한 Limulus amoebocyte lysate(LAL) assay(detection limit, 0.03 EU/ml; Charles River Charles River Laboratories, Inc., Wilmington, MA)를 이용하여 endotoxin (LPS)의 양을 검출하였다[25].

아미노산 조성 분석

시료(0.5 mg)을 0.1% phenol을 함유하는 6N HCl에 의해 110°C에서 24시간 동안 가수분해하였다. 가수분해물을 건조한 후 100 μ l coupling buffer(mixture of 0.7 ml acetonitrile, 0.2 ml triethylamine and 0.1 ml water)를 5 μ l phenylisothiocyanate (PITC)와 함께 첨가하고 실온에서 20분간 정치하여 아미노산의 phenylthiocarbonyl (PTC) 유도체를 형성시켰다. 시료를 진공 원심분리로 건조한 후 200 μ l solvent A(1.4 mM sodium acetate and 0.1% triethylamine in 6% acetonitrile, pH 6.1)에 용해시켜 Pico-Tag column (3.9 \times 300 mm, Waters Corporation, Milford, MA)에 loading 하여 solvent A에 대하여 solvent B(60% acetonitrile)로 a linear gradient를 주는 HPLC 의해 각 아미노산 유도체의 함량을 정량하였다.

결과 및 고찰

실크 피브로인의 산 및 효소적 가수분해

염산을 이용한 산 가수분해 결과 실크 피브로인은 가수분해반응 1시간 동안 가수분해도는 70%를 나타내었으며 반응 4시간까지 약간씩 증가하여 75%의 최고 가수분해도까지 도달하였다. 한편 각 효소를 0.05%(w/w)의 농도로 가하여 8시간 동안 피브로인을 가수분해시켰을 때 반응시간별 펩타이드 생성 추이를 Fig. 1에 가수분해도로 나타내었다. Alcalase의 가수분해도가 가장 우수하여 반응 3시간 만에 60%를 넘는 가수분해도를 보여주었으며 trypsin에 의해서도 분해반응이 잘 일어남을 알 수 있었다. 그러나 pepsin에 의한 분해반응속도는 다른 효소에 비하여 느렸으며 반응 12시간에 도달한 최고 가수분해도는 45%를 넘지 못하였다. 현재까지 피브로인의 가수분해에 대하여 산 가수분해[10] 또는 actinase[9], *Bacillus subtilis* 유래 protease[10], Alcalase [11] 등을 이용한 효소적 가수분해반응의 결과가 보고된 바 있으나, 가수분해 수율 또는 각 가수분해반응의 효율을 비교할 수 있는 연구보고는 없었다. 본 연구의 결과로부터, 피브로인의 분해는 산 가수분해에 의한 방법이 가장 높은 수율을 얻을 수 있으며 3종의 산업적으로 이용 가능한 단백질분해효소 중에서는 Alcalase가 가장 효율적인 피브로인 가수분해 효소임을 확인할 수 있었다. 최고 가수분해도에 이르도록 제조된 산 가수분해물 및 효소적 가수분해물을 MWCO 10,000의 한외여과막을 통과시켜 거대 폴리펩타이드 분자를 제거한 후 Sephadex G-25 gel filtration chromatography를 이용하여 생성 펩타이드를 분자 크기별로 분리하였다(Fig. 2). 생성 펩타이드의 크기에 있어서도 가수분해도가 높은 산 가수분해물이나 Alcalase 가수분해물의 경우에는 저분자량의 펩타이드 성분이 다량 생산된 반면 상대적

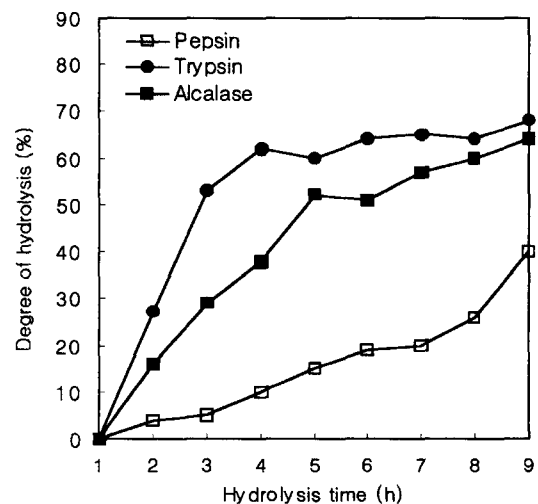


Fig. 1. Time profiles of the degree of hydrolysis for the proteolyses of silk fibroin with 0.05% (w/v) proteases.

