

# 항균 펩타이드의 구조와 활성에 관한 상관관계

## (Structure-Activity Relationship of Antimicrobial Peptides)

글 \_ 박윤경, 함경수 \_ 조선대학교 단백질소재연구센터

페니실린 이후 수많은 종류의 항생제가 개발되어 사용되어왔다. 그러나 요즘에 들어서 이들 항생제에 내성을 가지는 균주들이 과거와는 달리 빠른 속도로 등장하고 있고 따라서 이들 내성균주를 퇴치할 수 있는 새로운 작용 메카니즘을 가지는 항생제의 개발이 시급한 실정이다. 그러므로 천연에 존재하는 항균 펩타이드는 새로운 항생제의 후보물질로서 대두되고 있다. 자연계에 존재하는 항균 펩타이드들을 그대로 이용하거나 유사체들을 합성하여 이용하고자 하는 시도들이 있었으나 항균활성과 동시에 세포독성의 척도인 적혈구 용혈활성도 동시에 증가하기에 실제적인 응용에 많은 제약을 받고 있다. 따라서 항균활성이 높으며 세포독성이 없는 항균펩타이드의 개발을 위한 연구가 진행 중이다.

### 1. 항균 펩타이드란?

생물체에는 생체의 선천성 면역계(innate immunity) 및 숙주방어(host defense)에 중요한 역할을 담당하는 항균 펩타이드가 존재한다는 것이 최근 들어 많이 알려지고 있다. 특히, 곤충, 양서류 및 포유동물을 포함한 각종 생물체는 이들의 진화과정에서 각종 병원성 미생물의 감염에 대응하여 여러 종류의 펩타이드를 이용, 면

역 방어계(Immune defence)를 가지고 있다는 것이 알려지고 있다. 이러한 가운데 최근 들어 분석방법 및 구조결정법의 발달에 의하여 수많은 항균 펩타이드가 밝혀지고 있으며, 이 중 몇몇 항균 펩타이드는 각종 미생물에 대한 항생 활성의 작용 기작이 표적세포(target cell)의 인지질 이중층막(phospholipid layer membrane)과의 결합에 관련되어 있고, 펩타이드의 양쪽 친매성(amphipathic)에 의한 세포막상의 ion channel 또는 pore의 형성이 세포막의 막전위를 변화시키거나, 세포막을 파괴하여 결국에는 세포의 사멸(cell lysis)에 이르게 한다고 밝혀지고 있다.

인류는 수 세기동안 개구리를 병원균 감염에 대처하기 위한 치료의 수단으로 이용해왔으며 남미 국가들에 사는 오늘날에도 민간요법으로써 이를 사용하고 있다. 1962년에 *Bombina variegata*라는 개구리의 표피분비액에서 항균력 및 용혈력을 지닌 peptides의 존재를 처음 확인하였고, 이 후 24개의 아미노산으로 구성된 bombinin이란 항균 peptide가 최초로 분리되었다 [1]. 1971년에는 벌의 독소(bee venom)로부터 melittin이란 peptide가 정제되어 [2] 항균 peptides의 구조와 작용기전에 대한 연구가 본격적으로 수행되는 계기가 되었다. 그러나 melittin은 우수한 항균활성을 지니고 있음에도



불구하고 강력한 용혈력(적혈구에 대한 파괴력)을 갖고 있음으로 인해 신규 항생제로의 개발을 위한 더 이상의 연구를 진행시킬 수가 없었다. 따라서 melittin의 발견 이후, 용혈력이 없으며 항균활성이 우수한 천연 peptides의 발견을 위한 많은 연구들이 뒤따르게 되었다.

그리고 이렇게 발견된 항균 펩타이드를 활성화 증진된 펩타이드로 설계하기 위하여  $\alpha$ -helical wheel diagram을 기초로 아미노산을 치환한다든지, 펩타이드의 삼차원 구조와 항생 활성의 상관관계를 기초로 하여 세포독성이 없고 기능이 증진된 항생 펩타이드를 설계, 개발하고 있으며, 컴퓨터를 이용하여 펩타이드 구조를 예측하고, 이 구조로부터 고부가가치 유용 펩타이드들을 설계하고 있다. 또한 최근에는 peptidomimetics 기술의 도입을 적극적으로 추진함으로써 효과적인 신약 개발을 모색하고 있다.

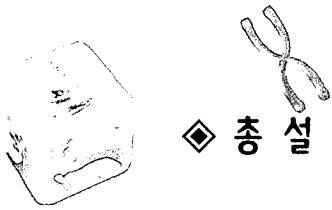
## 2. 자연계에서의 항생 펩타이드의 분포

항 미생물 peptides가 생물계에 널리 분포하고 있는 것으로 미루어 이들이 많은 생물체들의 host defense system에 있어 매우 중요한 역할을 할 것이라는 사실은 쉽게 짐작할 수 있다. 본 내용에서는 항생제를 대체할 수 있는 포유류, 양서류, 곤충, 식물 및 세균에 존재하는 항균 peptides에 관하여 기술하려 하는데 특히, 여러 종류의 peptide들이 지니는 구조적 유사성과 각각의 특이성에 대하여 중점적으로 다루고자 한다. 먼저 항균 peptide들 간의 공통된 구조적 특성을 유추해내기 위해선 여러 다른 생물체들로부터 분리된 peptide들의 구조를 비교 분석해야한다. 공통적인 구조적 motif를 파악하게 되면 특정 병원체를 제어하기 위해서는 어떤 구조의 peptide가 효과적일 수 있는지를 가늠할 수 있게 될 것이다. 이제까지 자연계에서 발견된 peptide들은 구조적인 측면에서 분류하면 크게 4부류( $\beta$ -sheet 구조: S-S 결합을 통해 안정화되는 구조; 양극성의  $\alpha$ -helices 구조; extended 구조; loop 구조)로 나눌 수 있는데, 이들

구조는 모두 친수성과 소수성의 두 면을 동시에 지닌 양극성의 특성을 지니고 있으며, 서열상에 어떠한 보존적 위치를 일정하게 차지하고 있는 아미노산들도 발견할 수 없었다. 일반적으로 미생물 peptides는 2~9개의 양전하 아미노산들(arg or lys)을 지니며 50% 이상의 소수성 아미노산들과 적은 수의 중성 혹은 음전하 아미노산들로 구성되어 있다. 그러나 이외에 항 미생물 peptides를 구성하는 데에 있어 어떤 특징적인 규칙도 존재하지 않기 때문에 각 peptide group에 있어 항균 활성화에 중요한 요인이 되는 구조를 알아내기 위해서는 다양하게 변화시킨 구조의 peptides를 합성하여 각각의 활성을 분석해야 한다. 현재까지는 이러한 방식의 연구를 통해서만 신규 peptide 항생제로써의 개발이 가능한 peptide 구조를 design해 낼 수 있다.

