



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0094155
(43) 공개일자 2010년08월26일

(51) Int. Cl.

A01N 63/02 (2006.01) *A01P 21/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0013448

(22) 출원일자 2009년02월18일

심사청구일자 2009년02월18일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

박윤경

전남 장성군 장성읍 남면 분향리 876-3번지

함경수

서울 특별시 서대문구 홍은3동 미성아파트 3동 305호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

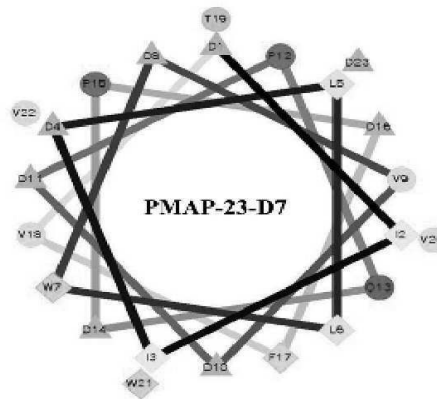
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 적조유발 생물에 항조류 활성을 가지는 적조 방제용 펩타이드, 그의 용도 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 적조 방제 활성을 갖는 서열번호 2로 기재되는 적조 방제용 펩타이드 관한 것이다. 본 발명에 의한 적조 방제용 펩타이드는 탁월한 항조류 활성을 나타내고 세포 독성이 없고 자연 분해가 가능하므로 해양생태계에 안전하고 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1b



(72) 발명자

김시욱

광주광역시 남구 봉선2동 한국아텔리움 101동 140
3호

박성철

광주광역시 북구 두암동 주공아파트 307-305

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B030302

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어 사업

연구과제명 바이러스 나노 캡시드 제조 원천 기술 개발

주관기관 조선대학교

연구기간 2008년 04월 15일 ~ 2014년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드에서 양전하를 띠는 아미노산을 음전하를 띠는 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 양전하를 띠는 아미노산은 친수성 부분인 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산인 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드.

청구항 4

제 3항에 있어서, 서열번호 2로 표시되는 아미노산인 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 적조 방제용 조성물은 알렉산드리움 속 (*Alexandrium sp.*), 알렉산드리움 카타넬라 (*Alexandrium catanella*), 스케렉토네마 코스타툼 (*Skeletonema costatum*) 및 프로로센트럼 미니멈 (*Prorocentrum minimum*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 적조 방제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드.

청구항 6

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 적조 방제용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산인 것을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 적조 방제용 펩타이드는 서열번호 2로 표시되는 아미노산인 것을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 적조 방제용 조성물은 알렉산드리움 속 (*Alexandrium sp.*), 알렉산드리움 카타넬라 (*Alexandrium catanella*), 스케렉토네마 코스타툼 (*Skeletonema costatum*) 및 프로로센트럼 미니멈 (*Prorocentrum minimum*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 적조 방제 활성을 가짐을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

청구항 10

항균 또는 항진균 활성을 가진 나선형 펩타이드에서 친수성 부분의 양전하를 띠는 아미노산을 음전하로 띠는 아미노산으로 치환하는 단계를 포함하는, 항균 또는 항진균성 펩타이드에 항적조 활성을 부여하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 친수성 부분의 양전하를 띠는 아미노산은 라이신(lysine), 아르기닌(arginine) 또는 히스티딘(histidine) 인 것을 특징으로 하는, 항균 또는 항진균 펩타이드에 항적조 활성을 부여하는 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 음전하를 띠는 아미노산은 아스파르트산(aspartic acid) 또는 글루탐산(glutamic acid)인 것을 특징으로 하는, 항균 또는 항진균 펩타이드에 항적조 활성을 부여하는 방법.

청구항 13

항균 및 항진균 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드에서 친수성 부분의 양전하를 띠는 아미노산을 음전하를 띠는 아미노산으로 치환하여, 적조 방제용 펩타이드를 제조하는 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 항생 활성을 가진 나선형 펩타이드는 서열번호 1에 기재된 아미노산으로 구성된 펩타이드인 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드 제조 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 친수성 부분의 양전하를 띠는 아미노산은 라이신(lysine), 아르기닌(arginine) 또는 히스티딘(histidine) 인 것을 특징으로 하고, 음전하를 띠는 아미노산은 아스파르트산(aspartic acid) 또는 글루탐산(glutamic acid)인 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드 제조 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 적조 생물의 생육을 저해하는 활성을 갖는 적조 방제용 펩타이드 및 이의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 적조는 플랑크톤이 번식하기에 알맞은 환경을 만나 대량 번식한 결과, 이들이 가지고 있는 다양한 색소로 인하여 해수의 색깔이 붉게, 혹은 녹색, 갈색으로 변하게 될 때 우리는 이런 현상을 통칭 적조라 부르고 있다. 우리나라 남해안 일대에 7월~9월 사이에 장마철이나 비가 온 뒤에는 바다의 색깔이 적갈색으로 변하여 바다에 살고 있는 굴, 조개, 홍합 등의 양식자원을 때로는 물고기까지 폐사하게 만든다. 또한, 유독성 식물플랑크톤을 먹은 어패류를 사람이 먹게 되면 여러 가지 패독현상을 일으키게 된다. 현재까지 적조를 예방하거나 적

