Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal 27: 9-15 (2012)

총설

새로운 천연 항생물질로서의 항균 펩타이드

차연경[1], 김영수[2], 최유성[3]*

Antimicrobial Peptides as Natural Antibiotic Materials

Yeon Kyung Cha[1], Young Soo Kim[2], and Yoo Seong Choi[3]*

접수: 2012년 2월 6일 / 게재승인: 2012년 2월 25일
© 2012 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Antimicrobial peptides are widely used in various organisms as a defense system against infection. The peptides are lethal towards bacteria and fungi, however have minimal toxicity in mammalian and plant cells. In this aspect, it is considered that antimicrobial peptides are new alternative materials for defensing against microbial infection. Here, we describe overall characteristics of antimicrobial peptides based on the mechanism of action, classification of the peptides, report detection/screening methods and chemical/biological production. It is expected that understanding of innate immune system based on antimicrobial peptides tends to develop novel natural antimicrobial agents, which might be applied for defensing pathogenic microorganisms resistant to conventional antibiotics.

Keywords: Antimicrobial Peptide, Screening, Production

1. 서론

지구에 살고 있는 대부분의 생명체들은 외부 미생물로부터의 침입을 막고, 이를 방지하기 위하여 항균 펩타이드들을 만들고 이를 분비하는 것으로 알려져 있다. 이는 고등생물에 있어서 병원균에 의한 면역반응이 일어나기 전에 일차적으로 여러 형태의 박테리아로부터의 침입을 막아주는 역할을 하는 것으로, 생명체들은 일차적으로 다양한 항균 펩타이드(antimicrobial peptide)들을 생산할 것으로 판단된다. 특히, 최근 기존 항생제들의 과도한 남용과 새로운 형태의 항생제 개발이 상대적으로 저조하여 항생제 내성균의 출현이 빠르게 증가하고 있고, 이에 대한 대안으로, 자연계에 존재하는 생명체들의 방어기작 중 하나인, 항균 펩타이드에 대한 관심과 탐색에 많은 관심들을 보이고 있다.

항균 펩타이드는 1962년에 개구리 (*Bombina variegate*)의 표피 분비액에서 처음으로 그 존재성을 발견하였고, 이 후 24개의 아미노산으로 구성된 bombinin이란 항균 펩타이드가 최초로 분리되었다 [1,2]. 그 이후 1971년 벌의 독소 (bee venom)로부터 melittin이란 펩타이드가 정제되는 등 여러 생물들로부터 다양한 항균 펩타이드들을 분리하기 시작하였고, 이후 많은 특성 및 기능에 관한 많은 연구가 수행되고 있다 [3]. 그러나 이제까지 발견된 많은 항균 펩타이드들에 대한 연구들을 보았을 때 구조나 활성의 측면에서 일반적 경향성을 가지고 있기는 하지만 아미노산의 서열상에서는 거의 유사성을 보이지 않고 있다. 이는 각각의 생물체가 자신이 살고 있는 환경에 적합하도록 자신의 펩타이드 구조 및 서열을 각기 다르게 진화시켜왔기 때문이라고 생각된다. 이러한 측면에서, 본 논문에서는 전반적인 항균 펩타이드의 특성을 설명하고, 새로운 항균 펩타이드의 탐색과 생산에 관하여 주로 기술하려 한다.

[1]포항제철고등학교
[1]Pocheol High School, Pohang 790-834, Korea

[2]삼성석유화학(주) 중앙연구소
[2]Samsung Petrochemical R&D Center, Yongin 446-712, Korea

[3]충남대학교 화학공학과
[3]Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejon 305-764, Korea
Tel: +82-42-821-5682, Fax: +82-42-821-8995
e-mail: biochoi@cnu.ac.kr

2. 항균 펩타이드의 특성

2.1 특징 및 작용 메커니즘

지금까지 밝혀진 이들 항균 펩타이드들의 공통적인 특징으로

일반적으로 대략 20개 내외의 아미노산으로 구성되어 있으며, 이들 아미노산 중 9-10개의 아미노산이 양전하를 띠는 아미노산인 리신 (Lysine), 아르기닌 (Arginine), 히스티딘 (Histidine) 등으로 구성되어 있다. 이들 항균 펩타이드들이 이런 양전하의 아미노산을 다량 포함하고 있는 것은 이 아미노산들이 이들의 활성에 직접적으로 영향을 주기 때문이다. 즉, 항균 펩타이드의 작용기작에서 이들 양전하를 띤 아미노산이 음전하를 띤 박테리아 세포막과 상호작용 시 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 또한 항균 펩타이드는, 양전하를 띤 부분뿐만 아니라 소수성 부분이 역시 공존하는 양쪽성의 성질을 띠고 있는데, 이 역시 이들의 작용 메커니즘에 관여하기 때문이다. 지금까지 항균 펩타이드의 작용기작 가설 중 가장 타당성 있게 제시되고 있는 것은 Shai-Matsuzaki-Huang (SMH) 모델로, 일단 발현된 펩타이드는 소수성과 친수성의 부분으로 적당한 구조를 이루게 되고 양전하를 띤 친수성 부분이 음전하를 띤 박테리아의 세포막과 결합하게 된다 [4-7]. (이때 펩타이드와 세포막의 결합력은 일반 Ca^{2+}, Mg^{2+}등에 비해 약 2-3배 더 강한 것으로 알려져 있다.) 그런 후 세포막과 결합된 펩타이드의 소수성 부분이 세포막 인지질 (phospholipid)의소수성 부분과 상호작용하며, 구멍 (wormhole)을 형성하게 되어 세포막의 투과도를 변화시키게 되고 결국 세포를 파쇄하게 된다고 보고되고 있다 (Fig. 1).

