

## 사람 태줄로부터 추출된 Type I Collagen의 Telopeptide 제거에 대한 분석

서 활<sup>+</sup>·안수진\*·김요숙\*\*·이하규\*\*

= Abstract =

### Analysis of Telopeptide Removal in Type I Collagen Purified From Human Umbilical Cords

Hwal Suh<sup>+</sup>, Soo-Jin Ahn\*, Yo-Sook Kim\*\*, Ha-Gyu Lee\*\*

Although collagen is still considered to be a poor immunogen, animals can produce antibodies to a number of different sites in the collagen molecule. In Type I collagen, three classes of antigenic determinants have been described those are recognized as different degrees in different species. These are essentially composed of helical, conformation-dependent antigenic determinants, and terminal, nonhelical antigenic determinants, and finally central antigenic determinants exposed only after denaturation of the collagen molecule.

To utilize collagen as implantable biomaterials, human embryonic collagen, less immunological to body, was purified from human umbilical cords and found to contain  $[a1(I)]_2, a2(I)$ . Each step of purification were observed by polarized light microscope and analyzed through SDS-PAGE. The conclusions are follows;

1. The purified collagen revealed gradual fiber indenties on each step of purification by polarized microscope.
2. The structural changes of extracted collagen as removed telopeptide were confirmed by SDS-PAGE.

**Key words** : Type I collagen, Telopeptide

### 서 론

교원섬유는 항원성(antigenicity)이 매우 낮은 단백질이고, 분자의 항원성을 띠는 부위는 나선형 부위의 아미노산 서열과 비나선형 양말단 부위이다[1].

사람 태줄에 존재하는 교원섬유는 Type I 과 III이며, 구조단백질이라고도하는 Type I collagen이 대부분을 차지한다. 교원섬유는 섬유 단백질로서 3개의 폴리펩타이드 사슬( $\alpha$ -사슬)들이 결합하여 교원섬유 분자 형성에 관여

한다. 각각의  $\alpha$ -사슬은 길이가 대략 3000Å이며, 약 1000개(Type I ; 1053개)의 아미노산으로 되어 있고, 교원섬유 분자의 분자량은 약 360,000이며,  $\alpha$ -사슬의 분자량은 약 120,000이다. 유전적으로 다른 특징이 있는 각각의 사슬들은 아미노산의 구성과 서열은 다르지만, glycine이 아미노산의 서열에서 매 세번째마다 위치(-X-Y-Gly-)하고 있다는 점에서 동일하다. 각각의  $\alpha$ -사슬은 아미노산이 나선형으로 배열되어진 형태로써, 사슬 길이의 96%가 나선형이며, 비나선형인 telopeptide들은 N말단과

+ 연세대학교 의과대학 의용공학교실

Department of Medical Engineering, Yonsei University College of Medicine

\* 한국과학기술연구원 의과학연구소

Biomedical Research Center, Korea Institute of Science and Technology

\*\* 가톨릭대학교 자연대학 생물학과

Department of Biology, College of Natural Science, the Catholic University of Korea

통신저자 : 서활, (120-749) 서울시 서대문구 신촌동 134, Tel.(02)361-5406 Fax.(02)363-9923

C말단에 존재한다[2]. 교원섬유의  $\alpha$ -사슬( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ -사슬)의 조합 형태가 교원섬유 분자들의 타입들을 결정하며, Type I의 경우 ( $\alpha 1(I)$ )<sub>2</sub>  $\alpha 2(I)$ 이다. 교원섬유는 사슬들의 나선형 단백질 부분들만 절단하는 교원섬유분해효소(collagenase)에 의해 분해되어진다.

교원섬유는 주로 섬유아세포 내에서 합성된 후 세포 외로 분비되어 섬유화과정을 거쳐 세포외기질로서 역할을 하게 된다. 교원섬유도 다른 분비성 단백질과 비슷한 경로를 통해 생합성되지만, 특유의 반응 과정을 가지고 있다. 교원섬유의 생합성과정은 크게 3단계로 이루어진다. 제 1단계는 교원섬유의 각각 폴리펩타이드 사슬에 대응하는 유전자 정보를 mRNA에 전사하고, 그 정보를 받아들여 리보솜 상에서 폴리펩타이드를 합성하는 과정, 제 2단계는 합성된 폴리펩타이드의 잔기들을 수산화하여 hydroxyproline과 hydroxylysine를 생산하고, 글리코실화를 일으켜 삼중 나선을 생성하는 과정, 제 3단계는 세포 외로 분비된 교원섬유의 전구체인 procollagen 분자가 교원섬유분자로 나누어지고, 4D-stagger 라고 불리는 규칙적인 배열을 이루면서 섬유다발을 형성하고, 이때 나선을 형성하지 못한, 교원섬유분자 양쪽 말단에 가교가 형성되어 분자내, 분자간 가교형성이 일어나는 과정이다[3], [4]. 가교의 형성은 연령이 증가됨에 따라 증가되며[5], 안정화된 섬유배열은 조직이나 기관의 장력과 안정성을 좌우하게 된다[6].

