(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0083166
(43) 공개일자 2021년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 37/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 37/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0164286
(22) 출원일자 2020년11월30일
심사청구일자 2020년11월30일
(30) 우선권주장
1020190175050 2019년12월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박희등
경기도 성남시 분당구 정자일로 27, 1406호
김한신
경기도 시흥시 배곧4로 106-26, 1014동 803호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

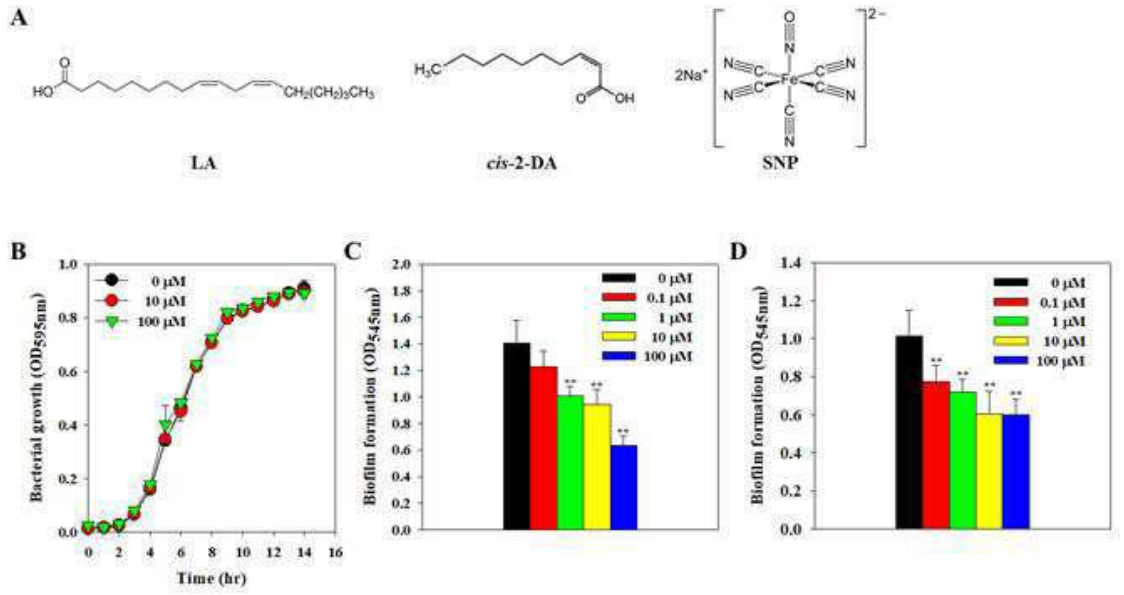
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **리놀레산을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 생물막 형성 억제 방법**

(57) 요 약

본 발명은 리놀레산을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 생물막 형성 억제 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

차은지

서울특별시 성북구 안암로9가길 73, 조이캐슬 A동 406호

함소영

서울특별시 성북구 안암로9가길 85, 305호

명 세 서

청구범위

청구항 1

리놀레산(linoleic acid)을 유효성분으로 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 리놀레산은 확산성 신호 분자 수용체 단백질인 RpfC에 결합하여 세포성 사이클릭 다이구아닐레이트 (c-di-GMP) 수준을 감소시키는 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물의 표면에 형성되는 생물막의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 수처리막 표면에 형성되는 생물막의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 식품 및 생활용품의 표면에 형성되는 생물막의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 치아 표면에 형성되는 생물막의 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물의 제형은 치약, 구강청정제, 구강용 스프레이, 구강용 티슈 제형, 구강용 연고제 및 구강용 바니쉬로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물의 제형은 주방용 세제, 바닥용 세제, 화장실용 세제, 주방용 소독제, 욕실용 소독제, 유리 세척제, 과일야채 세척제, 기름제거 세척제, 찌든때 제거제, 표백제, 가구 세척제, 의류용 세탁세제, 섬유유연제 및 변기 세척제로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 생물막 형성 억제용 조성물.

청구항 9

제1항 따른 조성물을 대상물의 표면에 처리하는 단계를 포함하는 생물막 형성 억제 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 리놀레산을 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 생물막 형성 억제 방법에 관한 것이

다.

배 경 기 술

[0002] 생물막 (biofilm)은 다당류, 단백질, 핵산으로 구성된 EPS (extracellular polymeric substance)로 덮여있는 미생물 군집이다. 미생물은 자연, 의료 및 산업 환경에서 다양한 표면에 생물막을 형성하는데, 특히 세균성 감염은 생물막과 밀접한 관련이 있다고 알려져 있다. 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*)은 대표적인 생물막 형성 미생물로, 요로감염, 상처, 폐, 카테터와 같은 광범위한 환경에서 발견된다. 구체적으로, 녹농균은 낭포성 섬유증 환자에서 심각한 만성 폐 감염을 유발하는 것으로 알려져 있다. 또한, 녹농균 생물막은 의료 기기, 콘택트렌즈 및 인공 임플란트에서도 발견되며, 이는 심각한 의학적인 문제를 일으킬 수 있다. 이러한 생물막을 구성하는 미생물은 부유 상태의 미생물보다 항생제에 대해 10 - 1,000 배 이상의 저항력을 지니고 있기 때문에, 감염된 환자로부터 생물막을 제거하는 것은 매우 어렵다.

