



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0094532  
(43) 공개일자 2013년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/005 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

C12N 7/01 (2006.01) A01N 63/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0015863

(22) 출원일자 2012년02월16일

심사청구일자 2012년02월16일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

박윤경

전라남도 장성군 남면 마흥길 45

김시욱

광주광역시 남구 봉선동 70 한국아텔리움아파트  
101-1403

오정일

부산광역시 금정구 부산대학로 63번길 2

(74) 대리인

이원희

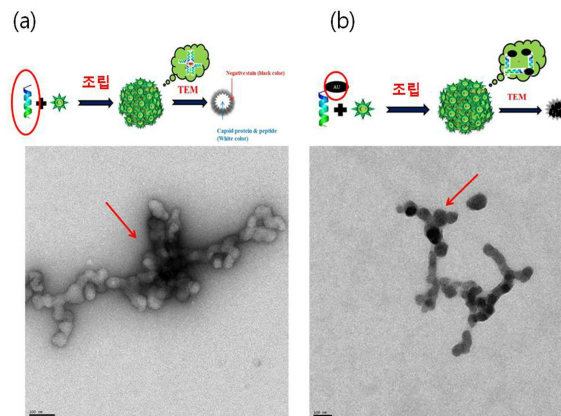
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 HPA3NT3 항적조 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항적조 활성을 갖는 HPA3NT3로 기재되는 항적조 펩타이드를 적조로부터 분리된 CsNIV에 탑재하는 것에 관한 것이며, 구체적으로 탁월한 항조류 활성을 나타내고, 세포 독성이 없으며, 자연 분해가 가능하며, 수용성인 HPA3NT3 펩타이드를 CsNIV 캡시드에 탑재함으로써, 상기 수용성인 HPA3NT3 펩타이드가 바닷물에서 쉽게 녹아버리는 단점을 보완하였으므로, HPA3NT3 펩타이드-CsNIV 캡시드 복합체를 유효성분으로 함유하는 적조 방제제를 해양 생태계에 안전하고 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-2000122

부처명 교육과학기술부

연구사업명 파이오니아 사업단

연구과제명 유해조류 제어를 위한 바이오나노 캡시드 제조 및 탑재 융합기술개발

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2011.03.01 ~ 2012.02.29

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드가 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스 (*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV) 캡시드(capsid)에 탑재된, 항적조 활성을 갖는 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, HPA3NT3 펩타이드는 서열번호 2의 HPA3 펩타이드 서열에서 9번째 글루탐산(Glu)과 13번째 세린(Ser)을 라이신(Lys)으로 치환한 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 항적조 활성을 갖는 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체.

### 청구항 3

제 2항에 있어서, HPA3 펩타이드는 서열번호 1의 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드 서열에서 16번째 글루타민(Gln)과 18번째 아미노산인 아스파르트산(Asp)을 트립토판(Trp)으로 치환한 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 항적조 활성을 갖는 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, HPA3NT3 펩타이드는 코클로디니움 폴리크리코이드스(*Cochlodinium polykrikoides*, *C. polykrikoides*), 코벤티아 마리나(*Cobetia marina*, *C. marina*), 편모조(*Heterosigma akashiwo*, *H. akashiwo*) 및 샤토넬라 카테나툼(*Chattonella catenatum*, *C. catenatum*)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 적조 유발 해조류에 대하여 항적조 활성이 있는 것을 특징으로 하는 항적조 활성을 갖는 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체.

### 청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 CsNIV 캡시드는 서열 번호 4 또는 5의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 항적조 활성을 갖는 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체.

### 청구항 6

- 1) pH 5.5 내지 6.5인 완충용액에서 CsNIV 캡시드를 캡소머로 분해시키는 단계;
- 2) HPA3NT3 펩타이드를 첨가하는 단계; 및
- 3) pH 7.5 내지 8.5인 완충용액에서 HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드 복합체를 형성시키는 단계를 포함하는, 제 1항에 기재된 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체의 제조방법.

### 청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 단계 1)의 완충용액은 pH 6.0인 것을 특징으로 하는 제 1항에 기재된 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체의 제조방법.

## 청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 단계 3)의 완충용액은 pH 8.0인 것을 특징으로 하는 제 1항에 기재된 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체의 제조방법.

## 청구항 9

제 1항에 기재된 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체를 유효성분으로 함유하는 적조 방제제.

## 청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 적조 방제제는 코클로디니움 폴리크리코이드스, 코베티아 마리나, 편모조 및 샤토넬라 카테나툼으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 항적조 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 적조 방제제.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 항적조 활성을 가지는 HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스 (*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV) 캡시드 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 플랑크톤이 번식하기에 알맞은 환경을 만나 대량 번식하게 되면, 이들이 가지고 있는 다양한 색소로 인하여 해수의 색깔이 붉게, 혹은 녹색, 갈색으로 변하게 되는 현상을 통칭 적조라 부르고 있다. 우리나라 남해안 일대에 7월~9월 사이에 장마철이나 비가 온 뒤에는 바다의 색깔이 적갈색으로 변하는 적조가 발생하고, 바다에 살고 있는 굴, 조개, 홍합 등의 양식자원을 때로는 물고기까지 폐사하게 만든다. 또한, 유독성 식물플랑크톤을 먹은 어패류를 사람이 먹게 되면 여러 가지 패독 현상이 나타난다.

