

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0087664 (43) 공개일자 2014년07월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 14/46 (2006.01) A23K 1/17 (2006.01)	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)	
(21) 출원번호 10-2012-0158201		
(22) 출원일자 2012년12월31일	(72) 발명자	
심사청구일자 2012년12월31일	박남규 부산 수영구 광안해변로 100, 212동 606호 (남천 동, 비치아파트)	
	서정길 부산 남구 용소로 45, (대연동, 부경대학교) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 김남식, 양기혁, 한윤호, 이인행	

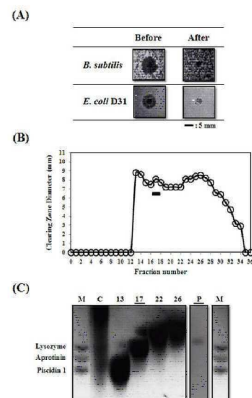
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 가다랑어 간 유래의 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항미생물성 펩타이드에 관한 것으로서, 항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 그의 용도를 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이민정

부산 남구 용소로 45, (대연동, 부경대학교)

정현교

부산 남구 용소로 45, (대연동, 부경대학교)

특허청구의 범위

청구항 1

항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드.

청구항 2

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

그람 음성균, 그람 양성균 및 효모에 대한 항균활성을 갖는, 항균 조성물.

청구항 4

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 항미생물성 펩타이드에 관한 것으로서, 더 상세하게는 가다랑어 유래의 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 항미생물성 펩타이드는 생물체의 선천성 면역체계(innate immune system)의 최전방 생체 방어인자이다. 항미생물성 펩타이드는 특정 미생물이나 항원에 반응하는 후천면역과는 달리 미생물의 종류에 크게 상관없이 작용하며 반응시간도 바로 혹은 몇 시간 내로 매우 빠르다. 내성균의 문제를 항상 내포하고 있는 기존의 항생제와 구분되어 내성의 문제 또는 면역문제나 거부반응의 문제없이 광범위한 생물계에서 미생물로부터 숙주를 보호하기 위해 자연적으로 생성되었기에 이들 항미생물성 펩타이드들은 천연 항생제라고 불린다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 가다랑어(Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*)로부터 면역기작을 담당하는 신규 항미생물 활성 펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명의 일 관점에 따르면, 항미생물 활성을 나타내고, 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드가 제공된다.

[0005] 상기 펩타이드는 가다랑어(Skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*)로부터 유래될 수 있으며, 그람 양성균, 그람 음성균 및 효모에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.

[0006] 상기 그람 양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 및 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)일 수 있으며, 상기 그람 음성균은 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 에스케리시아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 소네이(*Sigella sonnei*), 및 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 일 수 있으며, 및 상기 효모는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있다.

- [0007] 상기 펩타이드는 적혈구 세포를 파괴하지 않을 수 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물이 제공된다.
- [0009] 상기 항균 조성물에 있어서, 상기 펩타이드는 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*)로부터 유래될 수 있으며, 그람 양성균, 그람 음성균 및 효모에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.
- [0010] 상기 그람 양성균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 및 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)일 수 있으며, 상기 그람 음성균은 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 소네이(*Sigella sonnei*), 및 비브리오 파라헤모라이티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 일 수 있으며, 및 상기 효모는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있다.
- [0011] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.1 내지 50 중량% 로 포함할 수 있다. 또한, 추가로 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있으나, 상기 유효성분의 함량을 초과하지 않는 것이 바람직하다.
- [0012] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드의 유효 투여량은 0.001 mg/kg 내지 1 g/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 더 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 500 mg/kg의 투여량으로 투여될 수 있다. 한편, 상기 투여량은 환자의 나이, 성별 및 상태에 따라 적절히 조절될 수 있다.
- [0013] 상기 항균 조성물에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 비경구 투여 시 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 일 관점에 따르면, 상술한 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 사료첨가제가 제공된다.
- [0015] 상기 사료첨가제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 가다랑어(*Katsuwonus pelamis*)로부터 유래될 수 있으며, 그람 양성균, 그람 음성균, 및 효모에 대하여 항미생물 활성을 나타낼 수 있다.
- [0016] 상기 사료첨가제에 있어서, 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드를 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.1 내지 50 중량% 로 포함할 수 있다. 또한, 추가로 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드와 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있으나, 상기 유효성분의 함량을 초과하지 않는 것이 바람직하다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따른 펩타이드는 어류가 양식되고 있는 수조의 물에 직접 살포하는 것도 가능하다.

