

Isolation and Purification of Antimicrobial Peptide from Hard-shelled Mussel, *Mytilus coruscus*

Ryunkyoung Oh, Min Jeong Lee, Young-Ok Kim, Bo-Hye Nam, Hee Jeong Kong, Joo-Won Kim, Cheul Min An and Dong-Gyun Kim*

Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 619-705, Korea

Received September 23, 2016 / Revised October 18, 2016 / Accepted October 19, 2016

In this study, we investigated antimicrobial peptide from the acidified muscle extract of *Mytilus coruscus*, which mostly inhabits China, Japan, and Korea, to develop a natural product-derived antibiotics substitution in terms of its abuse and restriction. Antimicrobial peptide was purified by C₁₈ reversed-phase high-performance liquid chromatography and was detected as having a molecular mass of 6,701 Da by MALDI-TOF/MS. The N-terminal amino acid sequence of the purified peak was obtained from edman degradation, and 20 identified residues shown 100% identity with the N-terminus region of sperm-specific protein and protamine-like PL-II/PL-IV precursor of *Mytilus californianus*. We also identified 60 open-reading frame (ORF) encoding amino acids with 183 bp of purified peptide based on the obtained amino acid residues. The amino acid sequence of ORF showed 100% and the nucleotide sequence revealed 97.2% identity with the protamine-like PL-II/PL-IV precursor of *Mytilus californianus*. Synthesized antimicrobial peptide showed antimicrobial activity against gram-positive bacteria, including *Bacillus cereus* (minimal effective concentration [MEC], 20.8 µg/ml), *Bacillus subtilis* (MEC, 0.2 µg/ml), *Streptococcus mutans* (MEC, 0.2 µg/ml), gram-negative bacteria including *Pseudomonas aeruginosa* (MEC, 5.7 µg/ml), *Escherichia coli* (MEC, 2.6 µg/ml) and fungi, *Candida albicans* (MEC, 56.3 µg/ml). In addition, synthesized peptide showed stable activities under heat and salt conditions against gram-positive and gram-negative bacteria, but was inhibited by salt against only *C. albicans*. With these results, isolated peptide from *M. coruscus* could be an alternative agent to antibiotics for defending against pathogenic microorganisms, and helpful information to understand the innate immune system of marine invertebrates.

Key words : Antimicrobial peptide, hard shelled mussel, *Mytilus coruscus*, purification

서 론

항생제 및 화학제제의 무분별한 사용은 슈퍼박테리아와 같은 내성균주의 등장, 양식 수산물의 체내 잔류 및 이로 인한 수산물의 식품안전위협 등 심각한 부작용에 직면하고 있어 사용과 용법이 엄격히 제한되고 있다[23]. 따라서 국내외 많은 연구자들이 항생제 대체제 개발을 위하여 다양한 연구를 하고 있으며 최근에는 probiotics, bacteriophage, 천연항균물질 등이 주목받고 있다[23, 36]. 이러한 천연 항균물질 중에서 항균력을 가지는 펩타이드인 항균 펩타이드(Antimicrobial Peptides, AMPs)는 사이즈가 작은 펩타이드로 항균활성 이외에도 항충, 항암 및 항염활성 등 다기능을 가진다는 보고가 있으며, 대부분 천연물 유래이고 항균력이 크고 빠르며, 잔류성과 내성균

주 출현이 낮고, 생산 및 사용이 쉬운 장점 때문에 항생제 대체제로 많은 관심을 받고 있다[8, 40]. 최근에는 많은 연구자들이 다양한 생물 유래의 천연 항균 펩타이드의 장점을 이해하고 이를 이용한 항생제 대체제 개발 연구에 몰두하고 있다[36].

항균 펩타이드는 약 12~100개 정도의 아미노산으로 이뤄지며, 아미노산 서열 내에서 양전하를 띠는 리신(lysine), 아르기닌(arginine), 히스티딘(histidine) 등의 아미노산 잔기를 많이 포함하는 저분자의 단백질성 물질이다[38]. 미생물 뿐만 아니라 무척추동물과 척추동물에도 존재하며 생물체로부터 분리된 항균 펩타이드는 박테리아, 진균류, 바이러스 등에 이르는 넓은 범위의 미생물에 대해서 항균활성이 보고되어 있다[6, 11]. 다양한 생물에서 발견되는 항균 펩타이드는 α-helix, β-sheet 또는 random coil 구조를 가지고 이러한 구조는 대부분 친수성과 소수성을 동시에 지닌 양친매성의 특성을 지닌다[32, 39]. 보고된 항균 펩타이드들은 구조와 활성의 일반적 경향이 알려졌지만 아미노산의 서열과 구조, 그리고 활성에 대한 유사성 또는 일관성을 명확하게 규정하기엔 많은 연구가 필요하다[5].

다양한 생물 중 척추동물 이상 동물류는 선천적 면역 시스템(innate immunity)과 함께 후천성 면역 시스템(acquired

*Corresponding author

Tel : +82-51-720-2454, Fax : +82-51-720-2456

E-mail : combikola@korea.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.

immunity)을 가지고 있으며, 두 가지 면역 시스템을 이용하여 외부물질을 인식하고 선별한 뒤 다양한 반응을 통하여 제거 또는 불활 시킴으로써 외부물질로부터 자신의 몸을 보호한다 [34]. 그러나 무척추 동물의 경우 척추동물과는 달리 후천적 면역 시스템이 없으며, 오직 선천적 면역 시스템만으로 다양한 외부환경 또는 물질로부터 체내 항상성을 유지하며 살아간다 [7]. 특히 해양 무척추 동물의 경우 육상과는 다른 해양이라는 매우 독특한 환경에 노출되었으며, 그 중 여과섭이를 하는 패류 등의 해양무척추동물은 높은 수준의 미생물과 오염물질에 직접 노출되어 있어 선천적 면역 시스템이 매우 발달되었고, 이러한 선천적 면역 시스템의 주요한 성분으로 항균 펩타이드들이 알려져 있다 [35].

