



# 떡장어 유래의 카텝신 B 유전자 클로닝, 발현 및 효소학적 활성 측정

장진현 · 채준영\* · 이형호†

국립수산과학원(연구원) · \*부경대학교(학생) · †부경대학교(교수)

## Cloning, Expression and Enzymatic Activity Assay of Cathepsin B from Hagfish(*Eptatretus burgeri*)

Jin Hyeon JANG · Jun Young CHAE\* · Hyung Ho LEE†

National Institute of Fisheries Science(researcher) · \*Pukyong National University(student) ·

†Pukyong National University(professor)

### Abstract

Hagfish belongs to cyclostomata which has different characteristics from teleost and chondrichthyes. So, they are considered to have important taxonomic position. They are consumed as food and their skin can be used for leather. Cathepsin B is an enzyme classified as cysteine protease and papain family. Also, it can act as endopeptidase. It is involved in the process to degrade proteins in lysosome. In this research, we identified nucleotide and amino acid sequence of cathepsin B in *Eptatretus burgeri*. The nucleotide sequence length of *EbCtsB* is 1694 bp including 5'-UTR (107 bp), ORF (1002 bp), and 3'-UTR (585 bp). ORF encode 333 AA (amino acid sequences) which molecular weight is 36.8 kDa. And we purified recombinant *EbCtsB* and conducted activity assay using diverse pH condition, substrates, inhibitors, metal ions, and detergents. Z-RR-AMC considered as good substrate of *EbCtsB* have optimal activity at pH 7.5. Antipain is the best inhibitor of *EbCtsB*. Also, ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, and HgCl<sub>2</sub> can decrease the activity of *EbCtsB*. MgSO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub> can increase its activity. In the presence of SDS, the activity of *EbCtsB* is decreased.

**Key words** : Hagfish, Cathepsin B, Cloning, Expression, Enzymatic activity assay

### I. 서론

떡장어(*Eptatretus burgeri*)는 한국과 일본 등 해안에서 서식하며, 식용으로 많이 소비되고 있는 어종 중 하나이다. 주로 10 ~ 270m 깊이 바다에서 서식한다. 떡장어는 척삭동물문(Chordata), 원구류강(Cyclostomata), 떡장어목(Myxiniiformes), 피장어과(Myxinidae)에 속한다. 원구류강은 같은 어류에

속하는 경골어류와 연골어류와는 달리 턱뼈를 가지고 있지 않는 특징이 있다. 또한, 척삭동물문 중에 가장 하등한 종으로 알려져 있다. 이러한 이유 때문에 어류로 분류를 하지 않는 경우도 있지만 대부분은 어류로 분류를 하는 것이 일반적이다.

이렇듯 떡장어는 다른 어류와는 달리 눈이 퇴화되었고, 척삭(Notochord)을 가지며, 상대적으로

† Corresponding author : 051-629-5864, hyunghl@pknu.ac.kr

\* 이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2017년)에 의해 연구되었음

긴 장(Intestine)을 가지고 있다. 또, 피부(Skin)에는 점액을 분비하는 점액선(Mucous gland)이 있고, 비늘과 지느러미가 없는 특징을 가지고 있다(Do Yong-Hyun et al., 2014). 위와 같은 특징들 때문에 먹장어는 살아있는 화석이라 불리는 등 계통학적으로 중요한 위치를 차지하고 있다.

카텡신(Cathepsin) B는 시스테인(Cysteine) 프로테아제(Protease)로 papain family에 속한다(Kirschke H. et al., 1995). 주로 세포에서는 외부에서 들어온 단백질을 리소좀 내에서 분해하는 과정에 관여한다(Bohley P. and Per Ottar Seglen, 1992). 카텡신 B의 기질(Substrate)이 결합하는 위치는 29번째의 시스테인(Cysteine)과 199번째의 히스티딘(Histidine) 부위이다(Musil Dj et al., 1991). 카텡신 B는 다른 시스테인 프로테아제와는 달리 아르기닌(Arginine)도 결합을 할 수 있는데, 245번째의 글루탐산(Glutamic acid)가 존재하기 때문이다(Hasnain S. A. D. I. Q. et al., 1993). 이 뿐만 아니라 펩티딜디펩티다아제(Peptidyl dipeptidase)로서도 작용할 수 있다. 다른 papain family와는 달리 두 가지의 효소적 기능을 가지고 있기 때문에 상대적으로 엔도펩티다아제(Endopeptidase)로서의 기능이 떨어진다고(Cyglar Miroslaw et al., 1996).

차세대 염기서열 분석(Next Generation Sequencing, NGS)의 발달로 인하여 사람(Human), 쥐(Mouse) 등의 포유류와 어류에서는 모델생명체(Model organism)인 제브라피쉬(Zebrafish)처럼 게놈(Genome)의 정보와 유전자들의 정보가 알려져 있다. 하지만 먹장어 경우, 게놈 정보는 알려져 있지만, 유전자들의 대한 정보는 턱 없이 부족하다. 이러한 점에 착안하여 본 연구자들은 리소좀 내의 단백질 분해와 갑상선호르몬(Thyroid hormones)의 생성에 관여하는 카텡신 B를 연구대상 유전자로 선정하였다(Mort John S. and David J. Buttle, 1997).

본 연구에서는 먹장어 유래의 카텡신 B 유전

자의 서열을 밝히고, 대장균(*Escherichia coli*)을 이용해 재조합 단백질(Recombinant protein)을 발현하였다. 재조합 단백질을 정제를 통해 순수하게 분리하여 활성 측정(Activity assay)을 하였다. 본 연구의 결과를 통해 식용과 가축으로 쓰이는 먹장어와 카텡신 B에 대한 보다 나은 이해와 그로 인한 먹장어에 대한 관심의 증가로 인해 어가 소득에 도움이 될 것으로 기대된다.

## II. 연구 방법

### 1. 먹장어(*Eptatretus burgeri*) Cathepsin B의 cDNA Cloning

*E. burgeri* cathepsin B 유전자의 전체 길이를 식별하기 위해, 어류 *cathepsin B*에서 높게 보존된 부위에서 설계된 Oligonucleotides를 디자인하였다. 총 RNA는 하이브리드-R Kit (GeneAll)를 사용하여 먹장어로부터 분리하였다. cDNA는 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)와 SuperScript™ RT (Invitrogen)를 사용하여 분리된 mRNA에서 합성되었다.

SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech)를 사용하여 cDNA 혼합물과 5'-RACE 및 3'-RACE 프라이머인 먹장어 특이적인 프라이머와 Universal 프라이머를 이용하여 5'-RACE와 3'-RACE cDNA를 제작하였다. 본 연구에 사용된 프라이머 서열은 <Table 1>에 수록하였다.

증폭된 RACE 산물은 pGEM T-Easy 벡터 (Promega)에 삽입하여 재조합체를 만들고, 이를 *E. coli* DH5  $\alpha$  수용 세포에 형질전환시켰다.

형질전환된 *E. coli*는 100g/ml of ampicillin, 40g/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside (X-Gal) 와 0.4 mM isopropyl-thiogalactopyranoside (IPTG)가 첨가된 Luria-Bertani 평판배지에서 배양하여, 무작위로 배양된 흰 균락을 골라 PureHelix Fast-n-Pure Plasmid Kit (NANOHELIX)를 사용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다.

<Table 1> Oligonucleotide primers used in PCR amplification of Cathepsin B gene of *E. burgeri* (F, Forward; R, Reverse)

Primer name	5'-3' sequence	Information
EbCtL-F	GCG ACT TCA CCT GCT GAT A	Primers for cDNA library screening
EbCtL-R	AAG GAG GAT TCA TAT TTA TTT CCA C	
5'pGEX	GGG CTG GCA AGC CAC GTT TGG TG	Sequencing primers
3'pGEX	CCG GGA GCT GCA TGT GTC AGA GG	
EcoRI-EbCtB-pro	CCG GGA TCC CAA TGT ATT CCA CCA CCC CCA C	Primers for the construction of expression vector
XhoI-EbCtB	CCG CTC GAG TCA TCT AAG TTT TGG AGT CCC AGC	

재조합된 염기서열은 M13(-20)F/M13(-20)R 프라이머를 이용하여 COSMO co, Ltd. (Seoul, Korea)에서 서열분석을 하였다. 밝혀진 염기서열은 GeneBankDatabase (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)을 통하여 유사성을 조사하였다.

## 2. 먹장어(*Eptatretus burgeri*) Cathepsin B의 서열분석 및 계통학적 분석

*EbCtB* 아미노산 서열의 유사성 분석은 BioEdit (Hall Tom A., 1999), 시그널 펩타이드는 SignalP 4.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)를 이용하여 분석하였다. GENETYX Version 7.0.3 (Genetyx Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 아미노산 서열의 다중 정렬을 분석하고, MEGA 6의 neighbor-joining법을 이용하여 계통수를 그렸다 (Tamura Koichiro et al., 2013).

## 3. 재조합 proEbCtB의 *E. Coli* 발현 및 정제

재조합 *EbCtB* 발현백터를 *E. Coli* strain BL21(DE3)에 구축하기 위해, *E. burgeri* procathepsin B 서열이 포함된 서열에 BamHI/XhoI restriction sites (underlined)를 이용해 프라이머를 구축하여 다음 프라이머 서열을 제작하여, EcoRI-proEbCtB-F, 5'-CCCGGGATCCCAATGTATT

CCACCACCCCCAC-3'; XhoI-proEbCtB-R, 5'-CCGC TCGAGTCATCT AAGTTTGGAGTCCCAGC-3') PCR을 한 후, 다음과 같은 969bp의 단편을 pGEX-4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech)에 삽입하였다. 재조합 플라스미드인 proEbCtB/pGEX4T-1을 *E. coli* strain BL21(DE3)에 형질전환하였다. 형질전환된 세포는 암페실린 (50g/ml)이 함유된 LB 배지에서 약 3시간동안 37 °C에서 배양한 후, Isopropyl-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도 0.4mM가 되도록 첨가한 후 20°C에서 약 6시간을 배양했다. 과발현된 세포는 수확하여, phosphate buffered saline (PBS)에 재현탁시킨 후, sonicator (Vibra cell, Sonics & materials Inc, USA)를 이용해 세포를 파괴시킨 다음 4°C에서 20,000g의 속도로 20분간 원심분리하였다. 그 후 glutathione S-transferase (GST)분리를 위해 4°C에서 glutathione-Sepharose 4B column (Pharmacia Biotech Co., USA)를 이용해 proEbCtB를 추출하였다. 추출된 단백질은 Centrifugal Filters Centriprep 30K devices (Merrck Millipore)를 이용해 추출된 단백질을 농축하였다.

## 4. SDS-PAGE 및 Western Blotting

정제된 proEbCtB 단백질은 12% SDS-PAGE gel에 loading하여 Commassie brilliant blue R-250로

염색하였다. Western blotting은 Prestained molecular weight markers (Bio-Rad, USA)를 Standard로 하여 gel을 전기영동 한 다음 mouse monoclonal anti-GST antibody (1:2000, Santa Cruz Biotechnology)을 이용하여 수행되었다.

## 5. 효소학적 분석

*EbCb*의 단백질 활성은 Barret and Kirschke의 변형 방법에 따라 분석되었다(Barrett, Alan J., and Heidrun Kirschke., 1981).

Microplate Fluorometer (Packard Co. USA) excitation wavelength 380nm, emission wavelength 460nm를 이용하여 7-amido-4methylcoumarin(AMC)를 측정하였다. 효소 활성의 최적 pH는 기질인 Z-Phe-ARG-AMC를 이용하여 100mM sodium acetate buffer에서 pH 3-11 범위에서 측정하였다. 이를 바탕으로 다양한 기질, 저해제, 금속이온, 계면활성제를 이용하여 Assay를 진행하였다.

## III. 연구 결과

### 1. 먹장어(*Eptatretus burgeri*) Cathepsin B의 cDNA Cloning

먹장어 카텝신 B의 유전자 서열을 밝히기 위해, 먹장어 조직에서 추출한 total RNA로부터 합성한 cDNA를 사용하여 PCR을 진행하였다. 먼저, 일부 서열을 밝히기 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)로부터 타종의 카텝신 B 유전자들을 이용해 degenerated primer를 제작하였다. 이를 통해 밝혀진 서열을 이용해 각각 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA End) PCR (Polymerase Chain Reaction)와 3'-RACE PCR을 진행하였다.

클로닝 결과, 먹장어 카텝신 B의 염기서열 길이는 총 1694 bp였으며, 5'-UTR은 107 bp, 3'-UTR은 585 bp의 길이를 가지고 있었다. 또한,

ORF는 1002 bp로 총 333개의 아미노산의 정보를 가지고 있었다([Fig. 1]). 이로부터 나오는 먹장어 카텝신 B의 분자량은 약 36.8 kDa으로 밝혀졌다.

