



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월26일  
(11) 등록번호 10-2004153  
(24) 등록일자 2019년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/435 (2006.01) A01N 63/00 (2017.01)  
A23K 20/147 (2016.01) A23K 20/195 (2016.01)  
A23K 50/80 (2016.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/43504 (2013.01)  
A01N 63/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0080757  
(22) 출원일자 2018년07월11일  
심사청구일자 2018년07월11일
- (56) 선행기술조사문헌  
Kor J Fish Aquat Sci 44(5), 478-483, 2011  
인터넷 더 피쉬  
사이트(www.thefishsite.com)(2013.09.17.)  
A Tasiemski, Antimicrobial peptides in  
annelids, ISJ 5: 75-82 (2008.)  
KR101802245 B1

- (73) 특허권자  
경상대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자  
박찬일  
경상남도 통영시 광도면 죽림2로 31, 305동 601호  
배진술  
부산광역시 남구 수영로 345, 108동 3403호(대연  
동, 대연힐스테이트푸르지오)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
최규환

전체 청구항 수 : 총 11 항

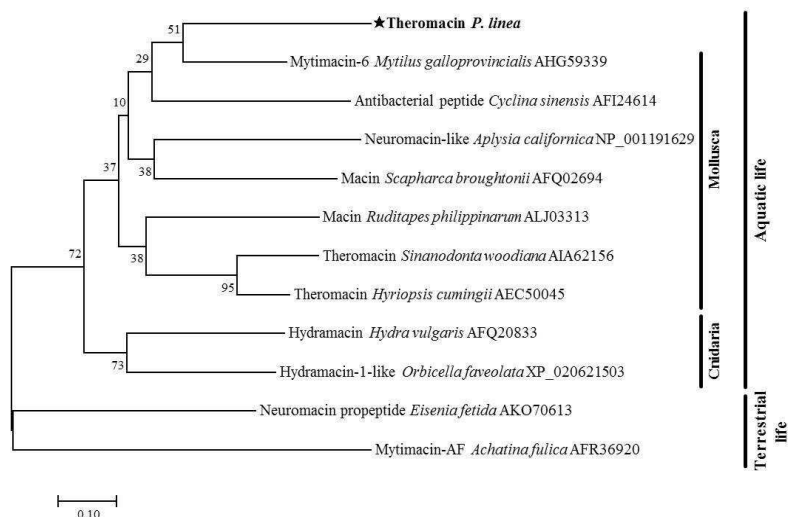
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 갯지렁이 유래의 신규한 더로마신 펩티드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 갯지렁이(*Perinereis lineae*) 유래의 항균 펩티드, 상기 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제조합 벡터, 상기 제조합 벡터로 형질 전환된 숙주세포, 상기 제조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 항균 펩티드를 생산하는 방법, 상기 방법에 의해 생산된 항균 펩티드, 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물 및 어류용 사료첨가제에 관한 것으로, 본 발명의 항균 펩티드는 어류에 대한 항생제 대체 물질로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

**A23K 20/147** (2016.05)

**A23K 20/195** (2016.05)

**A23K 50/80** (2016.05)

(72) 발명자

**소윤조**

전라북도 전주시 완산구 홍산로 390, 101동 301호  
(효자동3가, 서부신시가지아이파크아파트)

**조성환**

부산광역시 부산진구 신천대로 246, 101동 2301호  
(부암동, 메리움아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20150284

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 갯지렁이를 활용한 사료첨가제용 항균펩타이드 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2015.06.01 ~ 2018.05.31

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 갯지렁이(*Perinereis linea*) 유래의 항균 펩티드.

#### 청구항 2

제1항의 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

#### 청구항 4

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

#### 청구항 5

제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

#### 청구항 6

제4항의 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 과발현시키는 단계를 포함하는 항균 펩티드의 생산방법.

#### 청구항 7

제6항의 방법에 의해 생산된 항균 펩티드.

#### 청구항 8

제1항 또는 제7항의 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 조성물은 그람 양성균 및 그람 음성균에 대하여 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 어류용 항균 조성물.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 상기 그람 양성균은 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*)이며, 그람 음성균은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*), 비브리오 알지놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*), 비브리오 캠벨리(*V. campbellii*), 비브리오 하베이(*V. harveyi*) 및 비브리오 오르달리(*V. ordalii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 어류용 항균 조성물.

#### 청구항 11

제1항 또는 제7항의 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제.

## 발명의 설명

### 기술 분야

본 발명은 갯지렁이 유래의 신규한 더로마신 펩티드 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 그람 양성균 및 그람 음성균에 대한 항균활성이 있는 갯지렁이 유래의 신규한 더로마신 펩티드에 관한 것이다.

[0001]