[0003] 한편, 항균제 (Antimicrobial agents)는 세균 감염 치료를 위해 미생물의 성장을 억제시키는 방법이다. 과도한 양의 항균제는 내성을 유발할 수 있기 때문에 정족수 감지 (Quorum sensing; QS)와 세포성 사이클릭 다이구아닐레이트 (c-di-GMP)와 같은 생물막 형성 기작을 방해할 수 있는 생물막 억제제를 개발하기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다. 정족수 감지는 신호 물질을 이용한 미생물 간의 대화 체계로, 미생물의 밀도에 반응하여 생물막 형성과 같은 집단 행동을 조절한다. Patulin, halogenated furanones 및 4-nitro-pyridine-N-oxide는 신호 물질과 경쟁적으로 반응하여 미생물의 정족수 감지를 방해하는 생물막 형성 억제제이다. 미생물의 부유 및 고착 상태를 결정하는 주요 인자인 세포성 c-di-GMP은 생물막 형성 및 분산에 영향을 미치기 때문에, c-di-GMP의 조절 또한 다양한 생물막 억제제 개발에 사용되고 있다. 예를 들어 sulfathiazole과 azathioprine은 c-di-GMP 합성 억제를 통해 생물막 형성을 감소시키며, nitric oxide는 포스포디에스테라아제 (phosphodiesterase) 활성을 유도시켜 c-di-GMP를 억제시킨다.

[0004] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 새로운 생물막 형성 억제 효과가 있는 물질에 대하여 예의 연구하던 중, 리놀레산(linoleic acid)이 생물막이 형성되는 다양한 막 표면에서 해당 생물막의 형성을 억제하고, 기형성된 생물막을 효과적으로 분산시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명에서는 리놀레산(linoleic acid)을 유효성분으로 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물을 제공하고자 한다.

[0006] 또한, 본 발명에서는 상기 조성물을 대상물의 표면에 처리하는 단계를 포함하는 생물막 형성 억제 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 리놀레산(linoleic acid)을 유효성분으로 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명에서는 상기 조성물을 대상물의 표면에 처리하는 단계를 포함하는 생물막 형성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 생물막이 형성되는 다양한 막 표면에서 해당 생물막의 형성을 억제하고, 기형성된 생물막을 효과적으로 분산시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 조성물은 천연물을 기반으로 하는바, 생물막 관련 문제를 일으키는 다양한 분야에서 안전하게 사용될 수 있으며, 항균제와 조합시 시너지 효과를 발휘하여 항균 내 내성 증가로 인해 제거하기 어려운 생물막 또한 효과적으로 제어할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 녹농균 성장 및 생물막 형성에 대한 리놀레산(Linoleic acid, LA)의 영향에 관한 것으로서, (A)는 Linoleic acid (LA), cis-2-decenoic acid (cis-2-DA), sodium nitroprusside (SNP)의 화학 구조를 나타내고,

(B)는 다양한 농도의 LA (0, 10 및 100 μM)를 처리한 녹농균의 성장곡선을 나타내며, (C)는 다양한 농도의 LA (0-100 μM)를 처리한 녹농균의 생물막 양을 나타낸 것이다.

도 2는 공초점 레이저 주사 현미경 (CLSM)을 이용한 녹농균 생물막 분석 결과를 나타낸 것으로, (A)는 10 μM LA를 처리하지 않거나(왼쪽), 처리한(오른쪽) 녹농균 생물막의 CLSM 이미지를 나타내고, (B)는 ImageJ의 comstat 2를 이용하여 정량화한 생물막의 부피와 두께를 나타낸 것이다.

도 3은 녹농균 운동성에 대한 LA의 영향에 관한 것으로서, (A)는 24 시간 동안 10 μM LA를 처리하지 않거나(왼쪽), 처리한(오른쪽) 녹농균의 swimming, swarming 및 twitching 운동성을 나타내고, (B)는 swimming, swarming 및 twitching 운동에 의해 생성된 돌기의 길이를 나타낸 것이다.

도 4는 분산 신호 인자와 관련된 녹농균의 유전자 발현을 나타낸 것으로서, (A)는 LA를 처리한 미생물의 분산 신호 관련 유전자의 cDNA 복사 수를 대조군의 cDNA 복사 수로 표준화시킨 상대적인 유전자의 발현 정도를 나타내고, (B)는 다양한 농도의 LA(0-1000 μM)를 처리한 녹농균 돌연변이 (△PA14_54640 및 △PA14_65860)의 생물막 형성 억제 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 녹농균의 세포성 c-di-GMP 정도에 대한 LA의 효과를 나타낸 것으로서, (A)는 10 μM LA를 처리한 녹농균의 c-di-GMP 정도를 pSKcdrA (cdrA-lacZ fusion)을 보유한 b-galactosidase activity의 측정을 통해 분석한 결과를 나타내고(cis-2-DA 및 SNP가 실험의 양성 대조군으로 사용), (B)는 phosphodiesterase activity 측정을 위한 10 μM LA를 처리한 녹농균에 의한 bis-pNPP의 분해 정도를 나타내며, (C)는 세포 계수 방법을 통해 측정된 LA에 의한 녹농균의 분산능력을 나타낸 것이다.