조로 인한 피해를 줄이기 위한 여러 가지 방법들이 연구되었다. 그 예로서 화학약품을 뿌리거나 (Steidinger, 1983; Ryu *et al.*, 1998) 초음파 분쇄기, 오존 발생기, 원심분리기를 사용하여 화학적, 물리적으로 적조생물을 없애는 방법이 있다. 또한 점토를 이용하여 적조 원인생물을 흡착시켜 바닥으로 침전시키는 방법도 개발되었다 (Na *et al.*, 1996; Choi *et al.*, 1998). 그러나 이런 방법들은 생태계에 부작용을 미칠 수 있으며, 광범위한 적조 발생해역에서 이용되기에는 많은 문제점이 있다. 이에 현재 생물학적 방법으로 적조 원인생물을 제거하는 연구가 진행되고 있다. 이것은 생태계 내에서 피식자-포식자 관계를 이용해 원하지 않는 생물을 제거하는 방법이다 (Ishio *et al.*, 1989; Sakata *et al.*, Fukami *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1998). 그러나, 이 방법은 생태계의 먹이 사슬을 변화시켜 또 다른 문제점을 야기 한다. 또다른 분야에서는 해양 박테리아가 분비하는 물질에 의한 적조생물을 죽이는 방법도 활발히 연구되고 있다. 최근에는 단백질 합성저해제, 세포벽 저해제 및 세포막에 작용을 하는 항생제들을 사용하여 적조생물을 방제하는 시도를 하고 있다. 또는 이러한 물질들을 모델로 하여 인위적으로 저분자 물질들을 유기합성을 하여 생산하기도 하는데 이는 바다에서 분해가 되지 않고 축적되어 결국 농업부문에서 사용되는 농약에 의해 야기되는 문제점들처럼 해양생태계나 바다에서 생산되는 먹거리들을 통해 인체에까지 축적되는 문제점이 있다.

[0003] 이러한 문제점들을 고려해 볼 때 자연분해가 가능하며 인체나 자연 생태계에 무해한 적조 방제용 조성물로써 사용되어질 수 있는 것이 펩타이드나 단백질 제제이다. 이들은 또한 유전자 조작을 통하여 대량 발현하여 생산단가를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 적조생물에 특이하게 부착하는 박테리아나 바이러스의 표면에 펩타이드를 발현하여 적조 방제 활성을 나타나게 할 수도 있을 것이다.

[0004] 현재까지 벌독으로부터 정제된 양친매성 알파 나선구조를 가지는 항균 펩타이드인 메스토파란 비 (Mastoparan B)가 적조생물인 알렉산드리움 타마렌스(*Alexandrium tamarense*)와 샤토넬라 카테나툼 (*Chattonella catenatum*)에 대해 살조효과를 확인된 바 있다 (Seo *et al.*, 2003). 그러나 이 펩타이드는 낮은 농도에서 세포독성이 높게 나타나는 것으로 보고되어 있다.

[0005] 또한, 편모조류에 대해 선택적인 살조활성을 가지는 환형 펩타이드(일본 특허 출원 2003-056623)가 알려져 있으나 적조를 일으키는 특정 편모조류에서만 활성을 갖는다는 것이 확인 되었다(식별번호 53).

[0006] 또한, 적조 조류 살조 펩타이드(일본 특허 출원 2005-124258)가 알려졌으나, 상기 발명은 711개의 아미노산으로 된 73kDa의 프로테아제의 C 말단 부위를 포함하는 비교적 긴 펩타이드로 구성되어 효용성이 낮은 문제점이 있다.

[0007] 그러나 현재까지 적조 방제용 펩타이드의 종류가 별로 알려진 바가 없고, 실용화 된 것이 없어서, 새로운 펩타이드의 개발이 요구된다.

[0008] 이에 본 발명자들은 새로운 적조 방제용 펩타이드를 탐색하던 중 적조 생물의 세포벽은 셀룰로스로 주로 이루어져 있는데 이것은 전체적으로 양전하를 띠고 있어 서열번호 1의 양전하성 펩타이드와 결합하지 않을 것이므로, 이러한 점에 착안하여, 본 발명의 펩타이드를 제조하였고, 상기의 펩타이드가 강력한 적조 방제 활성을 보임을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 적조 방제용 펩타이드 제조 방법의 개발 및 이러한 방법을 이용하여 제조된 펩타이드 및 이를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물에 대한 것이다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0011] 항균성 및 항진균성의 항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드를 변형하여 조류에 적용할 수 있는 적조 방제용 펩타이드를 제공한다.

[0012] 또한, 상기의 펩타이드를 포함한 적조 방제용 조성물을 제공한다.

- [0013] 또한, 항생 활성을 가지는 펩타이드에 항적조 활성을 부여하는 방법을 제공한다.
- [0014] 아울러, 상기의 적조 방제용 펩타이드를 제조할 수 있는 제조 방법을 제공한다.

