



C O M M O N S D E E D

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리와 책임은 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)



2006年度 2月
博士學位論文

Molecular Cloning, Expression and
Purification of Fibrinolytic Enzyme
from *Pleurotus ostreatus*

朝鮮大學校大學院

遺傳子科學科

沈明花

Molecular Cloning, Expression and
Purification of Fibrinolytic Enzyme
from *Pleurotus ostreatus*

느타리버섯으로부터 혈전분해효소 정제 및 특성
분석과 유전자 발현

2005年 12月 28日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

遺 傳 子 科 學 科

沈 明 花

Molecular Cloning, Expression and
Purification of Fibrinolytic Enzyme
from *Pleurotus ostreatus*

指導教授 金 成 俊

이 論文을 理學博士學位 申請論文으로 제출함

2005年 12月 28日

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

遺 傳 子 科 學 科

沈 明 花

沈明花의 博士學位論文을 認准함.

委員長 朝鮮大學校 教授 印

委 員 朝鮮大學校 教授 印

委 員 益山大學 教授 印

委 員 東新大學校 教授 印

委 員 朝鮮大學校 教授 印

2005年 12月 28日

朝鮮大學校大學院

목 차

LIST OF TABLES	V
LIST OF FIGURES	VI
ABBREVIATIONS	IX
ABSTRACT	XI
I 서론	1
II 재료 및 방법	9
II-1 재료	9
II-1-1 균주	9
II-1-2 시약	9
II-1-3 느타리버섯 균사체 배양	10
II-2 혈전분해효소의 분리정제	10
II-2-1 조추출물 조제	10
II-2-2 단백질분해활성 및 혈전분해활성 검색	11
II-2-3 조단백질 분리	11
II-2-4 단백질 정량	12
II-2-5 단백질분해활성 측정	12
II-2-6 Cation-exchange chromatography	12
II-2-7 Anion-exchange chromatography	12

II -2-8	Gel-filtration chromatography	13
II -2-	Fast protein liquid chromatography.....	13
II -2-10	혈전분해효소의 분리	13
II -3	분자량 측정	13
II -3-1	FPLC를 이용한 분자량 측정(size exclusion).....	14
II -3-2	SDS-PAGE를 이용한 분자량 측정	14
II -3-3	SDS-fibrin zymography를 이용한 분자량 측정	14
II -4	N-말단 아미노산 서열분석	15
II -5	정제효소의 특성 분석	15
II -5-1	정제효소의 기질특이성 분석	15
II -5-2	효소활성에 대한 금속이온 및 단백질분해효소 억제제의 영향 ...	16
II -5-3	효소활성에 대한 pH의 영향	16
II -5-4	효소활성에 대한 온도의 영향	18
II -5-5	Fibrin 및 Fibrinogen에 대한 분해특성 분석	18
II -6	Total RNA isolation	18
II -7	혈전분해효소 유전자에 대한 특이적 primer의 제작	19
II -8	RT-PCR.....	19
II -9	Cloning을 위한 형질전환	20
II -10	DNA 염기서열 분석	20
II -11	Construction of expression vector for recombinant fibrinolytic enzyme gene	21
II -12	Expression and purification of fibrinolytic enzyme	22
II -13	SDS-PAGE.....	25
II -14	Western blot analysis	25

III 결과	26
III-1 단백질분해활성 및 혈전분해활성	26
III-2 느타리버섯 균사체로부터 혈전분해효소의 정제	26
III-2-1 조단백질 분리	26
III-2-2 혈전분해효소의 정제	28
III-3 혈전분해효소의 분자량 측정	28
III-3-1 FPLC 를 이용한 분자량 측정(size exclusion)	28
III-3-2 SDS-PAGE 및 fibrin zymography를 이용한 분자량 측정	29
III-4 혈전분해효소의 N-말단 아미노산 서열분석	29
III-5 혈전분해효소의 특성분석	38
III-5-1 기질특이성 분석	38
III-5-2 효소활성에 대한 금속이온의 영향	38
III-5-3 효소활성에 대한 Protease inhibitor의 영향	38
III-5-4 효소활성에 대한 pH의 영향	39
III-5-5 효소활성에 대한 온도의 영향	39
III-5-6 Fibrinolysis와 Fibrinogenolysis pattern 분석	39
III-5-6-1 Fibrinogenolysis	39
III-5-6-2 Fibrinolysis	45
III-6 Cloning and sequence analysis of <i>pofe</i>	45
III-7 Analysis of deduce amino acid sequence of PoFE.....	48
III-8 Gene expression of pofe.....	49
IV 고찰	62
V 적요	67

VI	참고문헌	69
	감사의 글	78

LIST OF TABLES

Table 1. List of synthetic chromogenic substrates	17
Table 2. Purification yields of fibrinolytic enzyme from <i>P. ostreatus</i> mycelium.....	34
Table 3. Effect of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>P. ostreatus</i> mycelium	41
Table 4. Effect of protease inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from <i>P. ostreatus</i> mycelium	42

LIST OF FIGURES

Fig. 1. The pathway of thrombosis and fibrinolysis	2
Fig. 2. The proportion of deaths by causes in WHO regions, estimates for 2000 (WHO 2001).....	3
Fig. 3. Mass formation of <i>Pleurotus ostreatus</i> fruiting body and culturing mycelia of <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
Fig. 4. Construction of cloning vector for recombinant <i>pofe</i>	23
Fig. 5. Construction of expression vector for recombinant <i>pofe</i>	24
Fig. 6. The assay of proteolytic and fibrinolytic activity from crude extracts of <i>Pleurotus ostreatus</i> mycelium	27
Fig. 7. Cation-exchange chromatography of fibrinolytic enzyme from <i>P. ostreatus</i> mycelium on CM-cellulose column.....	30
Fig. 8. Anion-exchange chromatography of fibrinolytic enzyme from <i>P. ostreatus</i> mycelium on DEAE-Sephadex A-50.....	31
Fig. 9. Gel-filtration chromatography of fibrinolytic enzyme from <i>P.</i> <i>ostreatus</i> mycelium on Sephadex G-75 column	32
Fig. 10. Gel-filtration chromatography of fibrinolytic enzyme from <i>P.</i> <i>ostreatus</i> mycelium on HiLoad 16/60 Superdex 75 pg column	33
Fig. 11. Molecular weight determination of PoFE using size- exclusion on HiLoad 16/60 Superdex 75 pg column	35

Fig. 12. Molecular weight determination of PoFE using SDS-PAGE and fibrin zymography	36
Fig. 13. Homology analysis of purified fibrinolytic enzyme amino acid sequence from <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
Fig. 14. Amidolytic activity on the several chromogenic substrates	40
Fig. 15. Effect of pH on the activity of the fibrinolytic enzymes from <i>P. ostreatus</i> mycelium	43
Fig. 16. Effect of temperature on the activity of the fibrinolytic enzymes from <i>P. ostreatus</i> mycelium.....	44
Fig. 17. Fibrinogenolysis and fibrinolysis pattern exhibited by the purified fibrinolytic enzyme from <i>P. ostreatus</i> mycelium	46
Fig. 18. Identification of the PoFE protein encoding gene from <i>P.ostreatus</i> mycelium	47
Fig. 19. Identification of cloned ~1.2Kb PCR product	51
Fig. 20. Identification of cloned ~860bp PCR product.....	52
Fig. 21. Nucleotide sequence of <i>pofe</i> (1269bp) gene encoding the precursor form of the fibrinolytic enzyme of <i>P.ostreatus</i> mycelium	53
Fig. 22. Schematic representation of the structures of premature gene(pGEM T- <i>pofe</i> 1.269bp) and functional gene(pGEM T-	

<i>pofe</i> 867bp)	54
Fig. 23. Nucleotide sequence of the PoFE cDNA and deduced amino acid sequence.....	55
Fig. 24. Multiple alignment of the full length metalloprotease sequences from <i>P. ostreatus</i> mycelium, <i>P. ostreatus</i> fruiting body, <i>Coccidioides posadasii</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> , and <i>Neurospora crassa</i>	56
Fig. 25. Multiple alignment of the Zinc binding domain sequences from <i>P. ostreatus</i> mycelium, <i>P. ostreatus</i> fruiting body, <i>Coccidioides posadasii</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> and <i>Neurospora crassa</i>	57
Fig. 26. The Zn binding domain of PoFE purified from <i>P. ostreatus</i> mycelium	58
Fig. 27. The structural analysis of PoFE sequence by using Gene runner programme.....	59
Fig. 28. Construction of expression vector pQE30- <i>pofe</i>	60
Fig. 29. Induction of recombinant PoFE in <i>E. coli</i> M15 (pREP4) strain	61

ABBREVIATIONS

BSA	bovine serum albumin
CM	carboxymethyl cellulose
CBB	coomassie brilliant blue
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	diethyl-pyrocarbonate
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediamine tetraacetic acid
EtBr	ethidium bromide
FPLC	fast protein liquid chromatography
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
NCBI	National Center for Biotechnology
OD	optical density
PA	plasminogen activator
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PDA	potato dextrose agar
PDB	potato dextrose broth
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
<i>P. ostreatus</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i>
<i>Pofe</i>	<i>Pleurotus ostreatus</i> fibrinolytic enzyme

PVDF	polyvinylidene difluoride
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain
SDS	sodium dodecyl sulfate
SK	streptokinase
TCA	trichloroacetic acid
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine
TLCK	N- α -tosyl-l-lysine chloromethyl ketone
tPA	tissue-type plasminogen activator
TPCK	N- α -tosyl-l-phenylalanine chloromethyl
UK	urokinase
uPA	urokinase-type plasminogen activator
WHO	World Health Organization

ABSTRACT

Molecular Cloning, Expression and Purification of Fibrinolytic Enzyme from *Pleurotus ostreatus*

Shen, Ming-Hua

Advisor: Prof. Kim, Sung-Jun, Ph. D.

Department of Genetic Science,

Graduate School of Chosun University

Fibrinolytic enzymes dissolve the blood clots, which are formed by the conversion of fibrinogen into fibrin via the proteolytic action of thrombin. When clots are not lysed, they accumulate in blood vessels and cause thrombosis leading to myocardial infarction and other cardiovascular diseases. The major thrombolytic agents are classified into two types. The plasminogen activators, such as urokinase, tPA (tissue type plasminogen activator), and streptokinase, which activate plasminogen to plasmin, and the plasmin-like proteins, such as nattokinase and lumbrokinase, which can directly degrade the fibrin.

Mushrooms constitute an important source of thrombolytic agents. Many fibrinolytic enzymes were identified in fruiting body of different medicinal

mushrooms, such as *Armillaria mellea* metalloprotease (AMMP) from *Armillaria mellea*, *Grifora frondosa* aminopeptidase(GfAP) from *Grifora frondosa* and *Pleurotus ostreatus* metalloprotease (PoMTP) from *Pleurotus ostreatus*. All of these enzymes are Zn-metalloprotease group proteins and belong to the same wood rotting fungi. Indeed the presence of fibrinolytic enzymes in fruiting body of some mushrooms have been identified although the presence of those enzymes in their cultured mycelia is not clear. Therefore we tried to isolate the fibrinolytic enzymes from cultured mycelia of mushroom. The purified enzyme was designated as *Pleurotus ostreatus* fibrinolytic enzyme (PoFE).

Fibrinolytic enzyme was purified from the edible mushroom, *Pleurotus ostreatus* by ion-exchange chromatography followed by gel filtration and fast protein liquid chromatography (FPLC). The purification protocol resulted in an 877-fold purification of the enzyme, with a final yield of 6.5%. The apparent molecular mass of the purified enzyme was estimated to be 32 kDa by SDS-PAGE, fibrin-zymography and gel filtration chromatography, which revealed a monomeric form of the enzyme. The optimal reaction pH and temperature were pH 6.5, and 35 °C, respectively. This protease effectively hydrolyzed fibrinogen, preferentially digesting the A α -chain and the B β -chain over γ -chains. Enzyme activity was enhanced by the addition of Ca²⁺, Zn²⁺ and Mg²⁺ ions. Furthermore, fibrinolytic enzyme activity was potently inhibited by tetrasodium ethylenediaminetetraacetate

(EDTA), and it was found to exhibit a higher specificity for the substrate S-2586 for chymotrypsin, indicating that the enzyme is a chymotrypsin-like metalloprotease. The first 19 amino acid residues of the N-terminal sequence were ALRKGGAAALNIYSVGFTS, which is extremely similar to the *Pleurotus ostreatus* metalloprotease purified from fruiting body of *Pleurotus ostreatus* (NCBI Accession No. AAU94648.1). The gene encoding a fibrinolytic enzyme, PoFE that belongs to the metalloprotease family was cloned and expressed in *Escherichia coli*. The gene has 867 base pairs and encodes an active protein of 288 amino acids. Sequence analysis suggests that the fibrinolytic enzyme from *Pleurotus ostreatus* consists of a Zn-binding domain which is amino acid sequence HEXXHXUGUXH (His¹⁹⁸~His²⁰⁸). The PoFE was cloned to plasmid pQE30 in the correct reading frame, with an N-terminal 6X His-tag sequence under the control of the T5 promoter and lac operator. The PoFE was inserted and orientation in the plasmid pQE30-pofe was confirmed by double restriction enzyme mapping. The plasmid pQE30-pofe were transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) expression host M15 (pREP4). All the picked clones were expressed the PoFE with a predicted band around 32 kDa. It is interesting to note that all of the recombinant protein was found in inclusion bodies which were confirmed by the western blot analysis.

In conclusion, the fibrinolytic enzyme purified from *Pleurotus ostreatus* exhibits

a profound fibrinolytic activity, and also evidences relatively high substrate specificity to fibrin. Therefore, *Pleurotus ostreatus* may become a new source for thrombolytic agents, and can be used to develop therapeutic agents for the treatment of thrombosis. In addition, the work described here provides a way to obtain a single component with fibrinolytic activity and a baseline information for further study on understanding of the structure-function relationship of the enzymes.

I 서 론

생체내의 세포는 혈액으로부터 영양물질과 산소를 공급받아 대사를 진행한다. 만일 이러한 혈액순환에 장애가 생기면 여러 가지 질병을 초래하게 된다. 체내에는 혈액을 응고시키는 blood clotting system과 응고된 혈전을 용해시키는 fibrinolytic system이 존재하는데 이러한 혈전의 생성과 용해과정은 체내의 조절계에 의하여 균형을 유지하고 있다. 혈관이 손상되어 출혈이 일어나면 혈액응고 기전이 작동하게 되는데 이 과정에서 활성화 된 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환되어 서로 중합체를 형성함으로써 생성된다^[1]. 형성된 혈전(fibrin clot)은 상처 회복 후 fibrinolysis라는 체내 혈전용해작용에 의해 plasmin등과 같은 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)가 활성화되어 혈전을 용해시킴으로써 혈관의 혈액은 다시 정상상태를 유지하게 된다 (Fig. 1). 이러한 혈전형성과 혈전용해계가 불균형을 이루게 되면 협심증, 뇌경색, 뇌출혈, 심근경색과 같은 심혈관계질환을 초래하게 되며, 이러한 질환은 경우에 따라서는 심각한 후유증 및 사망을 일으키게 되는데 이는 전세계 사망원인의 약 29%를 차지하고 있다^[2](Fig. 2). 특히, 혈전에 의해 유발되는 혈전증은 체내에 생성된 혈전이 과도하게 축적되거나 혈전용해기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈관을 따라 흐르면서 여러 가지 혈관계 질환을 유발한다. 이러한 혈전형성의 원인은 혈관내막의 손상, 혈액응고능의 항진, 정맥혈류 속도의 감소 등 다양한 요인이 작용하고 있다. 또한 서구화된 식생활, 노령인구의 증가 및 스트레스의 증가에 따라 이러한 질환은 증가추세를 보이고 있다. 따라서 혈관계 질환의 주원인 중 하나인 혈전을 용해하는 혈전용해제에 관한 관심이 점점 더 높아지고 있다.

혈전치료에 이용되는 혈전용해효소는 혈전성분인 섬유소(fibrin)를 용해시키는 물질로서 작용 기전에 따라 두 가지로 나눌수 있다. 즉 혈전용해효소의

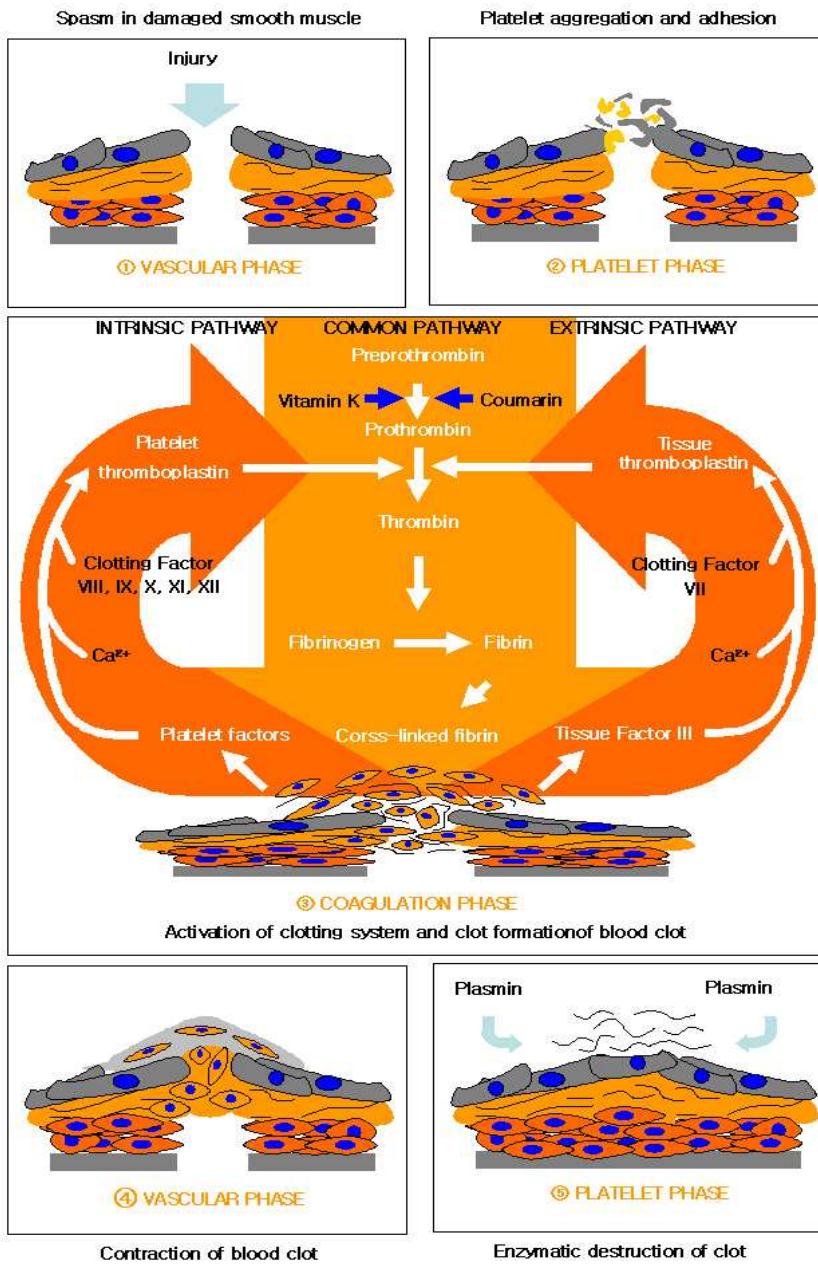


Fig. 1. The pathway of thrombosis and fibrinolysis.

