

명태(*Theragra chalcogramma*) 껍질 유래 젤라틴 가수분해물의 항 HIV-1 효능

박선주*

부경대학교 화학과

Anti-HIV-1 Activity of Gelatin Hydrolysate Derived from Alaska Pollack *Theragra chalcogramma* Skin

Sun-Joo Park*

Department of Chemistry, Pukyong National University, Busan 48513, Korea

Infection with HIV (Human immunodeficiency virus), over time, develops into acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The development of non-toxic and effective anti-HIV drugs is one of the most promising strategies for the treatment of AIDS. In this study, we investigated the anti-HIV-1 activity of gelatin hydrolysates from Alaska pollack skin. Gelatin hydrolysates were prepared using four enzymes (alcalase, flavourzyme, neutrase, and pronase E). Among these, the pronase E gelatin hydrolysate was found to inhibit HIV-1 infection in the human T cell-line MT4. It exhibited inhibitory activity on HIV-1_{IIIIB}-induced cell lysis, reverse transcriptase activity, and viral p24 production at noncytotoxic concentrations. Moreover, it decreased the activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) *in vitro*. Because HIV infection-induced activation of MMP-2 can accelerate collagen resolution and collapse of the immune system, pronase E gelatin hydrolysate might prevent the activation of MMP-2 in cells, resulting in collagen stabilization and immune cell homeostasis consistent with anti-HIV activation. These results suggest that pronase E gelatin hydrolysate could potentially be incorporated into a novel therapeutic agent for HIV/AIDS patients.

Key words: AIDS, Anti-HIV-1 activity, Alaska Pollack skin, Gelatin, Enzymatic hydrolysate

서론

인간면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency Virus, HIV)는 인간의 면역체계를 파괴시키는 레트로바이러스로서 후천성면역결핍증후군(Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS)을 일으키는 병원체이다. HIV는 주로 헬퍼 T 세포(T세포의 CD4⁺ 부위), 대식세포, 수지상 세포 등의 살아있는 면역세포들을 감염시키고 HIV에 감염된 CD4⁺ T 세포의 수가 치명적인 수준 이하로 내려가면 세포매개성 면역이 상실되고 점차 기회감염에 쉽게 노출되고 치명적 질환 및 사망에 이르게 한다(Barre-Sinoussi et al., 1993; Gallo et al., 1983). 대체로 HIV감염 10년 안에 AIDS로 진행되며 AIDS환자가 치료받지 않으면 보통 1년 이내 사망하는 것으로 알려져 있다. 1981년 처음으로 AIDS 환자가 보고된 이래 전 세계적으로 7,800만명

이 감염되었고, 3,900만명이 AIDS관련 질환으로 사망하였으며 2013년 한 해만 210만명이 새로 감염된 것으로 보고되고 있다(Kasedde et al., 2014). 국내의 경우도 2014년 한 해에 1,200여명이 신규로 HIV에 감염되어 9,600여명의 감염환자가 있다(Korea Federation for HIV/AIDS prevention. 2016. <http://www.kaid.or.kr/main>.)

AIDS 환자의 생존기간을 연장시켜줄 수 있는 약제로는 항레트로바이러스제가 있다. HIV감염자의 생존 기대치를 높이는 효과가 있어 AIDS로 진행되더라도 평균 5년 이상 생존기간을 연장할 수 있다고 알려져 있으나 AIDS를 완치시키는 치료제는 아니며 무엇보다 장기 복용의 경우 강한 독성과 부작용 그리고 약제 내성이 발생된다(Plaza et al., 2009; Zampella et al., 2008). 또한 고가의 치료비 때문에 모든 국가에서 항레트로바이러스제의 주기적인 투약이 가능한 것은 아니며, 사망자의 1/3

<http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2016.0594>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 49(5) 594-599, October 2016

