

울무, 홍화, 아욱종자의 혈전용해 효소활성 및 감마선 조사의 영향

권수정 · ¹임채영 · ²김재성 · 박민희, †이숙영

† 동신대학교 산업융가속기이용생물연구센터, ¹동신대학교 생물자원산업화지원센터, ²조선대학교 유전공학과
(접수 : 2005. 3. 10., 게재승인 : 2006. 1. 13.)

Fibrinolytic Activities and Effects of Gamma-Irradiated on Seeds from *Coix lacryma-jobi* L., *Carthamus tinctorius* L. and *Malva verticillata* L.

Su-Jung Kwon, Chae-Young Lim¹, Jae-Sung Kim², Min-Hee Park, and Sook-Young Lee†
Biology Research Center of Industrial Accelerators, Dongshin University, Naju 520-714, Korea
¹Biotechnology Industrialization Center, Dongshin University, Naju 520-714, Korea
²Department of Genetic Engineering, Chosun University, Gwang-Ju 501-759, Korea
(Received : 2005. 3. 10., Accepted : 2006. 1. 13.)

The fibrinolytic activities of soluble proteins extracted from seeds of *Coix lacryma-jobi* L., *Carthamus tinctorius* L. and *Malva verticillata* L. were studied. Fibrinolytic activity of extract from *C. lacryma-jobi* L. showed 1.3 times higher than plasmin used as positive control. The fibrinolytic enzyme was confirmed and extracted directly from seed of *C. lacryma-jobi* L. by a fibrin zymography. The protein was composed of a single polypeptide and its apparent molecular weight was found to be 7.8 kDa, as judged by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The effect of temperature for the proteolytic enzyme activity were stabilized above 50°C and then dramatically decreased. Also, the enzyme activity was clearly inhibited by APMSF, PMSF and TPCK, suggesting that it is a member of the chymotrypsin-like serine protease. In addition, effects of gamma-irradiated on seed of each plants were revealed that 8 Gy and 64 Gy were higher than others. This result shown that gamma-irradiation of seeds were capable to increase the fibrinolytic activity. All these results suggest the protease is a fibrinolytic enzyme belong to a family of chymotrypsin-like serine protease.

Key Words : *Coix lacryma-jobi* L., *Carthamus tinctorius* L., *Malva verticillata* L., fibrinolytic enzyme, gamma-irradiation

서론

혈관이 손상되면 출혈이 발생하며 지혈이 일어난다. 이 과정에서 혈소판 응집과 피브린 응집으로 혈전 (thrombus) 이 형성되어 지혈이 완결되고 손상된 부위의 조직이 재생되면 urokinase (UK, 유로키나아제), tissue-type plasminogen activator (t-PA, 조직 유래 플라스미노겐 활성화인자) 또는 streptokinase (SK, 스트렙토키나아제)에 의해 plasminogen (플라스미노겐)이 활성화되어 plasmin (플라스민)이 생성되고 plasmin에 의해 혈전이 용해되어 혈액은 다시 정상 상태로 순환하게 된다(1). 이러한 혈액의 응고-분해계는 여러 가지 효소의 작용에 의하여 균형을 이루고 있다(2). 혈전은 thrombin (트롬빈)에 의해서 fibrinogen (피브리노겐)으로부터

터 생성되고 plasminogen으로부터 활성화 되어 생성되는 plasmin에 의해 분해된다. 혈관계 질환은 혈액 내에서 형성 되는 혈전에 기인하는 경우가 대부분이며 이 혈전이 원인이 되어 질병을 유발시키는 것을 혈전성 성인병 또는 혈전증 (thrombosis)라고 한다. 오늘날 서양 문화의 유입으로 국내 식생활도 많이 변하여 동물성 식품의 소비가 급격히 증가하고 상대적으로 식물성 식품의 소비가 저하되고 있으며 이러한 식생활은 인체의 대사과정의 균형을 깨뜨려 뇌혈전증, 뇌출혈, 심부전증, 심장마비 등의 혈관계 질환에 의한 사망이 39%로 알려지고 있어 이 혈관계 질환의 주원인 중 하나인 혈전을 용해하는 혈전 용해제에 관한 관심이 점점 더 커지고 있다.

지금까지 사용되고 있는 혈전용해제로는 urokinase, t-PA, streptokinase 등(3-5)이 있으나 urokinase를 제외하고는 경구 투여를 할 수 없고(6), t-PA의 경우 반감기가 짧은 단점이 있으며, 이 용해제들은 투여 시 혈전에 대한 선택성이 적어 전신출혈이 발생하며 또한 가격이 비싼 단점이 있다(7). 기존에 사용되고 있는 혈전용해제들은 plasminogen 활성화

† Corresponding Author : Biology Research Center of Industrial Accelerators, Dongshin University, Naju Jeonnam 520-714, Korea
Tel : +82-61-336-1879, Fax : +82-61-336-1879
E-mail : seedbank2001@yahoo.co.kr

제(8)들로 간접적인 방법으로 혈전을 용해하지만 혈전을 직접 용해하는 새로운 혈전용해제들이 계속 보고되고 있다. 혈전용해에 관한 연구로는 흡혈 및 비 흡혈동물이나 곤충(9-14), 최근에는 뱀독과(15-34)과 거머리(35), 지렁이 등(36-41)에서 연구되어 왔으며, 근래에는 발효식품인 청국장(42), 된장(7), 젓갈(43), 일본의 전통대두 발효식품인 Natto(44, 45), 절임식품인 Shiokara(46, 47)에서의 분리도 연구되어 있으며, 해조류(48-50), 버섯 등의 균류(51, 52)에서도 분리되고 그 특성이 연구되고 있으나 식물에서는 작용 특정성분에 대한 연구는 부족한 실정이며, 기존의 혈전용해효소가 가지는 혈전에 대한 비특이적, 부작용, 고가 등의 단점을 해결할 수 있는 새로운 혈전용해 효소의 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 본 연구는 식물에서 새로운 혈전용해 효소개발을 위한 기초 연구로 울무 (*Coix lacryma-jobi* L.), 홍화 (*Carthamus tinctorius* L.), 아욱 (*Malva verticillata* L.)의 종자로부터 혈전용해효소 생산성을 조사하고 직접 추출하여 혈전용해 효소의 활성과 부분적인 특성을 조사하고 저선량의 감마선 조사가 혈전용해 효소의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

식물종자 및 시약

본 실험에 사용한 울무 (*Coix lacryma-jobi* L.), 홍화 (*Carthamus tinctorius* L.) 그리고 아욱 (*Malva verticillata* L.)의 종자는 전남 나주시의 종묘사에서 구입하여 사용하였으며, 시약으로 사용한 APMSF, PMSF, TLCK, TPCK, aprotinin, EDTA, EGTA, fibrinogen, pepstatin A, N,N-methylene-bis-acrylamide, SDS, TEMED, acrylamide, BSA, and Trizma base, azocasein, agarose는 Sigma Co. 제품을 사용하였고, plasmin, thrombin은 Calbiochem Co. 제품을 그의 사용된 시약들은 특급시약을 사용하였다.

