

## 홍합 (*Mytilus coruscus*)으로부터 항균활성 펩타이드의 정제

김인혜 · 김진욱 · 이재화\*  
신라대학교 공과대학 제약공학과

### Purification of a Antimicrobial Peptide from the Marine Mussel, *Mytilus coruscus*

In Hae Kim, Jin-Wook Kim, and Jae-Hwa Lee\*

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Engineering,  
Silla University, kwaebop-dong 1-1, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

(Received February 17, 2006 / March 15, 2006)

**ABSTRACT :** Antimicrobial peptides (AMPs) play an important role in this response by rapidly killing invading microorganisms. In this study antimicrobial peptide has been isolated from acidified whole body extract of a bivalve mollusk, the marine mussel (*Mytilus coruscus*). This peptide purified to homogeneity by gel-filtration and reversed-phase high performance liquid chromatography. The molecular weight was 1464.92 Da, determined by MALDI-TOF Mass spectrometry. In addition to growth inhibition of *Escherichia coli* D31.

**Key words :** AMPs, Marine mussel, MALDI-TOF Mass

## 서 론

척추동물 및 무척추동물들은 세균, 기생충 그리고 곰팡이 등과 같은 외부 물질의 침입으로부터 자신을 방어하기 위한 면역체계를 가지고 있다. 생체의 면역체계는 크게 비특이적 면역반응 (innate immunity)과 특이적 면역반응 (adaptive immunity)으로 구성되어 있다. 그 중에서 비특이적인 면역반응은 항균활성 펩타이드 (antimicrobial peptide) 및 lectin과 대식세포 (macrophage)등으로 구성되어 있고, 특이적 면역반응에는 B 림프구와 T 림프구 등으로 이루어져 있다. 이러한 면역반응으로 인해 생체가 세균등과 같은 이물질에 감염되었을 경우, 일차적인 방어 역할을 담당하는 비특이적 면역반응과 이차적인 방어 역할을 담당하는 특이적 면역반응이 조화를 이루면서 생체방어기능을 담당한다고 알려져 있다 (Hancock and Diamond, 2000). 이러한 비특이적인 면역을 수행하는 여러 물질 중 항균활성 펩타이드에 대한 연구는 단백질에 비해 분자량이 적은 점, 화학합성의 용이함 때문에 동물뿐만 아니라 식물에 이르기까지 다양한 개체로부터 폭넓은 연구가 진행 중에 있다. 지금까지 알려진 항균활성 펩타이드는 척추동물에서부터 무척추동물에 이르기까지 다양한 조직으로부터 정제되었다 (Lehrer and Ganz, 1999). 특히

양서류의 피부로부터 magainins, brevinins, temporins, esculentin 등 많은 항균활성 펩타이드가 정제되었다 (Bulet *et al.*, 2004; Rollins-Smith and Conlon, 2005).

최근에는 해양생물에 대해서도 항균활성 펩타이드에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그중에서 무척추동물에 대한 연구는 horseshoe crab (Nakamura *et al.*, 1988; Shigenaga *et al.*, 1990), penaeid shrimp (Destoumieux *et al.*, 1997), blue crab (Khoo *et al.*, 1999), shore crab (Schnapp *et al.*, 1996), woodlouse (Herbiniere *et al.*, 2005), solitary tunicate (Jang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2001) 등이 보고되었고 연체동물에서는 sea hare (Iijima *et al.*, 2003), american oyster (Seo *et al.*, 2005), 홍합인 *Mytilus edulis* (Charlet *et al.*, 1996), *Mytilus galloprovincialis* (Hubert *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 1999)등이 정제되어 보고되었다 (Table 1).

따라서 본 연구에서는 홍합 (*Mytilus coruscus*)에서 분자량이 1464.92 Da인 항균활성 펩타이드를 정제하여 일차구조를 분석 중에 있다.

## 재료 및 방법

### 실험동물

홍합 (*Mytilus coruscus*)은 2004년 2월에 여수에서 구입하

\*To whom correspondence should be addressed

**Table 1.** Antimicrobial peptides isolated marine invertebrates

Peptides	Source	Reference
Tachyplesin	Horseshoe crab	Nakamura <i>et al.</i> , 1988
Penaeidins	Shrimp	Destoumieux <i>et al.</i> , 1997
Callinectin	Blue crab	Khoo <i>et al.</i> , 1999
Bactenecin 7	shore crab	Schnapp <i>et al.</i> , 1996
Armadillidin	woodlouse	Herbiniere <i>et al.</i> , 2005
Dicynthaurin	solitary tunicate	Lee <i>et al.</i> , 2001
Dolabellamin	sea hare	Iijima <i>et al.</i> , 2003
Defensin	american oyster	Seo <i>et al.</i> , 2005
cystein rich peptide	<i>Mytilus edulis</i>	Charlet <i>et al.</i> , 1996,
Myticin	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Mitta <i>et al.</i> , 1999

였다. 살아있는 상태의 홍합의 패각을 분리 한 후, 액체질소로 급속 동결시켜 실험에 사용하기 전까지  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다.