Received 6 October 2016; Accepted 19 October 2016

*Corresponding author: Tel: +82. 51. 629. 5598 Fax: +82. 51. 629. 5583

E-mail address: parksj@pknu.ac.kr

이 경제성장이 없고 빈곤이 극심한 아프리카나 동남아시아 등 저개발국가에 집중되어 있다는 점을 고려할 때 AIDS의 예방 및 치료 방법이 더욱 더 다양화될 필요가 있다. 본 연구팀은 AIDS 치료제로 이용될 수 있는 무독성이면서 저가로 이용될 수 있는 후보물질을 발굴하기 위하여 수산물 유래 소재로부터 AIDS 바이러스의 감염을 억제할 수 있는 물질을 검색하고 분리하여 작용기작을 규명하는 연구를 수행해 왔으며, 본 연구에서는 제품화를 위한 가공공정에서 대량으로 폐기되고 있는 명태 껍질의 젤라틴을 효소로 가수분해하여 그 가수분해물의 항 HIV-1 저해 효능을 탐색하였다.

젤라틴은 졸 및 겔화하는 열가역적인 특성이 있어 식품용, 의약품용, 화장품용 소재로서 이용하기 위한 가능성이 검토되어 왔으나 이용 젤라틴의 대부분이 육상의 가축부산물로부터 추출되고 있어 육상동물 원료의 위생안전성에 대한 소비자들의 우려와 종교상 축산물을 섭취하지 않는 국가에서는 새로운 젤라틴 소재를 요구하고 있어 어류 유래의 젤라틴과 젤라틴 가수분해물의 의약적 소재 가능성의 검토 및 결과는 매우 중요한 의미를 가진다. 특히 수산물 유래 젤라틴의 이용에 관한 연구로는 어류 껍질 및 뼈 그리고 비늘 유래 젤라틴과 이들 젤라틴으로부터 추출한 가수분해물의 항산화 활성 및 ACE 저해 활성이 검토된 정도이며(Ahn et al., 2009; Heu et al., 2010), 바이러스성 감염질환에 대한 저해활성 연구는 거의 이루어진 바가 없어 본 연구는 수산물 유래 젤라틴의 효율적 응용이라는 점에서도 의미가 깊다.

재료 및 방법

재료

시료로 사용된 명태 껍질은 부산공동어시장에서 구입하여 -20℃에 저장하고 사용하였으며, 젤라틴의 가수분해물 제조를 위해 사용한 3종의 효소(alcalase, flavourzyme, neutrase)는 Novozyme Co. (Denmark)에서 그리고 pronase E는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

명태 껍질 젤라틴 및 효소 가수분해물의 제조

명태 껍질의 이물질 제거를 위하여 냉수(5℃ 이하)로 충분히 세척하고, 이를 0.3 M Ca(OH)₂ 알카리용액 처리 및 냉수로 재세척한 후 0.15 M acetic acid로 중화시켰다. 중화된 명태껍질에 원료대비 5배(v/w)의 증류수를 가해 50℃에서 4시간 동안 젤라틴을 추출하였다. 열수 추출한 젤라틴용액은 여과지(5A 110 mm, advantec, Japan)를 이용하여 감압 여과한 후 진공농축기를 이용하여 50℃에서 농축한 다음 동결건조하고 이를 분말로 분쇄하여 분말 젤라틴으로 사용하였다.

젤라틴 가수분해물은 분말 젤라틴(1% w/v)에 4가지 단백질 가수분해 효소(alcalase, flavourzyme, neutrase 및 pronase E)를 효소 대 기질 비를 1:50으로 첨가하고, 각 효소별 최적 온도와

및 최적 pH 조건에서 12시간 동안 반응시켰으며 100℃에서 10분간 효소의 반응을 불활성화시킨 후 pH를 7.0으로 조정해 주었다. 이 후 20분간 원심분리한 뒤 상층액을 pore size 7 μm의 여과지를 사용하여 여과하고 동결건조 후 분말화하여 최종적으로 젤라틴 효소가수분해물을 얻었다.

