

항균활성을 보유한 재조합 *Pichia pastoris* 균주의 개발

강대욱 · 이준원 · 허건영 · 안종석*

한국생명공학연구원, 항암연구실

Development of a Recombinant Strain of *Pichia pastoris* with Antibacterial Activity

Dae Ook Kang, Joon Won Lee, Gun Young Hoe and Jong Seog Ahn*

Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology P.O. Box 115,
Yuseong Daejeon 305-600, Korea

Abstract

To develop a yeast strain of *Pichia pastoris* producing an antibacterial peptide, we have attempted the expression and secretion of an insect defensin. The nucleotide sequences corresponding to mature defensin were chemically synthesized by 6 oligomers, assembled *in vitro* and the synthesized gene was identified by nucleotide sequencing. The prepro sequence of yeast mating factor $\alpha 1$ and the defensin gene were recombined into a *Pichia* expression vector, pPIC9K. The resulting plasmid, pPIDE, was transformed into *P. pastoris* GS115 and transformants selected on histidine-deficient minimal plates were tested for antibacterial activity against *Micrococcus luteus*. Four strains with different antibacterial activity were selected for further analysis. Southern hybridization and RT-PCR verified the defensin gene was maintained and transcribed in a host. Four strains were cultivated in YPD broth for 96 hours to compare cell growth and antibacterial activity. They showed no difference in cell growth, however, each strain showed different antibacterial activity pattern with culture time. The maximal activity was about 550 AU/ml.

Key words – Defensin, *Pichia pastoris*, antibacterial activity, secretion, mating factor $\alpha 1$

서 론

식물, 곤충, 어류, 양서류, 인간 등에 널리 분포되어 있는 항균 펩티드들은 병원성 미생물에 대한 초기 면역반응을 수행하며, 열이나 알칼리 등에 의하여 항균활성이 거의 소실되지 않는 강한 물리·화학적 안정성을 가지고 있다. 포유동물의 defensin과 곤충의 defensin은 그람양성 세균의

세포막에 channel를 형성함으로써 여러 이온들을 유출시켜 항균활성을 나타낸다[4].

최근의 항생제 과다 사용은 항생제 내성 균주의 출현과 항생제의 식용 가축물에 잔류되어 궁극적으로 인간에게 흡수, 축적되는 부작용을 초래할 가능성이 높다. 이러한 항생제의 부작용으로 인해 항생제의 과다 사용을 규제하고 있는 추세이다. 따라서 항균 펩티드와 같이 잔류성의 위험이 없으며 내성 균주의 출현 가능성이 낮은 안전한 새로운 유형의 천연 항생물질의 이용기술개발이 요구된다. 최근에 활발히 연구되고 있는 다양한 종류의 항균 펩티드는 항균

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 042-860-4312, Fax :
E-mail : jsahn@mail.kribb.re.kr

활성범위가 광범위하며 기존의 항생제들과는 다른 기작에 의해 항균활성을 나타내므로, 내성을 유발할 가능성이 적다는 장점을 가지고 있다. 항균펩티드는 외부 미생물의 공격으로부터 자신을 방어하는데 중요한 역할을 하므로 항균 펩티드는 제약, 사료, 식품분야 등에서 산업적 응용 가능성이 매우 높으며 몇 개의 후보 항균 펩티드는 치료제로 개발하기 위해 임상시험 중이다 [5-7,10,12].

항균 펩티드의 산업적 이용을 위해서는 항균 펩티드의 경제적인 대량 생산법이 우선적으로 해결되어야 한다. 지금까지 많이 사용된 화학합성법은 항균펩티드의 아미노산 잔기가 증가할수록 합성단가가 늘어나 경제성이 떨어지며 대량생산이 불가능한 단점이 있다. 또한 disulfide bond, 카르복시 말단의 amidation, 당쇄(glycosylation) 등이 분자내에 있는 항균 펩티드의 합성은 더욱 복잡해진다 [12,22]. Martemyanov 등은 [15,16] cell-free system인 *in vitro* translation을 이용하여 cecropin의 생산을 보고하였다. 다른 방법으로서 대장균이나 효모와 같은 미생물 숙주를 이용한 재조합 항균 펩티드를 생산하는 것이다 [17]. 대장균에서는 다른 단백질과 융합하여 재조합 항균 펩티드를 생산하기 위한 연구가 시도되었다 [8,18,19]. 그러나 대장균은 원핵세포이므로 진핵세포의 특징인 단백질의 전사 후 변형이 일어나지 않아 불활성화된 항균펩티드가 과량 생성되어 시험관내에서 추가로 리폴딩 과정을 (refolding process) 거쳐야 하는 단점이 있으며 안전성의 문제점을 극복해야 하는 과제가 대두된다.