발명의 효과

- [0018] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 가다랑어로부터 유래된 신규한 항미생물 활성을 갖는 펩타이드를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 가다랑어 간 추출물의 그람 양성균인 *B. subtilis* KCTC1021와 그람 음성균인 대장균(*E.coli* D31)에 대한 항미생물 활성을 확인한 사진(도 1a), 그람 양성균인 *B. subtilis* KCTC1021에 대하여 CAU-PAGE를 한 후 항미생물 활성을 확인한 그래프(도 1b), 및 상기 CAU-PAGE 분리된 간 추출물의 활성 분획물을 Acid-urea-PAGE를 한 후, 쿠마시 용액(Coomassie blue)으로 염색을 한 사진(도 1c)이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 가다랑어 간 추출물을 역상 HPLC를 이용하여 분리한 결과 그래프(도 2a), 및 본 발명의 일 실시예에 따른 가다랑어 간 추출물을 양이온 교환 컬럼을 수행한 후, 한번 더 역상 HPLC를 수행한 결과 및 이의 항미생물 활성을 나타낸 결과(도 2b)이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 분획된 펩타이드를 MALDI time-of-flight(TOF)/TOF 질량분석기를 이용하여 분자량을 분석한 결과(도 3a)이며, 정제된 펩타이드의 아미노산 서열을 분석한 결과(도 3b)이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 가다랑어 간 추출물에서 정제된 항미생물성 단백질의 아미노산 서열과 그

의 알려진 헤모글로빈 β 사슬(hemoglobin β chain)의 C-말단 아미노산 서열과 비교하여 나타낸 그림이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP 펩타이드의 인간 적혈구 세포에 대한 용혈활성을 피시딘 1(Piscidin 1)과 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0021] 실시예 1: 가다랑어 조직 추출물의 제조

[0022] 냉동 가다랑어를 동원 F&B (창원, 대한민국)으로 제공받아 간을 적출한 후 상기 간 조직에 미리 가열된 1% 아세트산(HAc)을 1:4(v/v)의 비율로 혼합하고, 단백질 분해효소의 활성을 막기 위해 5분 동안 가열하였다. 가열된 조직은 5분 동안 얼음 속에서 냉각시킨 후 균질화하였다(speed#6, T10 basic ULTRA-TURRAX, IKA, USA). 균질화한 후, 4℃, 15,000 x g에서 30분 동안 원심분리한 후, 상층액을 수득하고 하기 실험에 이용하기 직전까지 -70℃에 보관하였다.

[0023] 실시예 2: 가다랑어 추출물의 항미생물 활성

[0024] 가다랑어 추출물의 항미생물 활성은 *B. subtilis* KCTC1021와 그람 음성균인 대장균(*E. coli* D31)을 이용하였으며, 간 추출물의 각각의 항미생물 활성을 고감도 방사확산 분석(ultrasensitive radial diffusion assay, URDA) 방법을 이용하여 측정하였다.

[0025] 구체적으로 상술한 미생물들은 25℃ 또는 37℃에서 18시간 동안 TSB(Trypticase soy broth) 또는 SDB(Sabouraud's dextrose broth)에서 배양한 후, 상기 배양액을 McFarland 표준혼탁도 0.5(Vitek Colorimeter #52-1210; Hach, Loveland, CO, USA)가 되도록 각각 희석하였다. 상기 희석액은 약 $\sim 10^8$ CFU/ml(세균) 또는 $\sim 10^6$ CFU/ml(*C. albicans*)에 해당하는 양이다. 상기 희석액은 각각 0.5 ml을 9.5 ml의 깔개 겔(underlay gel)[10 mM 인산 완충액(pH 6.6), 0.03% TSB(tryptic soy broth) 또는 0.03% SDB(Sabouraud's dextrose broth), 및 1% I형 한천(low EEO)]에 혼합하여 5×10^6 CFU/ml(세균) 또는 5×10^4 CFU/ml(*C. albicans*)로 조정한 후 직경 10 cm, 높이 1.5 cm 평판 접시에 도포하였으며, 그 결과 1 mm 높이의 겔이 형성되었다. 그 후, 상기 평판 접시 내에 형성된 겔에 직경 2.5 mm 크기로 구멍을 뚫어 웰(well)을 만들었다. 그 후, 상기 웰에 간 추출물을 각각 5 μ l HAc(0.01% HAc)에 2배 순차희석한 후, 각각의 희석액을 1 mm 두께의 깔개 겔 내에 형성된 직경 2.5 mm의 웰에 첨가한 후, 25℃ 또는 37℃에서 3시간 동안 배양하였다. 배양된 현탁액 위에 10 mM 인산완충용액(pH 6.6)에 6% TSB 또는 6% SDB, 및 1% 한천을 포함하는 강도 두 배의 덮개 겔 10 ml을 덮은 후, 25℃ 또는 37℃에서 16 내지 18시간 동안 배양하였다. 다음 날 웰 주위에 형성된 투명지역(clear zone)의 직경을 측정함으로써 활성을 확인하였다. 웰의 투명지역(clear zone)의 직경에서 웰의 직경을 제한 값을 유니트(U)로 표현하였는데 0.1 mm를 1U로 환산하였고 합성 펩타이드의 최소 효과 농도(Minimal effective concentration, MEC, μ g/ml)는 펩타이드 농도의 로그값에 대한 유니트의 곡선의 X-intercept로 계산하였다(Seo JK et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 338:1998-2004, 2005).

