

비만 억제를 위한 췌장 리파아제 도메인에 대한 특이 난황항체의 개발

우승은 · 권진혁 · 양시용 · 박현주¹ · 김형권^{1,*}
(주)단바이오텍 생명과학연구소, ¹가톨릭대학교 생명공학전공

Development of Egg Yolk Antibody Specific to the Pancreatic Lipase Domain for Anti-Obesity. Woo, Seung Eun, Jin Hyuk Kwon, Si Yong Yang, Hyun Ju Park¹, and Hyung Kwoun Kim^{1,*}. *Life Sciences Research Center, DAN Biotech, Cheonan 330-834, Korea, ¹Department of Biotechnology, the Catholic University of Korea, Bucheon 420-743, Korea* – Human pancreatic lipase is a digestive enzyme which is synthesized in pancreas, secreted into small intestine, and there hydrolyze the fat in food. Pancreatic lipase protein composes of catalytic domain and colipase-binding domain. In this research, the gene segments corresponding to total protein, catalytic domain, and colipase-binding domain were cloned by PCR method, inserted into an expression vector, and then used to transform *Escherichia coli* BL21 (DE3). The recombinant proteins produced were purified and injected intramuscularly three times into laying hens. The egg yolk antibodies (IgY) were obtained from the egg yolks and tested for their antibody titer. Among three IgY, the IgY against colipase-binding domain showed the highest antibody titer. All three IgY had inhibitory effects on the porcine pancreatic lipase. Among them, the IgY against colipase-binding domain showed the highest inhibition effects. The fat diet with corn oil and IgY was administrated to the experimental rats and their blood compositions were examined with time course. The triglyceride concentration of treated rats was decrease meaningfully when compared with those of control rats. This suggested that the IgY against colipase-binding domain antigen inhibited pancreatic lipase *in vivo*.

Key words: Egg yolk antibody, pancreatic lipase, colipase-binding domain, lipase inhibition, obesity

서 론

비만이란 지방조직에서 지방의 합성량이 분해량 보다 많아서 지방세포의 수가 증가하거나 지방세포의 크기가 증대에 따라 나타나는 체지방 과잉 축적상태를 말한다[25]. 비만은 열량 섭취, 내분비 장애, 운동부족, 유전적인 요인 등이 있지만 그 중에서 과잉 에너지 축적이 가장 직접적으로 관계되며, 비만 환자의 약 95%는 다른 특별한 원인 없이 섭취하는 에너지에 비해 소비 에너지가 적을 때 초래되는 단순성 비만에 속한다[9]. 또한 비만으로 인해 당뇨병, 고혈압, 심혈관 관련 질환 및 무리한 체중에 의한 관절 질환, 폐 질환 및 암 등의 합병증을 유발하게 한다[17, 19]. 이렇듯 생활 습관병의 한 위험인자로 여겨지던 비만이 이제는 독립된 질병으로 인식되는 단계이며, 세계적으로 비만에 대한 관심이 크게 높아지고 있는 가운데 시장확대에 따른 신약개발 경쟁이 본격화되고 있다.

에너지 소비와 섭취의 불균형으로 발생하는 비만은 정도에 따라 운동요법, 저칼로리 식이요법 등과 함께 약물요법

을 적용하는데 이중 약물요법은 음식섭취를 감소시키거나 영양의 흡수 및 대사를 변화시키고 에너지 소비를 증가시키는 방향으로 이루어져 왔다[16]. 현재 FDA 승인을 받은 비만 치료의 대표적인 약물인 sibutramine과 orlistat의 경우, 체질량지수(body mass index, BMI) 30 kg/m² 이상 또는 다른 위험인자(고혈압, 당뇨, 이상지방혈증)가 있는 체질량지수 27 kg/m² 이상의 비만환자에게 적용하는 것으로, 일반적인 과체중을 포함한 비만 위험이 예상되는 사람들이 이용하기 어렵다[8, 10, 18]. 따라서 안전성과 기능성이 인정되는 천연물질의 개발이 요구되고 있다. 대표적인 천연물 소재로 녹차 카테킨(catechin), 포도씨 추출물(grape seed extract), 검정콩, 홍삼 등을 들 수 있으며 주로 지방분해효소인 리파아제 활성 억제에 초점을 두고 있다[24].

췌장 리파아제는 지방의 물질대사에 관여하는 효소로, 지방의 소화를 진행하고 장내 상피세포가 분해산물을 흡수하도록 돕는다[12, 13, 15, 20, 23]. 이와 같이 지방은 췌장 리파아제에 의해 분해되어 흡수되기 때문에 리파아제 효소의 활성을 저해할 경우 혈중의 지방흡수를 저하시킬 수 있다. 리파아제가 없을 시, 트리글리세라이드(지방)는 흡수되지 않고 대변으로 나오게 된다. 그 결과 체액 상실, 발육 부진, 체중 감소, 지용성 비타민 부족의 현상을 초래한다[13, 23]. 췌장 리파아제가 선천적으로 없는 환자의 경우 지방의 50~60%

*Corresponding author

Tel: 82-2-2164-4890, Fax: 82-2-2164-4865

E-mail: hkkim@catholic.ac.kr

는 흡수되지 못한다.

