

투구게로부터 단리된 항균성 펩티드의 구조-활성에 관한 연구

이형호 · 박장수* · 박남규

부산수산대학교 수산과학대학 생물공학과

*부산대학교 자연과학대학 화학과

Tachyplepsin I 은 투구게로부터 단리된 항균성 펩티드이다. 인지질막에 대한 tachyplepsin I 의 작용 메카니즘을 조사하기 위해서 tachyplepsin I 및 5개의 유도체를 액상법으로 합성하였다. 합성한 5개의 유도체는 [Phe²]-tachyplepsin I, [Phe^{8,13}]-tachyplepsin I, S-S결합을 가지지 않는 [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplepsin I 및 [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplepsin I 의 단편인 7(Acm)과 10(Acm)이다. 원편광이색성 (CD) 스펙트럼에서 tachyplepsin I 은 완충액에서 역평행 β -구조를 취하며 산성 지질막하에서는 완충액보다 약간 불규칙적인 구조를 가진다. Carboxyfluorescein 누출 실험결과 tachyplepsin은 중성 및 산성 지질막과 강하게 상호 작용 하였다. 또한 형광 실험하에서는 펩티드의 소수성 부분이 인지질막의 내부에 존재하였다. 7(Acm) 및 10(Acm) 유도체를 제외한 모든 펩티드들은 lipopolysaccharide결합에 있어 거의 유사한 활성을 나타냈었다. 따라서 지질이중막은 tachyplepsin I 을 안정한 β -구조로부터 덜 규칙적인 구조로 구조적 변화를 유도한다고 여겨진다.

Key words : Phospholipid bilayers, Tachyplepsin I, Leakage, Lipopolysaccharide-binding, Mechanism of action

최근, 어패류, 곤충, 양서류, 파충류, 그리고 척추동물은 생체내에서 균, 기생충에 대해 항균활성을 나타내는 염기성 폴리펩티드를 생산하는 데 아마도 이것은 침입한 균 및 이물질에 대한 숙주의 자체방어 메카니즘에 의한 것 같다(Kini & Evans, 1989; Bernheimer & Rudy, 1986).

현재까지 천연물로서 알려져있는 염기성 폴리펩티드를 단순히 1차 구조에 따라 세 분류로 다음과 같이 나눌수 있다. 첫째로 천연 항균활성 물질인 melittin(Dempsey, 1990), magainins(Soravia *et al.*, 1987), cecropins(Steiner *et al.*, 1988), sarcotoxin(Okada & Natori, 1985), mastoparan B(Park *et*

al., 1995)등으로, 이들은 양친매성 linear peptide로서 α -helix 구조를 취하고 있다. 둘째로 apidaecin(Casteels *et al.*, 1989)과 같은 linear peptide로서, 불규칙 구조를 취하고 있다. 셋째로 defensins(Eisenhauer *et al.*, 1989), bactenesin(Romeo *et al.*, 1988)처럼 분자내에 disulfide bond 형성에 의해 제한을 받고 있는 cyclic peptide로서 이들은 대개 양친매성 β -sheet 구조를 취하고 있다. 첫째 그룹의 항균 작용 메카니즘에 관한 연구는 많이 보고되어져 있으나, 후자에 대한 연구는 그리 활발하지 않기 때문에, 본 연구에서 해양생물인 투구게로부터 단리된 tachyplepsin I 과 그 유도체를 액상법으로 합성하여

구조-활성관계와 그들의 항균 작용 메커니즘을 밝히고자 한다.

최근에 분자내에 2개의 S-S결합을 가지는 일련의 염기성 항균활성 펩티드가 *Tachypleus tridentatus*와 *Limulus polyphemus*와 같은 여러 투구게의 혈구 추출물로부터 단리되어 졌으며 각각 tachyplepsins I-III(Nakamura *et al.*, 1988 ; Miyata *et al.*, 1989) 및 polyphemsins I 과 II로 불리고 있다. Tachyplepsin I은 그람 양성 및 음성균 그리고 곰팡이를 포함하고 있는 대부분의 미생물의 성장을 0.8~12 $\mu\text{m}/\text{ml}$ 의 최소농도(Nakamura *et al.*, 1988)에서 저해한다고 알려져 있으며, 흥미롭게도 그들은 lipopolysaccharide (LPS)에 결합하며, *Limulus* clotting cascade에서 LPS에 의해 활성화된 초기인자, factor C의 활성을 유의성 있게 저해하였다. 혈구에서 tachyplepsin의 농도는 극히 높으며, 개개의 투구게의 혈관림프에 대략 10 mg 존재한다고 한다. Tachyplepsin I의 일차구조는 Fig. 1에 나타내었다.

NMR에 의한 tachyplepsin I의 2차구조 해석에 의하면, 이 펩티드는 β -turn과 2개의 S-S결합에 의해 연결된 역평행 β -sheet 구조를 취하고 있다(Kawano *et al.*, 1990). 또한 tachyplepsin은 친수성 영역과 소수성 영역으로 분리된 양친매성 구조를 취하고 있다. 이런 양친매성 구조는 LPS 또는 세균막과 tachyplepsin I의 상호작용에 있어서 매우

중요한 역할을 하고 있는 것 같다. 본 연구는 인지질막상에서 양친매성 β -구조를 지니는 tachyplepsin I의 작용메커니즘에 관해 조사하였다.

Tachyplepsin I은 친수성 영역의 2번 위치에 하나의 Trp을, 소수성 영역의 8번 및 13번 위치에 2개의 Tyr을 가지고 있다. Shieh *et al.* (1989)의 보고에 의하면 laurylphosphorylcholine (LPC) 미셀과 tachyplepsin I이 상호작용할 때 Trp잔기 그리고 하나 또는 두 개의 Tyr잔기가 같은 방향에서 상호작용하고 있다고 하지만, 특히 인지질막에 의해 유도된 구조적인 변화에 대해선 잘 알려져 있지 않다.

따라서 Tachyplepsin I의 유도체를 이용하면 그러한 문제점을 명백히 하는데 있어서 효과적이라 생각되어진다. 이러한 이유 때문에 2번 위치의 Trp잔기를 Phe으로 치환한 $[\text{Phe}^2]$ -tachyplepsin I, 8과 13위치의 Tyr잔기를 Phe로 치환한 $[\text{Phe}^{8,13}]$ -tachyplepsin I 외에 S-S결합을 가지고 있지 않는 $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,7,12,16}]$ -tachyplepsin I, 그리고 $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,7,12,16}]$ -tachyplepsin I의 N-말단 헵타펩티드 (7Acm)와 C-말단 데카펩티드 (10Acm)를 합성하였다. 합성 유도체들의 일차구조는 Fig. 1에 나타내었다. 인지질막과 tachyplepsin I 및 그것의 유도체간의 상호작용을 형광 및 소광현상측정 형광 물질의 누출 활성 및 LPS-결합 활성에 의해 조사하였다.