## 배경 기술

- [0002] 오늘날 양식업은 가장 급속히 성장하는 수산업의 한 분야로서 급증하는 수산물의 수요에 따라 세계적으로 경제적 중요성이 인정되고 있다. 우리나라는 삼면이 바다로 이루어져 연안의 거의 모든 면적이 양식업으로 이용되고 있으며, 양식어는 밀도가 높은 사육이나 수질의 악화 등에 의해 면역력이 저하되므로 세균이나 기생충 등의 감염을 받기 쉬운 환경에 처해 있는 경우가 많다.
- [0003] 이러한 전염성 질병을 막기 위해 지금까지 다수의 항생제가 사용되어왔지만, 항생제의 오남용에 의하여 기존의 항생제에 대해 저항성을 가지는 항생제 내성 균주의 출현은 양식 어류를 위협하는 가장 심각한 문제의 하나로 대두되고 있고, 더욱 심각한 사실은 병원체의 항생제에 대한 내성을 획득하게 되는 능력 및 속도가 새로운 항생제 개발의 속도를 훨씬 앞지르고 있다는 것이다. 게다가 항생제의 사용은 어체 내 항생제 잔류에 의한 식품 위생상의 문제 및 환경으로의 확산에 의한 공중위생상의 문제를 내포하고 있으며, 항생제로는 치료할 수 없는 바이러스성 질병이 만연하여 대량폐사와 같은 심각한 사태가 발생하여 질병 감염의 문제가 더욱 심화되고 있다. 따라서 기존의 항생제와는 다른 새로운 항생물질의 탐색 및 개발이 필수적이며, 이에 대한 대안으로 자연계에 존재하는 생명체들의 선천방어 기작 중 하나인 항균 펩티드(antimicrobial peptides, AMPs)가 많은 관심을 받고 있다. 항균 펩티드는 약 30년 전에 곤충에서 발견되었으며, 항균 펩티드 데이터베이스(<http://aps.unmc.edu/AP/>)에서 그 수가 급격히 늘어나고 있는 추세이다.
- [0004] 경골 어류(teleosts)에 있어서, 후천 면역 시스템은 선천 면역 시스템만큼 잘 발달되어 있지 않은데, 이는 어류에 있어서 병원체에 대항하기 위해 선천 면역 시스템이 중요함을 의미한다. 항균 펩티드는 기존의 항생제에 저항성을 가지는 균주의 문제를 완화할 수 있는 새로운 항생제 대체물질로 기대되고 있는데, 이는 항균 펩티드가 기회감염균(opportunistic pathogen)으로부터 어류를 보호하는데 있어서 중요한 역할을 하며 선천 면역에서 강력한 무기로 작용하기 때문이다.
- [0005] 한편, 한국공개특허 제2014-0115774호에는 "지렁이에서 분리한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항균용 또는 항진균용 조성물"을 개시하고 있으나, 본원 발명의 신규한 더로마신 펩티드와 아미노산 서열 상동성이 매우 낮으며, 한국등록특허 제1660259호에는 돌돔 유래의 피스시딘에 관한 "돌돔 유래의 새로운 항미생물 펩티드 및 이의 용도"가 개시되어 있으나, 본원 발명의 갯지렁이 유래의 신규한 더로마신 펩티드 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 면역유도물질인 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래의 펩티도글리칸으로 자극시킨 갯지렁이(*Perinereis lineata*)로부터 신규한 항균 펩티드인 더로마신(theromacin) 펩티드를 동정하였고, 동정된 더로마신 펩티드의 마신 도메인 영역을 기초로 하여 합성 펩티드를 제작하여 항균활성 및 숙주의 적혈구에 대한 세포독성을 확인한 결과, 본 발명의 갯지렁이 유래의 더로마신 펩티드(PITM)가 그람 양성균 및 그람 음성균에 대해 항균활성을 나타내며, 숙주의 적혈구에 대해서는 약한 용혈활성을 나타내는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 갯지렁이(*Perinereis lineata*) 유래의 항균 펩티드를 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 단계를 포함하는 항균 펩티드의 생산방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 항균 펩티드를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제를 제공한다.

### 발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 갯지렁이 유래의 신규한 항균 펩티드는 다양한 어류 병원균에 대해 우수한 항균활성을 가질 뿐만 아니라, 숙주세포에 대한 세포독성은 거의 나타내지 않기 때문에, 어류의 기존 항생제 대체 물질로 사용하거나, 양식 어류에 대한 사료첨가제 등으로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 갯지렁이 체내에 8종의 면역유도 물질들을 주사하였을 때, 기존에 알려진 갯지렁이(*P. lineae*) 유래 항균 펩티드 아레니신-1(Arenicin-1)의 전사체 발현 수준을 분석한 결과이다. 1은 바실러스 서틸리스(*Bacillus subtilis*) 유래의 펩티도글리칸이며, 2는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 유래의 펩티도글리칸이며, 3은 메타노박테리움 속(*Methanobacterium* sp.) 유래의 펩티도글리칸이며, 4는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 유래의 펩티도글리칸이며, 5는 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.) 유래의 펩티도글리칸이며, 6은 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래의 펩티도글리칸이며, 7은 새우 껍질 유래의 키토산이며, 8은 게 껍질 유래의 키토산이며, ACT는 아세트산이다.

도 2는 SWISS 모델을 사용하여 더로마신(theromacin) 펩티드의 마신 도메인(macin domain)의 삼차원 구조를 예측한 그림이다.

도 3은 마신 패밀리 단백질의 계통발생을 분석한 그림이다.

도 4는 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 8종의 면역유도 물질로 각각 자극시킨 갯지렁이의 조직에서 더로마신의 mRNA 발현 수준을 분석한 결과이다. 1은 바실러스 서틸리스 유래의 펩티도글리칸이며, 2는 스태필로코커스 아우레우스 유래의 펩티도글리칸이며, 3은 메타노박테리움 속 유래의 펩티도글리칸이며, 4는 사카로마이세스 세레비지애 유래의 펩티도글리칸이며, 5는 스트렙토마이세스 속 유래의 펩티도글리칸이며, 6은 마이크로코커스 루테우스 유래의 펩티도글리칸이며, 7은 새우 껍질 유래의 키토산이며, 8은 게 껍질 유래의 키토산이며, ACT는 아세트산이다.

도 5는 넙치 적혈구에 대한 더로마신(sPITM) 펩티드의 용혈활성을 분석한 결과이다. 용혈의 비율은 0.2% Triton X-100을 처리한 적혈구 현탁액으로부터 수득한 용혈 수준에 대한 상대값으로 정의하였다. Vehicle은 더로마신 대신에 PBS를 처리한 대조군이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 갯지렁이(*Perinereis lineae*) 유래의 항균 펩티드를 제공한다.

[0018] 본 발명자는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 갯지렁이 유래의 더로마신(theromacin) 펩티드를 동정하여 이를 PITM(*Perinereis lineae* theromacin)으로 명명하였다.

