

천잠 cecropin-A 유전자 클로닝 및 재조합 발현

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

Cloning and functional expression of a cecropin-A gene from the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai*

Seong-Ryul Kim*, Kwang-Ho Choi, Sung-Wan Kim, Tae-Won Goo and Jae-Sam Hwang
Department of Agricultural Biology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-100, Korea

(Received April 08, 2014, Accepted May 15, 2014)

ABSTRACT

A cecropin-A gene was isolated from the immunized larvae of the Japanese oak silkworm, *Antheraea yamamai* and designed Ay-CecA. The complete Ay-CecA cDNA consists of 419 nucleotides with 195 bp open reading frame encoding a 64 amino acid precursor that contains a putative 22-residue signal peptide, a 4-residue propeptide and a 37-residue mature peptide with a theoretical mass of 4046.81. The deduced amino acid sequence of the peptide evidenced a significant degree of identity (62 ~ 78% identity) with other lepidopteran cecropins. Like many insect cecropin, Ay-CecA also harbored a glycine residue for C-terminal amidation at the C-end, which suggests potential amidation. To understand this peptide better, we successfully expressed bioactive recombinant Ay-CecA in *Escherichia coli* that are highly sensitive to the mature peptide. For this, we fused mature Ay-CecA gene with insoluble protein ketosteroid isomerase (KSI) gene to avoid the cell death during induction. The fusion KSI-CecA protein was expressed as inclusion body. The expressed fusion protein was purified by Ni-NTA immobilized metal affinity chromatography (IMAC), and cleaved by cyanogen bromide (CNBr) to release recombinant Ay-CecA. The purified recombinant Ay-CecA showed considerably antibacterial activity against Gram-negative bacteria, *E. coli* ML 35, *Klebsiella pneumonia* and *Pseudomonas aeruginosa*. Our results proved that this peptide with a potent antibacterial activity may play a role in the immune response of Japanese oak silkworm.

Key words : *Antheraea yamamai*, Cecropin, KSI-CecA, Antibacterial activity

서 론

곤충의 체액성 면역반응의 일환으로 분비되는 항균성 펩타이드들은 박테리아, 곰팡이 및 바이러스와 같은 병원균 침입에 대하여 강력한 방어 인자로 작용한다(Boman 1995, Bulet et al. 1999). 이들 펩타이드는 곤충의 지방체 및 혈구세포에서 합성되어 혈림프로 방출되는 저분자 물질로써 열에 안정하고 광범위한 항균 스펙트럼 및 높은 항균활성을 가진다. 또한 알레르기성 부작용 및 독성이 적고 기존 화학 항생제들과는 다른 작용 기작과 선택성으로 인해 의약 및 농업 분야에서 안전한 새로운 항생제로 인식되고 있다(Lehrer et al. 1993).

곤충에서 보고된 항균펩타이드들은 그들의 구조에 따라 크게 cecropin, defensins, proline-rich peptides, attacin-like proteins 및 lysozyme 등 5개 그룹으로 구분된다(Casteels et al. 1990, Otvos 2000, Zasloff 2002, Kim et al. 2007). Cecropin은 35개에서 39개의 아미노산 잔기로 구성된 양이온성 펩타이드로 *Hyalophora cecropia*에서 최초로 분리된 이후 나비목 및 파리목 곤충에서만 보고되었다(Steiner et al. 1981, Cociancich et al. 1994, Morishima et al. 1990). 이들 cecropin은 광범위한 항균 스펙트럼을 가지고 있지만 주로 그람음성균에 더욱 강한 활성을 보인다. 반면에 곤충의 defensin의 경우 파리목, 딱정벌레목, 벌목, 나비목, 잠자리목 등 다양한 곤충 종에서 보고되었다(Boman 1995,

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

Hoffman et al. 1999). 이들 defensin은 주로 그람양성균에 강한 활성을 나타내지만 그람음성균에는 활성이 낮은 것으로 알려져 있다.