다양한 부착성 패류 중 굴, 참담치류 및 진주조개는 우리나라의 패류 산업에서 큰 비중을 차지하고 있으며, 이러한 패류들은 외부환경의 변화 또는 자극에 이동을 할 수 없기 때문에 환경변화에 강하고, 항균 펩타이드 등의 다양한 방어물질을 많이 가진다고 보고되어 있다 [34]. 연체동물(Mollusca), 이매패강(Bivalvia), 돌조개목(Arcoida), 홍합과(Mytilidae)에 속하는 홍합류(Mytilidae)는 참담치(Hard shelled mussel, *Mytilus coruscus*), 캘리포니아 홍합(*Mytilus californianus*) 그리고 진주담치무리(*Mytilus edulis* species complex)가 있고, 그 중 진주담치무리는 진주담치(Blue mussel, *Mytilus edulis*), 지중해담치(Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*) 그리고 태평양푸른담치(Pacific blue mussel, *Mytilus trossulus*)로 분류된다 [37]. 이 중 참담치(*M. coruscus*)는 홍합, 섭조개, 담체 또는 열합 등의 이름을 가지고 있으며, 다른 홍합류와는 다르게 한국, 중국, 일본에서만 서식하고 양식이 어려워 해녀 또는 잠수부가 채취하는 물량에 의존하고 있는 중요 패류종이다 [37]. 패각은 오각형에 가깝고 각질은 홍합류 중 가장 단단하며, 표면은 흑색으로 광택이 있고, 조간대 또는 수심 20 m 내외의 암초에 부착하여 살아간다 [37]. 또한 한국, 중국, 일본에서 다 같이 식용으로 소비되고 있는 중요 패류이나 특히 한국과 중국에서 매우 귀한 식품으로 여겨지고 있다 [37].

홍합류 유래의 항균 펩타이드는 지중해담치 [9]와 진주담치 [6]에서 주로 연구되었으며 defensins [9, 18], myticins [19], mytilins [18, 24], mytimycins [6, 33] 등이 보고되어 있다. 하지만 참담치 유래 항균 펩타이드는 mytichitin-1 [25]과 myticusin-1 [16]만이 보고되어 있으며, 이는 참담치가 우리나라를 포함하는 중국과 일본에서만 서식하는 종이기 때문에 항균물질의 연구가 제한적으로 진행되고 있고 그에 따른 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구는 참담치(*M. coruscus*)의 조직 추출물을 이용하여 항균활성 물질의 탐색 및 정제과정을 수행하고 항균물질의 특성을 분석함으로써 항균 펩타이드의 항생제 대체제와 같은 활용 가능성을 검토하고 해양무척추동물의 선천적 면역 체계에 대해 이해하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

본 연구에 사용한 참담치의 경우 부산 자갈치 공동어시장에서 구입하여, 패각근, 혈액, 아가미, 간췌장, 족부 근육 등을 적출하였으며, 적출 후 모든 장기는 항균 펩타이드를 추출하기 전까지 -80°C 에서 급속 냉각하여 보관하였다.

시약 및 재료

항균활성 측정에 사용되는 미생물배지는 모두 Difco사(Difco, USA)의 배지를 사용하였고, low melting agarose는 Bio-Rad사(Bio-Rad, USA)의 제품을 사용하였다. 항균 펩타이드 추출과 정제에 사용된 acetic acid, trifluoroacetic acid (TFA), water 그리고 acetonitrile (ACN)은 모두 Berdic& Jackson사(B&D, USA)로부터 구입하였고 그 외의 모든 실험에 사용된 시약 및 재료는 특급을 사용하였다.

사용 균주 및 배양 조건

항균활성 측정에 사용된 그람양성, 그람음성, 그리고 진균류의 지표 균주들은 생물자원센터(KCTC), 한국중균협회(KCCM)에서 분양받았으며 각각의 균주들은 최적 온도와 배지에서 배양하였다(Table 1).

항균 펩타이드 추출

적출한 조직들은 액체질소와 막자사발을 이용하여 파쇄하고, 산 추출법을 통하여 조직 내 펩타이드를 추출하였다. 4배 부피의 1% acetic acid (v/v)을 조직 파쇄물에 첨가하여 100°C 에서 5분 끓인 후 충분히 냉각시켰다. 추출액은 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 후 상층액만을 취하여 -80°C 에 보관하였다. 상층액은 사용직전에 $0.45\ \mu\text{m}$ 의 필터를 사용하여 불순물을 제거하고 항균활성 측정 및 펩타이드 순수 정제 과정에 사용하였다.

항균 펩타이드의 분리 및 정제

참담치 족부 근육 추출물의 항균물질 분리 및 순수 정제 과정은 HPLC (DIONEX UltiMate 3000 HPLC system, Thermo Fisher Scientific, CA, USA)를 이용하여 2종류 역상 column을 사용하여 수행되었고, 각 분획들에 대한 항균활성은 *Streptococcus mutans*에 대한 ultrasensitive radial diffusion assay (URDA)법을 이용하였다 [15].

첫 번째 정제과정으로 참담치 족부 근육 유래 acetic acid 추출물은 CapCell-Pak C₁₈ reversed-phase column ($5\ \mu\text{m}$, $120\ \text{\AA}$, $4.6 \times 250\ \text{mm}$; Shiseido Co., Ltd, Tokyo, Japan)을 이용한 ACN 농도에 따른 분획들로 분리하여 항균 펩타이드가 존재하는 분획만을 구분하고자 하였다. A 용매는 H₂O (pH 2.2)에 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 포함하고 B 용매는 100%

Table 1. Pathogenic strains used in this study

Strains	Reference	Media	Temperature
Gram positive			
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 1012	BHI	30°C
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 1021	TSB	37°C
<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065	BHI	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM 11335	TSB	37°C
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	KCTC 3341	MH	37°C
Gram negative			
<i>Escherichia coli</i>	KCCM 40271	NB	37°C
<i>Enterobacter cloacae</i>	KCTC 2361	NB	37°C
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCTC 12385	NB	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC 1636	NB	37°C
<i>Proteus mirabilis</i>	KCTC 2510	MH	37°C
<i>Vibrio alginolyticus</i>	KCTC 2472	BHI	37°C
<i>Vibrio harveyi</i>	KCCM 40866	BHI+1% NaCl	26°C
Fungi			
<i>Candida albicans</i>	KCCM 11282	YM	25°C

CH₃CN (pH 2.2)에 0.1% TFA를 첨가하여 사용하였다. 분리 조건은 60분 동안 1.0 ml/min 유속으로 5%에서 65%까지 ACN농도를 증가시키며 각 분획의 항균활성을 확인하였다. 두 번째 정제과정으로 항균활성을 지닌 분획들을 모아서 TSK-gel ODS-80™ C₁₈ reversed-phase column (4.6×150 mm; TOSOH, Tokyo, Japan)을 적용시켜 다음과 같은 조건으로 분리과정을 수행하였다. A 용매는 H₂O (pH 2.2)에 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 포함하고 B 용매는 100% CH₃CN (pH 2.2)에 0.1% TFA를 첨가하여 사용하였다. 120분 동안 유속 0.2 ml/min으로 5%에서 65%까지 ACN농도를 순차적으로 증가시키면서 분리과정을 수행하였다. 검출기는 다양한 파장을 읽을 수 있는 diode array detector (Dionex, CA, USA)를 이용하였고, peak 중에서 220 nm 파장이 가장 높고, 나머지 파장의 변화가 낮은 peak들을 선별하여 URDA로 각각의 항균활성을 확인하였다.

