

공학석사 학위논문

붕장어 (*Conger myriaster*) 피부로부터
새로운 항균활성 펩타이드의 분리 및 정제

지도교수 박 남 규

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함

2002 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학



생 물 공 학 과

김 인 혜

김인혜의 공학석사 학위논문을 인준함

2001 년 12 월 26 일

주 심 이학박사 홍 용 가 (인) 

위 원 이학박사 이 형 호 (인) 

위 원 공학박사 김 성 구 (인) 

목 차

Abstract	1
I. 서 론	2
II. 재 료 및 방 법	7
1. 재료	7
1.1. 실험동물	7
1.2. 시약 및 재료	7
2. 실험방법	9
2.1. 추출	9
2.2. 정제	11
2.3. 항균활성 측정	13
2.4. 천연펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정	14
2.5. Chou-Fasman의 구조 예측법에 의한 2차구조 예측	14
III. 결 과 및 고 찰	15
1. 항균활성 펩타이드의 정제	15
1.1. 추출	15

1.2. 정제	15
2. 정제한 항균활성 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열결정	28
3. Chou-Fasman의 구조예측법에 의한 2차구조예측	32
4. 정제한 항균성 펩타이드의 작용메카니즘 예측	35
 IV. 요 약	 37
 V. 참 고 문 헌	 38
 VI. 감 사 의 글	 44

Purification of antimicrobial peptide from the skin of conger eel, *Conger myriaster*

In Hae Kim

Department of Biotechnology and Bioengineering

Graduate School

Pukyong National University

Abstract

A novel antimicrobial peptide was isolated from the skin of conger eel, *Conger myriaster*. This peptide was purified to homogeneity by gel-filtration, heparin affinity, ion-exchange and reversed-phase high performance liquid chromatography.

The primary structure of purified peptide, Ser-Ser-Gly-Pro-Phe-Gln-Ala-Tyr-Gly-Val-Gln-Tyr (1302 Da), was determined by an automated amino acid sequencing and MALDI-TOF Mass.

Comparison of the amino acid sequence with those of other known antimicrobial peptides revealed that purified peptide was a novel antimicrobial peptide. This peptide showed antimicrobial activity *in vitro* against *Bacillus subtilis* PM125. Chou-Fasman's prediction method showed that this peptide took an unordered structure containing the turn structure in N-terminus.

Key word: Antimicrobial peptide, Conger eel, MALDI-TOF, Chou-Fasman's Prediction method, HPLC

I. 서 론

척추동물 및 무척추동물들은 세균, 기생충 그리고 곰팡이 등과 같은 외부 물질의 침입으로부터 자신을 방어하기 위한 면역체계를 가지고 있다. 생체의 면역체계는 크게 비특이적 면역반응 (innate immunity)과 특이적 면역반응 (adaptive immunity)으로 구성되어 있다. 비특이적 면역은 항균활성 펩타이드 (antimicrobial peptides) 및 lectin에 의한 체액성 면역 (humoral immune response)과 대식세포 (macrophage), 다핵형 백혈구 (polymorphic leukocyte)등에 의한 세포성 면역 (cellular immune response)으로 이루어져 있다. 한편 특이적 면역반응에는 B 림프구가 항원을 인지한 후 분화되어 특이적인 항체를 분비하는 체액성 면역 반응과 억제 T 세포 (suppressor T cell), 세포독성 T 세포 (cytotoxic T cell) 및 기억 T 세포 (memory T cell), B 림프구를 활성화시키는 역할을 담당하는 세포성 면역반응으로 구성되어 있다. 생체가 세균등과 같은 이물질에 감염되었을 경우 일차적인 방어 역할을 담당하는 비특이적 면역과 이차적인 방어 역할을 담당하는 특이적 면역반응이 조화를 이루면서 생체방어기능을 담당한다고 알려져 있다 (1-5).

지금까지 비특이적 면역을 수행하는 여러 물질 중 항균활성 펩타이드에 대한 연구는 단백질에 비해 분자량이 적은 점, 분리의 편리함, 화학합성의 용이함 때문에 동물뿐만 아니라 식물에 이르기까지 다양한 개체로부터 폭넓게 연구되어져 오고 있다. 또한 이들 물질은 항균작용 외에 상처치료의 촉진 및 단핵세포 (monocyte)의 화학주성 (chemotaxis)작용을 나타낸다고 보고되어 있다 (6-12).

지금까지 알려진 항균활성 펩타이드를 살펴보면 포유류인 사람, 돼지 및 소의 호중구 (neutrophil)에서 α -defensin인 HNP1-4 (13), protegrins (14) 그리고 indolicidin (15), enkelytin (16) 등이 정제되었다. 또한 소의 피부 및 기관지점액질에서도 β -defensin과 treacheal antimicrobial peptides (TAP) (17)등이 보고되었다.

특히 놀랍게도 양서류인 개구리와 두꺼비의 피부로부터 bombinins (18), bombinin-like peptide (19), PGLa (20), magainins (21, 22), XPF (23), CPF (24), gaegurins (25), dermaseptin (26), ranalexin (27), brevinins (28), esculentin (29) 및 temporins (30)과 같은 수많은 항균활성 펩타이드가 정제되었다. 또한, 아시아산 두꺼비인 *Bufo bufo gargarizan*과 아프리카산 갈퀴 개구리인 *Xenopus laevis*의 위 (stomach)로부터 buforin I (31)과 PGQ (32)도 발견되었다.

곤충으로부터 유래한 항균활성 펩타이드로서는 gram-positive 및 gram-negative bacteria에 강한 활성을 가지는 cecropin (33), mastoparan B (34), melittin (35)등과 분자내에 disulfide bond를 가지는 defensin (36)등이 정제되었다. 그리고 Gly이 풍부하게 함유된 물질로 attacin (37), sacrotoxin (38), coleptericin (39)등이 알려져 있고, 비교적 pro를 다량 포함하는 동시에 분자량이 적은 펩타이드로서는 꿀벌로부터 정제한 apidaecin (40)과 abaecin (41)등이 있으며, *Drosophila*로부터 andropin (42)과 같은 펩타이드가 정제되었다.

육상생물에 비해 그다지 많은 연구가 이루어져 있지는 않지만, 최근에 수생생물을 대상으로 항균성 펩타이드에 관한 연구가 활발히 진행되어져 오고 있다. 메기 (Catfish)의 피부로부터 parasin I (43), 미꾸라지 (Mudfish)에서 misgurin (44), 새우 (Shrimp)에서 penaeidins (45), 일

본산 투구게 (Horseshoe crab)로부터 tachyplesin I (46), Blue crab의 혈액세포 (hemolymph)에서 callinectins (47), 멍게의 혈액세포 (Tunicate hemocyte)로부터는 styelin (48), clavinins (49), dicynthaurins (50)등이 있다. 또한 홍합 (Mollusc)에서 mytilin (51), myticin (52)이 정제되었고, 넙치 (Flounder)의 피부에서 pleurocidin (53) 및 혀가자미 (Moses sole fish)에서 pardaxins (54)등이 보고되었다. 본 연구실에서도 최근 곰장어 (*Eptatretus burgeri*)의 피부로부터 항균활성 펩타이드인 Burgerins (55)을 정제하였다.

지금까지 척추동물에서부터 무척추동물에 이르기까지 다양한 조직으로부터 많은 항균활성 펩타이드들이 정제되어 졌다. 특히, 양서류의 피부뿐만 아니라 곰장어를 비롯한 어류의 피부에서도 항균성 펩타이드가 존재하고 있다는 사실로 미루어 보아 붕장어의 피부에도 아직 발견되지 않은 항균성 펩타이드가 존재할 것이라 사료된다.

따라서 본 연구에서는 붕장어의 피부를 이용하여 항균활성 펩타이드를 정제하였고 일차구조를 규명하였다. 그 결과 정제된 펩타이드는 12개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 또한 지금까지 알려진 항균활성 펩타이드와 일차구조를 비교한 결과, homology를 나타내지 않는 새로운 종류의 항균활성 펩타이드로 판명되었다.

Table 1. Antimicrobial peptides isolated from Marine Organisms

Peptide	Sequence	Source	Reference No.
Penaeidins	YRGYTGPIPRPPPIGRPPLR	Shrimp	45
Tachyplesin I	KWCFRVCYRGICYRRCR	Horseshoe crab	46
Callinectin	WNSNXXFHVGRPPVVGRRPGXVXFRAP	Blue crab	47
Styelins	GXFGKAFXSVSNFAKKHKTA	Tunicate	48
Clavinins	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVF	Tunicate	49
Dicynthaurin	ILQKAVLDCLKAAGSSLSKAAITAIYNKIT	Tunicate	50
Myticin	HSHACTSYWCGKFCGTASCTHYLCRVLHPGKMCACV	Mollusc	52

Table 2. Antimicrobial peptides isolated from fishes

Peptide	Sequence	Source	Reference No.
Pleurocidin	GWGSFFKKA AHV GKHV GKAAL THYL	Flounder skin	43
Misgurin	RNRVDDL SKFSKKGAAARRRK	Mudfish	44
Parasin I	KGRGKNGKVR AKAKTRSS	Catfish	53
Pardaxin	GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGEQE	Moses sole fish	54
Burgerin I	FPWMFYGKYR	Hagfish skin	55

II. 재료 및 방법

1. 재료

1.1. 실험동물

붕장어 (*Conger myriaster*, 217마리, 체장 30 ~ 80 cm)는 2000년 5월에 부전동 부전시장에서 구입하였다 (Fig. 1). 살아있는 상태의 붕장어로부터 피부를 분리 한 후, 액체질소로 급속 동결시켜 실험에 사용하기 전까지 -70 °C에 보관하였다.

1. 2. 시약 및 재료

시료의 여과를 위한 Millex-LCR₁₃ (0.5 μ m), ULTRAFREE-MC (0.45 μ m), Syringe filter (0.44 μ m)와 Sep-Pak Vac C₁₈ cartridge는 Waters사 (Waters associates, Miliford, MA, USA)에서 구입하였고, Trypticase soy broth (TSB)는 Difco사 (Detroit, USA)에서 구입하였다. Sephadex G-25 (fine)는 Pharmacia사 (LKB, piscataway, NJ, Sweden)로부터 구입하였다. HPLC-grade용 H₂O, CH₃CN은 TEDIA사 (Ohio, USA)에서 구입하였고, Trifluoroacetic acid (TFA)는 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.