젤라틴 효소가수분해물의 단백질 함량 측정

각 효소가수분해물의 단백질 함량은 Pierce® BCA protein assay kit (Rockford, 95 IL, USA)를 사용하여 측정하였고, 단백질 정량의 표준물질은 BSA를 사용하였다.

세포 및 바이러스

항 HIV-1 활성을 *in vitro* 에서 검색하기 위해 MT-4와 H9/HIV-1_{IIIb} 세포를 NIH AIDS Reagent Program (Germantown, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 모든 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Scientific, USA), 50 μg/mL streptomycin, 50 U/mL penicillin (PAA, USA)이 첨가된 RPMI-1640 (Thermo Scientific, USA) 배지에서 계대 배양하였다. HIV-1 바이러스는 H9/HIV-1_{IIIb} 세포의 배양 상층액으로부터 수확하여 -80℃에 보관하고 실험직전에 37℃에 녹여 사용하였다. 바이러스 역가는 희석된 바이러스액을 MT-4 세포에 감염시키고 3일간 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 다음 생성된 p24 항원의 수를 측정하여 결정하였다.

세포 독성 시험

MT-4 세포를 96 well plate에 1.0 × 10⁴ cells/well로 분주하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후에 시료를 농도별로 희석하여 3일간 배양하고 550/690 nm에서의 흡광도 차이에 의해 살아있는 세포를 측정하는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 시험법으로 50% 세포 병변효과(cytopathic effect, CPE)가 나타나는 농도(CD₅₀)를 산출하여 세포독성을 측정하였다.

항 HIV-1 활성 실험

HIV-1 바이러스는 감염 후 복제과정에서 숙주세포인 면역세포를 파괴하고 세포 병변효과를 나타낸다. 따라서 가수분해물의 1차 항 HIV-1 활성은 HIV-1_{IIIb} 감염에 의한 MT-4 세포의 세포병변 억제능을 확인하여 측정하였다. MT-4 세포를 96 well plate에 1.0 × 10⁴ cells/well로 분주하여 배양하고 각 well에 100 TCID₅₀의 HIV-1_{IIIb}을 50 μL씩 첨가한 후 시료를 농도별로 100 μL씩 넣어 37℃, 5% CO₂로 유지된 배양기에서 3일간 배양하였다. 시료의 항 HIV-1 활성은 MTT 시험법으로 평가하였다.

MTT 시험은 MTT cell proliferation kit I (Boehringer Mannheim, Bernd Meyer, Ottweiler, Germany)을 사용하여 실행하였다. 96 well plate에 농도별로 희석된 시료와 바이러스액을 혼합하여 3일간 배양하고 세포 상층액을 100 μL씩 제거 한 후 각

well에 20 μ L의 MTT 용액(final concentration 0.5 mg/mL)를 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 정치시켰다. 각 well에 100 μ L DMSO (dimethyl sulfoxide) 용액을 첨가하여 기형성된 짙은 청색의 결정체인 formazan을 완전히 녹인 후에 microplate reader로 흡광도(test wavelength 550 nm, reference wavelength 690 nm)를 측정하였다. 시료의 항 HIV-1 활성 평가는 HIV-1_{III}에 감염된 세포군 및 비감염 대조 세포군의 흡광도를 기준으로 억제 정도를 측정 후 결정하였다.

HIV-1 p24 항원 측정

MT-4 세포를 96 well plate에 2.0×10^4 cells/well로 분주하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 각 well에 100 TCID₅₀의 HIV-1_{III} 50 μ L와 시료를 농도별로 100 μ L씩 넣어 37°C, 5% CO₂로 유지된 배양기에서 3일간 배양하였다. 3일 후 세포 상등액 중의 HIV 양은 Lenti-X p24 rapid titer kit (Clontech, USA)를 사용하여 결정하였다.

