

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0021826 (43) 공개일자 2012년03월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 7/08 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0080012 (22) 출원일자 2010년08월18일 심사청구일자 2010년08월18일	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내 (72) 발명자 박윤경 전라남도 장성군 남면 마흥길 45 김시욱 광주광역시 동구 서석동 조선대학교 375번지 박성철 광주광역시 북구 삼정로 50, 주공아파트 307동 305호 (두암동) (74) 대리인 이원희	

전체 청구항 수 : 총 8 항

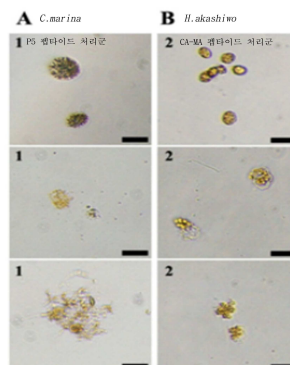
(54) 발명의 명칭 항적조 활성을 가지는 P 5 펩타이드 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 적조 방제 활성을 갖는 항적조 펩타이드 P5에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명에 의한 항적조 펩타이드는 적조 유발 조류에 대하여 탁월한 항적조 활성을 나타내고, 유익한 조류에는 독성이 없으며, 자연 분해가 가능하므로 해양 생태계에 안전하고 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2

C.marina 및 H.akashiwo에 대한 항적조 활성



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100002201

부처명 교육과학기술부

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업/바이오나노캡시드 융합기술개발연구단

연구과제명 유해조류 제어를 위한 바이오나노 캡시드 제조 및 탑재 융합기술개발

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2008.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는, P5 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 P5 펩타이드는 서열번호 1로 기재되는 CA-MA(Cecropin A - Magainin 2) 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 양전하와 소수성 영역이 증가된 펩타이드 또는 그의 유도체인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 P5 펩타이드는 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*), 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 항적조 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 P5 펩타이드는 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대하여 항적조 활성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 5

서열번호 1로 기재되는 CA-MA(Cecropin A - Magainin 2) 펩타이드의 하인즈 부위(hinge region)에 존재하는 글리신-이소루이신-글리신을 각각 프롤린으로 치환하고, 4번째 류신, 8번째 이소루이신, 14번째 류신, 15번째 히스티딘 각각을 라이신으로 치환하고, 5번째 페닐알라닌과 6번째 라이신, 12번째 라이신, 13번째 페닐알라닌, 16번째 세린, 17번째 알라닌, 20번째 페닐알라닌을 류신으로 치환하는 단계를 포함하는 제 1항의 펩타이드의 제조 방법.

청구항 6

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 적조 방제용 조성물은 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*), 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 항적조 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 적조 방제용 조성물은 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대하여 항적조 활성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 적조 생물의 생육을 저해하는 활성을 갖는 항적조 펩타이드 및 이를 함유하는 적조 방제용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 적조란(Red tides 또는 Harmful Algal Blooms) 바다에 사는 플랑크톤이 대량 번식하여 바닷물 색깔을 갈색이나 빨간색으로 변색시키며 생태계를 파괴시키는 현상이다. 적조생물의 종류는 전 세계적으로 200종이 넘고 우리나라 연안에서 나타나는 적조생물은 40종 여종이다. 적조로 인한 피해는 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 첫째는 어패류의 대량폐사나 인명피해이고, 또 하나는 관광산업의 피해이다. 구체적으로 살펴보면, 적조생물이 독성이 있는 유독성일 경우 어패류들이 먹이를 잡기 위하여 물을 빨아들이는 과정에서 유독성 적조생물을 먹으면 독소에 중독이 되고 결국 죽게 된다. 적조생물이 대량으로 번식한 뒤 질소, 인 등 영양염류를 다 써 버리면 일시에 죽어 해저에 가라앉게 되는데 이때 세균들이 이들을 분해하며 이 분해과정에서 세균들이 산소를 모두 써버리고 결국 해저는 무산소 상태가 되는데 운동성이 크게 떨어지는 폐류들은 질식사하여 죽게 된다. 또한, 적조는 주로 수온이 높고 바람이 세지 않은 늦봄과 여름에 자주 발생한다. 이 시기는 많은 관광객들이 해변을 찾아 수영을 하거나 구경을 하는 때인데 관광객들이 수영할 때 독성 적조생물이 들어 있는 물을 마시고 죽거나 마비가 될 수 있어 미국과 스페인, 이탈리아 등 많은 유럽 국가들은 해수욕장을 폐쇄하므로 관광수입에 막대한 피해를 준다. 우리나라의 경우 남해안의 넓은 해역에서 발생하며 남해안에서 일어나던 적조가 동해, 서해안에서도 발생하고 있다. 특히 서해안의 경우 1993년부터 천수만에서, 1995년부터는 전북연안에서 적조가 해마다 반복적으로 발생하고 있는데 1998년부터는 유해성 적조가 대규모로 발생하고 있다.