한편 효모세포를 숙주로 사용한 항균 펩티드의 생산은 *Saccharomyces cerevisiae*에서 주로 시도되었다. 그러나 *S. cerevisiae*는 일반적으로 재조합 단백질의 생산성이 낮으며 당쇄(glycosylation)의 양상이 고등세포와 비교해 비균질하고 과량(heterogenous hyper-glycosylation) 일어나는 단점이 있다 [9]. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위해서 non-*Saccharomyces* 효모인 *Pichia*나 *Hansenula*와 같은 메탄올 자화성 효모를 숙주로 사용하는 많은 연구가 시도되고 있다 [3,20]. 이러한 메탄올 자화성 효모는 값싼 배지를 사용하여 고농도 배양이 가능하고 메탄올 유도성 promoter가 존재하여 재조합 단백질의 생산성이 높은 장점이 있다. 또한 당쇄의 양상도 고등세포와 유사하다 [3, 9]. Kristen 등은 [11] 사탕무의 defensin을 *P. pastoris*에서 발현, 분비하고 정제하여 특성을 조사한 것을 보고하였다.

본 논문에서는 효과적인 항균 펩티드의 생산을 위한 생물계를 확립하기 위한 모델계로서 *P. pastoris*를 숙주로 사용하여 곤충 유래 항균 펩티드인 defensin을 활성형으로 분비한 내용에 관해 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 플라스미드

항균 펩티드 defensin의 발현을 위한 숙주로 *P. pastoris* GS115 [*his4*]를 Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 항균활성을 측정하기 위해 *Micrococcus luteus* IAM1056을 KCTC (Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받아 시험균으로 사용하였다. Defensin의 발현 및 분비를 위해 alcohol oxidase 1 유전자(AOX1)의 promoter와 mating factor $\alpha 1$ (MF $\alpha 1$) prepro sequence를 함유하고 있는 플라스미드 pPIC9K를 Invitrogen에서 구입하였다.

Defensin 유전자의 합성

40개의 아미노산으로 구성된 mature defensin을 coding하는 유전자를 하나의 올리고머로 화학 합성하는 것이 기술적으로 불가능하므로 올리고머 F1, R1, F2, R2, F3, 및 R3로 나누어 합성하였으며 defensin 유전자의 5' 과 3' 말단에 해당되는 올리고머 F1와 R3의 5' 과 3' 말단에는 제한효소 인식부위 *Xba*I과 *Eco*RI이 각각 함유되게 합성하였다. 여섯 개의 올리고머로 나누어 합성한 defensin 유전자는 우선 중간 부위에 해당하는 올리고머 F2와 R2 가닥의 5' 말단을 동시에 인산화시키고 모든 올리고머를 같은 농도로 섞고 65℃로 5분간 가열한 후 상온까지 서서히 냉각하였다. DNA ligase 효소를 처리하고 재구성한 디펜신 합성유전자의 5' 말단을 인산화시켰다. 합성한 6개의 염기서열은 다음과 같다.

