

제 1차년도
최종보고서

거머리를 이용한 고효율 혈전용해제 및
무성생식인자 추출연구

Screening and characterization of a highly
efficient anticoagulant factor

연구기관

한국과학기술원

과 학 기 술 처

제 출 문

과 학 기 술 처 장 관 귀 하

본 보고서를 “거머리를 이용한 고효율 혈전용해제 및 무성생식인자 추출연구” 과제의 연차보고서로 제출합니다.

1996. 12. 19

주관연구기관명 : 한국과학기술원

총괄연구책임자 : 강 계 원

연 구 원 : 윤 인 중

홍 석 진

김 동 령

정 효 일

이 주 운

고 재 균

김 영 혜

최 경 한

박 승 범

김 경 호

협·공동연구기관명 : 중국 천진 농업 과학원

협·공동연구책임자 : 초 건 국

요 약 문

I. 제 목

거머리를 이용한 고효율 혈전용해제 및 무성생식인자 추출 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현대 가장 심각한 질병들중 하나인 심장 혈관 질환을 치료할 수 있는 방법으로서는 흡혈동물을 이용한 강력한 효능을 가진 항혈액응고제 생산이 국제적인 관심이 되고 있다. 흡혈동물 중에서도 가장 잘 알려진 동물은 의학용 거머리이다. 일찍이 의학 분야에 사용되었던 거머리는 지금까지 많은 연구가 이루어져왔으며, 최근에는 선진국에서 거의 독점적으로 수행되어져 온 microsurgery의 발전과 더불어 거머리의 사용이 급격히 늘고 있는 실정이다. 그 외에도 거머리 침샘에서 여러 유용 성분이 분리되어 실제로 의학 분야와 생물학 분야에 응용되고 있다. 예로서 항혈액응고제인 hirudin, bufrudin, hementin, antistasin, calin,

decorsin, destabilase, plasminogen등이 있으며 아직도 많은 종류의 성분이 계속해서 검출되고 있다.

본 연구실에서는 거머리로부터 항혈액응고제를 비롯한 여러 유용 성분들을 분리, 분석하고 있는데 우리 나라에서는 논과 연못에서 서식하던 여러 종류의 거머리가 근래에 들어 화학 비료와 농약의 도입으로 사라지고 있어 지속적인 연구를 위한 재료의 공급과 사육 기술의 발달이 시급하다. 중국은 아직도 자연 상태가 다른 어느 나라보다도 잘 보존되어 있으며 서구에 비해 우리의 생태계와 비슷하며 아직 적어도 40-50 여종의 거머리가 서식하고 있다. 이미 중국 농업과학원 과학자들의 본원의 방문과 본 실험실 연구원들의 중국 방문을 통해 앞으로 수행되어야 할 연구에 대해 논의한 바 있으며 중국에는 한국과 유사한 거머리종 뿐만 아니라 다른 종류의 거머리들도 서식하고 있음을 확인하고 지난 여름동안 중국 천진 작물연구소 Zhang Weigang책임 연구원이 본 실험실에서 공동 연구를 수행하였으며 중국산 거머리의 여러 종류에서 유용성분을 검색하였다. 양측 모두 재료의 공급과 사육 기술, 유용 성분의 분리 및 분석, 유전자 조작 기술 등의 공동 연구 수행 및 상호 협력 하에 새로운 물질의 개발이 가능할 것이라는 결론에 도달하였다. 앞으로 지속적인 교류를 통해 이미 협의한 내용 중에 있듯이 구체적인 신유용물질을 분리 정제할 필요성이 있다. 일반적으로 신물질의 개발 여부는 생물 자원의 안정적 공급에 크게 의존하고 재료에 따라 생화학적 조성과 생체 활성이 다른 신물질을 얻을 수 있으므로 중국에서 다양한 종의 거머리가 공급이 되도록 추진하고 계속 공동연구가 수행되도록 하였으면 한다. 현재까지의 연구로 우리나라 및 중국 흡혈 거머리에서

thrombin inhibitor 를 확인하였으며 그 분리과정과 생화학적 특성에 대하여 연구된 바를 이 보고서로서 제출한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

당해년도 연구개발 목표는 다음과 같다.

1. 중국 연구원을 통해 거머리 채집 및 사육 방법을 전수
2. 한국산 거머리가 의료용으로 사용되기 적합한지를 bleeding time, blood clotting time 등을 조사해 알아본다.
3. 한국산 거머리에서 항혈액응고제인 thrombin inhibitor를 분리 및 특성 분석
4. 중국산 흡혈거머리에 대해 antithrombin activity 조사
5. 중국산 거머리에 대해 trypsin, chymotrypsin, elastase inhibitory activity 조사

원래 1차년도 목표는 항혈액응고제의 탐색 및 분리와 중국에 거머리 채집 방법 및 사육 방법을 전수시키는 것이었으나 거머리의 항혈액응고 성질을 의료용으로 이용하기 위해서 먼저 필요한 연구인 bleeding time, blood clotting time 조사와, 중국산 거머리에서 trypsin, chymotrypsin, elastase를 저해하는 활성 조사도 함께 수행되었다.

IV. 연구개발 결과

1. 중국에서도 채집한 거머리를 사육할 수 있도록 방법을 전수하였다.
2. 한국산 거머리의 bleeding time과 blood clotting time 등 hematological study를 통해 외국에서 의료용으로 사용되는 거머리들이 가지는 값과 비교하였다.
3. 한국산 거머리에서 항혈액응고제인 thrombin inhibitor를 여러 가지 단백질 순수분리 방법을 이용하여 분리하였고 생화학적인 특성 분석은 전기영동과 질량 분석 스펙트럼에 의한 실제 질량 분석, 아미노산 조성, 억제 활성 정도 등을 하였다. 그 결과 분자량이 6900정도의 폴리펩티드가 분석되었으며 특이성이 매우 높고 효소 억제 상수는 10^{-13} M정도였다. 아미노산 조성이 다른 hirudin 변이체들과 약간 차이가 있는 것으로 나타났다.
4. 중국산 거머리 *Hirudo*속에 대해 thrombin 억제 활성이 있음을 보였다.
5. 중국산 거머리들 *Whitmania pigra*, *W. edentula*, *H. nipponia* 이 trypsin, chymotrypsin, elastase 억제 활성을 가짐을 알 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 중국산 거머리들의 대량 채집이 가능하고 이로부터 항혈액 응고제를 비롯한 단백질 저해제등 유용 물질들을 계속적으로 분리할 수 있다.
2. 한국산 거머리에서 분리된 트롬빈 억제제를 유전자 조작에 의해 대량 생산하여 산업적, 의학적으로 응용할 수 있다.
3. Hematological study을 통해 한국산 흡혈 거머리를 성형 정형 수술 등에 이용할 수 있는 가능성을 보였다.

Summary

I. Project title

Screening and characterization of a highly efficient anticoagulant factor.

II. Objectives, Necessity

One of the best known of all bloodsucking animal is the medicinal leech which achieved early notoriety in the history of medicine. Being relatively large and closely associated with medicine, *H. medicinalis* has been by far the best studied. Today, the use of leeches in plastic surgery is increased throughout the world. Furthermore, leech has known that it contains various protease inhibitors in body, and many researchers are interested in these substances such as hirudin, bufrudin, hementin, antistasin, calin, decorsin and destabilase. These protease inhibitors have been known for serological, medical applications.

We have studied various protease inhibitors from Korean

leeches which were decreased drastically due to farming practice of application of fertilizer and insecticides.

It was necessary for cultivation of leeches in laboratory in order to obtain a sustainable supply in research. In China, the native ecology is well preserved and there are over 50 species of leeches. The present study is carried out a collaboration on the production of bioactive substances from leeches with the researchers in Tianjin Academy of Agricultural Sciences in China (TAASC). We have established the methods of leech cultivation, purification and characterization of protease inhibitors in both institutions.

We have identified a number of bioactive substances that are related to blood coagulation mechanisms from our own native leeches as well as species in China.

III. Contents, Scope of Research

The followings were the scope of the past year.

1. Mutual investigations on the leech collection and cultivation methods
2. Analysis of bleeding time and blood clotting time
3. Purification and characterization of thrombin inhibitor

from Korean native leech

4. Screening of thrombin inhibitory activity from Chinese native leeches
5. Screening of trypsin, chymotrypsin and elastase inhibitory activity from Chinese native leeches

The scope of first year research was limited to search for anticoagulant factor from Korean and Chinese leeches and to explore the methods of leech collections and cultivation to Chinese leeches in Tianjin Crop Research Institute. We have investigated the blood coagulation characteristics from species which had never been examined previously. Screenings of inhibitory activities against other proteases like trypsin, chymotrypsin and elastase from Chinese leeches were also examined.

IV. Results

Thrombin inhibitory activity was identified from Korean *H. nipponia*. Screening from leech crude extracts resulted strong thrombin inhibitory activities. Isolation and biochemical characterization were performed by the methods of polyacrylamide gel electrophoresis, mass spectrometry, amino acid composition, sequence analysis, and thrombin inhibition kinetics. The

antithrombin agent was a polypeptide which has about 6900 Da molecular weight and the amino acid composition is different from other thrombin inhibitors.

Chinese researchers with collaboration of our research team have collected leeches from various region in China and cultivated at outdoor as well as indoors at TAASC.

A number of assays for protease inhibitory activities from chinese species also revealed that *Whitmania pigra*, *W. edentula* and *H. nipponia* have antithrombotic actions and significant activities against trypsin, chymotrypsin and elastase examined.

In the present study, we have found a number of protease inhibitors that are small molecular mass of approximately 60 amino acid residues in primary sequences without carbohydrate moiety. These include thrombin inhibitor(hirudin), elastase inhibitor (guamerin I and II), subtilisin and chymotrypsin inhibitor (hirustasin). We have also found a larger molecular mass inhibitors of over 15 kDa. These include factor Xa inhibitor of antistasin and plasmin and trypsin inhibitor, bdellin-KL.

V. Applications

1. It is possible to obtain many useful products from the

Chinese native leeches.

2. Genetic engineering of the isolated thrombin inhibitor will be performed and recombinant inhibitor will be produced in large quantities with the final goal of application as a therapeutic agent.
3. From the results of hematological studies, it is shown that the Korean blood sucking leech has anticoagulation and platelet aggregation inhibiting activity.

CONTENTS

(영 문 목 차)

1. Introduction -----	14
2. Technical development situation -----	17
3. Procedure and results -----	21
1) Materials and methods -----	21
2) Results -----	32
3) Conclusion and discussion -----	55
4. Objective accomplishment and contribution	61
5. Application -----	62
6. References -----	63
Appendix -----	65

목 차

제 1 장 서론 -----	14
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	17
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	21
제 1 절 실험 재료 및 방법 -----	21
제 2 절 실험 결과 -----	32
제 3 절 결론 및 고찰 -----	55
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 ---	61
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	62
제 6 장 참고문헌 -----	63
부록 -----	65

제 1장 서론

거머리에 속하는 동물은 전세계적으로 무려 600-700종이 있으며 그 중에는 바다나 담수에서 사는 것도 있고 심지어는 육지의 나무나 숲에서만 사는 것도 있다. 유럽과 미국에서 잘 알려진 흡혈 거머리인 *Hirudo medicinalis* 는 2000여 년 전부터 흡혈의 성질을 이용해 의료용으로 사용되었다. 그 시대에는 거머리를 이용해 환자의 피를 뽑아 내거나 악마를 제거하는 것이 병을 제거하는 것이라고 믿어져 사용되었으나 오히려 감염이 유발되었다던가 피를 너무 많이 흘리는 등 그에 따른 부작용이 많았고, 18세기와 19세기에 들어 팔이나 다리를 절단하는 수술시 많이 사용되었다. 거머리는 숙주에 상처를 내어 침속에 존재하는 물질을 숙주로 유입하여 혈액 응고를 억제하고 platelet과 collagen 상호 작용을 저해함으로써 오랫동안 많은 피가 숙주로부터 흘러나오는 현상을 유발한다[1]. 거머리가 가지는 이러한 물질들 때문에 오늘날도 서구에서는 거머리를 성형 및 정형 수술에서 피를 흘려주기 위한 목적으로 쓰고 있다. 이런 이유로 거머리에 물렸을 때의 bleeding time과 clotting time은 거머리를 의료용으로 이용하는데 있어 중요한 의미를 가진다.

의료용으로서의 직접적인 응용 외에도 혈액 응고 과정중 thrombin, factor Xa 등과 상호 작용하여 숙주로부터 혈액이 응고되는 것을 방지하는 항 혈액응고제인 hirudin, bufrudin, hementin, antistasin, calin, decorsin, destabilase, plasminogen등이 거머리로부터 분리되어 연구되고 있다. 이들은 거머리가 숙주로부터 피를 섭취하는 것을 좀 더 용이하게 하는 역할을 한다. 사람의 경우, 인체내 혈액 속에 존재하는 thrombin은 혈액의 혈소판 응집 (platelet aggregation)과 피브린 (fibrin) 을 형성하는데 있어 직접적인 역할을 하는데 이러한 현상들이 in vitro상에서 거머리 침샘에서 유래된 hirudin에 의해 저해가 된다. 그 외에도 혈관 확장 인자나 피브린 분해 효소

들이 거머리에 존재하는 것으로 알려져 있다[2].

Hirudin은 그 중에 널리 알려진 단백질로 거머리의 침 속에 존재하며 혈액 응고에 꼭 필요한 트롬빈의 활성을 억제함으로써 혈액 응고 억제제의 역할을 수행한다. Hirudin은 이미 *Hirudo medicinalis* 라는 유럽산 거머리 종으로부터 최초로 발견되어 많은 사람에게 의해 분석되어졌고, 또한 여러 변이형의 hirudin도 같은 종 혹은 다른 종에서 발견되어지고 있다. 그러나 유럽을 제외한 다른 지역에 서식하는 흡혈 거머리들도 역시 유사한 혈액 응고 억제제들을 갖고 있을 것이므로 아직도 더 많이 조사되고 분석되어질 필요가 있었다.

헤파린은 혈전 이상 질환에 현재 가장 널리 사용되고 있는 의약품이지만 출혈 및 thrombocytopenia 같은 몇몇 심각한 부작용이 있는 것으로 알려져 있다. hirudin이 헤파린에 비해 몇가지 장점을 갖고 있는데, 첫째가 높은 투여량에 비해서 출혈 정도가 낮은 성질을 갖고 있다는 것이고, 둘째가, 실험동물을 사용하였을 때, hirudin은 혈전 용해 처리나 혈관 접합 수술 후 동맥에 나타나는 재 침적현상을 막는데 더 효과적이라는 것이다. 셋째는 hirudin은 직접적으로 트롬빈과 결합하여 작용하기 때문에, 헤파린의 경우처럼 antithrombin III (AT III) 같은 보조인자가 필요하지 않아 혈관내 혈액 응고 질환을 치료하는데 훨씬 효과적이다. 이러한 hirudin의 장점들에 의해 앞으로 hirudin이나 그 유도체의 의학에의 응용이 진행될 것이다. 그러나 이 성분은 외국에 서식하는 특정 거머리 종에서 생산되는 것이며 각 단백질의 아미노산 서열과 그 활성이 서로 상이할뿐더러 유전자 재조합에 의해 생산된 것은 활성이 크게 감소하여 아직 heparin 대신 의약용으로 사용하기에 경제성이 부족한 형편이어서 새로운 항혈액응고제의 개발이 필요하였다.

본 연구에서는 한국산 거머리 *H. nipponia*의 의료용으로서 응용 가능성을 알아보기 위해 이 거머리로 인한 상처로부터 생긴 피의 bleeding time과 clotting time을 알아보고 이를 다른 거머리종인 *M. decorda*, *H. medicinalis*

와 비교하였고, 동시에 거머리에 존재하는 혈액 응고 억제 물질에 대한 연구를 수행하여 의약품 개발의 기초 연구를 도모하고자 하였다. 또한 중국과의 공동연구 수행의 일환으로 중국산 거머리 여러 종으로부터 trypsin, elastase, thrombin 억제 활성을 찾고 이를 비교하여 중국산 거머리로부터 유용한 물질들을 분리할 수 있는 가능성을 보였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

서구에서는 오래전부터 거머리를 의료용으로 이용해 왔으며 현재는 거머리를 재료로 각종 유용 물질을 분리 정제하여 실제로 의학분야와 생물학 분야에 응용하기 위한 노력이 진행중이다. 이 중 가장 많이 알려진 것이 항혈액응고제인 hirudin으로 현재에도 세계 각지에서 hirudin에 대한 연구가 진행되고 있다. 지난 몇년 동안 치료용 항혈액응고제로서의 hirudin은 응용적인 측면에서 새로운 전기를 맞게 되었는데 그 이유는 분자 생물학의 발전에 따른 유전공학적인 방법으로 hirudin을 만들어낼 수 있기 때문이었다.[3]

Hirudin은 65 개의 아미노산, 7 kDa 정도의 작은 분자량을 갖고 있으면서 트롬빈에 대한 매우 강한 특이성을 갖고 활성억제를 나타내며, pico mole, 혹은 fento mole 정도의 낮은 K_i 값을 갖고 있어 순환계 관련 질환, 특히 혈액 관련 질환의 치료제로 주목을 받아왔다.

연도별로 hirudin의 연구 상황을 보면, table 1에 나타난 바와 같이 초창기에는 거머리가 hirudin을 갖고 있다는 사실에 기반을 두지 않은 채 의학 분야에 응용이 되었었고, *Hirudo medicinalis*라는 거머리에 항혈액응고성분이 존재한다는 사실을 알아내고부터는 여러 연구팀이 hirudin의 분리에 심혈을 기울여 순수 분리에 성공하였다(4,5,6). hirudin만의 개발 과정을 보면, 다음과 같다.

