

Recombinant Production and Antimicrobial Activity of an Antimicrobial Model Peptide (Uu-ilys-CF) Derived from Spoon Worm Lysozyme, Uu-ilys

Hye Young Oh, Hye-Jin Go and Nam Gyu Park*

Department of Biotechnology, College of Fisheries Sciences, Pukyong National University, 45 Yongso-ro, Nam-gu, Busan 48513, Korea

Received September 29, 2020 / Revised December 8, 2020 / Accepted December 9, 2020

Uu-ilys, an i-type lysozyme from spoon worm (*Urechis unicinctus*), is an innate immune factor that plays an important role in the defense against pathogens. It also possesses non-enzymatic antibacterial activity. Thus, there is a possibility to develop an antimicrobial model peptide from Uu-ilys. In this study, we report the design, production, and antibacterial activity of an Uu-ilys analog that exhibits antibacterial activity. The Uu-ilys structure was fragmented according to its secondary structures to predict the regions with antimicrobial activity using antimicrobial peptide (AMP) prediction tools from different AMP databases. A peptide containing the C-terminal fragment was predicted to exert antimicrobial activity. The chosen fragment was designated as an Uu-ilys analog containing the C-terminal fragment, Uu-ilys-CF. To examine the possibility of developing an AMP using the sequence of Uu-ilys-CF, recombinant fusion protein (TrxA-Uu-ilys-CF) was produced in an expression system that was heterologous. The produced fusion protein was cleaved after methionine leaving Uu-ilys-CF free from the fusion protein. This was then isolated through high performance liquid chromatography and reverse phase column, CapCell-Pak C18. The antibacterial activity of Uu-ilys-CF against different microbial strains (four gram-positive, six gram-negative, and one fungal strain) were assessed through the ultrasensitive radial diffusion assay (URDA). Among the bacterial strains tested, *Salmonella enterica* was the most susceptible. While the fungal strain tested was not susceptible to Uu-ilys-CF, broad spectrum antibacterial activity was observed.

Key words : Antibacterial activity, antimicrobial peptide, α -helical peptide, C-terminal fragment of lysozyme, recombinant peptide

서 론

항균성 펩타이드는 선천성 면역의 주요한 구성물질로서 모든 생명체에 존재하고 있으며, 현재까지 포유류와 어류를 포함하는 여러 동물에서 발견되었다[1, 11, 32]. 항균성 펩타이드는 대체적으로 12-50개의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, 염기성 아미노산의 존재로 인해 전체적으로 양전하를 지닌다. 또한, 양친매성 성질을 가지며, α -helix 또는 β -sheet와 같은 특정한 2차 구조를 취한다[6, 10, 27, 34]. 다양한 생물로부터 발견된 많은 항균 활성 펩타이드들은 2차 구조 뿐 아니라 분자의 크기, disulfide bond의 존재 유무 및 구조적인 모티프 등의 차이에도 불구하고 항균작용을 나타낸다. 현재까지 항균성 펩타이드의 항균 활성 메커니즘은 정확히 밝혀져 있지는 않다. 하지만 대부분의 항균성 펩타이드들은 크게 두가지 형태인 barrel-stave 메커니즘 및 carpet-like 메커니즘으로 활성을 나

타낸다고 알려져 있다[11]. 또한 이들 메커니즘 이외에도 항균 활성 펩타이드들은 세균의 세포막의 삼투압 변화, 세포벽과 단백질 합성 또는 DNA 합성의 저해 등과 같이 다양한 방법을 이용하여 항균 활성을 나타낸다고 알려져 있다[31]. 특히 양전하를 가지고 있는 항균성 펩타이드는 음전하를 가지고 있는 세포막의 성분과 일차적으로 정전기적 상호작용을 하며, 이러한 상호작용은 항균성 펩타이드가 세포막을 통과하게 하는 방아쇠 역할을 한다. 그 결과, 항균성 펩타이드는 양전하와 양친매성 성질을 이용하여 음전하를 띠는 박테리아의 세포막과 이온성 상호작용을 하여 세포막을 파괴시켜 최종적으로 박테리아를 사멸시킨다[4, 7, 22]. 이러한 항균 활성 펩타이드들은 전통적으로 사용해오던 화학성분의 항균제에 비해 세균에 내성이 적은 동시에 새로운 메커니즘을 통해 작용하고, 생체에 비교적 유해하지 않다고 보고되고 있다. 그 결과, 최근 항균성 펩타이드가 기존의 화학 항균제에 비해 새로운 항균 치료제로서 주목 받고 있다[24].

생체 내에서 존재하는 항균성 펩타이드는 선천성 면역반응에 관여하는 물질로 합성될 뿐만 아니라 항균 활성을 가지거나 다른 기능을 가지는 단백질에서 유래될 수 있다. 더욱이 원래 항균 활성을 가지는 단백질로부터 유래되는 항균성 펩타이드의 경우 단백질과는 다른 활성 메커니즘을 가질 수 있으며 단백질보다 더 강력한 항균 활성을 나타내기도 한다[16, 26].

*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.

