(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0084352
(43) 공개일자 2018년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A01N 63/02* (2017.01)
A23K 20/147 (2016.01) *A23K 20/195* (2016.01)
C07K 14/46 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/08 (2013.01)
A01N 63/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0007850
(22) 출원일자 2017년01월17일
심사청구일자 2017년01월17일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
박찬일
경상남도 통영시 광도면 죽림2로 31, 305동 601호
배진솔
부산광역시 남구 수영로 345, 108동 3403호(대연동, 대연힐스테이트푸르지오)
(74) 대리인
최규환

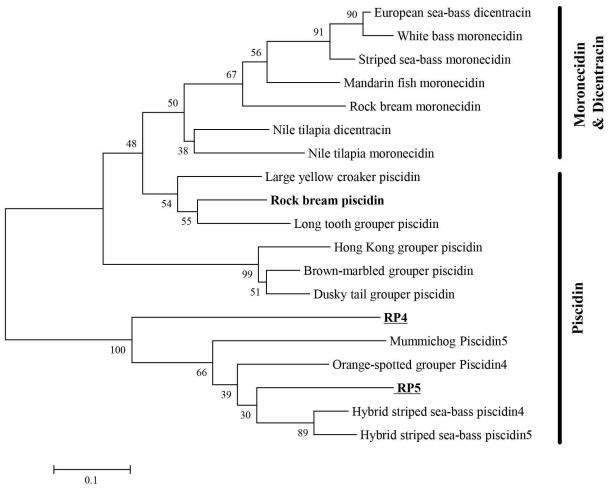
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **돌돔 유래의 신규한 피스시딘 펩티드 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 항균 펩티드, 상기 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포, 상기 재조합 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.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23K 20/147 (2016.05)
A23K 20/195 (2016.05)
C07K 14/461 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525006094
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 포스트게놈다부처유전체사업
연구과제명 해양수산생물 유전체정보 분석 및 활용기반 연구
기 여 율 1/2
주관기관 서울대학교 산학협력단
연구기간 2014.10.20 ~ 2022.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525005939
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 수산실용화기술개발사업
연구과제명 갯지렁이를 활용한 사료첨가제용 항균펩타이드 개발
기 여 율 1/2
주관기관 경상대학교 산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2018.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 항균 펩티드.

청구항 2

제1항의 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5 또는 서열번호 6의 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 이니애(*Streptococcus iniae*)이며, 그람 음성균은 에로모나스 살모니시다(*Aeromonas salmonicida*), 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*), 비브리오 알기노리티커스(*Vibrio alginolyticus*), 비브리오 할베이(*Vibrio harveyi*) 또는 비브리오 오르달리(*Vibrio ordalii*)인 것을 특징으로 하는 어류용 항균 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제7항의 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 돌돔 유래의 신규한 피스시딘 펩티드 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 그람 양성균 및

그람 음성균에 대한 항균활성이 있는 돌돔 유래의 신규한 피스시딘 펩티드에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 농어목(Perciformes) 돌돔과(Oplegnathidae)에 속하는 돌돔(rock bream, 학명 *Oplegnathus fasciatus*)은 태평양과 인도양 등지에 광범위하게 분포하며, 우리나라에서는 주로 남부이남 해역에 분포하는 경제적으로 중요한 양식대상어종으로 여겨지고 있지만, 어류의 양식이 발전함에 따라 이리도바이러스(iridovirus)에 의한 바이러스성 질병 등 많은 전염성 질병이 동반되어 왔으며, 여러 가지 제한적인 양식환경에 의한 스트레스 요인으로 인해 질병의 발생빈도가 높아져 돌돔 양식 산업에 있어서 막대한 경제적 피해를 입히고 있다.

[0003] 이러한 전염성 질병을 막기 위해 지금까지 다수의 항생제가 사용되어왔지만, 항생제의 오,남용에 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 어체 내 항생제의 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] 어류로부터 분리된 첫 항균 펩티드는 파르닥신(pardaxin)이며, 많은 종류의 항균 펩티드들이 다양한 어류로부터 발견되고 있는 실정이다. 대부분의 어류 항균 펩티드는 그들의 일차 구조에 기반하여 다섯 개의 패밀리로 분류되는데, 각각 카테리시딘(cathelicidin), 디펜신(defensin), 헵시딘(hepcidin), 피스시딘(piscidin) 및 히스톤 유래 펩티드(histone-derived peptides)이다.

[0006] 피스시딘(piscidin)은 선형의 양친매성 α-나선형 펩티드로, 히스티딘, 페닐알라닌 및 이소루신이 풍부한 매우 보존된 아미노 말단을 가지고 있는 항균 펩티드이다. 피스시딘은 상업적으로 양식되는 하이브리드 스트라이프배스(hybrid striped bass, *Morone saxatilis x Morone chrysops*)의 비만세포(mast cell)로부터 처음 발견되었고 그 이후, 많은 종류의 피스시딘이 농어목(Perciformes) 어류 중에서 발견되고 있다. 대부분의 피스시딘은 12개에서 50개의 아미노산 길이를 가지며, 세균, 곰팡이, 기생충 및 바이러스에 대하여 폭넓은 항균 활성을 가진다.

