

발간등록번호

11-1541000-001032-01

## 최 종 보 고 서

보안과제( ), 일반과제(✓)

과제번호 108077-03-3-SB010

내인성 항균펩타이드를 활용한 질병저항성  
가축개발을위한 원천기술의 개발  
(Evaluation of endogenous antimicrobial peptide  
over-expression strategy for developing disease resistance  
animals)

항균펩타이드의 살균 효과 탐색과 유전자조작기술을 이용한  
대량생산  
(Evaluation of the activity of porcine antimicrobial peptides and in  
vitro production)

건국대학교

농림수산식품부

농림수산식품부(생명산업기술개발사업)의 지원으로 건국대학교에서 수행한 연구 과제의 최종보고서를 배포함을 알려 드립니다.

- 사업명 : 생명산업기술개발사업
- 과제명 : 내인성 항균펩타이드를 활용한 질병저항성 가축개발을 위한 원천기술의 개발
- 발간등록번호 : 11-1541000-001032-01
- 총 연구기간 : 2008.06.25 ~ 2011.06.24

## 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “내인성 항균펩타이드를 활용한 질병저항성 가축개발을위한 원천기술의 개발”  
과제의 보고서로 제출합니다.

2011년 06월 24일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 박 찬 규

세부연구책임자 : 서 건 호

# 요 약 문

## I. 제 목

내인성 항균펩타이드를 활용한 질병저항성가축개발을 위한 원천기술의 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성(필요에따라 제목을 달리할 수 있음)

대규모 밀집식 가축사양에서 생산성향상을 위한 방안으로 사료에 동물용 항생제의 첨가제로써의 급여가 활용되어왔으나 이에 기인한 항생제 내성균의 발생과 이러한 내성균의 축산물을 통한 사람에게의 전파(돼지, 닭의 각종 세균의 항생제 내성을 조사한 결과, 테트라사이클린과 스트렙토마이신은 세균을 죽이는 약효를 거의 상실한 것으로 드러남)는 사회적 해결하여야 할 중요한 문제로 인식되고 있음. 식품의약품안전청이 2005년 4월부터 7개월간 조사한 '식품 중 식중독균 항생제 내성 모니터링' 결과에 따르면, 육류에서 검출된 대장균이 항생제에 92.5%의 내성률을 보이는 등 먹을거리의 항생제 내성균 역시 우려할 만한 수준인 것으로 나타남. 동물사료에 포함되는 항생제의 양을 감소시키는 방법으로는 현재 유기축산만이 대안으로 설정되어 있으나 이러한 방법으로는 축산물의 소비량을 충족시킬 수는 없음. 현재 항생제 대체제에 대한 개발이 진행되고 있으나 이와는 별도로 생체 내에서 자연적으로 생성되는 세균방어 물질들을 활용한 기술의 개발이 새로운 아이디어로 제시되었음. 본 기술은 바이오 생명공학기술을 동물산업에 활용하여 동물의 체내에서 분비되는 세균방어물질을 동물생산에 활용하여 동물산업부에서 생산성향상에 중요한 역할을 하는 항생제대체제의 개발을 목적으로 함.

## III. 연구개발 내용 및 범위(필요에따라 제목을 달리할 수 있음)

- 돼지 항균펩타이드(베타 디펜신 및 카셀리시딘)의 종류별 유전자 확보 및 특성분석
- 돼지 항균펩타이드(디펜신)의 탐색
- 돼지 항균펩타이드의 조직특이적 발현 시스템 개발
- 돼지 항균펩타이드 형질전환 벡터의 개발
- 돼지 항균펩타이드 형질전환 마우스의 생산
- 돼지 항균펩타이드 삼중형질전환 마우스의 개발
- Recombinant DNA 기법을 활용한 디펜신의 in vivo 생산
- 마우스 모델을 이용한 디펜신의 살모넬라 항균 효과 검증
- 돼지형질전환용 항균펩타이드의 선정 및 평가 (항균물질 개발용)

#### IV. 연구개발결과(필요에 따라 제목을 달리할 수 있음)

- 돼지 게놈분석을 통한 돼지 항미생물펩타이드 12종의 유전자 분석 및 클로닝을 통한 유전자 확보
- 게놈수준에서의 돼지 디펜신 및 카셀리시딘 펩타이드 분석 및 데이터 베이스화
- 항균펩타이드 12종에 대한 radiation hybrid map 작성완료 및 비교유전체지도 작성
- 살모넬라, 병원성 대장균 또는 돼지 질병 바이러스 저항성이 있는 항균 펩타이드로써 beta defensin 1,2 및 3와 PG1, PMAP1 및 PR을 선발함
- 항균펩타이드가 발현된 cell lysate를 이용하여 *in vitro* 상에서 항균효과 검증 (*Salmonella* Enteritidis, *E.coli* O157:H7)
- 확보된 돼지항미생물펩타이드 중 PG1, PMAP1 및 PR에 대한 형질전환 벡터시스템 및 *in vitro* 발현시스템 개발
- 돼지항균펩타이드 PG1, PMAP1 및 PR 유전자 과발현 형질전환 마우스 3종의 개발
- 돼지항균펩타이드 PG1, PMAP1 및 PR 유전자를 동시에 과발현하는 3중 형질전환 마우스의 개발
- 항균펩타이드 과발현 형질전환 마우스를 대상으로 행동학적 조직학적 수준의 표현형 및 과발현 부작용의 분석
- 항균펩타이드 과발현 형질마우스를 대상으로한 *in vivo* 박테리아 감염실험을 통한 항균펩타이드의 효능 분석
- Yeast를 활용한 *in vitro* 항미생물펩타이드 생산시스템의 개발 및 해당 발현산물의 항균효과 검증
- Salmonella* Enteritidis 접종실험
- Listeria monocytogens* 접종실험

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획(필요에따라 제목을 달리할 수 있음)

##### 1.연구성과 활용실적

###### (1) 논문게재

-Kim W, Kim S, Choi H, Truong ND, Thong le M, Kim JH, Xiao R, Park KK, Seo K, Lee H, Kim BS, Yoo MH and Park C. 2010. Discrimination of animal species using polymorphisms of the nuclear gene Zinc finger protein 238. *J Agric Food Chem*, 58:2398-2402.

-Hyeon JY, Chon JW, Hwang IG, Kwak HS, Kim MS, Kim SK, Choi IS, Song CS, Park C, Seo KH.2011. Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella* serovars in Retail meat. *J Food Prot.* 74:161-166.

###### (2) 특허성과

-항생펩타이드의 제조방법 및 그 펩타이드의 응용(Method of producing antimicrobial peptide and use of the same): 10-2010-0041334

-항생펩타이드의 제조방법 및 그 펩타이드의 응용(Method of producing antimicrobial peptide and use of the same): 10-2010-0041337

-항생펩타이드의 제조방법 및 그 펩타이드의 응용(Method of producing antimicrobial peptide and use of the same): 10-2010-0041340

## 2.연구성과 활용계획

-확보된 항균펩타이드 유전자를 활용한 대량생산기법의 개발을 통한 산업화 가능성 모색

-확보된 항균펩타이드 검증 기술을 활용한 후속연구에의 활용

-개발된 항균펩타이드 형질전환마우스 4종에 대한 후속연구를 통하여 항균펩타이드를 활용한 질병 저항성 가축의 생산을 위한 모델동물로 활용하며 항균펩타이드의 동물산업에 대한 활용법의 지속적 개발연구를 추진

-확보된 형질전환 마우스와 항균펩타이드를 활용한 산업동물의 무항생제 사육기술 개발을 위한 기반기술로써의 활용

-항균펩타이드의 항생제 대체 물질로서의 효능에 대한 검정이 더욱 필요하여 이에 대한 후속연구를 지속할 예정임

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### I. Project title

Evaluation of endogenous antimicrobial peptide over-expression strategy for developing disease resistance animals

#### II. Project objective

The objectives of this project are 1) to select and develop antimicrobial peptide transgenic mice using porcine protegrin1, PMAP1 and PR1 genes to estimate the effect of the peptide on Salmonella resistance of an animal and an increase of mucosal immunity, 2) to develop triple transgenic mice using the genes, 3) to establish a database for animal antimicrobial peptides and evaluate the bacteriocidal effects on Salmonella Choleraesuis and Salmonella Typhimurium and 4) to develop technology with originality regarding to an increase of animal disease resistance and to develop alternatives for current antibiotics used in animal production.

#### III. Results

We performed a genome level analysis to identify antimicrobial peptide genes in the porcine genome. We constructed radiatio hybrid map to determine the locations of these genes in the pig genome. From the results we identified 12 functional antimicrobial peptides including beta defensins, protagrins and cathelicidins. We constructed the vector system to developing transgenic mice overexpressing PG1, PMAP1 and PR genes. We also developed a triple transgenic mice expressing these genes at the same time. Transgenic mice showed increase expression of these antimicrobial peptides and also showed abnormal phenotypes probably caused by alteration of normal immune system. The more detailed analysis is currently undergoing. We also developed in vitro expression systems of these antimicrobial peptides using yeast expression system. The in vitro expressed peptides showed some level of antimicrobial activity but the expression level was still relatively low to obtain complete analysis results. The yeast lysates from the in vitro expression of beta defensin 1 showed positive effects on *Salmonella* Enteritidis, *E.coli* O157:H7.

#### IV. Application

The results from this study provide a possibility to apply these endogenous antimicrobial peptides to increase defense ability of animals against foreign pathogens. The transgenic

animals overexpressing pig antimicrobial peptides will be used as useful resources as model animals to evaluate the effect of antimicrobial peptides for the future studies. Also, the high efficiency in vitro expression of antimicrobial peptide could provide the solution for finding alternative substances for current commercial antibiotics. However, our study showed that the successful in vitro expression and purification of antimicrobial peptides requires further research.



# CONTENTS

## (영 문 목 차)

Chapter I . Research outline -----	12
A. Description on the necessity of the research -----	12
1. Economical and industrial importance -----	12
Chapter II . Developmental status -----	14
A. Worldwide situation -----	14
1. Antibiotics-free animal production -----	14
2. Antibiotic replacement technology -----	14
3. Animal disease resistance and technical development -----	15
4. Technology on beta defensins -----	15
B. Situation in Korea -----	15
C. Current research status -----	16
Chapter III . Materials and method and results -----	19
A. Methods and materials -----	19
B. Results -----	20
1. Identification of porcine antimicrobial peptides and expression vector construction -----	20
2. Evaluation of the antimicrobial effect of defensins on Salmonella and E.coli -----	24
3. Evaluation of antimicrobial effect of porcine beta defensin 1, 2 and 3 produced from the in vitro system using yeast -----	25
4. Construction of vector system to produce AMP transgenic mice -----	30
5. Production of Protegrin , PR-26, PMAP-36, transgenic mice -----	32
6. Characterization of AMO expression patterns from transgenic mice -----	35
7. Evaluation of the effects of artificially synthesized PG-1 -----	35
8. Expression of AMPs using <i>Pichia pastoris</i> -----	37
9. Characterization of eye abnormality from the AMP transgenic mice -----	39
10. Characterization of the yeast AMP expression system -----	40
11. Results of <i>Salmonella Enteritidis</i> infection to AMP transgenic mice -----	45
12. Results of <i>Listeria monocytogen</i> infection to AMP transgenic mice -----	46
Chapter IV . Achievement and contribution to the related field -----	48
A. Research objective and achievement -----	48

B. Contribution to the related field .....	49
Chapter V. Applications of research results .....	51
A. Progress in research applications .....	51
B. Future plans for research applications .....	51
C. Major technologies developed .....	52
D. The quality of technologies developed .....	52
E. Detailed plans for the research applications for each technologies .....	53
Chapter VI. Oversea informations collected during research .....	54
Chapter VII. References .....	55

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	12
제 1 절	연구개발의 필요성 -----	12
1.	연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성 -----	12
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	14
제 1 절	세계적 수준 -----	14
1.	무 항생제 사육 동물개발기술 현황 -----	14
2.	항생제 대체제 개발 기술개발 현황 -----	14
3.	질병저항성 유발인자 발굴기술 현황 및 관련 특허 -----	15
4.	beta defensin 관련 기술현황 -----	15
제 2 절	국내수준 -----	15
제 3 절	국내·외의 연구현황 -----	16
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	19
제 1 절	연구범위 및 연구수행 방법 -----	19
제 2 절	연구수행 결과 -----	20
1.	돼지 항미생물펩타이드의 발굴, 분석 및 발현백터의 제작 -----	20
2.	살모넬라 및 대장균에 대한 돼지 디펜신의 효과 검정 -----	24
3.	효모(yeast)를 이용한 돼지 beta defensin 1,2,3 발현 산물의 항균 효능 검정 ----	25
4.	형질전환마우스 생산을 위한 항균펩타이드 construct 제작 -----	30
5.	항미생물펩타이드 형질전환 마우스 3종 Protegrin 1, PR-26, PMAP-36의 생산 ----	32
6.	형질전환마우스의 유전자 발현분석 -----	35
7.	합성펩타이드 PG-1을 이용한 돼지 항균펩타이드 항균효능검정 -----	35
8.	Pichia pastoris를 활용한 돼지 항균 펩타이드의 발현 -----	37
9.	항균펩타이드 과발현 마우스 안구의 조직학적 분석 -----	39
10.	수립된 형질전환 Yeast의 발현 및 발현산물 확인(세포 내 분비 yeast) -----	40
11.	수립된 형질전환 Yeast의 발현 및 발현산물 확인(세포 외 분비 yeast) -----	43
12.	Salmonella Enteritidis 접종실험 -----	45
13.	Listeria monocytogens 접종실험 -----	46
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	48

제 1 절 연도별 연구목표 및 달성도	48
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도	49
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	51
제 1 절 연구성과 활용실적	51
1. 논문게재	51
2. 특허성과	51
제 2 절 연구성과 활용계획	51
제 3 절 핵심기술	52
제 4 절 연구결과별 기술적 수준	52
제 5 절 각 연구결과별 구체적 활용계획	53
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	54
제 7 장 참고문헌	55

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

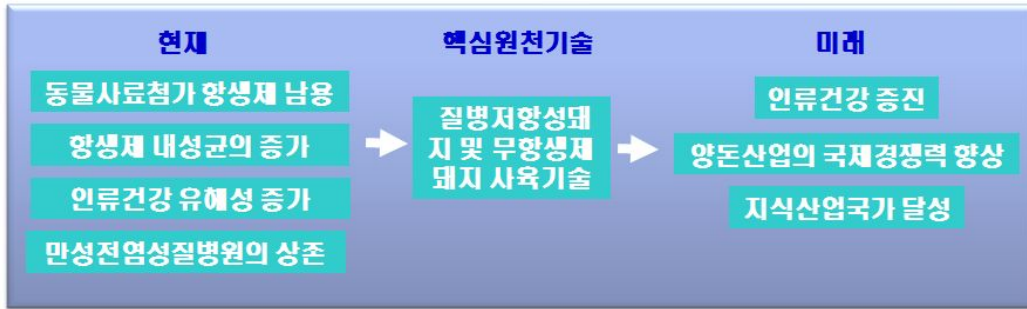


그림 1. 질병저항성 동물생산기술의 중요성

대규모 밀집식 가축사양에서 생산성향상을 위한 방안으로 사료에 동물용 항생제의 첨가제로써의 급여가 활용되어왔으나, 이에 기인한 항생제 내성균의 발생과 이러한 내성균의 축산물을 통한 사람에게의 전파는 사회적 문제를 유발하여 이에 대한 대책의 수립이 요구되고 있는 상황이다(돼지·닭의 각종 세균의 항생제 내성을 조사한 결과, 테트라사이클린과 스트렙토마이신은 세균을 죽이는 약효를 거의 상실한 것으로 보고됨). 또한 식품의약품안전청이 2005년 4월부터 7개월간 조사한 ‘식품 중 식중독균 항생제 내성 모니터링’ 결과에 따르면, 육류에서 검출된 대장균이 항생제에 92.5%의 내성률을 보이는 등 먹을거리의 항생제 내성균 역시 우려할 만한 수준인 것으로 나타났다 (문창진, 2007).

동물사료에 포함되는 항생제의 양을 감소시키는 방법으로는 현재 유기축산만이 대안으로 설정되어있으나 이러한 방법으로는 축산물의 소비량을 충족시킬 수는 없어 이에 대한 대처가 필요하다. 현재 항생제 대체제에 대한 개발이 진행되고 있으나 이와는 별도로 생체내에서 자연적으로 생성되는 세균방어 물질들을 활용한 기술의 개발이 필요하다 (Tomas 등, 1998, 2003, 2004). 항균펩타이드 활용기술은 바이오 기술을 동물에 활용하여 산업화에 목적을 두고 있으며 동물의 체내에 자연적으로 존재하는 세균방어물질을 동물생산에 활용한다는 측면에서 성공 가능성이 높을 것으로 예상된다. 양돈산업의 경우 현재 자돈 사망율이 30% 이상 도달하여 가축의 질병저항성 증대에 대한 근본적인 대책이 필요하다.

국내 동물용 항생제 총사용량은 2004년도 기준 1400톤으로 축종별 순위는 돼지 > 닭 > 수산용 > 소 순으로 나타났다(국내외 항생제 사용 실태: 2006년 식약청 자료). 국외의 경우 미국 연간 약 9100톤, 프랑스가 1400톤, 일본이 1059톤, 영국이 459톤, 호주가 199톤, 덴마크가 112톤, 뉴질랜드가 80톤, 스웨덴이 16톤, 노르웨이가 6톤으로 분석되었으며 선진 외국에 비해 가축 사육두수 및 생산량을 고려할 때 항생제의 사용이 높은 수준임을 나타내고 있다 (신호철, 2005). 국내외 친환경 축산물에 대한 소비자의 강력한 요구에 따른 항생제 사용량 절대 감소에 대한 필요성이 증대되고 있으며 이에따라 대체 항생제 개발이 시

급한 실정이다.