### 2. 먹장어(*Eptatretus burgeri*) Cathepsin B의 서열분석 및 계통학적 분석

먹장어 카텝신 B의 시그널 펩타이드(Signal peptide), 프로 펩타이드(Pro peptide), mature peptide를 알기 위해 분석을 실시하였다. 분석 결과, 1번째 메티오닌(Methionine)부터 20번째 프롤린(Proline)까지가 시그널 펩타이드, 21번째 프롤린(Proline)부터 80번째 글루탐산(Glutamic acid)까지 프로 펩타이드, 81번째 류신(Leucine)부터 333번째 아르기닌(Arginine)까지가 mature peptide로 밝혀졌다([Fig 2]).

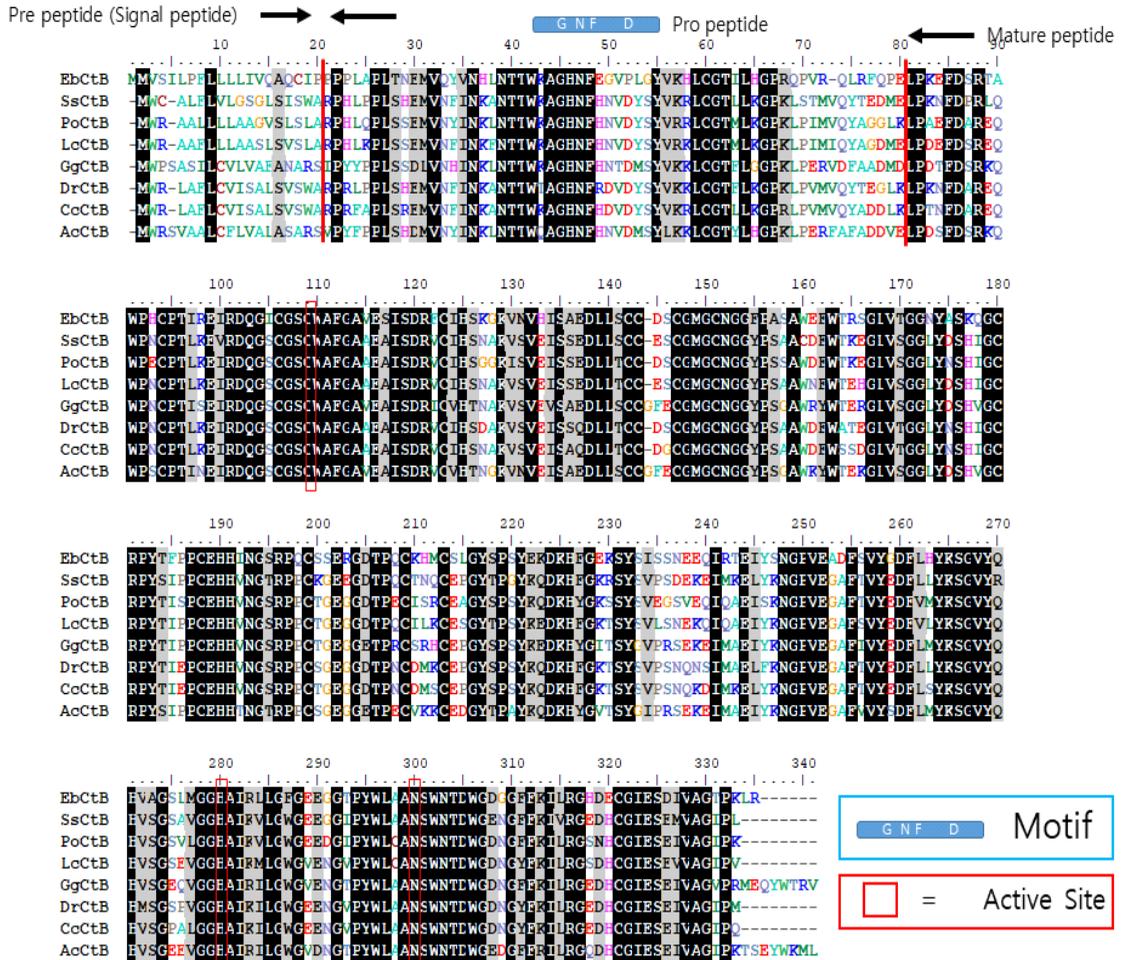
아미노산의 서열 유사성 분석을 위해 NCBI genebank로부터 연어(*Salmo salar*), 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 부세(*Larimichthys crocea*), 닭(*Gallus gallus*), 제브라피쉬(*Danio rerio*), 잉어(*Cyprinus carpio*), 캐롤리나 애눌(*Anolis carolinensis*)의 카텝신 B 아미노산 서열을 얻었다. 이를 이용해 타종의 카텝신 B와 먹장어 카텝신 B의 아미노산 서열의 유사성을 비교하였다. 비교 결과, GNFD motif 중 글리신(Glycine), 아스파라긴(Asparagine), 페닐알라닌(Phenylalanine)은 동일한 아미노산을 가지고 있었지만, 아스파르트산(Aspartic acid) 자리에는 프롤린(Proline)이 존재하였다. 또한, 활성 부위(Active site)인 시스테인(Cysteine), 글루탐산(Glutamic acid), 아스파라긴(Asparagine)은 다른 종과 일치하는 아미노산을 가지고 있었다.

계통학적 분석을 위해 다른 종의 프로테아제(Protease) 아미노산 서열을 NCBI로부터 얻었다. 프로테아제의 아웃그룹(Out group)으로는 아스파르트산 프로테아제(Aspartic protease)와 세린 프로테아제(Serine protease)를 사용하였다. 또, 카텝신 B-like의 아웃그룹으로는 카텝신 L-like를 사용하였다.

