

The Antimicrobial Characteristics of McSSP-31 Purified from the Hemocyte of the Hard-shelled Mussel, *Mytilus coruscus*

Ryunkyoung Oh¹, Min Jeong Lee¹, Young-Ok Kim¹, Bo-Hye Nam¹, Hee Jeong Kong¹, Joo-Won Kim¹, Jung-Youn Park¹, Jung-Kil Seo² and Dong-Gyun Kim^{1*}

¹Biotechnology Research Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

²Department of Food Science and Biotechnology, Kunsan National University, Kunsan 54150, Korea

Received September 27, 2017 / Revised October 15, 2017 / Accepted October 19, 2017

This study isolated and purified the antimicrobial peptide McSSP-31 from an acidified hemocyte extract of a *Mytilus coruscus*. The antimicrobial peptide was purified by using a C₁₈ reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). The peptide was determined to be 3330.549 Da by matrix assisted - laser desorption ionization time-of-flight mass spectrophotometer (MALDI-TOF/MS). The N-terminus of a 14 amino-acid sequence was identified as P-S-P-T-R-R-S-T-S-R-S-K-S-R by Edman degradation method. The acquired sequence showed a 93% similarity with the sperm-specific protein Phi-1, which is from *M. californianus*. The identified open-reading frame (ORF) of peptide was 306 bp encoding 101 amino acids, which was analyzed by rapid amplification of cDNA ends (RACE), cloning and sequencing analysis. We compared the full sequence with other known proteins that reveal the sperm-specific protein Phi-1 (93.5%) of *M. californianus*. Synthesized antimicrobial peptide (McSSP-31) showed antibacterial activity against gram-positive bacteria including *B. subtilis*, *S. mutans*, *S. aureus* and gram-negative bacteria including *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* and fungi, *C. albicans*. Also, synthesized peptide showed strong antibacterial activity against antibiotic-resistant strains, including *S. aureus*. The cytotoxicity of the peptide was determined by using the HUVEC human cell line. The peptide did not exhibit any significant cytotoxic effects on the normal human cell line, and it had very low hemolytic activity with flounder hemoglobin. The results demonstrated that peptide purified from the hemocyte of a *M. coruscus* exhibits antibacterial activity against various bacteria and has the potential to be an alternative antibiotic agent.

Key words : Antimicrobial peptide, *Mytilus coruscus*, purification, sperm-specific protein

서론

항생제는 다양한 질병예방과 치료에 가장 효과적인 화학제로 지난 한 세기 동안 사람의 수명연장과 다양한 농·축·수산물의 생산량 증대에 막대한 기여를 해왔다. 그러나 최근 이러한 항생제의 무분별한 오남용과 장기간 사용으로 인하여 다양한 부작용이 발생하고 있으며, 그 중 슈퍼박테리아와 같은 항생제 내성균주의 출현은 국제적인 문제로 발전하게 되었다[18, 19]. 또한 항생제의 체내 축적은 인류의 공중보건을 위협하는 가장 큰 문제로 발전하였으며, 이러한 현상을 해결하기 위해 사람에게 처방하는 항생제의 관리뿐만 아니라 사람이 소비하는 다양한 가축 및 수산물 사육에 사용되는 항생제의 사용

또한 엄격하게 관리해야 한다[18, 19]. 이에 따라 OECD 국가에서는 농·축·수산물에 대한 사료첨가제 및 치료용 항생제의 사용을 적극 규제하고 있다. 우리나라는 2011년 7월부터 사료첨가제로서 항생제 사용은 전면 금지하고 있으나 여전히 치료용 항생제 사용이 매우 높은 편이다[19].

항생제의 경우 항세균, 항진균, 항기생충, 항바이러스 및 항곤충 활성 등을 가지며 적은 양으로 효과가 뛰어나고 안정성이 높은 것이 특징이다. 그러나 아직 이러한 항생제를 대신할 수 있는 완벽한 대체물질은 없으며, 이를 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다[19, 26]. 다양한 항생제 대체제 중 항균 펩타이드(antimicrobial peptides, AMPs), 프로바이오틱스(probiotics), 파이토바이오틱스(phytobiotics), 그리고 백신(vaccine) 등이 최근 항생제를 대체 할 수 있는 물질로 주목 받고 있다[18]. 프로바이오틱스의 경우 다양한 유용균주의 개발과 현장 검증이 필요하고, 파이토바이오틱스는 추출물에 대한 독성을 고려해야 하며, 백신은 병원체의 변이속도가 너무 빠르다는 어려움이 있다[8, 31]. 그러나 항균 펩타이드는 항균 활성 이외의 항기생충, 항곤충, 항산화, 항염증, 항암 및 상처치유 능력 등의 활성을 추가적으로 가지는 다양한 기능이 보고되어 있고, 항균 작용기작에 의한 내성균주의 출현가능성이 낮으

*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.

며, 크기가 작아서 합성이 쉽기 때문에 다양한 분야에서 활용 가능성에 주목하고 있다[18, 26].

항균 펩타이드는 10~50여개의 아미노산으로 구성된 짧은 펩타이드로 주로 lysine (Lys, K)과 arginine (Arg, R)같은 아미노산을 많이 포함하고 있어 양전하를 띠고 있다[18]. 소수성 잔기와 염기성 및 친수성 잔기를 가지는 양친매성 (amphipathicity) 특성을 가지기 때문에 침입생물의 막에 부착하여 항균 작용한다고 알려져 있다[22]. 또한 선천적 면역시스템에 가장 핵심적인 역할을 하는 물질이기 때문에 많은 생물에서 발견되었고, 구조와 활성 및 작용기작에 관련된 다양한 특성들이 보고되었다[5, 11, 23, 27, 29]. 그러나 발견된 항균 펩타이드들의 일반적인 경향성에 대한 분석일 뿐 서열에 따른 구조와 활성에 대한 정확한 상관관계를 밝히기 위해서 아직 많은 연구가 필요하다[4, 18].

해양 무척추동물인 이매패류는 후천성 면역시스템(acquired immune system)이 발달되지 않아 외부의 비자기성 물질이 침입하였을 때 주로 선천성 면역시스템(innate immune system)에 의존하여 대응한다[18, 22]. 선천성 면역시스템의 다양한 성분 중 항균 펩타이드가 가장 주요한 역할을 수행한다고 알려져 있고 이와 관련된 다양한 항균 펩타이드가 보고 되었다[7, 24]. 또한 다양한 해양 무척추동물 중 이매패류에 속하는 참담치는 강력한 족사를 이용하여 갯마위 등에 부착성 생활을 하기 때문에 외부환경의 스트레스 또는 병원성 침입자를 피할 수 없으며, 해수에 존재하는 영양성분을 먹고 사는 여과섭식 방법을 이용하는 습성 때문에 다양한 미생물 및 오염물질 등에 노출될 확률이 매우 높다[25]. 따라서 본 연구에서는 이매패류의 부착성 생활과 여과섭식이라는 특이적인 습성에 주목하여 연구생물로 참담치를 선정하였다. 그리고 참담치의 조직별 추출물과 정제물의 항균 활성을 기반으로 항균성 물질을 분리 및 정제하고 항균 펩타이드의 특성을 밝혔다.

재료 및 방법

실험동물

동해안 자연산 참담치는 부산 자갈치 공동어시장에서 살아 있는 상태로 구입하였다. 체액(plasma)은 멸균된 주사기를 이용하여 추출하였으며, 모든 샘플들은 항균 펩타이드를 추출하기 전까지 -80℃에서 급속 냉각하여 보관하였다.

시약 및 재료

실험에 사용된 배지는 모두 Difco사(Difco, MI, USA)에서 구입하여 지표균의 배양 및 항균 활성 측정을 위해 사용하였고, ultrasensitive radial diffusion assay (URDA)를 위한 low melting agarose는 Bio-Rad사(Bio-Rad, CA, USA)의 제품을 사용하였다. 항균 펩타이드 추출과 정제과정의 high-performance liquid chromatography (HPLC) 분석을 위한 acetic acid, trifluoroacetic acid (TFA), water 그리고 acetonitrile (ACN)은 모두 Berdic&Jackson사(B&D, MI, USA) 제품을 사용하였다.

사용 균주 및 배양 조건

그람 양성균, 그람 음성균 및 진균류 지표 균주들은 생물자원센터(KCTC)와 한국중균협회(KCCM)에서 분양 받아 항균 활성 측정 및 검증에 사용하였다(Table 1). 항생제 내성 균주들에 대한 항균 활성 측정을 위한 균주들은 항생제내성균주은행(CCARM)에서 분양 받아 사용하였다(Table 2). 그리고 사용된 균주들은 각각 최적 온도와 배지에서 배양하였다.