[0003] 현재까지 적조를 예방하거나 적조로 인한 피해를 줄이기 위한 여러 가지 방법들이 연구되었다. 화학약품을 뿌리거나(Steidinger, 1983; Ryu et al., 1998) 초음파 분쇄기, 오존 발생기, 원심분리기를 사용하여 화학적, 물리적으로 적조생물을 없애는 방법이 있다. 또한 점토를 이용하여 적조 원인생물을 흡착시켜 바닥으로 침전시키는 방법도 개발되었다(Na et al., 1996; Choi et al., 1998). 그러나 이런 방법의 사용은 생태계에 또 다른 악영향을 미칠 수 있으며, 광범위한 적조 발생해역에서 이용되기에는 많은 문제점이 있다.

[0004] 현재 적조를 해결하기 위한 다른 방안으로써, 생물학적 방법을 이용하여 적조 원인생물을 제거하는 연구가 진행되고 있다. 이것은 생태계 내에서 피식자-포식자 관계를 이용하여 원하지 않는 생물을 제거하는 방법이다(Ishio et al., 1989; Sakata et al., Fukami et al., 1992; Park et al., 1998). 그러나, 이 방법은 생태계의 먹이 사슬을 변화시켜 또 다른 문제점을 야기할 수도 있다. 또한, 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 축적될 수 있으므로, 결국 농업부분에서 사용되는 농약에 의해 야기되는 문제점들처럼 해양생태계나 바다에서 생산되는 먹거리들에 축적되어 인체에까지 축적될 수 있는 가능성이 있다.

[0005] 이러한 문제점들을 고려해 볼때, 자연분해가 가능하며 인체나 자연 생태계에 무해한 항적조제로써 사용되어질 수 있는 것으로써 펩타이드나 단백질제제가 있다(대한민국 등록특허 10-1062793). 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 있다. 예를 들면, 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 확인

된 바 있다. 그러나 이 펩타이드는 낮은 농도에서 세포독성이 높게 나타나는 것으로 보고되어 있다.

[0006] 기존에 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스(*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV)의 피막 단백질 유전자가 연구된 바 있다(Y. Park *et al.*, Virus Research 142 (2009) 127.133). 하지만, 아직까지 항적조 활성을 가지며, 수용성인 특정 펩타이드를 적조로부터 분리된 CsNIV 캡시드에 탑재함으로써, 상기 항적조 활성을 가지는 특정 펩타이드가 바닷물에서 쉽게 용해되는 것을 방지하고, 펩타이드의 항적조 활성이 유지되는 것에 대해 확인한 바는 없다.

[0007] 이에 본 발명자들은 헬리코박터 파이오리 유래의 HP(2-20) 펩타이드를 모체로 하여 소수성 부분을 증가시킨 유사체(HPA3) 펩타이드의 불규칙한 구조를 가지는 N-말단 부분을 절단시킨 후 양이온을 증가시킨 유사체인 HPA3NT3 펩타이드를 적조로부터 분리한 CsNIV 캡시드에 탑재하였을 때, 상기 HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성이 유지되는 것을 확인하였으므로, HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드를 적조 방제제의 유효성분으로 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 항적조 활성을 가지는 HPA3NT3 펩타이드가 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스(*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV) 캡시드에 탑재된, HPA3NT3 펩타이드- CsNIV 캡시드의 복합체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항적조 활성을 가지는 HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드 복합체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 항적조 활성을 가지는 HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드 복합체를 함유하는 적조 방제제를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 HPA3NT3 펩타이드가 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스(*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV) 캡시드(capsid)에 탑재된 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은

[0013] 1) pH 5.5 내지 6.5 인 완충용액에서 CsNIV 캡시드를 캡소머로 분해시키는 단계;

[0014] 2) HPA3NT3 펩타이드를 첨가하는 단계; 및

[0015] 3) pH 7.5 내지 8.5 인 완충용액에서 HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드 복합체를 형성시키는 단계를 포함하는, 상기 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체의 제조방법을 제공한다.

[0016] 아울러, 본 발명은 상기 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체를 유효성분으로 함유하는 적조 방제제를 제공한다.

### 발명의 효과

[0017] 본 발명은 HPA3NT3 항적조 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드에 관한 것으로, 구체적으로 세포 독성이 없고, 자연 분해가 가능하며, 수용성인 항적조 HPA3NT3 펩타이드를 CsNIV 캡시드에 탑재한 후, 적조 유발 조류에 처리하였을 때, HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성이 유지되는 것을 확인하였다. 따라서, 수용성인 HPA3NT3 펩타이드를 CsNIV 캡시드에 탑재함으로써, 상기 HPA3NT3 펩타이드가 바닷물에서 쉽게 녹아버리는 단점을 보완하였으므로, HPA3NT3 펩타이드-CsNIV 캡시드 복합체를 유효성분으로 함유하는 적조 방제제를 해양생태계에 안전한 적조 방제제의 유효성분으로 유용하게 사용할 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스(*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV)에 탑재된 HPA3NT3 펩타이드의 확인을 위한 방법을 나타낸 도이다:

TEM: 투과전자현미경(transmission electron microscope).