HIV-1 역전사효소 활성

HIV-1 역전사효소(Reverse Transcriptase, RT) 억제활성 실험은 RT-Detect™ kit NEK-070A (Dupont medical products, Boston, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 효소는 유전자 재조합에 의해 생산된 HIV-1 RT (10 U/ μ L, 100 mM potassium phosphate, pH 7.1, 1 mM dithiothreitol, 50% glycerol)를 효소완충액[100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 160 mM KCl, 1 mM EDTA, 3 mM dithiothreitol, 3% (v/v) Triton X-100, and 10% (v/v) glycerol]에 0.005 U/ μ L로 희석하여 사용하였고 반응 혼합물은 primer가 부착된 RNA template와 triphosphate-DNA nucleosides를 반응혼합물 완충액(reaction buffer: 200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 40 mM MgCl₂)에 희석하여 사용하였다. 10 μ L 반응혼합물 완충액, 20 μ L 반응혼합물, 4 μ L 젤라틴 가수분해물, 5.2 μ L 효소완충액을 500 μ L test tube에 넣고 37°C에서 1시간 동안 역전사시키고 90°C에서 1분간 반응을 정지시켰다. 반응을 마친 RNA template를 알카리용액(5.62% potassium hydroxide, 94.38% water)으로 37°C에서 15분간 가수분해한 후 완충액(13.6% sodium phosphate, monobasic monohydrate, 86.4% water)으로 중화하였다. ELOSA 반응을 위해 중화시킨 반응액 50 μ L를 streptavidin-coated microplate well에 옮기고, horseradish peroxidase (HRP)-labeled detector probe와 biotin-labeled capture probe를 포함하는 ELOSA 용액 50 μ L 첨가하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다(Weber et al., 1989). 반응을 마치고 microplate well에 남은 시약이나 가수분해된 RNA를 제거하기 위해 세척액(2-chloroacetamide 용액 20X)을 물로 희석하여 3회 세척하였다. 세척한 microplate에 형광검출액(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate 용액) 100 μ L를 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 정지액(2.2% citric acid, 1.5% HCl, 1.5% sulfuric acid and 94.8% water) 100 μ L를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 spectrophotom-

Table 1. protein contents and anti-HIV-1 activities of gelatin hydrolysates from Alaska Pollack *Theragra chalcogramma* skin

Enzymes	Protein content (mg/g dry weight)	Anti-HIV-1 activity (IC ₅₀ , mg/mL)
Alcalase	101.42±8.12	0.92±0.74
Flavourzyme	58.22±1.91	> 3.90±0.41
Neutrase	68.71±0.48	> 3.50±0.74
Pronase E	89.71±4.46	0.57±0.16

All values are means±SE.

IC₅₀ value is the concentration of sample required for 50% inhibition.

eter로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 억제율의 계산은 다음과 같이 하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Activity control} - \text{Activity sample})}{\text{Activity control}} \times 100$$

MMP-2 효소 활성

MMP-2 assay kit (BIOMOL, PA, USA)의 방법에 따라서 측정하였다. 즉, 68 μ L의 반응 buffer와 시료 2 μ L가 담겨 있는 well에 20 μ L의 MMP-2를 첨가하여 37°C에서 60분간 반응하였다. 반응 후, thiopeptolide 기질 20 μ L를 첨가하여 37°C에서 60분간 반응한 후, 405 nm에서 측정하였다.

통계분석

실험결과와 통계처리는 각각의 시료에 대한 평균±표준편차를 나타내었다. SPSS 프로그램(SPSS Inc. Ver. 12.0)을 사용하여 1-way ANOVA test를 실시하여 조사 항목들 간의 유의성 검증은 Duncan의 다중위 검정으로 $P < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결과 및 고찰

명태 껍질 젤라틴 효소 가수분해물의 단백질 함량 및 항 HIV-1 활성

명태 껍질 유래 젤라틴을 가수분해하기 위해 4종의 단백질 분해효소(alcalase, flavourzyme, neutrase 및 pronase E)를 사용하였으며 항 HIV-1 활성이 높은 효소가수분해물을 선별하기 위하여 각 효소가수분해물의 단백질 함량 확인과 MTT법을 이용한 항 HIV-1 활성을 검토하였다(Table 1). 명태 껍질 젤라틴 1 g으로부터 얻어진 총 단백질 양을 확인한 결과 alcalase와 pronase E의 경우 101.42 ± 8.12 mg과 89.71 ± 4.46 mg의 단백질 양으로 다른 효소가수분해물 보다 높은 단백질 함량을 가지고 있는 것이 확인되었다.

