

# 知識天地

## 海洋生物中的天然抗生素—抗菌蛋白

陳志毅助研究員、郭欽明特聘講座、潘婕玉研究助理（細胞與個體生物學研究所臨海研究站）

### 前言

臺灣四面環海，海洋生物資源豐沛，許多的海洋生物資源應用在人類日常生活中隨處可見，如魚肝油、魚翅，或許許多的健康食品，這些產品只是從豐富的海洋生物資源中所得到的少部分有價值物質成份的應用而已。然而海洋生物所處的環境極為惡劣，充滿了許多微生物，許多海洋生物棲息其中，對於如何避免病原菌的感染是其中一大課題。而主要的項目在如何避免感染，所以海洋生物演化出特殊但對細菌極具殺傷力的免疫產物，也就是今天介紹的抗菌蛋白。因為許多海洋生物會產生許多不同種類的抗菌蛋白來抵禦微生物，進而避免產生疾病。目前在水產養殖上，濫用抗生素一直是政府漁業部門與漁民頭疼的問題，也是臺灣水產品屢屢被日本或歐盟驗出並遭致退貨的原因，最近民國 96 年 9 月份鰻魚因為被漁業署驗出使用禁藥恩諾沙星，引起恐慌，漁業署表示，驗出的量不會對人體造成傷害，檢驗也還在進行，然而在傳統養殖業使用抗生素的問題也逐漸浮上抬面。或許解決的方法，是從海洋生物的生存策略上尋找答案。由於海洋生物在生存策略上所產生的抗菌蛋白能有效的抑制微生物成長，利用分子生物學與生物技術的方法，從水生生物中選殖出抗菌蛋白基因，再利用蛋白質表達技術生產抗菌蛋白的重組蛋白，而後應用飼料添加，注射，或浸泡的方式增強水生生物的免疫力抑制微生物成長，以達到促進漁業產量、產業升級的目的。另一面，一勞永逸的方式，則進行基因轉殖，以特定的啟動子驅動欲表達的基因在所轉殖的魚或蝦上，而達到適時適量的表達抗菌蛋白於水生生物上，並產生抗菌的效果。

### 抗菌蛋白種類與抗菌蛋白的性質

水生生物因為遭遇到複雜的環境，所以需要仰賴牠們自己先天性免疫功能來抵禦病原菌。最早的研究是發現魚類本身在魚鱗體表會分泌許多黏液，這些黏液具有殺菌的特性，此抗菌蛋白（pleurocidin）最原始是由比目魚的體表黏液萃取出來，具有抑制一些革蘭氏陽性菌與陰性菌的特性，同時在國外的研究報告，也詳述一些目前正在進行，並從水生生物中選殖或研究的抗菌蛋白。無脊椎動物中的甲殼類如草蝦、白蝦等以先天性免疫為主，分為體液性免疫及細胞性免疫。抗菌蛋白是屬於體液性免疫的一種，抗菌蛋白在甲殼類中具有的特性可以直接破壞病原菌細胞膜，並使其滲透壓不平衡。無脊椎動物的抗菌蛋白起源大部分在血淋巴細胞中，此蛋白質表達的部分與魚類抗菌蛋白表達的部位非常不同，然而不論是從魚類或草蝦中所得到的抗菌蛋白，牠們的抗菌機制非常類似。抗菌蛋白屬於先天性免疫的一部分，其性質主要是藉由其帶正電的特性，會和細菌細胞膜上的磷脂質作用，在細胞膜形成離子通道的方式，改變細胞膜的通透性，從而使細胞膜喪失功能，以抵抗外來的病原菌。抗菌蛋白分布很廣泛，目前在許多物種中皆發現抗菌蛋白，由脊椎到無脊椎，由動物到植物均有發現，而且在昆蟲的淋巴液，兩生類的皮膚分泌物、胃黏液、腸道上皮，哺乳類動物的吞噬細胞中的液泡，傷口，表皮開口處，水泡內液體均可發現。

抗菌蛋白依據其化學結構及生化特性可分為下列幾種：線性螺旋抗菌蛋白、線性含特定胺基酸抗菌蛋白、分子間含雙硫鍵的抗菌蛋白。線性螺旋抗菌蛋白通常為含有兩性分子的  $\alpha$ -螺旋狀結構，此類抗菌蛋白通常可分為由帶電胺基酸所構成的親水性端和不帶電胺基酸所構成的疏水性端所組成。此類的典型例子是從蠶蛾中所發現的 cecropin，最先是從蠶蛾脂肪體與血淋巴球中的溶菌酵素中發現。早先在形成蛹時會產生 cecropin 以避免病原菌對蠶蛾感染。從蠶蛾中得到的 cecropin 又分成 cecropin A、cecropin B 與 cecropin D 三種型態，cecropin 可浸透脂質體，並在脂質雙層膜上形成一個陰離子選擇性通道進而瓦解病原菌。離子通道的途徑是由 cecropin 反平行結合形成一個二聚體結構，藉由戴正電的  $\text{NH}_2$ -terminal 螺旋結合到帶負電的細胞膜表面，疏水性的  $\text{COOH}$ -terminal 螺旋則插入細胞膜內，這些結合到膜上的二聚體會再聚集，形成一個聚合體，進而形成通道，另外，藉由二聚體的移動， $\text{NH}_2$ -terminal 螺旋會進入膜內，形成另一種離子通道。抗菌蛋白作用的機制仍有待進一步釐清，大致可分為筒狀穿鑿模式及地毯式覆蓋模式。這兩種模式都是運用抗菌蛋白在菌體上形成孔洞，造成菌體自身滲透壓的不平衡，而導致病原菌的死亡。

