GOVP1200102576

6606
L2936

최 종
연구보고서

# 한국고유 동 · 식물 및 곤충의 항균펩타이드 탐색 및 이용연구

Screening of Antimicrobial Peptides from Korean Animals, Plants and Insects and Their Applications

연구기관
한국과학기술원

농 림 부

대한민국
국회도서관
기증등록
2001. 3. 05
858982

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 "**한국고유 동·식물 및 곤충의 항균펩타이드 탐색 및 이용연구**" 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 12월 20일


주관연구기관명 : 한국과학기술원

총괄연구책임자 : 김 선 창

위탁연구기관명 : 경상대학교

위탁연구책임자 : 이 상 열

위탁연구기관명 : 생명공학연구소

협동연구책임자 : 박 호 용

# 요 약 문

## I. 제 목

한국고유 동·식물 및 곤충의 항균펩타이드 탐색 및 이용연구

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

1929년 Alexander Fleming에 의해 항생제인 페니실린이 발견된 이래 이들 항생물질은 인류의 질병치료에 지대한 공헌을 해왔다. 현재 9000종 이상의 항생물질이 발견되어 이중 150개 정도가 상업적으로 생산되어 이용되고 있으나, 장기간의 항생제 사용으로 인한 내성이 강한 병원균의 발생으로 기존의 항생제에 의한 병원균 치료에는 많은 문제점들이 있고, 장기 복용에 의한 부작용이 심하여 새로운 종류의 항균물질의 탐색과 개발이 절실히 요구되고 있다. 최근 수년간의 항균펩타이드에 대한 집중적인 연구결과 식물 및 원핵세포생물에서 인간을 포함한 고등생물에 이르기까지 거의 모든 생물체들이 외부균의 침입으로부터 자신을 방어하기 위한 수단으로 면역 체계와는 별도로 항균펩타이드를 이용하고 있음이 밝혀졌다. 이들 항균펩타이드는 상처등을 통한 외부의 자극을 받을때 발현이 유도되어 외부에서 침입하는 병원균을 죽이는 역할을 하는 제1차적인 자체방어수단으로 이용되고 있다.

항균펩타이드들의 특성은 기존의 항생제에 비하여 항균작용범위가 매우 넓으며 그 길이가 아미노산 20-40 정도로 짧고, 산·알칼리 및 열처리등에 거의 영향을 받지 않으며, 펩타이드를 구성한 아미노산에 secondary modification이 거의 없다는데 있

다. 또한 이들 항균펩타이드는 아미노산으로 구성된 물질로서 항균작용후 쉽게 분해될 수 있어 환경파괴의 위험이 적어 기존의 항생제보다 환경친화적이다. 지금까지 연구결과 항균펩타이드 구조와 활성간의 관계까지 밝혀진 대표적인 펩타이드는 곤충에서 분리된 cecropin과 melittin, 포유동물의 defensin, 개구리의 magainin, 참게류의 tachyplesin 등이 있다. 이들 항균펩타이드들은 정도의 차이는 있으나 공통적으로 대부분의 그램양성균 및 음성균, 원핵생물 및 곰팡이 등에 대하여 항균력을 갖고 있으며 일부는 바이러스나 암세포 등에도 작용하는 것으로 알려졌다. 이들의 구조와 작용기작 및 생체내에서의 생물학적 역할에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. 이들 항균펩타이드들의 공통적인 구조적 특성은 라이신(Lysine), 알지닌(Arginine)과 같은 basic 아미노산을 많이 포함하고 있으며 α-helix를 포함한 amphiphatic한 구조를 갖고 있고 양전하를 띤 이들 펩타이드가 음전하를 띤 미생물의 세포벽에 결합하여 나열되면서 동시에 α-helix 구조를 이루어 hydrophobic한 한쪽끝이 세포벽을 뚫고 들어가 구멍을 만들어 세포내 물질을 밖으로 유출시키거나 세포벽을 분해하여 미생물을 죽인다. 이들 펩타이드 항균물질의 활성도는 미생물 세포벽의 구조와 조성성분에 따라 차이가 나며 분리되는 펩타이드는 그 분리원에 따라 거의 다른 구조를 갖고 있어 그 조성이 무척 다양하다. 이는 각 생물이 자라나는 환경에 따라 침입하는 병원균의 종류가 다르므로 이에 대하여 작용펩타이드의 종류도 다른 것으로 생각된다.

현재 전세계적으로 항균펩타이드들에 대한 많은 연구결과 동·식물 및 곤충등에서 매년 수종의 항균펩타이드들이 새로이 발견되고 있으며 이들의 분자생물학적인 연구와 인체에 유용한 새로운 항균제로서의 가능성에 대한 연구가 집중적으로 진행되고 있다. 그러나 현재 어느것도 기존의 항생제와 견줄만한 강한 항균펩타이드가 탐색되지 않아 산업화되지 못하여 새로운 강력한 항균펩타이드 탐색에 주력하고 있다. 또한 이들 항균펩타이드의 구조와 활성과의 관계가 정확히 규명되어 있지 않고 세포내에서 이들의 발현조절 기작에 대한 연구가 거의 전무한 상태이다. 따라서 한국 고유의 양서류 및 어류, 식물 및 곤충에서 항균 및 항암능력이 강한 펩타이드를 탐색하여 우리 고유의 생물자원 개발과 이용을 꾀할 수 있으며 더 나아가 탐색된 펩타이드의 유전자구조와 발현조절기작을 연구함으로써 인체의 유사물질탐색과 작용기작연구에 중요한 기초자료를 제공할 수 있다. 또한 항균펩타이드와 면역시스템과의 상호관계를 분자생물학적 차원에서 규명할 수 있으며 이들 항균펩타이드를 인체 유용의약품으로 개발할 수 있는 이론적 근거를 제공할 수 있다. 그러므로 이들 항균펩타이드의 탐색 및 분리, 작용기작, 유전자 구조 및 발현조절에 대한 연구와 생물농약 및 내병성 식물 개발에 관한 연구가 절실히 요구되고 있다.

# Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

## 1. 연구개발의 최종목표

가. 한국 고유 동·식물 및 곤충에서의 신규 항균펩타이드의 탐색 및 분리, 정제
나. 항균펩타이드를 이용한 식품보조제, 항균제, 항암제, 항바이러스, 외상치료제 및 구강청결제로의 개발
다. 항균펩타이드를 이용한 새로운 생물농약의 개발
라. 항균펩타이드를 식물세포에 형질전환시켜 내병성 식물 개발
마. 항균펩타이드의 유전자 구조 분석 및 생물체내에서의 생산기작연구에 의한 고유 생물자원의 개량
바. 항균물질함유 한국고유 생물자원 확보 및 보존

## 2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 연 구 개 발 내 용 및 범 위 |
|---|---|---|
| 1차 년도 1996 | ㅇ 고유 양서류 및 어류 확보 및 항균펩타이드 탐색 | - 생체부위에 따른 항균물질 탐색 및 분리 정제<br>- 아미노산 조성 및 아미노산 서열 분석 |
| | ㅇ 항균펩타이드 대량분리 방법 및 공정 개발 | - 대형 분리 column 제조 및 소규모 공장 설계<br>- 펩타이드만 선택적으로 추출법 개발 |
| | ㅇ 유용작물에 감염하는 병원성 곰팡이에 대한 저항성 펩타이드의 분리 및 유전자 클로닝 | - 새로운 종류의 강력한 항균성 펩타이드의 분리와 항균력 측정<br>- 병원성 곰팡이에 대하여 강력한 살균력을 가지는 펩타이드에 대한 유전자 확보 |
| | ㅇ 유용곤충 및 곤충유래 항균 펩타이드 탐색 및 유전자 확보 | - 대상 곤충 탐색 및 확보<br>- 항균펩타이드 탐색 및 지표유전자 확보 |

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 연 구 개 발 내 용 및 범 위 |
|---|---|---|
| 2차 년도 1997 | ㅇ 고유 양서류 및 어류로부터 탐색된 항균펩타이드의 유전자 확보 | - 항균펩타이드 유전자 클로닝 및 유전자 구조 분석 |
| | ㅇ 항균펩타이드 분리공정 최적화 | - 펩타이드 대량 분리 및 안정성 연구 |
| | ㅇ 식물유래 항균펩타이드의 분리 및 유전자 클로닝 | - 항균펩타이드 분리 및 유전자 확보<br>- Differential display cDNA 방법에 의한 항균유전자 screening |
| | ㅇ 곤충유래 항균펩타이드 분리 및 특성 분석 | - 항균펩타이드 분리, 정제 및 생물학적 특성 분석 |
| 3차 년도 1998 | ㅇ 항균펩타이드 유전자 발현과 항균물질 생산 | - 항균펩타이드 아미노산 조성 변경 및 활성측정 |
| | ㅇ 항균펩타이드 유전자 발현과 항균물질 생산 | - 대장균을 이용한 overexpression<br>- 발현된 항균펩타이드의 활성 측정 |
| | ㅇ 유용한 식물에서의 항균물질 생산을 위한 발현벡터 개발 | - Inducible, tissue-specific, developmental stage-specific expression vector 개발 |
| | ㅇ 곤충유래 항균펩타이드 및 관련유전자 분리 및 특성 분석 | - 항균펩타이드의 물리, 화학적 특성 분석<br>- 관련유전자 분리 및 특성 분석 |

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 연 구 개 발 내 용 및 범 위 |
|---|---|---|
| 4차 년도 1999 | ㅇ 항균펩타이드의 생물학적, 물리화학적 특성 분석 | - 항균 작용 기작 규명<br>- NMR을 통한 구조 분석 |
| | ㅇ 항균펩타이드의 독성 및 안전성 연구 | - 동물세포 배양을 통한 항암성 연구<br>- Cytotoxicity 분석 |
| | ㅇ 병충해 내성의 유전자 구축과 형질전환 작물 개발 | - 형질전환 식물체 개발을 위한 transgenic DNA 구축<br>- 유용작물에 도입을 위한 형질전환 방법 개발 |
| | ㅇ 곤충유래 항균펩타이드 관련 유전자 발현 및 항균펩타이드 생산시스템 구축 | - 관련유전자 발현기구 해명<br>- 항균펩타이드 생산공정 개발 |
| 5차 년도 2000 | ㅇ 항균펩타이드 대량생산 및 실용화 | - 펩타이드 대량생산 최적화 조건 구축<br>- 항균펩타이드의 실용화<br>- 생물농약, 식품보전제, 외상치료제 및 구강청결제로 개발 |
| | ㅇ 내병성 형질전환 유용작물 개발과 응용 및 병원균 방제 물질 개발 | - 확립된 형질전환법을 이용하여 내병성 형질전환 유용작물 개발<br>- 유용작물에의 응용을 위한 생물농약으로의 실용화 확립 |
| | ㅇ 내병성 형질전환 작물의 종자 생산 및 수확량 변화 연구 | - 형질전환식물들에 병충해를 유발한 후 병징의 관찰<br>- 전체적인 형질전환작물의 수확량과 성장속도 관찰 |

# Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

## 1. 연구개발 결과

### 가. 한국고유 양서류 및 어류의 항균펩타이드 탐색 및 이용연구

한국고유 양서류 및 어류로부터 인체에는 독성이 없고 병원균만을 선택적으로 죽이는 강력한 항균펩타이드들을 탐색하고 이들의 유전자를 클로닝하였다. CD, NMR을 이용하여 탐색된 항균펩타이드들의 구조를 분석하였으며 펩타이드의 구조와 활성간의 상관관계를 규명하였다. 또한 이러한 정보를 바탕으로 보다 강력한 항균력을 가지는 항균펩타이드 유도체를 개발하였으며, 작용 기작 연구를 통해 항균펩타이드를 인체유용의약품 및 무공해 생물농약으로 개발할 수 있는 이론적 근거를 제시하였다. 그리고 대장균을 이용한 생물공학적 대량생산 및 분리법을 개발하여 항균펩타이드를 대량으로 공급할 수 있도록 하였다.

| 연 구 내용 | 연 구 결 과 |
|---|---|
| 한국고유 양서류 및 어류로부터 항균펩타이드 탐색 및 유전자 클로닝 | - 미꾸라지와 메기로부터 기존의 항균펩타이드보다 활성이 각각 10배, 25배이상 높은 misgurin과 parasin I 분리<br>- 두꺼비와 황소개구리로부터 buforin I, II와 bPaAP, bPcAP 분리<br>- 지렁이로부터 항균펩타이드 lumbricin 분리<br>- 분리된 항균펩타이들의 유전자 클로닝 |
| 항균 펩타이드 구조분석, 구조-활성 연구를 통한 강력한 유도체 펩타이드 개발 및 작용기작 규명 | - Parasin I, buforin II의 구조 분석<br>- Parasin I 유도체 8종, buforin II 유도체 10종 개발<br>- 개발된 유도체들의 인체에 대한 안정성 검증<br>- Parasin I, buforin II의 작용기작 규명<br>Parasin I:membrane permeabilization<br>Buforin II: cell penetration and inhibition of macromolecule synthesis |
| 대장균을 이용한 항균펩타이드 대량생산 | - 산성펩타이드 융합법을 이용한 대장균에서의 대량생산법 개발<br>- mRNA 안정화를 통하여 항균펩타이드 생산량을 증대<br>- 항균펩타이드 분리공정 최적화 |

## 나. 한국 고유식물의 항균성 펩타이드 탐색 및 식물병원균 방제물질 개발

한국 고유식물로부터 병 저항성 항균성 펩타이드나 저 분자량의 단백질들을 분리하여 병 저항성 능력을 측정하고 이들의 병원균 살균 mechanism을 규명하였다. 이들 단백질의 N-terminal amino acid sequence를 통하여 유전자 probe를 제조하여 항균 단백질을 코딩하는 유전자를 클로닝함과 동시에 병원균 처리에 대한 유전자의 발현특성을 규명하였다. 또한 이들 병 저항성 단백질 유전자를 식물체에 도입하여 병 저항성 형질전환 식물체를 제조하여 내병성 특성을 규명하였다.

| 연 구 내용 | 연 구 결 과 |
|---|---|
| 식물 병원균 저항성 펩타이드 및 저분자량 항균 단백질 분리와 특성분석 | - 배추, 호박, 수도 등으로부터 강력한 항균력을 가지는 thaumain-like protein, thionin, chitinase, β-1,3-glucanase, PR-4 protein 등을 분리<br>- 병 저항성 단백질들의 항균력 측정과 단백질의 안정성 분석 |
| 항균 단백질에 대한 유전자 클로닝 발현 pattern 분석 및 유용 host를 이용한 항균 단백질의 대량생산 | - 분리한 항균 단백질인 thaumain-like protein, thionin, chitinase, β-1,3-glucanase, PR-4 protein을 코딩하는 유전자의 크로닝과 유전자 구조분석<br>- Fungal elicitor 처리에 대한 항균 유전자의 발현조건 규명과 induction 연구<br>- 항균성 단백질의 대량생산을 위한 over expression vectors 구축<br>- 대장균 및 효모에서의 항균 물질대량 발현 |
| 항균 단백질의 살균기작 규명과 항균 유전자가 도입된 형질전환 식물체 제조 | - 항균단백질의 병원균 살균 mechanism 규명<br>- 병 저항성 유전자가 도입된 내병성 형질전환 식물체 (담배) 제조<br>- 도입된 내병성 유전자의 발현검증과 형질전환 식물체의 병 저항능 측정 |

### 다. 한국고유 곤충유래 항균펩타이드 탐색 및 개발

우리나라 고유곤충으로부터 항균펩타이드들을 탐색 및 분리하고 이들의 항균력을 측정하였다. 이들 항균펩타이드의 구조를 밝혔으며 인체에 대한 안정성을 검증하였다. 또한 항균펩타이드들의 유전자를 클로닝함과 동시에 병원균 처리에 대한 유전자의 발현특성을 규명하였다.

| 연 구 내용 | 연 구 결 과 |
|---|---|
| 한국고유 곤충으로부터 항균펩타이드의 탐색 및 분리 | - 잣나무넓적잎벌, 흰점박이꽃무지, 제주산 말매미로부터 항균펩타이드 분리 |
| 분리된 항균펩타이드의 특성 연구 | - CD를 이용한 항균펩타이드 crytonin의 구조 분석<br>- Hemolysis assay를 통해 안정성 검증 |
| 면역관련 유전자의 클로닝 및 발현기작 연구 | - Lysozyme 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석<br>- 미생물 주입에 따른 lysozyme 유전자의 induction pattern 확인 |

## 2. 활용에 대한 건의

본 연구결과를 통해 얻은 항균펩타이드들은 무공해 생물농약 및 병원균내성 식물의 개발에 이용할 수 있다. 따라서 병충해로 입는 엄청난 양의 수확량 감소를 방지할 수 있으며 인류의 식량난 해소와 농가의 소득증대 및 화학농약의 살포로 인한 환경오염방지 등 많은 장점을 제공할 수 있다. 그리고 이들 항균펩타이드를 식품보존제, 구강청결제, 외상치료제, 항바이러스 및 항암치료제 등으로 개발이 가능하므로 농민의 소득 증대 뿐 아니라 우리고유의 생물자원에서 개발된 항균펩타이드를 해외로 수출할 수 있어 국가적으로 큰 경제적 이득을 줄 수 있다. 또한 기존의 항생제 남용으로 생기는 건강문제를 미연에 방지할 수 있어 의료비용을 크게 절감할 수 있다. 따라서 신규항균펩타이드의 보다 넓은 이용연구를 위하여 국내·외 제약회사등과 제휴하여 공동으로 신의약으로 개발하는 것이 절실히 요구된다.

# SUMMARY

## I. Title

Screening of antimicrobial peptides from korean animals, plants and Insects and their applications

## II. Research Background

Since the discovery of penicillin in 1929 by Alexander Fleming, antimicrobial agents have played an important role in healthcare. Although there are over 150 commercial antimicrobial agents in use today, long-term use of antibiotics has led to the emergence of antibiotic-resistant pathogens and unforeseen side effects. Because of these problems, new antimicrobial agents need to be developed. Numerous studies show that most organisms, ranging from microorganisms to plants, animals, and human, use antimicrobial peptides as the first line of defense against invading microorganisms. Most of the antimicrobial peptides have broad spectrum of activity, are composed of 20-40 amino acids with no secondary modifications, and are resistant to acid, alkali, and heat. In addition, these antimicrobial peptides are basic due to the presence of numerous lysine and arginine residues. The positively charged antimicrobial peptides bind to the negatively charged microbial membranes, where they form amphipathic α-helices. Subsequently, the peptides permeabilize the cell membrane, which lead to the disintegration of the membranes and dissipation of transmembrane potential. Although many antimicrobial peptides have been isolated and characterized, they have not been commercialized due to the relatively weaker activity when compared to antibiotics and also because their mechanism of action still remains to be fully elucidated. The isolation and characterization of antimicrobial and anticancer peptides from Korean

국회도서관장서

amphibians, fish, plant, and insects can lead to the development and application of Korean natural resources. Furthermore, the relationship between the antimicrobial peptides and the immune system can be determined at the molecular level and provide the theoretical basis for the application of the antimicrobial peptides as therapeutic agents. Therefore, isolation and characterization of antimicrobial peptides and studies on its mechanism of action, gene structure, and expression analysis as well as application studies in biopesticides and disease-resistant plants need to be carried out.

## III. Research Objectives

The objectives of this research are:

1. Isolation and characterization of novel antimicrobial peptides from Korean animals, plants. and insects.

2. Development of antimicrobial peptides as antimicrobial agent, antitumor agent, antiviral agent, wound healing agent, food preservative, and mouthwash.

3. Development of antimicrobial peptides as biopesticide.

4. Development of disease-resistant transgenic plants by transformation of plant cells with antimicrobial peptides.

5. Genetic analysis and expression studies of antimicrobial peptides.

6. Preservation of Korean natural resources with therapeutic value.

# IV. Results and applications

## 1. Results

### A. Screening of antimicrobial peptides from Korean amphibians and fish and their applications

Pathogen-specific antimicrobial peptides with insubstantial cytotoxicity were isolated from Korean amphibians and fish and their genes were cloned. The structure of the antimicrobial peptides were determined by circular dichroism and nuclear magnetic resonance studies. Based on the results from structure-activity relations study, analogs with stronger antimicrobial activity were derived. The scientific basis for the application of antimicrobial peptides as biopesticides and therapeutic agents were established by mechanism of action studies. Finally, a procedure for the mass production and purification of antimicrobial peptides in *Escherichia coli* was developed.

### B. Isolation and development of plant pathogen-specific antimicrobial peptides from Korean plants

Antimicrobial peptides which can confer disease-resistance on plants were isolated from Korean plants and their mechanism of action was determined. Based on the N-terminal amino acid sequences, DNA probes were constructed and the genes encoding the antimicrobial proteins were cloned. The expression profile of the genes were also determined. These genes were used to develop transgenic plants with disease-resistance.

### C. Isolation and development of antimicrobial peptides from Korean insects

Antimicrobial peptides from Korean insects were isolated and characterized. The structure and cytotoxicity of these peptides were determined. Also, the genes encoding these antimicrobial peptides were cloned and their expression

profiles were analyzed.

## 2. Applications

The antimicrobial peptides obtained from this research can have applications in biopesticide and disease-resistant transgenic plants. Therefore, the enormous financial losses in crop due to plant pathogens can be reduced and food deficit can be overcome. Such applications can lead to increased income for the agricultural sector and prevent environmental pollution from the use of cytotoxic pesticides. Other applications in food preservative, hygiene products, wound healing agents, antiviral, and antitumor agents, can open new avenues for exports and thereby increase national wealth. In addition, the national healthcare costs can be reduced by decreasing antibiotics usage. For the development of antimicrobial peptides as novel therapeutic agents, cooperative research with domestic and foreign pharmaceutical companies should be promoted.

# CONTENTS

**Chapter 1. Introduction**

Section 1. Research Background ---------- 17
Section 2. Research Objectives ---------- 22
Section 3. Research Scheme ---------- 25

**Chapter 2. Screening of antimicrobial peptides from korean amphibians and Fish and their applcations**

Section 1. Introduction ---------- 27
Section 2. Materials and Methods ---------- 28
Section 3. Results and Discussion ---------- 33
Section 4. Publications, Patents, and Applications ---------- 92
Section 5. References ---------- 97

**Chapter 3. Isolation and development of plant pathogen-specific antimicrobial peptides from korean plants**

Section 1. Introduction ---------- 108
Section 2. Materials and Methods ---------- 110
Section 3. Results and Discussion ---------- 113
Section 4. Publications, Patents, and Applications ---------- 142
Section 5. References ---------- 144

**Chapter 4. Isolation and development of antimicrobial peptides from korean insects**

Section 1. Introduction ---------- 148
Section 2. Materials and Methods ---------- 150
Section 3. Results and Discussion ---------- 154
Section 4. Publications, Patents, and Applications ---------- 174
Section 5. References ---------- 177

# 목 차

**제 1 장 서 론**

제1절 연구개발의 필요성 ---------- 17
제2절 연구개발 목표 및 내용 ---------- 22
제3절 연구개발 추진체계 ---------- 25

**제 2 장 한국고유 양서류 및 어류의 항균펩타이드 탐색 및 이용연구**

제1절 서 설 ---------- 27
제2절 연구 수행 방법 ---------- 28
제3절 결과 및 고찰 ---------- 33
제4절 연구성과 및 활용계획 ---------- 92
제3절 참고문헌 ---------- 97

**제 3 장 한국 고유식물의 항균성 펩타이드 탐색 및 식물병원균 방제물질 개발**

제1절 서 설 ---------- 108
제2절 연구 수행 방법 ---------- 110
제3절 결과 및 고찰 ---------- 113
제4절 연구성과 및 활용계획 ---------- 142
제3절 참고문헌 ---------- 144

**제 4 장 한국고유 곤충유래 항균펩타이드의 탐색 및 개발**

제1절 서 설 ---------- 148
제2절 연구 수행 방법 ---------- 150
제3절 결과 및 고찰 ---------- 154
제4절 연구성과 및 활용계획 ---------- 174
제3절 참고문헌 ---------- 175

**부록:**

주요 발표 논문 ---------- 177

# 제 1 장 서 론

# 제 1 절. 연구개발의 필요성

## 1. 연구개발의 필요성

### 가. 기술적 측면

항균펩타이드는 그 작용범위가 거의 모든 병원균에서 암세포 및 바이러스에까지 이르러 기존의 항생제보다 그 특성이 우수함이 인정되나 분자량이 작고 aromatic amino acid를 적게 함유하고 있어 기존의 단백질 및 펩타이드 분리법으로는 쉽게 탐지되지 않아 이를 탐색하기 위해서는 기존의 방법으로 불순물을 제거후 HPLC를 이용하여 거의 모든 fraction을 받아 이들을 직접 미생물에 대하여 항균력을 측정한 후 분리추출하여야 한다. 이 과정에서 시료의 손실이 많으므로 효과적으로 단시간내에 시료의 손실없이 대량분리하는 방법의 개발이 필요하며 또한 분리된 물질의 항균력과 안전성을 정확하게 측정할 수 있는 방법이 필요하다.

분리된 항균펩타이드의 구조를 파악하기 위하여 아미노산 분석과 펩타이드 아미노산 서열을 파악하여야 되고 이를 검증하기 위해서 화학적으로 합성하여 그 특성을 비교하여야 한다. 상기와 같이 펩타이드를 단시간에 순수분리하여 특성을 파악할 방법을 개발하여 이용하면 유용한 항균펩타이드를 함유한 우리 고유의 생물자원을 대량 확보 보존할 수 있다. 확보된 생물자원에서 유용 항균펩타이드를 대량으로 분리정제하는 기술 개발이 필요할 뿐아니라 이들 항균펩타이드를 이용한 식품보존제 개발, 신의약 및 생물농약의 개발과 형질전환을 통한 내병성 식물 개발 기술이 절실히 요구되고 있다. 또한 탐색 분리한 항균펩타이드를 인체유용물질로 개발을 위하여는 인체 안정성 실험이 동시에 이루어져야 한다. 그러므로 본 과제를 통한 펩타이드 분리정제 기술, 구조분석 기술, 생물농약 개발, 형질전환에 의한 내병성 식물 개발 및 펩타이드 안정성 연구개발 등의 종합적인 기술 확보가 가능해지며 상호보완적으로 기술이 개발될 수 있다.

### 나. 경제 산업적 측면

항균펩타이드 탐색 및 이용연구를 통하여 새로운 항균펩타이드를 개발하면 이를 식품보존제, 구강청결제, 외상치료제, 항균제 및 항암치료제 등으로 개발이 가능할 뿐아니라 새로운 생물농약제 및 내병성 농작물 개발로서 농민의 소득증대를 시킬 수 있다. 또한 우리고유의 생물자원에서 개발된 항균펩타이드를 해외로 수출할 수 있어

국가적으로 큰 경제적 이득을 줄 수 있다. 기존의 항생제 남용으로 생기는 건강문제점을 미연에 방지할 수 있어 의료비용을 크게 절감할 수 있고 유용 항균펩타이드를 다량 함유한 우리 생물자원을 대규모로 재배 및 사육하여 농민들의 경제적 이득을 도모할 수 있고 신의약 개발 사업에 기폭제 역할을 할 수 있다.

### 다. 사회 문화적 측면

새로운 항균펩타이드가 개발되면 인류를 질병의 위협으로부터 해방시켜 편안하고 인간적인 삶을 영위할 수 있게할 뿐아니라 경제적 손실을 예방하고 쾌적한 환경을 만들어 인류의 복지향상에 크게 기여할 수 있다. 또한 이를 이용한 생물농약 개발로 화학농약에의한 환경오염을 방지할 수 있으며 내병성 작물의 개발로 천연상태에서 청정농업을 할 수 있어 안심하고 농산물을 구입하고 소비할 수 있어 국민 보건 향상에 크게 이바지 할 수 있다.

## 2.. 국내외 관련기술의 현황과 문제점

### 가. 외국의 경우

자체 면역 능력이 없는 곤충이 어떻게 미생물의 침입으로부터 자신을 방어하는가에 대한 연구 결과로 누에 애벌레에서 새로운 펩타이드 항균제인 Cecropin이 발견된 이래 생리활성물질로서 펩타이드의 중요성이 크게 인식되었다. 특히 1987년 Zasloff에 의해 아프리카 개구리인 *Xenopus laevis*로부터 magainin이 발견된 후 여러가지 다양한 생물로부터 항균펩타이드의 탐색이 시작되었으며 특히 양서류의 피부에 많은 종류의 생리활성을 가진 펩타이드와 Amine이 존재하는 것으로 확인되었다. 지금까지 알려진 대표적인 항균펩타이드로는 cecropin, magainin, bombinin, apidaecin, tachyplesin 등을 들 수 있다. 이들 대부분은 cDNA cloning 방법에 의해 유전자의 염기서열과 구조가 밝혀졌으며 특히 magainin과 tachyplesin에 대해서는 그 구조와 기능사이의 연관관계 연구가 상당히 진척되어 있다. 아직까지 분리된 어떤 펩타이드도 의약품으로 실제 이용되지 못하고 실험단계에 있는데 magainin의 경우 Magainin Pharmaceutical Inc.에 의해 여러가지 유사 펩타이드가 합성되었으며 이중 MSI-78이라는 22개 아미노산으로 구성된 magainin 유사 펩타이드는 Phase IIb / III test를 마치고 1998년부터 발궤양치료제로서 판매되고 있다. 현재는 이들 펩타이드를 화학적 합성에 의하여 생산하고 있으며 보다 값싸게 대량공급하기 위하여 생물학적 대량생산법이 연구되고 있다. 이외에도 미국의 Xoma사와 캐나다의 Intrabiotic사에서 항균펩

타이드 Protegrin과 IB-367의 임상실험을 각각 수행하고 있다. 현재의 문제점으로는 이들 항균펩타이드의 항균력이 기존 항생제보다 약하고 대량확보에 문제점이 있어 이를 극복하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

## 나. 국내의 경우

국내의 일부 연구진들도 항균펩타이드에 대한 산발적인 연구를 하고 있으나 고급 제약용 개발이 주목적이라 농어민에게 직접 연구 혜택이 돌아가기 힘든 실정이다. 본 연구실에서는 지난 수년간 항균활성범위가 넓고 강하며 병원균에 대한 선택성이 우수한 여러가지 항균펩타이드를 분리하고 그 구조와 조성을 밝히고 특성을 연구하고 있는데 이중 두꺼비 위에서 분리한 39개 아미노산 잔기로 구성된 항균펩타이드인 buforin은 국제 특허를 출원하였다. 또한 본 연구진의 연구결과를 지난 96년 5월 ASM(미국미생물학회) 정기학회, 97년 3월 Gordon conference(항균펩타이드 국제학회), 98년 9월 ICAAC(항균물질 국제학회), 99년 4월 Gordon conference(항균펩타이드 국제학회) 등에 발표하여 좋은 반응을 얻었으며 현재 항균펩타이드의 대량확보가 전세계적으로 가장 큰 문제인데 본 연구진의 새로운 유전자조작에 의한 펩타이드 대량확보 연구에 많은 관심을 표명하였다. 그리고 위탁연구기관인 경상대 이상열 박사는 다년간 식물자원의 항균성 펩타이드 분리와 유전자 확보 및 식물병원진균 방제물질 개발에 관하여 연구하였으며 본 대학의 이균민 교수는 유용펩타이드 및 단백질의 대규모 분리 및 추출 방법에 관하여 수십 편의 해외 논문을 내어 많은 기구와 실험 방법이 Set-up되어 있어 본 연구의 후반기에 큰 역할을 할 것으로 기대된다. 현재 Buforin 내부의 아미노산 21개 잔기를 갖는 부분이 buforin보다 강한 항균력을 보여 이의 구조를 토대로 30여종의 펩타이드를 합성하여 국제 특허를 출원 하였으며, 메기로부터 항균펩타이드가 새로 발견되어 이들의 연구결과를 국내 및 국제 특허를 출원중이다.

## 다. 문제점

항균펩타이드가 인체 유용한 의약품, 식품 첨가제 및 생물농약으로 널리 사용되기 위해서는 cytotoxicity가 없고 항균활성이 높으며 숙주세포 이외의 침입균세포에 대한 선택성이 높아야 되는 문제점이 있다. 이와 같은 항균펩타이드 탐색 작업이 꾸준히 진행되고 있으나 현재까지 미국 FDA 승인을 받아 의약용으로 정식으로 사용되는 것은 98년에 처음 발궤양치료제로 시판되는 MSI-78 하나뿐이다. 국내에서도 항균펩타이드의 중요성이 인식되어 최근 2-3년간 일부대학과 연구소에서 기본적인 연구를 수행하고 있으나 보다 체계적이고 지속적인 연구가 필요한 실정이다. 식물체내에서

antifungal 및 insecticidal 펩타이드의 발현은 현재까지 만족할 수준이 안되며, 특히 broad한 range의 병원균 내성물질의 개발은 아주 느린 속도로 진행되고 있다. 또한 곤충의 행태와 서식지 특성에 관한 기본자료가 부족하여 곤충유래 생체활성물질 및 유전자 탐색관련 시스템이 상대적으로 부족하다. 또한 기존의 펩타이드 분리법으로는 항균펩타이드를 손쉽게 탐지할 수 없고 또 분리과정에서 시료의 손실이 크고 많은 시간이 소요되는 단점이 있으므로 단시간에 항균펩타이드를 순수분리하여 특성을 파악할 수 있는 방법의 개발이 필요며 항균펩타이드를 대량으로 확보하지 못하여 상업화에 제한을 받고 있으므로 값싸게 대량으로 얻을 수 있는 생물학적 대량생산 방법의 개발이 절실히 요구된다.

## 3. 앞으로의 전망

기존의 항생제의 장기적 사용에 의한 내성이 강한 병원균이 다수 발생되고 이들의 부작용이 점점 심화되고 있으나 기존 항생제의 단순변형에 의한 연구에만 치중하여 신규 항균제 개발이 늦어지고 있다. 항균펩타이드는 생체내에서 직접 존재하며 그 구조가 아미노산으로 되어 있어 단순하며 항균 작용후 쉽게 분해되므로 이에 대한 집중적인 연구가 진행될 전망이다. 또한 항균펩타이드 중에서 인류가 식용으로 사용하는 동·식물 및 곤충에서 분리된 것은 그 자체가 인체에 안전하므로 이를 이용한 생물농약 및 내병성 식물종자 개발에 직접 이용할 수 있어 이에 대한 연구도 동시에 병행될 것으로 생각이 된다. 또한 성능이 우수한 항균펩타이드를 함유한 생물자원의 확보로 농어민의 소득증대를 도모할 수 있을 뿐 아니라 이들을 신물질로 제품화하여 해외 수출로 다가오는 UR에 대비할 수 있는 좋은 연구과제라 생각된다.

## 4. 기술도입의 타당성

선진 각국이 생물자원 확보 및 신기능 생물 소재 개발에 따른 기술적 경제적 이득을 확보하기 위하여 매년 수십편의 국제 특허를 내고 있으며 외국 특허가 국내에도 들어와 있는 실정이다. 따라서 우리도 유전자원의 확보 및 시장 개방화에 대응하기 위해 외국으로부터의 기술 도입보다는 국내 자체의 신규물질 탐색 및분석방법 개발하여 직접 사용하고, 이들 기술을 선진국과 상호교환하면서 필요한 경우 공동연구하는 것이 바람직하다. 특히 본 과제의 기술수준은 외국 선진국과 비교하여 그다지 뒤져있는 상황이 아니고 항균펩타이드의 대량생산 연구는 세계적 수준이라고 자부하므로 적극적 지원 여부에 따라 본 연구를 국제적 수준으로 올릴 수 있다.

국내외 기술수준 비교표

| 기 술 항 목 | 국 내(%) | 국 외(%) |
|---|---|---|
| 항균펩타이드 분리 정제 기술 | 90 | 100 |
| 유전자 조작 기술 | 90 | 100 |
| 식물형질 전환 기술 | 60 | 100 |
| 생물농약 개발 기술 | 50 | 100 |
| 펩타이드 구조분석 기술 | 90 | 100 |
| 발효공정 기술 | 90 | 100 |
| 의약품 제제화 기술 | 30 | 100 |

# 제 2 절: 연구개발 목표 및 내용

## 1. 연구개발의 최종목표

가. 한국 고유 동·식물 및 곤충에서의 신규 항균펩타이드의 탐색 및 분리, 정제
나. 항균펩타이드를 이용한 식품보조제, 항균제, 항암제, 항바이러스, 외상치료제 및 구강청결제로의 개발
다. 항균펩타이드를 이용한 새로운 생물농약의 개발
라. 항균펩타이드를 식물세포에 형질전환시켜 내병성 식물 개발
마. 항균펩타이드의 유전자 구조 분석 및 생물체내에서의 생산기작연구에 의한 고유 생물자원의 개량
바. 항균물질함유 한국고유 생물자원 확보 및 보존

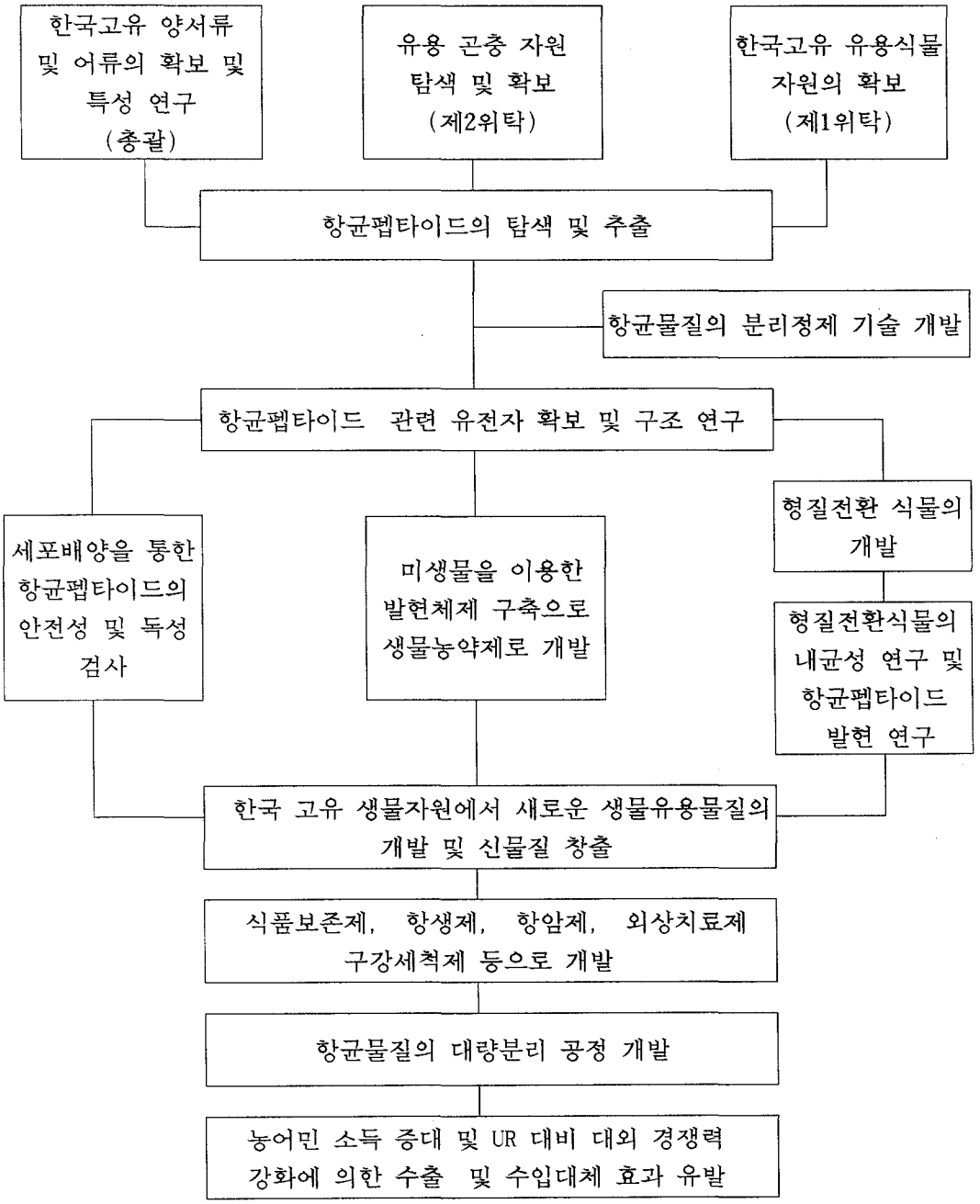
## 2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 연 구 개 발 내 용 및 범 위 |
|---|---|---|
| 1차 년도 1996 | ㅇ 고유 양서류 및 어류 확보 및 항균펩타이드 탐색 | - 생체부위에 따른 항균물질 탐색 및 분리 정제<br>- 아미노산 조성 및 아미노산 서열 분석 |
| | ㅇ 항균펩타이드 대량분리 방법 및 공정 개발 | - 대형 분리 column 제조 및 소규모 공장 설계<br>- 펩타이드만 선택적으로 추출법 개발 |
| | ㅇ 유용작물에 감염하는 병원성 곰팡이에 대한 저항성 펩타이드의 분리 및 유전자 클로닝 | - 새로운 종류의 강력한 항균성 펩타이드의 분리와 항균력 측정<br>- 병원성 곰팡이에 대하여 강력한 살균력을 가지는 펩타이드에 대한 유전자 확보 |
| | ㅇ 유용곤충 및 곤충유래 항균 펩타이드 탐색 및 유전자 확보 | - 대상 곤충 탐색 및 확보<br>- 항균펩타이드 탐색 및 지표유전자 확보 |

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 연 구 개 발 내 용 및 범 위 |
|---|---|---|
| 2차 년도 1997 | ㅇ 고유 양서류 및 어류로부터 탐색된 항균펩타이드의 유전자 확보 | - 항균펩타이드 유전자 클로닝 및 유전자 구조 분석 |
| | ㅇ 항균펩타이드 분리공정 최적화 | - 펩타이드 대량 분리 및 안정성 연구 |
| | ㅇ 식물유래 항균펩타이드의 분리 및 유전자 클로닝 | - 항균펩타이드 분리 및 유전자 확보<br>- Differential display cDNA 방법에 의한 항균유전자 screening |
| | ㅇ 곤충유래 항균펩타이드 분리 및 특성 분석 | - 항균펩타이드 분리, 정제 및 생물학적 특성 분석 |
| 3차 년도 1998 | ㅇ 항균펩타이드 유전자 발현과 항균물질 생산 | - 항균펩타이드 아미노산 조성 변경 및 활성측정 |
| | ㅇ 항균펩타이드 유전자 발현과 항균물질 생산 | - 대장균을 이용한 overexpression<br>- 발현된 항균펩타이드의 활성 측정 |
| | ㅇ 유용한 식물에서의 항균물질 생산을 위한 발현벡터 개발 | - Inducible, tissue-specific, developmental stage-specific expression vector 개발 |
| | ㅇ 곤충유래 항균펩타이드 및 관련유전자 분리 및 특성 분석 | - 항균펩타이드의 물리, 화학적 특성 분석<br>- 관련유전자 분리 및 특성 분석 |

| 구 분 | 연 구 개 발 목 표 | 연 구 개 발 내 용 및 범 위 |
|---|---|---|
| 4차 년도 1999 | ㅇ 항균펩타이드의 생물학적, 물리화학적 특성 분석 | - 항균 작용 기작 규명<br>- NMR을 통한 구조 분석 |
| | ㅇ 항균펩타이드의 독성 및 안전성 연구 | - 동물세포 배양을 통한 항암성 연구<br>- Cytotoxicity 분석 |
| | ㅇ 병충해 내성의 유전자 구축과 형질전환 작물 개발 | - 형질전환 식물체 개발을 위한 transgenic DNA 구축<br>- 유용작물에 도입을 위한 형질전환 방법 개발 |
| | ㅇ 곤충유래 항균펩타이드 관련 유전자 발현 및 항균펩타이드 생산시스템 구축 | - 관련유전자 발현기구 해명<br>- 항균펩타이드 생산공정 개발 |
| 5차 년도 2000 | ㅇ 항균펩타이드 대량생산 및 실용화 | - 펩타이드 대량생산 최적화 조건 구축<br>- 항균펩타이드의 실용화<br>- 생물농약, 식품보전제, 외상치료제 및 구강청결제로 개발 |
| | ㅇ 내병성 형질전환 유용작물 개발과 응용 및 병원균 방제 물질 개발 | - 확립된 형질전환법을 이용하여 내병성 형질전환 유용작물 개발<br>- 유용작물에의 응용을 위한 생물농약으로의 실용화 확립 |
| | ㅇ 내병성 형질전환 작물의 종자 생산 및 수확량 변화 연구 | - 형질전환식물들에 병충해를 유발한 후 병징의 관찰<br>- 전체적인 형질전환작물의 수확량과 성장속도 관찰 |

# 제 3 절: 연구개발 추진체계



# 제 2 장 한국고유 양서류 및 어류의 항균펩타이드 탐색 및 이용연구

(총괄과제; 한국과학기술원 김선창)

# 제 1 절. 서 설

현재 의약품 및 농·축·수산 등에 남용되고 있는 항생제는 병원균의 항생제 내성 유발 및 농·축·수산물에 항생제 잔류 문제를 야기시키고 인간 및 동물의 질병에 대한 대처 능력을 크게 약화시키고 있다. 인간 및 동물을 질병으로부터 보호하기 위하여 항생제의 사용은 필요하나 기존의 항생제는 여러 가지 부작용이 너무 많아 새로운 항균제 물질의 개발이 절실히 요구되고 있다. 신규 항균물질 개발에는 크게 2가지의 해결해야할 문제점이 있다. 첫째는 기존의 항생제에 대응할 만한 항균력을 갖는 항균제의 탐색과 탐색된 항균제가 균의 내성을 유발시키지 말아야 하며 단 시간에 그 효과가 크고 잔류 문제의 해결을 위하여 쉽게 분해되어야 한다. 둘째는 이들 항균제가 농·축·수산 분야에 널리 이용되기 위해서는 값싸게 대량으로 확보할 수 있어야 한다. 천연 항생제를 탐색했다 해도 이를 제대로 대량공급할 수 없으면 그 유용성이 없다.

현재 이와 같은 특성을 모두 갖춘 항균제가 탐색되지 않고 이를 위한 연구가 산발적으로 진행되고 있다. 가장 강력한 후보로 떠오르는 것이 항균펩타이드인데 이는 기존의 문제점을 어느 정도 극복할 수 있어 크게 주목을 받고 있다. 국내에서는 부산대 이복률 교수가 테네신이라는 항진균물질을 풍뎅이에서 개발했고 서울대 유전공학연구소 이병재교수가 개구린이라는 항균물질을 개발하여 연구를 수행하고 있으며 생명공학연구소 함경수 박사팀에서 기존의 항균물질을 재조합시켜 조합 항균펩타이드를 만들어 연구하고 있다. 해외에서도 지금까지 2000 종류 이상의 항균펩타이드가 개발되었으나 이들 기존에 개발된 항균펩타이드들은 항균력이 약하고 항균범위가 좁아 연구가 기초 실험에 국한되고 있다.

병원균에 내성을 유발하지 않는 항균물질의 탐색 및 이용연구는 전세계적으로 활발히 진행되어 천연물질의 종류가 수천종류가 알려져 있으나 기존의 항생제에 비하여 항균력이 상대적으로 낮을 뿐 아니라 대량 확보가 힘들어 그 값이 비싸 기존의 농·축·수산에 널리 이용하기가 불가능하다. 또한 기존의 항생제를 이용한 새로운 유도체의 개발은 1994년 Science의 특집호에서 언급된 것처럼 그 한계에 도달하였고 차세대 항균물질은 펩타이드쪽으로 방향을 바꾸어야 한다고 주장하고 있다. 그러므로 기존의 항생제에 대응할 만한 항균력이 있는 항균펩타이드의 개발과 생물공학적 방법에 의한 대량생산법이 절실히 요구된다.

따라서 본 연구진은 한국고유 양서류 및 어류에서 항균력이 강하고 항균작용 범위가 넓은 항균펩타이드를 탐색하였으며, 이들의 구조-활성 연구를 통하여 항균력이 더욱 증진된 유도체 펩타이드를 개발하였다. 또한 대장균을 이용한 항균펩타이드의 대량 생산 및 분리공정을 확립하였다.

# 제 2 절. 연구 수행 방법

## 1. 한국 고유 양서류 및 어류의 확보

본 연구진의 야외 현지 채집 및 국내외 연구자들로부터의 분양을 통하였다.

## 2. 항균펩타이드의 탐색

### 가. 펩타이드의 분리

한국고유 양서류·어류 및 환형동물의 조직을 Polytron homogenizer를 이용하여 extraction 용액 [0.2M sodium acetate, 0.2% Triton X-100, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 또는 1% trifluoroacetic acid, 1M HCl, 5% formic acid, 1% NaCl]에서 분쇄, 펩타이드만을 선택적으로 추출한 다음 Sep-Pak cartridge를 이용하여 펩타이드들을 농축하였다. 농축된 펩타이드들은 다음으로 heparin column과 C18 reversed-phase HPLC로 분리하여 순수한 펩타이드를 얻었다.

### 나. 항균펩타이드의 분자량 측정 및 아미노산 서열분석

분리된 항균펩타이드의 분자량은 matrix associated laser desorption(MALDI) 질량분석기를 이용하여 측정하였으며 아미노산 서열은 Edman degradation을 자동화한 기기인 기체상의 자동 아미노산 서열기를 이용하여 분석하였다.

### 다. 항균펩타이드의 최소저해농도(MIC) 측정

여러 종류의 미생물들을 농도가 $1x10^8$/ml이 되게 배양한 다음 배양된 미생물을 $1x10^4$/ml의 농도로 희석 시킨 후 10 μl의 희석된 미생물 배양액과 규칙적으로 농도가 증가하는 시료와 섞어 25°C나 37°C에서 1시간 배양하였다. 다음으로 이 혼합용액을 고체 배지위에 spreading한 후 25°C나 37°C에서 12시간 배양하여 생기는 colony수를 조사하여 시료가 없는 경우 생기는 colony수 보다 적은 수의 colony가 생기게 하는 시료의 최소농도를 시료의 그 미생물에 대한 최소저해농도(MIC)로 정하였다. 이를 기존의 항생제의 MIC와 비교하여 항균력의 세기를 검증하였다.

### 3. 탐색된 항균펩타이드의 cDNA cloning 및 유전자 구조 분석

cDNA library 제조 kit을 사용하여 cDNA library를 제조하고 이를 탐색하여 항균펩타이드를 coding하는 유전자를 클로닝하고 염기서열을 결정하였다. 그리고 결정된 cDNA의 염기서열로부터 항균펩타이드의 유전자 구조를 분석하였다.

### 4. CD, NMR을 이용한 구조분석 및 구조-활성 연구를 통한 강력한 유도체 펩타이드 탐색

펩타이드의 2차구조의 조성을 계산하기 위하여 펩타이드의 CD spectrum을 조사하였다. 그리고 CD spectrum에 의한 펩타이드의 개략적인 구조정보를 바탕으로 NMR을 이용한 구조연구를 수행하였다. 이를 바탕으로 펩타이드 구조와 항균활성의 연관관계를 유도체 펩타이드를 합성하여 연구하였으며 가장 강력한 항균력을 가지는 유도체 펩타이드를 선정하였다.

### 5. 항균펩타이드 작용 기작 연구

#### 가. 펩타이드의 bactericidal 활성과 cell lysis 측정

펩타이드가 cell을 어떻게 죽이는 가를 밝히기 위하여 우선 펩타이드가 cell을 bactericidal하게 죽이는 지와 cell을 lysis시키는 지를 조사하였다. 이를 위하여 mid-logarithmic phase에 있는 $10^7$ cell에 펩타이드를 최소저해농도보다 높은 농도로 처리한 후 시간별로 sample을 취하였다. 이들을 적당히 희석하여 일부는 trpticase soy agar 배지에 plating한 후 37 ℃에서 incubation하여 생성되는 colony 수를 측정하였고, 나머지 일부는 spectrophotomter를 이용하여 630 nm에서의 흡광도를 측정하여 cell의 lysis가 일어 났는 지를 확인하였다.

#### 나. 펩타이드의 작용부위 연구

현재까지 알려진 항균펩타이드는 cell의 membrane에 작용하거나 cell 내에서 DNA나 RNA와 결합하여 작용하는 것으로 알려지고 있다. 이에 펩타이드가 cell의 어느 부위에서 작용하여 cell을 죽이는 가를 밝히기 위하여 펩타이드를 cell에 처리한 후 cell의 어느 부위에 존재하는 지를 현미경으로 관찰하였다. 펩타이드를 현미경 상에

서 관찰하기 위하여 펩타이드를 FITC로 염색하였다. FITC로 염색된 펩타이드를 mid-logarithmic phase에 있는 $10^7$ cell에 최소저해농도보다 낮은 농도와 최소저해농도로 처리한 후 이를 confocal laser 현미경을 이용하여 관찰하였다.

1) Confocal microscopy

*Escherichia coli*를 37℃에서 mid-logarithmic phase까지 배양하고 원심분리로 harvest한 다음, 10mM NAPB buffer(pH 7.4)로 washing 및 resuspension하였다. 이렇게 준비된 *E. coli* 세포 1ml ($10^6$ CFU/ml)을 poly-L-lysine을 사용하여 slide glass에 고정시켰다. 여기에 biotinylation된 항균펩타이드를 처리하고 streptavidin-FITC를 반응시키고 washing한 후에 confocal microscope을 사용하여 형광부위를 관찰하였다.

