

한국산 갈색거저리로부터 분리된 항진균단백질의 항균효과와 그 작용 범위

정승조 · 이영훈¹ · 정재훈² · 이복률³ · 한동민*

원광대학교 분자생물학과

¹한국과학기술원 화학과

²한국과학기술원 생명과학과

³부산대학교 약학과

Antifungal Effect and activity spectrum of crude antifungal proteins from hemolymph of larvae of *Tenebrio molitor* in Korea

Seung Jo Chung, Young Hoon Lee¹, Jae Hoon Chung²,
Bok Ruel Lee³ and Dong Min Han*

Department of Molecular Biology, Wonkwang University, Chonbuk 570-749

¹Department of Chemistry, KAIST, Taejon 305-701

²Department of Life Science, KAIST, Taejon 305-701

³Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735

ABSTRACT: Antifungal protein from the hemolymph of larvae of *Tenebrio molitor* in Korea was partially purified by C₁₈ open column chromatography and assayed for the activity spectrum using 3 kinds of yeast and 4 kinds of filamentous fungi. The crude antifungal protein showed static activity for a broad range of fungal species. Weak cidal effects were observed in growing yeast type cells, including *Candida* and *Saccharomyces*. The affected cells were changed from ovoid to swollen and spherical form in shape. For filamentous fungi including *Aspergillus* and *Fusarium*, the crude antifungal protein affected the spore germination and the hyphal growth but not the viability significantly.

KEYWORDS: Antifungal protein, *Tenebrio molitor*, activity spectrum

최근에 곤충 및 식물의 방어 물질로서 항미생물 단백질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지 3종류의 단백질이 보고되어 있는데, 첫째로 cecropin으로서 이는 여러 곤충에서 분리되었으며 (Steiner *et al.*, 1981; Samakovlis *et al.*, 1990), 그 특징은 외부에서 균을 주입하거나 상처를 가할 때 곤충의 지방질에서 분비되는 항균단백질로서 주로 그람 양성균이나 그람 음성균에 대한 항균력을 가지고 있다. 둘째는 magainin으로서 이것은 *Xenopus laevis*의 소화관이나 표피에서 분리·정제된 것이며, 외부 병원균에 대하여 양서류의 표피를 보호하는

역할을 하는 것으로 추정되고 있다(Zasloff, 1987; Giovannini *et al.*, 1987). 셋째는 defensin이란 생체 방어 단백질로서 사람을 포함한 여러 종류의 포유동물의 식세포로부터 분리·정제되었는데, 이들은 항세균, 항진균, 항바이러스 활성이 있는 단백질로 발표되었다. 최근에 defensin은 돼지의 여포세포에서도 분리·정제되어 그 일차 구조가 보고되었다 (Ouellette *et al.*, 1989). Cecropin, magainin, defensin은 공통적으로 양전하를 띤 아미노산을 포함하고 있으며, 항세균성 활성을 나타내는 기전은 세포막에 channel을 형성하여 선택적으로 막의 작용을 차단하는 것이라고 추정되고 있다(Westerhoff *et al.*, 1989; Kagan *et al.*, 1990; Wade *et al.*, 1990).

*Corresponding author

그러나 곤충에서 생성되는 항진균 활성을 가진 단백질에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 현재까지 상업적으로 이용되고 있는 항진균 제제는 대부분이 단일구조의 유기화합물 합성체이고 단백질 구조를 가진 항진균 제제는 거의 개발되지 않고 있는 상태이다. 생물로부터 단백질 구조를 가진 항진균 물질이 분리된 경우는 식물에서 분리·정제되어 일차 구조와 생화학적 특성에 관한 연구결과가 보고된 것들이 있다(Huynh *et al.*, 1992; Cammue *et al.*, 1991). 최근에는 소의 식도로부터 항진균 및 항균 작용을 가진 단백질이 분리 정제되어 일차 구조와 그 특성에 관한 연구결과가 발표되었다(Diamond *et al.*, 1991). 항진균 단백질 중에는 cysteine을 많이 포함한 peptides(Cammue *et al.*, 1991; Diamond *et al.*, 1991)와 chitinase(Huynh *et al.*, 1992) 등이 항진균 활성을 나타내는 것으로 보이고 있다.

