

최종
연구보고서

BSAG850M-2000061-2

농작물 병원균에 대한 항진균 펩타이드의 탐색 및 개발연구

연구기관
생명공학연구소

농 립 부



최 종 보 고 서

190mm × 268mm

2000년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 농작물 병위균에 대한 합진균 펩타이드의 탐색 및 개발연구에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2000. 11. .

주관연구기관 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 김 길 룡 (인)

주관연구기관장 : 복 성 해

농 립 부 장 관 귀 하

직 인

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농작물 병원균에 대한 항진균 펩타이드의 탐색 및 개발연구에 관한 연구” 과제 최종보고서로 제출합니다.

2000. 11. . . .

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 김 길 룡

연 구 원 : 함 경 수

연 구 원 : 이 동 건

연 구 원 : 신 송 엽

연 구 원 : 장 소 운

요 약 문

I. 제 목

농작물 병원균에 대한 항진균 펩타이드의 탐색 및 개발연구에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

생물체의 항상성(homeostasis)을 유지하기 위하여서 중요한 역할을 담당하고 있는 물질중 하나가 펩타이드이다. 펩타이드는 호르몬, 증식, 항균, 항진균, 항암 효과등의 생리 활성을 갖는 중요한 생체활성 물질이다. 또한 펩타이드는 면역 반응에서 중요한 백신으로서의 사용 가능성이 제시되고 있으며, 여러종류의 질병의 진단용으로서도 널리 사육되고 있다. 그중 곤충, 양서류 및 포유류에서 분리된 항균 및 항진균 펩타이드는 박테리아, 곰팡이 및 바이러스에 이르기까지 다양하게 작용한다. 또한 최근에는 생리활성 펩타이드 구조로 부터 펩타이드공학의 기술을 이용하여 설계된 여러종류의 펩타이드들이 질병의 치료를 위한 약물로서의 시도되고 있다. 또한 항진균활성을 갖는 펩타이드는 농작물의 살균제 또는 식품에 있어서는 식품 보존제로서도의 활용 방안을 기대할 수 있다. 따라서 본 연구는 펩타이드 공학 기술의 발전에 중요하며, 나아가서는 강력한 항진균 펩타이드의 개량 기술을 발달시킬 수 있을 수 있을 것이라 생각되어진다. 그리고 농작물에 감염되는 병원균에 강력한 항진균활성을 가지며 인체에 무해한 펩타이드의 개발은 현재 문제가 대두되고 있는 농작물의 과량의 살충제에 투여에 의한 인체의 유해성, 토질오염 및 환경오염을 피할수 있는 대체물질로서의 이용에 될 수 있을 것이라 생각된다.

한편, 곡물의 피해는 해충 및 선충에 의한 피해, 시물의 병에 의한 피해, 잡초에 의한 피해등으로 대별할 수가 있다. 그 중 식물의 병해에 의한 손실 중 70-80%가 균류에 기인한다고 알려지고 있다. 이러한 식물 병원체들은 독성, 침습성, 무독성, 저독성 등의 여러 가지 형태로 분류되며, 이러한 병원성을 해결하는데에 지금까지 많은 노력들을 기울여 왔으며 요즈음에 와서는 환경적인 문제가 심각히 대두되는 시점에서 농약의 사용이라든지 수입 농산물에서의 인체에 유해한 농약성분의 검출등이 심각히 거론되고 있으며 그러한 문제점들을 해결하기 위하여 미생물성 농약이라든지 인체와

환경에 무해한 영향을 줄일 수 있는 새로운 물질의 개발에 많은 연구를 하고 있으며 또한 그러한 연구가 필요한 실정이다. 만약 이러한 기존의 농약성 물질을 대체 할수 있고 인체에 무해하며, 환경오염적인 면에서 무해한 물질의 개발은 농가 소득증대를 포함한 경제적 효과가 크며, 수입대체 및 수출 증대에도 이바지 할 수 있다고 생각된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

- Magainin 2 항균펩타이드의 크기조절 및 아미노산 치환에 의한 항진균성 증진
- CecropinA와 magainin 2을 접합시킨 접합펩타이드, magainin 2와 melittin을 접합시킨 MA-ME의 접합 펩타이드 및 아미노산 치환에 의한 analogue 펩타이드 합성을 통한 새로운 항진균성 펩타이드의 탐색
- 시스테인을 포함한 항진균 펩타이드들의 구조와 활성과의 상관관계에 대한규명 및 천연형보다 항진균 활성이 높은 펩타이드의 설계
- 미생물 유래의 항진균 펩타이드의 분리 및 항진균 활성조사
- CA-MA, CA-ME 접합펩타이드들의 구조 분석 및 항진균작용 기작규명
- 농작물의 병원성 감염에 대한 펩타이드 활성 검토
- 시스테인을 포함한 항진균 펩타이드들의 구조 분석 및 항진균작용기작의 규명

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

3년간의 연구를 통하여 새로운 항진균 합성 펩타이드의 개량 및 천연물성 항진균 펩타이드의 분리를 달성하였고, 그 작용기작에 대해서도 알아 보았다. 이러한 연구의 결과를 토대로 앞으로 농약이나 방부제의 대체 물질로 항진균 펩타이드를 개발함에 있어서 현재 사용되어지고 있는 화학적인 항진균제의 부작용을 보완해 주며 특히 농작물의 재배에 과량의 살충제 투여로 인하여 심각한 토지, 대기 오염 및 국민 보건에 심각한 악영향을 미치고 있는 실정을 생각해 볼 때 환경 오염을 줄이고 및 인체에 무해한 펩타이드성 항진균제의 개발은 국민의 건강복지를 향상시키고 나아가서는 농가 소득 증대에 이바지하므로 사회적인 측면에서 그 의미는 크다고 생각된다.

여 백

SUMMARY

Antifungal agents have become indispensable in the modern health care system by assisting and complementing the natural immune system. But with the appearance of resistance strains, there is a continuous search more potent and efficient antifungal agents. Antifungal agents act in two different way, one by targeting the physiology of the pathogen, the other by disrupting the cellular structure of the fungi. Among the potent agents reported sofar are small peptides like Cecropin A(CA), melittin(ME) and Magainin-2 (MA). But as already mentioned these peptides also show side effects such as hemolytic activity, which have prevented their use as therapeutic agents. In order to design highly potent antifungal peptides with lowered or no side effects and it has triggered considerable interest in the isolation of new antofungal peptides.

1. In order to design synthetic peptides with potent antifungal activity but low cytotoxic activity under physiological condition, several analogues of the previously reported Cecropin A (CA)-Melittin (ME), Cecropin A (CA)-Magainin-2 (MA) hybrid peptides, were synthesized. Antifungal activities were measured by growth inhibition of various pathogenic fungi and by hemolytic assay with human red blood cells, respectively. Substitution of Thr for Lys at position 18 and 19 of CA(1-8)-ME(1-12) and dramatic reduction in hemolytic activity.

2. To study the antifungal mechanism of these analogue peptide, confocal laser scanning microscopy, protoplast regeneration test. By confocal microscopy the analogue peptides were detected in the cell membrane. Additionally, the fungal protoplasts treated with the analogue peptides not only failed to regenerate the fungal cell walla but also disrupted the membrane. These facts suggested that the antifungal mechanism of these analogue peptides acts by pore formation in the cell membrane

3. A novel antifungal peptide was isolated from the culture supernatant of the filamentous fungi, *Aspergillus niger*. The whole amino acid sequence of this peptide was determined and the peptide was found to be composed of a single polypeptide chain with 58-amino acids including six cysteine residues. The antifungal peptide exhibited potent growth inhibitory activities against yeast strains as well as filamentous fungi.

4. In order to determine the functional region of the antifungal protein (AFP) isolated from *Aspergillus giganteus* responsible for growth inhibitory activity and the promotion of phospholipid vesicle aggregation. Overlapping peptides covering the complete sequence of AFP were synthesized. AFP(19-32) displayed potent antibiotic activity against fungi without peptide toxicity as indicated by hemolysis. Accordingly, AFP(19-32) could be used as a good model for design of effective agents.

5. The antifungal mechanism of a 20-mer peptide, Ib-AMP1, derived from *Impatiens balsamina* was investigated. The oxidized (disulfide bridged) Ib-AMP1 showed a 4-fold more potent antifungal activity against *Aspergillus flavus* and *Candida albicans* than reduced (non-disulfide bridged) Ib-AMP1. Ib-AMP1 showed very low activity in phospholipid disruption when compared with cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), α -helical amphiphatic antimicrobial peptide. The confocal microscopic analysis showed that Ib-AMP1 binds on cell surface or penetrates into cell membranes. These results suggested that Ib-AMP1 may manifest its antifungal activity against *Candida albicans* by inhibiting a distinct cellular process rather than ion channel or pore formation in cell membrane.

CONTENTS

1. Introduction
 - 1.1. Purpose of research
 - 1.2. Contents and range of research
 - 1.3. A far-reaching influence of technique
2. Screening of antifungal peptides against plant pathogens
 - 2.1. Design of antifungal synthetic peptides and evaluation of antifungal mechanism
 1. Introduction
 2. Materials and methods
 3. Results and discussion
 - 2.2. Isolation and characterization of a novel antifungal peptide from microorganism
 1. Introduction
 2. Materials and methods
 3. Results and discussion
 - 2.3. Effect of antifungal activity including cystein residues peptides
 1. Introduction
 2. Materials and methods
 3. Results and discussion
3. Reference

여 백

목 차

제 1 장 서 론

- 제1절 연구개발의 목적
- 제2절 연구개발의 내용 및 범위
- 제3절 기대효과

제 2 장 농작물 병원성 진균에 대한 항진균 펩타이드의 탐색

- 제1절 항진균 합성펩타이드의 설계, 합성 및 항진균 작용기작 연구
 - 1. 서론
 - 2. 재료 및 방법
 - 3. 결과 및 고찰
- 제2절 미생물 유래의 항진균성 펩타이드의 분리 및 항진균활성조사
 - 1. 서론
 - 2. 재료 및 방법
 - 3. 결과 및 고찰
- 제3절 시스테인을 포함한 항진균성 펩타이드의 항진균활성조사
 - 1. 서론
 - 2. 재료 및 방법
 - 3. 결과 및 고찰

제 3 장 인용문헌

여 백

제 1장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

현재 농작물의 제배, 보존, 유통과정의 농약성 화학물질의 과량사용으로 야기되는 인체유해 및 환경오염이 심각한 실정이다. 특히 수입농산물에서도 그 유통되는 과정에 많은 심각한 문제들이 야기되고 있다. 이러한 문제점들을 보완하는 쪽으로 그 대체 물질의 개발에 많은 노력을 기울이고 있는 실정으로 펩타이드 공학을 이용한 펩타이드성 항진균 펩타이드의 개발 연구를 통한 무공해 항진균제의 개발은 이와같은 문제를 해결해 줄 수 있고 나아가서는 농작물·식품 보존제로서의 응용이 가능하므로 앞으로의 전망은 높다고 사려된다. 본 연구에서는 식물병원체로 고구마, 복숭아, 토마토, 바나나 콩 등의 과일이나 작물, 야채등에 기생하여 식물 시들병을 일으키거나 식물의 뿌리 부분이라든지 영양분을 섭취하는 흡수관내 까지도 침범하여 병징을 일으키는 식물 병원성 진균인 *F. oxysporum*, *F. solani* 대상으로 강력한 항진균성 합성펩타이드를 개발하고 미생물 유래의 항진균 활성 polypeptide를 분리하기 위하여 실시하였으며, 수입 농산물이라든지 과일, 야채의 유통과정에서 감염이 되어 농산물의 보관상태뿐 아니라 그 농산물을 섭취하는 인체에 큰 영향을 주고 그리고 농산물과 가축의 사료에 감염이 되어 가축에게 치명적으로 작용하는 병원성 진균등을 대상으로 강력한 항진균성 합성펩타이드를 개발하고 미생물 유래의 항진균 활성 polypeptide를 분리하기 위하여 실시하였다.

제 2 절 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 단계별로 식물 병원성 진균에 대해 활성을 가지는 CA-MA 접합펩타이드, CA-ME 접합펩타이드 및 그 유도체 펩타이드를 설계하고 합성하였다. 그리고 식물성 병원균인 *F. oxysporum*, *F. solani* 그리고 과일, 야채와 같은 농산물이나 가축의 사료에 감염이 되어 인체나 가축에게 치명적인 병원성 진균 등을 중심으로 항진균성 검사를 한 후, 가장 강력한 항진균활성을 가지는 후보 펩타이드를 선정하였다. 이렇게 선정된 합성 펩타이드를 가지고 그 항진균 작용기작을 알아보기 위하여 Confocal microscopy, protoplast regeneration, ion release test, 등을 이용하여 그 기작을 알아 보았다. 이렇게 선정된 합성 펩타이드를 이용하여 최종적으로 담배잎에 감염된 *F. oxysporum*에 대한 항진균 활성을 In vivo상에서 검토하였다. 다음으로 새로운 천연물성 항진균 펩타이드를 분리하기 위하여 *Aspergillus niger*에서 분비되는 항진균 펩타이드를 분리하였으며, 이 펩타이드의 2차구조 및 전 서열을 밝혔다. 마지막으로 *Aspergillus giganteus*에서 분리된 시스테인을 포함한 항진균성 펩타이드인 AFP (antifungal peptide)의 크기조절에 의한 합성을 통해 활성부위 조사하였다. 그 펩타이드 구조와 항진균활성과의 상관관계를 조사하며, 최종적으로 식물에 병원균이 감염된 상태와 농산물에 감염된 상태에서 선정된 펩타이드의 항진균 활성을 측정한다.

마지막으로 *Impatiens balsamina*라는 식물에서 분리된 시스테인을 포함한 20개의 아미노산으로 구성된 항진균 펩타이드로 알려진 Ib-AMP1이라는 펩타이드를 합성하고 deprotection절차에 의하여 crude 펩타이드를 얻었다. 그리고 그 작용기작을 알아보기 위하여 Confocal microscopy, 인지질막 응축활성을 측정하였다.