2) FACS 분석

*E. coli*를 37℃에서 mid-logarithmic phase까지 배양하고 원심분리로 harvest한 다음, 10mM NAPB buffer(pH 7.4)로 washing 및 resuspension하였다. 이렇게 준비된 *E. coli* 세포 1ml ($10^5$ CFU/ml)에 항균펩타이드 (1 μg/ml) 과 propidium iodide (8 μg/ml)을 처리하고 FACSCAN flow cytometer를 사용하여 483nm의 파장에서 분석하였다.

3) NPN uptake assay

*E. coli*를 37℃에서 mid-logarithmic phase까지 배양하고 원심분리로 harvest한 다음에 5mM HEPES buffer(pH 7.2)로 washing 및 resuspension한다. 이렇게 준비된 *E. coli* 세포 1ml ($10^5$ CFU/ml)에 항균펩타이드 (1 μg/ml) 과 1-N-phenylnapthylamine (NPN, 10 μM) 을 처리하고 형광을 발하는 정도를 fluorescent spectrophotometer로 측정하였다.

4) β-galactosidase assay

*E. coli* ML-35를 37℃에서 mid-logarithmic phase까지 배양하고 원심분리로 harvest한 다음에 10mM NAPB buffer(pH 7.4)로 washing 및 resuspension하였다. 이렇게 준비된 *E. coli* 세포 1ml ($10^5$ CFU/ml)에 1.5mM o-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG)와 항균펩타이드 (1 μg/ml)을 첨가하고 15분 동안 배양한 다음, 생성된 o-nitrophenol (ONP)를 spectrophotometer를 사용하여 420nm 파장에서 분석하였다.

### 다. Cell의 RNA/protein 합성 저해 조사

펩타이드가 cell내로 들어가 DNA나 RNA와 결합하여 cell의 transcription이나 translation을 저해하는 지를 조사하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. Cell에 펩타이드를 최소 저해 농도보다 낮은 농도로 처리한 후 방사선으로 염색된 RNA나 protein의 precursor인 (*methyl*-3H)- thymidine L-(4,5-3H)-leucine을 첨가하여 이들이 cell의 RNA나 protein에 incorporation되는 가를 조사하였다.

## 6. 항균펩타이드의 독성 및 안정성 연구

항균펩타이드 및 그 유도체들의 cytotoxicity의 유무를 적혈구에 대한 hemolysis assay를 이용하여 측정하였다. 3ml의 적혈구를 pH 7.4의 phosphate-buffered saline(PBS)로 washing한 후에 동일한 buffer로 총 volume이 20ml이 되도록 희석하였다. 이렇게 준비된 적혈구 suspension을 2 배수로 희석되어 있는 펩타이드가 10$\mu$l씩 들어 있는 각 microfuge tube에 190$\mu$l씩 분기하였다. 이 tube들을 37 ℃에서 30분간 incubation시킨 후 4,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 각 tube의 상등액을 100$\mu$l씩 취해서 PBS로 10배 희석한 후에 absorbance를 567 nm에서 측정하였다. 펩타이드 대신에 0.1% Triton X-100으로 처리한 적혈구 sample의 absorbance를 100% hemolysis로 정의하고 이에 대한 다른 sample들의 상대적 absorbance를 percent hemolysis로 정의하였다.

## 7. 유전자 재조합을 통한 대장균에서의 항균펩타이드의 대량생산 및 분리

### 가. 산성펩타이드 융합법을 통한 대장균에서의 항균펩타이드의 대량생산 및 분리

대장균에서의 발현을 위한 벡터를 promoter inversion vector와 pET21c vector를 이용하여 제조하였다. 항균펩타이드의 양전하를 중화하기 위하여 적당한 음전하수를 갖는 산성펩타이드를 선별한 다음 선별된 산성펩타이드와 항균펩타이드의 유전자를 융합시킨 후 융합된 유전자를 gene amplification vector pBBS1에 cloning하고 이들의 multimer들을 얻었다. 얻어진 multimer들을 promoter inversion vector와 pET21c vector를 이용하여 발현하였다. CNBr 절단과 HPLC를 이용하여 발현된 융합단백질로부터 항균펩타이드만을 순수 분리하였다.

### 나. mRNA의 안정성 증가를 통한 항균펩타이드 생산량의 증대

Transcription과 translation의 synchronization이나 DeaD-box protein을 이용함으로써 mRNA의 안정성을 증가시켜 size가 큰 항균펩타이드 중합체의 발현을 증대시켰다. Transcription과 translation의 synchronization을 위해서는 expression vector로 사용된 pET21c vector로부터 T7 promoter 부위를 제거하고 그 부위에 tac promoter를 cloning함으로써, T7 RNA polymerase 대신에 *E. coli* RNA polymerase에 의하여 발현이 유도되도록 함으로써 transcription과 translation이 같은 속도로 진행되도록 하여 mRNA가 안정해지도록 하였다. 이와 같이 제작된 vector의 tac promoter downstream에 융합펩타이드 유전자의 multimer를 cloning하여 multimer들의 발현을 조사하였다. DeaD-box protein을 이용하여 mRNA의 안정성을 증가시키기 위해서는 DeaD-box protein과 융합펩타이드 multimer가 같은 cell내에서 발현되도록 하였다. 기존의 T7 promoter에 의하여 융합펩타이드 유전자가 발현되는 vector에서 DeaD-box protein이 같이 발현될 수 있도록 cloning하여 DeaD-box protein과 융합펩타이드 multimer가 induction과 동시에 같이 발현되도록 하여 발현된 DeaD-box protein이 융합펩타이드 multimer의 mRNA에 작용할 수 있도록 하였다.

## 8. 항균펩타이드의 이용 연구

대량으로 분리 정제한 항균펩타이드의 식품보존제, 외상치료제, 구강세척제, 항암제, 항생제, 생물농약제로의 개발 가능성을 제약회사들과 공동으로 연구하였다.

# 제 3 절. 결과 및 고찰

## 1. 한국고유 양서류, 어류 및 환형동물로부터 항균펩타이드 탐색 및 특성연구

현재까지 여러종류의 동·식물 및 곤충에서 항균펩타이드가 발견되었으나 전세계적으로 어류에서 항균펩타이드가 발견되었다는 보고는 없다. 따라서 본 연구에서는 한국산을 중심으로한 몇몇 어류로부터 항균활성을 나타내는 펩타이드의 존재 유무를 탐색한 결과 미꾸라지와 메기의 crude extract가 강력한 항균활성을 나타내었으며 단백질 분해효소인 proteinase K를 처리하여 펩타이드를 분해시킨후에는 항균활성이 없어짐을 보아 항균력을 나타내는 것이 펩타이드임을 확인하였다. 그런후 다음과 같이 항균펩타이드를 분리하고 그 특성을 분석하였다.

또한 한국산 양서류인 두꺼비와 황소개구리, 환형동물인 지렁이로부터도 같은 방법으로 항균펩타이드를 분리하고 그 특성을 분석하였다.

### 가. 미꾸라지 항균펩타이드의 분리 및 특성연구

1) 항균펩타이드의 분리 및 정제

미꾸라지 추출액을 heparin column을 이용해 추출액에 존재하는 여러 종류의 펩타이드들로부터 수종의 펩타이드만을 분획하였다. Heparin column으로 분획된 펩타이드들은 다시 C18 reversed-phase HPLC와 Gel permeation HPLC를 통해 순수한 펩타이드로 분리되어 그중 강력한 항균력을 가진 항균펩타이드를 선발하고 misgurin으로 명명하였다 (그림1).

2) 분리된 항균펩타이드의 특성분석 및 최소저해농도(MIC) 조사

분리된 항균펩타이드의 분자량을 MALDI 질량분석기를 이용하여 측정한 결과 그림2에서와 같이 2502 dalton임이 확인되었고 자동 아미노산 서열기를 이용하여 분리된 항균펩타이드의 아미노산 서열을 그림3과 같이 밝혔다. 이 아미노산 서열을 기존에 알려져 있는 다른 항균펩타이드들의 아미노산 서열과 비교한 결과 분리된 항균펩타이드가 새로운 항균펩타이드임을 확인하였다. 또한 분리된 항균펩타이드는 여러 가지 미생물에 대한 최소저해농도(MIC)를 측정한 결과 현재 미국에서 의약품으로 개발되고 있는 magainin 2보다 2-6배 더 높은 항균력을 가지고 있었다 (표1). 분리된 항균펩타이드의 작용기작은 그림4에서 보는 바와 같이 미생물의 세포막을 용해하여 세포내의

물질들이 밖으로 빠져나와 미생물을 죽이는 것으로 확인되었다.

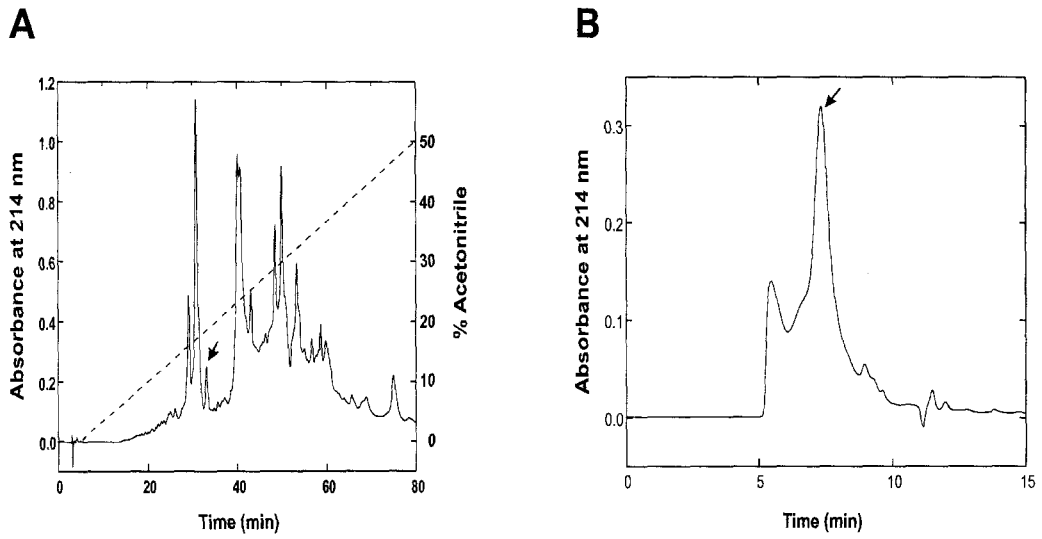



그림 1. 미꾸라지 항균펩타이드의 분리. A. Heparin column으로 일차분획한 active fraction을 C18 reverse-phase HPLC로 분리(화살표는 active peak를 나타냄). B. Gel-permeation HPLC를 이용한 active peak의 분리 (화살표는 active peak를 나타냄).

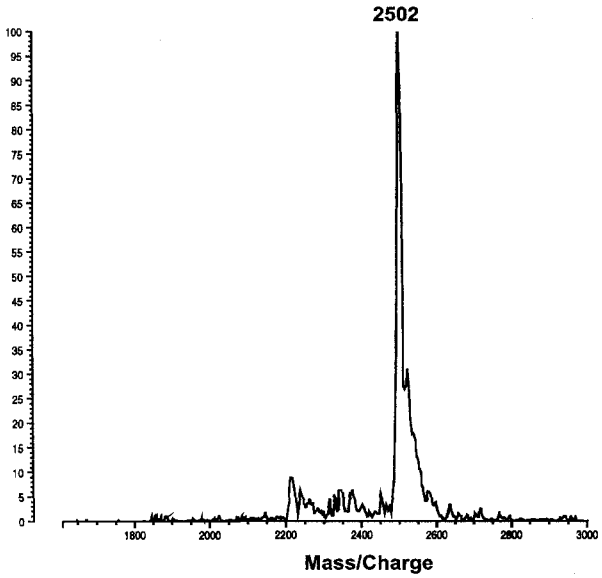



그림 2. 분리된 미꾸라지 항균펩타이드의 질량분석. 미꾸라지 항균펩타이드의 질량은 (MH+ = 2502) MALDI 질량분석기로 측정하였다.

1 10
**Arg-Gln-Arg-Val-Glu-Glu-Leu-Ser-Lys-Phe-**

11 20
**Ser-Lys-Lys-Gly-Ala-Ala-Ala-Arg-Arg-Arg-**

21
**Lys**

그림 3. 분리된 미꾸라지 항균펩타이드의 아미노산 서열. 미꾸라지 항균펩타이드의 아미노산 서열은 자동 아미노산 서열기를 이용하여 분석하였다.

| microorganism | minimal inhibitory concentration (μg/ml) | |
|---|---|---|
| | misgurin | magainin2 |
| Gram positive | | |
| *Bacillus subtilis* | 8 | 50 |
| *Staphylococcus aureus* | 8 | 50 |
| *Streptococcus mutans* | 16 | 100 |
| *Streptococcus pneumoniae* | 8 | 50 |
| *Pseudomonas putida* | 8 | 50 |
| Gram negative | | |
| *Escherichia coli* | 8 | 100 |
| *Salmonella typhimurium* | 8 | 25 |
| *Serratia sp.* | 16 | 50 |
| Fungi | | |
| *Candida albicans* | 16 | 25 |
| *Cryptococcus neoformans* | 8 | 12 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 4 | 25 |

**표 1. 미꾸라지 항균펩타이드와 magainin 2의 항균능력 측정.**

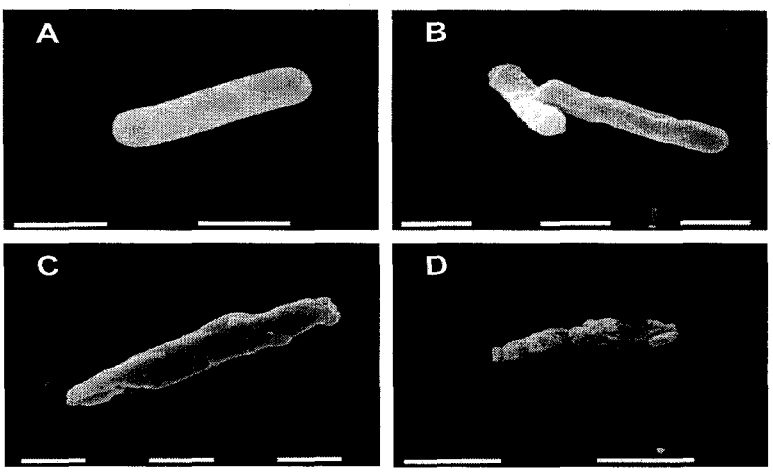



**그림 4. 미꾸라지 항균펩타이드와 머게이닌을 처리한 후 전자현미경을 이용한 *B. subtilis* 변화 관찰.**
**(A: control, B: 머게이닌을 최소저해농도로 처리한 후, C: 미꾸라지 항균펩타이드를 최소저해농도로 처리한 후, D: 미꾸라지 항균펩타이드를 최소저해농도의 5배농도에서 처리한 후)**

## 나. 메기 항균펩타이드의 분리 및 특성연구

### 1) 항균펩타이드의 분리 및 정제

메기의 표피조직을 Polytron homogenizer를 이용하여 extraction 용액 [0.2M sodium acetate, 0.2% Triton X-100, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)]에서 분쇄하고 Sep-Pak cartridge를 이용하여 펩타이드만을 선택적으로 추출 및 농축하였다. 농축된 펩타이드들을 C18 reversed-phase HPLC로 순수분리하고 항균펩타이드들 중 다양한 균주에 대해 강한 항균력을 지닌 항균펩타이드를 선별하여 이를 파라신 I이라 명하였다 (그림 5).

### 2) 분리된항균펩타이드의 특성분석 및 최소저해농도(MIC) 조사

파라신 I을 matrix associated laser desorption mass spectroscopy(MALDI-MS) 질량분석기로 분석하여 분자량이 2000.4 Da임을 측정하였다 (그림 6). Edman degradation 분석으로 파라신 I의 아미노산 서열이 KGRGKQGGKVRAKAKTRSS임을 밝혔다 (그림 7). 또한 아미노산 서열의 homology search로 파라신 I이 histone H2A의 N-말단으로부터 유래된다는 것을 유추할 수 있었다. 또한 여러 가지 미생물에 대한 최소저해농도(MIC)를 측정한 결과 현재 미국에서 의약품으로 개발되고 있는 magainin 2보다 25배 더 높은 항균력을 가지고 있었다 (표 2).

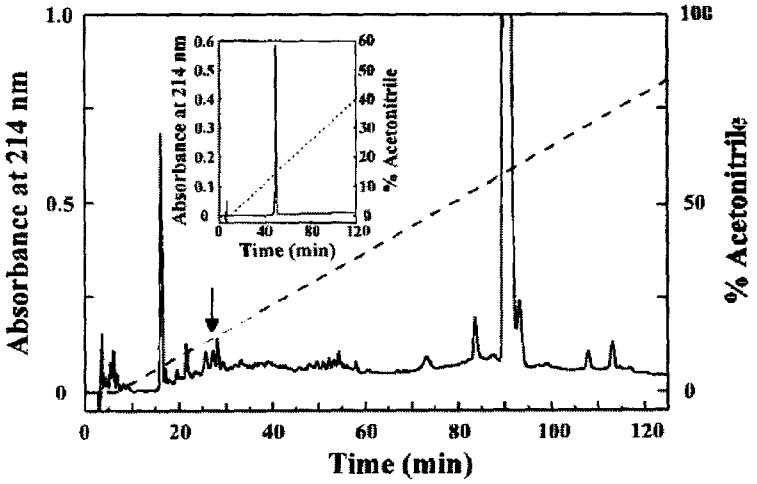



그림 5. 메기로부터 추출한 펩타이드들의 HPLC chromatogram. 화살표로 표시한 peak가 파라신 I임.

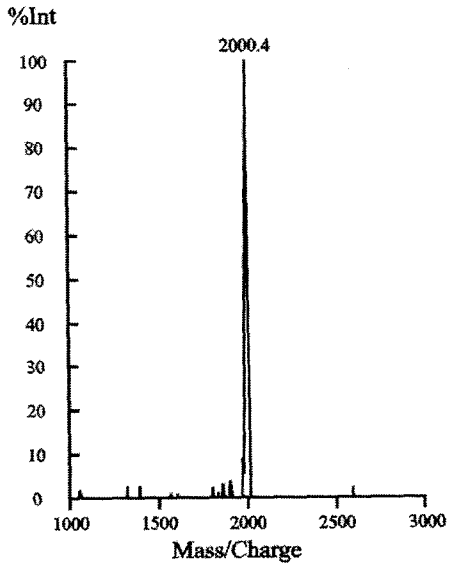



그림 6. 분리된 메기 항균펩타이드의 질량분석. 메기 항균펩타이드 (파라신 I)의 질량은 (MH+ = 200.4) MALDI 질량분석기로 측정하였다.

| Peptide | Amino acid sequence |
|---|---|
| | 1 5 10 15 20 25 |
| Parasin I | K G R G K Q G G K V R A K A K T R S S |
| Buforin I | A G R G K Q G G K V R A K A K T R S S R A G L Q F ... |
| Human histone H2A.5 | S G R G K Q G G K A R A K A K T R S S R A G L Q F ... |

그림 7. 분리된 메기 항균펩타이드의 아미노산 서열. 메기 항균펩타이드의 아미노산 서열은 자동 아미노산 서열기를 이용하여 분석하였다.

| Microorganism | Minimal inhibitory concentration (μg/ml) | | |
|---|---|---|---|
| | Parasin I | Buforin I | Magainin 2 |
| Gram-positive | | | |
| *Bacillus subtilis* ATCC 62037 | 1 | 4 | 50 |
| *Staphylococcus aureus* ATCC 15752 | 2 | 4 | 50 |
| *Streptococcus mutans* ATCC 25175 | 1 | 8 | 100 |
| *Pseudomonas putida* ATCC 17426 | 2 | 4 | 50 |
| Gram-negative | | | |
| *Escherichia coli* ATCC 27325 | 1 | 8 | 100 |
| *Salmonella typhimurium* ATCC 15277 | 2 | 4 | 25 |
| *Serratia* sp. ATCC 21074 | 4 | 8 | 50 |
| Fungi | | | |
| *Cryptococcus neoformans* ATCC 34881 | 2 | 4 | 12 |
| *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44774 | 2 | 4 | 25 |
| *Candida albicans* ATCC 10231 | 1 | 4 | 25 |

표 2. 파라신 I, buforin I, magainin 2의 항균능력 측정.

## 다. 두꺼비 항균펩타이드의 분리 및 특성연구

### 1) 항균펩타이드의 분리 및 정제

두꺼비 위 추출액을 heparin column을 이용해 추출액에 존재하는 여러 종류의 펩타이드들로부터 수종의 펩타이드만을 분획하였다. Heparin column으로 분획된 펩타이드들은 다시 C18 reversed-phase HPLC를 통해 순수한 펩타이드로 분리되어 그중 강력한 항균력을 가진 항균펩타이드를 선발하고 buforin I으로 명명하였다 (그림 8). 또한 Bufrorin I을 endoprotease Lys-C로 처리하여 생긴 21개의 아미노산으로 구성된 상력한 항균펩타이드를 buforin II라 명명하였다 (그림 10).

### 2) 분리된 항균펩타이드의 특성분석 및 최소저해농도(MIC) 조사

Buforin I, II를 각각 matrix associated laser desorption mass spectroscopy(MALDI-MS) 질량분석기로 분석한 결과 그 분자량이 4309 Da과 2432 Da임을 확인하였으며 (그림 9), Edman degradation 분석으로 아미노산 서열을 그림 10과 같이 밝혔다. 또한 아미노산 서열의 homology search로 bufroin I이 histone H2A의 N-말단으로부터 유래된다는 것을 유추할 수 있었으며 여러 가지 미생물에 대한 최소저해농도(MIC)를 측정한 결과 현재 미국에서 의약품으로 개발되고 있는 magainin 2보다 buforin I의 경우 3-12배 더 높은 항균력을 가지고 있었으며 buforin II는 6-25배 더 높은 항균력을 가지고 있었다 (표 3).

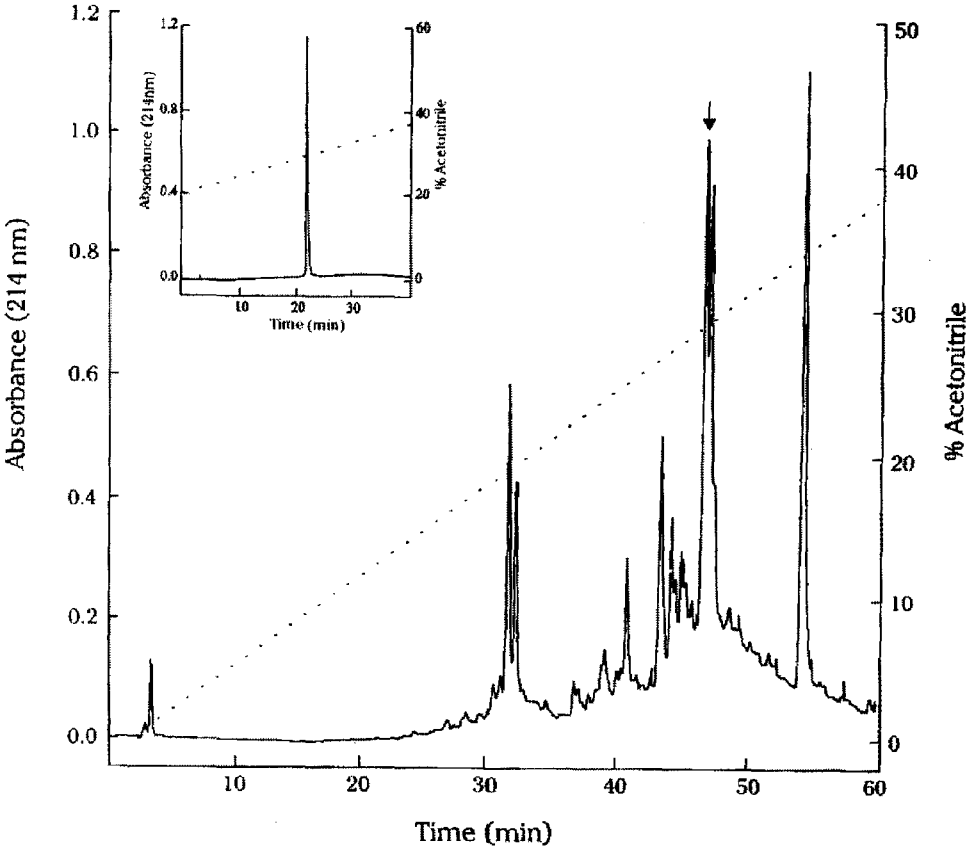



그림 8. 두꺼비로부터 추출한 펩타이드들의 HPLC chromatogram. 화살표로 표시한 peak가 buforin I임.

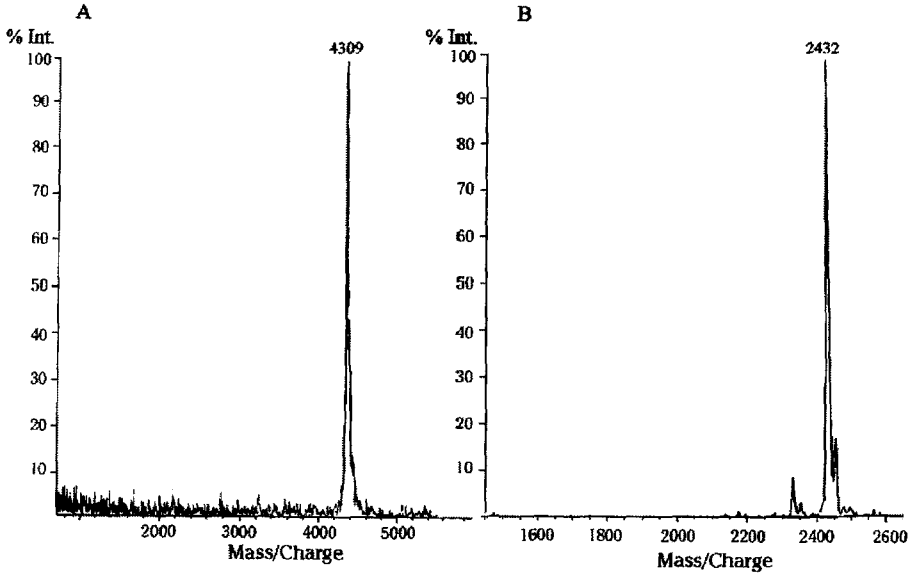



그림 9. Buforin I, II의 질량분석. Buforin I (A), II (B)의 질량은 MALDI 질량분석기로 측정하였다.

Comparison of Amino Acid Sequences of Buforin I, Buforin II and N-terminal Xenopus Histone H2A

| Peptide | Amino acid sequence |
|---|---|
| N-terminal of Xenopus histone H2A | S G R G K Q G G K T R A K A K T R S S R A G L Q F P V G R V H R L L R K G N Y A E R V |
| Buforin I | A G R G K Q G G K V R A K A K T R S S R A G L Q F P V G R V H R L L R K G N Y |
| Buforin II | T R S S R A G L Q F P V G R V H R L L R K |

그림 10. Buforin I, II의 아미노산 서열.

Antimicrobial Activities of Buforin I, Buforin II, and Magainin 2

| Microorganism | Minimal inhibitory concentrations* (μg/ml) | | |
|---|---|---|---|
| | Buforin I | Buforin II | Magainin 2 |
| Gram positive | | | |
| *Bacillus subtilis* | 4 | 2 | 50 |
| *Staphylococcus aureus* | 4 | 4 | 50 |
| *Streptococcus mutans* | 8 | 2 | 100 |
| *Streptococcus pneumoniae* | 4 | 4 | 50 |
| *Pseudomonas putida* | 4 | 2 | 50 |
| Gram negative | | | |
| *Escherichia coli* | 8 | 4 | 100 |
| *Salmonella typhimurium* | 4 | 1 | 25 |
| *Serratia sp.* | 8 | 4 | 50 |
| Fungi | | | |
| *Candida albicans* | 4 | 1 | 25 |
| *Cryptococcus neoformans* | 4 | 1 | 12 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 4 | 1 | 25 |

**표 3. Buforin I, buforin II, magainin 2의 항균능력 측정.**

## 라. 황소개구리 항균펩타이드의 분리 및 특성연구

### 1) 항균펩타이드의 분리 및 정제

황소개구리 위 추출액을 heparin column을 이용해 추출액에 존재하는 여러 종류의 펩타이드들로부터 수종의 펩타이드만을 분획하였다. Heparin column으로 분획된 펩타이드들은 다시 C18 reversed-phase HPLC와 cation-exchange HPLC를 통해 순수한 펩타이드로 분리되어 그중 강력한 항균력을 가진 3개의 항균펩타이드를 선발하고 각각 bullfrog pepsinogen A-derived antimicrobial peptide (bPaAP), bullfrog pepsinogen C-derived antimicrobial peptide (bPcAP)와 bullfrog buforin I으로 명명하였다(그림 11).

### 2) 분리된 항균펩타이드의 특성분석 및 최소저해농도(MIC) 조사

bPaAP, bPcAP 및 buforin I을 matrix associated laser desorption mass spectroscopy(MALDI-MS) 질량분석기로 분석한 결과 그 분자량이 1865.5, 3691.6, 4313.4Da임을 확인하였으며 (그림 12), Edman degradation 분석으로 아미노산 서열을 그림 13과 같이 밝혔다. 또한 아미노산 서열의 homology search로 bPaAP와 bPcAP는 각각 pesinogen A와 C의 propeptide로부터 유래되었다는 것을 알 수 있었으며 bullfrog bufroin I은 두꺼비에서 발견된 buforin I과 동일하였다. 그리고 여러가지 미생물에 대한 최소저해농도(MIC)를 표 4와 같이 측정하였으며 Edmundson wheel projection과 CD 분석을 통해 bPaAP와 bPcAP가 α-helix를 이루고 있음을 확인하였다 (그림 14).

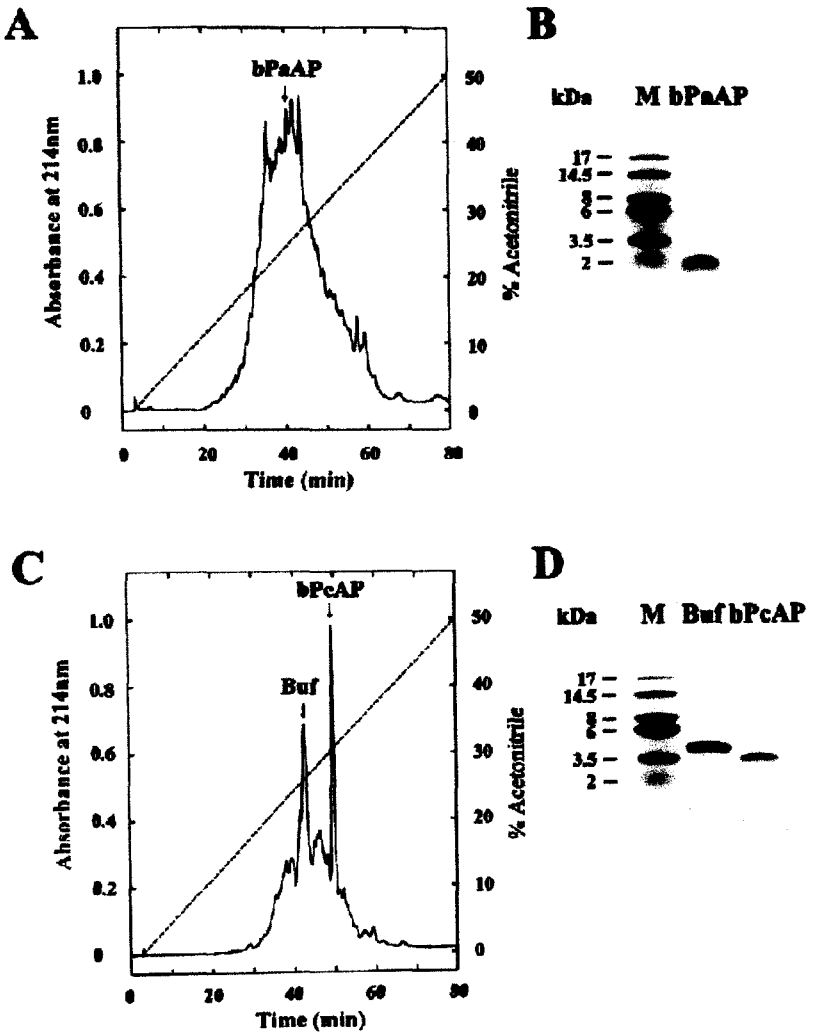



그림 11. 황소개구리로부터 추출한 펩타이드들의 HPLC chromatogram과 tricine SDS-PAGE. A, B는 bPaAP의 분리결과이며 C, D는 bPcAP와 bullfrog buforin의 분리결과임.

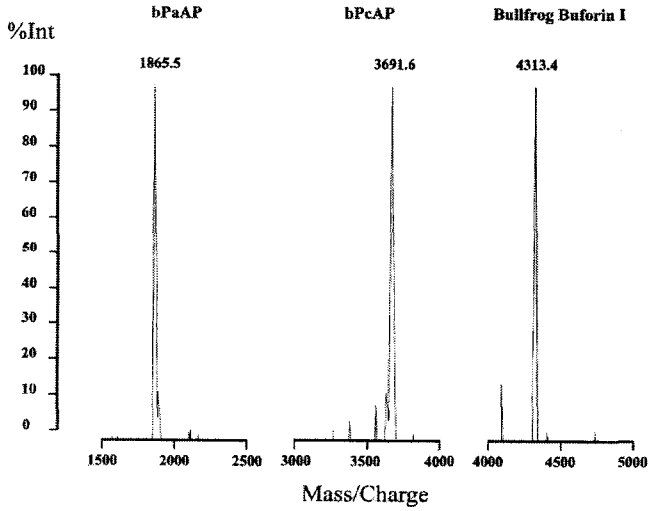



그림 9. 황소개구리로부터 분리한 항균펩타이드들의 질량분석.

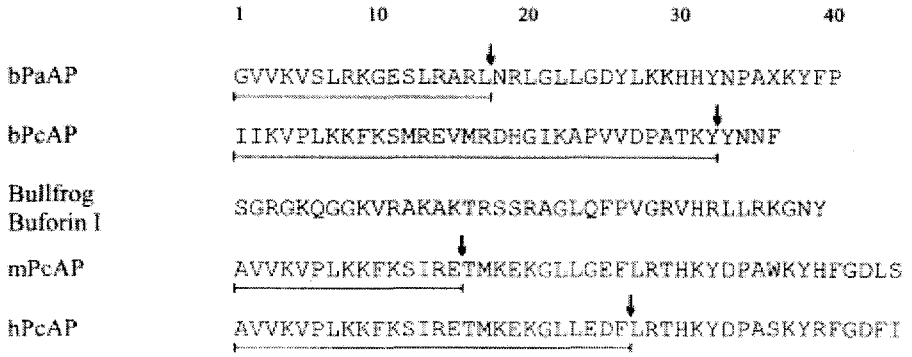



그림 13. 황소개구리로부터 분리한 항균펩타이드들의 아미노산 서열.

Antimicrobial activity of the isolated and synthetic antimicrobial peptides

| Microorganism | Minimal inhibitory concentration[a] (μg/ml) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | bPaAP | bPcAP | Bullfrog buforin I | mPcAP | hPcAP | Toad buforin I | Magainin 2 |
| Gram-positive | | | | | | | |
| *Bacillus subtilis* | 6 | 6 | 4 | 20 | 50 | 4 | 50 |
| *Staphylococcus aureus* | 20 | 6 | 4 | 50 | 100 | 4 | 50 |
| *Streptococcus mutans* | 6 | 6 | 8 | 30 | 50 | 8 | 100 |
| Gram-negative | | | | | | | |
| *Escherichia coli* | 10 | 10 | 8 | 50 | 50 | 8 | 100 |
| *Pseudomonas putida* | 10 | 6 | 4 | 100 | 100 | 4 | 50 |
| *Salmonella typhimurium* | 10 | 6 | 4 | 30 | 20 | 4 | 25 |
| *Serratia* sp. | 20 | 10 | 8 | 50 | 200 | 8 | 50 |
| Fungi | | | | | | | |
| *Candida albicans* | 10 | 10 | 4 | 100 | 100 | 4 | 25 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 6 | 6 | 4 | 10 | 12 | 4 | 12 |
| *Cryptococcus neoformans* | 6 | 6 | 4 | 40 | 100 | 4 | 25 |

[a]Minimal inhibitory concentration was determined by the radial diffusion assay as described in Section 2.

**표 4. 황소개구리로부터 분리한 항균펩타이드들의 항균능력 측정.**

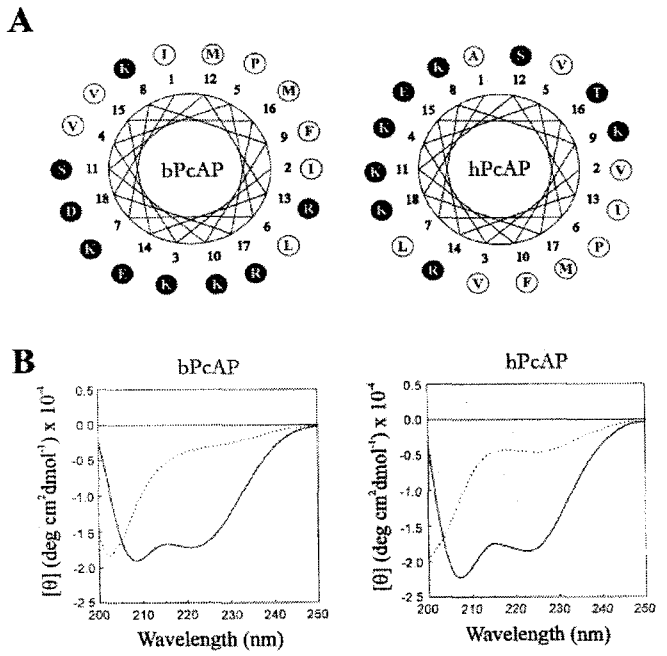



**그림 14. 황소개구리로부터 추출한 펩타이드들의 Edmundson wheel projection (A)와 CD spectra (B).**

## 마. 지렁이 항균펩타이드의 분리 및 특성연구

### 1) 항균펩타이드의 분리 및 정제

지렁이를 Polytron homogenizer를 이용하여 extraction 용액 [ 1% trifluoroacetic acid, 1M HCl, 5% formic acid, 1% NaCl]에서 분쇄하고 Sep-Pak cartridge를 이용하여 펩타이드만을 선택적으로 추출 및 농축하였다. 농축된 펩타이드들을 C18 reversed-phase HPLC로 순수분리하고 항균펩타이드들 중 다양한 균주에 대해 강한 항균력을 지닌 항균펩타이드를 선별하여 이를 lumbricin I이라 명하였다 (그림 15 A).

### 2) 분리된 항균펩타이드의 특성분석 및 최소저해농도(MIC) 조사

Lumbricin I을 matrix associated laser desorption mass spectroscopy(MALDI-MS) 질량분석기로 분석한 결과 그 분자량이 7231Da임을 확인하였으며 (그림 15 B), Edman degradation 분석으로 N-말단으로부터 22개의 아미노산 서열이 Phe-Ser-Lys-Tyr-Glu-Arg-Gln-Lys-Asp-Lys-Arg-Pro-Tyr-Ser-Glu-Arg-Lys-Asn-Gln-Tyr-Thr-Gly임을 확인하였다. 또한 여러가지 미생물에 대한 최소저해농도(MIC)를 측정한 결과 lumbricin I은 현재 미국에서 의약품으로 개발되고 있는 magainin 2보다 2-4배 더 높은 항균력을 가지고 있었으며 lumbrin I의 N-말단으로부터 유래한 lumbricin I(6-34)는 3-6배 더 높은 항균력을 가지고 있었다 (표 5).

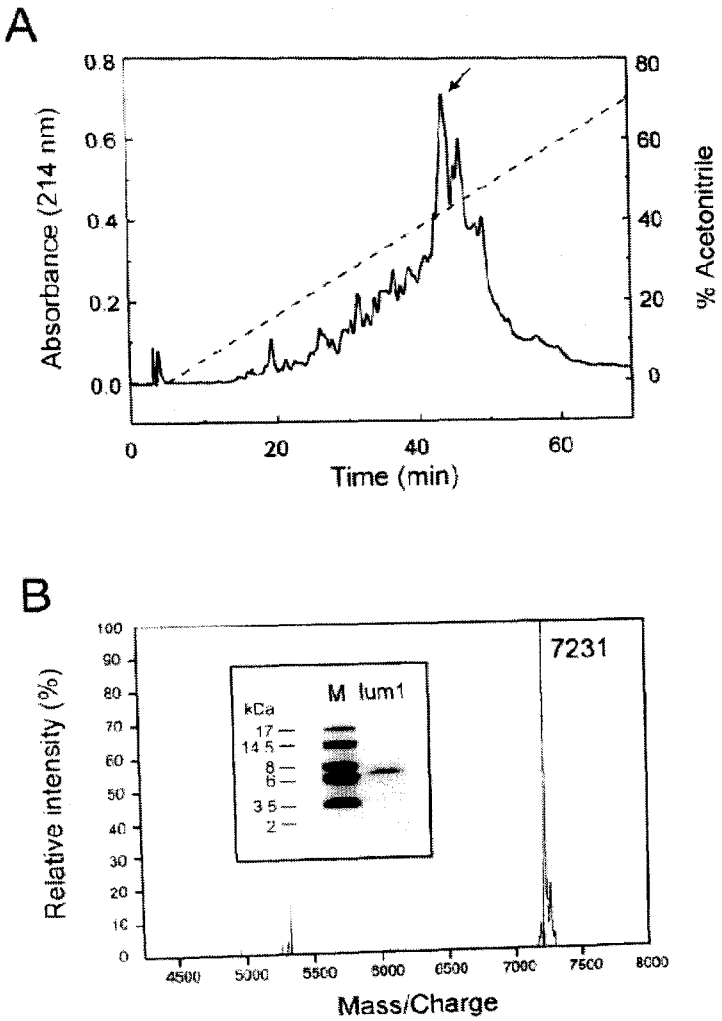



그림 15. 지렁이로부터 항균펩타이드의 분리. A. 지렁이에서 추출한 펩타이드들의 HPLC chromatogram. 화살표로 표시한 부분이 lumbricin I임. B. Lumbricin I의 질량 분석 및 tricine SDS-PAGE.

Antimicrobial activity of lumbricin I, lumbricin I(6–34) and magainin 2

| Microorganism (ATCC no.) | Minimal inhibitory concentrations (μg/ml) | | |
|---|---|---|---|
| | Lumbricin I | Lumbricin I(6–34) | Magainin 2 |
| Gram positive | | | |
| *Bacillus subtilis* (62037) | 12 | 8 | 50 |
| *Staphylococcus aureus* (15752) | 16 | 12 | 50 |
| *Streptococcus mutans* (25175) | 30 | 20 | 100 |
| Gram negative | | | |
| *Escherichia coli* (27325) | 12 | 8 | 100 |
| *Pseudomonas putida* (17426) | 16 | 12 | 50 |
| *Serratia* sp. (21074) | 16 | 12 | 50 |
| Fungi | | | |
| *Candida albicans* (10231) | 16 | 12 | 25 |
| *Cryptococcus neoformans* (34881) | 25 | 16 | 12 |
| *Saccharomyces cerevisiae* (44774) | 12 | 8 | 25 |

**표 5. 지렁이 펩타이드의 항균능력 측정.**

## 2. 항균펩타이드 cDNA cloning 및 유전자 구조 분석

### 가. RNA 분리

메기로부터 발견된 항균펩타이드 parasin I, 두꺼비로부터 발견된 항균펩타이드 buforin I과 지렁이로부터 발견한 항균펩타이드 lumbricin I의 cDNA를 얻기 위해서 먼저 각 조직으로부터 Chomczynski *et al.* 의 single step isolation method를 사용하여 totoal RNA를 분리하였다. 여기서 얻어진 total RNA를 poly(A)$^+$와 특이적으로 결합하는 oligo(dT)-cellulose affinity column을 이용 mRNA를 분리하였다. 분리된 RNA의 integrity는 1% formaldehyde-agarose gel을 이용하여 확인하였다.

### 나. First-strand cDNA의 합성

분리된 mRNA를 template로하여 universal adaptor sequence와 15개의 dT 잔기를 갖는 primer를 이용 first-strand cDNA를 합성하였다. 역전사효소로 M-MLV reverse transcriptase를 이용하였으며 만들어진 cDNA의 integrity는 반응에 사용된 dNTP mix에 [α-$^{32}$P]dCTP를 첨가하여 반응 종결 후에 반응물을 alkaline agarose gel에 running 하고 X-ray film에 expose 하여 확인하였다.

### 다. Oligonucleotide primer의 design 및 RACE를 통한 probe의 제조

RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends) 방법을 이용하여 cDNA library를 screening하는데 사용되는 probe를 제조하였다. RACE에 사용한 DNA primer의 제조는 항균펩타이드로부터 유추된 DNA 염기서열을 근거로 가능한 낮은 degeneracy를 갖는 부분을 priming region으로 선택하여 20개의 nucelotide로 만들었다. 합성된 gene specific primer와 universal adaptor primer를 이용하고 first-strand cDNA를 template로 RACE를 행하여 메기의 경우 약 170bp, 두꺼비와 지렁이의 경우 440bp의 specific product를 얻었다. 이 product를 전기영동된 agarose gel상에서 각각 size selection으로 분리한 다음 restriction enzyme으로 digest된 pBluescript 벡터에 cloning 하고 sequencing하였다.

### 라. cDNA library의 제조 및 screening

cDNA library를 만드는 방법으로 Gublerand Hoffman 방법을 이용하였다. First-strand cDNA로부터 second-strand cDNA를 합성하기위해 RNase H와 DNA

polymerase I, DNA ligase를 이용하였다. 합성후 T4 DNA polymerase를 이용하여 양 끝을 blunt-end로 만든다음 벡터에 cloning을 위해서 *Eco*R I adapter를 붙인후 universal adapter sequence에 포함된 *Xho* I으로 절단하였다. 과량의 adapter는 전기영동후 size selection을 함으로써 제거하였다. Cloning 벡터로는 Uni-Zap XR vector arms를 이용하였다. Cloning된 벡터를 *E. coli*에 도입하기위해 *in vitro* packaging을 이용하여 cDNA library를 제조하였다. 그런 다음 library를 RACE에 의해 얻어진 probe로 hybridization하여 screening 한 결과 parasin I과 buforin I의 경우 항균펩타이드 유전자가 독자적으로 존재하는 것이 아니라 histone H2A의 N-말단 부분이 cleavage 되어 생성되는 것으로 확인되었으며(그림 16, 17, 18) 지렁이의 경우 555bp로 구성된 full gene을 cloning 하였다 (그림 19). 이 지렁이 항균펩타이드 유전자의 아미노산 서열을 유추한 결과 proline잔기가 9개로 많은 특징을 가지고 있었으며 다른 proline-rich 항균펩타이드들과 homology를 비교한 결과 N-말단 부분이 상당한 유사성을 가지고 있었다 (그림 20).

```
  1                                                   Met Ser Gly Arg      4
  1   AT TCA GAC TTT CTG TCA CAT ACT GAA GCT ACC AAT ATG AGC GGA AGA     47

  5   Gly Lys Gln Gly Gly Lys Ala Val Ala Lys Ala Lys Thr Arg Ser Ser     20
 48   GGC AAA CAG GGA GGC AAG GCC GTG GCG AAG GCA AAG ACA CGT TCA TCC     95

 21   Arg Ala Gly Leu Gln Phe Pro Val Gly Arg Val His Arg Leu Leu Arg     36
 96   CGT GCC GGG CTC CAG TTC CCC GTG GGC CGT GTG CAC AGG CTG CTG CGT    143

 37   Lys Gly Asn Tyr Ala Glu Arg Val Gly Ala Gly Ala Pro Val Tyr Leu     52
144   AAA GGC AAC TAC GCC GAG CGT GTG GGC GCT GGC GCA CCA GTG TAC CTG    191

 53   Ala Ala Val Leu Glu Tyr Leu Thr Ala Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly     68
192   GCC GCA GTG CTC GAG TAC CTG ACT GCT GAG ATC CTG GAG TTG GCC GGA    239

 69   Asn Ala Ala Arg Asp Asn Lys Lys Thr Arg Ile Ile Pro Arg His Leu     84
240   AAC GCT GCC CGT GAC AAC AAG AAG ACT CGT ATC ATC CCC CGT CAC CTG    287

 85   Gln Leu Ala Val Arg Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gly Gly    100
288   CAG CTG GCA GTC CGT AAC GAC GAG GAG CTG AAC AAA CTG CTT GGC GGC    335

101   Val Thr Ile Ala Gln Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile Gln Ala Val Leu    116
336   GTC ACC ATC GCT CAG GGT GGT GTT CTG CCC AAC ATC CAG GCA GTG CTG    383

117   Leu Pro Lys Lys Thr Glu Lys Ala Val Lys Ala Lys ***                129
384   CTC CCC AAG AAG ACT GAG AAG GCC GTC AAA GCC AAG TAA AAT CGC TGG    431

432   TGC GGC TGC AAC CTG ACT ACT CAA CCC CCA AAG GCT CTT TTA AGA GCC    479

480   AAC CA                                                             484
```

**그림 16. 메기 항균펩타이드 Parasin I을 coding하는 유전자의 cDNA 염기서열 및 유추된 아미노산 서열. Parasin I을 coding하는 유전자는 독립적으로 존재하지 않고 histone H2A의 N-말단으로부터 유래하였음. Parasin I에 해당하는 아미노산 서열은 밑줄로 나타내었으며 histone H2A 유전자에 특이적인 inverted repeat sequence는 box로 표시하였음.**

```
1    GTC TGT ACA GAG AAG AGA ACG ATG TCT GGA CGC GGC AAA CAA GGA GGC   48
1                                Met Ser Gly Arg Gly Lys Gln Gly Gly    9

49   AAA GTG CGG GCT AAG GCC AAG ACC CGC TCA TCC CGG GCA GGC CTC CAG   96
10   Lys Val Arg Ala Lys Ala Lys Thr Arg Ser Ser Arg Ala Gly Leu Gln   25

97   TTC CCG GTC GGC CGT GTG CAC AGG CTC CTC CGC AAG GGC AAC TAC GCC  144
26   Phe Pro Val Gly Arg Val His Arg Leu Leu Arg Lys Gly Asn Tyr Ala   41

145  CAG AGG GTG GGC GCC GGC GCT CCC GTC TAC TTG GCC GCT GTG CTC GAG  192
42   Gln Arg Val Gly Ala Gly Ala Pro Val Tyr Leu Ala Ala Val Leu Glu   57

193  TAT CTC ACC GCC GAG ATC CTG GAG CTG GCC GGC AAT GCC GCC CGC GAC  240
58   Tyr Leu Thr Ala Glu Ile Leu Glu Leu Ala Gly Asn Ala Ala Arg Asp   73

241  AAC AAG AAG ACT CGC ATC ATC CCC CGT CAC CTG CAG CTG GCC GTG CGC  288
74   Asn Lys Lys Thr Arg Ile Ile Pro Arg His Leu Gln Leu Ala Val Arg   89

289  AAC GAC GAG GAG CTC AAC AAG CTG CTG GGC GGA GTC ACC ATC GCC CAG  336
90   Asn Asp Glu Glu Leu Asn Lys Leu Leu Gly Gly Val Thr Ile Ala Gln  105

337  GGG GGG GTC CTG CCC AAC ATC CAG GCC GTG CTG CTG CCC AAG ACC GAG  384
106  Gly Gly Val Leu Pro Asn Ile Gln Ala Val Leu Leu Pro Lys Thr Glu  121

385  AGC AGC AAG CCG GCC AAG AGC AAG TGA GCC CCG CTC TGC CCC GAA CCA  432
122  Ser Ser Lys Pro Ala Lys Ser Lys ***                              129

433  AAG GCT CTT CTA AGA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A                    466
```

그림 17. 두꺼비 항균펩타이드 buforin I을 coding하는 유전자의 cDNA 염기서열 및 유추된 아미노산 서열. Buforin I을 coding하는 유전자는 독립적으로 존재하지 않고 histone H2A의 N-말단으로부터 유래하였음. Buforin I에 해당하는 아미노산 서열은 밑줄로 나타내었으며 histone H2A 유전자에 특이적인 inverted repeat sequence는 화살표로 표시하였음.

