J. Mar. Biosci. Biotechnol. 2018, p. 34 - 43 Vol. 10, No. 2 [Review]

https://doi.org/10.15433/ksmb.2018.10.2.034 ISSN 2383-5400 (Online)

실리카테인: 생규화 및 응용

Silicatein: Biosilicification and Its Applications

양병선, 윤진영, 차형준*

Byeongseon Yang, Jin Young Yun, Hyung Joon Cha*

포항공과대학교, 화학공학과, 포항, 37673, 대한민국

Department of Chemical Engineering, Pohang University of Science and Technology, Pohang 37673, Republic of Korea

(Received 5 December 2018, Accepted 20 December 2018)

Abstract Silicon has become of increasing importance as the basic element of many high-technology products. Its synthesis is very difficult requiring high temperature solid-state reactions (>1000℃) or lower temperature methods (100-200℃) involving hydrothermal and solvothermal reactions under extreme pH conditions. In nature, on the other hand, a wide range of living organisms have collectively evolved the means of biosilicification at the astounding rate of gigatons/year. This is impressive because biosilicification in these organisms occurs under mild physiological conditions. Marine sponges possess the ability to sequester soluble silicon sources from their environments and assemble them into intricate 3D architecture. The advent of molecular biology has recently made it possible to glean molecular information about biosilicification from these systems and it turned out that enzyme silicatein is the core of biosilicification. In this review, biosilicification regulated by silicatein and its mechanism are described. Also, production of silicatein through recombinant technology and several applications of recombinant silicatein are described including immobilization of silicatein, formation of Au or Ag nanoparticles on nanowires, nanolithography approaches, core-shell materials, encapsulation, bone replacement materials, and microstructured optical fibers.

Keywords : Biomineral, Biosilica, Biosilicification, Silicatein, Recombinant Silicatein

서 론

20 세기 중반에 들어 항공 우주, 자동차, 통신, 전자 및 석유 화학 산업의 기술적 수요가 광대해짐에 따라, 철강 및 합금을 다루는 금속공학적 연구에 집중되었던 재료 과학 분야가 변화하기 시작했다. 특히, 실리콘 웨이퍼 및 집적 회로와 같은 많은 첨단 제품의 기본 요소로 실리콘의 중요성이 커지게 되었다. 자연에서 실리콘은 암석, 모래 및 점토 등의 광물에서 이산화규소(실리카)와 규산염의 형태로 발견된다. 기술이 획기적으로 발전한지 50 년이 넘었음에도 실리콘을 비롯한 첨단 소재의 제조 방법들은 여전히 제한적이다.

실리카는 규조류, 방산충 류, 선충류, 해면동물 및 고등 식물에 이르는 단세포 및 다세포 생물의 골격을 형성하는데 광범위하게 사용된다. 이러한 생물들은 수십억 년에 걸쳐 이산화규소, 탄산칼

* Corresponding author
Phone: +82-54-279-2280 Fax: +82-54-279-5528
E-mail: hjcha@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/by-nc/4.0/)

슘, 인산칼슘, 산화 철 등의 다양한 무기물질을 나노(<100 nm)에서 마이크로(0.1-100 μm), 매크로(>100 μm)에 이르는 규모에서 정교하고 복잡한 계층 구조를 정확하고 많은 양으로 형성할 수 있도록 진화해왔다. 이러한 생광물 (biomineral)의 독특한 특징은 이온이 고도로 유동적인 비 평형 환경에서 무기 구조(흔히 결정질)로 섬세하게 조직되는데 이러한 반응이 일반적으로 주변 압력, 온도 및 중성 근처의 생리적 pH 환경에서 일어난다는 것이다. 생광물 중에서도 무정형 수화 이산화규소 (SiO2·nH2O)는 전 지구적 생산 측면에서 가장 큰 규모로 생성된다.

원생동물, 해면동물, 연체동물 및 고등 식물을 포함하는 광범위한 생명체들은 연간 기가톤의 놀라운 속도로 생규화(biosilicification) 기작을 진화시켰다. 규조류, 방산충 및 해면동물은 수화된 무정형 실리카를 이용하여 현재의 공학 기술로도 재현하기 힘든 정밀하고 복잡한 3 차원 나노 및 미세 구조체를 형성 할 수 있다. 인간이 실리카를 합성하기 위해 전형적으로 고온 및 부식성 화학 물질을 사용하는 것과 달리 생규화는 온화한 생리적 조건에서 일어나기 때문에 주목받고 있다. 규조류와 해면동물이 주변 환경으로부터 용해성 실리콘 소스를 격리시켜 복잡한 3D 구조체로 형성시키는 능력이 있다는 것이 알려진 지 이미 한 세기가 지났지만 이러한 과정을 중재하는 단백질과 분자 메커니즘은 잘 알려지지 않았다.

분자 생물학이 발전함에 따라 이러한 시스템에서 생규화에 관여하는 분자 정보를 수집할 수 있게 되었다. 실제로 2 종의 유기체, 규조류 및 해면동물에서 생규화를 담당하는 단백질의 일부가 지난 10 년 동안 규명되었다. 생규화의 생물학적 메커니즘, 개념, 기능 및 설계 특성을 밝힘으로써 저온, 주변 압력 및 중성 근처의 pH 환경에서의 무기 나노 구조 제조법을 혁신적이고 이상적으로 추상화 할 수 있다. 이러한 새로운 생체모방 합성법은 수 나노 및 미세 구조의 무기물질을 생성하기 위하여 기존에 사용된 고온 고체상 반응(>1000℃) 또는 저온의 습식 화학적 방법(100-200℃)이 극한의 pH 조건하에서 열수 및 열역학적 반응을 수반하는 것과 뚜렷하게 대비된다.