최근 누에 유전체 연구를 통하여 cecropin, moricin, gloverin, attacin, lebocin 및 defensin 등 다양한 항균펩타이드 유전자가 보고되었다(Tanaka et al. 2008). 누에의 cecropin, moricin 및 gloverin은 전형적인 mutigene 패밀리로 각각 11, 12 및 4개의 유전자로 구성된다. 특히 cecropin 패밀리의 경우 A~D의 5개의 아류형(subtype)으로 분류되고 cecropin B의 경우 유전자 복제에 의해서 6개의 유전자가 동일 염색체상에 존재한다. 이들 유전자들은 침입하는 미생물에 따라 Toll 및 Imd 신호전달 경로에 의해서 각각 유도되어 발현되는 것으로 확인되었다.

일반적으로 곤충 항균펩타이드의 미생물에 대한 작용기작으로는 carpet 모델, toroidal-hole 모델 및 barrel stave 모델로 설명되는 세포막을 직접 파괴하여 박테리아를 치사시키는 기작과 세포막을 통과하여 세포질에서 DNA합성 억제 및 생장과 관련된 대사 작용 억제를 통하여 작용하는 기작이 알려져 있다(Brogden 2005, Powers and Hancock 2003). Cecropin의 경우 전자의 작용기작을 갖는 항균펩타이드로 새로운 펩타이드성 항생제 자원으로 부각되고 있다(DeLucca et al. 1997, Zaiou 2007).

따라서 본 연구에서는 새로운 펩타이드성 항생제 소재 개발을 목적으로 면역 유도된 천잠(*Antheraea yamamai*) 유충으로부터 cecropin A 유전자를 분리하고 재조합 발현을 통하여 항균활성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 천잠 유충의 면역유도

천잠(*A. yamamai*) 종령 유충에 대장균(*Escherichia coli* K-235)에서 분리된 lipopolysaccharide(LPS, sigma)를 체강에 주사하여 면역화 하였다. 즉, 0.1 mL의 LPS(50 mg/mL) 용액을 1 cc 주사기를 이용하여 종령 유충 체강에 주사한 다음 26°C에서 18시간 동안 면역을 유도하였다.

2. cDNA library 제작 및 유전자 발현 서열 꼬리표(EST) 분석

면역 유도된 천잠 유충 cDNA library를 제작하기 위해서 유충을 액체 질소에 마취한 후, Total RNA isolation kit(Qiagen, CA)를 사용하여 전체 RNA를 분리하였다. 100 µg의 전체 RNA로부터 Micro-FastTrack 2.0 mRNA isolation kit(Invitrogen)를 사용하여 약 10 µg의 mRNA를 순수 정제하였다. 정제된 mRNA를 주형으로 ZAP-cDNA synthesis kit(Stratagene)으로부터 *XhoI* linker primer 및 역

전사효소를 사용하여 2nd strand cDNA로 합성하였다. DNA 중합효소를 이용하여 cDNA 말단을 평활화한 다음 *EcoRI* adapter를 부착하여 제한효소 *XhoI*으로 절단하였다. DNA size 분획을 통하여 크기가 500 bp 이상인 cDNA를 분리하여 Uni-ZAP XR vector에 삽입한 다음 완전한 bacteriophage 상태가 되도록 Gigapack III Gold packaging extract kit(Stratagene)으로 packaging 함으로써 완전한 길이의 cDNA library를 제작하였다. 제작된 cDNA library로부터 cDNA 클론을 임의로 선별하여 Plasmid minipep kit(Dyne Bio Inc, Korea)을 사용하여 플라스미드 DNA를 순수 분리하였다. 분리된 플라스미드로부터 cDNA의 insert부분을 PCR로 증폭하여 500 bp 이상인 PCR 산물을 선별한 다음 염기서열을 분석하였다. DNA 염기서열 분석은 자동염기서열 분석 장치, CEQ 8000 Genetic Analysis System(Beckman caulter, USA)를 사용하여 결정하였다. 그 후 얻어진 염기서열을 바탕으로 유전자 발현 꼬리표(EST) 분석을 수행하였다. 유전자 상동성 분석(BLAST)을 통하여 기존에 보고된 곤충의 cecropin-A 유전자와 상동성이 높은 천잠 cecropin-A(CecA) 유전자에 대한 cDNA 클론을 선별하였다.