효 과

- [0015] 본 발명의 적조 방제용 펩타이드 또는 이를 유효성분으로 함유하는 적조방제용 조성물은 적조 생물의 사멸시키거나 적조 생물을 증식 및 생장을 억제할 뿐 아니라 세포독성이 없으므로, 안전하고 간편하게 적조가 심각한 해양에 손쉽게 적용할 수 있다. 또한, 본 상기의 펩타이드 제조 방법으로 신규하고 다양한 적조 방제용 펩타이드를 제조할 수 있다. 이와 같이 제조된 신규한 적조 방제용 펩타이드 및 조성물을 이용하면, 적조로 인한 피해가 감소되어 어업인의 소득증진 및 환경 보호 증진에 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드에서 양전하를 띠는 아미노산을 음전하를 띠는 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기의 펩타이드를 포함하는 적조 방제용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 항생 활성을 가지는 펩타이드에 항적조 활성을 부여하는 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 항생 활성을 가지는 나선형 구조의 펩타이드에서 친수성 부분의 양전하를 띠는 아미노산을 음전하를 띠는 아미노산으로 치환하여, 적조 방제용 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0020] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0021] '항생물질(antibiotics)'이란 박테리아 같은 균류의 활성을 억제하거나 균류를 사멸시키는 항균 작용을 가지거나, 곰팡이 같은 진균류의 활성을 억제하거나 진균류를 사멸시키는 활성을 가지는 항진균 작용을 갖는 물질을 의미한다.
- [0022] '적조 방제'란 항적제, 적조 방지, 살조 및 항조류 등의 여러가지 용어로 사용되며, 적조를 일으키는 조류(algae)의 생장을 억제하거나, 사멸시키거나, 운동성을 억제하는 등 조류의 증식을 막아 적조를 일으키는 현상을 제거하는 것을 의미한다. 또한, 보다 넓게는 적조를 일으키는 원인 조류를 사멸시키거나 생육을 억제한다는 의미도 포함한다.
- [0023] '양친매성 펩타이드(amphipathic peptide)'은 친수성 및 소수성 지역이 혼재하고 펩타이드를 의미한다. 특히 이러한 성질로 인해 친수성 부분은 물과 같은 극성 용매에 노출되도록 외부에 위치하고 소수성 부분은 단백질 내부에 위치하여 나선형 구조를 이룰 수 있는 펩타이드를 의미한다.
- [0024]
- [0025] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0026] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자는 항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드에서 양전하를 띠는 아미노산을 음전하를 띠는 아미노산으로 치환된 것을 특징으로 하는 적조 방제용 펩타이드를 제공한다.
- [0027] 본 발명자는 적조 방제용 물질을 찾고자 하는 과정에서, 항균 및 항진균의 특징을 갖는 펩타이드의 존재에 관심을 갖게 되었고, 상기의 활성을 조류에 적용시킬 수 있는 방법을 모색하였다. 이러한 과정에서, 돼지 창자에서 분리한 서열번호 1의 PMAP-23 아미노산 서열의 활성을 연구하던 중, PMAP-23이 박테리아에 대하여 강력한 항생활성을 가지고 있는 것(Zanetti M et al., J Biol Chem, 1994 Mar 18; 269(11): 7855-8)은 양전하성 펩타이드가 음전하를 띠는 박테리아의 세포막에 전기적인 상호작용에 의하여 결합하고 친수성과 소수성의 아미노산에 의해 양친매성 나선 구조를 가지게 되어, 이러한 구조로 세포막에 구멍을 뚫어 막전위를 변화시키거나 세포막을 파괴하여 항균활성을 가지는 것에 착안하여 본 발명의 제조방법을 발명하게 되었다.

- [0028] 본 발명은 기술적 특징은 항균 및 항진균 활성을 가진 항생 펩타이드를 조류에 적용할 수 있도록 적용시키는 것으로서 항생제의 활성을 항균 및 항진균성에서 항조류로 확대시킬 수 있는 펩타이드에 대한 것이다.
- [0029] 본 발명자는 조류에 상기의 항생 펩타이드가 적용될 수 없었던 것은 상기 항생제가 조류에 결합 될 수 없기 때문이라고 판단하였다. 박테리아나 곰팡이는 세포막이나 벽이 음전하를 띄고 있으나, 조류의 세포벽인 셀룰로스는 양전하를 띄고 있기 때문이다. 이에 항생 펩타이드의 나선형 구조중에, 박테리아나 곰팡이에 결합을 가능하게 하는 친수성 부분의 양전하를 띄고 있는 아미노산을 음전하를 띄고 있는 아미노산으로 치환하였다.
- [0030] 양전하를 띄고 있는 아미노산은 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘이 이에 해당되며, 이러한 아미노산을 음전하를 띄고 있는 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환하였다. 특히 양전하를 띄고 있는 아미노산 중 라이신 및 아르기닌을 아스파르트산으로 치환하는 것이 바람직하다.
- [0031] 양전하를 띄고 있는 아미노산을 모두 음전하를 띄고 있는 아미노산으로 치환하는 것이 바람직하나, 선택적으로 치환하여 제조하여 펩타이드 전체가 음전하를 띄는 펩타이드 또한 본원 발명에 범주 안에 속한다.
- [0032] 또한, 항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드는 모두 본원 발명의 제조 방법에 이용될 수 있으며, 특히 세포막에 구멍을 뚫어 항균 및 항진균 활성을 갖는 펩타이드가 바람직하며, 서열번호 1의 PMAP-23 펩타이드를 이용하는 것이 가장 바람직하다.
- [0033] 본 발명의 제조 방법은 양전하를 띤 아미노산을 음전하를 띤 아미노산으로 바꿀수 있는 방법이면 무엇이든 가능하나, 폴리펩타이드를 직접 제조하는 방법이나 유전공학적인 방법으로 유전자 서열을 변형시켜 아미노산을 치환하는 것이 바람직하다.
- [0034] 상기의 항균 및 항진균성 펩타이드가 항적조 활성을 갖는 펩타이드로 될 수 있는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 특히 적조생물의 세포벽으로서 양전하를 띠는 셀룰로스와 전기적 결합을 유도하기 위하여 펩타이드 유도체를 설계하고 합성하였다. 펩타이드의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)를 아미노기 보호 용기로 이용하는 메리필드의 액상 고상법을 사용하여 합성하였다. 즉, 아미노산을 하나씩 결합하여 합성하되, 서열번호 1의 펩타이드 중 1, 8, 10, 11 및 23번째 아미노산은 양전하를 띠는 아르기닌(Arginine)과 14 및 16번째 아미노산은 양전하를 띠는 라이신(Lysine)을 음전하를 띠는 아스파르트산(Aspartic acid)로 치환하여 서열번호 2의 펩타이드를 완성하였다.
- [0035] 상기 방법으로 적조 방제용 폴리펩타이드를 제조한 결과, 도면 2 내지 3에서 보는 것과 같이 실제 적조 방제 활성이 있음을 보이고 있다. 또한, 본 실시예에서는 보이고 있지 않으나, 양전하를 띄는 아미노산의 일부 치환시에는 서열번호 2의 펩타이드보다는 적조 방제 효능이 떨어지나 역시 활성을 가지고 있으므로, 본 발명의 특징을 가지고 있는 펩타이드는 적조 방제 및 살조에 효과적임을 알 수 있었다.
- [0036] 그러므로 7개의 친수성 부위의 양전하성 아미노산을 모두 음전하성 아미노산으로 치환하는 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않으며, 상기의 펩타이드가 음전하성을 띄게 하는 한 적정수의 치환 또한 본 발명의 범주 내에 속한다.
- [0037] 또한, 상기의 방법으로 제조된 서열번호 2의 펩타이드는 표 2에서 보듯이 규조류에 속하는 스케렉토네마 코스타툼, 편모조류에 속하는 프로로센트럼 미니멈, 편모조류에 속하는 알렉산드리움 등 여러가지 조류에 대하여 낮은 IC₅₀값을 보이므로 적조 방제 효과가 있음을 보였다. 또한, 도면 2 내지 3에서도 서열번호 2가 각각 알렉산드리움 속 및 스케렉토네마 코스타툼에 대한 적조 방제 효과가 있음을 보이고 있다.
- [0038]
- [0039] 또한, 본 발명은 상기의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물을 제공한다.
- [0040] 상기 적조 방제용 조성물에 추가될 수 있는 성분으로는 이미 적조 방제용으로 사용하고 있는 황토가 바람직하다. 그러나 이에 한정되지 않고 본 발명의 적조 방제용 펩타이드를 해양에 적절히 분산 또는 중합체에 적절히 섞어진 상태로 분산시킴으로써 그 효과를 증진시킬 수 있는 것은 무엇이나 조성물에 추가될 수 있을 것이다.