일반적으로 단백질추출은 단백질 고유의 극성이나 용해도(solubility) 등의 특성을 이용한 침전법, 크로마토그래피방법등을 이용한다. 교원섬유를 추출하기 위해서는 ammonium sulfate로 침전 분리한 후, DEAE-cellulose와 pH 7-8인 2-6M urea 완충 용액을 이용하여 크로마토그래피를 실시하고, Type I과 Type III는 침전 속도를 이용한 원심분리를 이용하여 추출한다. 산성과 중성 pH용액에서 추출 가능한 삼중 나선을 형성하고 있는 대부분의 교원섬유 type들은 pepsin에 내성이 있지만 가교를 형성하는 부위인 비나선형 부위와 pepsin에 민감한 부위를 pepsin digestion을 통해 항원성을 낮추고 수득율을 높이고 선택적 염 침전법으로, 얻고자 하는 type을 분리한다. 한편 pepsin에 내성이 있는 교원섬유분자를 다른 단백질들로부터 추출하기 위해서는 상대적으로 낮은 이온 강도에서 침전하는 특성을 이용하여 왔으며, 중성 pH에서 서로 다른 염농도로 다른 type들로부터 얻고자 하는 type들을 선별하여 왔다. Type I과 Type III가 함께 존재하는 경우에는 Type III에만 티올 Sepharose 4B 칼럼으로 공유크로마토그래피(covalent chromatography)를 실행하여 분리해 내기도 하며, 추출하여 얻은 시편을 검정하고, 추출정도를 측정하기 위해서는 전기영동이나 아미노산 조성, 서열분석 등의 방법을 이용하고, 기능 검정을 위해

동물실험이나 조직배양검정법을 이용하기도 한다.

생체 재료로서 교원섬유를 사용하는 경우를 살펴보면, 세포배양시 배양 기질이나, 상처 보호를 위한 막, 인공혈관과 같은 인공장기 등에 세포의 증식을 위한 기질 등으로 많이 사용된다. 주로 동물의 조직들로부터 추출한 교원섬유를 이용[7]하고 있으나, 아미노산의 서열, 비나선형 부위 등의 중간 차이에 따른 면역학적인 문제점들이 발생되고 있으며, 이 문제를 해결하기 위해 항원성이 낮은 사람 태반으로부터 Type I collagen을 추출하여 이용하였으나[8], [9], 수득율이 매우 낮아 사용하는데 많은 문제점이 따랐다. 사람 태줄에서의 Type I collagen은 항원성이 태반과 마찬가지로 낮고, 이 Type I collagen이 Type III collagen과 함께 존재하지만, 다량 존재하므로 분리해 내는 과정은 비교적 복잡하더라도 태반보다 상대적으로 수득율이 높다[10].

본 실험에서는 교원섬유를 체내 이식용 생체재료로서 사용하기 위해 항원성이 낮은 배의 교원섬유를 이용하려는 목적으로 사람 태줄로부터 양쪽 비나선형 말단 부위인 telopeptide부위가 제거된 Type I atelocollagen을 추출 분석하였다.

## 실험 재료 및 방법

사람 태줄로부터 Type I atelocollagen을 추출하면서 추출 단계별 거동을 편광현미경(Optiphoto-2, Nikon, Japan)과 SDS-PAGE를 통해 분석하였고, 대조군(control)으로 bovine skin에서 추출한 Type I collagen (Sigma Chemicals Co., MO, U.S.A)을 사용하였다.

### 1. Type I collagen 추출

수집된 사람 태줄의 혈관과 혈액을 제거 한 다음, 소독제인 75% 에탄올로 2시간, 4시간, 16시간 간격으로 처리하였다. 잔여 에탄올은 증류수로 3-4회 씻어 제거하였다. 소독 처리된 태줄들을 분쇄하고, 0.5M sodium acetate (Shinyopure Chemicals Co., Ltd, Osaka, Japan) 용액에 1g : 6.28ml의 비율로 침적한 다음 48시간 동안 반응시킨 후, 상층액을 원심분리(1500rpm, 10분; VS-4000, Vision Scientific Co., Ltd, Korea)하였다. 추출된 상층액은 원심분리 (3500rpm, 30분 Sorvall Super T 21, Dupont, U.S.A.)하여 침전물을 취하고, [0.5M acetate (Shinyopure Chemicals Co., Ltd, Osaka, Japan)+pepsin(520units/mg, Sigma Chemicals Co., MO, U.S.A.)]을 100ml : 30mg의 비로 섞은 용액과 1g : 6.28ml의 비율로 섞어 24시간 동안 반응시킨 다음 원심분리(27,000xg 60분; Sorvall Super T 21, Dupont, U.S.A.)하였다. 침전물을 1M NaCl(Sigma Chemicals Co., MO U.S.A.)/0.05M