제 3 절 기대효과

현재 우리나라에서는 펩타이드 공학기술의 중요성이 새롭게 대두되고 있으며, 여러 분야에서 새로운 펩타이드성 물질의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 따라서 본 연구의 바탕으로 기술적 측면에서 펩타이드의 설계, 합성, 정제기술의 발전을 도모할수 있으며 나아가서 펩타이드의 구조와 분석기술의 발전, 신기능 펩타이드의 설계 기술개발을 할 것으로 생각된다. 학문적으로는 항진균성 활성화에 대한 작용기작 규명, 항진균성 펩타이드 구조-기능간의 관계 정립할수 있을 것이다. 한편, 경제·산업적 측면에서 볼 때 펩타이드 공학과 관련된 신산업의 창출과 질병퇴치로 인한 국민 복지 증진 그리고 농약성 오염을 방지하여 수입농산물의 훼손방지, 환경오염의 방지 및 나아가서는 농가 소득 증대에 그 기여도가 클것으로 생각된다.

여 백

제 2장 항진균 펩타이드의 탐색 및 항진균 작용기작의 규명

제 1 절 항진균 합성펩타이드의 설계, 합성 및 항진균 작용기작 연구

1. 서론

곤충, 파충류 및 포유동물을 포함한 다양한 생물종으로부터 수종의 항균 펩타이드가 분리되고 이들의 구조가 결정되어 왔다. 초기에는 이들 항균 펩타이드는 항체를 생산하지 못하는 곤충과 같은 무척추동물의 특유의 생체방어기작으로 알려져 왔으나, 최근에 들어서 돼지의 창자에서 곤충에서 발견되는 cecropin A, cecropin B와 구조적으로 비슷한 cecropin P가 분리되어 포유류에서도 항균 펩타이드가 생체방어에 관여한다는 것이 시사되었다. 이들 항균펩타이드중에는 여러개의 Lys, Arg와 같은 염기성 아미노산으로 포함하며, 구조적으로 양쪽 친매성(amphiphatic) α -helix를 취하는 것이 많이 존재한다. 펩타이드의 양쪽 친매성은 표적세포의 인지질 이중층막과의 결합에 관련되어 있으며, 펩타이드의 양쪽 친매성에 의한 세포막상의 이온채널 또는 pore의 형성은 세포막의 막전위를 변화시키거나, 세포막을 파괴하여 결국에는 세포의 사멸에 이르게 한다.

페니실린 이후 수많은 종류의 항생제가 개발되어 생체에 외부침입의 세균을 퇴치를 위하여 사용되어왔다. 그러나 요즈음에 들어서 이들 항생제에 내성을 가지는 균주들이 등장하여 이들 내성균주를 퇴치할 수 있는 새로운 작용 메카니즘을 가지는 항생제의 개발이 시급한 실정이다. 천연에 존재하는 항균 펩타이드는 새로운 항생제의 후보물질로서 대두되고 있다. 현재 천연에 존재하는 수 많은 항균 펩타이드들을 아미노산 치환에 의하여 많은 유사체들을 합성하여, 항균활성을 증가시키려는 시도가 많았으나, 항균활성과 동시에 세포독성의 척도인 적혈구 용혈활성도 동시에 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 CA(1-8)와 magainin-2 (MA)의 아미노 말단에 해당하는 부위인 1-12를 서로 접합시킨 접합 펩타이드, CA(1-8)-MA(1-12) [CA-MA]를 설계하고, 특정부위를 다른 아미노산으로 치환시킨 유사체를 설계하고 합성하여 적혈구 용혈활성을 가지지 않으며, 강력한 항균, 항암 및 항진균을 지닌 펩

타이드 항생제를 얻으려 하였다. 항균 펩타이드의 항생 작용의 기작을 분자 레벨에서 규명하기 위하여 각종 세균, 진균 및 종양세포에서의 항균, 항진균 및 항암활성을 측정하고, 인체를 생체의 적용 가능성의 척도인 세포독성유무를 인간의 적혈구세포를 이용하여 조사하였으며, 인지질막내에 형광성 물질을 포집시킨 리포솜을 제작하여 펩타이드의 지질막의 파괴에 따른 형광물질의 방출 정도를 측정하였다. 또한 펩타이드의 생체막에서의 입체구조와 항생활성과의 상관관계를 조사하기 위하여 생체막을 모방하는 조건에서 CD 및 핵자기 공명을 이용하여, 펩타이드의 생체막 결합형의 구조를 측정하였다. 본 연구에 시도하는 기존의 항균 펩타이드를 이용한 펩타이드의 개량연구는 펩타이드성 항생제, 항균제, 항암제 개발에 직접 이용할 수 있으며, 항균 펩타이드와 지질과의 상호작용 및 구조-항생활성 상관관계 연구로부터 기존의 항균펩타이드의 항생활성을 증진시키며, 세포독성이 없으며, 강한항진균 활성을 갖는 약물을 제조할수 있을 것이다.

따라서 본 연구에서는 기존에 알려진 항균 펩타이드 구조 분석, 크기 조절 및 아미노산 치환에 의한 펩타이드의 구조와 항생활성의 상관관계, 항생활성의 작용기작의 해명, 항생활성이 증진된 새로운 항진균 펩타이드의 개발에 의하여 생물종 표적의 선택성을 유지하고 천연형의 펩타이드보다 강한 항생활성을 갖는 항생물질의 개발을 목표로 하였다. 이렇게 하여 개발된 펩타이드 항생제는 응용적으로 임상적 치료용으로도 적용 가능할것으로 여겨진다.

2. 재료 및 방법

가. 펩타이드의 설계

Magainin 2 및 CA-MA, CA-ME 접합펩타이드 그리고 시스테인을 포함한 항진균 펩타이드의 크기조절 및 특정부위의 아미노산을 성질이 다른 아미노산으로 치환시킨 유사체 펩타이드들을 설계하고 합성하였다.

나. 펩타이드의 합성 및 정제

펩타이드의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)를 아미노산의 N_{α} -amino group의 보호기(protecting group)로 사용하는 고상법(solid phase method)으로 합성하였다. 본 연구에서 설계한 펩타이드의 카르복실말단이 $-NH_2$ 형태인 펩타이드는 Rink Amide MBHA-Resin을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실말단이 $-OH$ 형태의 펩타이드는 Fmoc-아미노산-Wang Resin을 출발물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 coupling에 의한 펩타이드 chain의 연장(elongation)은 *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt)-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)법에 의하였다. 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 coupling 시킨후, 20% piperidine/*N*-methylpyrrolidone (NMP)용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 dichloromethane (DCM)으로 여러번 씻어준 다음 질소 가스로 말렸다. 여기에 TFA (trifluoroacetic acid)-phenol-thioanisole- H_2O -triisopropylsilane (85: 5: 5: 2.5: 2.5, vol./vol.) 용액을 가하고 2-3시간 반응시켜 보호기의 제거 및 resin으로 부터 펩타이드를 분리시킨 다음, diethylether로 펩타이드를 침전화 시켰다. 이렇게 하여 얻은 crude 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 acetonitrile gradient로 하여 정제형 reverse phase(RP)-HPLC column (Delta Pak, C_{18} 300Å, 15μ , 19.0 mm×30 cm, Waters)을 이용하여 정제하였다. 각 합성 펩타이드를 6N-HCl로 110°C에서 24시간 가수분해 시킨 후 잔사를 감압 농축 한 뒤, 0.02N-HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정하였다. 펩타이드의 농도는 Ile을 기준으로한 아미노산 분석의 결과로 부터 계산하였다.

다. 펩타이드의 아미노산 조성 및 분자량 확인

합성 펩타이드를 6N-HCl에 녹인후 22시간 110°C에서 가수분해하여 건조시킨후 amino acid analyzer에 의한 아미노산 조성확인을 확인하고 mass spectra에 의한 분

자랑 확인하였다

라. 펩타이드의 항진균활성 측정 및 최종 항진균펩타이드의 선정

펩타이드의 항진균 활성측정에 사용된 균주로는 병원성 진균인 *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. flavus* 및 *Aspergillus fumigatus* (KCTC) 6145를 사용하였다. 진균수는 96웰 microtiter plate에 각 웰당 2×10^3 cell가 되도록 진균을 포함한 YM배지 $100 \mu\text{l}$ 분주한 후, 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 각 웰당 $10 \mu\text{l}$ 씩 넣고, 30°C 배양기에서 24시간 방치하였다. 그리고 난후, $10 \mu\text{l}$ 의 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide] 용액 [5mg of MTT/ml of PBS (pH 7.4)]을 각각의 웰에 넣고 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. MTT에 의하여 생성된 Formazan crystal들을 용해하기 위해 0.02N HCl이 포함된 20 % SDS를 $30 \mu\text{l}$ 를 넣은 후, 37°C 에서 16시간 방치한다. 각 웰의 흡광도를 ELISA reader (Molecular Devices Emax, USA)로 570 nm에서 측정하였다.

마. Circular Dichroism (CD) 측정

펩타이드의 CD 스펙트럼은 J 720 spectropolarimeter (Jasco, Japan)를 사용하여 측정하였다. 모든 펩타이드 샘플은 분석하는 동안 25°C 를 유지 시켰다. 1mm의 pathlength cell을 사용하였으며, 샘플당 0.1 nm 간격으로 190~250 nm에서 연속적으로 4번 측정하였다. 세포막을 모방하는 조건에서 2차구조를 측정하기 위하여 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)을 포함한 50% TFE 및 30mM SDS에서 측정하였다. CD 스펙트럼의 측정을 위한 펩타이드의 농도는 $100 \mu\text{g/ml}$ 로 하였다. Mean residue ellipticity (θ)는 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 로 나타내며, $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} (\text{MRW}/10 \ell c)$ 로 나타낸다. $[\theta]_{\text{obs}}$ 는 millidegree로 측정되는 ellipticity를 의미하며, MRW는 펩타이드의 mean residue molecular weight를 의미한다. c 는 샘플의 농도(mg/ml)를 나타내고, ℓ 은 cell의 optical pathlength(cm)를 나타낸다. 펩타이드의 % α -helicity는 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\% \alpha\text{-helicity} = 100 ([\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0) / [\theta]_{222}^{100}$$

($[\theta]_{222}$ = the observed mean residue ellipticity per residue at 222nm in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. $[\theta]_{222}^0 = -3,000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ (the estimated ellipticity corresponding to a random coil structure) $[\theta]_{222}^{100} = -33,000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ (the estimated ellipticity corresponding to 100% α -helical peptide)

바. 적혈구 용혈활성의 측정

펩타이드의 세포독성은 사람의 적혈구 용혈 활성으로 측정하였다. 사람의 적혈구 (human erythrocytes)를 phosphate-buffered silane (PBS: 35 mM phosphate buffer/0.15 NaCl, pH 7.0)로 세 번 세척한다. Phosphate-buffered silane으로 희석한 8.0 % 적혈구 용액을 96-well microtiter plate에 100 μ l씩 loading한 후, 여기에 펩타이드 용액을 100 μ l씩 섞어준다. 그리고 난 후, 37 °C에서 1시간 배양하고 1000 g에서 원심분리하여 상등액만을 모았다. 414nm에서의 흡광도를 측정하여 용혈활성을 분석하였으며, 0.1% Triton X-100로 처리하였을 경우의 값을 100% 용혈도로 계산하였다. 펩타이드의 % hemolysis는 다음의 식에 의하여 계산하였다.

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{(\text{Abs}_{414\text{nm}} \text{ in the peptide solution} - \text{Abs}_{414\text{nm}} \text{ in PBS})}{(\text{Abs}_{414\text{nm}} \text{ in } 0.1 \% \text{ Triton X-100} - \text{Abs}_{414\text{nm}} \text{ in PBS})} \times 100$$

사. 항진균 작용기작의 규명

강력한 항진균활성을 가지는 선정된 합성 펩타이드를 Biotinylation시킨 후 *F. oxysporum*, *F. solani*, *A. flavus*, *A. parasticus*에 처리 한 후 Biotin antibody로 labelling 한 후, 현상을 가시화 시키기 위하여 Confocal microscopy를 사용하여 확인한다.

3. 결과 및 고찰

가. hybrid펩타이드 설계 및 합성

Cecropin A과 Magainin 2의 N-말단에 해당하는 부분을 접합시킨 CA(1-8)-MA(1-12)을 모델 펩타이드로 하여 특정부위의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시킨 7종류의 펩타이드와 Cecropin A과 Melittin의 N-말단에 해당하는 부분을 접합시킨 CA(1-8)-ME(1-12)을 모델 펩타이드로 하여 특정부위의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시킨 5종류의 펩타이드 그리고 Magainin 2의 역치환 시킨 펩타이드인 MA(10-17)MA(1-9)[MA-Inv], Magainin 2와 Melittin을 접합 시킨 MA(10-17)-ME(1-12)펩타이드를 설계하여 합성하였다. 이들 펩타이드들은 solid phase method로 합성하였으며 합성이 완료된 펩타이드는 분석형 역상 HPLC을 사용하여 단일 피크임을 확인하였으며, 펩타이드의 아미노산 조성 분석 및 정량을 위하여 6N-HCl에 의한 가수분해를 행하여 가수분해물을 아미노산 분석기(HITACHI 8500 A, Japan)에 의하여 아미노산 조성을 확인한 결과 각 합성 펩타이드의 아미노산 조성이 정확하다는 것을 확인하였다. 유도체 펩타이드는 CA(1-8)-MA(1-12)(아미노산 서열: KWKLFKKIGIGKFLHSAKKF-NH₂) 그리고CA(1-8)-ME(1-12) (아미노산 서열: KWKLFK-KIGIGAVLKVLTTG-NH₂) 의 소수성 부분의 hydrophobicity를 증가 시키거나 또는 펩타이드의 양쪽 친매성을 높이는 전략으로 설계하고 합성하였다 (Table 1).

이렇게 설계, 합성한 모델 펩타이드를 이용하여 항진균 활성을 측정하였다.

