

## 견 피브로인 효소 가수분해물의 동물 인지기능 향상 효과

여주홍\* · 이광길 · 권해용 · 우순옥 · 한상미 · 이용우 · 김진일 · 김성수<sup>1</sup> · 出村 城<sup>2</sup>  
농업과학기술원 농업생물부, <sup>1</sup>중앙대학교 의과대학, <sup>2</sup>北海道大學

### Cognitive Ability Enhancement Effects in Rats by *B. mori* Fibroin Enzymatic Hydrolysate

Joo-Hong Yeo\*, Kwang-Gill Lee, HaeYong Kweon, Soon-Ok Woo, Sang-Mi Han, Yong-Woo Lee,  
Jin-Il Kim, Sung-Su Kim<sup>1</sup> and Makoto Demura<sup>2</sup>

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon 441-100, Korea

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

<sup>2</sup>Division of Biological Science, Graduate School of Science, Hokkaido University, Sapporo 060-0810, Japan

#### ABSTRACT

We were investigated the cognitive ability enhancement in rats using *B. mori* fibroin molecular controlled hydrolysate by preparative recycle HPLC system. Also, some of its physicochemical properties and free amino acid components were investigated, too. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum are measured different pattern between high (HF) and low (LF) molecular controlled *B. mori* fibroin samples, respectively. The *in vitro* test by neuron primary cell culture are showed dependent on molecular weight (Mw) of *B. mori* fibroin in the order of LF > MF > HF, too. However, the memorial effects in rats by *in vivo* test are large dependent molecular weight on that maximum 50% than control. Also, the memorial effect was higher than the enzymatic relative and acid hydrolysate, which was  $50.0 \pm 2.1$  and  $25.9 \pm 0.32$  %, respectively.

**Key words** : Silk fibroin hydrolysate, memorial growth effect, NMR

#### 서 론

사회생활의 지나친 스트레스와 성인병으로 인해 50대 초기에 치매 증상을 보이는 사람도 늘어나고 있다고 한다. 현재 65세 이상 노인 인구의 8.3%인 22만명 정도가 흔히 “노망(老妄)”이라 불리는 퇴행성 뇌질환에 시달리고 있고, 노령화가 진행되는 2020년에는 10%이상으로 늘어날 전망이다(동아일보 2000.8.23). 치매의 원인으로서는 80여 가지가 알려져 있지만, 알츠하이머병(Alzheimer's Disease)이라 불리는 질환이 50~55%, 혈관성치매가 30~35% 정도를 차지하고 있는 것으로 알려져 있다. 그 중에서 치매의 가장 큰 비중을 차지하는 알츠하이머병은 서서히 진행되므로 초기에는 가족이 눈치 채지 못하는 것이 특징이고 그 원인은 뇌에 점착성을 가진 물질(아밀로이드 베타 단백질: amyloid  $\beta$ -protein)이 신경세포에 침착되어 그

독성으로 기억력 및 인지 기능을 상실하게 하는 것으로 알려져 있다(Selkoe, 1991). 반면, 혈관성치매는 알츠하이머병과는 달리 갑자기 발병하며, 동맥경화나 고혈압, 심장질환, 흡연, 고지혈증 등이 있는 사람이 뇌혈관이 막히거나(경색), 터져서(출혈) 뇌세포가 손상이 되거나 죽어가는 일어난 뇌질환이라 알려져 있다. 이 두 가지 모두가 기억력 및 인지기능에 손상을 입는다는 점에 있어서는 동일하다 할 수 있다. 이처럼 치매는 노령인구의 증가 및 사회생활의 향상으로 인해 점차 늘어나고 있는 추세이고 가정의 문제를 넘어 사회적 문제로까지 비화될 수 있는데, 그 원인에 대한 구조적 메카니즘 및 예방 및 치료에 대한 약리적 효능 등 수많은 연구가 진행되고 있으나 아직 정확한 규명을 못하고 있는 실정이다(Bartolini *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 1982; Moechars *et al.*, 1999).

