

Phage Display Library를 이용한 Salt-Resistant Alpha-Helical 항균 펩타이드의 새로운 탐색방법

박주희 · 한옥경 · 이백락¹ · 김정현*

인제대학교 인당분자생물학연구소, ¹인제대학교 생명공학부

A Novel Screening Strategy for Salt-resistant Alpha-helical Antimicrobial Peptides from a Phage Display Library. Park, Ju Hee, Ok Kyung Han, Baek Rak Lee¹, and Jeong Hyun Kim*. *Indang Institute of Molecular Biology, Inje University, Seoul 100-032, Korea, ¹School of Biotechnology and Biomedical Science, Inje University, Gimhae 621-749, Korea* - A novel screening strategy for salt-resistant antimicrobial peptides from a M13 peptide library was developed. Fusion of MSI-344, a magainin derivative and indolicidin to pIII coat proteins did not significantly affect viability of the recombinant phages, which indicated that the pIII could neutralize toxicity of the antimicrobial peptides and therefore it is possible to construct antimicrobial peptide library in *Escherichia coli*. On the basis of the conserved sequence of α -helical antimicrobial peptides, a semi-combinatorial peptide library was constructed in which the peptides were displayed by pIII. To remove hemolytic activity from the library, the phages bound to red blood cells were removed, and the subtracted phage library was screened for binding to target bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* under high salt concentrations. The screened peptides showed relatively low antimicrobial activity against the target bacteria. However, antimicrobial activities of the screened peptides P06 and S18 were not affected by the cation concentrations of 150 mM Na⁺, 2 mM Mg²⁺ and 2 mM Ca²⁺ without significant hemolytic activity. This screening strategy that is based on binding capacity to target cells provides new potential to develop salt-tolerant antimicrobial peptides.

Key words: Antimicrobial peptides, salt-resistance, phage display library

서 론

유전자에 의해 암호화(coding)된 항균 펩타이드(antimicrobial peptide)는 곤충에서 포유류에 이르는 거의 모든 동물에 존재하여 미생물 침입에 대한 innate immune system으로 알려져 있다[1]. 이중 α -helix 항균 펩타이드는 세균의 세포막에 작용하여 세포막을 파괴(disruption)함으로써 세포를 사멸하는 것으로 알려져 있다[16]. 항균 펩타이드는 기존에 사용되고 있는 항생제와 작용기전이 다르므로 기존 항생제에 내성이 있는 병원균에도 작용한다[1]. 또한 세균의 성장을 억제하는 것이 아니라 빠른 시간(30-180초)에 세균을 사멸시켜, 내성균주가 출현할 가능성이 비교적 적다[15]. 항균 펩타이드는 이와 같은 장점으로 인하여 항생제 내성균에 대처할 수 있는 물질로 기대되고 있다[1]. 반면, 많은 α -helix 항균 펩타이드는 염 농도, 특히 2 가 양이온에 의해 항균 역가가 심각하게 영향을 받는 경우가 많으며[11, 14, 17], 용혈 역가(hemolytic activity)가 있으며[10], 단백질 및 펩타이드

분해효소에 의한 분해로 인한 안정성의 저하[8] 등이 단점으로 지적되고 있다.

많은 연구자들이 위와 같은 단점을 극복하기 위해, 자연계에서 신규 펩타이드를 탐색하여 개량하거나[4, 13, 17], 물리화학적 성질을 기초로 항균 펩타이드 라이브러리를 제조하고 이로부터 단점이 개선된 펩타이드를 탐색하려는 연구[2, 9]가 수행되어 왔다. 본 연구는 α -helix 항균 펩타이드의 염에 의한 항균 역가의 저하와 용혈 역가 즉 진핵세포에 대한 독성이 개선된 펩타이드를 탐색하기 위한 새로운 방법을 제공하는 것이다. 항균 펩타이드는 세균에 대한 독성으로 인하여, 어떤 매개체 없이는 대장균에서 발현이 어렵다[8]. 본 연구는 M13 pIII이 항균 펩타이드의 독성을 중화하여, 대장균에서 항균 펩타이드 라이브러리 제조가 가능하다는 것을 제시하였고, 이 라이브러리로부터, *Pseudomonas aeruginosa*와 *Staphylococcus aureus*를 대상으로 생체 염 농도 보다 높은 조건에서도 흡착(binding)할 수 있는 펩타이드의 탐색을 시도하였다.