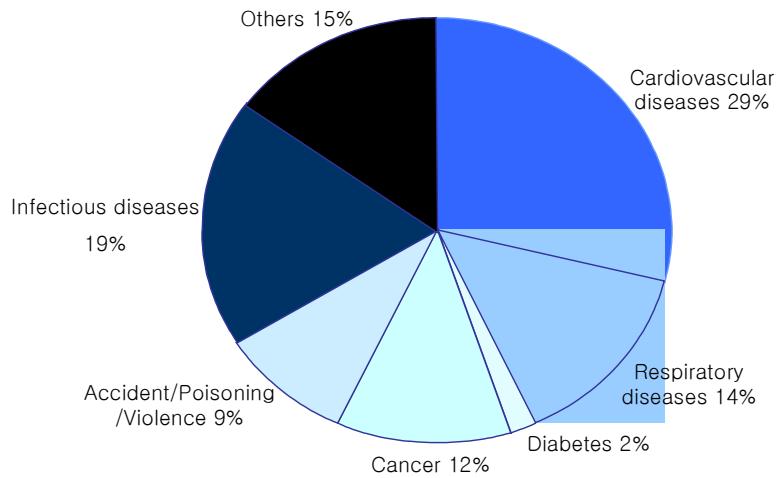


Fig.2. The proportion of deaths by causes in WHO regions, estimates for 2000 (WHO 2001).

직접적인 용해작용과, plasminogen 활성인자에 의해 plasmin을 활성화 시켜 혈전을 용해시키는 간접적인 용해작용이 있다. 현재 임상에서 쓰이고 있는 혈전용해제로는 tissue type plasminogen activator(tPA), streptokinase(SK), urokinase(UK) 등과 같은 plasminogen activator로서 이들은 혈전을 직접 용해시키지 않고 체내에 있는 plasmin의 전구체인 plasminogen을 활성화시켜 plasminogen을 plasmin으로 전환시켜 혈전을 용해시킨다. 이러한 혈전용해제는 혈전에 대한 선택성이 낮고 반감기가 짧으며, 알러지, 발열, 국소출혈 등과 같은 부작용을 가지고 있으며 또한 가격이 매우 높을 뿐 아니라, UK를 제외하고는 경구투여가 불가능하고, 체내 혈전형성 예방효과를 기대 할 수 없다. 따라서 부작용이 적고 혈전에 대한 선택성이 높으며 체내 혈전형성 예방효과가 있는 새로운 혈전용해제 개발이 절실히 요구되어짐에 따라 경제적이고 경구투여가 가능한 저분자 혈전증치료제 개발을 위한 연구가 다양하게 시도되고 있다^[3,4].

한편 세계 혈행개선제 시장은 연 평균 5%의 성장을 지속하고 있으며 1997년의 67억 달러의 규모로부터 2005년에는 93억 달러의 시장형성 전망을 나타내고 있다^[5]. 혈전분해제 개발시장은 크게 미국권, 유럽권, 아세아권으로 분류할 수 있다. 미국은 항응고제 및 혈전분해제가 항혈전제 시장을 주도하고 있으며 유럽권에서는 항혈소판제, 아세아권에서는 천연물을 이용한 혈전분해제가 주된 시장을 차지하고 있다. 전체적으로 성장의 동인을 분석하면 업계의 연구개발 강화, 고령인구 증가 및 정부의 예방의학 정책 등이 맞물려 항혈전제 시장은 지속적이고 높은 성장을 보일 것으로 분석되고 있다. 미국의 항응고제 시장은 경구형 항응고제와 저분자 헤파린 개발로 심근경색, 앵기나(angina) 등 치료범위를 확대하면서 시장성장의 동인이 되고 있다. 혈소판의 활성을 억제하여 혈전생성을 억제하는 항혈소판제제는 주로 허혈성 뇌출증 치료제로 사용되고 있으며 고령 인구의 급격한 증가는 항혈소판제의 시장을 연평균 25%

의 성장을 보일 것으로 분석하고 있다. 특히 일본, 한국, 중국과 같이 전통 발효식품이 발달된 곳에서는 Natto^[6,7], 청국장^[8,9], 된장^[10-12], 젓갈^[13-15], 김치^[16], Douchi^[17,18] 등으로부터 혈전분해물질을 만들어내는 미생물인 *Bacillus* sp.를 분리하였으며 또한 다양한 버섯^[19-23], 지렁이로부터 혈전분해효소를 분리 정제하였다^[24-26].

오늘날 많은 종류의 버섯들이 식용, 약용, 건강음료, 기호식품, 화장품 및 기타 산업분야에 이용되고 있다. 현재 지구상에는 약 1,500종의 버섯이 분류 등정되어 있는데 그 중 약 50%가 식용 가능한 것으로 알려져 있다. 버섯은 생태계에서 유기물을 분해하여 자연계의 평형을 조절할 뿐만 아니라 그 맛과 향이 좋아 예로부터 인기가 높은 식품중의 하나이다. 버섯은 단백질, 당질, 비타민, 무기질, 섬유소 등과 인체에 유용한 여러가지 물질을 함유하고 있으며 광범위한 약리작용도 나타내므로 성인병 치료에도 많이 이용되고 있다. 최근에는 버섯의 여러 가지 생리활성에 대한 연구 결과가 발표되면서 영양학적인 면은 물론 건강식품으로서의 관심이 높아지고 있다. 버섯은 항산화^[27-29], 항암^[30,31], 면역증강효과^[32] 및 콜레스테롤 저하 효과^[31]가 있으며 다양한 버섯류의 균사체 및 균사체 배양여액으로부터 혈전분해활성을 나타내는 물질을 분리함으로써 기능성 식품 및 의약품 소재로 이용하고자 하는 시도가 활발히 진행되고 있다^[19,34].

느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 담자균류 주름버섯목 느타리과의 버섯으로 활엽수 또는 침엽수의 고목에 군생하며, 특히 늦가을에 많이 발생한다. 것은 나비 5~15cm로 반원형 또는 약간 부채꼴이며 가로로 짧은 줄기가 달린다. 표면은 어릴 때는 푸른 빛을 띤 검은 색이지만 차차 퇴색하여 잿빛에서 흰빛으로 되며 매끄럽고 습기가 있다. 살은 두텁고 탄력이 있으며 흰색이다. 주름은 흰색이고 줄기에 길게 늘어져 달려있다. 자루는 길이 1~3cm, 굵기 1~2.5cm로 흰색이며 밑부분에 흰색 털이 빽빽이 나 있다. 자루는 옆이나 중심에서 나며 자루가 없는 경우도 있다. 포자는 무색의 원기둥

모양이고 포자무늬는 연분홍색을 띤다(Fig 3). 느타리버섯은 잘 알려진 식용 버섯으로, 인공재배도 많이 하며, 거의 세계적으로 분포한다. 또한 우리나라에서 가장 많이 생산되는 버섯으로서 높은 영양가와 향미를 가지고 있으며 지금까지 알려진 약리작용으로는 항산화작용^[35], 항암작용^[36,37], 콜레스테롤 저하 효과^[38], 고혈압 및 당뇨병 예방효과^[39] 등이 있으며 또한 느타리버섯 자실체로부터 혈전분해물질을 분리정제한 논문이 보고된 바 있다^[40]. 이러한 생리활성물질은 모두 느타리버섯 자실체로부터 얻어진 것으로서 본 연구에서는 자실체보다 훨씬 배양이 용이하고, 대량 생산이 가능한 균사체로부터 혈전분해효소를 분리정제하고 그 특성을 연구하였다.

또한 최근에는 유전자 조작기술, 단백질공학기술 및 기타 생물공학기술의 획기적 발전으로 인하여 종래에 가격적인 차원에서 사용 불가능했던 효소의 산업적 대량생산이 가능하게 되어 사용이 가능하게 되었다. 이러한 새로운 기술에 의해 생산되는 효소는 효소 이용 공정 자체가 인류가 요구하는 무공해, 저에너지공정을 실현시킬 수 있을 뿐만 아니라 가격면에서 화학적 및 물리적 방법으로 생산한 효소보다 상대적으로 저렴한 잇점을 가지고 있기에 이에 따른 기술의 활용 범위도 확대되고 있다. 따라서 유전공학기법을 이용하여 효소의 기능성을 기준으로 여러 가지 치료용 약품으로서의 효소의 개발이 많이 연구되어지고 있다. 유전공학, 단백질공학 및 효소화학 등 기초학문분야의 눈부신 발전과 생물공정 분야의 기술개발로 효소공학 분야의 응용 가능성성이 새로운 각도에서 재조명되고 있다.

현재 임상에서 사용되어지는 혈전분해제의 여러 가지 단점을 보완하여, 최근에는 생명공학기술을 이용하여 혈전분해효소들이 생산되고 있는 바 bacteria 또는 yeast등 숙주를 이용하여 된장^[41], 지렁이^[42-44], Douchi^[45] 등으로부터 혈전분해효소를 cloning 하고 expression한 결과가 많이 발표되고 있다. 본 연구에서는 유전공학 기법을 이용하여 고대로부터 식용버섯으로 애용되고 있는

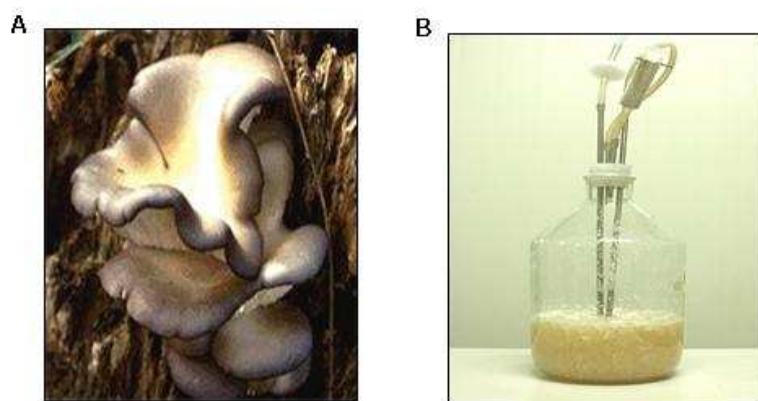


Fig. 3. Mass formation of *Pleurotus ostreatus* fruiting body (A), Culturing mycelia of *Pleurotus ostreatus* (B).

느타리버섯의 균사체로부터 혈전분해효소를 분리정제하고 그 유전자를 크로닝하여 발현시켰다.

II 재료 및 방법

II-1. 재료

II-1-1. 균주

본 실험에 사용한 느타리버섯 (*Pleurotus ostreatus*) 균주는 국립의산대학 특용작물가공과 균이학 실험실로부터 분양받아 사용하였다.

II-1-2. 시약

Azocasein, Trichloroacetic acid (TCA), CM-cellulose, Fibrinogen, Aprotinin, Pepstatin A, Sodium dodecyl sulfate (SDS), Phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), Glycine, 1-chloro-3-tosylamido-7-amido-2-heptanone (TLCK), N-tosyl-L-phenylalanyl chloromethyl ketone (TPCK), Trizma base, Plasmin, Tetrasodium, Ethylenediaminetetraacetate (EDTA), Thrombin, Isopropanol, Chloroform, Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG), Ethanol, Ampicillin, Kanamycin 등은 Sigma Co.(USA) 제품을, Agarose, pGEM-T easy vector cloning system Kit, DNA ligase, RNase, DNase와 *Hind* III, *Bam*H I 등과 같은 제한효소는 Promega Co.(USA) 제품을, Trizol™은 Invitrogen Co.(USA) 제품을, Ex Taq polymerase는 TAKARA Co.(Japan) 제품을, pQE expression kit, Plasmid DNA isolation kit, Ni-NTA spin kit와 DNA gel elution kit는 Qiagen Co.(USA) 제품을, Acrylamide, Sodium chloride는 Amresco Co.(USA)제품을 구입하여 사용하였으며 Ile-Glu-(OR)-Gly-Arg-pNA(S-2222), H-D-Phe-Pip-Arg-pNA(S-2238), H-D-Val-Leu-Lys-pNA(2251), H-D-Ile-Pro-Arg-pNA (S-2288), pyro-Glu-Gly-Arg-pNA(S-24444), MeO-Suc-Arg-Pro-Arg-Pro-Tyr-pNA(S-2586), Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA(S-2765)등 chromogenic substrates는

Chromogenix Co.(Sweden) 제품을, cDNA를 합성하기 위하여 사용한 MMLV, dNTPs, RNase inhibitor, Taq polymerase, DNA size marker와 primer는 Pioneer Co.(Korea) 제품을 사용하였다. Protein assay kit와 PVDF membrane은 Bio-Rad(USA) 제품을, 혈전분해효소 정제에 사용되어진 DEAE Sephadex A-50, Sephadex G-75, HiLoadTM SuperdexTM 75 column은 Amersham Pharmacia Biotech Co.(Sweden) 제품을 구입하여 사용하였으며 기타 시약은 특급을 사용하였다.

II-1-3 느타리버섯 균사체 배양

균사체 고체배양은 PDB(potato extract 20%, dextrose 2%) 배지에 한천을 2%(w/v) 첨가하여, 121°C, 1.5기압에서 20분간 가압살균 후 Petridish (Φ 8.5 cm)에 20mℓ씩 분주하여 배지를 조제하였다. 수집된 균사체 선단을 내경 6mm의 cork borer로 취하여 조제된 고체배지 중앙에 접종하여 25±1°C의 항온배양기에서 배양하였다. 균사체 액체배양은 PDB를 조제하여 100mℓ 씩 삼각플라스크에 분주한 후 사용하였다. 접종원은 고체배지상의 균사체의 선단을 내경 6mm의 cork borer로 취하여 사용하였다. 접종 후 진탕배양기에서 25±1°C, 120 rpm으로 7일간 1차 배양(seed culture)한 후 10 liter fermentor에 옮겨서 2차 배양(main culture)을 실시하였다.

II-2. 혈전분해효소의 분리 정제

II-2-1. 조추출물 조제

느타리버섯 균사체를 멸균수로 수차례 세척한 후 액체질소를 이용하여 세포벽을 파쇄한 후 Ultrasonicator(Sonics & Materials Inc., USA)로 균질화하여 6,000x g에서 원심분리한 후 상층액을 회수하여 조추출물로 사용하였다.

II-2-2. 단백질분해활성 및 혈전분해활성 검색

0.3% skim milk 용액 5mℓ에 동량의 2% agarose 용액 5mℓ를 첨가하여 혼합하고 1시간 동안 실온에서 고화시켜 skim milk plate를 제조하였다. 단백질 분해작용을 검색하기 위하여 skim milk plate에 지름 6mm의 구멍을 만들어 버섯 조추출물 10 μ g을 침적하였다. 37°C에서 12시간 반응시켜 생성된 투명대로 단백질분해활성을 확인하였다.

혈전분해활성은 Astrup와 Mullertz^[46]의 Fibrin agarose plate방법을 이용하여 측정하였다. fibrinogen을 0.3%가 되도록 5mℓ 완충용액(50mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4)에 용해시킨 후 동량의 2% agarose 용액을 첨가하여 혼합 시킨 후 thrombin 1 unit를 첨가하여 1.5mm 두께로 fibrin agarose plate를 제조하였다. fibrin agarose plate는 1시간 동안 실온에서 고화시킨 후 혈전분해활성을 측정하기 위해 fibrin plate에 내경 6mm의 구멍을 만들어 여기에 균사체 조추출액 10 μ g을 침적하고 37°C에서 12시간 반응하여 형성된 투명대로 혈전분해활성을 확인하였다.

II-2-3. 조단백질 분리

회수된 버섯 균사체에 동량의 멸균수를 가하여 Ultrasonicator를 사용하여 10분간 파쇄 후 4°C, 6,000 $\times g$, 30분 동안 원심분리시켜 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70°C로 전처리한 100% 에탄올을 천천히 가하여 최종적으로 에탄올 농도를 50%로 조정한 후 1시간 동안 4°C에서 교반하여 12,000 $\times g$, 30분 동안 원심분리 후 상층액을 회수하였다. 회수된 상층액에 -70°C로 처리된 동량의 100% 에탄올을 천천히 가하여 최종적으로 에탄올 농도를 75%로 조정하였고 1시간 동안 4°C에서 교반한 후 4°C, 12,000 $\times g$, 30분 동안 원심분리 후 형성된 침전물을 10mM Citrate-NaOH (pH 6.0)완충용액에 혼탁하였다. 또한

불순물을 제거하기 위하여 microcentrifuge를 이용하여 10,000rpm, 4°C, 10분 간 원심분리하였고, 상층액을 회수한 후 시료로 사용하였다.

II -2-4. 단백질 정량

효소의 단백질 정량은 Lowry^[47]등의 방법에 의한 BCA단백질정량 kit (Pierce Co., USA)를 사용하여 측정하였으며 표준단백질은 Bovine Serum Albumin (BSA)을 사용하였다.

II -2-5. 단백질분해활성 측정

단백질분해효소 활성을 Azocasein assay법^[48]을 이용하였다. Azocasein assay법은 azocasein이 분해되어 나오는 acid soluble material양을 측정함으로서 단백질분해활성을 판정하였다. 0.1% Azocasein용액 (50mM Tris-HCl, pH 7.0) 300μl에 단백질분획 50μl를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 미리차게 한 10%(w/v) trichloroacetic acid (TCA) 600μl를 넣고 즉시 혼합시켰다. 이 시료들을 10분 동안 얼음에 방치하여 반응을 정지시킨 후 microcentrifuge에서 12,000rpm, 4°C로 15분간 원심분리하였다. 그리고 상층액을 366nm에서 OD값을 측정하여 단백질분해활성을 측정하였다.

II -2-6. Cation-exchange chromatography

CM-Cellulose column (3.5×10cm)을 0.1N NaOH로 활성화시킨 후 10mM citrate-NaOH, pH 6.0 완충용액으로 평형화시켰다. 이 column에 조단백질을 주입하여 0~1.0M NaCl linear gradient를 형성시켜 단백질을 용출하였다. 용출속도는 1.0ml/min으로 수행하였으며 분획당 1.5ml을 회수하였다.

II -2-7. Anion-exchange chromatography

DEAE Sephadex A-50 column ($3.5 \times 10\text{cm}$)을 $20\text{ mM Tris-HCl(PH 8.0)}$ 완충용액으로 평형화시킨 후 cation-exchange chromatography에서 얻은 활성분획을 주입하여 anion-exchange chromatography를 수행하였다. $0\sim 1.0\text{ M NaCl linear gradient}$ 를 형성시켜 1.0mL/min 속도로 단백질을 용출하였으며 분획당 1.5mL 을 회수하였다.