도 2a는 캡소머(capsomer) 형태로 떨어져 있는 바이러스의 단량체 형태를 전자현미경으로 관찰한 도면이고, 도 2b는 도 2a의 캡소머 형태의 바이러스의 단량체 형태가 CsNIV 캡시드(capsid)로 조립된 것을 전자현미경으로 관찰한 도면이다;

4 가지 색의 원 표시 : 조립된 캡시드의 사이즈가 약간 상이함을 나타낸다.

도 3a는 CsNIV 바이러스 캡소머에서 캡시드로 조립할 때 골드가 탑재된 펩타이드를 탑재시켜서 그대로 전자현미경에서 관찰한 도면이고, 도 3b는 네가티브 스테이닝 방법으로 CsNIV 바이러스 캡시드에 탑재된 골드가 탑재된 펩타이드를 관찰한 도면이다;

검은색: 골드가 탑재된 펩타이드.

도 4는 물리화학적 형광 분석 방법을 사용하여 펩타이드의 캡시드 내부에 탑재 여부를 확인한 도면이다.

도 5는 캡시드 안에 탑재된 펩타이드를 유해 적조인 샤토넬라 카테나툼(*Chattonella catenatum*)에 처리하였을 때, 캡시드 내부의 펩타이드가 캡시드의 해리와 함께 항적조 활성 효과를 나타내는 도면이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 서열번호 3의 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드가 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스(*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV) 캡시드(capsid)에 탑재된, 항적조 활성을 갖는 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체를 제공한다.

[0021] 상기 HPA3NT3 펩타이드는 서열번호 2의 HPA3 펩타이드 서열에서 9번째 글루탐산(Glu)과 13번째 세린(Ser)을 라이신(Lys)으로 치환한 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0022] 상기 HPA3 펩타이드는 서열번호 1의 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드 서열에서 16번째 글루타민(Gln)과 18번째 아미노산인 아스파르트산(Asp)을 트립토판(Trp)으로 치환한 서열을 갖는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0023] 상기 HPA3NT3 펩타이드는 코클로디니움 폴리크리코이드스(*Cochlodinium polykrikoides*, *C. polykrikoides*), 코베티아 마리나(*Cobetia marina*, *C. marina*), 편모조(*Heterosigma akashiwo*, *H. akashiwo*) 및 샤토넬라 카테나툼(*Chattonella catenatum*, *C. catenatum*)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 항적조 활성이 있는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0024] 상기 CsNIV 캡시드는 본 발명의 참조로서 포함되는 Y. Park 등(Virus Research 142 (2009) 127.133)에 기재되는 아미노산 서열 중 하나일 수 있으며, 구체적으로 서열 번호 4 또는 5의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드와 16번째 아미노산인 글루타민과 18번째 아미노산인 아스파르트산을 트립토판으로 치환한 유사체 HPA3 펩타이드, HPA3에서 구조적으로 불규칙한 N-말단 부위를 절단한 후 양이온을 증가시키기 위하여 9번째 글루탐산과 13번째 세린을 라이신으로 치환한 아미노산 서열을 갖는 양친매성 항적조 HPA3NT3 펩타이드(peptide)를 제조하였다(표1 참조).

[0026] 또한, 본 발명은

[0027] 1) pH 5.5 내지 6.5 인 완충용액에서 CsNIV 캡시드를 캡소머로 분해시키는 단계;