[0007] 한편, 한국등록특허 제1660259호에는 돌돔 유래의 피스시딘에 관한 '돌돔 유래의 새로운 항미생물 펩타이드 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본원 발명의 두 종의 신규한 피스시딘 펩티드와 아미노산 서열 상동성이 매우 낮으며, 한국등록특허 제1493952호에는 '넙치의 지질다당류결합단백질로부터 유래한 항균 펩타이드 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본원 발명의 돌돔 유래의 신규한 피스시딘 펩티드 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*)를 인위감염 시킨 돌돔의 NGS 분석을 통해 두 종의 신규한 피스시딘 펩티드를 동정하였고, 동정된 두 종의 피스시딘 펩티드의 AMP12(antimicrobial peptide 12) 도메인 영역을 기초로 합성 펩티드를 제작하여 항균활성 및 숙주의 적혈구에 대한 세포독성을 확인한 결과, 상기 두 종의 돌돔 유래 피스시딘 펩티드가 다양한 그람 양성균 및 그람 음성균에 대해 항균활성을 나타내며, 숙주의 적혈구에 대해서는 약한 용혈활성을 나타냄을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 항균 펩티드를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 단계를 포함하는 항균 펩티드의 생산방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 생산된 항균 펩티드를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 돌돔 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

[0018] 도 1은 ExPASy 서버에서 SWISS 모델을 사용하여 RP4(A)와 RP5(B)의 AMP 12 도메인의 삼차원 구조를 예측한 그림이다. RP4, 돌돔 유래 피스시딘 4(rock bream piscidin 4); RP5, 돌돔 유래 피스시딘 5.

도 2는 어류에서 추론된 피스시딘 패밀리의 아미노산 서열의 계통발생을 분석한 그림이다.

도 3은 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 정상 돌돔의 여러 조직에서 RP4(A)와 RP5(B)의 mRNA 발현 수준을 분석한 결과이다. PBLs, 말초혈액 백혈구; Head kidney, 두신; Trunk kidney, 신장; Spleen, 비장; Liver, 간; Intestine, 장; Gill, 아가미; Muscle, 근육; Skin, 피부.

도 4는 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*, A 및 B), 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*, C 및 D) 또는 RSIV(Red seabream iridovirus, E 및 F)를 인위감염 시킨 후, 신장(kidney), 비장(spleen) 및 아가미(gill) 조직에서 RP4(A, C 및 E)와 RP5(B, D 및 F)의 mRNA 발현 수준을 시간별로 분석한 결과이다.

도 5는 돌돔 적혈구에 대한 RP4와 RP5 펩티드의 용혈활성을 분석한 결과이다. 용혈의 비율은 0.2% Triton X-100을 처리한 적혈구 현탁액으로부터 수득한 용혈 수준에 대한 상대값으로 정의하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 항균 펩티드를 제공한다.

[0020] 본 발명자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩티드(antimicrobial peptide) 도메인을 각각 포함하는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 돌돔 유래의 피스시딘(piscidin) 펩티드를 동정하여 이를 각각 RP4(rock bream piscidin 4) 및 RP5(rock bream piscidin 5)로 명명하였다.

[0021] 본 발명의 피스시딘 4(RP4) 펩티드는 69개의 아미노산 서열(서열번호 3)로 이루어져 있으며, 서열번호 1(18개의 아미노산)의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩티드 도메인을 포함하여 이루어져 있다. 또한, 본 발명의 피스시딘 5(RP5) 펩티드는 82개의 아미노산 서열(서열번호 4)로 이루어져 있으며, 서열번호 2(24개의 아미노산)의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩티드 도메인을 포함하여 이루어져 있다.

[0022] 본 발명에 따른 돌돔 유래의 항균 펩티드의 범위는 서열번호 1 내지 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시되는 피스시딘 펩티드 및 상기 펩티드의 기능적 동등물을 포함한다. "

기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩티드를 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 항균 활성을 의미한다.

[0023] 본 발명의 항균 펩티드는 전장의 피스시딘 펩티드(서열번호 3 또는 서열번호 4)일 수도 있으며, 항균 펩티드 도메인만을 포함한 펩티드(서열번호 1 또는 서열번호 2)일 수도 있다.

[0024] 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.

[0025] 바람직하게는, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5 또는 서열번호 6의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다. 본 발명의 서열번호 5의 염기서열은 전장의 피스시딘 4(RP4) 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이며, 서열번호 6의 염기서열은 전장의 피스시딘 5(RP5) 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드이다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0027] 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.

[0028] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 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, pLλ프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보좀 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(λ)의 좌향 프로모터(pLλ프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0029] 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: λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1 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.

[0030] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0032] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 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 츄린겐시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세슨스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0033] 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.

[0034] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. 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(Capecchi, 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)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 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.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 단계를 포함하는 항균 펩티드의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 항균 펩티드를 제공한다.

[0036] 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, 쉐이크 플라스크 배양에 의해서 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.

[0037] 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.

[0038] 본 발명의 상기 항균 펩티드는 전술한 바와 같으며, 그람 양성균 또는 그람 음성균 등의 세균에 대한 생육 저해 활성을 가진 항균 펩티드이다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 항균 조성물은 어류용 항균 조성물로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] "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 있으며, 바람직하게는 상기 그람 양성균은 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*)이고, 그람 음성균은 에로모나스 살모니시다(*Aeromonas salmonicida*), 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*), 비브리오 알기노리티커스(*Vibrio alginolyticus*), 비브리오 할베이(*Vibrio harveyi*) 또는 비브리오 오르달리(*Vibrio ordalii*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제를 제공한다.

[0043] 상기 사료첨가제는 바람직하게는 면역증강용이며, 어류용 사료첨가제로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 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.

[0045] 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, 옥분 또는 미강 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046] 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 글리코겐 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합(α-1,4-glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제, 유기 인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 말토오스를 두 분자의 글루코스로 가수분해하는 말타제 및 사카로스를 가수분해하여 글루코스-프룩토스 혼합물을 만드는 전환효소 등을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 사료첨가제는 어류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 또한, 상기 사료 첨가용 조성물에는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 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.

