(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0004009
(43) 공개일자 2015년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/48 (2006.01) *C12N 9/76* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0076906
(22) 출원일자 2013년07월02일
심사청구일자 2013년07월02일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
김춘성
광주 남구 서문대로678번길 7, 101동 1002호 (진월동, 대주아파트)
안훈
광주 서구 상무대로911번길 42, 103동 501호 (쌍촌동, 상무힐스테이트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김은구, 송해모

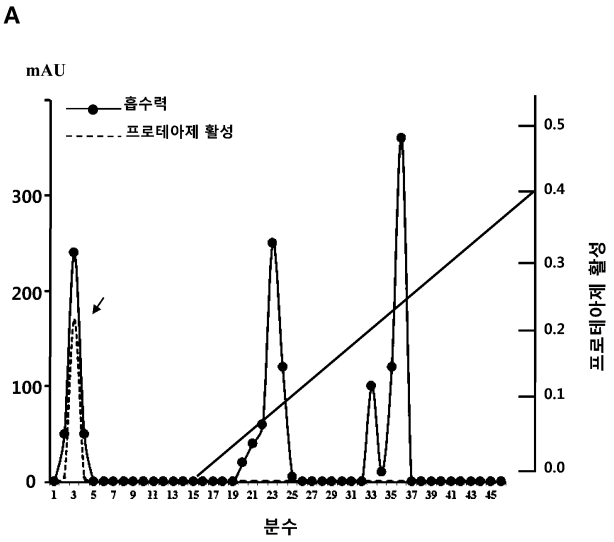
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **만가닥버섯으로부터 유래된 피브린분해 알파 키포트립신계 세린 메타로프로테아제 및 그 정제방법**

(57) 요 약

본 발명은 피브린분해 효소에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 만가닥버섯으로부터 유래된 피브린분해 알파 키포트립신계 세린 메타로프로테아제 및 그 정제방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



(72) 발명자

문성민

광주 서구 풍암순환로 86, 102동 1603호 (풍암동, 삼능남양아파트)

김승연

전남 장흥군 장동면 배산우봉길 7-1,

김도경

광주 북구 호동로 99, 101동 1506호 (문흥동, 우성아파트)

김홍중

광주 북구 설죽로 595, 104동 301호 (일곡동, 롯데아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

만가닥버섯(*Lyophyllum cinerascens*)으로부터 정제된 피브린분해 효소.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 피브린분해 효소는 알파 키포트립신계 세린 메타로프로테아제임을 특징으로 하는, 피브린분해 효소.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 피브린분해 효소의 분자량은 21 kDa임을 특징으로 하는, 피브린분해 효소.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 피브린분해 효소의 최초 8개의 잔기의 N-말단 아미노산 서열은 ITFQSASP임을 특징으로 하는, 피브린분해 효소.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 피브린분해 효소는 최적 반응 pH 8.0 및 37℃의 온도를 각각 갖는 중성 프로테아제임을 특징으로 하는, 피브린분해 효소.

청구항 6

a) *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*의 추출물을 제공하는 단계;

b) 상기 *L. cinerascens(만가닥버섯)의* 추출물을 20mM 트리스-HCl(pH 8.0)에서 용해시키는 단계;

c) 활성화 분획물들을 음이온 교환 모노 Q 5/5 컬럼을 이용하여 고속단백질액체크로마토그래피상에서 더욱 세분화하는 단계;

d) 아조카세인 검정(366nm)을 사용하여 활성화 분획물의 프로테아제 활성을 결정하는 단계;

e) 프로테아제 활성을 나타내는 분획물들은 울트라셀-10k를 이용하여 한외여과에 의해 분배 및 농축시키는 단계;

를 포함하는, 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)으로부터 유래된* 피브린분해 효소의 정제방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 정제방법은 4℃에서 수행됨을 특징으로 하는, 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)*으로부터 유래된 피브린분해 효소의 정제방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 단계 c)에서 상기 음이온 교환 모노 Q 5/5 컬럼은 0.5ml/min의 유동률 및 0~1 M NaCl의 선형 구배에서 동일한 버퍼로 균형이 유지됨을 특징으로 하는, 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)*으로부터 유래된 피브린분해 효소의 정제방법.

청구항 9

제 6 항에 있어서, 상기 정제방법은 상기 단계 e) 이후, 슈퍼덱스 200 100/300 컬럼을 이용하여 크기배제 겔 여과 고속단백질액체크로마토그래피에 의한 추가 정제 단계를 더욱 포함함을 특징으로 하는, *만가닥버섯(Lyophyllum cinerascens)*으로부터 유래된 피브린분해 효소의 정제방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 피브린분해 효소는 제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 따르는 정제방법에 의해 정

제됨을 특징으로 하는, 피브린분해 효소.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피브린분해 효소에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 만가닥버섯으로부터 유래된 피브린분해 알파 키포트립신계 세린 메타로프로테아제 및 그 정제방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식용버섯은 전세계 각기 다른 12,000종의 버섯들 중 2,000종이다. 약 35개의 식용버섯 종이 상업용으로 재배되고 있으며, 거의 200종이 의학 및 약학적 용도로 야생으로부터 수집 및 이용되었다. 최근 수십 년 동안, 식용버섯은 의학 및 약학 연구원들에게 중대한 토픽이 되고 있는 인체 건강을 증대시키고 면역체계를 강화시키기 위해 사용되어오고 있다. 식용버섯의 의학 및 약학적 잠재력을 바탕으로, 과학자들 및 업계에서는 재배된 식용버섯의 질을 향상시키기 위해 상당한 노력을 기울여 왔다. 재배된 식용버섯 제품들은 제품들의 생물학적 기능을 조사하는 임상연구 및 의학 연구를 위해 상당한 주의를 끌어오고 있다. 현재, 의학 및 식용 버섯들은 생물학적 활성화합물의 매력적인 원천이 되고 있다. 그것들은 일반적으로 음식, 향미 물질 및 민속 의약으로서 이용되고 있다. 그들의 추출물 및 생리활성 화합물은 피브린분해 뿐만 아니라 면역증재, 저콜레스테롤 효과, 항암, 항응고 활성 및 안티트롬빈 활성을 보여주는 것으로 보고되고 있다.

