

*Protaetia brevitarsis*가 생산하는 세균 유도성 항생활성물질, Protaecin

박호용* · 박두상¹ · 박순식 · 오현우 · 신상운
이형규 · 주창경² · 홍순덕¹

KIST 유전공학연구소, ¹경북대학교 미생물학과, ²(주)인터페이스 엔지니어링

Bacteria-Induced Antibiotic Peptide, Protaecin from the White-Spotted Flower Chafer, *Protaetia brevitarsis*

Park, Ho-Yong*, Doo-Sang Park¹, Soon-Sik Park, Hyun-Woo Oh,
Sang-Woon Shin, Hyeong-Kyu Lee, Chang-Kyeong Joo² and Soon-Duck Hong¹

Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejeon 305-333, Korea

¹Dept. of Microbiology, Kyungpook National University Taegu 702-701, Korea

²Interface Engineering Co. Ltd., Seoul 138-160, Korea

Abstract — The induced antibiotic peptides were isolated from the white-spotted flower chafer, *Protaetia brevitarsis* by injection of *E. coli* suspension to the larvae of the insect. The antibacterial activity of the peptides were assayed by the plate growth inhibition method, and were purified by ion-exchange chromatography, reversed-phase HPLC, ion-exchange HPLC and SDS-PAGE etc. The peptides were estimated as 9 kDa, 12 kDa in molecular weight and named Protaecin I and Protaecin II, respectively. Protaecin I and II have strong antibacterial activities against Gram-positive and/or Gram-negative bacteria, and they are stable in the heat treatment and in the range of pH 2-12.

지구상의 생물중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충은 지구생태학적으로 인류보다 훨씬 선점자이며, 환경에 대한 적응력이 뛰어나 전세계에 걸쳐 광범위하게 서식하고 있는데, 이들도 다른 고등생물과 마찬가지로 환경에 존재하는 다양한 미생물들의 침입에 대해 자신을 방어하는 기구를 보유하고 있다. 곤충에 있어서 이러한 방어 기작은 크게 혈림프내에 존재하는 여러가지 혈구세포들의 작용에 의한 세포성 면역과, 상처나 미생물의 주입에 의해 유도되는 혈림프내의 항생활성 factor들에 의한 체액성 면역으로 구분되고 있다(8). 곤충의 체액성 면역기작은 1981년 누에의 일종인 *Hyalophora cecropia*로부터 cecropin이라는 항생활성 펩타이드가 분리됨으로서 그 분자적 수준에서의 연구가 시작된 이래(10, 15), 다양한 종류의 항생활성 펩타이드들이 나비목과 파리목, 벌목, 딱정벌레목 등의 곤충으로부터 분리되었으며, 이들의 특징은

대부분이 새로운 종류의 염기성 펩타이드 혹은 폴리펩타이드로서 그람양성세균 또는 그람음성세균에 대해 폭 넓은 항생범위를 가지며, 알려진 활성물질로서는 cecropin(3, 15), apidaecins(5), abaecin(6), attacins(11), sarcotoxin II(1, 2), dipterocins(7), coleoptericin(4) 및 difensin류(12,13) 등이 있다.

본 연구에서는 곤충유래의 생체활성물질 탐색의 일환으로 흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*) 체강내로 외부 미생물을 인위적으로 주입하였을 때 유도되는 항생활성물질을 분리 정제하고 그 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험곤충

본 연구에 사용한 실험곤충은 한국과학기술연구원 유전공학연구소 곤충자원실에서 계통보전 되고 있는 흰점박이꽃무지 3령 유충이며, 16L : 8D, 65% R.H, 25°C 조건의 실내에서 사육하였다.

Key words: *Protaetia brevitarsis*, antibiotic peptide, Protaecin

*Corresponding author

균주 및 배지

항생물질의 생성과 활성의 검정에 사용된 균주는 *E. coli* KCTC 2597, *E. coli* KCTC 1682, *Enterobacter cloacae* KCTC 2361, *Klebsiella pneumoniae* KCTC 2208, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 2004, *Micrococcus luteus* KCTC 3065, *Staphylococcus aureus* KCTC 1621, *Staphylococcus epidermis* KCTC 1917, *Bacillus thuringiensis* KCTC 1033, *Streptococcus lactis* KCTC 1913, *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 1552, *Candida albicans* KCTC 1940, *Penicillium citrinum* KCTC 1255, *Aspergillus niger* KCTC 2119 등이며 한국과학기술연구원 유전공학연구소 배양생물실(KCTC)에서 분양받아 사용하였다.

미생물의 배양에는 기본적으로 bacto-nutrient 배지를 사용하였으며, *M. luteus*는 enriched nutrient 배지를, *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *A. niger*, *P. citrinum*은 potato dextrose 배지를 이용하였다.

항생물질의 생성

원심분리한 대수기의 *E. coli*를 살균된 생리식염수 용액에 10^8 cells/ml이 되도록 현탁한 다음, 공기층의 체강내로 1마리당 $5 \mu\text{l}$ 씩을 주입하고 18~24시간 경과 후 유충으로부터 회수한 채액을 빙냉하의 플라스틱 용기에 수집하였다. 이를 100°C 에서 3분간 열처리한 후 15,000 g에서 원심분리하고 그 상등액을 취하여 $0.45 \mu\text{m}$ filter를 통과시켜 사용하거나 -70°C 에서 보관하였다가 실험에 이용하였으며 항생활성의 측정에는 plate growth inhibition assay 방법을 사용하였다(9). 살균된 petri dish(87×15 mm)에 약 2×10^5 개의 대수기 bacterial cells이 포함된 1% nutrient agar medium(pH 7.2)을 7.5 ml 씩 분주하여 응고시킨 다음 paper disc를 놓고 각 disc당 $10 \mu\text{l}$ 의 시료를 첨가하여 37°C 에서 배양 후 형성된 clear zone의 직경을 측정하였다. 진균류의 경우 1% potato dextrose agar medium을 같은 방법으로 사용하였다.