1차 항 HIV-1 활성 평가는 사람의 T 세포 MT-4 세포에 100

TCID₅₀의 HIV-1_{111B} 용액과 함께 각 효소 가수분해물을 농도 별로 첨가하여 3일간 배양한 후 HIV-1 감염에 의해 일어나는 MT-4 세포의 병변효과를 억제하는 정도를 측정하여 결정하였다. Pronase E에 의해 가수분해된 젤라틴 가수분해물이 가장 높은 항 HIV-1 저해활성을 보여 0.57±0.16 mg/mL의 IC₅₀ 값을 가졌으며 alcalase 가수분해 효소물은 0.92±0.74 mg/mL의 IC₅₀ 값을 가졌다. 그 외의 효소가수분해물은 항 HIV-1 활성이 거의 나타나지 않았다. 따라서 단백질 함량이 높으면서 항 HIV-1 저해활성이 나타난 pronase E에 의한 명태 껍질 유래 젤라틴 가수분해물을 이용하여 항 HIV-1 활성을 추가 검토하였다.

Pronase E 가수분해물의 세포 무독성 확인

지금까지 개발되어 사용되고 있는 대부분의 AIDS의 예방 및 치료제의 가장 큰 문제점은 항 HIV-1 활성 물질의 사람 면역 세포에 대한 자체 독성이다. 즉 pronase E에 의한 명태 껍질 유래 젤라틴 가수분해물의 AIDS의 예방 및 치료제로서의 활용 가능성을 연구하기 위해서는 우선 사람의 면역세포에 대한 무독성이 확인되어야 한다. MT-4 세포에 대한 pronase E 젤라틴 가수분해물의 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 본 연구에서 사용된 최고농도인 1 mg/mL의 pronase E 젤라틴 가수분해물은 MT-4 세포에 대해 72 시간 세포 독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1).

Pronase E 젤라틴 가수분해물의 HIV-1 역전사효소 및 p24 항원 생성 억제활성

HIV-1 역전사효소는 HIV가 인체 면역세포 내에 침투한 후에

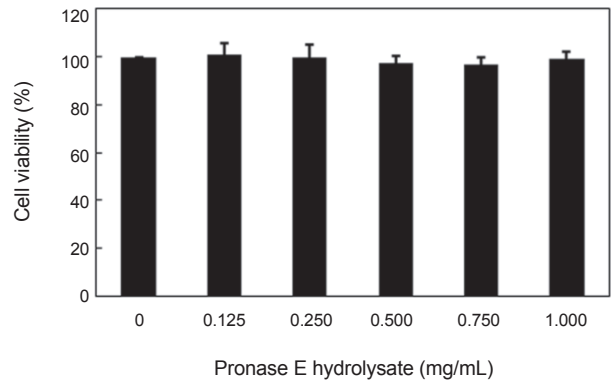


Fig. 1. Pronase E hydrolysate is non-cytotoxic in MT-4 cells. MT-4 cells were treated with 0-1 mg/mL pronase E hydrolysate for 72 h and the viability of MT-4 cells was measured by MTT assay. The data shown in the figure represents average of 3 independent experiments. All data are presented as mean ±S.D.