[0003] 씨. 폴리크리코이데스 종은 푸에르토 리코(Puert) 연안에서 처음 발견되었으며(Margalef, 1961), 이후 북미 대서양 연안의 뉴저지주 바메가트(Bamegat)만과 미국 캘리포니아 연안에서 적조를 유발한 *C. heterolobatum*(Silva, 1967)과 같은 종으로 간주되고 있다. 이 종은 일본의 하리마 나다(Harima Nada)와 구주의 야츠시로(Yatsushiro)만에서 적조를 일으켜 수산피해를 일으킨 이래(Yuki and Yoshimatsu, 1989), 일본 중부와 서부 연안에서도 적조를 일으켰다고 보고되었다(Fukuyo et al., 1990). 최근 캐나다(Whyte et al., 2000), 멕시코의 캘리포니아만(Gulf of California)(Carate Lizarraga et al., 2000), 및 중남미의 구아테말라(Guatemala)의 태평양 연안에서도 적조를 일으킨다고 보고되었다. 또한 와편모조류에 속하는 피. 미니멈(*P. minimum*), 및 피. 미캔스(*P. micans*)와 침편모조강에 속하는 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*), 샤또넬라 에스피(*Chattonella* sp.) 및 씨. 마리나(*C. marina*) 역시 적조를 유발한다고 알려져 있다. 샤또넬라 에스피(*Chattonella* sp.)의 경우 적조생물밀도가 50 이상일 때, 반경 2 ~ 5Km 수역에 걸쳐 발생하고 어업피해가 우려되어 적조주의보가 발령되며, 적조생물밀도가 100 이상일 때에는 반경 5Km이상 수역에 발생하여 상당한 어업피해가 예상되어 적조경보가 발령된다.

[0004] 현재까지 적조를 예방하거나 적조로 인한 피해를 줄이기 위한 여러 가지 방법들이 연구되었다. 화학약품을 뿌리거나 초음파 분쇄기, 오존 발생기, 원심분리기를 사용하여 화학적, 물리적으로 적조생물을 없애는 방법이 있다. 또한 점토를 이용하여 적조 원인생물을 흡착시켜 바닥으로 침전시키는 방법도 개발되었다. 그러나 이런 방법들은 생태계에 또 다른 악영향을 미칠 수 있으며, 광범위한 적조 발생해역에서 이용되기에는 많은 문제점이 있다. 현재 적조 원인생물을 제거하는 생물학적 방법도 연구가 진행되고 있다. 이것은 생태계 내에서 피식자-포식자 관계를 이용해 원하지 않는 생물을 제거하는 방법이다. 그러나, 이 방법은 생태계의 먹이 사슬을 변화시켜 또 다른 문제점을 야기할 수도 있을 것이다. 또 다른 분야에서는 해양박테리아가 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 해양 생태계나 바다에서 생산되는 먹거리들을 통해 인체에까지 축적될 것이다.

- [0005] 이러한 문제점들을 고려해볼 때 자연분해가 가능하며 인체나 자연 생태계에 무해한 항적조제로써 사용될 수 있는 것이 펩타이드나 단백질제제이다. 이들은 또한 유전자 조작을 통하여 대량 발현하여 생산단가를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 적조생물에 특이하게 부착하는 박테리아나 바이러스의 표면에 펩타이드를 발현하여 항적조 활성을 나타나게 할 수도 있을 것이다.
- [0006] 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. 그러나 이 펩타이드는 낮은 농도에서 세포독성이 높게 나타나는 것으로 보고되어 있다.
- [0007] 세크로핀(Cecropin) 계열의 양친매성 펩타이드는 초파리에서 처음 발견되었고, 그 후 누에 번데기 및 돼지의 작은 창자에서도 발견되었는데, 세크로핀 A(Cecropin A)는 항균활성은 높으나 항진균 및 항암활성은 미미한 것으로 보고되었으며(Boman, H. G. and Hultmark, D., *Annu. Rev. Microbiol.*, 1987, 41, 103), 또한 마가이닌 2(Magainin 2) 펩타이드는 세포독성이 없으면서 항균활성과 함께 항진균, 항암 및 항-원생동물 효과가 있다고 알려져 있다(Zaslloff, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 5449). 아울러, 이러한 두 펩타이드의 일부 서열들을 재조합시킨 접합 펩타이드(conjugation peptide)를 제조하여 항균, 항진균 또는 항암 활성이 탁월한 새로운 합성 펩타이드(CA-MA 펩타이드)를 제조할 수 있음이 알려져 있다(Chan, H. C., et al., *FEBS Lett.*, 1989, 259, 103; Wade, D., et al., *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 1992, 40, 429). 이러한, CA-MA 펩타이드는 박테리아에 대하여 항생활성을 가지고 것으로 보고되었다. 상기 양친매성 펩타이드는 음전하를 띠는 박테리아의 세포막에 전기적인 상호작용에 의하여 결합하고 친수성과 소수성의 아미노산에 의해 양친매성 나선 구조를 가지게 세포막에 구멍을 뚫어 막전위를 변화시키거나 세포막을 파괴하여 항균활성을 가진다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 항적조 활성을 나타내고, 유익한 조류에 대한 독성이 없으며, 자연 분해가 가능한 항적조제를 개발하고자 예의 노력한 결과, 항균 효과가 알려진 CA-MA(Cecropin A - Magainin 2) 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 양전하와 소수성 영역이 증가된 P5 펩타이드를 제작하여, 적조생물 및 유익한 규조류의 배양에 첨가하여, P5 펩타이드의 적조생물에 한정적인 항적조 활성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009]