항균 펩타이드 추출

멸균된 주사기를 이용하여 참담치 폐각근에서 적출한 체액(plasma)은 응고를 막기 위해 1% acetic acid와 1:1비율(v/v)로 섞은 후 4℃에서 15분간 1,870 rpm으로 원심분리하여 침전된

Table 1. Bacteria strains used in this study

Strains	Reference	Media	Temperature
Gram positive			
<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 1012	NB	30℃
<i>Bacillus subtilis</i>	KCTC 1021	TSB	37℃
<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM 11335	TSB	37℃
<i>Streptococcus mutans</i>	KCTC 3065	BHI	37℃
<i>Streptococcus parauberis</i>	KCTC 3651	TSB + 0.3% YE	37℃
Gram negative			
<i>Escherichia coli</i>	KCCM 40271	NB	37℃
<i>Enterobacter cloacae</i>	KCTC 2361	NB	37℃
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KCTC 12385	NB	37℃
<i>Proteus mirabilis</i>	KCTC 2510	NB	37℃
<i>Providencia stuartii</i>	KCTC 2569	NB	37℃
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KCTC 1636	NB	37℃
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	KCCM 41664	BHI + 1% NaCl	37℃
Fungus			
<i>Candida albicans</i>	KCCM 11282	YM	25℃

Table 2. Antibiotics resistant bacteria strains used in this study

Strains	Reference	Media	Temperature
Gram positive			
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCARM 0203	BHI	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCARM 0204	BHI	37°C
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCARM 3795	BHI	37°C
<i>Staphylococcus pyogenes</i>	CCARM 0206	TSB	37°C
Gram negative			
<i>Enterobacter cloacae</i>	CCARM 0252	BHI	37°C
<i>Escherichia coli</i>	CCARM 0238	BHI	37°C
<i>Escherichia coli</i>	CCARM 1A814	BHI	37°C
<i>Klebsiella aerogenes</i>	CCARM 0249	BHI	37°C
<i>Klebsiella oxytoca</i>	CCARM 0248	BHI	37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCARM 0225	BHI	37°C
<i>Salmonella typhimurium</i>	CCARM 0240	BHI	37°C

혈구를 분리하였다. 분리한 혈구는 1% acetic acid와 1:1비율 (v/v)로 혼합한 뒤 100°C에서 5분 동안 가열하여 펩타이드 성분들을 추출하였다. 추출물은 충분히 냉각시킨 후 4°C에서 15분간 3,000 rpm으로 원심분리하여 얻어진 상층액을 확보하였으며, 다음 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

항균 활성 측정

참담치 추출물의 항균 활성 측정 방법은 URDA법을 사용하여 Table 1, 2의 균주들 및 항생제 내성 균주들에 대한 생장 저해 정도를 관찰하였다[12]. 각 지표균주들은 최적 생육 배지를 이용하여 적정 배양 온도에서 18시간 동안 배양한 뒤 OD₆₀₀=0.1에 해당하는 박테리아 ~10⁸ CFU/ml 또는 효모 ~10⁶ CFU/ml가 되도록 동일 배지로 희석하였다. 0.01%의 각각의 배양한 배지, 1% agarose 및 10 mM phosphate buffer (pH 6.5)가 포함된 under-lay gel 9.5 ml에 희석된 균주 배양액 0.5 ml를 넣고 혼합 후 plate에 분주하여 굳혔다. 굳은 under-lay gel에 직경 2.2 mm구멍을 뚫은 후, 0.01% acetic acid 10 µl에 녹인 추출물 또는 정제 단계의 물질을 각각 주입하였다. 그리고 2%의 배양 배지, 1% agarose 및 10 mM의 phosphate buffer (pH 6.5)가 포함된 over-lay gel 10 ml을 under-lay gel 위에 붓고 굳힌 후, 지표균들의 최적 배양 온도에서 18시간 동안 정지 배양하였다. 배양 후 각각의 샘플 주위에 생긴 투명한 크기를 측정하여 항균 활성을 확인하였다.

항균 펩타이드의 분리 및 정제

참담치 혈구 추출물의 펩타이드성 물질들은 다양한 파장에서 분석이 가능한 검출기(diode-array detector)가 장착된 HPLC (DIONEX UltiMate 3000 HPLC system, Thermo Fisher Scientific, CA, USA)를 이용하여 총 2단계의 과정을 거쳐 순수하게 정제하였으며, 정제에 사용한 흡수파장은 220 nm, 254 nm 그리고 280 nm였다. 첫 번째 정제 단계로 동결건조 후 1/10 부피의 0.01% acetic acid로 녹인 10배 농축된 참담치

혈구 유래 추출물을 CapCell-Pak C₁₈ 역상 column (5 µm, 120 Å, 4.6×250 mm, Shiseido, Tokyo, Japan)에 주입하여 다음과 같은 조건으로 분리하였다. A 용매는 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)를 첨가한 H₂O (pH 2.2)이며, B 용매는 0.1% TFA를 첨가한 100% CH₃CN (pH 2.2)을 사용하였다. 그리고 B 용매 농도 5%에서 65%까지 60분 동안 1.0 ml/min 유속으로 증가시키며 분리하였다. 정제단계에서 얻어진 각 분획들은 *Bacillus subtilis*에 대해 URDA법을 이용하여 항균 활성을 확인하였다. 두 번째 정제 단계에서는 항균 활성을 보이는 모든 분획들에 대해서 첫 번째 정제 단계와 동일한 column과 용매를 사용하여 분리과정을 수행하였고 분리된 분획의 분리도와 항균 활성을 평가하였다. 1차 정제과정을 4회 반복하여 확보한 동일한 분획을 모아서 2차 정제를 위한 시료로 사용하였으며, 정제과정은 B 용매 농도 10%에서 30%까지 30분 동안 1.0 ml/min 유속으로 증가시키며 분리하여 단일 peak를 확보하였다.

정제물질의 trypsin 처리에 의한 단백질성 확인

항균 활성을 보이는 후보 항균 물질이 펩타이드 결합으로 이루어진 항균 펩타이드이며 이러한 펩타이드의 단백질성을 확인하기 위하여 단백질 분해 효소인 trypsin 처리 전, 후 항균 활성 변화 정도를 측정하였다. 순수하게 정제된 물질은 동결건조 후 0.01% acetic acid 10 µl에 녹인 후 2 µl의 trypsin (1 mg/ml)을 첨가하였다. 37°C에서 3시간 동안 배양시켜 효소와 반응시킨 뒤, URDA 법으로 *B. subtilis*에 대한 항균 활성의 변화를 분석하였다.

정제물질의 분자량 측정 및 일차구조 분석

최종 정제된 물질의 분자량은 MALDI-TOF/MS spectrometer (Ultraflex III matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrophotometer, BrukerDaltonik GmbH, Bremen, Germany)를 사용하여 측정하였다. 정제 물질을 0.1% TFA/50% CH₃CN (1:1, v/v)과 혼합하여 MALDI

plate에 도입한 후 분자량을 측정하였다. 정제 물질의 N-말단 아미노산 서열을 분석하기 위하여 pulse liquid automatic sequencer (model 473A; Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)를 사용하였다.

Total RNA 추출

참담치 조직의 total RNA는 TRIzol 시약(Life Technologies, CA, USA)을 이용하여 추출하였다. TRIzol 1 ml로 조직을 완전히 용해시킨 뒤 100 μ l의 chloroform을 첨가하여 상온에서 3분간 반응하였다. 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액과 분리한 뒤 isopropyl alcohol 250 μ l을 처리했다. 그리고 상온에서 10분 동안 반응 후 상층액을 제거하고 diethyl pyrocarbonate (DEPC)가 포함된 75% 에탄올을 처리하여 total RNA만을 순수 정제하였다. 4°C에서 13,000 rpm으로 10분간 원심분리 후 정제된 RNA는 실온에서 10분간 건조하였다. 이를 RNase-free water로 녹인 후 분광광도계(GE NanoVeu Plus UV-VIS Spectrophotometer, GE Lifesciences, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 RNA 농도 및 순도를 측정하였으며, 측정 후 RNA 샘플은 사용직전까지 -80°C에서 보관하였다.

Complementary DNA 합성

Transcriptor First-Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 first strand cDNA를 합성하였다. 추출한 RNA 1 μ g에 oligo dT primer를 넣고 최종부피가 13 μ l이 되도록 DEPC를 첨가한 뒤 65°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에서 2분간 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 반응 후 얼음에서 반응시켜 cDNA 합성을 종료시켰다.

RACE 분석을 위한 cDNA 합성

Edman 분석으로 확보한 N-말단 서열정보를 NCBI의 Basic Local Alignment Search Tool search (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)를 실시하였고, 그 중 유사도가 가장 높은 후보들을 선별하였다. 선별된 항균 펩타이드 염기서열을 바탕으로 degenerated primer와 gene-specific primer pair를 제작하였다. 항균 펩타이드의 open reading frame (ORF), 5'쪽 untranslated region (5'-UTR)과 3'쪽 UTR (3'-UTR)을 증폭한 뒤 염기서열을 분석하여 유전자 정보를 확인 하였다. TRIzol로 추출한 RNA를 주형으로 cDNA 합성을 위해 SMARTer® RACE 5'/3' Kit (Clontech, CA, USA)을 사용하였다. 5'-RACE-Ready cDNA 합성을 위하여 1 μ l의 RNA와 1 μ l의 5'-CDS primer A를 첨가하여 최종적으로 11 μ l가 되게 하였으며, 3'-RACE-Ready cDNA 합성을 위하여 1 μ l의 RNA와 1 μ l의 3'-CDS

primer A를 첨가하여 12 μ l로 만들었다. 혼합액은 72°C에서 3분, 42°C에서 2분간 반응 후 SMARTer II A Oligonucleotide 1 μ l를 5'-RACE cDNA 합성 혼합액에 첨가하였다. 5X First-Strand buffer 4 μ l, Dithiothreitol (DTT, 100mM) 0.5 μ l, dNTPs (20 mM) 1 μ l를 혼합하여 buffer mix를 제조 후 5'-와 3'-RACE-Ready cDNA synthesis 혼합액에 첨가한다. 그리고 RNase inhibitor (40 U/ μ l) 0.5 μ l, SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U) 2 μ l을 각 튜브에 첨가하여 42°C에서 90분, 70°C에서 10분간 반응한다. 5'-과 3'- RACE를 위한 cDNA 샘플은 -20°C에 보관하였다.