본 연구에서 사용한 URDA 방법은 Table 1의 병원성 균주들에 대한 성장 저해 정도를 관찰하였고 활성 측정법은 다음과 같다. 균주는 최적 생육 배지인 BHI, YM, NB 등 에서 18시간 이상 배양한 뒤 OD₆₀₀=0.1에 해당하는 박테리아 ~10⁸ CFU/ml 또는 효모 ~10⁶ CFU/ml가 되도록 동일 배지로 희석한다. 1% agarose가 포함된 under-lay gel 9.5 ml에 0.5 ml의 희석된 균주를 넣은 후 1 mm의 두께로 플레이트에 분주한다. 상온에서 굳힌 플레이트에 직경 2.2 mm의 구멍을 뚫은 후 10 µl의 추출물 또는 정제 단계의 샘플을 각각 주입했다. 샘플을 주입한 뒤 10 ml의 1% type I agarose 와 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)를 포함하는 over-lay gel을 붓고 굳힌 후 25°C (*Candida albicans*, *Vibrio harveyi*), 30°C (*Bacillus cereus*), 37°C (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *S. mutans*) 에서 18시간 이상 배양한 후 샘플 주위에 생겨난 투명환의 크기를 측정하여 항

균활성을 평가하였다. 펩타이드의 농도에 따른 측정된 투명환의 크기를 minimal effective concentrations [MECs, µg/ml]으로 나타냈다[15].

정제물질의 trypsin 처리 및 잔존 항균활성 평가

정제된 항균 물질이 단백질성임을 확인하기 위하여 trypsin 처리 전 후의 항균활성 유무와 변화 정도를 측정하였다. 10 µl의 정제된 물질에 trypsin 2 µl (1,000 µg/ml)를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응 시킨 뒤, URDA 법으로 *S. mutans*에 대한 항균활성의 유무 또는 활력의 변화를 측정하였다.

정제된 항균 펩타이드의 분자량 측정 및 일차구조 분석

정제된 펩타이드의 분자량은 MALDI-TOF/MS (Ultraflex III matrix-assisted laser desorption Ionization time-of-flight mass spectrophotometer, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)를 사용하여 linear mode로 측정하였다. 정제된 펩타이드는 0.1% TFA/50% CH₃CN (1:1,v/v)에 녹인 후 α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix solution (10 mg/ml CHCA in 0.1% TFA/50% CH₃CN, 1:1,v/v)과 혼합하여 MALDI plate에 도입한 후에 분자량을 측정하였다. N-말단 아미노산의 서열을 분석하기 위해 pulse liquid automatic sequencer (model 473A; Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)를 사용하였다.

펩타이드의 염기서열 분석

확보한 N말단 잔기를 통하여 NCBI의 BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>)를 실시하였고, 그 중 유사도가 가장 높은 펩타이드를 선별하였다. 확보한 항균 펩타이드의 nucleotide 서열을 바탕으로 degenerated primer와

gene-specific primer pair를 제작하여 항균 펩타이드의 open reading frame (ORF)을 증폭한 뒤 염기서열을 분석하여 유전자 정보를 확보하였고, NCBI의 GenBank database 내의 알려진 펩타이드와의 서열을 비교·분석하였다.

항균 펩타이드의 합성 및 항균활성 분석

NCBI의 BLAST search에서 확보한 아미노산 서열과 gene-specific primer로 증폭시킨 참담치의 nucleotide의 서열을 비교 분석하여 항균 펩타이드의 일차구조를 밝혔으며 이를 바탕으로 고상 화학합성을 하였다. 합성한 항균 펩타이드 분말은 0.01% acetic acid 용액에 충분히 녹인 뒤 항균활성을 검증하였다.

고염처리 및 열처리가 정제된 펩타이드의 항균활성에 미치는 영향

B. subtilis, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. mutans* 그리고 *C. albicans*를 각각의 최적 배양온도에서 배양 후 합성한 펩타이드의 항균활성을 확인하기 위해 URDA 방법의 지표균으로 사용하였다. 항균 펩타이드의 염농도에 대한 안정성 확인을 위해 0.01% acetic acid으로 녹인 샘플에 최종적으로 NaCl 농도가 0.5%, 1% 그리고 2%가 되도록 첨가한 뒤 0.01% acetic acid을 섞어 최종 부피 10 μ l로 만들어 URDA법으로 평가하였다. 열안정성 평가를 위하여 100°C에서 10분 동안 가열한 뒤 활성의 변화를 측정하였다.

RNA 추출

조직에 1 ml의 Trizol (Life Technologies, CA, USA)을 처리하여 완전히 용해시킨 뒤 100 μ l의 chloroform를 처리하여 상층액을 분리하고 250 μ l의 isopropanol을 처리했다. 그리고 상온에서 10분 동안 반응 후 원심분리로 상층액을 제거하고 DEPC가 포함된 에탄올을 처리하여 RNA 만을 순수 정제하였다. 추출한 RNA는 분광광도계를 이용하여 최종적으로 RNA 농도 및 순도를 측정했다.

Complementary DNA 합성

Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 first strand cDNA 를 합성하였다. RNA 1 μ g, oligo dT primer를 넣고 최종부피가 13 μ l이 되게 첨가하여 65°C 10분 반응시킨 후 얼음에서 2분 반응시켰다. 반응액에 reaction buffer (5x) 4 μ l, dNTP mix 2 μ l, Transcriptor Reverse Transcriptase 0.5 μ l, RNase inhibition 0.5 μ l을 첨가하여 50°C에서 1시간, 85°C에서 5분, 얼음에서 5분 반응시켜 종료시켰다.

조직별 protamine-like protein 발현 분석

각 조직 내 protamine-like (PL) 유전자의 발현을 비교·분석

하기 위하여 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR) 분석을 실시하였다. 각 조직별 cDNA를 100 ng을 주형으로 ABI 7500 Real-time PCR (Applied Biosystems, CA, USA) 으로 중합효소연쇄반응을 수행하여 유전자를 증폭하였고 Ct (cycle threshold) 값의 측정·분석을 통해 18s rRNA 발현과 정량 및 비교하여 표준화 하였다.