*Corresponding author

Tel: 82-2-2270-0991, Fax: 82-2-2263-9773

E-mail: jhk1140@inje.ac.kr

재료 및 방법

균주 및 배지

E. coli ER2738은 NEB(USA)에서, *P. aeruginosa* (ATCC15442)와 *S. aureus*(ATCC6538)은 한국 미생물 보존 센터(KCCM)에서 분양 받았다. *E. coli*는 Luria-Bertani(LB) 배지, *P. aeruginosa*와 *S. aureus*는 Muller Hinton broth (DIFCO, USA) 또는 TSA 배지(Sigma, USA)를 이용하여 37°C에서 진탕 배양하였다.

시약 및 유전자 조작

특별한 언급이 없는 모든 시약은 Sigma(USA)에서 구입하였고, oligonucleotide는 Genotech(Korea), 펩타이드는 A&PEP(Korea)에서 제작하였다. DNA 추출 및 정제는 Qiagen(USA), 제한효소 및 기타 효소는 NEB(USA), *Taq* DNA polymerase는 Promega(USA)에서 구입하였다. PCR 조건은 제조사의 표준 조건을 이용하였고, 기타 DNA 조작은 Sambrook 등[12]의 방법을 이용하였다.

MSI-344와 indolicidin이 M13 G에 융합된 M13 제조

MSI-344 유전자는 주형으로 F4MSI[8], primer로 MSI-F와 MSI-R(Table 1)을 이용하여 PCR 증폭하였고, indolicidin 유전자는 indo-F와 indo-R(Table 1)을 annealing하고 Klenow 효소를 이용하여 합성하였다. 두 DNA는 *Eag*I과 *Acc*65I로 절단하여, 동일 효소로 절단된 M13KE(NEB)에 클론링하여, M13-MSI와 M13-indo를 각각 제조하였다.

라이브러리 제조

Library primer(Table 1) 5 µg과 extension primer(Table 1) 1.7 µg을 annealing한 후 Klenow 효소를 이용하여 dsDNA를 합성하였다. 이 DNA를 *Eag*I과 *Acc*65I로 절단하여 동일 효소로 절단된 M13KE와 ligation하였다. 이를 1,800 volt, 201 Ω에서 electroporation(EasyJetPlus, Equibio)하여 *E. coli* ER2738에 transfection시켰다. 라이브러리의 heterogeneity는 무작위로 선택된 15 plaque으로부터 얻은 DNA의 염기서열을 결정하여 확인하였고, 라이브러리 size는 8×10⁷

이었다. 제조된 라이브러리는 10¹⁰ pfu/ml로 증폭하여 사용하였다.

원형질체(Protoplast) 제조

*P. aeruginosa*와 *S. aureus*를 TSA 배지에서 37°C, 12시간 동안 배양한 후, 원심분리하여 세균을 수확하였다. 세균들을 5 ml SMM buffer(0.5 M Sucrose, 20 mM MgCl₂, 20 mM Maleate buffer(pH 6.5))에 현탁하고, lysozyme 1 mg을 첨가하여 37°C, 30분 동안 반응한 후, 4°C, 5,000 rpm, 5분 동안 원심분리하여 원형질체를 얻었다. 이를 PBS buffer(137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄)로 1회 세척한 후 다시 PBS에 현탁하였다.

라이브러리의 탐색

사람 혈액을 4°C, 2,000 rpm, 5분 동안 원심분리하여 적혈구 층을 분리하고, PBS buffer로 3회 세척한 후, PBS buffer에 1×10⁹ cell/ml이 되도록 현탁하였다. 적혈구에 파아지 10¹⁰ pfu를 첨가하고 얼음에서 10분 흡착시킨 후, 4°C, 2,000 rpm, 5분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 적혈구에 흡착되지 않은 파아지를 증폭시킨 후, B buffer(150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, 0.1% Tween20, 500 mM Sucrose, 0.01 mM EGTA)에 10¹⁰ pfu/ml이 되도록 희석하였다. 이 파아지 현탁액 1 ml에 *P. aeruginosa*와 *S. aureus* 원형질체가 각각 10⁹ cell이 되도록 넣고, 얼음에서 10분간 흡착시킨 후, B buffer로 3회 세척하였다. 회수된 침전물을 0.5 M MgCl₂이 포함된 B buffer에 현탁하고, 얼음에서 5분간 방치한 후 4°C, 5,000 rpm, 5분 동안 원심분리하여 상층액을 취하였다. 회수된 파아지를 20% PEG/2.5 M NaCl로 침전시켜 농축하였다. 회수된 파아지를 다시 증폭하여, 대상 세균과의 흡착 과정을 반복하였다. 탐색된 파아지는 대장균에 infection 시킨 후 genome을 정제하여 DNA 염기서열을 결정하였다.