#### 시약 및 재료

Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  cartridge는 Waters사 (Maryland, USA), Trypticase soy broth (TSB)는 Difco사 (Detroit, USA)에서 구입하였다. HPLC용  $\text{H}_2\text{O}$  및  $\text{CH}_3\text{CN}$ 은 TEDIA사 (Ohio, USA)에서 구입하였다. Trifluoroacetic Acid (TFA)는 Sigma사 (St. Louis, USA)에서 구입하였다. 그 이외의 모든 시약은 특급을 사용하였다.

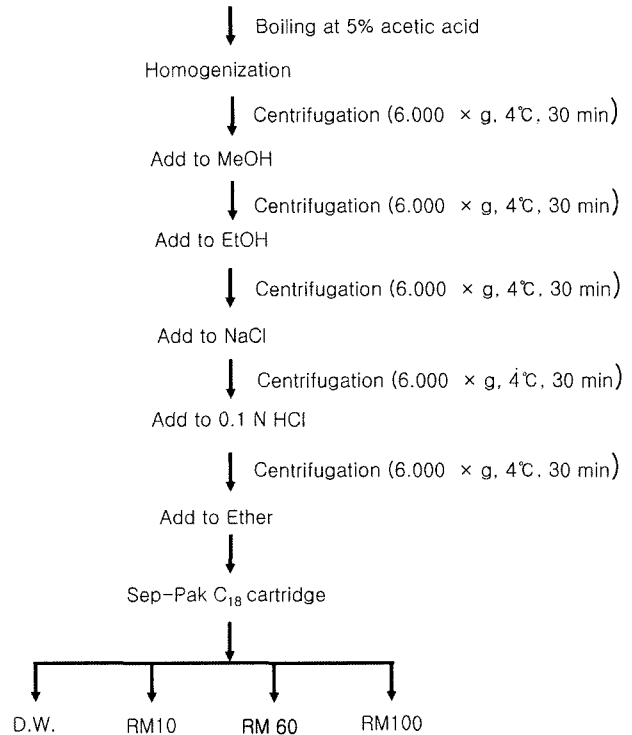
#### 홍합으로부터 시료의 추출

동결 보관된 홍합을 4L의 끓는 물에 15분간 가열하였다. 초산을 5% 되게 넣고 블렌더 (Multi Blender Mill, Nihonseiki, Kaisha, Ltd.)로 파쇄한 후  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 추출하였다. 균질화된 추출용액을 원심분리 ( $6,000\times\text{g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30분)하여 상층액을 농축시켰고, 시료 : MeOH를 1 : 3 (vol/vol)의 비율로 첨가하여 원심분리 ( $6,000\times\text{g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30분)로 고분자 물질을 제거하였다. 농축된 시료는 EtOH 및 NaCl을 시료 (100 mL) : EtOH (500 mL) : NaCl (1.2 g) 비율로 첨가하여 원심분리 ( $6,000\times\text{g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30분)를 행하였다. 얻어진 상층액이 0.1 N HCl이 되도록 HCl을 첨가하고, 원심분리 ( $6,000\times\text{g}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 50분)하여 침전물을 제거한 후 Sep-Pak  $\text{C}_{18}$  cartridge에 시료를 주입하였다. Column으로부터 0% (D.W.), 10% MeOH (RM 10), 60% MeOH (RM 60) 및 100% MeOH (RM 100)의 물질들을 각각 용출시켰다 (Fig. 1). 4 종류의 시료들을 3  $\mu\text{l}$ , 6  $\mu\text{l}$ , 9  $\mu\text{l}$ 를 각각 사용하여 *E. coli* D31에 대한 항균활성을 측정하였다 (Fig. 2).

