

홍합 (*Mytilus coruscus*) 족사 cuticle의 초미세구조 연구

An ultrastructural study of the cuticle in the byssus of marine mussel (*Mytilus coruscus*)

김상식¹, 최승환¹, 윤성진², 황동수^{3*}

Sangsik Kim¹, Seung Hwan Choi¹, Sung Jin Yoon², Dong Soo Hwang^{3*}

¹포항공과대학교 환경공학부, 경상북도 포항시, 790-784, 대한민국

²한국해양과학기술원 동해연구소, 경상북도 울진군 죽변면 해양과학길 48, 767-813, 대한민국

³포항공과대학교 융합생명공학부, 경상북도 포항시, 790-784, 대한민국

¹School of Environmental Science and Engineering, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Republic of Korea

²East Sea Research Institute, KIOST, Uljin 767-813, Korea

³School of Interdisciplinary Biosciences and Bioengineering, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Republic of Korea

(Received 23 December 2014, Revised 7 January 2015, Accepted 12 January 2015)

Abstract Mussel byssus is a bundle of threads used to attach mussels to wet substrates. Recently, a thin cuticle layer on the byssus has attracted public attentions due to its remarkable toughness - stiff as epoxy resin and extensible as rubber. Here, we observed ultrastructure of the cuticle layer in a far eastern mussel (*Mytilus coruscus*) to understand underlying mechanisms for the mechanical properties. The cuticle layer observed by TEM was composed of submicron-sized granular inclusions in a continuous matrix phase. In addition, ultrastructural study in the presence of tertiary amine (Tetraethylammonium, TEA) showed an evidence that the cuticle is stabilized by cation- π interaction.

Keywords : Byssal coating, cuticle, cation- π interaction

서론

바다 속 생물들은 항상 해수의 흐름에 의한 직/간접적인 스트레스에 지속적으로 노출 되어있다. 특히, 바위 또는 거대 해양생물에 붙어 자라는 조개류 (i.e. 홍합, mussel)는 흐름에 거슬러 부착상태를 유지해야 하기 때문에 굉장히 강한 저항력 받는다. 이들은 이러한 강한 힘을 이겨내기 위해 족사(byssus) 구

조를 이용 하는데[1-3], 최근에는 이를 이용하여 체내외의 수중 환경에 적용하여 사용하려는 연구가 활발하다. 예를 들어, 수술에 사용되는 의료용 조직접합제, 비상 상황에 봉합대신 사용될 수 있는 상처접합제, 방오소재(anti-fouling material) 등 다양한 분야에서 관심을 받고 있다[4,5]. 특히, 의료용 접착제는 기존의 헤파린이나 합성고분자 기반 생체 접착제와 달리, 수중환경에서의 낮은 접착력과 독성문제가 수

* Corresponding author
Phone: +82-54-279-9505 Fax: +82-54-279-9519
E-mail: dshwang@postech.ac.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0>)

반되지 않는 장점이 있다.

홍합의 접착 기전은 크게 다음의 3가지로 나눌 수 있다.

- 1) 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)-Fe³⁺ complex
- 2) Complex coacervation
- 3) Cation- π interaction

최근에는 족사 코팅층의 특성으로 인한 물리적 강도의 증가가 보고되고 있고, 단단한 산업용 접착제인 에폭시 수지와 유사하면서도 연신율이 100 % 이상 나오는 강한 물성(high toughness)을 나타낸다고 한다[1]. 이러한 특성은 철갑코팅(iron-clad coating)이라 불리는 Fe³⁺와 DOPA의 배위 결합이 중요하게 작용한다고 알려져 있으며, 활발하게 연구가 진행 중이다. 하지만, cation- π 작용력이 물성에 미치는 영향에 관한 연구는 미비한 실정이다.

