

백강잠으로부터 분리한 항균물질의 항생제 내성균에 대한 효과

이현우*** · 엄정선*** · 고미경*** · 김미성*** · 은재순**** · 전훈**** · 임재윤*****,#

*연세대학교 원주의과대학, **의림 바이오텍, ***세명대학교 한방식품영양학과, ****우석대학교 약학대학

(Received May 8, 2007; Revised July 27, 2007)

Effects of an Antimicrobial Substance from *Bombycis corpus* on Antibiotic Resistant Microbes

Hyeon-Woo Lee***, Jeong-Sun Um***, Mi-Kyung Ko***, Mi-Seong Kim***, Jae-Soon Eun****, Hoon Jeon**** and Jae-Yoon Leem*****,#

*Department of Biochemistry, Yonsei University Wonju College of Medicine, Wonju 220-701, Korea

**Eurim Biotec Co., Jecheon 390-030, Korea

***Department of Oriental Medical Food & Nutrition, Semyung University, Jecheon 390-711, Korea

****College of Pharmacy, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea

Abstract — *Bombycis corpus*, a batrycated silkworm and white-stiff silkworm, is an oriental drug consisting of the dried larva of silkworm, dead and stiffened due to the infection of *Beauveria*. A peptidyl antimicrobial molecule was purified from *B. corpus* by reverse phase-column chromatography and HPLC. Its molecular weight was determined to be 2295.45 by using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. Its antimicrobial activity was diminished by trypsin digestion. It exhibited a broad antimicrobial spectrum against not only Gram-negative, but also Gram-positive bacteria. Furthermore, it was found to have an antimicrobial activity against vancomycin-resistant enterococci (VRE), methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), and vancomycin-intermediate resistant *S. aureus* (VISA). It may be a useful molecule for a new antibiotic development, especially against antibiotic resistant microbe. This substance may play a role in the defense system of this animal against *Beauveria bassiana*. This is the first report of a peptidyl antimicrobial substance from *B. corpus*.

Keywords □ A peptidyl antimicrobial substance, *Bombycis corpus*, vancomycin-resistant enterococci, methicillin-resistant *S. aureus*, vancomycin-intermediate-resistant *S. aureus*

현재 임상적으로 응용되고 있는 항생물질은 주로 미생물로부터 유래된 것이 대부분이나 동·식물을 포함한 미생물 이외의 천연물로부터도 많은 항생 활성물질이 보고되고 있다.¹⁻⁴⁾ 특히 곤충으로부터 저분자 물질을 비롯한 다양한 종류의 항생 펩타이드들이 밝혀졌으며⁵⁾ 현재 이들 펩타이드 유도체를 이용하여 약물을 개발하려는 연구가 활발하다.^{6,7)} 한편, 곤충은 지구상에 현존하는 생물중 가운데 가장 번성한 생물집단으로서 다양한 생태학적 지위(ecological niches)를 점유할 수 있는 적응능력과 외적으로부터 자신을 보호하는 뛰어난 자기 방어능력을 지니고 있다.⁸⁾ 곤충의 생체 방어 기구는 혈구세포와 같은 식세포에 의한 세포

성 방어 기구와 체내 방어물질을 이용하는 체액성 방어 기구로 크게 나눌 수 있다. 체액성 방어물질로는 직접 이물질에 치사적으로 작용하는 혈구응집소와 항균 펩타이드 등이 존재한다.⁹⁾ 이러한 물질들은 침입한 세균을 인식하는 방어기구와 Toll pathway 및 IMD pathway를 거쳐 합성이 유도되어 침입한 세균의 세포막에 치사적으로 작용하여 세균을 사멸한다는 것이 밝혀지고 있다.⁷⁾ 최근에는 유용생물자원 확보 및 신기능 생물 소재 개발이라는 산업적, 경제적 측면에서의 중요성 때문에 항생제로의 개발을 목표로 이러한 생체방어물질을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 한편, 곤충유래생약인 백강잠(*Bombycis corpus*=*B. batricatus*)은 누에(*Bombix mori*) 유충이 백강균(*Beauveria bassiana*)에 감염되어 죽은 충체로서 한방에서는 驚風痙攣, 風熱頭痛, 咽喉痛 등의 치료에 응용되고 있다.¹⁰⁾ 본 연구팀은 백강균의 감염에 의해 누에의 생체방어기구가 활성화됨으로써 많은 유