3	GCG GGG GCT CAT GTG ATC TGC GCT CCC TCT TTC GAA TAC AAA CCC	47
48	AGA AGC TCT TCT ATT CTG AAC GCG GGG GCG CCG TTG TTT GTT GTT	92
93	CAA GGA AGA ATC ATC ATG ATG GTG TCA ATA CTG CCA TTT CTG CTT M M V S I L P F L L	137
138	TTG CTA ATA GTG CAA GCA CAA TGT ATT CCA CCA CCC CCA CTG GCT L L I V Q A Q C I P P P P L A	182
183	CCA CTG ACC AAC GAG ATG GTT CAA TAC GTC AAT CAT CTG AAC ACC P L T N E M V Q Y V N H L N T	227
228	ACG TGG AAG GCT GGA CAC AAC TTT GAG GGT GTA CCC TTG GGT TAT T W K A G H N F E G V P L G Y	272
273	GTG AAG CAT CTC TGT GGA ACC ATC CTC CAT GGG CCT CGC CAA CCT V K H L C G T I L H G P R Q P	317
318	GTC CGA CAG TTG AGG TTT CAA CCA GAG CTA CCT AAA GAG TTT GAC V R Q L R F F P E L P K E F D	362
363	TCG CGG ACA GCA TGG CCT CaT TGT CCG ACC ATC CGA GAG ATC CGT S R T A W F H C P T I R E I R	407
408	GAC CAG GGC ATC TGC GGT TCA TGC TGG GCT TTT GGT GCC GTG GAG D Q G I C G S C W A F G A V E	452
453	TCC ATC TCT GAT CGT TTT TGC ATC CAC TCC AAA GGG AAG GTG AAC S I S D R F C I H S K G K V N	497
498	GTT CAC ATC TCC GCC GAA GAT CTa CTC TCC TGC TGT GAT TCT TGT V H I S A E D L L S C C D S C	542
543	GGA ATG GGG TGT AAC GGT GGT TTT CCT GCT TCG GCT TGG GAA TTC G M G C N G G F P A S A W E F	587
588	TGG ACT CGG TCG GGG CTG GTA ACG GGT GGA AAC TAT GCA AGT AAA W T R S G L V T G G N Y A S K	632
633	CAA GGG TGT CGC CCA TAC ACA TTT CCA CCA TGT GAG CAC CAC ATT Q G C R P Y T F P P C E H H I	677
678	AAT GGA TCT CGC CCA CAA TGT TCC AGT GAG CGT GGA GAC ACA CCT N G S R P Q C S S E R G D T P	722
723	CAG TGC AAA CAC ATG TGC AGC CTA GGC TAC TCG CCC TCA TAT GAA Q C K H M C S L G Y S P S Y E	767
768	AAG GAC AAG CAC TTT GGT GAG AAA TCC TAC AGT ATT AGC TCA AAC K D K H F G E K S Y S I S S N	812
813	GAG GAA CAG ATA CGA ACA GAG ATA SAC TCG AAT GGT CCT GTG GAA E E Q I R T E I Y S N G P V E	857
858	GCT GAC TTC AGT GTG TAT GGA GAT TTC TTG CAC TAC AAG TCA GGG A D F S V Y G D F L H Y K S G	902
903	GTT TAC CAG CAC GTA GCT GGT TCA TTA ATG GGT GGC CAT GCC ATT V Y Q H V A G S L M G G H A I	947
948	CGC CTC CTG GGC TTT GGT GAA GAA GGT GGA ACG CCA TAC TGG CTG	992
280	R L L G F G E E G G T P Y W L	294
993	GCC GCA AAC TCC TGG AAT ACC GAC TGG GGA GAT GGA GGT TTC TTC	1037
295	A A N S W N T D W G D G G F F	309
1038	AAG ATT CTT CGT GGT CAT GAC GAA TGC GGG ATC GAA AGC GAC ATC K I L R G H D E C G I E S D I	1082
310		324
1083	GTT GCT GGG ACT CCA AAA CTT AGA TGA AAC GGT TGT TAT TGT CGC V A G T P K L R *	1127
1128	TCT GCA TTC TTT AAA ATG GTT TGA AGT GTT CTT TTG CCA GAT ACA	1172
1173	ATG TAT AAT TTT AGG AAT TTT AAC TCT ACT CCT TTA TCG GCA ATG	1217
1218	GTT GCA CAT TCG AAG TAT AGC TTT AAC AAA AAT TTA TTC TGT TGA	1262
1263	TGT TAT AGA TAG TGC ATG TCC ATC TTT TCC CCA CCC GTG ACA ATC	1307
1308	CTG CAA ATG ACT TGG CAG GAT AAA CTT TAT CTT TTC AAT GAC ACT	1352
1353	TTC TGA ATT ACC TTT ATG TAT CAT TGT GAT CAG CCT GGA GTT GAC	1397
1398	TTC GTG GTT AAG GTG GCG GGC TTG GAA CCT TAG GGT CCT GAC TCC	1442
1443	GAG CCC CTG TTG ACT GTT GAA TTA ACA CCA GGT GTG GTT GAC TCA	1487
1488	GTC TGT CAT CCT TCC GAG GTC GGT GAA ATG AGT ACC AGT GTA CTG	1532
1533	GGG TAA GAA CCA TTC GGG GTT AAC CTG TGG CTA AGT GGC AAC CCG	1577
1578	TCC AGG ACT GTA CTC CTT GTC AAT GAA ACT GCC TCA GCA GCC CTA	1622
1623	TGT GCC TTT ACG GCA TGA AAG GAA TAC TAT TAT TGG TTC ATG AAA	1667
1668	AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA 1694	

[Fig 1] Full nucleotide and amino acid sequences of *EbCtsB*

먹장어 유래의 카텡신 B 유전자 클로닝, 발현 및 효소학적 활성 측정



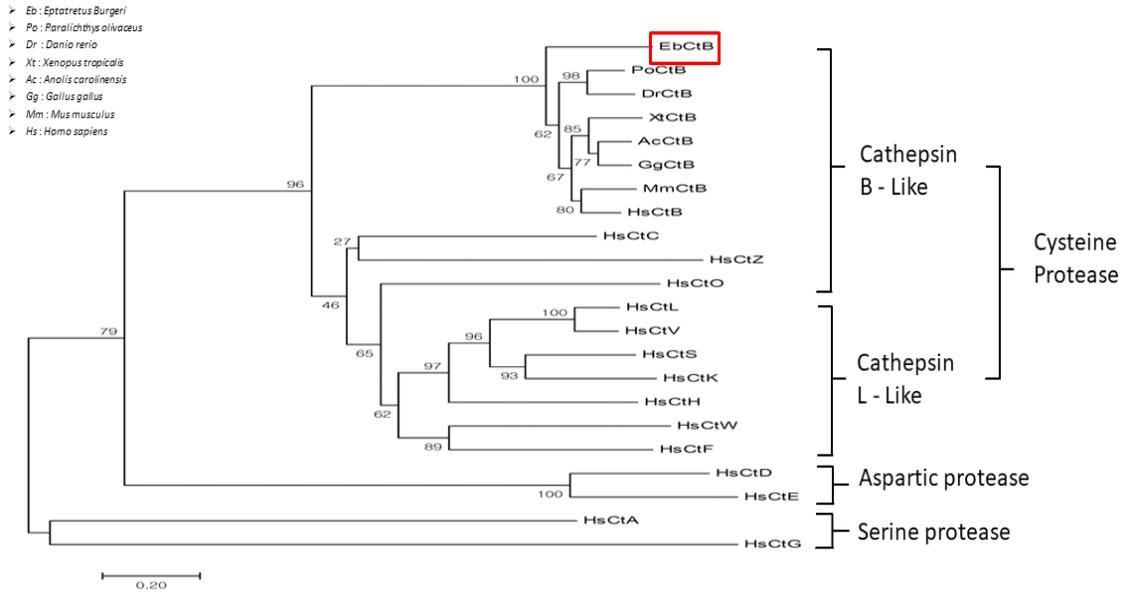
[Fig 2] Comparison of amino acid sequences between *EbCtsB* and other species *CtsB*. Red lines indicate cleavage site. Black arrows indicate end site of signal peptide and start site of pro peptide and mature peptide, respectively. Red boxes indicate active site.