예를 들면, 락토페린(Lactoferrin)을 펩신으로 처리한 경우 락토페리신이라는 항균성 유도체가 생성된다. 락토페리신은 락토페린보다 더 강한 항균 활성을 나타내었으며, 락토페린과는 다른 활성 메커니즘으로 활성을 나타낸다고 보고되었다[5]. 현재까지 다양한 단백질로부터 강한 활성을 지닌 항균성 펩타이드가 발견되었다. 이러한 항균성 펩타이드의 모체는 라이소자임[20], 락토페린[2, 28, 29], 성장인자[14], 카제인[12], 트롬빈[18], 헤모글로빈[13], 히스톤[19]과 같은 단백질이다.

고분자 또는 분자 내 S-S 결합이 많은 항균성 단백질은 화학적으로 합성이 어려울 뿐만 아니라 화학적 또는 생물학적 합성을 한 후 단백질 folding이 용이하지 않다는 단점을 지니고 있다. 이러한 것을 보완하기 위해서 항균 활성 또는 다른 기능을 가지는 단백질을 모체로 다양한 형태의 모델 펩타이드를 디자인 할 수 있다. 이러한 연구에는 단백질을 분해효소 또는 열처리 하여 그 분해물에서 항균 활성을 지니는 절편을 분리하는 방법과 항균 활성을 지닐 것으로 예상되는 절편을 화학적 또는 생물학적 합성을 통하여 생산하여 연구하는 방법이 있다. 라이소자임으로부터 유래된 항균성 펩타이드는 1990년대 후반부터 시작하여 보고된 바 있다[3]. 닭에서 분리된 hen egg white 라이소자임의 경우, 그 가수분해물이 항균 활성을 나타낸다고 보고되었다[3, 9, 15, 20, 21]. Goose egg white 라이소자임에서도 단백질분해효소 처리 후 얻어진 절편에서 항균 활성이 나타났다[25]. 인간 라이소자임의 N-말단에서도 항균 활성을 가지는 절편이 생성되는 것을 확인하였다[8]. 또한 거머리(*H. medicinalis*)에서는 무척추형 라이소자임 절편 2개(각 11잔기와 8잔기 길이)가 항균 활성을 나타내었다[33].

본 연구그룹은 이전 연구에서 개불(*Urechis unicinctus*)로부터 무척추형 라이소자임인 개불 라이소자임(Uu-ilyls)을 정제하였다[17]. Uu-ilyls는 그람 음성균과 양성균에 대해서 항균 활성을 나타내며, 122개의 아미노산으로 구성되어 있다 이 물질은 약 13.5 kDa에 해당하는 분자량을 지니며 동시에 16개의 시스테인 잔기를 가지고 있기 때문에 제대로 접합을 갖춘 형태로 생산하기가 어렵다. 또한, Uu-ilyls는 펩티도글리칸 층을 파괴하는 효소적 활성 외에도 비효소적 항균 활성을 가지고 있다. 이러한 결과들을 토대로 보았을 때, Uu-ilyls로부터 항균 활성을 지닌 유도체를 개발할 수 있는 가능성이 있다고 판단되어진다. 따라서, 본 연구를 통하여 Uu-ilyls에서 유래된 항균 활성을 가지는 유도체를 디자인하고 재조합 단백질 기술을 통하여 생산한 뒤, 여러 균주에 대한 항균 활성을 체크하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 재료

HPLC-grade의 water (H₂O) 및 acetonitrile (CH₃CN)은 J.T. Baker (NJ, USA)에서 구입하였고, Tryptic soy broth (TSB)

및 LB broth (Miller)는 Merck (Darmstadt, Germany)에서 구입하였다. Agarose (Low EEO Agar)는 Sigma (MO, USA)에서 구입하였고, 그 이외 모든 시약은 특급을 사용하였다.

개불 라이소자임 유도체 디자인

여러 데이터베이스를 사용하여 개불 라이소자임의 아미노산 서열로부터 항균 활성을 가진 부위를 예측하였던 이전 연구 데이터를 활용하여 항균 활성을 가질 것으로 예측되는 개불 라이소자임 유래 유도체를 디자인 하였다. 간략히 설명하면, 3개의 데이터베이스 Antimicrobial Peptide Database (APD, http://aps.unmc.edu/AP/prediction/prediction_main.php), Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMP, <http://www.camp.bicnirrh.res.in/prediction.php>), Database of Antimicrobial Activity and Structure of Peptides (DBAASP, <https://dbaasp.org/prediction>)에서 제공되는 항균 활성 펩타이드 예측 기구를 사용하여 유도체의 소수성도, net charge, 항균 활성 펩타이드로서의 가능성, 그리고 α -helix 생성 여부를 조사하였다. 이러한 조사된 예측 결과를 토대로 유도체를 디자인하였다.

유도체 구조 예측

예측한 유도체 서열의 α -helix 특성을 설명하기 위하여 EMBOSS pepwheel (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepwheel>)을 사용하여 helical wheel을 나타내었다. 유도체의 구조를 예측하기 위하여 *de novo* 펩타이드 구조 예측 도구(PEPFOLD 3, <https://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/PEP-FOLD3/>)를 사용하여 3D 모델을 생성하였다.

