(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년07월31일
(11) 등록번호 10-1763209
(24) 등록일자 2017년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/47 (2006.01) *A61K 31/4704* (2006.01)
C12Q 1/02 (2017.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/47 (2013.01)
A61K 31/4704 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0034141
(22) 출원일자 2016년03월22일
심사청구일자 2016년03월22일
(56) 선행기술조사문헌
Bindu Subhadra et al, 'Quorum sensing in Acinetobacter: with special emphasis on antibiotic resistance, biofilm formation and quorum quenching', AIMS Microbiology, 2016.02.29., Vol.2, No.1, 27-41*
KR1020110049193 A*
KR1020140019219 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최철희
대구광역시 수성구 상록로 41, 102동 2103호(범어동, 범어태왕아너스)
오만환
서울특별시 영등포구 도신로47가길 4-1, 18통 3반 (신길동)
(74) 대리인
특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 홍수민

(54) 발명의 명칭 **아시네토박터 노소코미알리스의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 방법, 및 아시네토박터 노소코미알리스의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 물질의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 *아시네토박터 노소코미알리스(Acinetobacter nosocomialis, A. 노소코미알리스)*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 방법, 및 *아시네토박터 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1b



(52) CPC특허분류
C12Q 1/025 (2013.01)
C12Q 1/6851 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C0257
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단
연구사업명 질환극복기술개발
연구과제명 다제내성 A. baumannii 세포밀도인식 조절자 AbaR의 제어물질 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2014.06.01 ~ 2017.05.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는, *아시네토박터 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 물질의 스크리닝 방법:

(a) *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에서의 서열번호 1의 AnoI 단백질 서열을 코드화하는 *anoI* 유전자 또는 서열번호 2의 AnoR 단백질 서열을 코드화하는 *anoR* 유전자의 발현을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 상기 *anoI* 유전자 또는 *anoR* 유전자의 발현을 저해시키는 경우에는 상기 시료는 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주의 생물막 형성능 및 표면 운동능을 억제하는 물질로 판정됨.

청구항 2

다음의 단계를 포함하는, *아시네토박터 노소코미알리스*에 의한 균혈증, 폐렴, 뇌막염 및 요로감염증으로부터 선택되는 질병의 치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법:

(a) *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에서의 서열번호 1의 AnoI 단백질 서열을 코드화하는 *anoI* 유전자 또는 서열번호 2의 AnoR 단백질 서열을 코드화하는 *anoR* 유전자의 발현을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 상기 *anoI* 유전자 또는 *anoR* 유전자의 발현을 저해시키는 경우에는 상기 시료는 *아시네토박터 노소코미알리스*에 의한 균혈증, 폐렴, 뇌막염 및 요로감염증으로부터 선택되는 질병의 치료 또는 예방 물질로 판정됨.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해 여부는 정량 실시간 PCR(q-RTPCR) 방법에 의해 측정되는 것인, 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해는 버스타틴에 접촉하지 않은 대조군과 비교하여 유전자의 발현이 20% 내지 90% 감소되는 것인, 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현의 저해가 *아시네토박터 노소코미알리스* 내에서 N-(3-히드록시-도데카노일)-L-호모세린 락톤의 생산을 감소시킴으로써 생물막 형성능 및 표면 운동능이 억제되는, 스크리닝 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 *아시네토박터 노소코미알리스(Acinetobacter nosocomialis, A. 노소코미알리스)*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 방법, 및 *아시네토박터 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] *아시네토박터 바우만니(Acinetobacter baumannii)*, *아시네토박터 피티(Acinetobacter pittii*, 종래의 아시네토박터 유전체종(genomic species) 3), 그리고 *아시네토박터 노소코미알리스(Acinetobacter nosocomialis*, 종래의 아시네토박터 유전체종(genomic species) 13TU)는 균혈증(bacteremia), 폐렴(pneumonia), 뇌막염(meningitis), 요로감염증(urinary tract infections) 및 상처 감염 [15, 16, 21]을 포함하는 다양한 병원성 감염을 유발하는 중요한 병원균으로 알려져 있다. 병원성 감염 및 이의 발병과 관련된 *A. 바우만니*의 생존양식(lifestyle)은 잘 알려져 있다 (비특허문헌 21 참조). 특히, *A. 바우만니*가 무생물 또는 생물 표면 상에 부착되고 생물막을 형성하는 메커니즘은 가혹한 건강 관리 환경, 예를 들어 건조, 영양 기아, 및 항생제 처리에서의 이의 생존 및 발병과 밀접하게 연관되어 있다 (비특허문헌 7, 8, 28 참조). 따라서, *A. 바우만니*에 대한 버스타틴 (비특허문헌 3 참조) 및 2-아미노이미다졸류 (비특허문헌 27 참조)와 같은 항생물막제(antibiofilm agent)에 대한 연구가 진행되어 왔다. 그러나, *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성에 요구되는 구체적인 요소에 대해서는 아직 밝혀진 바 없다.

[0003] 세포군의 밀도에 반응하여 특정 유전자를 조절하는 과정인 쿼럼 센싱(quorum sensing, 정족수 감지)을 통하여, 많은 세균들은 독성 요소 발현, 운동능 및 생물막 형성과 같은 그들의 사회적 행동을 조절한다 (비특허문헌 23 참조). 다양한 그람-음성 세균들은, LuxI-형 단백질에 의해 합성되는 N-아실호모세린 락톤류(AHLs)를 쿼럼 센싱 신호로서 사용한다 (비특허문헌 20 참조).

[0004] AHL 신호들은 동족인 LuxR-형 조절자 단백질과 직접적으로 상호작용하며, 이들의 복합체는 *lux* 상자로 알려진 특정 DNA 서열에 결합함으로써 쿼럼-센싱 목표 유전자의 발현을 조절한다 (비특허문헌 20 참조). *A. 바우만니*는 LuxI-형 단백질, AbaI, 및 LuxR-형 단백질, AbaI의 상류에 존재하지만 반대 방향으로 전사되는 AbaR로 구성된다 (비특허문헌 1 참조). AbaI는 *A. 바우만니*의 주요한 쿼럼-센싱 신호인 N-(3-히드록시-도데카노일)-L-호모세린 락톤 (OH-dDHL)의 생성에 요구된다 (비특허문헌 17 참조). *A. 바우만니 abaI* 돌연변이는 생물 및 무생물 표면에 유지되는 능력과 연관된 운동능 및 생물막 형성의 결핍을 나타낸다 (비특허문헌 5, 17, 26 참조). 세균성 발병에서 쿼럼 센싱의 중요성은, 생사의 압박 없이 이의 발병을 억제할 수 있는 기회를 제공하는 항균 치료의 개발을 위한 중요한 목표가 될 수 있음을 보여준다 (비특허문헌 4, 26 참조). 이러한 쿼럼 센싱의 생물학적 중요성에도 불구하고, 쿼럼 센싱 시스템은 *A. 노소코미알리스*에서 아직 확인되거나 분석된 바 없는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Bhargava N, Sharma P, Capalash N. 2010. Quorum sensing in Acinetobacter: an emerging pathogen. Crit. Rev. Microbiol. 36: 349-360.

(비특허문헌 0002) Callahan SM, Dunlap PV. 2000. LuxR- and acyl-homoserinelactone-controlled non-lux genes define a quorum-sensing regulon in Vibrio fischeri. J. Bacteriol. 182: 2811-2822.

(비특허문헌 0003) Chabane YN, M louka M B, A lexandre S, Nicol M, M arti S, Pestel-Caron M, et al. 2014. Virstatin inhibits biofilm formation and motility of Acinetobacter baumannii. BMC Microbiol. 14: 62.

(비특허문헌 0004) Chow JY, Yang Y, Tay SB, Chua KL, Yew WS. 2014. Disruption of biofilm formation by the human pathogen Acinetobacter baumannii using engineered quorum-quenching lactonases. Antimicrob. Agents Chemother. 58: 1802-1805.

(비특허문헌 0005) Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. 2011. Genetic analysis of surface motility in Acinetobacter baumannii. Microbiology 157: 2534-2544.

(비특허문헌 0006) Cook DM, Li P-L, Ruchaud F, Padden S, Farrand SK. 1997. Ti plasmid conjugation is independent of vir: reconstitution of the tra functions from pTiC58 as a binary system. J. Bacteriol. 179: 1291-1297.

(비특허문헌 0007) Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Nat. Rev. Microbiol. 5: 939-951.

(비특허문헌 0008) Gaddy JA, Tomaras AP, Actis LA. 2009. The Acinetobacter baumannii 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. Infect. Immun. 77: 3150-3160.

(비특허문헌 0009) Gray KM, Passador L, Iglewski BH, Greenberg EP. 1994. Interchangeability and specificity of components from the quorum-sensing regulatory systems of Vibrio fischeri and Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 176: 3076-3080.

(비특허문헌 0010) Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2: 95-108.

(비특허문헌 0011) Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. Annu. Rev. Microbiol. 57: 249-273.

(비특허문헌 0012) Hung DT, Shakhnovich EA, Pierson E, Mekalanos JJ. 2005. Small-molecule inhibitor of Vibrio cholerae virulence and intestinal colonization. Science 310: 670-674.

(비특허문헌 0013) Hunger M, Schmucker R, Kishan V, Hillen W. 1990. Analysis and nucleotide sequence of an origin of DNA replication in Acinetobacter calcoaceticus and its use for Escherichia coli shuttle plasmids. Gene 87: 45-51.

(비특허문헌 0014) Kim J, Park W. 2013. Identification and characterization of genes regulated by AqsR, a LuxR-type regulator in Acinetobacter oleivorans DR1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97: 6967-6978.

(비특허문헌 0015) Lee YC, Huang YT, Tan CK, Kuo YW, Liao CH, Lee PI, et al. 2011. Acinetobacter baumannii and Acinetobacter genospecies 13TU and 3 bacteraemia: comparison of clinical features, prognostic factors and outcomes. J. Antimicrob. Chemother. 66: 1839-1846.

(비특허문헌 0016) Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJ, Deschaght P, Passet V, et al. 2011. Genotypic and phenotypic characterization of the Acinetobacter calcoaceticusAcinetobacter baumannii complex with the proposal of Acinetobacter pittii sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 3) and Acinetobacter nosocomialis sp. nov. (formerly Acinetobacter genomic species 13TU). Res. Microbiol. 162: 393-404.

(비특허문헌 0017) Niu C, Clemmer KM, Bonomo RA, Rather PN. 2008. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from Acinetobacter baumannii. J. Bacteriol. 190: 3386-3392.

(비특허문헌 0018) Oh MH, Lee JC, Kim J, Choi CH, Han K. 2015. Simple method for markerless gene deletion of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii. Appl. Environ. Microbiol. 81: 3357-3368.

(비특허문헌 0019) Park SY, Lee SJ, Oh TK, Oh JW, Koo BT, Yum DY, et al. 2003. AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in Arthrobacter sp., and predicted homologues in other bacteria. Microbiology 149: 1541-1550.