난황항체(Immunoglobulin of egg yolk, IgY)란 난황 내에 존재하는 면역글로블린(IgG)이다. 태반과 모유가 없는 난생동물은 모체가 획득한 항체를 난황에 축적하여 면역물질을 자손에게 전달한다. 또한 면역된 산란계에 형성된 항체는 난황에 효과적으로 전달된다. 이러한 특징을 이용하여 난황으로부터 특이항체(specific antibody)를 얻을 수 있다[21]. 난황 중에 존재하는 IgY는 포유류의 IgG 계열의 수용성 면역 단백질로서 순수 연구 분야에서 진단분야까지 폭넓게 이용되며, 수동면역 및 질병 억제 목적뿐만 아니라, 화장품과 식품공업에도 응용되고 있다[5].

따라서 본 연구는 사람 췌장 리파아제의 특정 도메인구조에 대한 특이 난황항체를 생산하여, 생체외(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*)에서 리파아제 활성 억제 효과를 검증하고 비만억제제로의 개발 가능성을 조사하고자 실험하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 배양조건

한국생명공학연구원으로부터 사람 췌장리파아제 유전자(6-1-A-D04, pINCY)를 구입하였다. *Escherichia coli* BL21(DE3)를 재조합 단백질 발현의 숙주로, *Escherichia coli* XL1 Blue를 재조합 플라스미드의 보관 숙주로 사용하였고, pGEM T 벡터와 pET-22 벡터를 클로닝 벡터와 발현 벡터로 각각 사용하였다. 형질전환 *E. coli* BL21(DE3)는 Luria-Bertani 배지(10 g/L 트립톤, 5 g/L 효모추출물, 5 g/L 염화나트륨)에서 암피실린 100 µg/mL을 첨가한 후, 18°C에서 배양하였다. 재조합 단백질의 발현을 유도하기 위해서 배지에 이소프로필-β-D-치오갈락토피라노사이드(thiogalactopyranoside isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, IPTG)를 최종농도가 1 mM이 되도록 첨가하였다.

발현 플라스미드 구축

사람 췌장리파아제 유전자(6-1-A-D04, pINCY)를 주형 DNA로 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용한 프라이머는 다음과 같다. 전체 리파아제 단백질을 생산하기 위해서 Total-lipase F(F1, 5'-TAGACATATGCTGCCACTTTGGACT-3')와 Total-lipase R(R1, 5'-TACAAGCTTACACGGTGTG-AGGGTGAG-3')을 사용하였으며, 촉매활성도메인을 생산하기 위해서 Catalytic-domain F(F1, 5'-AGACATATGCTGCCACTTTGGACT-3')와 Catalytic-domain R(R2, 5'-GCCAAGCTTTGCAAATTACTGGCATC-3')를 사용하였다. 코리파아제 결합도메인을 생산하기 위해서 Colipase-binding-domain F(F2, 5'-CTCCATATGCGTTGGAGGTATAAGGTA-3')와 Colipase-binding-domain R(R1, 5'-TACAAGCTTACACGGTGTGAGGGTGAG-3')을 사용하였다.

PCR 반응조건은 다음과 같다. 초기 DNA변성을 95°C에

서 5분간 수행하고 변성(95°C, 1분), 냉각(41°C, 1분), 합성반응(72°C, 1분)을 30회 반복하였다. 마지막으로 72°C에서 10분간 합성반응을 수행하였다. 전기영동을 통해서 PCR 반응을 통해 합성된 3가지 DNA를 크기에 따라 분리하고 AxyPrep DNA gel extraction kit(Axygen Scientific, Inc., Union City, CA)를 사용하여 3가지 DNA를 젤로부터 각각 추출하였다. pGEM T 벡터를 사용하여 3가지 DNA를 각각 클로닝한 후, *Nde*I과 *Hind*III 제한효소로 처리하여 pET22b의 T7 프로모터 후위에 서브클로닝하였다.

재조합 단백질의 발현

제조된 3종류의 재조합 플라스미드를 각각 *E. coli* BL21(DE3) 균에 형질전환 시킨 후 200 mL배지에 접종하여 18°C에서 배양하였다. 흡광도(600 nm)가 0.5로 증가될 때까지 진탕배양기(230 rpm)에서 배양한 후, IPTG를 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가하고, 20시간 동안 발현유도배양을 수행하였다. 배양액을 원심분리(5,000×g, 10분)하여 균체를 모은 후, 인산완충액(10 mM, pH 7.5) 5 mL로 현탁하였다. 현탁된 균체를 초음파분해법을 통해 파쇄한 후, 원심분리(10,000×g, 10분)를 통해 세포추출액과 침전물을 각각 얻었다. 침전물은 동일 부피(5 mL)의 증류수에 현탁하여 사용하였다.

재조합 단백질의 정제 및 분석

재조합 단백질의 C-말단에 연결된 His-tag를 이용하여 효소 정제를 수행하였다. Ni-NTA 컬럼(QIAGEN Inc., Valencia, CA)를 50 mM 이미다졸(imidazole)이 포함된 염화나트륨(300 mM NaCl), 인산나트륨(50 mM, pH 8.0, NaH₂PO₄) 완충용액으로 평형화한 후, 세포추출액을 주입하고 동일용액으로 씻어준다. 이후에 200 mM 이미다졸이 포함된 용액을 사용하여 컬럼에 결합되어 있는 재조합 단백질을 용출한다.

단백질 농도는 소 혈청알부민을 표준단백질로 사용하여 Bradford protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 측정하였다.

SDS-PAGE 전기영동은 12%의 아크릴아미드 겔과 트리스-글리신 용액(Tris-glycine buffer, 1.5 M, pH 8.8)을 사용하여 수행하였다. 세포추출액과 침전물현탁액을 각각 20 µL씩 사용하여 전기영동을 수행하였고 염색시약은 Coomassie Brilliant Blue를 사용하였다.

