

## Purification of Two Novel Antimicrobial Peptides from Pyloric Caeca of the Starfish *Asterina pectinifera*

Hye-Jin Go, Yun Jung Bae and Nam Gyu Park\*

Department of Biotechnology, College of Fisheries Sciences, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Received May 13, 2014 / Revised July 24, 2014 / Accepted August 9, 2014

PAP-1, a novel antimicrobial peptide isolated from pyloric caeca extract of the starfish *Asterina pectinifera* was purified and characterized. First, the acidified pyloric caeca extract was put through Sep-Pak C18 solid phase extraction cartridge using a stepwise gradient. Among the eluents, RM 60 (retained materials at 60% methanol) showed good antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* D31 and was purified in C18 reversed-phase and ion-exchange high-performance liquid chromatography columns. The purification steps yielded two novel peptides showing strong antimicrobial activities. These peptides were named pyloric caeca *A. pectinifera* peptide 1 and 2 (PAP-1 and PAP-2). For the characterization of the purified peptides, the molecular weights and amino acid sequences were determined by MALDI-TOF MS and Edman degradation. The molecular weights of PAP-1 and PAP-2 were about 2951.54 Da and 2980.15 Da respectively. The amino acid sequences of PAP-1 and PAP-2 were partially determined: AIQNAGES and AIQNAAES, respectively. PAP-2 is an isoform of PAP-1, differing merely by a single residue at position 6 (glycine or alanine). The comparison of the N-terminal amino acid sequences and molecular weights of the peptides with those of other known antimicrobial peptides revealed that PAP-1 and PAP-2 have no homology with any known peptides. These findings suggest that PAP-1 and PAP-2 play a significant role in the innate defense system of starfish pyloric caeca.

**Key words** : Antimicrobial peptide, pyloric caeca, purification, starfish

### 서 론

Antimicrobial peptides (AMP)는 생체 내에 침입한 미생물들에 대한 생체방어 수단으로 선천성면역(innate immunity)에서 중요한 역할을 하고 있다. AMP는 무척추동물의 host defense에서 중요한 역할을 담당하고 있다[1, 3]. 선천성면역에 관련된 물질로는 lectin, pro-phenoloxidase activating factor, phagocytosis, AMP등이 존재한다. 이들은 외부로부터 체내에 미생물들이 침입하면 1차적으로 그것을 없애는 역할을 담당하고 있다[17]. 해양 무척추 동물의 대부분은 외부침입에 대한 방어수단으로서 선천성면역에 대부분 의존하고 있기 때문에 AMP의 역할이 매우 중요하게 작용하고 있다. 이러한 항균성 단백질 및 펩타이드는 다양한 종류의 해양무척추동물로부터 발견되었다[5, 11, 17].

불가사리에는 포유동물의 간에 해당하는 조직인 유문 맹낭(Pyloric Caeca)이 존재한다. 이 유문 맹낭은 hepatic caeca이라

고도 하며, 유문 위(pyloric stomach)와 연결되어 있다. 불가사리의 유문 맹낭은 유문 위에서 방사상 모양의 팔의 내강에서 다시 두 가닥으로 나누어져 있다. 불가사리는 다른 종류의 극피동물(해삼, 성게)처럼 영양분 흡수를 위한 장관을 가지고 있지 않지만, 대신에 유문 맹낭이라 불리는 일련의 유문 위의 소화관 소낭이 존재한다. 이들은 위에서 흡수 한 후에 먹이를 소화시키기 위한 효소를 생산, 분비 및 척추동물에 있어서 간과 같은 해독 및 살균기능을 하는 간상상피 조직이다[6, 9]. 최근 인간, 어류 및 양서류의 간으로부터 항균작용 및 철-조절 호르몬으로 작용하는 hepcidin이 발견되었다[13, 16]. 또한 넓적가시불가사리(crown-of-thorns, *Acanthaster planci*)를 비롯한 다른 종류의 불가사리의 유문 맹낭 조직으로부터 lipase/esterase, trypsin 및 phospholipase A<sub>2</sub>와 같은 단백질이 검출되었다[2, 7, 8]. 그러나 아직까지 별불가사리(*Asterina pectinifera*)의 유문 맹낭 조직으로부터 항균성 펩타이드에 대한 보고는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 별 불가사리의 유문 맹낭 추출물을 사용하여 항균활성을 나타내는 PAP-1 및 PAP-2를 정제하였다.