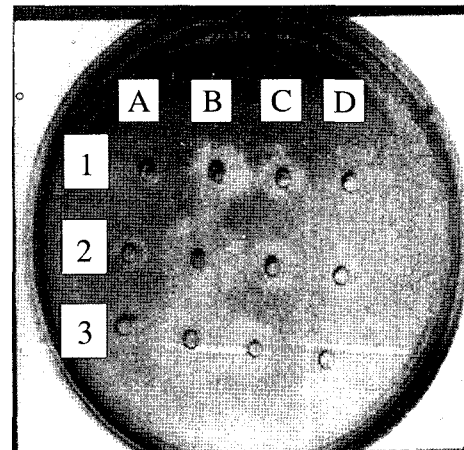
#### 항균활성 펩타이드의 분리 및 정제

*E. coli* D31에 항균 활성을 나타낸 RM 60은 9 단계의

Marine mussel (*Mytilus coruscus*), 4 kg



**Fig. 1.** Extraction of antimicrobial peptide from the marine mussels *Mytilus coruscus*.



**Fig. 2.** Antimicrobial activity of the marine mussel extracts eluted by sep-Pal  $\text{C}_{18}$  Cartridge. An aliquot of each extract was applied to a freshly poured lawn of *E. coli* D31. A: D. W., B: RM 60, C: RM 10, D: RM 10, 1; 3  $\mu\text{l}$ , 2; 6  $\mu\text{l}$ , 3; 9  $\mu\text{l}$ .

HPLC과정을 통하여 항균활성 펩타이드를 분리 정제하였다 (Fig. 3). 첫 단계로 동결 건조한 추출물 RM 60을 Vydac  $\text{C}_{18}$  (10 $\times$ 250 cm, Waters, USA) column에 주입하여 정제

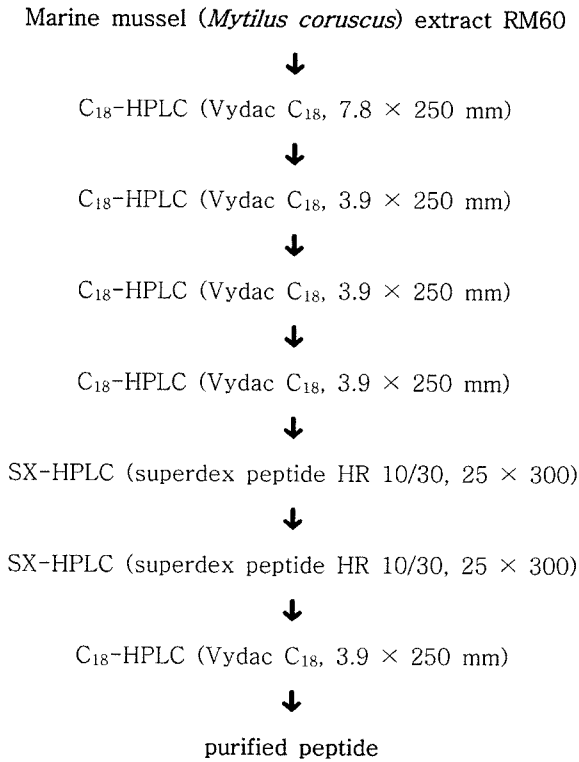


Fig. 3. Procedure for HPLC purification of antimicrobial peptide from the marine mussels, *Mytilus coruscus*. SX-HPLC; size exclusion HPLC.

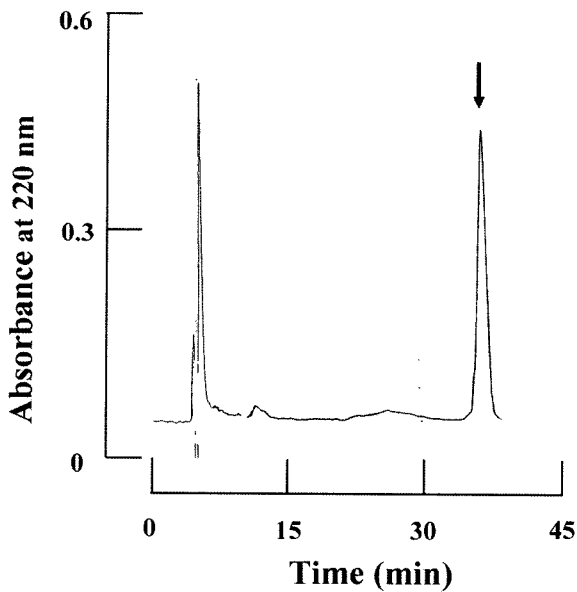


Fig. 4. Final purification of peptide. The active fraction of was loaded onto a Zorbax SB-phenyl C<sub>18</sub> (4.6×150 mm) column and eluted isocratically 27% CH<sub>3</sub>CN in 0.1% TFA at flow rate of 0.5 mL/min.