[0003] 섬유소는 트롬빈에 의해 피브리노겐으로 형성된 혈전의 주요 단백질 구성요소이다. 불용성 섬유소 섬유는 조직 플라스미노겐 활성제(t-PA), 유로키나제, 혈액 플라스미노겐 활성제, 혈관 플라스미노겐 활성제, 하게만 인자 및 스트렙토키나제 플라스미노겐 콤플렉스와 같은 플라스미노겐 활성제에 의해 플라스미노겐으부터 생성된 플라즈민에 의해 섬유소 분해제품으로 가수분해된다. 섬유성 응괴 형성과 섬유소분해는 생물학적 시스템에 적절히 규정되어 있다. 그렇지만, 혈관에 섬유성 응괴의 축적은 보통 혈전증을 일으키고 심근경색 및 기타 심혈관 질환에 이르게 된다. 이러한 장애는 전세계 걸쳐 사망의 주요 원인이 되고 있다.

[0004] 최근, 임상용으로 사용할 수 있는 피브린분해제는 주로 조직형 플라스미노겐 활성제, 유로키나제형 플라스미노겐 활성제 및 박테리아 플라스미노겐 활성제 스트렙토키나제와 같은 플라스미노겐 활성제들이다. 광범위하게 사용함에도 불구하고, 이러한 모든 제제들은 바람직하지 않은 부작용, 낮은 특이성 갖고 있으며 매우 비싸다는 문제점이 있다. 그러므로, 다양한 소스들로부터 기타 피브린분해 효소들을 위한 조사가 계속되어 오고 있다. 강한 피브린분해 효소들이 뱀독, 지렁이 분비물, 곤충, 해조류, 식품용 미생물 및 한국의 '청국장', 중국의 '도우치', 일본의 '낫토'와 같은 발효식품과 같은 다양한 소스에서 연구되어오고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자는 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여 연구한 결과, 일반적인 식용 버섯중의 하나로 알려져 있는 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)*으로부터 유래한 피브린분해 효소 및 그 정제방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 일 측면에서, 본 발명은 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)*으로부터 정제된 피브린분해 효소에 관한 것이다.

[0007] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)*의 추출물을 제공하는 단계; b) 상기 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)*의 추출물을 20mM 트리스-HCl(pH 8.0)에서 용해시키는 단계; c) 활성화 분획물들을 음이온 교환 모노 Q 5/5 컬럼을 이용하여 고속단백질액체크로마토그래피상에서 더욱 세분화하는 단계; d) 아조카세인 검정(366nm)을 사용하여 활성화 분획물의 프로테아제 활성을 결정하는 단계; e) 프로테아제 활성을 나타내는 분획물들은 울트라셀-10k를 이용하여 한외여과에 의해 분배 및 농축시키는 단계;를 포함하는, 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)*으로부터 유래된 피브린분해 효소의 정제방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0008] 일반적인 식용 버섯중의 하나인 만가닥버섯*(Lyophyllum cinerascens)*으로부터 피브린분해 효소를 추출함으로써

바람직하지 않은 부작용을 방지하고, 높은 특이성을 가지며 특히 비용적으로 저렴한 피브린분해 효소를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따르는, 모노 Q 5/50 컬럼의 이온 교환 크로마토그래피에 의해 수집되고 피브린 분해 활성을 나타내는 분획물들을 나타내는 그래프이다.

도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따르는, 도 1a의 분획물들이 슈퍼덱스 200 100/300 컬럼의 크기배제 크로마토그래피에 의해 더 세분화된 분획물을 나타내는 그래프이다.

도 1c는 본 발명의 일 실시예에 따르는, 정제된 효소의 균질성 및 분자량 단일 밴드를 나타내며(좌측), 정제된 피브린분해 효소의 가수분해 정도를 나타낸다(우측).

도 1d는 본 발명의 일 실시예에 따르는, *L.cinerascens(만가닥버섯)*의 정제된 피브린분해 효소의 분자질량을 나타내는 그래프이다.

도 2a 및 2b는 본 발명의 일 실시예에 따르는, 정제된 효소에 의한 피브리노겐의 가수분해 정도를 나타내는 도면이다.

도 3a 및 3b는 본 발명의 일 실시예에 따르는, 정제된 효소의 단백질분해 활성을 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따르는, 정제된 효소 활성을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하, 본 발명의 일부 실시 예들을 예시적인 도면을 통해 상세하게 설명한다. 각 도면의 구성요소들에 참조부호를 부가함에 있어서, 동일한 구성요소들에 대해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 부호를 가지도록 하고 있음에 유의해야 한다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지 구성 또는 기능에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략한다.

[0011] 이하, 본 발명의 일부 실시 예들을 예시적인 도면을 통해 상세하게 설명한다. 각 도면의 구성요소들에 참조부호를 부가함에 있어서, 동일한 구성요소들에 대해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 부호를 가지도록 하고 있음에 유의해야 한다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지 구성 또는 기능에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략한다.

[0012] 일 실시예에서, 본 발명은 *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*으로부터 정제된 피브린분해 효소를 제공한다.

[0013] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 피브린분해 효소가 알파 키포트립신계 세린 메타로프로테아제임을 특징으로 하는 피브린분해 효소를 제공한다.

[0014] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 피브린분해 효소의 분자량이 21 kDa임을 특징으로 하는 피브린분해 효소를 제공한다.

[0015] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 피브린분해 효소의 최초 8개의 잔기의 N-말단 아미노산 서열이 ITFQSASP임을 특징으로 하는 피브린분해 효소를 제공한다.

[0016] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 피브린분해 효소가 최적 반응 pH 8.0 및 37℃의 온도를 각각 갖는 중성 프로테아제임을 특징으로 하는 피브린분해 효소를 제공한다.

