



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

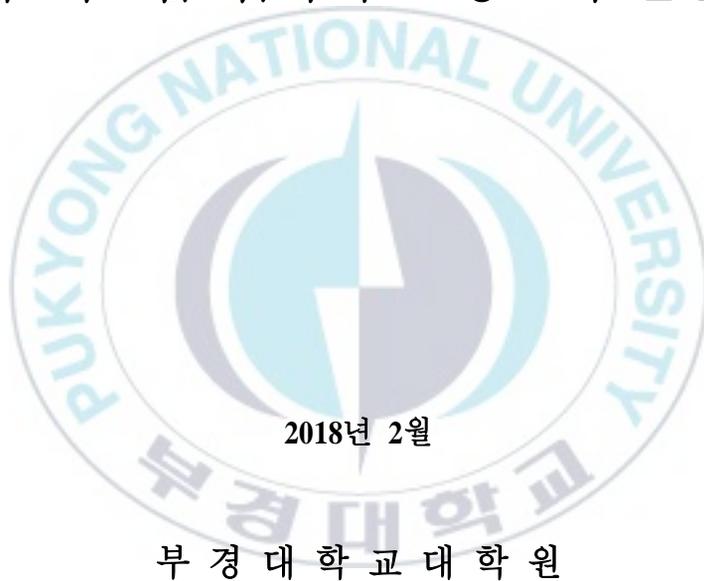
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사학위논문

별불가사리(*Asterina pectinifera*) 유래의
cysteine rich 항균활성펩타이드의 분자적
특성과 재조합 펩타이드 생산에 관한 연구



생물공학과

이태관

공 학 석 사 학 위 논 문

별불가사리 (*Asterina pectinifera*) 유래의
cysteine rich 항균활성펩타이드의 분자적
특성과 재조합 펩타이드 생산에 관한 연구



지도교수 박 남 규

이 논문을 공학석사 학위청구논문으로 제출함

2018년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

이 태 관

이태관의 공학석사 학위논문을 인준함

2018년 2월 23일



주	심	이학박사	이	형	호	(인)
위	원	이학박사	공	인	수	(인)
위	원	이학박사	박	남	규	(인)

목 차

Part I. 별불가사리(<i>Asterina pectinifera</i>) 유래의 cysteine rich AMP의 분자적 특성	
표와 그림 목차.....	V
초록.....	vii
I. 서론.....	2
II. 재료 및 방법.....	5
1. 실험재료.....	5
1.1. 실험동물.....	5
1.2. 재료 및 시약.....	5
2. 실험방법.....	6
2.1. Asterocin의 cDNA cloning.....	6
2.1.1. Total RNA 추출 및 5' RACE PCR.....	6
2.1.2. Ligation & Transformation.....	7
2.2. Asterocin의 Genomic DNA cloning.....	7
2.2.1. Genomic DNA 추출 및 PCR.....	7
2.2.2. Ligation & Transformation.....	8
2.3. 재조합 Asterocin 생산.....	10
2.3.1. 재조합 Plasmid 구축.....	10

2.3.2. 재조합 단백질 발현.....	10
2.3.3. Cell lysis & Ni-NTA 정제.....	11
2.3.4. Dialysis & CNBr 처리.....	11
2.3.5. HPLC 정제.....	12
2.4. 분자량 측정.....	12
2.5. DTT 처리 & HPLC 정제.....	12
2.6. 항균활성 측정.....	13
2.7. Asterocin precursor transcripts의 발현량 비교.....	14
III. 결과 및 토론.....	16
1. Asterocin의 cDNA와 genomic DNA cloning	16
1.1. Asterocin의 cDNA cloning	16
1.2. Asterocin의 genomic DNA cloning	17
2. 재조합 Asterocin 생산.....	21
3. 분자량 측정.....	24
4. DTT 처리 및 HPLC 정제.....	27
5. 항균활성 측정.....	31
6. Asterocin precursor transcripts의 발현량 비교.....	34
IV. 참고문헌.....	36

Part II. 모델 펩타이드 (α AL14)의 산업적 활용을 위한 유전자 조합과 재조합 펩타이드 발현

초록.....	40
I. 서론.....	41
II. 재료 및 방법.....	45
1. 실험동물.....	45
2. 실험방법.....	45
2.1. 재조합 펩타이드 생산.....	45
2.1.1. DNA Oligonucleotides 제작.....	45
2.1.2. 재조합 Plasmid 구축.....	49
2.1.3. 재조합 단백질 발현.....	52
2.1.4. Cell lysis & Ni-NTA 정제.....	52
2.1.5. Dialysis & CNBr 처리.....	53
2.1.6. HPLC 정제.....	53
2.2. 분자량 측정.....	53
2.3. Carboxypeptidase Y 처리.....	54
2.4. 항균활성 측정.....	54
2.5. 돌돔 내장 추출.....	55
2.5.1. CNBr 처리.....	55

2.5.2. Enzyme 처리.....	56
III. 결과 및 토론.....	57
1. 재조합 펩타이드 발현 및 정제.....	57
2. 분자량 측정.....	58
3. Enzyme 처리 및 항균활성 측정.....	65
4. 돌돔 내장 추출.....	66
IV. 참고문헌.....	69
V. 감사의 글.....	71



표와 그림 목차

Part I.

표 1. Primer의 염기서열.

표 2. Asterocin의 3가지 disulfide bond 패턴과 linear한 형태의 Asterocin을 이용한 여러 균주에 대한 항균활성 측정.

그림 1. Asterocin의 Edman degradation 및 3' RACE PCR결과.

그림 2. Asterocin의 전체 염기서열 및 아미노산서열.

그림 3. Asterocin의 염기 및 아미노산서열 모식도.

그림 4. Asterocin과 다른 종의 AMP유전자의 구조 비교.

그림 5. 재조합 Asterocin plasmid.

그림 6. Asterocin의 SDS-PAGE.

그림 7. 재조합 Asterocin의 peak1과 2의 정제.

그림 8. 정제한 재조합 Asterocin 분자량.

그림 9. Asterocin의 disulfide 결합 패턴에 대한 모식도.

그림 10. 재조합 Asterocin의 DTT 처리 후 정제.

그림 11. Asterocin과 SfCrAMP의 아미노산 및 특성 비교.

그림 12. Disulfide bond를 가지는 3가지 type의 Asterocin과 linear type의 Asterocin의 retention time (RT)비교.

그림 13. Asterocin precursor transcripts의 발현량 비교.

Part II.

표 1. Oligonucleotides 서열.

그림 1. 펩타이드와 CNBr과의 반응.

그림 2. α AL14와 α AL14-M 그리고 α AL14-EADEM의 아미노산 모식도.

그림 3. Gene assembly 및 plasmid 구축.

그림 4. α AL14 (-NH₂ type)의 HPLC 정제.

그림 5. α AL14 (-OH type)의 HPLC 정제.

그림 6. α AL14-M (-HSL type)의 HPLC 정제.

그림 7. α AL14-EADEM (-HSL type)의 HPLC 정제.

그림 8. α AL14 (-OH type)과 α AL14-M (-HSL type)의 분자량.

그림 9. α AL14-EADEM (-HSL type)과 α AL14 (-OH type)의 분자량.

그림 10. Carboxypeptidase Y 처리에 따른 항균활성측정.

그림 11. CNBr 처리한 돌돌 추출물의 항균활성 측정.

Molecular characterization of a starfish (*Asterina pectinifera*) cysteine rich antimicrobial peptide

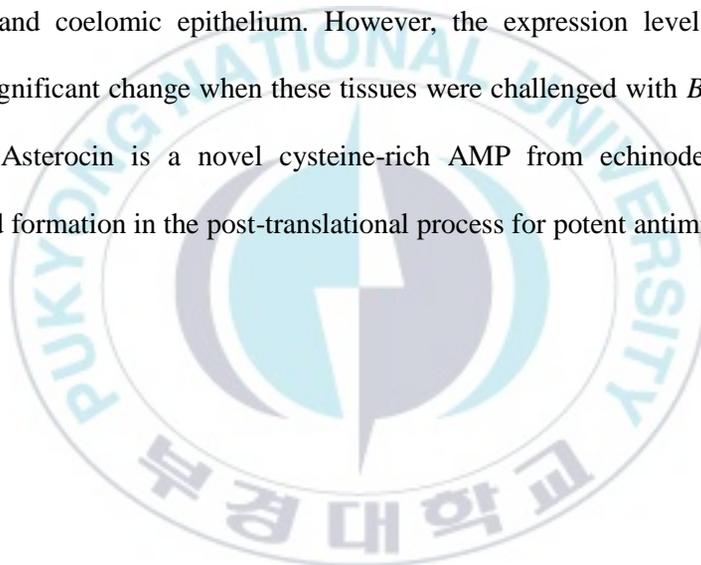
Tae Kwan Lee

*Department of Biotechnology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Antimicrobial peptides (AMPs) are innate immune factors distributed among most life forms including animals, plants, and bacteria. Marine invertebrates like starfish, *Asterina pectinifera*, depend on these factors for their survival in the microbe-rich seawater and marine sediments due to lack of adaptive immune system. To this day, there has been no reports of AMPs in this starfish species. In this study, the cDNA cloning, genomic structure analysis, recombinant production, antibacterial activity assay, and transcriptional expression of previously isolated starfish AMP, Asterocin from the tube feet of *P. pectinifera* are reported. cDNA cloning revealed that Asterocin comprises 1078 nucleotides including a 3' untranslated region (UTR) of 78 bp, an open reading frame (ORF) of 234 bp, and a 5' UTR of 766 bp. The ORF encoded a preproprotein of 77 amino acids (AAs), which was composed of a signal peptide of 19 AAs, prosequence of 24 AAs, a mature peptide of 33 AAs, and one Leu residue at the C-terminal end that is removed in the post-translational modification process. The mature peptide contained 4 cysteine residues that form 2 disulfide bonds. The homology search using the mature amino acid sequence of Asterocin revealed that Asterocin had no significant homology to

amino acid sequence of Asterocin revealed that Asterocin had no significant homology to AMPs from other species. However, the pattern of Asterocin gene structure, which was two exons separated by one intron, was similar to the gene structure of other echinoderm AMPs. Antimicrobial activity assay demonstrated Asterocin was active regardless of its disulfide bond formation against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. However, the most potent antimicrobial activity of Asterocin was observed when its disulfide bonds were formed. The transcriptional expression level of Asterocin was high in tube feet and coelomic epithelium. However, the expression level did not show statistically significant change when these tissues were challenged with *Bacillus subtilis*. Collectively, Asterocin is a novel cysteine-rich AMP from echinoderm that needs disulfide bond formation in the post-translational process for potent antimicrobial activity.



Part I .

별불가사리 (*Asterina pectinifera*) 유래의
cysteine rich 항균활성펩타이드의
분자적 특성

I. 서론

Antimicrobial peptide (AMP)는 동물, 식물, 박테리아 등 대부분의 생물체가 가지는 선천면역 반응 물질이다 (1, 2). 주로 12~50개의 아미노산으로 구성되어 있고, Lys, Arg같은 양전하를 띠는 아미노산을 2-9개 정도 포함한다 (3). 또한 일반적으로 β -sheet, α -helix구조를 취한다. 2차구조를 통해서 양친매성 구조를 취하는데 대표적인 AMP로는 protegrin, magainin, cyclic indolicin, and coiled indolicin가 있다 (4). AMP는 Gram 양성, 음성, 바이러스 그리고 곰팡이까지 넓은 범위의 병원균에 대해 항균활성을 가진다 (3). AMP의 기본 mechanism은 막의 barrier로서의 기능을 방해하는 것이다. AMP의 양전하를 띠는 부분이 박테리아의 세포막에 부착되어 막에 pore를 형성하거나 막 투과성을 변화시키는 등의 방식으로 막의 barrier특성을 교란시켜서 박테리아를 죽인다. 또는 RNA, DNA 같은 필수구성요소의 합성을 막는 방식으로 박테리아를 죽인다 (1, 5, 6).

해양생물은 바닷속에서 수많은 병원균에 노출된 채 살아 간다. 이는 해양생물들 역시 병원균을 방어하기 위한 효과적인 면역 체계를 갖고 있다는 것이다 (7). 특히 해양의 무척추 동물의 경우 사람을 포함하는 척추 동물에 비해 2차면역 반응을 갖추고 있지 못하고, 주변의 바뀌는 환경에 대해 빠르게 적응하기 위해 선천 면역 반응에 더 의존한다 (8-12).

극피동물은 계통학적으로 후구동물에 속하는 하나의 문으로, 불가사리류,

성게류, 바다나리류, 해삼류, 거미불가사리류로 나뉜다. 극피동물은 모두 해양 생물이고 water-vascular system와 tube feet을 가지는 특징이 있다. 특히, 바다나리류를 제외하고는 바닥에서 부유하면서 살아가기 때문에 병원균에 쉽게 노출된다. 지금까지 극피동물에서 여러 종류의 AMP가 발견되었다. 성게 (*Strongylocentrotus droebachiensis*)의 coelomocytes에서 발견된 cysteine-rich AMPs strongylocins (13, 14)와 heterodimeric AMPs centrocins (13, 15), 그리고 해삼 (*Halocynthia aurantium*)의 coelomocytes에서 발견한 Halocidin 등이 있다 (16).

본 연구실에서는 극피동물에 속하는 별불가사리 (*Asterina pectinifera*→*Patiria pectinifera* 변경) tube feet에서 항균활성펩타이드를 정제하였고, 편의상 Asterocin으로 명명하였다. Asterocin은 33개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 분자량은 3715 Da $[M+H]^+$ 이고, 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) polymerase chain reaction (PCR)결과 766bp의 3' untranslated region (UTR)로 구성되어 있었다 (그림 1). 그러나 Asterocin의 1차구조가 정확히 밝혀져 있지 않아서 본 연구에서는 Asterocin의 전체서열을 알아보기 위해서 5' RACE실험을 하였다. 또한 밝혀진 1차서열을 토대로 재조합 단백질을 이용해서 서로 다른 type의 disulfide bond를 가지는 Asterocin을 생산하여 항균활성을 확인하였다. 또한 Asterocin precursor transcripts의 조직별 발현량과 immune challenge에 의한 발현량을 확인하기 위해서 real time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)을 하였다.

A

Amino acid sequence (by Edman degradation)

10
20
30
 GKKR**N**AYFN**X** DDEXGN**P**G**XI** XKLVRG**K**K**ST** LN

B

```

1 AAGAGGAACGCCTACTTCAACTGTGACGATGAATGGGGCAACCCAGGCTGCATCTGCAAA
  K R N A Y F N C D D E W G N P G C I C K 20
61 TTGGTCAGGGGCAAGAAGTCTACCCTCAACTGCCTATAGactgagcatgcaggcacaggt
  L V R G K K S T L N C L * 32
121 tcgggcaagaactgactaccactgaagggatttttaggacactgattactatcgttttacg
181 acacgaatatcacagatggacttccctgtaacgctttaatcaatctaaatagggtttttagg
241 cgggtagaaagtaggcactttgtggtgcaaacggccgctggcacactaagaagcgaaggt
301 tcctcgaaatctgttctgtacttaatacttcattagcaggggccctgctaattatcttg
361 tttctgcattcttactttctcattaccgagaatgtacagatgaaaaaccacgcacgcat
421 taaaaatggccgtagagcagtagacagaatgcctagttatacctttgaaggtctctctcac
481 atgtcgtcacttccctacagattgccacgcgcacatggcattttgggctcaatttttcgtg
541 acgcacatcgccgctgcgctcgaagaaagttcgagcaaacacgcagttgtaattttcca
601 acgaagatggcgtcctatgagagagatctagaagattttgtagcagtgactcaatggcc
661 gttgatacactaacttagaaaactccatcgcgttcacgttcttcccttgtaactcagc
721 ttgttattaatttgaaatgtaaaaactaaaatgcaattaaactgccaggttgtaaacg
781 gggttgtgtaaactacatacggacgaaaagcaataaataaaaactattcctcatgcaaaac
841 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
  
```

그림 1. Asterocin의 Edman degradation 및 3' RACE PCR결과.