### (1) 포유류의 항균 peptides

포유류에서의 항균 peptides는 주로 neutrophils의 granules, 점막 혹은 상피세포의 분비액에 존재하거나 단백질들의 가수분해 산물로써 생겨난다. Phagocytosis의 기능을 가진 것으로 알려진 neutrophils은 여러 가지 다양한 항균 proteins과 peptides를 포함하고 있는 것으로 알려져 있는데, 이들 중엔 bactericidal/permeability-increasing proteins(BPI), lysozyme, lactoferrin, batenecins, defensins, indolicidins, cathelicidins 등이 있다. 또한 neutrophil 이외의 다른 세포들도 항균 proteins을 만들어 내는 것으로 확인되었다 (예: 상피세포는  $\beta$ -defensin; 혈소판은 platelet microbicidal proteins). 포유류의 항균 peptides 중 가장 활발하게 연구된 것은 defensin이라고 할 수 있다. Defensin에는  $\alpha$ -와  $\beta$ -type의 두 종류가 확인되었는데, 두 type 모두 세 개의 S-S 결합과 많은 arg 아미노산을 지니는 특징을 가지고 있다. 그러나 S-S 결합에 참여하는 cys 아미노산들의 서열 상 위치와 S-S 결합의 연결 방식에는 차이가 있으며 위치가 보존되어 있는 아미노산들 사이에도 두 peptide들 사이에는 차이가 있다. 또한 NMR 구조분석에 따르



면  $\alpha$ -defensin은 세 가닥의  $\beta$ -sheet 구조를 지니는데,  $\beta$ -defensin도 역시 유사한 구조를 갖고 있을 것으로 많은 과학자들은 예상하고 있다. 포유류에서  $\beta$ -defensin은 주로 neutrophils과 소장의 Paneth cells에서 발견되었고  $\beta$ -defensin은 상피세포, neutrophils와 그 밖의 다른 백혈구들에서 분리되었다 [3]. 또한 defensin은 곤충과 식물의 종자(seeds)에서도 발견되어진 바 있다 [4,5]. Defensin의 항 미생물 활성은 bacteria는 물론 fungi와 virus들에 대해서도 광범위하게 확인되었다. 포유류에서의 항균 peptides는 항균활성 이외에 다른 기능을 담당하는 염기성 단백질들이 가수분해되어 만들어지기도 한다. 이러한 경우의 가장 주목할 만한 단백질은 철 운반 기능을 가진 lactoferrin이라고 할 수 있다 [6]. Lactoferrin 상에 존재하는 항균활성 부위는 11개의 아미노산으로 구성된 peptide인 것으로 알려져 있는데, 이 부위는 위 소화효소인 pepsin에 의한 가수분해로써 lactoferrin으로부터 떨어져나오게 된다. 이 항균활성부위는 물론 lactoferrin에서 분리되어 나왔을 때에 보다 강력한 활성을 지니게 되는데, lactoferrin 구조에 포함되어 있을 경우에도 lactoferrin이 항균활성을 갖는 데에 중요한 구조적 motif가 되는 것으로 확인되었다. Lactoferrin은 현재 위장소화에 의해 활성 peptide가 만들어지도록 고안된 영양보조제로써 이용되고 있다.

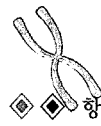
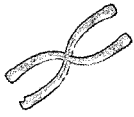
## (2) 양서류의 peptides

Bombinin과 Xenopus로부터의 magainin [7]을 발견한 이후, 많은 양서류들에 대하여 항 미생물 peptides의 존재가 탐색되어 왔다. 그 예로써 Xenopus에서는 magainin 이외의 여러 항균 peptides들이 발견되었는데, 이들은 표피의 과립 분비선뿐만 아니라 위장의 점막과 소장의 세포들에서도 존재하는 것으로 확인되었다. *Phylomedusa sauvagii*에서 발견된 dermaseptins [8]은 5개의 peptides member들로 구성된 family로써 효과적인 항진균 활성(antifungal activity) 특징을 갖고 있다. 양서류들에서 발견된 peptide들은 조합하여 작용 시

에는 활성에 있어 서로 상승효과를 갖는 것으로 확인되었는데, 서열상에서는 전혀 유사성을 보이지 않는다. 심지어는 같은 종에서 발견된 peptide들 간에도 아미노산 서열은 큰 차이를 보인다. 하지만 이제까지의 모든 양서류의 peptide들(magainins, dermaseptins, buforin II, ranalexins, brevinins 등)은 공통적으로 양전하의 양극성 특징을 지니는 것으로 규명되었다.

## (3) 곤충의 peptides

곤충에서의 항균 peptides는 크게 곤충 체내로 분비되는 peptides(예: cecropins, insect defensins 등)와 체외로 분비되는 peptides(예: melittin)로 구분된다. 곤충에서 발견된 항균 peptides의 생물학적 활성에 있어서는 melittin의 경우엔 진핵세포에 대한 세포독성을 지니며 cecropin은 주로 Gram 음성균에 더욱 강한 활성을 보인다. 또한 cecropin은 돼지의 소장 상피세포에서도 발견된 바 있어 생물계에 널리 분포되어 있는 형태의 peptides일 것으로 추정하고 있다. 곤충은 침입하는 미생물에 따라 특이적인 peptides를 발현시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어 초파리(*Drosophila*)의 경우는 혈림프에 적어도 7개의 항균 peptides가 존재하여 병원균에 감염 시에 각각 유도되는 것으로 확인되었다. 이 peptide들이 유도 합성되는 방식은 포유류의 면역반응에서 일어나는 과정의 한 방법(NF- $\kappa$ B의 발현을 위한 Toll signaling pathway)과 매우 흡사한 것으로 확인되었다 [9]. 곤충의 항균 peptides가 면역반응에 있어 포유류의 항체와 같은 특이성을 가지고 있지 않음에도 불구하고 곤충은 침입 미생물체를 구분할 수 있으며 또한 감염 미생물체의 유형에 따라 대응하여 적절한 peptide를 생산해 내는 것으로 규명되었다. 이러한 예는 역시 초파리에서 연구되었는데, 초파리가 곤충 병원성 fungus에 감염될 경우에는 오직 항 진균 peptide만을 생산해냄으로써 나름대로의 adaptive immune response를 한다는 것이다. 따라서 항 미생물 peptide는 특히, 곤충과 같은 진화단계상의 원시 생물체들에 있어 면역반응에



중요한 역할을 하는 것으로 간주되고 있는 것이다.

