

## Cecropin A-Magainin 2 유도체 펩티드의 *Trichosporon beigelii*에 대한 항진균 활성 및 인간 적혈구 세포에 대한 용혈활성

이동건 · 신송엽 · 이명규 · 함경수\*

한국과학기술연구원 생명공학연구소 펩티드공학연구Unit

강한 항진균 활성을 나타내며, 낮은 적혈구 용혈활성을 갖는 새로운 합성 펩티드를 얻기 위하여 cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) 및 이들의 유사체들을 설계하고 이들을 고상법에 의하여 합성하였다. 합성 펩티드의 항진균 활성은 *Trichosporon beigelii*에 대한 성장억제능에 의하여 측정하였으며, 세포독성은 인간의 적혈구 세포에 대한 용혈활성에 의하여 측정하였다. 펩티드의 양쪽 친매성의 증가는 항진균활성 보다는 적혈구 용혈활성에 큰 영향을 미쳤다. Cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12)의 12번 아미노산인 Lys를 Ala으로 치환시킨 유사체 펩티드(A2)는 가장 강한 항진균활성(minimum inhibitory concentration : 2.5 µg/ml)을 나타내며 비교적 낮은 적혈구 용혈활성(200 µg/ml의 펩티드 농도에서 0.5% hemolysis를 나타냄)을 나타내었다. 따라서 A2 펩티드는 세포독성을 갖지 않으며 강한 항진균 활성을 가지는 모델로서 유용하게 사용될것이다.

KEY WORDS □ Antifungal activity, hemolytic activity, hybrid peptide, *Trichosporon beigelii*

*Trichosporon beigelii*는 1865년 Beigel 등에 의하여 최초로 발견되었으며, 사모증(white piedra)을 유발시키는 병원성 진균이다(1). 사모증은 사람의 모발이나 체모 심지어는 수염이나 눈썹 등에도 감염되며 가끔 피부, 입, 손톱, 발톱 등에서도 감염된 것이 발견되며, 일단 감염이 되면 모공으로까지 침입을 하게 되어 면역체계를 약화시키는 것으로 알려져 있다(13, 14). 지금까지 여러종류의 항진균물질들을 대상으로 치료를 하고 있으나 가장 일반적으로 사용되는 amphotericin B의 경우 2 µg/ml의 농도에서 저해효과를 보이지만 종종 그 효과가 나타나지 않는 것으로 알려져 보다 효과적이며 인체에 무해한 항진균물질의 개발이 필요한 실정이다(4, 13, 14).

현재까지 곤충, 파충류 및 포유류로부터 수종의 항균 펩티드가 발견되어 왔다. 이들 항균펩티드는 동물계의 숙주방어 및 선천적 면역에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다(2, 16). 이들 항균 펩티드중에서 cecropin (CA)(7, 10, 12) 및 magainin-2 (MA)(11, 15)는 cecropia moth의 hemolymph, *Xenopus skin*으로 부터 각각 분리되고 아미노산서열이 결정되었다. CA 및 MA는 시스테인 잔기를 가지고 있지 않으며, 구조적으로 양쪽친화성의  $\alpha$ -helix를 형성하고 있는 것으로 알려지고 있다(3). 특히 cecropin의 경우는 곤충 뿐만 아니라 pig의 intestine에서도 분리되었으며 이것으로 미루어보아 고등동물계에도 널리 존재함을 알 수 있다(7). CA 및 MA는 그람 양성균 및 그람 음성균에 모두 작용하여 항균활성을 나타내고 있으며, 특히 MA는 그람 음성균에 대해서는 cecropin보다 약한 항균활성을 나타내지만, 진균에 대하여 항진균활성을 가지고 있음이 알려져 있다(15). 또한