조효소 용액의 제조

울무, 홍화 그리고 아욱의 종자 10 g을 40 ml의 25 mM 인산 완충용액 (pH 7.4)을 첨가하여 4°C에서 막자사발로 분쇄하여 균질화한 후, 6500 rpm 4°C에서 30분간 원심분리한 다음 상층액을 회수하였다. 상층액 중의 이물질 제거를 위해 거즈를 이용해 여과한 후, -70°C로 처리된 100%의 에탄올을 조금씩 가하여 최종적으로 50%의 에탄올 농도로 적정하여 1시간 동안 4°C에서 교반한 다음 6500 rpm, 4°C에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70°C로 처리된 100%의 에탄올을 조금씩 가하여 최종적으로 에탄올 농도를 75%로 적정하여 1시간 동안 4°C에서 교반하여 12000 rpm, 4°C에서 20분간 원심분리 하였다. 그리하여 형성된 침전물을 25 mM 인산 완충용액 (pH 7.4)에 용해하고 불순물을 제거하기 위해 12000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 회수하여 조효소 용액으로 사용하였다

효소 활성도의 측정

단백질분해 효소활성: 단백질 분해활성은 azocasein (아조카제인)이 분해되어 나오는 azo기의 양을 측정함으로써 단백질 분해 활성을 판정하는 azocasein 법(53)을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 1% azocasein (50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.0) 300 μ l에 각각의 측정시료를 50 μ l 넣고 37°C의 항온수조에서 30분간 반응시킨 후, 미리 차게 한 10% (W/V)의 TCA용액을 600 μ l을 넣고 즉시 혼합하였다. 이 시료들은 10분 동안 얼음에 놓아두어 반응을 정지시킨 다음, 미량원심분리기에서 원심분리하고 상층액을 분리하여 366 nm에서 흡광도를 측정하고 azocasein 표준곡선을 이용하여 단백질 분해활성을 환산하였다.

혈전용해 효소활성: 혈전용해 효소활성의 측정은 fibrin 평판법(54)을 약간 변형하여 혈전용해 효소인 plasmin을 표준시료로 하여 측정하였다. 즉, 25 mM 인산 완충용액 (pH 7.4)로 fibrinogen의 최종농도가 0.5%가 되도록 완전히 용해한 다음, 그 용액 5 ml에 0.1 ml의 100 NIH U/ml의 thrombin 용액을 첨가하여 잘 혼합한 다음, 동일한 완충용액으로 만든 2% agarose 용액을 5 ml첨가하여 다시 잘 혼합하고 페트리 디쉬에 부어 상온에 30분간 방치하여 피브린 응집을 형성시켜 fibrin 평판을 제조한다. 그리고 나서 구멍을 뚫어 10 μ l의 각각의 시료를 떨어뜨린 후 37°C에서 18시간 반응시키고 난 다음 형성된 투명한 직경을 표준시료인 plasmin과 비교하여 측정하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Bradford방법(55)에 의해 단백질 정량 Kit (Bio-Rad, USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준시료로는 Bovine serum albumin (BSA)를 사용하였다.

전기영동 분석과 Fibrin zymography

전기영동 분석: 단백질의 전기영동은 12% gel을 이용하여 Laemmli 방법(56)을 약간 변형하여 수행하였으며, native polyacrylamide gel electrophoresis (비변성 폴리아크릴아미드 젤 전기영동)은 10% gel을 이용하여 수행하였다. 혈전용해효소의 분자량은 표준단백질을 이용하여 상대적인 이동도인 Rf 값과 분자량의 semi-logarithmic plot에 의하여 결정하였으며 단백질은 Coomassie brilliant Blue R-250으로 염색하였고, 5% 메탄올과 7.5% 초산의 용액으로 탈색하였다.

Fibrin zymography: Fibrin zymography는 Kim 등(7) 방법에 의하여 수행하였다. 즉, 0.12% fibrinogen과 100 μ l의 thrombin 용액 (100 NIH U/ml)을 함유한 12% polyacrylamide gel에 20 μ g의 시료를 sample buffer (5X)와 혼합하여 loading한 다음 12 mA로 4°C에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 2.5% Triton X-100을 함유한 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)에 상온에서 30분간 고정한 다음 증류수로 세척하고 다시 효소반응 완충용액에 넣어 37°C에서 12시간 반응한 다음 염색하고 탈색하여 확인하였다. 그리고 혈전용해효소에 해당하는 부분의 단백질을 추출하여 효소의 부분적 특성을 조사하였다.

효소의 특성

최적온도 및 온도안정성: 온도에 따른 효소의 활성도 변화를 알아보기 위하여 30°C에서 80°C까지 10°C의 간격으로 각각 온도별로 1시간 반응시킨 후 azocasein 법과 fibrin 평판법을 수행하여 각각의 온도에 의한 단백질분해효소와 혈전용해효소의 활성변화를 측정하여 온도에 대한 효소의 안정성을 조사하였다.

각종 저해제의 영향: 일반적인 단백질분해효소 저해제로 알려진 APMSF, PMSF, TLCK, TPCK, EDTA, EGTA, aprotinin, pepstatin A 등을 1~5 mM의 농도로 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액으로 제조한 다음 추출효소를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 효소활성을 측정하여 활성을 비교하였다.