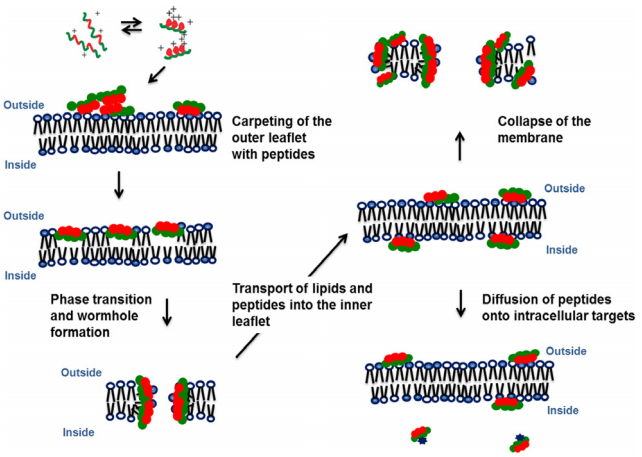

Fig. 1. The Shai-Matsuzaki-Huang model of the mechanism of action of an antimicrobial peptide [3].

그런데 항균 펩타이드의 활성이 진핵세포 (eukaryote)가 아닌 원핵세포 (prokaryote)에서 나타나는 이유는 이들의 세포막 구성성분의 차이 때문이다. 즉 진핵세포의 경우 원핵세포와는 달리 세포 이중막 중 외부와 맞닿은 표면 막의 알짜전하 (net charge)가 거의 0에 가까워 음전하를 띤 항균 펩타이드와 상호작용하는 힘이 약하다. 또한 진핵세포에 존재하는 콜레스테롤이 인지질 (phospholipid) 간의 유동성을 줄여주어 항균 펩타이드가 삽입되는 것을 약화시킴으로써 이들의 활성을 저해한다 (Fig. 2).

한편, 항균 펩타이드는 미생물 즉 Gram 양성균 및 음성균으로부터 또한 발견되고 있다. 이들 미생물 유래의 항균 펩타이드는 bacteriocins이라 불리워지며, 통상 항균 펩타이드가 분비된 미생물 자체에는 해를 미치지 않고 근연관계에 있는 미생물을 죽이거나 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다 [8]. 예를 들어, Gram 음성균의 대표적인 bacteriocins으로 colicins, microcins 등이 보고되고 있고, Gram 음성균 보다 더욱 다양하게 분포하며 주로 젖산균에서 생산되는 Gram 양성균의 bacteriocins은 lantibiotics로 대표되는 항균 펩타이드들로부터 여러 형태로 존재하여 활용되고 있다. 이들은 세포막 투과, 핵산 분해, 단백질 합성 저해 등 다양한 메커니즘에 의해 다른 세균들을 죽이는 것으로 알려져 있으며, 대체적으로는 표적세포의 막을 투과함으로써 작용한다고 알려져 있다 [8-10].

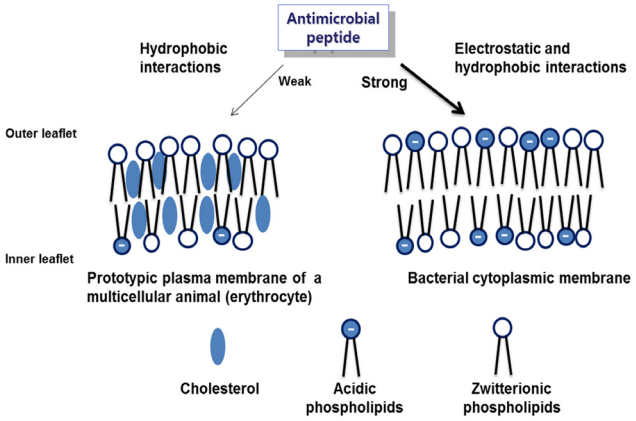

Fig. 2. The activity difference of antimicrobial peptides in the membranes of microbes and multicellular animals [3].