재조합 단백질의 플라스미드 구축 및 발현

유도체를 생산하기 위하여 먼저 polymerase chain reaction (PCR)을 통해 유도체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 Uu-ilyls-BamHI-M-CF (5'-CTAGGGGGGATCCATGCCTCTGG-3')와 Uu-ilyls-CF*-XhoI (5'-gggtgtgtctcagtcagcatctccc-3') primer를 사용하여 증폭하였다. 실험실에서 디자인된 pET-28a-TrxA 벡터에 증폭된 서열을 BamH I과 Xho I 제한 효소 사이트를 사용하여 프레임에 맞게 삽입하였다. 구축된 pET-28a-TrxA-CF 플라스미드를 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 균주에 transformation시켰다. 유도체를 포함하는 TrxA-유도체 퓨전 단백질은 0.5 mM Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 농도로 37 °C에서 6시간 동안 과발현되었으며, 과발현 후 *E. coli* cell을 원심분리(3,000× g, 20 min, 4°C)를 통하여 수거하였다. 수거된 세균 세포(bacterial cell)는 1× phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)을 사용하여 3번 세척되었다. 세척된 세포는 다시 1× PBS에 현탁되었으며, 초음파처리를 통하여 파쇄하고 원심분리를 통해 펠렛을 수거하였다.

재조합 단백질의 정제

수거한 펠렛은 이미다졸과 요소가 첨가된 1x PBS (8 M urea, 5 mM imidazole)를 사용하여 가용성화 하였다. 그런 다음 니켈 비드(Ni-NTA agarose, Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 친화성 크로마토그래피를 시행하여 과발현된 퓨전 단백질을 분리하였다. 분리된 퓨전 단백질을 용출시킨 용매에서 요소를 제거하기 위하여 Spectra/Por 1 dialysis tubing (MWCO 6-8 kDa; Spectrum Laboratories, USA)를 사용하여 5% 초산 용액에서 투석하였다. 투석한 퓨전 단백질은 곧바로 동결건조하였다.

재조합 퓨전 단백질로부터 유도체의 분리 및 분자량 측정

동결 건조한 재조합 단백질을 50% 포름산(formic acid)에 녹인 후, 유도체(Uu-ilyl-CF)를 얻기 위해 브롬화시안(BrCN) 처리를 8시간 동안 실온에서 암반응으로 진행하였다. 반응이 종결된 샘플은 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography; HPLC, Agilent Technologies, CA, USA)와 역상 컬럼(CapCell-Pak C₁₈, 4.6 mm × 250 mm, Shiseido Co., Japan)을 사용하여 원하는 유도체를 분리하였다. 분리한 유도체는 1,4-dithiothreitol (DTT) 처리를 하여 유도체 내 또는 유도체 사이의 S-S결합을 제거하였다. DTT로 처리된 유도체는 HPLC를 사용하여 분리하였으며, 다시 HPLC를 통하여 최종 정제되었다. 최종적으로 정제된 유도체의 분자량은 nanoscale liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS) 시스템을 사용하여 측정하였다.

항균활성 측정

생산된 개별 라이소자임 유래 유도체의 항균 활성은 ultra-sensitive radial diffusion assay (URDA)법을 통하여 측정하였다[23]. 항균 활성은 그람 양성균인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021과 그람 음성균인 *Escherichia coli* ML35를 포함하여 4개의 그람 양성균과 7개의 그람 음성균, 그리고 1개의 진균에 대해 실험하였다 사용한 균주는 다음과 같다: *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus* RN4220, *Micrococcus luteus* KCTC1071, *Salmonella enterica* ATCC13311, *E. coli* ML35, *E. coli* D31, *Shigella sonnei* KCTC2009, *Shigella flexneri* KCTC2517, *Streptococcus iniae* FP5228, *Vibrio anguillarum* KCTC2711, *Edwardsiella tarda* NUF251, *Candida albicans* KCTC7965. 먼저 tryptic soy broth (TSB) 3 ml에 균주를 16시간 동안 적절한 온도(25°C 또는 37°C)에서 배양한 후, 0.03% TSB가 포함된 10 mM phosphate buffer (PB, pH 6.57)를 사용하여 균의 농도가 10⁸ CFU/ml가 되도록 희석하였다(Vitek Colorimeter #52-1210, Hach, USA). 희석된 균액 0.5 ml를 취하여 9.5 ml underlay gel solution (10 mM PB (pH 6.57), 0.03% TSB, 1% type I (low EEO) agarose)에 혼합하여 섞어 주었다. 이 때 underlay gel의 균 농도는

5×10⁶ CFU/ml가 되도록 하였다. 그 뒤 균이 잘 혼합된 underlay gel을 사각 플레이트에 붓고 평평하게 굳도록 하였으며, 이 때 underlay gel의 두께는 약 1 mm가 되게 하였다. Underlay gel에 약 2.4 mm 직경의 well을 만들어, 5 µl의 증류수에 녹인 샘플을 각 well에 주입하였다(negative control, 증류수; positive control, Piscidin I). 플레이트를 적절한 온도에서 3 시간 동안 배양한 후 underlay gel 위에 10 ml overlay gel (10mM PB (pH 6.57), 6% TSB, 1% type I (low EEO) agarose)을 부은 다음 16시간 동안 적절한 온도에서 배양하였다. 항균 활성 반응의 세기는 각 well에 생성된 clear zone의 크기(mm)로 나타내었다.