亡。這種打洞模式對一般哺乳類細胞傷害影響較為輕微是因哺乳類的細胞膜較病原菌的細胞膜偏中性，在一般病原菌的細胞膜上帶負電，而動物細胞的細胞膜膽固醇含量較高且較不對稱，同時，病原菌的細胞膜除了疏水性的作用力外，還受到靜電力的影響，所以抗菌蛋白會針對病原菌作用。

## 抗菌蛋白的應用

從石斑魚中選殖出 epinecidin-1 抗菌蛋白，epinecidin-1 是一種小分子量的抗菌蛋白，當生物體受到病原菌入侵時，體內的免疫系統將會被刺激，促使多種細胞開始分泌抗菌蛋白，以抵抗外來病原菌。一般而言抗菌蛋白具有毒殺細菌、真菌、病毒之能力，而 epinecidin-1 是一個 25 個胺基酸所組成的蛋白質。利用組織免疫染色法觀察 epinecidin-1 之表現，發現石斑魚皮膚上黏液顆粒細胞和小腸細胞都有它的存在。同時肺炎雙球菌經過合成蛋白 (epinecidin-1) 處理後，能造成細菌在細胞膜中形成孔洞 (圖 1)，造成細胞滲透壓失調，胞內物質大量外漏，最後造成標的生物死亡。而石斑魚 epinecidin-1 合成蛋白可以有效抑制相關的菌種如下列所寫的表 1。另一種抗菌蛋白 (草蝦抗脂多醣因子 (SALF55-76)) 具有抗敗血症之效應，同時環化的草蝦抗脂多醣因子 (SALF55-76) 具有抑制數種臨床細菌成長之效應，當先注射草蝦抗脂多醣因子 (200 $\mu$ g/mouse) 進入老鼠體內 8 小時後，而再注射綠膿桿菌 24 小時後，老鼠得到 100% 的存活率。透過電子顯微鏡的解析，同樣也可以驗證綠膿桿菌被草蝦抗脂多醣因子之合成蛋白破壞細胞膜，呈現內容物外溢的情況，導致細菌死亡 (圖 2)。再者抗生素 (vancomycin) 與環化的草蝦抗脂多醣因子 (SALF55-76)，對於綠膿桿菌在老鼠體內均有類似抑菌的效果。若老鼠先注射草蝦抗脂多醣因子 (200 $\mu$ g/mouse)，而後再以綠膿桿菌攻擊，從組織解剖分析上，其肺臟有效的被保護，而沒有嚴重之塌陷。由上述初步實驗結果，可以驗證草蝦抗脂多醣因子 (SALF55-76) 具有預防老鼠敗血症之療性。此抗敗血症效果，在將來具有應用於人類醫療上之願景。

Microorganism (clinical isolate)	MIC ( $\mu$ g/mL)		
	g-ple 22-51	g-ple 22-42	wf-ple
<b>Gram-positive bacteria</b>			
<i>Listeria monocytogenes</i> (BCRC14930)	25	50	50
<i>Micrococcus luteus</i> (BCRC11034)	3.125	25	3.125
<i>Staphylococcus aureus</i> (BCRC10780)	6.25	12.5	6.25
<i>Streptococcus pyogenes</i> (BCRC10797)	25	25	25
<i>Streptococcus agalactiae</i> (819)	12.5	50	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (BCRC10783)	12.5	>100	>100
<i>Staphylococcus sp.</i> (BCRC10451)	6.25	50	6.25
<i>Staphylococcus xylosus</i> (BCRC12930)	>100	50	50
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (BCRC10794)	12.5	25	6.25
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. (BCRC10782)	6.25	6.25	6.25
<b>Gram-negative bacteria</b>			
<i>Enterobacter aerogenes</i> (BCRC10370)	25	50	50
<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. (BCRC10401)	100	100	>100
<i>Vibrio alginolyticus</i> (from die grouper)	3.125	12.5	6.25
<i>Klebsiella oxytoca</i> (BCRC13985)	12.5	100	50
<i>Salinivibrio costicola</i> subsp. (BCRC12910)	3.125	12.5	3.125
<i>Vibrio vulnificus</i> (YJ016)	6.25	50	50
<i>Vibrio harveyi</i> (BCRC13812)	3.125	12.5	3.125
<i>Vibrio harveyi</i> (BCRC12907)	25	12.5	6.25
<i>Vibrio vulnificus</i> (204)	6.25	12.5	6.25
<i>Vibrio alginolyticus</i> (BCRC12829)	6.25	12.5	6.25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC19660)	>100	60	50
<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. (BCRC13999)	100	100	50