감마선 조사가 혈전용해 효소활성에 미치는 영향

종자저장 중에 미생물에 의한 부패, 활력저하, 생리활성 물질의 감소와 장기저장에 따른 에너지 소비 증가 등이 문제가 되고 있어 저선량의 감마선 조사를 통해 울무, 홍화, 아욱의 종자로부터 혈전용해 효소활성에 미치는 효과 및 선량에 따른 차이를 조사하였다. 저선량 방사선 조사는 한국원자력연구소의 저준위 조사시설 (^{60}Co)을 이용하여 0, 1, 4, 8, 16, 32 그리고 64 Gray의 γ 선을 실온에서 건조 종자에 직접 조사하였다.

결과 및 고찰

효소 활성도의 측정

단백질 분해 활성: 모든 실험과정은 4°C에서 수행하였으며, 울무, 홍화 그리고 아욱의 종자 10 g을 40 ml의 25 mM 인산 완충용액 (pH 7.4)을 첨가하여 분쇄하고 균질화한 후, 6500 rpm 4°C에서 30분간 원심분리 하여 상층액을 회수하였다. 상층액 중의 이물질을 제거한 후, 50%의 에탄올 농도로 적정하여 1시간 동안 4°C에서 교반한 다음 원심분리 하여 상층액을 회수한 다음 100%의 에탄올을 조금씩 가하여 최종적으로 에탄올 농도를 75%로 적정하여 1시간 동안 원심분리 하였다. 그리하여 형성된 침전물을 25 mM 인산 완충용액 (pH 7.4)에 용해하고 불순물을 제거하여 농축한 다음 조효소 용액으로 사용하였다. 추출된 전체 수용성 단백질의 양상은 Fig. 1에 나타내었다. 그 결과 각각 아욱, 홍화, 울무의 종자로부터 수용성 단백질이 효과적으로 추출되어 농축되었음을 알 수 있었다. 혈전 분해효소는 단백질 분해 효소의 일종으로 주로 serine protease (세린계 단백질분해효소)나 metalloprotease (금속성의 단백질분해효소)로 알려져 있어 혈전분해 활성을 검증하기 위해서는 단백질분해 활성 검증이 선행되어야 한다. 따라서 각각의 울무, 홍화, 아욱의 종자로부터 추출한 수용성 단백질로부터 Azocasein 법을 이용하여 단백질 분해활성을 검증한 결과를 Table 1에 나타내었는데 그 결과 농축된 전체 단백질의 양에 비하여 비활성이 각각 울무는 18.1 units/mg, 홍화는 11.2 units/mg, 그리고 아욱에서는 8.1 units/mg로 나타나 울무의 경우 전체 수용성 단백질의 양

에 대한 단백질 분해효소의 비활성이 홍화와 아욱의 단백질 분해효소의 활성에 비하여 약 1.6~2.3배 높은 활성을 나타내었다.

Table 1. Protease activity of total soluble proteins concentrated with 50-75% ethanol from seeds of *C. lacryma-jobi* L., *C. tinctorius* L. and *M. verticillata* L.

	Total protein (mg)	Azocaseinolytic activity (U/mg protein)	Fibrinolytic activity (\square cm)
<i>C. lacryma-jobi</i> L.	29.4	18.1	2.1
<i>C. tinctorius</i> L.	38.7	11.2	0.8
<i>M. verticillata</i> L.	39.3	8.1	0.6

*One unit of azocaseinolytic activity is defined as the amount of enzyme which causes a net increase of 0.1 in absorbance at 366 nm in 1 hour.

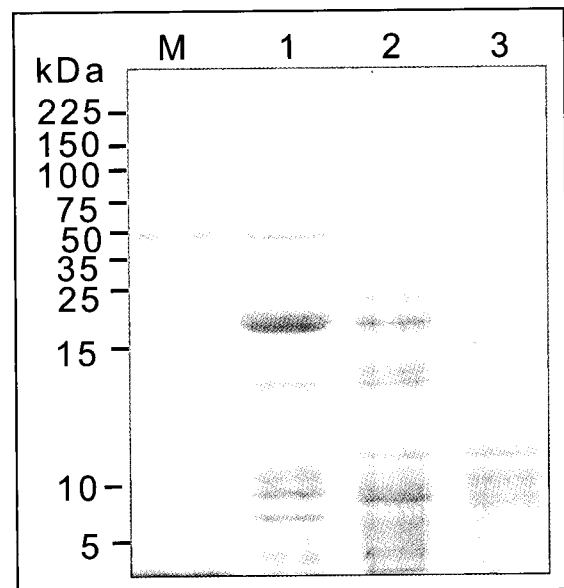


Figure 1. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of total soluble proteins concentrated with 50-75% ethanol from seeds of *C. lacryma-jobi* L., *C. tinctorius* L. and *M. verticillata* L. (A, Lanes, M, protein molecular weight markers; 1, *M. verticillata* L.; 2, *C. tinctorius* L.; 3, *C. lacryma-jobi* L.).

혈전분해 효소활성: 각각의 울무, 홍화, 아욱의 종자 추출물에 대한 혈전분해 활성은 fibrin 평판을 이용하여 각각의 추출물에 의하여 투명환을 형성함으로써 혈전용해 활성을 확인할 수 있었으며, 기존의 혈전용해제인 plasmin을 양성 대조구로 그 활성을 비교하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조구로 사용한 정제된 혈전용해 효소인 plasmin과 비교하였을 때 울무에서 약 2.2배의 높은 활성을 나타내었으며, 홍화와 아욱의 효소 활성은 plasmin과 비교하였을 때 상대적으로 그 활성이 낮게 나타났다. 또한 울무의 효소 활성은 홍화와 아욱의 효소 활성에 비하여 상대적으로 약 2.6~3.5배의 강력한 혈전용해 활성을 나타내었으나 홍화와 아욱에서는 전체 단백질에 비하여 상대적으로 낮은 혈전용해 활성을 나타내었다.

SDS-PAGE 및 fibrin zymography: 전체 수용성 단백질에서 혈전용해 효소를 확인하고, 분리하기 위하여 울무.

