

호박벌 유래 디펜신 유전자의 분자적 특성분석 및 항균 활성

강희윤 · 김인우¹ · 이준하¹ · 권용남¹ · 윤은영¹ · 윤희주¹ · 김성렬¹ · 김익수² · 황재삼^{1*}
경기도농업기술원, 농촌진흥청 농업생물부, 전남대학교 농업생명과학대학

Antimicrobial activity and characterization for defensin of synthetic oligopeptides derived from *Bombus ignitus*

Heui-Yun Kang, In-Woo Kim¹, Joon-Ha Lee¹, Young Nam Kwon¹, Eun-Young Yun¹, Hyung Joo Yoon¹, Seong-Ryul Kim¹, Iksoo Kim², Jae-Sam Hwang^{1*}

Gyeonggido Agricultural research and Extension Services, Hwanseong 445-300

¹Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-100, Republic of Korea

²Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Republic of Korea

(Received September 10, 2012, Accepted October 17, 2012)

Abstract

Antimicrobial peptides of insects are found and reported as immune defence system against infectious agents. The peptides are produced by fat body cells and thrombocytoids, a blood cell type. Defensin is 38-45 amino acids long and consists of an α -helix linked by a loop to an antiparallel β -sheet. Defensin from a bumblebee, *Bombus ignitus*, is known to comprise 52 amino acid residues. This peptide consists of two α -helixes; ACAANCLSM and KTNFKDLWDKRF and one β -sheet; GGRCEVCLCR. We carried out antibacterial activity test by radial diffusion assay against *Staphylococcus aureus* (Gram positive), *Escherichia coli* (Gram negative), *Pseudomonas syringae* (Gram negative), *Candida albicans* (fungi), MDRPA, MRSA, and VRE (antimicrobial resistant microbes) with synthetic oligopeptides from Pepton (Daejeon, Korea). The predicted curtailment fragment (GGRCEVCLCR-NH₂) for β -sheet had strong antibacterial activity when internal amino acids were removed. But, curtailment fragments (ACAANCLSM-NH₂ and TNFKDLWDKR-NH₂) of α -helix were not showed antibacterial activity. These synthetic oligopeptides were showed the great activity against Gram positive and negative bacteria.

Key words : Antimicrobial peptides, Defensin, *Bombus ignitus*

서 론

항생제의 남용으로 인하여 저항성을 나타내는 세균이 출현하면서 수퍼박테리아와 같이 현재 사용되고 있는 대부분의 항생제에 내성을 갖는 균주가 새로운 항생제의 개발속도보다 빠르게 나타나고 있다. 세균의 감염을 막기 위한 노력은 항생활성을 갖는 화합물질을 사용하는 한 끊임없이 이루어져야 할 것이고, 이를 극복하기 위해서 항생제에 대한 내성을 갖지 못하게 하는 것이 아니라 항생제 내성을 갖는 속도를 줄이며, 내성이 확산되지 못하게 하는 노력이 필요

하다(Andreu and Rivas 1998, Hancock and Diamond 2000, Hancock and Scott 2000). 항균 펩타이드는 미생물 종류에 상관없이 몇 시간 내에 작용하고, 면역, 거부반응, 내성 등의 문제없이 자연적으로 생성된 자연항생제로 알려져 있다. 많은 연구자들은 세균의 감염에 대해 효과적인 대응책으로 기존의 화합물질의 항생제와는 구별되는 새로운 개념의 항생제인 항균활성을 갖는 펩타이드를 선발하려는 연구를 진행하고 있으며, 자연계에서 가장 번성한 생물종이면서 다양한 생태환경에 대한 적응능력이 뛰어나고, 효과적인 방어수단을 갖고 있는 곤충으로부터 생체방어물질을 탐색하여, 새로

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

은 항균활성 펩타이드를 선발하는 연구가 활발히 이루어지고 있다(Epand et al. 1995, Epand and Vogel 1999, Oren and Shai 1998, Tossi et al. 2000).

