

천잠 세크로핀 항균펩타이드 분리 및 정제

김성렬* · 구태원 · 최광호 · 박승원 · 김성완 · 황재삼 · 강석우
농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Isolation and purification of a cecropin-like antimicrobial peptide from the japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*

Seong-Ryul Kim*, Tae-Won Goo, Kwang-Ho Choi, Seung-Won Park,
Sung-Wan Kim, Jae-Sam Hwang, Seok-Woo Kang

Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Republic of Korea
(Received April 18, 2012, Accepted October 16, 2012)

ABSTRACT

Cecropin is a well-studied antimicrobial peptide that play important role as key factor in insect humoral immunity. In this study, cecropin-like antimicrobial peptide was isolated and purified from the larval haemolymph of immune-challenged japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*. To isolate antimicrobial peptide, we separated and compared acidic extracted hemolymph protein bands between control and immune-challenged larvae using SDS-PAGE analysis. In the immune hemolymph extract, but not of non-immune hemolymph, we detected differential expressed peptide band with molecular mass 4,223.01 Da. To understand this peptide better, we successfully purified this peptide using cation exchange chromatography and gel permeation chromatography. Its N-terminal amino acid sequence obtained by Edman degradation evidenced a significant degree of identity with other lepidopteran cecropins. The purified *A. yamamai* cecropin-like peptide showed a broad spectrum of activity against fungi, Gram-negative and Gram-positive bacteria.

Key words : *Antheraea yamamai*, Cecropin, Antimicrobial peptide

서 론

곤충은 고등동물이 지닌 후천적 면역인자와는 달리 무척추동물과 같은 세포성 면역과 체액성 면역반응을 포함하는 선천적 면역인자를 분비함으로써 자신을 효과적으로 보호하는 면역체계를 가지고 있다(Boman 1995, Bulet et al. 1999). 이와 같은 선천적 면역은 곤충을 포함한 무척추동물에 있어서 초기감염에 대한 효과적인 방어인자로 중요한 역할을 한다. 곤충의 선천성 면역반응에서 세포성 면역은 세균, 곰팡이, 선충을 포함한 원생동물에 대한 식균작용, 결절형성과 캡슐형성을 포함하며, 체액성 면역반응에서는 병원체의 침입으로 인해 다양한 종류의 단백질 및 펩타이드가 지방체 및 혈구세포에서 합성되어 혈림프로 분비되는데 이들은 병원체에 대한 강력한 방어인자로 이용된다(Boman 1995, Hoffman et al. 1999, Bulet et al.

2004, Brogden 2005). 곤충의 체액성 면역반응의 일환으로 분비되는 항균성 펩타이드들은 그들의 아미노산 서열 및 구조에 따라 cecropins, defensins, proline-rich peptides, glycine-rich peptides 및 lysozyme류 등으로 분류되며, 나비목, 벌목, 파리목 및 딱정벌레목 등 다양한 곤충 종류로부터 발견되어졌다(Casteels et al. 1990, Otvos 2000, Zasloff 2002, Kim et al. 2007).

이들 곤충 항균 펩타이드 중 세크로핀류는 일반적으로 양친매성 헬릭스 구조를 가지는 양이온성 펩타이드로 35개에서 39개의 아미노산 잔기로 구성되어 있다(Cociancic et al. 1994, Saito et al. 2005). 그들은 면역 유도된 *Hyalophora cecropia*(Steiner et al. 1981)에서 최초로 분리된 이후 누에, 초파리 등 다양한 곤충 종에서 보고되었다(Kylsten et al. 1990, Morishima et al. 1990, Saito et al. 2005). 이들 세크로핀들은 병원균에 대한 광범위한 항균활성과 세포막

*Corresponding author. E-mail: ksr319@korea.kr

을 직접 파괴하는 작용기작을 가지고 있어 새로운 항생제 자원으로 부각되고 있다(DeLucca et al. 1997, Zaiou 2007).

따라서 본 연구에서는 곤충의 면역반응에 의해 생성되는 항균 펩타이드를 새로운 천연 항생제 개발을 위한 소재로 활용할 목적으로 면역 유도된 천잠(*Antheraea yamamai*) 유충 혈림프에서 처음으로 세크로핀류 항균 펩타이드를 분리하여 다양한 병원성 세균에 대한 항균활성을 검정하였다.