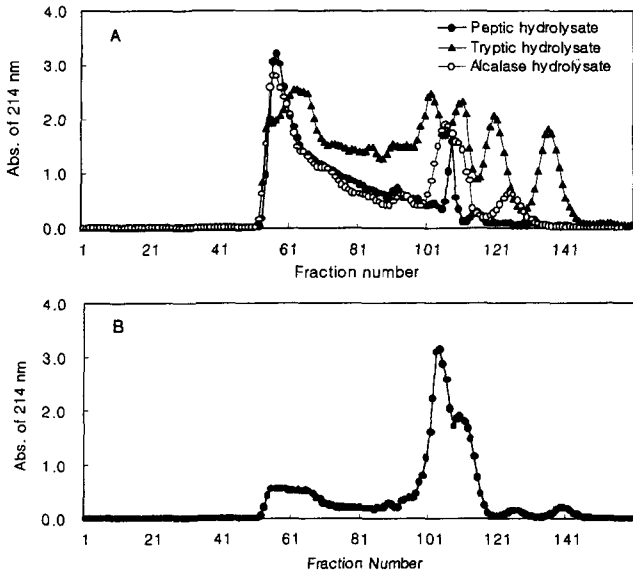


Fig. 2. Sephadex G-25 gel filtration chromatograms for several enzymatic hydrolysates (A) and acid hydrolysate (B) of silk fibroin.

으로 가수분해도가 낮은 trypsin 및 pepsin 가수분해물에는 고분자량의 펩타이드가 많이 함유되어 있음을 알 수 있었다. 본 실험조건에서의 Sephadex G-25의 분리특성은 Hyun 등[26]의 보고에서와 동일한 방법으로 조사한 결과, 분자량 10,000-3,000 사이, 3,000-1,000 사이, 1,000-500 사이, 500 이하의 펩타이드 분획이 각각 fraction number 50-90번, 91-110번, 111-120번, 121번 이상에서 용출되는 것으로 확인되었으며(data-not-shown), 분자량 1,500 이하 범위에서의 분리 분획을 비교해 볼 때 피브로인으로부터 얻어지는 가장 작은 범위의 펩타이드는 특히 Alcalase 가수분해에 의해 많이 생성되고 있음을 알 수 있었다.

산 가수분해물의 NO 생성촉진 활성

우선 산 가수분해에 의해 얻어진 피브로인의 가수분해물을 RAW 264.7 macrophage에 처리한 결과 가수분해물의 농도에 따라 NO 생성량의 증가추세가 명확하게 나타냄으로써 NO 생성의 촉진시키는 활성이 있음을 보여주었다 (Fig. 3). 산 가수분해물을 5 mg/ml의 농도로 처리할 경우에는 양성 대조구인 1 µg LPS와 유사한 정도의 NO 생성 촉진 활성을 나타내었다. 그러나 이러한 산 가수분해물의 활성이 피브로인의 가수분해반응으로부터 유래한 펩타이드에 의한 것인지 또는 가수분해물 내 오염된 endotoxin (LPS)에 의한 것인지를 확인하기 위하여 산 가수분해물의 endotoxin test를 실시한 결과, 1 mg 가수분해물 당 5.3 EU, 즉 0.53 ng의 LPS가 함유되어 있음을 확인하였다. 이러한 함유량의 LPS가 단독으로 처리될 경우에는 어느 정도의 NO 생성촉진 활성을 나타나는지를 알아보기 위하여

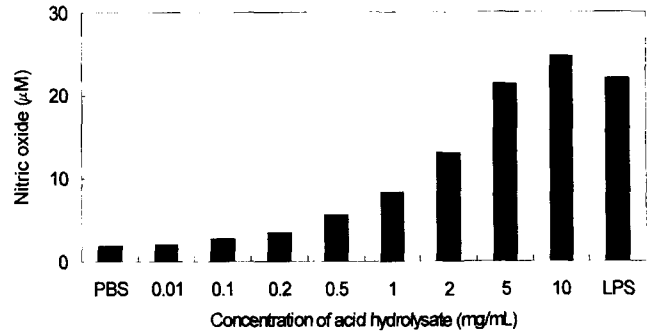


Fig. 3. Stimulation effect of the acid hydrolysate of fibroin on nitric oxide production.

