

곤충의 항세균성 단백질로부터 유도된
합성 Peptide들의 *in vitro* 및
*in vivo*에서의 항진균 작용

이 지 혜

미 생 물 과

곤충의 항세균성 단백질로부터 유도된
합성 Peptide들의 *in vitro* 및
*in vivo*에서의 항진균 작용

미 생 물 과

이 지 혜

**Evaluation of Antifungal Activity of Synthetic
Peptides Derived from Antibacterial
Protein, Tenecin 1**

Division of microbiology

Lee Ji Hye

Abstract

Previously we have reported about tenecin 1, which was isolated from a hemolymph

of coleopteran insect, *Tenebrio molitor* (meal worm) larvae. It was induced into hemolymph by injection of *Escherichia coli*. This protein had 43 amino acid residues and showed specific antibacterial activity against gram-positive bacteria.

To determine the active site of tenecin 1, we have synthesized several fragments of tenecin 1. Carboxy-terminal fragment of tenecin 1 (named TED - YCNGKRVCVCR) showed the same antibacterial activity as tenecin 1. Interestingly, TED peptide showed antifungal activity against *Candida albicans*.

To develop a new antifungal agents, we have synthesized TED analogue peptides. Among them, TEDFK (KFYCNGKRVCVCR) peptide, which contained phenylalanine and lysine residues at the amino-terminal region of TED peptide, showed antifungal activity against *C. albicans*. TEDFK peptide didn't show any antibacterial activity. Several TEDFK analogues had been synthesized and examined their antifungal activity *in vitro* and *in vivo*.

For antifungal activity *in vitro*, we used two kinds of system ; Sabouraud broth for yeast form and 1% FCS-RPMI 1640 for hyphae form. TEDFK and its analogues showed antifungal activity against yeast form and hyphae form of *C. albicans*. But, they didn't show antibacterial activity on gram-positive bacteria, *Staphylococcus aureus* and gram-negative bacteria, *E. coli*. For evaluating the antifungal activity of synthetic peptides *in vivo*, survival of mouse infected by *C. albicans* was examined. TEDFK and retro-TEDFK (synthesized with D-type amino acid) prolonged survival of mouse. TEDFK and its analogues didn't have hemolytic activity on human red blood cells.

I. 서 론

곤충은 외부에서 침입한 세균이나 곰팡이 혹은 상처 등의 외부 자극으로부터 자신을 보호하는데 있어 특이한 방어 기전을 이용한다는 것이 알려져 있는데, 최근

국내의 연구진의 활발한 연구 결과로 많은 부분이 분자 level까지 규명되어지고 있다. 예로서 항균 단백질¹⁻³⁾이나 lectin⁴⁾의 분비, phenoloxidase¹¹⁻¹²⁾의 작용으로 인한 melanin 합성, 외부 단백질성 독소에 대한 proteinase¹³⁻¹⁵⁾의 분비 등이 있다. 그 중 항균 단백질에 관하여는 스웨덴의 Hans G. Boman의 연구를 시초로 많은 연구진들에 의해 여러 곤충에서 분리, 정제되어 그 유전자까지 밝혀져 있다. 현재까지 보고된 곤충의 항균 단백질은 스웨덴 Hans G. Boman에 의해 나비목의 *Hyalophora cecropia* (giant silk moth)에서 분리된 cecropine²⁾, 프랑스 Jules A. Hoffman에 의해 파리목의 *Phormia terranova* (fleshfly)에서 분리된 insect defencin³⁾, 일본 Shunji Natori에 의해 파리목의 *Sarcophaga peregrina* (fleshfly)로부터 분리된 sapecin⁴⁾, sarcotoxin⁵⁾ 등이다. 그리고, 본인이 소속된 연구실에서 분리, 정제한 딱정벌레목의 *Holotrichia diomphalia* (한국산 참검정 풍뎡이)의 holotricin 1⁶⁾과 *Tenebrio molitor* (갈색 거저리)의 tenecin 1⁷⁾ 등이 있다. 이들의 아미노산 서열을 비교해 볼 때(Fig. 1) 여러 부분에서 공통된 서열을 가지고 있음을 알 수 있는데 아마도 이들 공통된 부분들 중의 하나가 이 단백질들로 하여금 항균 작용을 갖도록 만드는 활성 부위일 것으로 예상되어 졌고, 따라서 tenecin 1을 이용하여 활성 부위를 찾고자 하였다.

본 연구에서 사용한 tenecin 1은 *Tenebrio molitor*의 유충에 대장균을 주사하여 유도되어진 43개의 아미노산으로 구성된 항균 단백질로 분자내 6개의 cysteine이 있어 3개의 disulfide결합을 형성하며, 그람 양성균, 특히 *Staphylococcus*계와 *Bacillus*계에 대하여 선택적 활성을 가지고 있다.

Tenecin 1을 각 부분별로 나누어 synthetic peptide를 합성하여 43개의 아미노산 중 C-말단 부분의 11개의 아미노산(TED-YCNGKRVCVCR)만으로도 동일한 항균력을 나타낼 수 있음을 알았다. 그리고 TED는 그람 양성균에 대해서 뿐만 아니라 진균인 *Candida albicans*에도 활성을 나타냄을 발견하였다. TED를 여러 가지 형태로 변형시켜 보았는데 그 중 N-말단에 lysine과 phenylalanine을 첨가한 것(TEDFK-KFYCNGKRVCVCR)은 놀랍게도 그람 양성균에 대하여는 전혀 항균 활성을 나타내지 않고 *C. albicans*에 대하여 항진균 활성만을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 항진균제로 사용될 수 있는 신약 후보 물질로서 TEDFK를 바탕으로 더 좋은 항진균 활성을 갖는 여러 종류의 synthetic peptide를 합성하여, 그들의 *in vivo* 및 *in vitro*에서

*C. albicans*에 대한 항진균 활성을 조사하기로 계획하고 실험에 착수하였다.