3. 천잠 CecA 유전자 합성 및 재조합 대장균 발현벡터 제작

천잠 CecA 유전자는 EST 분석을 통하여 선별된 클론의 염기서열을 바탕으로 *BglII* 및 *KpnI* 제한효소 사이트를 포함하는 한쌍의 프라이머(5-GCATATGTGGAAGAT ATTCAAGAAA-3, 5-CTCGAGCATTCTTTGACGACAGTT-3)를 제작한 후 면역 유도된 천잠 유충 cDNA로부터 RT-PCR 반응을 통하여 합성하였다. PCR를 통해 수득한 CecA 유전자 및 과발현 벡터인 pET-29b(Novagen)를 *NcoI* 및 *XhoI*의 제한효소(Takara)로 절단한 후 ligation 과정을 거쳐 pET-cecA 플라스미드를 제작하였다. 또한, CecA의 기주에 대한 독성을 중화시킬 수 있는 결합 단백질로 125개의 아미노산으로 구성된 박테리아 케토스테로이드 아이소머레이저(KSI) 유전자를 *NcoI* 및 *XhoI* 제한효소 사이트를 포함하는 한 쌍의 프라이머(5-CAGATCTGATGCATACCCAGAAC-3, 5-GGGTACCCCTGGCATGCGTGAATAT-3)를 이용하여 PCR를 수행하여 합성하였다. PCR 산물은 아가로오스 젤 전기영동으로 DNA 밴드를 확인한 후, Gel Extraction Kit(Qiagen, USA)를 사용하여 아가로오스 젤로부터 DNA를 용출하여 정제한 다음 pGEM-T easy 벡터(Promega, USA)에 클로닝 하였다. 이 후, *BglII* 및 *KpnI* 제한효소를 이용하여 KSI 유전자를 벡터로부터 절단한 다음 동일한 제한효소로 절단된 pET-CecA 플라스미드에 삽입하여 대장균 재조합 발현벡터 pET-KSI/CecA를 제작하였다.

4. 천잡 CecA 항균펩타이드 재조합 발현 및 정제

천잡 CecA 유전자가 포함된 재조합 발현벡터 pET-KSI/CecA를 대장균 BRL(DE3)(Novagen)에 heat shock 방법으로 transformation하여 형질전환체를 제작한 다음 50 µg/mL의 카나마이신이 포함된 LB배지에 접종하여 37°C에서 16시간 배양하였고, 이를 다시 LB 배지에 접종한 후 37°C에서 OD₆₀₀가 0.5에 도달할 때까지 배양하였다. 이후 단백질 발현을 유도하기 위해 배양액에 0.4 mM의 IPTG 첨가하고 37°C에서 4시간 배양한 다음 배양액을 4,500 rpm으로 원심분리하여 수득하였다. 수거된 침전물을 His-binding buffer로 혼탁시킨 후, 초음파 파쇄한 후 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 soluble fraction과 insoluble fraction을 얻었다. 각각의 단백질 분획 용액은 SDS-PAGE를 통하여 발현을 확인하였다. 수득한 insoluble fraction에 8M urea가 포함된 His-binding buffer를 첨가하여 실온에서 30분간 용해시키고 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 이 후 Ni-NTA 컬럼을 이용하여 KSI-CecA 융합단백질을 정제하였다. 용출된 단백질 용액은 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 정제된 융합단백질은 염분 및 urea를 제거하기 위해서 투석막을 사용하여 증류수에서 투석하였다. 증류수에 투석하는 과정에서 불용성으로 변한 단백질들을 원심분리에 의해 다시 회수한 다음, 70% formic acid에 용해시키고, CNBr 0.5 g을 첨가하여 약 18시간 실온에서 교반을 통하여 KSI-CecA 융합단백질로부터 KSI와 CecA 항균펩타이드를 절단하였다. 혼합물로부터 formic acid 및 CNBr를 제거하기 위해서 동결 건조기를 이용하여 동결 건조한 후, 증류수로 용해하고 다시 동결 건조하는 과정을 2회 실시하였다. 최종적으로 동결 건조된 혼합물은 0.01% acetic acid 용액에 용해시킨 후, 14,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 soluble fraction과 insoluble fraction으로 분리하여 수거하였다. 분획된 각각의 단백질 시료는 16.5% SDS-Peptide PAGE로 분석하였다. 재조합 CecA가 포함된 수용성 분획은 다시 양이온 교환 크로마토그래피(FPLC)를 통하여 순수 정제하였고, 16.5% SDS-Peptide PAGE를 통하여 정제도 및 분자량을 분석하였다.