[0026] 그 결과, 도 1a 왼쪽 패널에 나타난 바와 같이 가다랑어 간 추출물은 그람 양성 균인 *B. subtilis* KCTC1021 및 그람 음성 균인 *E. coli* D31에 대하여 강력한 항미생물 활성을 나타냈다.

[0027] 이어, 본 발명자는 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 가다랑어 간 추출물에 포함된 활성물질이 가수분해 작용에 영향을 받는지의 여부를 단백질 분해 효소를 처리하여 확인하였다. 단백질 분해 효소로 250 μ g/ml 크리스탈 트립신(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA)을 이용하였으며, 상기 실시예 1의 가다랑어 간 추출물에 첨가하여 37℃에서 60분 동안 처리하였다. 그리고 상술한 바와 동일한 URDA 방법을 이용하여 그람 양성균인 *B. subtilis* KCTC1021 및 그람 음성균인 *E. coli* D31에 대한 항미생물 활성을 확인하였다.

[0028] 그 결과, 도 1a의 오른쪽 패널에 나타난 바와 같이, 상기 균에 대한 항미생물 활성이 현저하게 감소되었으며, 이러한 결과는 가다랑어 간 추출물이 단백질 항생물질을 포함하고 있다는 것을 의미한다.

[0029] 실시예 3: 가다랑어 간 추출물로부터 항미생물 펩타이드의 정제

- [0030] 본 발명의 일 실시예에 따른 향미생물 활성을 나타내는 가다랑어 간 추출물을 연속 산-요소-폴리아크릴아마이드 겔(continuous acid-urea-polyacrylamide gel, CAU-PAGE)과 역상 HPLC를 통하여 정제하였다.
- [0031] 먼저, CAU-PAGE는 이미 알려진 방법(Seo *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 338:1998-2004, 2005) Bio-Rad Prep Cell 491(Bio-Rad, US)를 사용하여 가다랑어 간 추출물을 초기에 정제하였다. 12% 아크릴아마이드 겔을 사용하였으며 5% HAc와 4.8 M Urea를 포함하고 0.48% (v/v) TEMED(tetramethylethylenediamine)와 0.22% (w/v) APS(ammonium persulphate)를 넣어 직경 28 mm 튜브를 이용하여 겔을 제작하였고, 겔은 4℃에서 90분 동안 pre-run을 수행하였다. 위와 아래 챔버 모두는 5% HAc를 넣어 주고, pre-run을 수행한 후, 위 챔버에 5% HAc를 다시 넣어주었다. 산성화된 간 추출물 10 ml 에 5 ml 샘플 용액(3.0 M urea in 5% HAc)을 혼합한 뒤, 겔에 로딩한 후 30 mA로 전류를 일정하게 4℃ 하에 전기영동을 수행하였다. 시료는 0.8 ml/분 속도로 용출되었고 12 ml 씩 분획물을 6시간 동안 수집하였다. 이 분획물은 -70℃에서 밤새 보관한 후 동결건조 하였다. 동결건조 후, 각 분획물은 0.01% HAc의 200 μ l로 용해하였고 각 분획물의 5 μ l로 향미생물 활성을 상술한 URDA 방법으로 확인하였다.
- [0032] AU-PAGE는 continuous AU-PAGE로부터 얻은 분획물의 순도를 확인하기 위하여 수행하였다. 4.8 M urea, 5% HAc, 0.48%(v/v) TEMED와 0.22%(w/v) APS를 넣어, 12% 아크릴 아마이드 겔(100 mm wide $\times$ 75 mm long $\times$ 1.0 mm thick)을 준비하였다. 150 V로 일정하게 유지하여 5% HAc에 들어 Mini PROTEAN II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories, US)를 이용하여 역-극성으로 60분 동안 pre-run하여 APS와 TEMED를 제거하였다. 시료는 샘플 용액(3.0 M urea in 5% HAc containing methyl green)과 1:1 비율로 섞은 후 실내 온도에서 150 V로 일정하게 50분 동안 5% HAc 하에서 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, 겔은 쿠마시 염색용액(Coomassie brilliant blue R-250 dye)로 염색 한 후 MeOH:HAc:H₂O(4:1:5) 용액으로 염색을 다시 제거하였다. 그 결과 CAU-PAGE 전개 이후에 향미생물 활성은 13-34 분획물 사이에서 흩어져 나타났으며(도 1b), 향미생물 활성 분획물의 AU-PAGE는 크기 의존적으로 분리되어 나타났다(도 1c).
- [0033] 도 2a에 나타난 바와 같이, 얻어진 향미생물 활성 분획물 17을 CapCell-Pak C18 역상 컬럼(5 μ m, 300A, 4.6 X 250mm, Shiseido, Japan)에 로딩하였다. 그 후, 상기 샘플에 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(CH₃CN, ACN)용액을 1 ml/분의 유속으로 60분 동안 5~65%까지 선형 농도구배를 처리하였으며 수득된 용출액의 흡광도는 220 nm 파장에서 관찰하였다. 그 결과 도 2a에 나타난 바와 같이, 강한 활성을 나타내는 단일 피크(도 2a의 화살표)가 관찰되었다.
- [0034] 이에, 도 2b에 나타난 바와 같이, 본 발명자는 향미생물 펩타이드를 정제하기 위하여, 상기 도2a의 단일 피크에 대하여 C18 역상 HPLC를 한번 더 수행하였다. 상기 샘플에 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(CH₃CN, ACN)용액을 1 ml/분의 유속으로 60분 동안 5~65%까지 선형 농도구배를 처리하였으며 수득된 용출액의 흡광도는 220 nm 파장에서 관찰하였다. 가장 강한 활성 피크는 44% 아세토니트릴(CH₃CN, ACN)용액에서 용출되었다.
- [0035] **실험예 1: 정제된 펩타이드의 향미생물 활성 측정**
- [0036] 이어 본 발명자는 상기 실시예 3에서 정제된 펩타이드의 향미생물 활성을 상술한 URDA 방법을 이용하여 확인하였다. 상기 실시예 3에서 최종 정제된 펩타이드를 단백질 분해 효소인 크리스탈 트립신 처리 전, 후의 향미생물 활성을 비교하였다.
- [0037] 250 μ g/ml 크리스탈 트립신(Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, USA)을 상술한 정제과정으로 최종 정제된 펩타이드에 37℃에서 60분 동안 처리하였다. 그리고 상술한 바와 동일한 URDA 방법을 이용하여 그람 양성 균인 *B. subtilis* KCTC1021에 대한 향미생물 활성을 확인하였다.
- [0038] 그 결과, 트립신 처리에 의해서 상기 펩타이드의 향미생물 활성은 완전히 사라졌다(도 2b 참조).
- [0039] **실험예 2: 정제된 펩타이드의 분자량 및 서열분석**
- [0040] 상기 실험예 1에서 향미생물 활성을 확인한 정제된 펩타이드의 분자량 측정은 선형모드((Bruker Daltonics, Billerica, MA)에 plused SMARTBEAM II(355 nm Nd:YAG 레이저; 반복속도 1 kHz)를 갖춘 Ultraflex III MALDI time-of-flight (TOF)/TOF 질량분석기를 이용하여 분석하였다. 우선, 상기 펩타이드는 CHCA(α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) 매트릭스 용액[10 mg/mL in 0.1% TFA/50% ACN, 1:1, v/v]과 0.1% TFA/50% ACN(1:1,v/v)의 혼합용액에 녹인 후, MALDI 플레이트에 바로 로딩하였다. 그후, 상기 스펙트라(spectra)는 Flex analysis software (version 3.3, Bruker Daltonics, DEU)를 이용하여 분석하였다. 또한, 정제된 펩타이드의 N 말단의 아미노산 서열은 펄스 리퀴드 자동 서열분석기(pulse liquid automatic sequencer, model 473A;

Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA)의 자동화된 Edman 분해 방법을 이용하여 분석하였다.

[0041] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 1개의 양성 이온 피크(2337.39)가 관찰되었다(도 3a 참고). 이러한 결과를 통해서 정제된 펩타이드가 Edman 분해 방법에 따라 분석한 결과 상기 펩타이드의 하기와 같은 21개의 아미노산 잔기를 포함한다는 것을 확인할 수 있었다(도 3b). MALDI-TOF-MS에 의해 얻은 2337.39 Da은 아미노산 서열을 바탕으로 계산된 2337.66 Da에 거의 근접한다는 것을 확인할 수 있었다. 정제된 펩타이드의 등전점(PI)은 9.7이다.

[0042] 정제된 펩타이드의 아미노산 잔기의 서열분석을 수행한 결과는 다음과 같다:

[0043] NH₂-TQQAFQKFLAAVTSALGKQYH-OH(서열번호 1).

[0044] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 아미노산의 상동성을 분석하기 위하여, Genome Net(://www.ncbi.nlm.gov/BLAST)에 있는 BLASTP 2.2.10과 TBLASTN 2.2.10 유사성 분석 프로그램을 이용하였다. 이론적인 등전점과 질량 분석은 ExPASy(://www.expasy.ch/tools/peptide-mass.html)로 추정하였다. 시퀀스 정렬은 ClustalX를 사용하여 수행하였다(Thomson *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 25: 4876-4882, 1997). 분석 결과 본 발명의 일 실시예를 통하여 정제된 펩타이드가 안타크티피쉬(*Trematomus bernacchii*, 86 %, 서열번호 2), 대서양대구(*Gadus morhua*, 71%, 서열번호 3), 대서양연어(*Salmo salar*, 80%, 서열번호 4), 메기(*Ictalurus punctatus*, 75%, 서열번호 5), 모스드래곤피쉬(*Cygnodraco mawsoni*, 86%, 서열번호 6), 유럽넙치(*Platichthys flesus*, 70%, 서열번호 7), 해덕(*Melanogrammus aeglefinus*, 76%, 서열번호 8), 송사리(*Oryzias latipes*, 80%, 서열번호 9), 나일티라피아(*Oreochromis niloticus*, 85 %, 서열번호 10), 오렌지 점 그라우퍼(*Platichthys flesus*, 70%, 서열번호 11), 무지개 송어(*Oncorhynchus mykiss*, 81 %, 서열번호 12) 및 레드시뱃(*Pagrus major*, 70%, 서열번호 13)을 포함한 다른 종의 헤모글로빈 β 체인의 C-말단과 매우 유사하였다(70-86%, 도 4참조).