도 6은 분산 신호 인자 관련 신호 시스템의 개략도를 나타낸 것으로, (A)와 (B)는 각각 낮은 세포 밀도(A) 및 높은 세포 밀도(B)에서 Xcc의 DSF 시스템을 나타내고, (C)는 녹농균 PA14에서 LA 처리로 인해 예상되는 DSF 시스템을 나타낸 것이다.

도 7A는 그람 음성균인 녹농균과, 그람 양성세균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)에 의한 생물막 형성에 대한 LA의 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이고, 도 7B는 황색포도상구균에 의한 생물막 분산에 대한 LA의 효과를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0013] 본 발명은 리놀레산(linoleic acid)을 유효성분으로 포함하는 생물막 형성 억제용 조성물 및 이를 이용한 생물막 형성 억제 방법을 제공한다.

[0014] 이때, 하기 실시예의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 리놀레산은 확산성 신호 분자와 유사한 구조로 생물막 세포 내의 확산성 신호 분자 수용체 단백질인 RpfC에 결합하여 세포성 사이클릭 다이구아닐레이트 (c-di-GMP) 수준을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 상기 생물막은 녹농균 (Pseudomonas aeruginosa), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*), 살모넬라균 (Salmonella spp), 적리균 (Shigella spp), 장염비브리오 (Vibrio parahaemolyticus), 콜레라균 (Vibrio choreae), 캠필로박터 (Campylobacter jejuni), 위막성 대장염균 (Clostridium difficile), 웰치균 (Clostridium perfringens), 엘시니아 장염균 (Yersinia enterocolitica), 피로리균 (Helicobacter pylori), 아메바 적리균 (Entemoeba histolytica), 바실러스 세레우스균 (Bacillus cereus), 보툴리누스균 (Clostridium botulinum), 인플루엔자균 (Haemophilus influenzae), 폐렴구균 (Streptococcus pneumoniae), 클라미디아 폐렴균 (Chlamidia pneumoniae), 레지오넬라 폐렴균 (Legionella pneumoniae), 부란하멜라균 (Branhamella catarrhalis), 결핵균 (Mycobacterium tuberculosis), 마이코플라즈마 (Mycoplasma pneumoniae), A형 용련균 (Storeptcoccus pyogenes), 디프테리아균 (Corynebacterium diphtheriae), 백일해균 (Bordetella pertussis), 옴병균 (Chramidia psittaci), 폐렴 간균 (Klebsiella pneumoniae), 엔테로박터 (Enterobacter spp), 프로테우스속 (Proteus spp), 아시네토박터 (Acinetobacter spp), 장구균 (Enterococcus faecalis), 포도상 구균

(Staphylococcus saprophyticus), B형 용련균 (Storeptcoccus agalactiae)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 균에 의해서 형성되는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 조성물은 의료 및 기타 산업 분야에서 생물막 형성을 억제하기 위한 용도로서 다양하게 사용될 수 있으며, 예를 들어 의료 분야에서는, 의료기기, 의료용 재료 또는 의료용 이식물의 표면에 형성되는 생물막 형성을 억제하는데 사용될 수 있다. 구체적으로는, 진찰 및 진단기기, 임상검사기기, 방사선기기, IUD, 기관 튜브, 각종 카테터, 정형외과 기기 등과 같은 수술관련기기, 병원설비 및 응급장비, 비만 및 건강관련기기, 콘택트 렌즈, 스텐트, 밸브, 성형 보형물 등과 같은 다양한 의료 분야에 사용될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 역삼투막 등과 같은 다양한 수처리막의 표면에 형성되는 생물막 형성을 억제하는 데에도 사용될 수 있으며, 더 나아가, 다양한 식품 및 세탁기, 가습기, 식기 세척기 등과 같은 다양한 생활용품의 표면에 형성되는 생물막 형성을 억제하는데에도 사용될 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 치아 표면에 형성되는 생물막 형성을 억제하는 데에도 사용될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 조성물의 제형은 상기 조성물의 제형은 치약, 구강청정제, 구강용 스프레이, 구강용 티슈 제형, 구강용 연고제 및 구강용 바니쉬로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명에 따른 조성물의 제형은 주방용 세제, 바닥용 세제, 화장실용 세제, 주방용 소독제, 욕실용 소독제, 유리 세척제, 과일야채 세척제, 기름제거 세척제, 찌든때 제거제, 표백제, 가구 세척제, 의류용 세탁세제, 섬유유연제 및 변기 세척제로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0021] 한편, 본 발명은 상기 조성물을 대상물의 표면에 처리하는 단계를 포함하는 생물막형성 억제 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 방법은 전술한 각종 의료기기 등과 수처리막 등의 표면에 상기 조성물을 코팅 처리함으로써 수행될 수 있는데, 이러한 코팅 처리는, 대상물 표면을 조성물 용액에 담지시키거나, 조성물 용액을 대상물 표면에 분무 처리하는 등의 방법에 의해서 수행될 수 있다.