- [0028] 2) HPA3NT3 펩타이드를 첨가하는 단계; 및
- [0029] 3) pH 7.5 내지 8.5 인 완충용액에서 HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드 복합체를 형성시키는 단계를 포함하는, 상기 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0030] 상기 단계 1)의 완충용액은 pH 6.0인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0031] 상기 단계 3)의 완충용액은 pH 8.0인 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 항적조 HPA3NT3 펩타이드(peptide)를 탑재하기 위해, 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스(*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV) 피막 단백질을 본 발명의 참조로서 포함되는 Y. Park 등(Virus Research 142 (2009) 127.133)의 내용을 제조하였다. 상기 CsNIV의 주요 피막 단백질의 아미노산 서열은 CsNIV로서 NCBI 단백질 데이터베이스(protein database)에 등록된 바있다((CsNIV, accession number YP\_473363)(서열번호: 4) 및 (CsNIV, accession number YP\_473362)(서열번호: 5)).
- [0033] 항적조 HPA3NT3 펩타이드의 CsNIV로의 탑재하기 위해, CsNIV 캡시드(capsid) 단백질을 pH 6 완충용액에서 단량체 구조나 작은 분자량의 캡소머 구조로 분해시켰다가, pH 8.0 완충용액에서 안정한 캡시드 구조를 형성할 때에 항적조 HPA3NT3 펩타이드를 적재하였다. 상기 조립과정에 의해 바이러스에 탑재된 HPA3NT3 펩타이드의 골드(gold) 탐침에 의한 확인하였을 때, 그 결과, 전자현미경으로 확인하였을 때, CsNIV 캡시드 안에 골드로 탐침된 HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 것을 확인하였다(도 1 참조).
- [0034] Ni-NTA 컬럼(column)을 이용하여 정제된 캡소머를 살조제인 HPA3NT3 펩티드 없이 조립하였으며 그 결과, 전자현미경으로 캡소머 형태로 떨어져 있는 바이러스의 단량체 형태를 관찰할 수 있었으며(도 2a 참조), 단량체 형태의 CsNIV 바이러스 캡시드로 조립된 것을 확인하였다(도 2b 참조). 아울러, 도 2b의 4 가지 색의 원으로 표시한 바와 같이 조립된 CsNIV 캡시드의 크기가 상이한 것을 확인하였다.
- [0035] 또한, 네가티브 스테이닝(negative staining) 방법을 이용하여 전자현미경으로 CsNIV 바이러스 캡시드에 탑재된 골드가 탐침된 펩타이드의 확인하였을 때, CsNIV 바이러스 캡소머에서 캡시드로 조립할 때 HPA3NT3 펩타이드를 탑재시킨 후 전자현미경으로 확인하였으며(도 3a 참조), 또한, CsNIV 바이러스 캡소머에서 캡시드로 조립할 때 골드가 탐침된 HPA3NT3 펩타이드를 탑재시키고 이를 네가티브 스테이닝 방법으로 확인하였다(도 3b 참조). 그 결과, 골드가 탐침된 펩타이드가 검은색으로 캡시드 내부에 존재함을 확인할 수 있었다. 아울러, 물리화학적 형광 분석 방법으로 펩타이드의 캡시드 내부에 탑재 여부 확인하였을 때, CsNIV 캡시드의 해리 후에 CsNIV 캡시드 내부에 존재하던 HPA3NT3 펩타이드에 탐침된 형광이 급속하게 나타남을 확인하였다(도 4 참조).
- [0036] 아울러, 본 발명은 상기 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체를 유효성분으로 함유하는 적조 방제제를 제공한다.
- [0037] 상기 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체의 농도는 0.01  $\mu\text{M}$  내지 100  $\mu\text{M}$ 일 때 항적조 활성을 나타내는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 HPA3NT3-CsNIV 캡시드 복합체의 농도가 0.25  $\mu\text{M}$  ~ 1.00  $\mu\text{M}$ 일 때 항적조 활성을 나타내는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0038] 상기 적조 방제제는 코클로디니움 폴리크리코이드스, 코베티아 마리나, 편모조 및 샤토넬라 카테나툼으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 적조유발 해조류에 대하여 항적조 활성을 가지는 것일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0039] 본 발명의 구체적인 실시예에서, CsNIV 캡시드 안에 탑재된 HPA3NT3 펩타이드가 항적조 효과를 가지는지 확인하기 위해, HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드를 유해 적조인 샤토넬라 카테나툼(*Chattonella catenatum*)에 처리하였으며, CsNIV 캡시드 내부에 있던 HPA3NT3 펩타이드가 CsNIV 캡시드의 해리와 함께 유해 적조를 파괴함을 확인하였다(도 5 참조).
- [0040] 따라서, 탁월한 항조류 활성을 나타내고, 세포 독성이 없으며, 자연 분해가 가능하며, 수용성인 HPA3NT3 펩타이드를 CsNIV 캡시드에 탑재함으로써, 상기 수용성인 HPA3NT3 펩타이드가 바닷물에서 쉽게 녹아버리는 단점을 보완하였으므로, HPA3NT3 펩타이드-CsNIV 캡시드 복합체를 유효성분으로 함유하는 적조 방제제를 해양생태계에 안전하고 유용하게 사용할 수 있다.

[0041] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예 및 실험예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 의해 제한되지 않는다.

[0042] <실시예 1> 항적조 펩타이드의 합성 및 분리정제

[0043] 양친매성 항적조 펩타이드(peptide)를 합성하기 위하여, 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드와 16번째 아미노산인 글루타민과 18번째 아미노산인 아스파르트산을 트립토판으로 치환한 유사체 HPA3 펩타이드, HPA3에서 구조적으로 불규칙한 N-말단 부위를 절단한 후 양이온을 증가시키기 위하여 9번째 글루탐산과 13번째 세린을 라이신으로 치환한 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드를 제조하였다(표1).

표 1

[0044] 시험에 사용된 펩타이드의 아미노산 서열

| 펩타이드명    | 서열                                             | 분자량    |
|----------|------------------------------------------------|--------|
| HP(2-20) | AKKVFKRLEKLFSKIQNDK-NH <sub>2</sub> (서열번호: 1)  | 2320.0 |
| HPA3     | AKKVFKRLEKLFSKIWNWK- NH <sub>2</sub> (서열번호: 2) | 2449.2 |
| HPA3NT3  | FKRLKKLFKKIWNWK- NH <sub>2</sub> (서열번호: 3)     | 2062.6 |