[0017] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 a) *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*의 추출물을 제공하는 단계; b) 상기 *L. cinerascens(만가닥버섯)*의 추출물을 20mM 트리스-HCl(pH 8.0)에서 용해시키는 단계; c) 활성화 분획물들을 음이온 교환 모노 Q 5/5 컬럼을 이용하여 고속단백질액체크로마토그래피상에서 더욱 세분화하는 단계; d) 아조카세인 검정(366nm)을 사용하여 활성화 분획물의 프로테아제 활성을 결정하는 단계; e) 프로테아제 활성을 나타내는 분획물들은 울트라셀-10k를 이용하여 한외여과에 의해 분배 및 농축시키는 단계;를 포함하는, *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*으로부터 유래된 피브린분해 효소의 정제방법을 제공한다.

[0018] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 정제방법이 4℃에서 수행됨을 특징으로 하는 *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*으로부터 유래된 피브린분해 효소의 정제방법을 제공한다.

[0019] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 단계 c)에서 상기 음이온 교환 모노 Q 5/5 컬럼이 0.5ml/min의 유동률 및 0~1 M NaCl의 선형 구배에서 동일한 버퍼로 균형이 유지됨을 특징으로 하는 *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*으로부터 유래된 피브린분해 효소의 정제방법을 제공한다.

[0020] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 정제방법이 상기 단계 e) 이후, 슈퍼덱스 200 100/300 컬럼을 이용하여 크기배제 겔 여과 고속단백질액체크로마토그래피에 의한 추가 정제 단계를 더욱 포함함을 특징으로 하는 *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*으로부터 유래된 피브린분해 효소의 정제방법을 제공한다.

[0021] 또 다른 실시예에서, 본 발명은 상기 피브린분해 효소가 전술한 실시예 중 어느 하나에 따르는 정제방법에 의해 정제됨을 특징으로 하는 피브린분해 효소를 제공한다.

[0022] 이하, 본 발명의 피브린분해 효소 및 그 정제방법을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0023] 일 측면에서, 본 발명은 식용 버섯인 *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*으로부터 정제된 새로운 피브린분해 효소를 제공한다. 피브린분해 효소를 모노 Q 5/5 컬럼의 음이온 교환 크로마토그래피 및 슈퍼덱스 200 100/300 컬럼의 크기배제 겔 여과 크로마토그래피의 결합을 이용하여 정제한다. 이러한 정제 프로토콜은 효소의 80.9-배 정제 및 5.7%의 최종수율을 산출한다. 정제된 효소의 분자량은 SDS-PAGE 및 크기배제 겔 여과에 의해 21 kDa이다. N-말단 아미노산 서열은 알려진 피브린분해 효소의 것과 비유사한 ITFQSASP이다. 정제된 효소는 최적반응 pH 8.0 및 37℃의 온도를 각각 갖는 중성 프로테아제이다. 효소활성은 $Cu2^{+}$ 및 $Co2^{+}$에 의해 억제된다. 그것은 또한 PMSF 및 TPCK에 의해 크게 억제된다. 게다가, 그것은 키모트립신계 세린 메탈로프로테아제를 지칭하는 키모트립신 색원체성 기질로 잘 알려진 S-7388에 비해 더 높은 특이성을 나타낸다. 10 ㎍의 정제된 효소의 상대적인 피브린분해 활성은 피브린 평판상의 1unit/ml 이상의 플라스민보다 두 배 더 크다. 더욱이, 정제된 효소는 우선 Aα-체인을 가수분해하고 다음 피브린의 전구체인 피브리노겐의 Bβ-체인 및 γ-체인으로 이어진다. 그러므로, 이러한 데이터는 식용버섯, *L. cinerascens(만가닥버섯)*으로부터 추출된 피브린분해 효소가 혈전용해 요법 및 혈전성 질환을 예방하는데 유용하다는 것을 제시하고 있다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)*의 추출물을 제공하는 단계; b) 상기 *L. cinerascens(만가닥버섯)*의 추출물을 20mM 트리스-HCl(pH 8.0)에서 용해시키는 단계; c) 활성화 분획물들을 음이온 교환 모노 Q 5/5 컬럼을 이용하여 고속단백질액체크로마토그래피상에서 더욱 세분화하는 단계; d) 아조카세인 검정(366nm)을 사용하여 활성화 분획물의 프로테아제 활성을 결정하는 단계; e) 프로테아제 활성을 나타내는 분획물들은 울트라셀-10k를 이용하여 한외여과에 의해 분배 및 농축시키는 단계;를 포함하는, *Lyophyllum cinerascens(만가닥버섯)으로부터 유래된* 피브린분해 효소의 정제방법을 제공한다.

[0025] **재료**

[0026] *L. cinerascens(만가닥버섯)*의 신선한 자실체(한국 씨드 및 베리어티 서비스, KSVS 2178)가 대한민국 예산의 예당 버섯 주식회사에 의해 제공되었다. 소과 피브리노겐, 인간 피브리노겐, 인간 섬유소, 소의 트롬빈, 인간 트롬빈, 플라스민, 아조카세인, 트리스(히도록시메틸) 아미노메탄(트리스), TEMED(N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민), SDS(황산도데실나트륨), N-토실-L-라이신 클로로메틸 케톤(TLCK), N-a-토실-L-페닐알라닌 클로로메틸 케톤(TPCK), 페닐메탄설포닐 플로라이드(PMSF), 4-(아미디노페닐) 메탄설포닐 플로라이드(APMSF), 에틸렌디아민 사초산(EDTA), 에틸렌글리콜 사초산(EGTA), 아프로티닌, 펩스타틴 A, 및 SDS-PAGE 및 겔 여과 크로마토그래피를 위한 저분자량 마커(marker)가 미국의 시그마 알드리치 컴파니로부터 구입되었다. 기질, S-2238, S-2288, S-2444, S-2765 및 S-7388가 크로모제닉스 컴파니(이태리, 밀라노)로부터 구입되었다. 모노 Q 5/5 및 슈퍼덱스 200 100/300 이 미국의 지이 헬스케어 컴파니로부터 구입되었다. 기타 시약들은 특별한 품질을 갖고 상업적으로 구입되었다.