본 연구는 곤충들이 진균이 많이 존재하는 흙이나 습지 등 불결한 서식 환경에서 성장할 수 있는 것은 곤충의 체내에 항진균 단백질과 같은 자체 방어 물질이 있는 것이 한 요인이라고 가정하고, 그러한 곤충들 중 체액에 *Candida albicans*에 대해 항진균 작용을 나타내는 물질을 지닌 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)로부터 그 물질을 부분·정제하여 진균에 속하는 여러 균주에 있어서 나타나는 활성 범위와 효과의 정도 및 활성 기작을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험 동물

곤충 강(Class Insecta), 딱정벌레 목(Order Coleoptera), 거저리 과(Family Tenebrionidae), 거저리 속(*Genus Tenebrio*)에 속하는 한국산 야생 갈색거저리(*Tenebrio molitor*)의 유충을 실험재료로 사용하였으며 24°C에서 밀기울과 배추잎을 먹이로 하고 습기보존을 위해 숨을 덮어서 사육하였다.

실험 대상 균주

효모형 진균류(酵母型 眞菌類)로 *Candida albicans* KCTC1940, *Saccharomyces cerevisiae* DBY747, *Trimorphomyces pabulonaceus*, 사상형 진균류(絲狀型 眞菌類)로 *Aspergillus nidulans* FGSC4, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria mali*를 사

용하였다.

배지 및 배양

*C. albicans*는 sabouraud 배지에서 배양하였고, *S. cerevisiae*는 YEPD, *A. nidulans*와 *A. niger*는 Aspergillus CM(Harsani, 1976), *F. oxysporum*와 *A. mali*는 potato dextrose 또는 YG(Timberlake, 1980)에서 각각 배양하였다. *S. cerevisiae*와 *A. mali*는 30°C에서, 나머지는 37°C에서 배양하였다.

항진균 단백질 추출 및 부분 정제

유충의 체액을 뽑아 체액 성분에 들어 있는 phenyloxidase에 의한 melanization을 방지하기 위해 phenylthiocarbamide 10 mg을 처리하였으며, 수확한 체액을 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 증류수로 10배 희석하고 고분자 단백질을 제거하기 위해 100°C에서 15분간 열처리한 후 24시간 동안 4°C에서 방치한 다음 거름종이로 여과하여 변성된 고분자 단백질을 걸러냈다. 여과액에 5% trifluoroacetate(TFA)를 섞어서 최종 농도가 체액 시료의 0.05%가 되도록 준비하였다. C₁₈ open column을 100% CH₃CN에서 suspending한 lesion으로 충진하고 위의 시료를 loading 하였다. 조건은 100% CH₃CN과 45% CH₃CN 용매를 각각 시료의 2배의 부피가 되게 사용하였다. 용출 속도는 6 ml/8 min이었다. 용출된 각 fraction에서 200 μl씩 취하여 진공건조한 후 멸균한 증류수 200 μl로 녹인 다음 spectrophotometry를 이용하여 *C. albicans*에 대한 항진균력을 조사하였다. C₁₈ open column chromatography를 2차에 걸쳐 시행하였다.

단백질 정량

단백질 정량은 Lowry법을 이용하였다(Lowry and Kosebrough, 1951).

각종 진균류에 대한 항진균 단백질 추출액 처리

*C. albicans*와 *S. cerevisiae*의 single colony를 액체배지에 접종하여 12시간 동안 진탕배양한 후 일정액의 배양액을 취해 세포수가 1×10⁴~2×10⁴ cells/ml이 되도록 희석하여 최종 부피가 400 μl가 되도록 항진균 단백질 추출액과 혼합하였다. 반응 후 4시간마다 일정량의 반응액을 취하여 고형배지에

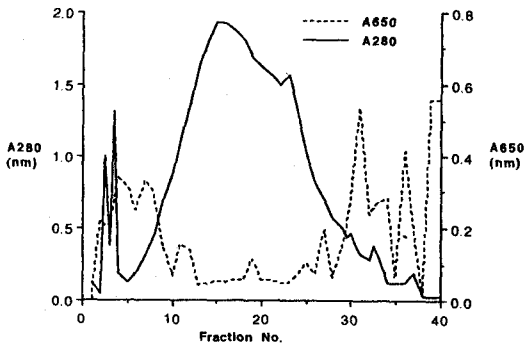


Fig. 1. C₁₈ open column pattern of antifungal protein (solid line; protein absorbance at 280 nm, dotted line; antifungal activity absorbance at 650 nm).