Edman degradation결과에 의하면 Asterocin은 32개의 아미노산으로 구성되어 있고 X로 표시된 4개의 아미노산이 분석되지 않았다 (A). 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) polymerase chain reaction (PCR)결과에 의해 99bp의 open reading frame (ORF)부분과 766bp의 3' untranslation region으로 구성되어 있는 것을 알 수 있다 (B).

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 실험동물

별불가사리 (*Patiria pectinifera*)는 부산 해운대구 청사포에서 썰물 때 바다에서 채집하였다. 채집한 불가사리는 순환되는 수조에서 해수를 14℃로 유지하여 3일간 순치 시킨 후 실험하였다.

1.2. 재료 및 시약

실험에 사용한 tryptic soy broth (TSB)와 Luria-Bertani (LB)배지는 Merck사 (Darmstadt, Germany)에서 구입하였고, 배지에 첨가한 항생제 ampicillin과 kanamycin은 LPS solution사 (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 균주는 *E.coli* DH5 α (NIH: Bethesda, MD, USA)와 *E.coli* BL21 (DE3) cell (Novagen, Madison, WI, USA)을 사용했다. HPLC정제용 water와 acetonitrile은 J.T Baker사 (Avantor-performance materials, PA, USA)로부터 구입하였고 trifluoroacetic acid(TFA)와 cyanogen bromide(CNBr)은 Sigma사 (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 그 외 모든 시약은 특급을 사용하였다.

2. 실험방법

2.1. Asterocin의 cDNA cloning

2.1.1. Total RNA 추출 및 5' RACE PCR

cDNA cloning을 위해 5' rapid amplification of cDNA ends (RACE) polymerase chain reaction (PCR)을 진행하였다. Total RNA는 Hybrid-R kit (GeneAll, Seoul, Korea)을 사용해서 *P. pectinifera*의 tube feet에서 추출하였고, mRNA는 Oligotex mRNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용해서 얻었다. 그리고 RACE PCR을 위한 cDNA 합성은 GeneRacer kit (RLM-RACE, invitrogen, CA, USA)를 이용하였다. 5' RACE PCR을 위한 primer는 3' RACE PCR결과 (그림 1B)를 참고해서 NCBI primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)를 이용해 sequence-specific primer로 제작하였다 (표 1). 5' RACE PCR은 GeneRacer 5' primer와 gene specific primer reverse (GSP-R)를 이용해서 진행하였다 (5' RACE cDNA sample 1ul, 10 X nTaq-HOT buffer 5ul, dNTP Mixture (2mM each) 5ul, GSP-R primer (10pmol/ul) 2ul, GeneRacer 5' primer (10pmol/ul) 2 ul, nTaq-HOT DNA Polymerase (5 units/ ul) 0.5 ul, sterilized water 34.5 ul; 95°C 10min, 5cycles in 95°C 30sec, 72°C 30sec, 72°C 90sec, 5cycles in 95°C 30sec, 70°C 30sec, 72°C 90sec, 25cycles in 95°C 30sec, 72°C 30sec, 72°C 90sec and 72°C 5min). PCR product는 1.5% agarose gel로 전기영동을 해서 LaboPass Gel Extraction kit (Cosmo genetech, Seoul, Korea)을 이용해서 추출하였다.

2.1.2. Ligation & Transformation

PCR product는 pGEM-T Easy vector system (Promega Corporation, USA)에 ligation 하였다 (TA vector 0.5 ul, PCR product 3.5 ul, T4 ligase 1 ul, 2 X ligation buffer 5 ul; overnight). *E.coli* DH5 α 에 transformation하였다. 먼저 ice에서 *E.coli* DH5 α 100ul에 ligation한 sample 10ul을 넣고 30min 방치하였다. 그리고 42°C에서 30sec heat-shock을 주고, 다시 ice에서 30sec 안정화 시킨 후 LB medium 400ul를 넣고 37°C, 1hr culture하였다. 그리고 ampicillin을 넣은 ALB agar plate (ampicillin 50ug/ml)에 도말한 후 37°C, overnight culture하였다. Single colony를 다시 5ml의 ALB medium (ampicillin 50 ug/ml)에서 37°C, 180rpm, overnight culture하였다. 이 후 Exprep plasmid SV (Gene All, Seoul, Korea)을 이용해서 plasmid를 추출 후 마크로젠에 sequencing을 의뢰해서 확인하였다.

2.2. Asterocin의 Genomic DNA cloning

2.2.1. Genomic DNA 추출 및 PCR

cDNA sequence를 바탕으로 해서 Asterocin precursor 서열의 open reading frame (ORF)과 3' UTR에서 각각 forward primer (GNP-F)와 reverse primer (GNP-R)를 제작하였다. Genomic DNA는 starfish tube feet에서 Exgene DNA extraction kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용해서 추출하였다. 100ng의 genomic DNA를

template로 사용해서 PCR을 하였다. PCR 조건은 다음과 같다. (genomic DNA(100ng/ul) 1ul, 10 X *n*Pfu-Forte buffer 5ul, dNTP mixture(2mM each) 5ul, *n*Pfu-Forte Polymerase (2.5 units/ul) 1ul, GNP-F (10pmol/ul) 2ul, GNP-R (10pmol/ul) 2ul, sterilized water 34ul; 95°C 2min, 30cycles in 95°C 30sec, 59-62.7 (gradient)°C 30sec, 72°C 90sec and 72°C 5min). PCR product는 1.5% agarose gel로 전기영동을 해서 확인하였다. 그리고 PCR product는 LaboPass Gel Extraction kit (Cosmo genetech, Seoul, Korea)을 이용해서 추출하였다.

2.2.2. Ligation & Transformation

추출한 PCR product는 TOPcloner™ Blunt core Kit (Enzynomics, Deajeon, Korea)를 이용해 ligation하였다 (pTOP Blunt V2 (10 ng/ul) 1ul, PCR product(14.1ng/ul) 1ul, 6X TOPcloner™ Buffer 1ul, sterilized water 3ul; 25°C 5min). *E.coli* DH5α에 transformation하였다. 먼저 ice에서 *E.coli* DH5α 100ul에 ligation한 sample 6ul을 넣고 30min 방치하였다. 그리고 42°C에서 30sec heat-shock을 주고, 다시 ice에서 30sec 안정화 시킨 후 LB medium 400ul를 넣고 37°C, 1hr culture하였다. 그리고 ALB agar plate (ampicillin 50ug/ml)에 도말한 후 37°C, overnight culture하였다. Single colony를 다시 5ml의 ALB medium (ampicillin 50 ug/ml)에서 37°C, 180rpm, overnight culture하였다. 이 후 Exprep plasmid SV (Gene All, Seoul, Korea)을 이용해서 plasmid를 추출 후 마크로젠에 sequencing을 의뢰해서 확인하였다.

표 1. Primer 의 염기서열.

Primer	Sequence(5'→3')	Usage
GeneRacer™ 5' Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	5' RACE PCR
GSP-R	CTCATAGGACGCCATCTTCGTTGGAA *(134→109)	
GNP-F	TTGTTAAGCGGGCCATGGAT *(164→183)	Gene cloning
GNP-R	CTTGCCCCTGACCAATTTGC *(287→268)	
qPCR-F	CATCGTTTTGCTGCTGTGCT *(90→109)	RT-qPCR
qPCR-R	ATCCATGGCCCGCTTAACAA *(183→164)	
EF1α qPCR-F	TCAACGACTACCAGCCCCTA	
EF1α qPCR-R	TTCTTGCTAGCCTTCTGGGC	

*그림 2에 나타난 염기서열번호.

2.3. 재조합 Asterocin 생산

2.3.1. 재조합 Plasmid 구축

Asterocin 생산을 위한 재조합 plasmid를 구축하기 위해서 실험실에서 pET28a(+) vector에 BamH I (Enzymomics, Deajeon, Korea), Nde I (Enzymomics, Deajeon, Korea)을 처리한 뒤 Thioredoxin A 유전자를 fusion시킨, pET28a(+)-TrxA vector를 사용하였다. 그리고 앞서 cloning한 Asterocin cDNA를 Multi cloning site에 넣어서 plasmid를 구축하였다 (그림 5).

2.3.2. 재조합 단백질 발현

구축된 plasmid를 *E.coli* BL21 (DE3)cell에 transformation한 뒤 kanamycin이 들어간 KLB agar plate (kanamycin 50ug/ml)에 도말해서 37°C, overnight culture하였다. Single colony를 다시 5ml의 LB medium (kanamycin 50ug/ml)에서 37°C, 180rpm, overnight culture를 하였다. 이후 500ml의 LB medium (kanamycin 50ug/ml)에 scale-up해서 optical density (OD⁶⁰⁰)를 분광광도계 (Vitek Colorimeter #52-1210, Hach, USA)로 측정해서 값이 0.6~0.7 될 때까지 37°C, 180rpm에서 약 3hr culture하였다. 그리고 IPTG를 1mM농도가 되도록 넣은 뒤 37°C, 180rpm, 4hr IPTG induction을 진행하였다. Bacterial cell은 원심분리 (830g, 40min, 4°C; VS-21SMT, Vision, Daejeon, Korea)해서 얻었다.

2.3.3. Cell lysis & Ni-NTA 정제

Bacterial cell을 1 X phosphate buffer saline(PBS, pH 7.4)로 washing하였다. 1 X PBS 10ml에 PMSF를 1mM 농도로 넣고 Sonifier 250 (Branson Ultrasonics, Annemasse, France)를 이용해서 40% amplitude, 20sec, 3회 sonication하였다. 그리고 다시 원심분리 (3735g, 40min, 4°C; VS-550, Vision, Daejeon, Korea)해서 상층액을 걸러내고 pellet을 10ml의 1 X PBS (5mM imidazole, 8M UREA)를 이용해 suspension하였다. 그리고 다시 원심분리 (3735g, 40min, 25°C)하여 상층액만을 분리하였다. 상층액에 Ni-NTA agarose (Qiagen, Hilden, Germany)을 넣고 25°C, 20min 반응 한 후 polypropylene column에 1 X PBS (500mM imidazole, 8M UREA)로 용출시켜서 His6-tagged 단백질을 정제하였다.

2.3.4. Dialysis & CNBr 처리

정제된 His6-tagged 단백질을 Standard Regenerated Cellulose (RC) Membrane: Dry Spectra/Por®1-5 Dialysis Tubing & Trial Kits을 이용해서 5L의 5% AcOH에서 overnight 하여 투석한 후 동결건조하였다. 동결건조된 sample을 2ml의 50% formic acid로 녹인 후 CNBr을 10mg/ml로 처리 하고 8hr, 암반응하였다. 반응 후 반응액의 10배 volume의 distilled water (D.W.)를 넣어준 뒤 동결건조하였다.

2.3.5. HPLC 정제

동결건조된 Sample을 2ml의 50% formic acid에 녹인 후 reverse phase high performance liquid chromatograph (RP-HPCL) (Capcellpak C18, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm; Shisheido Co., Tokyo, Japan)를 이용해서 정제하였다. 조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 5%로 흘려주고, 60min 동안 5 \rightarrow 65%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다 (그림 7).

2.4. 분자량 측정

정제한 펩타이드 (peak1과 2)의 분자량은 부경대학교 공동실험실습관에 있는 Ultra High Resolution Q-TOF LC MS/MS system (maXis-HD, Bruker, Germany)을 이용하여 측정하였다 (그림 8).

2.5. DTT 처리 & HPLC 정제

정제한 재조합 Asterocin peak1과 2를 500ug씩 섞어서 800ul distilled water(D.W.)에 녹였다. 그리고 100ul의 Tris-HCl (PH8.0, 100mM)와 100ul의 DTT (100mM)를 처리하고 42 $^{\circ}$ C, 2hr 반응하였다. 반응 후 2.3.5와 동일한 방법으로 정제하였다.

2.6. 항균활성 측정

재조합으로 생산한 2가지 type의 Asterocin과 이들을 환원 시킨 linear type의 Asterocin 그리고 화학 합성한 (type3; 그림9) Asterocin의 항균활성을 측정하기 위해 ultrasensitive radial diffusion assay(URDA)를 사용하였다 (17). 사용한 균주는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Micrococcus luteus* KCTC 1071, *Escherichia coli* D31, *Salmonella enterica* ATCC13311, *Shigella flexneri* KCTC 2517, *Streptococcus iniae* FP 5229, *Aeromonas hydrophila* KCTC 2358, *Edwardsiella tarda* NUF 251, *Vibrio parahaemolyticus* KCCM 41664 그리고 *Candida albicans* KCTC9765 이다. 우선 TSB medium에서 균주를 Fish pathogen은 25℃, 다른 균주는 37℃에 overnight으로 pre-culture하였다. Pre-culture한 균주는 비색계 (biomerieux, Lyon, France)를 이용해서 10mM PB (pH 6.6)로 $\sim 10^8$ CFU/ml 희석하였다 (*C.albicans*는 $\sim 10^6$ CFU/ml으로 희석). 희석한 균주 0.5ml을 9.5ml의 underlay gel (10mM PB (pH 6.6), 0.03% TSB, 1% agarose)에 넣었다. Underlay gel은 square petri dish에 붓고, sample을 loading 하기 위해서 약 2.5mm 직경의 well을 만들었다. Well의 두께는 1mm 이고, 5ul의 0.01% AcOH로 녹인 sample을 loading하였다. Loading한 sample은 1000→3.9ug/ml까지 2배씩 순차적으로 희석하였다. Loading 후 25℃, 3hr 뒤에 overlay gel (10mM PB(pH 6.6), 6% TSB, 1% agarose)을 부었다. 37℃, overnight culture 한 뒤 clear zone을 측정하였다. Clear zone의 직경은 units (0.1mm = 1U)로 표현하였다. 합성한 펩타이드의 Minimal

effective concentration (MEC, ug/ml)은 X-intercept of a plot of units against the \log_{10} of the peptide concentration (18)으로 계산하였다. 활성 측정 실험은 3회 반복 진행하였고, 결과는 평균값으로 처리하였다.