[0022] 본 발명에서, "유효 성분으로 포함"이라는 용어는, 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 또는 충분한 양으로 해당 성분이 포함되는 것을 의미한다. 실제 적용에 있어서 유효 성분으로 포함되는 양의 결정은 타겟 미생물에 의한 생물막 형성을 억제하기 위한 양으로서, 다른 독성을 야기하지 않는 사항을 고려해서 결정될 수 있다. 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 지닌 기술자라면 과도한 실험을 동반하지 않고 개별적 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 다양한 구강 관련 제품의 제조에 유용하게 활용될 수 있으며, 따라서, 담체, 희석제, 보조제 및 안정화제 등과 같은 다양한 부가 성분을 더 포함할 수도 있다.

[0025] [실시예]

[0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0028] 미생물의 성장과 생물막 형성에 대한 LA의 영향

[0029] LA가 녹농균 성장에 미치는 영향은 595 nm의 흡광도를 측정을 통해 분석하였다. 다양한 농도의 LA (10 및 100 μM)를 처리한 녹농균의 성장은 14 시간 배양기간 동안 LA를 처리하지 않은 것 (대조군)과 유사하였으며, 이것은 녹농균 성장이 100 μM의 고농도의 LA 처리에도 영향을 받지 않는 것을 의미한다 (도 1B). 녹농균 생물막 형성에 대한 LA 및 cis-2-DA의 효과는 96-well plate를 이용한 static biofilm formation assay 방법을 이용하여 평가하였으며 그 결과, 생물막 형성은 LA 및 cis-2-DA 처리 농도와 비례하여 감소하였다 (13-55% 및 23-41%; 0-100 μM) (도 1C). 연속 유동 조건에서 LA 및 cis-2-DA에 의한 생물막 형성 억제는 continuous drip-flow reactor와 공초점 주사 현미경 (CLSM)으로 분석하였다. 그 결과, LA 및 cis-2-DA를 처리한 생물막은 대조군보다 얇고 밀도가 낮은 것으로 나타났으며 (도 2A), LA 처리를 하지 않은 경우, 생물막 부피와 두께는 각각 19.9 ± 1.9 $\mu m^3/\mu m^2$ 및 24.2 ± 0.5 μm였고, LA 처리 시 각각 4.1 ± 2.8 $\mu m^3/\mu m^2$ 및 6.6 ± 6.2 μm으로 감소하는

것을 확인하였다(도 2B).

[0031] 미생물 운동성에 대한 LA의 영향

[0032] LA와 cis-2-DA가 녹농균의 운동성 (swimming, swarmming 및 twitching)에 미치는 영향을 다양한 배지에서 분석하였으며, 그 결과를 하기 도 3에 나타내었다. 그 결과, 10 μM LA 및 cis-2-DA 처리시, swimming 운동성은 대조군에 비해 각각 1.4 및 1.22배 ($P < 0.005$), swarming 운동성은 각각 9.1 및 9.7 배 증가하였으며 ($P < 0.005$), twitching 운동성은 증가하지 않는 것으로 확인되었다 ($P> 0.5$).

[0034] Diffusible signal factor (DSF) 관련 유전자 발현의 조절

[0035] LA는 cis-2-DA와 유사한 구조로 DSF 관련 유전자 발현에 영향을 줄 수 있을 것이라는 가설을 확인하기 위해, RT-qPCR을 통해 LA 처리에 의한 유전자의 발현을 평가 및 비교하였다. 분석 결과, rpfF, rpfC 및 rpfG 1 - 3 유전자의 발현이 각각 10 μM LA 처리로 인해 1.5 - 2.4 배 증가하였다 ($P < 0.005$) (도 4A). 또한, static biofilm assay를 통해 LA가 △rpf에 미치는 영향을 분석한 결과, 야생형 녹농균의 생물막 형성은 LA 처리농도 (0 - 1,000 μM)에 따라 8 - 41% 감소하는 것을 확인하였다 (도 4B).

[0037] 세포성 c-di-GMP에 대한 LA의 영향

[0038] c-di-GMP 양에 따라 cdrA를 발현할 수 있는 *E. coli* reporter 균주를 이용하여 c-di-GMP의 정도를 분석하였다. 그 결과, 10 μM LA, cis-2-DA 및 SNP 처리로 cdrA 발현이 각각 29, 34 및 57% 감소하는 것을 확인하였다 (도 5A). 또한, PDE 활성은 PDE에 특이적으로 반응하는 기질인 bis-pNPP의 분해를 분석함으로써 평가하였으며, 그 결과, LA는 대조군에 비해 2.4배 정도의 bis-pNPP를 분해하였으며, 양성 대조군인 cis-2-DA 및 SNP는 각각 2.9 및 3배의 bis-pNPP를 분해하는 것으로 나타났다 (도 5B). 뿐만 아니라, LA를 PBS로 세척한 생물막에 2 시간 및 4시간 처리 시 대조군에 비해 각각 2 배 및 3.3 배의 생물막 분산이 확인되었다 (도 5C).