1900-1950	의학 분야에 거머리를 이용하기 시작
1950-1955	hirudin의 분리와 단백질로써의 특성을 분석
1955-1960	hirudin의 혈액 응고 억제 기작에 대한 연구
1960-1980	트롬빈 억제에 대한 연구 및 hirudin을 의약분야에 사용하기 위한 연구 수행
1980-1984	hirudin 펩티드 mapping과 아미노산 서열 분석에 대한 연구를 진행

1984-1990 재조합 hirudin의 개발: hirudin 일부 절편에 대한 연구
 1990s hirudin의 구조와 혈액응고억제에 대한 연구
 : hirudin targeting

비싼 가격과 순수 분리의 어려운 난관에도 불구하고 Markwardt 등은 자연 hirudin의 기초적인 생화학적인 연구와 약리학 적인 연구를 해 내었으며, 그들은 이러한 실험으로부터 hirudin이 지혈에 이상이 있는 질병의 치료에 이용될 수 있다고 제안하였다 [7-11]. 분자생물학의 발전과 성장 호르몬이나 tissue-type plasminogen activator(t-PA), 인터페론 등과 같은 의료 약품의 cloning이 이루어짐에 따라 hirudin의 구조와 peptide mapping에 대한 관심이 높아지기 시작하였고, 결국 단백질 1차 구조를 알아내게 되었다 [12,13]. 1986년 이래로 hirudin이 clone으로 만들어지면서 여타 혈전 용해제의 대체 물질 혹은 첨가물로서 상업적 가치를 띠게 되었다. Pentapharm (Basle, Switzerland) 과 Plantorgan (Bad Zwischenahn, Germany), Mitsui Toatsu Chemicals (Tokyo), Farmitalia Carlo Erba (Milan, Italy), Merrel Dow Research Institute (Cincinnati, OH), BioPharm (Hendy, U.K.) 같은 기업들이 hirudin과 관련된 연구 프로젝트를 수행하고 있으며, CIBA-Geigy (Basle), Hoechst (Frankfurt, Germany), BASF/Knoll (Ludwigshaven, Germany), Transgene/Sanofi (Strasbourg/Paris), Genentech (So. San Francisco, CA), Biogen(Cambridge, MA) 같은 기업들은 hirudin 혹은 관련 물질들에 대한 Phase I 연구를 진행하고 있다 [14]. Hirudin 폴리펩타이드 중 산성 아미노산을 다량 함유하고 있는 C-terminal 선형 부분은 트롬빈의 피브리노펩타이드 결합위치에 비공유결합으로 달라붙는 성질이 있어 트롬빈의 효소 활성을 억제하고, 구형 부분인 N-terminal 영역은 세개의 disulfide bridge에 의해 구조가 결정되고, 트롬빈의 피브린 결합위치에 결합한다. 재조합 hirudin의 혈액응고 억제 활성은 자연 상태의 hirudin에 비하면 그 활성이 10배정도 약한데

그 이유는 hirudin의 아미노산 서열 63번째 tyrosine에 sulfate group이 존재하지 않기 때문이다. 이 단백질 분자는 적은 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 point mutation, end-group modifications, post-transcriptional change가 가능하다.

heparin은 가장 잘 알려진 혈전증의 치료제이지만 bleeding이나 thrombo- cytopaenia같은 심각한 부작용이 있다 [15]. 그러나 hirudin은 높은 투여량에도 불구하고 bleeding의 경향이 낮고 thrombolytic 처리나 혈관성형술, 관상동맥 bypass surgery 후에 관상동맥 내에 생성되는 폐색증상을 막는데 더욱 효과적이다[16,17,18]. Tissue plasminogen activator(t-PA) 와 streptokinase는 모두 피브린에 의해 형성된 blood clot을 분해하지만 이러한 성분 역시 치료에 응용되기에는 아직 제한이 많다. 즉, 혈전을 용해시키기 위해 사용한 후에 15% 에서 25%의 혈전이 같은 장소에 다시 생성된다고 알려졌다[19]. 폐색현상을 억제하는데 hirudin이 heparin에 비해 효과적이라는 사실은 혈전 내에 피브린에 결합하고 있는 트롬빈에 heparin AT III 보다 hirudin이 훨씬 더 잘 접근할 수 있기 때문으로 생각된다. hirudin의 또다른 장점은 heparin은 co-factor인 antithrombin III가 필요한 반면, hirudin은 트롬빈에 직접 작용한다는 사실이다. 예로 들면, heparin은 ATIII가 결여된 Disseminated Intravascular Coagulation (DIC)에는 거의 효과가 없다. 반면에 hirudin을 피하에 0.1 mg/kg으로 8시간 간격으로 만성 DIC환자에 투여한 결과 혈소판 수와 fibrinogen이 정상 상태로 돌아왔고, 피브린 단량체 complex들이 사라진다는 보고가 있다 [20].

국내에서는 지금까지 주로 미생물을 대상으로 해서 신규 물질을 탐색해 왔다. 국가간 경쟁이 치열한 현시점에서 국내의 생물 자원을 보존하고 이로부터 신물질을 개발하는 시도는 매우 미약한 실정이며 전세계적으로 수많은 신물질들이 개발되고 상품화되고 있는 현시점에서 우리의 생물 자원에서부터

신물질을 개발하는데 우리 나라도 힘을 기울여야 했다. 우리 나라에서도 지렁이를 원료로 혈전용해제를 개발하여 상품화하기도 했으나 거머리를 대상으로 한 연구는 본 연구실이 중심으로 거머리 사육법과 유용물질의 분리를 하고 있으며 이미 새로운 강력한 elastase inhibitor인 거머린과 trypsin-plasmin inhibitor인 bdellin-KL을 비롯하여 본 과제와 관련한 항혈액응고제의 하나로 thrombin inhibitor를 분리하여 분석중에 있다. 이들의 분리 기술 수준은 외국과 동등하나 분석 면에서 국내 기자재의 불충분으로 인해 불리한 점이 있음에도 불구하고 국외 연구 결과에 비교해 뒤지지 않는 결과를 내었다. 이러한 점으로 볼 때 충분한 생물 자원과 실험 재료, 기기가 공급된다면 국외에서 이루어지는 연구들과 나란히 하여 여러 유용 물질을 생산하는데 서로 도움을 줄 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 실험 재료 및 방법

1. 재료 및 시약

실험에 사용되는 거머리(*Hirudo nipponia*)는 전국적으로 오염이 적은 저수지 등에서 채집하여 자연 생태계가 유지되도록 제작된 실험실 사육장에서 오랫동안 사육하면서 이용할 수가 있었다. Bovine thrombin, 4-vinylpyridine 등은 Sigma사 제품을 사용하였다. Human thrombin, Chromozym TH, endoproteinase Lys-C 와 sequencing grade의 trypsin은 Boeringer Mannheim 에서 구입하였다. Sephadex G-75, G-200, DEAE-sepharose 등은 Pharmacia LKB 사의 제품을 사용하였다. Sep-Pak C₁₈ cartridge와 Delta-Pak C₁₈ reversed phase HPLC column은 Waters division of Millipore에서 구입하여 사용하였으며 그 밖의 시약은 reagent grade를 사용하였다.

2. 실험 방법

가. 거머리의 채집 및 사육

실험에 필요한 거머리는 채집이 쉬운 봄철과 가을철에 채집하여 실험실에서 계속 양식하여 얻었다. 거머리 채집방법은 수면에 파랑을 일으켜 거머

리를 유인하여 잡았다. 잡아온 거머리를 거머리 성장에 필요한 이온이 첨가된 용액(0.63 mM NaCl, 0.0368g/liter : 0.07 mM CaCl₂, 0.0078g/liter : 0.05 mM MgSO₄·7H₂O, 0.0123g/liter : 0.05 mM KCl, 0.0037g/liter)에 넣고 온도를 조절하면서 사육하며, 번식을 시켰다. 흡혈 거머리는 피를 먹이로 하므로, 먹이로 가능한 신선한 돼지나 소의 피를 membrane에 넣어 먹였다.

나. Hematological Study of Korean native leech *H.nipponia*

유사한 크기들 (0.35 - 0.37g)의 거머리를 건강한 9 명의 20대 남자와 3명의 20대 여자 팔 안쪽에 붙여 피를 빨게 하여 그 시간을 측정한다. 각 사람들의 팔에서 피를 다 빨고 난 거머리는 스스로 떨어지므로 피 빨기 전의 무게와 빨고 난 후의 무게 차이를 재어 기록한다.

(1) Bleeding Time 측정

거머리가 피를 다 빨고 나서 떨어져 나간 때부터 상처 부위에 피가 더 이상 흘러나오지 않을 때까지의 시간이 bleeding time이므로 이를 측정한다. Control bleeding time은 1회용 LANCET [FEATHER, Feather Safty Razor Co., LTD, Medical Division, Japan]에 의해 측정되었다.

(2) Coagulation parameters 측정

거머리에 물린 상처로부터 나온 피 표본을 거머리가 피를 다 빨고 떨어진 때부터 1, 5, 10, 15분 후에 각각 얻어 unsiliconized slide glass위에 놓고 피가 응고되는데 까지 걸리는 시간을 측정한다 [Munro et al.1991]. Control 로는 손가락에서 LANCET 으로 상처를 내어 피가 흘러나온지 1분이 경과한 후에 새롭게 피를 채취하여 피브린 응고시간을 측정하였다. 흘러나오는 피의 총 부피는 거머리가 상처로부터 떨어져 나온 후 흘러나오는 피의 부피를 micropipette 를 사용하여 측정하였고, control 로는 혈액 채취 장비로 상처를 내어 흘러나오는 피의 부피를 측정하여 사용하였다.

(3) Platelet Aggregation Test

피 표본들을 750g에서 3분간 원심 분리하고 상층액(혈소판이 많이 들어있는 혈장) 을 slide glass 에 얇게 도말하였다. 상처로부터 흘러나온 피를 glass 위에 도말하여 methanol로 고정하고 공기 중에서 잘 말린 후 Giemsa 염색 용액으로 10분간 염색하였다. 혈소판의 응집은 광학 현미경을 사용하여 관찰하였다.

혈소판 응집 반응은 thrombin (1 U/ml), collagen (1 μ l/ml) 와 ADP (10 μ M) 을 사용하여 거머리가 피를 다 섭취한 후 1분과 15분 후에 흘러나온 피를 시료로 사용하여 관찰하였다.

다. Thrombin inhibitor의 분리 및 특성 분석 실험

(1) Thrombin 억제 활성의 측정 방법

Thrombin 억제 활성을 측정하기 위해 microplate 에 50 μ l의 시료와 0.1 unit/ml의 트롬빈 50 μ l을 잘 섞어 37 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시키고 여기에 chromozym TH라는 200 μ M 트롬빈 specific substrate를 100 μ l 첨가하자마자 microplate reader로 405 nm에서 측정하였다. 시간에 따른 흡광도의 변화를 graph에 나타내어 linear range에 있는 값을 이용, anti트롬빈 활성을 계산하였다($\Delta A_{\text{hirudin}}/\text{min} = \Delta A_{\text{TB}}/\text{min} - \Delta A_{\text{s}}/\text{min}$: ΔA_{TB} ; 트롬빈 base value, ΔA_{s} ; sample absorbance). 다른 protease 에 대한 침샘 분비물의 효소 활성 억제는 합성 peptide-p-nitroanilides나 peptide ester, azocasein의 효소에 의한 가수분해 정도의 감소를 측정함으로써 얻어졌다. 즉, 각 substrate의 가수 분해는 p-nitroanilides의 경우에는 405 nm, peptide ester의 경우에는 256 nm, azocasein의 경우에는 440 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 결정되었다. 예를 들면, chymotrypsin의 억제 활성을 test할 경우, 기질로 합성 펩티드 (SucPheNHNP)를 사용하고 효소의 농도를 0.27 μ M, 기질의 농도를 4.32 mM로 하여 0.2 M TRA-HCl buffer에서 반응시켜, 405nm에서의 흡광도를 측정하였다. Trypsin의 경우는 기질로 BzArgNHNP을 이용, 효소의 농도를 0.13 μ M, 기질의 농도를 0.38 mM로 하여 반응, 흡광도를 측정하였다. 효소와 억제제의 활성도는 1 Unit (= 1 μ M의 기질이 분해되는 정도/1분) 의 단위로 나타내었다. 다른 Elastase 나 Cathepsin G 같은 효소의 활성도 측정 방법도 거의 유사하게 이루어졌다.

(2) Thrombin inhibitor 분리

(가) Thrombin inhibitor 추출

거머리에게 한달 이상 먹이를 주지 않고 굶겨 침샘에 항혈액응고 활성을 최대화시킨 후 0℃에서 잘게 썰어 500 ml의 80%(v/v)의 cold acetone에 넣고 10분간 얼음 위에서 잘 섞어 주었다. Sodium chloride를 최종 0.5 M로 첨가하여 항트롬빈을 추출하고 다시 여기에 trichloroacetic acid를 최종 0.2 M로 첨가하여 pH 3.0으로 30분에서 1시간 동안 추출하였다. 용해되지 않는 찌꺼기는 버리고 거름종이로 거른 후 남은 분획을 다시 100 ml의 NaCl과 TCA가 포함되어있는 80% cold acetone으로 추출하였다. 이 추출용액에 2배의 cold acetone을 첨가하고 -10℃에 방치하여 단백질을 침전시키고 침전물을 원심분리하여 cold acetone으로 씻어낸 후 다시 25 mM ammonium acetate buffer pH 6.9에 용해시켰다. 녹지 않는 찌꺼기를 버리고 cold ethanol이나 cold acetone으로 단백질을 다시 침전시켜 용매를 날려보냈다.

(나) 겔 크로마토그래피를 이용한 분리

Crude 추출물을 0.02 M acetate pH 6.9 완충용액으로 미리 평형화된 1.6 X 100 cm 의 Sephadex G-75 컬럼에 loading 하여 gel filtration을 수행하였다. 유속은 0.5 ml/min 으로 고정하여 한 컬럼부피가 용출될 때까지 280nm 에서 흡광도를 측정하였다. 용출 후 각 분획들은 트롬빈 억제 활성 측정법에 따라 활성을 측정하고 활성이 나타난 분획들을 모아 YM03 Ultrafiltration 으로 농축을 하였다.

(다) 양 이온 교환 수지를 이용한 단백질의 분리

농축된 시료를 2.5 X 20 cm 의 DEAE-Sepharose 칼럼(0.02 M acetate buffer pH 6.9)에 loading하여 0 - 1.0 M NaCl 농도구배로 용출하였다. 활성을 보이는 분획을 모아 다시 농축시켰다.

(라) 친화 크로마토그래피를 이용한 분리

친화 크로마토그래피 컬럼을 만들기 위해서 Sigma에서 구입한 bovine 트롬빈을 증류수에 투석하고 여기에 1 mM HCl로 충분히 씻어준 CNBr-Sepharose를 섞어 16시간 이상 4°C에서 반응을 시키면 thrombin-Sepharose가 만들어진다. 이 기질을 0.1M acetate buffer pH4.0 과 0.1M Tris-Cl pH 8.0으로 번갈아 가면서 세번정도 씻어주었다. 그 후 Thrombin-sepharose affinity 기질을 1 X 10 cm의 칼럼에 packing하고 0.1 M Tris/HCl buffer pH 8.0으로 평형화 시켰으며 부분적으로 분리된 fraction을 이 buffer 500 µl 에 녹인 후 칼럼에 loading 하였다. 칼럼을 이 buffer로 씻어내고, 결합된 분자를 0.1 M 4-aminobenzamidine/25mM HCl로 용출하였다. 3-4 칼럼부피의 fraction을 모아 Sephadex G-25 coarse 겔 크로마토그래피 컬럼으로 salt를 제거하고 동결건조시켰다.

(마) 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 분리

동결건조한 시료를 다시 50 μ l의 0.1% TFA에 녹인 후 시료를 역상 C₁₈ 컬럼에 loading하여 여러 가지 유기용매 시스템에서 분리를 시도하였다. 첫째가 0 % - 60 % acetonitrile, 0.09% TFA 의 농도구배로 용출하여 트롬빈 억제 활성을 측정하는 것이고, 둘째는 C₈ 컬럼에서 30 % - 50 % 메탄올, 0.1 % TFA 용매로 용출하는 것이다. 용출된 항 트롬빈 활성을 갖는 분획들을 진공건조하여 0 % - 50%메탄올/50%프로판올, 0.1 % TFA 용매로 재 크로마토그래피를 수행하여 그 순수도를 알아보았다. 흡광도는 214 nm에서 측정하고, 순수분리된 단백질은 다음의 분석을 위해 진공 하에서 말리고 4°C에 보관하였다.

(바) MALDI 를 이용한 질량 분석

KRATOS Analytical 사의 KOMPACT MALDI II 를 이용하여 Matrix Associated Laser Desorption Ionization (MALDI) 방법으로 순수 분리한 thrombin inhibitor의 질량을 분석하였다. 매트릭스로는 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid(C₁₀H₇NO₃) 또는 sinapinic acid 를 사용하였다. 진공 건조된 thrombin inhibitor를 HPLC grade water 5 μ l 에 녹여 그 중 1 μ l 를 Stainless Probe 에 loading 하고, 매트릭스와 섞은 후 따뜻한 바람으로 시료를 말렸다. 시료의 처리가 끝나고, MALDI 를 이용, 전하를 띤 단백질의 질량을 분석하였다.

(사) SDS-PAGE 와 Electroblothing

분리한 thrombin inhibitor의 순도와 그 분자량을 측정하기위해 SDS-

Tricine Polyacrylamide Gel Electrophoresis 방법을 이용했다. 이 방법은 작은 분자량을 갖는 단백질이나 폴리펩타이드를 전기영동하에서 쉽게 분리가 가능하도록 변형된 방법이다. SDS-Tricine PAGE 후 electroblotting을 수행하였다. 먼저 PVDF membrane을 100% methanol로 씻어 미리 transfer buffer에 담그어 두고, Gel을 PVDF가 들어있는 blotting apparatus에 끼워 넣고 transfer buffer에서 0.5 A로 10분에서 30분동안 electroelution하였다. PVDF membrane은 2차 증류수에 5분간 씻고 0.1% Coomassie Blue R-250, 50 % methanol에 5분간 담근 후 50 % methanol, 10 % acetate 에 5분에서 10분 동안 destain하였다. Membrane은 마지막으로 2차 증류수에 5분간 씻고 공기중에 말려 -20℃에 보관하였다.

(아) 아미노산 조성 분석

약 1.5 μg 의 reduced, S-pyridylethylated protein을 6 M HCl 에서 24시간동안 110℃로 기화상태에서 가열하여 가수분해한 후 PITC로 변이체를 만든 후 HPLC 에서 아미노산 분석을 수행하였다.

(자) N-terminal 아미노산 서열 분석

PVDF membrane 에 band로 나타난 단백질을 면도날로 도려내어 Teflon seal로 중심을 맞추고 sequenator의 cartridge block에 잘 올려놓았다. N-terminal 아미노산 서열은 0.1 - 0.5 nmol의 단백질을 Applied Biosystems gas-phase sequencer에 apply하여 PTH amino acid derivatives를 분석하였다. 이와 같은 방법으로 분석된 아미노산 배열을 비교하였다. 아미노산의 서열이

분석되면 이미 알려진 여러 가지 hirudin 변이형 (Transgene HV2:gene synthesis, Tolstoshev P et al, Transgene HV2: modified, by gene synthesis, Tolstoshev et al, Hirudin PA:Dotd et al, natural, Hirudin:Petersen et al, Dotd, Natural Hirudin:Brauer D et al)의 아미노산 서열과 비교하여 단백질의 1차 구조의 유사성을 조사하고, 이러한 변이형들의 활성도가 차이가 나는 이유를 알아보았다.