하였고 분리조건은 다음과 같다: 유속; 2.0 mL/min, B 용매의 농도; 0 → 60% (120분), 온도; 40°C의 조건으로 정제하였다. 활성이 있는 분획을 Vydac C<sub>18</sub> (4.6×150 cm, Waters, USA) column에 주입하였고 유속; 1.0 mL/min, B 용매의 농도; 20 → 50% (60분)의 조건으로 정제하였고 세 번째 단계는 전 단계와 동일한 column을 사용하였고 B 용매의 농도만 23 → 33%를 사용하였다. 다음 단계는 size exclusion column인 superdex peptide HR 10/30 (10×300 mm, Pharmacia, Sweden)을 사용하였다. 최종적으로 Zorbax SB-phenyl C<sub>18</sub> (Aglient, USA) column을 사용하여 유속; 0.5 mL/min, 27% 등용매 조건으로 정제하였다 (Fig. 4). 모든 역상 HPLC 정제단계에서 A 용매로는 0.1% TFA를 포함하는 H<sub>2</sub>O (pH 2.2)와 B 용매로는 0.1% TFA를 포함하는 CH<sub>3</sub>CN (pH 2.2)을 이용하여 B 용매 gradient로 분리 정제하였다. 또한 size exclusion HPLC는 0.1% TFA를 포함하는 30% CH<sub>3</sub>CN (pH 2.2) dmf 사용하여 물질을 용출시켰으며 정제에 사용한 흡수파장은 220 nm, 254 nm와 280 nm를 사용하였다.

항균활성 측정

정제과정 중에 얻은 각 분획에 대한 항균활성의 측정은 Radial diffusion assay법을 이용하여 *E. coli* D31에 대한 성장 억제를 관찰하였고 활성 측정법은 다음과 같다 (Lehrer *et al.*, 1991). *E. coli* D31를 37°C로 TSB에서 mid-logarithmic phase까지 배양한다. 그 후, 1.0 M phosphate buffer solution (pH 6.7)으로 3번 세정한 균배양액 1.0 mL (OD<sub>570</sub>=0.1, 5×10<sup>7</sup> CFU/mL)을 LB와 혼합한다. 사용한 LB 배지 조성액은 다음과 같다: 5 X LB broth; 20.7 mL, 1.0 M PBS (pH 6.7); 20.7 mL, D. W.; 58.6 mL, NaCl; 0.5 g, Low EEO agar; 1.57 g. streptomycin; 10 mg/mL 시료는 0.01% 초산 용액에 녹여 사용하였다. 준비된 LB 배지에 2-3 mm 정도의 well을 만든 후, well에 시료를 주입한 후, 37°C 18시간 배양한 후, clear zone의 크기로 활성을 측정한다.

결과 및 고찰

펩타이드의 정제

홍합 (*Mytilus coruscus*) 추출물인 D.W., RM 10, RM 60 및 RM 100을 사용하여 *E. coli* D31에 대해 항균활성을 측정하였다. 그 결과, 항균물질이 나타내는 clear zone의 크기는 RM 60이 가장 크게 나타내었다 (Fig. 2). 따라서 가장 활성이 큰 RM 60을 사용하여 항균활성 펩타이드를 정제하였다. RM 60은 역상 column과 size exclusion

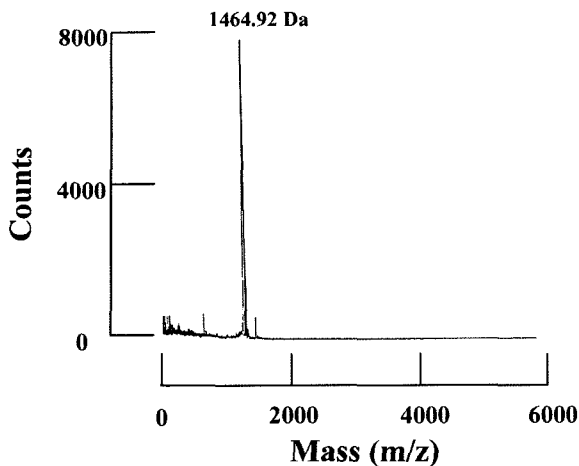


Fig. 5. MALDI-TOF Mass spectra of antimicrobial peptide in marine mussels. Analysis was carried out with a voyager-DE<sup>TM</sup>STR spectrometry, a-cyano-4-hydroxycinnamic acid was used as matrix.

column들을 순차적으로 사용하여 정제하였다. 최종 단계로는 Zorbox SB-phenyl column (4.6×150 mm, Agilent, USA) 을 사용하여 유속을 0.5 mL/min으로 하여 0.1% TFA을 포함한 27% CH<sub>3</sub>CN의 등용매 조건으로 순수하게 정제하였다 (Fig. 4).