[0040] 다양한 미생물의 생물막에 대한 LA의 영향

[0041] *Pseudomonas* 외에 다양한 미생물에 의한 생물막에 대한 LA (10 μM)의 영향을 보기 위해, 생물막 형성과 분산에 대한 실험을 수행하였다. 도 7은 그람 음성균인 녹농균과, 그람 양성세균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 캔디다 트로피칼리스(*Candida tropicalis*)에 의한 생물막 형성에 대한 LA의 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다. 도 7에 나타난 바와 같이, LA는 녹농균외에도 다양한 미생물에 의한 생물막 형성을 효과적으로 저감시키는 것으로 나타났다 (도 7A). 또한 *Staphylococcus*의 경우 LA는 생성된 생물막도 효과적으로 분산시킬 수 있는 것으로 확인되었다 (도 7B). 실제 환경에 존재하는 생물막 안에는 다양한 미생물이 함께 존재한다. 다양한 미생물의 생물막 형성과 분산에 영향을 미치는 LA의 특성은 환경 내에 존재하는 생물막 제어에 더욱 효과적일 것이라 판단된다.

[0043] 결과 검토

[0044] 미생물 생물막 분산은 흐름 또는 전단 응력으로 인한 물리적 분리로 인해 발생한다. 하지만, 영양분의 가용성, 산소 농도의 변화, 산화질소와 같은 환경 신호에 반응하여 생물막 자체로도 종종 분산이 일어나기도 한다. 생물막 분산은 불리한 환경 조건을 피하기 위한 미생물의 생존 전략이며, 미생물이 보다 유리한 환경으로 이동할 수 있는 기회를 제공한다. 단백질 CsrA (탄소 저장 조절제)는 대장균에서 세포 내 글리코겐 생합성 및 이화 작용에 영향을 주고, 생물막 분산을 유도하는 것으로 알려져 있다. c-di-GMP 형성 효소 (MxdA) 및 이펙터 단백질 (MxdB)은 *Shewanella oneidensis* MR-1 생물막 부착 및 분리에 영향을 미친다. 일부 연구에서는 미생물이 alginate lyase 및 dispersin B와 같은 EPS 분해 효소를 분비하여 *P. aeruginosa* 및 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 분산을 유도하는 것을 확인하였다. *P. aeruginosa*의 cis-2-DA에 의해 생성된 단일 불포화 지방산은 그람 양성 및 음성 미생물의 생물막 분산을 유도할 수 있다. Cis-2-DA는 기능 및 구조적으로 미생물과 곰팡이에서 세포 간 통신분자로서 작용하는 확산성 신호 인자 (DSF)와 관련이 있다.

[0045] DSF 신호 전달 메커니즘은 *Xanthomonas campestris pv. campestris* (*Xcc*)에서 처음 보고되었다. Xcc에서, rpf (병원성 인자 조절) 클러스터 유전자인 rpfF, rpfC 및 rpfG는 DSF 신호 시스템에서 중요한 역할을 한다. DSF 신호 감지 및 형질 도입은 각각 센서 키나제 (RpfC) 및 세포질 조절제 (RpfG)와 관련있다. RpfC 단백질은 3개의 도메인, histidine kinase (HK), CheY-like two-component receiver (REC) 및 C-terminal histidine phosphotransfer (HPT) 으로 구성된다. 한편, RpfG 단백질은 REC과 HD-GYP 도메인으로 구성되어있다 (Ryan and Dow, 2011). RpfG의 HD-GYP 도메인은 phosphodiesterase 활성을 통해 c-di-GMP 분자를 분해시킨다. DSF 시스템은 정족수 인식과 같은 미생물 밀도에 반응하여 유전자 발현을 조절하는 전사 조절 인자에 의해 신호를 생성하고 신호에 반응한다. 낮은 세포 밀도에서, 비인산화된 RpfC는 RpfF-RpfC 복합체를 형성시키고 DSF 생산을 기초 수준으로 제한하는 구조를 유지시킨다 (도 6A). 하지만, 높은 세포 밀도에서 DSF 분자의 축적은 RpfC 인산화 및 RpfF-RpfC 복합체로부터 RpfF의 방출을 유도하여, RpfF에 의한 DSF 분자의 생성을 증가시킨다 (도 6B). 인산화된 RpfC는 RpfG를 활성화시키고, RpfG의 HD-GYP 도메인의 phosphodiesterase activity를 통해 c-di-GMP 농도를 감소시킨다.