2.2. 항생물질로서 항균펩타이드의 장단점

기존의 항생제가 세포막 구성성분의 합성이나 세포의 활성을 화학적으로 저해하는 반면 항균 펩타이드는 SMH 모델에서 제시되었듯이 화학적인 방법이 아니라 물리적인 방법으로 세포막의 파쇄를 유도한다는 차이를 지닌다는 큰 차이점이 있다. 따라서, 기존의 항생제에 대하여, 세포는 자체의 화학적 활성 내지는 화학적 구조를 변화시킴으로써 항생제에 내성이 생기도록 하는 반면, 항균 펩타이드의 경우 이와 같은 장점으로 인해 기존의 내성균주에 대하여 강한 활성을 가지며, 또한 항생제 남용에 의한 내성균의 발생 측면에서도 안전한 것으로 여겨지고 있다. 또한 박테이아 뿐만 아니라 진균류에 대한 항균 기능도 있고, 무엇보다 가장 큰 장점은 펩타이드로 구성되어 이의 서열분석을 통한 유전공학적 대량생산이 가능하고 실제 그러한 연구들이 수행 중에 있다 [11,12]. 그러나 일반적으로 발견되는 항균 펩타이드는 최소발육억제농도 (Minimal Inhibition Concentration (MIC)) 값이 높다 (즉, 활성이 낮다)는 단점이 있으므로 발견된 것들 중 활성 정도가 높은 것을 선별하는 것이 매우 중요하다. 또한 단백질 분해효소에 의한 분해 역시 활성 테스트에 중요한 요소로 작용하기 때문에, 최근에는 생체에서 쓰이는 L-형 아미노산이 아닌 D-형의 아미노산 또는 비천연 아미노산으로 대체하는 등의 연구가 수행되고 있다. 하지만, D-형 또는 비천연 아미노산을 사용할 경우 단백질 분해효소에 의한 분해는 줄어들지만 일부 구조상의 변화를 동반하게 되어 그 자체의

Table 1. Representative antimicrobial peptides [11]

분류	Peptide 명칭	크 기	특 징	발견된 생물체	항균 활성도	참고문헌
Cysteine이 없는 α-helical 항균 펩타이드	Magainin	~2.5 kDa, 23개의 아미노산으로 구성	Lys rich	개구리의 표피	Gram 양성 및 음성균. fungi, 기생충	[28]
	Cecropins	~4 kDa, 30~45개의 아미노산으로 구성	Lys rich, C-말단이 amidation	곤충의 혈액	Gram 양성 및 음성균	[29]
	Cecropin P1	상 동	C-말단이 amidation	돼지의 소장 Paneth cells	Gram 음성균	[30]
	Buforin	39개의 아미노산으로 구성	Histone Ⅱa의 C-terminal 부위와 유사	황소개구리의 stomach	Gram 양성 및 음성균, 진균력	[31]
Cysteine residue가 없고 특정 아미노산들의 함량이 높은 항균 펩타이드	Bac5, Bac7	43 or 59개의 아미노산으로 구성	PRP, PP motif 지님	소의 neutrophils	Gram 양성 및 음성균	[32]
	PR39	39개의 아미노산으로 구성	PRP, PP motif 지님	돼지의 소장	Gram 양성 및 음성균	[33]
	Indolicidin	13개의 아미노산	5개의 trp residues를 포함	소의 neutrophils	Gram 양성 및 음성균	[34]
하나의 disulfide bond를 포함하는 항균 펩타이드	Dodecapeptide	12개의 아미노산	disulfide bond에 의해 중앙에 9개의 residues로 이루어진 loop가 존재	소의 neutrophils	Gram 양성 및 음성균,	[35]
	Brevinins	20-34개의 아미노산으로 구성	C-terminal 부위에 7개의 residues로 이루어진 loop가 존재	개구리	Gram 양성 및 음성균	[36]
	Ranalexin	20개의 아미노산으로 구성	상 동	상 동	Gram 양성 및 음성균	[37]
두 개 이상의 disulfide bond를 지는 β-sheet 구조의 항균 펩타이드	Defensins	29~45개의 아미노산, 분자량: ~4kDa	arg-rich, salt or ion sensitive activity	사람, 토끼의 neutrophils	Gram 양성 및 음성균, fungi	[38]
	β-defensin	38~42개의 아미노산으로 구성	4~8개의 arg을 포함	bovine leukocytes	상 동	[39]
	Protegrin	16~18개의 아미노산으로 구성	두 개의 S-S bonds	porcine leukocytes	Gram 양성 및 음성균, fungi, 강한 세포독성	[40]

활성을 저하시키므로 앞으로 이에 대한 해결방안 연구도 중요하다 할 수 있겠다 [13].