Fig. 1. Conger eel, *Conger Myriaster*

**This fish is a predator, feeding on crustaceans and fish.
The upper side is grayish while the lower side is white.
The common name is common conger, white spotted
conger and ma-anago.**

2. 실험방법

2.1. 추출

동결 보관된 봉장어 피부를 끓는 물에 10-15 분간 끓인 후, 5% 초산을 넣고 4 °C에서 3 시간 동안 교반하여 파쇄하였다. 파쇄한 시료는 4 °C에서 30 분 동안 8,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 상층액을 농축시킨 다음, EtOH을 첨가하여 불순물을 제거하였다. 그리고 4 °C로 30 분 동안 10,000 rpm으로 원심분리를 행한 후, 상층액에 시료의 부피 : NaCl = 1 ℓ : 12 g의 비로 NaCl을 첨가하여 4 °C에서 30 분간 12,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 상층액이 0.1 N HCl이 되도록 HCl을 첨가하고, 4 °C로 50 분간 15,000 rpm으로 원심분리를 행하였다. 부분적으로 물질을 분리하기 위해 상층액을 Sep-Pak C₁₈ cartridge에 주입하였다. 우선 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 100% MeOH로 활성화시킨 후, H₂O로 충분히 세정하였다. 계속해서 시료를 주입하여 0% (D.W), 10% MeOH (RM10) 및 60% MeOH (RM60)로 물질들을 각각 용출시켜 동결건조를 하였다 (Fig. 2). 동결건조한 3종류의 시료를 사용하여 *Bacillus subtilis* PM125에 대한 항균활성을 측정하였다 (Fig. 3).

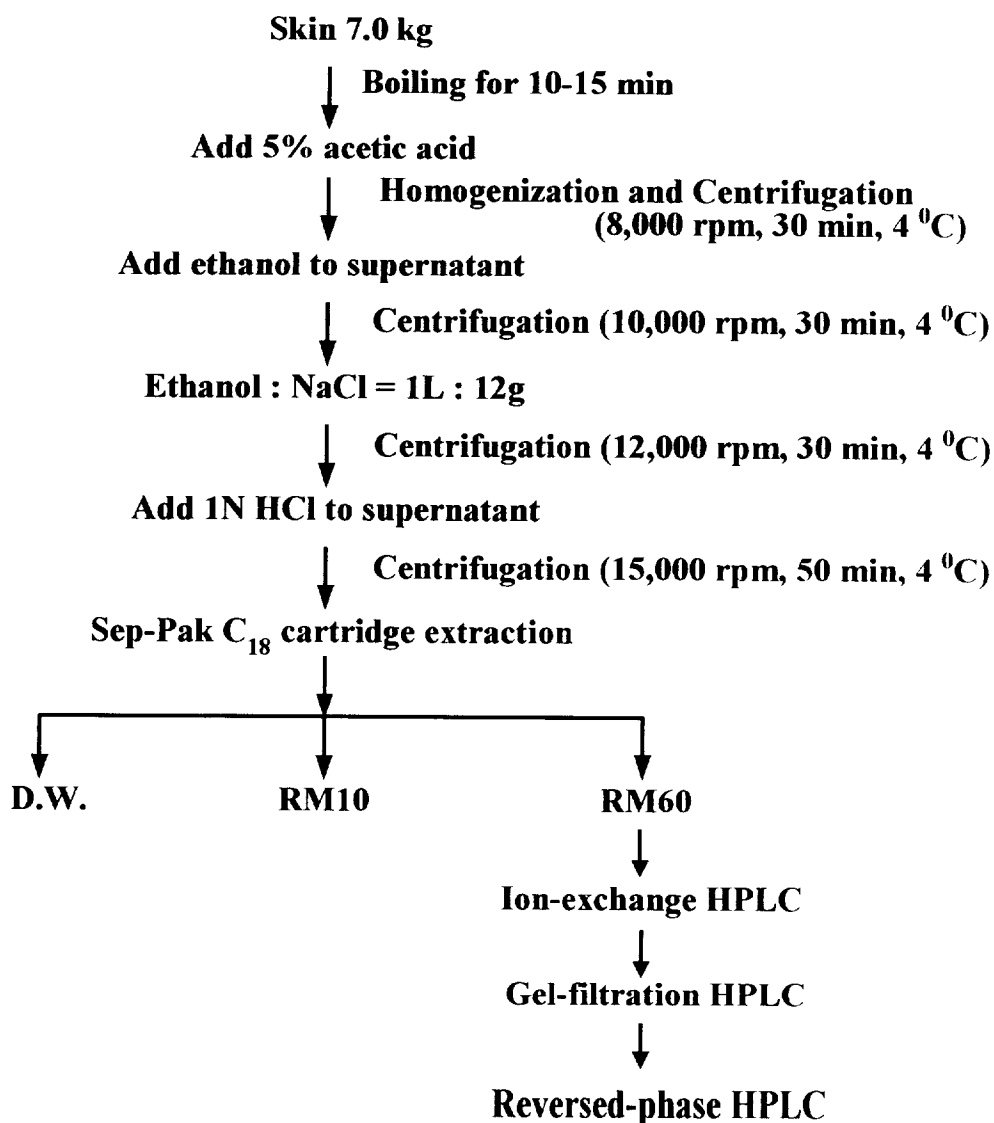


Fig. 2. Extraction and purification of antimicrobial peptide from the skin of conger eel, *Conger Myriaster*

2.2. 정제

① 첫 번째 단계:

동결 건조한 추출물 RM60 (2.6 g)을 5% 초산에 녹여서 동일 용매로 평형화되어 있는 Sephadex G-25 (2.6 × 110 cm, Pharmacia, Sweden) column에 주입하여 다음과 같은 조건으로 분취하였다: 흡광도; 254 nm, 용출속도; 1.0 ml/min, volume; 15 ml/fraction (Fig. 5). 분리한 각각의 분획들로부터 일정용액을 취하여 *Bacillus subtilis* PM125에 대해 고체배지법으로 항균활성의 유무를 측정하였다. 활성을 나타내는 분획들을 농축한 후, 연차적으로 정제과정을 수행하였다.

② 두 번째 단계:

Fig. 5에서 얻어진 활성 분획들을 cation-exchange column인 TSK-gel SP-5PW (7.5 × 75 mm, Tosho, Japan)를 사용하여 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다: A 용매; 10 mM는 Phosphate buffer (pH 6.0), B 용매; 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM Phosphate buffer (pH 6.0), B 용매의 Gradient; 0 → 100% (200 min), 유속; 1.0 ml/min, 파장; 220 nm, 온도; 40 °C (Fig. 6).

③ 세 번째 단계:

Fig. 6에서 활성을 나타낸 분획들을 anion-exchange column인 TSK-gel DEAE-5PW (7.5 × 75 mm, Tosho, Japan)를 사용하여 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다: A용매; 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2), B용매; 1.0 M NaCl이 포함된 10 mM Tris-HCl buffer (pH 9.2), B 용매의 Gradient; 0 → 0 (10 min) → 100% (100 min), 유속; 1.0 ml/min, 파장; 220 nm, 온도; 40 °C (Fig. 7).

④ 네 번째 단계:

Fig. 7에서 얻어진 활성 분획들을 affinity column인 Heparin-5PW (7.5 × 75 mm, Tosho, Japan)에 적용하여 다음과 같은 분리조건으로 정제하였다: A용매; 10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.1), B 용매; 1.0 M NaCl을 포함하는 10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.1), B 용매의 Gradient; 0 → 0 (10 min) → 100% (100 min), 유속; 1.0 ml/min, 파장; 220 nm, 온도; 40 °C (Fig. 8).

⑤ 다섯 번째 단계:

Fig. 8에서 활성을 나타낸 분획을 농축하여 Capcell-pak C₁₈ (10 × 250 mm, Shiseido, Japan) column에 주입하여 정제하였으며 분리조건은 다음과 같다: A 용매; 0.1% TFA (pH 2.2)를 포함한 H₂O, B 용매; 0.1% TFA를 포함한 100% CH₃CN (pH 2.2), B 용매의 Gradient; 10 → 50% (120 min), 유속; 2.0 ml/min, 파장; 220 nm, 온도; 40 °C (Fig. 9).

⑥ 여섯 번째 단계:

Fig. 9에서 반응을 나타낸 분획은 Novapak C₈ (3.9 × 150 mm, Waters, USA) column을 사용하여 다음의 분리조건으로 정제하였다: A 용매; 0.1% TFA (pH 2.2)를 포함한 H₂O, B 용매; 0.1% TFA를 포함한 100% CH₃CN (pH 2.2), B 용매의 Gradient; 10 → 30% (80 min), 유속; 0.5 ml/min, 파장; 220 nm, 온도; 40 °C (Fig. 10).

⑦ 일곱 번째 단계:

Fig. 10에서 활성을 나타낸 분획은 Novapak C₈ (3.9 × 150 mm,

waters, USA) column을 사용하여 B 용매의 Gradient; 15 → 25% (100 min)으로 분리하였다. 그 외는 여섯 번째 단계와 동일한 조건을 사용하였다 (Fig. 11).

⑧ 여덟 번째 단계:

Fig. 11에서 분리한 활성 peak는 Superdex peptide HR 10/30 (Pharmacia, Sweden) column을 이용하여 30% CH₃CN (pH 2.2)의 조건으로 분리하였고, 유속; 0.5 ml/min, 파장; 220 nm, 온도; 실온, 그 외에는 여섯 번째 단계와 동일한 조건을 사용하였다 (Fig. 12).

⑨ 마지막 단계:

Fig. 12에서 분리한 peak로 Capcell-pak C₁₈ (4.6 × 250 mm, Shiseido, Japan) column을 사용하여 26% isocratic 조건으로 40 °C에서 최종정제를 하였으며, 그 외에는 여덟 번째 단계와 동일한 조건을 사용하였다 (Fig. 13).

