

말벌 독성 물질과 그 유도체의 인지질 막 환경에서의 상호작용

이 봉 헌* · 박 흥 재
부산대학교 화학과 · 인제대학교 환경학과
(1997년 7월 20일 접수)

Interaction of Hornet Venom and its Derivatives in the Phospholipid Membrane Environment

Bong-Hun Lee* and Heung-Jai Park
Dept. of Chemistry, Pusan Nat'l Univ., Pusan, 609-735
Dept. of Environmental Science, Inje Univ., Kimhae, 621-749
(Manuscript received 20 July 1997)

Toxic Mastoparan B(MP-B) which is purified from the venom of the hornet *Vespa basalis* is a cationic amphiphilic tetradecapeptide. MP-B and its Ala-substituted analogues were synthesized by solid phase method and the toxic peptide-membrane interactions were examined by circular dichroism(CD) spectra, fluorescence spectra, and leakage abilities in phospholipid membranes. In the presence of phospholipid vesicles, synthetic MP-B and its analogues formed amphiphilic α -helical structures, but in the buffer solution, those exhibited random coil conformation as measured by CD. Fluorescence spectra of MP-B and its analogues which indicated the binding affinity of peptide on phospholipid vesicles showed that the replacement of Lys at position 2 and 11 with Ala caused a remarkable effect in the blue shift and that at position 2, in the leakage ability of the peptide.

Key words : hornet venom, toxic peptide, leakage ability, phospholipid membrane

1. 서 론

다양한 해양생물, 양서류, 곤충등과 같은 생물체로 부터 분비 또는 추출되는 천연 화합물의 많은 종류가 세포 독성을 지니며 주로 염기성이고 양친매성을 가지는 펩티드들로 알려져 있다. 이 중에는 개구리의 피부에서 발견되는 높은 항균성과 낮은 용혈활성을 가지는 23-잔기의 magainins와 꿀벌의 독액으로 부터 추출된 높은 용혈활성을 가지는 26-잔기의 melittin 그리고 말벌의 독액으로 부터 추출된 높은 독성과 낮은 용혈활성을 가지는 Mastoparan 관련 독성 펩티드들이 있다(Cornut et al., 1994). 이중 말벌의 독액중에는 histamine, serotonin 등을 비롯하여 각종 아민류가 포함되어 있고, phospholipase A₂, hyaluronidase, proteriyase 등의 각종 효소가 있으며, 용혈작용, 소염작용, 비만세포 탈과립작용, 신경독으로 작용하는 각종 저분자의 펩티드가 포함되어 있다(Haberman, 1992).

최근에 대만에 서식하고 있는 가장 독성이 강한 말벌의 한 종류인 Hornet *Vespa basalis*의 독액으로 부터 Ho 등(1993)에 의해 1991년에 Mastoparan족 독성 펩티드중 Mastoparan B가 처음 추출되었는데, 이 펩티드는 14개의 아미노산으로 구성되어 있고, C-말단이 아

미드화되어 있는 양이온성 peptide이다. Mastoparan B의 1차 구조는 Leu-Lys-Leu-Lys-Ser-Ile-Val-Ser-Trp-Ala-Lys-Lys-Val-Leu-NH₂로 밝혀졌다. 이전까지는 꿀벌독(honeybee venom)에 의한 국소 부종, 뱀독(snake venom)에 의한 국소 부종과 괴사에 대해서는 많이 연구가 되었으나, 말벌독(hornet venom)에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있었다.

Mastoparan B는 1, 2, 5, 8, 9 위치에 비교적 소수성이 작거나 극성인 잔기들을 가지고 있으므로 분자전체에 보다 많은 친수성 영역을 부여하게 되어 다른 Mastoparan족들 보다 더 많은 양친매성을 유지하게 된다(Ho et al., 1994). Mastoparan B와 같은 basic amphiphilic α -helical peptide들은 산성 리포솜과 중성 리포솜의 fusion 및 destabilization을 야기하며 α -helical content가 증가할수록 산성 리포솜의 fusion 능력이 증가되는 것으로 알려져 있다. 실제로 Mastoparan B가 막과 상호작용 함에 있어서 우선적으로 내부전하의 영향인 정전기적 인력에 의해 서로 접근하게 되지만, 궁극적으로는 Mastoparan B의 소수성 영역과 막의 소수성 영역에 의한 상호작용으로 인해 막 안으로 침투하는 것으로 알려져 있다. 최근에 Mastoparan B의 각 잔기