계통학적 분석 결과, 먹장어의 카텡신 B는 다른 종의 시스테인 프로테아제(Cysteine protease)와 같은 계통이며, 그 중, 카텡신 B와 한 그룹으로 묶이는 것을 확인하였다(Fig 3).

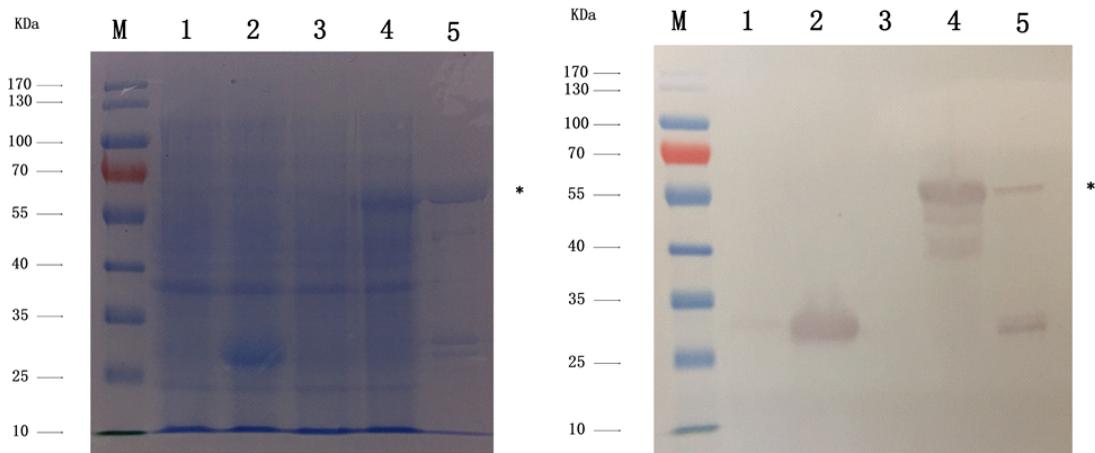
### 3. 재조합 proEbCtB의 *E.Coli* 발현 및 정제

먹장어 카텡신 B의 재조합 단백질(Recombinant

protein)을 발현 후 정제를 하였다. 균주는 대장균 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)를 사용하였고, 재조합 단백질 정제를 위해서는 glutathione S-transferase (GST)를 이용한 친화성 크로마토그래피(Affinity chromatography) 방법을 사용하였다. 정제된 단백질 확인은 SDS-PAGE와 western blotting하여 60 Kda의 재조합 단백질을 확인하였다(Fig 4).



[Fig 3] Result of phylogenetic tree analysis.



[Fig. 4] Expression and purification of recombinant proEbCtB. (A) Protein samples were separated by 12% SDS-PAGE and were visualized Coomassie R-250 blue staining. (B) Western blotting analysis of the SDS-PAGE separated proteins using monoclonal anti-GST antibody. Lane M, standard size marker; lane 1, whole cell lysate of *E. coli* BL21(DE3) with expression vector (pGEX 4T-1-Self); lane 2, whole cell lysate from 0.4mM IPTG-induced GST expressing *E. coli* BL21(DE3) with expression vector (pGEX 4T-1-Self); lane 3, whole cell lysate from IPTG-not induced *EbCtB*-expressing *E. coli* cells; lane 4, whole cell lysate from 0.4mM IPTG-induced proEbCtB-expressing *E. coli* cells; lane 5, purified proEbCtB protein. The asterisk (\*) indicates the purified proEbCtB protein (60 kDa).

#### 4. 효소학적 분석

정제된 재조합 단백질을 사용하여 다양한 pH, 기질(Substrate), 저해제(Inhibitor), 금속이온(Metal ion) 및 계면활성제(Detergent) 조건에 따라 먹장어 카텡신 B의 활성을 측정하였다.

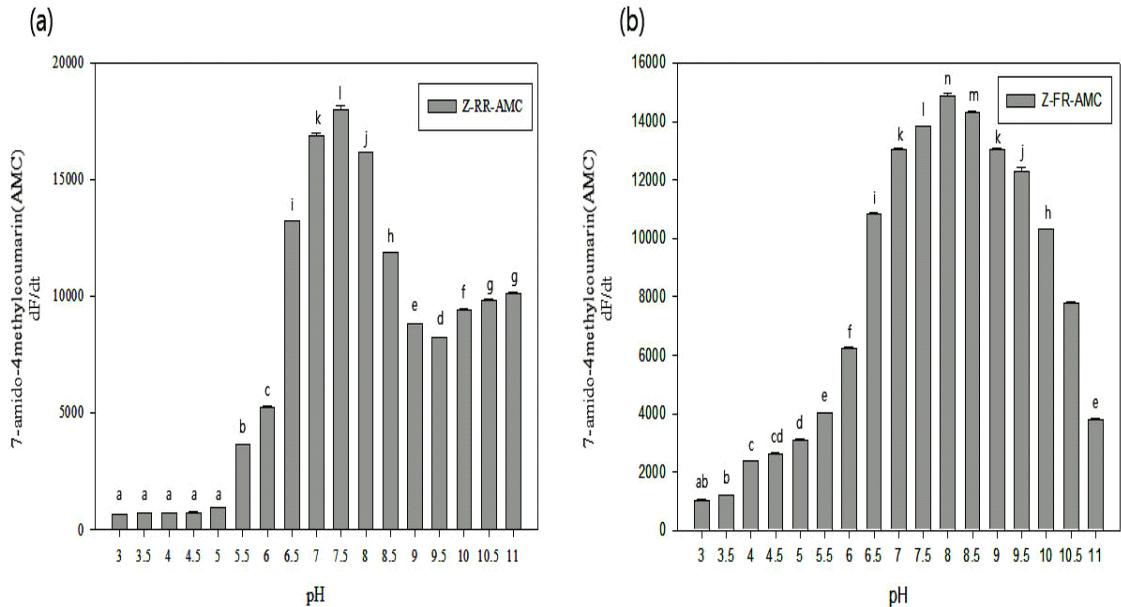
우선, pH의 조건은 pH 3부터 pH 11까지 0.5 간격으로 측정하였으며, 기질은 Z-RR-AMC와 Z-FR-AMC를 사용하였다. Z-RR-AMC의 경우, pH 3부터 pH 5까지는 큰 변화가 없다가, pH 5.5부터 활성이 증가하여 pH 7.5에서 가장 좋은 활성을 보였다([Fig 5a]). Z-FR-AMC는 pH 4부터 활성이 증가하여 pH 8에서 가장 좋은 활성을 보였다([Fig 5b]).