- [0041] 또한, 본 발명은 항균 또는 항진균 활성을 가진 나선형 펩타이드에서 친수성 부분의 양전하를 띠는 아미노산을 음전하로 띠는 아미노산으로 치환하는 단계를 포함하는, 항균 또는 항진균성 펩타이드에 항적조 활성을 부여하는 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 방법은, 항균 또는 항진균 활성을 가지는 항생 물질 중 세포벽에 특이적으로 결합하여 항생 작용을 하는 나선형 펩타이드의 성질을 변화시켜 조류를 죽이는 항적조 활성을 부여한다.
- [0043] 본 발명자는 항생물질을 연구중, 박테리아나 균류를 죽이는 기작이 조류에도 동일하게 적용될 수 있다고 여겼다. 다만, 그 항생 펩타이드가 조류에 붙을 수 없다는 점에 착안하여, 항생 펩타이드가 조류에 부착가능하도록 펩타이드를 변형하였다. 특히 서열번호 1의 PMAP-23을 이용하여 양전하를 띠는 아르기닌과 라이신을 음전하를 띠는 아스파르트산으로 치환하여 실험한 결과 도면 2 및 3에서 보는 것과 같이 적조 방제 활성이 있음을 확인하였다.
- [0044] 이로서 본원 발명과 같이 항생 펩타이드에 항적조 활성을 부여할 수 있음을 확인하였다. 본 명세서에서 다른 항생 펩타이드를 변형한 실시예는 보이고 있지 않으나, 다른 항생 펩타이드도 본 발명과 같이 펩타이드를 구성하는 아미노산을 변형하여, 항생 펩타이드가 음전하를 띠게 한 결과 항적조 활성을 보임을 확인하였다.
- [0045] 또한, 본 발명은 항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드에서 친수성 부분의 양전하를 띠는 아미노산을 음전하를 띠는 아미노산으로 치환하여, 적조 방제용 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0046] 본 발명은 항균 작용을 하는 서열번호 1을 변형하여 조류에 적용할 수 있는 새로운 펩타이드를 개발한 것이 본원 발명의 기술적 특징이며, 특히 음친화성 펩타이드를 제조하는 데 그 특징이 있으므로 서열번호 1 및 서열번호 2의 변형 중 활성에 크게 영향을 미치지 아니하는 범위 내의 변형은 당업자에게 자명하므로 본 발명의 범주 내에 속한다.
- [0047] 즉, 서열 번호 1의 아미노산을 치환하되 친수성과 소수성 부분이 유지되어, 3차원의 나선 구조를 갖는다면 상기의 변형된 펩타이드는 본 발명에서 언급한 서열 번호 1의 범주안에 속한다.
- [0048] 구체적으로 양전하를 띠고 있는 아미노산은 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘이 이에 해당되며, 특히 양전하를 띠고 있는 아미노산 중 라이신 및 아르기닌을 아스파르트산으로 치환하는 것이 바람직하다. 이러한 양전하를 띤 아미노산을 음전하를 띠고 있는 아스파르트산 또는 글루탐산으로 치환할 수 있으며, 특히 음전하를 띠고 있는 아미노산은 아스파르트산이 바람직하다.
- [0049] 양전하를 띠고 있는 아미노산을 모두 음전하를 띠고 있는 아미노산으로 치환하는 것이 바람직하나, 선택적으로 치환하여 제조하여 펩타이드 전체가 음전하를 띠게 만드는 것 또한 본원 발명에 범주안에 속한다.
- [0050] 또한, 항생 활성을 가진 나선형 구조의 펩타이드는 모두 본원 발명의 제조 방법에 이용될 수 있으며, 특히 세포막에 구멍을 뚫어 항균 및 항진균 활성을 갖는 펩타이드가 바람직하며, 서열번호 1의 PMAP-23 펩타이드를 이용하는 것이 가장 바람직하다.
- [0051] 본 발명의 제조 방법은 양전하를 띤 아미노산을 음전하를 띤 아미노산으로 바꿀수 있는 방법이면 무엇이든 가능하며, 폴리펩타이드를 직접 제조하는 방법이나 유전공학적인 방법으로 유전자 서열을 변형시켜 아미노산을 치환하는 것이 바람직하다.
- [0052] 아울러, 본 발명의 펩타이드는 실시예 3에서 입증한 바와 같이 적혈구나 사람 정상세포 독성 실험에서도 독성변화를 나타내지 않아 안전한 물질임을 확인하였다.
- [0053] 따라서, 본 발명의 펩타이드가 높은 적조 방제 활성을 가지는 효과적인 적조 방제용 펩타이드임을 알 수 있고, 세포 독성이 없어 적조 방제용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 짧은 서열의 단백질이므로 자연상태에서도 시간이 지남에 따라 자연 분해가 가능하므로 자연 생태계에 무해한 적조 방제용 조성물로써 유용하게 사용되어 질 수 있다.