를 치환하여 활성과 구조의 변화를 관찰하여 막과의 상호작용에 관한 메커니즘을 밝히고자 하는 노력들이 활발히 진행되고 있으며, 특히 NMR을 통해서 Mastoparan B의 3차 구조가 해석되었다(Chang et al., 1996).

본 연구에서는 14개로 구성된 Mastoparan B의 소수성 영역과 친수성 영역의 경계면에 있는 Lys², Lys¹¹ 그리고 친수성 영역안에 있는 Leu¹, Ser⁵, Ser⁸을 각각 Ala¹로 치환하여, 양친매성과 소수성도가 다른 Mastoparan B 유도체들이 막과 상호작용시 막에 대한 친화력 외에도 막과 결합했을 때 독성 펩티드의 구조적인 변화에 영향을 미치는 잔기를 찾음으로써 막과의 상호작용에 대한 메커니즘 및 활성 변화에 대하여 알아보았다.

2. 실험

2.1 벌독 Mastoparan B 및 그 유도체의 합성

Mastoparan B 및 그것의 Ala-치환 유도체들을 고상 합성법으로 합성하였다. 사용된 수지의 양은 0.1mmol (0.2083g)(Fmoc-NH SAL Resin)이었고, 각 아미노산 유도체는 4당량씩 반응시켰다. 보호 펩티드-수지의 단리 및 탈 보호는 TFA/phenol/EDT/H₂O/TIS(81.5:5:2.5:5:1)의 혼합용액을 사용하여 실행했다. 여기서 얻어진 미정제 펩티드를 Sephadex G-25로 겔 여과한 후 RP-HPLC와 FAB-mass spectroscopy 그리고 아미노산 조성분석으로 순도, 분자량 및 조성을 확인하였다.

2.2 벌독 펩티드의 정제 및 분석

수지로 부터 단리된 미정제 펩티드(crude peptide)를 Sephadex G-25를 이용하여 겔 여과 크로마토그래피를 실행하여 salts를 제거, 1차 정제하였다. 전개용매는 10% 초산을 사용했고 fraction collector를 이용해서 각 분획을 2ml씩 받았다. 트립토판 잔기의 흡수파장인 UV 280nm와 펩티드 결합의 흡수파장인 220nm 그리고 일반 아미노산들의 흡수파장인 214nm에서 높은 흡광도를 나타내는 분획을 모아서 동결 건조시켰다. 합성된 펩티드의 분자량 확인은 VG70-VSER Mass Spectrometer를 이용해서 확인하였으며 아미노산 조성분석을 이용해서 1차 구조를 확인했다.

2.3 말벌 독성 물질과 phospholipid membrane과의 상호 작용 측정

2.3.1 Egg-Yolk로 부터 PC(phosphatidyl choline) 추출

50~60g의 난황 3개에 이 무게의 2배에 해당하는 cold acetone을 첨가하여 약 15분간 혼합하였다. 이것을 감압 필터하여 노란색 분말만을 취해서 acetone과 같은 양의 98% ethanol을 넣고, 1시간 동안 혼합하였다. 다시 감압 필터하여 침전은 버리고 용액만 취하여 35℃ 이하에서 감압 증발시킨 후 소량의 petroleum ether로 완전히 녹이고 여기에 cold acetone을 첨가하여 1시간 이상 방치하였다. 용액을 버리고 얻어진 침전을 다시 chloroform에 녹여 column chromatography

(2.5×350mm, 실리카겔)로 PC를 얻었다.

2.3.2 양배추로 부터 PLD 추출

약 100g의 양배추에 소량의 물을 섞어 잘게 부수어 거르기로 거른 후 용액을 취하여 15분간 원심분리(8000rpm, 4℃)하였다. 원심분리후 용액만 취하여 55℃에서 잘 흔들어 준 후 얼음을 채워 약 20분간 방치하였다. 원심분리(3500rpm, 20분간)하여 상층액을 모아 약 2배의 cold acetone으로 흔들어 준 후 2500rpm에서 5분간 다시 원심분리하여 침전만을 모아 동결건조시켜 PLD를 얻었다.

