



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

공 학 박 사 학 위 논 문

Hybrid striped bass로부터 분리한
piscidin 1의 구조와 항균활성간의
상관관계



2012년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

문 호 성

공 학 박사 학 위 논문

Hybrid striped bass로부터 분리한
piscidin 1의 구조와 항균활성간의
상관관계

지도교수 박 남 규

이 논문을 공학박사 학위 청구논문으로 제출함

2012년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

생 물 공 학 과

문 호 성

문호성의 공학박사 학위논문을 인준함

2011년 12월 20일



목 차

I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	14
2.1. 항균활성 측정	14
2.1.1. 액체 배지법	14
2.1.2. URDA (Ultrasensitive Radial Diffusion Assay)법	14
2.2. 용혈활성측정	15
2.3. 리포솜의 제조	15
2.4. CD spectra	18
2.5. 형광물질의 유출실험	18
2.6. Fluorescence spectra	19
2.7. Quenching of Trp fluorescence	19
2.7.1. Acrylamide	21
2.7.2. DBrPC	21
III. 결 과	24
3.1. Piscidin 유도체들의 design	24
3.2. Piscidins 1, 2, 3 및 유도체들의 CD 스펙트럼	27
3.2.1 Piscidins 1, 2 및 3의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조	27
3.2.2. Dimer group의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조	29
3.2.3. Truncated peptide group의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조	35
3.2.4. Substitution peptide group의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조	36
3.2.5. Tryptophanyl substitution peptide group의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조	37
3.3 Piscidins 1, 2, 3 및 유도체들의 항균활성	38
3.3.1. 액체 배지법에 의한 항균활성	38
3.3.1.1. Piscidins 1, 2, 3의 항균활성	38
3.3.1.2. Dimer group의 항균활성	40

3.3.1.3. Truncated peptide group의 항균활성	40
3.3.1.4. Substitution peptide group의 항균활성	41
3.3.1.5. Tryptophanyl substitution peptide group의 항균활성	41
3.3.2. 액체 배지법에 의한 항곰팡이활성	41
3.3.2.1. Piscidins 1, 2, 3의 유도체들의 항곰팡이활성	41
3.3.3. URDA에 의한 항균활성	42
3.3.3.1. URDA에 의한 Piscidins 1, 2 및 3의 항균활성	42
3.3.3.2. URDA에 의한 Dimer의 항균활성	42
3.3.3.3. URDA에 의한 truncated peptide group의 항균활성	48
3.3.3.4. URDA에 의한 substitution peptide group의 항균활성)	48
3.3.3.5. URDA에 의한 tryptophanyl substitution peptide group의 항균활성	49
3.4. Piscidin 1 및 유도체들의 용혈활성	50
3.4.1. Dimer group의 용혈활성	50
3.4.2. Truncated peptide group의 용혈활성	50
3.4.3. Substitution peptide group의 용혈활성	55
3.4.4. Tryptophanyl substitution peptide group의 용혈활성	57
3.5. 리포솜 함유물의 유출실험 (Leakage experiment)	57
3.5.1. EYPC 리포솜에 대한 유출활성	57
3.5.1.1. Piscidins 1, 2, 3의 유출활성	57
3.5.1.2. Dimer group의 유출 활성	58
3.5.1.3. Truncated peptide group의 유출활성	58
3.5.1.4. Substitution peptide group의 유출활성	58
3.5.1.5. Tryptophanyl substitution peptide group의 유출활성	67
3.5.2. EYPC-EYPG (3:1) 리포솜에 대한 유출활성	67
3.5.2.1. Piscidins 1, 2, 3의 유출활성	67
3.5.2.2. Dimer group의 유출활성	68
3.5.2.3. Truncated peptide group의 유출활성	68
3.5.2.4. Substitution peptide group의 유출활성	68
3.5.2.5. Tryptophanyl substitution peptide group의 유출활성	69
3.5.3. DPPC 리포솜에 대한 유출활성	69

3.5.3.1. Piscidins1, 2, 3의 유출활성	69
3.5.3.2. Dimer group의 유출활성	70
3.5.3.3. Truncated peptide group의 유출활성	70
3.5.3.4. Substitution peptide group	70
3.5.3.5. Tryptophanyl substitution peptide group	71
3.5.4. DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 대한 유출활성	71
3.5.4.1. Piscidins 1, 2, 3의 유출활성	71
3.5.4.2. Dimer group의 유출활성	71
3.5.4.3. Truncated peptide group의 유출활성	72
3.5.4.4. Substitution peptide group	72
3.5.4.5. Tryptophanyl substitution peptide group	72
3.6. Titration study	73
3.6.1. DPPC를 이용한 titration	73
3.6.2. DPPC-DPPG (3:1)를 이용한 titration	74
3.7. Quenching	74
3.7.1. Acrylamide를 이용한 quenching	76
3.7.2. DBrPC를 이용한 quenching	79
IV. 토 론	88
V. 요 약	109
VI. 참 고 문 헌	111

List of Tables

Table 1. Antimicrobial peptides with helical conformation	7
Table 2. Antimicrobial peptides with β -sheet conformation	8
Table 3. Primary structure of piscidins and its analogues	25
Table 4. Helical contents of piscidin and its analogs	30
Table 5. Helical contents of dimer group	31
Table 6. Helical contents of truncated peptide group	32
Table 7. Helical contents of amino acid substitution peptide group	33
Table 8. Helical contents of tryptophanyl substitution peptide group	34
Table 9. Antimicrobial activities of piscidin 1, 2, 3 and its analogs	39
Table 10. Antimicrobial activities of piscidin 1, 2, 3 and piscidin 1-acid	43
Table 11. Antimicrobial activities of dimer peptides	44
Table 12. Antimicrobial activities of truncated peptides	45
Table 13. Antimicrobial activities of amino acid substitution peptides	46
Table 14. Antimicrobial activities of tryptophanyl substitution peptides	47
Table 15. Properties of piscidins 1, 2, 3 and its analogues	62
Table 16. Leakage ability of piscidin and its analogs in EYPC liposome	58
Table 17. Leakage ability of piscidin and its analogs in EYPC-EYPG (3:1) liposome	60
Table 18. Leakage ability of piscidin and its analogs in DPPC liposome	62
Table 19. Leakage ability of piscidin and its analogs in DPPC-DPPG (3:1) liposome	64

List of Figures

Fig. 1. Innate immunity and acquired immunity	4
Fig. 2. Schematic representation of the proposed models for the mode of action of α -helical antimicrobial peptide. (A) barrel stave pores formation, (B) carpet mechanism for membrane permeabilization, (C) toroidal pore formation.	11
Fig. 3. Small unilamella vesicles (SUVs) and Large unilamellar vesicles (LUVs) liposomes preparation methods.	17
Fig. 4. Calcein leakage from liposome. The fluorescence intensity was recorded at 520 nm with excitation at 490 nm.	20
Fig. 5. Structure of brominated phosphatidylcholines.	23
Fig. 6. Helical wheels predicting amphipathic α -helical conformations for piscidins 1, 2 and 3. Open circles, hydrophilic residues; filled circles, hydrophobic residues.	26
Fig. 7. Circular dichroism spectra of Piscidin 1 in 5 mM TES buffer containing 100 mM NaCl at pH7.4. Spectra were measured at 50 μ M and 1 mM of peptide and lipid concentration.	28
Fig. 8. Dose-response profile of the hemolytic activities of piscidin 1 and piscidin 1-acid against human red blood cells	51
Fig. 9. Dose-response profile of the hemolytic activities of dimer peptide group against human red blood cells	52
Fig. 10. Dose-response profile of the hemolytic activities of truncated peptide group against human red blood cells	53
Fig. 11. Dose-response profile of the hemolytic activities of amino acid substitution peptide group against human red blood cells	54
Fig. 12. Dose-response profile of the hemolytic activities of tryptophanyl substitution peptide group against human red blood cells	55
Fig. 13. Trp fluorescence titration curves for binding of F6W-P1 to liposome as a function of DPPC liposome concentrations	75

Fig. 14. Blue shift in Trp emission maxima of Trptophanyl substitution peptides in DPPC liposomes	77
Fig. 15. Blue shift in Trp emission maxima of Trptophanyl substitution peptides in DPPC-DPPG (3:1) liposomes	78
Fig. 16. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 and L19W-P1 by acrylamide in an aqueous buffer	80
Fig. 17. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 and L19W-P1 by acrylamide in DPPC liposomes	81
Fig. 18. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 and L19W-P1 by acrylamide in DPPC-DPPG (3:1) liposomes	82
Fig. 19. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 and L19W-P1 by acrylamide in EYPC liposomes	83
Fig. 20. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 and L19W-P1 by acrylamide in EYPC-EYPG (3:1) liposomes	84
Fig. 21. Depth-dependent quenching of tryptophan fluorescence by DPPC liposomes containing brominated phosphatidylcholine ($X = 0.3$) at a lipid. ..	86
Fig. 22. Depth-dependent quenching of tryptophan fluorescence by DPPC-DPPG (3:1) liposomes containing brominated phosphatidylcholine ($X = 0.3$) at a lipid	87
Fig. 23. Interaction of piscidin 1 with DPPC liposomes	106
Fig. 24. Interaction of piscidin 1 with DPPC-DPPG (3:1) liposomes	107
Fig. 25. Model depicting the insertion of piscidin 1 into DPPC and DPPC-DPPG (3:1) lipid bilayer	108

List of Abbreviation

CD; Circular dichroism

DPPC; Dipalmitoylphosphatidylcholine

DPPG; Dipalmitoylphosphatidylglycerol

EYPC; Egg yolk phosphatidylcholine

EYPG; Egg yolk phosphatidylglycerol

SUV; Small unilamellar vesicle

LUV; Large unilamellar vesicle

TES; N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid

TFE; Trifluoroethanol

TSB; Trypticase soy broth



Structure-Antimicrobial Activity Relationship of Piscidin 1, isolated from the Hybrid Striped Bass

Ho Sung, Moon

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

Piscidin 1 is a linear amphipathic, α -helical antimicrobial peptide consists of 22 amino acid residues isolated from the mast cells of hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*). Piscidin 1 has broad-spectrum antimicrobial activity against diverse microbes including bacteria, viruses, fungi, and parasites. In order to investigate the structural-activity relationship and its action mechanism, piscidins 1-3 and 30 analogues designed by the truncation, substitution, and homo-dimerization with antiparallel fashion by two Cys or Lys or Pro residues were synthesized by the solid-phase synthesis method.

In the CD spectra, piscidins 1-3 showed an unordered structure in aqueous buffer, but they took α -helical structures in the presence of TFE and membrane environments. Similarly, the N-terminal truncated analogs and the substituted analogues showed an unordered structure in aqueous buffer, but they also took α -helical structures in the others environments. However, the analogues derived from the N-terminus, the central region, and the C-terminus showed an unordered structure in all environments except for (1-18)-P1 which showed an α -helical structure. The dimerized analogues took one of structure among the α -helix/ β -sheet mixed structures, β -sheet, and unordered structure in all environments.

In antimicrobial activity results, the N- and the C-terminal truncated analogues showed similar or slightly weak activities compared to piscidin 1.

The sequential truncated analogues from the N-terminus retained their activity against all tested bacteria except for analogues truncated first 2 amino acids which is completely lost its activity against *S. aureus*. The C-terminal truncated analogues also retained their minimal activity. However, analogues [(5-18)-P1, (5-18)-P1, and (14-22)-P] derived from the central region are completely lost their activity. Interestingly, two substituted analogues, G8A-P1 (substituted Gly by Ala in position 8) and G8K-P1 (substituted Gly by Lys in position 8), exhibited stronger activity than those of piscidin 1. In addition, they showed potent activity against *E. tarda* and *V. anguillarum* having resistance to piscidin 1. On the other hand, in the cytotoxicity test, G8A-P1 had stronger hemolytic activity but G8K-P1 exhibited significantly less hemolytic activity than that of piscidin 1.

In the leakage experiments, the leakage ability of piscidins and its analogues showed the more efficient against neutral liposomes than acidic liposomes. The relative leakage abilities of them with liposomes were in the following order: DPPC > DPPC/DPPG > EYPC > EYPC/EYPG.

In the fluorescence study of the Trp-substituted analogues, I16W-P1 (substituted Ile by Trp in position 16) showed the strongest interaction with the neutral and acidic liposomes, but I10W-P1 (substituted Ile by Trp in position 10) showed the lowest interaction with both liposomes. The quenching of Trp fluorescence by acrylamide revealed that the Trp residues in the analogues are located inside of membranes. From the relative quenching efficiency by acrylamide, it could be expected that I16W-P1 is penetrated the most deeply into the membrane, but I10W-P1 is located mostly near the surface of the membrane. These results are well-matched to the results obtained from lipid titration experiment. In the quenching of Trp fluorescence by brominated liposomes composed of DPPC or DPPC/DPPG (3:1) containing 6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC and 11,12-DBrPC, the Trp residues in the F6W-P1, I10W-P1, I16W-P1, and L19W-P1 were efficiently quenched by bromines in the 9,10-DBrPC, 6,7-DBrPC, 11,12-DBrPC, and 6,7-DBrPC, respectively.

Based on our these results, we can suppose the action mode of piscidin 1 with the membrane as follows: firstly, piscidin 1 may attach horizontally to the membrane surface via electrostatic interaction with acidic head groups; secondly, it might be horizontally inverted to the preferred position for penetration; thirdly, the C-terminus of piscidins was orientated perpendicular into the membrane and then embedded into the membrane; fourth, piscidins are assembled into multimeric bundle for the formation of pores; finally, the intracellular materials was efflux to outside and bacteria was killed. Our results strongly suggest that piscidin is more likely to kill the bacteria by toroidal-like mechanism.



1. 서 론

일반적으로 척추 및 무척추동물들은 세균, 기생충 그리고 곰팡이등과 같은 외부 물질의 침입으로부터 자신을 방어하기 위해 항균활성 펩타이드를 생산하는 면역체계를 가지고 있다 (Kini and Evans, 1989). Fig. 1은 생체 내의 면역체계에 해당하는 비특이적 (or innate) 면역반응과 특이적 (or adaptive) 면역반응을 나타낸다. 비특이적 면역은 크게 항균활성 펩타이드 (antimicrobial peptide) 및 lectin등에 의한 체액성 면역반응 (humoral immune response)과 대식세포 (macrophage), 다형핵 백혈구 (polymorphonuclear leukocyte) 등에 의한 식작용 (phagocytosis) 및 캡슐화 (encapsulation)의 작용 및 자연 살해 세포 (natural killer cell)의 방어작용을 포함하는 세포성 면역반응 (cellular immune response)으로 구성되어 있다 (Couto *et al.*, 1992; John and Bevins, 1992; Nagaoka *et al.*, 1997; Alessandro *et al.*, 1995). 반면 특이적 면역체계 (adaptive immune system)도 비특이적 면역체계 (innate immune system)와 마찬가지로 외부로부터의 감염이 있을 때 B 림프구가 항원을 인지한 후, 분화되어 여러 가지의 특이적인 항체 (antibody)를 분비하는 체액성 면역반응과 억제 T 세포 (suppressor T cell), 세포독성 T 세포 (cytotoxic T cell), 기억 T 세포 (memory T cell)와 B 림프구를 활성화 시키는 역할을 담당하는 세포성 면역반응으로 구성되어 있다. 이와 같이 생체가 세균등과 같은 이물질에 감염되었을 경우에는 일차적인 방어 역할을 담당하는 비특이적 면역과 이차적인 방어 역할을 담당하는 특이적 면역이 조화를 이루면서 생체 방어기능을 담당한다고 알려져 있다. 지금까지 비특이적 면역의 기능을 지닌 여러 물질들 중 항균활성 펩타이드에 대한 연구는 식세포 (phagocytic cell)에서 분비되는 단백질들에 비해 작은 크기, 빠른 합성 속도와 낮은 대

사 경비를 필요로 하는 장점을 가지고 있기 때문에 최근에 활발히 진행되고 있다 (Alessandro *et al.*, 1995). 또한 항균 펩타이드들은 항균작용이외에 상처치료의 촉진 및 단핵세포 (monocyte)의 화학주성 (chemotaxis)작용을 나타낸다고 보고되고 있다 (Lehrer *et al.*, 1993).

최근에 비특이적 면역의 기능을 수행하는 많은 항균성 펩타이드들이 포유류, 양서류, 곤충, 식물 및 원핵생물로부터 발견되어졌다. 포유류로부터 정제된 항균성 펩타이드는 대부분 호중구 (neutrophil)와 피부의 점액질 및 내장으로부터 유래되었다. 포유류의 호중구는 아조필 과립 (azurophil granules)과 특이적인 과립 (specific granules)으로 구성되어 있으며, 인간, 토끼 및 쥐의 아조필 과립으로부터는 azurocidin (Nagaoka *et al.*, 1997)과 defensin (Lehrer and Ganz, 1990)이 정제되었고, 토끼의 특이적인 과립으로부터는 CAP 18 (Larrick *et al.*, 1995)과 lactoferrin (Baggiolin *et al.*, 1970)등이 정제되었다. 포유류에서 주로 발견된 항균펩타이드인 defensin에는 phagocytosis의 기능을 지닌 백혈구에 존재하는 α -type과 상피세포에서 합성, 분비되는 것으로 알려진 β -type의 두 유형이 있다. 두 type 모두 세 개의 disulfide bond를 가지며, Arg를 많이 포함하는 것이 특징이다. 소 (Bos taurus)의 피부 점액질로부터 β -defensin (Selsted *et al.*, 1993), 소의 기관지 점액 (bovin tracheal mucous)에서 tracheal antimicrobial peptide (TAP) (Diamond *et al.*, 1991) 및 설치류과 (murine)인 쥐의 소장에서 cryptidins (Selsted *et al.*, 1992)등이 발견되었다. 포유류로부터 정제된 펩타이드는 pig PMAP-37 (Alessandro *et al.*, 1995)과 human LL-37 (Turner *et al.*, 1998) 같은 linear한 구조를 가진 것과 소과 (bovin) 유래의 Pro/Arg이 풍부한 Bac-5 (Zanetti *et al.*, 1995)와 Bac-7 (Scocchia *et al.*, 1994), PR-39 (Storici and Zanetti, 1993) 및 Trp를 많이 포함하는 indolicidin (Del *et al.*, 1992)처럼 특정의 아미노

산을 많이 함유하고 있는 펩타이드들도 보고되고 있다.

양서류인 개구리와 두꺼비의 위, 피부 및 점막층으로부터도 많은 항균 펩타이드들이 정제되었다. 유럽산 두꺼비인 *bombina variegata*와 아시아산 두꺼비인 *bombina orientalis*의 피부에서 bombinins (Csordas and Michl, 1970) 및 bombinin-like peptide (Gibson *et al.*, 1991)가 정제되었고, 아프리카산 갈퀴 개구리인 *Xenopus laevis*의 피부로부터 PGLa (Andreu *et al.*, 1985), magainin-1 (Giovannini *et al.*, 1987), magainin-2 (Zasloff, 1987), XPF (Sures and Crippa, 1984) 및 CPF (Gibson *et al.*, 1986)가 정제되었다. 그리고 한국산 농개구리인 *Rana rugosa*의 피부에서 gaegurins (Park *et al.*, 1984), 남미산 개구리인 *phyllomedusa sauvagii*의 피부에서 dermaseptin (Mor *et al.*, 1991)과 남미산 황소개구리인 *rana catesbeiana*의 피부에서 ranalexin (Clark *et al.*, 1994)도 정제되었다. 또한 유럽산 개구리인 *Rana brevipoda*와 *Rana esculenta* 피부에서 brevinin-1, brevinin-2 (Morikawa *et al.*, 1992)와 brevinin-E, brevinin-2E, esculentin (Simmaco *et al.*, 1994)등이 정제되어졌고, 유럽산 적색 개구리인 *Rana temporaria*의 피부에서 brevinins (Morikawa *et al.*, 1992), esculentins (Simmaco *et al.*, 1994) 및 temporins (Simmaco *et al.*, 1996)등이 정제되었다. 또한 아시아산 두꺼비인 *Bufo bufo gargarizan*과 아프리카산 갈퀴 개구리인 *Xenopus laevis*의 위 (stomach)로부터 buforin I (Park *et al.*, 1996)과 PGQ (Moore *et al.*, 1991)가 정제되어졌다.

곤충으로부터 유래한 항균성 펩타이드는 cecropin, insect defensin등과 같이 곤충 체내로 분비되는 펩타이드와 melittin과 같은 곤충



Fig. 1. Innate immunity and acquired immunity

체외로 분비되는 펩타이드로 구분되며, 구조적으로는 크게 4 종류로 분류할 수 있다. 첫 번째 종류는 cecropin (Steiner *et al.*, 1981), mastoparan B (Ho and Hwang, 1991) 및 melittin (Tosteson *et al.*, 1985)과 같은 펩타이드로서 α -helix 구조를 지니면서, gram-positive 및 negative bacteria에 강한 활성을 가지는 종류이며, 두 번째 종류는 defensin으로 분자 내에 disulfide bond를 가지며 gram-positive bacteria에 대해서 강력한 활성을 가지며 일부 gram-negative bacteria에 대해서만 약간의 활성을 가지는 펩타이드이다. 세 번째 종류는 8-27 KDa의 크기를 가지며 Gly이 풍부하게 함유된 물질로서 attacin (Kockum *et al.*, 1984), sarcotoxin (Ando and Natori, 1988) 및 coleopteracin (Bullet *et al.*, 1991) 등이 포함된다. 네 번째 종류로는 비교적 Pro를 다량 포함하는 동시에 분자량이 적은 펩타이드로서 꿀벌 (honeybee)로부터 정제된 apidaecins (Casteels *et al.*, 1989) 과 abaecin (Casteels *et al.*, 1990) 등이 속한다. 또한 *Drosophila*의 reproductive tract의 ductal epithelial cell로부터 andropin (Samakovlis *et al.*, 1991)이 정제되기도 하였다.

식물의 경우도 외부의 감염으로부터 자신을 보호하기 위해서 항균 활성 펩타이드를 생성한다. 식물로부터 정제된 최초의 항균활성 펩타이드는 thionins (Balls *et al.*, 1942)이며, 이후 defensins (Epple *et al.*, 1997), Rs-AFPs (Franky *et al.*, 1992) 및 snakins (Segura *et al.*, 1999) 등의 항균활성 펩타이드들이 보고되었고, 이들은 분자 내에 2-6개의 disulfide bond를 소유하며, 2-9 KDa의 분자량을 가지고 있다. 식물에서 분리된 plant defensin은 곤충과 포유류에서 발견된 defensin과 매우 유사한 구조를 가지고 있으나, plant defensin은 곤충과 포유류의 defensin보다 높은 항진균력을 가지는 특징이 있다. 이는 식물이 세균보다는 fungi에 의한 감염이 많이 일어나기 때문에 이에 대한 방어체계라고 사료된다. 또

한 gram-positive bacteria인 *bacillus brevis*와 *polymyxa*로부터 항균활성 펩타이드인 gramicidin S (Sato *et al.*, 1978)와 polymyxin (Stansly *et al.*, 1947)이 각각 정제되었다.

이와같은 항균성 펩타이드에 관한 연구는 주로 육상생물을 대상으로 진행되어져 왔으나, 점차 신물질의 발견 빈도는 낮아지게 되었다. 그러나 신물질 개발에 중요한 원천이라 할 수 있는 해양에 존재하는 수많은 해양생물을 이용한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 효율적인 신물질의 개발과 더불어 약물 개발이 더욱 절실하다. 해양 생물은 육상생물과는 다른 환경에서 서식하고 있기 때문에 이들로부터 지금까지 발견되지 않은 새로운 물질 및 특이한 기능을 다량 보유하고 있는 물질들이 발견되어져 오고 있다.

Table 1과 2는 지금까지 발견된 해양생물 유래의 항균활성 펩타이드들을 구조적으로 분류한 것을 나타낸다. Table 1에 나타낸 것과 같이 α -helix 구조를 나타내는 대표적인 펩타이드로는 미꾸라지 (*misgurnus anguillicaudatus*) 유래의 misgurin (Park *et al.*, 1997), 도다리 (*pleuronectes americanus*) 유래의 pleurocidin (Alexander *et al.*, 1997), 농어 (*morone chrysops*) 유래의 piscidins (Silphaduang and Noga, 2001), 가자미 (*pardachirus marmoratus*) 유래의 pardaxin (Tompson *et al.*, 1986) 등이 보고되어 있다. 이들은 +20이상의 net charge를 가지며 소수성 잔기들과 친수성 잔기들이 양분되어 있는 양친매성 (amphipathic)을 가지고 있다. β -sheet 구조를 취하는 펩타이드로는 투구게 (*tachypleus tridentatus*) 유래의 tachyplestin (Nakamura *et al.*, 1988) 및 big defensin (Saito *et al.*, 1995), 농어 (*morone chrysops*) 유래의 hepcidin (Shike *et al.*, 2002), 진주담치 (*mytilis edulis*) 유래의 mytimicin (Charlet *et al.*, 1996), 굴 (*Crassostrea virginica*) 유래의 defensin (Seo *et al.*, 2005) 등이 보고되어 있다 (Table 2). Penaeidins 1,

Table 1. Antimicrobial peptides with helical conformation

Peptide	Sequence	Sequence length	Source
Sytelin	GFGKAFHSVSNFAKKHKTA-NH2	19	<i>styela clava</i>
Clavanin	VFQFLGKIIHHVGNFVHGFSHVNF-NH2	23	<i>styela clava</i>
Pleurocidin	GWGSFFKKAHVGVGKAALTYL-NH2	25	<i>pleuronectes americanus</i>
Misgurin	RQQVEELSKFSWKKGAAARRR-NH2	21	<i>misgurnus anguillicaudatus</i>
Pardaxin	GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGGQE-NH2	33	<i>pardachirus marmoratus</i>

Table 2. Antimicrobial peptides with β -sheet conformation

Peptide	Sequence	Sequence length	Source
Tachyplestin	KWCFRVCYRGICYRRCR-NH ₂	17	<i>tachypletus tridentatus</i>
Polyphemusin I	RRWCFRVCYRGFCYRKCR-NH ₂	18	<i>limulus polyphemus</i>
Mytimycin	DCCRKPFKHCWDCTAGTPYYGYSTRNIFGCTC-NH ₂	33	<i>mytilis edulis</i>
defensin	GFGSPWNRYSQSHSHSRSIGLGGYSASLRLTSSSYR	37	<i>Crassostrea virginica</i>

polyphemusin I (Miyata *et al.*, 1989) 및 II, defensin등도 β -sheet구조를 취하는 항균 펩타이드들이다. 이들은 분자 내에 disulfide bond를 가지며, α -helix를 지니는 항균성 펩타이드와 유사하게 +2 이상의 net charge와 양친매성을 가지고 있다. 그러나 이들 α -helix 및 β -sheet 구조와는 다른 불특정 구조를 가지는 항균성 펩타이드들을 살펴보면 Pro이 풍부한 PR-39, Trp이 풍부한 indolicidin (Del *et al.*, 1992)과 tritrypticin (Nagapal *et al.*, 1999), His이 풍부한 histatin, Phe이 풍부한 prophenin-1 (Harwig *et al.*, 1995)등이 알려져 있고 이들은 특정의 아미노산이 규칙적으로 많이 존재하는 것이 특징이며, random 및 polyproline II conformation과 같은 불특정 구조를 취한다고 알려져 있다.

위에서 설명한 항균성 펩타이드들의 항균활성 메커니즘은 현재까지는 정확히 알려져 있지는 않지만 일반적으로 크게 3가지 형태인 barrel-stave model, carpet mechanism 및 toroidal pore model로 분류 할 수 있다 (Fig. 2).

i) Barrel-Stave model : 항균활성 펩타이드가 생체막의 표면에 접촉하여 일정농도 이상의 중합체가 형성되고, 이러한 중합체들이 계속해서 모이면서 펩타이드들은 다발 (bundle)을 형성하여 생체막을 수직으로 관통하여 channel을 형성하게 된다. 이때 양친매성 항균활성 펩타이드의 hydrophobic한 부분은 lipid의 tail에 결합을 하고 hydrophilic한 부분은 pore의 안쪽에 위치한다. Membrane permeation은 비교적 낮은 펩타이드 농도에서 일어난다. 이러한 메커니즘에 의해 항균활성을 나타낸다고 알려진 펩타이드로는 α -helix 구조를 취하는 magainins, dermaseptins 및 cecropins 등이 있고 β -sheet 구조를 취하는 펩타이드는 brevinins, tachyplepsins, protegrins 및 thanatinsm 등이 알려져 있다.

ii) Carpet mechanism : 항균활성 펩타이드가 생체막과 정전기적인 상호작용을 이용하여 생체막 표면에 축적이 되기 시작하면 항균활성 펩타이드는 막의 유동성을 변화시키고 생체막의 barrier properties를 낮춘다. 항균활성 펩타이드가 역치 농도 (threshold concentration)까지 축적이 되면, 생체막 고유의 성질을 잃게 되고 micell화 되는 detergent like 메커니즘으로, α -helix 구조를 취하는 bombin-like peptide 및 PGLa와 β -sheet 구조를 취하는 insect defensin, sapecin A 및 drosomycin등이 알려져 있다.

iii) Toroidal pore model : 항균활성 펩타이드가 짧은 순간 pore를 형성하는 model이다. 항균활성 펩타이드의 hydrophilic한 부분이 생체막 표면의 lipid head group과 반응하여 생체막 표면에 평형하게 배열이 된다. 그 후 hydrophobic한 부분은 snorkel effect에 의해 막 내부로 들어가고, 항균활성 펩타이드의 농도가 역치 농도 (threshold concentration)에 이르면, 막 표면과 평행하던 펩타이드들이 배열을 바꿔 수직으로 세워지면서 cylindrical hydrophilic pore를 형성한다. Magainin 2 및 LL-37등이 이러한 메커니즘에 의해 활성을 나타낸다고 알려져 있다.