홍화 그리고 아욱의 종자 농축 추출물로부터 native PAGE (비환원 SDS-PAGE)를 행하고 fibrin zymography를 수행한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 울무에서만 활성이 나타났으며, 홍화와 아욱에서는 혈전용해 효소의 활성이 나타나지 않았다. 이는 울무의 혈전용해 효소는 피브린 응집에 직접적으로 작용하는 혈전용해 효소인데 반하여 홍화와 아욱의 혈전용해 활성은 t-PA나 urokinase 같은 피브린응집에 간접적으로 작용하는 효소일 것으로 생각된다. 따라서 울무의 혈전용해 효소를 직접 gel로부터 추출하여 단일효소임을 확인하고 활성염색을 실시하여 울무에서 추출된 혈전용해 효소의 부분적인 특성을 조사하였다.

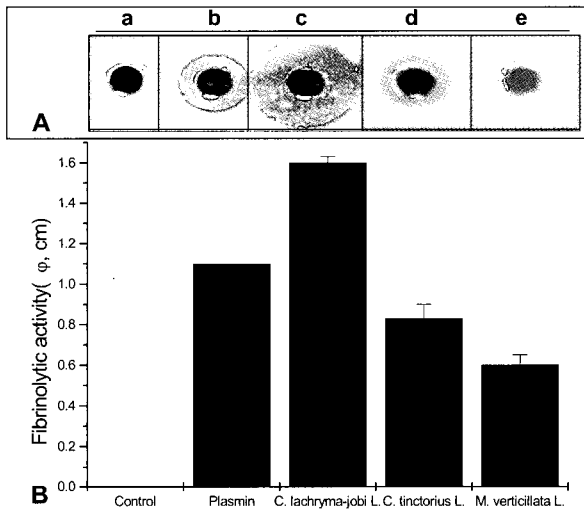


Figure 2. Fibrinolytic activity on the fibrin agarose plate from seeds of *C. lacryma-jobi* L., *C. tinctorius* L. and *M. verticillata* L. A, fibrin agarose plate; B, fibrinolytic activity (A, 25mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) as negative control; b, plasmin as positive control; c, *C. lacryma-jobi* L.; d, *C. tinctorius* L.; e, *M. verticillata* L.).

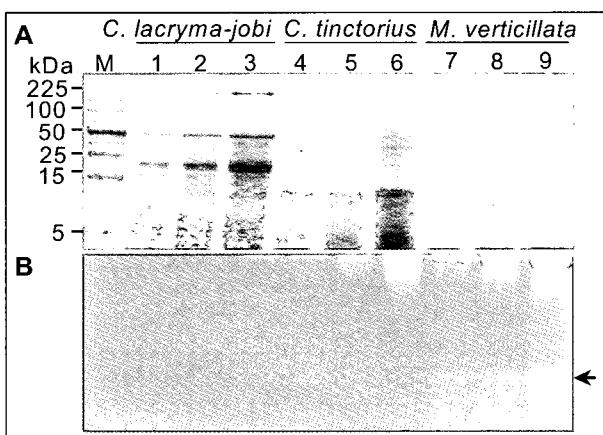


Figure 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and fibrin zymography from seeds of *C. lacryma-jobi* L., *C. tinctorius* L. and *M. verticillata* L. (A, SDS-PAGE; Lanes, M, protein molecular weight markers; 1, 4 and 7, 5 μ g, 2, 5 and 8, 10 μ g, 3, 6 and 9, 20 μ g. Zymogen analysis of purified protease for activity staining. Electrophoresis was performed with 8% native gel containing 0.8% fibrinogen and 100 NIHU/ml thrombin. Activity was detected by incubation at 37°C for 12 hr).

효소의 특성

효소의 분자량: 울무 추출효소의 단일성 확인과 분자량 측정을 위해 활성 염색과 SDS-PAGE를 수행한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 추출 단백질의 활성염색을 실시한 결과 추출효소가 혈전용해 효소임을 확인하였고, 추출효소의 분자량은 단일 polypeptide로 이루어진 약 7.8 kDa의 단백질임을 알 수 있었다. 본 효소는 *Vipera lebetina*에서 분리한 뱀독류의 피브린 응집에 직접 작용하는 혈전용해 효소인 lebetase의 분자량 약 22 kDa(21), *Agkistrodon piscivorus piscivorus*의 piscivorase I과 II의 분자량 각각 23과 29 kDa(25), *Agkistrodon saxatilis*의 혈전용해 효소 28 kDa(31), *Agkistrodon acutus*의 혈전용해 효소 26 kDa(32), 버섯류 *Tricholoma saponaceum*에서 분리된 혈전용해 효소 18 kDa(51), 미생물의 경우 42 kDa(41), 일본 전통발효 식품에서 분리한 katsuwo kinase 35 kDa(47), 생선 젓갈에서 분리한 *Bacillus* sp. KA38 유래의 혈전용해 효소 41 kDa(43), 곤충에서는 제조로부터 분리한 혈전용해 효소 45 kDa(13), *Tenoderia sinensis*에서 분리한 plasmin 유사 단백질 분해 효소 32.9 kDa(14), 동물류에서는 지렁이 *Lumbricus rubellus*에서 분리한 혈전용해 효소 32 kDa(38), *Katsuwonus pelamis*의 소화관에서 분리한 혈전용해 효소 38 kDa(43), 해양 녹조류 *Codium divaricatum*에서 분리한 혈전용해 효소 31 kDa 등(50) 뱀독류, 미생물류, 곤충류, 동물류, 녹조류 등에서 분리한 혈전용해 효소와는 다르게 분자량이 매우 작은 단백질임을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 기존에 보고된 혈전용해 효소의 분리에 있어 식물류에 대한 보고가 극히 적어 식물류의 혈전용해 활성에 대한 검토와 강력한 혈전 용해 활성을 가지는 식물류의 탐색이 필요하다고 생각된다. 특히, 울무에서 분리된 혈전용해 효소가 분자량이 작아 경구 투여 가능성이 있을 것으로 사료되며 추후 효과적인 정제과정과 분석 실험을 통하여 효소의 특성을 명확히 파악하고 작용기전을 조사해야 할 것으로 생각된다.