2.3.3 효소반응에 의한 PG(phosphatidyl glycerol) 합성

양배추로 부터 추출한 PLD를 완충용액(100mM acetic acid, 0.55495g CaCl₂, 5ml glycerol, pH 5.6)에 잘 섞은후, 300mg의 PC를 50ml의 ethylether에 녹인다. 이 둘을 혼합하면서 반응시켜(35℃ 이하) PG를 합성하였다.

2.3.4 리포솜(liposome) 제조

약 20mg의 인지질(phospholipid) 혼합물을 500ml 둥근바닥 플라스크에 넣어 소량의 CHCl₃-MeOH(2:1, v/v)로 완전히 녹였다. 감압 증발기로 유기용매를 완전히 제거하고 인지질이 플라스크 벽에 골고루 잘 발리게 되면 여기에 100mM의 글루코오스가 포함되어 있는 4ml의 Tris 완충용액(2mM EDTA, 10mM Tris, pH 7.5)을 넣어 vortex mixer로 흔들어 인지질이 완충용액에 잘 현탁되도록 하였다.

2.3.5 CD(circular dichroism) 스펙트라 측정

독성 펩티드-인지질 막의 상호작용시 2차 구조변화에 대한 영향을 관찰하기 위한 CD spectra를 JASCO J-600 spectropolarimeter(quartz cell, 1mm path-length)를 이용하여 25℃에서 buffer solution, 중성 및 산성 liposome하에서 측정하였다.

2.3.6 형광 스펙트라 측정

JASCO FP-550A Spectrofluorophotometer를 사용하여 25℃, 515nm에서 펩티드들의 형광 스펙트라를 측정했다. 펩티드내의 트립토판 잔기의 흡수파장인 280nm에서 excitation한 후 320nm부터 400nm까지 트립토판의 방출 스펙트럼을 관측하였다. 20mM의 Tris-HCl buffer에서 리포솜(PC와 PC/PG(3:1))이 있을 때와 없을 때의 방출 극대점을 비교하였다.

2.3.7 유출 능력(leakage ability) 실험

리포솜 함유물의 유출은 Weinstein법(Weinstein et al., 1997)에 의해 형광 염료인 carboxyfluorescein (CF)으로 측정하였다. 100mM CF를 함유하는 리포솜을 앞의 과정과 동일하게 sonication하여 만들었고, Sephadex G-50 칼럼에 통과시켜 리포솜에 함유되지 않은 CF를 제거하였다. 220μM의 리포솜에 2μM의 각

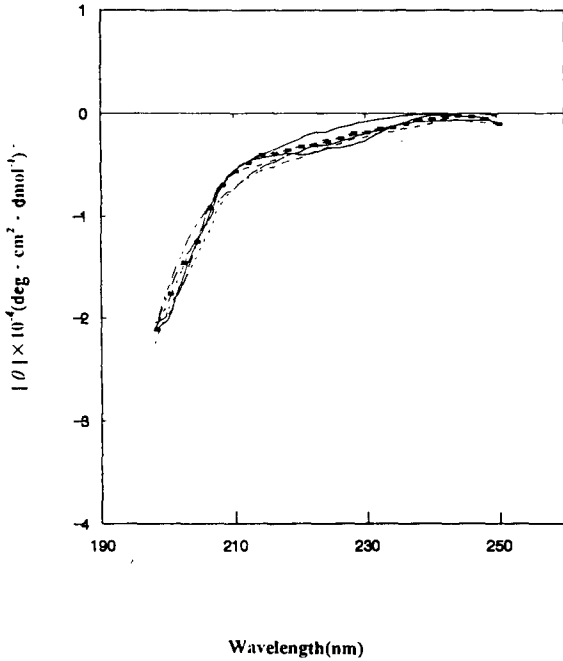


Fig. 1. CD spectra of Mastoparan B and its derivatives in buffer solution.