항생제의 동물사료 첨가 효과로는 유해미생물의 증식 억제, 영양소의 이용률과 흡수율 증가를 통한 성장률과 사료효율 개선, 장내 대사과정에 관여하여 면역증가, 치료효과를 증진시켜 질병 예방효과를 나타내며 성돈보다 자돈에서, 위생적인 환경보다 비위생적 환경에서, 급격한 스트레스 상황에서 그 효과가 더 유효한 것으로 보고되고 있다. 반면에 항생제 남용의 문제점으로는 항생제 내성균의 유발로 동물 치료의 어려움이 유발되고 축산물에 잔류해 사람으로 전이시 쇼크, 내성균 유발, 신체발육 이상 등 문제를 야기할 가능성이 많아 WHO 등 국제 기구에서 항생물질 규제를 시작하였다.

현재 사용되고 있는 항생제 대체물질로는 난황황체, 생균제, 유기산, Mannanoligosaccharide, Fructooligosaccharide, 키토산 등이 있으나 문제점으로는 대부분의 항균 효과 증명은 in-vitro 수준에 국한되며, 점막면역 시스템과의 관계 증명이 미흡하며 동물 실험 결과 항균 효과가 모호하고 생산비용의 증가로 인한 무제한 사용이 어려운 점등이 지적되고 있다.

신개념 천연 항생제 “디펜신(defensin)” 또는 항균 펩타이드(antimicrobial peptides)라 불리는 생체내 분자들은 선천면역(innate immunity) 반응물 중 하나로 미생물의 종류에 크게 상관 없이 작용하며, 즉각적 혹은 단 몇 시간 내에 작용하며 내성균의 문제에 직면해 있는 기존의 항생제와 구분되어 내성 문제가 없으며 후천면역에 대한 부작용이나 거부반응 문제가 없다 (Boman 등, 2003). 항균펩타이드인 디펜신의 발현이나 조절기작에 문제가 생기면 각종 감염 질환이 야기되는 것으로 보고되었으며 세균 군마다 작용하는 디펜신의 종류에 차이가 있는 것으로 예측되고 있다 (Brahmachary 등, 2004).

디펜신 연구는 비록 초기이기는 하나 큰 산업적 중요성을 내재하고 있다. 디펜신은 선천 면역 뿐만 아니라 선천면역-후천면역 사이의 교량 역할을 수행하며 인간 디펜신의 경우 항균력 뿐만 아니라 AIDS 억제 능력 등 항바이러스 효과 증명되었으며 lysozyme의 항균력 보다 수백배 강력한 효능을 지닌 것도 존재한다. 인간 디펜신은 병원균에 특이적으로 작용할 뿐만 아니라, 조합 사용 시 상승작용으로 치료의 범위가 다양하여 유도발현 등을 통한 새로운 감염치료 방법 수립의 가능성이 존재하며 유전자 조작에 의한 대량 생산으로 사료 첨가제로 산업화에 대한 가능성 또한 있는 것으로 판단되고 있다. 디펜신 유도 발현 메카니즘을 밝히고 기존 대체항생제 물질보 다우수한 디펜신의 효과를 분석하고, 항균펩타이드 과다발현 형질전환동물의 개발을 통하여 항균펩타이드의 동물산업에의 적용을 위한 산업기술 개발이 가능할 것으로 예상된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 세계적 수준

#### 1. 무 항생제 사육 동물개발기술 현황

- 현재까지 개발 또는 사용되고 있는 기술로는 유기축산기법을 활용한 방법이 있음. 그러나 유기축산과 대량생산은 서로 반대되는 개념으로 대량생산에 적합한 무항생제 사육기술은 실험동물에서 사용되는 SPF 사육방법을 제외하고는 없다.

#### 2. 항생제 대체제 개발 기술개발 현황

- 가. 가축용 항생물질 대체제에 대한 국내특허는 현재 1건이 존재함. 국제특허는 다수가 존재함. 현재 다양한 물질을 활용한 항생제 대체제 개발이 이루어지고 있으나 실제 축산에서 항생제를 대체할 수 있을 만큼 강력한 반면 저가의 생산비용으로 제공할 수 있는 물질은 아직 없다.

#### 나. 기존 항생제 대체 물질

##### (1) 난황항체

- 산란기에 병원균 등 특정 항원을 접종하여 그 항원에 대한 특이 항체를 난황 내에 대량 생산
- 초유와 함께 난황 급여 시 살모넬라 등 병원균 감염 효과에 대한 보고가 있다.

##### (2) 생균제

- 흔히 Probiotics로 불리는 동물이나 사람의 건강에 유익한 미생물을 말함
- 흔히 사용되는 세균으로는 비병원성 *Escherichia coli*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Treptococci*, 그리고 yeasts가 있음
- 임상목적에 따라 복합적으로 사용되기도 함
- 살아 있는 유용균주를 사료에 첨가하여 급여함
- 장내 균총 개선, 항생물질 생성, 병원성 미생물의 장관 내 부착 및 정착 억제 등을 통해 성장촉진 및 사료효율 개선

##### (3) 유기산

- 초유에 유기산 처리(프로피온산, 초산, 개미산 등)를 하여 초유의 이상 발효 방지
- 대장균 성장 억제 효과와 동시 젖산균 등 유용 세균 성장 촉진
- 초유의 보존 효과를 통한 사양 능력 향상

##### (4) Mannanligosaccharide(MOS)

- MOS 는 효모 세포벽으로부터 얻어진 탄수화물
- 가축에 급여 시 성장이 개선되고 면역력 향상에 효과
- 특히 병원성 *E. coli*, 살모넬라의 장관벽 부착을 줄이고 면역반응 증진

##### (5) Fructooligosaccharide(FOS)

- FOS은 감미료로 소화효소에 의해 가수분해되지 않는 난소화성당
- *Bifidobacteria*와 같은 유익세균은 이용하지만 병원성 세균은 이용하지 못함
- 사료첨가물로 사용할 경우 유익세균의 선택적 성장을 유도함
- FOS는 가축의 사료효율, 도체의 지방 함유율 감소에 효과 보고됨

## (6) 키토산

- 키토산은 버섯류와 사상균의 세포벽과 게, 새우 등 갑각류의 골격과 껍질을 구성하는 키틴질을 화학적 또는 생물학적으로 처리한 N-아세틸화합물
- 항종양활성, 면역부활작용, 항암활성, 항콜레스테롤 작용, 항고혈압성, 항균활성 등 다양한 생물활성 기능 보고됨

## 3. 질병저항성 유발인자 발굴기술 현황 및 관련 특허

- 현재까지 동물의 특정 질병저항성 및 특정미생물에 대한 저항성과 관련하여 발굴된 유용유전자가 일부 보고되었다 (Whitelaw 등, 2005). 그러나 항생제와 같이 광범위한 미생물에 저항성을 부여하는 유전자와 관련된 기전은 아직 알려지지 않고 있으며, 현재 동물의 분자유종학기술을 활용한 질병저항성동물을 개발하기 위한 노력이 진행되고 있으나 이러한 방법보다는 특정물질을 동물의 체내에서 발현시켜 질병저항성 동물을 개발하는 것이 더욱 효율적일 것으로 판단되고 있다.

## 4. beta defensin 관련 기술현황

항균펩타이드는 포유동물을 포함한 여러동물의 체내에서 자연적으로 생성되는 대표적인 항미생물 단백질로 여러 가지 종류가 존재함 (Hughes, 1999; Luenser 등, 2005). 디펜신의 확실한 항균 기작은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 세포막에 대한 직접적 작용하여 미생물을 사멸시키는 것 이외에도 면역시스템의 기능을 조절하는 기능이 있는 것으로 밝혀짐.

또한 항체와 같은 분자 불활성화 및 상호작용 저해의 작용을 하는 것으로도 보고되었으며 어떤 미생물의 경우 현재까지 밝혀진 디펜신이 효과적으로 작용하지 못하는 경우도 존재한다. 따라서 디펜신의 발현 유무에 따라 숙주 특이적 질병 발생의 근거가 되며, 인간 디펜신은 병원균에 특이적으로 작용할 뿐만 아니라, 이들을 조합하여 함께 사용했을 때의 상승작용까지 감안하면 그 치료 범위는 다양할 것으로 예상되고 있다. 이외에도 유도발현 기법을 이용하여 새로운 개념의 감염치료 방법 수립이 가능하며, 디펜신의 발현유도에 대해 이해가 깊어질수록, 생체 내 디펜신의 발현을 인위 조절할 수 있는 약제 개발에 한걸음 더 나아갈 수 있을 것으로 생각된다.

항생제 남용에 따른 내성균의 문제는 인간의 존립을 위협할 정도로 점점 더 골칫거리가 되고있으며, 이러한 시점에 자연 항생제인 항균펩타이드의 활용에 의한 내성균 문제를 피할 수 있는 이상적인 치료 및 예방 약제가 개발될 수 있다는 국제적인 견해도 또한 성립되고 있다. 국내 특허의 경우 외국의 기업에서 화장품 혹은 약학적 조성물의 제조에 beta defensin을 활용하는 내용으로 1건의 특허가 등록되어있다. 국제적으로는 현재 항미생물펩타이드의 실험실적 특성분석결과에 기반을 두고 산업화를 위한 기반 연구가 진행 중에 있으며 일부 개발품의 경우에 전임상 실험이 진행중이 기도 하다.

## 제 2 절 국내수준

생균제, 난황 항체 등 기존 항생제 대체 물질의 이상효과 연구 진행되어 왔으나, 디펜신 또는 항균 펩타이드를 동물산업에 활용하는 부분에 있어서는 아직은 개념 정립단계에 있다(내인성 천연항생물



질과 관련하여 현재 가장 치열한 연구가 진행중인 분야인 Defensin에 대한 연구에 있어서 국내연구팀에 의하여 수행된 연구를 Pubmed 데이터베이스를 통하여 검색한 결과 일치되는 검색결과가 검색되지 않았음).

항미생물펩타이드를 검색어로 검색하였을 경우 하등동물을 대상으로한 Defensin 이외의 항미생물제제에 대한 연구결과가 소수 검색되었으며 이러한 자료를 근거로 할 때 국내의 경우 천연항생펩타이드 자체 및 이를 활용한 응용연구에 대한 연구기반이 매우 취약한 것으로 생각된다. 현재 본 연구실의 경우 유전체를 기반으로 한 돼지의 beta defensin의 발굴에 대한 연구를 진행 중이며 또한 유전자 클로닝연구를 실시하고 있다.

### 제 3 절 국내 · 외의 연구현황

국내외에서 진행 중인 항균펩타이드 관련 연구현황은 표 1에 나타난 바와 같으며 국외의 경우 다양한 연구가 진행이 되고 있다.

표 1. 국내·외의 연구수행 기관 및 연구현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
UCLA	폐장 감염에 대한 각종 디펜신(defensin)의 역할규명 및 치료제로써의 활용법개발	디펜신을 항미생물제제로 활용하기 위한 연구진행 중
University of Iowa	기도에서의 점액성 방어기전을 통한 박테리아, 진균류 바이러스 등의 병원체에 대한 디펜신의 역할규명	디펜신을 항미생물제제로 활용하기 위한 연구진행 중 (Cheng 등, 2003)
Novozymes A/S	Antimicrobial activity와 polypeptide를 encode하는 nucleotide sequence를 포함하는 polynucleotide를 가지는 polypeptide의 활용에 관한 연구	항미생물효과를 가지는 폴리펩타이드 및 염기서열과 관련한 특허소유
Magainin Pharmaceuticals Inc.	Antimicrobial agent로 유용한 polypeptide의 정제와 antimicrobial peptide production에 관한 연구	항미생물 폴리펩타이드의 정제 및 생산과 관련한 특허소유
Sichuan University	HBD-2(human beta defensin)를 활용한 형질전환생쥐를 생산하여 Stap hylococcus aureus에 대한 저항성 평가	디펜신의 질병 저항성에 대한 in vivo 효과의 검정

MRC	디펜신 유전자제거마우스를 개발	디펜신의 질병 저항성에 대한 in vivo 효과가 있는 것으로 연구결과 도출
위스콘신 의과대학	디펜신 HD-5 형질전환 마우스를 개발하고 이 마우스에서 장내 병원성미생물의 억제력에 대한 평가	HD-5 형질전환 마우스의 경우 Salmonella typhimurium의 증식억제효과가 있음
University of California	항미생물억제 단백질인 cathelicidin 투여에 의한 포유동물의 미생물억제효과 평가	cathelicidin의 경우 피부괴양에 효과가 있으며 그 활용에 대한 연구진행 중
신라대학교	해조류를 이용한 항생제대체 사료 첨가제 개발	개념 정립
서울대학교	항생제 대체 기능성 물질의 사용효과에 관한 연구	IgA등 사용
Medical College of Wisconsin, The Cleveland Clinic Foundation, Harvard Medical School, University of Pennsylvania School of Medicine	Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expression a human intestinal defensin	개념정리 (Bevins, 2003)
R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, National Academy of Sciences of Ukraine	Human beta-defensin 3 (hBD-3) expression in A431 cell line and human vulval tumors	cell culture를 이용한 다량 발현 (Shnistsar 등, 2004)
Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University	Recombinant expression of human cathelicidin (hCAP18/LL-37) in Pichia pastoris	세균을 이용한 다량 발현 (Hong 등, 2007)
Department of Microbiology, University of British Columbia	Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria	세균활용 (Piers 등, 1993)
Department of Chemistry, Inha University	Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of alpha helical domain of Tenecin 1, an insect defensin protein, and structure-activity relationship study	디펜신의 구조변형 (Ahn 등, 2006)

Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Life Sciences College, Nanjing Normal University	Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in <i>Escherichia coli</i> using two fusion partners	세균발현 기법 (Chen 등, 2008)
Institute of Infocomm Research	ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences	항펩타이드데이터베이스 (Brahmachary 등, 2004)
Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institute of Clinical Pharmacology, Robert Bosch Hospital	A flow cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts	Flow cytometry를 이용한 defensin 효과 검증 (De Keersmaecker 등, 2006)
Department of Dermatology and Venerology, Klinikum der Johann Wolfgang Goethe Universität	Detection of human beta defensin-1 and -2 by RT-competitive multiplex PCR	PCR을 이용한 디펜신 발현 검증
Department of Medicine, UCLA Center for the Health Sciences 90024.	Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides	전통적인 항펩타이드들 검색
Department of Cell Biology and Molecular Genetics, University of Maryland,	Immune responses against <i>Salmonella enterica</i> serovar enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens	면역 반응 조사 (Ruby emd, 2003)
Centre of Microbial and Plant Genetics, K.U. Leuven	Flow cytometric testing of green fluorescent protein-tagged <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG for response to defensins	Flow cytometry의 이용 (De Keersmaecker 등, 2006)
Department of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University	Porcine beta-defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria	돼지 디펜신의 효과 (Veldhuizen 등, 2008)

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### 제 1 절 연구범위 및 연구수행 방법

본 연구의 연구범위 및 연구수행방법에 대한 요약은 표 2에 나타내었음. 세부적인 연구방법은 연구결과와 함께 제2절에 설명되어있다.

표 2. 연구범위 및 연구수행방법에 대한 요약

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
돼지 폐장 및 정소조직을 활용한 돼지게놈의 분석	돼지게놈에 대한 생물정보학적 분석, 돼지 조직의 RNA추출, RT-PCR, 클로닝	항미생물펩타이드 12종의 클로닝 및 유전자 확보
	포유동물 발현벡터를 활용한 transgenic construct의 구축	디펜신 및 카셀리시딘 유전자 발현시스템 구축
	생물정보학적 분석	게놈수준에서의 돼지 디펜신 및 카셀리시딘 펩타이드의 분석
	Radiation hybrid mapping	항균펩타이드 12종에 대한 radiation hybrid map 작성완료 및 비교유전체지도 작성
살모넬라 등 돼지 질병 관련 균으로 제한	선발된 디펜신의 Salmonella, 병원성 대장균 또는 돼지 질병 바이러스에 대한 살균 효과 검증	-돼지 항균펩타이드인 디펜신 (pBD1,2,3)을 293T cell에 transfection 하여 배양 후, cell을 수거하여 lysate 준비 -lysate의 Salmonella Enteritidis와 E.coli O157:H7 (10000CFU) 접종 후 4℃와 37℃에서 배양하여 24시간 후에 균수를 측정
Protegrin 1 형질전환마우스 개발용 벡터 평가 및 마우스 개발	C57BL/6 마우스를 이용한 전핵미세주입법을 통하여 형질전환 마우스 생산	Mucin 1 promoter를 활용한 Protegrin 1 형질전환 마우스line 개발완료
베타디펜신 2 형질전환 마우스 개발	C57BL/6 마우스를 이용한 전핵미세주입법을 통하여 형질전환 마우스 생산	beta actin promoter를 활용한 PMAP 형질전환 마우스 line 개발완료
카셀리시딘 형질전환마우스 개발	C57BL/6 마우스를 이용한 전핵미세주입법을 통하여 형질전환 마우스 생산	beta actin promoter를 활용한 PR26 형질전환 마우스 line 개발완료

형질전환 마우스의 유전자형 및 표현형분석	-유전자 삽입이 검정된 형질전환 마우스의 각종조직을 채취하여 RNA를 추출하고 RT-PCR을 통한 유전자 발현정도의 검정. -표현형분석의 경우 발생학적 및 번식학적 형질에 대한 이상을 확인하였으며, 분자세포생물학적 특징은 현재 분석	-형질전환마우스 3종, line 에 대한 유전자형 분석완료 및 형질전환마우스 3종에 대하여 형질전환 유전자 발현분석 완료 -3종의 유전자형질전환 마우스 당 발현이 높은 2개 line 확보 및 표현형적으로 비정상 개체에 대한 조직학적 실험 진행
항균펩타이드 형질전환 마우스의 교배를 통한 삼중형질전환 마우스의 개발	SPF 시설을 활용한 형질전환 마우스의 교배; 먼저 이중형질전환 마우스를 확보후 3중형질전환마우스 교배를 실시	3종의 마우스 라인간의 교배를 통하여 3중형질전환 마우스 교배
삼중형질전환 마우스개발을 위한 vector construct 제작	3개의 항미생물펩타이드를 최신 유전자발현기법인 다유전자발현기법을 활용하여 형질전환마우스제작용 3유전자발현construct를 제작	3종의 항미생물유전자인 PG1, PR26 PMAP을 동시에 발현시킬 수 있는 형질전환 construct
세포의 분비 디펜신의 생산체제 구축 및 항균효과 검정	배양액으로 분비되는 디펜신 대량 생산효모균주를 만들고, 해당 발현산물의 항균효과 검정	세포의 분비 디펜신의 분리정제 및 Salmonella에서 균억제 활성 관찰
항균펩타이드의 실질적 항균효과의 정량적 검증	항균펩타이드를 합성하여 병원균에서 항균효과를 관찰	PG1을 화학적으로 직접 합성하여 Salmonella에서 균억제 활성을 관찰
PG1, PR26, PMAP36의 효모내 형질전환 및 대량생산체제 구축	돼지 항균펩타이드인 PG1, PR26, PMAP36을 pichia pastoris에 형질전환하여 대량생산 체제 구축	PG1, PR26, PMAP36의 발현여부 및 lysate를 이용한 항균효과 검정

## 제 2 절 연구수행 결과

### 1. 돼지 항미생물펩타이드의 발굴, 분석 및 발현벡터의 제작

가. 항미생물펩타이드(AMP) 유전자의 클로닝: 돼지 폐장 및 정소조직에서 발현되는 12건의 AMP 유전자에 대하여 AMP 특이적 프라이머를 디자인한 후 RT-PCR을 실시 후 transcript를 증폭한 후 발현벡터시스템에 클로닝을 완료함. 또한 형질전환 유전자를 미생물과 면역시스템의 상호작용이 중요한 점막조직에서 발현시키기 위하여 돼지의 mucin 1 promoter를 PCR 증폭후 클로닝 하였다.