[0019] 본 발명에 따른 갯지렁이 유래의 항균 펩티드의 범위는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 더로마신 펩티드 및 상기 펩티드의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩티드를 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 항균 활성을 의미한다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 상기 항균 펩티드를 코딩하는 DNA 또는 RNA일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 또는 인위적인 합성 DNA를 포함하며, DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다.

[0021] 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일

부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다. 본 발명의 서열번호 2의 염기서열은 전장의 더로마신 캡티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0023] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 가지는 것이다. 진핵세포에서 이용가능한 번역 조절 요소인 인핸서(enhancer), 리보솜 결합 부위, 종결신호, 폴리아데닐레이션 신호 및 프로모터는 당업계에 공지되어 있다. 상기 발현 벡터는 당업계에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부의 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, pL $\lambda$ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*E. coli*)이 이용되는 경우, 대장균의 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파지( $\lambda$ )의 좌향 프로모터(pL $\lambda$ 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0025] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예:  $\lambda$ gt4 $\cdot$  $\lambda$ B,  $\lambda$ -Charon,  $\lambda$   $\Delta$ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다. 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0026] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카바페넴, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0028] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 대장균(*E. coli*) JM109, 대장균 BL21, 대장균 RR1, 대장균 LE392, 대장균 B, 대장균 X1776, 대장균 W3110, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 쉼린젠시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 사람 세포(예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl<sub>2</sub> 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)) 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-

9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

- [0031] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 과 발현하는 단계를 포함하는 항균 펩티드의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 항균 펩티드를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 항균 펩티드를 생산하는 방법은 형질전환체를 공지된 기술을 이용하여 재조합 단백질(펩티드)의 생산에 적합한 배지에서 배양한다. 예를 들어, 세포들은 적합한 배지와 단백질이 발현 및/또는 분리되는 것을 허용하는 조건 하에 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 또는 대규모 발효, 셰이크 플라스크 배양에 의해 배양될 수 있다. 배양은 공지기술을 사용하여 탄소, 질소원 및 무기염을 포함하는 적합한 배지에서 일어난다. 적합한 배지는 상업적으로 입수하거나 예를 들면, ATCC(American Type Culture Collection)의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있다.
- [0033] 상기 생산 방법에서는 목적 유전자에 의해 발현된 단백질(펩티드)을 당업계에 공지된 단백질 분리방법을 이용하여 회수할 수 있다. 예를 들어 단백질은 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 영양배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 나아가 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하여 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 상기 항균 펩티드는 전술한 바와 같으며, 그람 양성균 또는 그람 음성균 등의 세균에 대한 생육 저해 활성을 가진 항균 펩티드이다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물을 제공한다.
- [0036] 상기 항균 조성물은 어류용 항균 조성물로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] "항균(antimicrobial)"의 의미는 어떤 농도에서 미생물의 성장 또는 생존을 감소, 방지, 억제, 또는 제거하는 능력을 의미하며, 바람직하게는 항세균(anti-bacterial)을 의미할 수 있으며, 상기 세균은 그람 양성균 또는 그람 음성균일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 항균 펩티드가 항균 활성을 보이는 그람 양성균 또는 그람 음성균은 이에 제한하지 않으나, 그람 양성균은 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*)이고, 그람 음성균은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*), 비브리오 알지놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*), 비브리오 캠펠리(*V. campbellii*), 비브리오 하베이(*V. harveyi*) 및 비브리오 오르달리(*V. ordalii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제를 제공한다.
- [0040] 상기 사료첨가제는 바람직하게는 면역증강용이며, 어류용 사료첨가제로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 사료첨가제에는 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소, 다른 생균 형태의 미생물 제제 등과 같은 보조제 성분; 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분; 지질, 예를 들면 가열에 의해 임의로 액화시킨 동물성 지방 및 식물성 지방 등과 같은 주성분; 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제, 질병 예방제와 같은 첨가제가 추가로 포함될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 사료첨가제는 분말 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료 첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 사료 첨가용 부형제로는 예를 들어, 탄산칼슘, 말분, 제올라이트, 육분 또는 미강 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 사료첨가제는 하나 이상의 효소 제제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어 리파제와 같은 지방 분해 효소, 피틴산(phytic acid)을 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코젠 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합( $\alpha$ -1,4-glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제, 유기인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 말토오스를 두 분자의 글루코스로 가수분해하는 말타제 및 사카로스를 가수분해하여 글루코스-프룩토스 혼합물을 만드는 전환효소 등을 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 사료첨가제는 어류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 또한, 상기 사료 첨가용 조성물에는 탭 드레싱으로서 또는 이들을 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료

와 별도로, 별도의 경구 제형으로, 또는 다른 성분과 조합하여 쉽게 투여할 수 있다. 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

실험에 사용된 두토막눈썹갯지렁이(*Perinereis line*a)는 중국 산둥 동양시 인근의 양식장으로부터 수입된 것을 블루오션피아(주) (Jeonnam, South Korea)를 통해 구입하여 사용하였다.

### 2. 면역유도

면역유도제로는 하기 표 1에 개시한 바와 같이 6종의 펩티도글리칸(Peptidoglycan, PGN)과 2종의 키토산(Chitosan)(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며, 각 면역유도제는 제조회사의 프로토콜에 따라 적절한 용매에 용해시켜 1mg/L이 되도록 준비하였으며 실험에 사용하기 전까지 -20℃에서 보관하였다. 용해된 각 면역유도제는 개체당 100μl(0.1μg/worm)가 주입되도록 갯지렁이의 몸의 3~4군데로 분할하여 주사하였다. 대조구는 면역유도제 용해시 사용한 용매만을 100μl/worm 주사한 것으로 하였다. 각 면역유도제(실험구)와 용매 대조구는 개체수를 5마리로 하였으며, 각 실험구와 대조구는 3회씩 반복 수행하였다. 주사된 갯지렁이(*P. line*a)는 멸균된 PBS를 적신 톱밥 위에 18℃에서 18시간 동안 방치하여 체내에서 항균 펩티드(AMPs)를 합성하도록 유도하였다.