이들 펩티드는 세포독성을 나타내지 않는다. 특히 CA의 N말단의 양쪽친화성을 지닌 부분과 MA의 N말단의 소수성 부분의 아미노산 서열을 접합시킨 혼성 펩티드들이 본래의 천연형의 펩티드보다 강하거나 비슷한 항진균 활성을 나타내며 진핵세포에 대한 세포독성을 거의 나타내지 않는다는 것이 보고된 바 있다(5). 또한 CA의 N말단의 양쪽친화성을 지닌 부분인 CA(1-8)과 MA의 N말단의 소수성부분인 MA(1-12)를 서로 접합시킨 혼성 펩티드인 CA(1-8)-MA(1-12) 및 이들의 아미노산 치환 유사체들이 CA 및 MA와 비슷한 적혈구 용혈활성을 가지며, CA 및 MA에서 나타나지 않는 강한 항암활성을 나타낸다는 것을 보고하였다(9). 본 연구에서는 CA(1-8)-MA(1-12)의 구조와 항진균활성과의 상관관계를 검토하며, 세포독성을 가지지 않으며 보다 강한 항진균 활성을 가진 합성펩티드를 얻기위하여 CA(1-8)-MA(1-12)와 아미노산 치환에 의한 유사체 펩티드를 합성하여 인간의 적혈구 세포에 대한 용혈활성을 조사하고, 병원성 진균인 *Trichosporon beigelii*에 대한 항진균 활성을 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 펩티드의 합성

펩티드의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl) group를 아미노산의 N $\alpha$ -amino group의 보호기(protecting group)로 사용하는 고상법(solid phase method)(8)으로 합성하였다. 본 연구에서 설계한 펩티드는 모두 카르복실말단이 -NH $_2$  형태이므로 Rink Amide MBHA-Resin을 출발물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 결합에 의한 펩티드 사슬의 연장은 N-hydroxybenzotriazole(HOBt)-dicyclohexylcarbodiimide (DCC)법에 의하였다. 각 펩티드의 아미노말단의 Fmoc-아미

\*To whom correspondence should be addressed

노산을 결합 시킨 후, 20% piperidine/N-methylpyrrolidone (NMP)용액으로 Fmoc기를 제거하고 NMP 및 dichloromethane (DCM)으로 여러번 씻어준 다음 질소 가스로 말렸다. 여기에 TFA(trifluoroacetic acid)-phenol-thioanisole-H<sub>2</sub>O-triisopropylsilane(85:5:5:5:5, v/v) 용액을 가하고 2-3시간 반응시켜 보호기의 제거 및 resin으로부터 펩티드를 분리시킨 다음, diethylether로 펩티드를 침전화 시켰다. 이렇게 하여 얻은 crude 펩티드는 0.05% TFA가 포함된 acetonitrile gradient로 하여 정제형 reverse phase(RP)-HPLC column(Delta Pak, C<sub>18</sub> 300 Å, 15 µ, 19.0 mm × 30 cm, Waters, Milford, USA)을 이용하여 정제하였다.

**합성 펩티드의 아미노산 분석**

각 합성 펩티드를 6N-HCl로 110°C에서 24시간 가수분해시킨 후 잔사를 감압농축 한 뒤, 0.02 N-HCl에 녹여서 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A, Tokyo, Japan)로 아미노산 조성을 측정하였다. 펩티드의 아미노산 조성의 계산에서 Ile을 기준으로 하였다.

**사용균주 및 배지 조성**

본 실험에 사용한 *T. beigelii*(KCTC 7251)은 한국과학기술연구원 생명공학연구소의 유전자은행에서 분양받았다. *T. beigelii*의 배양은 28°C에서 YM배지(1% glucose, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 0.3% yeast extract pH 6.0)를 사용하였다.

**항진균활성의 측정**

세포주의 측정은 희석 평판법을 3회 반복하였으며, 활성 측정은 MTT방법(6)을 사용하였다. 우선 *T. beigelii* 세포수를 2 × 10<sup>5</sup>/ml이 되도록 YM배지에 희석한 후, 96 well microtiter plates(Nunc, Sweden)에 그 희석액 100 µl씩 각각의 well에 분주한 후, 각 펩티드의 최종농도가 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.32, 0.16, 0.08 µg/ml가 되도록 펩티드를 가한 후, 28°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배지의 pH를 10 × phosphate buffered saline(PBS, pH 7.0)용액 10 µl를 첨가하여 중화 시킨 후, MTT(Sigma, Louis, U.S.A.)용액 10 µl (MTT의 최종농도: 5 mg/ml)를 첨가하고, 37°C에서 4 시간 방치하였다. SDS 용액(20% SDS, 0.1 N HCl)을 30 µl씩 첨

가한 다음 37°C에서 12시간 배양 시킨 후, ELISA reader로 흡광도 570 nm에서 그 발색정도를 측정하였다. 같은 실험을 3회 반복하여 재현성을 확인하였다.

