

**Flesh fly (*Sarcophaga peregrina*) 성충으로부터 신규 항균물질의
정제와 성상해석 및 합성에 관한 연구**

임재윤, 박호용, 양재현*, 정세영**, 육창수**, Natori Sunji***
KIST 생명공학연구소, 우석대학교 약학대학*, 경희대학교 약학대학**,
동경대학 약학부***

[서론]

생물개체가 항상성을 유지해가며 생존하기 위해서는 자기와 비자기를 명확히 구별하는 것이 필요하며, 이물질의 침입으로부터 생체를 방어하는 기구를 갖추는 것은 대단히 중요하다고 생각한다.

척추동물과는 달리 항체 생산능력이 없는 곤충은 생체방어기구의 하나로서 유충 체액 중의 혈구응집소와 항균단백질 등에 의해 이물질을 배제하는 기구가 존재하는 것이 밝혀지고 있다. 예를 들면, Flesh fly (*Sarcophaga peregrina*)의 유충에서는 sarcophaga lectin이라는 혈구 응집소 그리고 Gram 음성균에 유효한 sarcotoxin과 Gram 양성균에 유효한 sapecin이라는 항균 단백질 등이 분리 보고되었다. 이러한 물질들은 체벽 상해의 자극으로 인해 그 유전자 발현을 거쳐 합성이 유도되어 침입한 세균의 세포막에 치사적으로 작용하므로써, 이물질(침입자)을 협동적으로 배제한다는 것이 밝혀지고 있다.

곤충의 생체 방어 기구를 규명하기 위한 연구의 일환으로서 Flesh fly (*Sarcophaga peregrina*) 성충으로부터 새로운 항균물질을 검색한 결과, 미지의 활성 분획을 얻어 분리 정제에 성공했다. 나아가 이 신규 화합물의 구조와 항균활성의 작용기전 그리고 그 생리활성, 특히 최근에 발암 및 골다공증 등의 병태에 밀접하게 관련되어 있어 많은 관심이 모아지고 있는 kinase에 대한 저해활성을 검토한 결과, 새로운 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

[결과]

1. 항균물질의 정제

Flesh fly (*Sarcophaga peregrina*)의 성충으로부터 항균활성을 유도하기 위해 *E. coli* K-12 594 (Str^r) 균주를 도포한 바늘로 성충의 복부에 상처를 주었다. 27°C에서 16시간 사육한 후, 프로테아제 저해제인 aprotinin을 포함한 0.1% TFA를 가해 분쇄했다. 초원심 조작후, 그 상등액을 여과해 분리 정제의 출발 재료로 썼다.

다음은 stepwise로 ODS reverse-phase 크로마토그래피를 실행해, 이 단계에서 이미 Flesh fly의 유충으로부터 분리 보고된 항균단백질 등과는 다른 활성 분획을 얻었다. 계속해서 그 활성 분획을 HPLC를 이용한 C18 reverse-phase 크로마토그래피, Carbon-500 normal-phase 크로마토그래피를 통해서 분리 정제를 반복한 결과, 활성과 일치하는 단일 peak를 얻었다. 활성의 회수율은 15%로 Flesh fly 한 마리당 약 500 ng 이상 존재하는 것이 계산 가능하다. 이때 항균활성은 액체배지에서 37°C, 5시간 배양한 *E. coli* K-12 594 (Str^r)의 증식을 50% 저해하는 활성을 1 unit로 정의하고 있다 (Table 1).

Table 1. Summary of purification of 5-S-GAD

Purification step	Total activity (units)	Total amount* (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)
Whole body Extract	n.d	n.d	n.d	-
C18 flash chromatography	30542.5	95	321.5	100
C18 HPLC	10189.8	8.56	1190.4	33
Carbon500 HPLC	5352.3	3.8	1408.5	18
C18 HPLC rechromatography	4582	3.16	1450	15

Total amount* was determined by the method of Lowry et al.(1951), with bovine serum albumin as a standard. n.d, not determined.

2. 항균물질의 구조해석

고분해능 FAB-MS 분석 결과, 이 항균물질은 분자량이 574.1804 (M+H)⁺ 로, 분자 조성식이 C₂₂H₃₁N₅O₁₁S인 화합물이란 것을 알았다. 이 분자식은 ESCA (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis), ¹³C-NMR, ¹H-NMR 분석 등의 분광학적 해석을 통해서도 확인 할 수 있었다.

DQF-COSY와 HOHAHA 스펙트럼에 의해 spin계를 해석했으며, ¹H-¹³C HSQC에 의해 수소와 탄소와의 상관관계를 결정했다. 그 결과, 부분구조로서 Glutamic acid (Glu), Glycine (Gly), β-Alanine (β-Ala), Cysteine (Cys), 3,4-dihydroxyphenylalanine (Dopa)를 갖고 있음을 알았으며, 이 결과는 아미노산 조성 분석의 결과와도 일치하였다.