### 재료 및 방법

#### 일반시약

Tryptic soybroth (TSB) 및 Agarose (Low EEO)는 Sigma사

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-629-5867, Fax : +82-51-629-5863

E-mail : ngpark@pknu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 또한 Streptomycin sulfate는 Gibco BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였다. HPLC용 water와 acetonitrile (ACN)은 Tedia (Ohio, USA)의 제품을 구입하였다.

#### 별불가사리의 유문 맹낭 추출물의 조제

별불가사리(전장 8.0-15.0 cm)는 부산 기장에서 채집하여 순환되는 해수 수조에서 추출직전까지 정시시켜 두었다. 적출한 300마리의 유문 맹낭 조직은 증류수로 재빨리 씻어 채액 및 이물질을 제거한 후 즉시 액체질소로 급속 동결시켜 추출 직전까지 -70°C에서 보관하였다. 동결된 조직들은 증류수와 1% 초산을 1:4(v/v)가 되도록 섞은 후 20분 동안 끓인 후, 균질화하여 추출액을 6,000×g 4°C, 30분간 원심분리 하였다. 계속해서 농축한 상층액에 1:3(v/v)으로 에탄올을 첨가한 후, 다시 원심분리(6,000×g 4°C, 30분)하여 상층액이 300 ml이 되도록 농축하였다. 농축된 시료에 1 N HCl을 10 ml 첨가한 후, 원심분리(15,000×g 4°C, 50분)하여 상층액을 농축하였다. 그 후, Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge (20 ml, Waters)에 농축액을 주입하여 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), 0.1% TFA가 포함된 10% 메탄올(RM10), 60% 메탄올(RM60), 100% 메탄올(RM100)을 순차적으로 사용하여 물질을 용출시켰다.

#### 항균활성의 측정

항균활성을 측정하기 위해 사용된 균주는 North Carolina State University의 Edward J. Noga 교수로부터 분양 받은 그람 음성균인 *Escherichia coli* D31과 그람 양성균 *Bacillus subtilis* KCTC1021을 사용하였다. 우선 배지 및 배양온도에서 18시간 동안 전 배양 후 BioMerieux Vitek, Inc. Colorimeter (Product No. 52-1210, BioMerieux, Inc., USA)를 사용하여 농도를 84%T (= 1×10<sup>8</sup> CFU/ml)가 되게 맞추었다. 그 후, 9.5 ml의 0.03% TSB, 1% Type I agarose 및 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)를 포함하는 underlay gel에 84%T로 희석된 균 0.5 ml를 넣고 잘 섞은 후에 plate에 편평하게 부어 굳히고, 굳은 plate에 punch를 사용하여 직경 2.5 mm의 well을 뚫은 후에, 추출물 총 부피의 1/100을 도입시켰다. 모든 sample은 0.01% acetic acid (pH 4.0)에 녹여 활성을 측정하였으며, negative control로 0.01% acetic acid (pH 4.0) 5 µl를 사용하여 용매에 의한 영향이 없음을 확인하였다. 추출물이 배지에 스며들면 3시간 동안 1차 배양한 후, 그 위에 10 ml의 6% TSB, 1% Type I agarose 및 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)를 포함하는 overlay gel을 붓고 굳힌 후에 동일한 온도에서 18시간 동안 2차 배양하였다. 다음 날, well주위의 clear zone의 유무 및 clear zone diameter (mm)를 확인하여 활성의 세기를 측정하였다.