실리카테인(Silicatein)

해면동물은 가장 오래된 후생 동물 중 하나이며 가장 단순한 다세포 생물 중 하나이다[1]. 해면동물에 속하는 보통해면류(Demospongiae)와 육방해면류(Hexactinellida)의 골격은 수화된 무정형 실리카로 이루어져있는데 큰 막대 (길이 1 m까지)에서 작은 바늘 모양에 이르기까지 종 특유의 형태를 보인다[2,3]. 해양 보통 해면류 중 하나인 오렌지둥굴해면(*Tethya aurantia*)는 해면동물의 생규화를 이해하기위한 전형적인 모델이다. 이 종의 주요 골격은 길이 2 mm, 직경 30 μm에 이른다[4,5].

모르스 그룹은 주변의 실리카를 플루오르화 수소산 용액으로 탈염시킴으로써 단백질로 구성된 축 방향 필라멘트가 바늘 모양의 해면 침골(spicule) 내부에 존재한다는 것을 밝혔으며 이는 실리카테인 효소로 판명되었다. 이 단백질 필라멘트는 실리카테인 α, β, γ 3개의 구성 단백질 소단위로 이루어져있다[4]. 이들의 분자량은 거의 비슷한데 특히 실리카테인 α와 β는 조성 및 아미노산 잔기까지 매우 유사하다.

단백질과 DNA 염기 서열 분석 결과 실리카테인은 파파인 유사 프로테아제 초가족의 카텝신 L과에 속하는 것이 밝혀졌다[4,6]. 실리카테인 α와 카텝신 L은 3차 구조를 가지며 활성 부위의 아미노산 잔기가 서로 매우 유사하다 (실리카테인 α의 세린, 히스티딘 및 아스파라긴, 그리고 카텝신 L의 시스테인, 히스티딘 및 아스파라긴). 그러나, 실리카테인 α에는 카텝신 L에 존재하는 4 개의 아미노산 루프가 없으며 세린이 풍부한 클러스터가 있는데 이는 단백질 표면에서 생규화의 템플릿 역할을 한다[4]. Suberitesdomuncula, Petrosiaficiformis와 같은 다른 해면동물 종의 실리카테인 또한 활성 부위 트리아드에 세린, 히스티딘 및 아스파라긴 잔기가 있다[7].

대부분의 시스테인 및 세린 가수 분해 효소의 메커니즘에는 카르보닐 탄소에서 펩타이드 아미

드 결합에 대한 티올 또는 알코올 작용기의 친핵성 공격이 있다[8]. 실리카테인 α와 카텝신 L의 유사성을 토대로 실리카테인 α가 간접적인 단백질성 템플릿으로 작용할 뿐만 아니라 실리카 합성에서 촉매역할을 하는 것으로 볼 수 있다. 이 가설은 tetraethyl orthosilicate(TEOS)[5]을 모델 기질로 시험되었고 실리카테인 필라멘트와 정제된 실리카테인 α 소단위 모두 저온 16℃ 및 중성 pH에서 시험관 내 TEOS의 가수분해를 촉매하는 것으로 확인되었다. 열 변성된 실리카테인은 효소적 활성을 나타내지 않는데 이는 실리카테인의 구조가 촉매 작용에 중요함을 의미한다. 활성 부위 세린의 수산기와 히스티딘의 이미다졸 질소 사이의 수소결합이 세린 산소의 친핵성을 증가시켜 기질 실리콘 중심으로의 친핵성 공격을 촉진한다는 것이 실리카테인의 효소 메커니즘으로 제안되었다. 친핵성 공격이 일어나면 에탄올이 제거되고 이미다졸의 질소에 의해 안정화된 단백질-O-Si 중간체가 형성되어 5배위 실리콘 중심이 만들어진다. 물이 첨가되면 알콕시드 결합이 완전히 가수 분해되어 실라놀, 또는 Si-OH 결합을 형성하며 이어서 응축이 일어나 실리카 골격을 형성한다[5]. 부위 특이적 돌연변이 실험을 통해 활성 부위의 세린과 히스티딘이 효율적인 가수분해 활성에 중요하다는 것이 밝혀졌다[9].

알콕시드에서 금속 산화물이 합성되면 연속적으로 다음 2개의 단계가 진행된다. 먼저 금속 알콕시화물이 가수 분해되어 금속 수산화물이 생성되고, 수산화기 및 잔류 알콕시드 그룹의 중축합 반응이 일어나 금속 산화물 네트워크를 형성한다[10]. 두 단계 중, 가수분해가 속도를 제한 단계이므로 일단 가수분해가 시작되면 두 금속 수산화물 사이의 응축을 통해 물을 방출(oxolation)하거나 금속 수산화물과 금속 알콕시화물 사이의 응축으로 알코올을 방출(alkoxolation)하여 중축합 반응이 일제히 일어날 수 있다[11-15]. 실리콘 알콕시드는 수중 친핵성 공격에 반응성이 없으므로 산화 규소로부터 실리카를 합성하기 위해서는 산이나 염기, 또는 불소 촉매 및 고온 조건이 필요한 반면 실리카테인은 저온 및 중성 pH에서 실리카를 합성한다[10].

생체 촉매 가수분해 이외에도 거시적 규모의 실리카테인 필라멘트는 실리카 침전을 위한 유기 템플릿 역할을 한다. 실리카는 나노 입자 형태로 전체 필라멘트를 따라 여러 층 두께로 침전된다[5]. 실크 피브로인(silk fibroin)과 셀룰로오스 섬유 표면에 존재하는 고밀도의 수산기가 중성 pH 및 16℃에서 실리카 형성을 일으킨다는 것은 중요한 의미가 있는데, 이는 실리카 형성에 수산기가 풍부한 영역이 필요하다는 것을 뜻하기 때문이다. 따라서 실리카테인 단량체를 구성하는 세린 클러스터 표면의 풍부한 수산화기가 실라놀 작용기와 중축합되어 단백질-O-Si 결합을 형성함으로써 실리카 합성의 템플릿 역할을 한다고 볼 수 있다[5,16].