이에 본 연구는 견 피브로인 가수분해물의 몇 가지 특

\*Corresponding author. E-mail: y610525@rda.go.kr

징과 *in vitro* 및 동물에 적용한 인지기능 향상 효과(*in vivo*)에 대한 적용 예를 소개하고자 한다. 이러한 성과에 대한 정확한 메카니즘에 대해서는 현재 연구가 계속 중임을 밝혀 두고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 원료

본 연구에 사용한 견사는 가잠(*Bombyx mori*)으로부터 얻어지는 견사를 사용하였다. 정련은 생사를 육비 50 : 1에서 5wt%의 마르셀 비누 및 3wt%의 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 혼합 용액에 넣어 90°C에서 40분간 2회 처리한 후, 증류수로 3번 정도 같은 작업을 반복하여 충분히 수세하여 사용하였다. 이 때의 연감율은 24%였으며, 이것을 순수 피브로인 원료로 하였다.

### 2. 피브로인의 가수분해

위에서 얻어진 순수 견 피브로인의 용해는 여 등(2000)의 방법에 따라 제조하였다. 효소 가수분해 용액을 Sephadex G-25 Gel Filtration Chromatography (Pharmacia, GradiFrac, UV-1 detection, Sweden) 장치를 이용하여 피브로인과 염을 완전히 분리하였다. 그 후, 3%(w/w)의 단백질 분해요소(Nove, Denmark)를 첨가하여 질소가스 충전 조건에서 55°C, 24시간 가수분해를 실시하였다. 그 후, 100°C에서 5분간 효소의 불활성 처리를 하여 잔유물을 제거한 다음, 0.45 μm 필터(Sartorius, Germany)로 잔유물을 분리하였다. 그 후 얻어진 각 시료를 챔버내 온도가 -5°C 내외를 유지하는 감압 건조 장치(삼원 냉열사, Model : Vacuum Freeze Dryer)를 이용하여 수용성 분말을 얻었다.

### 2. 피브로인 가수분해물 분획

위에서 얻어진 실크 피브로인 수용액을 이용하여 분획화를 시도하였다. 편의상 평균분자량(Mw)의 크기로 구분을 하였는데 HF (Mw 1000-2000), MF (Mw 500~1000), LF (Mw 500미만)로 구분하였다. 분획은 Preparative Recycling HPLC (LC-918 Model, JAI, Japan, Column : JAIGEL-GC310, UV : 220 nm, RI-Detector)장치를 이용한 수동제어법에 의해 진행하였다.

### 3. 분획물의 유리 아미노산 분석

위의 제 2절에서 얻어진 분획물의 분말 시료를 아미노산 pH 2.20 Loading buffer에 녹인 후 자동 아미노산 분석 장치(Pharmacia Biotec, Biochrom 20 Plus)를 이용하여 18종 아미노산 표준 샘플(Sigma, USA)에 대한 유리 아미노산 조성을 분석하였다.

### 4. NMR 구조 분석

제조방법에 따른 구조적 차이를 알아보기 위하여, 염산 가수분해물(LF)을 대조로 하여 효소 가수분해물을 핵자기 공명장치 (JEOL-400MHz)에 의한 <sup>13</sup>C NMR 측정을 행하였다. 조건은 Asakura (Asakura *et al.*, 1991; Asakura *et al.*, 1983)의 방법에 따랐다.