결과 및 고찰

참담치 추출물의 항균물질의 활성 확인

참담치(*M. coruscus*)로부터 분리한 조직을 파쇄한 뒤 산 추출과정으로 펩타이드 물질을 추출하고 항균활성을 분석하였다. 각각의 추출물들은 그람 음성, 그람 양성 균주와 진균류인 *C. albicans*에 다양한 항균활성을 보였으며, 특히 족부 근육 추출물이 병원성 균주들에 대한 가장 큰 항균활성을 나타내었다 (Table 2). 족부 근육 추출물은 그람양성 균주인 *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. mutans*에 대하여 강한 활성을 나타내었고, 그람음성 균주인 *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*에서 항균활성을 나타내었으나 *V. alginolyticus*, *V. harveyi*에서는 활성을 나타내지 않았다. 또한 진균류인 *C. albicans*에는 낮은 활성을 기록하였다. 이와 같이 다양한 항균활성 범위는 현재까지 보고 되어진 참담치에서 분리한 항균 펩타이드 mytichitin, myticusin와 같이 그람양성 균주에 강한 활성이 보이는 유사한 양상을 보였으며, 조직 추출물 내 존재하는 항균 물질을 단일 성분으로 순수 분리 정제하여 정확한 활성을 비교해볼 필요가 있었다[25]. 좀 더 다양한 지표균주를 평가해 볼 필요가 있지만 사람과 어병균주에 고르게 항균활성을 보여 다양한 의약품과 동물용의약품으로도 활용이 가능할 것으로 사료되었다. 족부 근육 추출물은 항균활성 테스트를 하였을 때 *S. mutans*에 가장 강한 활성을 보였기 때문에 족부 근육 추출물의 HPLC 분리 분획들에 대한 활성을 *S. mutans*를 지표균으로 이용하여 URDA를 통하여 측정하였다.

항균활성 펩타이드의 정제

참담치 족부 근육 추출물을 역상 column을 통한 HPLC로 항균물질을 순수 분리 정제하였다. CapCell-Pak C₁₈ column을 이용하여 다양한 분획물을 확인하였고, 각각의 용출된 분획은 URDA법으로 항균활성의 유무와 정도를 측정하였다. 그 결과, 약 26분에 용출된 분획에서 매우 높은 항균활성을 관찰할 수 있었으며, 약 6.5 mm 직경의 투명환을 기록하였다(Fig. 1A). 이를 TSK-gel ODS-80TM C₁₈ column으로 한번 더 정제한 결과 약 34.5분에서 순수한 하나의 분획을 회수할 수 있었으며, URDA를 통하여 약 8.8 mm 직경의 투명환을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 또한 순수 정제한 시료가 단백질성 항균물질임을 확인하기 위하여 trypsin 처리 전과 후의 항균활성을 비

Table 2. Antibacterial activity of crude extracts against pathogenic strains

Organism	Tissue				
	Abductor muscle	Hemocyte	Foot	Gill	Hepatopancreas
Gram positive					
<i>B. cereus</i>	-	+	+	-	+
<i>B. subtilis</i>	-	++	+++	-	-
<i>S. mutans</i>	++	+	+++	+++	++
<i>S. aureus</i>	-	-	+++	+++	+
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	-	-	-
Gram negative					
<i>E. coli</i>	++	++	++	++	++
<i>P. aeruginosa</i>	+	++	++	++	+
<i>E. cloacae</i>	-	-	++	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	+	++	+	-
<i>P. mirabilis</i>	-	-	-	+	-
<i>V. alginolyticus</i>	-	-	-	-	-
<i>V. harveyi</i>	-	-	-	-	-
Fungi					
<i>C. albicans</i>	-	+	+	-	-

Antimicrobial activity based on the diameter of inhibition zone (mm) follow this skins: +++≥7mm, ++4-7mm, +≤4mm.

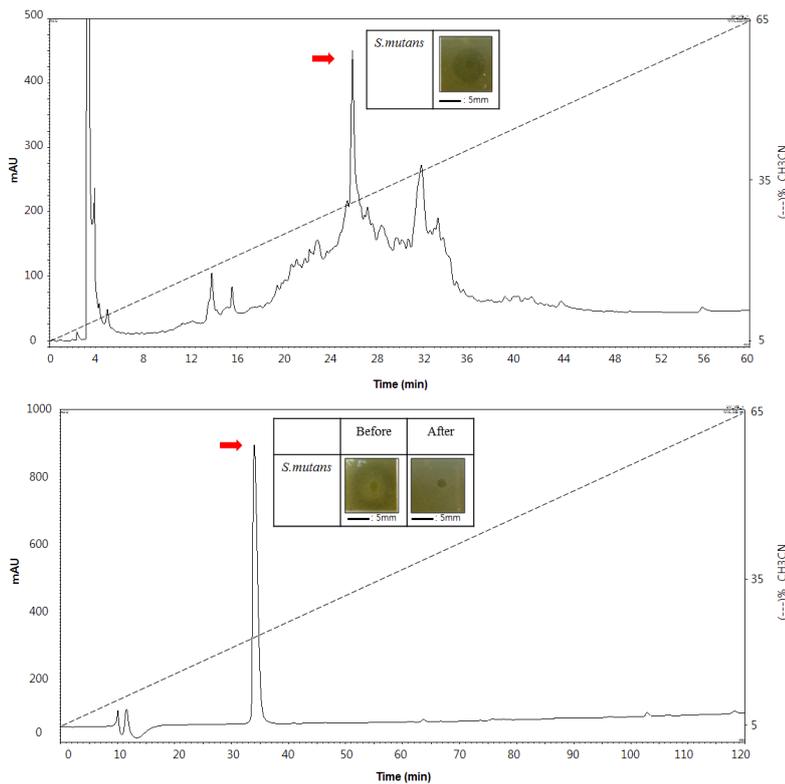


Fig. 1. Purification and antimicrobial activity of crude extract. (A) Purification of crude extracts from muscle of *M. coruscus*. The acidic extract was fractionated by the CapCell-Pak C₁₈ reversed-phase column. Elution was performed with a linear gradient of 5%→65% CH₃CN (pH2.2) in 0.1% TFA for 60 min at a flow rate 1.0 ml/min. The eluate was monitored at 220 nm. Fraction of the absorbance peak showed antimicrobial activity against *S. mutans* (inset). (B) Antimicrobial activity of the purified peak (before) and trypsin treated purified peak (after) against *S. mutans*. Active fraction was applied to the TSK-gel ODS-80™ C₁₈ reversed-phase column. Elution was performed with a linear gradient of 5%→65% CH₃CN (pH2.2) in 0.1% TFA for 120 min at a flow rate of 0.2 ml/min. The eluate was monitored at 220 nm. Fraction of the absorbance peak (indicated by the arrow) showed antimicrobial activity (before) and trypsin treated to purified extract (after) against *S. mutans*. Scale bar indicates 5 mm.