2.3. 항균활성측정

정제 과정 중에 얻은 각 분획에 대한 항균활성의 측정은 filter paper disk method (Advantec, Toyo, 8 mm, Japan)를 이용하여 *B. subtilis* PM125에 대한 성장억제를 관찰함으로써 확인하였고, 활성 측정법은 다음과 같다 (13). *B. subtilis* PM125를 37 °C로 TSB에서 mid-logarithmic phase까지 배양하였다 (630 nm = 0.4, 5×10^7 cell/ml).

정제과정에서 얻은 분획들의 일정한 농도를 취하여 멸균된 3차 증류수 (50 μl)에 녹인 후, paper disk에 흡수시켜 건조하였다. 배양한 균액 100 μl (630 nm = 0.04, 5×10^6 cell/ml)를 Trypticase Soy

Agar (TSA)에 도말하고 준비한 paper disk를 배지 위에 일정간격으로
정치시켜 37 °C에서 18 시간동안 배양하여 항균활성을 측정하였다.

2.4. 천연 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열결정

최종 정제한 시료의 분자량을 측정하기 위해서 MALDI-TOF Mass spectrometer (Voyager-DE™ STR spectrometer, Perseptive Biosystem, USA)를 이용하였고, Matrix로는 α -cyano-4-hydroxycinamic acid를 사용하였다. 정제한 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하기 위해서 Applied Biosystem gas-sequencer (Model precise 476A, Foster city, CA, USA)를 사용하여 Edman 분해법으로 분석하였다.

2.5. Chou-Fasman의 구조 예측법에 의한 2차구조 예측

붕창어에서 정제한 항균성 펩타이드의 2차구조를 예측하기 위해 Chou-Fasman의 구조 예측법을 이용하였으며 (56), 소수성도 (hydrophobicity)와 소수성 모멘트 (hydrophobic moment)는 Hoop & Wood 법을 이용하여 계산하였다 (57).

III. 결과 및 고찰

1. 항균활성 펩타이드의 정제

1.1. 추출

붕장어의 피부로부터 새로운 항균활성 펩타이드를 정제하기 위해서 5% 초산으로 추출한 추출물을 Sep-Pak C₁₈ cartridge를 이용하여 0%, 10% 및 60% MeOH로 추출을 한 후, 1/100 (assay volume/total volume)의 농도로 활성을 측정하였다. 그 결과, 0%, 10% MeOH 추출물보다 60% MeOH 추출물 (RM60)이 강한 항균활성을 나타내었기 때문에 RM60을 정제에 사용하였다 (Fig. 3).

RM60은 서로 다른 분리특성을 지닌 7종류의 column을 사용하여 분리하였고, 분리한 각각의 분획들에 대해서는 *B. subtilis* PM125 균주를 사용하여 항균활성을 측정하였다 (Fig. 4).

1.2. 정제

RM60을 Sephadex G-25 column (2.6 × 110 cm)에 주입하여 gel-filtration을 행한 결과, 34-44번 분획에서 항균활성을 나타내었다 (Fig. 5). Fig. 5에서 반응을 나타낸 활성분획들을 양이온 교환 column인 SP-5PW (7.5 × 75 mm)를 사용하여 정제하였고, 각 분획들의 항균활성을 측정한 결과, 약 0 M NaCl에서 용출된 분획에서 항균활성이 나타났다 (Fig. 6).

계속해서 활성분획들은 음이온 교환 column인 DEAE-5PW (7.5 × 75 mm)를 사용하여 정제하였고, 0 M NaCl의 농도에서 용출된 분획들에서 항균활성 반응이 나타났다 (Fig. 7).

Fig. 7에서 반응을 나타낸 분획은 Heparin-5PW (7.5 × 75 mm)에 주입하여 정제하였으며 음이온 교환 column과 마찬가지로 0 M NaCl의 농도에서 항균활성을 나타냈다 (Fig. 8). 양이온, 음이온 교환 및 친화성 column을 사용하여 분리된 형태로부터 이 물질이 염기성 및 산성 아미노산을 포함하고 있지 않거나 또는 펩타이드 자체의 net charge가 0임을 확인 할 수 있었다. 계속해서 Capcell-pak C₁₈ (10 × 250 mm)과 Novapak C₈ (3.9 × 150 mm)을 사용하여 정제하였으며, 각각 B 용매의 23-28% CH₃CN (Fig. 9) 및 19-23% CH₃CN에서 활성을 나타냈다 (Fig. 10).

Fig. 10에서 활성을 나타낸 분획은 동일한 column을 이용하여 정제하였고, 약 17% CH₃CN의 분획에서 항균활성이 나타났다 (Fig. 11).

정제한 물질의 분자량 범위를 알아보기 위해 Superdex peptide HR 10/30 column을 사용하였고 26.12분대에 단일 peak를 나타내었다 (Fig. 12). 이전의 본 연구실에서 동일한 분자량 column을 사용한 결과에 의하면 25-30분대의 peak는 약 1,000-1,500 Da 정도의 분자량을 나타내었다 (date not shown). 따라서 본 연구에서 정제된 물질 또한 약 1,000-1,500 Da 정도의 분자량을 가지고 있는 펩타이드라 생각되어졌다. 최종적으로 Capcell-pak C₁₈ (4.6 × 250 mm)을 사용하여 물질을 분리, 정제하였다 (Fig. 13).

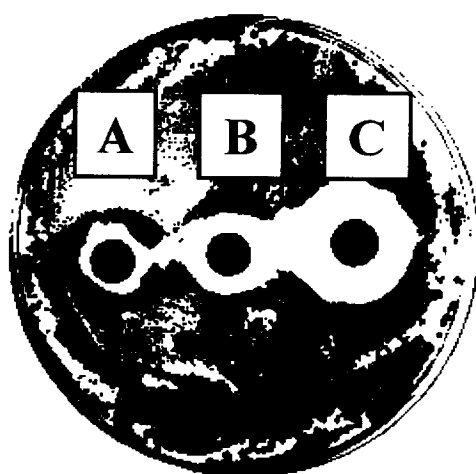


Fig. 3. Antimicrobial activity of solid phase extraction by Sep-pak C₁₈ cartridge. An aliquot of each extract was applied to a freshly poured lawn of *B. subtilis* PM125. A; D.W., B; RM10, C; RM60

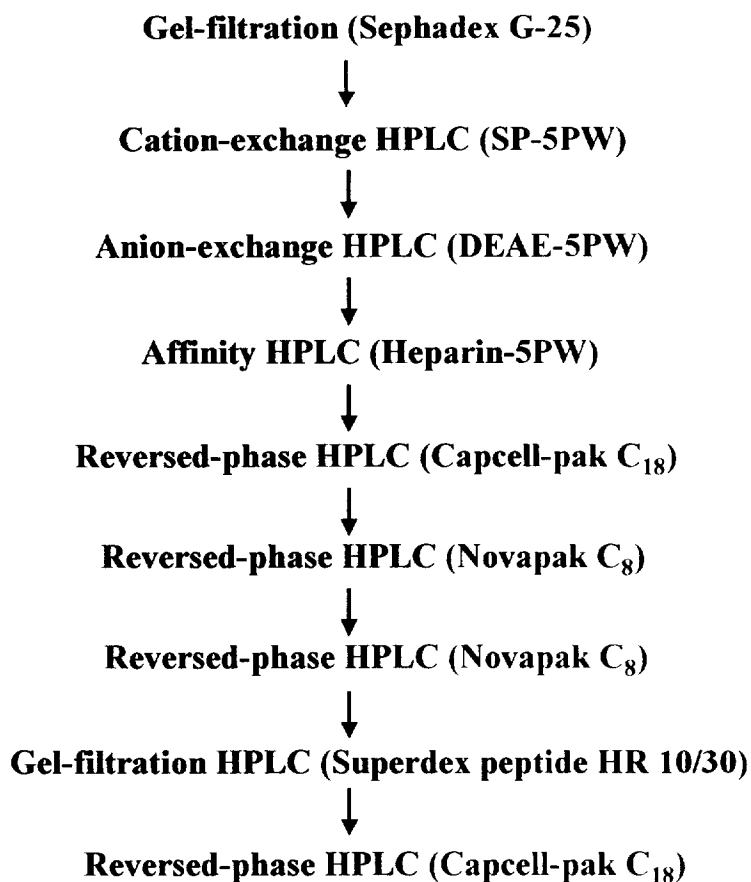


Fig. 4. Procedures for HPLC purification of antimicrobial peptide from the skin of conger eel, *Conger Myriaster*