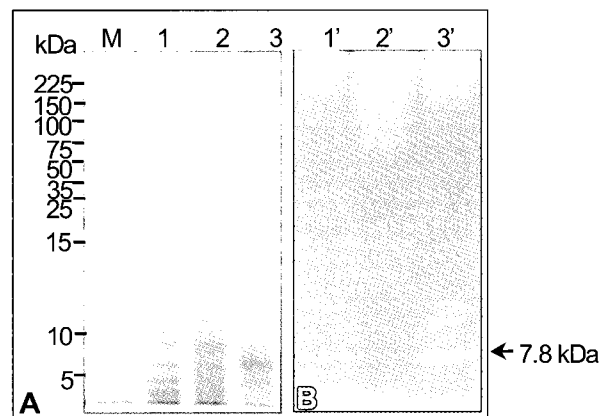


Figure 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and fibrin zymography from seeds of *C. lacryma-jobi* L., *C. tinctorius* L. and *M. verticillata* L. (A, SDS-PAGE; Lanes, M, protein molecular weight markers; 1 and 1', *C. lacryma-jobi* L.; 2 and 2', *C. tinctorius* L.; 3 and 3', *M. verticillata* L. B, Zymogen analysis of purified protease for activity staining. Electrophoresis was performed with 8% native gel containing 0.8% fibrinogen and 100 NIHU/ml thrombin. Activity was detected by incubation at 37°C for 12 hr).

Table 2. Effects of various inhibitors on the activity of the protease from seeds of *C. lacryma-jobi* L.

Inhibitors	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	-	100 ± 0.7
APMSF	1	32.1 ± 0.7
PMSF	1	28.7 ± 0.4
TPCK	1	33.2 ± 0.7
TLCK	1	63.2 ± 1.3
EDTA	5	102.3 ± 5.2
EGTA	5	111.3 ± 8.6
Aprotinin	1	67.7 ± 0.5
Pepstatin A	1	65.4 ± 0.7

*The protease was incubated in 25mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C for 1hr with various protease inhibitors. Azocaseinolytic activity was determined as described in the materials and methods section.

*One unit of azocaseinolytic activity is defined as the amount of enzyme which causes a net increase of 0.1 in absorbance at 366nm in 1 hour.

*The mean of triplicate experiments.

효소활성에 미치는 온도의 영향: 효소활성에 미치는 온도의 영향은 Fig. 5에서와 같이 50°C 이하의 온도에서는 비교적 안정적인 효소활성을 보인 반면 50°C부터 급격히 효소활성이 저하되어 60°C에서 40%의 효소활성을 보이다가 70°C 이상에서는 20% 이하로 현저히 감소되어 활성을 전혀 나타내지 않았다. 이는 뱀독류 *Agkistrodon piscivorus piscivorus*의 piscivorase I과 II의 65°C(25), 버섯류 *Tricholoma saponaceum*에서 분리된 혈전용해 효소 60°C(51), 동물류 *Lumbricus rubellus*에서 분리한 혈전용해 효소 60°C(38)에서 분리한 혈전용해 효소보다는 비교적 낮은 온도에서 활성을 나타내었지만 미생물류 일본 전통발효 식품에서 분리한 katsuwoxinase 37°C(47)와 곤충류 *Tenodera sinensis*에서 분리한 plasmin 유사 단백질 분해효소 30°C(14)활성이 강하였다는 보고와는 유사한 결과를 나타내었다.

각종 protease 저해제에 의한 영향: APMSF, PMSF, TLCK, TPCK, EDTA, EGTA, aprotinin, 그리고 pepstatin A 등 protease 저해제를 첨가하여 단백질 분해활성을 비교하여 Table 2에 나타내었다. APMSF, PMSF, TLCK 및 TPCK는 serine protease inhibitor (세린계 단백질 분해효소 저해제)이고 그중 TLCK는 trypsin-like serine protease inhibitor (트립신 유사 세린계 단백질 분해효소 저해제) 그리고 TPCK는 chymotrypsin-like serine protease inhibitor (키모트립신 유사 세린계 단백질 분해효소 저해제)로 알려져 있으며, aprotinin은 trypsin-like serine protease inhibitor이고 EDTA와 EGTA는 metalloprotease inhibitor (금속성 단백질 분해효소 저해제)이며 pepstatin A는 acid protease inhibitor (산성 단백질 분해효소 저해제)로 알려져 있다. 본 연구의 결과 각종 저해제에 대한 저해효과는 금속이온의 chelate (킬레이트 화합물)인 5 mM의 EDTA와 EGTA에서는 오히려 활성이 증진되고, TLCK, aprotinin 그리고 pepstatin A는 30~40%의 저해효과를 보인 반면, APMSF와 PMSF를 비롯해서 TPCK를 1 mM의 농도로 첨가한 경우 활성이 60~70%의 저해효과를 나타낸 것으로 보아 울무에서 추출한 혈전용해 효소는 chymotrypsin과 유사한 serine protease로 생각된다.

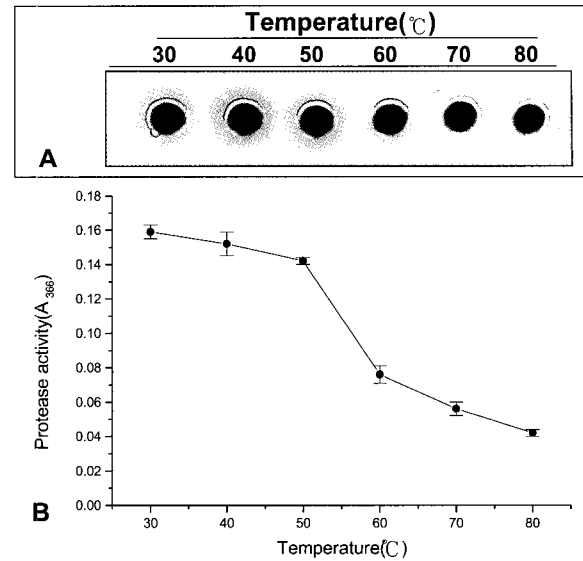


Figure 5. Effect of temperature on the fibrinolytic activity. The protease was incubated at various temperatures ranging from 30°C to 80°C for 30 min in phosphate buffer (pH 7.0) and the fibrinolytic and proteolytic activities were assayed with fibrin agarose plate and azocasein as substrate (A, fibrin agarose plate; B, protease activity with azocasein).