#### (4) 식물의 peptides

Thionins은 식물에서 분리된 최초의 항 미생물 peptides이다. 이 peptides는 세균, fungi, yeast와 여러 포유류 세포들에 이르기까지 다양한 세포들에 대해 독성을 지닌다. 이밖에도 plant defensins이라고 명명된 peptides가 분리된 바 있는데 이 peptides는 곤충과 포유류에서 발견된 defensins과 구조적으로 매우 유사한 것으로 확인되었다 [5]. 그러나 원래의 defensin과는 달리 plant defensin은 높은 항진균력을 지니고 있는데, 이는 식물계가 세균들 보다는 fungi에 의한 감염에 더욱 노출되어 있다는 사실을 감안할 때 매우 흥미로운 사실이라 하겠다. Plant defensin은 fungi에 작용 시, fungal hyphae를 형태적으로 변형시킴으로써 fungi의 성장을 저해하는 것과 형태적 변형 없이 성장을 저해하는 두 group으로 분류된다. Plant defensin은 병원성 진균으로 감염 시, 무의 잎에서 발현되어질 수 있는 것으로 확인되었는데, 이는 항 미생물 peptides가 식물의 생체방어체제에서도 중요한 역할을 하는 것임을 시사하는 것이다. Plant defensins의 작용방식에 대한 연구에서는 이 peptide에 대한 receptor들이 미생물 표면상에서 발견되었는데, 이는 peptides가 그들의 receptor에 결합하는 것이 항균활성을 발휘하는 데에 있어 매우 중요한 과정이라는 것을 시사하는 것이다.

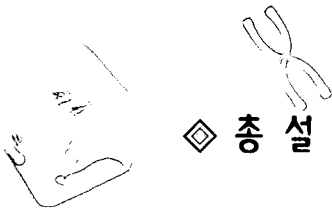
#### (5) 세균의 peptides

Gram 양성균과 음성균으로부터 분리되는 항균 peptides가 발견되었는데, 이들은 통칭하여 bacteriocins이라고 불리며 자신이 분리된 host bacteria에는 해를 미치지 않는다. Bacteriocins의 작용기전을 보면 *E. coli*에서 분리되는 microcin C7은 단백질 합성을 저해하며 *Lactococcus* peptide인 mersacidin은 peptidoglycan의 생합성을 저해함으로써 다른 세균에 대한 특이적 항균 활성을 갖게 된다. 그러나 대부분의 bacteriocin들(nisin, epidermidin등)은 표적세포의 막을 투과함으로써 작용한다고 밝혀졌다.

#### (6) Synthetic Peptides

새로운 항생제로써 peptides를 이용하기 위해선 이들의 작용방식을 규명하는 일이 매우 중요하다. 이러한 맥락에서 자연에서 발견된 항균 peptide들의 구조를 기초로 한 다양한 peptide들이 합성되어 항균활성을 증가시키는 구조를 찾아내기 위해서나 혹은 작용기전을 밝히기 위한 연구에서 이용되었다. 이러한 synthetic peptide의 첫 번째 예는 항균활성을 증가시키고 세포독성을 낮추기 위해 고안된 Cecropin-melittin의 hybrid form이라고 할 수 있다. 이외에도 여러 다른 유사한 연구들이 진행되어 많은 신물질 특허가 등록되어 있는 실정이다. 특히, Bessalle 연구팀은 다양한 길이와 소수성을 지닌 다양한 항균 peptide들을 합성하였다 [10]. 이들은 16~17개의 아미노산으로 구성된 양극성의 peptide가 높은 항균력과 세포독성을 갖는다는 것을 확인하였다. 그런데 소수성 아미노산인 Trp나 Phe를 Leu으로 치환시키면 (즉, peptide의 소수성을 감소시키면) 세포독성이 크게 줄어드나 항균력의 감소는 별로 없게 된다는 사실을 밝혀냈다. 또한 9~10개의 아미노산으로 이루어진 peptide의 경우엔 매우 낮은 항균 활성을 갖게 되는데, 이 peptide는 길이가 긴 peptide에 비해 매우 낮게  $\alpha$ -helix form을 이룬다는 사실을 알게 되었다. 그러나 bactenecin (12개), indolicidin (14개), gramicidin (10개) 등은 비록 길이가 짧지만 우수하고 광범위한 항균력을 지니고 있는데, 이는 이 peptide들이 길이가 긴 peptide들과 다른 방식으로 항균력을 갖게 됨을 의미하는 것이다. 따라서 항 미생물 활성을 갖은 데에 있어선 peptide의 길이 보다는 구조가 더욱 중요한 요인이 되는 것이다.

또한 특이성, 안정성 및 세포독성을 개선시키기 위한 목적으로 여러 peptide가 합성되었다. D-form의 아미노산들로만 구성된 magainin은 원래의 peptide (L-magainin)와 동일한 생물학적 활성을 보였다 [11]. 이 결과는 D-form의 아미노산들로 이루어진 peptide가 단백질 분해 효소에 대해 안정하며 따라서 이론적으로 안정된 *in vivo* 활성을 지닐 수 있다는 점에서 매우 흥미



로운 것이었다. 비록 많은 경우에 있어 synthetic peptide 들은 천연 peptide의 구조를 근거로 하여 합성되지만, 임의로 아미노산들을 배열시켜 합성하는 방식의 연구도 현재는 병행되고 있다.

### 3. 항균 펩타이드의 구조적 특징에 따른 분류

자연 항생제의 주요 그룹을 생화학적, 구조적 특징에 따라 4가지로 나누어 볼 수 있다.