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-290-1575 (팩스) 063-290-1812
(E-mail) jyleem@woosuk.ac.kr

용성분이 유도되었을 것으로 추정하고 백강잠으로부터 항생활성 물질을 분리하는 연구를 시작하였다.

메치실린 내성 황색포도상구균 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)는 폐렴, 피부감염, 연조직감염 및 폐혈증을 일으켜 높은 치사율을 나타내는 균이며 국내 종합병원에서의 MRSA의 발견 빈도가 60~70%로 매우 심각한 실정이다.^{11,12)} MRSA의 치료를 위해 반코마이신의 사용이 급격히 증가하면서 국내에서도 vancomycin-intermediate *S. aureus*(VISA)가 보고되고 있다.¹³⁾ 그리고 반코마이신내성 장구균 vancomycin-resistant enterococci (VRE)의 원내감염 발생률도 매년 증가하는 추세이다.¹⁴⁾ 그러나 현재 이러한 내성균에 적절히 사용 할 수 있는 항생물질이 부족한 실정이므로 이 균주들에 효과적으로 작용하는 항생물질의 개발이 절실히 요구되고 있다. 본 연구에서는 MRSA, VISA 및 VRE에 대한 항생물질 개발을 목표로 곤충유래 생약인 백강잠으로부터 이들 내성균에 효과적인 항균활성 물질을 분리·정제하였으며 몇 가지 특성을 확인하였기에 보고하고자 한다.

실험 방법

시료의 조제

경동시장에서 구입한 백강잠(*B. corpus*) 약 100 g을 분쇄하여 트립신 저해제(100 KIU/ml) 존재 하에 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 수용액 1 l에 넣고 실온에서 12시간 동안 추출하였다. 추출물을 30분 동안 35,000 g로 초원심 분리하여 상등액을 취하고 Millipore AA 박막(0.22 μ m)으로 여과한 후, 동결건조하여 실험 재료로 사용하였다.

시약 및 기기

시약은 주로 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였으며, Antibiotic medium 3, Bacto-trypton, Yeast Extract, Bacto-pepton, 그리고 Muller-Hinton Broth 등의 배지는 Difco 사(Detroit, MI, USA)의 제품을 주로 사용하였다. 그 밖의 시약은 특급 또는 HPLC용 등급을 사용하였다. 기기는 Waters Breeze HPLC(Waters, MA, USA), Model 680 Microplate Reader(Bio-Rad, CA, USA), SPECTRONIC 3000 ARRAY (Milton Roi, NY, USA) 흡광광도계, Voyager DESTRO(PerSeptive Biosystems, MA, U.S.A.) 질량분석기 및 ABI 아미노산 서열 자동분석기를 사용하였다.

미생물 균주 및 항균활성 시험

임상에서 분리한 반코마이신 내성 *Enterococcus faecium*(VRE) 및 vancomycin intermediate resistant *S. aureus*(VISA)는 passage-derived strains을 유도하여 반코마이신에 대한 MIC가 각각 128 μ g/ml, 12.8 μ g/ml을 나타내는 균주를 선발하여 사용하

였다. *S. aureus* CCARM 3501(MRSA) 균주는 항생제 내성균주 은행(Culture Collection of Antibiotics Resistant Microbes, CCARM)에서 구입하여 사용하였다. *Esherichiacoli* K-12 594 (Str^r) 균주는 동경대학의 Natori Shunji 교수로부터 분양 받았으며 그 밖의 항생제 감수성 균주인 *Bacillus subtilis* KCTC 3069, *Micrococcus luteus* KCTC 1056, *Staphylococcus aureus* KCTC 1928, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004, *E. coli* O157 H7 993, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Shigella flexneri* KCTC 2008 및 *Candida albicans* KCTC 1940 등은 한국유전자 은행(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 구입하여 사용하였다.