집중하고 24시간 배양 후 형성된 colony의 수를 측정하였다. *A. nidulans*와 *A. niger*는 3일간, *F. oxysporum*과 *A. mali*는 7일간 배양하여 0.1% tween 80 용액으로 포자를 수확하고 sodium phosphate 완충용액(0.1M, pH 7.0)로 2회 세척한 다음 항진균 단백질 추출액을 같은 방법으로 처리하였다.

결과 및 고찰

5,000 마리의 거저리 유충으로부터 혈림프를 채취하여 열처리한 후 C₁₈ open column으로 분획하였다(Fig. 1). Column을 통해 얻은 분획에 대해 spectrophotometer를 이용하여 650 nm에서 항진균력 측정을 한 뒤 활성을 보이는 9~29번의 분획을(Fig. 1) 모아 진공건조한 후 25 mg/ml의 농도가 되도록 멸균된 증류수에 녹여 4°C에 보관하여 사용하였다. 대략 5,000마리의 유충으로부터 50 mg 가량의 항진균 단백질을 추출액을 얻었으며 SDS-PAGE로 분석하였을 때 대략 4종류의 단백질이 관찰되었다.

이 항진균 단백질 추출액을 *C. albicans*, *S. cerevisiae* 및 *T. papilionaceus* 등 3종의 효모형 진균류와 *A. nidulans*, *A. niger*, *F. oxysporum*, *A. mali* 등 4종의 사상형 진균류에 처리하여 항진균 효과를 조사하였다. 효모형인 *C. albicans* 및 *S. cerevisiae*는 5 mg/ml의 항균 단백질 농도에서 거의 완벽하게 생장이 저해되었으며, 치사효과가 미약하게 나타났다(Fig. 2). 그러나 생장이 거의 일어나지 않는 조건에서는 치사효과가 나타나지 않은 것으로 보아 치

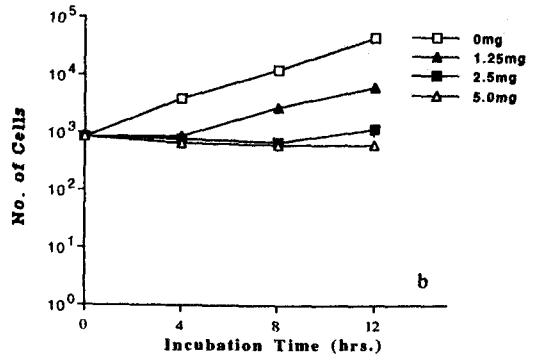
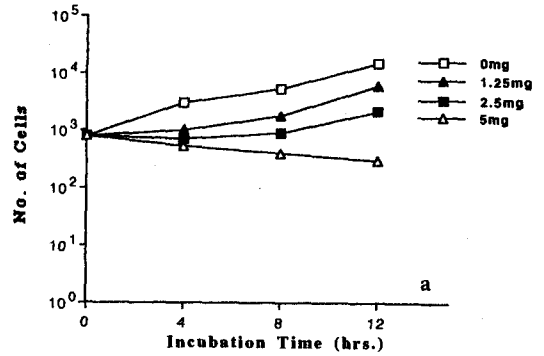


Fig. 2. Effect of crude antifungal protein on yeast type fungi: *Saccharomyces cerevisiae* (a) and *Candida albicans* (b) were treated with various concentrations and grown in YEPD and SB broth, respectively. Aliquots were removed at 4 hours interval and plated on YEPD or SB agar media.

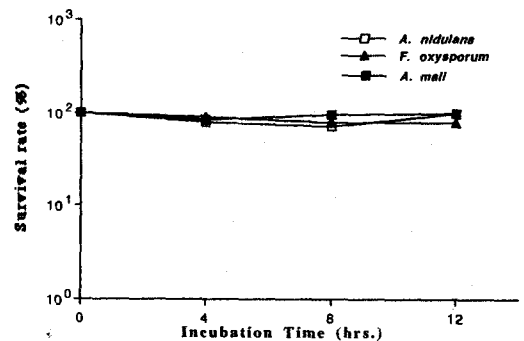


Fig. 3. Effect of crude antifungal protein on the viability of several filamentous fungi treated at the concentration of 5 mg/ml.