1980년대 Boman group에 의해 cecropin이 *Hyalophora cecropia*로부터 최초로 분리(Steiner et al. 1981)된 이후에 약 170여종의 항균활성 펩타이드가 보고되었고, 이들 대부분은 5 kDa 이하의 저분자물질로서 positive net charge를 가지며, α -helix를 형성하거나(Park et al. 1996, Samakovlis et al. 1991, Zasloff 1987), cystein 잔기를 갖는 cyclic peptide, proline/glycine 이 풍부한 펩타이드(Bulet et al. 1991, Casteels et al. 1989, Casteels et al. 1990, Lee et al. 1994) 등으로 구분할 수 있다. 대표적인 α -helical linear peptide인 cecropin은 C-말단이 amidation 되어 있고, Gram positive와 Gram negative bacteria에 강한 활성을 나타내며, defensin과 같이 disulfide bond를 형성하는 펩타이드는 Gram positive bacteria에 높은 항균활성을 갖고 있다(Lehrer et al. 1991, Selsted et al. 1993). 또한, proline/glycine rich peptide 등은 주로 Gram negative bacteria에 높은 활성을 나타내고 있으며 대표적인 펩타이드로는 abaecin, attacin 등이 있다(Hultmark et al. 1990, Casteels et al. 1990). 또한, 두개 이상의 S-S 결합을 지닌 β -sheet 구조의 펩타이드들은 주로 식세포(phagocytes)의 granule에서 발견되어 왔고 그 대표적인 펩타이드가 디펜신으로 알려져 있으며, 특히 intradisulfide 결합에 의해 형성된 분자내의 ring 구조에는 아르기닌과 같은 염기성 아미노산이 존재하여 ring 구조의 양전하가 펩타이드의 항균활성을 나타내는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Lehrer et al. 1991, Selsted et al. 1993).

현재까지 알려진 곤충유래 항균활성 펩타이드들은 비교적 작은 분자량에 구조가 간단하고, 활성부위의 일부 아미노산을 치환함으로써 항균능력을 조절할 수 있으며, 생체에서 유래한 것이므로 안정성이 높고 부작용이 적은 항생제 개발이 가능할 것이다(Hancock and Patrzykat 2002, Saido-Sakanaka et al. 1999). 따라서 곤충으로부터 탐색, 개발되고 있는 생체활성물질이나 생체방어물질은 곤충의 생물다양성만큼이나 잠재력이 크고, 곤충유래 항균 펩타이드의 유전자를 *in vitro*에서 발현시킴으로써 유용물질의 대량생산 시스템에 적용할 수 있을 것으로 기대한다.

본 연구는 곤충유래 항균 펩타이드를 이용하여 농작물 및 인체관련 병원균의 제어를 위한 소재화 개발에 이용할 수 있는 호박벌 유래 디펜신의 유전자 구조분석을 통한 항균 활성 부위를 선발 하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 펩타이드 합성

EST 분석에 의해 얻어진 디펜신 유전자의 full-length

Table 1. The strain which is used assay for antimicrobial activity

Type	Strain	Defensin
Gram negative	<i>Escherichia coli</i> ML35	○
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	○
Gram positive	<i>Bacillus subtilis</i>	-
	<i>Micrococcus luteus</i>	○
	<i>Enterococcus faecalis</i>	○
	<i>Enterococcus hirae</i>	○
	<i>Staphylococcus aureus</i>	○
Fungi	<i>Candida albicans</i>	○
Resistant microbe for antibiotics	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (MDRPA)(-)	○
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)(+)	○
	<i>Vancomycin resistant enterococci</i> (VRE)(+)	-
Plant Pathogenic microbe	<i>Pectrobacterium carotovorum</i>	○
	<i>Pseudomonas syringae</i>	○

cDNA 구조를 분석하고, 호박벌의 유전자 정보를 NCBI의 Gene bank로부터 검색한 후, FASTA를 이용하여 아미노산 서열간의 상동성을 확인한 후에 항균활성이 있다고 보고되어진 우수한 펩타이드 서열을 선발하였다. 단백질 구조 예상 서버를 운용하고 있는 Bioinformatics Unit - University College London의 PSIPRED에서 항균활성이 우수하다고 선발된 펩타이드서열에 대하여 2차구조를 예측하여 구조와 잔기 길이에 따라 (주)웹트론으로부터 제작하였고, 합성펩타이드의 C-말단은 amidation 처리하도록 하였다.

2. 세균/진균

항균력 검정을 위하여 세균(Gram negative, Gram positive), 진균, 내성균주 및 식물병원균 등의 미생물을 시험균주로 사용하였다(Table 1). 세균과 진균은 기존에 실험실에서 분양받아 계대 배양하여 사용하던 균주이고, 내성균주는 서울여자대학교 항생제 내성균주은행(CCARM)으로부터 분양 받았고, 식물병원균은 농촌진흥청 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양받아 사용하였다.

3. Radial diffusion assay

시험균주는 Tryptic soy broth (TSB) 배지 20 ml에 중간 지수기까지 배양하였다. 하층고체배지는 citrate phosphate buffer (9 mM sodium phosphate, 1 mM sodium citrate, pH7.4)에 0.03% TSB 배지, 1% agarose를 용해하여 멸균 한 후 45°C water bath에 식힌 다음 10 ml에 10 mM Tris(pH7.4) 용액으로 세척한 균주 4×10^6 CFU를 혼합하여 분주하였다. 하층배지가 굳으면 3 mm로 천공한 후, 5 μ l의 항균펩타이드 용액을 농도별로 첨가하고 펩타이드 용액이 배지에 확산 되도록 plate를 뒤집어서 37°C 배양기에 3시간 동안 배양