나. 합성 hybrid펩타이드의 항진균활성 및 인간 적혈구 세포에 대한 파괴능 검토

합성펩타이드의 항진균활성은 식물 병원균인 *F. oxysporum*, *F. solani*, 및 *A. flavus*, *A. fumigatus*대상으로 조사하였다. 항진균 활성은 3 μ g/ml의 농도에서 균의 생육정도를 건조균체량으로 측정하였다. 그 결과, 위의 모든 진균에 대해 항진균 활성이 높은 펩타이드로서는 CA(1-8)-MA(1-12), KWKLFKIGIGKFLHLAKKF-NH₂를 주형으로 하여 디자인한 유도체 펩타이드 중 CA- MA 의 12번 Lys을 Ala으로 치환시킨 KWKLFKKIGIGAFHLAKKF-NH₂펩타이드(CA-MA analogue 2) 그리고 CA(1-8)-ME(1-12), KWKLFKIGIGAVLKVLTTG-NH₂를 주형으로 하여 디자인한 유도체 펩타이드중 CA(1-8)-ME(1-12)의 18, 19번 Thr을 Lys으로 치환시킨

KWKLFKKIGIGAVLKVLKKG-NH₂ 펩타이드(CA-ME analogue 1)가 95-100%의 growth inhibition을 나타내었다.

Table 1. Amino acid sequences of the peptides used in this study

Peptides	Sequences
Cecropin A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQLAK-NH ₂
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS-NH ₂
Melittin	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂
CA(1-8)-MA(1-12)	KWKLFKKIGIGKFLHSAKKF-NH ₂
CA-MA analogue 1	KWKLFKKIGIGKFLHSA <u>TTF</u> -NH ₂
CA-MA analogue 2	KWKLFKKIGIG <u>A</u> FLHSAKKF-NH ₂
CA-MA analogue 3	KWKLFKKIGIGKFLH <u>L</u> AKKF-NH ₂
CA-MA analogue 4	KWKLFKKIGIG <u>A</u> FLH <u>L</u> AKKF-NH ₂
CA-MA analogue 5	KWKLFKKIGIGKFL <u>KL</u> AKKF-NH ₂
CA-MA analogue 6	KWKLF <u>A</u> KIGIGKFLH <u>L</u> AKKF-NH ₂
CA-MA analogue 7	KW <u>K</u> <u>K</u> FLKIGIGKFLH <u>L</u> AKKF-NH ₂
CA(1-8)-ME(1-12)	KWKLFKKIGIGAVLKVLTTG-NH ₂
CA-ME analogue 1	KWKLFKKIGIGAVLKVL <u>KKG</u> -NH ₂
CA-ME analogue 2	KWKLFKKIGIG <u>K</u> VLKVL <u>KKG</u> -NH ₂
CA-ME analogue 3	KWKLFKKIGIGALL <u>KAAKKG</u> -NH ₂
CA-ME analogue 4	KWKLFKKIGIGALL <u>KAAKVG</u> -NH ₂
MA(10-17)-MA(1-9)	KKFGKAFVGIGKFLHSA-NH ₂
MA(10-17)-ME(1-12)	KKFGKAFVGIGAVLKVLTTG-NH ₂

그리고 MA(10-17)-MA(1-9), KKFGKAFV GIGKFLHSA-NH₂ 펩타이드의 경우 *A. flavus* 및 *A. fumigatus*에서 각각 94.6%, 88.1%의 growth inhibition을 나타내었으나 *F. oxysporum*, 및 *F. solani*,에서는 5.9%, 19.1% growth inhibition을 나타내었다. 또 MA-ME, KKFGKAFVGIGAVLKVLTTG-NH₂ 펩타이드의 경우는 *A. flavus*, 및 *A. fumigatus*에서 각각 97.3%, 92.9%의 growth inhibition을 나타내었으며 *F. oxysporum*, 및 *F. solani*,에 대해서도 80.4%, 87.4%의 growth inhibition을 나타내었다 (Table 2).

Table 2. Antifungal activities of the hybrid peptides and its analogues

Peptides	% growth inhibition at 3 μ g/ml of peptide			
	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>
Cecropin A	32.5	22.0	0	16.4
Magainin 2	48.7	52.4	31.4	58.8
Melittin	99.3	100	100	96.9
CA(1-8)-MA(1-12)	75.7	73.9	76.7	66.7
CA-MA analogue 1	0	0	0	1.6
CA-MA analogue 2	100	100	94.2	85.8
CA-MA analogue 3	43.3	29.6	17.7	19.1
CA-MA analogue 4	34.4	26.2	72.6	69.9
CA-MA analogue 5	54.1	47.3	37.5	60.4
CA-MA analogue 6	98.3	88.1	78.5	76.2
CA-MA analogue 7	73.0	81.0	53.0	50.8
CA(1-8)-ME(1-12)	75.7	74.9	67.0	66.7
CA-ME analogue 1	89.2	93.3	80.4	74.7
CA-ME analogue 2	64.9	54.8	60.8	79.4
CA-ME analogue 3	75.7	64.3	72.6	69.9
CA-ME analogue 4	37.9	31	31.4	68.8
MA(10-17)-MA(1-9)	94.6	88.1	5.9	19.1
MA(10-17)-ME(1-12)	97.3	92.9	80.4	87.4

한편 이렇게 합성 설계한 hybrid peptide의 항진균 활성과 더불어 펩타이드의 세포 독성의 척도인 인간 적혈구 용혈활성에 대한 세포용혈활성에 대하여 조사하였다. 펩타이드를 200 μ g/ml투여 하였을 때 % hemolysis로 나타내었다. 펩타이드의 hydrophobicity를 증가시키면 % hemolysis도 증가하는 경향을 보였다 (Table 3).

Table 3. Hemolytic activities of the peptides

Peptides	% Hemolysis (200 μ g/ml)
Cecropin A	0.2
Magainin 2	0.1
Melittin	100
CA(1-8)-MA(1-12)	0.2
CA-MA analogue 1	18.1
CA-MA analogue 2	0.5
CA-MA analogue 3	2.0
CA-MA analogue 4	39.3
CA-MA analogue 5	24.6
CA-MA analogue 6	20.0
CA-MA analogue 7	38.6
CA(1-8)-ME(1-12)	14.1
CA-ME analogue 1	1.0
CA-ME analogue 2	1.5
CA-ME analogue 3	0.1
CA-ME analogue 4	0.8
MA(10-17)-MA(1-9)	0
MA(10-17)-ME(1-12)	0

이상의 연구에서 적혈구 용혈활성의 세포독성이 비교적 낮고 항진균활성이 높은 CA(1-8)-MA(1-12) 펩타이드의 유사체인 KWKLFKKIGIGAFHLAKKF-NH₂ 펩타이드(CA-MA analogue 2) 및 CA(1-12)-ME(1-12) 펩타이드 중 CA-ME의 18, 19번 Thr을 Lys으로 치환시킨 KWKLFKKIGIGAVLKVLKKG-NH₂ 펩타이드(CA-ME analogue 1) 그리고 MA-ME (KFKGKAFVGIGAVLKVLTTG-NH₂) 펩타이드를 설계할 수가 있었다. 이상과 같은 결과를 가지고 강력한 항진균활성을 가지는 putative candidate를 선정하였다.

다. CA-MA, CA-ME Hybrid 펩타이드의 항진균 작용기작의 규명

다음으로 선정된 펩타이드들의 항진균 기작을 규명하기 위하여 여러 가지 실험을 하였다. 먼저 CA-MA 의 12번 Lys을 Ala으로 치환시킨 KWKLFFKIGIG-AFLHLAKKF-NH₂펩타이드(CA-MA analogue 2) 그리고 CA(1-8)-ME(1-12), KWKLFFKIGIGAVLKVLTTG-NH₂를 주형으로 하여 디자인한 유도체 펩타이드중 CA-ME의 18, 19번 Thr을 Lys으로 치환시킨 KWKLFFKIGIGAVLKVLKKG-NH₂펩타이드(CA-ME analogue 1) 유사체 펩타이드를 항진균 작용기작을 밝히는 대상 펩타이드로 선정하였다.

먼저, 위의 펩타이드를 이용하여 곰팡이의 세포막에 어떻게 작용하는지를 알아보기 위하여 병원성 진균인 *T. beigelii*의 protoplast를 Novozyme 234와 Celullase를 5 mg/ml의 농도로 3시간 동안 30°C에서 처리하여 세포벽을 제거한 후, 0.8M NaCl과 10mM CaCl₂를 포함한 50mM Tris-HCl 완충용액에 넣은 후 700Xg에서 원심분리하여 protoplast를 각각 분리하였다. 먼저 CA-MA analogue 2와 CA-ME analogue 1 펩타이드를 *T. beigelii*의 protoplast에 처리한 후, 그 형태적인 변화 및 세포벽 재생능을 알아보았다. 위에서 제조한 protoplast에 펩타이드를 10µg/ml의 농도로 처리한 후, 0.8M NaCl이 함유된 YM soft agar에서 4일간 재생 시켰다. 세포벽의 재생능은 다음과 같은 공식으로 계산하였다.

Frequency of regeneration : [(number of colonies on plate)/(number of protoplast cells used)]X100

그 결과 선정된 유사체 펩타이드를 처리한 protoplast는 0.8M NaCl이 함유된 YM soft agar에서 거의 재생되지 않은 것으로 나타났다 (Table 4). 아마 유사체 펩타이드가 protoplast의 재생에 손상을 주는 것으로 생각되어진다. 이러한 사실을 가시화하기 위하여 아래의 실험을 진행하였다.

Table 4. The effect of the peptides on the regeneration of protoplast of *T. beigelii*

Peptides	Frequency of regeneration
Control ^a	76.24
Cecropin A	69.26
CA-MA analogue 2	5.4X10 ⁻¹
CA-ME analogue 1	6.2X10 ⁻¹

또한 펩타이드에 의한 protoplast의 형태적인 변화는 펩타이드를 30℃에서 3시간 처리 후 현미경으로 그 형태의 변화를 관찰한 결과, 우리가 선정한 펩타이드에 의해 세포막이 파괴가 되는 것을 관찰 할 수가 있었다 (Fig. 3) (*J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* Vol 2 243-248, 1999). 한편 선정된 유사체 펩타이드에 Biotin을 붙여서 Streptavidin FITC 형광 물질을 붙여서 그 항진균 작용 위치를 알아보려고 *Aspergillus*속과 *T. beigelii*를 대상으로 실험하였다.

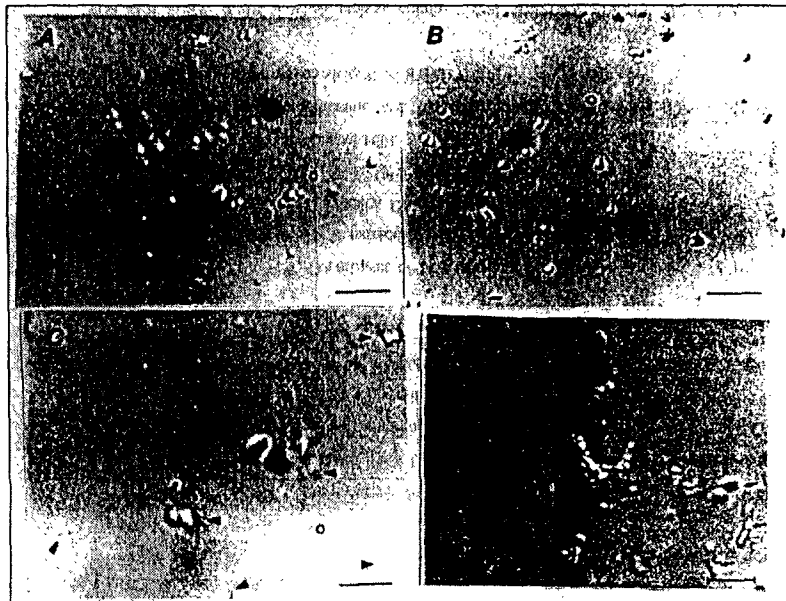


Figure 1. Morphological effects on the protoplasts of *T. beigelii*. A bar equals 10 μ m. A : No peptide, B : cecropin A, C ; CA-MA analogue 2, D : CA-ME analogue 1

그 결과 yeast와 filamentous fungi의 경우 세포표면에 signal이 나타나는 것으로 보아 세포막의 파괴에 의한 항진균 활성을 나타내는 것으로 생각되어진다 (Fig. 2, 3). 이상의 결과로 보아 본 연구에서 설계한 선정 펩타이드의 경우 진균의 세포막을

target로 하여 그 항진균 활성을 나타내는 것으로 생각된다.