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 우수한 항적조 활성을 갖는 P5 펩타이드, 이의 제조방법 및 상기 펩타이드를 함유하는 항적조용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 항적조 활성을 갖는, 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 P5 펩타이드를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 P5 펩타이드의 제조방법을 제공한다.
- [0013] 아울러, 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 P5 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 서열번호 2로 기재되는 P5 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 항적조용 조성물은 적조유발 해조류에 탁월한 항조류 작용을 나타내었으며, 유익한 조류에 대해서는 항적조 활성을 나타

내지 않으므로 해양 생태계에 안전한 항적조제로써 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)에 대한 CA-MA와 P5 펩타이드의 항적조 활성을 현미경으로 관찰한 그림이다:

A: 펩타이드를 처리하지 않은 대조군;

B: CA-MA 펩타이드 64 μ M을 처리한 군; 및

C: P5 펩타이드 8 μ M을 처리한 군.

도 2는 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에 대한 CA-MA와 P5 펩타이드의 항적조 활성을 현미경으로 관찰한 그림이다:

도 2의 A는 씨. 마리나(*C. marina*)에 대한 항적조 활성을 현미경으로 관찰한 그림이다;

1: P5 펩타이드 2 μ M을 처리한 군;

도 2의 B는 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에 대한 항적조 활성을 현미경으로 관찰한 그림이다; 및

2: CA-MA 펩타이드 4 μ M을 처리한 군.

도 3은 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대한 본 발명의 CA-MA와 P5 펩타이드의 영향을 보여주는 그림이다:

A: 펩타이드를 처리하지 않은 대조군;

B: CA-MA 펩타이드 32 μ M을 처리한 군; 및

C: P5 펩타이드 256 μ M을 처리한 군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0017] '적조 방제'란 항적제, 적조 방지, 살조 및 항조류 등의 여러가지 용어로 사용되며, 적조를 일으키는 조류(algae)의 성장을 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.

[0018] '양친매성 펩타이드(amphipathic peptide)'은 친수성 및 소수성 영역이 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.

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 항적조 활성을 갖는, 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 P5 펩타이드를 제공한다.

[0021] 본 발명의 P5 펩타이드는 세크로핀(Cecropin A, CA)과 마가이닌(Magainin 2, MA)을 접합시켜 제조한 서열번호 1로 기재되는 CA-MA(Cecropin A - Magainin 2) 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 양전하와 소수성 영역이 증가된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0022] 구체적으로, 본 발명의 P5 펩타이드는 친화성 나선모양을 가진 CA(Cecropin A)의 1-8 아미노산 부위와 MA(Magainin 2)의 1-12 아미노산 부위를 접합한 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위(hinge region)와 하나 또는 그 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 양전하와 소수성 영역이 증가된 합성 펩타이드인 것이 바람직하며, 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위에 존재하는 글리신-이소루

이신-글리신을 각각 프롤린으로 치환하고 4번째 류신, 8번째 이소루이신, 14번째 류신, 15번째 히스티딘 각각을 라이신으로, 5번째 페닐알라닌과 6번째 라이신, 12번째 라이신, 13번째 페닐알라닌, 16번째 세린, 17번째 알라닌, 20번째 페닐알라닌을 류신으로 치환하여 제조된 서열번호 2로 기재되는 펩타이드인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0023] 본 발명의 P5 펩타이드는 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*), 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 항적조 활성을 갖는 것이 바람직하며, 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대하여 항적조 활성을 나타내지 않는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위에 존재하는 글리신-이소루이신-글리신을 각각 프롤린으로 치환하고 4번째 류신, 8번째 이소루이신, 14번째 류신, 15번째 히스티딘 각각을 라이신으로, 5번째 페닐알라닌과 6번째 라이신, 12번째 라이신, 13번째 페닐알라닌, 16번째 세린, 17번째 알라닌, 20번째 페닐알라닌을 류신으로 치환하여 제조된 서열번호 2로 기재되는 펩타이드를 제조하였다. 이와 같이 제조된 본 발명의 펩타이드를 분리·정제하고 그 순도를 확인한 결과 95% 이상의 순도를 나타내었으며, MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) 질량 분석법을 이용하여 얻은 분자량이 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 일치하는 것을 확인하였다(표 1 참조).