산란계 면역

난황항체를 생산하기 위해 28주령의 ISA-brown계통 산란계에 면역을 실시하였다. 대장균에서 생산된 리파아제 전체 단백질, 촉매활성도메인, 코리파아제 결합도메인을 각각 100 µg/mL 농도가 되도록 PBS(phosphate buffered saline)로 희석한 후, Freund's complete adjuvant(Sigma-aldrich Inc. St. Louis, MO)와 동량으로 혼합/유화하여 면역원을 제조하

였다. 유화액 1 mL을 산란계의 흉근에 0.25 mL씩 4곳에 근육주사 하였으며, 추가접종은 1차 접종 후, 2주 간격으로 Freund's incomplete adjuvant(Sigma-aldrich Inc. St. Louis, MO)로 유화하여 1차 접종과 동일한 방법으로 총 2회 실시하였다. 3차 면역 후, 산란계의 의하정맥에서 채혈을 실시하여 혈청을 분리하였으며, 면역란은 매일 채란하여 8°C 저온실에 저장하였다.

난황항체 분리

면역한 산란계로부터 채란한 알로부터 수용성 난황항체(water soluble IgY fraction, WSF)를 분리하였다[7]. 면역란의 난황을 분리하여 증류수로 10배 희석하여 pH 5.0으로 조절한 다음 -20°C에서 동결 및 실온에서 해동시킨 후, 4°C에서 30분간 원심분리(10,000×g) 하여 상층액을 회수하여 여과 및 동결건조하였다.

면역원성 시험 및 난황항체가 확인

제조항 단백질원들을 면역하여 얻은 수용성 난황항체 분말에 대한 면역원성과 항체가를 측정하기 위해 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)를 실시하였다. MicrotestIII flexible assay plate(Falcon 3911, BD Biosciences)에 세 종류의 항원들과 각종 미생물의 항원(*Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *E. coli* K88, recombinant human rotavirus)을 탄산염-중탄산염 용액(carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6)으로 5 µg/mL이 되도록 희석한 후, 각각 100 µL씩 분주하여 4°C에서 18시간 동안 코팅하였다. PBST 용액(0.02 M NaH₂PO₄, 0.13 M NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.2)으로 세척한 후, 3% BSA 용액(bovine serum albumin, PBS, pH 7.3)을 각각 175 µL씩 분주하여 25°C에서 2시간 동안 블로킹하였다. 3% BSA/PBS 용액과 세척용액을 동량으로 섞은 희석용액을 이용하여 비면역 난황항체와 상기에서 획득한 수용성 난황항체를 단계별로 희석하여 각각 분주한 후, 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 2차 항체로는 alkaline phosphatase conjugated rabbit anti-chicken IgG를 5,000배 희석하여 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 각 반응 종료 시, 세척용액으로 플레이트를 5회 세척하였다. 기질용액으로는 p-니트로페닐인산(p-nitrophenyl phosphate)를 녹인 0.5 mM 염화마그네슘이 포함된 10% 디에틸아민(pH 9.8)용액을 사용하여 37°C에서 20분 동안 반응을 수행하였다. 5 M 수산화나트륨을 사용하여 반응을 정지시킨 후, ELISA reader(EL-800, BIO-TEK Instrument Inc.)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

리파아제 활성 저해 시험

생산된 난황항체에 의한 리파아제의 활성 저해 효과를 알아보기 위해 합성기질인 p-nitrophenyl caproate(pNPC, C₆)을 이용한 리파아제의 활성을 측정하였다. 음성 대조군으로

비면역 수용성 난황항체와 돼지 췌장 리파아제에 대한 수용성 난황항체를 사용하였다. 0.5 mg/mL 농도로 희석한 각 난황항체와 3 U/mL의 돼지췌장 리파아제(Sigma-aldrich Inc. St. Louis, MO)를 동량 혼합한 후, 37°C에서 1시간 반응하여 반응액으로 사용하였다. 합성기질을 사용한 효소의 활성 측정을 다음과 같이 수행하였다. 기질 혼합액은 10 mM pNPC와 에탄올 및 50 mM 트리스-염산 용액(Tris-HCl, pH 8.0)을 10:40:950의 부피 비율로 섞어 총 1 mL을 사용하였다. 이 혼합액에 반응액 5 µL를 혼합하여 35°C에서 3분간 반응시키고 효소반응에 의해서 생성된 p-니트로페놀의 양을 분광광도계로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 측정된 흡광도 값은 p-니트로페놀의 양과 시간으로 환산하여 U/mL로 단위 환산하였다.

임상시험

임상시험을 실시하기 위해 7 주령의 수컷 Sprague-Dawley (SD) rat 14마리를 공시하여 임상시험을 실시하였다. 케이지에 개체별로 분리하여 사육하였다. 리파아제 저해 활성 시험결과에 따라 선별된 코리파아제 결합도메인에 대한 수용성 난황항체(처리군)와 비면역 수용성 난황항체(대조군)를 0.5%(w/v) 농도가 되도록 콘오일, 콜레스테롤올레산염, 콜산(cholic acid)에 용해시켜 지방용액을 제조하여 1 mL씩 경구