Rapid Amplification of cDNA ends (3'RACE and 5'RACE-PCR)

Gene-specific primer들로 Sperm-GSP-3RACE (GAT TAC GCC AAG CTT CCA AGC CCA ACT CGT CGT TCA TCC AAG TCC AGG)와 Sperm-GSP-5RACE (GAT TAC GCC AAG CTT GCT TTT GGA CCT GGA CTT GGA TGA ACG ACG AGT), 그리고 degenerated primer들로 Sperm-DGT-3RACE (GAT TAC GCC AAG CTT CCI WSY CCI ACI MGI MGI WSY ACI WSY MGI)와 Sperm-DGT-5RACE (GAT TAC GCC AAG CTT ICK RSW YTT RSW ICK RSW IGT RSW ICK ICK)를 제작하였다. 2쌍의 primer들을 사용하여 2X SeqAmp Buffer 12.5 μ l, SeqAmp DNA Polymerase 0.5 μ l, 10X UPM 2.5 μ l, 5' 와 3' primer (10 μ M) 0.5 μ l를 섞어 최종 부피 25 μ l가 되게 한다. 균일하게 혼합 후 95°C에서 5분 동안 변성하였고 95°C에서 30초, 53-65°C에서 온도 구배를 주어 45초, 72°C에서 45초 동안 신장 반응을 35 cycle 동안 수행하였다. 그리고 72°C에서 5분간 최종 신장을 하였다. PCR 후 생성된 산물들은 1.5% agarose gel에 전기영동하여 증폭산물들의 크기를 확인하였다.

cDNA cloning

PCR 산물 정제 후 pGEM® T-easy vector systems (promega, WI, USA)을 사용하여 ligation하였고 이를 *Escherichia coli* XL-1 blue에 형질전환하였다. DNA-spin Plasmid Purification Kit (Intron, Gyeonggi-do, Korea)를 사용하여 plasmid DNA를 추출하였고 3130XL Genetic analyzer (Applied Biosystems, CA, USA)으로 염기서열을 분석하였다. Sequencing 과정을 통해 확보한 염기서열과 아미노산 서열을 기반으로 NCBI에서 BLAST를 통해 GenBank databas내에서 알려진 유사한 서열들을 찾을 수 있었고 BioEdit version 7.2.5를 사용하여 이러한 서열들과 비교 및 분석하였다.

항균 펩타이드의 합성 및 항균 활성 분석

cDNA cloning 과정을 통해 확보한 참담치 항균 펩타이드의 nucleotide 염기서열과 NCBI의 BLAST search에서 확보한

아미노산 서열을 비교 및 분석하여 항균 펩타이드의 정확한 일차구조를 밝혔으며, 이를 바탕으로 화학적으로 고상 합성을 하였다. 합성된 항균 펩타이드 분말은 1 mg/ml의 농도가 되도록 0.01% acetic acid에 충분히 녹인 뒤 항균 활성 및 특성을 검증하였다.

NaCl 및 가열 처리에 의한 항균 펩타이드 항균 활성 변화

B. subtilis, *E. coli*, *Candida albicans* 등 Table 1, 2에 열거한 지표균주에 대하여 NaCl 첨가 및 가열 처리에 의한 항균 펩타이드의 항균 활성 변화를 확인하기 위해 URDA 실험을 실시하였다. NaCl 농도에 따른 안정성 확인을 위해 0.01% acetic acid로 녹인 샘플에 NaCl 최종 농도가 0.5%, 1%, 2%가 되도록 첨가하였다. 그리고 0.01% acetic acid를 추가하여 최종 부피를 10 μ l로 맞추어 URDA법을 통해 활성을 확인하였다. 열에 대한 항균 활성 안정성 확인을 위해 0.01% acetic acid에 녹인 샘플을 100°C에서 10분 동안 가열한 뒤 항균 활성 변화를 측정하였다.

Hemolysis

항균 펩타이드의 용혈 활성 유무를 확인하기 위해 넙치 적혈구에 대한 용혈활성의 유무 및 용혈 정도를 측정하였다. 넙치의 혈액에 동량의 150 mM NaCl이 포함된 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4, PBS)를 넣고 혼합한 후 4°C에서 5,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 동일한 세척과정을 3회 반복하여 얻어진 적혈구를 3% 혼합용액이 되도록 PBS를 첨가한 후 사용하였다. 3% 적혈구 혼합물 90 μ l와 농도별의 항균 펩타이드 10 μ l를 섞은 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액을 4°C에서 5,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 상층액 70 μ l를 96-well plate로 옮겼다. 용혈 현상으로 인한 적혈구 유출 정도를 확인하기 위해서 분광광도계 (WALLAC VICTOR³ 1420 MULTILABEL COUNTER, Perkin Elmer, MA, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조구로 1% triton X-100과 piscidin 1 (1 mg/ml)을 사용하였으며, 음성 대조구로는 0.01% acetic acid와 PBS를 사용하였다. 용혈 활성의 정도는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\% \text{ 용혈활성} = \frac{[(\text{Abs}_{405\text{nm}} \text{ 펩타이드 흡광도} - \text{Abs}_{405\text{nm}} \text{ 버퍼 흡광도}) / (\text{Abs}_{405\text{nm}} \text{ 1\% Triton X-100 흡광도} - \text{Abs}_{405\text{nm}} \text{ 버퍼 흡광도})] \times 100}$$

세포 독성 측정

미국 세포주 및 균주은행(American Type Culture Collection, ATCC)에서 분양 받은 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC, ATCC PCS-100-010) 세포를 Endothelial Cell Growth Kit를 첨가한 vascular cell basal medium에서 배양하였다. 이를 96 well plate에 4,000 cell /well이 되도록

분주하고 24시간 배양 후 배지를 제거한다. 합성한 항균 펩타이드를 최종 농도가 50 μ g/ml 되도록 배지로 희석하여 100 μ l를 well에 첨가하였고, melittin을 양성 대조구로 사용하였다. 24시간 배양 후 CellTiter 96 AQ one solution cell proliferation assay (Promega, WI, USA) 시약을 20 μ l씩 처리 후 4시간 반응하여 분광광도계로 490 nm에서 흡광도를 측정하여 HUVEC 세포의 생존율을 측정하였다.

조직별 발현 분석

각 조직 내 유전자 발현을 비교·분석하기 위하여 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)을 실시하였다. 각 조직별 100 ng의 cDNA를 주형으로 ABI 7500 Real-time PCR (Applied Biosystems, CA, USA)을 사용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 증폭한 유전자의 Ct (cycle threshold) 값의 측정·분석을 통해 18S rRNA 발현과 정량 및 발현 정도를 비교하여 표준화하였다.

결과 및 고찰

참담치 혈구 추출물의 항균 활성 확인

참담치(*M. coruscus*) 체액으로부터 혈구성분을 분리하였고, 분리한 혈구들을 초산이 첨가된 열수 추출법으로 혈구성분에 존재하는 항균 펩타이드 후보물질들을 확보하였다. 확보한 추출물의 항균 활성을 그람 양성균 3종 9 strains, 그람 음성균 8종 14 strains, 그리고 진균류 1종을 지표균으로 사용하여 분석한 결과, 그람 양성균, 그람 음성균, 그리고 진균류인 *C. albicans* 등에 넓은 항균 활성을 나타내었다(Table 3). 혈구 추출물은 그람 양성 균주인 *B. subtilis*와 *Streptococcus parauberis*에 대하여 강한 활성을 나타내었고, 그람 음성 균주는 *Enterobacter cloacae*와 *Vibrio parahaemolyticus*에 높은 항균 활성을 나타내었다. 진균류 *C. albicans*와 항생제 내성균주들에 대해서는 낮은 생육저해 활성을 나타내었다(Table 3). 그 중 대표적인 지표균인 *B. subtilis*에 높은 항균 활성을 나타내어 *B. subtilis*를 정제과정에서 항균 활성 확인을 위한 URDA 실험의 지표균주로 사용하였다.

담치류의 항균 펩타이드는 defensin류, mytilin류, myticin류 및 mytimycin이 보고되었으며 주로 지중해담치(*Mytilus galloprovincialis*)와 진주담치(*Mytilus edulis*)에서 많은 연구가 이루어졌다[14-17]. 그러나 이러한 항균 펩타이드의 항균 활성 스펙트럼은 종류에 따라서 특정 그람 양성균, 그람 음성균 또는 진균류 중에게만 활성이 한정되어있다고 보고되어있으며, 본 연구에서 추출한 혈구 유래 추출물처럼 그람 음성균, 그람 양성균 그리고 진균류 모두에 항균 활성이 다양하게 있다는 결과는 많지 않았다[14-17]. Defensin류와 myticin류의 경우에는 그람 양성균에 강한 항균 활성을 가지고 그람 음성균들과

Table 3. Antimicrobial spectrum of the acidified hemocyte extract

Strains	Activity	Strains	Activity	Strains	Activity
Gram positive		Gram negative		Fugus	
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1012	++	<i>Escherichia coli</i> CCARM 0238 *	-	<i>Candida albicans</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	+++	<i>Escherichia coli</i> CCARM 1A814 *	-	KCCM 11282	
<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11335	-	<i>Escherichia coli</i> KCCM 40271	++		
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 0203 *	-	<i>Enterobacter cloacae</i> CCARM 0252 *	-		
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 0204 *	+++	<i>Enterobacter cloacae</i> KCTC 2361	+++		
<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3795 *	-	<i>Klebsiella aerogenes</i> CCARM 0249 *	-		
<i>Staphylococcus pyogenes</i> CCARM 0206 *	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> CCARM 0248 *	-		
<i>Streptococcus mutans</i> KCTC 3065	-	<i>Klebsiella pneumonia</i> KCTC 12385	++		
<i>Streptococcus parauberis</i> KCTC 3651	+++	<i>Proteus mirabilis</i> KCTC 2510	-		
		<i>Providencia stuartii</i> KCTC 2569	++		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0225 *	-		
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 1636	++		
		<i>Salmonella typhimurium</i> CCARM 0240 *	-		
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCM 41664	+++		

Antimicrobial activity was based on the diameter of clear zone (mm) follow this skim: +++ ≥ 7 mm, ++ 4-7 mm, + ≤ 4 mm. Asterisk (*) means antimicrobial activity against antibiotic resistant bacteria.