(비특허문헌 0020) Parsek MR, Greenberg EP. 2000. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gram-negative bacteria: a signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8789-8793.

(비특허문헌 0021) Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. Acinetobacter baumannii: emergence of a

successful pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21: 538-582.

(비특허문헌 0022) Rasmussen TB, Givskov M. 2006. Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. Int. J. Med. Microbiol. 296: 149-161.

(비특허문헌 0023) Rutherford ST, Bassler BL. 2012. Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2: a012427.

(비특허문헌 0024) Shrout JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR. 2006. The impact of quorum sensing and swarming motility on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation is nutritionally conditional. Mol. Microbiol. 62: 1264-1277.

(비특허문헌 0025) Simon R, Priefer U, Puhler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. Nat. Biotechnol. 1: 784-791.

(비특허문헌 0026) Stacy DM, Welsh MA, Rather PN, Blackwell HE. 2012. Attenuation of quorum sensing in the pathogen Acinetobacter baumannii using non-native N-acyl homoserine lactones. ACS Chem. Biol. 7: 1719-1728.

(비특허문헌 0027) Thompson RJ, Bobay BG, Stowe SD, Olson AL, Peng L, Su Z, et al. 2012. Identification of BfmR, a response regulator involved in biofilm development, as a target for a 2-aminoimidazole-based antibiofilm agent. Biochemistry 51:9776-9778.

(비특허문헌 0028) Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by Acinetobacter baumannii: involvement of a novel chaperoneusher pili assembly system. Microbiology 149: 3473-3484.

(비특허문헌 0029) Tucker AT, Nowicki EM, Boll JM, Knauf GA, Burdis NC, Trent MS, et al. 2014. Defining gene-phenotype relationships in Acinetobacter baumannii through one-step chromosomal gene inactivation. mBio 5: e01313-e01314.

(비특허문헌 0030) Zhang L, Murphy PJ, Kerr A, Tate ME. 1993. Agrobacterium conjugation and gene regulation by N-acyl-L-homoserine lactones. Nature 362: 446-448.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명은 *A. 노소코미알리스*에서 아직 밝혀진 바 없는 쿼럼 센싱 시스템의 메커니즘과 이에 관련된 유전자 및 단백질들을 동정하고 그 기능을 확인함으로써 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성 및 표면 운동능을 억제하는 방법을 제공하고, 이러한 원리를 통해 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성 및 표면 운동능을 억제할 수 있는 물질의 스크리닝 방법을 제공하고자는 것을 목적으로 한다.

[0008] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본 발명의 제 1 측면은 *아시네토박터 노소코미알리스* (*Acinetobacter nosocomialis*) 균주에 버스타틴(virstatin)을 접촉시켜 서열번호 1의 AnoI 단백질 서열을 코드화하는 *anoI* 유전자 또는 서열번호 2의 AnoR 단백질 서열을 코드화하는 *anoR* 유전자의 발현을 저해하는 것을 포함하는, *아시네토박터 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 방법을 제공할 수 있다.

[0011] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해로 인해 *아시네토박터 노소코미알리스* 내에서 N-(3-히드록시-도데카노일)-L-호모세린 락톤의 생산이 감소됨으로써 생물막 형성능 및 표면 운동능이 억제되는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해 여부는 정량 실시간 PCR(q-RTPCR) 방법에 의해 측정되는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해는 버스타틴에 접촉하지 않은 대조군과 비교하여 유전자의 발현이 약 20% 내지 약 90% 감소되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0014] 본 발명의 제 2 측면은 다음의 단계를 포함하는, *아시네토박터 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다: (a) *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에서의 서열번호 1의 AnoI 단백질 서열을 코드화하는 *anoI* 유전자 또는 서열번호 2의 AnoR 단백질 서열을 코드화하는 *anoR* 유전자의 발현을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 상기 *anoI* 유전자 또는 *anoR* 유전자의 발현을 저해시키는 경우에는 상기 시료는 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주의 생물막 형성능 및 표면 운동능을 억제하는 물질로 판정된다.

[0015] 본 발명의 제 3 측면은 다음의 단계를 포함하는, *아시네토박터 노소코미알리스*에 의한 균혈증, 폐렴, 뇌막염 및 요로감염증으로부터 선택되는 질병의 치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다: (a) *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에서의 서열번호 1의 AnoI 단백질 서열을 코드화하는 *anoI* 유전자 또는 서열번호 2의 AnoR 단백질 서열을 코드화하는 *anoR* 유전자의 발현을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 상기 *anoI* 유전자 또는 *anoR* 유전자의 발현을 저해시키는 경우에는 상기 시료는 *아시네토박터 노소코미알리스*에 의한 균혈증, 폐렴, 뇌막염 및 요로감염증으로부터 선택되는 질병의 치료 또는 예방 물질로 판정된다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해 여부는 정량 실시간 PCR(q-RTPCR) 방법에 의해 측정되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해는 버스타틴에 접촉하지 않은 대조군과 비교하여 유전자의 발현이 약 20% 내지 약 90% 감소되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

발명의 효과

[0019] 쿼럼 센싱(quorum sensing)은 세균이 세포 밀도를 감지하고 조직화 유전자를 발현하기 위한 신호 분자로서의 유도물질(autoinducer)를 생산하는 세포-대-세포 의사소통 과정이다. 본 발명에서 제시되는 결과들은 AnoI가 *A. 노소코미알리스* 내의 OH-dDHL의 생산에 중요한 요소이며, 이의 발현이 AnoR에 의해 상승 조절된다는 것을 보여준다. 게다가, *anoR* 돌연변이는 생물막 형성능이 저해되며, 특히 *anoR* 돌연변이의 운동능은 야생형의 그것에 의해 일관되고 현저하게 저하되었다. *anoR* 돌연변이의 생물막 형성과 운동능의 저하는 기능성 *anoR*에 의해 현저하게 회복되었으며, 이는 AnoR이 생물막 형성과 운동능에 중요한 역할을 한다는 것을 의미하였다. 더욱이, 본 발명에서는 버스타틴이 *anoR*의 발현을 저해함으로써 생물막 형성과 운동능을 저하시키는 데 역할을 한다는 것을 보여주었다. 결론적으로, 이들이 복합된 결과는 AnoIR이 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성과 운동능에 중요한 역할을 하는 쿼럼 센싱 시스템이라는 것과 버스타틴이 *anoR*의 발현의 저해제라는 것을 뒷받침한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a 및 1b는 *A. 노소코미알리스 anoI* 및 *anoR*의 물리적 지도 및 AnoI 및 AnoR의 서열분석 결과를 보여주는 이미지이다. 도 1a: 화살표는 *anoI* (유전자자리 태그 번호 WP_004711097) 및 *anoR* (유전자자리 태그 번호 WP_004711094) 의 코드화 지역을 나타내며, 상기 유전자의 일부가 가설의 단백질을 코드화한다. 본 도면은 *A. 노소코미알리스* (GenBank Accession No. GCA_000248315.2)의 뉴클레오티드 서열을 사용하여 제작되었다. 도 1b: NCBI 단백질 데이터베이스로부터 검색된 아미노산 서열 (*An*AnoI 은 Accession No. WP_004711097, *Ab*AbaI은 YP_001083198, *An*AnoR은 WP_004711094, 그리고 *Ab*AbaR은 YP_001083200)들이 Clustalw 프로그램을 이용해 정렬되었다 (http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html). 동일한 서열들 (검은색 상자) 및 유사한 서열들 (회색 상자)들이 나타나 있다. 유도 물질(autoinducer) 결합 지역(점선) 및 HTH 모티프(실선)이 상기 아미노산 서열에 표시되어 있다. *An*AnoI는 A. 노소코미알리스의 AnoI; *Ab*AbaI는 A. 바우만니의 AbaI; *An*AnoR은 A. 노소코미알리스의 AnoR; *Ab*AbaR은 A. 바우만니의 AbaR이다.

도 2a 내지 2d는 *A. 노소코미알리스*에 의해 생성되는 AHL의 질량분광분석 및 생물학적 분석 결과를 보여주는 이미지이다. 세균 배양 상청액으로부터 추출된 샘플들이 Acquity H-class 액체 크로마토그래피/SQD2 질량 분광분

석 (LC/MS) 시스템 및 *traG-lacZ*를 가지는 *A. 투메파키엔스* 바이오센서 균주에 의해 분석되었다. 야생형 균주에 의해 생성된 OH-dDHL(도 2a) 또는 합성 OH-dDHL(도 2b) 또는 *anoI* 돌연변이에 의해 생성된 OH-dDHL(도 2c)의 MS 프로필이 나타나 있다. 도 2d: *A. 투메파키엔스* NT1 (pDCI41E33) 가 도포된 플레이트 상의 컬러 존이 22 시간 후에 모니터되었으며 이어서 디지털 이미징 시스템을 이용해 촬영되었다. WT (pOH03)은 야생형; Δ*anoI* (pOH03)은 *anoI* 돌연변이; Δ*anoI* (pOH04)는 보완된 균주이다.

도 3은 *anoR* 돌연변이에서의 *anoI* 발현을 나타내는 그래프이다. 정지기에 도달할 때까지 MH 배지 내에서 배양된 세균 균주로부터 단리된 총 RNA의 qRT-PCR에의해 야생형과 *anoR* 돌연변이 균주에서의 *anoI* mRNA 수준이 분석되었다. 각각의 컬럼은 *anoI*의 mRNA 발현 수준을 나타낸다. 오차 막대는 SEM을 나타낸다. 평균 및 SEM 값은 3 회의 독립된 실험으로부터 계산되었다. ***, 야생형과 관련해 $p < 0.005$. WT는 야생형; Δ*anoR* 은 *anoR* 돌연변이이다.

도 4a 및 4b는 *A. 노소코미알리스* 균주의 생물막 형성능 및 표면 운동능을 보여주는 이미지이다. 도 4a: 5 ml의 폴리스티렌 튜브 상에 형성된 생물막이 겐티안 바이올렛 (0.1%)으로 15 분 동안 염색되었다 (위). 생물막으로부터 용출된 겐티안 바이올렛의 양은 총 세균 성장(OD600)으로 정규화된 OD570으로 정량화되었다 (아래). 도 4b: 균주들은 0.3% Eiken 소프트 아가를 함유하는 MH 배지 상에서 12 시간 동안 30℃에서 배양되었고, 운동능 지역이 촬영되었다. 오류 막대는 SEM을 나타낸다. 평균 및 SEM 값은 3 회의 독립된 실험으로부터 계산되었다. ***, 야생형과 관련해 $p < 0.005$. WT (pOH03)는 야생형; Δ*anoR* (pOH03)는 *anoR* 돌연변이; Δ*anoR* (pOH05)은 보완된 균주이다.