올리고머 F1 5'- CTA GAT AAA AGA GCT ACT TGT GAC TTG TTG TCT GGT ACC GGT ATC -3'

올리고머 R1 5'- TA TTT TCT CGA TGA ACA CTG AAC AAC AGA CCA TGG CCA TAG TTG GTG -3'

올리고머 F2 5'- AAC CAC TCT GCT TGT GCT GCT CAC TGT TTG TTG AGA GGT AAC AGA -3'

올리고머 R2 5'- AGA CGA ACA CGA CGA GTG

ACA AAC AAC TCT CCA TTG TCT CCA CCA -3'

올리고머 F3 5'- GGT GGT TAC TGT AAC GGT AAG
GCT GGT TGT GTT TGT AGA AAC TAA TAG -3'

올리고머 R3 5'- AAT TCA TTG CCA TTC CGA CAA
ACA CAA ACA TCT TTG ATT ATC AGC T -3'

MF α 1 preprosequence의 분리

생성된 항균펩티드를 세포 외로 분비시키기 위해 효모의 MF α 1 preprosequence를 이용하고 자 하였다. 제한효소 BamHI 인식부위를 함유하는 5' primer (CGAAGGAT-CCAAACGATGAG)와 XbaI 인식부위를 함유하는 3' primer (GCCTCTAGAGAGATACCCCTTC)를 사용하여 *Pichia*용 발현벡터인 pPIC9K를 template로 사용하여 QIAGEN (Valencia, CA, U.S.A.)사의 HotStart로써 PCR을 통해 MF α 1 preprosequence 240 bp DNA 단편을 분리하였다.

핵산의 분리

대장균에서 플라스미드 DNA의 분리는 QIAGEN사의 QIAprep miniprep kit를 사용하여 수행하였다. Southern hybridization을 위해서 *Pichia* 균주에서 QIAGEN Genomic-tip G/20을 사용하여 전체 게놈 DNA를 분리하였으며 RT-PCR을 수행하기 위한 전체 RNA의 분리는 동일 회사의 RNeasy mini kit를 사용하였다.

효모의 형질전환

최종적으로 제작한 defensin 분비벡터를 숙주인 *P. pastoris*의 염색체 DNA에 삽입하기 위해 재조합 플라스미드 pPIDE를 제한효소 SalI 을 처리하여 선형으로 만든 후 Invitrogen의 *Pichia* EasyComp Transformation kit를 사용하여 형질전환을 실시하였다.

Defensin을 분비하는 효모의 선별

아미노산 histidine이 없는 YNBD 한천배지 (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 2.0% dextrose, 2.0% agar)에서 일차 선별한 효모 형질전환체를 0.1 M phosphate 완충용액 (pH 7.0)을 함유하고 histidine이 없고 항생제 G-418 5 mg/ml을 함유한 YNBM (0.67% Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.5% methanol, 2.0%

agar, 100 mM potassium phosphate, pH 7.0) 한천배지에 tooth-picking하고 하룻밤 배양한 후 시험균인 *M. luteus* IAM1056 1%의 배양액을 함유한 NB agar (1.25% Bacto-heart infusion, 0.5% Bacto-nutrient broth, 0.25% Bacto-yeast extract, 0.8% agar) 10 ml을 붓고 30°C에서 24시간 배양한 후 시험균의 생육이 저해되어 균체주위에 생기는 투명환의 생성여부를 조사하여 활성형의 defensin이 분비되는 형질전환체를 선별하였다[13].

Defensin 유전자의 분석

숙주세포의 염색체 DNA에 삽입된 defensin 유전자가 유지되는 지를 확인하기 위해 Southern hybridization을 실시하였다. 형질전환체 4균주와 숙주세포에서 분리한 전체 게놈 DNA 10 μ g을 제한효소 BamHI과 EcoRI으로 절단하고 1.2% 아가로스겔에서 전기영동한 후 양전하를 띤 nylon membrane으로 진공 이동하고[11], 자외선 조사를 통해 고정하였다. Defensin 유전자를 함유한 120 bp DNA 단편을 PCR로써 증폭하고 정제한 후 Amersham Bioscience (Piscataway, NJ, U.S.A.)사의 Alkphos direct labeling and detection kit를 사용하여 labeling 하고 probe로 사용하여 hybridization을 수행하였다. 또한 defensin 유전자가 전사되어 생성된 mRNA를 확인하기 위해 QIAGEN Omniscript RT-PCR kit를 사용하여 위의 5균주에서 분리한 전체 RNA에서 RT-PCR을 실시하였다. agarose gel 전기영동 후 Southern hybridization을 하여 확인하였다.