II -2-8. Gel-filtration chromatography

Sephadex G-75 column($1.5 \times 130\text{cm}$)을 0.15M NaCl 을 함유한 $0.05\text{M phosphate(pH 7.2)}$ 완충용액으로 평형화시킨 후 anion-exchange chromatography에서 얻은 활성분획을 농축, 투석하여 주입하였다. 동일한 완충용액으로 0.1mL/min 의 속도로 단백질을 용출하였으며, 1.5mL 씩 분획을 회수하였다.

II -2-9. Fast protein liquid chromatography (FPLC)

HiLoad 16/60 Superdex 75 pg column을 이용하여 $0.05\text{M phosphate}/0.15\text{M NaCl, pH 7.2}$ 완충용액을 이용하여 bed volume의 2배를 훌려 보낸 후 Gel-filtration chromatography에서 얻은 활성분획을 주입하여 1.0mL/min 의 속도로 ACTA FPLC (Pharmacia Co.)를 수행하여 혈전분해효소를 분리정제하였다.

II -2-10. 혈전분해효소의 분리

혈전분해활성 측정법과 단백질분해활성 측정법에 의하여 단백질활성을 측정함으로써 혈전분해효소를 분리하였다. 먼저 분획들을 fibrin agarose plate에 $20\mu\text{l}$ 씩 침적하여 형성된 투명환의 크기를 확인하였다. 그리고 활성있는 부분을 취하여 Azocasein assay법으로 단백질분해활성을 측정하여 수치화하였다.

II -3. 분자량 분석

II -3-1. FPLC 를 이용한 분자량 측정(size exclusion)

정제된 혈전분해효소의 분자량을 확인하기 위하여 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase(36kDa), carbonic anhydrase(29kDa), trypsinogen-PMSF(24kDa), trypsin-inhibitor(20.1kDa) 등 standard marker를 이용하여 size exclusion을 수행하였다. 정제한 혈전분해효소와 standard marker를 동일한 조건으로 용출시켜 정제한 효소의 분자량을 확인하였다.

II -3-2. SDS-PAGE 를 이용한 분자량 측정

분리한 단백질은 SDS-PAGE^[49]를 수행하여 분자량을 측정하였다. 전기영동은 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 진행하였다. 단백질과 5x SDS Sample Buffer (60mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 14.4mM β-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue)를 혼합하여 100°C에서 7분간 중탕한 후 Protein marker(Cambrex Co.)와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기영동된 gel은 Coomassie brilliant blue(CBB) R 250으로 염색하고 Destaining buffer로 탈색시킴으로써 단백질 밴드를 확인하였다. 그리고 Protein marker의 이동거리(Rf)를 횡축으로, marker 분자량의 log함수를 종축으로 standard curve를 만든 후 정제된 효소의 이동거리에 근거하여 효소의 분자량을 측정하였다.

II -3-3. SDS-fibrin zymography 를 이용한 분자량 측정

SDS-fibrin zymography 활성확인법은 Kim^[50]등의 방법에 의하여 fibrinogen 농도가 0.12%(W/V)가 되게 12% polyacrylamide 용액에 혼합한 후 thrombin (0.1μU/ml)과 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine(TEMED)를 첨가하여 gel 을 제조하고 전기영동을 수행하였다. 단백질의 활성을 보존하고 전기영동 과정에서 일어나는 분해반응을 방지하기 위해 4°C에서 90~180V로 진행하였다.

그런 다음 SDS에 의해 불활성화된 효소를 재활성화 시키기 위하여 gel을 2.5% Triton X-100을 포함한 Tris-HCl (20mM, pH 7.2)에서 30분간 진탕시켜 SDS를 제거한 후 다시 증류수로 수 차례 세척하여 Triton X-100을 제거하였다. 그리고 gel을 활성반응 완충용액 (0.15M NaCl, 20mM Tris-HCl, pH 7.2)으로 15분씩 2번 세척한 후 그 완충용액에 넣어 37°C 항온기에서 15시간 반응을 시켰다. 반응이 끝난 후 gel을 CBB R 250으로 염색하고 Destaining buffer로 탈색시킴으로써 투명하게 나타난 fibrin 분해능을 지닌 단백질의 활성 부위를 확인하였다.

II-4. N-말단 아미노산 서열분석

정제된 단백질을 12% gel 상에서 SDS-PAGE 전기영동을 수행한 후 polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 transfer하였고 ponceau S로 염색하여 transfer 유무를 확인하였다. 활성부위를 PVDF membrane에서 잘라내어 기초과학지원연구소 광주분소에 의뢰하여 Edman 방법으로 N-terminal sequencing analysis를 수행하였다. N-terminal sequence는 National Center for Biotechnology information(NCBI)의 BLAST에 등록되어 있는 느타리버섯 자실체 유래의 metalloendoprotease(PoMTP) 아미노산 서열과 비교하였다.

II-5. 정제효소의 특성 분석

II-5-1. 정제효소의 기질특이성 분석

정제효소의 기질특이성을 분석하기 위하여 다양한 chromogenic substrate (Table 1)를 이용하여 amidolytic activity를 측정하였다. 사용되어진 chromogenic

substrate는 chromogen 사용법에 따라 각각 조제한 후 정제된 혈전분해효소 $1\mu\text{g}$ 을 첨가하여 37°C 에서 5분간 반응시켰고 ELISA reader를 사용하여 405nm에서 방출되어진 ρ -nitroaniline의 양을 측정하였다.

II-5-2. 효소활성에 대한 금속이온 및 단백질분해효소 억제제의 영향

정제한 효소의 활성에 대하여 금속이온이 미치는 영향을 알아보기 위해, CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 등 이온들이 각각 농도가 10mM 이 되도록 20mM Tris-HCl(pH 7.4) 완충용액에 용해시켜 사용하였다. 일정양의 효소용액과 혼합한 후 최종농도가 1mM 이 되도록 하여 37°C 항온기에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 azocasein assay를 수행하고 control(20mM Tris-HCl, pH 7.4)에 대한 상대적 활성을 이용하여 혈전분해 효소활성에 대한 영향을 비교하였다. 또한 효소활성에 대한 단백질 저해제의 영향을 알아보기 위해 PMSF, TLCK, TPCK, aprotinin, EDTA, pepstatin A 등 저해제와 효소용액을 혼합하여 37°C 항온기에서 1시간 동안 반응시킨 후 같은 방법으로 azocasein assay를 수행하여 효소활성에 대한 영향을 비교하였다.

II-5-3. 효소활성에 대한 pH의 영향

효소반응의 최적 pH조건을 검토하기 위해 정제된 혈전분해효소를 각 pH 완충용액에 동량으로 가하여 37°C 항온기에서 60분간 반응시킨 후 효소활성을 비교하였다. 이때 사용한 완충용액은 혈전분해활성에 대한 영향을 최소화하기 위하여 0.5M Glycine-HCl (pH 3.0), 0.5M Acetate (pH 4.0~5.0), 0.5M Tris-HCl (pH 6.0~8.0), 0.5M Glycine-NaOH (pH 9.0~10.0) 완충용액을 사용하였다. 항온기에서 60분 반응시킨 후 azocasein assay를 수행하여 pH에 의한 혈전분해효소의 활성을 측정하였다.

Table 1. List of synthetic chromogenic substrates

Chromogenic substrates	Amino acid sequence	Characteristics
S-2222	Bz-Ile-Glu-(OR)-Gly-Arg-pNA	for factor Xa
S-2288	H-D-Ile-Pro-Arg-pNA	for t-PA
S-2238	H-D-Phe-Pip-Arg-pNA	for thrombin
S-2251	H-D-Val-Leu-Lys-pNA	for plasmin and streptokinase-activated
S-2444	pyroGlu-Gly-Arg-pNA	for urokinase
S-2586	MeO-Suc-Arg-Pro-Tyr-pNA·HCl	for chymotrypsin
S-2765	Z-D-Arg-Gly-Arg-pNA·2HCl	for factor Xa

II-5-4. 효소활성에 대한 온도의 영향

분리된 단백질의 열 안정성을 알아보기 위하여 효소액을 20~90°C에서 10°C 간격의 온도에서 30분씩 열처리시킨 후 azocasein assay를 수행하여 온도에 의한 혈전분해효소의 활성을 측정하였다.

II-5-5. Fibrin 및 Fibrinogen에 대한 분해특성 분석

반응시간에 따른 Fibrin의 분해특성은 Datta^[51]등의 방법을 이용하여 확인하였다. 5μg fibrinogen을 함유한 용액(20mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15M NaCl)에 thrombin(0.1NIH unit)을 첨가하여 상온에서 1시간동안 반응시켜 fibrin을 조제하였다. 그리고 동일 양의 효소를 처리하여 37°C 항온기에서 시간별로 반응시킨 후 12% SDS-PAGE를 수행하여 fibrin의 분해패턴을 확인하였다.

Matsubara^[52]등의 방법을 이용하여 Fibrinogen에 대한 분해특성을 확인하였다. Fibrinogen(5μg)에 동일 양의 효소를 처리하여 시간별로 37°C 항온기에서 반응시킨 후 위와 같은 방법으로 SDS-PAGE를 수행하여 분해패턴을 확인하였다.

II-6. Total RNA isolation

Total RNA를 분리하기 위하여 모든 시약과 초자기구류는 diethylpyrocarbonate (DEPC)로 처리하였고, RNA는 TriZol™ reagent를 이용하여 분리하였다. 느타리버섯 균사체 100mg에 TriZol™ reagent 1mℓ를 첨가시키고 5분간 반응시켜 균질화한 후 0.2mℓ Chloroform을 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 12,000X g로 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 eppendorf tube에 옮긴 후 0.5mℓ의 isopropanol을 첨가하여 실온에서 15분간 반응시켰다. 12,000× g로 4°C에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전물에 75% 에탄올 1mℓ

을 첨가하여 혼합한 후 $7,500 \times g$ 로 원심분리하여 RNA pellet를 얻었다. 이 RNA pellet를 공기중에서 건조시켰으며 RNase free-water에 녹여 purity를 측정한 후 -20°C 에 보관하여 cDNA 합성에 이용하였다.

II-7. 혈전분해효소 유전자에 대한 특이적 primer의 제작

NCBI에 등록되어 있는 유전자은행을 검색하여 정제한 느타리버섯 균사체로부터 분리되어진 혈전분해효소의 N-말단 아미노산서열과 느타리버섯 자실체로부터 분리되어진 metalloprotease유전자(AY640032)의 염기서열을 비교분석하였고 start codon부위부터 stop codon부위까지 PCR을 수행 할 수 있도록 Bioneer(Korea)에 의뢰하여 primer를 제작하였다. Sense primer는 5' end에 *BamH*I restriction site를 첨가하여 5'-GGATCCATGTTGCGCTCCATCCTGTTAATTG-3'로 하였고 antisense primer는 stop codon 뒤에 *Hind* III restriction site를 첨가하여 5'-AAGCTTTACACTGGTGCTGCTACCCTGGC-3'로 하였다.

II-8. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

느타리버섯 균사체로부터 추출된 Total RNA와 oligo (dT)₁₈ 및 MMLV reverse transcriptase를 혼합하여 역전사 반응을 하였다. 2 μg total RNA와 10pmol oligo (dT)를 65°C 에서 10분 동안 반응시킨 후 dNTPs, RNase inhibitor, MMLV reverse transcriptase등 mixture와 42°C 에서 한 시간 동안 역전사반응을 하였다. 합성한 cDNA는 -20°C 에 보관하면서 사용하였다.

합성된 cDNA는 제작한 primer를 이용하여 94.0°C 에서 5분간 반응시킨 후 denaturation은 94.0°C 에서 1분, annealing은 63.0°C 에서 30초, extension은 72.0°C 에서 1분씩 35cycle로 하여 PCR을 수행하였다. PCR product는 1.2%

agarose gel로 전기영동하였고 ethidium bromide(EtBr)로 염색한 후 확인하였다.

II-9. Cloning을 위한 형질전환

*E.coli*의 형질전환을 위한 competent cell은 *E.coli* DH5 α 를 사용하여 만들고 -70°C에 보관하면서 사용하였다. Ligation은 Promega Co.(USA)의 방법에 따라 수행하였다. Ligation 반응액 10 μ l 내에 fresh PCR product 1.5 μ l, 2x ligation buffer 5 μ l, pGEM-T easy vector (25 ng/ μ l) 1 μ l, T4 DNA ligase (3.0 Weiss units) 1 μ l, 멸균수 1.5 μ l를 첨가한 후 잘 혼합하고, 4°C에서 overnight하여 ligation시켰다(Fig. 4). Ligation 혼합액 10 μ l와 competent cell 90 μ l를 혼합하여 잘 섞은 후 30분 동안 얼음에 정치하고 42°C에서 90초 동안 heat shock 하였다. 곧바로 2~3분 동안 얼음에 방치한 후 LB 액체배지 500 μ l를 가하여 수평으로 37°C에서 1시간 동안 150rpm으로 진탕배양하였다. 배양한 세포를 100 μ g/ml ampicillin, X-gal (40 μ g/ml), IPTG (0.01mM)가 함유된 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 12시간 동안 배양하여 흰색집락을 선발하였다. 형질전환체를 확인하기 위하여 선별한 흰색집락을 100 μ g/ml ampicillin이 함유된 LB 액체배지에 12시간 동안 배양한 후 배양액 5ml을 취하여 plasmid DNA isolation kit(Qiagen Co., USA)로 recombinant DNA인 pGEM T-pofe를 분리하였다. Vector에 삽입된 DNA가 정확히 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 제한효소 EcoR I로 절단한 후 이것을 EtBr이 함유된 0.8% agarose gel로 전기영동 시킨 후 자외선을 조사하여 관찰하였다.

II-10. DAN 염기서열 분석

클로닝된 vector는 SP6 primer를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 염기서열분석은 기초과학지원연구소 광주분소에 의뢰하여 수행하였다. Automatic DNA sequencer(model: ABI PRISM 377, Perkin Elmer, USA)을 이용하여 DNA 염기서열을 결정하였으며 확인된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 BLAST에서 느타리버섯 자실체유래의 metalloendoprotease(PoMTP)의 염기서열과 비교하여 분석하였다.

II-11. Construction of expression vector for recombinant fibrinolytic emzyme

pGEM T-*pofe*를 *Bam*H I, *Hind* III로 절단하여 얻은 PoFE 유전자를 동일한 효소로 처리한 pQE30 expression vertor에 ligation 하였다(Fig. 5). Ligation 반응액 10μl내에 pGEM T-*pofe*를 제한효소 *Bam*H I, *Hind* III로 절단하여 얻은 insert DNA 3μl, 2x ligation buffer (250mM Tris-HCl, pH 7.8, 100mM MgCl₂, 20 mM DTT, 4 mM ATP)5μl, pQE30 vector (25ng/μl) 1μl에 T4 DNA ligase (3.0 Weiss units) 1μl를 첨가한 후 잘 혼합하여 4°C에서 overnight하여 ligation시켰다. Ligation product인 pQE30-*pofe*를 *E.coli* DH5α에 형질전환하여 증폭시켰다. 얻어진 재조합 vector들은 DNA sequence analysis를 하여 원하는 단편이 cloning 되었음을 확인하였다. 발현을 위한 숙주세포는 *E.coli* M15[pREP4]를 사용하였다. pQE30-*pofe* 10μl와 competent cell 90μl를 혼합하여 잘 섞은후 30분 동안 얼음에 정치하고 42°C에서 90초 동안 heat shock 하였다. 곧바로 2~3분 동안 얼음에 방치하고 LB 500μl를 가하여 수평으로 37°C에서 1시간 동안 150rpm으로 진탕배양하였다. 배양한 세포를 100μg/ml ampicillin, 25μg/ml kanamycin이 함유된 LB 고체배지에 도말하여 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 몇 개의 colony를 취하여 액체배양하여

plasmid를 isolation한 후 각 primer로 PCR하여 recombinant strain을 확인하였다.

II-12. Expression and purification of fibrinolytic enzyme

단일 colony를 취하여 10mℓ 배지(25µg/mℓ kanamycin과 100µg/mℓ ampicillin을 함유)에 12시간 동안 배양한 후 500µl를 취하여 30mℓ 배지 (25µg/mℓ kanamycin과 100µg/mℓ ampicillin을 함유)에 접종하였다. 37°C에서 OD₆₀₀값이 0.5–0.7이 될 때까지 진탕배양한 후 최종농도가 1mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양액을 4,000x g에서 15분 동안 원심분리하여 세포를 모은 후 1mℓ lysis buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)로 세포를 혼탁시킨 후 lysozyme 농도가 1.0 mg/mℓ이 되도록 첨가하여 ice에서 30분간 반응시켰다. 세포를 sonicator로 파쇄한 후 4°C, 10,000x g에서 30분 동안 원심분리한 후 상층액을 회수하였다. lysis buffer로 평형화시킨 Ni-NTA spin column에 상층액을 주입하여 700x g, 2분 동안 원심분리하여 여과액을 수집한 후 SDS-PAGE 분석에 사용하였다. 또한 700x g, 2분 동안 원심분리하는 방법으로 600µl washing buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 20mM imidazol, pH 8.0)를 사용하여 Ni-NTA spin column을 두번 washing한 후 200µl elution buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 250mM imidazol, pH 8.0)로 6X His-tagged protein을 함유한 column을 두차례 elution하여 분액을 수집하고 SDS-PAGE를 수행하였다. 각 단계에서 얻은 분액 10µl에 5x SDS-PAGE sample buffer 2.5µl를 넣고 7분 동안 끓인 후 SDS-PAGE를 수행하였다.