도 5a 내지 5d는 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 운동능에 대한 버스타틴의 효과를 보여주는 이미지이다. 도 5a: 상이한 농도의 버스타틴을 가지는 96-웰 플레이트에 생물막이 형성되었으며, 겐티안 바이올렛 염색에 의해 정량화되었다. 각각의 컬럼은 상이한 농도의 버스타틴에서의 생물막 형성능을 나타낸다. 도 5b: DMSO 또는 100 μM의 버스타틴을 가지는 0.3 Eiken 소프트 아가를 함유하는 MH 배지에서 표면 운동능이 시험되었다. 도 5c: *A. 노소코미알리스*는 DMSO (동그라미) 또는 100 μM의 버스타틴 (삼각형)을 가지는 MH 배지에서 배양되었다. 도 5d: MH 배지 단독에서 배양된 세균과 비교하여, 100 μM의 버스타틴을 함유하는 MH 배지에서 배양된 세균으로부터 단리된 총 RNA의 qRT-PCR에 의해 *anoR*의 mRNA 수준이 분석되었다. 오류 막대는 SEM을 나타낸다. 평균 및 SEM 값은 3 회의 독립된 실험으로부터 계산되었다. *DMSO로 실험된 야생형과 관련해 $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.005$ 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0023] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0024] 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~하는 단계" 또는 "~의 단계"는 "~ 를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

[0025] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서, ?A 및/또는 B?의 기재는, ?A, B, 또는, A 및 B?를 의미한다.

[0027] 이하, 본 발명의 *아시네토박터 노소코미알리스(Acinetobacter nosocomialis, A. 노소코미알리스)*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 방법, *아시네토박터 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 물질의 스크리닝 방법, 및 *아시네토박터 노소코미알리스*에 의한 균혈증, 폐렴, 뇌막염 및 요로감염증으로부터 선택되는 질병의 치료 또는 예방 물질의 스크리닝 방법에 대하여 구현예 및 실시예와 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도

록 한다. 그러나, 본 발명이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서는 *A. 노소코미알리스* 유전체의 서열 분석에 의해 LuxI-형 단백질, AnoI, 및 LuxR-형 단백질, AnoR로 구성된 쿼럼 센싱 시스템을 확인하였으며, *A. 노소코미알리스*에 의해 생성되는 AHL을 동정하였다. 또한, *anoI* 결실 돌연변이를 제조하고 AHL 생성에서의 *anoI* 돌연변이의 효과를 분석함으로써 *A. 노소코미알리스* 내에서의 AHL 생성에 대한 AnoI의 역할을 밝혀내었다. 더불어, *A. 노소코미알리스*에서의 *anoI*의 발현 및 생물막 형성 및 운동능에 대한 AnoR의 기능을 검증하였으며, *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성 및 운동능의 억제자로서의 버스타틴의 효과 및, anoR의 발현에 대한 버스타틴의 효과 역시 분석하였다.

[0030] 이러한 분석으로부터, 본 발명자들은 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성 및 운동능에 관여하는 쿼럼 센싱 시스템의 작동 원리를 규명하고, 이와 연관된 유전자들을 동정하였으며, 버스타틴의 쿼럼 센싱 시스템 억제 메커니즘을 밝혀내었다.

[0031] 본 발명의 제 1 측면은 *아시네토박터 노소코미알리스*(*Acinetobacter nosocomialis*) 균주에 버스타틴(virstatin)을 접촉시켜 서열번호 1의 AnoI 단백질 서열을 코드화하는 *anoI* 유전자 또는 서열번호 2의 AnoR 단백질 서열을 코드화하는 *anoR* 유전자의 발현을 저해하는 것을 포함하는, *아시네토박터 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 방법을 제공하는데 있다.

[0032] 서열목록 상의 서열번호 1의 서열은 *A. 노소코미알리스*의 AnoI 단백질 서열을 나타내며, 이는 *AnanoI* 유전자에 의해 코드화된다. 서열번호 2의 서열은 *A. 노소코미알리스*의 AnoR 단백질 서열을 나타내며, 이는 *AnanoR* 유전자에 의해 코드화된다.

[0033] 서열번호 3의 서열은 *A. 바우만니*의 AbaI 단백질 서열을 나타내며, 이는 *AbAbaI* 유전자에 의해 코드화된다. 서열번호 4의 서열은 *A. 바우만니*의 AbaR 단백질 서열을 나타내며, 이는 *AbAbaR* 유전자에 의해 코드화된다.

[0034] 쿼럼 센싱은 세균의 생물막 형성능과 표면 운동능에 깊이 연관되어 있다. 본 발명에서는 OH-dDHL이 *A. 노소코미알리스*에 의해 생성되는 쿼럼 센싱 신호이고, 그리고 AnoI이 OH-dDHL의 생성에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀내었다. 따라서, *anoI* 유전자 및 이의 발현을 조절하는 *anoR* 유전자의 발현을 억제함으로써 결과적으로 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능을 억제하는 것이 가능하다.

[0035] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해로 인해 *아시네토박터 노소코미알리스* 내에서 N-(3-히드록시-도데카노일)-L-호모세린 락톤(OH-dDHL)의 생산이 감소됨으로써 생물막 형성능 및 표면 운동능이 억제되는 것일 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해 여부는 정량 실시간 PCR(quantitative Real-Time PCR) 방법에 의해 측정되는 것일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해는 버스타틴에 접촉하지 않은 대조군과 비교하여 유전자의 발현이 20% 내지 90% 감소되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해는 버스타틴에 접촉하지 않은 대조군과 비교하여 유전자의 발현이 약 30% 내지 약 60% 감소되는 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 제 2 측면은 다음의 단계를 포함하는, *아시네토박터 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및 표면 운동능 억제 물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다: (a) *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에서의 서열번호 1의 AnoI 단백질 서열을 코드화하는 *anoI* 유전자 또는 서열번호 2의 AnoR 단백질 서열을 코드화하는 *anoR* 유전자의 발현을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 상기 *anoI* 유전자 또는 *anoR* 유전자의 발현을 저해시키는 경우에는 상기 시료는 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주의 생물막 형성능 및 표면 운동능을 억제하는 물질로 판정된다.

[0039] 본 발명의 제 3 측면은 다음의 단계를 포함하는, *아시네토박터 노소코미알리스*에 의한 균혈증, 폐렴, 뇌막염 및 요로감염증으로부터 선택되는 질병의 치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다: (a) *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 *아시네토박터 노소코미알리스* 균주에서의 서열번호 1의 AnoI 단백질 서열을 코드화하는 *anoI* 유전자 또는 서열번호 2의 AnoR 단백질 서열을 코드화하는 *anoR* 유전자의 발현을 측정하는 단계로서, 상기 시료가 상기 *anoI* 유전자 또는 *anoR* 유전자의 발현을 저해시키는 경우에는 상기 시료는 *아시네토박터 노소코미알리스*에 의한 균혈증, 폐렴, 뇌막염 및 요로감염증으로부터 선택되는 질병의 치료 또는 예방 물질로 판정된다.

[0040] *A. 노소코미알리스*는 균혈증(bacteremia), 폐렴(pneumonia), 뇌막염(meningitis), 요로감염증(urinary tract

infections) 및 상처 감염 등을 포함하는 다양한 병원성 감염을 유발하는 병원균으로서, 이러한 발병 메커니즘은 세균의 생물막 형성 및/또는 표면 운동능과 밀접하게 관련되어 있다. 즉, *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및/또는 표면 운동능의 저하는 발병의 방지 또는 지연과 밀접하게 연관되어 있으므로, *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성능 및/또는 표면 운동능을 저하시키는 물질은 *A. 노소코미알리스*로 인한 균혈증, 폐렴, 뇌막염 및 요로감염증 등의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있다고 합리적으로 판단할 수 있다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 분석하고자 하는 시료는 단일 화합물 또는 혼합물일 수 있다. 예를 들어, 상기 분석하고자 하는 시료는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리 또는 천연 재료로부터 얻을 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA) 등에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해 여부는 정량 실시간 PCR(q-RTPCR) 방법에 의해 측정되는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해는 버스타틴에 접촉하지 않은 대조군과 비교하여 유전자의 발현이 약 20% 내지 약 90% 감소되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 *anoI* 유전자 또는 상기 *anoR* 유전자의 발현 저해는 버스타틴에 접촉하지 않은 대조군과 비교하여 유전자의 발현이 약 30% 내지 약 60% 감소되는 것일 수 있다.

[0045] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0047] **[실시예]**

[0048] **실험 방법**

[0049] **세균 균주, 플라스미드 및 배양 조건**

[0050] 본 발명에서 사용된 모든 세균 균주들 및 플라스미드들이 하기 표 1에 나열되어 있다. 별도로 기재되지 않은 한, *에스케리치아 콜리*(*Escherichia coli, E. coli*) 및 *A. 노소코미알리스*는 37℃에서 LB(Luria-Bertani) 배지에서 배양되었다. *E. coli* 내의 플라스미드의 유지를 위해, 클로람페니콜 (20 ㎍/ml) 또는 카나마이신 (50 ㎍/ml)이 배양 배지에 첨가되었다. 리포터 균주인 *아그로박테리움 투메파키엔스*(*agrobacterium tumefaciens*) NT1 (pDCI41E33)이 규명된 최소 배지에서 30℃의 온도에서 배양되었다 (비특허문헌 30 참조). 리포터 균주를 이용한 생물학적 분석(bioassay) 플레이트는 종래에 기술된 바와 같이 준비되었다 (비특허문헌 19 참조).

[0051] 합성 N-(3-히드록시-도데카노일)-L-호모세린 락톤 (합성 OH-dDHL)은 시그마-알드리치 (St. Louis, MO, 미국)로부터 구입되었다.