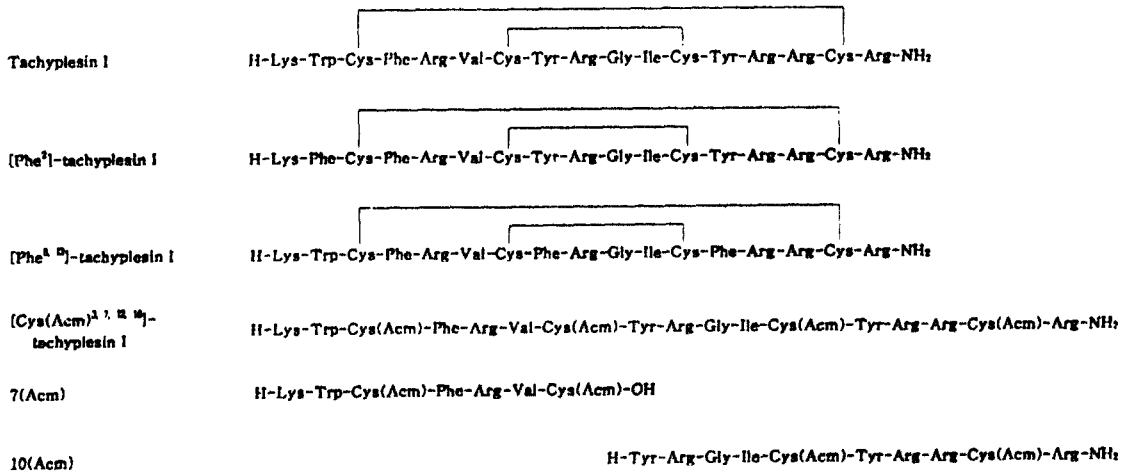


Fig. 1. Structures of tachyplepsin I and its analogs.

재료 및 방법

1. Liposome(인공막) 조제

인지질로서는 Egg yolk phosphatidylcholine (EYPC)과 Egg yolk phosphatidylglycerol (EYPG)을 사용하였으며 인공막의 조제법은 다음과 같다. EYPC 또는 EYPC-EYPG (3:1) (20 mg)이 녹아 있는 클로로포름 용액을 질소 가스를 사용하여 증발시켜 lipid film을 얻은 후, 20 mM Tris-HCl 완충액으로 수화시켜 30분 동안 실온에서 vortex 하고, Tomy Seiko ultrasonic disrupter Model UR-200P를 사용하여 10분간 3번 초음파처리를 행하였다. 얻어진 인공막은 0.1M NaCl을 포함하는 20 mM Tris-HCl 완충액으로 원하는 농도로 희석한 후 즉시 사용하였다.

2. 원편광이색성(circular dichroism : CD) 스펙트럼

CD스펙트럼은 JASCO J-600 spectropolarimeter를 사용하여 측정하였다. EYPC 또는 EYPC-EYPG (3:1)로 구성된 인공막 존재하에서 펩티드의 CD 스펙트럼 측정의 경우, 0.9 mM EYPC 또는 EYPC-EYPG (3:1)의 인공막을 포함하고 있는 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.0)에 펩티드를 녹였다. 인공막에 의한 산란을 보정하기 위해 인공막 자체의 CD 스펙트럼은 인공막 존재 하에서의 그것으로부터 감하였다.

3. 인공막으로부터 carboxyfluorescein (CF)의 누출효과

인공막으로부터 CF의 누출은 Suenaga *et al.* (1989)의 법에 따라 결정하였다. CF이 봉입된 인공막과 CF이 봉입되지 않는 liposome은 Sepharose 4B Column을 사용하여 분리하였다. 2 ml씩 들어 있는 분획들중 7번째 분획에 수집된 small unilamellar vesicle을 누출실험에 사용하였다. 인지질 농도를

70 μ M로 하기 위해 Tris-HCl 완충액으로 적당히 희석한 펩티드 용액(50 μ m)을 25°C에서 인공막 용액에 첨가하였다. 인공막으로부터 누출되는 CF의 형광 증가는 470 nm에서 excitation을 고정시키고 515 nm에서 emission을 관찰하였다. 형광 강도의 변화는 펩티드 첨가후 3분간 측정하였다. CF의 완전한 방출은 Triton X-100(0.1% v/v)을 첨가함으로써 실행되었다. 형광물질 방출의 %는 100 ($f-f_0$)/(f_i-f_0) 식에 의해 계산하였다. 여기서 f는 펩티드에 의해 유도된 형광 강도이며, f_0 및 f_i 는 각각 완충액 그리고 0.1% Triton X-100으로 처리시의 형광 강도이다.

4. 형광 스펙트럼

형광 스펙트럼은 JASCO FP-550A spectropolarimeter를 사용하여 기록하였다. 스펙트럼은 25°C에서 Trp을 포함하는 펩티드의 수용액 또는 인공막 상태에 있어서의 Trp의 스펙트럼을 보기위해 280 nm에서 excitation을 고정시키고 emission으로 Trp의 형광 변화를 측정하였다 (Suenaga *et al.*, 1989). 그리고 형광소광제인 요오드를 200 μ M의 EYPC-EYPG (3:1)의 산성지질막 존재하에서 그리고 완충액 상태하에서 적정함으로써 펩티드의 Trp형광의 소광 현상을 측정하였다. 또한 Stern-Volmer 방정식을 이용하여 소광 data를 분석하였다.

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$$

여기서 [Q]는 소광의 농도, F_0 와 F는 소광제 농도 [Q]의 비존재와 존재하에서 각각 280 nm의 형광 강도를 나타낸다. 또한 K_{sv} 는 Stern-Volmer 소광 상수를 나타낸다.

5. LPS-결합 활성

합성 화합물들을 사용하여 LPS에 의해 활성화된 factor C의 활성에 관한 억제 효과를 측정하였다 (Nakamura *et al.*, 1988). 합성 물질들의 단위는

2 µg LPS에 의해 증개되어지는 50%의 factor C 활성을 저해하는 양으로서 정의한다.