교하였다. URDA 평판을 배양한 결과, trypsin 처리 후에는 분리한 샘플 분획에서 항균활성이 완전히 사라졌음을 관찰하였다(Fig. 1B). Trypsin은 대표적인 단백질 분해효소로 정제된 시료의 활성이 완전히 소실된 결과는 추출물이 단백질성 항균 물질임을 보여주는 확실한 결과였다. 최종 정제된 물질은 일차구조 분석을 위해 MALDI-TOF/MS 분자량 측정과 edman

degradation 과정을 통한 N-말단 서열 분석을 수행하였다.

정제된 펩타이드의 분자량 및 N-말단 아미노산 서열 결정

최종적으로 참돔치의 족부 근육 조직으로부터 정제한 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열을 조사하기 위하여 MALDI-TOF mass spectrometer와 edman 분해법을 통한 N 말단 아미

노산 서열 분석을 실시했다. 그 결과 MALDI-TOF mass spectrometer을 통해 분자량이 약 6,701 Da이고 정제과정에서 순수하게 분리하였다.

N-말단의 부분적인 일차구조는 edman 분해법을 통해 (A-K-A-K-R-S-P-R-K-K-K-A-A-V-K-K-S-S-K-S) 20개의 아미노산을 우선 밝혔다. 밝혀낸 20개의 N-말단 서열을 NCBI의 GenBank database blast 검색한 결과 캘리포니아 홍합(*M. californianus*)의 sperm-specific protein과 protamine-like PL-II/PL-IV precursor와 100% 동일한 일차구조 상동성을 보였다. 또한 이러한 정보를 기반으로 제작된 primer들을 이용하여 ORF를 분석한 결과 183 bp로 60개의 아미노산을 코딩하고 있었다(Fig. 2). 밝혀진 60개의 아미노산 서열을 NCBI Gen Bank Database에서 검색한 결과 캘리포니아 홍합의 protamine-like PL-II/PL-IV precursor와 100% 일치하였다. 홍합의 다른 종들과 아미노산 서열을 비교한 결과 태평양푸른담치 (*M. trossulus*)의 sperm-specific PHI-2B/PHI-3 protein과 91.6%, 캘리포니아 홍합의 sperm-specific Phi-3 protein과 70% 일치하였다(Fig. 2). N말단의 20개 아미노산 서열과 동일했던 캘리포니아 홍합의 sperm-specific Phi-3 protein는 45개의 아미노산을 코딩하고 있는 펩타이드로 본 연구의 항균 펩타이드의 60개 보다는 사이즈가 작았고 총 45개의 아미노산 서열 중 39번째, 41번째, 42번째의 3개의 아미노산 서열이 일

치하지 않았다. 그리고 분리한 183 bp의 참담치 protamine-like 유전자 염기서열을 분석한 결과 캘리포니아 홍합의 protamine-like PL-II/PL-IV precursor와 97.2%, 태평양푸른담치의 histone h1-like protein과 86.3% 일치하였으며 아미노산의 높은 상동성과 다르게 염기서열의 유사도는 감소하는 결과를 알 수 있었다(Fig. 3). 또한 이러한 유전자의 특성을 규명하기 위해서 5', 3' UTR, domain, isoform 분석 등이 진행 중에 있으며 이는 종간의 protamine-like protein의 특성에 대한 이해를 증대시킬 수 있는 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

또한 확보한 아미노산 서열을 다양한 항균 펩타이드들의 정보만을 모아놓은 Antimicrobial peptide database (<http://aps.unmc.edu>)에서 N-말단의 부분적인 일차구조를 검색해 본 결과 약 40% 이하의 유사도들을 가진 항균 펩타이드들이 존재하였으며 그 중 가문비나무속에 속하는 시트가 가문비(*Picea sitchensis*)의 Piceain 1과 39.13%로 매우 낮은 유사도를 보였다 [17]. 이러한 결과를 통하여 본 연구에서 분리한 펩타이드는 신규 항균 펩타이드일 가능성이 높을 것으로 평가하였다.

Protamine-like protein은 다양한 생물 종의 sperm에서 발견되는 단백질로 sperm nuclear basic protein (SNBPs)에 속하며 정자형성 동안에 somatic histone을 대체하는 DNA 응축 단백질이다[2-4]. Spermatocyte에서 sperm로 형성되어질 때 somatic histone이 DNA와 결합한 histone이 되고 중간단계의

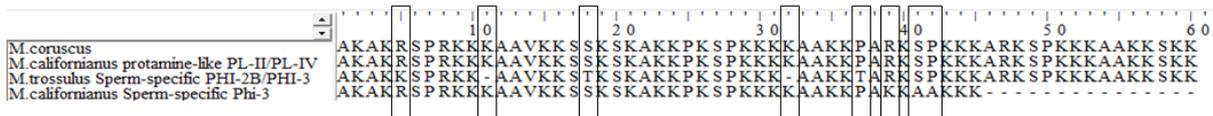


Fig. 2. Alignment of the purified peptide amino acid sequence with the *Mytilus* species. Unconserved amino acids are indicated by boxes. (ABC18200.1) *Mytilus californianus*, (Q05831.2) *Mytilus trossulus*, (P11860.1) *Mytilus californianus*.



Fig. 3. Alignment of the nucleotide sequence with the *Mytilus* species. Unconserved sequences are indicated by boxes. (DQ305038.1) *Mytilus californianus* protamine-like PL-II/PL-IV, (L02876.1) *Mytilus trossulus* histone h1-like.

단백질 protamine-like protein을 거쳐 protamine이 된다[3]. Protamine-like protein은 histone과 protamine의 중간적인 구조와 기능을 지니며 리신과 아르기닌이 35~50%의 높은 비율로 구성되어 있다[4]. Somatic histone은 역동적인 방식으로 DNA에 결합하고 유전자 발현조절에 중요한 역할을 하지만 protamine과 protamine-like는 유전체가 최대 압축이 되도록 단단하게 결합한다[3]. 특히 해양무척추 동물에서는 화학적인 수준에서 특성은 많이 보고되어있지만 DNA와의 상호작용으로부터 발생하는 특정 구조에 대해서는 잘 알려져 있지 않다[3].