결과 및 고찰

개별 라이소자임 서열로부터 항균 활성을 나타내는 유도체 디자인

이전 연구의 결과를 토대로 개별 라이소자임(Uu-ilyl) 서열 중 항균성 모델 펩타이드로서 개발이 가능하다고 예측된 C말단 서열을 사용하여 유도체를 디자인하였다[17]. Fig. 1은 Uu-ilyl의 일차구조에서 유도체(Uu-ilyl-CF)에 해당하는 아미노산 서열을 나타낸다. Uu-ilyl은 160 잔기의 아미노산으로 구성되어 있으며(Fig. 1A), C말단의 140-160 잔기에 해당하는 서열에서 α-helix를 나타내었다(Fig. 1B). α-helix 구조를 취하는 Uu-ilyl-CF는 21개의 아미노산으로 구성되어 있으며 4개의 염기성 아미노산과 2개의 산성 아미노산을 가지고 있다. APD 데이터베이스에서 조사한 결과에 의하면 Uu-ilyl-CF는 42%의 소수성도를 지니고, net charge가 +2이며, 4개의 소수성 잔기가 같은 표면에 존재하여 나선형 구조를 형성한다고 예측되었다. 또한 이 유도체는 CAMP 데이터베이스의 항균성 펩타이드 가능성 조사에서 0.730의 높은 점수를 얻었다. 이러한 결과

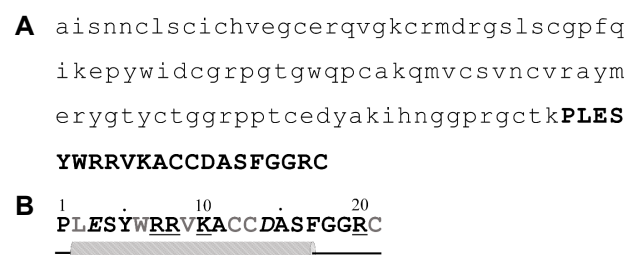


Fig. 1. The amino acid sequence of Uu-ilyl-CF. (A) The full amino acid sequence of the mature Uu-ilyl (i-type lysozyme from *U. unicinctus*). The sequence of the analog is indicated in bold. (B) The amino acid sequence and the secondary structure of Uu-ilyl-CF. The underlined letters are positively charged residues while italicized letters are negatively charged residues. Hydrophobic residues are in gray letters. The secondary structure showing the location of α-helix, which starts with Leu² and ends with Phe¹⁷, is drawn below the amino acid sequence.

를 기반으로 개불 라이소자임 C-말단에서 α -helix 구조에 해당하는 서열(PLESYWRRVKACCDASFGGRC)을 선정하여 항균성 모델 펩타이드로 디자인하였다. 디자인한 유도체는 개불 라이소자임의 C-말단에 위치하기 때문에 개불 라이소자임 C-말단 절편(Uu-ilyc-CF)로 명명하였다. 일반적으로 항균성 펩타이드는 5개에서 60개 사이의 아미노산 잔기로 구성되어 있으며, -5와 +10 사이의 net charge를 가진다. 또한, 10%에서 80% 사이의 소수성을 가지지만 대체적으로 40%에서 50% 사이의 소수성을 가지고 있다[30]. 이러한 항균성 펩타이드의 특성과 유도체인 Uu-ilyc-CF의 특성(42%의 소수성도와 +2의 net charge, 그리고 21개의 잔기수)을 비교하였을 때, Uu-ilyc-CF는 항균성 펩타이드가 지니는 특성에 부합되는 구조라 판단된다.

Uu-ilyc-CF의 구조 예측

Uu-ilyc-CF의 helical wheel projection을 통해 아미노산 잔기 간의 배열을 예측해본 결과, Uu-ilyc-CF는 5개의 소수성 아미노산 잔기(Leu², Tyr⁵, Trp⁶, Val⁹, Phe¹⁷)가 같은 방향에서 배열되어 있고, 다른 면에 4개의 산성 및 염기성 아미노산 잔기(산성: Glu³, Asp¹⁴; 염기성: Arg⁷, Lys¹⁰)를 가지는 전형적인 양친매성 구조를 나타내었다(Fig. 2A). 또한 PEPFOLD 3을 사용하여 Uu-ilyc-CF의 삼차원 모델(3D model)을 나타내었다(Fig. 2B). 모델링 결과에 따르면 Uu-ilyc-CF는 2번째 잔기인 Leu부터 17번째 잔기인 Phe까지가 α -helix 구조를 이루고 있으며, 마지막 부분에 짧은 코일 구조가 존재하고 있다.