따라서 다양한 개체로부터 단리된 여러 항균활성 펩타이드들은 2차 구조, 분자의 크기, disulfide bond의 존재 유무 및 구조적인 모티프 (structural motifs)등의 많은 차이에도 불구하고, positive의 net charge 및 양친매성 구조적 특징을 이용하여 세균의 막과 상호작용을 함으로서 항균작용을 나타낸다는 공통된 작용 메커니즘을 지닌다고 알려져 있다. 이와 같은 메커니즘을 이용하여 생체막에 결함을 한 펩타이드들은 다양한 방법

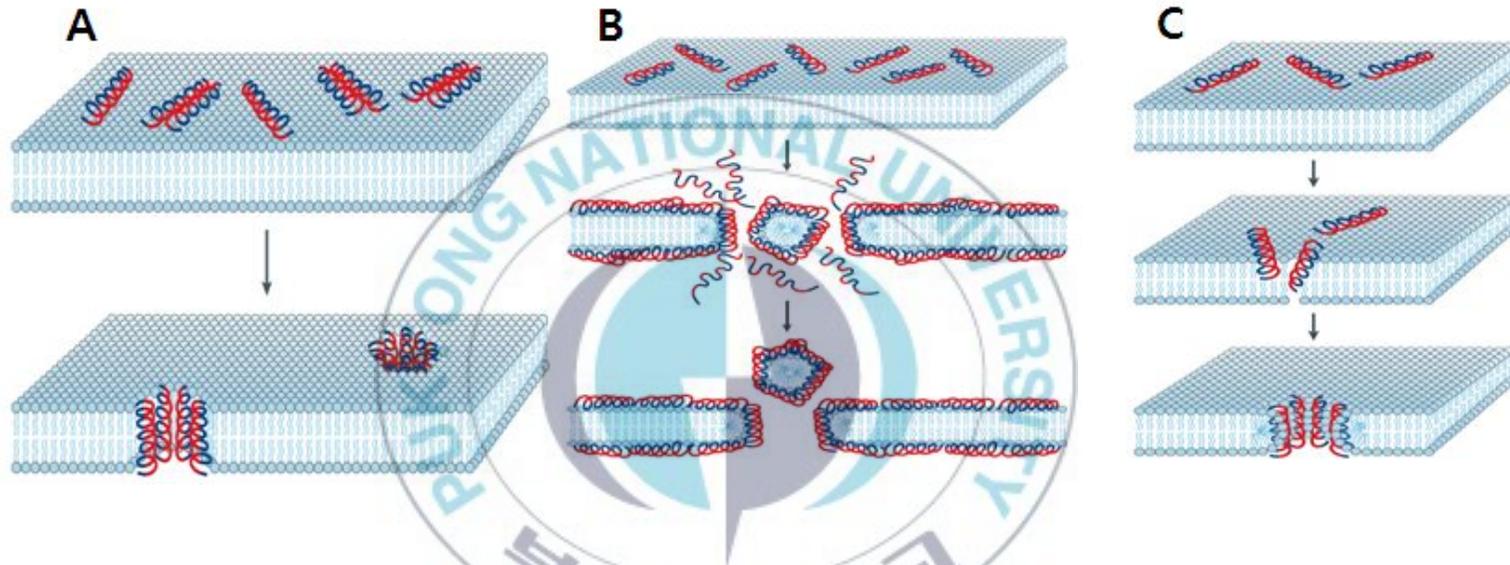


Fig. 2. Schematic representation of the proposed models for the mode of action of α -helical antimicrobial peptide. (A) barrel stave pores formation, (B) carpet mechanism for membrane permeabilization, (C) toroidal pore formation.

으로 균의 성장을 저해하게 된다. Defensins에 의한 단일가닥 DNA로의 파괴와 IL-8의 유도로 인한 염증 과정 (inflammatory process)의 조절 (Lehrer and Ganz, 1990), PR-39에 의한 긴장 (stress) 단백질들의 합성과 DNA 합성의 저해 (Storici and Zanetti, 1993) 및 buforin과 DNA와의 직접적인 결합에 의한 항균작용 (Park *et al.*, 1996) 등과 같이 다양한 방법을 이용하여 항균활성을 나타낸다는 것이 알려져 있다.

Piscidin은 hybrid striped bass 유래의 항균활성 펩타이드로 어류의 mast cell에서 정제된 최초의 항균활성 펩타이드이며, 바이러스, 세균, 효모 및 기생충등에 강력한 활성을 나타낸다. Piscidin은 양친매성 α -helical 펩타이드로 N-말단 쪽에 His과 Phe를 많이 포함하고 있다. Piscidin 1은 22개의 아미노산 잔기로 이루어져 있으며, 분자량은 2571 Da이다. Piscidin 2는 piscidin 1의 Arg¹⁸이 Lys¹⁸으로만 치환되어 있으며, piscidin 3는 piscidin 1과 N-말단 부분에 높은 homology를 나타낸다. Piscidin 4는 44개의 잔기로 이루어져 piscidin 1, 2, 3에 비해 2배정도 길이가 긴 펩타이드이지만 N-말단 영역에 높은 homology를 가지고 있다. Piscidin이 striped bass에서 최초로 발견된 이후에 white bass (*Morone chrysops*), snow grouper (*Epinephelus niveatus*), spot (*Leiostomus xanthurus*), Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*), 및 rabbitfish (*Siganus rivulatus*)를 포함하여 8과 (family) 11종 (species)에서 발견되고 있다.

이전의 CD연구에 의하면 piscidin은 buffer에서는 unstructure 구조를 가지지만 DPC (dodecylphosphocholine) micell에서는 높은 α -helix 구조를 취한다고 알려져 있다. 또한 ¹H NMR연구에 의하면 piscidin의 8-17번째 잔기는 dodecylphosphocholine (DPC) micell에서 α -helix 구조를 취한다고 보고 (Campagna *et al.*, 2007)되어 있으며, Lee *et al*

(2007)은 SDS micell에서 Phe²에서 Thr²¹까지 α -helical structure를 취한다고 보고하였다. 한편 Piscidin 1의 Gly⁸와 Gly¹³을 Ala 및 Pro으로 치환한 유도체에 관한 연구에 의하면 Gly¹³을 Ala으로 치환한 유도체의 항균활성이 piscidin 1보다 높아졌으며, Pro으로 치환한 유도체는 항균활성이 약 2-4배정도 감소하였다고 보고 되어있다 (Lee *et al.*, 2007). 또한 Gly⁸을 Pro으로 치환한 유도체는 CD 측정결과 piscidin 1과 같이 여러 가지 인공막 조건에서 α -helix 구조를 취하였으며, 인간 적혈구에 대한 세포독성은 현저히 낮아지면서 세균에 대한 강한 활성을 나타낸다고 보고하였다 (Lee *et al.*, 2010).

Piscidin 4에 대한 구조와 활성의 상관관계에 대한 이전의 연구에 의하면 piscidin 4는 수용액 상태에서 disordered structure를 취하지만, TFE 및 liposome에서는 약한 α -helical conformation을 취한다고 보고하였다. 또한 leakage를 이용한 막 유출실험에서 piscidin 4는 liposome과 강력한 hydrophobic interaction을 하며, DPPC > EYPC > DPPC-DPPG (3:1) > EYPC-EYPG (3:1)의 순서로 유출활성을 나타낸다고 보고되어 있다 (Park *et al.*, 2011)

Piscidin 1의 구조-생리활성 및 막과의 상호작용을 통하여 항균작용 메커니즘을 알아보기 위하여 piscidins 1, 2, 3 및 다양한 유도체를 합성하였으며, 이들을 대상으로 하여 CD 스펙트럼에 의한 2차구조의 해석과 인공막을 사용한 유출 (leakage), 적정 (titration) 및 소광 (quenching) 실험을 행하였다.

II. 재료 및 방법

2.1. 항균활성 측정

2.1.1. 액체 배지법

Minimum inhibitory concentration (MIC)와 minimum bactericidal concentration (MBC)는 standard microtiter broth dilution method (Wu and Hancock, 1999)의 변형된 방법으로 측정하였다. 펩타이드는 0.2% bovine serum albumin을 포함하는 0.01% HAc에 500 ug/ml의 농도를 제조하여 단계적으로 2배씩 희석한 것을 사용하였다. 실험에 사용한 균주는 최적의 배양온도에서 배양한 후 5×10^5 CFU/ml로 농도를 맞춘 뒤 사용하였다. 96-well plate에 균 배양액 100 ul를 넣은 후, 펩타이드 용액 11 ul를 첨가하여 18시간 배양하였다. 이때 모든 sample은 3 well 씩 test 하였다. 18시간 배양후 균이 자란 것이 보이지 않는 가장 낮은 농도를 MIC로 정의하였으며, MIC를 포함하여 MIC 보다 2배 및 4배 높은 농도의 배양액을 Mueller Hinton agar plate에 도말하여 18시간 배양 후 균이 자라지 않는 농도를 MBC로 정의하였다.

2.1.2. URDA (Ultrasensitive Radial Diffusion Assay)법

URDA (Seo *et al.*, 2005)방법에 사용된 균주는 *Bacillus subtilis* KCTC1021, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC2004, *S. iniae* FP5228, *E. tarda* H-4, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* KCTC2358, *Vibrio anguillarum* FP-5228이다. 실험에 사용된 균주는 trypticase soy broth (TSB) 배지에서 18시간동안 pre-culture 시켰다. 배양된 균주는 BioMerieux Vitek, Inc. Colorimeter (Product No. 52-1210, BioMerieux, Inc., USA)를 사용하여 84 %T (10^8 CFU/ml)가 되게 균을 희석하였다. 희

석된 균 0.5 ml을 9.5 ml의 0.03% TSB와 1% Type I agrose (low EEO)를 포함하는 10 mM phosphate buffer (pH 6.57)에 넣고 잘 섞은뒤 plate에 부어서 굳힌 다음 직경 3 mm의 punch로 well을 뚫어 5 ul의 sample을 loading 하였다. Sample은 0.01% HAc에 녹인 펩타이드로써 125 ug/ml에서부터 2배씩 희석하여 7.8 ug/ml까지를 측정하였다. Sample 이 배지에 스며들면 3시간 동안 배양한 후, 그 위에 6% TSB와 1% Type I agrose (low EEO)를 포함하는 10 mM phosphate buffer (pH 6.57) 10 ml을 붓고 굳혀서 18시간동안 배양하였다. 18시간 뒤 well 주위에 생긴 clear zone의 크기를 측정하고 0.1 mm를 1 unit로 환산하여 표현하였다. MEC (minimal effective concentration, ug/ml)은 y축에 unit, x축에 펩타이드의 농도를 \log_{10} 로 변환하여 표시한 그래프의 X 절편값이다.

2.2. 용혈활성측정

합성 펩타이드들의 human erythrocytes에 대한 용혈활성을 측정하였다. 신선한 적혈구들은 Alsever's solution을 이용하여 1:1 (v/v) 으로 희석하였으며, phosphate buffered saline (PBS, 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, pH 7.4)을 첨가한 후, 원심분리 (2,700 X g, 4°C, 1min)를 3회 반복하여 세정하였다. 침전물에 10% 혼합용액이 되도록 PBS를 첨가하여 혈장액을 제조하였다. 제조된 혈장액은 96-well plate에 50 ul 씩 분주하고 각각 다른 농도의 펩타이드를 50 ul 첨가하였다. 10분 간 실온에서 반응 시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 혈장액에 펩타이드 용액이 들어가지 않은것을 0%의 용혈활성으로 하고 0.1% Triton X-100을 넣었을 때의 흡광도를 100% 용혈활성으로 정의하였다.

2.3. 리포솜의 제조

CD, fluorescence spectrum, quenching 등의 실험에는 small unilamellar liposomes (SUVs)을 사용하였으며, leakage 실험에서는 large unilamellar liposomes (LUVs)을 사용하였다 (Fig 3).

SUVs는 6.85 mg (8.6 μ M)의 DPPC, DPPC-DPPG (3:1), EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1)를 conical glass tube에 넣고 chloroform에 녹인 후, 질소가스를 이용하여 인지질이 conical glass tube 벽면에 얇은 막을 형성하도록 잘 말려준 다음 감압하에서 일정시간동안 방치시켰다. 건조된 lipid film에 100 mM NaCl을 포함하는 5 mM N-tris(hydroxymethyl)-methyl-2-amino-ethanesulfonic acid (TES) buffer (pH 7.4) 3 ml을 첨가하여 30분간 vortexed-mixing을 하였다. 이후 probe-type sonicator (Fisher Sonic Dismembrator Model 300)을 이용하여 10분 간격으로 3회 sonication을 실시하였다. 이때 리포솜의 농도는 약 3 mM 이며, CD, fluorescence spectrum, quenching 실험에 사용하였다.

Calcein을 포함하는 LUVs는 CD측정 등에 사용하는 vesicle의 제조법과 약간 변형된 방법을 이용하여 만들었다. 20 mg (25 μ M)의 DPPC, DPPC-DPPG (3:1), EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1)로 conical glass tube에 lipid film을 만들고 150 mM의 NaCl을 포함하는 TES buffer (pH 7.4)를 2 ml 첨가한 후, 70 mM calcein을 넣고 1 N NaOH를 이용하여 용해시켰다. 리포솜 용액을 20분간 vortexing 한 후, 액체질소를 이용하여 동결과 해동 과정을 10회 반복하였다. 그 후 0.1 μ m polycarbonate membrane filter가 장착된 Avanti Mini-Extruder를 이용하여 10회 filter를 하였다. Calcein을 포함하지 않은 LUVs들은 Separose 4B (1 X 18 cm) column을 이용하여 제거하였으며 calcein을 포함하는 fraction은 leakage 실험에 사용하였다.

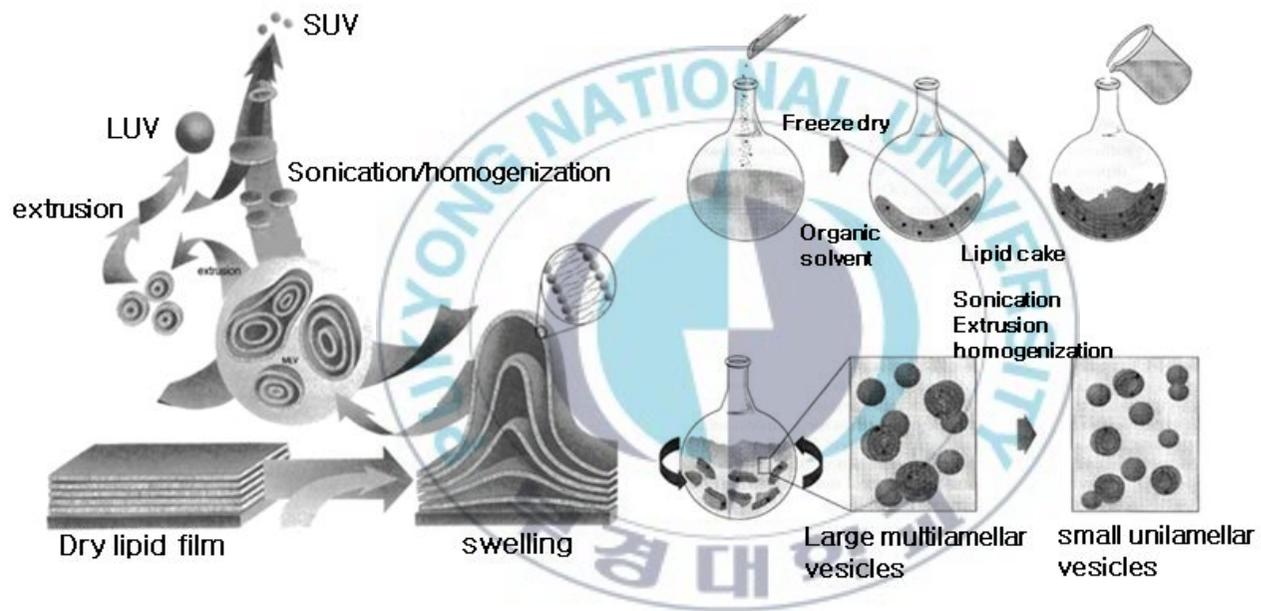


Fig. 3. Small unilamella vesicles (SUVs) and Large unilamellar vesicles (LUVs) liposomes preparation methods.

2.4. CD spectra

펩타이드들의 2차구조를 확인하기 위해서 1 mm path-length를 가진 quartz cell을 사용하여 JASCO J-700 spectropolarimeter로 CD 스펙트럼을 측정하였다. TES buffer (pH 7.4), TFE (50%, 100%), 중성 및 산성 liposome (DPPC, DPPC-DPPG (3:1), EYPC, EYPC-EYPG (3:1))에 펩타이드 용액을 넣어 최종 volume를 200 μ l로 조정 한 후, CD 스펙트럼을 측정하였다. CD 측정에 사용한 펩타이드들의 최종농도는 모든 조건하에서 50 μ M이 되도록 5mM TES buffer (pH 7.4)에 녹여 사용하였다. 한편 liposome 자체에 의한 CD 스펙트럼의 영향을 제거하기 위해서 리포솜에 펩타이드를 투여했을 때의 CD 스펙트럼에서 리포솜만의 스펙트럼을 상쇄시킨 다음, 각각의 CD 스펙트럼을 얻었다. 스펙트럼은 195nm에서 250nm에 걸쳐 25 $^{\circ}$ C에서 4번씩 반복해서 측정하였으며, 모든 CD 스펙트럼은 몰타원율 (molar ellipticity)로서 표현하였다. 펩타이드들의 helical content는 Wu *et al.* (1981)의 방법을 이용하여 계산하였으며, 계산식은 다음과 같다 (Wu *et al.* 1981).

$$f_h = (\theta_{222} - \theta_{222}^0) / (\theta_{222}^{100} - \theta_{222}^0)$$

θ_{222} 는 222nm에서의 몰타원율이며, θ_{222}^0 및 θ_{222}^{100} 은 222nm에서의 0% 및 100% helical content로써, 각각 2000 및 32000 deg \cdot cm²/dmol로 계산하였다.

2.5. 형광물질의 유출실험

리포솜에 함유된 형광물질의 유출실험을 하기 위해서 PTI C61 spectrofluorimeter (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ)를 사용하였다. Separose 4B column으로 분리한 calcein을 포함하는 LUVs 용액 25 μ l (~95 μ M) 와 150 mM NaCl을 포함하는 20 mM TES

buffer (pH 7.4)를 넣고 1분간 base line을 확인한 후 펩타이드 용액을 넣고 3분간 calcein의 유출정도를 측정하였다 (Fig. 4). 이때 리포솜의 최종 농도는 95 μM 이었으며 총 volume이 1ml이 되도록 하여 실험하였다. 리포솜으로부터 유출되는 형광물질의 변화는 490 nm에서 excitation 시킨 후, 520 nm에서의 형광의 세기를 관찰하였다. 10% Triton X-100 용액 10 μl 를 첨가하여 얻은 형광세기 (intensity)를 100% calcein-release로 정의하였으며, 다음과 같은 식을 이용하여 펩타이드에 의한 유출정도를 나타내었다.

$$\text{Dye-release (\%)} = (F - F_0 / F_t - F_0) \times 100$$

F는 펩타이드에 의해 나타난 형광 세기이고, F_0 은 펩타이드가 포함되지 않은 상태에서의 형광도이며, F_t 는 Triton X-100에 의한 형광도를 나타낸다.

2.6. Fluorescence spectra

Fluorescence spectrum은 PTI C61 spectrofluorimeter (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ)를 이용하여 1cm pathlength를 가진 quartz cuvette로 측정하였다. 펩타이드내의 Trp 잔기의 흡수파장인 280 nm에서 여기 (excitation)시킨 후, 300 nm에서 400 nm까지 Trp 잔기의 방출 (emission) 스펙트럼을 측정하였다. 5 μM 의 펩타이드 용액에 각각 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100배의 리포솜을 첨가하여 방출 극대점 (emission maxima)의 단파장쪽에서의 이동 (blue-shift)과 형광의 세기를 측정하였다.

2.7. Quenching of Trp fluorescence

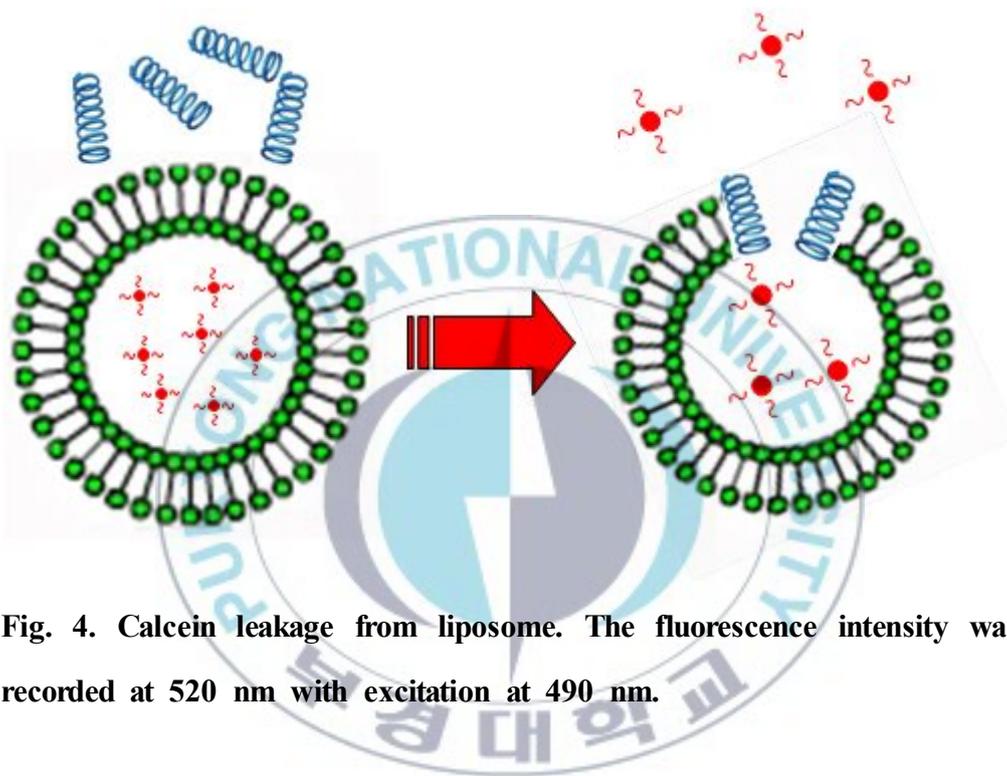


Fig. 4. Calcein leakage from liposome. The fluorescence intensity was recorded at 520 nm with excitation at 490 nm.

2.7.1. Acrylamide

Trp을 함유하는 펩타이드들의 Trp fluorescence의 소광 측정은 리포솜의 존재와 비 존재하에서 수용성 quencher인 acrylamide를 적정하여 측정하였다. 펩타이드와 리포솜의 비율은 1:100 이며, 280 nm에서 excitation 시킨후 300 nm에서 400 nm까지 emission 스펙트럼을 scan 하여 Trp의 소광을 측정하였다. 소광 data는 Stern-Volmer equation의 소광 상수 (quenching constant)로서 나타내었고, Stern-Volmer equation은 다음과 같다

$$F_0 / F = K_{sv} \cdot [\theta] + 1$$

F_0 은 리포솜이 존재하지 않을 때의 형광 세기, F 는 리포솜이 존재할 때의 세기, K_{sv} 는 Stern-Volmer 소광상수 (quenching constant) 및 $[\theta]$ 는 소광제 (quencher)의 농도를 의미한다.

2.7.2. DBrPC

펩타이드내의 Trp의 소광 측정은 PTI C61 spectrofluorimeter (Photon Technology International, Lawrenceville, NJ)를 이용하여 측정하였다. 펩타이드에 포함된 Trp의 소광 현상을 측정하기 위하여 소광제 (quencher)인 bromine이 치환된 brominated phospholipid (DBrPC) (6,7-DBrPC;1-palmitoyl-2-(6,7-dibromo)stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 9,10-DBrPC;1-palmitoyl-2-(9,10-dibromo)stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine, 11,12-DBrPC;1-palmitoyl-2-(11,12-dibromo)stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)을 포함하는 중성 및 산성 리포솜을 사용하였다 (Fig. 5). 6,7-DBrPC, 9,10-6,7-DBrPC 및

11,12-6,7-DBrPC는 리포솜 center로부터 각각 10.8, 8.3 및 6.3 Å 떨어진 위치에 bromine이 치환되어 있다고 알려져 있다 (McIntosh and Holloway, 1987). Trp을 소유한 펩타이드들의 스펙트럼은 280 nm에서 여기시켜서 25°C에서 측정하였다. 30% DBrPC를 포함하는 DPPC 및 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 펩타이드 용액을 첨가하고 최종 volume이 1 ml이 되도록 하여 Trp이 나타내는 형광의 소광효과를 조사하였다. 이때 사용한 펩타이드와 리포솜의 농도는 각각 5 μ M과 500 μ M 이었다.



1,2-Dibromostearoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine

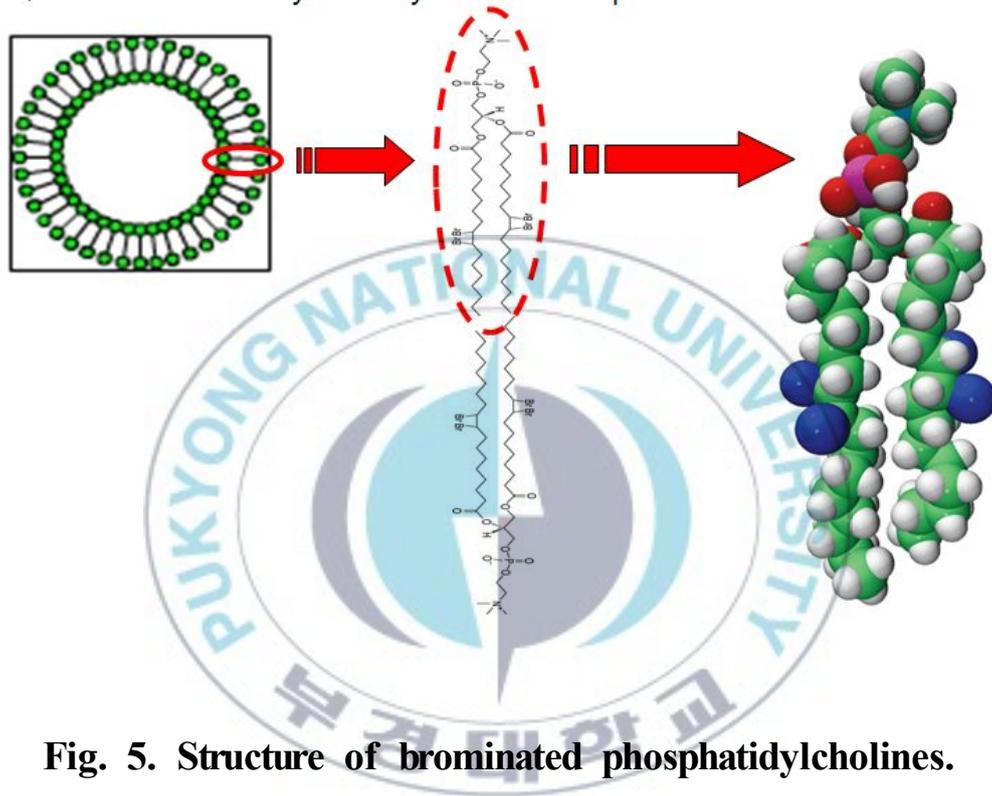


Fig. 5. Structure of brominated phosphatidylcholines.

