creative commons
COMMONS DEED

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

dCollection

공 학 석 사 학 위 논 문

졸복 (*Takifugu pardalis*)과 별불가사리 (*Patiria petinifera*)에서 정제된 생리활성 펩타이드의 분자적 특성 및 재조합 펩타이드 생산 연구

2018년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

박 지 빈

공 학 석 사 학 위 논 문

졸복 (*Takifugu pardalis*)과 별불가사리 (*Patiria petinifera*)에서 정제된 생리활성 펩타이드의 분자적 특성 및 재조합 펩타이드 생산 연구

지도교수 박 남 규

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2018년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

박 지 빈

박지빈의 공학석사 학위논문을 인준함

2018년 2월 23일

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

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. 졸복 (*Takifugu pardalis*)에서 정제된 Hepcidin-like antimicrobial peptide의 분자적 특성 및 재조합 펩타이드 생산 연구

표 VI

그림 목록 VI

초록… VII

Ⅰ. 서론 2

Ⅱ. 재료 및 방법 8

1. 재료 8

1.1. 실험동물 8

2. 실험 방법 8

2.1. cDNA Cloning과 서열 분석 8

2.2. Recombinant TpHAMP의 생산 10

2.2.1. Plasmid 제작 10

2.2.2. 대량 생산 11

2.2.3. Recombinant TpHAMP의 분자량 계산 및 retention time 비교……13

2.3. 항균 활성 실험……14

2.3.1. 배지의 제조……14

2.3.2. 항균 활성 측정……15

2.4. TpHAMP의 발현 분석……16

2.4.1. 조직 추출……16

2.4.2. RT-qPCR을 통한 발현 분석……17

Ⅲ. 결과 및 토론……19

1. TpHAMP의 서열 분석……19

2. Recombinant TpHAMP……19

2.1. Recombinant TpHAMP의 생산……19

2.2. Recombiant TpHAMP 와 native TpHAMP의 비교……20

3. Recombinant TpHAMP의 항균활성 측정……21

3.1. Recombinant TpHAMP와 환원된 TpHAMP의 활성 비교……21

3.2. 항균 활성 실험……22

4. RT-qPCR을 통한 발현 분석……23

4.1. Immune challenge 후 발현 분석……23

4.2. 과염도 처리 후 발현 분석……..…...24

5. 결론……25

VI. 참고 문헌……36

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Part Ⅱ. 별불가사리 (*Patiria petinifera*)로부터 정제된 OrexinA-like peptide의 분자적 특성과 재조합 펩타이드 생산 연구

표 목록..... 40

그림 목록..... 40

초록… 41

Ⅰ. 서론..... 43

Ⅱ. 재료 및 방법 52

1. 재료 52

1.1. 실험동물……..52

2. 실험 방법……..52

2.1. cDNA cloning 과 서열 분석……..52

2.2. Recombinant PpOrxA-Leu 생산……..……53

2.2.1. Plasmid 제작……..…...53

2.2.2. 대량 생산 ……..…54

2.3. PpOrxA의 C-말단 Amidation……..56

2.3.1. Amidation……..……56

2.3.2. LC-MS를 이용한 분자량 측정……57

2.3.3. 별불가사리의 근수축활성 측정……58

Ⅲ. 결과 및 토론……59

1. Recombinant PpOrxA……59

1.1. PpOrxA 서열 분석……59

1.2. Recombinant PpOrxA-Leu 생산……59

2. PpOrxA-Leu의 C-말단 Amidation……60

2.1. Amidation……60

2.2. LC-MS를 통한 분자량 측정……61

2.3. 근수축 활성 실험……62

3. 결론……63

Ⅵ. 참고 문헌……71

Ⅶ. Acknowledgement……73

표 목록

표 1. TpHAMP의 cDNA cloning과 RT-qPCR을 위한 primer 서열 목록

표 2. rTpHAMP 의 항균 활성 측정

그림 목록

그림 1. 알려진 다른 동물 유래의 Hepcidin과 졸복 유래의 TpHAMP와의 Homology 비교

그림 2. TpHAMP의 전체 서열

그림 3. Recombinant TpHAMP 생산

그림 4. rTpHAMP와 환원된 rTpHAMP

그림 5. rTpHAMP와 native TpHAMP의 비교

그림 6. TpHAMP 조직별 발현량 비교

그림 7. *V.anguillarum* challenge 후 시간당 TpHAMP의 발현량 비교

그림 8. 과염도에서의 TpHAMP의 발현량 비교

Molecular characterization and recombinant peptide production of bioactive peptide from the puffer fish, *Takifugu pardalis*

Ji Been Park

Depart of Biotechnology, Graduate School,

Pukyong National University

Abstract

Hepcidins are small cysteine-rich antimicrobial peptides that play an important role in fish immunity against pathogens. A hepcidin-like antimicrobial peptide (TpHAMP) identified from the mucus of puffer fish (*Takifugu pardalis)* had been reported previously. In this study, the full nucleotide sequence of TpHAMP, which was 576 bp, including a 5'-untranslated region (UTR) of 90 bp, a 3'-UTR of 219 bp, and an open reading frame (ORF) of 267 bp was determined. The ORF encoded a polypeptide of 88 amino acids (AAs), which includes a predicted signal peptide of 24 AAs, a prosequences of 41 AAs, and Hepcidin domain of 23 AAs. Recombinant TpHAMP was produced using an expression vector modified to fuse Thioredoxin A (TrxA) to mature TpHAMP (pET-28a (+)-TrxA-TpHAMP) in a heterogeneous expression system. rTpHAMP showed antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria including fish pathogens. Real-time quantitative-PCR showed that TpHAMP transcripts were most expressed in liver of healthy *T. pardalis.* The expression levels post immune challenge were elevated in liver and

intestine at 16 hr while no significant changes were detected in skin, spleen, head kidney, body kidney, and gills. Moreover, exposure to 1% NaCl increased expression level in liver. Collectively, these results imply that TpHAMP may be important for innate immune system.

Part Ⅰ.

졸복 (*Takifugu pardalis*)에서 정제된 Hepcidin-like antimicrobial peptide의 분자적 특성 및 재조합 펩타이드 생산 연구

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Ⅰ. 서 론

해양생물은 수용성 환경에 항상 노출되어 생활하고 있기 때문에 다양한 병원균에 노출되어 있다. 이러한 환경에서 병원 미생물로부터 해양생물 특히, 어류의 체내로의 감염을 막기 위해 다양한 항생제를 사용하고 있다. 그러나 이러한 항생제는 어류와 같은 수생 생물에 높은 수준으로 축적되어 결국 사람의 건강에까지 영향을 미치는 단점을 가지고 있다. 게다가 수중 생태계에서 항생제에 내성을 가진 박테리아 수가 증가하면서 물고기 질병 조절에 항생제를 사용하는 것이 어려워지고 있다 [Kim et al., 2014].

이러한 항생제의 대체물질로서 항균활성 펩타이드가 각광받고 있다. 항균활성 펩타이드는 보통 12 ~ 50개의 아미노산으로 이루어져 있고, 양전하를 가지며 양친매성을 지니고 있는 것이 특징이다. 이러한 특징 때문에 음전하를 가지는 미생물의 막과 이온 상호작용을 하여 미생물의 세포막의 이중층 구조를 파괴하여 미생물의 세포막 기능을 상실시킨다. 또, 항균활성 펩타이드는 미생물의 세포막으로 삽입하여 세포막을

관통하는 pore를 형성하거나 막 투과성을 변화 시키는 등으로 막의 barrier 특성을 교란시켜 미생물을 죽인다 [Powers and Hancock, 2003; Brogden, 2005]. 이러한 mechanism을 가지고 있으면서 비특이적으로 항균활성을 나타내는 항균활성 펩타이드는 특이적으로 항생제와는 달리 박테리아 대한 내성이 쉽게 생기지 않아 항생제의 대체물질로 각광받고 있다 [Mardirossian et al., 2014;, Zhu et al., 2014]. 또한 항균활성 펩타이드는 일반적으로 α-helix 또는 β-sheet와 같은 규칙적인 2차구조를 취하며 β-sheet 구조를 취하는 물질의 경우에는 서열 중 Cysteine이 많은 것이 특징이며 박테리아, 바이러스 및 곰팡이 등 여러 미생물에 대해 다양한 항균활성을 나타낸다 [Izadpanah et el., 2005; Staek et al., 2002; van 't Hof et al., 2001].

항균활성 펩타이드는 포유류, 곤충, 식물, 미생물, 어류, 갑각류, 파충류 등 다양한 생물체에서 발견되었다 [Andreu and Rivas, 1998]. 이러한 결과는 모든 생물에서 항균활성 물질이 주요한 생체 방어 물질로 작용한다는 것을 의미한다 [Andreu and Rivas, 1998; Lehrer and Ganz, 1999]. 수중 환경에서 살아가는 동물들은 항상 물속에 존재하는 많은 박테리아나 바이러스, 원생동물과 같은 미생물에 의해 감염의 위험에 노출되어 있기 때문에 항균성 펩타이드가 있을 확률이 높다 [Hancock and Lehrer, 1998].

특히 어류는 수중 환경에서 박테리아와 바이러스 등과 같은 광범위한 해로운 요소에 대해 자신의 피부에 지속적으로 영향을 받아오기 때문에 어류에서 발견된 항균활성 펩타이드들은 미생물들에 노출되기 쉬운 조직인 피부/점액질, 아가미, 내장과 같은 자기 방어적인 조직에서 존재하여 생체방어기능을 담당하고 있다 [Magnadóttir, 2006].

항균활성 펩타이드인 Hepcidin은 최초로 사람의 urine에서 발견되었다. Hepcidin은 23~25개의 아미노산으로 구성되어 있으며, Arg과 Lys을 포함하고 있기 때문에 염기성 항균활성 펩타이드이다. 그리고 Hepcidin은 간에서 정제되었기 때문에 liver expressed antimicrobial peptide (LEAP)로도 불린다. Hepcidin은 분자 내에 8개의 시스테인 (cysteine)을 포함하고 있기 때문에 4개의 이황화결합을 이루고 있다. 또한 이들은 주로 항균성 작용을 나타내는 동시에 철분 조절에 관여를 한다 [Park et al., 2001]. Hepcidin은 사람뿐만 아니라 쥐나 토끼 등과 같은 많은 척추동물에서 발견되었으며 또한 포유동물뿐만 아니라 다양한 어류로부터 정제되었다. 그 예로 Red sea bream (*Chrysophrys major*) [Chen et al., 2005], White bass (*Morone chrysops)* [Shike et al., 2002], Gilthead seabream *(Sparus aurata L.*) [Cuesta et al., 2007], Winter flounder (*ㅖ(ㅖ (Pleuronectes americanus*), Atlantic salmon (*Salmo salar*) [Douglas et al., 2003], Flounder

(*Paralichthys olivaceus*) [Kim et al., 2005; Hiroco et al., 2005], Catfish *(Silurus asotus*) [Bao et al., 2005], Tubot (*Scophthalmus maximus)* [Chen et al., 2007], Zebrafish (*Danio rerio*) [Shike et al., 2004] 등이 있다.

이전에 본 연구실에서 졸복의 점액질로부터 항균황성 펩타이드인 물질을 정제하였다. 정제한 펩타이드는 에드만 분해법 (Edman degradation)에 의해 부분적으로 다음과 같이 밝혀졌다: RKRXRFXXNXXPGKQGXVFXXGF. 본 연구에서는 이러한 결과를 이용하여 에드만 분해법에 의해 읽히지 않은 X를 Cysteine으로 가정하여 지금까지 알려진 항균활성 펩타이드 아미노산 서열과의 homology를 측정해 보았다 (그림 1). 그 결과 다른 생물 유래의 Hepcidin의 아미노산과 높은 homology를 나타내었기 때문에 정제한 물질을 Hepcidin-like antimicrobial peptide로 명명하였으며, 편의상 TpHAMP로 명명하였다 (그림 1). 본 연구에서는 졸복 유래의 TpHAMP의 완전한 일차서열을 알아보기 위해 cDNA cloning과 더불어 재조합 펩타이드 생산 및 조직별 발현 연구에 대해 실험을 진행하였다.

본 연구에서는 TpHAMP가 졸복의 점액질로부터 정제되었기 때문에 세균 감염을 유발하는 많은 미생물에 대항하여 수중환경에서 자기방어적인 일차적인 목표를 가지고

체외로 분비되었다고 생각하여 Hepcidin의 기능 중 항균활성에 초점을 맞추어 실험을 진행하였다.