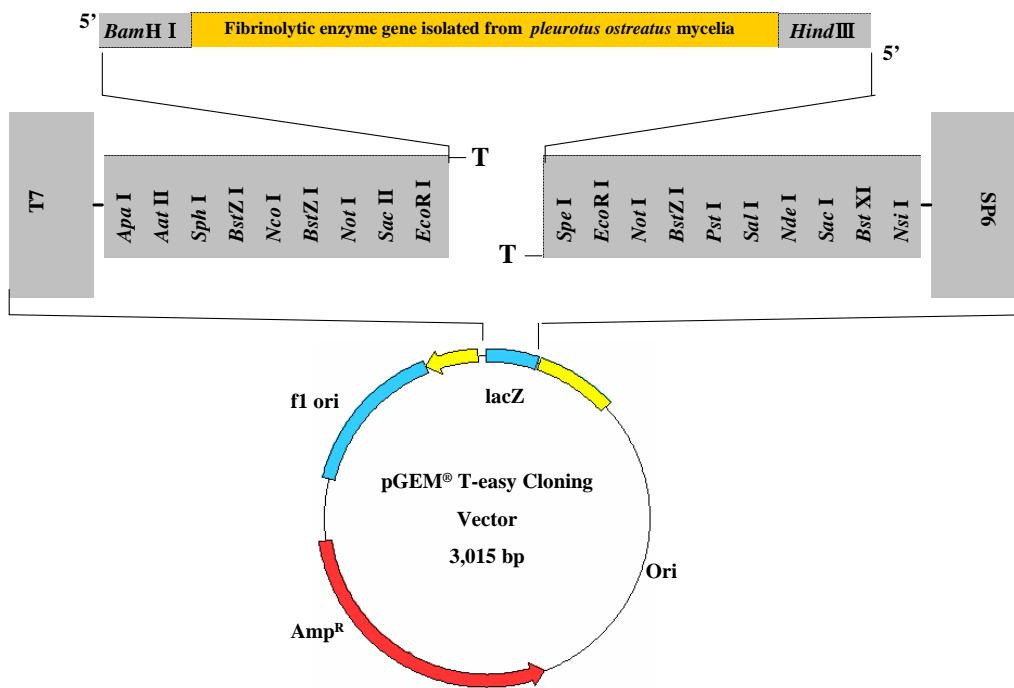


Fig. 4. Construction of cloning vector for recombinant *pofe*

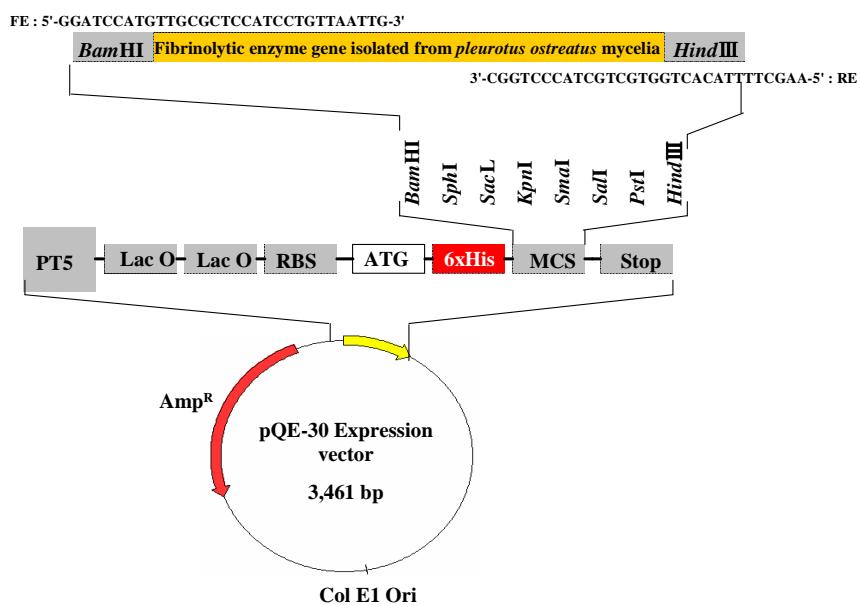


Fig. 5. Construction of expression vector for recombinant *poFE*

II -13. SDS-PAGE

조제한 단백질은 SDS-PAGE^[49]를 수행하여 분자량을 분석하였다. 전기영동은 12%의 separating gel과 5% stacking gel로 이루어진 SDS-PAGE gel 상에서 진행하였다. 단백질과 5x SDS Sample Buffer (60mM Tris-HCl, pH 6.8, 14.4mM β-mercaptoethanol, 25% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue)를 혼합하여 100°C에서 7분간 중탕한 후 protein marker (Cambreco co. USA)와 함께 전기영동을 수행하였다. 전기영동된 gel은 CBB R 250으로 염색하고 destaining buffer로 털색시킴으로써 단백질バンド를 확인하였다.

II -14. Western blot analysis

전기영동후 단백질을 100V에서 90분간 PVDF membrane에 transfer하였다. Skim milk를 농도가 5%가 되도록 TBST용액 (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 137mM NaCl, 0.1% Tween20)에 녹여 blocking solution을 제조하여 membrane을 담그고 한 시간 동안 shaker 위에 올려 놓고 흔들어 주었다. 한시간 후 TBST 용액으로 15분씩 4회 세척한 후 1:1000 비율로 TBST 용액에 희석한 6X His-tag antibody로 4°C에서 12시간 처리 후 동일한 방법으로 15분씩 4회 세척한 후 1:1000의 비율로 TBST 용액에 희석한 alkaline phosphatase conjugated antibody(second antibody)로 실온에서 2시간 처리하였다. alkaline phosphatase secondary antibody에 의한 반응을 확인하기 위하여 NBT/BCIP를 처리하여 단백질 band를 확인하였다.

III. 결과

III-1. 단백질분해활성 및 혈전분해활성

2% Skim milk plate에 정량한 버섯추출물 10 μ g과 양성대조군으로 trypsin 10 μ g을 침적하고 37°C에서 12시간 동안 반응시킨 후 상대적으로 형성된 lysis zone으로 비교분석하였다. 느타리버섯의 균사체 단백질분해활성은 Fig. 6A에서와 같이 trypsin에 비교하여 상대적으로 85%의 단백질분해활성을 나타내었다. 또한 혈전분해활성은 Fig. 6B에서와 같이 대조군으로써 Plasmin 1.0 unit에 비교하여 균사체에서는 78%의 혈전분해활성을 나타냄에 따라 느타리버섯의 균사체에 혈전분해효소가 존재함을 알 수 있었다.

III-2. 느타리버섯 균사체로부터 혈전분해효소의 정제

III-2-1. 조단백질 분리

혈전분해효소활성을 유지시키기 위하여 모든 정제과정은 4°C에서 수행하였으며, 혈전분해효소가 분리되어지는 에탄올 농도를 측정하기 위하여 10~90% 까지 10% 간격으로 에탄올 농도를 점진적으로 증가시켜서 분리된 단백질을 20mM Tris-HCl (pH 7.4) 완충용액에 혼탁하여 단백질분해활성 및 혈전분해활성을 측정하였고, 단백질분해활성 단위는 OD_{366nm}에서 0.1의 값을 1.0 unit로 정하였다. 느타리버섯의 혈전분해효소는 50~75% 에탄올 농도분획에서 8,424unit로 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 2). 따라서 50~75% 사이의 에탄올 농도에서 침전된 단백질을 혈전분해효소 정제에 사용하였다.

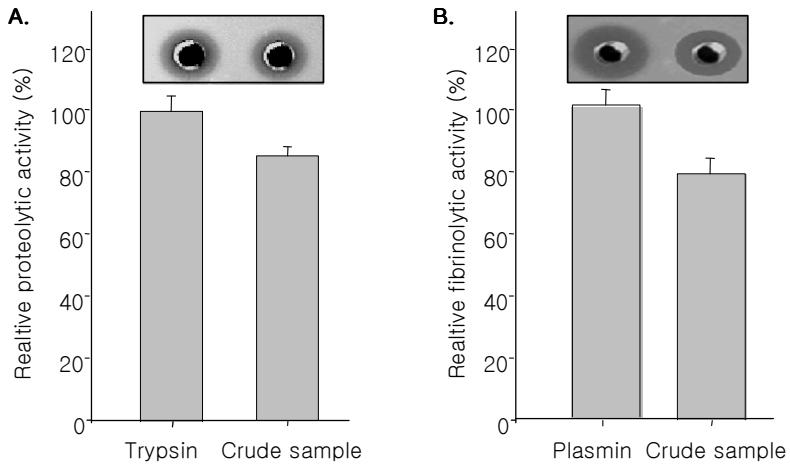


Fig. 6. The assay of proteolytic and fibrinolytic activity from crude extracts of *Pleurotus ostreatus* mycelium. A, Proteolytic activity was measured by using skim milk plate; B, Fibrinolytic activity was measured by using fibrin agarose plate. 20 μ g of crude extract was placed in each hole and incubated at 37°C for 12 hrs. Trypsin and Plasmin are used as positive control.

III-2-2. 혈전분해효소의 정제

Cation-exchange chromatography를 수행하기 위하여 CM-cellulose를 이용하여 10mM Citrate-NaOH (pH 6.0)으로 평형화한 후 0~1.0M NaCl (pH 6.0)로 평형화한 후 0~1.0M NaCl (pH 6.0) 농도구배를 형성시켜 1.0ml/min으로 분획하였으나, 결합이 이루어지지 않고 flow-through로 용출되어 anion-exchange chromatography를 수행하였다(Fig. 7). 양이온 교환수지로부터 회수한 농축된 시료를 삽입시켜 0~1.0M NaCl 농도구배를 형성시켜 활성분획을 분리한 후 280nm에서 단백질함량을 측정하였고 azocasein assay를 수행하여 활성분획을 분리하였다(Fig. 8). DEAE sephadex A-50 column chromatography를 수행한 결과 약 0.8M의 NaCl 농도에서 혈전분해효소들이 정제됨을 확인하였으며 활성분획을 수집하여 동결건조시킨 후 투석을 통하여 gel-filtration을 수행하였다. Sephadex G-75 column을 이용하여 DEAE sephadex A-50 column에서 활성을 나타낸 분획물을 0.1ml/min의 용출속도로 정제하였다(Fig. 9). 활성을 나타내는 분획물들을 수집하여 동결건조로 농축 시킨 후 투석을 하여 FPLC를 수행하는 시료로 사용하였다. 혈전분해효소를 순수정제하기 위하여 Amersham pharmacia Co.의 HiLoad 16/60 Superdex 75 pg을 이용하여 FPLC를 수행한 결과 느타리버섯 균사체로부터 약 876배의 정제된 효소를 얻었으며 회수율은 6.5%를 나타내었다(Fig. 10, Table 2). 이와 같이 정제된 효소를 PoFE (*Pleurotus ostreatus* fibrinolytic enzyme)라고 명명하였다.

III-3. 혈전분해효소의 분자량 측정

III-3-1. FPLC를 이용한 분자량 측정(size exclusion)

혈전분해효소의 분자량을 측정하기 위하여 HiLoad 16/60 Superdex 75 pg column에 Gel-filtration marker로써 glyceraldehydes-3-phosphate dehydro-

genase (36kDa), carbonic anhydrase (29kDa), trypsinogen-PMSF (24kDa), trypsin-inhibitor (20.1kDa)를 이용하여 혈전분해효소 정제시 이용된 동일한 조건으로 size exclusion을 수행하였다. size exclusion을 수행한 결과 Fig. 11과 같은 Molecular mass standard curve가 작성되었으며, 이를 기초로 하여 정제된 혈전분해효소의 분자량을 측정한 결과 약 32kDa으로 확인되었으며, 이는 느타리버섯 자실체로부터 분리정제된 PoMTP와 유사한 분자량을 가지고 있음을 확인하였다.

III-3-2. SDS-PAGE 및 fibrin zymography 를 이용한 분자량 측정

정제된 혈전분해효소의 분자량을 측정하기 위하여 size exclusion 외에 SDS-PAGE 및 fibrin zymography를 수행하여 분자량을 확인한 결과 size exclusion과 동일하게 약 32kDa에서 분자량을 나타냄을 확인하였다 (Fig. 12).

III-4. 혈전분해효소의 N-말단 아미노산 서열분석

정제효소의 N-말단 아미노산 서열은 한국기초과학지원연구소 광주분소에 의뢰하여 결정한 결과 ALRKGGAAALNIYSVGFTS의 아미노산 서열을 확인할 수 있었으며 이에 근거하여 NCBI Blast에서 상동성이 있는 amino acid 서열을 검색하여 비교분석하였다. Fig. 13에서와 같이 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 Joh^[53] 등에 의해 보고되어진 느타리버섯 자실체로부터 분리정제된 metalloprotease (AAU94648.1)의 아미노산 서열과 N-말단 아미노산 서열이 일치함을 확인할 수 있었으며, *Coccidioides posadasii*^[54]로부터 분리정제된 metalloprtease I precursor (AAQ07436)와 유사한 amino acid 서열을 가지고 있음을 확인하였다.

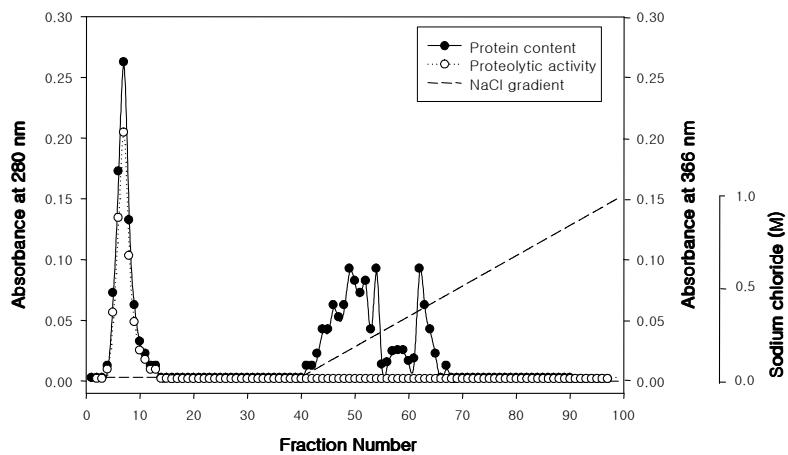


Fig. 7. Cation-exchange chromatography of fibrinolytic enzyme from *P. ostreatus* mycelium on CM-cellulose column. The protein sample was applied to the column (3.5×10 cm) equilibrated with 10mM citrate-NaOH buffer (pH 6.0). The protein was eluted with 0~1.0M NaCl linear gradient at the flow rate of 1.0ml/min at 4°C.

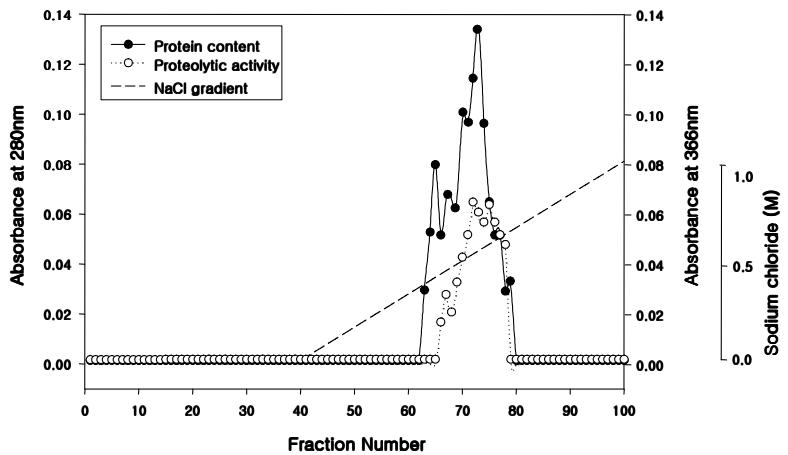


Fig. 8. Anion-exchange chromatography of fibrinolytic enzyme from *P. ostreatus* mycelium on DEAE-Sephadex A-50 column. The protein sample was applied to the column (3.5×10 cm) equilibrated with 20mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). The protein was eluted with 0~1.0M NaCl linear gradient at the flow rate of 1.0ml/min at 4°C.

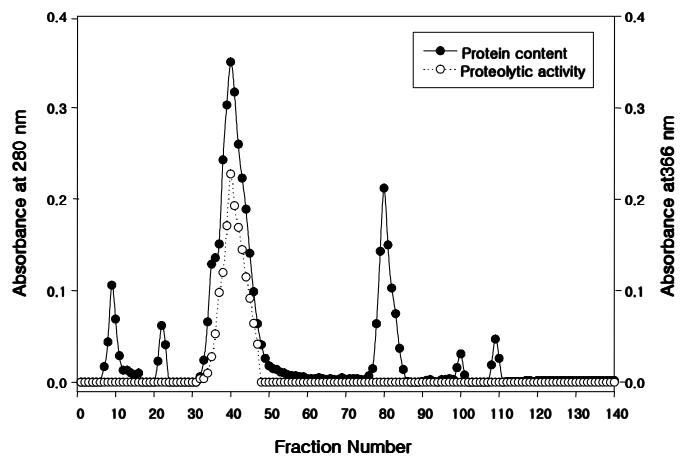


Fig. 9. Gel-filtration chromatography of fibrinolytic enzyme from *P. ostreatus* mycelium on Sephadex G-75 column. The protein sample was applied to the column (1.5×130 cm) equilibrated with 0.05M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.15M NaCl. The protein was eluted at the flow rate of 0.1 ml/min at 4°C.

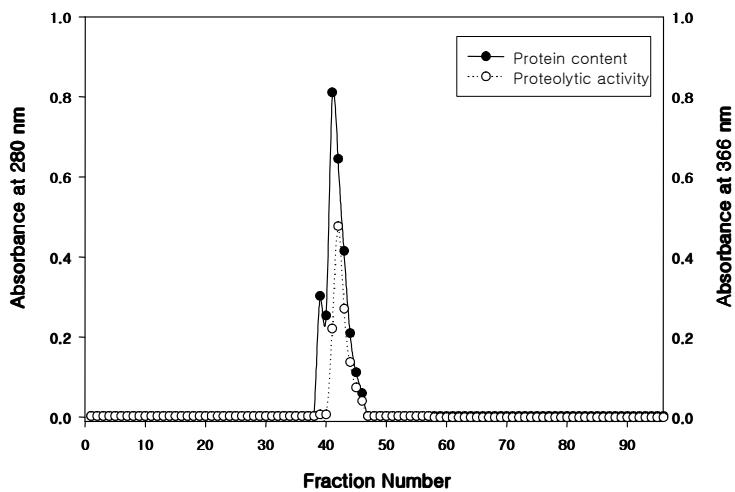


Fig. 10. Gel-filtration chromatography of fibrinolytic enzyme from *P. ostreatus* mycelium on HiLoad 16/60 Superdex 75 pg column. The protein sample was applied to the HiLoad 16/60 Superdex 75 pg column equilibrated with 0.05M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.15M NaCl. The protein was eluted at the flow rate of 1.0 ml/min at room temperature.

Table 2. Purification yields of fibrinolytic enzyme from *P. ostreatus* mycelium

Purification step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Proteolytic activity (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Recovery (%)	Purification fold
Homogenate	250	N. D.	N. D.	-	-	-
Crude extracts	500	6,782	8,424	1.2	100	1
DEAE Sephadex A-75	5	3.98	1,573	395	18.7	329
Sephadex G-75	3	0.91	635	697.8	7.5	581.5
HiLoad 16/60	2	0.52	548	1053	6.5	876
Superdex 75 pg						

Note. N.D., not determined. Protease activity was measured by using the azocasein assay, as described under Materials and methods.

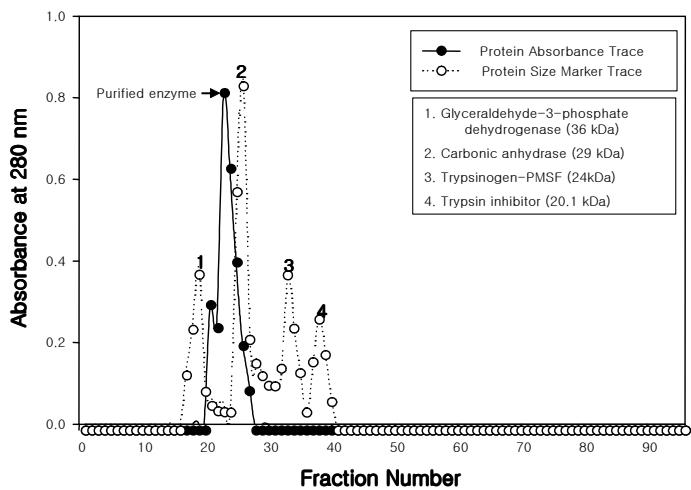


Fig. 11. Molecular weight determination of PoFE using size-exclusion on HiLoad 16/60 Superdex 75 pg column. The standard markers and purified enzyme was eluted through a Superdex 75 equilibrated with 0.05mM phosphate buffer containing 0.15M NaCl, pH 7.2, at a flow rate of 1.0ml/min.