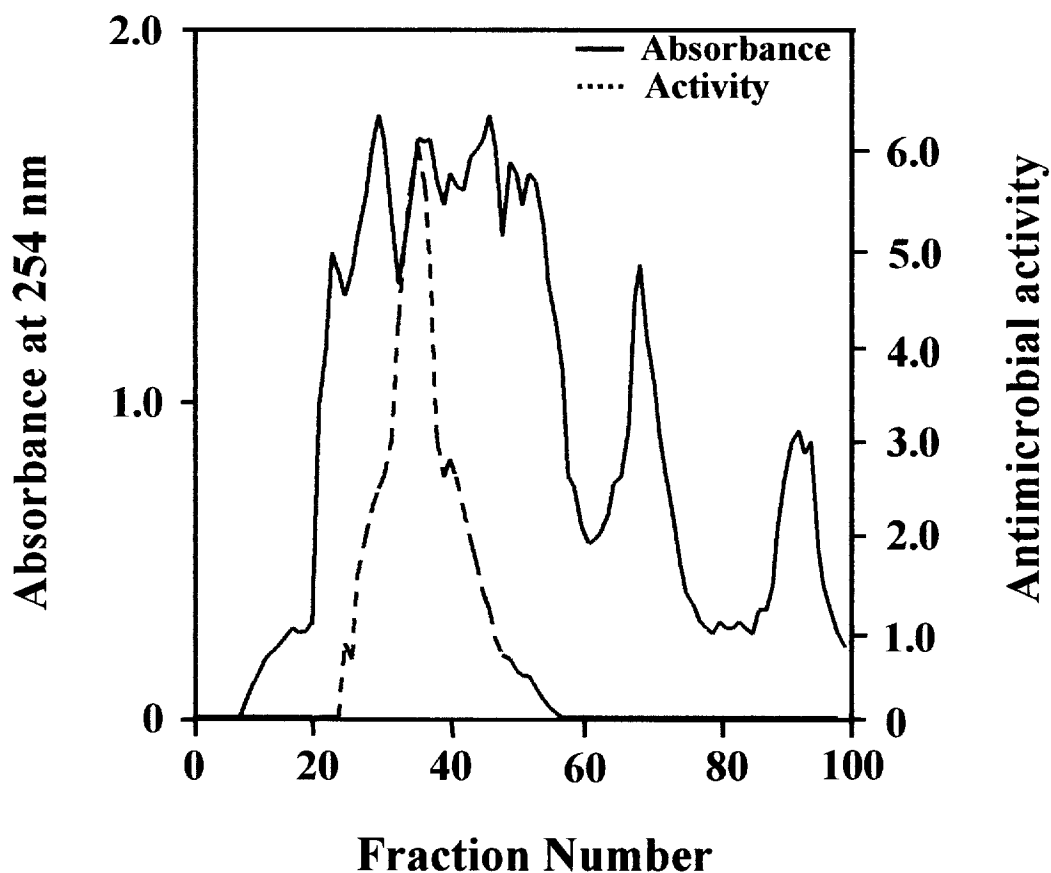


Fig. 5. Gel-filtration profile of the 60 % methanol extract from Sep-Pak C₁₈ cartridges on Sephadex G-25 column using 5% acetic acid as eluent. Fractions (15 ml) were collected and antimicrobial activity was assayed with 150 ul of each fraction. Antimicrobial activity against *B. subtilis* PM125 is expressed in diameter (mm) of growth inhibition. absorbance; (—), antimicrobial activity; (---)

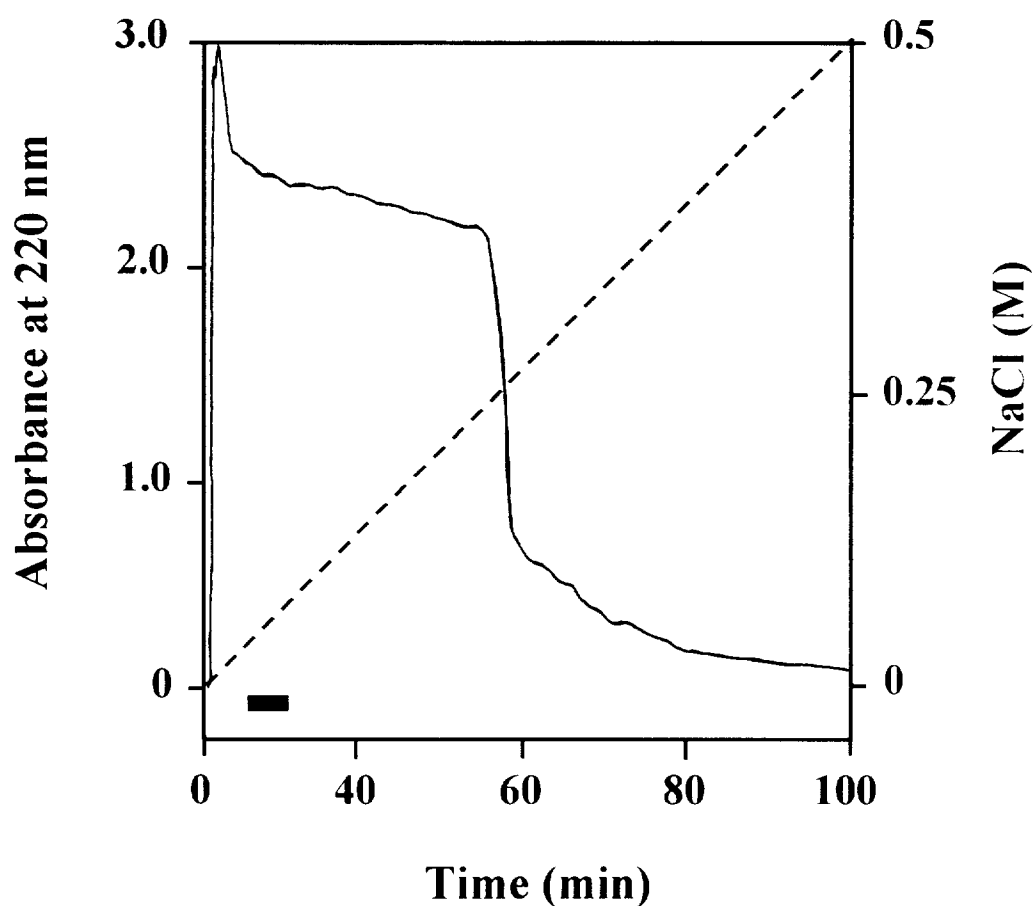


Fig. 6. Cation-exchange HPLC profile of the active fractions from sephadex G-25 column. The active fractions were pooled and loaded onto a SP-5PW (7.5 x 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted - line) in 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) at a flow rate of 1.0 ml/min. The fractions indicated by the black bar were active region against *B. subtilis* PM125.

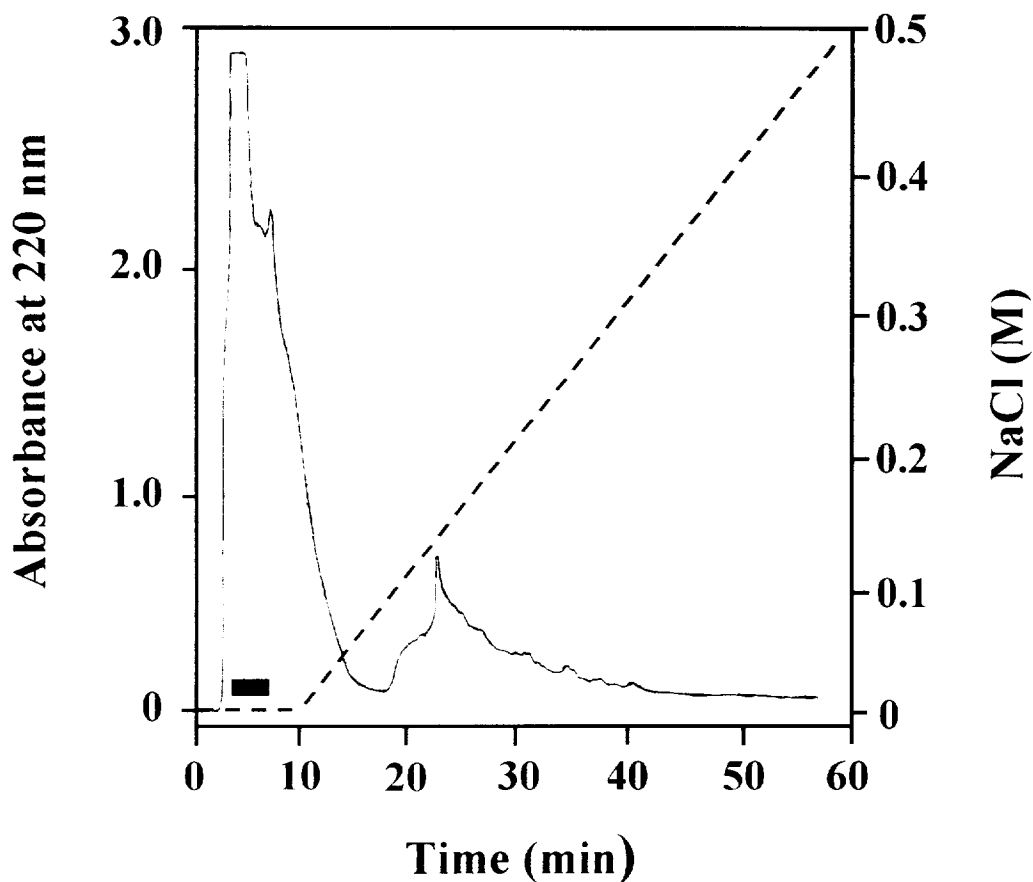


Fig. 7. Anion-exchange HPLC profile of the active fraction from cation-exchange column. The active fractions were pooled and loaded onto a DEAE-5PW (7.5 x 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tri-HCl buffer (pH 9.2) at a flow rate of 1.0 ml/min. The fractions indicated by the black bar were active region against *B. subtilis* PM125.

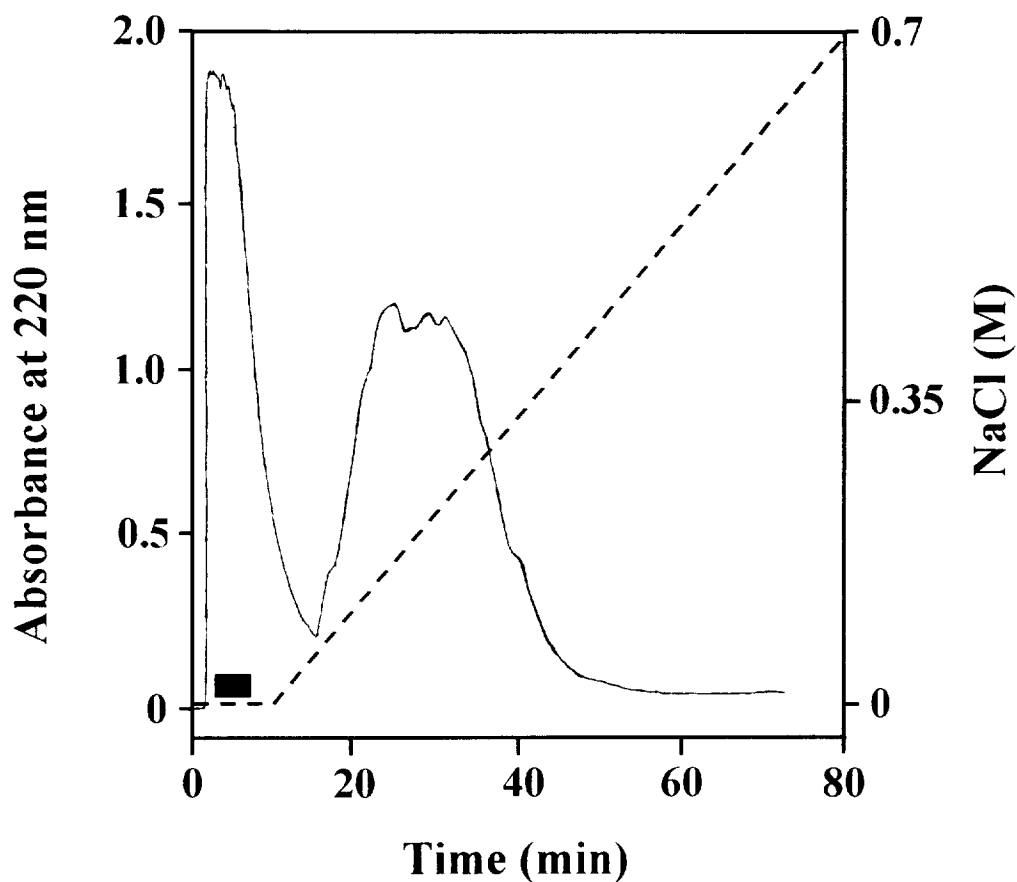


Fig. 8. Affinity HPLC profile of the active fractions from anion-exchange column. The active fractions were pooled and loaded onto a Heparin-5PW (7.5 x 75 mm) column and eluted with a linear gradient of 1.0 M NaCl (dotted line) in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 6.1) at a flow rate of 1.0 ml/min. The fractions indicated by the black bar were active region against *B. subtilis* PM125.