[0027] **피브린분해 효소 정제**

[0028] 모든 정제 단계들은 4℃에서 수행되었다. 상기 단계로부터의 *L. cinerascens(만가닥버섯)* 추출물이 20mM 트리스-HCl(pH 8.0)에서 용해되었다. 이후, 활성화 분획물들이 0.5ml/min의 유동률 및 0~1 M NaCl의 선형 구배에서 동일한 버퍼로 균형이 유지되는 음이온 교환 모노 Q 5/5 컬럼을 이용하여 고속단백질액체크로마토그래피상에서 더

세분화되었다. 각각의 분획물이 280nm에서 흡수량을 위해 수집 및 측정되었고 피브린평판법에 의해 피브린분해 활성을 위해 스크린되었다. 활성화 분획물의 프로테아제 활성은 아래 기재된 바와 같이 아조카세인 검정(366nm)으로 결정되었다. 피브린분해 활성을 보여주는 분획물들은 울트라셀-10k(미국, 메사추세츠, 밀리포르)를 이용하여 한외여과에 의해 분배 및 농축되었다. 추가 정제는 동일한 유동률에서 동일한 버퍼로 균형을 유지시킨 슈퍼덱스 200 100/300 컬럼을 이용하여 크기배제 겔 여과 고속단백질액체크로마토그래피에 의해 수행되었다. 용리가 280 nm에서 분광광도계로 측정되었고 활성은 아조카세인 검정 및 피브린평판법으로 분석되었다. 이후, 활성화 분획물들은 한외여과에 의해 결합 및 농축되었으며 추가 분석을 위해 정제된 효소로서 이용되었다.

[0029] **분자량의 결정**

[0030] 정제된 효소의 분자량은 도데실 황산 나트리움 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의해 결정되었다. 5 ㎍의 단백질이 5배 샘플 버퍼(60 mm 트리스-HCl(pH 6.8) 25% 글리세롤, 2% SDS, 베타 머캅토에탄올, 0.1% 브로모페놀 청색)와 함께 혼합되었다. 그 혼합물은 5분 동안 100℃에서 끓였고 전기 이동을 작용시켰다. 겔은 쿠마시 브릴리언트 블루 R-250로 염색되었고 효소의 분자량은 표준 마커(미국, 일리노이즈, 록포드)로 결정되었다. 정제된 효소의 분자량을 산정하기 위해서, 우리는 0.5ml/min의 유동률에서 AKTA FPLC(미국 뉴저지, 아머샴 바이오사이언스, 피스카타웨이)를 이용하여 실온에서 크기배제를 수행하였다. 트랜스퍼링(81 kDa), 난백 알부민(43 kDa), 트립시노겐-PMSF(24 kDa) 및 미오글로빈(17.3 kDa)를 포함하는 크기배제 겔 여과 단백질 마커가 사용되었다.

[0031] **섬유소 지아모그래피**

[0032] 섬유소 지아모그래피가 Leber & Balkwill의 방법에 따라 수행되었다. 녹는 겔 용액(12%)은 10 ml의 전체 부피에 준비된 0.1%(w/v) 피브리노겐을 함유하였고 SDS모액이 혼합될 때 유도되었던 불용성 불순물을 제거하기 위해 원심 분리되었다. 소 트롬빈(100 NIH unit/ml) 및 TEMED가 1unit/ml의 최종 농도의 겔 용액에 각각 추가되었다. 정제된 피브린분해 효소는 섬유소 겔로 전기이동 작용되었고 그 후 2.5% 트리톤X-100 용액에서 세척되었고 섬유소를 위해 37℃에서 0.15mM 의 NaCl 및 0.02% $NaNO_3$를 함유한 반응버퍼(20 mM의 트리스-HCl(pH 7.5)를 준비함)를 포함한 배스에서 배양되었다.

[0033] **효소활성에 대한 다양한 조건의 효과**

[0034] 아조카제인 검정이 효소의 피브린분해 활성에 대한 온도의 효과에 대한 평가를 위해 사용되었다. 효소활성을 위한 최적의 온도가 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 및 90 ℃의 온도범위에 걸쳐서 20mM 트리스-HCl 버퍼(pH 8.0)에서 효소활성의 측정에 의해 결정되었다. 효소의 열 안정성을 관찰하기 위해서, 효소활성이 효소를 1시간 동안 20mM 트리스-HCl 버퍼(pH 8.0)에서 다양한 온도(40, 50, 및 60℃)로 배양한 후에 측정되었다. 효소활성을 위한 최적의 pH가 0.5M 글리신-HCl(pH 2.0 및 3.0), 0.5M 아세테이트(pH 4.0 및 5.0), 0.5M 트리스-HCl(pH 6.0, 7.0, 및 8.0), 및 0.5M 글리신-NaOH(pH 9.0 및 10.0) 버퍼에서 잔여효소활성의 측정에 의해 결정되었다. 효소의 pH 안정성이 37℃에서 1시간 동안 배양한 후에 각각의 효소 용액의 잔여 프로테아제 활성의 측정에 의해 산정되었다. 다양한 프로테아제 억제제의 효과가 TPCK, TLCK, EDTA, EGTA, PMSF, APMSF, 아프로티닌 및 펩스타틴 A를 이용하여 조사되었다. 효소는 37℃에서 1시간 동안 20mM 트리스-HCl 버퍼(pH 8.0)에서 다양한 억제제와 함께 미리 배양되었다. 배양 후에, 효소의 잔존활성이 1% 아조카제인으로 측정되었다. 피브린분해 활성에 대한 금속 이온의 효과가 또한 $CuCl_2$, $NaCl_2$, $MnCl_2$, $CoCl_2$, $ZnCl_2$, $MgCl_2$, and $CaCl_2$으로 조사 및 평가되었다. 정제된 효소는 1시간 동안 다른 금속이온으로 사전에 배양되었고 이후 1% 아조카제인을 이용하여 프로테아제 활성의 측정이 이어졌다.