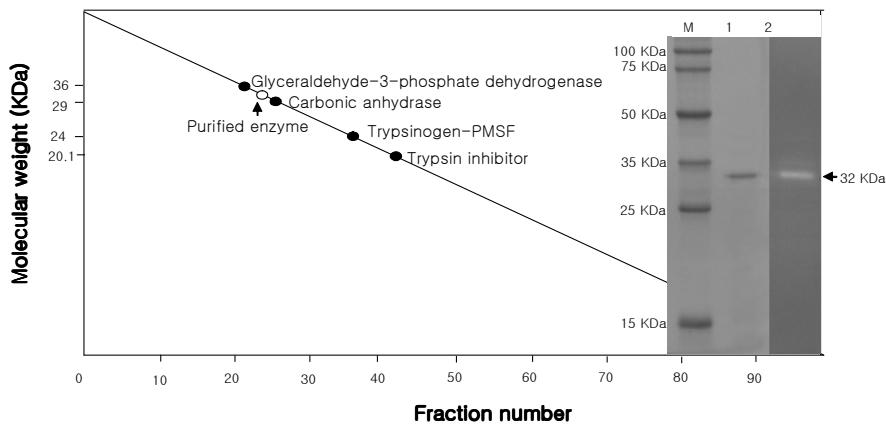


Fig. 12. Molecular weight determination of PoFE using SDS-PAGE and fibrin zymography. M: protein standard marker; lane 1: purified PoFE on SDS-PAGE; lane 2: purified PoFE on fibrin zymography.

PoFE	A	L	R	K	G	G	A	A	A	L	N	I	Y	S	V	G	F	T	S
AAU94648	A	L	R	K	G	G	A	A	A	L	N	I	Y	S	V	G	F	T	S
AAQ07436	S	L	R	K	G	G	Y	A	A	L	N	V	Y	F	L	K	D	L	G

Fig. 13. Homology analysis of purified fibrinolytic enzyme amino acid sequence from *Pleurotus ostreatus*. The shadow indicates similar amino acid residues between the purified enzyme and other proteolytic enzymes. PoFE: the purified fibrinolytic enzyme from *P.ostreatus*; AAU94648: metalloprotease from *Pleurotus ostreatus*; AAQ07436: metalloprotease 1 precursor from *Coccidioides posadasii*.

III-5. 혈전분해효소의 특성분석

III-5-1. 기질특이성 분석

정제효소의 기질특이성을 확인하기 위하여 다양한 합성기질을 이용하여 느타리버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소와 반응시켜 amidolytic 활성을 측정하였다. Fig. 14에서 보는바와 같이 느타리버섯 균사체로부터 분리 정제된 혈전분해효소는 chymotrypsin의 기질인 S2586에서 가장 높은 활성을 나타내었다.

III-5-2. 효소활성에 대한 금속이온의 영향

금속이온에 의한 혈전분해활성을 분석하기 위하여, 각각 CaCl_2 , CoCl_2 , CuCl_2 , FeCl_2 , MnCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 용액을 2mM 농도로 조제하여 최종농도가 1mM이 되도록 효소 100 μg 과 동일한 volume의 용액을 처리한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 금속에 대한 혈전분해효소활성을 측정하였다. Table 3에서 보는바와 같이 금속이온을 첨가하지 않았을 때의 활성을 100으로 하여, 그 상대적인 활성도를 측정하였을 때, Zn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} 에 의해 혈전분해효소활성이 14~22% 증가됨을 확인할 수 있었으며, 반면에 Cu^{2+} 를 첨가한 경우에는 활성이 13%정도 감소함을 볼수 있었다.

III-5-3. 효소활성에 대한 Protease inhibitor의 영향

Protease inhibitor에 의한 혈전분해활성을 분석하기 위하여 PMSF, TLCK, TPCK, aprotinin, EDTA, pepstatin A를 효소 100 μg 과 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 azocasein assay를 수행하여 혈전분해활성을 측정하였다. Table 4에서와 같이 정제된 혈전분해효소는 EDTA에 의해 활성이 억제되어 짐을 확인

할 수 있었으며, 이는 정제된 혈전분해효소가 metalloprotease일 것으로 추정된다.

III-5-4. 효소활성에 대한 pH의 효과

pH에 의한 혈전분해효소의 활성을 분석하기 위하여 pH 2.0 ~ pH 10.0 범위에서 혈전분해활성을 측정하였다. 각 pH 조건의 reagent에 효소 100 μ g을 처리하고 1시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 azocasein assay를 수행하여 pH에 의한 영향을 분석하였다. 그 결과 Fig. 15에서 보는 바와 같이 pH 6.0과 7.0 사이에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, 일반적으로 pH 6.0 ~ pH 7.0 범위를 벗어나면 활성이 급격히 감소하였다. 따라서 이 효소는 중성에 가까운 pH에서 활성이 큰 효소임을 알 수 있었다.

III-5-5. 효소활성에 대한 온도의 영향

온도에 의한 혈전분해효소의 영향을 분석하기 위하여 20°C ~ 90°C 온도에서 효소액을 30분 동안 방치 시킨 후 분해활성 변화를 측정하였다. Fig. 16에 나타낸 바와 같이 35°C에서 최대활성을 보였으며 35°C 이상의 온도에서는 활성이 감소하였고 50°C 이상의 온도에서는 활성이 아주 낮았으며 37°C에서는 최적조건에서의 약 85%에 해당하는 활성을 보여주었다.

III-5-6. Fibrinolysis 와 Fibrinogenolysis pattern 분석

III-5-6-1. Fibrinogenolysis

Fibrinogen (5 μ g)에 동일 양의 혈전분해효소를 처리하여 시간별로 37°C 항온기에서 반응시킨 후 12% SDS-PAGE를 수행하여 fibrinogen 분해패턴을 확인하였다. 반응 5분 이내에 A α , B β chain은 완전히 분해되어졌으나 γ chain

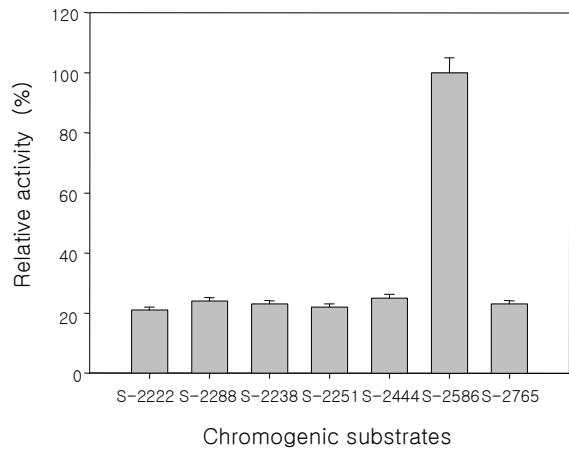


Fig. 14. Amidolytic activity on the several chromogenic substrates. Amidolytic activity was measured spectrometrically using the chromogenic protease substrates such as S2222, S2288, S2238, S2251, S2444, S2586 and S2765 .

Table 3. Effect of metal ions on the activity of the fibrinolytic enzyme from *P. ostreatus* mycelium

Metal ions	Concentration(mM)	Relative activity (%)
Control	-	100
Ca ²⁺	1.0	118
Co ²⁺	1.0	96
Cu ²⁺	1.0	87
Fe ²⁺	1.0	91
Mn ²⁺	1.0	94
Mg ²⁺	1.0	122
Zn ²⁺	1.0	114

Reaction conditions are as described under materials and methods.

Table 4. Effect of protease inhibitors on the activity of the fibrinolytic enzyme from *P. ostreatus* mycelium

Protease inhibitors	Concentration(mM)	Relative activity (%)
Control	-	100
PMSF	1.0	78
TLCK	1.0	81
TPCK	1.0	74
EDTA	1.0	52
aprotinin	1.0	88
peptstatin A	1.0	88

Reaction conditions are as described under materials and methods.

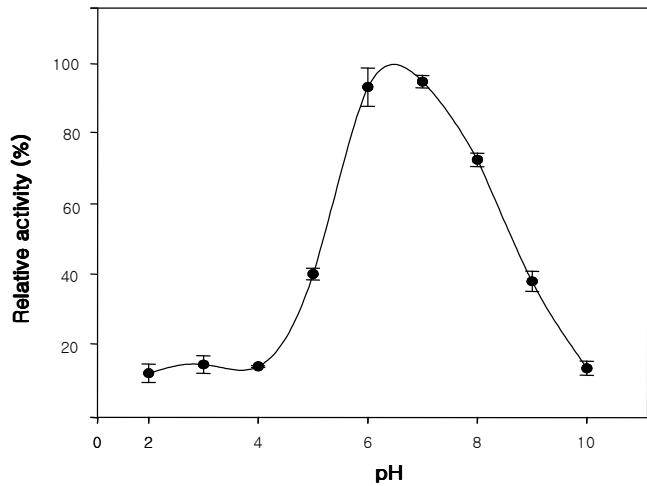


Fig. 15. Effect of pH on the activity of the fibrinolytic enzymes from *P. ostreatus* mycelium. Enzyme activity was assayed in the pH range of 2–10. 0.5M glycine-HCl (pH 2.0~3.0), 0.5 M acetate (pH 4.0~ 5.0), 0.5 M Tris-HCl (pH 6.0~8.0) and 0.5 M glycine-NaOH (pH 9.0~ 10.0) buffers were used with 0.1% azocasein.

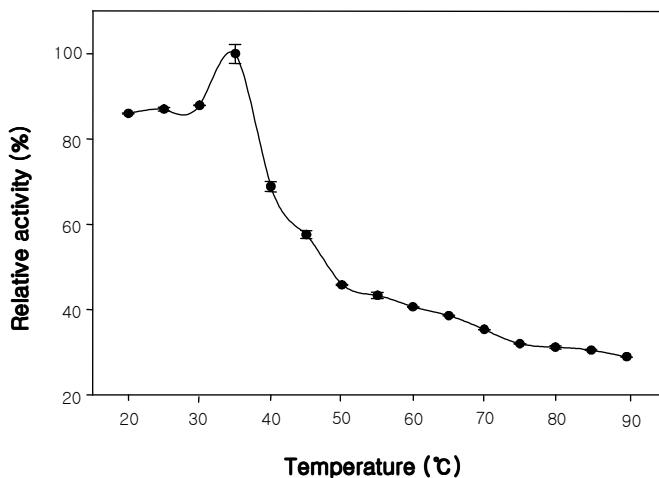


Fig. 16. Effect of temperature on the activity of the fibrinolytic enzymes from *P. ostreatus* mycelium. The purified enzyme was incubated at temperatures from 20 to 90°C for 30minutes.

은 반응 후 30분 부터 분해가 시작되어 α , β chain에 비하여 상대적으로 혈전분해효소에 대한 저항성을 가지고 있는 것으로 판명되었다(Fig. 17A).

III-5-6-2. Fibrinolysis

Fibrinogen(10 μ g)과 thrombin(0.1unit)을 상온에서 1시간 동안 반응시켜 fibrin을 조제한 후 동일 양의 혈전분해효소를 처리하여 시간별로 37°C 항온기에서 반응시키고 나서 12% SDS-PAGE를 수행하여 fibrin 분해패턴을 확인하였다(Fig. 17B). 반응 5분 후에 α -chain이 분해되었고 β chain과 γ - γ chian은 α chain에 비하여 상대적으로 효소에 선택성이 낮은 것으로 확인되었다. β chain과 γ - γ chian은 반응 후 5분후부터 점차 분해되어짐을 확인하였다. 또한 본 실험에서 느타리버섯 균사체로부터 분리정제한 혈전분해효소는 SK, UK, t-PA 등과 같이 plasminogen을 활성화시켜 혈전을 분해하는 메커니즘과는 달리 직접 혈전을 분해시킴을 확인하였다.

III-6. Cloning and sequence analysis of *pofe*

GenBank data를 검색하여 느타리버섯 균사체로부터 정제된 혈전분해효소의 N-terminal amino acid sequence와 느타리버섯 자실체로부터 분리한 metalloprotease유전자(AAU94648)의 염기서열을 비교분석하여 start codon부위부터 stop codon까지 PCR를 수행할 수 있도록 primer를 제작하여 PCR를 수행하였다. PCR 결과 약 860bp와 1.2Kb의 DNA 단편이 증폭됨을 확인할 수 있었다(Fig. 18). 확인된 PCR product의 염기서열을 분석하기 위하여 pGEM T-easy cloning vector에 ligation하여 *E. coli* DH5 α competent cell에 형질전환시킨 후 Amp+/X-gal/IPTG가 포함된 LB plate에 도말하여 12시간 배양하였다. ampicillin에 저항성을 가지며 white colony를 나타내는 형질전환체를 분리하여

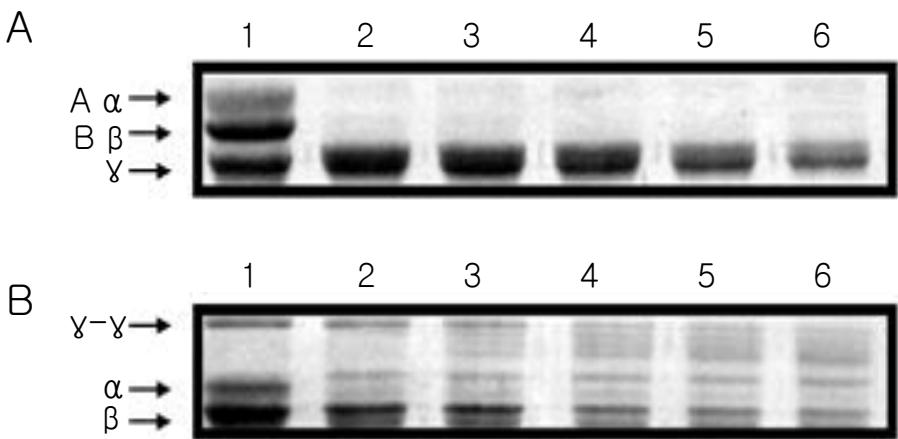


Fig. 17. Fibrinogenolysis and fibrinolysis pattern exhibited by the purified fibrinolytic enzyme from *P. ostreatus* mycelium. The enzyme was incubated with 10 μ g of fibrinogen or fibrin in 10mM of Tris-HCl buffer (pH 7.2) at 37°C for up to 1hr. Lane 1: control, without enzyme; lane 2: after 5min of reaction; lane 3: after 10min of reaction; lane 4: after 15min of reaction; lane 5: after 30min of reaction; lane 6: after 1hr of rection.

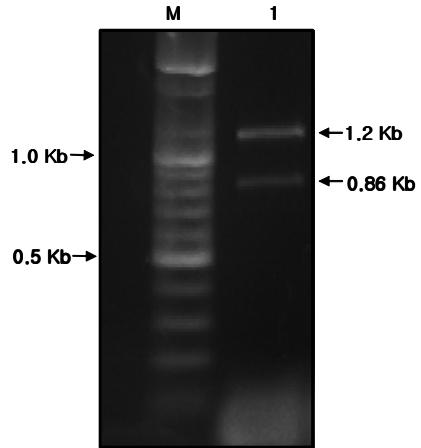


Fig. 18. Identification of the PoFE protein encoding gene from *P. ostreatus* mycelium.

RT-PCR was performed using PCR primers which were designed for the conserved sequences in metalloprotease encoding gene from *P. ostreatus* fruiting body. M: 100bp ladder DNA marker; Lane 1: PCR products.

ampicillin을 포함하고 있는 LB broth에 배양하여 plasmid를 분리하였다. 분리된 재조합된 plasmid의 insert 삽입 유무를 확인하기 위하여 EcoR I으로 처리하여 절단한 결과 Fig. 19, 20에서 보는바와 같이 약 1.2Kb 및 860bp의 insert DNA를 각각 확인할 수 있었다. 염기서열을 분석한 결과 정확히 1,269bp와 867bp의 크기임을 확인하였다(Fig. 21, 22). 이를 NCBI blast를 이용하여 분석한 결과 pGEM T-pofe (1,269bp)는 7개의 Exon과 6개의 intron으로 구성되어 있는 pre-mRNA 형태를 취하고 있음을 확인하였으며, pGEM T-pofe (867bp)의 염기서열을 분석한 결과 intron이 제거된 mature form임을 확인할 수 있었다. 따라서 pGEM T-pofe (867bp)의 염기서열을 Gene Runner programme을 이용하여 분석한 결과 288개의 아미노산잔기를 가진 단백질을 encoding하고 약 32kDa 크기의 단백질을 발현시키는 것으로 계산되어 분리정제한 단백질의 크기와 일치됨을 확인할 수 있었다(Fig. 23).

III-7. Analysis of deduce amino acid sequence of PoFE

분리된 혈전분해효소 유전자 염기서열을 기초로 하여 유추된 아미노산 서열을 NCBI protein blast를 이용하여 상동성을 분석하였다. 유추된 아미노산 서열은 느타리버섯 자실체로부터 정제된 metalloprotease의 아미노산서열 (AAU94648.1)과 89%, *Coccidioides posadasii*로부터 정제한 metalloprotease (AAQ07436.1)과 41%의 상동성을 나타내었다(Fig. 24). 유추된 아미노산서열을 NCBI protein blast를 이용하여 domain 구조를 분석한 결과 분리되어진 혈전분해효소는 His¹⁹⁸-Glu¹⁹⁹-Val²⁰⁰-Gly²⁰¹-His²⁰²-Trp²⁰³-Phe²⁰⁴-Gly²⁰⁵-Leu²⁰⁶-Tyr²⁰⁷-His²⁰⁸의 아미노산서열을 포함하였는데 이 부위는 AAU94648.1 (Metalloprotease from *P. ostreatus*), AAQ07436.1 (Metalloprotease from *Coccidioides posadasii*), CAB63909.1 (Metalloprotease from *Metarhizium*

anisopliae var. anisopliae), CAD71082.1(Metalloprotease from *Neurospora crassa*)등에서 보이는 Zn²⁺ binding domain과 유사한 것으로 분석되었다 (Fig.25). 또한 목재부후균 뽕나무버섯 (CAB42792), 잎새버섯^[59] (BAB82381) 으로부터 분리정제된 metalloprotease들이 가지는 HEXXHXUGUXH Zn²⁺ metalloprotease domain과 매우 유사한 것으로 판명되었다. 특히 일반적인 Zn²⁺ metalloprotease domain 구조에서와 동일하게 Gly²⁰⁵의 양 옆(Phe²⁰⁴, Leu²⁰⁶)의 아미노산이 소수성 아미노산이고 His¹⁹⁸, Glu¹⁹⁹, His²⁰², His²⁰⁸에 의하여 Zn²⁺ binding domain의 pocket structure가 구성되어 있음을 확인하였으며, Zn binding domain의 주위에 7개의 Ca²⁺분자가 결합할수 있는 구조로 밝혀졌다(Fig. 26). 또한 생물체내에서 각종 기능을 조절하고 있는 다양한 단백질의 phosphorylation site와 glycosylation site가 존재하고 있음을 확인하였다. Fig. 27에서 보는바와 같이 glycosylase에 의하여 당화 부위인 Asn⁵⁰-Val⁵¹-Ser⁵²-Leu⁵³, Asn⁷¹-Ser⁷²-Thr⁷³-Val⁷⁴과 Asn¹¹²-Ala¹¹³-Thr¹¹⁴-Trp¹¹⁵에서 Asn에 당화가 일어날 것으로 추정된다^[60]. cAMP-/cGMP-dependent protein kinase에 의하여 인산화되는 부위인 Lys⁵⁴-Lys⁵⁵-Glu⁵⁶-Ser⁵⁷는 Ser⁵⁷에 인산화 될것으로 추정되어지며^[61], casein kinase II에 의하여 인산화되는 casein kinase II consensus sequences(SXE/D)로 Ser¹⁶⁹-Pro¹⁷⁰-Lys¹⁷¹-Asp¹⁷²가 존재하며 Ser¹⁶⁹에 인산화가 일어날 것으로 추정된다^[32]. 또한 tyrosine kinase phosphorylation consensus sequence (KXXXEXXY)인 Lys¹¹⁸-Ala¹¹⁹-Glu¹²⁰-Pro¹²¹-Glu¹²²-Ser¹²³-Ile¹²⁴-Tyr¹²⁵가 존재하며, Tyr¹²⁵ 위치에 인산화가 일어날 것으로 추정되며, Protein kinase C phosphorylation consensus sequence ([ST]X[RK])가 ²⁰Thr, ⁵²Ser, ⁷³Thr, ¹⁰⁷Thr, ¹⁶⁹Ser, ²⁴¹Thr, ²⁶³Ser에 존재하는 것으로 확인되었다(Fig. 27).