[0045] 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예를 통하여 정제된 펩타이드가 신규한 항미생물 활성을 갖는 펩타이드이며, 본 발명자는 상기 펩타이드를 SH β AP(Skipjack hemoglobin β chain related antimicrobial peptide)라고 명명하였다.

[0046] 실험예 3: SH β AP 펩타이드의 항균 스펙트럼 분석

[0047] 본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP 펩타이드의 항균 스펙트럼을 URDA 방법을 이용하여 확인하였다.

[0048] 항균 스펙트럼 측정에는 그람 양성균인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 및 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)를 이용하였으며, 그람 음성균인 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 대장균(*Escherichia coli*), 슈도모나스 에루지노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica*), 시겔라 소네이(*Sigella sonnei*), 및 비브리오 파라헤모리티커스(*Vibrio parahaemolyticus*) 및 효모인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)를 이용하였다. 항미생물 활성을 측정한 방법은 상기 실험예 1과 동일하며, 에어로모나스 하이드로필라(*Aeromonas hydrophila*), 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)와 비브리오 파라헤모리티커스(*Vibrio parahaemolyticus*)의 경우 TSB(Trypticase soy broth)에서 25℃ 온도조건으로, 나머지 세균들은 TSB(Trypticase soy broth)에서 37℃ 온도조건에서 배양하였으며, 효모인 캔디다 알비칸스(*Candida albicans*)는 SDB(Sabouraud's dextrose broth)에서 37℃ 온도조건에서 배양되었다는 면에서 차이가 있었다. 이때, 양성 대조군으로는 E.J. Noga (NCSU, NC, USA)교수로부터 제공받은 교잡종 줄무늬 베스(hybrid striped bass, *Morone saxatilis* x *M. chrysops*)로부터 분리된 α -나선형의 항미생물성 펩타이드인 피시딘 1(Piscidin 1)을 사용하였다(Silphaduang and Noga, *Nature*, 414(6861): 268-269, 2001).

[0049] 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP펩타이드는 그람 양성균(*B. subtilis*, 및 *S. aureus*[MECs, 6.5-57.0 μ g/mL])과 그람 음성균(*E. coli* D31, *E. coli* ML35p, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, 및 *S. sonnei*[MECs, 2.0-19.0 μ g/mL])과 효모(*C. albicans*[MECs, 12.0 μ g/mL])에 대하여 모두 강한 항미생물 활성을 나타냈으며, 양성 대조군인 피시딘 1과도 유사한 항미생물 활성을 보였다. 또한 *S. iniae*와 *V. parahemolyticus*[MECs, 1.5-23.0 μ g/mL]에 대하여 강한 항미생물 활성을 보였다. 그러나 *A. hydrophila*에 대하여는 MEC 수치가 >125.0 μ g/mL을 나타내며 항미생물 활성이 거의 나타나지 않았다, 이러한 결과는 본 발명의 일 실시예에 따른 SH β AP 펩타이드가 광범위한 항미생물 활성을 가지고 있음을 시사한다.

[0050]

본 발명의 펩타이드의 항균 스펙트럼

미생물	그람염색 여부	최소효과농도(g/mL) [M] ^a	
		SHAP	Piscidin 1
<i>B. subtilis</i> KCTC1021	+	16.0	7.5
<i>B. subtilis</i> RM125	+	6.5	4.5
<i>S. aureus</i> KCTC162	+	57.0	4.5
<i>E. coli</i> D31	-	15.0	3.8
<i>E. coli</i> KCTC1116	-	2.6	7.0
<i>E. coli</i> ML35p	-	6.2	2.3
<i>P. aeruginosa</i> KCTC2004	-	19.0	8.0
<i>S. enterica</i> KCTC2514	-	2.0	7.0
<i>S. sonnei</i> KCTC2009	-	6.0	13.0
Fish pathogen			
<i>A. hydrophila</i> KCTC2358	-	>125.0	10.0
<i>S. iniae</i> FP5229	+	23.0	6.5
<i>V. parahemolyticus</i> HUF91	-	1.9	2.3
<i>V. parahemolyticus</i> KCCM41664	-	1.5	3.1
Yeast			
<i>C. albicans</i> KCTC7965	Yeast	12.0	>62.5

[0051]

실험예 4: SHβAP 펩타이드의 용혈활성

[0052]

본 발명의 일 실시예에 따른 SHβAP 펩타이드의 용혈활성을 확인하기 위하여, 인간 적혈구 세포를 이용하여 측정하였다(Park *et al.*, *Biochemistry*, 50, 3288-3299, 2011).