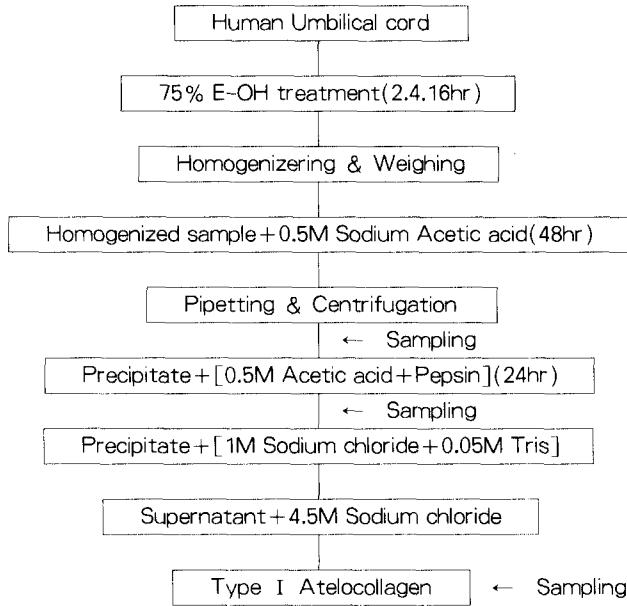


그림 1. Type I atelocollagen 추출  
Fig. 1. Type I atelocollagen purification

Trizma(Sigma Chemicals Co., MO U.S.A.)용액과 1g : 6.28ml의 비율로 침적한 다음 24시간동안 반응시켜 원심 분리(3,500rpm,60분;Sorvall Super T 21, Dupont, U. S.A.)한 다음 상층액을 취득하고, 이 상층액에 4.5M NaCl 용액을 첨가하여 24시간동안 반응시켜 원심분리(27,000xg 5분)한 다음 침전물(Type I atelocollagen)을 취하였다 (Fig. 1).

### 2. 편광현미경으로 각 교원섬유 추출 단계별 관찰

편광현미경을 이용하여 0.5M sodium acetate 처리 후 추출되어진 교원섬유(침전물)의 형태, 0.5M acetate와 pepsin 처리 후 추출되어진 교원섬유(침전물)의 형태, 4.5M NaCl 처리 후 추출되어진 교원섬유의 형태를 사진관찰 하였다.

### 3. 전기영동(SDS-PAGE)

교원섬유의 추출정도는 추출과정 중 3 단계에서 전기영동을 실시하여 관찰하였다. 0.5M sodium acetate 용액 처리 후에 얻은 상층액을 원심분리하여 얻은 침전물(SA), 0.5M acetate 용액과 pepsin처리 한 후에 초원심분리 하여 얻은 침전물(AA), 마지막으로 4.5M NaCl 용액을 처리하여 원심분리하여 얻은 침전물인 Type I atelocollagen들(SC)의 단계에서 시편을 취하였다(Fig. 1). 30 µg/well씩 정량한 단백질 시편을 각각 환원제로 타올 화합물인 DTT가 첨가된(reducing condition) 시편 완충용액(sample buffer)과 첨가되지 않은(nonreducing

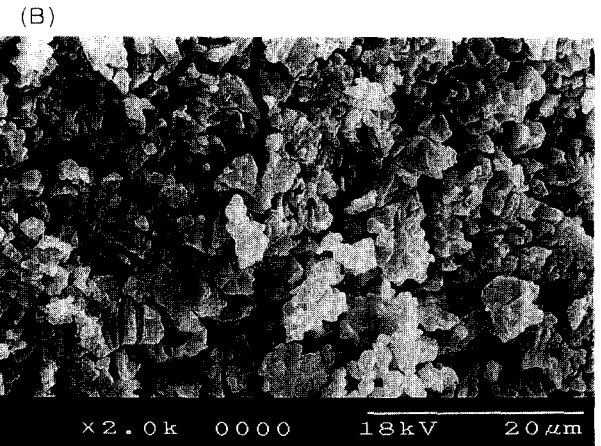
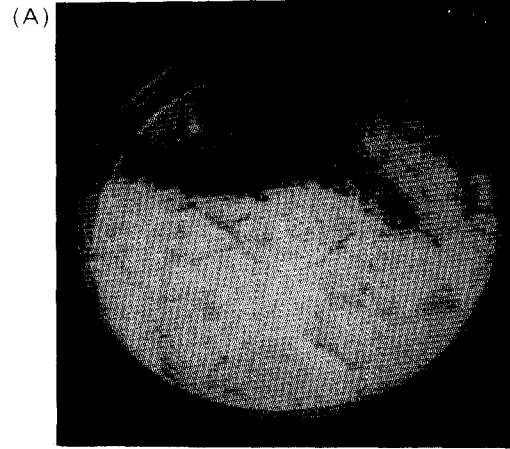


그림 2. 추출한 Type I atelocollagen;(A) 동결건조된 type I atelocollagen, (B) 주사전자현미경으로 동결건조된 type I atelocollagen 관찰