항균활성은 주로 Leem 등의 방법⁵⁾에 따라 liquid growth inhibition assay로 검정하였다. 즉, 대수기의 균주를 3×10^8 cell/ml로 희석하여 130 mM NaCl, 0.2%(W/V) BSA를 포함하는 10 mM phosphate buffer(pH 6.0)에 혼합한 후, Muller-Hinton Broth로 300배 희석해 96 well microtiter plate에 100 μ 씩 첨가한다. 여기에 적당량의 시료를 10 μ 의 10 mM phosphate buffer에 계열 희석하여 첨가한 후, 37°C에서 5시간 배양하여 650 nm에서의 흡광도를 측정해 균의 증식을 결정하였다. 항균활성의 정량은 시료 대신 0.05% BSA를 포함하는 50 mM phosphate buffer(pH 6.0)만 첨가한 경우의 균의 증식을 100%로 해 그 증식저해 활성을 계산하였다. 한편, MIC는 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)의 미량액체배지 희석법에 의하여 조제한 균주와 혼합하여 35°C에서 20시간 배양한 후, 650 nm에서의 흡광도를 측정해 증식을 저해하는 최소농도로 결정하였다.¹⁵⁾ 또한, 대상균주를 도말한 평판배지에 적당량의 시료를 묻힌 paper disc를 올려놓고 37°C에서 20시간 배양하여 생기는 투명반의 크기를 측정하여 항균활성을 검정하였다.

항균활성 물질의 분리·정제

백강잠 추출물의 동결건조시료로부터 활성성분을 분리·정제하기 위하여 0.05% TFA 수용액에 용해한 후 ODS-AM AM12 S50 수지를 충전시킨 칼럼을 이용하여 크로마토그래피를 실시하였다. 용출용매는 0.05% TFA 수용액, 0.05% TFA 10% CH₃CN 및 0.05% TFA 40% CH₃CN을 사용하였으며 우선 0.05% TFA 수용액으로 용출하면서 220 nm와 285 nm에서의 UV 흡광도를 측정하였다. 용출분획의 흡광도가 0.2 이상 올라가지 않고 유지 되면 단계적으로 0.05% TFA 10% CH₃CN으로 용출하였으며, 마지막으로 0.05% TFA 40% CH₃CN을 사용하여 용출하였다. 용출분획을 동결·건조하여 적당량의 10 mM phosphate buffer에 용해한 후, 상기방법으로 항균활성을 검정하였다. 활성이 확인된 분획으로부터 활성물질을 순수하게 분리하기 위해 YMC-Pack ODS-A 칼럼(S-5, 120 Å, 250×4.6 mm: YMC, Kyoto, Japan)을 이용하여 역상 HPLC를 실행하였다. 용출분획의 흡광

도 패턴을 확인하기 위해 UV 검출기를 사용하였다. 먼저 활성 분획의 건조시료를 증류수에 용해한 후 HPLC에 주입하고 0.1% TFA 수용액으로 용출하여 유효성분을 칼럼에 흡착시켰다. CH₃CN의 농도를 linear gradient 방법에 의해 0%로부터 30%까지 50 분 동안 증가시켰다. 용출분획의 건조시료에 대해 활성을 확인한 후 CH₃CN의 농도가 15%로부터 30%까지 60분 동안 증가되도록 용출하여 활성을 가진 피크를 얻을 수 있었다. 이 피크의 순도를 확인하기 위해 TSK gel Carbon-500 칼럼(150×4.6 mm: Tosoh, Tokyo, Japan)을 이용하여 HPLC 분석을 실시하였다. 분석조건은 CH₃CN의 농도를 10%로부터 40%까지 80분 동안 증가시키는 linear gradient 방법을 사용하였다.