Mastoparan B(—), [Ala¹]-MP B(—), [Ala²]-MP B(—), [Ala⁵]-MP B(---), [Ala⁸]-MP B(-·-·), [Ala¹¹]-MP B(-·-·).

펩티드를 넣은 후 25분 동안 CF의 형광 변화를 측정하였다. 펩티드를 넣지 않은 경우를 기준점(영점)으로 잡고 Triton-X 100을 넣은 경우의 형광 세기를 100으로 잡아서 각 펩티드들을 넣었을 경우에 나타나는 상대적인 형광 세기를 %로 나타내었다.

3. 결 과

3.1 CD 스펙트라

펩티드-막의 상호작용시 2차 구조변화에 대한 영향을 관찰하기 위한 CD spectra를 Fig. 1, 2, 3에 각각 나타내었다. 완충용액에서 Mastoparan B와 유도체들은 모두 random한 구조를 취하고 있으며 중성 리포솜인 PC의 존재하에서는 [Ala¹]-MP B는 random한 구조이고 나머지는 다소 차이는 있으나 208nm와 222nm 부근에서 negative한 w자형의 전형적인 α -helical 구조를 취하는 것으로 나타났다. 산성 리포솜인 PC/PG(3:1)의

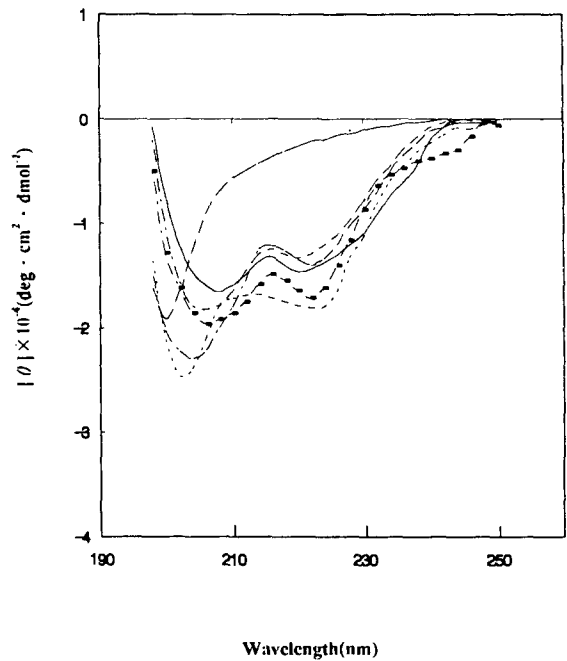


Fig. 2. CD spectra of Mastoparan B and its derivatives in neutral liposome(EYPC).

Mastoparan B(—), [Ala¹]-MP B(—), [Ala²]-MP B(—), [Ala⁵]-MP B(---), [Ala⁸]-MP B(-·-·), [Ala¹¹]-MP B(-·-·).

존재하에서는 Mastoparan B와 유도체들은 모두 208nm와 222nm 부근에서 PC에서 보다 더 강한 negative한 w자형의 전형적인 α -helical 구조를 취하는 것으로 나타났다. 계산된 α -helical content는 PC에서 [Ala⁸]-MP B(53%) > [Ala²]-MP B(50%) > Mastoparan B(43%) > [Ala⁵]-MP B(42%) > [Ala¹¹]-MP B(40%) > [Ala¹]-MP B(23%)의 순서로 나타났고, PC/PG(3:1)에서는 [Ala²]-MP B(66%) > [Ala¹]-MP B = [Ala⁸]-MP B(59%) > Mastoparan B = [Ala⁵]-MP B(57%) > [Ala¹¹]-MP B(52%)의 순서로 나타났다.