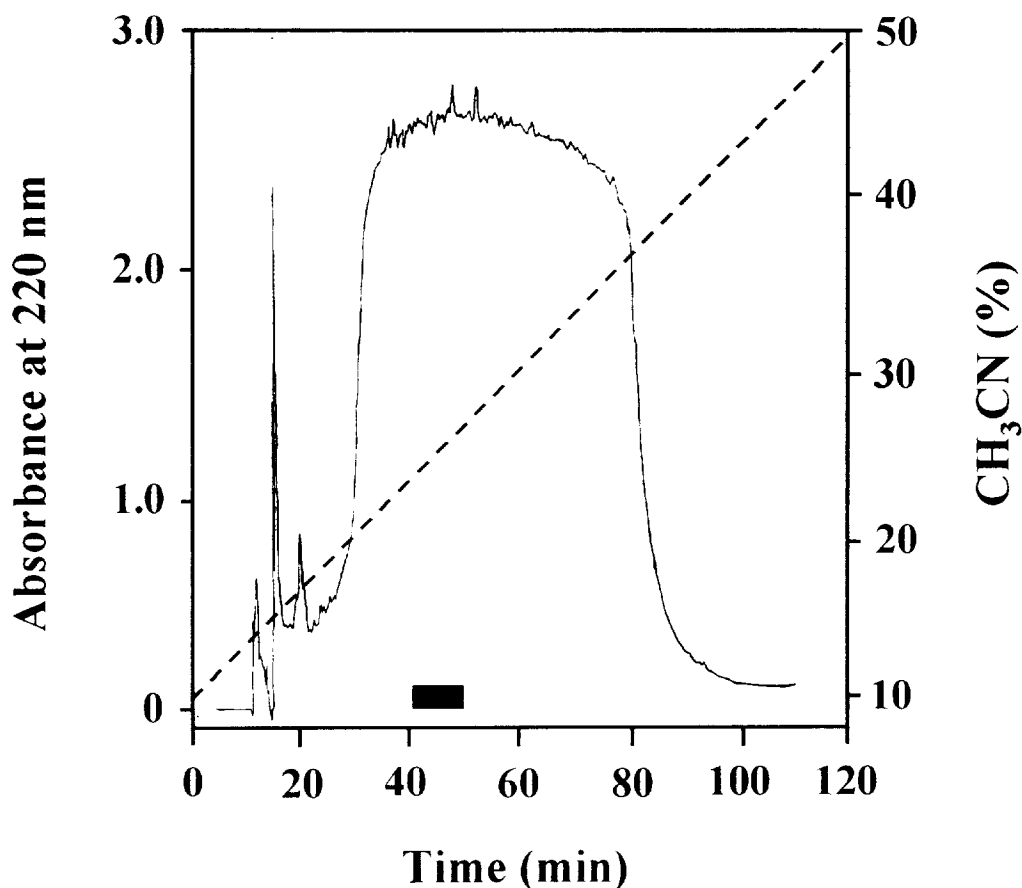


Fig. 9. Reversed-phase HPLC profile of the active fractions from affinity column. The active fractions were pooled and loaded onto a Capcell-pak C₁₈ (10 x 300 mm) column and eluted with a linear gradient of acetonitrile (dotted line) in aqueous TFA at a flow rate of 2.0 ml/min. The peaks indicated by the black bar were active region against *B. subtilis* PM125.

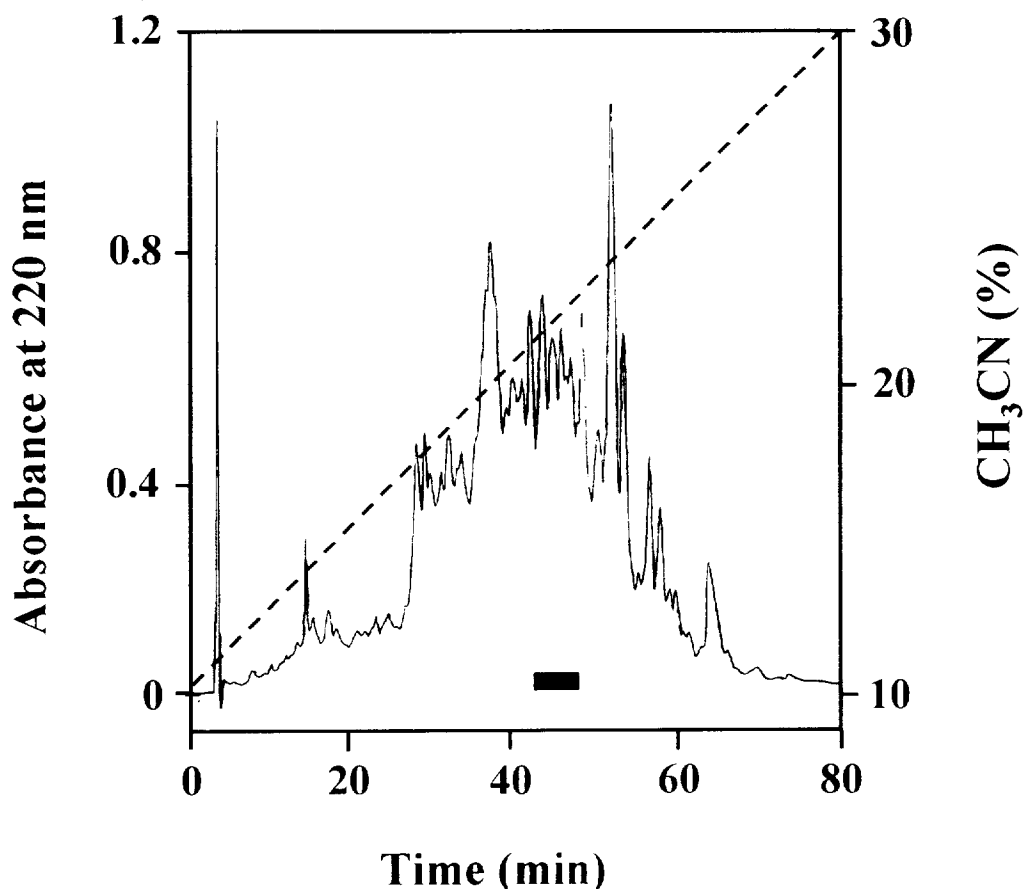


Fig. 10. Reversed-phase HPLC profile of the active fractions from reversed-phase column. The active fractions were pooled and loaded onto a Novapak C₈ (3.9 x 150 mm) column and eluted with a linear gradient of acetonitrile (dotted line) in aqueous TFA at a flow rate of 0.5ml/min. The peaks indicated by the black bar were active region against *B. subtilis* PM125.

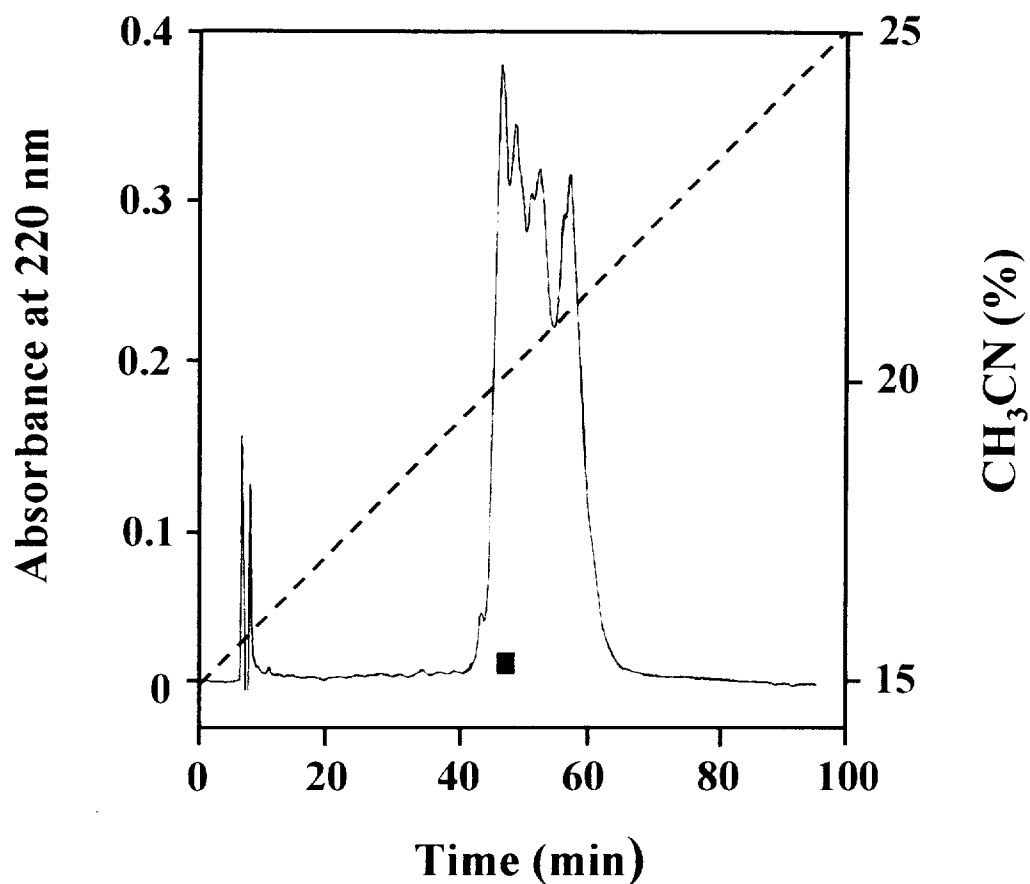


Fig. 11. Reversed-phase HPLC profile of the active fractions from reversed-phase column. The active fractions were pooled and loaded onto a Novapak C₈ (3.9 x 150 mm) column and eluted with a linear gradient of acetonitrile (dotted line) in aqueous TFA at a flow rate of 0.5 ml/min. The peak indicated by the black bar was active region against *B. subtilis* PM125.