사작용은 생장하는 세포에서만 일어나는 것으로 생각된다(Fig. 3). 반면 사상형 진균류에 대한 항진균 효과는 효모형 진균보다 훨씬 약하게 나타났다. Via-

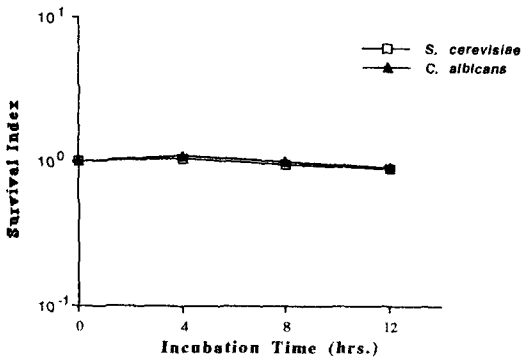


Fig. 4. Effect of crude antifungal protein on the viability of two yeast type fungi at non-growing condition. Cells were treated with antifungal protein at the concentration of 5 mg/ml and incubated in 0.05M phosphate buffer (pH 7.0).

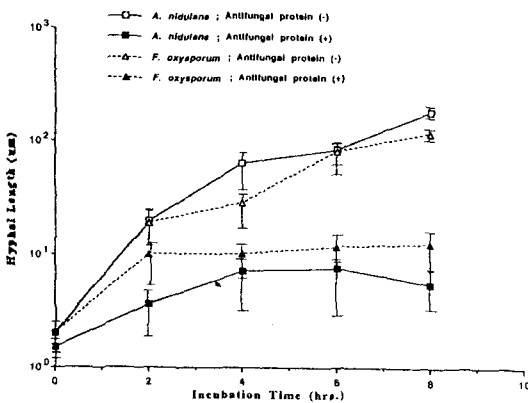


Fig. 5. Effect of crude antifungal protein on hyphal growth of filamentous fungi. Conidia of *A. nidulans* or *F. oxysporum* were treated with crude antifungal protein at concentration of 5 mg/ml and incubated in CM broth. When 5 hours had passed since incubation and more than 80% of spores protruded germ tubes, the hyphal length was estimated through microscope at every 2 hours and average length of ten hyphae was represented.

ble counting 법으로 조사한 결과를 보면 사상형 진균류에 대해서는 치사효과가 나타나지 않았다(Fig. 4; *A. niger*는 자료 미제시). 그러나 *A. nidulans*의 포자의 발아 속도와 *F. oxysporum* 및 *A. nidulans*의 정단생장 속도가 현저히 감소되는 것이 관찰되어 (Fig. 5), 항진균 단백질 추출액 속에는 사상균의 발아 및 생장을 억제하는 단백질이 있을 것으로 사료된다.

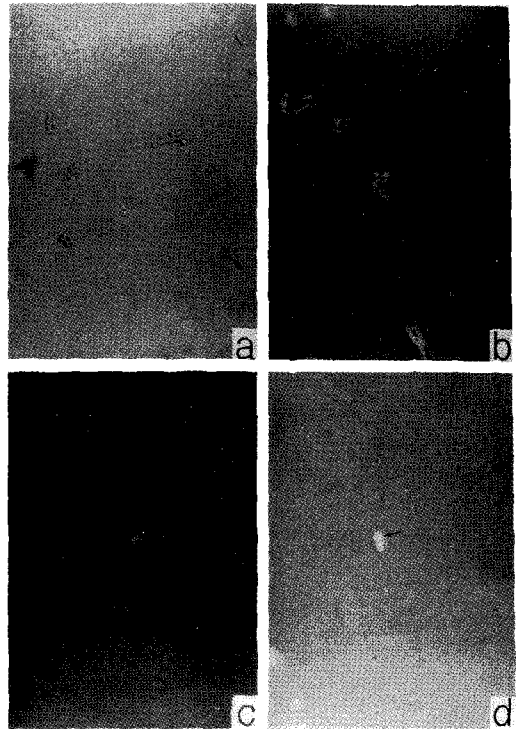


Fig. 6. Morphology of yeast cells treated with antifungal protein at the concentration of 5 mg/ml for 4 hrs. (a) *Candida albicans*: untreated cells with ovoid form. (b) *Candida albicans*: treated cells. Arrows indicate morphologically changed cells, from ovoid to swollen and spherical form. (c) *Saccharomyces cerevisiae*: untreated cells. (d) *Saccharomyces cerevisiae*: treated cells. (×400).