감마선 조사가 혈전용해 활성에 미치는 영향: 종자저장 중에 미생물에 의한 부패, 활력저하, 생리활성물질의 감소와 장기저장에 따른 에너지 소비 증가 등이 문제가 되고 있어 저선량의 감마선 조사를 통해 울무, 홍화, 아욱의 종자로부터 혈전용해 효소활성에 미치는 효과 및 선량에 따른 차이를 조사하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는바와 같이 울무의 종자에 있어서는 비조사 종자의 fibrin 평판에서의 투명환 지름 1.2 cm와 비교하여 1, 4, 16, 32 Gy의 선량에서 각각 투명환의 지름이 1.1, 1.14, 1.05, 1.03 cm를 나타내어 상대적으로 낮은 활성을 보인 반면에 8 Gy와 64 Gy의 선량에서는 투명환의 지름이 1.5와 1.68 cm를 나타내어 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. 홍화의 종자에서는 비조사 종자의 투명환 지름이 0.7 cm인데 반하여 1 Gy의 선량에서 1.76 cm를 보여 활성이 크게 증가하였으나 나머지 선량에서는 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다. 한편 아욱의 종자에 있어서는 0.56 cm의 비조사 종자에 비하여 4와 32 Gy의 선량에서 0.77과 0.75 cm로 상대적으로 강한 활성을 보였으며, 나머지 선량에서는 같거나 저하되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 각각의 시료에 대한 저선량의 방사선의 조사는 각각 서로 다른 선량에서 효소의 활성을 증진시키거나 감소시키는 효과를 나타내었는데 이러한 결과는 γ 선 조사가 저장종자의 발아력을 증진시키고 생리활성 향상에 영향을 미친다고 알려져 있어 유사한 결과를 나타내었다. 그러나 아직까지 그 기작은 밝혀지지 않았다. 이상의 결과로 볼 때, 저선량의 감마선의 조사가 울무, 홍화, 아욱 종자의 혈전용해 활성을 향상시킬 가능성을 나타낼 수 있을 것으로 생각되며, 효소활성의 증진과 감소에 저선량의 감마선의 효과에 대한 기작이 연구되어야 할 것으로 사료된다.

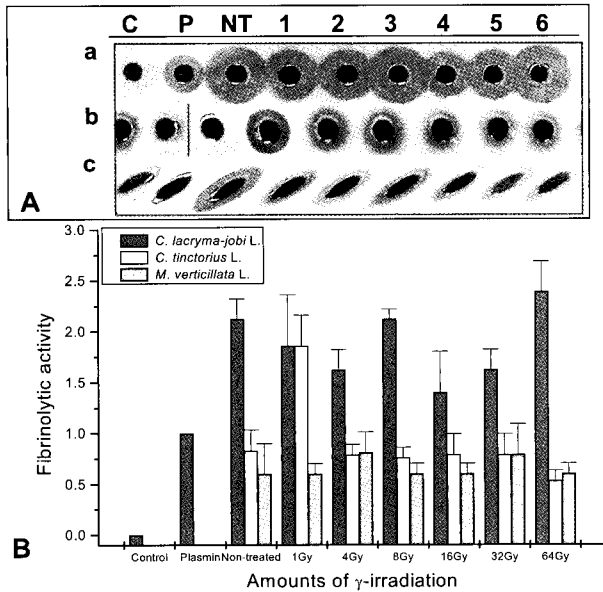


Figure 6. Effect of gamma-irradiation on the fibrinolytic activity from seeds of *C. lacryma-jobi* L., *C. tinctorius* L. and *M. verticillata* L. A, fibrin agarose plate (a, *C. lacryma-jobi* L.; b, *C. tinctorius* L.; c, *M. verticillata* L. C, 25mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) as negative control; P, plasmin as positive control; NT, not treated; 1, 1 Gy; 2, 4 Gy; 3, 8 Gy; 4, 16 Gy; 5, 32 Gy; 6, 64 Gy; B, fibrinolytic activity).

요약

미생물 및 동물에 비해 식물에서는 혈전용해효소에 대한 연구가 부족한 실정이며, 기존의 혈전용해효소가 가지는 혈전에 대한 비특이적, 부작용, 고가 등의 단점을 해결할 수 있는 새로운 혈전용해효소의 개발을 위하여 울무, 홍화, 아욱의 종자로부터 추출된 수용성 단백질의 혈전용해 활성을 조사하였다. 각각의 식물들로부터 추출된 조효소 용액은 기존 혈전 용해효소인 plasmin과 양성 대조군으로 하여 비교하여 fibrin 평판법으로 확인한 결과 피브리린 응집을 효과적으로 분해하였다. 그 중 울무종자의 수용성 추출물의 혈전용해 활성은 양성 대조군인 plasmin과 비교하여 1.3배의 높은 활성을 나타내었다. 전체 수용성 단백질은 50-75% 에탄올을 이용하여 농축하였으며 울무의 혈전용해효소는 fibrin zymography를 수행하여 확인하고 직접 추출하였다. SDS-PAGE에 의하여 추출효소의 분자량을 측정된 결과 7.8 kDa으로 단일 polypeptide임을 확인하였으며, 효소 활성에 미치는 온도의 효과는 50°C 이상에서는 비교적 안정하였으나 더 낮은 온도에서는 급격히 효소활성이 감소하였다. 또한, 각종 단백질분해효소 저해제에 의한 영향을 조사한 결과 APMSF, PMSF, pepstatin A 그리고 TPCK에 강력하게 저해되는 것으로 보아 추출효소는 chymotrypsin과 유사한 serine protease의 하나로 생각되었다. 그러나 EGTA와 EDTA 처리에 의해서는 효소활성의 저해가 두드러지게 나타나지 않았다. 더욱이, 종자저장 중에 미생물에 의한 부패, 활력저하, 생리활성물질의 감소와 장기저장에 따른 에너지 소비 증가 등이 문제가 되고 있어 저선량의 감마선 조사를

통해 울무, 홍화, 아욱의 종자로부터 혈전용해 효소활성에 미치는 효과 및 선량에 따른 차이를 조사하였는데 비조사 종자인 대조구와 비교하여 1 Gy, 4 Gy, 16 Gy, 32 Gy선량에서는 낮은 활성을 보였으면 반면에 8 Gy와 64 Gy의 선량에서는 더 높은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 v선 조사가 종자의 혈전용해 활성을 향상시킬 가능성이 있을 것으로 생각된다. 이상의 모든 결과로 볼 때 울무의 추출 효소는 chymotrypsin-like serine protease에 속하는 혈전용해효소임을 확인할 수 있었다.