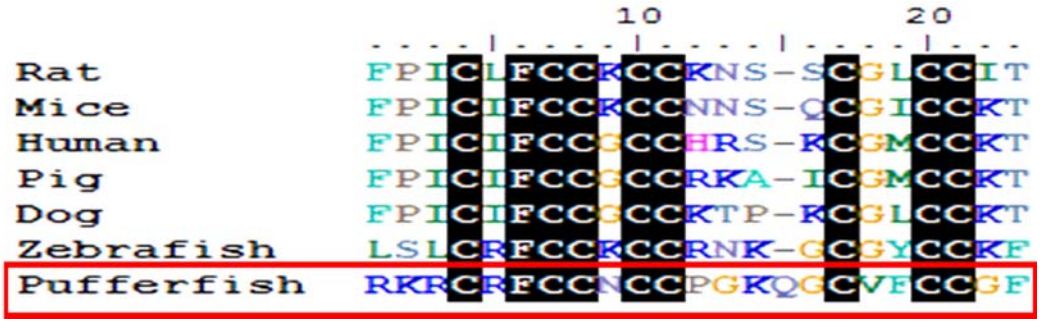


그림 1. 알려진 다른 동물 유래의 Hepcidin 과 졸복 유래의 TpHAMP 와의 Homology 비교

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1.1. 실험동물

본 실험에 사용한 졸복 (*Takifugu pardalis*)은 2016년 3월 부산광역시 남구 대연동에 위치한 섬마을횟집에서 구입을 하였다. 구입 후 16 ℃의 해수 300 L의 수조에 실험에 사용하기 전까지 보관하였다

2. 실험방법

2.1. cDNA cloning 과 서열 분석

정제한 TpHAMP 의 cDNA를 cloning하기 위해 이전의 실험에서 에드만 분해법으로 밝혀진 TpHAMP의 일차 서열인 RKRXRFXXNXXPGKQGXVFXXGF을 이용하여 실험을 진행하였다. 그림 1에서 나타낸 것처럼 일차 서열의 X를 Cys으로 가정한 아미노산 서열과 다른 항균활성 펩타이드인 hepcidin의 서열을 비교하였을 때, Hepcidin과 homology가 높은 것을 확인하였다. 그러므로 에드만 분해에 의해 읽히지 않은 X는 Cys일 것이라 가정하고 primer를 제작하였다 (표 1). 제작한 primer를 사용하여 TpHAMP의 전체적인 서열을 밝히기 위해 3′ 와 5′ rapid amplification of cDNA ends

(RACE) PCR을 진행하였다. 졸복의 skin 조직 100mg을 적출하여 Hybrid-R kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. mRNA는 Oligotex mRNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 합성하였다. RACE PCR을 위한 cDNA 합성은 GeneRacer kit (RLM-RACE; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 합성하였다. 3′ RACE PCR을 위해 두 개의 degenerate primer를 제작하였다 (표 1). 먼저, 첫 번째 3′ RACE PCR에서는 Deg-Fw1 primer와 GeneRacer 3′ nested primer를 사용하여 진행하였다. 두 번째 PCR에서는 Deg-nested-Fw2 primer와 GeneRacer 3′ nested primer를 사용하여 진행하였다. 두 번의 3′ RACE PCR 조건은 같으며 먼저, 95℃로 5분간 initial denaturation 한 후 5 cycle을 95℃로 30초 60℃로 30초 72℃로 30초씩 반복하였다. 그 후 5cycle을 95℃ 30초, 57℃ 30초, 72℃ 30초 반응한 후 25 cycle 95℃ 30초, 54℃ 30초, 72℃ 30초간 진행하여 마지막 extension으로 72℃로 5분간 반응하였다. 두 번째 3′ PCR product를 사용하여 pGEM-T easy vector system (Promega, Madison, WI, USA) 삽입시켜 서열 분석을 진행하였다. 3′ RACE 서열 분석 결과를 이용하여 5′ RACE PCR에 사용할 2개의 primer (GSP-Rv1와 GSP-Rv2)를 제작하였다 (표 1). 5′ RACE PCR은 nTaq Hot polymerase (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하였으며, PCR 조건으로는 95℃에서 10분간 initial denaturation 후, 35cycle간 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초로

반응한 후 마지막 extension 72℃ 5분간 반응을 진행하였다. PCR 후 마찬가지로 vector에 삽입하여 서열 분석을 하였다. 밝혀진 TpHAMP의 cDNA의 뉴클레오티드 서열은 ExPASy를 사용하여 단백질 서열로 번역하였다.

2.2. Recombinant TpHAMP 생산

2.2.1. Plasmid 제작

Recombinant TpHAMP의 생산을 하기 위해 본 연구실에서 만든 modified pET-28a(+) system을 사용하여 생산하였다. 이 system을 구축하기 위해서 먼저 사용할 제한효소를 붙인 primer를 제작하는데, N-말단을 잘라내는 CNBr cleavage를 위해 Met을 붙여 TpHAMP-BamHⅠ-Met-Fw primer와 TpHAMP-XhoⅠ-Rv primer를 제작하여 PCR을 통해 TpHAMP cDNA 서열을 증폭시켰다 (표 1). PCR product를 제한효소 BamHⅠ과 XhoⅠ으로 enzyme digestion시킨 후 사용하였다. 사용한 vector도 마찬가지로 같은 제한 효소를 사용하여 enzyme digestion한 후 gel-purification을 통해 확인하였다. 그 후 pET-28a(+)-TrxA fusion vector와 PCR product를 ligation하였다 (그림 3A). 그 후 *E.coli* BL21(DE3) 균주 (Novagen, Madison, WI, USA)에 transformation하여 올바르게 서열이 삽입되었는지 서열을 분석하여 확인하였다. 그 후 대량 생산을 통하여 재조합

펩타이드를 생산하였다.

2.2.2. 대량 생산

E.coli BL21 (DE3) 균주에 transformation한 균주를 사용하여 재조합 펩타이드를 생산하였다. Transformation한 균주 10 ㎕를 5 ㎖의 30 ㎍ kanamycin + Luria-Bertani medium (KLB medium)에 분주하여 37℃ shaking incubator에 16시간 배양 하였다. 그 후 500 ㎖의 KLB medium에 배양한 균주를 모두 분주한 다음, 37 ℃ shaking incubator에 배양을 진행하였다. 진행 중간에 optical density (OD_{600})의 측정값이 0.4~0.6이 나왔을 때 균의 성장이 활발하기 때문에, 이때 1 M isopropyl β-$_D$-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 500 ㎕ 첨가하여 IPTG 농도가 1 mM이 되도록 하였다. IPTG 첨가 후 약 4 시간 동안 37 ℃ shaking incubator에서 다시 배양하여 과발현을 진행하였다. 그 후 원심분리 (vs-21smt, 20,000g, 20min, 4℃) 하여 상층액은 버리고 pellet만을 1 x phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4)로 3번 washing하였다. 다시 원심분리 후 다시 1 x PBS로 균주를 suspension하여 Sonifier 250 (Branson Ultrasons, Annemasse, France)를 사용하여 40% amplitude 에서 20초간 3번의 sonication을 진행하였다. Sonication후 원심분리 (20,000g, 20min, 4℃)를 진행하여 pellet을 얻었다.

Pellet을 His-tag affinity로 정제하기 위해 8 M urea와 5 mM imidazole을 포함한 1 x PBS에 풀어주었다. TpHAMP-fusion peptide는 Nickel-nitrilotriacetic acid resin (Novagen)을 30:1 비율의 volume을 넣어 1 시간 실온에 배양하여 His-tag affinity chromatography를 사용하여 정제하였다. 그 후 필터를 이용하여 fusion peptidie가 binding된 nickel을 8 M urea와 500 mM imidazole이 포함된 1 x PBS로 bead의 2 배 volume으로 용출하였다 (그림 3B). 용출된 fusion peptide는 SpectraPor dialysis membranes (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Doinguez, CA, USA)를 사용하여 4 L의 5 % HAc에 약 16시간동안 투석하였다. 투석한 sample을 동결 건조한 후 50 % formic acid로 녹인 후 Met의 C-말단을 자르는 CNBr cleavage를 진행하였다. 10 ㎎/㎖ CNBr (final concentraion)를 녹인 sample에 주입한 후 8시간동안 암반응을 한 후 10 배 volume의 D.W.로 희석 후 동결건조를 진행하였다. 동결 건조된 fusion peptide mixture은 3 ㎖의 50 % formic acid로 녹인 후 RP-HPLC (Capcell PAK C18; 4.6 x 250 mm, Shisheido; 5-65 % Acetonitrile (ACN) 0.1 % Trifluoroacetic acid (TFA), 1 ㎖/ min, 60min)를 이용하여 각각의 peak들을 정제하였다 [Wu et al., 2003].

2.2.3. Recombinant TpHAMP의 분자량 계산 및 retention time 비교

좀복의 점액질에서 정제한 TpHAMP를 재조합과정을 통해 recombinant TpHAMP (rTpHAMP)를 합성하였다. 합성한 rTpHAMP가 제대로 합성되고 정제되었는지 확인하기 위해 rTpHAMP의 분자량을 측정하여 좀복의 점액질에서 천연물 정제를 통해 정제된 항균활성 펩타이드와 같은 분자량을 나타내는지 확인하였다. 또한 분자내에 이황화 결합을 이루고 있는지 확인하기 위해 rTpHAMP 에 이황화 결합을 끊는 1,4-dithiothreitol (DTT)을 사용하여 환원 시켰다. rTpHAMP와 환원된 rTpHAMP의 retention time을 비교하기 위해 RP-HPLC (Capcell PAK C18; 4.6 x 250 mm, Shisheido; 20-30 % ACN in 0.1 % TFA, 1 ㎖/ min, 20min)로 분석하였으며, RP-HPLC를 통해 분리된 물질들의 분자량 측정은 MALDI-TOF/TOF 를 이용하여 분석하였다. 마찬가지로 rTpHAMP가 native TpHAMP와 같은 이황화 결합을 분자내에 가지고 있는 물질임을 확인하기 위해 동일한 RP-HPLC를 사용하여 isocatic HPLC (23 % ACN in 0.1 % TFA)에서 native TpHAMP와 retention time을 비교하여 용출되는 시간대를 확인하였다.

2.3. 항균 활성 실험

2.3.1. 배지의 제조

본 연구에서는 rTpHAMP와 환원된 rTpHAMP의 항균활성을 측정하기 위해서 Ultrasensitive radial diffusion assay (URDA)와 Minimal effective concentration (MEC) 실험을 진행하였다 [Seo et al., 2005; Seo et al., 2012; Lehrer et al., 1991]. 사용한 균주로는 그람 양성 균주인 *Bacilus subtilis* (KCTC1021)와 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1621). 그리고 그람 음성 균주인 *Escherichia coli* (D31)와 *Salmonella enterica* (KCTC2514)를 사용하였다. 어병 세균은 *Streptococcus iniae* (FD5228), *Edwardsiella tarda* (KCTC12267), *Aeromonas hydrophila* (KCTC2358) 및 *Vibrio anguillarum* (KCTC2711)를 사용하였다. 총 8개의 균주를 사용하여 항균활성 실험을 진행하였다. 박테리아 배양 조건으로는 각각의 박테리아를 tryptic soy broth로 만든 agar plate (TSA)에서 37 ℃에서 18 시간 동안 seed culture하여 각각의 colony를 TSB 액체배지에 옮긴 후 37 ℃에서 seed culture하여 사용하였다. 한편, 어병세균인 *V. anguillarum* 은 25 ℃에서 24 시간 동안 키운 후 사용하였다. 배양한 균주들은 570nm에서 optical density가 0.1 (84 %T), 약 8 x 10^4 CFU/ ㎖가 되도록 DR100 Colorimeter (Product No. 41101-71, BioMerieux, Inc.,

USA) 를 이용하여 희석하였다. Agarose plate의 조성은 다음과 같다. Underlay agarose; TSB powder 0.015 g, 1.0 M phosphate buffer (PB) (pH 6.57) 1 ㎖, D.W 48.5 ㎖, agarose 0.5 g, Overlay agarose; TSB powder 3 g, 1.0 M phosphate buffer (PB) (pH 6.57) 1 ㎖, D.W 48.5 ㎖, agarose 0.5 g. 멸균하여 준비한 배지를 42 ℃가 되도록 식힌 후 희석시킨 균주와 함께 배지에 넣고 잘 섞은 후 plate를 만들어 굳혀 사용하였다.

2.3.2. 항균활성 측정

rTpHAMP의 항균활성을 측정하기 위해서 여러 희석시킨 균주를 넣어 만든 underlay agarose 배지에 외경이 2.3 mm 정도가 되는 well을 vacuum을 사용하여 만든 뒤 well에 시료를 주입하였다. rTpHAMP는 RP-HPLC를 통해 piscidin-1 (1 ㎎)을 이용하여 RP-HPLC를 통해 농도를 계산하여 1 ㎎을 맞추어 사용하였다. 시료의 1 ㎎/㎕에서 2 배씩 희석하여 9개의 농도 (1 ㎎/㎕, 500 ㎍/㎕, 250 ㎍/㎕, 125 ㎍/㎕, 62.5 ㎍/㎕, 31.3 ㎍/㎕, 15.6 ㎍/㎕, 7.8 ㎍/㎕, 3.9 ㎍/㎕)로 맞추어 농도 별로 5 ㎕씩 loading 한 후 약 3시간 후 overlay agarose 배지를 부은 후 37 ℃, 18시간동안 배양한 후 well 주위의 clear zone 크기를 재었다. 항균 활성 크기를 비교하기 위해 대조군 실험으로는 Piscidin-1을 사용하였다.

2.4. TpHAMP의 발현 분석

2.4.1. 조직 추출

살아있는 졸복에서 TpHAMP의 발현량 차이를 조직별로 알아보기 위해 해양에서 어류에 많은 질병을 야기하는 *V. anguillarum* 균주를 사용하였다. 이 균을 immune infection 하여 졸복에서의 각 조직별 TpHAMP의 발현량 차이를 시간 변화에 따라 측정하였다. 2 개의 16 ℃의 300 L 해수 수조에 졸복 각각 10마리를 2~3일 보관하여 안정화 한 뒤 실험을 진행하였다. 실험 방법은 25 ℃에서 24 시간 동안 키운 *V. anguillarum* 균을 분광 광도계를 사용하여 OD_{600}값을 0.1 (8 x 10^4 CFU/ ㎖)로 맞추어 30 ㎖를 300 L 해수에 풀어 실험을 진행하였다. 0시간, 16시간과 32시간에 대한 발현 분석을 조사하기 위해 각각의 시간에 해당되는 3마리의 졸복을 대상으로 body-kidney, gill, head-kidney, intestine, liver, skin 및 spleen의 7가지 조직을 약 100 mg씩 적출하였다.

해수의 염농도에서 약 1% 정도 염농도를 올렸을 때 졸복 체내에서의 TpHAMP의 발현량을 알아보기 위해 실험을 진행하였다. 해수의 염농도 (3 %, 29.5 ppt)보다 약 1 % 더 높인 다음 (4 %, 39 ppt), 시간의 변화에 따라 TpHAMP의 발현량을 확인하였다.