다양한 기질 조건에는 기질로 Z-FR-AMC, Z-RR-AMC, Z-GPR-AMC, Z-LLE-AMC, Z-AAF-AMC, Z-GGR-AMC, MeOSuC-AAPV-AMC, SVC-LLVY-AMC, Bz-RGFFP-4MeO  $\beta$  NA를 사용하였다. Z-RR-AMC를 사용했을 때, 먹장어 카텡신 B의 활성이 가장 좋았고, Bz-RGFFP-4MeO  $\beta$  NA

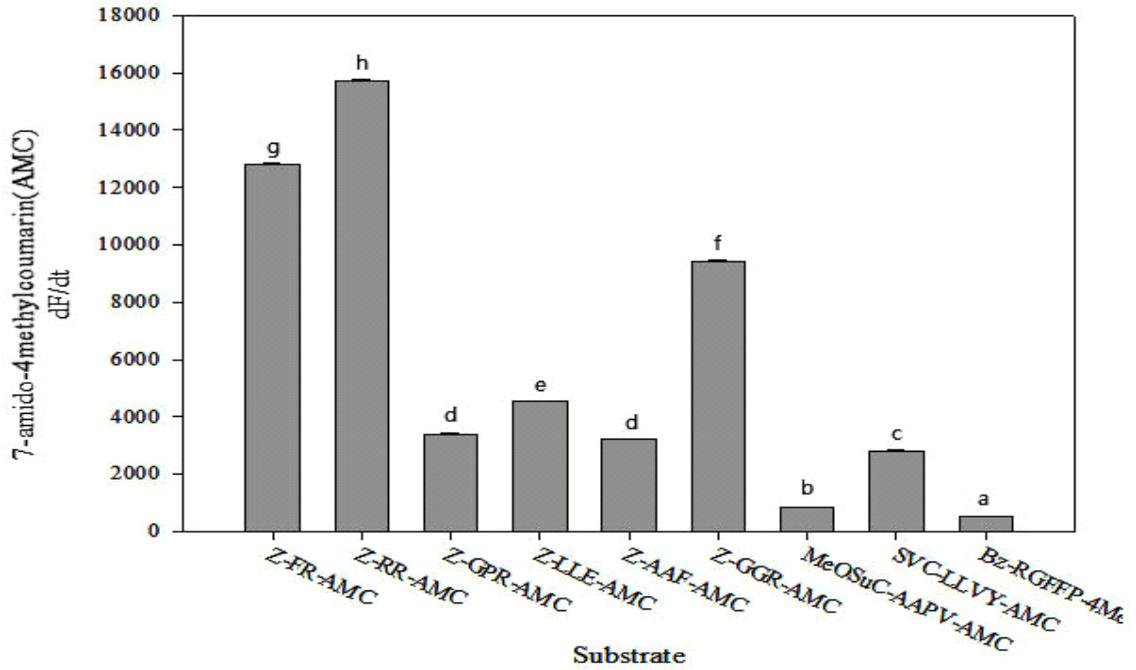
를 기질로 사용하였을 때가 가장 나쁜 활성을 나타내었다([Fig 6]).

저해제로는 E-64, Antipain, Chymostain, NEM, PMSE, Aprotinin, EDTA, EGTA, Pepstatin A를 사용하여 실험하였다. 가장 강력한 저해제로 antipain이 작용하였고, E-64와 EGTA가 가장 약한 저해제로 작용하였다([Fig 7]).

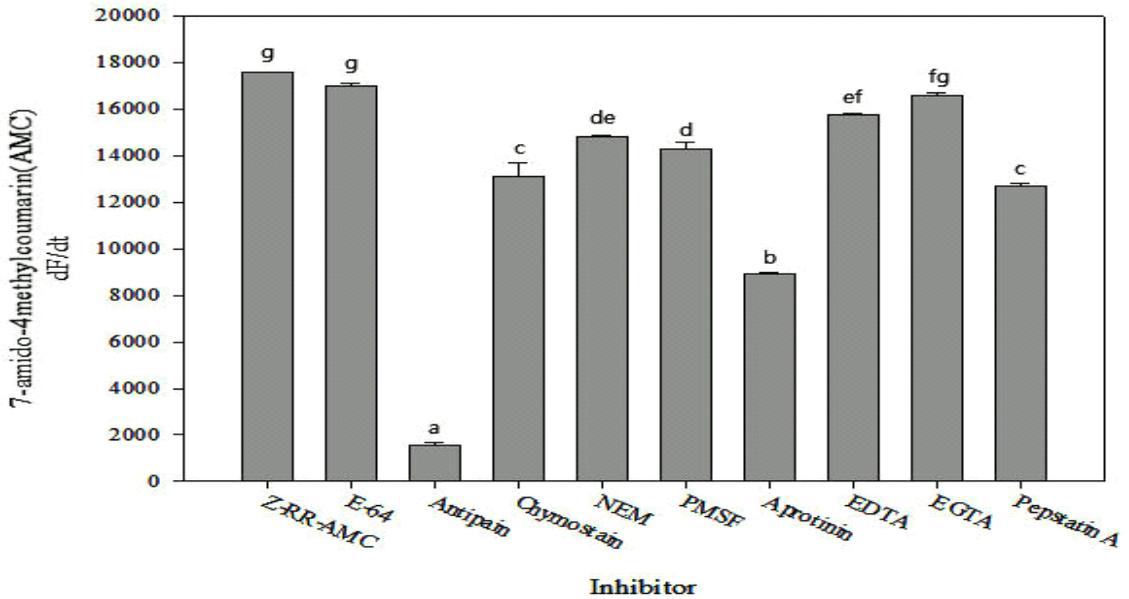
마지막으로 금속이온으로 ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, KCl을 사용하였다. 또, 계면활성제는 Triton X-100, Tween 20, SDS, Brij35를 사용하였다. 각각의 금속이온과 계면활성제는 10mM과 50mM의 두 가지의 농도로 처리하여 실험을 진행하였다. 먼저, 10mM의 농도에서 MgSO<sub>4</sub>와 Tween 20 처리조건에서 먹장어 카텡신 B의 활성이 크게 바뀌지 않았고, ZnSO<sub>4</sub>와 SDS 처리 조건에서 활성이 크게 감소하였다([Fig 8a]). 50mM의 농도에서는 10mM의 농도와 비교하였을 때 전체적인 경향은 비슷하게 보이지만 활성과 억제 효과의 효과가 더욱 강하게 나타났다([Fig 8b]).