III. 결 과

3.1. Piscidin 유도체들의 design

본 연구에 사용된 piscidin 1의 유도체들의 1차구조는 Table 3에 나타내었다. Piscidin 1이 항균활성을 나타내기 위한 최소활성영역을 조사하기 위해 piscidin 1의 N-말단의 fragment인 (1-11)-P1와 (1-18)-P1, C-말단의 fragment인 (14-22)-P1 및 N-말단과 C-말단 영역의 아미노산 4개를 각각 제거한 fragment인 (5-18)-P1을 합성하였다. 그리고 piscidin 1의 N-말단에 존재하는 아미노산의 중요성을 알아보기 위해 N-말단의 아미노산을 순차적으로 제거한 (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1을 합성하였다. 또한 C-말단에 존재하는 아미노산의 중요성을 알아보기 위해 Gly를 제거한 (1-21)-P1을 합성하였다. 또한 펩타이드의 길이와 활성간의 상관관계를 알아보기 위해 piscidin 1을 구성하고 있는 아미노산 길이에 해당하는 dimer를 합성하였다. (1-11)-P1을 모체로 한 D1-P1은 중앙에 2개의 Cys이 서로 간에 disulfide bridge로 연결되어 양쪽에 (1-11)-P1이 연결된 것이다. D2-P1은 D1-P1과는 다르게 가운데에 있는 두 개의 Cys이 peptide bond로 연결되어 양쪽에 (1-11)-P1이 연결된 것이다. 이때 D2-P1에 있는 2개의 Cys의 side chain은 AcM으로 보호되어 있다. 또한 Lys을 중심으로 양쪽에 (1-11)-P1이 연결된 D3-P1, 한 개의 Pro를 중심으로 양쪽에 (1-11)-P1이 연결된 D4-P1 및 연속된 두 개의 Pro를 중심으로 양쪽에 (1-11)-P1이 연결된 D5-P1을 합성하였다.

Fig. 6에 나타내듯이 piscidin 1은 친수성 영역과 소수성 영역으로 나누어진 cationic amphiphilic α -helical 구조를 취하고 있다. 이들 두 영역 부분을 증대시키기 위해서 또는 경계면에 존재하는 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 구조와 활성간의 상관관계를 알아보기 위해 다음과

Table 3. Primary structure of piscidins and its analogues

Peptide	Sequence
Original source	
Piscidin 1	F F H H I F R G I V H V G K I T H R L V T G
Piscidin 2	F F H H I F R G I V H V G K I T H K L V T G
Piscidin 3	F I H H I F R G I V H A G R I S G R F L T G
Dimer	
D1-P1	H V I G R F I H H F F C C F F H H I F R G I V H
D2-P1	H V I G R F I H H F F C C F F H H I F R G I V H
D3-P1	H V I G R F I H H F F K F F H H I F R G I V H
D4-P1	H V I G R F I H H F F P F F H H I F R G I V H
D5-P1	H V I G R F I H H F F P P F F H H I F R G I V H
Truncated peptide	
(1-11)-P1	F F H H I F R G I V H
(1-18)-P1	F F H H I F R G I V H V G K I T H R
(5-18)-P1	I F R G I V H V G K I T H R
(14-22)-P1	K I T H R L V T G
(1-21)-P1	F F H H I F R G I V H V G K I T H R L V T
(2-22)-P1	F H H I F R G I V H V G K I T H R L V T G
(3-22)-P1	H H I F R G I V H V G K I T H R L V T G
(4-22)-P1	H I F R G I V H V G K I T H R L V T G
(5-22)-P1	I F R G I V H V G K I T H R L V T G
Amino acid substitution	
G8A-P1	F F H H I F R A I V H V G K I T H R L V T G
G8K-P1	F F H H I F R K I V H V G K I T H R L V T G
V10K-P1	F F H H I F R G I K H V G K I T H R L V T G
G13A-P1	F F H H I F R G I V H V A K I T H R L V T G
G13P-P1	F F H H I F R G I V H V P K I T H R L V T G
H17A-P1	F F H H I F R G I V H V G K I T A R L V T G
H17K-P1	F F H H I F R G I V H V G K I T K R L V T G
G22K-P1	F F H H I F R G I V H V G K I T H R L V T K
Tryptophanyl substitution	
F6W-P1	F F H H I W R G I V H V G K I T H R L V T G
V10W-P1	F F H H I F R G I W H V G K I T H R L V T G
I16W-P1	F F H H I F R G I V H V G K W T H R L V T G
L19W-P1	F F H H I F R G I V H V G K I T H R W V T G



Fig. 6. Helical wheels predicting amphipathic α -helical conformations for piscidins 1, 2 and 3. Open circles, hydrophilic residues; filled circles, hydrophobic residues.

같은 유도체들을 합성하였다. 우선 친수성 영역과 소수성 영역의 경계면에 위치하는 동시에 helix breaker로 작용하는 Gly⁸을 비극성 아미노산인 Ala으로 치환하여 소수성 영역을 증대시킨 G8A-P1과 극성 아미노산인 Lys로 치환하여 친수성 영역을 증대시킨 G8K-P1, 그리고 친수성 영역에 존재하지만 비극성 아미노산인 Val¹⁰을 극성 아미노산인 Lys으로 치환시켜 친수성 영역을 증가시킨 V10K-P1을 합성하였다. 또한 소수성 영역에 존재하는 Gly¹³을 Ala 또는 helix breaker 역할을 하는 Pro으로 치환시킨 유도체인 G13A-P1과 G13P-P1을 합성하였다. 한편, 이들 두 영역의 경계면에 위치하는 His¹⁷을 Ala으로 치환시켜 소수성영역을 증가시킨 H17A-P1과 Lys으로 치환시켜 친수성 영역을 증대시킨 H17K-P1을 합성하였다. 아울러 친수성 영역에 존재하는 Gly²²을 Lys으로 치환하여 양이온 전하 뿐만 아니라 동시에 친수성 영역을 증대시킨 G22K-P1를 합성하였다. 마지막으로 piscidin 1과 인공막과의 상호작용 및 Trp fluorescence 연구를 위해 piscidin 1의 6번, 10번, 16번 및 19번 위치의 아미노산을 각각 Trp로 치환시킨 F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1을 합성하여 본 연구에 사용하였다.

3.2. Piscidins 1, 2, 3 및 유도체들의 CD 스펙트럼

Piscidins 1, 2, 3 및 유도체들의 2차구조를 확인하기 위해서 TES buffer, 50% TFE, 100% TFE, DPPC, DPPC-DPPG (3:1), EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1) 조건하에서 CD 스펙트럼을 측정하였다.

3.2.1 Piscidins 1, 2 및 3의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조 (Table 4)

Fig. 7은 piscidin 1의 CD 스펙트럼을 나타낸다. TES buffer에서 piscidin 1은 random 형태를 취하였으나, TFE 및 인공막 존재하에서는

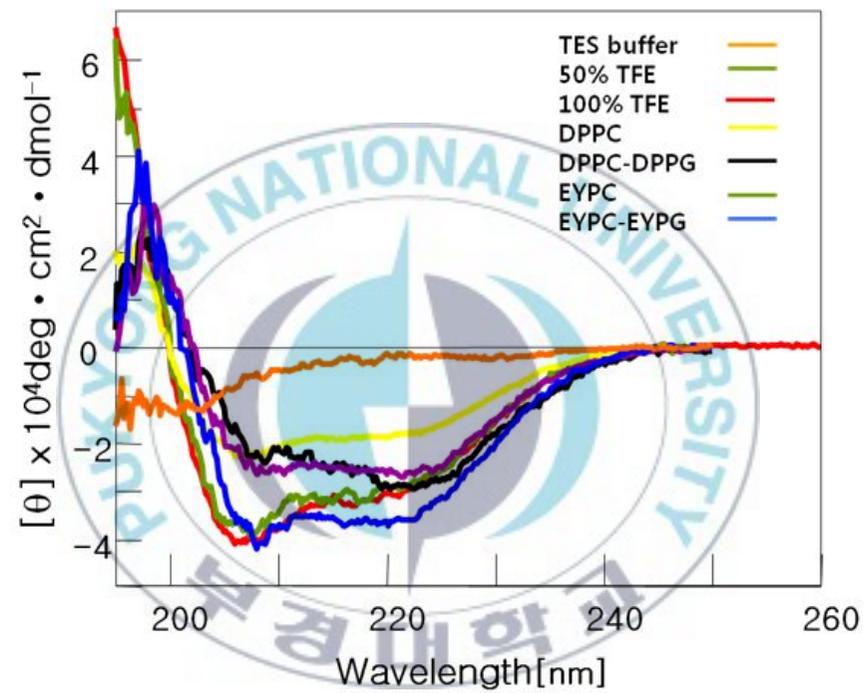


Fig. 7. Circular dichroism spectra of Piscidin1 in 5mM TES buffer containing 100mM NaCl at pH7.4. Spectra were measured at 50uM and 1mM of peptide and lipid concentration.

208 nm와 222 nm에서 negative minimum을 가지는 전형적인 α -helix 형태를 나타내었다.

Wu method (Wu *et al.*, 1981)를 이용하여 CD 스펙트럼에서 나타난 각각의 물질들에 대한 helicity를 계산하였다 (Table 4 ~ 8). TES buffer에서 piscidins 1, 2, 및 3는 모두 random한 형태를 취하였다. Helix inducer 물질로 알려진 50% 및 100% TFE 조건하에서는 piscidin 1과 piscidin 2는 모두 90% ~ 97%의 helicity를 나타냈지만, piscidin 3은 이들에 비해 다소 낮은 58% 및 69%의 helicity를 나타냈다. DPPC 리포솜에서 piscidins 1, 2 및 3는 약 54%정도의 helicity를 나타내었으며, DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에서 이들 물질들은 약 90%의 helicity를 나타내었다. 이들 결과로 미루어 보아 piscidins 1 ~ 3은 중성지질보다는 산성지질 존재하에서 α -helix를 더 잘 형성한다는 것을 나타낸다. 한편, EYPC 조건에서 piscidin 2는 100%의 helicity를 나타내었고, piscidin 1 및 piscidin 3은 각각 82% 및 77%의 helicity를 나타내었다. EYPC-EYPC (3:1)에서는 piscidin 1과 piscidin 2가 100%의 helicity를 나타낸 반면에 piscidin 3는 68%의 helicity를 나타내었다. 천연지질을 사용한 구조 연구에 있어서도 piscidin 1은 중성지질보다 산성지질에서 α -helical 구조를 더 잘 형성하였다.

3.2.2. Dimer group의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조 (Table 5)

Dimer group의 유도체들은 TES buffer, DPPC, DPPC-DPPG (3:1), EYPC 및 EYPC-EYPC (3:1) 조건에서 모두 β -sheet 구조를 취하는 것으로 나타났다. 50% 및 100% TFE 조건에서 D1-P1은 구조의 변화를 일으키지 못하고 β -sheet 구조를 유지하였다. D2-P1과 D5-P1은 TFE 용매에 의해 α -helix 구조로 유도되었으나, 완벽한 구조의 변화를 일으키지

Table 4. Helical contents of piscidin and its analogs

Helicity	Buffer	50% TFE	100% TFE	DPPC	DPPC-DPPG (3:1)	EYPC	EYPC-EYPG (3:1)
Piscidin 1	R	90	93	54	91	82	100
Piscidin 2	R	90	97	53	91	100	100
Piscidin 3	R	58	69	54	88	77	68

Table 5. Helical contents of dimer group

Helicity	Buffer	50% TFE	100% TFE	DPPC	DPPC-DPPG (3:1)	EYPC	EYPC-EYPG (3:1)
D1-P1	β	β	β	β	β	β	β
D2-P1	β	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	β	β	β	β
D3-P1	β	48	55	β	β	β	β
D4-P1	β	$\alpha+\beta$	36	β	β	β	β
D5-P1	β	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	β	β	β	β

Table 6. Helical contents of truncated peptide group

Helicity	Buffer	50% TFE	100% TFE	DPPC	DPPC-DPPG (3:1)	EYPC	EYPC-EYPG (3:1)
(1-11)-P1	R	R	R	R	R	R	R
(1-18)-P1	R	70	87	29	57	56	67
(5-18)-P1	R	$\alpha+\beta$	$\alpha+\beta$	R	R	R	R
(14-22)-P1	R	β	β	β	β	β	β
(1-21)-P1	R	97	75	71	62	89	96
(2-22)-P1	R	100	95	62	66	61	84
(3-22)-P1	R	83	74	43	69	37	89
(4-22)-P1	R	91	100	35	82	54	91
(5-22)-P1	R	100	73	30	70	54	80

Table 7. Helical contents of amino acid substitution peptide group

Helicity	Buffer	50% TFE	100% TFE	DPPC	DPPC-DPPG (3:1)	EYPC	EYPC-EYPG (3:1)
G8A-P1	R	81	98	85	76	100	100
G8K-P1	R	91	100	72	100	100	100
V10K-P1	R	95	82	52	100	93	83
G13A-P1	R	93	96	100	100	100	100
G13P-P1	R	68	56	31	48	71	74
H17A-P1	R	100	100	72	52	100	100
H17K-P1	R	97	87	63	79	100	100
G22K-P1	R	89	82	68	58	93	100

Table 8. Helical contents of tryptophanyl substitution peptide group

Helicity	Buffer	50% TFE	100% TFE	DPPC	DPPC-DPPG (3:1)	EYPC	EYPC-EYPG (3:1)
F6W-P1	R	98	76	71	87	90	97
V10W-P1	R	100	100	100	100	100	100
I16W-P1	R	98	78	81	90	100	100
L19W-P1	R	100	87	70	94	100	100

못하고 α 와 β 가 혼합된 구조를 취하는 것으로 나타났다. D3-P1은 50% 및 100% TFE 조건에서 β -sheet 구조에서 α -helix 구조로 구조의 변화가 일어났으며, 50% TFE에서 48%, 100% TFE에서 55%의 helicity를 나타내었다. D4-P1은 50% TFE 조건에서는 α 와 β 가 혼합된 구조를 취하는 것으로 나타났으나, 100% TFE 조건에서는 α -helix 구조를 취하였으며 36%의 helicity를 나타내었다.

3.2.3. Truncated peptide group의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조 (Table 6)

(1-11)-P1은 측정된 모든 조건에서 random 구조를 취하는 것으로 나타났다. Piscidin 1의 N-말단 영역에 해당하는 (1-18)-P1은 TES buffer 상태에서는 random한 형태를 취하였으며, 50% 및 100% TFE 상태에서 각각 70% 및 87%의 helicity를 나타내었다. DPPC-DPPG (3:1), EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1) 리포솜 조건에서는 각각 57%, 56% 및 67%의 helicity를 나타내었다. 그러나 DPPC 리포솜 조건에서는 29%의 낮은 helicity를 나타내었다. Piscidin 1의 중앙부분에 해당하는 (5-18)-P1은 TES buffer 상태에서는 random한 형태를 취하였으며, 50% 및 100% TFE 조건에서는 α 와 β 구조가 혼합된 구조를 취하였다. 인공막 존재하에서는 모두 random 구조를 취하는 것으로 나타났다. Piscidin 1의 C-말단 영역인 (14-22)-P1은 TES buffer를 제외한 모든 조건에서 β -sheet 구조를 취하였다. 따라서 piscidin 1과 유사한 α -helical 구조를 유지하기 위해서는 N-말단의 1 ~ 18번째 잔기까지가 최소 영역부분인 것 같다.

(2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 TES buffer 상태에서는 random한 형태를 취하였으며, 50%, 100% TFE 조건에서는 모두 70% ~ 100%의 helicity를 나타내었다. DPPC 리포솜 조건에서는 N-말단의 아미노산 잔기가 하나씩 제거됨에 따라 62%, 43%, 35% 및 30%로 순차적으

로 helicity가 낮아졌다. 이러한 결과들은 piscidin 1의 N-말단에 존재하는 아미노산이 하나씩 차례대로 제거된 유도체들은 어느 정도 helix 구조를 유지하였지만, piscidin 1에 비해 전반적으로 helix 함유량은 감소함을 알 수 있었다. DPPC-DPPG (3:1) 리포솜 조건에서는 65% ~ 70%의 helicity를 나타내었고, EYPC 리포솜 조건에서 (2-22)-P1은 61%, (3-22)-P1은 37%, (4-22)-P1와 (5-22)-P1은 둘다 54%의 helicity를 나타내었다. EYPC-EYPG (3:1) 리포솜 조건에서는 80% ~ 91%의 helicity를 나타내었다. 이와 같은 결과는 piscidin 1이 DPPC 리포솜과 반응하여 α -helix를 형성하기 위해 N-말단 부위가 중요한 역할을 담당하고 있지만, 그 이외의 다른 리포솜들과 반응할 때는 N-말단 부위가 중요한 기능을 하지 않는다는 것을 의미한다. 한편 (1-21)-P1은 TES buffer 조건에서 random한 구조를 나타냈으며, 50% 및 100% TFE 조건에서 각각 97% 및 75%의 helicity를 나타내었다. 그리고 DPPC에서 71%, DPPC-DPPG (3:1)에서 62%, EYPC에서 89% 및 EYPC-EYPG (3:1)에서 96%의 helicity를 나타내었다.

3.2.4. Substitution peptide group의 CD 스펙트럼에 의한 2차구조 (Table 7)

Substitution peptide group의 helical contents는 Table 7에 나타내었다. 아미노산을 치환한 모든 유도체들은 TES buffer 조건하에서 random한 구조를 나타내었다. G8A-P1, G8K-P1 및 G13A-P1은 TES buffer를 제외한 모든 조건에서 72% ~ 100%의 높은 helicity를 나타내었으며 이들은 piscidin 1보다 더 높은 helicity를 나타내었다. 반면에 G13P-P1은 buffer를 제외한 다른 조건들에서는 31% ~ 74%의 helicity를 나타내어 치환한 유도체들 중에서 가장 낮은 helicity를 나타내었다. 일반적으로 Gly과 Pro은 helix breaker 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 Gly이 Ala과 Lys으로 치환된 유도체들은 piscidin 1보다 α -helical 구조를 더 잘 형성하였지만, Pro으로 치환된 유도체

는 다른 유도체보다 α -helical 구조를 형성하지 못하였다. V10K-P1은 DPPC 리포솜 조건에서는 51%의 helicity를 나타내었다. 다른 조건들에서는 82% ~ 100%의 helicity를 나타내었다. H17K-P1 또한 DPPC 리포솜 조건에서 63%의 helicity를 나타내었다. 다른 조건에서는 모두 79% ~ 100%의 helicity를 나타내었다. V10K-P1와 H17K-P1은 Val 및 His을 각각 Lys으로 치환한 유도체로 아마도 Lys에 의한 치환이 펩타이드의 양친매성을 증가시켜 piscidin 1보다 높은 helicity를 나타낸 것 같다. H17A-P1은 DPPC에서 72%, DPPC-DPPG (3:1)에서는 52%의 helicity를 나타내었으나, EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1)에서 모두 100%의 helicity를 나타내었다. 따라서 양친매성 구조의 소수성 영역이 증가된 H17A-P1이 piscidin 1보다 더 잘 소수성 상호작용을 할 것이며, 그 결과 piscidin 1보다 α -helix 구조를 더 잘 형성한 것 같다. 이 결과와 연관되어 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜 조건에서 H17A-P1은 piscidin 1에 비해 helicity가 많이 감소되었다. 아마도 그 이유는 극성 아미노산들 사이에 존재하는 His을 Ala으로 치환하여 양친매성 구조의 소수성 영역이 증가하였기 때문에 산성 지질과 정전기적인 상호작용이 더 불리하게 작용한 것 같다. G22K-P1은 TFE 조건에서 80%이상, EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1) 조건에서는 90% 이상의 helicity를 나타내었다. 그리고 DPPC에서는 68%, DPPC-DPPG (3:1)에서는 58%의 helicity를 나타내었다. 아마도 이러한 결과는 양친매성 구조의 친수성 영역의 Gly을 Lys으로 치환하여 Fig. 6에 나타낸 것처럼 양친매성이 증가하여 piscidin 1보다 더 높은 helicity를 나타내는 것 같다.

3.2.5. Tryptophanyl substitution peptide group의 CD 스펙트럼에 의한 2차 구조 (Table 8)

TES buffer에서 F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1은 모두

random 구조를 나타내었으며, 100% TFE 조건에서는 각각 76%, 100%, 78% 및 87%의 helicity를 나타내었다. 50% TFE 조건에서는 모두 100%의 helicity를 나타내었다. V10W은 다른 모든 조건에서 100%의 helicity를 나타내었다. 한편 EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1)에서 I16W-P1과 L19W-P1은 100%, F6W-P1은 90%이상의 helicity를 나타내었다. 또한 DPPC 조건에서 F6W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1의 helicity는 각각 71%, 81% 및 70%이었으며, DPPC-DPPG (3:1)에서는 87%, 90% 및 94%를 나타냈다. 이들 4종의 유도체들은 모두 piscidin 1보다 높은 helicity를 나타내었다.

3.3 Piscidins 1, 2, 3 및 유도체들의 항균활성

합성한 piscidins 1, 2, 3 및 유도체들의 항균 및 항곰팡이 활성을 액체 배지법 및 고체 배지법을 이용하여 측정하였다. 액체 배지법은 최소저해농도 (MIC)와 최소살균농도 (MBC)로, 고체 배지법은 최소효과농도 (MEC)로 표시하였다.

3.3.1. 액체 배지법에 의한 항균활성

액체 배지법에 의한 항균활성의 결과를 Table 9에 나타내었다.

3.3.1.1. Piscidins 1, 2, 3의 항균활성

Piscidins 1, 2 및 3은 *S. aureus*에 대해서 3.13 ug/ml에서 항균활성을 나타내었으며, piscidin 1-acid는 piscidin 1보다 2배 정도 낮은 6.25 ug/ml에서 활성을 나타내었다. 이 4종류의 펩타이드의 *S. aureus*에 대한 MBC는 모두 6.25 ug/ml을 나타내었다. 한편 *E. coli* D31에 대한 piscidin 1, piscidin 1-acid, piscidin 2 및 piscidin 3의 MIC 및 MBC 값은 모두 3.13 ug/ml이었다.

Table 9. Antimicrobial activities of piscidin 1, 2, 3 and its analogs

	<i>S. aureus</i>		<i>E.coli</i>		<i>C. albicans</i>
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC
Piscidin 1	3.13	6.25	3.13	3.13	100
Piscidin 1-acid	6.25	6.25	3.13	3.13	50
Piscidin 2	3.13	6.25	3.13	3.13	100
Piscidin 3	3.13	6.25	3.13	3.13	50
D1-P1	>50	>50	3.13	6.25	100
D2-P1	>50	>50	3.13	6.25	100
D3-P1	25	50	3.13	3.13	>100
D4-P1	12.5	25	1.56	1.56	100
D5-P1	50	50	3.13	3.13	100
(1-11)-P1	>50	>50	>50	>50	>100
(1-18)-P1	50	50	6.25	6.25	50
(5-18)-P1	>50	>50	>50	>50	50
(14-22)-P1	>50	>50	>50	>50	>100
(1-21)-P1	3.13	6.25	1.56	1.56	50
(2-22)-P1	12.5	25	3.13	3.13	50
(3-22)-P1	>50	>50	0.78	0.78	50
(4-22)-P1	>50	>50	3.13	6.25	50
(5-22)-P1	>50	>50	3.13	3.13	50
G8A-P1	3.13	6.25	1.56	1.56	100
G8K-P1	6.25	12.5	0.78	1.56	100
V10K-P1	12.5	12.5	0.78	1.56	100
G13A-P1	6.25	6.25	3.13	3.13	100
G13P-P1	>50	>50	3.13	3.13	100
H17A-P1	3.13	6.25	1.56	1.56	100
H17K-P1	6.25	6.25	1.56	1.56	100
G22K-P1	3.13	6.25	3.13	3.13	100
F6W-P1	3.13	6.25	3.13	3.13	100
V10W-P1	3.13	6.25	3.13	3.13	100
I16W-P1	3.13	12.5	1.56	1.56	100
L19W-P1	3.13	6.25	3.13	6.25	100

3.3.1.2. Dimer group의 항균활성

D4-P1은 *S. aureus*에 대해 12.5 ug/ml 및 25 ug/ml의 MIC와 MBC 값을 나타내었다. 그리고 D3-P1 및 D5-P1의 MIC는 25 ug/ml이었으며, MBC는 50 ug/ml이었다. 그러나 D1-P1 및 D2-P1은 50 ug/ml에서도 활성을 나타내지 않았다. 한편 *E. coli* D31에 대한 D1-P1, D2-P1, D3-P1 및 D5-P1의 MIC는 3.13 ug/ml이었으며, D4-P1의 MIC는 piscidin 1보다 2배 활성이 강한 1.56 ug/ml을 나타내었다. D1-P1 및 D2-P1의 MBC는 6.25 ug/ml, D3-P1 및 D5-P1은 3.13 ug/ml이었다. D4-P1의 MBC는 1.56 ug/ml이었다.

3.3.1.3. Truncated peptide group의 항균활성

(1-11)-P1, (5-18)-P1 및 (14-22)-P1은 *S. aureus*에 대해 50 ug/ml에서 활성을 나타내지 않았으나, (1-18)-P1은 50 ug/ml에서 활성을 나타내었다. 또한 (2-22)-P1은 12.5 ug/ml에서 MIC 값을 나타내어, piscidin 1 보다는 활성이 약했지만 활성을 유지하였다. 그러나 (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 50 ug/ml까지도 활성을 나타내지 않았다. 그리고 (1-21)-P1은 piscidin 1과 같은 3.13 ug/ml에서 MIC를 나타내었다. 한편 (1-11)-P1, (5-18)-P1 및 (14-22)-P1은 *E. coli*에 대해 50 ug/ml에서 활성을 나타내지 않았으나 (1-18)-P1은 piscidin 1보다 약간 활성이 약한 6.25 ug/ml의 MIC 값을 나타내었다. 그리고 (2-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 piscidin 1과 같은 농도에서 활성을 나타내었지만 (1-21)-P1 및 (3-22)-P1은 piscidin 1보다 각각 2배 및 4배 더 강한 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 piscidin 1이 세균들에 대해 활성을 나타내기 위해서는 N-말단 영역의 18개 이상의 잔기가 필요하며 N-말단 및 C-말단 그리고 가운데 영역의 fragment만으로는 활성을 나타내기 힘들다는 것을 의미한다. 또한 C-말단 아미노산인 Gly 뿐만

아니라 N-말단에 존재하는 Phe은 항균활성에 영향을 나타내지 않았다.

3.3.1.4. Substitution peptide group의 항균활성

G8A-P1, H17A-P1 및 G22K-P1은 *S. aureus*에 대해 piscidin 1과 같은 MIC 농도에서 활성을 나타내었다. G8K-P1, G13A-P1 및 H17K-P1은 piscidin 1보다 2배 정도 약한 활성을 나타내었다. V10K-P1은 MIC 및 MBC 모두 12.5 ug/ml을 나타내었다. 그러나 G13P-P1은 50 ug/ml까지 활성을 나타내지 않았다. 한편 G8K-P1과 V10K-P1은 *E. coli*에 대해 piscidin 1보다 활성이 2배 이상 증가하였다. G8A-P1, H17A-P1 및 H17K-P1의 MIC와 MBC는 1.56 ug/ml이었으며, G13A-P1, G13P-P1 및 G22K-P1은 piscidin 1과 같은 3.13 ug/ml에서 반응을 보였다.

3.3.1.5. Tryptophanyl substitution peptide group의 항균활성

Trp으로 치환한 4종류의 유도체들은 *S. aureus*에 대해 piscidin 1과 같은 활성을 보였으며, 16W-P1만 12.5 ug/ml의 MBC 값을 나타내었다. *E. coli*에 대해 F6W-P, V10W-P1 및 L19W-P1은 3.13 ug/ml이었고 I16W-P1은 1.56 ug/ml이었다. MBC의 경우 F6W-P와 V10W-P1은 3.13 ug/ml, I16W-P1은 1.56 ug/m 그리고 L19W-P1은 6.25 ug/ml을 나타내었다.

3.3.2. 액체 배지법에 의한 항곰팡이활성

3.3.2.1. Piscidins 1, 2, 3의 유도체들의 항곰팡이활성

Piscidin 1 및 piscidin 2는 *C. albicans*에 대해서 100 ug/ml에서 반응을 나타내었으나, piscidin 1-acid 및 piscidin 3는 50 ug/ml에서 반응을 나타내었다. Dimer 유도체들 뿐만 아니라 (1-11)-P1, (1-11)-P3, C(1-11)-P1 및 (14-22)-P1은 100 ug/ml에서 거의 반응을 나타내지 않았다.

그러나 (1-18)-P1, (5-18)-P1, (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1, (5-22)-P1 및 (1-21)-P1은 50 ug/ml에서 활성을 나타내었다. 한편 특정 아미노산을 치환한 유도체들과 Trp으로 치환한 유도체들은 모두 100 ug/ml에서 활성을 나타내었다.

3.3.3. URDA에 의한 항균활성

URDA에 의해 측정된 항균활성의 농도는 MEC (ug/ml)로 나타내었으며, 그 결과는 Tables 10 ~ 14에 나타내었다. .