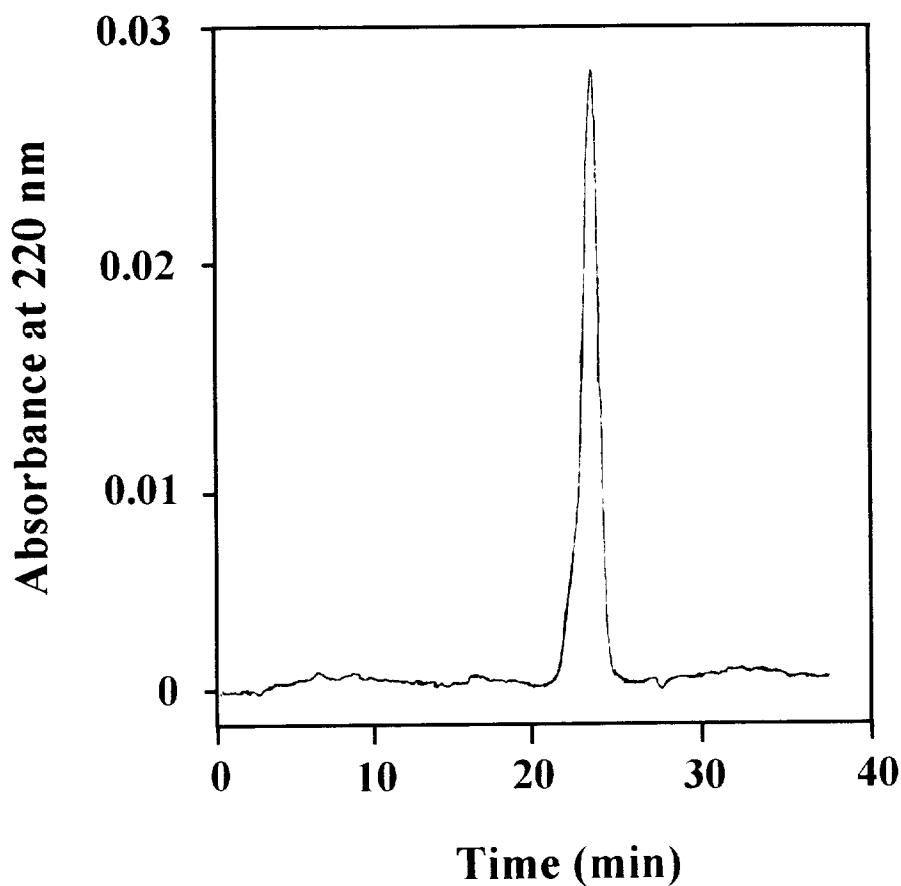


Fig. 12. The peak was pooled and loaded onto a Superdex peptide HR 10/30 (10 x 300 mm) column and eluted with a 30% acetonitrile (dotted line) in aqueous TFA at a flow rate of 0.5 ml/min.

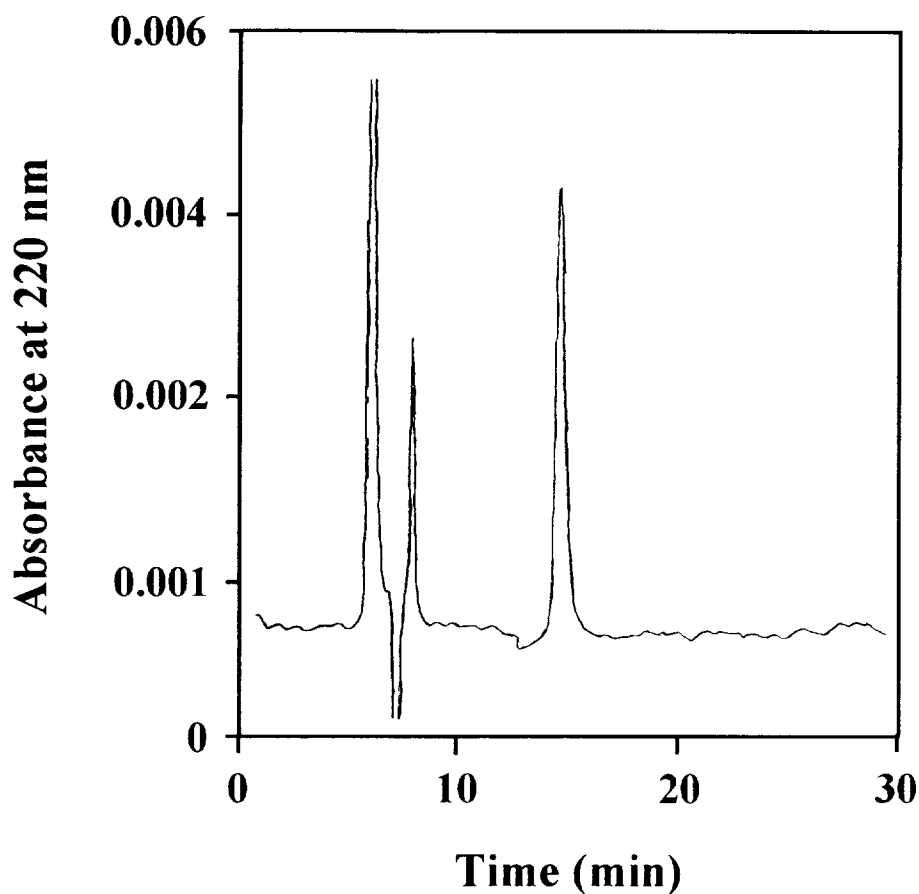


Fig. 13. Final purification of peak from Superdex peptide HR 10/30 column. The active peak was pooled and loaded onto a Capcell-pak C₁₈ (4.6 x 250 mm) column and eluted isocretically with a 26 % acetonitrile (dotted line) in aqueous TFA at a flow rate of 0.5 ml/min.

2. 정제된 항균활성 펩타이드의 분자량 및 아미노산 서열 결정

최종적으로 정제한 항균성 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열을 조사하기 위해 MALDI-TOF Mass와 Edman 분해법을 이용한 peptide sequencer를 사용하였다. Fig. 14는 MALDI-TOF Mass를 사용하여 정제한 펩타이드의 분자량을 측정한 것이다. Fig. 14에서 나타내듯이 이 펩타이드는 1302 Da에서 peak를 나타냈다. Table 3은 Edman 분해법을 이용한 peptide sequencer를 사용하여 결정한 펩타이드의 아미노산 서열을 나타낸다. Sequencing 결과에 의하면 이 펩타이드는 염기성 아미노산을 포함하지 않으며 방향족 아미노산 및 중성 아미노산으로 구성된 dodecapeptide였다. 따라서 분자량 측정 및 sequencing 분석결과에 의해 봉장어 피부로부터 정제한 항균활성 펩타이드의 일차구조는 다음과 같다 : Ser-Ser-Gly-Pro-Phe-Gln-Ala-Tyr-Gly-Val-Gln-Tyr.

그러나 이 펩타이드의 C-말단이 $-NH_2$ 또는 $-OH$ 형태인가는 분자량 측정 및 sequencing 데이터만으로 정확하게 알 수 없기 때문에 차후로 이들 두 형태의 펩타이드를 합성하여 천연물과 합성물과의 활성 및 화학적 성질을 조사할 예정이다. 일반적으로 대부분의 항균성 펩타이드들은 세균막과 상호작용을 하기 위해 positive charge를 나타내는 염기성 아미노산을 가지고 있는 것이 특징이다. 그러나 본 연구에서 정제한 dodecapeptide는 염기성 아미노산을 가지고 있지 않으며, 중성 아미노산인 Ser, Gln, Ala, Val과 α -helix 구조를 방해하는 잔기로 알려진 Pro와 Gly을 그리고 방향족 아미노산인 Tyr과 Phe을 가지고 있다. 위의 결과를 토대로 Protein Gene Bank의 Data를 이용하여 펩타이드 sequencing의 동일성 (homology)을 조사한 결과, 본 연구에서 정제한

펩타이드는 이미 기존에 발견된 물질들과 유사성이 없는 새로운 펩타이드로 판명되었다. 현재까지 붕장어 (*Conger Myriaster*)로부터 유래하는 생리활성 물질은 피부 점액질에서 lectin (hemagglutinins) (58, 59)과 lactose-ligand인 gelatin (60) 및 congerin (61)이 정제되었으나 붕장어 피부로부터 분자량이 적은 항균활성 펩타이드에 대한 보고는 전무한 실정이다.