#### 항균활성 펩타이드의 정제

강한 항균활성을 나타내는 RM60을 사용하여 6단계의 HPLC 과정을 거쳐 물질을 정제하였다. 첫 단계로, 역상 HPLC (Vydac C<sub>18</sub>, 7.5×250 mm)를 이용하여 부분 정제하였으며, 분리조건은 다음과 같다. A 용매; 0.1% TFA 수용액(pH 2.2), B 용매; 0.1% TFA를 포함한 100% ACN (pH 2.2), B 용매 농도 구배; 0→60% (120분), 유속 2.0 ml/min, 파장; 220 nm (Fig. 4). 반응을 나타낸 활성 분획은 양이온 교환 column인 TSK-gel CM-5PW (Tosoh, 7.5×750 mm)에 적용하여 A 용매로 20 mM ammonium acetate (pH 5.15)와 B 용매로서 1.0 M ammonium acetate (pH 5.15)를 사용하여 0→100%의 B 용매 농도 구배로 100분간 2.0 ml/min의 유속으로 행하였다. 두 번째 단계의 양이온 교환 HPLC에서 얻어진 활성 분획은 계속해서 두 단계의 역상 HPLC와 음이온 교환 HPLC를 교차적으로 사용하여 반복 정제하였다. 최종적인 정제 과정은 역상 HPLC (Hypersil BDS C<sub>18</sub>, Hewlett-Packard, 125×2 mm)를 이용하여 28→38%로 40분간 0.4 ml/min의 유속으로 분석하였다(Fig. 2). 각각의 과정에서 분리된 분획들은 *E. coli* D31을 사용하여 항균활성을 측정하였다.

#### 분자량 및 서열 분석

최종 정제한 항균활성물질의 분자량을 측정하기 위해서 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) Mass spectrometer (Voyager-DE<sup>TM</sup> STR spectrometer, perseptive Biosystem, USA)를 사용하였으며, Matrix는 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid를 사용하였다. 또한 정제한 천연물의 아미노산 서열을 분석하기 위해서 Edman 분해법을 이용한 Shimadzu (PPSQ-21A, Japan)아미노산 분석기를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

#### 별불가사리 유문 맹낭으로부터 항균 활성 물질 추출

Sep-Pak C<sub>18</sub> cartridge에서 얻은 0% (D.W.), 10% (RM10), 60% (RM60) 및 100% (RM100) 메탄올을 각각 사용하여 물질을 용출시켰다. 이들 4종류의 용출액들은 각각 전체양의 1/100에 해당하는 양을 사용하여 *E. coli* D31과 *B. subtilis* KCTC1021에 대해 항균활성을 측정하였다. 각각의 시료는 *B. subtilis* KCTC1021보다 *E. coli* D31에 대해서 강한 항균활성을 나타내었다. 특히 RM60에서 용출된 물질이 강한 반응을 보였다. DW, RM10 및 RM100은 RM 60보다 약한 반응을 나타내었다. 그러므로 RM60을 사용하여 항균활성을 지닌 물질을 정제하였다(Fig. 1).

#### 항균활성 펩타이드의 정제

항균활성 물질을 정제하기 위해서 RM60은 4단계의 역상 HPLC 및 2단계의 ion exchange HPLC 분석을 거쳤다(Fig.

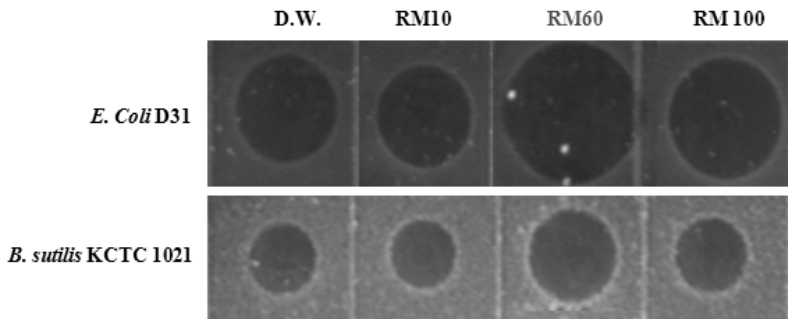


Fig. 1. Antimicrobial activity of the starfish' pyloric caeca extracts eluted by Sep-Pak C18 cartridge. Clear zone indicates antimicrobial activity of each extract. D.W.; H<sub>2</sub>O extract, RM10; 10% methanol extract, RM60; 60% methanol extract, RM100; 100% methanol extract.

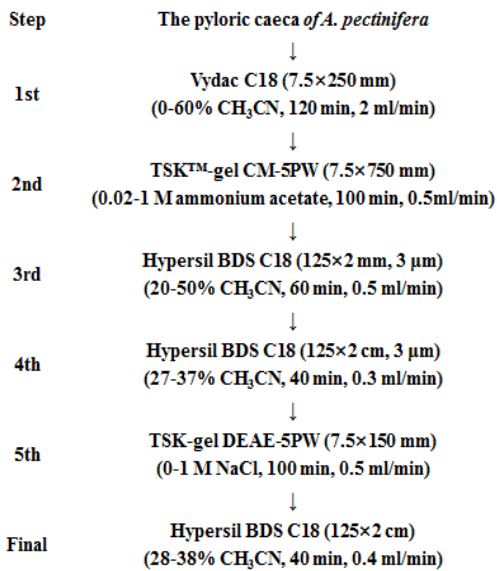


Fig. 2. Procedures for the HPLC purification of antimicrobial peptide from the pyloric caeca extract of starfish *Asterina pectinifera*.