(차) 내부 아미노산 서열 분석

Trypsin을 이용한 절단 방법 (PAGE 이후 gel 내에서 절단) :
SDS-Tricine PAGE 이후에 단백질 fixing 단계없이 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색된 단백질 band 를 잘라내어 50 % acetonitrile/200 mM ammonium carbonate, pH 8.9 를 150 μ l 넣은 후 30 $^{\circ}$ C 에서 20분간 씻고 실온에서 semidry 하도록 방치하였다(약 10분간). 그런 다음 0.02% Tween 20 이 들어있는 200 mM ammonium carbonate, pH 8.9 용액을 5 μ l 정도 gel 에 흡착시키고 250 μ g/ml 의 농도로 200 mM ammonium carbonate, pH 8.9 용액에 녹아 있는 trypsin 용액을 2 μ l 첨가하였다. trypsin 용액이 흡수된 후에 ammonium carbonate 완충용액을 5 μ l 씩 gel 크기가 원상태로 회복될 때까지 첨가하였다. Gel 조각을 Eppendorf tube 에 넣고 rehydration (ammonium carbonate)용액을 gel 이 다 잠길 때까지 최소한의 부피로 첨가하였다. Digestion 반응을 30 $^{\circ}$ C 에서 overnight 수행하고, 약 1.5 μ l 의 trifluoroacetic acid 를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 반응이 끝난 후, 펩타이드를 60 % acetonitrile, 0.1 % trifluoroacetic acid 용액 100 μ l 로 30 $^{\circ}$ C 에서 잘 흔들면서 두번 반복하여 추출하였다. 추출액을 모두 모아서 진공 건조하에 20 μ l 까지 농축시

켰다. 펩타이드들을 0.1 % trifluoroacetic acid, acetonitrile 농도구배로 0.3 ml/min 의 유속으로 C₁₈ 역상 HPLC 에서 분리하였다. 그리고 아미노산 서열 분석을 각 peak 마다 수행하였다.

(카) Thrombin inhibitor의 kinetic parameter 측정

분리된 thrombin inhibitor의 dissociation constant(K_I)와 association rate constant(k_1)의 값은 수소이온 농도에 따라 각각 다른 농도의 thrombin inhibitor의 존재하에 트롬빈의 기질 분해를 측정하여 progress curve data를 분석, 결정하였다. thrombin inhibitor의 농도는 정확한 K_I 값을 얻기 위해 5배 이상의 농도 범위로 결정하고, kinetic parameter(k_1 과 K_I)는 progress curve data의 비선형 회귀 분석으로 얻었다. 정량 분석 조건하에서, k_1 은 거의 k_1' 과 같고, K_I 값은 다음 식에서 주어진 관계로부터 계산되었다.
 $K_I = K_I' / (1 + S/K_m)$: S는 기질 농도, K_m 은 기질의 Michaelis 상수이다.

라. 중국산 거머리로부터 여러 단백질 효소 억제 활성을 조사

중국산 거머리들이 아직 종 분류가 확실히 되어있지 않기 때문에 먼저 확실히 분류될 수 있는 종들로 나누고 각각을 50 mM Tris-Cl로 homogenization한 후 원심분리하여 상층액을 얻는다. 이들을 여러 단백질 효소 억제 활성을 측정하기 위해 microplate 에 50 μ l의 시료와 17000 U/ml trypsin, 50 U/ml chymotrypsin, 100 U/ml elastase 15 μ l을 각각 섞고 각각의 0.1 % azocasein 을 500 μ l 첨가하여 37°C에서 50분간 반응시킨 후 15 % TCA 500 μ l를 넣어 4

℃에 담그어 반응을 중지시킨다. 15분 후 이를 10000 rpm에서 10분간 원심분리하고 그 상층액의 흡광도를 440 nm에서 측정하였다. Control은 sample, 각 enzyme, azocasein과 TCA를 함께 넣어 반응을 일으키지 않은 것으로 잡았다. Thrombin 억제 활성은 3-1에 설명한 방법과 같이 조사하였다.

제 2 절 실험 결과

1. Hematological study of Korean native leech, *H. nipponia*

H. nipponia 는 비교적 작은 흡혈 거머리이다 (평균 0.36 g의 무게). 숙주에 달라붙은 모든 거머리는 숙주로부터 피를 모두 섭취하였다. 거머리가 피를 빠는 데 걸리는 시간은 64 ± 14 분(평균 \pm 표준편차) 였고 거머리가 피를 섭취한 후에 증가한 몸무게는 평균 594 ± 174 % 였다. 이것은 유럽 거머리 *H. medicinalis* 의 경우인 70.5 ± 38 분과 460 ± 253 % 와 비교를 할 때, 비슷한 경향을 보였고, 미국산 거머리 *M. decora* 의 경우인 68 ± 26 분과 58 ± 19 % 에 비하면 더 효율적인 먹이 섭취를 하고 있다는 것을 알 수 있었다. 거머리가 먹이를 섭취한 후에 직경 1 mm 에 다다르게 상처가 생겨났다. 거머리가 피를 빨 후에 상처로부터 흘러나오는 피는 210 ± 142 분 동안 멈추지 않았다. 이 데이터는 control 의 경우인 6.0 ± 2.6 분 에 비교할 때, 거머리로부터 상당한 혈액 응고 억제 물질이 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 거머리 상처로부터 피가 흘러나오는 유량은 3분 동안 39 ± 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ 이었고, control 의 경우는 10 ± 3 $\mu\text{l}/\text{min}$ 였다. Table 1은 각각 다른 거머리 종으로부터 측정된 혈액 응고 관련 데이터를 보여준다.

가. Blood coagulation

거머리가 피를 다 빨고 난 후 1, 5, 10, 5분 후에 혈액 응고 시간을 측정하였다. 거머리에 의해 생긴 상처로부터 흐른 혈액 응고는 1분 후에 채취한 피에서는 강하게 억제되나 시간이 지남에 따라 점차 억제 정도가 감소한다. 15분 후에는 혈액 응고 시간이 control 값 정도로 줄어들었다 (Table 2).

나. Platelet aggregation

거머리에 의해 흘러나오는 혈액 속의 혈소판은 피가 다 흐르고 난 후 15분이 지날 때까지도 응집되지 않는다. Thrombin, ADP, collagen에 의해 유도되는 응집은 거머리가 떨어지고 난 후 1분 뒤 채취한 혈액에서는 일어나지 않았고 15분 후에 채취한 혈액에서는 정상과 똑같이 일어났다.

2. Thrombin inhibitor의 분리 및 특성 분석 실험

가. 거머리의 Crude Extract에서 단백질 분해 효소 억제제의 활성 측정

흡혈종의 경우 트롬빈 inhibitor 활성이 강하게 나타났고, elastase inhibitor의 활성도 역시 강하게 측정되었다. Thrombin inhibitor의 활성 측정은 chromozym TH라는 chromogenic substrate를 이용하여 트롬빈에 의해 분해되는 양을 ELISA reader(Emax, Molecular Dynamics)에서 측정하였고, elastase inhibitor의 활성도는 azocasein을 substrate로 사용하여, elastase에 의해 분해되는 azocasein의 product를 Spectrophotometer를 이용, 측정하였다(Fig. 1).

나. Thrombin inhibitor의 분리

(1) Thrombin 억제 활성의 추출

거머리 몸의 머리 부분 1/3 정도를 잘라내어 (18.5g) 80% 수용성 아세톤에서 homogenize한 후 0.5 M NaCl 과 0.3 M TCA를 첨가하여 pH 3.0정도로 30분간 추출하였다. 찌꺼기는 거름종이에 걸러 다시 한번 위 과정을 반복하였다. 이 두 분획을 하나로 모아 여기에 100% 아세톤(-10℃) 을 160 ml 첨가하여 단백질을 침전시키고 원심분리기로 15분 동안 원심분리한 후 침전물을 수확하였다.

Total Crude Extract의 양 : 1.82 g

1.82g에 6 ml의 acetate buffer에 suspend 하였다.

Voltex로 잘 섞은 후 1000 x g 에서 10분간 원심분리하여 완전히 녹지 않는 불순물들을 제거하고 상층 용액을 다음 단계에 이용하였다.

(2) 이온 교환 수지를 이용한 분리

거머리 crude extracts를 20 mM ammonium acetate pH 6.87로 미리 평형화 되어있는 DEAE-Sepharose CL-6B (2 x 20 cm)에 loading하였다. 같은 완충용액으로 용출액의 O.D. 254nm 가 0.1 이하가 될 때까지 씻어낸 후, 농도구배를 0 M - 1 M의 NaCl 로하여 용출하였다 (Fig. 2). 그 결과 0.3 M NaCl 부터 0.55 M NaCl 이온 농도사이에서 트롬빈을 억제하는 성분이 용출된다는 것을 알 수 있었다. 이처럼 넓은 영역에서 트롬빈 억제 활성이 나타나는 이유는 아직 정확히 알 수 없고, 생화학적

인 분석이 끝난 후 단백질의 특성을 알아내고 나서야 설명이 가능할 것이다. 총 90 ml의 활성 분획을 YM03 membrane을 이용하여 ultrafiltration으로 5 ml 까지 농축시켰다.

(3) 겔 크로마토그래피를 이용한 분리

이온 교환 수지로부터 얻은 활성 분획을 25 mM ammonium acetate buffer (pH 6.9) 로 평형화된 Sephadex G-75 (medium, 1.6 x 73 cm) 컬럼에 크기에 따라 분리를 수행하는 겔 크로마토그래피를 수행하였다. 유속은 0.5 ml/min 으로 고정하였고, 용출 후 각 분획에 대한 트롬빈 억제 활성을 측정하였다(Fig. 3). 활성도를 나타내는 분획은 총 60 ml 이었다. 이를 다시 YM03 membrane으로 질소 기체로 ultrafiltration하여 5 ml 까지 농축하였다.

(4) Thrombin-Sepharose 친화 크로마토그래피

트롬빈을 CNBr-Sepharose 에 결합시켜 0.6 x 5 cm 되는 컬럼에 packing 하였다 (Fig. 4). 이 컬럼을 0.1 M Tris pH 8.0 으로 미리 평형화시키고 여기에 5 ml 의 시료를 loading 한 후에 같은 완충용액에 0.5 M NaCl이 첨가된 완충용액으로 O.D._{254nm} 가 0.05 이하가 될 때까지 씻어주었다. 그 후에 0.1 M glycine-HCl (pH 2.75)로 단계적 용출방법으로 3-4 column volume의 부피를 용출하여 모두 13 ml 을 모았다. 이 시료를 Speed-Vac으로 농축하고 Sephadex G-25 컬럼으로 salt를 제거하였다. 이 시료를 Sep-Pack (Millipore) 으로 salt를 제거하고 다시 진공 건조하였다.

(5) High Performance Liquid Chromatography(HPLC)

샘플을 이차 증류수 50 μ l에 녹여 C₁₈ 역상 컬럼이 장착된 HPLC에 loading 하고 20 % - 30% acetonitrile/ 0.1 % TFA 의 농도구배로 110분간 분리하였다 (Fig. 5). 각 분획의 활성도를 조사해보면 retention time으로는 30 분에서 65 분까지 나온 모든 분획에서 활성도를 나타내었고, acetonitrile의 농도로 보면 21% 로부터 24% 이내에 활성 단백질이 모두 용출되었다. 적어도 3개의 peak에서 활성도를 보여 각각에 대한 분석이 필요할 것 같다. 또한 한 종류의 단백질이 HPLC profile에서 너무 넓게 퍼져 나오는 경향을 보이고 있는데 이것 또한 해결해야 할 과제였다. C₁₈ 컬럼으로 분리한 트롬빈 억제 활성 분획들을 모두 모아 진공 건조 방법으로 농축하고 이를 다시 C₈ 역상 컬럼으로 분리하였다. 분리 조건은 용출시키는 유기용매를 메탄올로 바꾸어 30 % - 50 % 메탄올의 선형 농도구배로 단백질을 용출시켰다.

(6) SDS Tricine PAGE

앞에서 분리하는 과정마다 활성이 있는 분획들을 모아 16%T, 3%C SDS-Tricine polyacrylamide gel 전기영동을 한 결과, Fig. 6 과 같은 결과를 얻었다. 이 결과 마지막 단계인 HPLC 단계에서 순수한 12kDa 의 thrombin inhibitor가 분리됨을 알 수 있었다. 이 thrombin inhibitor의 pI 값을 isoelectric focusing 을 통해 알아본 바로는 약 3.75 정도의 pI 값이 얻어졌다. 실제 hirudin 변이형의 pI 값도 이와 유사한 3.6 - 4.2 정도로 분포되어 있다.

(7) MALDI를 이용한 질량 분석 결과

높은 농도에서는 순수하게 분리된 폴리펩타이드의 질량 분석시에 검출이 잘 안되는 경향이 있었다. 그렇기 때문에 매트릭스를 바꾸고 dilution rate를 바꾸어가며 질량을 분석하였다. 그 결과 thrombin inhibitor의 질량은 6968 Da 로 검출이 되었으며 약 60여개의 아미노산으로 되어있을 가능성이 있다 (Fig.7).

(8) 아미노산 조성 분석 결과

분리된 thrombin inhibitor를 가수분해한 후 변이체를 만들어 HPLC 에서 분석하였다. 그 결과 glycine과 alanine의 아미노산을 제외하고 많은 부분 hirudin과 유사한 조성을 나타냈다 (Table 4).

(9) Kinetic Data 분석

트롬빈 억제 활성은 bovine thrombin 과 Chromozym TH 를 사용하여 측정하였다.

Tight-Binding Inhibition

$$v_s = (v_o/2[T_h])\{((K_i + n[T_i]) - [T_h])^2 + 4K_i[T_h]\}^{1/2} - (K_i + n[T_i] - [T_h])$$

v_o : inhibitor가 존재하지 않을 때의 트롬빈 반응속도, $[T_h]$: 전체 트롬빈 농도, n : inhibitor의 양과 몰수를 정하는 인자, $[T_i]$: inhibitor의 농도 and K_i : apparent inhibition constant 이다.

측정 평형상태의 반응속도는 앞의 식에 의해서 비선형 회기분석으로 얻었다.

Slow, Tight-Binding Inhibition

$$P = v_s t + (v_o - v_s)(1 - e^{-k_{app}t}) / k_{app} + a$$

P 는 시간 t 에서의 생성물의 양; v_o, v_s 와 k_{app} 는 각각 최초 반응속도, 평형 반응속도 그리고 apparent 1차 속도 상수이다. a 는 $t = 0$ 에서 값을 보정해 주는 항이다.

(10) Thrombin inhibitor 아미노 말단기의 서열 분석

약 200 pmole 의 thrombin inhibitor 를 Applied Biosystem 476A protein sequencer 에 load 하여 automated Edman degradation 방법으로 아미노산 서열을 분석한 결과 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

EEEECKDEEYCAGYLDIDCYESHQKECCQK

30개의 아미노산이 아미노 말단기로부터 분석되었다. Trypsin 으로 이 억제제를 처리하여 Fig. 8. 과 같이 여러 가지 절편들을 얻을 수 있었고, 각각을 아미노산 서열 분석한 결과 앞에서 얻은 30개의 아미노산 서열 뒤에 24개의 아미노산 서열을 더 분석할 수 있었다. Overlapping 하여 전체의 아미노 말단 서열을 적어보면,

EEEECKDEEYCAGYLDIDCYESHQKECCQKQAVAAKNPENCKYGEEDWCGEYK

과 같은 결과를 알 수 있고, 이를 다음에서 다른 거머리 유래 thrombin inhibitor 와 상동성이 있는지 알아보았다.

Hirudin : VVYTDCTESGQNLCLCEGSNVCGQGKNCILGSDGEKNQCVTGEGTPKPQSHNDGDFEEIPE
EYLQ

PS : MRYTACTESGQNQCICEGNDVCGQGRNCQFDSSGKKCVEGEGTRKPQNEGQHDFDPIPEEY
LS

Hemadin : MFSTKMFVVFVAVCICVTQSIRFGMGKVPCPDGEVGYTDCGEKICLYGQSCNDGQCSGDPK
PSSEFEFEIDEEEK

H. nipponia :
EEECKDEEYCAGYLDIDCYESHIQKECCQKCQAVAAKNPENCKYGEEDWCGEYK

위에서 볼 수 있듯이 이 연구로부터 밝혀진 thrombin inhibitor 의 아미노산 서열 은 여타 hirudin variant 와는 다르다는 것을 확인할 수가 있었고, 억제 작용 기작 은 binding kinetics 로 예측하건대, 유사할 것으로 추측된다.

3. 중국산 거머리로부터 여러 단백질 효소 억제 활성을 조사

중국산 흡혈 거머리 *Hirudo* 속에 대해 thrombin inhibitory activity를 조사해 보았더니 강력한 활성이 존재함을 알 수 있었다 (Table. 6). 그 외에도 *Whitmania pigra*, *W. edentula*, *H. nipponia*와 아직 확인되지 않은 종에 대해

trypsin, elastase, chymotrypsin 억제 활성을 조사해 본 결과, 같은 양의 거머리 추출물들 중 trypsin, chymotrypsin, elastase에 대한 억제 활성 모두 *W. pigra*가 제일 높았다.

Table 1. Bleeding and the bleeding rate from the leech bite wounds.

	<i>H. nipponia</i> (n=14)	<i>M. decora</i> (n=18)	<i>H. medicinalis</i> (n=15)	Control 1* (n=18)	Control 2** (n=12)
Bleeding time (min)	210 \hat{u} 142	73 \hat{u} 20	600 \hat{u} 105	6.0 \hat{u} 0.7	6.0 \hat{u} 2.6
Range	65 - 540	21 - 161	390 - 1380	3.5 - 8.5	3.0 - 9.5
Bleeding rate (μ l/min)	39 \hat{u} 10	33 \hat{u} 10	206 \hat{u} 95	30 \hat{u} 15	10 \hat{u} 3

Values are given as means \hat{u} SD. Data for *M. decora* and *H. medicinalis* are taken from Munro *et al.* (1991).

* Subjects used for Munro *et al.* (1991)

** Controls were the same subjects volunteered in this study

Table 2. Blood coagulation of blood flowing from the leech bite wounds with time intervals.

Whole blood clotting time (min)	Time after the termination of feeding (min)				
	1	5	10	15	Control
<i>H. nipponia</i>	12.9 $\hat{\cup}$ 3.1	7.5 $\hat{\cup}$ 2.4	4.3 $\hat{\cup}$ 1.8	2.8 $\hat{\cup}$ 0.5	2.9 $\hat{\cup}$ 0.6
<i>H. medicinalis</i>	9.0	5.5	4.0	2.5	2.5
<i>M. decora</i>	5.8	4.0	3.0	2.5	2.5

Values are given as mean. Values for *H. medicinalis* and *M. decora* are taken from Munro *et al.* (1991).