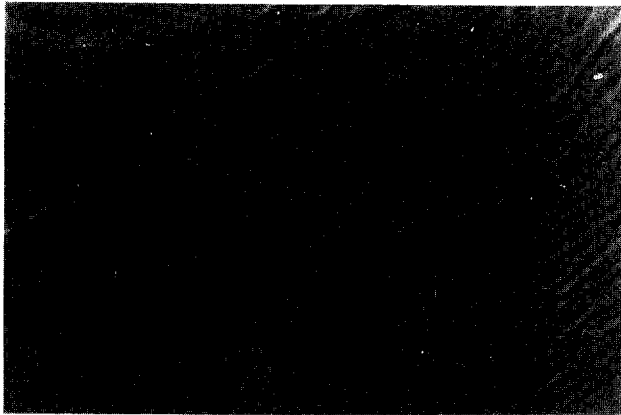
Fig. 2. Purified type I atelocollagen;(A) Lyophilized type I atelocollagen, (B) Observation of lyophilized type I atelocollagen with scanning electron microscope

condition) 시편완충용액을 혼합시킨 다음, 7.5% 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩하여 전기영동하였다. Bovine skin으로부터 추출된 Type I collagen를 pepsin 처리한 후 대조군으로 사용하여 비교,분석하였다.

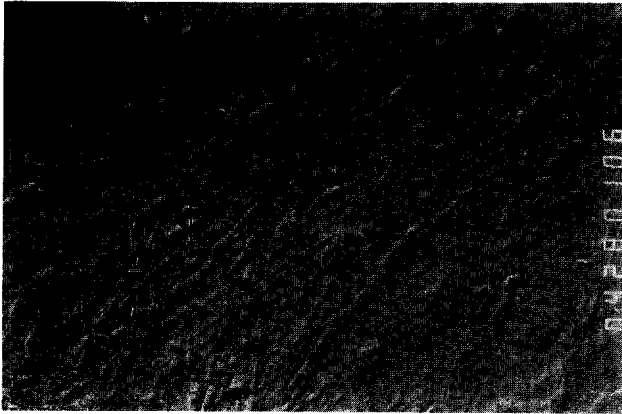
## 결 과

### 1. Type I collagen 추출

본 연구에서 사용한 교원섬유 추출 방법을 통하여 평균적으로 사람태줄 100g당, 0.5M acetate나트륨 용액 처리 후 단계에서 13.5g, [0.5M acetate+pepsin] 용액 처리 후 단계에서 2.4g, 동결건조 후에는 최종적으로 0.25g의 Type I atelocollagen을 얻을 수 있었다. Fig. 2의 (A)는 이 Type I atelocollagen을 동결건조 시킨 후 사진이고, Fig. 2의 (B)는 동결 건조된 시편의 결정체의 형상을



(A)



(B)



(C)

그림 3. 편광현미경으로 교원섬유 추출단계별 관찰

;x 400;\*CF : 교원섬유, TP : 텔로펩타이드, (A) 0.5M 아세트산나트륨용액으로 추출한 교원섬유 형태, (B) [0.5M 아세트산 + 펩신]용액으로 추출한 교원섬유 형태, (C) 4.5M 염화나트륨용액으로 추출한 교원섬유 형태

Fig. 3. Observation of each step of collagen purification with polarized light microscope x 400;\* CF : Collagen fiber, TP : Telopeptide, (A) extracted collagen fiber morphology with 0.5M sodium acetate solution. (B) extracted collagen fiber morphology with 0.5M acetate solution (C) extracted collagen fiber morphology with 4.5M Sodium chloride solution

주사전자현미경으로 관찰한 사진이다.

## 2. 편광현미경으로 각 교원섬유 추출 단계별 관찰

각 단계별 추출물의 변화는 밀도와 형성된 섬유의 형태적 차이를 편광현미경을 이용하여 관찰하였다 (Fig. 3).

Fig. 3-(A)에서는 약 알칼리 용액(pH 8.3-8.8)인 0.5M sodium acetate 용액을 처리한 후 추출되어진 교원섬유의 형태 사진들로. 섬유다발의 형태를 하고 있는 교원섬유를 관찰할 수 있다.

Fig. 3-(B)에서는 pH 3.93-4 정도의 산성용액인 0.5M acetate을 처리하여 전 단계(A)보다 작은 단위로 나뉘어진 형태인 섬유상을 하고 있으며, 섬유 다발이나 섬유들의 말단 부위들이 벌어지고, 아주 작은 길이로 잘려져 있는 형태를 관찰 할 수 있다.

Fig. 3-(C)에서는 4.5M NaCl 용액 처리후 추출되어진 교원섬유의 형태를 전단계의 사진 (A),(B)들과는 현저한 차이를 나타내는 가늘고 짧아진 섬유들이 나무의 가지처럼 듯한 모양과 유사한 형태를 관찰 할 수 있다.

## 3. 전기영동(Electrophoresis; SDS-PAGE)

항원성이 비교적 적은 사람뱃줄로부터 추출한 교원섬유의 추출정도와 항원성을 띠는 telopeptide 제거 여부에 따른 교원섬유의 구조적 변화정도를 분석하기 위해 추출과정 중 Fig. 1에서 제시하고 있는 3 단계에서 단백질 분석시 자주 이용되는 SDS-PAGE를 이용하였다 (Fig. 4).

