



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

별불가사리(*Patiria pectinifera*)에서
분리한 Orexin A-related peptide의
수율 향상을 위한 연구 및 근육
활성 조사

2022년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

해양수산생명과학부 생물공학전공

노 인 영

공 학 석 사 학 위 논 문

별불가사리(*Patiria pectinifera*)에서 분리한 Orexin
A-related peptide의 수율 향상을 위한 연구 및 근육 활성
조사

The logo of Pukyong National University is a circular emblem. It features a stylized compass rose or star-like design in the center, composed of four curved segments in shades of blue and grey. The words "PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY" are written in a circular path around the central design.

지도교수 박 남 규

이 논문을 공학 석사 학위논문으로 제출함.

2022년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

해양수산생명과학부 생물공학전공

노인영

노인영의 공학석사 학위논문을 인준함.

2022년 2 월 25 일



위원장	이학박사	이형호 (인)
위원	이학박사	한상준 (인)
위원	이학박사	박남규 (인)



목차

I. 서론	1
II. 실험 재료 및 방법	10
1. 실험 재료	10
2. 실험 방법	10
2.1. IPTG induction을 통한 fusion 단백질 과발현	10
2.2. Recombinant Orexin A-related peptide ($r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$) 생산 조건	11
2.3. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 대량 생산	13
2.3.1. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 로 형질전환 된 <i>E. coli</i> 대량 배양	13
2.3.2. Ni-NTA 정제	14
2.3.3. 투석 및 CNBr 처리	15
2.4. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 C-말단 아마이드화	16
2.5. 분자량 측정	17
2.6. 효소와 용매에 따른 rPpOrxA 생산 수율 변화	17
2.6.1. pH 조건별 생산 수율 변화	17
2.6.2. 사용한 효소의 양에 따른 생산 수율 변화	18
2.6.3. DMF 사용 여부에 따른 생산 수율 변화	19
2.7. 근육 수축 활성	20
2.8. 조직별 발현량 비교	21

2.8.1. Total RNA 추출	21
2.8.2. cDNA 합성	22
2.8.3. Real time quantitative PCR (RT-qPCR)	23
2.9. 통계처리	24
III. 결과	27
1. 재조합 단백질 IPTG induction 조건 설정	27
2. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 아마이드화	31
3. Q-TOF LC/MS 분자량 측정	33
4. 효소와 용매에 따른 rPpOrxA 생산 수율 변화	36
4.1. pH에 따른 생산 수율	36
4.2. 효소(carboxypeptidase Y) 사용량에 따른 생산 수율	42
4.3. DMF 사용 여부에 따른 생산 수율	47
5. 근육 수축 활성	51
6. 조직별 발현량	54
IV. 고찰	56
V. 참고 문헌	61
Abstract	65
VI. Acknowledgement	67

표 목록

표 1. Primer selection을 위한 PpOrxA의 primer 서열 목록	25
표 2. 펩타이드들의 이론적 분자량 값과 Q-TOF LC/MS에 의한 측정 값	34
표 3. pH 조건에 따른 HPLC 분획의 분자량 및 아마이드화 생산 수율	41
표 4. 효소의 양에 따른 rPpOrxA의 생산 수율	46
표 5. DMF 사용 여부에 따른 rPpOrxA의 생산 수율	50

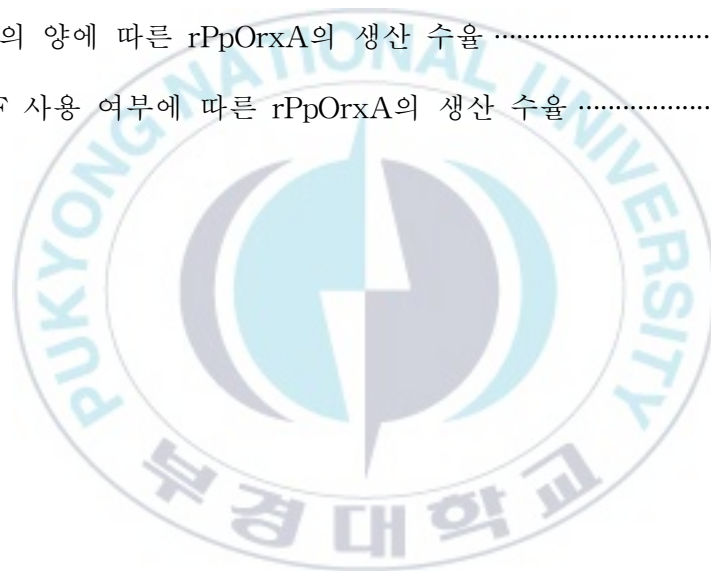


그림 목록

그림 1. 극피동물의 Orexin A-related peptide 서열	7
그림 2. Carboxypeptidase Y의 transpeptidation	8
그림 3. Native Orexin A-related peptide와 recombinant Orexin A-related peptide	9
그림 4. pET-28a(+)-TrxA fusion vector	12
그림 5. RT-qPCR을 위한 primer set PCR 결과	26
그림 6. IPTG 처리에 의한 Fusion 단백질 과발현 SDS-PAGE 결과	28
그림 7. 재조합 단백질 제조를 위한 실험 조건 결과	29
그림 8. CNBr 처리 후 HPLC 및 LC/MS 결과	30
그림 9. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 C-말단에 대한 아마이드화 반응 전/후 HPLC chromatogram	32
그림 10. 아마이드화 반응 전/후의 펩타이드들의 Q-TOF LC/MS 결과	35
그림 11. Nucleophile pH 6에서의 HPLC chromatogram과 분자량	38
그림 12. Nucleophile pH 7에서의 HPLC chromatogram과 분자량	39
그림 13. Nucleophile pH 8에서의 HPLC chromatogram과 분자량	40
그림 14. 효소의 양에 따른 아마이드화 반응의 HPLC 결과	44
그림 15. 효소의 양에 따른 아마이드화된 생성물의 Q-TOF LC/MS 결과	45
그림 16. DMF를 사용하지 않은 경우 반응에 대한 HPLC 결과 및 분자량	48
그림 17. DMF를 사용한 경우 반응에 대한 HPLC 결과 및 분자량	49
그림 18. 별불가사리 조직에 대한 $r\text{PpOrxA-Met-NH}_2$ 의 근육 수축 활성	52

그림 19. Apical muscle에 대한 rPpOrxA-Met-NH ₂ 의 농도별 근육 수축 활성 및 농도 의존 활성	53
그림 20. PpOrxA의 조직별 발현량	55
그림 21. 생체 내에서 작용하는 PpOrxA (Orexin A-related peptide)의 가 상적인 생리활성 및 역할에 대한 상관관계	60



별불가사리(*Patiria pectinifera*)에서 분리한 Orexin A-related peptide의 수율
향상을 위한 연구 및 근육 활성 조사

노 인 영

부 경 대 학 교 대 학 원 해양수산생명과학부 생물공학전공

요 약

Orexin A는 각성 안정화, 섭식 작용 조절, 다른 신경 전달 물질과의 상호 작용에 관여하는 것으로 알려진 신경성 펩타이드이다. 신경성 펩타이드(Neuropeptide)는 생체 내에서 신경전달물질 또는 신경 조절과 관련된 중요한 역할을 하는 펩타이드로, 생체 내에서 다수의 항상성 시스템의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 신경성 펩타이드는 척추동물 및 무척추동물의 여러 조직들에서 발견되고 있으며, 특히 불가사리나 성게와 같은 극피동물의 신경성 펩타이드는 계통발생학적으로 무척추동물 중에서도 인간의 신경성 펩타이드와 가장 밀접하게 관련되어 있다고 알려져 있다. 따라서 극피동물에서의 신경성 펩타이드의 정제 및 구조-활성 간의 상관관계에 대한 연구는 특히 사람에게 유용한 역할을 할 수 있을 것이라 생각된다.

본 연구에서는 극피동물인 별불가사리(*Patiria pectinifera*)의 관측에서 정제된 Orexin A-related peptide의 아마이드화 수율을 높이기 위한 여러 조건을 탐색하며, 정제된 펩타이드의 근육 수축 활성에 대해 알아보기 위한 실험을 하였다.

Orexin A-related peptide의 분자량 및 1차 구조는 LC/MS와 cDNA cloning에 의해 분자량이 3,466Da이고, 3개의 이황화 결합을 형성하는 6개의 시스테인을 포함하는 33개의 아미노산으로 구성되어 있다는 것이 확인되었다. 재조합 단백질은 융합 발현 벡터 pET-28a(+)-TrxA를 사용하여 이중 발현 시스템에서 생산되었으며, CNBr 처리를 통해 C-말단의 Met을 절단하여 재조합 Orexin A-related peptide (r[Leu33]PpOra)를 생산하였다. 이렇게 생성된 재조합 Orexin A-related peptide (r[Leu33]PpOra)는 C-말단에 -OH기를 가지고 있다. 한편, 자연계에 존재하는 native Orexin A-related peptide는 C-말단이 아마이드화되

어 있다. 따라서 Carboxypeptidase-Y (CPD-Y)와 Met-NH₂·HCl을 사용하여 아마이드화 과정을 수행하였다. 아마이드화 과정에서 pH, CPD-Y 및 DMF의 양을 변화시켜 재조합 Orexin A-related peptide-Met-NH₂ (rPpOraA)의 생산 수율을 높이기 위한 최적 조건을 조사하였다.

먼저 재조합 펩타이드의 아마이드화 반응에 있어서 pH의 변화는 수율에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 3가지 조건(pH 6, 7, 8) 중 pH 6에서 생산 수율이 가장 높은 것을 확인하였다. 또한, CPD-Y의 양이 생산 수율에도 영향을 미치는 것을 확인하였다. 반면 DMF의 사용 여부는 생산 수율에 큰 변화를 일으키지 않았다.

조직별 Orexin A-related peptide의 발현량을 알아보기 위해 RT-qPCR을 수행한 결과 불가사리의 다양한 조직 중 radial nerve cord에서 가장 높은 발현량을 보이는 것을 확인하였다.

rPpOraA에 의한 근육 수축 활성은 불가사리의 3개 조직(apical muscle, cardiac stomach, tube feet)에서 확인되었다. rPpOraA는 3가지 조직 중 apical muscle에서 가장 강력한 수축 활성을 보였다.



I. 서론

신경성 펩타이드(Neuropeptide)는 생체 내에서 신경전달물질 또는 신경 조절과 관련된 중요한 역할을 하는 펩타이드로, 생체 내에서 다수의 항상성 시스템의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다[Krieger, 1983]. 이러한 신경성 펩타이드는 척추동물 및 무척추동물의 여러 조직들에서 발견되고 있으며, 척추동물에서는 대표적으로 tachykinin, bombesin 등의 신경성 펩타이드가 알려져 있고, 무척추동물에서는 문어, 곤충, 불가사리나 성게 등에서 eledoisin, proctolin 등의 신경성 펩타이드가 알려져 있다[Greenberg and Price, 1983]. 특히 불가사리나 성게와 같은 극피동물의 신경성 펩타이드는 계통발생학적으로 무척추동물 중에서도 인간의 신경성 펩타이드와 가장 밀접하게 관련되어 있기 때문에 극피동물에서의 신경성 펩타이드의 정제 및 구조-활성 간의 상관관계에 대한 연구는 특히 사람에게 유용한 역할을 할 수 있을 것이라 생각된다[Semmens et al., 2016; Kondo and Akasaka, 2012].

하이포크레틴(hypocretin)이라 불리는 Orexin은 동일한 prepro-hypocretin 유전자에서 유래되어 분비되며 2개의 G-protein coupled receptor에 결합하는 신경성 펩타이드이다[Sakurai et al., 1988]. 이들 펩타이드가 결합되는 경우에는 기면증과 불면증을 유발하고, 에너지 항상성, 스트레스 관련 행동 및 보상 시스템에 있어서 이상을 유발한다고 알려져 있다. 즉, Orexin은 수면 및 각성 상태를 조절하고 에너지 항상성에 관여하며, 섭식을 조절하는 시상하부의 핵과 상호 연결되어 있기 때문에 섭식 작용을 조절하는 역할을 한다. 또한 다른 신경전달물질 시스템과 함께 상호작용하여 여러 기능을 수행하는 것으로도 알려져 있다 [Tsujino and Sakurai, 2009; Tsujino and Sakurai, 2013; Shahid et al., 2012].

Orexin에는 Orexin A와 Orexin B의 두 종류가 있는데, 이 두 가지 종류

의 Orexin은 외측 시상하부 영역에서만 발현된다고 알려져 있다 [Giardino and de Lecea, 2014; Tsujino and Sakurai, 2009]. 척추동물에서 보고된 Orexin의 경우에는 쥐(rat)의 뇌 추출물에서 확인된 Orexin A와 Orexin B가 있는데, 이는 모두 Orexin receptor-1 (OX₁R)의 리간드에 해당된다. Orexin A는 33개 아미노산(ELPDCCRQKTCSCRLYELLHGAGNHAAGILTL-NH₂)으로 구성되어 있으며, 펩타이드 사슬 내에는 4개의 cysteine 잔기를 가지며 Cys⁶ - Cys¹²와 Cys⁷ - Cys¹⁴ 사이에 2개의 disulfide bond를 가지고 있는 것이 특징이다. 또한 Orexin A는 N-말단에 pyroglutamyl 잔기를, C-말단에는 -NH₂로 아미드화 되어 있는 형태를 가지고 있다. Orexin B는 28개의 아미노산(RSGPPGLQGRLQRLQLQASGNHAAGILTM-NH₂)으로 구성되어 있으며, C-말단이 -NH₂로 아미드화된 선형 펩타이드라고 알려져 있다. 게다가 Orexin B는 Orexin A와 다르게 cysteine 잔기를 포함하지 않기 때문에 disulfide bond가 존재하지 않으며, Orexin A의 서열과 46% 동일한 염기서열을 가지고 있다고 알려져 있다[Tsujino and Sakurai, 2009; Semmens et al., 2016].

Orexin A와 Orexin B는 쥐, 사람과 같은 척추동물에서 많이 보고되어 왔다. 하지만 최근 transcriptome 연구에 의하면 무척추동물로부터 Orexin A와 유사한 서열을 지니는 물질이 존재한다고 보고되었다. 무척추동물의 Orexin A의 경우에는 펩타이드 서열 내에 6개의 cysteine 잔기를 가지고 있으며, 3쌍의 disulfide bond를 형성하고 있는 것이 특징이다. 무척추동물의 Orexin A는 대표적으로 불가사리 *Asterias rubens*에서 발견된 Orexin A type protein이 있으며[Semmens et al., 2016], 이외에도 불가사리인 *Ophionotus victoriae*와 성게인 *Strongylocentrotus purpuratus*에서도 alignent 결과 Orexin A-related peptide라 예측되는 물질의 발견이 보고되고 있다 (그림 1) [Zandawala et al., 2017]. 하지만 이들 Orexin A 유사 물

질들은 정제되어 구조가 밝혀진 것이 아니라 transcriptome 연구에 기반을 둔 일차 구조의 상동성을 근거로 예측된 경우에 해당된다.

Orexin과 같은 신경성 펩타이드는 다른 생물학적 활성 펩타이드와 마찬가지로 prepropeptide로 생산되어 여러 번역 후 변형(post-translational modification) 과정을 통해 active peptide로 생산된다. 먼저 prepropeptide에 존재하는 signal peptide가 signal peptidase에 의해 절단된다. 그 후 dibasic한 서열(RK, KR, RR, KK)을 propeptide convertase 라는 효소가 인식하여 절단이 일어나고, 이 때 dibasic한 잔기 앞에 glycine이 존재하면 peptidylglycine α -amidating mono-oxygenase (PAM, EC 1.14.17.3)라는 효소에 의해 인식되어 산화적 절단이 일어나서 C-말단이 아마이드화 되는 결과를 초래한다[Kapuscinski et al., 1993]. 이러한 아마이드화는 펩타이드의 생물학적 활성에 있어 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[Kolhekar et al., 1997].

본 연구실에서는 이전에 별불가사리(*Patiria pectinifera*)가 몸을 이동하거나 섭식 작용을 하고자 할 때 사용하는 운동 기관인 관족(tube feet)에서 근육 수축 활성을 나타내는 생리활성 펩타이드 Orexin A-related peptide (PpOrxA)를 정제하였다. 별불가사리 관족에서 정제된 PpOrxA는 유전자 클로닝을 통해 쥐의 뇌 추출물에서 확인된 Orexin A와 동일하게 33개의 아미노산으로 구성되어 있다는 것을 밝혀냈다. 또한 이 물질은 서열 내에 6개의 cysteine 잔기를 가지고 있으며, 이 cysteine 잔기들이 서로 결합을 형성하여 3쌍의 disulfide bond를 이루고 있다는 것을 확인하였다. 또한 이 펩타이드를 루벤스 불가사리에서 transcriptome 분석에 의해 확인된 Orexin A type protein의 서열과 상동성 검사를 실시해 본 결과, 6개의 cysteine 잔기 이외에도 높은 상동성을 나타낸다는 것을 확인하였다 (그림 1). 비록 불가사리 유래의 Orexin A-related peptide는 척추동물에서 발견

된 Orexin A처럼 아미노산 잔기 수는 동일하지만 분자내의 S-S 결합 수는 다른 특징을 지니고 있다.

별불가사리 관족에서 정제된 PpOrxA는 화학적 방법과 생물학적 방법을 통해 생산이 가능하다. 화학적 방법으로는 고상합성법을 사용할 수 있지만, 펩타이드 합성 시 본 연구에서 사용할 PpOrxA처럼 6개의 cysteine을 가지고 있으며, 33 잔기에 해당하는 서열의 경우 합성 단가 면에 있어 고비용이 든다는 단점이 있다. 또한 합성 이후에는 아미노산 side chain의 보호기들을 제거하여 disulfide bond를 올바르게 형성해야 하는데, 이 과정에서 원하지 않는 다양한 조합의 S-S 결합이 형성될 수 있다. 따라서 본 연구실에서는 이전에 유전자 클로닝을 통해 밝혀진 PpOrxA의 서열을 이용하여 recombinant peptide를 생산하는 생물학적 방법으로 recombinant Orexin A-related peptide ($r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$)를 우선적으로 생산하였다. 하지만 본 연구에서 생산한 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 는 C-말단이 -OH로 되어 있기 때문에 이를 아마이드화(-NH₂) 하는 과정이 필요하다. Recombinant peptide의 C-말단 아마이드화 방법에는 크게 화학적인 방법과 생물학적 방법이 존재한다[Henriksen et al., 1992]. 먼저 C-말단을 아마이드화하는 화학적 방법은 반응의 특이성이 비교적 좋지 않으며 반응시간이 오래 걸린다는 단점을 지니고 있다. 또한 peptide가 반응시약과 반응하기 위해서 강산이나 강염기 또는 고온에서 반응을 해야하는 경우가 발생하기 때문에 펩타이드의 side chain의 -COOH나 -NH₂와 같은 functional group이 hydrazine, ammonia 등과 반응하여 원하지 않는 부반응을 일으켜 예측할 수 없는 다양한 생성물을 형성할 수 있다는 취약점도 지니고 있다.

한편, C-말단의 생물학적 아마이드화 방법 중에는 효소를 사용하는 방법이 알려져 있는데, carboxypeptidase Y (CPD-Y)가 이 효소들 중 하나에

해당한다. 이 효소는 C-말단에 있는 아미노산을 가수분해하여 제거하는 작용을 하며, 이와 동시에 말단 아미노산이 제거된 C-말단 부위에 아마이드화 되어 있는 다른 종류의 아미노산 유도체를 치환시키는 transpeptidation 기능도 가지고 있기 때문에 이를 이용하여 부반응없이 아마이드화를 행하는 것이 가능하다[Breddam et al., 1991]. 따라서 생물학적 방법과 비교해 보았을 때 화학적 방법은 여러 단점이 존재하기 때문에 본 실험에서는 $r[Leu^{33}]PpOrxA$ 의 C-말단을 생물학적 방법인 효소를 사용하여 Met - NH_2 로 아마이드화 하였다.