[0053] [표 1]

균주 또는 플라스미드	관련 특성들[a]	참조 또는 출처
세균 균주들		
A. nosocomialis		
ATCC 17903	Type strain	[16]
OH01	17903 with Δ*anoI*	본원
OH02	17903 with Δ*anoR*	본원
A. tumefaciens		
NT1	Derivative of strain C58 cured of pTiC58	[6]
E. coli		
DH5α λ*pir*	*supE44* Δ*lacU169* (ϕ80 *lacZ* ΔM15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA 96 thi-1 relA1* λ *pir phage lysogen*; plasmid replication	실험실 수집
S17-1 λ*pir*	λ*pir* lysogen; *thi pro hsdR hsdM*$^+$ *recA* RP4-2 Tc::Mu-Km::Tn*7*;Tp^r Sm^r; host for π-requiring plasmids; conjugal donor	[25]
플라스미드		
pUC4K	pUC4 with *nptI*; Ap^r, Km^r	Pharmacia
pHKD01	pDS132, multicloning sites; *oriR6K*, *sacB*, Cm^r	[18]
pOH01	pHKD01 with Δ*anoI*::*nptI*; Cm^r, Km^r	본원
pOH02	pHKD01 with Δ*anoR*::*nptI*; Cm^r, Km^r	본원
pWH1266	*E. coli-Acinetobacter* shuttle vector; Ap^r, Tet^r	[13]
pOH03	pWH1266 with *nptI*; Km^r, Tet^r	본원
pOH04	pOH03 carrying *anoI* with native promoter (P_{anoI}); Km^r, Tet^r	본원
pOH05	pOH03 carrying *anoR* with native promoter (P_{anoR}); Km^r, Tet^r	본원

[0054]

[0056] **결실 돌연변이의 제조**

[0057] *anoI* 및 *anoR* 유전자 각각은 종래에 기술된 오버랩 확장 PCR 방법을 이용하여 각각의 목표 유전자의 열린번역틀(ORF)을 따로따로 결실시킴으로써 차단되었다 (비특허문헌 18 참조). 예를 들어, *anoI*의 코드화 지역의 상류 및 하류 지역 (각각 대략 1kb)에 특이적인 네 개의 PCR 프라이머 (표 2 참조)를 이용하여 두 PCR 단계를 수행함으로써 *anoI*을 가지지 않는 돌연변이 DNA 절편이 증폭되었다. 카나마이신 저항을 부여하는 *nptI*와 *anoI*의 상류 및 하류 지역을 오버랩 확장 PCR에 의해 결합하기 위해, 상류 지역의 증폭을 위한 ANOI02F 및 ANOI02R 프라이머들이 그들의 5? 말단에 추가적으로 25 개의 뉴클레오티드를 함유하도록 디자인되었고, 이는 하류 지역 및 *nptI*에도 동일하게 적용되었다. 상류 및 하류 지역들은 각각 프라이머 쌍들 ANOI01F/ANOI01R 및 ANOI02F/ANOI02R을 이용하여 *A. 노소코미알리스* ATCC 17903의 유전체 DNA로부터 증폭되었다. 카나마이신 저항 카세트(*nptI*)는 주형으로서 pUC4K를 가지는 프라이머 쌍 U1/U2 (표 2 참조)를 이용하여 증폭되었다. 수득된 세 종의 PCR 산물들은 동몰 농도로 혼합되었으며 ANOI01F 및 U2 프라이머들에 의해 오버랩 확장 PCR이 수행되었다. 결과 3.1 kb DNA 절편은 FspI-소화된 pHKD01에 부착(ligate)되어 pOH01을 형성하였다 (표 1 참조). pOH01을 함유하는 *E.coli* S17-1 λ*pir* 균주가 *A. 노소코미알리스* ATCC 17903로의 접합 공여체(conjugal donor)로서 사용되었다. 접합 및 피접합전달균주(transconjugant)의 단리는 종래에 기술된 대로 수행되었다 (비특허문헌 18 참조). *anoI* 결실 돌연변이는 PCR 분석에 의해 확인되었다. 유사한 방법으로, *anoR* 결실 돌연변이가 제조되고 PCR 분석에 의해 확인되었다. *anoI* 및 *anoR* 결실 돌연변이들은 각각 OH01 및 OH02로 이름붙여졌다.

[0058] [표 2]

올리고뉴클레오티드	서열 (5'-3')[a, b]	목표 유전자
A. 노소코미알리스 유전자 결실에 사용		
ANO01F	TTTCTGAAACCCTTTAAGGTTGTT	*anoI*
ANO01R	TACAAGTGCTTCCACTTATTTTTAATG	
ANO02F	TTAAAAATAAGTGGAAGCACTTGTATGGTTTAAAGGTTAACTCTTGTCTCTC	
ANO02R	GCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACAGGATTTTGGGGAAGTTTGC	
ANO03F	GCACGATTTTTGGCTCACAG	*anoR*
ANO03R	AAAGATATATAAAGAATGTAGAGTATTATAAAATAAATAA	
ANO02F	TACTCTACATTCTTTATATATCTTTGCTCTCATTAGGCTCCATTCAG	
ANO02R	GCAACACCTTCTTCACGAGGCAGACGTCGCCCATTCAGTAAAACC	
결실 돌연변이의 보완에 사용		
ANO03F	GCGGGGGGCATGCGAAACCTGTAAATTTTTACAGTTACCG	*anoI*
ANO03R	GCGGGGGGGAATCCCTAGGTTAACTCATGTCCGAGAGAC	
ANO03F	GCGCGGGGGGATCCAAACTTATTCCTTACTTTAAATTCATAGACTAAC	*anoR*
ANO03R	GCGGGGGGGCATGCCCTACCTGTTCAAGTACCCTCAA	
카나마이신 저항 카세트의 증폭에 사용		
U1	GTCTGCCTCGTGAAGAAGGTG	*nptI*
U2	GATCCGTCGACCTGCAGG	
실시간 PCR의 정량에 사용		
16SF	GCACGGGTGAGTAATGCTTAG	16S rRNA
16SR	CGTACGACGTATGCGGTATTAG	
ANO04F	GCTTATCTGGTCGCTCAAGATAG	*anoI*
ANO04R	ACGGCAGAGGTATTCCATTCA	

[a] 올리고뉴클레오티드들은 *A. 노소코미알리스* ATCC17903 유전체서열을 이용해 설계되었음 (GenBank Accession No. CCA_000248315.2)

[b] 상응하는 주형에 상보적이지 않은 뉴클레오티드 서열들은 밑줄로 표시함

[0059]

[0061] **결실 돌연변이들의 보완(complementation)**

[0062] *anoI* 및 *anoR* 돌연변이들의 보완을 위해, *EcoRI* 및 *PstI*에 의해 소화되고 DNA 중합효소 I의 클레나우 절편에 의해 평활말단이 된 pWH1266 내로 *nptI*를 서브클로닝하는 것에 의해 pWH1266의 앰피실린-저항 유전자(*bla*) (표 1 참조)를 카나마이신 저항 유전자로 대체하였다. 새로운 벡터는 pOH03으로 이름붙여졌다 (표 1 참조). 그들의 원래의 프로모터 지역을 가지는 *anoI* 및 *anoR* ORF들 각각은 *A. 노소코미알리스* ATCC 17903의 유전체 DNA로부터 특정 프라이머쌍들 (표 2 참조)에 의하여 증폭되었고, 이어서 BamHI 및 SphI에 의해 소화되었다. 결과 DNA 절편들은 동일한 효소에 의해 선형화된 pOH03 플라스미드 내로 각각 서브클론되어 pOH04 및 pOH05가 되었다 (표 1 참조).

[0064] **세균 배양 상청액으로부터의 AHL의 추출 및 탐지**

[0065] *A. 노소코미알리스*로부터 AHL을 추출하기 위하여, 세균 세포들은 MH(Mueller-Hinton) 배지에서 24 시간 동안 30 ℃의 온도에서 배양되었다. 세포들은 3,500 rpm에서 30 분 동안 원심분리에 의해 제거되었으며, 이어서 0.2 ㎛ 필터를 통과하여 여과되었다. 상청액은 동일한 부피의 산성화 에틸 아세테이트에 의해 2회 추출되었다. 총 추출물이 풀(pool) 되었고, 30℃ 온도의 진공 하에 회전증발농축기인 Rotavapor (BuFlawil, Switzerland)에 의해 건조되었으며, 이어서 동결 건조기(Ilshin Biobase, 서울, 한국)에서 건조되었다. 샘플들은 아세토니트릴 100 ㎕에 용해되었고, Waters SQD2 질량 분광분석기(Waters, MA, 미국)와 인터페이스로 접속된 Waters Acquity H-Class UPLC 시스템에 1 ㎕이 로딩되었다. Waters Acquity UPLC BEH C18 옥타데실실란 컬럼 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)을 이용하여 크로마토그래피 분리가 수행되었다. 이동상 A 및 B는 각각 물 및 아세토니트릴 내의 0.1% 포름산이었다. 샘플들은 아래의 구배 프로필에서 시험되었다 (분, 이동상 A: 이동상 B): 0 분, 70%:30%; 5 분, 30%:70%; 6 분, 30%:70%; 6.1 분, 70%:30%; 및 10 분, 70%:30%.

[0066] 30 V로 고정된 모세관 전압, 3 kV의 이온 분사 전압, 30 V의 튜브 렌즈 전압, 및 350 ℃의 모세관 온도에서, 질량 분광(MS) 분석이 ESI-양이온 모드에서 수행되었다. MS 데이터 분석은 MassLynx 4.1 소프트웨어 (Waters)를 이용하여 수행되었다. 표준으로서, 합성 OH-dDHL이 또한 LC/MS에 의해 분석되었다.

[0068] **정량 실시간 PCR**

[0069] 버스타틴이 첨가 또는 첨가되지 않은 30℃의 MH 배지(OD600,2.0)에서 배양된 *A. 노소코미알리스* 균주의 총 RNA가 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, 미국)에 의해 단리되었다. 상기 총 RNA로부터 PrimeScript RT Master Mix (TaKaRa, 시가, 일본)를 이용하여 cDNA가 합성되었다. cDNA의 실시간 PCR 증폭은 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) 표 2에 나열된 특정 프라이머들의 쌍을 이용하여 Thermal Cycler Dice Real-Time System

(TaKaRa)에 의하여 수행되었다.

[0070] 표준화를 위한 내부 준거로서 16S rRNA 발현 수준을 이용하여 목표 유전자의 상대적인 발현 수준이 계산되었다.

[0072] **생물막 및 표면 운동능 시험**

[0073] 생물막 형성 분석을 위해, *A. 노소코미알리스*가 30℃ 온도의 MH 배지 내에서 배양되었다. 밤새 배양 후 동일한 배지에 1:200으로 희석되었으며, 희석된 배양액 1 ml이 폴리스티렌 튜브 (12 x 75 mm) 내에서 8 시간 동안 30℃에서 쉐이킹 없이 인큐베이션되었다. 부유 세포들이 제거되고, 이어서 튜브는 1 ml의 멸균수로 2 회 세척되었다. 생물막 세포들이 0.1%(w/v) 겐티안 바이올렛 용액으로 실온에서 15 분 동안 염색되었다. 튜브가 1 ml의 멸균수로 3 회 세척되었고 이어서 30 분 동안 공기 건조되었다. 총 세균 성장(OD600)으로 정규화된 생물막으로부터 용출된 흡광도 570 nm(OD570) 겐티안 바이올렛의 양을 측정함으로써 생물막이 정량되었다.

[0074] 표면 운동능은 0.3% Eiken 소프트 아가(Eiken Chemical, 도쿄, 일본)를 함유하는 MH 배지에서 시험되었다. 운동능 시험을 위해, *A. 노소코미알리스*는 정지기(OD600, 2.0)가 될 때 까지 MH 배지에서 배양되었고, 그리고 배양 1 ㎕이 운동능 플레이트의 중앙에 접종되었다. 플레이트는 12 시간 동안 30 ℃에서 쉐이킹 없이 인큐베이션되었고, 이어서 디지털 이미징 시스템(UTA-1100; UMAX Technologies)을 이용해 촬영되었다.