[0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **재료 및 방법**

[0050] **재료**

[0051] 본 발명에 사용된 돌돔은 경상남도 수산자원연구소(통영시, 한국)로부터 공급받아 사용하였다. 공급받은 돌돔(68.5±10g, 14.3±1cm)은 20~23℃의 통기(通氣)의 바닷물 조건에서 2주동안 순치하였다. 모든 동물 실험은 경상대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하여 수행되었다.

[0052] **RP4 및 RP5 cDNA의 분자적 특성 분석**

[0053] 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*)로 자극시킨 돌돔으로부터 백혈구를 분리하고, 분리된 돌돔 백혈구의 mRNA에 기반한 cDNA를 이용하여 차세대시퀀싱(next generation sequencing)을 수행하여 두 종류의 피스시딘 유전자를 획득하였다. 뉴클레오티드와 추론된 아미노산 서열은 GENETYX 프로그램(버전 8.0, SDC software development, 일본)과 미국 국립생물정보센터의 BLAST(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)를 이용하여 확인하였다. 상기 돌돔 유래의 두 종의 피스시딘을 각각 RP4(rock bream piscidin 4)와 RP5(rock bream piscidin 5)로 명명하였다. 두 종의 피스시딘에 대한 분자량, 등전점 및 총 전하(net charge)는 Peptide calculator Server(http://www.bachem.com/service-support/peptide-calculator/)를 사용하여 예측하였다. SMART(http://smart.embl-heidelberg.de/)를 사용하여 시그널 펩티드 및 특징적인 도메인의 위치를 조사하였다. 다른 어류 유래의 피스시딘, 모로네시딘(moronecidin) 및 디센트라신(dicentracin)의 아미노산 서열과의 다중 서열 정렬은 ClustalW 프로그램(http://www.genome.jp/tools/clustalw/)을 이용하여 수행하였다. RP4 및 RP5의 계통발생학적 위치를 확인하기 위해 MEGA 버전 4.0 프로그램(http://www.megasoftware.net/mega4/)으로 neighbor-joining(NJ)법을 이용하여 계통수를 제작하였으며, bootstrap 샘플링은 2,000번 반복 수행하였다. RP4 및 RP5의 삼차 구조는 ExPASy 서버에서 SWISS 모델(https://swissmodel.expasy.org/)을 사용하여 예측하였다.

[0054] **정상 어체의 조직별 RP4 및 RP5 유전자 발현분석**

[0055] 돌돔의 조직별 RP4 및 RP5 유전자의 발현을 알아보기 위해서, 건강한 어체 3마리를 벤조카인(Sigma, 미국)으로 마취하고, 미정맥(caudal vein)의 혈액, 말초혈액 백혈구(Peripheral blood leukocytes, PBLs) 및 적혈구(Red blood cells, RBCs)를 Percoll 밀도 구배 방법을 이용하여 분리하였다. 또한, 채혈을 마친 어체는 해부하여 두신(head kidney), 신장(trunk kidney), 비장, 간, 장, 아가미, 근육 및 피부 조직을 무균적으로 적출하였다. 총 RNA는 TRIzol 시약(Invitrogen, 미국)을 사용하여 추출하였으며, 지노믹 DNA 분자를 제거하기 위해 RNase-free DNaseI(Takara, 일본)을 처리하였다. 분리된 총 RNA의 순도와 농도는 NanoVue 분광광도계(GE Healthcare Life Science, 스웨덴)을 사용하여 측정하였다. cDNA 합성은 first-strand cDNA 합성 키트(Takara)를 이용하여

제조사의 방법에 따라 합성하였다. 정량적 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)은 SYBR Green master mix(Takara)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 수행하였다. qRT-PCR은 상기에서 준비된 cDNA 주형과 GENETYX 버전 8.0 프로그램의 Primer3 검색을 사용하여 고안된 RP4 또는 RP5에 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 수행하였다. EF-1α(elongation factor 1 alpha)는 RP4와 RP5의 상대적인 발현양을 결정하기 위한 대조유전자로 사용하였다. 각 프라이머 세트의 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0056] 본 발명에 사용된 PCR 프라이머 정보

표적 유전자	용도	염기서열 정보(5'→3')
RP4	Real time F	GCTGAACCTGGGGAGTGTTT (서열번호 7)
	Real time R	GCAGCCAATCAGGTCCATAC (서열번호 8)
RP5	Real time F	GAGCACAGATACCACCGTGA (서열번호 9)
	Real time R	CGCTGATAAGCTGGAGCATC (서열번호 10)
EF-1α	Real time F	CCCCTGCAGGACGTCTACAA (서열번호 11)
	Real time R	AACACGACCGACGGGTACA (서열번호 12)

[0057] qRT-PCR의 증폭조건은 50℃에서 4분 및 95℃에서 10분간 초기 변성단계 후에, 95℃에서 20초, 60℃에서 1분을 1회로 하여 총 45회 반응시켰으며, 마지막으로 95℃에서 15초, 60℃에서 30초 및 95℃에서 15초간 분리단계를 수행하였다. RP4와 RP5 유전자의 발현은 Thermal Cycler DICE Real-time 시스템(Takara)에 따라 상대적인 Ct($2^{-\triangle \triangle CT}$) 방법으로 결정하였으며, RP4와 RP5 mRNA 발현 수준은 EF-1α mRNA 발현 정도와 비교하여 평균±표준편차의 값으로 나타내었고, 각 조직간 유전자 발현의 유의적 차이는 ANOVA(one-way analysis of variance) 분석을 통해 확인하였다.