그림 2에 나타낸 것과 같이 CPD-Y가 아마이드화 하고자 하는 펩타이드와 반응하여 C-말단을 가수분해하여 제거하고, C-말단이 제거된 위치에 곧바로 $-NH_2$ 로 아마이드화 되어 있는 아미노산 유도체를 치환시키는 transpeptidation 작용을 하여 amidation modification이 형성된다. 이러한 반응에 있어서 CPD-Y는 C-말단 위치에 Phenylalanine (Phe), Methionine (Met), Leucine (Leu), Alanine (Ala)과 같은 방향족 아미노산이나 소수성 아미노산 잔기가 존재할 경우 친수성 아미노산 잔기가 있는 경우 보다 가수분해가 훨씬 더 잘 일어난다고 보고되어 있다[Breddam, 1986]. 게다가 CPD-Y는 pH, dimethyl formamide (DMF) 등과 같은 여러 조건의 변화에 따라 아마이드화 반응에 있어서 효소의 가수 분해와 transpeptidation 작용이 영향을 받는다고 알려져 있다 [William and Schuster, 1991].

본 연구에서는 Orexin A-related peptide의 재조합 펩타이드를 대량으로 만들어내는 실험을 진행하였다. 또한 이러한 재조합 펩타이드를 대량으로 생산하기 위하여 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) induction의 최적 조건을 찾고자 하였다. 그림 3에 나타낸 것처럼 생산 과정을 통해 만들어진 $r[Leu^{33}]PpOrxA$ 는 C-말단이 $-Leu-OH$ 로 형성되어 있다. 따라서

C-말단을 native form인 -Met-NH₂로 만들어 주기 위하여 효소로 CPD-Y를 사용하였고, 기질로 *r*[Leu³³]PpOrxA를, nucleophile로 L-Met-NH₂·HCl을 사용하여 아마이드화 반응을 실시하였다. 이와 더불어 CPD-Y의 가수분해와 transpeptidation에 영향을 주는 pH와 용매의 변화에 따라 *r*PpOrxA-Met-NH₂ (*r*PpOrxA)의 생산 수율을 비교하는 실험을 진행하였다.

PpOrxA는 별불가사리의 관족 추출물을 사용하여 apical muscle에 대한 근육수축반응 활성 측정을 통해 정제되었다. 따라서 본 실험에서는 별불가사리의 apical muscle 외에 cardiac stomach과 tube feet 조직을 포함하여 3가지 조직에서 *r*PpOrxA-Met-NH₂ (*r*PpOrxA)의 근육 수축 활성을 알아보려고 하였으며, 마지막으로 PpOrxA 유전자의 별불가사리 내 조직별 발현량을 알아보기 위해서 RT-qPCR을 실시하였다.



그림 1. 극피동물의 Orexin A-related peptide 서열. 거미불가사리, *Ophionotus victoriae* (Ovic), 루벤스 불가사리, *Asterias rubens* (Arub), 보라성게, *Strongylocentrotus purpuratus* (Spur)의 Orexin 펩타이드 서열 및 별불가사리(*Patiria pectinifera*) Orexin A-related peptide (PpOrxA)의 서열.

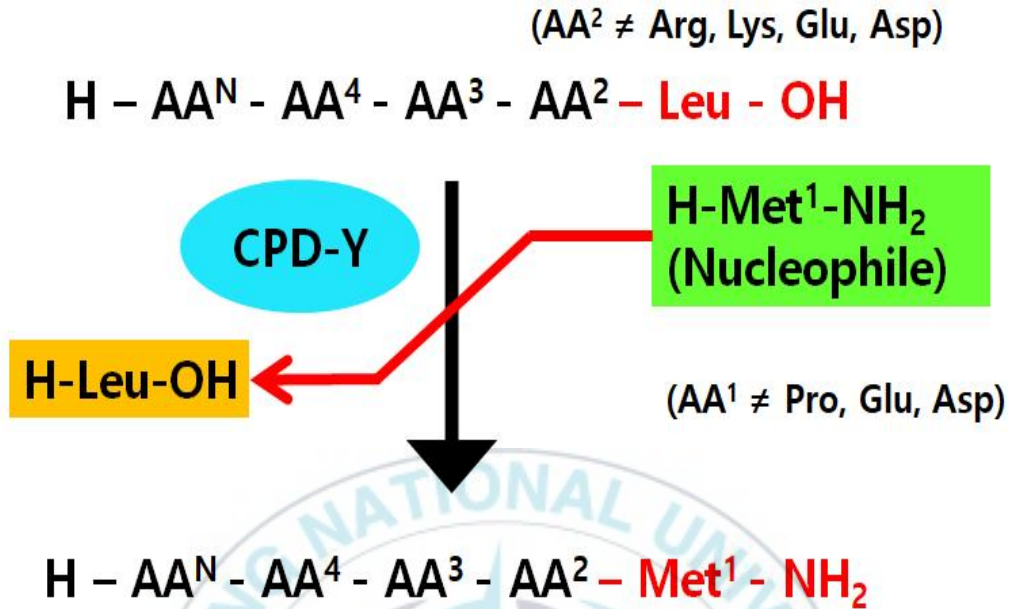


그림 2. Carboxypeptidase Y의 transpeptidation; Carboxypeptidase Y (CPD-Y)의 transpeptidation 기능을 그림으로 나타내었다. CPD-Y의 처리를 통해 -Leu-OH가 가수분해되어 절단되고, transpeptidation 기능을 통해 nucleophile로 사용한 -Met-NH₂으로 치환된다.

PpOrxA MW : 3,466.08Da

GNACCKGTCH EIPKGCNCPYKAVLCGELNTLT **M - NH₂**

r[Leu³³]PpOrxA MW : 3,449.03Da

GNACCKGTCH EIPKGCNCPYKAVLCGELNTLT **L - OH**

그림 3. Native Orexin A-related peptide (PpOrxA)와 recombinant Orexin A-related peptide (*r*[Leu³³]PpOrxA); native Orexin A-related peptide (PpOrxA)는 C-말단이 Met-NH₂로 아마이드화되어 있는 반면에, *r*[Leu³³]PpOrxA의 경우에는 C-말단이 Leu-OH로 되어 있다. 따라서 *r*[Leu³³]PpOrxA를 생산한 뒤, 아마이드화 과정이 필요하다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에서 사용한 실험동물은 부산광역시 해운대구 기장군 청사포에서 채집한 별 불가사리(*Patiria pectinifera*)를 사용하였다. 채집한 별불가사리는 수온을 13℃로 유지시키며, 순환 시스템을 갖춘 수조에서 보관하였다.

2. 실험 방법

2.1. IPTG induction을 통한 fusion 단백질 과발현

pET - 28a(+)-TrxA fusion vector로 형질전환된 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 균주에 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 처리하여 fusion 단백질의 과발현 여부를 확인하고자 하였다. 14 mL Round-bottom tube에 Kanamycin 30 μ g/ml이 포함된 Luria-Bertani medium (BD) (30 μ g/ml KLB) 5 mL를 분주하였다. 분주한 30 μ g/ml KLB 5 mL에 pET - 28a(+)-TrxA fusion vector로 형질전환한 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 균주를 seeding한 뒤, 37℃, 200 rpm 조건으로 16시간 동안 배양하였다. 다음 날 30 μ g/ml KLB 50 mL에 seed culture한 균주를 1 mL 넣어 준 다음, 분광광도계(Mecasys, Optizen Pop, Korea)의 O.D₆₀₀ 값이 0.5 - 0.6이 나오도록 진탕배양기에서 37℃, 200 rpm 조건으로 약 1시간 30분 동안 배양하였다. 배양 후에는 50 mL conical tube에 25 mL 씩 분주하였다. 25mL 씩 분주한 후 하나는 IPTG를 처리하지 않았고, 다른 하나는 최종 농도가 0.1mM이 되도록 IPTG를 처리하였다. 두 조건 모두 37℃, 200 rpm 조건

으로 3시간 배양하였다. 배양 후에는 cell lysis를 통해 insoluble과 soluble로 분리하여 SDS-PAGE (SDS-PAGE separating gel conc; 15%, running voltage; 170V)를 실시하였다.

2.2. Recombinant Orexin A-related peptide ($r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$) 생산 조건

Recombinant Orexin A-related peptide ($r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$)를 생산하기 위해 pET - 28a(+)-TrxA fusion vector로 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) 균주를 사용하여 seed culture를 하였다(그림 4). Kanamycin 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 포함된 Luria-Bertani medium (BD) (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KLB) 5 mL에 *E. coli* BL21 (DE3) 균주를 분주하여 진탕배양기(Gaonscience, SW-90F, Korea)에서 37°C, 200 rpm 조건으로 16시간 동안 배양하였다. 다음날 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KLB 50 mL에 seed culture한 균주를 각각 1 mL씩 넣어 준 다음, 분광광도계의 O.D₆₀₀ 값이 0.5 - 0.6이 나오도록 진탕배양기에서 37°C, 200 rpm 조건으로 약 1시간 30분 동안 배양(pilot culture) 하였다.

배양된 균주에 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종농도가 0.1 mM과 0.5 mM이 되도록 첨가하여 진탕배양기에서 37°C, 200 rpm 조건으로 각각 3시간, 6시간 배양하였다.

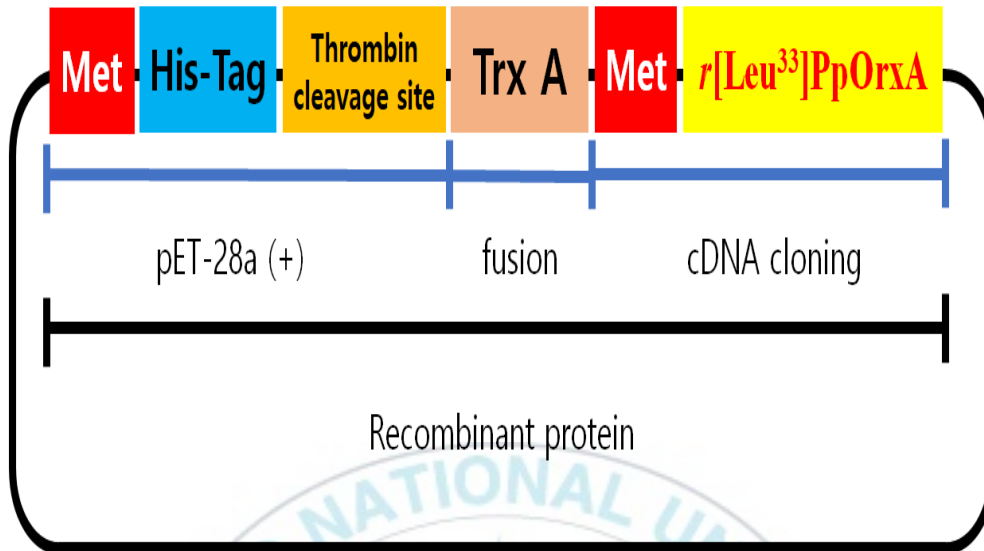


그림 4. pET-28a(+)-TrxA fusion vector. 본 연구실의 이전 실험에서는 pET-28a vector를 사용하여 transformation한 Escherichia coli BL21 (DE3) 균주를 이용하여 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 를 생산하였다. 재조합 단백질을 생산할 경우 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 에 있는 cysteine 잔기들이 disulfide bond를 잘 형성하도록 하기 위해 pET-28a vector에 존재하는 T7-Tag 위치를 제거하고, 그 대신에 Trx A를 삽입하였다. 또한 CNBr cleavage를 위하여 Met을 붙여주었다.

배양이 끝나고 난 후, $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 를 생산하기 위한 IPTG induction 최적 조건을 확인하기 위해 5가지 조건별 (3 hr, 0 mM; 3 hr, 0.1 mM; 3 hr, 0.5 mM; 6 hr, 0.1 mM; 6 hr, 0.5 mM)로 SDS-PAGE (SDS-PAGE separating gel conc; 15%, running voltage; 170V)로 진행하여 단백질 발현 결과를 확인하였다. SDS-PAGE를 통해 IPTG induction의 최적 조건을 확인하였으며, 동일한 방법으로 *E. coli* BL21 (DE3) 균주를 1.5 L KLB medium에 배양(main culture)하였고, 확인된 최적 조건으로 IPTG induction을 실시하여 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 대량생산을 실시하였다.

2.3. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 대량 생산

2.3.1. $[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 로 형질전환된 *E. coli* 대량 배양

6개의 14 mL round tube에 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KLB medium을 각각 5 mL씩 (total 30 mL KLB) 분주한 뒤, 각각의 tube에 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) 균주를 분주하여 진탕배양기에서 37°C, 200 rpm 조건으로 16시간 동안 배양하였다. 다음날 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ KLB medium 1.5 L에 배양한 균주를 분주하였고, O.D₆₀₀ 값이 0.5 - 0.6이 나오도록 진탕배양기에서 37°C, 200 rpm 조건으로 약 1시간 30분 동안 배양하였다. O.D₆₀₀ 값을 확인한 뒤, 최종 농도가 0.1 mM이 되도록 IPTG를 주입하여 진탕배양기에서 37°C, 200 rpm 조건으로 3시간 배양하였다. 배양 이후에는 원심 분리(4°C, 3,000 x g, 20분)를 실시하여 상층액과 pellet을 분리하였다. 분리된 pellet은 1X phosphate buffered saline (1X PBS, pH 7.4)를 사용하여 washing 과정을 3번 실시하였다. Washing 이후에는 1X PBS를 사용하여 pellet을 현탁하였다. 현탁액에 20 mg/mL Lysozyme(Lysozyme from chicken egg white, Sigma, MO, USA)을 최종 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 주입하여 1시간 30분 동안 실온에서 반응시켜 cell lysis를 실시하였고, Sonifier 250 (Branson

Ultrasons, Annemasse, France)을 사용하여 duty cycle 30%로 약 2분간 sonication을 진행하였다. sonication이 끝난 sample은 원심 분리(4℃, 3,000 ×g, 30분)하여 상층액(soluble)과 pellet (insoluble)으로 분리하였다.

2.3.2. Ni-NTA 정제

원심 분리를 통해 분리된 상층액(soluble)과 pellet (insoluble)은 Ni-NTA agarose (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 His-tag affinity purification을 진행하였다. 먼저 pellet (insoluble)은 1X binding buffer로 현탁하였다. 1X binding buffer의 조성은 다음과 같다: 1X PBS, 8 M Urea, 5 mM Imidazole. 현탁액은 원심 분리(25℃, 3,000 ×g, 30분)를 통해 상층액만 취하여 Ni-NTA agarose와 적정량 혼합하여 실온에서 1시간 30분 동안 반응시켰다. 상층액(soluble)은 2X binding buffer를 분주하여 soluble sample과 1:1로 혼합하여 1X binding buffer 상태로 만든 후, 원심 분리(4℃, 3,000 ×g, 30분)를 실시하였다. 2X binding buffer의 조성은 다음과 같다: 100 mM NaH₂PO₄, 600 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8.0. 원심분리를 통해 분리된 상층액은 적정량의 Ni-NTA agarose와 혼합하여 4℃에서 1시간 30분 동안 반응시켰다.

Ni-NTA agarose와 반응이 끝난 insoluble 및 soluble sample은 PierceTM Disposable 10 mL polypropylene column (Thermo fisher Scientific, MA, USA)에 분주하였다. PierceTM Disposable 10 mL polypropylene column에 분주한 후, 각각의 washing buffer를 사용하여 총 3번 washing 과정을 실시하였다. Washing buffer의 조성은 다음과 같다: insoluble washing buffer, 8 M Urea, 5 mM Imidazole, 0.5 M NaCl; soluble washing buffer, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8.0. Washing 과정이 끝난 후에는 각각의 elution buffer를 사용하여 elution을 진행하였다.

Elution buffer의 조성은 다음과 같다: insoluble elution buffer, 8 M Urea, 500 mM Imidazole; soluble elution buffer 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, pH 8.0.

2.3.3. 투석 및 CNBr 처리

Elution이 끝난 insoluble과 soluble sample은 Spectra/Por Dialysis Membrane (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) (standard RC tubing / MWCO : 6-8 kDa)을 사용하여 투석을 실시하였다. 먼저 insoluble sample의 경우에는 dialysis membrane을 5% acetic acid에 넣어 5분간 활성화시켰다. Dialysis membrane의 activation이 완료되면 insoluble sample을 membrane에 모두 넣은 뒤, 이를 5% acetic acid 4 L에 넣어 교반기 위에서 교반시키며 16시간 동안 투석을 진행하였다. Soluble sample의 경우에는 dialysis membrane을 1X PBS에 넣어 5분간 활성화시켰으며, soluble sample을 넣은 dialysis membrane을 1X PBS 4 L에 넣고 교반시키며 16시간 동안 투석을 진행하였다. 투석이 끝난 insoluble 및 soluble sample은 50 mL tube에 옮겨 담고, 비어 있는 dialysis membrane에는 50% formic acid 1 mL를 넣어주어 washing 과정을 실시한 뒤, 이를 50 mL tube에 함께 넣어주었다. 다음으로 원심 분리 (4°C , $3,000 \times g$, 2분)를 진행하였으며, 원심 분리 이후에는 동결건조를 실시하였다. 동결건조가 끝난 sample은 50% formic acid를 사용하여 완전히 녹여준 다음, Met 잔기의 C-말단을 절단하기 위하여 최종 농도가 10 mg/ml가 되도록 Cyanogen bromide (CNBr)을 각각 sample에 처리하였다. CNBr 처리된 sample은 진탕배양기에서 25°C , 200 rpm 조건으로 8시간 동안 암반응을 진행하였다. 암반응 이후에는 초기 volume의 10배가 되도록 3차 증류수로 희석하여 CNBr의 작용을 불활성화시켜 주었다. CNBr 처리가 끝난

sample은 동결건조를 실시하였으며, 동결건조된 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 은 0.1% TFA가 포함된 증류수 27.5 mL를 사용하여 완전히 녹여준 다음, reverse phase high performance liquid chromatography (역상 HPLC)를 실시하여 분리정제하였다. 역상 HPLC 조건은 다음과 같다: CAPCELL PAK C18, 10×250 mm (Shisheido, Japan), 25 - 65% acetonitrile/0.1% TFA, 40분, 3 ml/min, 220 nm. 정제된 분획들은 동결건조하여 분말 형태로 보관하였다.

2.4. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 C-말단 아마이드화

정제한 PpOrxA는 C-말단이 -NH₂로 아마이드화 되어있지만 재조합으로 합성한 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 은 C-말단이 -OH로 되어 있기 때문에 아마이드화를 진행하였다. 먼저 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 C-말단에 존재하는 Leu-OH를 절단하기 위하여 가수분해와 transpeptidation 작용을 하는 효소인 carboxypeptidase Y (CPD-Y)를 사용하였다. 또한 Leu-OH를 절단함과 동시에 nucleophile로 사용한 L-Methioninamide hydrochloride (L-Met-NH₂·HCl, 98%)을 치환하여 C-말단이 Met-NH₂로 아마이드화된 rPpOrxA-Met-NH₂ (rPpOrxA)를 생산하고자 하였다. L-Met-NH₂·HCl은 EDTA와 함께 증류수에 녹여 60 mg/ml L-Met-NH₂·HCl (5 mM EDTA) 조건의 nucleophile stock을 제작하였다. Nucleophile stock의 경우 3 M NaOH와 1 M HCl을 사용하여 원하는 pH 조건을 맞추어 제작하였다. 다음으로 동결건조한 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 에 nucleophile인 L-Met-NH₂·HCl을 1 mL 넣어 완전히 녹여주었고, 30℃ 항온 수조에서 아마이드화 반응을 실시하였다. 각 반응시간 별(CPD-Y 처리 전, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min, 1 hr)로 반응물들은 100 µl 씩 취하여 100% acetic acid 280 µl와 3차 증류수 620 µl를 혼합하여 1.5 mL tube에 넣고 액체질소로 급속 냉각시킴으로써 효소의 가수분해 작용과 transpeptidation 작용을 불활성화시켜 주었다. 아마이드화 반

응 이후, 각 반응시간별 반응물들은 역상 HPLC를 통해 분리·정제하였다. 역상 HPLC 조건은 다음과 같다: CAPCELL PAK C18, 4.6×250 mm (Shisheido, Japan); 조건 1: 25 - 38% Acetonitrile/0.1% TFA, 26분, 220 nm, 조건 2: 23 - 38% Acetonitrile/0.1% TFA, 30분, 220nm.