3.2 형광 스펙트라

Mastoparan B가 생물 활성을 나타내는 주요 원인은 막과의 친화도 때문이다. 양친매성과 소수성도 그리고 α -helical 구조가 서로 다른 펩티드의 막침투 능력을 알아보기 위해 Trp 잔기의 흡광정도를 측정하였다. Con-

Table 1. Blue shifts of Mastoparan B and its derivatives in liposome

peptide	Emission Maxima(nm)			shift	
	control	PC	PC/PG(3:1)	PC	PC/PG(3:1)
[Ala ¹]-MP B	358	358	354	0	4
[Ala ²]-MP B	359	356	342	3	17
[Ala ⁵]-MP B	357	357	352	0	5
[Ala ⁸]-MP B	357	356	347	1	10
[Ala ¹¹]-MP B	354	355	340	1	14
Mastoparan B	361	360	353	1	8

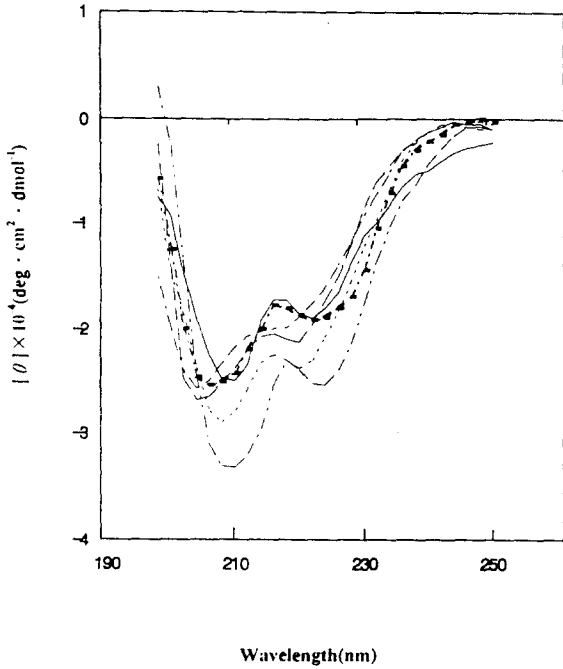


Fig. 3. CD spectra of Mastoparan B and its derivatives in acidic liposome(EYPC/EYPG). Mastoparan B(—), [Ala¹]-MP B(—), [Ala²]-MP B(—), [Ala⁵]-MP B(---), [Ala⁸]-MP B(---), [Ala¹¹]-MP B(---).

trol과 비교했을 때 중성 리포솜인 PC에서 단파장으로 이동(blue shift)의 정도는 0~3nm의 blue shift로 거의 변화가 없었다. 그러나 산성 리포솜인 PC/PG(3:1)에서 단파장으로 이동의 정도는 Table 1에 나타난 것처럼 소수성도가 클수록 단파장으로서의 이동이 컸으며, 이동의 순서는 [Ala²]-MP B ≅ [Ala¹¹]-MP B > [Ala⁸]-MP B ≅ Mastoparan B > [Ala⁵]-MP B ≅ [Ala¹]-MP B로 나타났다. 중성 리포솜에서 보다 산성 리포솜에서 더 큰 단파장으로서의 이동이 생기는 것은 산성 리포솜의 음전하와 펩티드의 양전하간의 상호작용이 중성 리포솜에서 보다 더 크게 작용하여 막으로 침투가 더 잘 일어나는 것으로 여겨진다.

3.3 리포솜 내부 함유물의 유출 실험 결과

단백질이나 펩티드가 막의 지질 이분자층에 결합하게 되면 막의 결합상태에 변화를 초래하며 동시에 막 투과성에 변화를 나타낸다. 이러한 막과 펩티드간의 상호작용에 대한 연구가 활발히 진행중이며(Lee et al., 1992), 본 연구에서는 펩티드가 인공막(인지질막)과 결합했을 때 리포솜 내부에 함유시킨 형광 색소인 CF의 유출능력을 각 펩티드에 대해 조사하였다. 이러한 유출능력은 막과의 친화도로 이해할 수 있으며, 각 펩티드의 유출능력을 측정함으로써 막과의 친화도 및 침투능력을 이해할 수 있다. Fig. 4, 5에 펩티드들의 형광 색소(CF) 유출능력을 시간 함수로 도시하여 중성과 산성 리포솜에서