[0025] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 P5 펩타이드가 CA-MA 펩타이드 보다 뛰어난 항적조 활성을 갖는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 적조생물에 대한 상기 두 종류의 펩타이드의 50% 생육 저해농도(50% of inhibitory concentration, IC₅₀)를 측정하였다. 그 결과, 실험에 사용된 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*), 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*), 샤토넬라 에스피(*Chattonella sp*), 씨. 마리나(*C. marina*), 피. 미니멈(*P. minimum*), 피. 미칸스(*P. micans*), 및 에스. 코스타툼(*S. costatum*) 적조생물에 대하여, CA-MA 펩타이드에 비하여 P5 펩타이드는 보다 낮은 농도에서 조류의 생육을 저해하는 것을 확인할 수 있었다(표 2 참조). 즉, P5 펩타이드는 CA-MA에 비하여 우수한 항적조 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

[0026] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 P5 펩타이드의 셀룰로우스(cellulose) 세포벽을 가지고 있는 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)에 대한 항적조 활성을 관찰하였다. 배양된 씨. 폴리크리코이데스의 배지에, CA-MA 펩타이드와 P5 펩타이드를 첨가하여 24시간 배양한 후 관찰한 결과, 64 μ M CA-MA 펩타이드를 처리한 군에 비하여, 8 μ M의 P5 펩타이드를 처리한 군에서 씨. 폴리크리코이데스의 외형 및 소기관들의 형태가 더욱 많이 사라지는 것을 관찰할 수 있었다(도 1 참조).

[0027] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, P5 펩타이드의 셀룰로우스 세포벽을 갖고 있지 않은 씨. 마리나(*C. marina*) 및 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에 대한 항적조 활성을 관찰하였다. 씨. 마리나에는 P5 펩타이드를 2 μ M 처리하였으며, 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에는 CA-MA 펩타이드를 4 μ M 처리하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, CA-MA 펩타이드를 처리한 에이치. 아카쉬우에 비하여, 낮은 농도로 처리한 P5 펩타이드에서 씨. 마리나의 외형 및 소기관들의 형태가 더욱 많이 무너지는 것을 관찰할 수 있었다(도 2 참조).

[0028] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 P5 펩타이드를 유익한 규조류에 처리하여, 이의 항적조 활성이 적조생물에 한정되는 것임을 확인하고자 하였다. 에스. 코스타툼을 배양한 후, CA-MA 펩타이드(32 μ M) 및 P5 펩타이드(256 μ M)를 처리한 후, 광학현미경으로 관찰한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 배양 후 24시간 내지 72시간의 변화에도 상기 규조류의 변화가 관찰되지 않았다(도 3 참조).

[0029] 따라서, 본 발명에 따른 P5 펩타이드는 유해한 적조생물에 대하여 항적조 활성을 가지고 있으며, 이러한 항적조 활성은 낮은 농도에서도 유효하게 작용되며, 보다 구체적으로 셀룰로우스 세포벽이 없는 적조생물부터, 셀룰로우스 세포벽을 갖는 적조생물에게까지 항적조 활성을 보이며, 유익한 규조류에는 영향을 미치지 않기 때문에, P5 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 조성물을 항적조제로써 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 P5 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 P5 펩타이드는 세크로핀(Cecropin A, CA)과 마가이닌(Magainin 2, MA)을 접합시켜 제조한 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 양전하와 소수성 영역이 증가된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0032] 구체적으로, 본 발명의 P5 펩타이드의 제조방법에 있어서, 친화성 나선모양을 가진 CA(Cecropin A)의 1-8 아미

노산 부위와 MA(Magainin 2)의 1-12 아미노산 부위를 접합한 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위(hinge region)와 하나 또는 그 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 양전하와 소수성 영역이 증가된 합성 펩타이드인 것이 바람직하며, 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위에 존재하는 글리신-이소루이신-글리신을 각각 프롤린으로 치환하고 4번째 류신, 8번째 이소루이신, 14번째 류신, 15번째 히스티딘 각각을 라이신으로, 5번째 페닐알라닌과 6번째 라이신, 12번째 라이신, 13번째 페닐알라닌, 16번째 세린, 17번째 알라닌, 20번째 페닐알라닌을 류신으로 치환하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 본 발명의 구체적인 실시예에서 확인할 수 있듯이, 상기와 같은 단계를 포함하는 제조단계에 의해서 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 아미노산을 치환하여 제조된 서열번호 2로 기재되는 P5 펩타이드는 적조 유발 조류에 대하여 우수한 항적조 활성을 보였다.