2.5. 분자량 측정

역상 HPLC를 통한 분리·정제 후에 아마이드화 반응으로 rPpOrxA가 제대로 생산되었는지 확인하기 위해 각 분획들은 Q-TOF LC/MS (Bruker maXis - HD Ultra LC - MS/MS Q-TOF system)를 사용하여 분자량을 측정하였다. Q-TOF LC/MS에서는 Waters Acquity UPLC BEH C18, column (2.1 mm×100 mm, 300 Å, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하여 측정을 하였으며, 실험 조건은 다음과 같다: Mobile phase A buffer, water/0.1% Formic acid; Mobile phase B buffer, Acetonitrile/0.1% Formic acid; 20 - 30% Mobile phase B (0 - 10분). 유전자 클로닝을 통해 밝혀진 Orexin A의 서열을 바탕으로 ExPASy tool을 사용하여 native form Orexin A (PpOrxA)와 r[Leu³³]PpOrxA의 이론적 분자량을 계산하여 LC/MS로 측정한 분획의 분자량과 이론적 분자량 값이 동일한 값을 나타내는지 비교하였다.

2.6. 효소와 용매에 따른 rPpOrxA 생산 수율 변화

2.6.1. pH 조건별 생산 수율 변화

Nucleophile의 pH 조건별 아마이드화 반응을 통한 rPpOrxA-Met-NH₂ (rPpOrxA)의 생산 수율을 비교하기 위해 3가지 조건(pH 6, 7, 8)으로 실험을 진행하였다. 우선 증류수에 L-Met-NH₂·HCl을 300 mg 녹인 후, 최종 농도가 5 mM이 되도록 EDTA를 혼합하였다. 다음으로 3 M NaOH와 1

M HCl를 적정량 사용하여 pH를 3가지 조건 (pH 6, 7, 8)에 맞게 설정한 뒤, 증류수를 사용하여 최종 volume을 5 mL로 맞추어 60 mg/mL L-Met-NH₂·HCl (5 mM EDTA, pH 6, 7, 8) nucleophile stock을 제작하였다. 동결건조된 r[Leu³³]PpOrxA 196 µg에 pH 조건별 nucleophile stock을 1 mL 넣어 vortexing한 뒤, 22 µg/µl CPD-Y를 2 µl 처리하였다. CPD-Y를 넣고 난 뒤에는 30°C에서 반응시키며, 각 반응시간별(CPD-Y 처리 전, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min, 1 hr)로 반응물을 100 µl 씩 취하여 280 µl Acetic acid와 3차 증류수 620 µl를 혼합한 1.5 mL tube에 넣어 액체질소로 급속 냉각시킴으로써 효소(CPD-Y)의 활성을 불활성화시켜 주었다. 각 반응물은 역상 HPLC (Shisheido, Japan, CAPCELL PAK C18; 4.6×250 mm, 25 - 38% acetonitrile/0.1% TFA, 26분, 1 ml/min, 220 nm)로 분리하였으며, Q-TOF LC/MS를 사용하여 rPpOrxA의 생성여부를 분자량으로 확인하였다. 분자량 측정 후 생성된 -NH₂ type (rPpOrxA)의 peptide 양과 아마이드화 반응에 사용한 -OH type (r[Leu³³]PpOrxA)의 peptide의 양을 비교하여 생산 수율을 확인하였다.

2.6.2. 사용한 효소의 양에 따른 생산 수율 변화

아마이드화 반응에 있어서 사용한 효소 (CPD-Y)의 양에 따른 rPpOrxA의 생산 수율을 비교하기 위한 실험을 하였다. 먼저 60 mg/mL L-Met-NH₂·HCl (5 mM EDTA, pH 6) nucleophile stock을 동결건조시켜 두었던 r[Leu³³]PpOrxA에 넣어 r[Leu³³]PpOrxA를 완전히 녹여준 다음, 22 µg/µl CPD-Y를 각각 0.5, 1 및 2 µl로 양을 다르게 하여 처리한 뒤, 아마이드화 반응을 실시하였다. 각각 다른 조건으로 효소를 처리한 후, 30°C에서 반응을 시켰다. 해당 반응시간 별로 반응물을 100 µl씩 취하여 280 µl Acetic acid와 3차 증류수 620 µl를 혼합한 1.5 mL tube에 넣어 액체질소로 급속

냉각시킴으로서 효소의 활성을 불활성화 시켜 주었다. 각 반응물은 역상 HPLC (Shisheido, Japan, CAPCELL PAK C18; 4.6×250 mm, 23 - 38% acetonitrile/0.1% TFA, 30분, 1 ml/min, 220 nm)를 진행하여 분리하였고, 반응물의 분리가 끝나면 앞선 실험과 동일한 방법으로 Q-TOF LC/MS를 사용하여 분자량 측정을 하였다. 분자량 측정 후에는 rPpOrxA의 양과 아마이드화 반응에 사용한 $r[\text{Leu}^{33}]$ PpOrxA의 양을 비교하여 rPpOrxA의 생산 수율을 확인하였다.

2.6.3. DMF 사용 여부에 따른 생산 수율 변화

Henriksen, et al. (1992)에서 기질로 사용한 peptide를 DMF에 녹인 뒤, 아마이드화 반응을 수행하였기 때문에 DMF의 사용 여부에 따른 rPpOrxA의 생산 수율 변화를 확인하고자 하였다. 먼저 60 mg/ml L-Met-NH₂·HCl (5 mM EDTA, pH 6) nucleophile stock 500 µl를 사용하여 동결건조된 $r[\text{Leu}^{33}]$ PpOrxA 98 µg을 완전히 녹여준 다음, 22 µg/µl CPD-Y를 1.86 µl 처리하였다. 아마이드화 반응은 효소를 넣은 다음 30℃ 항온 수조에서 반응시켰다. 아마이드화 반응을 진행하는 동안 반응시간별로 반응물을 50 µl씩 취하여 140 µl acetic acid 와 3차 증류수 310 µl가 혼합되어 있는 1.5 mL tube에 넣고 액체질소로 급속 냉각시켜 효소의 활성을 불활성화시켜 주었다. 효소 반응을 불활성화 시킨 뒤에는 역상 HPLC (Shisheido, Japan, CAPCELL PAK C18; 4.6×250 mm, 25 - 38% acetonitrile/0.1% TFA, 26 분, 1 ml/min, 220 nm)를 사용하여 분획별로 분리하였고, 분리 이후 Q-TOF LC/MS를 통한 분자량 측정을 통해 rPpOrxA의 생산 여부를 확인하였다. 생성물은 분자량 확인으로 생산 여부를 확인한 뒤, rPpOrxA의 생산 수율을 계산하여 DMF를 사용한 경우와 사용하지 않은 경우의 생산 수율을 서로 비교하였다.

2.7. 근육 수축 활성화

먼저 별불가사리를 해부하여 배면과 복면을 분리한 뒤, 조직을 분리하였다. 복면과 배면을 분리한 후 배면을 뒤집으면 5개의 팔을 따라 팔의 중앙을 가로 지르는 apical muscle이 위치하고 있다. tube feet와 cardiac stomach의 경우에는 복면에 위치하고 있다. 5개의 팔이 모이는 복면의 정중앙에는 cardiac stomach이 위치하고 있으며, tube feet은 한 쪽 팔의 중앙에 있는 ambulacral plate를 mess로 절단하였을 때 절단한 부분의 양 쪽 측면에 위치하고 있는 조직이다. 3가지 조직 (apical muscle, tube feet, cardiac stomach)을 각각 분리한 뒤에는 조직을 단편으로 제작하여 근육 수축 활성화 실험에 사용하였다. 근육 수축 활성화 실험의 모든 과정은 55 mM artificial sea water (ASW) buffer를 사용하여 진행하였다. 55 mM ASW의 조성은 다음과 같다: NaCl 445 mM, MgCl₂ 55 mM, CaCl₂ 10 mM, KCl 10 mM, Tris-HCl (pH 7.8 10 mM), Glucose 10 mM.

먼저 반응조의 지지대에 apical muscle, tube feet, cardiac stomach의 단편을 고정시키고, 조직의 위쪽 부분은 isometric transducer에 연결하였다. Isometric transducer에 조직을 연결하고 나면 resting tension이 1.0 g으로 평형이 유지되도록 안정화시켜 주었다. 조직의 tension이 1.0 g으로 안정화되는 것을 확인하고 나면 apical muscle에는 5×10^{-5} M의 Acetylcholine (Ach)을, tube feet에는 5×10^{-6} M의 Carbachol (Carb)을 cardiac stomach에는 10^{-6} M의 Carbachol (Carb)를 투여하여 근육을 활성화하였다. 근육이 활성화되면 정제한 rPpOrxA를 고농도에 해당하는 10^{-5} M 농도로 투여하여 각 조직에서의 근육 수축 활성화 여부를 측정하였다. 조직별 근육 수축 활성화 정도는 근육을 활성화시키기 위해 사용한 Carb과 Ach을 100%로 설정하여 상대적인 비율을 계산하여 나타내었다.

3가지 조직에 대한 근육 수축 활성을 확인한 뒤, 별불가사리의 apical

muscle은 5×10^{-6} M의 Acetylcholine (Ach)으로 활성화하여 정제한 rPpOrxA를 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} 및 10^{-5} M 농도로 누적 투여하여 rPpOrxA에 대한 농도별 근육 수축 활성을 확인하였다. 농도별 수축 활성은 5×10^{-6} M Ach의 최대 수축에 대한 상대적 수축 %로 나타내었다. 반응 크기는 EC_{50} 및 E_{max} 로 나타내었다.

2.8. 조직별 발현량 비교

별불가사리(*Patiria pectinifera*)의 7가지 조직(cardiac stomach, radial nerve cord, tube feet, pyloric stomach, gonads, pyloric ceaca, apical muscle)을 사용하여 각 조직별 PpOrxA 유전자의 발현량을 비교하고자 RT-qPCR (Real time quantitative PCR)을 실시하였다.

2.8.1. Total RNA 추출

RT-qPCR을 하기에 앞서 GenAll hybrid-R™ kit (GeneAll Biotechnology, Korea)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 우선 RiboEx™ 1 mL에 별불가사리를 해부하여 얻은 7개의 조직(cardiac stomach, radial nerve cord, tube feet, pyloric stomach, gonads, pyloric ceaca, apical muscle)을 1.5 mL tube에 각각 100 mg 씩 넣어 균질화 한 후, 상온 (room temperature)에서 5분간 반응을 실시하였다. 반응이 끝나면 균질화된 조직에 chloroform 200 μ L을 첨가하여 vortexing을 시켜준 다음, 다시 한 번 상온에서 2분간 반응시켜 주었다. 반응이 끝나면 이를 원심분리 (4℃, 12,000 $\times$ g, 15분)하여 상층액만 따로 분리하였다. 다음으로 Buffer RB1을 상층액과 동일한 양으로 넣어 완전히 혼합시켜 주었다. 혼합이 완료되면 혼합물을 mini column type F로 분주한 후 원심 분리 (12,000 $\times$ g, 30초)를 실시하였다. 이어서 500 μ L Buffer SW1을 mini column에 넣어 원심 분리 (2

5℃, 12,000×g, 30초)를 실시하였다. SW1 buffer를 이용한 washing 과정이 끝나면 mini column에 500 µl Buffer RNW를 넣어 원심분리 (25℃, 12,000 ×g, 30초)를 실시하였다. 원심분리 후, 동일한 조건으로 1분간 원심분리를 실시하여 column에 잔존하는 에탄올을 제거하였다. 에탄올 제거 이후에는 mini column에 Nuclease-free water를 30 µl 넣어 1분간 반응한 후, 원심 분리 (10,000 ×g, 1분)를 하였다. 위와 같은 과정을 거쳐 추출된 별불가사리의 7가지 조직별 total RNA는 NanoDrop Lite(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)을 사용하여 농도와 순도를 측정하였다.

2.8.2. cDNA 합성

별불가사리의 7가지 조직별 total RNA는 1µg이 되도록 TOPscript™ RT Dry MIX (dT18 plus)(Enzynomics, Daejeon, Korea)에 넣고 증류수를 첨가하여 전체 volume을 20 µl로 통일시켜 주었고, PCR (BIORAD, Korea)을 사용하여 조직별 cDNA를 합성하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 50℃로 60분간 반응, 95℃로 5분간 반응.

별불가사리의 PpOrxA의 서열을 바탕으로 NCBI primer blast를 사용하여 primer를 design 하였으며, 이 중에서 3가지를 선택하여 사용하였다 (표 1). 선택된 primer에 대한 대조군으로 사용할 house keeping gene으로는 별불가사리에서 항상 발현되는 유전자로 밝혀진 EF1-α를 사용하였다. PpOrxA와 EF1-α primer는 증류수로 희석하여 최종 농도가 10 pmol/µl가 되도록 제작하였다. RT-qPCR을 위한 최적의 primer set를 선별하기 위해 합성된 조직별 cDNA를 각각 1 µl씩 섞어 template mixture를 제작하였다. 다음으로 10 pmol/µl의 PpOrxA (PpOrxA-1, PpOrxA-2, PpOrxA-3) primer set와 EF1-α primer set를 Prime Taq Premix 2X (GENETBIO, Korea)에 분주한 다음 PCR을 실시하였다. PCR 반응 조성물은 다음과 같

다: forward primer 1 μ l, reverse primer 1 μ l, cDNA mix 1 μ l, 멸균수 7 μ l. PCR 반응 조건은 다음과 같다: 34 cycle; 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 30초 반응. PCR이 완료되면 증폭된 DNA의 유무와 길이를 확인하고자 1% Agarose gel과 100 bp plus DNA Marker (GENETBIO, Korea)를 사용하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후에는 Maxidac Gel Imaging system (Daihan Scientific, Korea)을 이용하여 결과를 확인하여 가장 명확하고 단일 밴드로 증폭된 primer set를 선택하여 RT-qPCR에 사용하였다 (그림 5).

2.8.3. Real time quantitative PCR (RT-qPCR)

cDNA의 희석 계수를 정하기 위하여 별불가사리의 Orexin A-related peptide primer set (PpOrxA-3 primer)와 TOP realTM qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with high Rox) (Enzynomics, Korea)를 사용하여 RT-qPCR을 실시하였다. 우선 PpOrxA-3 primer 17.6 μ l에 멸균수 123.2 μ l와 TOP realTM qPCR 2X PreMIX 176 μ l를 혼합하여 mastermix I을 제작하였다. EF1- α 도 동일한 방법으로 mastermix I을 제작하였다. 각각의 mastermix I을 만들고 나면 5개의 strip tube에 멸균수를 7.2 μ l 씩 분주한 뒤, cDNA mix를 각각 1X, 3X, 9X, 27X, 81X 희석이 되도록 넣어 혼합하였다. cDNA mix를 분주하고 나면 PCR strip tube를 준비하여 mastermix I을 62.7 μ l 씩 동일한 양을 넣어준 다음 미리 만들어 두었던 1X, 3X, 9X, 27X, 81X 농도로 희석한 cDNA mix를 3.3 μ l 씩 넣어 mastermix II를 완성하였다. 완성된 mastermix II는 Hard-Shell PCR Plates 96well (BIORAD)에 20 μ l 씩 분주하여 RT-qPCR을 3번 반복 실시하였다. Well 당 loading 되는 sample의 조성은 다음과 같다: TOP realTM qPCR 2X PreMIX 10 μ l, cDNA mix 1 μ l, forward primer 1 μ l, reverse

primer 1 μ l, 멸균수 7 μ l. RT-qPCR 이후에는 얻어진 결과를 사용하여 comparative CT method로 별불가사리의 각 조직에서 PpOrxA 전사체의 상대적 전사 발현 수준을 EF1- α 와 비교하였다.

2.9. 통계 처리

별불가사리의 각 조직에서 PpOrxA 전사체의 상대적 전사 발현 수준은 통계 분석을 위해 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, USA)을 사용하여 Bonferroni multiple range post-hoc analysis로 one-way analysis (ANOVA)을 수행하여 통계를 나타내었다. 통계적으로 유의한 결과로 표시된 그래프는 동일한 소프트웨어를 사용하여 작성되었으며, Relative fold expression은 평균 표준 편차로 결정되었고, $p < 0.05$ 로 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

표 1. Primer selection을 위한 PpOrxA의 primer 서열 목록

Name	Sequence (5'→3')
EF1-α Forward	TTCTTGCTAGCCTTCTGGGC
EF1-α Reverse	TCAACGACTACCAGCCCCTA
PpOrxA-1-Forward	TGGCAGGATTGTAGGCGTTT
PpOrxA-1-Reverse	TTCTACTTGACGTCACCGC
PpOrxA-2-Forward	CCCGGTTGCTCATCGTACTT
PpOrxA-2-Reverse	TAGCGTTTCTCCCCGAACAC
PpOrxA-3-Forward	GCTGCAATTGCCCTACAAG
PpOrxA-3-Reverse	TGCGGTCTTCGTTGTTGGTA

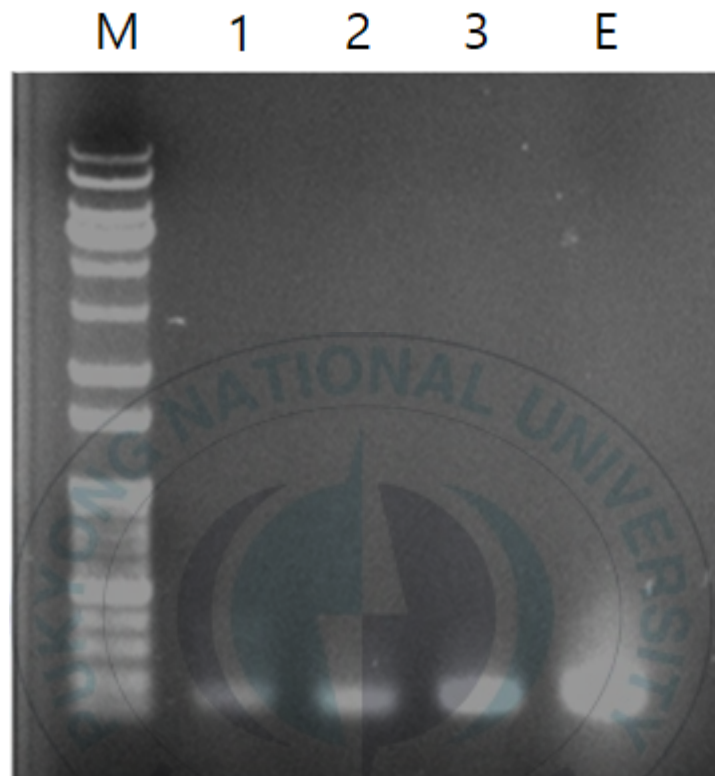


그림 5. RT-qPCR을 위한 primer set PCR 결과. 그림 5의 왼쪽부터 (M) Marker, (1) PpOrxA-1 set, (2) PpOrxA-2 set, (3) PpOrxA-3 set, (E) EF1- α set이다. Primer designing tool을 사용하여 design한 primer 3가지 (표 1) 와 EF1- α 를 사용하여 1% Agarose gel에서 전기영동을 실시하였으며, Marker로는 100bp plus DNA Marker (GENETBIO) 를 사용하였다. 전기영동 이후에는 Maxidac Gel Imaging system을 이용하여 결과를 확인하였고, PpOrxA-3 primer set를 RT-qPCR에 사용하기로 결정하였다.