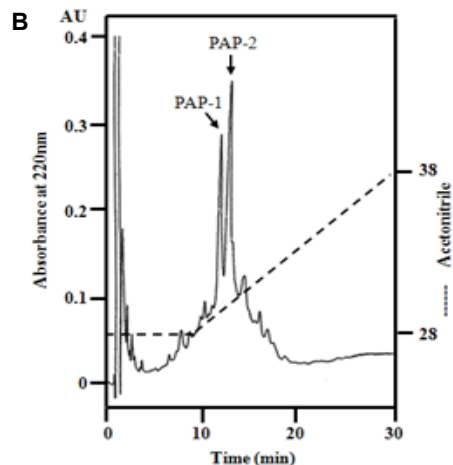
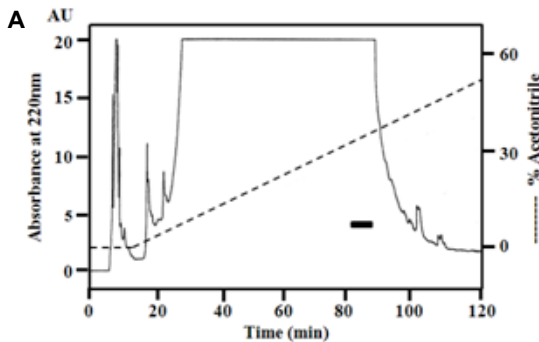


Fig. 3. (A) First reversed-phase HPLC separation of the pyloric caeca extract of the *A. pectinifera* extract. The RM60 was fractionated by the Vydac C18 column. Elution was performed with a linear gradient of 0 - 60% acetonitrile in 0.1% TFA for 120 min at a flow rate of 1 ml/min. The eluate was monitored at 220 nm. Fraction of the absorbance peak (indicated by the black) showed antibacterial activity against *E. coli* D31. (B) Final purification of the fraction in (A) and the protein was purified with Hypersil BDS C18 column and a linear gradient of 28-38% acetonitrile in 0.1% TFA for 40 min at a flow rate of 1 ml/min. The eluate was monitored at 220 nm.

2). 첫 단계로, Vydac C<sub>18</sub> (7.5×250 mm)을 사용하여 분석하였고, 42-44 분획에서 반응을 나타내었다(Fig. 3A). 반응을 나타낸 활성 분획은 Fig. 2에 나타난 것처럼 양이온 및 음이온 교환 HPLC와 역상 HPLC를 교차 반복적으로 사용하였다. 최종 단계의 역상 HPLC (Hypersil C<sub>18</sub>, 125×2 mm)에서 28→38%로 분리하여 최종적으로 PAP-1과 PAP-2를 정제하였다(Fig. 3B).

**PAP-1과 PAP-2의 분자량 및 서열 분석**

PAP-1과 PAP-2의 부분적인 아미노산 서열과 분자량은 MALDI-TOF 질량분석기와 아미노산 서열 분석기를 사용하여 결정하였다. PAP-1과 PAP-2의 분자량은 각각 2951.77 Da (Fig. 4A) 및 2980.15 Da (Fig. 4B)로 분자량이 유사한 물질로서 약 25개 정도의 아미노산으로 구성된 물질인 것 같다. 또한 PAP-1과 PAP-2의 부분적인 아미노산 서열은 각각 다음과 같다: PAP-1, AIQNAGES; PAP-2, AIQNAAES. 이들 물질들의 부분적인 아미노산 서열 분석 결과에 의하면 PAP-1과 PAP-2는 단지 6번째 위치에 존재하고 있는 아미노산만 다른 잔기를 포함하고 있다. 이러한 결과는 이들 물질이 서로 isoform 형태