효모세포의 배양

세포성장과 항균활성을 비교하기 위해 선별한 *Pichia* 형질전환체 4균주를 100 ml의 BMMY 배지(2% Bacto-peptone, 1% Bacto-yeast extract, 0.5% 메탄올, 0.1 M potassium phosphate, pH 6.5, 1.34% YNB, 0.00004% biotin)에서 30°C에서 96시간 진탕 배양하였다. 24시간 간격으로 배양액을 채취하여 600 nm에서 흡광도를 재어서 세포성장을 측정 한 후 원심분리하여 상등액을 회수하여 항균활성을 측정하였다.

항균활성의 정량적 분석

정량적으로 항균활성을 측정하기 위해 2% agar plate에 1%의 시험균 배양액을 함유한 배지(1.25% Bacto-heart

Defensin의 분비

플라스미드 pPIDE를 *HIS4* 유전자 내에 있는 인식부위 *SalI*으로 절단한 후 숙주인 *P. pastoris* GS115의 염색체 DNA의 *HIS4* 유전자에 삽입하기 위해 형질전환을 하였다. 아미노산 histidine이 없는 최소 배지에서 형질전환체를 일차로 선별한 후 이것을 0.5 mg/ml의 G-418을 함유하고 탄소원으로 0.5% 메탄올을 함유한 YNBM 아가배지에서 배양한 후 *M. luteus*의 생육저지를 통한 defensin의 분비를 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 플라스미드 pPIC9K로 형질전환된 숙주는 균체주위에 투명환이 관찰되지 않았으나 pPIDE로 형질전환된 숙주의 균체주위에는 활성형 defensin의 분비로 인해 시험균인 *M. luteus*의 생육이 저해되어 생긴 다양한 크기의 투명환이 존재하였다. 이 중 투명환의 크기로 대표적인 4 균주를 선별하고 1, 2, 3, 4 라 명명하였다(투명환의 크기: 3>1>4>2). 각 균주의 항생제 G-418 5 mg/ml에 대한 내성을 조사한 결과 투명환 크기의 양상과 일치하였다.

Defensin 유전자의 분석

숙주의 염색체 DNA에 삽입한 defensin 유전자를 확인하기 위해 선별한 4 균주와 음성 대조군인 pPIC9K 형질전

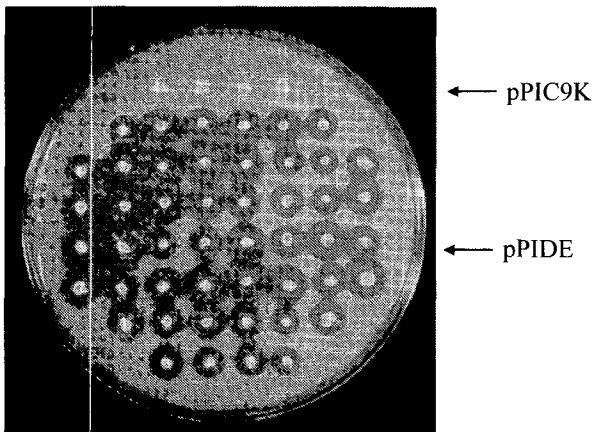


Fig. 3. Secretion of biologically active defensin from yeast transformants.

P. pastoris GS115 cells transformed with pPIDE were grown on YNBM agar media containing phosphate buffer, pH 7.0 at 30°C for 24 hr. The plates were overlaid with 10ml of 0.8% top agar containing 1% log-phase cells of *M. luteus* IAM1056 and followed by overnight incubation at 37°C.