[0035] **피브리노겐분해 SDS-PAGE 검정 및 섬유소분해평판검정**

[0036] 정제된 피브린분해 효소의 피브리노겐분해력은 마츠바라 외의 방법에 따라 수행되었다. 간단하게는, 1% 인간 피브리노겐이 20㎕의 총 부피의 20mM 트리스-HCl(pH 8.0) 버퍼에 5 ㎍의 정제된 효소와 혼합되었고, 10, 20, 30, 40, 50, 및 60분 동안 37℃에서 배양되었다. 그 반응은 1M urea, 4% SDS, 및 4% 베타 머캅토에탄올을 포함하는

변성 버퍼의 추가에 의해 정지되었다. 소화 제품은 12% SDS-PAGE에 의해 분석되었다. 피브린분해 활성은 섬유소 평판을 이용하여 측정되었다. 섬유소평판은 0.1M 인산염 버퍼(pH 8.0), 7.4 ml의 1.5% 아가로스 및 0.1 ml의 소 트롬빈(100 NIH unit/ml)에 2.5 ml의 1.5% 인간 피브리노겐으로 구성된 용액을 부어서 평판으로 만들어 졌다. 평판 안에 용액은 섬유성 응괴층을 형성하기 위해서 실온에서 1시간 동안 남겨두었다. 5㎍의 효소액이 조심스럽게 평판위에 놓여졌고 이후 그 평판은 8시간 동안 37℃에서 배양되었다. 효소활성이 평판상의 리신 부위의 직경의 측정에 의해 산정되었다. 동등한 양의 플라스민 용액(1 NIH unit/ml)이 양성조절로서 사용되었다.

[0037] **아미돌리틱 활성검정**

[0038] 합성 색원체성 기질에 대한 정제된 피브린분해 효소의 아미돌리틱 활성을 결정하기 위해서, 5㎍의 정제된 피브린분해 효소를 함유하고 있는 200㎕의 20mM 트리스-HCl(pH 8.0) 버퍼가 300 ㎕의 0.5mM 기질 S-2238, S-2288, S-2444, S-2765 및 S-7388와 함께 혼합되었다. 10분 동안 37 ℃에서 배양한 후에, 방출된 *p*-니트로아닐린의 양이 405nm에서 마이크로플레이트 리더(미국, 캘리포니아, 서니베일, 분자장치)로 결정되었다.

[0039] **N-말단 서열분석의 결정**

[0040] 정제된 효소는 10% SDS-PAGE의 대상이 되었고 일렉트로블로팅 시스템(미국, 캘리포니아, 바이오-래드)을 이용하여 폴리비닐리덴의 다이플루오라이드 멤브레인(미국, 매사추세츠, 밀리포아)으로 이동되었다. N-말단 서열은 대한민국 서울 단백질 서열분석 연구소에서 자동 단백질 서열분석기(ABI 492, Precise, 퍼킨 엘머, 미국)를 이용하여 에드먼 분해에 의해 결정되었다.

[0041] **통계분석**

[0042] 데이터는 최소한 3개의 개별적인 실험의 ±SEM를 의미하는 것으로 표현된다. 그룹들 사이의 통계비교가 두 개의 테일드 스튜던트 티-테스트(미국, 엑셀, 마이크로소프트)를 이용하여 수행되었다. 통계적 유의도가 *p < 0.05; **p < 0.01로 설정되었다.

[0043] **피브린분해 프로테아제의 정제 및 특성**

[0044] 새로운 피브린분해 프로테아제가 [표 1]에 목록된 음이온 교환 FPLC 및 겔 여과 크로마토그래픽 서열 단계에 의해 *L. cinerascen(만가닥버섯)*으로부터 정제되었고 도 1에 도시되어 있다.

표 1

	총단백질 (mg)	총프로테아제 활성(U)	특이 활성 (U/mg)	수율 (%)	정제도
조추출물	178.9	930.2	5.2	100	1
음이온 교환	18.26	368.8	20.2	10.2	3.9
겔여과	0.67	314.4	469.3	5.7	80.9

프로테아제 활성은 재료 및 방법에서 기재된 바와 같이 아조카세인 시금을 이용하여 측정되었다.

[0045]

[0046] 피브린분해 활성은 정제의 지수로서 사용되었다. 거의 178.9mg의 단백질이 에탄올 침전 이후 천연추출물로부터 획득되었다. 천연효소가 모노 Q 5/50 컬럼의 이온 교환 크로마토그래피에 적용되었고 화살표로 표시된 바와 같이 피브린분해 활성을 나타내는 분획물들이 수집되었다(도 1A). 그 분획물들은 슈퍼덱스 200 100/300 컬럼의 크기배제 크로마토그래피에 의해 더 세분화되었다(도 1B). 각각의 정제 단계의단백질들은 SDS-PAGE의 대상이 되었다. 정제된 효소는 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 발견되었고 환원 조건하에서 약 21kDa의 단일 밴드를 발생하였다(도 1C, 좌측). *L.cinerascens(만가닥버섯)*의 정제된 피브린분해 효소의 분자질량은 ACTC fast FPLC를 이용하여 슈퍼덱스 200 100/300 컬럼에 대한 크기 배제에 의해 산정된 바와 같이 21 kDa인 것으로 발견되었다(도

1D). 이러한 값은 SDS-PAGE에 의해 산정된 값과 유사하다. 피브린 분해력을 확인하기 위해서, 정제된 피브린분해 효소가 피브린 효소도의 대상이 되었다. 정제된 피브린분해 효소는 도시된 바와 같이 효과적으로 피브린을 가수분해할 수 있었다(도 1C의 우측).

[0047] **피브리노겐 및 피브린분해 활성 검정**

[0048] 정제된 효소에 의한 피브리노겐의 가수분해는 12% SDS-PAGE에 의해 분석되었다(도 2A). 우선, 정제된 효소는 즉시 피브리노겐의 Aα-체인을 가수분해하였고, 이후 10분의 배양 후에 Bβ-체인으로 이어졌다. 효소들은 또한 γ-체인을 가수분해하되, 더욱 천천히 수행하였다. 피브리노겐 γ-체인은 1시간의 배양 후에 효소에 의해 거의 완전히 가수분해되었다. 정제된 피브린분해 효소는 섬유소평판법에 의해 조사되었다. 도 2B에서와 같이, 정제된 효소의 추가는 청정 지역을 초래하였고 청정의 크기는 플라스민(1NIH unit/ml)보다 더 컸다.