MIC 측정

MIC는 broth microdilution 방법[4]을 이용하였다. *P.*

Table 1. Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence
MSI-F	5'CTGCCCGGGTACCTTTCTATTCTCACTCTGGGATCGGCAAATTCCTG
MSI-R	5'GCGCGAATTCGGGCCGACTTTTCAGGATTTTAAC
indo-F	5'CGCGAATTCGGTACCTTTCTATTCTCACTCTATTCTGCCGTGGAAATGGCCGTGGTGGCC
indo-R	5'CGCGAATTCGGGCCGAGCGGGCGCCACGGCCACCACGGCCATTTCCACGGCAGA
library	5'CATGTTTCGGCCGAMMHMMHWYBWBTVYWMVCYKWMVMMHKYKYMMHMMAGAGT-GAGAATAGAAAGGTACCCGGG
extension	5'CATGCCCGGGTACCTTTCTATTCTC

1) The restriction enzyme sites incorporated in the oligonucleotides were underlined
 2) Symbols of bases in the oligonucleotides is corresponding to IUPAC.

*aeruginosa*와 *S. aureus*를 3 ml의 Muller Hinton broth (MHB)에 접종하고, 37°C에서 약 12시간 동안 배양한 후, 배양액 10 μ l(2×10^5 cfu/ml)와 serial dilution된 펩타이드 90 μ l를 혼합하고, 96 well plate에서, 37°C에서 12시간 동안 배양한 후, 600 nm에서 흡광도(SpectraMax250, Molecular Devices)를 측정하여 각 세균의 성장 여부를 조사하였다. 염이 존재할 때의 MIC 측정은 전배양부터 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂를 첨가하였다.

용혈 역가 측정

용혈 역가는 Klüver 등[6]의 방법을 이용하였다. 사람의 혈액을 위와 동일한 방법으로 준비하였다. 적혈구 현탁액(1×10^9 cell/ml) 20 μ l와 PBS buffer에 농도 별로 녹인 동일 부피의 펩타이드를 혼합한 후, 37°C에서 30분 동안 방치시켰다. 4°C, 2,000 rpm, 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 증류수로 10배 희석하고, 414 nm에서 흡광도를 측정(SpectraMax250, Molecular Devices)하여 용혈 정도를 평가하였다. 이 때 대조군으로 PBS만 처리한 것과, 2% SDS를 처리하여 것을 사용하였다.

결과 및 고찰

M13 파아지를 이용한 항균 펩타이드 라이브러리의 제조

항균 펩타이드의 DNA 조합 라이브러리를 제조하기 위해서는, 항균 펩타이드가 갖는 숙주에 대한 독성을 중화함으로써, 항균 펩타이드를 발현시킬 수 있는 앵커 단백질이 필수적이다[7, 8]. M13 파아지의 pIII(mature form)은 중성 pH에서 전하가 -27으로써 항균 펩타이드의 양전하로 인한 독성을 중화하기[7] 충분한 음전하를 가지고 있다. M13 pIII가 항균 펩타이드의 독성을 중화할 수 있는지를 조사하기 위해, magainin 2 유도체 MSI-344[5]와 indolicidin[3]의 유전자를 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 M13 gIII과 융합시켰다. MSI-344 또는 indolicidin과 융합된 gIII gene을 갖는 파아지 DNA를 대장균에 transfection시켰을 때, 생성되는 파아지의 titer는 야생형 파아지와 큰 차이가 없었다(Fig. 1). 이 결과는 M13의 pIII는 MSI-344와 indolicidin이 융합된 상태에서도 정상적인 파아지를 생성할 수 있으며, MSI-344와 indolicidin의 독성을 중화할 수 있는 것을 암시하며, 따라서 DNA를 바탕으로 한 항균 펩타이드 조합 라이브러리의 제조가 가능하다는 것을 제시하였다.