**인간의 적혈구 세포에 대한 용혈활성의 측정**

인간의 적혈구 세포를 phosphate buffered saline(PBS: 35 mM sodium phosphate, 150 mM sodium chloride, pH 7.0)용액으로 3번 세척 하였다. 펩티드를 PBS용액에 400 µg/ml이 되게 녹인 후, 이 용액을 4% 적혈구 용액에 0.5 ml을 첨가하여 펩티드의 최종농도가 각각 200 µg/ml이 되게 하였다. 이렇게 펩티드를 첨가한 적혈구 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1,000×g에서 5분간 원심 분리를 하여 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 100%의 용혈현상은 1%의 Triton X-100에 의해 파괴되는 적혈구의 측정값으로 하였다. 용혈 정도를 나타내는 % hemolysis(% HL)는 다음의 식에 의해 계산하였다. % HL=[(A<sub>414nm</sub> in the peptide solution-A<sub>414nm</sub> PBS)/(A<sub>414nm</sub> 1% Triton X-100-A<sub>414nm</sub> PBS)]×100.

**결과 및 고찰**

CA, MA, melittin(ME) 및 본 연구에서 합성한 펩티드의 아미노산 서열을 Table 1에 나타내었다. CA는 N말단은 염기성이며, 양전하를 띤 Lys잔기와 소수성 아미노산이 번갈아 가면서 배열되어 있어서 양쪽친화성을 띤 양쪽친화성 부분으로 이루어져 있으며, 중앙부분에 Gly-Ile-Ile 및 Gly-Pro 서열을 가지는 유동성부분을 가지며, C말단은 소수성부분으로 이루어져 있다. 반면에 MA는 N말단은 소수성 부분으로 C말단은 양쪽 친화성 부분으로 이루어져 있으며, 별도로 부터 분리된 ME와 매우 흡사한 구조를 취하고 있다 (Table 1). 이들 항균 펩티드는 Lys이 많이 존재하여, 양전하를 띤 부분은 세포막의 음이온 전하와의 결합에 관여하며, 소수성 부분은 펩티드의 세포막으로의 translocation에 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 설계한 CA(1-8)-MA(1-12) 혼성 펩티드도 α-helical wheel diagram(Fig. 1)에 나타낸 바와 같이 양쪽 친화성 부분을 나타내며, 특히 CA의 특징적인 양쪽친화성-유동성-소수성의 구조와 유사하다. CA(1-8)-MA(1-12) 혼성 펩티드의 α-helical wheel dia-

**Table 1.** The amino acid sequences of CA, MA, ME and hybrid peptides

Peptides	Sequences	Remarks
CA	KWKLFFKKIEKVGQNIIRDGIHKAGPA-VAVVGQATQIAK-NH <sub>2</sub>	Native peptide
MA	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	Native peptide
ME	GIGAVLKVLTGTPALISWIKR-KROQ-NH <sub>2</sub>	Native peptide
CA-MA	KWKLFFKKI GIG KFLHSAKKF-NH <sub>2</sub>	CA(1-8)-MA(1-12)
A1	KWKLFFKKI GIG KFLHSATTF-NH <sub>2</sub>	CA-MA: K <sup>18</sup> , K <sup>19</sup> → T, T
A2	KWKLFFKKI GIG AFLHSAKKF-NH <sub>2</sub>	CA-MA: K <sup>12</sup> → A
A3	KWKLFFKKI GIG KFLHLAKKF-NH <sub>2</sub>	CA-MA: S <sup>16</sup> → L
A4	KWKLFFKKI GIG AFLHLAKKF-NH <sub>2</sub>	CA-MA: K <sup>12</sup> , S <sup>16</sup> → A, L
A5	KWKLFFKKI GIG KFLKLAKKF-NH <sub>2</sub>	CA-MA: H <sup>15</sup> , S <sup>16</sup> → K, L
A6	KWKLFAKI GIG KFLHLAKKF-NH <sub>2</sub>	CA-MA: K <sup>6</sup> , S <sup>16</sup> → A, L
A7	KWKKFLKI GIG KFLHLAKKF-NH <sub>2</sub>	CA-MA: L <sup>4</sup> , K <sup>6</sup> , S <sup>16</sup> → K, L, L

The underlined amino acid residues indicate the substituted ones from CA(1-8)-MA(1-12). The superscript numbers indicate the positions in CA(1-8)-MA(1-12).