5. 천잡 CecA 항균펩타이드 활성 검정

정제된 재조합 천잡 CecA의 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 그람 양성세균 *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*들은 3%(w/v) TSB(Tryptic Soy Broth, Difco, USA) 액체 배지

에서 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 µl의 세균 배양액 (2×10^6 CFU/mL)을 분주 한 후, 단계적으로 희석된 항균 펩타이드 용액들을 각 well당 10 µl씩 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 RDA 용 underlay gel(9 mM sodium phosphate, 1 mM 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 µl씩 구멍에 넣었고, 펩타이드가 확산되도록 37°C에서 3시간 배양한 후, 그 위에 RDA 용 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. 천잡 CecA cDNA 클로닝 및 염기서열 분석

본 연구에서는 천잡 유래 cecropin-A(CecA) 항균펩타이드 유전자를 클로닝하고 염기서열 분석을 통하여 구조를 동정하여 Ay-CecA로 명명하였다(그림 1). 즉, 천잡 CecA cDNA 클론은 면역 유도된 유충의 전체 cDNA library로부터 임의로 1180개의 유전자 클론을 분리하여 유전자 발현 서열 꼬리표(EST) 분석을 통하여 분리하였다. 선발된 천잡 CecA cDNA 클론에 대한 염기서열 분석 결과, 전체 cDNA 크기는 419 bp로 64개의 아미노산 잔기를 인코딩하는 195 bp ORF(Open Reading Frame)로 구성되어 있다(그림 1). SignalP 및 기존 보고된 나비목 곤충의 cecA와 아미노산 상동성 분석을 통하여 천잡 CecA 유전자는 22개 잔기의 signal peptide, 4개 잔기의 propeptide 및 항균 활성을 갖는 37개 잔기로 구성된 성숙 단백질(mature protein) 영역으로 구성됨을 확인하였다. 따라서 천잡 cecA 항균펩타이드는 37개의 아미노산으로 구성되며 예상 분자량은 4046.81Da로 산출되었다. 또한 기존에 보고된 cecropin 유사 펩타이드와 동일하게 C말단에 glycine 잔기가 존재하고 있어 amidating 효소에 의해 아미드화 되는 것으로 사료된다. 누에의 cecropin D(Hara et al. 1994)를 제외한 대부분 곤충의 cecropin 항균펩타이드들의 C말단은 아미

```

1 TCATTGAAATCTTACTTCACTACAGTCACTCGTTAGTAAAAGAATAGTGATTATTAATA
61 ATGAATTTCTCGCGGTTGTTTTATTTTGTTCGCTCTCGTCTTGGCTCTAACACGGTT
   M N F S R L F Y F V F A L V L A L T T V
121 AACGCGGCCGAGAACCTAAATGGAAGTTTTTCAAGAAGATTGAGAGAGTCGGTCAGAAC
   N A A P E P K W K F F K K I E R V G Q N
181 ATTCGCGATGGCATCATAAAAGCTGGTCCAGCCGTCGCTGTTGTCGGCAAGCGACAAAT
   I R D G I I K A G P A V A V V G Q A T N
241 ATCGCTAAGGGCTAAAAATCTACGTAATATTTATATAAAAATCTTCTGTATATAGATT
   I A K G *
301 ATTTAATTATTTTAAAGAAGATTGTGTCTCGTTCAAGAAAGCATTATCCTATTTATAA