[0058] **병원체 감염에 의한 RP4 및 RP5 유전자의 발현분석**

[0059] 각기 다른 종류의 병원균에 의한 RP4 및 RP5의 mRNA 발현 수준을 분석하기 위해서, 건강한 돌돔에 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*), 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*) 또는 RSIV(red seabream iridovirus)를 인위감염시켰다. 구체적으로, 에드워드시엘라 타르다 및 스트렙토코커스 이니애는 국립수산과학원(부산, 한국)으로부터 제공받아 사용하였으며, RSIV는 통영의 수산시장에서 RSIV 감염된 돌돔의 조직으로부터 분리하여 사용하였다. 병원균은 부검 및 PCR을 통해서 확인, 분석하였다. 에드워드시엘라 타르다, 스트렙토코커스 이니애 및 RSIV는 PBS(phosphate-buffered saline)로 현탁하여 각각 $1.5x10^5$ cells/fish, $1.5x10^5$ cells/fish 및 $1.0x10^4$ copies/fish가 되도록 돌돔의 복강에 주사하였으며, 병원균을 접종한 어체들은 먹이 공급없이 23~26℃의 통기(通氣)의 바닷물 조건에서 유지하였다. 접종 후 0(대조구), 6, 12, 24 및 48시간 후에 각 병원균별 3마리씩 무작위로 선정하여 신장, 비장 및 아가미 조직을 적출하였다. 적출한 조직에서 RP4 및 RP5의 mRNA 발현 수준을 확인하기 위한 총 RNA 추출 및 cDNA 합성 그리고 qRT-PCR은 전술한 정상 어체의 조직별 RP4 및 RP5 유전자 발현 분석에 기재된 방법과 동일하게 수행하였다.

[0060] **RP4 및 RP5의 AMP12 도메인 펩티드 합성**

[0061] SMART(Simple Modular Architecture Research Tool) 프로그램을 통해 예측된 RP4와 RP5의 AMP12(antimicrobial peptide 12) 도메인 펩티드를 GL Biochem(중국)에 의뢰하여 합성하였다. 합성된 펩티드는 HPLC로 95%까지 정제하였으며, 25% 아세토니트릴에 녹였으며, 사용 전까지 4℃에서 보관하였다.

[0062] **항균활성 분석**

[0063] 본 발명의 항균활성 분석에 사용된 그람 양성균은 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*, FP5228)이고, 그람 음성균은 에로모나스 살모니시다(*Aeromonas salmonicida*, RFAS1), 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*, FP4130), 비브리오 알기노리티커스(*Vibrio alginolyticus*, KCCM2928), 비브리오 할베이(*Vibrio harveyi*, ATCC14126) 및 비브리오 오르달리(*Vibrio ordalii*, KCCM41669)이다. 상기 모든 미생물은 국립수산과학원으로부터 공급받았으며, 모든 세균 균주들은 뇌심장침출액(brain heart infusion, BHI) 고체 배지에서 연속적으로 배양하였다.

[0064] 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위해서, 배지미량희석법(broth

microdilution)을 사용하여 세균 증식이 일어나지 않는 최소 농도를 측정하였다. 즉, 모든 세균 균주들을 BHI 액체 배지에 배양하고, 액상 배양된 세균들을 1,000 x*g*의 속도로 10분동안 원심분리하여 세포 펠렛을 수득하고, 얻어진 세포 펠렛을 PBS로 세척한 후 540nm에서 흡광도가 0.15가 되도록 재현탁하여 Mueller Hinton(MH) 액체 배지에 $5x10^6$ cfu/㎖이 되도록 희석하여 준비하였다. 1,000㎛M 스톡(stock) 농도의 합성된 피스시딘 RP4 및 RP5 펩티드는 96 웰 플레이트에 MH 액체 배지로 2배씩 단계 희석하여 0.5㎛M 농도까지 준비하였다. 상기 희석된 각각의 세균(50㎕)을 합성된 피스시딘 RP4 및 RP5 펩티드가 단계 희석되어 준비되어 있는 96 웰 플레이트에 넣어 혼합하고, 알루미늄 호일로 덮은 후 상온에서 12시간 동안 진탕배양하였다. 세균 성장은 $VICTOR^3$ 1420 Multilabel Counter(PerkinElmer, 미국)를 사용하여 540nm에서 배양액의 흡광도 변화를 측정하여 분석하였다. 또한, 세균의 성장이 50%가 되는 반최고치억제농도(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})를 측정하였다.

[0065] **용혈활성 분석**

[0066] 합성된 피스시딘 RP4 및 RP5 펩티드의 세포 독성을 분석하기 위해, 상기 각 펩티드의 용혈활성을 확인하였다. 간단하게, 분리한 돌돔의 적혈구를 PBS로 3회 세척한 후 10%(v/v) 농도로 PBS에 재현탁하였고, 상기 항균활성 분석 방법에서 실시한 것과 동일하게 합성된 각 피스시딘 펩티드를 96 웰 플레이트에 단계 희석하여 준비하고, 현탁한 돌돔의 적혈구를 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 플레이트를 37℃에서 30분간 진탕배양한 후, 400 x*g*에서 15분간 원심분리하였다. 원심분리 후, 상층액 70㎕을 새로운 96 웰 플레이트로 옮긴 후, 540nm에서 광학밀도를 측정하였다. 용혈의 정도는 0.2% Triton X-100을 적혈구에 처리한 그룹의 용혈 정도를 100% 용혈로 하여 이에 대한 상대적인 값으로 계산하였다.