항균활성 물질의 특성분석

활성물질을 증류수에 녹인 후 UV 흡수 스펙트럼을 분석하였다. 질량분석 스펙트럼은 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight(MALDI-TOF) 방법에 의해 분석하였다. 단백질 함량은 BCA Protein assay kit(Pierce, IL, USA)를 사용하여 정량분석 하였으며, 활성물질의 구조를 확인하기 위해 아미노 말단의 아미노산 서열을 분석하였다. 질량분석 및 아미노산 서열 자동분석은 한국 기초과학연구원연구소에서 수행하였다. 한편, 활성성분이 펩타이드성 물질임을 확인하기 위해 100 µg의 최종 정제품을 100 µl의 2 M urea(pH 7.5)에 녹인 후 단백질분해효소인 트립신 1 µg을 가한 다음 37°C에서 12시간 반응시켰다. 10 µl의 반응액을 취해 10 mM phosphate buffer에 계열 희석한 후 항균활성의 유무를 확인하였다. 대조군으로는 트립신을 넣지 않고 반응시킨 최종 정제품을 이용하였다.

실험 결과

항균활성 물질의 분리·정제

백강잠 추출물의 동결건조시료를 C18 역상칼럼 크로마토그래피에 의해 분리한 후 항균활성을 확인한 결과, 0.05% TFA 수용액 및 0.05% TFA 10% CH₃CN으로 용출한 분획으로부터는 활성을 검출할 수 없었으나, 0.05% TFA 40% CH₃CN으로 용출한 분획 2곳에서 강한 활성을 검출하였다. 활성량이 많은 분획으로부터 활성성분을 분리·정제하기 위하여 C18 역상 HPLC를 실시한 결과, CH₃CN 농도 약 20~30% 사이에서 2개의 활성 피크를 얻었다. 비교적 강한 비활성을 나타내는 분획을 다시 C18 역상 HPLC로 분석하여 활성을 가진 단일피크를 얻을 수 있었다(Fig. 1). 이 단일피크의 순도는 TSK gel Carbon-500 칼럼을 이용한 HPLC 분석으로 확인하였으며 물질을 bocorpsin으로 명명하였다(자료 미제시). 일반적으로 용출되는 CH₃CN의 농도는 유기분자의 소수성 또는 분자량에 비례하므로 활성물질은 비교적 분자량이 큰 물질로 추정하였다.

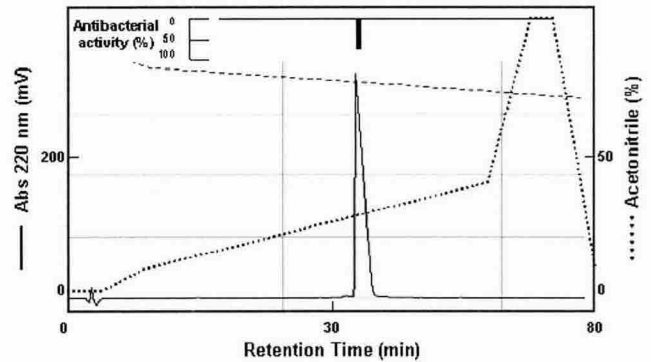


Fig. 1 – Reverse-phase HPLC profile of an antimicrobial substance purified from *Bombycis corpus*. The UV absorption at 220 nm was monitored (solid line). Fractions were concentrated and assayed for antimicrobial activity (inset). Chromatographic conditions were: column, YMC-Pack ODS-A, S-5, 120 Å, C18 250×4.6 mm; solution A, 0.1% trifluoroacetic acid; solution B, 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile; linear gradient 15–30% solution B in solution A (dotted line) for 60 min at flow rate, 1 ml/min.