[0054] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0055] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예

[0056] <실시예 1> 펩타이드의 합성 및 분리정제

[0057] 본 발명자들은 양친매성 적조 방제용 펩타이드를 합성하기 위하여, 돼지로부터 유래하는 서열번호 1의 PMAP-23 펩타이드의 친수성 영역 양이온 아미노산을 음이온 아미노산으로 치환하였다. 구체적으로, 실험실의 합성기(CEM company)로 합성한 서열번호 1로 기재되는 펩타이드의 1, 8, 10, 11, 23번째 아미노산인 아르기닌과 14, 16번째 아미노산인 라이신을 아스파르트산으로 치환하여 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 제조하였다(표1 및 도1).

[0058] 펩타이드의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)를 아미노기 보호 용기로 이용하는 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법을 사용하여 합성하였다(Merrifield, RB., *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149, 1963). 본 발명의 펩타이드에서 카르복실말단이 -NH₂ 형태인 펩타이드는 링크 아미드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 체인(chain)의 연장은 N-하이드록시벤조-트리아졸-디사이클로-헥사카르보이미드법(N-hydroxybenzotriazole-dicyclohexylcarbodiimide)(HOBt-DCC)에 의하여 수행하였다.

[0059] 각 펩타이드 아미노 말단의 Fmoc-아미노산을 커플링시킨 후, 20% 피페리딘/디메틸 포마마이드(piperidine/Dimethyl formamide, 이하 'DMF' 라 약칭함) 용액으로 Fmoc기를 제거하고 DMP 및 디클로로메탄(dichloromethane, DCM)으로 여러번 세척한 다음 질소 가스로 건조시켰다. 상기 건조된 레진에 트리플루오로아세트산:페놀:티오아니솔:물:트리이소프로필실란(trifluoroacetic acid(TFA) : phenol : thioanisole : H₂O : triisopropylsilane = 85: 5: 5: 2.5: 2.5(vol./vol.)) 용액을 가하고 4시간 동안 반응시켜 보호기를 제거하고, 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 다음, 차가운 디에틸 에테르(diethyl ether)로 30분 동안 반응시킨 뒤 원심분리기로 펩타이드를 침전시켰다. 그리고 나서 디에틸 에테르로 침전된 펩타이드를 한번 더 세척한 뒤 재침전시키고 공기중에 건조시켰다. 이렇게 하여 얻은 크루드(crude)한 형태의 펩타이드를 pH 8인 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate)에 녹여 아세토니트릴을 그라디언트(gradient)로 하여 정제형 역상 HPLC 컬럼(reverse phase-HPLC column)(Delta Pak, C₁₈ 300Å, 19.0 mm × 30 cm, Waters)으로 정제하였다. 정제된 합성 펩타이드를 에드만 디그레이데이션(Edman degradation)방법으로 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산의 조성을 측정하고, MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) 질량 분석법(Hill, *et al.*, *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 5, 395, 1991)을 이용하여 펩타이드의 분자량을 측정하였다.

[0060] 그 결과, 본 발명에서 합성한 서열번호 2로 기재되는 펩타이드는 95% 이상의 순도를 나타내었으며, 측정된 분자량이 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 일치하여 정확한 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 합성되었음을 확인하였다.