3.3.3.1. URDA에 의한 Piscidins 1, 2 및 3의 항균활성 (Table 10)

Piscidin 1은 *B. subtilis*에 대해 2.7 ug/ml, *P. aeruginosa*에 대해서는 3.0 ug/ml에서 항균활성을 나타내었다. 또한 어병세균인 *S. iniae*에 대해서는 9.7 ug/ml, *A. hydrophila*에 대해서는 4.9 ug/ml에서 활성을 나타내었다. Piscidin 1-acid는 *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에 대해 piscidin 1보다 약 2배 및 4배 약한 활성을 나타내었다. *S. iniae* 및 *A. hydrophila*에 대해서도 활성을 나타내었지만 piscidin 1보다 활성이 낮았다. Piscidin 2는 *B. subtilis*와 *P. aeruginosa*에 대해서 각각 6.8 ug/ml 및 22.1 ug/ml에서 활성을 나타내었다. 그리고 *A. hydrophila* (6.3 ug/ml) 및 *S. iniae* (20.0 ug/ml)에 대해서는 piscidin 1에 비해 활성이 약 1.3배 및 2배 감소되었다. Piscidin 3는 *B. subtilis* 및 *P. aeruginosa*에 대해 piscidin 1보다 약 2배 약한 활성을 나타내었다. 또한 *S. iniae* 및 *A. hydrophila*에 대해서도 강한 항균활성을 나타내었다. 그러나 *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대해 piscidins 1 ~ 3 및 piscidin 1-acid는 모두 125 ug/ml에서도 활성을 나타내지 않았다.

3.3.3.2. URDA에 의한 Dimer의 항균활성 (Table 11)

Table 10. Antimicrobial activities of piscidin 1, 2, 3 and piscidin 1-acid

	Gram(+)	Gram(-)	Fish pathogen			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. iniae</i>	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. anguillarum</i>
	MEC (ug/ml)					
Piscidin 1	2.7	3.0	9.7	>125	4.9	>125
Piscidin 1-acid	5.1	13.9	25.1	>125	7.3	>125
Piscidin 2	6.8	22.1	20.0	>125	6.3	>125
Piscidin 3	5.3	5.5	6.9	>125	6.2	>125

Table 11. Antimicrobial activities of dimer peptides

	Gram(+)	Gram(-)	Fish pathogen			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. iniae</i>	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. anguillarum</i>
	MEC (ug/ml)					
D1-P1	-	-	-	-	-	-
D2-P2	-	-	-	-	-	-
D3-P1	2.3	6.0	52.5	>125	41	>125
D4-P1	-	-	-	-	-	-
D5-P1	-	-	-	-	-	-

Table 12. Antimicrobial activities of truncated peptides

	Gram(+)	Gram(-)	Fish pathogen			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. iniae</i>	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. anguillarum</i>
	MEC (ug/ml)					
(1-11)-P1	-	-	-	-	-	-
(1-18)-P1	17.0	8.8	14.0	>125	7.0	>125
(5-18)-P1	5.4	29.2	>125	>125	78.8	>125
(1-21)-P1	7.0	14.0	62.5	>125	4.6	>125
(2-22)-P1	3.8	2.5	18.1	>125	3.8	>125
(3-22)-P1	3.2	6.0	15.4	>125	3.7	>125
(4-22)-P1	2.3	4.6	7.6	>125	3.9	>125
(5-22)-P1	3.2	1.7	8.1	>125	4.6	>125

Table 13. Antimicrobial activities of amino acid substitution peptides

	Gram(+)	Gram(-)	Fish pathogen			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. iniae</i>	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. anguillarum</i>
	MEC (ug/ml)					
G8A-P1		1.2	4.1	8.0	1.9	8.3
G8K-P1	2.9	1.2	2.8	12.1	3.5	8.0
V10K-P1	3.2	2.8	4.3	>125	4.3	>125
G13A-P1	3.5	3.0	6.7	>125	4.2	15.1
G13P-P1	5.3	2.0	9.9	>125	3.7	>125
H17A-P1	5.1	5.5	23.8	>125	4.1	13.7
H17K-P1	3.4	4.2	14.6	>125	4.1	>125
G22K-P1	8.3	10.1	4.2	>125	4.0	>125

Table 14. Antimicrobial activities of tryptophanyl substitution peptides

	Gram(+)	Gram(-)	Fish pathogen			
	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. iniae</i>	<i>E. tarda</i>	<i>A. hydrophila</i>	<i>V. anguillarum</i>
	MEC (ug/ml)					
F6W-P1	6.7	12.4	12.8	>125	5.4	>125
V10W-P1	5.0	11.4	10.9	>125	7.3	>125
I16W-P1	4.1	3.4	5.1	>125	3.7	1.6
L19W-P1	4.4	17.6	14.2	>125	5.7	3.3

D3-P1은 *B. subtilis* 및 *P. aeruginosa*에 대해서는 매우 강력한 항균력을 보였다. 그러나 *S. iniae* (52.5 ug/ml) 및 *A. hydrophila* (41 ug/ml)에 대해서는 piscidin 1보다 비교적 낮은 활성을 나타내었으며, *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대해서는 piscidin 1과 마찬가지로 125 ug/ml까지도 활성을 나타내지 않았다.

3.3.3.3. URDA에 의한 truncated peptide group의 항균활성 (Table 12)

(5-18)-P1은 *B. subtilis*에 대해 5.4 ug/ml에서 비교적 높은 항균활성을 나타내었으나, *P. aeruginosa*에 대해서는 29.2 ug/ml에서 항균활성을 나타내었다. *A. hydrophila*에 대해서는 piscidin 1보다 약 16배 높은 농도인 78.8 ug/ml에서 항균활성을 나타내었으며, *S. iniae*, *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대해서는 125 ug/ml에서도 활성을 나타내지 않았다. (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 *B. subtilis*에 대해 각각 3.8 ug/ml, 3.2 ug/ml, 2.3 ug/ml 및 3.2 ug/ml을 나타내었고, *P. aeruginosa*에 대해서는 2.5 ug/ml, 6.0 ug/ml, 4.6 ug/ml 및 1.7 ug/ml에서 활성을 나타내었다. 따라서 이들 유도체들의 경우 N-말단이 순차적으로 제거되는 것과 무관하게 활성이 유지되었다. 이들 4종류의 물질들은 *S. iniae*에 대해서 18.1 ug/ml, 15.4 ug/ml, 7.6 ug/ml 및 8.1 ug/ml을 나타내어 N-말단이 제거됨에 따라 활성이 증가하는 것으로 나타났다. 한편, 어병세균인 *A. hydrophila*에 대해서는 대체적으로 piscidin 1 보다 활성이 강하게 나타났지만, *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대해서는 125 ug/ml에서도 활성을 나타내지 않았다.

3.3.3.4. URDA에 의한 substitution peptide group의 항균활성 (Table 13)

G8K-P1, V10K-P1, H17K-P1 및 G13A-P1은 *B. subtilis*에 대해 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었지만, G13P-P1 및 H17A-P1은 piscidin 1보다 약 2배 낮은 활성을 보였다. *P. aeruginosa*에 대해서는 G8A-P1 및 G8K-P1은 둘 다 piscidin1 보다 2배 이상 강한 활성을 나타내었으며, G13P-P1, V10K-P1 및 G13A-P1 또한 piscidin 1과 거의 유사한 항균활성을 나타내었다. 그리고 H17K-P1 및 H17A-P1은 piscidin 1보다 활성이 약 2배 감소되었다. 또한 *S. iniae*에 대해서 G8K-P1, G8A-P1 및 V10K-P1은 매우 강한 활성을 나타내었지만, G13A-P1, G13P-P1, H17A-P1 및 H17K-P1은 piscidin 1보다 약 2 ~ 3배 정도 활성이 감소하였다. *A. hydrophila*의 경우, 모든 아미노산 치환 유도체들은 piscidin 1보다 활성이 증가되었다. Piscidin 1이 활성을 나타내지 않았던 *E. tarda*에 대해서는 G8A-P1 및 G8K-P1이 강한 활성을 나타내었지만, 다른 치환 유도체들은 여전히 125 ug/ml까지 활성을 나타내지 않았다. 마지막으로, *V. anguillarum*의 경우 대해서는 G8A-P1, G8K-P1, G13A-P1 및 H17A-P1은 강한 활성을 나타내었지만, V10K-P1, G13P-P1 및 H17K-P1은 125 ug/ml에서도 활성을 나타내지 않았다.

3.3.3.5. URDA에 의한 tryptophanyl substitution peptide group의 항균활성 (Table 14)

*B. subtilis*에 대해서 F6W-P1, I10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1은 강한 항균활성을 나타내었지만, piscidin 1에 비해서는 약간 약한 활성을 보였다. 한편, *P. aeruginosa*에 대해 I16W-P1은 piscidin 1과 유사한 활성을 보였으나, F6W-P1, V10W-P1 및 L19W-P1은 약 4-6배정도 활성이 감소하였다. 그리고 *S. iniae*에 대해 I16W-P1은 piscidin 1보다 약 2배 활성이 증가되었으나, 나머지 F6W-P1, V10W-P1, 및 I19W-P1은 piscidin 1처럼 활성이 유지되었다. *A. hydrophila*에 대해서도 4 종류의 유도체들은 piscidin 1보다

다소 강한 활성을 나타내거나 활성이 유지되었다. *E. tarda*에 대한 항균활성은 V10W-P1 및 I16W-P1이 62.5 ug/ml에서 활성을 나타냈지만, F6W-P1과 L19W-P1은 125 ug/ml에서도 활성을 나타내지 않았다. 흥미롭게도 I16W-P1 및 L19W-P1은 *V. anguillarum*에 대해서 매우 강한 활성을 나타내었다. 그러나 F6W-P1 및 V10W-P1은 125 ug/ml에서도 활성을 나타내지 않았다.

3.4. Piscidin 1 및 유도체들의 용혈활성

Piscidin 1 및 유도체들과 적혈구 막에 대한 상호작용을 조사하기 위해 인간의 적혈구를 사용하여 용혈활성을 측정하였다. 용혈활성 측정 결과는 Figs. 8 ~ 12에 나타내었다. 또한 용혈활성을 비교하기 위해서 용혈활성이 강하다고 알려진 MPB를 positive control로 사용하였으며, 용혈작용이 거의 없다고 알려진 magainin 2를 negative control로 사용하였다. Piscidin 1은 6.25 ug/ml 농도까지는 거의 반응을 나타내지 않았지만, 25 ug/ml에서 46%로 증가되면서 100 ug/ml에서는 83%의 용혈활성을 나타냈다. 반면에 piscidin 1-acid는 100 ug/ml에서도 거의 용혈활성을 나타내지 않았다. Control로 사용된 MPB는 100 ug/ml에서 약 66%의 용혈활성을 나타냈지만, magainin 2는 100 ug/ml에서 전혀 용혈활성을 나타내지 않았다 (Fig. 8).

3.4.1. Dimer group의 용혈활성

D3-P1은 50 ug/ml에서 23%, 100 ug/ml에서 63%의 용혈활성을 나타내었으며, D4-P1은 100 ug/ml에서 23%의 용혈활성을 나타내었다. 그러나 D1-P1, D2-P1 및 D5-P1은 100 ug/ml에서도 거의 용혈활성을 나타내지 않았다 (Fig. 9).

3.4.2. Truncated peptide group의 용혈활성

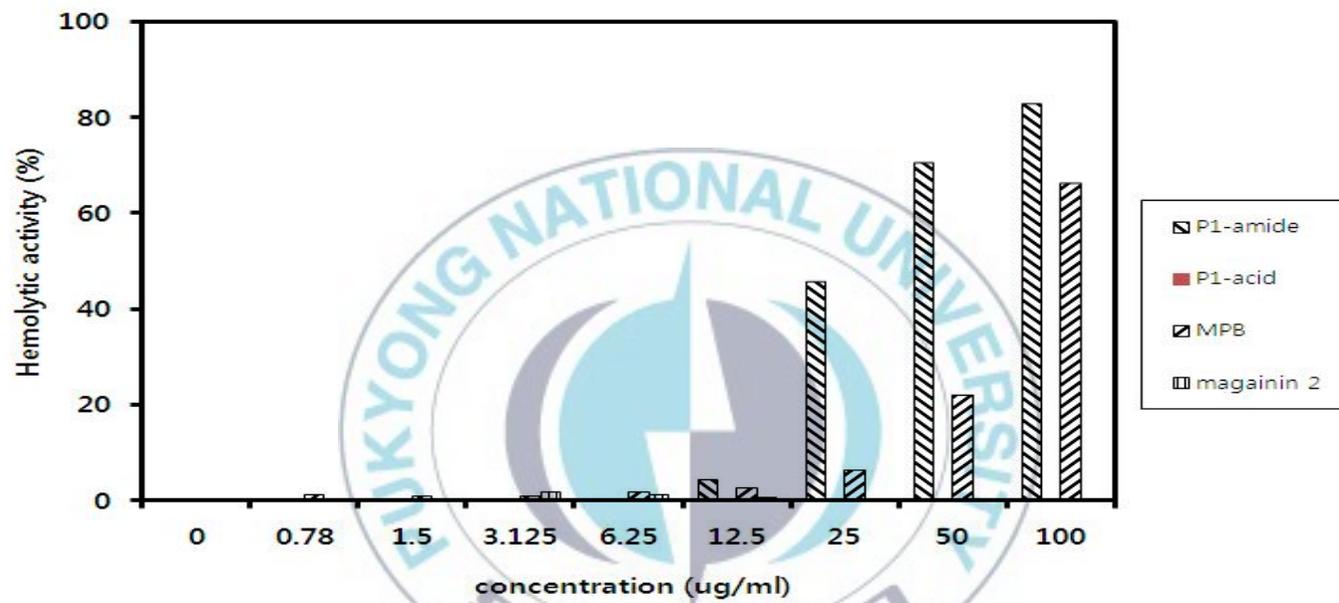


Fig. 8. Dose-response profile of the hemolytic activities of piscidin 1 and piscidin 1-acid against human red blood cells

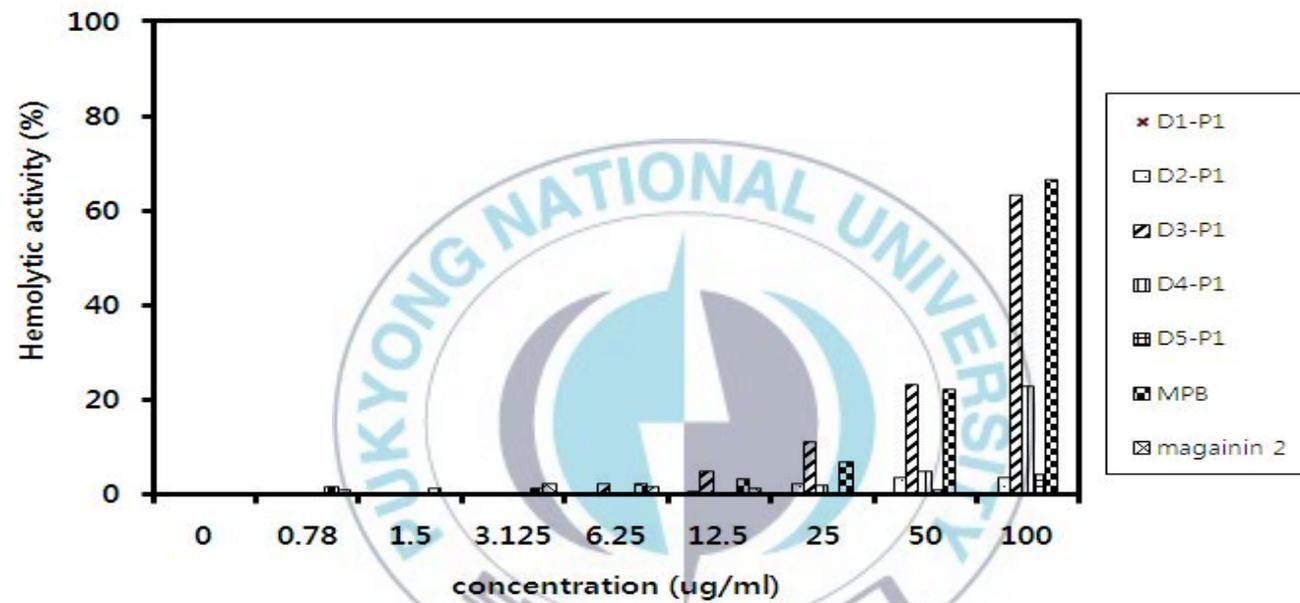


Fig. 9. Dose-response profile of the hemolytic activities dimer peptide group against human red blood cells

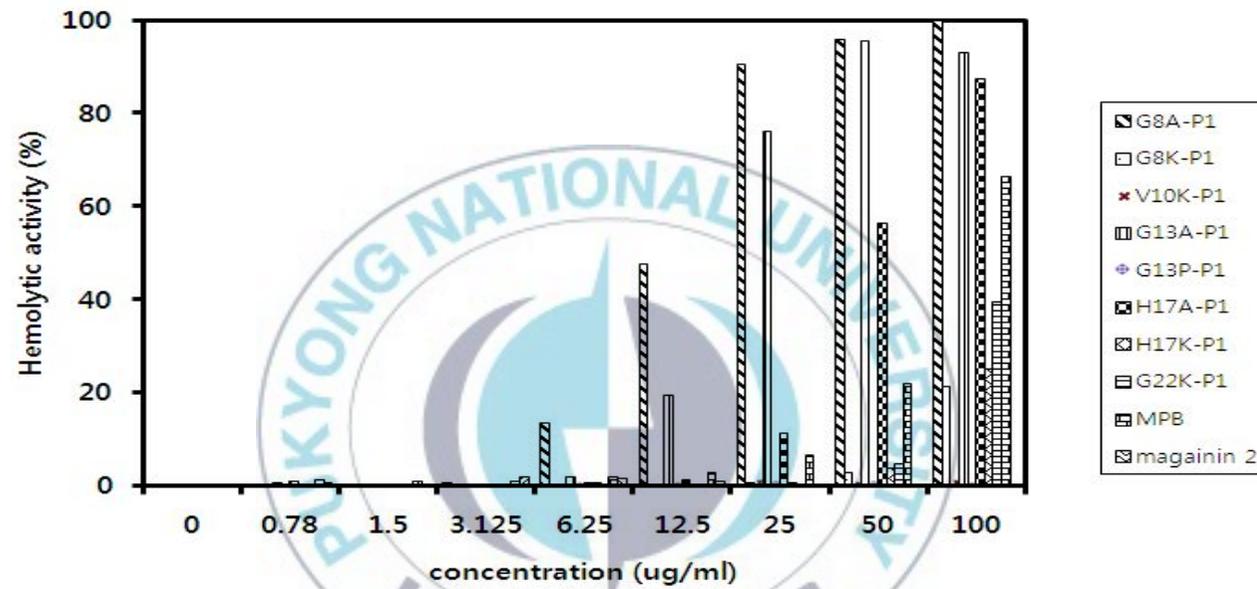


Fig. 11. Dose-response profile of the hemolytic activities of amino acid substitution peptide group against human red blood cells

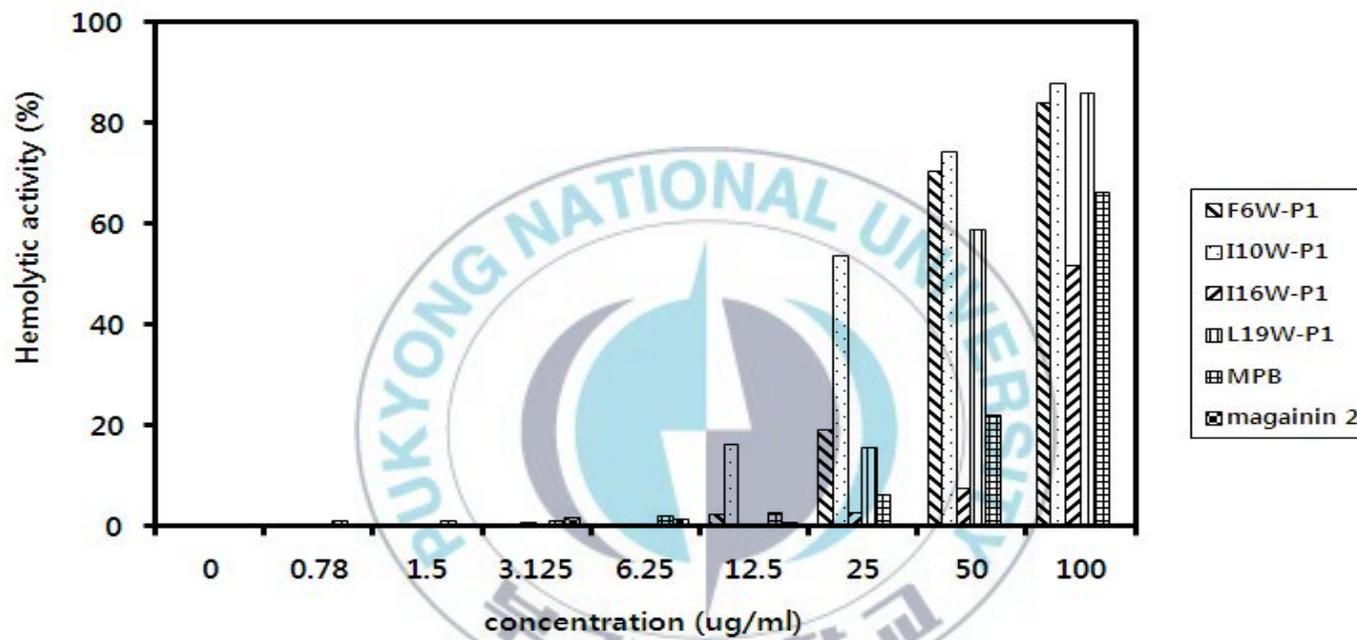


Fig. 12. Dose-response profile of the hemolytic activities of tryptophanyl substitution peptide group against human red blood cells

(1-11)-P1, (1-18)-P1, (5-18)-P1, (14-22)-P1, (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 100 ug/ml에서 거의 용혈활성을 나타내지 않았다. 한편, C-말단 아미노산인 Gly를 제거한 (1-21)-P1은 50 ug/ml에서 9%의 낮은 용혈활성을 나타내었으며 100 ug/ml에서 piscidin 1보다는 약간 낮은 73%의 용혈활성을 나타내었다 (Fig. 10).

3.4.3. Substitution peptide group의 용혈활성

G8A-P1 및 G13A-P1은 50 ug/ml에서 각각 96% 및 95%를 나타내 piscidin 1보다 강한 용혈활성을 나타내었다. 일반적으로 Ala는 Gly보다 hydrophobicity가 높다고 알려져 있기 때문에 Table 15에 나타낸 것처럼 G8A-P1 및 G13A-P1은 piscidin 1보다 약간 높은 hydrophobicity를 나타내고 있다. 이러한 결과로 인해 G8A-P1 및 G13A-P1은 piscidin 1보다 높은 용혈활성을 나타내는 것 같다. His를 Ala로 치환한 H17A-P1의 경우는 100 ug/ml에서 piscidin 1과 유사한 87%의 용혈활성을 나타내었다. 한편 G8K-P1, H17K-P1 및 G22K-P1은 50 ug/ml에서 5% 미만의 용혈활성을 나타내었으며, 100 ug/ml에서도 각각 21%, 25% 및 39%로 piscidin 1보다 매우 낮은 용혈활성을 나타내었다. 또한 V10K-P1와 G13P-P1은 100 ug/ml에서도 거의 용혈활성을 나타내지 않았다 (Fig. 11). Fig. 8 및 Table 15에 나타낸 것처럼 piscidin 1보다 hydrophobicity가 낮아지거나 또는 아미노산 치환에 의해 양친매성의 친수성 영역이 증대된 유도체들은 piscidin 1보다 낮은 용혈활성을 나타내었다. 따라서 아미노산을 치환한 유도체들의 용혈활성의 세기는 다음과 같다: G8A-P1 = G13A-P1 > H17A-P1 > G22K-P1 > H17K-P1 = G8K-P1 > V10K-P1 = G13P-P1.

Table 15. Properties of piscidins 1, 2, 3 and its analogues

	<H>	<u>
Original source		
Piscidin 1	-0.59	0.84
Piscidin 2	-0.59	0.84
Piscidin 3	-0.50	0.82
Dimer group		
D1-P1	-1.01	0.42
D2-P1	-1.01	0.42
D3-P1	-0.83	0.88
D4-P1	-0.97	0.75
D5-P1	-0.93	0.48
Truncated peptide group		
(1-11)-P1	-1.01	0.79
(1-18)-P1	-0.52	0.93
(5-18)-P1	-0.24	1.02
(5-22)-P1	-0.39	0.89
(14-22)-P1	-0.04	1.00
(1-21)-P1	-0.62	0.88
(2-22)-P1	-0.50	0.84
(3-22)-P1	-0.40	0.77
(4-22)-P1	-0.39	0.83
(5-22)-P1	-0.39	0.89
Amino acid substitution peptide group		
G8A-P1	-0.61	0.84
G8K-P1	-0.45	0.84
V10K-P1	-0.39	0.94
G13A-P1	-0.61	0.85
G13P-P1	-0.59	0.84
H17A-P1	-0.59	0.84
H17K-P1	-0.43	0.87
G22K-P1	-0.45	0.92
Tryptophanyl substitution peptide group		
F6W-P1	-0.63	0.85
V10W-P1	-0.68	0.81
I16W-P1	-0.66	0.91
L19W-P1	-0.66	0.87

<H> : Hydrophobicity, <u>: Hydrophobic moment.

3.4.4. Tryptophanyl substitution peptide group의 용혈활성

I16W-P1은 50 ug/ml에서 8%, 100 ug/ml에서 52%로 Trp으로 치환한 유도체들 중에서 가장 낮은 용혈활성을 나타냈다. 한편 F6W-P1, V10W-P1 및 L19W-P1은 50 ug/ml에서 각각 71%, 74% 및 59%였으며, 100 ug/ml에서는 84%, 88% 및 86%의 용혈활성을 나타내 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었다 (Fig. 12).

3.5. 리포솜 함유물의 유출실험 (Leakage experiment)

단백질이나 생리활성 펩타이드는 막의 지질 이중층과 상호작용을 하여 막에 변화를 초래하는 동시에 막의 투과성에 영향을 미칠 수 있다. 따라서 인지질막에 대한 합성 펩타이드들의 상호작용을 알아보기 위해, 형광물질인 calcein을 함유하고 있는 DPPC, DPPC-DPPG (3:1), EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1) 리포솜을 사용하여 펩타이드에 의해 유출되는 형광물질의 유출활성을 측정하였다.

3.5.1. EYPC 리포솜에 대한 유출활성

3.5.1.1. Piscidins 1, 2, 3의 유출활성

EYPC 리포솜으로부터 펩타이드 용액에 의해 유도되는 형광물질의 유출능력은 Table 16에 나타내었다. Piscidin 1은 0.5 uM 및 1 uM에서 각각 25% 및 37%의 유출활성을 나타내었으며, 10 uM에서는 약 95%의 유출활성을 나타내었다. Piscidin 1-acid는 0.5 uM 및 1 uM에서 각각 piscidin 1보다 약간 강한 44% 및 57%의 활성을 나타내었으며, 10 uM에서는 100%의 유출활성을 나타내었다. Piscidin 2는 0.5 uM 및 1 uM에서 32%와 46%를 그리고 10 uM에서는 100%의 유출활성을 나타내었다. 그러나 piscidin 3는 piscidin 1 및 piscidin 2보다 약한 형광유출활성을 나타내었다. 따라서 piscidin 1, 2,

3의 EYPC에 대한 유출능력의 세기는 다음과 같다: piscidin 1-acid > piscidin 2 > piscidin 1 > piscidin 3.

3.5.1.2. Dimer group의 유출 활성

D3-P1은 0.5 uM 및 1 uM에서 각각 64% 및 76%의 유출활성을 나타내었으며, 10 uM에서는 100%의 강한 활성을 나타내었다.

3.5.1.3. Truncated peptide group의 유출활성

(5-18)-P1은 1 uM에서 2.2%, 10 uM에서 12%의 약한 유출활성을 나타내었다. N-말단 아미노산을 차례로 하나씩 제거한 유도체들, (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1의 유출활성을 비교한 결과, Table 16에 나타내듯이 펩타이드의 체인 길이가 짧아질수록 유도체들의 유출활성 능력도 상대적으로 감소되었다. 따라서 EYPC에 대한 truncated peptide group의 유출활성의 세기는 다음과 같다: (2-22)-P1 > (3-22)-P1 > (4-22)-P1 > (5-22)-P1 > (5-18)-P1.

3.5.1.4. Substitution peptide group의 유출활성

G8K-P1이 0.5 uM에서 52%, 1 uM에서 71%, 그리고 5 uM에서는 95%로 가장 강한 유출활성을 나타내었다. V10K-P1, H17K-P1 및 G13A-P1은 0.5 uM에서 각각 39%, 34% 및 25%의 활성을 나타내었으며, 1 uM에서는 각각 50%, 41% 및 30%의 유출활성을 나타내어 piscidin 1보다 약간 강한 활성을 나타내었다. 그러나 G8A-P1, G13P-P1 및 H17A-P1은 0.5 uM에서 각각 17%, 16% 및 15%의 유출활성을 나타내었고, 1 uM에서는 27%, 24% 및 22%의 유출활성을 나타내 piscidin 1에 비해 유출활성의 세기는 감소하였다.