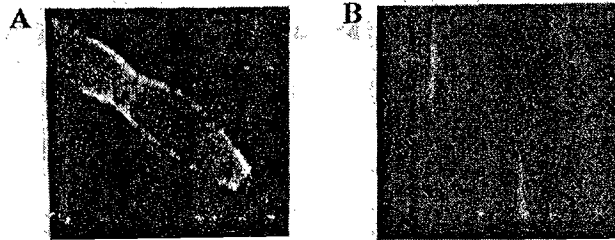


Figure 2. Distribution of CA-ME analogue 1 in *T. beigelii* as visualized by confocal laser scanning microscopy

A: *T. beigelii* cells were incubated with biotinylated CA-ME analogue 1

B: *T. beigelii* cells were incubated with biotinylated Cecropin A

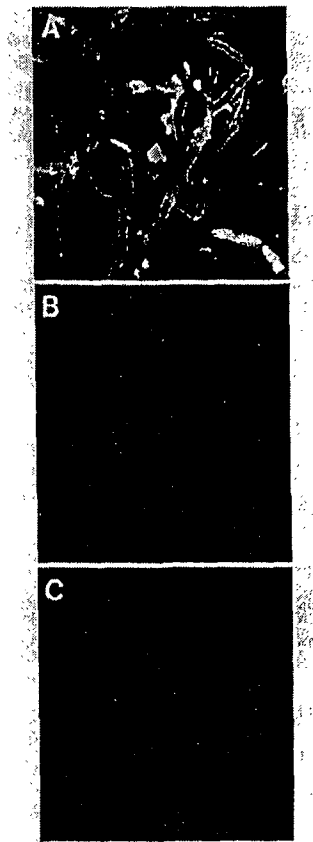


Figure 3. Distribution of CA-ME analogue 1 in *Aspergillus fumigatus* as visualized by confocal laser scanning microscopy

- A: *A. fumigatus* cells were incubated with biotinylated CA-ME analogue 1
- B: *A. fumigatus* cells were incubated with biotinylated CA
- C: *A. fumigatus* cells were incubated without peptide treatment

라. 세포막을 mimic하는 조건에서의 CA(1-8)-MA(1-12) 및 analogues의 2차구조 해석

CA(1-8)-MA(1-12)의 구조와 항진균 활성과의 상관관계를 조사하기 위하여 CD spectra로 펩타이드의 2차구조를 측정하였다. CD 측정시 펩타이드의 농도는 100 μ g/ml로 하였으며, 세포막을 mimic하는 상태인 50% trifluoroacetic acid(TFE) 및 30mM sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액상에서 측정하였다 (Fig. 4). 펩타이드의 α -helicity는 다음의 계산식에 의하여 계산하였다. 아래의 계산식에 의하여 계산된 α -helicity를 아래의 Table 5에 나타내었다.

$$\% \alpha\text{-helicity} = 100 ([\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0) / [\theta]_{222}^{100}$$

$[\theta]_{222}$: 222nm 에서의 observed mean residue ellipticity

$[\theta]_{222}^0$: 0% α -helicity일때의 측정값 (-2,000 deg·cm²/dmol)

$[\theta]_{222}^{100}$: 100% α -helicity일때의 측정값 (-30,000 deg·cm²/dmol)

Table 5. Percentage α -helicity of the peptides in various media deduced from CD spectra

Peptides	phosphate buffer	50% TFE	30mM SDS
CA(1-8)-MA(1-12)	0.7	55.9	16.9
Analogue 1	6.0	70.0	26.2
Analogue 2	5.1	52.5	30.7
Analogue 3	4.5	76.0	32.3
Analogue 4	2.6	90.7	84.9
Analogue 5	2.9	54.6	31.8
Analogue 6	3.0	53.8	29.6
Analogue 7	2.7	69.6	63.0

CA(1-8)-MA(1-12)의 18, 19번째의 Lys잔기를 Thr로 바꾼 유도체(analogue 1)는 세포막을 mimic하는 조건인 30mM SDS상에서도 α -helicity의 변화가 없음 [CA(1-8)-MA(1-12): 16.9 %, Analogue 1: 26.2 %]에도 불구하고 항진균 활성에 사용한 Table 1에서의 진균에서 현저한 활성의 저하를 보였다. 또한 펩타이드의 각 진균에 대한 % growth inhibition과 % α -helicity와의 상관관계를 regression line(Fig. 5)으로 조사하여 본 결과, 펩타이드의 % α -helicity와 항진균 활성과는 상관관계가 없음을 알았다. 따라서 amphipathic α -helical 펩타이드의 항진균 활성에는 α -helical structure는 필수적이지만 α -helicity가 증가에 비례하여 항진균 활성이 증가하는 비례 관계는 성립하지 않음을 알았다.

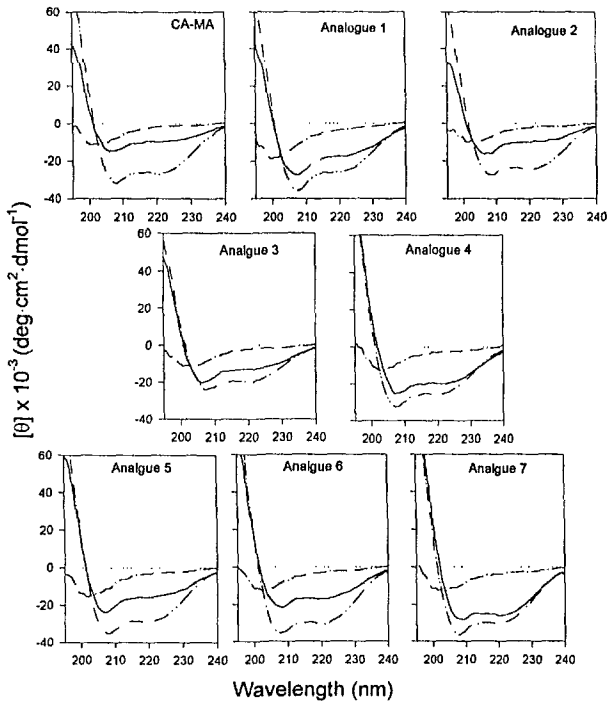


Figure 4. CD spectra of CA-MA and its analogues.

10mM sodium phosphate, pH 7.2 (—), 50% TFE/10mM sodium phosphate, pH 7.2 (— —) 30mM SDS/10mM sodium phosphate, pH 7.2 (— · —)

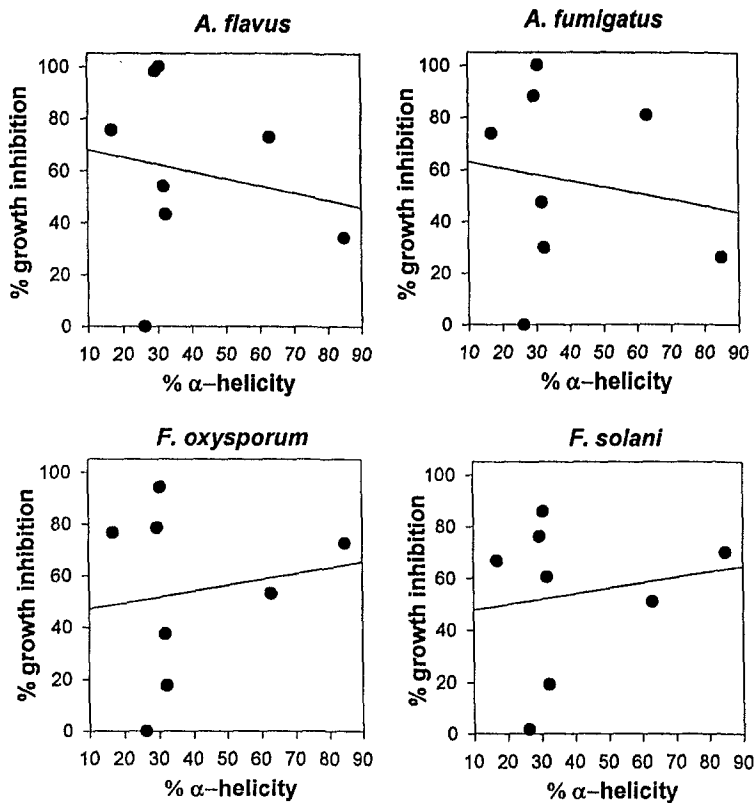


Figure 5 Regression lines for % growth inhibition against fungi versus % α -helicity of the peptides

마. 식물에 감염된 상태에서의 항진균활성 검사

CA-MA 의 12번 Lys을 Ala으로 치환시킨 KWKLFFKIGIGAFLLAKKF-NH₂펩타이드(CA-MA analogue 2) 그리고 CA(1-8)-ME(1-12), KWKLFFKIGIGAVLK VLTTG-NH₂를 주형으로 하여 디자인한 유도체 펩타이드중 CA-ME의 18, 19번 Thr을 Lys으로 치환시킨 KWKLFFKIGIGAVLKVLKKG-NH₂펩타이드(CA-ME analogue 1) 유사체 펩타이드를 가지고서 타바코식물의 잎에 *F. oxysporum*이 감염된 상태에서의 항진균 활성을 검토하였다.

먼저 선정된 펩타이드를 이용하여 타바코 식물의 잎에 상처를 내고 병원성 곰팡이인 *F. oxysporum*을 감염 시키는 단계에서 펩타이드를 100µg/ml의 농도로 상처난 부위에 곰팡이 와 같이 처리 하였다. 그리고 3일이 지난 단계에서 그 잎의 감염 여부를 관찰 함으로서 항진균 활성을 In vivo상태에서 관찰하였다. 그 결과 CA-MA analogue 2 와 CA-ME analogue 1을 처리한 잎에서는 곰팡이의 감염 여부가 관찰 되지 않은 것으로 보아 본 연구에서 선정된 펩타이드가 In vivo상태에서도 강한 항진균 활성을 나타내는 것을 확인 할 수가 있었다 (Fig 6). 이러한 결과를 볼 때, 앞으로 항진균 펩타이드의 개발에 있어서 좋은 모델이 될 수 있을 것으로 생각된다.

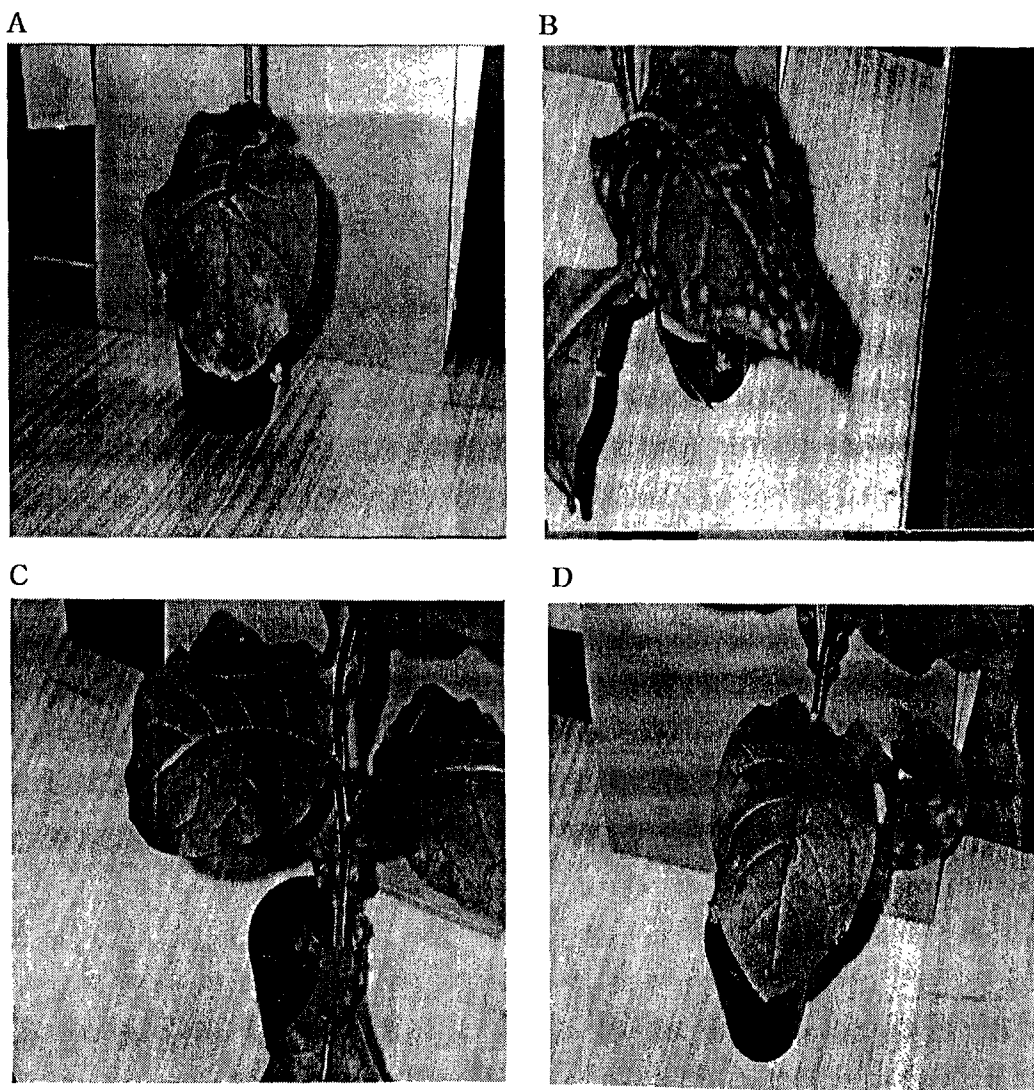


Fig 6. Antifungal activity of antifungal peptides against tobacco plant
A: Control, B: Cecropin A, C: CA-MA analogue 2, D: CA-ME analogue 1

제 2 절 미생물 유래의 항진균성 펩타이드의 분리 및 항진균 활성조사

1. 서론

최근 병원성 진균에 대해 좀더 효과적이고 세포독성이 없는 천연물성 항진균 물질에 대한 분리에 많은 연구분야에서 흥미를 가지고 있다. 그 중 항진균 펩타이드에 대한 분리연구가 많은 비중을 차지하고 있는 실정이다. 현재까지 포유동물, 곤충, 식물 등에서 α -defensin, β -defensin, Protegrins, IB-AMP, Thanatin 등과 같은 많은 종류의 항진균 펩타이드가 분리되었다. 그러나 미생물 즉 진균에서 분리된 항진균 펩타이드는 2종류가 있으며, 그 중 하나는 *Aspergillus giganteus*에서 분리된 51개의 아미노산으로 구성된 것이 그것이며, 다른 하나는 페니실린의 생산균주로 알려진 *Penicillium chrisogenum*에서 분리된 55개의 아미노산으로 구성된 항진균 펩타이드가 그것이다. 이러한 항진균 펩타이드는 숙주방어작용에 중요한 역할을 담당할 것이라고 생각된다. 본 연구에서는 우리나라의 전통식품에 많이 사용되어지고 있는 사상균인 *Aspergillus niger*에서 새로운 항진균 펩타이드의 분리를 시도하였으며, 이러한 항진균 펩타이드는 앞으로 새로운 항진균제로서의 실질적인 그 역할을 할 것으로 생각된다.

2. 재료 및 방법

가. *Aspergillus niger*에서 새로운 항진균 polypeptide의 분리

먼저 *Aspergillus niger*를 5 l YPD배지(glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5%, pH 5.5)에 접종한 후, 진탕배양을 28°C에서 5일간 배양하였다 (교반속도 140rpm). 그 후 배양액을 Ultrafiltration하여 균체와 그 상등액을 분리하였으며, 분리한 상등액을 pH가 중성으로 되게 1M Tris-HCl pH7.0 완충용액으로 조정을 하였다. 이렇게 처리한 sample을 다시 Amicon(MW 10,000 cut off)으로 농축을 하였다. 이렇게 농축된 상등액을 CM-sepharose column (2.3 X 20cm) equilibrated with 50mM Tris-HCl, pH 7.0에 통과시킨 후, NaCl gradient를 0에서 1M의 농도로 elution하여 분자량 약 10,000정도의 polypeptide를 분리하였으며, 이렇게 분리한 물질을 동결 건조하여 역상 HPLC로 분리 한 결과, 항진균활성을 가지는 단일 peak의 물질을 분리 할 수가 있었다.