(B)의 왼쪽부터 환원제가 첨가 되지 않는 시편완충용액으로 처리한 시편의 밴드들은 Cn, SAn, AAn, SCn이고, 첨가된 경우의 시편들의 밴드들은 Cr, SAR, AAR, SCr 로 나타났다.

SA의 경우 추출의 첫 단계로 C와 비교시  $\gamma$  사슬만을 확인할 수 있고, C에서 나타난 다른 밴드들은 나타나지 않았다. AA의 경우는 교원섬유가 다른 분자들과 주로 가교를 형성하는 양말단 부위인 telopeptide 부위를 제거하기 위해 pepsin 처리한 후 시편으로  $\gamma$ ,  $\beta$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  순의 밴드가 덜 추출되어 C와 AA 밴드들은  $\beta_{11}$ 과  $\beta_{12}$ 의 밴드들이 차이를 나타내고 있다. C와 SC의 밴드들은 일치하고 있다. telopeptide를 제거하기 전단계인 SAn 와 SAR 밴드들은 큰 차이를 나타내고 있으며, 제거 후의 추출단계의 밴드들은, AAn와 AAR, SCn와 SCr 의 밴드들, 그리고, Cn과 Cr의 밴드들은 거의 일치하고 있다.

## 고 찰

교원섬유를 체내 이식용 생체 재료로서 사용하기 위해 항원성이 비교적 적은 배의 교원섬유를 이용하려는 목적으로, Type I 과 Type III collagen이 존재하는 사람 뱃

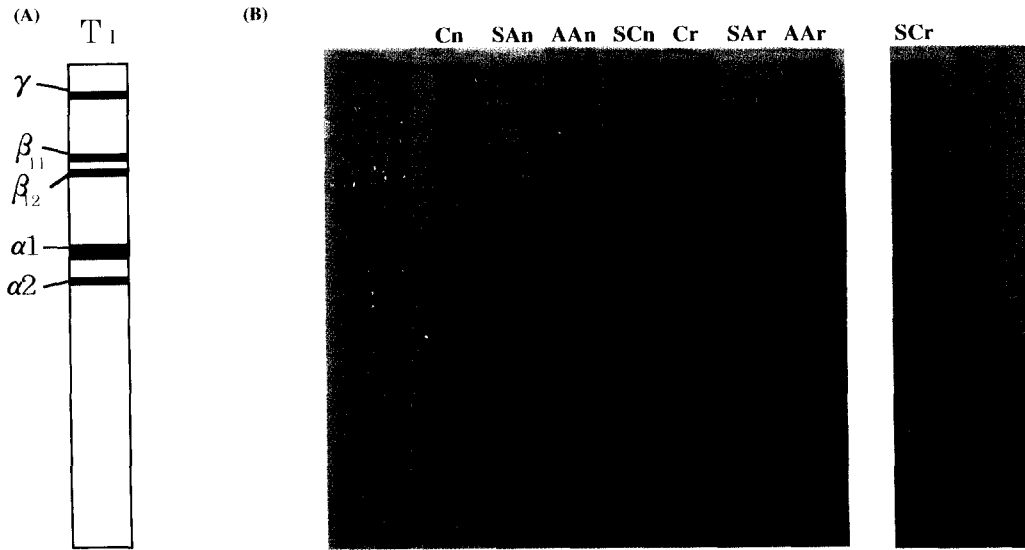


그림 4. 교원섬유 추출단계별 비환원성 및 환원성 SDS-PAGE; 7.5% gel, 100V \*Tr: type I collagen/ c: 우피 type I collagen/ SA: 0.5M 아세트산나트륨으로 추출한 교원섬유/ AA:[0.5M 아세트산+펩신]용액으로 추출한 교원섬유/ SC:4.5M 염화나트륨 용액으로 추출한 교원섬유/ n:비환원성, r:환원성 ;(A) type I collagen의 SDS-PAGE, (B) 교원섬유 추출단계별 SDS-PAGE  
 Fig. 4. Non-reducing and reducing SDS-PAGE of each step of collagen purification ; 7.5% gel, 100V \*T<sub>i</sub>:type I collagen/C:bovine skin type I collagen/SA : extracted collagen fiber with 0.5M sodium acetate solution/AA : extracted collagen fiber with 0.5M acetate solution and pepsin/SC : extracted collagen fiber with 4.5M sodium chloride solution/n : non-reducing r : reducing;(A) SDS-PAGE of type I collagen, (B)SDS-PAGE of each step of collagen purification