표 3. 돼지 항미생물펩타이드의 RT-PCR 증폭을 위한 프라이머 및 PCR 조건

Locus	Primers	Temps (°C)	Product size (bp)	Source
PBD1 Pre-propeptide	PBD-1F	60	253	lung cDNA
	PBD1-R			

PBD1 mature	mPBD-1F	58	200	lung cDNA
	PBD-1R			
PBD2 Pre-propeptide	PBD-2F	60	282	lung cDNA
	PBD-2R			
PBD2 mature	mPBD-2F	58	155	lung cDNA
	PBD-2R			
PBD3 Pre-propeptide	PBD-3F	55	259	lung cDNA
	PBD-3R			
PBD3 mature	mPBD-1034F	55	170	lung cDNA
	PBD-3R			
PBD104 mature	mPBD-104F	53	156	lung cDNA
	mPBD-104R			
PBD108 Pre-propeptide	PBD-108F	56	253	lung cDNA
	PBD-108R			
PBD108 mature	mPBD-108F	53	166	lung cDNA
	mPBD-108R			
Protegrin 1 Pre-propeptide	PTG-F	57	462	lung cDNA
	PTG-1R			
Protegrin 2 Pre-propeptide	PTG-F	57	459	lung cDNA
	PTG-2R			
Hepcidine Pre-propeptide	HEP-F	60	334	lung cDNA
	HEP-R			
Porcine mucin 1 promoter	PMUC1-250f	58	250	genomic DNA

나. Radiation hybrid panel을 이용하여 발굴된 돼지 항균펩타이드 유전자의 물리적 위치를 결정하기 위하여, 일본 National Institute of Agrobiological Sciences의 Hamasima 박사 팀에서 제작한 radiation hybrid panel을 이용하여 mapping을 실시하였다. Radiation hybrid mapping 방법을 이용한 AMP 항미생물펩타이드(AMP) 유전자들의 물리적지도 작성을 위한 돼지유전자 특이적 PCR 프라이머의 디자인을 위하여 AMP 유전자 12개에 대하여 3' UTR의 염기서열을 기준으로 돼지와 마우스 유전자의 차별이 이루어질 수 있는 부분에 대하여 PCR 프라이머를 디자인하고 PCR을 실시하여 특이적 발현을 검증하였다.

표 4. 항미생물 펩타이드 RT-PCR을 위한 PCR 프라이머 정보

Gene	Accession number	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Annealing Tm(°C)	Product size(bp)
PBD2	AF516144	CAGAGGTCGGACCACTACAT	TTCCTTGGCCTGTGTGTCC	60	169
PBD3	AF516143	GGTAGCTGTTCTGTGAGTGG	GGCTTCTGTAGACTTCAAGG	58	114
PBD4	AY460576	ATCCTCAGTATGGTGGCTTG	GGAAGGCTTAGTAACAGTGG	55	203
PBD104	BK005520	GATGCAGACAGGATATGTGG	AACAGCATGGATAGGTGTGG	58	103
PBD108	DQ274056	GCACCACAAGTCAACCTAGT	GACAGACAGAGAAGGTTGGA	52	112
PBD114	BK005522	CCTGTGGTGGATCCTGAACGA	CTCTGTACTGGTGCACACAT	56	194
PBD123	AY506573	CATGAAGTGTGGAGTGCCT	ATGAGTTCACAGAACCGTCG	57	225
PBD125	AY460575	CCTACACTCAATGGCCACTA	CCTGCTCAGTTCCTGTGCTT	58	147

PBD129	BK005521	ATCCGCACACTTGAAGAGGT	CTTCTGGAGGTCGTGGAGTT	60	194
CAMP	DQ274057	TACTTAGCCGACTGCGTGAT	GAAGTCTGAACCAGGATAGC	54	137
HAMP	BK005518	CCAGAGGCTAAGAAGAGACA	TCTACGTCTTGCAGCACATC	61	95
LEAP2	BK005519	ATGATTCCGGAGTGCCTCACG	GGAGCATTGTCGCAGGTAAG	60	115

다. Radiation hybrid mapping을 통한 AMP 유전자 12개의 유전자 위치결정결과: 돼지 radiation hybrid cell panel을 이용하여 12개의 AMP 유전자를 7개의 염색체에 대하여 그 위치를 결정함. Cell panel의 retention frequency는 26~76%까지로 나타났다.

표 5. 12종의 향미생물 펩타이드에 대한 radiation hybrid mapping 결과

SSC	Gene	Closest markers	Distance (cR)	LOD score	Retention (%)
2	LEAP2	<a href="#">SR005044</a>	0.245	12.08	26%
6	HAMP	<a href="#">SR010602</a>	0.128	16.27	32%
	PBD4	<a href="#">SR011170</a>	0.104	18.52	43%
7	PBD125	<a href="#">SW1681</a>	0.228	13.47	36%
9	PBD104	<a href="#">SR013030</a>	0.853	1.58	76%
13	CAMP	<a href="#">SR010609</a>	0.119	17.24	33%
	PBD2	<a href="#">SR012300</a>	0.088	19.24	34%
15	PBD3	<a href="#">SR020344</a>	0.135	14.85	36%
	PBD129	<a href="#">SR020344</a>	0.165	13.57	33%
	PBD108	<a href="#">SR010197</a>	0.114	17.79	34%
17	PBD114	<a href="#">SR005317</a>	0.139	15.12	26%
	PBD123	<a href="#">SR000638</a>	0.233	13.13	41%

라. 향균펩타이드 12종에 대하여 radiation hybrid map 결과를 바탕으로 사람과 소의 게놈 데이터베이스와 비교하여 비교유전체지도를 작성 하였다.

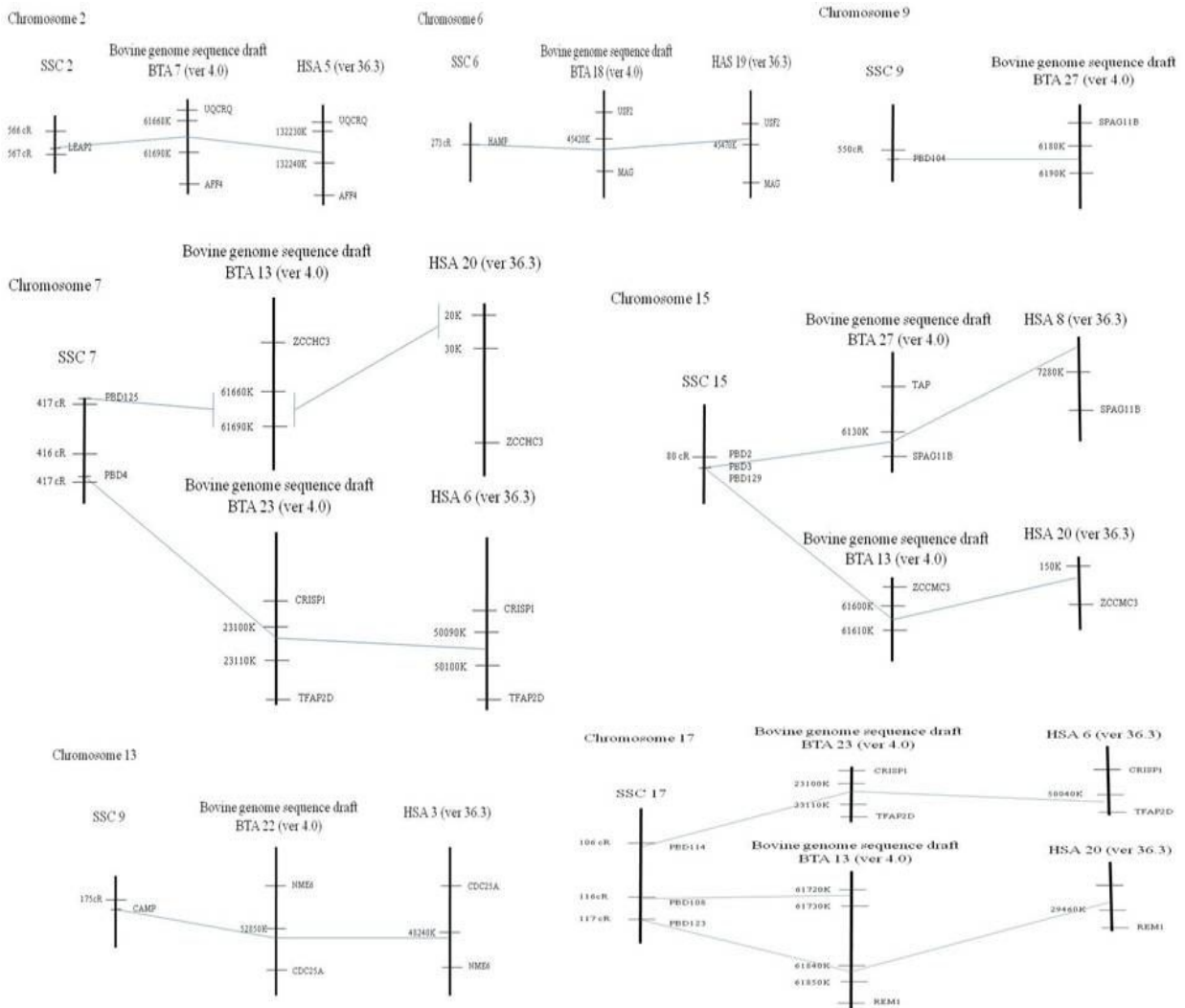


그림 2. 돼지, 소 및 사람과의 항균펩타이드 비교유전자 지도. 발굴된 돼지 항균펩타이드의 RH mapping 결과를 기반으로 항균펩타이드의 유전적 conservation을 소와 사람과 함께 비교하였다.

마. 항미생물펩타이드 발현을 위한 발현벡터 construct의 제작: b-actin promoter를 사용한 조직 비 특이적 발현벡터(벡터 1) 과 점막조직에서 특이적으로 발현되는 조직 특이적 벡터(벡터2)를 기존에 보고된 pCAGGS 벡터를 기반으로 하여 beta actin promoter 와 mucin 1 promoter를 활용하여 구축하였다.



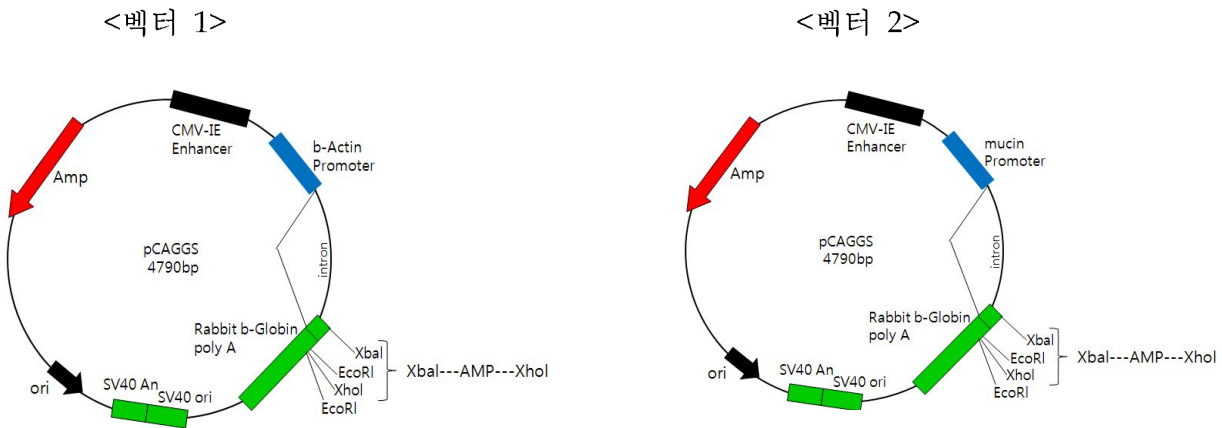


그림 3. beta defensin 1,2,3 발현을 위한 형질전환 construct vector map

2. 살모넬라 및 대장균에 대한 돼지 디펜신의 효과 검정

가. *Salmonella* Enteritidis(SE) 항균효과실험: 돼지 항균펩타이드인 beta defensin 1,2,3을 293T cell에 transfection하여 배양 후, cell을 수거하여 lysate를 만들어 *Salmonella* Enteritidis와 *E.coli* O157:H7 (1000CFU) 항균효과를 알아보았다. 준비된 lysate에 균을 접종 후 4°C와 37°C에서 배양하여 24시간 후에 균수를 측정하였다.

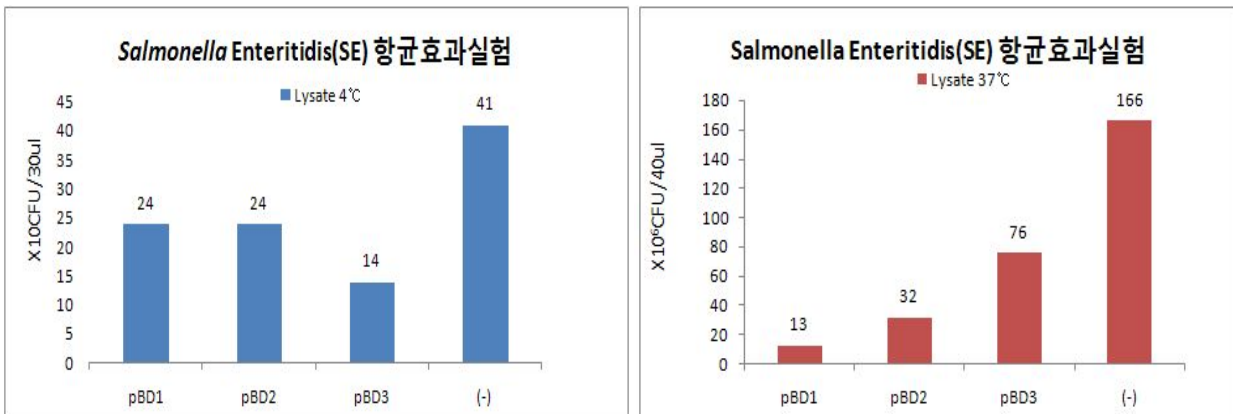


그림 4. Salmonella Enteritidis 항균효과실험 결과

24시간 후에 4°C에서 배양 한 lysate에 *Salmonella* Enteritidis균수를 측정한 결과 control 보다 돼지 항균펩타이드인 디펜신 1,2와 3이 모두 *Salmonella* Enteritidis균수를 줄이는 것으로 나타났다. 37°C에서 배양한 것의 균수 역시 control 보다 감소하였다. 돼지 항균펩타이드인 디펜신이 항균효과가 있음을 보여준다.

나. *E.coli* O157:H7 항균효과실험

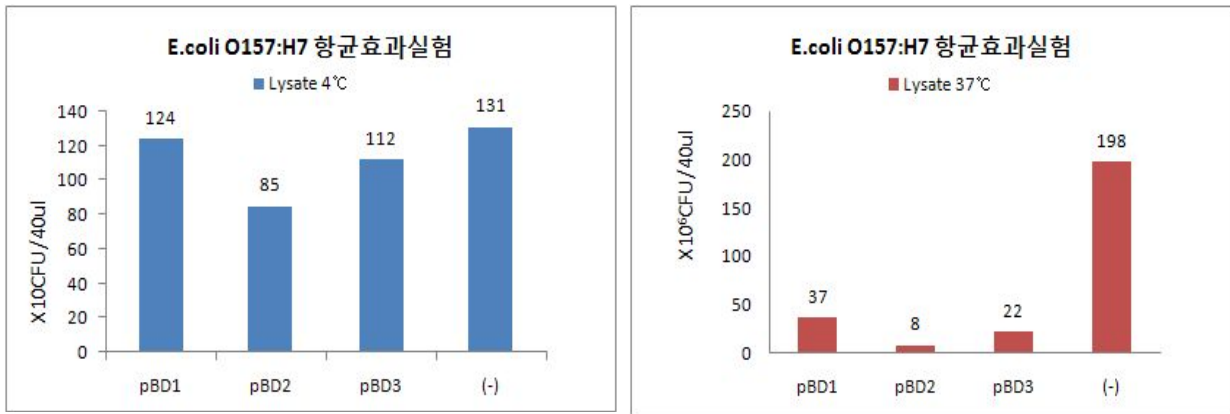


그림 5. E.coli O157:H7 항균효과실험 결과

24시간 후에 4°C에서 배양 한 lysate에 E.coli O157:H7 균수를 측정한 결과 control 보다 돼지 항균펩타이드인 디펜신 1,2와 3이 모두 E.coli O157:H7 균수를 줄이는 것으로 나타났다. 37°C에서 배양한 것의 균수 역시 control 보다 감소하였다.

### 3. 효모(yeast)를 이용한 돼지 beta defensin 1,2,3 발현 산물의 항균 효능 검정

돼지 beta defensin 1,2,3 발현 산물의 항균 효능을 검정하기 위하여, 본 과제는 각각의 돼지 beta defensin에서 mature peptide sequence만을 이용하여 효모(yeast) 세포질내외의 발현을 유도하기로 한다. 이에 따라 각각의 mature peptide 구조를 확인한 후, 효모 발현 벡터에 삽입하고 효모내로 도입하여 발현을 유도한다.