Table 3. Purification Step 에 따른 specific activity

Step	Inhibitor Activity (ATU/ml)	Protein 농도 (mg/ml)	Specific Activity (ATU/mg)	Total Protein 양 (mg)	Yield (%)
Anion Exchange	155	0.84	184.5	168	100
Gel Filtration	1489.2	0.64	2326.9	13	97
Affinity Chromatography	21.87	0.012	1822.5	0.51	3

Table 4. 아미노산 조성 분석 결과 및 hirudin과의 비교

Amino Acid	HV1 (<i>H. medicinalis</i>)	Thrombin Inhibitor (<i>H. nipponia</i>)
Cys	6	2.69
Asp+Asn	10	11.19
Glu+Gln	11	11.15
Ser	4	4.25
Gly	10	5.22
His	1	2.13
Arg	0	1.48
Thr	5	3.50
Ala	0	3.88
Pro	3	3.99
Tyr	2	0.60
Val	2	3.65
Met	-	-
Ile	3	1.19
Leu	4	3.65
Phe	1	1.11
Trp	-	-
Lys	3	4.05
Total	65	≈ 62

Table 5. Kinetic Analysis

type of inhibition	K_i' (pM)	K_{on}' ($\times 10^9$ M ⁻¹ s ⁻¹)	K_{off}' ($\times 10^{-3}$ s ⁻¹)	K_i (fM)
tight binding	2.98 ± 1.10			142 ± 52
slow binding	3.89 ± 2.09^b	1.51 ± 0.38	5.86 ± 1.67	185 ± 99

^b $K_i' = K_{off}' / K_{on}'$

Table 6. 중국산 거머리 추출물들에 대한 protease inhibitory activity assay

	Inhibitory activity (I_r^a /mg protein)			
	<i>W.pigra</i>	<i>W. edentula</i>	<i>H. nipponia</i>	<i>unknown</i>
Thrombin	N.D	N.D	0.43	N.D
Trypsin	1.24	0.57	0.21	0.08
Chymotrypsin	0.41	0.20	0.20	0.08
Elastase	1.0	0.12	0.08	0.03

^a I_r 은 $(1-A_i/A_o)$ 로 여기에서 A_o 는 control이 440 nm에서 갖는 흡광도이고 A_i 는 거머리 추출물을 넣고 효소와 기질과 반응시킨것의 흡광도이다.

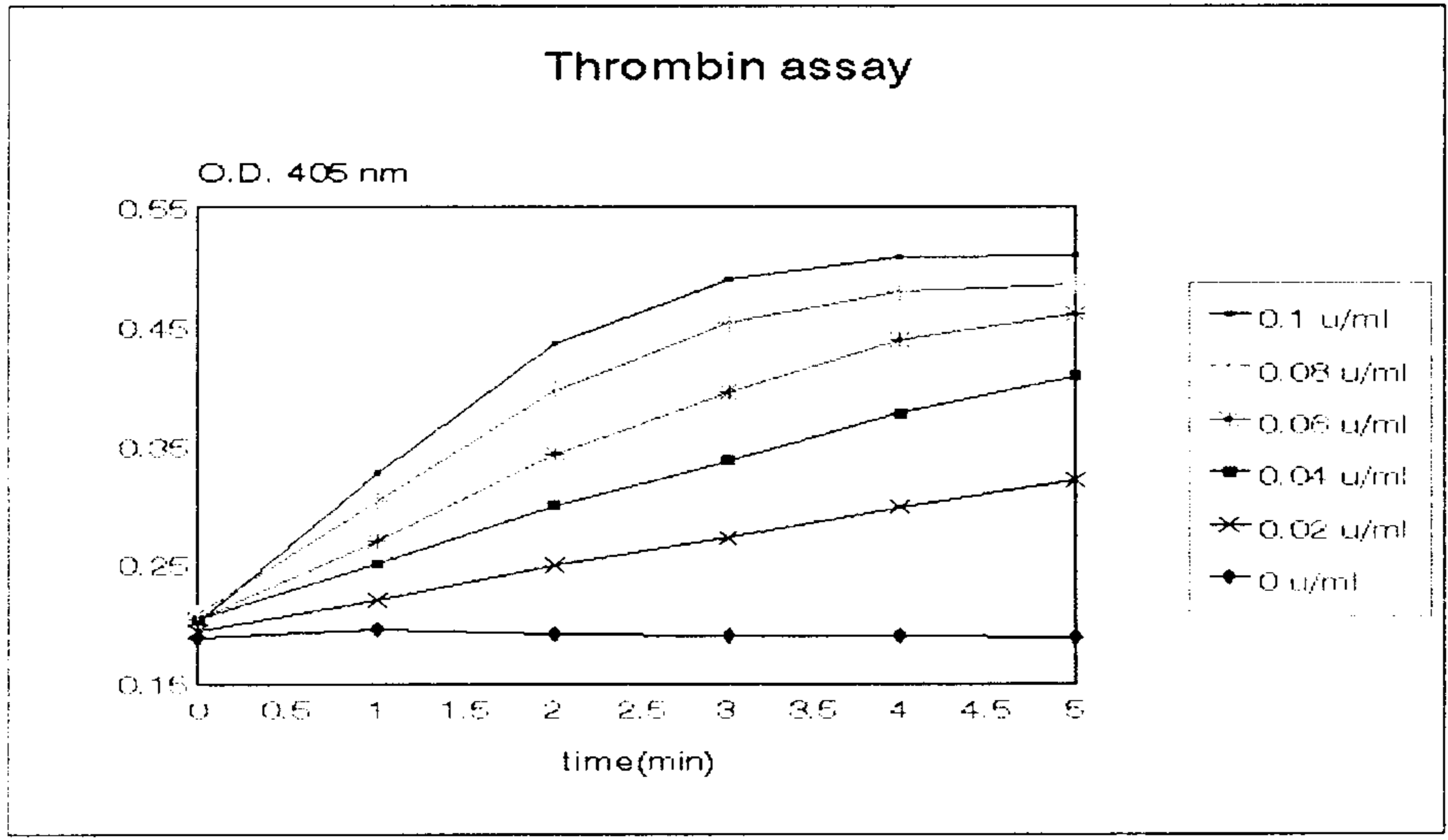


Figure 1. Thrombin Assay

Thrombin의 specific activity에 따라 위 그림과 같은 profile을 얻을 수 있다

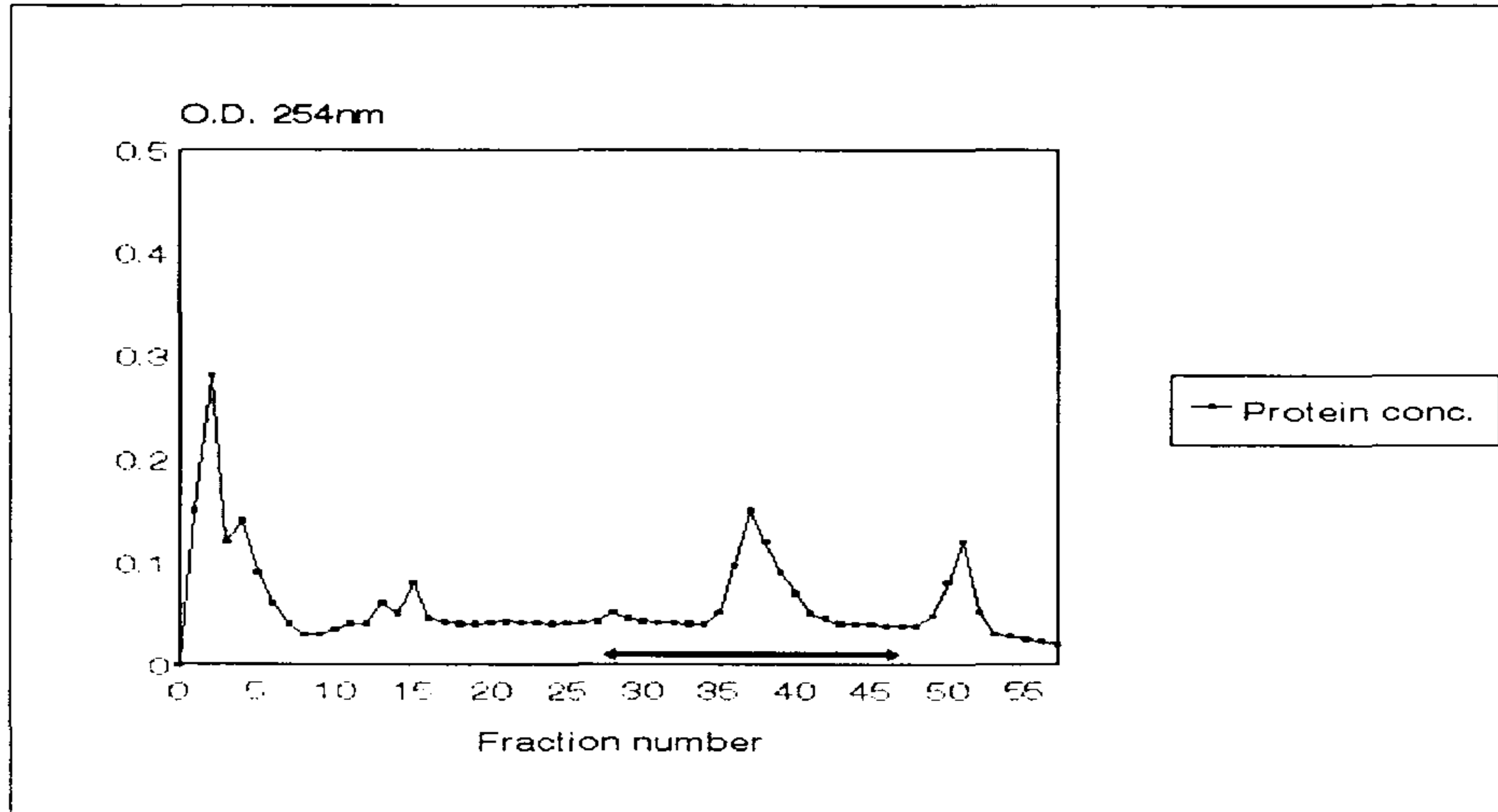


Figure 2. DEAE-Sepharose Chromatography 결과

Crude extract를 2x20 cm DEAE-Sepharose column에 developing한 결과로 thrombin inhibiting fraction은 protein profile 아래 bar로 표시하였다.

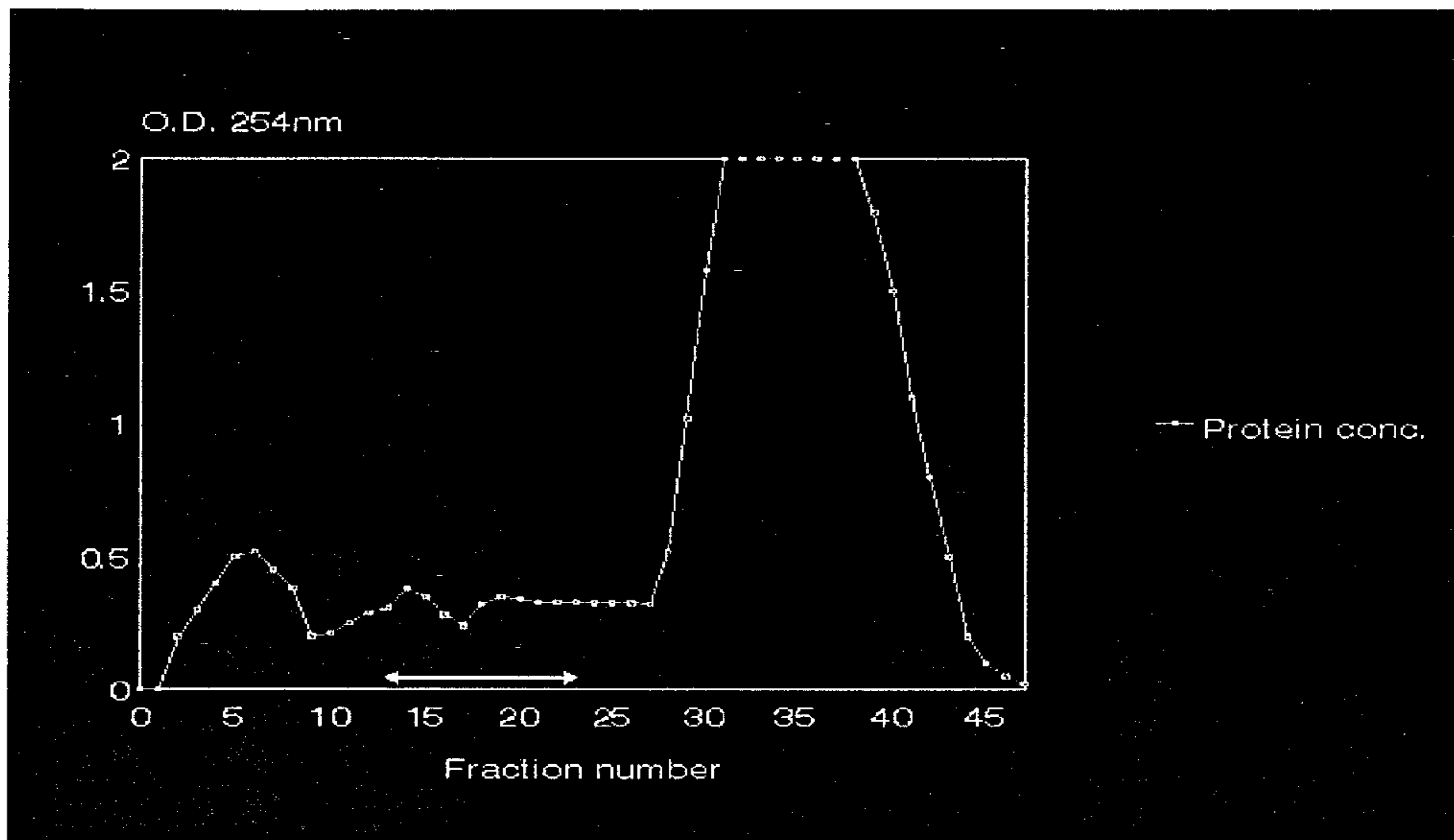


Figure 3. Gel Filtration 결과

Anion exchange chromatography 이후 Sephadex G-75로 gel filtration 한 결과를 나타낸 그림으로 역시 active 한 분획들을 아래 bar로 표시하였다.

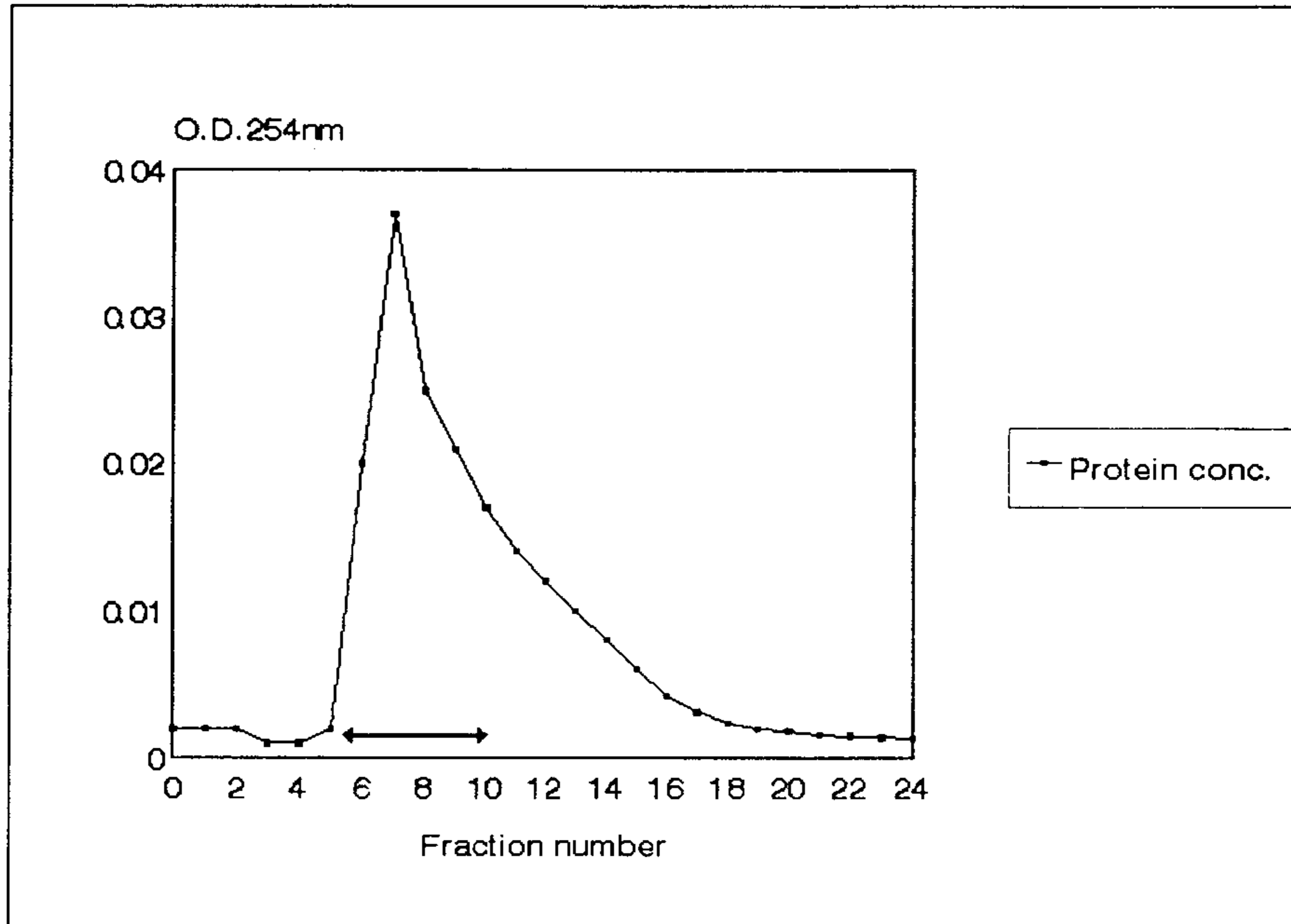


Figure 4. Affinity Chromatography 결과

Thrombin-Sepharose로 gel filtration 에서 얻은 sample을 affinity chromatography 한 그림. 빛금 칠한 부분이 active 한 분획들이다.