6. 펩티드 합성

(6-1). 측쇄가 보호된 dipeptide 합성, Boc-AA₁-AA₂-OPac (AA=아미노산)

THF용매를 사용하여 Boc-AA₁-OH를 녹인 후 Et₃N을 넣은 용액에 isobutyl chloroformate를 -15°C에서 첨가한 후 거기에 H-AA₂-OPac · TFA를 CHCl₃용매에 넣고 Et₃N을 넣은 용액을 첨가하여 0°C에서 2시간 반응 시킨 후 실온에서 하루동안 반응시켜 Thin layer chromatography (TLC)로 반응의 여부를 확인하였다. 반응용액을 농축기로 증발시킨 뒤 EtOAc에 녹여 5% KHSO₄, 물, 5% NaHCO₃, 물로 씻은 후 EtOAc로 추출하여 Na₂SO₄로 물을 제거시켰다. Na₂SO₄를 제거한 용액을 농축시켜 ether로써 결정화하고 미반응물질은 silica gel column (CHCl₃ : MeOH system)을 이용하여 회수하였다.

(6-2). 측쇄가 보호된 heptadecapeptide 합성
우선 C-말단에 Boc-Arg(Tos)-OH에 아마이드화를 행한 Boc-Arg(Tos)-NH₂를 TFA처리하여 H-Arg(Tos)-NH₂를 얻은 뒤, Boc-Cys(4-MeBzl)-OH와 (6-1)의 방법처럼 무수 혼합방법에 의해 보호된 dipeptide를 얻었다. 그리고 Boc-Phe-OH 및 Boc-Cys(4-MeBzl)-OH를 phenacylbromide와 작용시켜 Boc-Phe-OPac 그리고 Boc-Cys(4-MeBzl)-OPac을 만든 후, 이들을 TFA처리하여 얻은 H-Phe-OPac와 H-Cys(4-MeBzl)-OPac을 사용하여, Boc-Cys-(4-MeBzl)-OH와 H-Phe-OPac를, Boc-Val-OH 또는 Boc-Ile-OH와 H-Cys(4-MeBzl)-OPac를 6-1)의 방법처럼 무수 혼합방법에 의해 결합시켜 보호된 dipeptides들을 얻었다. 그리고 tri-, tetra-, pentapeptide들은 Fig. 2에 있는 것처럼 활성에스테르 또는 EDC-HOBt에 의해 단계적으로 합성하였다. Boc-group은 TFA 또는 4 N의 DXN/HCl로, phenacyl ester는 Zn/AcOH로 제거하였으며, 최종적으로 얻어지는 보호된 화합물은 라세미화를 줄이기 위해 EDC-HOBt로 결합시켰다. TLC, 녹는점 측정과 원

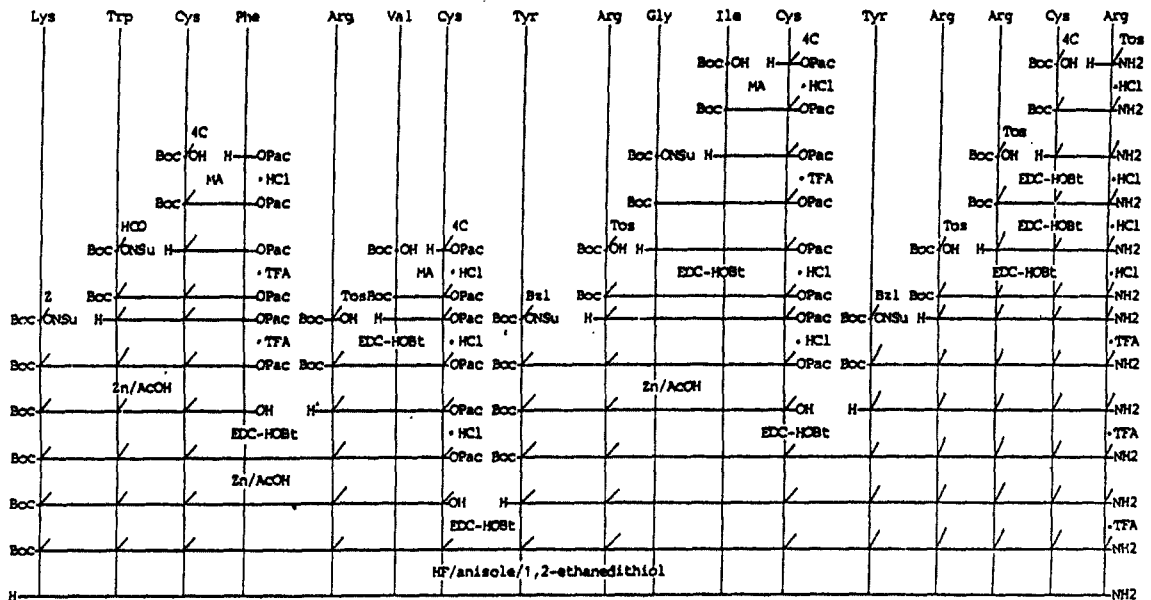


Fig. 2. Synthetic scheme of tachyplesin I by liquid phase method.

소 분석을 통하여 이 화합물들의 순도 측정을 행하였다. 또한 TLC를 사용하여 반응 중간 단계를 확인하였다.

(6-3). HF처리에 의해 탈보호된 linear heptadecapeptide

(6-2)에서 얻어진 최종 화합물들은 측쇄가 보호되어 있으므로 보호기들을 HF 처리하여 제거하였다. 우선 측쇄의 보호기들이 이탈하면서 생성되는 부반응을 방지하기 위해서 시료(50 mg)에 scavenger인 anisole (1.2 ml)과 1,2-ethanedithiol (0.8 ml)를 HF (8 ml)와 혼합시켜 0°C에서 3시간 반응시킨후 수압 아스피레이터로 HF를 제거한 뒤, 남아있는 HF와 scavenger를 ethylacetate로 제거하였다. 계속해서 5% 초산으로 탈보호된 heptadecapeptide를 추출하여 동결건조시킨후, 30% 초산으로 평형화된 Sephadex G-25 column 및 Sephadex-CM을 이용하여 물질을 분리시켜 재동결건조하였다. Yield는 70%였다.