300 L 해수에 3 kg 의 salt를 녹여 풀어준 후 0시간, 16시간 및 32시간 마다 각각 졸복 3마리의 skin, liver 및 head kidney 조직을 약 100 ㎎씩 적출하여 사용하였다.

2.4.2. RT-qPCR을 통한 발현 분석

각각의 실험에서 적출한 조직들을 total RNA를 추출하기 위해 Hybrid-R (GeneAll, Seoul, Korea) kit를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 양을 확인하기 위해 agarose gel 전기영동을 통해 확인하였다. RNA는 NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, MA, USA)를 이용하여 농도를 측정하였다. 각각의 total RNA에서 1 ㎍을 계산하여 cDNA 합성을 하였다. cDNA 합성은 TOPscript cDNA synthesis kit with oligo dT (dT18; Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 진행하였다. 사용할 cDNA의 희석배수와 사용하는 primer set를 결정하기 위해 cDNA를 10배 50배 100배 희석하여 각각의 primer (QHep1-F/R primer, QHep-2-F/R, Beta actin1-F/R, Beta actin2-F/R)으로 PCR을 진행하였다 (표 1). RT-qPCR은 CFX Connect real-time PCR detection system을 사용하여 실험하였다. RT-qPCR의 template은 cDNA를 50배 희석하

여 사용하였다. 10 ㎕의 2 x SYBR Green premix (TOPreal qPCR 2 x Premix; Enzynomics) 1 ㎕ (10pmol/㎕) 의 TpHAMP와 beta actin 각각의 forward, reverse primer, 1㎕의 50 x D cDNA template, 8 ㎕의 nuclease-free water를 넣어 최종 volume이 20 ㎕가 되게 한 후 PCR을 진행하였다. primer는 QHep1-F primer, QHep-R primer를 사용하였고, Beta actin1-F/R를 사용하여 비교하였다 (표 1). RT-qPCR 조건으로는 95 ℃에서 10분간 진행한 후, 40 cycle로 95℃ 10초, 60 ℃ 15초, 72 ℃ 15초간 진행하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Ⅲ. 결과 및 토론

1. TpHAMP의 서열 분석

졸복의 점액질에서 정제한 Hepcidin-like antimicrobial peptide인 TpHAMP의 3′ RACE PCR과 5′ RACE PCR cloning을 진행하였다. 그 결과로 총 576 bp의 서열이 밝혀졌으며 그 중 5′-untranslated region (UTR) 은 90 bp, open reading frame (ORF) 서열은 267 bp, 3′-UTR 부분은 polyadenylation consensus 서열 (AATAAA)을 포함하여 219 bp으로 이루어져 있다. TpHAMP의 ORF는 총 88개의 아미노산으로 이루어져 있으며 24개의 아미노산으로 이루어진 signal peptide와 41개의 아미노산으로 이루어진 prosequences와 23개의 mature peptide가 포함되어 있다 (그림 2). 그 결과로 mature peptide에서 이전의 실험 결과에서 에드만 분해법으로 읽히지 않은 X가 Cysteine 잔기인 것을 확인하였으며 4개의 disulfide bonds가 이루어져 있을 것이라고 예상 된다.

2. Recombinant TpHAMP

2.1. Recombinant TpHAMP의 생산

본 연구실에서 합성한 modified fusion vector인 pET28a(+)-TrxA에 TpHAMP 서열을

삽입하여 plasmid를 구축한 후, *E.coli* BL21 (DE3)에 transformation하여 *E. coli*를 통해 fusion peptide를 배양하였다. 그 후 1mM IPTG를 처리하여 fusion peptide를 발현시켜 SDS-PAGE를 통해 rTpHAMP가 유도되었는지 확인하였다 (그림 3). 발현된 것을 확인한 후 His-tag affinity chromatography를 하였다. rTpHAMP를 정제한 후 CNBr Cleavage와 RP-HPLC (Capcell PAK C18; 4.6 x 250 mm, Shisheido; 5-65 % ACN 0.1 % TFA, 1 ㎖/ min, 60min)를 통하여 정제하여 다음 실험과정을 진행하였다.

2.2. Recombinant TpHAMP 와 native TpHAMP의 비교

Recombinant TpHAMP의 분자 내에 이황화 결합을 이루고 있는지 확인하기 위해 rTpHAMP와 환원된 rTpHAMP의 retention time (RT)을 비교해 본 결과, 이들 두 물질은 다른 RT를 나타내었다 (그림 4A). 이러한 결과로 미루어보아 rTpHAMP는 내부에 있는 8개의 Cys 잔기들이 서로 어떤 형태로의 이황화 결합을 형성하고 있을 것이라고 예상할 수 있다. 또한 rTpHAMP와 환원된 rTpHAMP를 사용하여 MALDI-TOF/TOF로 분자량을 측정한 결과, rTpHAMP의 분자량은 2910 Da $[M+H]^+$, 환원된 rTpHAMP의 분자량은 2918 Da $[M+H]^+$이었으며, 이들 두 물질간에 약 8의 분자량이 차이가 나는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 rTpHAMP 분자내에 존재하는 8개

의 Cys가 4개의 이황화 결합을 이루고 있다는 것을 의미하는 동시에 서로간의 RT가 다르다는 것을 입증하고 있다 (그림 4). 또한 rTpHAMP가 native TpHAMP와 같은 이황화 결합을 가지고 있는지 확인하기 위해 rTpHAMP와 native TpHAMP의 RP-HPLC에서 retention time을 비교하였다. 그 결과, 두 물질은 각각 같은 시간대에 용출되었다 (그림 5). 그 후 rTpHAMP와 native TpHAMP를 혼합하여 isocratic RP-HPLC (23 % ACN in 0.1 % TFA)을 진행한 결과 7분대에서 한 개의 단일 peak가 측정 되었다. 또한 분석된 혼합물의 peak의 세기는 native만을 정제한 것과 rTpHAMP만을 정제한 것을 합친 정도의 mAU가 측정되었다. 따라서 rTpHAMP는 native TpHAMP와 같은 이황화 결합을 가지고 있기 때문에 reduction 과정과 refolding 과정이 필요 없음을 확인하였다 (그림 5).

3. Recombinant TpHAMP의 항균활성 측정

3.1. Recombinant TpHAMP와 환원된 TpHAMP의 활성 비교

rTpHAMP와 환원된 rTpHAMP의 활성 차이를 확인하기 위해 *B. subtilis* (KCTC1021)와 *E. coli* (D31)를 사용하여 Ultra Radial Diffusion Assay (URDA)로 항균 활성을 측정하였다. 활성 측정에 사용한 양은 각각 HPLC로 정제한 흡광도의 세기의 125 mAU에 해당

되는 양을 사용하여 활성을 보았다. 그 결과 그람음성균 및 그람 양성균에서 모두 활성이 나타났고, rTpHAMP에서 좀 더 큰 활성을 보였다 (그림 4B). 따라서 rTpHAMP 분자내의 이황화 결합의 유무는 활성의 크기에는 영향을 미치지만 활성의 유무에는 영향을 끼치지 않는다는 것을 확인하였다.

3.2. 항균 활성 실험

Native TpHAMP와 rTpHAMP가 같은 시간대에 용출되어 서로 같은 이황화 결합을 가진 물질임을 확인하였기 때문에 rTpHAMP를 이용하여 여러 균주에 항균 활성 실험을 진행하였다. 사용한 균주로는 *B. subtilis* (KCTC1021), *E. coli* (D31), *S. enterica* (KCTC2514), *S. iniae* (FD5228), *E. tarda* (KCTC12267), *A. hydrophila* (KCTC2358)와 *V. anguillarum* (KCTC2711)을 포함한 총 8개의 균주를 사용하였다. 항균활성 실험으로는 MEC 방법을 사용하였으며, 활성 측정을 진행한 결과 rTpHAMP는 모든 균주에 대해 활성을 보였다. 특히 *E. coli, S. Enterica, B.* subtilis에서 활성이 좋았는데, *E. coli*에서 MEC값이 1.71, *S. enterica*에서는 2.40, *B. subtilis*에서는 3.50 으로 측정되었다. 이들 3가지 균주에서 rTpHAMP는 대조군으로 사용된 Piscidin-1에서 보다 큰 활성을 나타내었다. 어병 균주에서도 모든 균주에서 활성을 보였지만 그 중에서 특히 *V.*

anguillarum 에서 가장 큰 활성을 보였다 (표 2). 따라서 rTpHAMP는 그람음성균, 그람양성균 및 어병세균 등 모든 균주에 항균활성을 나타내었다.

표 2에 나타내듯이 rTpHAMP는 어류에 영향을 미치는 어병세균들 모든 균주에 활성을 보였다. 하지만 균주들 중 *V. anguillarum*에서 가장 큰 활성을 보였기 때문에 *V. anguillarum* 균주를 사용하여 졸복에서 TpHAMP의 시간당 조직별 발현량을 알아보기 위한 면역 실험을 진행하였다.

4. RT-qPCR을 통한 발현 분석

4.1. Immune challenge 후 발현 분석

항균 활성 실험인 MEC 결과로 어병세균 중 *V.anguillarum* 균주에서 가장 큰 활성을 보였기 때문에, 이 균주를 사용하여 bacteria challenge 실험을 하였다. 그 후 졸복의 조직에서 TpHAMP의 상대적인 발현량을 조사하기 위해, 졸복에서 총 7가지 조직 (body-kidney, gill, head-kidney, intestine, liver, skin, spleen)을 사용하였다. 조직별 시간의 변화에 따라 RT-qPCR을 하여 조직별 TpHAMP 발현량을 조사하였다. 통계처리에는 GraphPad Prism version 7을 사용하였다. 그림 6은 immune challenge 후의 RT-qPCR 결과를 나타낸다. 먼저 0시간대에서는 모든 조직에서 TpHAMP의 발현이 약간

씩은 되지만, 그 중에서 liver 조직에서 가장 많은 발현량을 보였고 다음으로 intestine 에서 큰 발현량을 보였다. 그 후 시간이 지남에 따라 liver 조직과 intestine 조직에서 TpHAMP 발현량이 증가되는 것을 알 수 있고, liver 조직에서는 16시간 후 TpHAMP의 발현량이 가장 높았다. 또한 intestine에서도 시간이 지남에 따라 TpHAMP의 발현량이 점차 증가하는 것을 알 수 있다 (그림 6 과 7). 이러한 결과로 미루어 보아 졸복에서의 TpHAMP은 체외에서 미생물에 의해 반응하여 발현되어 체외로 분비되는 물질이라 예상 된다.

4.2. 과염도 처리 후 발현 분석

앞의 졸복의 면역실험과 마찬가지로 해수보다 높은 염도에서 졸복의 체내에서 TpHAMP의 발현량이 어떻게 변하는지 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 해수에 염처리 후 조직별 시간에 따른 발현량을 RT-qPCR을 통해 알아보았다. 먼저, 해수 300 L (3 %)에 salt 3 kg을 넣어 녹인 후 최종 해수 염농도가 4 %가 되게 한 후 실험을 진행하였다. 4 %의 해수에 살아 있는 졸복을 넣어 시간 변화에 따른 상대적인 TpHAMP의 발현량을 비교하였다. 0시간, 16시간, 32시간으로 나누어 졸복에서 각각 Head kidney, Liver 및 Skin 조직을 적출하여 RT-qPCR을 진행하였으며, 마찬가지로 통계처리하여

결과를 나타내었다. 그 결과 면역 실험과 마찬가지로 liver 조직에서 16시간대에 발현량이 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 나머지 조직에서는 별다른 발현량 차이를 보이지 않았다 (그림 8). 따라서 졸복의 체내에서 TpHAMP는 과염도의 해수에서도 발현량이 변화하는것으로 보아 졸복의 TpHAMP는 체외에서 어떠한 자극이 있을 때 발현이 유도되는 것임을 예상할 수 있다.

5. 결론

Hepcidin은 사람의 urine과 plasma에서 처음으로 정제된 small cysteine-rich AMP이다. 어류에서 정제된 Hepcidin은 hamp1, hamp2로 2가지가 알려져 있으며 기능으로는 철분 대사 조절과 항균 반응의 기능을 가지고 있다. 본 연구에서는 Hepcidin의 기능 중 항균 반응에 초점이 맞추어 실험을 진행하였다. 먼저 서열분석을 통해 밝힌 전체적인 서열에서 mature peptidie인 RKRCRFCCNCCPGKQGCVFCCGF를 밝혔으며, 그것을 토대로 recombinant TpHAMP를 합성하였다. 합성한 rTpHAMP와 native TpHAMP를 HPLC를 통해 비교해 보았을 때, 두 물질이 같은 물질임을 확인하였다. rTpHAMP를 통해 항균 활성 실험을 진행한 결과 rTpHAMP는 그람음성균, 그람양성균 및 어병세균에서 큰 활성을 보였다. 또한 박테리아에 대한 면역 실험과 과염도를 처

리에 의한 졸복의 조직에 따른 상대적인 발현량은 졸복의 체외에서 어떠한 자극이 있을 때의 졸복내에 각각의 조직들에서 TpHAMP가 유도되었으며, 특히 liver조직에서 발현량이 높았다. 이러한 결과로부터 졸복의 TpHAMP는 선척적인 면역반응에 중요한 역할을 한다는 것을 제시한다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

표 1. TpHAMP의 cDNA cloning과 RT-qPCR을 위한 primer 서열 목록

Name	Sequence (5'-3')	Information
Hep-DeF1	TGYTGYAAYTGYTGYCCNGG (299~321)*	For cDNA Cloning
Hep-DeF2	GGNAARCARGGNTGYGTNTTYTG (308~327)	
Hep-SpR1	TCAGCTCTGTGAAGGCTGCTGATGG (480~504)	
Hep-SeR2	TGGACGTCATGGCAGAATGA (466~485)	
QHEP1-F	TGACAAGAGTCACCTGCACAA (30~50)	For RT-qPCR
QHEP1-R	CGCAACAACAGCAACACTGAA (104~124)	
Beta actin1-F	GTCCCTGTATGCCTCCGGTC	
Beta actin1-R	GCAGAGCGTAGCCCTCGTAG	
GeneRacer™ 3′ Primer	GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG	Universal primers for 5′ and 3′ RACE
GeneRacer™ 3′ Nested Primer	CGCTACGTAACGGCATGACAGTG	
GeneRacer™ 5′ Primer	CGACTGGAGCACGAGGACACTGA	
GeneRacer™ 5′ Nested Primer	GGACACTGACATGGACTGAAGGAGTA	
H-exp-F	ACTCGGATCCATGCGTAAACGCTGCGGTTTTG (291~310)	For recombinant protein
H-exp-R	GATCTCGAGTCAGAACCCGCAGCAGAAAAC (342~362)	

*** :** 그림 2에 나타낸 서열의 잔기번호.

GAAAATCAGACAGGAGAAGTCAGAGGAGCTGACAAGAGTCACCTGCACAAGAGTCAAAGC 60
CCGGAACCAGTTGGAGCAGTTCAGCCCTCCAGAGATGAAGACCTTCAGTGTTGCTGTTGT 120
M K T F S V A V V 9
TGCGGCCGTCCTGCTGGCCCTCATTTGTCTCCAGGAGAGCTCTGCTCTTCCTCTCAGTGA 180
A A V L L A L I C L Q E S S A L P L S E 29
ATTGGAAGATGTGGAGGTGCCAGTGATGGATGATAATGGAGCTTCTGTATATGAAGAGAT 240
L E D V E V P V M D D N G A S V Y E E M 49
GCCAGTGGACTCCTGGCAGATGCCGTATACCAACATATACAGGCTTCTTCGTAAACGCTG 300
P V D S W Q M P Y T N I Y R L L R K R C 69
CAGGTTTTGCTGTAATTGCTGCCCTGGAAAGCAGGGATGTGTTTTCTGCTGCGGGTTCTG 360
R F C C N C C P G K Q G C V F C C G F * 88
ATCACTCCCGATGTCACCAACTATAACACTAGATTATTTTTTGTCAACTTGAAAGTATTG 420
AGTGACCCTGTGATTTTCAATATCTGATGTTTCTTCTGGACTTTGTCATTCTGCCGTGAC 480
GTCCATCAGCCTTCACGGAGCTGAAATGTTTGCAGTTATGTCTAAGTGATCCAAATAAAC 540
ACTAATGACTCCCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 580

그림 2. TpHAMP 의 전체 서열.

