

## 그람양성균의 증식에 미치는 잉어펩티드글리칸 접수체단백질(PGRP 2)의 영향

김유신, 김동률, 박미성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《선진과학기술을 받아들이는것은 나라의 과학기술을 빨리 발전시키기 위한 중요한 방도의 하나로 됩니다.》(《김정일선집》 중보판 제15권 500페이지)

펩티드글리칸접수체단백질(PGRP)은 펩티드글리칸의 그물구조에서 N-아세틸글루코자민과 N-아세틸무람산결합사슬사이를 이어주는 펜타글리신의 L-알라닌결합을 분해하는 아미다제활성을 가진다.[1]

잉어의 PGRP 2에 대한 연구는 세계적으로도 아직 시작에 불과하다.[2]

우리는 PGRP 2가 펩티드글리칸을 분해하는 방식으로 그람양성균의 성장을 억제하는가를 보았다.

### 재료 및 방법

PGRP 2유전자의 재조합체만들기 원핵발현운반체인 pQE-30, pQE-31, pQE-32(그림 1)와 PMD18운반체에 연결된 PGRP 2유전자를 *Bam*H I과 *Hind* III으로 분해하고 리가제로 연결(16°C에서 16h)한 다음 *E. coli* DH5α에 형질전환하였다.

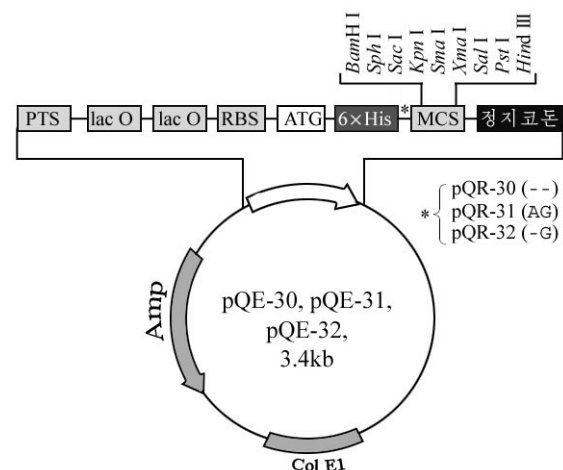


그림 1. 원핵발현운반체 pQE-30, pQE-31, pQE-32의 지도

양성균선발은 *Bam*H I과 *Hind* III으로 분해하여 검사하였다. 선발된 양성균을 다시 배양하여 플라스미드를 분리하고 *E. coli* BL21에 형질전환한 다음 평판에서 양성균을 PCR로 선발하였다.

PGRP 2유전자의 대장균에서의 발현 및 정제 PGRP 2유전자가 재조합된 플라스미드가 들어있는 단독균무지를 2mL의 LB배지(Amp, 50 μg/mL)에 접종하고 37°C에서 OD<sub>600</sub>=0.4까지 배양하였다. 1mL의 배양액을 대조로 꺼내고 나머지 배양액에 100mmol/L의 IPTG를 최종농도가 0.4mmol/L 되게 첨가하고 3h동안 연속배양하였다. 배양이 끝난 다음 배양액

1mL를 취하여 원심분리(12 000×g, 30s)하고 침전물을 PBS용액으로 세척하였다. 여기에 PBS용액 100 μL와 단백질전기영동용색소완충액을 100 μL 첨가하고 10min간 끓는 물에서 처리한 다음 SDS-PAGE를 진행하였다. 단백질전기영동에서 발현을 확인한 다음 100mL의 IPTG

유도배양물을 원심분리하여 균체를 얻고 PBS용액 4mL를 첨가하여 초음파로 30min(2s 간격으로)동안 처리한 다음 원심분리(6 000r/min, 15min, 4℃)하여 상등액을 His-Bind Resin으로 정제하였다.

펩티드글리칸의 효소분해 펩티드글리칸(PGN, 《SIGMA》)을 기질로서 리용하였다. 정제한 PGRP 2(4mg/mL) 0.1mL를 펩티드글리칸이 들어있는 20mmol/L 헤페스완충액 1.9mL(pH 7.2, 150mmol/L NaCl)에 방치하였다. 펩티드글리칸의 분해정도는 광전비색계(540nm)에서 시간별로 측정하였다.

세균의 생장억제측정 세균(*Bacillus megaterium*)배양은 LB배지에서 진행하였다.(37℃, OD=0.5) 세균배양물을 원심분리(3 000r/min)하여 침전물을 수집하고 헤페스완충액으로 두 번 세척하였다. 세균응집물을  $10^4$ 배로 희석하고 2mL를 취하여 PGRP 2(200  $\mu$ g/mL)과 반응(22℃, 30min)시켰다. 대조로는 PBS를 첨가하였다. 반응이 끝난 다음 반응액 50  $\mu$ L를 취하여 LB평판에 도말하고 37℃에서 18h동안 배양한 다음 균무지수를 세는 방법으로 측정하였다.

## 결과 및 논의

PGRP 2의 원핵발현 PGRP 2의 원핵발현을 위하여 원핵발현운반체 PQE30의 *Bam*H I과 *Hind* III구역에 PGRP 2의 ORF구역을 삽입하고 IPTG를 리용하여 원핵발현을 진행하였다. PGRP 2의 SDS-PAGE전기영동결과는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 PGRP 2의 띠가 뚜렷하게 나타났다.