2.7. Asteroцин precursor transcripts의 발현량 비교

Asteroцин precursor transcripts의 발현량을 알아보기 위해서 RT-qPCR 분석을 하였다. 분석에 사용한 조직은 coelomic epithelium, coelomocytes, gonad, pyloric caecae, stomach, Tiedmann's body 그리고 tube feet을 사용하였다. 이 중 발현량이 많았던 coelomic epithelium과 tube feet을 이용해서 immune challenge에 따른 Asteroцин precursor transcripts의 발현량을 0hr, 8hr, 16hr, 그리고 32hr에서 적출해서 분석하였다. Immune challenge는 해양생물에게 질병을 일으키는 병원균 중 하나인 *V. anguillarum* (19)을 이용하였다. *V. anguillarum*을 25°C에서 overnight culture 후 optical density (OD⁶⁰⁰)를 분광광도계 (Vitek Colorimeter #52-1210, Hach, USA)를 사용하여 측정값을 0.1로 맞추어 30ml의 균을 300L 해수에 풀어 실험을 진행하였다. Total RNA는 5마리 불가사리에서 각각 조직을 추출해서 모은 후 Hybrid-R (GeneAll, Seoul, Korea)을 이용해서 추출하였다. 그리고 RNA quality는 1.0% agarose gel 전기영동을 통해서 확인하고, Nano Drop Lite (Thermo fisher scientific, Wilmington, MA, USA)를 통해서 정량하였다. cDNA는 TOPscript cDNA synthesis Kit with oligo dT (dT18) (Enzynomics, Deajeon, Korea)를 이용해서 합성하

였다. Asterocin precursor cDNA와 대조군으로 사용된 factor1 α (EF1 α , accession No. AAT06175)cDNA는 각각 qPCR-F와 qPCR-R 그리고 EF1 α qPCR-F와 EF1 α qPCR-R를 사용해서 amplification과 elongation을 하였다. 불가사리의 조직들에 대한 Asterocin precursor transcripts의 발현량을 정량분석 하기 위해서 CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, USA)을 이용해서 RT-qPCR하였다 (20). 반응조건은 다음과 같다. (Total 20ul - 2 \times SYBR green premix (TOPreal qPCR 2X PreMix, Enzynomics, Daejeon, Korea) 10ul, forward primer (10 pmol/ul) 1ul, reverse primer (10pmol/ul) 1ul, 10 X diluted cDNA 1ul, nuclease free water 7ul; 95 $^{\circ}$ C 10 min, 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s and 72 $^{\circ}$ C 15 s with fluorescence recording at the end of each cycle). Product specificity를 보장하기 위해 Melt curve analysis은 60-90 $^{\circ}$ C 온도범위에서 시행하였다. Amplicons은 agarose gel을 이용한 product size확인을 통해서 분석하였다. EF1 α 의 발현량 대비 Asterocin precursor transcripts의 조직별 상대적 발현량 분석은 comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$)을 이용해서 분석하였다 (21). 총 3회의 반복실험 결과를 통계적으로 분석하였다. 통계분석은 GraphPad Prism software version 7.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, USA)의 one-way analysis of variance (ANOVA) with Duncan's multiple range post-hoc analysis (immune challenge data는 two-way ANOVA 방식 사용)을 이용해서 나타냈다. Relative fold expression은 평균 \pm 표준편차로 나타냈다. P 값 ($P < 0.05$)은 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

Ⅲ. 결과 및 토론

1. Asterocin의 cDNA 와 genomic DNA cloning

1.1. Asterocin의 cDNA cloning

Asterocin precursor의 전체 nucleotide sequence를 얻기 위해서 3' RACE PCR결과를 바탕으로 5' RACE PCR을 진행하였다. 5' RACE PCR 결과, Asterocin precursor의 nucleotide sequence는 78bp의 5' untranslated region (UTR), 766bp의 3' UTR, 그리고 234bp의 open reading frame (ORF)으로 총 1078bp로 구성되어 있다. 아미노산은 총 77개로, signal 4.1을 이용해서 19개의 signal peptide가 존재하는 것을 확인하였고, 이어서 24개의 prosequence, 33개의 mature peptides, 그리고 마지막으로 Leu⁷⁷으로 구성되어 있다 (그림 2-3).

cDNA cloning에 의해 분석된 서열을 보면 Asterocin의 경우 precursor protein으로 만들어 진 뒤 signal peptide (Met¹-Ala¹⁹)에 의해서 세포막 밖으로 분비되고, dibasic cleavage site (Lys⁴²-Arg⁴³)가 효소에 의해 절단되어 prosequence의 분리된 뒤 disulfide bonds의 형성 등의 post-translational modification을 통해서 mature form (Gly⁴⁴-Cys⁷⁶)을 형성 할 것으로 예상된다. 마지막의 Leu⁷⁷ 은 Cys-Leu 사이를 자르는 metalloprotease에 의해 잘린 것으로 예상된다. Metalloprotease는 protease의 한 종류로 주로 metal 관련 가수분해를 하는 enzyme인데, 기질 내

Cys-Leu사이 펩타이드 결합을 자른다는 보고가 있다 (22).

1.2. Asterocin의 genomic DNA cloning

Asterocin의 genomic DNA 서열을 분석한 결과, 2개의 exon이 존재하고 그 사이에 766bp의 intron이 존재하는 것을 알 수 있다. Exon1 에는 5' UTR (78bp), signal peptide (19aa), prosequence(24aa), 그리고 mature peptide (8aa)가 속한다. 그리고 766bp의 intron이 있고, 뒤이어 exon2에 mature peptide (25aa)와 prosequence(Leu)가 있고 이어서 3' UTR (766bp)가 있다 (그림2-3). 따라서 Asterocin의 mature peptide는 exon1의 8개의 아미노산과 exon2의 25개의 아미노산으로 구성된 33개의 아미노산 잔기를 가진 펩타이드임이 판명되었다.

BLAST 분석을 해본 결과 Asterocin은 다른 AMP들과의 homology가 거의 없었다. 하지만 Asterocin의 genomic DNA sequence에 있는 exon과 intron의 구조를 보면 다른 종류의 극피동물과 비슷한 exon과 intron 사이의 패턴을 찾을 수 있는데, 그 예로는 별불가사리 *Patiria miniata* (accession No. AKZP01101613), *Patiria pectinifera* (SfCrAMP, unpublished data), 해삼 *Patiria parvimensis* (accession No. JXUT0100825), 그리고 성게 *Strongylocentrotus purpuratus* (AAGJ05078 965)가 있다. Asterocin을 포함한 5가지의 AMP들 모두 2개의 exon 사이에 intron이 있는 패턴이 genomic DNA sequence에 나타난다 (그림 4). 이러한 패턴은 극피동물이 가지는 새로운 cysteine-rich AMPs의 prototype일 것으로 생각된다.

1 aaoggggaaaattgccgaaaaagagagagtcaaccataattcttctcacagcgatcatatcacagaaaaccgcaagttagccatcATG
M 1

82 AAGACCTTCATCGTTTTGCTGCTGCTGGCACTGGTCTGGCCGCTTTCGCCGTTGAGGAAATGGACGGAGATGACACCTTTGTTAAG
K T F I V L L L C L A L V A A F A V E E M D E D T F V K 31

Intron (766bp)

172 CGGGCCATGGATGACCTGGCTCAGGTCAACAAGCGGAGAAAGAGGACGCCCTACTTCAACTGTGACGATGAATGGGGCAACCCAGGG
R A M D D L A Q V I K R G K K R N A Y F N C D D E W G N P G 61

262 TGCATCTGCAAAATGGTCAGGGGCAAGAGTCTACCCCTCAACTGCCCTATAGactgagca tgcaggcacaggttcggggcaagaactgacta
C I C K L V R G K K S T L N C L * 77

352 cactgaaggattttaggacactgattactatcgtttttagacacagcaatacacagatggacttctctgtaacgctttaa tcaaatctaaa
442 tagggttttagcgggtagaaaagtaggcactttgtggtgcaaacggccgtggcacactaagaacgaaaggttctctcgaaatctgttctg
532 tacttaatacttcatttagcaggggcccctgctaattacttctgttctgcatcttctcattctcattaccggagaattacagatgaaaa
622 ccacgcagcatataaa tggccgtagagcagtagacagaa tgcctagttataccttggaggctctctcacatgctcgtcacctcctaca
712 gattgccacgcgcatcggcaatttggcgtcaattttctgtgacgcacatacggccgtcgcaaaaagttcgagcaaacgcagt
802 tgtaatttcccaacgaagatggcgtccctatgagagagagatagaagatgttgcgagttactcaatggccgttgatcactaaacttag
892 aaaactccatcatcgttcacgttctcccttgtaactcagcttgttataattgaaatgtaaaaaactaaaaatgcaattaaactgccc
982 aggttgttaacggggttgtgtaaaactacatacggacgaaaagcaataaa taaaactattcctcatgcaaaaaacaaaaa
1072 aaaaaa



그림 2. Asterocin의 전체 염기서열 및 아미노산서열.

Asterocin 염기는 총 1078bp이다. 5' UTR과 3' UTR은 각각 78bp와 766bp로 검은색 소문자로, ORF는 234bp로 검은색 대문자로 표시하였다. 아미노산은 총 77개로 19개의 signal peptide는 보라색, 24개의 prosequence는 하늘색, 33개의 mature peptides는 빨간색으로 각각 나타냈다. 그리고 마지막으로 Leu⁷⁷은 검은색으로 나타냈다.

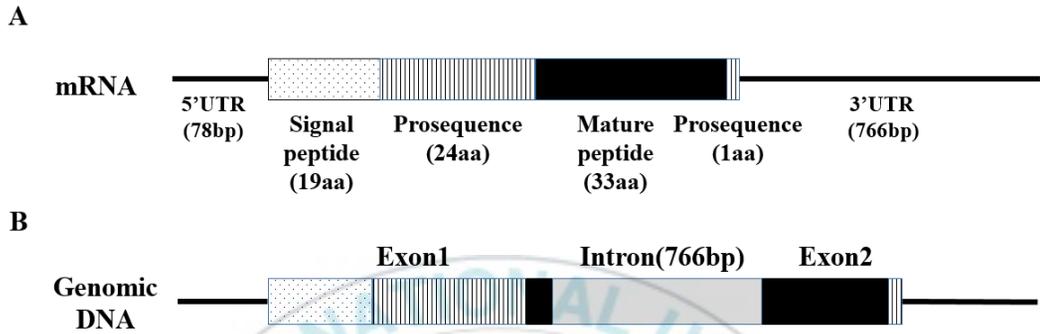


그림 3. Asterocin의 염기 및 아미노산서열 모식도.

Asterocin의 mRNA 염기 및 아미노산 모식도(A). Asterocin의 genomic DNA 염기 서열 모식도(B). Signal peptide는 점 패턴, prosequence는 줄무늬 패턴, mature peptide는 검은색 그리고 intron 부분은 회색으로 각각 나타냈다.

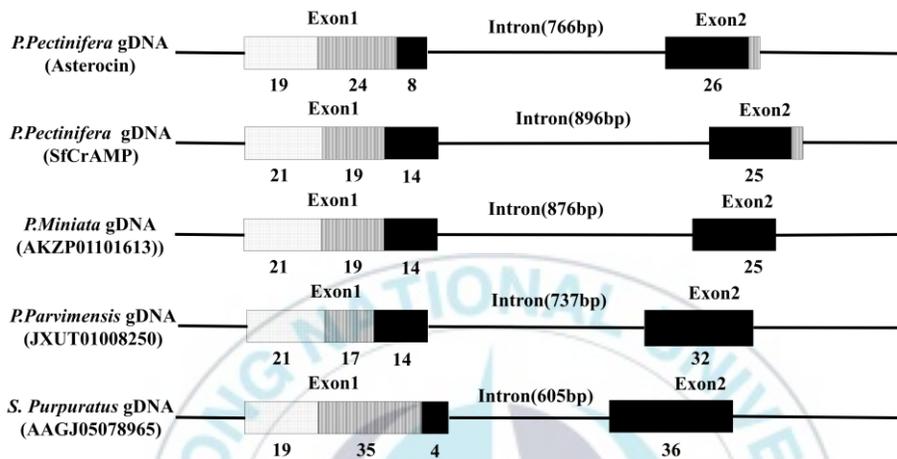


그림 4. Asterocin과 다른 종의 AMP유전자의 구조 비교.

별불가사리 *P. pectinifera*에 있는 Asterocin 및 SfCrAMP유전자의 구조와 *P. miniata*, *P. parvimensis*, 그리고 *S. Purpuratus*에 있는 AMP유전자의 구조.

2. 재조합 Asterocin 생산

Asterocin cDNA는 실험실에서 pET28a(+) vector에 Thioredoxin A 유전자를 넣어서 만든 pET28a(+)-TrxA에 ligation 한 뒤 *E.coli* BL21(DE3) cell에 transformation하였다. 그리고 *E.coli* BL21(DE3) cell을 IPTG 처리해서 과발현을 유도하였다. 과발현 유도 여부는 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다 (그림 6). 이후 His6-tagged 단백질을 Ni-NTA Agarose(Qiagen, Hilden, Germany)이용해서 정제하였다. 그리고 CNBr cleavage을 처리한 뒤 RP-HPCL (Capcellpak C18, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm; Shisheido Co., Tokyo, Japan)을 이용해서 정제하였다 (그림 7). 조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 5%로 흘려주고, 60min 동안 5 \rightarrow 65%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다. Asterocin으로 예상되는 peak는 2개가 각각 peak1은 26min (B용매: 24%) 그리고 peak2는 29min (B용매: 27%)에서 용출되었다.

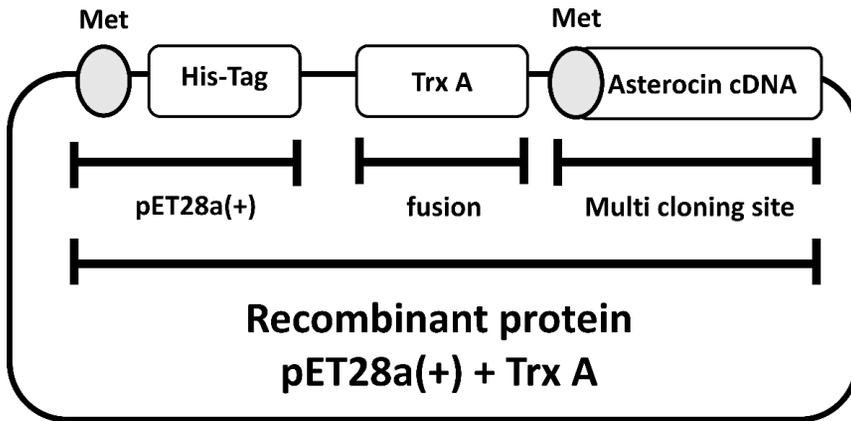


그림 5. 재조합 Asterocin plasmid.

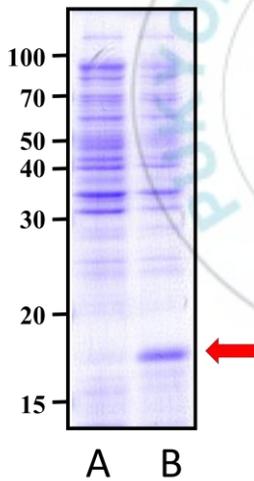


그림 6. Asterocin의 SDS-PAGE.

No induction (A). 10mM IPTC induction (B). 화살표로 표시한 band가 His6-tagged 단백질.

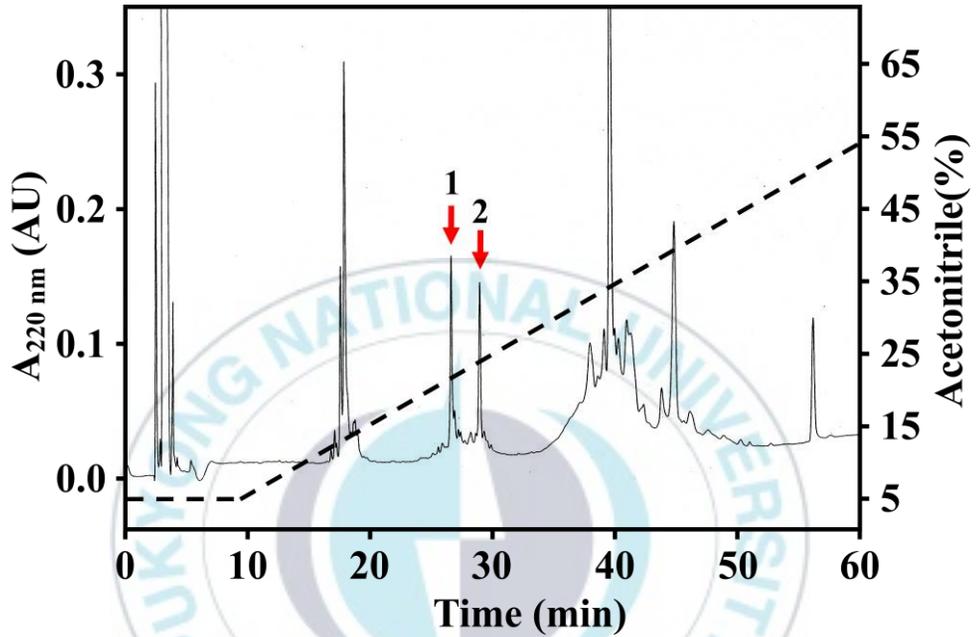


그림 7. 재조합 Asterocin의 peak1과 2의 정제.

정제조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 5%로 흘려주고, 60min 동안 5→65%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다.

3. 분자량 측정

정제한 2개 peak의 물질들의 분자량을 측정한 결과, peak1은 3713.7666 Da $[M+H]^+$, peak2는 3713.7680 Da $[M+H]^+$ 이었다 (그림 8). 분석한 재조합 Asterocin peak1과 2의 분자량은 Asterocin에 존재하는 4개의 cysteine이 2개의 disulfide bond를 형성할 때의 분자량인 3712.78 Da [Monoisotopic]과 동일한 값을 나타냈다. 분자량의 계산값과 실험값이 같다는 것은 재조합 Asterocin이 올바르게 합성되었다는 것을 의미한다. 그림 7에 나타나듯이 2개의 peak로 물질을 정제하였고, 이 2개의 물질이 분자량 측정을 통해서 모두 Asterocin임을 확인하였다. 이렇게 정제한 2개의 Asterocin은 Asterocin내에 존재 하는 4개의 cysteine 사이에 intramolecular disulfide bond의 패턴이 다른 것으로 추정된다 (그림 9).