표 1

본 발명에 사용된 면역유도제

| No. | 성분     | 유래                                                   | 용매                                              |
|-----|--------|------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| 1   | 펩티도글리칸 | 바실러스 서틸리스<br>( <i>Bacillus subtilis</i> )            | PBS<br>(Biosesang, Seongnam,<br>South Korea)    |
| 2   |        | 스타필로코커스 아우레우스<br>( <i>Staphylococcus aureus</i> )    |                                                 |
| 3   |        | 메타노박테리움 속( <i>Methanobacterium</i> sp.)              |                                                 |
| 4   |        | 사카로마이에스 세레비지애<br>( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) |                                                 |
| 5   |        | 스트렙토마이세스 속( <i>Streptomyces</i> sp.)                 |                                                 |
| 6   |        | 마이크로코커스 루테우스<br>( <i>Micrococcus luteus</i> )        |                                                 |
| 7   | 키토산    | 새우(Shrimp)                                           | 0.1 M 아세트산<br>(Kanto Chemical,<br>Tokyo, Japan) |
| 8   |        | 게(Crab)                                              |                                                 |

### 3. 분자적 특성 분석

최적 면역유도제인 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래의 펩티도글리칸으로 자극시킨 갯지렁이의 조직으로부터 분리한 mRNA를 이용하여 차세대시퀀싱(next generation sequencing) 분석을 수행하고, 이로부터 NCBI(National Center for Biotechnology Information) BLAST 프로그램(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)과 UniProt 서비스(<http://www.uniprot.org/>)를 이용하여 갯지렁이 유래 유전자들의 기능을 확인하였고, 유전자의 주석(annotation)에 항균 활성이 있는 후보 유전자들을 선별하였고, 그 중 더로마신 유전자를 선택하였다. 뉴클레오타이드와 추론된 아미노산 서열은 GENETYX ver. 8.0 프로그램(SDC Software Development, Tokyo, Japan)과 NCBI의 BLASTX 프로그램(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 이용하여 확인하였다. 상기 갯지렁이 유래의 더로마신을 RITM(*Perinereis line*a theromacin)으로 명명하였다. 상기 펩티드에 대한 분자량(Molecular weight, MW), 등전점(Isoelectric point, pI) 및 총 전하(net charge)는 펩티드 계산기 서버(<http://www.bachem.com/service-support/peptide-calculator/>)를 이용하여 예측하였으며, 특정 도메인의 위치는 SMART(Simple Modular Architecture Research Tool)(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)로 확인하였다.

[0054] 또한, 다른 종의 마신 도메인(Macin domain)을 보존하고 있는 유전자의 멀티 시퀀스 얼라이먼트(multiple sequence alignment)와 계통발생학적 분석은 메가 버전 7 프로그램의 NJ(neighbor-joining)법으로 부스트랩 샘플링(bootstrap sampling)을 10,000번 반복 수행하였다. PITM의 마신 도메인의 삼차구조는 I-Tasser 서버(<http://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>)를 이용하여 예측하였다.

#### [0055] 4. 유전자 발현 분석

[0056] NGS 분석을 통해 동정된 갯지렁이의 유래 더로마신의 mRNA 발현을 알아보기 위해서, qRT-PCR을 수행하였다. 구체적으로, 면역이 유도된 갯지렁이로부터 내장기관이 모여 있는 머리 부분을 해부하여 샘플링하였고, TRIzol(Invitrogen, Carlsbad, USA)법으로 총 RNA를 분리하였다. DNA를 제거하기 위하여 DNase I (RNase-free)(Takara, Shiga, Japan)을 처리하였으며, 분리한 총 RNA는 나노브 분광광도계(GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden)를 이용하여 순도와 농도를 측정하였다. 첫-가닥 cDNA 합성키트(Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR은 SYBR 그린 마스터 믹스(Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 3 반복으로 수행되었으며, 이때 사용된 특이적 프라이머 세트는 이미 보고된 다른 갯지렁이류(*Arenicola* sp.)의 항균 펩티드(AMP)인 아레니신-1(Arenicin-1)의 cDNA 염기서열을 참고하여 GENETYX 버전 8.0 프로그램의 Primer3 검색을 사용하여 디자인되었다. 이때, 하우스키핑 유전자는 NGS 분석을 통해 확인한 갯지렁이(*P. lineae*)의 액틴(actin) 유전자를 사용하였다. PCR 반응물은, cDNA 주형 1 $\mu$ l, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 각각 1 $\mu$ l, SYBR 그린 12.5 $\mu$ l 및 증류수 9.5 $\mu$ l를 혼합하여 총량 25 $\mu$ l이 되도록 하였으며, 증폭 조건은 50℃에서 4분, 95℃에서 10분간 초기변성, 이후에 95℃에서 20초, 60℃에서 1분을 한 주기로 하여 총 45회 반응시켰으며, 마지막으로 95℃에서 15초, 60℃에서 30초, 95℃에서 15초 마지막 해리로 수행되었다. 모든 실험은 3 반복으로 수행되었으며, 증폭된 유전자의 Ct(Cycle threshold) 값은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었다.

### 표 2

[0057] 본 발명의 qRT-PCR에 사용된 프라이머 정보

| 프라이머 명         | 염기서열(5'→3')                   |
|----------------|-------------------------------|
| Arenicin-1 정방향 | GCCAGGGCAAATCAGTGT (서열번호 3)   |
| Arenicin-1 역방향 | GTAACGCACCAGCACACCT (서열번호 4)  |
| PITM 정방향       | AAGCTGGGCTGTCCGTACT (서열번호 5)  |
| PITM 역방향       | GGCATGGCCTAAACACTGAC (서열번호 6) |
| actin 정방향      | ATCAGGGAGTGATGGTAGGC (서열번호 7) |
| actin 역방향      | GAGGACCGGATGTTCTTCAG (서열번호 8) |

#### [0058] 5. PITM의 마신 도메인 펩티드 합성

[0059] SMART(Simple Modular Architecture Research Tool) 프로그램을 통해 예측된 PITM의 마신 도메인(Macin domain)의 아미노산 서열에 기초하여 합성 펩티드(Synthetic PITM, sPITM)를 합성하였다. 합성된 펩티드는 HPLC로 95%까지 정제하였으며, 25% 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)에 녹였으며, 사용 전까지 4℃에서 보관하였다.