진균류에는 항균 활성이 약하며, mytimcin 항균 펩타이드는 진균류에만 강한 항균 활성이 있다고 알려져 있다[16, 17]. 그러나 mytilin류의 경우 매우 다양한 isoform이 존재하는데 이러한 isoform에 따라서 항균 스펙트럼이 다양하다고 보고되었다[16, 17]. 그 중 mytilin B, C 그리고 D형은 그람 양성균과 그람 음성균에, G1형은 그람 양성균에만 항균 활성이 있다고 보고되어 있다[17]. 따라서 본 연구에서 추출한 참담치의 혈구 유래 추출 물질은 순수 단일 펩타이드가 아닌 다양한 성분들이 혼합되어 있기 때문에 그람 양성균과 그람 음성균 그리고 진균류에 항균 활성을 보이는 넓은 항균 스펙트럼을 가진다고 판단할 수 있었으며, 역상 HPLC를 이용하여 순수한 항균 펩타이드를 분리하고자 하였다. 또한 *B. cereus*, *B. subtilis* 그리고 *E. coli*와 같은 대표적인 지표균주에 항균 활성을 보이고, 병원성 균주인 *S. parauberis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *V. parahaemolyticus*에 항균 활성이 있어 다양한 치료 및 예방제로 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

항균 활성 펩타이드의 정제

참담치 혈구 추출물을 원심분리 한 뒤 상층액을 0.45 μm filter (Millipore, Darmstadt, Germany)에 통과시켜 고형물을 제거하고 HPLC에 주입하여 역상 column을 통하여 다양한 peak들을 확보 및 정제하였다. 첫 번째 정제단계에서 CapCell-Pak C₁₈ column을 이용하여 30개 이상의 분획을 확보하였으며, 분리한 각각의 분획물들은 URDA법으로 *B. subtilis*에 대하여 항균 활성을 확인하였다. 그 결과 일부 분획들에서 항균 활성을 나타내었다. 다양한 분획 중 220 nm 흡수 파장에서 16분에 용출된 분획이 254 nm와 280 nm의 파장에서는 검출 정도가 매우 낮았으며 URDA 상의 clear zone 직경이 약 7.7

mm로 강한 항균 활성을 가진다는 것을 알 수 있었다(Fig. 1A). 이 분획을 한번 더 정제과정을 진행하여 최종적으로 3개의 분획을 확보할 수 있었으며, 그 중 13.8분에 용출된 단일 peak에서만 항균 활성이 있음을 확인하였다(Fig. 1B). 최종 정제된 항균 펩타이드의 단백질성을 확인하기 위해 trypsin 처리 전과 후의 항균 활성을 비교하였다. 실험에 사용된 trypsin은 대표적인 단백질 분해효소로 알려진 항균 펩타이드들이 많이 가지는 lysine과 arginine 아미노산 잔기 다음의 펩타이드 결합을 분해한다. URDA 방법을 통하여 trypsin 처리 후의 항균 활성이 완전히 소실되었음을 알 수 있었다(Fig. 1B). 이러한 결과를 통해 본 연구에서 분리한 후보물질은 단백질성 항균 물질임을 알 수 있었고, 일차구조인 아미노산 서열 중 lysine 또는 arginine 잔기를 하나 이상 포함하는 항균 펩타이드임을 확신하였다[5, 11, 23, 27, 29]. 최종 정제된 항균 펩타이드 후보물질은 일차구조인 아미노산 서열 분석을 위해 동결건조하였고, MALDI-TOF/MS 분자량 측정과 edman 분해법을 통한 N-말단 아미노산 서열 분석을 수행하였다(Fig. 1C).

정제된 항균 펩타이드의 분자량 및 N-말단 아미노산 서열 분석

최종 정제된 참담치 혈구 유래 항균 펩타이드의 분자량과 정제 후 분리도를 확인하기 위하여 MALDI-TOF/MS 분석을 실시하였고 그 결과 분자량 3,330.549 Da의 단일물질임을 확인하였다(Fig. 1C). 그리고 분리한 순수 분획물의 N-말단의 일차구조를 밝혀내기 위하여 edman 분해법을 통한 아미노산 서열분석을 실시한 결과 14개의 아미노산 서열을 확인하였고 밝혀진 아미노산 서열은 P-S-P-T-R-R-S-T-S-R-S-K-S-R임을 알 수 있었다(Fig. 1C).

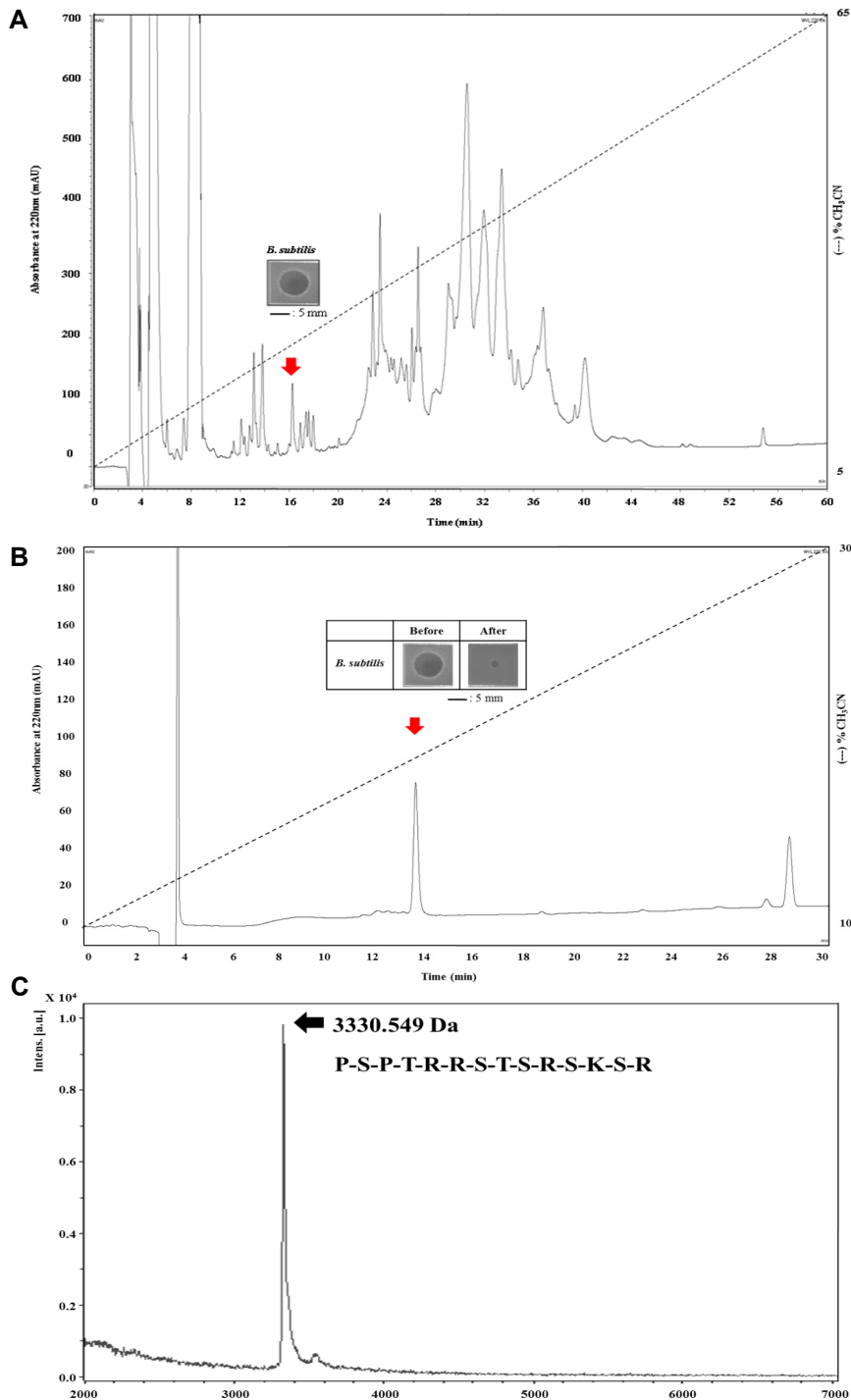


Fig. 1. Purification and antimicrobial activity of purified peptide and mass spectrometry analysis with N-terminal sequences determined by edman degradation. (A) Antimicrobial activity of the extract against *B. subtilis*. The acidic extract was fractionated by the CapCell-Pak C₁₈ reversed-phase column. 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 *B. subtilis* (inset). (B) Antimicrobial activity of the purified peak (before) and trypsin treated purified peak (after) against *B. subtilis*. Active fraction was applied to the CapCell-Pak C₁₈ reversed-phase column. Elution was performed with a linear gradient of 10% → 30% CH₃CN (pH2.2) in 0.1% TFA for 30 min at a flow rate of 1.0 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 *B. subtilis*. Scale bar indicates 5 mm. (C) Mass spectrometry analysis of single mass with 3330.549 Da and N-terminal sequences (14 amino acids) determined by edman degradation.