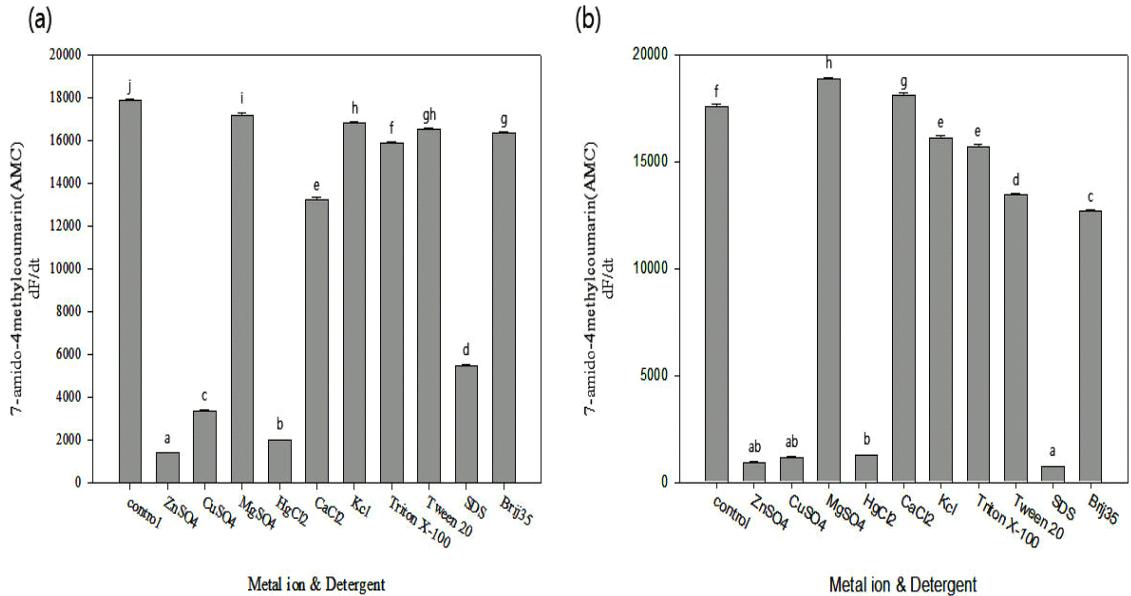
[Fig 5] Activity of *EbCtsB* in diverse pH conditions. (a) Result of using Z-RR-AMC as substrate. (b) Result of using Z-FR-AMC as substrate



[Fig 6] Activity of *EbCtsB* in diverse substrates.



[Fig 7] Activity of *EbCtsB* in diverse inhibitors



[Fig 8] Activity of *EbCtsB* in diverse metal ions and detergents. (a) Result of using 10mM concentration. (b) Result of using 50mM concentration.

#### IV. 고찰 및 결론

본 연구에서는 먹장어 유래의 카텡신 B의 유전자 서열 전체를 동정하고, 이에 따른 단백질 서열을 밝혔다. 먹장어 카텡신 B의 염기서열은 총 1694 bp였으며, 이 중 ORF의 길이는 1002 bp였다. 이로부터 번역(Translation)되는 단백질은 총 333개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 분자량은 약 36.8 kDa이었다. 시그널 펩타이드는 20개의 아미노산으로 이루어져 있고, 프로 펩타이드는 60개의 아미노산으로 이루어져 있었다. 이를 제외한 mature protein은 253개의 아미노산으로 구성되어 있었다.

타종의 카텡신 B와 아미노산 서열의 유사성도 비교하였다. 비교 결과, 대부분 60% 이상의 유사도를 보였다. 그 중, papain family에 속하는 시스테인 프로테아제의 접힘(folding)과 안정성(stability)에 영향을 주는 GNFD 모티프를 분석하였다(Karrer, Kathleen M., Stacia L. Peiffer, and

Michele E. DiTomas., 1993). 분석 결과 글라이신(Glycine), 아스파라긴(Asparagine), 페닐알라닌(Phenylalanine)은 동일하게 존재하였지만, 아스파르트산(Aspartic acid)을 대신하여 프롤린(Proline)이 존재하였다. 이러한 차이 때문에 먹장어의 카텡신 B의 접힘이 달라지게 되어 활성 및 안정성에 영향을 줄 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 활성 부위(Active site)인 시스테인(Cysteine), 글루탐산(Glutamic acid), 아스파라긴(Asparagine)은 서열의 변화가 없었다. 따라서 기질(Substrate)이 활성 부위에 접합(Binding)하는 것에는 영향을 미치지 않을 것으로 예상된다.

계통학적 분석 결과에서도 먹장어의 카텡신 B는 시스테인 프로테아제와 카텡신 B-like들과 한 그룹으로 묶이는 결과를 보였다.

먹장어 유래 카텡신 B의 유전자 서열 분석, 단백질 서열 분석, 계통학적 분석 결과를 종합하면 본 연구진이 밝힌 서열은 카텡신 B라고 예측할 수 있다.

더 정확하게 카텡신 B라는 것을 확인하기 위

하여 재조합 단백질(Recombinant protein)을 만들어 효소학적 활성을 측정하였다. 조건은 pH, 기질(Substrate), 저해제(Inhibitor), 금속이온(Metal ion), 계면활성제(Detergent)를 달리하여 진행하였다.

pH의 경우에는 Z-RR-AMC와 Z-FR-AMC에서 각각 pH 7.5와 pH 8에서 가장 좋은 활성을 보였다. 일반적으로 알려진 카텡신 B의 최적 활성 조건은 pH 6으로 알려져 있는데(Barrett, Alan J., and Heidrun Kirschke., 1981)), 먹장어의 활성 조건은 이것과 차이가 난다. 이러한 결과의 이유는 카텡신 B의 접힘에 관련된 GNFD 모티프의 아미노산 서열의 차이가 생겨 구조가 달라졌을 가능성이 있다.