(6-4). 펩티드 정제

상기의 (6-3)에서 얻은 물질(35 mg)을 2-mercaptoethanol로 환원시킨 후, Sephadex G-10 column으로 2-mercaptoethanol을 제거하였다. 그 후 얻은 분획을 동결 건조하여 실온에서 3일간 공기 산화를 행하여 올바르게 folding된 화합물과 그렇지 않은 화합물을 reverse-HPLC를 사용하여 crude한 화합물을 분리하였다. 분리 A용매로서는 0.1% TFA가 포함된 물과 B용매로서는 0.1% TFA를 포함하는 아세트니트릴을, 그리고 분리 column으로 TSK gel ODS 120T column (0.78×30 cm)을 사용하였으며 (Fig. 3) 최종 yield는 4%였다. 최종 분취한 물질을 사용하여 아미노산 분석을 한 결과 이론값과 실험값이 잘 일치하였으며 결과는 다음과 같다. Gly 1.1(1), Val 1.0(1), Ile 1.0(1), Tyr 1.8(2), Phe 0.9(1), Lys 0.9(1), Arg 5.1(5). Tachyplesin I 이외의 다른 유도체들도 유사한 방법으로 합성 및 정제를 행하고 아미노산 분석을 하였다.

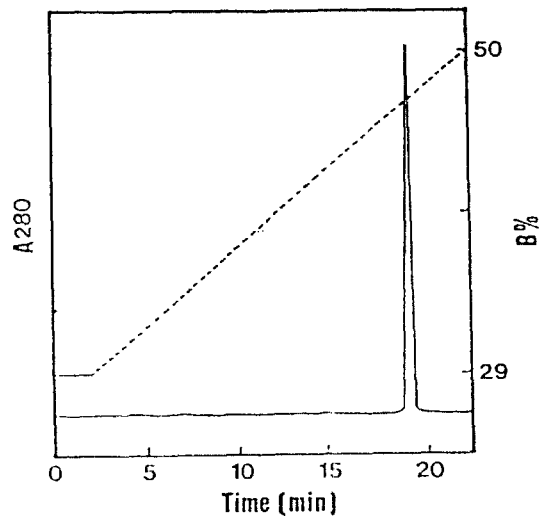


Fig. 3. HPLC elution profile of purified tachyplesin I. TSK gel ODS 120T column (0.78×30 cm). Solvent system : 0.1% trifluoroacetic acid (A) - acetonitrile containing 20% A (B). Elution was conducted using a linear concentration gradient of B, 29% for 2min and 29-50% for 20min. Flow rate, 2.0 ml/min.

결 과

1. Tachyplesin I 및 유도체 합성

Tachyplesin 및 유도체는 Fig. 2와 같이 액상법으로 합성했으며 합성한 유도체는 Fig. 1과 같다. Tachyplesin 2 위치의 Trp잔기를 Phe로 치환한 [Phe²]-tachyplesin I, 8과 13위치의 Tyr잔기를 Phe로 치환한 [Phe^{8,13}]-tachyplesin I, 2개의 disulfide결합을 절단한 형태의 linear한 [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplesin I, 그리고 [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplesin I의 N-말단부의 헵타펩티드 (7Acm)와 C-말단의 데카펩티드 (10Acm)를 합성하였다.

2. Lipopolysaccharide(LPS) 결합 활성

그람음성균은 외막에 LPS를 포함하고 있기 때문에 LPS에 대한 tachyplesin I 및 그 유도체들의 친화력을 측정된 결과, LPS에 대한 tachyplesin I 및 그것의 유도체들의 친화력을 ID_{50} 으로 나타냈다. LPS의 2.5 μg 을 중화시키는데 필요한 ID_{50} 값은 천연 및 합성 tachyplesin I에 대해 각각 1.05 μg , 0.92 μg 이었다. $[\text{Phe}^2]$ -tachyplesin I은 0.90 μg , $[\text{Phe}^{8,13}]$ -tachyplesin I은 1.65 μg , $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,7,12,16}]$ -tachyplesin I은 1.50 μg 이었다. 그리고 7(Acm) 및 10(Acm)의 경우는 중화시키는 능력을 지니지 못했다.

또한 천연품과 합성품의 ID_{50} 이 차이가 나는 것은 활성측정을 하기 위해 천연품을 취하는 과정에서 합성품보다 세균에 많이 노출되어졌기 때문이라 생각한다. 따라서 LPS에 결합 능력을 나타내기 위해선 tachyplesin을 구성하고 있는 17개의 모든 아미노산들이 필요하다고 생각한다.

3. CD 스펙트럼

CD 스펙트럼은 완충액, LPC 미셀, EYPC, 그리고 EYPC-EYPG(3:1) 존재하에서 측정하였다. 완충액에서 tachyplesin I은 210 nm 주위에서 broad한 negative minimum을 나타냈는데 (Fig. 4) 이것은 이 펩티드가 어떤 규칙적인 구조, 즉 β -구조를 취한다는 것을 나타내고 있다 (Izumiya *et al.*, 1979). Tachyplesin I 유도체들도 완충액 상태에서 유사한 구조를 취하였다. LPC 미셀에서 tachyplesin I은 완충액에서의 스펙트럼보다 negative minimum이 적어졌고 235 nm 주위에서 약한 positive band를 나타냈다. EYPC에서 tachyplesin I의 CD 스펙트럼은 펩티드의 구조에 대한 어떤 특징적인 결과를 나타내지 않았다. EYPC-EYPG(3:1)로 구성된 인지질막에서 tachyplesin I은 205 nm 주위에서 broad한 negative minimum을 나타냈다. 이러한 CD 스펙트럼의 변화는 완충액에서의 β -구조가 다소 덜 규칙적인 구조, 아마도 부분적으로 불규칙 구조를 포함하고 있는 β -구조로 구조변화를 하고 있다는 것을 나타내고 있는 것 같다.

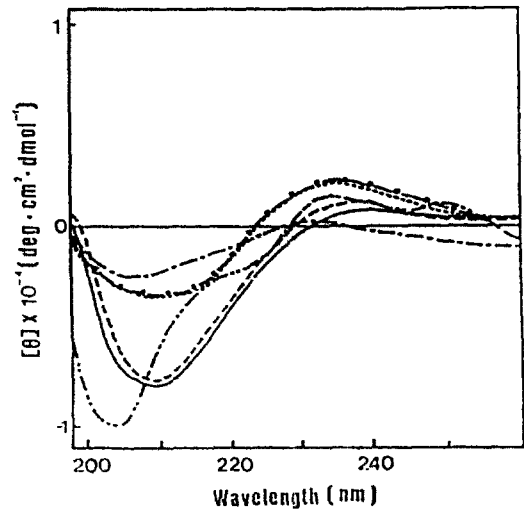


Fig. 4. CD spectra of tachyplesin I. The spectra were recorded in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0). (-----) native tachyplesin I, (—) synthetic tachyplesin I. Synthetic tachyplesin I in the presence of 1.5 mM LPC micelles (·····), 0.9 mM EYPC liposomes (- · - · -), and EYPC-EYPG(3:1) liposomes (- - - - -). Native tachyplesin I in the presence of 1.5 mM LPC micelles (- · - · -). The peptide concentrations are 10~40 μM .