[0046] DSF 신호에 반응하여, 녹농균은 생물막 형성을 제어하고 항균성 펩타이드에 대한 내성을 증가시킨다. 녹농균의 Rpf 유전자는 클러스터에서 인코딩되지 않지만, BLASTp 분석 결과 PA14_54640 (30%) 및 PA14_65860 (32%)이 각각 *Xcc*의 RpfF 및 RpfC에 대해 높은 아미노산 서열 유사성을 보였다. 녹농균의 DSF에는 Xcc의 RpfC 단백질과 유사한 아미노산 서열을 지니는 input domain을 포함하는 sensor kinase인 PA1396 (PA14_65860)가 필요하다. PA14_54640 (PA3591)은 RpfF와 유사한 역할을 한다는 것도 알려져 있다. phosphodiesterase 활성을 지니는 2개의 HD-GYP 도메인인 PA4108 (PA14_10820) 및 PA4781 (PA14_30830)은 RpfG 단백질로 작용할 수 있다고 보고되었다. response regulator PA14_65880는 녹농균에서 RpfG-1 단백질과 유사하며, sensor kinase (rpfC)와 response regulator (rpfG) 유전자는 Xcc에서 하나의 오페론으로 구성되어있다. 하지만 PA14_65880은 HD-GYP 도메인을 인코딩하지 않으며 이것은 RpfG-1이 Xcc에서 RpfG와 유사하지 않다는 것을 의미하므로, 2개의 rpfG-2 및 -3 유전자 (HD-GYP 도메인 유전자; PA14_10820 및 PA14_30830)를 추후 실험을 위해 선택하였다.

[0047] LA는 DSF 신호 분자와 유사한 화학 구조를 지니고 있으며, 이러한 특징은 녹농균의 DSF 유사 신호 시스템을 통해 c-di-GMP 수준을 감소시킬 수 있다는 것을 의미한다. 이를 증명하기 위해, 3개의 rpfF, rpfC 및 rpfG 동족체의 발현을 LA 존재 하에 RT-qPCR에 의해 분석하였으며, 그 결과 5개의 유전자 발현이 증가함을 확인하였다 (도 4A). 또한, LA 처리는 PDE 활성 증가를 통해 c-di-GMP 수준을 감소시켰으며 (도 5A 및 5B), 이것은 LA가 *P. aeruginosa*의 cis-2-DA와 같은 신호 분자로 작용할 수 있다는 것을 의미한다. 또한, DSF를 생성할 수 없는 rpfF knockout mutant 생물막은 고농도의 LA 처리에 의해 감소됨을 확인하였다 (도 4B). 이러한 결과를 바탕으로 LA에 의한 녹농균 생물막 억제에 대한 분자 메커니즘을 제안하고자 한다 (도 6C). DspI (PA14_54640; PDB 5WYB)를 이용한 LA 및 cis-2-DA의 silico 도킹 연구에는 SYBYL-X 2.1.1의 Surflex-Dock GeomX module이 사용되었다. 두 화합물의 최상의 도킹은 DspI의 촉매 부위의 결합에서 발생한다. LA 및 cis-2-DA의 카르복실산기는 CoA-결합 부위의 주 아미노산기로 알려진 Glu126 (LA의 경우 2.10Å, cis-2-DA의 경우 1.99Å)과 강한 수소 결합을 하며, 이외에도 Ala78 (LA의 경우 2.22Å, cis-2-DA의 경우 2.14Å) 및 Gly123 (LA의 경우 1.88Å)의 NH 그룹과 추가적인 수소 결합을 형성한다. LA는 DSF 신호 전달 수용체 단백질 RpfC에 결합하여, RpfC 인산화 및 RpfG의 활성화를 유도시킨다. 이와 같은 신호 전달은 RpfG의 HD-GYP 도메인의 phosphodiesterase 활성을 통해 세포 내 c-di-GMP 농도를 감소시켜 생물막을 억제시키는데 관여한다.

[0048] 위의 결과들은 LA가 DSF 관련 QS를 통해 c-di-GMP 농도를 조절할 수 있음을 나타낸다. LA에 의해 조절되는 c-di-GMP는 EPS 생산, 독성 및 운동성과 같은 다양한 표현형을 변화시킨다. *P. aeruginosa* 생물막 형성은 편모와 관련된 swimming 및 swarming 운동성에 역으로 조절되며, type IV pili와 관련된 twitching 운동성은 표면 부착을 증가시킨다. *P. aeruginosa*가 편모 또는 type IV pili를 사용하여 생물막을 형성하는지의 여부는 생물막 형성 단계에 달려있다. Flagella는 표면으로 이동하여 생물막 분산에 관여하는 반면, type IV pili는 응집 및 미세 콜로니 형성에 관여한다. 실험결과 LA 처리 시 swimming 및 swarming 운동은 증가했지만, twitching 운동에는 변화가 없었다 (도 3). 또한 EPS의 주성분인 탄수화물 및 단백질의 양이 각각 35% 및 4% 정도 감소했다. 이와 같은 결과는 LA가 DSF 신호 전달 시스템을 이용하고, c-di-GMP 농도 조절을 통해 미생물의 운동성 및 EPS 생성에 영향을 미친다는 것을 의미한다.