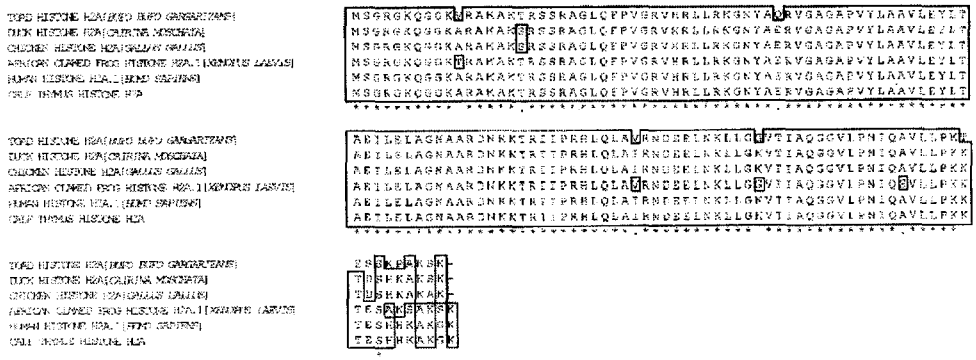


그림 18. 두꺼비 항균펩타이드 buforin I을 coding하는 유전자의 유추된 아미노산 서열을 다른 여러종류의 histone H2A 아미노산 서열과 비교.

```
  1   GG CAC GAG CTA TCT CTC TGC CTC ATC ACT CTC CCT TTC CCC TCT CTC     47
 48  TCT CTC ATT ATC TTG CTG TCT CTC TGT CTG ACT ATC ATG TCT CTC TGT     95
  1                                                Met Ser Leu Cys       4

 96  ATC TCT GAC TAT CTC TAT CTG ACT CTG ACT TTC TCA AAG TAC GAA CGC    143
  5  Ile Ser Asp Tyr Leu Tyr Leu Thr Leu Thr Phe Ser Lys Tyr Glu Arg     20
                                          ↑
144  CAG AAG GAC AAG AGG CCA TAC TCG GAA CGC AAG AAC CAA TAC ACG GGT    191
 21  Gln Lys Asp Lys Arg Pro Tyr Ser Glu Arg Lys Asn Gln Tyr Thr Gly     36

192  CCG CAG TTC CTC TAT CCT CCG GAG CGC ATC CCA CCG CAG AAG GTC ATC    239
 37  Pro Gln Phe Leu Tyr Pro Pro Glu Arg Ile Pro Pro Gln Lys Val Ile     52

240  AAA TGG AAC GAG GAG GGT CTT CCC ATC TAC GAA ATC CCC GGC GAA GGA    287
 53  Lys Trp Asn Glu Glu Gly Leu Pro Ile Tyr Glu Ile Pro Gly Glu Gly     68

288  GGT CAC GCA GAA CCA GCT GCC GCC TAG GTT AGA TTT CAG CTG AAC CGA    335
 69  Gly His Ala Glu Pro Ala Ala Ala ***                                 77

336  TTG CCA ACC GGA GAG GAA GAG AGT TGA TTT CGA TAG AGC GTG TGG ACA    383

384  GAA CTA TCA GCG TTC TTT TTA CCA TCG TCG CTA TAA GTC TAT CAC TCT    431

432  TAG AGG ATC AAG TAG ATT GCG TAG ACC TAG TTA ACT AAA CCT AAA TCA    479

480  ATT GTT GTC TTG GTT TTA AAT GAG TGG AGA GGA AAA TTA AAC AAA TTA    527

528  CAA CCC CTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA A                              555
```

**그림 19. 지렁이 항균펩타이드를 coding하는 유전자의 cDNA 염기서열 및 유추된 아미노산 서열.** The cloned cDNA was 555 base pairs in length and contained an open reading frame of 231 base pairs. The lumbricin precursor consisted of 76 amino acids with 14 residues in a pre-segment (*in italic*). The *arrow* indicates the end of the putative signal sequence. The sequence of the mature lumbricin is *underlined*. The *Kozak* motif-like sequence is indicated by a *double underline*. The stop codon and the polyadenylation signal are marked with *asterisks* and a *dotted line*, respectively. Proline residues are *boldface type*.

```
Lumbricin (6-34)   RQKD---KRPYSE--RKNQYTG---PQFLYP--PERIPP----
PR-39              RRRP---RPPYLPRPRPPPFFPPRLPPRIPPGFPPRFPP-RFP
Bac5               PFRPPIRRPPIRP-PFYPPFRPPIRPPIFPPIRPPFRPPKRFP
                    .   . *         .     *   *  *   **
```

그림 20. 지렁이 항균펩타이드와 다른 proline-rich 항균펩타이드들의 아미노산 서열 비교. The amino acid sequence deduced from cDNA encoding lumbricin (residues 6-34) was aligned with the sequences PR-39 and Bac5. Sequences were aligned using the CLUSTAL W program with default parameters (Thompson *et al.*, 1994). In aligning sequences, breaks are introduced to optimize the similarity. *Asterisks* and *dots* indicate perfect matches of amino acids and conserved substitutions, respectively. Residues identical in two or more sequences are *boxed*.

## 3. CD, NMR을 이용한 항균펩타이드의 구조 분석

### 가. 파라신 I 의 구조 분석

CD를 이용하여 parasin I 의 구조를 측정해 본 결과 parasin I은 α-helix 구조를 나타낼 것으로 예상되었다. 정확한 구조를 파악하고 이를 바탕으로 보다 강력한 유도체를 개발하기 위해서는 NMR을 통해 parasin I의 2차구조를 결정하는 것이 필요하다. 따라서 파라신 I을 30mM perdeuterated SDS 용액(pH 5.0)에 2mM의 농도로 녹여 시료를 준비하고 이 시료를 298K에서 500MHz NMR spectrometer로 분석하여 $^{1}$H-TOCSY NMR spectra를 측정한 다음, 이렇게 구한 spectra의 $^{1}$H chemical shift를 측정하고 finger print region을 분석하여 구조를 결정하였다.

$^{1}$H chemical shift로 나타난 finger print region (그림 21)을 분석한 결과 파라신 I의 잔기 9번부터 17번까지가 α-helix를 이루고 있었다 (그림 22). 이는 파라신 I이 총 19개의 잔기로 이루어져 있으므로 파라신 I의 47%가 α-helix를 이루고 있음을 나타낸다. 또한 파라신 I의 α-helix가 amphipathic한 구조를 이루는 것도 관찰되었다 (그림 23).

파라신 I의 NMR spectra를 SDS 용액에서 측정한 이유는 SDS가 용액에서 micelle를 형성하여 cell membrane와 유사한 성질을 나타내기 때문이다. 파라신 I이 SDS 용액에서 α-helix를 이루고 있다는 것은 파라신 I이 membrane과 접촉할 때 phospholipid의 hydrophilic head와 hydrophobic tail과 작용하여 α-helix의 구조가 나타난다는 것을 증명한다.

### 나. 부포린 II 의 구조 분석

파라신 1과 마찬가지로 CD 및 NMR을 이용하여 구조를 분석한 결과 buforin II는 크게 3가지의 domain으로 구성되었는데 그것은 N-terminal의 random region과 가운데의 extended helix region 그리고 C-terminal의 regular helix로 구성되어 있으며 이는 proline hinge에 의해 구분되어 있음을 확인하였다 (그림 24). 이러한 buforin II의 구조적 특징은 전체적으로 buforin II가 amphipathic한 성질을 띄게 한다 (그림 25).

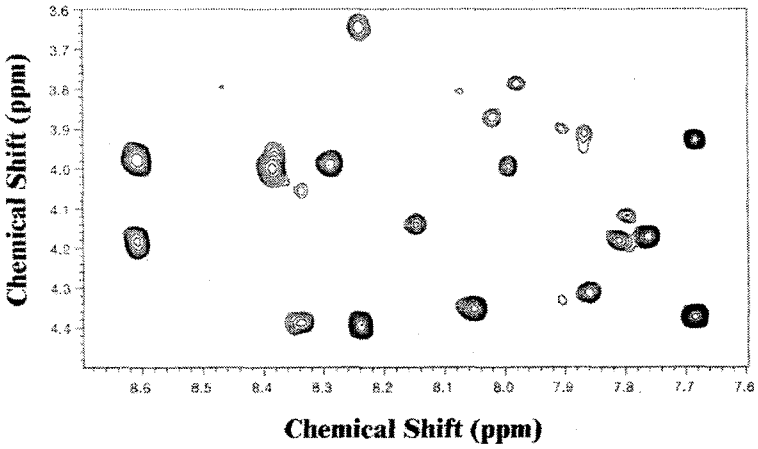



그림 21. 파라신 I의 $^{1}$H-TOCSY NMR spectrum

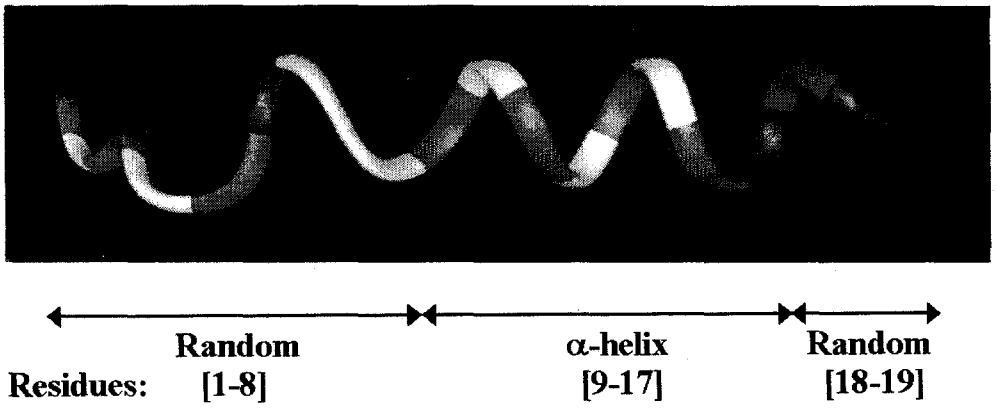



그림 22. 파라신 I의 backbone structure.

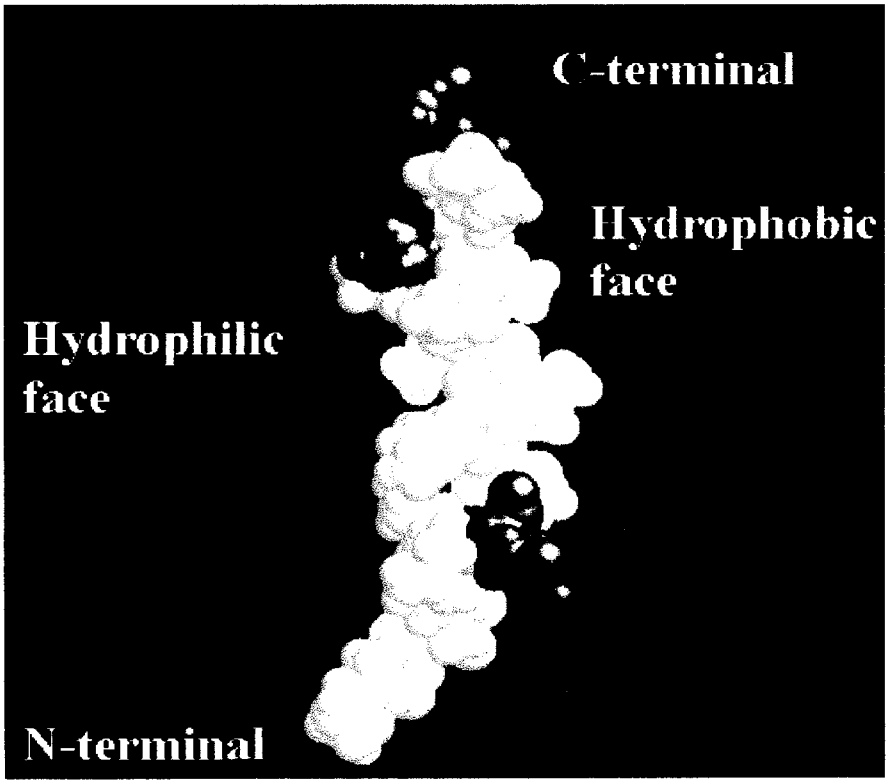



그림 23. 파라신 I의 space-fill model.

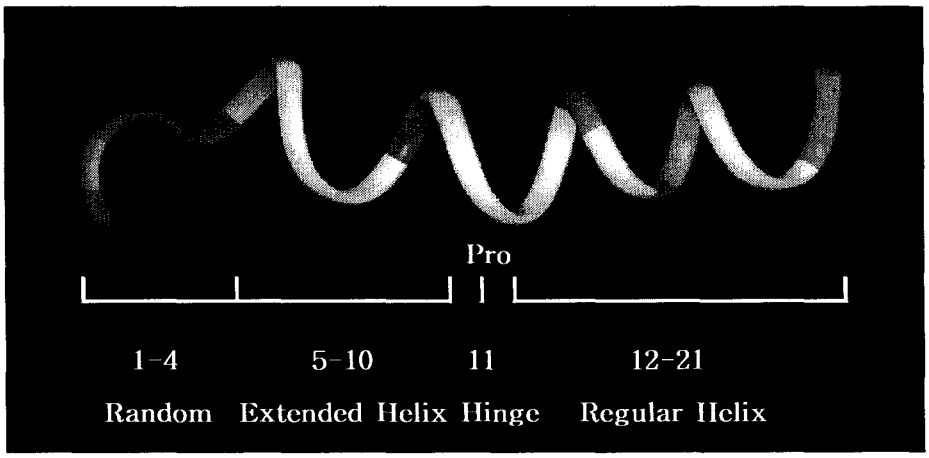



그림 24. Buforin II의 3차원 구조 model

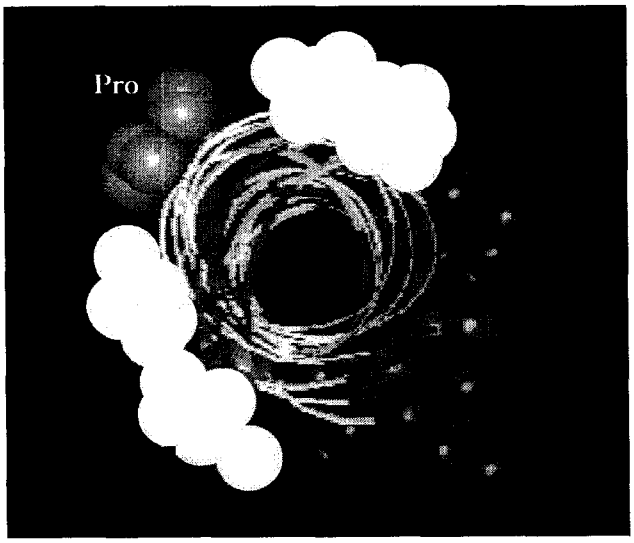



그림 25. Buforin II의 amphipathic 구조 model

## 4. 구조-활성 연구를 통한 강력한 유도체 항균펩타이드 개발

### 가. 항균펩타이드 파라신 I 의 유도체 연구

보다 더 강력한 항균력을 지닌 항균펩타이드를 개발하기 위해 파라신 I의 유도체들을 합성하여 항균력을 측정하였다. 파라신 I의 잔기들이 항균력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 파라신 I의 아미노산 잔기가 삭제된 유도체들을 표 6과 같이 합성하여 그들의 항균활성을 측정하였다. 표 7에서와 같이 C-말단을 삭제한 경우 항균력이 증가하였다. 조사된 유도체들 중에서는 파라신 I의 C-terminal 부분에 위치해 있는 4개의 잔기들을 제거한 펩타이드가 가장 강한 항균력을 나타내었고 N-terminal의 random coil이 항균력에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 관찰하였다. N 말단의 특정 아미노산들을 치환시킨 substitution analogs들을 표 8과 같이 합성하여 그들의 항균활성을 측정한 결과 N-terminal의 길이와 lysine과 같은 basic 아미노산의 유무가 중요하다는 것을 관찰하였다 (표 9). N-terminal의 lysine을 arginine으로 치환함으로서 항균력이 증진되었다.

### 나. 항균펩타이드 부포린 II 의 유도체 연구

부포린 II는 N-말단 random structure, extended helix, proline hinge, C-말단 amphiphilic helix의 4부분으로 구성되어 있다. 부포린 II의 각 구조가 항균력에 미치는 영향을 조사하기 위하여 부포린 II의 아미노산 잔기가 삭제되거나 치환된 유도체들을 표 10과 같이 합성하여 그들의 항균활성을 측정하였다. 표 11에서와 같이 N-말단 random structure를 삭제한 경우 항균력이 증가하였지만 N-말단으로부터 더 삭제하여 펩타이드 잔기가 6-21, 7-21, 8-21, 9-21, 10-21, 11-21로 줄인 경우 항균력이 감소하였다. 반면 C-말단에서 4 잔기를 삭제한 경우 항균력이 완전히 사라져 버렸다. 한편, proline-hinge를 leucine으로 치환 경우 항균력이 현저히 감소 하였으며 부포린 II 아미노산 서열의 특징적인 motif인 RLLR을 연속시킨 경우 박테리아에 대한 항균활성은 증가하였으나 항진균력은 감소하였다.

| Truncation analogs | Amino Acid Sequence |
|---|---|
| Pa(2-19) | G R G K Q G G K V R A K A K T R S S |
| Pa(1-17) | K G R G K Q G G K V R A K A K T R |
| Pa(1-15) | K G R G K Q G G K V R A K A K |
| Pa(1-14) | K G R G K Q G G K V R A K A |

표 6. 파라신 1 truncation analogs들의 아미노산 서열.

| Microorganisms | Minimal inhibitory concentrations (μg/ml)* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Parasin I | Pa[1-17] | Pa[1-15] | Pa[1-14] | Pa[2-19] | Buforin II | MSI344 |
| Gram positive | | | | | | | |
| Streptococcus mutans | 2 | 2 | 2 | 128 | 128 | 8 | 2 |
| Bacillus subtilis | 2 | 1 | 1 | 64 | 128 | 4 | 1 |
| Staphylococcus aureus | 4 | 4 | 4 | 128 | >128 | 4 | 4 |
| Staphylococcus epidermis | 2 | 2 | 2 | 128 | >128 | 2 | 4 |
| *Gram negative* | | | | | | | |
| Escherichia coli | 1 | 1 | 1 | >128 | >128 | 2 | 1 |
| Pseudomonas putida | 1 | 0.5 | 1 | 64 | 128 | 2 | 1 |
| Salmonella enteriditis | 4 | 4 | 4 | >128 | 128 | 4 | 4 |
| Klebsiella pneumoniae | 1 | 1 | 2 | 128 | >128 | 1 | 4 |
| Fungi | | | | | | | |
| Cryptococcus neoformans | 2 | 1 | 1 | >128 | >128 | 2 | 32 |
| Saccharomyces cerevisiae | 2 | 1 | 1 | >128 | >128 | 2 | 32 |
| Candida albicans | 2 | 1 | 1 | >128 | >128 | 2 | 32 |

표 7. 파라신 1 truncation analogs들의 최소저해농도.

| Substitution analogs | Amino Acid Sequence |
|---|---|
| [A[1]]Pa | A G R G K Q G G K V R A K A K T R S S |
| [S[1]]Pa | S G R G K Q G G K V R A K A K T R S S |
| [R[1]]Pa | R G R G K Q G G K V R A K A K T R S S |
| [K[1]]Pa(2-19) | K R G K Q G G K V R A K A K T R S S |

표 8. 파라신 1 substitution analogs들의 아미노산 서열.

| Microorganisms | Minimal inhibitory concentrations (μg/ml)* | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Parasin I | [A[1]]Pa | [S[1]]Pa | [R[1]]Pa | [K[1]]Pa(2-19) | Buforin II | MSI344 |
| Gram positive | | | | | | | |
| *Streptococcus mutans* | 2 | 16 | 16 | 1 | 32 | 8 | 2 |
| *Bacillus subtilis* | 2 | 16 | 32 | 2 | 32 | 4 | 1 |
| *Staphylococcus aureus* | 4 | 8 | 4 | 2 | 16 | 4 | 4 |
| *Staphylococcus epidermis* | 2 | 8 | 8 | 2 | 16 | 2 | 4 |
| Gram negative | | | | | | | |
| *Escherichia coli* | 1 | 4 | 8 | 0.5 | 8 | 2 | 1 |
| *Pseudomonas putida* | 1 | 4 | 16 | 1 | 16 | 2 | 1 |
| *Salmonella enteriditis* | 4 | 16 | 32 | 2 | 16 | 4 | 4 |
| *Kletsiella pneumoniae* | 1 | 16 | 8 | 1 | 16 | 1 | 4 |
| Fungi | | | | | | | |
| *Cryptococcus neoformans* | 2 | 8 | 4 | 2 | 8 | 2 | 32 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 2 | 8 | 16 | 1 | 16 | 2 | 32 |
| *Candida albicans* | 2 | 16 | 32 | 1 | 16 | 2 | 32 |

표 9. 파라신 1 substitution analogs들의 최소저해농도.

| 펩타이드 | 아미노산 서열 |
|---|---|
| Buforin II | TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK |
| BUF(5-21) | RAGLQFPVGRVHRLLRK |
| BUF(6-21) | AGLQFPVGRVHRLLRK |
| BUF(7-21) | GLQFPVGRVHRLLRK |
| BUF(8-21) | LQFPVGRVHRLLRK |
| BUF(9-21) | QFPVGRVHRLLRK |
| BUF(10-21) | FPVGRVHRLLRK |
| BUF(11-21) | PVGRVHRLLRK |
| BUF(1-17) | TRSSRAGLQFPVGRVHR |
| [Lys2][Lys6][Leu7]BUF(5-21) | RKGLQKLVGRVHRLLRK |
| [RLLR]5 | RLLRRLLRRLLRRLLRRLLR |

**표 10. 부포린 II와 그 유도체들의 아미노산 서열.**

| 미생물 | 최소저해농도 (μg/ml) | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Buforin II | BUF (5-21) | BUF (6-21) | BUF (7-21) | BUF (8-21) | BUF (9-21) | BUF (10-21) | BUF (11-21) | BUF (1-17) | [Lys$^2$][Lys$^6$] [Leu$^7$] BUF(5-21) | (RLLR)$_5$ |
| Gram positive bacteria | | | | | | | | | | | |
| *Bacillus subtilis* | 2 | 1 | 4 | 4 | 8 | 18 | 32 | 25 | >200 | 18 | 2 |
| *Staphylococcus aureus* | 4 | 2 | 8 | 8 | 18 | 62 | 32 | 50 | >200 | 18 | 1 |
| *Streptococcus mutans* | 2 | 1 | 4 | 4 | 8 | 36 | 32 | 25 | >200 | 36 | 2 |
| *Streptococcus pneumonia* | 4 | 2 | 4 | 4 | 18 | 18 | 32 | 50 | >200 | 18 | 2 |
| Gram negative bacteria | | | | | | | | | | | |
| *Escherichia coli* | 4 | 2 | 2 | 2 | 8 | 36 | 32 | 25 | >200 | 18 | 2 |
| *Salmonella typhimurium* | 1 | 2 | 2 | 2 | 4 | 18 | 16 | 25 | >200 | 4 | 1 |
| *Serratia macerance* | 4 | 2 | 2 | 2 | 8 | 36 | 32 | 50 | >200 | 36 | 2 |
| *Pseudomonas putida* | 2 | 1 | 4 | 4 | 18 | 18 | 64 | 50 | >200 | 18 | 2 |
| Fungi | | | | | | | | | | | |
| *Candida albicans* | 1 | 1 | 8 | 8 | 36 | 62 | 32 | 50 | >200 | 16 | 8 |
| *Cryptococcus neoformans* | 1 | 1 | 8 | 8 | 62 | 62 | >100 | 50 | >200 | 8 | 8 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 1 | 1 | 8 | 8 | 36 | 62 | >100 | 50 | >200 | 4 | 8 |

**표 11. 부포린 II 와 그 유도체들의 최소저해농도.**

## 5. 항균펩타이드 작용 기작 연구

### 가. 파라신 I 의 작용 기작 연구

Confocal microscopy, NPN uptake assay와 β-galactosidase assay를 통해 항균펩타이드 파라신 I의 정확한 작용기작과 작용부위를 확인하였다.

1) Confocal microscopy

*Escherichia coli*를 37℃에서 mid-logarithmic phase까지 배양하고 원심분리로 harvest한 다음, 10mM NAPB buffer(pH 7.4)로 washing 및 resuspension한다. 이렇게 준비된 *E. coli* 세포 1ml ($10^6$ CFU/ml)을 poly-L-lysine을 사용하여 slide glass에 고정시켰다. 여기에 biotinylation된 파라신 I 을 처리하고 streptavidin-FITC를 반응시키고 washing한 후에 confocal microscope을 사용하여 형광부위를 관찰하였다.

Strepavidin은 biotin에 대해 강한 affinity를 나타내기 때문에 파라신 I에 붙어있는 biotin에 streavidin-FITC complex가 붙어 파라신 I이 cell의 어느 부위와 interaction을 일으키는지를 보여 줄 수 있다. 실험 결과 그림 26과 같이 파라신 I은 *E. coli* 세포막에 localization되는 것을 확인하였다. 또한, 세포막에 작용한다고 알려진 머게이닌 2도 같은 결과를 보여줬다. 반면에 cytoplasm에 작용한다고 알려진 부포린 II는 세포내에 분포하는 것을 확인하였다.

2) NPN uptake assay

*E. coli*를 37℃에서 mid-logarithmic phase까지 배양하고 원심분리로 harvest한 다음에 5mM HEPES buffer(pH 7.2)로 washing 및 resuspension하였다. 이렇게 준비된 *E. coli* 세포 1ml ($10^5$ CFU/ml)에 파라신 I (1 μg/ml) 과 1-N-phenylnapthylamine (NPN, 10 μM) 을 처리하고 형광을 발하는 정도를 fluorescent spectrophotometer로 측정하였다.

NPN은 cell membrane의 lipid과 같은 hydrophobic한 환경에서만 형광을 나타내는 dye이며 NPN은 손상이 없는 membrane은 침투하지 못하고 permeabilize된 membrane에만 선택적으로 insertion되어 형광을 나타낸다. NPN uptake 정도를 측정한 결과, 파라신 I으로 처리한 *E. coli*에서 형광이 나타났다. 또한 유도체들이 cell membrane을 permeabilize시키는 정도가 항균력에 비례하였다 (그림 27).

3) β-galactosidase assay

*E. coli* ML-35를 37℃에서 mid-logarithmic phase까지 배양하고 원심분리로 harvest한 다음에 10mM NAPB buffer(pH 7.4)로 washing 및 resuspension하였다. 이렇게 준비된 *E. coli* 세포 1ml ($10^5$ CFU/ml)에 1.5mM o-nitrophenyl-β-D-galactoside (ONPG)와 파라신 I (1 μg/ml)을 첨가하고 15분 동안 배양한 다음, 생성된 o-nitrophenol (ONP)를 spectrophotometer를 사용하여 420nm 파장에서 분석하였다.

*E. coli* ML-35는 permease-deficient strain으로서 ONPG를 cell 내로 uptake하지 못한다. 그러나 outer membrane과 cytoplasmic membrane이 permeabilize될 경우에는 ONPG가 cell내로 uptake되어 β-galactosidase에 의해 ONP로 분해가 된다. 이렇게 분해된 ONP는 420nm의 파장으로 측정할 수 있다. *E. coli* ML-35를 이용하여 β-galactosidase assay를 수행한 결과 그림 28에서와 같이 파라신 I은 cytoplasmic membrane을 permeabilize시켰으며 파라신 I과 유도체들이 cell membrane을 permeabilize시키는 정도가 항균력에 비례한다는 것을 관찰하였다.

이상의 결과로부터 파라신 I의 작용기작은 cell membrane에 localize한 후에 outer membrane과 inner membrane을 차례로 permeabilization 시켜 cell membrane의 disintegration을 유도하여 depolarization, ion leakage등의 작용으로 cell metabolism을 멈춤으로서 cell을 죽이는 것으로 여겨진다.

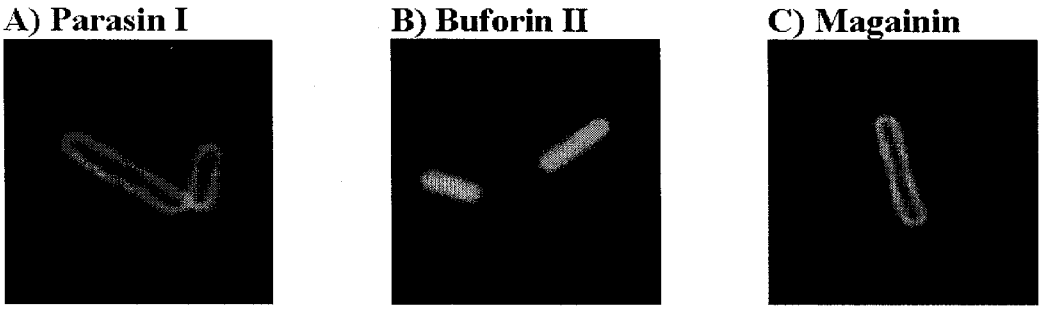



그림 26. FITC로 염색한 파라신 I으로 처리한 대장균의 confocal 현미경 image

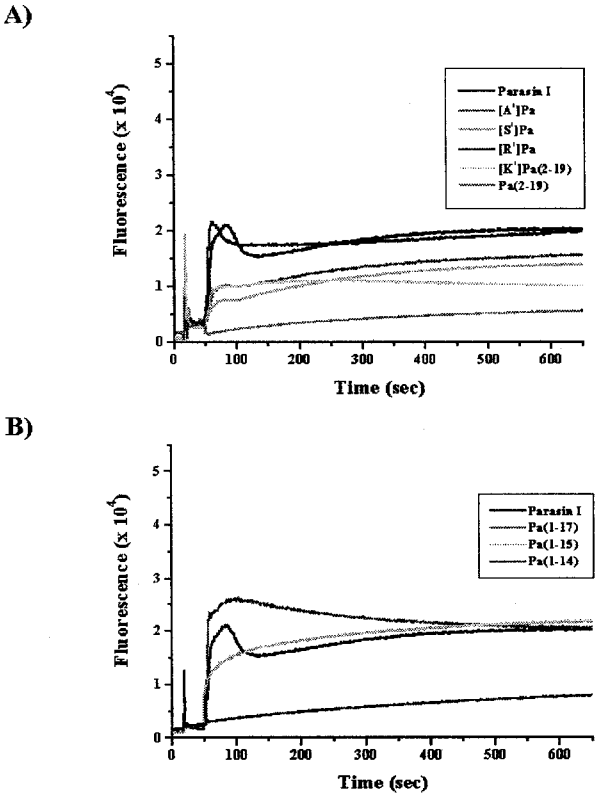



그림 27. NPN uptake assay

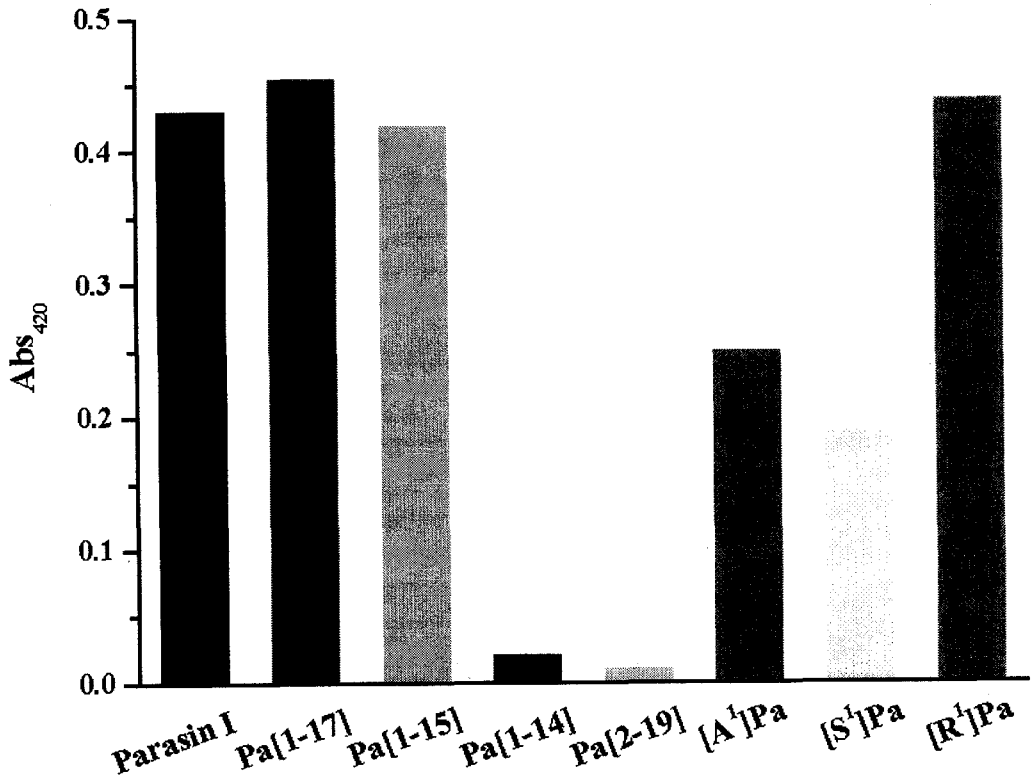



그림 28. β-galactosidase assay

## 나. 부포린 II의 작용 기작 연구

1) 부포린 II 의 bactericidal 활성과 cell lysis 측정

부포린 II의 작용기작을 밝히기 위하여, 대장균에 대하여 부포린 II가 세포를 bactericidal하게 죽이지 여부와 세포를 lysis시키는 지를 조사하였다. 그리고, 이 결과를 지질막-활성의 magainin II와 비교하였다. 그림 29에서와 같이 부포린 II와 magainin II를 최소저해농도의 5배의 농도로 대장균에 처리했을 때 두 펩타이드의 경우 모두 수 분내에 대장균을 모두 살균하였다. 그러나, 부포린 II는 magainin II와 달리 630 nm에서의 흡광도가 변하지 않았다. 즉, 위의 결과로부터 부포린 II는 magainin II와 같이 세포를 bactericidal하게 죽이지만 magainin II와는 달리 세포의 지질막에 작용하지는 않는 다는 것을 확인하였다. 그리고 다음으로 부포린 II가 세포의 어느 부위에 작용하는 가를 확인하였다.

2) 부포린 II 의 작용부위 연구

부포린 II 의 세포 내에서의 작용 부위를 확인하기 위하여, FITC로 염색된 부포린 II 와 magainin II 를 대장균에 처리하고 이를 confocal laser 현미경을 이용하여 관찰하였다. FITC로 염색하여도 부포린 II 와 magainin II 의 항균력은 변하지 않았다. 그림 30에서와 같이 염색된 부포린 II 는 magainin II 와 달리 경우 최소저해농도보다 낮은 농도에서 세포막을 통과하여 세포의 cytoplasm에 축적되었다. 이 결과로 부포린 II 의 작용부위는 다른 항균펩타이드처럼 세포의 지질막이 아니라 세포내의 cytoplasm 이라는 것을 확인하였다. 그리고, 그림 31에서와 같이 부포린 II 는 DNA나 RNA에 강하게 결합함을 확인하였다.

3) 부포린 II의 구조와 항균력의 상관관계

부포린 II 와 그 유도체들의 3차원적 구조와 활성간의 관계를 조사하기 위하여 이들의 구조를 CD spectrum을 이용하여 측정하였다 (표 13). N-말단 random structure를 삭제한 경우 $\alpha$-helix가 증가하였고 N-말단으로부터 더 삭제하여 펩타이드 잔기가 6-21, 7-21, 8-21, 9-21, 10-21, 11-21로 줄인 유도체의 경우 $\alpha$-helix의 양이 순차적으로 감소하는 것을 확인하였다. 한편 C-말단에서 4 잔기를 삭제하여 항균력이 완전히 사라진 유도체의 경우 $\alpha$-helix 또한 전혀 없는 것으로 확인되었다. 이 결과들로부터 부포린 II의 $\alpha$-helix의 양과 항균력이 정비례관계가 있음을 확인하였다. 반면 proline-hinge를 leucine으로 치환한 유도체의 경우 $\alpha$-helix는 증가하였으나 항

균력을 감소하는 것으로 보아 proline-hinge에 의하여 생기는 구조적인 특징이 항균력에 중요한 것으로 판단된다.

또한 부포린 II의 truncated analogue들의 cell 침투능력을 FACS를 이용하여 측정한 결과, 그림 32에서 보는 바와 같이 항균력이 가장 높은 BUF(5-21)이 cell 내부로 가장 많이 침투하였고 buforin II, BUF(8-21), BUF(5-20)의 순서로 cell 내부로의 침투능력이 저하되는 것을 확인하였다. 이 결과로 buforin II 유도체들의 항균력은 cell 내부로의 침투능력이 밀접한 관계를 가지고 있음을 할 수 있다.

4) 부포린 II의 생체내에서의 작용 기작 연구

부포린 II 와 유도체들은 cell내로 들어가 항균작용을 하며 cell 내로 들어가는 능력의 차이가 바로 항균력의 차이인 것으로 나타났다. 부포린 II의 생체내에서의 작용기작을 규명하기 위하여 in vitro transcription inhibition assay와 in vitro translation inhibition assay를 수행하여 부포린 II가 cell의 RNA, 단백질 합성에 어떤 영향을 미치는 지를 조사하였다.

가) In vitro transcription assay

*Nde*I 제한효소로 linearize시킨 플라스미드 pUC19 1μg에 nucleotide, [α-32P]CTP, transcription 버퍼, RNase inhibitor, 그리고 T3 RNA polymerase를 첨가하였다. 이 mixture에 규칙적으로 농도가 증가하는 부포린II 시료들을 첨가한 다음 37℃에서 1시간 동안 incubation시켜 생성된 transcript들을 formamide와 섞은 후에 boiling시켜 17.5% formaldehyde를 함유하고 있는 1% agarose gel상에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후에 gel을 vacuum상에서 건조시키고 autoradiographic film으로 분석하였다. 그 결과 부포린 II의 농도가 증가함에 따라 transcription level이 점차적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 33 A).

나) In vitro translation assay

pUC19 플라스미드에 존재하는 LacZ와 β-lactamase 유전자들을 translation시키기 위해 *E. coli* T7 S30 Extract System을 사용하였다. pUC19 1μg에 [$^{35}$S]methionine 5 μCi과 *E. coli* T7 S30 extract를 첨가시키고 규칙적으로 농도가 증가하는 부포린II 시료들을 처리한 다음 37℃에서 1시간 동안 incubation시켰다. 이렇게 하여 얻은 translation product들을 15% tricine-SDS polyacrylamide gel상에서 분리하여 PVDF membrane으로 transfer한 다음, autoradiographic film으로 분석하였다. 그 결과 부

포린 II의 농도가 증가함에 따라 translation level이 점차적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 33 B).

다) In vivo translation assay

pUC19 플라스미드를 가지고 있는 *E. coli* 를 mid-logarithmic phase 까지 키운 후 10 mM NAPB로 washing한 다음 이렇게 준비된 *E. coli* 세포 1ml ($10^6$ CFU/ml)에 규칙적으로 농도가 증가하는 부포린 II 시료들을 처리하고 37℃에서 1시간 동안 incubation시켰다. 여기에 100mM IPTG 15 μl, 5 mg/ml ampicillin 15 μl, TSB 470 μl 를 첨가한 후 다시 37℃에서 5시간 동안 incubation시켰다. 그런 다음 snoication을 통해 *E. coli* 세포들을 파쇄하고 이렇게 하여 얻은 homogenate의 β-galactosidase 활성을 β-Gal assay kit을 이용하여 측정하였다. 그 결과 in vitro translation assay의 결과와 마찬가지로 부포린 II의 농도가 증가함에 따라 translation level이 점차적으로 감소함을 확인할 수 있었다 (그림 34).

위 결과들은 부포린 II가 cell내로 들어가 DNA/RNA와 binding하여 transcription/translation을 억제하는 작용기작을 가지고 있음을 제시한다.

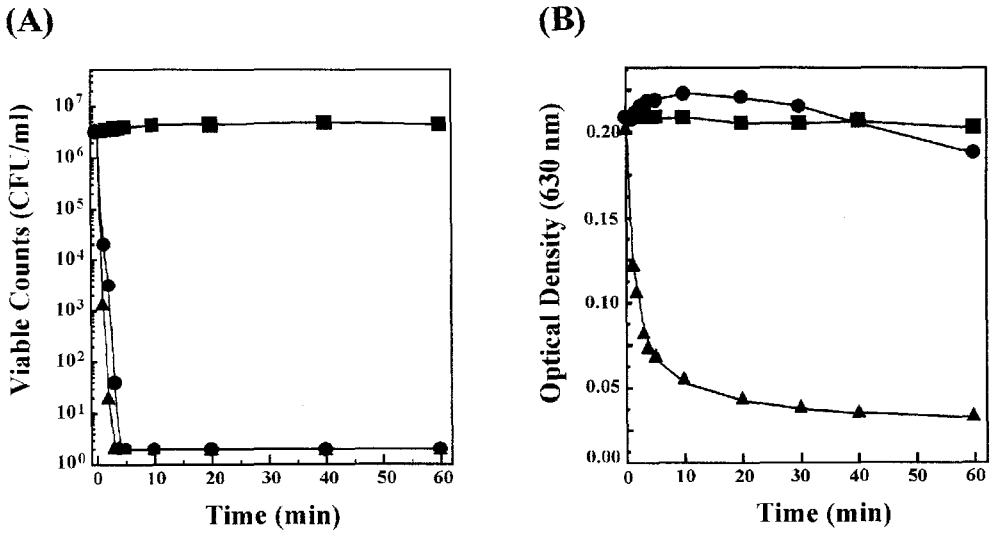



그림 29. 부포린 II와 magainin II의 bactericidal 활성과 cell lysis 측정

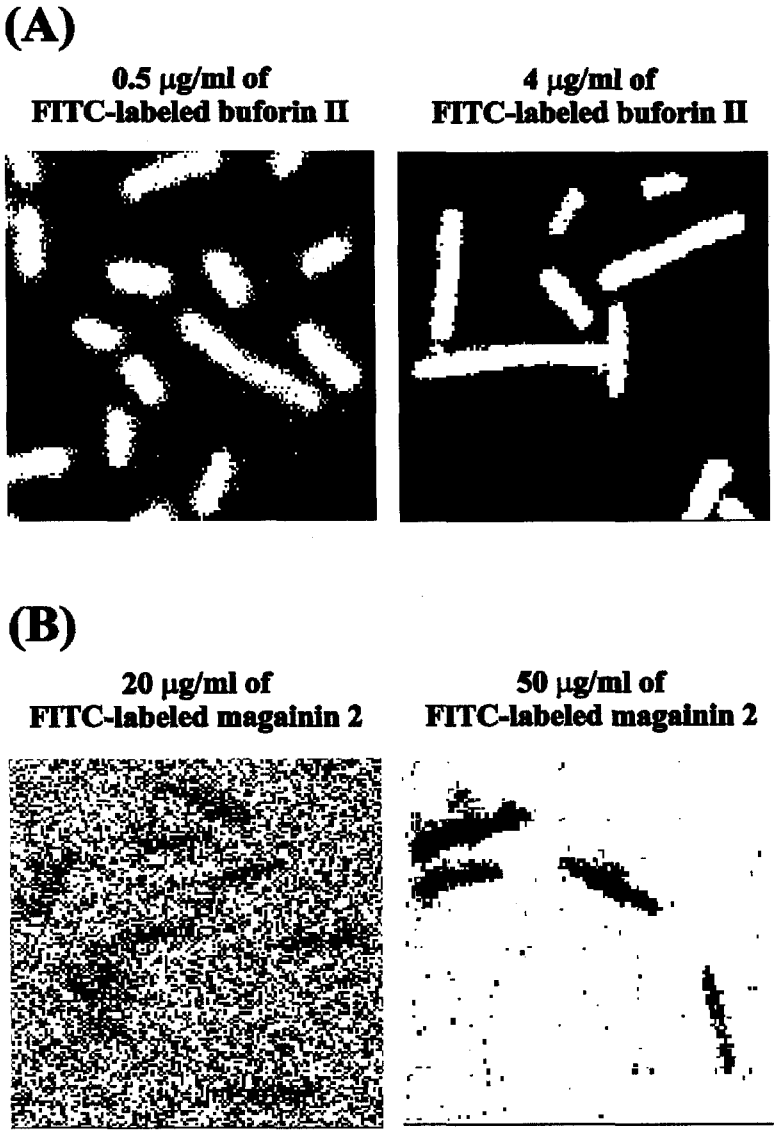
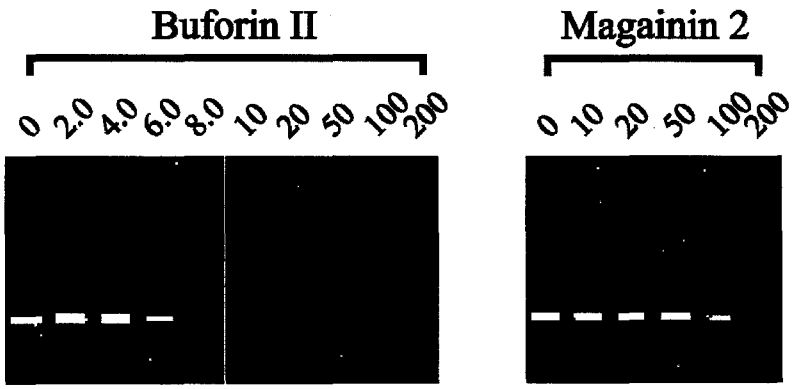



그림 30. FITC로 염색한 부포린 II와 magainin II로 처리한 대장균의 confocal 현미경 image

## DNA binding assay




## RNA binding assay

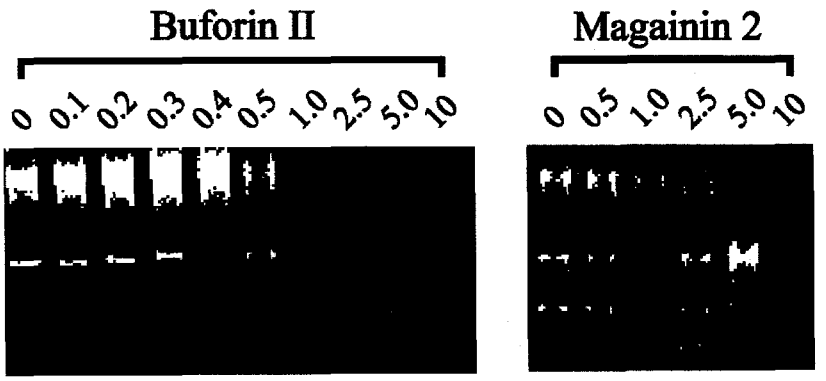



그림 31. 부포린 II 와 magainin II 의 Gel retardation 실험.

| 펩타이드 | α-helix 양 |
|---|---|
| Buforin II | 43 |
| BUF(5-21) | 52 |
| BUF(6-21) | 45 |
| BUF(7-21) | 43 |
| BUF(8-21) | 22 |
| BUF(9-21) | 20 |
| BUF(10-21) | 18 |
| BUF(11-21) | 15 |
| BUF(1-17) | 0 |
| [$Lys^{2}$][$Lys^{6}$][$Leu^{7}$]BUF(5-21) | 64 |
| $[RLLR]_5$ | 82 |

**표 13. 부포린 II와 그 유도체들의 α-helix 양**

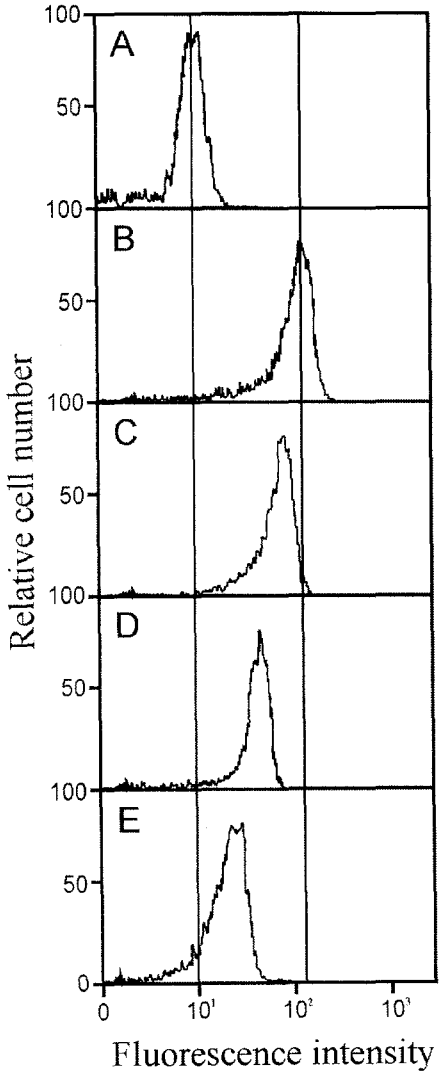



그림 32. FACS analysis of *E. coli* cells, treated with FITC-labeled buforin II and its analogs.
A: 10mM NAPB, B: 16 μg/ml of FITC-BUF(5-21), C: FITC-buforin II, D: FITC-BUF(8-21), E: FITC-BUF(5-20).

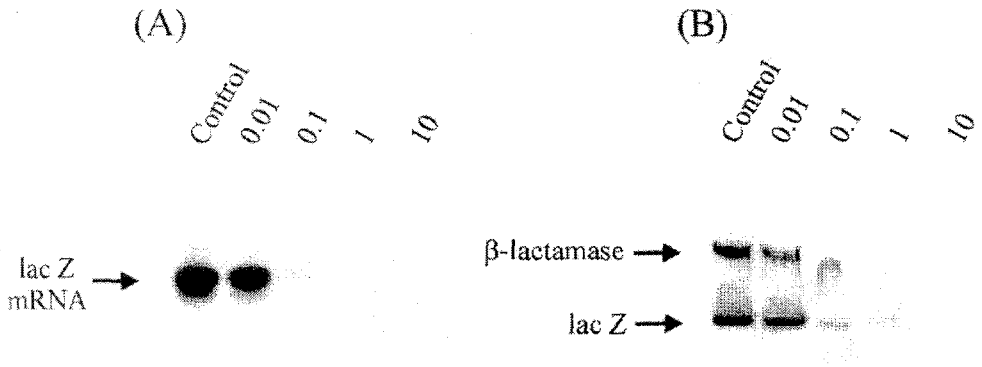



그림 33. Buforin II가 in vitro transcription과 translation에 미치는 영향.

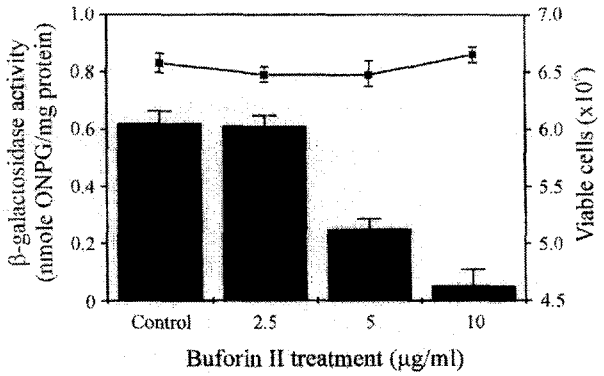



그림 34. Buforin II가 in vivo transcription과 translation에 미치는 영향.

## 6. 항균펩타이드의 독성 및 안정성 연구

항균펩타이드 파라신 I, 부포린 II 및 그 유도체들의 cytotoxicity의 유무를 적혈구에 대한 hemolysis assay를 이용하여 측정하였다. 3ml의 적혈구를 pH 7.4의 phosphate-buffered saline(PBS)로 washing한 후에 동일한 buffer로 총 volume이 20ml이 되도록 희석한 후 이렇게 준비된 적혈구 suspension을 펩타이드가(200 $\mu$g/ml) 10 $\mu$l씩 들어 있는 각 microfuge tube에 190 $\mu$l씩 분기하였다. 이 tube들을 37 ℃에서 30분간 incubation시킨 후 4,000rpm에서 5분간 원심분리하고, 각 tube의 상등액을 100 $\mu$l씩 취해서 PBS로 10배 희석한 후에 absorbance를 567 nm에서 측정하였다. 펩타이드 대신에 0.1% Triton X-100으로 처리한 적혈구 sample의 absorbance를 100% hemolysis로 정의하고 이에 대한 다른 sample들의 상대적 absorbance를 percent hemolysis로 정의하였다.