[0053]

상기 적혈구 세포는 구연산을 처리된 혈액을 5분 동안 3000 x g에서 원심분리하여 수득한 후, 플라즈마와 버피 코트(buffy coat)를 제거하기 위해 150 mM NaCl을 포함하는 10 mM 인산완충액(pH 7.4)으로 세척한 후, 완충액에 현탁하여 3%의 적혈구 용적율(hematocrit)로 조절하였다. 그 결과 상기 현탁액은 약 2×10^8 cells/ml 비율로 적혈구를 포함한다. 상기 3% 적혈구 용적율을 갖는 현탁액에 SHβAP 또는 피시딘 1을 0 내지 100 μg/ml의 농도로 첨가한 후, 37℃에서 60분 동안 반응시켰다. 상기 상층액을 5분 동안 3,000 x g에서 원심분리해서 얻은 상층액을 마이크로타이터 플레이트에 넣은 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 용혈반응을 표현하였다. 100% 용혈반응은 0.1% Triton X-100을 처리한 후, 방출되는 헤모글로빈에 따라 결정되었다. SHβAP 또는 피시딘 1에 의한 적혈구 용혈반응은 하기 수학적 식 1에 의해 계산하였다.

수학적 식 1

$$\text{적혈구 용혈반응(\%)} = \frac{(\text{펩타이드 용액의 } 405\text{nm에서의 흡광도} - \text{완충액의 } 405\text{nm에서의 흡광도})}{(0.1\% \text{ 트리트론 X-100의 } 405\text{nm에서의 흡광도} - \text{완충액의 } 405\text{nm에서의 흡광도})} \times 100$$

[0054]

[0055]

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 본 발명의 일 실시예에 따른 SHβAP 펩타이드는 인간 적혈구 세포에 대해서 용혈활성을 전혀 나타나지 않았으며, 이러한 용혈활성을 100 μg/ml의 농도로 처리하였을 때에도 관찰되지 않았다. 반면 양성대조군으로 이용한 피시딘 1은 12.5 μg/ml의 농도로 인간 적혈구 세포에 처리하였을 때에도 세포가 용혈되는 것을 관찰할 수 있었다(도 5 참조). 이 결과는 SHβAP는 세포독성이 낮으며, 이는 잠재적으로 질병 치료를 위한 기존의 항생제의 대안으로 사용할 수 있음을 시사한다.

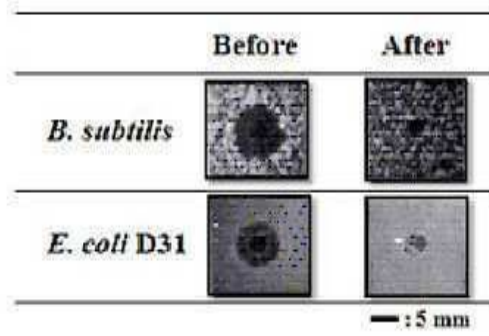
[0056]

본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

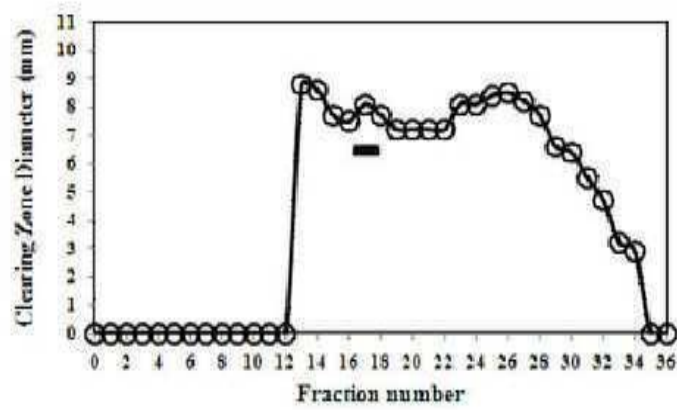
도면

도면1

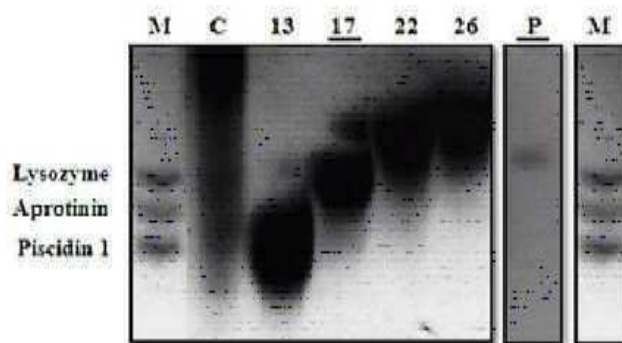
(A)



(B)