항균 펩타이드의 조합 라이브러리를 설계하기 위해, 대표적인 77가지 선형 항균 펩타이드들의 아미노산 서열을 multiple sequence alignment를 수행하였다(Fig. 2). 이로부터 13개의 아미노산 잔기로 구성된 가장 잘 보존된 부위를 찾았으며, normalization을 통하여, 아미노산 잔기의 보존된 정도를 보정하여, 보존된 아미노산 서열을 찾아내었다(Table 2). 이 보존된 서열을 토대로 degenerative oligonucleotide를

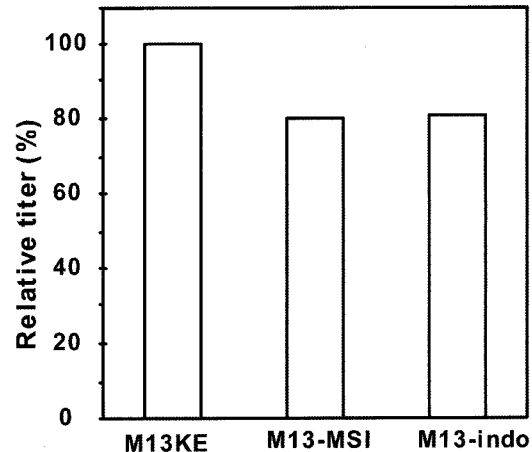


Fig. 1. Viability of M13 containing pIII fused with MSI-344 and indolicidin. *E. coli* ER2738 cells were transfected with the same amount of DNA (10 ng) of M13KE, M13-MSI and M13-indo.

설계(Table 2) 및 합성하고 재료 및 방법에 기술한 바와 같이 gIII에 융합하여 8×10^7 의 M13 파아지 라이브러리를 제조하였다.

대상 세균에 흡착(binding)을 이용한 항균 펩타이드 탐색

위에서 제조된 라이브러리로부터 세균에 흡착할 수 있는 능력을 기준으로 항균 펩타이드를 함유하는 파아지를 탐색하였다. 대상 세균은 기존의 항생제에 대한 내성을 일으키는 대표적인 미생물인 *P. aeruginosa*와 *S. aureus*를 선택하였다. 선형 α -helical 항균 펩타이드는 여러 가지 장점에 불구하고, 높은 이온 농도, 특히 2가 양이온 농도의 증가에 따른 급격한 항균 역가의 저해[11, 14, 17]와 비교적 높은 용혈 역가[10]라는 단점을 갖고 있다. 이러한 단점이 개선된 항균 펩타이드를 탐색하기 위해, 적혈구에는 낮은 흡착력을 갖지만 대상 세균에 대해서는 생체 양이온 농도에서 흡착할 수 있는 항균 펩타이드의 탐색을 시도하였다.

라이브러리를 먼저 적혈구와 흡착시켜, 적혈구와 높은 친화력을 갖는 파아지를 제거함으로써 높은 용혈 역가(hemolytic activity)를 가질 가능성이 있는 펩타이드를 미리 제거하였다. 적혈구에 흡착되지 않은 파아지의 titer를 측정 한 결과(data not shown), 라이브러리의 99.7%의 파아지가 PBS buffer 조건하에서 적혈구에 흡착된 것을 알 수 있었고, 이로부터 라이브러리의 대부분의 파아지는 적혈구와 높은 친화력이 있음을 알 수 있었다.

선형 α -helical 항균 펩타이드는 세포막에 작용하는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 세포막과 상호작용하는 펩타이드를 탐색하기 위해 대상 세균의 세포벽을 제거하고 흡착에 사용하였다. 또한 대상 세균과 흡착 시, 염 농도를 생체 염 농도 보다 높은 조건(150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂)에서 수행함으로써, 생체 이온 농도에서도 높은 흡착력을 유지할