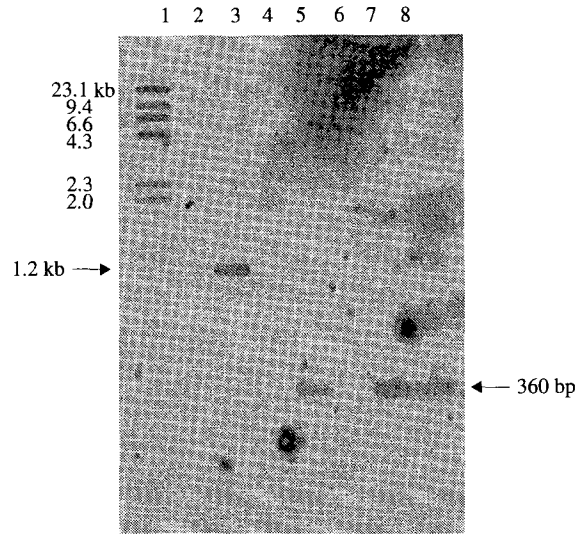


Fig. 4. Southern hybridization analysis of total genomic DNA isolated from transformants. Genomic DNAs were digested with *Bam*HI and *Eco*RI, fractionated in 1.2% agarose gel, and then transferred to positively charged nylon membrane. The membrane was hybridized with labeled defensin gene. Lane 1, λ -Hind III digest; 3, pUC19/defensin containing the synthesized defensin gene as a (+) control; 4, pPIC9K transformant; 5-8, pPIDE transformant 1-4.

환체에서 분리한 전체 게놈 DNA를 *Bam*HI과 *Eco*RI으로 절단한 후 defensin 유전자를 probe로 사용하여 Southern hybridization을 실시한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 플라스미드 pPIC9K로 형질전환된 숙주에서는 밴드가 나타나지 않았으나(lane 4) pPIDE 형질전환체에서는 MF α 1 prepro sequence와 defensin 유전자에 해당하는 360 bp 크기의 밴드가 투명환 크기의 양상과 비슷하게 관찰되었다(lane 5-8). Lane 3는 양성 대조군으로 defensin 유전자를 함유하고 있는 1.2 kb DNA 단편이다. 따라서 Southern hybridization을 통해 defensin 유전자가 숙주세포에서 유지됨을 확인하였다.

Defensin 유전자가 전사되어 생성된 mRNA를 확인하기 위해 위의 균주에서 분리한 전체 RNA를 template로 사용하여 RT-PCR을 수행하고 hybridization으로 확인한 결과를 Fig. 5A와 5B에 각각 나타내었다. 그림 5A는 RT-PCR후 생성물을 아가로스겔 전기영동으로 확인한 것으로 lane 1은 100 bp ladder이고 lane 2는 양성 대조군으로 MF α 1 prepro sequence와 defensin 유전자를 함유한 360 bp DNA 단편이고 lane 3은 음성대조군인 pPIC9K 형질전환

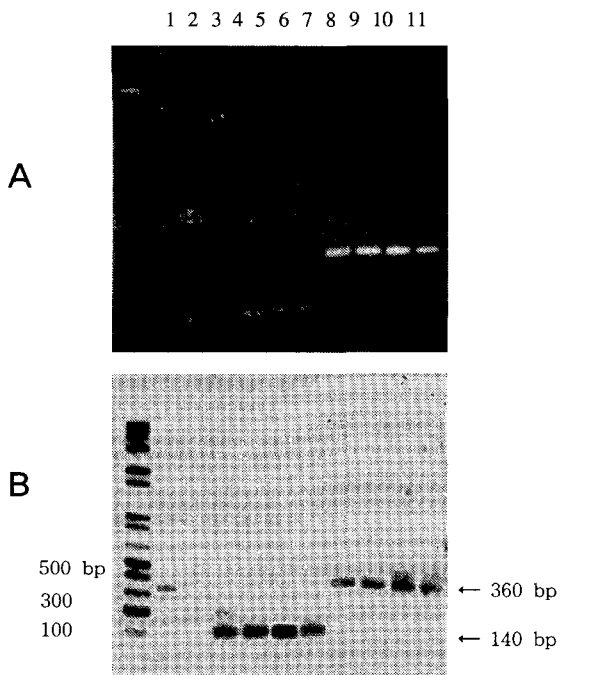


Fig. 5. RT-PCR and its Southern hybridization analysis. Defensin cDNA was amplified from total RNA isolated from transformants by RT-PCR and subjected to agarose gel electrophoresis(A) and Southern hybridization using defensin gene as a probe(B). Lane 1, 100 bp ladder; 2, (+) control; 3, pPIC9K transformant; 4 & 8, transformant 1; 5 & 9, transformant 2; 6 & 10, transformant 3; 7 & 11, transformant 4.