HIV 바이러스의 RNA를 DNA로 변환시키는데 필요한 효소로서 HIV-1 역전사효소를 억제시킴으로써 HIV 바이러스의 증식을 억제시킬 수 있다(Basavapathruni and Anderson, 2006). Pronase E에 의한 명태 껍질 유래 젤라틴 가수분해물의 HIV-1 역전사효소 억제 활성 능력을 조사하였으며 그 결과 pronase E 젤라틴 가수분해물은 농도 의존적으로 HIV-1 역전사효소 활성을 억제하여 IC₅₀ 값은 0.54±0.07 mg/mL로 확인되었다(Fig. 2A). 또한 HIV-1에 감염되어 생산되는 바이러스양은 p24 항원의 양으로 측정하였으며, Fig. 2B의 결과는 HIV-1 감

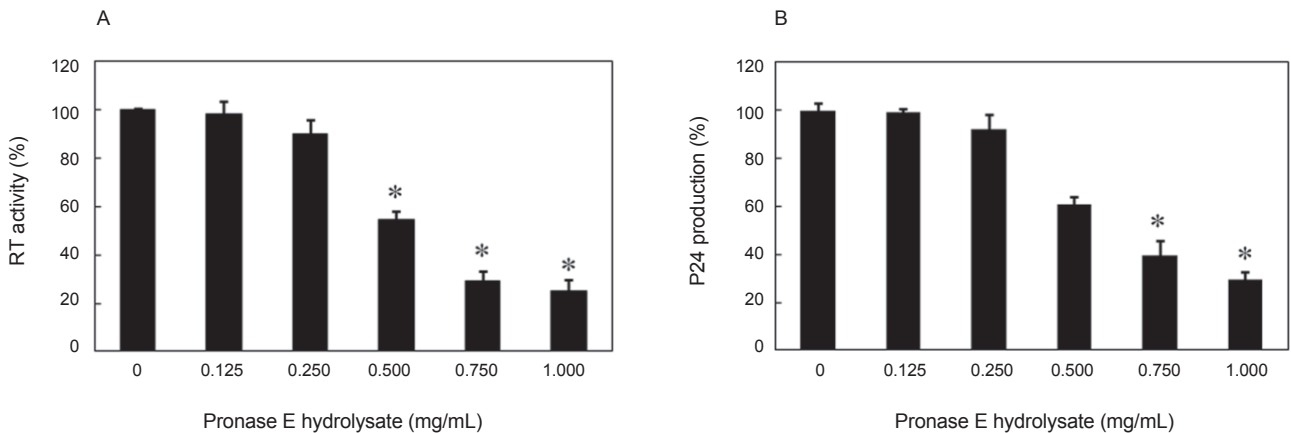


Fig. 2. Pronase E hydrolysate inhibits HIV-1 reverse transcriptase activity and p24 production. The effect of pronase E hydrolysate on HIV-1 RT activity was determined by colorimetric RT activity assay. The data shown in the figure represents average of at least 3 independent experiments. The IC₅₀ values were determined by analyzing the data with GraphPad Prism 7.0. *P<0.05 compared to the control without pronase E hydrolysate (0 mg/mL). (B) Effect of pronase E hydrolysate on p24 production in HIV-1_{111B} infected MT-4 cells. MT-4 cells were infected with HIV-1_{111B} of 100 TCID₅₀ in the presence or absence of 0-1 mg/mL pronase E hydrolysate. The amount of p24 production was determined by p24 antigen capture ELISA. The data shown in the figure are average of at least 3 independent experiments. All data are presented as mean±S.D. *P<0.05 compared to the control without pronase E hydrolysate (0 mg/mL).