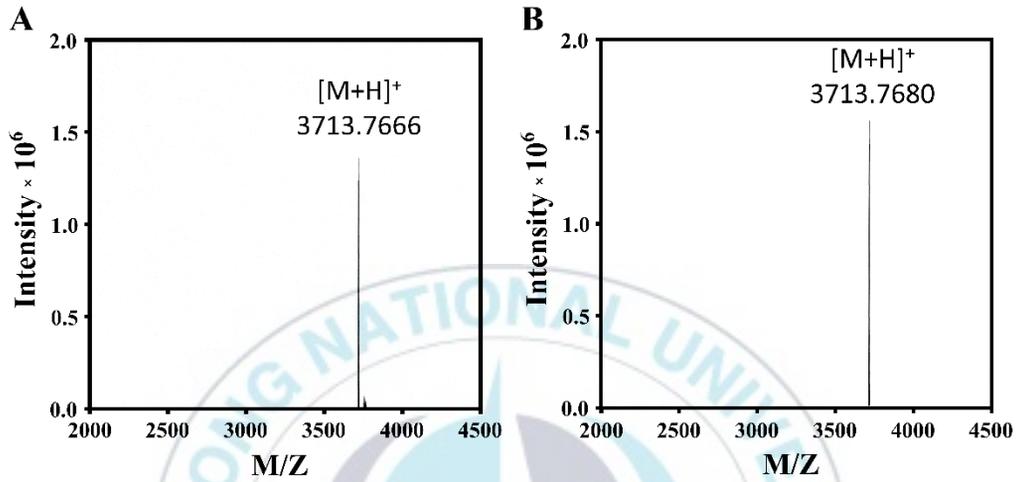


그림 8. 정제한 재조합 Asterocin의 분자량.
Peak1의 분자량 (A). peak2의 분자량 (B).

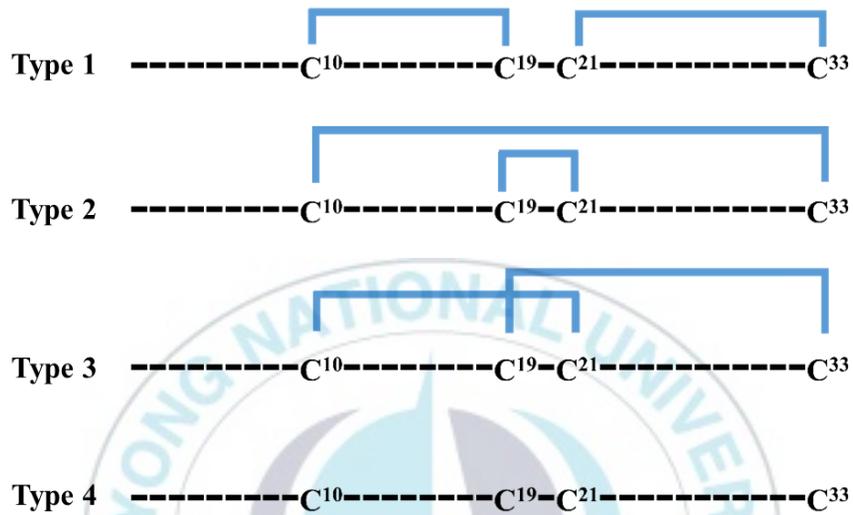


그림 9. Asteroцин의 disulfide 결합 패턴에 대한 모식도.

4. DTT 처리 및 HPLC 정제

2개의 disulfide bond를 가지고 있는 Asterocin의 disulfide bond를 환원시키기 위해서 DTT를 처리하였다. 재조합 Asterocin peak1과 2를 500ug씩 섞어서 800ul distilled water (D.W.)에 녹였다. 그리고 100ul의 Tris-HCl (PH8.0, 100mM), 100ul의 DTT (100mM)를 처리하고 42℃에서 2hr 반응하였다. 그리고 RP-HPLC (Capcellpak C18, 5μm, 4.6 × 250 mm; Shisheido Co., Tokyo, Japan)로 분석하였다. 조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 5%로 흘려주고, 60min 동안 5→65%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다. DTT를 처리하면 Asterocin은 환원되어 cyclic화합물이 아닌 linear화합물이 된다. 따라서 DTT를 처리한 물질들은 DTT 처리 전의 peak1 보다는 4min 그리고 peak2 보다는 1min 가량 늦게 용출되었다 (그림 10). 이 결과는 DTT로 peak1과 2의 disulfide bond를 끊었을 때 같은 물질인 linear형태가 되었다는 것을 의미한다. 그러나 2가지 재조합 Asterocin이 그림 9에 나타낸 어떠한 type의 결합형태를 갖는지 아직 알 수 없다.

본 실험실에서 이전에 같은 종의 starfish의 coelomic epithelium에서 정제하고 합성한 SfCrAMP (unpublished data)가 있다. 이 물질의 아미노산 서열은 Asterocin과 유사하다. SfCrAMP는 총 38개의 아미노산으로 구성되어 있는데, 이는 33개의 아미노산으로 구성된 Asterocin보다 5개 많지만, 47%의 identity를 보이고 아미노산 서열 중간에 서로 유사하게 보존되는 부분이 존재하였다 (그

림 11). 두 물질 모두 4개의 cysteine이 거의 동일한 위치에 있으며, PI 값 역시 9.13과 9.2로 비슷하였다. 따라서 Asterocin과 SfCrAMP는 그림 9에 나타낸 4가지 type중에서 같은 type의 disulfide bond를 가질 것이라 예상하였다. 본 실험실의 연구결과에 따르면 SfCrAMP는 그림 9에 나타낸 4개의 type중에 type3인 C1-C3/C2-C4 사이에서 disulfide bond를 가질 때 가장 강한 항균활성을 나타내었다 (data not shown). 따라서 type3의 disulfide bond를 가지는 Asterocin을 합성하였다.

합성한 type3의 Asterocin과 재조합 방식으로 생산한 peak1과 2 그리고 linear 형태의 Asterocin의 화학적 성질을 비교하기 위해서 RP-HPLC로 retention time (RT)을 측정하였다. 조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 20%로 흘려주고, 20min 동안 20→30%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다 (그림 12).

Peak1은 17min, peak2는 22.5min, DTT 처리한 Asterocin은 23.5min 그리고 합성한 Asterocin은 21.5min에 용출되었다. Peak1과 2는 합성물과 각각 다른 peak로 정제되었다. 그림 8에 나타낸 3가지 type의 disulfide 결합 중에서 합성물 (type3)과 다른 2가지 type (type1 또는 type2)중 하나의 disulfide 결합을 각각 갖는 것으로 보인다. 최종적으로 disulfide 결합을 가지는 3가지 type과 linear한 형태까지 총 4가지 type의 Asterocin을 얻었다.

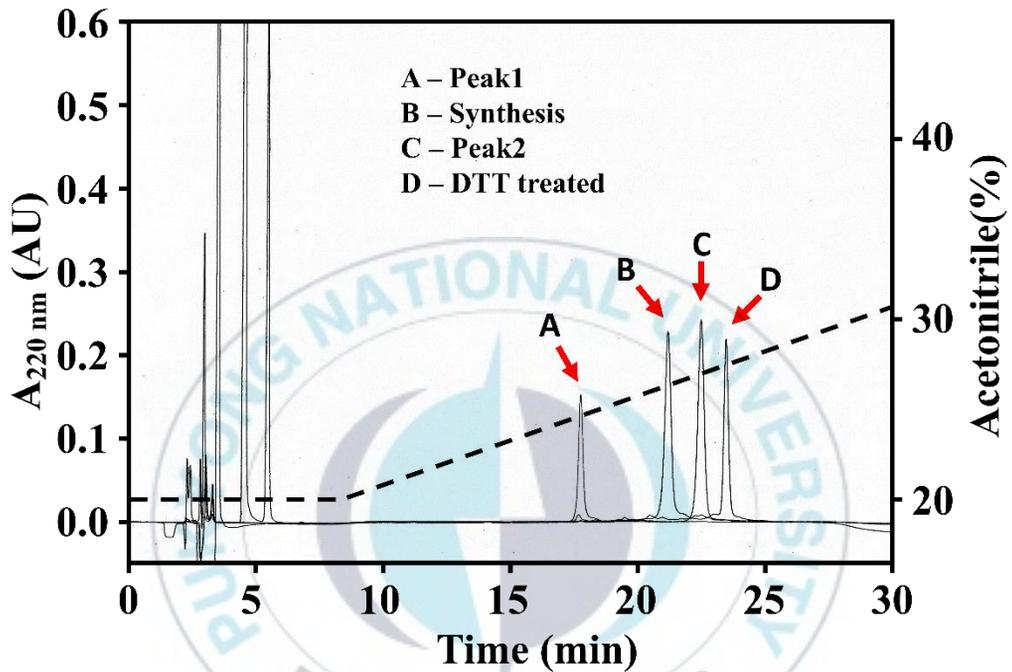


그림 12. Disulfide bond를 가지는 3가지 type의 Asterocin과 linear type의 Asterocin의 retention time (RT)비교.

0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 20%로 흘려주고, 20min 동안 20→30%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다.

5. 항균활성 측정

합성한 Asterocin (type3), 재조합 Asterocin (peak1과 2) 그리고 linear type Asterocin (type4)은 URDA법으로 항균활성을 측정하였다 (17). 항균활성을 측정하기 위해 총 10개 균주를 사용했다 (표 2). Gram-negative bacteria인 *Salmonella enterica* ATCC13311와 *Shigella flexneri* KCTC 2517 경우 minimal effective concentration (MEC)값이 각각 4.13 (ug/ml)에서 6.87 (ug/ml), 1.42 (ug/ml)에서 97.86 (ug/ml)로 4가지 type의 펩타이드에서 모두 활성을 나타냈다. 그리고 Gram-positive bacteria인 *B.subtilis* KCTC1021와 *Staphylococcus aureus* KCTC 1621 그리고 *Micrococcus luteus* KCTC 1071에서는 MEC가 11.15 (ug/ml)에서 >250 (ug/ml)로 측정되었다. 한편, Gram-positive bacteria인 *E. coli* D31에서는 합성한 Asterocin (type3)만 MEC가 >250(ug/ml)로 측정되었다. 또 Fish pathogens인 *Streptococcus iniae* FP 5229와 *Aeromonas hydrophila* KCTC 2358 그리고 *Edwardsiella tarda* NUF 251에서도 합성한 Asterocin (type3)만 MEC가 각각 181.93 (ug/ml), 93.65 (ug/ml), >250 (ug/ml)로 측정되었다. 그러나 *Vibrio parahaemolyticus* KCCM 41664와 fungus *Candida albicans* KCTC9765에서는 모두 활성을 보이지 않았다.

전체적으로 봤을 때 SfCrAMP의 항균활성 결과에서 예상한대로 C1-C3와 C2-C4 type의 disulfide bond가 형성될 때 Asterocin 역시 상대적으로 높은 minimal effective concentration (MEC) 활성을 나타내었다. 그러나 *S.enterica* ATCC13311의 경우에는 4가지 type의 Asterocin이 활성을 가지고 있었고, V.

parahaemolyticus KCCM 41664와 *C. albicans* KCTC9765 경우는 disulfide bond와 상관없이 활성이 없었다.

2개의 disulfide bond를 가지는 cysteine-rich AMP의 disulfide bond의 중요성에 대한 연구들에 따르면 disulfide bond가 가질 수 있는 특정 조합이 β -hairpin-like structure를 형성 하는데 필요하고, 이때 cysteine-rich AMP들이 가질 수 있는 완전한 항균활성을 가질 수 있다고 한다 (23-26).

Asterocin의 경우도 2개의 disulfide bond를 가질 때 비교적 강한 활성을 가지며, C1-C3와 C2-C4 조합의 disulfide bond가 다른 조합에 비해서 항균활성이 강한 것으로 봐서, 완전한 항균활성을 갖는데 유리한 형태라고 생각된다. 그러나 disulfide bond가 없는 linear한 형태에서도 항균활성을 나타내기 때문에, disulfide bond가 물질의 안정성이나 folding에 영향을 주어서 완전한 기능을 갖는데 기여하지만 disulfide bond 자체가 단순히 항균활성을 보이는데 있어서는 반드시 요구되지는 않는 것으로 보인다.

표 2. Asterocin의 3가지 disulfide bond 패턴과 linear한 형태의 Asterocin을 이용한 여러 균주에 대한 항균활성 측정.

Microbe	^a Minimal effective concentration (ug/mL)			
	Asterocin Synthesis (Type 3)	Asterocin Peak1	Asterocin Peak2	Asterocin linear type (Type 4)
Gram-positive				
<i>Bacillus subtilis</i> KCTC 1021	20.53	>250	>250	>250
<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	11.15	100.26	100.81	172.14
<i>Micrococcus luteus</i> KCTC 1071	36.18	>250	>250	>250
Gram-negative				
<i>Escherichia coli</i> D31	>250	ND	ND	ND
<i>Salmonella enterica</i> ATCC13311	4.13	10.76	4.95	6.87
<i>Shigella flexneri</i> KCTC 2517	1.42	10.3	97.86	22.25
Fish pathogens (Gram-positive)				
<i>Streptococcus iniae</i> FP 5229	181.93	ND	ND	ND
Fish pathogens (Gram-negative)				
<i>Aeromonas hydrophila</i> KCTC 2358	93.65	ND	ND	ND
<i>Edwardsiella tarda</i> NUF 251	>250	ND	ND	ND
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> KCCM 41664	ND	ND	ND	ND
Fungus				
<i>Candida albicans</i> KCTC9765	ND	ND	ND	ND

^a 항균활성 측정은 3 번 반복 실험으로 진행 하였고, 그 평균값을 표시.

^b ND 는 250 ug/mL 이상의 농도의 펩타이드가 사용되어도 활성이 없는 경우.

6. Asteroцин precursor transcripts의 발현량 비교

Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR)을 이용해서 불가사리의 7개 조직에 대한 Asteroцин precursor transcripts의 발현량을 측정하였다 (그림 13A). 결과를 보면 Asteroцин이 최초정제 되었던 tube feet에서 가장 많은 발현량을 보였고 coelomic epithelium에서 그다음으로 많은 발현량을 보였다. 그리고 나머지 5개 조직의 값들은 통계적으로 오차범위 안에서 유의미한 결과를 얻을 수 없었다. 발현량이 많았던 tube feet과 coelomic epithelium을 사용하여 immune challenge에 따른 발현량을 측정하였다 (그림 13B). Asteroцин coding region을 target으로 하는 gene-specific primer를 제작해서 사용하였으며, EF1 α 를 invariant control로 사용하였다 (20). Immune challenge 결과에서는 시간대 별로 두 조직에서 발현량이 서로 비슷한 패턴을 보였다. 0hr~ 16hr까지는 두 조직에서 모두 발현량이 줄어들었지만 32hr에서 다시 증가하였다. 32hr에서 갑자기 증가한 원인은 추가적인 연구가 필요하겠지만, 32hr에 해당하는 조직을 적출시 불가사리 조직들의 부패가 심했었다. 이를 통해 유추 해볼 수 있는 점은 불가사리에게 적용한 immune challenge조건이 불가사리에게 치명적으로 작용한 것이 아닌가 생각된다. 그럼에도 불구하고 0hr부터 지속적으로 증가하는 양상을 보이지 않았다. 따라서 Asteroцин의 경우 외부 병원균에 의해 유도되는 물질이라기보다는 tube feet 이나 coelomic epithelium에서 항시 발현되어 유지되면서 선천성면역 반응에 기여를 하는 물질로 추정된다.