진균의 일종인 *C. albicans*는 국소 감염의 경우 피부, 손톱 감염 및 구강염, 질염의 형태로 나타나고, 전신 감염의 경우 fungemia, candida성 폐렴, 수막염 등으로 나타나면서, 고혈압, 저혈압, septic shock과 같은 증상을 나타내기도 한다. 특히, 전신 감염은 면역력이 저하된 환자에서 많이 발생하고, 이는 광범위 항생제, 면역 억제제, steroid 제제의 투여에 의해 악화될 수 있으며, HIV 감염같은 세포성 면역 감소 질환에 의해서도 악화된다¹⁸⁻¹⁹, *C. albicans*는 환경에 따라 yeast, pseudohyphae, true hyphae를 형성할 수 있는 부정형의 효모인데, yeast에서 hyphae로의 전환은 온도가 33℃ 이상이 되고 pH가 중성 정도가 되며 혈청과 같은 유도체가 존재할 때 일어난다. 이러한 전환은 이 균의 virulence factor로도 중요한 역할을 하는 것이 보고되어 있다¹⁰.

본 연구에서는 *in vitro*에서 Sabrouaud broth와 RPMI 1640을 사용하여 각각 yeast form과 hyphae form의 *C. albicans*에 대한 항진균 작용을 측정하였다. Yeast form의 *C. albicans*에 대하여 TEDFK는 40µg/ml, KSLK는 1.25µg/ml에서 활성이 있었고, hyphae form의 *C. albicans*에 대하여는 TEDFK 500µg/ml, KSLK 10µg/ml에서 활성이 있었다. *In vivo*에서는 *C. albicans*에 감염된 mouse에 retro-TEDFK 200µg을 정맥 주사하고 12일간 관찰시 control군에 비해 약 60%의 생존률을 보였다. TEDFK와 그 유도체들은 실험에 사용된 농도내에서 적혈구에 대하여 hemolytic activity를 나타내지 않았다. 본 연구 결과는 peptide성 항진균 물질의 개발에 필요한 기본 자료를 제공하였고, 이들은 앞으로 다른 종류의 항진균제 개발에 필요한 기초 자료가 될 것으로 생각되어진다.

Tenecin 1	V	T	C	D	I	L	S	V	E	A	K	G	V	K	L	N	D	A	A	C	A	A	H	C	L	F	R	G	R	S	G	G	Y	C	N	G	K	R	V	C	V	C	R	
Holotricin 1	V	T	C	D	L	L	S	L	Q	I	K	G	I	A	I	N	D	S	A	C	A	A	H	C	L	A	M	R	R	R	K	G	G	S	C	K	Q	G	V	C	V	C	R	N
Insect defencin	A	T	C	D	L	L	S		G	T	G	I	N	H	S	A	C	A	A	H	C	L	L	R	G	N	R	G	G	Y	C	N	G	K	G	V	C	V	C	R	N			
Sapecin	A	T	C	D	L	L	S		G	T	G	I	N	H	S	A	C	A	A	H	C	L	L	R	G	N	R	G	G	Y	C	N	G	K	A	V	C	V	C	R	N			
Sapecin C	A	T	C	D	L	L	S		G	I	G	V	A	Q	H	S	A	C	A	L	H	C	V	F	R	G	N	R	G	G	Y	C	T	G	K	G	I	C	V	C	R	N		

Fig. 1. Tenecin 1 및 항균 단백질의 아미노산 서열 비교

II. 실험 재료 및 방법

1. 시약 및 기기

Glucose, crystal violet, sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Sigma Co., peptone, agar, antibiotic medium 3 (M3)는 Difco Co., RPMI 1640, PBS (-)는 Nissui Co., fetal calfs serum (FCS)는 Boehringer mannheim Co., cyclophosphamide는 Shionogi Co., hydrochloric acid는 Merck Co., isopropanol, ethanol은 Junsei Co.에서 구입하여 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 autoclave, incubator (Eyela), CO₂ incubator (Sanyo), UV spectrophotometer (Shimadzu), centrifuger (Hanil), peptide synthesizer (Applied Biosystem Instrument), HPLC (Gilson)이다.

2. 사용 배지 및 용액의 조성

본 실험에서 미생물의 배양을 위하여 사용된 배지는 아래와 같다.

- 1) PBS (-)
- 2) Sabouraud plate
- 3) Sabouraud broth
- 4) M3 plate
- 5) M3 broth
- 6) 1% FCS-RPMI 1640

3. 실험동물 및 균주

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 무게 25-30g 정도의 수컷 mouse를 사용하였다.

균주는 *Candida albicans* TIMM 1768, *Cryptococcus neoformans* ATCC 36556, *Staphylococcus aureus* JC-1, *Escherichia coli* K 12 균주를 사용하였으며 *C. albicans*와 *C. neoformans*는 Sabouraud 고체 사면 배지에, *S. aureus*와 *E. coli*는 M3 고체 사면 배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다.

4. Peptide의 합성

Peptide는 peptide synthesizer를 이용하여 고상 합성법²⁰⁾으로 합성하였다. Resin은 MBHA(methylbenzhydrylamide)를 사용하였다. 합성에 사용된 아미노산의 N-말단은 F-moc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)기로, 반응성 있는 side chain은 Trt(trityl), Boc(butyloxy-carbonyl), t-Bu(*t*-butylester), Pmc(pentamethylchloroman)기 등으로 보호하였다. Peptide는 N-말단에서 C-말단으로 합성되는데, HOBt(N-hydroxybenzotriazole) - DCC(dicyclohexyl-carbodiimide)법을 이용하였다. 합성이 완료된 peptide는 분리용액을 사용하여 resin으로부터 분리시킨 후, C_{18} reverse phase HPLC로 정제하고, 정제된 peptide의 분자량을 질량 분석기를 이용하여 확인하였고, 동결 건조하여 사용하였다.