[0049] **정제된 효소의 생리활성**

[0050] 효소의 최적온도는 반응온도를 다양하게 함으로써 결정되었으며, 효소의 열 안정성은 1시간 동안 다른 온도에서 정제된 피브린분해 효소를 배양하여 조사되었다. 도 3A에서와 같이, 정제된 효소는 30 내지 60℃사이의 온도에서 활발하였고, 40℃에서 최대활성을 보여주었다. 정제된 피브린분해 효소의 활성에 대한 pH의 효과는 다양한 pH값에서 버퍼들에 의해 결정되었다. 도 3B에서와 같이, 정제된 효소는 넓은 pH범위(pH 2~10)에서 활발화였고, pH8에서 최대활성을 보여주었다. 정제된 효소는 1시간 동안 37℃에서 7~8의 pH범위에서 안정적이었다. 정제된 효소활성에 대한 여러가지 프로테아제 억제제의 효과는 [표 2]로 요약된다.

표 2

[0051]

억제제	농도	잔여 활성(%)
무		100 ± 2.0
아프로티닌	1 ug/ml	86 ± 1.6
TPCK	5 mM	67 ± 1.1
TLCK	5 mM	88 ± 1.7
EDTA	5 mM	51 ± 1.1
EGTA	5 mM	62 ± 1.5
PMSF	1 mM	46 ± 1.8
APMSF	1 mM	85 ± 1.1
펩스타틴 A	1 ug/ml	68 ± 0.9

[0052] 정제된 효소는 세린 프로테아제 억제제인 1mM PMSF에 의해 강하게 억제되었고 아스파르트산 프로테아제 억제제 및 키모트립신 억제제로서 각각 알려진 1㎍/ml의 펩스타틴 A 및 5mM의 TPCK에 의해 강력하게 억제되었다. 게다가, 정제된 효소는 또한 메타로프로테아제 억제제로서 잘 알려진 5mM EDTA 및 EGTA에 의해 강하게 억제되었다. 게다가, 효소활성에 대한 여러 개의 금속이온의 효과는 37℃에서 1시간 동안 1.0mM의 각각의 금속이온과 함께 효소를 배양한 후 잔여 효소활성의 측정에 의해 조사되었다(표 3).

표 3

금속 이온	농도	잔여 활성 (%)
무		100 ± 2.0
$Cu2^+$	1 mM	55 ± 2.3
$Na2^+$	1 mM	79 ± 4.6
$Mn2^+$	1 mM	99 ± 1.8
$Co2^+$	1 mM	39 ± 6.9
$Zn2^+$	1 mM	77 ± 3.8
$Mg2^+$	1 mM	92 ± 1.5
$Ca2^+$	1 mM	101 ± 4.8

[0053]

[0054] 정제된 효소는 Cu^{2+} 및 Co^{2+}에 의해 강하게 억제되었지만, 정제된 효소활성은 Ca^{2+}에 의해 변경되지 않았다. 기질 특이성을 조사하기 위해서, 우리는 [표 4]에 보여지는 바와 같이 각기 다른 5개의 합성 색원체성 기질들에 대한 정제된 피브린분해 효소의 가수분해 활성을 측정하였다.

표 4

합성 프로테아제 기질	프로테아제
H-D-Phe-Pip-Arg-pNA (S-2238)	트롬빈
H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288)	조직 플라스미노겐 활성인자
Glu-Gly-Arg-pNA (S-2444)	유로키나제
N-α-Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA (S-2765)	Xa 인자
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (S-7388)	알파-키모트립신

[0055] **상기 기질들은 리스트 된 각각의 프로테아제에 대해 효과적이다.**

[0056] 테스트된 모든 기질들은 정제된 피브린분해 효소에 의해 가수분해되었다. 테스트된 기질들 중에서, 정제된 효소 활성은 키모트립신 기질, S-7388(Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA)에 대하여 크게 나타났다(도 4).

[0057] **N-말단 아미노산 서열의 분석**

[0058] 최초 8개의 잔기의 N-말단 아미노산 서열은 ITFQSASP로서 결정되었다. NCBI 블라스트는 기타 기존의 피브린분해 효소 및 기타 버섯 세린 프로테아제로 어떠한 서열 상동성도 나타내지 않았다. 이러한 자료는 *L. cinerascens (만가닥버섯)*으로부터 정제된 효소가 신규한 키모트립신계 세린 메타로프로테아제임을 제시하고 있다.

[0059] 본 발명에서, 본 발명자는 먼저 신규한 키모트립신계 세린 메타로프로테아제가 식용버섯인 *L. cinerascnes(만가닥버섯)*으로부터 정제되었음을 밝혔다. 정제된 효소의 분자량은 SDS-PAGE 및 크기배제 겔 여과(도 1)에 의해 21kDa인 것으로 계산되었다. *L. cinerascens(만가닥버섯)*의 정제된 효소의 분자량은 포유류, 어류 및 인서트 키모트립신 프로테아제(20-30 kDa)로 부터 보고된 분자량들과 유사하였다. 더욱이, 원 조건하의 정제된 효소의 자이모그래피는 프로테아제 활성을 나타내었다.