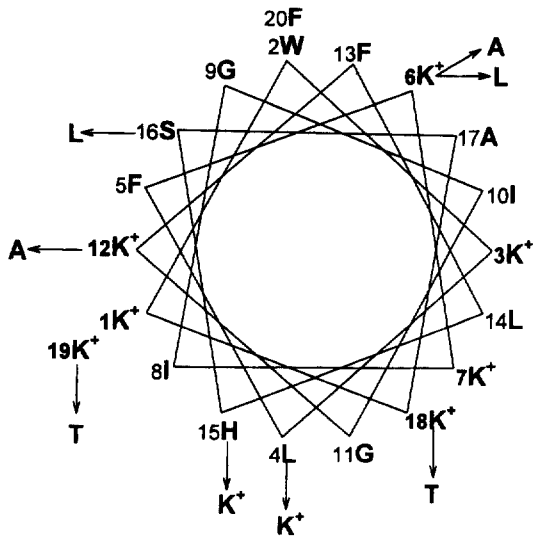


Fig. 1. The  $\alpha$ -helical wheel diagram of CA(1-8)-MA(1-12) hybrid peptide. The arrows indicate the amino acid residues in its analogue peptides.

gram을 바탕으로 하여 아미노산을 치환시킨 유사체 펩티드들을 설계하였다.

합성 펩티드들은 분석용 RP-HPLC column을 이용한 용출 양상으로부터 확인한 결과 그 순도가 모두 95% 이상으로 나타났으며(결과는 나타내지 않음), 아미노산 분석(amino acid analyzer, Hitachi, 8500A)에 의하여 각 합성 펩티드의 아미노산 조성 및 펩티드의 정량을 행하였다. 각 합성 펩티드의 아미노산 분석에 의한 아미노산 조성의 측정값과 계산값이 잘 일치함을 보였다(Table 2).

본 연구에서는 CA(1-8)-MA(1-12) 혼성 펩티드 및 특정부위를 다른 아미노산 치환 유사체들에 대한 적혈구 용혈활성 및 *T. beigeli*에 대한 항진균 활성에 대하여 조사하였다. 펩티드 농도에 따른 진균성장의 억제능을 concentration-response curve로 나타내었으며(Fig. 2), 이 curve로부터 최소 성장저해농도(MIC: minimum inhibitory concentration)값을 구하였다(Table 3). 또한 펩티드를 200  $\mu$ g/ml 농도로 투여하였을 때 펩티드의 적혈구 용혈활성을 %로 나타내었다(Table 2). 용혈활성 측정시 1% Triton X-100을 투여 하였을 때를 100% hemolysis로 간주 하였으며, 펩티드를 투여하지 않았을 때를 0% hemolysis로 간주하여, 이것을 기준으로 하여 각 펩티드

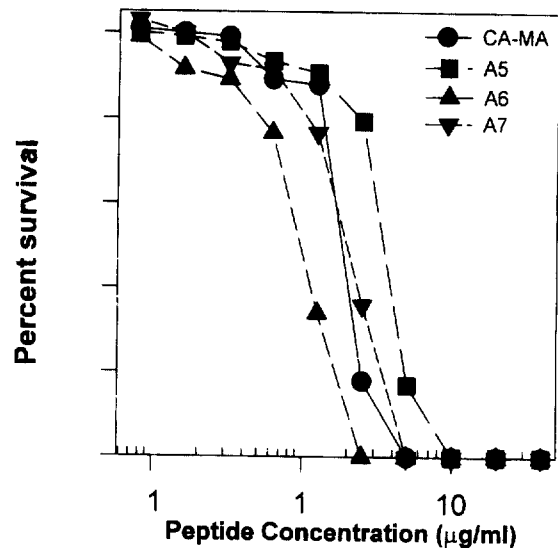
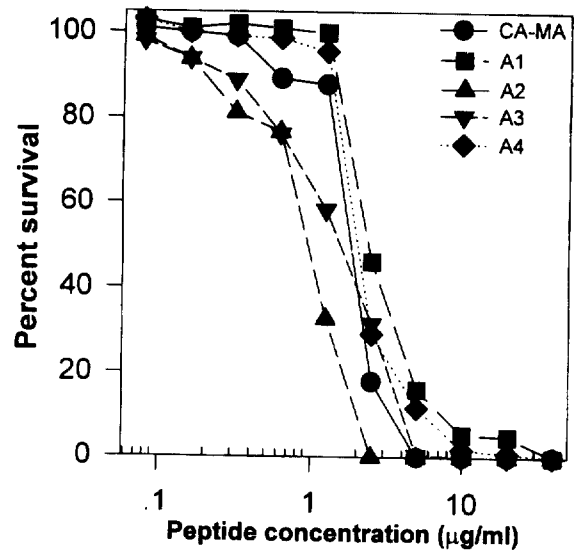


Fig. 2. The concentration-response curves of the peptides in the growth inhibition against *T. beigeli*.