#### 가. Pig beta defensin sequence의 정보

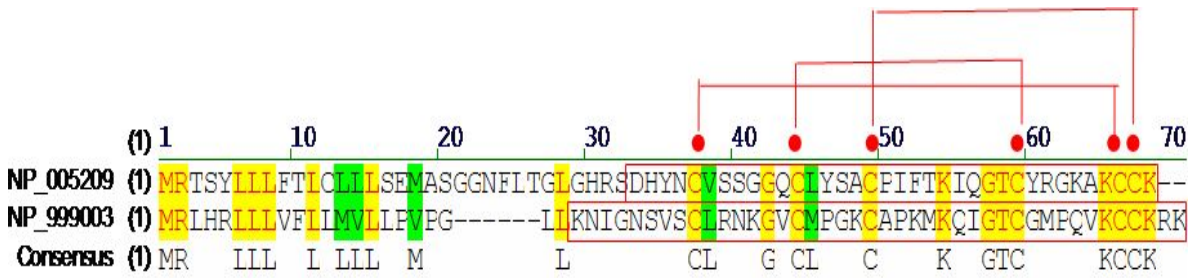
표 6. 돼지 beta defensin 1,2,3 유전자 시퀀스 정보

Class	Accession No.	cDNA(bp)	aa
pBD1	NM_213838	195	64
pBD2	NM_214442	210	69
pBD3	NM_214444	204	67

효모내외의 발현을 위한 각각의 mature peptide를 확인하기 위해 NCBI 유전자 은행의 정보를 확인하고 이에 대한 각각의 mRNA에서 cDNA 및 염기서열을 확인한다. 그러나 동물세포내 발현이 아닌 대장균이나 효모의 발현을 위해서 합성신호(transcript factor)를 제외한 최종 발현산물(mature peptide)의 크기를 확인이 필요로 하다. 특히 돼지와 사람의 beta defensin 유전자 구조를 비교함으로써 필요한 mature peptide sequence를 확인한다.

#### 나. 돼지와 사람 beta defensin cDNA 구조

##### (1) Pig beta defensin 1(pBD1)

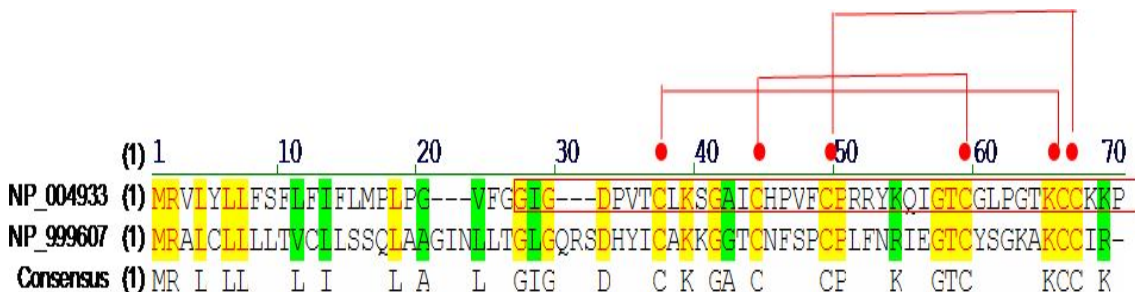


Class	Human	Pig
aa	68	64
Mature peptide	36(33-68)	42(23-64)
Disulfide Bond	37 ↔ 66	31 ↔ 60
	44 ↔ 59	38 ↔ 53
	49 ↔ 67	43 ↔ 61

그림 6. 돼지 beta defensin 1의 cDNA 구조 및 아미노산 염기서열 정보

돼지와 사람의 beta defensin 1은 위의 그림과 표에 나타난 것과 같이 유사한 구조를 가지고 있는 것으로 나타났다. Mature peptide의 구성은 다소 차이가 있으나, 항균 기능으로서의 역할을 담당할 것으로 예상되는 이황화결합(disulfide bond)의 위치는 동일한 것으로 나타났다. 따라서 돼지 beta defensin 1의 42개 아미노산을 발현시킬 수 있는 염기서열을 추출하여 발현벡터 구축에 이용한다.

(2) Pig beta defensin 2(pBD2)

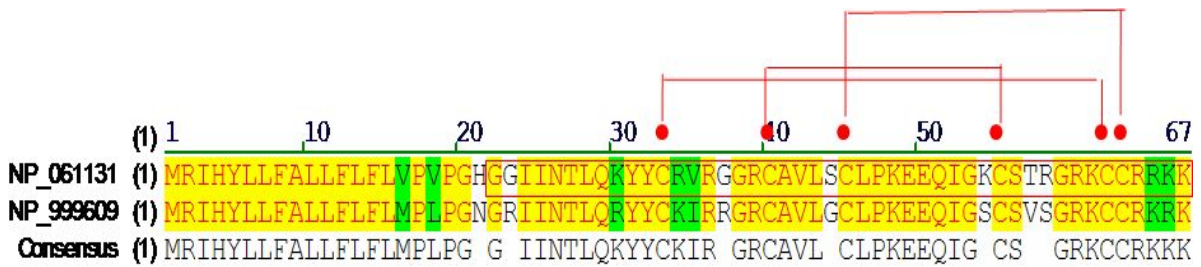


Class	Human	Pig
aa	64	69
Mature peptide	41(24-64)	43(27-69)
Disulfide Bond	31 ↔ 60	37 ↔ 66
	38 ↔ 53	44 ↔ 59
	43 ↔ 61	49 ↔ 67

그림 7. 돼지 beta defensin 2의 cDNA 구조 및 아미노산 염기서열 정보

돼지 beta defensin 2의 경우, 사람의 BD2 유전자 비교를 통해 mature peptide 형태를 확인하고 이용할 수 있도록 하였다. 돼지 BD2 역시 항균 역할이 기대되어 지는 이황화결합 부위를 포함하는 염기서열을 추출하여 발현벡터 구축에 이용하였다.

(3) Pig beta defensin 3(pBD3)



Class	Human	Pig
aa	67	67
Mature peptide	45(23-67)	45(23-67)
Disulfide Bond	33 ↔ 62	33 ↔ 62
	40 ↔ 55	40 ↔ 55
	45 ↔ 63	45 ↔ 63

그림 8. 돼지 beta defensin 3의 cDNA 구조 및 아미노산 염기서열 정보

돼지 beta defensin 3의 경우, 사람의 BD3 유전자 비교해 볼때 가장 유사한 염기서열 및 구조를 나타내고 있다. 전체적인 cDNA의 길이 및 아미노산 구조가 거의 동일함을 알 수 있으며, 특히 mature peptide 형태는 돼지와 사람이 거의 유사함을 알 수 있었다. 돼지 BD3 역시 항균 역할이 기대되어 지는 이황화결합 부위를 포함하는 염기서열을 추출하여 발현백터 구축에 이용하였다.

(4) Pig beta defensin 1,2,3의 구조 비교

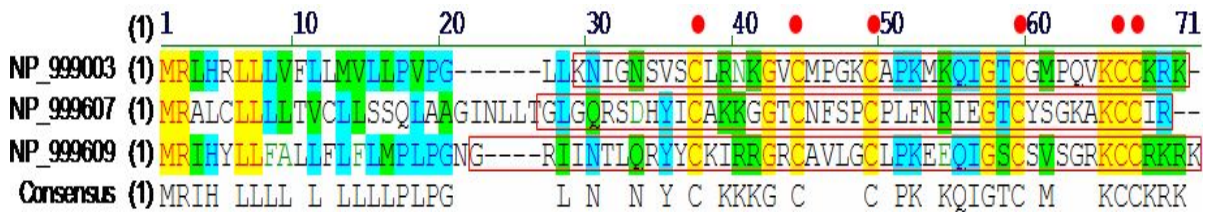


그림 9. 돼지 beta defensin 1,2,3의 mature peptide 비교

돼지 beta defensin 1, 2 그리고 3의 cDNA와 mature peptide 형태를 비교하여 보면 각각의 cDNA 전체 길이나 아미노산 형태에서는 약간의 차이가 나타났으나, 전반적으로 mature peptide에서의 이황화결합(disulfide bond)의 위치는 동일한 것으로 나타났다. 특히 돼지 beta defensin 1과 3은 매우 유사함을 나타내었고, 각각의 최종산물의 항균 효능에 차이가 나타난다면 이황화결합 내부의 아미노산의 구성에 따라 항균 효능의 차이가 나타날 수도 있다는 가정이 확인된다면 새로운 항균기능을 발휘하는 신소재 개발에 이용될 수 있다고 사료된다.

다. 효모 균주내로 돼지 beta defensin의 발현

돼지 beta defensin의 효모 세포질내의 발현을 통해 그 발현산물(lysate 또는 isolation 또

는 purified products)에 대한 항균 효능을 검정하기 위해 효모 균주 발현벡터를 구축, 효모 균주내로 도입하며 도입된 효모 균주의 배양을 통해 최종 산물의 항균 기능을 확인한다.

- (1) 돼지 beta defensin mature peptide 염기서열 증폭 및 발현 균주내 벡터의 도입  
 각각의 mature peptide 증폭에 필요한 PCR primer를 설계하여 증폭을 실시한다. 증폭에 필요한 각각의 primer 설계 서열은 다음과 같다.

표 7. 돼지 beta defensin 1,2,3의 mature peptide 증폭을 위한 PCR 프라이머 정보

Class	Primer	Sequence(5' → 3')
pBD1	N-PBD1	ACC CTC GAC GAA TTC ATG AAA AAC ATA GGA AAT TCT GTT
	C-PBD1	CGC CCG GTG GTC GAC TTA CTT CCT TTT GCA GCA TTT
pBD2	N-PBD2	ACC CTC GAC GAA TTC ATG GGT CTT GGC CAG AGG TCC GAC CAC
	C-PBD2	ATA CGC TCC GTC GAC TCA GCG GAT GCA GCA CTT GGC
pBD3	N-PBD3	ACC CTC GAC GAA TTC ATG AGA ATC ATA AAT ACA TTA CAA AGG
	C-PBD3	ATA CGC TCC GTC GAC TCA TTT CCT CTT TCG GCA GCA

각각의 mature peptide 절편을 추출하기 위해 위의 primer를 통해 제1세부과제에서 제공된 template를 이용하여 PCR 증폭산물을 확보하였으며, 이를 다음의 효모 균주내 도입 발현벡터를 통해 구축하였다. 도입 과정과 발현벡터의 내용은 다음과 같다.

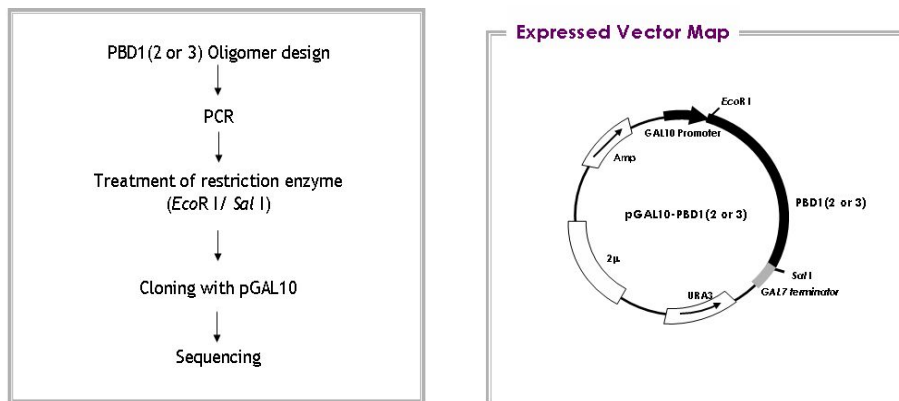


그림 10. 돼지 beta defensin 1,2,3의 클로닝 모식도와 효모 균주 내 발현 vector map

위의 과정을 통해 구축된 발현 벡터는 효모 균주의 세포질내로 돼지의 beta defensin이 발현하도록 구축하였으나, 실제로 발현과정에 있어서 항균의 효능이 강하여 실제 발현과정에서 효모 균주가 항균물질에 의해 사멸할 수 있기에 효모 균주의 배양액내로 즉, 세포질 밖으로 발현시킬 수 있는 프로모터를 사용하여 발현 벡터를 구축하였다.

- (2) 효모 배양액내(extracellular) 발현 시스템의 벡터 구축  
 효모 배양액내 발현을 위하여 새로운 primer를 설계하여 벡터의 발현 frame에 맞게 재구

축 하였다. 이에 대한 내용은 다음과 같다.

### pGAL10-PPL-Pig Beta Defensin 1

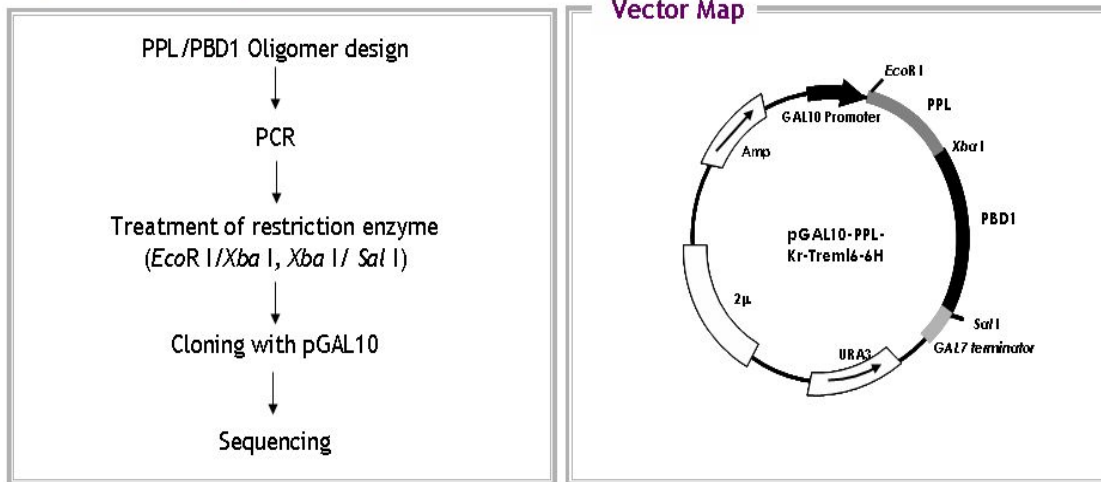


그림 11. 돼지 beta defensin 1,2,3의 클로닝 모식도와 효모 배양액 내 발현 vector map

상기의 primer 설계를 통해 새로운 발현벡터에 크로닝하여 확인하고 효모 균주내로 도입하게 된다. 이런 과정을 통해 발현되는 산물은 효모 세포질내가 아닌 배양액내로 발현 분비하도록 설계된 것이다.

### (3) 효모 균주 내 발현벡터의 도입 및 발현

#### 5. cerevisiae transformation

##### A. Before starting

- 5~10 ug Plasmids
- Salmon sperm DNA (10mg/ml)
- YPD medium (1% Yeast extract, 2% peptone, 1% glucose)
- 10X TE, 10X LiAc, 50% PEG-3350, DMSO
- 30 °C incubator
- YNBCAD (0.67% YNB, 2 % glucose, 0.5% casamino acids, 2 % Agar) plates
- YPDG medium (1% Yeast extract, 2% peptone, 1% glucose, 1% galactose)

**B. Strain** : *S.cerevisiae* Y2805 *Agal1*

**C. Method** : LiAc method

**D. Spread** : YNBCAD

**E. Incubation Temp** : 30 °C

그림 12. S.cerevisiae 효모 균주 내 형질전환 과정

상기의 과정을 통해 현재 효모 내 발현벡터가 도입되어 배양 중에 있으며, 이에 대한 발현

산물을 통해 항균 효능을 검정할 계획이다.

#### 4. 형질전환마우스 생산을 위한 항균펩타이드 construct 제작

가. 형질전환 Promoter의 클로닝 : ubiquitous expression promoter로 사용할 beta actin promoter는 기존의 pCAGGS construct를 변형시켜 제작하였으며 점막조직특이적 발현 Promoter인 mucin1 promoter는 돼지의 genomic DNA에서 promoter activity를 띠는 부분을 확인 후 클로닝을 실시하여 확보하였다.

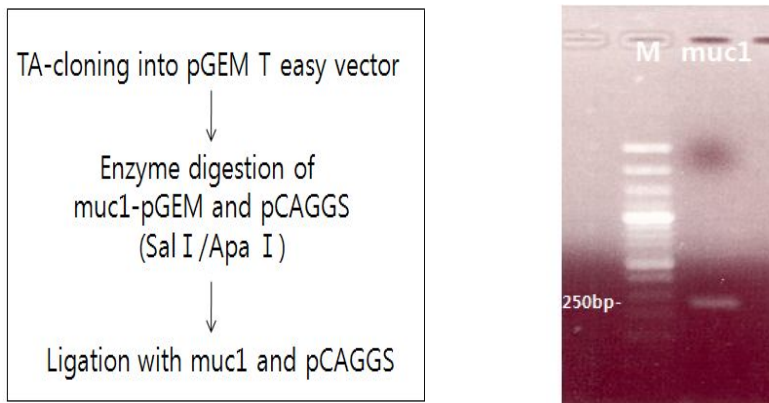


그림 13. Mucin 1 promoter cloning 모식도와 PCR 증폭 사진

나. 항미생물펩타이드(AMP) 유전자 Protegrin 1, PR-26, PMAP-36의 형질전환 construct의 개발: 항미생물작용이 우수한 것으로 결정된 3종의 항미생물펩타이드에 대하여 각각의 형질전환 construct를 DNA 클로닝 기법을 사용하여 개발하였다. PG1의 경우 mucin1 promoter를 활용하여 점막에서의 발현을 목적으로 하였으며 PR26와 PMAP의 경우 actin promoter를 사용하여 동물의 조직 전체에서의 항미생물 펩타이드 발현을 목적으로 하였다. 형질전환 construct는 제한효소를 가지고 절단하였을 때 예상되는 insert가 삽입된 것을 그림 15에서 나타내어 주고 있다.