[0034] 아울러, 본 발명은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 P5 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명의 P5 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물은 세크로핀(Cecropin A, CA)과 마가이닌(Magainin 2, MA)을 접합시켜 제조한 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 아미노산 중 하나 또는 그 이상을 치환하여 양전하와 소수성 영역이 증가된 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0036] 구체적으로, 본 발명의 P5 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물에는 있어서, P5 펩타이드는 친화성 나선모양을 가진 CA(Cecropin A)의 1-8 아미노산 부위와 MA(Magainin 2)의 1-12 아미노산 부위를 접합한 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위(hinge region)와 하나 또는 그 이상의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하여 양전하와 소수성 영역이 증가된 합성 펩타이드인 것이 바람직하며, 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위에 존재하는 글리신-이소루이신-글리신을 각각 프롤린으로 치환하고 4번째 류신, 8번째 이소루이신, 14번째 류신, 15번째 히스티딘 각각을 라이신으로, 5번째 페닐알라닌과 6번째 라이신, 12번째 라이신, 13번째 페닐알라닌, 16번째 세린, 17번째 알라닌, 20번째 페닐알라닌을 류신으로 치환하는 단계를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0037] 상기 본 발명의 P5 펩타이드는 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*), 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 항적조 활성을 갖는 것이 바람직하며, 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대하여 항적조 활성을 나타내지 않는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0038] 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.

[0039] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0040] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] <실시예 1> 펩타이드의 합성 및 분리정제

[0042] 본 발명자들은 서열번호 2로 기재되는 본 발명의 P5 항적조 펩타이드를 합성하기 위하여, 세크로핀 에이(cecropin A)의 1 ~ 8 잔기와 마가이닌2(magainin 2)의 1-12 기를 접합하여 만든 CA-MA 펩타이드를 치환하여 라이신과 류신이 풍부한 펩타이드인 P5를 제조하였다(표1).

[0043] 본 발명의 P5 항적조 펩타이드는 서열번호 1로 기재되는 CA-MA 펩타이드의 하인즈 부위에 존재하는 글리신-이소루이신-글리신(Glycine-Isoleucine-Glycine)을 각각 프롤린(Proline)으로 치환하고 4번째 류신(Leucine), 8번째 이소루이신(Isoleucine), 14번째 류신(Leucine), 15번째 히스티딘(Histidine) 각각을 라이신(Lysine)으로, 5번째 페닐알라닌(Phenylalanine)과 6번째 라이신(Lysine), 12번째 라이신(Lysine), 13번째 페닐알라닌

(Phenylalanine), 16번째 세린(Serine), 17번째 알라닌(Alanine), 20번째 페닐알라닌(Phenylalanine)을 류신(Leucine)으로 치환하여 제조하였다.

[0044] 펩타이드의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)를 아미노기 보호 용기로 이용하는 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법을 사용하여 합성하였다. 본 발명의 펩타이드에서 카복실말단이 $-NH_2$ 형태인 펩타이드는 링크 아마이드 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-hydroxybenzo triazole-dicyclo-hexycarbodiimide)(HOBt-DCC)에 의하여 수행하였다. 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 여러 번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 건조시킨 레진에 트리플루오로아세트산:페놀:티오아니졸:물:트리이소프로필실란(trifluoroacetic acid(TFA) : phenol : thioanisole : H_2O : triisopropylsilane = 85: 5: 5: 2.5: 2.5(vol./vol.)) 용액을 첨가하고 4시간 동안 반응시켜 보호기를 제거하고, 레진으로부터 펩타이드를 분리시켰다. 그 뒤, 차가운 디에틸 에테르(diethyl ether)로 30분 동안 반응시킨 뒤, 원심분리기로 펩타이드를 침전시키고, 다시 디에틸 에테르로 침전된 펩타이드를 한번 더 씻어준 뒤 침전시킨 다음 공기 중에 건조시켰다. 상기 방법으로 얻은 크루드(crude)한 형태의 펩타이드를 pH 8인 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate)에 녹여 아세트니트릴을 그라디언트(gradient)로 하여 정제형 역상 HPLC 컬럼(reverse phase-HPLC column)(Delta Pak, C_{18} 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 분석법을 이용하여 펩타이드의 분자량을 측정하였다.