CAA07511	:	-----GIGAILSAGKSI	IKGLANGLAEHF-----	:	25
P39080	:	-----GVLSNVIGYLKKI	GTGALNAVLKQ-----	:	24
CAB61442	:	-----GLLDSLKGFAATA	GKGVLSLLSTASC	KLAKTC	: 33
CAA54843	:	-----GLLDSIKMAISAG	KGALQNLKVASCK	LDKTC	: 33
CAB61445	:	-----GILDTLKNLAISA	AKGAAQGLVNKAS	CKLSGQC	: 33
P40841	:	-----GIFDKLKNFAKGV	AQSLLNKASCKLS	SGQC----	: 29
CAA54844	:	GIFSKLGRKKIKNLLI	SGLKNVGKEVGM	DVVRTGIDIAGCK	IKGEC : 46
P25230	:	--GLRKRLRKFRNKI	KEKLLKIGQKI	QGLLPKLPRTDY	----- : 37
NP_004336	:	--LLGDFFRKSKEK	IGKEFKRIVQRI	KDFLRNLVPRTE	----- : 37
AAA31070	:	-----GRFRRLRKKTR	KRLKKGKVLKWI	PPVGSIPLGGC	----- : 36
P83248	:	GKFSV--FGKILRSI	AKVFKGVGKVRK	QFKTASDLDKNQ	----- : 37
AAO74637	:	GKIPIGAIKKAGKA	IGKGLRAVNIAS	TAHDVYTFKPKRH	----- : 41
P14661	:	-SWLSKTAKLENSA	KKRISEGIAIAI	IQGGPR-----	: 31
AAQ04687	:	-GFFKAWRKVKHAG	RRVLDTAKGVGR	HYVNNWLNRYR	----- : 37
AAQ04688	:	-GWFKAWRKVKHAG	RRVLKGVGIHY	GVGLI-----	: 30
P14665	:	----WNPFKELERAG	QRVDAVISAAP	AVATVGOAAIARG	----- : 37
AAD29438	:	---RWKIFKKIEKVG	QNI RDGIVKAG	PAVAVVGOAATI	----- : 35
CAA29872	:	----WNPFKELEKVG	QRVDAVISAAGP	-----	: 23
AAK81850	:	-GGLKKGKLEGVG	KRVFKASEKALP	VAVGIKALG	----- : 35
AAB82493	:	-GWLKIGKKIERVG	QHTRDATI QVI	GIAQQAANVAATAR	----- : 39
JC7573	:	--IKVPLKFKSMRE	VMRDHGIKAP	VDPATKY-----	: 32
CAB75949	:	--SIGSALKKALP	VAKKIGKIALPI	AKAALP-----	: 29
AAQ16625	:	--GWGSFFKKAHV	GKHVGAAL	THYL-----	: 25
P82415	:	--GWKDWLKKGK	EWLKAKGPGIV	KAALQAATQ	----- : 30
P82417	:	--DFKDWMTAGE	WLKKKGPGIL	KAAMAAAT	----- : 29
P61508	:	---KIKWFKTMKSI	AKFIAKEQMK	HLGGE-----	: 27
P11006	:	--GIGKFLHSAKK	FGAFVGEIMNS	-----	: 23
AAO62960	:	-GLLSVLGSAKH	IVLPHVVPVIAEKI	-----	: 25
AAO62954	:	-GLFSVLGAVAKH	IVLPHVVPVIAEK	-----	: 24
CAC42164	:	--GIGAILKVLST	GLPALISWIKR	KRQE-----	: 26
P83240	:	--FWGALAKGALK	LIPSLFSSFS	SKKD-----	: 24
P82427	:	--FWGALIKGA	AKLIPSVVGL	FKKKQ-----	: 24
P82423	:	--WLGSAKIGAK	LLPSVVGL	FKKKQ-----	: 25
P82425	:	-GIWGTAKIGIK	AVPRVISML	KKKKQ-----	: 26
P62571	:	-GLVSSIGRALG	GLLADVVK	KGQPA-----	: 25
P81847	:	-GLIGSIGKALG	LVDVLPKPL	QAAS-----	: 26
CAA31764	:	-GWASKIGQTLG	KIAKVLQGLM	QPK-----	: 25
P82038	:	-GLAGAISSAL	DKLKQSQLIK	KNYAKKLGYP	----- : 30
P62563	:	-GLWQKIKDKA	SELVSGIVE	GVK-----	: 22
P56244	:	-GLWQKIKSA	AGDLASGIVE	GIKS-----	: 23
AAK63254	:	--ILGPVISTIG	VLGGLLKNL	-----	: 20
O18494	:	-GXFGKAFXSV	SNF	FAKHKTA-----	: 20
CAA71424	:	-----VFQFLGKI	IHHVGNFVHG	FSHVF-----	: 23
AAL57318	:	-----FFHHIFR	GIVHVGKTI	HRLVTG-----	: 22
P83188	:	---GLNTLKKV	FQGLHEAIK	LINNHVQ-----	: 24
NP_000191	:	-----DSHAKRHH	GYKRKFHEK	HSHRGY-----	: 24
CAA51080	:	-AMWKDVLKKI	GTVALHAG	KAAALGAVADT	ISQ----- : 31
CAD92230	:	-ALWKDILKNV	GKAAGKAVL	NTVTD	MVNQ----- : 28
CAC29431	:	-ALWKDILKN	AGKAALNEI	NQLVNQ-----	: 24
P83642	:	-GLWNKIKEA	AKSAGKAAL	G	GVNEMV----- : 25

Fig. 2. Multiple sequence alignment of linear α -helical antimicrobial peptides. The box on the alignment denotes the conserved region used for the antimicrobial peptide library design. The conserved region was chosen by aligning 77 α -helical antimicrobial peptides, 50 sequences of which were shown due to space limitation. GenBank accession numbers and the lengths of the peptides are indicated at the left and at the right of the alignment, respectively.