Table 16. Leakage ability of piscidin and its analogs in EYPC liposome

EYPC	Peptide concentration (uM)						
	0.05	0.1	0.5	1	2	5	10
	Leakgae ability (%)						
Piscidin 1-amide		16	25	40			95
Piscidin 1-acid		21	44	57			100
Piscidin 2		16	32	46			100
Piscidin 3		3	12	18			44
D3-P1		36	64	76			100
(5-18)-P1				2			12
(2-22)-P1	48	58	79				100
(3-22)-P1		49	72	79			99
(4-22)-P1		38	56	67			96
(5-22)-P1		19	43	45			81

(continued)

EYPC	Peptide concentration (uM)						
	0.05	0.1	0.5	1	2	5	10
	Leakage ability (%)						
G8A-P1			17	27	44	84	100
G8K-P1		25	53	71	59	95	
V10K-P1		16	40	50			92
G13A-P1			25	30	55	91	
G13P-P1			16	24	28	45	59
H17A-P1			15	22	36	79	100
H17K-P1		21	34	41			98
F6W-P1		16	28	39			97
V10W-P1		26	47	63			100
I16W-P1	41	50	86	96			
L19W-P1		14	30	42			99

Table 17. Leakage ability of piscidin and its analogs in EYPC-EYPG (3:1) liposome

EYPC-EYPG (3:1)	Peptide concentration (uM)					
	0.5	0.1	2.5	5	7.5	10
	Leakage ability (%)					
Piscidin 1-amide		7	11	26	57	90
Piscidin 1-acid		10	27	62	93	100
Piscidin 2		4	17	38	69	94
Piscidin 3		2				19
D3-P1		13	33	64	94	100
(5-18)-P1				4		2
(2-22)-P1		20	48	90	100	
(3-22)-P1		22	55	86	95	
(4-22)-P1		10	28	46	54	78
(5-22)-P1		6		25		47

(continued)

EYPC-EYPG (3:1)	Peptide concentration (uM)						
	0.5	0.1	2.5	5	7.5	10	
			Leakage ability (%)				
G8A-P1		7	15	27		82	
G8K-P1		13	41	94			
V10K-P1		3		20	32	46	
G13A-P1		9	19	37	72	98	
G13P-P1		4		10		18	
H17A-P1		6	11	25	57	95	
H17K-P1		3	10	29	8	74	
F6W-P1		7	19	49	89	100	
V10W-P1		16	39	79	100		
I16W-P1	8	15	44	87			
L19W-P1		7	14	24	49	81	

Table 18. Leakage ability of piscidin and its analogs in DPPC liposome

DPPC	Peptide concentration (uM)							
	0.005	0.01	0.03	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00
	Leakage ability (%)							
Piscidin 1-amide		16	33	61	70		99	100
Piscidin 1-acid		30	47	72	85	100		100
Piscidin 2		28	53	70	81	94	100	
Piscidin 3		22	37	49	51	64	71	
D3-P1		10	40	61	91	99		
(5-18)-P1		2	15	16	19			
(2-22)-P1		33	76	96			100	
(3-22)-P1		13	56	69	85	94		
(4-22)-P1		21	60	64	84	95		
(5-22)-P1		14	56	75	86	95		

(continued)

DPPC	Peptide concentration (uM)							
	0.005	0.01	0.03	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00
	Leakage ability (%)							
G8A-P1		17		47		66	84	97
G8K-P1	55	64	89		100			
V10K-P1	35	44	61	82	91			
G13A-P1		25		60		77	91	
G13P-P1		24		53		83	92	
H17A-P1		19		39		53	80	
H17K-P1		31	57	68		93		
F6W-P1		29		47		72	91	
V10W-P1	28	40		60		95		
I16W-P1		26	26	85	100			
L19W-P1		36		63		86	96	

Table 19. Leakage ability of piscidin and its analogs in DPPC-DPPG (3:1) liposome

DPPC-DPPG (3:1)	Peptide concentration (uM)							
	0.03	0.05	0.10	0.25	0.50	1.00	2.50	5.00
	Leakage ability (%)							
Piscidin 1-amide		8			15	29	71	99
Piscidin 1-acid			13		45	84	100	
Piscidin 2					18	31	69	100
Piscidin 3					11	13	23	53
D3-P1					28	42	77	98
(5-18)-P1					32	42	50	61
(2-22)-P1			50	73	90	97		
(3-22)-P1		59	74	82	95	100		
(4-22)-P1			33	59	68	94		
(5-22)-P1				68	87	97		

따라서 piscidin 1의 특정부위를 Lys으로 치환하여 양친매성 구조에서 상대적으로 친수성 부분이 증가된 유도체들 (G8K-P1, V10K-P1, H17K-P1)의 유출활성은 증가하였다. EYPC에 대한 아미노산 치환 유도체들의 유출활성의 세기는 다음과 같다: G8K-P1 > V10K-P1 > H17K-P1 > G13A-P1 > G8A-P1 = G13P-P1 = H17A-P1.

3.5.1.5. Tryptophanyl substitution peptide group의 유출활성

F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1은 0.5 uM 농도에서는 28%, 47%, 86% 및 30%의 활성을 나타냈으며, 1 uM의 농도에서는 각각 38%, 63%, 96% 및 42%로 나타났다. 따라서 F6W-P1 및 L19W-P1은 piscidin 1과 유사한 활성을 나타낸 반면 V10W-P1 및 I16W-P1은 piscidin 1보다 각각 약 2배 - 3배 강한 유출활성을 나타내었다. 따라서 이들의 형광물질 유출능력의 세기는 다음과 같다: I16W-P1 > V10W-P1 > F6W-P1 ≥ L19W-P1.

3.5.2. EYPC-EYPG (3:1) 리포솜에 대한 유출활성

3.5.2.1. Piscidins 1, 2, 3의 유출활성

Table 17에는 EYPC-EYPG (3:1)을 이용한 펩타이드 용액의 형광물질 유출능력을 나타내었다. Piscidin 1은 2.5 uM에서 약 11%, 5 uM에서는 약 26%의 유출활성을 보였으며, 10 uM에서는 약 90%의 활성을 나타내었다. Piscidin 1-acid는 5 uM에서 62%의 유출활성을 나타냈으며, 7.5 uM에서는 약 93%의 높은 유출활성을 나타내었다. 또한 piscidin 2는 2.5 uM에서 17%, 5 uM에서 38% 그리고 10 uM에서는 94%의 유출활성을 나타내어 piscidin 1보다 약간 강한 활성을 나타내었다. 한편 piscidin 3는 10 uM에서도 약 19% 정도로 매우 약한 유출활성을 보였다. 따라서 이들의 유출활성 능력의 세기는

다음과 같다: piscidin 1-acid > piscidin 2 > piscidin 1 ≫ piscidin 3.

3.5.2.2. Dimer group의 유출활성

D3-P1은 2.5 uM에서 약 33%, 5 uM에서 약 64% 그리고 10 uM에서 100%의 유출활성을 나타내었다.

3.5.2.3. Truncated peptide group의 유출활성

Piscidin 1은 10 uM에서 90%의 유출활성을 나타내었지만, (5-18)-P1은 10 uM에서 약 2%의 유출활성을 나타내었다. 또한 (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 5 uM에서 각각 90%, 86%, 46% 및 25%로 유출활성이 줄어들었다. (2-22)-P1과 (3-22)-P1은 7.5 uM에서 거의 100%에 가까운 활성을 나타냈지만, (4-22)-P1과 (5-22)-P1은 10 uM에서도 78%와 47%의 유출활성을 나타내었다. 이들의 유출능력의 세기는 다음과 같다: (2-22)-P1 > (3-22)-P1 > (4-22)-P1 > (5-22)-P1 > (5-18)-P1.

3.5.2.4. Substitution peptide group의 유출활성

G8K-P1은 2.5 uM에서 41%, 5 uM에서 94%의 유출활성을 나타내어 아미노산 치환 유도체들 중에서 가장 강한 유출활성을 나타내었다. 또한 G13A-P1도 5 uM에서 37%, 7.5 uM에서 72%의 유출활성을 나타내어 piscidin 1보다 강한 유출활성을 나타내었다. 그러나 G8A-P1, H17A-P1 및 H17K-P1은 2.5 uM에서 10% ~ 15%, 5 uM에서는 25% ~ 29%로 piscidin 1과 유사한 유출활성을 나타내었다. 반면에 V10K-P1은 5 uM에서 20%로 piscidin 1과 비슷한 활성을 나타내었으나, 10 uM에서 46%의 유출활성을 나타내어 piscidin 1보다 매우 낮은 유출활성을 나타내었다. 또한 G13P-P1은

10 uM에서도 18%의 낮은 유출활성을 나타내었다. 따라서 이들의 유출활성의 세기는 다음과 같다: G8K-P1 > G13A-P1 > G13A-P1 = H17A-P1 = H17K-P1 > V10K-P1 ≫ G13P-P1.

3.5.2.5. Tryptophanyl substitution peptide group의 유출활성

F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1는 2.5 uM에서 각각 19%, 39%, 44% 및 14%로 나타났으며, 5 uM의 농도에서는 각각 49%, 79%, 87% 및 24%로 나타났다. V10W-P1 및 I16W-P1은 7.5 uM에서 각각 100%의 유출활성을 나타내었으나, F6W-P1 및 L19W-P1은 각각 89% 및 49%의 유출활성을 나타내었다. 그러나 F6W-P1은 10 uM에서 100%의 활성을 나타내었다. 또한 L19W-P1은 같은 농도에서 81%의 활성을 보였다. 따라서 이들의 형광물질 유출능력의 세기는 다음과 같다: I16W-P1 > V10W-P1 > F6W-P1 ≥ L19W-P1.

3.5.3. DPPC 리포솜에 대한 유출활성

3.5.3.1. Piscidins 1, 2, 3의 유출활성

DPPC 리포솜을 이용한 막 유출 실험 결과는 Table 18에 나타내었다. Piscidin 1은 0.5 uM에서 약 99%의 유출활성을 보였다. Piscidin 1-acid는 매우 낮은 농도인 0.25 uM에서 100%의 유출활성을 나타내었고, piscidin 2 역시 0.05 uM에서 70%, 0.5 uM에서 100%의 유출활성을 나타내어 piscidin 1보다 높은 유출활성을 나타내었다. 반면에 piscidin 3는 0.1 uM에서 51%, 0.5 uM에서는 71%의 유출활성을 나타내었다. 따라서 EYPC, EYPC-EYPG (3:1)와 DPPC에 대한 piscidin의 유출활성의 결과를 비교했을 때, piscidin은 EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1)보다는 DPPC에 더 결합을 잘하는 것 같다.

3.5.3.2. Dimer group의 유출활성

D3-P1도 마찬가지로 매우 낮은 농도인, 0.05 uM에서 61%, 0.1 uM에서 91%, 및 0.25 uM에서 99%의 유출활성을 나타내었다.

3.5.3.3. Truncated peptide group의 유출활성

(2-22)-P1은 0.03 uM에서 76%의 유출활성을 나타냈으며, 0.05 uM에서는 96%의 유출활성을 나타내었다. (3-22)-P1은 0.05 uM과 0.1 uM에서 각각 69% 및 85%의 유출활성을 나타내었다. (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 0.05 uM에서 각각 64%와 75%, 0.1 uM에서는 각각 84%와 86%의 유출활성을 나타내었다. 이러한 결과는 N-말단 잔기를 차례로 제거한 유도체들의 경우 DPPC 리포솜에 대해 유사한 유출활성을 나타내는 것으로 미루어 보아 N-말단 영역의 아미노산들은 소수성 상호작용을 함에 있어서 그다지 중요한 역할을 하지 않는 것 같다. 한편, (5-18)-P1은 0.1 uM에서 단지 19%의 유출활성만을 나타내었다. 이들 물질들의 유출활성의 세기는 다음과 같다: (2-22)-P1 > (3-22)-P1 = (4-22)-P1 = (5-22)-P1 ≫ (5-18)-P1.

3.5.3.4. Substitution peptide group

V10K-P1과 G8K-P1은 0.1 uM에서 각각 90%와 100%의 유출활성을 나타내었다. H17K-P1, G13P-P1, G13A-P1 및 G8A-P1은 0.25 uM에서 각각 93%, 83%, 77% 및 66%의 유출활성을 나타내었지만, H17A-P1은 0.5 uM에서 80%의 유출활성을 나타내었다. 이들 아미노산을 치환한 유도체들은 EYPC에서와 마찬가지로 Lys으로 치환한 유도체들의 활성이 piscidin 1보다 높게 나타났다. 따라서 이들의 DPPC에 대한 유출활성의 세기는 다음과 같다: G8K-P1 > V10K-P1 > H17K-P1 > G13A-P1 = G13P-P1 > G8A-P1 > H17A-P1.

3.5.3.5. Tryptophanyl substitution peptide group

F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1는 0.05 uM의 농도에서 각각 47%, 60%, 85% 및 63%로 나타났으며, 0.25 uM에서는 72%, 95%, 100% 및 86%로 나타났다. 따라서 이들의 형광물질 유출능력의 세기는 다음과 같다: I16W-P1 > V10W-P1 ≥ L19W-P1 > F6W-P1.

3.5.4. DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 대한 유출활성

3.5.4.1. Piscidins 1, 2, 3의 유출활성

DPPC-DPPG (3:1) 리포솜을 이용한 막 유출 실험 결과는 Table 19에 나타내었다. Piscidin 1 및 2는 1 uM 농도에서 각각 29%와 31%, 2.5 uM 농도에서 각각 71%와 69% 그리고 5 uM 농도에서 각각 99%와 100%의 유출활성을 나타내었다. Piscidin 1-acid는 1 uM에서 84%, 2.5 uM에서 100%의 유출활성을 나타내었다. Piscidin 3는 5 uM에서 piscidin 1 및 2 보다는 다소 약한 약 53%의 유출활성을 나타내었다. DPPC 리포솜의 경우 piscidin 1, piscidin 2 및 piscidin 3는 DPPC-DPPG (3:1)에서 보다 더 낮은 농도에서 더 높은 활성을 나타냈다. 이러한 결과들은 piscidin들이 막과 상호작용시 친수성 상호작용보다 소수성 상호작용이 더 중요하다는 것을 나타낸다. 또한 이들 물질들은 EYPC의 경우에서도 EYPC-EYPG (3:1)보다 더 높은 활성을 나타내었다. 따라서 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 대한 이들의 유출활성의 세기는 다음과 같다: Piscidin 1-acid ≫ Piscidin 2 = Piscidin 1 ≫ Piscidin 3.

3.5.4.2. Dimer group의 유출활성

D3-P1은 1 uM 농도에서 42%, 2.5 uM농도에서 77%의 유출활성을 나타내었으며, 5 uM에서는 98%의 유출활성을 나타내었다.

3.5.4.3. Truncated peptide group의 유출활성

(5-18)-P1은 1 uM에서 42%, 5 uM에서 61%의 유출활성을 나타내었다. (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 0.25 uM에서 각각 73%, 82%, 59% 및 68%의 유출활성을 나타냈으며, 0.5 uM에서는 각각 90%, 95%, 68% 및 87%의 유출활성을 나타내었다. (2-22)-P1 및 (3-22)-P1은 (4-22)-P1 및 (5-22)-P1 보다 더 높은 활성을 나타내었다. 아마도 이러한 결과는 DPPC-DPPG (3:1)에서 정전기적인 상호작용을 하기 위해 N-말단의 첫 번째와 두 번째에 존재하는 Phe은 그다지 중요하지 않다는 것을 나타낸다. 따라서 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 대한 이들의 유출활성의 세기는 다음과 같다: (3-22)-P1 > (2-22)-P1 = (5-22)-P1 > (4-22)-P1 ≫ (5-18)-P1.

3.5.4.4. Substitution peptide group

G8K-P1은 1 uM 농도에서 61%, 2.5 uM에서는 98%의 유출활성을 나타내었다. G8K-P1이 piscidin 1보다 활성이 높아진 것은 양친매성 구조의 소수성 영역과 친수성 영역의 경계면에 위치하는 Gly이 Lys으로 치환되어 친수성 영역이 약간 더 증대되어 정전기적 상호작용이 더 유리하게 작용한 결과인 것 같다. 나머지 G8A-P1, V10K-P1, G13A-P1, G13P-P1, H17A-P1 및 H17K-P1은 1 uM에서 26% ~ 37%, 2.5 uM에서는 44% ~ 79%에 해당하는 활성을 나타내었으며, 5 uM에서는 거의 100%에 해당하는 유출활성을 나타내었다.

3.5.4.5. Tryptophanyl substitution peptide group

I16W-P1은 1 uM의 농도에서 94%이며, 2.5 uM에서는 100%로 완전한 유출활성을 나타내었다. 또한 F6W-P1, V10W-P1, 및 L19W-P1은 1 uM

의 농도에서 40%, 57%, 및 43%로 나타났으며, 2.5 μM 에서는 87%, 93%, 및 79%로 나타났다. 따라서 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 대한 이들의 형광 물질 유출능력의 세기는 다음과 같다: I16W-P1 > V10W-P1 > L19W-P1 = F6W-P1.

3.6. Titration study

펩타이드에 존재하는 Trp의 indole ring의 거동을 보다 더 잘 이해하기 위해서 Trp로 치환한 유도체를 사용하여 DPPC 및 DPPC-DPPG (3:1)의 리포솜에 대한 친화도를 형광 스펙트럼으로 측정하였다.

3.6.1. DPPC를 이용한 titration

F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1에 0 ~ 500 μM 의 DPPC 리포솜을 각각 투여했을 때 Trp 형광의 세기와 최대형광을 나타내는 파장의 단파장 쪽으로의 이동 (blue-shift) 스펙트럼을 측정하였다. Fig. 13은 F6W-P1의 lipid titration 스펙트럼을 나타낸 것이다. 스펙트럼 상에서 나타난 것처럼 DPPC의 농도가 증가할수록 유도체들에 의한 형광의 세기가 증가하였으며, 방출 파장도 단파장으로 이동하였다. DPPC 존재하에서 펩타이드들의 단파장으로의 이동 정도를 Fig. 14에 나타내었다. TES buffer 존재하에서 V10W-P1 및 I16W-P1의 방출 스펙트럼의 최대 파장은 350 nm이었고, F6W-P1는 346 nm, L19W-P1은 348 nm였다. DPPC 리포솜을 농도별로 각각 투여한 결과, 반응에 사용한 DPPC 리포솜 농도에 비례하여 최대 방출 스펙트럼의 파장이 단파장 쪽으로 서서히 이동하였다. 최종적으로 500 μM 의 리포솜을 투여하였을 때 I16W-P1이 34 nm로 가장 많이 blue shift를 나타냈다. 그리고 F6W-P1, L19W-P1 및 V10W-P1의 순서로 각각 24 nm, 18 nm, 16 nm만큼 단파장으로 이동하였다. 따라서 piscidin 1의 유도체들에 존재하는

Trp이 막 속으로 삽입되는 능력의 세기는 다음과 같다: I16W-P1 \gg F6W-P1 > L19W-P1 > V10W-P1.

3.6.2. DPPC-DPPG (3:1)를 이용한 titration

F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1에 0 ~ 500 μ M의 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜을 각각 투여했을 때 Trp 형광의 세기와 최대형광을 나타내는 스펙트럼을 측정하였다. DPPC와 마찬가지로 DPPC-DPPG (3:1)의 농도가 증가할수록 유도체들에 의한 형광의 세기가 증가하였으며, 방출 파장도 단파장으로 이동을 하였다. DPPC-DPPG (3:1) 리포솜 존재하에서 펩타이드들의 단파장으로의 이동 정도를 Fig. 15에 나타내었다. TES buffer 존재하에서 F6W-P1 및 I16W-P1의 방출 스펙트럼의 최대 파장은 모두 348 nm이었고, V10W-P1 및 L19W-P1은 모두 346 nm였다. DPPC-DPPG (3:1) 리포솜을 0 ~ 500 μ M까지 각각 투여한 결과 DPPC와 마찬가지로 I16W-P1이 34 nm로 가장 많이 blue shift를 나타냈다. 그리고 F6W-P1, L19W-P1 및 V10W-P1의 순서로 각각 26 nm, 16 nm, 14 nm만큼 단파장으로 이동하였다. 따라서 piscidin 1 각 부위의 Trp이 막속에 침투하는 능력의 세기는 다음과 같다: I16W-P1 \gg F6W-P1 > L19W-P1 > V10W-P1.

3.7. Quenching

펩타이드들에 존재하는 Trp 잔기의 indole ring이 소광제 (quencher)와 가까워질수록 Trp의 발광이 강하게 감소하게 되는데 이러한 현상을 소광이라고 한다. 따라서 펩타이드 내에 존재하는 Trp 잔기의 거동을 알아보기 위해서 인공막의 존재와 비존재하에서 수용성 quencher인 acrylamide와 지용성 quencher인 bromine이 치환된 지질을 이용하여 Trp 잔기의 분포도를 조사하였다.

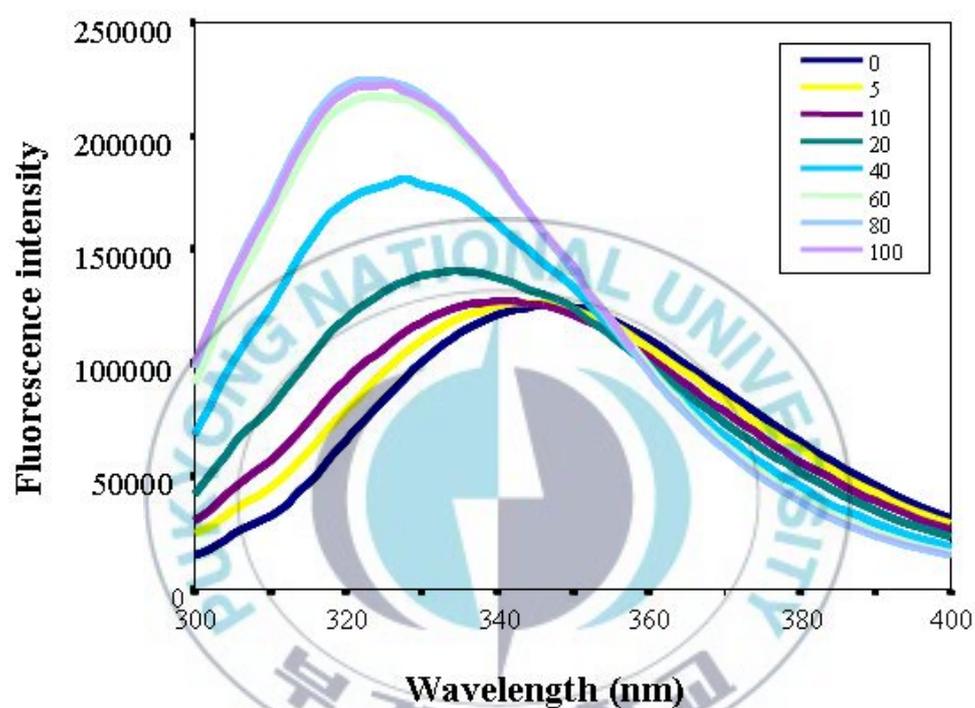


Fig. 13. Trp fluorescence titration curves for binding of F6W-P1 to liposomes as a function of DPPC liposome concentrations.

3.7.1. Acrylamide를 이용한 quenching

수용성 quencher인 acrylamide를 0 ~ 140 μM 까지 인공막의 존재 및 비존재하에서 측정하였다. 인공막이 존재하지 않을 때 수용액 상태에 존재하는 Trp는 acrylamide와 쉽게 반응하기 때문에 acrylamide의 농도가 증가할수록 형광의 세기는 점점 감소하였다. 인공막 존재하에서 acrylamide를 측정했을 때 Trp의 소광의 정도는 수용액 상태보다 작게 나타났다. 이러한 현상은 펩타이드가 막 속으로 파고 들어가 막 외부에 존재하고 있는 acrylamide와 반응하기 어렵다는 것을 의미한다. 이러한 소광의 정도의 세기를 Stern-volmer plot으로 나타내었다 (Figs. 16 - 20). 또한 Stern-volmer plot의 slope인 소광상수 (quenching constant, K_{sv}) 값이 크다는 것은 강한 소광효과를 나타낸다는 것을 의미한다. 인공막이 존재하지 않는 buffer상태에서 F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1의 K_{sv} 값은 약 21 ~ 27이었다.

DPPC 존재하에서 K_{sv} 값은 I16W-P1이 3.64로 나타나, 가장 낮은 소광현상을 보였으며, F6W-P1, L19W-P1, 및 V10W-P1은 각각 4.34, 4.53 및 5.09이었다. 이러한 결과는 DPPC 리포솜 존재하에서 I16W-P1에 있는 Trp이 지질 이중층의 소수성 영역에 가장 깊이 위치하고 있다는 것을 의미한다. DPPC-DPPG (3:1) 존재하에서도 DPPC와 마찬가지로 I16W-P1 (3.41)이 가장 낮은 K_{sv} 값을 가졌으며, V10W-P1 (4.18)와 L19W-P1 (3.97)는 비슷하였고 F6W-P1 (4.70)이 가장 높은 K_{sv} 값을 나타내었다. 이러한 결과들은 DPPC 뿐만 아니라 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜 존재하에서 piscidin에 존재하는 Trp들은 막속에 존재하고 있다는 것을 나타낸다.

한편 EYPC 리포솜 존재하에서 L19W-P1이 가장 낮은 K_{sv} 값, 4.36을 나타내었다. 이것은 EYPC 리포솜에서 L19W-P1이 인지질 이중막에 가장 깊이 위치하고 있다는 것을 의미한다. I16W-P1, F6W-P1 및 V10W-P1은 각각 4.42, 4.84, 5.94의 K_{sv} 값을 나타내었다. EYPC-EYPG (3:1) 리포솜 존재

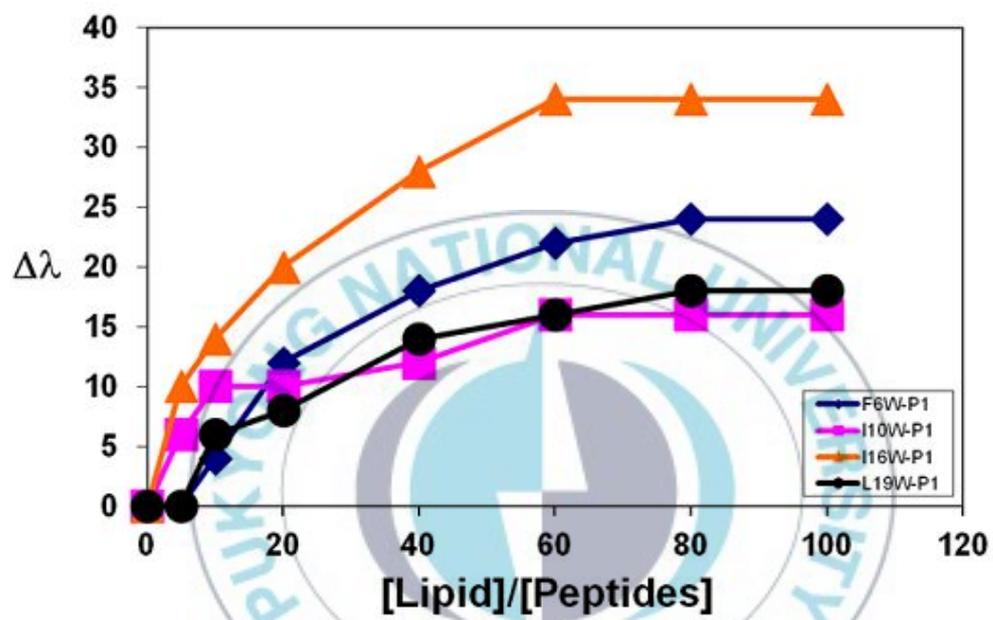


Fig. 14. Blue shift in Trp emission maxima of Trptophanyl substitution peptides in DPPC liposomes

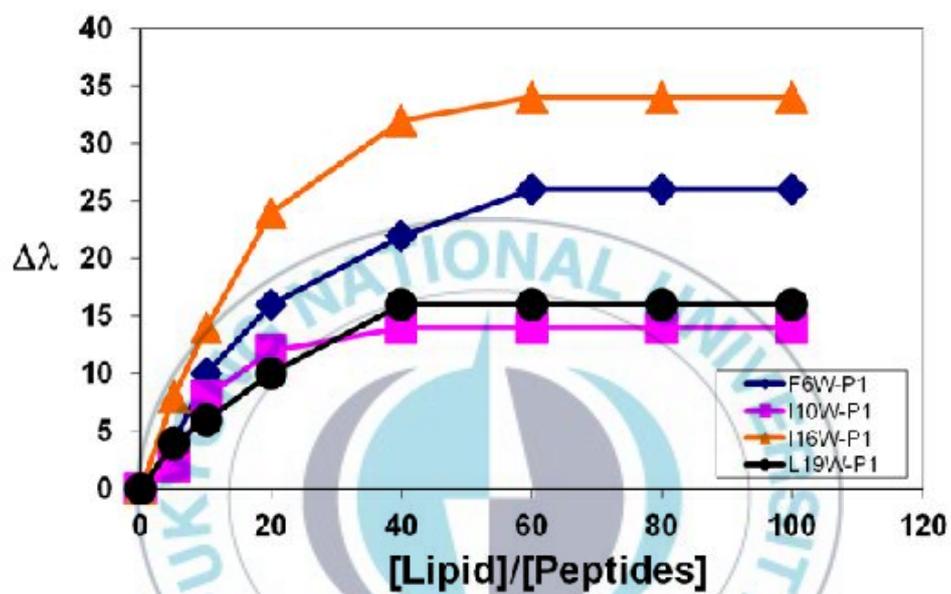


Fig. 15. Blue shift in Trp emission maxima of Tryptophanyl substitution peptides in DPPC-DPPG (3:1) liposomes

하에서는 I16W-P1이 3.19로 가장 낮은 Ksv 값을 나타내었다. 그리고 F6W-P1, L19W-P1 및 V10W-P1의 Ksv 값은 각각 4.33, 4.63 및 4.77을 나타내었다. 따라서 천연지질인 EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1) 리포솜에서는 I16W-P1이 지질 이중층의 가장 깊은 부위에 존재하는 것을 의미한다.