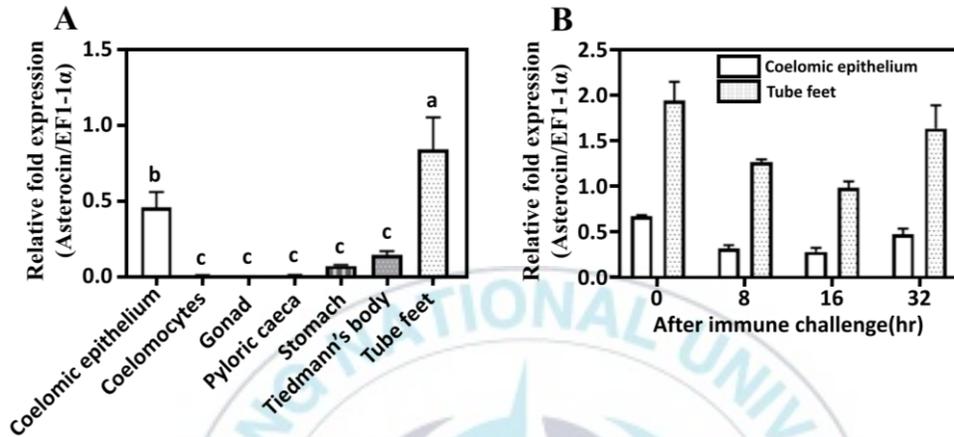


그림 13. Asterocin precursor transcripts의 발현량 비교.

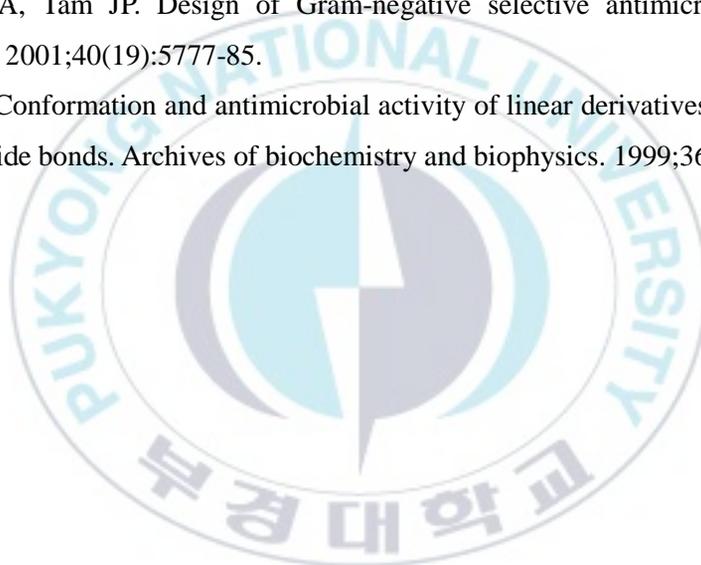
Coelomic epithelium, coelomocytes, gonad, pyloric caeca, stomach, tiedmann's body 그리고 tube feet까지 총 7개의 조직에서의 Asterocin precursor transcripts의 발현량을 그래프로 나타냈다 (A). Coelomic epithelium과 tube feet에서의 immune challenge에 따른 Asterocin precursor transcripts의 발현량을 그래프로 나타냈다 (B).

IV. 참고 문헌

1. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3:238.
2. Boman HG. Peptide Antibiotics and Their Role in Innate Immunity. *Annual Review of Immunology*. 1995;13(1):61-92.
3. Brown KL, Hancock REW. Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Current Opinion in Immunology*. 2006;18(1):24-30.
4. Huang Y, Huang J, Chen Y. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function. *Protein & Cell*. 2010;1(2):143-52.
5. Wimley WC. Describing the Mechanism of Antimicrobial Peptide Action with the Interfacial Activity Model. *ACS chemical biology*. 2010;5(10):905-17.
6. Andersson DI, Hughes D, Kubicek-Sutherland JZ. Mechanisms and consequences of bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Drug Resistance Updates*. 2016;26(Supplement C):43-57.
7. Bulet P, Stöcklin R, Menin L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunological Reviews*. 2004;198(1):169-84.
8. Falanga A, Lombardi L, Franci G, Vitiello M, Iovene MR, Morelli G, et al. Marine Antimicrobial Peptides: Nature Provides Templates for the Design of Novel Compounds against Pathogenic Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(5):785.
9. Tincu JA, Taylor SW. Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(10):3645-54.
10. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science (New York, NY)*. 1999;284(5418):1313-8.
11. Ellis AE. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*. 2001;25(8):827-39.
12. Ullal AJ, Wayne Litaker R, Noga EJ. Antimicrobial peptides derived from hemoglobin are expressed in epithelium of channel catfish (*Ictalurus punctatus*,

- Rafinesque). *Developmental & Comparative Immunology*. 2008;32(11):1301-12.
13. Li C, Haug T, Styrvold OB, Jørgensen TØ, Stensvåg K. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental & Comparative Immunology*. 2008;32(12):1430-40.
 14. Li C, Blencke H-M, Haug T, Stensvåg K. Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. *Developmental & Comparative Immunology*. 2015;49(1):190-7.
 15. Li C, Haug T, Moe MK, Styrvold OB, Stensvåg K. Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental & Comparative Immunology*. 2010;34(9):959-68.
 16. Jang WS, Kim KN, Lee YS, Nam MH, Lee IH. Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*. *FEBS letters*. 2002;521(1-3):81-6.
 17. Seo J-K, Go H-J, Kim C-H, Nam B-H, Park NG. Antimicrobial peptide, hdMolluscidin, purified from the gill of the abalone, *Haliotis discus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2016;52(Supplement C):289-97.
 18. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SSSL, Jackson R, Eisenhauer P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *Journal of Immunological Methods*. 1991;137(2):167-73.
 19. Frans I, Michiels CW, Bossier P, Willems KA, Lievens B, Rediers H. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*. 2011;34(9):643-61.
 20. Kim CH, Kim EJ, Go HJ, Oh HY, Lin M, Elphick MR, et al. Identification of a novel starfish neuropeptide that acts as a muscle relaxant. *Journal of Neurochemistry*. 2016;137(1):33-45.
 21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-8.

22. Moncrief JS, Obiso R, Jr., Barroso LA, Kling JJ, Wright RL, Van Tassell RL, et al. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. *Infection and Immunity*. 1995;63(1):175-81.
23. Laederach A, Andreotti AH, Fulton DB. Solution and micelle-bound structures of tachyplesin I and its active aromatic linear derivatives. *Biochemistry*. 2002;41(41):12359-68.
24. Mani R, Waring AJ, Lehrer RI, Hong M. Membrane-disruptive abilities of β -hairpin antimicrobial peptides correlate with conformation and activity: A ^{31}P and ^1H NMR study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 2005;1716(1):11-8.
25. Muhle SA, Tam JP. Design of Gram-negative selective antimicrobial peptides. *Biochemistry*. 2001;40(19):5777-85.
26. Rao AG. Conformation and antimicrobial activity of linear derivatives of tachyplesin lacking disulfide bonds. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1999;361(1):127-34.



Part II.

모델 펩타이드(α AL14)의 산업적
활용을 위한 유전자 조합과
재조합 펩타이드 발현

Gene assembly and recombinant expression of a model peptide (α AL14) for the application of
bioindustry

Tae Kwan Lee

*Department of Biotechnology, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Peptides are small polymers typically composed of 50 or less amino acids. Although numerous bioactive peptides have been reported up to date, mass production of peptides are often difficult limiting their utilization in pharmaceutical or cosmetic industries. This study aims to propose an effective and economic mass production method for these bioactive peptides. The expression plasmid is constructed firstly by fusing Thioredoxin A sequence into pET28a(+) vector, then the nucleotide sequences of desired peptides with Met at the beginning were inserted using restriction enzyme sites in the multiple cloning site (pET28a(+)-TrxA-peptides). The plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and overexpression of the recombinant fusion protein was induced. Then, each peptide is separated by cyanogen bromide (CNBr) digestion, which cleaves C-terminus of Met residues. This method allows the simultaneous production of different peptides. Moreover, Met changes in the CNBr digestion leaving a homoserine lactone at the C-terminus contributing to structural stability of recombinant peptide.

I. 서론

펩타이드는 약 50개 이내의 아미노산으로 구성된 단위체이다. 펩타이드의 경우 단백질과 달리 크기가 작기 때문에 화학적 방법으로 생산도 가능하고, 쉽게 변이가 가능하다. 또한 적은 양으로 강한 생리 활성을 갖기 때문에 의약품부터 화장품, 그리고 각종 바이오 소재로도 많이 연구되고 있다. 특히 항균 활성 펩타이드의 경우 넓은 범위의 항균활성, 그리고 주로 미생물의 막을 표적으로 하기 때문에 항생제에 내성 균주들도 내성을 가지기가 어렵다 (1). 항생제의 경우 특이적으로 작용하기 때문에 변이를 통해서 내성을 가질 수 있지만, 세포막의 경우는 모든 세균이 가지고 있는 구조이고 필수적 요소이기 때문에 변이를 통한 내성을 갖기가 힘들다. 그래서 항생제 내성을 갖는 균주에 대한 대안으로 각광을 받고 있다 (2). 그러나 이러한 장점에도 불구하고 아직까지 펩타이드는 생산비용 때문에 상용화하지 못하고 있다. 현재 국내외에서 펩타이드를 효율적으로 생산하기 위한 연구가 진행되고 있다.

펩타이드를 생산하는 방법은 크게 두 가지가 있는데, 하나는 화학적 합성을 통해서 생산하는 방법이고, 나머지 하나는 생물공학적인 방식으로 생산하는 방법이다. 화학적 합성법의 경우 Solid-phase (3)와 liquid phase (4)가 있는데 가격이 비싸서 대량생산이 힘들기 때문에 상용화하기에는 맞지 않다 (5). 또한 기술적으로 아미노산 개수가 30개가 넘어가면 합성이 힘들다는 단점이 있다. 생

물공학적 방식은 재조합 균주를 이용해서 생산하는 방식이다. 현재 많은 항균 활성 펩타이드가 재조합 균주를 이용하는 방식으로 생산되고 있다 (6). 이용하는 재조합 균주는 *Escherichia coli* (7), *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas putida* 그리고 *Bacillus subtilis* (8) 등이 있다.

생물공학적 방식의 방법에서는 펩타이드가 숙주세포 내에서 독성을 가져서 숙주세포의 성장을 저해하는 것을 조절 할 수 있어야 한다. 그리고 펩타이드는 단백질에 비해 짧고 구조가 단순하기 때문에 protease에 대한 안정성이 매우 떨어진다. 이런 점들을 해결하기 위해서 fusion expression을 사용한다 (1).

본 연구에서는 이렇게 활용가치가 높은 펩타이드들을 효율적으로 대량생산하는 방법을 제시하고자 한다. 사용한 방식은 재조합 균주를 이용해서 fusion expression 방식을 사용하였다. 실험에서 사용한 펩타이드는 실험실 내에서 design한 model antimicrobial peptide인 α AL14로, 총 14개의 아미노산으로 구성되어 있으며, α -helix 구조를 취하는 염기성 펩타이드이다.

본 연구의 방법은 하나의 펩타이드의 생산이 아닌 한번의 발현과 정제과정으로 여러 개의 펩타이드를 생산해 내는 시스템을 구축하는 것이 목적이다. 여러 개의 펩타이드를 분리 정제 하는 과정에서 CNBr이 사용되는데, CNBr은 단백질에서 Met과 그 뒤에 결합되어 있는 아미노산의 사이를 자르는 시약이다. 이러한 원리를 이용하여, 생산할 펩타이드 사이에 Met 서열을 넣고 발현을 한 뒤, CNBr 처리해서 각각의 펩타이드를 분리 정제 할 수 있다. 또한

CNBr 처리를 할 경우 C-말단에 있는 Met은 homoserine lactone (HSL)으로 modification이 일어난다 (그림 1). 이럴 경우 C-terminal exopeptidase에 대한 분해가 저해되어 펩타이드의 안정성을 높이는 효과가 있다.

본 연구에서 사용한 방법에서 CNBr은 여러 개의 펩타이드를 한번에 분리 정제함과 동시에 C-말단의 안정성을 확보 할 수 있게 한다. 따라서 CNBr cleavage site인 Met이 생산하고자 하는 펩타이드서열의 마지막에 있어야 하기 때문에 펩타이드를 정제 하는 단계에서 Met이 마지막에 포함된 펩타이드들의 정제를 시도하였다. 그리고 이 연구의 목적이 상용화이기 때문에 식용으로 사용되지 못하고 버려지는 미이용자원인 돌돔의 내장을 이용하여 단백질을 추출하고 바로 CNBr 처리를 해서 물질을 정제하는 방식으로 본 연구에서 사용한 방법에 바로 적용이 가능한 펩타이드를 정제하였다.

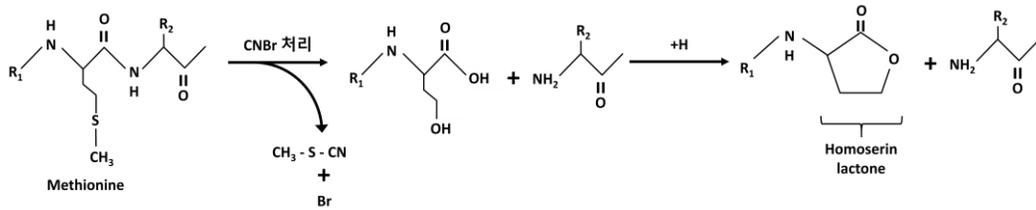


그림 1. 펩타이드와 CNBr과의 반응.

CNBr을 처리하면 Met과 그 뒤 아미노산 사이의 펩타이드 결합이 끊어지고, Met의 S-CH₃가 떨어져나가면서 Met의 C-말단은 Homoserine lactone으로 modification 된다.



II. 재료 및 방법

1. 실험동물

남천 해변시장에서 돌돔 (*Oplegnathus fasciatus*)의 내장을 얻었다. 그리고 실험하기 전까지 -80°C deep freezer에 보관하였다.

2. 실험방법

2.1. 재조합 펩타이드 생산

2.1.1. DNA Oligonucleotides 제작

재조합 plasmid에 넣을 펩타이드는 실험실에서 design한 model antimicrobial peptide인 αAL14 의 서열을 사용하였다. αAL14 의 아미노산 서열은 AAWKLLKALAKAAL로 총 14개의 아미노산으로 구성되어 있다. 정제과정에서 cyanogen bromide (CNBr) cleavage를 이용해서 정제하기 위해 14개의 아미노산 앞쪽에 Methionine(Met)을 넣어서 총 15개의 아미노산 서열을 사용하였다. 그리고 Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/revtrans.htm>)을 이용해서 총 15개의 아미노산으로 번역되는 총 45bp의 염기서열을 결정하였다. 그리고 45bp서열 양 끝에 각각 EcoR I (G/AATTC), Xho I (C/TCGAG)

의 enzyme cleavage site를 넣어서 α AL14-F를 제작하고 상보적인 α AL14-R를 제작하였다. 그리고 Met이 homoserine lactone (HSL)으로 modification 될 때 그 물질의 C-말단 안정성을 실험하기 위해서 α AL14 아미노산서열 마지막에 Met을 추가한 α AL14-M-F와 α AL14-M-R을 제작하였다. 그리고 2개의 펩타이드가 하나의 multi-peptide로 발현된 후 CNBr cleavage를 이용해서 각각 분리 정제 가능한지를 알아보기 위해, 2set의 α AL14 아미노산 서열 사이에 5개의 아미노산 (EADEM)을 추가한 α AL14-EADEM-F와 α AL14-EADEM-R까지 제작하였다 (그림 2). 앞서 설명한대로 α AL14는 basic한 아미노산들이 많아서 2개의 α AL14를 한번에 발현할 경우 재조합 균주에 독성으로 작용할 수 있기 때문에 acidic한 아미노산인 EADE와 CNBr cleavage를 위한 M을 포함하는 총 5개의 아미노산을 2개의 α AL14 서열 사이에 넣어 주었다. 표 1에 각각의 염기 서열을 나타냈다. 각각의 oligonucleotides는 마크로젠에 의뢰해서 합성하였다.