재료 및 방법

1. 천잠 유충의 면역유도

천잠(*A. yamamai*) 유충으로부터 세크로핀 항균 펩타이드를 분리하기 위하여 종령 유충에 박테리아 막 성분인 lipopolysaccharide(LPS, sigma)를 주사하여 면역화 하였다. 즉, 50 - 100 ul의 LPS(50 mg/ml) 용액을 1회용 미세주사기를 이용하여 종령 유충 체강에 주사한 다음 26°C에서 18시간 면역을 유도하였다.

2. 혈림프 단백질 추출 및 SDS-PAGE 분석

면역 유도된 천잠 유충 및 무처리 정상 유충으로부터 혈림프를 채취하여 13,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 그 상등액을 -20°C에 보관 한 다음 단백질 추출에 사용하였다. 보관된 혈림프 시료를 동일한 양의 1% 아세트산 용액과 진탕, 혼합한 다음 실온에서 2시간 교반을 통하여 단백질을 추출하였다. 혼합액은 4°C에서 13,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상등액을 회수한 다음 ultra-filtration 으로 저분자 단백질(20 kDa cut off)을 분리하여 SDS-peptide 전기영동 분석에 사용하였다. 단백질 전기영동 후, gel은 시각화를 위해 0.1% Coomassie Brilliant Blue G250으로 염색 및 탈색 한 다음 gel 이미지 비교 분석을 통하여 면역 유도된 혈림프 시료에 특이적으로 발현되는 펩타이드 밴드를 분리하였다. 이후 분리된 펩타이드 밴드는 4700 proteomics Analyzer(Applied Biosystems)를 이용한 MALDI-TOF MS 분석을 통하여 질량을 측정하였다.

3. 세크로핀 항균 펩타이드 정제 및 동정

면역 유도된 유충 혈림프 추출물을 냉동건조기를 이용하여 동결 건조한 다음 0.3% 아세트산에 용해시킨 후, 14,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 상등액을 수거하였다. 이후 Hitrap SP HP 컬럼을 이용한 양이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 세크로핀 항균 펩타이드를 정제하였다. 용출된 단백질 분획은 16.5% SDS-peptide 전기영동 및 방사선 확산 분석(Radial Diffusion Assay : RDA)을 이용한 항균활성 검정을 통하여 확인하였다. 항균 펩타이드가 포함된 분획은 다시 Superdex Peptide 컬럼을 이용한

액상 크로마토그래피(FPLC)를 사용하여 순수 정제하였고, 16.5% SDS-Peptide 전기영동을 통하여 그 정제도 및 분자량을 분석하였다. 순수 분리 정제된 세크로핀 항균 펩타이드는 Applied Biosystem Procise Sequencer를 사용한 Edman degradation법으로 N말단 아미노산 서열을 결정한 다음 BLAST 상동성 분석을 통하여 동정하였다.

4. 천잠 세크로핀 항균 활성 검정

정제된 천잠 세크로핀 및 대조구로 사용한 호랑나비 유래 파필리오신 과 멜리틴의 항균 활성은 병원균에 대한 최저성장저해농도(MIC: minimum inhibitory concentration)를 측정하여 검정하였다. 항균 활성 분석에 사용한 그람 음성세균 *Escherichia coli* ML35, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 그람양성세균 *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*들은 3%(w/v) TSB(Tryptic Soy Broth, Difco, USA) 액체 배지에서 37°C, 200 rpm 조건으로 18시간 진탕배양한 후, 다시 동일한 조건에서 4×10^6 CFU/ml 농도가 되도록 2시간 30분간 2차 배양하였다. 진균인 *Candida albicans*는 YPD 배지(1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)에서 30°C, 200 rpm 조건으로 24시간 진탕배양한 후 사용하였다. 96-well microplate의 각 well에 90 μ l의 세균 배양액 (2×10^6 CFU/ml)을 분주 한 후, 단계적으로 희석된 항균 펩타이드 용액들을 각 well당 10 μ l씩 첨가한 다음 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 분광 광도계(600 nm)에서 흡광도를 측정하여 MIC를 결정하였다. 또한 용출된 재조합 항균 펩타이드 분획들은 RDA 분석으로 병원성 대장균(*E. coli* ML35)에 대한 항균활성을 검정하였다. 멸균된 RDA용 underlay gel(9mM sodium phosphate, 1mM sodium citrate, pH7.4, 1% low electroendosmosis agarose, 0.03% TSB)에 배양된 대장균(4×10^6 CFU/ml)을 혼합하여 100 mm 사각플레이트에 부어 굳혔다. 언더레이 겔에 지름 3 mm의 구멍을 내어 시료를 10 μ l씩 구멍에 넣었고, 펩타이드가 확산되도록 37°C에서 3시간 배양한 후, 그 위에 RDA용 overlay gel(6% TSB, 1% low electroendosmosis agarose)을 부어 굳힌 다음 37°C에서 18시간 동안 배양하였다. 이후 clear zone의 크기를 측정하여 항균 활성을 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 면역유도에 따른 특이 발현 펩타이드 분리 및 분자량 측정