TpHAMP 의 전체 서열로는 총 576 bp 로 90 bp 의 5′-untranslated region (UTR), 267 bp 의 open reading frame (ORF)와 219 bp 의 3′-UTR 을 포함하며, ORF 는 총 87 개의 아미노산으로 이루어져 있으며 23 개의 아미노산으로 이루어진 signal peptide (blue)와 41 개의 아미노산으로 이루어진 prosequences (black)와 23 개의 mature peptide (red)가 포함되어 있다.

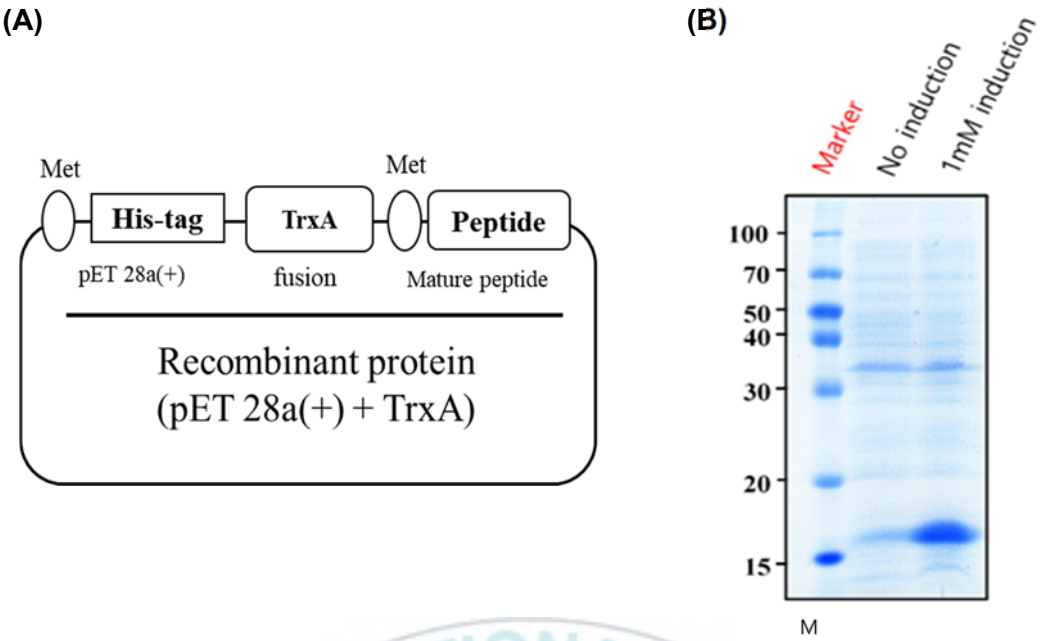


그림 3. Recombinant TpHAMP의 생산.

(A) pET 28a(+) vector에 ThioredoxinA 단백질 서열을 fusion하여 fusion vector를 만든 후 TpHAMP mature peptide 서열을 넣어 plasmid를 제작하여 재조합 펩타이드를 생산하였다. 그 후 *E.coli* BL21 (DE3) 균주를 사용하여 대량 생산하여 사용하였다. **(B)** fusion vector에 37℃에서 1 mM IPTG로 induction 하였을 때 단백질이 유도되었다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

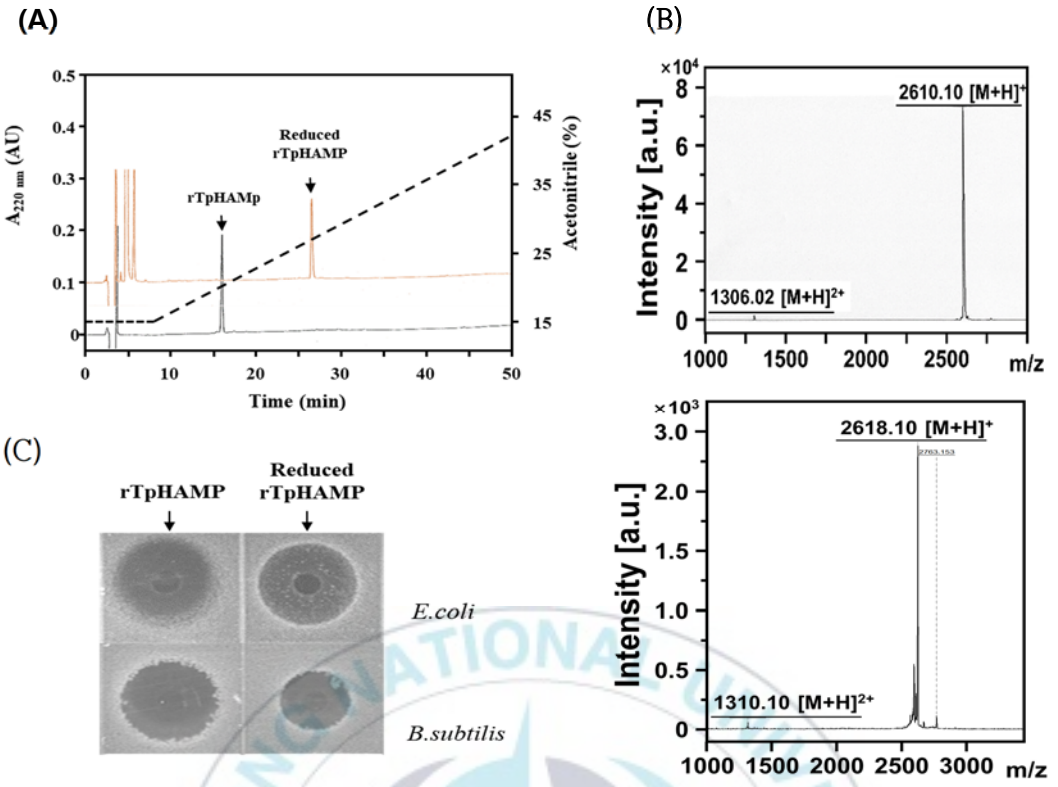


그림 4. rTpHAMP 와 환원된 rTpHAMP.

(A) rTpHAMP 와 환원된 rTpHAMP 의 retention time 을 비교하였다. (CAP-Cell Pak C18, 5-65% Acetonitrile in 0.1% TFA, 1ml/min) **(B)** rTpHAMP (그림 上) 와 환원된 rTpHAMP(그림 下)의 분자량 측정 결과이다. **(C)** rTpHAMP 와 환원된 rTpHAMPf 를 *B.subtilis* (KCTC1021), *E. coli* (D31)에서 125mAU 씩 URDA 로 활성을 보았다.

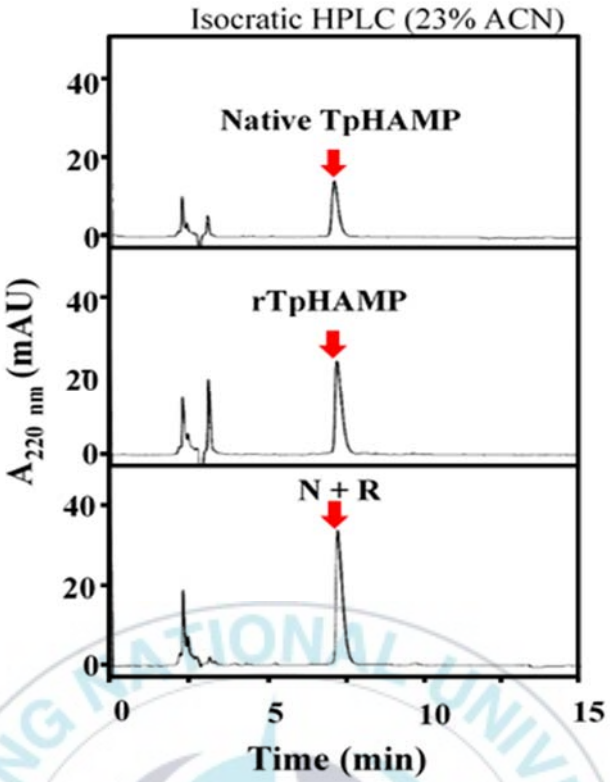


그림 5. rTpHAMP 와 native TpHAMP 의 비교.

Isocratic RP HPLC (23 % ACN in 0.1% TFA)를 진행한 결과 rTpHAMP (그림 上), native TpHAMP (그림 中), recombinant + native TpHAMP (그림 下)를 얻었다.

표 2. rTpHAMP 의 항균활성 측정.

Microbe		Minimal effectives concentration (μg/uL)	
		rTpHAMP	Control (piscidin-1)
Gram-positive	*Bacillus subtilis* KCTC 1021	3.50	4.39
	Staphylococcus aureus KCTC 1621	28.08	4.18
Gram-negative	*Escherichia coli* D31	1.71	4.10
	Salmonella enterica ATCC13311	2.40	5.52
Fish pathogen	*Streptococcus iniae* (FD5228)	39.36	4.96
	Edwardsiella tarda (KCTC12267)	17.65	15.55
	Aeromonas hydrophila (KCTC2358)	35.96	4.68
	Vibrio anguillarum (KCTC2711)	4.81	3.77

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

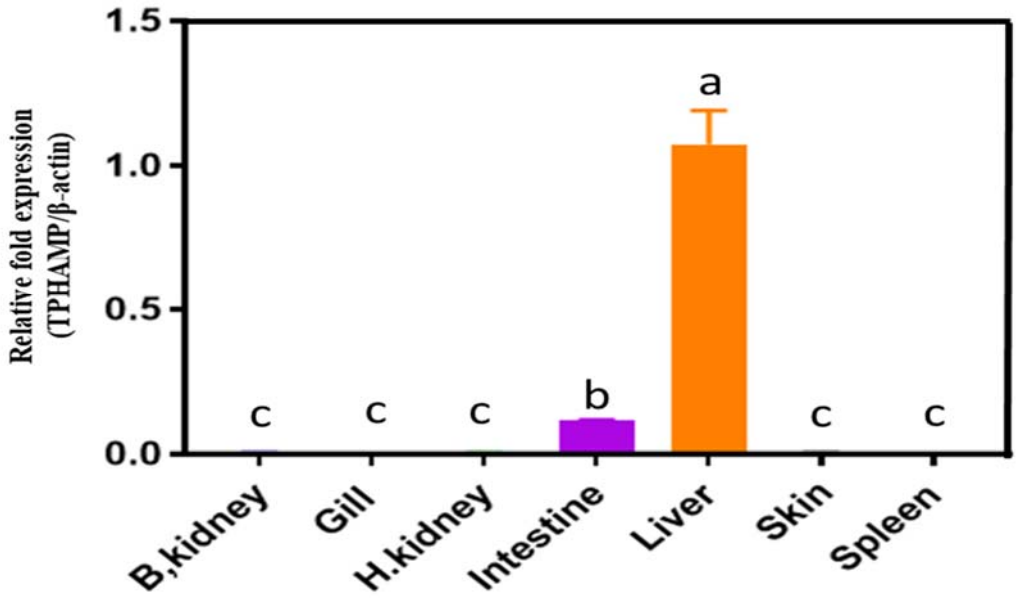


그림 6. 졸복에서 TpHAMP 조직별 발현량 비교.

건강한 졸복에서의 TpHAMP는 모든 조직에서 발현이 되지만 특히 liver 조직에서 가장 많은 발현량을 보였고, 그 다음으로 intestine 조직에서 많은 발현량을 보였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

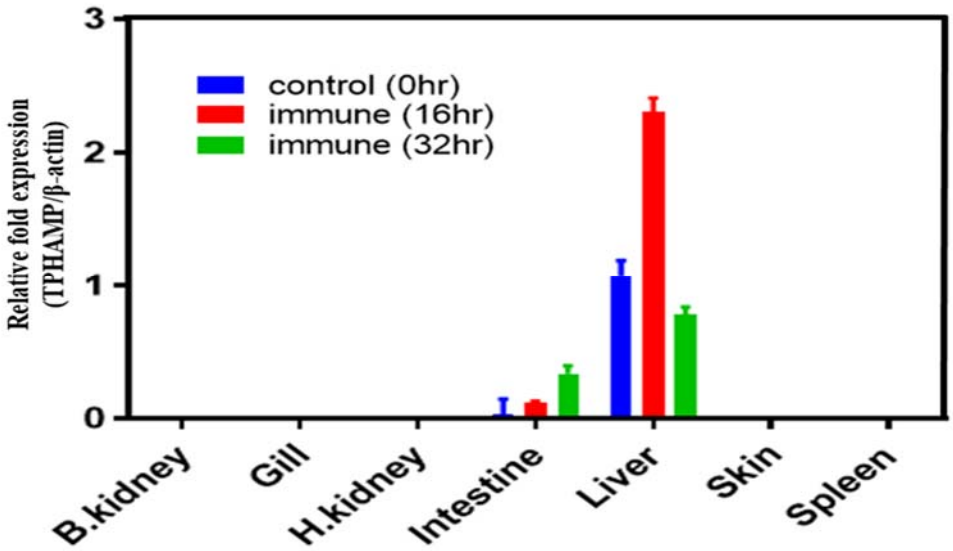


그림 7. *V.anguillarum* challenge 후 시간당 TpHAMP의 발현량 비교.