[0045] 그 결과, 본 발명에서 합성한 CA-MA와 P5 펩타이드는 95% 이상의 순도를 나타내었으며, MALDI 질량 분석법(Hill, et al., *Rapid Commun. Mass Spectrometry*, 1991, 5, 395)을 이용하여 얻은 분자량이 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 일치하므로 서열번호 2로 기재되는 정확한 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 합성되었음을 확인하였다.

표 1

[0046] 실험에 사용된 펩타이드의 아미노산 서열

펩타이드명	서열	분자량
CA-MA	KWKLFKKIGIGKFLHSAKKF-NH ₂ (서열번호1)	2404.3
P5	KWKKLLKKPLLLKKLL-NH ₂ (서열번호2)	2250.1

[0047] <실험예 1> 펩타이드의 항적조 활성 측정

[0048] 상기 <실시예 1>에서 합성한 모체 CA-MA와 P5 펩타이드의 항적조 활성을 측정하고자, 본 발명자들은 상기 두 펩타이드의 적조생물에 대한 50% 생육 저해농도를 측정하였다. 구체적으로, 항적조 활성을 측정하기 위한 적조생물로 한국해양미세조류은행에서 분양을 받은 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*), 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*), 샤토넬라 에스피(*Chattonella sp*), 씨. 마리나(*C. marina*), 피. 미니멈(*P. minimum*), 피. 미칸스(*P. micans*), 및 에스. 코스타툼(*S. costatum*)을 사용하였다. 상기 각 조류를 F2 배지[150 mg $NaNO_3$, 8.69 mg $NaH_2PO_4 \cdot 9H_2O$, 10 mg ferric EDTA, 0.22 mg $MnCl_2$, 0.11 mg $CoCl_2$, 0.0196 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$, 0.012 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 1 μg Vitamine B₁₂, 1 μg Biotin, 0.2 μg Thiamine·HCl / 1ℓ 필터된 해수]에서 배양조건 온도 22℃, 염분 34‰, 그리고 조도 3,000 렉스(lux)이었고, 14시간/10시간 명암 주기로 일정하게 두고 배양하였다. 전배양된 적조 생물 세포를 세포수 10^4 /ml의 농도로 희석하여 24 웰(well) 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종하였다. 상기 <실시예 1>에서 합성한 CA-MA와 P5 펩타이드를 256 μM /웰(well) 농도로부터 시작하여 1/2배씩 희석하여 상기 균주가 접종된 플레이트에 첨가하였다. 상기 언급한 배양조건과 동일한 조건에서 36시간 동안 배양하면서 6시간마다 적조생물의 수를 헤모사이토미터(hemocytometer)를 이용하여 측정하였다. 배양 24시간 후, 50% 생육 저해농도(50% of inhibitory concentration, 이하 'IC₅₀' 라 약칭함)

값을 결정하였다.

[0049] 그 결과, 모체 CA-MA 펩타이드에 비하여 P5 펩타이드가 적조 생물에 대하여 강한 항적조 활성을 나타내었다(표 2). 따라서, 본 발명의 <실시예 1>에서 제조한 P5 펩타이드는 항적조 활성이 뛰어난 펩타이드임을 확인할 수 있었다.

표 2

[0050] 적조유발 해양생물(해조류)에 대한 항적조 활성 측정

적조 생물	CA-MA (μM)		P5 (μM)	
	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
씨. 폴리크리코이데스 (<i>C. polykrikoides</i>)	64	128	8	16
에이치. 아카쉬우(<i>H. akashiwo</i>)	4	8	1-2	2
샤또넬라 에스피(<i>Chattonella</i> sp.)	8	16	2	4
씨. 마리나(<i>C. marina</i>)	4	8	4	8
피. 미니멈(<i>P. minimum</i>)	128	>256	32	64
피. 미캔스(<i>P. micans</i>)	128	>256	32	64
에스. 코스타툼(<i>S. costatum</i>)	32	>256	>256	>256