Table 2. Amino acid residue distribution in the conserved region of antimicrobial peptides.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Conserved residues	W,G,I,L	W,F,I,L	G,K,S	K,D	I,W,V,L,F	G,F,K,W,L	K,R	K,F,V	I,V,A,G	K,G,H	H,K,G	V,A,F	A,I,G,L,V
Primer sequence	kkg	dkk	rrm	rrm	dkk	bks	mrg	bks	rba	vrs	vrs	dkk	dkk

Table 3. Amino acid sequences of the screened peptides.

Target	Peptide	Amino acid sequence	pI	% Hydrophobic amino acids
<i>P. aeruginosa</i>	P06	WIDGGGKLTGKFG	8.6	31
	P11	WGSNGVKVTRHLI	11.0	38
	P27	VVNNVRQLIKSMG	11.0	38
<i>S. aureus</i>	S02	VIEKVVKLVGDVR	8.6	54
	S17	GFESGLRLTGKFL	8.8	38
	S18	VSNEGLQRIRHMS	9.6	23

수 있는 항균 펩타이드의 탐색을 시도하였다.

이와 같은 negative selection과 positive selection을 통해 탐색된 파아지 중 각 대상 세균으로부터 각 50개씩 총 100 개의 파아지 genome을 분리하여, DNA 염기서열을 분석한 결과, *P. aeruginosa*로부터 6종, *S. aureus*로부터 7종의 펩타이드가 탐색되었음을 확인할 수 있었다. 탐색된 13종의 펩타이드들 중에서, α -helix를 형성할 수 있는 펩타이드를 선별하고, pI 값과 hydrophobic 아미노산이 차지하는 %를 기준으로 하여 *P. aeruginosa*로부터 3종, *S. aureus*로부터 3종의 펩타이드들을 화학적으로 합성하였다(Table 3).

탐색된 펩타이드들의 역가

합성된 펩타이드들의 항균 역가를 평가하기 위해, 각 대상 세균에 대한 MIC를 측정하였다. 염이 없는 조건에서는

탐색된 모든 펩타이드가 비교적 높은 256~512의 MIC 값을 보였다(Fig. 3). 하지만 높은 염 농도(150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂) 조건에서, S02, S18은 *P. aeruginosa*에 대해 MSI-344와 비슷한 MIC 값을 보였고, P06, P11, P27, S17의 경우 높은 염 농도 조건에서 MSI-344보다 *P. aeruginosa*에 대한 MIC 값이 낮았으며, 실험한 염 농도에 의해 항균 역가가 영향을 받지 않았다(Fig. 3). 반면, *S. aureus*에 대한 MIC 경우, P06과 S18을 제외한 모든 펩타이드는 MSI-344와 같이 염에 의해 항균 역가가 영향을 받았다. 반면, P06과 S18은 *P. aeruginosa*, *S. aureus* 모두에 대한 MIC가 염에 의해 영향을 받지 않았다. MSI-344의 경우, 펩타이드 농도가 증가함에 따라 용혈 역가 또한 증가한 반면, 탐색된 펩타이드들은 1,024 μ g/ml의 농도에서도 용혈 역가를 거의 보이지 않았다(Fig. 4).