항생물질의 분리정제

50 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 5.2)로 평형화된 CM-Sepharose CCF-100 컬럼(34×240 mm, Sigma)에 시료를 통과시킨 후, 1 ml/min의 유속으로 0에서 1 M까지의 NaCl 농도구배로서 용출시키고, 매 10분마다 분획을 채취하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 분획을 진공 건조하여 증류수에 녹인 다음 항생활성을 측정하고 ultrafiltration(MWCO 1000)을 통하여 농축시킨 후, YMC-PACK ODS-18 컬럼(250×20 mm)을 이용하여 정제하였다.

분당 4 ml의 유속으로 0.05% TFA로 평형화된 컬럼에서, 0~60% acetonitrile 농도구배로 용출시켜, 220 nm UV detector(HP 1050 series), 2.0의 출력으로 측정하여 얻어진 각 분획을 진공 건조하여 $200 \mu\text{l}$ 의 증류수에 녹여 항생활성을 확인하였다. 이 분획을 동일조건에서 60분간 15~30% acetonitrile 농도구배로서 용출시키거나, 50 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 5.2)로 평형화된 Protein Pak SP 이온교환 컬럼(7.5×70 mm, Waters)에서 분당 1 ml의 유속으로 60분간 0~0.5 M의 NaCl 농도구배로 용출시키고 매 1분당 분획하여 항생활성을 측정하였다.

분자량 측정

HPLC에서 얻어진 활성 분획을 동결 건조한 다음 멸균된 증류수에 녹여 Tricine SDS-PAGE(16.6%T, 6%C)를 실시하고 coomassie brilliant blue G-250으로 염색하였으며, 분자량 측정을 위한 표준 단백질은 Sigma사의 제품을 이용하였다(14).

이화학적 특성

시료의 pH에 대한 안정성은 시료를 pH 2~12까지 조정된 완충용액 $15 \mu\text{l}$ 와 혼합한 뒤 25°C 에서 24시간 유지하였다가 *E. coli*와 *M. luteus*에 대한 항생활성을 측정하였으며 각 pH의 조정은 0.1 M HCl-KCl(pH 2.0), 50 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 4.0, 6.0), 0.1M phosphate buffer(pH 8.0), NaHCO_3 -NaOH buffer(pH 10.0), Na_2HPO_4 -NaOH buffer(pH 12.0)를 이용하였다. 열 안정성 조사는 증류수에 녹인 시료를 100°C 에서 6시간 처리하면서 plate growth inhibition assay에 의해 활성 변화를 측정하였다. 프로테신의 자외선 흡수 스펙트럼은 $100 \mu\text{g}$ 의 프로테신 물질을 포함하는 증류수 1 ml를 UV/Vis spectrophotometer (Milton Roy 3000)를 이용하여 200 nm부터 320 nm까지의 파장에서 연속적인 자외선 흡수 스펙트럼을 측정하였다.

Protease assay

시료 1 mg당 10 IU의 protease를 첨가한 후, 37°C 에서 0~8시간에 걸쳐 *E. coli*와 *M. luteus*에 대한 항생활성의 변화를 plate growth inhibition assay로 측정하였다(4). 실험에 사용된 protease는 Proteinase K(Type XI, from *Tritirachium album*, Sigma)와 Protease type XIV(from *Streptomyces griseus*, Sigma)이며 50 mM phosphate buffer(pH 7.5)에 녹여 사용하였고 대조구에는 동량의 buffer만을 첨가하였다.

Bactericidal assays

정제된 Protaecin I과 II 10 μ l(1 mg/ml)를 대수기의 bacterial cells(*E. coli*, *M. luteus*) 100 μ l가 포함된 microtube에 첨가한 후 0~6시간 동안 여러 시간 단위로 600 nm에서의 흡광도를 측정하고 colony forming unit를 측정하였다. 대조구는 항생활성물질 대신에 멸균된 증류수 10 μ l를 첨가한 동일 조건을 사용하였다.

전자현미경 관찰

정제된 Protaecin I 20 μ l를 대수기의 *E. coli*가 포함된 nutrient broth와 생리식염수에 각각 첨가하고 10분 후 적당량을 채취하여 1% phosphotungstic acid로 negative staining한 후, 투과 전자현미경(Philips CM20)을 이용하여 세포의 변화 상태를 관찰하였다.

결과 및 고찰

항생물질의 생성

공시충의 체강에 적당량의 *E. coli* 현탁액을 주입한 직후부터 120시간까지 유충으로부터 체액을 채취하여 항생활성을 측정된 결과, *E. coli*에 대한 항생활성은 12~18시간에서 유도되어 48시간까지 지속되었고 *M. luteus*에 대한 항생활성은 3~6시간에서 유도되어 121시간 이상까지 지속되었다(Fig. 1). 그러나 immunization하지 않은 시료에서는 *E. coli*에 대해 아무런 항