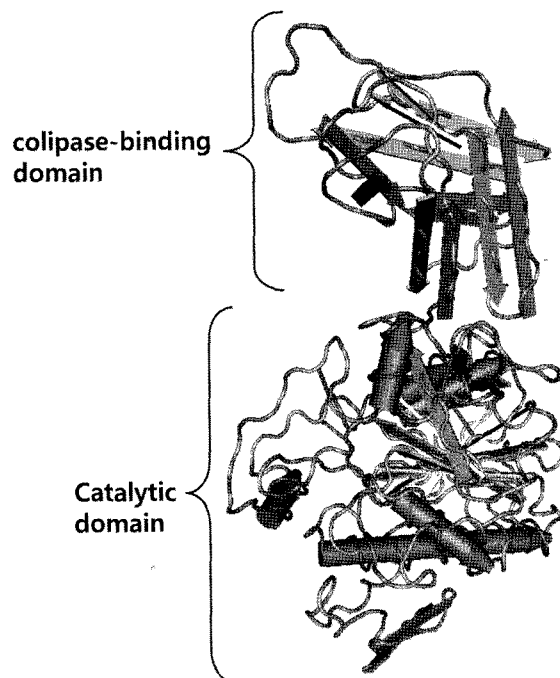


Fig. 1. Three-dimensional structure of human pancreatic lipase. The schematic protein structure was redrawn based on the original crystal structure of human pancreatic lipase (PDB ID: 1N8S) [24] using Cn3D program. N-terminal catalytic domain has a typical α/β hydrolase fold and C-terminal colipase-binding domain contains a double β -sheet fold. α -Helices and β -strands are represented as cylinders and broad arrows, respectively.

투여하였다. 경구 투여 후, 2시간 간격으로 안와정맥에서 채혈을 실시하여 혈청 분리 후, 중성지방산, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤을 측정하여 지방의 장관 흡수 억제효과를 측정하였다.

결과 및 고찰

사람 췌장 리파아제 도메인 유전자 클로닝

사람의 췌장 리파아제 효소는 음식물속에 포함된 지방의 가수분해를 수행하는 촉매활성 도메인과 담즙산염(bile salt)의 저해작용을 억제하는 코리파아제(colipase) 결합도메인으로 구성되어 있음이 보고되었다(Fig. 1)[1-4, 6, 11, 22]. 본 연구에서는 췌장 리파아제에 대한 항체 생산용 항원단백질로써 전체 리파아제 단백질뿐만 아니라 촉매활성 도메인과 코리파아제 결합도메인을 사용하기로 결정하였다.

사람의 췌장 리파아제 유전자의 염기서열을 조사 분석한

결과[14], 전체 유전자는 1398개의 뉴클레오티드로 구성되어 있으며, 전반부 1059개의 뉴클레오티드가 촉매활성도메인을 코딩하고 후반부 336개의 뉴클레오티드가 코리파아제 결합도메인을 코딩하는 것으로 밝혀졌다(Fig. 2). 본 연구에서는 사람 췌장 리파아제 유전자와 재료 및 방법에 기술한 3가지 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써, 각각 1395, 1059, 336개의 뉴클레오티드로 구성된 DNA 조각을 제조하였다. 제조된 DNA 조각을 각각 pGEM T 벡터에 먼저 클로닝하고 이후에 발현벡터인 pET22 벡터에 서브클로닝하였다.

사람 췌장 리파아제 도메인 단백질의 생산과 분리

앞서 제조된 3가지 재조합 플라스미드를 사용하여 *E. coli* BL21 (DE3)를 형질전환하고 18°C에서 배양하면서 IPTG를 사용하여 재조합단백질의 발현을 유도하였다. SDS-PAGE를 통해서 세포 내 단백질의 양상을 분석한 결과, 리파아제 전