*V. anguillarum*을 해수에 넣은 후 시간당 발현량을 비교해 본 결과 liver와 intestine에서 발현량이 증가하였다. 결과적으로 체외의 미생물에 대한 방어기작으로 TpHAMP이 발현된다는 것을 확인할 수 있다.

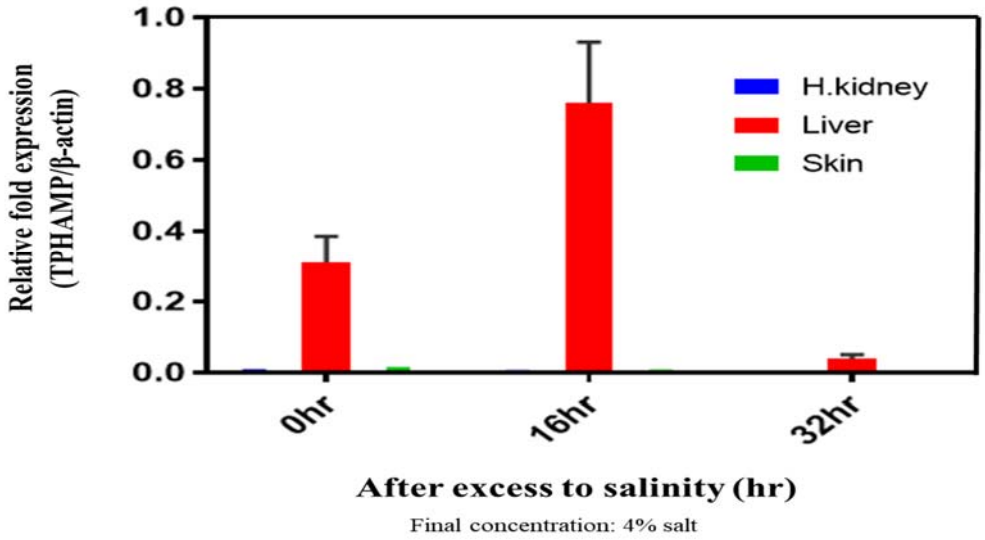


그림 8. 과염도에서의 TpHAMP의 발현량 비교.

해수에 1% 염도를 더 넣은 후 시간당 발현량을 비교해 본 결과 마찬가지로 liver 조직에서 발현량이 증가하였다. 결과적으로 졸복은 체외의 자극에 대한 방어기작으로 TpHAMP이 발현한다는 것을 확인할 수 있다.

VI. 참 고 문 헌

Alvarez, C.A., Guzman, F., Cardenas, C., Marshall, S. H., and Mercado, L. (2014) Antimicrobial activity of trout hepcidin, *Fish Shellfish Immunol 41*, 93-101.

Andreu, D., and Rivas, L. (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview, *Biopolymers 47*, 415-433.

Bao, B., Peatman, E., Li P, He, C., Liu, Z., (2005) Catfish hepcidin gene is expressed in a wide range of tissues and exhibits tissue-specific up-regulation after bacterial infection. *Dev Comp Immunol* 29:939-950.

Brogden, K.A., (2005). "Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?" *Nature Reviews Microbiology* 3: 238.

Chen, S.L., Xu, M. Y., Ji, X.S., Yu, G.C., Liu, Y., (2005) Cloning, characterization and expression analysis of hepcidin gene from red sea bream *(Chrysophrys major)*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:1608-1612.

Chen, S.L., Li, W., Meng, L., Sha, Z.X., Wang, Z.J., and Ren, G.-C. (2007) Molecular cloning and expression analysis of a hepcidin antimicrobial peptide gene from turbot (Scophthalmus maximus), *Fish Shellfish Immunol 22*, 172-181.

Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M.A., (2007) The antimicrobial peptide hepcidin exerts as important role in the innate immunity against bacteria in the bony fish gilthead seabream. *Mol Immunol* 45:2333-2342.

Douglas, S.E., Gallant, J.W., Ryan, S.L., Andrew, D., Stephen, C.M.T., (2003) Identification and expression analysis of hepcidin-like antimicrobial peptides in bony fish, *Dev*

Comp Immunol 27:589-601.

Hancock, R.E.W., Lehrer, R., (1998) Cationic peptides: anew source of antibiotics. *Trands Biotechnol* 16:82-88. doi:10.1016/S0167-7799(97)01156-6.

Hirono, I., Hwang, J.Y., Ono, Y., Kurobe, T., Ohira, T., Nozaki, R. et al (2005) Two different types of hepcidins from Japenese flounder *Paralichthys olivaceus*. *FEBS J* 272:5256-5264.

Izadpanah, A., and Gallo, R. L. (2005) Antimicrobial peptides, *J Am Acad Dermatol 52*, 381-390.

Kim, H., Jang, J.H., Kim, S.C., Cho, J.H., (2014). De novo generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity. *J Antimicrob Chemother.* 69,121-132.

Kim, Y.O., Hong, S.H., Nam, B.H., Lee, J.O., Kim, K.K., Lee, S.J., (2005) Molecular cloning and expression analysis of two hepcidin genes from plive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 69:1411-1414.

Lehrer. R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S., Jackson, R., Eisenhauer, P.,(1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J Immunol Methods* 137, 167–173.

Lehrer, R.I., Ganz, T., (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* 11:23-17.

Magnadóttir, B., (2006) Innate immunity of fish (overview), *Fish Shellfish Immunol 20*, 137-151.

Mardirossian, M., Grzela, R., Giglione, C., Meinnel, T., Gennaro, R., Mergaert, P., Scocchi, M., (2014) The host antimicrobial peptide Bac7(1-35) binds to bacterial ribosomal proteins and inhibits protein synthesis. *Chem. Biol.* 21, 1639-16478.

Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., and Ganz, T., (2001) Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver, *J Biol Chem 276*, 7806-7810.

Powers, J.P.S., and Hancock, R.E.W., (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity, *Peptides 24*, 1681-1691.

Seo, J.K., Lee, M.J., Go, H.J., Park, T.H., Park, N.G., (2012) Purification and characterization of YFGAP, a GAPDH-related novel antimicrobial peptide, from the skin of yellowfin tuna, Thunnus albacares. *Fish Shellfish Immunol* 33, 743–752.

Seo, J.K., Crawford, J.M., Stone, K.L., Noga, E.J., (2005) Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, Crassostrea virginica. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1998–2004.

Shike, H., Shimizu, C., Lauth, X., and Burns, J. C. (2004) Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates, *Dev Comp Immunol 28*, 747-754.

Shike, H., lauth, X., Westerman, M.E., Ostland, V.E., Carlberg, J.M., Van, J.C., Shimizu, C., Bulet, P., Burns, J.C., (2002) Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur J Biochem* 269:2232-2237.Stark, M., Liu, L. P., and Deber, C. M. (2002) Cationic hydrophobic peptides with antimicrobial activity, *Antimicrob Agents Chemother 46*, 3585-3590.

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.

Wu, Z., Powell, R., Lu, W., (2003), Production folding of human neutrophil alpha-defensins in vitro without the pro-peptide. *J Am Chem Soc* 125, 2402-2403.

Zhu, X., Ma, Z., Wang, J.J., Chou, S.L, Shan, A.S., (2014) Importance of tryptophan in transforming an amphipathic peptide into a pseudomonas aeruginosa-targeted antimicrobial peptide. *PLoS One* 9 10;9(12) e114605.

Part Ⅱ.

별불가사리 (*Patiria petinifera*)에서 정제된 OrexinA-like peptide의 분자적 특성 및 재조합 펩타이드 생산 연구

표 목록

표 1. PpOrxA cDNA Cloning 과 recombinant PpOrxA-Leu 생산을 위한 primer 서열 목록

표 2. rPpOrxA-Leu 과 rPpOrxA 의 이론적 분자량 계산

그림 목록

그림 1. C-말단의 아미노산에 따른 active peptide 형태

그림 2. 단백질의 C-말단 amidation 방법

그림 3. 척추동물에서의 Orexin A 와 Orexin B

그림 4. 척추동물과 무척추동물에서의 OrexinA-like peptide 의 일차구조 서열

그림 5. PpOrxA cDNA ORF 서열

그림 6. Native PpOrxA와 Recombinant PpOrxA-Leu

그림 7. rPpOrxA-Leu의 amidation 반응 후 RP-HPLC

그림 8. LC-MS를 이용한 분자량 측정

그림 9. PpOrxA 의 근수축 활성

Molecular characterization and recombinant peptide production of bioactive peptide from the starfish, *Patiria petinifera*

Ji Been Park

Department of Biotechnology, Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

An OrexinA-like peptide (named PpOrxA) was isolated from tubefeet of starfish, *Patinia petinifera*, and its full sequence was obtained previously. PpOrxA was determined to be composed of 33 amino acids and contain amidation at C-terminus. In this study, recombinant PpOrxA (rPpOrxA) was produced using a modified expression vector (pET-28a (+)-TrxA) in a heterogeneous expression system. To produce PpOrxA with C-terminal amidation, the nucleotide sequence of mature PpOrxA was first modified to obtain Leu residue at C-terminus instead of Met and Gly residues encoded in the original sequence. Then after fusion protein TrxA-PpOrxA was separated by Cyanogen bromide digestion, Leu was replaced by amidated Met residue (Met-NH2) using Carboxypeptidse Y. The amino acid sequence of five residues at the N-terminus and the molecular weight was measured by Edman degradation and LC-MS, respectively, to confirm the identity and C-terminal amidation of rPpOrxA. The bioactivity of rPpOrxA was measured by muscle bioassay. Collectively, rPpOrxA with C-terminal amidation was successfully produced using pET-28a (+)-TrxA-PpOrxA plasmid in a prokaryotic expression system and carboxypeptidase Y. Moreover, the C-terminal

amidated recombinant peptide was active in the muscle bioassay while recombinant peptide without C-terminal amidation was inactive suggesting C-terminal amidation is important for PpOrxA bioactivity.

.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

Ⅰ. 서 론

우리 생체 내에는 많은 생리 활성 물질이 있는데 그 중에서도 prepropeptide로부터 잘려서 활성을 띄는 active peptide가 있다. 이 prepropeptide는 대개 RR, RK, KR, KK와 같이 dibasic한 서열이 존재하는데 이 부분이 propeptide convertase에 의해 잘리면서 active peptide가 된다. 이 때 절단되는 dibasic한 잔기 앞에 glycine이 있게 되면 peptidylglycine á-amidating mono-oxygenase (PAM, EC 1.14.17.3) 이라는 효소의 산화적 절단에 의해서 peptide의 c-말단은 carboxyl기가 아닌 amide기가 된다 [Kapuscinski et al., 1993]. 이러한 prepropeptide의 합성경로에 대한 mechanism을 보면 cell 내에서 합성된 signal sequence가 우선 target site에 도달하게 된다. Target site에 도달한 prepropeptide는 signal peptidase에 의해 signal sequence가 잘리면서 propeptide가 되지만 이러한 propeptide는 아직까진 활성을 띄지 않으며, active peptide로 잘리게 되어야 활성을 가지게 된다. 여기서 propeptide로부터 mature peptide를 형성하기 위해 절단부위가 있는데, C-말단의 dibasic한 서열을 인식하는 propeptide convertase가 이 site를 자르면서 propeptide에서 active peptide인 mature peptide가 만들어진다. 이 때 잘리는 dibasic한 서열 앞에 gly이 위치하게 되면 PAM 효소가 작용하게 되어 active peptide의 C-말단이 $RR_{n-1}R_n$-COOH (R_n= Gly)가 아닌 아마이드화된 RR_{n-1}-NH_2가 된다.

이러한 펩타이드 아미노산의 C-말단을 amidation하는 방법에는 화학적인 방법과 in vitro에서 효소에 의한 생물학적 방법이 있다 (그림 2A). 화학적으로 아미노산의 C-말단을 amidation하는 방법으로는 열 또는 강산 및 강염기 조건과 같이 peptide에 영향을 줄 수 있는 극한 상황뿐만 아니라 반응하는 전구체 또한 일반적인 peptide의 C-말단의 carboxyl기가 아닌 다른 형태를 필요로 한다. 예를 들어 그림 2A에서 나타낸 것과 같이 Ammonium carboxylate에서 열을 가한 상태에서 실험을 진행해야 amide기가 되는 것과 같이 amidation에 앞서 다른 한 단계가 추가되거나 하는 단점들이 있다 [Henriksen et al., 1992].

화학적인 방법의 단점을 보완하기 위한 것으로 생물학적으로 효소를 이용한 amidation 방법이 있는데, 그 중 하나가 Carboxypeptidase Y를 이용한 방법이 있다. 가수분해 효소인 Carboxypeptidase Y는 주로 C-말단을 가수분해 하는 기능을 가지고 있지만 transpeptidation으로써의 기능 또한 가지고 있다 [Breddam et al., 1991; Henriksen et al., 1992]. 즉, C-말단의 아미노산을 제거하는 동시에 아마이드된 아미노산을 그 위치에 치환시키는 기능을 지니고 있다. 그림 2B에 나타낸 것과 같이 amidation은 C-말단의 잔기가 Hydrophobic한 아미노산이 위치하고 있을 때 수율이

더 좋으며, pH가 중성의 상태에서 더욱 반응이 잘 일어 난다고 보고되었다.