금속산화물 합성

앞서 언급했듯, 실리카테인 필라멘트와 정제된 실리카테인 α에는 실리콘 알콕시드의 가수분해 활성이 있다. 자연 추출한 실리카테인을 중성 및 16℃(해양 해면동물 *T. auratia*의 서식지 온도이자 실리카테인 활성의 최적 온도)에서 배양한 경우 실리카테인의 표면이 실리카로 코팅되는 것이 확인되었다.

자연적으로 실리카테인은 실리카를 합성하기 위해 넓은 범위의 전구체를 이용하며 다른 금속 산화물 합성에 촉매작용을 할 것으로 예상된다. 이어서 실리카테인은 polysilsesquioxanes, 이산화티타늄[17,18], 이산화 지르코늄[19], 산화 갈륨[20], barium oxofluorotitanate와 같은 금속 산화물을 생성시키는 다른 금속 알콕시화물의 가수 분해를 촉매 하는 것으로 밝혀졌다. 이는 실리카테인 효소의 활성 부위가 매우 탄력적이며 그 기질 범위와 작용 메커니즘에 적응할 수 있음을 의미한다. 또한 실리카테인의 다른 특성과 중요성이 가시화되었다. 적절한 전구체가 사용되고 나노결정의 방향이 단백질 표면에 대해 균일할 때, 금속 산화물은 비정질 침전물보다는 나노 결정질로 합성되었다. 이는 실리카테인 필라멘트가 결정화에서 잠재적으로 중요한 역할을 하고 있으며, 이는 결정 성장에 있어 선호되는 방향성에

영향을 끼침을 시사한다[17].

재조합 실리카테인 기반 물질 합성

녹색 화학(green chemistry)적 관점에서, 본래의 실리카테인의 생촉매 및 템플릿 역할을 통한 현저히 낮은 온도에서의 새로운 무기 구조체 형성은 나노 물질 합성을 위한 보다 안전하고 저에너지 촉매 경로를 제공하기 때문에 상당한 관심을 받는다. 그러나 이러한 접근법에서는 소량의 실리카테인 필라멘트로는 제한된 양의 무기 물질을 얻을 수 있다는 한계가 있다. 이를 극복하기 위해 재조합 실리카테인이 제안되었다. 재조합 실리카테인을 가수 분해를 위한 생체 촉매로 사용함으로써 주위 환경에서 무기물질을 보다 효율적이고 신속하게 대규모로 합성할 수 있다.

먼저, 대장균에서 재조합 실리카테인을 생산하고 TEOS를 효소적으로 가수분해하여 실리카를 형성할 수 있음이 확인되었다[5]. 이어서 다른 그룹은 재조합 실리카테인을 얻기 위해 원핵 및 진핵 발현 시스템 모두를 사용했다. 실리카테인 α 및 β를 대장균에서 발현한 사례도 보고되었고 histidine-tag를 포함한 재조합 단백질이 Ni-NTA 매트릭스상에서 정제되었다.

그러나 실리카테인의 높은 소수성 때문에 발현과 재구성이 어려웠고 실리카테인 집합체의 세포내 응집체(intracellular inclusion body)가 형성되었다. 이러한 이유로 다른 연구 그룹은 재조합 실리카테인이 세포 표면에 존재하도록 하는 대안적 접근법을 제시했다. Curnow는 대장균 세포 바깥 표면에 실리카테인 α (from *T. aurantia*)을 재조합 발현함으로써 실리카테인 기반의 전 세포 생촉매(whole-cell biocatalyst)를 개발하는 데 성공했다. 이는 실리카테인 α를 재조합 형태의 대장균 외막 단백질 A (OmpA)의 first extracellular loop에 삽입함으로써 이루어졌다. 재조합 융합 OmpA-Sil 단백질은 세포 당 약 5만개의 복제물, 또는 전체 외부 구성원 단백질의 약 20-25%에 달하는 높은 수율로 세포 표면에 분류되는 것으로 보고되었다[21]. 또한 실리카테인 기반의 전 세포 생체 촉매는 무기 인산 티타늄 및 poly(L-lactide) 고분자와 같은 생체적합성 및 생분해성 유기 고분자 합성의 원료로 기능할 수 있음이 밝혀졌다[22].

분자생물공학적으로 융합 단백질을 만들면 본래 실리카테인의 특성 외에도 부가적인 생물학적 특성을 가지는 실리카테인을 생성할 수 있다. 한 예로 접착 단백질인 실크 피브로인 염기 서열을 실리카테인과 융합하여 실리카테인과 그로부터 형성된 실리카 나노 입자를 표면에 부착할 수 있다[23].

합성 실리카테인 유사체 기반 물질 합성

생물학적 시스템을 모방하여 합성된 실리카테인 유사체는 저렴하고 열에 더 잘 견딜 수 있는데 이는 잠재적 대량 생산을 위한 저온 나노 조립과 같은 응용 기술 발전을 위해 필수적이다. 몇몇 연구 그룹들은 본래 단백질의 촉매 활성을 모방한, 생물학적으로 영감을 받은 많은 템플릿을 예측하여 합성함으로써 실리카테인의 작용 메커니즘을 성공적으로 검증하고 확장했다. 본래 실리카테인 효소의 활성 부위 특징이 유사한 합성 시스템에서 pH 7에서의 촉매 활성에 필요하다는 가설을 입증하기 위해 최초로 자가 조립형 diblock copolypeptides를 합성했다[24]. 실리카테인의 활성 부위 기능을 모방하기 위해 친핵성 잔기(세린과 시스테인)를 아민 말단 잔기와 결합시켜 공중합체에 적절한 이중 기능성을 부여했다[4,5,9]. 이러한 비교적 단순한 diblock copolypeptides는 pH 7에서 촉매 가수 분해 활성을 나타냈고 TEOS를 전구체로 사용하여 실리카를 형성했다. 이는 친핵성 곁사슬 및 수소 결합이 가능한 질소 함유 곁사슬 모두를 포함하는 diblocks가 이러한 작용기가 결핍되고 친핵체의 강도에 따라 촉매 활성이 증가하는 동족체보다 더 효율적임을 입증한다. 세린 및 라이신의 단일 중합체 및 이들의 혼합물은 실리카를 형성하지 않았다. 최근 Adamson은 중성 pH 및 저온에서 실리카 형성을 위한 비펩타이드 diblock copolymer인 poly(hydroxylated butadiene-b-2-vinylpyridine)을 합성했다[25].