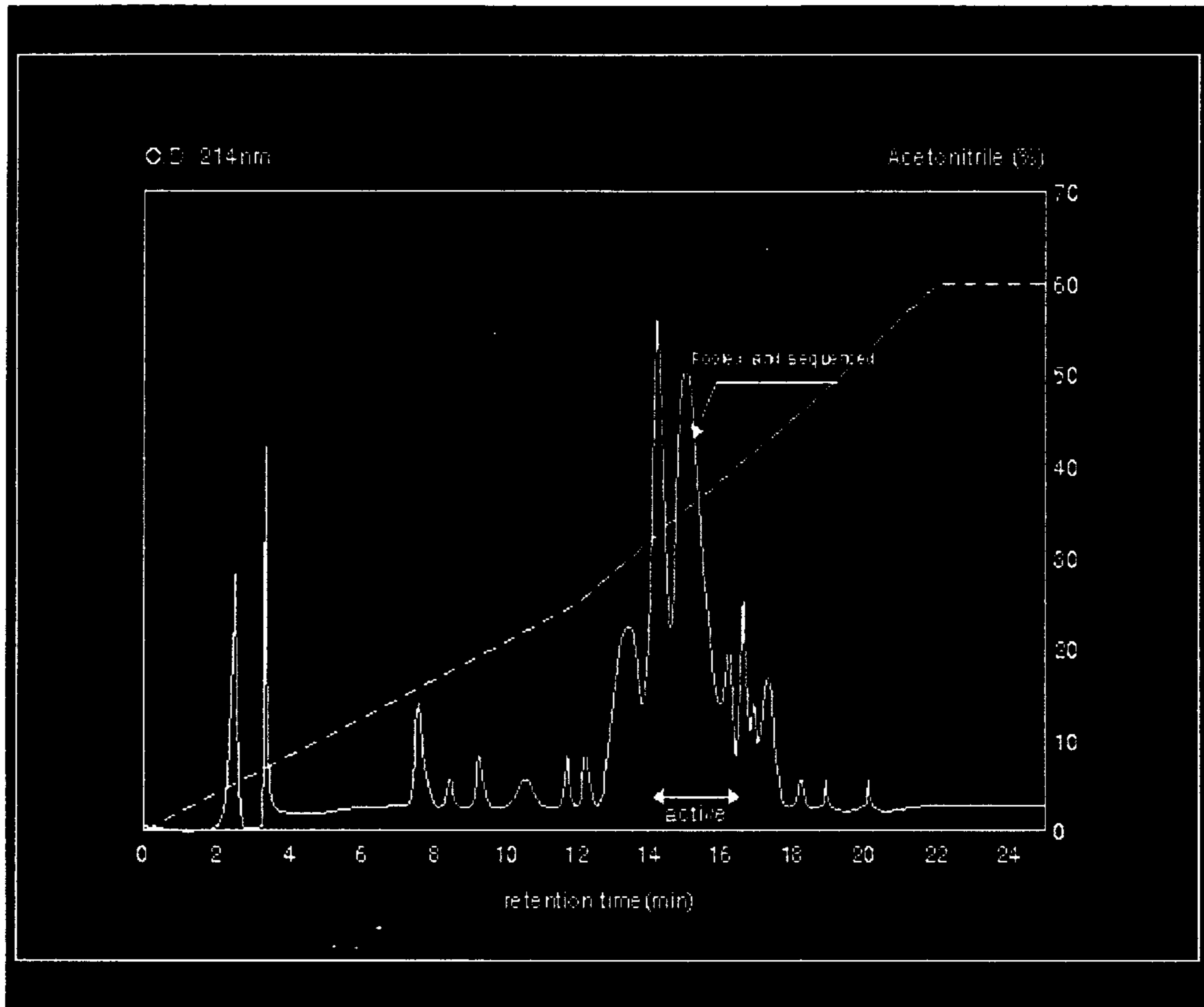


Figure 5. Reverse phase HPLC 결과

C18 reverse phase column으로 앞에서 모은 sample을 분리하였다. Active한 부분이 넓게 퍼진 상태로 elution 되었다.

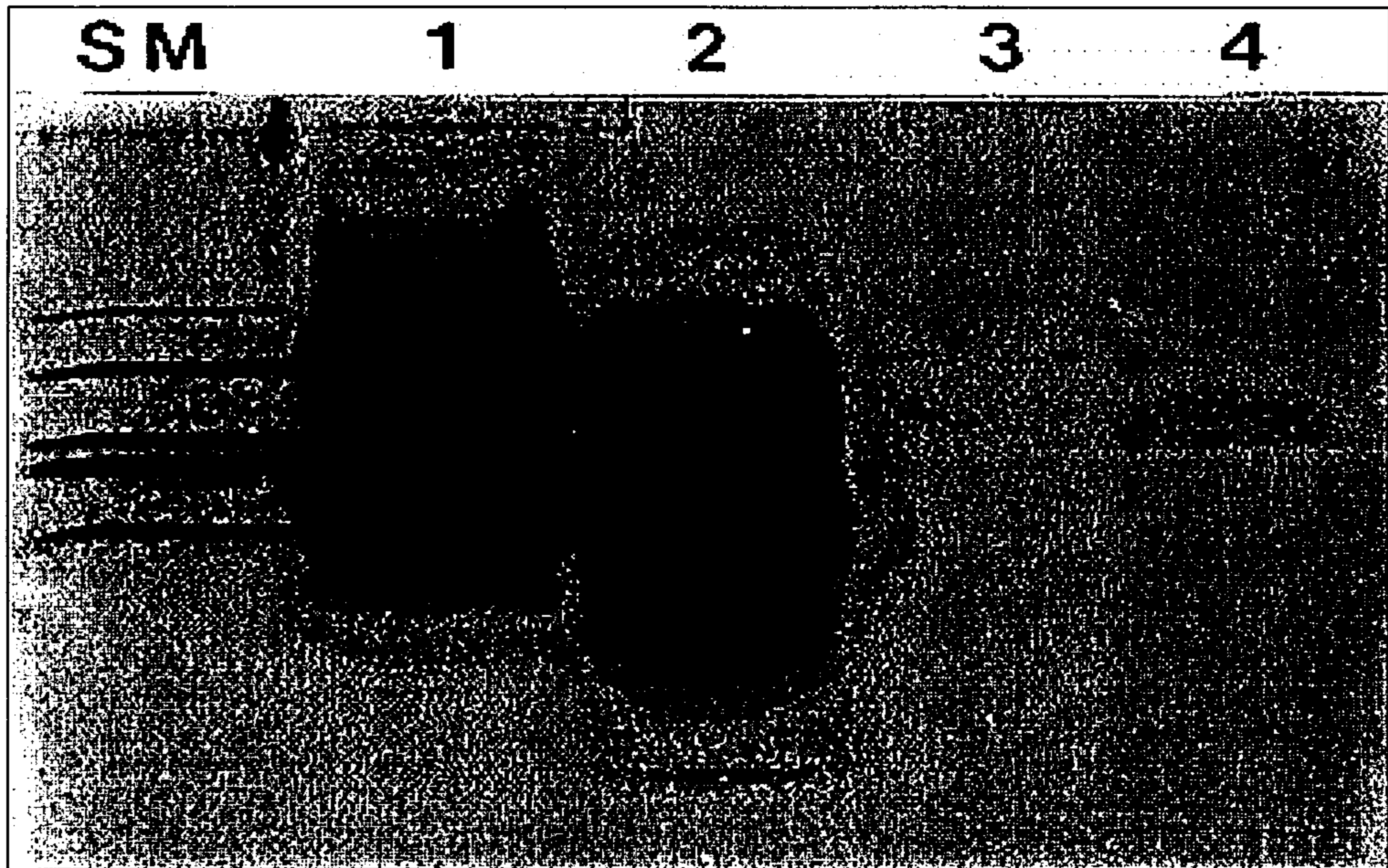


Figure 6. SDS Tricine PAGE

SM : size marker (16.9kDa, 14.4kDa, 10.6kDa, 8.2kDa, 6.2kDa, 3.5kDa, 2.5kDa), 1번 : DEAE-Sepharose 분획, 2번 : Gel filtration 분획, 3번 : Affinity chromatography 분획, 4번 : HPLC 분획

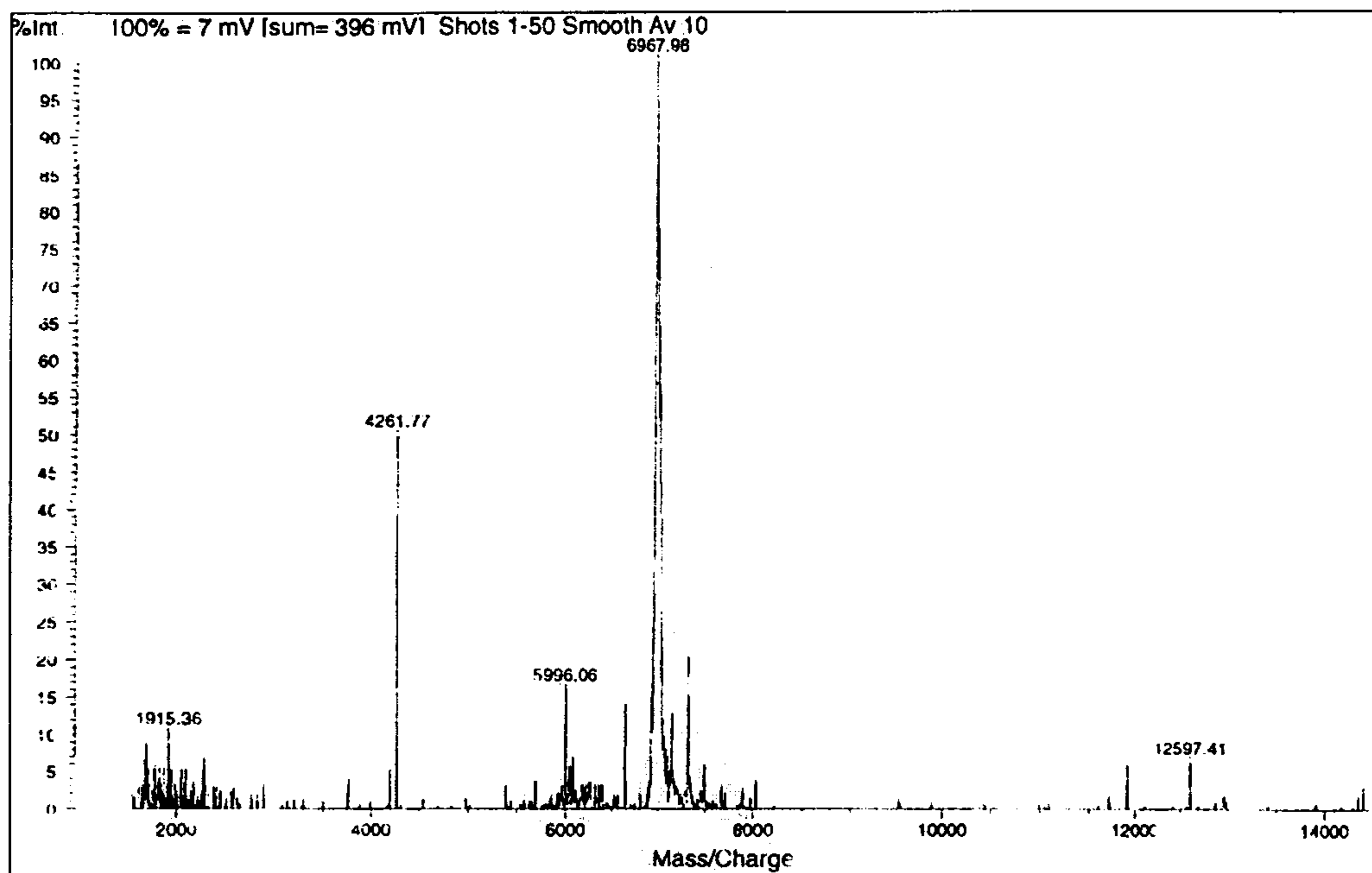


Figure 7. MALDI Mass Spectrometry 결과

실제로 측정된 thrombin inhibitor의 분자량은 $[MH^+] = 6968 \text{ Da}$ 으로 나타났다.

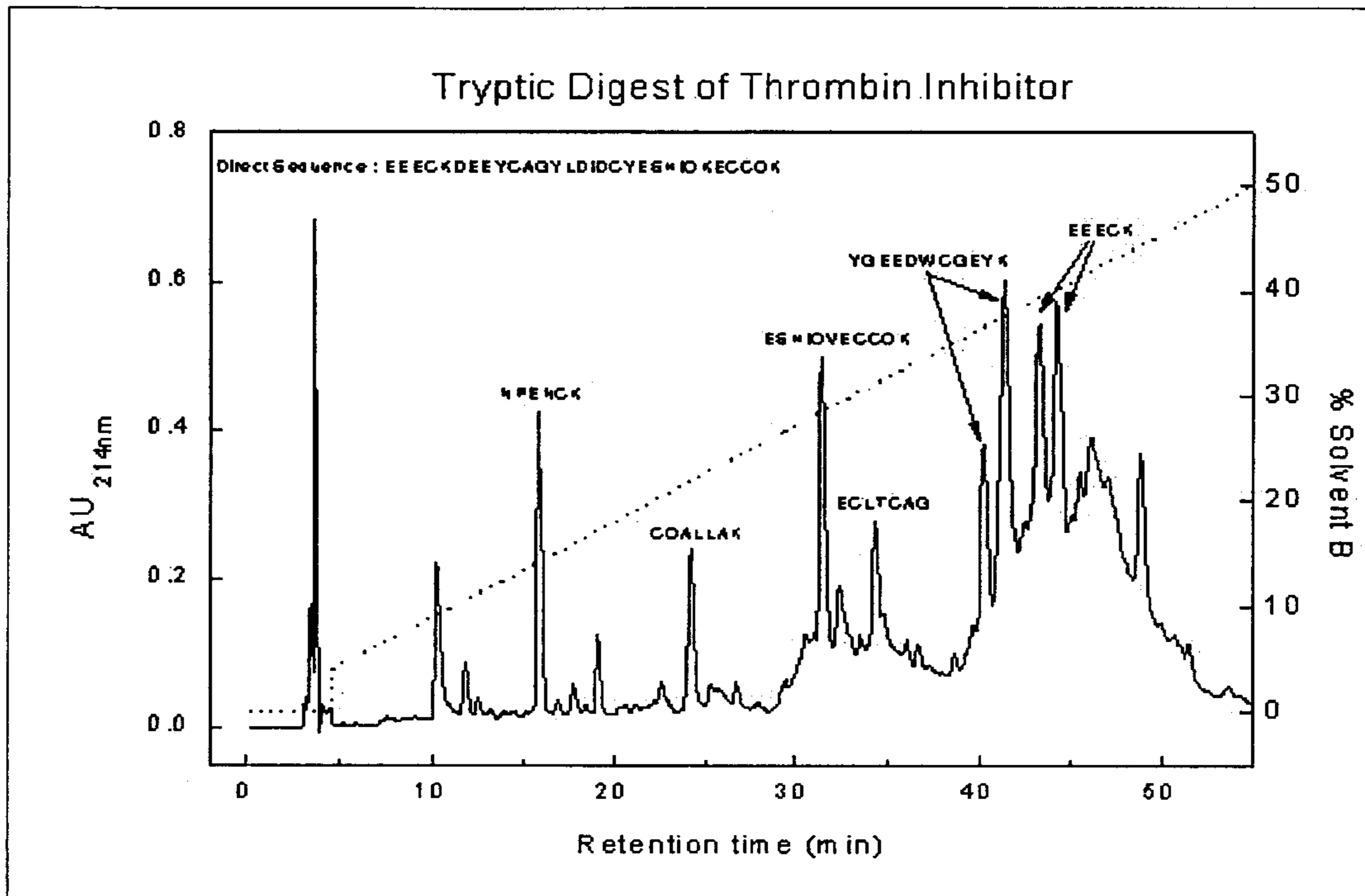


Figure 8. Trypsin 으로 digestion 한 후 HPLC 를 수행한 thrombin inhibitor. Thrombin inhibitor 를 trypsin 으로 16시간 처리한 후 vydac C8 column 으로 절편들을 분리하였다. 각각의 절편들을 automated Edman degradation 방법으로 아미노산 서열 분석을 수행하였고, 이미 분석된 서열과 비교를 통해서 그 서열을 연장하였다. Solvent B 는 0.1% TFA/acetonitrile 이다.

제 3 절. 결론 및 고찰

우리 나라에서 발견되는 흡혈 거머리 *Hirudo nipponia*에 물렸을 때의 bleeding time도 서구의 흡혈거머리들과 같이 많이 지연됨을 볼 수 있었고 이 bleeding time은 다른 source들에 의한 bleeding에 비해 36배나 더 길다. 또한 *H. nipponia*의 whole blood clotting time을 통해 거머리 침속에 강력한 anti-thrombin 활성이 있음을 알 수 있었는데 거머리가 물고 나서 떨어진 바로 직 후의 혈액은 응고가 강력히 억제되는데 비해 거머리가 떨어지고 난 후 15분 뒤에 채취한 혈액은 보통과 같이 응고되었다. Bleeding, coagulation time은 거머리 종들에 따라 차이를 보이는데 아마도 이는 각 거머리 종에 따른 상처의 크기와 거머리 침에 존재하는 서로 다른 성분들이 다르기 때문인 것 같다. 예를 들어 *H. nipponia*는 지름이 1 mm인 상처를 만드는데 비해 *H. medicinalis*는 3 mm의 상처를 만들고 *H. nipponia*의 침 속 성분을 다 조사해보지는 않았지만 그 속에 들어있는 저해제들은 *H. medicinalis*와 다르다. *H. nipponia*의 항혈액응고 활성은 서구의 흡혈거머리들 *M. decora*, *H. medicinalis*들보다 강력한데 bleeding time은 *H. medicinalis* 보다 작다. 이는 혈액 응고의 저해는 platelet과 collagen상호작용을 저해하여 생기는 bleeding의 지연과 관계없음을 보인다. Antithrombin activity가 없는데도 bleeding이 지연되는 것은 이 거머리에 의한 상처에 platelet이 응집되는 것을 방해하는 다른 성분이 존재함을 뜻한다.

*H. nipponia*에 의한 상처에서 나온 총 혈액은 *M. decora*보다는 많고 *H. medicinalis*보다는 작는데, *M. decora*와 *H. medicinalis*의 평균 크기가 *H. nipponia*보다 6배 이상 큰 것을 고려해볼 때 *H. nipponia*의 항혈액응고, 항혈소판 응집 활성은 서구 거머리들처럼 의료용으로서의 응용 가능성을 가졌다고 할 수 있다.