[0076] **유도물질의 탐지를 위한 생물학적 분석**

[0077] A. 노소코미알리스가 MH 배지 내에서 30℃의 온도에서 밤새 배양되었고, OD600가 1이 될 때 까지 희석되었다. *A. 투메파키엔스* NT1 (pDCI41E33)가 입혀진 플레이트 상에 희석된 샘플 5 ㎕을 점 모양으로 놓았다. 합성 OH-dDHL이 또한 대조군으로서 놓여졌다. 플레이트는 30 ℃에서 22 시간 동안 인큐베이션 되었다. 세균을 둘러싼 컬러 존이 디지털 이미징 시스템 (UTA-1100)을 이용해 촬영되었다.

[0079] **생물막 및 운동능에 대한 버스타틴의 효과**

[0080] 버스타틴 (Virstatin, 4-[N-(1, 8-나프탈이미드)]-n-뷰티릭산, Enzo Life Sciences, MI, 미국)이 디메틸 설폭사이드(DMSO, Sigma-Aldrich) 내에 가용화되었다. *A. 노소코미알리스*가 MH 배지 내에서 배양되었고, 이어서 OD600가 0.05가 되도록 조정되었다. 다양한 농도의 버스타틴이 있거나 또는 버스타틴이 없는 96-웰 플레이트 내에 세균 샘플 200 ㎕가 심어졌다. 세균 샘플은 12 시간 동안 30℃에서 정적으로 배양되었다. 생물막은 겐티안 바이올렛 염색을 이용해 정량되었다. 운동능 시험은 버스타틴이 있거나 없는 운동능 플레이트에서 수행되었다.

[0082] **데이터 분석 및 통계**

[0083] 평균 및 평균표준편차(standard errors of the means, SEM)는 적어도 3 회의 독립 실험으로부터 계산되었다. 모든 데이터는 SAS 프로그램(SAS software; SAS Institute Inc., Cary, NC, 미국)을 이용하여 스튜던트의 T 검정에 의해 분석되었다. 실험군간의 차이는 P 값이 <0.005 일 때 현저하다고 간주되었다.

[0085] **실험 결과**

[0086] ***A. 노소코미알리스* AnoI 및 AnoR의 확인 및 서열분석**

[0087] *A. 노소코미알리스* 유전체 서열 데이터베이스(GenBank Accession No. GCA_000248315.2) 내의 LuxI-형 신타아제 및 LuxR-형 조절자로 구성되는 쿼럼 센싱 시스템을 찾는 과정에서, 호모세린 락톤 신타아제를 코드화하는 *luxI*의 상동성을 발견하였다 (도 1a 참조). 추정되는(putative) *A. 노소코미알리스* LuxI은 이론적인 분자량 20,356 Da과 5.16의 pI를 가지는 183 개의 아미노산으로 구성된다. 추정되는 LuxI는 *A. 바우만니*의 AbaI의 아미노산 서열과 94% 일치하였다. 게다가, 추정되는 *luxI*로부터 다르게 전사되는 LuxR-형 전사 조절자를 코드화하는 유전자를 발견하였다 (도 1a 참조). 추정되는 LuxR-형 전사 조절자는 이론적인 분자량 27,328 Da 및 5.99의 pI를 가지는 238 개의 아미노산으로 구성되었다. 추정되는 LuxR-형 전사 조절자는 *A. 바우만니*의 AbaR과 높은 수준의 동일성(아미노산 서열 94%)을 가지는 것으로 밝혀졌다 (도 1b 참조, 아래). 추정되는 LuxR-형 조절자는 N-말단 부분 및 C 터미널 부분의 헬릭스-턴-헬릭스(HTH) 모티프에 유도물질(autoinducer) 결합 도메인을 함유한다 (도 1b 참조, 아래). 따라서, 이러한 정보는 추정되는 LuxI 및 LuxR이 *A. 노소코미알리스* 내의 쿼럼 센싱 시스템일 수 있음을 나타내며, 따라서 AnoI(*Acinetobacter nosocomialis* LuxI) 및 AnoR(*Acinetobacter nosocomialis* LuxR)이라고 이름붙여졌다.

[0089] **OH-dDHL의 생성에 대한 *anoI* 돌연변이의 효과**

[0090] OH-dDHL은 *A. 바우만니* 내에서 주요한 쿼럼 센싱 신호이며, 이 쿼럼 센싱 신호는 AbaI에 의해 합성된다 (비특허문헌 17 참조). 본 발명자들은 *A. 노소코미알리스*가 OH-dDHL을 생성한다고 가정하였다. *A. 노소코미알리스*가 OH-dDHL을 생성하는지 여부를 시험하기 위해, 배양 상청액의 에틸 아세테이트 추출물이 준비되었고 액체 크로마토그래피(LC)/질량 분광기(MS)에 의해 분석되었다. 배양 상청액의 MS 프로필이 합성 OH-dDHL의 그것과 비교되었다 (도 2a 및 2b 참조). 본 발명자들은 상청액의 MS 프로필 내의 *m/z* 102 내의 절편이 호모세린 락톤 링의 특성임을 발견하였다. 합성 OH-dDHL과 비교하여, *A. 노소코미알리스* 균주의 MS 프로필의 *m/z*값 300은 크로마토그래피에서 5.42분의 머무름 시간을 가지는 합성 OH-dDHL의 그것에 해당하였다. 이러한 결과는 *A. 노소코미알리스*가 쿼럼 센싱 신호 분자로서 OH-dDHL을 생성한다는 것을 의미한다.

[0091] 추가적으로, AnoI가 OH-dDHL의 생성에 필요한지 여부를 확인하기 위하여, *anoI* 돌연변이가 형질 변이에 의해 제조되었고, *anoI* 돌연변이에 의해 생성된 AHL 신호가 LC/MS 및 *traG-lacZ*을 함유하는 *A. 투메파키엔스* 리포터 균주에 의해 야생형의 그것과 비교되었다 (도 2c 및 2d 참조). 야생형과의 비교 결과, 300의 *m/z*값은 *anoI* 돌연변이의 MS 프로필에서는 발견되지 않았다. 게다가, 야생형 균주는 플레이트 상에서 *A. 투메파키엔스*의 청색 컬러 존을 형성하였다. 야생형 균주에 의한 컬러 존은 양성 대조군인 합성 OH-dDHL의 그것과 유사하였다. 그러나, *A. 투메파키엔스* 리포터 균주는 *anoI* 돌연변이 균주가 점찍어진 구역에서는 컬러 존을 형성하지 못했다. *anoI* 돌연변이의 컬러 존 생성 결핍은 pOH04의 도입에 의해 현저하게 회복되었는데, 이는 *anoI* 돌연변이 균주의 컬러 존 결핍은 *anoI* 하류의 유전자의 어떠한 극성 효과(polar effect)에 의한 것이라기보다는 *anoI*의 비활성화에 의한 것이라는 것을 시사한다. 따라서, 복합된 결과는 AnoI가 OH-dDHL 생성에 매우 중요하다는 사실을 의미한다.

[0093] **_anoR_ 돌연변이에서의 _anoR_ 발현의 효과**

[0094] 본 발명자들은 추정되는 *lux* 상자가 *anoI*의 상류 지역에 위치한다는 것을 발견하였다. 따라서, *anoI*의 발현이 AnoR에 의해 조절될 수 있다고 가정하였다. 이러한 가설을 시험하기 위해, *anoR* 돌연변이가 형질 변이에 의해 제조되었고, 야생형과 *anoR* 돌연변이에서의 *anoI* 발현 수준이 정량 실시간 PCT(qRT-PCR)을 이용해 측정되었다 (도 3 참조). *anoI*의 발현은 *anoR* 돌연변이에서 현저히 감소되었다. 결과적으로, AnoR은 *A. 노소코미알리스*에서 *anoI*의 발현을 양적으로(positively) 조절한다는 사실을 시사한다.

[0096] **생물막 형성과 운동능에 대한 _anoR_ 돌연변이의 효과**

[0097] *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성에 대한 AnoR의 역할을 이해하기 위해, 야생형과 *anoR* 돌연변이의 폴리스티렌 표면에 대한 생물막 형성 능력이 겐티안 바이올렛 염색에 의해 측정되었다 (도 4a 참조). 야생형과 비교하여, *anoR* 돌연변이의 생물막 형성 능력은 표면에 대해 저하되었으며, 디지털 이미징 시스템에 의해 시각화되었다 (도 4a 참조, 위). 생물막의 양적 분석에서, 야생형 균주의 생물막 형성 능력(OD570/OD600)은 6.7이었으나, 반면 *anoR* 돌연변이의 능력은 3.6이었다 (도 4a 참조, 아래). *anoR* 돌연변이를 기능을 가지는 *anoR*(pOH05)로 보완한 경우 감소된 생물막 형성 능력은 야생형의 그것과 비슷한 수준으로 회복되었다 (도 4a 참조). 이러한 결과는 *anoR* 돌연변이의 감소된 생물막 형성능력은 *anoR*의 하류의 유전자의 어떠한 극성 효과에 의한 것이라기보다는 *anoR*의 비활성화에 기인한 것임을 의미한다.

[0098] 표면 운동능은 쿼럼 센싱 시스템에 의해 조절된다 (비특허문헌 11 참조). *A. 노소코미알리스*의 표면 운동능에 대한 AnoR의 역할을 시험하기 위해, *anoR* 돌연변이가 반고체 플레이트 표면을 이동하는 능력을 야생형의 그것과 비교하여 시험되었다. 도 4b에 나타난 바와 같이, 부모(parental) 야생형 균주는 접종 지점으로부터 멀리 이동할 수 있었다. 그러나, *anoR* 돌연변이 균주는 접종 지점으로부터 멀리 이동하는 능력이 현저히 결핍되었다. *anoR* 돌연변이의 이동성의 결핍은 pOH의 도입에 의해 현저히 회복되었으며, 이는 AnoR이 *A. 노소코미알리스*의 운동능에 중요한 요소라는 것을 의미한다.