특성분석

Bocorpsin의 분자량은 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight(MALDI-TOF) 방법에 의해 2295.45임을 확인하였다(Fig. 2). BCA 법에 의한 단백질 정량분석결과 정량적으로 검량선을 그릴 수 있었으며 트립신으로 반응시킨 시료는 항균활성이 소실됨을 확인하였다(자료 미제시). 이상의 결과로부터 bocorpsin은 펩타이드성 물질임을 확인할 수 있었다. 한편, 아미노산 서열분석은 결과를 얻을 수 없었다.

항균 스펙트럼 분석 및 내성균에 대한 항균활성

Bocorpsin은 그람 양성균 뿐만이 아니라 그람 음성균에도 매우 강한 활성을 나타내며, 특히 항생제 내성균인 MRSA, VISA 및 VRE에 대하여 강한 항균활성을 나타내었다. 그람 양성균인 *B. subtilis* KCTC 3069, *M. luteus* KCTC 1056, *S. aureus* KCTC 1928, *P. aeruginosa* KCTC 2004에 대하여 MIC 값이 각각 3.2, 6.4, 6.4, 12.8 µg/ml이었으며, 그람 음성균인 *E. coli* K12 594, *E. coli* O157 H7 993, *K. pneumoniae* KCTC 2208, *S. flexneri* KCTC 2008에 대하여 각각 1.6, 3.2, 6.4 12.8 µg/ml의 MIC 값을 나타내었다. 또한, 진균인 *C. albicans* KCTC 1940에 대해서도 128.0 µg/ml에서 그 증식을 저해하였다. 특히 메치실린 내성균인 *S. aureus* CCARM 3501와 반코마이신 내성 *S. aureus* (VISA) 및 *E. faecium* 균주(VRE)에 대하여 각각 12.8, 3.2, 1.6 µg/ml의 MIC 값을 나타내어 강한 증식저해 활성을 갖는 것을 알 수 있었다(Table I). 임상에서 분리한 VISA 및 VRE는 반코마이신의 대하여 매우 강한 내성을 나타내는 균주이다. 대조군으로 사용한 magainin II는 VRE에 대한 MIC가 10 µg/ml을 나타내어 bocorpsin이 magainin II에 비해 6배 정도 강한 활성을