5. Minimal inhibitory concentration (MIC)과 minimal fungicidal concentration (MFC)의 측정

MIC와 MFC를 측정하기 위하여 micro dilution method²¹⁾를 사용하였다. Sabouraud 고체 사면 배지에서 배양한 *C. albicans* TIMM 1768의 colony를 취하여 saline 1ml에 현탁시킨 후 3000rpm, 5분, 4°C의 조건으로 원심 분리시키고, 잔사에 다시 saline 1ml를 넣어 현탁시킨 후 현탁액을 Sabouraud broth로 희석하여 균의 수가 1×10^5 cells/ml가 되도록 하였다. Peptide는 800µg/ml에서 12.5µg/ml까지 saline으로 2배씩 희석하여 준비하였다. 균 희석액 20µl와 peptide 용액 10µl, Sabouraud broth 170µl를 혼합하여 (최종적으로 균의 수는 1×10^4 cells/ml이고, peptide의 농도는 40µg/ml

에서 0.625 μ g/ml) 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 MIC는 control에 비해 균의 성장을 50% 감소시키는 최소 농도로 정의하였다. 이 중 균의 성장이 관찰되지 않는 sample에서 20 μ l씩 취하여 Sabouraud 고체 평판 배지에 도말하고 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양한 후 colony의 생성을 확인하여 MFC를 결정하였다. 이 때 MFC는 colony가 전혀 생성되지 않는 최소 농도로 정의하였다.

6. 항진균 작용에 대한 시간과 inoculum size의 영향

MIC의 측정과 동일한 방법으로 균 현탁액을 만든 후 Sabouraud broth로 희석하여 균의 수가 10^4 , 10^5 , 10^6 cells/ml가 되도록 조절하였다. 사용한 peptide는 MFC의 2 배량이 되도록 만들었다. 균 희석액 20 μ l와 peptide 용액 10 μ l, 배지 170 μ l를 혼합하여 이 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 0, 20, 40, 60, 90, 120분간 배양한 후, 20 μ l씩을 취하여 Sabouraud 고체 평판 배지에 도말하고 다시 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 배양하여 colony의 수를 세었다²²⁾.

7. *C. albicans*의 hyphae form에 대한 항진균 활성 측정

*C. albicans*를 hyphae로 자라게 하기 위하여 1% FCS-RPMI 1640 배지를 사용하였다. MIC의 측정과 동일한 방법을 사용하여 균 현탁액을 만든 후 1% FCS-RPMI 1640으로 희석하여 1×10^4 cells/ml가 되도록 조절하였고, peptide는 1500, 300, 150, 30, 15, 3 μ g/ml가 되도록 준비하였다. 96 well plate에 균 희석액 50 μ l와 peptide 용액 50 μ l, 1% FCS-RPMI 1640 50 μ l를 넣고 혼합하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 20시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, colorimetric assay²³⁾로 활성을 측정하였다. 96 well plate의 바닥에 붙어 있는 hyphae를 70% ethanol로 소독하고 물로 잘 씻은 후 0.02% crystal violet 100 μ l로 염색하였다. 15분 후 상등액은 버리고 물로 씻은 후 건조시키고 hyphae에 염색되어 있는 crystal violet을 0.04 N HCl-isopropanol액 150 μ l와 0.25% SDS액 50 μ l로 추출하여 590nm에서 흡광도를 측정하였다.

8. Hemolytic activity 측정

적혈구를 PBS (-)에 현탁시켜 2×10^7 cells/ml가 되도록 하고, peptide는 160 μ g/ml에서 2.5 μ g/ml까지 2배씩 희석하여 준비하였다. 적혈구 현탁액 250 μ l와 peptide 용액 250 μ l를 혼합하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양한 후, 원심분리하고 상등액으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

9. *In vivo*에서의 항진균 활성 측정

*In vivo*에서의 항진균 활성 측정²⁰⁾을 위하여 25-30g의 수컷 mouse를 사용하였다. Mouse에 cyclophosphamide 200mg/kg을 복강 주사하고 4일후 *C. albicans* TIMM 1768로 감염시켰다. *C. albicans*는 고체 사면 배지에서 colony를 위해 Sabouraud broth 10ml에 접종하여 12시간 배양시킨 후 3000rpm, 5분, 4 $^{\circ}$ C의 조건에서 원심 분리하였다. 잔사를 saline으로 2회 세척한 후, 얻어진 잔사를 saline으로 희석하여 균의 수가 1×10^6 cells/ml가 되도록 하여 250 μ l씩(2.5×10^5 cells) mouse의 꼬리 정맥으로 주사하였다. 약 10분 후 peptide 용액을 200 μ g씩 정맥 주사하고 12일간 관찰하였다.

III. 실험 결과 및 고찰

1. Synthetic peptide

Fig. 2에 나타낸 것과 같이 tenecin 1의 활성 부위를 찾기 위하여 tenecin 1을 부분별로 나누어 synthetic peptide를 합성하였다. 중간 부위의 aspartic acid에서 arginine까지를 TEA, asparagine부터 glycine까지를 TEB, N-말단 부분의 valine부터 lysine까지를 TEC, C-말단 부분의 tyrosine에서 arginine까지를 TED라 명명하였다. 이들 synthetic peptide로 *S. aureus*에 대한 항균 활성을 측정한 결과, Tab. 1에 나타난 것과 같이 C-말단 부분인 TED만이 tenecin 1과 동일한 활성을 나타내었다. 흥

미로운 것은 TED는 *S. aureus*뿐 아니라 진균인 *C. albicans*에도 활성을 나타낸다는 것이다. TED를 여러 가지 형태로 변형시키던 중, TED의 N-말단에 phenylalanine과 lysine을 첨가한 TEDFK라는 peptide는 tenecin 1에서 유도되어진 peptide임에도 불구하고 *S. aureus*에는 전혀 활성이 없고 *C. albicans*에만 활성이 있음을 알았다. 따라서 TEDFK를 모체로 TEDFK보다 더 좋은 항진균 활성을 가지는 peptide를 찾아 내하고자 하였다.