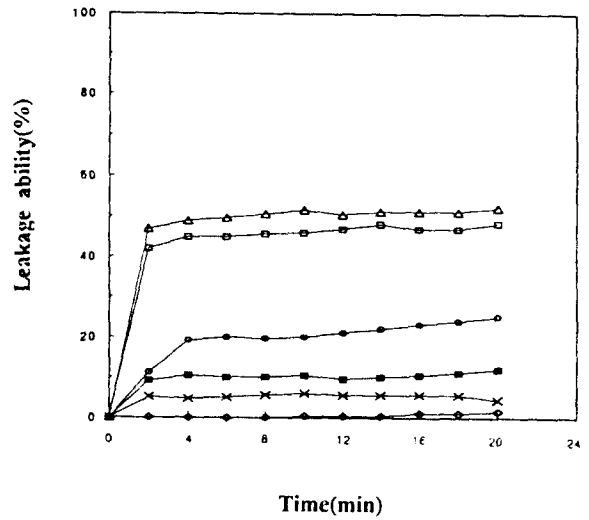


Fig. 4. Leakage of carboxyfluorescein in EYPC liposome.

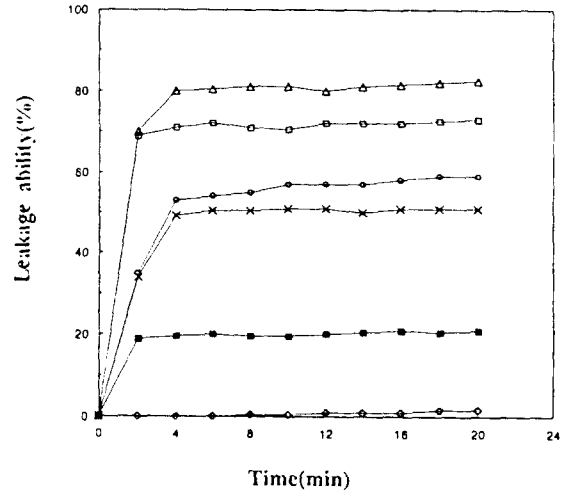


Fig. 5. Leakage of carboxyfluorescein in EYPC/EYPG(3:1) liposome. Mastoparan B(●), [Ala¹]-MP B(◊), [Ala²]-MP B(◄), [Ala⁵]-MP B(⊖), [Ala⁸]-MP B(✕), [Ala¹¹]-MP B(⊕). Concs. of peptide and liposome were 2 μM and 220 μM.

의 유출능력을 비교하였다. 중성 리포솜에서 펩티드들의 유출능력은 [Ala²]-MP B의 경우 약 50%를 나타내었으며, 다른 펩티드들은 그 이하의 유출능력을 나타내었고 산성 리포솜에서 보다 약 30~50% 정도 감소하는 유출능력을 나타내었다. 산성 리포솜에서는 [Ala²]-MP B의 경우 약 80% 정도의 유출능력을 나타내었고 산성 리포솜과 중성 리포솜 둘 다에서 약 3분 이내에 모든 펩티드들이 최대 유출능력을 나타내었다. 그러나 [Ala¹]-MP B의 경우에는 두 가지 리포솜에 대해 거의 유출능력을 나타내지 않았다.

4. 토 론

Mastoparan B 및 유도체들의 막과의 상호작용시 2차 구조변화를 관찰하기 위한 CD spectra에서 막과의 상호작용이 없는 완충용액에서는 펩티드들이 거의 random한 형태를 취하며, 중성 리포솜에서는 약하긴 하지만 208nm와 222nm 부근에서 negative한 w자형의 전형적인 α -helical 구조를 취하는 것으로 보였고, 산성 리포솜에서는 중성 리포솜에서 보다 더 명확한 α -helical 구조를 취하는 것으로 나타났다. 이렇게 중성 리포솜보다 산성 리포솜에서 더 큰 α -helical 구조를 취하는 것은 산성 리포솜내의 음전하(-1)와 펩티드의 Lys 잔기에 의해 제공되는 양전하(+3) 간의 상호작용이 우선적으로 작용하며, 2차적으로는 소수성도가 큰 펩티드일수록 리포솜내의 소수성 환경에 잘 적응하여 막으로의 침투가 더욱 용이해지는 것으로 생각된다.