본 연구에서는 천잠 유래 항균 펩타이드를 분리하기 위해서 5령 유충 체강에 박테리아 세포막 성분인 LPS를 주

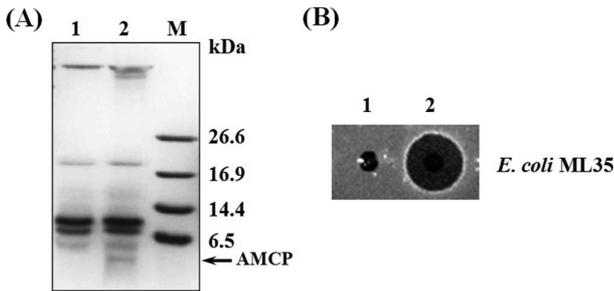


Fig. 1. Isolation of antimicrobial candidate peptide (AMCP) from *A. yamamai* hemolymph extracts. (A) Tricine SDS-PAGE of *A. yamamai* hemolymph extracts. The acidic extracts (10 ug of total protein) were resolved in 16.5% polyacrylamide gel. Lane 1, non-immune hemolymph extract; lane 2, immune hemolymph extract; lane M, molecular weight mark. (B) Growth inhibition of *E. coli* ML35. Lane 1, non-immune hemolymph extract; lane 2, immune hemolymph extract

사하여 선천성 면역 반응을 유도한 다음 정상 유충의 혈림프 시료와 SDS-PAGE 겔 이미지 비교분석 및 항균활성 비교분석 실시하였다(Fig. 1). 단백질 전기영동 분석 결과, 면역 유도된 혈림프 단백질 추출 시료에서만 특이적으로 발현되는 후보 항균 펩타이드(AMCP) 1종을 확인하였으며 그 분자량은 약 4kDa으로 측정되었다(Fig. 1A). 또한 면역 유도 혈림프 단백질 추출물은 병원성 대장균(*E. coli* ML35)에 대한 RDA 분석에서 매우 높은 항균 활성을 나타냈었다(Fig. 1B). 반면에 정상 유충 혈림프에서는 항균활성이 전혀 나타나지 않았다. 특이적으로 발현된 펩

타이드 밴드를 겔로부터 분리한 다음 trypsin을 처리하여 단편으로 분해시킨 후 MALDI-TOF MS 분석에 의한 peptide mass fingerprinting을 통하여 세크로핀류 항균 펩타이드로 확인되었다. 또한 MALDI-TOF MS을 통한 펩타이드 질량 분석 결과, 그 분자량이 4223.01 Da으로 측정되었다(Fig. 2).

2. 천잠 세크로핀 항균 펩타이드 정제 및 동정

LPS 면역 유도된 천잠 혈림프 단백질 추출 시료로부터 양이온 교환 크로마토그래피 및 Superdex peptide 컬럼을 이용한 액상 크로마토그래피(FPLC)을 사용하여 세크로핀 항균펩타이드를 순수 정제하였다(Fig. 3). 일반적으로 세크로핀을 포함한 곤충 항균펩타이드 대부분은 양전하를 띠고 있어 음전하를 가지는 세포막 지질에 쉽게 결합하는 특성이 있다(Hoffman et al. 1999, Bulet et al. 2004). 따라서 본 연구에서 세크로핀 항균 펩타이드를 양이온 교환 크로마토그래피 방법을 이용하여 손쉽게 정제하였다(Fig. 3A). 즉, 0.3% 아세트산 용액에서 세크로핀을 음전하를 띠는 담체에 결합시킨 후 1M 염화나트륨을 사용하여 결합된 단백질을 점차적으로 용출하여 분획하였다. 용출된 단백질 분획은 단백질 전기영동 및 항균활성검정을 통하여 세크로핀이 포함된 분획을 선별하였다. 회수한 분획을 냉동건조로 농축한 다음 염 및 기타 단백질을 제거하기 위해 Superdex peptide 컬럼으로 gel filtration 크로마토그래피를 수행하여 2차 정제하였다(Fig. 3B). 또한 용출된 분획은 단백질 전기영동 분석 및 항균활성 검정을