줄로부터 대부분의 결합조직들의 형태를 형성 유지하는 구조단백질이라고 불리는 교원섬유인 Type I collagen 중 Suh(10)의 추출 방법을 응용하여 산성 용해성 교원섬유를 추출하였다. 어린 동물의 결합조직에서는 1M NaCl 과 같은 중성 염기 용액(pH 8-8.2)이나 HCl이나, citrate, acetate와 같은 pH 4.5이하의 약산성 용액에 의해 가용화 될 수 있는 교원섬유 추출이 가능하다고 보고되어 있다[11], [12]. 중성염 용액에서는 분자간 가교가 형성 되지 않은 교원섬유가 추출되고, 묽은 산성용액은 분자간 가교인 Schiff's base을 절단하므로 많은 교원섬유를 추출할 수 있다. 추출시 교원섬유 분자들이 가교를 형성하여 섬유의 형태를 유지하고, 면역반응을 일으키는 비나선형 말단 부위인 이 telopeptide을 단백질분해효소인 pepsin을 일정량 처리하여 제거하는 방법은 많은 실험들에서 적용된다(8, 9, 10, 13, 14). 본 실험에서는 0.5M acetate와 pepsin 처리에 의해 분자간 가교를 형성하는 telopeptide 부위를 제거되어 용해된 atelocollagen들 중에서 1M NaCl과 0.05M Trizma 혼합용액으로 Type III collagen을 침전시켜 분리하고, 4.5M NaCl을 이용하여 telopeptide 이 제거되어 항원성이 없는 교원섬유인 Type I atelocollagen을 추출하는 선택적 염 침전법(selective salt precipitation)을 이용하였다[11], [15].

본 실험에서 사용한 교원섬유 추출 방법을 통하여 평균적으로 사람태줄 100g당, 0.5M sodium acetate 용액 처리 후 단계에서 13.5g, 0.5M acetate용액과 pepsin 처리

후 단계에서 2.4g, 동결건조 후에는 최종적으로 0.25g의 Type I atelocollagen을 얻을 수 있었다(Fig. 2).

본 실험에서는 사람 태줄로부터 교원섬유 추출시 각각의 추출 단계에서 Speer[16] 등에 의해 이용되었던 방법을 이용하여, 교원섬유와 섬유 다발의 형태 변화를 제시하고 있는 섬유 상의 서로 다른 밀도와 여러 층으로 형성되어진 섬유의 형태적 차이에 의해 발생되어지는 다양한 이중굴절(birefringance)의 강도와 섬유들간의 가지를 친 경우와 분리된 경우의 명암의 차이를 이용하여 편광 현미경으로 추출 단계별 구조 변화를 관찰하였다(Fig. 3).

Fig. 3의 (A)에서 섬유 다발을 하고 있는 교원섬유의 형태는 끊어지지 않은 분자내, 분자간의 가교에 의해 유지되고 있는 것으로 사료되어진다. (B)는 산성 용액에 의해 분자간 가교가 제거되고, 용해되어, 또한 교원섬유의 말단 부위인 비나선형의 telopeptide을 잘라내는 효소인 pepsin 처리에 의해, 섬유 분자나, 섬유 다발의 형태 유지 기능을 하는 가교가 주로 형성되어 있는 분자들의 telopeptide부위가 제거되어, 섬유 다발의 형태가 파괴된 것으로 추정되며, 미소한 길이의 섬유들은 잘려진 telopeptide(TP)일 것으로 사료된다. (C)는 Type I atelocollagen 섬유의 형태(CF)를 보여주고 있으며, 전 단계의 사진 (A)와 (B)들과는 현저한 차이를 보여주고 있는 가늘고 짧아진 섬유들이 나무의 가지를 친 듯한 모양과 유사한 형태를 관찰 하였다.

항원성이 비교적 적은 사람 태줄로부터 추출한 교원섬유

가 비나선형 양쪽 말단 부위인 telopeptide가 제거된 type I atelocollagen임을 확인하고, 추출 정도와 단백질 구조 분석하기 위해 SDS-PAGE 방법을 이용하였다(Fig. 4). Telopeptide부위를 제거하기 위해 일정량의 pepsin을 처리하여 제거하였는데, 제거 여부를 분석하기 위해서는 교원섬유 분자에서 이 비나선형 부위에만 황을 포함한 아미노산이 존재하는 점을 이용하였다. 각 추출 단계별 시편을 티올 화합물인 환원제를 첨가한 시편 완충 용액과 첨가하지 않은 시편완충용액으로 처리한 후 전기영동을 하여 이황화 결합의 존재 여부에 따른 밴드의 차이를 이용하여, 추출 단계별 교원섬유의 구조 변화를 교원섬유 구조를 비교분석하였다.

교원섬유 분자들을 변성시킨 경우  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 사슬이 형성되어 교원섬유의 분석시 많이 이용된다.  $\alpha$ -사슬은 1개씩의 펩타이드 사슬로 풀어진 상태이고,  $\beta$ -사슬은 두개의  $\gamma$ -사슬들이 분자내 가교에 의해  $\alpha_{11}$ 은  $\alpha_1$ - $\alpha_1$ ,  $\beta_{12}$ 은  $\alpha_1$ - $\alpha_2$ 이,  $\gamma$ -사슬은 3개의  $\alpha$ -사슬들이 분자내 가교에 의해 형성된 것이다.  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\gamma$  성분의 분리 동정에는 SDS-PAGE 를 이용한다. 또, 이 SDS -PAGE는 교원섬유의 타입을 동정하는 데도 이용이 되는 데, 확인하고자 하는 Type I collagen은 Fig. 4의 (A)  $\gamma$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  순의 주요 밴드가 나타난다[4], [17]. 이 밴드의 유형을 Fig. 4의 (B)에서 확인 할 수가 있다. 또,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{12}$  밴드의 확인으로  $\gamma$ -사슬의 구성이  $(\alpha_1)_2\alpha_2$ 이며, 추출한 교원섬유가 Type I collagen임을 간접적으로 추정할 수 있다.