또한 홍합의 족사 표피에 관한 연구가 캘리포니아 홍합 (*Mytilus californianus*)과 지중해 홍합(진주담치 *Mytilus edulis* or *Mytilus galloprovincialis*)에 대해서만 제한적으로 보고되어 있기 때문에, 한국 토종 홍합(far eastern mussel, *Mytilus coruscus*)의 족사 코팅층과 구조에 대한 고찰이 필요하다. 마지막으로, 족사 코팅층의 기계적 물성에 cation- π 작용력이 어떤 기여를 하는지에 대해서도 알아볼 필요가 있다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 홍합은 독도 연안에서 직접채취한 홍합(*Mytilus coruscus*)으로 한국해양과학기술원 동해연구소 해양생물 생리-생태연구팀의 윤성진 박사으로부터 제공받았다. Sodium acetate, tetraethylammonium (TEA) 는 시그마알드리치에서 구입하였다.

홍합족사 준비

10×10×0.2 cm 아크릴판에 홍합을 고무줄로 고정시켜 수조에 매달고, 물 순환기를 통해서 고정된 홍합이 해수의 흐름을 인지하여 족사를 생산할 수 있도록 해주었다(Fig. 1). 홍합에 의해 아크릴판에 생산된 족사는 distal part를 면도칼로 절단한 뒤, 인공해수(pH 8.2)에 담근 후 실험을 진행하였다.

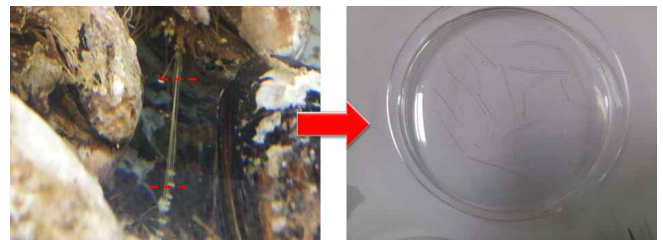


Fig. 1. Preparation of mussel byssus from *Mytilus coruscus*.

투과전자현미경 관찰

(Transmission electron microscopy, TEM)

바다와 비슷한 환경을 만들어 주기 위해서 인공해수에 담근 족사, TEA 효과를 보기 위해서 0.1 M sodium acetate, 0.6 M NaCl, 0.7 M TEA (pH 8.2)에 담근 후, 족사를 관찰하였다.

주사전자현미경 관찰

(Scanning electron microscopy, SEM)

Table 1. Buffer condition of mechanical properties test.

Buffer	Condition
①	0.1M Sodium acetate (pH8.2)+0.6M NaCl
②	0.1M Sodium acetate (pH8.2)+0.6M NaCl +0.1M TEA
③	0.1M Sodium acetate (pH8.2) + 0.6M NaCl +0.5M TEA

Table 1은 3가지 서로 다른 조건의 해수조건을 보여주고 있다. ①~③ 모두 바다와 유사한 환경 조건을 위해 pH 8.2에 맞추고 NaCl을 첨가하였다. 그리고 홍합 족사의 코팅 내 cation- π 작용력을 확인하기 위해 0.1 M, 0.5 M TEA를 첨가한 실험군을 각각 설정하였다. 준비된 족사를 각각의 용액에 12시간 동안 담근 후, 50% 늘렸을 때 홍합 족사 코팅의 초미세 구조를 가속전압 5 kV 조건에서 SEM (JEOL JSM-7401F, JAPAN)으로 관찰하였다.

결 과

1) 구조

A. 기존의 홍합족사의 미세구조와 유사한지 비교연구

인공해수조건에서의 코팅층의 관찰

지금까지 연구된 홍합 족사의 내부는 대부분 콜라

젠과 유사한 단백질로 이루어져 있다고 알려져 있고, 표면은 수많은 과립 구조 (granular structure)를 가지고 얇게 코팅되어있는 것으로 알려져 있다[5]. 기본해수(TEA-free) 조건에서 관찰된 홍합 (far eastern mussel) 족사 코팅층 내부를 Fig. 2(a)에 나타내었다. 관찰된 홍합의 족사는 평균적으로 약 100 μm 두께를 갖는 것을 알 수 있었고, 평균적으로 2-3 μm 두께를 갖는 코팅층이 발견되었다. 기존에 관찰된 홍합 코팅과 유사하게, 한국 토종 홍합 족사의 코팅층 내부에는 지름 1 μm 미만의 과립들이 잘 분포되어 있었다. 또한, 코팅층의 표면은 미세한 주름이 관찰되었다. 구조를 보였다 (Fig. 2(b)).