기질은 총 9가지를 사용하여 실험을 하였다. 가장 활성이 좋았던 기질은 Z-RR-AMC로 대표적인 카텡신 B의 기질이다. 다음으로는 세린(Serine) 프로테아제의 기질인 Z-FR-AMC, 프로테아제의 한 종류인 우로키나아제(Urokinase)의 기질인 Z-GGR-AMC, 프로테아좀(Proteasom)의 기질인 Z-LLE-AMC 순으로 활성이 좋았다. 카텡신 K의 기질인 Z-GPR-AMC, 트라이펩티딜 펩티다아제(Tripeptidyl peptidase)의 기질인 Z-AAF-AMC, 프로테아좀(Proteasom)의 기질인 SVC-LLVY-AMC가 비슷한 활성을 보여주었다. 마지막으로 엘라스테아제(Elastase)의 기질인 MeOSuC-AAPV-AMC와 카텡신 D의 기질인 Bz-RGFFP-4MeO $\beta$ NA의 활성이 가장 좋지 않았다. 카텡신 B의 기질인 Z-RR-AMC에서 가장 활성이 좋았다는 점을 고려하면 본 연구자들이 정제한 단백질이 카텡신 B의 기능을 할 수 있다는 것을 알 수 있다.

저해제를 사용한 실험에서는 antipain 조건에서 먹장어 카텡신 B의 활성이 가장 억제되었다. 이것은 기존에 알려진 antipain이 카텡신 B의 활성을 억제한다는 것과 동일한 결과이다(Suda, Hiroyuki et al., 1972). 추가적으로 주목할 점은 기존의 연구 결과에 의하면 카텡신 B는 E-64에 의해 활성이 억제되지만(Hanada Kazunori et al,

1978), 먹장어 카텡신 B의 경우에는 강하게 억제되지 않았다는 점이다.

금속이온을 사용한 실험에서는 먹장어 카텡신 B의 활성을 억제하는 경우와 증가시키는 경우 두 가지로 나누어졌다. 먼저, 먹장어 카텡신 B는 ZnSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, HgCl<sub>2</sub>에 의해서 활성이 억제되었는데, 이것은 기존의 연구 결과에서 보고된 것과 일치하는 내용이다(Kamboj Ramesh C., Suresh Pal, and Hari Singh., 1990). 먹장어 카텡신 B는 MgSO<sub>4</sub>와 CaCl<sub>2</sub> 조건에서 활성이 증가하는 결과를 보였다. 10mM의 조건에서는 활성의 증가 효과를 보이지 않지만 50mM의 조건에서 활성 증가의 효과를 보인다. 이것은 10mM의 농도가 두 금속이온이 충분한 효과를 보이기에 부족한 양이라서 그런 것으로 생각된다.

다양한 계면활성제의 효과를 보기 위한 실험에서는 SDS가 가장 강력한 억제효과를 보였다. 10mM의 농도에서는 SDS를 제외하고는 큰 억제 효과를 보이지 못하였으나, 50mM에서는 SDS를 비롯한 다른 계면활성제들도 억제 효과가 나타났다. 이 효과는 계면활성제에 의한 먹장어 카텡신 B의 구조 변화로 해석할 수 있다.

먹장어는 식용뿐만 아니라 가축제품으로 쓰이는 등 활용되는 분야가 다양하다. 하지만 아직까지 먹장어에 대한 연구는 턱없이 부족하다. 따라서 본 연구를 통해 밝혀진 먹장어의 카텡신 B 유전자에 대한 정보가 앞으로 진행될 먹장어 관련 연구에 기초자료로써 사용될 수 있기를 기대한다.

## References

- Barrett AJ and Kirschke H(1981). [41] Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. In *Methods in enzymology* (Vol. 80, 535~561). Academic Press.
- Bohley P and Seglen PO(1992). Proteases and proteolysis in the lysosome. *Experientia*, 48(2), 151~157.
- Cyglar M, Sivaraman J, Grochulski P, Coulombe R,

- Storer AC and Mort JS(1996). Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure*, 4(4), 405~416.  
[https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00046-9)
- Do YH, Min BH, Myeong JI, Jee YJ and Chang YJ(2014). Effects of Water Temperature and Salinity on Blood Properties and Oxygen Consumption in Hagfish (*Eptatretus burgeri*). *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, 26(1), 214~222.  
<http://dx.doi.org/10.13000/JFMSE.2014.26.1.214>
- Hall TA(1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000..
- Hanada K, Tamai M, Yamagishi M, Ohmura S, Sawada J and Tanaka I(1978). Isolation and characterization of E - 64, a new thiol protease inhibitor. *Agricultural and Biological Chemistry*, 42(3), 523~528.  
<https://doi.org/10.1080/00021369.1978.10863014>
- Hasnain SADIQ, HIRAMA T, Huber CP, Mason P and Mort JS(1993). Characterization of cathepsin B specificity by site-directed mutagenesis. Importance of Glu245 in the S2-P2 specificity for arginine and its role in transition state stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1), 235~240.
- Kamboj RC, Pal S and Singh H(1990). Purification and characterization of cathepsin B from goat brain. *Journal of Biosciences*, 15(4), 397~408.  
<https://doi.org/10.1007/BF02702681>
- Karrer KM, Peiffer SL, and DiTomas ME(1993). Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 3063~3067.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.90.7.3063>
- Kirschke H, Langner J, Riemann S, Wiederanders B, Ansorge S, and Bohley P(1980). Lysosomal cysteine proteinases. *Protein degradation in health and disease*, 15~35.
- Mort JS and Buttle DJ(1997). Cathepsin B. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29(5), 715~720.  
[https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(96\)00152-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(96)00152-5)
- Musil D, Zucic D, Turk D, Engh RA, Mayr I, Huber R, ... and Katunuma N(1991). The refined 2.15 Å X ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *The EMBO journal*, 10(9), 2321~2330.
- Suda H, AOYAGI T, HAMADA M, TAKEUCHI T and UMEZAWA H(1972). Antipain, a new protease inhibitor isolated from agtinomycetes. *The Journal of antibiotics*, 25(4), 263~265.  
<https://doi.org/10.7164/antibiotics.25.263>
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S(2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725~2729.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>

- 
- Received : 12 July, 2019
  - Revised : 29 July, 2019
  - Accepted : 06 August, 2019