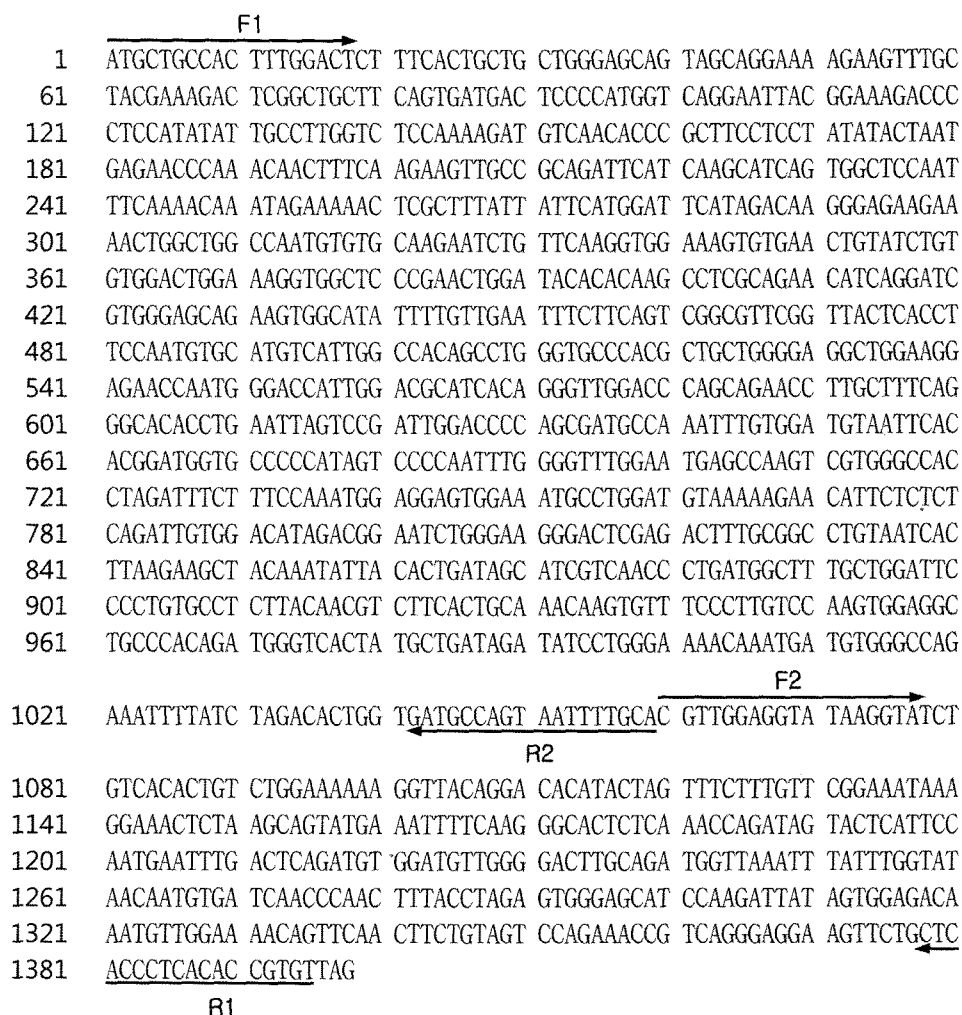


Fig. 2. Nucleotide sequence of human pancreatic lipase gene. The nucleotide sequence (1,398 bases) encoding human pancreatic lipase gene (GenBank ID, NM_000936) is presented. Primer F1 and R1 indicate total lipase forward and reverse primers, respectively. Primer F2 indicate colipase-binding domain forward primer and primer R2 indicate catalytic domain reverse primer.

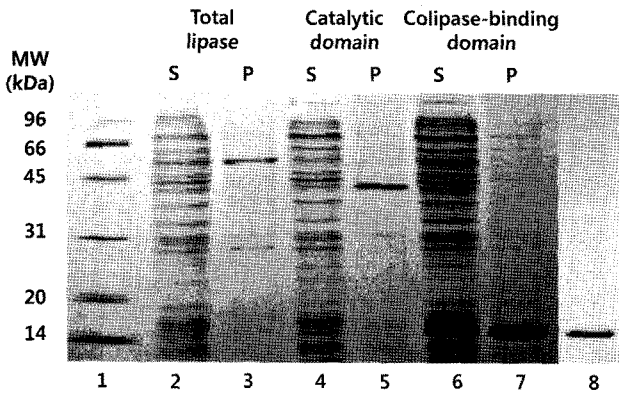


Fig. 3. SDS-PAGE analysis of total lipase, catalytic domain, and colipase-binding domain. Lane 1 indicates molecular mass standard. Lane 2 and 3 indicate soluble and insoluble fraction of *E. coli* cells containing total lipase gene. Lane 4 and 5 indicate those of *E. coli* cells containing catalytic domain gene. Lane 6 and 7 indicate those of *E. coli* cells containing colipase-binding domain gene. Lane 8 indicates the purified colipase-binding domain. S, soluble fraction; P, insoluble fraction.

체단백질(약 51.2 kDa), 촉매활성도메인(약 38.8 kDa), 코리파아제 결합도메인(약 12.3 kDa)에 해당되는 재조합 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 3가지 재조합단백질은 수용성 분획(S)과 불용성분획(P)에서 모두 관찰되었으며, 특히, 코리파아제 결합도메인이 다른 2가지 단백질에 비해서 대량으로 생산된 것을 확인하였다.

대량 생산된 코리파아제 결합도메인의 경우, Ni-NTA 컬럼을 이용하여 수용성분획으로부터 순수하게 분리할 수 있었다(Fig. 3). 리파아제 전체단백질과 촉매활성도메인의 경우에는 불용성 분획의 단백질을 정량한 후에 항원단백질로 직접 사용하였다.

Table 1. Specificity of antibodies immunized with recombinant protein.

Adhesive antigen	Egg yolk antibody against			
	Normal	H	A	C
H	-	+++	++	++
A	-	++	+++	+
C	-	++	+	+++
ST	-	-	-	-
HP	-	-	-	-
K88	-	-	-	-
rRota	-	-	-	-

Egg yolk antibodies were diluted to 1:50,000 ~ 1:1,000,000. Normal, non-immunized egg yolk antibody; H, IgY against recombinant total lipase; A, IgY against recombinant catalytic domain; C, IgY against recombinant colipase-binding domain; ST, *Salmonella typhimurium*; HP, *Helicobacter pylori*; K88, *E. coli* K88; rRota, recombinant human rotavirus protein. Range of titer: -, below 50,000; +, 100,000 ~ 500,000; ++, 500,000 ~ 1,000,000; +++, over 1,000,000.

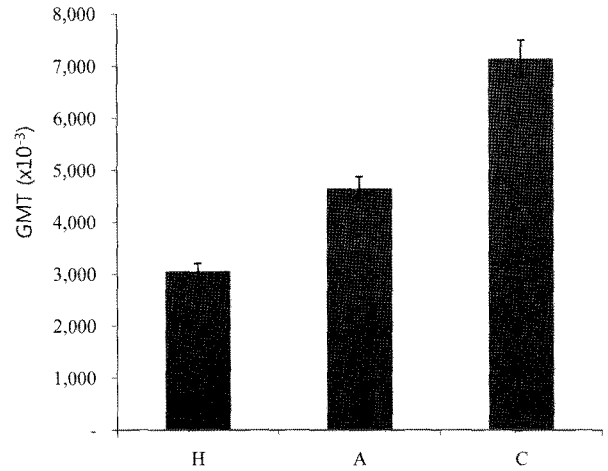


Fig. 4. Antibody response in the egg yolk (water soluble fraction) powder of chicken intramuscularly immunized with recombinant protein. H, IgY against recombinant total lipase; A, IgY against recombinant catalytic domain; C, IgY against recombinant colipase-binding domain. Chicken were immunized with different protein on Day 0, Day 14, and Day 28. Chicken egg yolk were gathered 28 days after the last injection and tested for the presence of recombinant protein-specific IgY. Results are represented as the geometric mean titer (GMT).