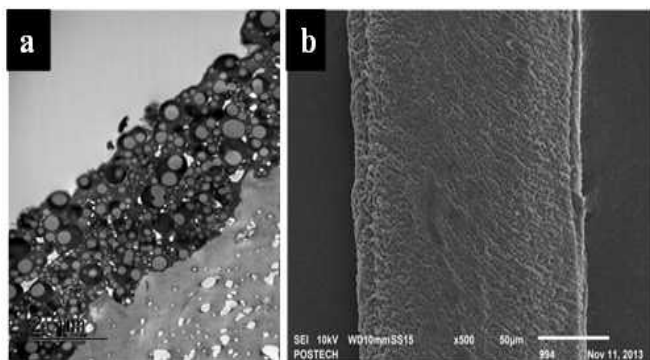


Fig. 2. (a) TEM micrograph of coated outer layer of mussel byssus incubated with TEA-free artificial seawater, (b) The morphology of outer surface of mussel byssus with TEA-free artificial seawater.

B. Cation-π 결합에 의해서 족사의 미세구조가 변하는지에 관한 연구

Cation-π 작용력에 의한 코팅층의 물성변화

Cation-π 작용력은 벤젠링과 양이온이 벤젠전자구조의 특성때문에 인력이 발생하는 것으로, 물속에서 전기력 (electrostatic interaction)보다 인력이 훨씬 강한 것으로 알려져 있다. 홍합의 족사는 95%이상이 단백질로 되어있으며, 아미노산 조성분석 결과 홍합의 족사 안에는 양이온으로 하전된 아미노산과 벤젠링을 가지는 아미노산의 비율이 각각 약 20 mol% 이상으로 상당히 높기 때문에, Cation-π 작용력은 홍합의 수중 접착에 중요한 작용력으로 예상되어왔다. 그러므로 본 연구에서는 홍합 족사의 벤젠링을 갖는 물질들과 가장 강한 Cation-π 작용력을 바탕으로 결

합하여 족사의 미세구조를 붕괴시킬 수 있는 (Tetraethylammonium, TEA)를 고농도로 넣어주어 Cation-π 결합이 족사 코팅의 미세구조에 미치는 영향에 대해서 관찰하였다. Cation-π 작용력의 유무에 따른 물성강도를 확인하기 위해, 강한 (+)전하를 띤 TEA의 농도를 증가시키며, 족사 길이의 50%를 당겼을 때 변화를 확인하였다 (Fig. 3-5). Fig. 3에서 나타나는 코팅층의 변화는 크게 보이지 않았으나, 0.1 M TEA (Fig. 4), 0.5 M TEA (Fig. 5)에서 각각 확인된 표면 이미지에서는 결합(defect) 정도가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 0.1 M TEA의 경우, 2-3 μm의 불규칙한 점 단위의 결합(dot-like defect)이 발생했지만 기본적인 구조를 유지하였다. 반면, 0.5 M TEA 처리 후, 인장강도 실험을 진행하였을 때에는 코팅층이 가지고 있는 구조를 유지하지 못하고, 종 방향 결합(longitudinal defect)이 발생되었다. 또한, 연신율을 50%보다 더 크게 할수록 코팅표면이 더 길게 찢어지고 변형이 생긴 것을 확인할 수 있었고, TEA 농도가 0.1M, 0.5M 증가할수록 연신율 30, 40, 50 %에서 경도가 감소하는 것을 볼 수 있었다. 이는 TEA의 농도가 증가할수록 홍합 족사의 표면 내 cation-π 결합력을 감소시켜 홍합 족사의 경도를 줄여준 것으로 보여진다. 연신율 값이 30%일 때는 TEA 농도가 증가할수록 경도가 줄어드는 기울기가 작은 반면 연신율 값이 50%일 때는 TEA 농도가 증가할수록 경도가 급격하게 줄어드는 것을 볼 수 있었다(data was not shown).