[0100] **생물막 형성, 운동능 및 _anoR_ 발현에 대한 버스타틴의 효과**

[0101] 버스타틴은 전사 조절자 ToxT의 이량체화를 차단함으로써 *Vibrio cholerae*의 독성을 저해하는 작은 유기 분자이다 (비특허문헌 12 참조). 본 발명자들은 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성에 대한 버스타틴의 효과를 연구하였다. 이러한 목적으로, 다양한 농도의 버스타틴을 가지는 마이크로리터 플레이트 웰들에 *A. 노소코미알리스*의 야생형 균주가 배양되었다. 12 시간 후에, 버스타틴의 농도에 따른 생물막 형성이 겐티안 바이올렛 염색에 의해 모니터되었다. 도 5a에 나타난 바와 같이, 버스타틴에 용량-의존적으로 생물막 형성이 감소하였다. 100 μM의 버스타틴을 함유하는 MH 배지에서의 생물막 중량은 DMSO를 함유하는 MH 배지의 그것에 비해 약 30% 감소되었다. 추가로, 본 발명자들은 *A. 노소코미알리스*의 운동능에 대한 버스타틴의 효과를 연구하였다. 버스타틴

(100 μM)을 함유하는 운동능 플레이트 상에서 *A. 노소코미알리스*의 운동능의 감소가 관찰되었다 (도 5b 참조). 감소된 생물막 중량 및 운동능이 버스타틴에 의한 세균 생장의 억제에 의한 것인지 여부를 확인하기 위해, DNSO 또는 버스타틴(100 μM)과 함께 배양된 *A. 노소코미알리스*의 생장이 비교되었다. 버스타틴과 함께 배양된 세균은 버스타틴이 없이 배양된 세균과 그 성장에 차이가 없었으며 (도 5c 참조), 이는 버스타틴이 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성 및 운동능의 저해자(inhibitor)라는 것을 의미한다. 이러한 결과에 기반하여, 본 발명자들은 버스타틴에 의한 생물막 중량 및 운동능의 감소가 *anoR*의 발현 수준 감소에 의한 것이라고 가정하였다. 이 가설을 검증하기 위해, 버스타틴(100 μM) 또는 DMSO를 각각 함유하는 배지 내에서 배양된 *A. 노소코미알리스*의 *anoR* 발현 수준이 qRT-PCR에 의해 분석되었다. 버스타틴으로 인큐베이션된 세균에서 *anoR*의 발현 수준은 DMSO로 인큐베이션된 세균에서의 그것에 비해 약 60% 감소되었다 (도 5d 참조). 따라서, 이러한 결과들을 고려할 때, 버스타틴이 *anoR*의 발현을 차단함으로써 생물막 형성과 운동능을 저해하는 소분자라는 결론을 내릴 수 있다.

[0103] 생물막은 항생제 치료 및 감염 동안의 숙주 면역반응을 포함하는 다양한 환경 스트레스로부터 세균을 방어하는 역할을 한다 (비특허문헌 10 참조). 생물막을 형성하는 세균의 능력은 세균의 표면 커뮤니티의 확립 및 확산을 조절하는 표면 운동능에 의존한다 (비특허문헌 11, 29 참조). 따라서, 생물막 형성 및 운동능에 기여하는 요소들은 병원성 세균의 병독성에 중요한 영향을 미친다. 쿼럼 센싱은 생물막 형성 및 표면 운동능과 연관된 유전자의 발현을 조절하는 주요한 요소로 알려져 있다 (비특허문헌 5, 14, 24 참조). 쿼럼 센싱 시스템은 *A. 바우만니*에서 동정된 AbaI 및 AbaR로 구성된다 (비특허문헌 17 참조). 비록 AbaR의 역할이 아직 분석되지 않았지만, AbaI가 *A. 바우만니*의 생물막 형성과 운동능에 중요한 역할을 한다는 것은 주목할만하다 (비특허문헌 5, 7 참조). 본 발명자들은 *A. 노소코미알리스* ATCC 17903 유전체 서열 상의 LuxI-형 단백질, AnoI, 및 LuxR-형 단백질, AnoR로 구성된 쿼럼 센싱 시스템을 *A. 바우만니* AbaI 및 AbaR과의 상동성을 이용해 확인하였다 (도 1 참조). 본 발명에서는 OH-dDHL이 *A. 노소코미알리스*에 의해 생성되는 쿼럼 센싱 신호이고, 그리고 AnoI이 OH-dDHL의 생성에 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀내었다 (도 2 참조).

[0104] *lux* 상자는 보존된 조절 서열을 나타내며, LuxR-형 단백질 및 AHL들에 의한 목표 유전자의 직접적이니 쿼럼 센싱 조절과 일치한다 (비특허문헌 20 참조). *lux* 상자의 컨센서스 서열은 *Vibrio fischeri* 및 *P. aeruginosa*에서 잘 분석되어 있다. *lux* 상자는 회귀성 서열을 가지는 RNSTGYAXGATNXTRCASRT (N = A, T, C, 또는 G; R = A 또는 G; S = C 또는 G; Y = T 또는 C; X = N 또는 갭)의 20 bp의 컨센서스 서열로 밝혀졌다 (비특허문헌 2, 9 참조). 추정되는 AbaR의 DNA 결합 부위인 추정되는 *lux* 상자(CTGTAAATTCTTACAG)는 *A. 바우만니*의 *abaI*의 상류 지역에서 발견되었다 (비특허문헌 17 참조). 본 발명자들은 회귀성의 *lux*-상자 유사 서열(ACCTGTAAATTTTTACAGTT)이 *A. 노소코미알리스*의 *anoI*의 추정되는 프로모터 지역에 위치하는 것을 발견하였다. 본 연구는 *anoI*이 AnoR에 의해 양성적으로 조절되는 것을 밝혀내었다 (도 3 참조). AnoR은 추정되는 *lux* 상자에 직접적으로 결합함으로써 *anoI*에 대해 그 효과를 나타내는 것으로 추정된다. 게다가, 본 발명에서는 AnoR이 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성 및 운동능에 필요하다는 것을 보여준다 (도 4 참조). 녹농균(Pseudomonas aeruginosa)은 그의 표면 운동능을 통해 생물막을 형성하며, 이에 의해 세균은 표면상에서 연속적으로 움직일 수 있고, 분열하고, 그리고 균일한 생물막을 형성한다 (비특허문헌 24 참조). 따라서 *anoR* 유전자의 돌연변이가 *A. 노소코미알리스*의 표면 운동능과 관련된 유전자의 발현을 억제함으로써 생물막 형성을 감소시키는 것이 가능하다. 따라서, AnoR-의존성 쿼럼 센싱 조절 네트워크를 통한 표면 운동능은 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성에 중요한 역할을 할 수 있다.

[0105] 쿼럼 센싱의 차단은 세균의 발병을 저해하는 항생 치료적 접근이다 (비특허문헌 22 참조). 본 발명에서, 본 발명자들은 *anoR*의 발현이 버스타틴에 의해 감소되었고, 이에 따라 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성과 운동능이 감소되었음을 발견하였다 (도 5 참조). 버스타틴은, 콜레라 독소의 발현을 유도하는 전사 요소인 ToxT의 이량체화를 저해하는 것으로 알려져 있다 (비특허문헌 12 참조). 따라서 버스타틴은 *anoR*의 발현에 필요한 전사 요소들 중 하나를 방해함으로써 *anoR*의 발현을 저감시키는 것도 가능하다. 따라서, *anoR* 발현에 대한 버스타틴의 효과를 설명하기 위해 *anoR* 발현의 조절 메커니즘의 연구가 필요하다. 버스타틴과 관련된 유도체들을 이용한 추가적인 스크리닝 또한, *A. 노소코미알리스*의 쿼럼 센싱 시스템의 더욱 효과적인 저해제들의 개발에 필요하다.

[0106] 결론적으로, 본 발명은 AnoI가 *A. 노소코미알리스*의 쿼럼 센싱 신호인 OH-dDHL의 생성에 요구된다는 것을 밝혀내었다. AnoR은 *anoI*의 발현 필수적이며, *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성 및 운동능에 필요하다. 마지막으로, 버스타틴은 *anoR*의 발현을 저해하는 소분자이다.

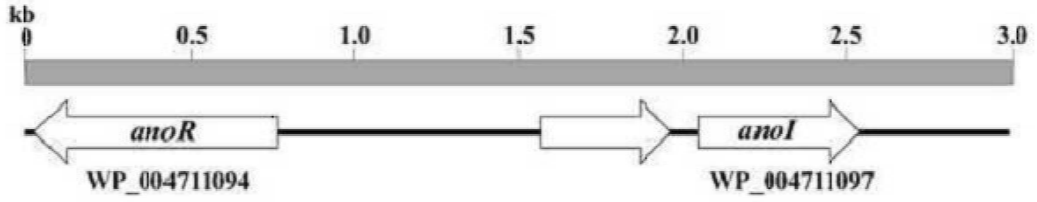
[0107] 따라서, 복합된 결과들은 AnoIR이 *A. 노소코미알리스*의 생물막 형성과 운동능에 중요한 역할을 하는 쿼럼 센싱

시스템이라는 것을 시사하며 버스타틴과 관련된 유도체들이 항생 치료제의 개발에 사용될 수 있을 것이다.