#### [0060] 6. 항균활성 분석

[0061] 본 발명의 항균활성 분석에 사용된 그람 양성균은 스트렙토코쿠스 이니아(*Streptococcus iniae* FP5228)이고, 그람 음성균은 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli* JM109), 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda* FP4130), 비브리오 알지놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus* KCCM2928), 비브리오 캠펠리(*V. campbellii* KCCM40684), 비브리오 하베이(*V. harveyi* ATCC14126) 및 비브리오 오르달리(*V. ordalii* KCCM41669)이다. 상기 모든 미생물은 국립수산물과학원(NIFS, Busan, South Korea)에서 제공받았으며, 대장균(*E. coli*)을 제외한 모든 균주는 BHI(brain heart infusion) 고체 배지에서 27℃에서 12시간 이상 배양하였으며, 하나의 콜로니만을 BHI 액체배지에 순수 배양하였다. 대장균(*E. coli*)은 LB 액체배지를 이용하여 37℃에서 동일한 방법으로 순수 배양하였다. 순수배양된 세균을 1,000  $\times$ g에서 10분간 원심분리하였으며, PBS로 1회 세척한 후 540nm에서 흡광도가 0.15가 되도록 재현탁하여 MH(Mueller Hinton) 액체배지에  $10^{-3}$ 배 희석하여 준비하였다. 각 균의 농도는 약  $5 \times 10^6$  cfu/mL로 확인되었다.

[0062] 또한, sPITM 펩티드의 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해서, 배지미량희석법(broth microdilution)을 사용하여 세균 증식이 일어나지 않는 최소 농도를 측정하였다. 즉, 25% ACN에 용

해시킨 합성 펩티드 40 $\mu$ l를 96-웰 플레이트(Thermo Scientific, Roskilde, Denmark)의 첫 번째 웰에 분주하고 나머지 웰에는 20 $\mu$ l의 MH 액체배지를 분주하여 2배씩 단계 희석하였다. 다양한 농도로 희석된 sPITM 펩티드 20 $\mu$ l에 각각의 균 현탁액 80 $\mu$ l를 첨가한 후 27 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 진탕배양하였으며, 대장균(*E. coli*)의 경우 37 $^{\circ}$ C에서 동일하게 배양하였다. 이때, 대조구는 합성 펩티드를 제외한 25% ACN 용매만을 같은 방법으로 단계 희석하여 균과 혼합하고 배양한 것으로 하였다. 본 실험은 정확성을 위해 3 반복 수행되었으며, 배양 후, VICTOR3 1420 멀티라벨 카운터(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 540nm에서 흡광도의 변화를 측정하였으며, MIC의 범위는 세균의 성장이 억제되기 시작하는 펩티드의 가장 낮은 농도로 하였다.

[0063] **7. 용혈활성 분석**

[0064] 합성된 더로마신 펩티드(sPITM)의 세포 독성을 분석하기 위해, 넙치의 적혈구를 이용하여 용혈성 분석을 수행하였다. 실험에 사용된 넙치는 통영(Gyeongnam, South Korea) 인근의 시장에서 구입하였다. 적혈구를 분리하기 위해 해파린(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 처리한 주사기를 이용하여 넙치의 부정맥으로부터 2mL의 말초혈액을 채혈하였다. 채혈된 말초혈액은 700  $\times$ g에서 15 $^{\circ}$ C의 조건으로 15분 동안 원심분리하여 적혈구만을 분리하였으며, 분리한 적혈구는 PBS로 3회 세척한 후 1mL의 적혈구에 4mL의 PBS를 첨가하여 재현탁하였다.

[0065] 25% ACN에 용해시킨 합성 펩티드와 용매(대조구) 50 $\mu$ l를 96-웰 플레이트(Thermo Scientific, Roskilde, Denmark)에서 PBS로 2배씩 단계 희석하였으며, 재현탁된 넙치 적혈구 50 $\mu$ l를 각 웰에 분주한 후 알루미늄 호일로 감싸고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하였다. 이때, 음성대조구와 양성대조구는 각각 적혈구 50 $\mu$ l에 PBS(용혈 0%)와 0.2% Triton X-100(용혈 100%)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 50 $\mu$ l를 첨가한 것을 사용하였다. 배양된 플레이트는 400  $\times$ g에서 15분간 원심분리하였으며, 상층액 70 $\mu$ l를 다른 새로운 96-웰 플레이트에 옮겨 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 용혈률은 양성대조구와 비교하여 결정하였으며, 본 실험은 정확성을 위해 3회 반복 수행하였다.

[0066] **8. 통계분석**

[0067] 실험을 통해 얻어진 모든 분석의 결과값은 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며, SPSS(SPSS INC., Version 20.0) 프로그램을 이용하여 분산분석(one-way ANOVA test)을 실시하였다. *p*값이 0.05 미만일 때 대조구와 실험구간에 유의성이 있는 것으로 간주하였다(\**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01).