체이다. Lane 4-7은 pPIDE 형질전환체 1-4이고 defensin 유전자만을 증폭한 것으로 합성 defensin 유전자에 해당하는 120 bp의 band가 나타났다. 또한 lane8-11은 lane 4-7과 같은 시료를 MF α 1과 defensin 유전자를 동시에 증폭한 것으로 두 유전자를 함유하고 있는 양성 대조군(lane 2)과 같은 360 bp의 band가 관찰되었다.

Agarose gel에서 전기영동 한 것을 nylon membrane에 옮기고 defensin 유전자를 probe로 사용하여 Southern hybridization으로 확인한 결과를 Fig. 5B에 나타내었다. Lane 1은 시료의 밴드크기를 추정하기 위해 labeling한 100 bp ladder이며 나머지는 Fig. 5A의 lane과 동일하다. Fig. 5A에서 나타난 밴드들과 동일한 크기에서 양성 신호에 해당하는 밴드가 나타났다. 따라서 Fig. 5A의 RT-PCR로 증폭한 밴드들은 defensin mRNA에서 유래된 것을 확인하였다.

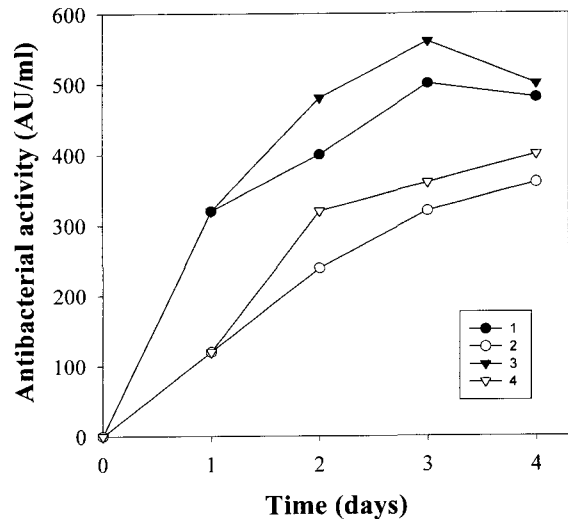
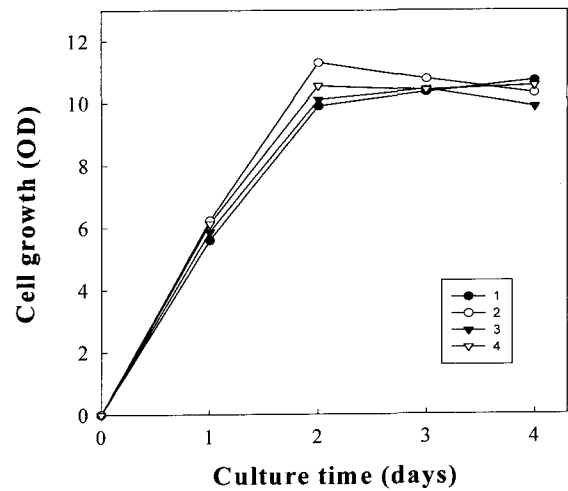


Fig. 6. Time courses of cell growth and antibacterial activity of transformants.

Four transformant strains were grown in 100 ml of BMMY media at 30°C for 96 hours with aeration. Each culture(1 ml) was taken at an interval of 24 hours, and then cell growth and antibacterial activity were measured.

세포성장과 항균활성

선별한 형질전환체 4균주를 100 ml의 BMMY 배지에서 96시간 배양하면서 세포성장과 항균활성을 측정하여 Fig. 6에 나타내었다. 배양시간에 따른 4균주의 세포성장은 거의 동일한 양상을 나타내었으나 항균활성은 각 균주 별로 다른 양상을 보였다. 48시간 동안 세포성장은 급격하게 증가하고 그 이후로는 세포성장이 멈추는 정지기에 도달되었다. 항균활성도 세포성장과 연관된 양상을 보여 48시간까

지 급격히 증가하고 그 이후는 96시간까지 완만하게 증가하였으나(형질전환체 2, 4) 형질전환체 1과 3은 72시간 배양 시 항균활성이 최대를 나타내었다. 각 균주의 항균활성은 Southern hybridization에 나타난 밴드의 진하기와 항생제 G-418에 대한 내성양상과 거의 일치하였다.