에 대한 % hemolysis를 계산하였다.

세포독성의 지표가 되는 적혈구 용혈활성에 있어서는 CA(1-8)-MA(1-12)의 12번의 Lys을 Ala으로 치환시킨 유사체(A2) 및 16번의 Ser을 Ala으로 치환시킨 유사체(A3)는 낮은

Table 2. Amino acid compositions of the synthetic peptides determined by amino acid analysis

Amino acid	CA-MA	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7
Thr	0.79(1)	1.79(2)	-	-	-	-	-	-
Ser	-	0.78(1)	0.74(1)	-	-	-	-	-
Gly	2.12(2)	2.05(2)	2.05(2)	2.09(2)	2.10(2)	2.09(2)	2.07(2)	2.17(2)
Ala	1.06(1)	1.04(1)	2.04(2)	1.04(1)	2.06(2)	1.05(1)	1.96(2)	0.89(1)
Ile	2.00(2)	2.00(2)	2.00(2)	2.00(2)	2.00(2)	2.00(2)	2.00(2)	2.00(2)
Leu	2.24(2)	2.19(2)	2.20(2)	3.28(3)	3.23(3)	3.38(3)	3.23(3)	3.22(3)
Phe	3.15(3)	3.11(3)	3.09(3)	3.12(3)	3.08(3)	3.19(3)	3.09(3)	3.10(3)
Lys	6.81(7)	4.81(5)	5.92(6)	7.00(7)	5.94(6)	8.16(8)	5.91(6)	6.97(7)
His	1.05(1)	1.03(1)	1.01(1)	1.05(1)	1.02(1)	-	0.99(1)	1.03(1)

**Table 3.** Antifungal and hemolytic activities of the synthetic peptides in this study

Peptides	<i>T. beigeli</i> MIC <sup>a</sup> (μg/ml)	% Hemolysis (200 μg/ml)
CA(1-8)-MA(1-12)	5.0	0.2
A1	40.0	18.1
A2	2.5	0.5
A3	10.0	2.0
A4	20.0	39.3
A5	10.0	24.6
A6	2.5	20.0
A7	5.0	38.6

<sup>a</sup>Minimum inhibitory concentration.

적혈구 용혈활성을 나타내었다. 반면에, 18번 및 19번의 염기성 아미노산인 Lys을 Thr으로 치환시킨 유사체(A1), 12번 Lys을 Ala으로, 16번의 Ser을 Leu으로 이중치환 시킨 유사체(A4) 및 펩티드의 양쪽친매성을 증가시킨 유사체(A5, A6, A7)는 20~40%의 강한 적혈구 용혈활성을 나타내었다. A1 및 A4는 MIC값을 기준으로 보았을 때 CA(1-8)-MA(1-12)보다 8배, 4배의 항균활성의 저하를 보인 반면에 A2 및 A6은 MIC값이 2.5 μg/ml로 CA(1-8)-MA(1-12)보다 2배의 항균활성의 상승을 나타내었다.

이와 같은 결과로 부터 CA(1-8)-MA(1-12)의 양쪽 친화성을 높이거나 소수성 부분의 소수성을 높일수록 항진균 활성보다는 적혈구 용혈활성을 높이는 경향을 나타내었다. CA(1-8)-MA(1-12)의 18번 및 19번 염기성 아미노산인 Lys을 Thr으로 치환시키면 *T. beigeli*에 대한 항진균 활성에 있어서는 격심한 활성의 저하를 나타내는 반면에 적혈구 용혈활성에 있어서는 격심한 활성의 증가를 나타내었다. 이와 같은 사실은 혼성 펩티드의 친수성 부분의 Lys잔기수의 증가에 의한 양전하의 증가는 항진균 활성에 중요한 역할을 담당한다는 것을 나타내었다. 또한 A1 펩티드에 있어서 *T. beigeli*에 대한 항진균 활성과 적혈구 세포의 lysis활성의 차이는 이들 세포막을 이루는 lipid의 조성의 차이에 의한 것으로 생각된다.