항균 펩타이드의 염기서열 분석 및 특성

Edman 분해법으로 밝혀진 14개의 N-말단 서열의 NCBI GenBank database blast 검색결과 캘리포니아 담치의 sperm-specific protein Phi-1과 93% (14개 잔기 중 13개 일치), protamine-like PL-III protein과 87% (14개 잔기 중 12개 일치) 그리고 진주담치의 sperm-specific protein Phi-1과 87%(14개 잔기 중 12개 일치)의 유사도를 가지는 것을 알 수 있었다(Fig. 2B). 특이하게도 본 연구에서 항균 펩타이드가 분리된 참담치 (*M. coruscus*)의 알려진 단백질들 중에서 가장 유사도가 높은 단백질은 mytilin-5 precursor 였으며 35%(14개 잔기 중 5개 일치)의 낮은 유사도를 보였다. 이와 같이 참담치 유래의 항균 펩타이드 및 관련 연구 및 보고가 다른 담치류에 비하여 매우 적으며 본 연구에서 확보한 참담치 유래의 sperm-specific protein의 특성분석은 추후 해양 무척추 동물의 항균 활성 및 특징과 관련하여 중요한 연구 자료가 될 수 있다고 판단된다.

확보한 N-말단 아미노산 서열과 다른 담치류의 sperm-specific protein의 아미노산 서열정보를 기반으로 gene specific primer와 degenerated primer들을 제작하여 ORF와 함께 5'쪽과 3'쪽의 UTR 시퀀스를 확보하고 분석 하였다(Fig. 2). 각각의 primer들을 이용하여 PCR 반응으로 얻어진 산물들을 cloning 한 뒤 염기서열을 분석한 결과 분리한 항균 펩타이드는 101개

의 아미노산을 코딩하는 306 bp의 ORF로 이루어져 있음을 알 수 있었고, 15 bp의 5'UTR 그리고 54 bp의 3'UTR으로 이루어져 있다는 것을 밝혀냈다(Fig. 2A). MALDI-TOF mass spectrometer를 통해 순수하게 분리한 항균 펩타이드의 분자량은 약 3,330 Da이었으며, 이러한 분자량 정보와 밝혀진 아미노산 서열을 바탕으로 분석한 결과 본 연구에서 분리한 참담치 유래 항균 펩타이드는 sperm-specific protein의 methionine (Met, M) 다음 두 번째 아미노산인 proline (Pro, P)부터 31개의 아미노산에 해당한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 2B). 또한 확보한 참담치 항균 펩타이드의 전체 아미노산 서열을 담치류의 유사단백질인 캘리포니아 담치와 진주담치의 sperm-specific protein들과 캘리포니아 담치와 태평양 푸른담치(*M. trossulus*)의 protamine-like PL-III protein들의 아미노산 서열을 비교 및 분석하였다(Fig. 2B). 그 결과 캘리포니아 담치의 sperm-specific protein Phi-1과 93.5%, protamine-like PL-III protein과 76.4%, 태평양 푸른담치의 protamine-like PL-III protein과 84.3% 그리고 진주담치의 sperm-specific protein Phi-1과 79.4%의 유사도를 보였다(Fig. 2B). 따라서 본 연구에서 확보한 참담치 혈구 유래 3.3 kDa의 펩타이드는 참담치 sperm-specific protein Phi-1 (PL-III)에서 유래한 항균 펩타이드라는 것을 확인하였으며 참담치 sperm-specific protein Phi-

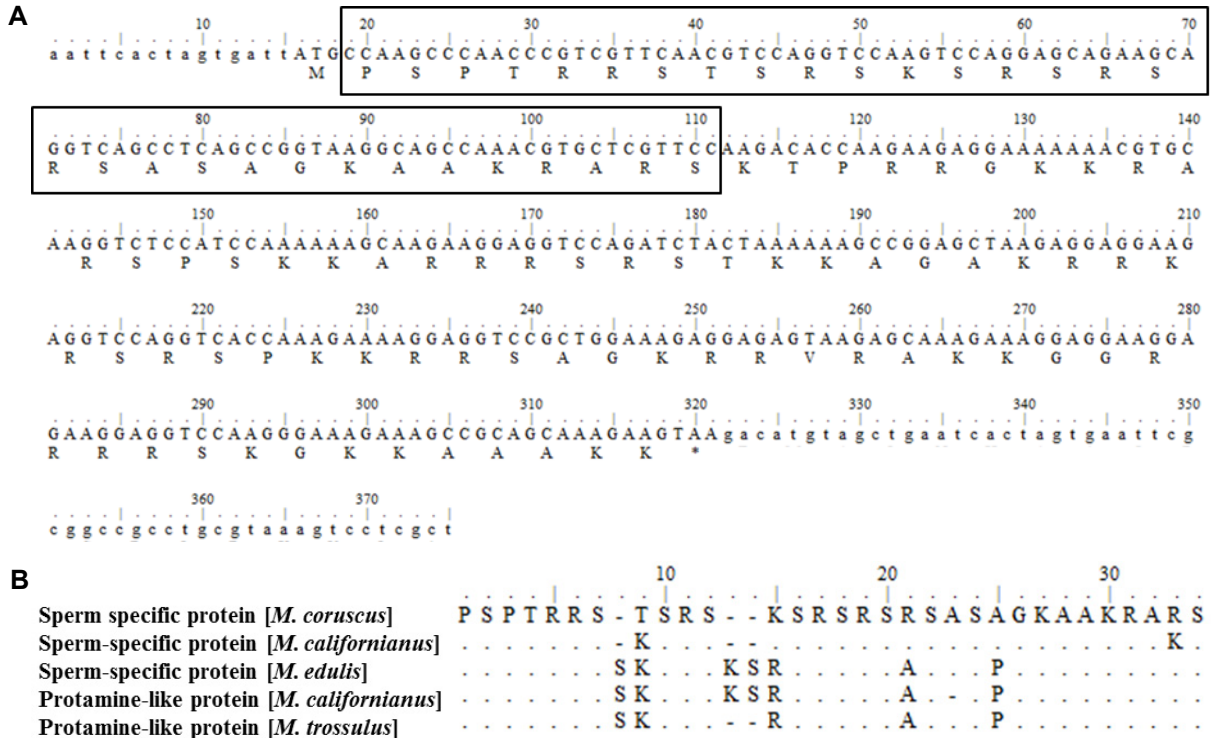


Fig. 2. cDNA and deduced amino acid sequence of sperm-specific protein (McSSP-31) from *M. coruscus*, and multiple sequence alignment of the similar sperm-specific proteins and protamine-like proteins sequences of *Mytilus* species. (A) Identified full nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of sperm-specific protein (McSSP-31) from *M. coruscus*. The sequence of sperm-specific protein (McSSP-31) is in black box. (B) Sequence comparison of the sperm-specific proteins and protamine-like proteins from *M. californianus*, *M. trossulus* and *M. edulis*. Dots indicate conserved same amino acid sequences.

1 (PL-III)의 서열과 항균 활성에 관련된 특성을 최초로 보고하였고 이를 *Mytilus coruscus* sperm-specific protein-31 (McSSP-31)이라고 명명하였다. 현재 다양한 참돔치 McSSP-31 isoform들을 찾고 있으며, 펩타이드의 활성을 높이는 저분자 유도체에 관한 연구를 진행 중에 있기 때문에 추후 참돔치 유래 항균 펩타이드 연구와 이매패류 등 해양 무척추 생물의 선천적 면역시스템과 관련된 다양한 정보를 제공 할 수 있을 것으로 기대된다.

Sperm nuclear basic proteins (SNBPs)는 정자 형성 시에 핵 DNA에 부착하여 구조적 안정과 package에 관여하며 histone (H) type, protamine (P) type, protamine-like (PL) type 으로 나누어진다[6, 10, 13]. SNBPs의 대표적인 단백질인 sperm-specific protein에 속하는 PL-II, PL-III(Ø1), PL-IV(Ø3)는 protamine과 histone의 중간적인 구조와 기능을 가진다. PL type은 다른 이매패류 종들에 비해 상대적으로 histone의 비율이 적고, 염기성 아미노산인 arginine이 다량 함유되어 있는 특징을 지닌다. 그리고 담치류에서 somatic histone은 DNA와 반응하여 SNBPs로 대체되며 이는 정자성숙과 관련이 있다고 보고되었다[9, 20, 21]. 이러한 특징에 관한 연구는 해양 무척추동물에서 많이 밝혀졌지만 유전자에 대한 정보는 거의 없으며 매우 가까운 종끼리라도 유전자 서열 변이가 매우 크다고 밝혀졌다[9]. 따라서 본 연구결과 및 추후 연구를 통하여 참돔치의 생식과 발생에 관련된 단백질의 특성을 밝힐 수 있을 것으로 판단되며, 발생과정에 관여하는 단백질류의 항균 활성 및 특성에 대한 연구결과는 참돔치, 담치류 및 이매패류의 계통발생학적, 진화적 그리고 면역학적 측면에서 다양한 자료를 제공 할 수 있을 것으로 사료된다.