표 1

[0061] 시험에 사용된 펩타이드의 아미노산 서열

펩타이드(명명)	서열	분자량
PMAP-23	RIIDLLWRVRRPQKPKFVTWVR-NH ₂ (서열번호 1)	2961.65
PMAP-23-D7	DIIDLLWDVDDPQDPDFVTWVD-NH ₂ (서열번호 2)	2730.97
멜리틴 (Melittin)	GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ-NH ₂ (서열번호 3)	2846.80

[0062] <실험예 1> 펩타이드의 적조 방제 활성 측정

[0063] <1-1> 적조생물에 대한 생육 50% 저해농도 측정

[0064] 상기 실시예 1에서 합성한 서열번호 2로 기재되는 펩타이드의 적조 방제 활성을 측정하였다. 구체적으로, 적조 방제 활성을 측정하기 위한 적조생물로 한국해양미세조류은행에서 분양을 받은 알렉산드리움 속(*Alexandrium* sp.), 알렉산드리움 카타넬라(*Alexandrium catanella*), 스케렉토네마 코스타툼(*Skeletonema costatum*) 및 프로로센트럼 미니멈(*Prorocentrum minimum*)을 사용하였다. 상기 각 조류를 F2 배지(150 mg NaNO_3 , 8.69 mg $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 10 mg ferric EDTA, 0.22 mg MnCl_2 , 0.11 mg CoCl_2 , 0.0196 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.012 mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 μg Vitamine B_{12} , 1 μg Biotin, 0.2 μg Thiamine $\cdot \text{HCl}$ / 1L 필터된 해수)에서 배양조건 온도 22℃, 염분 34‰, 그리고 조도 3,000 렉스(lux)이었고, 14 시간/10시간 명암 주기로 일정하게 두고 배양하였다. 전배양된 적조 생물 세포를 세포수 $10^4/\text{ml}$ 의 농도로 희석하여 24 웰(well) 마이크로 타이트리이트 플레이트에 접종하였다. 상기 실시예 1에서 합성한 서열번호 2의 펩타이드를 256 $\mu\text{M}/\text{well}$ 농도로부터 시작하여 1/2배씩 희석하여 상기 균주가 접종된 플레이트에 첨가하였다. 또한, 항균활성을 가지는 것으로 알려진 서열번호 1의 PMAP-23와 멜리틴(melittin)을 첨가하여 대조군으로 사용하였다. 위에 언급한 배양조건에서 36시간 동안 배양하면서 6시간 마다 적조생물 수를 헤모사이토메터(hemocytometer)를 이용하여 측정하여, 50% 생육 저해농도(50% of inhibitory concentration, 이하 'IC₅₀'라 약칭함) 값을 결정하였다.

[0065] 그 결과, 서열번호 1로 기재되는 펩타이드는 적조생물에 대하여 활성을 보이지 않는 반면에 서열번호 2로 기재되는 본 발명의 펩타이드는 강한 적조 방제 활성을 나타내었다(표 2). 따라서, 본 발명의 실시예 1에서 제조한 펩타이드는 적조 방제 활성이 뛰어난 펩타이드임을 알 수 있었다.

표 2

[0066] 적조유발 해양생물(해조류)에 대한 적조 방제 활성 측정

펩타이드	50% 생육 저해농도(IC ₅₀ , μM)			
	알렉산드리움 속	알렉산드리움 카타넬라	스케렉토네마 코스타툼	프로로센트럼 미니멈
서열번호 1	>256	>256	256	>256
서열번호 2	16	16	8	16

[0067] <1-2> 적조 방제 활성의 가시화

[0068] 본 발명의 펩타이드가 적조 방제 활성을 가지는 것을 광학 현미경상에서 가시화하기 위하여, 알렉산드리움 속과 스케렉토네마 코스타툼을 F2 배지(배지조성은 상기 실험예 1에서 서술)에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 $10^4/\text{ml}$ 의 농도로 24웰 마이크로 타이트리이트 플레이트에 접종한 뒤 서열번호 2의 펩타이드를 32 $\mu\text{M}/\text{well}$ 의 농도와 양성 대조군인 서열번호 1의 펩타이드를 256 $\mu\text{M}/\text{well}$ 농도로 상기 적조생물이 접종된 플레이트에 첨가하여 22℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 가시화하기 위하여 광학 현미경상에서 관찰하여 그 결과를 도 2와 3에 나타내었다.

[0069] 도 2에서 알 수 있듯이, 적조유발 생물인 알렉산드리움 코스타툼에 아무것도 처리하지 않은 경우(음성 대조군)는 생물의 수가 유지되고 외형적 변화가 없고, 서열번호 1의 양전하성 펩타이드는 256 $\mu\text{M}/\text{well}$ 의 농도로 처리하였지만 적조생물이 군집화가 현상이 개체화되는 현상과 약간의 개체에서 외형적 변화를 보였다. 그러나, 서열번호 2(32 $\mu\text{M}/\text{well}$ 의 농도로 처리)에서는 거의 모든 생물체에서 생물체내의 물질이나 소기관들이 사라진 형태이고 서로 뭉쳐있었다. 이로써 본 발명의 펩타이드의 적조 방제 활성을 확인하였다.

[0070] 또한, 도3에서도 볼 수 있듯이 스케렉토네마 코스타툼에서도 도2의 결과와 유사한 결과를 확인되었다.

[0071] <실험예 3> 펩타이드의 세포독성실험

[0072]

본 발명의 적조 방제용 펩타이드가 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 적조 방제용 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사하였다. 구체적으로, 사람의 적혈구를 8%의 농도가 되도록 인산염 완충 용액(PBS, pH 7.0)으로 3번 씻은 다음 희석하고 여기에 본 발명의 적조 방제 펩타이드인 서열번호 2와 서열번호 1D와 멜리틴으로 기재되는 항생 펩타이드를 256 μ M/웰 농도로부터 1/2배로 연속적으로 희석하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액을 1,000 x g로 원심분리하여 그 상등액 속에 포함된 헤모글로빈 양을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 파괴 정도를 조사하기 위하여 1% 트리톤-X100 (Triton X-100)을 첨가하여 흡광도를 측정하였고, 1% 트리톤 X-100의 세포 파괴능을 100%로 하여 이를 각 펩타이드의 적혈구 파괴능과 비교하여 하기 수학적 식 1에 따라 계산하였다.