표 1. Oligonucleotides 서열.

Oligonucleotides	Sequence(5'→3')
raAL14-F	AATTCATGGC GGCCTGGAAA CTGCTGAAAG CGTTGGCAA GCGGCCCTA TAAC
raAL14-R	GTACCGCCGG ACCTTTGACG ACTTTCGCAA CCGTTTCCGC CGGGATATTG AGCT
raAL14-M_F	AATTCATGGC GGCCTGGAAA CTGCTGAAAG CGTTGGCAA GCGGCCCTA ATGGAAGCGG ATGAG TAAC
raAL14-M_R	GTACCGCCGG ACCTTTGACG ACTTTCGCAA CCGTTTCCGC CGGGATTACC TTCGCCTACT CATTGAGCT
raAL14-EADEM-F	AATTCATGGC GGCCTGGAAA CTGCTGAAAG CGTTGGCAA GCGGCCCTA GAAGCGGATG AGATG GCGGC CTGAAACTG CTGAAAGCGT TGGCAAAGGC GGCCCTATAAC
raAL14-EADEM-R	GTACCGCCGG ACCTTTGACG ACTTTCGCAA CCGTTTCCGC CGGGATCTTC GCCTACTCTA CCGCCGGACC TTTGACGACT TTCGCAACCG TTCCGCCGG GATATTGAGC T

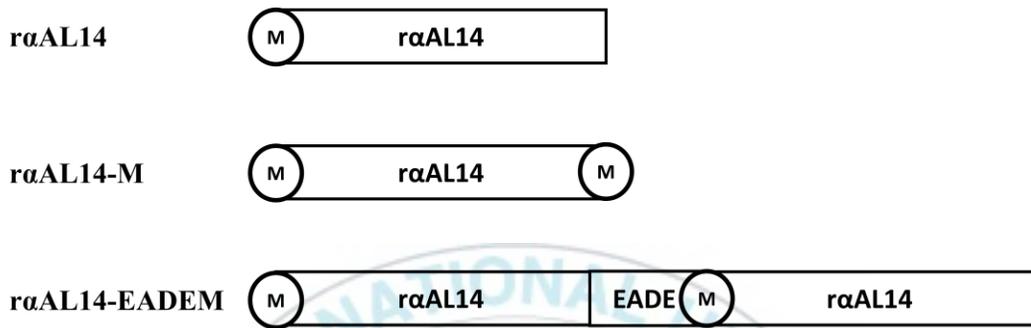


그림 2. rαAL14와 rαAL14-M 그리고 rαAL14-EADEM의 아미노산 모식도.

2.1.2. 재조합 Plasmid 구축

발현에 사용한 plasmid vector는 실험실에서 pET28a(+) vector 내에 Thioredoxin A 유전자를 fusion시켜 modification한 pET28a(+)-TrxA vector를 사용하였다 (9). 그리고 oligonucleotides와 ligation 하기 위해서 pET28a(+)-TrxA vector는 enzyme EcoR I, Xho I 로 처리하였다 (1 X FastCut Buffer 5ul, EcoR I 1ul, Xho I 1ul, pET28a(+)-TrxA (871ng/ul) 5ul, sterilized water 38ul; 37°C 15min). Enzyme 처리 후 1.5 agarose gel로 전기영동하고 LaboPass Gel Extraction kit (Cosmo genetech, Seoul, Korea)을 사용해서 추출하였다. 2.1.1.에서 합성한 3set의 oligonucleotides는 각각 T4 Polynucleotide Kinase (enzymomics, Daejeon, Korea)를 이용해서 phosphorylation하고, 동시에 hybridization하였다 (10 X T4polynucleotide kinase buffer 2ul, T4 polynucleotide kinase (10units/ul) 1ul, α AL14-F (100pmol) 1ul, α AL14-R (100pmol) 1ul, sterilized water 15ul; 37°C 60min, 95°C 5min, 85°C 1sec, 85°C→30°C / 20min). 그리고 hybridization한 oligonucleotides와 enzyme처리한 pET28a(+)-TrxA vector는 DNA Ligation kit<Mighty Mix> (Takara, Japan)를 이용해서 ligation한 후 *E.coli* DH5 α 에 transformation하였다. Ice에서 *E.coli* DH5 α 100ul에 ligation한 sample 8ul을 넣고 30min 방치하였다. 그리고 42°C에서 30sec heat-shock을 주고, 다시 ice에서 30sec 안정화 시킨 후 LB medium 400ul를 넣고 37°C, 1hr culture하였다. 그리고 kanamycin을 넣은 KLB agar plate (kanamycin 50ug/ml)에 도말한 후 37°C, overnight culture하였다. Single colony를 다시 5ml의

ALB medium (ampicillin 50 ug/ml)에서 37℃, 180rpm, overnight culture하였다. 이후 Exprep plasmid SV (Gene All, Seoul, Korea)을 이용해서 plasmid를 추출 후 마크로젠에 sequencing을 의뢰해서 확인하였다 (그림 3). rαAL14-M과 rαAL14-EADEM도 같은 방식으로 진행하였다.



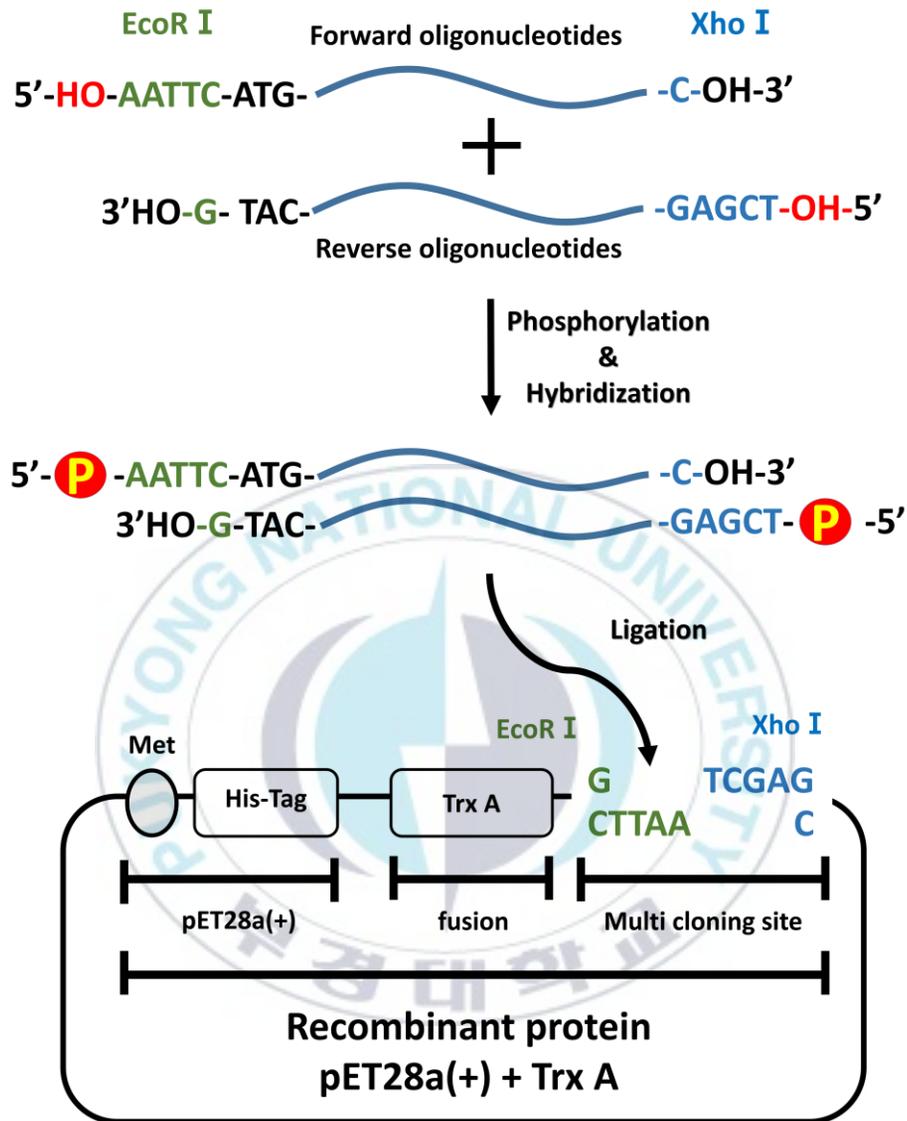


그림 3. Gene assembly 및 plasmid 구축.

Forward oligonucleotides와 reverse oligonucleotides는 phosphorylation과 hybridization을 동시에 진행하였다. 그리고 enzyme (EcoR I, Xho I)을 처리한 pET28a(+)-TrxA vector에 ligation해서 plasmid를 구축하였다.

2.1.3. 재조합 단백질 발현

구축된 plasmid를 *E.coli* BL21 (DE3)cell에 transformation한 뒤 kanamycin이 들어간 KLB agar plate (kanamycin 50ug/ml)에 도말해서 37°C, overnight culture하였다. Single colony를 다시 5ml의 KLB medium (kanamycin 50ug/ml)에서 37°C, 180rpm, 4hr culture 후 500ml의 KLB medium (kanamycin 50ug/ml)에 scale-up해서 optical density (OD⁶⁰⁰)를 분광광도계 (Vitek Colorimeter #52-1210, Hach, USA)로 측정한 값이 0.6~0.7 될 때까지 37°C, 180rpm에서 약 3hr culture하였다. 그리고 IPTG를 1mM농도가 되도록 넣고 37°C, 180rpm, 4hr culture하였다. Bacterial cell은 원심분리 (830g, 40min, 4°C; VS-21SMT, Vision, Daejeon, Korea)해서 얻었다.

2.1.4 Cell lysis & Ni-NTA 정제

Bacterial cell을 1 X phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 washing하였다. 1 X PBS 10ml에 PMSF를 1mM농도로 넣고 Sonifier 250 (Branson Ultrasonics, Annemasse, France)를 이용해서 40%amplitude, 20sec, 3회 sonication하였다. 다시 원심분리 (3735g, 40min, 4°C)해서 상층액을 걸러내고 pellet을 10ml의 1 X PBS (5mM imidazole, 8M UREA)로 suspension하였다. 그리고 다시 원심분리 (3735g, 40min, 25°C)하여 상층액만을 분리하였다. 상층액에 Ni-NTA agarose (Qiagen, Hilden, Germany)을 넣고 25°C에서 20min간 반응 한 후 polypropylene column에 1 X PBS (500mM imidazole, 8M UREA)로 용출시켜서 His6-tagged 단백질을 정제하였다 (10, 11).

2.1.5. Dialysis & CNBr 처리

정제한 His6-tagged 단백질을 Standard Regenerated Cellulose (RC) Membrane: Dry Spectra/Por®1-5 Dialysis Tubing & Trial Kits을 이용해서 5L의 5% AcOH에서 overnight 하여 투석한 후 동결건조하였다. 동결건조한 sample을 2ml의 50% formic acid로 녹인 후, CNBr을 10mg/ml로 처리 하고 8hr동안 암반응하였다 (12-14). 반응 후 20ml의 distilled water(D.W.)를 넣어준 뒤 동결건조하였다.

2.1.6. HPLC 정제

동결건조한 sample을 2ml의 50% formic acid에 녹인 후 reverse phase high performance liquid chromatograph (RP-HPCL) (Capcellpak C18, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm; Shisheido Co., Tokyo, Japan)를 이용해서 정제하였다. 조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water(A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 20%로 8min 흘려주고, 40min동안 20 \rightarrow 60%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제 하였다.

2.2. 분자량 측정

α AL14와 α AL14-M 그리고 α AL14-EADEM 분자량은 부경대학교 공동실험실습 관에 있는 Ultra-High Resolution Q-TOF LC MS/MS system (maXis-HD, Bruker, Germany)로 측정하였다.

2.3. Carboxypeptidase Y 처리

α AL14 (-OH type)와 α AL14-M (-HSL type)의 각각 10ug은 RP-HPLC를 이용해서 정량하였으며, 10ul의 1 X PBS에 녹인 뒤 1ul의 Carboxypeptidase Y (*S.cerevisiae*, C3888; SIGMA, St. Louis, MO, USA) (0.25ug/ul)를 각각 넣어서 35°C에서 2hr동안 반응하였다. 반응 후 동결건조하였다.

2.4. 항균활성 측정

정제한 α AL14 (-OH type)와 α AL14-M (-HSL type) 그리고 carboxypeptidase Y를 처리한 α AL14 (-OH type)와 α AL14-M (-HSL type)의 항균활성을 ultrasensitive radial diffusion assay (URDA)를 사용하여 측정하였다 (15). 사용한 균주는 *Bacillus subtilis* KCTC 1021를 사용하였다. 우선 tryptic soy broth (TSB) medium에서 균주를 37°C에 overnight으로 pre-culture하였다. Pre-culture한 균주는 비색계 (biomerieux, Lyon, France)를 이용해서 10mM PB (pH 6.6)로 $\sim 10^8$ CFU/ml 희석하였다. 희석한 균주 0.5ml을 9.5ml의 underlay gel (10mM PB (pH 6.6), 0.03% TSB, 1% agarose)에 넣었다. Underlay gel은 square petri dish에 붓고, sample을 loading 하기 위해서 약 2.5mm 직경의 well을 만들었다. Well의 두께는 1mm 이고, 5ul의 0.01% AcOH로 녹인 sample을 loading하였다. Loading한 sample은 1000→3.9ug/ml까지 2배씩 순차적으로 희석하였다. Loading 후 25°C, 3hr 뒤에 overlay gel (10mM PB(pH 6.6), 6% TSB, 1% agarose)을 부었다. 37°C에서

overnight culture 한 뒤 clear zone을 측정하였다. Clear zone의 직경은 units (0.1mm = 1U)로 표현 하였다. 합성한 펩타이드의 Minimal effective concentration (MEC, ug/ml)은 X-intercept of a plot of units against the \log_{10} of the peptide concentration (16)으로 계산하였다. 활성 측정 실험은 3회 반복 진행하였고, 결과는 평균값으로 처리하였다.

2.5. 돌돔 내장 추출

돌돔의 내장 (10g)에 30ml의 5% AcOH를 첨가 한 뒤 homogenizer (IKA[®] T10 basic ULTRA-TURRAX, USA)로 조직을 잘게 분쇄하였다. 그리고 원심분리 (13,000 g, 20min; VS-21SMT, Vision, Daejeon, Korea)를 하여 상층액을 분리 한 뒤 동결건조하였다.

2.5.1. CNBr 처리

동결건조한 돌돔 내장의 추출물을 2ml의 50% formic acid로 녹인 후, CNBr을 10mg/ml로 처리하고 8hr동안 암반응을 하였다. 반응 후 반응액의 10배 volume의 distilled water (D.W.)를 넣고 동결건조하였다. 이후 실험방법 2.3 및 2.4와 동일한 방식으로 carboxypeptidase Y를 처리한 뒤 항균활성을 측정하였다.

2.5.2. Enzyme 처리

CNBr을 처리한 돌돔 내장 추출물은 Trypsin (from bovine pancreas TPCK treated, T1426; SIGMA, St. Louis, MO, USA), α -chymotrypsin (TLCK treated from bovine pancreas, C3142; SIGMA, St. Louis, MO, USA), 그리고 pronase (Roche, Switzerland)와 각각 반응시켰다. CNBr을 처리한 돌돔 내장 추출물은 650ng을 사용하였다. Trypsin과 chymotrypsin은 30°C에서 1hr 그리고 pronase는 42°C에서 20min 반응시켰다. 항균활성 측정은 실험방법 2.4와 동일하게 측정하였다.