그리고, HMBC 스펙트럼에서 관찰된 long range coupling의 해석에 의해 이들 아미노산의 결합양식을 결정할 수 있었으며, ¹H-¹⁵N HSQC 스펙트럼에 의해 Glu와 β-Ala 이 1급 아민으로서 존재하는 것도 알 수 있었다. 이상의 해석 결과, 이 물질은 신규 펩타이드성 화합물로서 그 구조는 N-β-alanyl-5-S-glutathion-3,4-dihydroxyphenylalanine (5-S-GAD)으로 결정했다 (Fig. 1).

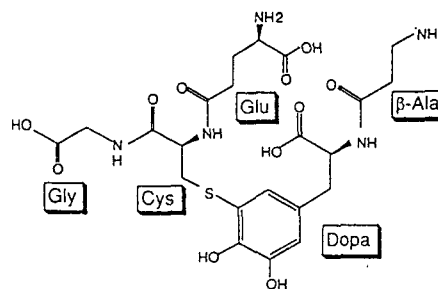


Fig. 1 Structure of 5-S-GAD

3. 5-S-GAD의 합성

구조확인 및 대량합성을 목적으로 유기 및 효소합성법에 의해 5-S-GAD의 합성을 시도했다.

먼저, 액상법에 의해 *N*-β-Ala-Dopa를 합성한 후, 다음으로 버섯의 tyrosinase를 이용한 효소 반응을 이용해서 Glutathion (GSH) 과 Dopa의 5번 탄소와의 사이에 sulfide 결합을 도입함으로써 최종적으로 5-S-GAD의 합성에 성공했다 (Fig. 2).

합성품과 정제표품을 동시에 C18 reverse-phase HPLC로 분석한 결과, 같은 응출 시간에 검출되었다 (Fig. 3). 또한, UV, IR, 선광도, NMR, FAB-MS 등의 다른 분광학적 해석 결과도 일치했다.

그리고, 항균활성을 비교 측정한 결과, 정제표품과 동일한 specific activity를 나타냈다 (Fig. 4). 이상의 결과를 바탕으로, 위에서 결정된 5-S-GAD의 구조는 *N*-β-alanyl-5-S-glutathion-3,4-dihydroxyphenylalanine으로서 틀림이 없으며 이 물질 자체가 항균물질이라는 것을 최종 확인 할 수 있었다.

4. 5-S-GAD의 항균활성의 작용 기전

먼저 5-S-GAD의 항균 스펙트럼을 검토했다. 그 결과, *E. coli* K-12 594 (*str^r*)을 포함해 *M. luteus* FDA 16 그리고 *S. aureus* IFO 12732의 증식을 50% 저해하는 농도, IC₅₀는 각각 26 μM, 17 μM, 31 μM 이었다. 이와 같이 5-S-GAD는 Gram 양성균 뿐만 아니라 Gram 음성균에도 작용한다고 생각한다. 5-S-GAD의 기지의 구조유사체에 관한 항균활성에 대해서는 보고된 바 없지만, melanoma 환자로부터 이상 대사되는 5-S-Cys-Dopa (5-S-CD)는 항증양활성을 갖고 있음이 보고되었으며, 그 작용 기전으로서는 H₂O₂의 발생을 매개한다는 것이 보고된 바 있다. 이러한 점에 착안하

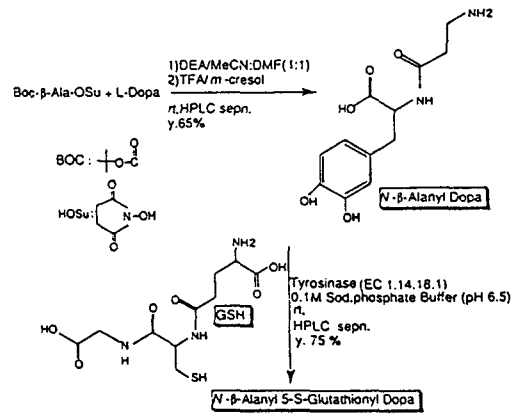


Fig. 2 Scheme of Synthesis of *N*-β-Alanyl 5-S-Glutathionyl Dopa

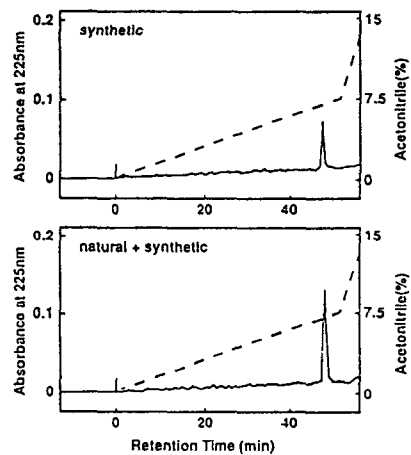


Fig. 3 RP-HPLC profile of 5-S-GAD

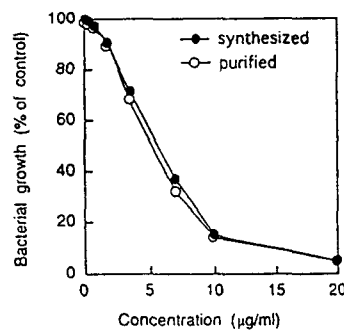


Fig. 4 Comparison of antibacterial activity of synthesized and purified 5-S-GAD

여, 5-S-GAD의 항균활성의 작용 기전도 H_2O_2 를 매개하고 있지 않을까 하는 관점에서, H_2O_2 를 가수분해하는 효소 catalase를 첨가해 5-S-GAD의 항균활성의 변화를 측정했다. 그 결과, catalase 첨가량에 의존해서 항균활성이 감소해, 5-S-GAD 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 항균활성은 catalase 125 $\mu\text{g/ml}$ 을 첨가함으로써 완전히 소실되었다 (Fig. 5).