### 5. *in vitro* 실험

PC12 세포는 RPMI1640 (Gibco, USA)와 10% heat inactivated horse serum과 5% fetal bovine serum (Gibco, USA), 1% Antibiotic-antimycotic (Gibco, USA)을 공급하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 항온 항습기에서 배양하였으며, 48시간마다 계대를 해 주었다. PC12 cells (ca. 1×10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>)에 제조한 분획물(HF, MF, LF)을 50 μg/μl 씩 가한 다음 48시간 배양한 후 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 대조구는 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 50 μg/μl을 처리하였다. 세포 생존율은 다음의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{생존율} = \frac{\text{실험군의 평균흡광도} - \text{기준흡광도}}{\text{대조군의 평균흡광도} - \text{기준흡광도}} \times 100$$

### 6. *in vivo* 실험

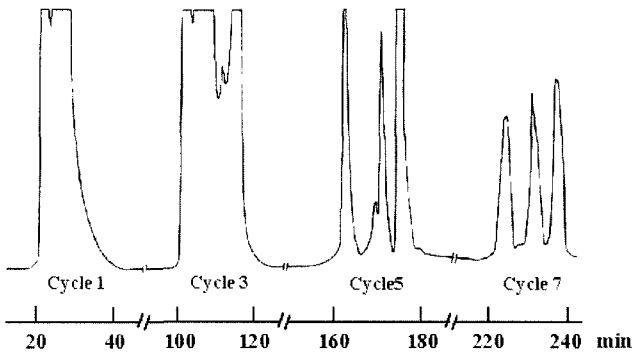
삼육 실험 동물센터로부터 분양 받은 체중 250±5 g 내외의 외견상 건강한 Sprague-Dawley Rat의 웅성 흰쥐를 사용하여 고형 사료 및 일정 조건(온도:20±2°C, 습도:50%, 명암:12시간 light/dark cycle)하에서 충분히 적응시킨 후 사용하였다. 실크 분획물은 생리 식염수에 용해하여 50 μg/μl을 14일간 oral needle를 사용하여 경구 투여 하였으며, 10마리의 Rat을 8방 미로찾기 기구(Advanced, Sweden)를 이용하여 행동반응 결과를 측정하였다. 대조구는 같은 동물에 scopolamine(Sigma, USA)을 25 μg/μl 투여하여 중추신경을 차단시킨 다음, 2시간 후 실크분획물을 투여하여 미로찾기 시간의 차이를 인지 기능 향상의 척도로 삼았다.

## 결과 및 고찰

### 1. 실크 피브로인의 분획화 및 분자량

효소 가수분해물에 대한 분획 차트 사진을 그림 1에 실었다. 그림 1에 나와 있는 것처럼 분자량 및 조성이 다른 몇가지 성분이 피크로 나타나고 있음을 알 수 있다.

즉, 처음에는 단일 피크로 관측되어지다가 Preparative Recycling HPLC를 이용하여 7회 cycle을 한 결과, 3개의 단일 피크로 분리되어짐을 알 수 있다. 앞부분(Fraction-1)을 LF 및 가운데 부분(Fraction-2)을 MF 및 뒷부분(Fraction-3)의 피크를 HF로 분획화 하였다. 이들의 피크로 보아서



**Fig. 1.** Preparative recycle HPLC chromatography of enzymic treated silk fibroin. Three peaks are obtainable through total 7 cycling steps left to right are fraction 1, 2, and 3, respectively.

단일물질로 생각은 되어지나 본 연구로서는 정확한 결과는 알 수 없다. 이것은 분자량의 차이에 기인한 성분이 다름을 의미하며 구조가 다른 성분이 있음을 의미한다 할 수 있다. 이러한 사실은 NMR측정 결과 및 아미노산 조성의 차이에서도 알 수 있다. 분자량은 여 등(1999)의 방법과 동일하게 각각의 성분을 측정하였는데, LF인 (A)부분은 Mw 480, (B)부분은 Mw800 및 (C)부분은 Mw14000대의 분자량을 각각 나타내었다.