[0109] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

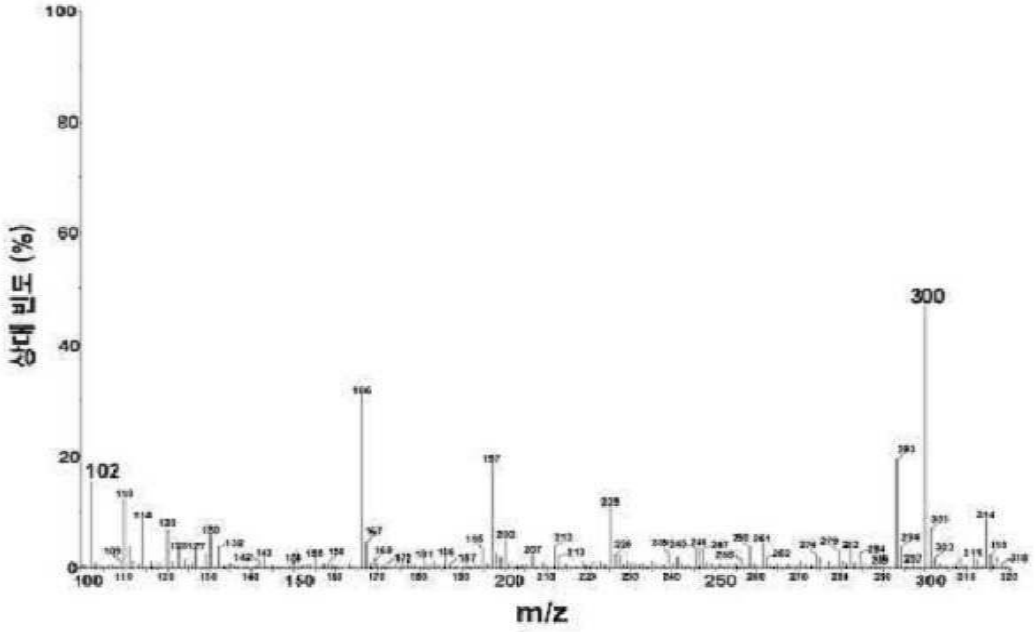
도면1a



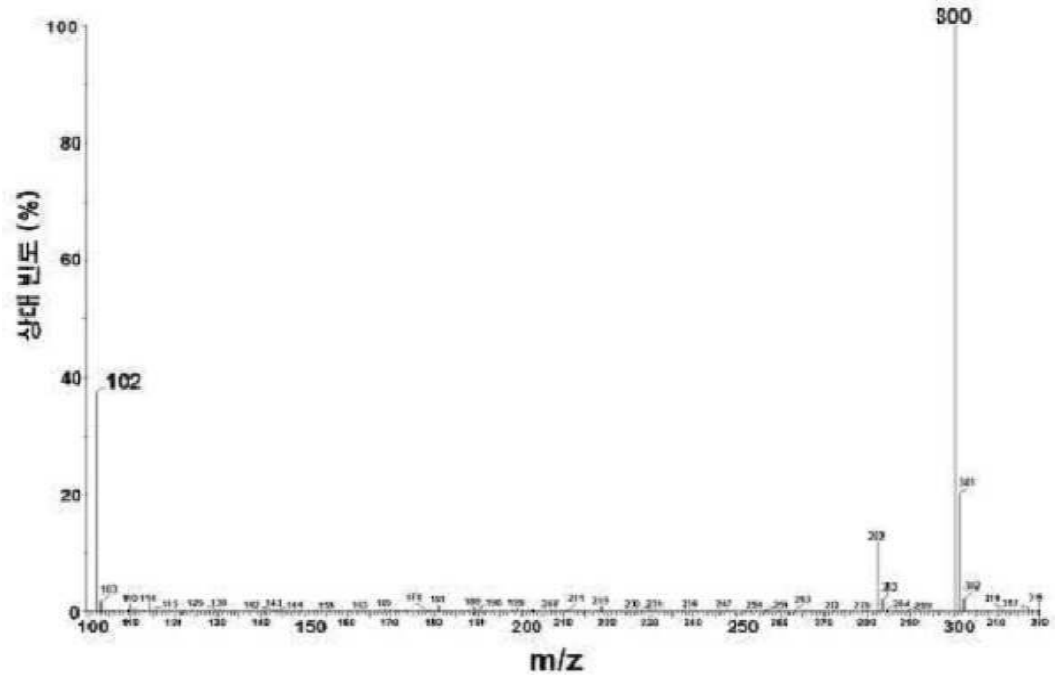
도면1b



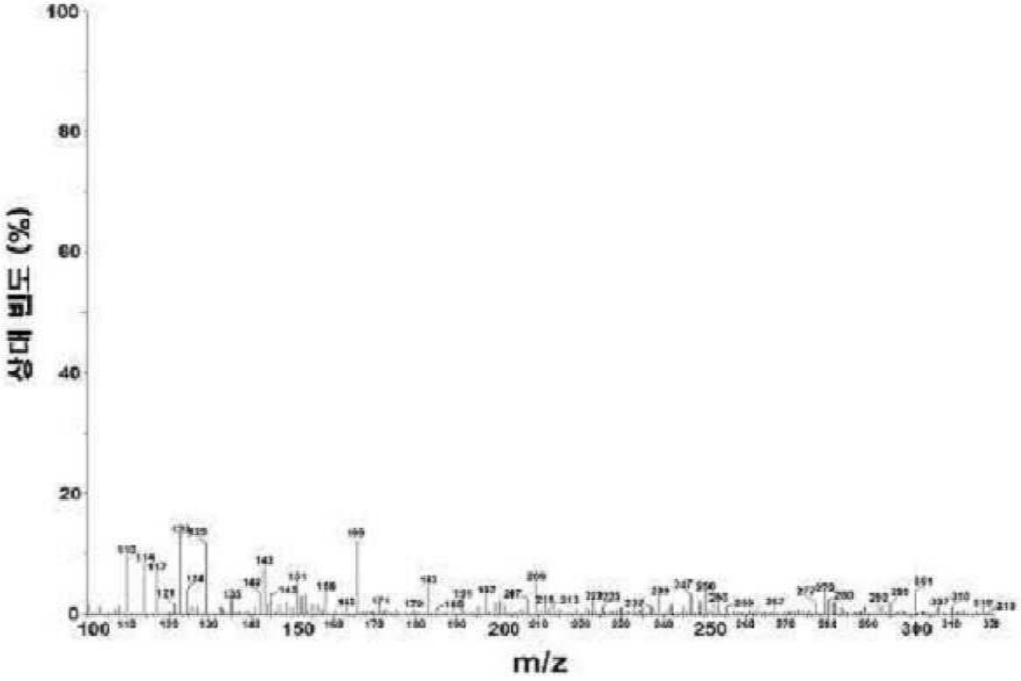
도면2a



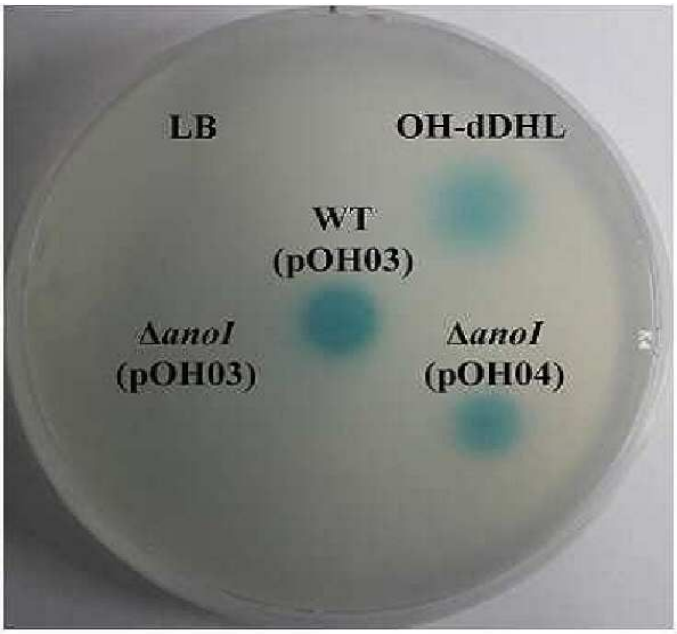
도면2b



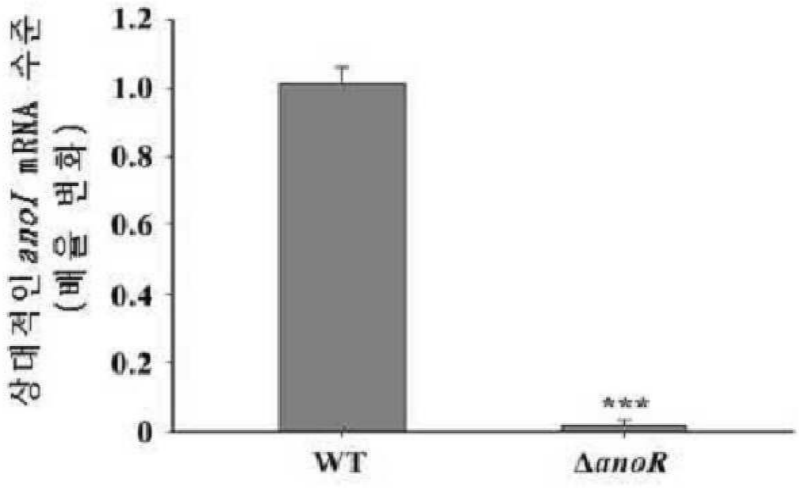
도면2c


100
80
60
40
20
0
상대 비도 (%)
100
150
200
250
300
m/z

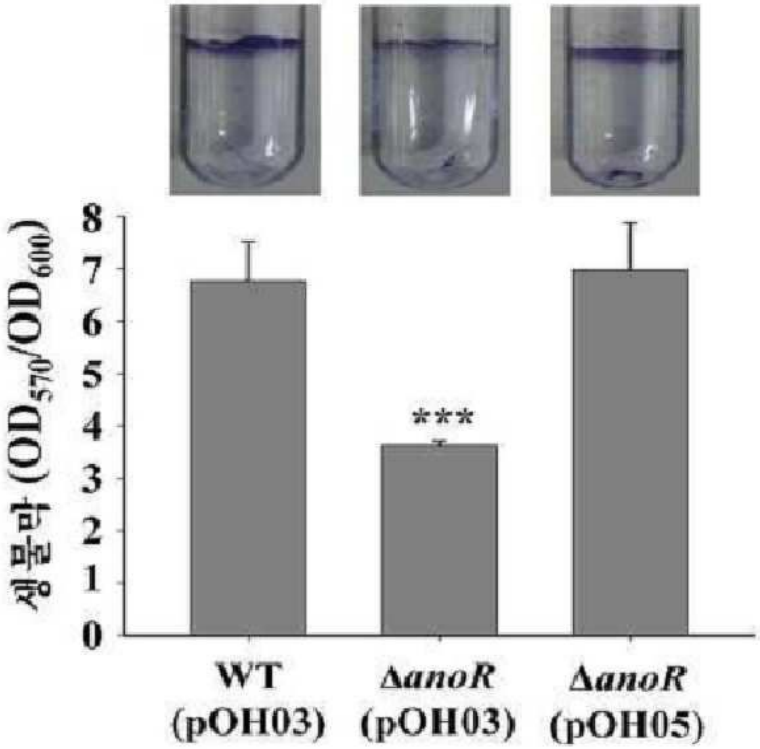
도면2d


LB
OH-dDHL
WT
(pOH03)
ΔanoI
(pOH03)
ΔanoI
(pOH04)

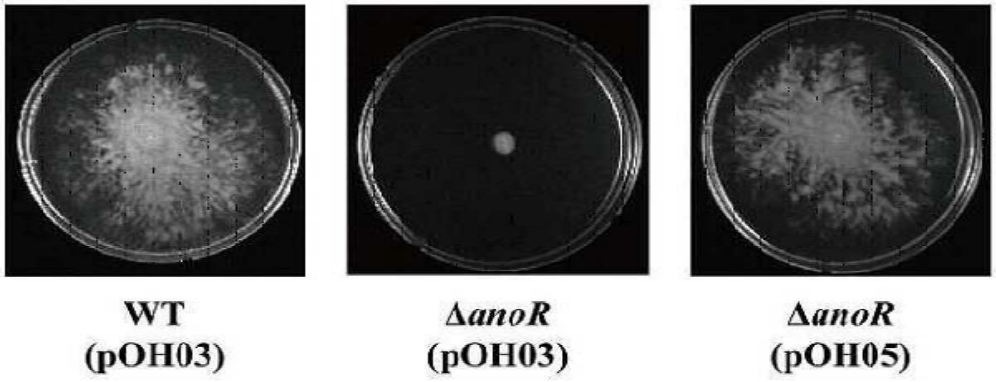
도면3


상대적인 anoI mRNA 수준
(배율 변화)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
WT
ΔanoR

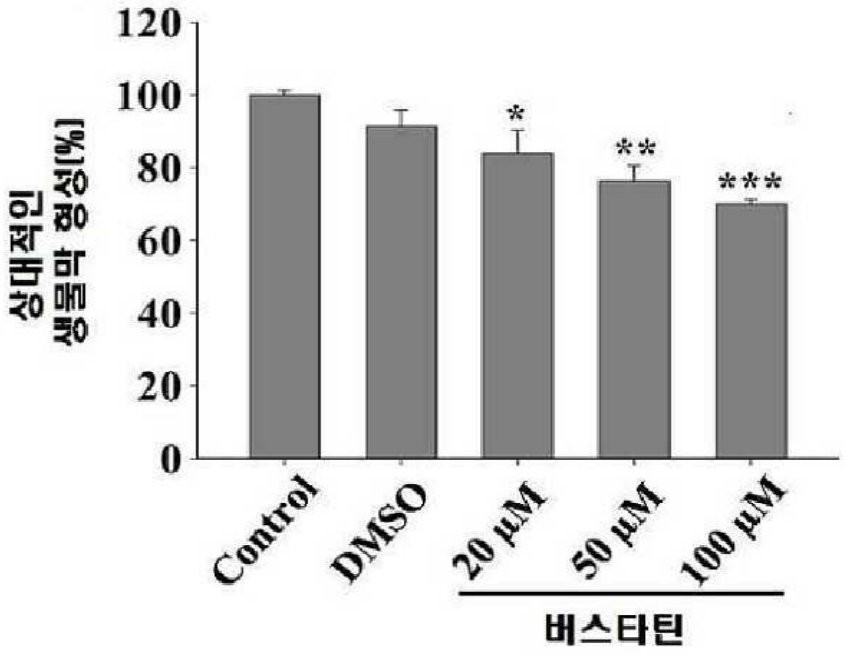
도면4a


생물막 (OD570/OD600)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
***
WT
(pOH03)
ΔanoR
(pOH03)
ΔanoR
(pOH05)