이러한 사실은 각 균주의 항균활성의 차이는 숙주의 염색체 DNA에 삽입된 defensin 유전자의 copy 수와 밀접한 상관이 있음을 시사한다. 따라서 본 연구실에서는 이들 균주들에 재조합되어 삽입된 defensin 유전자의 copy 수를 분석하고 이를 이용하여 항균활성이 강력한 균주를 선별할 계획이다. 또한 *Pichia*에서 발현 분비된 defensin을 정제하여 아미노산 서열을 분석하고 이를 통하여 MF α 1의 prepro sequence를 이용하여 *Pichia*에서도 단백질 혹은 펩티드의 분비계가 *S. cerevisiae*와 같이 작동하는 지에 대한 논의를 추가로 시도할 예정이다.

이상에서 기술한 바와 같이 저렴한 메탄올을 탄소원으로 이용할 수 있을 뿐만 아니라 고농도 배양이 가능하여 재조합 단백질의 생산성이 높아 산업화가 용이한 *P. pastoris*를 숙주로 사용하여 곤충 유래 항균 펩티드인 활성형의 defensin을 분비하였다. 최근의 항생제 과다 사용은 항생제 내성 균주의 출현과 항생제의 식용 가축물에 잔류되어 궁극적으로 인간에게 흡수, 축적되는 부작용을 초래할 가능성이 높다. 따라서 항균 펩티드와 같이 잔류성의 위험이 없으며 내성 균주의 출현 가능성이 낮은 안전한 새로운 유형의 천연 항생물질의 이용기술개발이 요구된다. 본 연구에서 개발한 defensin을 분비하는 효모인 *Pichia*는 defensin 유전자가 염색체 DNA에 삽입되어 있으므로 산업용 배지에서 대량 배양 시 문제되는 플라스미드의 불안정성을 해결할 수 있는 장점이 있다. 배양학적 연구가 완료되면 이 균주는 항생제의 사용을 줄이거나 대체할 수 있는 사료첨가제로서 또한 순수 정제한 defensin은 구강 청정제 및 식품보존제 등으로 유용하게 사용될 가능성이 있을 것으로 사료된다.

요 약

곤충에서 유래한 항균 펩티드, defensin을 항균활성이 있는 활성적인 형태로 분비하는 *Pichia* 균주를 개발하기 위

한 일환으로서 MF α 1 prepro sequence와 defensin 합성유전자를 *Pichia* 발현 벡터에 재조합하여 형질전환하고 아미노산 histidine을 첨가하지 않은 최소 배지에서 형질전환체를 일차적으로 선별하였다. 선별한 형질전환체를 대상으로 항생제 G-418에 대한 내성과 *M. luteus*를 시험균으로 사용하여 생육환 저해를 통한 defensin의 세포 외 분비를 조사하여 4 균주를 선택하고 분석하였다. Southern hybridization을 통해 숙주의 염색체 DNA에 삽입한 defensin 유전자가 유지됨을 확인하였으며 전체 RNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하여 defensin mRNA를 증폭하고 Southern hybridization을 실시한 결과 증폭된 밴드는 probe로 사용한 defensin 유전자에 의해 양성 신호가 나타났다. 배양시간에 따른 4 균주의 세포성장과 항균활성을 비교하기 위해 BMMY 배지에서 96시간 배양하였다. 세포성장은 모두 유사한 양상을 보였다. 세포성장은 48시간 동안 급격하게 증가한 후 그 이후로는 정지기에 도달되었다. 항균활성도 48시간까지 급격히 증가하였으며 항균활성이 가장 높은 형질전환체 균주 3는 72시간 배양 시 550 AU/ml을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 중점연구사업 생명공학실용화사업단 연구비로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Aguinaga, M. P., C. Sharan, D. N. Singh and M. S. Valenzuela. 1989. Efficient transfer of DNA to nylon membranes using vacuum blotting in presence of alkali. *Biotechniques* 7, 1077-1079.
2. Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1808-1815.
3. Cereghino, G. P. L., A. J. Sunga, J. L. Cereghino and J. M. Cregg. 2001. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Genetic Engineering* 23, 157-169.
4. Cociancich, S., A. Ghazi., C. Hetru., J. A. Hoffmann, and L. Letrllier. 1993. Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels