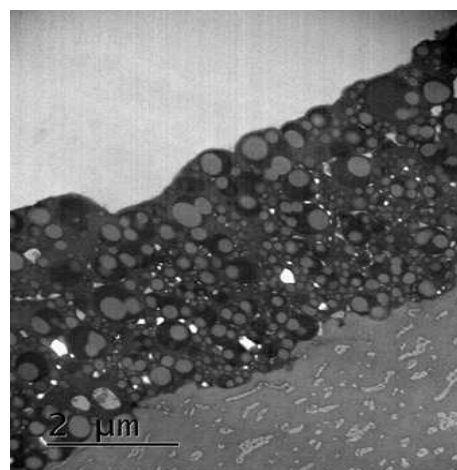


Fig. 3. TEM micrograph of coated outer layer of mussel byssus incubated with 0.7 M TEA artificial seawater after 50% elongation.

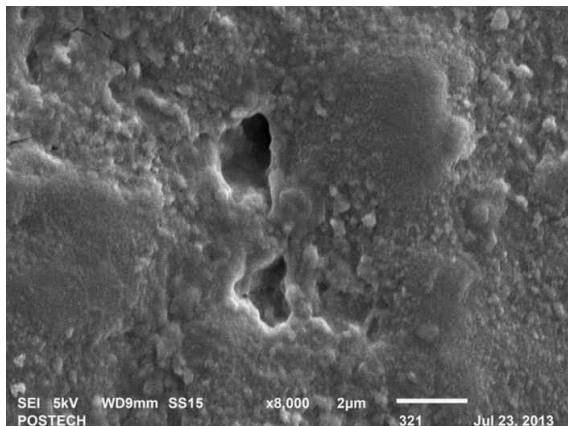


Fig. 4. The morphology of outer surface of mussel byssus incubated with 0.1 M TEA artificial seawater after 50% elongation.

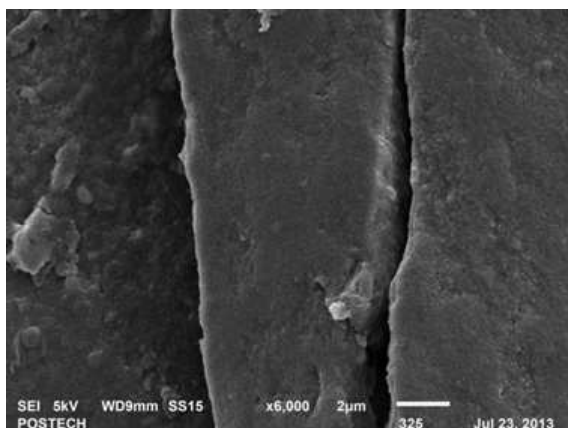


Fig. 5. The morphology of outer surface of mussel byssus incubated with 0.5 M TEA artificial seawater after 50% elongation.

고 찰

기존 연구[6-7]에 나타난 다른 홍합과 비교했을 때 한국의 토종홍합(*Mytilus coruscus*)의 족사는 상당히 유사한 모습을 하고 있었다. 족사의 제일 바깥층은 큐티클 층으로 둘러싸여 있고 내부는 콜라겐으로 되어있다는 것을 확인할 수 있었다. 우리가 획득한 종류 또한 바깥은 큐티클 층으로 둘러싸여 있다는 것을 확인할 수 있었다.