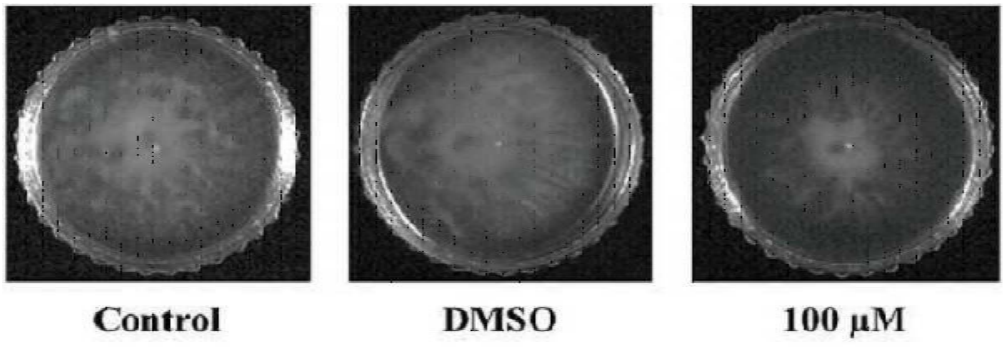
도면4b



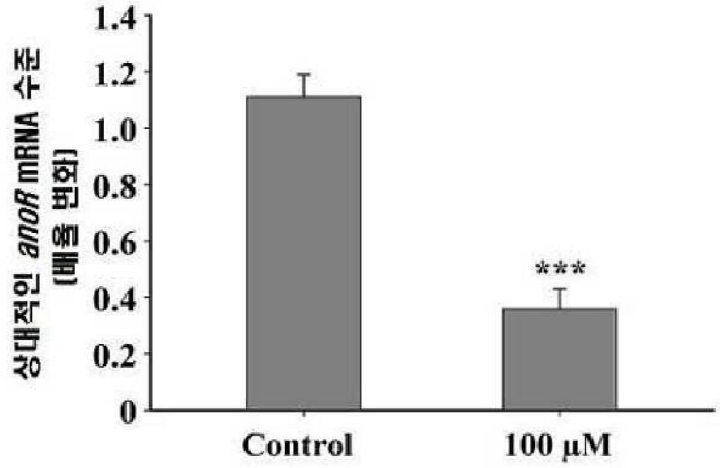
도면5a



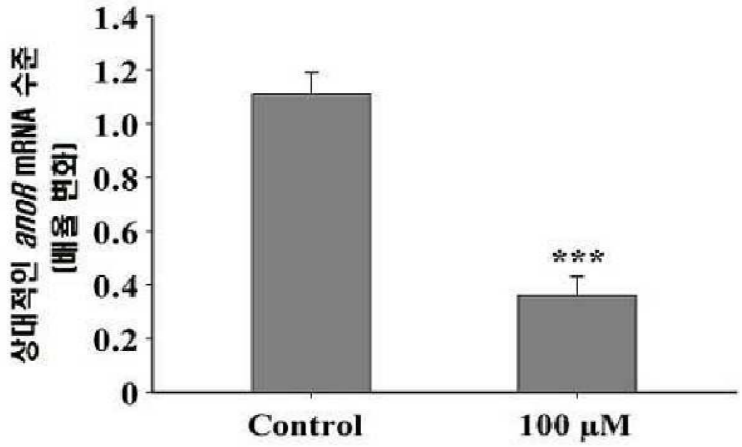
도면5b



도면5c



도면5d



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Method for inhibiting biofilm formation and surface motility of A. nosocomialis and method for screening agent for inhibiting biofilm formation and surface motility of A. nosocomialis

<130> P16038

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 183

<212> PRT

<213> Acinetobacter sp.

<400> 1

Met Asn Ile Ile Ala Gly Phe Gln Asn Asn Phe Ser Glu Gly Leu Tyr

1 5 10 15

Ser Lys Phe Lys Ser Tyr Arg Tyr Lys Val Phe Val Glu His Leu Gly
20 25 30
Trp Glu Leu Asn Cys Pro His Asn Glu Glu Leu Asp Gln Phe Asp Lys
35 40 45
Val Asp Thr Ala Tyr Val Val Ala Gln Asp Arg Asp Ser Asn Ile Ile
50 55 60
Gly Cys Ala Arg Leu Leu Pro Thr Thr Gln Pro Tyr Leu Leu Gly Glu
65 70 75 80
Ile Phe Pro Gln Leu Leu Asn Gly Ile Pro Leu Pro Cys Ser Pro Glu

85 90 95
Ile Trp Glu Leu Ser Arg Phe Ser Ala Val Asp Phe Ser Asn Pro Pro
100 105 110
Thr Thr Val Ser Gln Ala Val Ser Ser Pro Val Ser Ile Ala Ile Leu
115 120 125
Gln Glu Ala Ile Asn Phe Ala Arg Glu Gln Gly Ala Lys Gln Leu Ile
130 135 140
Thr Thr Ser Pro Leu Gly Val Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ala Gly Phe
145 150 155 160

Arg Ala His Arg Ala Gly Pro Pro Met Thr Ile Asp Gly Tyr Ser Met
165 170 175
Phe Ala Cys Leu Ile Asp Val
180

<210> 2
<211> 238
<212> PRT
<213> Acinetobacter sp.
<400> 2

Met Glu Ser Trp Gln Glu Asp Leu Leu Ser Ala Phe Leu Val Val Lys
1 5 10 15
Asn Glu Asp Glu Leu Phe Glu Val Val Lys Ser Thr Ala Ser Lys Leu

20 25 30

Gly Phe Asp Tyr Cys Ala Tyr Gly Met Gln Ser Pro Leu Ser Ile Ala
35 40 45
Glu Pro Lys Thr Ile Met Leu Asn Asn Tyr Pro Gln Ala Trp Gln Lys
50 55 60
Arg Tyr Ile Glu Gln Arg Tyr Val Lys Val Asp Pro Thr Val Gln His
65 70 75 80
Cys Met Val Ser Leu Gln Pro Leu Val Trp Ser Ser Gln Asn Ala Lys
85 90 95
Thr Gln Glu Glu Lys Asp Phe Trp Glu Glu Ala Arg Ser Tyr Gly Leu

100 105 110
Asn Val Gly Trp Ala Gln Ser Ser Arg Asp Phe Ile Gly Thr Arg Gly
115 120 125
Met Leu Thr Leu Ala Arg Ser Thr Asp Gln Leu Ser Glu Lys Glu Gln
130 135 140
Lys Ala Gln Tyr Thr Asn Met Tyr Trp Leu Thr Gln Thr Val His Ser
145 150 155 160
Ser Ile Ala Lys Ile Val Asn Asp Val Glu Phe Ser Gln Phe Asn Leu
165 170 175

Tyr Leu Thr Asn Arg Glu Lys Glu Ala Leu Arg Trp Thr Ala Glu Gly
180 185 190
Lys Thr Ser Ala Glu Ile Ala Gln Ile Ile Gly Val Thr Glu Arg Thr
195 200 205
Val Asn Phe His Leu Cys Asn Ser Met Gln Lys Leu Asn Val Asn Asn
210 215 220
Lys Ile Ser Ala Ala Ile Arg Ala Val Met Leu Gly Leu Leu
225 230 235
<210> 3
<211> 129
<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 3

Met Ala Gln Asp Arg Glu Ser Asn Ile Ile Gly Cys Ala Arg Leu Leu
1 5 10 15

Pro Thr Thr Gln Pro Tyr Leu Leu Gly Glu Ile Phe Pro Gln Leu Leu
20 25 30

Asn Gly Met Pro Ile Pro Cys Ser Pro Glu Ile Trp Glu Leu Ser Arg
35 40 45

Phe Ser Ala Val Asp Phe Ser Asn Pro Pro Ser Ser Ser Ser Gln Ala
50 55 60

Val Ser Ser Pro Val Ser Ile Ala Ile Leu Gln Glu Ala Ile Asn Phe
65 70 75 80

Ala Arg Glu Gln Gly Ala Lys Gln Leu Ile Thr Thr Ser Pro Leu Gly
85 90 95

Val Glu Arg Leu Leu Arg Ala Ala Gly Phe Arg Ala His Arg Ala Gly
100 105 110

Pro Pro Met Thr Ile Asp Gly Tyr Ser Met Phe Ala Cys Leu Ile Asp
115 120 125

Ile

<210> 4

<211> 198

<212> PRT

<213> Acinetobacter baumannii

<400> 4

Met Gln Ser Pro Leu Ser Ile Ala Glu Pro Lys Thr Ile Met Leu Asn
1 5 10 15

Asn Tyr Pro Glu Ala Trp Gln Lys Arg Tyr Val Glu Arg Gln Tyr Val
20 25 30

Lys Ile Asp Pro Thr Val Gln His Cys Met Val Ser Leu Gln Pro Leu
35 40 45

Val Trp Ser Ser Gln Ser Ala Lys Thr Gln Ala Glu Lys Asp Phe Trp

50 55 60

Glu Glu Ala Arg Ser Tyr Gly Leu Asn Val Gly Trp Ala Gln Ser Ser
65 70 75 80
Arg Asp Phe Ile Gly Thr Arg Gly Met Leu Thr Leu Ala Arg Ser Asn
85 90 95
Asp Gln Leu Ser Glu Lys Glu Gln Lys Ala Gln Tyr Thr Asn Met Tyr
100 105 110
Trp Leu Thr Gln Thr Val His Ser Ser Ile Ala Lys Ile Val Asn Asp
115 120 125

Val Glu Phe Ala Lys Phe Asn Leu Tyr Leu Thr Asn Arg Glu Lys Glu
130 135 140
Ala Leu Arg Trp Thr Ala Glu Gly Lys Thr Ser Ala Glu Ile Ala Gln
145 150 155 160
Ile Leu Gly Val Thr Glu Arg Thr Val Asn Phe His Leu Ser Asn Ser
165 170 175
Met Gln Lys Leu Asn Val Asn Asn Lys Ile Ser Ala Ala Ile Arg Ala
180 185 190
Val Met Leu Gly Leu Leu

195