Fig. 4-(B)의 밴드들을 (A)와 비교하여 살펴보면 SAn과 SAR의 밴드들은 매우 큰 차이를 보이고 있다. 이는 이황화 결합이 존재하는 비나선형의 양말단 부위가 제거 되지 않아 SAR의 경우 티올 화합물인 환원제에 의해 이황화 결합이 제거되어 SAn의 밴드들과 큰 차이를 보이고 있는 것으로 사료되며, 이 단계의 편광현미경사진인 Fig. 3의 (A)에서 교원섬유 분자간의 가교가 형성되어 있는 비나선형의 양말단 부위가 존재하여 섬유다발의 형태를 유지하고 있음으로 이 사실을 뒷받침해 준다. AAn과 AAr 그리고 SCn과 SCr 의 밴드들은 거의 일치하고 있다. 항원성을 띠고 이황화결합이 존재하는 비나선형 부위가 제거되어 밴드들이 일치하고 있는 것으로 사료된다. AA의 밴드들과 SC의 밴드들은  $\beta_{11}$ 과  $\beta_{12}$ 의 밴드들이 차이가 나는 것은 AA의 단계에는 Type I과 Type III가 분리되어지지 않아 밴드가 차이가 나는 것과, Fig. 3의 (B)에서 알 수 있듯이 섬유들이 완전히 분리되지 않았기 때문인 것으로 사료되어진다. 추출한 Type I collagen인 SCn, SCr의 밴드와 telopeptide를 제거하기 위해 pepsin 처리한 대조군인 Cn 과 Cr의 주요 4개의 밴드들( $\gamma$ ,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{12}$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ )과 일치하였다.

편광현미경사진들과 SDS-PAGE의 분석한 결과를 고려할 때, 본 실험에서 사람 태줄로부터 telopeptide가 제거된 Type I atelocollagen을 정제하였음을 알 수 있었다. 교원섬유 분자 아미노산의 10%만을 차지하는 비나선형 말단 부위에 미량 존재하는 황을 포함한 아미노산이 존재하여 이황화 결합을 형성하는 것으로, 나선형부위에서도 존재하지 않고, 교원섬유분자가 몇 개의 서브유니트의 형태로 존재하지 않음을 알 수 있었다. 한편 본 실험에서는 Type I의  $\alpha_1(I)$ ,  $\alpha_2(I)$ 의 경우 다양한 동물들의 피부, 뼈, 치아 등의 결합조직들 사이에서 높은 수준의 구조적, 아미노산의 조성 및 서열 등의 동일성(homology)을 보인다는 점을 유의하여 bovine skin의 Type I collagen을 대조군으로 이용하였다[12].

## 결 론

교원섬유를 체내 이식용 생체 재료로서 사용하기 위해 항원성이 낮은 배의 교원섬유를 이용하려는 목적으로 사람 태줄로부터 양쪽 비나선형 말단 부위인 telopeptide가 제거된 교원섬유를 추출 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

1. 각 추출 단계별 추출물의 변화를 밀도와 형성된 섬유의 형태적 차이를 편광현미경을 이용하여 관찰하였다. 1단계, 약 알칼리 용액인 0.5M sodium acetate용액을 처리 후 추출 되어진 교원섬유 다발의 형태, 2단계 산성 용액인 0.5M acetate와 pepsin을 처리하여 telopeptide 부위들이 제거되어, 교원섬유 다발이 풀어진 형태, 추출 마지막 단계 4.5M NaCl 용액 처리후 추출되어진 가늘고 짧아진 섬유들이 나무의 가지를 친 듯한 모양의 교원섬유의 형태 관찰할 수 있다.
2. 추출된 Type I collagen의 telopeptide 제거에 따른 구조적 변화를 SDS-PAGE를 실시하여 telopeptide 부위가 제거된 Type I atelocollagen을 추출한 것을 확인하였다.