McSSP-31의 항균 활성 및 안정성

참돔치 cDNA cloning과 RACE 분석을 통하여 확보한 염기 서열을 기반으로 31개 아미노산으로 이루어진 McSSP-31을 고상 합성 하여 항균 활성 확인 및 특성을 평가하였다. 합성한 항균 펩타이드는 그람 양성 균주 *B. subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*에서 활성을 보였으며, 그람 음성 균주 *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*에서 활성을 나타내었다. 그리고 진균류인 *C. albicans*에서는 약한 항균 활성을 나타내었다(Fig. 3A). 합성한 항균 펩타이드는 그람 양성 균주보다 그람 음성 균주에서 더 높은 항균 활성을 보였으며 그람 음성 균주 중에서는 *E. coli*와 *P. aeruginosa*에서 가장 강하게 활성을 나타냈다. McSSP-31도 다른 참돔치류에서 분리된 항균 펩타이드인 defensin류와 myticin류처럼 넓은 범위의 균주들에 대해 항균 스펙트럼을 보이는 것이 아니라 그람 음성 균주에는 활성이 높고 그람 양성 균주와 진균류에는 활성이 낮은 비슷한 경향의 항균 활성이 있음을 확인하였다(Fig. 3A).

분리·합성한 McSSP-31의 열과 염분에 의한 안정성은

URDA 방법을 사용하여 항균 활성 변화의 유무를 통해 측정하였다(Fig. 3A). 100℃에서 10분간 가열하여 고온에 의한 McSSP-31의 활성 변화를 측정하였을 때 *C. albicans* 이외의 균주에서는 항균 활성의 변화를 관찰 할 수 없었으며, 이에 따라 열 안정성이 매우 뛰어난 것을 알 수 있었다(Fig. 3A). 또한 0.5~2%의 NaCl을 첨가하여 염분에 의한 항균 활성 변화를 평가하였다. 그러나 NaCl 첨가를 통한 안정성을 평가하였을 때 McSSP-31은 그람 음성 균주에만 항균 활성을 유지하였으며, 그람 양성 균주에는 NaCl 농도가 높아질수록 항균 활성이 감소하였다(Fig. 3A). 그리고 진균류인 *C. albicans*에 대해서는 0.5%의 NaCl 첨가로 인하여 항균 활성이 사라짐을 확인하였다. 육상 생물에서 분리한 항균 펩타이드의 경우 NaCl에 의하여 항균 활성이 저해 받는다는 보고가 있으나, 해양생물 유래의 항균 펩타이드는 NaCl에 의한 항균 활성의 영향이 없다고 알려져 있다[18]. 그러나 혈구에서 분리한 McSSP-31은 참돔치인 해양생물에서 분리하였음에도 NaCl에 의해 항균 활성이 저해 받는 결과를 관찰 할 수 있었다. 이러한 항균 활성의 변화는 그람 양성균과 진균류에서만 발견되었기 때문에 그람 음성균과는 다른 세포벽과 세포막의 구조적 차이로 인한 작용기작 차이로 인한 결과로 예상 할 수 있었으며, 아미노산 서열, 구조 및 항균 활성 특성을 분석하여 그람 양성균과 진균류 제어를 위한 항균 펩타이드 개발에 중요한 정보를 제공할 것이다. 또한 그람 음성 균주에는 염분에 의한 활성 저해를 받지 않기 때문에 그람 음성균 제어를 위한 첨가제 소재로 개발 및 활용이 가능할 것으로 예측하였다. 합성한 McSSP-31을 8종 11 strain의 항생제 내성 균주들에 대한 항균 활성을 측정하였다(Table 2). 항생제 내성 균주들에 대한 항균 활성은 약하게 나타났지만, 특히 *S. aureus* CCARM 0203, *S. aureus* CCARM 0204 및 *E. coli* CCARM 1A814 3 균주는 항균 펩타이드에 민감하였다(Fig. 3B). 특이하게도 참돔치 혈구의 hemocyte 추출물은 항생제 내성균주인 *S. aureus* CCARM 0203과 *E. coli* CCARM 1A814에 매우 낮은 항균활성을 기록하였는데, 이는 조직 추출물 속에 McSSP-31 펩타이드가 상대적으로 매우 적게 포함되어 있어 이러한 결과를 보인것으로 판단된다. 또한 *S. aureus* CCARM 0204 균주는 혈구 추출물과 합성 펩타이드에 높은 민감도를 확인할 수 있었는데, 이러한 결과는 *S. aureus* CCARM 0204 균주가 hemocyte 조직 추출물 내에 존재하는 McSSP-31 외 다른 종류의 항균 펩타이드에 영향을 받았을 것으로 사료된다.

합성 펩타이드를 100℃에서 가열하여 열 안정성을 분석한 결과 *S. aureus* CCARM 0204는 가열하기 전의 활성보다 가열 후의 활성이 더 커졌으며, 나머지 균주에서는 활성의 변화가 없었고, *S. aureus* CCARM 3795에서는 항균 활성이 사라졌다(Fig. 3). 또한, 합성 펩타이드에 대하여 NaCl 처리 후 항균 활성의 안정성을 분석한 결과 *S. aureus* CCARM 3795 균주를 제외한 나머지 균주에서는 뚜렷한 활성 변화는 일어나지 않았

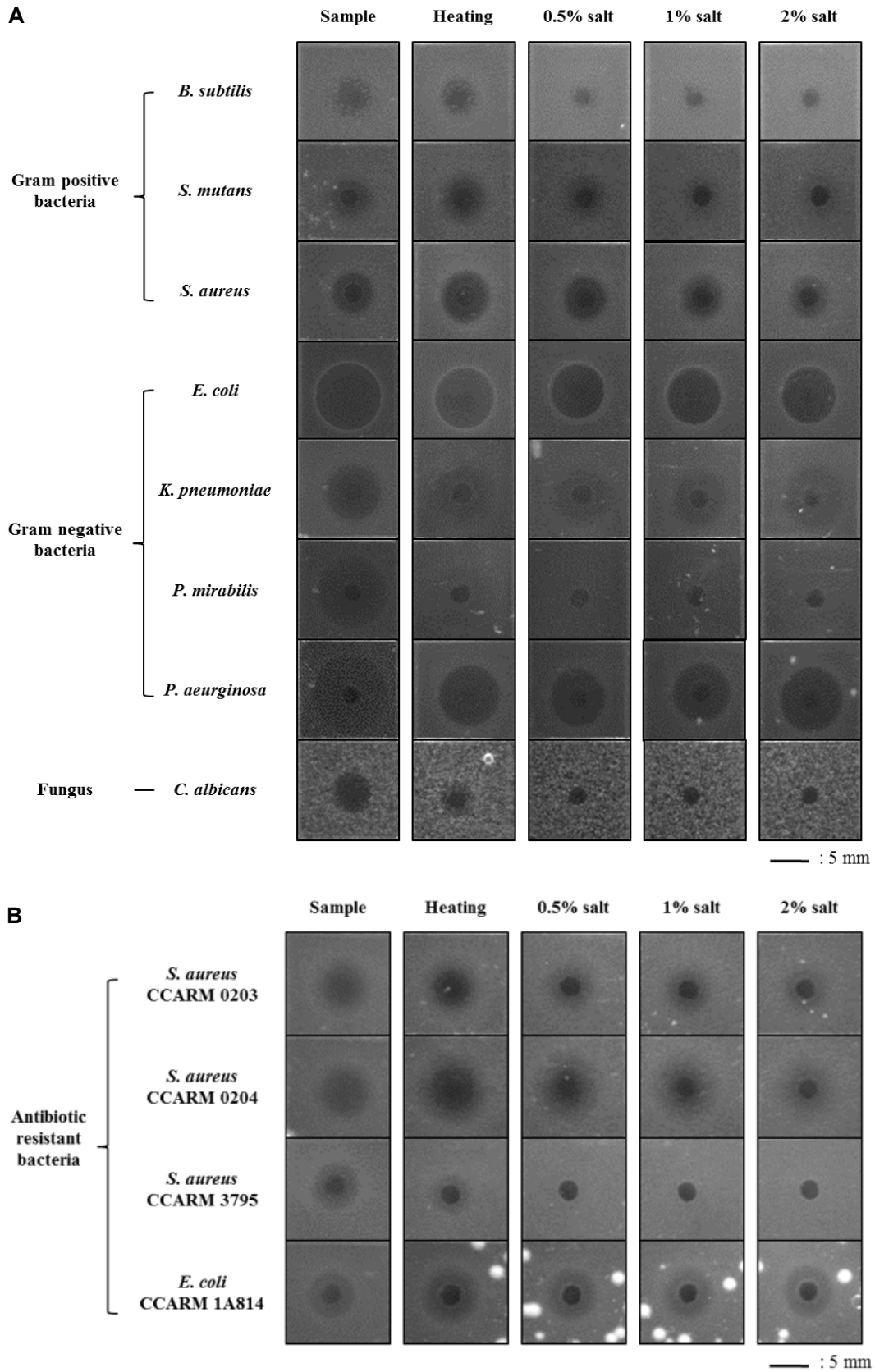


Fig. 3. Antimicrobial activities and stability of synthesized peptide (McSSP-31) under heat and salt condition against Gram positive, Gram negative bacteria, fungus (A) and antibiotic resistant bacteria (B). Scale bar indicates 5 mm.