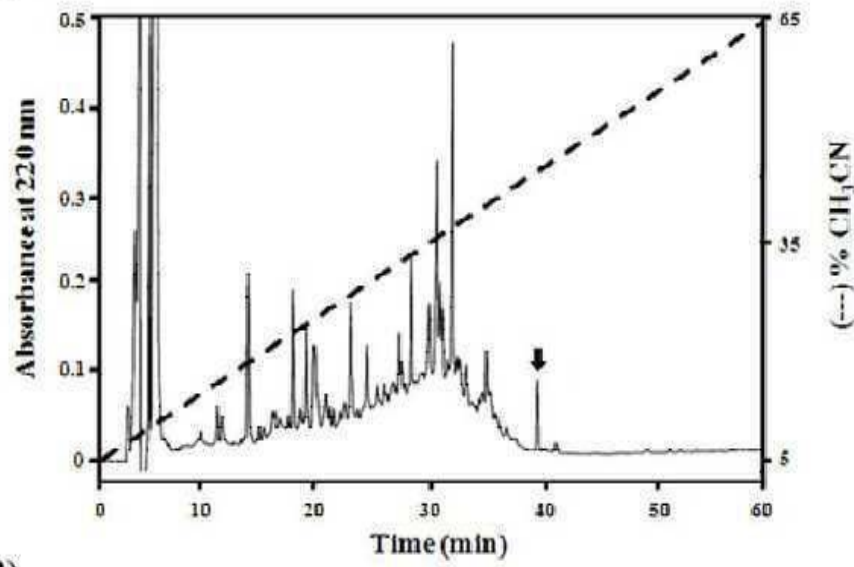


(C)

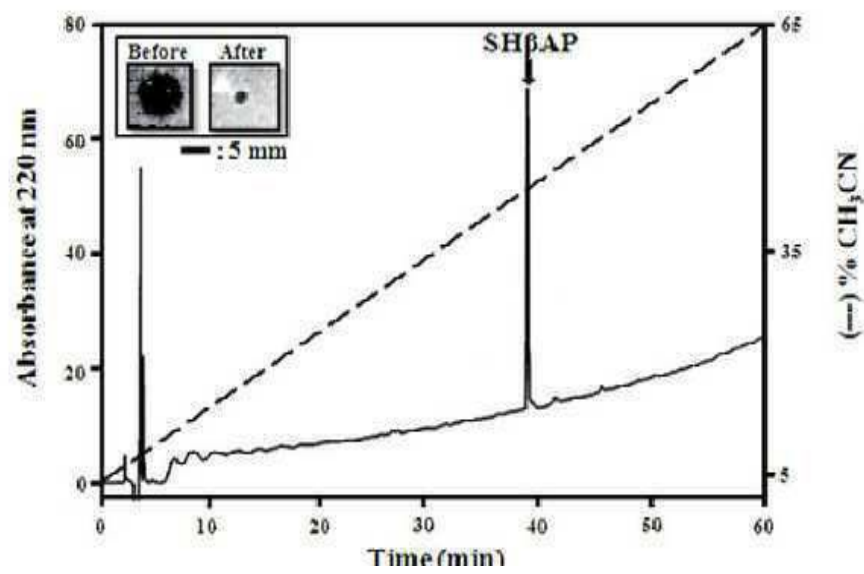


도면2

(A)

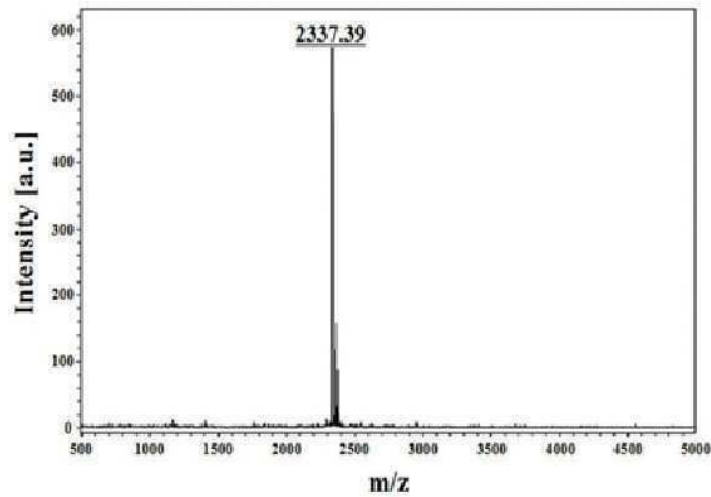


(B)



도면3

(A)



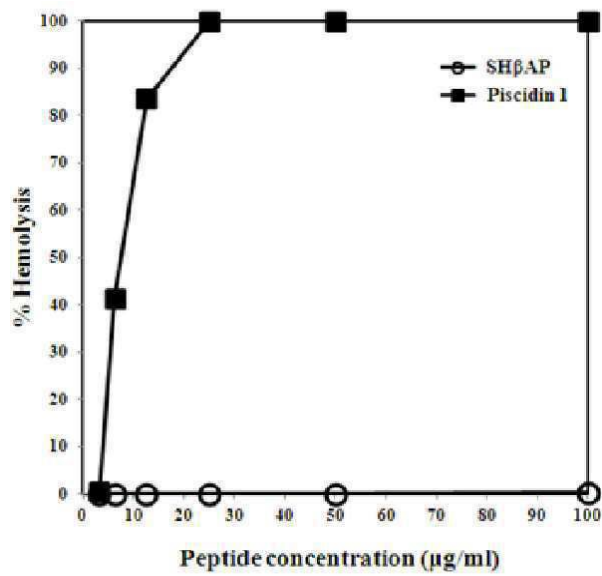
(B)