## 참 고 문 헌

1. D. Byrom, *Biomaterials*, Stokton Press, pp 57-79, 1991.
2. Olsen, B.R., Guzman, N.A., Engel, J., Condit, C. and S. Aase, "Purification and Characterization of a Peptide from the Carboxy Terminal Region of Chick Tendon Procollagen Type I.", *Biochem.*, vol. 16, no. 13, pp 3030-6, 1977.
3. Cheung, D.T., Dicesare, P., Benya, P.D., Libaw, E., and M.E. Nimni, "The presence of intermo-

- lecular disulfide cross-linkes in type III collagen.", J. Biol. Chem., vol. 258, no. 12, pp 7774-8, 1983.
4. M.E. Nimni, COLLAGEN. CRC Press. Inc. 1988.
  5. Yamauchi, M., Woodley, D.T. and G.L. Mechanic, "Aging and crosslinking of skin collagen.", Biomed. Biophsi. Res. Communi.. vol. 152, no. 2, pp 898-903, 1988.
  6. Gelman, R.A., Poppke D.C. and K.A. Piez, "Collagen fibril formation in vitro.: The role of the non-helical terminal regions.", Conn. Tiss. Res. , vol. 7, pp 11741-5, 1979.
  7. Matton, G., Anseeuw, A., and F. DeKeyser, "The History of Injectable Biomaterials and the Biology of Collagen.", Aesth. Plast. Surg., vol. 9, pp 133-40, 1985.
  8. Bailey, A.J., Sims, T.,J., Duance V.C., and N.D. Light , "Partial characterization of a second basement membrane collagen in human placenta : Evidence for the existence of two type IV collagen molecules." FEBS LETTERS. vol. 99, no. 2, pp 361-66, 1979.
  9. Niybizi, C., Fietzek, P.P. and M. Rest, "Human Placenta Type V collagens : Evidence for the an  $\alpha 1(V)$ ,  $\alpha 2(V)$ ,  $\alpha 3(V)$  Collagen molecule.", J. Biochem., vol. 259, pp 14170-4, 1984.
  10. Suh, H., "Biodegradable inorganic -organic composite artificial bone substitute -Part 2. Collagen purification and its physical and biological properties.", J. KOSOMBE.,vol. 15, pp 341-6, 1994.
  11. Bornstein, P. and H.Sage, "Structurally distinct collagen types," Ann. Rev. Biochem., vol. 49, pp 957-1003, 1980.
  12. Miller, E.J., "Biochemical characteristics and biological significance of the genetically distinct collagens.", Mol. and Cell. Biochem., vol. 13, no. 3, pp 165-92, 1976.
  13. Ahn,S.J., Lee H.K. and H. Suh, "Cross-link effects on the physical of the collagen purified from human umbilical cords", J. KOSOMBE, vol. 16, no. 2, pp 65-6, 1994.
  14. Law, J.K., Parsons, F.H. and A.B. Weiss, "An evaluation of purified reconstituted type I collagen fibers.", J. Biomed. Mater. Res., vol. 23, pp 961-77, 1989.
  15. Hill, R.J., E. Harper, "Quantitaion of type I and type III collagens in human tissue samples and cell culture by cyanogen bromide peptide analysis.", Anal. Biochem., vol. 141, pp 83 -93, 1984.
  16. Speer, D.P., Chavapil, M., Ulreich, J., and C.D. Eskelson, "Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials.", J. Biomed. Mater. Res., vol. 14, pp 753-64, 1980.
  17. Church, R.L., Yaeger, J.A. and M.L. Tanzer, "Isolation and partial characterization of procollagen fractions produced by a clonal strain of calf dermosparactic cells.", J. Mol. Biol. vol. 86, pp 785-799, 1974.

= 국문초록 =

교원섬유는 항원성이 매우 낮은 단백질이고, 분자의 항원성을 띠는 부위는 나선형 부위의 아미노산 서열과 비나선형 양쪽말단 부위이다. 이러한 교원섬유를 동물로부터 추출하여 체내이식용 생체 재료로서 사용되어져 왔으나, 종(species)의 차이와, 분자의 항원성을 띠는 양쪽 비나선형말단 부위 존재 등으로 인한 많은 항원성이 문제시 되어왔다. 이런 문제점을 해결하기 위해 항원성이 낮은 배의 교원섬유를 이용하려는 목적으로 사람 태줄로부터 양쪽 비나선형 말단 부위인 telopeptide가 제거된 교원섬유를 추출 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있다.

1. 각 추출 단계별 추출물의 변화를 밀도와 형성된 섬유의 형태적 차이를 편광현미경을 이용하여 관찰하였다. 1단계, 약 알칼리 용액인 0.5M sodium acetate용액을 처리 후 추출 되어진 교원섬유 다발의 형태, 2단계 산성용액인 0.5M acetate와 pepsin 을 처리하여 telopeptide 부위들이 제거되어, 교원섬유 다발이 풀어진 형태, 추출 마지막 단계 4.5M NaCl 용액 처리후 추출되어진 가늘고 짧아진 섬유들이 나무의 가지를 친 듯한 모양의 교원섬유의 형태 관찰할 수 있다.

2. 추출된 Type I collagen 의 telopeptide 제거에 따른 구조적 변화를 telopeptide 부 위에만 존재하는 이황화 결합의 존재 여부로 관찰하였다. 시편에 티올 화합물인 환원제를 처리한 후, SDS-PAGE를 실시하여 telopeptide를 제거하기 전단계의 밴드들은 이황화 결합이 존재하여 큰차이를, 제거한 다음 단계의 밴드들이 일치하여 telopeptide가 제거된 Type I collagen을 추출한 것을 확인하였다.