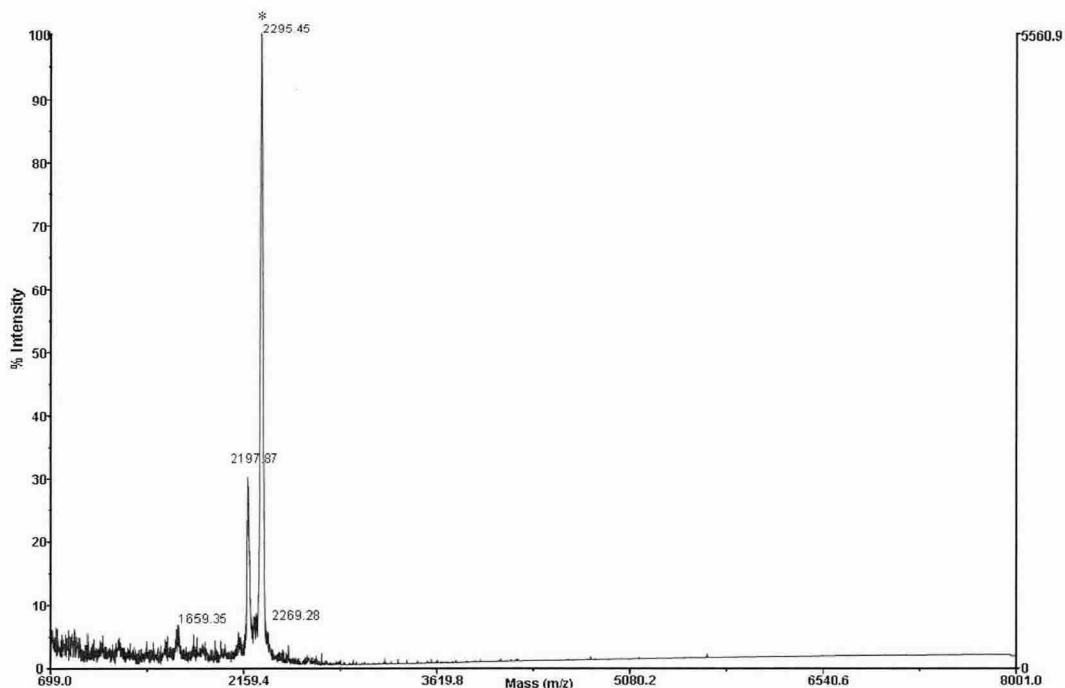


Fig. 2 – MALDI-TOF mass spectrum. Its molecular weight was determined by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry in reflectron mode, using CHCA as a matrix. Mass peak was detected as shown by asterisk (found: m/z 2295.45).

Table I – Antimicrobial activity against various strains

Microorganism	MIC (µg/ml)
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 3069	3.2
<i>Micrococcus luteus</i> KCTC 1056	6.4
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1928	6.4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 2004	12.8
<i>Escherichia coli</i> K12 594	1.6
<i>Escherichia coli</i> O157 H7 993	3.2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	6.4
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2008	12.8
<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	128.0
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3501(MRSA)	12.8
<i>Staphylococcus aureus</i> (VISA)*	3.2
<i>Enterococcus faecium</i> (VRE)**	1.6

*This strain is a high level resistance to vancomycin (MIC 12.8 µg/ml).

**This strain is a high level resistance to vancomycin (MIC 128 µg/ml).

나타냄을 알 수 있었다(자료 미제시). Magainin II는 아프리카 개구리로부터 보고된 항균 펩타이드로서 곤충유래 펩타이드와 같이 생체방어를 담당하는 물질로 알려져 있다.⁷⁾ 또한, Bocorpsin의 VRE에 대한 항균활성을 paper disc 법에 의해 분석한 결과, 100 µg/ml의 반코마이신은 거의 활성을 나타내지 않았으나 5 µM의 bocorpsin은 강한 활성을 나타내었다(Fig. 3).

고 찰

항생요법의 최대문제점은 내성균주의 출현으로 세계적 이슈가

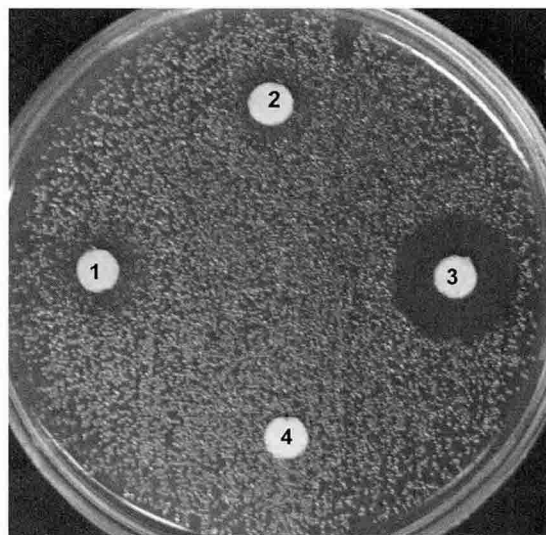


Fig. 3 – Antimicrobial activity on vancomycin-resistant enterococci (VRE). Its antimicrobial activity on vancomycin-resistant enterococci was accessed by paper disc diffusion test. An antimicrobial substance from *B. corpus* was applied on VRE spread plate at a various concentration with control as following; 1, 100 µg/ml of vancomycin; 2, 0.1 µM of antibacterial substance from *B. corpus* 3, 5 µM of antibacterial substance from *B. corpus* 4, PBS.