#### 정제한 펩타이드인 일차구조 및 분자량

최종 정제한 물질의 분자량을 조사하기 위해 MALDI-TOF mass spectrometry를 사용하였다. 그 결과 1464.92 Da 분자량을 얻을 수 있었다 (Fig. 5). 아미노산 서열을 결정하기 위해 Edman 분해법을 이용한 peptide sequencer를 사용하여 일차구조를 분석 중에 있다.

## 요 약

홍합 (*Mytilus coruscus*) 추출물 RM 60을 사용하여 *E. coli* D31을 대상으로 항균활성 펩타이드를 분리 정제하였다. 정제한 펩타이드는 MALDI-TOF Mass spectrometry를 사용하여 분자량을 측정한 결과, 1464.92 Da으로 나타났으며 Edman 분해법을 이용한 peptide sequencer를 사용하여 일차구조를 분석 중에 있다.

## 참 고 문 헌

Bulet, P., Stocklin, R. and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptide: from invertebrates to vertebrates. *Immunology* **198**, 169-184.

- Charlet, M. Chernysh, S. Philippe, H. Hetru, C. Hoffmann J. A. and Bulet, P. (1996) Innate immunity: isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusk, *Mytilus edulis*, *J. Biol. Chem.* **271**, 21808-21813.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., VanDorsselaer, A. Rodriguez J. and Bachere, E. (1997) Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei*, *J. Biol. Chem.* **272**, 28398-28406.
- Hancock, R.E.W. and Diamond, G. (2000) The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol.* **8**, 402-410.
- Herbinière, J., Braqart-Varnier, C., Grève, P., Strub, J.-M., Frère, J., Van Dorsselaer, A and Martin, G. (2005) Armadillidin, a novel glycine-rich antibacterial peptide directed against gram-positive bacteria in the woodlouse *Armadillium vulgare* (Terrestrial Isopod, Crustacean), *Dev. Comp. Immunol.* **29**, 489-499.
- Hubert, F. Noel, T. and Roch, P. (1996) A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*), *Eur. J. Biochem.* **240**, 302-306.
- Iijima, R. Kisugi, J. and Yamazaki, M. (2003) A novel antimicrobial peptide from the sea hare *Dolabella auricularia*, *Dev. Comp. Immunol.* **27**, 305-311.
- Jang, W.S., Kim, K.N., Lee, Y.S., Nam M.H. and Lee, I.H. (2002) Halocidin: a new antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*, *FEBS Lett.* **521**, 81-86.
- Khoo, L., Robinette, D.W. and Noga, E.J. (1999) Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes, *Mar. Biotechnol.* **1**, 44-51.
- Lee, I.H., Lee, Y.S., Kim, C.H., Kim, C.R., Hong, T., Menzel, L., Boo, L.M., Pohl, J., Sherman, M.A., Waring, A. and Lehrer, R.I. (2001) Dicynthaurin: An antimicrobial peptide from hemocytes of the solitary tunicate, *Halocynthia aurantium*, *Biochim. Biophys. Acta* **1527**, 141-148.
- Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.S., Jackson, R. and Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* **137**, 167-173.
- Lehrer, R.I. and Ganz, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 23-27.
- Mitta, G., Vandenbulcke, F., Hubert, F. and Roch, P. (1999) Mussel defensins are synthesized and processed in granulocytes then released into the plasma after bacterial challenge, *J. Cell Sci.* **112**, 4233-4242.
- Rollians-Smith L.A. and Conlon, J.M. (2005) Antimicrobial peptide defensins against chytridiomycosis, an emerging infectious disease of amphibian population. *Devel. Comp. Immunol.* 1-10.
- Schnapp, D., Kemp, G.D. and Smith, V.J. (1996) Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptides, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*, *Eur. J. Biochem.* **240**, 532-539.
- Seo, J-K., Crawford, J.M., Stone K.L. and Noga, E.J. (2005) Purification of a novel arthropod defensin from the american

oyster, *Crassostrea virginica* *Biochim. Biophys. Acta* **338**,  
1998-2004.  
Shigenaga, T., Muta, Y., Toh, F., Tokunaga, F. and Iwanaga, S.

(1990) Antimicrobial tachyplesin peptide precursor, *J. Biol. Chem.* **265**, 21350-21354.