[0045] 펩타이드의 합성은 9-플루오레닐메톡시카보닐(9-fluorenylmethoxycarbonyl, Fmoc)를 아미노기 보호 용기로 이용하는 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법을 사용하여 합성하였다. 본 발명의 펩타이드에서 카르복실말단이 -NH<sub>2</sub> 형태인 펩타이드는 링크 아미드 MBHA-레진(Rink Amide MBHA-Resin)을 출발물질로 사용하였다. Fmoc-아미노산의 커플링(coupling)에 의한 펩타이드 체인(chain)의 연장은 N-하이드록시벤조-트리아졸-디사이클로-헥시카르보이미드(N-hydroxybenzo triazole-dicyclo-hexycarbodiimide)(HOBt-DCC)에 의하여 수행하였다. 각 펩타이드 아미노 말단의 Fmoc-아미노산을 커플링시킨 후, 20% 피페리딘/디메틸 포마미드(piperidine/Dimethyl formamide, 이하 'DMF' 라 약칭함) 용액으로 Fmoc기를 제거하고 DMP 및 디클로로메탄(dichloromethane, DCM)으로 여러번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 건조시킨 레진에 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid, TFA) : 페놀(phenol) : 티오아니졸(thioanisole) : 물(H<sub>2</sub>O) : 트리이소프로필실란(triisopropylsilane) = 85: 5: 5: 2.5: 2.5(vol./vol.) 용액을 가하고 4 시간 동안 반응시켜 보호기를 제거하고, 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 다음, 차가운 디에틸 에테르(diethyl ether)로 30분 동안 반응 시킨 후 원심분리기로 펩타이드를 침전시켰으며, 다시 디에틸 에테르로 침전된 펩타이드를 한번 더 침전시키고 공기중에 건조시켰다. 상기 과정을 통해 얻은 미가공(crude) 형태의 펩타이드를 pH 8인 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate)에 녹여 아세토니트릴(acetonitrile)을 그라디언트(gradient)로 하여 정제형 역상 HPLC 컬럼(reverse phase-HPLC column)(Delta Pak, C<sub>18</sub> 300Å, 19.0 mm × 30 cm, Waters)으로 정제하였다. 정제된 합성 펩타이드를 에드만 디그래데이션(Edman degradation)방법으로 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산의 조성을 측정하고, 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI) 질량 분석법을 이용하여 펩타이드의 분자량을 측정하였다.

[0046] 그 결과, 본 발명에서 합성한 모든 펩타이드는 95% 이상의 순도를 나타내었으며, 측정된 분자량이 아미노산 서열로부터 계산하여 얻은 분자량과 일치하여 정확한 아미노산 서열을 가지는 펩타이드가 합성되었음을 확인하였다.

[0047] <실시예 2> 채토세로스 살스기네움 핵 봉입형 바이러스(*Chaetoceros salsugineum* nuclear inclusion virus, CsNIV) 피막 단백질의 준비

[0048] 본 발명의 참조로서 포함되는 Y. Park 등(Virus Research 142 (2009) 127.133)의 내용을 근거로 하기와 같이 CsNIV 피막 단백질을 제조하였다.

[0049] 채토세로스 살스기네움 Ch42를 정제된 CsNIV과 함께 접종하였고, 배양하였으며, 배양후에 CsNIV 펠렛을 수집하였다. CsNIV 피막 단백질을 암호화하는 유전자를 증폭하기 위해 프라이머를 설계하였으며, CsNIV의 DNA를 주형으로 하여 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시하였다. CsNIV 피막 단백질을 암호화

하는 유전자를 포함하는 벡터를 제작하였으며, 대장균(*E. coli*)에서 발현시킨 후 CsNIV 피막 단백질을 정제하였다. 상기 정제된 CsNIV의 피막 단백질을 질량 분석기(mass spectrometry)로 분석하였고, 부분적인 아미노산 서열과 알려진 단백질 데이터베이스를 비교하기 위해 BLASTX 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)을 사용하여 아미노산 서열을 확인하였다. 상기 CsNIV의 주요 피막 단백질의 아미노산 서열은 CsNIV로서 NCBI 단백질 데이터베이스(protein database)에 등록된 바이다((CsNIV, accession number YP\_473363)(서열번호: 4) 및 (CsNIV, accession number YP\_473362)(서열번호: 5)).

**[0050] <실시예 3> 항적조 HPA3NT3 펩타이드의 CsNIV로의 탑재**

CsNIV 캡시드(capsid) 단백질은 pH 6 완충용액(20 mM 인산 나트륨(sodium phosphate), 150 mM NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, pH 6.0)에서 단량체 구조나 작은 분자량의 캡소머 구조로 분해되었다가 pH 8.0 완충용액(20mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5% (v/v) Triton X-100, pH 8.0)에서 안정한 캡시드 구조를 형성하였다. 상기와 같이 작은 분자량의 캡소머 구조로 분해되었다가, 안정한 캡시드 구조를 형성할 때에 항적조 HPA3NT3 펩타이드를 적재하였다.

**[0052] <실험예 1> CsNIV 바이러스에 탑재된 HPA3NT3 펩타이드의 골드(gold) 탐침에 의한 확인**

골드 입자(AuNP-citrate, 20 nm)를 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 구매하였고 실험을 위해  $6.99 \times 10^{11}$  입자(particles)/ml(520 nm=0.91)의 단위로 맞춰서 사용하였다. 이를 상기 <실시예 1>에서 준비한 살조 펩타이드인 HPA3NT3와 반응시켰으며, 상기 조건은 주사 가능한 등급의 물(injectable-grade water)에 0.05 mM HPA3NT3 펩타이드를 녹인 후 골드 입자 1 nM과 섞어서 전자 현미경에서 CsNIV 캡시드에 HPA3NT3 펩타이드의 탑재 여부를 확인하는 목적으로 사용하였다. 이때, 대략적으로 AuNP/peptide 1:5000의 몰라 비율(molar ratio)이 최적이었다.