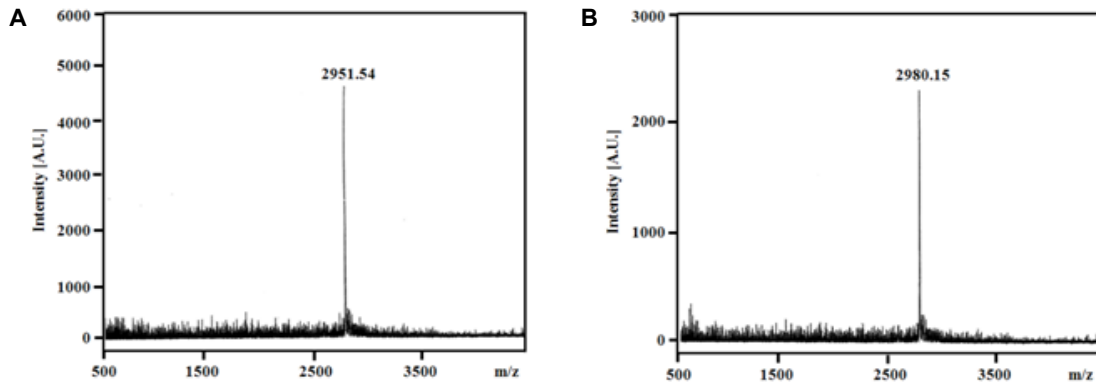


Fig. 4. The molecular weight of the PAP-I (A) and PAP-II (B) were determined using an MALDI-TOF mass spectrometer equipped with a pulsed smart beam II in linear mode. MALDI-TOF mass spectrum showed the singly charged species. This result indicated that the molecular weight of the purified peptides are 2951.54 Da and 2980.15 Da.

로 존재하고 있을 것이라 예상된다. 한편 PAP-1과 PAP-2의 아미노산 서열을 토대로 하여 기존에 밝혀진 물질들과 동일성을 비교한 결과, 이들 물질들은 어떤 물질과도 동일성을 나타내지 않는 것으로 판명되었다.

항균 펩타이드는 미생물들과 접촉이 빈번한 조직인 피부, 점액질 및 체액에서 많이 발견되었으며, 해양생물인 hagfish [18], catfish [15], winter flounder [4], loach [14], polychaeta [12]의 조직으로부터 새로운 물질들이 발견되었다. 그러나 해양 무척추동물의 유문 맹낭을 이용하여 새로운 항균성 펩타이드의 연구에 대한 보고는 전무한 실정이다. 따라서 불가사리의 유문 맹낭 추출물로부터 발견된 PAP-1과 PAP-2는 무척추동물에서 처음으로 발견된 항균성 물질이다. 또한 PAP-1과 PAP-2는 불가사리의 유문 맹낭에 존재하고 있는 새로운 항균 활성 펩타이드라 생각되며, 이들 물질은 불가사리의 유문 맹낭에서 선천성 방어 시스템에서 중요한 역할을 하고 있는 물질이라 생각된다. 현재 이들 물질의 정확한 서열을 알기 위해서 cDNA cloning 연구를 하고 있는 중이다. 앞으로 계속해서 불가사리에서 새로운 항균을 포함한 다양한 생리활성을 지닌 물질이 발견된다면, 인간과 다른 생물체에 피해를 주고 있는 불가사리를 새로운 방법으로 이용할 수 있는 계기가 될 수 있을 것이라 생각된다.

### 감사의 글

이 논문은 2007년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 연구임(No. KRF-2007-521-F00042).