[0060] 정제된 효소는 세린 프로테아제 및 메탈로프로테아제에 대한 다양한 특별 억제제에 의해 영향을 받았다. PMSF 및 EDTA는 정제된 효소가 정제된 효소의 피브린분해 활성을 크게 감소시켰으며 정제된 효소가 세린 메타로프로테아제임을 나타내었다. 게다가, TPCK는 또한 정제된 효소의 피브린분해 활성을 크게 억제하였다(표 3). 합성 키모트립신 억제제는 달걀흰자위, 리마콩, 감자 및 나무콩의 자연억제제 뿐만 아니라 TPCK, ZPCK 및 PMSF에 알

려져 있다. 효소의 아미돌리틱 활성은 여러 개의 합성 색체원성 기질을 가지고 조사되었다(도 4). 효소는 세린 프로테아제로서 알려져 있는 알파 키모트립신을 위한 기질로서 Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA에 비해 가장 높은 특이성을 보여주었고 기타 테스트된 합성 기질에 비해 더 낮은 활성을 보여주었다. 이러한 결과는 정제된 효소가 키모트립신계 세린-메타로프로테아제라는 것을 강하게 뒷받침해주고 있다. 그것은 *Cordyceps militaris(동충하초, 31)*의 키모트립신계 포로테아제, *Codium divaricatum(말청각, 32)*의 말청각프로테아제, *Catharsius molossus (말레이몰로쑤스소똥구리, 33)*의 카타르시오스 포로테아제-1 및 *Eisenia foetida(줄지렁이, 34)*의 혈전용해효소에 대해서 보고된 유사한 패턴이었다. 정제된 효소에 대한 pH의 효과가 조사되었다(도 3). 흥미롭게도, 정제된 효소에서는 넓은 pH범위의 활성(6 내지 9)이 모니터 되었다. 유사한 결과가 *Penaeus monodon(얼룩새우,* 35)로부터 정제된 키모트립신에 대해 보고되었다. 피브리노겐 분해 패턴은 정제된 효소가 즉시 피브린 Aα-체인 및 Bβ-체인을 가수분해한다는 것을 드러냈다. 이것은 60분 이내에 γ-체인의 빠른 소화로 이어졌다(도 2). 이러한 결과는 피브리노겐 분해 패턴이 *Agkistrodon contortrix*(아크키스트로돈속, 36) 및 *Codium divaricatum*(말청각, 37)의 피브린분해 효소에 의해 빠르게 피브리노겐 Aα-체인 및 Bβ-체인을 가수분해하였다는 유사한 보고를 갖는다. 더욱이, 정제된 효소의 피브린분해 활성은 플라스민보다 더 큰 청정의 크기 및 청정 영역의 형성을 보여주었다. 정제된 효소는 인공 섬유소의 직접적인 분열을 통해 작용하기 때문에 직접적으로 작용하는 피브린 분해제인 것으로 입증되었다. 이러한 결과로, 우리는 정제된 효소가 피브린분해 효소로서 작용한다는 것을 제공한다. 이러한 결과로, 우리는 이러한 정제된 효소는 혈전용해요법을 위해 채택될 수 있을 뿐만 아니라 동맥 및 정맥에 비정상적인 혈전의 형성을 방지할 수 있다는 것을 제시한다.

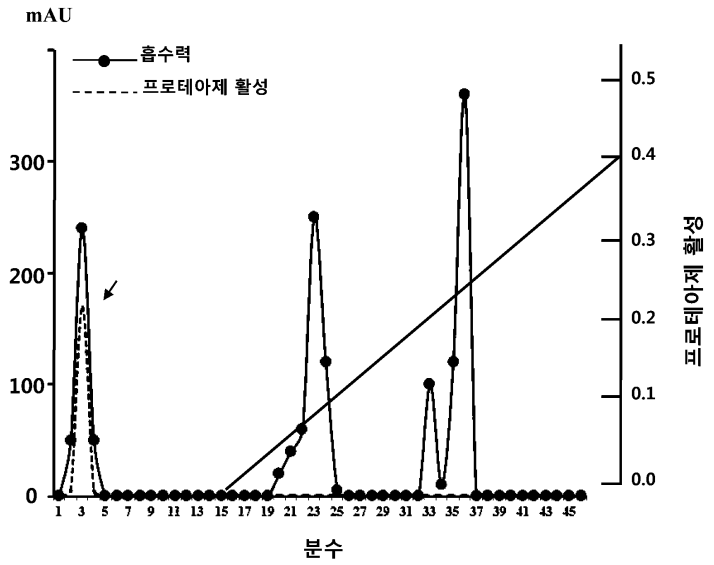
[0061] 요컨대, 식용버섯인 *L. cinerascens(만가닥버섯)*으로부터 정제된 키모트립신계 세린 메타로프로테아제는 혈전용해요법을 위해 유용하며 룸브로키나제 및 나토키나제와 같은 알려진 피브린분해 효소와 유사하다.

[0062] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 수정 및 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시 예들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

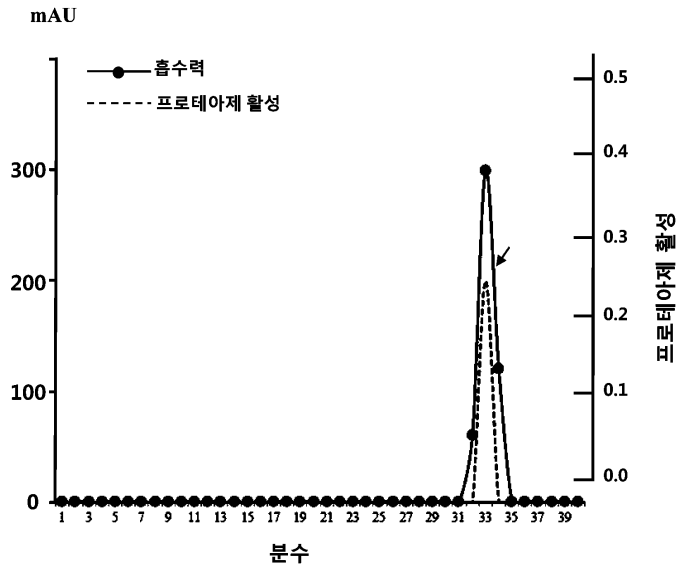
도면1a

A



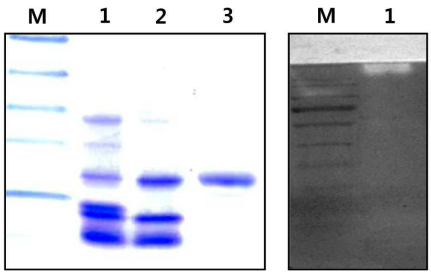
도면1b

B

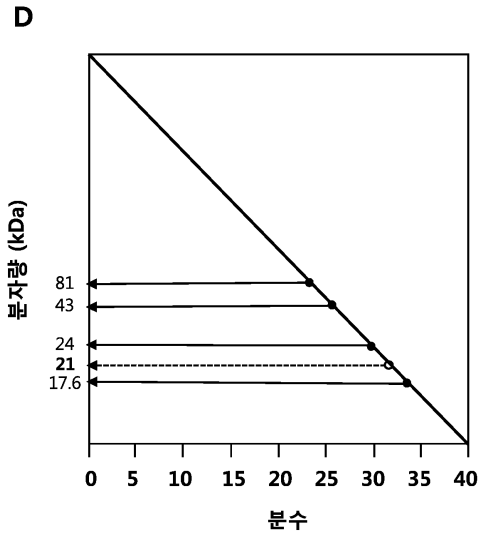

mAU
흡수력
프로테아제 활성
300
200
100
0
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
프로테아제 활성
1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25 27 29 31 33 35 37 39
분수