합성한 TEDFK의 유도체들을 Tab. 2와 Tab. 3에 나타내었다. TEDFK-1, 2, 9는 glycine, lysine, arginine을 삭제한 것이고, TEDFK-3, 4, 5는 glycine대신 각각 phenylalanine, leucine, lysine으로 치환한 것이며, TEDFK-6, 7, 8은 asparagine을 각각 leucine, valine, lysine으로 치환한 것이다. aib-1, 2, 3은 TEDFK내의 3개의 cysteine을 차례대로 aminoisobutylic acid로 치환한 것인데, 이것은 TEDFK내에 3개의 cysteine이 존재하여 분자내 혹은 분자간에 여러 가지 형태로 disulfide 결합을 형성하게 되는 것을 방지하기 위해서이다. M series와 KSLK는 TEDFK로부터 많은 변화가 일어났고 peptide내에 lysine이 많아졌다는 것이 특징이다. 물리 화학 parameter를 이용한 computer graphic program으로 계산한 결과, TEDFK와 aib-1, 2, 3은 β -sheet의 구조를 취하고 M series와 KSLK는 α -helix의 구조를 취하게 되는 것으로 예상되었다. TEDFK와 KSLK를 *in vivo*에 적용하기 위하여 혈액 내의 proteinase에 대해 저항성을 가질 수 있는 또 다른 유도체도 합성하였는데, retro-TEDFK, retro-KSLK, red-KSLK, card-KSLK이다. retro-TEDFK와 retro-KSLK는 전체의 아미노산을 천연에 존재하는 L-type의 아미노산 대신 D-type의 아미노산을 사용하여 합성한 것이고, red-KSLK과 card-KSLK는 N-말단의 보호를 위해 N-말단의 lysine과 lysine사이를 Fig. 3에 나타낸 것과 같이 peptide 결합을 reduction form 및 carbamate form으로 만든것이다. 또한 이들의 C-말단을 보호하기 위해 C-말단의 lysine은 D-type의 아미노산을 사용하여 합성하였다.

2. Synthetic peptides의 MIC 및 MFC

Synthetic peptides의 MIC와 MFC를 측정한 결과를 Tab. 4에 나타내었다. *C. albicans*

TIMM 1768에 대해 TEDFK의 MIC, MFC는 각각 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 인데, KSLK의 MIC와 MFC는 $1.25\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 항진균 활성이 매우 증가하였음을 알 수 있었다. 또 다른 진균인 *C. neoformans* ATCC 36556에 대해서도 MIC를 측정하였는데 *C. albicans*의 경우와 비슷한 정도로 활성이 있었다. 그러나, 그람 양성균인 *S. aureus*나 그람 음성균인 *E. coli*에 대해서는 거의 활성을 나타내지 않았고, M 33과 KSLK는 *E. coli*에 대해 활성을 보이기는 하나 *C. albicans*에 비해서는 매우 높은 MIC 및 MFC 값을 나타내었다.

3. 항진균 활성에 대한 시간과 inoculum size의 영향

TEDFK의 항진균 활성에 대한 시간과 inoculum size의 영향을 Fig. 4에 나타내었다. TEDFK $80\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 사용하였는데, 약 40분까지 급속한 감소 곡선을 보였고 60분경에는 90% 이상 사멸하였다. 이 때, inoculum size는 항진균 활성에 크게 영향을 주지는 않았다. TEDFK 외에 다른 peptide도 같은 결과를 보였다.

4. Synthetic peptide의 *C. albicans* hyphae form에 대한 항진균 활성

*C. albicans*는 환경에 따라 yeast, pseudohyphae, true hyphae를 형성하는 부정형의 효모이다. *C. albicans*가 hyphae form으로 성장했을 때의 모습을 Fig. 5에 나타내었다. *In vitro*에서의 실험시 대부분 yeast form에 대한 활성 측정만을 하게 되는데 체내에서는 대부분 hyphae form으로 성장하므로 hyphae form에 대한 활성 측정도 필요하였기에 TEDFK, M 33, KSLK의 hyphae form에 대한 항진균 작용에 대해 조사하였고, 결과를 Fig. 6에 나타내었다. *C. albicans*를 hyphae로 자라게 하기 위하여 1% FCS-RPMI 1640 배지를 사용하여 37°C , 5% CO_2 의 조건에서 배양하였다. Control로 fluconazole을 사용하였는데, Fig. 6에서는 fluconazole이 가장 좋은 활성을 나타내는 것 같으나 이것은 fungistatic 효과만을 나타내었다. 그러나, M 33과 KSLK는 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 90% 정도가 사멸하였고, 농도를 높이면 완전히 fungicidal 효과를 나타내

었다. TEDFK는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 활성을 나타내지 않았으나 약 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 활성을 보였다. Yeast form과 hyphae form에 대한 활성 농도를 비교해 볼 때, yeast form에 비해 약 10배 정도 높은 농도에서 hyphae form에 대해 항진균 활성을 나타내었다. 이 결과에서 *C. albicans*는 hyphae form이 yeast form에 비해 훨씬 저항성이 크다는 것을 알 수 있었다.

5. Synthetic peptide의 hemolytic activity 측정

지금까지 *in vitro*에서의 활성을 바탕으로 *in vivo* 실험을 하고자 하였는데, peptide를 정맥투여하기 위해서는 hemolysis가 가장 큰 문제로 보고되고 있기에 hemolytic activity를 측정해 보았다. TEDFK, M 33, KSLK의 hemolytic activity를 Fig. 7에 나타내었다. 이 중 mellitin은 펩의 독 성분으로 적혈구에 대하여 완전히 hemolysis를 일으키는 control peptide로 사용하였다. Synthetic peptide 중 M 33은 농도를 증가시킬 때 약간의 hemolysis를 유도하였지만, TEDFK와 KSLK는 전혀 hemolytic activity를 나타내지 않았다. 따라서 M 33은 제외하고, TEDFK와 KSLK를 *in vivo* 실험의 synthetic peptide로 결정하였다.