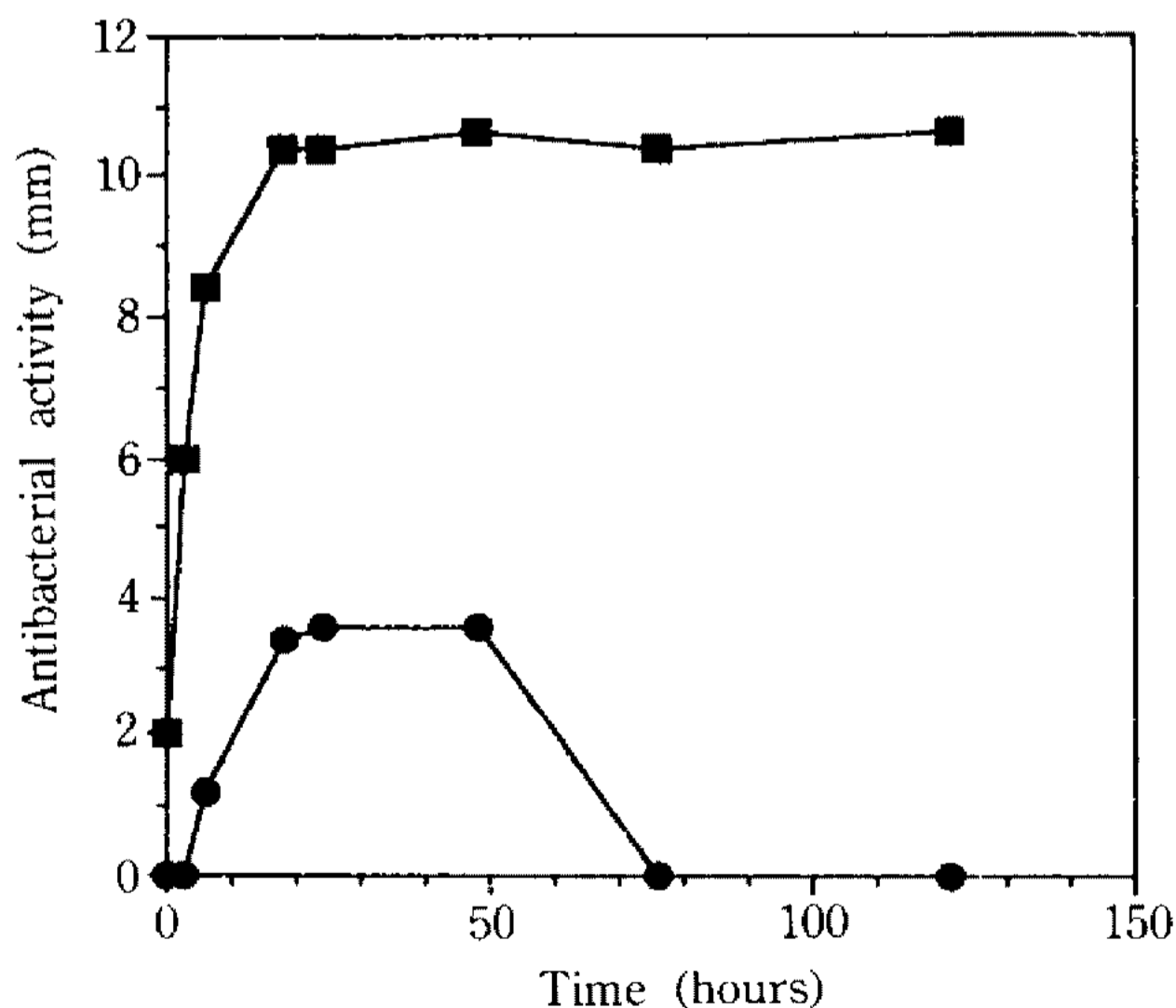


Fig. 1. Induction of antibacterial activity in hemolymph of *P. brevitarsis* after injection of *E. coli*.

Antibacterial activities were assayed by the plate growth inhibition assay against *E. coli* (—●—) and *M. luteus* (—■—).

생활성이 나타나지 않았으며, *M. luteus*의 경우 약한 항생활성이 나타남으로 보아 *M. luteus*에 항생활성을 가지며 상존하는 소량의 물질이 곤충체내에 존재함을 추정할 수 있었다. Immunization한 혈림프를 protease로서 처리하였을 때 *E. coli*에 대한 항생활성은 두 가지 protease 모두에서 30분 이내에 사라졌고 *M. luteus*에 대한 항생활성은 protease type XIV에서는 90분 후 활성이 나타나지 않았다. 그러나 protease K 처리시 8시간 후에도 50%의 활성이 잔존하였다. 이로 보아 protease에 대한 감수성에 차이가 있으며, *E. coli*와 *M. luteus*에 대해 서로 다른 작용을 가지는 두가지 이상의 peptide성 물질이 공시충의 체액성 면역에 관여한다고 생각된다.

항생물질의 분리 정제

약 3000마리의 흰점박이꽃무지 유충을 immunization시키고 18~24시간 후 hemolymph를 채취하여 100°C에서 5분간 열처리하여 원심분리 과정을 거쳐 약 500 ml의 시료를 얻었다. 이 시료를 CM-Sepharose 이온교환 컬럼(34×240 mm)을 이용하여 분당 1 ml의 유속으로 용출시키고, 10분 간격으로 분획하여 280 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 분획 200 μ l씩을 진공건조 후 20 μ l의 증류수에 녹여 항생활성을 조사한 결과, 0.2~0.3 M NaCl 농도에서 *E. coli*와 *M. lu-*