### 2. 유리 아미노산 조성 분석

표 1에 위에서 분리한 분획물의 유리 아미노산 조성을 비교하여 실었다. 유리 아미노산은 어떤 물질이 원래 상태에서 기능성을 나타내는 척도가 될 수 있기에 기능성이 강조되는 식품 및 의약 단백질과 같은 분야에서 중요하게 작용될 수 있다. 때문에 인지 기능향상의 기능성 측면에서 볼 때 중요한 인자로 작용할 수 있다. 유리아미노산을 제외한 다른 부분을 유추함으로써 유효기능성을 연관하고 유추할 수 있기 때문이다.

표 1에 나와 있는 것과 같이 대조로 사용한 염산 가수

**Table 1.** Free amino acid compositions of fractionated of *B. mori* silk fibroin by preparative recycling HPLC

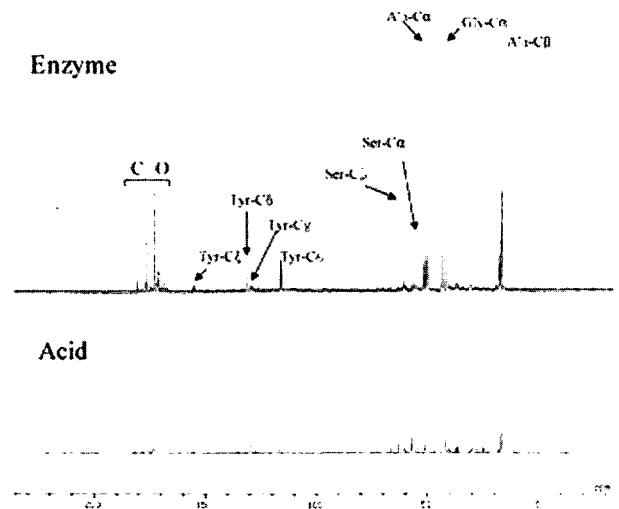
Amino acid	Acid	Fraction-1 (LF)	Fraction-2 (MF)	Fraction-3 (HF)
Asp	1.00	5.26	1.02	0.74
Ser	11.71	16.95	11.35	4.91
Glu	1.12	4.84	0.88	0.44
Gly	42.73	31.84	32.00	19.49
Ala	29.80	18.58	17.50	10.44
Cys	-	0.00	0.00	7.50
Tyr	4.10	2.65	18.26	14.45
Phe	-	1.40	3.74	20.82

분해물의 유리아미노산 조성과 효소 가수분해분획물의 유리 아미노산 조성은 많은 차이가 있음을 알 수 있다. 특히 실크 피브로인에서 주성분으로 알려지고 있는 Gly, Ala, Ser 및 활성의 기능을 나타내는 Cys, Tyr 및 Phe의 조성에 현격한 차이가 있음을 알 수 있으며 곧 기능성과 연관이 되어질 수 있음을 의미한다. 즉, Table 1의 유리아미노산 조성에서 볼 경우 Fraction-1(LF)의 경우는 대조의 염산 가수분해 성분과 어느 정도 비슷하며, Fraction-2(MF) 및 Fraction-3(HF)의 경우는 활성기로 작용할 수 있는 아미노산이 다량으로 함유함을 알 수 있다. 특히 MF의 경우는 Tyr이 18.26 mol%(LF의 거의 9배) 및 Phe의 경우는 20.82mol%(LF의 20배)의 차이를 보이고 있다.

### 3. Nuclear Magnetic Resonance (NMR)분석

그림 2에 핵자기공명장치(NMR)를 이용한 산 및 효소 가수분해물의 <sup>13</sup>C-NMR 피크를 실었다. 단백질의 구조 분석에 있어서 NMR 기술은 가장 강력한 분석수단으로 활용되고 있으며, NMR의 이론에 근거한 언어진 각각의 피크는 구조적 차이를 반영한다 할 수 있다(Asakura, 1991). 위 절에서도 언급한 바와 같이 본 연구에서 얻고자 하는 분자량이 다른 성분의 보다 확실한 증거가 될 수 있다.