6. *In vivo*에서의 항진균 활성

Synthetic peptide의 전신 감염 mouse에 대한 항진균 활성을 Fig. 8에 나타내었다. (a)는 TEDFK, retro-TEDFK, aib-1에 대한 결과를, (b)에는 retro-KSLK, red-KSLK, carb-KSLK에 대한 결과를 나타내었다. (a)에서는 peptide대신 saline을 주사한 control군의 mouse는 3일만에 모두 죽었으나, TEDFK군과 aib-1군은 12일까지 약 20%의 생존률을 보였고, retro-TEDFK군은 60%의 생존률을 보였다. retro-TEDFK와 TEDFK를 비교해 볼 때, 예상과 같이 체내에서 retro-TEDFK가 더 안정하여 높은 생존률을 나타내는 것 같다. (b)에서 control군은 12일까지 20%의 생존률을 보였는데 오히려 retro-KSLK와 red-KSLK를 투여한 군은 4일만에 모두 죽었고, carb-KSLK

균은 control군과 같이 20%의 생존율을 보였다. *In vitro*에서 TEDFK보다 활성이 더 좋은 red-KSLK, carb-KSLK, retro-KSLK가 *in vivo*에서는 반대의 결과를 나타내었다. 이는 현재까지 확실한 원인은 규명할 수 없으나, 체내에서의 안정성과 독성의 문제에 기인하는 것 같다. red-KSLK, carb-KSLK, retro-KSLK가 *in vivo*에서 *C. albicans*에 대하여 높은 활성을 가질 뿐 아니라, *E. coli*에 대하여도 어느 정도 활성을 가지는데, *in vivo*에서 *C. albicans*에 감염된 mouse의 생존율을 연장시키지 못하는 것은 *C. albicans*에 대한 선택성이 낮고 mouse 혈액 내의 세포에 대해 독성을 가지는 것이 아닌가 생각되어진다. 앞으로의 개발에서는 활성의 증가도 중요하지만, 체내에서의 안정성 증가 및 독성의 감소를 고려하여야 할 것으로 사료된다.

Tenecin 1 VTCDILSVEAKGVKLNDAACAAHCLFRGRSGGYCNGKRVCVCR
 TEA DAACAAHCLFR
 TEB NDAACAAHCLFRGRSGG
 TEC VTCDILSVEAKGVK
 TED YCNGKRVCVCR

Fig. 2 Tenecin 1 및 단편의 아미노산 서열

Tab. 1 Tenecin 1과 단편의 함균 및 함진균 활성

strain peptide	<i>Staphylococcus aureus</i> JC-1	<i>Candida albicans</i> TIMM 1768
TEDFK	+	-
TEA	-	-
TEB	-	-
TEC	-	-
TED	+	+

Tab. 2 TEDFK 및 TEDFK 유도체들의 아미노산 서열

소문자는 D-type의 아미노산을, aib는 aminoisobutylic acid를 의미한다.

peptide	sepuence
TED	YCNGKRVCVCR-NH ₂
TEDFK	KFYCNGKRVCVCR-NH ₂
retro-TEDFK	k f y c n g k r v c v c r-NH ₂
TEDFK-1	KFYCN KRVCVCR-NH ₂
TEDFK-2	KFYCNGKRVCVCR-NH ₂
TEDFK-3	KFYCNFKRVCVCR-NH ₂
TEDFK-4	KFYCNLKRVCVCR-NH ₂
TEDFK-5	KFYCNKKRVCVCR-NH ₂
TEDFK-6	KFYCLGKRVCVCR-NH ₂
TEDFK-7	KFYCVGKRVCVCR-NH ₂
TEDFK-8	KFYCKGKRVCVCR-NH ₂
TEDFK-9	KFYCNGK VCVCR-NH ₂
aib-1	KFY(aib)NGKRVCVCR-NH ₂
aib-2	KFYCNGKRV(aib)VCR-NH ₂
aib-3	KFYCNGKRVCV(aib)R-NH ₂

Tab. 3 TEDFK 유도체들의 아미노산 서열

소문자는 D-type의 아미노산을, * 는 reduction을, ^c 는 carbamate를 의미한다.

peptide	sepuence
M 4	KKYCKKRVCVCR-NH ₂
M 5	KKYC�KKCVCR-NH ₂
M 18	KFYCDGKRVCVCR-NH ₂
M 19	KFY(aib)NGKKVFVFK-NH ₂
M 22	KKYIKKVFVFK-NH ₂
M 23	KKKYIVFVFK-NH ₂

peptide	sequence
KSLK	KKVVFVKVKFVK-NH ₂
red-KSLK	K [•] KVVFVKVKFVK-NH ₂
card-KSLK	K ^c KVVFVKVKFVK-NH ₂
retro-KSLK	k k v v f k v k f k k -NH ₂