3.7.2. DBrPC를 이용한 quenching

본 연구에서는 6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC 및 11,12-DBrPC를 각각 30% 포함하는 DPPC 및 DPPC-DPPG (3:1)을 제조하여 Trp를 포함하는 펩타이드가 인공막의 어느 부위에 존재하는지 알아보려고 하였다 (Fig. 21 - 22). 6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC 및 11,12-DBrPC를 포함하는 DPPC 리포솜에서 F6W-P1은 각각 3.85, 4.65 및 1.06의 Ksv 값을 나타냈다. 소광제인 bromine이 막 내부에 위치하고 있기 때문에 acrylamide와는 달리 Ksv 값이 크다는 것은 펩타이드 내의 Trp 잔기가 인지질 acyl chain에 있는 bromine과 가까이 존재한다는 것을 의미하며, Ksv 값이 작다는 것은 펩타이드 내의 Trp이 bromine과 멀리 떨어져 존재한다는 것을 의미한다. 따라서 이러한 결과는 piscidin 1의 N-말단 6번째에 존재하는 Trp이 인지질 alkyl chain에 존재하는 6,7번 및 9,10번 위치의 bromine에 가까이 위치한다는 것을 의미한다. 또한 11,12-DBrPC 리포솜에 대한 Ksv 값이 가장 적기 때문에 F6W-P1의 경우는 11, 12번에 위치하는 quencher와 가장 멀리 떨어져 위치하는 것 같다. V10W-P1의 경우, 6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC 및 11,12-DBrPC에 대한 Ksv 값은 2.60, 1.90 및 0을 나타내었다. 따라서 F6W-P1과 마찬가지로 piscidin 1의 10번째에 존재하는 Trp은 11,12번 위치에 있는 소광제 보다는 6,7번 및 9,10번 위치에 있는 소광제에 더 가까이 위치하는 것 같다. 한편, I16W-P1은 6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC 및 11,12-DBrPC에 대해 3.20, 4.15 및 7.30의 Ksv 값을 나타내었는데, 이것은 16번째 위치에 있는 Trp은 11,12번 위치의

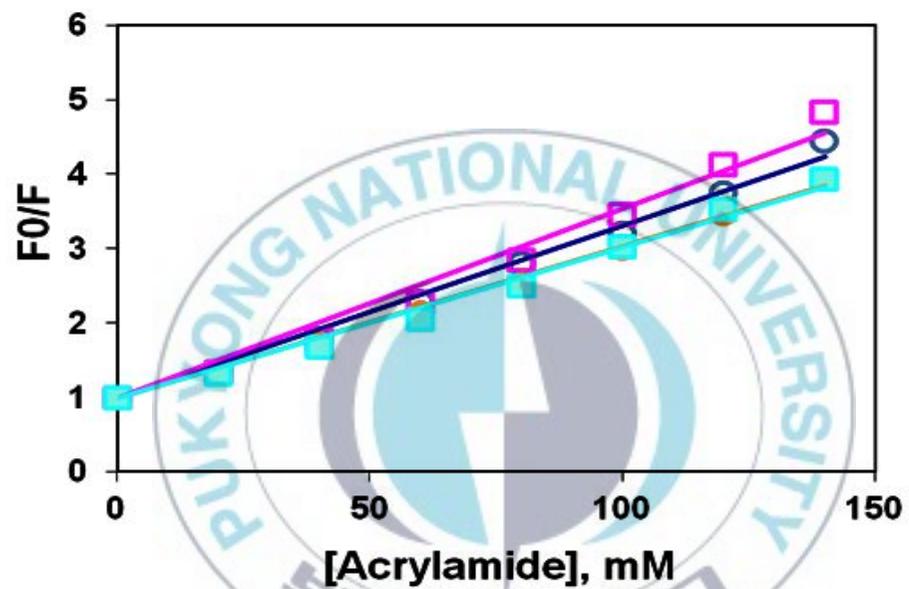


Fig. 16. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1 (●), V10W-P1 (■), I16W-P1 (●) and L19W-P1 (■) by acrylamide in an aqueous buffer.

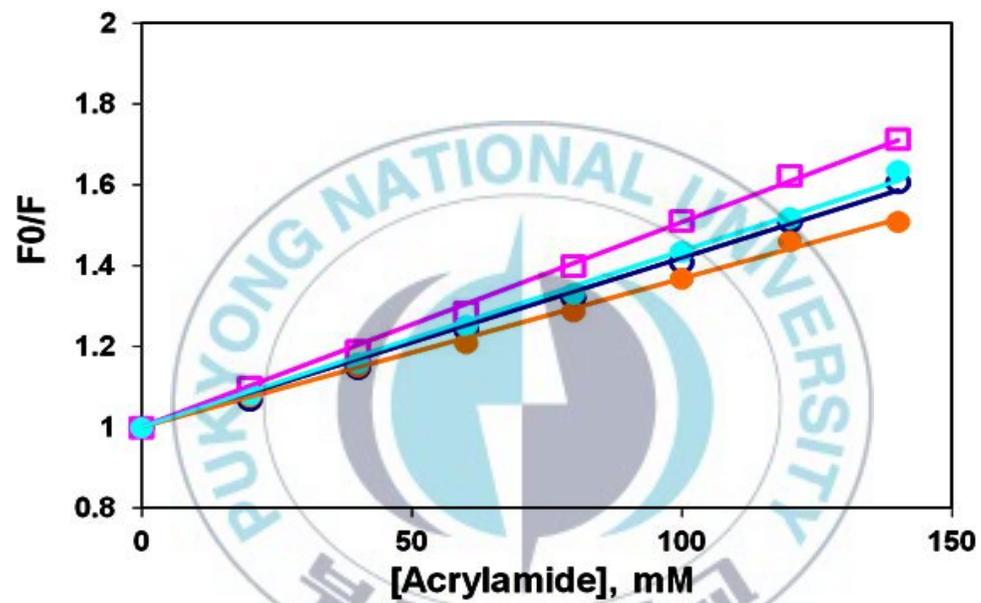


Fig. 17. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1 (●), V10W-P1 (□), I16W-P1 (●) and L19W-P1 (■) by acrylamide in DPPC liposomes.

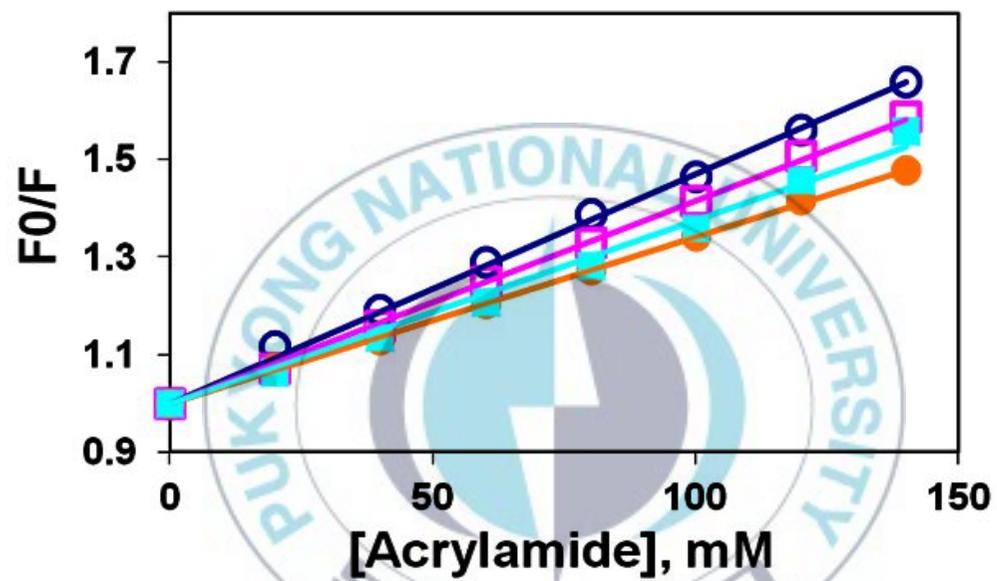


Fig. 18. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1 (○), V10W-P1 (□), I16W-P1 (●) and L19W-P1 (■) by acrylamide in DPPC-DPPG (3:1) liposomes.

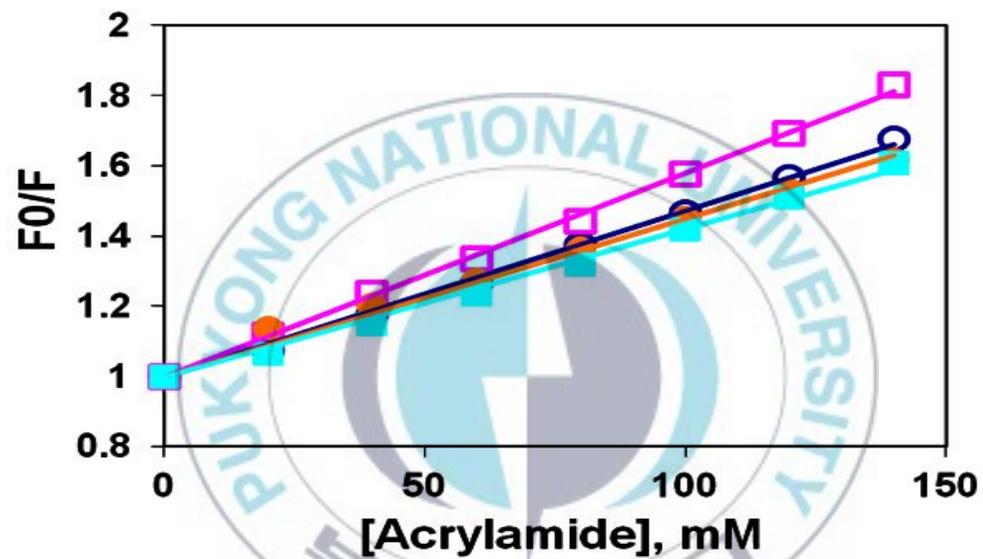


Fig. 19. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1 (○), V10W-P1 (□), I16W-P1 (●) and L19W-P1 (■) by acrylamide in EYPC liposomes.

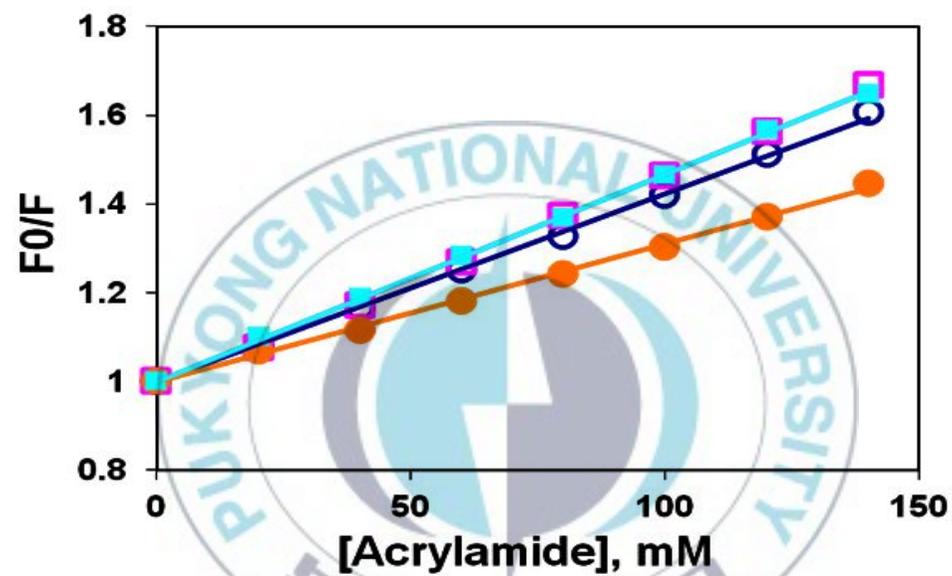
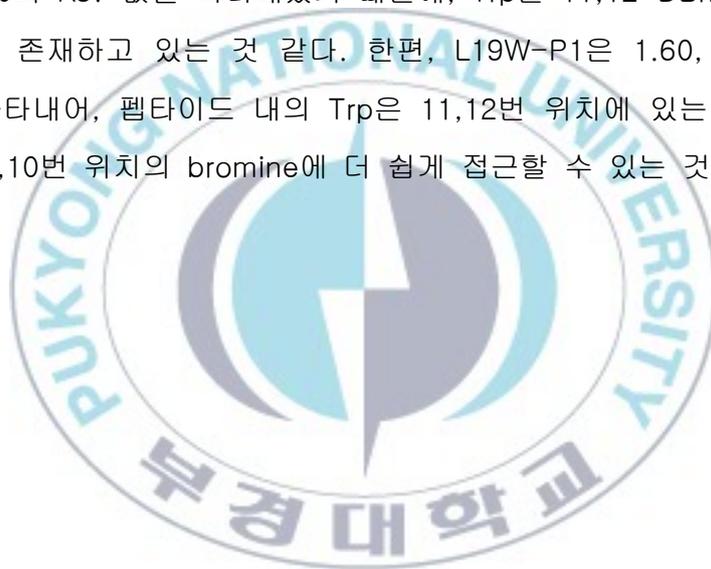


Fig. 20. Stern-Volmer plots for the quenching of the fluorescence of the Trp residue of F6W-P1 (○), V10W-P1 (□), I16W-P1 (●) and L19W-P1 (■) by acrylamide in EYPC-EYPG (3:1) liposomes.

bromine에 가장 가까이 존재하고 있다는 것을 의미한다. C-말단에 Trp을 포함하고 있는 L19W-P1은 3.10, 2.70 및 0.20의 Ksv 값을 나타내어, 6,7번 및 9,10번 위치의 bromine에 가까이 존재하고 있다는 것을 나타낸다.

30% bromine을 포함하는 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜 존재하에서 F6W-P1의 6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC 및 11,12-DBrPC에 대한 Ksv 값은 2.20, 1.80 및 1.15으로 DPPC 리포솜의 결과와 유사하였다. V10W-P1의 Ksv 값은 0.8, 2.5, 0으로 9,10번 위치에 있는 소광제에서 가장 많은 소광현상이 일어났다. 그러나 I16W-P1은 6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC 및 11,12-DBrPC에 대해 4.70, 4.45 및 5.80의 Ksv 값을 나타내었기 때문에, Trp은 11,12-DBrPC에 가장 가까운 위치에 존재하고 있는 것 같다. 한편, L19W-P1은 1.60, 1.06 및 0의 Ksv 값을 나타내어, 펩타이드 내의 Trp은 11,12번 위치에 있는 bromine보다는 6,7 및 9,10번 위치의 bromine에 더 쉽게 접근할 수 있는 것 같다.



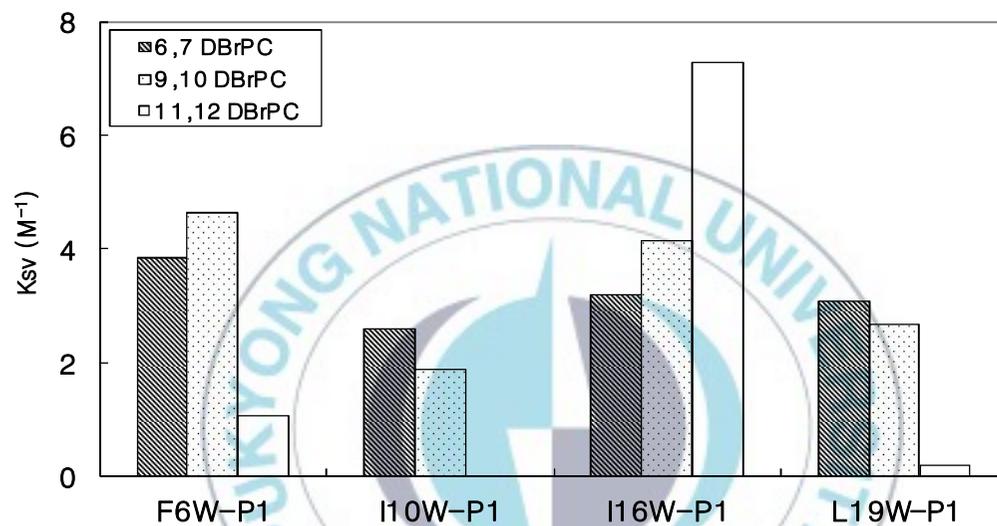


Fig. 21. Depth-dependent quenching of tryptophan fluorescence by DPPC liposomes containing brominated phosphatidylcholine (X = 0.3) at a lipid.

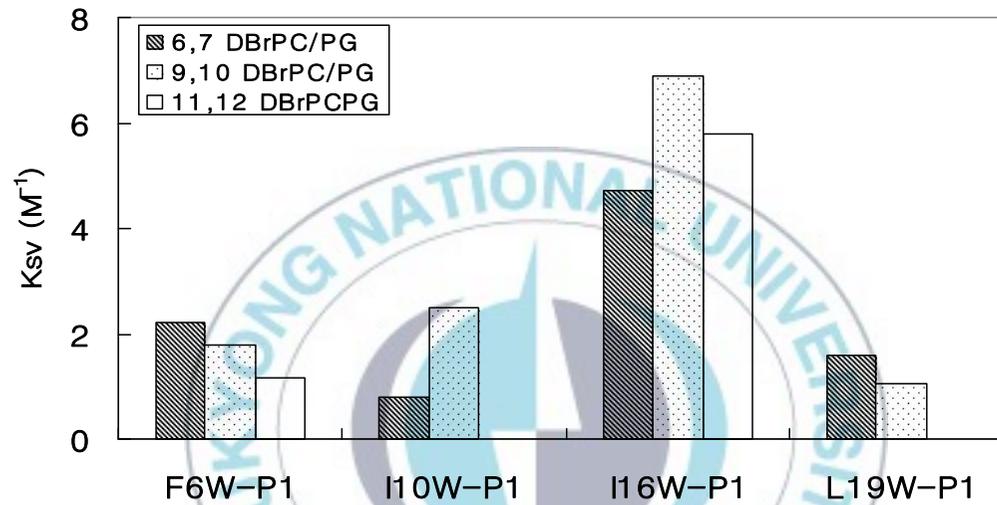


Fig. 22. Depth-dependent quenching of tryptophan fluorescence by DPPC -DPPG (3:1) liposomes containing brominated phosphatidylcholine ($X = 0.3$) at a lipid.

IV. 토 론

Piscidin 1의 구조와 활성간의 상관관계를 연구하기 위하여 N-말단, C-말단을 제거한 유도체 및 특정 위치의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 다양한 유도체들을 합성하였다 (Table 3). 이들을 이용하여 CD, 항균, 용혈 및 다양한 형광실험을 하였다.

Piscidins 1 - 3 및 유도체들의 2차구조를 확인하기 위해서 TES buffer, TFE, 중성 및 산성지질막 조건하에서 CD 스펙트럼을 측정하였다. Piscidins 1 - 3은 TES buffer 상태에서 모두 random 형태를 취하였다. 그러나 다른 용매 조건에서는 208 nm와 222 nm에서 double minimum을 가지는 전형적인 α -helix 형태를 취하였다. 특히 천연과 합성 인지질막 중 천연 인지질막에서 더 높은 helicity를 가졌으며, 중성 보다는 산성 지질막에서 더 높은 α -helix 구조를 형성하였다. 최근 CD 및 NMR 연구에 의하면 piscidin 1은 micell, TFE 및 PC/PG 리포솜 존재하에서 α -helix 구조를 형성한다고 보고되었다 (Lee *et al.*, 2007, Campagna *et al.*, 2007.) 또한 NMR 연구에 의하면 piscidin 1은 SDS micell에서 piscidin은 Phe²에서 Thr²¹까지 helix 구조를 취한다고 하였으며 (Lee *et al.*, 2007), DPC micell에서는 piscidin의 8번째에서부터 17번째 잔기까지가 α -helix 구조를 형성한다고 보고되었다 (Campagna *et al.*, 2007).

Dimer 유도체의 모체인 (1-11)-P1은 모든 조건에서 random 형태를 취하였다. 2차구조 예측 프로그램 (EMBOSS, Garnier method)에 의하면 (1-11)-P1은 random한 구조를 형성한다고 예측되었다. 이 예측 결과는 CD spectra에서 나타난 결과와 유사하다. 그러므로 CD spectra와 EMBOSS 예측으로부터 얻은 결과들은 잘 일치한다. Dimer인 D1-P1, D2-P1, D3-P1, D4-P1 및 D5-P1은 TES buffer와 인공막 조건에서 모두 β -sheet 구조를 나

타내었다. 그러나 TFE 용매하에서 이들 유도체들간에는 약간의 구조의 변화가 발생했다. D3-P1 및 D4-P1은 β -sheet 구조에서 α -helix로의 구조 변화가 일어났으며, D2-P1 및 D5-P1은 β -sheet 구조가 주된 구조를 유지하면서 약간의 α -helix구조가 혼합된 형태를 나타내었다. 비록 (1-11)-P1은 random 구조를 형성하지만, dimer 유도체들은 주로 β -sheet 구조를 나타낸다. 따라서 (1-11)-P1이 어떤 특정 아미노산들에 관계없이 이들을 중심으로 하여 dimer를 형성할 때 random구조 보다는 최종적으로 β -sheet 구조를 더 용이하게 형성하는 것 같다.

(1-18)-P1은 TES buffer 상태에서는 random 구조를 형성하였지만, 측정된 다른 모든 조건에서는 piscidin 1과 마찬가지로 α -helix 구조를 취하였다. 이러한 결과는 DPC micelle에서 piscidin이 8번째에서부터 17번째 잔기까지 α -helix 구조를 형성한다고 보고된 결과와 일치한다 (Campagna *et al.*, 2007). 따라서 piscidin이 α -helix 구조를 유지하기 위해서는 최소한 18잔기가 필요한 것 같다. C-말단으로부터 9잔기에 해당하는 (14-22)-P1은 TES buffer에서는 random한 구조를 나타내었지만, 다른 측정 용매하에서는 모두 β -sheet 구조를 나타내었다. 따라서 (14-22)-P1은 완충액 상태에서 random한 구조를 취하다가 인공막 상태하에서 β -sheet로 구조 변화를 취하는 것 같다. (5-18)-P1은 TES buffer와 지질이층막에서는 random한 구조를 나타내었지만, TFE 조건에서는 α -helix와 β -sheet가 혼합된 구조를 나타내었다. 따라서 위 결과들을 종합해보면, piscidin 1은 N-말단 부위가 α -helix 구조를 취하며 C-말단 부위로 가면서 점차 random 구조를 이루고 있는 것을 알 수 있다.

(2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1은 TES buffer 상태에서는 모두 random 구조를 나타내었지만, TFE 및 인공막 존재하에서는 모두 α -helix 구조를 형성하였다. 비록 이들은 인공 및 천연 중성 리포솜 존

재하에서 아미노산 잔기가 하나씩 줄어들수록 helicity가 감소되었지만, piscidin 1의 전체적인 α -helix 구조에는 큰 영향을 미치지 않았다. 뿐만 아니라 산성 리포솜 조건에서는 잔기의 변화에 관계없이 helicity가 유지되었다. 이와 같은 결과는 piscidin 1이 중성지질막에서 α -helix를 형성하기 위해서는 N-말단의 잔기들이 중요한 역할을 담당하고 있지만, 산성지질막에서는 N-말단 부위가 그다지 중요한 기능을 하지 않는다는 것을 의미한다. 또한 C-말단의 Gly를 제거한 (1-21)-P1은 중성 및 산성지질막 존재하에서 piscidin 1보다 약간 더 높은 helix 함량을 나타냈다.

Piscidin 1에 존재하는 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 펩타이드들은 대부분 α -helix 구조를 유지하거나 또는 오히려 helix 함량이 증가되었다. 그 중에서도 특히 Gly¹³을 Ala으로 치환한 G13A-P1이 가장 높은 helicity를 나타내었고, 모든 인공막 존재하에서 100%의 helicity를 나타내었다. Fig. 6에 나타내듯이 piscidin 1의 Gly¹³은 α -helical wheel diagram의 소수성 영역에 위치하고 있는데, Gly¹³을 Ala으로의 치환은 소수성 영역을 확장시켜 줄 뿐만 아니라 helix breaker인 Gly을 치환함으로써 보다 더 안정한 helix를 형성할 수 있도록 도와 줄 것이다. 또한 G8K-P1 및 G8A-P1도 대부분의 용매에서 piscidin 1보다 높은 helicity를 나타내었다. 아마도 이러한 결과는 Gly⁸ 역시 소수성 및 친수성 영역의 경계면에 위치하는 잔기인 동시에 helix를 불안정하게 하는 아미노산이기 때문에, Lys 또는 Ala의 치환에 의해 친수성/소수성 영역을 증대시키거나 또는 flexibility를 감소시킴으로서 helix를 더 잘 형성하게 하는 것 같다. 한편, G13P-P1은 전체적으로 piscidin 1보다 약한 helicity를 나타내었는데, 아마도 Pro의 치환으로 인해 수소결합의 방해와 펩타이드의 중앙부분에서 kink 부분이 생겨 piscidin 1보다 오히려 낮은 helicity를 나타내는 것 같다. H17A-P1, H17K-P1 및 G22K-P1은 DPPC-DPPG (3:1)조건을 제외하고는 대체적으로 helicity가 증가하였다. 친수

성 영역 사이에 존재하는 Val¹⁰을 Lys으로 치환시킨 V10K-P1은 helix 구조를 유지함에 있어서 커다란 영향을 나타내지 않았다.

Trp으로 치환한 펩타이드들은 대부분 piscidin 1보다 높은 helicity를 나타내었으며, 특히 V10W-P1은 buffer를 제외한 모든 조건에서 100%의 helicity를 나타내었다. 따라서 piscidin에 있는 방향족 또는 지방족 아미노산 대신에 Trp으로의 치환은 구조 변화에 그다지 특별한 영향을 나타내지 않았다.

액체배지법에 의한 항균활성 결과와 고체배지법에 의한 항균활성 결과는 약간 차이가 있기 때문에 활성 시스템 확립을 위해서 2가지 방법을 이용하여 유도체들의 활성을 측정하였다. 우선 액체배지법에 의하면 piscidins 1 - 3은 *S. aureus* 및 *E. coli*에 대해 강한 활성을 나타내었다. Dimer 유도체들은 *S. aureus*에 대해서 piscidin 1보다 4배 이상 약한 활성을 나타내었다. 이들 유도체들은 *E. coli*에 대해서는 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었고, 특히 D4-P1은 piscidin 1보다 약 2배 강한 활성을 나타내었다. CD 구조 분석에 의하면 대부분의 용매들에서 piscidins 1 - 3은 α -helix 구조를 취하였지만, dimer 유도체들은 주로 β -sheet 구조를 형성하였다. 따라서 이들 물질들이 형성하는 2차 구조가 다름에도 불구하고 대부분의 펩타이드들이 항균활성을 나타내었기 때문에, 항균활성에 있어서 그다지 특정한 구조의 존재가 필요하지는 않는 것 같으며 오히려 펩타이드의 길이가 중요한 역할을 하는 것 같다.

(1-11)-P1, (5-18)-P1, (14-22)-P1은 *S. aureus* 및 *E. coli*에 대해서 거의 활성을 나타내지 않았다. CD 구조 분석 결과, (1-11)-P1 및 (5-18)-P1은 대부분 불규칙적인 구조를 나타내었는데, 이러한 불규칙적인 구조는 막과 상호작용을 하여 항균활성을 나타내기 위해서 규칙적인 구조를 지니는 것 보다 다소 불리하게 작용하는 것 같다. 한편 (14-22)-P1은 지질 이

중막에서 주로 β -sheet 구조를 형성하였다. 이 유도체는 dimer 유도체와 마찬가지로 β -sheet 구조를 형성하였지만 항균활성을 나타내지 않았다. Dimer들의 펩타이드 잔기는 약 23-24 잔기들로 구성되어 있지만, (14-22)-P1은 9 잔기의 아미노산으로 구성되어 있다. 따라서 비록 β -sheet 구조를 형성한다 하더라도 항균활성을 나타내기 위해서는 어느 정도의 펩타이드의 체인의 길이를 필요로 하는 것 같다. 이들과는 대조적으로 α -helix 구조를 형성하는 (1-18)-P1은 *S. aureus* 및 *E. coli*에 대해서 활성을 유지하였기 때문에 piscidin 1의 helix 구조와 항균활성을 유지하기 위해서는 N-말단으로부터 최소한 18잔기가 필요한 것 같다. 부가적으로 항균활성에 있어서 C-말단에 존재하는 아미노산의 역할을 알아보기 위해 Gly를 제거한 (1-21)-P1은 *S. aureus*, *E. coli* 및 *C. albicans*에 대해서 piscidin 1과 유사하거나 약간 높은 활성을 나타내었다. 따라서 C-말단의 마지막 Gly은 활성을 나타내는데 중요한 역할을 하지 않는 것 같다.