III-8. Gene expression of *pofe*

느타리버섯 균사체로부터 분리된 혈전분해효소 유전자를 발현시킬 목적으로 expression vector인 pQE30 expression vector와의 reading frame을 조절하기 위하여 5'-GGATCCATGTTGCGCTCCATCCTGTTAATTG-3'와 5'-AAGCTTTACAC TGGTGCTGCTACCCTGGC-3'과 같이 forward와 reverse primer를 제작하여 PCR을 수행하였다. 약 860bp의 PCR product를 확인하여 발현 백터인 pQE 30에 ligation한 후 *E.coli* M15(pREP4) competent cell로 transformation 하였다. 재조합된 plasmid의 insert 삽입유무를 확인하기 위하여 plasmid를 분리하여 *BamH* I, *Hind* III로 절단한 후 EtBr0.1 함유된 0.8% agarose gel에 전기영동한 결과 약 860bp의 insert DNA를 확인할 수 있었다(Fig. 28). 형질전환된 집락을 selection하여 LB에서 12시간 배양한 후 새로운 LB에 접종하여 OD₆₀₀에서 0.6에 이를 때 까지 배양시킨 후 1.0mM IPTG를 처리하여 6X His Tag0I fusion된 혈전분해효소를 발현 유도시켰다. 이에 대한 발현유무를 확인하기 위하여 형질전환된 세포로부터 조단백질을 제조한 후 20μg/μl로 정량하여 전기영동을 수행하였다. Fig. 29A에서 보는바와 같이 32KDa의 예상 단백질 크기로 느타리버섯 혈전분해효소 유전자가 발현됨을 확인하였다. 또한 이를 검증하기 위하여 Ni-NTA spin column으로 affinity chromatography를 수행하여 발현된 단백질을 정제하고 Alkaline phosphatase conjugated 6X His tag primary antibody를 이용하여 western blot을 수행한 결과 Fig. 29B에서와 같이 32KDa의 단백질이 발현됨을 확인하였다.

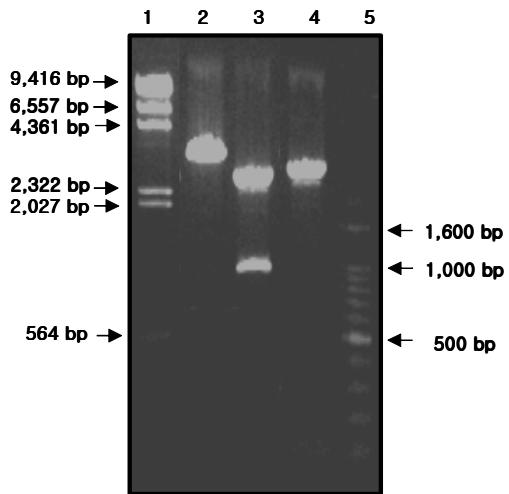


Fig. 19. Identification of cloned ~1.2Kb PCR product. The constructed pGEM T-*pofe* were resolved by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and then visualized by EtBr staining of the gel. Lane 1: λ /HindIII DNA marker; lane 2: pGEM T-*pofe*/HindIII; lane 3: pGEM T-*pofe*/EcoRI ; lane 4: pGEM T easy vector/*pst* I; lane 5: 100bp ladder DNA marker.

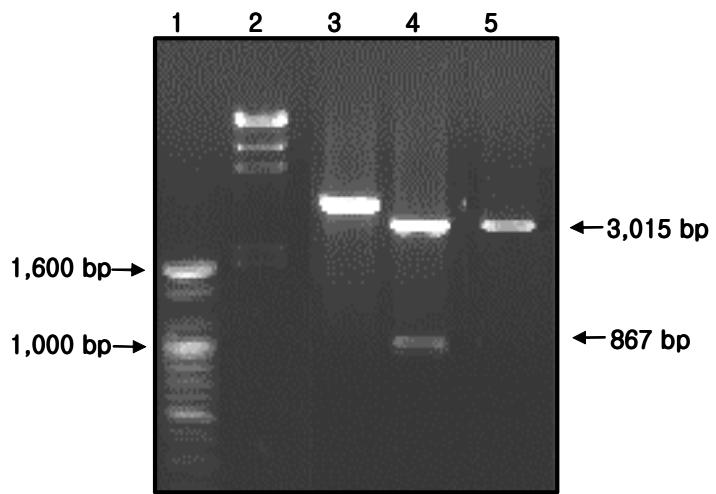


Fig. 20. Identification of cloned ~860bp PCR product. The constructed pGEM T-*pofe* were resolved by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and then visualized by EtBr staining of the gel. Lane 1: 100bp ladder DNA marker; lane 2: λ /HindIII DNA marker; lane 3: pGEM T-*pofe*/HindII; lane 4: pGEM T-*pofe*/EcoRI; lane5: pGEM T-easy vector/*pst*I.

1 T A G C T A T G C A T C C A A C G C G T T G G G A G C T C T C T C T C T C T 30
 31 C C C A T A T G G T C G A C C C T G C A G G G C G G C C G C G A 60
 61 A T T C A C T A G T G A T T T G G A T T C C A T T G T T G C G C G C T 90
 91 C C A T C C C T G T T A A T T T G C A C T C T C T C C T G C T C C G 120
 121 C C T A C G T G C T G G G G A G C A C A C C C A G A C C C A 150
 151 G G T A G G A G T T C G A T T C A G C G T T T C T A C G A G G A 180
 181 T G C T T G C T A C G A T T T G G C A T A G G C A A A G G G 210
 211 T T T G C G G G T C G C A A C C A A G C C A A G A A A G T G 240
 241 T C C A A A G G G G C G G A G G G C C C A T T T T G A C G G G C C 270
 271 T T A G A A A G C A A C G T C A G G C C T G A A A A A A G A G A 300
 301 G T T C T T T C A C C G T C G C A G T G C A C T G G C A T T G 330
 331 T C G T C A G C C A G A A T T C C A C G G T C C G T G G C G 360
 361 G G A A C A T C C C G T G C G T T A A A C C T C G T C G T T 390
 391 T C T T C G T G C A A G A T T G G T G A C C C A T T G T G T T 420
 421 A G C G A T T C C C A A A T T A C G G G A C C A A A T C C A A 450
 451 G T C T T G A A A T G A C G G C G T A C G G C G T A C T C G G G C 480
 481 T T T C A T T T G A A C T T T G C A A G G T A C C C A C A C G T 510
 511 A C G C T C A A C G C T A C A T G G T T T G G C A A G G G C C 540
 541 G A A C C G G A G A G G T A A G T G T G A G G C C T T T A C G T 570
 571 C A G A C A C C C T C A C C A A T T C G G G A T T T A C T T G T 600
 601 A G T A T A T A C C A A G A T T G A A A A T G A A G G G C G G C C 630
 631 C T G C G A A A G G G A G G G A G G C C G C T G C T C A T A A C 660
 661 A T T T A C A G C G T A G G G T G A G G C C T C C T T A A A T C 690
 691 T C C G C A T T G C G T G T T C G T A G C A C T C A T C C A 720
 721 C T T T C A C C A G G T T T A C T T C T G G T T A C T A C T 750
 751 A C G G G G C T T C T A G G G A T A C G C A A C G T T C C C C A T 780
 781 T T G C A T A T G G G T A C A G G T C C A A A A G G G A T T G A C G 810
 811 G T G T T G T G A T C C C A T T T A C G G C C T C G G G T T C C G G 840
 841 G G G G C A A C T T T G G G A T A C A T A C A A A C C T C G G G G A 870
 871 T G T A T G T G T C T G G G T T C C C T T C C T C C C G A 900
 901 G C A T A C A C C T G A T C A G G C T G A T A C T G T T 930
 931 T C T C A C A C T A A A C C C G C A A C G G C A C G A A G T C G G 960
 961 T C A C T G G T T T G G G C C T C T A C C C A C C C T T C C A 990
 991 A G G A G G G T T G C G A C G A A C C T G G G A G A C T A T G T 1020
 1021 T G A T T G A A C C C C C T C T G A G G T C T T A C A A A A C N 1050
 1051 T T G G A T G C C C C G T T G T C T T G A C A C T T T G A C 1080
 1081 A G C G A A G T T T G A C C C C N N C C C G A G N T T G T T G 1110
 1111 C G N C N T C A N N A N A C N T G T T C T A T A T G G A A A 1140
 1141 C T C C A T A A C T A C A T G G G A C T A C A C C C G A T G A T 1170
 1171 G A G T G C A T G A C C G G A G T T T C A C C C G A A G G G G C A G 1200
 1201 G G T C A G G C G C A T G A G G A G A A C A G T T C C T G G G A C G 1230
 1231 T A C C G G G G G C G T C G A G G G C C A G G G G T A G C A G C A 1260
 1261 C C A G T G T A A

Fig. 21. Nucleotide sequence of *pofe* (1269bp) gene encoding the precursor form of the fibrinolytic enzyme of *P. ostreatus* mycelium. Shade indicates exons.

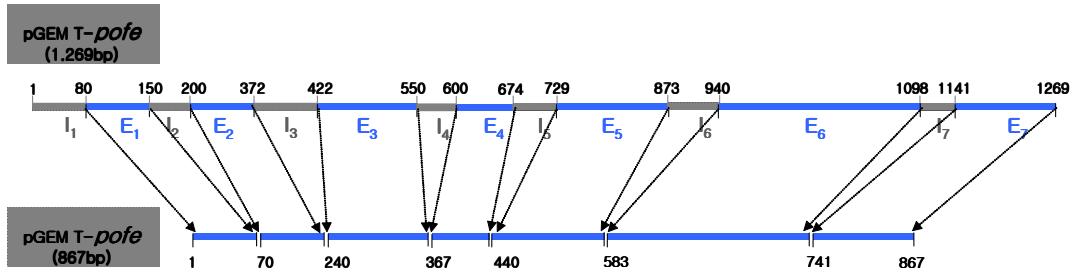


Fig. 22. Schematic representation of the structures of premature gene(pGEM T-pofe 1.269bp) and functional gene(pGEM T-pofe 867bp). Exons are indicated by filled boxes and numbered from E₁ to E₇.

1 M L R S I L L I A L S C S A Y 15
 1 A T G T T G C G C T C C A T C C T G T T A A T T G C A C T C T C C T G C T C C G C C T A C 45
 16 V L G S T P R P R Q R V C G S 30
 46 G T G C T G G G G A G C A C A C C C A G A C C C A G G C A A A G G G T T T G C G G G T C G 90
 31 Q P S Q E S V Q R A E A H F D 45
 91 C A A C C A A G C C A A G A A A G T G T C C A A A G G G C G G A G G C C C A T T T G A C 135
 46 G L R S N V S L K K E S S F T 60
 136 G G C C T T A G A A G C A A C G T C A G C C T G A A A A A A G A G A G T T C T T T C A C C 180
 61 V A V H W H V V S Q N S T V R 75
 181 G T C G C A G T G C A C T G G C A T G T C G T C A G C C A G A A T T C C A C G G T C C G T 225
 76 G G N I P D S Q I T D Q I Q V 90
 226 G G C G G G A A C A T C C C C G A T T C C C A A A T T A C G G A C C A A T C C A A G T C 270
 91 L N D A Y A Y S G F S F E L A 105
 271 T T G A A T G A C G C G T A C G C G T A C T C G G G C T T T C A T T T G A A C T T G C A 315
 106 S T T R T V N A T W F G K A E 120
 316 A G T A C C A C A C G T A C G C T C A A C G C T A C A T G G T T T G G C A A G G C C G A A 360
 121 P E S I Y Q D E M K A A L R K 135
 361 C C G G A G A G T A T A T A C C A A G A T G A A A T G A A G G C G G C C T G C G A A A G 405
 136 G G A G G A G C C G C T G C T C T A A A C A T T T A C A G C G T A G G G T T T A C T T C T 450
 151 G Y Y Y G L L G Y A T F P F A 165
 451 G G T T A C T A C T A C G G G C T T C T A G G A T A C G C A A C G T T C C C A T T T G C A 495
 166 Y G Y S P K D D G V V I H Y A 180
 496 T A T G G G T A C A G T C C A A A G G A T G A C G G T G T T G T G A T C C A T T A C G C C 540
 181 S V P G G N L D T Y N L G M T 195
 541 T C G G T T C C G G G G G C A A C T T G G A T A C A T A C A A C C T C G G G A T G A C C 585
 196 A T H E V G H W F G L Y H T F 210
 586 G C A A C G C A C G A A G T C G G T C A C T G G T T T G G C C T C T A C C A C A C C T T C 630
 211 Q G G C D E P G D Y V D E P P 225
 631 C A A G G A G G T T G C G A C G A A C C T G G A G A C T A T G T T G A T G A A C C C C C T 675
 226 L S L T K L W M P R C L D T L 240
 676 C T G A G T C T T A C A A A A C T T T G G A T G C C C C G T T G T C T T G A C A C T T T G 720
 241 T A K F D P I H N Y M D Y T D 255
 721 A C A G C G A A G T T T G A C C C C A T C C A T A A C T A C A T G G A C T A C A C C G A T 765
 256 D E C M T E F T E G Q G Q R M 270
 766 G A T G A G T G C A T G A C C G A G T T C A C C G A A G G G C A G G G T C A G C G C A T G 810
 271 R E Q S W T Y R G V E A R V A 285
 811 A G A G A A C A G T C C T G G A C G T A C C G G G G C G T C G A G G C C A G G G T A G C A 855
 286 A P V
 856 G C A C C A G T G T A A

Fig. 23. Nucleotide sequence of the PoFE cDNA and the deduced amino acid sequence.

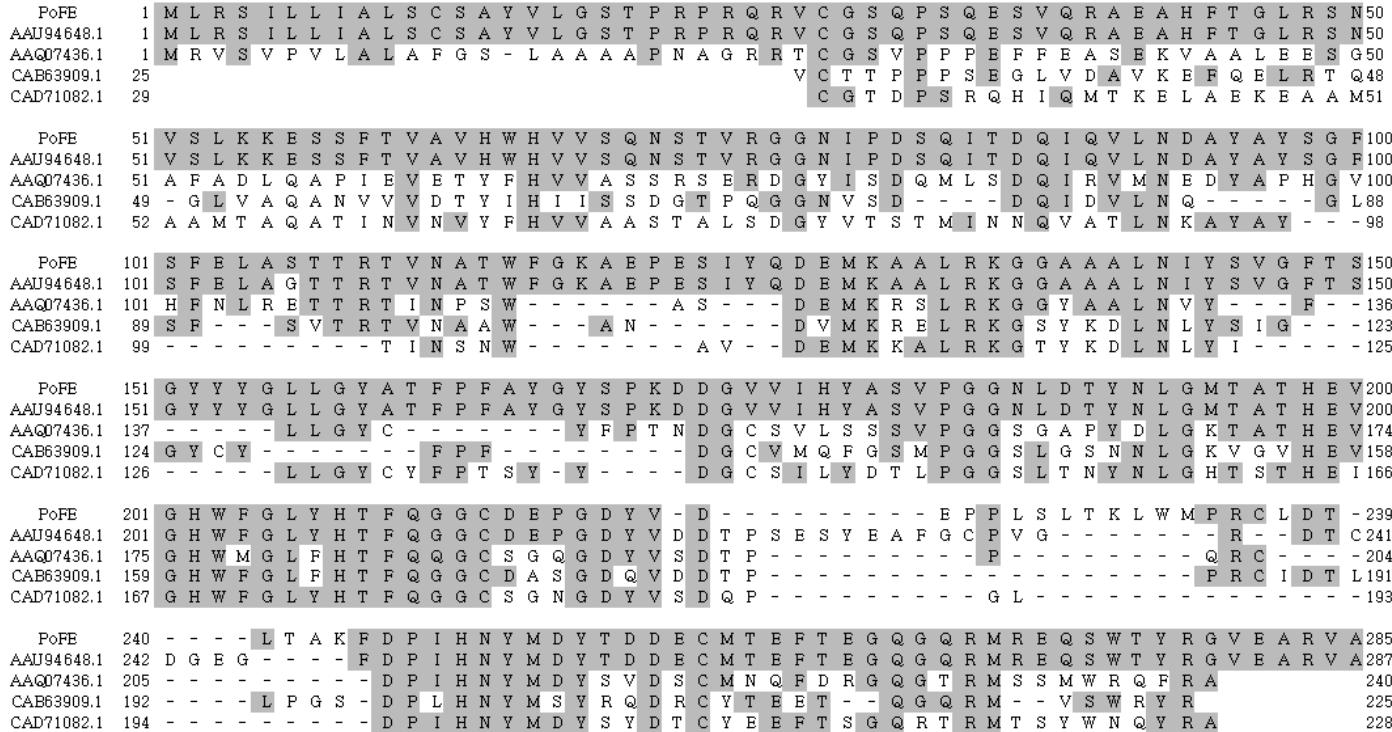


Fig. 24. Multiple alignment of the full length metalloprotease sequences from *P. ostreatus* mycelium(PoFE), *P. ostreatus* fruiting body (AAU94648.1), *Coccidioides posadasii* (AAQ07436.1), *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* (CAB63909.1) and *Neurospora crassa* (CAD71082.1). The shade is 100% sequence identity. The alignment is generated using clustalx software.