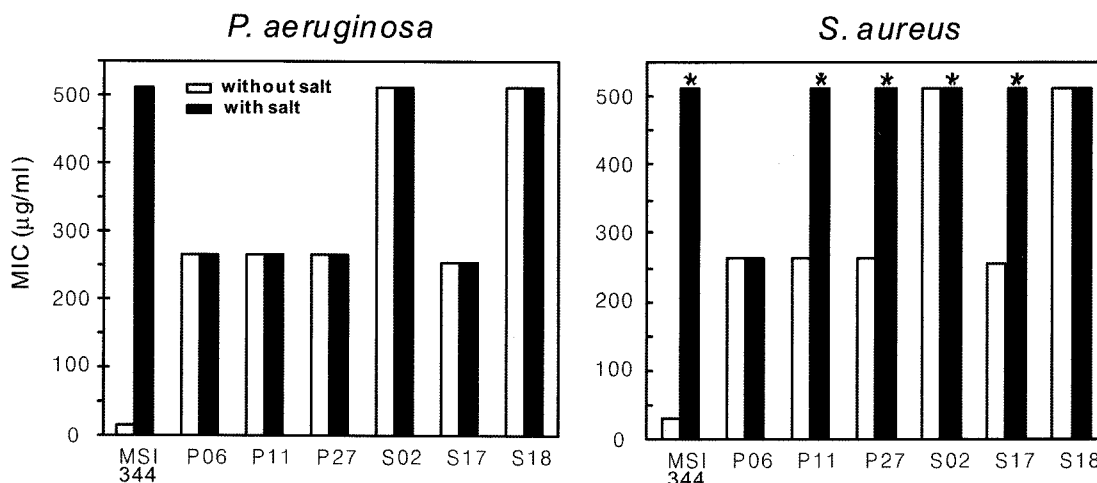


Fig. 3. Effect of salt on MICs of the screened peptides against *P. aeruginosa* and *S. aureus*. MICs were determined by the broth microdilution method in MH medium without and with salt (150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂). The asterisks indicate MICs over 512 μ g/ml.

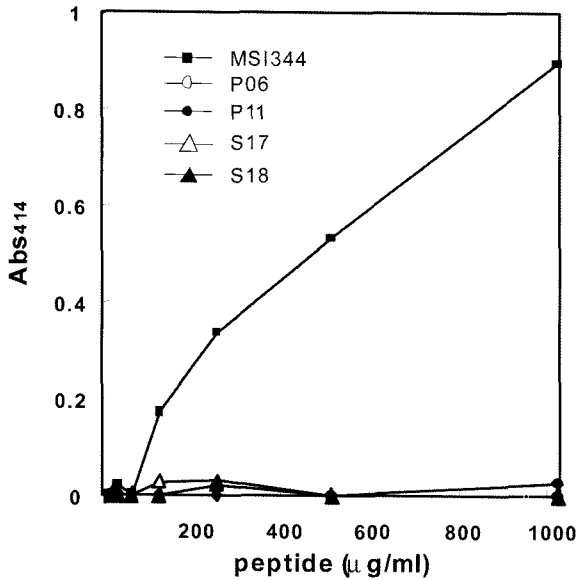


Fig. 4. Hemolytic activity of the screened peptides. The hemolytic activities of the peptides were determined using human red blood cells (RBC). Serial dilutions of the peptides were incubated with RBC at 37°C for 30 min in PBS buffer. Hemoglobin release was monitored using by measuring the absorbance at 414 nm.

항균 펩타이드가 대상 세균의 세포막에 흡착하는 능력과 이들의 생물학적 기능, 즉 세균을 사멸하는 능력에는 상관 관계가 있는 것으로 알려져 있다[2]. 따라서 본 연구에서는 대상 세균에 흡착할 수 있는 능력을 기준으로 펩타이드를 탐색하였다. 탐색된 펩타이드 중 P06과 S18은 *P. aeruginosa* 와 *S. aureus*에 대해, 본 실험 조건인 생체 염 농도 보다 높은 조건에서의 항균 역가와 염이 없는 조건의 항균 역가가 동일하게 유지되는 것으로 보아, 생체 염 농도 보다 높은 조건에서도 대상 세균과 흡착을 유지할 수 있는 것으로 추론 된다. 따라서 탐색된 펩타이드의 항균 역가는 기존의 항균 펩타이드에 비해 낮았지만, 염에 의해 역가가 저해되는 단점을 갖는 펩타이드와 융합 시 두 펩타이드의 단점이 서로 보완 될 가능성을 시사한다. 또한 본 연구는 항균 펩타이드 라이브러리를 유전자에 의해 coding된 조합 라이브러리의 제조가 가능함을 제시하였다. 구축된 library는 펩타이드 라이브러리와 달리 재사용이 가능하며, 본 연구의 탐색방법은 항균 펩타이드에 이미 내성이 있는 세균에 적용이 가능 할 것으로 기대된다.

요 약

생체 염 농도에서도 항균활성을 유지할 수 있는 선형 α -helical 항균 펩타이드를 M13 펩타이드 라이브러리로부터 탐색할 수 있는 새로운 방법을 개발하였다. M13의 pIII은 magainin 유도체인 MSI-344와 indolicidin과 융합된 상태에