2.3. 항균 펩타이드 분류 및 현황

항균 펩타이드는 곤충 및 동물의 생체방어기전 선천적 면역과정을 연구하던 중에 발견되어, 초기에는 발견된 생명체에 근거하여 분류가 이루어 졌다. 하지만, 이후 미생물 유래의 항균 펩타이드를 포함하여 곤충, 식물, 동물에서 500여 개 이상의 항균 펩타이드가 자연에서 발견되면서, 현재 항균 펩타이드는 아미노산 조성의 특이적 분포와 2차 구조를 바탕으로 분류하고 있다 [14]. 첫째, 시스테인 (Cysteine)이 없는 α-나선형 (α-helical) 항균 펩타이드는, 1980년에 최초로 거인 누에나방의 혈림프에서 발견된 세크로핀 (cecropin) 이후, 여러 형태의 세크로핀 (cecropin)들이 다양한 곤충들에서 분리되었거나 cDNA가 클로닝되어 왔으며, 1989년에는 돼지의 소장 상피세포에서도 발견된 바 있다 [15,16]. 세크로핀 (cecropin)의 구조는 강한 염기성의 나선형 N-말단 부위와 소수성의 나선형 C-말단 부위로 되어 있고, 이 두 부위는 프롤린 (proline)이나 글리신 (glycine)으로 구성된 연결부위 (hinge region)에 의해 연결되어 있다. 대개 C-말단 아미노산은 아미드화 (amidation)되어 있으며, N-말단의 첫 번째나 두 번째의 아미노산은 트립토판 (tryptophane)으로 되어있는 것이 특징이다. 세크로핀 (cecropin) 이외에도 많은 종류의 α-나선형 항균 펩타이드가 다양한 생물체들로부터 발견되어 왔다 [17]. 둘째, 시스테인 (Cysteine)이 없고 특정 아미노산의 함량이 높은 선형 항균 펩타이드로 분류되며, 이들은 프롤린 (proline), 아르기닌 (arginine), 글리신 (glycine), 등의 아미노산이 다른 잔기들에 비해 특히 많이 포함하고 있다. 셋째, 하나의 이황화결합 (disulfide bond)을 포함하는 항균 펩타이드는, 주로 개구리의 표피에서 발견된 것들로써 C-말단 부위에서 이황화결합에 의해 7개의 아미노산으로 이루어진 루프 구조를 지닌 것이 하나의 특징이다. 항균활성 분포가 매우 광범위하다. 넷째, 두 개 이상의 이황화결합을 지닌 β-병풍 구조의 항균 펩타이드는, 주로 식세포 (phagocytes)의 granule에서 발견되어 왔다. 대표적인 펩타이드로는 디펜신 (defensing)이 있는데 이들은 토끼, 쥐, 사람의 백혈구에서 발견되었다. 디펜신 (defensing)은 사람의 백혈구의 경우에는 전체 단백질의 5-7%를 차지할 만큼 풍부하며, 아르기닌 (arginine)이 풍부한 펩타이드이다. 펩타이드 내부의 이황화결합에 의해 형성된 분자내의 링 구조에 아르기닌 (arginine) 같은 염기성 아미노산이 존재하는데 이런 링 구조의 양 전하가 펩타이드의 항균활성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 대표적인 주요 항균 펩타이드를 Table 1에 정리하였다 [14].

3. 항균 펩타이드의 탐색 및 생산

3.1 항균 펩타이드의 탐색

항균 펩타이드를 항생제로 생산하는데 있어서 가장 먼저 수행되어야 할 과정은 새로운 항균 펩타이드를 탐색하고 분리해내야 하는 것이다. 일반적으로 산 추출 방법을 사용하는데, 이는 원심분리를 통하여 얻은 침전물로써 세포를 얻은 후, 초음파로 세포를 파쇄하고 5%의 아세트산에서 장시간 처리하여 최종적으로 산 추출물을 얻어 이를 acid urea-(AU)-PAGE 전기영동을 수행하여 펩타이드들을 분리해 낸다 (이때 산 추출은 보통 양전하를 띄는 단백질을 얻을 때 사용되는 방법이다). AU-PAGE로 펩타이드를 분리한 젤은 잘 세척한 후 미생물을 깔아놓은 세포 배양용 플레이트에 겹쳐 하루 정도 키움으로써 어느 부위에 해당하는 펩타이드가 항균력을 지닌 펩타이드인지를 찾아낼 수 있고, 이 펩타이드를 역상 액체크로마토그래피 (reverse phase-high performance liquid chromatography)를 통하여 정제한 후, 아미노산 분석을 통하여 최종적으로 그 서열을 밝혀내게 된다.

한편, 일반적으로 발견되는 항균 펩타이드들의 항균력은 기존의 항생제와 비교하였을 때 상대적으로 낮은 활성을 지니고 있다. 따라서 새롭게 발견된 항균 펩타이드라 할 지라도 그 활성 정도를 측정하여 선별하는 과정이 필수적이다. 이에 항생제의 활성을 측정하기 위하여 다음과 같은 여러 방법이 사용되고 있다.

① Disc diffusion method: 이 방법은 대상 미생물을 깔아놓은 세포 배양용 플레이트에 일정 면적에 일정량의 샘플을 떨어뜨려 키운 후 플라크 (plaque)의 지름을 측정하여 그 활성도 정도를 측정하는 방법으로, 병원과 같은 곳에서 일상적으로 가장 많이 사용하고 가장 간편한 방법 중 하나이다 [18].

② Agar dilution method: 항생제의 활성을 나타내는 지표로는 최소발육억제농도 (MIC)가 널리 사용되는데, 이는 세포성장을 저해하는데 필요한 최소한의 항생제 농도로서 이 값이 낮을수록 높은 활성을 지닌 것을 의미하고, 이 값은 같은 항생제라 할 지라도 각 균주에 따라 그 값이 다르다. 이 방법은 항생제의 활성을 MIC로 정확히 수치화하여 나타내는 방법으로 일정 세포농도에 다른 농도의 항생제를 첨가한 후 세포 배양용 플레이트에 깔고 키워 그 콜로니 (colony) 수를 셈으로써 그 개수가 처음으로 감소하는 시점의 농도를 MIC로 나타내게 된다 [19].