나. 항진균 polypeptide의 항진균 활성측정

polypeptide의 항진균 활성측정에 사용된 균주수는 96웰 microtiter plate에 각 웰당 2×10^3 cell가 되도록 진균을 포함한 YM배지 100 μ l 분주한 후, 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 각 웰당 10 μ l씩 넣고, 30°C 배양기에서 24시간 방치하였다. 그리고 난후, 10 μ l의 MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide] 용액 [5mg of MTT/ml of PBS (pH 7.4)]을 각각의 웰에 넣고 37°C 배양기에서 4시간 동안 배양하였다. MTT에 의하여 생성된 Formazan crystal들을 용해하기 위해 0.02N HCl이 포함된 20 % SDS를 30 μ l를 넣은 후, 37 °C에서 16시간 방치한다. 각 웰의 흡광도를 ELISA reader (Molecular Devices Emax, USA)로 570 nm에서 측정하였다.

다. Circular Dichroism (CD) 측정

펩타이드의 CD 스펙트럼은 J 720 spectropolarimeter (Jasco, Japan)를 사용하여 측정하였다. 모든 펩타이드 샘플은 분석하는 동안 25°C를 유지 시켰다. 1mm의 pathlength cell을 사용하였으며, 샘플당 0.1 nm 간격으로 190~250 nm에서 연속적으로 4번 측정하였다. 세포막을 모방하는 조건에서 2차구조를 측정하기 위하여 10 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)을 포함한 50% TFE 및 30mM SDS에서 측정하였다. CD 스

펙트럼의 측정을 위한 펩타이드의 농도는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 하였다. Mean residue ellipticity (θ)는 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ 로 나타내며, $[\theta] = [\theta]_{\text{obs}} (\text{MRW}/10 \ell c)$ 로 나타낸다. $[\theta]_{\text{obs}}$ 는 millidegree로 측정되는 ellipticity를 의미하며, MRW는 펩타이드의 mean residue molecular weight를 의미한다. c 는 샘플의 농도(mg/ml)를 나타내고, ℓ 은 cell의 optical pathlength(cm)를 나타낸다. 펩타이드의 % α -helicity는 다음식에 의하여 계산하였다.

$$\% \alpha\text{-helicity} = 100 ([\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0) / [\theta]_{222}^{100}$$

($[\theta]_{222}$ = the observed mean residue ellipticity per residue at 222nm in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$. $[\theta]_{222}^0 = -3,000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ (the estimated ellipticity corresponding to a random coil structure) $[\theta]_{222}^{100} = -33,000 \text{ deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$ (the estimated ellipticity corresponding to 100% α -helical peptide)

3. 결과 및 고찰

가. 미생물 유래의 새로운 항진균 펩타이드의 분리

미생물 유래의 천연형 항진균 펩타이드를 분리하기 위하여 *Aspergillus niger*로부터 항진균성 저분자물질(AFP : Antifungal Protein)의 분리를 시도 하였다. 우선 *Aspergillus niger*를 5 l YPD배지(glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5%, pH 5.5)에 접종한 후, 진탕배양을 28℃에서 5일간 배양하였다 (교반속도 140rpm). 그 후 배양액을 Ultrafiltration하여 균체와 그 상등액을 분리하였으며, 분리한 상등액을 pH가 중성으로 되게 1M Tris-HCl pH7.0 완충용액으로 조정을 하였다. 처리한 sample을 다시 Amicon (MW 30,000 cut off)으로 농축을 하였다. 농축된 상등액을 CM-sepharose column (2.3 X 20cm) equilibrated with 50mM Tris-HCl, pH 7.0에 통과시킨 후, NaCl gradient를 0에서 1M의 농도로 elution하였다 (Fig 1). 이상과 같이 분리한 물질을 동결 건조하여 역상 HPLC로 분리 한 결과, 단일 peak의 물질을 분리 할 수가 있었다 (Fig 2). 이렇게 분리한 펩타이드를 Tricin전기영동상에서 확인 하였다 (Fig 3). 그 결과 단일 저분자 물질임을 확인 할 수가 있었다.

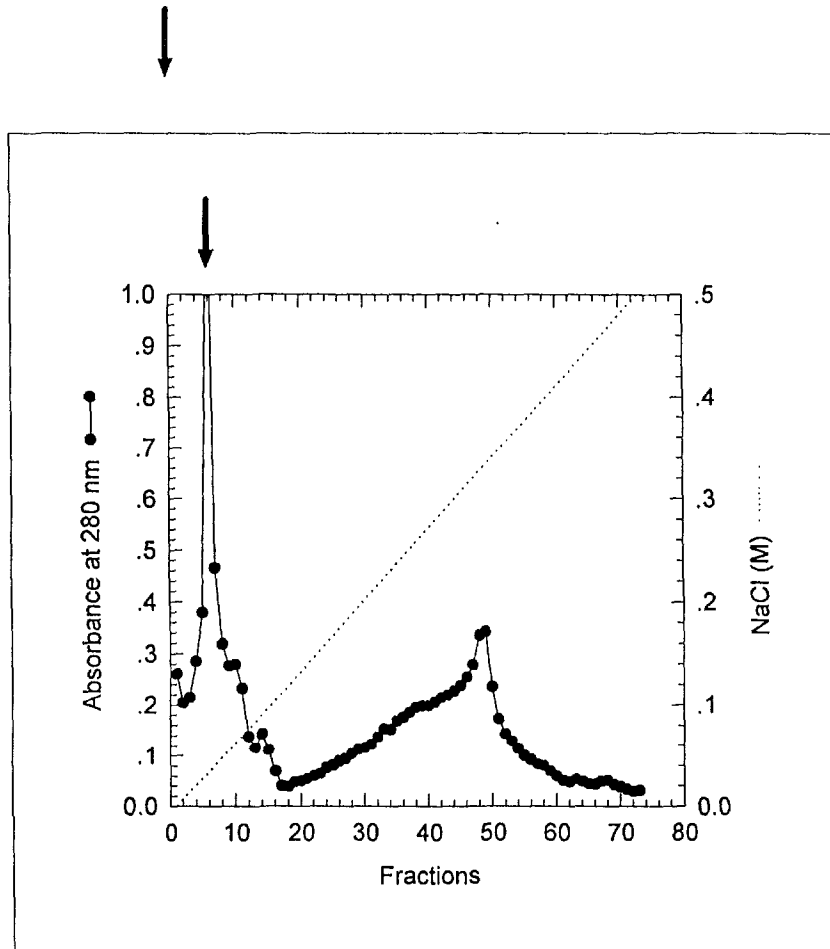


Figure 1. CM-Sepharose elution profile of *A. niger* culture supernatant
 The filtered culture supernatants were loaded onto the CM-Sepharose column (2.3 X 20cm) equilibrated with 50mM Tris-HCl, pH 7.0. After extensive washing with same buffer, proteins were eluted with 400-ml of linear gradient from 0 to 1.0M NaCl.

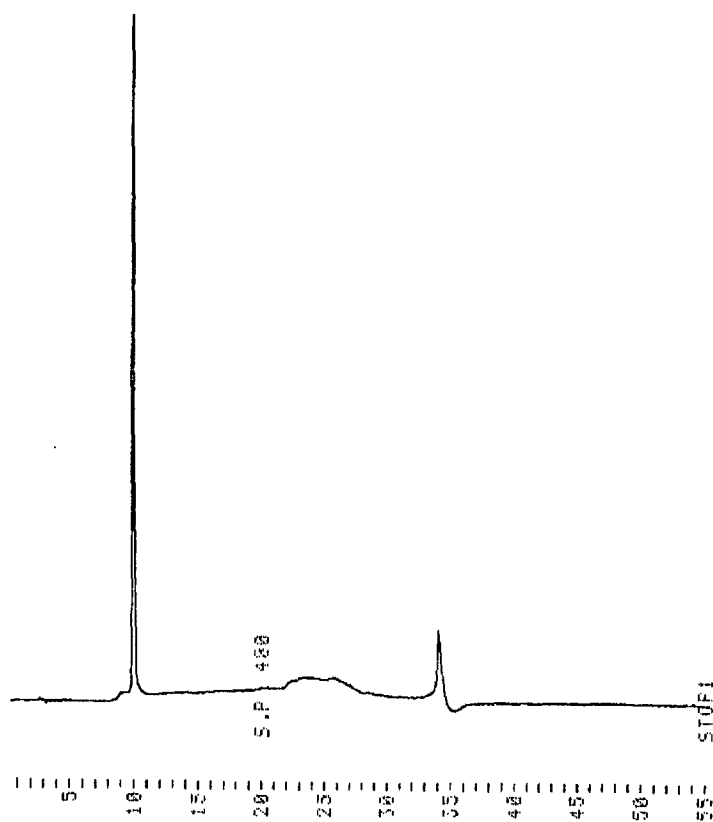


Figure 2. Isolation of AFP from *A. niger* culture supernatant using C₁₈ reverse phase HPLC

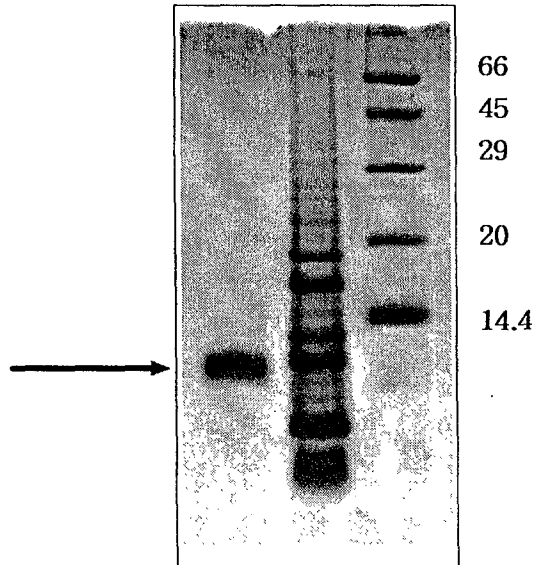


Figure 3. C₁₈ RP-HPLC eluted peak was resolved in Tricine gel

Lane 1 : peak fraction; Lane 2 : peptide marker; Lane 3 : low molecular weight marker

분리한 펩타이드성 물질을 *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *T. beigellii*, 등의 진균을 대상으로 그 활성을 측정 한 후, 각진균들의 MIC (Minimal inhibitory concentrations) 값을 구할 수가 있었다 (Table 4).

Table 4. Minimal inhibitory concentrations (MIC) of Antifungal protein against various fungi

Microorganism	MIC(μ M)
<i>A. flavus</i>	8
<i>A. fumigatus</i>	4-8
<i>F. oxysporum</i>	8-15
<i>F. solani</i>	8
<i>T. beigelii</i>	8-15
<i>C. albicans</i>	8-15
<i>S. cerevisiae</i>	8

이렇게 분리 정제한 항진균성 단백질의 아미노말단의 서열을 확인한 결과 46개의 잔기를 확인 할 수가 있었다 (Table 5). 본 단백질의 정확한 분자량을 알아 보기 위하여 MALDI-MS로 확인한 결과 분자량이 6582.63으로 나타났다 (Fig. 4). 또한 이 단백질의 전 서열을 밝히기 위하여 분리, 정제한 단백질을 endopeptidase Glu-C(Fig. 5)와 trypsin(Fig. 6)을 1:25(W/W)비율로 효소 처리를 한 다음 펩타이드 단편을 역상 HPLC로 분리 정제 한 후, Applied Biosystems 476A protein sequencer로 아미노산 서열 분석을 하였다. 그 결과 시스테인 6개를 포함한 58개의 아미노산으로 구성된 단백질임을 확인 할 수가 있었다 (Fig. 7).

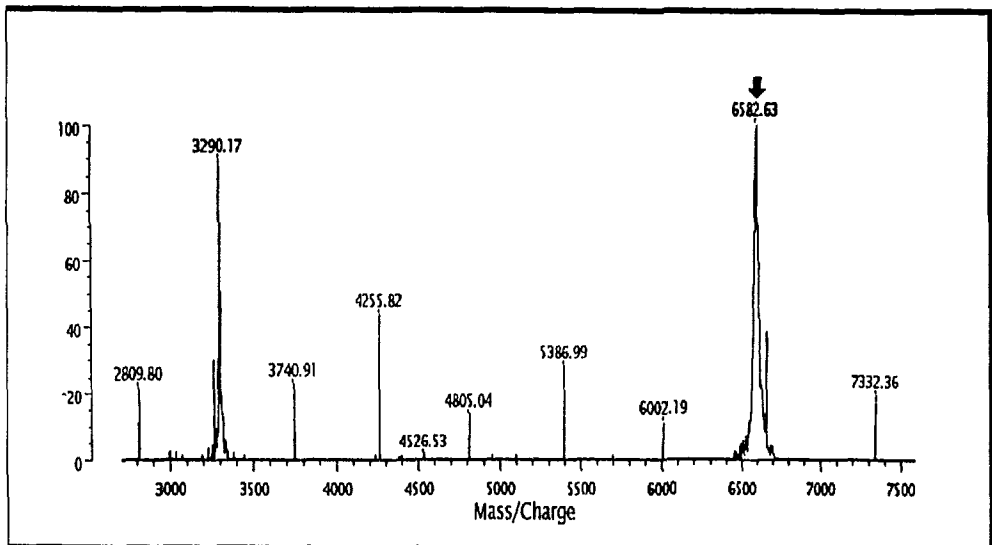


Figure 4. MALDI mass spectra of the purified antifungal protein.

The arrow shows the molecular weight(6582.6) of purified antifungal protein.

This value confirmed to be correct the result calculated from amino acid sequence analysis.