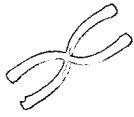
#### (1) 양이온 펩타이드

항생 펩타이드의 가장 큰 그룹으로써 구조적 특징에 따라 3가지 종류로 나누어 볼 수 있다.  $\alpha$ -나선 구조를 형성하는 선상 펩타이드, 단일 또는 여러 이황화 결합을 포함한 시스테인-풍부 열린 펩타이드, 프롤린, 글리신, 히스티딘 같은 특정한 아미노산이 풍부한 분자가 그것이다.  $\alpha$ -나선 구조를 형성하는 선상 펩타이드를 예를 통해서 살펴보면, 인시류인 *Hyalophora ceropia*의 hemolymph로부터 처음 분리된 cecropins가 있다. Cecropin은 시스테인 잔기가 없는 3.4 kDa 선상 양친 펩타이드로 짧은 hinge에 의해 연결된 두 개의  $\alpha$ -나선 부분을 포함하고 있다. (강염기의 N-말단 영역과 강한 소수성 C-말단 나선). 또, 발톱개구리의 피부에서 분리한 magainin이 있다. Cecropins와 magainin은 박테리아, 섬유성 균류, 원생동물, 후생동물을 포함한 넓은 범위의 미세 생물체에 대항하는 활성이 있다. 마지막으로 두꺼비와 물고기의 표피로부터 최근 분리된 histone의 잘려진 형태와 상응하는 양이온 펩타이드가 있는데 크기가 2.4 kDa으로 cecropin과 구조적으로 유사하고 박테리아, 균류에 대항하는 활성이 있다. 이런 분자들이 항미생 활성이 있는 이유는  $\alpha$ -나선 분자가 박테리아 막을 관통한 뒤 핵산과 결합하여 세포 대사를 막음으로써 빠른 세포 사멸을 이끌기 때문이다. 그 다음 단일 또는 여러 개의 이황화 결합을 포함한 시스테인-풍부 열린 말단 펩타이드가 있다. 시스테인에 의해 이황화 결합을 형

성하는 2.8 kDa의 항미생 분자로 무척추동물과 척추동물 둘 다에서 분리된 2 kDa 헤어핀-구조 펩타이드는 항박테리아와 항균 활성을 보이고 있다. 그 예로 곤충, 포유류, 식물로부터 분리된 defensins라는 4 kDa분자가 있는데, 무척추동물 defensins는 3개, 식물 defensins는 4개의 이황화 결합으로 되어 있다. 이들은 공통적으로 2개의 이황화 결합에 의해  $\beta$ -sheet에 연관된  $\alpha$ -나선으로 구성되어 있다. 또, 특정한 아미노산이 풍부한 양이온 펩타이드가 있다. 곤충으로부터 분리된 분자는 주로 프롤린과 글리신이 풍부하고 포유류에서 분리된 분자는 히스티딘과 트립토판이 풍부하여 항박테리아, 항균 활성을 가진다. 현재, 이런 모든 양이온 펩타이드에 대한 활성 기작이 설명되지는 못했다. 그러나, Shai-matzusaki-Huang 모델이 항미생 활성에 대한 가능한 설명을 주고 있다. 선상 양친성  $\alpha$ -나선 펩타이드의 경우 막 투과력을 증가시킴에 의한다. 즉 음이온 지질과 펩타이드의 양이온이 상호작용하여 지질의 재배열에 의해 막을 불안정시켜 결국 표적 세포로 펩타이드가 들어가 활성을 나타내는 것이다. 그리고 시스테인-풍부 펩타이드의 경우, 지질 이중층의 이온 투과성 채널을 형성함에 의한다. 그 외 몇몇 가성들이 펩타이드가 표적 세포를 죽이는 기작을 제안하고 있다. 즉 세포벽을 분해시키는 hydrolyases를 유도하여 막 기능을 방해함에 의해 펩타이드가 세포 내로 들어와 활성을 나타낸다는 것이다.

#### (2) 음이온 펩타이드

일반적으로 포유동물 표피로부터 분리되는데 2종류가 있다. 소와 인간의 감염성 물질에서 최근 발견된 인산화된 화합물을 포함한 첫 번째 종류는 신경 펩타이드 전구체의 과정으로부터 파생되고 주로 gram-positive 박테리아에 대항하는 활성이 있다. 두 번째 종류는 아스파라드산 풍부 분자이다. 이 분자는 소 폐의 surfactant로부터 분리되었는데 group I serine protease의 중성 전하 전구 펩타이드와 구조가 유사하고 폐 효소 체계의 활성을 조절할 수 있다. 그 예로 인간 땀에서 분리하여



gram- positive 박테리아 병원균의 다양성에 반응하는 dermcidin이라는 음이온 47-아미노산 펩타이드가 있다.

### (3) 방향성 펩타이드

쌍시류 유충에서 분리된 저분자량의 항박테리아 화합물로 구성되어 있는데 현재 정확한 기작은 아직 알려지지 않았다.

### (4) 산소 - 결합 단백질로부터 파생된 펩타이드

그 예로 절지동물과 환형동물의 hemolymph에서 분리된 Hemocyanin 파생물이다. Blood meal ingestion 후에 기생체의 의해 형성된 척추동물 헤모글로빈의 잘려진 형태로 이 단백질은 박테리아를 죽이는 화합물로 보고되고 있고 병원균과 싸우는 내부적 무기로서 사용되는 방어 분자 저장고로서 고려되고 있다. 1980년대 중반 이후 다내성 박테리아 균주가 등장하여 기존에 있는 항생제가 치료로 효과를 보지 못하게 됨으로써 항생제를 대체할만한 대체 약물이 불가피하게 되었다. 이때, 천연물로부터 분리한 항미생 활성을 가진 펩타이드가 항생제를 대체할 약물로 가능하다고 보인다.

## 4. Peptide의 작용 mechanism

아미노산들의 서열만을 가지고 peptide의 활성화나 2차 구조를 예상하는 것은 어렵다. S-S결합이 없는 대부분의 항균 peptide들은 수용액 속에서는 random 구조를 취하지만 생체막에 결합되거나 소수성 환경과 만나게 되면 어떤 구조를 갖게 된다.