361 ACCCACTGCCATAATTATGATAATAAAGTATTAAGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the cDNA encoding for *A. yamamai* cecropin-A (Ay-CecA). The N-terminal sequence obtained by Edman degradation are highlighted in grey color. The predicted signal peptide cleavage site is indicated with arrow. The putative mature peptide is underlined and asterisk indicates the stop codon.

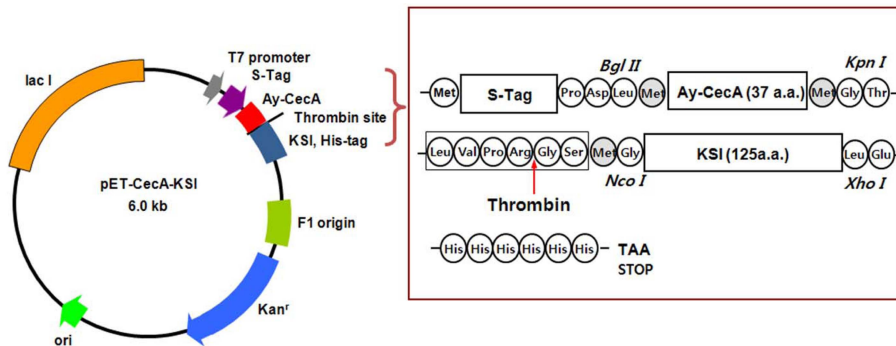


Fig. 2. The construction of recombinant plasmid for expression of CecA-KSI fusion protein. The DNA fragment encoding Ay-CecA was inserted into pET29 vector. The plasmid containing the fusion genes of Ay-CecA and ketosteroid isomerase (KSI).

드화 되어있다(Cociancich et al. 1994, Saito et al. 2005). 이 glycine 잔기의 아미드화는 carboxypeptidase 분해 반응에서 cecropin 항균펩타이드를 보호하는 것으로 사료된다(Liang et al. 2006). 또한 이 아미드화와 펩타이드 활성과의 상관관계는 곤충 종에 따라 차이가 있는데, *H. cecropia* 에서 분리된 cecropin A(Callaway et al. 1993)의 경우 C 말단 아미드화에 의해 항균활성이 크게 향상된 반면, *Anopheles gambiae* 에서 cecropin의 아미드화는 항균활성에 영향을 주지 않는다고 보고된 바 있다(Vizioli et al. 2000). 천잠 CecA의 아미노산 서열은 CLUSTAL W 프로그램을 이용한 상동성 분석에서 다른 나비목 곤충에서 분리된 cecropin 유사 펩타이드와 약 62~78%의 높은 상동성을 나타내었다.

2. 천잠 CecA 재조합 대장균 발현 및 정제

분리된 천잠 CecA 항균펩타이드의 특성 및 항균 스펙트럼을 분석하기 위해서 대장균 발현 시스템을 이용하여 재조합 발현 및 정제를 수행하였다. 천잠 CecA 유전자가 도입된 대장균 발현벡터를 구축하기 위해 면역 유도된 천

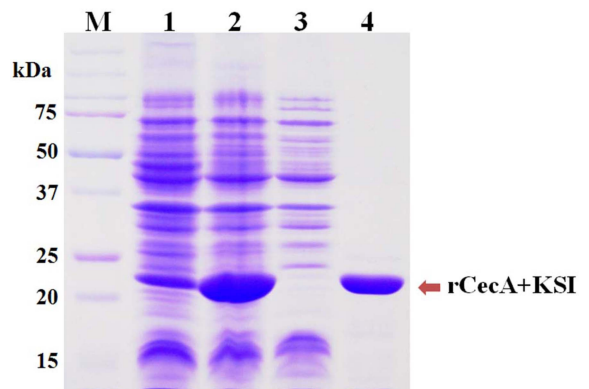


Fig. 3. Analysis of expressed CecA-KSI fusion protein by SDS-PAGE. Lane M, Protein molecular weight marker; lane 1, total cell extract without IPTG; lane 2, IPTG-induced total cell extract; lane 3 and 4, soluble and insoluble fraction of cell extract, respectively.

잠 유충 cDNA로부터 PCR 반응을 통하여 천잠 CecA 유전자의 성숙 아미노산 영역 111 bp 합성하여 기존에 상용화 되고 있는 pET-21b 벡터에 클로닝 하였다(그림 2).

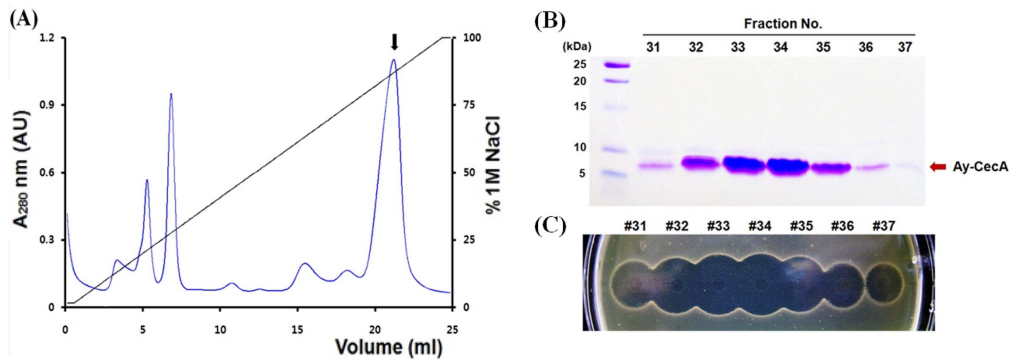


Fig. 4. Purification of recombinant Ay-CecA from soluble fraction cleaved by CNBr. Profile of cation exchange chromatography(A). Arrow indicates the peak containing Ay-CecA. Tricine-SDS-PAGE analysis(B) and inhibition zone assay(C) of fractions 31 ~ 37 collected from the superdex peptide column against *E. coli* ML35.