[0068] **실시예 1. 최적의 면역유도제 선정**

[0069] 갯지렁이(*P. lineae*)로부터 가장 많이 항균 펩티드(AMPs)를 유도할 수 있는 물질을 선정하기 위하여, 8개의 면역유도제로 갯지렁이를 면역유도하였으며, 종래 갯지렁이류(polychaetes)인 바다벌레(*Arenicola marina*)로부터 유래된 알려진 AMP인 아레니신-1(Arenicin-1)의 cDNA 발현을 qRT-PCR법을 통해 확인하여, 가장 많이 아레니신-1의 발현을 유도할 수 있는 1종의 면역유도제를 선정하였다. 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 펩티도글리칸(PGN) 1~6그룹은 대조구(PBS 주사)와 비교하여 각각 0.55, 0.28, 0.52, 0.52, 1.09 및 1.43배의 아레니신-1의 mRNA 발현을 유도하였으며, 키토산 7 및 8그룹은 대조구(0.1M의 아세트산 주사)와 비교하여 0.75 및 0.80배의 mRNA가 발현되었다. 모든 실험구와 대조구 사이에 유의적인 차이는 없었으나, 아레니신-1 유전자 발현을 가장 많이 유도한 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래의 펩티도글리칸 6(PGN 6)을 갯지렁이(*P. lineae*) 유래의 신규한 AMP 동정을 위한 면역유도제로 선정하였다.

[0070] **실시예 2. 갯지렁이 유래 더로마신의 분자적 특징 분석**

[0071] 갯지렁이 유래의 신규한 AMP는 상기 실시예 1에서 선정된 PGN6로 면역화한 갯지렁이의 조직으로부터 분리한 mRNA를 이용하여 차세대시퀀싱(next generation sequencing) 분석을 수행하고, 이로부터 NCBI BLAST 프로그램과 UniProt 서비스를 이용하여 갯지렁이 유래 유전자들의 기능을 확인하였고, 유전자의 주석(annotation)에 평균 활성이 있는 후보 유전자들 중 더로마신 유전자를 선택하였다. 갯지렁이 유래의 신규한 더로마신(Theromain)의 유전자는 312bp의 ORF(open reading frame)를 포함하며 103개의 아미노산을 코딩하는 것으로 확인되었으며, 상기 더로마신은 마신 도메인(Macin domain, K<sup>34</sup>~S<sup>90</sup>)을 보존하였다. 더로마신의 분자량은 11.4 kDa이었으며, 등전점(pI)은 9.25이었으며, SWISS 모델을 사용하여 더로마신의 마신 도메인의 삼차 구조를 예측한 결과, 2개의  $\alpha$ -나선형 구조를 가지고 있는 것으로 확인되었다(도 2). NCBI의 펩티드 시퀀스 데이터베이스에 등록되어있는 다른 종의 마신 도메인을 보존하고 있는 유전자와 PITM의 아미노산 서열을 가지고 수행된 계통발생학적 분석 결과, 수상동물(Aquatic life)과 육상동물(Terrestrial life) 그룹으로 크게 나뉘었다. 본 발명의 PITM은 수상동물의 그룹에 속해 있었으며, 계통발생학적 거리는 자포동물문(Cnidaria)보다 연체동물문(Mollusca)에 더 가까웠다(도 3).

[0072] 실시예 3. 더로마신 발현 분석

[0073] 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*) 유래의 펩티도글리칸을 처리하여 면역유도한 갯지렁이 조직에서 더로마신(Theromacin)의 mRNA 발현수준을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 상기 표 1에 개시한 바와 같이 유래가 다른 8종의 면역유도제를 처리하였을 때, PGN 4 및 6그룹에서 유의적인 차이를 나타내었으며, 특히, PGN 6그룹에서 대조구에 비해 51.89배로 가장 많이 더로마신의 발현이 유도되었으며, 키토산 7그룹에 의해서도 유전자 발현이 대조구와 비교하여 유의적인 증가를 나타내는 것을 확인하였다(도 4).

[0074] 실시예 4. 항균활성 분석

[0075] 합성된 갯지렁이 유래의 더로마신(PITM) 펩티드의 항균활성을 최소억제농도(MIC)를 통해 분석한 결과, 하기 표 3에 개시한 바와 같이 그람 양성균과 그람 음성균에 대한 상기 펩티드의 항균활성에는 다소 차이가 있는 것으로 관찰되었다. 구체적으로, sPITM 펩티드는 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 및 비브리오 하베이(*V. harveyi*)에 대해서는 MIC가 62.5 $\mu$ g/mL로 비교적 낮은 항균효과를 나타내었으며, 에스케리키아 콜라이(*E. coli*) 및 스트렙토코쿠스 이니아에(*S. iniae*)에 대해서는 각각 31.3 $\mu$ g/mL 및 31.3 $\mu$ g/mL의 MIC를 보였다. 비브리오 알지놀리티쿠스(*V. alginolyticus*) 및 비브리오 캄벨리(*V. campbellii*)에 대해서는 MIC가 각각 15.6 $\mu$ g/mL 및 7.8 $\mu$ g/mL로 비교적 항균효과가 높았으며, 특히 비브리오 오르달리(*V. ordalii*)에 대해서는 1.0 $\mu$ g/mL의 MIC로 매우 강한 항균효과를 보였다.

표 3

[0076] 다양한 병원균에 대한 sPITM 펩티드의 항균활성

| 세균                                          | 균주 No.    | 그람 | MIC ( $\mu$ g/ml) |
|---------------------------------------------|-----------|----|-------------------|
| 에스케리키아 콜라이( <i>Escherichia coli</i> )       | JM109     | 음성 | 31.3              |
| 에드워드시엘라 타르다( <i>Edwardsiella tarda</i> )    | FP4130    | 음성 | 62.5              |
| 스트렙토코쿠스 이니아에( <i>Streptococcus iniae</i> )  | FP5228    | 양성 | 31.3              |
| 비브리오 알지놀리티쿠스( <i>Vibrio alginolyticus</i> ) | KCCM2928  | 음성 | 15.6              |
| 비브리오 캄벨리( <i>V. campbellii</i> )            | KCCM40684 | 음성 | 7.8               |
| 비브리오 하베이( <i>V. harveyi</i> )               | ATCC14126 | 음성 | 62.5              |
| 비브리오 오르달리( <i>V. ordalii</i> )              | KCCM41669 | 음성 | 1.0               |