4. 지질 이중막으로부터 형광물질의 누출활성

세균막과 합성물질간의 상호작용을 간접적으로 알아보기 위해서 산성지질 및 중성지질로부터 형광물질 누출능력을 조사하였다(Fig. 5). 그 결과 7(Acm) 및 10(Acm)을 제외한 모든 물질들은 저농도(약 1.5 M)에서 완전히 형광물질을 누출시켰다.

5. 합성 펩티드들의 형광 및 소광현상

지질이중막에서 존재하는 펩티드의 거동을 알아보기 위해서 형광스펙트럼을 사용하여 산성 인지질막과 Trp을 포함하는 합성 펩티드들의 상호작용을 조사하였다. 완충액에서 tachyplesin I, $[\text{Phe}^{8,13}]$ -tachyplesin I, $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,7,12,16}]$ -tachyplesin I, 그

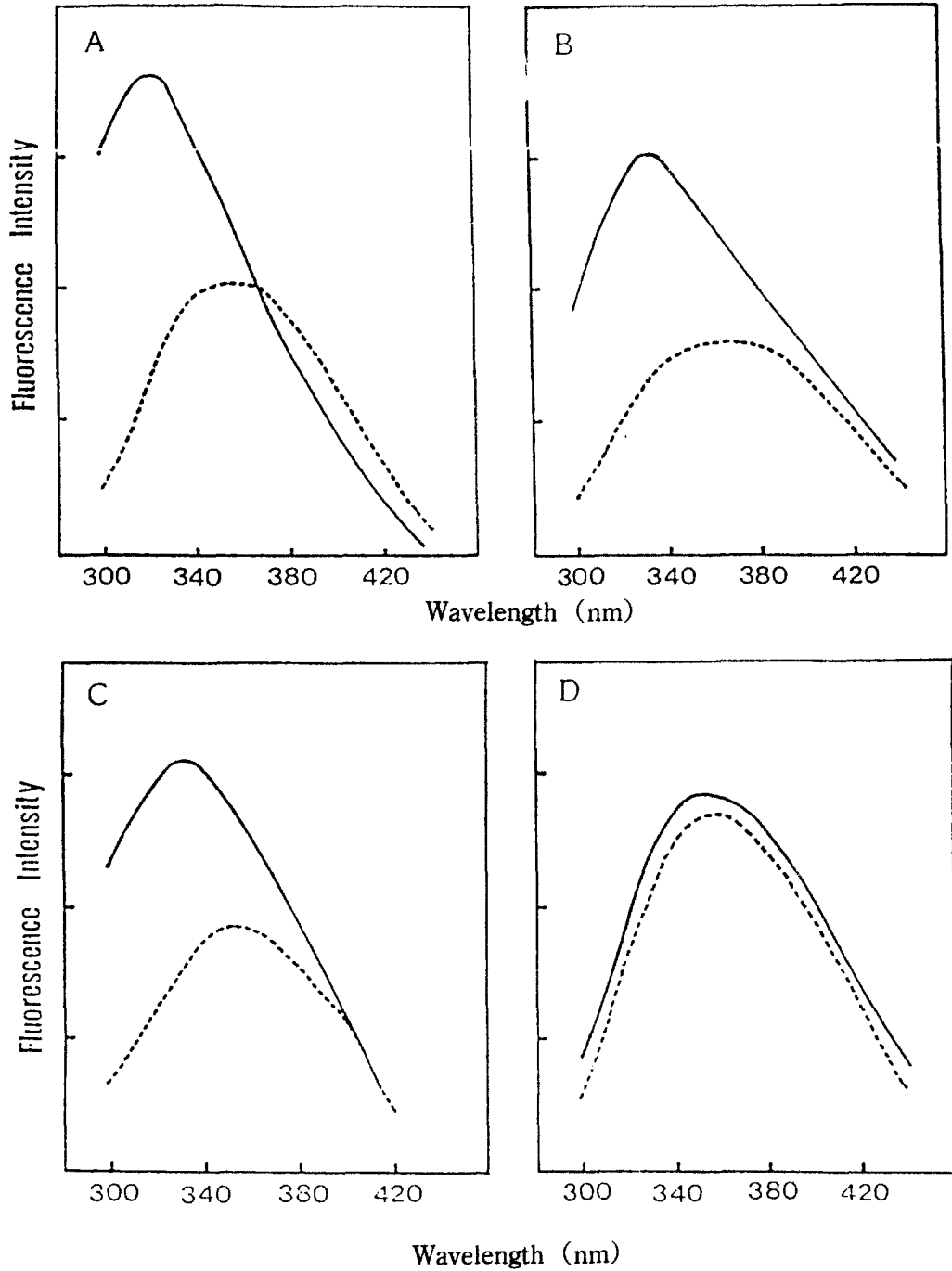


Fig. 5. Fluorescence spectra of tachyplepsins I (A), [Phe^{8,13}]-tachyplepsin I (B), [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplepsin I (C), and 7(Acm) (D) in the absence (-----) and presence (——) of EYPC-EYPG(3:1) liposomes. The concentration of peptide and liposomes were 11 and 220 M, respectively.

리고 7(Acm)의 형광 스펙트럼은 각각 356, 366, 354, 358 nm에서 emission 최대치를 나타내었다 (Fig. 5). EYPC-EYPG (3 : 1)의 산성 인공막을 첨가했을 때 tachyplesin I 과 $[\text{Phe}^{8,13}]$ -tachyplesin I, $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,7,12,16}]$ -tachyplesin I의 emission 최대치는 각각 34, 32, 22 nm의 단파장 쪽으로 이동하였다(Fig. 5A-C). 그러나 7(Acm)의 경우 단파장으로서의 이동은 보이지 않았다(Fig. 5D).

또한 산성 liposome 존재 및 비존재하에서 Trp 형광에 대한 I⁻의 소광효과를 알아보았다(Fig. 6). 산성 liposome하에서 tachyplesin I, $[\text{Phe}^{8,13}]$ -tachyplesin I, $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,7,12,16}]$ -tachyplesin I의 Stern-Volmer plot의 slope, K_{sv} 는 각각 5.4, 6.0, 4.3 M^{-1} 이었고 완충액에 대한 slope, K_{sv} 는 각각 9.3, 9.5, 및 8.7 M^{-1} 로 약 절반이었다.