③ Colorimetric method: 앞서 언급한 두 방법은 항생제 활성측정 시 가장 많이 쓰이는 방법이지만 미생물을 세포 배양용 플레이트에서 최소한 하루 이상 키워야 하기 때문에 다소 시간소모적인 방법이라는 단점을 가지고 있다. 이에 빠른 시간 내에 단순한 변색 반응으로 항균 활성을 측정하는 방법이 제시되었다. 이 방법에 사용되는 물질은 인지질 (phospholipid)에 PDA (polymerized Poly DiAcetylene)가 결합된 것으로, 이것이 담긴 용액상에 항균 펩타이드를 첨가하였을 경우 항균 활성이 없을 때의 파란색에서, 그 활성 정도에 따라 점차 붉은 색으로 변하게 된다 [20,21]. 이 반응은 항균 펩타이드가 인지질 (phospholipid)과 결합된 PDA의 구조를 화학적으로 변화시킴으로써 그 구조변화에 따른 파장의 변화로 인하여 진행되고, 나타나게 된다.

④ Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) method: 수많은 항균 펩타이드 후보물질로부터, 단시간에 효율적으로 고활성의 항균 펩타이드를 스크리닝하는 방법의 일환으로, FRET의 효율과 항균 펩타이드의 항균성을 연계하여 수많은 항균 펩타이드의 활성을 빠르게 측정하는 방법이다 [22]. 구체적으로 항균 펩타이드의 항균활성에 의해 세포가 파쇄될 경우, 세포 내부와 외부에서 나타나는 pH 변화를 FRET 효율로서 측정할 수 있도록 하였으며, 이를 위하여 FRET이 가능한 서로 다른 형광단백질을 융합단백질로 제작하여 세포 내부에서 발현시키고, 항균 펩타이드에 의해 세포가 파쇄됨에 따라 세포 외부로 유출된 형광 융합단백질의 발광특성이 FRET 효율로 나타나게 하였다. 전반적인 시스템은 Fig. 3에 나타내었다.

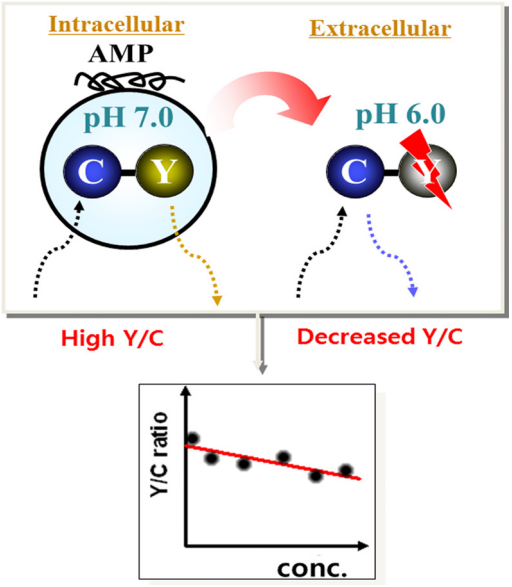

Fig. 3. FRET-based activity assay of antimicrobial peptides [22].

3.2. 항균 펩타이드의 생산

3.2.1. 화학적 합성

펩타이드의 경우 다량의 아미노산이 펩티드 결합에 의해 연결된 단백질과는 달리, 아미노산의 수가 적어 유기화학적인 합성을 통하여 생산할 수 있는데, 일반적으로 현재 상용되어 시중에서 판매되고 있는 항균 펩타이드의 경우 거의 대부분이 이러한 화학적 합성을 통하여 생산하고 있다 [23,24]. 대표적으로, Fmoc과 같은 보호기를 이용한 펩타이드 유기합성법을 이용하여 고체상에서 합성하는 장치가 일반적으로 사용되고 있으며, 반응을 연속적으로 수행하여 합성하고자 하는 펩타이드를 C-말단부터 N-말단의 순서로 합성한다. 그리고, 합성이 끝난 펩타이드는 trifluoroacetic acid (TFA)를 이용하여 고체 레진에서 떼어내고 ethyl ether와 같은 물질로 침전시킨 후, 농축, 동결건조의 과정을 거쳐 냉동 건조한다. 항균 펩타이드는 보통 의약품으로 사용되는 것을 목적

으로 하여 FDA의 까다로운 승인 절차를 통과해야 하기 때문에 분리정제 과정이 매우 중요하다. 따라서 합성된 다소 정제 순도가 낮은 펩타이드는 필요에 따라 크로마토그래피 (Preparative Chromatography) 법으로 더욱 분리시켜 순수 정제 할 수 있으므로 화학적 합성법이 많이 쓰인다. 하지만 이러한 장점에도 불구하고 아직 합성량이 1 cycle당 0.02~0.2 mmol 정도로 매우 적으므로 대량생산에 문제가 있어 그에 따른 단가상승으로 인하여 기존의 항생제와 같은 시장 경쟁력을 갖추기는 아직 무리인 것으로 판단된다.

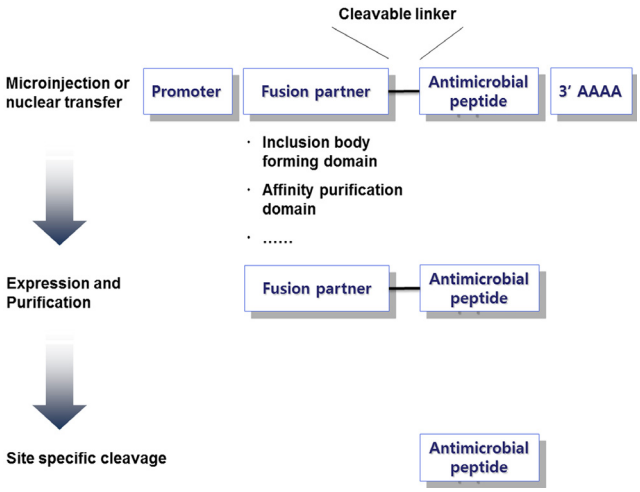

Fig. 4. Production of antimicrobial peptides based on fusion protein strategy.