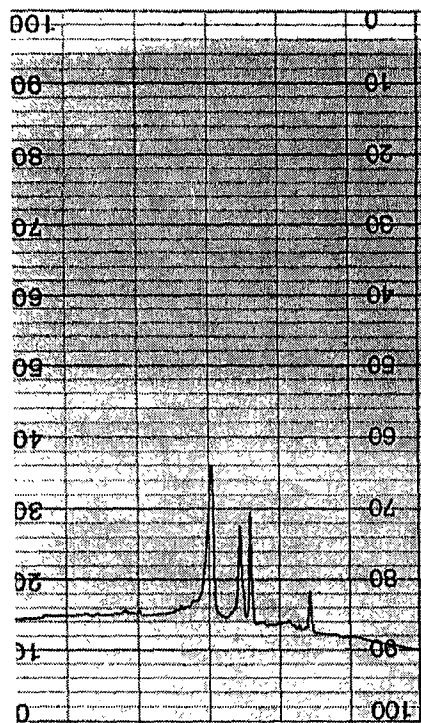


Figure 5. Isolation of AFP digested sample by endopeptidase Glu-C using C₁₈ reverse phase HPLC

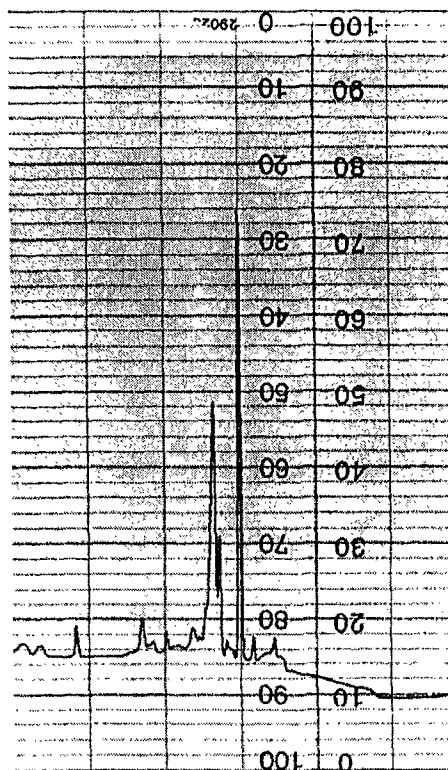


Figure 6. Isolation of AFP digested sample by Trypsin using C₁₈ reverse phase HPLC

Table 5. Automated sequence analysis of Antifungal protein

Cycle no.	PTH-derivatives	Yield (pmol)	Cycle no.	PTH-derivatives	Yield (pmol)
1	Leu	281.4	26	Val	104.0
2	Ser	15.1	27	Ser	6.6
3	Lys	277.4	28	Cam-Cys	ND
4	Tyr	188.7	29	Pro	41.6
5	Gly	304.2	30	Ser	5.3
6	Gly	301.4	31	Ala	31.7
7	Glu	214.3	32	Ala	49.7
8	Cam-Cys ^{a)}	ND ^{b)}	33	Asn	35.3
9	Ser	27.8	34	Leu	26.0
10	Leu	3.8	35	Arg	43.8
11	Glu	156.9	36	Cam-Cys	ND
12	His	109.0	37	Lys	55.0
13	Asn	134.2	38	Thr	23.0
14	Thr	32.0	39	Asp	23.5
15	Cam-Cys	ND	40	Arg	25.5
16	Thr	29.0	41	His	25.2
17	Tyr	96.5	42	His	23.0
18	Arg	109.2	43	Cam-Cys	ND
19	Lys	235.7	44	Glu	7.6
20	Asp	79.5	45	Tyr	70.8
21	Gly	72.2	46	Asp	20.7
22	Lys	259.8			
23	Asn	75.2			
24	His	62.8			
25	Val	69.2			

^a Cam-Cys: Carboxyamidomethyl cysteine.

^b ND, not determined.



Figure 7. Amino acid sequencing strategy of Antifungal protein.

The direct sequence was determined by automated Edman degradation without fragment. T(T1-T9) and G(G1-G4) denote the peptides derived from trypsin and endopeptidase Glu-C digestions, respectively.

이상의 결과를 토대로 분리된 항진균단백질의 전아미노산 서열의 결과를 비교 검토하여 보면 이미 보고된 바 있는 미생물 유래의 AFP중 *Aspergillus giganteus*에서 밝혀진 AFP와 *Penicillium chrysogenum*에서 분리된 AFP와 비슷한 유형, 즉 cystein의 위치가 같으며 상동적인 부위가 많다는 결과를 얻을 수가 있었다 (Fig 8).

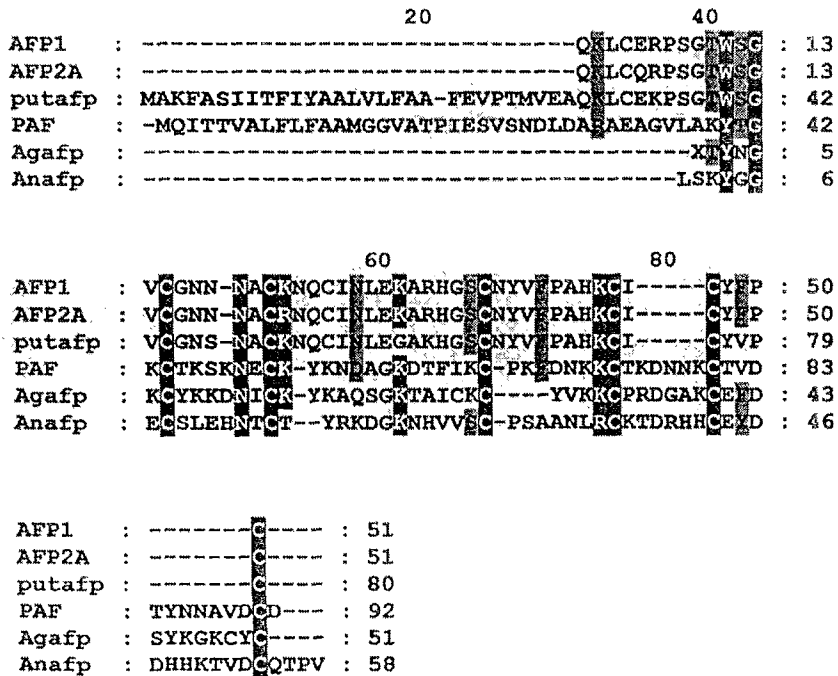


Figure 8. Sequence comparison of antifungal peptide and various antifungal protein. *Dark boxes* show the conserved sequences, and *shade boxes* indicate similar residues. AFP1 and AFP2A: *Sinapis alba*, putaftp : *Arabidopsis thaliana*, PAF : *Penicillium chrysogenum*, Agafp : *Aspergillus giganteus*.

이러한 결과를 놓고 볼 때, *Aspergillus niger*에서 분리한 AFP는 이미 보고된 AFP의 유사적인 펩타이드로 생각되어지며, 이러한 결과는 학문적으로도 새로운 가치가 있을 것으로 생각되어진다 (대한민국 특허 출원 : 10-1999-0009957). 이것을 다른 진균 유래의 항진균 펩타이드와 비교한 결과 새로운 항진균 펩타이드로 판명되었다 (*Biochem. Biophys. Res. Communi.* 263(3) 646-651, 1999). 우선 이 펩타이드의 구조 분석을 위하여 CD spectra로 펩타이드의 2차구조를 측정하였다. CD 측정시 펩타이드의 농도는 100 $\mu\text{g/ml}$ 로 하였으며, 세포막을 mimic하는 상태인 50% trifluoroacetic acid(TFE) 및 30mM sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액상에서 측정하였다 (**Fig. 9**). 펩타이드의 % α -helicity는 다음의 계산식에 의하여 계산하였다.

$$\% \alpha\text{-helicity} = 100 ([\theta]_{222} - [\theta]_{222}^0) / [\theta]_{222}^{100}$$

$[\theta]_{222}$: 222nm 에서의 observed mean residue ellipse

$[\theta]_{222}^0$: 0% α -helicity일때의 측정값 (-2,000 deg·cm²/dmol)

$[\theta]_{222}^{100}$: 100% α -helicity일때의 측정값 (-30,000 deg·cm²/dmol)

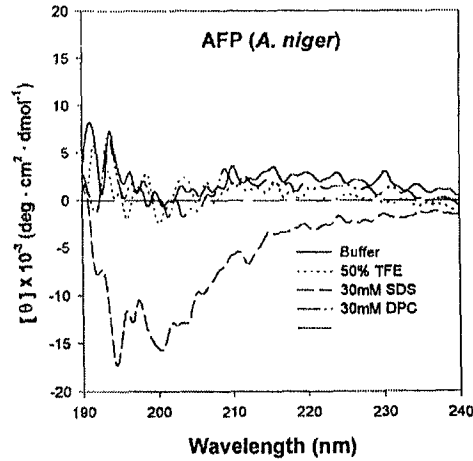


Figure 9. CD spectra of antifungal peptide isolated from *A. niger*

2차 구조분석의 결과 본 펩타이드는 기존의 antimicrobial peptide와는 달리 α -helix구조나 β -sheet구조는 나타나지 않았다.

다음으로 *A. niger*의 염색체 상에서 본 펩타이드의 유전자 검색을 위하여 전 염색체를 분리하였다. 우선 *A. niger*를 5 l YPD배지(glucose 2%, peptone 1%, yeast extract 0.5%, pH 5.5)에 접종한 후, 진탕배양을 28°C에서 3일간 배양하였다 (교반속도 140rpm). 그 후, 균체와 그 상등액을 분리하였으며, 분리한 균체를 물리적으로 파쇄하여 전 염색체를 분리 하였다. 한편 분리한 염색체를 주형으로 하여 PCR을 수행하기 위하여 분리한 펩타이드의 전 아미노산 서열로부터 N말단과 C말단에서 각각 21mer의 primer를 제작하였다.

5'

Leu Ser Lys Tyr Gly Gly Glu
TTATCAAAGTACGGTGGAGAG

3'

Val Pro Thr Gln Cys Asp Val
CAAGGTTGCGTTACACGTCAG

이렇게 제작한 primer를 가지고 PCR을 수행한 결과 약 200bp의 single band를 확인하였다 (Fig. 10).

200bp는 항진균 단백질의 coding region이 포함되어 있을 것으로 생각되어지며 앞으로 promotor region을 확인하고자 한다.



Figure 10. Analysis of antifungal peptide gene by PCR

위의 PCR product를 elution하여 이것을 southern hybridization을 할 때 probe로 사용하였다. 먼저 *A. niger*로 부터 전 염색체를 분리하였으며 total chromosomal DNA를 *Pst* I, *Sal* I, *Hind* III, *Eco*R I등 4종류의 제한효소로 자른 후, 이것을 주형으로 southern hybridization을 하였다 (Fig. 11). 그 결과 *pst* I으로 절단한 chromosomal DNA상에서 약 2Kb 지점에서 signal band를 확인 할 수가 있었으며 이것은 peptide 서열의 크기와 비교해 볼 때 정확한 유전자의 존재를 확인 할 수가 있었다.

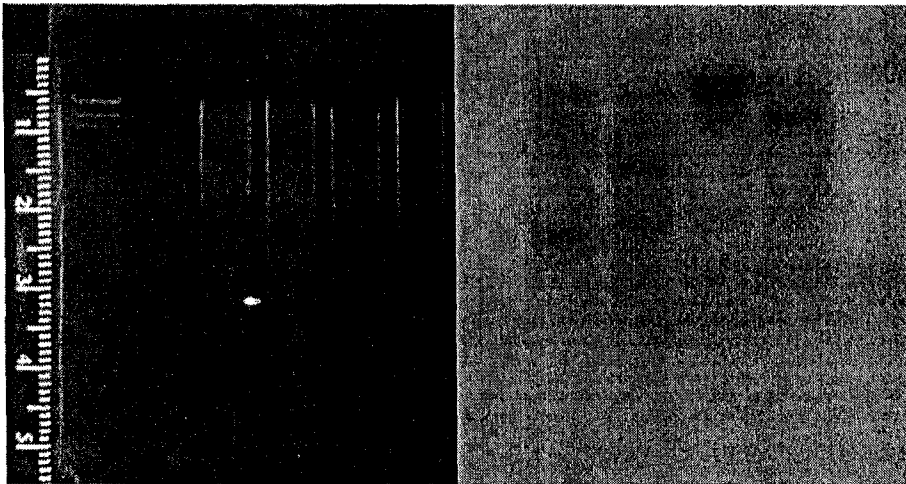


Figure 11. Southern hybridization of antifungal peptide chromosomal gene
Lane 1 : *Pst*I, Lane 2 : *Sal* I, Lane 3 : *Hind* III, Lane 4 : *EcoR* I,

제 3 절 시스테인을 포함한 항진균성 펩타이드의 항진균 활성조사

1. 서론

현재까지 밝혀진 많은 종류의 항진균 펩타이드는 그 구조적인 특징과 항진균활성과의 상관관계에 대해서 그다지 밝혀지지 않고 있다. 그 중 펩타이드의 서열상에서 시스테인이 포함된 경우 이 시스테인 잔기에 의해서 disulfide bridge가 형성되며 이러한 구조적인 특징이 항진균 활성에 미치는 기초적인 연구가 앞으로 항진균 펩타이드를 개발함에 있어서 중요시 되고 있는 분야로 대두되고 있다.

본 연구에서는 *Aspergillus giganteus*에서 분리된 51개의 아미노산으로 구성된 항진균 펩타이드와 *Impatiens balsamina*라는 식물에서 분리된 시스테인을 포함한 20개의 아미노산으로 구성된 항진균 펩타이드로 알려진 Ib-AMP1이라는 펩타이드를 설계한 펩타이드를 Fmoc-아미노산을 이용한 고상법에 의하여 각 펩타이드의 보호 펩타이드를 합성하여 그 구조와 항진균 활성과의 상관관계 및 항진균 작용기작에 대해 알아보았다. 이러한 연구는 앞으로 항진균 합성 펩타이드의 개발에 있어서 중요한 기초적 연구가 될것으로 생각된다.