으나 일반 지표균주들의 연구결과와 비슷하게 활성의 세기가 감소하였다(Fig. 3B). *S. aureus* CCARM 3795 균주에 대한 항균 활성은 가열 및 NaCl 처리 후 활성이 거의 소실되었다(Fig. 3B). 이를 통해 같은 그람 양성균이지만 항생제 내성균주의 strain에 따른 항균 활성에 대한 민감도가 다를 수 있었다. 또한 이러한 정도 및 특징은 항생제 내성 기작과 관련이 있을 것으로 사료되며, 따라서 항생제 내성균주의 제어에 위한 소재 개발을 위한 추후 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

항균 펩타이드의 용혈 활성

참담치 유래의 McSSP-31가 가지고 있는 용혈활성 유무를 확인하기 위해 넙치의 적혈구에 대하여 용혈 활성 정도를 분석하였다. 양성 대조군으로 사용한 어류에서 분리한 대표적인 항균 펩타이드인 piscidin 1과 1% Triton X-100은 100 µg/ml에서 매우 강한 용혈 활성을 보였지만, 합성 펩타이드의 경우 같은 농도에서 두 대조군에 비해 매우 낮은 15.2% 수준의 용혈 활성이 있음을 알 수 있었다(Fig. 4A). 또한, 농도별로 McSSP-31의 용혈 활성을 측정된 결과, 양성 대조군인 piscidin 1은 고농도 100 µg/ml에서 100% 용혈 활성을 나타냈으며 저농도 6.5 µg/ml에서 11.6% 수준으로 용혈활성이 급격히 줄어들었

다. 반면, McSSP-31의 경우 고농도 100 µg/ml에서 용혈 활성 15.2%을 나타냈으며 저농도 6.5 µg/ml에서 약 5.0% 이하의 용혈 활성을 나타내었다(Fig. 4B). 따라서 본 연구에서 분리한 참담치 유래 McSSP-31은 넙치 사료첨가제 및 세균성 질병 치료제 등으로 활용 가능할 것으로 기대할 수 있었다.

MTS assay에 의한 세포 독성 확인

HUVEC 세포에 대한 독성을 확인하기 위하여 50 µg/ml의 농도의 McSSP-31과 26개의 아미노산으로 이루어진 벌독에서 발견된 melittin을 양성 대조군으로 사용하여 세포 독성을 비교·평가 하였다. 각각의 샘플들을 처리하고 24시간 배양 후 MTS 용액을 처리하여 HUVEC 세포의 생존율을 확인하였다. 살아 있는 세포에만 염색되는 MTS의 특성을 이용하여 세포의 생존율을 측정하는 방식으로 세포 독성의 정도를 분석하였는데 McSSP-31을 처리했을 때에는 98.2%의 높은 세포 생존율을 확인하였고 형태학적인 변화도 없었으나 대조군인 melittin을 처리했을 시 11.1%의 낮은 생존율을 관찰 할 수 있었다(Fig. 5A, Fig. 5B). 벌독에서 분리한 melittin은 뛰어난 항균 및 항암 활성이 보고되어 있다[28, 32]. 그러나 이러한 활성과 함께 강한 세포독성이 있어 항균 활성이 필요한 분야에 활용이 제한되고 있으나, 본 실험에 발견한 31개의 아미노산으로 이루어진 McSSP-31은 매우 낮은 세포독성을 지니고 있어 다양한 분야에 항균 활성 소재로 활용이 가능할 것으로 기대한다.

조직별 정량적 발현 분석

참담치에서 분리한 7개의 조직인 외투막, 혈구, 폐각근, 족부근육, 간췌장, 아가미, 입출수공으로부터 mRNA 수준에서의 발현을 qPCR로 분석하였다. McSSP-31의 발현은 폐각근에서 가장 높았으며 다음으로 혈구와 족부 근육 순으로 발현이 높았다. 다음으로 외투막, 간췌장, 아가미, 입출수공 순으로 발현을 보였지만 유의적인 차이는 없었다(Fig. 6). 따라서 본 연구에서 밝혀낸 McSSP-31은 특정 조직에서만 발현되는 조직 특이적인 단백질이 아니라 참담치의 모든 조직에서 높게 발현되는 유전자임을 알 수 있었다. 담치류의 sperm-specific protein 및 protamine 또는 protamine-like 단백질 군은 주요 기능이 정자세포 형성 및 DNA 안정화이지만 생물의 생식세포뿐만 아니라 여러 조직에서 높은 copy수로 분포하는 유전자로 알려져 있어 본 연구와 비슷한 결과를 확인하였다[9].

다양한 해양 무척추 동물은 후천적 면역시스템이 잘 발달되어 있지 않아 선천적 면역시스템에 거의 의존하고 있으며 다양한 조직 중에서 체액 내 혈구세포 및 혈장성분에 다양한 항균관련 물질이 많이 존재한다고 보고되어있다[22]. 그러나 본 연구에서 체액 성분 중 혈구 추출물에서만 항균 활성이 높았으며, 정제과정에서 하나 이상의 다양한 항균 물질이 있음을 알 수 있었다. 그 중 약 3.3 kDa 크기의 항균 펩타이드를 단일 분리할 수 있었으며, N-말단 분석과 cDNA cloning 등의

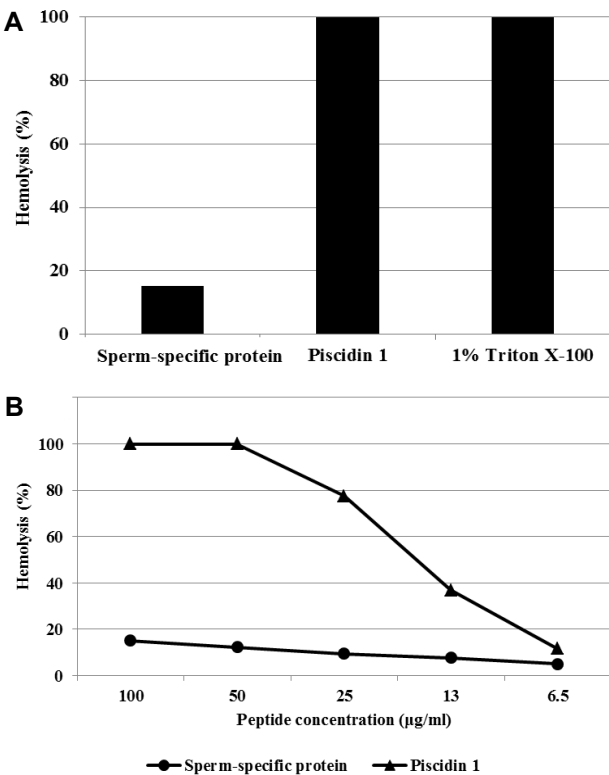


Fig. 4. Hemolytic activities of sperm-specific protein (McSSP-31) and piscidin 1 against erythrocytes of flounder (*Paralichthys olivaceus*). (A) The concentration of each sample was 100 µg/ml. (B) Effect of hemolysis depending on concentrations of samples (100, 50, 25, 13, 6.5 µg/ml).

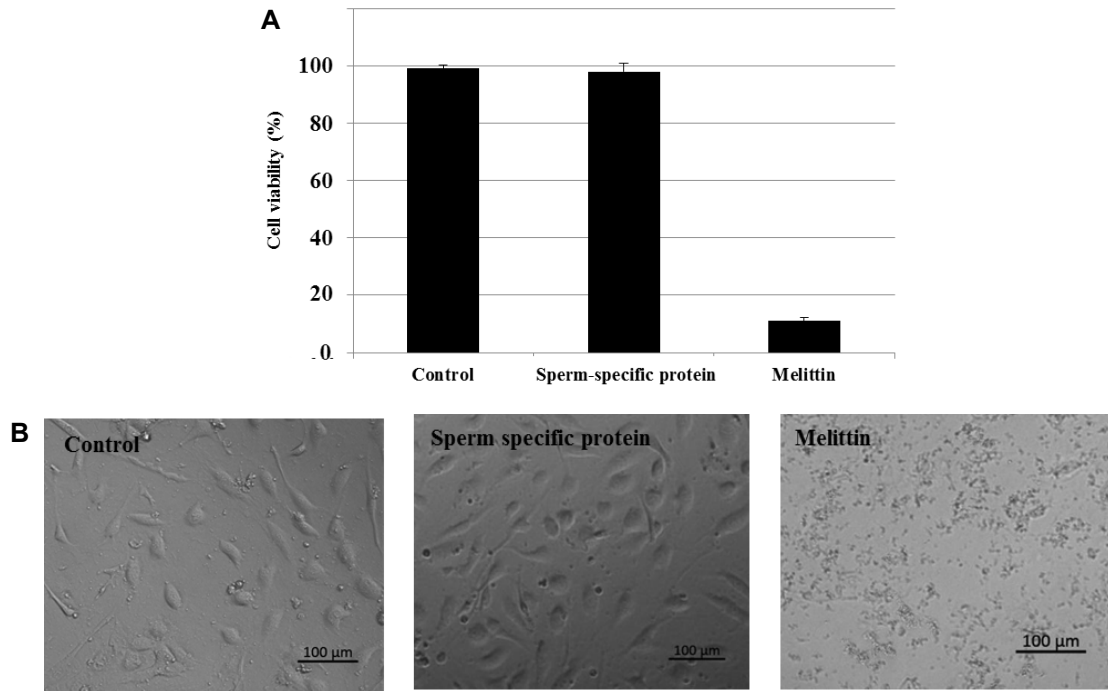


Fig. 5. Cell viability on HUVEC cell by MTS assay. (A) Determination of the cell viability after treatment of 50 μg/ml of synthesized peptide (McSSP-31) and melittin for positive control on HUVEC cell. Error bars represent the mean ± SD of three technical replicates. (B) Differentiation of HUVEC cell morphology after treatment of peptide and melittin for 24hr. Scale bar indicates 100 μm.