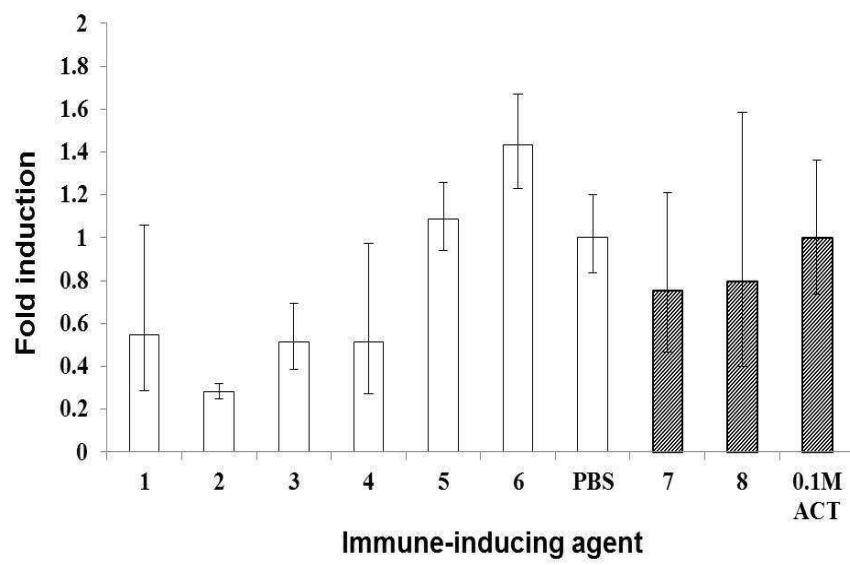
[0077] 실시예 5. 용혈활성 분석

[0078] 합성된 갯지렁이 유래의 더로마신(PITM) 펩티드의 세포독성을 분석하기 위해서 넙치 적혈구에 대한 용혈활성을 분석하였다. 그 결과, 도 5에 개시한 바와 같이 sPITM 펩티드의 용혈활성은 대조구와 비교하여 1,000~2,000 $\mu$ g/mL의 고농도에서만 강하게 나타났으며, 250 $\mu$ g/mL 이하의 농도에서는 용혈이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

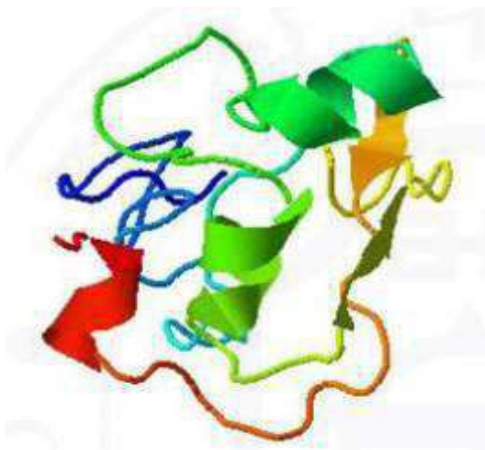
[0079] 이상의 결과들을 통해, 갯지렁이 유래의 신규한 더로마신 펩티드(PITM)는 다양한 어류 병원균에 대해 항균활성이 있으며, 세포 독성이 거의 없는 것을 알 수 있었다. 특히, 병원균에 대한 최소억제농도(MIC) 및 용혈활성 결과를 종합하면, PITM 펩티드는 비브리오 알지놀리티쿠스(*V. alginolyticus*), 비브리오 캄벨리(*V. campbellii*) 및 비브리오 오르달리(*V. ordalii*)에 대해 항균 효과가 우수한 펩티드임을 알 수 있었으며, 본 발명의 상기 신규한 더로마신 펩티드는 기존의 항생제를 대체하는 물질로 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