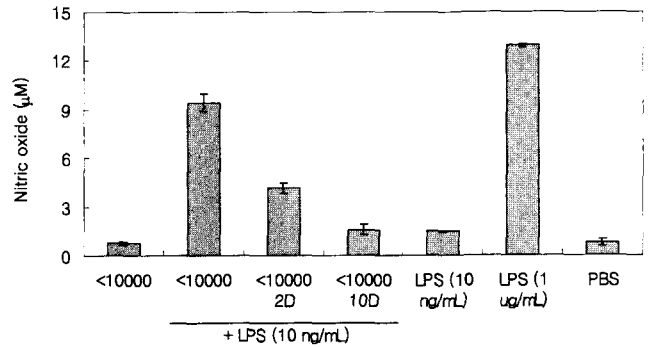


Fig. 4. Stimulation of nitric oxide production by the fraction of molecular weight lower than 10,000 obtained from the acid hydrolysate of fibroin.

<10000; fraction of MW lower than 10,000, <10000 2D; two-fold diluted <10000 fraction, <10000 10D; ten-fold diluted <10000 fraction, + LPS (10 ng/ml); the additional treatment of 10 ng/ml LPS with each fraction, PBS; phosphate buffered saline (pH 7.4).

10 ng/ml LPS를 처리하였으나 활성이 매우 미약함을 알 수 있었다(Fig. 4). 한편 산 가수분해물을 MW cut-off 10,000의 한외여과막을 통과시켜 함유된 LPS를 제거한 후의 가수분해물에 대한 NO 생성촉진 활성을 측정한 결과 이 경우에서도 역시 활성이 나타나지 않았다. 그러나 MW cut-off 10,000 이하의 산 가수분해물과 10 ng/ml LPS를 혼합 처리한 경우에는 NO 생성촉진 활성이 관찰되었고 또한 가수분해물의 농도를 높여줌에 따라 활성도 증가함을 보여주었다(Fig. 4). 이러한 실험결과로부터 본 연구에서 제조된 실크 피브로인의 가수분해물에는 미량의 LPS가 오염되어 있었으나 단독적으로 활성을 나타낼 수 있는 농도보다는 훨씬 낮은 수준이며, 가수분해물에 존재하는 피브로인 유래의 펩타이드(및 아미노산) 성분이 LPS 성분과 함께 작용하여 macrophage의 NO 생성을 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

효소적 가수분해물의 NO 생성촉진 활성

효소적 가수분해물을 MW cut-off 10,000의 한외여과막을 통과시켜 함유되어 있을 수 있는 LPS 성분을 제거한

후, 동결건조를 거쳐 2 mg/ml을 10 ng/ml LPS와 함께 macrophage에 처리함으로써 가수분해물 성분에 의한 NO 생성촉진 활성을 측정하였으며, 산 가수분해물 역시 동일한 방법으로 처리하여 활성을 비교하였다. 본 연구에서 제조된 3종의 효소적 가수분해물 모두가 NO 생성촉진 활성을 나타내었고 그 중에서는 peptic hydrolysate의 활성이 가장 우수하였으며 tryptic hydrolysate와 Alcalase hydrolysate의 순으로 활성이 낮아지는 경향을 보여주었다(Table 1). Fig. 2에서 관찰된 바와 같이 가수분해물 내 펩타이드들의 분자량 분포가 peptic hydrolysate의 경우가 가장 고분자량의 펩타이드 함량이 높고 tryptic hydrolysate, Alcalase hydrolysate의 순으로 저분자량 펩타이드의 함량이 높아지므로, 효소적 가수분해물의 활성은 가수분해물 내 펩타이드 성분들의 분자량 분포에 의해 영향을 받는 것으로 추정되었다. 이를 확인하기 위하여 peptic hydrolysate를 MW cut-off 1,000 및 500의 한외여과막을 이용하여 분자량 범위가 500

이하, 500-1,000 사이, 1,000-10,000 사이인 세 분획으로 나누어 활성을 측정한 결과, 큰 분자량 범위의 분획일수록 높은 활성을 나타내었다(Table 1). 이러한 결과로부터 피브로인으로부터 유래하는 펩타이드의 분자량이 클수록 NO 생성촉진활성이 높다는 추정은 가능성이 높은 설명임을 알 수 있었다. 단, 산 가수분해물의 경우에는 큰 분자량의 펩타이드 성분이 매우 적음에도 불구하고 활성은 peptic hydrolysate 다음으로 높게 나와 이러한 설명에 부합하지 않는 결과를 나타냄으로써 가수분해물 내 아미노산 조성 등 다른 요인에 의해 활성이 영향을 받는 것으로 판단되어 아미노산 조성 분석실험을 수행하였다.