파라신 I, 부포린 II 및 그 유도체들은 hemolysis가 0.02미만인데 비해 cytotoxic하다고 알려진 melittin은 0.645에 이르는 hemolysis를 나타냈다 (표 14, 15). 이는 파라신 I, 부포린 II 및 유도체들이 cytotoxicity가 거의 없음을 나타낸다. 마찬가지로 동물세포 배양을 통한 실험에서도 melitttin은 세포독성을 나타낸 반면 파라신 1, 부포린 II 및 그 유도체들은 독성이 없었다.

| Peptide | $OD_{567}$ (conc.= 1mg/ml) |
|---|---|
| Parasin I | 0.011 |
| Pa(1-17) | 0.013 |
| Pa(1-15) | 0.012 |
| Pa(1-14) | 0.015 |
| Pa(2-19) | 0.010 |
| [$A^1$]Pa | 0.014 |
| [$S^1$]Pa | 0.013 |
| [$R^1$]Pa | 0.010 |
| Melittin | 0.645 |
| 0.2% Triton X-100 | 0.658 |

표 14. 파라신 1과 그 유도체들의 hemolytic activity

| Peptides \ 농도 (μg/ml) | % Hemolysis of huame red blood cells | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 | 10 | 25 | 50 | 100 | 200 |
| Buforin II | 0.00 | 0.05 | 0.12 | 0.23 | 0.24 | 0.35 |
| BUF(5-21) | 0.01 | 0.03 | 0.13 | 0.19 | 0.21 | 0.31 |
| BUF(6-21) | 0.01 | 0.05 | 0.09 | 0.15 | 0.19 | 0.23 |
| BUF(7-21) | 0.02 | 0.12 | 0.12 | 0.16 | 0.21 | 0.29 |
| BUF(8-21) | 0.02 | 0.05 | 0.11 | 0.22 | 0.26 | 0.41 |
| BUF(9-21) | 0.01 | 0.06 | 0.14 | 0.18 | 0.22 | 0.31 |
| BUF(10-21) | 0.06 | 0.08 | 0.21 | 0.22 | 0.26 | 0.32 |
| BUF(11-21) | 0.02 | 0.09 | 0.12 | 0.24 | 0.34 | 0.52 |
| BUF(1-17) | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| BUF(5-20) | 0.05 | 0.06 | 0.16 | 0.32 | 0.43 | 0.74 |
| BUF(5-19) | 0.02 | 0.13 | 0.15 | 0.26 | 0.50 | 0.59 |
| BUF(5-18) | 0.03 | 0.12 | 0.14 | 0.23 | 0.42 | 0.88 |
| $[K^z][K^b][L']$ BUF(5-21) | 0.04 | 0.23 | 0.67 | 0.85 | 1.24 | 1.76 |
| $[RLLR]_5$ | 0.34 | 0.76 | 1.32 | 1.65 | 2.12 | 2.24 |
| Melittin | 45.21 | 63.83 | 81.45 | 90.03 | 99.10 | 99.21 |

**표 15. 부포린 II와 그 유도체들의 hemolytic activity**

## 7. 항균펩타이드의 대량생산 및 이용연구

### 가. 산성펩타이드 융합에 의한 항균펩타이드의 발현 및 생산

항균펩타이드의 양전하를 중화하기 위한 적당한 길이 및 음전하수를 갖는 산성펩타이드를 선별한 후 선별된 산성펩타이드와 항균펩타이드 buforin II의 유전자를 합성하여 각각 vector에 cloning하였다. 이때 buforin II의 유전자 양쪽 끝에 methionine을 encoding하는 염기서열을 포함하여 multimer로 발현후에 CNBr에 의하여 monomer로 절단하는 데 이용될 수 있도록 하였다. 산성펩타이드로 선별된 modified magainin intervening sequence (MMIS)는 양쪽 끝에 cysteine을 encoding하는 염기서열을 부가하여 펩타이드 사이의 상호작용을 증가시킬 수 있도록 고안하였다 (그림 35). 이들 산성펩타이드 유전자들을 재조합 PCR에 의하여 buforin II 유전자와 in-frame으로 fusion한 후에 gene amplification system을 이용하여 이들 융합 유전자의 multimer들을 제조하였다 (그림 36). 각각의 융합유전자에 대하여 1, 2, 4, 6-mer의 multimer들을 유전자 발현 vector인 pET21c vector를 이용하여 발현시킨 결과가 그림 37과 같다. Buforin만으로 구성된 multimer들과 비교할 때 이들 융합유전자의 multimer는 전반적으로 발현 정도가 매우 높아진 것을 볼 수 있었다. 또한 이들 융합펩타이드의 multimer들은 모두 inclusion body 형태로 발현되었다.

발현된 융합펩타이드의 multimer로부터 순수한 재조합 buforin II를 분리하기 위하여 20L fermentor에 MMIS-buforin의 6-mer를 포함하는 발현 vector를 가진 대장균 숙주세포를 배양하고 IPTG induction에 의하여 발현을 유도하였다. 발현된 융합펩타이드 6-mer의 inclusion body를 분리하여 CNBr로 절단 한 후에, QAE-Sephadex Anion-exchange chromatography에 의하여 buforin이 포함되어 있는 unbound fraction을 분리하였다. Unbound fraction으로부터 C18 reverse-phase HPLC에 의하여 순수한 재조합 buforin II를 분리하였다. 각각의 정제 단계별로 sample들을 SDS-PAGE에 의하여 분석한 결과 및 HPLC chromatogram이 그림 38과 같으며, 각각의 정제단계에 따른 purification table이 표 16과 같다.

분리한 재조합 buforin II의 분자량 및 homogeneity를 측정하기 위하여 Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry를 이용하였고, 아미노산 서열을 분석한 결과 정제된 재조합 buforin II의 분자량은 2512 Da이며, C-terminal의 homoserine잔기를 제외하면 정확히 원래의 buforin II와 일치함을 알 수 있었다. 또한, 정제된 재조합 buforin II의 항균활성을 측정하기 위하여 여러 가지 미생물들에 대한 minimal inhibitory concentration을 측정한 결과 표 17과 같이 원래의 buforin II와 같은 항균활성을 가지고 있음이 밝혀졌다.

## 나. mRNA의 안정성 증가를 통한 항균펩타이드 생산량의 증대

산성펩타이드 융합법을 통해 항균펩타이드를 중합체 형태로 대량으로 발현시킬때 size가 큰 multimer 인 경우 size가 작은 multimer에 비해 발현 효율이 떨어짐을 확인하였다. 이런 현상을 극복하기 위해 transcription과 translation의 synchronization이나 DeaD-box protein을 이용함으로써 mRNA의 안정성을 증가시켜 size가 큰 항균펩타이드 중합체의 발현을 증대시키는 연구를 수행하였다.

1) Transcription과 translation의 synchronization 의 영향

Transcription과 translation의 synchronization을 위해서 그림 39 A와 같이 expression vector pET21c로부터 T7 promoter 부위를 제거하고 그 부위에 tac promoter를 cloning하였다. 이것은 T7 RNA polymerase 대신에 *E. coli* RNA polymerase에 의하여 발현이 유도되도록 함으로써 transcription과 translation이 같은 속도로 진행되도록 하여 mRNA가 안정해지도록 하는 효과가 있다. 이와 같이 제작된 vector의 tac promoter downstream에 융합펩타이드 유전자의 multimer를 cloning하여 multimer들의 발현을 조사한 결과 그림 39 B에서와 같이 12-, 24-, 36-mer 같이 size가 큰 multimer로 갈수록 T7 promoter를 이용하는 것보다 tac promoter를 이용한 것이 발현이 잘 되는 것을 확인하였다.

2) Dead-box protein을 이용한 mRNA의1 안정성 증가

DeaD-box protein을 이용하여 mRNA의 안정성을 증가시키기 위해서 DeaD-box protein과 융합펩타이드 multimer가 같은 cell내에서 발현되도록 그림 40 A와 같이 기존의 T7 promoter에 의하여 융합펩타이드 유전자가 발현되는 vector에 DeaD-box gene을 cloning하여 발현된 DeaD-box protein이 융합펩타이드 multimer의 mRNA에 미치는 영향을 분석한 결과 그림 40 B에서와 같이 12-, 24-, 36-mer 같이 size가 큰 multimer로 갈수록 발현 정도가 현저히 향상되는 것을 관찰하 수 있었다.

## 다. 항균펩타이드 분리공정 최적화

항균펩타이드를 대장균을 이용하여 대량 생산한 다음 발현된 융합펩타이드의 multimer로부터 순수한 재조합 항균펩타이드를 분리하는 방법을 확립하였다. 산성펩타이드 융합체의 경우 inclusion body를 분리하여 CNBr로 절단 한 후에 QAE-Sephadex Anion-exchange chromatography를 수행하면 unbound fraction에는 항균펩타이드만이

포함되어 있게 된다. 이것을 C18 reverse-phase HPLC를 에 의하여 순수한 재조합 항균펩타이드만을 분리하였다.

### 라. 항균펩타이드 대량생산 최적화 조건 구축 및 실용화 연구

항균펩타이드의 대량 생산을 위하여 대용량 발효조에서의 최적 발효조건을 결정하는 연구를 수행하였다. Complex medium을 이용한 발효의 경우 회분식 발효에서는 유용하게 사용할 수 있지만 유가식 배양을 이용한 대량생산의 경우에는 배지의 가격이 상승하고 foam의 형성으로 인해 운전이 곤란하기 때문에 defined medium을 사용하기 위하여 기존의 R medium을 변형시킨 modified R medium을 기본으로 다양한 종류의 탄소원과 질소원을 사용하여 최적 발효 조건을 탐색한 결과 pH-stat methods를 이용한 pulse feeding방법으로 유가식 배양을 수행시 30C, pH 6.8에서 base로는 ammonia water를 사용하면서 탄소원의 고갈로 pH가 상승하는 순간에 10g의 glucose가 투입되도록 하는 방법을 사용하는 것이 가장 많은 균체 및 펩타이드를 얻을 수 있었다.

본 연구를 통해 강력한 항균펩타이드 및 그 유도체들을 확보하였으며 국내 및 국제 특허를 출원하였다. 또한 생물공학적 기법을 통해 대장균에서 항균펩타이드를 대량으로 생산하는 방법을 확립하였다. 이들 항균펩타이드 및 유도체들은 무공해 생물농약 및 병원균내성 식물의 개발, 사료 첨가제 등으로의 개발 가능성이 크므로 제약회사 등과의 공동 연구를 통해 실제 응용 가능성을 타진할 필요가 있다.

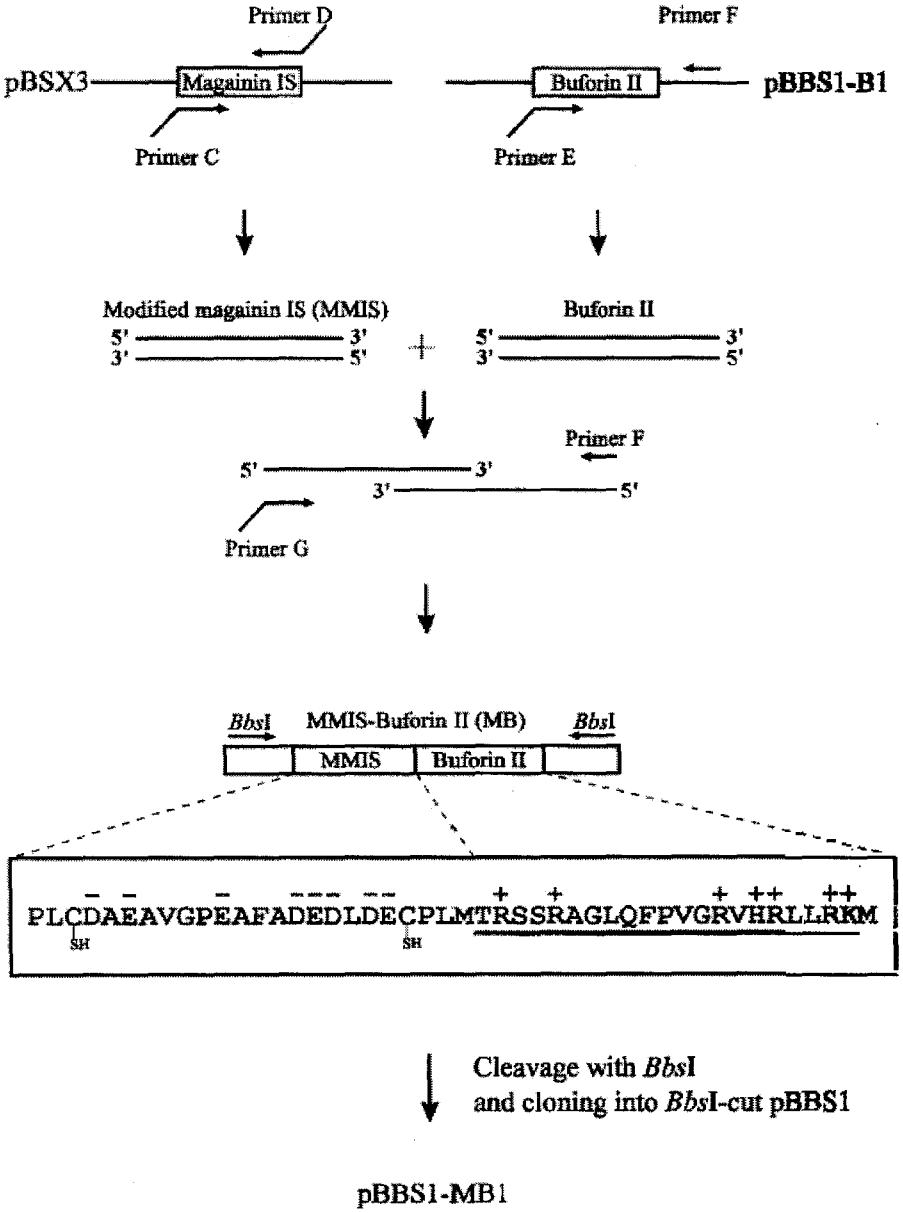



그림 35. 산성펩타이드-부포린 II 융합체 유전자의 제작

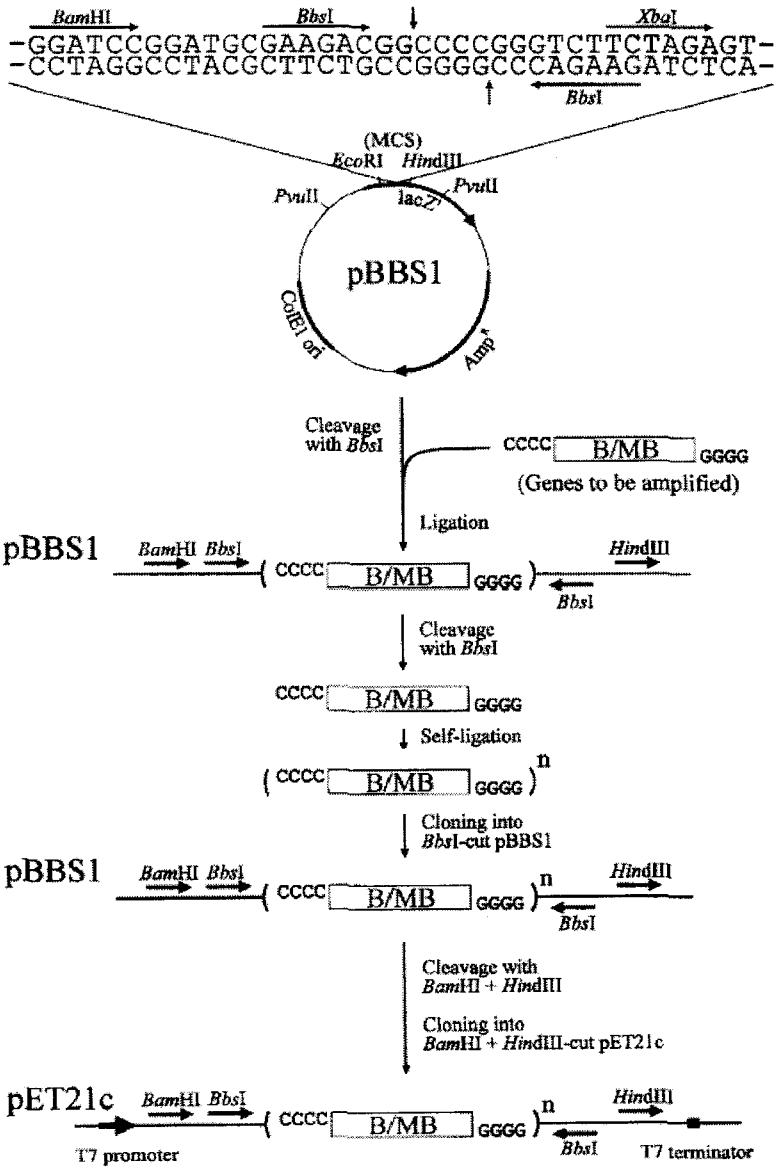



그림 36. Gene amplification vector pBBS1을 이용한 산성펩타이드-부포린 II 융합체 유전자의 multimerization

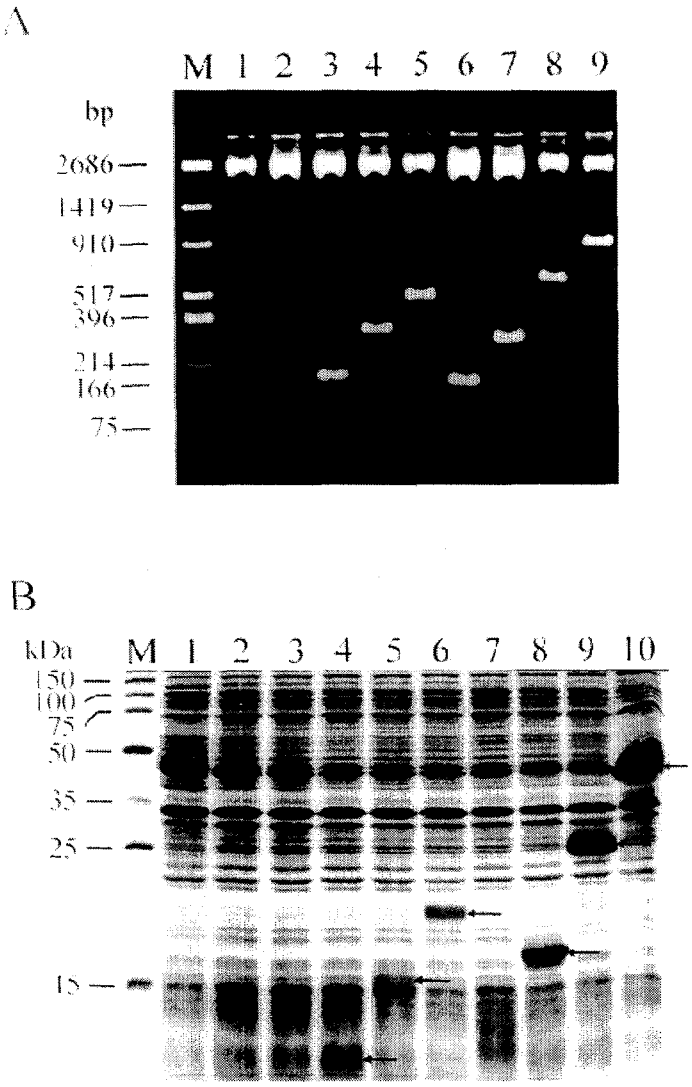



그림 37. 산성펩타이드-부포린 II 융합체 유전자의 발현. A. 융합체 유전자의 전기영동. M; marker, 1; pBBS1 vector, 2-5; pBBS1-B1, -B2, -B4, and -B6, 6-9; pBBS-MB1, -MB2, -MB4, and -MB6. B. 융합체 유전자의 대장균에서의 발현. M; marker, 1; BL21(DE3), 2; BL21(DE3) containing pET21c, 3-6; BL21(DE3) harboring pET21c-B1, -B2, -B4 and -B6, 7-10; BL21(DE3) harboring pET21c-MB1, -MB2, -MB4 and -MB6.

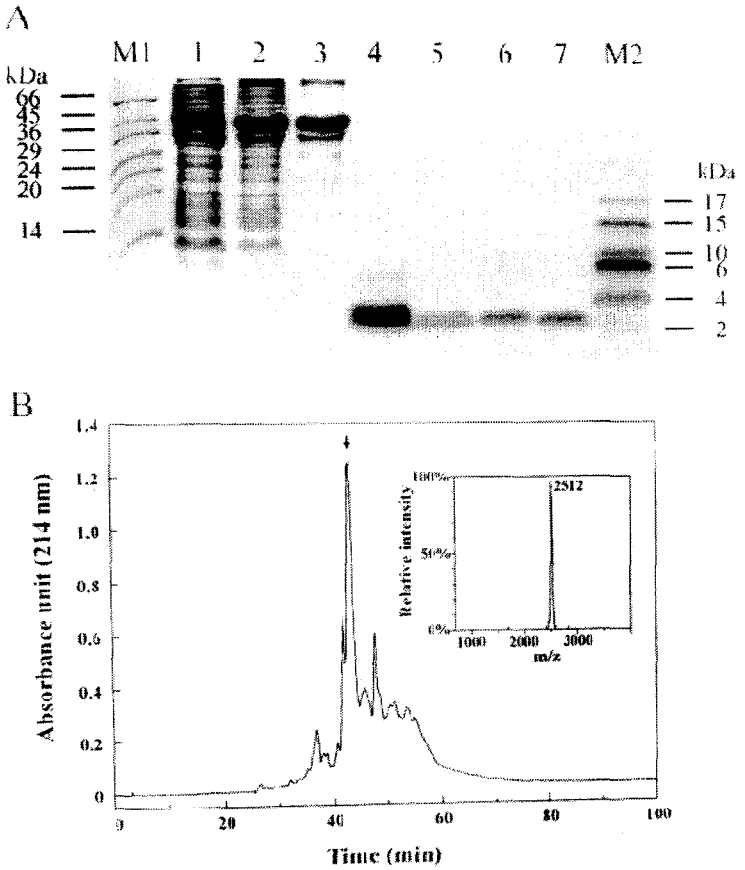



그림 38. pET21c-MB6를 가지고 있는 대장균 BL21(DE3)에서 발현된 중합체로부터 재조합 buforin II의 분리정제. A. SDS-PAGE analysis of purified recombinant buforin II. Lanes M1 and M2 represent molecular weight markers. Lanes 1 and 2 show total cell proteins before and after induction, respectively. Lanes 3 and 4 represent inclusion bodies isolated from total cell proteins and solubilized inclusion bodies cleaved by CNBr, respectively. Lanes 5 and 6 show unbound fractions on QAE-Sephadex chromatography and recombinant buforin II purified by HPLC, respectively. Lane 7 is the natural buforin II. B. Purification of recombinant buforin II by reverse-phase HPLC of unbound fractions from QAE-Sephadex chromatography and determination of purity by MALDI-MS (inset).

| Purification step | Total protein (mg)[a] | Protein of interest (mg)[b] | Yield (%)[c] |
|---|---|---|---|
| Crude extracts[d] | 1290.0 | 670.8 | **100** |
| Inclusion bodies | 998.1 | 665.7 | **99.2** |
| QAE chromatography (after CNBr cleavage) | 124.9 | 119.0 | **17.7** |
| HPLC | 107.0 | 107.0 | **15.6** |

**표 16. *E. coli*.로부터 재조합 buforin II의 분리**

| Microorganism | Minimal inhibitory concentration (μg/ml)[a] | | |
|---|---|---|---|
| | Recombinant buforin II | Buforin II | Magainin II |
| Gram positive | | | |
| *Bacillus subtilis* | 2 | 2 | 50 |
| *Staphylococcus aureus* | 4 | 4 | 50 |
| *Streptococcus mutans* | 2 | 2 | 100 |
| *Streptococcus pneumoniae* | 4 | 4 | 50 |
| Gram negative | | | |
| *Escherichia coli* | 4 | 4 | 100 |
| *Salmonella typhimurium* | 1 | 1 | 25 |
| *Serratia* sp. | 4 | 4 | 50 |
| *Pseudomonas putida* | 2 | 2 | 50 |
| Fungi | | | |
| *Candida albicans* | 1 | 1 | 25 |
| *Cryptococcus neoformans* | 1 | 1 | 12 |
| *Saccharomyces cerevisiae* | 1 | 1 | 25 |

**표 17. 재조합 buforin II, natural buforin II 와 magainin II의 미생물에 대한 항균활성 비교.**

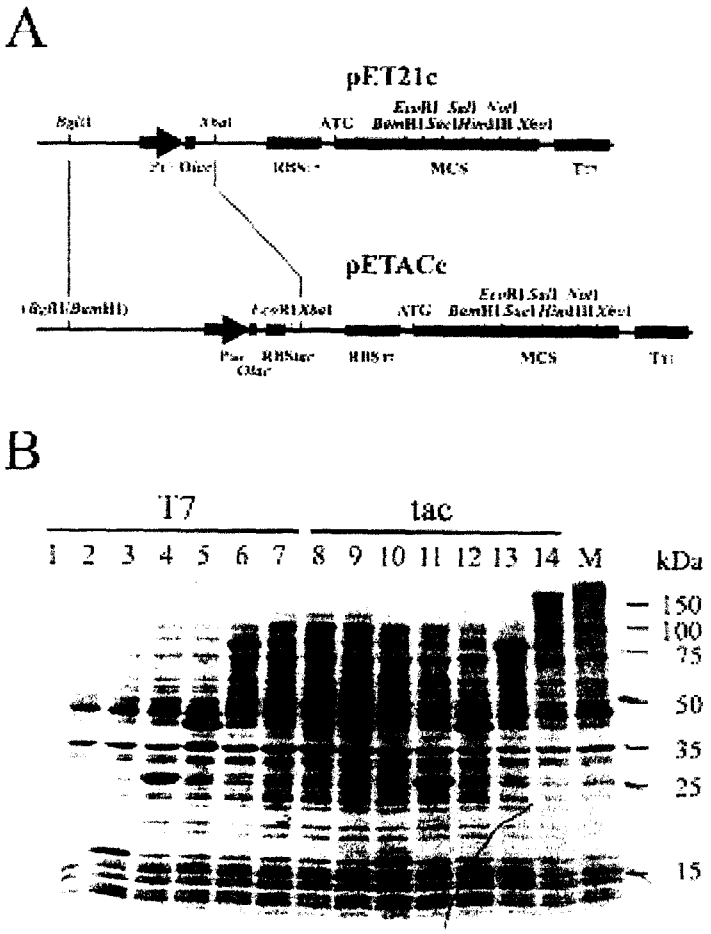



그림 39. MMIS-부포린 II 중합체 multimer의 발현에 DeaD-box protein이 미치는 영향 분석. A. T7 promoter와 deaD 유전자를 가지고 있는 pED vector의 모식도. B. MMIS-부포린 II 중합체 multimer의 발현에 DeaD-box protein이 미치는 영향 분석. 1-5; 각각 pET21c와 pET21c에 6-, 12-, 24-, 36-mer가 클로닝되어있는 것, 6-10; 각각 pED와 pED에 6-, 12-, 24-, 36-mer가 클로닝되어있는 것, 11-15; 각각 pETACc와 pETACc에 6-, 12-, 24-, 36-mer가 클로닝되어있는 것

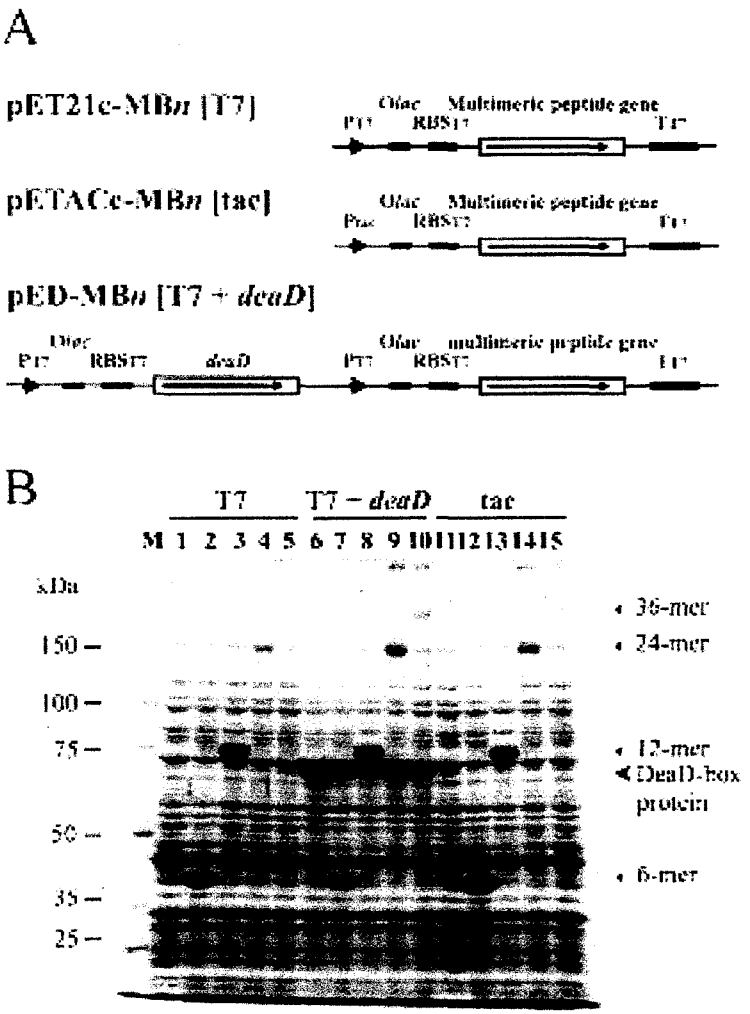



그림 40. MMIS-부포린 II 중합체 multimer의 발현에 DeaD-box protein이 미치는 영향 분석. A. T7 promoter와 deaD 유전자를 가지고 있는 pED vector의 모식도. B. MMIS-부포린 II 중합체 multimer의 발현에 DeaD-box protein이 미치는 영향 분석. 1-5: 각각 pET21c와 pET21c에 6-, 12-, 24-, 36-mer가 클로닝되어있는 것, 6-10: 각각 pED와 pED에 6-, 12-, 24-, 36-mer가 클로닝되어있는 것, 11-15: 각각 pETACc와 pETACc에 6-, 12-, 24-, 36-mer가 클로닝되어있는 것.

# 제 4 절. 연구성과 및 활용계획

## 1. 국내 논문 발표 (3편)

JH Lee, JH Kim, SS Hong, HS Lee and SC Kim. Multimeric expression of the antimicrobial peptide buforin II in Escherichia coli by fusion to a cysteine-rich acidic peptide. Journal of Microbiology and Biotechnology. 9: 303-310. SCI등재 (1999)

KO Lee, MG Kim, HH Jang, JH Lee, SC Kim, and SY Lee. Biochemical properties of a chitin-binding class III chitinase in pumpkin leaves. Journal of Biochemistry and Molecular Biology. 32: 157-163. (1999)

JH Lee, SS Hong, and SC Kim. Expression of an antimicrobial peptide magainin by a promoter inversion system. Journal of Microbiology and Biotechnology. 8(1): 34-41. SCI 등재 (1998)

## 2. 해외 논문 발표 (20편)

HS Kim, H Yoon, I Minn, CB Park, WT Lee, M Zasloff, SC Kim. Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. J Immunol. (2000) 165(6):3268-74.

S Kobayashi, K Takeshima, CB Park, SC Kim, K Matsuzaki. Interactions of the novel antimicrobial peptide buforin 2 with lipid bilayers: proline as a translocation promoting factor. Biochemistry. (2000) 39(29):8648-54.

CB Park, KS Yi, K Matsuzaki, MS Kim, SC Kim. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. (2000) 97(15):8245-50.

SW Shin, DS Park, SC Kim, and HY Park. Two carbohydrate recognition domains of Hyphantria cunea lectin bind to bacterial lipopolysaccharides through

O-specific chain. FEBS Lett. 467(1): 70-4., (E.U), SCI (2000.2).

JY Suh, YT Lee, CB Park, KH Lee, SC Kim, and BS Choi. Structural and functional implications of a proline residue in the antimicrobial peptide gaegurin. Eur J. Biochem. 266(2): 665-674, (E.U), SCI, (1999.12).

JF Liang and SC Kim. Not only the nature of peptide but also the characteristics of cell membrane determine the antimicrobial mechanism of a peptide. J. Pept. Res. 53(5): 518-22, (E.U), SCI (1999.5).

MG Kim, KO Lee, NE Cheong, YO Choi, JH Jeong, MJ Cho, SC Kim, and SY Lee. Molecular cloning and characterization of a class III chitinase in pumpkin leaves, which strongly binds to regenerated chitin affinity gel. Plant Science. 147: 157-163, (USA), SCI, (1999).

SW Shin, SS Park, DS Park, MG Kim, SC Kim, PT Brey, and HY Park. Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, Hyphantria cunea, using PCR-based differential display and subtractive cloning. Insect Biochem. Mol. Biol. 28(11): 827-37, (USA ), SCI, (1998.11) .

IY Park, CB Park, MS Kim, and SC Kim. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, Parasilurus asotus. FEBS Lett. 437(3): 258-62, (E.U), SCI, (1998.10).

JH Cho, CB Park, YG Yoon, and SC Kim. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. Biochim. Biophys. Acta. 1408(1): 67-76, (USA), SCI, (1998.10).

CJ Park, JH Lee, SS Hong, HS Lee, and SC Kim. High-level expression of the angiotensin- converting-enzyme-inhibiting peptide, YG-1, as tandem multimers in Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50(1): 71-6, (E.U), SCI, (1998.7).

I Minn, HS Kim, and SC Kim. Antimicrobial peptides derived from pepsinogens in

the stomach of the bullfrog, Rana catesbeiana. Biochim. Biophys. Acta. 1407(1): 31-9, (USA), SCI, (1998.7).

MG Kim, SW Shin, KS Bae, SC Kim, and HY Park. Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, Bombyx mori and the fall webworm, Hyphantria cunea. Insect Biochem. Mol. Biol. 28(3): 163-71, (USA), SCI, (1998.3).

CB Park, HS Kim, and SC Kim. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 244(1): 253-7, (USA), SCI, (1998.3) .

JH Lee, I Minn, CB Park, and Kim SC. Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in Escherichia coli. Protein Expr. Purif. 12(1): 53-60, (USA), SCI, (1998.2).

CB Park, JH Lee, IY Park, MS Kim, and SC Kim. A novel antimicrobial peptide from the loach, Misgurnus anguillicaudatus. FEBS Lett. 411(2-3): 173-8, (E.U), SCI, (1997.7).

NE Cheong, YO Choi, WY Kim, SC Kim, MJ Cho, and SY Lee. Purification and molecular cloning of an antifungal PR-5 protein from flower buds of Brassica campestis and cloning of its gene. Physiol. Plant. 101: 583-590, (E.U), SCI, (1997).

HS Kim, CB Park, MS Kim, and SC Kim. cDNA cloning and characterization of buforin I, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A. Biochem. Biophys. Res. Commun. 229(2): 381-7, (USA), SCI, (1996.12).

GS Yi, CB Park, SC Kim, C Cheong. Solution structure of an antimicrobial peptide buforin II. FEBS Lett. 398(1): 87-90, (E.U), SCI, (1996.11).

CB Park, MS Kim, and SC Kim. A novel antimicrobial peptide from Bufo bufo gargarizans. Biochem. Biophys. Res. Commun. 218(1): 408-13, (USA), SCI, (1996.1).

## 3. 해외 학회 발표 proceedings (8건)

An Antimicrobial Peptide Derived from Histone H2A of *Bufo bufo gargarizans,* 96th General Meeting of the American Society for Microbiology, 1996, co-author C. B. Park, H. S. Kim, S. S. Hong

Expression of an antimicrobial peptide buforin II in tandem polymers, 1996, 10th International Biotechnology Symposium, co-author J. H. Lee, P. C. Lee.

cDNA cloning and characterization of BuforinI, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A, 1997, Gordon Research Confernece, co-author Kim H.S., Park C.B., Kim M.S.

An antimicrobial peptide Buforin derived from HistonH2A and its mechanism of action, 1997, International Peptide Symposium

Structure-activity analysis of buforin II, a 21-residue antimicrobial peptide. 1998, 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotheraphy, co-author Park C.B., Kim H.S.

Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus.* 1998, 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotheraphy, co-author Park I. Y., Park C. B.

Generation of the antimicrobial peptide parasin I from histone H2A in a catfish skin by an enzymatic cascade reaction. 1999, 2nd Gordon Conference on Antimicrobial Peptides, co-author Cho, J.H.

Innate Defense System of the Toad Stomach Mediated by an Histone H2A-Derived antimicrobial Peptide. 1999, 2nd Gordon Conference on Antimicrobial Peptides, co-author Kim, H.S.

## 4. 특허등록 실적 (3건)

| 번호 | 등록자 | 등록 특허/프로그램명 | 등록 국가명 | 등록일 | 특기사항 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 김선창, 박찬배, 김인철, 이현수 | Antimicrobial peptide isolated from *Bufo Bufo Gargarizans.* | 미국 | 1999.8 | 특허번호 5936063 |
| 2 | 김선창, 박찬배, 홍승서, 이현수 | 한국산 두꺼비로부터 분리한 신규 항균펩타이드 | 한국 | 1995 | 특허번호 제 149278호 |
| 3 | 김선창, 이재현, 홍승서, 이현수 | 항균펩타이드 대량 제조방법 및 그에 유용한 플라즈미드 벡터 | 한국 | 2000.5 | 특허번호 제 263583호 |

## 5. 특허출원 실적 (6건)

| 번호 | 출원자 | 출원 특허/프로그램 제목 | 출원 국가명 | 출원일 (출원번호) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 김선창, 박인엽, 박찬배 | A Novel antimicrobial peptide isolated from *Parasilurus asotus* and its uses. | 국제 특허 | 1999 PCT/KR99/00126 |
| 2 | 김선창, 박찬배, 홍승서, 이현수 | A Novel antimicrobial peptide isolated from *Bufo Bufo Gargarizans.* | 국제 특허 | 1996 PCT/KR96/00147 |
| 3 | 김선창, 박찬배, 이재현, 이현수 | 생물학적 활성이 있는 신규 항균펩타이드 | 한국 | 1999-1813 |
| 4 | 김선창, 이재현, 홍승서, 이현수 | 항균펩타이드 대량 제조방법 | 한국 | 1997 (97-21312) |
| 5 | 김선창, 이재현, 홍승서, 이현수 | 신규한 펩타이드 항생물질 발현벡터 및 그를 이용한 항생물질의 제조방법 | 한국 | 1993 (93-6361) |
| 6 | 김선창, 박찬배, 홍승서, 이현수 | 한국산 두꺼비로부터 분리한 신규 항균펩타이드 | 한국 | 1995 (95-2164) |

## 5. 활용 계획

가. 본 연구를 통해 확립한 항균펩타이드의 탐색 방법을 이용하여 이후 다른 생물자원으로부터 생리활성물질의 탐색을 손쉽게 할 수 있다.

나. 본 연구를 통해 얻은 항균펩타이드의 구조와 작용기작에 대한 정보는 인체유용의 약품 및 무공해 생물농약으로 개발할 수 있는 이론적 근거를 제시할 수 있다. 또한 한국적 생물소재확보로 국가생물자원 및 관련물질특허, 제조특허 등 산업재산권 확보로 선진국의 특허장벽을 극복할 수 있다

다. 본 연구결과를 통해 얻은 항균펩타이드들은 무공해 생물농약 및 병원균내성 식물의 개발에 이용할 수 있다. 따라서 병충해로 입는 엄청난 양의 수확량 감소를 방지할 수 있으며 인류의 식량난 해소와 농가의 소득증대 및 화학농약의 살포로 인한 환경오염방지 등 많은 장점을 제공할 수 있다.

라. 본 연구결과를 통해 얻은 항균펩타이드를 식품보존제, 구강청결제, 외상치료제, 항바이러스 및 항암치료제 등으로 개발이 가능하므로 농민의 소득 증대 뿐 아니라 우리고유의 생물자원에서 개발된 항균펩타이드를 해외로 수출할 수 있어 국가적으로 큰 경제적 이득을 줄 수 있다. 또한 기존의 항생제 남용으로 생기는 건강문제를 미연에 방지할 수 있어 의료비용을 크게 절감할 수 있다. 따라서 신규항균펩타이드의 보다 넓은 이용연구를 위하여 국내·외 제약회사등과 제휴하여 공동으로 신의약으로 개발하는 것이 절실히 요구된다.

# 제 5 절. 참고문헌

Steiner H. and Boman H. G. (1981) Sequence and specificity of two antimicrobial proteins involved in insect immunity, Nature, 292: 246-248

Boman H. G. and Merrifield R. B. (1989) Antimicrobial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids, FEBS letters, 259: 103-106

Selsted M. E. and Ouellette A. (1992) Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense, J. Cell Biol., 118: 929-936

Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: Isolation, Characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of precursor, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84: 5449-5453

Miyata T. and Shimonishi Y. (1989) Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, Tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity, J. Biochem., 106: 663-668

Bechinger B., Zasloff M. and Opella S. J. (1992) Structure and interactions of magainin antibiotic peptides in lipid bilayers: a solid state nuclear magnetic resonance investigation, Biophys. J., 62: 12-14

Mor A. and Nicolas P. (1994) The NH2-terminal (α-helical domain 1-18 of dermaseptin is responsible for antimicrobial activity, J. Biol. Chem., 269: 1934-1939

Duclohier H. and Spach G. (1989) Antimicrobial peptide magainin I from Xenopus skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayer, Biophysical J., 56: 1017-1021

Westerhoff H. V. and Zasloff M. (1989) Magainins and the disruption of membrane-linked free energy transduction, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86:

6597-6601

Grant, Jr. E. and Roseman M. A. (1992) Mechanism of Magainin 2a induced permeabilization of phospholipid vesicles, Biochemistry, 31: 9912-9918

Leippe M. and Muller-Eberhard H. J. (1994) Cytolytic and antibacterial activity of synthetic peptides derived from amoebapore, the pore-forming peptide of Entamoeba histolytica, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91: 2602-2606

Gabay J. E. (1994) Ubiqutous natural antibiotics, Science, 264: 373-374

Frohman, M. A., Dush, M. K. and Martin, G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 8998-9002

Gubler, U. and Hoffman, B. J. (1983) A simple and very efficent method for generating cDNA libraries, Gene, 25: 263-269

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74: 5463-5467

di Guan, C., Li, P., Riggs, P. D. and Inouye, H. (1988) Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein, Gene, 67: 21-30

Maina, C. V., Riggs, P. D., Grandea III, A. G., Slatko, B. E., Moran, L. S., Tagliamonte, J. A., McReynolds, L. A. and di Guan, C. (1988) An *Escherichia coli* vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein, Gene, 74: 365-373

Maloy W. and Kari U. (1995) Structure-activity studies on magainins and other host defense peptides, Biopolymers, 37: 105-122

Reilly, D. S., Tomassini, N. and Zasloff, M. (1994) Expression of magainin

antimicrobial peptide genes in the developing granular glands of *Xenopus* skin and induction by thyroid hormone, Developmental Biology, 162, 123-133

During. K. (1993) Can lysozymes mediate antibacterial resistance in plants?, Plant Mol. Biol., 23: 209-214

Heitz, T., Geoffroy, P., Stintzi, A., Fritig, B., and Legrand, M. (1993) cDNA cloning and gene expression analysis of the microbial proteinase inhibitor of tobacco, J. Biol. Chem., 268: 16987-16992

Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M. G., Soria, M., and Lappi, B. A. (1992) Ribosome-inactivating proteins from plants : present status and future prospects, Bio/Technology, 10: 405-412

Raikhel, N. V. and Wilkins, T. A. (1987) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding wheat germ agglutinin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 6745-6749

Lambert, J., Keppi, E., Wicker, C., and Hoffmann, D. (1989) Insect immunuty : Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of the insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bacterial peptides, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 262-266

Boman, H. G. (1991) Antibacterial peptides : Key components needed in immunity, Cell, 65: 205-207

Sheng, Y. H., Huang, H. C., and Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. syringae $Harpin_{pss}$ : A protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants, Cell, 73: 1255-1266

Ryals, J., Uknes, S., and Ward, E. (1994) Systemic acquired resistance, Plant Physiol., 104: 1109-1112

Schlumbaum, A., mauch, F., Vogeli, U., and Boller, T. (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth, Nature, 234: 365-367

Nelson, D. E., Raghothama, K. G., Singh, N. K., Hasegawa, P. M., and Bressan, R. A. (1992) Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene, Plant Mol. Biol., 19: 577-588

Broekaert, W. F., Marien, W., Vanderleyden, J., and Cammue, B. P. A. (1992) Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin- binding proteins, Biochemistry, 31: 4308-4314

Nakayama, K., Omatam, K., Okahashi, I., Nakamura, Y., Kolkenbroch, H., and Ulbrich, N. (1990) Amino acid sequence and disulfide bridges of an antifungal protein isolated from *Aspergillus giganteus*, Eur. J. Biochem., 193: 31-38

Hofman, S. J., Looker, D. L., Roehrich, J. M., Cozart, P. E., Durfee, S. L., Tedesco, J. L., and Stetler, G. L. (1990) Expression of fully functional tetrameric human hemoglobin in *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 8521

Zambroski, P., Tempe, J., and Schell, J. (1989) Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants, Cell, 56: 193

Stachel, S. E., Messens, E., von Montagu, M., and Zambroski, P. (1985) Identification of the plant molecule produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*, Nature, 318: 624

Cristou, P., MacCabe, D. E., and Swain, W. F. (1988) Stable trransformation of callus by DNA-coated gold particles, Plant Physiol., 87: 671

Park, C. B., Kim, M. S. and Kim, S. C. (1996) A Novel Antimicrobial Peptide from *Bufo bufo gargarizans*, BBRC, 218: 408-413.

Lee, J. H., Skowron, P. M., Rutkowska, S. M., Hong, S. S., and Kim, S. C. (1996) Sequential Amplification of Cloned DNA as Tandem Multimers using Class-IIS Restriction Enzymes, *Genet Anal Biomol Eng*, 13: 139-145

Kim H. S., Park C. B., Kim M. S., and Kim S. C. (1997) cDNA cloning and

characterization of BuforinI, an antimicrobial peptide: a cleavage product of histone H2A, BBRC, 229: 381-387

Lee J. H., Minn I., Park C. B., and Kim S .C. (1998) Acidic peptide-mediated expression of the antimicrobial peptide buforin II as tandem repeats in *Escherichia coli*, Protein Expression and Purification 12: 53-60

Nicolas, P., and A. Mor. 1995. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. Annu. Rev. Microbiol. 49: 277

Gilman, R. H., R. Partanen, K. H. Brown, W. M. Spira, S. Khanam, B. Greenberg, S. R. Bloom, and A. Ali. 1988. Decreased gastric acid secretion and bacterial colonization of the stomach in severely malnourished Bangladeshi children. Gastroenterology 94: 1308

Rose, F. R., K. Bailey, J. W. Keyte, W. C. Chan, D. Greenwood, and Y. R. Mahida. 1998. Potential role of epithelial cell-derived histone H1 protein in innate antimicrobial defense in the human gastrointestinal tract. Infect. Immun. 66: 3255

Gorden, J., and P. L. Small. 1993. Acid resistance in enteric bacteria. Infect. Immun. 61: 364

Gahan, C. G., and C. Hill. 1999. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 50: 93

Boman, H. G. 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. Annu. Rev. Immunol. 13: 61

Hancock, R. E. W. 1997. Peptide antibiotics. Lancet 349: 418

Ouellette, A. J., and M. E. Selsted. 1996. Paneth cell defensins: Endogenous peptide components of intestinal host defense. FASEB J. 10: 1280

Gallo, R. L., M. Ono, T. Povsic, C. Page, E. Eriksson, M. Klagsbrun, and M. Bernfield. 1994. Syndecans, cell surface heparan sulfate proteoglycans, are induced by a proline-rich antimicrobial peptide from wounds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11035

Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard, and J. J. Oppenheim. 1999. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. Science 286: 525

Boman, H. G., I. A. Boman, D. Andreu, Z. Li, R. B. Merrifield, G. Schlenstedt, and R. Zimmermann. 1989. Chemical synthesis and enzymic processing of precursor forms of cecropins A and B. J. Biol. Chem. 264 :5852

Zanetti, M., L. Litteri, R. Gennaro, H. Horstmann, and D. Romeo. 1990. Bactenecins, defense polypeptides of bovine neutrophils, are generated from precursor molecules stored in the large granules. J. Cell Biol. 111: 1363

Valore, E. V., and T. Ganz. 1992. Posttranslational processing of defensins in immature human myeloid cells. Blood 79: 1538

Wilson, C. L., A. J. Ouellette, D. P. Satchell, T. Ayabe, Y. S. Lopez-Boado, J. L. Stratman, S. J. Hultgren, L. M. Matrisian, and W. C. Parks. 1999. Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense. Science 286: 113

Lehrer, R. I., M. Rosenman, S. S. L. Harwig, R. Jackson, and P. Eisenhauer. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. J. Immunol. Methods 137: 167

Monestier, M., T. M. Fasy, M. J. Losman, K. E. Novick, and S. Muller. 1993. Structure and binding properties of monoclonal antibodies to core histones from autoimmune mice. Mol. Immunol. 30: 1069

Yakabe, E., M. Tanji, M. Ichinose, S. Goto, K. Miki, K. Kurokawa, H. Ito, T.

Kageyama, and K. Takahashi. 1991. Purification, characterization, and amino acid sequences of pepsinogens and pepsins from the esophageal mucosa of bullfrog (*Rana catesbeiana*). J. Biol. Chem. 266: 22436

Taggart, R. T., L. G. Cass, T. K. Mohandas, P. Derby, P. J. Barr, G. Pals, and G. I. Bell. 1989. Human pepsinogen C (progastricsin). J. Biol. Chem. 264: 375

Furihata, C., D. Saito, H. Fujiki, Y. Kanai, T. Matsushima, and T. Sugimura. 1980. Purification and characterization of pepsinogens and a unique pepsin from rat stomach. Eur. J. Biochem. 105: 43

Samloff, I. M. 1989. Peptic ulcer: the many proteinases of aggression. Gastroenterology 96: 586

Foltmann, B. 1981. Gastric proteinases--structure, function, evolution and mechanism of action. Essays Biochem. 17: 52

James, M. N. G., and A. R. Sielecki. 1986. Molecular structure of an aspartic proteinase zymogen, porcine pepsinogen, at 1.8 A resolution. Nature 319: 33

Stemmer, C., J. P. Briand, and S. Muller. 1997. Mapping of linear histone regions exposed at the surface of the nucleosome in solution. J. Mol. Biol. 273: 52

Schiltz, R. L., C. A. Mizzen, A. Vassilev, R. G. Cook, C. D. Allis, and Y. Nakatani. 1999. Overlapping but distinct patterns of histone acetylation by the human coactivators p300 and PCAF within nucleosomal substrates. J. Biol. Chem. 274: 1189

Perry, C. A., C. A. Dadd, C. D. Allis, and A. T. Annunziato. 1993. Analysis of nucleosome assembly and histone exchange using antibodies specific for acetylayed H4. Biochemistry 32: 13605

Lin, R., J. W. Leone, R. G. Cook, and C. D. Allis. 1989. Antibodies specific to acetylated histones document the existence of deposition- and

transcription-related histone acetylation in Tetrahymena. J. Cell Biol. 108: 157

Puerta, C., F. Hernandez, L. Lopez-Alarcon, and E. Palacian. 1995. Acetylation of histone H2A.H2B dimers facilitates transcription. Biochem. Biophys. Res. Commun. 210: 409

Groppi, V. E., and P. Coffino. 1980. G1 and S phase mammalian cells synthesize histones at equivalent rates. Cell 21: 2333

Chang, L., S. S. Loranger, C. Mizzen, S. G. Ernst, C. D. Allis, and A. T. Annunziato. 1997. Histones in transit: cytosolic histone complexes and diacetylation of H4 during nucleosome assembly in human cells. Biochemistry 36: 469

Hiemstra, P. S., P. B. Eisenhauer, S. S. L. Harwig, M. T. van den Barselaar, R. van Furth, and R. I. Lehrer. 1993. Antimicrobial proteins of murine macrophages. Infect. Immun. 61: 3038

Watson, K., R. J. Edwards, S. Shaunak, D. C. Parmelee, C. Sarraf, N. J. Gooderham, and D. S. Davies. 1995. Extra-nuclear location of histones in activated human peripheral blood lymphocytes and cultured T-cells. Biochem. Pharmacol. 50: 299

Zlatanova, J. S., L. N. Srebreva, T. B. Banchev, B. T. Tasheva, and R. G. Tsanev. 1990. Cytoplasmic pool of histone H1 in mammalian cells. J. Cell Sci. 96: 461

Atkinson, M. J., D. A. Bell, and S. K. Singhal. 1985. A naturally occurring polyclonal B cell activator of normal and autoantibody responses. J. Immunol. 135: 2524

Watabe, Y., H. Kuramochi, Y. Furuya, N. Inagaki, S. Seino, S. Kimura, and J. Shimazaki. 1996. Identification of histone H2A.X as a growth factor secreted by an androgen-independent subline of mouse mammary carcinoma cells. J. Biol.