N-말단의 아미노산을 순차적으로 제거한 유도체들의 경우 *S. aureus*에 대해서는 첫 번째 Phe를 제거한 (2-22)-P1은 piscidin 1 보다 활성이 4배 정도 감소되었으며, 두 번째 아미노산을 제거한 (3-22)-P1은 거의 활성이 소실되었다. 그러나 *E. coli*에 대해서는 N-말단의 아미노산을 4개까지 제거한 유도체도 piscidin 1처럼 활성이 유지되었다. 아마도 이것은 Gram-negative 및 Gram-positive bacteria의 세포막의 구성성분의 차이로 인해 나타나는 결과인 것 같다. 또한 Gram-positive bacteria에 활성을 나타내기 위해서는 piscidin 1의 N-말단에 존재하는 소수성 아미노산이 필요하지만, Gram-negative bacteria에 대해서는 N-말단의 잔기들이 그다지 중요한 역할을 하지 않는다는 것을 의미한다.

특정 아미노산을 치환한 유도체들중 G8A-P1 및 H17A-P1은 *S. aureus*에 대해 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었지만, G8K-P1, V10K-P1

및 H17K-P1들은 piscidin에 비해 활성이 약 2배 - 4배 낮아졌다. 그러나 G13P-P1은 거의 활성을 나타내지 않았다. 한편 2차 구조 연구에 의하면 G13P-P1은 측정된 대부분의 용매들에서 piscidin 1에 비해 낮은 helix 함량을 나타냈지만, 다른 치환 유도체들은 모두 piscidin의 helix 함유량이 유사하거나 더 높은 값을 나타냈다. 따라서 이러한 2차구조, 즉 α -helix의 함량이 항균활성에 어느 정도 중요한 역할을 하는 것 같다. 이와는 대조적으로 *E. coli*에 대해서는 모든 유도체들이 활성이 유지되거나 piscidin 1보다 약 2배 - 4배 활성이 증가하였다. Trp으로 치환한 유도체들은 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었다. 이러한 결과들로부터 미루어 보아 아미노산의 치환에 의해 유도된 친수성 및 소수성 영역의 증대는 항균활성에 그다지 커다란 영향을 미치지 않는 것 같다. 한편, piscidins 및 모든 유도체들은 *C. albicans*에 대해 약한 활성을 나타내거나 거의 활성을 나타내지 않았다. 세균막은 phosphatidylglycerol (PG), cardiolipin (CL), 또는 phosphatidylserine (PS)와 같은 음전하를 가지는 지질로 구성되어 있는 반면에 포유동물의 막은 phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) 또는 sphingomyelin (SM)과 같은 zwitterionic 인지질으로 주로 구성되어 있으며 (Yeaman and Yount, 2003), 또한 항균활성 펩타이드들의 활성을 감소시키는 cholesterol도 포함하고 있다 (Matsuzaki, 1999). 이러한 차이로 인해 piscidin 1 및 유도체들이 선택적으로 반응을 하는 것 같다.

URDA법에 의하면 piscidin 1은 *B. subtilis* (2.7 ug/ml)와 *P. aeruginosa* (3.0 ug/ml)에 대해 강한 항균활성을 그리고 *A. hydrophila* (4.9 ug/ml) 및 *S. iniae* (9.7 ug/ml)에 대해서도 활성을 나타내었다. Piscidin 1-acid는 이들 세균들에 대해 약 2배 - 4배 약한 활성을 보였다. 이러한 결과는 piscidin의 C-말단이 free acid인 상태보다는 amidation된 형태가 항균활성을 나타내기 위해 더 중요하다는 것을 의미한다. Piscidin 2 역시 활성을

나타냈지만, piscidin 1보다는 다소 약한 활성을 나타냈다. 한편, piscidin 3는 측정된 세균들에 대해 piscidin 1과 유사한 활성을 나타냈다. 그러나 piscidins 1 - 3 및 piscidin 1-acid는 모두 *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대해서는 활성을 나타내지 않았다. D3-P1은 *B. subtilis* 및 *P. aeruginosa*에 대해서 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었지만, 어병세균들에 대해서는 약한 활성 (41.0 ug/ml ~ 52.5 ug/ml) 또는 활성을 나타내지 않았다.

(1-18)-P1은 측정된 세균들에 대해 piscidin 1보다 다소 약한 활성을 나타내었지만, (5-18)-P1은 *B. subtilis* (5.4 ug/ml)에 대해서만 활성이 유지되었다. 따라서 이들 결과들로부터 미루어 보아 piscidin 1은 helix 구조와 항균활성을 유지하기 위해서는 N-말단으로부터 최소한 18잔기가 필요한 것 같다. Piscidin 1의 N-말단의 아미노산들이 제거된 (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1들은 활성에 그다지 영향을 미치지 않았다. 그러나 piscidin 1의 Gly²²을 제거한 (1-21)-P1은 piscidin에 비해 약간 낮은 활성을 나타내었다. 따라서 piscidin 1이 항균활성을 유지하기 위해서 C-말단의 Gly²² 및 N-말단의 Phe¹ - His⁴까지의 아미노산들은 중요한 역할을 하지 않는 것 같다.

흥미롭게도 G8A-P1 및 G8K-P1은 piscidin 1이 활성을 나타내지 않았던 *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대해서도 매우 강한 항균활성을 나타내었으며, 다른 균주들에 대해서도 piscidin 1보다 약 2 - 3배 높은 활성을 나타내었다. 아마도 이러한 결과는 양친매성 α -helix 구조의 경계면에 존재하는 Gly⁸을 Lys 또는 Ala으로 치환함으로써 친수성/소수성 영역을 증대시키거나 또는 CD 결과에서도 나타내듯이 flexibility를 감소시켜 piscidin 1보다 helix를 더 잘 형성하게 하여 막과의 상호작용이 더 유리하게 작용한 때문인 것 같다. Gly¹³을 Ala으로 치환한 G13A-P1의 경우, piscidin 1이 활성을 나타내지 않았던 *V. anguillarum*에 대해서 높은 활성을 나타내었으며, 나머지 균주들에

대해서는 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었다. 따라서 piscidin 1의 8번째와 13번째에 존재하는 Gly를 각각 Ala으로의 치환은 helicity의 함유량 뿐만 아니라 항균활성의 효과도 증대시켰다. 또한 G13P-P1은 측정된 균주들에 대해 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었다. 그러나 CD 결과에 의하면 G13P-P1은 piscidin 1보다 오히려 낮은 helicity를 나타내었다. 따라서 항균활성을 나타내기 위해서는 piscidin 1의 helix 함유량이 중요한 것이 아니라 piscidin 1이 지니고 있는 양친매성 구조가 활성에 중요한 역할을 하는 것 같다. Piscidin 유도체를 이용한 이전의 연구에 의하면 Gly⁸ 및 Gly¹³을 Ala으로 치환하여 hydrophobicity를 증가시킨 경우 항균활성이 증가한다고 보고하였으며, Pro으로 치환한 유도체들중 Gly⁸을 Pro으로 치환하였을 경우에는 piscidin 1과 유사한 활성을 나타내었으나, Gly¹³ 및 양쪽 모두를 Pro으로 치환한 유도체들은 항균활성이 약 2-4배정도 감소하였다고 보고 (Lee et al., 2007)하여 본 연구결과와 일치함을 알 수 있다. 특히 V10K-P1은 *S. iniae*에 대해서만 piscidin 1보다 약 2배정도 강한 활성을 나타내었고, H17A-P1은 *V. anguillarum*에 대해서 13.7 ug/ml에서 활성을 나타내었다. H17K-P1 역시 piscidin 1과 유사한 활성을 나타냈을 뿐만 아니라 helix 함유량에 있어서도 그다지 차이가 나지 않았기 때문에 His을 Lys으로 치환한 효과는 활성 및 helix 함유량에 별 다른 영향을 주지 않았다. Amphipathic model peptide, KLALKLALKALKALKLA를 이용한 연구에 의하면, 이들 물질들이 형성하는 양친매성 구조에서 친수성 영역이 증대되면 항균활성이 증가하고 그 반면에 소수성 영역이 증가하면 용혈활성이 증가된다고 보고하였다 (Dathe et al., 1996). 그러나 본 연구에서는 친수성 영역을 증대시킨 유도체(G8K-P1, V10K-P1 및 H17K-P1)와 소수성 영역을 증대시킨 유도체(G8A-P1, G13A-P1 및 H17A-P1)간에 있어서 뚜렷한 항균활성의 차이는 발생하지 않았다.

Trp으로 치환한 4종류의 유도체들은 다른 균주들에 대해 piscidin 1과 활성이 유사하거나 약간 낮은 활성을 보였다. 그러나 특히 주목할 만한 유도체들은 I16W-P1 및 L19W-P1이다. 왜냐하면 이들은 piscidin 1이 활성을 나타내지 않는 *V. anguillarum*에 대해서 매우 강한 활성을 나타내었기 때문이다. Trp이 치환된 4종류의 유도체들은 다른 균주들에 대해 piscidin 1과 활성이 유사하거나 약간 낮은 활성을 보였다. 또한 CD 구조 분석에 의하면 이들 유도체들은 α -helix 구조를 형성하였다. 따라서 소수성 영역에 존재하고 있는 아미노산들을 Trp으로의 치환은 piscidin 1의 활성 및 구조에 별 다른 영향을 주지 않는다는 것을 의미한다.

항균활성 펩타이드가 항생물질로서 유용성을 가지기 위해서는 세균에 대한 항균활성을 가지면서 인간의 적혈구 세포에 대해 낮은 용혈활성을 나타내야 한다. Piscidin 1은 25 μ M에서 약 50%의 용혈활성을 나타내었으며, 100 μ M에서는 83%의 용혈활성을 나타내었다. 한편 positive control로 사용한 MPB는 100 μ M에서 piscidin 1보다 낮은 용혈활성을 나타내었다. Dimer 유도체들중 D1-P1, D2-P1, D4-P1 및 D5-P1은 50 μ M 농도에서도 거의 용혈활성을 나타내지 않아 세포독성이 거의 없는 것으로 나타났다. 그러나 D3-P1은 100 μ M에서 63%로 MPB와 거의 유사한 용혈활성을 보였다. (1-11)-P1, (1-18)-P1, (5-18)-P1 및 (5-18)-P1은 100 μ M에서도 거의 용혈작용을 나타내지 않았다. Piscidin 1의 N-말단의 아미노산들이 제거된 (2-22)-P1, (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1들은 100 μ M에서도 용혈활성을 나타내지 않았다. 또한 이들 N-말단의 4종류의 유도체들은 Table 15에 나타내듯이 piscidin 1보다 낮은 hydrophobicity를 나타낸다. 따라서 N-말단에 존재하는 Phe 및 His이 용혈작용을 나타내는데 있어서 중요한 역할을 하는 것 같다. 그러나 (1-21)-P1은 50 μ M까지만 해도 거의 활성을 나타내지 않았지만 100 μ M에서 73%로 오히려 piscidin 1보다 더 높은 용혈활성을 나

타내었다. 아마도 C-말단 아미노산인 Gly의 제거로 인해 (1-21)-P1의 hydrophobicity (-0.62)가 증가되었기 때문인 것 같다.

G8A-P1, G13A-P1 및 H17A-P1은 piscidin 1보다 높은 용혈활성을 나타냈다. 이들 펩타이드들은 piscidin 1과 유사한 hydrophobicity를 가지고 있지만, Gly 또는 His을 각각 Ala으로 치환시켜 piscidin 1보다 소수성 영역을 조금 더 증대시킨 유도체들이다. 반면, piscidin 1에 비해 친수성 영역을 조금 더 증대시킨 유도체인 V10K-P1, G13P-P1, G8K-P1, H17K-P1 및 G22K-P1은 거의 용혈활성을 나타내지 않거나 piscidin보다 낮은 활성을 보였다. 위에서 언급한 것처럼, 18잔기로 구성된 양친매성 구조를 지닌 모델 펩타이드에 있어서 소수성 영역이 증가하면 용혈활성이 증가한다고 보고되었다 (Dathe *et al.*, 1996). 따라서 이러한 연구 결과는 본 연구의 용혈활성에 대한 연구결과와 잘 일치한다.

Trp으로 치환한 4종류의 유도체들은 비록 hydrophobicity가 piscidin 1보다 높았지만, 양친매성 구조에는 특별한 변화를 주지 않았기 때문에 piscidin 1과 거의 유사하거나 약간 낮은 용혈활성을 나타내는 것 같다. 용혈 작용을 나타낸다는 것은 piscidin 1 및 유도체들이 적혈구에 작용하여 헤모글로빈을 방출시킨다는 것을 의미하기 때문에 적혈구의 막은 심한 손상을 받을 것이다. 이전의 Park *et al* (1995)의 연구에 의하면 mastoparan B (MPB)는 적혈구와 반응하여 정상적인 discoid 형태로부터 crenated 형태 (echinocytes)로 변화시켰다. 따라서 piscidins도 MPB와 유사하게 적혈구의 형태를 변화시키거나 막을 파괴시킬 것으로 생각된다.

Piscidin 1과 유도체들의 막과의 상호작용을 알아보는 일환으로서 EYPC, EYPC-EYPG (3:1), DPPC 및 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 대해 piscidins 1 - 3 및 piscidin 1-acid의 형광물질 유출활성 능력을 측정하였다. 그 결과, piscidins의 활성의 세기는 농도 의존적으로 증가 하였으며, 산성지

질 보다는 중성지질에서 더 강력한 유출활성을 나타내었으며, 천연지질보다 합성지질에서 더욱 강력한 유출활성을 나타내었다. 예를들면 piscidin 1은 DPPC 리포솜에서 매우 낮은 농도인 0.5 uM에서 완전한 유출활성을 나타냈으며, DPPC-DPPG (3:1) 리포솜보다는 약 10배 높은 활성을 나타냈다. 그리고 EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1)보다는 약 20배 높은 활성을 나타내었다. 따라서 인공막들에 대한 이들 물질들의 활성의 세기는 DPPC > DPPC-DPPG (3:1) EYPC ≥ EYPC-EYPG (3:1)의 순으로 나타났다. 한편 piscidins의 활성의 세기는 모든 인공막 존재하에서 piscidin 1-acid > piscidin 2 > piscidin 1 > piscidin 3 의 순으로 나타났다.

Dimer인 D3-P1 또한 강한 유출활성을 나타내었다. DPPC 리포솜에서 D3-P1은 0.25 uM에서 완전한 활성을 보였다. 다른 인공지질막에 대해서도 D3-P1은 강한 유출활성을 나타냈지만 DPPC 리포솜보다는 20배 - 40배 약한 반응을 하였다. (5-18)-P1은 DPPC, EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1) 리포솜에서는 매우 약한 활성을 나타내었지만, DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에서는 piscidin이 100%를 나타낸 농도 (5 uM)에서 약 60%의 활성을 나타내었다. 현재 (1-18)-P1은 연구 진행중이다. N-말단의 아미노산을 순차적으로 제거한 유도체들중 (2-22)-P1은 사용한 모든 지질 이중막으로부터 가장 높은 유출활성을 나타내었다. (2-22)-P1은 DPPC 리포솜에서 0.25 uM에서 완전한 유출활성을 나타내었는데, 이것은 piscidin 1보다 2배 낮은 농도에 해당된다. 따라서 piscidin 1이 항균활성을 나타내는데 있어서 Phe¹이 반드시 필요하지 않다는 것을 의미한다. 또한 (2-22)-P1은 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 대해 1.0 uM에서 거의 100% 활성을 나타내었는데, 이 활성세기를 DPPC리포솜과 비교하면 약 4배 높은 농도에 해당한다. 그리고 EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1) 리포솜에 대해서는 (2-22)-P1이 DPPC보다 10 uM에서 약 40 배 약한 반응을 나타내고 있다. 따라서 이 물질은 소수성 상호작용 뿐만 아니라 정전적인

상호작용을 통하여 인공막으로부터 형광물질을 유출시키는 것 같다. (3-22)-P1, (4-22)-P1 및 (5-22)-P1도 (2-22)-P1과 마찬가지로 DPPC, DPPC-DPPG (3:1), EYPC, EYPC-EYPG (3:1) 순으로 반응을 하였다. 또한 아미노산이 하나씩 제거될수록 활성이 감소하였지만, 활성은 유지되었다. 그러나 산성지질의 리포솜에 대해 (4-22)-P1과 (5-22)-P1은 (2-22)-P1과 (3-22)-P1보다 약한 반응을 나타내었는데, 아마도 His⁴와 His⁵의 제거로 인해 정전기적인 상호작용이 약해져 발생한 결과인 것 같다.

아미노산을 치환한 유도체의 경우, EYPC 리포솜에 대해서는 대부분의 유도체들이 piscidin 1과 동일한 농도(10 uM) 또는 2배 낮은 농도에서 완전한 유출활성을 나타내었지만, G13P-P1은 10 uM에서 60%만 유출을 보였다. 또한 EYPC-EYPG (3:1) 리포솜의 경우, G8K-P1은 piscidin 1보다 2배 낮은 농도인 5 uM에서 완전한 유출활성을 나타냈으며, G8A-P1 및 H17K-P1은 10 uM에서 각각 82%와 74%에 해당하는 활성을 보였다. 그러나 V10K-P1 및 G13P-P1은 10 uM에서 현저히 활성이 감소되었다. 한편 DPPC 리포솜의 경우, G8A-P1은 piscidin 1과 동일한 농도 (1 uM)에서 거의 100 %의 유출활성을 나타내었지만, 다른 유도체들은 piscidin 1보다 10배 (G8K-P1과 V10K-P1), 20배 (G13A-P1, G13P-P1 및 H17A-P1), 40배 (H17K-P1) 낮은 농도에서 80%이상의 활성을 나타냈다. DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 있어서는 대부분의 유도체들이 piscidin 1과 동일한 농도인 5 uM에서 완전한 유출활성을 나타내었지만, G8K-P1은 2.5 uM에서 거의 100%의 유출을 보였다. CD 결과에 의하면 G13P-P1은 EYPC 및 EYPC-EYPG (3:1) 상태하에서 약 70%에 달하는 높은 helix 함유량을 나타냈지만, 예상과는 달리 특히 EYPC-EYPG (3:1) 리포솜에서 유출활성은 강하지 않았다. 이와는 대조적으로 G13P-P1은 DPPC 및 DPPC-DPPG (3:1) 상태하에서 50% 이하의 낮은 helix 함유량을 나타냈지만, 놀랍게도 강한 유출활성을 나타내었다. 항균활성 결과에 의하면

G13P-P1은 piscidin 1과 유사한 항균활성을 나타내었다. 따라서 비록 낮은 helix 함유량을 지닌 물질이라 하더라도 Fig. 6의 helical wheel diagram에 나타난 것처럼 양친매성 구조를 취한다면 항균활성 또는 유출활성을 나타내기 위해 막과 상호작용을 하는 것 같다고 생각된다.

마지막으로 Trp으로 치환된 4종류의 유도체들도 지질 이중막에 대해 높은 유출활성을 나타내었다. 이들 물질들은 DPPC 리포솜에 대해서 다른 리포솜들보다 약 10배 - 50배나 낮은 농도에서 아주 민감한 반응을 보였다. 특히 I16W-P1은 DPPC 막에 대해 piscidin 1보다 10배 낮은 농도인 0.1 μ M에서 100% 유출활성을 나타내었다.

단백질 및 폴리펩타이드에 존재하는 Trp은 형광을 나타내기 때문에 막과의 상호작용을 연구하기 위해 매우 유용하게 사용된다. Trp의 indole ring은 280 nm에서 흡광을 나타내기 때문에 Trp을 포함하는 펩타이드를 excitation 시키면 350 nm에서 형광을 나타낸다. 이러한 현상을 이용하여 펩타이드와 인공막과의 상호작용 연구 뿐만 아니라 막내에서의 Trp의 거동을 파악하는 것이 가능하다. Hybrid striped bass의 아가미에 있는 mast cell로부터 발견된 항균활성 펩타이드인 piscidins은 분자내에 Trp을 포함하고 있지 않다. 따라서 Trp으로 치환한 4종류의 유도체인 F6W-P1, V10W-P1, I16W-P1 및 L19W-P1을 합성하여 막과의 상호작용을 통하여 piscidin 1의 항균활성 메커니즘을 연구하고자 하였다. 우선 이 유도체들의 DPPC 및 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜에 대한 친화도를 알아보기 위하여 펩타이드에 중성 및 산성지질 리포솜을 농도별로 투여하여 형광의 변화를 측정하였다. 중성지질 및 산성지질을 투여한 결과 모든 유도체들이 blue shift를 하였으며, 그 중에서도 I16W-P1이 가장 많이 blue shift를 하였다. 중성지질의 적정에 대한 펩타이드들의 단파장으로의 이동의 세기는 다음과 같다: I16W-P1 (34 nm) > F6W-P1 (24 nm)

> L19W-P1 (18 nm) > V10W-P1 (16 nm). 한편 산성지질의 적정에 대한 단파장으로의 이동의 세기는 다음과 같다: I16W-P1 (34 nm) > F6W-P1 (26 nm) > L19W-P1 (16 nm) > V10W-P1 (14 nm). 이러한 결과들은 piscidin 유도체들에 존재하는 Trp이 수용액 상태에서 소수성 환경, 다시 말해서 막 속으로 깊게 들어가 있다는 것을 의미한다. 또한 이들 펩타이드들이 막과 상호작용할 때 친수성 아미노산의 양전하와 산성지질의 음전하간의 정전기적인 상호작용 뿐만 아니라 소수성 아미노산과 인지질막 내부에 있는 acyl chain과의 소수성 상호작용도 함께 작용하고 있다는 것을 제시한다. 가장 많이 blue shift를 한 I16W-P1이 Trp 치환 유도체들 중에서 가장 강한 항균활성을 나타내는 것으로 미루어 보아 이들 결과들은 잘 일치하고 있다.

또한 소광제를 사용하여 펩타이드에 포함되어 있는 Trp이 막 내에 분포하는지 또는 수용액 상태에 존재하는지를 알아보는 것이 가능하다. 우선 수용성 quencher인 acrylamide를 이용하여 인지질막의 존재 및 비존재하에서 Trp의 소광현상을 측정하였다. 인지질막이 존재하지 않는 조건에서 Trp를 포함하는 4종류의 유도체들은 Trp의 indole ring과 acrylamide가 반응하여 높은 소광현상을 나타내었으나, 리포솜 존재하에서는 유도체들이 막 속에 위치하여 소광현상이 현저히 줄어드는 것을 알 수 있다. 이것은 인지질막 적정 실험에서 Trp이 치환된 유도체들이 인지질막 존재하에서 blue-shift가 많이 일어나 막 속에 삽입되어 있다는 것과 일치하는 결과이다. 또한 Stern-volmer plot를 이용하여 소광의 정도를 K_{sv} 값으로 나타내었다 (Figs. 16 - 20). 측정에 사용한 지질의 종류에 따라 약간의 차이는 있지만, I16W-P1은 DPPC, DPPC-DPPG (3:1) 및 EYPC-EYPG (3:1)에서 모두 가장 낮은 K_{sv} 값을 나타내었기 때문에 다른 유도체들 보다도 막 속의 가장 깊은 곳에 위치하는 것 같다. 반면에 V10W-P1은 가장 높은 K_{sv} 값을 나타내어 막 속에 얇게 또는

경계면 근처에 위치하는 것으로 생각된다. 이러한 결과는 또한 인지질막 적정 실험 및 항균활성 결과와도 잘 일치한다.

6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC 및 11,12-DBrPC를 각각 30% 포함하는 DPPC 및 DPPC-DPPG (3:1) 리포솜을 이용하여 Trp를 포함하는 펩타이드가 인공막 내의 어느 위치에 존재하는지 조사하였다. Fig 21과 22는 각각 DBrPC 및 DBrPC-PG의 Ksv의 값을 나타낸다. 중성지질의 경우 F6W-P1은 인지질 acyl chain에 존재하는 9,10번 위치에, 그리고 V10W-P1은 6,7번에 가까이 존재하고 있다는 것을 의미한다. 또한 I16W-P1은 11,12번에 더 쉽게 접근 가능하다는 것을 뜻한다. 한편 L19W-P1은 6,7번 위치에 더 접근하기 용이하다는 것을 나타낸다. 산성지질에 대해서 F6W-P1은 6,7번에서 더 많은 소광이 일어났으며, V10W-P1과 L19W-P1은 9,10번 위치에 가까이 있는 것 같다. 그러나 I16W-P1은 11,12-DBrPC에 더 쉽게 접근할 수 있는 것 같다. 또한 최근에 모델 펩타이드와 Temporin L 및 Burgerins에 있는 Trp과 인공막과의 상호작용을 조사하기 위해 지용성 소광제인 DBrPC를 이용한 연구가 이루어졌다 (De Kroon *et al.*, 1990, Kitamura *et al.*, 1999, Zhao and Kinnunen, 2002, Seo *et al.*, unpublished data). 예를 들면, Temporin L과 DBrPC를 이용한 실험 결과, temporin L은 N-말단영역이 막 속 깊은 곳에 위치하며 N-말단 4번째에 존재하는 Trp은 지질 이중층의 중간에서 약 $8.0 \pm 0.5 \text{ \AA}$ 에 위치한다고 하였다 (Zhao and Kinnunen, 2002). 13개의 아미노산으로 이루어진 temporin L은 α -helix 구조를 취하며 전체 길이가 약 19.5 \AA 이다. Lipid bilayer의 길이는 약 40 \AA 이며 그 중에서 인지질의 head 부분에 해당하는 길이는 5 \AA 이라고 알려져 있다. 따라서 temporin L은 지질 이중층의 한 쪽 layer를 관통하는 길이에 해당하기 때문에 약 8.0 \AA 의 깊이에 Trp이 존재하는 것 같다.

본 연구에서의 CD 및 이전의 NMR과 분자 모델링 연구 결과로부터

piscidin 1은 완벽한 α -helix 구조를 취한다고 가정하였다. Piscidin 1은 22개의 아미노산으로 구성되어 있기 때문에 α -helix 구조를 취할 경우 펩타이드의 길이는 33 Å이 된다. Lipid bilayer의 길이는 약 40 Å이며 인지질의 head 부분의 길이는 5 Å이라고 알려져 있다. 또한 인지질의 acyl chain에 있는 6,7-, 9,10- 및 11,12-bromine 위치는 lipid bilayer의 중앙으로 부터 10.8 Å, 8.3 Å 및 6.3 Å에 위치한다고 보고되어 있다 (McIntosh and Holloway, 1987). 본 연구의 CD, 항균활성, 소광, 적정에 대한 결과들을 종합하여 phospholipid와 piscidin 1의 가상적인 model을 Figs. 23 -25에 나타내었다. DBrPc를 포함하는 리포솜을 사용하여 소광실험을 한 결과, piscidin 유도체들은 중성지질과 산성지질막에서 약간 다른 패턴을 나타냈기 때문에 가상적인 메커니즘을 중성지질 및 산성지질막으로 나누어 살펴보기로 하였다. 우선 DPPC의 경우, Fig. 23에 나타난 것처럼 piscidin 1과 막의 소수성 부분이 소수성 상호작용을 하기 위하여 C-말단이 막 속으로 삽입되어 지질 이중막의 inner layer쪽으로 깊게 들어가게 되면, F6W-P1은 이중막의 out layer의 6,7과 9,10의 사이에 위치하게 되며, V10W-P1은 lipid bilayer의 중간 부분에 위치하게 된다. 또한 I16W-P1은 inner layer의 11,12의 위치에 그리고 L19W-P1은 inner layer의 6,7의 위치에 접근하기 쉽기 때문에 33 Å의 길이를 지니는 piscidin 1은 막을 충분히 수직적으로 span 할 수 있다. 이러한 Piscidin 1 유도체들의 conformation 및 orientation은 소광 및 적정 실험의 결과와 잘 일치한다. 따라서 piscidin 1은 양친매성 α -helix 구조를 형성하여 DPPC 리포솜의 소수성 영역인 acyl chain과 소수성 상호작용을 하기 위해 C-말단 측으로부터 막 속으로 깊이 삽입될 것이고, 최종적으로 강력한 항균 활성 및 유출활성을 일으키게 된다.