III. 결과

1. 재조합 단백질 IPTG induction 조건 설정

Recombinant Orexin A-related peptide ($r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$) 생산 조건을 알아보기 이전에 pET - 28a(+)-TrxA fusion vector로 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) 균주에 IPTG를 처리하여 fusion 단백질의 과발현 여부를 알아보려고 하였다. IPTG induction과 No IPTG induction, 두 가지 조건으로 나누어 배양한 뒤, SDS-PAGE를 통해 fusion 단백질 발현 여부를 비교하였다(그림 6). SDS-PAGE 결과에 의하면 IPTG 처리를 하였을 때, 17kDa에서 목적으로 하는 fusion 단백질이 과발현 되었음을 확인할 수 있었다.

Fusion 단백질 생산 여부를 확인한 후에 3 hr (0 mM IPTG, 0.1 mM IPTG, 0.5 mM IPTG), 6 hr (0.1 mM IPTG, 0.5 mM IPTG)의 5가지 IPTG 조건으로 배양하여 induction을 시킨 후, SDS-PAGE를 통해 각 조건별 재조합 단백질 발현량을 비교하였다(그림 7). SDS-PAGE 결과에 의하면, 5가지 조건들 중에서 0.1 mM IPTG 조건에서 3시간 배양하였을 때 재조합 단백질의 발현량이 가장 많은 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 대량생산에 있어서 37°C, 3 hr 배양 및 IPTG의 최종 농도는 0.1 mM로 설정하였고, *E. coli* BL21 (DE3) 균주를 1.5 L로 bulk up하여 동일 조건으로 배양 및 induction하여 재조합 단백질을 대량생산하였다. 대량생산 이후에는 His-tag affinity 정제 및 CNBr 처리 과정을 통해 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 를 생산하였다. 그림 8에 나타내었듯이 HPLC 결과 여러 개의 분획이 존재하고 있지만 LC/MS를 통해 분자량을 분석한 결과, 화살표로 표시한 분획이 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 에 해당된다는 것을 확인하였다.

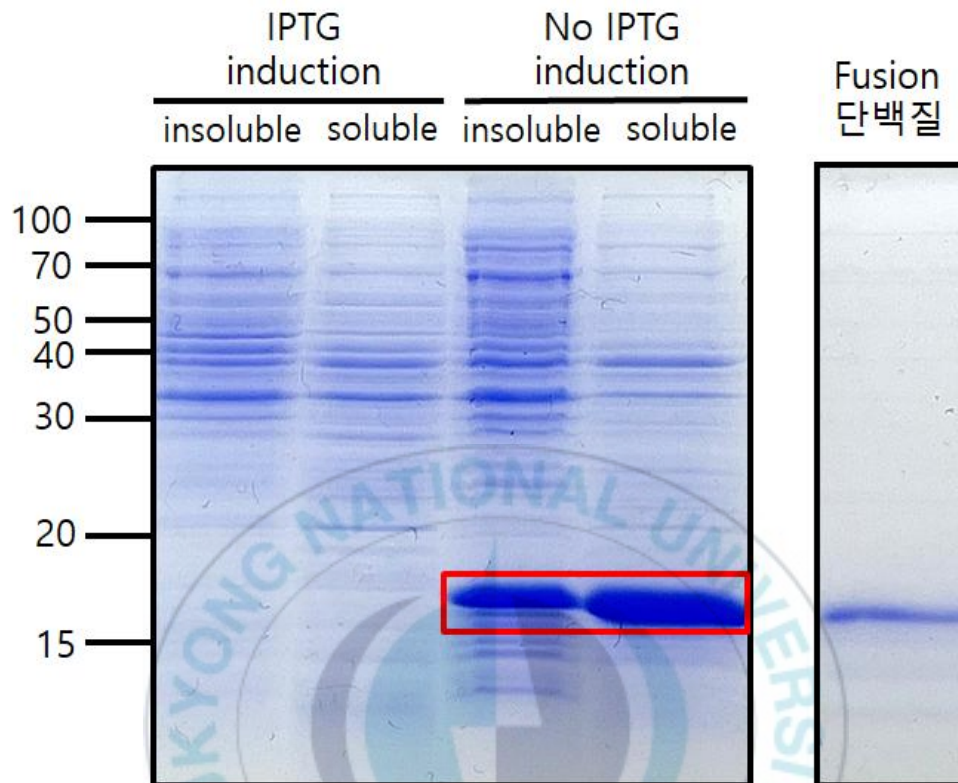


그림 6. IPTG 처리에 의한 Fusion 단백질 과발현 SDS-PAGE 결과. SDS-PAGE 결과로 보아 형질전환된 *E. coli* BL21 (DE3) 균주에 IPTG를 처리하였을 때 17kDa에서 목적으로 하는 fusion 단백질이 과발현 된 것을 확인할 수 있었다.

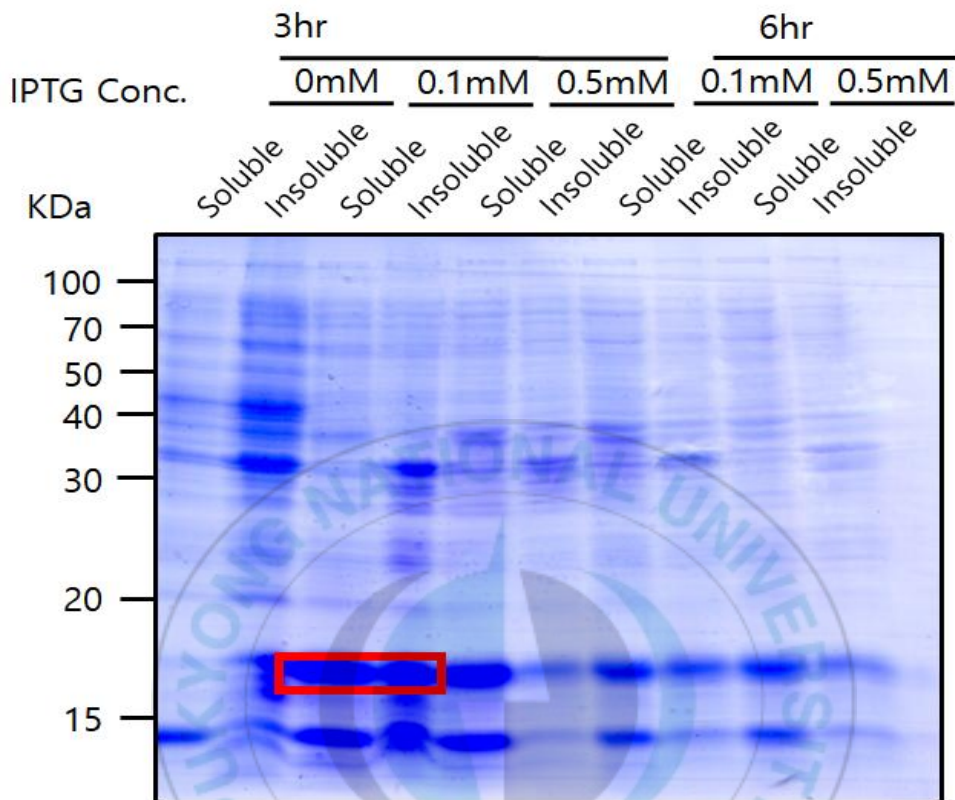


그림 7. 재조합 단백질 제조를 위한 실험 조건 결과. 5가지 조건들 중에서 3 hr 배양, 0.1 mM 조건 (빨간색 사각형으로 나타낸 부분)에서 IPTG Induction을 실시하였을 때 insoluble과 soluble에서 단백질의 발현량이 다른 조건들에 비해 많은 것을 확인하였다. 따라서 대량 생산에 있어서 IPTG induction 조건을 37°C, 3 hr 배양, 0.1 mM로 결정하여 실험을 진행하였다.

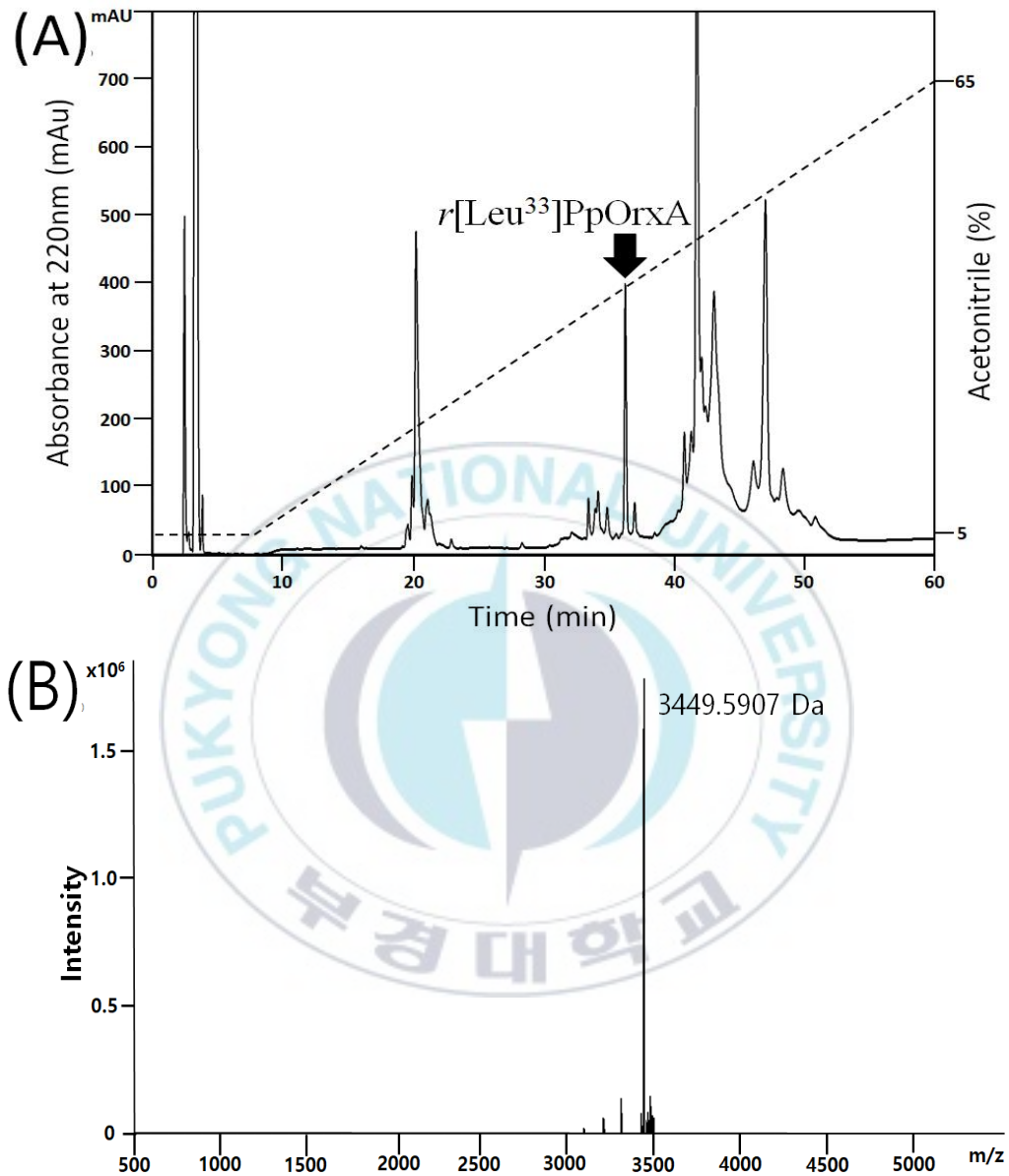


그림 8. CNBr 처리 후 HPLC 및 LC/MS 결과. (A) CNBr 처리 후 HPLC 결과; 화살표로 표시된 분획은 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 에 해당한다. (B) $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 분자량 측정 결과; 분자량 확인 후, $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 에 해당하는 분획만을 하나의 tube에 모아 동결건조하였다.

2. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 아마이드화

별불가사리에 존재하는 Orexin A의 native form인 NH_2 type으로 제작하기 위해 생산된 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 는 Carboxypeptidase Y (CPD-Y)와 nucleophile인 $\text{L-Met-NH}_2 \cdot \text{HCl}$ 을 함께 반응시켰다. 아마이드화 반응을 통해 얻어진 각 반응시간별 반응물들은 역상 column (CAPCELL PAK C18 4.6 x 250 mm, Shisheido, Japan)을 사용하여 HPLC로 분획 별로 분리하였다. 역상 HPLC 조건은 다음과 같다; 23 - 38% ACN / 0.1% TFA, 30 분, 1 ml/min 220 nm. 그림 9는 재조합 단백질인 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 C-말단에 대한 아마이드화 반응을 하기 전과 아마이드화 반응을 한 후의 크로마토그램을 나타낸다. 그림 9의 (A)는 아마이드화 반응 전의 크로마토그램으로 31%의 ACN에서 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ (화살표 A)가 용출되었다. 반면, 효소와 nucleophile을 사용하여 반응을 시킨 후에는 그림 9의 (B)에 나타내듯이 여러 분획들로 나누어지는 것을 볼 수 있는데, 이를 통해 효소인 CPD-Y에 의한 가수분해 반응 및 transpeptidation 반응이 진행되고 있다는 것을 알 수 있다. 그림 9의 (B)에 나타낸 화살표 B는 $r\text{PpOrxA}$ 이며, LC/MS로 분자량을 확인하였다.

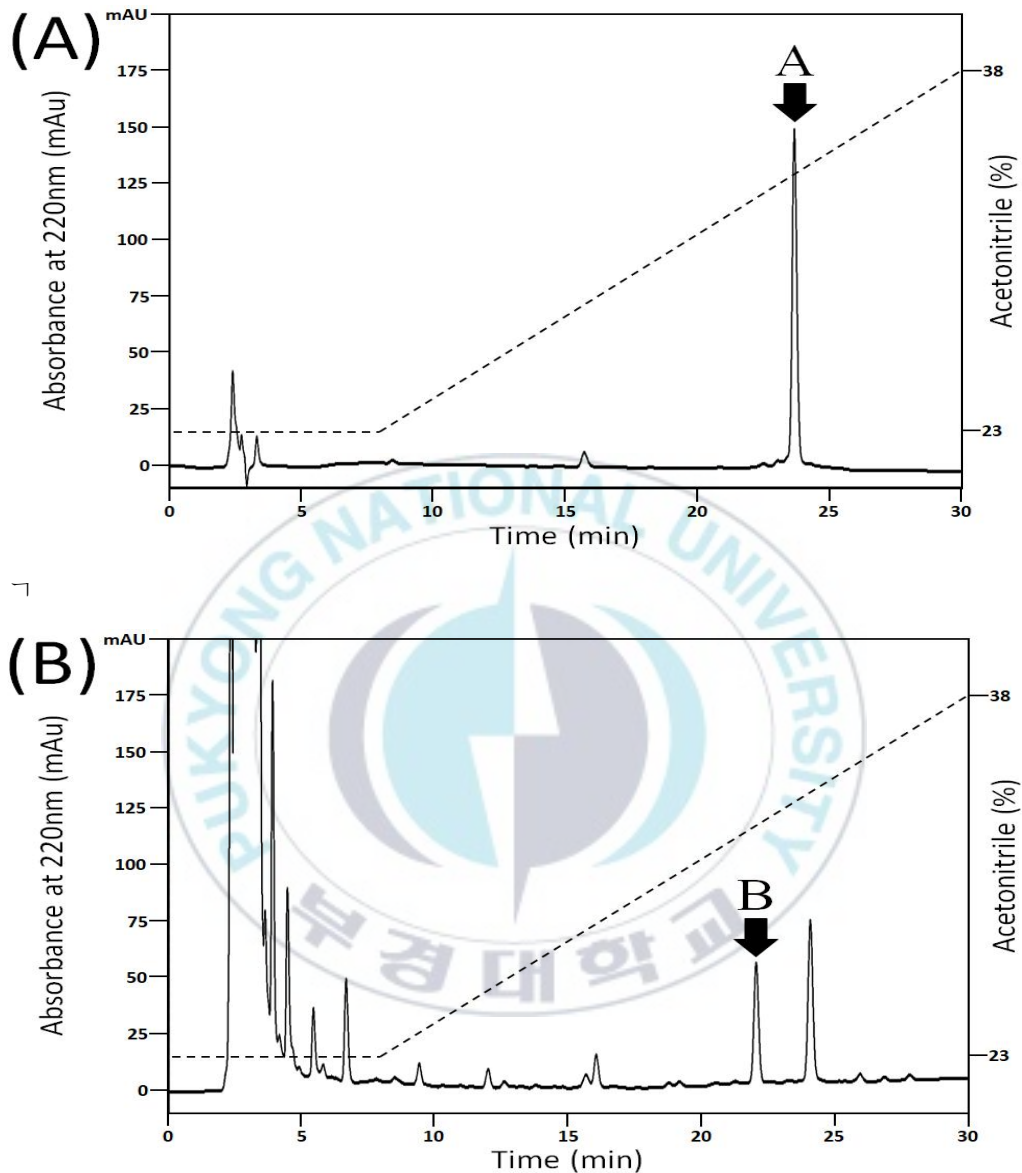


그림 9. $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 C-말단에 대한 아마이드화 반응 전/후 HPLC chromatogram. (A) 아마이드화 반응 전 역상 HPLC chromatogram: 분획 A는 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 이다. (B) 아마이드화 반응 후 역상 HPLC chromatogram(반응시간 30초): 분획 B는 $r\text{PpOrxA-Met-NH}_2$ ($r\text{PpOrxA}$)이다. (그림 9는 nucleophile pH 6에서의 아마이드화 반응으로, 이 때 $r\text{PpOrxA}$ 의 생산 수율은 30.6%로 확인되었다.)

3. Q-TOF LC/MS 분자량 측정

HPLC를 통해 분리한 각각의 분획들을 Q-TOF LC/MS를 사용하여 분자량 측정을 실시하였다. 또한 Orexin A native form과 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOraA}$ 의 이론적인 분자량 값을 Q-TOF LC/MS 측정값과 비교하여 물질이 제대로 생산되고 분리되었는가를 확인하였다. 참고로 이론적인 분자량 값은 ExPASy tool로 계산하였다. 표 2에는 Orexin A native form (PpOraA)과 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOraA}$ 의 이론적 분자량을 나타내었다. 또한 그림 9의 화살표로 표시한 분획 A와 분획 B의 분자량 값도 나타내고 있다.

33개의 아미노산을 가지는 PpOraA의 이론적인 분자량은 3,466.08 Da이고, $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOraA}$ 는 3,449.03 Da으로 계산되었다. 다음으로 Q-TOF LC/MS로 측정한 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOraA}$ 의 분자량은 3,449.5523 Da이었고, 아마이드화 반응 이후 생성된 $r\text{PpOraA-Met-NH}_2$ 의 분자량은 3,466.5289 Da으로 측정되었다 (그림 10). 따라서 Q-TOF LC/MS를 통해 측정된 분자량 값과 이론적 분자량 값은 거의 일치하였기 때문에, 그림 9의 (A)에 나타낸 분획 A는 Leu - OH type에 해당하는 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOraA}$ 이며, 분획 B는 Met-NH₂ type에 해당하는 $r\text{PpOraA-Met-NH}_2$ 임을 확인 할 수 있었다. 따라서 이러한 결과는 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOraA}$ 가 CPD-Y에 의해 C-말단 마지막 잔기인 Leu³³이 잘려나가고, 계속해서 nucleophile인 L-Met-NH₂·HCl과 반응하여 천연물인 $r\text{PpOraA}$ ($r[\text{Met}^{33}\text{amide}]\text{PpOraA}$)로 올바르게 아마이드화 되었다는 것을 의미한다.