Orexin은 척추동물인 쥐 (rat) 의 뇌에서 발견된 신경성 펩타이드로 알려져 있으며, hypocretin라고도 한다. Orexin은 Orexin A와 Orexin B로 알려져 있으며 [Gotter et al., 2012], 50% 동일 염기서열을 가진 두 종류의 펩타이드는 하나의 전구 단백질로부터 분열되어 만들어진다. Orexin A는 33개의 아미노산으로 되어 있고 두 개의 이황화 결합을 가지고 있는 반면에 Orexin B는 선형의 28개 아미노산 펩티드로 되어 있다 [Tsujino and Sakurai, 2009] (그림 3). Orexin A와 B는 척추동물에서만 발견되며 무척추동물에서는 Orexin A 아미노산 서열만 알려져 있다 [Semmens et al., 2016]. 척추동물에서 밝혀진 Orexin A은 28~33개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드로 4 개의 Cys가 2 개의 이황화 결합을 이루고 있다. Orexin A의 기능으로는 각성을 일으켜 에너지 대사에 관여하여 불면증, 에너지 조절에 관여를 하고 식욕을 증가시킨다. 또한 다른 신경전달물질 시스템과의 상호작용을 한다고 알려져 있고, C-말단이 –OH가 아닌 $–NH_2$로 존재한다는 것이 특징적이다 [Szlachcic et al., 2013; Tsujino and Sakurai, 2013; Giardino and de Lecea, 2014].

이전에 본 연구실에서 별불가사리의 tubefeet 조직에서 근육수축활성을 지닌 펩

타이드를 정제하였다. 이 물질은 분자량이 약 3466 Da의 33 개의 아미노산으로 구성된 펩타이드이며, 6 개의 Cys이있다. 이 물질은 지금까지 알려진 근육수축활성을 지닌 펩타이드들과는 상동성을 지니고 있지 않다. 그림 3에 나타낸 서열에서 알 수 있듯이 최근 무척추동물에서 밝혀진 Orexin A는 척추동물의 Orexin A와는 달리 6 개의 Cys가 존재하며 3 개의 이황화 결합으로 이루어져 있다. 대표적으로 아무르 불가사리 (*Asterias rubens*)에서 발견된 Orexin A type protein이 있다 [Semmens et al., 2016]. 본 연구실에서 별불가사리에서 정제한 33개의 잔기를 지닌 생리활성 펩타이드를 아무르 불가사리 유래의 Orexin A 아미노산 서열과 Homology한 결과, 이 펩타이드는 아무르 불가사리에서 발견된 Orexin A type protein과 서열과 6 개의 Cys뿐만 아니라 높은 상동성을 나타냈기 때문에 Orexin A like peptide로 명명하였으며 편의상 PpOrxA로 명명하였다 (그림 3).

본 연구에서는 이전 실험에서 무척추동물인 별불가사리의 Tubefeet 조직에서 정제한 OrexinA-like peptidie를 Cloning 하여 밝혀진 서열로 재조합 펩타이드로 만드는 실험을 진행하였다 [Semmens et al., 2016]. 그리고 Orexin A의 C-말단이 아마이드화가 되어 있기 때문에 C-말단이 –COOH로 되어있는 재조합 펩타이드를 (PpOrxA-Leu) 합

성 후, C-말단의 아마이드화를 위해 amidation실험을 추가적으로 진행하였다. 아울러 PpOrxA가 별불가사리의 tubefeet 조직에서 정제되었기 때문에 tubefeet 조직이 불가사리에서 손과 발의 역할을 하기 때문에 움직이는 근육에 관여를 할거라 생각되어 근육수축 실험을 통해 활성을 측정하였다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

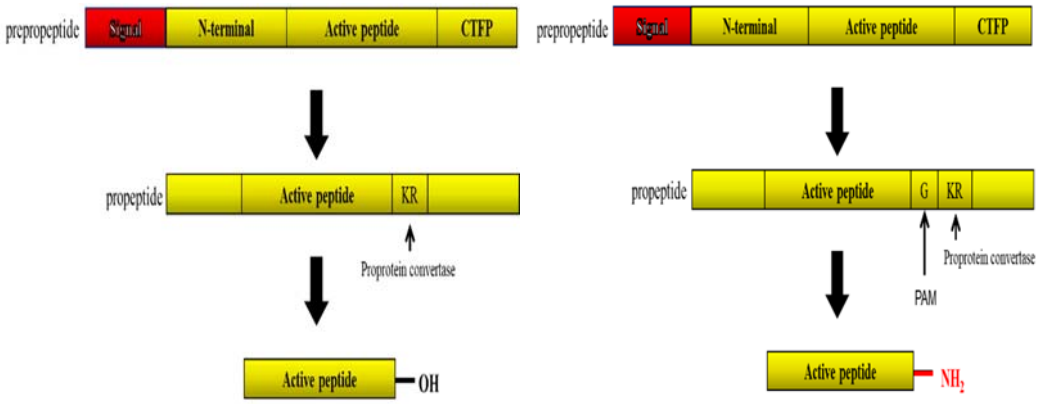
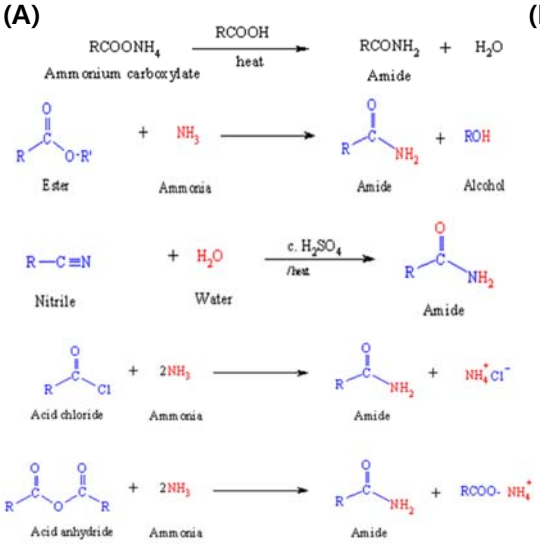


그림 1. C-말단의 아미노산에 따른 active peptide 형태.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

(A)



(B)

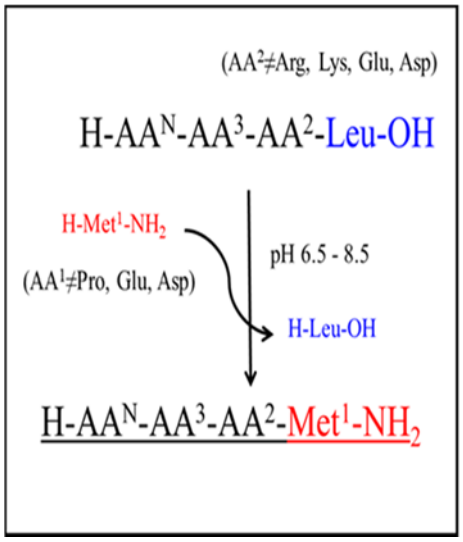


그림 2. 단백질의 C-말단의 amidation 방법.

(A) 화학적인 amidation 방법으로 여러 가지의 단계가 수반되어야 한다는 점과 비교적 특이성이 좋지 않고 오래 걸린다는 단점이 있다. **(B)** 효소적인 합성 방법으로 Carboxypeptidase Y 의 transpeptidation 기능을 나타내었다. H-Leu-OH 가 Carboxypeptidase Y 를 처리한 결과 H-Met-NH_2 로 치환되는 것을 볼 수 있고, 비교적 특이성이 좋고 온화한 환경에서 반응 한다는 장점을 가지고 있다.

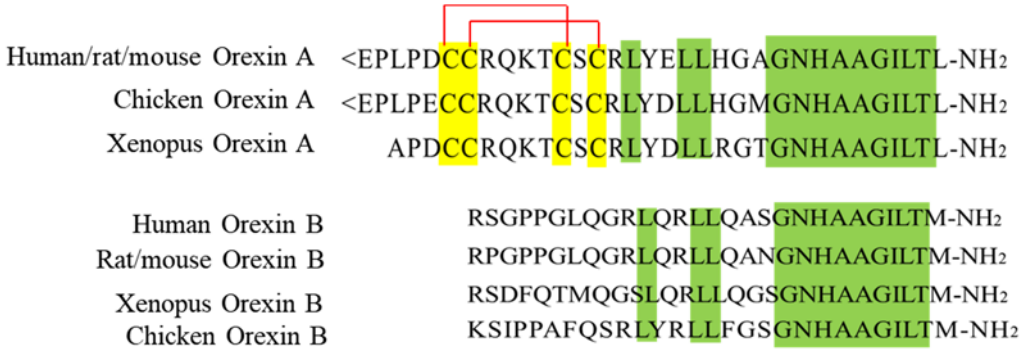


그림 3. 척추동물에서의 Orexin A와 Orexin B

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

그림 4. 척추동물과 무척추동물에서의 OrexinA-like peptide의 일차구조 서열.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 재료

1.1. 실험동물

실험에 사용된 별불가사리(*Patiria petinifera*) 는 부산광역시 해운대구 기장군 청사포 바다에서 채집하여 실험에 사용하였다.

2. 실험 방법

2.1. cDNA cloning 과 서열 분석

본 연구실에서 정제하고 cloning한 PpOrxA는 C-말단이 아마이드화 되어 있는 물질이다. Recombinant peptide를 제작하면 C-말단이 –OH 형태로 되기 때문에 C-말단을 아마이드화 시키기 위해 추가적으로 amidation 실험이 진행되어야 한다. 그림 5A에 나타내듯이 native PpOrxA는 C-말단에 Met 잔기를 지니고 있으며 아마이드화 되어 있다. 따라서 그림 5B와 같이 PpOrxA의 amidation을 위해서 C-말단의 Met 잔기를

Leu 잔기로 치환시킨 형태의 recombinant PpOrxA-Leu (rPpOrxA-Leu)을 일차적으로 만들어야 하기 때문에, 또 다른 primer를 제작하여 PCR을 통한 recombinant peptide cloning을 진행하였다 (표 1). 먼저 불가사리의 tubefeet 조직 100mg을 추출하여 Hybrid-R kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA는 Topscript RT dryMix(dT18)을 사용하여 합성하였고 Primer는 실험실에서 cloning한 PpOrxA 서열을 이용하여 제작하였다 (표 1). PCR은 nTaq Hot polymerase (Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하였다. PCR 조건으로는 95℃에서 10분간 initial denaturation 후, 35cycle간 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초간 반응하였다. 그 후 마지막 extension으로 72℃에서 5분간 반응하였다. 그 결과인 PCR product를 pGEM-T easy vector system (Promega, Madison, WI, USA) 삽입 시켜 서열 분석을 진행하였다.

2.2. Recombinant PpOrxA-Leu 생산

2.2.1. Plasmid 제작

Recombinant PpOrxA-Leu은 본 연구실에서 제작한 modified pET-28a(+) system을 사용하여 생산하였다. 우선, 각각에 제한효소인 *EcoR*I, *Sal*I 을 사용하여 primer를 제작하였다. CNBr cleavage를 위해 Met을 붙여 PpOrxA-*EcoR*I-Met-Fw primer와

Carboxypeptidase Y의 기능이 C-말단의 아미노산이 hydrophobic한 아미노산일 때 반응이 잘된다는 논문에 내용에 따라 PpOrxA 서열 중 마지막 잔기인 Met을 Leu으로 치환하기 위해 PpOrxA-*Sal*I-Leu-Rv primer를 제작하였다 (표 1). 이 primer를 사용하여 PCR을 통해 modified된 PpOrxA cDNA 서열을 증폭시켰다. PCR 조건과 과정은 앞의 실험방법 2.1.과 같게 진행하였다. 그 후 PCR product를 마찬가지로 제한효소 *EcoR*I과 *Sal*I으로 enzyme digestion시킨 pET-28a(+)-TrxA fusion vector에 삽입시켰다. 그 후 *E.coli* BL21(DE) 균주 (Novagen, Madison, WI, USA)에 transformation하여 제대로 서열이 삽입되었는지 서열을 분석하여 확인하였다. 그 후 *E.coli*를 통한 대량 생산을 통하여 rPpOrxA-Leu을 생산하였다.

2.2.2. 대량 생산

Transformation한 균주를 *E.coli*를 사용하여 대량 생산하였다. 먼저 5 ㎖의 30㎍ kanamycin + Luria-Bertani medium (KLB medium)에 균주를 분주하여 37℃ shaking incubator에 16시간 배양하였다. 다음날 500 ㎖의 KLB medium에 배양한 균주 모두 분주한 다음 37℃ incubator에 약 3 시간 배양하였다. 배양한 배지를 optical density (OD_{600})에 측정하였을 때, 측정값이 0.4~0.6이 나오면 0.5mM isopropyl β-$_D$-1-

thiogalactopyranoside (IPTG)를 배지에 첨가하여 4 시간 동안 37 ℃에서 배양하여 과발현시켰다. 배양한 균주를 원심분리하여 pellet만을 취한 후 1 x phosphate-buffered saline (PBS; pH 7.4)로 3번 씻어 원심분리하였다. 계속해서 1 x PBS로 균주를 suspension한 후, Sonifier 250 (Branson Ultrasons, Annemasse, France)를 사용하여 40% amplitude에서 20 초간 3번의 sonication을 진행하였다. 원심분리 (vs-21smt, 20,000g, 20min, 4℃)를 진행 후, pellet만을 8 M urea와 5 mM imidazole을 포함한 1 x PBS에 suspension하여 His-tag affinity purification를 진행하였다. PpOrxA-Leu를 형성하기 위한 fusion peptide는 Nickel-nitrilotriacetic acid resin (Novagen)을 30:1 비율의 volume을 넣어 1시간정도 실온에 배양하여 affinity chromatography를 이용하여 정제하였다. 그 후 필터를 이용하여 fusion peptide가 binding된 nickel을 8 M urea와 500 mM imidazole이 포함된 1 x PBS로 bead의 2배 volume으로 용출하였다. 용출된 fusion peptide은 SpectraPor dialysis membranes (Spectrum Laboratories, Inc., Rancho Doinguez, CA, USA)를 사용하여 4 L의 5 % HAc에 약 16 시간동안 투석하였다. 투석한 sample을 동결 건조한 후 3 ㎖의 50 % formic acid로 녹인 후, Met 잔기의 C-말단 부분을 자르는 CNBr을 처리하였다. 10 ㎎/㎖ CNBr (final concentraion)를 녹인 sample에

주입한 후, 8 시간동안 암반응을 하였고 10 배 volume의 D.W.로 희석하여 동결건조를 진행하였다. CNBr로 처리된 fusion peptide mixture은 3 ㎖의 50 % formic acid로 녹인 후, reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) (Capcell PAK C18; 4.6 x 250 mm; Shisheido, 5-65 % ACN in 0.1 % TFA, 1㎖/min)를 이용하여 각각의 peak들을 정제하였다.