Ⅲ. 결과 및 토론

1. 재조합 펩타이드 발현 및 정제

α AL14 (-OH type), α AL14-M (-HSL type) 그리고 α AL14-EADEM (α AL14-EADEM-HSL type과 α AL14-OH type)을 생산하는 실험을 하였다. 우선 Gene을 assembly하였다 (그림 3). 이후 pET28a(+)-TrxA vector에 삽입해서 재조합 plasmid를 구축 한 뒤, *E.coli* BL21 (DE3)cell (Novagen, Madison, WI, USA)에 transformation하였다. 그리고 *E.coli* BL21 (DE3)cell을 IPTG 처리해서 과발현을 유도하였다. 발현된 His6-tagged 단백질을 Ni bead를 이용해서 정제하였다. 그리고 CNBr로 처리한 후 RP-HPCL (Capcellpak C18, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm; Shisheido Co., Tokyo, Japan)을 이용해서 정제하였다. 조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min간 20%로 흘려주고, 40min 간 20 \rightarrow 60%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다. 합성한 α AL14 (-NH₂ type)peak는 26.5min에 용출되었고 (그림 4), 이를 토대로 α AL14 (-OH type)으로 예상되는 peak는 약 24min에 (그림 5), α AL14-M (-HSL type)으로 예상되는 peak는 약 27min에서 용출되었다 (그림 6). α AL14-EADEM 에서 α AL14-EADEM (-HSL type)으로 예상되는 peak는 26min에, 그리고 α AL14 (-OH type)으로 예상되는 peak는 24min에 용출되었다 (그림 7).

2. 분자량 측정

그림 2에서 나타내듯이 재조합 방식으로 생산한 3개의 펩타이드들로부터 생산한 4개의 펩타이드 분자량을 측정 한 결과, α AL14 (-OH type)분자량은 1467.9090Da [M+H]⁺, α AL14-M (-HSL type)분자량은 1550.9429Da [M+H]⁺였다 (그림 8). 그리고 α AL14-EADEM로부터 분리정제한 α AL14-EADEM (-HSL type) 분자량은 1995.0818 Da [M+H]⁺이고 α AL14 (-OH type) 분자량은 1466.9224 Da [M+H]⁺였다 (그림 9) [α AL14 (-OH type): 1467.9090Da [M+H]⁺와 α AL14 (-OH type): 1466.9224 Da [M+H]⁺는 동일한 물질임]. 재조합 방식으로 생산한 4개의 펩타이드들의 분자량의 실험값과 계산값은 일치하였다.

본 연구에서 pET28a(+)-TrxA plasmid vector를 사용하여 α AL14와 α AL14-M 그리고 α AL14-EADEM을 성공적으로 생산하였다. 이러한 방법을 사용하면 α AL14 (14잔기)보다 크기가 더 큰 펩타이드들도 multi-peptide로 발현시켜서 대량생산 가능하다고 생각된다.

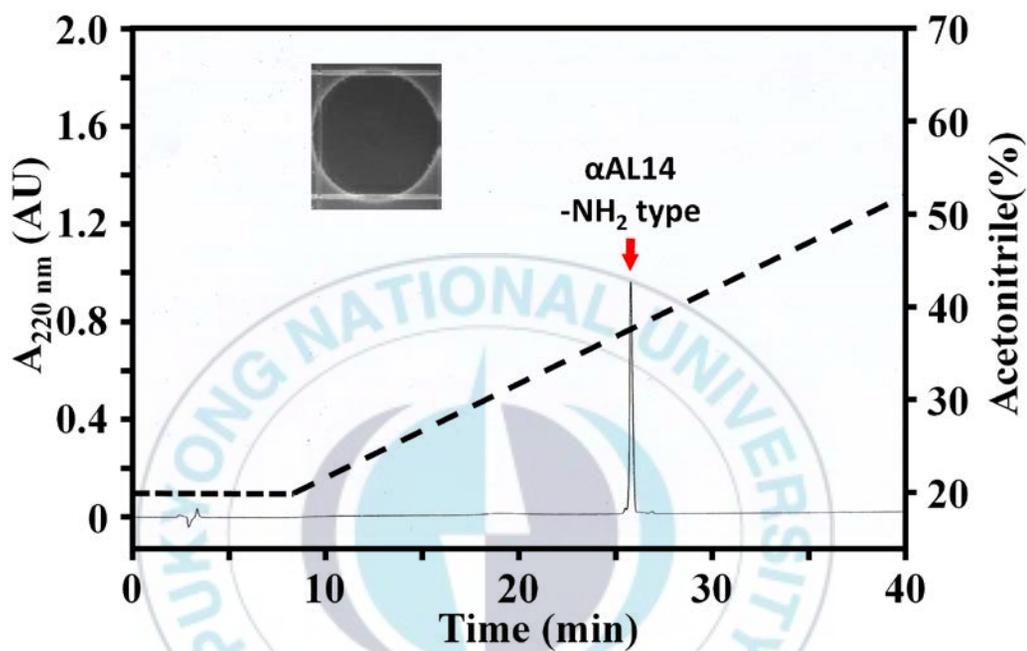


그림 4. α AL14 (-NH₂ type)의 HPLC 정제.

정제조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 20%로 흘려주고, 40min 동안 20→60%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다. 정제한 물질 10ug을 사용하여 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대해 항균활성을 측정하였다.

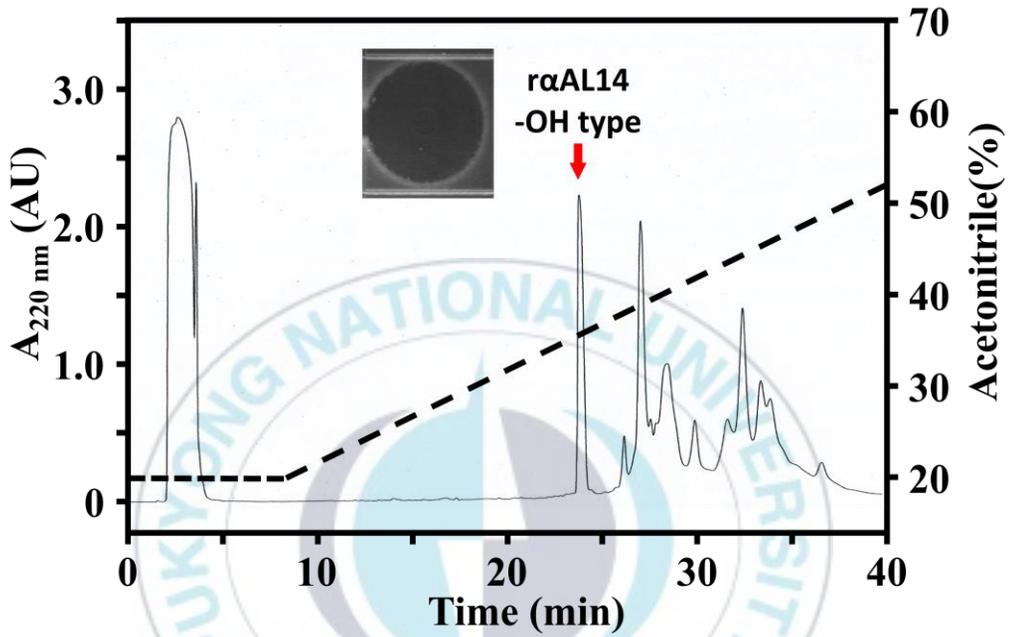


그림 5. $r\alpha$ AL14 (-OH type)의 HPLC 정제.

정제조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 20%로 흘려주고, 40min 동안 20→60%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다. 정제한 물질 10ug을 사용하여 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대해 항균활성을 측정하였다.

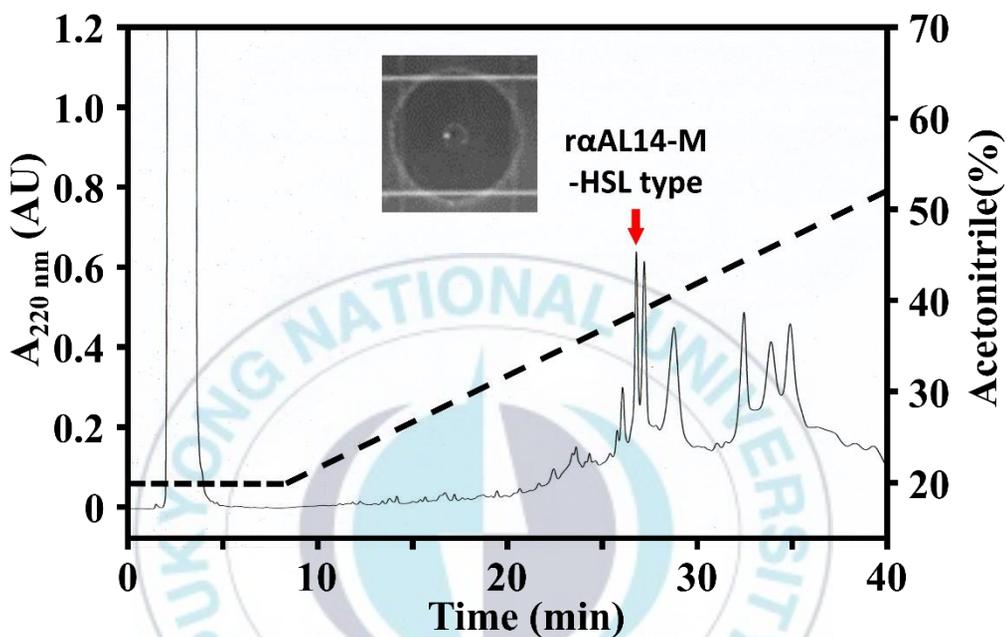


그림 6. $r\alpha$ AL14-M(-HSL type)의 HPLC 정제.

정제조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 20%로 흘려주고, 40min 동안 20→60%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다. 정제한 물질 10ug을 사용하여 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대해 항균활성을 측정하였다.

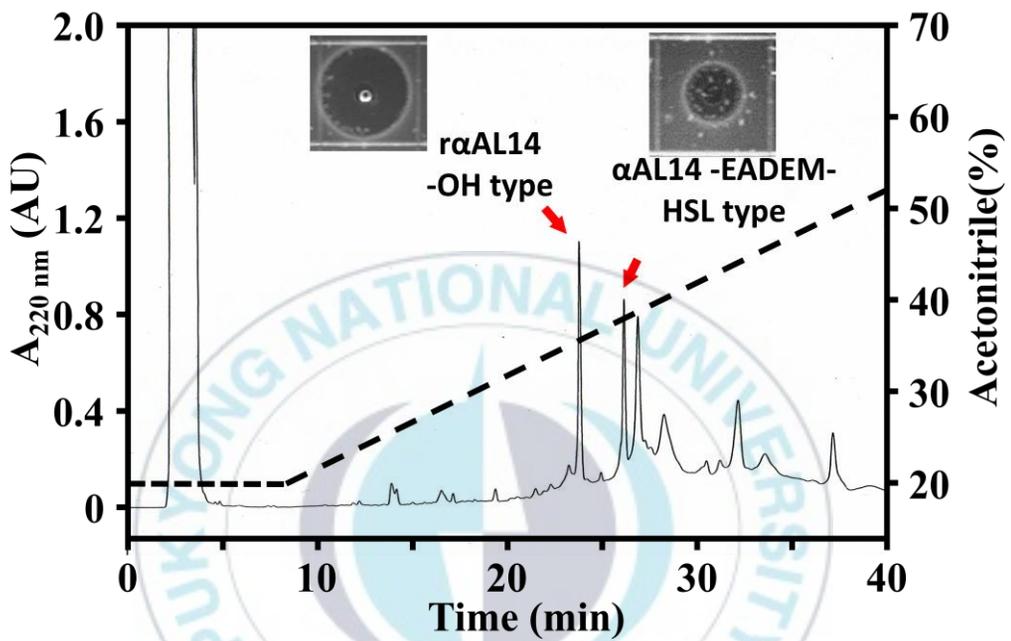


그림 7. rαAL14-EADEM (-HSL type)의 HPLC 정제.

정제조건은 0.1% TFA가 들어간 LC water (A용매), 0.1% TFA가 들어간 acetonitrile (B용매)을 사용하였고, B용매를 8min동안 20%로 흘려주고, 40min 동안 20→60%로 1.0ml/min 유속으로 흘려서 정제하였다. 정제한 물질 10ug을 사용하여 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대해 항균활성을 측정하였다.

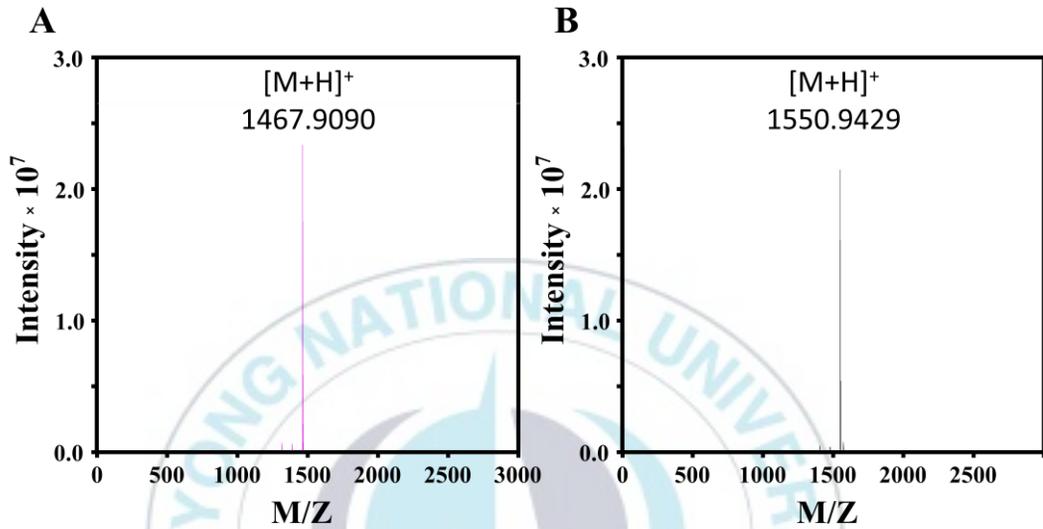


그림 8. α AL14 (-OH type)과 α AL14-M (-HSL type)의 분자량.
 α AL14 (-OH type)의 분자량 (A). α AL14-M (-HSL type)의 분자량 (B).

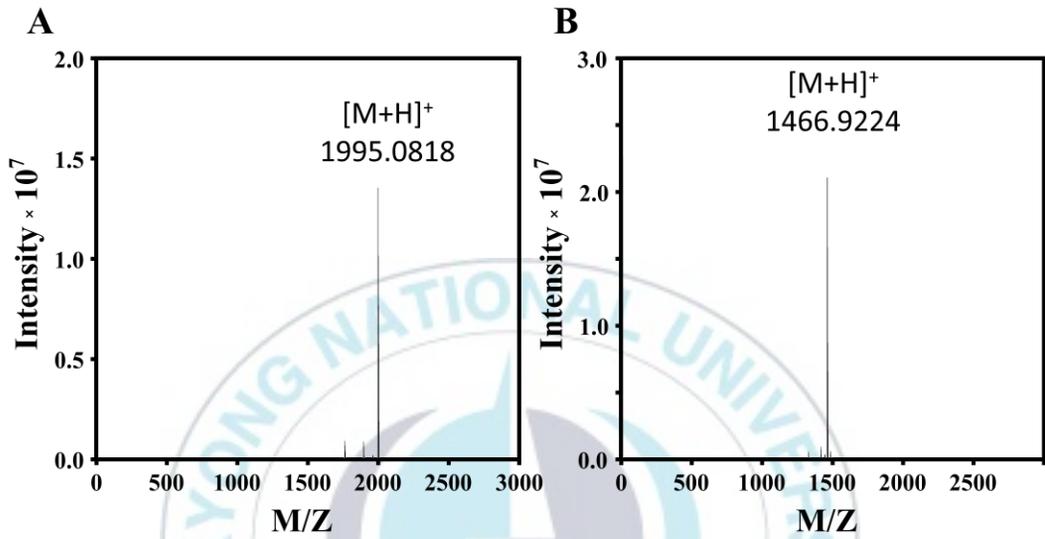


그림 9. rαAL14-EADEM (-HSL type)과 rαAL14 (-OH type)의 분자량.

rαAL14-EADEM (-HSL type)의 분자량 (A). rαAL14 (-OH type)의 분자량 (B).