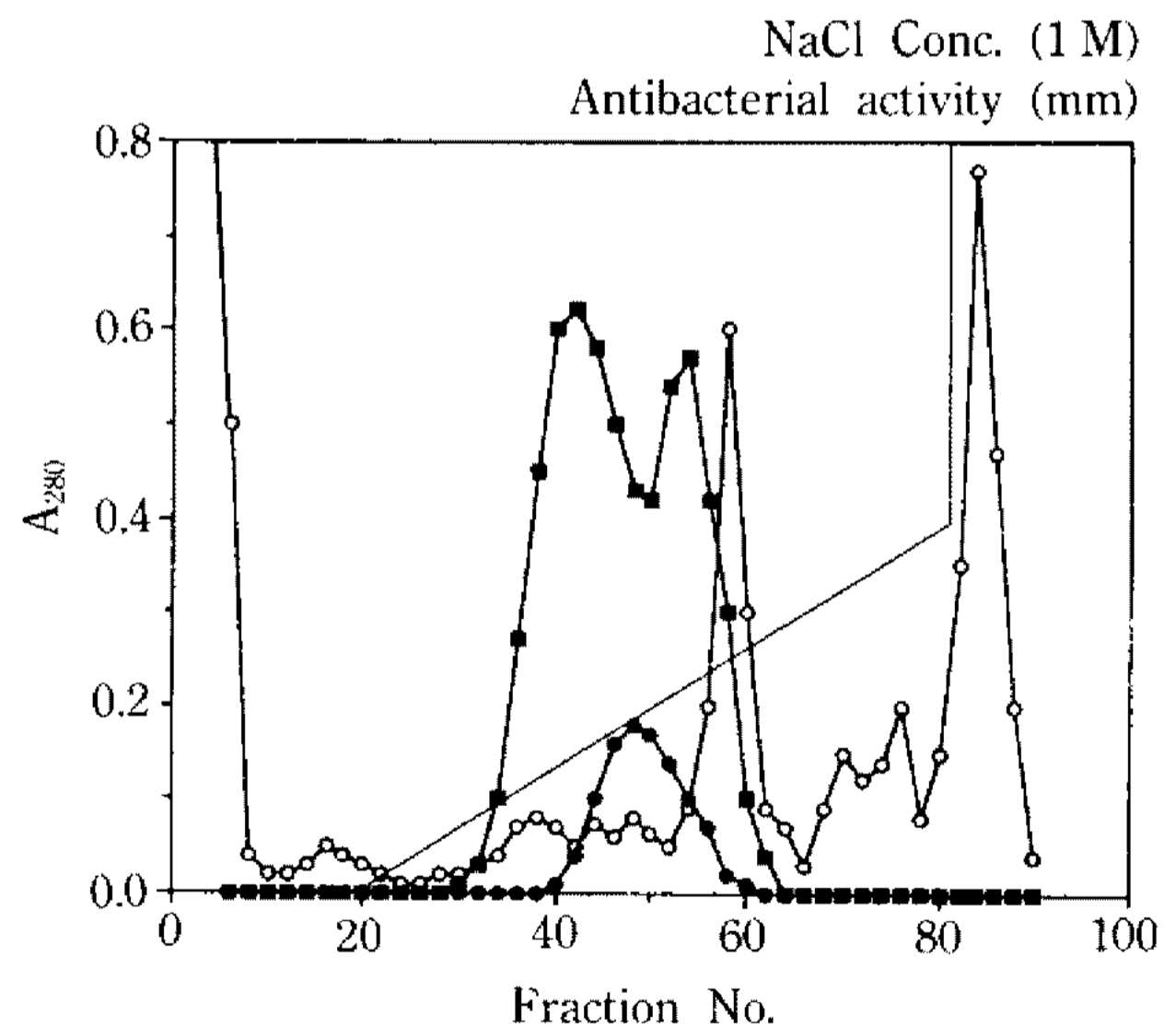


Fig. 2. CM-sepharose chromatogram of immune hemolymph from *P. brevitarsis*.

Immune hemolymph was applied to the column, which was equilibrated with 50 mM citric acid-sodium citrate buffer. Elution was performed with a linear gradient of 0.1 M~0.5 M NaCl concentration. The fractions were assayed for antibacterial activity against *E. coli* (—●—) and *M. luteus* (—■—); absorbance at 280 nm (—○—).

*teus*에 대한 항생활성이 나타났다(Fig. 2). CM-sepharose 이온교환 컬럼에서 항생활성이 존재하는 분획들을 수집한 뒤 N₂ gas를 이용하여 ultrafiltration (MWCO 1000)으로 농축하고 농축된 부분을 0.45 μm filter에서 여과하여 역상 HPLC 시료로 사용하였다. YMC-PACK ODS-18 분취용 컬럼을 이용하여 분당 4 ml의 유속에서 0~60% acetonitrile 농도구배로 용출시킨 결과, 약 35% acetonitril에서 *E. coli*에 대한 강한 항생활성을 가지는 분획이 용출되었고 50~55% acetonitrile에서 *M. luteus*에 대한 항생활성을 가지는 분획이 용출되었다(Fig. 3). 역상 HPLC에서 얻어진 활성분획들을 동결건조한 다음 멸균된 50 mM citric acid-sodium citrate buffer로 녹여 정제에 이용하였다. 먼저 Fig. 3의 A 분획을 다시 역상 HPLC에서 15~30% acetonitril linear gradient로서 0~60분간 용출시킨 다음 활성 분획을 모아 동일 조건에서 단일 peak를 확인하였다. 이 분획을 동결건조하여 농축시키고 멸균된 증류수에 녹여 SDS-PAGE로서 분자량을 확인한 결과, 9 kDa 위치에서 단일 band가 얻어졌으며, 이를 Protacacin I이라 명명하였다(Fig. 4).

Fig. 3의 C 분획을 50 mM citric acid-sodium citrate buffer(pH 5.2)로 평형화된 Protein Pak sp 이온교환 HPLC column(7.5×70 mm, Waters)에서 60분간 0~0.5 M의 NaCl 농도구배로서 용출하여 약 0.2 M의 NaCl 농도에서 활성분획을 획득하였으며, SDS-PAGE 결과 12 kDa의 위치에서 단일 band로 나타나

정제를 확인하였으며, 이를 Protacacin II라 명명하였다(Fig. 4).

항생물질의 이화학적 특성

정제된 Protacacin I과 Protacacin II를 이용하여 pH 및 열 안정성을 조사한 결과, Protacacin I과 Protacacin II는 pH 2~12에서 24시간 처리하였을 때에도 활성이 그대로 유지되었으며 100°C에서 30분간 처리에서 약 50%의 활성 감소가 나타났다. 또한 자외선 흡수 스펙트럼을 조사하였을 때 220 nm 부근 이외의 파장에서는 강한 흡수가 거의 없었다.