그림 2의 위 피크(A)가 효소로 가수분해하여 얻어진 <sup>13</sup>C-NMR피크이고 아래에 있는 피크는 산으로 가수분해한 피크이다. 때문에 분자량이 차이가 나고 당연히 구조적 차이에 의한 피크의 차이를 반영하고 있다. 그림 2-(A)에 각 피크에 해당되는 부분을 분석하여 표시하였다. 전형적인 실크피브로인의 <sup>13</sup>C-NMR 피크와 일치하고 있으며, 이것은 Asakura(1993)가 보고한 피크와도 아주 잘 일치하고 있다. 여기에 비해 그림 2(B)의 저분자화 된 실



**Fig. 2.** <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum pattern of enzymatic (A) and hydrochloric acid (B) hydrolysate.

크 피브로인의 피크는 상대적으로 단순하게, 해당되는  $^{13}\text{C}$  만을 반영하고 있어 비교적 단순로운 피크를 나타내고 있다. 두 피크를 비교해 볼 때 크게 Gly. Ala. 부분의 피크의 차이는 물론, 특히 170~180 ppm에서 관측되어지는 Tyr.의 Carbonyl (C=O) 피크 부분을 보면 이러한 구조적인 차이를 확실히 알 수 있다. 특히, NMR 이론에 의하면 입체구조 차이는 관측하고자 하는 핵(본 연구의 경우는 Carbon) 주위의 환경을 반영하는 결과가 되므로 그림 2에서 보여지는 피크의 차이는 구조적 차이에서 온다고 할 수 있다.

#### 4. *in vitro*에 의한 분자량별 피브로인의 세포 보호 활성 효과

우선 분자량이 다른 분획 물질의 활성을 알아보기 위하여 PC12 세포배양에 의한 활성을 알아보았다. 그림 3에 비교 그림을 실었다. 대조는 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ )에 의한 세포 독성을 유발군으로 삼았다. 정상 세포를 100으로 하고  $\text{H}_2\text{O}_2$ 에 의한 세포 독성을 0으로 환산하였을 때의 세포 보호 활성 효과를 나타내고 있다.

그림3에 나와 있는 것과 같이 세포독성을 유발한 유발군에 비해 분자량이 다른 분획물의 경우, 차이가 있음을 나타내고 있다. 그림에서 나타난 것 같이 분자량이 500미만(LF)의 경우 무려 23.6%의 세포가 살아날 수 있음을 나타내고 있다. 반면 분자량 500-1000(MF) 범위의 경우는 17.3%와 분자량 1000-1500이상의 경우(HF)는 6.9%의 세포 보호 효과가 있음을 나타내고 있다. 이것은 분명히 분자량에 따른 활성을 기대할 수 있음을 의미하며 우리가 원하는 순수분리에 의한 단일물질의 수준까지 갔을 때 활

성을 나타낼 수 있음을 의미한다 할 수 있다.

#### 5. *in vivo*에 의한 분자량별 피브로인의 동물 인지 기능 향상 효과

이러한 분자량의 차이에 의한 효과를 알아보기 위하여 대조군(scopolamine)에 의한 동물의 인지 기능 향상 효과를 알아보았다. 대조약물인 scopolamine을 투여하게 되면 순간적으로 대뇌의 신경이 차단되어 인지 기능을 나타낼 수 없게 된다. 여기에 분획 실크 분획물을 투여하였을 경우, 그 효과를 그림 4에 실었다.