아미노산 조성이 NO 생성촉진 활성에 미치는 영향

제조된 피브로인 및 각 가수분해물의 아미노산 조성을 분석한 결과 각 가수분해별로 특징적인 아미노산 조성을 나타내었다(Table 2). 효소적 가수분해물의 아미노산 조성을

Table 1. Stimulation effects of several hydrolysates (MW<10,000) of silk fibroin on nitric oxide production

Treatment	Concentration of produced NO (μ M)
PBS	1.1 \pm 0.1
LPS (10 ng/ml)	2.8 \pm 0.5
LPS (1 μ g/ml)	15.6 \pm 0.8
Peptic hydrolysate + LPS (10 ng/ml)	14.7 \pm 0.5
Tryptic hydrolysate + LPS (10 ng/ml)	12.6 \pm 0.4
Alcalase hydrolysate + LPS (10 ng/ml)	7.6 \pm 0.5
Acid hydrolysate + LPS (10 ng/ml)	12.3 \pm 0.5
Peptic hydrolysate (1,000<MW<10,000) + LPS (10 ng/ml)	13.9 \pm 0.4
Peptic hydrolysate (500<MW<1,000) + LPS (10 ng/ml)	12.7 \pm 0.4
Peptic hydrolysate (MW<500) + LPS (10 ng/ml)	10.4 \pm 0.7

Table 2. Amino acid compositions (mol%) of fibroin preparation and several peptide fractions separated from the acid- and Alcalase hydrolysate

Amino acid	Fibroin	Peptic hydrolysate	Tryptic hydrolysate	Alcalase hydrolysate	Acid hydrolysate
Gly	40.51	34.56	45.12	50.19	31.43
Ala	32.28	33.00	28.35	25.27	43.62
Val	4.20	2.92	4.50	3.12	5.60
Leu	0.68	0.59	1.60	0.51	1.25
Ile	1.05	2.16	1.56	1.80	1.62
Met	0.10	1.06	1.31	0.17	0.07
Ser	11.86	10.80	7.55	11.03	6.32
Thr	0.84	1.43	1.60	0.90	0.78
Cys	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
Pro	0.71	0.52	0.05	0.46	0.80
Asp	1.64	2.45	0.97	1.58	0.66
Glu	2.01	1.37	1.70	1.63	0.80
Phe	1.28	1.09	1.61	0.70	0.85
Tyr	1.59	2.06	1.47	1.51	1.26
Trp	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00
Lys	0.14	1.39	0.61	0.29	1.20
Arg	0.88	4.60	1.82	0.84	3.74
His	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

비교한 결과 NO 생성촉진 활성이 높아지는 순서 즉 Alcalase, tryptic, peptic hydrolysate의 순으로 arginine 및 lysine과 같은 positively charged group을 side chain으로 갖는 아미노산의 함량이 높음을 알 수 있었다. 특히 가수분해물의 arginine 함량이 활성에 따라 큰 차이를 보여 주었는데 이러한 특징은 다음의 두가지 사실과 관련이 있을 것으로 추정되었다. 첫째로는 macrophage는 L-arginine의 amidine nitrogen를 산화시킴으로써 NO를 생성하기 때문에 [27] 가수분해물 중 arginine의 함량이 높을수록 macrophage에 처리된 arginine 농도가 높아져서 NO 생성이 촉진되었을 것으로 사료되었다. 둘째로는 현재까지 밝혀진 면역활성 촉진 펩타이드들이 모두 말단에 arginine을 가지고 있는 펩타이드들이라는 것과의 관련성을 생각할 수 있었다. 즉 immunoglobulin으로부터 유래하여 phagocytosis를 촉진시키는 내재성 펩타이드인 tuftsin(TKPR)을 비롯하여 [28] 대두 단백질 유래의 펩타이드로서 phagocytosis 촉진활성, 세균 감염 방어작용, TNF 분비 촉진활성 등을 나타내는 HCQRPR 및 QRPR [22], 또한 대두 단백질 유래의 soy-metide(MITLAIPVNKPGK), 우유 단백질 유래의 casoxin C(YIPIQYVLSR), 쌀 단백질 유래의 oryzatensin(GYPMYPLPR) 등의 면역조절활성 펩타이드들이 공통적으로 arginine(R) 말단을 가지고 있음을 볼 수 있다 [21].