표 2. 펩타이드들의 이론적 분자량 값과 Q-TOF LC/MS에 의한 측정 값

	C-말단	Expasy 측정 값		LC/MS 측정값
		without S-S	with S-S	
Native form Orexin A (PpOrxA)	TLTM-NH ₂	3472.13	3466.08	3465.5 (이전 데이터)
r[Leu ³³]PpOrxA	TLTL-OH	3455.08	3449.03	
그림 9의 Peak A (r[Leu ³³]PpOrxA)	TLTL-OH	3455.08	3449.03	3449.5523
그림 9의 Peak B (rPpOrxA)	TLTM-NH ₂	3472.13	3466.08	3466.5289

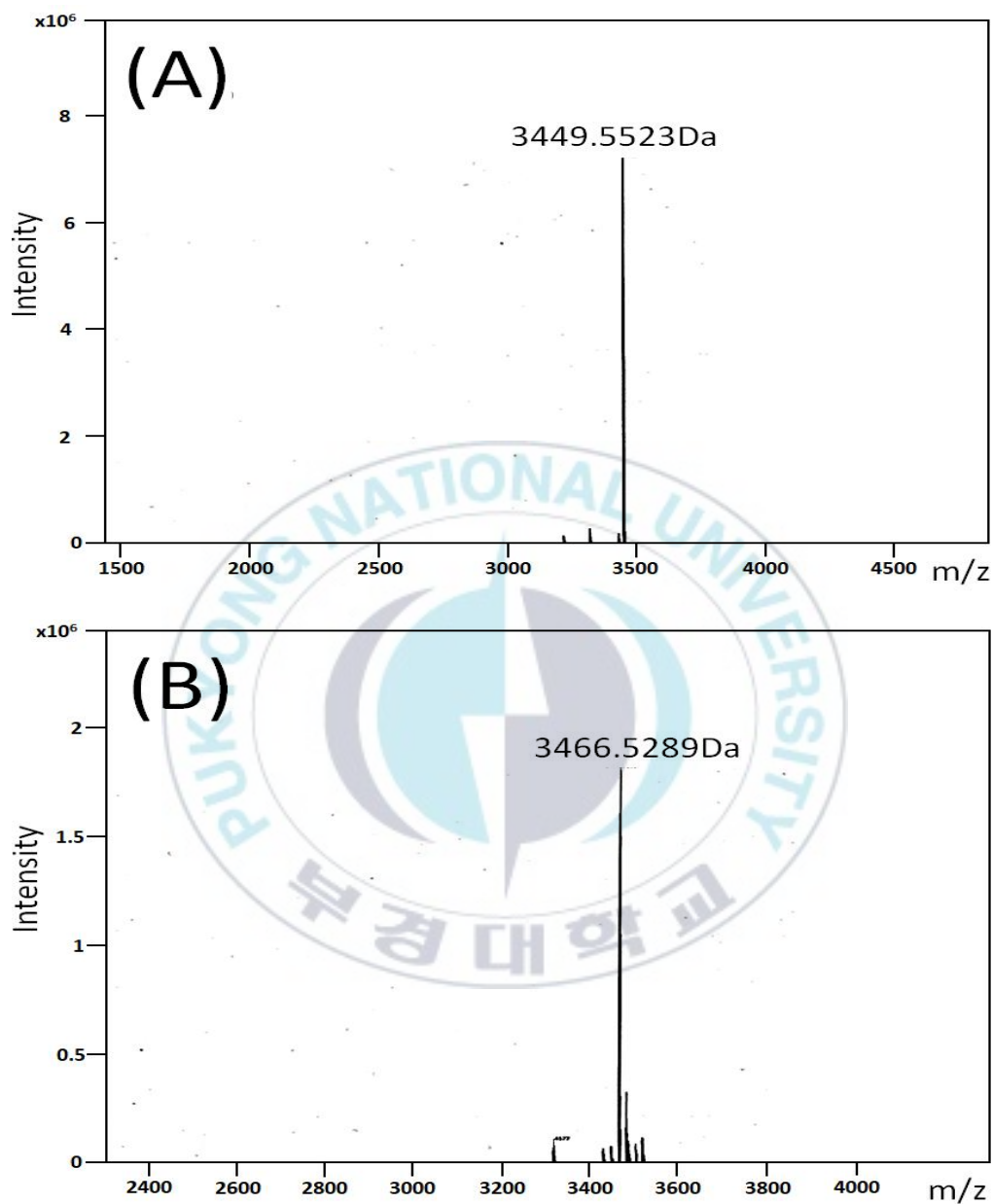


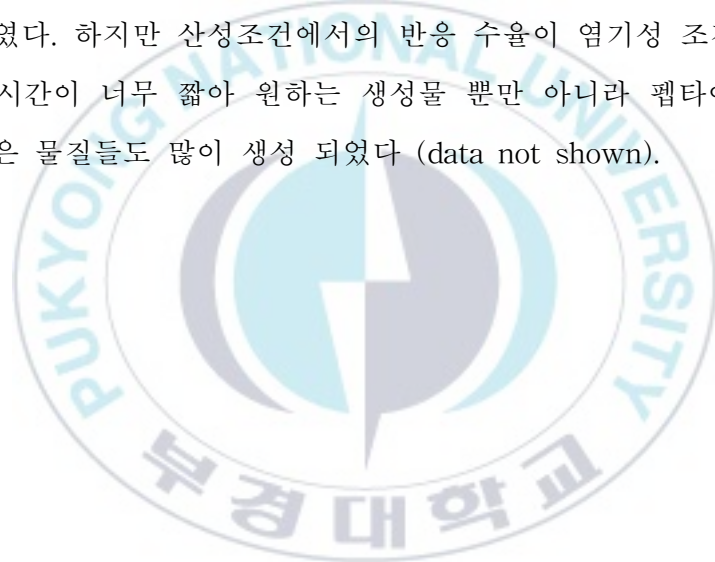
그림 10. 아마이드화 반응 전/후의 펩타이드들의 Q-TOF LC-MS 결과. (A) 그림 9의 화살표 A, $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 분획의 Q-TOF LC/MS의 분자량 측정 결과. (B) 그림 9의 화살표 B, $r\text{PpOrxA-Met-NH}_2$ 분획의 Q-TOF LC/MS의 측정 결과.

4. 효소와 용매에 따른 rPpOrxA의 생산 수율 변화

4.1. pH에 따른 생산 수율

아마이드화에 사용하는 Nucleophile의 pH 조건에 따른 rPpOrxA-Met-NH₂ 생산 수율을 비교하고자 하였다. pH meter기를 사용하여 nucleophile의 pH를 각각 산성(pH 6), 중성(pH 7), 염기성(pH 8)의 3가지 조건으로 제작하였고, r[Leu³³]PpOrxA는 3가지 조건 모두 196 µg으로 동일한 양을 사용하였다. r[Leu³³]PpOrxA 196 µg은 pH 별 nucleophile인 60 mg/ml Met-NH₂·HCl (5 mM EDTA)을 1 mL 사용하여 완전히 녹인 뒤, 22 µg/µl의 CPD-Y를 2 µl 씩 처리하여 아마이드화를 행하였다. 아마이드화 반응 이후, 각 반응시간별 반응물들은 역상 column (CAPCELL PAK C18, 4.6x250 mm, Shisheido, Japan)을 사용하여 각각의 분획들을 분리 정제하였다. HPLC 조건은 다음과 같다: ; 25-38% ACN / 0.1% TFA, 26분, 1 ml/min, 220 nm. 역상 HPLC를 통해 분리된 분획은 Q-TOF LC/MS를 통해 분자량을 분석하였다. 결과적으로 Nucleophile이 산성인 pH 6 조건(그림 11)에서는 생산 수율이 약 26%(반응시간 : 30초)로 나타났고, 중성인 pH 7 조건(그림 12)에서는 약 21%(반응시간 : 30초), 염기성인 pH 8 조건(그림 13)에서는 약 13%(반응시간 : 5분)의 생산 수율을 나타내었다(표 3). 염기 조건인 pH 8에서는 반응시간이 30 초인 다른 두 조건과 다르게 반응시간이 5 분일 때 rPpOrxA-Met-NH₂의 분획이 얻어지는 것으로 보아 이는 효소인 CPD-Y가 C-말단의 마지막 잔기를 자르는 가수분해 작용이 염기성 조건에서는 저해되어 아마이드화 반응을 유도하는 transpeptidation 반응이 느리게 일어난다고 생각되어진다. 또한 그림 13의 (A)에 나타낸 1 번과 2번 분획의 LC/MS를 통해 측정된 분자량은 각각 3,447.5713 Da, 3,447.5676 Da으로 나타났다. 이는 3,449 Da의 분자량을 가지는

$r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 과 비교해서 약 1 Da 차이가 나므로 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 peak에 해당한다고 생각된다. 또한 그림 13의 (A)에 나타낸 1번과 2번 분획의 분자량은 매우 유사하나 chromatogram 상 peak가 나누어져 나타나는 것은 두 물질이 동일한 물질이 아닐 가능성이 있다는 것을 의미한다. 따라서 이 부분에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 생각된다. 이 결과를 바탕으로 Nucleophile의 pH가 산성 조건인 pH 6에서 아마이드화를 실시하는 것이 중성 또는 염기성 조건 하에서 아마이드화를 하는 것 보다 $r\text{PpOrxA-Met-NH}_2$ 의 생산 수율을 높이는데 있어 더 좋은 조건이라는 것을 확인하였다. 하지만 산성조건에서의 반응 수율이 염기성 조건보다는 높지만 반응시간이 너무 짧아 원하는 생성물 뿐만 아니라 펩타이드 서열의 길이가 짧은 물질들도 많이 생성 되었다 (data not shown).



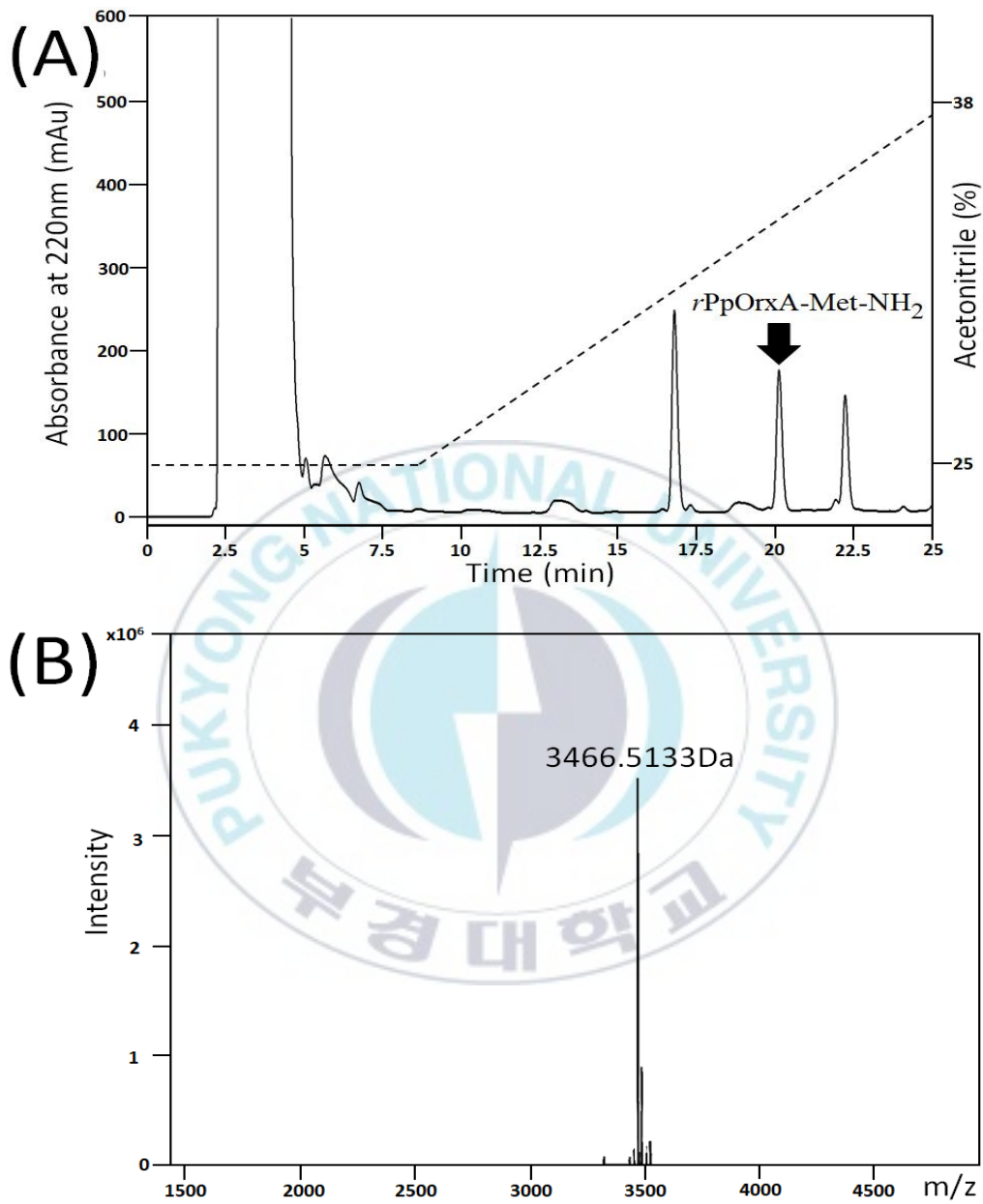


그림 11. Nucleophile pH 6에서의 HPLC chromatogram과 분자량. (A) pH 6에서의 HPLC 결과 (반응시간 30초), (B) rPpOrxA-Met-NH₂ 분획의 Q-TOF LC/MS 결과

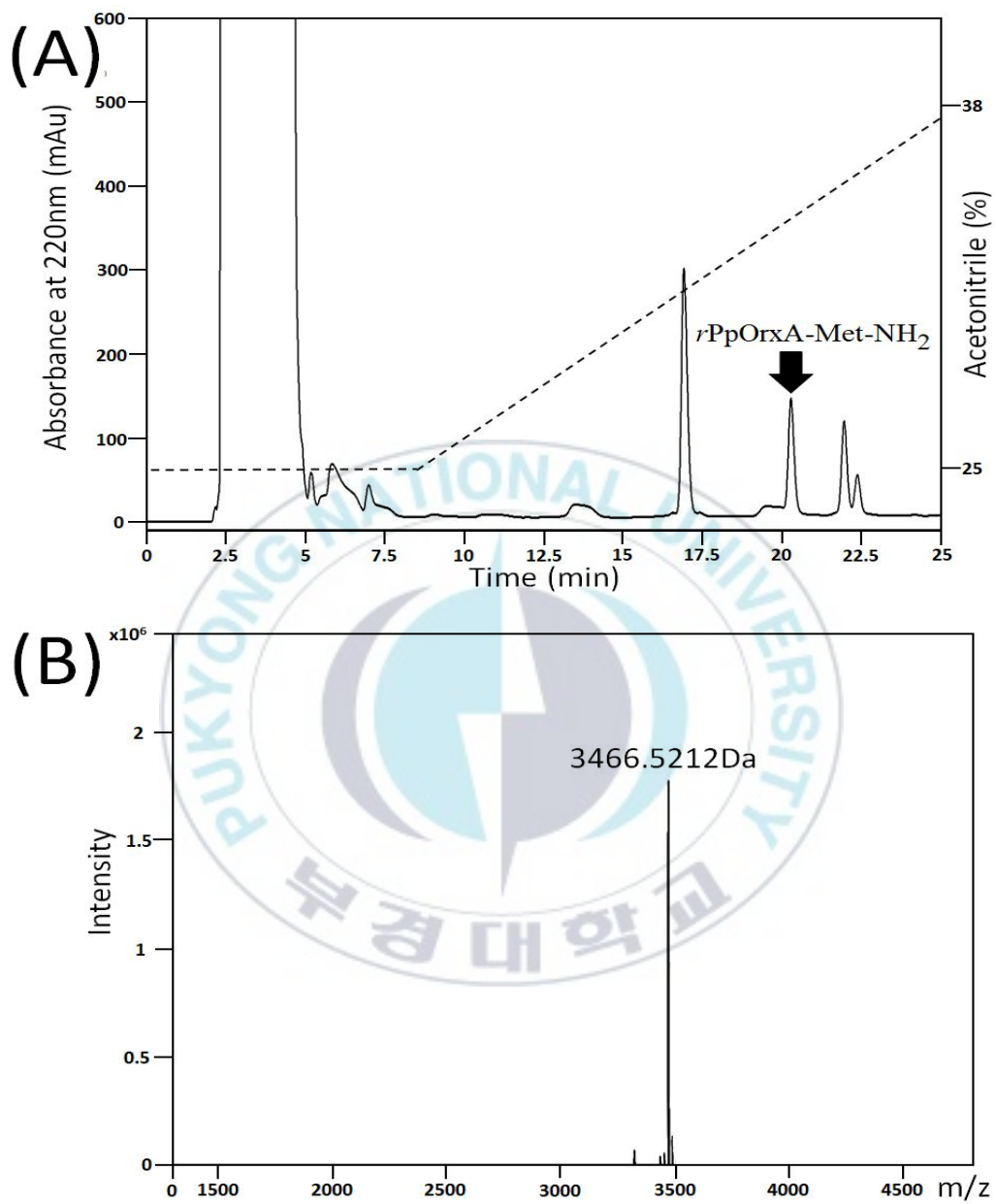


그림 12. Nucleophile pH 7에서의 HPLC chromatogram과 분자량. (A) pH 7에서의 HPLC 결과(반응시간 30초), (B) *rPpOrxA-Met-NH₂* 분획의 LC/MS 결과

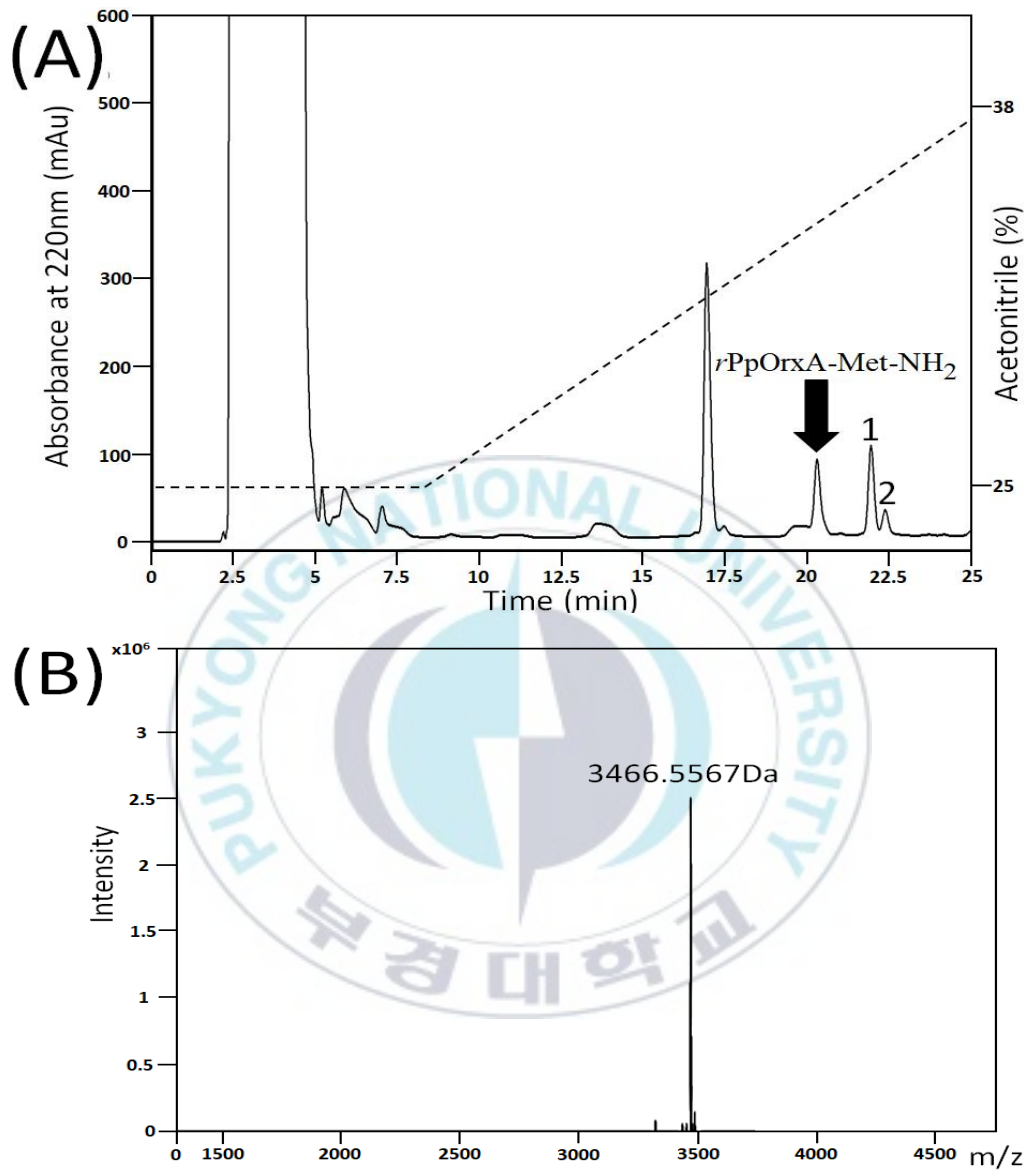


그림 13. Nucleophile pH 8에서의 HPLC chromatogram과 분자량. (A) pH 8에서의 HPLC 결과(반응시간 5분), 화살표 부분이 *rPpOrxA-Met-NH₂*이다. (B) *rPpOrxA-Met-NH₂* 분획의 LC/MS 결과.