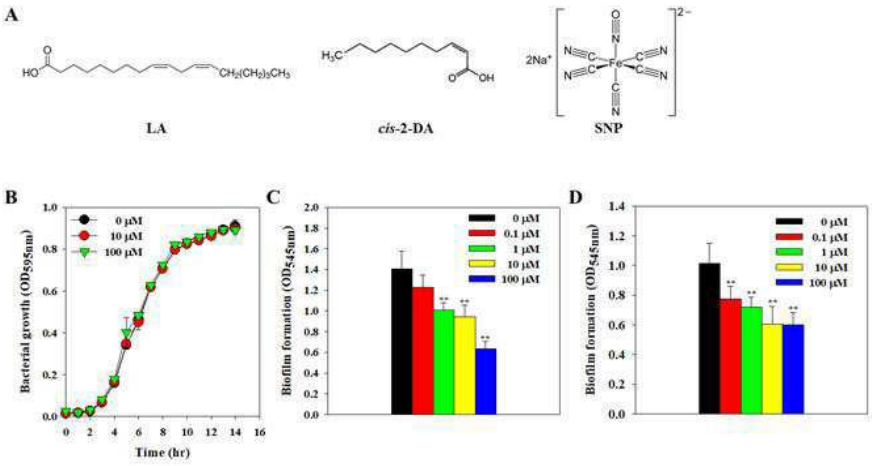
[0049] 생물막 분산을 담당하는 신호 분자의 개발은 생물막 형성을 억제하는 것이 아니라 미생물을 유동상태로 유도함으로써 표면에 형성된 생물막을 제거한다는 면에서 중요한 의미를 지닌다. 본 발명에서는 LA가 생물막을 분산시킬 뿐만 아니라 생물막 형성을 억제할 수 있다는 것을 증명하였다. 식물성 지방산인 LA는 천연 물질로, 생물막 관련 다양한 분야에 안전하게 적용될 수 있다. 또한, 항균제와 조합한다면, 항생제 내성 증가로 인해 제거하기

어려운 생물막을 효과적으로 제어할 수 있다. 이뿐만 아니라 전염병 문제 또는 산업적 생물 오염 문제를 포함하여 다양한 분야에서 원치 않는 생물막을 제어하는 데 도움이 될 것이다.

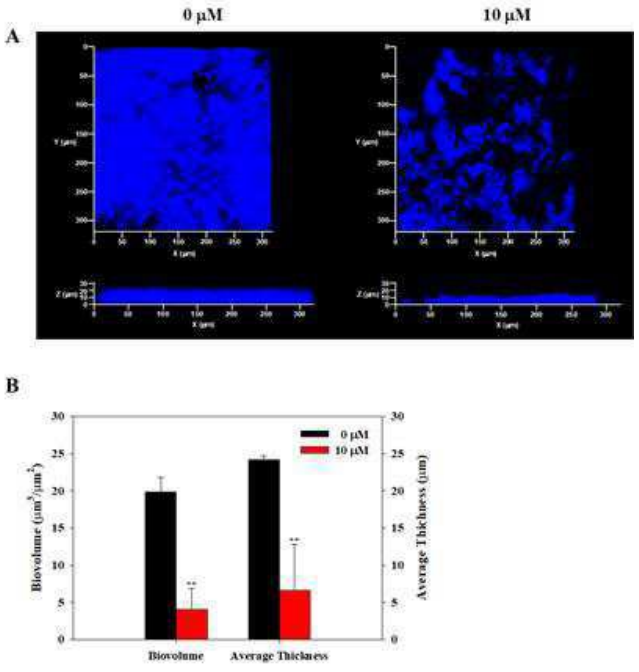
[0051] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