2. 재료 및 방법

가. 펩타이드의 합성

펩타이드의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)를 아미노산의 N_α -amino group의 보호기(protecting group)로 사용하는 고상법(solid phase method)으로 합성하였다. 본 연구에서 설계한 펩타이드의 카르복실말단이 $-NH_2$ 형태인 펩타이드는 Rink Amide MBHA-Resin을 출발물질로 사용하였으며, 카르복실말단이 $-OH$ 형태의 펩타이드는 Fmoc-아미노산-Wang Resin을 출발물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 coupling에 의한 펩타이드 chain의 연장(elongation)은 *N*-hydroxybenzotriazole (HOBt)-dicyclo-hexylcarbodiimide (DCC)법에 의하였다. 각 펩타이드의 아미노말단의 Fmoc-아미노산을 coupling 시킨 후, 20% piperidine /*N*-methylpyrrolidone (NMP)용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 dichloromethane (DCM)으로 여러번 씻어준 다음 질소 가스로 말렸다. 여기에 TFA (trifluoroacetic acid)-phenol-thioanisole- H_2O -triisopropylsilane (85: 5: 5: 2.5: 2.5, vol./vol.) 용액을 가하고 2-3시간 반응시켜 보호기의 제거 및 resin으로부터 펩타이드를 분리시킨 다음, diethylether로 펩타이드를 침전화 시켰다. 이렇게 하여 얻은 crude 펩타이드는 0.05% TFA가 포함된 acetonitrile gradient로 하여 정제형 reverse phase(RP)-HPLC column (Delta Pak, C_{18} 300Å, 15μ , 19.0 mm×30 cm, Waters)을 이용하여 정제하였다. 각 합성 펩타이드를 6N-HCl로 110°C에서 24시간 가수분해 시킨 후 잔사를 감압농축 한 뒤, 0.02N-HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산 조성을 측정하였다. 펩타이드의 농도는 Ile을 기준으로한 아미노산 분석의 결과로 부터 계산하였다.

나. 인지질막 응축활성 측정

펩타이드의 인지질막 응축활성을 측정하기 위하여 HEPES 완충용액 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4)에 현탁된 최종농도가 50mM의 phosphatidylcholine (PC) / phosphatidylserine (PS) (4:1, w/w)의 인지질막을 Carboxyfluorescein(CF)-encapsulated large unilamellar vesicles (LUV)가 포함된 상태에서 sonication process로 제조하였다. 일정량의 지질막 현탁액에 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 혼합하고, 일정시간 경과된 후 흡광도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *Aspergillus giganteus*에서 유래된 Cystein을 포함한 antifungal protein(AFP)의 활성부위 규명에 대한연구

*Aspergillus giganteus*에서 분리, 정제된 항진균 단백질(antifungal protein; AFP)는 51개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 강한 항진균활성을 나타낸다고 보고 되어있다. 또한 AFP는 분자내에 8개의 Cys잔기를 포함하고 있으므로 4개의 disulfide bridge를 형성한다고 알려져 있다. 지금까지 AFP의 활성부위에 대하여서는 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 AFP가 항생활성을 나타내는 최소한의 영역을 조사하기 위하여, 먼저 AFP 전체 아미노산 서열을 크게 5부분으로 절단하여 아미노산 17개로 이루어진 5종류의 펩타이드 fragment들을 합성하였다. AFP의 아미노산 전체 서열과 합성한 5개의 펩타이드 fragment의 아미노산 서열은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Amino acid sequences of the AFP isolated from *Aspergillus giganteus*

Peptide	amino acid sequence
AFP	ATYNGKCYKKNICKYKAQSGKTAICKCYVKKCPRDGAKCEFDSYKKGKCYC
AFP(1-17)	ATYNGKCYKKNICK
AFP(13-29)	ICKYKAQSGKTAICKCY
AFP(22-38)	KTAICKCYVKKCPRDGA
AFP(28-44)	CYVKKCPRDGAKCEFD
AFP(35-51)	RDGAKCEFDSYKKGKCYC

펩타이드의 합성은 solid phase method를 이용한 Fmoc-chemistry에 의하여 합성하였다.

각 합성 펩타이드의 그람 양성균(*B. subtilis*) 및 그람 음성균(*E. coli*)에 대한 항균 활성(antibacterial activity)은 minimum inhibitory concentration(MIC)값으로 나타내었다. 또한 펩타이드의 항암활성의 측정은 폐암세포의 일종인 small cell lung cancer(SCLC) cell line을 사용하였으며, 항암활성(antitumor activity)은 50% inhibitory concentration(IC₅₀)으로 나타내었다. 항진균 활성의 측정은 filament성 진균인 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium oxysporum* 및 *Fusarium solani*을 이용하였으며, 항진균활성(antifungal activity)도 IC₅₀로 나타내었다. 펩타이드

의 독성은 사람의 적혈구(human erythrocytes)에 대한 용혈활성으로 나타내었으며, 일정량의 펩타이드를 투여하였을때(100 μ M), % hemolysis로 나타내었다. Table 1에 나타낸 펩타이드의 항균, 항암, 항진균 및 적혈구 용혈활성을 Table 2 및 Table 3에 요약하였다.

Table 2에 나타낸 바와 같이 5개의 펩타이드중에 AFP(13-29) 및 AFP(22-38)이 항균활성에 있어서는 강한 활성을 나타낸 반면에 다른 부위의 펩타이드는 본 실험에서 사용한 펩타이드의 최고 농도인 50 μ M에서도 활성을 나타내지 않았다. 또한 항암 활성 및 항진균활성에서도 AFP(13-29) 및 AFP(22-38)가 다른 부위의 펩타이드 보다 높은 활성을 나타내었다. 또한 위의 펩타이드들은 100 μ M에서 전혀 적혈구 용혈활성을 나타내지 않았다.

Table 2. Antibacterial and antitumor activity of the peptides derived from AFP protein

Peptides	Bacterial cells (MIC: μ M)		Tumor cells (SCLC) (IC ₅₀ : μ M)	
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	NCI-H126	NCI-H148
AFP(1-17)	>50	>50	>60	>60
AFP(13-29)	12.5	6.125-12.5	58.0	38
AFP(22-38)	12.5-25.0	12.5	52.0	23
AFP(28-44)	>50	>50	>60	>60
AFP(35-51)	>50	>50	>60	>60

Table 3. Antifungal and hemolytic activity of the peptides derived from AFP protein

Peptides	Fungal cells (IC ₅₀ : μ M)				% Hemolysis (100 μ M)
	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	
AFP(1-17)	38.0	70	32.5	70	0
AFP(13-29)	10.1	11.0	10.8	15.0	0
AFP(22-38)	11.0	11.2	12.5	20.0	0
AFP(28-44)	30.0	55.0	25.0	50.0	0
AFP(35-51)	43.0	70.0	40.0	50.0	0

AFP protein의 전서열 중에서 13-29 및 22-38에 해당하는 펩타이드가 가장 강한 항균, 항암 및 항진균활성을 나타내었으므로 활성을 나타내는 최소한의 영역(shortest functional region)을 검토하기 위하여 AFP의 13-29 및 22-38의 서열을 중복시킨 AFP(22-29)을 기준으로 하여 N- 및 C-쪽으로 아미노산 잔기를 하나씩 연장시킨 펩타이드를 합성하였다. 합성펩타이드의 아미노산 서열을 Table 4에 나타내었다.

Table 4. Amino acid sequences of the synthetic peptides

Peptides	amino acid sequence
AFP(22-29)	KTAICKCY
AFP(21-30)	GKTAICKCYV
AFP(20-31)	SGKTAICKCYVK
AFP(19-32)	QSGKTAICKCYVKK
AFP(18-33)	AQSGKTAICKCYVKKC

Table 4의 펩타이드에 대하여 항균, 항암, 항진균 및 적혈구 용혈활성을 조사 한 결과를 Table 5 및 6에 나타내었다. 그 결과 14개의 아미노산 잔기로 이루어진 AFP(19-32)가 박테리아, 종양세포 및 곰팡이에 대하여 가장 강한 항생활성을 나타내었으므로 AFP protein의 활성부위는 19번째 아미노산 잔기로 부터 32번째 아미노산 잔기에 존재한다는 사실을 알았다. 또한 각 펩타이드는 펩타이드 농도 100 μ M에서 전혀 적혈구 용혈활성을 나타내지 않았다.

Table 5. Antibacterial and antitumor activity of the synthetic peptides

Peptides	Bacterial cells (MIC: μ M)		Tumor cells (SCLC) (IC ₅₀ : μ M)		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	NCI-H126	NCI-H148	NCI-H69
AFP(22-29)	12.5	3.125-6.25	120.0	170.0	190.0
AFP(21-30)	25.0	6.125	90.0	180.0	210.0
AFP(20-31)	25.0	6.125	50.0	75.0	65.0
AFP(19-32)	12.5	0.78-1.56	22.0	53.0	30.0
AFP(18-33)	25.0	3.125	90.0	100.0	90.0

Table 6. Antifungal and hemolytic activity of the synthetic peptides

Peptides	Fungal cells (IC ₅₀ : μ M)				% Hemolysis (100 μ M)
	<i>A. flavus</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. solani</i>	
AFP(22-29)	50.0	45.0	70.1	80.7	0
AFP(21-30)	21.0	25.0	40.2	30.2	0
AFP(20-31)	31.0	31.0	60.0	30.0	0
AFP(19-32)	12.0	16.0	10.0	10.1	0
AFP(18-33)	30.0	27.0	30.7	30.0	0

따라서 AFP 단백질의 항균, 항암 및 항진균활성을 나타내는 최소한의 부위는 아미노산 19번째에서 32번째에 존재한다는 사실을 알았으며, 이 부위를 포함한 합성 펩타이드는 적혈구 용혈활성을 전혀 나타내지 않았으므로 항진균제, 항균제 및 항암제 개발의 모델로서 유용한 펩타이드임을 알았다.

나. 시스테인을 포함한 항진균 펩타이드의 합성 및 항진균 활성 검사

*Impatiens balsamina*라는 식물에서 분리된 시스테인을 포함한 20개의 아미노산으로 구성된 항진균 펩타이드(QWGRRC CGWGPGRRYCVRWC)로 알려진 Ib-AMPI이라는 펩타이드를 설계한 펩타이드를 Fmoc-아미노산을 이용한 고상법에 의하여 각 펩타이드의 보호 펩타이드를 합성하고 deprotection절차에 의하여 crude 펩타이드를 얻었다. 그리고 그 작용기작을 알아 보기 위하여 펩타이드의 아미노 말단에 Biotin을 접목하여 2종류의 펩타이드를 합성하였다. 이렇게 합성한 Crude펩타이드는 reversed phase HPLC에 의한 정제하여 순수하게 정제된 펩타이드를 얻었다. 이렇게 합성한 펩타이드를 6N-HCl에 녹인후 22시간 110℃에서 가수분해하여 건조시킨후 amino acid analyzer에 의한 아미노산 조성확인을 확인하고 mass spectra에 의한 분자량 확인하였다. 이렇게 합성한 펩타이드를 시스테인의 disulfide bond를 12시간 상온에서 air oxidation(pH 8.2)시킨 후, C18-RP HPLC로 분리하여 Oxidation form과 reduction form의 펩타이드를 각각 준비하였다 (Fig 2).

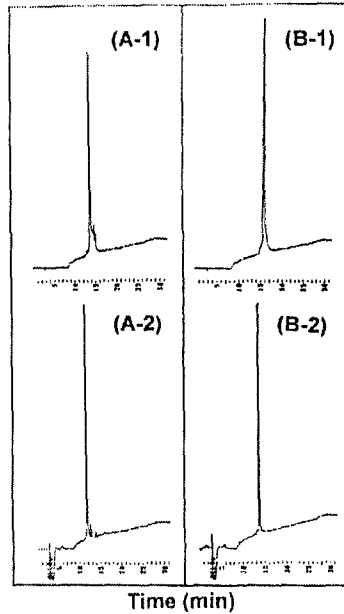


Figure 1. Analytical reverse-phase HPLC profiles of IB-AMP1 and biotinylated Ib-AMP1.

A-1: reduced Ib-AMP1, A-2: oxidized Ib-AMP1, B-1: biotinylated reduced Ib-AMP1, B-2: biotinylated oxidized Ib-AMP1

위에서 합성된 펩타이드를 가지고서 *A. flavus*와 *C. albicans*를 대상으로 항진균 활성을 검토하였다. 먼저 항진균 활성을 측정하기 위하여 *A. flavus*와 *C. albicans*를 YPD 완전배지에 도말하여 배양한 후, 포자 현탁액과 세포 현탁액을 제조하였다. 이렇게 제조한 세포를 MTT법으로 여러농도에서 항진균 활성을 측정하였다. 그 결과 oxidized form이 reduced form보다 항진균 활성이 4배가 더 증가된 결과를 얻을수가 있었다 (Table 7).

Table 7. Antifungal activity of the reduces and oxidized IB-AMP1 against *Aspergillus flavus* and *Candida albicans*

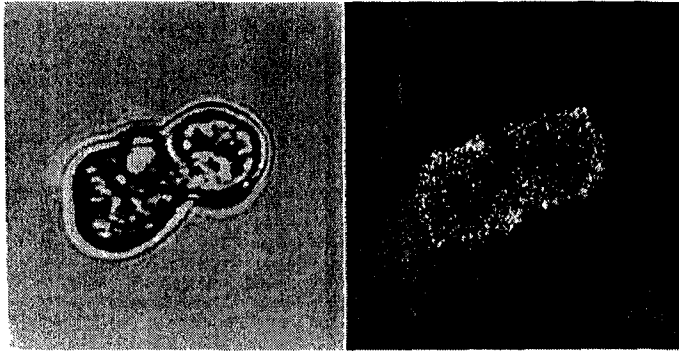
IB-AMP1	MIC(μ M)	
	<i>C. albicans</i>	<i>A. flavus</i>
Oxidized form	5.0	2.5
Reduced form	20.0	10.0

Table 7의 결과를 놓고 볼 때 시스테인을 포함한 항진균 펩타이드는 시스테인에 의한 disulfide bond의 형성이 활성에 중요한 영향을 미치는 것으로 보인다.