Protamine-like protein은 PL-I, PL-II, PK-III, PL-IV 4개 그룹으로 나뉜다. PL-I은 histone H1 related PL protein으로 어류와 양서류에서 연구되어왔지만 담치류에서는 정보가 많지 않다[3]. Sperm specific proteins; (PL-II, PL-III, PL-IV)은 담치류에서 정자형성과 관련있다고 보고되었다[2-4]. *Mytilus*의 PL-II 단백질은 histone H1 family에 속하며 histone H1의 winged helix motif와 유사도가 높으며 84개의 아미노산으로 구성된 구형의 core를 가지고 있다[3]. PL-III단백질은 histone과 protamine의 중간산물이지만 protamine과는 다른 특징을 지닌다[3]. PL-IV 단백질은 6.5 kD으로 리신이 풍부한 histone H1의 C-말단과 매우 비슷한 구성으로 되어있으며 PL-II/PL-IV precursor의 변형 후 변형과정의 생성물이다[2-4]. 본 연구에서 분리한 펩타이드의 기능을 밝히기 위한 계통발생학적 및 진화론적인 실험은 진행되지 않았지만 다양한 패류에서 sperm 생산과 관련하여 항균활성이 보고되었으며, histone-like 단백질의 항균활성이 일부 알려진 것 같이 생식세포관련 단백질에서 항균활성이 보고되었다[14]. 패류는 아니지만 연어의 생식세포로부터 분리한 arginine-rich polycationic 단백질로 알려진 protamine에서 항균활성을 지닌다고 알려져 있다[26]. 또한 캘리포니아 홍합의 sperm 생성과 관련있는 protamine-like protein의 연구는 활발히 이뤄졌지만 참담치의 protamine-like protein의 연구는 아직 보고되어진 바가 없다[3]. 또한 참담치의 생식소를 포함하는 내장 조직이 아닌 족부 근육에서 발견되었다는 점에서 특이하다고 할 수 있으며, 따라서 신규 또는 다기능성 항균 펩타이드 가능성이 높을 것으로 판단되며 추가적인 연구를 통해서 무척추생물의 면역 시스템과 관련한 다양한 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

항균 펩타이드의 활성 및 안정성 분석

Degenerated primer set와 gene specific primer set를 이용하여 확보한 염기서열들을 토대로 protamine-like II/IV precursor의 ORF를 밝혔다. 그리고 이러한 서열을 바탕으로 60개 아미노산으로 이루어진 protamine-like II/IV precursor를 고상합성하였고 다양한 균주에 대한 항균활성을 관찰했다(Fig. 4). 합성한 펩타이드는 그람양성 균주인 *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. mutans*, 그람음성 균주인 *P. aeruginosa*, *E. coli*에 그리고 진

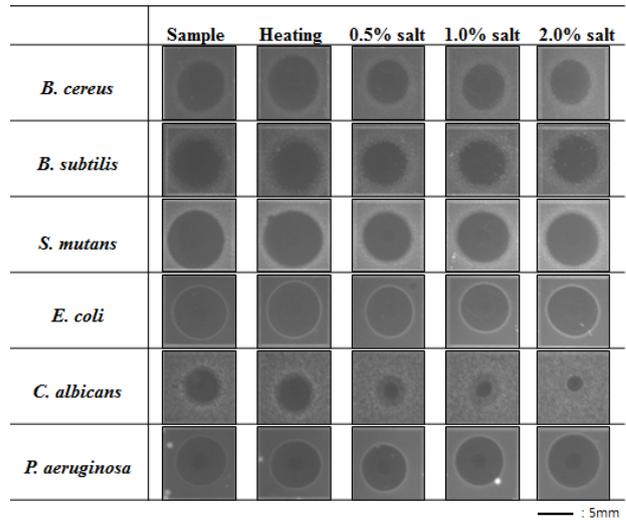


Fig. 4. Antimicrobial activity and stability of synthesized peptide against 6 strains. Scale bar indicates 5 mm.

균류인 *C. albicans*에도 항균활성을 나타내었다(Fig. 4). 다양한 농도별로 각 균에 대한 항균활성을 확인하였고 활성의 정도를 최소유효농도(minimal effective concentration, MEC)로 나타내었다(Table 3). 그람양성 균주인 *B. subtilis*와 *S. mutans*에 가장 민감한 항균활성을 보였다(Table 3). *S. mutans*에 높은 항균활성을 나타내는 결과는 조직에서 추출한 natural form의 항균 펩타이드와 동일한 항균활성 결과를 알 수 있었다. 또한 다양한 참담치류에서 발견되는 항균 펩타이드로 다양한 균에 항균활성을 보이거나 특히 그람양성 균주에 더욱 민감도가 높다는 공통된 특성을 확인 할 수 있었으며 그람양성 균주 중에서 *B. cereus*에만 활성이 낮은 독특한 특징을 발견할 수 있었다.

본 연구에서 밝혀진 일차구조를 바탕으로 합성한 60개의 합성 펩타이드는 100°C에서 10분 가열 후 항균활성의 변화가 없는 높은 열안정성을 보였으며, 일반적으로 알려진 육상 생물 유래의 항균 펩타이드가 NaCl에 의하여 활성이 저해받는 것과는 달리 해양생물 유래 항균 펩타이드의 특징인 NaCl에 의하여 활성이 2%까지 저해 받지 않음을 알 수 있었다(Fig. 4). 그러나 독특하게도 *C. albicans*에 대한 항균활성만이 저해되었다(Fig. 4). 이는 일반 미생물과 달리 진균류에 대해서 다른 기작을 통해 항균활성을 보이거나 진균류의 구조적 차이로 인한 것으로 예상되며 추후 이러한 기작의 연구는 항균 펩

Table 3. Minimal effective concentration (MEC) of peptide

Microbe	Gram	MEC (µg/ml)
<i>B. cereus</i>	+	20.8
<i>B. subtilis</i>	+	0.2
<i>S. mutans</i>	+	0.2
<i>E. coli</i>	-	2.6
<i>P. aeruginosa</i>	-	5.7
<i>C. albicans</i>	fungi	56.3

이드의 다양한 기능 연구와 진균류에 대한 항생제 대체제 개발에 중요한 정보를 제공할 것으로 사료된다.

따라서 이러한 넓은 항균활성 범위의 높은 열안정성과 염안정성을 고려한다면 본 연구에서 확보한 참담치 유래의 항균 펩타이드는 충분히 안정적인 역할을 할 것으로 사료되며 수산용 항생제 대체제의 후보소재로 높은 가능성을 기대할 수 있었다.