3.2.2. 유전공학적 생산

① 대장균을 숙주로 한 생산사례: 대장균의 경우 항균 펩타이드가 활성을 띨 수도 있는 미생물의 일종이므로 이를 생산균주로 이용하여 항균 펩타이드를 발현하고자 할 경우, 일반적으로 비수용성의 또 다른 단백질과 융합시킴으로써 세포 내에서 응집체 형태로 발현되도록 유도한다 (Fig. 4). 구체적으로 예를 들면, 중성의 pH에서 불용성으로 발현되는 멍게 (*Halocynthia aurantium*) 유래의 배큘로바이러스 다각체 (polyhedrin)와 항균펩타이드를 융합시켜 생산균주의 성장저해 현상을 방지함과 동시에 발현 후 항균 펩타이드의 분리정제를 용이하게 수행할 수 있다 (Fig. 5) [25]. 특히, 배큘로바이러스 다각체 (polyhedron)는 보통 12개의 단위 다각체 단백질이 모여 결정을 이루고 있고, 대장균 내에서 물리화학적 특성에 따라 수용성 또는 응집체 형태로 발현되며, 응집체 형태의 배큘로바이러스 다각체 (polyhedron) 단백질은 pH 변화에 의하여 수용성 단백질로 변화 시킬 수 있다. 따라서, 이 경우 별도의 계면활성제를 사용하지 않고도 용이하게 항균 펩타이드 융합단백질을 pH 조건 변화에 기반하여 쉽게 분리할 수 있는 특징을 지니고 있다.

② 형질전환 식물을 숙주로 한 생산사례: 앞서 살펴본 대장균을 생산모체로 하여 생산하였을 경우 가장 높은 양의 발현을 유도할 수는 있겠으나 항균 펩타이드가 치료용으로 사용됨을 감안할 때 미생물의 세포벽에 존재하는 lipopolysaccharide (LPS)의 위험성 때문에 분리정제 시 상당한 주의가 필요할 뿐만 아니라, 이에 따른 수득율 감소를 상당히 감수해야 하는 단점이 있다. 따라서 미생물이 아닌 다른 여러 생산모체에서 생산하려는 연구들이 수행되고 있으며, 그 중에서 식물에서 항균 펩타이드를 생산한 연구논문들이 의외로 많을 것을 볼 수 있다. 예를 들면, 양의 myeloid 유래의 항균 펩타이드인 SMAP-29를 intein, chitin-binding domain (CBD)과 융합시켜 이를 식물체인 담배 (*Nicotiana tabacum*)에 감염시키는 방법을 사용하여 생산하였다 [26]. 이때 intein은 단백질의 발현 후 생체 내의 복제 후 수정 (post-translational modification)과정 시 잘려져 나가는, 일명 단백질 splicing이 일어나는 부분으로 dithiothreitol (DTT), hydroxylamine과 같은 특정 화학물질과 함께 처리함으로써 SMAP-29와 CBD을 잘라내기 위한 절단자리로 사용되고 있다. 그리고, CBD는, 재조합 단백질의 정제에 보편적으로 사용되는 His-tag과 마찬가지로, 세포 파쇄 후 추출물로부터 우리가 원하는 융합 단백질을 분리해내기 위한 affinity-tag으로 키틴 (chitin)과 결합력이 높아 키틴 (chitin)을 부착시킨 레진에 통과시킴으로써 이를 분리하는 데 사용된다 (Fig. 4). 하지만, 식물체를 이용할 경우 개체수당 수율이 좋다고 할지라도 식물체를 키워야 하며, 식물세포를 파쇄하는 과정이 일반 동물세포나 미생물과 비교하였을 때 더 많은 단계가 요구된다.

③ 형질전환 동물을 숙주로 한 생산사례: 항균 펩타이드를 CHO 세포와 같은 동물세포에서 배양하는 것이 아닌 형질전환 동물을 통하여 생산하려는 연구들도 수행 되어지고 있다 [3,27]. 대표적인 예로, 영국의 PPL Therapeutics와 같은 회사의 경우 항균 펩타이드를 생산하도록 유전자변형을 시킨 유전체를 핵을 제거한 난소의 난모세포 (oocyte)에주입하여 착상시켜 태어난 동물로부터 이를 발현, 생산하고 있다. 이때 발현된 항균 펩타이드는 유선 (mammal gland)에서 분비되도록 조절하여 형질전환 동물의 젖으로부터 이를 분리해내는 전략으로 생산한다. 이때 역시 항균 펩타이드를 분리, 정제하기 위하여 융합단백질을 위한 짝 (fusion partner) 및 절단을 위한 연결부위 (cleavage linker)를 삽입하였다 (Fig. 4). 형질전환 동물을 사용한 생산 시스템의 장점을 살펴보면, 우선 한번 형질전환 동물을 만들고 나면 이를 사육하여 이들로부터 융합된 항균 펩타이드를 분리해 내므로 세포배양 및 세포파쇄를 통한 추출과정 등이 제거되어 비교적 생산과정에서 저비용으로 생산할 수 있다. 또한 높은 발현율과 더불어 수율도 좋은 것으로 알려져 있다. 게다가 이를 소에서 생산할 경우 소는 개체당 연간 10,000 L에 육박하는 우유를 생산하기 때문에 생산수율에 있어서 상당한 것으로 보고하고 있다. 또한 형질전환 동물을 숙주로 사용할 경우 형질전환 식물과 마찬가지로 복제후 수정 (posttranslational modification)이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 상당히 많은 항균 펩타이드의 경우 발현 후 C-말단 부분에 아미드화 (amidation)가 일어남으로 인하여 그 활성이 배가되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이