이후 염기서열 분석을 통하여 ORF를 확인하였다. 또한 발현 기주인 대장균에 대한 재조합 CecA 독성 증화를 위해서 125개의 아미노산으로 구성된 박테리아 유래 불용성 단백질인 ketosteroid isomerase(KSI)를 융합 파트너로 도입하여 대장균 발현백터를 제작하였다(그림 2). 즉, *NcoI* 및 *XhoI* 제한효소로 절단된 KSI 유전자를 분리한 후 동일한 제한효소로 절단된 pET-CecA 플라스미드에 삽입하여 pET-CecA-KSI 재조합 발현백터를 제작하였다. 재조합 발현백터 pET-CecA-KSI 플라스미드를 분리 정제한 후, 발현 균주인 *E. coli* BRL(DE3)에 Transformation하여 CecA-KSI 융합단백질을 생산하는 재조합 대장균 BRL(DE3)-(pET-CecA-KSI)을 선별하였다. 재조합 단백질 발현은 IPTG induction을 통하여 유도한 후, 단백질 전기영동(SDD-PAGE)을 통하여 확인하였다(그림 3). CecA-KSI 융합단백질은 약 23KDa 분자량으로 대부분 불용성 단백질로 발현되었다. 재조합 CecA는 Ni^{2+} -chelating chromatography, CNBr 절단 반응, 투석 및 양이온 교환 chromatography 과정을 통하여 순수 정제하였다(그림 4). 대장균에서 추출된 불용성 융합단백질 CecA-KSI는 8M urea 변성용액으로 용해한 후 Ni^{2+} -chelating chromatography로 정제하였다. 정제된 KSI-MLP1 융합단백질은 투석을 통하여 다시 불용성으로 치환한 후 1M CNBr를 처리하여 융합단백질로부터 재조합 CecA를 분리하였다. CNBr 절단 반응 후, CecA는 대부분 수용성 단백질로 치환되어 불용성 단백질인 KSI로부터 쉽게 분리됨을 확인하였다. 일반적으로 cecropin을 포함한 곤충 항균펩타이드 대부분은 양전하를 띠고 있어 음전하를 가지는 세포막 지질에 쉽게 결합하는 특성이 있다(Hoffman et al. 1999, Bulet et al. 1999). 따라서 본 연구에서는 항균펩타이드 특성을 이용하여 CNBr cleavage 반응 후, 수용성 단백질로부터 재조합 CecA를 양이온 교환 chromatography 방법으로 정제하였다(그림 4A). 이후 용출된 분획은 SDS-PAGE 단백질 전기영동 분석 및 대

장균에 대한 항균활성 검정을 통하여 확인하였다(그림 4B, C). SDS-PAGE 분석 결과, 분획 31~37에서 약 4~5 kDa의 항균 펩타이드 밴드를 확인하였으며, 또한 이들 분획은 대장균에 대한 RDA 분석에서 높은 항균활성을 나타냈다. 정제된 천잡 CecA는 Applied Biosystem Procise Sequencer를 사용하여 N-말단 아미노산 서열을 결정하였다. 분석한 N-말단 아미노산 서열은 KWKFFKKI이었고, 이는 CecA의 N-말단 아미노산 서열과 일치하였다. 따라서 CecA를 재조합 대장균에서 성공적으로 생산하였음을 확인하였다.

3. 재조합 천잡 CecA의 항균 및 용혈 활성 검정

대장균에서 재조합 발현된 천잡 CecA의 항균 활성은 다양한 병원균에 대한 최소 생장 억제 농도(MIC)를 측정하여 검정하였다(표 1). 재조합 천잡 CecA는 그람음성세균 *E. coli* ML35, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*에 매우 우수한 항균활성을 보였지만 그람양성세균 *S. aureus*, *E. faecalis*, *M. luteus*에 대해서는 강력한 항균 및 항진균 활

Table 1. Antimicrobial activity spectrum of recombinant Ay-CecA

Microorganism	Minimum Inhibitory Concentration(MIC, uM)	
	Ay-CecA	Melittin
Gram negative bacteria		
<i>E. coli</i> ML35	0.25	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.5	2
Gram positive bacteria		
<i>Staphylococcus aureus</i>	16	2