도면1c

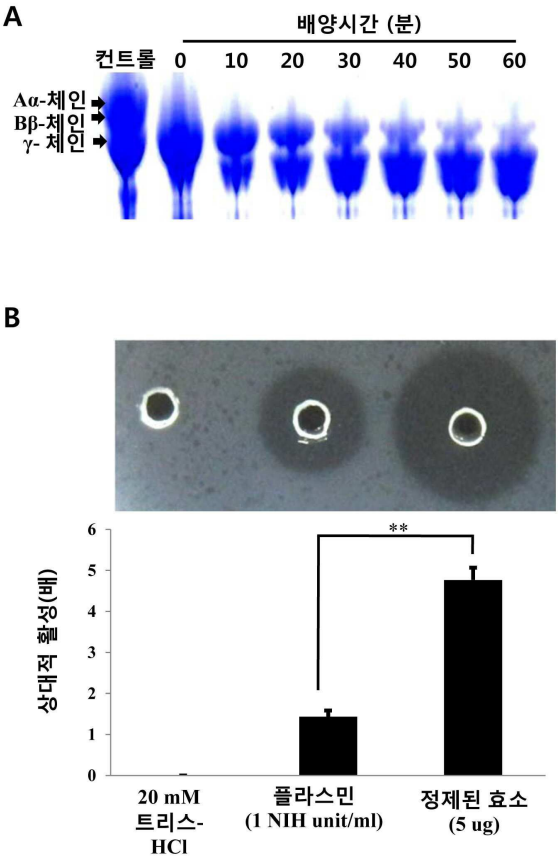
C


M
1
2
3
M
1

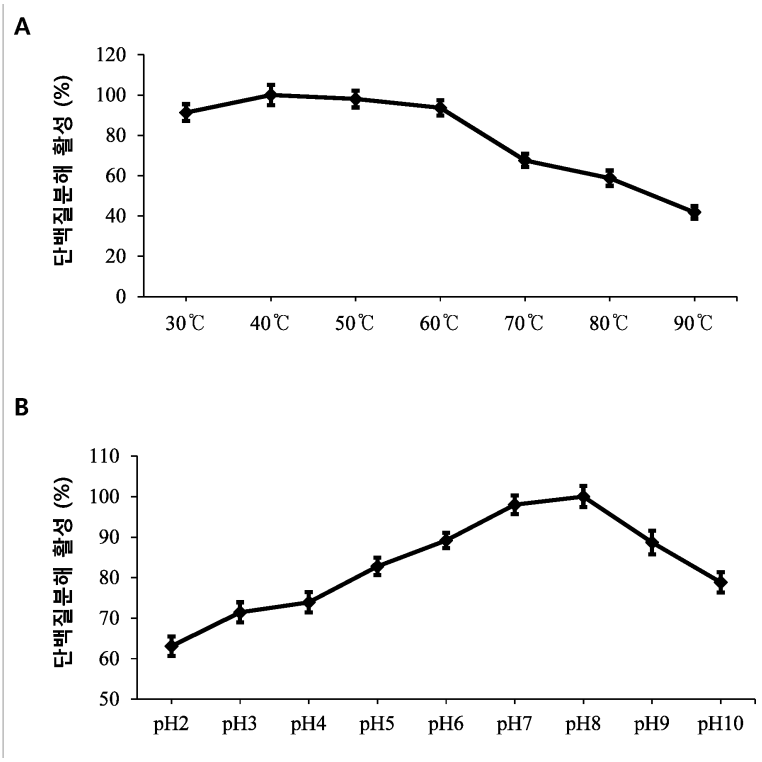
도면1d


D
분자량 (kDa)
81
43
24
21
17.6
0 5 10 15 20 25 30 35 40
분수

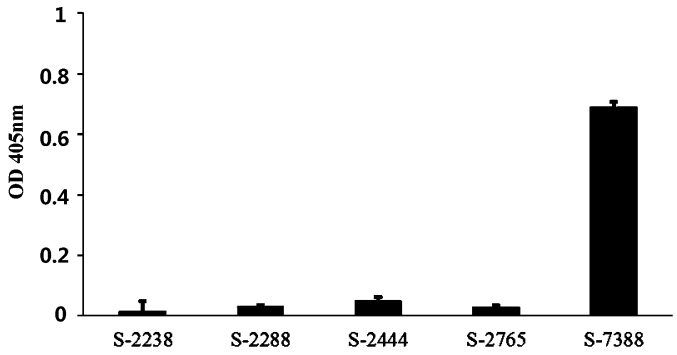
도면2


A
배양시간 (분)
컨트롤 0 10 20 30 40 50 60
Aα-체인
Bβ-체인
γ- 체인
B
**
상대적 활성(배)
0 1 2 3 4 5 6
20 mM 트리스-HCl
플라스민 (1 NIH unit/ml)
정제된 효소 (5 ug)

도면3


A
단백질분해 활성 (%)
120
100
80
60
40
20
0
30℃
40℃
50℃
60℃
70℃
80℃
90℃
B
단백질분해 활성 (%)
110
100
90
80
70
60
50
pH2
pH3
pH4
pH5
pH6
pH7
pH8
pH9
pH10

도면4


OD 405nm
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
S-2238
S-2288
S-2444
S-2765
S-7388