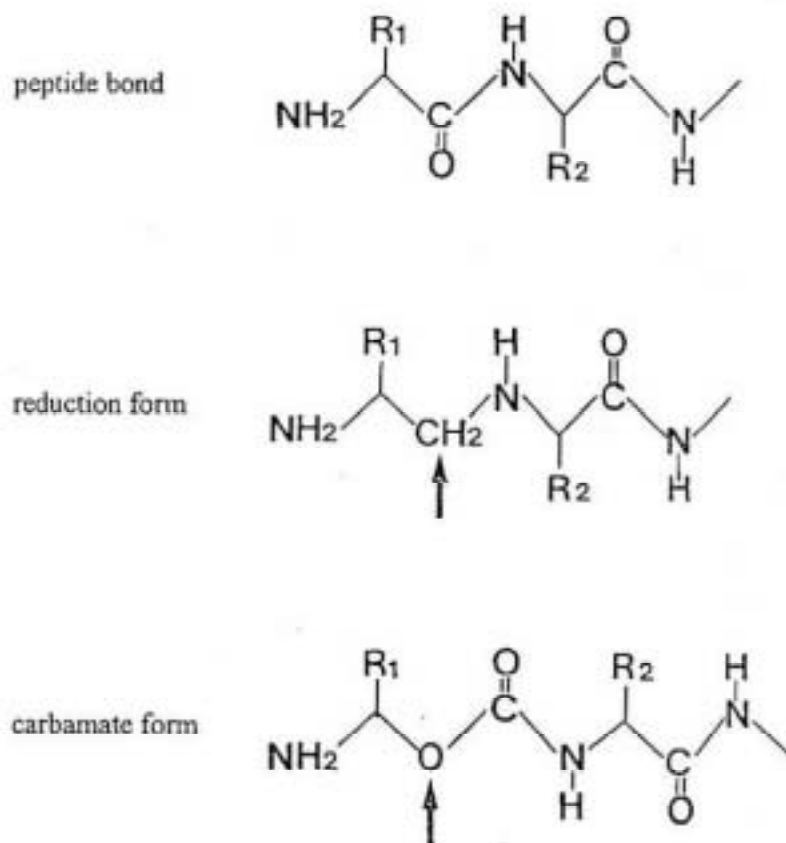


Fig. 3 Peptide bond의 reduction form과 carbamate form

Tab. 4 Synthetic peptide의 MIC 및 MFC

strain peptide	MIC on <i>C.albicans</i> TIMM 1768 ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	MFC on <i>C.albicans</i> TIMM 1768 ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	MIC on <i>C.neoformans</i> ATCC 36556 ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	MIC on <i>S.aureus</i> ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)	MIC on <i>E.coli</i> ($\mu\text{g}/\text{m}\ell$)
TEDFK	40	40	40	—	—
retro-TEDFK	40	40	40	—	—
aib-1	10	10	10	—	—
M 4	10	> 40	10	—	—
M 5	20	40	20	—	—
M 19	20	20	20	—	—
M 33	2.5	10	2.5	—	20
KSLK	1.25	5	1.25	—	10
KSLK-red	1.25	5	1.25	—	20
KSLK-carb	1.25	5	1.25	—	20
retro-KSLK	1.25	5	1.25	—	10

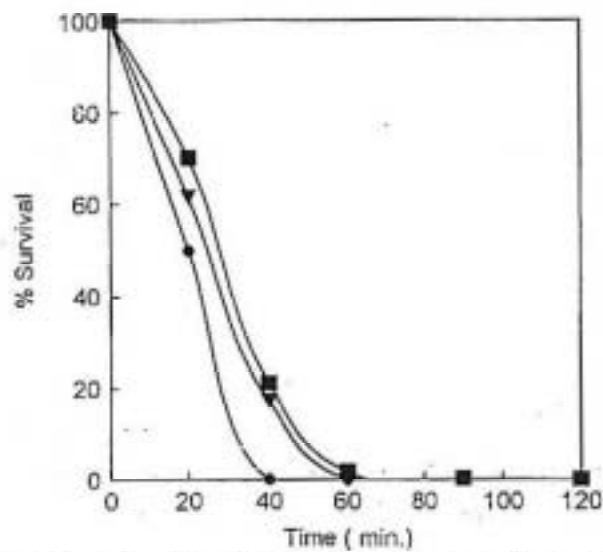


Fig. 4 항진균 활성에 대한 시간과 inoculum size의 영향(TEDFK 80 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 를 사용)

- : *C. albicans* 1×10^7 cells/ml
- ▼ : *C. albicans* 1×10^4 cells/ml
- : *C. albicans* 1×10^5 cells/ml