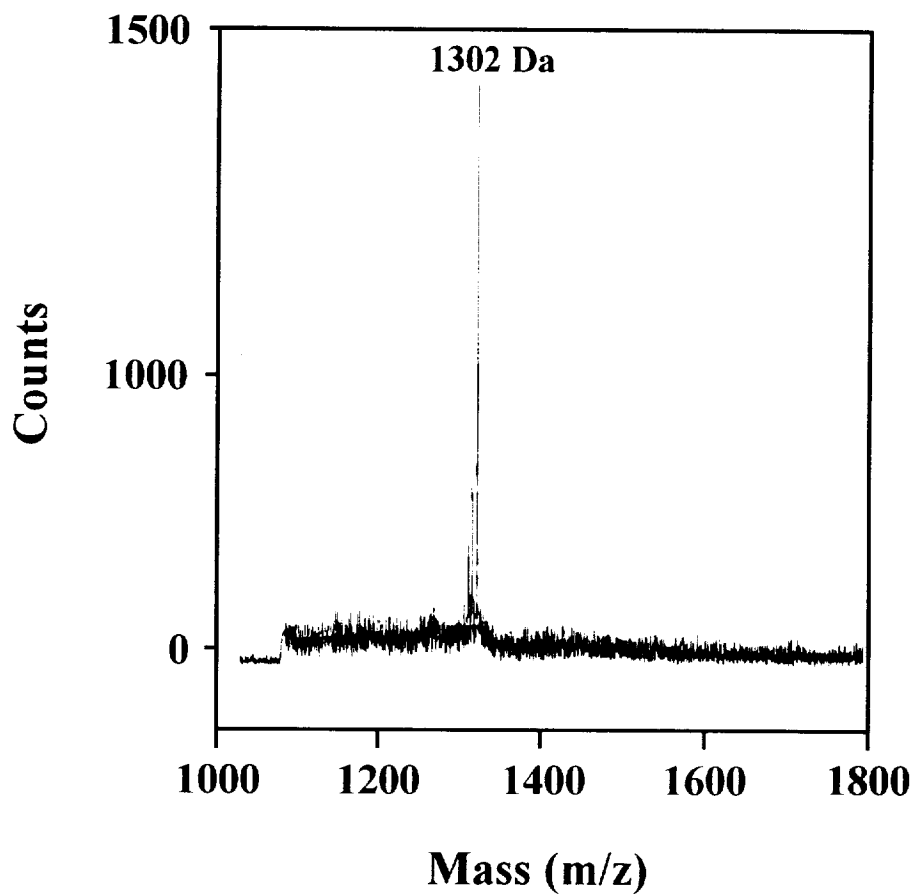


Fig. 14. MALDI-TOF Mass spectra of native antimicrobial peptide in conger eel skin. Analysis was carried out with a voyager - DETM STR mass spectrometer, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as matrix.

Table 3. Amino acid sequence and molecular weight of purified peptide from the skin of conger eel, *conger myriaster*

Cycle no.	Amino acid	Yield (pmol)	m/z
1	Ser	31	1302 Da
2	Ser	28	
3	Gly	33	
4	Pro	30	
5	Phe	33	
6	Gln	31	
7	Ala	31	
8	Tyr	31	
9	Gly	27	
10	Val	28	
11	Gln	26	
12	Tyr	18	

3. Chou-Fasman의 구조 예측법에 의한 2차 구조 예측

붕장어의 피부로부터 정제한 항균활성 펩타이드는 Chou-Fasman의 구조 예측법을 이용하여 RNA III inhibitor peptide (RIP) 와 더불어 2차구조를 예측, 비교하였다 (Table 4). RIP는 *Staphylococcus xylosus*로부터 정제되어진 heptapeptide로서 세균막에 있는 receptor와 반응하여 *Staphylococcus aureus*의 병원성을 유발시키는 agr의 transcript인 RNA II, RNA III의 합성을 저해함으로써 항균활성을 나타내는 것으로 이전연구에 보고되었다 (62). 또한 본 연구에서 정제되어진 항균활성 펩타이드와는 그 구성아미노산이 유사함을 가지고 있는 펩타이드이다.

Table 4에 나타나듯이 정제된 펩타이드는 N-말단 영역에서 turn구조를, 그리고 C-말단에서는 sheet 및 helix가 혼합된 형태를 나타내었다. 이러한 결과는 이 펩타이드가 특정한 2차 구조를 취하지 않는다는 것을 의미하는 것 같다. 그리고 Table 5에 나타나있듯이 붕장어에서 정제된 펩타이드는 RIP에 비해서 hydrophobicity와 Hydrophobic moment 모두 낮은 것으로 나타났다. 이러한 사실은 붕장어에서 정제된 펩타이드가 *B. subtilis*에 항균활성을 나타내기 위한 막과의 상호작용에 있어서 특정한 구조나 양친매성도가 중요하지 않음을 의미하는 것이다. 따라서 이러한 결과는 붕장어에서 정제된 펩타이드가 막과의 정전기적 및 소수성 상호작용에 필요한 특이적 이차구조와 양친매성도보다 막에 존재하는 특이한 수용체와의 상호작용을 위하여 펩타이드의 구성아미노산이 관여하는 것을 간접적으로 알 수 있었다.

Table 4. Prediction of secondary structure of the purified Peptide by Chou-Fasman's prediction methods

Peptide	Prediction
Purified peptide	SSGPFQAYGVQY h h h h h H s s s s S s S TTTTTTTTTT T
RIP III	YSPWTNF S s s s s SS TTTT

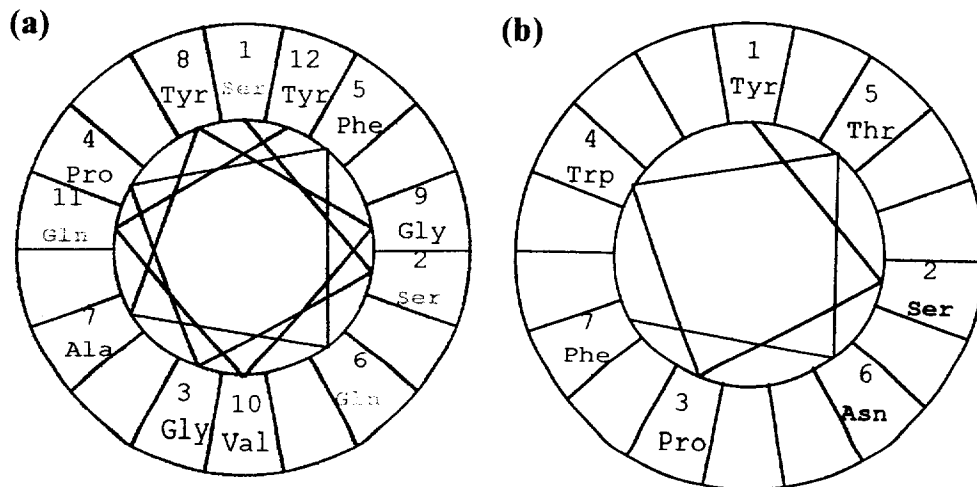
* H; helix, S; sheet, T; turn

Table 5. Comparisons of hydrophobicity & hydrophobic moment (A) and helical wheel diagram (B) between purified peptide and RIP III

(A) Hydrophobicity & hydrophobic moment by Wood & Hoff's methods

	Purified peptide	RIP III
Mean hydrophobicity	-0.68	-1.16
Hydrophobic moment	0.37	0.89

(B) Helical wheel diagram of purified peptide(a) and RIP III(b) by Chou-Fasman's methods



4. 정제한 항균성 펩타이드의 작용 메카니즘 예측

최근에 *Staphylococcus xylosus*로부터 RNA III inhibiting peptide (RIP)가 발견되었다 (62). RIP는 *Staphylococcus aureus*의 병원성을 유발시키는 agr의 transcript인 RNA II 및 RNA III의 합성을 저해하는 작용을 지니고 있는 항균활성 펩타이드로서 특히 *Staphylococcus aureus*에 의해 야기된 cellulitis (봉와직염), keratitis (각막염), septic arthritis (패혈성 관절염), mastitis (유선염) 및 osteomyelitis (골수염)를 포함한 질병에 효과적인 저해제로 작용한다고 최근에 보고되었다. 이 펩타이드는 7개의 아미노산으로 구성된 heptapeptide이며, 일차구조는 다음과 같다: Tyr-Ser-Pro-Trp-Thr-Asn-Phe. 또한 이 펩타이드는 염기성 아미노산을 소유하지 않으며 4개의 중성 아미노산인 Pro, Ser, Asn 및 Thr으로 구성되어 있다.

본 연구에서 봉장어 피부로부터 정제한 항균성 펩타이드는 12개로 구성된 새로운 펩타이드이다. 이 펩타이드는 염기성 아미노산을 가지고 있지 않으며 중성 아미노산인 Ser, Gln, Ala, Val과 α -helix 구조를 방해하는 잔기로 알려진 Pro과 Gly을, 그리고 방향족 아미노산으로 2개의 Tyr과 1개의 Phe를 포함하고 있다.

본 연구에서 정제한 펩타이드와 RIP를 비교해 보면 두 물질간의 homology는 없지만 Ser, Pro, Tyr, Phe과 같은 아미노산을 소유하고 있으며 또한 염기성 아미노산이 포함되지 않은 공통된 특징을 가지고 있다. 그리고 이들 물질에 공통으로 포함된 아미노산의 비율을 계산해 보면 51%로 매우 높은 값을 나타낸다. 이때 Gln과 Asn 그리고 Ser과 Thr은 같은 종류의 아미노산으로 간주하여 계산하였다.

따라서 본 연구에서 정제한 항균성 펩타이드인 dodecapeptide는

RIP와 유사하게 세균막에 있는 receptor에 반응한 후, 생체 내에서 RNA II 및 III의 합성을 저해하는 동시에 항균작용을 나타낸다고 생각되어 진다.

현재 봉장어피부에서 정제한 dodecapeptide는 합성중이며, 합성물질을 이용하여 다양한 균주에 대한 항균작용 및 *S. aureus*에 의해 야기된 여러 질병에 대한 저해제로서의 효능 여부를 조사할 예정이다.

IV. 요약

붕장어, *Conger myriaster* 의 피부로부터 새로운 항균활성 펩타이드를 정제하였다. 정제한 펩타이드는 여러 특성을 지닌 gel-filtration, heparin affinity, ion-exchange 및 C_{18} , C_8 reversed-phase HPLC를 이용하여 순수한 peak을 얻을 수 있었다. 정제한 펩타이드의 일차구조는 automated amino acid sequencer와 MALDI-TOF Mass를 이용하여 다음과 같이 결정되었다: Ser-Ser-Gly-Pro-Phe-Gln-Ala-Tyr-Gly-Val-Gln-Tyr (1302 Da).