3. Enzyme 처리 및 항균활성 측정

α AL14 (-OH type)과 α AL14-M (-HSL type)은 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대해 각각 10ug을 사용했을 때 합성한 α AL14 (-NH₂ type)만큼 강한 항균활성을 나타내었다 (그림 4-6). 또한 α AL14-EADEM (-HSL type)도 항균활성을 나타내었다 (그림 7).

α AL14 (-OH type)과 α AL14-M (-HSL type)의 안정성을 조사하기 위해서 Carboxypeptidase Y를 처리한 뒤 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대해 항균활성을 측정하였다 (그림 10). 그 결과 α AL14 (-OH type)은 활성이 저해 되었지만, α AL14-M (-HSL type)의 경우 활성에 변화가 없었다. Carboxypeptidase Y는 펩타이드의 C-말단부터 아미노산을 자르는 enzyme인데, α AL14 (-OH type)의 경우는 enzyme이 작용해서 α AL14의 C-말단 아미노산인 Leu를 잘라서 활성이 저해된 것으로 보인다. 그러나 α AL14 (-HSL type)의 경우는 활성이 유지 되었다. 이는 enzyme이 C-말단에 형성된 HSL과 반응하지 못해서 α AL14-M의 활성이 유지된 것으로 보인다. 즉 CNBr 처리 후 α AL14-M (-HSL type)에서 C-말단에 있는 Met이 HSL으로 modification된 것이 α AL14-M의 C-말단의 안정성 향상에 기여하는 것으로 생각된다. 비록 α AL14만을 이용한 실험결과 이지만, C-말단 아미노산 서열에 Met을 추가한 뒤 HSL화 시키는 것이 새로운 항균활성 펩타이드를 디자인 할 때 사용할 수 있는 유용한 방법이 될 수 있을 것이다.

위 실험결과를 정리하면 다음과 같다. 첫째로 CNBr을 사용하여 multi-

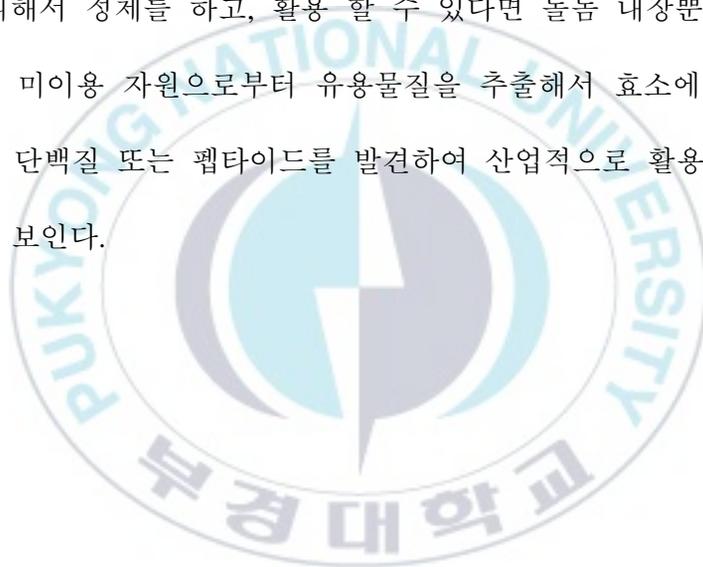
peptide를 분리정제 하는 것이 가능하며, 둘째로는 CNBr을 사용하여 C-말단을 cyclic한 형태로 만들어 carboxypeptidase Y에 대해 안정성을 향상시킨 새로운 형태의 펩타이드를 합성 가능하다는 것이다. 또한 C-말단만이 아닌 N-말단의 modification을 통한 안정성을 향상 시킬 수 있는 방법에 대한 연구도 진행된다면 더 안정적인 형태의 펩타이드 합성이 가능 할 것으로 보인다.

4. 돌돔 내장 추출

돌돔 내장으로부터 추출한 추출물에 대해서는 항균활성을 측정하지 않았다. 그러나 CNBr 처리한 돌돔 내장 추출물은 항균활성이 있었다. 이때 CNBr 처리한 돌돔 내장 추출물에서 항균활성을 나타내는 물질이 단백질 (또는 펩타이드)인지를 알아보기 위해서 Carboxypeptidase Y, trypsin, chymotrypsin 그리고 pronase과 반응시킨 후 항균활성을 측정하였다. 그 결과 CNBr 처리한 돌돔 내장 추출물은 Carboxypeptidase Y와 관계없이 항균활성을 나타내었다 (그림 11A). 이는 항균활성을 띄는 물질이 CNBr에 의해 잘려진 물질이고 동시에 C-말단에 있는 Met이 HSL으로 modification이 일어나서 Carboxypeptidase Y에 의한 분해가 일어나지 않는 물질이라 유추된다. 그러나 trypsin, chymotrypsin 그리고 pronase을 처리한 경우 전부 활성을 나타내지 않았다. 이를 통해서 알 수 있는 물질은 활성을 가지는 물질이 단백질 (또는 펩타이드)이기 때문에 3가지 enzyme에 의해서 분해가 되어서 활성이 사라진 것으로 보인다 (그림 11B).

돌돔의 내장 추출물로부터 유용한 기능을 가진 단백질 또는 펩타이드이면

서 동시에 C-말단의 마지막 아미노산이 Met으로 구성되어 있는 유용물질을 얻는 것이 본 연구의 또 다른 목적 중의 하나이다. 이렇게 추출한 유용물질은 최종적으로 본 논문에서 제시한 multi-peptide형태로 생산하는 방법에 이용하기 적합한 물질이다. 그 이유는 C-말단에 Met이 있는 물질은 CNBr을 통해 분리정제 할 수 있을 뿐만 아니라 HSL을 형성함으로써 Carboxypeptidase Y같은 exopeptidase에 대한 안정성을 가질 수 있기 때문이다. 이렇게 정제 단계에서 CNBr을 처리해서 정제를 하고, 활용 할 수 있다면 돌돔 내장뿐만 아니라 얼마든지 다른 미이용 자원으로부터 유용물질을 추출해서 효소에 안정한 유용성 생리활성 단백질 또는 펩타이드를 발견하여 산업적으로 활용하는 것이 가능할 것으로 보인다.



Carboxypeptidase Y

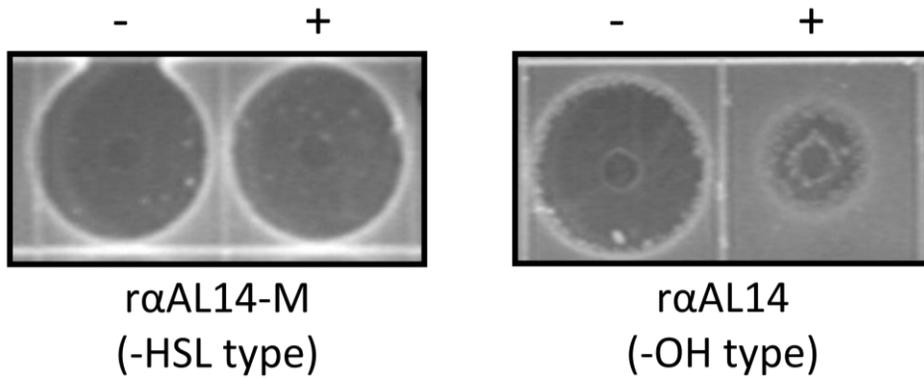


그림 10. Carboxypeptidase Y 처리에 따른 항균활성 측정.

rαAL14-M (-HSL type)과 rαAL14 (-OH type)을 각각 carboxypeptidase Y로 처리 한 뒤 URDA assay로 항균활성을 측정하였다.

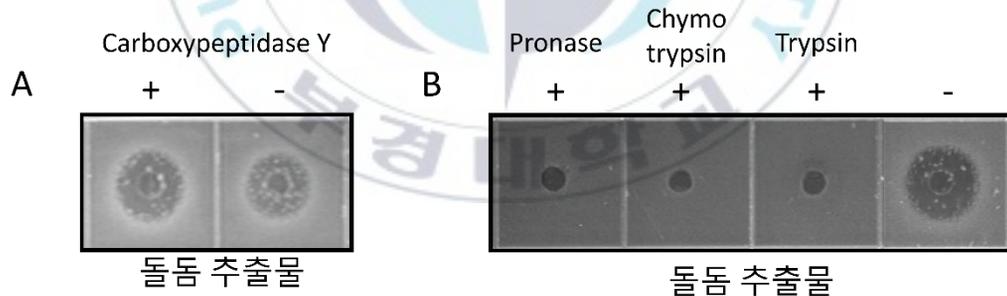


그림 11. CNBr 처리한 돌돔 추출물의 항균활성 측정.

CNBr 처리한 돌돔 내장 추출물을 carboxypeptidase Y로 처리 한 뒤 URDA assay로 항균활성을 측정하였다 (A). CNBr 처리한 돌돔 내장 추출물을 pronase, chymotrypsin, trypsin으로 처리 한 뒤 URDA assay로 항균활성을 측정하였다 (B).

IV. 참고 문헌

1. Li Y. Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: A review. *Protein expression and purification*. 2011;80(2):260-7.
2. Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*. 2006;24:1551.
3. Merrifield RB. *Solid-Phase Peptide Synthesis*. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc.; 2006. p. 221-96.
4. Mutter M, Bayer E. Rapid Procedure for Liquid-Phase Peptide Synthesis: The Crystallization Method. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1974;13(1):88-9.
5. Andersson L, Blomberg L, Flegel M, Lepsa L, Nilsson B, Verlander M. Large-scale synthesis of peptides. *Peptide Science*. 2000;55(3):227-50.
6. Ingham Aaron B, Moore Robert J. Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2007;47(1):1-9.
7. Li Y, Chen Z. RAPD: a database of recombinantly-produced antimicrobial peptides. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;289(2):126-9.
8. Nijland R, Kuipers OP. Optimization of protein secretion by *Bacillus subtilis*. *Recent patents on biotechnology*. 2008;2(2):79-87.
9. Kim C-H, Lee YJ, Go H-J, Oh HY, Lee TK, Park JB, et al. Defensin-neurotoxin dyad in a basally branching metazoan sea anemone. *The FEBS Journal*. 2017;284(19):3320-38.
10. Abate C, Luk D, Gentz R, Rauscher FJ, Curran T. Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: both Fos and Jun contact DNA directly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(3):1032-6.
11. Bush GL, Tassin AM, Fridén H, Meyer DI. Secretion in yeast. Purification and in

vitro translocation of chemical amounts of prepro-alpha-factor. *Journal of Biological Chemistry*. 1991;266(21):13811-4.

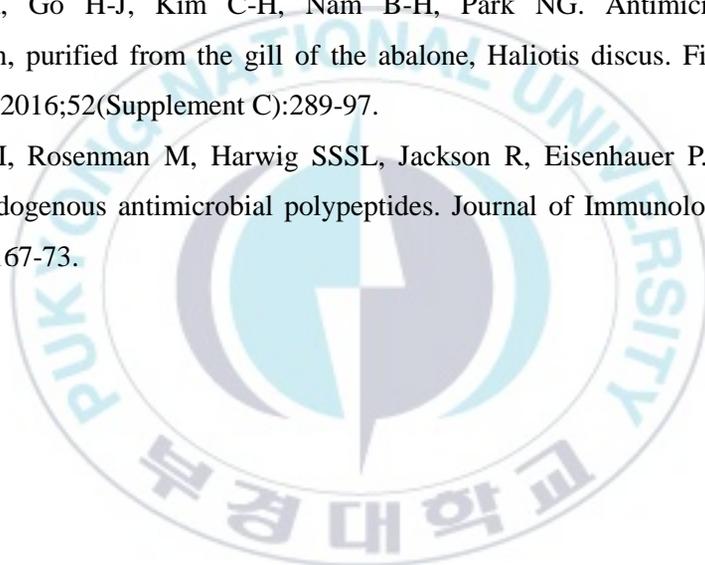
12. Lucast LJ, Batey RT, Doudna JA. Large-scale purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus protease. *BioTechniques*. 2001;30(3):544-6, 8, 50 passim.

13. Mohanty AK, Simmons CR, Wiener MC. Inhibition of tobacco etch virus protease activity by detergents. *Protein expression and purification*. 2003;27(1):109-14.

14. Fang L, Jia KZ, Tang YL, Ma DY, Yu M, Hua ZC. An improved strategy for high-level production of TEV protease in *Escherichia coli* and its purification and characterization. *Protein expression and purification*. 2007;51(1):102-9.

15. Seo J-K, Go H-J, Kim C-H, Nam B-H, Park NG. Antimicrobial peptide, hdMolluscidin, purified from the gill of the abalone, *Haliotis discus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 2016;52(Supplement C):289-97.

16. Lehrer RI, Rosenman M, Harwig SSSL, Jackson R, Eisenhauer P. Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *Journal of Immunological Methods*. 1991;137(2):167-73.



V. 감사의 글

캡스톤부터 시작된 3 년간의 실험실 생활 동안 많은 가르침을 주시고, 또한 아낌없는 격려와 조언을 해주신 지도교수님인 박남규 교수님께 고개 숙여 감사의 인사를 드립니다. 그리고 학부를 포함한 6 년동안 많은 가르침을 주신 홍용기 교수님, 공인수 교수님, 이형호 교수님, 김중균 교수님, 김성구 교수님, 정귀택 교수님께도 감사의 인사를 드립니다.

캡스톤으로 처음 실험실에 들어왔을 때 직접 실험을 가르쳐 주셨던 고혜진 박사님, 2 년동안 옆자리에서 제가 질문 할 때마다 친절하게 가르쳐 주시고 세세한 것까지 많이 챙겨 주셔서 감사했습니다. 그리고 실험의 재미를 알려주신 김찬희 박사님, 그동안 정말 실험에 대해서 많은걸 배운 것 같습니다. 말도 안 되는 질문을 해도 설명해주시고, 때로는 직접 실험을 보여 주시면서 알려주시고 감사했습니다. 실험적인 부분뿐만 아니라 두 분 박사님들께 배운 것들은 많은 도움이 되었습니다.

석사를 하면서 나를 많이 반성하게 만든 혜영이 누나, 실험도 항상 열심히 하고 청소나 힘든 일 있으면 술선수범하는 모습을 보고 많이 배웠어요. 그리고 뭐든 물어보면 다 알려주고, 가끔 쓸데없는 얘기를 해도 잘 들어주고 항상 고마웠어요. 남은 박사 과정도 잘 마치길 응원할게요.

석사 동기인 지빈이와 준용이, 준용이는 지금은 다른 곳에서 석사를 하고 있지만 같이했던 1 년 동안 즐거웠고 지금 있는 곳에서 석사 잘 마치길 기원 할게. 그리고 지빈이는 석사 동안 장난도 많이 쳤는데 잘 받아줘서 덕분에 석사 기간 재미있게 보낸 거 같고 고마웠어.

석사 때 함께 했던 효진이 형, 성원이형, 태한이, 병관이, 태우, 초희, 소희, 예슬이, 도현이, 영훈이, 석현이, 기동이 그리고 수빈이까지 덕분에 실험실

에서 즐거웠고, 다들 잘 되길 바랄게. 그리고 과사 조교 종현이, 석사 하면서 더 많이 어울리고 술도 자주 마셨던 거 같은데, 고마웠고 앞으로도 자주 보자. 또 석사 고민할 때부터 석사과정까지 많이 상담해주고 조언 해주고, 술도 많이 사줬던 동현이형, 태영이도 진짜 고마워요.

석사 포함해서 학교에서 보냈던 6 년간 많은 추억을 만들었던 진영이, 승민이, 기동이, 태현이, 혜원이 그리고 석현이까지 다들 여행도 많이 가고 덕분에 6 년이 즐거웠고 고마웠어.

마지막으로 항상 하고 싶은 거 하라고 든든하게 지원해주신 아빠, 늘 사랑 받는 아들임을 알려주는 엄마, 항상 용기를 북돋아 주는 우리 형 그리고 아침마다 정신 번쩍 차리게 잔소리 해주시는 할아버지까지 다들 너무 사랑하고 감사합니다. 저에게 도움을 주신 모든 분들께 다시 한번 감사 드리며 이 논문을 마무리 하겠습니다.