고 찰

이전의 NMR연구에 의하면 tachyplesin I은 수용액내에서 β -turn을 가지는 역평행 β -sheet 구조, 다시 말해 소수성 cluster(장기 6-13)와 친수성 clus-

ter(장기 14-17)에 의해 형성된 양친매성 구조를 취함을 제시하였다(Kawano *et al.*, 1990). 현재의 CD연구는 tachyplesin I이 완충액내에서 그런 β -구조를 취하고 있음을 시사해 주고 있다. 다시 말해 LPC 미셀과 중성 혹은 산성인지질막의 존재시 관찰되어지는 다른 형태는 tachyplesin I의 구조가 미셀과 인지질막에 의해 구조적인 변화가 일어날 수 있다는 것을 보여주고 있다. 특히 산성인지질막의 환경에서는 덜 규칙적인 구조를 취하나 그다지 β -구조와 다르진 않다. 이것은 disulfide bonds들에 의해 형성된 안정한 역평행 β -구조는 완충액 상태보다는 덜 규칙적으로 구조화된 했지만 미셀과 인지질 이중막에서는 CD 스펙트럼으로서는 해석되기 어려운 어떤 특별한 형태로 변형되어질 수 있다는 의미로도 해석되어질 수 있다. 직선의 형태를 이루는 $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,7,12,16}]$ -tachyplesin I은 중성의 인지질막만을 제외한 모든 환경하에서 cyclic peptide의 형태와 비슷한 형태를 취하였다. 따라서 tachyplesin I 및 유도체들이 2차 구조를 취하는데 있어서 disulfide bond의 존재 유무는 그다지 상관없다고 생각되어진다.

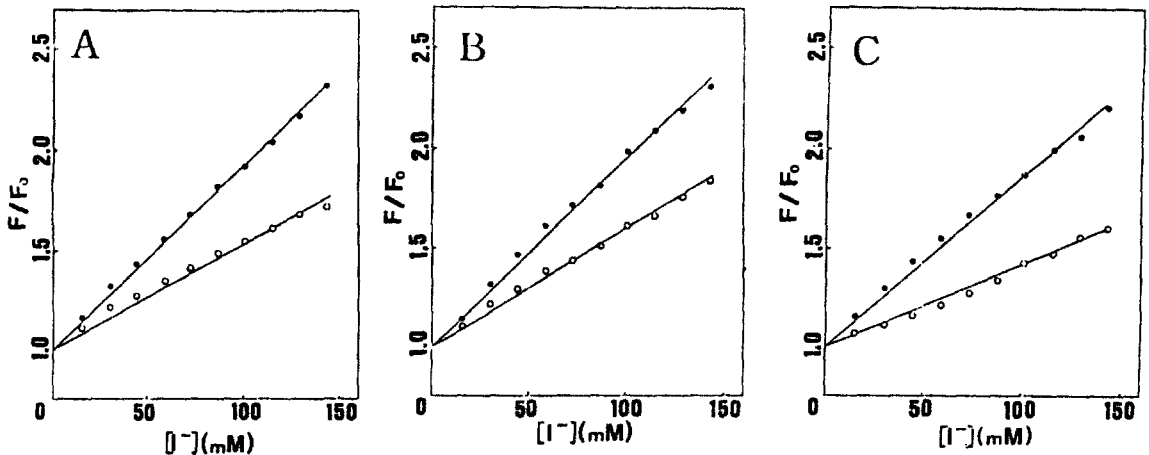


Fig. 6. Stern-Volmer plots of the quenching of tryptophan fluorescence in tachyplesin I (A), $[\text{Phe}^{8,13}]$ -tachyplesin I (B) $[\text{Cys}(\text{Acm})^{3,7,12,16}]$ -tachyplesin I (C) was recorded in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 25°C in the absence (●) and presence (○) of 200 M EYPC-EYPG (3 : 1) liposomes. The concentration of the peptide was 6 M and the excitation wavelength was 280 nm.

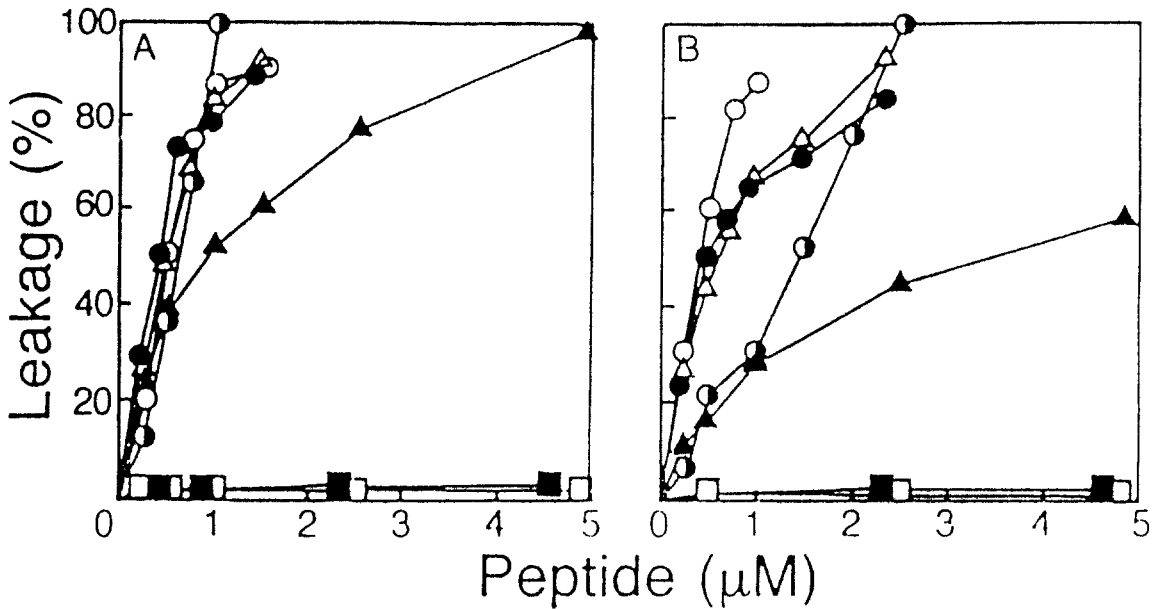


Fig. 7. Release of encapsulated carboxyfluorescein from EYPC liposomes(A) and EYPC-EYPG (3 : 1) liposomes (B) as a function of the peptide concentration. Tachyplesin I (○), [Phe²]-tachyplesin I (●), [Phe^{8,13}]-tachyplesin I (△), [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplesin I (▲), 7(Acm) (□), and 10(Acm) (■), and 4₃ (⊙). The concentrations of EYPC liposomes and EYPC-EYPG(3 : 1) liposomes were 70 μM.