Chem. 271: 25126

Mecheri, S., G. Dannecker, D. Dennig, P. Poncet, and M. K. Hoffmann. 1993. Anti-histone autoantibodies react specifically with the B cell surface. Mol. Immunol. 30: 549

Khan, I. U., R. Wallin, R. S. Gupta, and G. M. Kammer. 1998. Protein kinase A-catalyzed phosphorylation of heat shock protein 60 chaperone regulates its attachment to histone 2B in the T lymphocyte plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10425

Hirsch, J. G. 1958. Bactericidal action of histone. J. Exp. Med. 108: 925

Bilozur, M. E., and C. Biswas. 1990. Identification and characterization of heparan sulfate-binding proteins from human lung carcinoma cells. J. Biol. Chem. 265: 19697

Bab, I., D. Gazit, M. Chorev, A. Muhlrad, A. Shteyer, Z. Greenberg, M. Namdar, and A. Kahn. 1992. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. EMBO J. 11: 1867

Multigner, L., J. Gagnon, A. Van Dorsselaer, and D. Job. 1992. Stabilization of sea urchin flagellar microtubules by histone H1. Nature 360: 33

Brix, K., W. Summa, F. Lottspeich, and V. Herzog. 1998. Extracellularly occurring histone H1 mediates the binding of thyroglobulin to the cell surface of mouse macrophages. J. Clin. Invest. 102: 283

Moore, K. S., C. L. Bevins, M. M. Brasseur, N. Tomassini, K. Turner, H. Eck, and M. Zasloff. 1991. Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*. J. Biol. Chem. 266: 19851

Mor, A., M. Amiche, and P. Nicolas. 1994. Structure, synthesis, and activity of dermaseptin b, a novel vertebrate defensive peptide from frog skin: relationship with adenoregulin. Biochemistry 33: 6642

# 제 3 장 한국 고유식물의 항균성 펩타이드 탐색 및 식물병원균 방제물질 개발

(위탁과제1; 경상대학교 이상열)

# 제 1 절. 서 설

지난 수십년간 급격한 세계 인구증가로 인하여 지구상의 전 인류는 그들의 식량 확보라는 어려운 문제에 직면하여 왔다. 그러나 인류는 이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 새로운 농업기술의 도입, 품종개량, 토양 비옥도 증진, 병충해 방제 등을 통하여 많은 식량 증산을 이루는 성과를 거두었다. 그중에서도 농약 사용에 의한 병충해와 잡초 방제는 농업생산 증대에 없어서는 안될 중요한 요소로 인식되고 있다. 특히, 근래에 들어서는 농업생산 방식이 집중적 재배로 바뀜에 따라 농약 사용이 더욱 더 증가되고 있는 것이 현실이다. 따라서 세계적으로 농작물의 병충해 방제를 위하여 투여하는 농약 사용량은, 1960년 총 매출액이 8.5억불이었던 것이 1970년에는 27억불, 1980년에는 116억불, 1990년에는 264억불로 급격하게 증가되고 있으며, 우리나라의 농약 소비량만도 년간 5,600억원 (1993년 농림통계)에 이르고 있는데, 아직도 병충해에 의한 농작물 손실량은 총생산량의 약 26%나 되고 있다. 또한 농약사용으로 인한 인명피해 및 자연생태계 파괴 등 간접손실은 농약사용량의 약 3~4배에 달하는 것으로 추정되기 때문에 농약으로 인한 경제적 손실은 실로 막대하다. 그러므로, 화학농약이나 비료의 사용으로 인한 환경오염과 자연의 파괴를 방지하기 위하여 최근에는 생물학적 방법에 의한 식물 병원균의 방제에 많은 노력을 하고 있다. 그리고, 최근에는 유전공학적 기법을 이용한 항균성 펩타이드나 저분자량의 단백질을 이용한 식물 병원진균 방제물질의 개발과 응용에 대한 연구가 미국이나 구라파 등의 유명 연구소에서 진행되고 있는데, 이들중 대표적인 곳이 Monsanto, DuPont, CibaGeigy, Mogen International등의 대기업들이다. 또한 이들 기업뿐만 아니라, 국가적인 차원에서도 (스위스 National Priority Program, 독일의 Max-Planck 식물육종연구소, 영국의 John Innes 연구소) 대대적인 연구가 추진되고 있다.

또한 항균성 펩타이드와 저분자 단백질을 이용한 생물학적 방제물질의 개발노력과 함께 이들 펩타이드나 단백질을 coding하는 유전자를 유용작물에 도입함으로서 항균성 형질전환 작물의 개발에 대한 연구도 상당한 속도로 진행되고 있다. 아직 실용화 되지는 않았지만 미국을 비롯한 구라파 선진국에서는 바이러스 표피단백질 유전자가 도입된 바이러스 저항성 형질전환식물체, *B.T-toxin* 및 proteinase inhibitor 유전자가 도입된 내병성 형질전환식물체등 수종의 내바이러스성 및 내병성작물이 개발되어 포장시험단계에 있으며, 곰팡이병 저항성 형질전환식물체 또한 아직 기초 연구단계이긴 하지만 최근 네델란드의 Mogen International사(1993년)에서 곰팡이 세포벽 용해효소인 chitinase와 β-1,3-glucanase를 복합도입 시켜 *Fusarium*에 저항성이 있는 토마토를 개발하였다는 보고가 있어 큰 가능성을 제시해주고 있다. 이러한 연구결과, 유전공학기법으로 만든 바이러스 저항성 형질전환식물체는 1~2년 내에 완전 실용화

될 전망이며 내충성 작물은 2004년, 곰팡이병 저항성 작물은 2006년까지 실용화 될 것으로 예측되고 있다. 따라서 본 연구의 중요한 목적은 여러가지 식물자원으로부터 항균성 펩타이드와 저분자량의 단백질들을 분리하고, 이들의 병원성 곰팡이에 대한 spectrum이나 specificity를 연구하고 우리나라의 주요한 작물에 병을 유발시키는 곰팡이병에 대한 생물학적 방제물질과 형질전환 유용작물을 개발하고자 하였다.

# 제 2 절. 연구 수행 방법

## 1. 식물 곰팡이병 저항성 펩타이드과 단백질의 분리 및 유전자 클로닝

### 가. 식물 곰팡이병에 대한 저항성 펩타이드나 저분자량 단백질의 screening

다양한 한국 고유의 야생식물로부터 cell extract 를 만들어 병충해 내성 여부를 plate assay법을 이용하여 일차 screening하였다. 이들 cell extract 를 열처리나 여러 proteinase 로 처리하여 펩타이드나 단백질 여부를 확인함과 동시에 이미 알려진 강력한 병원성 곰팡이 내성 단백질을 확보하고 다양한 최신 chromatography 기법을 사용하여 이들 단백질이나 펩타이드를 분리하고 특성을 규명하였다.

### 나. 유용 유전자의 분리 및 변형, 조작

알려진 유전자들은 genomic DNA 를 사용할 경우에는 PCR 법을, total RNA 나 mRNA 의 경우에는 RT/PCR 법을 이용하여 유전자를 클로닝하였다. 그리고 적은 분자량의 항진균성 단백질에 대한 유전자들은 oligomer 합성법을 이용하여 클로닝하였다.

### 다. 새로운 유전자의 cloning

새로운 항진균성 단백질은 단백질을 순수분리한 후에, 항체를 만들어 expression library로부터 antibody를 사용하여 screening 하거나 순수 분리된 단백질의 N-terminal peptide sequence를 구하고 이를 이용하여 degenerate oligomer 를 제조한 후 cDNA library 를 사용하여 screening 하였다.

### 라. 항진균성 펩타이드나 단백질의 형질 변형

Phage의 single strand DNA를 이용한mutagenesis 방법이나, PCR 법을 이용한 mutagenesis 방법 등과 chimeric construct 를 이용한 유전자 변형방법을 이용하여, 항진균성 단백질 유전자의 형질을 변형시키고 이들의 활성변화를 관찰하여 강력한 항균 단백질을 제조하였다.

## 2. 병원성 곰팡이 저항성 유전자의 발현과 조절연구

### 가. Total RNA 및 genomic DNA 의 분리

Total RNA 는 LiCl/phenol 방법을 이용하여 식물체로부터 순수분리하였고, Genomic DNA 는 식물체의 조직을 액체질소로 얼린 후 proteinase K 로 처리한 후 CsCl gradient 를 이용하여 분리하였다.

### 나. Southern 및 Northern blot hybridization

실험하고자 하는 DNA 를 필요에 따라 restriction enzyme 으로 자르고 standard 방법으로 Southern blot 을 nylon membrane 이용하여 수행하였다. Northern blot 은 formaldehyde 방법을 이용하여 gel electrophoresis 하고 nylon membrane 에 transfer 하여 blot을 만들고, probe 를 random priming 하거나 PCR labeling 방법에 의해 $^{32}$P로 labelling 하여 Church 방법에 의하여 hybridization 하였다.

### 다. *E. coli* overexpression 균주를 이용한 곰팡이 살균력 test

Secretion vector 를 이용하여 항균 단백질을 *E. coli* 에서 overexpression 시키고 이들 단백질의 활성을 plate 상에서 plate assay 법으로 확인하였다.

### 라. Expression vector 의 구축

일차적으로 여러가지 상업화 되어진 vector 를 이용하여 test하였고 새로운 secretion vector를 여러 종류의 bacteria 유전자에서 leader sequence 나 다른 signal sequence 나 inducible expression system을 응용하여 발현시키고자 하는 host cells에 적당하도록 변형시킨 inducible expression system을 구축하였다.

## 3. 유용작물의 형질전환 방법 개발과 형질전환 식물체 개발

### 가. 식물곰팡이병에 대한 저항성을 지니는 형질전환 transgenic plant의 제조

형질전환용 construct electroporation 방법을 이용하여 *Agrobacterium* 에 transfer 한 후에 그들이 *Agrobacterium* 에서 안정하게 존재하는지를 확인하였다. 이때 유전자의 확인은, *E. coli* 에서 사용하고 있는 mini prep 방법과 동일한 방법으로

하여 plasmid DNA를 *Agrobacterium* 에서 분리하였고 Southern blot hybridization 을 통하여 확인하였다.

### 나. 형질전환용 유전자의 도입확인

원하는 gene 이 도입되었는 지에 대한 transgenic plant 들의 일차 확인은 kanamycin resistance 를 이용하여 확인하였고, 확인된 transgenic plant 의 유전자가 안정하게 다음 세대에 전이되는지를 T1 generation 에서 다시 transformant를 재확인하였다. Transgenic plant 들로부터 다시 total RNA 를 분리한 후에, transgenic plant 들에서는 expression 이 가장 많이 되는 것을 선택하여 항균력을 측정하였다.

# 제 3 절. 결과 및 고찰

## 1. 다양한 식물체로부터 강력한 항균성 펩타이드 및 저 분자량의 단백질 분리 및 항균 특성 분석

### 가. 호박 잎으로부터 병원균에 대하여 강력한 활성의 novel class III chitinase 효소 단백질 분리 및 항균 특성분석

호박 잎으로부터 병원균의 세포벽을 강력하게 분해하는 class III chitinase 효소 단백질을 분리하고 (그림 2-1) chitin-affinity gel 과 HPLC Mono Q column chromatography를 수행하여 (그림2-2), SDS-전기영동 실험을 한 결과 분자량이 29kDa 이었으며 효소의 N-termional amino acid 순서를 결정 (AGIAIYWGQNGNEGS) 하여 database에서 search 한 결과, 이 효소는 Class III type의 새로운 chitinase임을 알 수 있었다 (그림 2-3). 또한 호박 잎으로부터 순수분리한 novel chitinase 단백질을 이용하여 이 단백질과 specific하게 반응하는 항체를 토끼로부터 제조하였다. 그리고 이 단백질이 fungal cell wall 구성성분인 chitin을 분해하여 생성시키는 분해산물을 HPLC-sugar 분석 column을 이용하여 분석한 결과, 이 단백질이 chitin을 이들의 subunit인 N-acetyl glucosamine으로 분해함으로써 병원균을 살균하게 됨을 알 수 있었다 (그림 2-4). 이 단백질을 항균제제로 이용할 수 있는 지에 대한 연구를 하기 위하여 이 단백질의 안정성을 관찰하여 보았다. 그 결과 호박 잎에 존재하는 class III chitinase는 항균 단백질은 pH 2-11 까지의 광범위한 pH에서 85% (maximal activity 대비) 이상의 활성을 유지함을 알 수 있었고, 열에 대한 안정성도 상당히 높아서 60°C의 온도에서도 매우 안정함을 알 수 있었다 (그림 2-5).

### 나. 배추 꽃에서 분리한 강력한 항균 활성의 thaumatin-like protein의 순수분리 및 항균 특성분석

다양한 병원성 미생물의 공격을 받는 환경속에서 병원균에 대한 항균력을 강하게 나타내며 생육하는 배추의 꽃으로부터 광범위한 항균력을 가지는 thaumatin-like protein을 DEAE, Mono Q, C18 column chromatography 등을 수행하여 단백질을 순수분리 하였다 (그림 2-6). 순수분리한 단백질의 분자량을 SDS-PAGE 방법으로 분석한 결과 27 kDa 임을 알 수 있었고 순수분리한 단백질에 대한 항체는 다른 PR-5 단백질과는 immuno cross-reactivity가 없음을 알 수 있음으로서 지금까지 발견된 단백질과는 구조적으로 다른 항균 단백질임을 알 수 있었다. 순수분리한 PR-5 단백질의

N-terminal amino acid 서열분석: 순수분리한 PR-5 단백질의 N-terminal amino acid 의 아미노산 서열은 그림 2-7과 같았고 database search 결과 PR-5 group의 단백질임을 알 수 있었다.

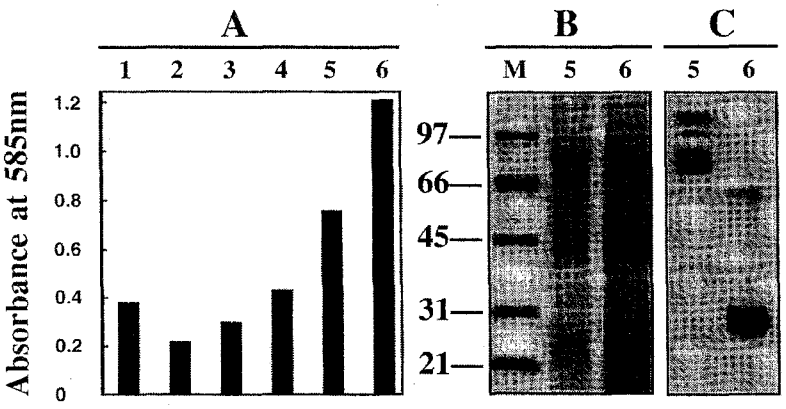



그림 2-1. Comparison of chitinase activity in the cytosolic fraction of various plant leaves. Chitinase activity in 10 ㎍ soluble proteins extracted from various plant leaves was measured as described in Materials and Methods (A). 20 ㎍ of soluble proteins from the two sample having relatively higher chitin hydrolyzing activity (lane 5 and 6) were separated on a 12% SDS-PAGE gel containing 0.01% glycol chitin and either stained with Coomassie blue (B) or subjected to active staining of the chitinase activity in the gel (C). Lane 1 to 6 represent the proteins extracted from the leaves of red pepper (lane 1), tomato (lane 2), soybean (lane 3), arrow root (lane 4), cucumber (lane 5) and pumpkin (lane 6).

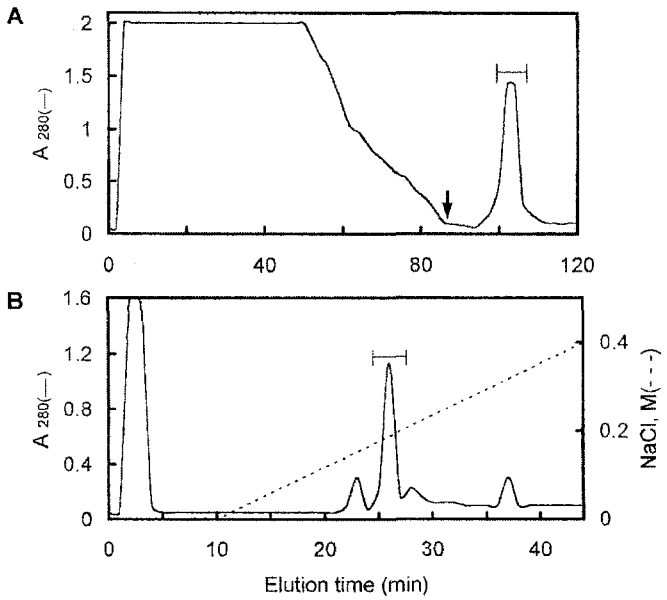



그림 2-2. Purification of the chitinase (PL-ChtIII) from pumpkin leaves. Proteins obtained from the ammonium sulfate fractionation were applied to a regenerated chitin affinity gel and eluted with 20 mM NaOH solution. The arrow ( ↓ ) indicates the starting point of enzyme elution (A). After the pH of the eluted fractions was adjusted to pH 7.0 immediately, the elute was combined and concentrated in YM 10 amicon concentrator. The protein was further purified by HPLC Mono-Q column chromatography (B). Protein concentration was measured by the absorbance change at 280nm (A280) and the fractions containing chitinase activity were pooled as indicated by bars in the chromatogram.

| Enzyme sources[1] | *N*-terminal amino acid seqeunces[2] |
|---|---|
| PL-ChtIII | A G **I** A **I** **Y** **W** G **Q** **N** **G** N **E** **G** S |
| Cucumber | A G **I** A **I** **Y** **W** G **Q** **N** **G** N **E** **G** S |
| Tobacco | G D **I** V **I** **Y** **W** G **Q** **N** **G** N **E** **G** S |
| *Arabidopsis* | G G **I** A **I** **Y** **W** G **Q** **N** **G** N **E** **G** N |
| Pokeweed | A G **I** A **I** **Y** **W** G **Q** **N** **G** G **E** **G** T |

[1] *N*-terminal amino acid sequence of cucumber (Metraux *et al.*, 1989), tobacco (Lawton *et al.*, 1992), Arabidopsis (Verburg *et al.*, 1993), and pokeweed (Ohta *et al.*, 1995) were compared with that of PL-ChtIII.
[2] The conserved amino acids are marked as bold characters.

그림 2-3. Comparison of N-terminal amino acid sequence of the PL-ChtIII with those of other class III chitinases in plants.

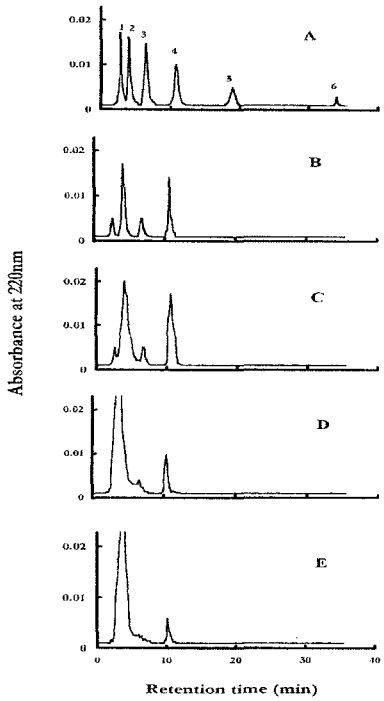



그림 2-4. Analysis of reaction products of the purified PL-ChtIII for swollen chitin as a substrate.
The purified PL-ChtIII was incubated with swollen chitin for 30 min (B), 1 h (C), 2 h (D) and 4 h (E). After the reaction, 40 ㎕ of reaction supernatant was collected at the indicated time-intervals and injected into a carbohydrate analysis HPLC column. Panel A indicates mixture of chito-oligosaccharide standards, N-acetylglucosamine (1), chitobiose (2), chitotriose (3), chitotetrose (4), chitopentose (5) and chitohexose (6).

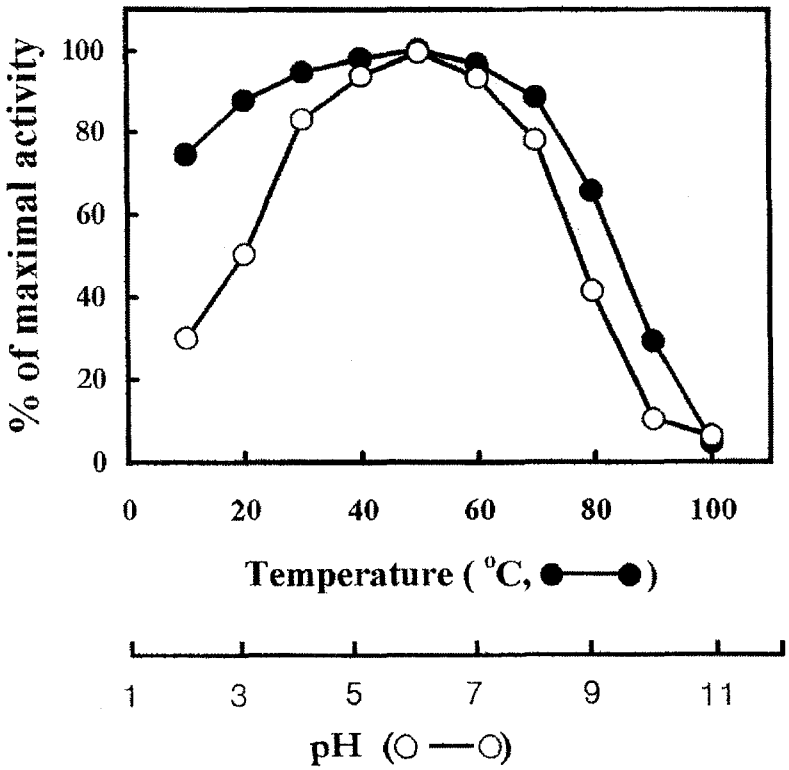



그림 2-5. Effects of temperature and pH on the PL-ChtIII activity. Chitinase activity was determined as described in Materials and Methods at different pH and temperatures.

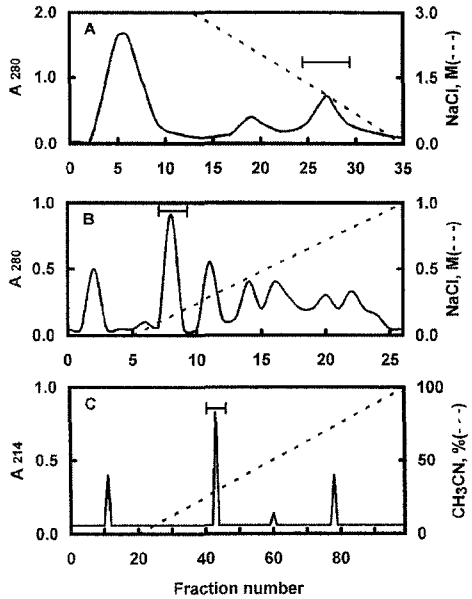



그림 2-6. Purification of the BFTP from flower buds of B. campestris. Proteins from 2 kg of flower buds of B. campestris were extracted as described in Materials and Methods. Proteins obtained from ammonium sulfate fractionation (20-80 %) were separated with a butyl-toyopearl column (A). After pooling the major fractions with antifungal activity, they were dialyzed and further purified by consecutive chromatography on HPLC Mono Q (B) and reverse-phase C18 columns (C). During the purification, the BFTP activity in the column fractions was assayed by hyphal rupture and growth inhibition of N. crassa.

pBFTP MASLNFNFALLLLISRASASTVVFFNKCRYPVWP

signal sequence

BFTP STVVFFNKCRYPVWP

그림 2-7. Comparison of the N-terminal amino acid sequence of pBFTP with the peptide sequence determined by Edman degradation technique.

## 다. 배추 꽃에서 순수분리한 PR-5 단백질의 항균력 측정 결과

배추 꽃으로부터 순수분리한 PR-5 단백질을 이용하여 다양한 식물 병원균에 대한 항균력을 조사하기 위하여 여러 가지 병원성 곰팡이 포자와 공배양을 수행하여 첨가한 PR-5 단백질에 의하여 포자발아가 저해되는 정도를 측정하였다. 그 결과, *F. oxysporum*, *T. reesei*, 및 *N. crassa* 등 광범위한 병원성 미생물들의 포자발아를 강력하게 억제함을 알 수 있었다 (그림 2-8). 이 단백질이 병원균을 죽이는 mechanism을 연구하기 위하여 곰팡이 균사가 성장하고 있는 agar 배지에 filter paper을 놓고 단백질을 농도별로 apply 한 다음 일정시간 후에 곰팡이 균사의 성장이 저해되는 정도를 조사하여 보았다. 그 결과 단백질의 농도가 증가될수록, 병원균의 균사성장이 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 따라서 본 과제에서 배추 꽃으로부터 분리한 PR-5 단백질이 곰팡이 균사의 성장을 강하게 억제함을 확인할 수 있었다. 이와 같은 PR-5 단백질에 의한 곰팡이 균사의 성장억제가 어떤 방법으로 일어나게 되는 지에 대한 mechanism을 규명하기 위하여 slide glass 위에 agar 배지를 얇게 굳히고 그 위에 곰팡이 균사를 성장시킨 다음, 단백질을 methylene blue와 함께 apply 하였다. 그리고 곰팡이 균사가 사멸되는 과정을 현미경 하에서 관찰한 결과, 순간적으로 (1-2초이내) PR-5 단백질이 곰팡이 세포막 (fungal plasma membrane)을 puncture 하여 세포내의 삼투압 balance를 파괴하여 세포의 rupture를 유발함을 알 수 있었으며 이러한 결과 주로 fungal septum이나 cell의 apex 부근을 파괴하여 살균한다는 사실을 알 수 있었다 (그림 2-9, 2-10). 또한 이 단백질의 병원성 곰팡이 살균능력이 병원균의 세포막 형성을 방해하는 nikkomycin Z 시약을 PR-5 단백질 시약과 함께 사용할 경우 상당한 synergy 효과가 있음을 입증함으로써 미생물의 세포벽 (cell wall)과 세포막 (plasma membrane)을 동시에 파괴하는 것은 항균제제를 제조하는 데 중요한 strategy 라는 사실을 알 수 있었다 (그림 2-11).

## 라. 배추 꽃의 PR-5 protein의 물리화학적 안정성 연구

앞의 실험결과 배추 꽃에서 분리한 PR-5 단백질이 강력한 항균력을 가지고 있음을 확인하였다. 이 단백질의 열 안정성을 관찰하기 위하여 differential scanning calorimeter를 이용하여 열 흡수곡선을 조사하였다. 이렇게 열에 대한 단백질의 변성과 refolding 연구를 수행한 결과, 이 단백질은 68°C에서 변성이 시작됨을 알 수 있었고 (그림 2-12), 열을 제거하는 경우 다시 renaturation되어 활성이 회복됨을 증명할 수 있었다. 또한 이 단백질이 자연계에 존재하는 여러 가지 단백질 분해효소에 대하여 안정한 지를 조사하기 위하여 protease 존재 하에서 이 단백질의 분해여부를 관찰하여 보았다. 그 결과 이 단백질은 trypsin이 공격할 수 없는 구조를 이루고 있어

이 protease에 의하여 전혀 단백질 분해가 유발되지 않음을 알 수 있었고, 단백질 분해효소 처리 전후에 항균력이 전혀 변화되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 우리가 분리한 항균단백질이 자연계의 여러 가지 환경 하에서 안정한 항균력을 유지할 수 있음을 관찰할 수 있었다 (그림 2-13).

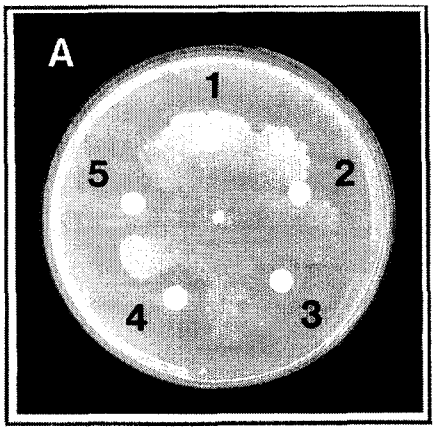



그림 2-8. Antifungal activity of the PLTP measured by hyphal extension-inhibition assay against *Neurospora crassa* (A). To perform the hyphal extension-inhibition assay, fungal mycelia of *F. oxysporium* (A) were harvested from actively growing fungal plates and placed into the center of petridishes containing PDA media. After incubation of these dishes for 24-48 hr at 25°C to allow for mycelial growth, the PLTP protein solutions were applied to filter discs laid on the agar surface in front of the advancing fungal mycelium. They were further incubated and measured the growth inhibition of fungi at 25°C. The amounts of protein added onto the disc are 0 µl (disc #1), 2.5 µl (disc #2), 5 µl (disc #3), 10 µl (disc #4), and 20 µl (disc #5) of the 2 µM PLTP. The total volume applied onto each disc was adjusted to 20 µl with the addition of 10 mM potassium phosphate, pH 5.5 buffer.

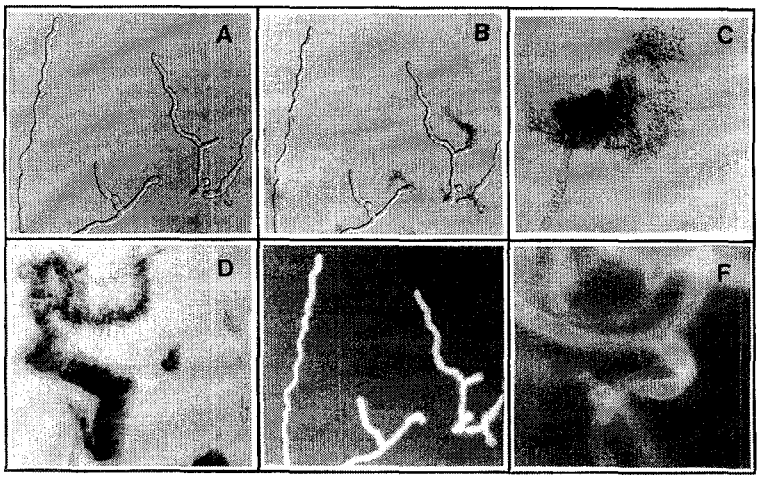



그림 2-9. Identification of SSTP's target sites on fungal cell. For hyphal rupture test, 10μl of 0.2μM bovine serum albumin (A) or SSTP (B, C and D) in 0.005% methylene blue was dropped onto the hyphae of *N. crassa* in PDA media on a slide glass. The hyphal tip (C) and septum region (D) are magnified. The morphological changes of the fungal hyphae was observed using inverted light microscope (A-D). After the SSTP treatment, the calcofluor white M2R was treated again to the bursted hyphae and washed unreacted reagent at mild conditions. The fluorescence illuminated from the binding of calcofluor white M2R with the fungal cell wall was detected on fluorescence microscope (E). As a positive control, calcofluor white M2R was treated after *S. marcescens* chitinase treatment (F). Magnification of the microscope for A, B, E and C, D, F are 40 and 200 folds respectively.

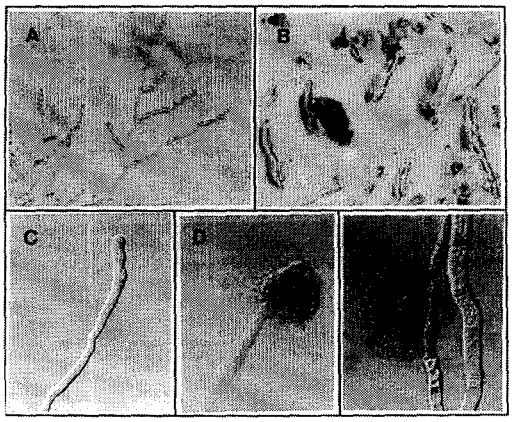



그림 2-10. Antifungal activity of the PLTP on hyphal rupture of *Neurospora crassa*. For hyphal rupture test, 10 μl of the purified PLTP (200 nM) in 0.005% methylene blue was added to germinated hyphae of *N. crassa* in PDA plate (B, D and E) and BSA was treated the same procedure as a control (A and C). The resulting hyphae were photographed using phase contrast light microscopy at 40x magnification (A and B) and 200x magnification at hyphal tip and septum regions (C, D, and E).

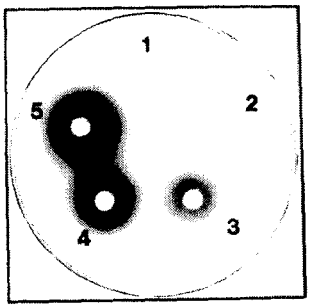



그림 2-11. Synergistic effect of the PLTP with nikkomycin for growth inhibition of *Candida albicans*. 10 μl of 400 nM PLTP (1) or 5 μM of nikkomycin (2) is loaded on a paper-disc. 2 μl (3), 5 μl (4), and 10 μl (5) of the 400 nM PLTP were loaded onto paper-discs containing 5 μM nikkomycin, respectively. The clear zones around the discs represent areas of growth inhibition. The total volume applied onto each disc was adjusted to 10 μl with the addition of 10 mM potassium phosphate, pH 5.5 buffer.

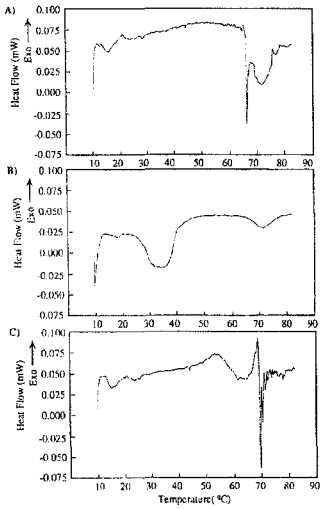



그림 2-12. Heat absorption curves of the CFTP upon heat treatment by micro-DSC. Thermal denaturation of the CFTP was measured by temperature changes from 10°C - 90°C with a scan rate of 0.2°C/min (A) under the $N_2$-pressure. To examine the reversibility of the protein structure, the denatured protein was slowly cooled to 4°C and rescanned thermal absorption with the same procedure (B).

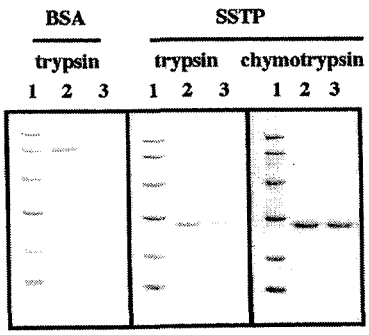



그림 2-13. SDS-PAGE on 12% polyacrylamide of proteolytic digestion products. The proteolytic enzymes of trypsin and chymotrypsin were incubated with bovine serun albumin or SSTP for 0min (lane 2) and 30min (lane 3). In lane 1, low molecular weight standard was applied. Note that only the trypsin-digested BSA was shown, since it was completely digested by chymotrypsin.

## 2. 항균 단백질을 코딩하는 유전자 크로닝과 염기서열 결정 및 발현 pattern 분석

### 가. 호박 잎에서 분리한 강력한 항균 활성의 novel class III chitinase 효소를 코딩하는 유전자 크로닝과 발현분석

순수분리한 chitinase 의 N-terminal amino acid로부터 oligo-primer 제조하여 호박 잎으로부터 제조한 cDNA library를 스크리닝하여 이 단백질을 코딩하는 유전자를 분리한 결과 1,019 bases를 가지고 있었으며 861 bp 의 open reading frame (ORF)을 가지고 단백질을 코딩함을 알 수 있었다 (그림 2-14). N-terminal 에 20개의 signal sequence를 가지고 있었으며 6개의 highly conserved cycteine 아미노산을 소유하고 있었다. 또한 125번과 127번에 aspartic acid 및 glutamic acid 의 active site를 함유하고 있음을 알 수 있었다 (그림 2-15).

### 나. Novel class III chitinase 효소 유전자의 발현 pattern 분석

강력한 활성을 갖는 class III chitinse를 probe로 사용하여 이 유전자의 발현 pattern을 조사해 본 결과, 이 유전자는 병원균 elicitors 인 glycol chitin, fungal elicitor, mercuric chloride 및 UV 등에 의하여 강력하게 발현이 유도됨을 알 수 있었고 (그림 2-16), 이들의 처리에 의하여 약 1시간 이내에 mRNA가 발현되어 병원균의 침입에 대한 방어를 개시하였으나 이로부터 약 24시간 후에 단백질이 발현됨을 관찰하므로서 유전자의 발현과 단백질로의 expression 사이에는 20시간 정도의 시간적 차이가 존재함을 알았다 (그림 2-17). 또한 이 유전자의 발현은 주로 꽃의 anther 와 stigma에서 발현되므로서 식물의 번식과 생장에 대단히 중요한 기능을 수행함을 알 수 있었다. 그리고 이 유전자는 genome 상에서 2개 정도의 isotype을 가지고 있음을 Southern blot analysis 결과, 확인할 수 있었다 (그림 2-18).

### 다. 배추 꽃에서 분리한 강력한 항균 활성의 thaumatin-like protein을 코딩하는 유전자분리 및 유전자의 구조분석

순수분리한 PR-5 단백질의 N-terminal amino acid의 아미노산 서열로부터 결정한 amino acid로부터 deduced한 oligo-primer 제조한 후 brassica flower cDNA library로부터 이 단백질을 코딩하는 유전자를 크로닝하였다. 그 결과 933 bases로 구성되었으며 723개 bp의 open reading frame (ORF)을 가지고 있었고 19개의 signal sequence를 가지고 있다는 사실을 알 수 있었다 (그림 2-19). 순수분리한 단백질로부터 제조

한 oligonucleotide probe를 이용하여 이 단백질을 코딩하는 유전자를 결정하고 이들을 database에 도입하여 homology search를 한 결과 그림 2-20과 같이 PR-5 단백질을 코딩하는 유전자임을 확인할 수 있었다.

### 라. Thaumatin-like protein 유전자의 발현분석

PR-5 유전자를 probe로 사용하여 이 유전자의 발현 pattern을 식물의 조직과 다양한 extracellular stimuli의 처리에 의한 발현변화를 조사한 결과 이 유전자는 식물의 flower와 stem에서 주로 발현되어 기능을 수행함을 알 수 있었다. Northern blot analysis의 실험결과는 그림 2-21과 같다.

```
                                        CCCGGGGGCAGGAATTCGGATCCCCAA   27
ATGGCTGCTCTATTAGTTATGTTCCTCCTCGCCGCTTCCATTTTCCGATCATCCCACGCC   87
 M  A  A  L  L  V  M  F  L  L  A  A  S  I  F  R  S  S  H  A    (20)

GCCGGAATCGCTATTTATTGGGGCCAAAACGGCAACGAAGGCTCTCTTGCTTCCACTTAC  147
 A  G  I  A  I  Y  W  G  Q  N  G  N  E  G  S  L  A  S  T  Y    (40)

GCCACCGGAAACTACCAATTTGTCAACGTGGCATTTCTCTCCTCCTTTGGCAACGGCCAA  207
 A  T  G  N  Y  Q  F  V  N  V  A  F  L  S  S  F  G  N  G  Q    (60)

TCTCCGGTACTCAACCTCGCCTTCCACTGCAACCCCGACAACAACGGCTGCGCTTTCTTA  267
 S  P  V  L  N  L  A  F  H  C  N  P  D  N  N  G  C  A  F  L    (80)

AGCAGCGAAATTAACGCCTGCCAAAGTCAAGGCGTCAAAGTCCTCCTCTCAATCGGCGGC  327
 S  S  E  I  N  A  C  Q  S  Q  G  V  K  V  L  L  S  I  G  G   (100)

GGAGCTGGAAGCTACTCGCTCTCCTCCGCCGATGACGCGGCACAAGTAGCGAATTTCATC  387
 G  A  G  S  Y  S  L  S  S  A  D  D  A  A  Q  V  A  N  F  I   (120)

TGGAATAATTACCTCGGCGGTCAGTCGAGCTCCAGGCCAGCTACAGACGCCGTTTTAGAC  447
 W  N  N  Y  L  G  G  Q  S  S  S  R  P  A  T  D  A  V  L  D   (140)

GGAGCTGATTTCGATATCGAAGCCGGGTCGGGTCAATTCTGGGACGAACTTGGCCCGAAA  507
 G  A  D  F  D  I  E  A  G  S  G  Q  F  W  D  E  L  G  P  K   (160)

CTGAAGGGTTTGGGTCAAGTCATTATCTCCGCCGCGCCGCAATGTCCGATCCCCGACGCG  567
 L  K  G  L  G  Q  V  I  I  S  A  A  P  Q  C  P  I  P  D  A   (180)

CACTTGGACACTGCAATTAAAACCGGGCTGTTTGATTTCGTCTGGGTTCAATTCTACAAC  627
 H  L  D  T  A  I  K  T  G  L  F  D  F  V  W  V  Q  F  Y  N   (200)

AACCCGCCGTGCATGTTTACTGATGGAAACACTAACAATCTCCTCAATTCTTGGAACCAG  687
 N  P  P  C  M  F  T  D  G  N  T  N  N  L  L  N  S  W  N  Q   (220)

TGGTCCACGTTTCCGGCCGGGAAGCTGATAATGGGGCTCCCGGCGGCGCCTGAAGCAGCT  747
 W  S  T  F  P  A  G  K  L  I  M  G  L  P  A  A  P  E  A  A   (240)

CCGAACGGCGGATTTATTCCATCGGATGTCCTTATTTCACAAATTCTTCCGACCATAAAA  807
 P  N  G  G  F  I  P  S  D  V  L  I  S  Q  I  L  P  T  I  K   (260)

TCAACTTCCAACTATGGAGGAGTTATGTTGTGGAGCAAGTTTTTTGACAATGGCTACAGC  867
 S  T  S  N  Y  G  G  V  M  L  W  S  K  F  F  D  N  G  Y  S   (280)

GACGCCATTAAAGGCAGCATCTAAGCTAAATTACTTAATTACCCATGAATAAGCAAAAAA  927
 D  A  I  K  G  S  I  *                                       (287)

AAATGGGCATTCTTGTCCTTTTTATATATATATATTTAAATTTGTGTGATGTAATAAAAT  987
AAGTCTTTATTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACT                            1019
```

그림 2-14. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the PL-ChtIII cDNA. The nucleotide sequence of PL-ChtIII is numbered starting with the first nucleotide of the insert. Amino acid numbering starts with the first methionine residue. Box indicate the sequences of signal sequence.

```
Pumpkin      AGIAIYWGQNGNEGSLASTCATGNYQFVNVAFLSSFGNGQSPVLNLAFHC  50
Cumcumber    AGIAIYWGQNGNEGSLASTCATGNYEFVNIAFLSSFGSGQAPVLNLAGHC  50
Tobacco      GDIVIYWGQNGNEGSLADTCATNNYAIVNIAFLVVFGNGQNPVLNLAGHC  50
Arabidopsis  GGIAIYWGQNGNEGNLSATCATGRYAYVNVAFLVKFGNGQTPELNLAGHC  50
               * ********** *  ****  *  ** ***  ** ** * *******

Pumpkin      NPDNNGCAFLSSEINACQSQGVKVLLSIGGGAGSYSLSSADDAAQVANFI 100
Cumcumber    NPDNNGCAFLSDEINSCKSQNVKVLLSIGGGAGSYSLSSADDAKQVNNFI 100
Tobacco      DPNAGACTGLSNDIRACQNQGIKVMLSLGGGAGSYFLSSADDARNVANYA 100
Arabidopsis  NPAANTCTHFGSQVKDCQSRGIKVMLSLGGGIGNYSIGSREDAKVIADYL 100
              *    *         *     ** ** *** * *   *  **
                                      • •
Pumpkin      WNNYLGGQSSSRPATDAVLDGADFDIEAGSGQFWDELGPKLKGLGQ---- 146
Cumcumber    WNSYLGGQSDSRPLGAAVLDGVDFDIESQSGQFWDVLAQELKNFGQ---- 146
Tobacco      WNNYLGGQSNTRPLGDAVLDGIDFDIEGGTTQHWDELAKTLSQFSQQ-RK 149
Arabidopsis  WNNFLGGKSSSRPLGDAVLDGIDFNIELGSPQHWDDLARTLSKFSHRGRK 150
             **  *** *  **   ***** ** **    * ** *   *

Pumpkin      VIISAAPQCPIPDAHLDTAIKTGLFDFVWVQFYNNPPCMFTDGNTNNLLN 196
Cumcumber    VILSAAPQCPIPDAHLDAAIKTGLFDSVWVQFYNNPPCMFAD-NADNLLS 195
Tobacco      VYLTAAPQCPFPDTWLNGALSTGLFDYVWVQFYNNPPCQYSGGSADNLKN 199
Arabidopsis  IYLTGAPQCPFPDRLMGSALNTKRFDYVWIQFYNNPPCYSSSGNTQNLFD 200
                  ***** **     *  *  ** ** ********        **

Pumpkin      SWNQWST-FPAGKLIMGLPAAPEAAPNGGFIPSDVLISQILPTIKSTSNY 245
Cumcumber    SWNQWTA-FPTSKLYMGLPAAREAAPSGGFIPADVLISQVLPTIKASSNY 244
Tobacco      YWNQWNA-IQAGKIFLGLPAA-QGAAGSGFIPSDVLVSQVLPLINGSPKY 247
Arabidopsis  SWMKWTTSIAAQKFFLGLPAAPEAA-DSGYIPPDVLTSQILPTLKKSRKY 249
              *  *       *   *****   *   * ** *** ** **       *

Pumpkin      GGVMLWSKFFDN--GYSDAIKGSI-  267
Cumcumber    GGVMLWSKAFDN--GYSDSIKGSIG  267(81%)
Tobacco      GGVMLWSKEYDN--GYSSAIKANV-  269(67%)
Arabidopsis  GGVMLWSKEWDDKNGYS-SILASV-  272(60%)
             ********  *   ***  *
```

그림 2-15. Comparison of the deduced amino acid sequence of PL-ChtIII with other class III chitinases.
Gaps were introduced to maximize alignment. Conserved cysteine residues are denoted by a box. The glutamic acid and the aspartic acid residues proposed to be a part of the catalytic site of plant class III chitinases are indicated by bold circles (I). Asterisks (H) indicate the identical amino acid.

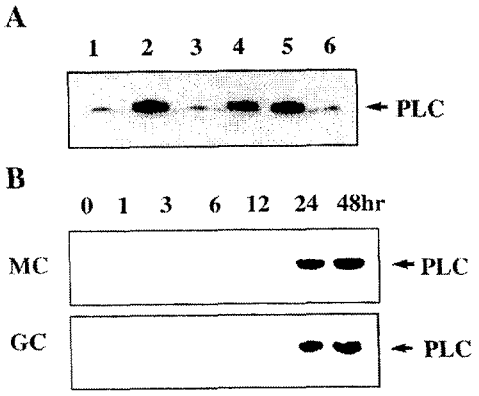



그림 2-16. Effect of fungal elicitor or glycol chitin on the expression of PL-ChtIII protein.
The expression level of PL-ChtIII protein was measured by western blot analysis using the soluble proteins isolated from pumpkin leaves after the same treatment and same time-intervals.

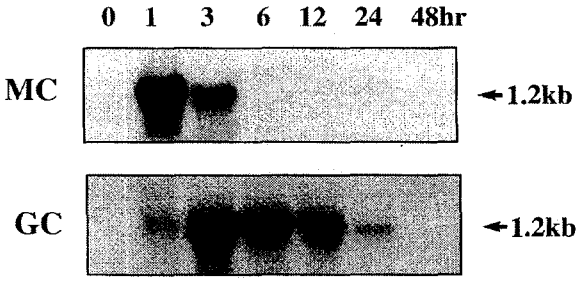



그림 2-17. Effect of fungal elicitor or glycol chitin on the expression of PL-ChtIII mRNA.
For Northern analysis, total RNAs were isolated from pumpkin leaves with the indicated time intervals after fungal elicitor (FE) or 0.01% glycol chitin (GC) treatment. The RNAs were separated in a 1.8% agarose gel, blotted, and hybridized to a 32P-labeled PL-ChtIII cDNA probe.

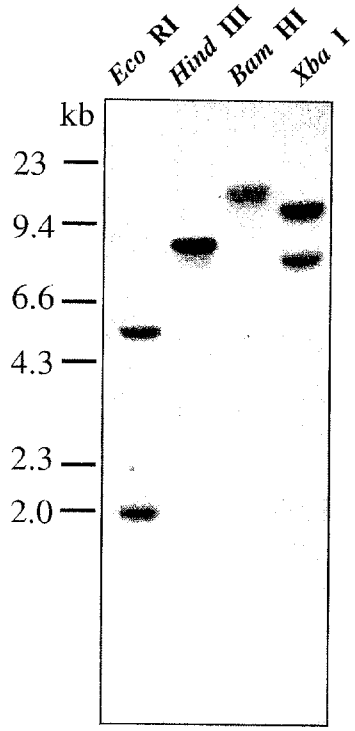



그림 2-18. Southern hybridization of pumpkin leaf genomic DNA.
20 ug of genomic DNAs were digested with the following restriction enzymes: Eco RI (lane 1), Hind III (lane 2), Bam HI (lane 3), and Xba I (lane 4). The DNA fragments were separated in a 0.8% agarose gel, transferred to a nylon membrane, and probed with the 32P-labeled 1.2 kb cDNA of PL-ChtIII.

```
                                        ccttgctcaagtggagctcgatca   24
ATGGCTTCACGAAACCTCTTCAACTTCGCTCTCCTTCTTCTTATCTCTCGCGCTTCAGCT   84
 M  A  S  R  N  L  F  N  F  A  L  L  L  L  I  S  R  A  S  A   (20)
TCAACGGTAGTATTCTTCAACAAATGCAGATACCCAGTGTGGCCAGGCATCCAGCCCATC  144
 S  T  V  V  F  F  N  K  C  R  Y  P  V  W  P  G  I  Q  P  S   (40)
GCCGCCCAAAACATACTCGCCGGCGGTGGATTTAAGCTTCCGGCTAACAAAGCCTACACC  204
 A  A  Q  N  I  L  A  G  G  G  F  K  L  P  A  N  K  A  Y  T   (60)
CTTCAGCTCCCACCGCTTTGGTCCGGCCGCTTCTGGGGTCGCCACGGCTGCACATTCGAC  264
 L  Q  L  P  P  L  W  S  G  R  F  W  G  R  H  G  C  T  F  D   (80)
GGATCTGGCCGTGGTCGCTGCGCCACCGGTGACTGCGGCGGTTCTCTCACCTGCAACGGA  324
 G  S  G  R  G  R  C  A  T  G  D  C  G  G  S  L  T  C  N  G  (100)
GCTGGCGGTTCACCTCCGGCAACTCTCGCAGAAATCACCCTCGGACAAGAGCTTGACTTC  384
 A  G  G  S  P  P  A  T  L  A  E  I  T  L  G  Q  E  L  D  F  (120)
TATGACGTCAGCCTCGTCGACGGTTATAACCTCGCGATGTCTATAATGCCGCTCAAAGGT  444
 Y  D  V  S  L  V  D  G  Y  N  L  A  M  S  I  M  P  V  K  G  (140)
AGAGGACAATGTAGCTACGCCGGTTGTGTAAGCGATCTAAACCGGATGTGTCCGGTTGGG  504
 R  G  Q  C  S  Y  A  G  C  V  S  D  L  N  R  M  C  P  V  G  (160)
TTACAAGTCCGGTCACGCAACGGGAAACGGGTATTAGCCTGTAAAAGCGCTTGCTCTGCC  564
 L  Q  V  R  S  R  N  G  K  R  V  L  A  C  K  S  A  C  S  A  (180)
TTCAACTCACCACAGTACTGTTGTACCGGCACGTTCGGTAACCCACTCACCTGCAAGCCA  624
 F  N  S  P  Q  Y  C  C  T  G  T  F  G  N  P  L  T  C  K  P  (200)
ACGTCATACTCCAAAATCTTCAAGGTCGCTTGCCCTAAAGCTTATTCTTATGCTTACGAC  684
 T  S  Y  S  K  I  F  K  V  A  C  P  K  A  Y  S  Y  A  Y  D  (220)
GACCCAACCAGCATCGCAACTTGCTCCAAGGCTAACTACATCGTCACCTTTTGCCCTCAC  744
 D  P  T  S  I  A  T  C  S  K  A  N  Y  I  V  T  F  C  P  H  (240)
CATCGCCGTTAAaatcacaattattaagaagaaatcatttctttattagcaaaatcttgt  804
 H  R  R  *                                                  (243)
gttatgtaattgagaatctttgaggtttatgtttctacaattgtaacactcttgaaatgc  864
aaaatcctataacaatatcaatatcagtagattttgttattgataacacttaaaaaaaaa  924
aaaaaaaaa                                                     933
```

그림 2-19. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the pBFTP cDNA. The nucleotide of the pBFTP cDNA is numbered starting with the first nucleotide of the insert. Amino acid numbering starts with the first methionine residue.

```
          ▼
BFTP      MAS-----RNLFNFALLL-----LISRASASTVVFFNKCRYFVWPGIQPIAAQNILAGGGFKLPANKAYT 60
PWIR2     ATSPV--------LFLLLAV---FAAGASAATFNIKNNCGFTIWPAGIPVG-------GGFALGSGQTSS 52
THMII     ------------------------------ATFEIVNRCSYTVWAAASKGDAA--LDAGGRQLNSGESWT 38
MAI       ------------------------------AVFTVVNQCPFTVWAASVPVG-------GGRQLNRGESWR 33
PROB12    M-----NFLKSFPFYAFLCFGQYFVAYTMAATFDIVNQCTYTYWAAASPG--------GGRQLNSGQSWS 57
OLP       MSH----LTTFLVFF-LLAFVTY--TYA-SGVFEVHNNCPYTVWAAATPVG-------GGRRLERGQSWW 55
NP24      V------------LFFLLC-VTY--TYA--ATIEVRNNCPYTVWAASTPIG-------GGRRLNRGQTWV 46
AP24      MSNNMGNLRSSFVFF-LLALVTY--TYA--ATIEVRNNCPYTVWAASTPIG-------GGRRLDRGQTWV 58
                                         ..   *.* .. *..            **  *  ...

BFTP      LQLPP-LWSGRFWGRHGCTFDGSGRGRCATGDCGGSLTCNGAGGSPPATLAEITLGQ--ELDFYDVSLVD 127
PWIR2     INVPAGTQAGRIWARTGCSFNG-GSGSCQTGDCGGQLSCS-LSGRPPATLAEYTIGGGSTQDFYDISVID 120
THMII     INVEPGTKGGKIWARTDCYFDDSGRGICRTGDCGGLLQCKRFG-RPPTTLAEFSLNQYGK-DYIDISNIK 106
MAI       ITAPAGTTAARIWARTGCQFDASGRGSCRTGDCGGVVQCTGYG-RAPNTLAEYALKQFNNLDFFDISLID 102
PROB12    INYNPGTYQARIWGRTNCNFDGSGRGNCETGDCNGMLECQGYG-KPPNTLAEFALNQPMQ-DFYDISLYD 125
OLP       FWAPPGTKMARIWGRTNCNFDGAGRGWCQTGDCGGVLECKGWG-KPPNTLAEYALNQFSNLDFWDISVID 124
NP24      INAPRGTKMARIWGRTGCNFNAAGRGTCQTGDCGGVLQCTGWG-KPPNTLAETALDQFSNLDFWDISLVD 115
AP24      INAPRGTKMARVWGRTNCNFNAAGRGTCQTGDCGGVLQCTGWG-KPPNTLAEYALDQFSGLDFWDISLYD 127
          .         .. *.* .* *.. *.* * ****.* . *   . ..*.**** ..      *. *.*  .

BFTP      GYNLAMSIMPLK-GRGQCSYAGCVSDLNRMCPVGLQVRSRNGKRVLACKSACSASNSPQYCCTGTFGNPL 196
PWIR2     GFNLAMDFS------------------------------------------CST------------GDAL 136
THMII     GFNVPMDFSPTTRG---CRGVRCAADIVGQCPAKLKAPGG------GCNDACTVFQTSEYCCTTGKG--- 164
MAI       GFNVPMSFLP-DGGSGCSRGPRCAVDVNARCPAELRQDGV-------CNNACPVFKKDEYCCVGSAAN-- 162
PROB12    GFNIPMEFSPINGG---CRNLRCTAPIMEQCPAQLKTQGG-------CNNPCTYIKTNEFCCTNGPGS-- 183
OLP       GFNIPMSFGPTKPGPGKCHGIQCTANINGECPGSLRVPGG-------CNNPCTTFGGQQYCCTQGP---- 183
NP24      GFNIPMTFAPTKPSGGKCHAIHCTANINGECPRALKVPGG-------CNNPCTTFGGQQYCCTQGP---- 174
AP24      GFNIPMTFAPTNPSGGKCHAIHCTANINGECPRELRVPGG-------CNNPCTTFGGQ-YCCTQGP---- 186
          *.*..*..                                           *.

BFTP      TCKPTSYSKIFKVACPKAYSYAYDDPTSIATCS--KANYIVTFCPHHR--------------------R  243
PWIR2     QCR--------DPSCPPPQAYQHPNDVATHACSGNN-NYQITFCP------------------------  172(43%)
THMII     --GPTEYSRFFKRLCPDAFSYVLDKPTTV-TCPGSS-NYRVTFCPTA/LELEDETA-------------  209(39.7%)
MAI       NCHPTNYSRYFKGQCPDAYSYPKDDATSTFTCPAG-TNYKVVFCP------------------------  206(38.8%)
PROB12    -CGPTDLSRFFKARCPDAYSYPQDDPPSLFTCPPGT-NYRYYFCP------------------------  226(38.1%)
OLP       -CGPTELSRWFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCTSWTTDYKVMFCPYG/SAHNETTNFPLEMPTSTHEVAK 251(28.4%)
NP24      -CQPTELSKFFKKRCPDATSTPQDDPTSTFTCPGGSTNTRVVFCPNG/VAD---PDFPLEMPASTDEVAK 239(27.6%)
AP24      -CGPTFFSKFFKQRCPDAYSYPQDDPTSTFTCPGGSTNYRVIFCPNG/QAH---PNFPLEMPGS-DEVAK 249(25.1%)
                      . ** . .    .  .   .*.   .     ***
```

**그림 2-20. Comparison of the deduced amino acid sequence of pBFTP with other typical PR-5 proteins. The deduced amino acid sequences of BFTP (this work), PWIR2 from wheat (Rebmann et al. 1991), THAII from Thaumatococcus daniellii Benth (Edens et al. 1982), MAI from maize (Richardson et al. 1987), PROB12 (Cornelissen et al. 1986), OLP (Takeda et al. 1991) and AP24 (Melchers et al. 1993) from tobacco and NP24 from tomato (King et al. 1988) are aligned for comparison. Stars (*) mark positions of perfectly conserved amino acids and dots (.) mark well-conserved positions. The amino acid sequence identity of the proteins shared with BFTP is shown in the last column (%). The N-terminal signal sequence cleavage site is indicated by a solid triangle. Slashes (/) denote the reported cleavage sites of the C-terminal propetide. The alignment was computed with the CLUSTAL program of the PCGENE software package.**

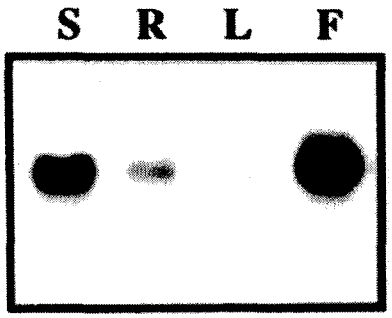



그림 2-21. Expression of the pBFTP in different tissues of B. campestris. The tissues examined are: S, stems; R, roots; L, leaves; F, flower buds. The mRNA detected by the radiolabeled probe was about 0.9 kb in size.