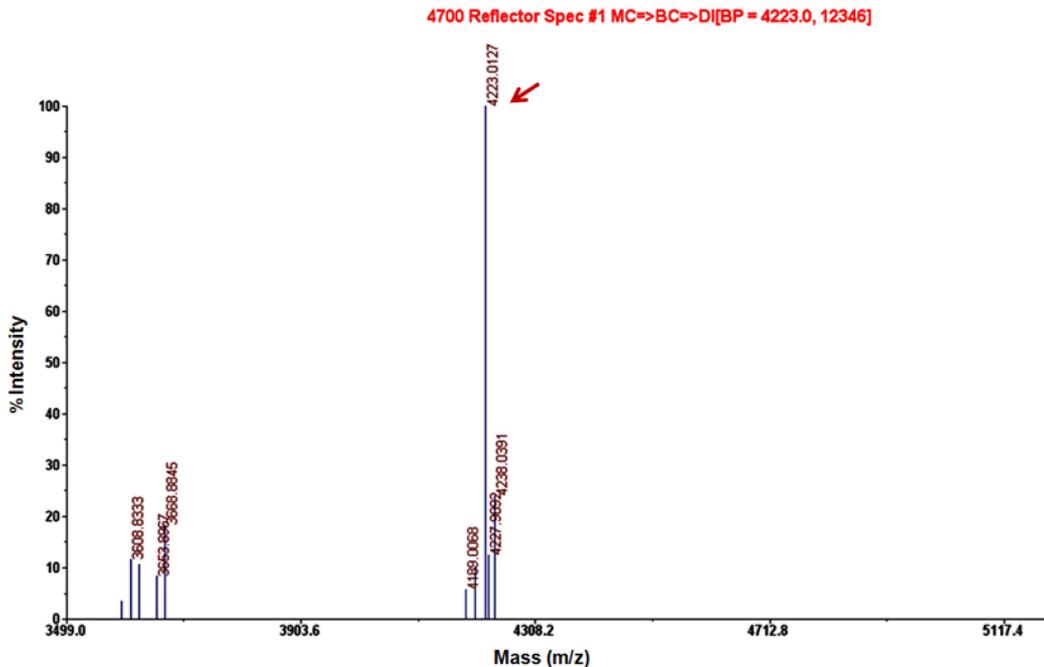


Fig. 2. MALDI-TOF MS spectrum of Isolated antimicrobial candidate peptide (AMCP) from *A. yamamai* hemolymph extracts. The major peak is at an m/z value of 4,223.01.