<i>Enterococcus faecalis</i>	16	2
<i>Micrococcus luteus</i>	16	1
Yeast fungi		
<i>Candida albicans</i>	4	4

Table 2. Hemolytic activity of recombinant Ay-CecA

Peptide	% Hemolysis (uM)				
	100	50	25	12.5	6.25
Ay-CecA	0	0	0	0	0
Melittin	100	100	100	100	98

성을 가지는 melittin에 비해 항균활성이 낮았다. 또한 캔디다증을 유발하는 *C. albicans*에 대해서도 항진균활성을 보였다. 이들 병원균에 대한 최소생장억제농도는 *E. coli* ML35에 0.25 μM, *K. pneumoniae* 및 *P. aeruginosa*에서는 각각 1 및 0.5 μM로 측정되었고, 그람양성균인 *S. aureus*, *E. faecalis* 및 *M. luteus*에 대해서는 16 μM로 확인되었다. 또한 진균 *C. albicans*에서는 MIC 값이 4 μM로 melittin과 동일하였다. 이상의 결과로 본 연구에서 생산한 재조합 천잠 CecA는 기존에 보고된 다양한 곤충의 cecropin과 유사한 광범위한 항균스펙트럼을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 높은 용혈 활성을 가지는 벌독 유래의 항균 펩타이드인 melittin을 대조군으로 하여 재조합 cecA의 용혈 활성을 비교한 결과, 100 uM의 높은 농도에서도 적혈구에 대한 용혈 활성이 전혀 확인되지 않았다(표 2). 따라서 재조합 천잠 CecA는 melittin에 비해 세포 독성이 없는 안전한 항균물질인 것으로 사료된다. 일반적으로 곤충에서 분리된 cecropin 항균펩타이드는 기존 보고된 carpet 모델, toroidal-hole 모델 및 barrel stave 모델로 설명되는 세포막을 직접 파괴하여 박테리아를 치사시키는 작용기작(Powers and Hancock 2003)으로 미생물에 대해 보다 효과적으로 작용하며 광범위한 항균스펙을 나타낸다. 따라서 본 연구에서 생산한 재조합 천잠 CecA는 새로운 천연 항생제 개발을 위한 의약 소재로 그 가치가 클 것으로 기대된다.

적 요

면역 유도된 천잠(*Antheraea yamamai*) 유충에서 cecropin-A 유전자를 분리하였고 이 유전자를 Ay-CecA로 명명하였다. 전체 Ay-CecA cDNA 크기는 419 bp로 64개의 아미노산 잔기를 인코딩하는 195 bp ORF로 구성되어 있다. 천잠 CecA 유전자는 22개 잔기의 signal peptide, 4개 잔기의 propeptide 및 항균활성을 갖는 37개 잔기로 구성된 성숙 단백질(mature protein) 영역으로 구성되고 예상 분자량은 4046.81 Da으로 산출되었다. 천잠 CecA의 아미노산 서열은 다른 나비목 곤충에서 분리된 cecropin과 매우 높은 상동성(62 ~ 78%)을 나타냈다. Ay-CecA 유전자의 C 말단에 기존에 보고된 곤충의 cecropin에서와 동일하게 C

말단 아미드화를 위한 glycine 잔기가 존재하고 있다. 이 펩타이드의 항균활성을 검증하기 위해서 대장균 발현 시스템을 이용하여 활성이 있는 재조합 Ay-CecA 발현에 성공하였다. 발현 기주인 대장균에 대한 재조합 CecA 독성 중화를 위해서 불용성 단백질인 ketosteroid isomerase(KSI) 유전자를 CecA 유전자와 융합하였다. 융합 CecA-KSI 단백질은 대부분 불용성 단백질로 발현되었다. 발현된 융합 단백질은 Ni-NTA immobilized metal affinity chromatography (IMAC)에 의해서 정제하였으며 CNBr 반응을 통하여 재조합 CecA를 절단하여 용출하였다. 최종적으로 양이온 교환 chromatography 과정을 통하여 CecA를 순수 정제하였다. 정제된 재조합 Ay-CecA는 그람음성균인 *E. coli* ML 35, *Klebsiella pneumoniae* 및 *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 매우 높은 항균활성을 나타냈다. 따라서 본 연구 결과, 높은 항균활성 지닌 CecA는 천잠의 면역 반응에서 중요한 역할을 담당할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 기관고유사업(주관과제번호: PJ008475) 연구비 지원에 의하여 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