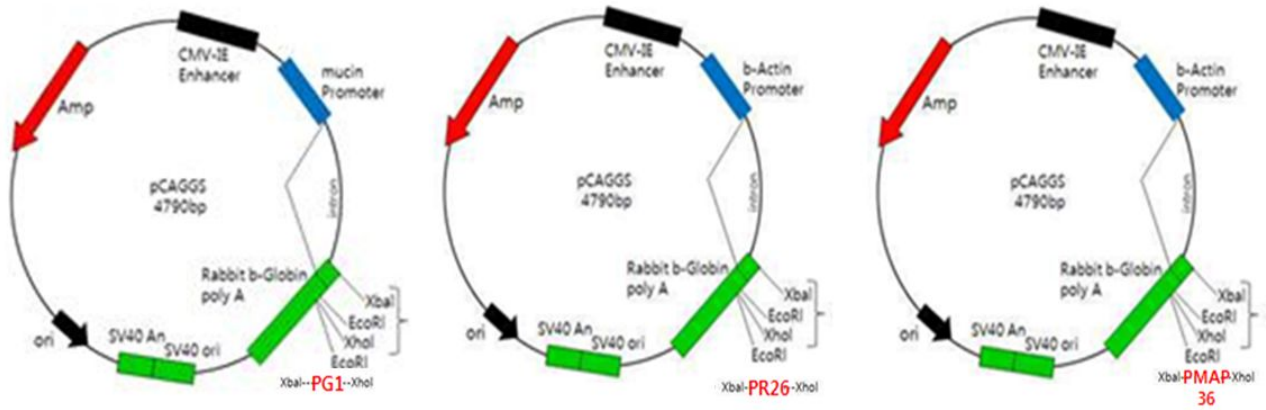


그림 14. Protegrin 1, PR-26, PMAP-36의 형질전환 construct vector map

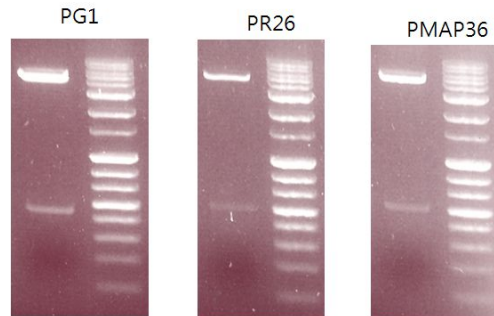


그림 15. Protegrin 1, PR-26, PMAP-36의 형질전환 construct vector map의 제한효소절단결과

다. 3개의 항미생물펩타이드 동시발현을 위한 유전자다중발현 construct의 개발  
 3개의 AMP 유전자(Protegrin 1, PR-26, PMAP-36)를 단일 construct에서 동시에 발현하는 최신기법을 활용하여 3개의 항미생물펩타이드를 한꺼번에 발현하는 마우스를 생산하기 위한 construct를 완료하였다(그림 16, 17). 기존에 보고된 2A 서열을 활용한 유전자 다중발현 기법을 활용하여 construct를 제작하였다. 유전자 클로닝을 위하여 사용된 프라이머 정도를 표8에 정리하였다.

표 8. 삼중형질전환 마우스 개발을 위한 유전자클로닝현황

Locus	Primers	Temps (°C)	Product size (bp)	Source
Protegrin 1	PTG-F	55	462	lung cDNA
	PTG-1R			
PR-26	mPR-39F	57	498	lung cDNA
	PR-26R			
PMAP-36	PMAP-F	57	538	lung cDNA
	PMAP-36R			
Porcine mucin1 promoter	PMUC-250F	58	250	lung cDNA



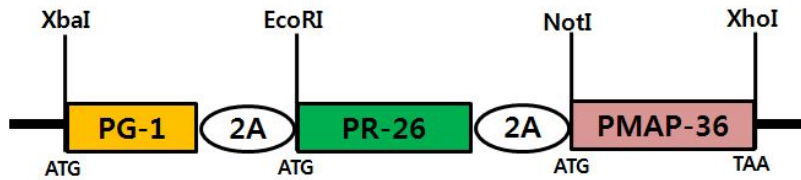


그림 16. 3개의 항미생물펩타이드의 동시발현을 위한 삼중형질전환 construct의 유전자구성 모식도

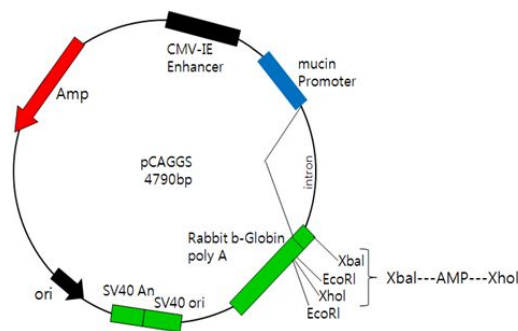


그림 17. Mucin1 promoter를 활용한 Protegrin 1, PR-26 및 PMAP-36 3중 형질전환 construct vector map

5. 항미생물펩타이드 형질전환 마우스 3종 Protegrin 1, PR-26, PMAP-36의 생산

개발된 3건의 단일유전자형질전환 construct를 C57BL6/J 마우스의 수정란을 이용하여 전핵 미세 주입법을 실시하였으며 C57BL6/J 대리모에 이식하여 형질전환마우스 3종을 생산하였다.

가. Microinjection을 위한 DNA 정제: Microinjection 할 DNA 절편이 잘려져 나오도록 제한 효소로 DNA vector를 digestion한 후 이를 agarose gel에 전기영동하여 DNA를 정제하였다. 제한효소 자른 vector는 전기영동을 통해 분리한 후 electroelution-> DEAE - Sephacel(e.g., Elutip D, S&S, Keene NH)이나 glass bead adsorption(e.g., GeneClean II, AioGene, Inc., QIAEXII)방식으로 desalting 및 concentraion 함. Calf thymus 정량을 이용한 flurometer나 ethidium bromide gel 상에서 알고 있는 농도 사이즈를 기준으로 정량하는 방법을 이용하여 DNA를 정량하고, 1-4ng/ $\mu$ l의 농도로 microinjection buffer에 녹여 준비하였다.

나. Microinjection/Founder mouse 생산: 과배란 유도를 위하여 암컷 마우스에 PMSG와 hCG 호르몬 주사를 48시간 간격으로 주사하고, 수컷 마우스와 교미를 유도한 후, 다음날

아침 vaginal plug를 체크하여 교배유무를 확인하며, vaginal plug이 있는 암컷 마우스의 난관으로부터 zygote를 채란하였다. DNA 용액을 injection 피펫에 loading 후, 현미경 하에서 융성 전핵에 주입. DNA의 주입 여부는 융성전핵의 팽창으로 확인하였으며, Microinjection이 끝나면 0.5~1시간 배양기로 옮겨 생존 및 lysis 된 것을 분류하였다. DNA가 주입된 수정란 중 생존한 것을 선별하여, 0.5 dpc의 대리모의 난관에 이식함. 한 마리의 대리모당 20개정도의 수정란을 이식하였으며, 이식 후 19일째에 20~30%가 분만되었다.

다. 생산된 형질전환마우스 사육환경: 생산된 형질전환마우스는 건국대학교 실험동물연구센터 사육실 SPF(specific pathogen free) 환경 하에서 사육되고 있다.



그림 18. 건국대학교 동물실험실 SPF 환경 하에서의 사육중인 형질전환 마우스

라. Founder mouse 확인

미세주입 된 수정란을 대리모에 이식한 후 19일째가 되면 분만하게 되고, 태어난 생쥐가 2주정도 자란 후에 꼬리를 잘라 genomic DNA를 추출, PCR analysis를 통해 유전자의 삽입 여부를 확인 한다.

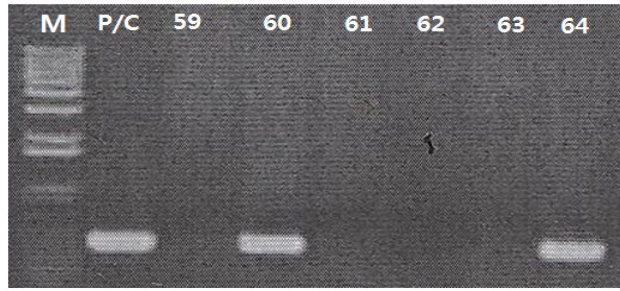


그림 19. 형질전환 마우스의 tail DNA PCR 결과. Positive control (p/c) 및 형질전환 개체인 animal 60, 64에서 PCR 밴드가 나타남

마. 형질전환마우스의 교배

PCR screening으로 founder 형질전환 마우스를 선별하고, 선별된 founder 형질전환마우스는 각 라인별로 normal mouse와 교배하여 F1을 생산. 교배방식 및 교배의 결과를 표9와 그림20에 나타내었다.

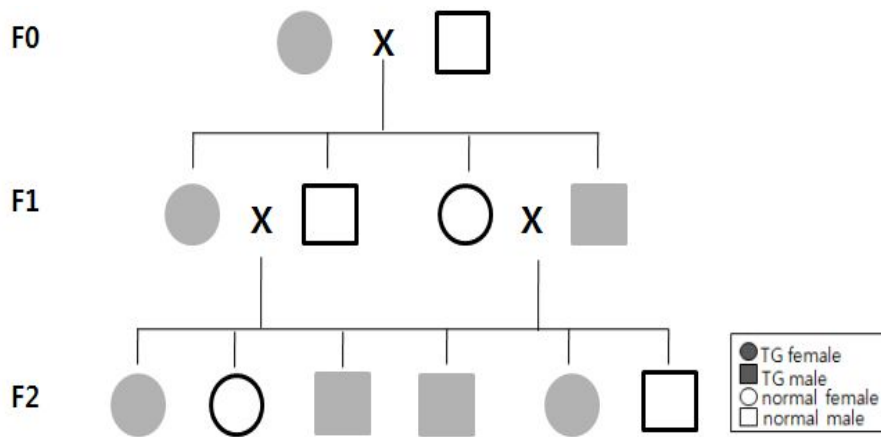


그림 20. 형질전환 생쥐계통 확보를 위한 founder 개체의 교배. F0가 founder 동물임

위의 교배를 통하여 현재까지 선별된 형질전환 생쥐의 각 유전자별 라인 수는 아래의 표와 같으며 현재 라인을 유지하기위한 교배가 지속적으로 실시되고 있다.

표 9. 항미생물펩타이드 형질전환 마우스 구축현황

Gene	Number of line	
	Founder (F0)	F1
PG1_muc1	7	6
PR26_actin	5	2
PMAP36_actin	8	7



그림 21. 개발된 3종의 항미생물펩타이드 형질전환 마우스의 사진(대표개체). 왼쪽부터 차례대로 PG1, PR-26, PMAP-36 형질전환 마우스 임

바. 다중형질전환 마우스계통의 확보

현재까지 개발된 3종의 형질전환 마우스에 대하여 발현정도가 높은 개체들을 선발하여 2중 3중 형질전환마우스를 생산하기위한 교배도 또한 진행 중임.

6. 형질전환마우스의 유전자 발현분석

Germline transmission이 확인된 F1 TG에서 각 유전자의 발현 여부를 확인하기 위해 각 라인별로 1마리의 TG에서 조직을 적출하여 RNA를 추출한다. 3 $\mu$ g의 total RNA를 RT후, semi-quantitative RT-PCR을 통해 유전자의 발현 양을 관찰한다. 현재 PG-1 형질전환 마우스의 경우, 5개의 F1라인에서 Protegrin 1 유전자의 발현 양을 관찰했으며, 가장 높은 발현 양을 보이는 한 개의 F1라인을 보유하고 있다(그림 20). PR-26, PMAP-36 형질전환 마우스 또한 동일한 방법으로 과발현 라인을 확보하였다.

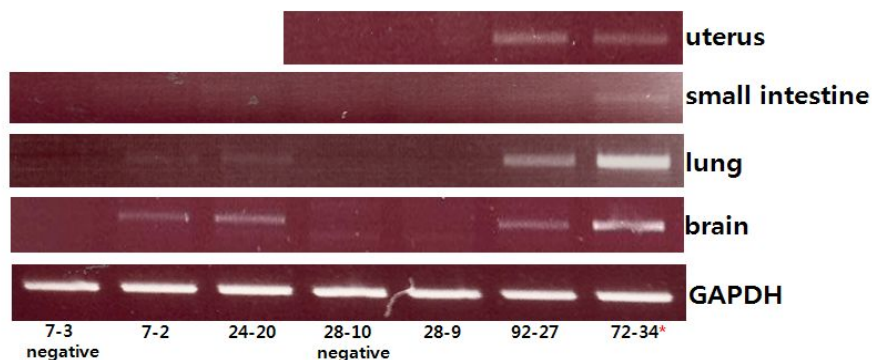


그림 22. PG-1 형질전환 마우스라인의 유전자발현 현황. 라인 72-34가 가장 발현양이 높음

7. 합성펩타이드 PG-1을 이용한 돼지 항균펩타이드 항균효능검정

가. PG1의 화학적 합성 및 SDS-PAGE를 통한 목적 단백질의 관찰

실험대상 항균 펩타이드 중 하나인 PG1을 화학적으로 합성하여, 단백질 자체의 항균효과를 검정하였다. PG1은 화학적으로 합성된 후 정제되었으며 정제순도는 98%이다. 합성된

PG1의 단백질 서열은 RGGRLCYCRRRFCVCVGRG이며 분자량은 2167이다. 합성된 PG1 단백질은 tricine SDS-PAGE (16% gel)을 활용하여 밴드를 확인하였다. Gel 상에서 3KDa 이하에 밴드가 보였으며, 이는 2.1KDa 가량 되는 PG1의 단백질과 일치하는 것으로 보인다.

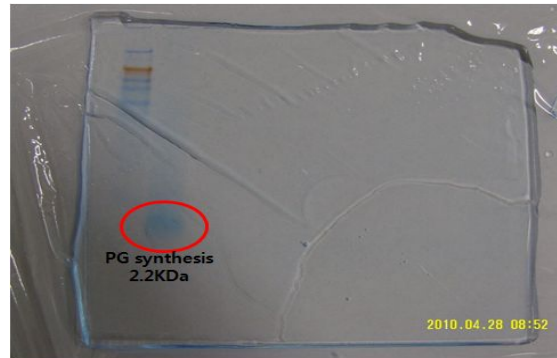


그림 23. SDS-PAGE를 통한 pG1 단백질 band 확인

나. 합성된 PG1의 항균효과 실험

합성된 PG1을 다음과 같은 방법으로 *Salmonella*에서 항균효과 검증을 실시하였다. 96 plate well에 *S. Enteritidis*가 함유된 (69CFU) Mueller Hinton Broth (MHB)를 분주하였다. 분주된 MHB에 PG1을 0-16  $\mu$ M로 농도별 접종한 후, 37°C에서 18시간 배양하였으며 4-6시간마다 영양배지에 혼합액을 접종하여 균수를 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

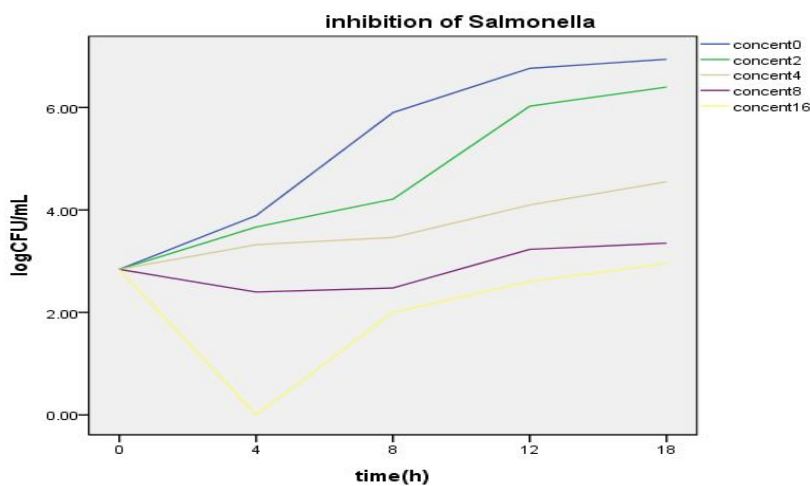


그림 24. 합성된 protein을 이용한 *Salmonella* Enteritidis(SE) 항균효과실험

그림에서 볼 수 있듯이 PG1이 함유된 경우(concent 2-16)에는 함유되지 않은 경우보다 (concent 0) *S. Enteritidis*의 증균이 억제되었다. 이러한 균 억제경향은 농도에 비례하여, PG1의 농도가 상승할수록 *Salmonella*의 억제효과가 큰 것으로 나타나 농도가 16  $\mu$ M일 때는 18시간 이후의 균 농도가 4log가량 억제되었다. 또한 PG1은 살모넬라의 상승곡선에서 유도기 (lag phase)를 연장시키는 것을 균수생장곡선을 통해 확인하였다. 향후

Salmonella 외에 *Bacillus*나 *E. coli* 등 다른 균에 대한 균 억제효과를 관찰할 예정이다.

8. *Pichia pastoris*를 활용한 돼지 항균 펩타이드의 발현

돼지에서 발견된 항균 펩타이드인 PG1, PR-26, PMAP-36의 각각의 mature peptide의 구조를 확인한 후, 효모 발현벡터에 삽입하고 효모내로 도입하여 발현을 유도한다.

가. Mature protein의 확인

*Pichia pastoris* 내의 발현을 위한 각각의 mature peptide를 확인하기 위해 NCBI 유전자은행의 정보를 확인하고 이에 대한 각각의 mRNA에서 cDNA 및 염기서열을 확인한다. 동물세포 내 발현이 아닌 대장균이나 효모의 발현을 위해서 합성신호(transcript factor)를 제외한 최종 발현산물(mature peptide) 크기의 확인이 필요하다.

표 10. PG1, PR-26, PMAP-36 mature peptide 정보

Class	amino acid
PG-1	RRRPRPPYLPRPRPPFFPPRLPPRIPPGF
PR-26	GRFRRLRKKTRKRLKKIGKVLKWIPPVGSIPLGCG
PMAP-36	RGGRLCYCRRRFCVVCVGRG

각각의 mature peptide 증폭에 필요한 PCR primer를 설계하여 증폭을 실시한다. 위와 같은 과정을 거쳐 삽입된 유전자는 다음과 같다.