### 3. 항균 펩타이드 thionin과 trx 유전자의 크로닝과 대장균을 이용한 발현

앞에서 연구한 항균 단백질 이외에도 항균력을 가진다고 알려진 항균 펩타이드인 thionin을 코딩하는 유전자를 크로닝하고 이들의 염기서열을 결정하였다. 그림 2-22에서 보는바와 같이 이 유전자는 N-terminal 과 C-terminal의 양쪽에 signal sequences를 가지고 있음으로서 두 번의 processing을 거친 후에 mature protein을 생성하게 됨을 확인할 수 있었다. 이 유전자는 그림 2-23에서 보는 바와 같이 배추 꽃에서만 specific 하게 발현되는 조직특이적 발현 현상을 보여줌을 알 수 있었다. 이 유전자의 genomic complexcity를 조사하기 위하여 genomic Southern 분석 실험을 수행한 결과, 이 유전자는 single copy gene으로 이루어져 있음을 알 수 있었다 (그림 2-24). Thionin cDNA로부터 deduced한 mature protein만의 유전자를 PCR로 크로닝하여 이 펩타이드 gene을 대장균을 이용하여 glutathione fusion vector에 발현시켰으며 thrombin을 이용하여 mature protein part를 순수분리 하였다 (그림 2-25). 이와함께, 환경스트레스 저항성을 가진다고 밝혀진 환원력의 trx 단백질을 코딩하는 유전자를 크로닝하여 염기서열을 결정하였으며 이 유전자를 이용한 형질전환 식물체를 제조하고 이들 형질전환 식물체의 환경 스트레스 저항성 및 내병성 능력을 측정하였다.

```
                                    ↓
CFT          MEG----KTVILGVIIMSLVMAQNQVEAKICCPRTIDRNIYNACRLTGAS    46
Crambin      MEG----KTVILSVLIMSLVMSYNQVEATTCCPSIVARSNFNVCRLPGTS    46
ATH-Thi2.2   MEG----KTVISSLLIMSLVLAQIQVEAKICCPTKDDRSVYFVCMLSVSS    45
ATH-Thi2.1   MKG----RILILSLLIMSLVMAQVQVEAKICCPSNQARNGYSVCRIRFS-    44
BLT          MATNKSIKSVVICVLILGLVLEQVQVEAKSCCKNTTGRNCYNACRFAGGS    50
DB4          MAPSKSIKSVVICVLILGLVLEQVQVEGKSCCKATLARNCYNTCHFAGGS    50
HTH1         MG----LKGVMVCLLILGLVLEQVQVEGKSCCRSTLGRNCYNLCRVRGAQ    46
             *       . ..  ..*..**..  * *.. **    .*. .  *    .

CFT          MTNCAN-LSGCKIVSGTTCPPGYTR/DIILQNY--GDAVNEYCKLGCASSV    92
Crambin      EAICAT-YTGCTIIPGATCPGDYAN/NILKNSAQGNAVNEYCKWGCASSV    94
ATH-Thi2.2   QFYCLL-KSKCKNTSQTICPPGYTN/DILENS--GDAVNEYCKLGCASSV    91
ATH-Thi2.1   KGRCNQ-VSGCQM--GDTCPRGWVN/AILENSA--DATNEHCKLGCETSV    88
BLT          RPVCATA-CGCKIISGPTCPRDYPK/LNLLPESGEPNATEYCTIGCRTSV    98
DB4          RPVCAGA-CRCKIISGPKCPSDYPK/LNLLPESGEPDVTQYCTIGCRNSV    98
HTH1         K-LCAG-VCRCKLTSSGKCPTGFPK/LALVSNSDEPDTVKYCNLGCRASN    94
                *      *        ** .. .   *        .  ..*. ** .*

CFT          CGALTTLKNSMQVNC-EGAVSQCTNACSNFCTKG---SAKVVETA  133
Crambin      CGALTNLQNSDAREIVNGAVRQCTNACSDFCTNG---SAKAVETA  136(64.7%)
ATH-Thi2.2   CGALTTLQNEDASKVLSEAVEQCTKACSSVCTGG---STAAVKSA  133(62.4%)
ATH-Thi2.1   CGAMNTLQNSDASEIVNGISEQCAKGCSLFCTKSYVVPPGPPKLL  133(47.45)
BLT          CDNM---DNVSRGQEMKFDMGLCSNACARFCNDGRVIQSVEA---  137(42.1%)
DB4          CDNM---DNVFRGQEMKFDMGLCSNACARFCNDGAVIQSVEA---  137(38.3%)
HTH1         CDYM--VNAAADDEEMKLYLENCGDACVNFCNGDAGLTSLTA---  134(31.6%)
             *. .   ..     .  .      *...*   *. .    .
```

그림 2-22. Comparison of deduced amino acid sequences of CFT with other thionins. The deduced amino acid sequences of CFT (this work) is aligned with crambin of C. abyssinica [15], ATH-Thi2.1, ATH-Thi2.2 of A. thaliana [1], BLT of barley [16], DB4 of Hordeum vulgare [17], and HTH1 of H. vulgare [18]. Asterisks(*) denote positions perfectly conserved and dots(.) mark well-conserved positions. Gaps are introduced to maximize the alignment. The amino acid sequence identity of the proteins shared with CFT is shown in the last column(%). Arrow indicates the N-terminal signal peptide cleavage site and the slash(/) denotes the cleavage site of the C-terminal propeptide. The alignment was computed with the CLUSTAL program of the PCGENE software package (Genofit SA, Geneva, Switzerland/Intelligenetics, Mountain View, CA).

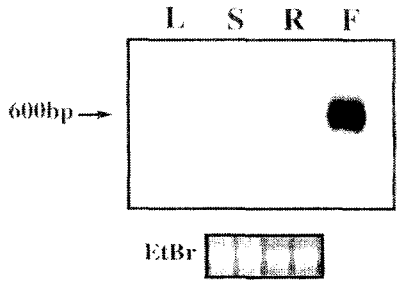



그림 2-23. Tissue-specific expression of CFT in different tissues of C. cabbage. Total RNAs from the leaves(L), stems(S), roots(R) or flowers(F) were isolated and subjected to northern blot analysis. The mRNA detected by the radiolabeled probe was about 0.6kb in size. For equal loading of RNA in each lane, the gel was examined after staining with EtBr.

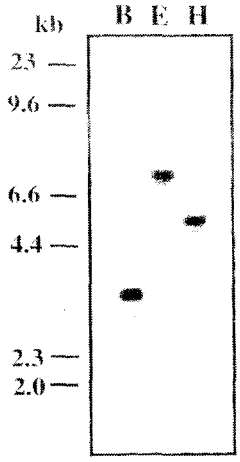



그림 2-24. Genomic Southern blot analysis of the CFT gene. Purified genomic DNA digested with BamHI(B), EcoRI(E), or HindIII(H) respectively was size-fractionated on a 0.8% agarose gel and the blot was hybridized with the [32P]-labeled full-length CFT cDNA. Size markers in kb are shown on the left.

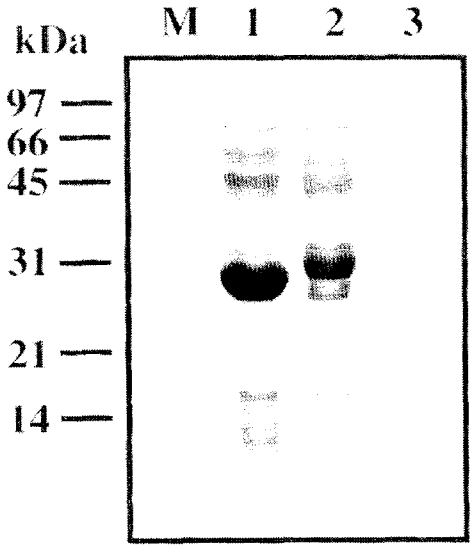



그림 2-25. Expression of CFT gene in E. coli. Expression of the GST-fusion protein was induced by adding 0.2mM IPTG and continued the culture at 30oC for 4hr. Fusion proteins obtained from the cytosolic fraction of E. coli transformed cells were separated on 15% SDS-PAGE before (lane 1) or after (lane 2) IPTG induction. After purification of the fusion protein, the N-terminal portion of GST protein was removed by thrombin and the purified CFT protein was loaded in lane 3. M indicates molecular size marker.

## 4. 항균 단백질을 도입한 내병성 형질전환 식물체 제조

강력한 항균력을 가지고 있는 항균단백질의 유전자들 식물체에 도입하여 병원균에 대하여 저항성을 가지는 내병성 형질전환 식물체를 제조하고자 하였다. 이를 위하여 여러 가지 형질전환 식물체를 제조하였으며 이중 대표적인 연구결과를 표시하면 다음과 같다. 다양한 병원균이나 환경스트레스에 저항능을 보이는 trx 단백질에 대한 유전자를 binary vector에 ligation하고 35S promoter를 이용하여 식물체내에서 강력하게 발현이 유도되는 sense-constructs 와 유전자의 발현을 suppression 시키는 antisense-construct DNAs를 제조하고 (그림 2-26) 이들 유전자를 담배에 도입하여 형질전환시킨 담배를 제조하였다. 형질전환 식물체에서의 유전자가 over-expression 되었는지, 그리고 anti-sense construct의 경우 이 유전자의 발현이 억제될 수 있었는지 등에 대한 유전자 발현 측정은 Northern blot analysis 실험을 통하여 확인하였으며 그 결과는 그림 2-27과 같았다. 제조한 형질전환체가 환경 스트레스에 대한 저항능력이 있는지를 관찰하기 위하여 UV, methyl viologen, $H_2O_2$ 등을 처리한 결과 sense-construct가 도입된 형질전환 담배는 wild-type나 antisense-construct 도입 담배에 비하여 상당히 강력한 저항능을 보임을 알 수 있었다 (그림 2-28). 또한 제조한 형질전환 식물체가 병원성 곰팡이에 대한 저항능력이 있는지를 관찰하기 위하여 형질전환 식물체의 잎에서 다양한 병 저항성 단백질인 PR-proteins를 코딩하는 유전자의 expression을 Northern blot analysis로 관찰한 결과 그림 2-29와 같이 PR 1-4까지의 병 저항성 유전자의 발현이 증가됨을 관찰할 수 있었다. 또한 병원균의 잎에 감염시킨 형질전환 잎을 현미경하에서 관찰한 결과 그림 2-30에서 보는 바와 같이 형질전환 식물체의 잎에서도 UV 조사에 의하여 HR 반응에서 나타나는 형광이 발하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 agar plugs에 감염시킨 *P. parasitica* 병원균을 담배와 incubation시킨 결과 그림 2-31과 같이 유전자가 도입된 형질전환 담배의 경우는 병원균에 대하여 상당한 저항성을 보이는 반면, vector만 도입된 담배는 완전히 고사하는 결과를 얻음으로서 병원성 곰팡이에 대하여 상당한 저항성을 보임을 알 수 있었다. 그리고 담배 잎에서 곰팡이의 번식을 관찰하기 위하여 anilineblue를 염색한 결과 유전자가 도입된 형질전환체에서는 곰팡이균의 번식이 저해된 반면 vector만 도입된 담배의 경우에는 균사가 왕성하게 번져나감을 관찰함으로서 도입한 유전자의 발현에 의하여 병원균에 저항성이 강한 형질전환 식물체가 제조되었음을 알 수 있었다.

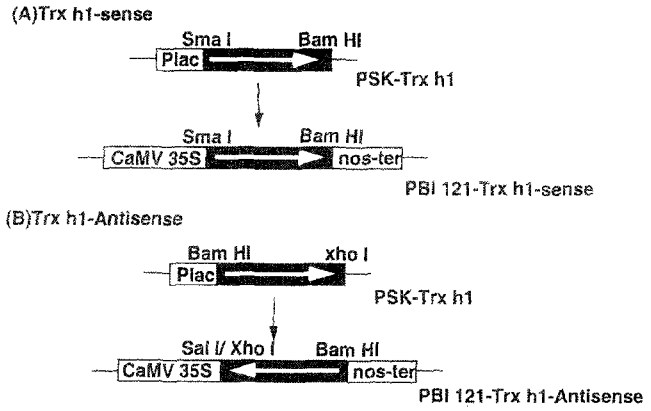



그림 2-26. Construction of snese- and antisense- gene constructs to transform them into tobacco plants. For the over-expression of the gene, 35S CaMV promoter was used.

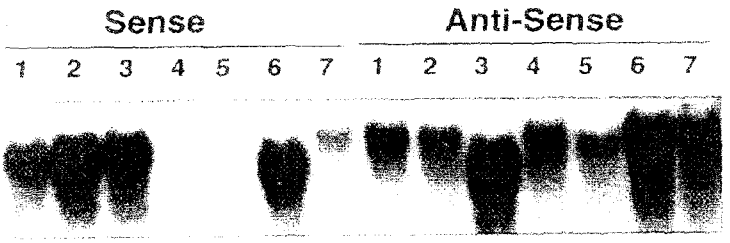



그림 2-27. Expression of trx gene in sense- and antisense-transgenic tobacco plants. Total RNAs extracted fromthe seventh leaf of wild type and transgenic tobacco plants were analyzed by Northern blot analysis.

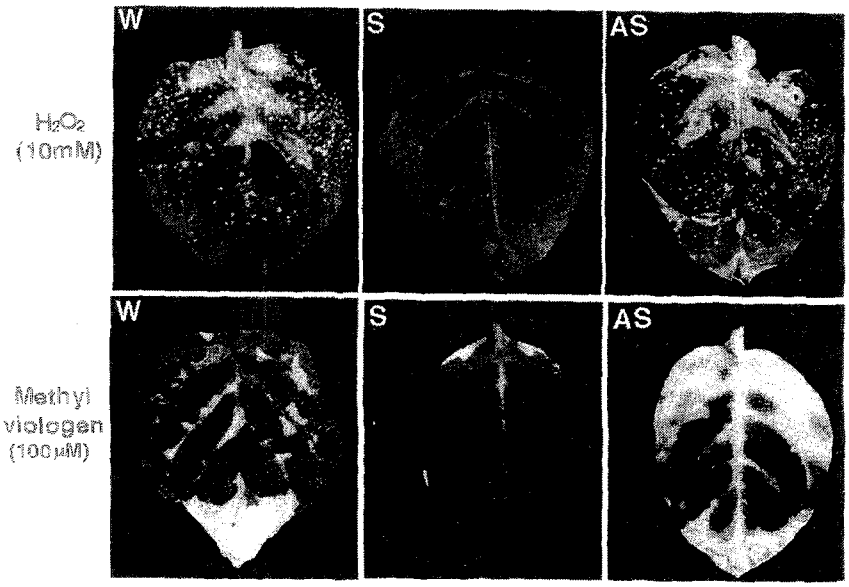



그림 2-28. Resistance of transgenic tobacco plants containing trx gene against various excellular stimuli.

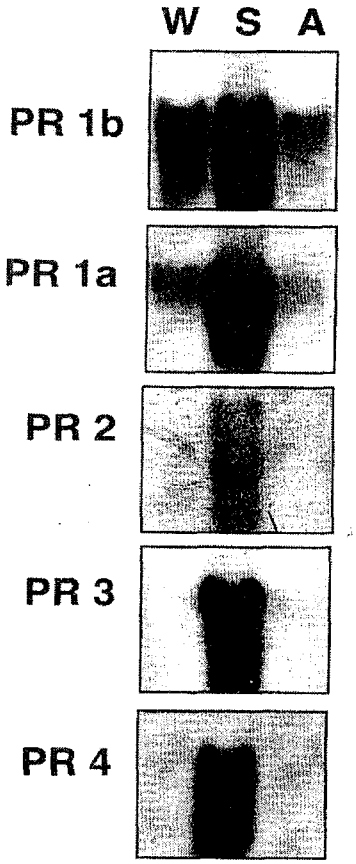



그림 2-29. Induction of various PR-protein genes in transgenic tobacco plants. Total RNAs obtained from 10 days old transgenic plants were hybridized with the 32P-labeled PR genes.

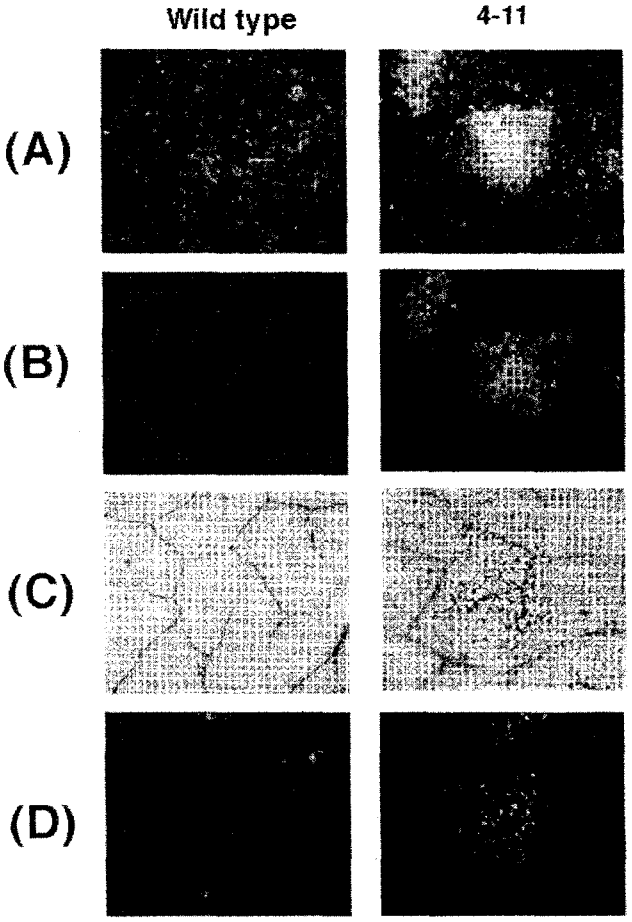



그림 2-30. Accumulation of autofluorescent matrerials in HR-like legions of transgenic tobacco plants. Fully expanded leaves from 6-wk old plants were used for microscopic analysis. A, Light microscopic analysis. B, UV-stimulated autofluorescence in intact leaves. C, lactopherol-cleared leaves in a light microscope. D, UV-stimulated autofluorescence in lactopherol-cleared tobacco leaves.

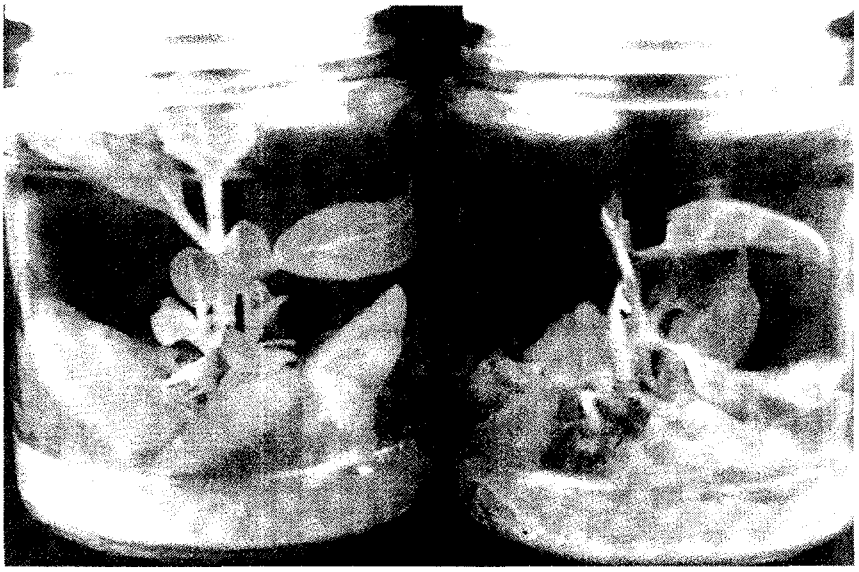


그림 2-31. Enhanced disease tolerance of the transgenic tobacco expressing trx. The zoospores of pathogen, P. parasitica was directly inoculated on one-month-old tobacco leaves for 8 days.

# 제 4 절. 연구성과 및 활용계획

## 1. 논문 발표 (3편)

Cheong, N.E., Choi, Y.O., Kim, W.Y., Kim, S.C., Cho, M.J. and Lee, S.Y. (1997) Purification of an antifungal PR-5 protein from flower buds of Brassica campestris and cloning of its gene. Physiol. Plant. 101(3); 583-590.

Kim, M.G., Kim, W.Y. Cheong, N.E., Lee, K. O., Moo Je Cho, Kim, S.C., and Lee, S.Y. (1999) Molecular cloning and characterization of a class III chitinase in pumpkin leaves, which strongly binds to regenerated chitin affinity gel. Plant Sci. 147; 157-163

Lee, K.O., Kim, M.G., Jang, H.H., Lee, J.H., Kim, S.C. and Lee, S.Y. (1999) Biochemical properties of a chitin-binding class III chitinase in pumpkin leaves. J. Biochem. Mol. Biol. 32 (6), 541-546

## 2. 해외 학술 발표 proceddings (5건)

Kim, W.Y., Cheong, N.E., Son, H.S., Lee, K.O., Choi, Y.O., Cho, M.J., and Lee, S.Y. (1997) Molecular cloning of a thioredoxin reductase gene from a salt-treated subtractive cNDA library of A. thaliana. Presented at 3rd Int. Conference of the Society for free radical research. Pisa, Italy 1997. 9. 15 - 9. 18.

N. E. Cheong, Y. O. Choi, K. O. Lee, C. H. Hong, B. G. Cheong, H. J. Moon, M. J. Cho and Lee, S.Y. (1998) Molecular characterization of fungal elicitor-induced rice GDIs specific for ypt/rab small GTPases. Presented at the 4Th Korea-Germany Joint Symposium in plant Biotechnology (Sep. 22, 1998)..

Lee, S.Y. (1998) Molecular characterization of fungal elicitor-induced rice *OsGDI*, a GDP Dissociation Inhibitor Protein specific for Rab/Ypt subfamily small GTPase. Presented at the 4Th Korea-Germany Joint Symposium in plant Biotechnology (Sep. 22, 1998).

Lee, SY, Choi, YO, Lee, KO, Jung, BG, Chi, YH, Lee, JY, Jang, HH, and Cho, MJ (2000) Biochemical property comparison of Brassica CPRxII isolated from the same plant. (6th Int. Congress of Plant Mol. Biol. June 16-24, Quebec, Canada)

LEE, Seung Sik, JunG, Bae Kyo, LEE, Kyun Oh, JANG, Ho Hee, CHI, Yong Hun, CHOI, Yeon Ok, Lim and Sang Yeol Lee (2000) Differential expression of the three Prx and their biochemical characteriation. (Presented at FAOBMB, Beijing, China at Oct. 21-24. 2000).

### 3. 특허 (2건)

Lee, S.Y., Cho, M.J., Kim, S.C. (1999) A novel fungicidal plant protein. Patent No. 0250025 R.O.K. (특허등록: 1999. 12. 29.)

Kim, M.G., Cho. M.J., and Lee, S.Y. (2000) Antifungal class IV chitinase in pumpkin leaves. Patent No. 98-48291. R.O.K. (특허등록중)

### 4. 활용 계획

가. 본 연구를 통해 개발한 자연계에 존재하는 다양한 식물 sources 로부터 유용한 항균성 단백질을 분리하거나 활성이 강한 병원균에 대한 내성을 갖는 단백질을 screening 하는 방법은 의약품이나 무공해 농약 등의 개발에 유용하게 활용할 수 있다.

나. 본 연구를 통해 개발된 병 저항성 단백질의 screening과 이들 유전자의 cloning, mutagenesis를 통한 유전자의 형질 개량기술은 다양한 의약품이나 생리활성 물질 등의 특성을 변화 시킬수 있는 중요한 단백질 유전공학 기술이며 생물산업 전반에 사용할 수 있다.

다. 본 연구를 통해 개발된 항균 유전자의 도입에 의한 형질전환 작물은 병충해로 입는 엄청난 양의 수확량 감소를 방지할 수 있으며 인류의 식량난 해소와 농가의 소득 증대 및 화학농약의 살포로 인한 환경오염방지 등 많은 장점을 제공할 수 있다.

# 제 5 절. 참고문헌

During, K. (1993). Can lysozymes mediate antibacterial resistance in plants? Plant Mol. Biol. 23: 209-214

Heitz, T., Geoffroy, P., Stintzi, A., Fritig, B., and Legrand, M. (1993) cDNA cloning and gene expression analysis of the microbial proteinase inhibitor of tobacco. The J. of Biol. Chem. 268: 16987-16992

Ward, E. R., S. J. Uknes, S. C. Williams, S. S. Dincher, D. L. Wiederhol, D. C. Alexander, P. Ahl-Goy, J. P. Metraux and J. Ryals (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. Plant Cell 3:1085-1094

Bohlmann, H., Clausen, S., Behnke, S., and Apel, K. *et al.*, (1988). Leaf-specific thionins of barley-a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involed in the defence mechanism of plants

Lambert, J., Keppi, E., Wicker, C., and Hoffmann, D. *et al.*, (1989). Insect immunity :Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranovae* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 262-266

Hans G. Boman. (1991). Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. Cell. 65: 205-207

Sheng, Y.H., Huang, H.C. and Collmer. A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. syringae $Harpin_{pss}$ : A protein that is secteted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. Cell. 73: 1255-1266

Walton, J.D. (1994). Deconstructing the cell wall. Plant Physiol. 104: 1113-1118

Ryals, J., Uknes, S. and Ward, E. (1994). Systemic acquired resistance. Plant

Physiol. 104: 1109-1112

Rosario, V. E., B. J. Barkla, V. J. Higgins and E. L. Blumwald (1994) Plant defense response to fungal pathogens. Plant Physiol. 104:209-215.

Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. and Lappi, D.A. (1992). Ribosome-inactivating proteins from plants : present status and future prospects. Bio/Tech. 10: 405-405-412

Nelson, D.E., Raghothama, K.G., Singh, N.K., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1992). Analysis of structure and transcriptional activation of an osmotin gene. Plant Mol. Biol. 19: 577-588.

Broekaert, W.F., Marien, W., Vanderleyden, J., and Cammue, B.P.A. (1992). Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. Biochem. 31: 4308-4314

Mehdy, M. C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. Plant Physiol. 105:467-472.

Nakayama, K., Omata, K., Okahashi, I., Nakamura, Y., Kolkenbrock, H. and Ulbrich, N. (1990). Amino acid sequence and disufied bridges of an antifungal protein isolated from Aspergillus giganteus. Eur. J. Biochem. 193: 31-38

Lehrer, R., Ganz, T. and Selsted, M. (1991). Defensins: Endogenous antibiotic peptides of animal cells. Cell 64: 229-230

Lim, Y-S, Cha, M-K, Kim, Yun C-H, Kim, K and Kim, I-H (1994) Purification and characterization of thiol-specific antioxidant protein from human red blood cell: a new type of antioxidant protein. Biochem. Biophys. Res. Commun. 199: 199-206

Hille, J., Roelvink, A., Fransson, H., van Kammen, A., and Zabel, P. (1986). Bleomycin resistance: a new dominant selectable marker for plant cell

transformation. Plant Mol. Biol. 7: 171

Cha, M-K, Kim, H-K and Kim, I-H. (1995) Thioredoxin-linked thiol peroxidase from periplasmic space of *E. coli*. (1995) J. Biol. Chem. 270: 28635-28641

Chae, H. Z., T. B. Uhm and S. G. Rhee (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. J. Biol. Chem. 269:27670-27678.

Bauer, D., Muller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P., Strauss, M., Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). Nucleic Acids Res. 21, 4272-4280 (1993).

Bowles, D.J.(1990) Defense related proteins in higher plants. Annu. Rev. Biochem., 59, 873-907

Bradley, D. J., P. Kjellbom, and C. J. Lamb (1992) Elicitor and wound induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall structural protein: A novel, rapid plant defense response. Cell 70:21-30

# 제 4 장 한국고유 곤충유래 항균펩타이드의 탐색 및 개발

(위탁과제2; 생명공학연구소 박호용)

# 제 1 절 서설

항생활성펩타이드는 동물과 식물의 innate immunity에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있으며 현재까지 알려진 것들 중의 약 50%가 invertebrate에서 보고되었다. 곤충은 지구상에서 가장 번성한 생물종으로서 다양한 생육환경에 대한 적응 능력이 뛰어날 뿐 아니라 효과적인 자기 방어수단을 보유하고 있다. 이러한 이유로 곤충은 새로운 종류의 항생활성펩타이드를 탐색하는데 있어서 중요한 자원으로 인식되고 있다. Boman group에 의해 *Hyalophora cecropia*로부터 cecropin이 최초로 보고된 이래로 약 170여종의 항생활성펩타이드가 곤충으로부터 분리되었다. 이들은 대개의 경우에 있어서 분자량 5kDa 이하의 저분자 물질로서 생리적인 pH에서 positive net charge를 가지며 양친매성 $\alpha$-helices 구조나 hairpin 과 유사한 $\beta$-sheet구조 또는 여러 가지 이차구조의 혼합체로 구성된다. 이들의 이러한 구조적 특성을 이용하여 항생활성펩타이드를 대략적으로 1) cystein 잔기가 결여되어 있으며 $\alpha$-helix를 형성하는 linear peptide, 2) cystein 잔기를 가지는 cyclic peptide, 3) proline이나 glycine이 풍부하게 존재하는 펩타이드로 구분할 수 있다. Cecropin은 대표적인 $\alpha$-helical linear peptide로서 Lepidoptera와 Diptera에서 주로 보고되었으며 약 4kDa의 분자량과 분자내에 두 개의 $\alpha$-helix가 hinge에 의해 연결된 구조를 가진다. Cecropin은 통상적으로 C-말단이 amidation 되어 있으며 Gram positive와 Gram negative bacteria에 강한 활성을 나타낸다. 두 번째 group에 속하는 펩타이드로서는 분자량이 2-6kDa 정도이며 분자내에 1-4개의 disulfide bond를 형성하는 형태를 보이며 곤충류에서 가장 광범위하게 분포하고 있는 defensin이 그 대표적인 예로서, Gram positive bacteria에 대해 높은 항생활성을 나타낸다. 이들 group에 속하는 다른 특이적인 항생활성펩타이드로서 *Drosophilla*에서 분리된 dorsomycin과 *Podisus maculiventris*에서 분리된 thanatin이 있다. Drosomycin은 5kDa의 peptide로서 분자내에 여덟개의 cysteine분자에 의해 4개의 disulfide 결합을 하고 있으며 특이적으로 식물에서 분리된 defensin과 매우 높은 상동성을 보유하고 있다. Thanatin은 21개의 아미노산 잔기로 구성되는 매우 작은 항생펩타이드로서 bacteria 및 fungi에 대해 매우 높은 항생활성을 나타내었다. 세 번째 group에 속하는 펩타이드로 proline rich peptide와 Glycin rich peptide 등이 있으며 이들은 분자량이 8-24kDa의 다양한 크기를 가지고 있으며 주로 gram negative bacteria에 대해 높은 활성을 나타내며 일부는 Gram positive bacteria와 fungi에 대해서도 활성을 나타내는 경우가 있다. 이 범주에 속하는 펩타이드로서는 apidaecin, abaecin, attacin, sarcotoxin등이 포함된다.

이처럼 현재까지 그 특성이 알려진 곤충유래 항생활성펩타이드들은 다음과 같은 관점에서 활용가능성이 예상된다. 1) 곤충유래 항생활성펩타이드들은 대개 비교적 작

은 펩타이드류로 구조가 간단한 편이고 활성부위를 포함한 구조분석이 용이하다. 2) 이들 물질의 활성부위 부분을 변형함으로서 항생활성 영역을 포함하는 항생능력을 조절할 수 있으며 특히, 기존의 항생제에 대해 강한 내성을 보이는 병원성 미생물에 대해 항생활성을 나타내는 방향으로 개발함으로서 그 가치를 더욱 높일 수 있다. 3) 곤충유래 항생활성물질들은 생체에서 유래된 것이어서 생체내에서 안정할 뿐만 아니라 부작용이 적은 항생제의 개발에 응용할 수 있을 것이다. 4) 이처럼 간단한 구조를 가지면 짧은 시간에 증폭되는 특성을 갖는 곤충유래 항생펩타이드를 coding하는 유전자의 promotor를 포함한 발현 조절인자를 이용하여 in vitro에 유용물질을 대량생산하는 시스템 구성에 응용할 수 있으며, 5) 따라서 현재 곤충으로부터 탐색, 개발되고 있는 순환계 질환 치료제나 면역강화제 등 여러 생체 활성물질과 함께 곤충생체방어기구를 이용한 항생물질 개발의 잠재력은 곤충의 생물다양성 만큼이나 거의 무한히 클 것으로 기대된다.

이러한 관점에서 다양한 곤충자원을 이용한 유용물질 생산, 즉 신기능 생물소재나 생체활성물질을 개발하기 위한 움직임이 현재 선진국에서 매우 활발히 이루어지고 있으며, 특히 일본의 경우 "곤충기능 이용기술개발연구"를 1993년도부터 국가생명공학 관련연구 중 최우선 과제의 하나로 산학연 협동체제로 중점 수행하고 있다.

본 연구에서는 여러 가지 곤충으로부터 새로운 종류의 항생활성 펩타이드를 분리하기 위한 탐색을 실시하였으며, 그 중 말매미로부터 새로운 항생활성펩타이드를 분리하였고, 기존에 분리된 흰불나방 유래의 lysozyme의 유전자 분석과 발현특성을 조사하였다.

# 제 2절 연구 수행 방법

## 1. 곤충자원

실험에 사용한 곤충자원은 본 연구소에서 인공사육에 성공하여 누대 사육하고 있는 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)의 유충과 제주도 성산 일대에서 채집한 말매미(*Cryptotympana dubia*)성충, 그리고 강원대 박규택 교수로부터 분양받은 잣나무넓적잎벌(*Acantholyda parki*) 유충을 재료로 사용하였다. 흰점박이꽃무지 및 말매미는 개체자체가 큰 이유로 재료수집이 쉬운 장점이 있다. 말매미는 한국전역에 분포하지만, 특히 제주 일대에 밀집해 분포하는 것으로 알려져 있다. 말매미의 유충은 재료 수집이 곤란하며, 다른 곤충의 항생펩타이드 연구 결과 성충과 유충간의 항균펩타이드의 분포차이가 크지 않다는 점을 고려해서 성충을 연구재료로 선택하였다.

## 2. 잣나무넓적잎벌 유충, 흰점박이꽃무지 유충 및 말매미 성충의 immunization과 조추출액의 조제

잣나무넓적잎벌 종령유충 (약 400마리)에 *E. coli* K-12 594($str^r$)균주 $10^8$ cell/ml 5㎕를 주입하였다. 이를 27℃에서 16시간 사육한 후 protease 저해제인 aprotinin을 포함한 0.1% TFA를 가하여 분쇄하였다. 이를 35,000 × g에서 30분간 초원심분리하여 그 상등액을 0.2㎛ filter를 여과하여 항생활성의 검정 및 활성물질의 분리, 정제를 위한 재료로 이용하였다.

## 3. 공시균주

공시균주는 그람양성, 그람음성세균 및 곰팡이등 11종으로 생명공학연구소 유전자은행(Korean Collection for Type Culture : KCTC)에서 분양 받아 계대 배양후 사용하였으며(표 3-1), *E. coli* K-12 594($str^r$)균주는 동경대 약학부의 Natori 교수로부터 분양받아 사용하였다.

| | Stain | KCTC No | |
|---|---|---|---|
| Gram-positive | *Bacillus subtilis* | 3068 | |
| | *Staphylococcus aureus* | 1928 | $Rec^{+}$ |
| | *Micrococcus luteus* | 3063 | $Sm^{r}$, $Pen^{r}$, $Km^{r}$ |
| | *Mycobacterium smegamtis* | 2002 | $Cm^{r}$, $Tc^{r}$ $Su^{r}$ |
| | *Enterococcus lactis* | 2012 | |
| Gram-negative | *Escherichia coli K12-594* | 2208 | $Se^{r}$ |
| | *Klebsiella pneumonae* | 1925 | $Phe^{r}$ $Tyr^{r}$ |
| | *Salmonella typhimuri* | | |
| Fungi | *Candida albicans* | 7965 | $Phe^{r}$ $Tyr^{r}$ |
| | *Candida tropicals* | 7221 | |

**표 3-1. List of microorganism strain**

## 4. 사용배지

Bacto-trypton (DIFCO Laboratories. USA)
Yeast extract (DIFCO Laboratories. USA)
Bacto-pepton (DIFCO Laboratories. USA)
Potato dextrose broth premix (DIFCO Laboratories. USA)
Bactoagar (DIFCO Laboratories. USA)
Antibiotic medium 3 (DIFCO Laboratories. USA)

## 5. 항생활성의 검정

그람 양성균, 그람 음성균 및 곰팡이를 포함한 11종의 균주를 LB agar 배지(1% bactopepton, 0.5% yeast extract, 1% sodium chloride, 1.2% agar)에서, 곰팡이는 potato dextrose agar 배지(30% dice potatos, 2% Glucose, 1.2% agar)에 계대 배양한 후 single colony를 취하여 24시간 37℃(곰팡이 30℃)에서 액체배양을 하였다. 배양액 일부를 다시 3~6시간 액체 배양하여 mid-logarithmic 상태($OD_{650}$ 0.3)유지하

여 본 실험에 사용하였다. 최저 생육저해농도 측정은 broth microdilution 법(Leem et al., 1998)에 준하여 행하였다. Microtiter plate에 100㎕의 균주 희석액과 ($10^5$CFU/1㎖ media) 1% bacto-peptone으로 희석한(최종농도 100㎍/㎖ ~ 0.37㎍/㎖) 크립토닌 100㎕를 첨가하여 10시간 37℃(곰팡이 30℃)에서 배양하였다. Positive control과 negative control로서는 동일 volume의 magainin이나 peptide 희석용액을 처리 하였다. MIC 값은 배양 후 650nm에서 흡광도가 초기의 값과 비교하였을 때 변화가 없는 가장 낮은 농도의 값으로 정하였다.

## 6. Hemolysis 활성측정

항생펩타이드의 용혈작용(hemolysis)은 Bessalle의 방법에 준하여 실시하였다. Microtube에 희석된 적혈구 세포 190㎕, PBS로 희석한 (최종농도 200㎍/㎖~0.37㎍/㎖) 크립토닌 10㎕ 또는 동량의 melitin이나 maganin을 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료 후 위 반응물을 4000×g에서 5분간 원심분리하고 그 상등액 100㎕취하고 PBS를 첨가하여 최종부피가 1㎖되도록 희석한 다음 576nm에서 흡광도를 측정하였다. Hemolysis 활성의 측정은 576nm에서의 0.1% Triton X-100으로 처리한 적혈구 세포의 흡광도 값을 100%로 정하여 산출하였다.

## 7. Circular dichroism spectroscopy

50mM sodium phosphate buffer (NAPB, pH7.4)와 40%(V/V) TFE (trifluoro ethanol)/50mM NAPB에 각각 최종 농도가 50uM로 크립토닌을 첨가하였다. CD-Ord Cell에 위 시료 400㎕ 넣은 다음 circular dichroism(CD) spectroscopy이용하여 190nm - 240nm 파장에서 helicity을 측정하였다. % helicity의 산출은 Chen과 Yang의 방법을 이용하였다.

$[\theta]_{222}$ : 222nm에서의 각 잔기 당 ellipticity의 평균값

$[\theta]^{0}_{222}$ : random coil 일때의 값 (-1000 deg · $cm^2dmol^{-1}$)

$[\theta]^{100}_{222}$: 100% helicity일때의 값 (-36500 deg · $cm^2dmol^{-1}$)

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

## 8. 기기분석

정제된 항생활성 펩타이드의 아미노산 서열분석은 기초과학지원연구소의 펩타이드 서열 결정기(Procise Protein sequencing system, Aplied Biosystems)를 이용하여

분석하였다. 이상에서 얻어진 아미노산 서열을 바탕으로 상기 항생활성물질을 화학적으로 대량합성하였다(Peptron). 또, 천연 및 합성 항생활성물질의 분자량을 MALDI 질량분석기(Voyager DE STR Biospectrometry Workstation, PerSeptive Biosystems)로서 측정하였다.

## 9. 항생펩타이드의 분리 및 정제

항생활성펩타디드의 분리 정제는 C18 column chromatography 및 C18 HPLC등을 이용하여 수행하였다.

## 10. 흰불나방 lysozyme 유전자의 cloning 및 염기서열 결정

분리된 흰불나방 lysozyme의 N-말단 아미노산 서열을 기초로 하여 degenerate probe를 제작한 다음 이를 이용하여 cDNA library를 screening 하였다. 약 12만개의 plaque를 탐색한 결과 4개의 positive clone을 획득하였으며 이를 sequenase ver. 2.0을 이용하여 염기서열을 결정하였다.

## 11. Northern blot analysis

흰불나방 유충을 액체질소에 냉동시킨 후 막자사발에서 분쇄하여 4 M gyanidium isocyanste homogenization 완충액(4 M guanidium isocynate, 25mM EDTA, 50 mM Tris-HCL, pH 7.5 23ml plus 2 ml $\beta$-mercaptoethanol)에 녹여서 homogenizer로서 cell을 파괴하였다. 이를 최종농도 0.5% SDS를 첨가하여 상온에서 10분간 4,000 X g로서 원심분리하고 그 상등액을 5.7 M CsCl에 loading 하여 24,000rpm, 24시간동안 초고속원심분리를 실시하여 total RNA를 획득하였다. 대장균에 의해 immunize 된 유충의 각 단계에서 획득한 total RNA 20$\mu$g을 formaldehyde가 첨가된 1% agarose gel에서 전기영동하고 이를 Nylon membrane로 capillary transfer하였다. 흰불나방의 lysozyme 유전자의 cDNA를 probe로 이용하여 68℃에서 밤샘반응으로서 hybridization 하여 autoradiography하였다.

# 제 3절 연구결과

## 1. 말매미 성충으로부터 항생활성펩타이드의 분리 및 특성조사

### 가. 항생활성펩타이드의 분리

면역유도된 말매미 유충의 최종 원심분리 상등액을 이용하여 reversed phase chromatography를 수행하였다. 시료를 0.05% TFA로 평형화된 C18 fresh column(YMC GEL ODS AM)에서 0.05% TFA acetonitrile을 stepwise(10%, 50%, 100%)로 용출하였으며 이때의 유속은 3ml/min이었다. 이 중 50% 용출물에서 항생활성이 검출되었으며(그림 3-1), 이 활성분획에 대한 Ninhydrin 반응결과 양성반응을 보임으로서 항생활성펩타이드의 존재 가능성이 매우 높아 이 분획으로서 계속적인 정제를 실시하였다.

다음 정제단계로 이온교환수지 칼럼을 검토해보았으나 분리도가 낮아 reverse phase HPLC를 검토하였고, HP-SB-C18-HPLC를 통해서 활성분획 #79를 얻었다. 그 분석조건은 다음과 같다. ; 0min → 15min(0% $CH_3CN$) → 20min(15% $CH_3CN$) → 100min 45% $CH_3CN$). 화살표로 표시한 부분이 활성분획에 해당된다 (그림 3-2). 그 다음단계로 YMC-ODS-HPLC를 이용하여 다음조건으로 [0min → 10min (0% $CH_3CN$) → 15min(20% $CH_3CN$) → 95min(35%$CH_3CN$) ] 분석하여 활성분획 #10을 얻었다 (Fig. 3). 다음 단계로 역시 YMC-ODS-HPLC를 검토하여 단일 peak로 추정되는 #5를 얻었다 (그림 3-4).

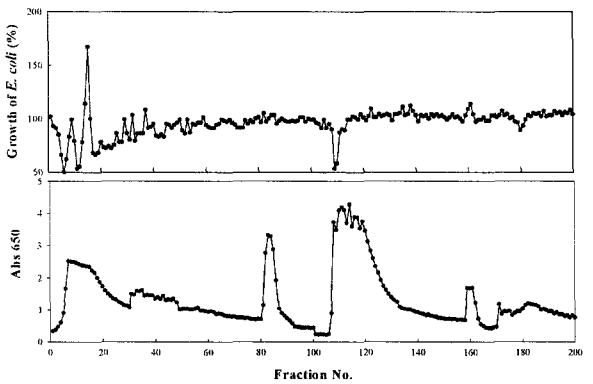



**그림 3-1. Reversed phase chromatography and antimicrobial activity profile of whole body extract from injured *Cryptotympana dubia* adult.**

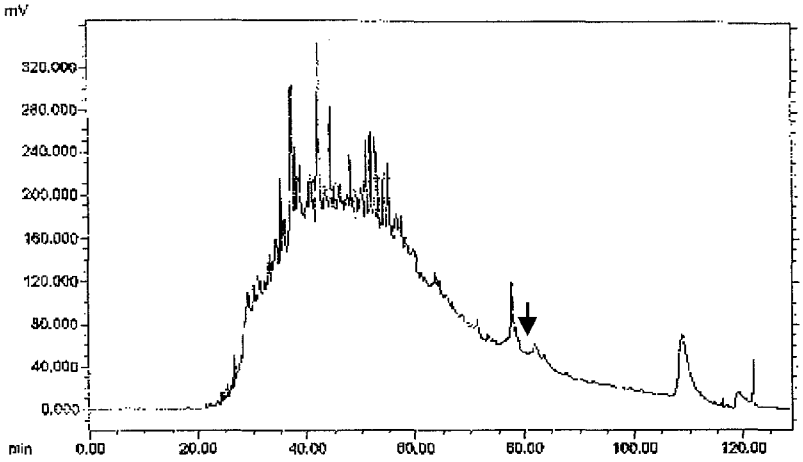



그림 3-2. C18 HPLC profile of active fraction from C18 clumn chromatography of whole body extract from injured *Cryptotympana dubia* adult.

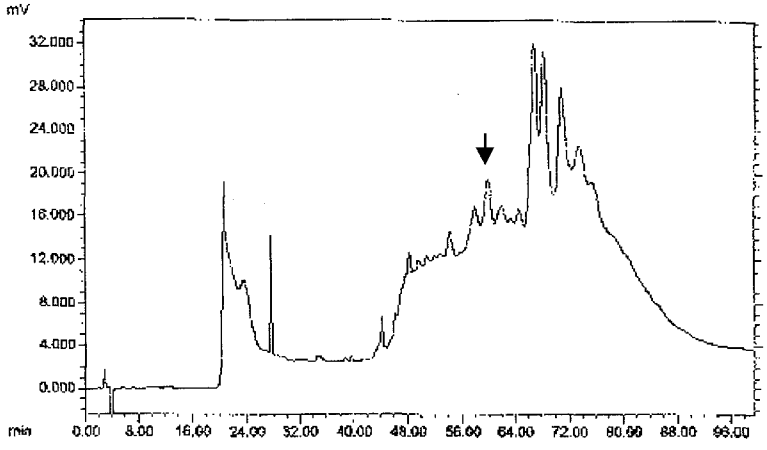



그림 3-3. C18 HPLC profile of active fraction from C18 HPLC of #79.

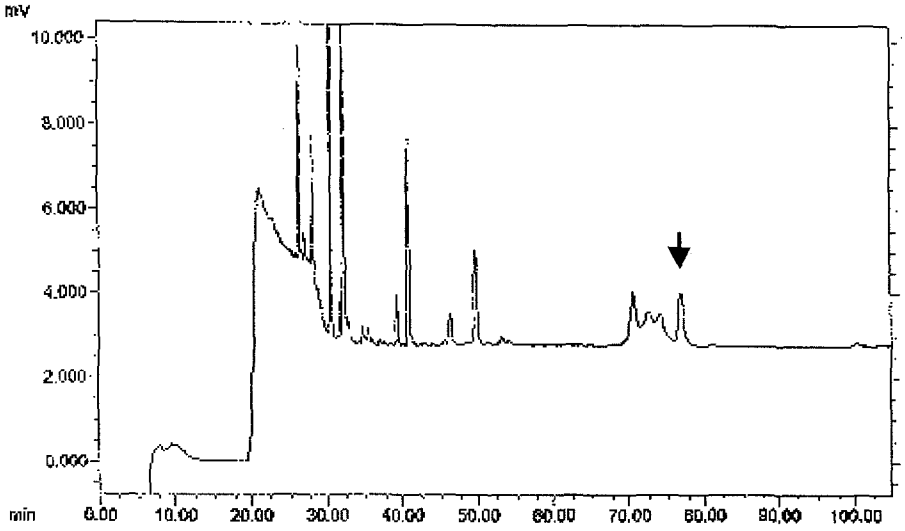



그림 3-4. C18 HPLC profile of active fraction from C18 HPLC of #10

## 나. 아미노산 서열 분석 및 화학적 합성

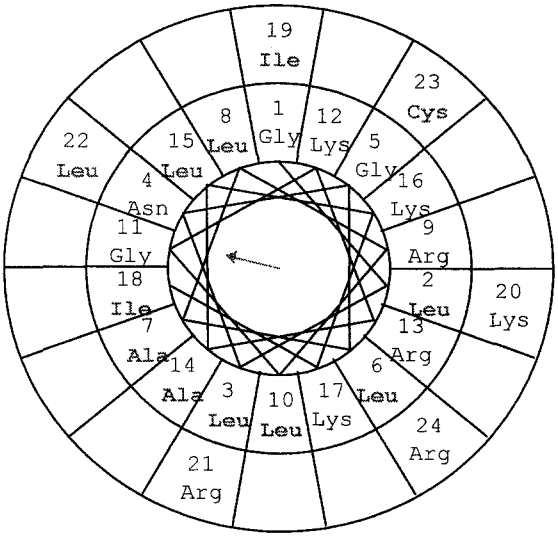
정제된 펩타이드의 아미노산 서열분석 결과 #5 분획은 24개의 아미노산으로 구성되었으며, GenBank data base 탐색 결과 유사한 서열이 발견되지 않았으므로, 이 펩타이드를 새로운 종류의 항생활성 펩타이드 "Cryptonin"이라 명명하였다 (그림 3-5). Cryptonin의 아미노산 서열을 $\alpha$-helical wheel diagram 분석한 결과 소수성 아미노산 잔기들과 cationic 아미노산 잔기들이 $\alpha$-helix상에서 서로 대칭적인 위치에 존재하는 전형적인 catinoic 항생활성 펩타이드의 특성인 양친매성 $\alpha$-helix의 양상을 나타내었다 (그림 3-6).