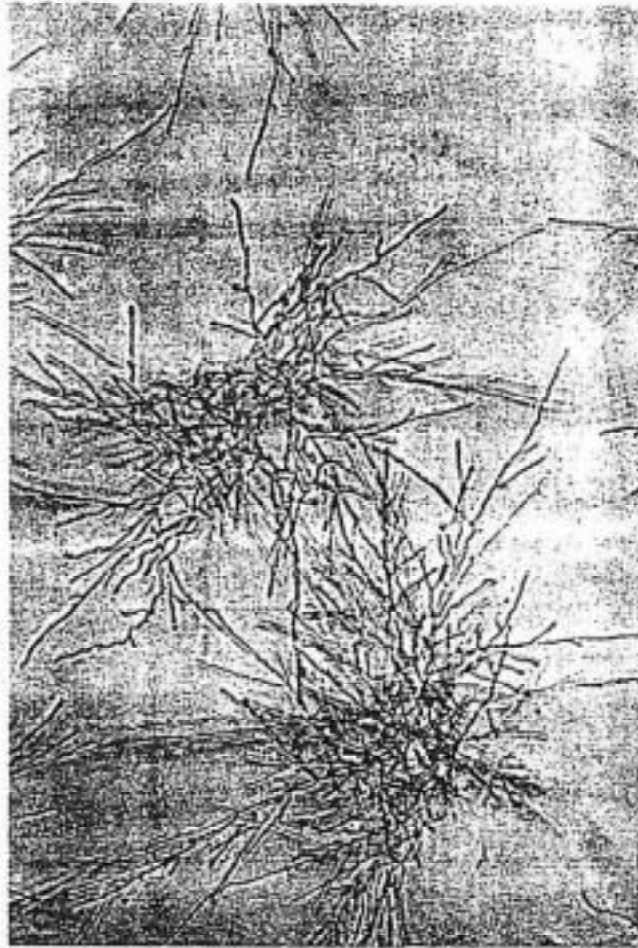


Fig. 5 *C. albicans*의 hyphae form

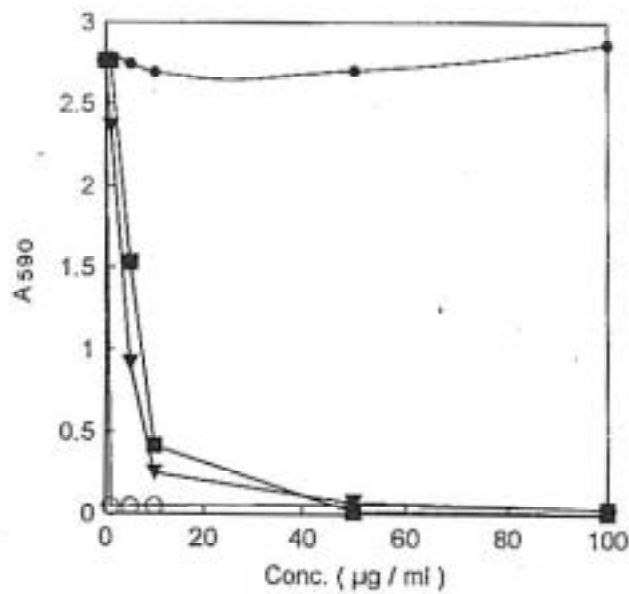


Fig. 6 TEDFK, M 33 및 KSLK의 hyphae form에 대한 항진균 활성

● : TEDFK ■ : M 33
 ▼ : KSLK ○ : Fluconazole

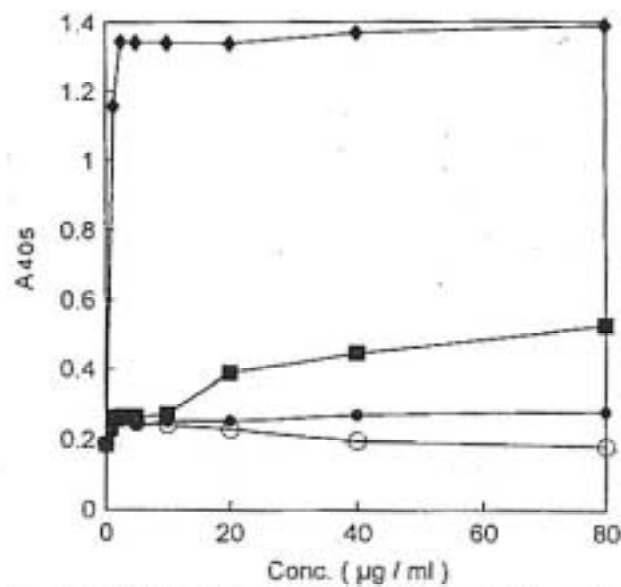


Fig. 7 TEDFK, M 33 및 KSLK의 hemolytic activity

● : TEDFK ■ : M 33
 ▼ : KSLK ○ : Mellitin

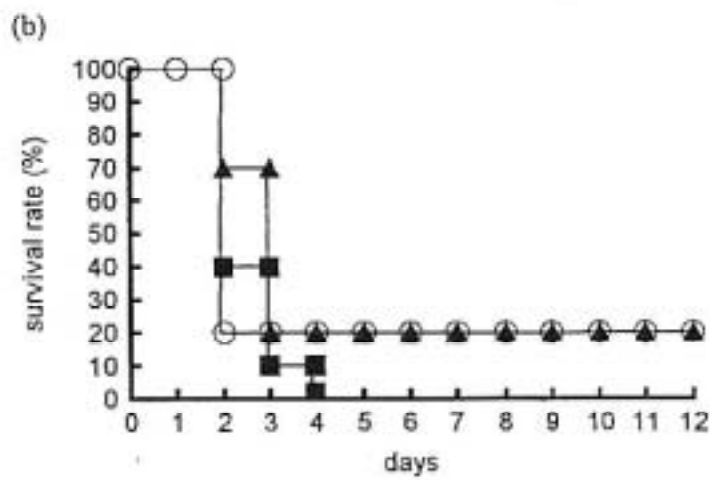
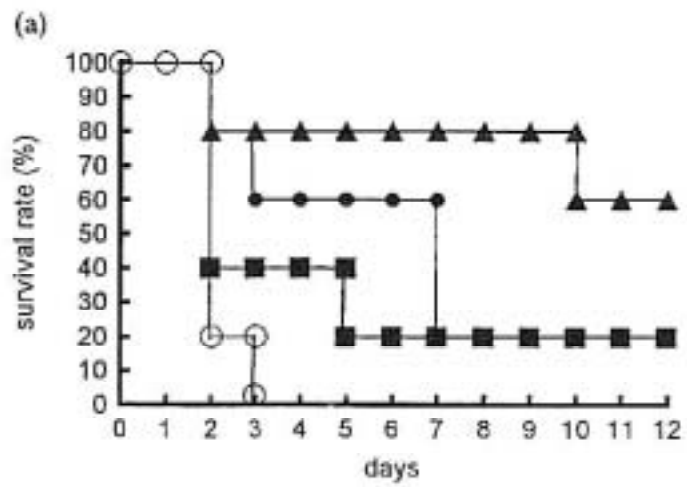


Fig. 8 Synthetic peptide의 *in vivo*에서의 항진균 활성

(a) ○ : saline ■ : TEDFK ▲ : retro-TEDFK ● : aib-1
 (b) ○ : saline ■ : retro-KSLK,red-KSLK ▲ : carb-KSLK

IV. 결 론

1. 갈색 거저리 (*T. molitor*)의 유충으로부터 분리된 항균 단백질인 tenecin 1의 단편으로부터 *C. albicans*에 대하여 활성을 갖는 새로운 항진균 peptide를 찾았고 그 이름을 TEDFK라 명명하였다. 또한 TEDFK를 모체르하여 TEDFK 보다 더 좋은 항진균 활성을 갖는 유도체들을 합성할 수 있었다.
2. *In vitro* 실험에서, yeast form의 *C. albicans*에 대하여는 TEDFK 40 μ g/ml, KSLK 1.25 μ g/ml의 농도에서 항진균 활성이 있었고, hyphae form에 대하여는 TEDFK 500 μ g/ml, KSLK 10 μ g/ml의 농도에서 항진균 활성이 있었다.
3. *In vivo* 실험에서 *C. albicans*에 감염된 mouse에 retro-TEDFK 200 μ g을 정맥 주사하고 12일간 관찰 시 control군에 비해 약 60%의 생존률을 보였다. 그러나, *in vitro*에서 항진균 활성이 더 좋은 retro-KSLK 및 red-KSLK, carb-KSLK를 정맥 주사한 군은 control군에 비해 mouse의 생존률을 증가시키지 못하였다. 그 이유는 정확하지는 않지만 체내에서의 안정성 및 독성의 문제에 기인하는 것 같다.
4. 지금까지의 연구에서 *C. albicans*에 대해 높은 활성을 가지는 peptide를 얻을 수 있었지만, 앞으로 더욱 좋은 peptide를 개발하기 위하여 활성의 증가 뿐 아니라 체내에서의 안정성의 증가 및 mammalian cell에 대한 세포 독성을 고려한 개발이 필요할 것 같다.
5. 현재 항세균성 단백질 혹은 peptide의 활성 mechanism은 대체로 세포막의 투과성 변화에 의한 cell death의 유도인 것으로 추측하고 있으나, TEDFK 및 그의 peptide의 활성 mechanism은 전혀 연구되어진 바가 없다. 앞으로 그에 대한 연구도 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 참고문헌