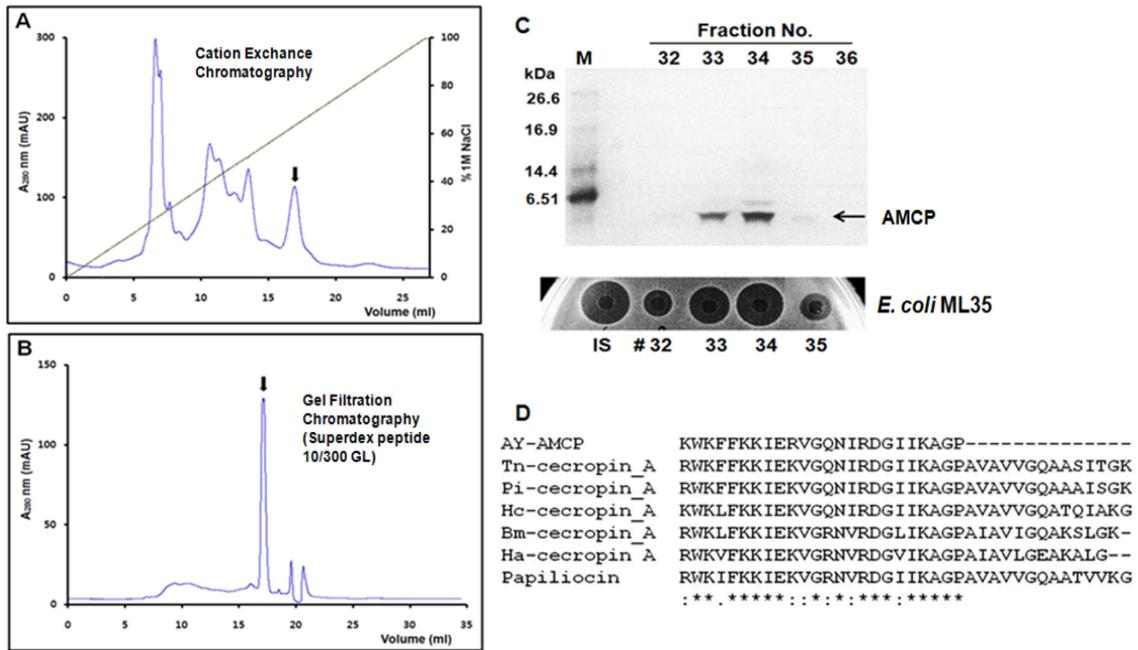


Fig. 3. Purification and identification of cecropin from *A. yamamai* hemolymph extracts. (A) Profile of cation exchange chromatography as the first step in purification. (B) Profile of superdex peptide gel permeation chromatography as the final purification. Arrow indicates the peak containing *A. yamamai* cecropin. (C) Tricine SDS-PAGE analysis and inhibition zone assay of fractions 32-35 collected from the superdex peptide column. (D) N-terminal amino acid sequence and multiple sequence alignment of purified *A. yamamai* cecropin.

Table 1. Antimicrobial activity spectrum of purified *A. yamamai* cecropin

Microorganism	Minimum Inhibitory Concentration(MIC, ug/ml)	
	<i>A. yamamai</i> cecropin	Melittin
Gram negative bacteria		
<i>E. coli</i> ML35	1	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	8
Gram positive bacteria		
<i>Staphylococcus aureus</i>	64	4
<i>Enterococcus faecalis</i>	128	4
<i>Micrococcus luteus</i>	128	4
Yeast fungi		
<i>Candida albicans</i>	64	4

통하여 확인하였다(Fig. 3C). SDS-PAGE 분석 결과, 분획 32, 33, 34, 35에서 약 4 kDa의 항균 펩타이드 밴드를 확인하였으며, 또한 이들 분획은 대장균에 대한 RDA 분석에서 항균활성을 나타냈었다. 정제된 세크로핀은 Applied Biosystem Procise Sequencer를 사용하여 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 분석한 N-말단 아미노산 서열은 KWKFFKKIERVG이었고 누에를 포함한 나비목 곤충의

Cecropin A 항균 펩타이드의 N-말단 아미노산 서열과 약 80% 이상의 높은 상동성을 나타냈었다(Fig. 3D).

3. 천잠 세크로핀 항균 펩타이드 항균 활성 검증

정제된 천잠 세크로핀의 항균 활성은 최소생장억제농도(MIC) 측정을 통하여 검증하였다(Table. 1). 천잠 세크로핀은 그람음성세균 *E. coli* ML35, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* 및 그람양성세균 *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. luteus*에 대한 항균활성을 나타냈었다. 또한 칸디다증을 유발하는 *C. albicans*에 대해서도 항진균활성을 보였다. 이들 병원균에 대한 최소생장억제농도는 *E. coli* ML35에 1 ug/ml, *K. pneumoniae* 및 *P. aeruginosa*에서는 2 ug/ml, *S. aureus*는 64 ug/ml, *E. faecalis* 및 *M. luteus*에 대해서는 128 ug/ml로 측정되었으며 진균 *C. albicans*에서는 64 ug/ml로 확인되었다. 즉, 천잠 세크로핀은 3종의 그람양성세균 및 1종의 진균에 대해서는 강력한 항균 및 항진균 활성을 가지는 melittin에 비해 항균활성이 낮았지만 3종의 그람음성세균에서는 멜리틴에 비해 4~8배 이상의 우수한 항균력을 나타냈었다. 따라서 천잠 세크로핀은 기존에 보고된 다양한 곤충의 세크로핀과 유사한 광범위한 항균 스펙을 가지고 있음을 확인하였다. 일반적으로 곤충 항균 펩타이드의 미생물에 대한 작용기작으로는 carpet 모델, toroidal-hole 모델 및 barrel stave 모델로 설명되는 세포

막을 직접 파괴하여 박테리아를 치사시키는 기작과 세포막을 통과하여 세포질에서 DNA합성 억제 및 성장과 관련된 대사 작용 억제를 통하여 작용하는 기작이 알려져 있다(Powers and Hancock 2003). 세크로핀의 경우 전자의 작용기작을 갖는 항균 펩타이드로 미생물에 대해 보다 효과적으로 작용하며 광범위한 항균스펙을 나타낸다. 따라서 본 연구에서 분리된 천잠 세크로핀은 새로운 천연 항생제 개발을 위한 의약 소재로 그 가치가 클 것으로 기대된다.