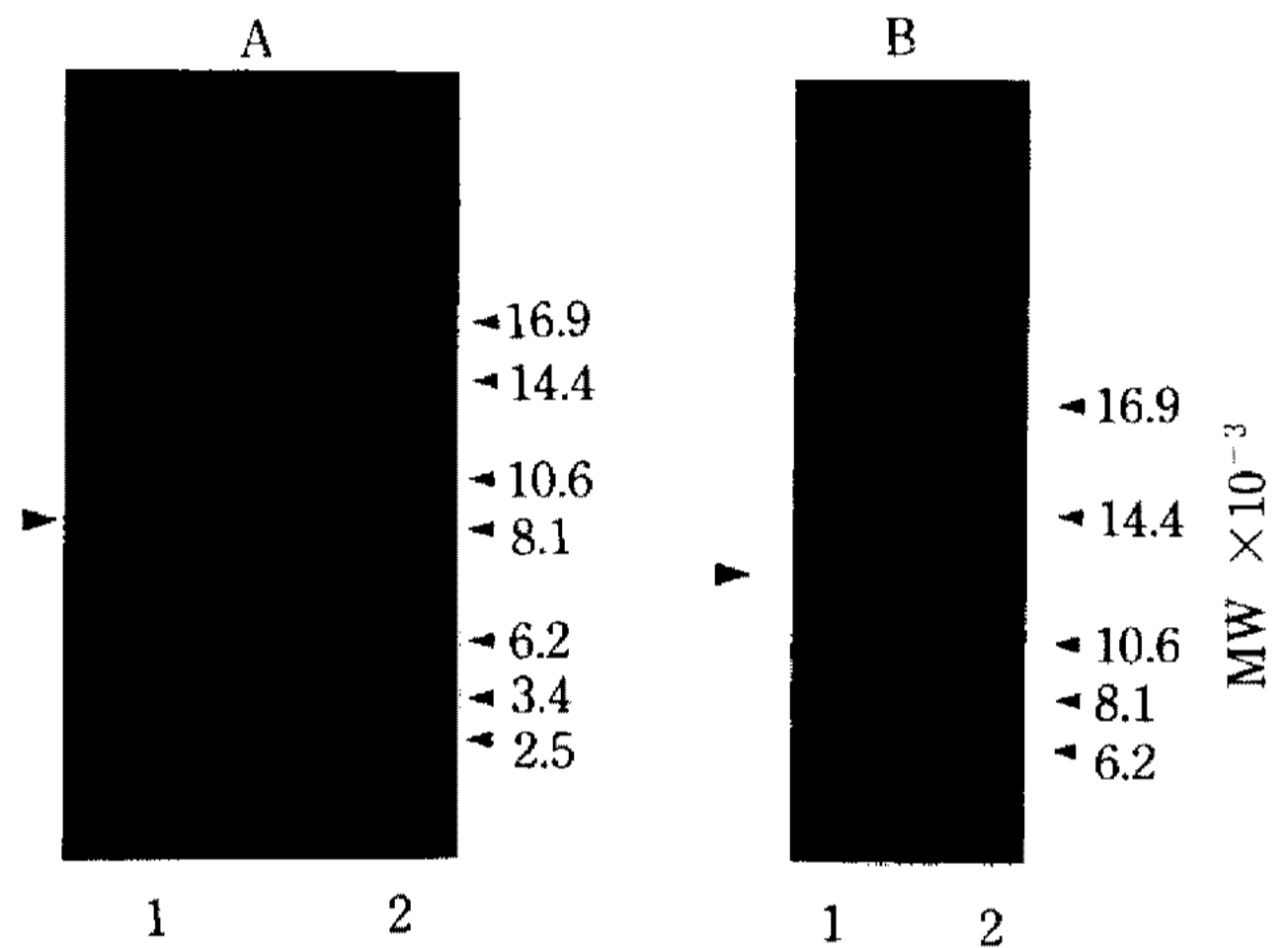


Fig. 4. Tricine SDS-PAGE (16.6%, 6%C) of Protacacin I and II from reversed phase HPLC. A; Protacacin I. B; Protacacin II.