앞서 언급한, 실리카의 합성법들은 모두 실리카테인 또는 실리카테인 유사체를 기본으로 한다. 이로 인해 생성된 무기물은 유기 촉매 템플

릿과 밀접하게 접촉하고 있기 때문에 고순도 물질을 필요로 하는 장치 응용에는 적합하지 않다[26]. 이에, 저온에서 동적으로 제어된 무기 나노결정 제조를 위해 실리카테인의 메커니즘을 기초로 하여 유기 생촉매 또는 템플릿 사용을 하지 않는 저온 증기 확산 합성 방법이 최근 개발되었다[27,28]. 여기서 결합염기인 수산화물은 친핵체 수산화기 역할을 하며 결합산인 암모늄은 수소결합을 받아들이는 질소 원자 역할을 한다.

생규화의 응용

실리카 기반 물질은 산업 및 의학 분야에서 널리 사용되며, 초소형 전자 공학, 광전자 공학, 바이오센서 및 촉매와 같은 첨단 기술 제품에 쓰인다. 실리카는 유리, 도자기, 페인트, 접착제 및 분리 재료의 제조 또는 반도체 소자의 절연체로도 사용된다. 화학 반응을 이용하여 실리카를 생산하는 것은 고온 및 고압, 극한의 pH 조건이 필요한 반면, 해면동물에서 일어나는 실리카 형성은 온화한 주변 환경 조건 하에서 일어난다. 또한, 규산질 해면류는 골격을 구성하는 요소들을 높은 정확도와 많은 수로 생산할 수 있다. 따라서 이러한 생물체에서의 실리카 형성 메커니즘은 나노바이오 기술에 사용될 새로운 바이오 실리카의 설계, 특히 나노 규모로의 설계에 매우 중요한 의미를 가진다[29].

1. 실리카테인 고정화

다양한 표면에 실리카테인을 고정화하는 것은 많은 응용 분야에 활용된다. 실리카테인을 사용하는 것은 무기 및 유기 표면에 다른 금속 산화물 혹은 실리카 코팅을 하는데 좋은 방법이다. 이 방법의 장점은 실리카테인의 효소적 성질에 기인하는데, 저온 및 중성에 근접한 pH의 온화한 효소 조건 하에서 생규화 작용을 일으킨다는 것이다. 이러한 특성은 특히 열에 민감한 물질이나 알칼리성 혹은 산성 pH 조건에서 손상되는 물질을 코팅하는데 중요하다.

실리카테인 고정화의 핵심 원리는 히스티딘 태그의 상호작용이다. 실리카테인을 고정화하기 위해 chelator nitrilotriacetic acid(NTA)가 사용된다. 히스티딘 태그 친화적 서열이 있는 재조합 실리카테인은 표면에 고정되었을 때 생 촉매적인 활성을 유지한다[30]. 실리카테인의 히스티딘 태그는 링커인 NTA를 통해 단백질을 표면에 연결하는 결합 부위가 된다. NTA는 4개의 금속-킬레이트 부위를 가지므로 6개의 리간드 결합 부위가 있는 Ni^{2+}같은 금속 이온과 강하게 결합하고 2개의 결합 자리를 남길 수 있다. 그런 다음 히스티딘 태그는 남은 2개 부위와 충분히 강한 상호작용을 한다. 따라서 재조합 실리카테인은 NTA와 Ni^{2+}복합체 형성을 할 수 있는 히스티딘 태그를 이용하여 결합한다[30].

하나의 좋은 예로 금 표면에 실리카테인을 드러내는 것이 있다. 실리카테인을 금 표면에 고정하기 위해 유기 티올로 종결된 NTA를 사용했다. 티올 말단이 금 표면에 결합하는 반면, NTA 말단은 일단 Ni^{2+}복합체를 형성하면 재조합 실리카테인의 히스티딘 태그에 선택적으로 결합한다[31]. NTA 유기 티올의 자가 조립 단일 층(self-assembled monolayer; SAM) 침착과 Ni^{2+}표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance; SPR) 분광법에 의해 실리카테인의 정착을 모니터링 한 후, 실온 및 중성 pH에서 실리카 침착물 형성을 확인함으로써 표면에 지지된 실리카테인 필름의 가수 분해 활성을 입증하였다.

재조합 실리카테인을 금 표면에 고정화하는 다른 방안으로, 반응성 에스테르 중합체인 poly (acetoxime methacrylate)를 사용하여 금 표면에 직접 결합되어 매개 역할을 하는 시스테아민 단일 분자층의 아민과의 반응을 통해 금 표면을 코팅했다[32]. 그리고 ω-terminated NTA 아민을 중합체 층의 상부 표면에 화학적으로 흡착시켰다. 일단 Ni^{2+}와 복합체가 형성되면, NTA는 최종 표층으로서 히스티딘 태그 재조합 실리카테인과 결합할 수 있다.

또한 실리카테인은 금속 산화물 표면상에 고정화 될 수 있다. 금속 산화물 표면에 중합체를 부착하기 위한 고정기로 사용되는 도파민(카테콜) 잔기 및 히스티딘 태그가 부착된 단백질을 고정화하는 NTA 링커가 포함된 중합체 리간드를 이

용하여 TiO_2나 Fe_2O_3와 같은 금속 산화물의 표면 기능화(surface functionalization)를 할 수 있다. 이 방법은 히스티딘 태그가 부착된 실리카테인을 TiO_2 나노 와이어와 γ-Fe_2O_3나노 입자에 고정화하는 데 사용되었다[33].