표 3. pH 조건에 따른 HPLC 분획의 분자량 및 아마이드화 생산 수율

pH	사용한 펩타이드의 양	반응시간	LC-MS 측정값 (Da)	생산 수율
6	196 μ g	30초	3,466.5133	26%
7	196 μ g	30초	3,466.5212	21%
8	196 μ g	5분	3,466.5567	13%



4.2. 효소 (carboxypeptidase Y) 사용량에 따른 생산 수율

아마이드화 반응에 있어서 효소인 CPD-Y의 사용량에 따른 rPpOrxA-Met-NH₂의 생산 수율을 비교하기 위한 실험을 하였다. Nucleophile은 산성 조건(pH 6)으로 60 mg/ml L-Met-NH₂ • HCl (5 mM EDTA) 1mL 사용하였고, 기질인 r[Leu³³]PpOrxA의 양은 26.35 µg으로 통일하여 사용하였다. 22 µg/µl CPD-Y는 각각 2 µl (44 µg), 1 µl (22 µg), 0.5 µl (11 µg)의 3가지 조건으로 맞춘 뒤, 30°C 항온 수조에서 아마이드화 반응을 실시하였다. 아마이드화 반응 이후에는 반응시간별에 따른 반응물을 역상 column (Shisheido, Japan, CAPCELL PAK C18, 4.6 x 250 mm)으로 분리하였다 (그림 14). HPLC 조건은 다음과 같다: 23-38% ACN / 0.1% TFA, 30분, 1 ml/min, 220 nm. HPLC로 얻은 분획들은 Q-TOF LC/MS로 분자량을 분석하였다(그림 15, 표 4). 실험 결과 CPD-Y를 11 µg 사용한 경우는 Met-NH₂ type의 생산 수율이 약 30.6%, 22 µg 사용한 경우는 약 18.6%로 나타났다. 하지만 44 µg을 사용한 경우는 CPD-Y가 마지막 잔기인 Leu 하나만을 절단하여 rPpOrxA-Met-NH₂을 형성하는 것이 아니라 그보다 훨씬 더 많은 C-말단의 아미노산들을 절단하여 원하는 rPpOrxA-Met-NH₂ type의 생산 수율은 0%로 나타났다. 그림 14의 (A)에 나타난 1번 분획과 2번 분획의 측정분자량은 각각 3,122.3587 Da, 3,252.4202 Da이다. rPpOrxA의 서열로 미루어보아 1번 분획(이론적 분자량 3,121.61 Da)은 C-말단에서 3개의 아미노산이 절단되어 30개의 잔기로 구성된 물질이며, 2번 분획(이론적 분자량 3,251.82 Da)은 C-말단에서 3개의 아미노산이 절단된 후, 아마이드화가 일어나 C-말단이 Met-NH₂ 형태인 31개의 잔기로 구성된 물질임을 확인하였다. 이를 통해 CPD-Y를 44 µg 사용하는 조건에서는 효소의 가수분해 작용이 매우 활발하게 일어나 C-말단이 Leu 하나만 절단되는 것이 아니라 33개보다 2개 또는 3개 더 절단되어 형성된다는 것을 확

인하였다. 따라서 그림 14 A의 1번과 2번 분획의 서열은 아래에 나타난 서열이라고 예측된다.

rPpOrxA: GNACCKGTCHEIPKGCNCPYKAVLCGELNTLTM-NH₂

1번 분획: GNACCKGTCHEIPKGCNCPYKAVLCGELNT-OH

2번 분획: GNACCKGTCHEIPKGCNCPYKAVLCGELNTM-NH₂



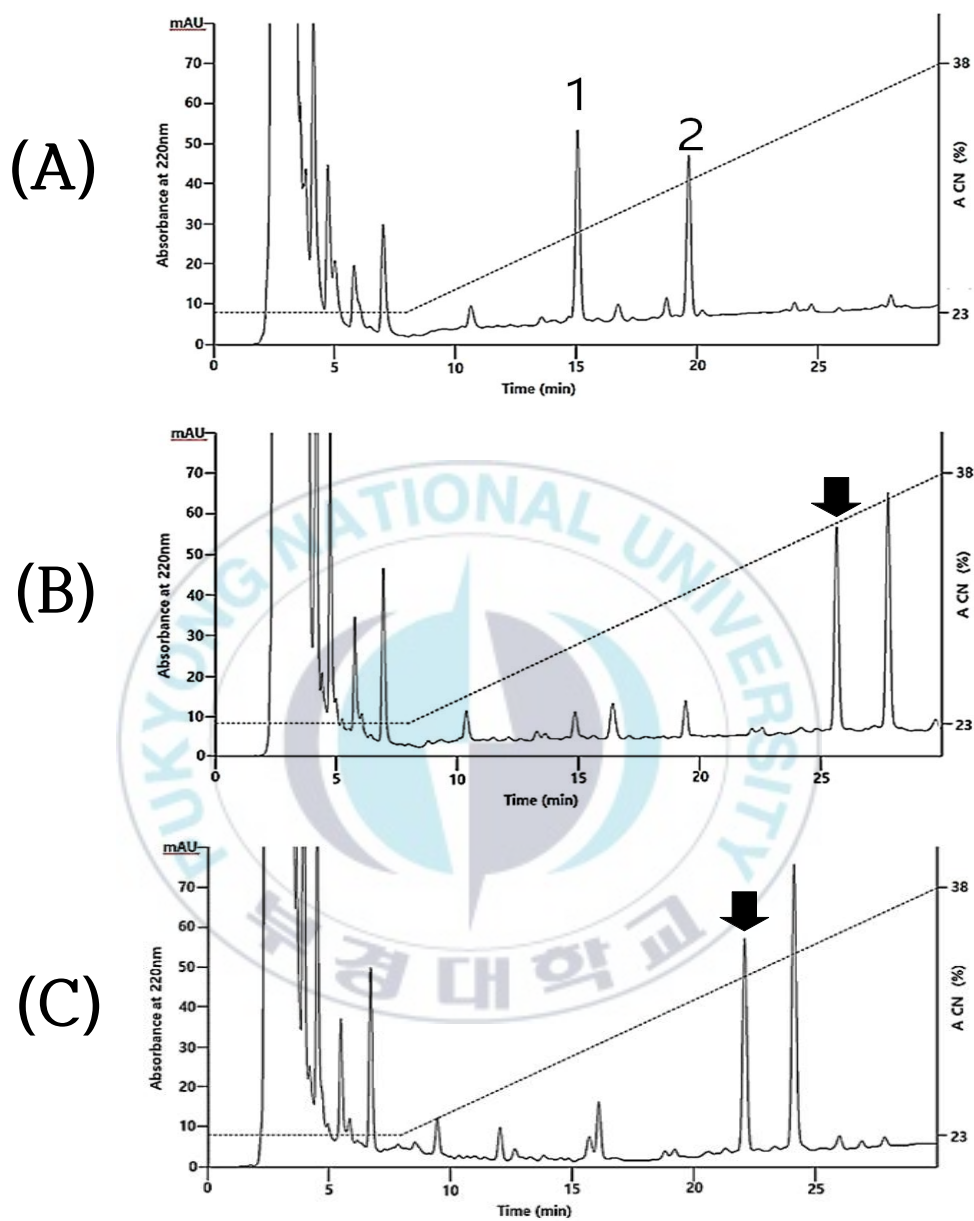


그림 14. 효소의 양에 따른 아마이드화 반응의 HPLC 결과. (A) CPD-Y 44 μg 사용(반응시간 30초), (B) CPD-Y 22 μg 사용(반응시간 30초), (C) CPD-Y 11 μg 사용(반응시간 30초).

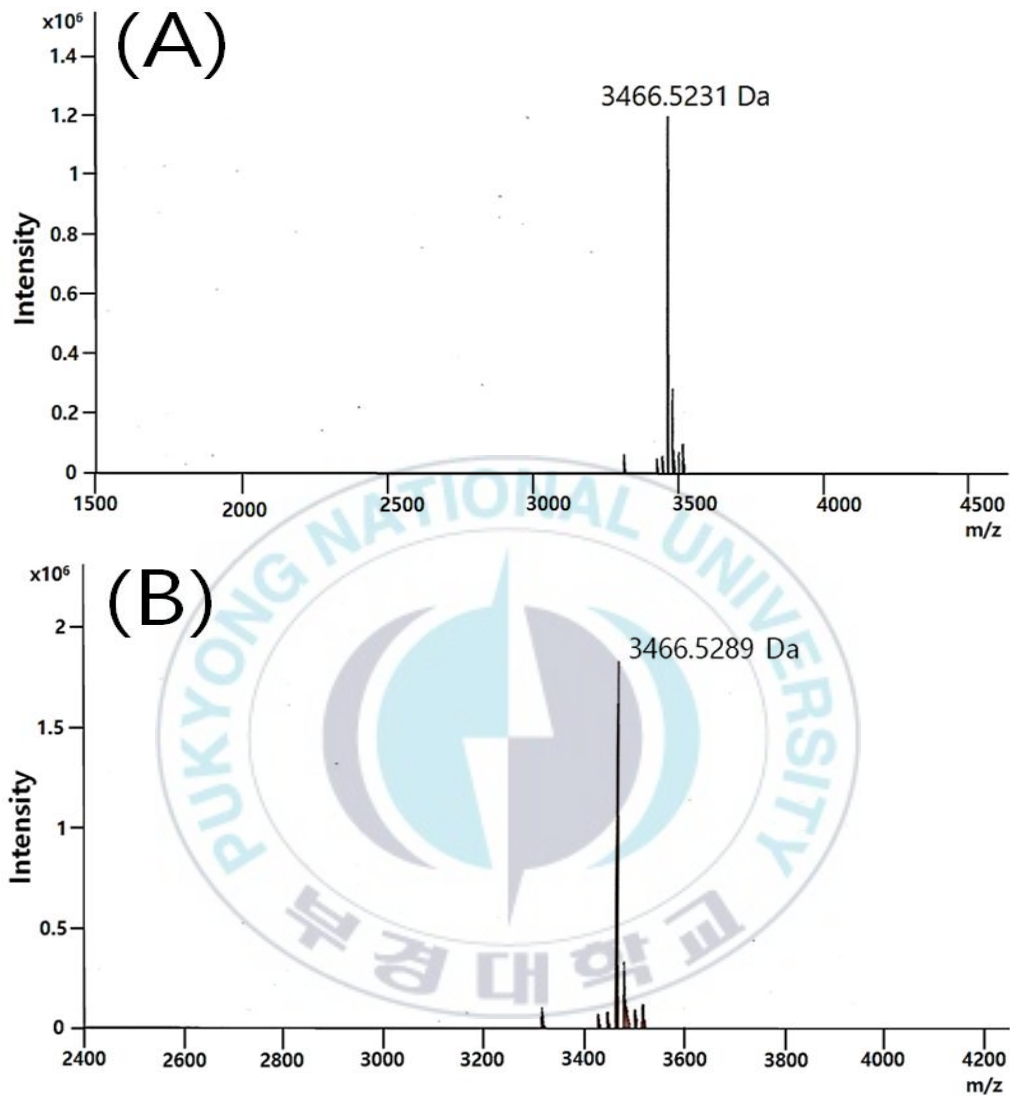


그림 15. 효소의 양에 따른 아마이드화된 생성물의 Q-TOF LC/MS 결과. (A) CPD-Y를 22 μ g 사용하였을 때 분획의 분자량, (B) CPD-Y를 11 μ g 사용하였을 때 분획의 분자량. 그림 13의 (B)와 (C)에서 화살표로 나타낸 분획의 분자량은 각각 3,466.5231 Da, 3,466.5289 Da이며, 둘 다 rPpOrxA-Met-NH₂ 로 확인하였다.

표 4. 효소의 양에 따른 rPpOrxA의 생산 수율

사용한 효소의 양	반응시간	LC-MS 측정값 (Da)	생산 수율
44μg	30초	-	0%
22μg	30초	3,466.5231	18.6%
11μg	30초	3,466.5289	30.6%



4.3. DMF 사용 여부에 따른 생산 수율

Henriksen et al., (1992)에 의하면 human calcitonin의 C-말단 아마이드화 실험에서 기질로 사용한 peptide를 dimethylformamide (DMF)에 녹여 실험하였다고 보고되었다. 또한 DMF가 CPD-Y의 가수분해 작용과 transpeptidation에 영향을 미친다고 보고되어 있다[Lewis and Schuster, 1991]. 따라서 DMF 사용 여부에 따른 아마이드화 수율의 변화를 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 진행하였다. Nucleophile은 산성(pH 6) 조건으로 60 mg/ml L-Met-NH₂ • HCl (5 mM EDTA) 1mL 사용하였으며, 기질인 r[Leu³³]PpOrxA의 양은 각각 98 µg을 사용하였다.

효소인 CPD-Y 22 µg/µl은 1.86 µl (40.9 µg)를 사용하였다. 반응시간별 아마이드화 반응물들은 역상 column (CAPCELL PAK C18, 4.6 x 250 mm, Shisheido, Japan)으로 분리하였으며, HPLC 조건은 다음과 같다: 25-38% ACN / 0.1% TFA, 26분, 1 ml/min, 220 nm. 그림 16는 DMF를 사용하지 않았을 때 반응의 크로마토그램을 나타냈으며, 그림 17은 DMF를 사용하였을 때 반응의 크로마토그램을 나타낸다. DMF는 반응시키는 sample volume의 0.4%에 해당하는 양을 첨가하여 아마이드화를 하였다. 실험 결과 DMF를 사용하지 않은 경우는 rPpOrxA-Met-NH₂ 생산 수율이 약 28.6%로 나타났고, DMF를 사용한 경우에는 생산 수율이 약 29.6%로 나타났다(표 5). 이러한 결과는 본 연구에서 r[Leu³³]PpOrxA의 아마이드화 반응에 있어서 DMF의 사용여부는 rPpOrxA의 수율 향상에 크게 영향이 없다는 것을 나타낸다.

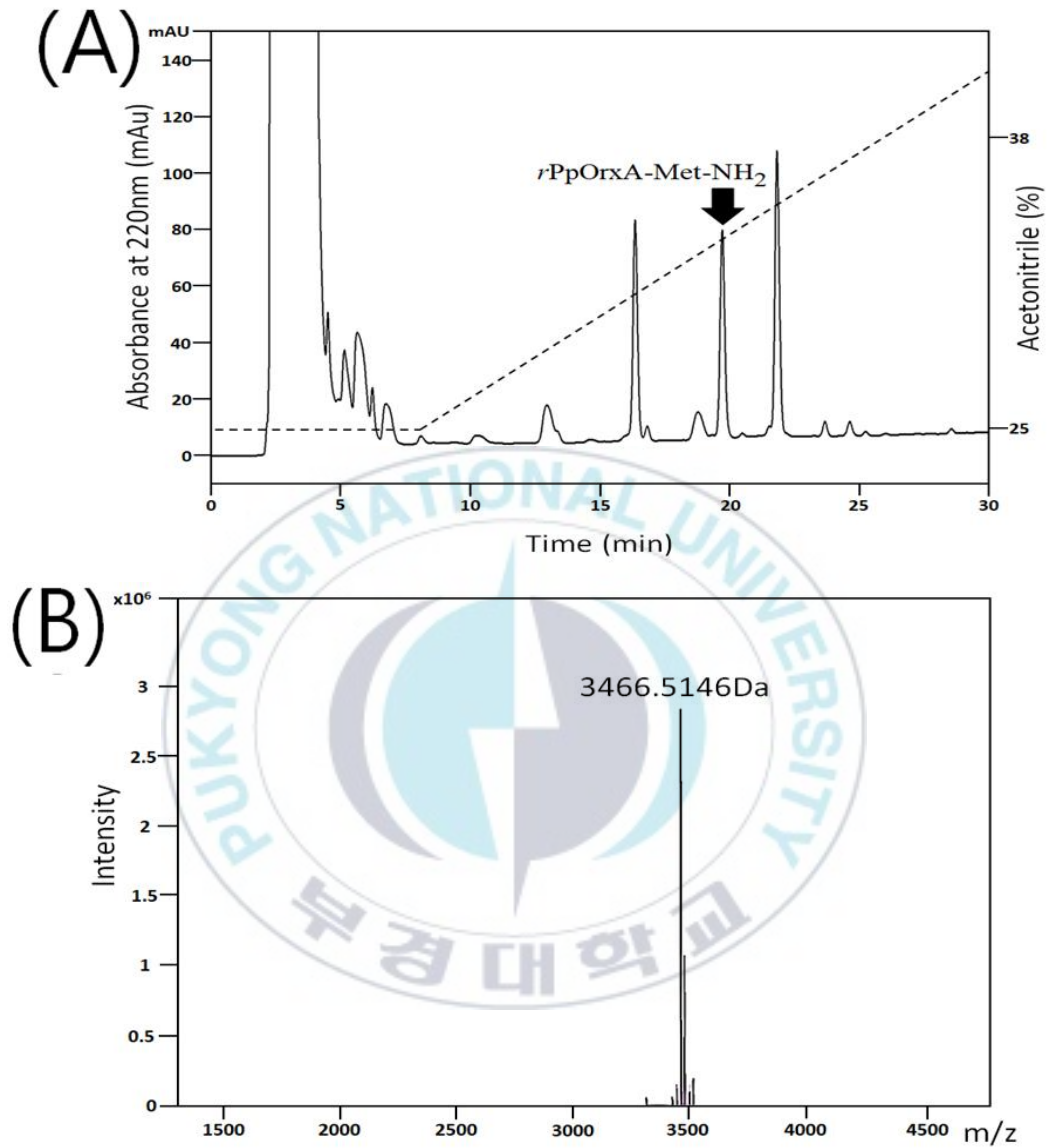


그림 16. DMF를 사용하지 않은 경우 반응에 대한 HPLC 결과 및 분자량. (A) DMF를 사용하지 않은 경우 HPLC 결과(반응시간 30초), 화살표는 rPpOrxA-Met-NH₂를 나타낸다. (B) rPpOrxA-Met-NH₂ 분획의 LC-MS 결과