이상의 결과와 같이, 5-S-GAD의 항균활성은 H_2O_2 에 의한 것임이 간접적으로 시사되었고, 기지의 항균단백질의 작용 기전과는 다르다는 것이 밝혀졌다.

5. 5-S-GAD의 생리활성

한편, 5-S-GAD의 구조 유사체인 기지물질 5-S-Cys-Dopa가 항증양활성을 나타내는 것에 착안하여 5-S-GAD의 항증양활성에 관해서 MTT법에 의해 검토한 결과, Ehrlich, IMC ca 세포주 등 몇 가지 종양 세포주의 증식을 유의성 있게 저해하는 것을 알았다. 또한 Kinase에 대한 저해활성을 *in vitro*에서 검토한 결과, *c-src* 및 *v-src* 등의 *src* Family 그리고 *bcr-abl* tyrosine Kinase 활성을 선택적으로 저해하는 것이 밝혀졌다 (Fig. 6).

[결론 및 고찰]

Flesh fly (*Sarcophaga peregrina*)의 성충으로부터 대장균에 대한 항균활성을 지표로, 새로운 항균물질을 분리, 정제했다. 이 물질은 분자량이 573인 신규 펩타이드성 화합물로서 그 구조는 *N*- β -alanyl-5-S-glutathion-3,4-dihydroxyphenylalanine (5-S-GAD)이며, 합성 5-S-GAD를 이용한 해석을 통해 이 구조가 항균활성을 가진 실체라는 것을 밝혔다. 또한, 5-S-GAD의 항균활성의 작용 기전은 Flesh fly가 만들어 내는 기지의 항균단백질 등과는 달리, H_2O_2 를 매개로 해서 살균적으로 작용한다는 것을 시사했다.

5-S-GAD의 구조로부터, 이 화합물은 기지의 항균단백질과 같이 유전자 발현을 통해서 합성되는 것이 아니고, 2차적으로 대사되어 생합성되는 물질로 생각된다. 한편, 곤충의 감염 방어기구의 하나로서, 페놀산화효소의 활성화기구가 알려져 있다. 이러한 관점과 더불어 Flesh fly에서는 체표상해시에 항균단백을 합성하는 조직인 지방체의 세포내 GSH 농도가 감소하는 것과 체액 중에 β -Ala-Tyr이 존재하는 것을 고려하면, 5-S-GAD는 GSH과 β -Ala-Tyr으로부터 페놀산화효소에 의해 합성되는 생합성 경로를 가정할 수 있다.

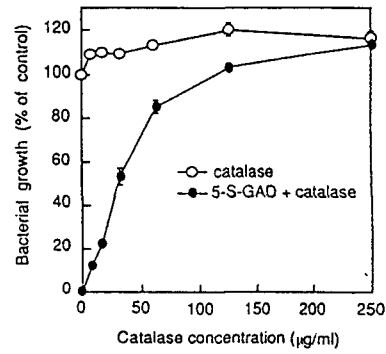


Fig. 5 Effect of catalase on the antibacterial activity of 5-S-GAD

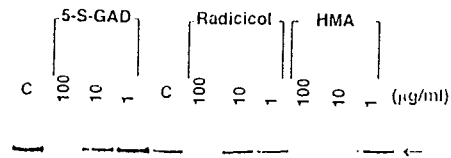


Fig. 6 Effects of 5-S-GAD on p210^{bcr-abl} kinase activities

최근, 항균 단백질의 유전자 발현에 H_2O_2 에 의해 활성화되는 전사인자가 관여한다는 것이 보고되었다. 5-S-GAD는 그 자신이 항균활성을 갖는 외에 다른 생체 방어 기구의 활성화에도 관계하는 key molecule일 가능성을 지적할 수 있다. 따라서 5-S-GAD의 생물학적 의미의 규명은 단지 무척추 동물 뿐만이 아니라 생물 일반의 생체 방어 기구를 이해하는 중요한 실마리가 되리라 생각한다.

또한, 최근의 연구에 의하면, 많은 암 유전자 산물이 signal 전달분자로서 세포의 이상증식과 관련되어 있다는 것이 밝혀지고 있다. 따라서 5-S-GAD는 세포의 증식 및 암화에 있어서의 세포내 signal 전달의 복잡한 분자기구, 특히 단백질 tyrosine 인산화의 역할을 해명하는데 있어 특이적 probe로서 이용 가능할 뿐 만 아니라, 나아가 암세포 등의 이상증식 및 골다공증 등 각종 질병의 새로운 치료제로의 개발 가능성도 지적하고 싶다.