1. Glaser, R. W. 1981, On the existence of immunity principles in insect. *Psyche* 25 : 38-46
2. Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T. & Boman, H. G. 1980, Insect Immunity : Purification and properties of three inducible bacterial proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* 106 : 9-16
3. Lambert, J., Keppi, E., Dimarccq, J. L., Wicker, C., Dorsseler, A. V., Hoffman, J., Fothergill, J. & Hoffman, D. 1989, Insect Immunity : Isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of two insect antibacterial peptides with sequence homology to rabbit lung macrophage bactericidal peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86 : 262-266.
4. Matsuyama, K. & Natori, S. 1988, Purification of three antibacterial proteins from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*, *J. Biol. Chem.* 263 : 17112-17116.
5. Okada, M. & Natori, S. 1985, Primary structure of hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) larvae, *J. Biol. Chem* 260 : 7174-7177
6. Lee, S. Y., Moon, H. J., Kurata, S., Kurama, T., Natori, S & Lee, B. L. 1994, Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein of larvae of a coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia*. *J. Biochem.* 115 : 82-86
7. Moon, H. J., Lee, S. Y., Kurata, S., Natori, S. & Lee, B. L. 1994, Purification and molecular cloning of cDNA for an inducible antibacterial protein from larvae of the coleopteran, *Tenebrio molitor*. *J. Biochem.* 116 : 53-58
8. Lee, S. Y., Moon, H. J., Kawabata, S., Kurata, S., Natori, S. & Lee, B. L. 1995, A sapecin homologue of *Holotrichia diomphalia* : Purification, sequencing and determination of disulfide pairs. *Biol. Pham. Bull.* 18 : 457-459

9. Lee, S. Y., Moon, H. J., Kurata, S., Natori, S. & Lee, B. L. 1995, Purification and cDNA cloning of an antifungal protein from the hemolymph of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Biol. Pharm. Bull.* 18 : 1049-1052
10. Komano, H., Kasama, E., Nagasama, Y., Nakanishi, Y., Matsuyama, K., Ando, K. & Natori, S. 1987, Purification of *Sarcophaga* (flesh fly) lectin and detection of sarcoxin in the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina*, *Biochem. J.* 248 : 217-222
11. Leonard, C., Soderhall, K. & Rarcliffe, N. A. 1995. Studies on pro-phenoloxidase and protease activity of *Blaberus craniifer* haemocytes, *Insect Biochem.* 15 : 803-810
12. Ashida, M., Ishizaki, Y. & Iwahama, H. 1993, Activation of pro-phenoloxidase by bacterial cell walls or β -1,3-glucan in plasma of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113 : 562-568
13. Saito, H., Kurata, S. & Natori, S. 1992, Purification and characterization of a hemocyte proteinase of *Sarcophaga*, possibly participating in elimination of foreign substances, *Eur. J. Biochem.* 204 : 911-914
14. Kurata, S. Saito, H. & Natori, S. 1992, Purification of 29 kDa hemocyte proteinase of *Sarcophaga peregrina*. *Eur. J. Biochem.* 209 : 939-944
15. Homma, K., Kurata, S. & Natori, S. 1994, Purification, characterization and cDNA cloning of procathepsin L from the culture medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J. Biol. Chem.* 269 : 15258-15264
16. Lorian, V. 1991, Antibiotics in laboratory medicine. 3rd ed. William and Wilkins. 198-205
17. Walsh, T. J., De Pauw, B., Anaissie, E. & Martino, P. 1994, Recent advances in the epidemiology, prevention and treatment of invasive fungal infections in neutropenic patients. *J. Medical & Veterinary Mycology.* 32 : 33-51

18. Sarosi, G. A., Davies, S. F. 1993, Fungal diseases of the lung. 2nd ed. Raven Press. 17-28
19. Bodey, G. P. 1993, Candidiasis, Pathogenesis, Diagnosis and Treatment. 2nd ed. Raven Press. 1-20
20. Merrifield, R. B. 1986, Solid phase synthesis. *Science*. 232 : 342-347
21. Ghannoum, M. A., Ibrahim, Y., Fu, M., Shafiq, J., Edwards, Jr. & Criddle, R. 1992, Susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans* : microdilution technique. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 2881-2886
22. Marcia, S. Alcouloumre., Mahmoud, A. Ghannoum., Ashraf, S. Ibrahim., Michael, E. Selsted., Tohn, E. & Edwards, Jr. 1993, Fungicidal properties of defensin NP -1 and activity against *Cryptococcus neoformans in vitro*. *Antimicrobial agent & Chemotherapy*. 37 : 2628-2632
23. Abe, S., Satoh, T., Tokuda, Y., Tansho, S. & Yamaguchi, H. 1994, A rapid colorimetric assay for determination of leukocyte-mediated inhibition of mycelial growth of *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.* 38 : 385-388
24. Aoyagi, K., Itoh, N., Abe, F., Abe, S., Uchida, K., Ishizuka, M., Takeuchi, T. & Yamaguchi, H. 1992, Enhancement by ubenimex (bestatin) of host resistance to *Candida albicans* infection. *J. Antibiotics*. 45 : 1778-1784