모든 면에서 보았을 때 형질전환 동물로부터 항균 펩타이드를 생산하는 과정도 상당히 합리적인 것으로 사료된다.

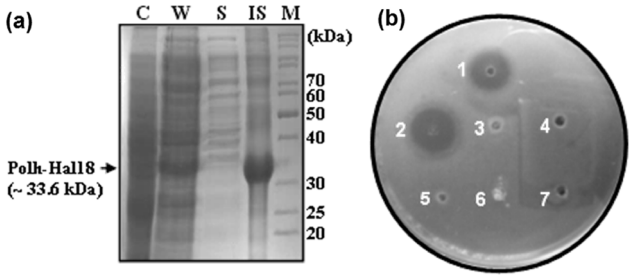

Fig. 5. Expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedron in *Escherichia coli* [25]. (a) The expression of fusion protein of polyhedrin and halocidin subunit (antimicrobial peptide), (b) Antibacterial activity assay of purified recombinant halocidin subunit.

4. 결론

항균 펩타이드는 자연계의 생명체에서 사용되는 방어기작 중 하나로, 이에 대한 연구는 자연계에서 환경친화적으로 일어나는 생명현상을 이해하는 데 기여한다고 판단된다. 또한, 실용적 측면에서 기존의 항생제 내성 문제를 극복할 수 있는 하나의 대안으로, 최근 더욱 삶의 질 향상과 건강을 지향하는 인류의 욕구에 부흥하는 천연 소재로서, 각종 유제품을 비롯한 가공식품의 저장성 증진을 위한 식품보존제, 기존 항생제의 활성을 촉진시켜 주는 보조제, 식품첨가제, 농약, 항균성을 필요로 하는 다양한 소재 등에 이르기까지 다양하게 활용될 수 있다. 최근 스크리닝 기법의 발달로 빠르게 탐색되고 확보된 항균성이 높은 새로운 항균 펩타이드는 향후 항암제, 항바이러스제, 생체기능을 모방한 의료용 소재 개발에도 적용될 가능성이 있다. 특히, 해양생명체의 경우 육상생물과는 달린 해양에 존재하는 수많은 미생물에 직접적으로 노출되어 있어, 해양생명체로부터 지금까지 알려지지 않은 새로운 해양생물 유래의 항균성이 높은 펩타이드를 탐색 및 확보하고자 하는 데 점점 더 많은 관심들을 보이고 있다. 뿐만 아니라, 항균 펩타이드의 화학적 합성뿐만 아니라 유전공학적 대량생산 기술과 분리정제의 기술 개발은 궁극적으로 항균 펩타이드 경제적인 생산과 함께 산업화를 촉진시킬 수 있는 발판이 될 것으로 판단된다.

감사

이 연구는 2011년도 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었으며, 이에 감사드립니다.

References

1. Kiss, G. and H. Michl (1962) On the venomous skin secretion of the orange speckled frog *Bombina variegata*. *Toxicon* 1: 33-39.
2. Csordas, A. and H. Michl (1970) Isolation and structure of a haemolytic polypeptide from the defensive secretion of european *Bombina* species. *Monatsh Chem.* 101: 182-189.
3. Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
4. Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 1-10.
5. Huang, H. W. (2000) Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry* 39: 8347-8352.
6. Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1462: 55-70.
7. Yang, L., T. M. Weiss, R. I. Lehrer, and H. W. Huang (2000) Crystallization of antimicrobial pores in membranes: magainin and protegrin. *Biophys. J.* 79: 2002-2009.
8. Gillor, O., A. Etzion, and M. A. Riley (2008) The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 591-606.
9. Duquesne, S., D. Destoumieux-Garzon, J. Peduzzi, and S. Rebuffat (2007) Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat. Prod. Rep.* 24: 708-734.
10. Nagao, J. I., S. M. Asaduzzaman, Y. Aso, K. Okuda, J. Nakayama, and K. Sonomoto (2006) Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *J. Biosci. Bioeng*. 102: 139-149.
11. Inqham, A. B. and R. J. Moore (2007) Recombinant production of antimicrobial peptides in heterologous microbial systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 47: 1-9.
12. Li, Y. (2011) Recombinant production of antimicrobial peptides in *Escherichia coli*: a review. *Protein Expr. Purif.* 80: 260-267.
13. Fjell, C. D., J. A. Hiss, R. E. Hancock, and G. Schneider (2011) Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11: 37-51.
14. Lee, I. H. (2000) Antimicrobial peptides in innate immnne System. *Biowave* 2: Sub. No. 7.
15. Hultmark, D., A. Engstrom, H. Bennich, R. Kapur, and H. G. Boman (1982) Insect immunity: isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from Cecropia pupae. *Eur. J. Biochem.* 127: 207-217.
16. Lee, J. Y., A. Boman, C. X. Sun, M. Andersson, H. Jornvall, V. Mutt, and H. G. Boman (1989) Antibacterial peptides from pig intestine: isolation of a mammalian cecropin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 9159-9162.
17. Boman, H. G. (1991) Antibacterial peptides: key components needed in immunity. *Cell* 65: 205-207.
18. Bhunia, A. K., M. C. Johnson, and B. Ray (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 261-268.
19. Barefoot, S. F. and T. R. Klaenhammer (1983) Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1808-1815.
20. Kolusheva, S., T. Shahal, and R. Jelinek (2000) Peptide-membrane interactions studied by a new phospholipid/polydiacetylene colorimetric vesicle assay. *Biochemistry* 39: 15851-15859.
21. Kolusheva, S., L. Boyer, and R. Jelinek (2000) A colorimetric assay for rapid screening of antimicrobial peptides. *Nat. Biotechnol.* 18: 225-227.