연구를 통하여 참담치 sperm-specific protein의 단편임을 알 수 있었다. Sperm-specific protein의 2번째 proline 아미노산부터 32번째 아미노산인 serine (Ser, S)까지 31개의 아미노산으로 이루어진 항균 펩타이드는 넓치 혈구세포에 대한 용혈활

성이 없었으며, 사람의 HUVEC 세포에 대한 독성 또한 없음을 알 수 있었다. Piscidin 1 등 일부 해양 생물에서 분리한 항균 펩타이드의 경우 항균 활성 및 기능성은 뛰어나지만 높은 용혈활성과 세포독성을 가진다는 보고가 있어 산업적 활용에 제한이 있다[30]. 하지만 본 연구에서 분리한 McSSP-31의 경우 그람 양성 균주와 진균류에 항균 활성을 가지고 있었으며, 특히 그람 음성 균주에 뛰어난 항균 활성을 나타냈다. 그리고 용혈활성 및 세포독성이 거의 없기 때문에 수산용 사료 첨가제 및 치료제 등 항생제 대체제로 활용 가능성이 높을 것으로 생각된다. 현재 확보한 아미노산의 서열과 이차구조를 기반으로 아미노산 잔기 치환 및 amidation 등의 변형을 통하여 항균 활성이 증가된 유도체들을 제작하고 있으며 항기생충, 항산화, 항염증 등 다양한 기능성을 평가하고 있다. 또한 재조합 단백질의 발현 및 활성을 평가하여 산업적 활용을 위한 대량 생산 조건을 검토 중에 있다. 따라서 이러한 결과를 분석 및 활용한다면 해양 무척추 동물의 항균 펩타이드와 선천성 면역 시스템에 대한 많은 정보를 제공할 것이며, 나아가 항생제 대체제 개발 등을 통하여 화학제에 저감화에 큰 기여를 할 수 있을 것이다.

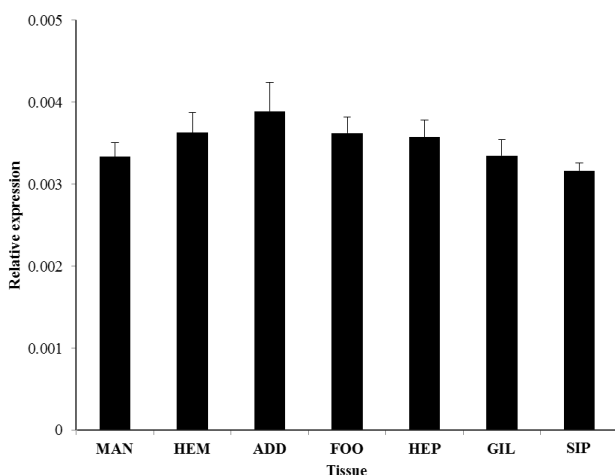


Fig. 6. Quantitative analysis of sperm-specific protein (McSSP- 31) expression level in the various tissues. MAN: mantle, HEM; hemocyte, ADD; adductor muscle, FOO; foot, HEP; hepatopancreas, GIL; gill, SIP; siphone. Error bars represent the mean ± SD of three technical replicates.

감사의 글

이 논문은 2017년도 국립수산물학원 수산시험연구사업 수

산생명자원유래 항미생물 천연소재 개발(R2017022)의 지원으로 수행된 연구입니다.

References

- Ausió, J. 1999. Histone H1 and evolution of sperm nuclear basic proteins. *J. Biol. Chem.* **274**, 31115-31118.
- Balhorn, R. 2007. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* **8**, 227
- Carlos, S., Jutglar, L., Borrell, I., Hunt, D. F. and Ausió, J. 1993. Sequence and characterization of a sperm-specific histone H1-like protein of *Mytilus californianus*. *J. Biol. Chem.* **268**, 185-194.
- 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.
- Eirín-López, J. M., Frehlick, L. J. and Ausió, J. 2006. Protamines, in the footsteps of linker histone evolution. *J. Biol. Chem.* **281**, 1-4.
- 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.
- Heath, D. D. and Hilbish, T. J. 1998. *Mytilus* protamine-like sperm-specific protein genes are multicopy, dispersed, and closely associated with hypervariable RFLP regions. *Genome* **41**, 587-596.
- John, D. and Ausió, J. 2002. Protamine-like proteins: evidence for a novel chromatin structure. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 353-361.
- 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.
- Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S. L., Jackson, R. and Eisenhaur, P. 1991. Ultrasensitive assay for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* **137**, 167-173.
- Lewis, J. D., Saperas, N., Song, Y., Zamora, M. J., Chiva, M. and Ausió, J. 2003. Histone H1 and the origin of protamines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 4148-4152.
- Mitta, G., Hubert, F., Dyrynda, E. A., Boundry, 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.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F., Salzet, M. and Roch, P. 2000. Involvement of mytilins in mussel antimicrobial defense. *J. Biol. Chem.* **275**, 12954-12962.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Noël, T., Romestand, B., Beauvillain, J. C., Salzet, M. and Roch, P. 2000. Differential distribution and defence involvement of antimicrobial peptides in mussel. *J. Cell Sci.* **113**, 2759-2769.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F. and Roch, P. 2000. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEMS Lett.* **486**, 185-190.
- Oh, R., Lee, M. J., Kim, Y. O., Nam, B. H., Kong, H. J., Kim, J. W., An, C. H. and Kim, D. G. 2016. Isolation and purification of antimicrobial peptide from hard-shelled mussel, *Mytilus coruscus*. *J. Life Sci.* **26**, 1259-1268.
- 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.
- Ruiz-Lara, S., Prats, E., Casas, M. T. and Comudella, L. 1993. Molecular cloning and sequence of a cDNA for the sperm-specific protein $\phi 1$ from the mussel *Mytilus edulis*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 11.
- Santel, A., Thomas, W., Nicole, B. and Renate, P. 1997. The *Drosophila* don juan (dj) gene encodes a novel sperm specific protein component characterized by an unusual domain of a repetitive amino acid motif. *Mech. Develop.* **64**, 19-30.
- Seo, J. K., Kim, D. G., Oh, R., Park, K. S., Lee, I. A., Cho, S. M., Lee, K. Y. and Nam, B. H. 2017. Antimicrobial effect of the 60S ribosomal protein L29(cgRPL29), purified from the gill of pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol.* **67**, 675-683.
- Shai, Y. 2002. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* **66**, 236-248.
- Tincu, J.A. and Taylor, S.W. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3645-3654.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wade, D., Andreu, D., Mitchell, S. A., Silveria, A. M. V., Boman, A., Boman, H. G. and Merrifield, R. B. 1992. Antibacterial peptides designed as analogs or hybrids of cecropins and melittin. *Int. J. Pept. Protein Res.* **40**, 429-436.
- 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.
- Yuan, T., Zhang, X., Hu, Z., Wang, F., and Lei, M. 2012. Molecular dynamics studies of the antimicrobial peptides piscidin 1 and its mutants with a DOPC lipid bilayer. *Biopolymers* **97**, 998-1009
- Zaslloff, M. 2002. Antimicrobial peptide of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zhu, H., Yang, X., Liu, J., Ge, Y., Qin, Q., Lu, J., Zhan, L., Liu, Z., Zhang, H., Chen, X., Zhang, C., Xu, L., Cheng, H. and Sun, X. 2014. Melittin radiosensitizes esophageal squamous cell carcinoma with induction of apoptosis *in vitro* and *in vivo*. *Tumour Biol.* **35**, 8699-8705.

초록 : 참담치(*Mytilus coruscus*) 혈구(hemocYTE)에서 분리한 McSSP-31의 항균 특성 분석

오윤경¹ · 이민정¹ · 김영옥¹ · 남보혜¹ · 공희정¹ · 김주원¹ · 박중연¹ · 서정길² · 김동균^{1*}

(¹국립수산과학원 생명공학과, ²군산대학교 식품생명과학부)

참담치 hemocyte에 존재하는 항균 펩타이드를 역상 HPLC column을 사용하여 분리 및 정제하였다. 정제된 펩타이드는 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrophotometer (MALDI-TOF/MS) 분석을 통해 분자량이 3330.549 Da이며, edman 분해법을 통해 14개의 N-말단 아미노산 서열을 확보하였다. 분석한 N-말단 서열은 *M. californianus*의 sperm-specific protein Phi-1과 protamine-like PL-III protein과 각각 93%와 87%의 유사도를 나타냈으며, *M. edulis*의 sperm-specific protein Phi-1과 87% 일치함을 확인하였다. 또한 open-reading frame (ORF)은 306 bp의 길이에 101개의 아미노산을 코딩하고 있음을 밝혔으며, 이는 *M. californianus*의 sperm-specific protein Phi-1와 93.5% 유사하였다. 분자량과 아미노산 서열에 근거하여 31개 아미노산으로 구성된 펩타이드를 합성하였으며 이는 그람 양성균인 *B. subtilis*, *S. mutans*, *S. aureus*와 그람 음성균인 *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* 그리고 진균류인 *C. albicans*에 항균 활성을 보였다. 합성한 펩타이드는 항생제 내성 균주인 *S. aureus* CCARM 0203와 *S. aureus* CCARM 0204에 항균 활성을 보였다. 합성 항균 펩타이드는 넘치 혈장에 대한 용혈현상은 없었고, 세포독성을 확인한 결과 HUVEC cell line에 전혀 독성을 보이지 않았다. 본 연구 결과, 참담치의 혈구로부터 분리 및 정제한 sperm-specific protein 유래 항균 펩타이드는 다양한 균주에 항균 활성을 보였고 낮은 세포독성을 가졌으며, 이러한 특성은 본 실험에서 분리한 항균 펩타이드가 항생제 대체재로서 개발 가능성을 제시하고 있다.