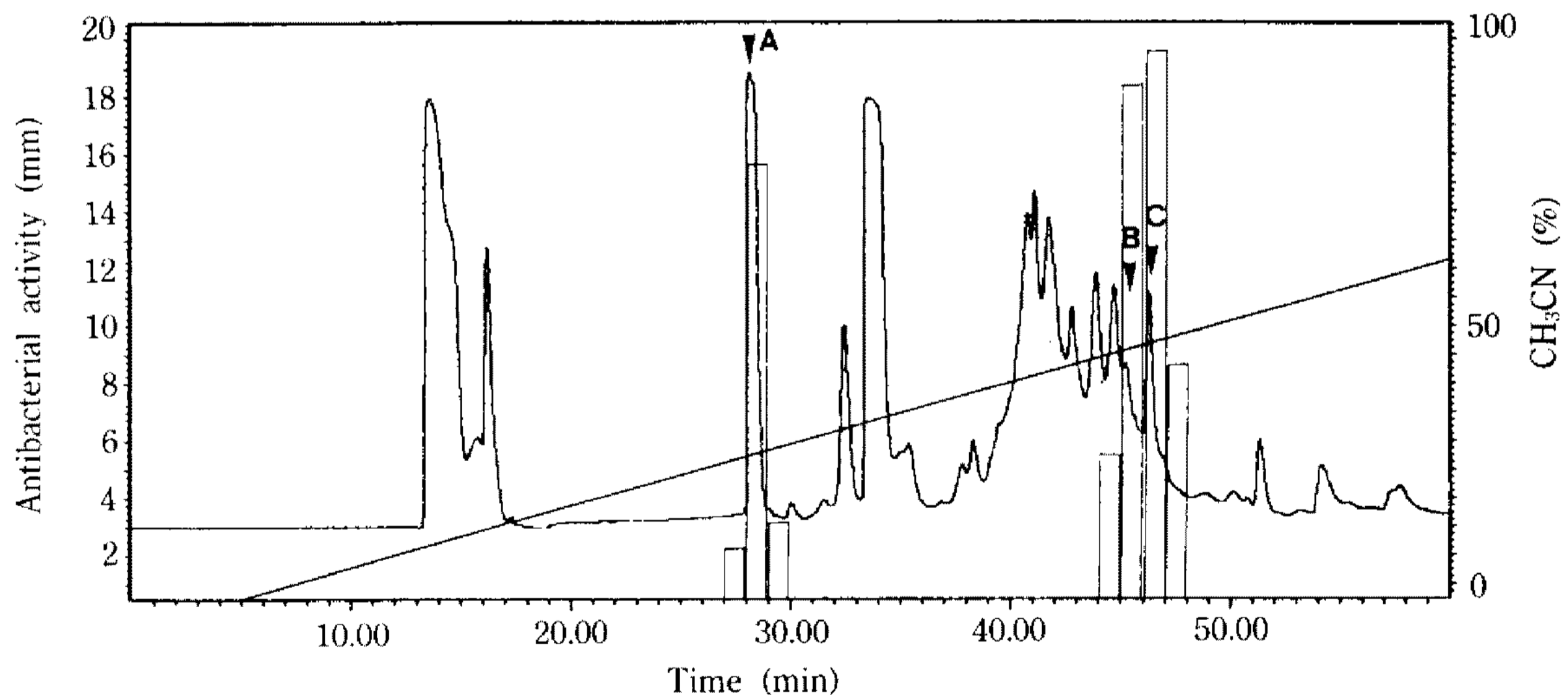
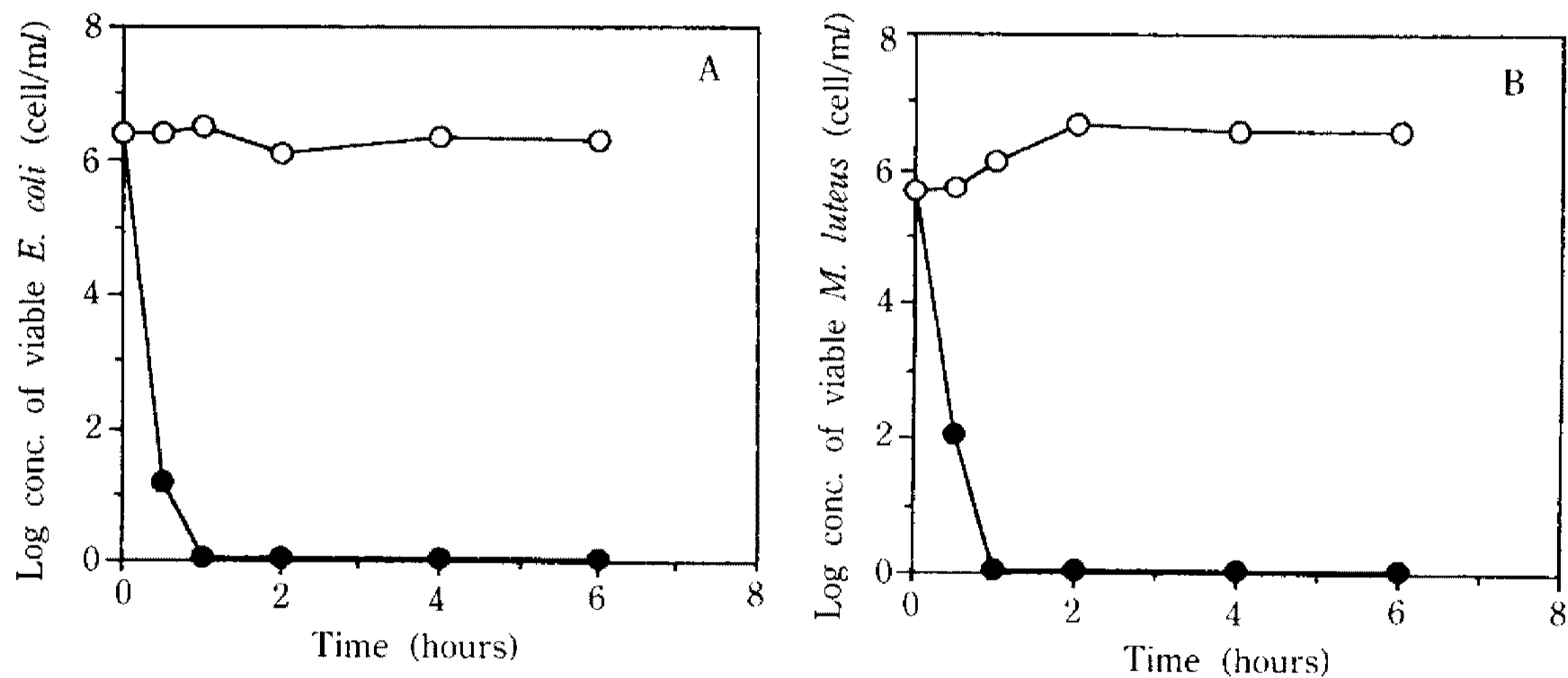


Fig. 3. Reversed-phase HPLC chromatogram of antibacterial substances from *Protoetia brevitarsis*. After CM-sepharose ion-exchange column, the active substance was fractionated on a YMC-PACK ODS-18 column (250×20 mm). Elution was performed over 60 min with a linear gradient from 0% (5 min) to 60% (60 min) acetonitrile in a acidified water (0.50% TFA) at a flow rate of 4 ml/min. The absorbance was monitored at 220 nm. The antibacterial activity was tested on aliquots of each fraction by plate growth inhibition assay. Peak A: activity against *E. coli*, Peak B and C: activity against *M. luteus*.

Table 1. Antibiotic spectrum of Protacacin I and II from immune hemolymph of *P. brevitarsis*.