[0067] **실시예 1. RP4 및 RP5의 분자적 특징 분석**

[0068] 돌돔 유래의 신규한 피스시딘인 RP4와 RP5의 유전자는 각각 240bp 및 249bp 크기의 ORF(open reading frame)를 포함하며 각각 80개 및 83개의 아미노산을 코딩하는 것으로 확인되었다. 상기 두 피스시딘은 하나의 펩티드(1~22개의 아미노산)와 항균 펩티드(antimicrobial peptide, AMP) 12 도메인(RP4의 경우 23~37개의 아미노산; RP5의 경우 23~43개의 아미노산)으로 구성되어 있었다. RP4 및 RP5의 분자량, 등전점 및 총 전하와 각각의 AMP12 도메인의 아미노산 서열 정보는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0069] RP4 및 RP5의 AMP12 도메인 서열 및 특징

	AMP12 도메인 서열	분자량(kDa)	등전점	총 전하
RP4	FFQELKEGWKNIKKA (서열번호 1)	18.7	10.2	2.0
RP5	FFGRLKAVFRGARQGWKEHRY (서열번호 2)	26.1	12.0	5.1

[0070] SWISS 모델을 사용하여 RP4와 RP5의 AMP 12 도메인의 삼차 구조를 예측한 결과는 도 1과 같으며, 이 결과는 소수성과 친수성 잔기를 가지는 양친매성 알파 나선형 구조를 가진 다른 피스시딘 패밀리의 AMP 모델과 유사한 것으로 확인되었다.

[0071] Neighbor-joining(NJ)법을 이용하여 작성된 계통수를 보면, 본 발명의 돌돔 유래 신규한 피스시딘 RP4 및 RP5는 다른 어류 유래의 피스시딘 4 및 피스시딘 5 단백질과 하나의 주된 가지 내에서 무리를 이루는 것으로 확인되었다(도 2).

[0072] **실시예 2. 건강한 어체의 각 조직별 RP4 및 RP5 발현 분석**

[0073] 건강한 돌돔의 다양한 조직에서 RP4와 RP5의 mRNA 발현수준을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다. 그 결과, RP4 및 RP5 모두 말초혈액 백혈구(PBL)에서 가장 낮은 mRNA 발현 수준을 보였으며, 그 외 실험한 모든 조직에서 보편적으로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다(도 3). RP4의 경우, 말초혈액 백혈구에서 발현되는 mRNA수준과 비교하여 근육 조직에서 243.9배로 가장 높은 발현량을 나타내었으며, 그 뒤를 이어 간(181.9배), 아가미(163배), 비장(156.1배), 피부(130.1배), 신장(86배), 장(79배) 및 두신(5배)의 순으로 유전자의 발현이 확인되었다(도 3A). RP5의 경우는, 말초혈액 백혈구에서 발현되는 mRNA 수준과 비교하여 이자에서 340.1배로 가장 높은 mRNA 수준이 확인되었으며, 그 뒤를 이어 아가미(292.7배), 신장(292배), 근육(226.5배), 간(123.4배), 장(122.2배), 피부(53.8배) 및 두신(40.3배) 순으로 확인되었다(도 3B).

[0074] **실시예 3. 병원균 감염 후 RP4 및 RP5의 발현 분석**

[0075] 다른 종류의 병원균에 의한 돌돔의 직접적인 면역성에 있어서 RP4 및 RP5의 발현 수준을 확인하기 위해서 병원균을 인위감염 시킨 후, 신장, 비장 및 아가미에서 mRNA 발현 수준을 시간별로 조사하였다.

[0076] 그 결과, 세균 및 바이러스 병원균에 대해서 전반적으로 RP4가 RP5 보다 병원균 감염 후 높은 수준으로 발현 유도되는 것을 확인하였다(도 4). 그람 음성균인 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*)를 인위감염 시킨 경우, RP4의 mRNA는 대조구(0 시간)에 비해 신장과 비장은 12시간째에 각각 12.8배 및 21.9배로 가장 높은 발현 수준을 나타낸 후 시간이 경과됨에 따라 발현 수준이 감소되는 경향을 보였으며, 아가미는 신장과 비장에 비해서는 mRNA 발현 유도 수준이 높지 않은 것으로 확인되었다(도 4A). 반면 RP5의 경우는 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 인위감염 후 아가미에서는 mRNA의 발현 수준이 증가되지 않고 오히려 감소됨을 확인하였고, 신장에서는 6시간째에 대조구 대비 7.8배의 발현 수준을 보인 후 감소되는 경향을, 비장에서는 12시간째에 대조구 대비 3.8배의 발현 수준을 보인 후 감소되는 경향을 보여주었다(도 4B). 그람 양성균인 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*) 인위감염 후의 RP4 및 RP5의 mRNA 발현 수준 변화를 분석한 결과에서도 RP4의 경우에는 병원균 인위감염 후 신장, 비장 및 아가미에서 mRNA 발현 수준이 증가됨을 확인할 수 있었으며, 각 조직별로는 신장에서 48시간째 대조구 대비 15.1배, 비장에서는 24시간째에 대조구 대비 28.0배 그리고 아가미에서는 12시간째에 대조구 대비 11.3배의 mRNA 발현 수준을 관찰할 수 있었다(도 4C). 반면, RP5의 경우에는 비장 및 아가미 조직에서 mRNA의 발현 유도가 거의 이루어지지 않음을 확인할 수 있었고, 신장에서만 6시간 및 24시간째에 대조구 대비 약 5배 정도의 mRNA 발현 수준을 보여주었다(도 4D).

[0077] RSIV 바이러스 감염의 경우에는 RP4 및 RP5 모두 세균 감염의 경우보다는 mRNA 발현 수준 증가폭이 크지 않은 것으로 확인되었다. RSIV 감염 후 RP4의 mRNA 발현 수준은 신장에서는 6시간째, 비장에서는 24시간째, 그리고 아가미에서는 6시간째에 가장 높은 것으로 확인되었으며(도 4E), RP5의 경우에는 바이러스 감염 후 신장과 아가미 조직에서 mRNA의 발현이 유도되지 않은 것으로 확인되었다(도 4F).