1 10 20
TQQAFQKFLAAVTSALGKQYH

도면4

											10									20	
<u>Skipjack tuna</u>	T	Q	Q	A	F	Q	K	F	L	A	A	V	T	S	A	L	G	K	Q	Y	H
Antarctic fish	T	Q	G	A	F	Q	K	F	L	A	V	V	V	S	A	L	G	K	Q	Y	H
Atlantic cod	T	Q	V	A	W	Q	K	F	L	S	V	V	V	S	A	L	G	R	Q	Y	H
Atlantic salmon	-	Q	E	A	F	Q	K	F	L	A	V	V	V	S	A	L	G	R	Q	Y	H
Catfish	-	Q	A	A	L	Q	K	F	L	A	V	V	V	S	A	L	G	K	Q	Y	Q
Dragonfish	T	Q	A	A	F	Q	K	F	L	A	V	V	V	S	A	L	G	K	Q	Y	H
European flounder	-	Q	E	A	W	Q	K	F	L	S	V	V	V	S	A	L	G	R	Q	Y	H
Haddock	T	Q	V	A	W	Q	K	F	L	A	V	V	V	S	A	L	G	R	Q	Y	H
Medaka	-	Q	A	T	F	Q	K	F	L	A	V	V	V	S	A	L	G	R	Q	Y	H
Nile Tilapia	-	Q	E	A	W	Q	K	F	L	A	V	V	V	S	A	L	G	R	Q	Y	H
Orange-spotted grouper	-	Q	A	A	F	Q	K	F	I	A	V	V	V	N	A	L	G	R	Q	Y	H
Rainbow trout	T	Q	E	A	F	Q	K	F	L	A	V	V	V	S	A	L	G	R	Q	Y	H
Red seabream	-	Q	E	A	W	Q	K	F	L	A	V	V	V	N	A	L	G	R	Q	Y	H

도면5



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> Novel antimicrobial peptide from the Skipjack tuna and uses thereof

<130> PD12-0628

<160> 13

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Katsuwonus pelamis

<400> 1

Thr Gln Gln Ala Phe Gln Lys Phe Leu Ala Ala Val Thr Ser Ala Leu

1 5 10 15

Gly Lys Gln Tyr His

20

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Trematomus bernacchii

<400> 2

Thr Gln Gly Ala Phe Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Ser Ala Leu

1 5 10 15

Gly Lys Gln Tyr His

20

<210> 3

<211> 21

<212> PRT

<213> Gadus morhua

<400> 3

Thr Gln Val Ala Trp Gln Lys Phe Leu Ser Val Val Val Ser Ala Leu

1 5 10 15

Gly Arg Gln Tyr His

20

<210> 4

<211> 20

<212>

> PRT

<213> Salmo salar

<400> 4

Gln Glu Ala Phe Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Ser Ala Leu Gly

1 5 10 15

Arg Gln Tyr His

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Ictalurus punctatus

<400> 5

Gln Ala Ala Leu Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Ser Ala Leu Gly

1 5 10 15

Lys Gln Tyr Gln

20

<210> 6

<211> 21

<212> PRT

<213> Cygnodraco mawsoni

<400> 6

Thr Gln Ala Ala Phe Gln Lys Phe Leu Ser Val Val Val Ser Ala Leu

1 5 10 15

Gly Lys Gln Tyr His

20

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Platichthys flesus

<400> 7

Gln Glu Ala Trp Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Ser Ala Leu Gly

1 5 10 15

Arg Gln Tyr His

20

<210> 8

<211> 21

<212> PRT

<213> Melanogrammus aeglefinus

<

400> 8

Thr Gln Val Ala Trp Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Ser Ala Leu

1 5 10 15

Gly Arg Gln Tyr His

20

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

<213> Oryzias latipes

<400> 9

Gln Ala Thr Phe Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Ser Ala Leu Gly

1 5 10 15

Arg Gln Tyr His

20

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Oreochromis niloticus
 <400> 10

Gln Glu Ala Trp Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Ser Ala Leu Gly
 1 5 10 15

Arg Gln Tyr His
 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Platichthys flesus
 <400> 11

Gln Ala Ala Phe Gln Lys Phe Ile Ala Val Val Val Asn Ala Leu Gly
 1 5 10 15

Arg Gln Tyr His
 20

<210> 12
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Oncorhynchus mykiss
 <400> 12

Thr Gln Glu Ala Phe Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Ser Ala Leu

1 5 10 15

Gly Arg Gln Tyr His
 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Pagrus major
 <400> 13

Gln Glu Ala Trp Gln Lys Phe Leu Ala Val Val Val Asn Ala Leu Gly

1	5	10	15
Arg Gln Tyr His			
20			