[0051] <실험예 2> 셀룰로우스 세포벽이 있는 적조에 대한 항적조 활성 관찰

[0052] 본 발명 펩타이드의 항적조 활성을 광학 현미경상으로 가시화하기 위하여, 셀룰로우스 세포벽을 가지고 있는 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)를 상기 <실험예 1>에 사용한 F2 배지에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 10⁴/ml의 농도로 24웰 마이크로 타이틀레이트 플레이트에 접종한 뒤 모체 CA-MA 펩타이드를 64 μM/웰(well)의 농도와 P5 펩타이드를 8 μM/웰(well) 농도로 상기 적조생물이 접종된 플레이트에 첨가하여 22℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 가시화하기 위하여 광학 현미경 상에서 관찰하여 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0053] 그 결과, 도 1에서 알 수 있듯이, 적조유발 생물인 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)에 아무것도 처리하지 않은 경우(음성 대조군)에는 생물의 수가 유지되었고, 외형적 변화가 없었으며, 모체 CA-MA 펩타이드는 64 μM/웰의 농도로 처리하였을 때 적조생물의 외형적 변화를 보였다. 그러나, P5 펩타이드는 CA-MA 펩타이드보다 1/8배 낮은 농도인 8 μM/웰의 농도로 처리한 군에서 거의 모든 생물체에서 생물체 내의 물질이나 소기관들이 사라진 형태였다. 이로써, 본 발명의 P5 펩타이드는 모체 CA-MA 펩타이드에 비하여 낮은 농도에서 항적조 효과를 보이므로, P5 펩타이드를 항적조제로 유용하게 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0054] <실험예 3> 셀룰로우스 세포벽이 없는 적조에서의 항적조 활성 관찰

[0055] 본 발명 펩타이드의 항적조 활성을 광학 현미경상으로 가시화하기 위하여, 셀룰로우스 세포벽을 가지고 있지 않은 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)를 상기 <실험예 1>에 사용한 F2 배지에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 10⁴/ml의 농도로 24웰 마이크로 타이틀레이트 플레이트에 접종한 뒤 모체 CA-MA 펩타이드를 4 μM/웰의 농도와 P5 펩타이드를 2 μM/웰 농도로 상기 적조생물이 접종된 플레이트에 각각 첨가하여 22℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 가시화하기 위하여 광학 현미경 상에서 관찰하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0056] 그 결과, 셀룰로우스 세포벽을 가지고 있는 적조 생물에 비하여 셀룰로우스 세포벽을 가지고 있지 않은 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에서 더 낮은 농도의 펩타이드 처리에 의하여 적조가 억제됨을 확인할 수 있었다. 모체 CA-MA 펩타이드는 4 μM/웰의 농도로 처리하였을 때 적조생물의 외형적 변화를 보였고 P5 펩타이드는 2 μM/웰의 농도로 처리에서 거의 모든 생물체에서 생물체내의 물질이나 소기관들이 사라진 형태였다. 이로써 본 발명의 P5 펩타이드가 강력한 항적조 활성이 있음을 확인하였다(도 2).

[0057] <실험예 4> 유익한 규조류에 대한 펩타이드의 항적조 활성 관찰

[0058] 본 발명 펩타이드의 규조류에서의 영향을 광학 현미경상으로 가시화하기 위하여, 해양 생태계에 해로운 영향을 미치지 않는 규조류인 에스. 코스타툼(*S. costatum*)을 상기 <실험예 1>에 사용한 F2 배지에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 $10^4/\text{ml}$ 의 농도로 24웰 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종한 뒤 모체 CA-MA 펩타이드를 $32 \mu\text{M}$ /웰의 농도와 P5 펩타이드를 $256 \mu\text{M}$ /웰 농도로 상기 적조생물이 접종된 플레이트에 첨가하여 22°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 가시화하기 위하여 광학 현미경 상에서 관찰하여 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0059] 그 결과, 펩타이드와 규조류를 반응시킨 후 3일이 지나도 높은 농도의 펩타이드 특히 P5가 조류에 전혀 나쁜 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 3).

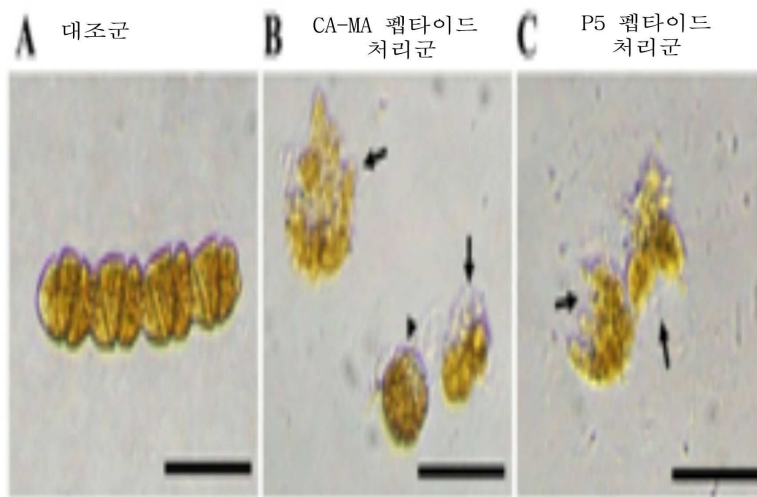
산업상 이용가능성

[0060] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 적조 방제 활성을 갖는 항적조 펩타이드 P5는 탁월한 항적조 활성을 나타내고 유익한 조류에는 독성이 없으며, 자연 분해가 가능하므로 해양 생태계에 안전하고 유용하게 사용될 수 있다.