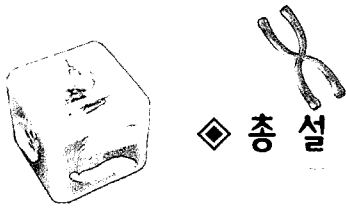
예를 들면 cecropins과 melittin은 막 환경 하에서 양극성의  $\alpha$ -helix 구조로 folding 되어진다. peptide의 양전하와 소수성의 두 가지 구조적 특성은 peptide와 세균의 막사이의 초기 결합에 있어 매우 중요한 것으로 알려져 있다. peptide의 양전하는 세균 막과의 인력을 증가시키는 데에 중요하며 소수성은 막과의 소수성 결합력을 증가시켜줌으로써 막에 결합되는 데에 크게 기

여한다. 대부분의 peptide들은 Gram 음성균의 외막에 존재하는 LPS에서 결합된 후 self-promote [12] 방식에 따라 세균으로 들어가는 것으로 확인되었다. peptide가 LPS에 결합되는 친화력은  $Ca^{2+}$ ,와  $Mg^{2+}$ 보다 최소 3배 이상 강한 것으로 측정되었다.

따라서 peptides은  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ 등과 경쟁하여 이 이온들이 결합되는 부위에 결합하여 정상적인 막의 barrier 특성은 교란된다. peptide에 의해 영향을 받은 막의 부위는 일시적인 틈이 생기게 되는데, 이 곳으로 여러 분자들(peptide를 포함한)이 유입되게 된다. 그러나 이러한 초기의 peptide와 세균 막사이의 interaction이 일어난 후, 세균이 어떻게 죽게 되는 가에 대해선 아직 명확히 밝혀지지 않았다.

Model membrane을 가지고 수행된 연구에 따르면 defensins, cecropins bacteriocins와 indolicidin 등은, 기질 이중막에 voltage-dependent ion channels을 형성시키는 것으로 확인되었으며, 이 channel들은 크기와 life time에 있어 매우 다양하다. 일반적으로 이러한 작용기전은 막에 결합되어 삽입된 후 pore(barrel-like pore)를 형성하게 되면 더 많은 monomer들이 pore쪽으로 이끌려 와서는 pore크기를 확장시킨다는 것이다. peptide의 작용기전에 대한 또 다른 가설은 'carpet model' [13]로써 설명되는 것인데, 즉, peptide가 세균 막 표면에 포화된 후, 막 전체를 파괴시킨다는 것이다. 이외에도 막 안에서 다양한 갯수의 peptide들이 부분적인 aggregation을 일으켜 ions이 통과되는 route를 제공한다는 가설이 있다.

peptide가 membrane potential을 교란하는 정도를 측정 한 연구에서는 일부 peptides만이 MIC 농도에서 *E. coli*의 cytoplasmic membrane을 완전히 depolarize시킬 수 있음을 확인하였고, MIC 이하의 농도에서도 membrane potential을 부분적으로 파괴시켰다. 이 사실을 peptide가 일정한 역치 농도 이상에서만 막을 파괴 할 수 있다는 기존의 carpet model의 가설과 모순되는 결과이었다. 그러나 indolicidin과 batenecin 같은



peptide들은 그들의 MIC에서도 cytoplasmic membrane 을 투과하지 못했다 [14]. 이는 이들이 다른 action mechanism을 지니고 있음을 시사하는 결과이다.

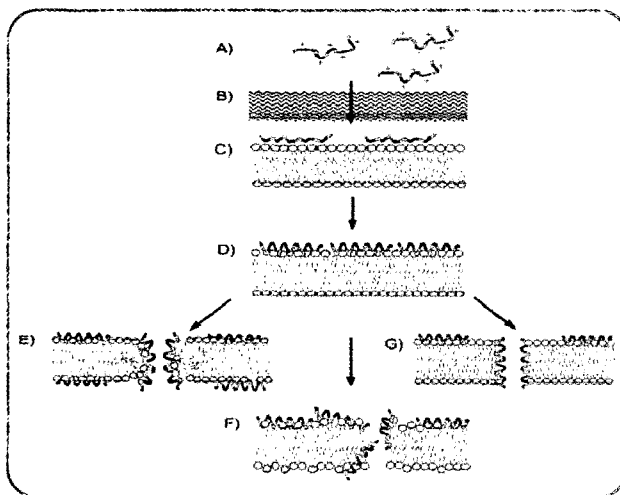
Peptide의 항균 kinetic은 대단히 빠르다. 보통 2-3분 내에 killing 효과를 보인다. 따라서 peptide가 bacteria 를 죽이는 단계를 monitor하는 것은 매우 어렵다. 결론 적으로 peptide의 항균 작용 mechanism에 대해선 아직 완전한 해명이 이루어져 있지 않고 있다. 또한 항균활성 과 세포독성을 갖게 하는 peptide의 구조적 motif에 대 해서도 일관성 있는 규칙을 찾아내지 못한 실정에 있다. 따라서 in vivo 활성의 존재만을 가지고 peptide의 in vivo 활성을 예측하는 것에는 무리가 있는 것이다. 하지만 실험동물 체내에서 cytotoxicity가 없이 항균활성을 지니는 많은 항균 peptides들이 규명되고 있는 실정이다. 그러므로 머지않아 실제 임상에서 항균 peptide가 사용 되어질 수 있을 것이란 가능성은 매우 높다고 하겠다.

지금까지 생물체로부터 분리된 항균 펩타이드로는 곤 충에서 분리된 Cecropin(CA)과 유사한 펩타이드인

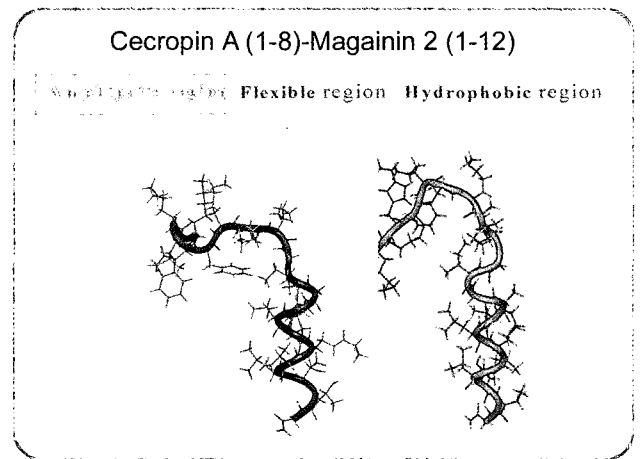
cecropin P1이 포유동물인 돼지의 창자(pig intestine) 에서도 발견되고 있다. 또 벌독으로부터 분리된 Melittin(ME)은 26개의 아미노산으로 이루어져 있으며,  $\alpha$ -helical amphiphatic 구조를 이루며, C-말단에 Lys 잔 기가 많이 존재하고, N-말단에는 소수성 아미노산들이 많이 존재하는 CA와 바뀐 구조 (inverted structure)를 취하는 것으로 알려져 있다. 또한  $\alpha$ -helical amphiphatic structure에 속하는 항균 펩타이드로서는 개구리의 피층 (skin)으로부터 분리된 Magainin-2(MA)를 들 수 있다.