현재까지 알려진 몇가지 항생활성 펩타이드와 Cryptonin을 alignement 시켜본 결과 개구리의 표피에서 분리된 Maganin 1과 2, Bombinin 등과 일부 서열에서 잘 보존된 아미노산서열들이 Cryptonin에서도 나타나고 있음을 보아 Cryptonin의 작용 양식 또한 이들 펩타이드의 작용 양식과 매우 유사할 것으로 추정되었다. 이러한 아미노산의 상동성은 Cryptonin이 곤충에서 분리된 최초의 maganin 계열의 항생활성 펩타이드로서 그 의미가 매우 크다. 또한 Cryptonin에서는 특징적인 다른 maganin 계열 항생활성 펩타이드에는 존재하지 않는 하나의 cys 잔기가 23번 위치에 존재하였으나 이 잔기와 항생활성과의 연관관계에 대해서는 아미노산의 치환이나 결실에 의한 활성의 검정 등의 연구가 필요하다.

말매미로부터 분리되는 Cryptonin은 분리과정이 매우 어려울 뿐 아니라 최종적으로 얻을 수 있는 정제된 펩타이드의 양이 매우 한정되어 있음으로서 이를 화학적으로 합성하고자 하였다. 펩타이드의 합성은 (주)펩트론에 의뢰하였으며 고상합성법 (solide phase method)에 준하여 수행하였다. 화학적으로 합성된 Cryptonin과 분리된 펩타이드의 분자량은 MALDI Mass로서 측정한 결과 각각 약 2740 Da 및 2703 Da로 나타나는 것으로 보아 자연상의 Cryptonin은 아미노산 서열에 특이적인 수식은 가지고 있지 않은 것으로 추정된다 (그림 3-7). 화학적으로 합성된 펩타이드의 활성과 자연상의 정제된 펩타이드의 활성을 조사함으로서 그 항생활성을 측정하였다.

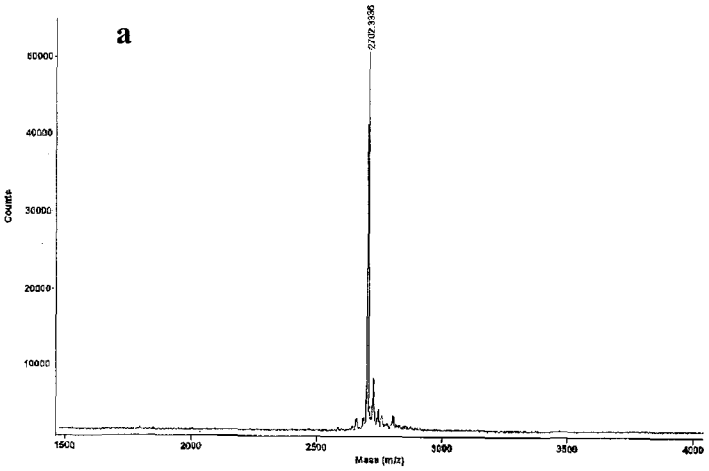
| | |
|---|---|
| **Magainin 1** | **G**I**G**KF**L**HSA-**GK**FG-**K**AFVGE**I**MKS |
| **Magainin 2** | **G**L**G**KF**L**HSA-K**K**FG-**K**AFVGE**I**MNS |
| **Bombinin 2** | **G**I**G**-A**L**-SA--**K**G**AL**K**G**L**A**K**G**L**AQHFAN* |
| **Bombinin-realted peptide 1** | **G**I**G**GA**L**LSA-**GK**S**AL**K**G**L**A**K**G**L**E-HFAN* |
| **Bombinin-like peptide 1** | **G**I**G**ASILSA-**GK**S**AL**K**G**L**A**K**G**L**E-HFAN* |
| **Cryptonin** | **G**L**L**NG**L**ALRL**GK**R**AL**K**K**I**I**K**R**L**CR |

그림 3-5. Sequence alignment with several cationic antimicrobial peptide.




| |
|---|
| Hydrophobic residues |
| Hydrophilic residues |
| Mean hydrophobicity: 0.14 |
| Hydrophobic moment : 1.04 |

그림 3-6. The $\alpha$-helical wheel diagram of cryptonin (Hydrophilic amino acids that may constitute amphipathic helix are represented as a bold letter and the hydrophobic amino acid residue are indicated underlined.



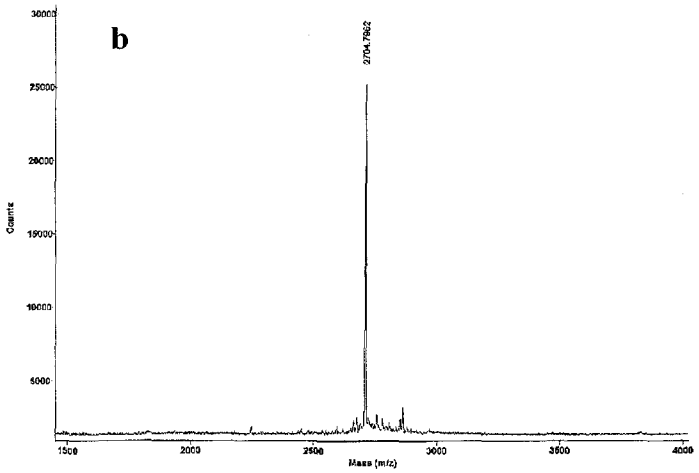




그림 3-7. MALDI Mass analysis of natural and synthetic Cryptonin. a; natural Cryptonin, b; synthetic Cryptonin.

### 다. Cryptonin의 항생활성

Cryptonin의 MIC 값의 측정은 몇종의 그람양성 및 그람음성균을 대상으로 실시하였으며 개구리의 피부에서 분리되었으며 23개의 아미노산 잔기의 항생활성 펩타이드로서 Cryptonin과 유사한 분자량을 가지는 Magainin II의 화학적 합성품과 또 이의 항생활성을 증가시킨 analogue인(Ala,$^{8,13,18}$)-Magainin II amide(Sigma)를 비교대상으로 하였다. 그 결과, 자연상 및 합성 Cryptonin의 활성은 조사된 균주 모두에서 거의 유사한 활성을 나타내었다. 또한 Cryptonin의 항생활성은 Magainin II 보다 우수한 항생활성을 가지는 것으로 판명되었으며 이의 analogue인 (Ala,$^{8,13,18}$)-Magainin II amide와 유사한 정도의 MIC 값을 가지는 것으로 나타났다 (표 3-2). 반면 식물병원성 세균에 대해서는 농업 살균제의 원제로 사용되는 tetra cycline과 streptomycin 과 비교하였을 때 저해력이 낮았다 (표 3-3). 그러나 Cryptonin이 동식물에 대한 독성이 매우 낮다는 점과 유전공학적 기법을 이용한 transgenic plant의 제조가능성등을 보여주었다. 개발을 위한 연구가 진행중에 있으며, Cryptonin의 다른 균주에 대한 항생활성 및 항진균활성, 항암활성에 대한 연구등을 계획하고 있다.

### 라. Cricular dichroism 분석

양친매성 $\alpha$-helix를 형성하는 항생활성펩타이드의 특성은 소수성 환경하에서 helix의 percentage가 증가하는 것으로서 이는 이런 종류의 펩타이드들이 지질이중층 내에서 helix를 형성함으로서 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. Cryptonin 의 $\alpha$-helix 형성여부를 조사하기 위하여 친수성 환경 (phosphate buffer)과 소수성 환경 (40% TFE)하에서의 %-helicity를 CD로서 측정하였을 때 Cryptonin은 소수성 환경하에서 helix %가 증가하는 것으로 나타났으며 (그림 3-8), 그 값은 표 3-4에 제시하였다.

### 마. Hemolytic activity 측정

Cryptonin의 독성여부를 hemolytic 활성으로서 조사하였을 때 벌독의 주성분인 melitin이 100㎍/mℓ에서 100%의 용혈작용을 나타낸 반면 동일농도에서 Cryptonin은 17.3% Magainin은 20.7%가 나타남으로서 낮은 독성을 나타낼 것으로 추정되어지며 이 펩타이드가 낮은 독성을 지니는 broad spectrum의 항생물질로서 개발될 수 있는 가능성을 제시하였다 (그림 3-9).

| Microorganism | Minimum inhibition concentration(MIC μg/μℓ | | |
|---|---|---|---|
| | Cryptonin | MagaininII | $Ala^{8,13,18}$ magainin II-amic |
| *Bacillus subtilis* | 3.12 | 25 | 3.12 |
| *Micrococus luteus* | 2.5 | 25 | 3.12 |
| *E. coli. K12-594* | 3.12 | 50 | 3.12 |
| *Candida Albicans* | 50 | ND[1)] | 100 |
| *Candida tropicals* | 3.12 | ND | 1.52 |

1) not determined

**표 3-2. Antimicrobial activity of cryptonin compared with magainin II and $Ala^{8,13,18}$ magainin II-amide**

| | MIC μg/mℓ | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Cryptonin | Cryptonin analogue | Tetra-cycline | Streptomyc |
| *Streptomyces scabies* | >100 | >100 | N.D[1)] | N.D |
| *Streptomyces scidicabies* | >100 | >100 | N.D | N.D |
| *Streptomyces turgidiscabies* | 50 | >100 | N.D | N.D |
| *Xanthomonas campestris pv. pruni* | 50 | >100 | 1.56 | 3.12 |
| *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* | >100 | >100 | 0.78 | 3.12 |
| *Xanthomonas acmpesris pv. pelargonii* | >100 | >100 | 1.56 | 3.12 |
| *Erwinia carotovora subsp. carotovora* | 100 | >100 | 0.78 | 0.78 |
| *Ralstonia Solanacearum* | 20 | >100 | 0.78 | 0.78 |
| *Pseudomonas syringae pv. syringae* | 2.5 | >100 | 0.78 | 3.12 |

1) not determined

**표 3-3. Plant pathogenic antimicrobial activity of cryptonin and its analogues compared with tetracyclin and streptomycin**

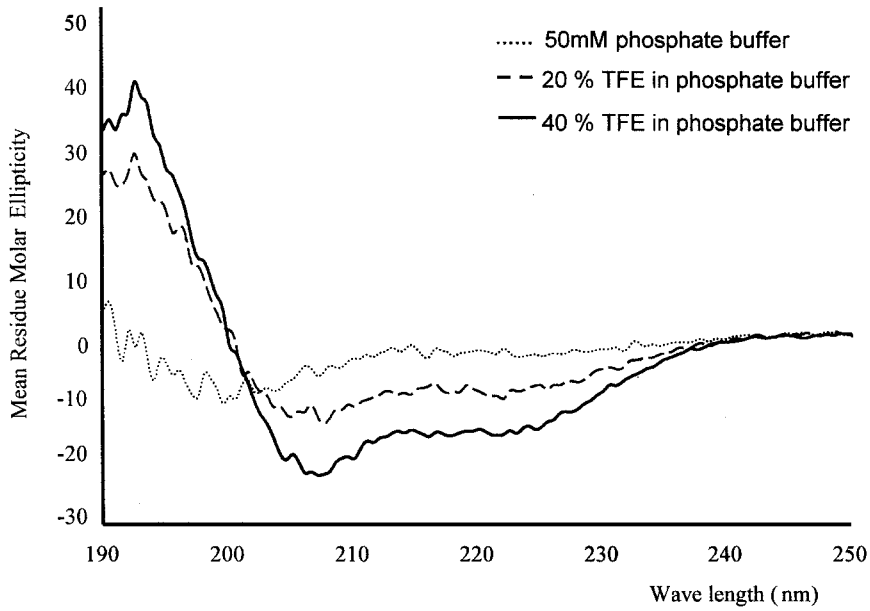



**그림 3-8. Circular dichroism(CD) spectra of cryptonin in the various solution**

| Peptide | Buffer | | 40%TFE | |
|---|---|---|---|---|
| | $[\theta]_{222}$ | $\alpha$-helix(%) | $[\theta]_{222}$ | $\alpha$-helix(%) |
| Cryptonin | -83305 | 6.70 | -399946 | 42.9 |

The $\alpha$-helicity of the peptide were calculated with the equation

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

**표 3-4. Percent $\alpha$-helicity of Cryptonin and its analigues.**

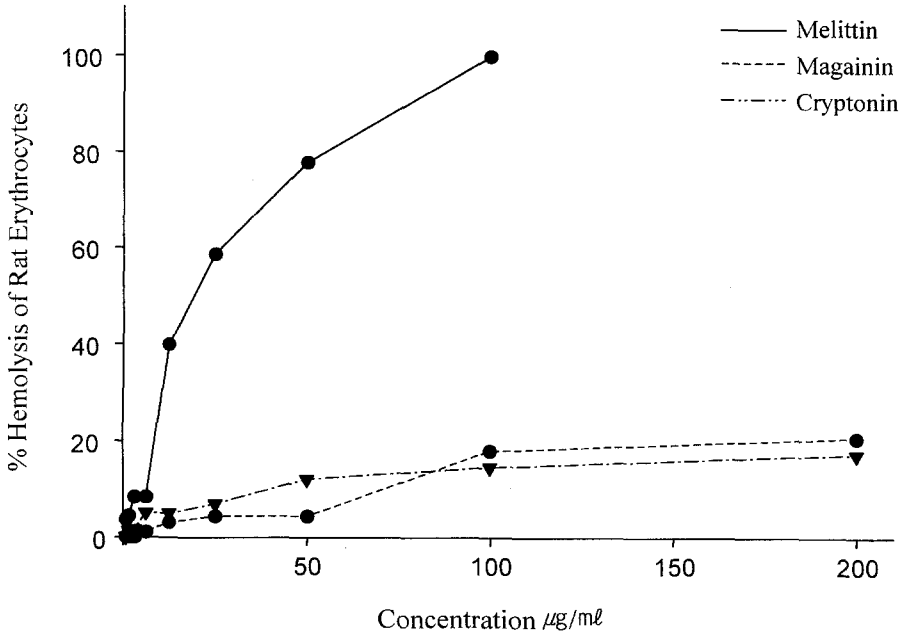



그림 3-9. Hemolysis activity of cryptonin, magainin and melittin

## 2. 잣나무넓적잎벌 유충으로부터 항생활성의 탐색 및 활성분획의 분리 및 정제

면역유도된 잣나무넓적잎벌의 최종 원심분리 상등액을 이용하여 reverse-phase chromatography를 실행하였다. 시료를 0.05% TFA로 평형화된 C18 fresh column (YMC GEL ODS AM, 2.5×20cm)에서 0.05% TFA acetonitrile을 stepwise (10%, 50%, 100%)로 용출하였으며 이때의 유속은 4mℓ/min이었다. 얻어진 각 분획의 항생활성을 조사하여 다수의 항생활성분획을 획득하였으며 이를 용출되는 acetonitril 의 농도에 따라 각각 Ap10A, Ap10B, Ap10C, Ap50A, Ap50B, Ap50C, 그리고 Ap100A로 명명하였다 (그림 3-10). 계속해서 각 활성분획을 정제하기 위하여 HPLC를 이용한 C18(YMC ODS A) reversed-phase chromatography를 실행하였다. 그 분석은 Ap10A, Ap10B, Ap10C에 대해서는 50분간 10-50%의 0.1% TFA acetonitril linear gradient로서 용출하였으며 이때의 유속은 1mℓ/min이었다. Ap10A로부터는 용출시간 34분, 43분, 72분에 검출된 분획에서 강한 항생활성을 확인하였으며 이들을 각각 Ap10AⅠ, Ap10BⅡ, Ap10CⅢ로 명명하였다 (그림 3-11).

Ap10B로부터는 용출시간 59분에 검출된 peak에서 강한 항생활성을 나타내었으며 이를 Ap10BⅠ으로 명명하였다 (그림 3-12). Ap10C로부터는 67분에 용출된 main peak에서 역시 강한 항생활성이 검출되었으며 이를 Ap10CⅠ으로 명명하였다 (그림 3-13). 또한 Ap50A 으로부터는 59분에 용출된 peak에서 강한 항생활성이 검출되었고, 이를 Ap50AⅠ으로 명명하였다 (그림 3-14).

## 3. 흰점박이꽃무지 유충으로부터 항생활성분획의 분리

면역 유도된 흰점박이꽃무지 유충의 최종 원심분리 상등액을 이용하여 reversed phase chromatography를 수행하였다. 시료를 0.05% TFA acetonitrile을 stepwise (10%,50%, 100%)로 용출하였으며 이때의 유속은 3mℓ/min이었다. 각 분획의 항생활성을 조사한 결과 10%, 50%의 용출물에서 항생활성을 검출할 수 있었으며 특히 10% 용출물의 경우 새로운 종류의 항생활성펩타이드를 포함하고 있을 가능성이 매우 높은 것으로 추정되며 이 분획에 대한 대량조제 및 정제를 진행중이다 (그림 3-15).

그림 3-10.

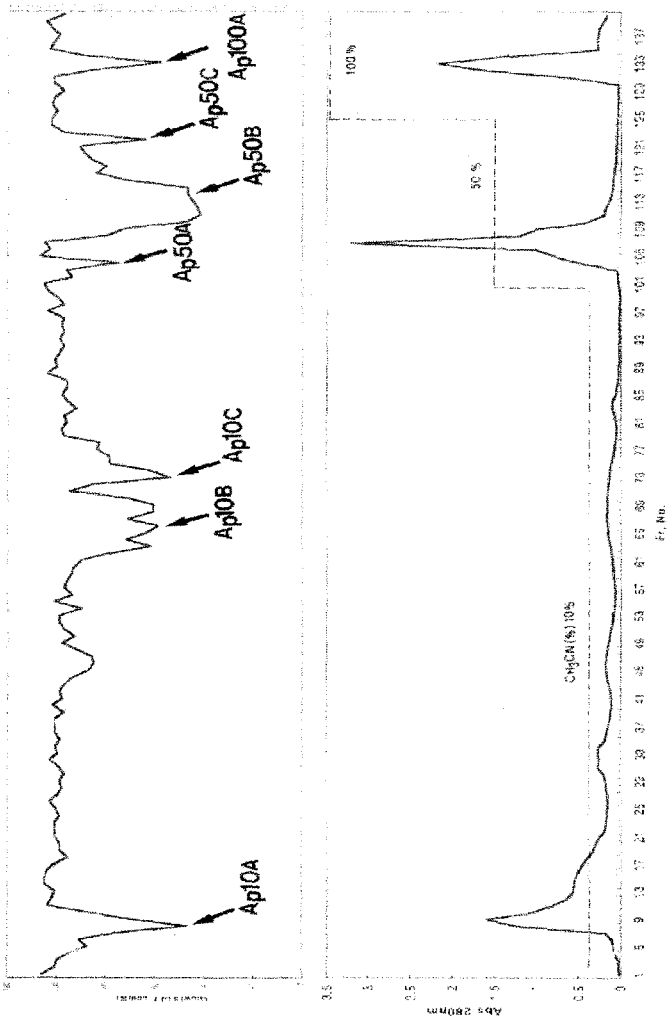



Fig. 10. Antimicrobial activity (upper panel) of C18 fresh column chromatography (lower panel) of whole body extract from injured *A. posticalis* larvae

그림 3-11.

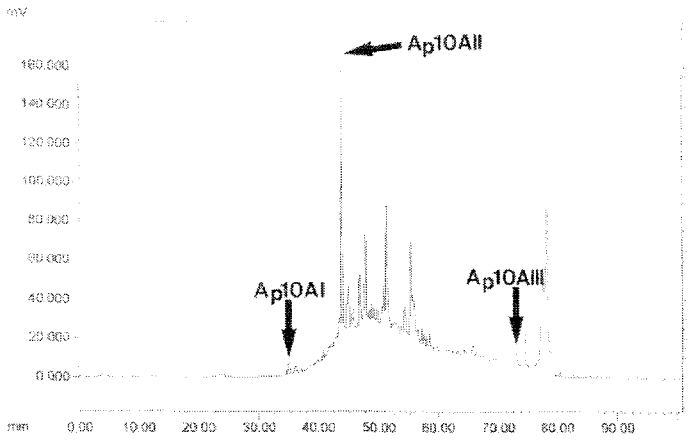



Fig. 11. C18 HPLC profile of active fraction Ap10A from C18 fresh column chromatography (lower panel) of whole body extract from injured *A. posticalis* larvae

그림 3-12.

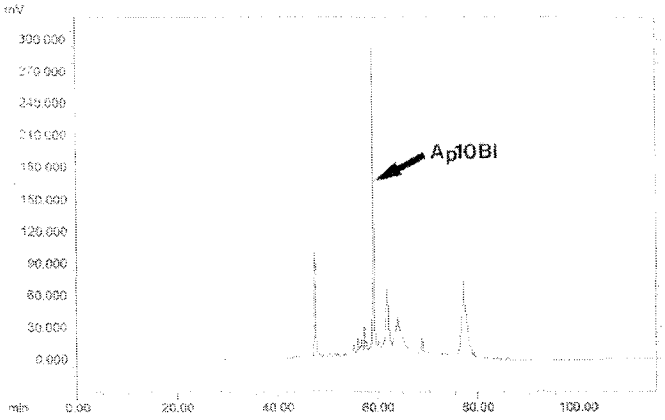



Fig. 12. C18 HPLC profile of active fraction Ap10B from C18 fresh column chromatography (lower panel) of whole body extract from injured *A. posticalis* larvae

그림 3-13.

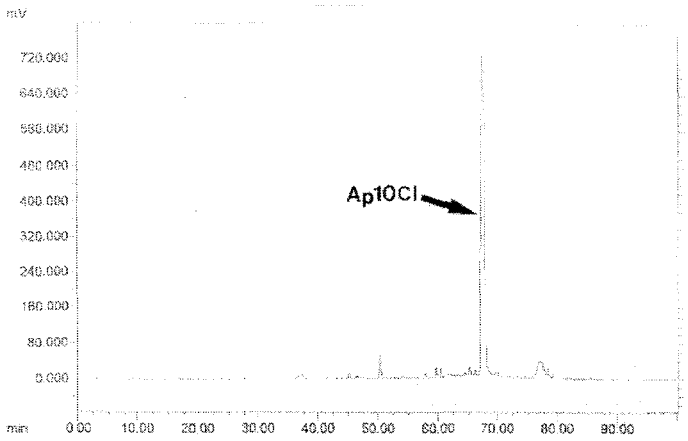



Fig. 13. C18 HPLC profile of active fraction Ap10C from C18 fresh column chromatography (lower panel) of whole body extract from injured *A. posticalis* larvae

그림 3-14.

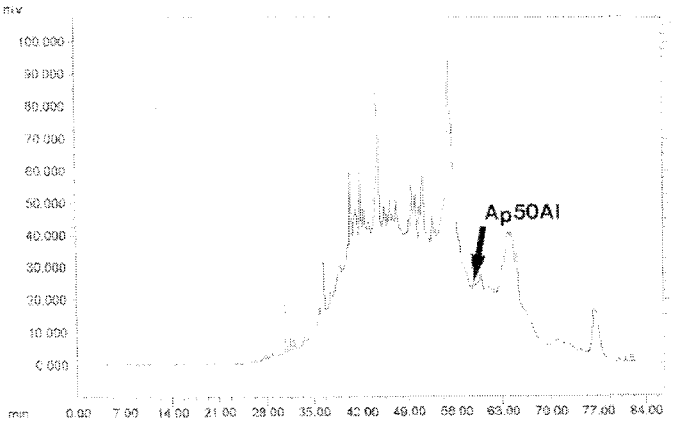



Fig. 14. C18 HPLC profile of active fraction Ap50A from C18 fresh column chromatography (lower panel) of whole body extract from injured*A. posticalis* larvae

그림 3-15.

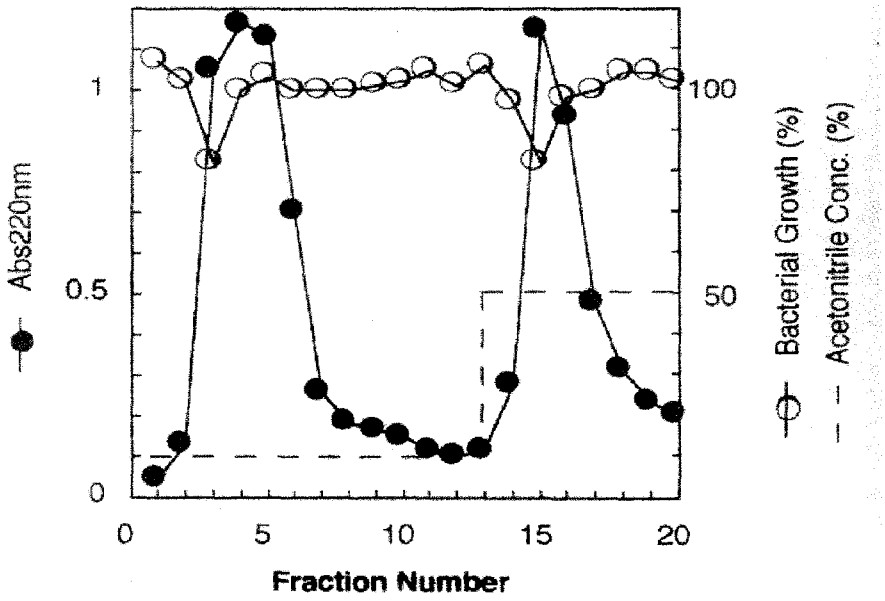



Fig. 15. C18 fresh column chromatography of whole body extract from *E. coli* injected *P. brevitarsis* larvae

## 4. Lysozyme 유전자의 분리 및 특성규명

### 가. 염기서열 및 특성

곤충의 lysozyme은 다른 생물의 lysozyme과 유사한 구조를 가지고 있으나 곤충의 면역반응에 의해 합성이 증가하여 외부 침입자에 대한 방어적 기작을 나타내는 항생활성펩타이드의 일종이다. 흰불나방에서 분리된 lysozyme의 아미노산 서열을 기초로 하여 분리된 lysozyme cDNA의 염기서열을 결정하였다 (그림 3-16). 그 결과 143개의 아미노산으로 구성된 14,079Da의 분자량을 가지고 있었으며 이는 SDS-PAGE에 의해 측정된 단백질의 분자량 14,000Da과 잘 일치함을 보여주었다. N-말단에 20개의 putative signal peptide가 존재하였으며 이는 *B. mori* 나 *M. sexta*에서 분리된 lysozyme에서와 유사하였다. 흰불나방의 lysozyme 유전자는 Lepidopteria목에 속하는 다른 곤충의 경우 31-33%정도의 상동성을 나타내었다 (그림 3-17). 이를 기초로 하여 phylogenic diagram을 작성하면 그림 3-18에서와 같다.

### 나. 미생물의 주입에 의한 lysozyme 유전자의 유도

흰불나방 lysozyme 유전자의 mRNA발현을 곤충 유충에 대장균을 immunization 한 후 시간의 경과에 따라 조사하였다 (그림 3-19). Lysozyme 유전자는 normal condition에서 basal한 발현을 나타내었지만 대장균의 주입시 1시간 후부터 급격하게 발현량이 증가하며 5시간까지 그 발현이 유도되어짐을 보여주었다. 이는 흰불나방에서 면역 관련 유전자들의 발현 양상과 매우 유사한 것으로서 분리된 lysozyme이 곤충의 면역기작에 중요한 역할을 하고 있을 것으로 추정되어지며 그 주요 기능은 침입한 미생물들의 세포벽 성분들의 분해가 될 것이라고 유추할 수 있다.

```
                          M   Q   K   L   A   V   F   L   F   A        10
GTTTCTCTACCTTGTGTAAA ATG CAG AAG TTA GCA GTT TTC CTG TTC GCT        50

 I   A   A   V   C   I   H   C   E   A   K   Y   Y   S   T   R        26
ATA GCA GCG GTT TGC ATT CAT TGT GAA GCG AAA TAT TAT TCG ACG CGA        98
                                        ▲

 C   D   L   V   R   E   L   R   K   Q   G   F   P   E   N   Q        42
TGT GAT CTC GTT CGA GAG TTA AGG AAA CAA GGG TTC CCT GAA AAC CAA       146

 M   G   D   W   V   C   L   V   E   N   E   S   G   R   K   T        58
ATG GGA GAT TGG GTA TGT TTG GTT GAG AAT GAG AGC GGC AGA AAG ACA       194

 D   K   V   G   P   V   N   K   N   G   S   K   D   Y   G   L        74
GAC AAG GTG GGA CCA GTG AAC AAG AAT GGC TCT AAG GAC TAC GGA CTA       242

 F   Q   I   N   D   K   Y   W   C   S   N   T   R   T   P   G        90
TTC CAG ATC AAC GAC AAA TAC TGG TGC AGC AAC ACC AGG ACT CCT GGA       290

 K   D   C   N   V   T   C   A   D   L   L   L   D   D   I   T       106
AAA GAC TGC AAC GTT ACT TGT GCC GAT TTG TTG TTG GAT GAT ATC ACG       338

 K   A   S   T   C   A   K   K   I   F   K   R   H   N   F   R       122
AAA GCC TCA ACT TGT GCT AAG AAG ATC TTC AAG CGT CAT AAC TTC AGG       386

 A   W   Y   G   W   R   N   H   C   D   G   K   T   L   P   D       138
GCG TGG TAC GGA TGG CGT AAC CAC TGC GAT GGC AAA ACT TTG CCT GAT       434

 T   S   N   C   *                                                   143
ACC AGC AAC TGT TAA AACCTCATCACATTGCAAAATCATATATATTTGAACTATCATA       492
```

**그림 3-16. Nucleotide and the deduced amino acid sequnce of *Hyphantria* lysozyme. The termination codon is marked with an asterisk. The solid underline and an arrowhead indocate the predocted signal sequence and the N-terminal of the mature protein, respectively. The synthetic degenerative probe was designed from the amino acid sequence indicated by dotted underline.**

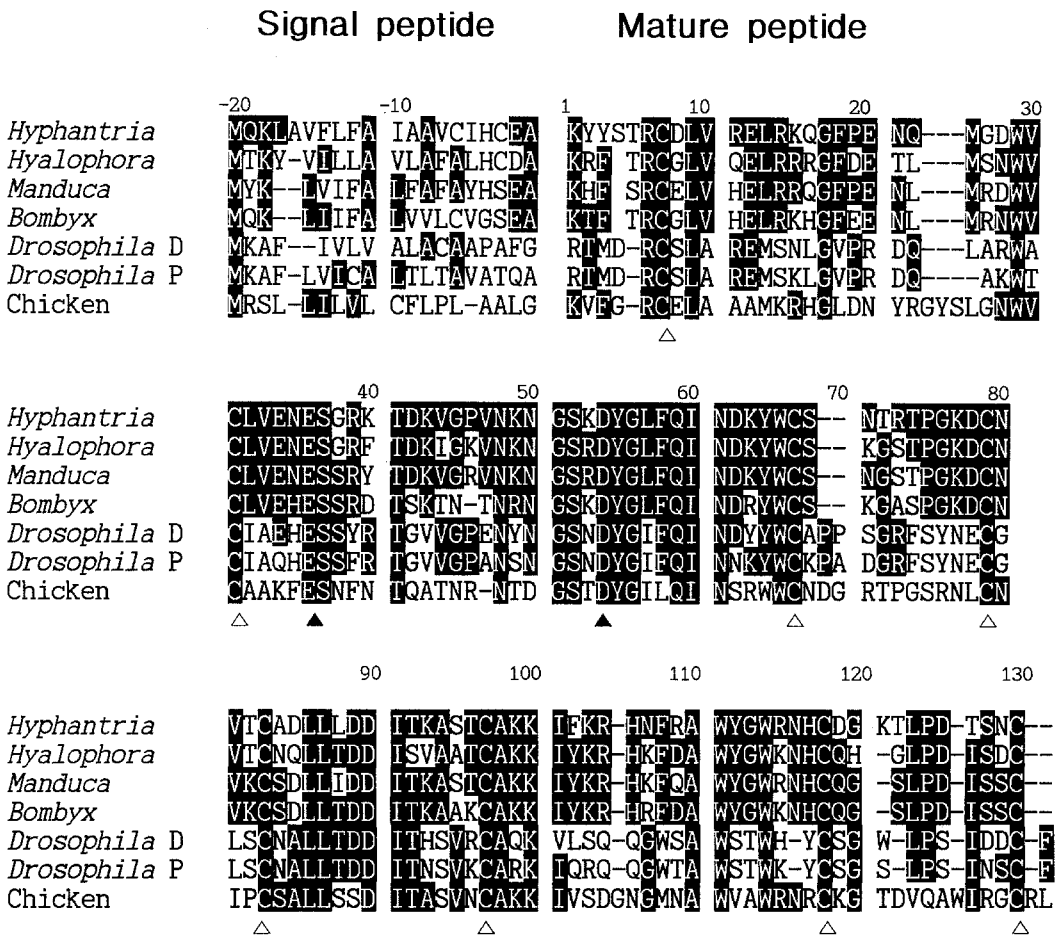



그림 3-17. Amino acid sequence comparison of several lyzosymes from chicken and other insects(A)

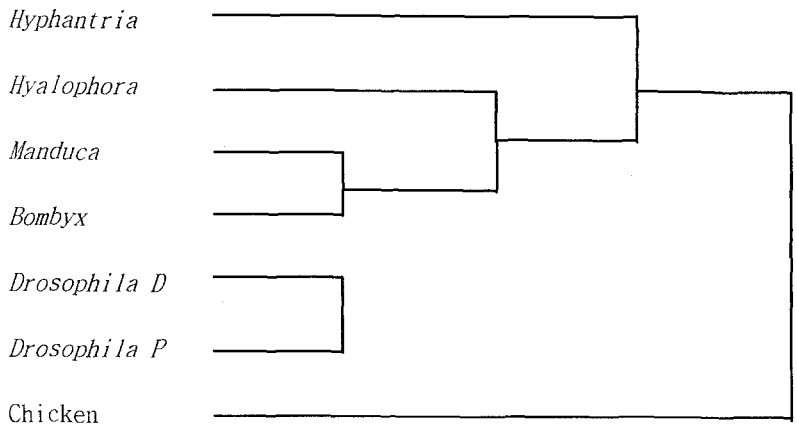



그림 3-18. Phylogenetic tree of the selected lysozyme Numbers on the phylogenetic tree indicate the percentage of similarity index on each branch analyzed by a Clustal program.

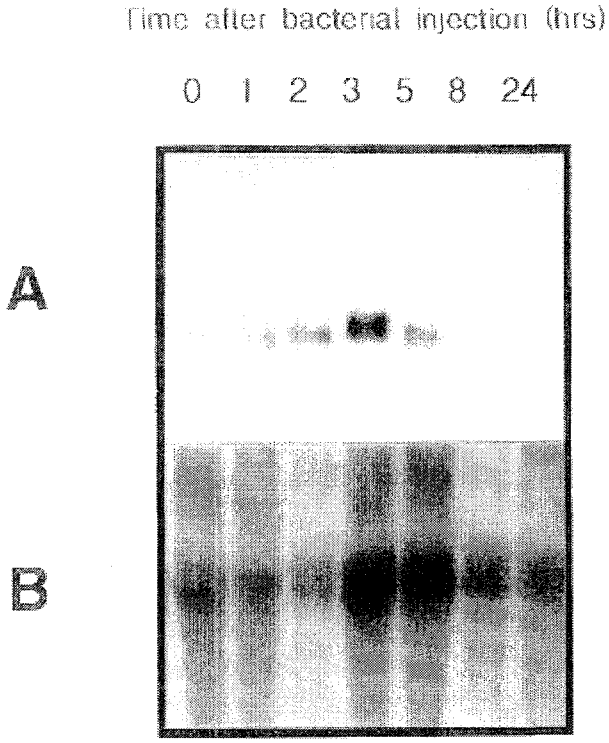



그림 3-19. Induction profile of *Hyphantria* lysozyme gene expression following the bacterial injection(A). The same blot stained with methylene blue(B). Tatal RNA(20$\mu$g) was loaded in each lane and analyzed by Northern hybridization with 32P-labeled antisense RNA probe *Hyphantria* lysozyme. The membrane was stained with methylene blue(0.04%) prior to probe hybridization in order to check the loaded quantity and transfer efficiency.

# 제 4 절. 연구성과 및 활용계획

## 1. 논문 발표 (3편)

SW Shin, DS Park, SC Kim, and HY Park. Two carbohydrate recognition domains of Hyphantria cunea lectin bind to bacterial lipopolysaccharides through O-specific chain. FEBS Lett. 467(1): 70-4., (E.U), SCI (2000.2).

SW Shin, SS Park, DS Park, MG Kim, SC Kim, PT Brey, and HY Park. Isolation and characterization of immune-related genes from the fall webworm, Hyphantria cunea, using PCR-based differential display and subtractive cloning. Insect Biochem. Mol. Biol. 28(11): 827-37, (USA ), SCI, (1998.11) .

MG Kim, SW Shin, KS Bae, SC Kim, and HY Park. Molecular cloning of chitinase cDNAs from the silkworm, Bombyx mori and the fall webworm, Hyphantria cunea. Insect Biochem. Mol. Biol. 28(3): 163-71, (USA), SCI, (1998.3).

## 2. 특허 (2건)

박호용, 신상운, 박두상. 말매미로부터 분리한 신규항생활성 펩타이드 (대한민국 특허출원제2000-5508호, 2000.2.3 출원)

박호용, 박순식, 신상운, 박두상, 한창훈. 흰불나방이 생산하는 라이소자임 (대한민국 특허출원 제96-2755호)

## 3. 활용 계획

가. 곤충유래 항균펩타이드 이용한 의약, 농약 및 산업소재 생산

나. 곤충유래 항균펩타이드의 특성분석 및 데이타베이스 구축

# 제 5 절. 참고문헌


Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Langueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Doresselaer, A., and Hoffmann, J. A. (1993) *J, Biol. Chem.* 268, 14893-14897

Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., and Hoffmann, D. (1999) Dev. & Comp. Immu. 23: 329-344

Chen Y. H., Yang J. T., (1971) *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 44, 1285-1296.

Chan Y. H., J. Yang T., Chau K. H., (1974) *Biochem.*, 13, 3350-3359.

Dimarcq, J. L,. Keppi, E., Dunbar, B., Lambert, J., Reichhart, J. M., Hoffman, D., Rankine, S., M., Fothergill, J. E., and Hoffmann, J. A. (1988) *Eur. J. Biochem.* 171, 17-22

Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaunt, L., Langueux, M., Broekaert, W. F., Hettru, C., and Hoffmann, J, A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 33159-33163

Fehlbaum, P., Bulet, P., Chernysh, S., Briandd, J. P. Roussel, j. P., Letellier, L., Hetru, C., and Hoffmann, J, A. (1996) *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 93, 12210-1225

Hoffman, J. A., and Reichhart J. M. (1997) *Trends Cell Biol.* 7. 309-316

Hultmark, D., Steniner, H., Rasmuson, T. & Boman, H.G. (1980) *Eur. J. Biochem.* 106, 7-16

Hulmark , D., Engströn, Å., Andersson, K., Steiner, H., Bennich, H. & Bomam H. G. (1983) *EMBO J.* 2, 571-576

Kanai, A., and Natori , S. (1990) *Mol. Cell Biol.* 10, 6114-6122

Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K., Ganz, T. (1993) *Annu. Rev. Immunol.* 11, 105-128

Matsuzaki, K., Sugishita, K., Harada, M., Fujii, N. Miyajima, K.(1997) *Biochim. Biophys. Acta.*, 1327, 119-113

Park Chan Bae, Kim Mi Sun, Kim Sun Chang. (1996) *Biochim. Biophys. Res. Commune.*, 218, 408-413

Bassalle, R., Kapikovsky, A. Gorea, J., and Shalit. I.(1990) *FEBS Lett.* 27, 151-155

Bessalle, R., Haax. H. and Goria. A.(1992) *Antimicrobial Agents Chemotherapy.*, Feb. 313-317.

Shin S. Y., Kang J. H., Jung S. Y., Kim Y. M., Haham K. S., (2000) *Biochim. Biophys. Acta.*, 1468, 209-218.

Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., and Boman, H. G. (1981) Nature confusum292, 246-248

# 부 록

## (주요 발표 논문)

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 218, 408–413 (1996)
Article No. 0071

# A Novel Antimicrobial Peptide from *Bufo bufo gargarizans*

Chan Bae Park,* Mi Sun Kim,† and Sun Chang Kim*

*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejeon 305-701, Korea; and †Korea Institute of Energy Research, Biomass team, Taejeon 305-343, Korea

Received November 24, 1995

A potent and structurally novel antimicrobial peptide was isolated and characterized from the stomach tissue of *Bufo bufo gargarizans*, an Asian toad. The 39-amino acid peptide, named buforin I, was purified to homogeneity by heparin-affinity column and reverse-phase HPLC. The amino acid sequence of buforin I was identical in 37 of 39 amino-terminal residues of Xenopus histone H2A. The buforin I showed strong antimicrobial activities *in vitro* against a broad-spectrum of microorganisms and was found to be more potent than magainin 2. In addition, a 21-amino acid peptide, named buforin II, which was derived from buforin I, showed more potent antimicrobial activities than buforin I. © 1996 Academic Press, Inc.

In recent years, a number of antimicrobial peptides, which play one of the most important defense roles against pathogenic microorganisms, have been isolated from various biological sources (1). Melittin was one of the first antimicrobial peptides isolated from the venom of bees (2) and later bombinins were purified from an European frog (3). Steiner and Boman also found that a pupae of cecropia moth produced an antimicrobial peptide named cecropin (4). To date, about 2,000 antimicrobial peptides have been identified (1). These antimicrobial peptides carry net positive charges and most of them have the propensity to form an amphipathic $\alpha$-helix structure (5,6,7). It was reported, even though the precise action mechanism of the antimicrobial peptides remains to be determined, that they rapidly disturbed the membrane function of pathogenic microorganisms (8,9,10).

Amphibians are rich in antimicrobial molecules, particularly in the antimicrobial peptides. More than 20 different antimicrobial peptides have been isolated from the skins and stomachs of *Xenopus laevis, Bombina,* sp., *Phyllomedusa,* sp., and *Rana* sp (1,5–6,10–11). These molecules are produced and stored in specialized granular glands in dermal structure or gastric mucosa (12). In this study, we report a novel antimicrobial peptide purified from the stomach of *Bufo bufo gargarizans,* an Asian toad, which has been used as a wound-healing agent in traditional Korean medicine.

## MATERIALS AND METHODS

*Peptide purification.* Twenty adult toads (both male and female), captured in the wild in the middle part of the Korean peninsula, were choked by being left for 10 min in a desiccator filled with $CO_2$ gas. The stomachs were removed (tissue weight, 12.5g) and the toads were subsequently sacrificed. To minimize peptidases activities and maximize solubilization of peptides, the stomachs were homogenized in 120 ml of 1% (v/v) trifluoroacetic acid, 1 M HCl, 5% (v/v) formic acid, 1% (w/v) NaCl and pepstatin A at 1 $\mu$g/ml using a homogenizer (Polytron, Sweden) (12). The homogenate was then centrifuged at 20,000 × *g* for 30 min in a Himac SCR20BR (Hitachi, Japan) and the supernatant was collected. The peptides in the supernatant were then subjected to reverse-phase concentration using a Sep-Pak C18 cartridge (Waters associates, Milford, MA) which was activated with 80% acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and flushed with 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid to remove the excess acetonitrile. After being loaded with the supernatant, the cartridge was washed with 20 ml of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid and the peptides trapped in the Sep-Pak C18 cartridge were eluted with 6 ml of 80% (v/v) acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid. The eluates were then lyophilized and subsequently resuspended in 10 ml of 0.01 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.01 M NaCl and were loaded onto a 1.0 × 10 cm heparin sepharose column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) equilibrated with 0.01 M Tris-HCl (pH 7.5) containing 0.01 M NaCl (13). The peptides were eluted by 0.5 M NaCl and the active fraction pools were further purified by HPLC on a 3.9 × 300 mm Delta Pak C18 column (Waters associates, Milford, MA) with a linear gradient of 0% buffer A to 50% buffer A at 1 ml/min for 1 h (buffer A; acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid). Each peak was collected and antimicrobial activity of the each peak was tested after dried under the vacuum. The purity of the isolated peptide was assessed by reverse-phase



0006-291X/96 $12.00
Copyright © 1996 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS 229, 381–387 (1996)
ARTICLE NO. 1814

# cDNA Cloning and Characterization of Buforin I, an Antimicrobial Peptide: A Cleavage Product of Histone H2A

Hun Sik Kim,* Chan Bae Park,* Mi Sun Kim,† and Sun Chang Kim*,[1]

*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea; and †Biomass Team, Korea Institute of Energy Research, Taejon 305-343, Korea

Received October 29, 1996

A cDNA containing coding information for buforin I, the toad stomach antimicrobial peptide, was identified by PCR. The cloned cDNA encoded a protein of 129 amino acids whose 39-amino-acid N-terminus was identical to buforin I. Nucleotide sequence analysis of the cloned cDNA revealed that it had over 90% amino acid homology with histone H2A, the replication-dependent protein. Both Northern and Southern blot analysis of the toad genome suggested that histone H2A and buforin I were encoded by the same gene. A specific protease responsible for the generation of buforin I from histone H2A was found to be present in the crude extracts of the toad stomach. These results suggest that there exists a specific regulation mechanism which converts the toad histone H2A to the antimicrobial peptide buforin I. © 1996 Academic Press, Inc.

Antimicrobial peptides, important mediators in the primary host defense system against pathogenic microorganisms, are widely distributed in nature and often show marked interspecies diversity in structure and spectrum of activity (1). Among living organisms, amphibians are a rich source of antimicrobial peptides, particularly of the amphipathic $\alpha$-helical class such as magainin (2), gaegurin (3) and buforin I (4). Since an amphibian swallows its prey intact, and stores its food in its stomach for some period of time before digestion begins, secretion of antimicrobial peptides into the stomach lumen might be needed to inhibit the growth of pathogenic bacteria (5). Many antimicrobial peptides have been isolated from skins and stomachs of amphibians (6). The antimicrobial peptides are originally synthesized as inactive precursors and become active antimicrobial peptides by proteolytic cleavages (6-8). These molecules are generally stored as processed, active peptides in large granules within the granular glands, which eventually release their contents onto the external surface upon adrenergic stimulation or invasion of microorganisms through injury (2, 9, 10). In the previous paper (4), we reported the isolation of buforin I, the novel antimicrobial peptide, from toad stomachs, which showed a broad spectrum of antimicrobial activities. In this study, through the cDNA cloning of buforin I and Northern and Southern blot analysis of the toad genome, we report that buforin I originated from the toad histone H2A by a proteolytic cleavage.

## MATERIALS AND METHODS

*cDNA library construction.* Toad stomachs were prepared as described in the previous paper (4). The total RNA was extracted from the homogenized toad stomachs by the guanidium thiocyanate method (11), and the poly(A)$^+$ mRNA was isolated from the total RNA using an oligo(dT)-cellulose column (Sigma, St. Louis, MO). A cDNA library was constructed with the Uni-ZAP XR cDNA library kit (Stratagene, La Jolla, CA) according to the procedure provided by the manufacturer.

*PCR cloning.* A polymerase chain reaction (PCR)-based strategy was used to amplify the cDNA encoding buforin I in the cDNA library. To minimize the background and increase the specificity of the PCR reaction, the hot start

[1] To whom correspondence should be addressed. Fax: +82 42 869 2610. E-mail: sckim@sorak.kaist.ac.kr.



0006-291X/96 $18.00
Copyright © 1996 by Academic Press, Inc.
All rights of reproduction in any form reserved.

FEBS 17799 FEBS Letters 398 (1996) 87-90

# Solution structure of an antimicrobial peptide buforin II

Gwan-Su Yi[a], Chan Bae Park[b], Sun Chang Kim[b], Chaejoon Cheong[a,*]

[a]Magnetic Resonance Group, Korea Basic Science Institute, 52 Yeoeun-Dong, Yusung-Gu, Taejon 305-333, South Korea
[b]Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, South Korea

Received 23 July 1996; revised version received 1 October 1996

**Abstract** **The structure of 21-residue antimicrobial peptide buforin II has been determined by using NMR spectroscopy and restrained molecular dynamics. Buforin II adopts a flexible random structure in $H_2O$. In trifluoroethanol (TFE)/$H_2O$ (1 : 1, v/v) mixture, however, buforin II assumes a regular α-helix between residues $Val^{12}$ and $Arg^{20}$ and a distorted helical structure between residues $Gly^7$ and $Pro^{11}$. The model structure obtained shows an amphipathic character in the region from $Arg^5$ to the C-terminus, $Lys^{21}$. Like other known cationic antimicrobial peptides, the amphipathic structure might be the key factor for antimicrobial activity of buforin II.**

*Key words:* Antimicrobial peptide; Buforin II; 2D-NMR; Molecular dynamics

## 1. Introduction

Recently, an antimicrobial peptide, buforin I, was isolated from the stomach tissue of an Asian toad, *Bufo bufo gargarizans*, and a more potent peptide buforin II was derived from buforin I [1]. These peptides show strong antimicrobial activities in vitro against a broad spectrum of microorganisms, including fungi [1]. Buforin II, a 21-residue cationic peptide containing the residues from $Thr^{16}$ to $Lys^{36}$ of buforin I, shows about two times higher activity than buforin I.

There have been comprehensive studies on a cationic antimicrobial peptide, magainin 2, isolated from the skin of *Xenopus laevis* [2]. Magainin 2 forms an α-helix in trifluoroethanol(TFE)/$H_2O$ with charged residues on one side resulting in a large hydrophobic moment [3]. It interacts with bacterial and acidic model membranes [4] and destroys the ionic gradient across the cell membranes by forming ion channels [5]. For the buforin peptides, the structure and the detailed mechanism of the activity have not been resolved yet. Because the primary sequences of buforin II and magainin 2 are very different and the antimicrobial activities of buforin 2 are about 20 times higher than those of magainin 2, the structure of buforin II is of interest.

*Corresponding author. Fax: 82-42-865-3419.
E-mail: cheong@comp.kbsi.re.kr

*Abbreviations:* TFE, trifluoroethanol; DQF-COSY, double quantum filtered correlation spectroscopy; TOCSY, total correlation spectroscopy; NOESY, nuclear Overhauser enhancement spectroscopy; TPPI, time-proportional phase incrementation; RMD, restrained molecular dynamics; SA, simulated annealing; NOE(s), nuclear Overhauser effect(s)

## 2. Experimental

### 2.1. Peptide synthesis

Buforin II was synthesized by the Seoul Branch of the Korea Basic Science Institute (KBSI), using the solid-phase synthesis method on a Milligen 9050 Pepsynthesizer and fluoren-90-ylmethoxycarbony(F-moc)-polypeptide active ester chemistry. The product was purified by reverse-phase HPLC on a Waters Delta-pak C18 column. The peptide was eluted with a $H_2O$/acetonitrile linear gradient containing 0.1% trifluoroacetic acid. The homogeneity was assessed by the reverse-phase HPLC on a Waters Delta-pak C18 column and by amino acid analysis on a Waters PICO-TAG® Amino Acid Analysis System. Its mass was confirmed on a Kratos MALDI-TOF spectrometer by the Mass Spectrometry Group at KBSI.

### 2.2. NMR spectroscopy

The NMR spectra were obtained on a Bruker DMX600 spectrometer. The samples were either in 50 mM phosphate buffer containing 10% $D_2O$ at pH 7.0 or in TFE-$d_3$/50 mM phosphate buffer at pH 7.0 (1 : 1, by volume). The concentration of the peptide was about 2 mM and the experiments were performed at 10°C, 25°C and 35°C. Deuterated solvents were purchased from Aldrich and Cambridge Isotope Laboratory. For sequential assignments and structural determination, double quantum filtered correlation spectroscopy (DQF-COSY) [6], total correlation spectroscopy (TOCSY) [7] and nuclear Overhauser enhancement spectroscopy (NOESY) [8] experiments were performed. In TOCSY experiments, an MLEV-17 composite pulse sequence [9] was used for spin locking with a mixing time of 75 ms. The NOESY spectra were obtained with mixing times from 50 to 300 ms. Normally, the 2D data were acquired with 2 k ($t_2$ domain) ×512 ($t_1$ domain) data points, but for the DQF-COSY, 4 k×1 k data points were collected.