2. 나노 와이어 상의 은 및 금 나노 입자 형성

실리카테인은 실리카 에스테라아제와 실리카 중합 효소 활성 외에 나노 기술과 관련한 부작용이 있는 것으로 밝혀졌다. 실리카테인은 용액 상에서 금 또는 은 나노 입자의 환원적 형성을 촉진할 수 있다[33]. Tetrachloroaurate 음이온 ($AuCl_4^-$) 수용액으로 Au 나노 입자를 합성하기 위해 TiO_2가 포함 된 재조합 실리카테인을 사용했는데 이는 효소의 활성 부위 화학(active site chemistry)이 포함되지 않은 환원성 비 가수 분해 메커니즘을 통해 일어난다. Au_0로의 $AuCl_4^-$ 음이온의 환원은 단백질의 표면 아래에 숨겨진 자유 티올 그룹을 포함할 수 있다. 형성된 나노 입자는 단백질 표면의 염기성 아미노산 잔기의 NH_2 그룹에 의해 안정화되는 것으로 추측된다. 또한 나노 결정은 S3 대칭축을 가지고 있어서 단백질에서 삼각형 모양의 나노 결정으로의 키랄 유도를 야기한다.

실리카테인은 수용액에서 $AgNO_3$의 환원에 의해 은 나노 입자도 형성할 수 있다. 은 나노 입자가 항균 활성이 있는 것에 기인하여 실리카테인 매개로 형성한 은 나노 입자를 상처 드레싱 또는 생체 의학기구의 코팅 제조에 활용할 수 있다.

3. 나노리소그래피 (Nanolithography)

소프트 리소그래피 과정은 초소형 전자 공학에서 그 중요성이 점점 커지고 있다[35,36]. 그러나 이 과정들은 효소-촉매 반응을 이용하지 않는다. 한편, 실리카테인은 실리카 패턴 제조에 유용할 두 가지 특성이 있다. 실리카테인은 (1) 생물 촉매 활성이 있다. 수용성 전구체로부터 실리카 및 다른 금속 산화물을 형성 할 수 있으며, (2) 구조 유도 활성을 나타낸다. 실리카테인 분자는 자가 조립되어, 실리카 및 기타 금속 산화물 패턴을 합성하는 데 사용할 수 있는 단백질 템플릿을 형성 할 수 있다. 실리카테인 템플릿은 다양한 표면(금속, 금속 산화물 또는 유리)에서 생성될 수 있고 실리카테인 단백질 필라멘트는 3D 실리카 구조체의 생촉매적 형성을 위한 템플릿 역할을 하는 3D 주형을 만들 수 있다. 실리카테인의 이러한 특이한 성질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 소프트 리소그래피 공정을 적용한 실리카 패턴의 제어된 구현을 위한 실리카테인 매개의 생광물화 반응이 가진 잠재적인 영향은 저온 및 중성 부근 pH에서 실리카를 합성하는 실리카테인의 능력에 달려있는데, 이는 온화하고 환경친화적 조건 하에서 마이크로 전자 장치의 새로운 제조 공정을 가능하게 한다.

마이크로 소프트 프린팅(μCP) 및 모세관에서의 마이크로 몰딩(MIMIC)을 포함하여 다양한 소프트 리소그래피 기술을 실리카테인 분자 증착의 패턴 제어에 이용할 수 있다. 최근 재조합 실리카테인을 이용한 소프트 리소그래피를 통해 전기적으로 절연 된 바이오 실리카 층이 보고되었다[37]. 마이크로접촉 프린팅(microcontact printing) 기술로 재조합 단백질을 선택적으로 고정화했고[35], 단순성, 저비용, 재현성, 높은 표면 처리 능력과 처리 된 표면의 높은 충진 효율성의 균형을 잡았다[38]. 실리카 미세 구조 또는 필름은 단순히 생광물화 시간을 변화시켜 얻을 수 있으며, 이 기술은 다른 표면에 생광물화된 무기 필름을 구현하는데 적합하다.

4. 코어셸(Core-shell) 물질

해면 침골의 독특한 물리화학적 특징을 가지는 라멜라 구조를 모방한 물질을 합성하기 위해 실리카테인의 생합성 능력을 활용하는 것은 흥미로운 접근이다. 앞서 언급했듯이, 히스티딘 태그와 NTA의 니켈 복합체 형성을 통해 다양한 금속 및 금속 산화물 상에 재조합 실리카테인을 고정할 수 있다. 이러한 재조합 실리카테인의 고정화를 통해, 복잡한 구조와 특징을 가지며 금속 및 금속 산화물 층이 교대로 있는 침골과 유사한 코어셸 물질을 제조할 수 있음이 밝혀졌다[39]. 침골을 과황산암모늄으로 처리하여 표면을 NH_2 잔기로 기능화했다. 그 다음, NTA 종결 시스테아민

또는 NTA 말단 반응성 에스테르 중합체 등을 처리했다. 마지막으로 실리카테인이 니켈 복합체를 형성하며 고정화되었다. 이 실리카테인이 고정된 침골은 주변 온도 및 중성 pH에서 금속 또는 금속 산화물 전구체 용액에 담가졌다. 실리카테인의 작용으로 생체 금속, 금속 산화물 층이 형성되었다. 이 과정을 반복하여 층상의 서로 다른 다중 금속 또는 금속 산화물 층을 만들 수 있다. SEM 분석을 통해 실리카테인으로 덮인 침골의 표면이 단백질성 층에 의해 주름져있음을 밝혔다. TEOS를 전구체 용액으로 사용했을 경우, 후방 산란된 SEM 이미지에서 실리카로 덮인 침상의 표면에 두꺼운 표면층이 추가적으로 존재함을 확인하였다. 실리카테인이 아닌 중합체로 처리하여 기능화한 침골은 완전히 매끄러운 표면을 나타냈다. 이러한 방식으로 복잡한 구조체를 형성할 수 있다. 기존의 금속 산화물 합성 방법으로는 정교한 구조체를 만들기 어렵고 혹독한 반응 조건, 많은 비용과 시간이 필요하다.