대뇌에 신경전달이 안되어 인지기능에 이상을 주었을 때는 마치 뇌경색과 같은 효과를 나타내어 인지 기능에 이상이 오게 된다. 여기에 분획 분자량을 먹일 경우 그 회복 효과를 알 수 있는데 8방 미로찾기의 경우, 그 효과를 알 수 있다. 만약 어떠한 약물에 의해 회복 효과를 갖는다면 그곳을 기억하게 되어 그 구멍으로는 나오지 않게 된다. 이것으로 동물에 의한 인지기능향상 효과의 척도로 삼았다. 그림에 나와 있는 것처럼 유발군에 비해 분자량이 500-1000내외(MF)의 경우 무려 50%의 기억력 회복효과를 나타내었다. 뿐만 아니라 분자량 500이하(LF)의 저분자의 경우도 25.9%의 기억력 회복효과를 나타내었다. 반면 수행한 샘플 중 고분자량이라 생각되어지는 분자량 1000-1500(HF)의 경우, 7.9%의 기억력 회복효과를 나타내어 각 분자량에 의한 확실한 활성을 나타내었다. 제 4절의 *in vitro* 세포에 의한 결과는 분자량이 제일 저분자량이 세포활성이 있었으나 직접 *in vitro*동물에 실험에 있어서는 중간정도(MF)의 분자량이 효과가 있었다. 정확히 어느 정도의 분

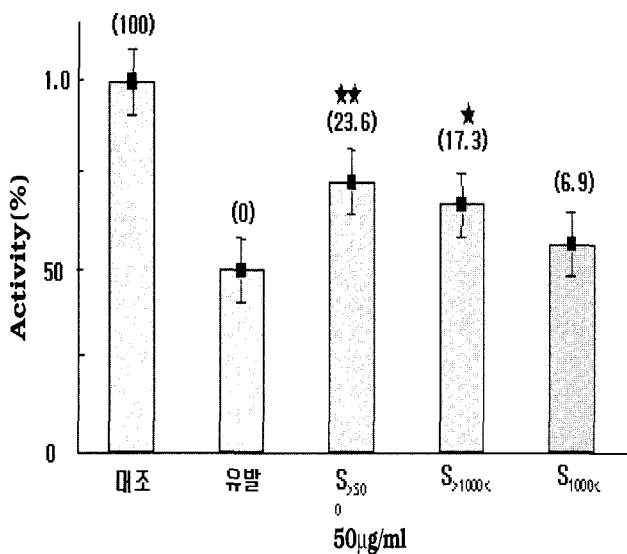


Fig. 3. The protective effect of silk fibroin fractions on PC12 cell death induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

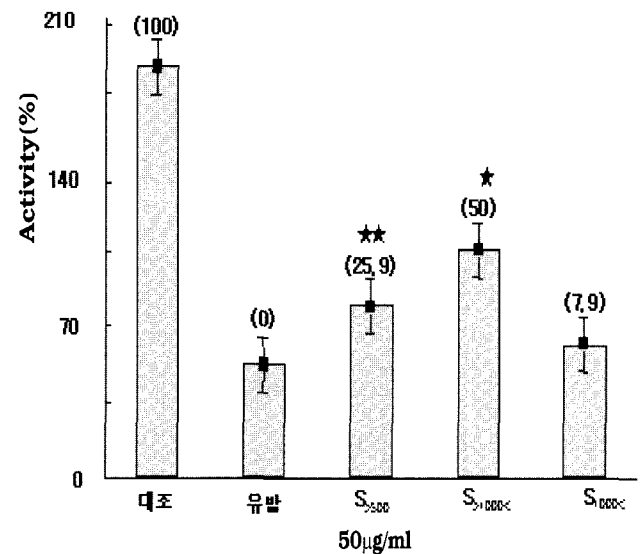


Fig. 4. The effect of silk fibroin fractions on the cognitive ability enhancement of rat treated with scopolamine.

자랑대에서 활성이 있는지에 대해서는 현재 연구가 진행 중에 있으며, 금후 단일물질에 의한 실험의 결과와 그 물질의 구조를 파악할 경우 기능성과 구조의 상관관계를 밝힐 수 있는 중요한 연구결과를 기대할 수 있을 것으로 기대한다.