2.3. PpOrxA의 C-말단 Amidation

2.3.1. Amidation

PpOrxA의 C-말단 잔기의 amidation을 위해 C-말단의 Met 잔기를 Leu으로 치환시킨 재조합 PpOrxA-Leu을 우선 만들었다. 그 후 rPpOrxA-Leu 서열의 C-말단 잔기인 Leu을 Carboxylpeptidase Y를 이용하여 자른 후 동시에 Met-NH_2-HCl 기질을 처리하여 C-말단이 amidation된 PpOrxA-Met-NH_2 만들기로 하였다 (그림 5). RP-HPLC를 통해 정제한 rPpOrxA-Leu를 동결건조하여 무게를 잰 후 사용하였다. 실험방법으로는 C-말단 amidation방법을 참고한 논문에서 사용한 시약과 양을 참고하여 실험을 진행하였다. 먼저, 동결건조한 350 ㎍의 rPpOrxA-Leu을 농도를 1 ㎍/㎕로 맞추어 사용 하였다. C-말단을 아마이드화로 치환시킬 기질로 Met-NH2-HCl (216 ㎎/ 300 ㎕)를 사용

하였으며, 3 M NaOH +1 M NaEDTA을 첨가하여 stock을 만들어 실험을 진행하였다. 사용한 효소인 Carboxylpeptidase Y는 30.5 ㎍/ 1.22 ㎕를 사용하였다. 효소는 제일 마지막에 넣어 사용하며 반응물을 약 650 ㎕를 만들어 water bath를 이용하여 30 ℃에서 20 분 동안 반응하였다. 반응 시킨 후 0, 10, 20 분에서 각각 10 ㎕씩 따내어 100 % Acetic acid (28 ㎕)와 D.W. 62 ㎕를 섞어 반응을 중지시켰다. 이 반응물 100 ㎕를 사용하여 각각의 반응 시간당 RP-HPLC (25-35% ACN in 0.1% TFA, 20min)를 진행하여 효소에 의한 최종생성물인 PpOrxA의 생성여부를 확인하였다 (그림 7).

2.3.2. LC-MS 를 이용한 분자량 측정

Amidation 반응 후 RP-HPLC를 통해 20 분 반응시켜 분리한 peak들을 LC-MS (Bruker maXis-HD LC-MS/MS Q-TOF system)를 통해 분자량을 측정하였다. LC-MS에서 사용한 column은 Waters Acquity UPLC BEH C18 column (2.1 mm × 100 mm, 300 Å, 1.7 μm, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 분자량을 측정하였다. 실험 조건으로는 A buffer (0.1% formic acid in water [v/v])와 B buffer (0.1% formic acid in acetonitrile [v/v])를 사용하였으며, 20 % B (0–1.0 min), 20% B → 40% B (1.0–21.0 min), 40% B → 95% A (21.0–22.0 min)에서 실험을 진행하였다. 분자량은 electrospray ionization (ESI)

와 multiple reaction monitoring (MRM)에서 측정되었다. LC-MS를 이용하여 분자량을 측정한 결과와 ExPasy를 통해 계산한 분자량과 비교하여 amidation이 되었는지 확인하였다 (그림 8과 표 2)

2.3.3 별불가사리의 근수축활성 측정

별불가사리에서 정제한 PpOrxA가 tubefeet 조직에서 정제되었기 때문에 PpOrxA가 불가사리의 움직이는 근육에 관여를 하고 있다고 생각되어 별불가사리의 apical muscle에서의 근수축 실험을 진행 하기로 하였다. 별불가사리를 해부하여 배면과 복면을 분리하여 배면을 뒤집으면, 5개의 팔을 따라 중앙을 가로 지르는 apical muscle 부분이 있다. 이 muscle을 mess를 이용하여 20 mm의 단편으로 만들어 사용하였다. 모든 과정은 25 mM artificial sea water (ASW) buffer 에서 진행하였으며, 조성은 445mM NaCl, 55 mM $MgCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 10 mMTris-HCl (pH 7.8) 10 mM Glucose 이다. 먼저 준비된 apical muscle을 반응조의 지지대에 고정시키고, 위쪽은 isometric transducer에 연결하여 resting tension이 1. 0 g이 되도록 30 분간 평형화 시켰다. 조직의 tension이 1.0 g이 유지되면 10^{-5} M의 Ach를 투여하여 근육을 활성화 시켰다. 이 후 HPLC 정제 단계에서 얻은 peak들을 투여하여 수축활성을 측정하였다.

Ⅲ. 결과 및 토론

1. Recombinant PpOrxA

1.1. PpOrxA의 서열 분석

별불가사리의 tubefeet에서 정제한 PpOrxA 유전자 구조는 PCR cloning을 통해 Orexin ORF 전체 서열과 PpOrxA의 mature peptide의 서열을 밝혔다. PpOrxA 의 mature peptide는 총 33개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 6개의 Cys가 포함되어 있으므로 3개의 이황화 결합이 이루어져 있을 것이라 예상된다 (그림 5). 그리고 앞서 서론에서 말 한 것과 마찬가지로 mature peptide C-말단 서열 뒤 Gly이 위치하고 있어 C-말단이 아마이드화가 되어 있을 것이라 예상된다. 이 결과로 인해 PpOrxA를 Recombinant peptide로 생산한 후 추가적으로 C-말단의 amidation을 통해 C-말단을 아마이드화 시키는 과정이 필요로 하다는 것을 확인하였다.

1.2. Recombinant PpOrxA-Leu 생산

cDNA cloning 결과, PpOrxA의 mature peptide는 C-말단이 아마이드화되어 있다는 것을 확인하였다. 그 결과로 보아 우선, recombinant peptide인 rPpOrxA-Leu을 먼저

생산 후, 추가적으로 아마이드화 실험을 진행하였다. 먼저, PpOrxA의 C-말단을 아마이드화 하기 위해 PpOrxA의 C-말단의 마지막 아미노산인 Met 잔기를 Leu 잔기로 치환하였다. 그 이유는 실험에 사용한 효소인 Carboxypeptidadse Y가 Hydrophobic한 서열을 가진 기질과 아마이드화 반응을 잘한다는 보고가 있기 때문이다. PpOrxA의 C-말단인 Met을 Leu으로 치환한 PpOrxA-Leu서열을 PCR로 cloning하여 recombinant peptide를 제작하였다. 이 물질은fusion vector인 pET28a(+)-TrxA에 ligation 후, *E.coli* BL21(DE3)에 transformation하여 서열분석을 통해 확인하였다. 그 이후 fusion peptide를 *E.coli*를 통해 과발현하였으며, fusion peptide를 His-tag affinity chromatography를 하였다. 위 과정에서 얻은 fusion peptide을 정제한 후 투석 하였다. 투석한 sample을 CNBr을 처리하였고 RP-HPLC를 통하여 정제하여 rPpOrxA-Leu을 얻었다. (그림 6).

2. PpOrxA-Leu의 C-말단 amidation

2.1. Amidation

앞에서 합성한 rPpOrxA-Leu의 C-말단의 아마이드화를 위해 rPpOrxA-Leu과 Carboxypeptidase Y와 Met-NH_2-HCl 기질을 반응시켜 amidation 반응여부를 시간에 따라 RP-HPLC (25-35 % ACN in 0.1 % TFA, 20 min, 0.5 ㎖/ min)로 분석하였다. 그 결

과 반응시간이 지남에 따라 rPpOrxA-Leu의 peak (peak A) 이외에 C-말단이 Met-NH_2로 되어있는 rPpOrxA (peak B)를 포함한 여러 개의 peak 가 관측되었다. 이러한 peak들의 형성은 amidation 반응이 일어나고 있다는 것을 의미한다 (그림 7).

2.2. LC-MS를 통한 분자량 측정

Carboxypeptidase Y를 사용하여 amidation 반응을 진행한 후 amidation이 정확하게 되었는지 확인하기 위하여 RP-HPLC를 통해 분리한 peak A와 B를 LC-MS를 통해 분자량을 측정하였다. 그림 7과 표 2에 측정한 분자량값과 PpOrxA서열을 토대로 ExPasy 에서 계산한 이론적 분자량과 비교하여 나타내었다. 먼저, 이론적인 PpOrxA-OH type의 분자량은 3449.02 Da이고, amidation 후에 형성되는 PpOrxA-Met-NH_2 type의 분자량은 3466.08 Da이다. LC-MS를 이용하여 측정한 peakA의 분자량은 3448.97 Da으로 나왔으며, peak B의 분자량은 3466.03 Da으로 측정되었다. 따라서 약간의 오차값이 존재하지만 두 물질의 분자량이 각각 거의 같음을 알 수 있다. 이러한 결과로부터 peak A는 amidation 반응을 하기 전의 sample (rPpOrxA-Leu)이고, peak B는 반응 후 sample (rPpOrxA)에 해당되는 것을 확인하였다 (그림 8과 표 2).

2.3. 근수축 활성 측정

Amiadtion 반응 후 HPLC로 분리한 peak A와 peak B 및 다른 peak들을 사용하여 별불가사리의 apical muscle에 대한 근수축 활성 측정을 하였다 (그림 9). 그림 8B에 나타내듯이 아마이드화가 일어난 peak B는 근수축 활성을 나타냈지만, rPpOrxA-Leu (peak A) 및 다른 peak들은 활성이 나타나지 않았다. 그러므로 PpOrxA는 C-말단의 amidation이 활성을 나타내는 데에 필수적이라는 것을 알 수 있다. 본 실험에서 천연물과 동일한 rPpOrxA의 C-말단 amidation 수율은 그다지 좋지 않았다. 그러나 amidation 반응에 참고한 논문에 따르면 Carboxypeptidase Y를 통한 amidation의 수율은 최대 90 %까지 나타낸다고 보고되었다 [Breddam et al., 1991]. 이러한 수율의 차이가 발생하는 이유로 Breddam 그룹은 중성조건에서 실험을 진행한 반면 본 연구에서는 amidation 반응을 염기성 조건 (약 pH 8~9)에서 진행하였다. 아마 이러한 실험 조건의 차이로 인해 PpOrxA의 수율이 감소한 것 같다고 생각된다. 또한, 하나의 조건에 대해서만 실험을 진행 하였기에 수율이 증가하는 조건을 찾지 못하였다. 수율의 증진을 위해서는 추가적으로 기질과 효소의 비율 및 온도, 반응시간 등의 최적 실험 조건을 찾는 실험이 필요하다고 할 수 있다.

3. 결론

본 연구에서는 이전의 실험에서 별불가사리의 tubefeet에서 정제한 OrexinA like peptide에 대한 연구를 진행하였다. 정제한 PpOrxA의 cDNA는 cloning에 의해 mature peptide 서열의 C-말단 뒤에 Gly이 위치하고 있어 C-말단이 –OH type이 아닌 $–NH_2$ type으로 아미노산 서열이 아마이드화가 된 것을 확인하였다. Recombinant peptide는 일반적으로 C-말단이 –OH 으로 합성되기 때문에 C-말단이 아마이드화 된 형태를 만들기 위해서 Recombinant peptide 생산 후 C-말단의 amidation 실험을 추가적으로 필요하다. 따라서 일차적으로 합성한 rPpOrxA-Leu을 사용하여 amidation 반응을 추가적으로 실험하였다. rPpOrxA-Leu에 가수 분해 효소인 Carboxypeptidase Y와 Met-NH_2-HCl을 기질로 사용하여 반응 후, 성공적으로 C-말단이 아마이드화 된 것을 확인하였다. 또한 본 연구에서 rPpOrxA의 환원 과정과 refolding단계를 진행하지 않았지만 근수축 활성 측정 및 LC-MS를 이용한 분자량 측정 결과로 미루어 보아 이미 rPpOrxA 분자내에 이황화 결합이 형성 되어 있음을 확인하였다. 그러나 rPpOrxA 내의 이황화 결합이 어떠한 패턴으로 되어 있는지는 지금 현재의 실험 결과만으로는 정확히 알 수 없다.

표 1. PpOrxA의 cDNA Cloning 과 recombinant PpOrxA-Leu 생산을 위한 primer 서열 목록.

Name	Sequence (5'-3')	Information
ORX-F primer	GCTGCAGGATGCGCACGG (1~19)*	For cDNA cloning
ORX-R primer	GAAAGTCTTCAATATACGTCTTCTGCG (474~-500)	
OrxA-EcoRI-Met-Fw primer	AGAGGAGAATTCATGGGGAACGCCTG (82~92)	For recombinant protein
OrxA-SalI-Leu-Rv primer	CTCCTGTCGACTCATAAGGTAAGTGTGT (167~176)	

* : 그림 5에서 나타낸 잔기의 서열번호

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

그림 5. PpOrxA cDNA ORF 서열.

Cloning 을 통해 PpOrxA 의 전체 ORF 서열을 밝혔으며, 총 483 b 로 이루어져 있으며 160 개의 아미노산으로 이루어져 있고, 그 중 mature peptide 는 33 개의 아미노산이고 Met 뒤의 Gly 에 의해 amidation 이 일어나 C-말단이 –NH2 형태로 존재하는 것을 알 수 있었다.