적 요

세크로핀(cecropin)은 곤충의 체액성 면역에 있어서 효과적인 방어인자로 작용하는 항균 펩타이드로 잘 알려져 있다. 본 연구에서는 면역 유도된 천잠, *Antheraea yamamai* 유충 혈림프로부터 세크로핀 항균 펩타이드 분리 및 정제를 실시하였다. 먼저 항균 펩타이드를 분리하기 위해서, 면역 유도된 유충 및 정상 유충으로부터 추출된 혈림프 단백질 시료에 대한 단백질 전기영동(SDS-PAGE)를 통하여 비교분석하였다. 정상누에 혈림프 시료에 비해 면역 유도된 혈림프 추출물에서만 특이적으로 발현되는 분자량 4,223.01 Da의 펩타이드 밴드를 검출하였다. 선발된 면역 유도 특이적 발현 펩타이드의 특성 분석을 위해서 이온 교환 크로마토그래피 및 gel permeation 크로마토그래피를 수행하여 특이적으로 발현되는 펩타이드를 성공적으로 순수 정제하였다. 정제된 펩타이드는 Edman degradation 법으로 N말단 아미노산 서열을 결정하였고 다른 나비목 곤충의 세크로핀과 매우 높은 상동성을 나타내어 세크로핀으로 동정하였다. 또한 정제된 천잠 세크로핀 항균 펩타이드는 그람음성세균, 그람양성세균 및 곰팡이에 대해 폭 넓은 항균 스펙트럼을 나타냈었다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 생명산업기술개발사업(No. 311059-04)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

인용문헌

Boman HG (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 61~92.

Brogden K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Rev Microbiol* **3**, 238~250.

Bulet P, Hetru C, Dimarcq J, Hoffmann D (1999) Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Dev Comp Immunol* **23**, 329~344.

Bulet P, Stocklin R, Menin L (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**, 169~184.

Casteels P, Ampe C, Riviere L, Damme JV, Elicone C, Fleming M, Jacobs F, Tempst P (1990) Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *Eur J Biochem* **187**, 381~386.

Cociancich S, Bulet P, Hetru C, Hoffmann JA (1994) The inducible antibacterial peptides of insects. *Parasitol Today* **132**~139.

DeLucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE, Walsh TJ (1997) Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 481~483.

Hoffman JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313~1318.

Kim SR, Lee EM, Yoon HJ, Choi YS, Yun EY, Hwang JS, Jin BR, Lee IH, Kim I (2007) Antibacterial activity of peptides synthesized based on the *Bombus ignitus* abaecin, a novel proline-rich antimicrobial peptide. *Int J Indust Entomol* **14(2)**, 147~150.

Kylsten P, Samakovlis C, Hultmark D (1990) The cecropin locus in *Drosophila*; a compact gene cluster involved in the response to infection. *EMBO J* **9**, 217~224.

Morishima I, Suginaka S, Ueno T, Hirano H (1990) Isolation and structure of cecropins, inducible antibacterial peptides, from the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B* **95**, 551~554.

Otvos L (2000) Antibacterial peptides isolated from insects. *J Peptide Science* **6**, 497~511.

Powers JP, Hancock RE (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681~1691.

Saito A, Ueda K, Imamura M, Atsumi S, Tabunoki H, Miura N, Watanabe A, Kitami M, Sato R (2005) Purification and cDNA cloning of a cecropin from the longicorn beetle, *Acalolepta luxuriosa*. *Comp Biochem Physiol B* **142**, 317~323.

Steiner H, Hultmark D, Engstrom A, Bennich H, Boman HG (1981) Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246~248.

Zaslouff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organism. *Nature* **415**, 329~344.

Zaiou M (2007) Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med (Berl)* **85**, 317~329.