- in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 19239-19245.
5. Ganz T. and R. I. Kehrler. 1999. Antibiotic peptides from higher eukaryotes: biology and applications. *Molecular Medicine Today* **5**, 292-297.
 6. Hancock, R. E. W. and R. I. Lehrer. 1998. Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends in Biotechnol.* **16**, 82-88.
 7. Hancock, R. E. W. 1999. Host defensw (cationic) peptides: What is their future clinical potential? *Drugs* **57**, 469-473.
 8. Haught, C., G. D. David, R. Subramanian, K. W. Jackson and R. G. Harrison. 1998. Recombinant production and purification of novel antisense antimicrobial peptide in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **57**, 55-61.
 9. Hodgson, J. 1993. Expression systems : A user's guide. *Bio/Technology* **11**, 887-893.
 10. Kelly, K. J. 1996. Using host defenses to fight infectious diseases. *Nature Biotechnology* **14**, 587-590.
 11. Kristensen, A. K., J. Brunstedt, J. E. Nielsen, J. D. Mikkelsen, P. Roepstroff and K. K. Nielsen. 1999. Processing, disulfide pattern, and biological activity of a sugar beet defensin, AX2, expressed in *Pichia pastoris*. *Protein Express. Purif.* **16**, 377-387.
 12. Latham, P. W. 1999. Therapeutic peptides revisited. *Nature Biotechnology* **17**, 755-757.
 13. Lehrer R. I., M. Rosenman, S. S. Harwig, R. Jackson and P. Eisenhauer. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* **137**, 167-173.
 14. Lepage, P., C. Heckel, S. Hunbert, S. Stahl and G. Rautmann. 1993. Recombinant technology as an alternative to chemical peptide synthesis: expression and characterization of HIV-1 recombinant peptides. *Anal. Biochem.* **213**, 40-48
 15. Martemyanov, K. A., A. S. Spirin and A. T. Gudkov. 1997. Direct expression of PCR products in a cell-free transcription/translation system: synthesis of antibacterial peptide cecropin. *FEBS Letters* **414**, 268-270.
 16. Martemyanov, K. A., V. A. Shirokov, O. V. Kurnasov A. T. Gudkov and A. S. Spirin. 2001. Cell-free production of biologically active polypeptides: application to the synthesis of antibacterial peptide cecropin. *Protein Express. Purif.* **21**, 456-461.
 17. Pang, S.-J., S. M. Oberhaust, J. L. Rasmussen, D. C. Knipple, J. R. Bloomquist, D. H. Dean, K. D. Bowman and J. C. Sanford. 1992. Expression of a gene encoding a scorpion insectotoxin peptide in yeast, bacteria and plant. *Gene* **116**, 165-172.
 18. Piers, K. L., M. H. Brown and R. E. W. 1993. Hancock. Recombinant DNA procedures for producing small antimicrobial cationic peptides in bacteria. *Gene* **134**, 7-13.
 19. Piers, J. C., W. L. Malony, L. Salvador and C. F. Dungan. 1997. Recombinant expression of the antimicrobial peptide polyphemusin and its activity against the protozoan oyster pathogen *Perkinsus marinus*. *Mol. Marine Biol. Biotechnol.* **6**, 248-259.
 20. Sreekrishna, K., R. G. Brankamp, K. E. Kropp. D. T. Blankenship, J.-T. Tsay. P. L. Smith, J. D. Wierschke, A. Subramaniam and L. A. Birkenberger. 1997. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* **190**, 55-62.
 21. Singh, A., E. Y. Chen, J. M. Lugovoy, C. N. Chang, R. A. Hitzeman and P. H. Seeburg. 1983. *Saccharomyces cerevisiae* contains two discrete genes coding for the α -factor pheromone. *Nucleic Acid Res.* **11**, 4049-4063
 22. Zhang, L., T. Falla, M. Wu, S. Fidai, J. Burian, W. Kay and R. E. W. Hancock. 1998. Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 674-680.

(Received July 11, 2002; Accepted August 21, 2002)