Table 3. Suppression starting concentration for microbes of defensin synthetic peptide (μg)

Strain	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	cecropin
<i>E. coli</i> ML35(-)	0.25	1	-	5	5	2	5	1	5	-	0.5
<i>P. aeruginosa</i> (-)	0.5	-*	-	-	-	2.5	-	-	-	-	0.5
<i>M. luteus</i> (+)	0.5	2	-	-	-	2	-	1	2	-	0.5
<i>E. faecalis</i> (+)	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5
<i>E. hirae</i> (+)	-	2	-	-	10	2	-	-	-	-	> 0.5
<i>S. aureus</i> (+)	1	2	-	-	-	2	-	2	5	-	-
MDRPA(+)	0.5	-	-	-	-	5	-	-	-	-	0.5
MRSA(+)	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5
<i>C. albicans</i>	0.25	1	-	-	-	-	-	0.25	2	-	NT**
<i>P. syringae</i>	NT	<2	NT	NT	<2	<2	NT	NT	NT	NT	0.5

* -, No activity; **NT, not tested

S1)Bign-14aa(38C-51F-NH₂), S2)Bign-12aa(35V-46L-NH₂), S3)Bign-9aa(43F-51F-NH₂), S4)Bign-17aa(25G-41T-NH₂), S5)Bign-12aa(28G-39R-NH₂), S6)Bign-10aa(28G-39R-NH₂) except 33N-34G, S7)Bign-10aa(38C-46L-NH₂), S8)Bign-9aa(35V-43F-NH₂), S9)Bign-5aa(35V-39R-NH₂), S10)Bign-7aa(28G-34G-NH₂)

이하로 가장 우수하였고, S2(35V-46L-NH₂, 12aa), S6(28G-39R-NH₂, 10aa)와 S8(35V-43F-NH₂, 9aa)은 2 μg 부터 항균 활성을 보였으며, S9(35V-39R-NH₂, 5a)은 5 μg 부터 항균 활성이 나타났다. *Enterococcus faecalis* 균주에 대해서는 S1 (38C-51F-NH₂, 14aa)에서 2 μg 부터 이증환이 발생하였고, *Enterococcus hirae* 균주에 대해서는 S2(35V-46L-NH₂, 12aa)와 S6(28G-39R-NH₂, 10aa)에서 2 μg 부터 이증환이 발생하였고, S5(28G-39R-NH₂, 12aa)에서는 10 μg 에서 이증환이 발생하여, *Enterococcus* 속에 대해서는 항균활성이 있지만 대체로 이증환이 관찰되어 뚜렷한 항균활성이라고 보여지지 않았다. *Staphylococcus aureus*에 대한 항균력 분석은 S1(38C-51F-NH₂, 14aa)이 최소 생육억제 농도가 1 μg 이하로 가장 우수하였고, S2(35V-46L-NH₂, 12aa), S6(28G-39R-NH₂, 10aa)와 S8(35V-43F-NH₂, 9aa)은 2 μg 부터 항균 활성을 보였으며, S9(35V-39R-NH₂, 5aa)은 5 μg 부터 항균 활성이 나타났다. *Candida albicans*(진균)에 대해서 S1(38C-51F-NH₂, 14aa)와 S8(35V-43F-NH₂, 9aa)이 최소 생육억제 농도가 0.25 μg 이하로 가장 우수하였고, S2(35V-46L-NH₂, 12aa)은 1 μg 부터, S9(35V-39R-NH₂, 5aa)은 2 μg 부터 항균활성을 보였다. 내성균주에 대한 항균력은 Multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA)에서 S1(38C-51F-NH₂, 14aa)은 0.5 μg 부터 항균활성을 보였고, S6(28G-39R-NH₂, 10aa)은 5 μg 부터 항균활성을 나타냈다. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)는 S1(38C-51F-NH₂, 14aa)에서 2 μg 부터 항균활성을 보였다. 백합, 시클라멘, 비로란 등에서 세균성무름병 병원균인 *Pectobacterium carotovorum*에 대해서는 S2(35V-46L-NH₂, 12aa), S6(28G-39R-NH₂, 10aa)와 S5 (28G-39R-NH₂, 12aa)에서 순차적으로 항균활성이 우수하였고, 사과나 배의 가지마름병 병원

균인 *Pseudomonas syringae*에서는 S6(28G-39R-NH₂, 10aa), S2(35V-46L-NH₂, 12aa)와 S5(28G-39R-NH₂, 12aa) 순서대로 항균활성이 우수하였다.