### 2.3. Structure calculation

Structures of buforin II were calculated using a molecular modeling program, NMRchitect (Biosym, Inc.) on an Indigo2 (Silicon Graphics, Inc.) workstation and a Cray Y-MP C916/16512 supercomputer in the System Engineering Research Institute (Taejon, Korea). Sixty-nine distance constraints for the structure calculations were obtained from the NOESY spectra acquired in TFE/$H_2O$ at pH 7, 10°C. Volume integration was performed for NOESY mixing times of 50, 100, 150 and 250 ms and the crosspeak intensities were classified as strong, medium, or weak and converted into upper bounds of distance restraints of 2.8, 3.6 or 5.0 Å, respectively. The 12 $J_{HN\alpha}$ values were converted into loose dihedral angle restraints of $-30° < \phi < -100°$. Hydrogen bonding restraints were not used. Thirty initial structures were generated and refined using the distance geometry algorithm [10] DGII (Biosym, Inc.) with the NMR restraints.

The best structure which showed the lowest violation against the constraints was subjected to the restrained molecular dynamics (RMD) with the simulated annealing (SA) procedure [11] of NMRchitect (Biosym, Inc.). The consistent valence force field (CVFF) of DISCOVER 2.9 (Biosym, Inc.) was used for the molecular dynamics calculations. The SA procedure was started by restrained energy minimization which includes 100 iterations using the steepest descent minimization followed by 500 iterations using the conjugate gradients minimization. Then, 0.5 ps of RMD with 1 fs time steps was performed at 300 K followed by energy minimization. After this, the temperature was raised to 1000 K and the RMD was performed for 50 ps. Then, the temperature was gradually lowered to 300 K by 10 ps RMD in 5 steps. Finally, the steepest descent (100 iterations) and subsequent conjugate gradient minimizations (1500 iterations) were performed twice.

0014-5793/96/$12.00 © 1996 Federation of European Biochemical Societies. All rights reserved.
*PII* S0014-5793(96)01193-3

J. Microbiol. Biotechnol. (1998), 8(1), 34-41

MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY
© Korean Society for Applied Microbiology

# Expression of an Antimicrobial Peptide Magainin by a Promoter Inversion System

LEE, JAE-HYUN, SEUNG-SUH HONG[1], AND SUN-CHANG KIM*

*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-Dong, Yusong-Ku, Taejon 305-701, Korea,*
*[1]Samyang Genex Research Institute, Taejon 305-701, Korea*

Received: May 26, 1997

**Abstract** A method was developed for the controlled expression of an antimicrobial peptide magainin in *Escherichia coli*. A series of concatemeric magainin genes was constructed with a gene amplification vector, and fused to the 3' end of *malE* gene encoding the affinity ligand, *E. coli* maltose-binding protein (MBP). The construct directed the synthesis of the fusion protein with the magainin polypeptide fused to the C-terminus of MBP. The fusion protein was expressed in a tightly regulatable expression system which was under the control of an invertible promoter. The MBP-fused magainin monomer was expressed efficiently. However, the expression level of the MBP-fused magainin in *E. coli* decreased with the increasing size of multimers possibly because of the transcription and translation inhibition by the multimeric peptides. After purification using an amylose affinity column, the fusion protein was digested by factor Xa at a specific cleavage site between the monomers. The recombinant magainin had an antimicrobial activity identical to that of synthetic magainin. This experiment shows that a biologically active, antimicrobial peptide magainin can be produced by fusing to MBP, along with a promoter inversion vector system.

**Key words:** Antimicrobial peptide, expression, promoter inversion vector, *Escherichia coli*

Antimicrobial peptides have received increasing attention in recent years because of their contribution as a first line of host defense against infections of pathogenic microorganisms [6]. A large number of antimicrobial peptides have been identified from various sources, including amphibians [2], insects [10], mammalians [16], plants [3], invertebrates [19] and prokaryotes [11]. These peptides exhibit potent antimicrobial activities against a broad range of microorganisms, including bacteria, protozoa, fungi and viruses [13, 16]. The antimicrobial peptides have been shown to exert their activity by the formation of multimeric pores directly through the lipid bilayer of the cell membrane [18, 28]. Despite the activities of these peptides against microorganisms, they do not induce lysis of erythrocytes or lymphocytes at comparable concentrations [30, 31]. The mature peptides, derived by the processing of large precursors, share common structural features such as a high content of basic amino acid residues and a global distribution of hydrophobic and hydrophilic residues leading to amphipathic conformations [23].

The antimicrobial peptides have been obtained from living organisms, and this has become a limiting factor for their mass production and widespread applications. Chemical synthesis could be an alternative method. However, the chemical synthesis of peptides longer than 10 amino acids in length is not cost-effective. Therefore, a biological expression system, if developed successfully, would be one of the most cost-effective approaches for the production of large quantities of antimicrobial peptides. Recently, several groups have attempted to produce antimicrobial peptides in different biological systems. Cecropin A has been expressed in baculovirus expression systems [1, 9] and in *E. coli* [4], insect defensin from *Phormia terranovae* in yeast [22], human defensin HNP-1 and CEME [27] in various bacterial expression systems [20], magainin in the erythrocytes of transgenic mice [26], and moricin from *Bombyx mori* in *E. coli* [7]. However, most of these methods have limitations, such as the proteolysis of the fusion protein [20], or the toxic effects of the expressed peptides to the host [5]. As a new approach, we developed a bacterial expression system for the antimicrobial peptide magainin

*Corresponding author
Phone: 82-42-869-2619; Fax: 82-42-869-2610;
E-mail: sckim@sorak.kaist.ac.kr

PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION 12, 53–60 (1998)
ARTICLE NO. PT970814

# Acidic Peptide-Mediated Expression of the Antimicrobial Peptide Buforin II as Tandem Repeats in *Escherichia coli*

Jae H. Lee, Il Minn, Chan B. Park, and Sun C. Kim[1]
*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejon 305-701, Korea*

Received July 1, 1997, and in revised form September 22, 1997

**Antimicrobial peptides have received increasing attention as a new pharmaceutical substance, because of their broad spectrum of antimicrobial activities and the rapid development of multidrug-resistant pathogenic microorganisms. The main obstacle to the wide application of antimicrobial peptides has been the lack of a cost-effective, mass-production method. A novel mass-production method for an antimicrobial peptide of 21 amino acids, buforin II, which was isolated from the stomach of the amphibian *Bufo bufo gargarizans*, has been developed. This method is based on the neutralization of the positive charges of buforin II by fusing to an acidic peptide to avoid the lethal effect of the expressed antimicrobial peptide on the host cells. The fusion peptide was expressed in *Escherichia coli* as tandem repeats to increase the product yield. Multimers of the acidic peptide–buforin II fusion peptide were expressed at high levels without causing damage to the cells. The presence of cysteine residues in the acidic peptide was critical for the high level expression of the fusion peptide multimers. Multimers of this fusion peptide were expressed as inclusion bodies, and about 107 mg of pure buforin II was obtained from 1 L of *E. coli* culture by cleaving the multimers with CNBr. Recombinant buforin II had an antimicrobial activity identical to that of natural buforin II. These results may lead to a general, cost-effective solution to the mass production of antimicrobial peptides and other basic peptides which are lethal to the host strain.** © 1998 Academic Press

*Key Words:* **antimicrobial peptide, expression, acidic peptide, tandem multimer, *Escherichia coli*.**

Antimicrobial peptides, which play one of the key roles in primary host defense against infections of pathogenic microorganisms, have received increasing attention as new antimicrobial substances in recent years. This is because of their broad spectrum of antimicrobial activities and the rapid development of microbial resistance to conventional antibiotics (1). Antimicrobial peptides are part of the innate immune system widely distributed in nature (2). Many different kinds of antimicrobial peptides have been identified from various sources such as amphibians, insects, mammalians, plants, invertebrates, and prokaryotes (3–8). Active antimicrobial peptides, derived by the processing of large precursors, share common structural features such as a high content of basic amino acid residues and a global distribution of hydrophobic and hydrophilic residues leading to amphipathic $\alpha$-helical conformations under hydrophobic conditions or $\beta$-sheet conformations (9). These peptides exhibit potent antimicrobial activities against a broad range of microorganisms, including bacteria, protozoa, fungi, and viruses (5). They have been shown to exert their activities directly through the lipid bilayer of the cell membranes by the formation of multimeric pores or by disrupting the cell membranes (10,11). The most intriguing feature of these molecules is their potential not to fall victim to the same microbial resistance problems as conventional antibiotics, because their mechanism of action is different (1). To date, researchers have been unable to induce bacterial resistance to antimicrobial peptides (1). Despite the activities of these peptides on prokaryotes, they do not induce lysis of erythrocytes or lymphocytes at comparable concentrations (12–14). Therefore, from a drug development point of view, these host-defense peptides may provide a powerful new class of antimicrobial pharmaceuticals.

For pharmaceutical applications, a large quantity of antimicrobial peptides needs to be produced economically. Chemical synthesis is not economically practical for peptides more than 10 amino acids in length. Therefore, if developed successfully, a biological expression

[1] To whom correspondence should be addressed. Fax: +82 42 869 2610. E-mail: sckim@sorak.kaist.ac.kr.

1046-5928/98 $25.00
Copyright © 1998 by Academic Press
All rights of reproduction in any form reserved.

FEBS Letters 437 (1998) 258–262 FEBS 20997

# Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*

In Yup Park[a], Chan Bae Park[a], Mi Sun Kim[b], Sun Chang Kim[a,*]

[a]*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1, Yusong-gu, Kusong-dong, Taejon 305-701, South Korea*

[b]*Korea Institute of Energy Research, Biomass Team, Taejon 305-343, South Korea*

Received 31 August 1998; received in revised form 22 September 1998

**Abstract In response to epidermal injury, *Parasilurus asotus*, a catfish, secreted a strong antimicrobial peptide into the epithelial mucosal layer. The molecular mass of the antimicrobial peptide, named parasin I, was 2000.4 Da, as determined by matrix-associated laser desorption ionization mass spectrometry. The complete amino acid sequence of parasin I, which was determined by automated Edman degradation, was Lys-Gly-Arg-Gly-Lys-Gln-Gly-Gly-Lys-Val-Arg-Ala-Lys-Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser. Eighteen of the 19 residues in parasin I were identical to the N-terminal of buforin I, a 39-residue antimicrobial peptide derived from the N-terminal of toad histone H2A [Kim et al. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 229, 381–387], which implies that parasin I was cleaved off from the N-terminal of catfish histone H2A. Parasin I showed strong antimicrobial activity, about 12–100 times more potent than magainin 2, against a wide spectrum of microorganisms, without any hemolytic activity. Circular dichroism spectra of parasin I indicated a structural content of 11% α-helix, 33% β-sheet, and 56% random coils. The β-sheet axial projection diagram of parasin I showed an amphipathic structure. Our results indicate that the catfish may produce parasin I from its histone H2A by a specific protease upon injury to protect against invasion by microorganisms.**

**© 1998 Federation of European Biochemical Societies.**

*Key words:* Antimicrobial peptide; Histone H2A; Epidermal injury; Catfish; *Parasilurus asotus*

## 1. Introduction

Antimicrobial peptides, which are widespread in nature and are among the earliest developed elements of innate immunity, are important components of the natural defenses of living organisms against invading microorganisms [1,2]. Many different kinds of antimicrobial peptides have been found from amphibians [3], insects [4], mammals [5], plants [6], microorganisms [7,8], and fishes [9,10]. Most of the antimicrobial peptides kill target cells rapidly and specifically, and have unusually broad activity spectra [9,11]. In addition to the microbicidal activity, antimicrobial peptides may also have other functions such as promotion of wound healing [12], stimulation of monocyte chemotaxis [13], and inhibition of cytokine response [14].

Mucous surfaces of living organisms are under constant attack from microorganisms. However, invasive infections are rare, remain localized, and heal rapidly. Recent reports have established antimicrobial peptides as the host-defense effector molecules which protect the mucous epithelia from invading microbes [15]. Some of these agents of mucosal immunity include andropin from the ductal epithelial cells of the reproductive tract of *Drosophila* [16], magainins from the mucosal skin surface and the gastrointestinal tract of *Xenopus laevis* [17], buforin I from *Bufo bufo gagarizans* [11], tracheal antimicrobial peptide (TAP) from the bovine tracheal mucosa [18], and pleurocidin from *Pleuronectes americanus* [19].

Even though many antimicrobial peptides have been reported in the mucous layer of amphibians, insects, and mammals [11,16,18], only a few have been found in the mucous layer of aquatic organisms [9,10,22]. In this study, we report the discovery of a strong and inducible antimicrobial peptide from the epithelial mucosal layer of the catfish, *Parasilurus asotus*.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Microorganisms

All of the microorganisms used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The following microorganisms were used: *Bacillus subtilis* ATCC 62037, *Staphylococcus aureus* ATCC 15752, *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Pseudomonas putida* ATCC 17426, *Escherichia coli* ATCC 27325, *Salmonella typhimurium* ATCC 15277, *Serratia* sp. ATCC 21074, *Cryptococcus neoformans* ATCC 34881, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 44774, and *Candida albicans* ATCC 10231.

### 2.2. Peptide purification

Catfishes were injured by scratching the skin (16 $cm^2$) with a sandpaper and 5 h after the wounding, the catfishes were stunned by electro-shock. The proteinaceous epithelial mucosal layer was scraped off from both the unwounded and wounded catfishes. The mucus (20 g) collected from the catfish skin was then homogenized using a Waring blender (Waring, New Hartford, CT, USA) in 200 ml of extraction medium (0.2 M sodium acetate, 0.2% Triton X-100, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). The homogenate was centrifuged at $20000 \times g$ for 30 min in a Himac SCR20BR (Hitachi, Tokyo, Japan) and the supernatant was collected. The peptides in the supernatant were subsequently subjected to reverse-phase concentration using a Sep-Pak C18 cartridge (Millipore, Milford, MA, USA) which was activated with 80% acetonitrile containing 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA) (buffer A) and flushed with 0.1% (v/v) TFA (buffer B) to remove the excess acetonitrile. After being loaded with the supernatant, the Sep-Pak C18 cartridge was washed with 20 ml of buffer B and the peptides trapped in the cartridge were eluted with 6 ml of buffer A. The eluate was then lyophilized and subsequently resuspended in buffer B. The resuspended sample was applied to a C18 reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) column (3.9×300 mm, Delta Pak, Millipore) and elution was achieved with a linear gradient of 0–80% acetonitrile in 0.1% TFA for 2 h at a flow rate of 1 ml/min. Each fraction was lyophilized, resuspended in water, and was assayed for antimicrobial activity against *B. subtilis* ATCC 62037. The peaks with antimicrobial activity were identified and pooled. The purity of the isolated peptide was assessed by reverse-phase HPLC and matrix-associated laser desorption ionization mass spectroscopy (MALDI-MS) (Kratos Kompact

*Corresponding author. Fax: (82) (42) 869-2610.
E-mail: sckim@sorak.kaist.ac.kr

0014-5793/98/$19.00 © 1998 Federation of European Biochemical Societies. All rights reserved.
PII: S0014-5793(98)01238-1

BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS **244**, 253–257 (1998)
ARTICLE NO. RC988159

# Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions

Chan Bae Park, Hun Sik Kim, and Sun Chang Kim[1]
*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Yusong-gu Kusong-dong, Taejeon 305-701, Korea*

Received January 6, 1998

**The mechanism of action of buforin II, which is a 21-amino acid peptide with a potent antimicrobial activity against a broad range of microorganisms, was studied using fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled buforin II and a gel-retardation experiment. Its mechanism of action was compared with that of the well-characterized magainin 2, which has a pore-forming activity on the cell membrane. Buforin II killed *Escherichia coli* without lysing the cell membrane even at 5 times minimal inhibitory concentration (MIC) at which buforin II reduced the viable cell numbers by 6 orders of magnitude. However, magainin 2 lysed the cell to death under the same condition. FITC-labeled buforin II was found to penetrate the cell membrane and accumulate inside *E. coli* even below its MIC, whereas FITC-labeled magainin 2 remained outside or on the cell wall even at its MIC. The gel-retardation experiment showed that buforin II bound to DNA and RNA of the cells over 20 times strongly than magainin 2. All these results indicate that buforin II inhibits the cellular functions by binding to DNA and RNA of cells after penetrating the cell membranes, resulting in the rapid cell death, which is quite different from that of magainin 2 even though they are structurally similar: a linear amphipathic α-helical peptide.** © 1998 Academic Press

Antimicrobial peptides have received increasing attention in recent years as their contribution to host defense mechanisms in the animal kingdom is gradually becoming appreciated (1). More than 2,000 antimicrobial peptides have been isolated from diverse biological sources, including amphibians (2, 3), insects (4), mammals (5), fish (6), plants (7) and prokaryotes (8). These peptides possess antimicrobial activities against bacteria, fungi and enveloped viruses with little or no cytolytic activity (9, 10). In most cases, these peptides have the common features of being highly basic, due to the presence of multiple arginine and lysine residues, and of forming amphipathic structures (11). The amphipathic nature of these peptides presumably underlies their biological activities which enables them to associate with lipid membranes and disrupt normal membrane functions. The mechanism of action has been investigated for many of antimicrobial peptides, including cecropin A (12, 13), several defensins (14) and magainins (15, 16). The killing mechanism found for most peptides investigated consists of attacks on the outer and inner membranes, ultimately resulting in lysis of the bacteria. Channel formation in artificial membranes was demonstrated for cecropins (17), defensins (18) and magainins (19, 20). Proline-arginine-rich peptides, however, act differently, because the high concentration of proline is incompatible with amphipathic structure formation. Indeed, PR-39 does not have a pore-forming activity but does inhibit the macromolecular synthesis (21). Therefore, there is still considerable debate on the precise mechanism.

Recently a novel 39-amino acid residue peptide (termed buforin I) was isolated from the stomach tissue of the Asian toad, *Bufo bufo garagriozans,* and a more potent buforin II consisting of 21 amino acids was derived from buforin I (3). Buforin II showed a strong antimicrobial activity against a broad spectrum of microorganism, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungi without any significant hemolytic activity (3). The structure study of buforin II using nuclear magnetic resonance showed that the peptide adopted an amphipathic helix in a hydrophobic environment (22). The structure of buforin II predicted

[1] Corresponding author. Mailing address: Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Yusong-gu Kusong-dong, Taejeon 305-701, Korea. Fax: 82-42-869-2610. E-mail: sckim@sorak.kaist.ac.kr.



0006-291X/98 $25.00
Copyright © 1998 by Academic Press
All rights of reproduction in any form reserved.

ELSEVIER

Biochimica et Biophysica Acta 1407 (1998) 31–39

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA
BBA

# Antimicrobial peptides derived from pepsinogens in the stomach of the bullfrog, *Rana catesbeiana*

Il Minn, Hun Sik Kim, Sun Chang Kim *

*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Yusong-gu, Kusong-dong, Taejon 305-701, South Korea*

Received 8 January 1998; revised 17 March 1998; accepted 25 March 1998

**Abstract**

Three antimicrobial peptides, which had strong antimicrobial activity against a broad spectrum of microorganisms, were isolated from the stomach of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. Two of the antimicrobial peptides were found to be derived from the N-terminal sequences of pepsinogen A and C prosequences. The amino acid sequences of the new antimicrobial peptides, named bullfrog pepsinogen A-derived antimicrobial peptide (bPaAP) and bullfrog pepsinogen C-derived antimicrobial peptide (bPcAP), were Gly-Val-Val-Lys-Val-Ser-Arg-Leu-Lys-Gly-Glu-Ser-Leu-Arg-Ala-Arg-Leu (MW 1865.5) and Ile-Ile-Lys-Val-Pro-Leu-Lys-Lys-Phe-Lys-Ser-Met-Arg-Glu-Val-Met-Arg-Asp-His-Gly-Ile-Lys-Ala-Pro-Val-Val-Asp-Pro-Ala-Thr-Lys-Tyr (MW 3691.6), respectively. The bPaAP and bPcAP adopted 35% and 42% amphipathic α-helical structure in 50% trifluoroethanol, respectively, and were non-hemolytic up to a concentration of 200 μg/ml. Synthesized pepsinogen C prosequences of monkey and human, which had similar structural characteristics as bPaAP and bPcAP, also showed antimicrobial activity at concentrations of 10–200 μg/ml. The third peptide was buforin I, previously found in the stomach of the Asian toad, *Bufo bufo gargarizans*. These findings strongly suggest that peptides derived from the prosequences of pepsinogens, along with buforin I, may contribute to the antimicrobial function of the gastrointestinal mucosa of vertebrates, including human. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Antimicrobial; Peptide; Pepsinogen; Prosequence; Bullfrog; *Rana catesbeiana*

## 1. Introduction

Living organisms are endowed with an innate immunity consisting of various antimicrobial peptides against invading microorganisms [1]. Many different families of antimicrobial peptides, which were classified based on the amino acid sequence and secondary structure, have been isolated from insects, plants, animals, and microorganisms [2,3]. Among these antimicrobial peptides, those from the mucosal epithelia of the reproductive, respiratory, and gastrointestinal systems of vertebrates have attracted increasing interest, since the incidence of infectious disease on the mucosal surfaces is rare despite a continuous exposure to a wide variety of pathogenic microorganisms [4]. These peptides include andropin, a cecropin-related peptide from the reproductive tract of *Drosophila* [5]; magainin, a peptide from granular glands of skin and gastrointestinal mucosa of *Xenopus laevis* [6,7]; tracheal antimicrobial peptide, a peptide from mammalian respiratory mucosa [8]; and enteric defensins, peptides from mammalian intesti-

* Corresponding author. Fax: +82 (42) 869 2610; E-mail: sckim@sorak.kaist.ac.kr

0925-4439/98/$19.00 © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0925-4439(98)00023-4

ELSEVIER

Biochimica et Biophysica Acta 1408 (1998) 67–76

BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA
BBA

# Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization

Ju Hyun Cho, Chan Bae Park, Young Geol Yoon, Sun Chang Kim *

*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Yusong-gu Kusong-dong, Taejon 305-701, South Korea*

Received 15 June 1998; revised 5 August 1998; accepted 13 August 1998

**Abstract**

A novel antimicrobial peptide was isolated and characterized from the earthworm, *Lumbricus rubellus*. The antimicrobial peptide was purified to homogeneity by a heparin-affinity column and C18 reverse-phase HPLC, and named lumbricin I. Lumbricin I was a proline-rich antimicrobial peptide of 62 amino acids (15% proline in molar ratio; molecular mass, 7231 Da), whose complete sequence was determined by a combination of peptide sequence and cDNA analysis. The peptide and cDNA sequence analysis revealed that lumbricin I was produced as a precursor form consisting of 76 amino acids, with 14 residues in a presegment and 62 residues in mature lumbricin I. Lumbricin I showed antimicrobial activity in vitro against a broad spectrum of microorganisms without hemolytic activity. In addition, a 29-amino acid peptide, named lumbricin I(6–34), which was derived from residues 6–34 of lumbricin I, showed marginally stronger antimicrobial activity than lumbricin I. Northern blot analysis on total RNA revealed that expression of lumbricin I gene was not induced by bacterial infection, but was constitutively expressed. Furthermore, the expression of lumbricin I gene was specific in adult *L. rubellus*: Lumbricin I mRNA was detected only in adult *L. rubellus*, but not in eggs and young *L. rubellus*. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Antimicrobial peptide; Proline-rich peptide; Earthworm; *Lumbricus rubellus*; cDNA cloning

## 1. Introduction

In recent years, antimicrobial peptides have become recognized as important contributors to nonspecific host defense for both vertebrates and invertebrates. The value of antimicrobial peptides lies in their ease and speed of synthesis, their broad specificity against prokaryotic cells and their general lack of toxicity for eukaryotic hosts [1]. Thus, they serve as a first-line defense against microbial invasion, supplementing the host's humoral and cellular immune system. Many different kinds of antimicrobial peptides, which possess antimicrobial activity against bacteria, fungi and enveloped viruses with little or no cytolytic activity, have been isolated from diverse sources [1,2]. Most of these peptides, although a few non-cationic antimicrobial peptides have been recently characterized [3,4], share the property of being cationic, but otherwise differ considerably in basic features, such as their size, the presence of disulfide bonds and structural motifs [5]. These peptides have been shown to exert their antimicrobial activities through either the lipid bilayer of the cell

* Corresponding author. Fax: +82 (42) 869-2610; E-mail: sckim@sorak.kaist.ac.kr

0925-4439/98/$ – see front matter © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
PII: S0925-4439(98)00058-1

*J. Microbiol. Biotechnol.* (1999), 9(3), 303–310

MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

© The Korean Society for Applied Microbiology

# Multimeric Expression of the Antimicrobial Peptide Buforin II in *Escherichia coli* by Fusion to a Cysteine-Rich Acidic Peptide

LEE, JAE-HYUN[1], JEONG-HYUN KIM[1], SEUNG-SUH HONG[1], HYUN-SOO LEE[1], AND SUN-CHANG KIM*

*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea*
*[1]Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejon 305-348, Korea*

Received: February 18, 1999

**Abstract** A cost-effective mass production method for a strong antimicrobial peptide, buforin II, which was isolated from the stomach of *Bufo bufo gargarizans*, has been developed. This method is based on the neutralization of the positive charge of buforin II by fusion with a cysteine-rich acidic peptide (CAP) to avoid any lethal effect on the host. The neutralized fusion peptide was multimerized and expressed in *Escherichia coli* as tandem repeats to increase the production yield. Multimers of the CAP-buforin II fusion peptide were successfully expressed at high levels in *E. coli* as inclusion bodies. More than 100 mg of pure buforin II was obtained per 1 l of *E. coli* culture after cleaving the multimeric polypeptide with CNBr. The buforin II obtained from the recombinant *E. coli* had antimicrobial activity identical to that of natural buforin II. The proposed expression system can provide a cost-effective mass production method for both antimicrobial peptides and other host-lethal basic proteins.

**Key words:** Antimicrobial peptide, expression, acidic peptide, tandem multimer, *Escherichia coli*

Antimicrobial peptides are part of the innate immune system widely distributed in nature [8]. A large number of antimicrobial peptides have been identified from various sources such as amphibians, insects, mammalians, plants, invertebrates, and prokaryotes [3, 4, 11, 13, 22, 29]. Active antimicrobial peptides share common structural features such as a high content of basic amino acid residues and a global distribution of hydrophobic and hydrophilic residues leading to amphipathic α-helical conformation under hydrophobic conditions, or β-sheet conformation [36]. These peptides exhibit potent antimicrobial activities against a broad range of microorganisms, including bacteria, protozoa, fungi, and viruses [22]. They have been shown to exert their activities directly through the lipid bilayer of the cell membrane by the formation of multimeric pores [25, 41]. Because of the antimicrobial mechanism of these molecules being quite different from that of conventional antibiotics, it is suggested that these peptides might offer an answer to the currently problematic multidrug-resistant strain development [15]. The fact that there has been no report on the induction of bacterial resistance against antimicrobial peptides supports this notion. Moreover, some of the antimicrobial peptides do not induce lysis of erythrocytes or lymphocytes at comparable concentrations in spite of their activities on prokaryotes [7, 42, 43]. Therefore, in view of drug development, these antimicrobial peptides may provide a new class of powerful antimicrobial agents.

The need for a large quantity of antimicrobial peptides for pharmaceutical applications has prompted us to investigate and develop cost-effective production methods. Recently, several researchers have attempted to develop biological expression systems for the production of antimicrobial peptides. Cecropin A has been expressed in baculovirus expression systems [1, 10] and *E. coli* [5], an insect defensin from *Phormia terranovae* in yeast [35], human defensin HNP-1 and CEME [40] in various bacterial expression systems [33], magainin from the skin of *Xenopus laevis* in the erythrocytes of transgenic mice [38] and *E. coli* [18], moricin from *Bombyx mori* in *E. coli* [9], gaegurin 4 from the skin of *Rana rugosa* in *E. coli* [16], and polyphemusin from horseshoe crab *Limulus polyphemus* in *E. coli* [34]. Each of the above systems, however, has its own limitations and is far from satisfactory for mass production: the yields were rather low [1, 5, 9, 16, 18, 34], proteolysis of the fusion protein occurred [33], or the product was toxic to the host [6]. To overcome current biological expression problems, we have developed a novel expression method in which a negatively charged acidic peptide is fused to a positively charged antimicrobial

*Corresponding author
Phone: 82-42-869-2619; Fax: 82-42-869-2610;
E-mail: sckim@sorak.kaist.ac.kr

*Eur. J. Biochem.* 266, 665–674 (1999) © FEBS 1999

# Structural and functional implications of a proline residue in the antimicrobial peptide gaegurin

**Jeong-Yong Suh[1,*], Young-Tae Lee[1], Chan-Bae Park[2], Keun-Hyeung Lee[3], Sun-Chang Kim[2] and Byong-Seok Choi[1]**

[1]*Department of Chemistry and* [2]*Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon, Korea;* [3]*Mogam Biotechnology Research Institute, Koosung-myon, Yongin-kun, Kyonggi-do, Korea*

Although it is commonly known as a helix breaker, proline residues have been found in the α-helical regions of many peptides and proteins. The antimicrobial peptide gaegurin displays α-helical structure and has a central proline residue (P14). The structure and activity of gaegurin and its alanine derivative (P14A) were determined by various spectroscopic methods, restrained molecular dynamics, and biological assays. Both P14 and P14A exhibited cooperative helix formation in solution, but the helical stability of P14 was reduced substantially when compared to that of P14A. Chemical-shift analysis indicated that both of the peptides formed curved helices and that P14 showed diminished stability in the region around the central proline. However, hydrogen-exchange data revealed remarkable differences in the location of stable amide protons. P14 showed a stable region in the concave side of the curved helix, while P14A exhibited a stable region in the central turn of the helix. The model structure of P14 exhibited a pronounced kink, in contrast to the uniform helix of P14A. Both peptides showed comparable binding affinities for negatively charged lipids, while P14 had a considerably reduced affinity for a neutral lipid. With its destabilized α-helix, P14 exhibited greater antibacterial activity than did P14A. Hence, electrostatic interaction between helical peptides and lipid membranes is believed to be the dominant factor for antibacterial activity. Moreover, helical stability can modulate peptide binding to membranes that is driven by electrostatic interactions. The observation that P14 is a more potent antibacterial agent than P14A implies that the helical kink of P14 plays an important role in the disruption of bacterial membranes.

*Keywords*: antimicrobial peptide; gaegurin; proline kink; NMR.

All living organisms must defend themselves against environmental enemies. A clever strategy found in nature involves the secretion of small antimicrobial peptides in the early stages of infection. These peptides are beneficial in their quick and efficient response to infectious bacteria and fungi, and thus have survived throughout evolution even in animals with a much more complex defense system, the immune system [1]. Antimicrobial peptides have been isolated from plants [2], fishes [3], amphibians [4–6], insects [7,8], and mammals [9,10].

Peptides with antimicrobial activity have been classified by structure into two main categories, an α-helix family and a defensin family. Peptides in the α-helix family generally have a random coil structure in aqueous solutions, but are induced to assume a helical conformation in organic solvents such as trifluoroethanol or liposome suspensions. These α-helical peptides penetrate bacterial membranes and disrupt membrane structure by ion channel formation [11]. Defensin family peptides can be further divided into two subgroups according to their structural topology. Mammalian defensins have a triple β-sheet structure [12], while insect defensins form two-stranded β-sheets with a flanking α-helix [13]. All defensins contain three disulfide bonds, but the topology and spacing of these bonds vary between species. Defensins alter bacterial membrane structure by multimeric pore formation [14]. It has been hypothesized that electrostatic interactions and membrane potential are important factors in the insertion into membranes by defensins.

A third, but less well-characterized class of antimicrobial peptides consists of those that do not belong to either of the two structural categories described above. Two such peptides are attacin [15] and apidaecin [16]. These peptides have been shown to be bacteriostatic rather than bacteriolytic, and thus exhibit their antimicrobial activity only with growing bacterial cells. Little is known about the structure of these peptides.

α-Helical peptides have been shown to act on a broad spectrum of microbes ranging from Gram-positive and Gram-negative bacteria to fungi and protozoa. The defensins, however, act only on Gram-positive bacteria, and attacins show activity against only a few species of Gram-negative bacteria. From a pharmaceutical standpoint, the hemolytic activity of selected antimicrobial peptides is another important factor to consider. For example, antimicrobial peptides from amphibian species have very little hemolytic activity. The properties of individual peptides that lead to the variations in antimicrobial and hemolytic activities that exist among such peptides are not well understood for the following reasons. First, the lipid compositions of membrane bilayers differ among the various microbial species and influence peptide function. Second, other characteristics of bacterial and fungal membranes such as glycosylation, sterol content, and membrane potential affect the ability of a peptide to interact with a lipid bilayer.

Proline has long been recognized as a helix-breaking amino acid, as a result of its lack of a hydrogen-bonding donor group and its steric hindrance of hydrogen bonding of the adjacent

*Correspondence to* B.-S. Choi, Department of Chemistry, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon, 305-701, Korea.
Fax: + 82 42 8692810, Tel.: + 82 42 8692868. E-mail: bschoi@kaist.ac.kr
*Abbreviations*: L/P ratio, lipid to peptide ratio.
* *Present address*: PENCE, 713 Heritage Medical Research Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta T6G 2S2, Canada.
(Received 15 July 1999, accepted 5 October 1999)

ELSEVIER

Plant Science 147 (1999) 157–163

PLANT SCIENCE

www.elsevier.com/locate/plantsci

# Molecular cloning and characterization of a class III chitinase in pumpkin leaves, which strongly binds to regenerated chitin affinity gel☆

Min Gab Kim [a], Kyun Oh Lee [a], Na Eun Cheong [a], Yeon Ok Choi [b], Jin Hee Jeong [a], Moo Je Cho [a,b], Sun Chang Kim [c], Sang Yeol Lee [a,b,*]

[a] *Department of Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, South Korea*
[b] *Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Chinju 660-701, South Korea*
[c] *Department of Biological Science, KAIST, Daejeon, South Korea*

Received 26 January 1999; received in revised form 25 May 1999; accepted 3 June 1999

**Abstract**

A class III chitinase (PL-ChtIII) with a molecular weight of 29 kDa was purified to homogeneity from pumpkin leaves using regenerated chitin affinity gel and high-performance liquid chromatography Mono-Q anion exchange column chromatography. In contrast to other class III chitinases reported in plants, the PL-ChtIII strongly binds to regenerated chitin gel column, which can provide a convenient tool for the enzyme purification. An oligonucleotide probe derived from the N-terminal amino acid sequence of the purified PL-ChtIII was used in cloning the cDNA. The full-length cDNA of the *PL-ChtIII* clone consists of 27 and 128 binding pairs (bp) of 5′- and 3′-untranslated region, respectively, and 864 bp of open reading frame. The deduced amino acid sequence of the clone shares significant homology with plant class III chitinase enzymes. The nucleotide sequence of the *PL-ChtIII* cDNA predicts the synthesis of a preprotein, which is subsequently processed into a mature protein by removal of an N-terminal signal peptide. The protein contains six cysteine residues conserved in all class III chitinases at their invariant positions. Expression of *PL-ChtIII* mRNA is significantly induced within 1–3 h by the treatment of fungal elicitor or glycol chitin, but the expression of PL-ChtIII protein maximally occurred 12 h after the elicitor treatments. © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

*Keywords:* Binding to regenerated chitin gel; Class III chitinase; Cysteine rich domain; Pumpkin leaves

## 1. Introduction

Chitinases (EC 3.2.1.14) in higher plants catalyze the hydrolysis of chitin, a linear homopolymer of β-1,4-linked *N*-acetylglucosamine residues, into oligomer or monomer [1]. In plant cells, chitinase is induced by pathogenic attack [2], wounding [3] and plant hormones [4], as well as by a number of other environmental stimuli [5]. The induction of chitinases is often co-ordinated with the induction of specific β-1,3-glucanases and other pathogenesis-related proteins [6]. Most plants possess a number of chitinase isozymes that differ in primary structure, molecular weight, isoelectric point, and subcellular localization [7]. Molecular cloning of chitinases from various plants has facilitated the classification of these proteins. At least four classes of plant chitinases have been proposed [8] based on their primary structures: Class I chitinases contain an N-terminal cysteine-rich domain of approximately 40 amino acids and a highly conserved main structure separated by a variable hinge region. Class II chitinases lack the N-termi-

☆ The nucleotide sequence reported in this paper has been submitted to the GenBank under accession number AF082284.

* Corresponding author. Present address: Department of Biochemistry, College of Natural Science, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, South Korea. Tel.: +82-591-751-5958; fax: +82-591-759-9363.

*E-mail address:* sylee@nongae.gsnu.ac.kr (S.Y. Lee)

0168-9452/99/$ - see front matter © 1999 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.
PII: S0168-9452(99)00108-9

# Interactions of the Novel Antimicrobial Peptide Buforin 2 with Lipid Bilayers: Proline as a Translocation Promoting Factor†

Satoe Kobayashi,‡ Kenta Takeshima,§ Chan Bae Park,‖ Sun Chang Kim,‖ and Katsumi Matsuzaki*,§

*Graduate Schools of Pharmaceutical Sciences and Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan, and Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea*

*Received February 29, 2000; Revised Manuscript Received May 8, 2000*

ABSTRACT: Buforin 2 is an antimicrobial peptide discovered in the stomach tissue of the Asian toad *Bufo bufo gargarizans*. The 21-residue peptide with +6 net charge shows antimicrobial activity an order of magnitude higher than that of magainin 2, a membrane-permeabilizing antimicrobial peptide from *Xenopus laevis* [Park, C. B., Kim, M. S., and Kim, S. C. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun. 218*, 408–413]. In this study, we investigated the interactions of buforin 2 with phospholipid bilayers in comparison with magainin 2 to obtain insight into the mechanism of action of buforin 2. Equipotent Trp-substituted peptides were used to fluorometrically monitor peptide–lipid interactions. Circular dichroism measurements showed that buforin 2 selectively bound to liposomes composed of acidic phospholipids, assuming a secondary structure similar to that in trifluoroethanol/water, which is an amphipathic helix distorted around $Pro^{11}$ with a flexible N-terminal region [Yi, G. S., Park, C. B., Kim, S. C., and Cheong, C. (1996) *FEBS Lett. 398*, 87–90]. Magainin 2 induced the leakage of a fluorescent dye entrapped within lipid vesicles coupled to lipid flip-flop. These results have been interpreted as the formation of a peptide–lipid supramolecular complex pore [Matsuzaki, K. (1998) *Biochim. Biophys. Acta 1376*, 391–400]. Buforin 2 exhibited much weaker membrane permeabilization activity despite its higher antimicrobial activity. In contrast, buforin 2 was more efficiently translocated across lipid bilayers than magainin 2. These results suggested that the ultimate target of buforin 2 is not the membrane but intracellular components. Furthermore, buforin 2 induced no lipid flip-flop, indicating that the mechanism of translocation of buforin 2 is different from that of magainin 2. The role of Pro was investigated by use of a P11A derivative of buforin 2. The derivation caused a change to magainin 2-like secondary structure and membrane behavior. $Pro^{11}$ was found to be a very important structural factor for the unique properties of buforin 2.

Recently, a number of antimicrobial peptides composed of 15–40 amino acids have been discovered in various organisms (*1*). These peptides play significant roles in host defense against invading pathogenic microorganisms. Many of these peptides are considered to act on the lipid matrix of bacterial cell membranes, destroying the barrier property and killing the bacteria, although the actual mechanisms of action are still under argument. For magainin 2, a representative antimicrobial peptide discovered in the skin of the African clawed frog *Xenopus laevis* (*2–4*), we have proposed the following model. The peptide forms an amphipathic helix in lipid bilayers, which essentially lies parallel to the membrane surface (*5*). Five helices on average together with several surrounding lipids form a membrane-spanning pore comprising a dynamic, peptide–lipid supramolecular complex, which allows not only ion transport but also rapid flip-flop of membrane lipids (*6*). Upon disintegration of the pore, a fraction of the peptide molecules is stochastically translocated into the inner leaflet (*7, 8*). These processes can be controlled by modifying the peptide charge (*9*). This mechanism is universally applicable to other amphiphathic peptides such as mastoparan X (*10*) and PGLa (*11*).

In 1996, the antimicrobial peptide buforin 1 was isolated from the stomach tissue of the Asian toad *Bufo bufo gargarizans*, and a more potent peptide, buforin 2, was derived from buforin 1 (*12*). Buforins show much stronger antimicrobial activities against a broad spectrum of microorganisms compared with magainin 2. Interestingly, the mechanism of action of buforin 2 has been suggested to be different from those of membrane-acting peptides, although the physicochemical properties of the peptide are similar to those of other peptides in terms of amphipathicity and basicity (Table 1). Park et al. (*13*) reported that buforin 2 kills bacteria without cell lysis and has strong affinity for DNA and RNA, suggesting that the target of buforin 2 is not the cell membrane but intracellular nucleic acids. Indeed, buforin 1 was reported to show sequence homology with the N-terminus of histone H2A (*14*). Several peptides are also considered to have mechanisms of action other than membrane permeabilization (*15–18*). Even for these peptides, peptide–membrane interactions are important because

† Supported in part by the Mochida Memorial Foundation for Medical and Pharmaceutical Research, the Kato Memorial Bioscience Foundation, the Mitsubishi Foundation, and Novartis Foundation (Japan) for the Promotion of Science.

* To whom correspondence should be addressed: Telephone 81-75-753-4574; fax 81-75-761-2698; e-mail katsumim@pharm.kyoto-u.ac.jp.

‡ Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University.

§ Graduate School of Biostudies, Kyoto University.

‖ Korea Advanced Institute of Science and Technology.

10.1021/bi0004549 CCC: $19.00 © 2000 American Chemical Society
Published on Web 06/30/2000

FEBS Letters 467 (2000) 70–74 FEBS 23274

# Two carbohydrate recognition domains of *Hyphantria cunea* lectin bind to bacterial lipopolysaccharides through O-specific chain

Sang Woon Shin[a], Doo-Sang Park[a], Sun Chang Kim[b], Ho-Yong Park[a,*]

[a]*Insect Resources Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52 Eoun-Dong, Yusong, Taejon 305-333, South Korea*
[b]*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, South Korea*

Received 5 November 1999; received in revised form 27 December 1999

Edited by Shozo Yamamoto

**Abstract We previously identified a novel lectin cDNA from the fall webworm [Shin et al. (1998) Insect Biochem. Mol. Biol. 28, 827–837], which encodes two carbohydrate recognition domains (CRD-N and CRD-C) and is up-regulated following bacterial challenge. The lipopolysaccharide (LPS) binding activities of the recombinant CRD-N and CRD-C (rCRD-N and rCRD-C) were investigated by enzyme-linked immunosorbent assay. The LPS binding of rCRD-N and rCRD-C was pH-dependent: at pH below 6.0, they show a higher binding ability to LPS. The binding of the rCRD-N was inhibited by both D-mannose and *N*-acetyl-D-glucosamine, whereas the binding of the rCRD-C was inhibited only by D-mannose. The binding of both rCRD-N and rCRD-C to *Escherichia coli* was mainly mediated through the O-specific chain.**

**© 2000 Federation of European Biochemical Societies.**

*Key words:* Insect immunity; Carbohydrate recognition domain; Lipopolysaccharide binding; *Hyphantria cunea* lectin

## 1. Introduction

Injury and subsequent bacterial infection in insects stimulate a complex battery of defense responses, similar to the acute inflammatory response of mammals [1]. In most cases, hemocytes attach to pathogens and remove them by phagocytosis, nodule formation or encapsulation. Invasion of foreign pathogens may be recognized by plasma or hemocyte surface proteins that bind specifically to microbial cell wall components. Lectins are possible recognition molecules and may be involved in innate insect immunity. Previously, we identified a cDNA from a lepidopteran insect, *Hyphantria cunea*, that encodes a novel member of the C-type lectin superfamily with two different carbohydrate recognition domains (CRDs), namely CRD-N and CRD-C [2]. The deduced amino acid sequence of *H. cunea* lectin showed a significant similarity with the lipopolysaccharide (LPS) binding protein of the American cockroach, that is related in sequence to the C-type lectins of vertebrates [3,4]. Recently, the studies of BmLBP (LPS binding protein from *Bombyx mori*) and immunolectin revealed that they contain two different CRDs [5,6]. The amino acid sequence alignment of *H. cunea* lectin, BmLBP and immunolectin shows that C-type lectins with two CRDs are conserved in three lepidopterian insects, *H. cunea*, *B. mori* and *Manduca sexta* (Fig. 1).

While most members of the C-type lectins contain only a single carbohydrate binding domain, macrophage mannose receptor, phospholipase A2 receptor and DEC receptor contain either eight or 10 lectin domains [7]. This raises the question as to how three insect lectins, *H. cunea* lectin, BmLBP and immunolectin with two carbohydrate binding domains, relate to the multiple carbohydrate binding domains found in higher animals. It is speculated that an increased number of binding domains in the same molecule work cooperatively to enhance ligand avidity [8,9]. As part of the functional analysis of *H. cunea* lectin, we expressed the genes encoding each of CRD-N and CRD-C domains of *H. cunea* lectin in *Escherichia coli*, and characterized the binding specificity of the recombinant CRD-N and CRD-C (rCRD-N and rCRD-C).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Reagents

The following reagents were purchased from Sigma: LPSs from *E. coli* 026/B6 (L8274), *E. coli* O111/B4 (L2630), *E. coli* EH100 (L9641), *E. coli* F583 (L6893), *Klebsiella pneumoniae* (L4268), *Pseudomonas aeruginosa* (L9143) and *Serratia marcescens* (L6136); yeast mannan (M7504), D-glucose (G8270), D-mannose (M4625), D-galactose (G0750), D-fructose (F0127), *N*-acetyl-D-glucosamine (A8625), *N*-acetyl-D-galactosamine (A2795), L-fucose (F2252) and L-rhamnose (R3875).

### 2.2. Expression of CRDs in E. coli

The cDNA fragments encoding each of CRD-N and CRD-C domains were PCR-amplified with a pair of specific primers flanking each domain. The PCR products were cloned into the *Eco*RI and *Sal*I sites of the pET-21a(+) containing T7·Tag (Novagen, Madison, WI, USA). Plasmids with correct inserts were transformed into *E. coli* strain BL 21 (DE3)pLysS (Novagen). The recombinant rCRDs were expressed as insoluble inclusion bodies. The purified inclusion bodies were applied to a T7·Tag agarose affinity column. The eluents were subjected to refolding process by step-dialysis (urea concentration = 1 M, 0.5 M, 0.25 M and 0 M) against TBS buffer (20 mM Tris–HCl, 140 mM NaCl, 0.05% (w/v) $NaN_3$, pH 7.5) containing 0.05% (v/v) Tween-20 and 10 mM $CaCl_2$. The refolded proteins were dialyzed three times against distilled water at 4°C.

### 2.3. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA for C-type lectin-carbohydrates binding assay [10,11] was used to detect LPS binding activity of the rCRDs. Polysorp microtiter plates (Nunc, Denmark) were coated with LPS overnight in 100 μl of coating buffer (15 mM $Na_2CO_3$, 35 mM $NaHCO_3$, 0.05% (v/v) Tween-20, pH 9.5) at 4°C. The plates were washed three times with washing buffer (TBS buffer containing 0.05% Tween-20, pH 5.0) after each subsequent step. After coating, the plate was blocked with 1% (w/v) BSA in washing buffer for 1 h. The rCRDs (100 μl in washing buffer), T7·Tag antibody (100 μl of a 1:5000 dilution in washing buffer, Novagen), α-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate (100 μl of a 1:5000 dilution in washing buffer, Sigma) were added sequentially while washing between each step. All incubation steps were carried out at room temperature for 1 h. Alkaline phosphatase substrate,

*Corresponding author. Fax: (82)-42-860 4659.
E-mail: hypark@mail.kribb.re.kr

0014-5793/00/$20.00 © 2000 Federation of European Biochemical Societies. All rights reserved.
PII: S0014-5793(00)01127-3

# Structure–activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: The proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II

Chan Bae Park*, Kwan-Su Yi†, Katsumi Matsuzaki‡, Mi Sun Kim§, and Sun Chang Kim*¶

*Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Yusong-gu, Kusong-dong, Taejon 305-701, Korea; †Ontario Cancer Institute, University of Toronto, 610 University Avenue, Toronto, Canada; ‡Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan; and §Biomass Team, Korea Institute of Energy Research, Taejon 305-343, Korea

Edited by Bruce Merrifield, The Rockefeller University, New York, NY, and approved May 23, 2000 (received for review November 29, 1999)

**Buforin II is a 21-aa potent antimicrobial peptide that forms, in a hydrophobic medium, an amphipathic structure consisting of an N-terminal random coil region (residues 1–4), an extended helical region (residues 5–10), a hinge (residue 11), and a C-terminal regular α-helical region (residues 12–21). To elucidate the structural features of buforin II that are required for its potent antimicrobial activity, we synthesized a series of N- and C-terminally truncated or amino acid-substituted synthetic buforin II analogs and examined their antimicrobial activity and mechanism of action. Deletion of the N-terminal random coil region increased the antibacterial activity ≈2-fold, but further N-terminal truncation yielded peptide analogs with progressively decreasing activity. Removal of four amino acids from the C-terminal end of buforin II resulted in a complete loss of antimicrobial activity. The substitution of leucine for the proline hinge decreased significantly the antimicrobial activity. Confocal fluorescence microscopic studies showed that buforin II analogs with a proline hinge penetrated the cell membrane without permeabilization and accumulated in the cytoplasm. However, removal of the proline hinge abrogated the ability of the peptide to enter cells, and buforin II analogs without a proline hinge localized on the cell surface, permeabilizing the cell membrane. In addition, the cell-penetrating efficiency of buforin II and its truncated analogs, which depended on the α-helical content of the peptides, correlated linearly with their antimicrobial potency. Our results demonstrate clearly that the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II, and the cell-penetrating efficiency determines the antimicrobial potency of the peptide.**

In addition to the highly specific cell-mediated immune response, vertebrates and other organisms have a defense system made up of distinct groups of broad-spectrum antimicrobial peptides (1). One major group of such peptides includes short linear polypeptides (≈40 aa or less) that have been isolated from diverse species such as insects and mammals (1, 2). The largest family includes those polypeptides that are positively charged and that adopt an amphipathic α-helical structure. Well-known examples of α-helical peptides are the cecropins of insects and mammals (1) and histatins from human saliva (3). In amphibians, which are rich in antimicrobial peptides, many amphipathic α-helical antimicrobial peptides [such as magainins (4), bombinins (5), buforins (6), and dermaseptin (7)] have been isolated from glands in the skin and gastrointestinal tract. These cationic α-helical peptides possess a broad range of antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi, as well as protozoa (8–10). The precise mechanism of the broad-spectrum antimicrobial activity of these peptides is not yet fully understood. However, data revealed that these peptides attack the outer and inner membranes of bacteria, ultimately resulting in either disruption of the cell membrane (11) or cooperative permeabilization (12).

A 39-aa peptide, buforin I, was isolated from the stomach tissue of the Asian toad *Bufo bufo garagrizans*, and a more potent antimicrobial peptide of 21 amino acids, called buforin II, was derived from buforin I (6). Buforin II shows much stronger antimicrobial activity against a broad spectrum of microorganisms compared with other α-helical antimicrobial peptides (6). Interestingly, the action mechanism of buforin II has been suggested to be different from those of membrane-acting peptides, although the physicochemical properties of the peptide are similar to those of other α-helical peptides (13). Buforin II kills bacteria without cell lysis and has a strong affinity for DNA and RNA (13), suggesting the possibility that the target of buforin II is the intracellular nucleic acids, not the cell membranes. Buforin II has a helix-hinge-helix structure; the N-terminal extended helix includes residues 5 to 10, and the C-terminal helix includes residues 12 to 21. The helices are separated by a proline residue situated at amino acid position 11 (14). This two-helix organization and unique mode of action make buforin II a highly attractive candidate for deciphering the role of each structural element in conferring on buforin II its highly potent antimicrobial activity. In addition, structure-activity studies of buforin II may provide new insights into its unique molecular mechanism of antimicrobial action. In this study, we designed a series of structurally altered synthetic buforin II and determined their antimicrobial potencies and secondary structures. The mechanisms of bacterial killing action for buforin II analogs are also studied.

BIOCHEMISTRY

## Materials and Methods

**Design of Buforin II Analogs.** A series of truncated, amino acid-substituted, and laboratory-designed synthetic analogs of buforin II was synthesized to investigate the role of each structural element of buforin II in conferring highly potent antimicrobial activity. The ribbon model of buforin II is presented in Fig. 1, and the sequences of the peptides and their designations are given in Table 1. Buforin II was truncated progressively from its N-terminal random coil region to residues 5 to 21, 6 to 21, 7 to 21, 8 to 21, 9 to 21, 10 to 21, and 11 to 21 to evaluate the contribution of the N-terminal random coil and extended helical region to its antimicrobial activity. To examine the role of the C-terminal

This paper was submitted directly (Track II) to the PNAS office.

Abbreviations: cfu, colony-forming unit; PI, propidium iodide; FACS, fluorescence-activated cell sorter.

¶To whom reprint requests should be addressed. E-mail: sckim@mail.kaist.ac.kr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "*advertisement*" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Article published online before print: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10.1073/pnas.150518097. Article and publication date are at www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.150518097