Activities are expressed as follows: +, 2 to 4 mm; ++, 4 to 8 mm; +++, 8 to 16 mm; +++, above 16 mm; -, no inhibition

Strains		Activities	
		Protacacin I	Protacacin II
Gram(-) bacteria	<i>E. coli</i> KCTC 2597	+++	+
	<i>E. coli</i> KCTC 1682	++	+
	<i>Enterobacter cloacae</i> KCTC 2361	++	+
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2208	+++	++
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KCTC 2004	+++	+
Gram(+) bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621	+++	++
	<i>Staphylococcus epidermis</i> KCTC 1917	+++	++
	<i>Bacillus thuringiensis</i> KCTC 1033	+++	+
	<i>Streptococcus lactis</i> KCTC 1913	+++	+
	<i>Micrococcus luteus</i> KCTC 3063	++	++++
Fungi	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KCTC 1552	-	-
	<i>Candida albicans</i> KCTC 1940	-	-
	<i>Penicillium citrinum</i> KCTC 1255	-	-
	<i>Aspergillus niger</i> KCTC 2119	-	-

**Fig. 5. Bactericidal activities of Protacacin I and II.**

Each 10 μ g of Protacacin I and II were added to 100 μ l of an exponential growth phase culture ($OD_{600} = 0.15 - 2.0$) of *E. coli* (A) and *M. luteus* (B) (treated: $- \bullet -$, controls: $- \circ -$). Aliquots were removed at various time intervals and were plated on nutrient agar to determine the number of colony forming units (CFU) after an overnight incubation at 37°C.

항생물질의 활성

정제된 Protacacin I과 Protacacin II의 여러가지 미생물에 대한 항생활성 범위를 plate growth inhibition assay로서 측정하였다(Table 1). 각각의 미생물에 ml 당 1 mg의 Protacacin I과 II를 10 μ l씩 첨가한 결과, 두가지 모두 본 실험에 사용된 모든 세균에 대해 항생활성을 나타낼 수 있었고, Protacacin I이 *E. coli*를 비롯한 그람 음성균에 보다 효과적인 반면, Protacacin II는 *M. luteus*에 대한 활성이 특이적으로 강하게

나타났다. 그러나 본 실험에 사용된 효모나 곰팡이 종류에서는 아무런 항생활성이 발견되지 않았다.

*E. coli*에 대하여 강한 항생활성을 나타내는 Protacacin I과 *M. luteus*에 대해 강한 항생활성을 가지는 Protacacin II를 이용하여 liquid growth inhibition assay를 실시하였다. Protacacin I과 II를 *E. coli*와 *M. luteus*에 각각 첨가하였을 때 30분 내에 대부분의 세포가 사멸하였다(Fig. 5). 또한 전자현미경을 이용하여 세포의 사멸 양상을 관찰한 결과, 짧은 시간내에