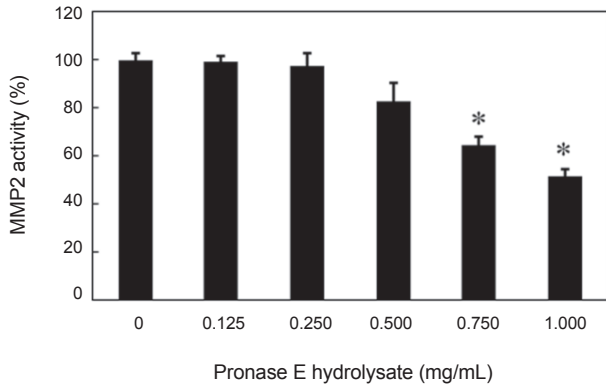


Fig. 3. Pronase E hydrolysate inhibits MMP2 activity. The effect of pronase E hydrolysate on MMP2 activity was determined by colorimetric MMP2 assay. The data shown in the figure represents average of at least 3 independent experiments. All data are presented as mean±S.D. * $P < 0.05$ compared to the control without pronase E hydrolysate (0 mg/mL).

염에 의해 생성되는 p24 항원이 pronase E 젤라틴 가수분해물의 농도에 의존하여 감소함을 나타내어 IC_{50} 값은 0.59 ± 0.84 mg/mL로 측정되었다. 결과적으로 HIV-1_{IIIIB} 감염에 의한 MT-4 세포의 병변효과, 역전사효소 활성화 그리고 p24 항원 생성을 pronase E 젤라틴 가수분해물은 농도 의존적으로 억제할 수 있음이 확인되었다.

Pronase E 젤라틴 가수분해물의 MMP-2 저해 활성

일반적으로 젤라틴 효소가수분해에 의해 생성되는 저분자형의 콜라겐은 체내 흡수가 쉬워지고 체내에 흡수된 콜라겐은 아미노산으로 분해된 후 콜라겐으로 재합성된다. 한편 HIV 감염은 콜라겐 분해를 초래하는 것으로 알려져 있다(Ester et al., 2008; Diaz et al., 2010; Kusko et al., 2012). HIV 감염이 기저막과 세포 기질을 분해하는 단백질 분해효소인 matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)의 활성화를 유도하여 콜라겐의 분해와 조직 손상을 초래한다(Mastroianni and Liuzzi, 2007; Ruehl et al., 2011). 따라서 본 연구에서는 pronase E 젤라틴 가수분해물이 MMP-2 효소 활성화를 직접 저해할 수 있는 지 in vitro 실험을 실행하였다. 그 결과, Pronase E 가수분해물 처리를 하지 않은 대조구와 비교하였을 때, pronase E 가수분해물 처리는 MMP-2 효소의 활성을 유효하게 억제함을 확인하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 명태 껍질 유래 젤라틴 효소가수분해물이 면역세포 내에서도 MMP-2 효소 활성화를 저해하고 기저막의 콜라겐 재생을 유도함으로써 HIV-1 감염 억제 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각되며 명확한 메커니즘 규명을 위해서는 pronase E 가수분해물 처리 이후의 세포 내 MMP-2 단백질 발현 및 활성 변화와 콜라겐의 생성량의 변화 등에 관한 후속 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과를 요약해 보면, 명태 껍질 유래 젤라틴의 pronase E 가수분해물은 사람면역 T 세포에 대해 무독성이며 HIV-1 감염에 대해 상당한 저항적 효과가 있어 향후 가수분해물을 정제하고 분리하여 항 HIV-1 활성이 더욱 더 높은 펩타이드를 얻음으로써 AIDS 예방 및 치료제 개발에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 젤라틴 효소가수분해물의 경우 체내 흡수율이 높아 관련 감염 저항성 식품소재와 천연 의약소재 등으로도 이용될 수도 있을 것으로 사료된다

사 사

이 논문은 부경대학교 자율창의기술연구비 (2015년)에 의하여 연구되었습니다.