이중, CA는 그람음성균에는 강한 항균활성을 나타내 지만, 그람양성균에는 다소 약하다. 그리고 MA는 그람- 음성균 및 그람-양성균 모두에 대하여 다소 약하지만 broad spectrum을 나타내며, ME은 그람-음성균 및 그 램-양성균 모두에 대하여 매우 강한 항균활성을 나타내 지만 진핵세포(예: 적혈구 용혈활성)에 대하여 세포독성 을 나타내는 것으로 알려져 있다.

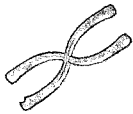
이상의 항균 펩타이드에 관한 연구를 바탕으로 본 연 구실에서는 Cecropin (CA)의 N말단 양쪽친매성을 지 닌부분과 Magainin-2 (MA)의 N-말단 아미노산 서열 을 접합시킨 hybrid 펩타이드인 CA(1-8)-MA(1-12)[CA- MA] 접합 펩타이드를 설계한 후, 특정부위를 Leucine 과 Lysine으로 치환시킨 유사체를 설계하고 합성하여



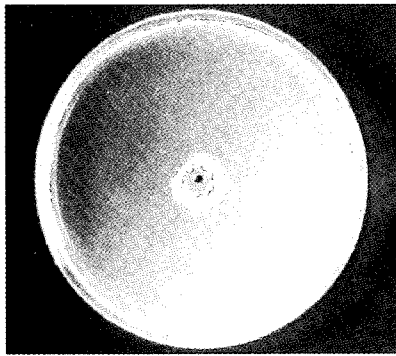
항생 펩타이드의 작용 기작 (A) Electrostatic attraction to anionic microbial surface, (B) passage across the outer membrane, (C) electrostatic attraction to anionic phospholipids in the cytoplasmic membrane, (D) structuring, membrane insertion and accumulation, (E) toroidal pore formation, (F) carpet mechanism for membrane permeabilization, (G) barrel stave pores formation



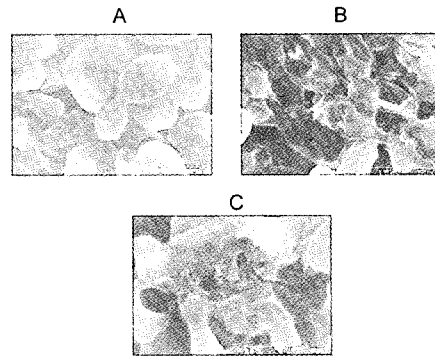
CA(1-8)-MA(1-12)[CA-MA] 접합 펩타이드의 분자 구조 모식도



◆◆ 항균 펩타이드의 구조와 활성에 관한 상관관계 // 박윤경, 함경수



Agar hole assay for antifungal effect of PMAP-23 against *T. rubrum*. PMAP-23 (5μM/10μl) was located at the center of the *T. rubrum* mycelium disk on the 1% PDB agarose plate. The plate was incubated 3 days at 28 °C.



Scanning electron microscopy of (A) untreated *C. albicans*, and after treatment for 4 h at 28°C, (B) with 12.5μM Melittin, (C) 12.5μM PMAP-23 analogue peptide (P6).

적혈구 용혈활성은 갖지 않으며, 천연 펩타이드에 비해 강력한 항균, 항암 및 항진균을 활성을 가진 항균펩타이드를 설계할 수 있었다 [15].

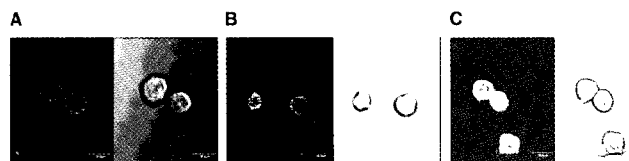
PMAP-23(porcine myeloid antimicrobial peptide-23) 펩타이드는 porcine myeloid mRNA의 cDNA로부터 분리된 cathelicidin family에 속하는 항균 펩타이드로서 이 펩타이드는 153개의 아미노산 잔기로 이루어진 prepropeptide의 C-말단에 23개의 아미노산으로 이루어져 있는 antimicrobial domain으로서 포함되어 있다 [16].

PMAP-23은 7개의 염기성 아미노산과 11개의 소수성 아미노산들을 포함하고 있다. 이 펩타이드는 항진균 활성을 갖는 펩타이드로 알려졌으며, 23개의 아미노산에 트립토판 등을 이용하여 소수성을 증가시켜 유사체 펩타이드를 설계하는 방법을 사용하며 사람에서 병원성을 일으키는 *C. albicans*, *T. beigeli*, *T. rubrum* 등에서 소수성을 증가시킨 유사체 펩타이드 P6의 경우 항진균 활성이 매우 증가 하는 결과를 얻을 수 있다 [17].

세균인 *S. pneumoniae* 유래의 Pep27 펩타이드는 낮은 항균활성을 나타내며 항진균활성은 거의 나타나지 않는 특징을 갖는다. 그러나 이 27개의 아미노산으로 구성된 펩타이드에 소수성 부위를 증가시키기 위해 트립토판을 이용하여 유사체 펩타이드를 설계하면 그 결과

는 바뀌게 된다. 즉. 약간의 항균활성이 나타나고 백혈병 세포주 (AML-2) 및 위암세포주(SNU 601)를 사용하여 항암활성을 측정하면, <sup>2</sup>Arginine, <sup>4</sup>Glutamic acid, <sup>11</sup>Serine, <sup>13</sup>Glutamine을 Tryptophan (W) 잔기로 치환한 유사체 펩타이드의 경우 강력한 항암활성을 나타내게 된다. 그리고 이러한 항생작용의 정확한 부위를 찾는 방법으로 DNA, RNA, protein의 합성효율 실험과 암세포에서 FACScan 분석을 이용한 apoptosis의 determination과 세포막의 integrity를 측정할 수 있고, 암세포를 이용한 Confocal Microscopy를 수행하여 암세포에서 펩타이드가 작용할 때 전형적인 apoptosis의 형태를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다.