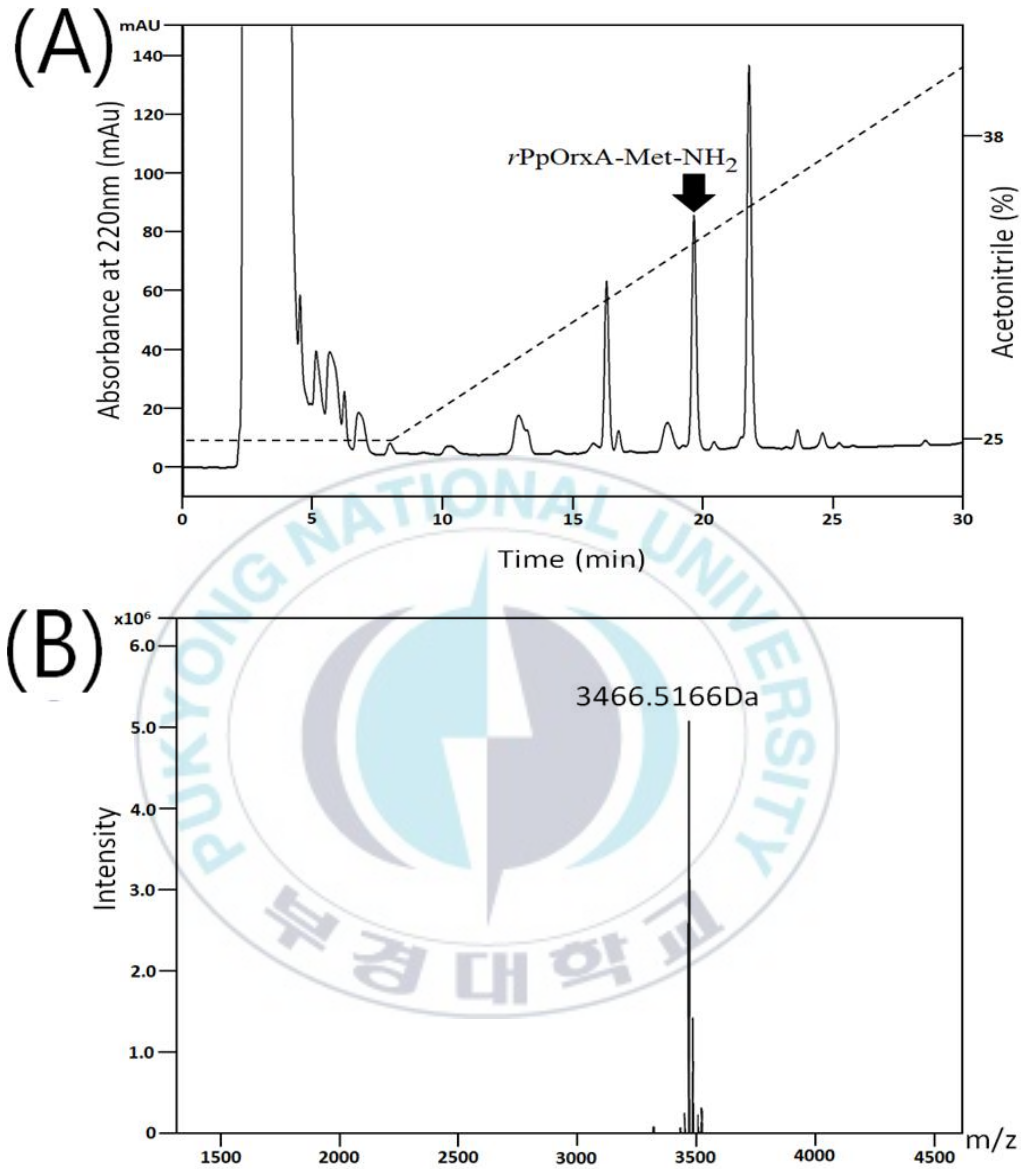


그림 17. DMF를 사용한 경우 반응에 대한 HPLC 결과 및 분자량. (A) DMF를 사용한 경우 HPLC 결과(반응시간 30초), 화살표는 *rPpOrxA-Met-NH₂*를 나타낸다. (B) *rPpOrxA-Met-NH₂* 분획의 LC-MS 결과. 그림 16과 그림 17에서 화살표로 나타낸 분획의 분자량은 3,466.5Da으로 *rPpOrxA-Met-NH₂*의 분자량과 일치하며, 이는 생성물이 제대로 생산되었다는 것을 의미한다.

표 5. DMF 사용 여부에 따른 rPpOrxA의 생산 수율

DMF 사용 여부	사용한 펩타이드의 양	반응시간	LC/MS 측정값 (Da)	생산 수율
X	98μg	30초	3,466.5146	28.6%
O	98μg	30초	3,466.5166	29.6%



5. 근육 수축 활성화

본 실험실에서 생산한 rPpOrxA-Met-NH₂ (rPpOrxA)을 사용하여 별불가사리의 조직에 대해 근육 수축 활성을 측정하였다. 펩타이드의 근육 활성화 측정은 apical muscle, tube feet 및 cardiac stomach을 사용하여 근육 수축 활성을 조사하였다. 근육 수축 활성을 확인하기 이전에 우선 apical muscle은 Acetylcholine (Ach)으로, tube feet과 cardiac stomach은 Carbachol (Carb)을 사용하여 근육을 활성화하였다. rPpOrxA는 10⁻⁵ M 농도로 투여하였고, isometric transducer를 통해 근육 수축 활성을 그래프로 확인하였다. 그림 18에 나타내듯이 rPpOrxA는 apical muscle, tube feet, cardiac stomach에 rPpOrxA에 대해 근육 수축 활성을 나타냈으며, apical muscle은 약 36%, tube feet에서는 약 17%, cardiac stomach에서는 약 20%의 활성을 보였다.

3가지 조직에서의 근육 수축 활성을 확인한 뒤, 3가지 조직 중 가장 높은 활성을 나타내었던 별불가사리의 apical muscle에 대해 농도별 근육 수축 활성을 측정해 보았다. apical muscle은 5 × 10⁻⁶ M의 Acetylcholine (Ach)으로 활성화시킨 뒤, 정제된 rPpOrxA를 10⁻¹⁰, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵ M 농도로 누적 투여하여 근육 수축 활성을 그래프로 확인하였다. 그림 19에 나타내듯이 apical muscle에서 rPpOrxA는 10⁻⁸ M에서 2.47%의 역치값을 나타내었으며, 10⁻⁵ M에서 25.18 ± 1.68 %의 수축 활성(E_{max})과 EC₅₀ 값은 4.981 × 10⁻⁸ M이었다.

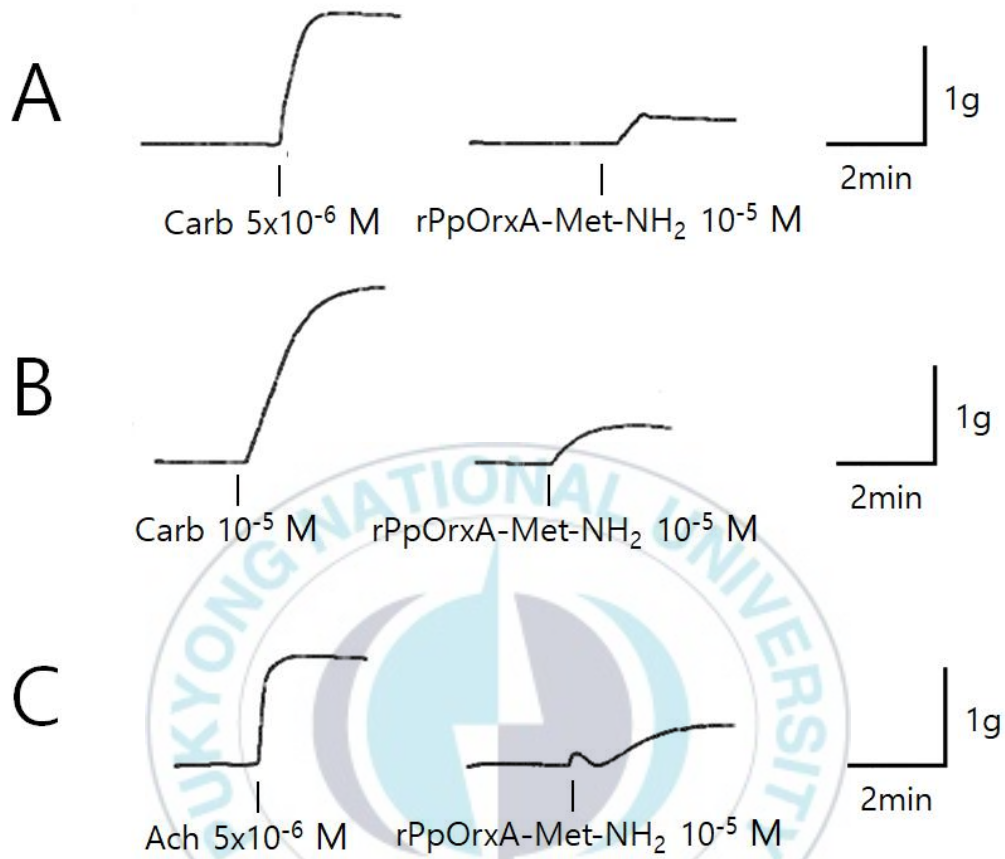
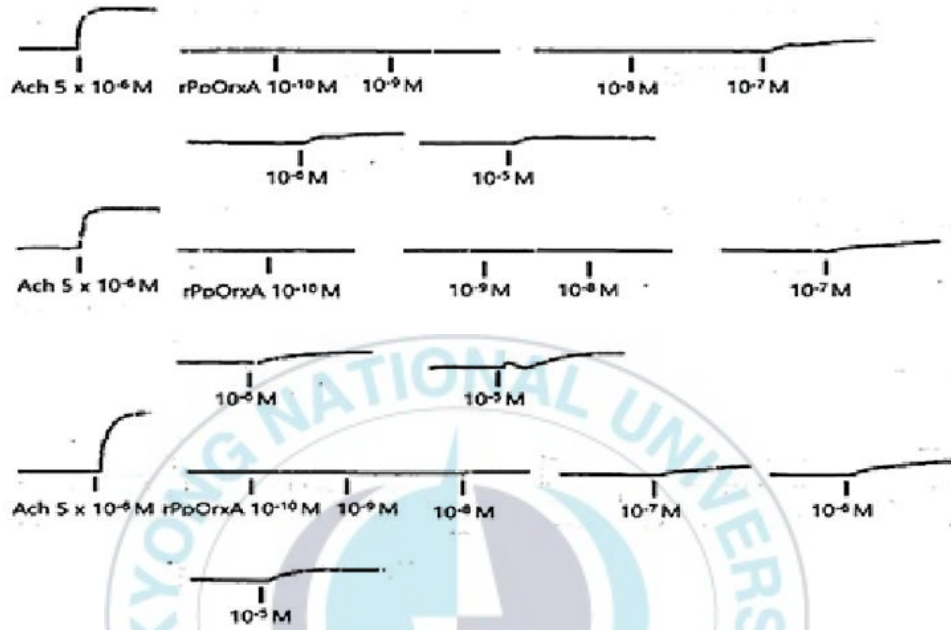


그림 18. 별불가사리 조직에 대한 rPpOrxA-Met-NH₂의 근육 수축 활성. (A) tube feet, (B) cardiac stomach, (C) apical muscle. Tube feet은 17%, cardiac stomach은 20%, apical muscle은 36%의 근육수축활성을 나타내었 으며, apical muscle에서 rPpOrxA-Met-NH₂(rPpOrxA)에 의한 근육수축활 성이 가장 높게 나타났다.

(A)



(B)

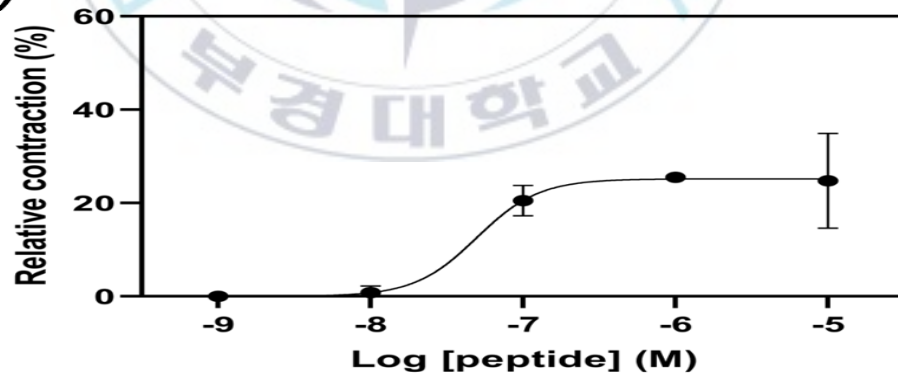


그림 19. Apical muscle에 대한 rPpOrxA-Met-NH₂의 농도별 근육 수축 활성 및 농도 의존 곡선. (A)는 apical muscle에 대한 rPpOrxA의 농도별 근육 수축 활성 그래프이고, (B)는 rPpOrxA의 농도별 apical muscle의 근육 수축 활성에 대한 농도 의존 곡선을 나타낸 것이다. (n=3)

6. 조직별 발현량

PpOrxA 유전자의 조직별 발현량을 알아보기 위해서 별불가사리의 7가지 조직(Cardiac stomach, radial nerve cord, tube feet, pyloric stomach, gonads, pyloric ceaca, apical muscle)에서 total RNA를 추출하였다. 조직별로 total RNA를 추출한 후, 3 set의 PpOrxA primer (표 1)를 이용하여 PCR을 한 결과 PpOrxA-3 primer set에서 가장 명확한 결과를 확인하였고, 계속해서 PpOrxA-3 primer set를 이용하여 실험을 진행하였다. 다음으로 template의 농도를 결정하기 위하여 RT-qPCR을 실시하였다. RT-qPCR 후, PCR efficiency를 계산한 결과, PpOrxA의 PCR efficiency는 1.9896, EF-1 α 는 2.1071로 확인되었다. Template 농도 결정 후, 각 조직별 PpOrxA의 발현량을 비교하기 위하여 comparative CT method로 별불가사리의 각 조직에서 PpOrxA 전사체의 상대적 전사 발현 수준을 EF1- α 와 비교하였다. 그림 20에 나타난 것처럼, radial nerve cord는 다른 조직들에 비해 PpOrxA의 발현량이 높게 나타났다. 또한 radial nerve cord에서 상대적 전사 발현 수준 값이 1을 넘어서는 모습을 보였는데, 이는 house keeping gene인 EF-1 α 보다 PpOrxA의 발현 수준이 더 높다는 것을 나타낸다.

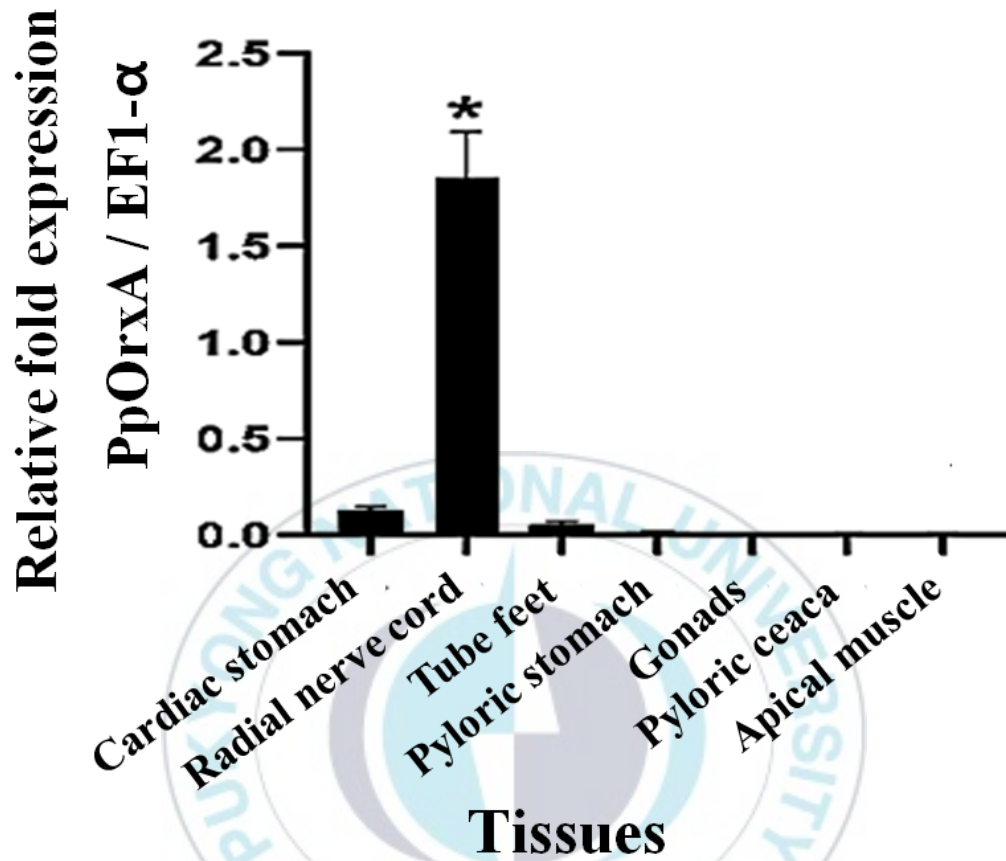


그림 20. PpOrxA의 조직별 발현량. RT-qPCR을 실시한 결과 radial nerve cord에서 가장 발현량이 많다는 것을 확인하였다.

IV. 고찰

Orexin A는 신경성 펩타이드의 일종으로 생체 내에서 수면 및 각성 상태, 에너지 항상성, 섭식 작용을 조절하는 역할을 수행한다고 알려져 있다. 또한 다른 신경전달물질 시스템과의 상호 작용을 통해 생체 내에서 여러 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 본 연구실에서는 이전에 별불가사리의 관측 추출물로부터 apical muscle 수축 활성 측정을 통해 새로운 물질을 정제하였고, 유전자 클로닝을 통하여 서열 분석을 하였다. 이러한 연구를 통해 정제한 새로운 펩타이드는 무척추동물의 Orexin A-related peptide와 동일하게 33개의 아미노산 잔기를 가지며, 6개의 cysteine이 3쌍의 disulfide bond를 형성하고 있는 물질임을 확인하였다. 따라서 이 물질이 무척추동물의 Orexin A와 관련이 있을 것이라 판단하여 Orexin A-related peptide (PpOrxA)라고 명명하였으며, 이 물질을 대량생산하고자 하였다. PpOrxA는 고상합성법으로 대량 생산하기에는 어려움이 있기 때문에 재조합 펩타이드로 생산하는 방법을 선택하였다. 우선 pET-28 vector를 사용하여 plamid를 구축하였다. 이 때 *E. coli* BL21 (DE3)의 경우 Post translational modification이 일어나지 않아 C-말단이 아마이드화 되어 있는 펩타이드를 생산하지 못한다. 따라서 PpOrxA의 33번째 자리에 있는 Met을 Leu으로 치환하여 vector에 삽입한 뒤, $r[\text{Leu}^{33}]$ PpOrxA를 대량 생산하였다. 이 때 C-말단의 아미노산이 친수성 아미노산 보다는 소수성 아미노산일 경우, 아마이드화에 사용하는 효소인 CPD-Y와 반응성이 좋다는 보고에 따라 33번째 자리에 있는 Met을 소수성 아미노산 중 하나인 Leu으로 치환을 하였다[Breddam, 1986].