도면

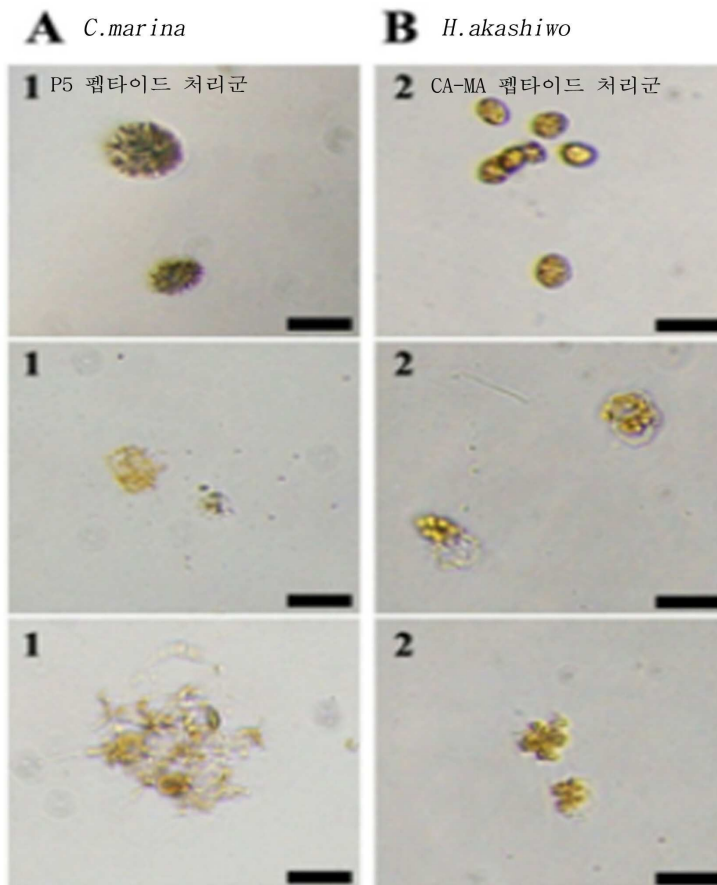
도면1

*C.polykrikoides*에 대한 항적조 활성



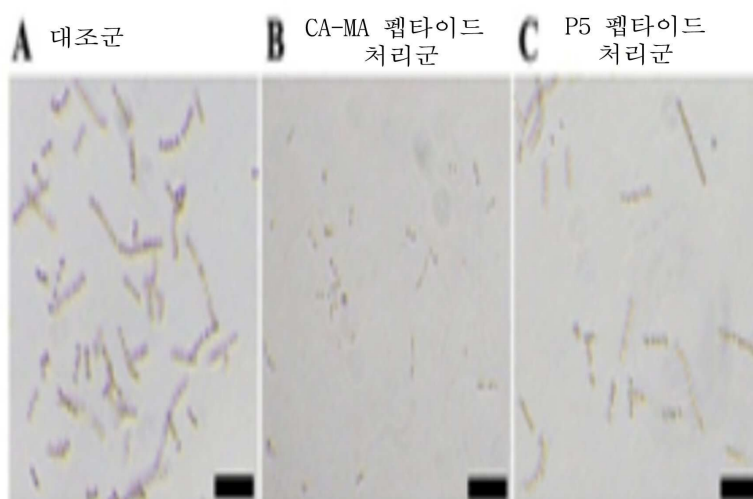
도면2

C.marina 및 *H.akashiwo*에 대한 항적조 활성



도면3

*S. costatum*에 대한 항적조 활성



서열 목록

<110> Industry Academy Cooperation Foundation Chosun University
 <120> P5 peptide having antialgae activity against organism induced red tide and the use of the same
 <130> 10p-07-51
 <160> 2
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CA-MA peptide made by fusing 1-8 amino acid of secropin A and 1-12 amino acid of magainin 2
 <400> 1
 Lys Trp Lys Leu Phe Lys Lys Ile Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser

1	5	10	15
Ala Lys Lys Phe			
20			
<210>	2		
<211>	20		
<212>	PRT		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	peptide with increased + charge and hydrophobicity by substituting amino acids of SEQ. ID. NO 1 with lysine and leucine		
<400>	2		
Lys Trp Lys Lys Leu Leu Lys Lys Pro Pro Pro Leu Leu Lys Lys Leu			
1	5	10	15
Leu Lys Lys Leu			
20			