Tachyplesin I 과 유도체에 의해 중성 혹은 산성인지질 이중막으로부터 형광물질의 누출은 인공막을 파괴하는 능력을 보여준다. Trp이나 Tyr을 Phe로 치환해도 형광물질을 누출시키는 활성에는 그다지 큰 영향을 주지 않았다. [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplesin I 을 cyclic peptide인 tachyplesin I 과 비교해 봤을 때 비록 덜 효과적이지만 지질이중막을 파괴 할 수 있는 반면, [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplesin I 의 구성 성분인 7(Acm)과 10(Acm)의 경우 지질 이중막의 파괴 능력이 없다는 것을 나타내었다(Fig. 7). 중성 혹은 산성 인지질막 존재시 형광스펙트럼 (Fig. 5A-C)과 형광의 소광실험(Fig. 6)은 tachyplesin I 과 그 유도체들의 Trp잔기가 지질 이중막에 묻혀 있음을 보여주고있다. 그렇기 때문에, tachyplesin I 은 지질 head 그룹의 전하에 상관없이 이중막을 파괴하기 위해 지질과 결합되어져 있다. 따라서 Trp를 포함하는 친수성 부위와 지질이중막

내의 소수성 core와의 상호작용이 펩티드가 지질 이중막을 통과 할 수 있도록 만든다. 형광물질 누출실험에서 tachyplesin I 의 첨가후 즉시 파열이 관찰되었기 때문에, 이 형광누출 결과로 미루어보아 펩티드가 지질 이중막을 통과했음을 알 수 있다. 7(Acm)의 경우 blue shift가 관찰되지 않는다는 것은 이러한 짧은 펩티드가 인공막과 상호작용 할 수 없다는 것을 의미한다(Fig. 5D).

Fig. 7에서 나타낸 바와 같이, 양친매성인 동시에 소수성인 염기성 α-helical 펩티드 4₃은 중성 및 산성 지질막과 반응하여 형광물질을 방출시킬 수 있다. 이것은 소수성 부분이 지질이중막의 소수성 부위를 통과하기 때문이다(Mihara *et al.*, 1987). 또한 LPC 미셀과 tachyplesin I 이 상호작용할 때 Trp잔기와 Tyr잔기가 같은 방향에서 상호작용하고 있다고 보고되어 있다 (Shieh *et al.*, 1989).

한편, 친수성및 소수성 잔기들로 이루어진 Ac-(Ser-Val-Lys-Val)₂-NHCH₃는 β-구조를 취하는 염

기성 펩티드로서 산성 지질 이중막과만 반응하여 형광물질을 아주 약하게 방출한다(Ono *et al.*, 1990). β -sheet 구조를 가진 tachypleisin이 중성 지질막과 아주 강하게 상호작용을 일으킬 수 있다는 사실은 역평행 β -sheet 구조의 같은 편에 위치한 네 개의 소수성 아미노산 잔기들(Val⁶, Tyr⁸, Ile¹¹, Tyr¹³)로 구성된 소수성 head group 존재에 의해 설명되어질 수 있다(Kawano *et al.*, 1990). 이런 소수성 cluster는 4₂에서와 같이 중성 지질 이중막에 대한 친화성 증가를 가져온다.

많은 항균활성을 지닌 생리활성펩티드들은 천연에서는 양친매성 생체막상에 작용한다(Kaiser & Kezdy, 1987). 양친매성 환경에서, 펩티드는 α -helix 및 β -구조와 같은 특별한 2차 구조를 이루게 된다. 지질 이중막의 비극성 내부에서는 입체적으로 허용된 펩티드의 2차 구조가 수용성 환경에서의 취하는 구조보다 훨씬 안정하기 때문에 인지질에 의한 환경은 unfolding된 폴리펩티드에는 매우 적합하지 않다(Popot and Engelman, 1990). 그러나 이러한 현상은 tachypleisin I의 경우는 아니다.

현재의 연구는 지질 이중막이 tachypleisin I을 β -구조로부터 덜 규칙적인 구조로의 구조 변화를 유도함을 보여주고 있다. 이것은 tachypleisin I과 지질 이중막간의 강한 소수성 상호작용이 에너지적으로 안정한 2차 구조를 다소 덜 안정한 구조로 전환시킴을 의미한다. 항균활성 펩티드의 작용에 대해, Kini와 Evans (1989)는 펩티드들이 세포막과 반응하기 위해 구조상의 공통되는 부위, 즉 양이온 영역은 세포표면과의 결합에 영향을 주는 반면 소수성 영역은 용혈 활성을 결정한다고 제안했다.

따라서 위에서 제안한 가설과 현재의 연구의 모든 실험 결과들을 토대로 tachypleisin I과 인지질막과의 가상적인 상호작용을 Fig. 8에 나타내었다. 우선 일차적으로 펩티드의 친수성 부분과 인지질막의 극성부분간의 정전기적인 상호작용이 일어나며, 이러한 상호작용이 방아쇠 역할을 하여 펩티드의 소수성 부분과 인지질막의 비극성부분간의 소수성

상호작용이 일어난 후 tachypleisin I의 역평행 β -sheet 구조와 알맞은 소수성 부분이 규칙적으로 정렬된 이중막구조를 확장시켜 막투과성을 증가시켜 막내용물들을 누출시킬 뿐만 아니라 항균 활성을 포함한 tachypleisin의 다양한 생물활성을 가져오는 것으로 생각되어진다. 그리고 Staphylococcal delta toxin 및 melittin (Bernheimer & Rudy, 1986), pardaxins (Shai *et al.*, 1991), defensins (Eisenhauer *et al.*, 1989), sarcotoxin I (Okada & Natori, 1985), magainins (Soravia *et al.*, 1988), cecropins (Steiner *et al.*, 1988), 그리고 미토콘드리아 단백질의 전구체의 여러 유도체들 (Mihara *et al.*, 1987)을 포함한 수많은 양친매성 펩티드들도 본질적으로 위에서 제시한 바와 같은 유사한 메카니즘에 의해 세포의 투과성을 증대시킬 것으로 생각되어진다.

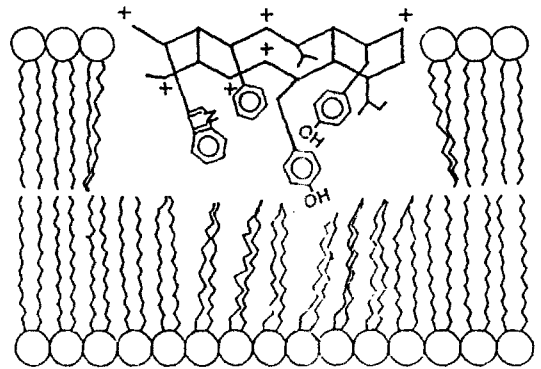


Fig. 8. A proposal mechanism of the interaction of tachypleisin I with phospholipid bilayers.