또한 *H. nipponia*로부터 thrombin inhibitor를 스크리닝한 결과 다른 흡혈 동물에서와 유사하게 thrombin inhibitor가 침샘에 함유되어 있음을 알아내었고,

이 성분을 자연에서 채집한 거머리로부터 95% 이상의 순도로 분리해내었다. 이미 기존에 다른 종의 거머리에서 발견되는 thrombin inhibitor들을 분리한 보고서로부터 아세톤 추출법이 효과적임을 알 수 있었고, 이를 적용하여 추출시에 높은 수득률을 얻을 수 있었다. 아세톤 추출법은 작고 비극성 용매에 잘 녹는 성질을 갖고 있을 때, 적용이 가능한 방법으로, 우리 나라 흡혈 거머리에도 적용될 수 있었다. 이온 교환 수지에서 0.3 M NaCl - 0.55 M NaCl 농도의 넓은 범위에 걸쳐 thrombin 억제 활성이 용출되었다. 이것은 아마도 자연상태에 있는 thrombin inhibitor는 여러 가지의 변이형이나 다중 복합체들을 갖고 있거나, C-terminus 로부터 단백질 분해효소 등에 의해 몇 개의 아미노산이 잘려나간 형태의 thrombin inhibitor가 애초에 존재하기 때문이 아닌가 추측된다. 다른 hirudin 변이형들의 분자량으로부터 thrombin inhibitor의 분자량이 6000 Da 에서 12 kDa 사이에 있을 것이라 추측되기 때문에, 겔 크로마토그래피의 분자크기 sieve를 미리 조정하여 Sephadex G-75 (분리 범위 : 분자량 3000 - 70 kDa) 를 사용하였고, 이 방법을 이용하여 대부분의 작은 크기의 단백질이나, 색소들을 제거할 수 있었다. 겔 크로마토그래피에서는 어느 정도 좁은 분획량에 몰려 thrombin inhibitor가 검출되었는데, 그 다음 과정인 thrombin 친화 크로마토그래피는 트롬빈과 특이적으로 결합하는 단백질을 분리하는 방법으로 이 실험에 도입하였다. 트롬빈과 결합한 thrombin inhibitor를 효과적으로 용출하는 방법을 개발하기 위해 3가지 방법을 사용하였는데, serine 단백질 분해효소 계열의 억제제인 0.1 M 4-aminobenzoic acid 용액을 25 mM HCl로 산성화시킨 용액으로 용출할 때에는 desalting 에 문제가 있었고, 0.1 M glycine-HCl, pH 2.8로 용출할 때에는 그 다음 단계인 HPLC 이후 아미노산 조성분석이나 N-terminal 아미노산 서열 분석에 glycine이 많이 나타나는 경향이 있어 분리시 0.1 M citric acid, pH 2.9를 사용하였다. 역상 HPLC를 이용한 분리 단계에서 처음부터 C₁₈ 컬럼을 이용하여 분리하는 것은 그다지 좋은 결과를 내지 못하였다. 역상 HPLC 의 경우 C₈ 컬럼을 사용하는 것이 더 좋은 분리능을 보였고, 용매도 여러 종류를 바꾸어가며

조건을 잡아본 결과 0.1% TFA/acetonitrile 에서는 넓게 퍼져서 용출되어 다른 단백질과 섞여나오고, sodium phosphate, pH7.0/acetonitrile 의 경우에는 분리능이 좋지 않았다. 메탄올을 용매로 사용했을 때, acetonitrile 의 경우보다는 좋은 분리능을 보였지만 계속해서 넓게 퍼져 용출되는 현상은 사라지지 않았다. 두번째 역상 HPLC를 수행할 경우에는 50% n-propanol + 50% methanol 를 이용한 ternary gradient HPLC 방법이 더욱 효과적임을 알 수 있었다. 이렇게 용매에 따라 다른 용출 양상을 보이는 이유는 아마도 이 thrombin inhibitor의 용해 성질이 용매에 따라 특이하기 때문인 것으로 여겨진다.

SDS-Tricine PAGE 로부터 분리된 thrombin inhibitor의 경우 약 12 kDa 정도임을 알 수가 있었다. 그러나 여타 hirudin 변이형의 경우, 평균 60여개의 아미노산에 6000-7000 Da 정도임이 밝혀져 있어 매우 다른 것처럼 여겨졌다. 그러나 자연상태의 hirudin의 경우 SDS-PAGE 상에서 분석할 경우, 약 13000 Da 정도의 분자량의 단백질로 나타나고, 다른 물리적 방법에 의한 분자량 측정에 의하면 분자량이 9.1 - 16.0 kDa 와 같이 측정된다는 보고가 있기 때문에 더욱 정확한 분자량 측정 방법이 요구되었다. 정확한 분자량 측정 방법으로는 기초과학지원 센터 질량분석실의 Matrix assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) 를 이용하였으며, 순수 분리한 thrombin inhibitor의 실제 질량을 [MH]⁺ 형태의 이온을 검출함으로써 측정하였다. 그 결과 다른 다중 복합체의 형태는 나타나지 않았고, 실제 질량은 6967.98 Da으로 측정되었다. MALDI를 이용한 분자량 분석시 이 thrombin inhibitor의 signal이 잘 검출되지 않는 경향을 보였는데, 용액 속에 용해되어있는 성질이 매우 특이하기 때문으로 보여지고, 매트릭스 형성이 잘 안되기 때문이 아닌가 사료된다. 또한 단백질에 glycosylation 되어있을 경우에도 그러한 현상이 나타나는데, *Hirudinaria manillensis*에서 발견되어지는 hirudin 변이체들은 이처럼 glycosylation 되어 있다고 알려져있다. 이러한 glycoprotein 은 negative LDI mass 스펙트럼에서 더욱 잘 검출되는 성질이 있기 때문에, 이 실험을 수행할 필요성이

있다고 여겨진다. 실제 질량이 6968 Da 정도라면 이 thrombin inhibitor는 약 62개 정도의 아미노산을 갖고 있었다.

순수 분리한 thrombin inhibitor의 아미노산 조성을 분석한 결과 다른 hirudin 변이체와 glycine 과 arginine, alanine 수에 있어 차이가 있다는 것을 알 수 있었다. 처음에는 N-terminal 아미노산 서열 분석은 확실하게 이루어지지 않았다. Trypsin으로 thrombin inhibitor를 PAGE 상에서 잘라 절편을 만들어 절편을 HPLC 로 분석한 결과 약 3개 정도의 잘린 절편들이 주로 검출되었고 지속적인 분석을 시도하였다. 이 thrombin inhibitor는 분리 과정에서 trypsin inhibitor와 거의 유사한 물리화학적 성질을 갖고 있는 듯, 계속해서 같은 위치에 검출되다가 thrombin 친화 크로마토그래피와 역상 HPLC 과정에서 서로 나뉘어 분리되었다. 아미노 말단기의 서열 분석을 재 시도하여 일차적으로 30개의 아미노산 서열을 확인 하였다. 이 서열로 homology 분석을 시도하였는데, 나온 결과는 기존의 thrombin inhibitor와는 상동성이 거의 없는 것으로 나타났다. 계속해서 분리된 thrombin inhibitor를 reduction, alkylation 하여 trypsin 으로 자른 후 그 절편들을 HPLC 상에서 분리하고, 각각을 아미노 말단 서열 분석을 수행하였다. 그 결과 이전에 나온 30 개의 아미노산 서열과 overlapping 되는 절편을 찾아낼 수 있었고, 결과적으로 54개의 아미노산 서열을 분석해 낼 수 있었다. 이러한 54개의 아미노산 서열도 역시 여타 thrombin inhibitor와 homology를 찾아낼 수 없었는데, 단백질의 한 성질인 hydrophobicity profile 을 비교하였을 때에는 이 아미노 말단 부분이 다른 hirudin variant 와 유사하다는 사실을 알아내었다. 이러한 성질은 여러 가지 아미노산 서열이 존재한다고 하더라도 그 아미노산 성질이 유사한 경우 그 단백질의 기능적인 측면에서 유사한 기작을 수행할 수 있을 것이라는 추측을 가능하게 한다. 이번에 분리하여 분석한 thrombin inhibitor의 경우에도 아마 이러한 경우일 것으로 예측되는데, 좀 더 구체적인 연구를 통해서 증명되어야 할 것이다. 즉, hirudin antibody 에 의한 activity 감소가 일어나는지, 같은 antibody 에 의해서

detection 이 되는지, NMR 이나 X-ray crystallography, 혹은 CD 같은 분석을 통해 그 구조가 hirudin variant 와 유사한지, 그리고 thrombin 에 결합하는데 필요한 아미노산은 보존되어 있는지, fibrinogen 에 결합하는 위치가 hirudin 과 같은지 등의 실험이 이루어 질 때, 그 예측을 증명할 수가 있을 것이다.

C-terminal 아미노산 서열은 carboxypeptidase를 이용하여 아미노산 변이체를 분석하는 방법과 Mass Spectrometry를 이용하여 서열을 분석하는 방법을 사용하려고 한다. 클로닝이 가능해지면, recombinant thrombin inhibitor로 실험 동물 연구(venous thrombosis, disseminated microthrombosis model)를 통해 *in vivo* 에서 antithrombotic efficacy를 알아보려고 한다. 이미 이러한 연구들은 재조합 hirudin의 경우 외국에서 행해져있고, 그 결과 antithrombotic pharmaceutical 로써 hirudin의 가능성을 보여주고 있다.

분리 과정에서의 thrombin inhibitor 활성 측정으로부터 거머리 1마리당 약 70 unit 이상의 thrombin inhibitor가 포함되어 있음을 알 수 있었고, 마지막 단계인 HPLC 분석에서의 thrombin inhibitor의 활성은 단백질 양이 정확히 측정할 수 없는 미량이었기 때문에 정확한 specific activity를 계산할 수는 없었으나 최소 6000 ATU/mg 이상의 활성을 나타내었다. 분리 과정 중의 thrombin 친화 크로마토그래피는 특이적 결합에 의한 분리에는 효과적이거나 이 실험에서 thrombin inhibitor를 분리하는데 있어 효율에 문제가 있었다. 어느 정도가 컬럼에 결합되지 않고 용출되어 나와 여러번 계속해서 컬럼에 결합-용출 과정을 반복해 주어야 잃어버리는 양을 줄일 수 있었다. 그러나 친화 크로마토그래피의 경우 10번 이상 사용할 경우 효율이 점점 감소하여 사용하지 못하는 경우가 발생하였다. 친화 크로마토그래피를 거치지 않고 바로 역상 HPLC 과정을 수행할 경우에도 specific activity 에는 변화가 없고 오히려 수득률을 높이는 결과를 얻을 수 있었다. 많은 양을 분리할 경우, 단계를 줄일 필요가 있을 때에는 이 친화 크로마토그래피 과정을 생략해도 될 것이다.

중국산 거머리에 대해 thrombin inhibitory activity를 조사해본 결과 *H. nipponia*에 그 활성이 검출되었으며 앞으로 이를 계속적인 분리하여 한국산 거머리에서 분리되는 thrombin inhibitor와 비교함과 동시에 그 특성을 분석해 봐야 할 것 같다. 그 외에도 *W. edentula*, *W. pigra*, unknown에서 모두 trypsin, chymotrypsin, elastase에 대한 억제 활성이 나타났으며 이 중에서도 *W. pigra*가 가지는 활성이 매우 커서 각 거머리들을 대상으로 더 자세한 분석을 해야 할 것이다. 이상의 결과로부터 중국산 거머리에서 여러 유용성분을 분리할 수 있는 가능성을 보였다. 중국 거머리들에 대해서도 아직 분류가 확실히 되어있지 않으므로 이 또한 빨리 이루어져야 할 것이다.

※ 저널에 게재하기 위하여 작성된 논문을 본 보고서의 끝에 첨부하였습니다.

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

의학적으로 유용하며 작은 분자량을 갖는 단백질인 항혈액응고물질을 거머리에서 분리하여 그 작용기작을 규명하고 동맥경화 및 혈전 치료에 응용될 수 있는지를 검토하여 새로운 의약품으로 개발될 수 있도록 대량 생산을 하는 것이 최종의 목표였으며 그 중 제 1차년도인 본 연구에서는 중국산 거머리의 채집 및 배양 기술 확립, 혈전용해 단백질 분리 정제 및 특성 분석을 목표로 하였다.

1차년도의 연구 결과로서 중국 천진 농업과학원 연구원들과의 효율적인 교류에 의해 우리 나라 및 중국에서 거머리를 대량 채집하여 추출된 단백질로부터 항혈액응고제의 활성을 가진 단백질을 screening하였고, 본 연구실에서 보유하는 단백질 분리 기술을 이용하여 한국산 거머리로부터 항혈액응고제를 순수 분리 및 특성 분석을 하였고 이는 본 연구의 평가 착안점인 유효성분의 신규성 여부, 활성과 특이성의 정도, 유효성분의 순수 분리, 이미 기존에 있는 다른 물질과의 비교 등의 항목에 입각해 평가해 볼 때 만족스러운 결과로 볼 수 있다. 그 밖에도 한국산 거머리를 직접 의료용으로 응용할 수 있는지 여부를 알아볼 수 있는 혈액학적 연구를 통해 그 항혈액응고, 항응집 성질이 서구에서 의료용으로 쓰이고 있는 거머리들과 다를 바가 없어 수술에의 직접적인 이용 가능성을 보였으므로 당해년도의 연구 목표를 충분히 달성했다고 본다.

이 결과로부터, 미약했던 우리나라 생물 자원 개발을 계속적으로 주력해야하는 중요성과 그 발전 가능성을 보였고 또한 유용물질의 분리 및 분석 기술이 서구에서 이루어지는 연구들과 동등할 수 있음을 보였다. 의약품의 개발 분야와 의료 기술의 신장에도 중요한 영향을 끼칠 수 있는 결과라고 볼 수 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용 계획

순수하게 분리된 항혈액응고제인 thrombin inhibitor는 보건 분야의 신소재로 개발 이용이 가능하다. 이 분리된 억제제의 완전한 아미노산 서열을 밝히고 특성 분석 연구를 성공함으로써 유전자 조작을 통해 대량 생산의 기반을 확립할 필요가 있으며 기업체의 협조를 받아 대량 생산을 이룰 수 있다. 대량 생산된 항혈액응고제는 동물 실험을 통해 의약 개발 가능성을 검증하고 heparin등의 여타 치료제와 비교 분석을 하며 임상에 직접 적용하여 의약품을 개발하는데 주력한다. 개발하게 되면 병원에서 수술시나 응혈 등을 제거할 때 사용될 수 있어 의학 분야와 생물학 분야에 응용될 수 있으므로 지속적인 임상 테스트와 국제 협력을 통해 외국의 기술과 국내의 기술 및 재료를 적절히 활용하면 국민 보건상 더욱 이롭고 부가가치 높은 물질을 창출해 낼 것이다.

항혈액응고, 항응집 성질이 있는 것으로 드러난 한국산 흡혈거머리를 성형수술이나 정형수술 등 microsurgery에 직접 이용할 수 있으므로 이를 병원과 협조하여 추진 할 계획이다.

중국과의 지속적인 상호 협력으로 중국거머리들의 지속적인 확보를 할 수 있고 그로부터 여러 유용한 성분들을 분리하여 새로운 물질을 만들어 낼 것이다.

제 6 장 참고문헌

- [1] Munro, R., Siddall, M., Desser, S. S., Sawyer, R. T. (1989) *Throm. Haemost.* 61, 366-369
- [2] Orevi, M., Rigbi, M., Hy-Am, E., Matzner, Y., Eldor, A. (1992) *Prostaglandins* 43, 483-495
- [3] Gardell, S.J., Duong, L.T., Diehl, R.E., York, J.D., Hare, T.R., Register, R.B., Jacobs, J.W., Dixon, R.A.F. and Friedman, P.A. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 17947-17952.
- [4] Seymour, J.L., Henzel, W.J., Nevins, B., Stults, J.T. and Lazarus, R.A. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 10143-10147.
- [5] Jordan, S.P., Mao, S-S., Lewis, S.D. and Shafer, J.A. (1992) *Biochemistry*, 31, 5374-5380.
- [6] Nutt, E., Gasic, T., Rodkey, J., Gasic, G.J., Jacobs, J.W., Friedman, P.A. and Simpson, E. (1988) *J. Biol. Chem.* 263, 10162-10167.
- [7] Blankenship, D.T., Brankamp, R.G., Manley, G.D. and Cardin, A.D. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 166, 1384-1389.
- [8] Malinconico, S.M., Katz, J.B. and Budzynski, A.Z. (1984) *J. Lab. Clin. Med.* 103, 44-58.
- [9] Scharf, J., Engels, J. and Tripier, D. (1989) *FEBS Lett.* 225, 105-110.
- [10] Markwardt, F. and Walsmann, P. (1958) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 312, 85-98.
- [11] Badgy, D., Barabas, E., Graf, L., Petersen, T.E. and Magnusson, S. (1976) *Methods Enzymol.* 45, 669-678.

- [12] Adams, S.L. (1989) *Semin. Thromb. Hemost.* 15, 261-264.
- [13] Markwardt, F. (1989) *Semin. Thromb. Hemost.* 15, 269-282.
- [14] Sawyer, R.T. (1991) *Biotechnology* 9, 513-518.
- [15] Stringer, K.A. and Lindenfeld, J.A. (1992) *Ann. Pharmacother.* 26, 1535-1540.
- [16] Graf, L., Patty, A., Barabas, E.B. and Bagdy, D. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 310, 416-417.
- [17] Fenton, J.W. II, Villanueva, G.B., Ofosu, F.A. and Maraganore, J.M. (1991) *Haemostasis* 21(suppl. 1), 27-31.
- [18] Mao, S.J.T., Yates, M.T., Owen, T.J. and Krstenansky, J.L. (1988) *Biochemistry* 27, 8170-8173.
- [19] Scacheri, E., Nitti, G. Valsasina, B., Orsini, G. Visco, C., Ferrera, M., Sawyer R.T. and Sarmientos, P. (1993) *Eur. J. Biochem.* 214, 295-304.
- [20] Strube, K-H., Kröger, B., Bialojan, S., Otte, M. and Dodt, J. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 8590-8595.

Hematological Studies on the Bite of *Hirudo nipponia*.

Seokjin Hong¹, Roy T. Sawyer², and Kewon Kang¹

¹Department of Biological Sciences, KAIST, 373-1, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon, Korea and ²Biopharm(UK) Ltd, Hendy, Dyfed, Wales, UK

Abstract

Blood-sucking leech has a number of peptides in its saliva to overcome the host's haemostatic mechanisms. Hirudin is a representative peptide in leech saliva. The present study showed that a Korean native leech, *Hirudo nipponia* has anticoagulation and antiaggregating activity which causes prolonged bleeding time and clotting time. The bleeding time after a bite is 210 min on the average and is longer than *Macrobdella decora* but shorter than *Hirudo medicinalis*. The coagulation time of blood flowing from the leech bite is prolonged compared with that of control bleeding time by the template device. It takes approximately 15 min of bleeding time for recovery a normal coagulation state of blood. A single blood sucking increased the body weight of *H. nipponia* is 594%. Platelet smears also showed no aggregation after 15 min of blood flowing, but responded normally to thrombin, collagen and ADP.