5. 캡슐화(Encapsulation)

효소 또는 세포와 같은 생물학적 시스템을 하이드로젤(hydrogel)로 캡슐화하는 바이오캡슐화는 생명공학 분야에서 큰 관심을 받고 있다. 캡슐화 기술은 생체 의학에서 널리 사용되는데, 이에 유리한 조직 적합성을 특징으로 하기 때문이다. 조직 공학에서 스캐폴드(scaffold)로서, 환경 민감성 하이드로젤로서, 또는 지효성 (sustained-release) 전달 시스템으로써의 잠재적인 응용 이 외에도, 바이오캡슐화 된 분자 또는 세포는 바이오센서로 활용될 수 있다. 실리카를 이용한 바이오캡슐화와 관련하여 극복해야 할 장애물 중 하나는, 모놀리식젤(monolithic gel)이 아니라 micrometric powder를 생성하기 위해 규산염 또는 실리콘 알콕사이드의 젤화 과정을 제어하는 것이다. 과거에 poly(silicate)-바이오캡슐화를 위해 두 경로가 사용되었는데 (1) 금속 알콕시화물의 가수 분해 및 축합 반응과 (2) 금속의 수성 염의 겔 형성능을 활용하는 것이다. 실리콘 알콕사이드 기반 졸-젤 화학 (sol-gel chemistry)는 알코올을 시용하는데 이는 시작 전구체의 가용화를 위한 공용매다. 그러나 대부분의 바이오캡슐화에서 알코올은 불리하다. Avnir와 Kaufman은 알콕사이드 단량체를 사용하여 알코올이 실리카젤 형성을 방해할 수 있음을 보였다[40]. 그리고 TEOS 용액을 사용하여 효모 세포를 poly(silicate)로 캡슐화하는 시도를 했다. 이어서 세균이 실리카테인 α 유전자로 형질 전환 될 수 있음을 증명하였다. 유도된 실리카테인 α 유전자와 실리카테인이 발현되면 박테리아 세포 표면으로 옮겨져 촉매 활성을 유지한다. 전자 현미경 분석 결과, 규산 존재 하에서 성장한 형질 전환된 박테리아가 전체 세포를 캡슐화하는 실리카 덮개를 형성시킨다는 것이 밝혀졌다. 놀랍게도 박테리아의 성장 동태 (growth kinetic)은 실리카 껍질 형성에 영향을 받지 않았다[40].

생화학적 연구에 근거하여 생광물화 반응에 관여하는 펩타이드 및 단백질이 때로는 무기 구조 내에 명백히 갇힌다고 할 수 있다. 이러한 발견으로 인해 세포, 효소[42], 나노 입자[43,44]의 캡슐화를 위한 생체 모방 접근법이 개발되었다. 무해한 생체 모방 캡슐화 과정은 기존의 졸-젤 캡슐화 방법의 대안적 접근법이 될 수 있다[41].

6. 골 대체재

생규화는 골 대체재 및 골 재생 스캐폴드에 대한 유망한 접근법이 되었다. 실리카는 조직공학에서 뼈와 연골의 스캐폴드로 사용되는 다양한 물질의 한 구성요소이다[45,46]. 실리카테인 매개로 합성된 바이오 실리카로 코팅된 표면에서 세포가 자랄 경우, 인간의 골 형성 세포(human osteosarcoma SaOS-2 cell)의 광물화가 크게 증가하는 것이 밝혀졌다[47]. 이러한 이유로 실리카테인을 활용하는 것은 수술에 사용되는 금속 임플란트를 코팅하기 위한 바이오 실리카 제조에 유망한 접근방법이 될 수 있다. 금속 임플란트는 실리카테인에 의해 바이오 실리카로 코팅될 수 있으며, 이 바이오 실리카로 코팅된 티타늄 임플란트에서 성장한 SaOS-2 세포는 광물화를 촉진했다. 생촉매적으로 형성된 바이오 실리카 층은 임플란트의 생체 적합성을 향상시킬 것으로 기대된다. 게다가, 유기 물질과 혼합된 이 임플란트는

무기 물질과 비교하여 우수한 기계적 안정성과 계면 결합을 보였다.

7. 미세구조 광섬유

광섬유 통신 시스템의 도입으로 통신에 혁명이 일어났다. 광섬유는 실리카 유리로 된 중심부와 저굴절률 피복 및 외부 코팅으로 이루어져있다. 해면 침골은 고효율로 빛을 전달하는 광학 섬유처럼 보인다. 파장 615~1310nm인 빛만이 침골 섬유를 통과할 수 있으며 그 외의 파장을 갖는 빛은 걸러진다[48]. 해면 광섬유의 장점 중 하나는 기술적인 광섬유에 비해 안정성이 높다는 것이다. 과학 기술로 만든 무기재료 광섬유는 과하게 구부리면 쉽게 파손되는 반면, 무기 및 유기물질로 구성된 복합체인 해면 광섬유는 기계적 힘에 대해 훨씬 더 안정적이다.

결 론

실리카테인 필라멘트가 가수 분해 효수 및 생규화의 템플릿으로 작용하여, 생체 모방 물질 합성의 새로운 방법을 제시한다는 것이 입증되었다. 이 메커니즘의 핵심 측면은 분자 전구체의 촉매 가수분해 및 주형화된 중축합 반응이 반응속도론적 지배 반응이라는 것과 실리카테인 필라멘트를 따라 산화물 물질의 성장하는 것이라 할 수 있다. 또한 다양한 polysilsesquioxanes 및 금속 산화물에 대한 광범위한 비자연적 기질이 천연 실리카테인의 촉매 활성에 사용될 수 있다. 히스티딘 태그가 달린 재조합 실리카테인이 성공적으로 생산되었고, 이를 다양한 표면에 고정화함으로써 나노 와이어상에 금 및 은 나노입자 형성, 코어셸 물질, 골 대체재와 같은 다양한 응용에 활용하였다. 차세대 생체 모방 물질 제조법은 더욱 복잡한 생물학적 시스템에서 영감을 얻어야 하며, 그로 인해 더 높은 수준의 구조적 복잡성 및 정밀성을 가지는 바이오 실리카를 합성하여 더욱 다양하게 활용할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단의 해양·극지기초원천기술개발사업의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2015M1A5A1037055).