Mfp-1은 홍합의 철갑 코팅에서 발견된 유일한 고분자 소재이다[12-14]. 홍합의 족사는 대부분이 홍합의 발에서 분비되는 단백질로 구성되어있고, 지금

까지 홍합의 족사를 구성하는 25-30 개 정도의 홍합 발 단백질 (mussel foot protein)들이 주로 발견되었다. 그 중 최근에 홍합 족사를 코팅하는 코팅단백질인 mfp-1 (mussel foot protein(Mfp)-1)에 대한 보고도 많이 되었다[15-17]. 그리고 1996년 일본의 Koji Inoue 박사는 mussl *Mytilus coruscus*(Mcfp1)을 보고 하기도 하였다[18]. 이처럼 홍합 족사 코팅에 대해서 관심이 늘어나면서, 다양한 홍합의 mfp-1 과 같은 단백질의 서열은 유사한 점이 많다고 보고 된 바 있지만 홍합 코팅층의 초미세 구조에 대한 연구는 미비한 부분이 많다.

홍합 족사의 접착을 설명하는 메커니즘으로는 첫째로 Fe³⁺이 Mfp-1에 있는 DOPA containing protein들과 만드는 배위 결합으로 수중에서 이들은 tris-catecholate(III) complex를 형성하는 방법과[19-22] cation-π 결합으로 양이온과 전자가 풍부한 방향족 화합물 사이의 비공유결합으로 수중에서 강한 결합을 유지하는 것이 알려져 있다[23-25]. 홍합의 족사 단백질에는 리신과 같은 양이온과 티로신과 같은 방향족 그룹이 다량 함유되어 홍합 접착에 중요한 기작으로 작용할 것으로 예상하고 있다.

지금까지 시행된 선행 연구에서는 홍합 족사 코팅의 화학적 결합과 구성 단백질의 유전자 정보에 대한 연구에 집중하였다. 하지만 본 연구에서는 cation-π 작용력과 물성의 상관관계에 대해서 코팅 표면과 내부의 초미세구조 구조의 변화를 관찰을 통해 실질적으로 확인하였다. 또한, TEA나 nicotinic acetylcholine의 경우 1~2mM 정도의 양이온으로 cation-π 결합을 소모시킬 수 있다고 알려져 있기 때문에[8-11], TEA를 사용하여 족사의 강도에 미치는 결합력의 영향을 cation-π 결합의 분포밀도에 따라서 확인하였다. 본 연구는 다양한 생체 재료와 신소재 복합재료의 개발 및 응용을 가능성을 확인 하였고, 의약품, 수중접착제, 방오제 등의 개발에 큰 도움을 줄 것으로 생각된다.

결 론

홍합 족사의 코팅층은 뛰어난 연신율과 함께 에폭시와 유사한 강한 강도를 가지게 한다. Cation-π 결합의 존재밀도에 따라서 외부에서 가해지는 힘에 대해 저항하는 강도(toughness)가 강해짐을 확인할 수 있

었다. 따라서, cation- π 결합은 해양생물 접착과 강도에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며, 이를 활용한 의료용 접착제(bioadhesive)나 해양 수송 시스템에서 쓰일 수 있는 방오소재 개발을 위한 메커니즘에 이용될 수 있다.

감사의 글

This work was supported by the Marine Biotechnology Program (Marine BioMaterials Research Center) funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Korea. This research was also supported in part by Korea Ministry of Environment as "Human Resource Development Project for Energy from Waste & Recycling.