난황항체 생산

지방분해 효소인 리파아제에 대한 리파아제 전체단백질, 촉매활성도메인, 코리파아제 결합도메인을 면역원으로 사용하여 생산된 수용성 난황분말(WSF)의 항체를 측정하고자 하였다. 항체의 특이성을 조사하기 위해 준비된 세 종류의 항원 및 각종 미생물의 항원(*Salmonella typhimurium*, *Helicobacter pylori*, *E. coli* K88, recombinant human rotavirus)을 코팅한 후 상기에서 획득한 각 수용성 난황항체와 비면역 난황항체에 대한 ELISA를 실시하였다(Table 1). 비면역 항체의 경우에는 사용한 모든 항원단백질에 대해 항원-항체 반응을 나타내지 않았으며(GMT 50,000 이하), 세가지 수용성 난황항체도 각종 미생물 항원에 대해서 반응을 보이지 않았다(GMT 50,000 이하). 반면에 세가지 난황항체는 면역유도실험에 사용한 3종류의 항원단백질에 대해서 특이적인 항원-항체반응을 나타내었다(GMT 100,000 이상). 이중에서도 그림4에 나타난 것과 같이 코리파아제 결합도메인(C)에 대한 IgY가 코리파아제 결합도메인에 대해서 가장 높은 항체가(7,140,000)를 나타냈다. 반면에 전체단백질(H)과 촉매활성도메인(A)에 대한 IgY는 해당 항원단백질에 대해서 각각 3,000,000과 4,700,000의 항체를 나타내었다. 따라서 동일한 양의 항원을 면역하였을 때 항체 생성율이 가장 높은 코리파아제 결합도메인의 면역원성이 가장 높은 것으로 확인되었다.

리파아제 활성 저해 시험

생산된 난황항체의 리파아제 활성 저해 효과를 알아보기

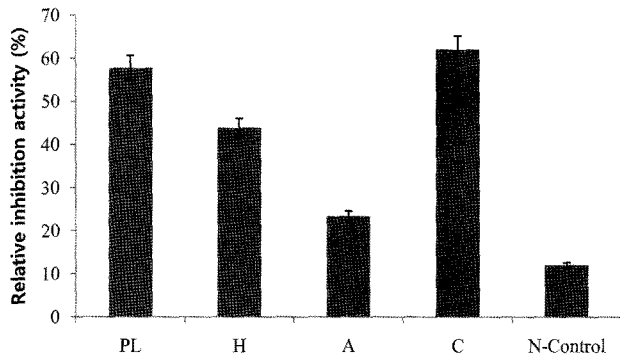


Fig. 5. Inhibition of lipase activity with egg yolk IgY. Porcine pancreatic lipase was incubated with egg yolk IgY and then the residual activity was assayed by pNPC-spectrophotometric method. Vertical axis means relative inhibition activity. 100% value means a complete inhibition and 0% value no inhibition. PL, IgY against porcine lipase; H, IgY against recombinant total lipase; A, IgY against recombinant catalytic domain; C, IgY against recombinant colipase-binding domain; N-control, non-immunized IgY.

위해 리파아제의 pNPC 분해활성을 측정하였다. 리파아제 활성 억제율을 측정된 결과, Fig. 5와 같이 음성 대조군인 비면역 수용성 난황항체는 12%, 양성대조군인 돼지췌장 리파아제에 대한 수용성 난황항체는 58%까지 리파아제 활성을

억제하였다. 반면에 코리파아제 결합도메인과 전체단백질 및 촉매활성도메인에 대한 난황항체는 각각 62%, 44%, 23%까지 리파아제 활성을 억제하였다. 이러한 결과는 양성대조군인 돼지 췌장 리파아제에 대한 수용성 난황항체보다 코리파아제 결합도메인에 대한 수용성 난황항체가 리파아제 활성을 효과적으로 저해함을 보여준다.

임상시험

리파아제 활성을 저해시키는 난황항체가 포함된 지방용액을 경구 투여하여 최종적으로 지방의 장관흡수 억제 효과를 검증하였다. 혈중 중성지방산을 측정된 결과 Fig. 6A와 같이 지방용액 투여 후 중성지방산의 수치는 1시간 후까지 급속히 증가하였으며 그 이후부터는 감소하는 경향을 보였다. 대조군의 경우 4시간 이후부터는 7주령 rat의 일반적인 중성지방산 수치 범위(85.6±18.6)안에서 일정하게 유지되었다. 그러나 처리군의 경우 4시간 이후부터는 대조군에 비해 유의적으로 감소하였다(P<0.005). 혈중 총 콜레스테롤은 7주령 rat의 일반적인 총 콜레스테롤 범위(97.00±7.71)안에서 수치가 변화하였다(Fig. 6B). 처리군은 총 콜레스테롤 변화가 거의 없는 반면 대조군은 경구 투여 2시간 후부터 총 콜레스테롤이 증가하는 경향을 보였다. 또한 혈중 HDL-콜레스테롤은 지방용액 투여 1시간 이후부터 감소하였으며 대조군