Uu-ilyc-CF의 재조합 단백질 플라스미드 구축 및 발현

Uu-ilyc-CF의 재조합 단백질 플라스미드는 실험실에서 자체적으로 디자인된 pET-28a-TrxA 플라스미드에 Uu-ilyc-CF의 뉴클레오티드 서열을 붙여서 구축하였다. 구축된 플라스미

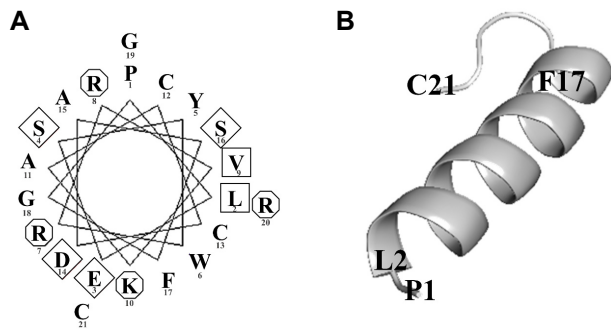


Fig. 2. Helical wheel projection and 3-dimensional model of Uu-ilyc-CF. (A) Helical wheel projection of the analog. Residues in octagon are positively charged while residues in rhombus are negatively charged. Residues in square indicate hydrophobic residues. (B) The 3D model of the analog. The first and the last residues are indicated with letters and numbers (P1 and C21). The start and the end residues of the α -helix are indicated (L2 and F17).

드는 His 잔기 6개로 구성된 His-tag를 가지고 있으며, Thrombin 절단 부위, Thioredoxin A (TrxA), Met 잔기, 그리고 Uu-ilyc-CF로 이루어져 있다(Fig. 3A). His-tag은 친화성 정제(Affinity purification)를 위하여 존재하며, TrxA는 발현 균주에서 목적 물질이 더 잘 발현되도록 설계되었다. 또한 Met 잔기는 브롬화시안 처리로 유도체를 TrxA로부터 분리할 목적으로 사용되었다. 따라서 브롬화시안 처리를 하면 구축한 플라스미드에 존재하는 Met 잔기와 Uu-ilyc-CF간을 절단하기 때문에 제작한 퓨전 단백질로부터 Uu-ilyc-CF가 떨어져 나가게 된다. 그 결과 목적으로 하는 유도체인 Pro¹부터 Cys²¹까지 총 21개 아미노산 잔기로 이루어진 펩타이드로 존재하며, 퓨전 단백질 상 존재하던 His-tag, thrombin 절단 부위, TrxA, 그리고 Met잔기는 활성에 영향을 끼치지 않는다. TrxA-Uu-ilyc-CF퓨전 단백질의 과발현은 0.5 mM IPTG를 처리하여 37 °C에서 6시간 동안 진행되었다. IPTG처리되지 않은 균주와 처리된 균주를 수거하여 과쇄한 뒤 용해성과 비용해성 단백질(soluble and insoluble proteins)로 나누어 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행 한 결과, IPTG처리된 균의 비용해성 단백질에서 과발현이 일어났다(Fig. 3B, lane 3). 이 비용해성 단백질을 수거하여 요소를 사용하여 가용성화 하였다. 그런 다음, 비용해성 단백질에서 과발현 된 퓨전단백질만 분리하기 위하여 친화성 정제를 하였다(Fig. 3C).

분리된 퓨전 단백질은 브롬화시안의 처리로 TrxA와 Uu-ilyc-CF를 절단하였으며, HPLC와 역상 컬럼을 사용하여 분리되었다(Fig. 4A). 그 후 분리된 Uu-ilyc-CF은 DTT처리에 의해

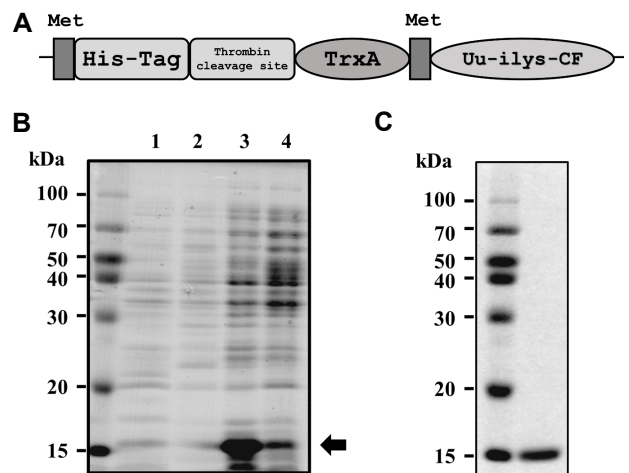


Fig. 3. Recombinant production of Uu-ilyc-CF. (A) Schematic diagram of recombinant TrxA-Uu-ilyc-CF fusion protein. (B) Overexpression of the fusion protein induced by IPTG. (1: non-induced, insoluble; 2: non-induced, soluble; 3: induced, insoluble; 4: induced, soluble). The gray arrow indicates TrxA-Uu-ilyc-CF, which is overexpressed in insoluble form. (C) Affinity purified fusion protein, TrxA-Uu-ilyc-CF.