정제한 항균성 펩타이드와 기존에 알려진 항균활성 펩타이드와의 sequencing을 비교한 결과, 지금까지 밝혀진 펩타이드와는 유사성이 없는 새로운 항균활성 펩타이드로 확인되었다.

Chou-Fasman 예측법을 이용하여 2차구조를 예측한 결과, N-말단에서 turn구조 그리고 C-말단에서 sheet 및 helix가 혼합된 형태가 나타났으며, 특정한 2차구조를 취하지 않는 것으로 예측되었다.

V. 참 고 문 헌

1. Gururaj Rao, A. (1995) *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **8**, 6-13.
2. Andreu, D., and Rivas, L. (1998) *Biopolymers* **47**, 418-433.
3. Hancock, R. E. W., and Diamond, G. (2000) *Trends Microbiol.*, **8**, 402-410.
4. Hancock, R. E. W., and Scott, M. G. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 8856-8861.
5. Salzet, M. (2001) *Trends Immunol.*, **22**, 285-288.
6. Lehrer, R. I., and Ganz, T. (1993) *Annu. Rev. Immunol.*, **11**, 105-128.
7. Peschel, A., and Vincent Collins, L. (2001) *Peptides* **22**, 1651-1659.
8. Simmaco, M., Mignogna, G., and Barra, D. (1998) *Biopolymers* **47**, 435-450.
9. Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J.-L., and Hoffmann, D. (1999) *Devel. Comp. Immunol.*, **23**, 329-344.
10. Otvos, L. Jr. (2000) *J. Peptide Sci.*, **6**, 497-511.
11. Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamino, J. M., and Rodriguez-Palenzuela, P. (1998) *Biopolymers* **47**, 479-491.
12. Liu, L., Wang, L., Jia, H. P., Zhao, C., Heng, H. H. Q., Schutte, B. C., McCray, P. B., and Ganz, T. (1998) *Gene* **222**, 237-244.
13. Gudmundsson, G. H., and Agerberth, B. (1999) *J. Immun. meth.*, **232**, 45-54.

14. Subbalakshmi, C., and Sitaram, N. (1998) *FEMS Microbiol. Lett.*, **160**, 91-96.
15. Friedrich, C. L., Moyles, D., Beveridge, T. J., and Hancock, R. E. W. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.*, **44**, 2086-2092.
16. Boman, H. G. (1995) *Annu. Rev. Immuno.*, **12**, 61-92
17. Diamond, G., Zasloff, M., Eck, H., Brasseur, M., Maloy, W. L., and Bevins, C. L. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 3952-3956.
18. Csordas, A., and Michl, A. (1970) *Monatsh. Chem.*, **101**, 82-189.
19. Gibson, B. W., Tang, D., Mandrell, R., Kelly, M., and Spindel, E. R. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 23103-23111.
20. Andre, D., Aschauer, H., Kreil, G., and Merrifield, R. B. (1985) *Eur. J. Biochem.*, **149**, 531-535.
21. Giovannini, M. G., Poulyer, L., Gibson, B. W., and Williams, D. H. (1987) *J. Biochem.*, **243**, 113-120.
22. Zasloff, M. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 5449-5453
23. Sures, I., and Crippa, M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81**, 380-384.
24. Gibson, B. W., Poulter, L., Williams, D. H., and Maggio, J. E. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 5341-5349.
25. Park, J. M., Jung, J.-E., and Lee, B. J. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **205**, 948-954.
26. Mor, A., Nguyen, V. H., Delfour, A., Migliore-Samour, D., and

- Nicolas, P. (1991) *Biochemistry* **30**, 8824-8830.
27. Clark, D. P., Durell, S., Maloy, W. L., and Zasloff, M. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 10849-10855.
28. Morikawa, N., Hagiwara, K., and Nakajima, T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **189**, 184-190.
29. Simmaco, M., Mignogna, G., Barra, D., and Bossa, F. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 11956-11961.
30. Simmaco, M., Mignogna, G., Canofeni, S., Miele, R., Mangoni, M. L., and Barra, D. (1996) *Eur. J. Biochem.*, **242**, 788-792.
31. Park, C. B., Kim, M. S., and Kim, S. C. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **218**, 408-413.
32. Moore, K. S., Bevins, C. L., Brasseur, M. M., Tomassini, N., Turner, K., Eck, H., and Zasloff, M. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 19851-19857.
33. Steiner, H., Hltmark, D., Engstrom, A., Bennich, H., and Boman, H. G. (1991) *Nature* **292**, 246-248.
34. Ho, C.-L., and Hwang, L.-L. (1991) *J. Biochem.*, **274**, 453-456.
35. Tosteson, M. T., Holmes, S. J., Razin, M., and Tosteson, D. C. (1985) *J. Membr. Biol.*, **87**, 35-44.
36. Rees, J. A., Moniatte, M., and Bulet, P. (1997) *Insect Biochem. Molec. Biol.*, **27**, 413-422.
37. Kockum, K., Faye, I., Von Hofsten, P., Lee, Y., Xanthopoulos, K. G., and Boman, H. G. (1984) *J. EMBO.*, **3**, 2071-2075.
38. Ando, K., and Natori, S. (1988) *Biochemistry* **27**, 1715-1721.
39. Bulet, P., Cociancich, S., Dimarcq, J. L., Lambert, J., Reichhart,

- J. H., Hoffmann, D., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 24520-24525.
40. Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., and Tempst, P. (1989) *J. EMBO.*, **8**, 2387-2391.
 41. Casteels, F., Ampe, C., Riviere, L., Damme, J. V., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., and Tempst, P. (1990) *Eur. J. Biochem.*, **187**, 381-386.
 42. Samakovlis, C., Kylsten, P., Kimbrell, D. A., Engstrom, A., and Hultmark, D. (1991) *J. EMBO.*, **10**, 163-169.
 43. Park, I. Y., Park, C. B., Kim, M. S., and Kim, S. C. (1998) *FEBS Lett.*, **437**, 258-262.
 44. Park, C. B., Lee, J. H., Park, I. Y., Kim, M. S., and Kim, S. C. (1997) *FEBS Lett.*, **411**, 173-178.
 45. Bachera, E., Destoumieux, D., and Bulet, P. (2000) *Aquaculture* **191**, 71-88.
 46. Osaki, T., Omotezako, M., Nagayama, R., Hirata, M., Iwanaga, S., Kasahara, J., Hattori, S., Ito, I., Sugiyama, H., and Kawabata, S.-I. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 26172-26178.
 47. Khoo, L., Robinette, D. W., and Noga, E. J. (1999) *Mar. Biotechnol.*, **1**, 44-51.
 48. Lee, I. H., Cho, Y., and Lehrer, R. I. (1997) *Comp. Biochem. Physiol.*, **3**, 515-521.
 49. Lee, I. H., Zhao, C., Cho, Y., Harwig, S. S. L., Cooper, E. L., and Lehrer, R. I. (1997) *FEBS Lett.*, **400**, 158-162.
 50. Lee, I. H., Lee, Y. S., Kim, C. H., Kim, C. R., Hong, T.,

- Menzel, L., Boo, L. M., Pohl, J., Sherman, M. A., Waring, A., and Lehrer, R. I. (2001) *Biochem. Biophys. Acta.*, **1527**, 141-148.
51. Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J. A., and Bulet, P. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 21808-21813.
 52. Mitta, G., Hubert, F., Noel, T., and Roch, P. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **265**, 71-78.
 53. Cole, A. M., Weis, P., and Diamond, G. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 12008-12013.
 54. Tompson, S. A., Tachibana, K., Nakanishi, K., and Kubota, I. (1986) *Science* **233**, 341-343.
 55. Seo, J.-K. (2000): Structure and Biological Activities of Novel Antimicrobial peptides Isolated from the Skin of Hagfish, *Eptatretus burgeri*. Ph. D. Dissertation in Pukyong National University.
 56. Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1974) *Biochemistry* **13**, 211-245.
 57. Eisenburg, D. (1984) *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 595-623.
 58. Kamiya, H., Muramoto, K., and Goto, R. (1988) *Dev. Comp. Immunol.*, **12**, 309-318.
 59. Shiomi, K., Uematsu, H., Yamanaka, H., and Kikuchi, H. (1989) *Comp. Biochem. Physiol.*, **92B**, 255-261.
 60. Nakamura, O., Watanabe, T., Kamiya, H., and Muramoto, K. (2001) *Dev. Comp. Immunol.*, **25**, 431-437.
 61. Muramoto, K., Kagawa, D., Sato, T., Ogawa, T., Nishida, Y.,

- and Kamiya, H. (1999) *Comp. Biochem. Biophys.*, **123**, 33-45.
62. Gov, Y., Bitler, A., Dell'Acqua, G., Torres, J. V., and Balaban, N. (2001) *peptides* **22**, 1609-1620.

Ⅷ. 감 사 의 글

학문의 길을 시작하기에 늦은 만학도를 끊임없이 격려해주시고 옆에서 지켜봐 주신 박 남규 지도교수님께 감사의 마음을 전합니다.

부족한 논문을 끝까지 고람해 주시는 이 형호 교수님, 홍용기 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

그리고 우리 실험실인 생물유기화학 실험실, 선배, 후배님들 모두 고맙습니다. 마지막까지 같이 고생하고 논문 수정을 봐준 서 정길 선배님, 실험실의 든든한 버팀목이 되어준 김 은정, 김 찬위씨도 너무 고맙고, 같이 고생해 준 혜진씨도 고맙습니다. 또, 호성, 윤정, 막내 상현이, 취업준비로 바쁜 외화, 멀리서 늘 격려해주는 신미정에게도 고맙다는 말 전하고 싶습니다.

항상 옆에 있어준 동생 인관이와 올케, 건강하게 커가는 민경이와 도희, 애정어린 시선으로 곳곳하게 살아가는 인매언니가 있기에 많은 힘이 되었습니다.

끝으로 새벽에 도시락을 준비해주시고 늘 안타가운 시선으로 딸의 학위과정을 지켜 봐 주신 어머니와 아버지께 이 논문을 드립니다.