그 결과, 전자현미경으로 확인하였을 때, CsNIV 캡시드 안에 골드로 탐침된 HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 것을 확인하였다(도 1).

**[0055] <실험예 2> CsNIV 바이러스 캡소머 형태에서 CsNIV 바이러스 캡시드로 조립**

Ni-NTA 컬럼(column)을 이용하여 정제된 캡소머를 살조제인 HPA3NT3 펩티드 없이 조립하였다.

그 결과, 전자현미경으로 캡소머 형태로 떨어져 있는 바이러스의 단량체 형태를 관찰할 수 있었으며(도 2a), 단량체 형태의 CsNIV 바이러스 캡시드로 조립된 것을 확인하였다(도 2b). 아울러, 도 2b의 4 가지 색의 원으로 표시한 바와 같이 조립된 CsNIV 캡시드의 크기가 상이한 것을 확인하였다.

**[0058] <실험예 3> 네가티브 스테이닝(negative staining) 방법을 이용하여 전자현미경으로 CsNIV 바이러스 캡시드에 탑재된 골드가 탐침된 펩타이드의 확인**

CsNIV 바이러스 캡소머에서 캡시드로 조립할 때, HPA3NT3 펩타이드 또는 골드가 탐침된 HPA3NT3 펩타이드를 탑재하였고, 이를 확인하기 위해 전자현미경으로 관찰하였다.

그 결과, CsNIV 바이러스 캡소머에서 캡시드로 조립할 때 HPA3NT3 펩타이드를 탑재시킨 후 전자현미경으로 확인하였으며(도 3a), 또한, CsNIV 바이러스 캡소머에서 캡시드로 조립할 때 골드가 탐침된 HPA3NT3 펩타이드를 탑재시키고 이를 네가티브 스테이닝 방법으로 확인하였다(도 3b). 그 결과, 골드가 탐침된 펩타이드가 검은색으로 캡시드 내부에 존재함을 확인할 수 있었다.

**[0061] <실험예 4> 물리화학적 형광 분석 방법으로 펩타이드의 캡시드 내부에 탑재 여부 확인**

물리화학적 형광 분석 방법을 사용하여, CsNIV 캡시드 내부에 HPA3NT3 펩타이드 여부를 확인하였다. 즉, 로다민(Rhodamin)이 탐침된 HPA3NT3 펩타이드가 CsNIV 캡시드 안쪽에 탑재되면 실험 초에는 형광 분광이 나타나지 않지만, 인위적인 처리에 의해 CsNIV 캡시드를 깨뜨린다면 형광이 급속도로 높아질 것으로 예상하였다. 로다민

이 탐침된 HPA3NT3 펩타이드를 CsNIV 캡시드 안쪽에 탑재하였고, 인위적인 처리 전후의 형광 정도를 측정하였다.

[0063] 그 결과, CsNIV 캡시드의 해리 후에 CsNIV 캡시드 내부에 존재하던 HPA3NT3 펩타이드에 탐침된 형광이 급속하게 나타남을 확인하였다(도 4).

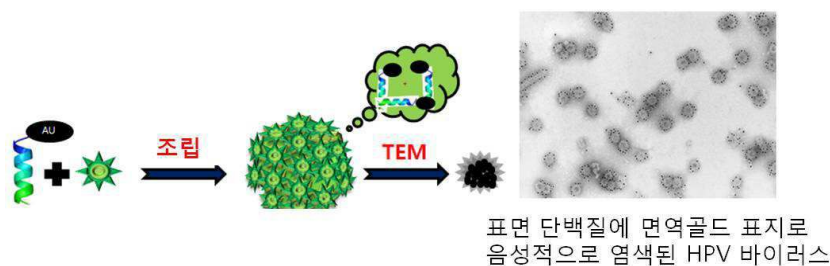
#### [0064] <실험예 5> 캡시드 내부에 있던 펩타이드의 유해 적조 실험

[0065] CsNIV 캡시드 안에 탑재된 HPA3NT3 펩타이드가 항적조 효과를 가지는지 확인하기 위해, HPA3NT3 펩타이드가 탑재된 CsNIV 캡시드를 유해 적조인 샤토넬라 카테나툼(*Chattonella catenatum*)에 처리하였다. 이때, 유해 적조인 샤토넬라 카테나툼(*Chattonella catenatum*)은  $2 \sim 4 \times 10^4$  세포/mL로 맞춰서 24-웰 조직 배양 플레이트(24-well tissue culture plate)에 준비하였다. f/2 배지(medium)(Sigma-Aldrich)에 녹인 실험용 CsNIV 캡시드 내부에 있던 HPA3NT3 펩타이드를  $0.25 \mu\text{M}$  농도로 맞추었고, 펩타이드 처리 한 시간 후 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