항진균 단백질 추출액을 처리한 후 현미경으로 형태 변화를 조사한 결과, 효모형 진균류의 세포는 반응 후 4시간이 경과하면서 세포가 정상적인 타원형에서 구형으로 변화하고 부풀어 크기가 확대되는 현상이 관찰되었다(Fig. 6). 이러한 형태적 변화는 효모의 세포벽의 구조에 이상이 발생하였을 가능성을 시사하며 이러한 변화로 인해 정상적인 출아가 저해될 것으로 추정되고 효모성 진균류에 대한 항진균 단백질 추출액의 생장 억제 또는 치사 효과는 이러한 형태적 변화와 연관이 있을 것으로 사료된다. 생장을 하지 않는 세포에 처리하였을 경우 위와 같이 부풀어진 세포 형태가 잘 관찰되지 않는 점이 이러한 가능성을 뒷받침한다.

사상형 진균류인 *A. niger*, *A. nidulans* 및 *F. oxys-*

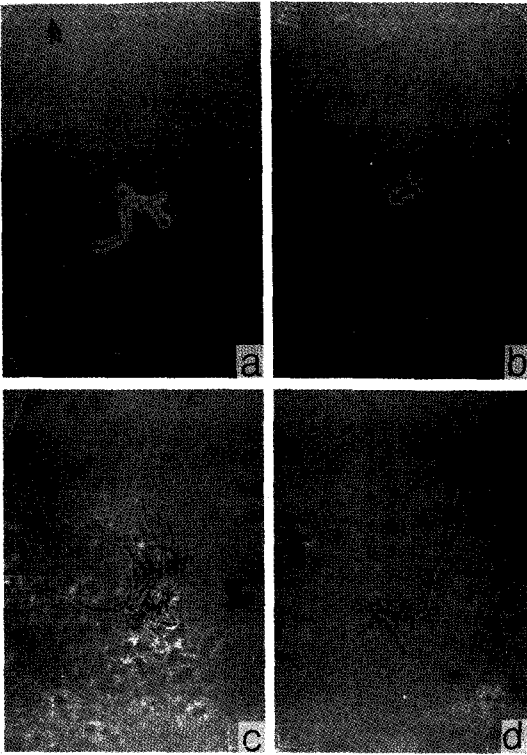


Fig. 7. Morphology of *Aspergillus niger* cells treated with antifungal protein for 8 hours. (a, b) and 12 hours. (c, d) after germination induction. (a, c) untreated cells. (b, d) treated cells. Arrows indicate the abnormal tips. ($\times 400$).

porum 경우에서도 항진균단백질 추출액을 처리하였을 때, 늦게까지 발아되지 않는 포자가 많이 관찰되었고 발아된 포자중 많은 수가 생장이 일어나는 정단의 형태가 변형되어 있음이 관찰되었다(Fig. 7; *A. nidulans* 및 *F. oxysporum*는 자료 미제시). 이러한 형태변화는 항진균단백질 추출액이 포자관의 형성과 정상적인 정단생장을 억제하는 것을 보여준다. 한편 *Basidiomycetes*에 속하는 *T. papilionaceus*는 생장 및 형태 등에 전혀 영향을 받지 않았다(자료 미제시).