한편 효소적 가수분해물들의 아미노산 조성을 비교해 볼 때 가수분해물의 alanine 함량이 높고 glycine 함량이 낮아질수록 NO 생성촉진활성이 높아짐을 알 수 있었다 (Table 2). 실크 피브로인 단백질은 glycine과 alanine을 많이 함유하는 특이한 아미노산 조성을 가지는데 원래 단백질은 glycine이 alanine보다 많으나 가수분해과정을 통해 alanine이 많이 포함된 펩타이드 성분들이 많이 생산될 경우에 NO 생성촉진활성이 높아지는 것으로 사료되었다. 또한 Table 1에서 볼 수 있는 바와 같이 산 가수분해물의 NO 생성촉진 활성을 효소적 가수분해물과 비교해 보면 peptic hydrolysate보다는 낮으나 tryptic hydrolysate과 거의 유사하였으며 Alcalase hydrolysate보다는 높은 수준이었다. 앞서서도 언급한대로 산 가수분해물 내 펩타이드 성분의 분자량은 위의 효소적 가수분해물들에 비해 낮은 분자량 분포를 가지고 있음에도 불구하고 (Fig. 2) 높은 활성을 나타내고 있었다. 이것은 아미노산 조성의 특이성에 기인하는 것으로 추정되었다. 즉 산 가수분해물은 arginine의 함량이 peptic hydrolysate 다음으로 높은 수준이었으며 alanine의 함량이 특이하게 높고 glycine 함량은 상대적으로 낮다는 특성으로 인하여 위에서 설명한 아미노산 조성의 영향에 의해 이해될 수 있었다 (Table 2). 얻어진 모든 결과로부터 결론적으로 피브로인 가수분해물의 NO 생성촉진활성은 생성된 펩타이드의 분자량 분포, arginine 함량, alanine 및 glycine의 함량 등에 의해 결정됨을 확인할 수 있었다.

이상 본 연구에서 실크 피브로인 가수분해물을 제조하고

그들의 NO 생성촉진활성에 영향을 미치는 주요 요인들을 조사한 결과들을 기초로 하여, 실크 피브로인을 원료로 한 면역조절활성 펩타이드, 즉 NO 생성촉진을 통한 암예방 기능을 나타낼 수 있는 펩타이드 성분을 효율적으로 생산할 수 있을 것으로 기대되었다.

요 약

실크 피브로인의 가수분해를 통해 생산된 펩타이드 성분에 의해 murine macrophage RAW264.7 세포에 의한 nitric oxide 생성이 촉진됨을 발견하였다. 산 및 효소적 가수분해물의 가수분해도를 비교한 결과 실크 피브로인 단백질은 산 가수분해에 의해 가장 효과적으로 분해되었으며 효소적 가수분해의 경우에는 pepsin, trypsin, Alcalase의 순으로 가수분해도가 높았다. 산 가수분해물을 단독으로 macrophage에 처리하였을 때 처리농도에 따라 NO 생성촉진활성이 높아졌으나 이 활성은 가수분해물 내의 펩타이드 성분들과 오염되어 혼재하는 LPS 성분의 상호작용에 의한 것임이 확인되었다. 함유된 LPS 성분들을 한외여과에 의해 제거한 효소적 가수분해물들의 NO 생성촉진활성은 peptic hydrolysate가 가장 높았고 tryptic-, Alcalase hydrolysate 순이었다. 이러한 활성의 차이는 가수분해물 내의 고분자량 펩타이드 분포가 많을수록 활성이 높다는 관계에 기인하였으나 산 가수분해물의 경우에는 예외적으로 나타났다. 각 가수분해물의 아미노산 조성을 분석한 결과 arginine, lysine의 함량이 높을수록 활성이 높으며 alanine의 glycine에 대한 비율이 커질수록 활성이 높아졌다. 산 가수분해물의 경우에는 낮은 분자량의 펩타이드들이 많이 분포하지만 arginine 및 alanine의 함량이 높아 비교적 높은 NO 생성촉진활성을 나타내는 것으로 확인되었다.