감사

본 연구는 산업자원부 지정 동신대학교 산업융가속기이용생물연구센터 지원에 의한 것입니다.

REFERENCES

1. Markland, F. S. (1998), Snake venom and hemostatic system, *Toxicon* **36**(12), 1749-1800.
2. Davie, E. W., K. Fugikawa, and W. Kisiel (1991), The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation, *Biochemistry* **30**, 10363-10370.
3. Reed, G. L., L. F. Lin, B. Parham-Seren, and P. Kussie (1995), Identification of plasminogen binding region in streptokinase that is necessary for the creation of streptokinase plasminogen activator complex, *Biochemistry* **34**, 10266-10271.
4. Mullertz, S. and M. Lassen (1953), An activator system in blood indispensable for formation of plasmin by streptokinase, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **82**, 264.
5. D'Costa, S. S. and M. D. P. Boyle (1998), Interaction of a group A *Streptococcus* within human plasma results in assembly of a surface plasminogen activator that contributes to occupancy of surface plasmin-binding structures, *Microbial Pathogenesis* **24**, 341-349.
6. Sumi, H., M. Seiki, N. Morimoto, H. Tsushima, M. Maruyama, and H. Mihara (1985), Plasma fibrinolysis after intraduodenal administration of urokinase in rats, *Enzyme* **33**, 121-127.
7. Kim, S. H. (1998), New trends of studying on potential activities of Doen-jang. *Korea Soybean Diges.* **15**(1), 8-15.
8. Holden, R. W. (1990), Plasminogen activators: pharmacology and therapy, *Radiology* **174**, 993-1001.
9. Hellmann, K. and R. I. Hawkins (1964), Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus*, *Stal. Nature* **201**, 1008-1009.
10. Hamouda, B. M. H. and M. Ammar (1984), Demonstration of plasminogen activators in the saliva of a predatory insect of the family of Reduviidae, *Arch. Inst. Pasteur. Tunis.* **61**, 73-95.
11. Amarant, T. W. Burkhart, H. D. LeVine, C. L. Arocha-Pinango, and I. Parikh (1991), Isolation and complete amino acid sequence of two fibrinolytic proteases from the toxic Saturniid caterpillar *Lononia achelous*, *Biochim. Biophys. Acta.* **1079**, 214-221.
12. Matsushima, A., K. Shioya, M. Kobayashi, Y. Kodera, and Y. Inada (1993), Activation of fibrinolysis with the protease from *Dermatophagoides farinae*, *Thromb. Haemost.* **70**, 545.
13. Park, H-J. and S-D. Park (1998), Purification and characteristics of fibrinolytic enzyme having molecular weight 45,000 dalton from *Holotrachia* extract, *J. Herbology* **13**(1), 119-137.
14. Hahn, B. S., S. Y. Cho, M. Y. Ahn, and Y. S. Kim (2001),