22. Kim, Y. S. and H. J. Cha (2006) High-throughput and facile assay of antimicrobial peptides using pH-controlled fluorescence resonance energy transfer. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50: 3330-3335.
23. Kent, S. B. (1988) Chemical synthesis of peptides and proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 957-989.
24. Barany, G., N. Kneib-Cordonier, and D. G. Mullen (1987) Solid-phase peptide synthesis: a silver anniversary report. *Int. J. Pept. Protein Res.* 30: 705-739.
25. Wei, Q., Y. S. Kim, J. H. Seo, W. S. Jang, I. H. Lee, and H. J. Cha (2005) Facilitation of expression and purification of an antimicrobial peptide by fusion with baculoviral polyhedrin in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 5038-5043.
26. Morassutti, C., F. De Amicis, B. Skerlavaj, M. Zanetti, and S. Marchetti (2002) Production of a recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Lett.* 519: 141-146.
27. Andreu, D. and L. Rivas (1998) Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415-433.
28. Gesell, J., M. Zasloff, and S. J. Opella (1997) Two-dimensional 1 H NMR experiments show that the 23-residue magainin antibiotic peptide is an alpha-helix in dodecylphosphocholine micelles, sodium dodecylsulfate micelles, and trifluoroethanol/ water solution. *J. Biomol. NMR* 9: 127-135.
29. Holak, T. A., A. Engstrom, P. J. Kraulis, G. Lindeberg, H. Bennich, T. A. Jones, A. M. Gronenborn, and G. M. Clore (1988) The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* 27: 7620-7629.
30. Sipos, D., M. Andersson, and A. Ehrenberg (1992) The structure of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 in solution, determined by proton-NMR. *Eur. J. Biochem.* 209: 163-169.
31. Yi, G. S., C. B. Park, S. C. Kim, and C. Cheong (1996) Solution structure of an antimicrobial peptide buforin II. *FEBS Lett.* 398: 87-90.
32. Scocchi, M., D. Romeo, and M. Zanetti (1994) Molecular cloning of Bac7, a proline- and arginine-rich antimicrobial peptide from bovine neutrophils. *FEBS Lett*. 352: 197-200.
33. Agerberth, B., J. Y. Lee, T. Bergman, M. Carlquist, H. G. Boman, V. Mutt, and H. Jornvall (1991) Amino acid sequence of PR-39. Isolation from pig intestine of a new member of the family of proline-arginine-rich antibacterial peptides. *Eur. J. Biochem.* 202: 849-854.
34. Selsted, M. E., M. J. Novotny, W. L. Morris, Y. Q. Tang, W. Smith, and J. S. Cullor (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* 267: 4292-4295.
35. Romeo, D., B. Skerlavaj, M. Bolognesi, and R. Gennaro (1988) Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J. Biol. Chem.* 263: 9573-9575.
36. Conlon, J. M., T. Halverson, J. Dulka, J. E. Platz, and F. C. Knoop (1999) Peptides with antimicrobial activity of the brevinin-1 family isolated from skin secretions of the southern leopard frog, *Rana sphenocephala*. *J. Pept. Res.* 54: 522-527.
37. Clark, D. P., S. Durell, W. L. Maloy, and M. Zasloff (1994) Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic, polymyxin. *J. Biol. Chem.* 269: 10849-10855.
38. Pardi, A., X. L. Zhang, M. E. Selsted, J. J. Skalicky, and P. F. Yip (1992) NMR studies of defensin antimicrobial peptides. 2. Three-dimensional structures of rabbit NP-2 and human HNP-1. *Biochemistry* 31: 11357-11364.
39. Zimmermann, G. R., P. Legault, M. E. Selsted, and A. Pardi (1995) Solution structure of bovine neutrophil beta-defensin-12: the peptide fold of the beta-defensins is identical to that of the classical defensins. *Biochemistry* 34: 13663-13671.
40. Fahrner, R. L., T. Dieckmann, S. S. Harwig, R. I. Lehrer, D. Eisenberg, and J. Feigon (1996) Solution structure of protegrin-1, a broad-spectrum antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *Chem. Biol.* 3: 543-550.