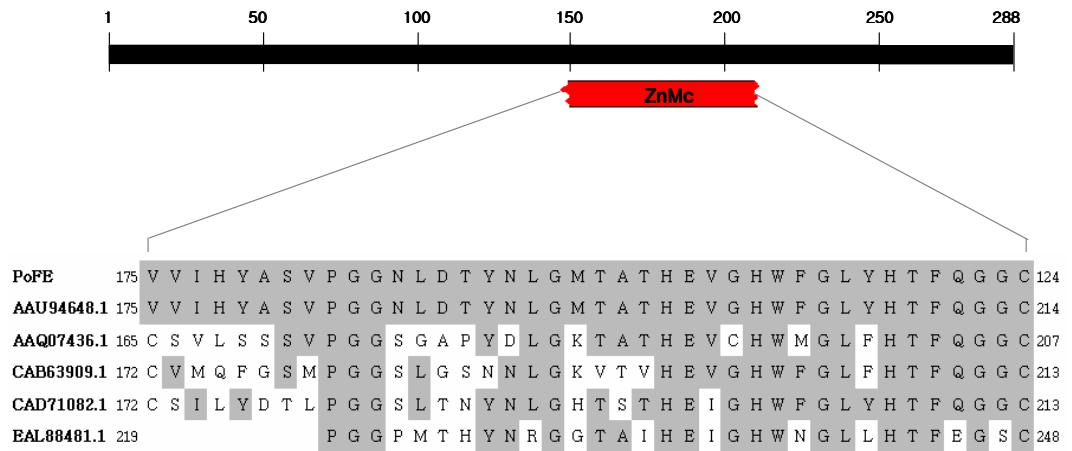


Fig. 25. Multiple alignment of the Zinc binding domain sequences from *P. ostreatus* mycelium(PoFE), *P. ostreatus* fruiting body(AAU94648.1), *Coccidioides posadasii* (AAQ07436.1), *Metarrhizium anisopliae* var. *anisopliae* (CAB63909.1) and *Neurospora crassa* (CAD71082.1). The conserved region is indicated by the shade.

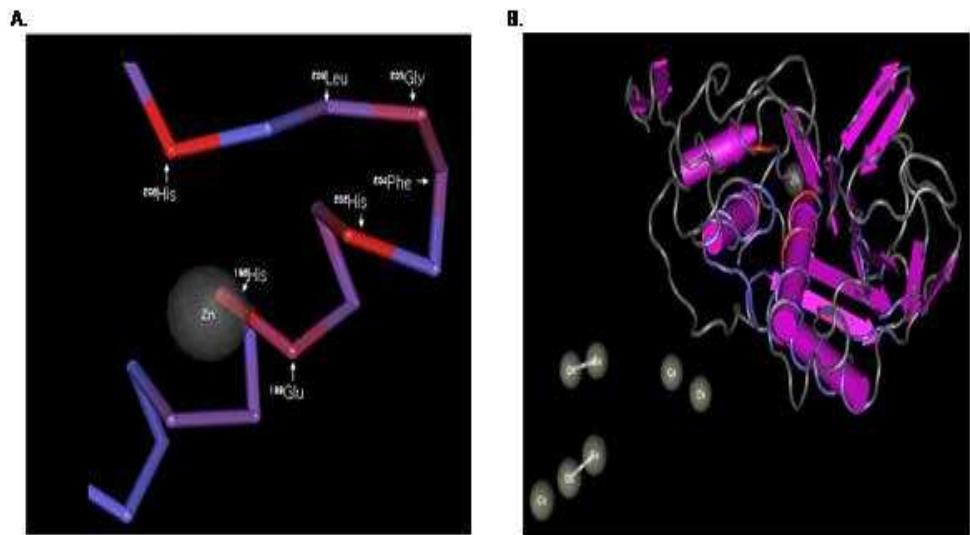


Fig. 26. The Zn binding domain of PoFE purified from *P. ostreatus* mycelium.

A, Tube diagram of Zn biding domain (HEXXHXUGUXH); B, Ribbon diagram of normal metalloprotease which need 7 Ca^{2+} ions. Above diagrams were created by using Cn3D programme in NCBI.

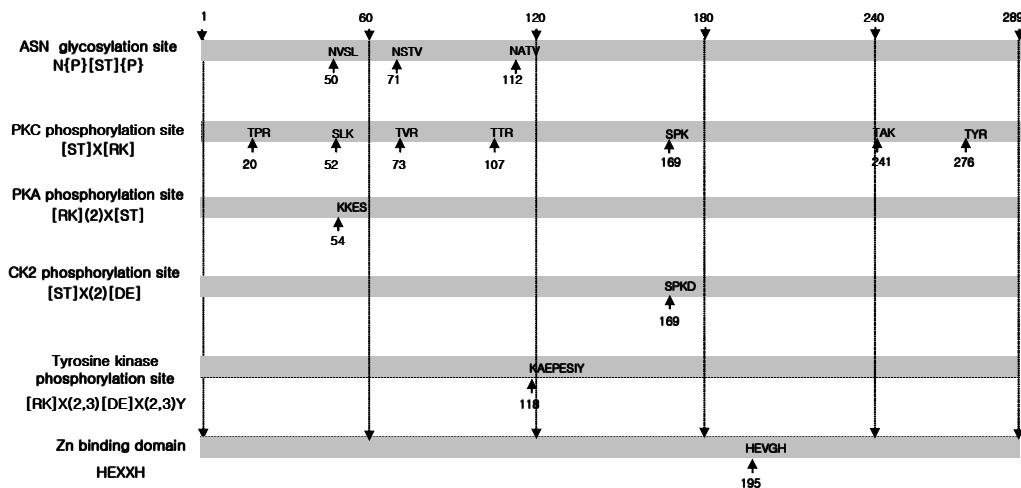


Fig. 27. The structural analysis of PoFE sequence by using Gene runner programme. The motif of N-glycosylation site(N{P}{ST}{P}), The motif of protein kinase C phosphorylation site (ST]X[RK]), The motif of cAMP-and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation site ([RK](2)X[ST]), The motif of casein kinase II phosphorylation site ([ST]X(2)[DE]), The motif of Tyrosine kinase phosphorylation site ([RK]X(2,3)[DE]X(2,3)Y) and the Zn binding domain (HEXXH) site are included.

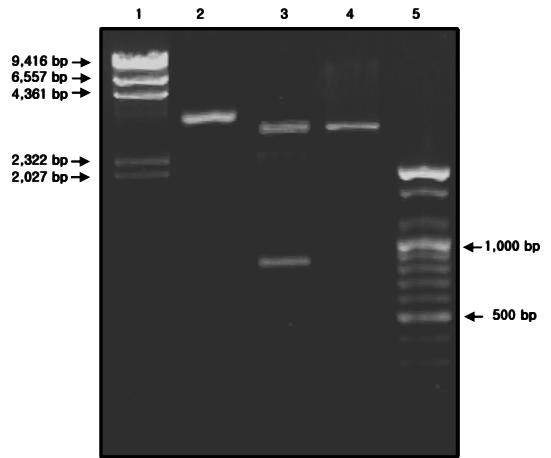


Fig. 28. Construction of expression vector pQE30-*pofe*. The mature form of *pofe* (867bp) was cloned into pQE30 expression vector. The constructed pQE30-*pofe* were resolved by electrophoresis on 0.8% agarose gel and then visualized by EtBr staining of the gel. Lane 1: λ /Hind III DNA marker; lane 2: pQE30-*pofe*/Hind III; lane 3: pQE30-*pofe*/Hind III+*Bam*HI; lane 4: pQE30 vector/Hind III; lane 5: 100bp ladder DNA marker.

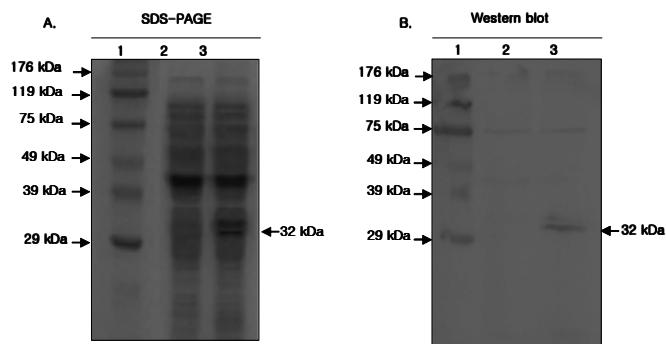


Fig. 29. Induction of recombinant PoFE in *E. coli* M15 (pREP4) strain.

A, SDS-PAGE analysis of PoFE protein expression. B, Western blot analysis of PoFE protein expression. Lane 1: Protein standard marker; Lane 2: Protein sample from recombinant *E.coli* without treatment of IPTG; Lane 3: Protein sample from recombinant *E.coli* after treatment of IPTG for induce the PoFE.

IV 고찰

생체내의 혈관계가 손상을 받게 되면 혈액은 응고현상을 일으켜 자혈되며, 이 과정에서 생성된 혈전은 체내의 혈전분해 기작에 의해 분해된다. 이와 같은 혈액중의 응고-분해계는 효소의 작용에 의해 균형을 이루고 있는데 이 균형이 깨지게 되어 혈전의 분해 기능이 저하되면 이로 인해 여러 가지 증상이 유발된다. 최근 서구화된 식문화와 노령인구의 증가로 인해 성인병 발생이 많아지고 있으며 그중 심혈관계 질환이 사망원인의 다수를 차지하고 있다. 따라서 혈관장애의 주된 요인인 혈전의 분해에 대한 연구가 활발히 진행되어지고 있다^[63].

현재까지 많이 사용되고 있는 혈전용해제로는 SK, UK, t-PA등이 있다. 하지만 이러한 혈전용해제는 다양한 부작용과 더불어 체내 혈전형성 예방에 사용하기에는 너무 높은 고가의 의약품으로 치료제로만 사용이 제한되어져 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위하여 최근에는 식품의 섭취를 통해 뇌졸증, 심근경색, 혈전증등을 미연에 방지하거나 개선시킬 수 있는 새로운 혈전용해제 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^[64,65].

버섯은 다양한 성분을 함유하고 있어 예로부터 식용과 약용으로 널리 이용되어 왔다. 최근에는 버섯이 혈관계질환 원인의 하나인 혈전을 분해하는 성분도 함유하고 있는 것으로 나타나 혈관계질환의 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 알려졌다^[23,58]. 따라서 버섯의 자실체 및 균사체로부터 혈전에 대한 선택성이 크고 fibrin 분해활성이 높은 새로운 혈전분해물질을 탐색하는 연구가 많이 진행되어 오고 있다. 본 연구에서는 경제성 있는 대량 액체배양이 가능하고 부작용을 최소화할수 있는 약용 및 식용버섯인 느타리버섯 균사체로부터 혈전분해효소를 정제하고 이에 대한 특성을 분석하였다.

느타리버섯 균사체의 혈전분해효소는 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography, Sephadex G-75를 이용한 gel-filtration, HiLoad

Superdex 75를 이용한 FPLC등의 정제과정을 거쳐 분리정제한 결과 혈전분해효소의 비활성은 1053unit/mg으로 조추출물에 비하여 876배 증가하였으며 수율은 6.5%로 나타났다. 또한 FPLC에서 얻은 활성분획을 SDS-PAGE와 fibrin zymography를 수행하여 하나의 polypeptide로 이루어진 단일 단백질임을 알 수 있었으며 분자량을 분석한 결과 약 32kDa으로서 size-exclusion 결과와 동일한 것으로 확인되어 느타리버섯 자실체부터 분리정제된 PoMTP와 분자량이 동일함을 알 수 있었다. 정제된 혈전분해효소를 N-말단 아미노산 서열을 분석한 결과 ALRKGGAAALNI YSVGFTS의 아미노산 서열을 확인하였으며, 이를 NCBI protein blast를 이용하여 분석하였다. 그 결과 혈전분해효소는 Joh^[53] 등에 의해 보고되어진 느타리버섯 자실체로부터 분리정제된 metalloprotease와 비교할 때 89%의 상동성을 나타내었으며 또한 *Coccidioides posadasii*^[54]로부터 분리된 metalloprotease와는 41%의 유사한 서열을 가지고 있는 것으로 나타났다.

느타리버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소의 특성을 조사하기 위하여 온도, pH, 금속이온 및 단백질분해효소 저해제, chromogenic substrate를 이용하여 그 특이성을 분석하였다. 효소의 열안정성을 알아본 결과 정제된 혈전분해효소는 35°C에서 최적활성을 나타냈는 바 이는 Lee^[19] 등이 보고한 *A. mellea*의 혈전분해효소가 33°C에서 최적활성을 나타낸 것과 유사하며, 미생물로부터 분리정제된 혈전분해효소^[17]와 할미송이버섯(*Tricholoma saponaceum*)^[31]으로부터 분리정제된 혈전분해효소가 50~60°C에서 최적활성을 나타내고 있는 결과와는 차이를 나타내고 있다. 따라서 이러한 결과는 느타리버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 인체투여시 온도측면에서 안정적인 효소활성을 나타낼 것으로 생각된다. 또한 효소활성에 대한 pH의 영향을 확인한 결과 pH 6.5에서 최적활성을 나타내었으며 이는 대부분 버섯에서 추출한 혈전분해효소가 산성 또는 중성에서 안정하다는 결과와 일치하였다^[19,20].

여러 가지 금속이온 및 단백질 저해제에 대한 영향을 조사한 결과 Mg^{2+} , Ca^{2+} 및 Zn^{2+} 에 의해 활성이 증가됨을 확인하였고 EDTA에 의해 활성이 저하됨에 따라 분리정제된 혈전분해효소는 metalloprotease로 추정된다. 이와 같은 결과는 Nonaka^[55]등에 의해 보고되어진 느타리버섯 자실체로부터 분리정제된 혈전분해효소가 metalloprotease라는 사실과 일치하였다. 이외에도 느타리버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 금속이온 및 단백질 저해제에 대하여 뽕나무버섯 (*Armillaria mellea*)^[19], 잎새버섯 (*Grifola frondosa*)^[56], 할미송이버섯 (*Tricholoma saponaceum*)^[58] 등 버섯으로부터 분리정제된 metalloprotease 계열의 혈전분해효소와 매우 유사한 특성을 나타냄을 알 수 있었고 Zn^{2+} binding domain (HEXXH)을 가지고 있음을 확인하였다.

효소의 기질특이성을 조사한 결과 chymotrypsin에 대한 substrate인 S2586에 대하여 가장 높은 특이성을 나타냄에 따라 분리정제된 혈전분해효소는 chymotrypsin 계열의 단백질분해효소임을 알 수 있으며 이는 *A. mellea*^[19]의 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소의 기질특이성과 일치하였다. 혈전분해효소의 fibrinogenolysis를 분석한 결과 정제된 혈전분해효소는 반응 5분 이내에 $A\alpha$, $B\beta$ chain을 완전히 분해하였으며 γ chain은 반응 후 30분부터 분해가 시작되었는데 이는 fibrinogen을 $A\alpha$, $B\beta$ 및 γ chain 순으로 분해하는 plasmin과는 다른 분해양상을 보여주었다^[66]. 이러한 결과는 γ chain이 $A\alpha$, $B\beta$ chain에 비하여 상대적으로 혈전분해효소에 대한 저항성을 가지고 있는 것으로 판명되며 또한 이러한 결과는 느타리버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소가 fibrin의 전구체인 fibrinogen을 분해시켜 체내 혈전형성 예방효과를 가지고 있음을 시사하였다. fibrinolysis를 확인한 결과 느타리버섯 균사체로부터 분리정제된 혈전분해효소는 α chain과 $\gamma-\gamma$ chain, β chain 순으로 fibrin을 분해하여 plasmin 분해패턴과 다른 양상을 보였으며 반응 후 5분부터 fibrin이 분해되어 짐에 따라 급성혈전성질환 치료제로서의 사용가능성을 시사하였다. 따라서 위의 결과를 종합하여 볼 때 느타리버섯 균사체로

부터 분리정제된 혈전분해효소는 fibrin 및 fibrinogen에 대하여 직접적인 혈전분해특이성을 가지고 있으며, 자실체보다 균사체는 매우 경제적으로 대량 액체배양이 가능하기 때문에 본 연구의 목적인 경제적이고 부작용을 최소화할 수 있는 혈전분해효소의 대량생산이 가능 하리라 사료되어 진다. 하지만 인체에 사용할 목적을 위해서는 향후 정제된 혈전분해효소에 대한 다양한 임상실험이 필요하다.

최근에 생명공학기술의 도입으로 여러 가지 단백질들이 대량 생산되고 있다. 현재 임상에서 사용되고 있는 혈전분해제들의 문제점들을 해결하기 위하여 bacteria 또는 yeast를 이용하여 지령이^[68], Douchi^[67,69], 된장^[41] 등으로부터 혈전분해효소를 cloning하고 expression한 논문이 많이 발표되고 있다. 본 연구에서는 느타리버섯의 균사체로부터 혈전분해효소 유전자를 크로닝하여 발현시켰다. 느타리버섯 균사체를 배양하여 total RNA를 분리하여 RT-PCR를 수행하였을 때 약 1.2Kb, 860bp의 PCR product를 확인하여 각각 pGEM T vector에 ligation하여 DNA sequence를 확인한 결과 1.2Kb의 DNA는 intron을 함유한 premature mRNA임을 알수 있었다. Kim^[70]등의 연구에 의하면 *Cordyceps militaris* 균사체 배양 후 자실체를 배양하기 위하여 25°C에서 18°C로 온도변환시 혈전분해효소가 분비되어 진다는 보고에 따라 느타리버섯 균사체의 배양조건을 18°C로 온도변환시 mature form과 premature form이 동시에 확인되어짐에 따라 균사체에서 자실체로 변환 시 온도변화에 따른 alternative splicing에 의한 결과라고 사료되어진다. 하지만 이는 Joh^[53]등에 의하여 보고된 metalloprotease의 유전자가 균사체보다 자실체에서 선택적으로 더 많이 발현된다는 결과와는 다르다. pGEM T-pofe (867bp)의 염기서열을 분석한 결과 288개의 아미노산서열임을 확인 할 수 있었으며 이를 NCBI blast를 이용하여 구조분석을 진행하였다. 느타리버섯 균사체의 혈전분해효소 유전자로부터 유추된 아미노산 서열에는 zinc²⁺ binding domain을 가지고 있으며 또한 Zn²⁺ binding domain 주위에 7개의 Ca²⁺분자가 결합 할 수 있는 구조로 밝혀졌다. 혈전분해효소의 활성에 대한 금속이온의 영향에서 나타난

바와 같이 Ca^{2+} 과 Zn^{2+} 에 의해 효소활성이 증가되는 것은 이러한 구조적 특징에 의해 결정되었을 것으로 사료된다. 이외에도 glycosylation site 및 다양한 phosphorylation site가 존재하고 있음을 확인하였다. 크로닝한 *pofe* 유전자를 *E.coli* M15 숙주세포에서 발현을 유도한 결과 32KDa 크기의 단백질이 확인되었으며 또한 western blot으로도 확인되었다. 발현 단백질의 활성은 fibrin agarose plate로 측정하였으나 활성이 나타나지 않았다. 본 연구에서는 진핵세포의 유전자를 원핵생물로 형질전환 시킴에 따라 post translational modification system의 차이로 protein conformation을 취하지 못함에 따라 혈전분해활성을 나타내지 못한 것으로 추정된다. 따라서 이러한 processing에 의한 conformation을 구성할 수 있는 post translation 및 host 특이성이 중요할 것으로 사료된다. 향후 이러한 post translational modification을 위해서는 yeast vector 및 yeast cell로의 electrophorition에 의한 형질전환 및 발현 유도가 필요하리라 사료되어진다.