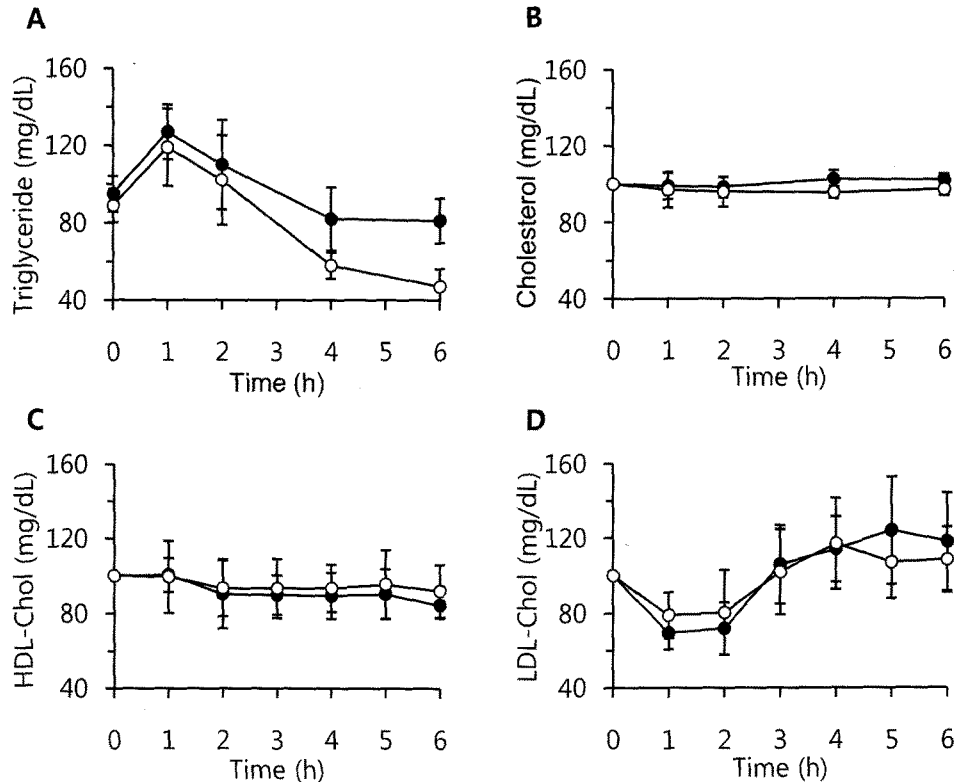


Fig. 6. Developmental changes of triglyceride, cholesterol, HDL, and LDL in serum. Serum components were analyzed with time course after oral administration of fat diet with corn oil and IgY. Closed circles (●) mean oral administration of corn oil mixed with normal IgY. Open circles (○) mean oral administration of corn oil mixed with IgY immunized against recombinant colipase-binding domain.

보다 처리군의 수치가 높은 경향을 나타내었다(Fig. 6C). 혈중 LDL 콜레스테롤은 대조군과 처리군에서 비슷한 양상을 보이며 변화하였다(Fig. 6D).

본 연구에서는 재조합 코리파아제 결합도메인을 항원단백질로 사용하여 면역화시킨 산란계로부터 생산된 난황항체에 해당 항원단백질에 대한 특이적 항체가 포함되어 있으며 생체외(*in vitro*)에서 췌장리파아제의 활성을 저해할 수 있음을 밝힐 수 있었다. 그뿐만 아니라 코리파아제 결합도메인에 대한 난황항체를 먹이와 함께 섭취한 쥐의 혈중 중성지방 수치가 대조군에 비해 상대적으로 감소하는 것으로부터 난황항체가 생체내(*in vivo*)에서도 췌장 리파아제의 활성을 저해하는 것으로 추정할 수 있게 되었다. 이러한 연구결과는 코리파아제 결합도메인을 사용하여 생산된 난황항체가 비만억제제로의 개발가능성이 있음을 보여준다.

요 약

사람 췌장 리파아제는 췌장에서 합성되어 소장으로 분비된 후, 음식물속의 지방을 가수분해하는 소화효소이다. 췌장 리파아제 단백질은 촉매활성도메인과 코리파아제 결합도메인의 2개의 도메인으로 구성되어 있다. 본 연구에서는 리파아제 전체단백질과 촉매활성도메인 및 코리파아제 결합도메인 유전자를 PCR 방법으로 증폭하여 발현벡터에 넣은 후, 대장균에서 발현시켜 얻은 3가지 재조합 단백질을 산란계에 3차례 주사하여 면역반응을 유도하였다. 난황단백질을 분리하여 항체를 측정된 결과, 코리파아제 결합도메인의 항원성이 가장 높은 것으로 밝혀졌다. 또한, 돼지 췌장 리파아제의 활성저해 실험에서도 코리파아제 결합도메인에 의해 만들어진 난황항체가 지방분해활성 저해작용이 가장 큰 것으로 밝혀졌다. 코리파아제 결합도메인 난황항체가 첨가된 지방을 실험동물에게 급여하고 혈중 주요 성분을 분석한 결과, 코리파아제 결합도메인에 의한 난황항체를 섭취한 경우에 혈중 중성지방의 수치가 대조군에 비해서 유의적으로 감소했음을 확인하였다. 결론적으로 코리파아제 결합도메인을 항원단백질로 사용하여 얻은 난황항체가 생체 내에서 췌장 리파아제의 활성을 억제할 수 있으며 비만억제제로의 개발 가능성이 있음을 보여주었다.