수학적 식 1

[0073]

$$\% \text{ 적혈구 파괴능(hemolysis)} = \left(\frac{\text{흡광도 A} - \text{흡광도 B}}{\text{흡광도 C} - \text{흡광도 B}} \right) \times 100$$

[0074]

상기 식에서, 흡광도 A는 414 nm 파장에서 펩타이드 용액을 처리했을 때 흡광도, 흡광도 B는 414 nm 파장에서 파괴능 0%인 PBS만 처리했을 때 흡광도 및 흡광도 C는 414 nm 파장에서 1% 트리톤 X-100의 흡광도를 나타낸다.

[0075]

그 결과, 본 발명의 서열번호 1의 적조 방제용 펩타이드는 세포독성을 거의 나타내지 않는 반면, 양성 대조군으로 사용한 벌독인 멜리틴은 세포 독성이 매우 높게 나타났다(표 3).

표 3

[0076]

항생 펩타이드의 세포 독성 측정

펩타이드	% 용혈 활성						
	256 μ M	128 μ M	64 μ M	32 μ M	16 μ M	8 μ M	4 μ M
서열번호 1	22.1	10.4	1.5	0	0	0	0
서열번호 2	0	0	0	0	0	0	0
멜리틴	100	100	100	100	92.3	66.9	16.7

[0077]

<실험예 4> 펩타이드의 광합성 저해실험

[0078]

본 발명의 서열번호 1의 펩타이드의 적조 방제 활성을 적조 생물의 클로로필 에이 (Chlorophyll a)의 함량을 측정하여 도4에서 나타내었다. 알렉산드리움 속를 F2 배지(배지조성은 상기 시험 예1에서 서술)에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 10⁵/ml의 농도로 12웰 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종한 뒤 서열번호 2의 펩타이드와 양성 대조군인 서열번호 1의 펩타이드를 64 μ M/웰(well)의 농도로 첨가한 후 22℃에서 6, 12, 24, 36, 48, 72시간 동안 배양하였다.

[0079]

배양 후, 샘플들을 원심분리 한 후, 추출용매인 90% 아세톤을 넣어가며 균지지질기(homogenizer)로 파쇄하였다. 이후 파쇄된 샘플에서 클로로필 에이를 유리시키기 위해 -20℃에서 빛을 차단한 후 4시간 동안 방치하였다. 4시간 후 샘플을 원심분리하고 상등액을 조심히 취하고 나서, 상기 상등액으로부터 엽록소 A양을 전체 세포의 흡광도와 하기 식을 이용하여 측정하였다.

수학적 식 2

[0080] $\text{Chl a } (\mu\text{g/ml}) = (12.25 (A_{663}A_{750})2.55(A_{620}A_{750}))*\text{총 volume}/\text{샘플 volume}$

[0081] 그 결과 도 4에서 보여주듯이 서열번호 2의 펩타이드를 처리한 군에서 엽록소 A의 양이 현저히 준 것으로 나타난 것으로 보아 본 발명의 적조 방제용 펩타이드가 적조생물의 성장을 저해함을 알 수 있었다.

산업이용 가능성

[0082] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에서 제조한 적조 방제용 펩타이드는 적조유발 해조류에 탁월한 항조류 작용을 나타내었고, 세포독성을 나타내지 않으므로 해양생태계에 안전한 적조 방제용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0083] 도 1은 도 1A에 도시된 서열번호 1의 PMAP-23 펩타이드에 양전하성 아미노산을 음전하성 아미노산으로 치환시킴으로써 본 발명에 의한 도 1B에 도시된 서열번호 2의 적조 방제용 펩타이드의 헬리컬 휠 다이어그램(helical Heel Diagram)을 보여주는 모식도이다.

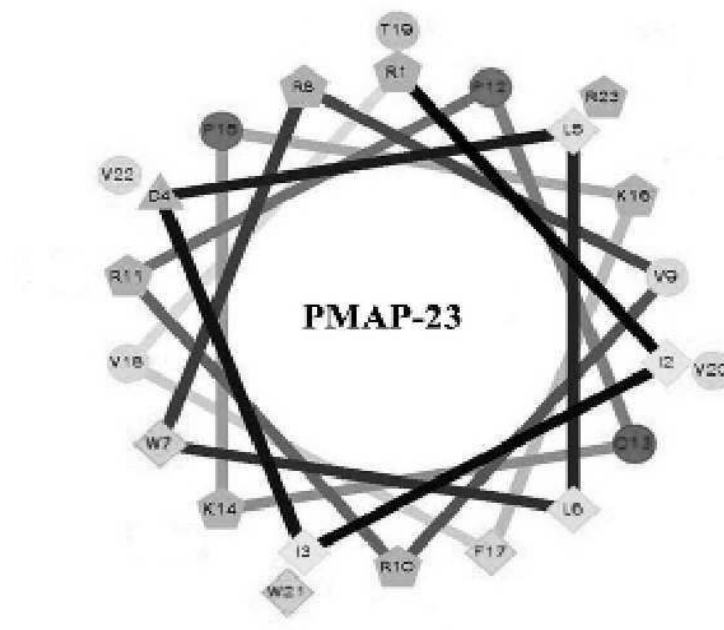
[0084] 도 2는 알렉산드리움 속 (*Alexandrium sp.*)에 대한 본 발명의 적조 방제용 펩타이드인 PMAP-23-D7의 적조 방제 활성을 나타낸 사진이다.