친수성 영역에 있는 잔기들을 소수성 잔기인 Ala으로 치환한 유도체들이 대부분 큰 구조적 변화와 유출 능력을 나타내었고, 특히 Lys²을 Ala으로 치환한 유도체가 Mastoparan B와 다른 유도체들에 비해 큰 구조적 변화와 유출 능력을 나타내었다. 그러나 1번 Leu을 Ala으로 치환한 유도체는 Mastoparan B 보다 구조적 변화가 적고 유출 능력도 거의 나타내지 않았다.

1번 Leu을 Ala으로 치환한 유도체의 경우 적은 구조적 변화와 활성을 나타내는데 이것은 Leu 보다 소수성이 낮은 Ala으로 치환하여 전체적인 소수성도가 낮아지게 되므로 막과의 2차적인 상호작용을 적게하는 것으로 보인다. 이전의 NMR 해석에 의하면 1-2번 까지의 잔기가 α -helix 구조에 별다른 영향을 보이지 않는 것으로 알려져 있는데 2번 Lys을 Ala으로 치환한 유도체의 경우, 다른 유도체들에 비해서 큰 구조적 변화와 유출능력을 나타낸다. 이것은 α -helix 구조 형성에 있어서 가변성 잔기인 Lys 대신 α -helix 형성을 추구하는 Ala으로 치환한 것이 원인인 것으로 판단된다. 또한 소수성 영역과 친수성 영역에 위치한 까닭에 소수성 Ala으로 치환한 결과, 분자 전체의 소수성도가 증가하여 막과의 2차적인 상호작용을 많이 하는 것으로 보인다. 5번과 8번 Ser을 소수성 Ala으로 치환한 유도체는 둘다 Lys을 소수성 Ala으로 치환한 유도체들보다 적은 구조적 변화와 유출 능력을 나타낸다. 이것은 Lys 보다 친수성이 덜한 Ser을 소수성 Ala으로 치환했을 때 전체적인 소수성도

는 Lys 만큼 증가하지 못하기 때문에 막과의 2차적인 상호작용시 Lys을 Ala으로 치환한 유도체 만큼 소수성 영향이 효과적이지 못한 것으로 생각된다.

결론적으로 양친매성은 생물활성을 위해서 반드시 필요한 조건이긴 하지만 같은 모체 peptide에서 유도된 peptide들 간의 활성에 있어서는 양친매성보다 소수성의 증가가 활성에 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단되며, 2번 Lys을 Ala으로 치환한 유도체의 경우 다른 유도체들에 비해서 큰 구조적 변화와 활성을 나타내었는데 이것은 2번 자리 Lys을 (-) 전하를 가지는 Asn, Asp로 치환한 유도체들과 비교했을 때와 유사한 결과를 나타내었다. 즉 Mastoparan B가 막과의 상호작용시 2번 Lys의 역할이 구조적 변화나 활성을 위해 다른 잔기들보다 중요한 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- Bailey, P. D. 1992, in *An Introduction to Peptide Chemistry*, pp. 67-69.
- Chang, C. C., Hwang, K. T., Yu, H. M., Wang, K. T., and Wu, S. H. 1996, *Biochem. Biophys. Acta.* 1292, 1-8.
- Cornut, I., Buttner, K., Dasseux, J. L. and Dufourcq, J. 1994, *FEBS Lett.* 5, 29-33.
- Danilenko, M., Worland, P., Carlson, B., Sausville, E. A., and Sharoni, Y. 1993, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196(3), 1296-1302.
- Haberman, E. 1992, *Science.* 117, 314-322.
- Ho, C. L., Hwang, L. L., Lin, Y. L., Chen, C. T., and Yu, H. M. 1994, *Eur. J. Pharm.* 259, 259-264.
- Lee, S., Aoki, R., Oishi, O., Aoyagi, H., and Yamasaki, N. 1992, *Biochem. Biophys. Acta.* 1103, 157-162.
- Weinstein, J. N., Yoshikami, S., Henkart, P., Blumenthal, R. and Hagins, W. A. 1997, *Science.* 195, 489-492.
- Yu, H. M., Wu, T. M., Chen, S. T., Ho, C. L., Her, G. R. and Wang, K. T. 1993, *Biochem. Mol. Bio. Inter.* 29(2), 241-246.