References

- Boman HG (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 61~92.
- Brogden KA (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.
- Callaway JE, Lai J, Haselbeck B, Baltaian M, Bonnesen SP, Weickmann J, Wilcox G, Lei SP (1993) Modification of the C terminus of cecropin is essential for broad-spectrum antimicrobial activity. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 1614~1619.
- 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.
- Hara S, Taniai K, Kato Y, Yamakawa M (1994) Isolation and amidation of the non-amidated form of cecropin D from larvae of *Bombyx mori*. *Comp Biochem Physiol B* **108**, 303~308.

- 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.
- Lehrer RI, Lichtenstein AK, Ganz T (1993) Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu Rev Immunol* **11**, 105~128.
- Liang Y, Wang JX, Zhao XF, Du XJ, Xue JF (2006) Molecular cloning and characterization of cecropin from the housefly (*Musca domestica*), and its expression in *Escherichia coli*. *Dev Comp Immunol* **30**, 249~257.
- 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.
- Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, Nakajima Y, Sagisaka A (2008) A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**, 1087~1110.
- Vizioli J, Bulet P, Charlet M, Lowenberger C, Blass C, Muller HM, Dimopoulos G, Hoffmann J, Kafatos FC, Richman A (2000) Cloning and analysis of a cecropin gene from the malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **9**, 75~84.
- Zaiou M (2007) Multifunctional antimicrobial peptides: therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med (Berl)* **85**, 317~329.
- Zasloff M (2002) Antibacterial peptides of multicellular organism. *Nature* **415**, 329~344.