표 11. 삽입된 PG1/ PR26/ PMAP36 유전자의 염기서열 정보

Class	AccessionNo	sequence (5'->3')
PG1	NM_001123149	agg gga ggt cgc ctg tgc tat tgt agg cgt agg ttc tgc gtc tgt gtc gga cga gga
PR26	NM_214450	agg aga cgt ccc cga ccc cca tat ttg cca agg cca agg cca cct ccg ttt ttc cca cca agg ctc cca cca agg atc cca cca ggg ttc
PMAP36	NM_001129965	gga cga ttt aga cgg ttg cgt aag aag acc cga aaa cgt ttg aag aag atc ggg aag gtt ttg aag tgg att cct ccc att gtc ggc tca ata ccc ttg ggt tgt ggg

나. 발현벡터의 구축

증폭된 목적 유전자를 *Pichia pastoris* 균주 내 도입 발현벡터를 통해 구축하였다. 벡터구축과 재조합 plasmid의 도입을 위한 균주로는 *E. coli* TOP10F가 사용되었으며, 해당 항

균 펩타이드 생산을 위한 효모균주로는 *Pichia pastoris* GS115균주가 사용되었다. 발현에 필요한 벡터로는 pPIC3.5를 사용하였다. pPIC3.5에는 AOX1유전자가 있어서 프로모터로 사용되며, 이 프로모터는 메탄올을 탄소원으로 사용할 때 발현이 유도된다. 사용된 벡터와 벡터 내 도입과정은 다음과 같다.

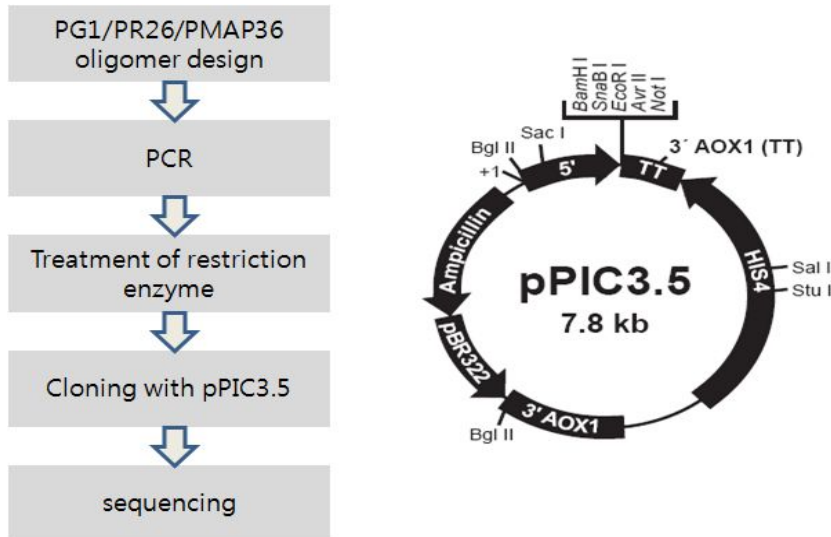


그림 25. 클로닝 모식도와 vector map

다. 균주 내 도입

대장균은 LB배지를 이용하여 배양한 후 형질전환체를 선별하기 위해 암피실린이 고농도로 함유된 배지에서 배양하였다. 배양된 대장균의 plasmid DNA를 추출한 후, *Pichia pastoris* 반응능 세포와 electroporation하여 형질전환을 실시하였다. 최소배지인 MD배지 (1.34% YNB,  $4 \times 10^5$  % biotin, 2% dextrose)에 HIS+유전체가 도입된 형질전환체를 배양하여 균주를 선별하였으며. 유전자의 도입을 확인하기 위해서 형질전환이 완료된 *Pichia pastoris* 균주에서 Direct PCR을 실시하였다.

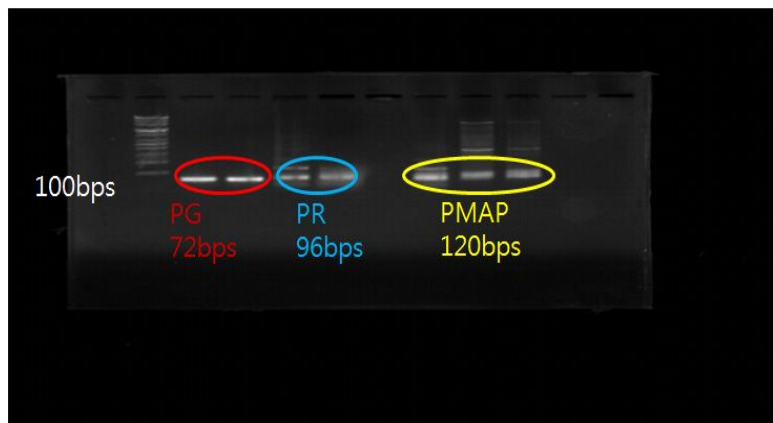


그림 26. direct PCR을 통한 삽입 유전자의 확인

#### 라. 발현

MGY(1.34% YNB, 1% glycerol,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin)와 MM(1.34% YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % biotin, 0.5% methanol) 배지는 각각 효모 형질전환체의 성장배지와 유도배지로 사용되었으며, 형질전환이 되지 않은 *Pichia pastoris*는 음성대조군으로 선정하였다. 음성대조군의 성장배지와 유도배지를 각각 MGYH (MGY에 histidine첨가)와 MMH (MM에 histidine첨가)로 사용하였다. 균주는 MGY에서 하루간 배양하여 균수를 늘린 후, 발현 유도물질인 메탄올이 함유되어 있는 MM배지에서 2-3일간 30도에서 진탕 배양하여 단백질을 발현시켰다.

#### 마. Cell lysis 및 보관

2-3일간 진탕배양된 배양액을 원심분리를 통해 세포를 수거하여 pellet을 형성시킨다. 세포내 발현이므로 세포를 파쇄하였으며, protein inhibitor이 함유된 PBS에 glass bead를 넣어준 후 vortexing하여 lysate를 형성하였다. 상기의 과정을 통해 현재 lysate를 제조하여 냉동보관 중에 있으며 해당 lysate의 단백질을 정제 및 농축한 후에 목적산물의 발현과 항균효능을 검정할 계획이다.

### 9. 항균펩타이드 과발현 마우스 안구의 조직학적 분석

PG1-F1 단일형질전환마우스 안구의 이상이 발견되어 조직학적 관점에서 대조군과 비교 분석을 실시함. PG1 형질전환마우스의 안구를 적출하여 4% 파라포름알데하이드에 담귀 약 24시간 동안 고정하였다. 고정된 안구를 파라핀 블록 속에 넣고 6 $\mu$ m 두께의 수직단면으로 절단하여 슬라이드 위에 고정하였다. 건조된 슬라이드는 xylene을 이용하여 파라핀을 제거한 후 100, 90, 75, 50%의 에탄올을 거쳐 수화(hydration) 후 매 10회 간격으로 조직적편을 Hematoxylin/eosin (H&E)으로 염색하였다. 염색된 슬라이드는 파라핀 제거 후 탈수화(dehydration)를 위하여 역순으로 에탄올 처리 후 Permount 용액을 이용하여 커버스립으로 고정하였다. Hematoxylin/eosin(H&E)으로 염색된 조직은 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 전반적인 안구 조직 절편들은 형태학적인 측면에서 정상 마우스와 차이를 보였고, 특히 PG1 형질전환마우스의 광수용체세포(photoreceptor cell)층이 구조적인 비정상 형태이고, 그 세포수가 현저히 적었다.



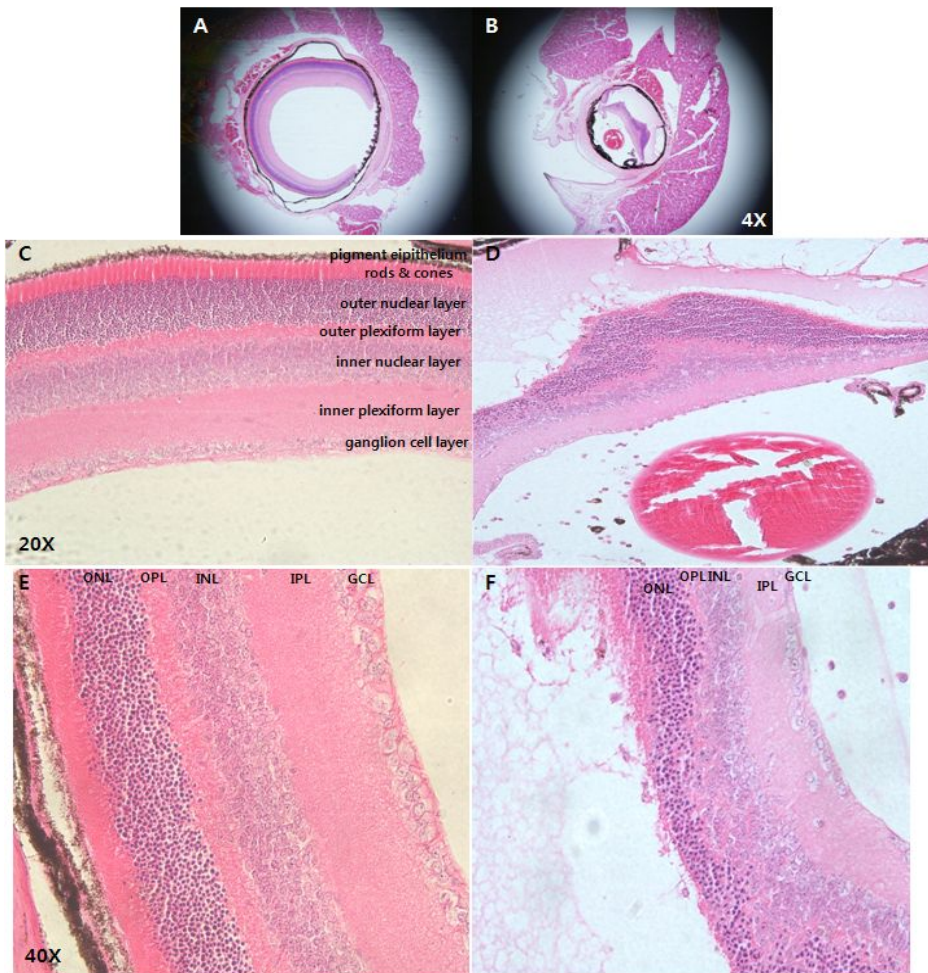


그림 27. H&E로 염색한 PG-1 단일형질전환마우스와 정상마우스의 안구 조직 비교

향후, 안구의 이상이 발견된 PG-1 단일형질전환마우스 뿐만 아니라 다른 종의 항균펩타이드 과발현 형질전환 마우스를 대상으로 조직학적, 발생학적 관점에서 대조군과 비교 분석을 실시하여 병리학적 부작용 발생 여부에 대한 추가 분석이 필요할 것으로 생각된다.

#### 10. 수립된 형질전환 Yeast의 발현 및 발현산물 확인(세포 내 분비 yeast)

##### 가. Yeast의 발현 실험

1차 년도에 형성된 형질전환 yeast를 발현시켜, Tricine SDS-PAGE 등을 통하여 발현산물을 확인하였다. 형질전환체 이스트는 yeast, peptone, dextrose(1%)가 함유된 YPD broth에서 30°C에서 12시간 배양하여, 균을 log phase까지 상승시켰다. 이후 이스트의 프로모터인 gal10을 inducing 하기위해 galactose를 총 2% 함량이 되게 한 후, 48시간동안 30°C에서 진탕배양 하였다. 배양 후, centrifuge를 통해 균을 모으고 Y-PER을 사용하여 균체를 용해한 후, 단백질을 추출하였다. 활성의 감소를 우려하여 단백질의 분리 및 정제는 한외여과 방식을 사용하였으며, 예상되는 디펜신의 크기는 4-5KDa이므로 3과 10MWCO

의 Centricon을 활용하였다. 10MWCO에서 필터를 통과한 산물(10KDa 이하)는 3MWCO에서 다시 필터링 하며, 필터에 걸린 산물(3KDa이상, 10KDa이하)을 수집하였다. 수집된 산물은 항균테스트 등에 사용하였으며 그 과정은 아래와 같다.

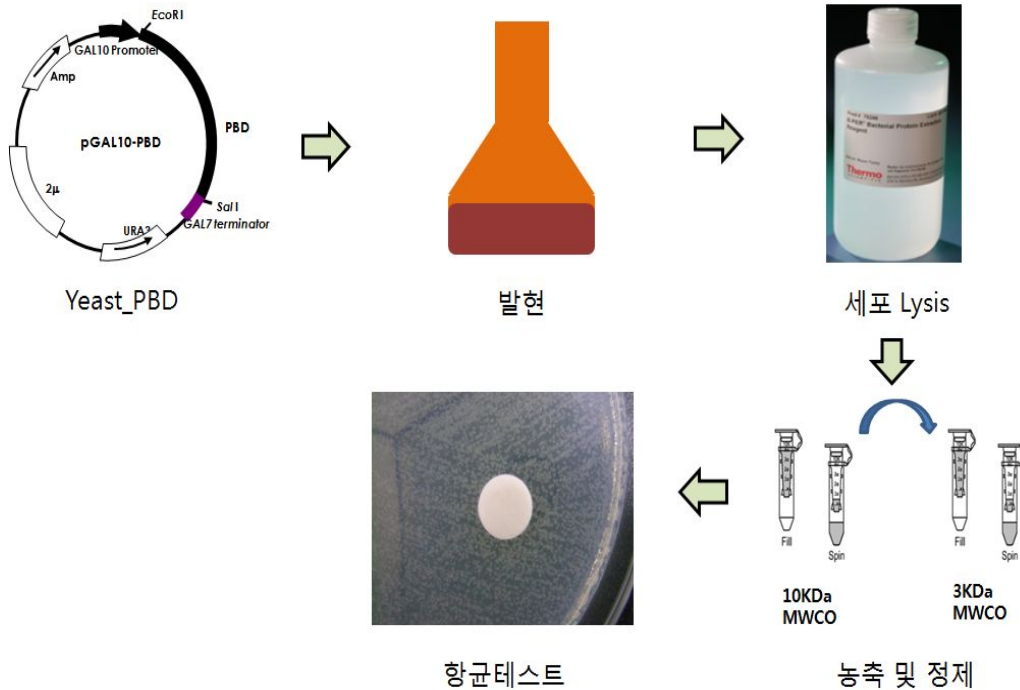


그림 29. 세포내 분비 Yeast의 발현 및 정제과정

나. Tricine SDS-PAGE test를 통한 발현산물의 확인

수집된 산물은 SDS-PAGE를 통하여 산물을 확인하였다. 예상되는 사이즈가 10KDa 이하로 매우 작으므로 작은 단백질의 확인에 사용되는 16% Tricine SDS-PAGE를 활용하였다. 그 결과는 아래 그림과 같다.

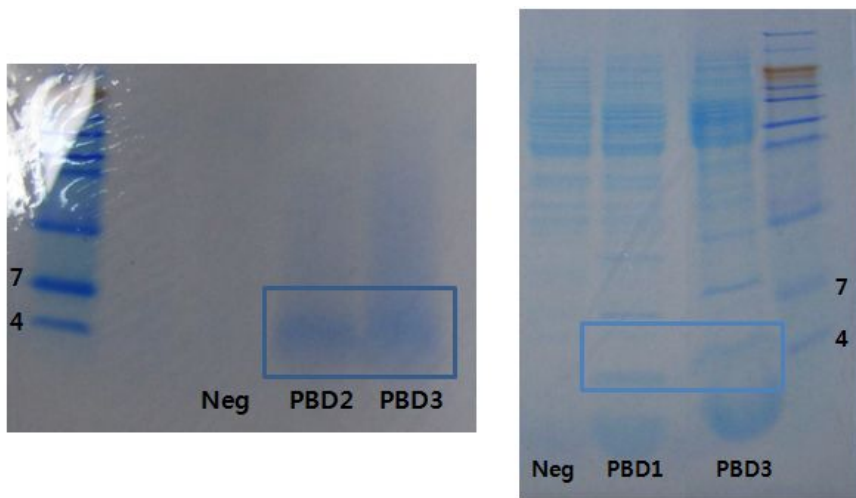


그림 29. Tricine SDS-PAGE를 통해 확인된 PBD 1-3

삽입한 산물은 40-50개 사이의 아미노산으로서 예상되는 사이즈는 크기는 4-5KDa이다. 그림에서 발현산물들은 4-7KDa 사이즈에서 밴드를 보였으며, 음성을 밴드를 보이지 않았다. 발현조건과 SDS-PAGE 조건에 따라 밴드가 보이지 않기도 하여, 반복실험을 통해 PBD1-3의 밴드를 확인하였다. 해당 사이즈는 4-5KDa 사이로 의심되어 삽입된 유전자가 발현된 것으로 판단하였다.

#### 다. 항균효과의 검정

##### (1) SDS-PAGE gel 상에서의 항균효과 검정

SDS-PAGE의 발현산물에서 바로 항균효과를 측정한 Kang et al (2002)의 연구를 토대로 하여, 동일하게 다시 발현한 후, SDS-PAGE gel을 세균이 포함된 배지에서 배양하였다.