(A)

Native PpOrx A

G N A C C K G T C H E I P K G C N C P Y K A V L C G

E L N T L T M-NH_2

Recombinant PpOrx A-Leu

G N A C C K G T C H E I P K G C N C P Y K A V L C G

E L N T L T L-OH

(B)

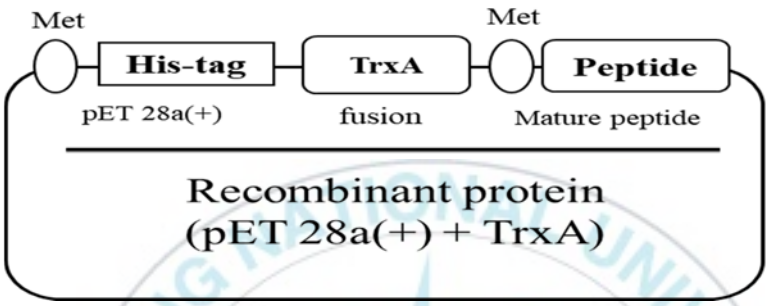


그림 6. Native PpOrxA와 Recombinant PpOrxA-Leu.

원래의 PpOrxA의 아미노산 서열에서 Carboxypeptidase Y가 hydrophobic한 아미노산에서 반응을 잘한다는 내용에 따라 C-말단의 Met을 Leu으로 치환시켜 재조합 펩타이드 plasmid를 제작하였다.

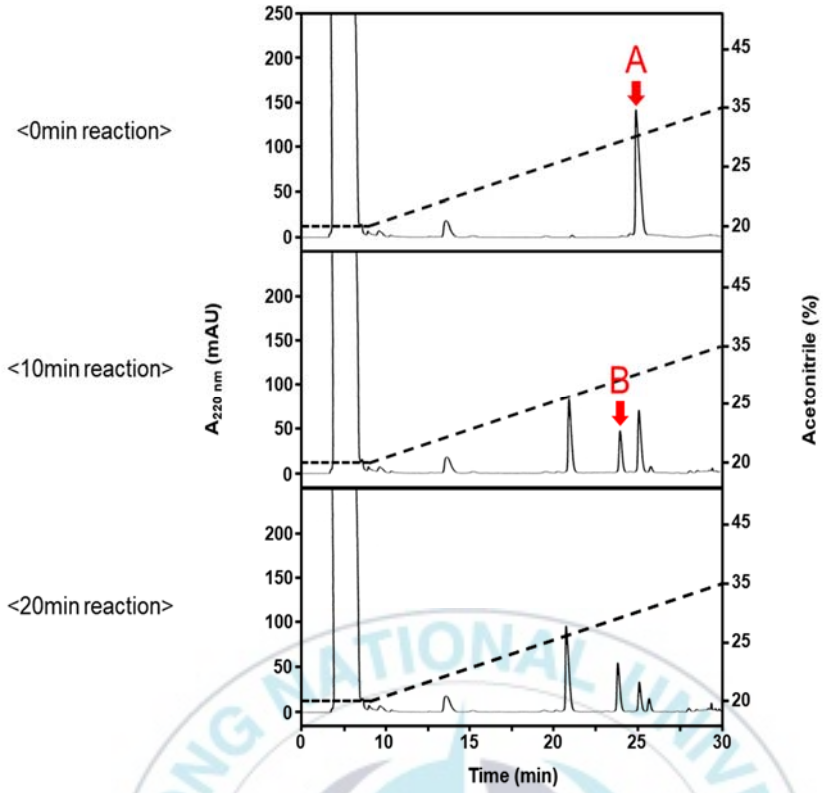


그림 7. rPpOrxA-Leu의 amidation 반응 후 RP-HPLC.

0 분대의 PpOrxA 의 peak A 가 반응 시간이 지남에 따라 peak B 를 비롯한 peak 들로 나눠 진 것으로 보아 amidation 반응이 일어나고 있다는 것을 의미한다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY
부경대학교

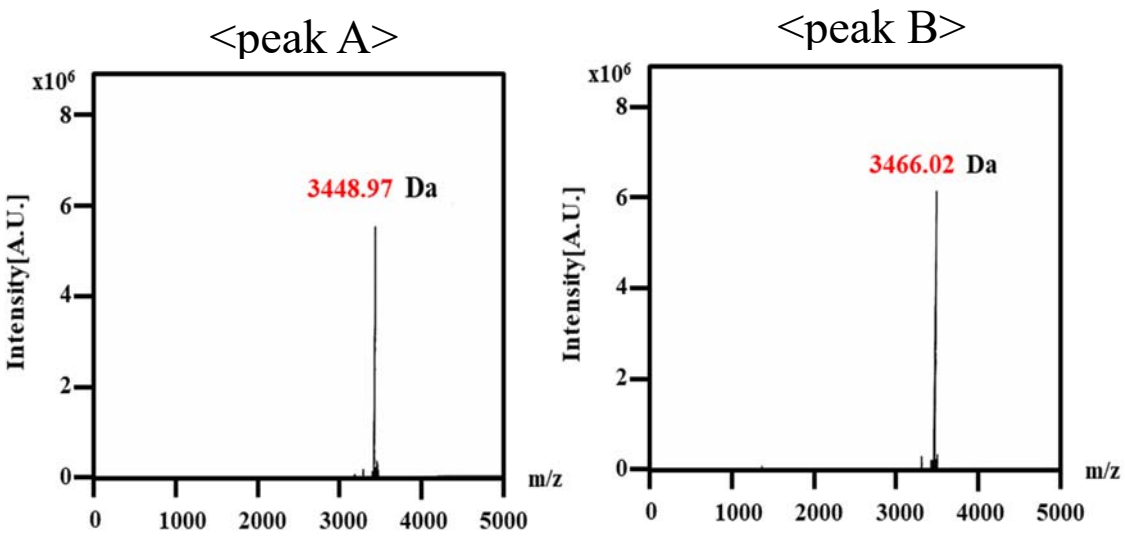


그림 8. LC-MS를 이용한 분자량 측정.

Amidation 반응을 통해 얻은 peak A, B가 밑의 표와 비교하였을 때, amidation 반응 전 분자량과 amidation 반응 후 분자량과 거의 같음을 알 수 있기에 amidation 반응이 일어났다고 할 수 있다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

표 2. rPpOrxA-Leu과 rPpOrxA의 이론적 분자량 계산.

Sample name	C-말단	Average (Da)	
		M.W without S-S	M.W with 3 S-S
반응 전 **rPpOrxA-Leu**	**TLTL-OH**	3455.08	**3449.03**
반응 후 **rPpOrxA**	**TLTM-NH_2**	3472.13	**3466.08**

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

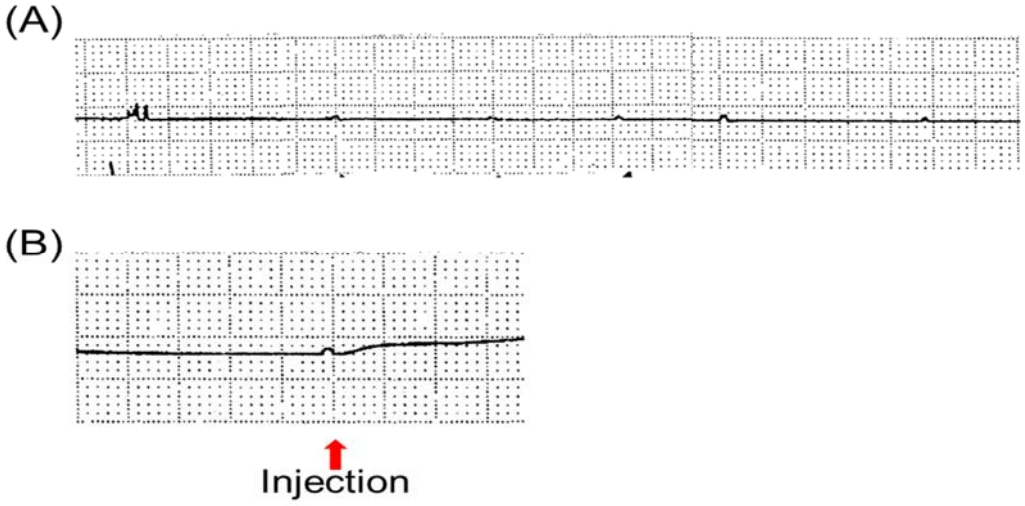


그림 9. PpOrxA 의 근수축 활성.

(A) peak B를 제외한 peak들을 별불가사리의 apical muscle에 근수축 활성을 본 결과로 아무런 반응이 나오지 않았다**. (B)** peak B를 injection한 결과로 약간의 근수축 활성을 나타내었다.

PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY 부경대학교

VI. 참 고 문 헌

Breddam, K., Widmer, F., Meldal, M., (1991) Amidation of growth hormone releasing factor (1-29) by serine carboxypeptidase catalysed transpeptidation. *Int J Pept Protein Res*. 37(2): 153-60

Giardino, W.J., de Lecea, L., (2014), Hypocretin (orexin) neuromodulation of stress and reward pathways. *Curr Opin Neurobiol.* 2014 29:103-8.

Gotter, A.L., Webber, A.L., Coleman, P.J., Renger, J.J., Winrow, C.J., (2012), International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXVI. Orexin receptor function, nomenclature and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2012 64(3):389-420.

Henriksen, D.B., Rolland, M., Jacobsen, M.H., Buchardt, O., Breddam, K., (1992) C-terminal amidation of calcitonin by carboxypeptidase Y catalyzed transpeptidation with a photocleavable nucleophile. *Pept Res.* 5(6):321-4

Kapuscinski, M., Green, M., Sinha, S.N., Shepherd, J.J., Shulkes, A., (1993), Peptide alpha-amidation activity in human plasma: relationshipto gastrin processing. *Clin enocrinol (Oxf)* 39(1):51-8

Semmens, D.C., Mirabeau, O., Moghul, I., Pancholi, M.R., Wurm, Y., Elphick, M.R., (2016), ranscriptomic identification of starfish neuropeptide precursors yields new insights into neuropeptide evolution. *Open Biol.* 2016 6(2):150224

Szlachcic, A., Majka, J., Strzalka, M., Szmyd, J., Pajdo, R., Ptak-Belowska, A., Kwiecien, S., Brzozowski, T., (2013), Experimental healing of preexisting gastric ulcers induced by hormones controlling food intake ghrelin, orexin-A and nesfatin-1 is impaired under diabetic conditions. A key to understanding the diabetic

gastropathy?, *J Physiol Pharmacol.* 64(5):625-37.

Tsujino, N, Sakurai T. (2009), Orexin/hypocretin: a neuropeptide at the inferface of sleep, energy homeostasis, and reward system. *Pharmacol Rev* 162-76

Tsujino, N., Sakurai, T., (2013) Role of orexin in modulating arousal, feeding, and motivation. *Front Behav Neurosci.* 18;7:28.

Ⅶ. Acknowledgement

실험실 생활을 시작한 지 벌써 3년이라는 시간이 지났습니다. 학사 과정과 석사 과정을 보내는 동안 옆에서 조언을 아끼지 않으시며 지도해 주신 박남규 교수님께 먼저 감사의 말씀을 드립니다.

또한 본 논문의 심사위원을 맡아주신 이형호 교수님, 공인수 교수님께도 감사인사 드리며, 4년간 생물공학과에서 생물공학에 대한 지식을 쌓을 수 있게 지도해주신 홍용기 교수님, 김중균 교수님, 김성구 교수님, 정귀택 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

학부생 때 실험실에 들어와 처음 실험을 시작했을 때부터 마지막까지 많은 가르침을 주신 김찬희 박사님께도 깊은 감사 인사 드립니다. 실험 외에도 많은 것을 배워갈 수 있었던 3년이었습니다.

힘들 때 옆에서 위로해 주시고, 많은 것을 챙겨주시던 고혜진 박사님께도 깊은 감사 인사 드립니다. 박사님들 덕분에 석사 과정 동안 많은 것을 배워가는 것 같습니다.

그리고 학부생 때부터 석사 과정까지 옆에서 많은 도움을 준 혜영이언니! 언니 덕분에 힘들었던 석사 생활 즐겁게 했던 것 같아요. 약 3년동안 질문을 많이 했는데도 불구 하고 그때마다 친절히 대답해줘서 정말 든든했고 고마웠어요. 석사 졸업해도 자주 만나서 맛있는 것도 먹으러 가요! 연락 자주할게요. 남은 박사생활 무사히 마치시길 바라요. 파이팅!

석사 동기인 태관 오빠, 석사 과정 동안 티격태격했지만 오빠 덕분에 즐겁게 석사 과정을 마칠 수 있었다고 생각해. 석사 2년동안 정말 고생 많았고, 고마웠어! 앞으로 좋은 일만 가득하길 바랄게. 자주 연락하자

석사 과정 동안 실험실 멤버였던 효진 오빠, 승민이, 태한 오빠, 태우, 병관, 초희, 소희, 예슬이, 기동이, 도현이, 영훈이, 석현이, 수빈이, 종범이, 선우. 너희들 덕분에 실험실에서 자주 웃고 즐겁게 생활했던 것 같다. 실험실에 활력을 줘서 고맙고 앞으로도 잘해나가길 바랄게.

특히, 옆에서 힘들 때나 즐거울 때 많은 힘이 되어줬던 기동이. 내 징징거림, 불평, 불만 언제나 잘 들어줘서 정말 고맙고 앞으로도 행복하자.

힘들 때나 즐거울 때, 술 한잔 하러 모여준 예진언니, 승민이, 소희, 종헌 오빠, 혜영이 언니, 전부 너무 고마웠어요. 종종 모여서 또 맛집 탐방합시다!

그리고 가끔 만나서 모르는 실험실 얘기해도 열심히 들어주고 받아주었던 내 친구들도 정말 고마워. 말로는 못했지만 착하고 멋진 너희들이 있어서 든든하고 언제나 즐거웠어. 다들 바빠서 자주 보진 못하지만 종종 만나서 회포 풀자.

마지막으로, 석사를 진학한다고 했을 때 아무 말없이 지원해주셨던 엄마, 오빠, 이모, 이모부, 진이, 효인이, 약 26년 간 옆에서 많은 응원을 해주셔서 정말 감사했습니다. 앞으로 자랑스러운 딸, 언니, 동생이 되도록 노력하겠습니다. 사랑하고 감사합니다.

지금까지 이 논문이 나오기까지 옆에서 응원해주신 많은 분들께 감사드리며 이 논문을 바칩니다.