본 연구에서는 생산된 $r[\text{Leu}^{33}]$ PpOrxA을 native form으로 만들기 위한 아마이드화 과정을 진행하였고, 아마이드화 수율을 높이기 위한 여러 조건

들을 알아보았다. 그 결과 nucleophile의 pH가 산성 조건인 상태에서, $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$: CPD-Y의 비가 2.4 : 1 [w/w]의 비율일 때 30.6%의 수율을 나타내었다. 한편 이전의 본 연구실 실험에서는 합성 수율이 23%이었다 (data not shown). 따라서 본 연구 실험은 이전의 결과보다 수율이 7.6% 향상된 조건을 나타내고 있다. 그리고 DMF는 이번 실험을 통해 $r[\text{Leu}^{33}]\text{PpOrxA}$ 의 아마이드화 수율을 향상 시키는데 큰 영향이 없다는 결과를 확인하였다. 하지만 William and Schuster, (1991)의 보고에 따르면 CPD-Y의 가수 분해 능력 및 transpeptidation 작용은 DMF 이외에도 1% SDS, DMSO 등의 용매에 영향을 받는다고 보고되었다. 따라서 이들 용매를 사용하여 아마이드화 반응 수율의 증감에 대한 차이점이 있는 것으로 보아 추가적인 실험이 필요하다고 생각된다.

본 연구에서는 별불가사리의 apical muscle, cardiac stomach, tube feet를 사용하여 rPpOrxA의 근육 수축 활성을 알아보는 실험을 진행하였으며, 그 결과 apical muscle에서 약 36.5 %, tube feet에서 약 16.67%, cardiac stomach에서 약 20%의 활성을 나타내었다. 이는 apical muscle이 별불가사리의 움직임에 관여하는 근육이기 때문에 tube feet과 cardiac stomach보다 높은 활성을 나타내었다고 생각된다. Apical muscle에 대한 rPpOrxA의 누적 투여 실험에 의하면 rPpOrxA는 10^{-8} M에서 2.47%로 반응을 나타내기 시작하여 10^{-5} M에서 25.18 ± 1.68 %의 수축 활성(E_{max})을 나타내었다. EC_{50} 값은 4.981×10^{-8} M이었다. 또한 농도 의존 곡선을 보면 10^{-5} M에서 오차범위가 크게 나타나는 것을 확인하였으며, 이는 그림 19 A에 나타낸 세 번째 근육 수축 활성 그래프의 10^{-5} M 농도에서 다른 두 번의 결과 보다 높은 활성이 나타났기 때문이다. 위 실험 결과 rPpOrxA가 apical muscle에 대해 농도 의존 반응을 나타낸다는 것을 확인하였다.

이번 실험을 통해 apical muscle, cardiac stomach, tube feet에서

rPpOrxA-Met-NH₂ (rPpOrxA)에 의한 근육 수축 활성이 있다는 것을 확인하였기 때문에 추가적으로 cardiac stomach과 tube feet에서 rPpOrxA-Met-NH₂의 농도 변화에 따른 근육 수축 활성을 알아보기 위한 실험이 필요할 것으로 생각된다.

한편, PpOrxA의 조직별 발현량을 보면 다른 조직들과 비교한 결과, radial nerve cord에서 PpOrxA의 발현량이 많은 것을 확인할 수 있다. 이 결과는 이전에 정제하여 Orexin A-related peptide (PpOrxA)로 명명하였던 물질이 Orexin과 같은 신경성 펩타이드에 해당하기 때문에 항상성 조절에 핵심적인 역할을 수행하는 신경인 radial nerve cord에서 발현량이 가장 높게 나타났다고 생각된다.

Rodgers et al. (2002)에 의하면 척추동물의 Orexin A는 생체 내에서 섭식 작용을 증진시키는 작용을 한다고 보고되었다. 또한 본 연구에서는 근육 수축 활성 실험을 통해 별불가사리의 섭식 작용과 관련된 조직인 cardiac stomach에서 PpOrxA에 의한 수축 활성이 나타나는 결과를 확인하였다. 또한 조직별 발현량 비교를 통해 PpOrxA도 척추동물의 Orexin A와 같은 신경성 펩타이드임을 확인하였다. 따라서 PpOrxA도 별불가사리의 생체 내에서 섭식 작용과 관련된 역할을 수행할 것이라 예측되어진다.

그림 19는 지금까지의 결과를 토대로 PpOrxA의 생체 내에서 나타나는 생리활성의 역할에 대한 가상적인 상관관계를 나타내었다. 그림 21에서 나타낸 것과 같이 별불가사리는 섭식 후 포만 상태일 경우, 생체 내 PpOrxA의 농도가 낮아져 섭식 작용이 억제될 것이며, 근육 움직임에 대한 활성도 낮아지게 되어 먹이를 향해 느린 속도로 이동할 것이라 예상된다(그림 21 A). 반면에 별불가사리가 기아 상태일 경우, 생체 내 PpOrxA의 농도는 높아져 섭식 작용이 촉진될 것이며, 높아진 PpOrxA의 농도에 의해 근육의 활성 또한 높아지게 되어 먹이를 향해 이동하는 속도가 포만 상태일 보다

빨라질 것으로 예상된다(그림 21 B). 또한 본 연구에서는 PpOrxA에 의한 근육 수축 활성만을 확인하였기 때문에 별불가사리가 섭식 작용을 하고자 먹이를 향해 이동하는 과정을 설명하기 위해 PpOrxA의 근육 이완 활성과 관련된 실험도 추후에 필요하다고 생각된다. 그러기 위해서는 별불가사리 생체 내 PpOrxA와 섭식작용과의 관계를 확인하기 위한 *in vivo* 실험이 필요할 것으로 생각된다.

한편, 척추동물의 경우 Orexin 이외에도 Neuropeptide Y (NPY), Galanin, Melanin-concentrating hormone (MCH) 등의 펩타이드가 섭식 작용 촉진에 관여하고 있다고 알려져 있다. 또한 Leptin, Cocaine-and amphetamine regulated transcript (CART), Corticotropin releasing hormone (CRH)처럼 섭식 작용을 억제하는 펩타이드도 척추동물의 생체 내에 존재하며 섭식 작용을 조절한다고 알려져 있다(Volkoff, 2006; Jensen, 2001). 따라서 척추동물과 동일하게 후구동물에 해당하는 별불가사리도 섭식 작용을 조절하는 물질이 생체 내에 존재할 것이라 생각된다. 하지만 아직까지 무척추동물에서 섭식 작용 조절 물질에 대한 연구는 아직 정확히 밝혀져 있지 않다. 따라서 무척추동물에서 섭식 작용 조절 물질에 대한 더 많은 연구를 통해 해적생물로 분류되는 불가사리로부터 비만, 섭식 장애 치료 등의 분야에 활용할 수 있는 새로운 물질을 발견하고, 그들을 활용하기 위해 재조합 또는 화학적 합성을 통해 대량 생산할 수 있을 것이라 생각된다.

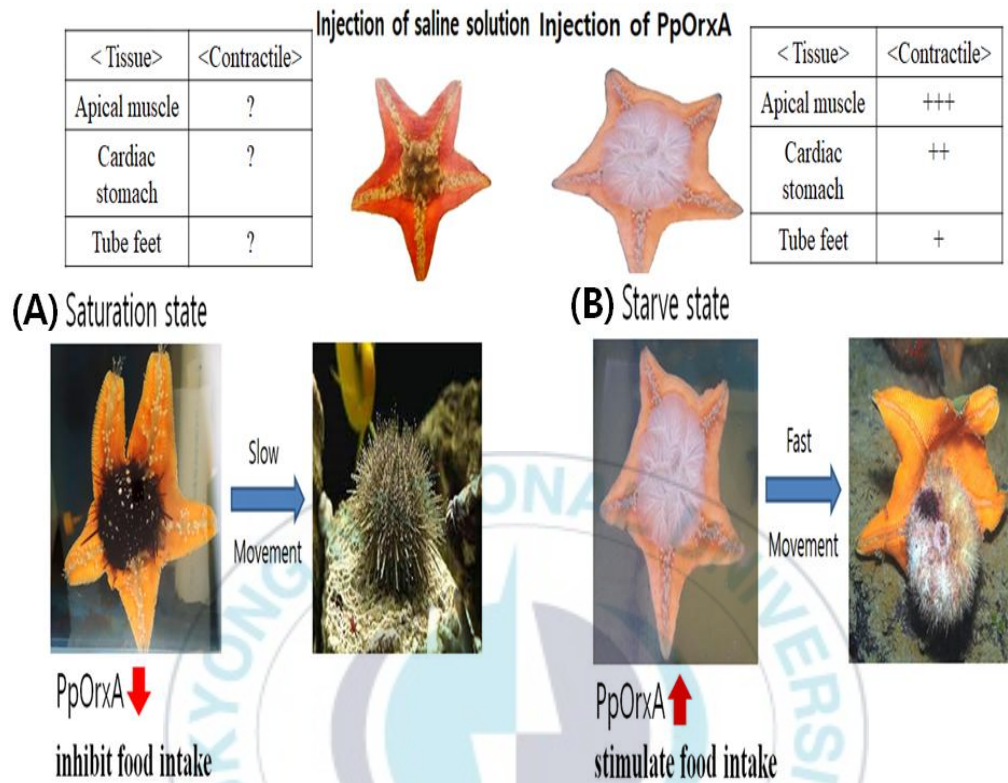


그림 21. 생체 내에서 작용하는 PpOrxA (Orexin A-related peptide)의 가상적인 생리활성 및 역할에 대한 상관관계

V. 참고 문헌

Breddam, K. (1986). Serine carboxypeptidases. A review. *Carlsberg Research Communications*, 51(2), 83.

Breddam, K., WIDMER, F., & MELDAL, M. (1991). Amidation of growth hormone releasing factor (1 - 29) by serine carboxypeptidase catalysed transpeptidation. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 37(2), 153-160.

Giardino, W. J., & de Lecea, L. (2014). Hypocretin (orexin) neuromodulation of stress and reward pathways. *Current Opinion in Neurobiology*, 29, 103-108.

Greenberg, M. J., & Price, D. A. (1983). Invertebrate neuropeptides: native and naturalized. *Annual Review of Physiology*, 45(1), 271-288.

Henriksen, D. B., Rolland, M., Jakobsen, M. H., Buchardt, O., & Breddam, K. (1992). C-terminal amidation of calcitonin by carboxypeptidase Y catalyzed transpeptidation with a photocleavable nucleophile. *Peptide Research*, 5, 321-321.

Jensen, J. (2001). Regulatory peptides and control of food intake in non-mammalian vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 128(3), 469-477.

Kapuscinski, M, Green, M, Sinha, S. N, Shepherd, J. J., & Shulkes, A. (1993). Peptide α amidation activity in human plasma: relationship to gastrin processing. *Clinical Endocrinology*, 39(1), 51–58.

Kolhekar, A. S., Roberts, M. S., Jiang, N., Johnson, R. C., Mains, R. E., Eipper, B. A., & Taghert, P. H. (1997). Neuropeptide amidation in *Drosophila*: separate genes encode the two enzymes catalyzing amidation. *Journal of Neuroscience*, 17(4), 1363–1376.

Kondo, M., & Akasaka, K. (2012). Current status of echinoderm genome analysis—what do we know?. *Current Genomics*, 13(2), 134–143.

Krieger, D. T. (1983). Brain peptides: what, where, and why?. *Science*, 222(4627), 975–985.

Lewis, W. S., & Schuster, S. M. (1991). Carboxypeptidase Y stability. *Journal of Biological Chemistry*, 266(31), 20818–20822.

Sakurai, T, Amemiya, A, Ishii, M., Matsuzaki, I, Chemelli, R. M, Tanaka, H., & Yanagisawa, M. (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell*, 92(4), 573–585.

Semmens, D. C. Mirabeau, O. Moghul, I. Pancholi, M. R. Wurm, Y., &

Elphick, M. R. (2016). Transcriptomic identification of starfish neuropeptide precursors yields new insights into neuropeptide evolution. *Open Biology*, 6(2), 150224.

Shahid, I. Z. Rahman, A. A., & Pilowsky, P. M. (2012). Orexin and central regulation of cardiorespiratory system. *Vitamins & Hormones*, 89, 159–184.

Tsujino, N., & Sakurai, T. (2009). Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the interface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacological Reviews*, 61(2), 162–176.

Tsujino, N., & Sakurai, T. (2013). Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 7, 28.

Volkoff, H. (2006). The role of neuropeptide Y, orexins, cocaine and amphetamine-related transcript, cholecystokinin, amylin and leptin in the regulation of feeding in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 144(3), 325–331.

Zandawala, M. Moghul, I. Yañez Guerra, L. A. Delroisse, J. Abylkassimova, N. Hugall, A. F., & Elphick, M. R. (2017). Discovery of novel representatives of bilaterian neuropeptide families and reconstruction of neuropeptide precursor evolution in ophiuroid echinoderms. *Open Biology*, 7(9), 170129.

Zhang, Z. Z, Yang, S. S, Dou, H, Mao, J. F, & Li, K. S. (2004). Expression, purification, and C-terminal amidation of recombinant human glucagon-like peptide-1. *Protein Expression and Purification*, 36(2), 292-299.



Study to improve the production yield of Orexin A-related peptide isolated from starfish (*Patiria pectinifera*) and investigation of it's myoactivity

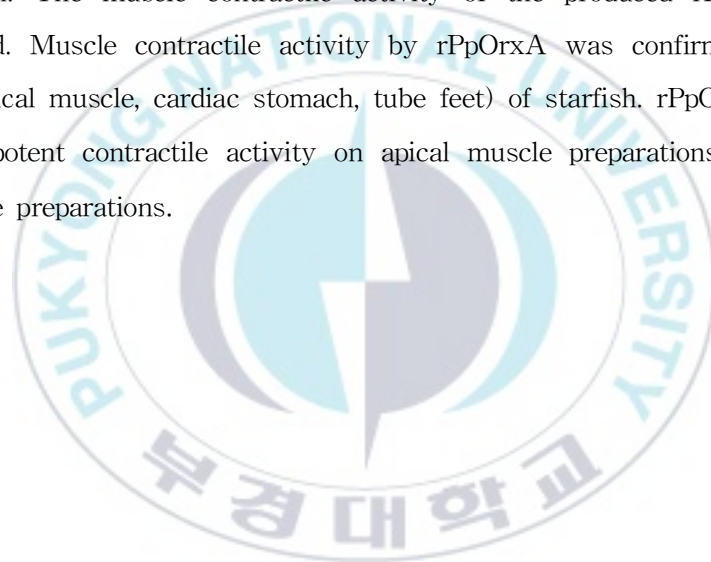
In young Noh

School of Marine and Fisheries Life Science (Major in Biotechnology),
Pukyong National University

Abstract

Orexin A is a neuropeptide known to be involved in stabilizing arousal, increasing appetite, and interacting with other neurotransmitters. The orexin A-related peptide used in this study was purified from the tube feet of the starfish (*Patiria pectinifera*), and this peptide exhibited muscle contractile activity. The molecular weight and the primary structure of Orexin A-related peptide determined by LC/MS & cDNA cloning showed that the peptide has a molecular weight of 3,466Da and is composed of 33 amino acids including 6 cysteines that form 3 disulfide bonds. Orexin A-related peptide was produced in a heterologous expression system using the fusion expression vector pET-28a(+)-TrxA. The produced recombinant Orexin A-related peptide (r[Leu³³]PpOrxA) was cleaved by CNBr treatment at the C-terminus of Met. The recombinant Orexin A-related peptide (r[Leu³³]PpOrxA) thus produced has a -OH group at the C-terminus. On the other hand, native orexin A-related peptide that exists in nature have an amidated C-terminus. Therefore, the amidation process was performed using carboxypeptidase-Y (CPD-Y) and L-Met-NH₂ • HCl. In addition, the optimal conditions for obtaining the maximum production yield of recombinant Orexin A-related peptide-Met-NH₂ (rPpOrxA) by changing the amounts of pH, CPD-Y and DMF in the amidation

process were investigated. The changes in pH affected the production yield. It was confirmed that the production yield was the highest at pH 6 among the three conditions (pH 6, 7, 8). Moreover, it was confirmed that the amount of CPD-Y also affects the production yield. On the other hand, the change in DMF did not cause a significant change in the production yield of the peptide. RT-qPCR was performed to determine the transcriptional expression level of the Orexin A-related peptide by tissue, and it was confirmed that the highest expression level was found in the radial nerve cord among various tissues of the starfish. The muscle contractile activity of the produced rPpOrxA was investigated. Muscle contractile activity by rPpOrxA was confirmed in three tissues (apical muscle, cardiac stomach, tube feet) of starfish. rPpOrxA showed the most potent contractile activity on apical muscle preparations among the three tissue preparations.



VI. Acknowledgement

실험실 생활을 시작한지 벌써 3년이라는 시간이 지나게 되었습니다. 학사 과정과 석사 과정을 보내는 동안 옆에서 많은 지도와 조언을 아끼지 않으신 박남규 교수님께 먼저 감사의 말씀을 드립니다. 또한 본 논문의 심사위원을 맡아주신 이형호 교수님, 한상준 교수님께도 감사의 말씀을 드립니다.

3년이라는 긴 시간 동안 BMS 실험실에서 지내며 부족한 부분이 많고 실수가 많았지만 열심히 지도해주시며, 실험적인 부분뿐만 아니라 그 외 다른 부분에 있어서도 많은 것을 가르쳐 주시고, 힘들 땐 옆에서 위로해주시며 많이 챙겨주신 고혜진 박사님과 조미정 박사님께도 깊은 감사 인사드립니다. 박사님들 덕분에 석사 과정을 무사히 마칠 수 있었던 것 같습니다.

캡스톤 실험부터 석사 학위 과정까지 실험을 하는데 있어 하나 하나 세세한 부분까지 도움을 주었던 혜영이 누나, 실험하면서 문제 생길 때마다 같이 고민해주시고 친절하게 답변해주셔서 너무 감사했어요. 덕분에 석사 학위 졸업 성공한 것 같아요. 그리고 같은 시기에 석사과정 시작하고 실험실에서 함께 실험을 하면서 동거동락한 석사 동기 종환이, 2년 동안 서로 많이 도와가면서 실험실 생활 할 수 있어서 고마웠고, 덕분에 재미있게 석사 생활 할 수 있었던 것 같다. 그동안 고생 많았어.

석사 과정 동안 같은 실험실 멤버였던 원정이, 수현이. 너희 덕분에 바쁘고 힘들어도 자주 웃으면서 즐겁게 실험실 생활 할 수 있었던 것 같다. 고마워.

그리고 실험 재료인 별불가사리를 구할 때 많은 도움을 주신 부산시 수산업 협동 조합 민락 어촌계 해녀분들에게도 감사의 말씀을 전합니다.

마지막으로 항상 나를 걱정해주며 내 편이 되어 주시고, 석사 진학 시 아낌없는 지원과 응원을 해 주었던 아버지. 너무 사랑하고 감사합니다. 앞으로 자랑스러운 아들이 되도록 열심히 노력할게요.

지금까지 이 논문이 나오기까지 옆에서 많은 응원과 도움을 주신 분들께 감사드리며 이 논문을 바칩니다.