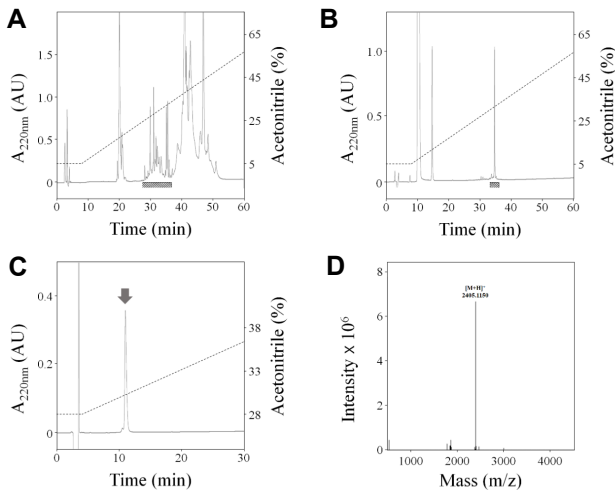


Fig. 4. The HPLC chromatogram of Uu-ilyl- CF purification. (A) The HPLC chromatogram of the CNBr treated recombinant TrxA-Uu-ilyl-CF fusion protein. The bar in the chromatogram indicates cleaved Uu-ilyl-CF peaks. (B) The HPLC chromatogram of the DTT treated Uu-ilyl-CF. The bar in the chromatogram indicates Uu-ilyl-CF. (C) The final HPLC chromatogram of Uu-ilyl-CF. The gray arrow indicates Uu-ilyl-CF. (D) The molecular weight of Uu-ilyl-CF was determined as 2405.1150 Da $[M+H]^+$.

S-S결합이 모두 환원되었으며, 이를 역상 컬럼에 주입하여 HPLC를 시행하여 본 결과 하나의 피크로 용출되었다(Fig. 4B). 마지막으로 DTT처리된 Uu-ilyl-CF을 같은 컬럼에 다른 gradient 조건으로 주입하였을 때, 10-12분(약 28-29% 아세트오나이트릴)에 하나의 피크로 용출되었다(Fig. 4C). 용출된 피크를 LC-MS/MS를 통하여 분자량 측정 한 결과, $[M+H]^+$ 값이 2405.1150 Da으로 측정되었다(Fig. 4D). 이는 이론값인 2404.76 Da과 잘 일치하였다.

Uu-ilyl-CF의 항균 활성

Uu-ilyl-CF의 항균 활성은 ultrasensitive radial diffusion assay (URDA) 방법을 사용하여 측정하였다(Fig. 5A). Uu-ilyl-CF (0.5 mg/ml)를 5 μ l 사용하여 항균 활성을 확인한 결과, 가장 강한 항균 반응을 나타낸 균주는 그람 음성균인 *S. enterica*로 직경 6.4 mm의 clear zone을 나타내었다. 그 다음으로는 그람 음성균인 *S. sonnei*와 *E.coli* ML35에서 활성이 강하게 나타났으며, 그람 양성균인 *B.subtilis*와 *S.aureus*, 그람 음성균인 *E.coli* D31, *S. flexneri*, 그리고 *E.tarda*에는 활성은 있었으나 상대적으로 크지는 않았다. 하지만 그람 양성균인 *M. luteus*와 *S. iniae*, 그람 음성균인 *V. anguillarum*, 그리고 진균인 *C. albicans*에는 활성을 보이지 않았다(data not shown). 그람 양성균인 *B. subtilis*에서 재조합 개불 라이소자임(rUu-ilyl)과 Uu-ilyl-CF의 활성을 비교하여 본 결과, 같은 농도(100 μ g/ml)에서 개불 라이소자임이 Uu-ilyl-CF보다 1.94배 더 큰 clear

zone을 나타내었다. 한편, Uu-ilyl-CF를 10배 높은 농도 (1 mg/ml)로 처리한 경우는 개불 라이소자임(100 μ g/ml)보다 2.32배 더 큰 clear zone을 가지고 있었다(Fig. 5B).

본 연구와 유사한 결과가 다양한 형태의 라이소자임에서 유래된 유도체들에서도 항균 활성을 나타낸다고 보고되었다. 닭에서 유래된 hen egg white 라이소자임(HEWL) 경우, 단백질 분해효소인 clostripain로 처리 후, 생성된 C-말단 유도체(98번 잔기부터 112번 잔기에 해당)는 *Escherichia coli* ATCC25922를 비롯한 5개의 균주에 항균 활성을 나타내었다[20]. Goose egg white 라이소자임의 경우는 N-말단 유도체(20번 잔기부터 28번 잔기에 해당)가 그람 음성과 양성균에 항균 활성을 나타내었다[25]. 또한, 거머리(*H. medicinalis*)에서 발견된 무척추형 라이소자임의 절편들도 항균 활성을 나타낸다고 보고되었다. 거머리의 라이소자임 유래의 모델 펩타이드로 α -helix 4, α -helix 5 및 α -helix 6이 있는데, 그 중에서 α -helix 4를 구성하는 67번째 잔기부터 77번째 잔기로 만들어진 절편은 *Escherichia coli* MDMSU52를 비롯한 3개 균주에 강력한 항균 활성을 나타내었다. 하지만 α -helix 5를 구성하는 85번째 잔기부터 92번째 잔기로 만들어진 절편은 활성이 없었고, α -helix 6를 구성하는 105번째 잔기부터 112번째 잔기로 만들어진 절편은 *Micrococcus luteus* MDMSU128에서만 활성을 나타내었다[33]. 결론적으로 본 연구에서 개불 라이소자임의 C-말단 영역에