[0078] **실시예 4. 항균활성 분석**

[0079] 합성된 RP4와 RP5 펩티드의 항균활성을 최소억제농도(MIC)와 반최고치억제농도(IC_{50})를 통해 분석한 결과, 그람 양성균과 그람 음성균에 대한 두 펩티드의 항균활성에는 다소 차이가 있는 것으로 관찰되었다(표 3).

표 3

[0080] 다양한 병원균에 대한 RP4와 RP5의 항균활성

세균	그람	온도 (℃)	RP4		RP5	
			MIC (μM)	IC_{50}(μM)	MIC (μM)	IC_{50}(μM)
Aeromonas salmonicida	(-)	27	7.8	250	7.8	125
Edwardsiella tarda	(-)	27	62.5	1,000	15.6	1,000
Streptococcus iniae	(+)	27	15.6	500	7.8	62.5
Vibrio alginolyticus	(-)	27	7.8	250	0.5	31.3
Vibrio harveyi	(-)	27	125	>1,000	0.5	31.3
Vibrio ordalii	(-)	27	2.0	31.3	15.6	500

[0081] RP4 펩티드는 비브리오 할베이(*V. harveyi*)에 대해서 가장 약한 항균활성을 나타내었으며, 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)에 대해서도 약한 항균활성을 보여주었다. 반면, 비브리오 오르달리(*V. ordalii*)에 대해서는 가장 강력한 항균활성을 보여주었다.

[0082] RP5 펩티드는 RP4 펩티드에 비해 보다 넓은 범위의 항균활성을 보여주었는데, 특히, 비브리오 알기노리티커스(*V. alginolyticus*) 및 비브리오 할베이(*V. harveyi*)에 대해서 강력한 항균활성을 보여주었으며, 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 및 비브리오 오르달리(*V. ordalii*)는 RP5 펩티드에 대해서는 민감하지 않은 것으로 확인되었다.

[0083] **실시예 5. 용혈활성 분석**

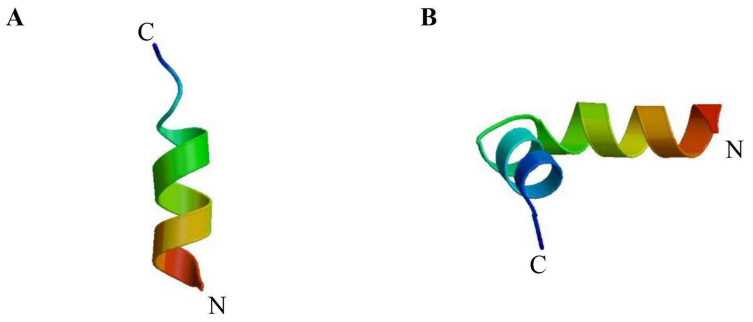
[0084] 합성된 RP4 및 PR5 펩티드의 세포독성을 분석하기 위해서 돌돔의 적혈구에 대한 용혈활성을 시험하였다. 그 결과, 두 종의 펩티드 모두 약한 수준의 세포독성을 보이는 것으로 확인되었으나, RP5 펩티드가 RP4 펩티드보다는

강한 용혈활성을 보이는 것으로 확인되었다(도 5). RP5 펩티드의 경우는 63 μM 농도까지는 용혈 활성이 거의 확인되지 않았으나, 상기 농도 이후의 구간에서 적혈구 세포에 대한 독성이 점차 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, RP5 펩티드가 약 65% 수준의 적혈구 용혈 정도를 보이는 500 μM 농도에서 RP4 펩티드의 경우에는 어떠한 세포독성도 확인되지 않음을 관찰하였다(용혈 정도 0.92%).

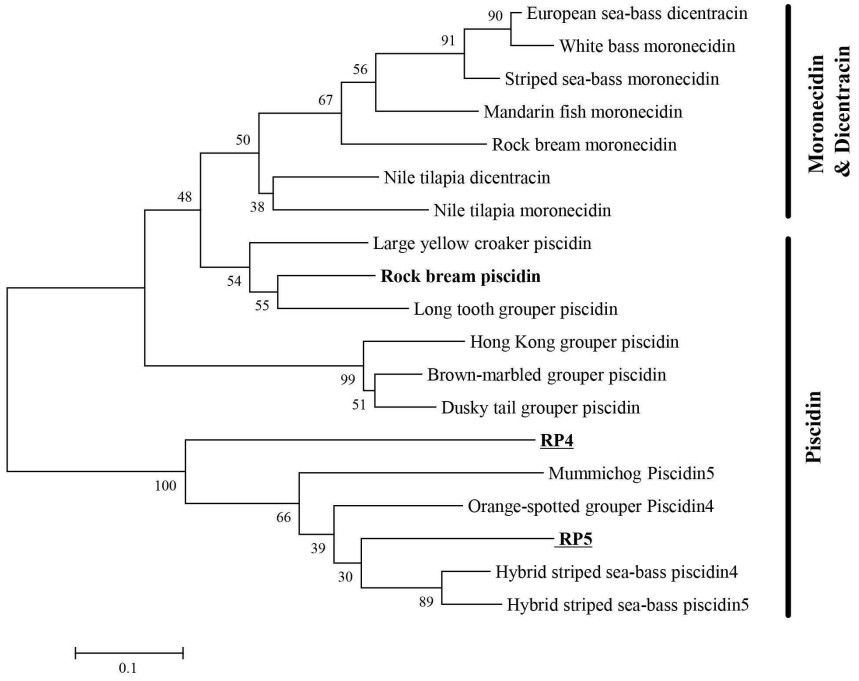
[0085] 이상의 결과들을 통해, 돌돔 유래의 신규한 피스시딘 펩티드, RP4와 RP5는 다양한 병원균에 대해 항균 활성이 있으며, 약한 세포 독성이 있음을 알 수 있었다. 특히, 병원균에 대한 최소억제농도(MIC)와 반최고치억제농도(IC_{50}) 결과 및 용혈활성 결과를 종합하면, RP4 펩티드의 경우는 스트렙토코커스 이니애(*Streptococcus iniae*), 에로모나스 살모니시다(*Aeromonas salmonicida*), 비브리오 알기노리티커스(*Vibrio alginolyticus*) 및 비브리오 오르달리(*V. ordalii*)에 우수한 항균 활성이 있으며, RP5 펩티드의 경우는 스트렙토코커스 이니애(*S. iniae*), 비브리오 알기노리티커스(*V. alginolyticus*), 비브리오 할베이(*V. harveyi*)에 대해 항균 효과가 우수한 펩티드임을 알 수 있었으며, 본 발명의 상기 두 종의 신규한 피스시딘 펩티드는 기존의 항생제를 대체하는 물질로 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