사람의 위점막에서 생존하는 것으로 알려진 *Helicobacter pylori*로부터 HP (2-20) 펩타이드가 1999년 Boman에 의해 분리되었고 [18], 이 펩타이드는 강력한 항균활성은 아니지만, 넓은 범위의 항균 활성을 갖



Confocal microscopy of Jurkat cells after the treatment with FITC-labeled PA2 as a function of times. A: 30 min, B: 60 min, C: 120 min





## ◆ 총 설



는 것으로 알려져 있다. 하지만, 19개의 아미노산으로 구성된 이 항균 펩타이드를 위에서 언급한 방법과 마찬가지로 트립토판을 이용한 소수성 증가 방법과 serine을 이용하여 소수성 부위를 감소시키는 방법으로 유사체 펩타이드를 설계하고 항균, 항진균 활성을 측정하면 소수성 부위를 가장 많이 증가시킨 유사체 펩타이드(Anal 3)가 HP (2-20) 보다 항균활성이 10배 이상 증가되며 곰팡이에서는 4배 정도 활성이 증가되는 것을 확인할 수 있다. 반대로 소수성 부위를 감소시키면 항생활성은 원래의 HP (2-20)보다 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있을 것이다. 또 펩타이드의 살균속도를 배양 시간에 따라 측정해보면, 소수성 부위를 가장 많이 증가시킨 Anal 3가 강력한 항균 펩타이드로 알려진 Melittin과 유사한 살균 속도를 나타낸다는 것을 확인할 수 있다 [19].

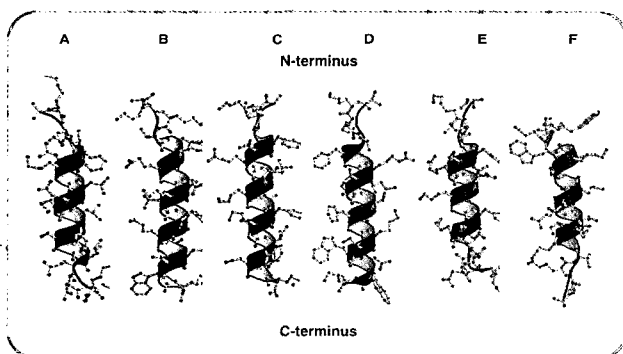
따라서 본 연구실에서는 현재 다음과 같은 실험들을 통해서 펩타이드공학 연구실의 목표인 고부가가치 유용 펩타이드의 개발에 주력하고 있다.

첫째, 펩타이드의 분리, 정제 및 합성방법으로써, 항균 활성을 보유하는 천연형 항균 펩타이드를 탐색하고 분리, 정제하기 위하여 FPLC(Fast Protein Liquid Chromatography) 및 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 신규 항생 펩타이드를 분리하고 있다. 또한 항균 펩타이드의 합성은 Fmoc-chemistry를 이용한 고상법(solid phase method)으로

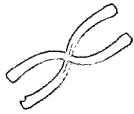
시행하며, 정제형 C18 column을 이용한 revesed-phase HPLC에 의하여 분리 정제한다. 정제 펩타이드들의 아미노산 조성 및 정량은 펩타이드를 산 가수분해 한 후 아미노산 분석에 의하여 확인하며, 합성 펩타이드의 분자량 확인은 Mass Spectroscopy에 의하여 확인한다.

둘째, 항생 활성 측정을 위해 본 연구실에서 보유하고 있는 각종 박테리아(그램 양성균 및 음성균)와 병원성 진균의 생육을 완전히 억제시키는 최소한의 농도(MIC)를 정하며, 항바이러스 활성측정은 Vaccinia virus에 HIV의 감염에 있어 중요한 역할을 하는 envelope protein인 gp 120, 41을 encode하는 gene을 도입한 vPE 16을 사용하며, fusion을 일으키는 상대 세포로는 CD4 receptor를 encode하는 gene을 발현시킨 변이세포 HeLa/CD4+ cell, 즉 HeLa S3 cell 표면에 CD4 receptor를 발현시킨 mutant cell을 사용한다. 실제로 바이러스의 표면에 gp 120, 41을 발현하고 있는 vPE 16과 CD4 receptor를 발현하고 있는 HeLa/CD4+ cell를 co-culture하게 되면 cell fusion 후 거핵 다세포(multinucleated cell), syncytia의 형성이 관찰되며, cell based assay(HIV-1과 Molt cell을 이용한 CPE-MTT assay)를 실시함으로써 효율적인 cell fusion inhibitor에 대한 탐색이 가능해진다. 그리고 항암 효능과 내성 억제 효능을 가진 펩타이드를 선별할 수 있는 검색계를 확립하기 위해서 급성 골수성 백혈병세포 AML-2/WT와 내성세포주 AML-2/D100, AML-2/DX100 그리고 위암 세포주 SNU-638, SNU-668을 대상으로 여러 펩타이드에 대한 세포독성을 각각 측정하고 있다. 그리고 항생 활성을 갖는 펩타이드의 적혈구(human erythrocytes) 세포에 대한 독성을 시험하기 위하여 용혈활성을 측정하고 있으며, 세포 독성이 일어나지 않는 펩타이드만을 선별하고 있다.

셋째, 구조결정 및 활성 기작 연구를 위해 CD spectroscopy에 의하여 생체막을 mimic하는 조건하에서 인산염 완충액, TFE 또는 SDS를 포함한 용매에서 펩타이드의 2차 구조를 밝히고 있으며, 3차 구조는 주



Ribbon diagram of the lowest energy structure of (A) HP(2-20), (B-F) analogue1 analogue5 peptides in 150mM SDS micelle at 318K.