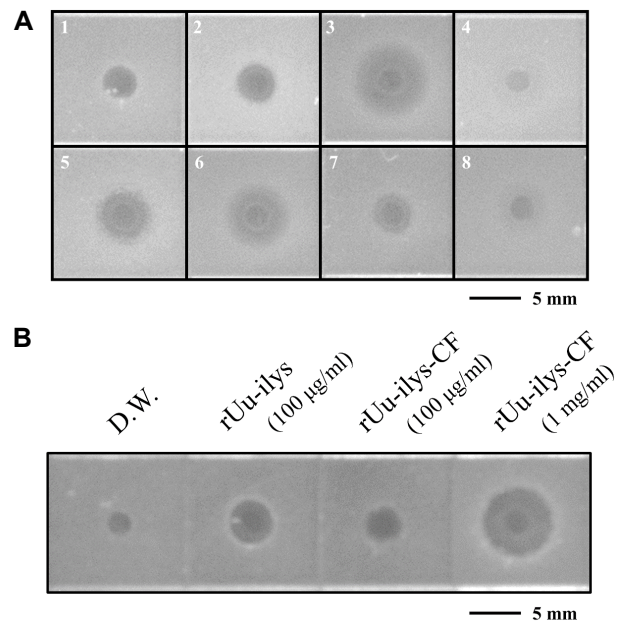


Fig. 5. The antimicrobial activity of rUu-ilyl and rUu-ilyl-CF. (A) The antimicrobial activity of Uu-ilyl-CF against eight different bacterial strains. 1: *B. subtilis*, 2: *S. aureus*, 3: *S. enterica*, 4: *E. coli* D31, 5: *E. coli* ML35, 6: *S. sonnei*, 7: *S. flexneri*, 8: *E.tarda*. The tested concentration is 0.5 mg/ml. The black bar indicates 5 mm. (B) The antimicrobial activity of rUu-ilyl and rUu-ilyl-CF against *B. subtilis*. The black bar indicates 5 mm.

해당되는 유도체(Uu-ilyls-CF)는 그람 양성균과 음성균에 대해 항균활성을 나타내었다. 이 모델 펩타이드는 +2의 net charge, 42%의 소수성도를 가지는 양친매성 α -helix 구조를 가진다. 이 펩타이드는 발현 균주 *E.coli* BL21 (DE3)에서 TrxA가 연결된 퓨전 단백질로 과발현되어 BrCN처리에 의해 분리되었다. 본 논문의 결과를 토대로 Uu-ilyls-CF와 개별 라이소자임의 항균 활성에 대한 시너지 효과를 추후 확인할 계획이다.

감사의 글

본 논문은 2019년 부경대학교 자율창의학술연구비(과제번호; C-D-2019-0822)로 연구되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Andreu, D. and Rivas, L. 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* **47**, 415-433.
- Bellamy, W., Takase, M., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. 1992. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *J. Appl. Bacteriol.* **73**, 472-479.
- Carrillo, W. and Ramos, M. 2018. Identification of antimicrobial peptides of native and heated hydrolysates from hen egg white lysozyme. *J. Med. Food* **21**, 915-926.
- Eband, R. M. and Vogel, H. J. 1999. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1462**, 11-28.
- Gifford, J. L., Hunter, H. N. and Vogel, H. J. 2005. Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor and immunological properties. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2588-2598.
- Go, H. J., Kim, C. H., Park, J. B., Kim, T. Y., Lee, T. K., Oh, H. Y. and Park, N. G. 2019. Biochemical and molecular identification of a novel hepcidin type 2-like antimicrobial peptide in the skin mucus of the pufferfish *Takifugu pardalis*. *Fish Shellfish Immunol.* **93**, 683-693.
- Hancock, R. E. W. and Diamond, G. 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**, 402-410.
- Ibrahim, H. R., Imazato, K. and Ono, H. 2011. Human lysozyme possesses novel antimicrobial peptides within its N-terminal domain that target bacterial respiration. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 10336-10345.
- Ibrahim, H. R., Thomas, U. and Pellegrini, A. 2001. A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *J. Biol. Chem.* **276**, 43767-43774.
- Izadpanah, A. and Gallo, R. L. 2005. Antimicrobial peptides. *J. Am. Acad. Dermatol.* **52**, 381-390.
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D. H. and He, Q. 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am. J. Transl. Res.* **11**, 3919-3931.
- López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L. and Recio, I. 2006. Identification of antibacterial peptides from bovine kappa-casein. *J. Food Prot.* **69**, 2992-2997.
- Mak, P., Wójcik, K., Silberring, J. and Dubin, A. 2000. Antimicrobial peptides derived from heme-containing proteins: hemocidins. *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**, 197-207.
- Malmsten, M., Davoudi, M., Walse, B., Rydengård, V., Pasupuleti, M., Mörgelin, M. and Schmidtchen, A. 2007. Antimicrobial peptides derived from growth factors. *Growth Factors* **25**, 60-70.
- Mine, Y., Ma, F. and Lauriau, S. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 1088-1094.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F. and Vogel, H. J. 2011. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* **29**, 464-472.
- Oh, H. Y., Kim, C. H., Go, H. J. and Park, N. G. 2018. Isolation of an invertebrate-type lysozyme from the nephridia of the echiura, *Urechis unicinctus*, and its recombinant production and activities. *Fish Shellfish Immunol.* **79**, 351-362.
- Papareddy, P., Rydengård, V., Pasupuleti, M., Walse, B., Mörgelin, M., Chalupka, A., Malmsten, M. and Schmidtchen, A. 2010. Proteolysis of human thrombin generates novel host defense peptides. *PLoS Pathog.* **6**, e1000857.
- 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.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Klausner, S., Hunziker, P. and von Fellenberg, R. 1997. Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *J. Appl. Microbiol.* **82**, 372-378.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Wild, P., Schraner, E. and von Fellenberg, R. 2000. Effect of lysozyme or modified lysozyme fragments on DNA and RNA synthesis and membrane permeability of *Escherichia coli*. *Microbiol. Res.* **155**, 69-77.
- Powers, J. P. and Hancock, R. E. 2003. The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.
- 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.
- Stark, M., Liu, L. P. and Deber, C. M. 2002. Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3585-3590.
- Thammasirirak, S., Pukcothanung, Y., Preecharam, S., Daduang, S., Patramanon, R., Fukamizo, T. and Araki, T. 2010. Antimicrobial peptides derived from goose egg white lysozyme. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **151**,