REFERENCES

1. Aoublal, M., L. de la Fourniere, I. Douchet, A. Abousalham, C. Daniel, M. Him, Y. Gargouri, R. Verger, and A. De Caro. 1995. Human pancreatic lipase. Importance of the hinge region between the two domains, as revealed by monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* **270**: 3932-3937.
2. Ayvazian, L., I. Crenon, S. Granon, C. Chapus, and B. Kerfelec, 1996. Recombinant C-terminal domain of pancreatic lipase retains full ability to bind colipase. *Protein Eng.* **9**: 707-711.
3. Bezzine, S., F. Ettato, M. G. Ivanova, V. Lopez, R. Verger, and F. Carriere. 1999. Human pancreatic lipase: colipase dependence and interfacial binding of ILid domain mutants. *Biochemistry* **38**: 5499-5510.
4. Carriere, F., K. Thirstrup, S. Hjorth, F. Ferrato, P. F. Nielsen, C. Withers-Martinez, C. Cambillau, E. Boel, L. Thim, and R. Verger. 1997. Pancreatic Lipase Structure-function relationships by domain exchange. *Biochemistry* **36**: 239-248
5. Hatta, H., J. S. Sim, and S. Nakai. 1998. Separation of phospholipids from egg yolk and recovery of water soluble protein. *J. Food. Sci.* **53**: 425-432.
6. Jennens, M. L. and M. E. Lowe. 1995. C-terminal domain of human pancreatic lipase is required for stability and maximal activity but not colipase reactivation. *J. Lipid Res.* **36**: 1029-1036.
7. Kim, J. W., D. K. Kim, and C. Kim. 2000. Production of specific egg yolk antibody against K99 (F5) fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci. Technol.* **42**: 371-378.
8. Kim, M. H. 2004. Updates in treating obesity. *Kor. J. Health Psychol.* **9**: 493-509.
9. Kim, Y. S., 1990. Classification and evaluation of obesity. *Kor. J. Nutrition.* **23**: 337-340.
10. Lee, E. H., Y. J. Lee, O. B. Cho, and S. M. Kang. 2007. Effects of a combined diet of Jerusalem artichoke's Inulin, Lotus leaf and herb extracts in obesity induced white rat with fat diet. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**: 295-303.
11. Lowe, M. E. 1997. Structure and function of pancreatic lipase and colipase. *Annu. Rev. Nutr.* **17**: 141-158.
12. Lowe, M. E. 1997. Molecular mechanisms of rat and human pancreatic triglyceride lipases. *J. Nutr.* **127**: 549-557.
13. Lowe, M. E. 2002. The triglyceride lipases of the pancreas. *J. Lipid Res.* **43**: 2007-2016.
14. Lowe, M. E., J. L. Rosenblum, and A. W. Strauss. 1989. Cloning and characterization of human pancreatic lipase cDNA. *J. Biol. Chem.* **33**: 20042-20048.
15. Moreno D. A., N. Ilic, A. Poulev, D. L. Brasaemle, S. K. Fried and I. Raskin, 2003, Inhibitory effects of grape seed extract on lipases, *Nutrition* **19**: 876-879.
16. Park, H. S. 2001. Pharmacological therapy of obesity, *J. Kor. Soc. Study Obesity*, **10**: 118-127.
17. Prpkins, B. M. and C. M. Doak, 1998, The obesity prevalence is a worldwide phenomenon. *Nut. Rev.* **56**: 104-114.
18. Reddy, P. M. and S. S. Chow, 1998, Focus on orlistat: a non-systemic inhibitor of gastrointestinal lipase for weight reduction in the management of obesity. *Formulary* **33**: 943-959.
19. Shin, M. K. and S. H. Han, 2006, Effects of Lotus (*Nelumbo Nucifera Gaermer*) leaf powder on lipid concentration in rat fed high fat diet rats. *Kor. Food Culture* **21**: 202-208.
20. Sharma, N., V. K. Sharma, and S. Y. Seo, 2005. Screening of some medicinal plants for anti-lipase activity. *J. Ethnopharmacol.* **97**: 453-456.
21. Shimizu, M., R. C. Fritzsimmmons, and S. Nakai. 1998. Anti-*E. coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of

- immunized chickens as a potential food ingredient. *J. Food Sci.* **53**: 1360-1366.
22. Van Tilbeurgh, H., L. Sarda, R. Verger, and C. Cambillau. 1992. Structure of the pancreatic lipase-procolipase complex. *Nature* **359**: 159-162.
23. Whitcomb, D. C. and M. E. Lowe. 2007. Human pancreatic digestive enzymes. *Dig. Dis. Sci.* **52**: 1-17.
24. Yamamoto, M., S. Shimura, Y. Itoh, T. Ohsaka, M. Egawa, and S. Ionue. 2000. Anti-obesity effects of lipase inhibitor CT-II, an extract from edible herbs, Nomame Herba, on rats fed a high-fat diet. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **24**: 758-764.
25. Yoon, Y. S., S. M. Choi, S. B. Hong, J. M. Hong, J. W. Kim, H. S. Lee, and S. G. Hong. 2002. Development of an anti-obesity dietary supplement inhibiting the digestion of carbohydrate and lipid. *Kor. J. Soc. Food cookery Sci.* **18**: 319-324.

(Received Nov. 2, 2008/Accepted Dec. 8, 2008)