[0085] 도 3은 스케렉토네마 코스타툼 (*Skeletonema costatum*)에 대한 본 발명의 적조 방제용 펩타이드인 PMAP-23-D7의 적조 방제 활성을 나타낸 사진이다.

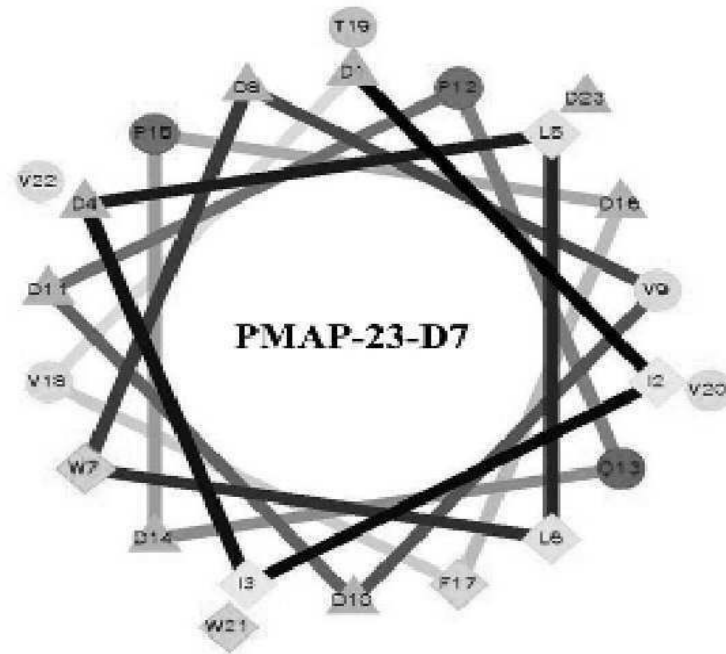
[0086] 도 4는 본 발명의 펩타이드의 알렉산드리움 속 (*Alexandrium sp.*)에 대한 활성정도를 클로로필 에이의 함량을 보여주는 그래프이다.

도면

도면1a

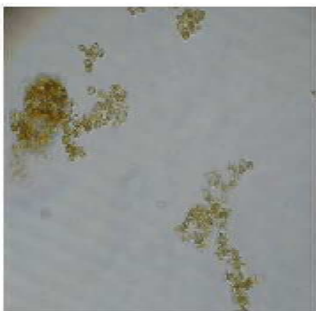


도면1b

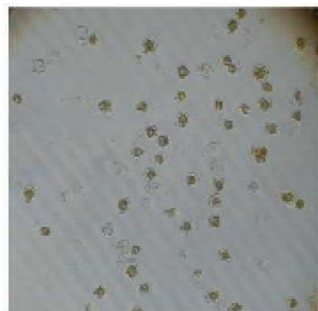


도면2

음성대조군



서열번호 1 (PMAP-23)



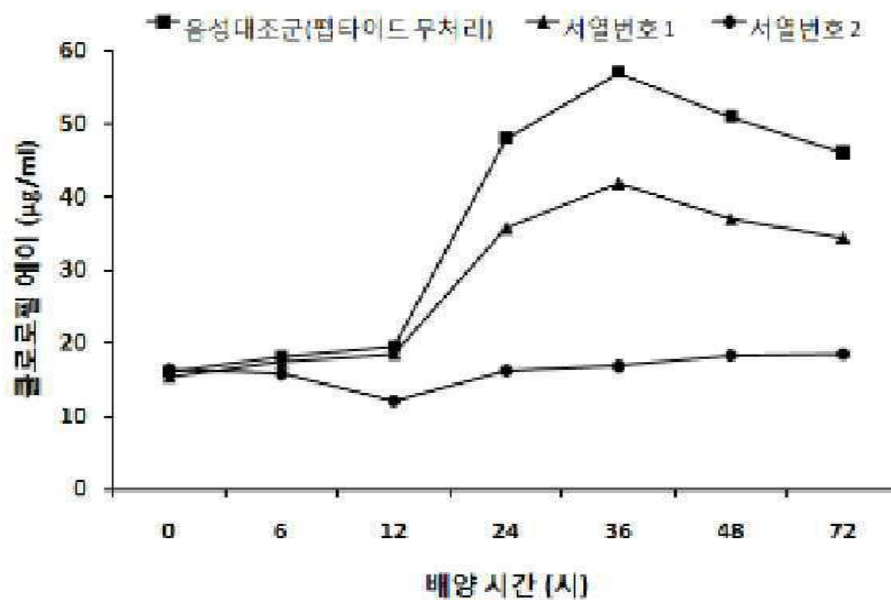
서열번호 2 (PMAP-23-D7)



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Chosun University
- <120> Anti-red tide peptide with antialgae activity against organism induced red tide, the uses thereof and the preparing method
- <130> 9p-01-18
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PMAP-23

<400> 1
 Arg Ile Ile Asp Leu Leu Trp Arg Val Arg Arg Pro Gln Lys Pro Lys
 1 5 10 15

Phe Val Thr Val Trp Val Arg
 20

<210> 2
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> PMAP-23-D7

<400> 2
 Asp Ile Ile Asp Leu Leu Trp Asp Val Asp Asp Pro Gln Asp Pro Asp
 1 5 10 15

Phe Val Thr Val Trp Val Asp
 20

<210> 3
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Melittin

<400> 3
 Gly Ile Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala Leu
 1 5 10 15

Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln
20 25