V 적 요

현대사회의 식문화의 서구화와 노령인구의 증가에 따라 심혈관계 질환으로 사망하는 인구수가 점차 증가하고 있다. 이러한 심혈관계질환의 주요원인 중 하나인 혈전은 혈액내에서 blood cascade mechanism에 의해 활성화된 thrombin에 의하여 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 생성된다. 이러한 혈전은 plasminogen activator에 의하여 활성화된 plasmin에 의해 용해되어 혈관의 혈액은 다시 정상상태를 유지하게 된다. 그러나 혈전이 과도하게 축적되거나 혈전의 용해작용이 원활하지 못할 경우에는 생성된 혈전이 혈류를 따라 이동하면서 뇌경색, 뇌출혈, 고혈압, 심근경색과 같은 심혈관계질환을 일으킨다. 이러한 혈전에 의한 성인병을 치료하기 위하여 최근에는 여러 가지 천연물질로부터 혈전분해활성을 가지는 물질을 분리정제하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

본 연구에서는 느타리버섯 균사체로부터 혈전분해효소를 분리정제하여 그 특성을 연구하였다. 느타리버섯 균사체로부터 혈전분해효소를 분리정제하기 위하여 ion-exchange chromatography, gel-filtration chromatography와 FPLC를 수행하여 876배의 활성을 나타내는 효소를 정제하였으며 회수율은 6.5%였다. 정제된 효소의 분자량은 32KDa이었으며 N-말단 아미노산서열을 확인한 결과 ALRKGGAAALNIYSVGFTS로서 느타리버섯 자실체로부터 분리된 metalloprotease와 높은 상동성을 나타내었다. 정제된 혈전분해효소의 특성을 연구한 결과, 최적온도는 35°C, 최적 pH는 6.5로서 약산성과 중성사이에서 안정한 활성을 나타내었다. 정제된 혈전분해효소는 fibrinogen의 A α , B β chain을 5분 이내에 분해하는 반면 γ chain은 느린 반응을 보였다. 또한 fibrin에 대해 α chain은 빠르게 분해하였으나 β , γ chain은 상대적으로 느린 반응을 나타내었다. 이러한 결과는 인체 투여시 pH와 온도 측면에서 안정적인 효소활성을 나타낼 것으로 사료되고, 혈전형성 억제 및 분해능을 가진 특이적인 기능성식품의 재료로 적합할 것으로 예상되어 진다. 금속이온인 Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺

등에 의해 활성이 14~22% 증가하였으며 EDTA에 의해 활성이 48% 감소되는 것으로 보아 metalloprotease인 것으로 확인되었으며 또한 S-2586에서 가장 높은 기질특이성을 나타낸 것으로 chymotrypsin계열의 효소임을 알 수 있었다.

느타리버섯 균사체로부터 혈전분해효소유전자를 크로닝하여 염기서열을 분석한 결과 이 유전자는 867bp의 염기서열을 가지고 있었으며 288개의 아미노산으로 구성된 32KDa 크기의 단백질로 발현됨을 확인하였다. 유추된 아미노산서열에 근거하여 NCBI blast에서 검색한 결과 느타리버섯 자실체로부터 분리한 metalloprotease와 89%의 상동성을 나타내었으며 또한 zinc binding domain 구조를 가지고 있음을 확인하였다. IPTG로 *pofe* 유전자를 *E.coli* M15 숙주세포에서 발현을 유도한 결과 32KDa 크기의 혈전분해효소가 제대로 발현되었고 western blot으로도 확인되었다. fibrin agarose plate를 이용하여 발현된 단백질의 활성을 조사하였지만 활성이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 본 연구에서 진핵 세포의 유전자를 원핵생물로 형질전환시킴에 따라 post translational modification system의 차이로 protein conformation을 취하지 못함에 따라 혈전분해활성을 나타내지 못한 것으로 추정된다. 따라서 향후 이러한 post translational modification을 위해서는 yeast vector 및 yeast cell로의 electrophoration에 의한 형질전환 및 발현 유도가 필요하리라 사료되어진다.

VI 참고문헌

1. D. Voet and J. G. Voet, Biochemistry, John Wiley & Sons, New York, 1990, 1087-1095.
2. Y. Mine, A. H. K. Wong, B. Jiang, Fibrinolytic enzyme in Asian traditional fermented foods, *Food Research International*, **38**:243-250, 2005.
3. H. Sumi, H. Hamada, K. Nakanishi, H. Hiratani, Enhancement of the fibrinolytic activity in plasma by oral administration of nattokinase, *Acta Haematologica*, **84**: 139-143, 1990.
4. M. Fujita, K. Hong, Y. Ito, R. Fujii, K. Kariya, S. Nishimuro, Thrombolytic effect of nattokinase on a chemically induced thrombosis model in rat, *Biological & pharmaceutical bulletin*, **18**: 1387-1391, 1995.
5. 생물학정보센터, 항혈전제의 세계시장 및 전망, 2002, 5-6.
6. H. Sumi, H. Hamada, H. Tsushima, H. Mihara and H. Muraki, A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet, *Experientia*, **43**: 1110–1111, 1987.
7. M. Fujita, K. Nomura, K. Hong, Y. Ito, A. Asada and S. Nishimuro, Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **197**: 1340–1347, 1993.
8. Y. T. Kim, W. K. Kim, and H. I. Oh, Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from ChungKookJang. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **23**: 1-5, 1995.
9. W. Kim, K. Choi and Y. Kim, Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. Strain CK 11-4 screened

- from Chungkook-Jang, Applied and Environmental Microbiology, **62**: 2482–2488, 1996.
10. W. Kim, N. S. Choi, W. Y. Lee, J. W. Lee and D. H. Kim, Isolation of *Bacillus* strains secreting fibrinolytic enzymes from *Doen-Jang*, Korean Journal of Microbiology, **34**: 87-90, 1998.
 11. K. W. Hyun, J. S. Lee, J. H. Ham, and S. Y. Choi, Isolation and identification of microorganism with potent fibrinolytic activity from Korean traditional *Deonjang*, Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, **33**: 24-28, 2005.
 12. S. H. Kim and N. S. Choi, Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from *Doen-Jang*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **64**: 1722–1725, 2000.
 13. H. K. Kim, G. T. Kim, D. K. Kim at al, Purification and characterization of novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish, Journal of Fermentation and Bioengineering, **84**: 307-312, 1997.
 14. S. A. Jang, M. H. Kim, M. S. Lee, T. K. Oh and C. B. Sohn, Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus* sp. S19 from shrimp, Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology, **28**: 258-263, 2000.
 15. A. H. K. Wong and Y. Mine, A novel fibrinolytic enzyme in fermented shrimp paste. A traditional Asian fermented seasoning, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **52**: 980–986, 2004.
 16. K. A. Noh, D. H. Kim, N. S. Choi, and S. H. Kim, Isolation of fibrinolytic enzyme producing strains from *kimchi*, Korean Journal of Food Science and Technology, **31**: 219-223, 1999.
 17. Y. Peng, Q. Huang, R.H. Zhang and Y.Z. Zhang, Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus*

- amyloliquefaciens* DC-4 screened from *douchi*, a traditional Chinese soybean food, Comparative Biochemistry and Physiology part B: Biochemistry and Molecular Biology, **134**: 45–52, 2003.
- 18. Y. Peng, Y. Z. Zhang, Isolation and characterization of fibrinolytic enzyme producing strain DC-4 from Chinese douchi and primary analysis of the enzyme property, Chin High Technology Letters, **12**: 30-33, 2002.
 - 19. S. Y. Lee, J. S. Kim, J. E. Kim, K. Sapkota, M. H. Shen, S. Kim, H. S. Chun, J. C. Yoo, H. S. Choi, M. K. Kim, S. J. Kim, Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*, Protein Expression and Purification, **43**: 10-17, 2005.
 - 20. J. H. Kim and Y. S. Kim. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from *Armillaria mellea*, Korean Journal of Mycology, **26**: 583-588, 1998.
 - 21. J. H. Kim, K. H. Yoo, S. J. Seok and Y. S. Kim, Screening of fibrinolytic activities of extracts from wild mushrooms collected in Mt. Chigap of Korea, Korean Journal of Mycology, **33**: 18-21, 2005.
 - 22. J. H. Lee, J. L. Yang, C. S. Jung, H. S. Kim and J. S. Cho, Isolation and purification of fibrinolytic enzyme of edible mushroom, *Sarcodon aspratus* (Berk.) S. Ito, Korean Journal of Life Science, **11**: 561-567, 2001.
 - 23. J. S. Lee, H. S. Baik and S. S. Park, Optimal production and characterization of fibrinolytic enzyme from *Fomitella fraxinea* mycelia, Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, **30**: 325-331, 2002.
 - 24. N. Nakajima, H. Mihara and H. Sumi, Characterization of potent fibrinolytic enzyme in earthworm *Lumbricus rubellus*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **57**: 1726-1730, 1993.
 - 25. N. Nakajima, M. Sugimoto and K. Ishihara, Earthworm serine protease:

- characterization, molecular cloning, and application of the catalytic functions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **23**: 191-212, 2003.
- 26. H. Sumi, N. Nakajima and H. Mihara, A very stable and potent fibrinolytic enzyme found in earthworm *Lumbricus rubellus* autolysate, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **106**: 763-766, 1993.
 - 27. H. J. Kim, J. T. Bae, J. W. Lee at al, Antioxidant Activity and Inhibitive Effects on Human Leukemia Cells of Edible Mushrooms Extracts, *Korean Journal of Food Preservation*, **12**: 80-85, 2005.
 - 28. K. M. Lo and Peter C. K. Cheung, Antioxidant activity of extracts from the fruiting bodies of *Agrocybe aegerita* var. *alba*, *Food chemistry*, **89**: 533-539, 2005.
 - 29. L. M. Cheung, Peter C. K. Cheung and Vincent E. C. Ooi, Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts, *Food chemistry*, **81**: 249-255, 2003.
 - 30. M. Ye, J. K. Liu, Z. X. Lu, Y. Zhao, S. F. Liu, L. L. Li, M. Tan, X. X. Weng, W. Li and Y. Cao Grifolin, a potential antitumor natural product from the mushroom *Albatrellus confluens*, inhibits tumor cell growth by inducing apoptosis in vitro, *FEBS Letters*, **579**: 3437-3443, 2005.
 - 31. P. Yoshioka, T. Ikikawa, M. Noda and F. Fukuoka, Studies on antitumor activity of some fraction from Basidiomycete I, An antitumor acidic polysaccharide fraction from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel, *Chemical & pharmaceutical bulletin*, **20**: 1175-1180, 1972.
 - 32. H. I. Kang, J. Y. Kim, K. D. Moon at al, Effect of the crude polysaccharide of *Pleurotus eryngii* on the activation of immune cell, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **33**: 1092-1097, 2004.

33. M. H. Kweon, S. T. Kwon, S. H. Kwon, M. S. Ma, Y.I. Park, Lowering Effects in Plasma Cholesterol and Body Weight by Mycelial Extracts of Two Mushrooms: *Agaricus blazai* and *Lentinus edodes*, Korean Journal of Microbiology and Biotechnology, **30**: 402-409, 2002.
34. J. H. Kim and Y.S. Kim, A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **63**: 2130–2136, 1999.
35. I. C. Jung, J. S. Lee, Antioxidative Effect of Mycelium-free Culture Broth Extracts of *Pleurotus ostreatus*, Journal of Korean Society for Hygenic Science, **5**: 19-24, 1999.
36. P. Yoshioka, T. Ikikawa, M. Noda, and F. Fukuoka, Studies on antitumor activity of some fraction from Basidiomycete I, An antitumor acidic polysaccharide fraction from *Pleurotus ostreatus* (Fr.) Quel.Chem, Bull, **20**: 1175-1180, 1972.
37. H. X. Wang, J. Q. Gao and T. B. Ng, A New Lectin with Highly Potent Antihepatoma and Antisarcoma Activities from the Oyster Mushroom *Pleurotus Ostreatus* , Biochemical and Biophysical Research Communications, **275**: 810-816, 2000.
38. P. Bobek, L. Ozdín and S. Galbavý, Dose and Time Dependent Hypocholesterolemic Effect of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Rats, Nutrition, **14**: 282-286, 1998.
39. S. T. Chang and P. G. Miles, Mushroom Science in “Edible mushroom and their cultivation”, CRC press, Inc., 3-25,1989.
40. H. S. Choi and H. H. Shin. Purification and partial characterization of a fibrinolytic protease in *Pleurotus ostreatus*, Mycologia, **90**: 674-679, 1998.
41. N. S. Choi, K. T. Chang, P. J. Maeng and S. H. Kim, Cloning, expression, and fibrin (ogen)olytic properties of a subtilisin DJ-4 gene from *Bacillus*

- sp. DJ-4 , FEMS Microbiology Letters, **236**: 325-331, 2004.
42. Y. Hu, X. L. Meng, J.P. Xu, W. Lu and J. Wang, Cloning and expression of earthworm fibrinolytic enzyme PM₂₄₆ in *Pichia pastoris*, Protein Expression and Purification, **43**: 18-25, 2005.
43. T. Ge, Z. J. Sun, S. H. Fu and G. D. Liang, Cloning of thrombolytic enzyme (lumbrokinase) from earthworm and its expression in the yeast *Pichia pastoris*, Protein Expression and Purification, **42**: 20-28, 2005.
44. R. L. Hu, S.F. Zhang, H. Y. Liang, N. Li and C.C. Tu, Codon optimization, expression, and characterization of recombinant lumbrokinase in goat milk, Protein Expression and Purification, **37**: 83-88, 2004.
45. Y. Peng, X. J. Yang, L. Xiao and Y. Z. Zhang, Cloning and expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) gene from *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 in *Bacillus subtilis*, Research in Microbiology, **155**: 167-173, 2004.
46. Astrup and S. Mullertz, The fibrin plate method for estimating of fibrinolytic activity, Archives of biochemistry and biophysics, **40**: 346-351, 1952.
47. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Frarr et al, Protein measurement with the folin phenol reagent, The Journal of Biological Chemistry, **193**: 265-275, 1951.
48. L. M. Patton, D. Pretzer, B. S. Schulteis, B. S. Saggart, K. D. Tenant and N. K. Ahmed, Activity assay for characterizing the thrombolytic protein fibrolase, Journal of biochemical and biophysical methods, **27**: 11-23, 1993.
49. U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄, Nature, **227**: 680-685, 1970.
50. S. H. Kim, N. S. Choi, W. Y. Lee, Fibrin zymography: a direct analysis of fibrinolytic proteases on gels, Analytical Biochemistry, **263**: 115-116,

1998.

51. G. Datta, A. Dong, J. Witt and A.T. Tu, Biochemical characterization of basilase, a fibrinolytic protease from *Crotalus basiliscus basiliscus*, Archives of biochemistry and biophysics, **317**: 365–373, 1995.
52. K. Matsubara, K. Hori, Y. Matsuura, K. Miyazawa, Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme and identification of fibrinogen clotting enzyme in a marine green alga, *Codium divaricatum*, Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology, **125**: 137-43, 2000.
53. J. H. Joh, B. G. Kim, W. S. Kong at al, Clong and developmental expression of metzincin family metalloprotease cDNA from oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*, Microbiology Letters, **236**: 325-331, 2004.
54. Ch. Y. Hung, K. R. Seshan, J. J. Yu at al, A Metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* Contributes to Evasion of Host Detection, Infection and Immunity, **73**: 6689-6703, 2005.
55. T. Nonaka, N. Dohmae, Y. Hashimoto and K. Takio, Amino acid sequences of metalloendopeptidases specific for acyl-lysine bonds from *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies, Journal of Biochemistry, **272**: 30032-30039, 1997.
56. T. Nonaka, H. Ishikawa, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, N. Dohmae, Characterization of a thermostable lysine-specific metalloendopeptidase from the fruiting bodies of a basidiomycete *Grifola frondosa*, Journal of Biochemistry, **118**: 1014-1020, 1995.
57. J. H. Kim, Y. S. Kim, Characterization of a metalloenzyme from a wild mushroom *Tricholoma saponaceum*, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **65**: 356-362, 2001.
58. J. H. Kim, Pufification and characterization of fibrinolytic enzyme from

Tricholoma saponaceum, The Korean Journal of Mycology, **28**: 60-65, 2000.

59. T. Saito, N. Dohmae, M. Tsujimoto, K. Takio, PCR cloning and heterologous expression of cDNA encoding a peptidyl-Lys metallo-endopeptidase precursor of *Grifola frondosa*, The Journal of general and applied microbiology, **48**: 287-92, 2002.
60. T. Kato, M. Suzuki, T. Murata and E. Y. Park, The effects of N-glycosylation sites and the N-terminal region on the biological function of β 1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 2 and its secretion, Biochemical and Biophysical Research Communications, **329**: 699-705, 2005.
61. C. Keicher, S. Gambaryan, E. Schulze, K. Marcus, H. E. Meyer and E. Butt, Phosphorylation of mouse LASP-1 on threonine 156 by cAMP-and cGMP-dependent protein kinase, Biochemical and Biophysical Research Communications, **324**: 308-316, 2004.
62. F. A. Saad, E. Salih, L. Wunderlich, R. Flückiger and M. J. Glimcher, Prokaryotic expression of bone sialoprotein and identification of casein kinase II phosphorylation sites, Biochemical and Biophysical Research Communications, **333**: 443-447, 2005.
63. A. Banerjee, Y. Chisti and U. C. Banerjee, Streptokinase-a clinically useful thrombolytic agent, Biotechnology Advances, **22**: 287-307, 2004.
64. H. Sumi, N. Nakajima and C. Yatagai, A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara" a Japanese traditional fermented food, Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, **112**: 543-547, 1995
65. Y. R. Jang, W. K. Kim, I. B. Kwon and H.Y. Lee, Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Jeot-Gal, salt-fermented fish, Korean Journal of Food Science and Technology, **30**: 655-659, 1998.

66. 이미홍. 2004. 팽이버섯 균사체 배양액에서 혈전분해효소의 분리정제 및 특성분석. 조선대학교 석사학위논문.
67. R. H. Zhang, L. Xiao, Y. Peng, H. Y. Wang, F. Bai and Y. Z. Zhang, Gene expression and characteristics of a novel fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) in *Escherichia coli*, Letters in Applied Microbiology, **41**: 190-195, 2005.
68. I. H.Cho, E. S. Choi, H. H. Lee, Molecular cloning, sequencing, and expression of a fibrinolytic serine protease gene from the earthworm *Lumbricus rubellus*, Journal of biochemistry and molecular biology, **30**: 574-581, 2004.
69. L. Xiao, R. H. Zhang, Y. Peng, Y. Z. Zhang, Highly efficient gene expression of a fibrinolytic enzyme (subtilisin DFE) in *Bacillus subtilis* mediated by the promoter of alpha-amylase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*, Biotechnology Letters, **26**: 1365-1369, 2004.
70. 김성준, 2002. 밀리타리스 동충하초로부터 혈전분해효소 정제 및 생리활성분석. 농림부 연구결과보고서, GA0362-0232