α -helix를 형성하는 펩타이드는 소수성의 세포막에 결합하거나 세포막의 안전성을 감소시켜 막 투과성을 교란시킴으로써 항균작용을 일으키는 것으로 추측하고 있고 (Matsuzaki 1988), 디펜신과 같은 펩타이드의 항균기작으로는 세균의 세포막에 부착하여 이중지질막 안에서 분자끼리 모여 channel을 만들어 세포질의 유출을 유도하여 세균을 죽일 수 있다고 여겨지고 있다(Yeaman and Yount 2003). 일반적으로 α -helix의 2차구조를 취하는 펩타이드들은 아미노산 서열내에 시스테인 잔기가 없다고 알려져 있으나(Hancock 2001, Lee et al. 1997, Marchini et al. 1993), 본 연구의 디펜신 합성펩타이드에는 PSIPRED에서 α -helix라고 예측한 영역에 시스테인이 있어 실제 α -helix 구조가 아니거나 합성펩타이드가 2차 구조를 형성하지 못하는 것으로 예상된다.

적 요

호박벌 유래 디펜신의 전체 아미노산 서열의 구조 분석 후에 항균활성을 갖는 서열을 선발하였고, 전체 및 펩타이드 길이와 구조적 차이에 대한 종합적인 결과로서 기존에 보고되어진 α -helix 구조의 펩타이드 보다는 β -sheet의 일부 서열과 α -helix의 서열이 공존할 때 항균 활성이 보다 뛰어난 것을 확인하였다. 특히 시스테인-아르기닌 (38C-39R)이 포함되어 있는 펩타이드 서열에서 항균력이 우수하였고, 이는 세포벽에 친화력이 있는 염기성 펩타이드의 특성으로 예상하고 있다.

감사의 글

본 논문은 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호:PJ008706) 및 차세대바이오그린21사업(과제번호: PJ008158)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용 문헌

- Andreu D, Rivas L (1998) Animal antimicrobial peptides : an overview. *Biopolymers* **47**, 415~433.
- Bulet P, Cociancich S, Dimarcq JL, Lambert J, Reichhart JM, Hoffmann D, Hetru C, Hoffmann JA (1991) Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J Biol Chem* **266**, 24520~24525.
- Casteels P, Ampe C, Jacobs F, Vaeck M, Tempst P (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* **8**, 2387~2391.
- Casteels P, Ampe C, Riviere L, Van Damme J, 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.
- Epand RM, Vogel HJ (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta* **1462**, 11~28.
- Epand RM, Shai Y, Segrest JP, Anantharamaiah GM (1995) Mechanisms for the modulation of membrane bilayer properties by amphipathic helical peptides. *Biopolymers* **37**, 319~338.
- Hancock RE, Patrzykat A (2002) Clinical development of cationic antimicrobial peptide cyclic beta-sheet tachyplesin I with lipopolysaccharides. *Biochim Biophys Acta* **1562**(1~2), 32~36.
- Hancock RE (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* **1**(3), 156~164.
- Hancock RE, Scott MG (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 8856~8861.
- Hancock RE, Diamond G (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. *Trends Microbiol* **8**, 402~410.
- Hultmark D, Steiner H, Rasmuson T, Boman HG (1990) Insect Immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur J Biochem* **106**, 7~16.
- Lee IH, Zhao C, Cho Y, Harwig SS, Cooper EL, Lehrer RI (1997) Clavanins, alpha-helical antimicrobial peptides from tunicate hemocytes. *FEBS Lett* **400**, 158~162.
- Lee SY, Moon HJ, Kurata S, Kurama T, Natori S, Lee BL (1994) Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia*. *J Biochem* **115**, 82~86.
- Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME (1991) Defensins: endogenous antibiotic peptides of animal cells. *Cell* **64**, 229~230.
- Marchini D, Giodano PC, Amons R, Bernini LF, Dallai R (1993) Purification and primary structure of ceratotoxin A and B, two antibacterial peptides from the female reproductive accessory glands of the medfly *Ceratitis capitata* (Insecta:Diptera). *Insect Biochem Mol Biol* **23**, 591~598.
- Matsuzaki M (1998) Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta* **1376**(3), 391~400.
- Oren Z, Shai Y (1998) Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **47**, 451~463.
- Park CB, Kim MS, Kim SC (1996) A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 408~413.
- Saido-Sakanaka H, Ishibashi J, Sagisaka A, Momotani E, Yamakawa M (1999) Synthesis and characterization of bactericidal oligopeptides designed on the basis of an insect antibacterial peptide. *Biochem J* **338**, 29~33.
- Samakovlis C, Kylsten P, Kimbrell DA, Engstrom A, Hultmark D (1991) The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J* **10**, 163~169.
- Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, McGuire PA, Novotny MJ, Smith W, Henschen AH, Cullor JS (1993) Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem* **268**, 6641~6648.
- 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.
- Tossi A, Sandri L, Giangaspero A (2000) Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**, 4~30.
- Yeaman MR, Yount NY (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* **55**(1), 27~55.
- Zaslaff M (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 5449~5453.