조직별 정량적 발현 분석

참담치로부터 분리한 각 장기 조직들로부터 mRNA 수준에서의 발현을 정량적 실시간 연쇄증합반응으로 분석한 결과, 항균 펩타이드의 발현은 족부 근육에서 가장 높았으며 아가미, 폐각근, 생식소 및 내장을 포함하는 간체장, 그리고 혈액순으로 발현이 높았다(Fig. 5). Protamine-like 단백질류의 보고된 주요기능을 고찰해 봤을 때 생식소가 포함된 간체장보다 근육과 아가미에서 발현이 높은 것은 상당히 흥미로운 결과였으며, 이때폐류의 항균 펩타이드 관련 연구 중 굴에서 분리된 선천성 면역 요소인 defensin, molluscidin의 경우에도 아가미 조직에서 가장 발현이 높게 나타나는 것으로 밝혀졌다 [29, 31]. 그리고 본 연구의 항균물질 또한 족부 근육 다음으로 아가미에서 발현이 높게 나타나는 경향을 보였으며 이는 참담치 각 조직 마다 항균 물질을 축적하고 있음을 짐작할 수 있었다.

본 연구 결과 참담치 각 조직들에는 다른 해양무척추 동물과 같이 다양한 항균 물질들이 존재하는 것으로 확인되었으며, 족부 근육 추출물에서 분리한 단백질성 항균물질의 항균활성 및 특징을 평가하였다. 다양한 연구결과 및 특성들도 다른 해양동물의 항균 펩타이드와 유사한 일반적인 경향을 지니면서도 신규한 특성을 지니는 것을 알 수 있었다. 현재 확보한 염기서열과 5', 3'-RACE PCR를 통하여 UTR 부분 분석과 재조합 단백질의 제작 및 대량 생산을 통해서 특성 분석을 진행하

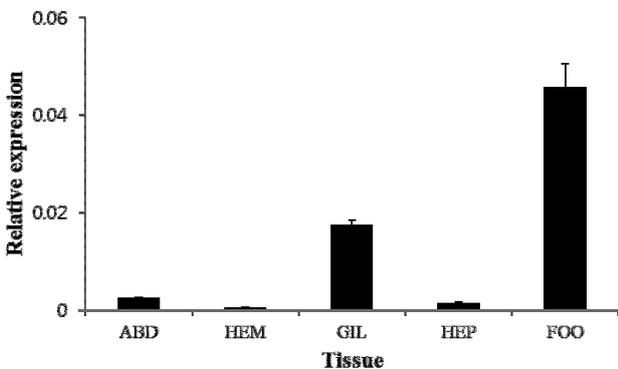


Fig. 5. Quantitative analysis of protamine-like expression in the various tissues. Tissue-specific expression of protamine-like. Error bars represent the mean ± SD of three technical replicates. ABD: abductor muscle, HEM: Hemocyte, GIL: gills, HEP: Hepatopancreas, FOO: Foot.

고 있다. 그리고 아미노산의 일차구조 분석을 통한 항균활성이 더욱 높고 다양한 병원균에 대해 항균활성을 지니는 일부 잔기가 변형 또는 치환된 다양한 유도체 후보들을 제작 중에 있으며 항암, 항산화, 항중 등 다양한 기능을 지닌 항균 펩타이드로서 평가 및 연구를 진행할 예정이다. 이에 따라 항균 펩타이드의 작용기작 연구를 통해 활용성을 평가하고 나아가 해양 무척추동물의 면역 시스템 연구를 수행할 계획이다. 그리고 항생제 대체제를 위한 항균 펩타이드 개발을 위해 생산 기술과 분리정제 기술의 연구 및 개발이 진행될 것이며 이는 경제적으로 수산용 항생제 대체제 생산과 산업화를 진행할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 추후 연구를 통해서 해양 무척추동물의 선천성 면역 기작과 항생제 대체 물질 개발에 많은 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 국립수산물과학원 수산시험연구사업 수산생명자원유래 항미생물 천연소재개발(R2016023)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Aditya, K., Heinrich, K., Lategan, M. J. and Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* **274**, 1-14.
- Ausió, J. 1999. Histone H1 and evolution of sperm nuclear basic proteins. *J. Biol. Chem.* **44**, 31115-31118.
- Ausió J., Eirín-López J M. and Frehlick, L. J. 2006. Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J. Biol. Chem.* **281**, 1-4.
- Ausió, J., Lewis, J. D., Saperas, N., Zamora, M. J. and Chiva, M. 2004. Histone H1 and the origin of protamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4148-4152.
- Cha, Y. K., Kim, Y. S. and Chio, Y. S. 2012. Antimicrobial peptides as natural antibiotic materials. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **27**, 9-15.
- Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. A. and Bulet, P. 1996. Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol. Chem.* **271**, 21808-21813.
- Gregory, B. and Gail, S. 1996. Immunity and the Invertebrates. *Dev. Immunol.* **275**, 60-63.
- Hancock, R. and Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**, 402-410.
- Hubert, F., Noel, T. and Roch, P. 1996. A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Eur. J. Biochem.* **240**, 302-306.
- James, F. G., Nouth, C., Manker, P. G., Ian, S. W., Jennifer, A.C. and Daniel, M. R. 2003. Phosphorylation of soybean nodulin26 on serine 262 enhances water permeability and