될 만큼 매우 심각하다. MRSA가 발견된 이래 1990년대에 들어서서는 *S. aureus*의 50% 이상이 MRSA로 분리되면서 이에 감수성이 있는 반코마이신의 사용이 급격히 증가하였다. 그러나 1996

년 이후 일본, 미국 및 프랑스 등에서 VISA가 발견되면서 MRSA에 대한 반코마이신 치료요법의 효율을 저하시키는 요인으로 작용하고 있다.^{16,17)} 한편, 최근 5% 이상의 enterococci 중에서 반코마이신 내성을 나타내는 VRE가 발견되고 있고, VRE의 원내 감염 발생률은 매년 증가하는 추세이며 VRE의 내성유전자가 다른 그람양성구균으로 전파될 가능성이 제기되었다. 실제로 지난 수년간 enterococcal vancomycin resistant gene인 *vanA*, *vanB* 및 *vanC*가 VISA의 내성원인 유전자로 추정되었으며 최근 미국에서 MRSA로부터 분리된 vancomycin 고도내성구균에서 *vanA* 유전자가 발견되었다.¹⁸⁾ 이상과 같이, MRSA, VISA 및 VRE에 적절히 사용 할 수 있는 항생물질이 부족한 실정이므로 이 균주들에 효과적으로 작용하는 항생물질의 개발이 요구된다. 최근 개발된 내성균 치료용 항생제 Linezolid가 임상에서 많이 사용되고 있는데 이미 Linezolid 내성균의 출현이 보고되었다.¹⁹⁾ 향후 항생물질의 개발 방향은 기존의 항생제와는 다른 항생기전을 나타냄으로써 내성이 발생하지 않는 항생물질을 개발하는 것이 매우 시급하고 중요하다고 사료된다. 곤충을 비롯하여 고등동물까지 생체방어물질로서 다양하게 존재하는 항균 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP)는 주로 병원균의 세포벽에 membrane pore를 형성하거나 이온채널에 길항적으로 작용하여 그 활성을 나타내는 것으로 보고되고 있다.²⁰⁾ 최근에 보고된 진균 유래 항균단백질 Plectasin 등 몇 종의 후보 펩타이드를 이용하여 새로운 항생제를 개발 중에 있다.²¹⁾

본 연구를 통해 백강잠으로부터 분리·정제된 펩타이드성 항균물질 bocorpsin은 그람 양성균 뿐만 아니라 그람 음성균에도 매우 강한 활성을 나타내며, 특히 MRSA, VISA 및 VRE에 대하여 다른 항균펩타이드에 비해 강한 항균활성을 나타내었다(자료 미제시). 누에 유충에 백강잠이 감염되면 누에 체내에서 생체방어기구가 활성화됨으로써 여러 항균물질이 유도될 것이다. Bocorpsin도 생체방어기구가 활성화되면서 유도되어 누에의 백강잠에 대한 방어기구에 중요한 역할을 하는 물질일 것으로 사료된다. Bocorpsin은 UV 극대 흡수 파장이 220 nm와 285 nm로 전형적인 펩타이드의 특성을 보였다(자료 미제시). 또한, 항균 펩타이드와 유사한 분자량을 갖고 있으며, 트립신에 의해 항균 활성이 소실되었으므로 Lys 또는 Arg이 함유된 펩타이드성 물질로 추정할 수 있다. 한편 에드만 분해에 의한 아미노산 서열 자동분석결과로부터 어떤 아미노산도 검출되지 않았으므로 아미노 말단이 수식되어 있을 것으로 예상된다. Bocorpsin을 항생물질 개발의 선도물질로 응용하기 위해서는 그 구조 및 활성 메카니즘에 관한 후속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

항생제 내성균인 MRSA와 VRE에 대한 항생물질 개발을 목

표로 곤충 유래의 생약인 백강잠으로부터 항균활성을 검출하였다. 백강잠 추출물을 C18 역상 칼럼 크로마토그래피 및 C18 역상 HPLC와 carbon-500 HPLC를 시행하여 순수하게 정제된 물질을 분리하였으며 이 항균물질을 bocorpsin으로 명명하였다. 이 물질은 그람 양성균 뿐만 아니라 그람 음성균에도 매우 강한 활성을 나타내었으며, 특히 VISA, MRSA 및 VRE에 대하여 강한 항균활성을 나타내었다. Bocorpsin의 분자량은 2295.45 이었으며, 트립신에 의해 항균활성이 소실되었으므로 펩타이드성 물질로 추정된다.