감사의 말씀

본 논문의 연구는 1994년도 교육부 해양·수산 분야 학술연구조성비에 의해 지원되었음

참고문헌

Bernheimer, A. W. and Rudy, B.: Interactions between membranes and cytolytic peptides.

- Biochim. Biophys. Acta, 864 : 123-141, 1986.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M. and Tempst, P. : Apidaecins : antibacterial peptides from boneybees. EMBO Journal, 8 : 2387-2391, 1989.
- Dempsey, C. E. and Sternberg, B. : The actions of melittin of membranes. Biochim. Biophys. Acta, 1031 : 143-161, 1990.
- Eisenhauer, P. B., Harwig, S. S. L., Szklarek, D., Ganz, T., Selsted, M. E. and Lehrer, R. I. : Purification and antimicrobial properties of three defensin from rat neutrophils. Infect. Immun. 57 : 2021-2027, 1989.
- Izumiya, N., Kato, T., Aoyagi, H., Waki, M. and Kondo, M. : "Synthetic aspects of biologically active cyclic peptides-gramicidin S and tyrocidines". pp. 49-107, Kodansha, Tokyo and Halsted press, New York, 1979.
- Kawano, K., Yoneya, T., Miyata, T., Yoshikawa, K., Tokunaga, F., Terada, Y. and Iwanaga, S. : Antimicrobial peptide, tachyplesin I, isolated from hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). J. Biol. Chem., 265 : 15365-15367, 1990.
- Kaiser, E. T. and Kezdy, F. J. : Peptides with affinity for membranes. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 16 : 561-581, 1987.
- Kini, R. M. and Evans, H. J. : A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptide. Int. J. Peptide Protein Res., 34 : 277-286, 1989.
- Mihara, H., Kanmera, T., Yoshida, M., Lee, S., Aoyagi, H., Kato, T. and Izumiya, N. : Design and synthesis of amphiphilic basic peptides with antibacterial activity and their interaction with model membrane. Bull. Chem. Soc. Jpn., 60 : 697-706, 1987.
- Miyata, T., Tokunaga, F., Yoneya, T., Yoshikawa, K., Iwanaga, S., Miwa, M., Takao, T. and Shimonishi, Y. : Antimicrobial peptides, isolated from horseshoe crab hemocytes, tachyplesin II, and polyphemusins I and II : Chemical structures and biological activity. J. Biochem., 106 : 663-668, 1989.
- Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T. and Shimonishi, Y. : Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*) J. Biol. Chem., 163 : 16709-16713, 1988.
- Okada, M. and Natori, S. : Primary structure of sarcotoxin I, an antibacterial protein induced in the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* (Flesh Fly) larvae. J. Biol. Chem. 260 : 7174-7177, 1985.
- Ono, S., Lee, S., Mihara, H., Aoyagi, H., Kato, T. and Yamasaki, N. : Design and synthesis of basic peptides having amphipathic β -structure and their interaction with phospholipid membranes. Biochem. Biophys. Acta 1022 : 237-244, 1990.
- Park, N. G., Yamato, Y., Lee, S. and Sugihara, G. : Interaction of mastoparan-B from venom of a hornet in Taiwan with phospholipid bilayers and its antimicrobial activity. Biopolymers 36 : 793-801, 1995.
- Popot, J. -L. and Engelman, D. M. : Membrane protein folding and oligomerization : The two-stage model. Biochemistry, 29 : 4031-4037, 1990.
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M. and Genaro, R. : Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. J. Biol. Chem., 263 : 9573-

- 9575, 1988.
- Shai, Y., Hadari, Y. R. and Finkels, A. : pH-Dependent pore formation properties of pardaxin analogues. *J. Biol. Chem.*, 266 : 22346-22354, 1991.
- Shieh, T. -C., Kohzuma, T., Park, N. G., Ohno, M., Nakamura, T., Iwanaga, S. and Yamamoto, T. : Synthesis and properties of tachyplesin I, a lipopolysaccharide-binding peptide, from *Tachypleus tridentatus*. *FEBS. Lett.*, 252 : 121-124, 1989.
- Soravia, E., Martini, G. and Zasloff, M. : Antimicrobial properties of peptides from *Xenopus granular gland secretions*. *FEBS Lett.* 228 : 337-340, 1988.
- Steiner, H., Andreu, D., and Merrifield, R. B., : Binding and action of cecropin and analogue : antibacterial peptides from insects. *Biochim. Biophys. Acta*, 939 : 260-266, 1988.
- Suenaga, M., Lee, S., Park, N. G., Aoyagi, H., Kato, T., Umeda, A. and Amako, K. : Basic amphipathic helical peptides induce destabilization and fusion of acidic and neutral liposomes. *Biochem. Biophys. Acta.*, 981 : 143-150, 1989.

Studies on the structure-activity of antimicrobial peptide isolated from horseshoe crab

Hyung-Ho Lee, Jang-Su Park* and Nam-Gyu Park

*Department of Biotechnology and Bioengineering, College of Fisheries Science, National Fisheries University of Pusan, *Department of Chemistry, College of Natural Science, Pusan National University*

Tachyplesin I is an antimicrobial peptide isolated from horseshoe crab. To investigate the mechanism of action of tachyplesin I for phospholipid bilayers, tachyplesin I and five analogs have been synthesized by the solution method. The synthesized five analogs are [Phe²]-tachyplesin I, [Phe^{8,13}]-tachyplesin I, [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplesin I with no disulfide bonds, 7(Acm) and 10(Acm) which denote the fragments [Cys(Acm)^{3,7,12,16}]-tachyplesin I. Circular dichroism spectra showed that tachyplesin I took an antiparallel β -structure in buffer solution and a less ordered structure in acidic liposomes. The carboxyfluorescein leakage experiment indicated that tachyplesin I interacted strongly with neutral and acidic phospholipid bilayers. In fluorescence experiment, the hydrophobic part of the peptide was shown to be embedded in lipid bilayers. All the peptides except for 7(Acm) and 10(Acm) were almost equally active in lipopolysaccharide binding. Therefore, the present study suggested that phospholipid bilayers induced a conformational change of tachyplesin I from the stable β -structure to a less ordered one.

Key words : Phospholipid bilayers, Tachyplesin I, Leakage, Lipopolysaccharide-binding, Mechanism of action