P8-83

도라지(*Platycodon grandiflorum*)로부터 L-FABP 증강물질의 분리 및 특성

김동섭*, 김혜경[1], 신동훈, 홍범식, 조홍연.
고려대학교 생명공학원, [1]한서대학교 생물공학과

최근 통계청 발표에 따르면 간질환에 의한 40대 사망자는 10만명 당 41.4명으로 2위인 교통사고에 비해 38% 나 높다. 여기에 알코올 소비량과 여성 음주인구의 급격한 증가 추세에 있는 우리나라의 알코올성 간질환 중 가장 많은 비율을 차지하는 지방간은 간질환 환자의 45%를 차지하고 있으며, 환자들은 대부분 이를 잘 인식하지 못하고 있다. 알코올의 장기 섭취는 지방산의 산화를 억제하고 에스테르화를 증가시켜 지방간을 유도하여 간 조직내의 콜레스테롤 대사, 단백질 합성 및 분비 등에 영향을 미쳐 간의 기능저해를 초래한다. 지방간의 원인이 되는 비만, 지속적 음주 및 약물 복용, 당뇨 등이 교정되지 않는다면 지방간염, 간섬유화를 거쳐 간경변증으로 진행될 수 있다 현재까지 정확히 지방간을 유발시키는 단일 인자는 밝혀져 있지 않으며 다양한 요인에 의하여 발병되는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 장기간 알코올 섭취 후에 분해 대사물로 생성되는 acetealdehyde 및 acetate에 의한 지방대사의 이상 및 중성지방의 축적으로 발생되는 지방간과 이때 변화되는 L-FABP(liver fatty acid binding protein)와의 상호 연관 관계를 규명하는 것에 있다. 또한 지방간 예방 및 치료용 phytochemicals의 소재화 연구의 일환으로 200여 종의 양념채소, 서양향신료, 건강채소, 차 및 죽류 등의 재료를 대상으로 극성도에 따라 계통추출한 후 L-FABP 증강물질을 검색하였다. 검색용 *in vitro* assay계는 human liver cell line의 일종인 HepG2 2E1 LNCX2을 사용하였으며 L-FABP의 양을 ELISA방법으로 정량함으로써 알코올에 의해 감소된 L-FABP를 증가시키는 물질을 검색하였다. 총 200여 점의 extract library를 대상으로 1차 및 2차 검색 및 5주간의 *in vivo* 실험 결과, 독성이 없고 높은 L-FABP 증가를 보인 도라지 methanol 추출물을 최종 시료로 선정하였다. 도라지의 methanol 추출물을 silica gel 60 open column chromatography, Prep. TLC 및 analytical HPLC 순으로 L-FABP 증강물질을 정제하였다.

P8-84

Helicobacter pylori Arginase의 Cloning, 고발현, 정제 및 저해물질 탐색

박준태*, 신동훈, 홍범식, 조홍연.
고려대학교 생명공학원

*H. pylori*는 그람음성, 미호기성이며, 강한 운동성을 부여하는 편모를 가지고 있는 나선형의 박테리아로 사람의 위 상피세포 표면과 점막층 사이에서 colony를 형성함으로써 만성 및 급성 위염, 위·십이지장 궤양, 위암을 유발한다. 강산성인 위내에서 urease를 분비하여 urea로부터 암모니아를 생성하고 위산을 중화시킴으로써 증식하며, 감염경로는 사람의 배설물에서 입을 통해 옮겨지는 것으로 추정되고 있다. 우리나라의 경우 성인에서 약 80%의 감염률을 보이고 있는 이 균은 세계보건기구에서 1급 발암물질로 규정하고 있다. 본 연구는 *H. pylori*가 생산하는 arginase의 저해물질을 개발함으로써 *H. pylori* 질소대사 중간물질의 하나이면서 생육에 있어 필수적인 물질로 알려진 urea의 생합성을 감소시키고, 동시에 nitric oxide에 의한 균의 생육을 저해시킬 목적으로, *H. pylori* arginase 유전자를 cloning하고 고발현시킨 후 정제하였으며, 정제한 효소를 사용하여 저해물질을 해조류를 대상으로 검색하였다. *H. pylori* genomic DNA로부터 *H. pylori* arginase(rocF) gene을 PCR로 증폭시켜 얻은 products를 pET-16b vector에 cloning하였고, *E. coli* BL21-DE3에 형질전환하였다. 재조합된 *H. pylori* arginase는 표준assay계에서 매우 높은 활성을 나타내었고, host로부터 얻은 6xHis-tagged 조효소를 Ni-NTA affinity chromatography를 사용하여 1단계로 90%이상 정제하였다. 이 정제효소를 이용하여 극성도에 따라 추출한 60여종의 해조류를 대상으로 arginase 저해활성을 나타내는 물질을 검색하였다. 그 결과 갈조류군 중에서 완도 미역귀, 제주 개몸, 속초 뜸부기의 메탄올 추출물에서, 홍조류군 중에서는 부산 잔금분홍잎의 메탄올 추출물에서, 녹조류군 중에서는 광천 파래의 메탄올 추출물에서 약 55% 이상의 저해활성을 나타내었다.