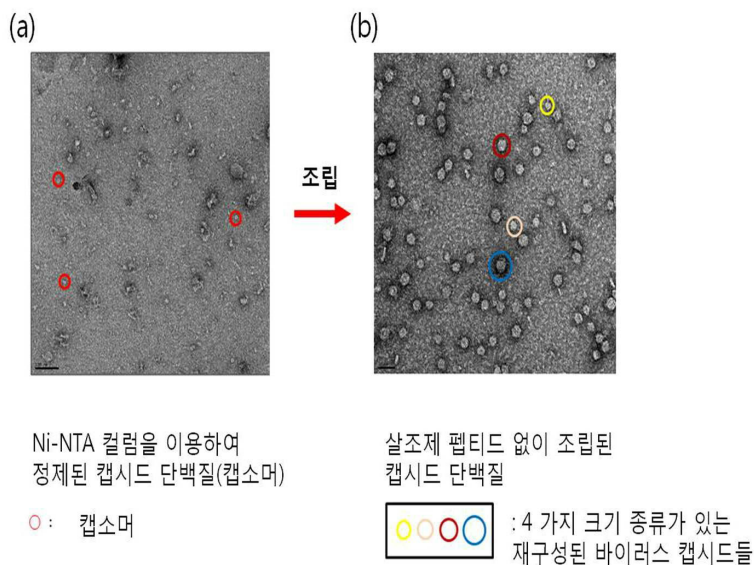
[0066] 그 결과, CsNIV 캡시드 안에 탑재된 HPA3NT3 펩타이드를 유해 적조인 샤토넬라 카테나툼에 처리하였을 때 CsNIV 캡시드 내부에 있던 HPA3NT3 펩타이드가 CsNIV 캡시드의 해리와 함께 유해 적조를 파괴함을 확인하였다(도 5).

### 도면

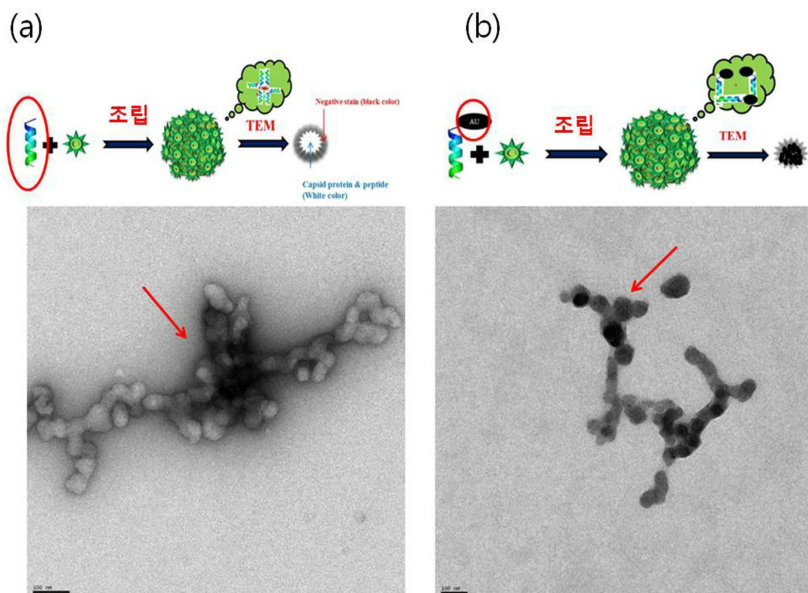
#### 도면1



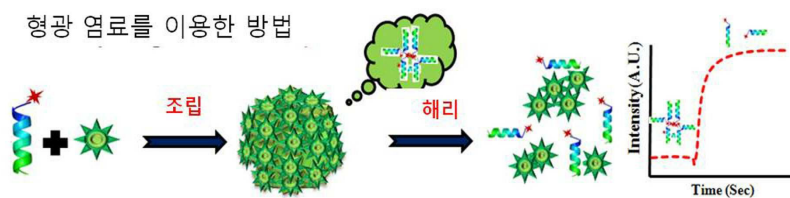
#### 도면2



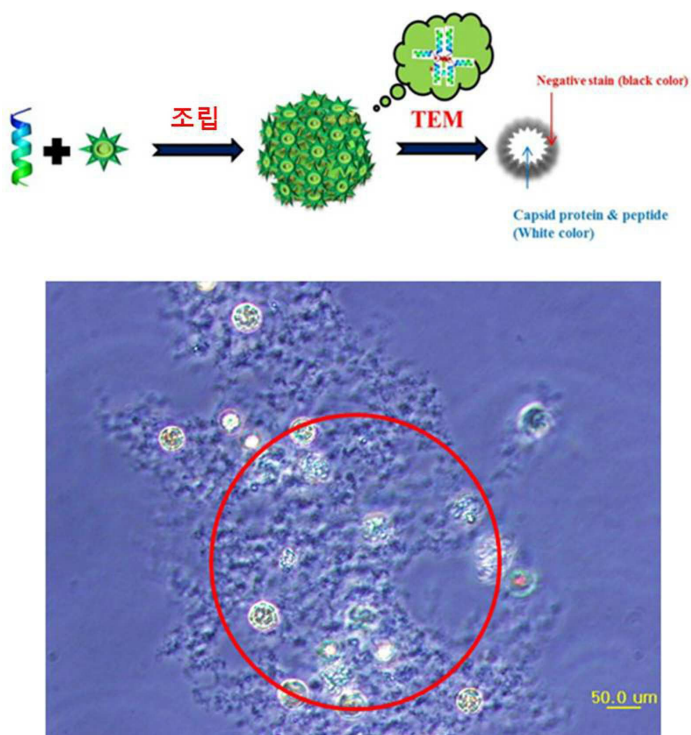
도면3



도면4



도면5



## 서열 목록

<110> Industry Academy Cooperation Foundation Chosun University  
 <120> CsNIV capsid containing HPA3NT3 peptide having anti-algae  
 activity against organism induced red tide and the use of the  
 same