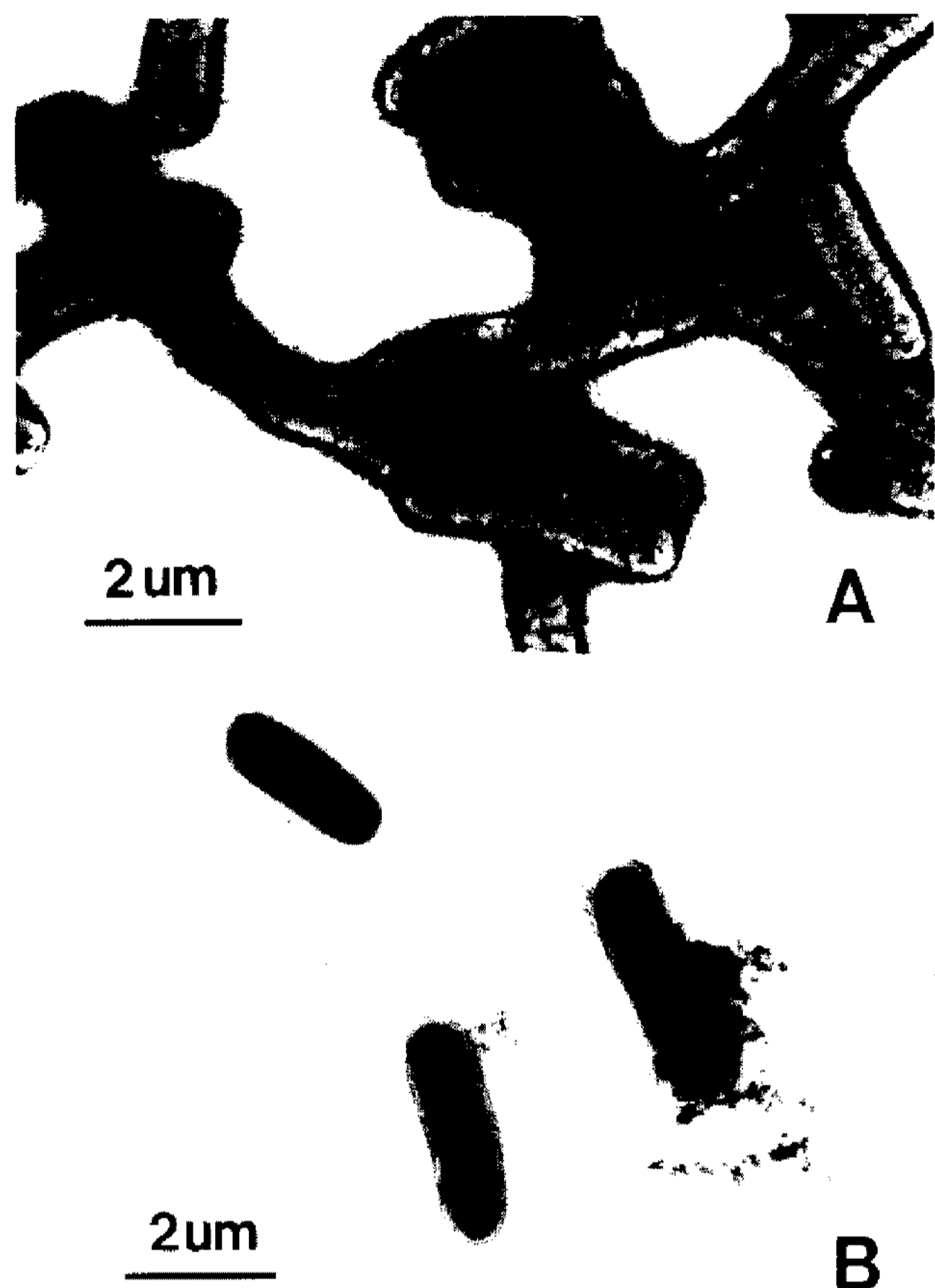


Fig. 6. Electron micrograph of *E. coli* cells treated with Protacacin I, stained with 1% PTA.

A: non-treated *E. coli* cells. B: Protacacin I-treated *E. coli* cells.

대부분의 *E. coli* 세포가 급격히 파괴되는 것을 볼 수 있었고, 특히 세포의 말단 표층으로부터 용균현상이 일어나고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 6). 이러한 결과로 볼 때 Protacacin I은 강한 bactericidal 활성이 있는 것으로 생각된다.

결론적으로, 본 연구에서의 Protacacin I과 II는 지금까지 알려져 있는 곤충유래 항생활성물질들과는 일부 상이한 생물학적 및 이화학적 특성을 지니고 있으며, 또한 흰점박이꽃무지로부터의 생체활성물질에 관한 보고는 전혀 없기에 이들을 새로운 물질이라 생각하고 현재 분리된 물질 전체를 비롯한 활성부위의 보다 자세한 펩타이드 구조 및 서열을 탐색, 분석중에 있다.

요 약

흰점박이꽃무지(*Protaetia brevitarsis*)의 유충 체강에 적당량의 *E. coli* 현탁액을 주사하고 일정시간 경과 후의 체액을 채취하여 유도된 항생활성물질 탐색 및

활성범위를 검정하였다. 탐색된 물질을 plate growth inhibition 방법으로 항생활성을 측정하고 이온교환 크로마토그래피, 역상 HPLC, 이온교환 HPLC 및 SDS-PAGE 등의 방법에 의해, 분자량 약 9 kDa, 12 kDa의 항생활성 펩타이드를 분리정제하고 이들을 각각 프로테신(Protacacin) I과 II로 명명하였다. 프로테신 I은 광범위의 그람 양성세균 및 그람 음성세균에 대하여 강한 항생활성을 나타내었으며, 프로테신 II는 일부 그람 양성세균에 특이적으로 높은 항생활성을 나타내었다. 또한 프로테신 I과 II는 pH와 열에 대해서도 안정하였다.

참고문헌

1. Ando, K., and S. Natori. 1988. Molecular cloning, sequencing, and characterization of cDNA for Sarcotoxin IIA, an inducible antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (Flesh fly). *Biochem.* **27**: 1715-1721.
2. Ando, K., and S. Natori. 1988. Inhibitory effects of sarcotoxin IIA, an antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina*, on growth of *Escherichia coli*. *J. Biochem.* **103**: 735-739.
3. Boman, H.G., I. Faye, G.H. Gudmundsson, J.Y. Lee, and D.A. Lidholm. 1991. Cell free immunity in cecropia: A model system for antibacterial proteins. *Eur. J. Biochem.* **201**: 23-31.
4. Bulet, P., S. Cociancich, J.L. Dimarcq, J. Lambert, J.M. Reichhart, D. Hoffmann, C. Hetru, and J.A. Hoffmann. 1991. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J. Biol. Chem.* **266**: 24520-24525.
5. Casteels, P., C. Ampe, F. Jacobs, M. Vaeck, and P. Tempst. 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J.* **8**: 2387-2391.
6. Casteels, P., C. Ampe, L. Riviere, J.V. Damme, C. Elicone, M. Fleming, F. Jacobs, and P. Tempst. 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honey bee (*Apis mellifera*). *Eur. J. Biochem.* **187**: 381-386.
7. Dimarcq, J.L., D. Zachary, J.A. Hoffman, D. Hoffman, and J.M. Reichhart. 1990. Insect immunity: expression of two major inducible antibacterial peptides, defensin and dipteracin, in *Phormia teranovae*. *EMBO J.* **9**: 2507-2515.
8. Gotz, P., and H.G. Boman. 1985. Insect immunity. *Comp. Insect Physiol. Biochem. Pharmacol.* **3**: 453-485.
9. Hewitt, W., and S. Vincent. 1989. *Theory and Application of Microbiological Assay*, Pp. 38-79. Acade-

- mic Press, San Diego, California.
10. Hultmark, D., H. Steiner, T. Rasmuson, and H.G. Boman. 1980. Insect immunity: Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *Eur. J. Biochem.* **106**: 7-16.
 11. Kockum, K., J. Faye, P.V. Hofsten, J.Y. Lee, K.G. Xanthopoulos, and H.G. Boman. 1984. Insect immunity: isolation and sequence of two cDNA clones corresponding to acidic and basic attacins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J.* **3**: 2071-2075.
 12. Lambert, J., E. Keppi, J.-L. Dimarcq, C. Wicker, J.-M. Reichhart, B. Dunbar, P. Lepage, A.V. Dorselaer, J. Hoffmann, and J. Fothergill. 1989. Insect immunity: isolation from immune blood of the dipteran *Phormia terranova* of rabbit lung macrophage bactericidal peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**: 262-266.
 13. Matsuyama, K., and S. Natori. 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.
 14. Schagger, H., and G.V. Gagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 368-379.
 15. Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Benich, and H.G. Boman. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect. *Nature(Lond)*. **292**: 246-248.

(Received November 23, 1993)