References

1. Lee BP, Messersmith PB, Israelachvili JN, Waite JH. 2011. Mussel-inspired adhesives and coatings. *Annu. Rev. Mater. Res.* **41**, 99-132.
2. H.J.Cha, D.S.Hwang and S.Lim. 2008. Development of bioadhesives from marine mussels. *Biotechnol.J.* **3**, 631-638.
3. H.G.Silverman and F.F.Roberto. 2007. Understanding Marine Mussel Adhesion. *Mar.Biotechnol.* **9**, 661-681.
4. C.P.Barnes, S.A.Sell, E.D.Boland, D.G.Simpson and G.L.Bowlin. 2007. Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **59**, 1413-1433.
5. Holten-Andersen N, Thomas E.Mates et al. 2009. Metals and the Integrity of a Biological Coating: The Cuticle of Mussel Byssus. *Langmuir.* **25**, 3323-3326.
6. Holten-Andersen N and J.H.Waite. 2008. Mussel-designed protective coatings for compliant substrates. *J Dent Res.* **87**, 700-709.
7. Holten-Andersen N, Fantner GE, Hohlbauch S, Waite JH, Zok FW. 2007. Protective coatings on extensible biofibres. *nature materials.* **6**, 669-672.
8. R.MacKinnon, G.Yellen. 1990. Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science*, **250**, 276-279.
9. C.A.Ahern, A.L.Eastwood et al. 2006. A Cation- π Interaction between Extracellular TEA and an Aromatic Residue in Potassium Channels. *J. Gen. Physiol.* **128**, 649-657.
10. L.Heginbo-tham, R.MacKinnon. 1992. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. *Neuron* **8**, 483-491.
11. S.A.Pless, J.D.Galpin et al. 2011, A novel mechanism for fine-tuning open state stability in a voltage-gated potassium channel. *Nat.Comm.* **2**, 351
12. J.H.Waite, 1983. Evidence for a repeating 3,4-dihydroxyphenylalanine- and hydroxyproline - containing decapeptide in the adhesive protein of the mussel, *Mytilus edulis* L. *J.Biol.Chem.* **258**, 2911-2915.
13. S.W.Taylor, D.B.Chase et al. 1996. Ferric Ion Complexes of a DOPA-Containing Adhesive Protein from *Mytilus edulis*, *Inorg.Chem.* **35**, 7572-7577.
14. Qi Lin, Delphine Gourdon et al. 2007. Adhesion mechanisms of the mussel foot proteins mfp-1 and mfp-3. *Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **104**, 3782-3786.
15. J.H.Waite, 1986. Mussel glue from *Mytilus californianus* Conrad: a comparative study. *J. Comp. Physiol. B* **156**, 491-496.
16. J.H.Waite, J.H., et al. 1989. The glue protein of ribbed mussels (*Geukensia demissa*): a natural adhesive with some features of collagen. *J. Comp. Physiol. B* **159**, 517-525.
17. J.H.Waite, L.M Rzepecki. 1991. alpha, beta-Dehydro-3, 4-dihydroxyphenylalanine derivatives: rate and mechanism of formation. *Arch. Physiol. Biochem.* **285**, 27-36
18. Koji Inoue, Yasuhiro Takeuchi et al. 1996. Adhesive Protein cDNA Sequence of the Mussel *Mytilus coruscus* and Its Evolutionary Implications. *J Mol Evol* **43**, 348-356.
19. S.W.Taylor, D.B.Chase et al. 1996. Ferric ion complexes of a DOPA-containing adhesive protein from *Mytilus edulis*. *Inorg.Chem.* **35**, 7572-7577.
20. M.J.Harrington, A.Masic et al. 2010. Iron-Clad Fibers: A Metal-Based Biological Strategy for Hard Flexible Coatings. *Science* **328**, 216-220.
21. H.Zeng, D.S.Hwang et al., 2010. Strong Reversible Fe³⁺-mediated Bridging between Dopa-Containing Protein Films in Water. *Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **107**, 12850-12853
22. D.S.Hwang, A.Masic et al. 2013. Marine Hydroid Perisarc: A chitin- and melanin-reinforced composite with DOPA-iron (III) complexes. *Acta Biomater.* **9**, 8110-8117
23. J.C.Ma, D.A.Dougherty, 1997. The Cation- π Interaction. *Chem. Rev.* **97**,1303-1324.

24. Dougherty DA. 1996. Cation- π interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science*, **271**, 163-168.
25. G.Waksman, D.Cowburn et al., 1992. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH₂ of v-src complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Nature* **358**, 646-665.