이상의 결과와 같이 항진균단백질 추출액은 각종 균류에 대해 치사효과가 크지 않았고 주로 정상적 생장을 억제하는 작용을 나타내었다. 특히 사상성 진균류에 대한 치사효과는 거의 나타나지 않았으며 다만 생장의 억제하는 효과만 보여주었다. 그러나 치사효과가 미약하거나 나타나지 않는 이유가 항진균 단백질의 양이 적기 때문일 수도 있다. 따라서

거저리 혈림프에 존재하는 항진균단백질의 기능을 정확히 조사하기 위해서는 이 유전자를 분리하여 미생물에서 대량으로 발현시키는 방법이 뒤따라야 할 것이다. 또한 거저리 혈림프 추출 단백질이 비교적 넓은 범위의 균류에 대해 항진균 활성을 보이는데 이것이 한 종류의 단백질에 의한 작용인지 아니면 적어도 2종 이상의 항진균성 단백질이 존재하기 때문인지를 항진균 단백질을 순수 분리하여 조사할 필요성이 있다. 그러나 순수 분리된 단백질 양이 워낙 적기 때문에 정확한 조사를 위해서는 역시 유전자를 분리하여 미생물에서 대량으로 발현시키는 방법을 사용하여야 할 것으로 사료된다.

적 요

거저리 유충의 혈림프로부터 항진균성 단백질을 C_{18} open column chromatography로 부분 정제하여 3종류의 효모형 진균류와 4종류의 사상형 진균류에 대한 항진균 활성을 측정하였다. 항진균 단백질은 대부분의 균류에 대해 생장억제의 활성을 보여주었으며 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Candida albicans*에 대해서는 미약하나마 치사효과가 관찰되었다. 항진균 단백질을 처리하였을 때, 달걀형의 효모형 균체 모양이 둥글고 크게 변하였다. 사상형 진균류에 대해서는 생장억제 효과와 함께 균사체의 정단 부위가 심하게 변화한 형태가 관찰되었다. 이러한 결과로부터 거저리 유충의 혈림프에는 비교적 넓은 범위의 진균류에 대해 치사 또는 생장억제 기능을 가진 항진균 단백질들이 존재함을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 1992-1995 한국과학재단 특정기초 연구비(92-50-00-04)의 지원으로 수행되었음.

參考文獻

- Cammue, B.P.A., Miguel F.C. De Bolle and Franky R.G. Terras. 1991. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 2228-2233.

- Diamond, G., M. Zasloff, H. Eck, M. Brasseur, W.L. Maloy and C.L. Bevins. 1991. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3952-3956.
- Giovannini, M.G., L. Poulter, B.W. Gison and D.H. Williams. 1987. Biosynthesis and degradation of peptides derived from *Xenopus laevis* prohormones. *Biochem. J.* **243**: 113-120.
- Harsani, I., A. Granek and D.W. Mackenzie. 1976. Genetic damage induced by ethylalcohol in *Aspergillus nidulans*. *Mutation Res.* **48**: 51-74.
- Huynh, Q.K., C.M. Hironaka, E.B. Levine, C.E. Smith, J.R. Borgmeyer and D.M. Shah. 1992. Antifungal proteins from plants. *J. Biol. Chem.* **267**: 6635-6640.
- Kagan, B.L., M.E. Selsted, T. Ganz and R.I. Lehler. 1990. Antimicrobial defensin peptides from voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 210-214.
- Law, D.J. and W.E. Timberlake. 1980. Developmental regulation of laccase levels in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **144**: 509-517.
- Lowry, O.H. and N.J. Kosebrough. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Ouellette, A.J., R.M. Greco, M. James, D. Fridrick, J. Nafttilan and J.T. Fallon. 1989. Developmental Regulation of cryptdin, a corticostatin/defensin precursor mRNA in mouse small intestinal crypt epithelium. *J. Cell. Biol.* **108**: 1687-1695.
- Samakovlis, C., D.A. Kimbrell, P. Kylsten, A. Engstrom and D. Hultmark. 1990. The immune response in *Drosophila*: pattern of cecropin expression and biological activity. *EMBO J.* **9**: 2969-2976.
- Steiner, H., D. Hultmark, A. Engstrom, H. Bennich and H.G. Boman. 1981. Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**: 246-248.
- Wade, D., A. Boman, B. Wahlin, C.M. Drain, D. Andreu, H.G. Boman and R.B. Merifield. 1990. All-D amino acid-containing channel-forming antibiotic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4761-4765.
- Westerhoff, H.V., D. Juretic, R.W. Hendler and M. Zasloff. 1989. Magainins and the disruption of membrane-linked free-energy transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6597-6601.
- Zasloff, M.A. 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.