감사의 말

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로서 (HMP-00-B-22000-0150), 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Minoura, N., M. Tsukada, and M. Nagura. 1990. Physicochemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial. *Biomaterials* **11**: 430-434.
2. Minoura N., S. I. Aiba, M. Higuchi, Y. Gotoh, M. Tsukada, and Y. Imai. 1995. Attachment and growth of fibroblast cells on silk fibroin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **208**: 511-516.
3. Qian J., Y. Liu, H. Liu, T. Yu, and J. Deng. 1997. Immobilization of horseradish peroxidase with a regenerated silk

- fibroin membrane and its application to a tetrathiafulvalene-mediated H_2O_2 sensor. *Biosens. Bioelectron.* **12**: 1213–1218.
4. Hanawa, T., A. Watanabe, T. Tsuchiya, R. Ikoma, M. Hidaka, and M. Sugihara. 1995. New oral dosage form for elderly patients: preparation and characterization of silk fibroin gel. *Chem. Pharm. Bull.* **42**: 282–288.
 5. Luo, J., K. Chen, Q. Xu, and K. Hirabayashi. 1993. Study on foodization of fibroin and its functionality, pp. 73–87. *In The collection of papers for the second international silk conference, China.*
 6. Akai, H. 1999. New physiological functions of silk material. *Shokuhin to Kaihatsu* **34**: 45–47.
 7. Gotoh, K., H. Izumi, T. Kanamoto, Y. Tamada, and H. Nakashima. 2000. Sulfated fibroin, a novel sulfated peptide derived from silk, inhibits human immunodeficiency virus replication *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 1664–1670.
 8. Takano, R., K. Hirabayashi, and K. Chen. 1991. Preparation of soluble silk fibroin powder by hydrochloric acid hydrolysis. *Sov. Phys. Crystallogr.* **60**: 358–362.
 9. Chen, K., Y. Umeda, and K. Hirabayashi. 1996. Enzymatic hydrolysis of silk fibroin. *J. Seric. Sci. Jpn.* **65**: 131–133.
 10. Kim, M. K., K. H. Lee, H. J. Lim, S. J. Lee, S. H. Lee, and K. S. Min. 1996. Preparation protocols for the functional polypeptide materials from cocoon. *Korean Patent* 98712.
 11. Kim, D. K., Y. H. Kim, K. B. Kim, and Y. G. Chin. 2001. The changes of molecular weight and structure in the preparation process of silk fibroin powder. *J. Kor. Fiber Soc.* **38**: 105–110.
 12. Nahm, J. H. and Y. S. Oh. 1995. A Study of pharmacological effect of silk fibroin. *RDA J. Agric. Sci.* **37**: 145–157.
 13. Meisel, H. 1997. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Prod. Sci.* **50**: 125–138.
 14. Gill, I., R. Lopez-Fandino, X. Jorba, and E. N. Vulfson. 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. *Enz. Microb. Technol.* **18**: 162–183.
 15. Urban, J. L., H. M. Shepard, J. L. Rothstein, B. J. Sugarman, and H. Schreiber. 1986. Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 5233–5237.
 16. Nathan, C. 1992. Nitric Oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**: 3051–3064.
 17. Nathan, C. 1995. Natural resistance and nitric oxide. *Cell* **82**: 873–876.
 18. Mantovani, A., B. Bottazzi, F. Colotta, S. Sozzani, and L. Ruco. 1992. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* **13**: 265–270.
 19. Schlimme, E. and H. Meisel. 1995. Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Die Nahrung* **39**: 1–20.
 20. Kayser, H. and H. Meisel. 1996. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* **383**: 18–20.
 21. Sohn, D. H. 1997. Bioactive peptides enhancing health and their applications. *Food Sci. Industry* **30**: 22–29.
 22. Yoshikawa, M., K. Kishi, M. Takahashi, A. Watanabe, T. Miyamura, M. Yamazaki, and H. Chiba. 1993. Immunostimulating peptide derived from soybean protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **685**: 375–376.
 23. Ding, A. H., C. F. Nathan, and D. J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **141**: 2407–2412.
 24. Carmichael, J., W. G. DeGraff, A. F. Gazdar, J. D. Minna, and J. B. Mitchell. 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* **47**: 936–942.
 25. Remillard, J. F., M. C. Gould, P. F. Roslansky, and T. J. Novitsky. 1987. Quantitation of endotoxin in products using the LAL kinetic turbidimetric assay. *Prog. Clin. Biol. Res.* **231**: 197–210.
 26. Hyun, C. K. and H. K. Shin. 2000. Utilization of bovine blood plasma proteins for the production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Process Biochem.* **36**: 65–71.
 27. Stuehr, D. J., S. S. Gross, I. Sakuma, R. Levi, and C. F. Nathan. 1989. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J. Exp. Med.* **169**: 1011–1120.
 28. Nishioka, K., A. Constantopoulos, P. S. Satoh, and V. A. Najjar. 1972. The characteristics, isolation and synthesis of the phagocytosis stimulating peptide tuftsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**: 172–179.

(Received Oct. 12, 2001/Accepted Feb. 4, 2002)