- is regulated developmentally and by osmotic signals. *Plant Cell*. **15**, 981-991.
11. Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J. and Gibson, L. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture* **274**, 1-14.
 12. Kim, I. H., Kim, J. W. and Lee, J. H. 2006. Purification of antimicrobial peptide from the marine mussel, *Mytilus coruscus*. *Environ. Mutagens Carcinogens*. **26**, 25-29.
 13. Kim, W. J., Cho, M. Y., Jee, B., Park, M. A. and Kim, N. Y. 2014. Administration and use of aquaculture drugs in Korea. *Kor. J. Fish. Pathol.* **27**, 67-75.
 14. Kim, Y. H., Kim, S. M. and Lee, S. Y. 2014. Antimicrobial activity of protamine against oral microorganisms. *Biocontrol. Sci.* **20**, 275-280.
 15. Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S., Jackson, R. and Eisenhauer, P. 1991. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* **137**, 167-173.
 16. Liao, Z., Wang, X. C., Liu, H. H., Fan, M. H., Sun, J. J. and Shen, W. 2013. Molecular characterization of a novel antimicrobial peptide from *Mytilus coruscus*. *Fish Shellfish Immunol.* **34**, 610-616.
 17. Liu, R., Mu, L., Liu, H., Wei, L., Yan, T., Chen, M., Zhang, K., Li, J., You, D. and Lai, R. 2011. Two antimicrobial and nematocidal peptides derived from sequences encoded *Picea sitchensis*. *J. Pept. Sci.* **17**, 627-631
 18. Mitta, G., Hubert, F., Dyrzynda, E. A., Boudry, P. and Roch, P. 2000. Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Dev. Comp. Immunol.* **24**, 381-393.
 19. Mitta, 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.
 20. Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T. and Shimonishi, Y. 1989. Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.* **106**, 663-668.
 21. Moon, H. S., Kim, Y. K., Lee, M. H., Yoon, N. Y., Lee, D. S., Yoon, H. D. and Seo, J. K. 2011. Isolation and Purification of an Antimicrobial Material from the Jellyfish *Nemopilema nomurai*. *Fish Aquatic Sci.* **44**, 478-483.
 22. Nam, B. H., Seo, J. K., Lee, M. J., Kim, Y. O., Kim, D. G., An, C. M. and Park, N. G. 2015. Functional analysis of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) β -thymosin: Focus on antimicrobial activity. *Fish Shellfish Immunol.* **45**, 167-174.
 23. Park, I. S., Oh, R., Lee, M. J., Moon, J. Y., Kim, Y. O., Nam, B. H., Kong, H. J., Kim, W. J., An, C. M. and Kim, D. G., 2015. Antibacterial activity of bacteria isolated from rocks on the seashore. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **48**, 904-912.
 24. Parisia, M. G., Lia, H., Toubianaa, M., Parrinello, N., Cammarata, M. and Rocha, P. 2009. Polymorphism of mytilin B mRNA is not translated into mature peptide. *Mol. Immunol.* **46**, 384-392.
 25. Qin, C. L., Huang, W., Zhou, S. Q., Wang, X. C., Liu, H. H., Fan, M. H., Wang, R. X., Gao, P. and Liao, Z. 2014. Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. *Fish Shellfish Immunol.* **41**, 362-370.
 26. Richards, R. C. 2001. Histone H1: an antimicrobial protein of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 549-555.
 27. Rocha, P., Yangb, Y., Toubianaa, M. and Aumelasba, A. 2008. NMR structure of mussel mytilin, and antiviral antibacterial activities of derived synthetic peptides. *Dev. Comp. Immunol.* **32**, 227-238.
 28. Seo, J. K. 2016. Screening and purification of an antimicrobial peptide from the gill of the Manila Clam *Ruditapes philippinarum*. *Kor. J. Fish. Aquat. Sci.* **49**, 137-145.
 29. 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.
 30. Seo, J. K., Lee, M. J., Go, H. J., Kim, G. D., Jeong, H. D., Nam, B. H. and Park, N. G. 2013. Purification and antimicrobial function of ubiquitin isolated from the gill of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Immunol.* **53**, 88-98.
 31. Seo, J. K., Lee, M. J., Nam, B. H. and Park, N. G. 2013. cgMolluscidin, a novel dibasic residue repeat rich antimicrobial peptide, purified from the gill of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* **35**, 480-488.
 32. Shai, Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**, 236-248.
 33. Sonthi, M., Cantet, F., Toubiana, M., Trapani, M. R., Parisi, M. G., Cammarata, M. and Roch, P. 2012. Gene expression specificity of the mussel antifungal mytimycin (MytM). *Fish Shellfish Immunol.* **32**, 45-50.
 34. Thomas, B., Norimasa, I. and Isabell, H. 2012. Evolution of the immune system in the lower vertebrates. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **13**, 127-149.
 35. Tincu, J. A. and Taylor, S. W. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3645-3654.
 36. Tom, D., Patrick, S. and Peter, B. 2011. Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 251-258.
 37. Yoo, S. K. 1986. Coastal culture. *Gudeok publisher*. 141-158.
 38. Van't, H. W., Veerman, E. C, Helmerhorst, E. J. and Amerongen, A. V. 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.* **382**, 597-619.
 39. Yechiel, S. 2000. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by K-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**, 55-79.
 40. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptide of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.

초록 : 참담치(*Mytilus coruscus*) 유래 항균 펩타이드 분리 및 정제

오윤경 · 이민정 · 김영옥 · 남보혜 · 공희정 · 김주원 · 안철민 · 김동균*
(국립수산과학원 전략양식부 생명공학과)

항생제 남용의 문제점 및 사용제한에 따른 천연물 유래 항생제 대체제 개발을 위하여 우리나라와 중국, 일본에서만 서식하는 고유종인 참담치의 족부 근육 추출물로부터 항균 펩타이드를 분리 및 정제하였다. C₁₈ 역상 컬럼을 사용하여 항균 펩타이드를 정제하였으며, MALDI-TOF/MS로 분석 결과 분자량은 6,701 Da에 해당하였다. edman degradation 방법으로 N-말단 아미노산 서열 분석을 통하여 20개의 아미노산 서열을 밝혔으며 이는 캘리포니아 홍합(*Mytilus californianus*)의 sperm-specific protein 또는 protamine-like PL-II/PL-IV precursor와 100% 상동성을 지님을 밝혀냈다. 이러한 정보를 바탕으로 ORF를 분석한 결과 60개의 아미노산을 코딩하는 183 bp로 캘리포니아 홍합의 protamine-like PL-II/PL-IV precursor와 아미노산 서열이 100% 일치하였고 유전자 염기서열은 97.2%의 상동성을 나타냈다. 합성된 항균 펩타이드는 그람 양성 균주 *Bacillus cereus* (MEC, 20.8 µg/ml), *Bacillus subtilis* (MEC, 0.2 µg/ml), *Streptococcus mutans* (MEC, 0.2 µg/ml), 그람 음성 균주 *Pseudomonas aeruginosa* (MEC, 5.7 µg/ml), *Escherichia coli* (MEC, 2.6 µg/ml) 그리고 진균류 *Candida albicans* (MEC, 56.3 µg/ml)의 항균활성을 나타냈다. 또한 높은 열안정성을 지녔으며, *C. albicans*를 제외하고 열안정성을 지닌 항균 펩타이드로 확인되었다. 이를 통해 참담치 유래의 항균 펩타이드는 항생제 대체제의 후보소재로 높은 가능성을 지녔다고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서 분리한 참담치 족부 근육 유래 항균 펩타이드는 향후 추가적인 연구를 통하여 항생제를 대체할 수 있는 물질의 개발이 가능할 것으로 사료된다. 그리고 해양무척추동물의 선천성 면역 기작에 대한 정보를 제공할 것으로 기대한다.