- 84-91.
26. Valero, Y., Saraiva-Fraga, M., Costas, B. and Guardiola, F. A. 2020. Antimicrobial peptides from fish: beyond the fight against pathogens. *Rev. Aquac.* **12**, 224-253.
 27. van't Hof, W., Veerman, E. C., Helmerhorst, E. J. and Amerongen, A. V. 2001. Antimicrobial peptides: properties and applicability. *Biol. Chem.* **382**, 597-619.
 28. van der Kraan, M. I., Groenink, J., Nazmi, K., Veerman, E. C., Bolscher, J. G. and Nieuw Amerongen, A. V. 2004. Lactoferrampin: a novel antimicrobial peptide in the N1-domain of bovine lactoferrin. *Peptides* **25**, 177-183.
 29. Viejo-Díaz, M., Andrés, M. T., Pérez-Gil, J., Sánchez, M. and Fierro, J. F. 2003. Potassium efflux induced by a new lactoferrin-derived peptide mimicking the effect of native human lactoferrin on the bacterial cytoplasmic membrane. *Biochem. Mosc.* **68**, 217-227.
 30. Wang, G. 2015. Improved methods for classification, prediction and design of antimicrobial peptides. *Methods Mol. Biol.* **1268**, 43-66.
 31. Yeaman, M. R. and Yount, N. Y. 2003. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* **55**, 27-55.
 32. Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
 33. Zavalova, L. L., Yudina, T. G., Artamonova, I. I. and Baskova, I. P. 2006. Antibacterial non-glycosidase activity of invertebrate destabilase-lysozyme and of its helical amphipathic peptides. *Chemotherapy* **52**, 158-160.
 34. Zhang, L. J. and Gallo, R. L. 2016. Antimicrobial peptides. *Curr. Biol.* **26**, R14-19.

초록 : 개발 라이소자임 유래 항균성 모델 펩타이드(Uu-ilyl-CF)의 재조합 단백질 생산 및 항균 활성

오혜영 · 고혜진 · 박남규*

(부경대학교 수산과학대학 생물공학과)

개발 라이소자임(Uu-ilyl)은 개발(*Urechis unicinctus*)로부터 정제된 무척추형 라이소자임으로 병원균에 대한 방어에 주요하게 작용하는 선천성 면역 물질이며, 비효소적 항균 활성을 가지고 있어 항균 활성을 지닌 유도체의 개발 가능성을 가지고 있다. 본 논문은 개발 라이소자임에서 유래된 항균 활성을 가지는 유도체의 디자인과 생산을 기술하고 있다. 여러 항균성 펩타이드(antimicrobial peptide, AMP) 데이터베이스에서 제공하는 항균성 펩타이드 예측 도구를 사용하여 개발 라이소자임에서 항균 활성을 가지는 부위를 예측하였다. 개발 라이소자임 C-말단의 절편이 항균 활성을 나타낼 것으로 예측되었으며, 이 펩타이드는 C-말단 절편, Uu-ilyl-CF라 명명하였다. Uu-ilyl-CF은 이형 발현 시스템인 TrxA-Uu-ilyl-CF 퓨전 단백질을 사용하여 생산하였다. 만들어진 퓨전 단백질은 브롬화시안을 사용하여 메티오닌 잔기를 절단하였으며, 절단된 Uu-ilyl-CF은 고성능액체크로마토그래피와 역상 컬럼인 CapCell-Pak C18을 사용하여 분리되었다. Uu-ilyl-CF의 항균 활성을 조사하기 위해서 여러 균주(그람양성균 4개, 그람음성균 7개, 진균 1개)를 사용하였다. Uu-ilyl-CF의 항균 활성은 살모넬라에서 가장 높은 반응을 보였다. 비록 Uu-ilyl-CF는 진균에 활성을 나타내지 않았지만, 사용한 균주들에서 넓은 범위의 항균 활성을 나타내었다.