### References

- Boman, H. G. 2003. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J Intern Med* **254**, 197-215.
- Brahimi-Horn, M. C., Guglielmino, M. L., Rivett, D. E. and Sparrow, L. G. 1989. The carboxyl ester lipase profile of the pyloric caecum from the crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*). *Comp Biochem Physiol B* **93**, 529-537.
- Bulet, P., Stocklin, R. and Menin, L. 2004. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**, 169-184.
- Cole, A. M., Weis, P. and Diamond, G. J. 1997. Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. *J Biol Chem* **272**, 12008-12013.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Van, D. A., Rodriguez, J. and Bachere, E. 1997. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *J Biol Chem* **272**, 28398-28406.
- Jangoux, M. 1982. Digestive system; Asteroidea. In *Echinoderm Nutrition* Jangoux M. and Lawrence J. M. ed. Balkema Press. Rotterdam, 235-272.
- Kishimura, H. and Hayashi, K. 2002. Isolation and characteristics of trypsin from pyloric ceca of the starfish *Asterina pectinifera*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **132**, 485-490.
- Kishimura, H. and Hayashi, K. 2005. Characterization of phospholipase A2 from the phloric ceca of two species of starfish, *Coscinasterias acutispina* and *Plazaster borealis*. *Food Chem* **92**, 407-411.
- Lawrence, J. M. 1982. Digestion. In *Echinoderm Nutrition* Jangoux M. and Lawrence J. M. ed. Balkema Press. Rotterdam, 283-316.
- Martinage, A., Belaiche, D., Dupressoir, T. and Sautiere, P. 1983. Primary Structure of Histone H2A from Gonads of the Starfish *Asterias rubens*. *Eur J Biochem* **130**, 465-472.
- Miitta, G., Hubert, F., Noel, T. and Roch, P. 1999. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur J Biochem* **265**, 71-78.
- Ovchinnikova, T. V., Aleshina, G. M., Balandin, S. V., Krasnodembskaya, A. D., Markelov, M. L., Frolova, E. I., Leonova, Y. F., Tagaev, A. A., Krasnodembsky, E. G. and Kokryakov, V. N. 2004. Purification and primary structure

- of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine *polychaeta Arenicola marina*. *FEBS Lett* **577**, 209-214.
13. Park, C. H., Valore, E. V., Waring, A. J. and Ganz, T. 2001. Hecpidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem* **276**, 7806-7810.
  14. Park, C. B., Lee, J. H., Park, I. Y., Kim, M. S. and Kim, S. C. A. 1997. Novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *FEBS Lett* **411**, 173-178.
  15. Park, I. Y., Park, C. B., Kim, M. S. and Kim, S. C. 1998. Parasin I, an antimicrobial peptide derived from histone H2A in the catfish, *Parasilurus asotus*. *FEBS Lett* **437**, 258-262.
  16. Shi, J. and Camus, A. C. 2006. Hecpidins in amphibians and fishes: Antimicrobial peptides or iron-regulatory hormones? *Dev Comp Immunol* **30**, 746-755.
  17. Seo, J. K., Crawford, J. M., Stone, K. L. and Noga, E. J. 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 1998-2004.
  18. Subramanian, S., Ross, N. W. and MacKinnon, S. L. 2009. Myxinidin, a novel antimicrobial peptide from the epidermal mucus of hagfish, *Myxine glutinosa*. *Mar Biotechnol* **11**, 748-757.

**초록 : 별불가사리 *Asterina pectinifera*의 유문맹낭 추출물로부터 새로운 2종류의 항균활성 펩타이드의 정제**

고혜진 · 배윤정 · 박남규\*

(부경대학교 수산과학대학 생물공학과)

별불가사리(*Asterina pectinifera*)의 유문 맹낭 추출물로부터 새로운 항균활성 펩타이드를 정제하기 위해서 유문 맹낭 추출물을 역상 HPLC와 이온 HPLC column에 주입하였다. 강한 항균활성을 나타내는 2개의 새로운 펩타이드가 유문 맹낭 추출물로부터 정제되었다. 이러한 물질들은 Pyloric caeca *Asterina pectinifera* peptides (PAP-1와 PAP-2)라 명명하였다. 정제한 물질들의 특성을 알아보기 위해서, 분자량 및 아미노산 서열 분석은 MALDI-TOF 질량분석기와 에드만 분해법으로 조사하였다. PAP-1과 PAP-2의 분자량은 각각 약 2952 Da 및 2980 Da이었다. PAP-1과 PAP-2의 부분적인 N-말단 서열은 다음과 같다. PAP-1, AIQNAGES; PAP-2, AIQNAAES. PAP-2는 PAP-1의 6번째 위치(glycine or alanine)에서 한 잔기만 다른 isoform에 해당된다. 지금까지 밝혀진 항균활성 펩타이드와의 분자량 및 N-말단 아미노산 서열을 비교한 결과, 이들 물질들은 다른 물질들과 동일성을 나타내지 않았다. 이러한 발견은 PAP-1과 PAP-2가 별불가사리의 유문맹낭의 선천성 방어계에 중요한 역할을 담당하고 있는 것을 시사하고 있다.