서도 파아지의 viability에 영향을 주지 않는 것으로 보아, MSI-344와 indolicidin의 대장균에 대한 독성을 중화할 수 있는 것으로 판단되며, 따라서 대장균에서 항균 펩타이드 라이브러리의 제조가 가능함을 증명하였다. 선형 항균 펩타이드의 보존된 부위를 바탕으로, 13개의 아미노산 잔기로 구성된 semi-combinatorial 항균 펩타이드 라이브러리를 M13를 이용하여 제조하였다. 제조된 파아지 라이브러리는 먼저 적혈구에 흡착시켜, 높은 용혈 역가를 가질 가능성이 있는 파아지를 제거한 후, 높은 염 농도에서 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Staphylococcus aureus*에 흡착할 수 있는 파아지를 탐색하였다. 탐색된 펩타이드들은 염이 없는 조건에서는 비교적 낮은 항균 역가를 보였지만, P06와 S18 펩타이드의 경우, 생체 염 농도보다 높은 150 mM Na⁺, 2 mM Mg²⁺, 2 mM Ca²⁺의 조건에서도 항균 역가가 영향을 받지 않았으며, 심각한 용혈 역가 또한 보이지 않았다. 본 연구에서 개발한 대상 세균에 대한 흡착능력을 이용한 탐색방법은 salt-tolerant antimicrobial peptide의 개발의 새로운 가능성을 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지방대육성지원 사업 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2004-C00167).

REFERENCES

1. Brown, K. L. and R. E. Hancock. 2006. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr. Opin. Immunol.* **18**: 24-30.
2. Deslouches, B., S. M. Phadke, V. Lazarevic, M. Cascio, K. Islam, R. C. Montelaro, and T. A. Mietzner. 2005. *De novo* generation of cationic antimicrobial peptides: influence of length and tryptophan substitution on antimicrobial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 316-322.
3. Falla, T. J., D. N. Karunaratne, and R. E. Hancock. 1996. Mode of action of the antimicrobial peptide indolicidin. *J. Biol. Chem.* **271**: 19298-19303.
4. Friedrich, C., M. G. Scott, N. Karunaratne, H. Yan, and R. E. Hancock. 1999. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1542-1548.
5. Ge, Y., D. L. MacDonald, K. J. Holroyd, C. Thornsberry, H. Wexler, and Z. Zasloff. 1999. *In vitro* antibacterial properties of pexiganan, an analog of magainin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 782-788.
6. Klüver, E., S. Schulz-Maronde, S. Scheid, B. Meyer, W. G. Forssmann, and K. Adermann. 2005. Structure-activity relation of human beta-defensin 3: influence of disulfide bonds and cysteine substitution on antimicrobial activity and cytotoxicity. *Biochemistry* **44**: 9804-9816.
7. Lee, J. H., J. H. Kim, S. S. Hong, H. S. Lee, and S. C. Kim.

1999. Multimeric expression of the antimicrobial peptide buforin II in *Escherichia coli* by fusion to a cysteine-rich acidic peptide. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 303-310.
8. Lee, J. H., J. H. Kim, S. W. Hwang, W. J. Lee, H. K. Yoon, H. S. Lee, and S. S. Hong. 2000. High-level expression of antimicrobial peptide mediated by a fusion partner reinforcing formation of inclusion bodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**: 575-580.
 9. Liu, D. and W. F. DeGrado. 2001. *De novo* design, synthesis, and characterization of antimicrobial beta-peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **123**: 7553-7559.
 10. Marr, A. K., W. J. Gooderham, and R. E. Hancock. 2006. Antibacterial peptides for therapeutic use: obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* **6**: 468-472.
 11. Minahk, C. J. and R. D. Morero. 2003. Inhibition of enterocin CRL35 antibiotic activity by mono- and divalent ions. *Lett. Appl. Microbiol.* **37**: 374-379.
 12. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A.
 13. Shin, S. Y., S. T. Yang, E. J. Park, S. H. Eom, W. K. Song, Y. Kim, K. S. Hahm, and J. I. Kim. 2002. Salt Resistance and Synergistic Effect with Vancomycin of alpha-Helical Antimicrobial Peptide P18. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**: 558-562.
 14. Tencza, S. B., J. P. Douglass, D. J. Creighton, R. C. Montelaro Jr., and T. A. Mietzner. 1997. Novel antimicrobial peptides derived from human immunodeficiency virus type 1 and other lentivirus transmembrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**: 2394-2398.
 15. Tomita, T., S. Hitomi, T. Nagase, H. Matsui, T. Matsuse, S. Kimura, and Y. Ouchi. 2000. Effect of ions on antibacterial activity of human beta defensin 2. *Microbiol. Immunol.* **44**: 749-754.
 16. Tossi, A., S. Luca, and G. Anna. 2000. Amphipathic, α -Helical Antimicrobial Peptides. *Biopolymers* **55**: 4-30.
 17. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389-395.

(Received Oct. 2, 2007/Accepted Nov. 20, 2007)