- Purification and characterization of plasmin-like protease from *Tenodera sinensis* (Chinese mantis), *Insect Biochemistry and molecular biology* **31**, 573-581.
15. Chung, K. H. and D. S. Kim (1992), Fibrinolytic and Coagulation Activities of Korean Snake Venoms, *Korean Biochem. J.* **25**, 696-701.
 16. Ouyang, C. and T. F. Huang (1976), Purification and properties of the fibrinolytic principle of *Agkistrodon acutus* venom, *Biochimica et Biochemica Acta.* **439**, 146-153.
 17. Bajwa, S. S., H. Kirakossian, K. N. N. Reddy, and F. S. Markland (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*) snakes, *Toxicon.* **20**, 427-432.
 18. Dauod, E., A. Tu, and M. F. el-Asmar (1986), Isolation and characterization of an anticoagulant proteinase cerastase F-4 from *Cerastes cerastes* (Egyptian sand viper) venom, *Thromb. Res.* **42**, 55-62.
 19. Ahmed, N. K., K. D. Tennant, F. S. Markland, and J. P. Lacz (1990), Biochemical characteristics of fibrolase, a fibrinolytic protease from snake venom, *Haemostasis* **20**, 147-154.
 20. Siigur, E. and J. Siigur (1991), Purification and characterization of lebetase, a fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* (snake) venom, *Biochim. Biophys. Acta.* **1074**, 223-229.
 21. Siigur, J., M. Samuel, K. Tonismagi, J. Subbi, E. Siigur, and A. T. Tu (1998), Biochemical characterization of lebetase, a direct-acting fibrinolytic enzyme from *Vipera lebetina* snake venom, *Thrombosis research* **90**, 39-49.
 22. Chiou, S. H., C. C. Hung, and K. F. Huang (1992), Characterization of a protease with alpha- and beta-fibrinogenase activity from the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox*, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **187**, 389-396.
 23. Zhang, Y., A. Wisner, Y. Xiong, and C. Bon (1995), A novel plasminogen activator from snake venom, *J. Biol. Chem.* **270**, 10246-10255.
 24. Datta, G., A. Dong, J. Witt, and A. T. Tu (1995), Biochemical characterization of basilase, a fibrinolytic enzyme from *Crotalus basilicus basilicus*, *Achieves Biochemistry and Biophysics* **317**, 365-373.
 25. Hahn, B. S., I. M. Chang, and Y. S. Kim (1995), Purification and characterization of picivorase I and II, the fibrinolytic enzymes from eastern cottonmouth moccasin venom (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*), *Toxicon.* **33**(7), 929-941.
 26. Sugiki, M., Yoshida, E., Anai, K., and M. Maruyama (1998), Activation of single-chain urokinase-type plasminogen activator by a hemorrhagic metalloproteinase, jararafibrinase I, in *Bothrops Jararaca* venom, *Toxicon.* **36**, 993-1000.
 27. Ramirez, M. S., E. E. Sanchez, C. Garcia-Prieto, J. C. Perez, G. R. Chapa, M. R. McKeller, R. Ramirez, and Y. D. Anda (1999), Screening for fibrinolytic activity in eight viperid venoms, *Com. Biochem. Physiol.* **124**(C), 91-98.
 28. Sanchez, E. F., C. I. Santos, A. Magalhaes, C. R. Diniz, S. Figueiredo, J. Giloy, and M. Richardson (2000), Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (bushmaster) snake venom, *Achives of Biochemistry and Biophysics.* **378**(1), 131-141.
 29. Trummal, K., H. Vija, J. Subbi, and J. Siigur (2000), MALDI-TOF mass spectrometry analysis of substrate specificity of lebetase, a direct-acting fibrinolytic metalloproteinase from *Vipera lebetina* snake venom, *Biochimica et Biochemica Acta.* **1476**, 331-336.
 30. Swenson, S., L. R. Bush, and F. S. Markland (2000), Chimeric derivative of fibrolase, a fibrinolytic enzyme from southern copperhead venom, processes inhibitory activity on platelet aggregation, *Achieves Biochemistry and Biophysics* **384**(2), 227-237.
 31. Koh, Y. S., K-H. Chung, and D. S. Kim (2001), Biochemical characterization of a thrombin-like enzyme and a fibrinolytic serine protease from snake (*Agkistrodon saxatilis*) venom, *Toxicon.* **39**, 555-560.
 32. Xiuxia, L., C. Jiashu, Z. Yingna, Q. Pengxin, and Y. Grangmei (2001), Purification and biochemical characterization of F IIa a fibrinolytic enzyme from *Agkistrodon acutus* venom, *Toxicon.* **39**, 1133-1139.
 33. Guo, Y. W., T. Y. Chang, K-T. Lin, H-W. Liu, K-C. Shih, and S-H. Cheng (2001), Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a β -fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquaquamatus* (Taiwan Habu), *Protein Expression and Purification* **23**, 483-490.
 34. Jin, Y., Q. M. Lu, J. F. Wei, D. S. Li, W. Y. Wang, and Y. L. Xiong (2001), Purification and characterization of jerdofibrase, a serine protease from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake, *Toxicon.* **39**, 1203-1210.
 35. Chudzinski-Tavassi, A. M., E. M. Kelen, A. P. Paula-Rosa, S. Loyau, C. A. Sampaio, C. Bon, and E. Angles-Cano (1998), Fibrinogenolytic properties of purified hementerin, a metallo-proteinase from the leech *Haementeria depressa*, *Thromb. Haemost.* **80**, 155-160.
 36. Hrzencak, T., M. Popovic, T. Bozic, M. Grdisa, D. Kobrehel, and L. Tiska-Rudman (1998), Fibrinolytic and anticoagulative activities from the earthworm *Eisenia foetida*, *Comp. Biochem. Physiol. B.* **119**, 825-832.
 37. Fan, Q., C. Wu, L. Li, R. Fan, C. Wu, Q. Hou, and R. He (2001) Some features of intestinal absorption of intact fibrinolytic enzyme III-1 from *Lumbricus rubellus*, *Biochimica et Biochemica Acta.* **1526**, 286-292.
 38. Jeon, O-H., W-J. Moon, and D-S. Kim (1995), An anticoagulant/fibrinolytic protease from *Lumbricus rubellus*, *J. Biochem. Mol. Biol.* **28**(2), 138-142.
 39. Nakajima, N., H. Mihara, and H. Sumi (1993), Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**(10), 1726-1730.
 40. Mihara, H., N. Nakajima, and H. Sumi (1993), Characterization of potent fibrinolytic enzymes in earthworm, *Lumbricus rubellus*, *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 1730.
 41. Mihara, H., H. Sumi, T. Yoneta, H. Mizumoto, R. Ikeda, M. Seiki, and M. Maruyama (1991), A novel fibrinolytic enzyme extracted from the earthworm, *Lumbricus rebellus*, *Japanese journal of Physiology* **41**, 461.
 42. Kim, Y. T., W. K. Kim, and H. S. Oh (1995), Screening and Identification of the Fibrinolytic Bacterial Strain from ChungKook-jang, *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **2**(3), 1-5.
 43. Kim, H. K., G. T. Kim, D. K. Kim, W. A. Choi, S. H. Park, Y. K. Jeong, and I. S. Kong (1997), Purification and Characterization of a novel Fibrinolytic Enzyme from *Bacillus* sp. KA38 Originated from Fermented Fish, *J. Fermentation and Bioengineering* **84**(4), 307-312.
 44. Fujita, M., K. NoMura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada, and S. Nishimura (1993), Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 1340-1347.
 45. Sumi, H., H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara, H., and H. A. Muraki (1987), A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet, *Experientia.* **43**, 1110-1111.
 46. Nakajima, N., N. Taya, and H. Sumi (1993), Potent fibrinolytic enzyme from the lysate of *Katsuwonus pelamis* digestive tract (shiokara): purification and characterization, *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**(9), 1604-1605.
 47. Sumi, H., N. Nakajima, and C. Yatagai (1995), A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack Shiokara, a Japanese

- traditionally fermented food, *Comp. Biochem. Physiol. B.* **112**(3), 543-547
48. Matsubara, K., H. Sumi, K. Hori, and K. Miyazawa (1998), Purification and characterization of two fibrinolytic enzymes from a marine green alga, *Codium intricatum*, *Comparative Biochemistry and Physiology* **119B**(1), 177-181.
 49. Matsubara, K., K. Hori, Y. Matsuura, and K. Miyazawa (1999), A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*, *Phytochemistry* **52**, 993-999.
 50. Matsubara, K., K. Hori, Y. Matsuura, and K. Miyazawa (2000), Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*, *Comparative Biochemistry and Physiology* **125**, 137-143.
 51. Kim, J. H. (2000), Purification and Characterization of Fibrinolytic enzyme from *Tricholoma saponaceum*, *The Korean Society of Mycology* **28**(1), 60-65.
 52. Kim, J. H. and Y. S. Kim (1998), Purification and Characterization of Fibrinolytic enzyme from *Armillariella mellea*, *The Korean Society of Mycology* **26**(4), 583-588.
 53. Patton, L. M., D. Pretzer, B. S. Schulteis, K. D. Saggart, K. D. Tennant, and N. K. Ahmed (1993), *J. Biochem. Biophys. Met.* **27**(1), 11-23.
 54. Astrup, T. and S. Mullertz (1952), The fibrin agarose plate method for estimating fibrinolytic activity, *Arch. Biochem. Biophys.* **40**, 346-351.
 55. Bradford, M. M. (1976), A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
 56. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685.