Keywords: *Hirudo nipponia*; Leech; Bleeding; Coagulation; *Hirudo medicinalis*; *Macrobdella decora*

Correspondence and offprint requests to: Dr K.W. Kang, Department of Biological Sciences, KAIST, 373-1, Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon, Korea

Introduction

Hirudo nipponia is the common blood sucking leech in south Korea(Hong *et al.* 1993). The leech grows to 10 cm and is taking blood meals through an incision. Leech bite of *Hirudo nipponia* is known for prolonged bleeding as that of European leech, *Hirudo medicinalis*(Munro *et al.* 1989). It is reported that anticoagulating factor plays a major role in clotting inhibition and prolonged bleeding may be due to inhibition of platelet-collagen interaction(Manor *et al.* 1991). Platelet aggregation and fibrin formation of blood induced by thrombin is inhibited by hirudin in vitro(Tam *et al.* 1979) and Calin prevent collagen-mediated platelet adhesion/aggregation (Munro *et al.* 1991). Prolonged bleeding time of *H. medicinalis* suggest that leech saliva contains not only anticoagulation agents but also inhibitors of platelet aggregation (Orevi *et al.* 1992). During sucking and storage of blood in the leech crop, the anticoagulants and antiaggregants of leech saliva prevent host's blood from clotting. These agents not only help the leech to feed blood as much as it can uptake without clogging, but also ensure the leech to ooze the water of ingested blood through nephridia.

The leech have not been used for bleeding purpose of plastic and constructive surgery as in the western countries(Wade *et al.* 1990, Rouholamin and Harris 1991). We have investigated the bleeding time and clotting time from the wound of *H. nipponia* in human volunteers. The results were compared with data for *M. decora*, and *H. medicinalis*.

Materials and Methods

Leeches were collected from local ponds and cultured under laboratory conditions. Adult leeches of similar size (0.35 - 0.37g) were applied to the forearm volar surface of healthy 11 male and 3 female volunteers with 20 - 30 age. After feeding, the weight gain of leech and the duration of feeding were measured. All experiments were performed at the laboratory conditions.

Bleeding Time

Leeches were fed sated and allowed to detach by themselves from forearms. The bleeding time of the bite wound is measured a period from the leech detached to the blood stopped at the wound. Control bleeding times were measured by disposable standard template device (FEATHER, Feather Safety Razor Co., LTD, Medical Division, Japan).

Coagulation parameters

The blood samples flowing from leech bite wounds were collected at 1, 5, 10 and 15 min after the termination of feeding and whole blood clotting times were measured on unsiliconized slide glass (Munro *et al.* 1991). Autologous 'finger-prick' controls were measured during the first minute following skin puncture. Volumes of blood loss were measured by collecting free-flowing blood from either the leech bite wounds or the puncture directly into precalibrated adjustable micropipettes.

Platelet Aggregation Test

Blood samples were centrifuged at 750 x g for 3 min and platelet rich plasma (supernatant) were smeared on slide glass. Blood smears of blood flowing from the wounds were fixed in methanol, air dried and stained for 10 min with Giemsa stain. Platelet aggregations were observed by light microscopy.

Platelet aggregation responses to thrombin (1 U/ml), collagen (1 μ l/ml) and ADP(10 μ M) were measured at 1 min and 15 min after the termination of feeding.

Results

H. nipponia is a rather small blood-sucking leech (mean weight=0.36g). All of the attached leeches fed on human successfully. The duration of feeding was 64 ± 14 min (mean \pm SD) and the mean increase in body weight of leeches was 594 ± 174 %, which are comparable to 70.5 ± 38 min, 460 ± 253 % in *H. medicinalis* and 68 ± 26 min, 58 ± 19 % in *M. decora*, respectively. After feeding, the size of bite was 1 mm in diameter. Bleeding from the leech bite wound was prolonged for 210 ± 142 min compared with control of 6.0 ± 2.6 min. The mean bleeding rate from leech bite wound during the first 3 min was 39 ± 10 μ l/min and the rate of control for the same period was 10 ± 3 μ l/min.

Table 1 shows a comparison of bleeding characters of the leech wounds in different species.

Table 1. Bleeding and the bleeding rate from the leech bite wounds.

	<i>H. nipponia</i> (n=14)	<i>M. decora</i> (n=18)	<i>H. medicinalis</i> (n=15)	Control 1* (n=18)	Control 2** (n=12)
Bleeding time (min)	210 ± 142	73 ± 20	600 ± 105	6.0 ± 0.7	6.0 ± 2.6
Range	65 - 540	21 - 161	390 - 1380	3.5 - 8.5	3.0 - 9.5
Bleeding rate (µl/min)	39 ± 10	33 ± 10	206 ± 95	30 ± 15	10 ± 3

Values are given as means ± SD. Data for *M. decora* and *H. medicinalis* are taken from Munro *et al.* (1991).

* Subjects used for Munro *et al.* (1991)

** Controls were the same subjects volunteered in this study

Blood Coagulation

Whole blood clotting times were measured at intervals of 1, 5, 10 and 15 min following the termination of feeding. Blood coagulation flowing from leech bite wounds was strongly inhibited in blood up to 1 min of bleeding, and diminishing progressively with time. After 15 min, whole blood clotting time reduced to the control value (Table 2).

Table 2. Blood coagulation of blood flowing from the leech bite wounds with time internals.

Whole blood clotting time (min)	Time after the termination of feeding (min)				
	1	5	10	15	Control
<i>H. nipponia</i>	12.9 ± 3.1	7.5 ± 2.4	4.3 ± 1.8	2.8 ± 0.5	2.9 ± 0.6
<i>H. medicinalis</i>	9.0	5.5	4.0	2.5	2.5
<i>M. decora</i>	5.8	4.0	3.0	2.5	2.5

Values are given as mean. Values for *H. medicinalis* and *M. decora* are taken from Munro *et al.* (1991).

Platelet Aggregation

Platelets in blood flowing by the leech did not aggregate until 15 min after termination of bleeding but the control blood showed clear platelet aggregation after 5 min of bleeding. Thrombin, ADP and collagen induced aggregation were impaired in blood flowing at 1 min after feeding, but aggregations were returned at the 15 min after bleeding.

Discussion

We have found that bleeding time by *H. nipponia* bite is prolonged as blood sucking leeches from western countries. The bleeding time is 36 times longer than comparable bleeding by other sources.

H. nipponia inhibited the coagulation of human blood by its saliva. Whole blood clotting time shows *H. nipponia* has strong anti-thrombin activities in the saliva. The blood coagulation activities were strong at a period of right after the termination of feeding, however, these are recovered to their normal levels after 15 min. These are some differences among species in bleeding and coagulation times. These variations may be related to the size of wound and different components in leech saliva. *H. nipponia* makes only 1 mm wound in the skin compared with 2-3 mm of *H. medicinalis*. Salivary components of *H. nipponia* have not been investigated, but inhibitors in saliva might be different from *H. medicinalis*. Anticoagulation activity from the bite of *H. nipponia* was strongest among three leech species. However, the bleeding time of *H. nipponia* was less than that of *H. medicinalis*. The results may indicate that the inhibition of blood clotting is independent from prolonged bleeding which is due to inhibition of platelet-collagen interaction.

The prolonged bleeding in the absence of antithrombin activity implies the existence of other components which may prevent platelet aggregation at the wound of *H. nipponia* bite. The total loss of blood from the bite wound of *H. nipponia* was greater than that of *M. decora* but less than that of *H. medicinalis*. Because the mean weights of *M. decora* and *H. medicinalis* are, however, about six times the weight of *H. nipponia*, anticoagulation and antiplatelet activities of *H. nipponia* seem to be as potent as European leech.

References

- Wade JW, Brabham RF, Allen RJ (1990) Medicinal leeches: Once again at the forefront of medicine. *Southern Medical Journal* 83:1168-1173
- Rouholamin E, Harris D (1991) 'Reach for a leech': leeches and microsurgery. *Injury* 22:159-160
- Tam SW, Fenton JW, Detwiler TC (1979) Dissociation of thrombin from platelets by hirudin. *J Biol Chem* 254:8723-8725
- Munro R, Hechtel FOP, Sawyer RT (1989) Sustained bleeding after a leech bite in the apparent absence of hirudin. *Throm Haemost* 61:366-369
- Munro R, Siddall M, Desser, SS, Sawyer RT (1991) Bleeding in human volunteers from the bite of the American medicinal leech *Macrobdella decora* compared with its European counterpart *Hirudo medicinalis* *Comp Haematol Int* 1:214-216
- Orevi M, Rigbi M, Hy-Am E, Matzner Y, Eldor A (1992) A potent inhibitor of platelet activating factor from the saliva of the leech *Hirudo medicinalis*. *Prostaglandins* 43:483-495
- Munro R, Sawyer RT, Hechtel FOP and John R (1992) Sustained bleeding from bites of hatchling leeches. *Comp Haematol Int* 2:27-29
- Munro R, Powell Jones, Sawyer RT (1991) Calin - a platelet adhesion inhibitor from the saliva of the medicinal leech. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2:179-184

Isolation and Characterization of
Thrombin Specific Inhibitor from
H.nipponia

Seok Jin Hong, Dong Ryeong Kim and Ke Won Kang
Department of Biological Sciences, Korea Advanced
Institute of Science and Technology, 305-701, Taejon,
Korea

Summary

Thrombin inhibitor from blood-sucking leech, *Hirudo nipponia*, was purified by size-exclusion, ion-exchange, affinity and high performance liquid chromatography. Tricine-SDS-polyacrylamide gel electrophoresis showed the molecular weight of the polypeptide isolated was about 10 kDa. The molecular

mass obtained by mass spectrometry was 6968 Da which was much less than that from gel electrophoresis. The amino acid composition of the purified thrombin inhibitor showed a quite similarity compared to hirudin. The hirudin-like inhibitor has the blocked N-terminal amino acid and a pentapeptide sequence determined from the inhibitor, Asp-Val-Pro-Gln-Pro, showed no corresponding sequence from previously reported hirudin. This inhibitor is heat and acid stable polypeptide and denaturant such as urea and guanidine-HCl did not affect its inhibitory activity. The binding of isolated inhibitor to thrombin is extremely tight, with an inhibition constant, K_i value of 142 fM.

Keywords : *Hirudo nipponia*, thrombin inhibitor, hirudin, purification

Abbreviations: HPLC, high performance liquid chromatography; TFA, trifluoroacetic acid; HEPES, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid] ; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis

1. Introduction

Blood sucking animals are known to contain various anticoagulant agents which is necessary to prevent the clotting of blood during ingestion and digestion[1-5]. One of the well known species, leech has small peptides in saliva to overcome the hosts haemostatic mechanisms[6-9]. One of these small peptides, hirudin acts as a anticoagulant by inhibiting thrombin which is a key enzyme in blood clotting[10-17]. In recent years, anticoagulant activities have been purified by many investigators[18-21] and cDNA cloning and expression in microorganism have been succeeded[22,23]. *Hirudo nipponia*, a dominant hematophagous leech species in far east Asia can be characterized by following criteria; 1)Well developed three jaws, but entirely lacking salivary papillae, 2)a large number of tooth projections like saw, 3)no median longitudinal furrow on ventral surface of upper lip, 4)twenty two annuli are present between 5th eye and male genitalia, 5)distinctive reproductive organs with the anatomical

examination, 6) mature size does not exceed 7-8 centimeters, 7) 34 segments with more than 100 annuli, and 8) five pairs of eye within 20th anterior annuli. This blood sucking species has been primarily interested in investigation for pharmacological substances in Asia. For preexperiment, screening of various anticoagulant from *H. nipponia* resulted that hirudin-like thrombin specific inhibitor plays a crucial role in anticoagulation. *Hirudo nipponia* have also trypsin/plasmin inhibiting activity. In this paper, we present the hirudin-like thrombin specific inhibitor isolated from *H. nipponia* and the biochemical characteristics of it.

2. Materials and methods

Captured leeches in field was cultured in leech culture tank. The tank was filled fresh water and fine mud on bottom. Tank temperature is adequate at 20 ~

25 °C. Leeches were fed with porcine blood in the feeding sac. Bovine α -thrombin and natural hirudin were from Boehringer Mannheim and Sigma. DEAE-Sepharose, trypsin, chymotrysin, elastase and factor Xa were from Sigma. Chromogenic substrate, Chromozym TH, was purchased from Boehringer Mannheim. Sephadex G75 was from Pharmacia, Aquapore RP300 C8 column was from Pierce. Other chemicals and buffers are of analytical reagent grade.

2.1. Crude Extraction of thrombin inhibitor

Blood-sucking leeches were starved for 1 month and leech heads - above the genital organ - were cut with scissors. 600 ml of 80% aqueous acetone were added. Leech heads were homogenized with biohomogenizer (Biospec Products Inc.). Extraction was carried out by the addition of 0.5 M NaCl and 0.2 M trichloroacetic acid(TCA) with continuous stirring for 30 min. The debris and insoluble residue were removed by centrifugation at 8000g. Extraction step was replicated

with pellet. Two portion of extracts were combined and two volumes of acetone was added to this extract. The precipitates were centrifuged, washed with cold acetone, and resuspended to 25 mM ammonium acetate buffer, pH 6.9. The insoluble residue was removed by centrifugation and protein was precipitated by adding nine-fold excess volume of acetone at -10°C . The precipitate was separated and dried.

2.2. Gel filtration Chromatography

Extract was further purified by Sephadex G-75 gel filtration column(2.0 x 100 cm) which was preequilibrated with 20 mM ammonium acetate pH 6.87. The crude sample is reconstituted in 5 ml of 20 mM ammonium acetate buffer, pH 6.9, centrifuged and applied to the gel filtration column. The column was developed with the same buffer at a rate of 25 ml/hr. Fractions of 6 ml were collected and each fraction was tested for inhibition activity against thrombin. Active fractions were pooled and concentrated with ultrafiltration(DIFCO, YM03).

2.3. Chromatography on DEAE-Sepharose CL 6B

The concentrated sample was applied directly to a DEAE-Sepharose column(2 x 30 cm) preequilibrated with 20 mM ammonium acetate, pH 6.9. The column was washed with the equilibration buffer until the absorbance of the effluent was below 0.1 at 254nm. The bound inhibitor was eluted with a linear gradient of 0 - 1 M NaCl in the equilibration buffer at 20 ml/h flow rate at room temperature, and the effluent was collected in 4-5 ml fractions. The fractions which had thrombin inhibiting activity were pooled and concentrated by ultrafiltration.

2.4. Reversed phase HPLC

Concentrated active inhibitor was purified finally by reversed phase HPLC using Aquapore C8 RP-300 column(Pierce) with a ternary gradient from 0.1 % TFA in water to 0.1 % TFA in methanol + 0.1 % TFA in propanol at 0.8 ml/min flow rate. SDS-Tricine-

polyacrylamide gel electrophoresis (16.5%T, 3%C acrylamide) was used to check the purity of the purified protein[24]. The proteins in gel were stained by Silver staining[25]. Protein concentration was determined by Bradford method[26] and amino acid composition analysis.

2.5. Amidolytic Enzyme Assay and Kinetic Data Analysis

The thrombin inhibiting activity was measured with bovine α -thrombin and chromogenic substrate, Chromozym TH. Fifty μ l of thrombin (0.1 unit/ml dissolved in 20 mM HEPES, 0.15M NaCl, 1% PEG 6000, pH8.0) and 50 μ l of sample were combined and incubated in microtiter plates at 37°C for 5 min. After adding 100 μ l of substrate to reaction solution, the absorbance was measured at 405 nm by microplate reader. (Emax, Molecular Dynamics). The amount of product formed was calculated by using an absorption coefficient of 9.75 mM⁻¹cm⁻¹ for 4-nitroaniline at 405 nm.

Tight-binding and slow-binding inhibition of α -thrombin by thrombin inhibitor were analyzed as previously described[27-34]. Tos-Gly-Pro-Arg-p-NA was used as substrate of thrombin at a final concentration of 100 μ M. In tight-binding inhibition, 20.5 pM α -thrombin and 0.25 - 10 ng/ml inhibitor were preincubated for 10 min and then the steady-state velocity was measured after the addition of substrate. Under the specified conditions the K_m value of the substrate for bovine α -thrombin was 5.01 μ M. In case of slow-binding inhibition, inhibitor and substrated were preincubated, and the reaction was started by addition of 10.3 pM thrombin. The observed steady-state velocities were fitted to eqn 1 and eqn 2 by using nonlinear regression[27-30].

Tight-Binding Inhibition

$$v_s = (v_o/2[T_h]) \{ \{ (K_i' + n[T_i] - [T_h])^2 + 4K_i' [T_h] \}^{1/2} - (K_i' + n[T_i] - [T_h]) \} \quad (1)$$

where v_o is the velocity observed in the absence of the inhibitor, $[T_h]$ is the total thrombin concentration, n

is a factor that corrects the inhibitor concentration units to molarity, $[T_i]$ is the thrombin inhibitor concentration in terms of weight per volume and K_i' is the apparent inhibition constant.

Slow, Tight-Binding Inhibition

$$P = v_s t + (v_o - v_s) \{ (1 - e^{-k_{app} t}) \} / k_{app} + a \quad (2)$$

where P is the amount of product formed at time t ; v_o , v_s and k_{app} represent the initial velocity, steady-state velocity and an apparent first-order rate constant; a is a displacement term for compensating the value at $t = 0$.

2.6. Mass spectrometry analysis of purified thrombin inhibitor

Positive ion mass spectrum was obtained on a KOMPACT MALDI II (KRATOS Analytical). The underivatized inhibitor was dissolved in HPLC grade water at a concentration of about $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$. One μl of sample was

deposited on the probe and 1 μ l of matrix(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) was mixed by using the micropipette tip. The mixture solution was dried under warm air and mass spectrum was gained.

2.7. Analysis of the stability of thrombin inhibitor

Purified thrombin inhibitor was treated in various conditions as specified in Table 3 and diluted 500-fold with HEPES buffer(20 mM HEPES, 0.15M NaCl, 0.1% PEG 6000, pH8.0). The inhibitor was incubated for 20 min in acidic, neutral and alkaline conditions. The control sample (untreated inhibitor) was taken as 100% of the inhibitor activity.

2.8. Amino Acid Composition Analysis

Approximately 5 μ g of purified sample was hydrolyzed in 6 M HCl at 110°C for 24 h. The hydrolysate was derivatized with phenylisothiocyanate and analysed.

2.9. Removal of N-terminal block and N-terminal protein sequence analysis

Blocked N-terminus of thrombin inhibitor was removed by incubation of inhibitor with anhydrous trifluoroacetic acid at 40°C for 1 hr. After drying trifluoroacetic acid, N-terminal sequence of purified thrombin inhibitor was analyzed by automated Edman degradation with on-line HPLC analysis. About 1 nmole of thrombin inhibitor peptide was applied to an Applied Biosystems gas-phase sequencer model 476A and the PTH-amino acid derivatives were analysed.

3. Results and discusstion

3.1. Purification of thrombin inhibitor

Extraction of protein from leech whole body yielded most of thrombin inhibitor contained. Concentrated inhibitor was applied to gel filtration column and size excluded. The activity of thrombin specific inhibitor was eluted in the range of 0.5-0.7 M NaCl from DEAE-Sepharose column. Then active thrombin inhibitor was purified by reversed phase HPLC. The specific activity of the inhibitor was about 7,000 NIH antithrombin units/mg which is measured using Chromozym TH as a substrate. Final reversed phase chromatography was repeated on Aquapore RP300 C8 column. Fig. 1 showed the elution profile on this column. Only one peak with thrombin inhibitory activity was obtained. The yield obtained at final stage was about 15-20% (Table 1). The specific activity of thrombin inhibitor was determined to be 6650 ATU/mg. Material obtained in this procedure was used for further characterization.