References

- Ahn YS, Lee WW, Lee SH, Ahn GN, Ko CI, Oh CK, Oh MC, Kim DW, Jeon YJ and Kim SH. 2009. Processing and biological activity of gelatin hydrolysate from Branchiostegus japonicus Scales. Korean J Fish Aquat Sci 42, 417-425. <http://dx.doi.org/10.5657/kfas.2009.42.5.417>.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautuet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W and Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220, 868-871. <http://dx.doi.org/10.1126/science.6189183>.
- Basavapathruni A and Anderson KS. 2006. Developing novel nonnucleoside HIV-1 reverse transcriptase inhibitors: beyond the butterfly. Curr Pharm Des 12, 1857-1865. <http://dx.doi.org/10.2174/138161206776873617>.
- Diaz A, Alos L, Leon A, Mozos A, Caballero M, Martinez A, Plana M, Gallart T, Gil C, Leal M, Gatell JM, Garcia F and Study Group of Lymphoid Tissue immunopathogenesis in HIVi. 2010. Factors associated with collagen deposition in lymphoid tissue in long-term treated HIV-infected patients. AIDS 24, 2029-2039. <http://dx.doi.org/10.1097/qad.0b013e32833c3268>.
- Estes JD, Haase AT and Schacker TW. 2008. The role of collagen deposition in depleting CD4+ T cells and limiting reconstitution in HIV-1 and SIV infections through damage to the secondary lymphoid organ niche. Semin Immunol 20, 181-186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2008.04.002>.
- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J and Popovic M. 1983. Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220, 865-867. <http://dx.doi.org/10.1126/science.6601823>.
- Heu MS, Park CH, Kim JG, Kim HJ, Yoon MS, Park KH and Kim JS. 2010. Improvement of the antioxidative and ACE-

- inhibiting activities of commercial soy sauce using gelatin hydrolysates from the by-product of Alasaka Pollock. *Korean J Fish Aquat Sci* 43, 179-187. <http://dx.doi.org/10.5657/kfas.2010.43.3.179>.
- Kasedde S, Kapogiannis BG, McClure C and Luo C. 2014. Executive summary: opportunities for action and impact to address HIV and AIDS in adolescents. *J Acquir Immune Defic Syndr* 66 Suppl 2, S139-143. <http://dx.doi.org/10.1097/QAI.000000000000206>.
- Korea Federation for HIV/AIDS prevention. 2016. Retrieved from <http://www.kaid.or.kr/main>. on September 29.
- Kusko RL, Banerjee C, Long KK, Darcy A, Otis J, Sebastiani P, Melov S, Tarnopolsky M, Bhasin S and Montano M. 2012. Premature expression of a muscle fibrosis axis in chronic HIV infection. *Skelet Muscle* 2, 10. <http://dx.doi.org/10.1186/2044-5040-2-10>.
- Mastroianni CM and Liuzzi GM. 2007. Matrix metalloproteinase dysregulation in HIV infection: implications for therapeutic strategies. *Trends Mol Med* 13, 449-459. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2007.09.001>.
- Plaza A, Bifulco G, Keffer JL, Lloyd JR, Baker HL and Bewley CA. 2009. Celebesides A-C and theopapuamides B-D, depsipeptides from an Indonesian sponge that inhibit HIV-1 entry. *J Org Chem* 74, 504-512. <http://dx.doi.org/10.1021/jo802232u>.
- Ruehl M, Muche M, Freise C, Erben U, Neumann U, Schuppan D, Popov Y, Dieterich W, Zeitz M, Farndale RW and Somasundaram R. 2011. Hydroxyproline-containing collagen analogs trigger the release and activation of collagen-sequestered proMMP-2 by competition with prodomain-derived peptide P33-42. *Fibrogenesis Tissue Repair* 4, 1. <http://dx.doi.org/10.1186/1755-1536-4-1>.
- Zampella A, Sepe V, Luciano P, Bellotta F, Monti MC, D'Auria MV, Jepsen T, Petek S, Adeline MT, Laprevote O, Aubertin AM, Debitus C, Poupat C and Ahond A. 2008. Homophymine A, an anti-HIV cyclodepsipeptide from the sponge *Homophymia* sp. *J Org Chem* 73, 5319-5327. <http://dx.doi.org/10.1021/jo800583b>.