References

1. Muller, W. E. G. Naturwissenschaften. 1995. Molecular phylogeny of metazoa (animals): Monophyletic origin. **82**, 321.
2. Simpson, T. L. 1984. The Cell Biology of Sponges; Springer Publishing: New York.
3. Levi, C., Barton, J. L., Guillemet, C., Le Bras, E., Lehuede, P. J. 1989. A remarkably strong natural glassy rod: the anchoring spicule of the Monorhaphis sponge. *Mater. .Sci. Lett*. **8**, 337.
4. Shimizu K, Cha J, Stucky GD, Morse DE. 1998. Silicatein alpha: cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **95**, 6234–6238
5. Cha JN, Shimizu K, Zhou Y, Christianssen SC, Chmelka BF, Stucky GD, Morse DE. 1999. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA **96**, 361–365
6. Krasko, A., Lorenz, B., Batel, R., Schro¨der, H. C., Mu¨ller, I. M., Mu¨ller, W. E. G. 2000. Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge Suberites domuncula is controlled by silicate and myotrophin. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4878.
7. Pozzolini, M., Sturla, L., Cerrano, C., Bavestrello, G., Camardella, L., Parodi, A. M., Raheli, F., Benatti, U., Mu¨ller, W. E. G., Giovine, M. 2004. Molecular cloning of silicatein gene from marine sponge Petrosia ficiformis (Porifera, Demospongiae) and development of primmorphs as a model for biosilicification studies. *Mar. Biotechnol.* **6**, 594.
8. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner, J. F., Eds. 2004. Handbook of Proteolytic Enzymes, Volume 2: Cysteine, Serine and Threonine Peptidases; Elsevier: London.
9. Zhou, Y., Shimizu, K., Cha, J. N., Stucky, G. D., Morse, D. E. 1999. Efficient Catalysis of Polysiloxane Synthesis by Silicatein α Requires Specific Hydroxy and Imidazole Functionalities. *Angew. Chem., Int. Ed.* **38**, 779.
10. Brinker, C. J., Scherrer, G. W. 1990. Sol-Gel Science: the Chemistry of Sol-Gel Processing; Academic Press: New York.
11. Henry, M., Jolivet, J. P., Livage, J. 1992. In Chemistry, Spectroscopy and Applications of Sol-Gel Glasses; Reisfeld, R., Ed.; Springer-Verlag: New York; Vol. 77, pp 153.
12. Sanchez, C., Ribot, F. 1994. Molecular design of hybrid organic-inorganic materials with electronic properties. *New J. Chem.* 18, 1007.

13. Bradley, D. C., Mehrotra, R. C., Gaur, D. P. 1978. Metal Alkoxides; Academic Press: London.
14. Ribot, F., Toledano, P., Sanchez, C. 1991. Hydrolysis-condensation process of .beta.-diketonates-modified cerium(IV) isopropoxide. *Chem. Mater.* **3**, 759.
15. Mark, J. E. 1996. The Sol-Gel Route to Inorganic-Organic Composites. In Heterogeneous Chemistry ReViews; Wiley & Sons: New York, Vol. 3, p 307.
16. Weaver, J. C., Morse, D. E. 2003. Molecular biology of demosponge axial filaments and their role in biosilicification. *Microsc. Res. Technol.* **62**, 356.
17. Sumerel JL, Yang W, Kisailus D, Weaver JC, Choi JH, Morse DE. 2003. Biocatalytic structuredirecting synthesis of titanium dioxide. *Chem. Mater.* **15**, 4804 – 4809
18. Tahir MN, Théato P, Müller WEG, Schröder HC, Borejko A, Faiß S, Janshoff A, Huth J, Tremel W. 2005. Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein. *Chem. Commun.* **28**, 5533 – 5535
19. Bansal V, Rautaray D, Ahmad A, Sastry M. 2004. Biosynthesis of zirconia nanoparticles using the fungus Fusarium oxysporum. *J. Mater. Chem.* **14**, 3303 – 3305
20. Kisailus D, Choi JH, Weaver JC, Yang W, Morse DE. 2005. Enzymatic synthesis and nanostructural control of gallium oxide at low temperature. *Adv. Mater.* **17**, 314 – 318
21. Curnow, P., Bessette, P. H., Kisailus, D., Murr, M. M., Daugherty, P. S., Morse, D. E. 2005. Enzymatic Synthesis of Layered Titanium Phosphates at Low Temperature and Neutral pH by Cell-Surface Display of Silicatein-α. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 15749.
22. Curnow, P., Kisailus, D., Morse, D. E. 2006. Biocatalytic Synthesis of Poly(l-Lactide) by Native and Recombinant Forms of the Silicatein Enzymes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **45**, 613.
23. Müller WEG, Geurtsen WK, Schröder HC. 2006. Biosilica-adhesive protein nanocomposite materials: synthesis and application in dentistry. US Patent Application No. US60/839,601
24. Cha, J. N., Stucky, G. D., Morse, D. E., Deming, T. J. 2000. Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides. *Nature.* **403**, 289.
25. Adamson, D. H., Dabbs, D. M., Pacheco, C. R., Giotto, M. V., Morse, D. E., Aksay, I. A. 2007. Non-Peptide Polymeric Silicatein α Mimic for Neutral pH Catalysis in the Formation of Silica. *Macromolecules.* **40**, 5710.
26. Brutchey, R. L., Yoo, E. S., Morse, D. E. 2006. Biocatalytic synthesis of a nanostructured and crystalline bimetallic perovskite-like barium oxofluorotitanate at low temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10288.
27. Kisailus, D., Schwenzer, B., Gomm, J., Weaver, J. C., Morse, D. E. 2006. Kinetically Controlled Catalytic Formation of Zinc Oxide Thin Films at Low Temperature. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 10276.
28. Brutchey, R. L., Cheng, G., Gu, Q., Morse, D. E. 2008. Positive Temperature Coefficient of Resistivity in DonorDoped BaTiO3 Ceramics derived from Nanocrystals synthesized at Low Temperature. *Adv. Mater.* **20**, 1029.
29. Schröder, H. C., Anatoli Krasko, A., Brandt, D., Wiens, M., Tahir, M. N., Tremel, W., Müller, W.E.G. 2007. Silicateins, silicase and spicule-associated proteins: synthesis of demosponge silica skeleton and nanobiotechnological applications Porifera Research: Biodiversity, Innovation and Sustainability. 581-592
30. Tahir MN, Théato P, Müller WEG, Schröder HC, Janshoff A, Zhang J, Huth J, Tremel W. 2004. Monitoring the formation of biosilica catalysed by histidine-tagged silicatein. *Chem. Commun.* 2848 – 2849
31. Sigal, G. B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., Whitesides, G. M. 1996. A self-assembled monolayer for the binding and study of histidine-tagged proteins by surface plasmon resonance. *Anal. Chem.* **68**, 490.
32. Nawaz Tahir, M., The´ato, P., Mu¨ller, W. E. G., Schro¨der, H. C., Borejko, A., Fai, S., Janshoff, A., Huth, J., Tremel, W. 2005. Formation of layered titania and zirconia catalysed by surface-bound silicatein. *Chem. Commun.* 5533.
33. Tahir MN, Eberhardt M, Therese HA, Kolb U, Theato P, Müller WEG, Schröder HC, Tremel W. 2006. From single molecules to nanoscopically structured functional materials: Au nanocrystal growth on TiO2 nanowires controlled by surface bound silicatein. *Angew. Chem. Int. Ed.* **45**, 4803 – 4809
34. Shukoor MI, Natalio F, Metz N, Glube N, Tahir MN, Therese HA, Ksenofontov V, Theato P, Langguth P, Boissel JP, Schröder HC, Müller WEG, Tremel W. 2008. dsRNA-functionalized multifunctional ɣ-Fe2O3 nanocrystals: a tool for targeting cell surface receptors. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* **47**, 4748 – 4752
35. Xia Y, Whitesides GM. 1998. Soft lithography. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 550 – 575
36. Pisignano D, Maruccio G, Mele E, Persano L, Di Benedetto F, Cingolani R. 2005. Polymer nanofibers by soft lithography. *Appl. Phys. Lett.* **87**, 123109
37. Alessandro Polini, Stefano Pagliara, Andrea Camposeo, Adriana Biasco, Heinz C. Schröder, Werner E. G. Müller, and Dario Pisignano. 2011. Biosilica Electrically-Insulating Layers by Soft Lithography-Assisted Biomineralisation with Recombinant Silicatein *Adv. Mater.* **23**, 4674 – 4678
38. S. A. Ruiz , C. S. Chen. 2007. Microcontact printing: A tool to pattern. *Soft Matter.* 3, 1.
39. Schröder HC, Natalio F, Shukoor I, Tremel W, Schloßmacher U, Wang X, Müller WEG. 2007.