한편 산성지질막과 piscidins의 상호작용에 대해서는 Fig. 24에 나타내었다. 산성지질막은 표면에 polar group을 가지기 때문에 음전하를 띠게 된

다. 양친매성 α -helix 구조를 지니는 piscidin 1은 지질막의 음전하와 반응하기 위해서 펩타이드 내에 존재하는 염기성 아미노산으로 구성된 친수성 영역과 우선 강한 정전기적인 상호작용을 할 것이다. 이러한 정전기적인 상호작용이 펩타이드 안에 존재하는 소수성 아미노산으로 구성된 소수성 영역들이 막 속으로 쉽게 삽입될 수 있도록 방아쇠 역할을 하게 될 것이다. 그러나 Fig. 24에 나타낸 것처럼, piscidin 1은 DPPC 지질막과는 다르게 초기 단계에서부터 막 속으로 깊게 들어가는 것이 불가능할 지도 모른다. 이와 같은 이유는 F6W-P1은 6,7번에서, I16W-P1은 11,12번에서 그리고 V10W-P1은 9,10번에서 그리고 L19W-P1은 6,7-DBrPC에서 더 소광이 잘 일어난 소광 실험의 결과로 설명이 가능하다. 또한 산성지질막 존재하에서 piscidin 1 유도체들이 인공막과 평행하게 놓여있는 orientation은 소광 및 적정 실험의 결과와 잘 일치한다. 따라서 piscidin 1은 양친매성 α -helix 구조를 형성하여 산성지질막과 정전기적인 상호작용을 통하여 막 속으로 DPPC와는 다르게 펩타이드의 소수성 영역들이 들어가서 규칙적인 막의 구조에 변화를 일으켜, 그 결과 다양한 생리활성을 가져오게 될 것이다. 최근의 NMR 연구에 의하면 piscidin 1은 산성지질막 존재하에서 막 속으로 깊게 들어간 형태가 아니라 평행한 상태로 막 표면에 놓여 있는 상태로 존재한다고 보고 하였기 때문에 (Chekmenev *et al.*, 2006 and 2007), 산성지질막의 경우에 있어서는 piscidin 1의 conformation은 본 연구의 결과와 일치하는 것 같다. 이러한 중성지질과 산성지질막에서 piscidin의 상호작용의 결과를 토대로 하여 최종적인 piscidin 1의 항균활성 메카니즘을 Fig. 25에 나타내었다. 우선 수용액 상태에서 random 구조를 취하는 piscidin이 Fig. 24에 나타낸 것처럼 초기단계에 산성지질막과 평행한 orientation을 지닌 α -helix 구조가 정전기적인 상호작용을 한 후, 막과 소수성 상호작용을 하기 위해 막의 inner layer에 들어가서 규칙적인 막의 구조에 변화를 일으키게 된다. 중간단계로 Fig. 23에 나타낸 것처럼 C-말단

측이 막 속으로 깊이 삽입될 것이고, 완전히 막을 관통하는 형태를 취할 것이다. 위에서 언급한 것 처럼 메카니즘을 설명하기 위해 편의상 piscidin 1은 완벽한 α -helix 구조를 취한다고 가정하였다. 그러나 본 연구의 CD 구조 결과에 의하면 piscidin 1은 DPPC 지질막에서 약 54%의 helix 함유량을 나타낸 반면 G13A-P1은 모든 인공지질막에서 100%의 helix 함유량을 나타내었다. 이러한 결과는 piscidin이 완벽한 helix를 취하지 않는다는 것을 의미한다. 따라서 마지막 단계로 piscidin 1은 Fig. 25에 나타난 것처럼 helix 구조가 Gly¹³에서 약간 휘어진 배위를 취하면서 막을 수직적으로 관통할 것이다. 이러한 배위를 형성했을 때 펩타이드의 친수성 영역이 막 속에 존재하기 때문에 piscidin은 에너지적으로 불안정한 conformation을 취할 것이다. 이러한 문제를 극복하기 위해서 piscidin은 dimer를 형성한 다음, pore를 형성하여 최종적으로 다양한 생리활성을 일으킬 것이다. 지금까지 발견된 magainin 2, protegrin-1, melittin, LL-37 및 MSI-78과 같은 항균활성 펩타이드들이 toroidal mechanism을 통하여 항균활성을 나타낸다고 알려져 있는데 (Brogden, 2005), 아마 piscidin도 이들과 유사한 메카니즘을 통하여 강력한 항균활성을 나타낸다고 생각된다.

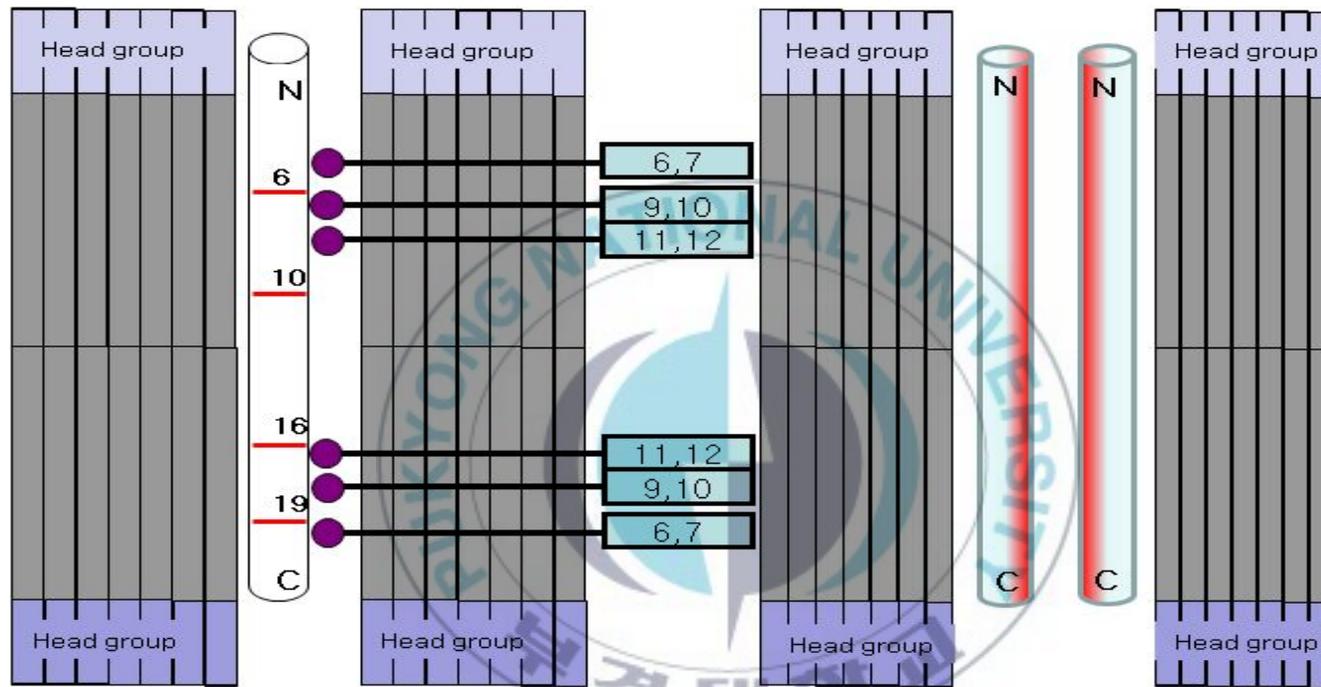


Fig. 23. Interaction of piscidin 1 and DPPC liposomes.

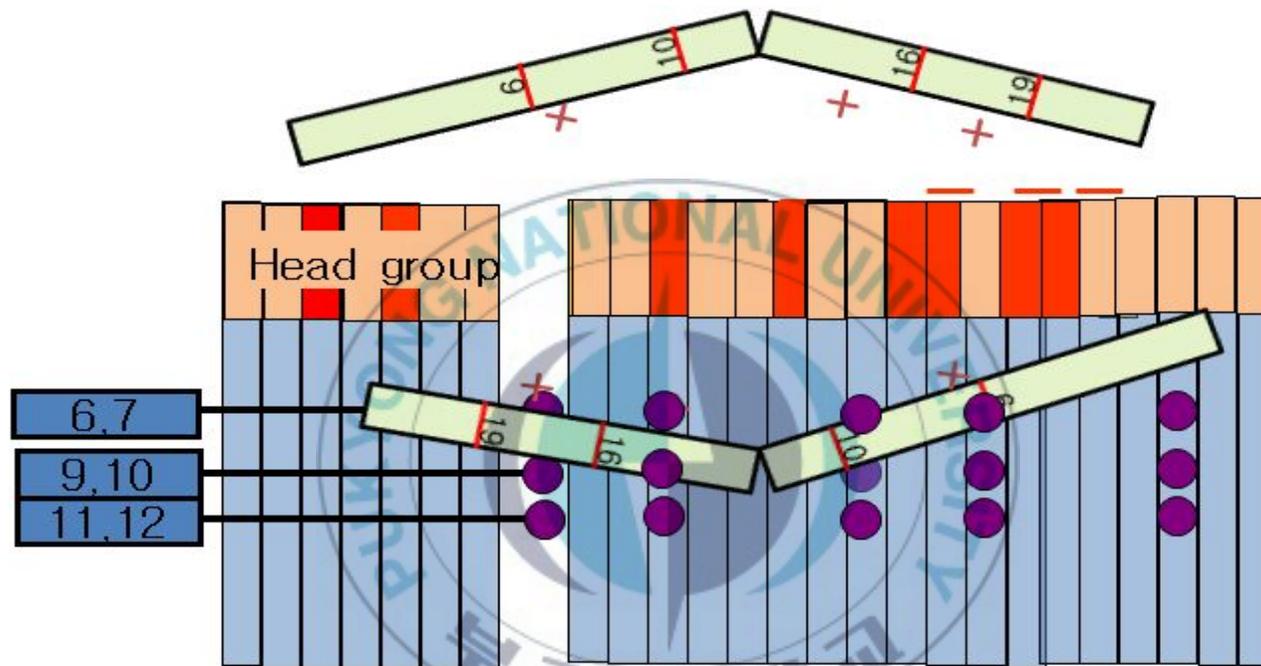


Fig. 24. Interaction of piscidin 1 with DPPC-DPPG (3:1) liposomes

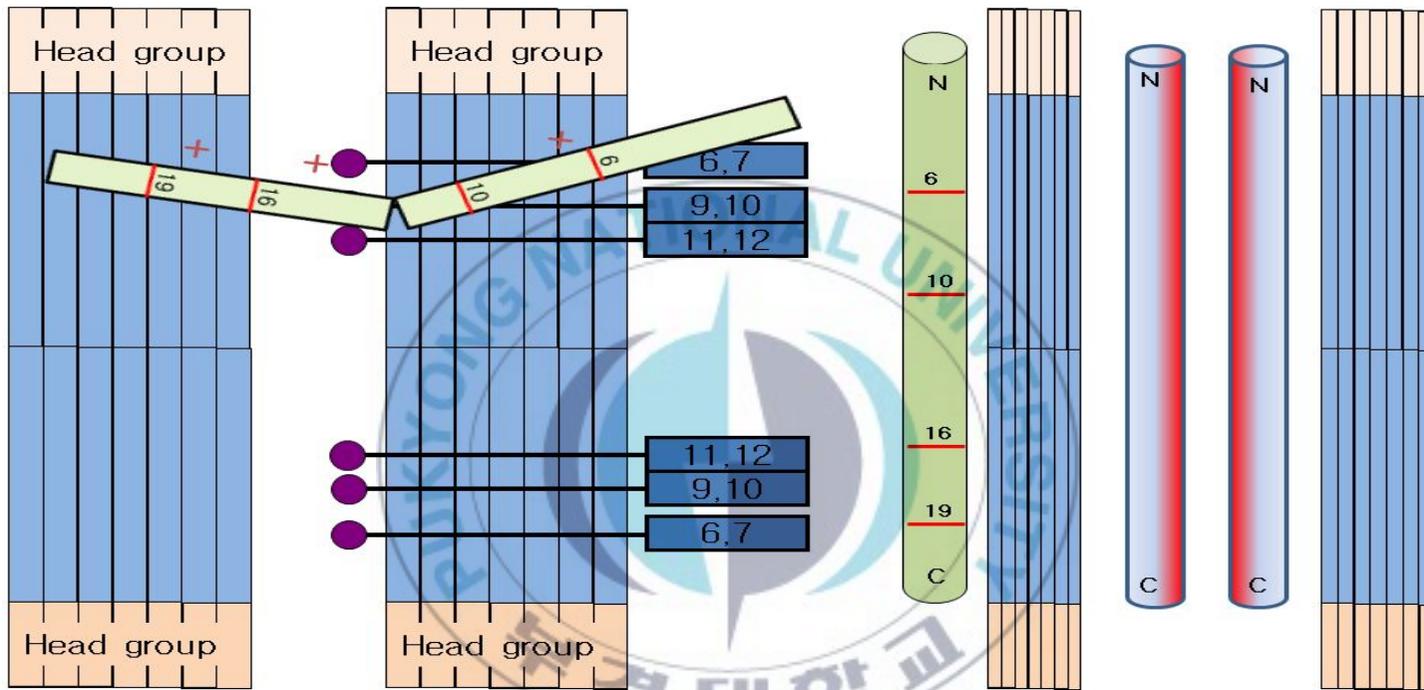


Fig. 25. Model depicting the insertion of piscidin 1 into DPPC and DPPC-DPPG (3:1) bilayer

V. 요약

Piscidin 1은 hybrid striped bass 유래의 22개의 잔기로 이루어진 amphipathic cationic α -helical 펩타이드이며, bacteria, virus, fungi 및 parasite에 강력한 활성을 나타낸다. 이러한 piscidin 1의 구조와 활성간의 상관관계 및 항균활성 메커니즘을 규명하기 위해 반복, 절단, 치환 등의 방법으로 piscidin 1 - 3를 포함하여 총 30종의 유도체를 합성하였다.

CD 스펙트럼을 이용한 2차 구조 예측에서 piscidin 1 - 3은 TES buffer 상태에서는 모두 random한 구조를 취하였으나, TFE 및 인공막 존재에서는 모두 α -helix 구조를 취하였다. Dimer 펩타이드들은 α -helix 구조를 취하지 않고, α 와 β 구조가 혼합된 구조이거나 β 구조 또는 random한 구조를 취하는 것으로 나타났다. Piscidin 1의 N-말단 영역, 중간 영역 및 C-말단 영역의 fragment들은 random한 구조를 취하였으며, (1-18)-P1은 α -helix 구조를 취하였다. N-말단을 제거한 유도체 및 아미노산을 치환한 유도체들은 모두 buffer 이외의 조건에서 α -helix 구조를 취하였다.

항균활성에 있어서 (1-18)-P1은 최소한의 항균활성을 유지하였으나, (5-18)-P1, (5-18)-P1 및 (14-22)-P1은 항균활성을 상실하였다. N-말단을 순차적으로 제거한 유도체들의 경우에는 *S. aureus*에 대해서만 N-말단쪽 2번째 아미노산까지를 제거하였을 때 항균활성이 사라졌으나, 나머지 균주들에 대해서는 N-말단 4번째 잔기까지를 제거하였어도 항균활성을 유지하였다. 아미노산을 치환한 유도체들중 G8A-P1과 G8K-P1은 piscidin 1보다 활성이 증가 되었다. 특히 piscidin 1이 활성을 나타내지 않았던 *E. tarda* 및 *V. anguillarum*에 대해서도 활성을 나타내었다. 강력한 항균활성을 가지는 G8A-P1은 piscidin 1보다 높은 용혈활성을 나타내었으나, G8K-P1은 piscidin 1의 약 1/4정도의 용혈활성을 나타내었다.

Lipid titration 연구에서는 I16W-P1이 산성 및 중성 리포솜에서 가장 강한 상호작용을 하는 것으로 나타났으며, I10W-P1이 막과 가장 낮은 interaction을 하는 것으로 나타났다. Acrylamide를 이용한 Trp의 소광현상 실험에 의하면 인공막 존재하에서 Trp을 치환한 유도체들은 모두 인공막 속에 위치하고 있는 것으로 나타났으며, I16W-P1이 인공막의 가장 깊은 곳에 위치하며, I10W-P1은 막의 가장 바깥쪽에 위치하는 것으로 나타나 lipid titration 실험과 일치하는 결과를 나타내었다.

Bromine이 치환된 6,7-DBrPC, 9,10-DBrPC 및 11,12-DBrPC를 이용한 소광실험 결과 DPPC 리포솜에서 F6W-P1은 9,10-DBrPC, I10W-P1은 6,7-DBrPC, I16W-P1은 11,12-DBrPC 그리고 L19W-P1은 6,7-DBrPC에서 가장 강한 소광현상을 나타내었다.

이러한 결과를 종합한 결과, piscidin 1은 C-말단이 liposome의 inner layer 쪽으로 먼저 들어가 수직으로 세워져 존재한다는 것으로 나타났으며, 산성 지질의 경우에는 산성 지질의 negative charge와 piscidin 1의 hydrophilic region이 정전기적인 상호작용으로 결합한 후 piscidin 1의 hydrophobic region은 막의 소수성 부분으로 돌아들어가 막과 수평으로 배열되어 있는 구조를 예측할 수 있었다.

VI. 참고 문헌

Alessandro T., Scocchi M., Zanetti M., Storici P. and Gennaro R. (1995). PMAP-37, a novel antibacterial peptide from pig myeloid cells cDNA cloning, chemical synthesis and activity. *Eur. J. Biochem.* 228: 941-946.

Ando K. and Natori S. (1988). Inhibitory effect of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 103: 735-739.

Andreu D., Ashauer H., Kreil G. and Merrifield R.B. (1985). Solid phase synthesis of PYL and isolation of its natural counterpart, PGL a (PYL a-(4-24)) from skin secretion of *Xenopus laevis*. *Eur. J. Biochem.* 149: 531-535.

Balls A.K., Hale W.S. and Harris T.H. (1942). A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem* 19: 279-288.

Bullet P., Cociancich S., Dimarcq J.L., Lambert J., Rechhart J.M., Hoffmann D., Hetru C. and Hoffmann J.A. (1991). Insect immunity: Isolation from a coleopteran insect a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defencin family. *J. Biol. Chem.* 266: 24520-24525.

Campagna S., Saint N., Molleand A. and Aumelas G. (2007). Structure and mechanism of action of the antimicrobial peptide piscidin. *Biochemistry* 46: 1771-1778.

Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M. and Tempst P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* 8: 2387-2391.

Casteels P., Ampe C., Riviere L., Van Damme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F. and Tempst P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major

antimicrobial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). Eur. J. Biochem. 187: 381-386.

Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hetru C., Hoffmann J. and Bulet P. (1996). Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. J. Biol. Chem. 271: 21808-21813.

Chekmenev E.Y., et al (2006) Investigating molecular recognition and biological function at interfaces using piscidins, antimicrobial peptides from fish. Biochem. et Biophys. Acta. 1758: 1359-1372.

Clark D.P., Durell S., Maloy W.L. and Zasloff M. (1994). Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. J. Biol. Chem. 269: 10849-10855.

Cole A.M., Weis P. and Diamond G. (1997) Isolation and characterization of pleurocidin, an antimicrobial peptide in the skin secretions of winter flounder. J. Biol. Chem. 272: 12008-12013.

Couto M.A, Harwig S.S.L, Cullor J.S, Hughes J.P. and Lehrer R.I. (1992) Identification of eNAP-1, an antimicrobial peptide from equine neutrophils. Infection and Immunity 60: 3065-3071.

Csordas A. and Michl H. (1970). Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of European *Bombina* species. Monash. Chem. 101: 182-189.

Dathe M., Schumann M., Wieprecht T., Winkler A., Beyermann M., Krause E., Matsuzaki K., Murase O. and Bienert M. (1996). Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. Biochemistry 35: 12612-12622.

De Kroon A.I., Soekarjo M.W., De Gier J. and De Kruijff B. (1990). The role of charge and hydrophobicity in peptide–lipid interaction: a comparative study based on tryptophan fluorescence measurements combined with the use of aqueous and hydrophobic quenchers. *Biochemistry* 29: 8229–8240.

Del Sal G., Storici P., Schneider C., Romeo D. and Zanetti M. (1992). cDNA Cloning of the Neutrophil Bactericidal Peptide Indolicidin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 187: 467-472.

Diamond G., Zasloff M., Eck H., Brasseur M., Maloy W.L. and Bevins C.L. (1991). Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3952-3956.

Epple P., Apel K. and Bohlmann H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin gives enhanced resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9: 509-520.

Franky R.G.T., Hilde M.E.S., Miguel F.C.De Bolle and Fred V.L. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) Seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 15301-15309.

Gibson B.W., Poulter L., Williams D.H. and Maggio J.E. (1986). Novel peptide fragments originating from PGLa and the caerulein and xenopsin precursors from *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 261: 5341-5349.

Gibson B.W., Tang D.Z., Mandrel I.R., Kelly M. and Spindel E.R. (1991). Bombinin-like peptides with antimicrobial activity from skin secretions of the Asian toad, *Bombina orientalis*; *J. Biol. Chem.* 266: 23103-23111.

Giovannini M.G., Poulter L., Gibson B.W. and Williams D.H. (1987). Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochem. J.* 243: 113-120.

Harwig S.S., Kokryakov V.N., Swiderek K.M., Aleshina G.M., Zhao C. and Lehrer R.I. (1995). Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett.* 362: 65-69.

Ho C.L. and Hwang L.L. (1991). Structure and biological activities of a new mastoparan isolated from the venom of the hornet *Vespa basalis*. *Biochem. J.* 274: 453-456.

Jones D.E. and Bevins C.L. (1992). Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J. Biol. Chem.* 267: 23216-23225.

Kini R.M. and Evans H.J. (1989). A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. *Toxicon* 27: 613-635.

Kockum K., Faye I., Hofsten P.V., Lee J.Y., Xanthopoulos K.G. and Boman H.G. (1984). Insect immunity. Isolation and sequence of two cDNA clones corresponding to acidic and basic attacins. *EMBO J.* 3: 2071-2075.

Larrick J.W., Hirata M., Balint, R.F., Lee J., Zhong J. and Wright S.C. (1995). Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 63: 1291-1297.

Lee S.A., Kim Y.K., Lim S.S., Zhu W.L., Ko H., Shin S.Y., Hahm K.S. and Kim Y. (2007). Solution Structure and Cell Selectivity of Piscidin 1 and Its Analogues. *Biochemistry* 46: 3653-3663.

Lehrer R.I. and Ganz T. (1990). Review: antimicrobial polypeptides of human

neutrophils. *Blood* 76: 2169-2181.

Lehrer R.I., Lichtenstein A.K. and Ganz T. (1993). Defensins: antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 105-128.

Matsuzaki K. (1999). Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica. et Biophysica. Acta.* 1462: 1-10.

McIntosh T.J. and Holloway P.W. (1987). Determination of the depth of bromine atoms in bilayers formed from bromolipid probes, *Biochemistry* 26: 1783-1788.

Miyata T., Tokunaga F., Yoneya T., Yoshikawa K., Iwanaga S. and Niwa M. (1989). Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II: chemical structures and biological activity. *J. Biochem.* 106: 663-668.

Moore K.S., Bevins C.L., Brasseur M.M., Tomassini N., Turner K., Eck H. and Zasloff M. (1991). Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 266: 19851-19857.

Mor A., Nguyen V.H., Delfour A., Migliore-Samour D. and Nicolas P. (1991). Isolation, amino acid sequence and synthesis of dermaseptin, a novel antimicrobial peptide of amphibian skin. *Biochemistry* 30: 8824-8830.

Morikawa M., Ito M. and Imanaka T. (1992). Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene. *J. Ferment. Bioeng.* 74: 255-261.

Morikawa N., Hagiwara K. and Nakajima T. (1992) Brevinin-1 and -2, unique

antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda porsa*. Biochem. Biophys. Res. Comm. 189: 184-190.

Nagaoka S., Awano T., Nagata N., Masaoka M., Hori G. and Hashimoto K. (1997). Serum cholesterol reduction and cholesterol absorption inhibition in Caco-2 cells by a soy protein peptic hydrolysate. Biosci. Biotech. Biochem. 61: 354-356.

Nagpal S., Gupta V., Kaur K.J. and Salunke D.M. (1999). Structure-function analysis of tritrypticin, an antibacterial peptide of innate immune origin. J. Biol. Chem. 274: 23296-23304.

Nakamura T., Furunaka H., Miyata T., Tokunaga F., Muta T., Iwanaga S., Niwa M., Takao T., Shimonishi Y., Nakamuro T., Furunaka H. and Miyata T. (1988). Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). J. Biol. Chem. 263: 16709-16713.

Park C.B., Kim M.S. and Kim S.C. (1996). A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 218: 408-413.

Park C.B., Lee J.H., Park I.Y., Kimand M.S. and Kim S.C. (1997). A novel antimicrobial peptide from the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. FEBS Lett. 411: 173-178.

Park J.M., Jung J.E. and Lee B.J. (1994). Antimicrobial peptides from the skin of a korean frog, *Rana rugmu*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205: 948-954.

Park N.G., Silphaduang U., Moon H.S., Seo J.K., Corrales J. and Noga E.J. (2011). Structure-Activity Relationships of piscidin 4, a piscine antimicrobial peptide. Biochemistry 50: 3288-3299.

Park N.G., Yamato Y., Lee S. and Sugihara G. (1995). Interaction of

mastoparan-B from venom of a hornet in taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. *Biopolymers* 36: 793-801.

Saito T., Kawabata S., Shigenaga T., Takayenoki Y., Cho J. and Nakajima H. (1995). A novel big defensin identified in horse shoe crab hemocytes: isolation, amino acid sequence, and antibacterial activity. *J. Biochem.* 117: 1131-1137.

Samakovlis C., Kylsten P., Kimbrell D.A., Engstrom A. and Hultmark A. (1991). The andropin gene and its product, a male-specific antibacterial peptide in *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 10: 163-169.

Sato K., Ueda K., Kondo M., Aoyagi H. and Izumiya N. (1977). Studies of Peptide Antibiotics. XXXV. Synthesis of Gramicidin S by a Fragment Solid-Phase Method. *Bull. Chem. Soc.* 50: 1999-2004.

Scocchi M., Romeo D. and Zanetti M. (1994). Molecular cloning of Bac7, a proline- and arginine-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. *FEBS Lett.* 35: 197-200.

Segura A., Moreno M., Madueno F., Molina A. and Garcia-Olmedo F. (1999). Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 16-23.

Selsted M.E., Miller S.I., Henschen A.H. and Ouellette A.J. (1992). Enteric Defensins: Antibiotic Peptide Components of Intestinal Host Defense. *J. Cell Biol.* 118: 929-936.

Selsted M.E., Novotny M.J., Morris W.L. and Tang Y.Q. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* 267: 4292-4295.

Selsted M.E., Tang Y.Q., Morris W.L., McGuire P.A. and Novotony M.J. (1993). Purification, primary structures and antibacterial activities of B-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 268: 6641-6648.

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

Shike H., Lauth X., Westerman M.E., Ostland V.E., Carlberg J.M., VanOlst J. C., Shimizu C., Bulet P. and Burns J.C. (2002). Bass hepcidin is a novel antimicrobial peptide induced by bacterial challenge. *Eur. J. Biochem.* 269: 2232-2237.

Simmaco M., Mignogna G., Barra D. and Bossa F. (1994). Antimicrobial peptides from skin secretion of *Rana esculenta*. Molecular cloning of cDNA encoding esculentin and isolation of new active peptides, *J. Biol. Chem.* 269: 11956-11961.

Simmaco M., Mignogna G., Canofeni S., Miele R., Magoni M.L. and Barra D. (1996). Temporins, antimicrobial peptides from the European red frog *Rana temporaria*. *Eur. J. Biochem.* 242: 788-792.

Stansly P.G., Shepherd R.G. and Weate H.J. (1947). Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 81: 43-54.

Steiner H., Hultmark D., Engstrom A., Bennich H. and Boman H.G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* 292: 246-248.

Storici P. and Zanetti M. (1993). A cDNA derived from pig bone marrow cells contains a sequence identical to the intestinal antimicrobial peptide PR-39.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1058-1065.

Sures I. and Crippa M. (1984). Xenospin: the neurotensin-like octapeptide from *Xenopus* skin at the carboxyl terminus of its precursor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 380-384.

Thompson S.A., Tachibana K., Nakanishi K. and Kubota I. (1986). Melittin-like peptides from the shark-repelling defense secretion of the sole *Pardachirus-pavoninus*. Science 233: 341-343.

Tosteson M.T., Holmes S.J., Razin M. and Tosteson D.C. (1985). Melittin lysis of red cells. J. Mem. Biol. 87: 35-44.

Turner J., Cho Y.N., Dinh N., Waring A.J. and Lehrer R.I. (1998). Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 2206-2214.

Wu C.S.C., Ikeda K. and Yang J.T. (1981). Ordered conformation of polypeptides and protein in acidic dodecyl sulfate solution. Biochemistry 20: 566-570.

Wu E.S., Jacobson K., Szoka F. and Portis, Jr A. (1978). Lateral diffusion of a hydrophobic peptide, N-4-nitrobenz-oxa-1,3-diazole gramicidin S, in phospholipid multibilayers. Biochemistry 17: 5543-5550.

Wu, M. and Hancock R.E.W. (1999). Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. J. Biol. Chem. 274: 29-35.

Yeaman M.R. and Yount N.Y. (2003). Mechanism of antimicrobial peptide action and resistance. Pharmacol. Rev. 55: 27-55.

Zhao H. and Kinnunen P.K.J. (2002). Binding of the antimicrobial peptide temporin L to liposomes assessed by Trp fluorescence. *J. Biol. Chem.* 277: 25170–25177.

Zanetti M., Gennaroand D. and Romeo R. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and avariable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett.* 374: 1-5.

Zasloff M. (1987). Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5449-5453.