도면

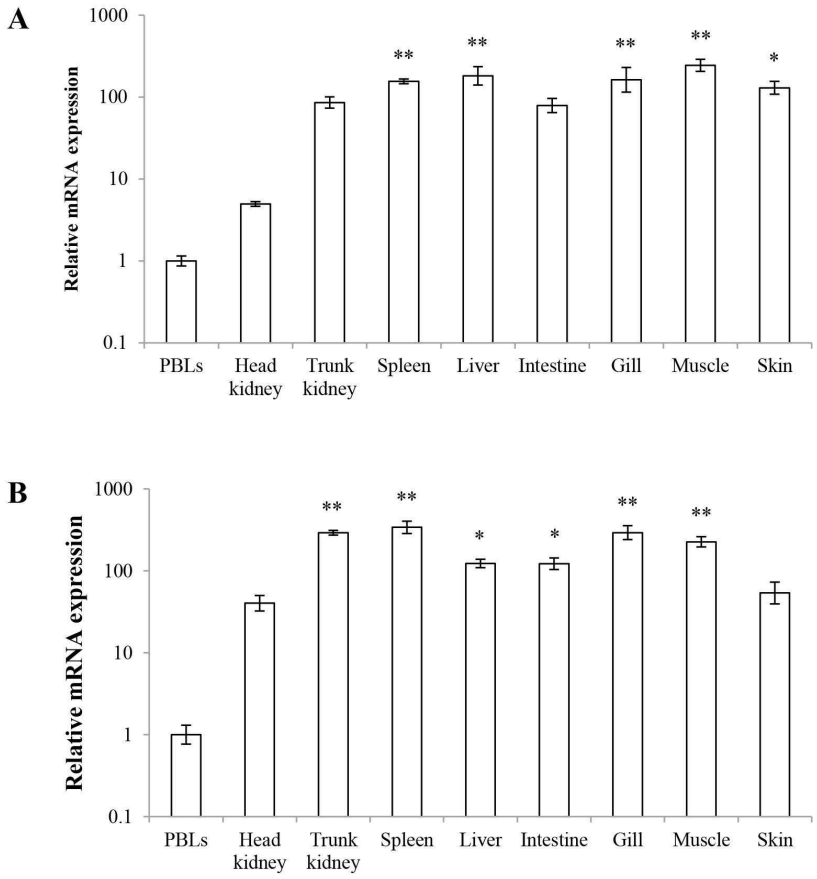
도면1



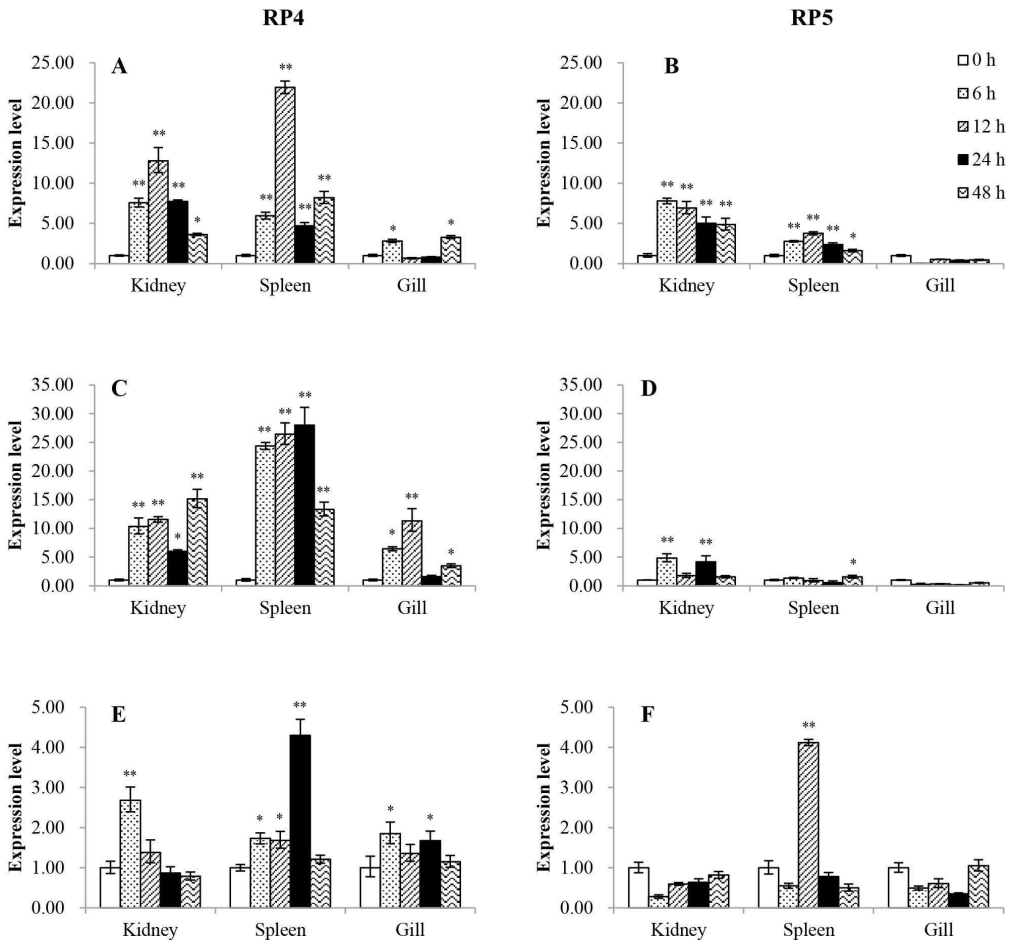
도면2



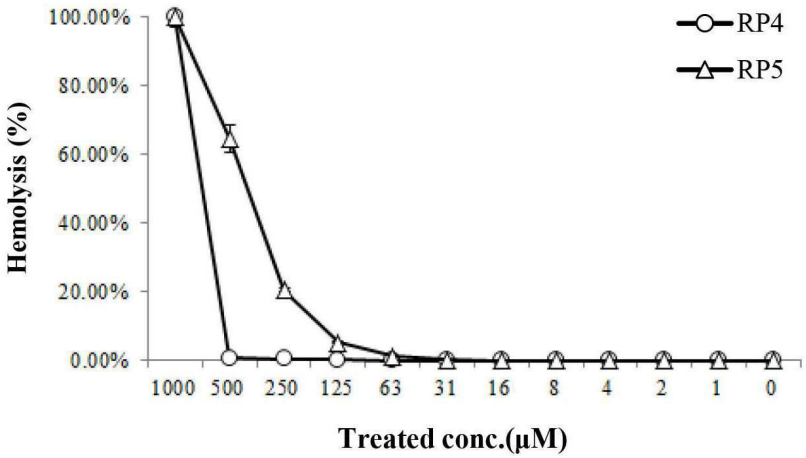
도면3


A
Relative mRNA expression
1000
100
10
1
0.1
**
**
**
**
*
PBLs
Head kidney
Trunk kidney
Spleen
Liver
Intestine
Gill
Muscle
Skin
B
Relative mRNA expression
1000
100
10
1
0.1
**
**
*
*
**
**
PBLs
Head kidney
Trunk kidney
Spleen
Liver
Intestine
Gill
Muscle
Skin

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Novel piscidin peptide from Rock bream and uses thereof

<130> PN16518

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Oplegnathus fasciatus

<400> 1

Gly Glu Cys Phe Phe Gln Glu Leu Lys Glu Gly Trp Lys Asn Ile Lys
1 5 10 15

Lys Ala

<210> 2

<211> 69

<212> PRT

<213> Oplegnathus fasciatus

<400> 2

Met Lys Cys Val Met Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Val Val Leu Met
1 5 10 15

Ala Glu Pro Gly Glu Cys Phe Phe Gln Glu Leu Lys Glu Gly Trp Lys
20 25 30

Asn Ile Lys Lys Ala Trp Lys Glu Glu Ala Phe Gln Lys Asp Leu Lys
35 40 45

Lys Met Ala Lys Lys Tyr Gly Pro Asp Trp Leu Gln Lys Ile Gly Val
50 55 60

Thr Thr Thr Pro Pro

65

<210> 3

<211> 210

<212> DNA

<213> Oplegnathus fasciatus

<400> 3

atgaagtgtg ttatgatctt tcttgtgttg acgctggtcg tcctcatggc tgaacctggg 60

gagtgttttt ttcaagagct gaaagaaggg tggaaaaata tcaaaaaagc atggaaagag 120

gaagctttcc agaaggactt gaagaagatg gctaaaaagt atggacctga ttggctgcag 180

aaaataggag tcaccaccac accaccataa 210