Apposition of silica lamellae during growth of spicules in the demosponge Suberites domuncula: biological/biochemical studies and chemical/ iomimetical confirmation. *J. Struct. Biol.* **159**, 325 – 334

40. Müller WEG, Engel S, Wang X, Wolf SE, Tremel W, Thakur NL, Krasko A, Divekar M, Schröder HC. 2008. Bioencapsulation of living bacteria (Escherichia coli) with poly(silicate) after transformation with silicatein-α gene. *Biomaterials* **29**, 771 – 779
41. Rajesh R. Naik, Morley O. 2005. Stone Integrating biomimetics Materialstoday Volume 8, Issue 9, pp 18 – 26
42. Luckarift, H.R., Spain, J.C. , Naik, R.R., Stone, M.O. 2004. Enzyme immobilization in a biomimetic silica support Nature Biotechnology Volume 22, Issue 2, pp 211-213
43. Naik, R.R. , Tomczak, M.M., Luckarift, H.R., Spain, J.C., Stone, M.O. 2004. Entrapment of enzymes and nanoparticles using biomimetically synthesized silica Chemical Communications Volume 10, Issue 15, 7, pp 1684-1685
44. Knecht, M.R., Wright, D.W. 2004. Dendrimer-mediated formation of multicomponent nanospheres Chemistry of Materials Volume 16, Issue 24, 30, pp 4890-4895
45. Yamamuro T, Hench LL, Wilson J (eds). 1990. Handbook on Bioactive Ceramics, vol I: Bioactive Glasses and Glass-Ceramics. Boca Raton, FL: CRC Press
46. Hench LL, Wilson JW. 1984. Surface-active biomaterials. *Science* **226**, 630 – 636
47. Schröder HC, Boreiko O, Krasko A, Reiber A, Schwertner H, Müller WEG. 2005. Mineralisation of SaOS-2 cells on enzymatically (silicatein) modified bioactive osteoblast-stimulating surfaces. J Biomed Mater Res Part B: *Appl. Biomater.* **75B**, 387 – 392
48. Müller WEG, Wendt K, Geppert C, Wiens M, Reiber A, Schröder HC. 2006. Novel photoreception system in sponges Unique transmission properties of the stalk spicules from the hexactinellid Hyalonema sieboldi. *Biosens. Bioelectron.* **21**, 1149 – 1155
49. Richard L.B., Daniel E.M. 2008. Silicatein and the translation of its Molecular Mechanism of Biosilification into Low Temperature Nanomaterials Synthesis. *Chem. Rev.* **108**, 4915-4934
50. Schröder H. C., Schloßmacher U., Boreiko A., Natalio F., Baranowska M., Brandt D., Wang X., Tremel W., Wiens M., and Müller W. E.G. 2009. Silicatein: Nanobiotechnological and Biomedical Applications Progress in Molecular and Subcellular Biology, Volume **47**, V, 251-273