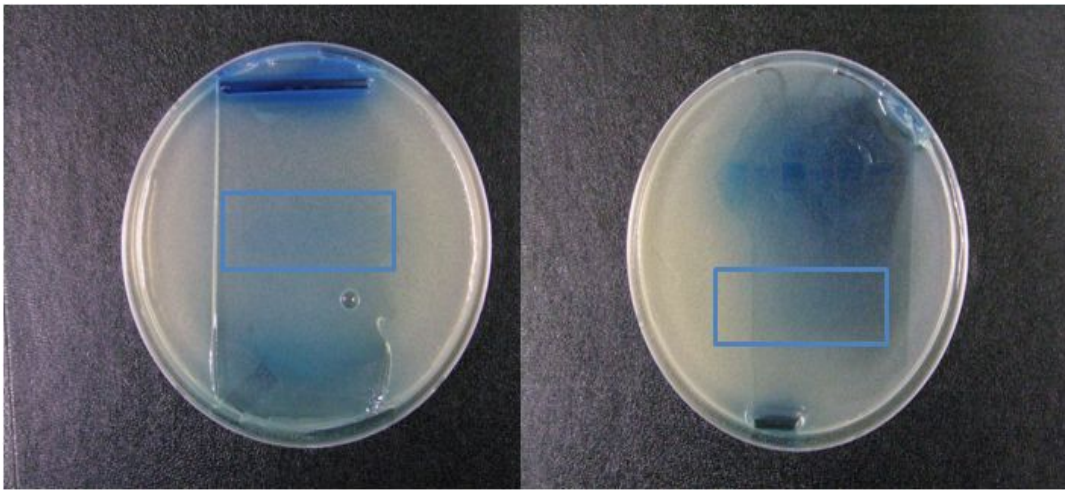


그림 30. SDS-PAGE의 필름이 포함된 배지에서의 세균 성장\_항균효과를 확인하지 못함

실험에 사용한 균은 바실러스 세레우스와 황색포도상구균이며, 0.8% 아가가 포함된 NB top 배지를 필름위에 붓고, 균을 접종하여 37도에서 24시간 배양하였다. 배양결과 의심되는 밴드부근에서 균을 억제하는 환 등이 생성되지 않아, 항균효과를 확인할 수 없었다. 이는 단백질의 삼차구조가 계면활성 성분이 높은 SDS에 의해서 분해되었기 때문으로 분석된다.

##### (2) 디스크를 활용한 항균효과 검정

디스크에 모아진 단백질 발현물을 접종하고, 디스크를 균이 도말된 배지에 두고 균을 배양하였다. 그 결과는 아래와 같다.

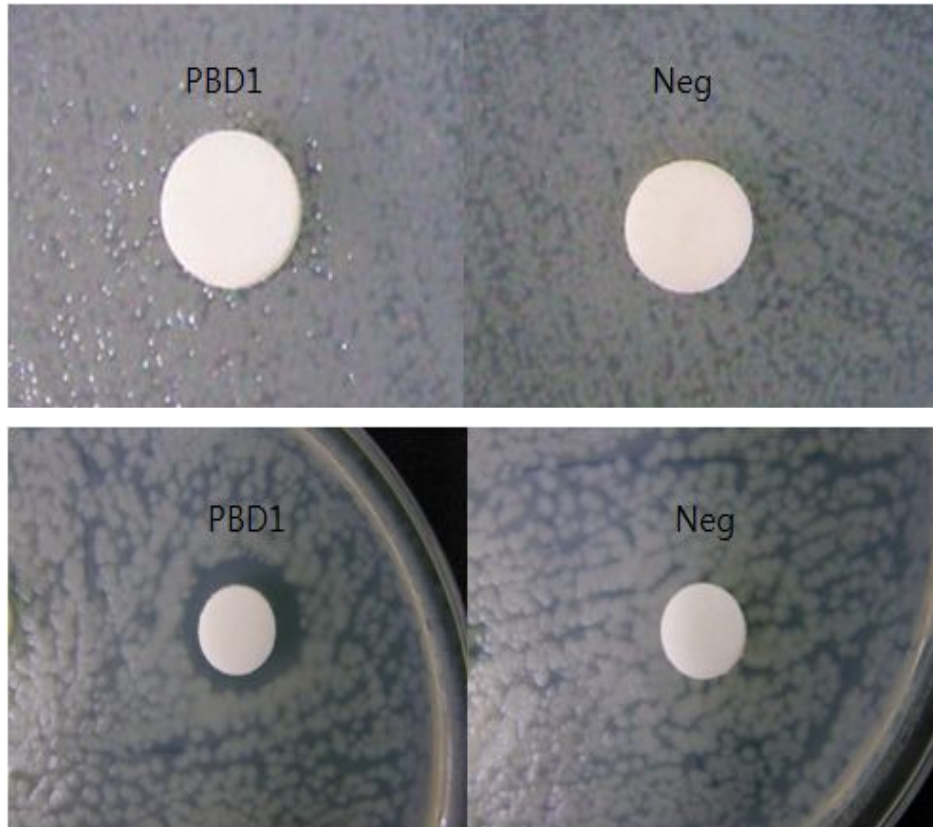


그림 31. 살모넬라(위)와 바실러스(아래)에서 PBD1의 항균환 테스트

실험결과, PBD 2, 3에서는 명확한 환을 형성하지 않아, 항균효과를 확인할 수 없었으나, PBD1에서는 살모넬라 엔터리티디스에서는 별다른 환을 보이지 않았으나, 바실러스 세레우스에서는 환을 형성하여, 항균효과를 타나냈음을 확인하였다. 그러나 PBD 2, 3의 경우 본 실험에서는 단백질 자체가 추출된 것이 아니어서 정확한 농도를 확인할 수 없었기 때문에, 실제 발현산물 자체의 문제인지, 혹은 농도가 낮아서 그런 것인지는 확실하게 단정할 수 없을 것으로 보인다.

## 11. 수립된 형질전환 Yeast의 발현 및 발현산물 확인(세포 외 분비 yeast)

### 가. Yeast의 발현 실험

1차 년도에 형성된 형질전환 yeast를 발현시켜, Tricine SDS-PAGE 등을 통하여 발현산물을 확인하였다. 위에 언급된 형질전환 yeast와는 달리 발현산물이 외부로 추출되는 형태의 yeast로서 위와 마찬가지로 형질전환체 이스트는 yeast, peptone, dextrose(1%)가 함유된 YPD broth에서 30도에서 12시간 배양하여, 균을 log phase까지 상승시켰다. 이후 이스트의 프로모터인 gal10을 inducing 하기위해 galactose를 총 2% 함량이 되게 한 후, 48시간 동안 30도에서 진탕배양 하였다. 배양 후, centrifuge를 통해 균을 모아, 균은 버리고 상층액만을 모았다. 활성의 감소를 우려하여 단백질의 분리 및 정제는 한외여과 방식을 사용하였으며, 예상되는 디펜신의 크기는 4-5KDa이므로 3과 10MWCO의 Centricon을 활용하였다. 10MWCO에서 필터를 통과한 산물(10KDa 이하)는 3MWCO에서 다시 필터링 하며, 필터에 걸린 산물(3KDa이상, 10KDa이하)를 수집하였다. 한외여과 방식을 통해 실험에 적

합한 수준의 발현산물을 반복적으로 모았으며, 수집된 산물은 균 억제 실험에 사용되었다.

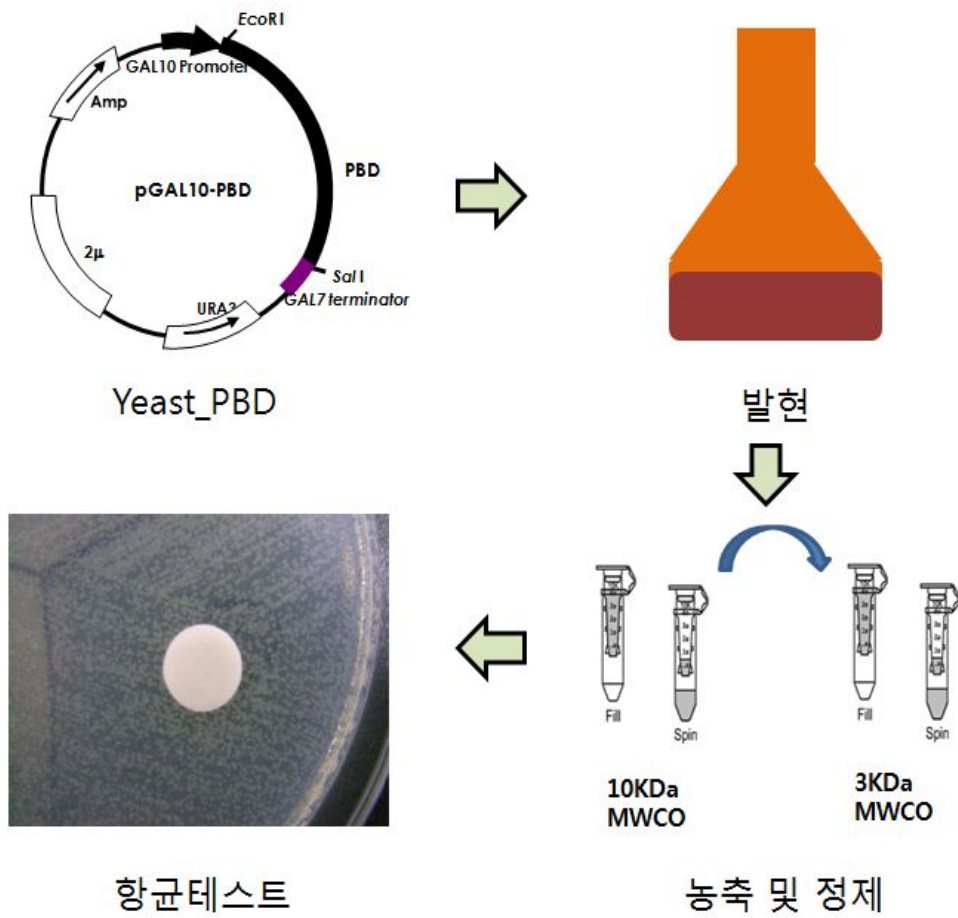


그림 32. 세포내 분비 Yeast의 발현 및 정제과정

나. 디스크를 활용한 항균효과 검정

위에서 한 것과 마찬가지로 디스크에 모아진 단백질 발현물을 접종하고, 디스크를 균이 도말된 배지에 두고 균을 배양하였다. 그 결과는 아래와 같다.

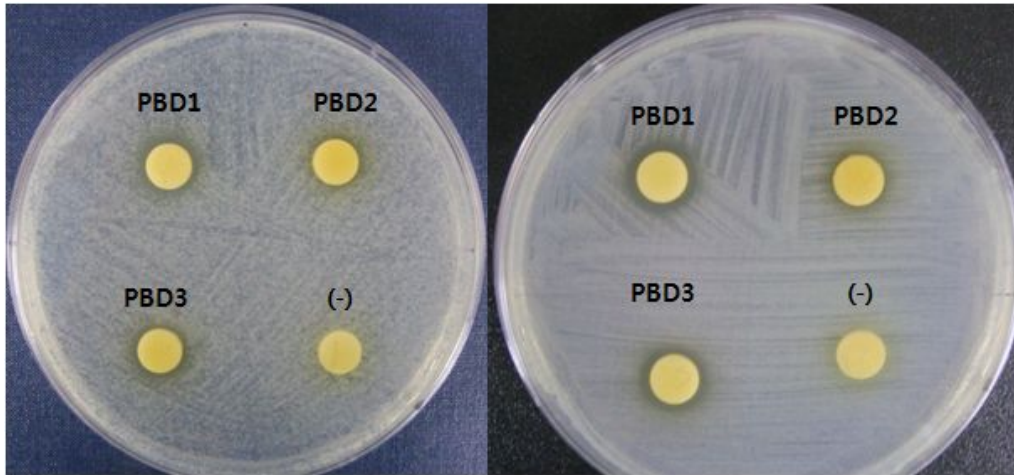


그림 33. 바실러스(좌)와 대장균(우)에서 PBD1의 항균환 테스트

10 시간가량 균을 키우고, 디스크를 활용하여 항균효과를 테스트 했을 때, 그람양성인 바실러스 세레우스와 대장균에서 음성컨트롤은 환을 보이지 않았으나, PBD 1, 2, 3은 약간의 환을 형성하였다. 항균물질은 해당 균에 대하여 약간의 효과를 발휘한 것 같으나, 위에 언급된 바와 마찬가지로 정확한 농도를 알 수 없기 때문에, 효과를 보이는 정확한 농도는 확인할 수 없었다.

## 12. *Salmonella Enteritidis* 접종실험

- 가. PG-1(21번) 단일형질전환마우스와 다른 두 마리의 대조군 마우스에 LD50을 상회하는 중-고농도의 살모넬라를 경구투여 하였으며, 7일간 관찰함
- 나. 접종 5일째부터 PG-1(21번)의 발병이 관찰되었으며, 다른 대조군 마우스도 6일째부터 발병이 관찰됨(발병의 기준은 체중의 급격한 감소, 피모저하, 신경증상, 반응둔화 등 살모넬라 감염증의 전형적인 증상이 관찰되어 발병으로 간주하였음)
- 다. PG-1(21번)은 발병 하루 후 폐사하였고, 두 마리의 대조군 마우스 역시 발병된 지 하루 만에 폐사하였음
- 라. 결론적으로 본 실험에서는 사용한 마우스의 수가 적어 명확한 결론을 내릴 수 없었으나 본과제의 연구기간 종료후에도 추가적인 감염실험이 필요한 것으로 사료됨

표 12. *Salmonella Enteritidis* 접종실험 결과

접종량	마우스 (5주령)	접종 0일	접종 1일	접종 2일	접종 3일	접종 4일	접종 5일	접종 6일	접종 7일
중고농도 $4.0 \times 10^8$	control-♀	정상	정상	정상	정상	정상	정상	발병	폐사
	control-♀	정상	정상	정상	정상	정상	정상	발병	폐사
	PG-(21번)	정상	정상	정상	정상	정상	발병	폐사	

13. *Listeria monocytogens* 접종실험

- 가. mucin 1이 주로 소화기 및 호흡기 점막에서 발현된다는 보고가 있으므로 경구투여를 할 필요가 있음
- 나. 경구투여 모델이 확립된 연구가 많지 않으나, Lee 등(2001)의 연구를 참조하여 고농도 ( $10^9$ - $10^{10}$ )로 경구투여 하여 경과를 일주일동안 관찰하였으나 발병하지 않음
- 다. 경구투여의 효과가 없음에 따라, 2차적으로 고농도부터 중농도(LD50)로 복강투여 하였음
- 라. 고농도에서는 형질전환마우스를 비롯한 대조군 마우스가 접종 후 1일에 발병 후 폐사하였으며, 형질전환마우스가 특징적으로 발병의 정도가 약하거나 onset이 느리지는 않음
- 마. 중고농도에서는 모두 발병하였으며, 폐사 개체는 관찰하지 못함
- 바. 중농도(LD50)에서는 접종 후 2일 재부터 발병하여, 중고농도나 고농도에 비해 질병의 onset이 느리게 나타났으나, PG-1 형질전환마우스와 대조군 마우스 간에 차이점은 없음. 특히, PG-1(15, 17번) 형질전환마우스의 경우 임상증상은 있었으나 생존한데 반해 PG-1(19번)은 접종 3일 후 폐사하여 질병에 더 취약하게 반응하였음

표 13. *Listeria monocytogens* 접종실험 결과

접종량 (복강투여)	마우스 (5주령)	접종 0일	접종 1일	접종 2일	접종 3일	접종 4일
고농도 $2.5 \times 10^8$	control-♀	정상	폐사			
	control-♂	정상	발병	폐사		
	PG-(15번)	정상	발병	폐사		
중고농도 $2.5 \times 10^7$	control-♀	정상	발병	발병	발병	발병
	control-♂	정상	발병	발병	발병	발병
	PG-(17번)	정상	발병	발병	발병	발병
중농도 (LD50) $2.5 \times 10^6$	control-♀	정상	정상	발병	발병	발병
	control-♂	정상	정상	발병	발병	발병
	PG-(19번)	정상	정상	발병	폐사	

PG-1 펩타이드는 *Listeria monocytogens*에 대한 MIC 농도가 낮은 편이며, *Salmonella enteritidis*에 대해서는 어느 정도 항균효과가 있는 것으로 보고되어 본 연구에서도 해당 균에 대해 항균효과를 발휘할 것으로 예상하였음. 그러나 본 실험 결과, PG-1 형질전환마우스가 질병의 임상증상의 정도, 폐사 정도, clearance, 질병의 onset 시간 등에 있어 대조군 마우스와 뚜렷한 차이를 확인하지 못하였다(강제 폐사 시킨 후, 장기에서 균수를 측정할 수 있었으나 발병의 정도에 차이가 없어 수행 생략). 반면에 살모넬라와 리스테리아의 특정농도(중농도)에서는 대조군 마우스에 비해 민감하게 반응하였다.



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구목표 및 달성도

돼지 항균펩타이드 유전자의 발굴 및 산업화용 후보유전자 선정을 1차 및 2차 년도기간동안에 완료하였으며 또한 항균펩타이드 beta defensin 1을 효모에서 발현시켜 그 효능을 검정하였다. 3차년도 동안에는 돼지 항균펩타이드 3종에 대하여 형질전환 마우스를 개발하여 그 특징을 분석하였으며 항균펩타이드 과발현 마우스에 세균접종을 통한 항균펩타이드의 in vivo 효과를 검정하였다. 초기연구계획서에 포함되어있던 세부연구개발 내용에 대한 전반적인 목표는 달성하였으며 그 세부내용을 표 14에 정리하였다. 그러나 항균펩타이드 형질전환 마우스를 활용한 세균의 in vivo 감염실험 결과도출이 연구기간의 한계상 완벽하지 못하여 후속연구가 필요하며 지속적으로 연구를 진행할 예정에 있으며, 비록 실험을 진행하였으나 현재로서는 in vivo 세균감염실험에 대한 결과는 다소 불명확하게 나타나 이 부분에 대한 후속연구가 진행 중이다.