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Oplegnathus fasciatus

<400> 4

Gly Glu Cys Phe Phe Gly Arg Leu Lys Ala Val Phe Arg Gly Ala Arg
1 5 10 15

Gln Gly Trp Lys Glu His Arg Tyr
20

<210> 5

<211> 82

<212> PRT

<213> Oplegnathus fasciatus

<400> 5

Met Lys Tyr Val Met Ile Phe Leu Val Leu Thr Leu Val Val Leu Met
1 5 10 15

Ala Glu Pro Gly Glu Cys Phe Phe Gly Arg Leu Lys Ala Val Phe Arg
20 25 30

Gly Ala Arg Gln Gly Trp Lys Glu His Arg Tyr His Arg Asp Met Arg
35 40 45

Lys Met Ala Glu Arg Tyr Gly Pro Asn Trp Gln Gln Lys Leu Gly Gly
50 55 60

Asn Ala Asn Pro Gln Pro Glu Glu Asn Ala Glu Asp Ala Pro Ala Tyr
65 70 75 80

Gln Arg

<210> 6

<211> 249

<212> DNA

<213> Oplegnathus fasciatus

<400> 6

atgaagtatg ttatgatctt tcttgtgttg acgctggtcg tcctcatggc tgaacccggg 60

gagtgttttt ttggacgtct aaaagccgta ttcagaggtg ccagacaagg atggaaagag 120

cacagatacc accgtgacat gaggaagatg gctgaaagat atggaccaaa ttggcagcag 180

aaactaggag ggaacgccaa cccacaacct gaagaaaatg ctgaagatgc tccagcttat 240

cagcgttga 249

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gctgaacctg gggagtgttt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gcagccaatc aggtccatac 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gagcacagat accaccgtga 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

cgctgataag ctggagcatc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

cccctgcagg acgtctacaa 20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

aacacgaccg acgggtaca 19