로 NMR을 이용하고 있다. 그리고 활성 펩타이드의 작은 인지질막 파괴능을 측정하여 연구하고 있다. 즉, 세포의 모델막을 Phosphatidyl choline(PC) 및 phosphatidyl choline (PC)/ phosphatidyl serine(PS) (3:1)로 large unilamellar vesicles(LUVs)로 reverse phase ether evaporation method에 의해 제조하고, 제조된 인지질막에 펩타이드를 처리 후 인지질막이 깨져 막내부의 형광성 물질이 방출되는 정도로 인지질막 파괴능 활성을 측정한다. 그리고 생체내 세포막의 유동성 변화(membrane dynamics)를 보기 위해 형광물질인 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)을 이용하여 Fluorescence Spectrophotometer에서 펩타이드에 의한 세포막 유동성을 측정하여 항균 펩타이드가 어떠한 기작에 의해 활성을 나타내는지를 확인하고 있으며, 그 외 방법으로 펩타이드 처리 후 세포막의 보존상태를 알아보기 위해 FACScan(Fluorescence Activated Cell Scanning and Sorting) analysis, SEM(Scanning Electron Microscopy) 그리고 CLSM(Confocal Laser Scanning Microscopy)을 이용하여 항균 기작을 밝히고 있다.

이러한 기존의 항균 펩타이드를 이용한 소수성 영역의 증가 및 감소 또는 positive charge의 증가 등으로 항생펩타이드를 설계할 수 있으며, 펩타이드성 항생제, 항균제, 항암제 개발에 직접 이용할 수 있다. 그리고 항균 펩타이드와 지질과의 상호작용 및 구조-항생활성 상관관계 연구로부터 기존에 알려진 항균펩타이드의 항생활성을 증진시키며, 세포독성이 없는 약물을 제조할 수 있을 것이다. 이렇게 하여 개발된 펩타이드 항생제는 화학적 항생제를 대체할 수 있는 물론이고 항생제 내성을 지닌 세균들에 대해서도 응용 가능할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Gibson B.W., L. Poulter, D.H. Williams, and J.E. Maggio. 1986. Novel peptide fragments originating from PGLa and the caerulein and xenopsin precursors from *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 261, 5341-5349.
- Lubke K., S. Matthes, and G. Kloss. 1971. Isolation and structure of N 1 -formyl melittin. *Experientia* 27, 765-767.
- Wiesenfeld H.C., R.P. Heine, M.A. Krohn, S.L. Hillier, A.A. Amortegui, M. Nicolazzo, and R.L. Sweet. 2002. Association between elevated neutrophil defensin levels and endometritis. *J. Infect. Dis.* 186, 792-797.
- Munks R.J., J.V. Hamilton, S.M. Lehane, and M.J. Lehane. 2001. Regulation of midgut defensin production in the blood-sucking insect *Stomoxys calcitrans*. *Insect. Mol. Biol.* 10, 561-571.
- Broekaert W.F., F.R. Terras, B.P. Cammue, and R.W. Osborn. 1995. Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* 108, 1353-1358.
- Murdoch C.A. and K.R. Matthews. 2002. Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA. *J. Appl. Microbiol.* 93, 850-856.
- 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.
- Mor A. and P. Nicolas. 1994. Isolation and structure of novel defensive peptides from frog skin. *Eur. J. Biochem.* 219, 145-154.
- Khush R.S., F. Leulier, and B. Lemaitre. 2001. Drosophila immunity: two paths to NF-kappaB. *Trends Immunol.* 22, 260-264.
- Bessalle R., A. Gorea, I. Shalit, J.W. Metzger, C. Dass, D.M. Desiderio, and M. Fridkin. 1993. Structure-function studies of amphiphilic antibacterial peptides. *J. Med. Chem.* 36, 1203-1209.
- Wade D., A. Boman, B. Wahlin, C.M. Drain, D. Andreu, H.G. Boman, R.B. Merrifield. 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4761-4765.
- Hancock R.E., V.J. Raffle, and T.I. Nicas. 1981. Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19, 777-785.
- Gazit E., I.R. Miller, P.C. Biggin, M.S. Sansom, and Y. Shai. 1996. Structure and orientation of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 within phospholipid membranes. *J. Mol. Biol.* 258, 860-870.
- Friedrich C.L., D. Moyles, T.J. Beveridge, and R.E. Hancock. 2000. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 2086-2092.
- Park Y., D.G. Lee, P.I. Kim, E.-R. Woo, G.W. Cheong, C.-H. Choi, and K.-S. Hahm. 2003. A Leu-Lys-rich antimicrobial peptide: activity and mechanism. *Biochimica Biophysica Acta.* 1645, 172-182.
- Lee D.G., D.-H. Kim, Y. Park, H.-K. Kim, H.N. Kim, Y.K. Shin, C.-H. Choi, and K.-S. Hahm. 2001. Fungicidal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine Myeloid against *Candida albicans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 570-574.
- Lee D.G., P.I. Kim, Y. Park, E.-R. Woo, J.S. Choi, C.-H. Choi, and K.-S. Hahm. 2002. Design of novel analogues with potent fungicidal

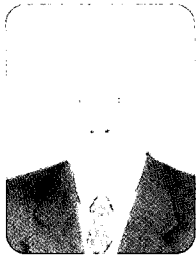


activity based on the antimicrobial peptide, PMAP-23 isolated from porcine myeloid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 231-238.

Putsep K., S. Normarks, and H.G. Boman. 1999. The origin of cecropins; implications from synthetic peptides derived from ribosomal protein L1. *FEBS Lett.* 1999, 451:249-252

Lee D.G., H.N. Kim, Y. Park, H.K. Kim, B.H. Choi, C.-H. Choi, and K.-S. Hahm. 2002. Design of novel analogue peptides with potent antibiotic activity without hemolytic activity based on the antimicrobial peptide derived from N-terminal sequence of *Helicobacter pylori* Ribosomal Protein L1. *Biochim. Biophys. Acta* 1598, 185-194.

## 약 력



### 함 경 수

- 1969 연세대학교 화학과 졸업
- 1979 미국 듀켄대 생화학 박사
- 1981-1982 미국 워싱턴 의대 예방의학교실 전임강사
- 1983-1986 연세대학교 의대 생화학교실 조교수
- 1986-1999 한국생명공학연구원 책임연구원, 실장, 그룹장, 선임연구부장
- 1998-1999 한국과학기술기획평가원 전문위원
- 2000-현재 조선대학교 의과대학 석좌교수, 단백질소재연구센터 소장
- 2004 한국생화학분자생물학회 회장
- 2005-현재 한국펩타이드학회 회장
- 2005-현재 국제생화학분자생물학연맹 (FAOBMB) 회장