특히, A2는 *T. beigeli*에 대하여 MIC값 2.5 μg/ml의 강한 항진균 활성을 나타내며, 200 μg/ml의 펩티드 농도에서 0.5%의 아주 낮은 적혈구 용혈활성을 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 A2 펩티드와 같이 세포독성이 낮으며, 강한 항진균활성을 나타내는 합성 펩티드를 얻을 수 있었으며, A2 펩티드는 *T. beigeli* 뿐만 아니라 각종 진균에 대하여 강한 항진균활성을 가지며, 낮은 세포독성을 나타내는 펩티드 항진균제를 개발하는데 유용한 모델 펩티드로 이용될 수 있을 것이다.

### 참고문헌

1. Beigel, H. cited by Fonseca F. 1930. O genero *Trichosporon*. *Rev. Med. Cir. do Brasil* 38, 251-261.

- Boman, H.G. 1991. Antibacterial peptides: Key components needed in immunity. *Cell* 65, 205-207.
- 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, 7620-7626.
- Keay, S., D.W. Denning, and D.A. Steven. 1991. Endocarditis due to *Trichosporon beigeli*: in vitro susceptibility of isolates and review. *Rev. Infect. Dis.*, 13 383-386.
- Lee, D.G., S.Y. Shin, S.G. Lee, K.L. Kim, M.K. Lee, and K.S. Hahm. 1997. Antifungal activities of Magainin-2 hybrid peptides against *Trichosporon beigeli*. *J. Microbiol. Biotech- nol.* 7, 49-51.
- Lee, D.G., S.G. Lee, K.L. Kim, and K.S. Hahm. 1997. The Measurement of antifungal effect by MTT assay. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3, 335-337.
- Lee, J.Y., A. Boman, C. 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.
- Merrifield, R.B. 1986. Solid phase synthesis. *Science* 232, 341-347.
- Shin, S.Y., M.K. Lee, K.L. Kim, and K.S. Hahm. 1997. Structure-antitumor and hemolytic activity relationships of synthetic peptides derived from cecropin A-magainin 2 and cecropin A-melittin hybrid peptides. *J. Peptide Res.* (in press)
- 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.
- Soravia, E., G. Martini, and M. Zasloff. 1988. Antimicrobial peptides from *Xenopus granular gland secretions*. *FEBS Lett.* 228, 337-340.
- von Hofsten, P., J. Faye, K. Kockum, J.Y. Lee, K.G. Xanthopoulos, L.A. Boman, H.G. Boman, A. Engstrom, D. Andreu, and R.B. Merrifield. 1985. Molecular cloning, cDNA sequencing, and chemical synthesis of cecropin B from *Hyalophora cecropia*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 2240-2243.
- Walsh, T.J., K.R. Newman, M. Moody, R.C. Wharton, and J.C. Wade, J.C. 1986. Trichosporonosis in patients with neoplastic disease. *Medicine (Baltimore)* 65, 268-279.
- Walsh, T.J., G.P. Melcher, M.G. Rinaldi, T. Lecciones, D.A. McGough, P. Kelly, J. Lee, D.J. Callender, M. Rubin, and P.A. Pizzo. 1990. *Trichosporon beigeli*, an emerging pathogen resistant to amphotericin B. *J. Clin. Microbiol.* 28, 1616-1622.
- Zasloff, M. 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.
- Zasloff, M. 1992. Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 4, 3-7.

(Received July 19, 1997/Accepted September 1, 1997)

---

**ABSTRACT: Fungicidal and Hemolytic Activity of Cecropin A-Magainin 2 Analogue Peptides against *Trichosporon beigelii* and Human Red Blood Cells**

**Dong Gun Lee, Song Yub Shin, Myung Kyu Lee and Kyung-Soo Hahm\*** (Peptide Engineering Research Unit, KRIBB, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea)

In order to design a novel synthetic peptide with improved fungicidal activity but low hemolytic activity, a hybrid peptide, cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12), and its analogue peptides were synthesized by the solid phase method. Antifungal and hemolytic activities of the synthetic peptides were assessed by the growth inhibition against *Trichosporon beigelii* and the cell membrane lysis against human red blood cells, respectively. Analogue 2 in which Lys at position 12 in cecropin A(1-8)-magainin 2(1-12) was substituted with Ala showed most potent antifungal activity (MIC: 2.5 µg/ml) with minimal hemolytic activity (0.5% hemolysis at the 200 µg/ml peptide). This peptide (A2), therefore, could be useful as a model for further designing potent antifungal peptides without cytotoxicity.