MIC: minimal inhibitory concentration; g-ple 22-51: grouper epinecidin-1 peptide (residues 22-51); g-ple 22-42: grouper epinecidin-1 peptide (residues 22-42); wf-ple: winter pleurocidin (Jia *et al.*, 2000).

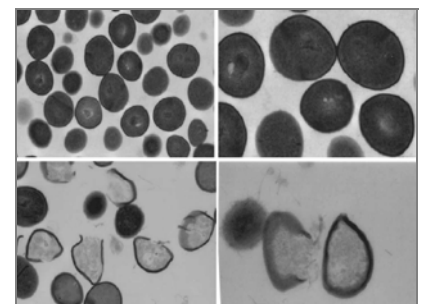


圖 1

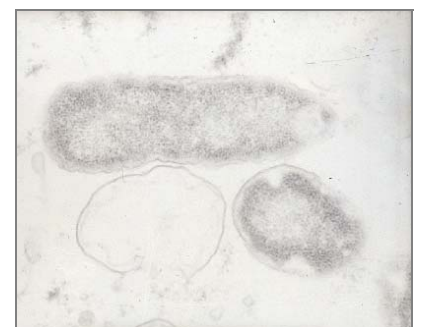


圖 2

表 1

## 結語

抗菌蛋白具有許多不同的來源與角色，每一種抗菌蛋白所能毒殺的細菌各有不同，而臺灣抗生素的濫用已經使得一些病菌開始產生抗藥性，再加上生物鏈的累積作用，人類本身變成了抗生素最終累積的地方。面臨這樣的結果，就必須研究新興的替代用藥—抗菌蛋白 (Antimicrobial peptides; AMPs)。同時海洋生技勢必為臺灣未來科技發展的主流，海洋資源的豐沛與海洋生物間的歧異度，提供了比陸地生物還複雜的演化史，海洋生物之間為了在複雜的環境中生存，早就發展出多功能性的抗菌機制與抗菌蛋白。臺灣以海洋立國，當就相關海洋生物技術再加強，並且探

索海洋世界中更多的抗菌蛋白，並運用這些珍貴的海洋資源中的抗菌蛋白發展抗癌，抗菌，抗敗血症等醫學相關領域之研究，這些開發並不像新藥的開發一般冗長，同時除了醫學藥用外，在水產養殖的科學及產業上，更有發展的利基。呂秀蓮副總統前一陣子宣揚海洋科技立國的言論確實鼓勵臺灣的海洋生物科技研究人員，如何注入更多的研究經費與人力，實在是此研究能否成功的關鍵點。中央研究院一直是臺灣學術研究的火車頭，臨海研究站的設立又是中央研究院朝著基礎與應用研究並重之方向邁進，以往中央研究院都被稱為象牙塔中的研究，如今期望臨海研究站在未來的海洋生技發展上，能扮演上、中游的角色，把研究成果推廣至產業，也更希望成為臺灣水生生物抗菌蛋白研發中心。(此篇文章已投稿科學月刊，審查中)

致謝：電子顯微鏡的圖片由中央研究院細胞與個體生物學研究所林泰郎先生完成。

資料來源：

1. Chia-Yu Pan, Tsung-Tai Chao, Jian-Chyi Chen, Jyh-Yih Chen\*, Wei-Chen Liu, Cheng-Hui Lin, Ching-Ming Kuo\* (2007). Shrimp (*Penaeus monodon*) anti-lipopolysaccharide factor reduces lethality of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. *International Immunopharmacology* 7(5):687-700. \* Corresponding author.
2. Chia-Yu Pan, Jyh-Yih Chen\*, Yih-Shyun E. Cheng, Chun-Yao Chen, I-Hsun Ni, Jenn-Feng Sheen, Yu-Liang Pan, Ching-Ming Kuo\* (2007). Gene expression and localization of the epinecidin-1 antimicrobial peptide in the grouper (*Epinephelus coioides*), and its protection of fish against pathogenic infection. *DNA and Cell Biology* 26(6): 403-413. \* Corresponding author.
3. 陳志毅。2005。魚、蝦抗菌蛋白之研發應用。農科新世紀，農業生物科技園區專訊。p47-50。