히스타그수지(His-tag-resin)를 리용하여 단백질을 정제하였는데 결과 IPTG유도후 단백질의 농도는 10mg/mL이고 정제후 단백질의 농도는 4mg/mL였다.

펩티드글리칸분해에 미치는 리조짐과 PGRP 2의 효과 선행연구들에서 리조짐은 세균세포벽을 구성하는 펩티드글리칸의 N-아세틸글루코자민과 N-아세틸무람산의  $\beta$ -1, 4결합을 분해한다는것이 이미 알려졌다.[3] 또한 포유류동물의 펩티드글리칸식별단백질이 펩티드결합의 다리결합을 분해하는 아미다제활성을 가진다는것이 알려졌다.

잉어 PGRP 2의 펩티드글리칸을 분해하는 아미다제활성을 보기 위한 실험결과는 그림 3과 같다.

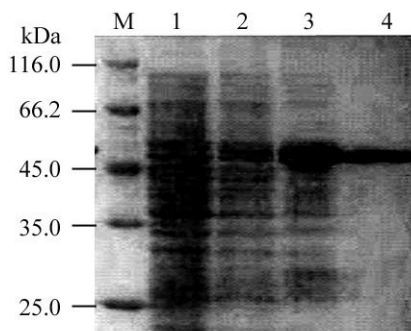


그림 2. PGRP 2의 SDS-PAGE 전기영동상

M은 단백질분자량표식자, 1-양성대조, 2-음성대조, 3-IPTG 유도배양액, 4-정제단백질

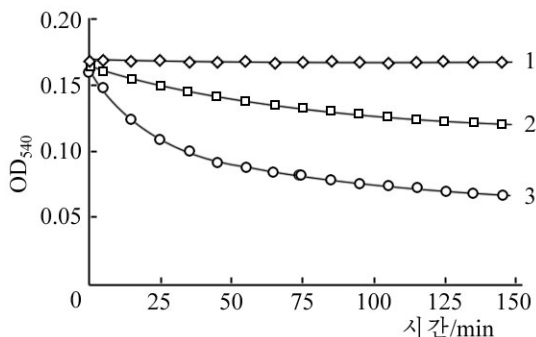


그림 3. 펩티드글리칸분해에 미치는 리조짐과 PGRP 2의 효과

1-PBS, 2-PGRP 2, 3-PGRP 2+리조짐

그림 3에서 보는바와 같이 PGRP 2는 펩티드글리칸분해활성이 있었으며 리조짐과 함께 작용시켰을 때 펩티드글리칸의 분해률은 훨씬 더 높았다.

PGRP 2가 그람양성균의 생장에 미치는 영향을 보기 위하여 그람양성균인 *B. megaterium*에 PGRP 2를 작용시켰다.(그림 4)

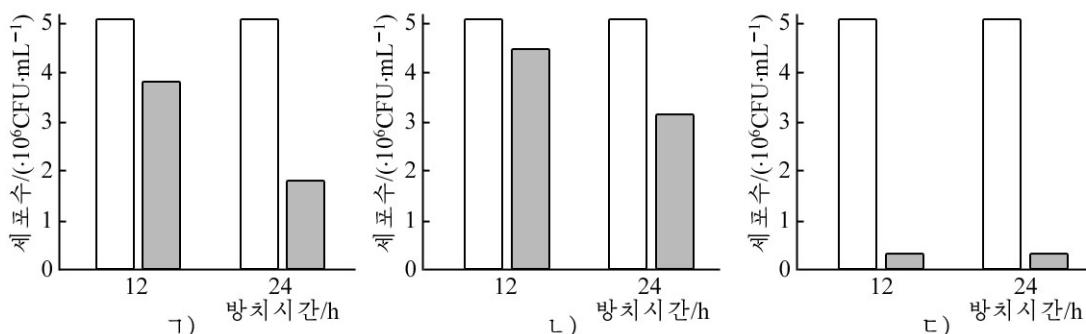


그림 4. PGRP 2가 *B. megaterium*의 생장에 미치는 영향

ㄱ) *B. megaterium* + 리조짐, ㄴ) *B. megaterium* + PGRP 2, ㄷ) *B. megaterium* + ccPGRP 2 + 리조짐;

□ 대조구, ■ 시험구

그림 4에서 보는바와 같이 PGRP 2는 그람양성균의 생장을 억제하는데 리조짐과 같이 처리하면 그 억제률이 더 높아진다.

## 맺 는 말

- 1) PGRP 2는 펩티드글리칸을 분해하는 작용이 있다.
- 2) PGRP 2는 그람양성균의 생장을 억제한다.

## 참 고 문 헌

- [1] C. Geoffroy et al.; Developmental and Comparative Immunology, 31, 790, 2007.
- [2] M. Peter; Biochemical and Biophysical Research Communications, 35, 994, 2006.
- [3] I. Naoki et al.; Molecular Immunology, 46, 1768, 2009.

주체103(2014)년 7월 5일 원고접수

## Influence of Peptidoglycan Recognition Protein (PGRP 2) of Common Carp (*Cyprinus carpio*) on Growth of Gram Positive Bacteria

Kim Yu Sin, Kim Tong Ryul and Pak Mi Song

PGRP 2 of common carp hydrolyses peptidoglycan band of bacteria.

PGRP 2 of common carp has anti-bacterial activity.

Key words: PGRP, *Cyprinus carpio*, anti-bacteria