3.2. Characteristics of purified thrombin inhibitor

SDS-Tricine gel electrophoresis showed a single band with an apparent molecular weight of 10 kDa (Fig. 2).

MALDI mass spectrometry gave protonated thrombin inhibitor $[MH^+]$ real mass of 6967.98 Da (Fig. 2). Purified thrombin inhibitor showed weak signal intensity on MALDI mass spectrometry under various matrix. The pI of thrombin inhibitor determined by isoelectric focusing was about 3.8. The pI value was calculated by comparing to pI standard markers (data not shown).

3.3. Kinetic Analysis

It was found that thrombin and inhibitor bound 1 : 1 stoichiometry by tight-binding inhibition analysis. From the analysis, the apparant dissociation constant $K_i' = 2.98 \pm 0.7$ pM was determined. The first order rate constant of thrombin-inhibitor interaction was analyzed by slow binding inhibition analysis. k_{on} and $k_{off} (=k_{on} \times K_i)$ were calculated by the equation 3[30].

$$k_{app} = [k_{on} / (1 + [S]/K_m)] [T] + k_{off} \quad (3)$$

where k_{app} is the apparent first-order rate constant, k_{on}' is the association rate constant, S is the substrate concentration, T_i is the inhibitor concentration, K_m is the Michaelis-Menten constant and k_{off}' is the dissociation rate constant. Obtained k_{on}' and k_{off}' values were $1.51 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ and $5.86 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$, respectively. K_i value from slow binding inhibition analysis is $185 \pm 99 \text{ pM}$, which is in agreement with the K_i determined from tight binding inhibition analysis (Table 2).

3.4. Stability test of purified thrombin inhibitor

The effect of extreme pH and temperature on thrombin inhibitor activity was investigated (Fig. 4). After 20min incubation at acidic, neutral and alkaline conditions and at various temperatures, the activity of inhibitor was measured. The activity was slightly decreased at low pH but no activity change was detected at neutral pH. In alkaline condition, the thrombin

inhibitor is readily inactivated at elevated temperatures. The inactivation began to occur after 40°C temperature. Incubation of inhibitor with thrombin longer than 2hrs at room temperature in acidic (pH1.3) or alkaline condition (pH13.0) did not affect inhibiting activity (data not shown). Table 3 shows the stability of inhibitor under extreme conditions. The thrombin inhibiting activity mostly remained in acidic condition after incubation for 20 min at 90 °C and the inhibitor was still active in alkaline solution. The denaturant such as urea and guanidine-HCl did not affect the activity of inhibitor at 90 °C. These characteristics of inhibitor were similar to the report of hirudin[35].

3.5. Amino Acid composition and N-Terminal Sequence Analysis

The amino acid composition of the purified inhibitor was analyzed and compared to other hirudin variants (Table 2). The amino acid composition of the purified thrombin inhibitor was similar to that of

other hirudin variants. Glycine is contained lower amount compared to hirudin.

The inhibitor polypeptide which was collected in single rHPLC peak was used for determination of the NH₂-terminal amino acid sequence, however N-terminus of purified thrombin inhibitor was not determined because of the N-terminal blocking group. After treatment of trifluoroacetic acid, we could assign five amino acid sequence, **DVPQP**. No amino acid peak was detected after five cycles of Edman degradation.

Table 1. Purification Steps and Thrombin Inhibitory Activity

Step	Total Protein (mg)	Specific		
		Activity (ATU/mg)	Recovery (%)	Fold (%)
Crude Extract	64	729.6	100	1
Gel Filtration	25	1138.5	63	1.6
Anion Exchange	3.3	2969.9	22	4.1
HPLC	2.2	6641.8	18	9

Table 2 . Kinetic constants for the inhibition of α -thrombin by inhibitor

type of inhibition	K_i' (pM)	k_{on}' ($\times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$)	k_{off}' ($\times 10^{-3}\text{S}^{-1}$)	K_i (fM)
tight binding	2.98 ± 1.10			142 ± 52
slow binding	3.89 ± 2.09^a	1.51 ± 0.38	5.86 ± 1.67	185 ± 99

Assays were performed as described under "Experimental Procedures" and the data were analyzed as described under "Amidolytic Enzyme Assay and Kinetic Data Analysis" to yield the values of the kinetic constants.

^a $K_i' = k_{off}' / k_{on}'$

Table 3. Effect of denaturant and temperature on thrombin inhibitor stability

Denaturant	% inhibition activity on different incubation condition	
	25 °C for 60 min	90 °C for 20 min
8 M Urea	100.2	100.9
6 M GdmHCl	98.9	99.1
2 % SDS	105.3	79.3

Inhibitor activity of the control sample (10mM Hepes, pH 8.0, 0.14M NaCl, 1% PEG 6000) was taken as 100 %. GdmCl, guanidine hydrochloride; SDS, sodium dodecyl sulfate

Table 4. Amino Acid Composition of purified thrombin inhibitor and other hirudin variants.

Amino Acid	HV1	HM1	Purified Inhibitor ^a
Cys	6	8	2.36 ^b
Asp+Asn	9	10	10.0
Glu+Gln	13	10	10.1
Ser	4	6	5.1
Gly	9	11	5.4
His	1	1	2.1
Arg	-	-	1.3
Thr	4	4	3.6
Ala	-	2	3.3
Pro	3	3	4.4
Tyr	2	2	0.8
Val	4	7	3.1
Met	-	1	-
Ile	2	3	1.1
Leu	4	6	3.3
Phe	1	4	1.3
Tryp	-	-	-
Lys	3	5	4.6

^a The values are averages of three analyses.

^b Cysteine residues cannot be accurately determined by this method.

Fig. 1. Rechromatography of purified thrombin inhibitor on Aquapore RP300 C-8 7 μ m (4.6 \times 250 mm). Thrombin inhibitor was eluted with a ternary linear gradient from 0.1% TFA/water to 50% methanol/0.1% TFA + 50% propanol /0.1% TFA in 60 min at 30 $^{\circ}$ C. Flow rate: 0.8 ml/min.

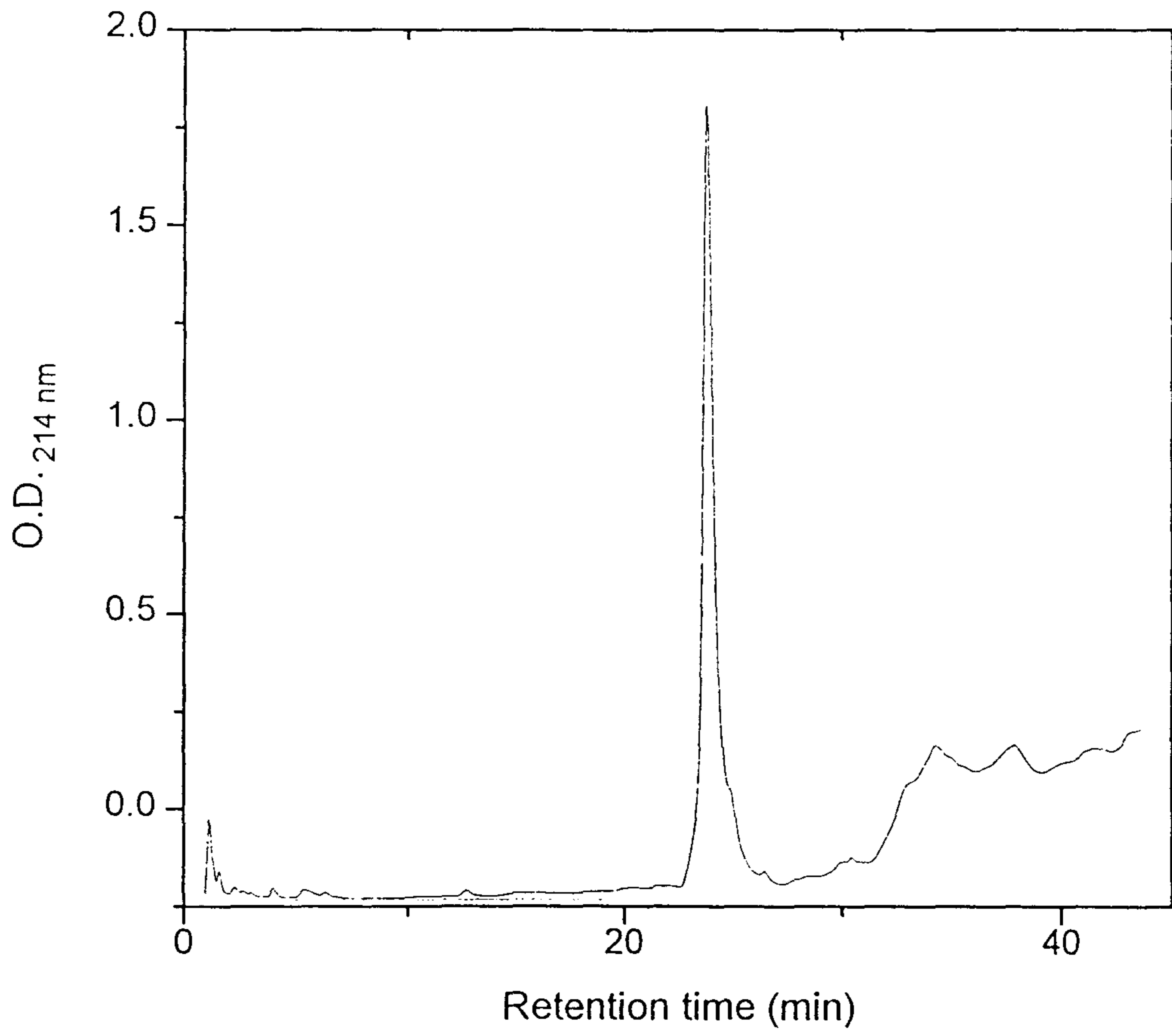
Fig. 2. Matrix-associated laser desorption ionization(MALDI) mass spectrometry shows the mass of the purified thrombin inhibitor is 6968 Da. α -cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as matrix. Y axis shows signal intensity. (Inset) Tricine SDS PAGE of purified thrombin inhibitor. Gels of the purified fraction from the C8 HPLC chromatography step were run as described under "Materials and methods". The gel was stained with silver stain. Arrows indicate molecular mass standards(16.9, 14.4, 8.5, 6.2, and 2.5 kDa).

Fig. 3. Tight-binding inhibition of α -thrombin by inhibitor. Assays were performed as described in

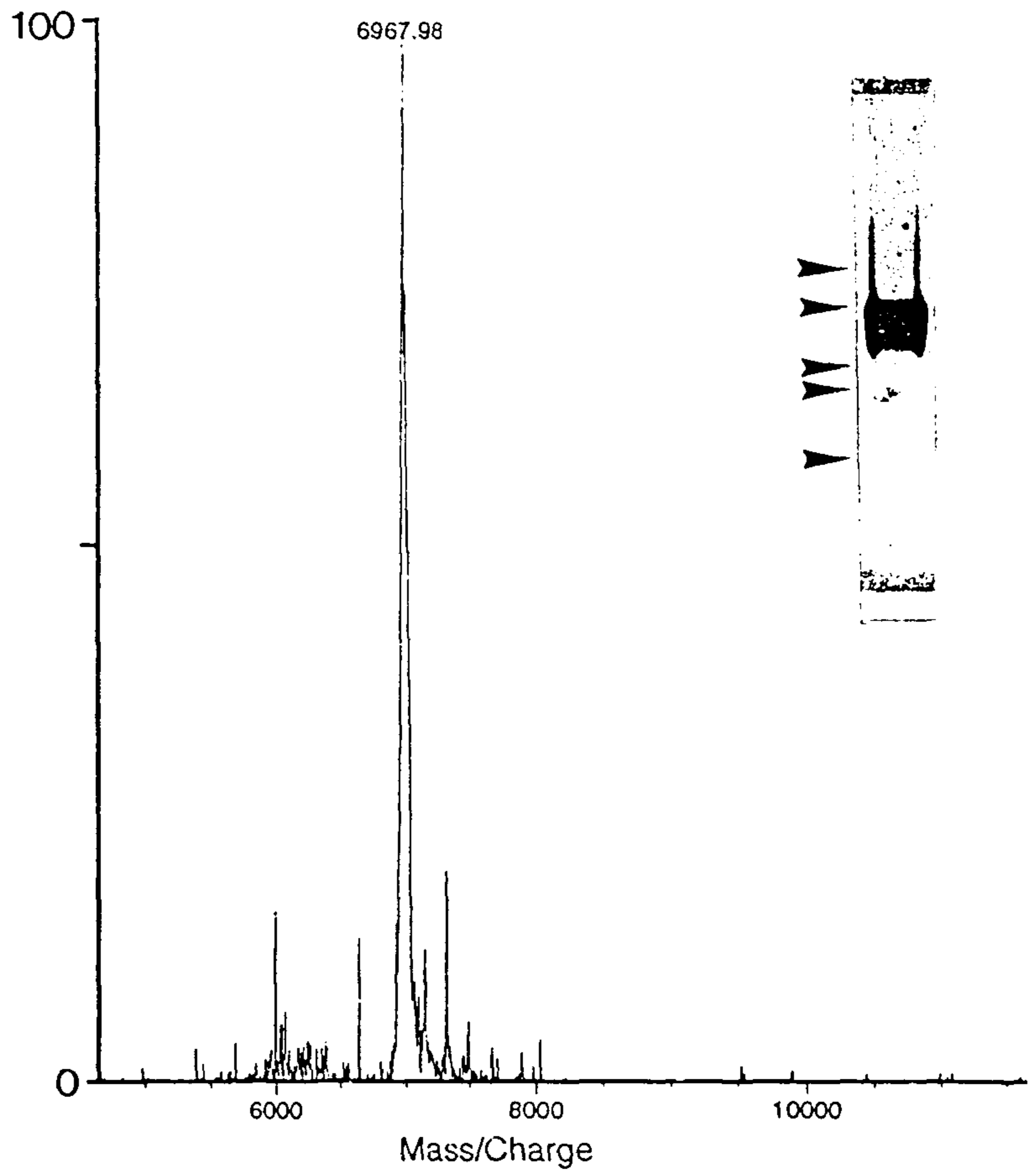
Materials and methods in the presence of 100 μ M chromozym TH as substrate. The observed steady-state velocities were fitted to equation (1) by using nonlinear regression. The line in the figure shows the best fit of the data.

Fig. 4. pH and heat stability of thrombin inhibitor. The inhibitor was incubated at various temperature for 20 min in buffer varying pH values and diluted 500-fold with HEPES buffer (20 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 0.1% PEG 6000, pH8.0). Inhibitory activity of the control sample (10 mM Hepes, pH8.0, 0.15 M NaCl, 0.1% PEG 6000) was taken as 100 %. The inhibitory activity was sharply decreased in alkaline solution and in high temperature. (■) pH1.3; (●) pH8.0; (▲) pH13.0.

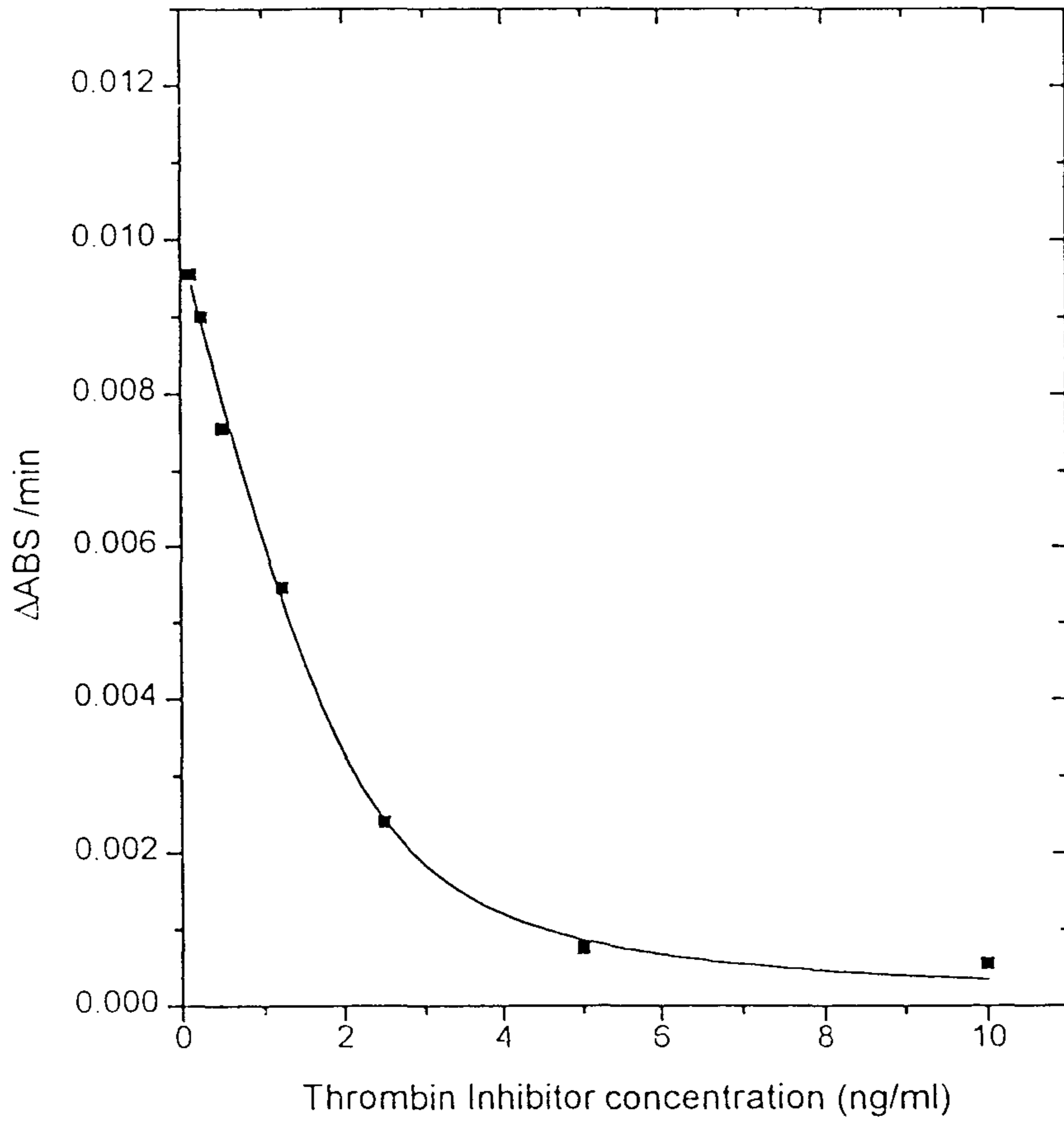
1



2



3



4