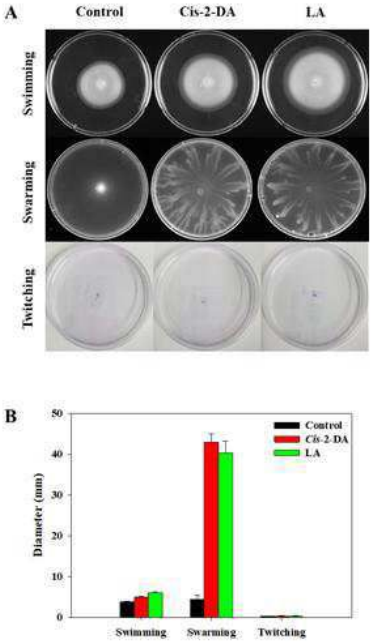
도면1



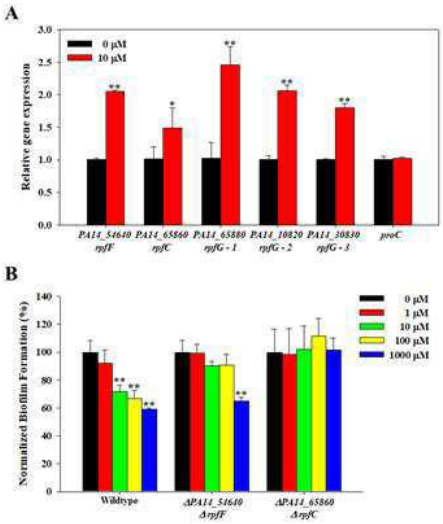
도면2



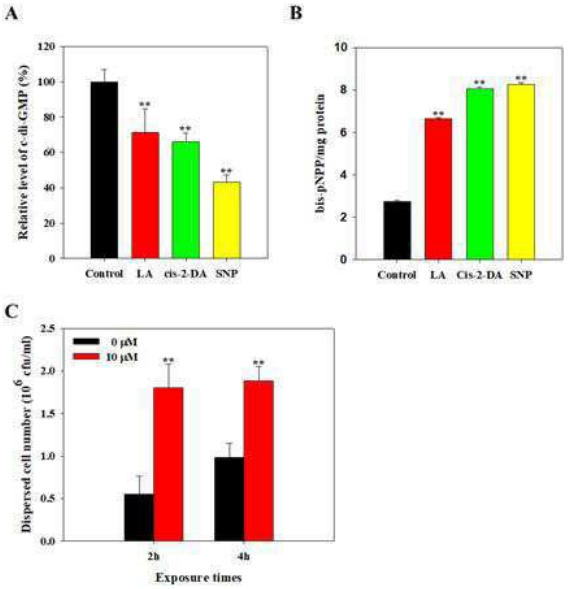
도면3


A
Control
Cis-2-DA
LA
Swimming
Swarming
Twitching
B
Control
Cis-2-DA
LA
Diameter (mm)
Swimming
Swarming
Twitching

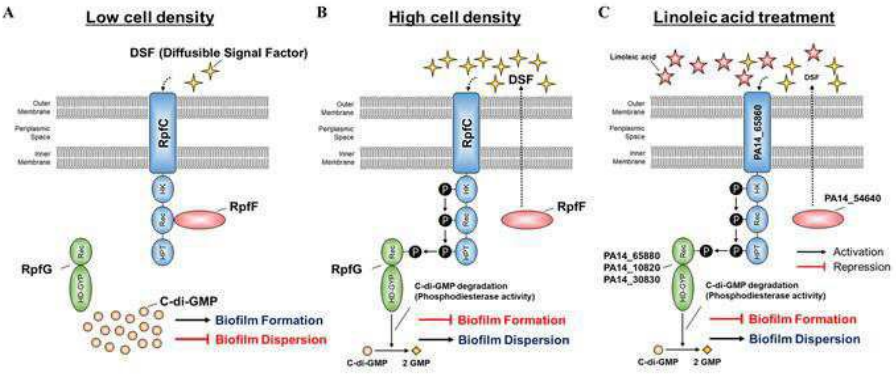
도면4


A
0 μM
10 μM
Relative gene expression
PA14_54610 rpfF
PA14_65860 rpfC
PA14_65880 rpfG-1
PA14_10820 rpfG-2
PA14_30830 rpfG-3
proC
B
0 μM
1 μM
10 μM
100 μM
1000 μM
Normalized Biofilm Formation (%)
Wildtype
ΔPA14_54610 ΔrpfF
ΔPA14_65860 ΔrpfC

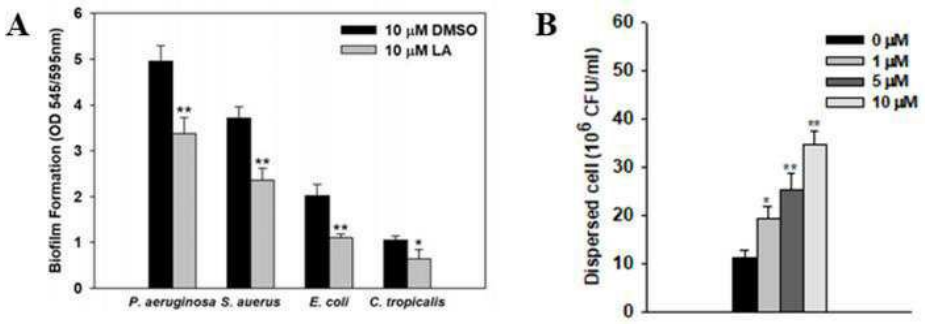
도면5


A
B
C
Relative level of c-di-GMP (%)
Control
LA
cis-2-DA
SNP
bis-pNPP/mg protein
Dispersed cell number (10^6 cfu/ml)
0 μM
10 μM
2h
4h
Exposure times

도면6


A
Low cell density
DSF (Diffusible Signal Factor)
RpfC
RpfF
RpfG
C-di-GMP
Biofilm Formation
Biofilm Dispersion
B
High cell density
DSF
C-di-GMP degradation
(Phosphodiesterase activity)
2 GMP
C
Linoleic acid treatment
PA14_65880
PA14_10820
PA14_30830
PA14_54640
Activation
Repression

도면7


A
10 μM DMSO
10 μM LA
Biofilm Formation (OD 545/595nm)
P. aeruginosa
S. auerus
E. coli
C. tropicalis
B
0 μM
1 μM
5 μM
10 μM
Dispersed cell (10^6 CFU/ml)