표 14. 연차별 연구목표 및 연구개발 수행내용 및 목표달성도

구분 (연도)	연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1차연도 (2008년)	돼지항균펩타이드(디펜신)의 종류별 유전자 확보 및 특성분석	항미생물펩타이드 12종의 클로닝 및 유전자 확보	100
		디펜신 및 카셀리시딘 유전자 발현시스템 구축	100
	항균펩타이드(디펜신)의 탐색	개놈수준에서의 돼지 디펜신 및 카셀리시딘 펩타이드의 분석	100
		항균 펩타이드와 일반 펩타이드의 비교 분석 후 데이터 베이스화	100
		항균펩타이드 12종에 대한 radiation hybrid map 작성완료 및 비교유전체지도 작성	100
	디펜신의 항균효과 검증	살모넬라, 병원성 대장균, 또는 돼지 질병 바이러스 저항성이 있는 항균 펩타이드균을 선발함	100
		항균펩타이드 (beta defensin 1) 가 발현된 cell lysate를 이용하여 in vitro 상에서 항균 효과 검증 - Salmonella Enteritidis, E.coli O157:H7	100
		효모 균주 내 발현백터의 도입 및 발현	100
	2차연도 (2009)	항균펩타이드 형질전환마우스의 개발 및 생산	형질전환 promoter(mucin 1)의 클로닝
항미생물펩타이드 유전자 protegrin 1, PR-26, PMAP-36의 형질전환 construct의 개발			100
항미생물펩타이드 형질전환 마우스 3종 생산			100

		형질전환마우스의 유전자형 및 표현형 분석	100
	항균펩타이드 삼중형질전환마우스의 개발	3개의 항미생물펩타이드 동시 발현을 위한 유전자 다중발현 construct 개발	100
	돼지 항균 펩타이드의 항균효능 검증	항미생물펩타이드 유전자 <i>protegrin 1</i> 유전자의 단백질 관찰 및 항균효과 실험	100
	Recombinant DNA 기법을 활용한 디펜신의 대량 생산	<i>Pichia pastoris</i> 균주 내 도입 발현벡터 구축	100
		<i>Pichia pastoris</i> 균주 내 PG-1, PR-26, PMAP-36 유전자 도입 확인	100
3차연도 (2010)	돼지 항미생물펩타이드 삼중형질전환마우스의 생산	PG-1, PR-26, PMAP-36이 동시에 발현되는 삼중형질전환마우스의 생산	100
	항미생물펩타이드 형질전환마우스 조직을 활용한 미생물성장억제력 분석	PG-1, PR-26, PMAP-36 형질전환마우스의 조직적출, 미생물성장억제력 평가	90
	마우스의 장, 폐, 자궁 등 점막조직에서의 항미생물펩타이드 과발현시의 발현량 및 과발현시의 분자생물학적 분석	형질전환마우스의 조직학분석, 조직별 유전자 발현패턴분석	100
	항균펩타이드 과발현 마우스의 발생학적 및 병리학적 부작용 발생여부 확인	항균펩타이드 과 발현 형질전환마우스를 대상으로 대조군과의 비교 분석 및 조직학적 차이 관찰 및 분석	100
	돼지형질전환용 항균펩타이드의 선정	돼지게놈분석결과와 형질전환마우스 결과를 통하여 양돈산업에 적용가능 한 천연항균펩타이드 분석	90
	PG-1, PR-26, PMAP-36 단일형질전환마우스의 살모넬라 감염저항성 분석	형질전환마우스와 정상마우스의 살모넬라 감염 저항성을 정량적으로 비교	90

## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

1. 가축의 질병저항성 향상을 위한 신규소재의 개발: 돼지 내인성 항균펩타이드 유전자 발굴을 통하여 확보된 항균펩타이드 유전자들은 돼지게놈정보를 활용한 가축 질병저항성 향상 기술개발에 기여하였으며, 향후 유전자 조작기법을 활용한 *in vitro* 대량발현 및 생산을 통하여 신규 항생제 대체제 개발에 활용될 수 있는 신규 소재들을 도출하였다.
2. 항생제 대체제 개발분야의 기술발전예 기여: 국제협약에 따라서 사료내 항생제 첨가금지를 대비하기 위한 기술개발을 위하여 항균펩타이드를 활용한 방법이 전세계적으로 검토되고 있으며 이에 대한 보다 구체적인 연구결과들을 제시하였다. 후속연구의 결과에 따라서 항균펩타이드 기반의 항생제대체제 개발연구에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

3. 돼지 항균펩타이드 형질전환 동물의 개발을 통한 항균펩타이드 in vivo 기능이해의 촉진: 본 연구에서 개발된 4종의 항균펩타이드 과발현 형질전환 마우스를 동물모델로 활용한 후속 연구들은 항균펩타이드의 작용기전에 대한 보다 구체적인 이해를 위하여 매우 유용하게 사용될 수 있다. 또한 본연구의 결과에 따르면 항균펩타이드의 과발현은 단순한 항균작용 뿐만이 아닌 항균펩타이드의 역할에 대한 추가적인 기능들이 있음이 제시되었다.
4. 돼지 항균펩타이드 분석 및 효능검증 기술의 발전: 항균펩타이드의 경우 그 분자량이 매우 작아 전기영동을 통한 확인에 어려움이 있었으나, 본 연구를 통하여 개발된 기술을 통하여 항균펩타이드의 농축 및 효능검정에 대한 기술적 진전이 이루어 졌다.
5. 양돈산업에서 질병저항성 증진을 위한 기술개발 촉진: 양돈 산업의 경우 현재 자돈 사망률이 30%이상 도달하는 양돈 산업의 핵심문제인 4P(PED, PRRS, PMWS, PRDC) 질병에 대한 대책 수립을 위한 방안의 하나로 돼지의 내인성 항균펩타이드를 활용하는 아이디어를 제시 하였으며 양돈산업에서 소모성질환에 의한 생산성 저하 관련연구에 유용하게 활용될 것으로 판단된다.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절 연구성과 활용실적

본연구과제의 수행을 통하여 도출된 연구성과중 가장 우선적인 성과는 항균펩타이드 동물모델의 개발에 대한 것이며, 향후 이들 모델동물의 지속적인 활용 및 분석을 통하여 학술적인 면에서는 항균펩타이드의 기능에 대한 새로운 자료들이 도출이 될 것으로 예상된다. 아직 완전한 논문발표에까지는 도달하지 못하였으나 항균펩타이드 모델동물의 분석을 통한 유용한 결과들이 도출되고 있는 중이다. 산업적 연구성과 면에서는 돼지 항균펩타이드 in vitro 생산에 대한 특허가 3건 출원되었으며, 이들 특허 및 본 연구를 통하여 구명된 돼지의 항균펩타이드들을 활용한 산업화 시도가 후속 과제를 통하여 지속적으로 이루어질 예정이다.

#### 1. 논문게재

- 가. Kim W, Kim S, Choi H, Truong ND, Thong le M, Kim JH, Xiao R, Park KK, Seo K, Lee H, Kim BS, Yoo MH and Park C. 2010. Discrimination of animal species using polymorphisms of the nuclear gene Zinc finger protein 238. J Agric Food Chem, 58:2398-2402.
- 나. Hyeon JY, Chon JW, Hwang IG, Kwak HS, Kim MS, Kim SK, Choi IS, Song CS, Park C, Seo KH. 2011. Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of Salmonella serovars in Retail meat. J Food Prot. 74:161-166.

#### 2. 특허성과

- 항생펩타이드의 제조방법 및 그 펩타이드의 응용(Method of producing antimicrobial peptide and use of the same): 10-2010-0041334
- 항생펩타이드의 제조방법 및 그 펩타이드의 응용(Method of producing antimicrobial peptide and use of the same): 10-2010-0041337
- 항생펩타이드의 제조방법 및 그 펩타이드의 응용(Method of producing antimicrobial peptide and use of the same): 10-2010-0041340

### 제 2 절 연구성과 활용계획

본 과제의 연구성과는 다음과 같은 분야에서 활용 중 또는 활용 예정에 있다.

1. 확보된 항균펩타이드 유전자를 활용한 대량생산기법의 개발을 통한 산업화 가능성 모색
2. 확보된 항균펩타이드 검증 기술을 활용한 후속연구에의 활용

3. 개발된 항균펩타이드 형질전환마우스 4종에 대한 후속연구를 통하여 항균펩타이드를 활용한 질병 저항성 가축의 생산을 위한 모델동물로 활용하며 항균펩타이드의 동물산업에 대한 활용법의 지속적 개발연구를 추진
4. 확보된 형질전환 마우스와 항균펩타이드를 활용한 산업동물의 무 항생제 사육기술 개발을 위한 기반기술로서의 활용
5. 항균펩타이드의 항생제 대체 물질로서의 효능에 대한 검정이 더욱 필요하여 이에 대한 후속 연구를 수행할 예정임
6. 본연구의 결과는 양돈 산업에서 소모성질환으로 인한 생산성 감소를 극복하여 양돈생산성 향상을 통한 산업경쟁력 향상을 위하여 활용

### 제 3 절 핵심기술

본 연구과제를 통하여 도출된 기술들 중 4대 주요 핵심기술을 표 15에 나타내었다. 이들 핵심기술들은 향후 본 연구결과의 산업화를 위하여 중요하게 활용될 것이다.

표 15. 연구개발 핵심기술명

구분	핵심기술명
①	동물의 질병저항성 향상을 위한 돼지내인성 항균펩타이드 유전자의 발굴
②	돼지항균펩타이드 형질전환 마우스의 개발
③	돼지항균 펩타이드 분석 및 효능검증 기술의 개발
④	돼지항균 펩타이드 실험실수준 생산기술 개발

### 제 4 절 연구결과별 기술적 수준

본 과제에서 개발된 핵심기술의 수준은 ②번 기술인 돼지항균펩타이드 형질전환 마우스의 경우 세계에서 처음으로 개발된 동물임. 이들 항균펩타이드 모델동물을 활용한 연구는 후속연구를 통하여 흥미로운 결과들을 도출할 것으로 예상된다. 또한 ①번 기술의 경우 현재 SCI 논문이 투고 준비 중에 있으며 이를 통하여 확인된 돼지항미생물 펩타이드의 산업적 활용에 대한 후속 연구가 준비 중에 있다. ③번과 ④번기술 또한 항균펩타이드의 산업화를 위해 매우 중요한 핵심기술들로 즉각적인 산업화를 위해서는 기술의 향상이 다소 요망되는 것으로 판단이 되지만 전반적인 핵심기술의 개발 수준은 매우 우수하다. 세부적인 사항은 표 16에 제시되었다.

표 16. 연구개발 핵심기술의 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장으로 해결	정책 자료	후속연구 활용
①의 기술		✓								✓
②의 기술	✓					✓				✓
③의 기술				✓						✓
④의 기술		✓								✓

\* 각 해당란에 v 표시

## 제 5 절 각 연구결과별 구체적 활용계획

본 과제의 핵심연구결과의 활용을 위한 계획을 표 17에 제시하였다. 4대 핵심기술을 활용하여 돼지항미생물펩타이드의 항생제대체제로의 활용을 위한 시도, 항미생물펩타이드 과발현의 경우에 in vivo 작용을 검정을 통한 안전성 검사시스템의 구축, 양돈산업 소모성질환에 항미생물펩타이드의 활용가능성 모색, 사료 및 식품첨가제로써의 활용등에 대한 활용을 모색하고 있는 중이다.

표 17. 연구개발 핵심기술의 활용계획 및 기대효과

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	유전자 조작에 의한 대량 생산으로 사료 첨가제로 산업화 가능성
②의 기술	-질병저항성 가축 개발을 위한 지적재산권 확보 -항균펩타이드 미생물 살균작용에 대한 in vivo 효과의 검정 -항균펩타이드 형질전환동물 육의 보관기간 증대 효과의 검정
③의 기술	양돈산업의 핵심문제인 4P(PED, PRRS, PMWS, PRDC) 질병에 대한 대책 수립
④의 기술	-천연항생제 대체제 생산 -사료첨가제의 생산 -식품첨가제로써의 활용

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 미생물들의 항균제에 대한 저항성을 극복하기위하여 음전하를 띠는 항미생물펩타이드 (cationic antimicrobial peptides)가 현재 항생제를 대체하기위한 대안으로 고려성이 점점 높아지고 있다(Nguyen 등, 2011).
2. 유전정보가 해독된 동물종의 증가로 항균펩타이드 유전자에 대한 정보가 급격히 증가되고 있음. 주요가축의 경우 이미 게놈프로젝트가 완료 또는 완료 직전에 있어 이러한 정보를 활용한 항균펩타이드 기능의 정밀분석이 매우 중요할 것으로 판단된다.
3. 국제적으로 항미생물펩타이드만을 전문으로 연구하는 연구소 및 데이터베이스들이 존재함
  - 가. 국제 항미생물펩타이드 데이터베이스 (the antimicrobial peptide database, <http://ap.s.unmc.edu/AP/main.php>)를 참고하면 다양한 AMP에 대한 특징 및 정보를 검색할수 있음
  - 나. Anitimicrobial peptides laboratory (University of Trieste Italy)
  - 다. 2년마다 AMP를 주제로한 Gordon conference가 개최되며 제약회사 등 전세계의 많은 주요 연구자들이 학회에 참가함. 2011년 이탈리아 Lucca에서 개최됨
  - 라. AMP와 관련한 다수의 회사가 존재함: 회사리스트:  
<http://www.businessdb.com/products/antimicrobial-peptides>
  - 마. Pergamum AB ([www.pergamum.se](http://www.pergamum.se)) 사에 의해 DPK-060 및 PXL01 등의 제품이 현재 임상시험 중에 있음.

## 제 7 장 참고문헌

1. Ahn HS, Cho W, Kang SH, Ko SS, Park MS, Cho H, Lee KH. 2006. Design and synthesis of novel antimicrobial peptides on the basis of alpha helical domain of Tenecin 1, an insect defensin protein, and structure-activity relationship study. *Peptides* 27:640-648.
2. Boman HG. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine* 254:197-215.
3. Brahmachary M, Krishnan SP, Koh JL, Khan AM, Seah SH, Tan TW, Brusic V, Bajic VB. 2004. ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res.* 32:D586-589.
4. Brian CS, Joseph PM, Jennifer AB, Jesse DW, Hong PJ, Michael JW, Thomas LC, Paul BM. 2001. Discovery of five conserved  $\beta$ -defensin gene clusters using a computational search strategy. *Genetics* 99:2129-2133.
5. Chen YQ, Zhang SQ, Li BC, Qiu W, Jiao B, Zhang J, Diao ZY. 2008. Expression of a cytotoxic cationic antibacterial peptide in *Escherichia coli* using two fusion partners. *Protein Expr Purif.* 57:303-311.
6. Cheng YK, Yin C, Yu HZ, Reen W. 2003. ORFeome-based search of airway epithelial cell-specific novel human  $\beta$ -defensin genes. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29:71-80.
7. De Keersmaecker SC, Braeken K, Verhoeven TL, Perea Vélez M, Lebeer S, Vanderleyden J, Hols P. 2006. Flow cytometric testing of green fluorescent protein-tagged *Lactobacillus rhamnosus* GG for response to defensins. *Appl Environ Microbiol.* 72:4923-4930.
8. Hong IP, Lee SJ, Kim YS, Choi SG. 2007. Recombinant expression of human cathelicidin (hCAP18/LL-37) in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett.* 29:73-78.
9. Hong PJ, Brian C, Schutte, AS, Rose L, Janet M, G, Georgia KJ, Brian FT, Joseph PM, Andre R, Tomas G, Paul BM. 2001. Discovery of new human  $\beta$ -defensin using a genomics-based approach. *Gene.* 263:211-218.
10. Hughes AL. 1999. Evolutionary diversification of the mammalian defensins. *CMLS* 56:94-103.
11. Luenser K, Ludwig A. 2005. Variability and evolution of bovine  $\beta$ -defensin genes. *Genes and Immunity* 6:115-122.
12. Maxwell AI, Morrison GM, Dorin JR. 2003. Rapid sequence divergence in mammalian  $\beta$ -defensins by adaptive evolution. *Molecular Immunology* 40:413-421.
13. Nita H, Salzman, Dipankar Ghosh, Kenneth M, Huttenr, Yvonne Paterson & Charles L. Bevins. 2003. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expression a human intestinal defensin. *Nature* 422:522-526.
14. Nuding S, Fellermann K, Wehkamp J, Mueller HA, Stange EF. 2006. A flow



- cytometric assay to monitor antimicrobial activity of defensins and cationic tissue extracts. *J Microbiol Methods* 65:335–345.
15. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* –article in press
  16. Piers KL, Brown MH, Hancock RE. 1993. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* 30:7–13.
  17. Radhakrishnan Y, Hamil KG, Yenugu S, Young SL, French FS, Hall SH. 2005. Identification, characterization and evolution of a primate  $\beta$ -defensin gene cluster. *Genes Immun.* 6:203–210.
  18. Robert IL, Tomas G. 2002. Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology* 14:96–102.
  19. Ruby R, Sheela, Uma Babu, Jie Mu, Subbiah Elankumaran, Daniel A. Bautista, Richard B. Raybourne, Robert A. Heckert, Wenxia Song. 2003. Immune responses against *Salmonella enterica* Serovar Ebterutudus infection in virally immunosuppressed Chickens. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10:670–679.
  20. Sabina ST, Christoph L, Rueid F. 1995. Comparative genome map of human and cattle. *Genomics* 27:489–496.
  21. Sang Y, Blecha F. 2009. Porcine host defense peptides: Expanding repertoire and functions. *Developmental and Comparative Immunology* 33:334–343.
  22. Schroder JM. 1999. Epithelial peptide antibiotics. *Biochemical Pharmacology* 57:121–134.
  23. Shnitsar VM, Lisovskiy IL, Soldatkina MA, Nespryadko SV, Turchak OV, Vinnitskaya AB, Poqrebniy PV. 2004. Human beta-defensin (hBD-3) expression in A431 cell line and human vulval tumors. *Exp Oncol.* 26:328–330.
  24. Tomas G. 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature* 3:710–720.
  25. Tomas G. 2004. Defensins: antimicrobial peptides of vertebrates. *C. R. Biologies* 327:539–549.
  26. Tomas G and Rovert IL. 1998. Antimicrobial peptides of vertebrates. *Innate Immunity.* 10:41–44.
  27. Veldhuizen EJ, Rijnders M, Claassen EA, van Dijk A, Haagsman HP. 2008. Porcine beta-defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria. *Mol Immunol.* 45:386–394.
  28. Whitelaw CB, Sang HM. 2005. Disease-resistant genetically modified animals. *Rev Sci Tech.* 24:275–83.
  29. Yashwanth R, Mario AF, Frank SF, Susan HH. 2007: Comparative genomic analysis of a mammalian  $\beta$ -defensin gene cluster. *Physiol Genomics* 30:213–222.
  30. Yongming S, Amar AP, Guolong Z, Chris RR, Frank B. 2006. Bioinformatic and expression analysis of novel porcine  $\beta$ -defensins. *Mammalian Genome.* 17:332–339.

31. 문창진. 2007. 국가항생제내성안전관리사업 연구보고서. 식품의약품안전청.
32. 신호철. 2005. 동물용 의약품 실태조사 연구보고서. KISTI.
33. 이성미, 강호조. 2001. *Listeria monocytogenes*를 경구접종한 마우스에서 균의 장기 침입 및 경과. 한국수의공중보건학회. 25:29-34.