도면

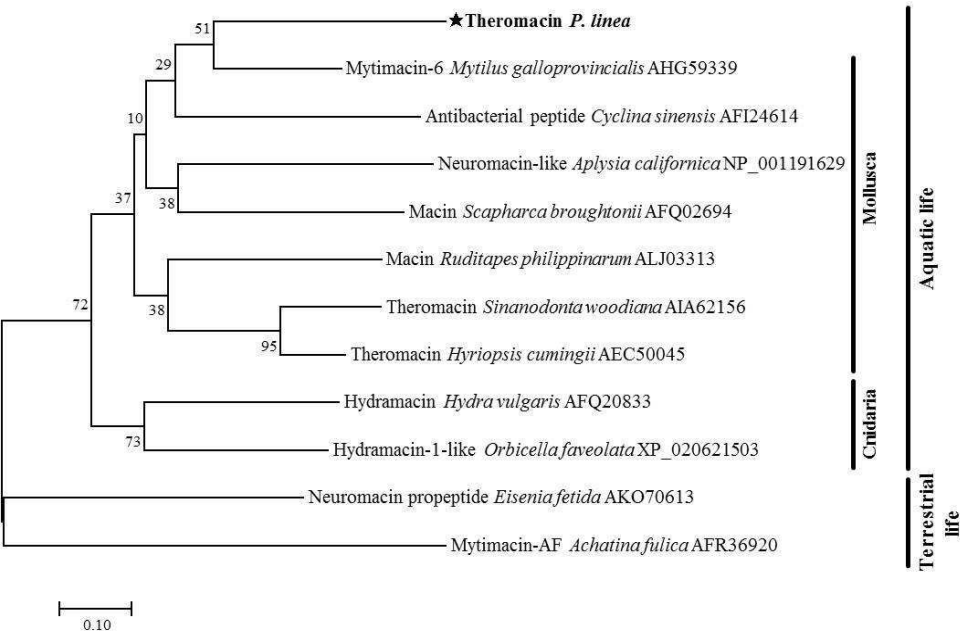
도면1



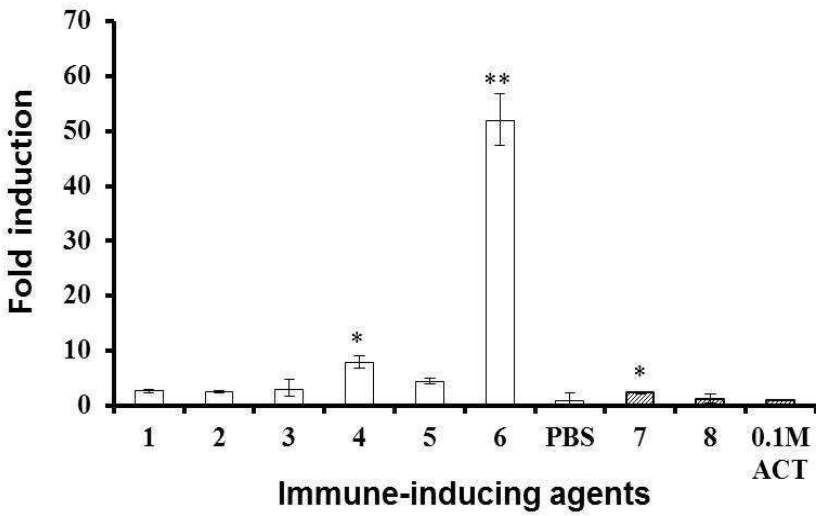
도면2



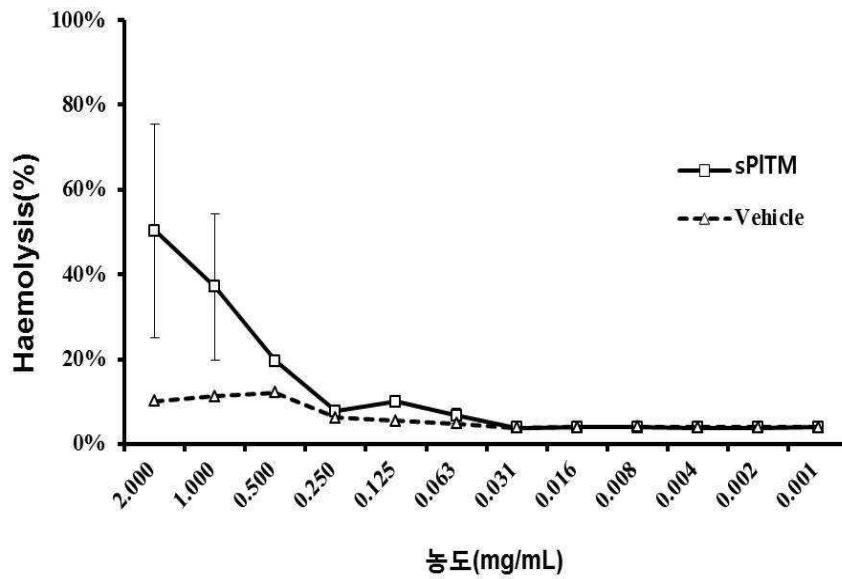
도면3



도면4



도면5



## 서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Novel thrombin peptide from Perinereis linea and uses thereof

<130> PN18219

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 103

<212> PRT

<213> Perinereis linea

<400> 1

Met Val Ala Lys Ile Ser Ile Val Thr Ser Ala Val Met Met Leu Leu

1 5 10 15

Val Met Ser Phe Ile Pro Gln Asn Glu Ala Gly Leu Phe Arg Thr Phe

20 25 30

Gly Lys Cys Trp Asp Thr Trp Ser Arg Cys Thr Arg Phe Thr Ser Val

35 40 45

Phe Thr Gly Ser Val Trp Asn Thr Cys Gln Lys Arg Cys Gln Cys Leu

50 55 60

Gly His Ala Thr Gly Ser Cys Val Leu Arg Arg Ser Glu Cys Pro Leu

65 70 75 80

Thr Ser Gln Ala Tyr Arg Cys Glu Cys Ser Gly Ser Arg Thr Gly Pro

85

90

95

Arg Pro Ser Gly Cys Thr His

100

<210> 2

<211> 312

<212> DNA

<213> Perinereis linea

<400> 2

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atggttgcca agatttccat tgttacttct gcagtcatga tgctgcttgt gatgtcgttc | 60  |
| atccacaga atgaagctgg gctgttccgt acttttggaa agtgctggga tacatggagt  | 120 |
| agatgcactc gggtcacaa tggtttcact ggatctgtgt ggaatacttg ccagaaaagg  | 180 |
| tgctcagtgt taggccatgc cactggtagt tgtgtgttga gaagatcaga gtgcccctta | 240 |
| acttcccagg cttacagatg tgaatgttcg ggctcccga cggacctag gccctcaggt   | 300 |
| tgtactcact aa                                                     | 312 |

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

|                     |    |
|---------------------|----|
| gccagggcaa atcagtgt | 18 |
|---------------------|----|

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

|                      |    |
|----------------------|----|
| gtaacgcacc agcacacct | 19 |
|----------------------|----|

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

|            |                     |    |
|------------|---------------------|----|
| <220><223> | primer              |    |
| <400>      | 5                   |    |
| aagctgggct | gttcgtact           | 20 |
|            |                     |    |
| <210>      | 6                   |    |
| <211>      | 20                  |    |
| <212>      | DNA                 |    |
| <213>      | Artificial Sequence |    |
| <220><223> | primer              |    |
| <400>      | 6                   |    |
| ggcatggcct | aaacactgac          | 20 |
| <210>      | 7                   |    |
| <211>      | 20                  |    |
| <212>      | DNA                 |    |
| <213>      | Artificial Sequence |    |
| <220><223> | primer              |    |
| <400>      | 7                   |    |
| atcagggagt | gatggttagc          | 20 |
| <210>      | 8                   |    |
| <211>      | 20                  |    |
| <212>      | DNA                 |    |
| <213>      | Artificial Sequence |    |
| <220><223> | primer              |    |
| <400>      | 8                   |    |
| gaggaccgga | tgttcttcag          | 20 |