### 적 요

견 피브로인 가수분해물의 몇 가지 특성과 *in vitro* 및 *in vivo*에 의한 동물 인지 기능 향상효과를 알아본 결과, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

- 1) 효소 가수분해 실크 피브로인 펩타이드의 분획에 있어 3가지의 분자량이 다른 분획을 제조할 수 있었다.
- 2) 분획 별 실크 피브로인 펩타이드의 유리 아미노산 조성은 분획간의 유의차가 나타났으며, 분획 2 및 3의 경우 활성부분을 가진 Cys, Tyr 및 Phe부분이 상당한 양을 차지하였다.
- 3) 대표적으로 산 및 효소 가수분해물의 핵자기공명(NMR)법에 의한 구조적 차이는 산으로 가수분해한 저분자와 그렇지 않은 샘플 간에는 확실한 구조적 차이에 기인한 상이한 스펙트럼을 관측할 수 있었다.
- 4) 분자량 별 실크 피브로인의 인지기능 향상 효과를 세포배양(*in vitro*) 및 동물투여(*in vivo*)에 의해 알아본 결과, 세포배양에 의한 활성 효과는 분자량에 따라 다소 차이가 나타났으며, 그 중 분자량 500미만의 샘플군(LF)이 대조인 유발군에 비해 23.5%의 세포보호 효과가 있었다. 또한 동물(*in vivo*)에 의한 인지기능 향상 효과에 있어서는 보다 확실한 차이가 나타났는데, 그 중 분자량 500-1000정도의 분자량 범위의 분획물질을 10 mg/kg을 투여하였을 경우, 대조군(scopolamine)에 비하여 최고 50%까지 기억회복 효과를 나타내었다.

### 사 사

본 연구는 바이오그린 21연구과제의 연구비 지원에 의해 일부 수행되었으며 관계자 여러분들께 감사드립니다.

### 인용문헌

Asakura T., M. Demura, M. Nagashima, R. Sakaguchi, M. Osanai and K. Ogawa (1991) Metabolic flux and incorporation of [<sup>13</sup>C] glycine into silk fibroin studied by <sup>13</sup>C NMR *in vivo* and *in vitro*, *Insec. Biochem.*, **21**(7): 743~748.

Asakura T., H. Suzuki and Y. Watanabe (1983) Conformational Characterisation of Silk Fibroin in Intact Bombyx mori and Philosamia cynthia ricini Silkuorms by <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy, *Macromoleculus*, **16**(6): 1024~1026.

Bartolini M., C. Bertucci, V. Cavrini and V. Andrisano (1997)  $\beta$ -Amyloid aggregation induced by human acetylcholinesterase : inhibition studies, *Biochem. Pharm. Bull.*, **65**: 407~416.

동아일보, 난치병인가 “치매” 불치병인가 (2000. 8. 23)

Lee, M. W., S. C. Park, H. S. Chae, J. H. Bach, H. J. Lee, S. H. Lee, Y. K. Kang, K. Y. Kim, W. B. Lee and S. S. Kim(2001) The Protective Role of HSP90 against 3-Hydroxykynurenine-induced Neuronal Apoptosis, *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **284**, 261~267.

Moechars, D. (1999) Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain, *J. Biol. Chem.*, **274**: 6483~6492.

Morris, R.G.M., P. Garrud, J. N. P. Rawlins, and J. O'keefe. (1982) place navigation impaired in rats with hippocampal lesions, *Nature*, **297**: 681~683.

Selkoe, D. J. (1991) Amyloid Protein and Alzheimer's Disease, *Sci. Amer.*, Nov: 40~47.

Yeo, J. H, K. W. Lee, H. C. Kim, Y. L. Oh, A. J. Kim and S. Y. Kim (2000) The Effects of PVA/Chitosan/Fibroin(PCF)-Blended Spongy Sheets on Wound Healing in Rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **23**: 1220~1223.

여주홍, 이광길, 이용우, 남진, 김선여 (1999) 용해조건에 따른 견 단백질의 조성 변화, *Anal. Sci. & Tech.*, **12**(4): 306~311.