감사의 말씀

본 연구는 2003년도 교육인적자원부 지방대육성지원사업(KRF-2003-002-E00042) 및 지방연구중심대학육성사업에 의해 일부 지원되었습니다.

참고문헌

- 1) Schroder, J. M. and Harder, J. : Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 469 (2006).
- 2) Andreu, D. and Rivas, L. : Animal antimicrobial peptide: An overview. *Biopolymers* **55**, 415 (1998).
- 3) Matsuyama, K. and Natori, S. : Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*. *J. Biol. Chem.* **263**, 17112 (1988).
- 4) Boman, H. G., Nilsson, I. and Rasmuson, B. : Inducible antibacterial defence system in *Drosophila*. *Nature* **237**, 232 (1972).
- 5) Leem, J.-Y., Nishimura, C., Kurata, S., Shimada, I., Kobayashi, A. and Natori, S. : Purification and characterization of *N*- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3,4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biol. Chem.* **271**, 13573 (1996).
- 6) Nakajima, Y., Alvarez-Bravo, J., Cho, J., Homma, K., Kanegasaki, S. and Natori, S. : Chemotherapeutic activity of synthetic antimicrobial peptides: correlation between chemotherapeutic activity and neutrophil-activating activity. *FEBS Lett.* **415**, 64 (1997).
- 7) Zasloff, M. : Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389 (2002).
- 8) Wilson, C. and Peter, F. M. : *Biodiversity*. Natl. Acad. Press (1988).
- 9) Hoffmann, J. A., Janeway, C. A. Jr. and Natori, S. : Phylogenetic perspectives in immunity-The insect host defense. *Molecular Biology Intelligence Unit.*, R.G. Landes Co. (1994).
- 10) Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Public Health,

- PR. China : *A coloured atlas of the Chinese materia medica specified in pharmacopoeia of the people's republic of China*, Guangdong science & technology press, p. 482 (1995).
- 11) Hiramatsu, K., Cui, L., Kuroda, M. and Ito, T. : The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends of Microbiol.* **9**, 486 (2001).
 - 12) Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, Li., Yamamoto, K. and Hiramatsu, K. : Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**, 1819 (2002).
 - 13) Kim, M. N., Pai, C. H., Woo, J. H., Ryu, J. S. and Hiramatsu, K. : Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 3879 (2000).
 - 14) Arthur, M., Reynolds, P. and Courvalin, P. : Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol.* **4**, 401 (1996).
 - 15) NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. NCCLS approved standard M7-A6. NCCLS, Wayne, Pa. (2003)
 - 16) Marchese, A., Debbia, E. A., Tonoli, E., Gualco, L. and Schito, A. M. : *In vitro* activity of thiamphenicol against multiresistant *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Staphylococcus aureus* in Italy. *J. Chemother.* **14**, 554 (2002).
 - 17) Linares, J. : The VISA/GISA problem: therapeutic implications, *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 815 (2001).
 - 18) Chang, S., Sievert, D. M., Hageman, J. C., Boulton, M. L., Tenover, F. C., Downes, F. P., Shah, S., Rudrik, J. T., Pupp, G. R., Brown, W. J., Cardo, D. and Fridkin, S. K. : Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene. *N. Engl. J. Med.* **384**, 1342 (2003).
 - 19) Tsiodras, S., Gold, H. S., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Wennersten, C., Venkataraman, L., Moellering, R. C. and Ferraro, M. J. : Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **358**, 207 (2001).
 - 20) Brogden, K. A. : Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 238 (2005).
 - 21) Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sonksen, C. P., Ludvigsen, S., Raventos, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jorgensen, S. G., Sorensen, M. V., Christensen, B. E., Kjaerulff, S., Frimodt-Moller, N., Lehrer, R. I., Zasloff, M. and Kristensen, H. H. : Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* **437**, 975 (2005).