다. 시스테인을 포함한 항진균 펩타이드의 작용기작의 규명

IB-AMP1의 항진균 작용기작을 알아 보기 위하여 Biotine이 부착된 oxidized form의 펩타이드를 *C. albicans*에 30℃에서 10분간 처리 후, PBS완충용액으로 3번이상 세척하였다. 그리고 세포내에서의 상태를 알아보기 위하여 2% Triton X-100을 처리 한 후, 위의 방법으로 펩타이드를 처리하였다. 그 후 Streptavidin-FITC를 처리한 후, 펩타이드가 *C. albicans*의 어느 위치에 존재하는지를 Confocal microscopy로 가시화하였다. 그 결과 Ib-AMP1는 세포막을 인식하여 세포내로 들어가서 어느 특정 세포 소기관에 결합하는 것으로 나타났다 (Fig 2).

A



B

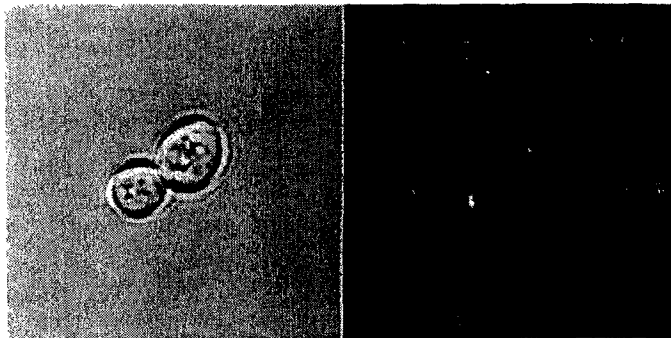


Figure 2. Confocal fluorescence microscopy of Ib-AMP1 against *C. albicans*. A: Yeast cells of *C. albicans* were incubated for 10min at 30°C with 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biotinylated Ib-AMP1(oxidized form), B: Prior to treatment of the biotinylated Ib-AMP1(oxidized form), the yeast cells were permeabilized with 2% Triton X-100.

이러한 세포 소기관과의 결합에 의해 항진균 활성이 나타나는 것으로 생각되며, 아직 그 세포 소기관이 무엇인지에 대해서는 밝혀지지 않고 있다.

한편 이 펩타이드의 인지질막 응축활성을 측정하기 위하여 HEPES 완충용액 (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4)에 현탁된 최종농도가 50mM의 phosphatidylcholine (PC) / phosphatidylserine (PS) (4:1, w/w)의 인지질막을 sonication process로 제조하였다. 일정량의 지질막 현탁액에 단계적으로 희석한 펩타이드 용액을 혼합하고, 일정시간 경과된 후 흡광도를 측정하였다.

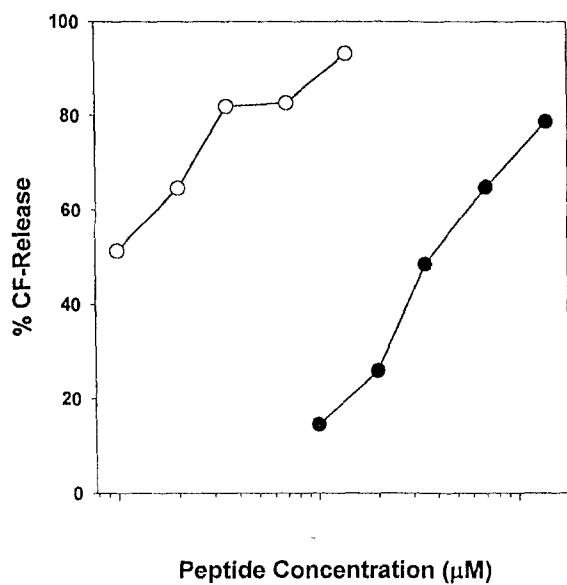


Figure 3. CF-Release from LUVs composed of PC:PS (4:1) induced by by cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) (●) and oxidized Ib-AMP1 (○). The released CF fluorescence was measured at excitation = 490nm and emission = 520nm.

그 결과 Ib-AMP가 지질막을 파괴하지 않은 것으로 나타났다. 이것은 펩타이드가 안으로 들어갈 때 다른 기작으로 들어 갈 것으로 생각되어진다. 아마 이것은 항진균 작용기작과 관련 있을것으로 생각된다.

제 3장 인용문헌

1. Boman, H.G. 1991. Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell*. **65**: 205-207.
2. Zasloff, M. 1992. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **4**: 3-7.
3. Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich, and H.G.Boman, H. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*. **292**: 246-248.
4. von Hofsten, P., I. Faye, K. Kockum, J.Y. Lee, K.G. Xanthopoulos, L.A. Boman, H.G. Boman, A. Engstrom, D. Andreu, and R.B. Merrifield. 1985. Molecular cloning, cDNA sequencing, and chemical synthesis of cecropin B from *Hyalophora cecropia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**: 2240-2243.
5. Lee, J.Y., A. Boman, C. Sun, M. Andersson, H. Jornvall, V. Mutt, and H.G. Boman. 1989. Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 9159-9162.
6. Zasloff, M. 1987. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84**: 5449-5453.
7. Soravia, E., G. Martini, and M. Zasloff. 1988. Antimicrobial peptides from *Xenopus* granular gland secretions. *FEBS Lett.* **228**: 337-340.
8. Tosteson, M.T., J.J. Levy, L.H. Caporale, M. Rosenblatt, and D.C. Tosteson. 1987. Solid phase synthesis of melittin: Purification and functional characterization. *Biochemistry*. **26**: 6627-6631.

9. Holak, T.A., A. Engstrom, P.J. Kraulis, G. Lindeberg, H. Bennich, T.A. Jones, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. 1988. The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry*. **27**: 7620-7626.
10. Tosteson, M.T., S.J. Holmes, M. Razin, and D.C. Tosteson. 1985. Melittin lysis of red cells. *J. Membr. Biol.* **87**: 35-44.
11. Boman, H.G., D. Wade, L.A. Boman, B. Wahlin, and R.B. Merrifield. 1989. Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett.* **259**: 103-106.
12. Andreu, D., J. Ubah, A. Boman, B. Wahlin, D. Wade, R.B. Merrifield and H.G. Boman. 1992. Shortened cecropin A-melittin hybrids. *FEBS Lett.* **296**: 190-194.
13. Wade, D., D. Andreu, S.A. Mitchell, A.M.V. Silveira, A. Boman, H.G. Boman, and R.B. Merrifield. 1992. Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin. *Int. J. Peptide Protein Res.* **40**: 429-436.
14. Merrifield, R.B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* **232**: 341-347.
15. Beaulieu, D., J. Tang, D.J. Zeckner, and T.R. Parr. 1993. Correlation of cilofungin in vivo efficacy with its activity against *Aspergillus fumigatus* (1,3)- β -D-glucan synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* **108**: 1133-138.
16. Tang, J. and T.R. Parr. 1991. W-1 Solubilization and Kinetics of Inhibition by Cilofungin of *Candida albicans* (1,3)- β -D-glucan synthase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**: 99-103.
17. Hill, J.A., R.S. Annan and K. Biemann. 1991. Matrix-assisted laser desorption ionization with a magnetic mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass*

Spectrom. 5: 395-399.

18. Bartnicki-Garcia, A. 1968. Cell Wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* 22: 87-108.
19. Borgia, P.T. and C.L.Dodge. 1992. Characterization of *Aspergillus nidulans* Mutants Deficient in Cell Wall Chitin or Glucan. *J. Bacteriol.* 174: 377-383.
20. Sawistowska-Schroder, E.T., D. Kerridge, and H. Perry. 1984. Echinocandin inhibition of 1,3- β -D-glucan synthase from *Candida albicans*. *FEBS lett.* 173: 134-138.
21. Taft, C.S., T. Stark, and C.P. Selitrennikoff. 1988. Cilofungin(LY121019) inhibits *Candida albicans* (1,3)- β -D-glucan synthase activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 1901-1903.
22. Taft, C.S. and C.P. Selitrennikoff. 1988. LY121019 inhibits *Neurospora crassa* growth and (1,3)- β -D-glucan synthase activity. *J. Antibiot.* 41: 697-701.
23. Taft, C.S. and C.P. Selitrennikoff. 1990. Cilofungin inhibition of (1,3)- β -D-glucan synthase: the lipophilic side chain is essential for inhibition of enzyme activity. *J. Antibiot.* 43: 433-437.
24. Marx, F., H. Haas, M. Rein^o], G. Stoffler, F. Lottspeich, and B. Re^o]. 1995. Cloning, structural organization and regulation of expression of the *Penicillium chrysogenum paf* gene encoding an abundantly secreted protein with antifungal activity. *Gene* 167: 167-171.
25. Lee, D.G., S.Y. Shin, S.G. Lee, M.Y. Lee, and K.S. Hahm. 1996. Antifungal effect of Melittin-hybrid synthetic peptides for *F. oxysporum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 529-533.

26. Lee, M.K., D.G. Lee, S.Y. Shin, S.G. Lee, J.H. Kang, and K.S. Hahm. 1996. Antifungal activities of peptides with the sequence 10-17 of Magainin-2 at the termini against *A. fumigatus*. *J. Microbiol.* **34**: 274-278.
27. Lee, D.G., S.Y. Shin, S.G. Lee, M.Y. Lee, K.L. Kim, and K.S. Hahm. 1997. Antifungal activities of Magainin-2 hybrid peptides for *T. beigeli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 49-51.
28. Lee, D.G., J-H Park, S.Y. Shin, M.K. Lee, K.L. Kim, and K.S. Hahm. 1997. Design of novel analogue peptides with potent fungicidal but low hemolytic activity based on the cecropin A-melittin hybrid structure. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **43**: 489-498.
29. Rico, H., C. Carrillo, C. Aguado, S. Mormeneo, and R. Sentandreu. 1997. Initial steps of wall protoplast regeneration in *Candida albicans*. *Res. Microbiol.* **148**: 593-603.
30. Antonio, M.R., A.M. Pozo, J.L. Mancheno, and M.O. gavilanes. 1997. Characterization of a natural larger form of the antifungal protein (AFP) from *Aspergillus giganteus*. *Biochimica. Biophysica. Acta.* **1340**: 81-87.
31. Taylor, R.H, D.P. Acland, S. Attenborough, B.P.A. Cammue, I.J. Evans, R.W. Osborn, J.A. Ray, S.B. Rees, and W.F. Broekaert. 1997. A novel family of a small cystein-rich antimicrobial peptides from seed of *Impatiens balsamina* is derived from a single precursor protein. *J. Biological. Chemistry* **272**: 24480-24487.
32. Hao, J.J., Y.Z. Xu, C.D. Geng, W.Y. Liu, E.D. Wang, Z.Z. Gong, and N. Ulbrich. 1998. Purification of α -sarcin and an antifungal protein from *Aspergillus giganteus* by blue sepharose CL-6B affinity chromatography. *Protein expression and purification* **14**: 295-301.

33. Patel, S.U, R.W. Osborn, S.B. Rees, and J.M. Thornton. 1998. Structure studies of *Impatiens balsamina* antimicrobial protein (Ib-AMP1). *Biochemistry* **37**: 983-990.
34. Lee, D.G., S.Y. Shin, C.Y. Maeng, and K.S. Hahm. 1998. Cecropin A-melittin hybrid peptide exert its antifungal effects by damaging on the plasma membranes of *Trichosporon beigeli*. *Biotechnology Letter* **20**: 211-214.
35. Kang, J.H., Shin, S.G, S.Y. Jang, M.K. Lee, and K.S. Hahm. 1998. Release of aqueous contents from phospholipid vesicles induced by cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) hybrid and its analogues. *J. Peptide Res.* **52**: 45-50.
36. Lee, D.G., Z.Z. Jin, S.Y. Shin, J.H. Kang, K.S. Hahm, and K.L. Kim. 1998. Structure-Antifungal Activity Relationships of Cecropin A-Magainin 2 and Cecropin A-Melittin Hybrid Peptides on Pathogenic Fungal Cells. *J. Microb Biotechnol.* **8**: 595-600.
37. Shin, S.Y, J.H. Kang, M.K. Lee, S.Y. Kim, Y.M. Kim, and K.S. Hahm. 1998. Cecropin A-magainin 2 hybrid peptides having potent antimicrobial activity with low hemolytic effect. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **44**: 1119-1126.
38. Shin, S.Y, J.H. Kang, and K.S. Hahm. 1998. Structure-antibacterial, antitumor and hemolytic activity relationships of cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J. Peptide Res.* **53**: 82-90.
39. Lee, D.G., C.Y. Maeng, S.Y. Shin, and K.S. Hahm. 1999. Influence on the cell membrane of *Trichosporon beigeli* by fungicidal peptide derived from cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12). *J. Biochem. Mol. Biol. Biophys.* **2**: 243-248.

40. Lee, D.G., S.Y. Shin, C.Y. Maeng, Z.Z. Jin, K.L. Kim, and K.S. Hahm. 1999. Isolation and Characterization of Antifungal Peptide from *Aspergillus niger*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 646-651.
41. Lee, D.G., Z.Z. Jin, C.Y. Maeng, S.Y. Shin, M.K. Lee, K.L. Kim, and K.S. Hahm. 1999. Antifungal Mechanism of Antifungal Peptide Derived From Cecropin A(1-8)-Melittin(1-12) Hybrid Against *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 168-172.
42. Shin, S.Y., J.H. Kang, D.G. Lee, S.Y. Jang, K.L. Kim, and K.S. Hahm. 1999. Influences of hinge region of a synthetic antimicrobial peptide, cecropin A (1-13)-melittin(1-13) Hybrid on Antibiotic Activity. *Bull. Kor. Chem. Soc.* **20**: 1078-1084.
43. Shin, S.Y., J.H. Kang, D.G. Lee, S.Y. Jang, M.Y. Seo, and K.S. Hahm. 1999. Structure and antibiotic activity relationships of brevinin-1 and thanatin containing *Rana boxa*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 440-445.
44. Lee, D.G., S.Y. Shin, D.H. Kim, M.Y. Seo, J.H. Kang, Y.H. Lee, K.L. Kim, and K.S. Hahm. 1999. Antifungal mechanism of a cystein-rich antimicrobial peptide, Ib-AMPI, from *Impatiens balsamina* against *Candida albicans*. *Biotechnology Letter* **22**: 1047-1050.