<130> 12p-02-02

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 1

Ala Lys Lys Val Phe Lys Arg Leu Glu Lys Leu Phe Ser Lys Ile Gln

1 5 10 15

Asn Asp Lys

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 2

Ala Lys Lys Val Phe Lys Arg Leu Glu Lys Leu Phe Ser Lys Ile Trp

1 5 10 15

Asn Trp Lys

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 3

Phe Lys Arg Leu Lys Lys Leu Phe Lys Lys Ile Trp Asn Trp Lys

1 5 10 15

<210> 4

<211> 328

<212> PRT

<213> Chaetoceros salsugineum DNA virus

<400> 4

Met Gln Lys Ala Arg Asp Glu Phe Asn Leu Ser Leu Asn Leu Gly Gly

1 5 10 15

Ala Ala Glu Pro Gly Tyr Trp Ser Glu Tyr Leu Asp Gln Ala Asp Ile

20 25 30

Glu Thr Phe His Gln Gln Ala Tyr Ala Asn Ala Asp Gly Leu Ala Ile

35 40 45

Arg Ile Asn Pro Val Thr Gly Tyr Lys Glu Leu Tyr Val Ser Gly Ser

50 55 60

Arg Gly Val Arg Asp His Ile Gln Asn Leu Ala Glu Gly Leu Ser Arg

65 70 75 80

Gly Ile Asp Asp Tyr Asp Glu Trp Leu Glu Ala Tyr Gly Ala Gly Lys

85 90 95

Lys Ala Glu Thr Leu Trp Thr Glu Thr Gly Trp Gly Lys Ala Arg Ala

100 105 110

Ala Asp Pro Met Asp Gln Gln Ala Phe Glu Trp Ala Lys Thr Ala Leu

115 120 125

Ser Gly Ser Glu Leu Ala Arg Asp Tyr Trp Thr Gln Tyr Ile Asp Thr

130 135 140

Val Ile Glu Ala Glu Gly Val Glu Val Val Tyr Gly His Ser Arg Gly

145 150 155 160

Ala Ala Thr Ile Ser Gly Leu Lys Ser Asn Val Lys Lys Ile Gly Leu

165 170 175

Asp Gly Ala Met Tyr Ile Ala Lys Glu Asp Thr Glu Phe Thr Asn Leu

180 185 190

Ala Asn Ala Asn Leu Leu Ile Pro Gln Leu Pro Gly Val Val Asp Tyr

195

200

205

Ala Ile Ser Gly Gly Tyr Lys His Asn Val Tyr Leu Pro Asn Arg Ala

210

215

220

Phe His Asp Val Ala Arg Gly Lys Asp Val Glu Lys Lys Pro Lys Pro

225

230

235

240

Thr Gly Glu Ala Ser Ala Ala Gln Arg Lys Lys Gln Arg Arg Gln Arg

245

250

255

Pro Arg Ala Gln Lys Ser Arg Glu Arg Val Lys Glu Leu Asp Lys Leu

260

265

270

Leu Gly Arg Lys Thr Asp Asp Gln Lys Lys Ala Gln Tyr Leu Arg Asn

275

280

285

Arg Arg Lys Tyr Phe Lys Trp Lys Lys His Tyr Lys Asp Ala Lys Arg

290

295

300

Leu Gly Lys Ile Val Tyr Glu Ser Tyr Lys Lys His Gln Glu Leu Lys

305

310

315

320

Ser Gly Val Tyr Arg Arg Arg Arg

325

<210> 5

<211> 392

<212> PRT

<213> Chaetoceros salsugineum DNA virus

<400> 5

Met Ala Arg Lys Lys Ser Thr Pro Arg Arg Arg Lys Ala Val Lys Arg

1

5

10

15

Arg Arg Thr Val Arg Arg Arg Gln Ser Pro Lys Ala Arg Val Arg Ser

20

25

30

Thr Thr Thr Lys Ala Lys Arg Arg Ile Ser Pro Ser Gly Ser Gly Ser

35

40

45

Gln His Leu Thr Val Arg Lys Gln Pro Phe Ser Asn Ala Thr Ser Gln

50

55

60

Pro Lys Ile Leu Asp Gly Ala Leu Thr Ser Ser Leu Ser Arg Arg Leu

65 70 75 80

Gln Asn Val Ile Gly Leu Thr Asn Gly Asn Gly Gly Leu Gly Thr Glu

85 90 95

Ile Met His Ile Phe Phe Ala Pro Thr Leu Gly Ile Pro Leu Ile Ala

100 105 110

Met Asn Ser Ala Glu Gly Val Ala Leu Arg Pro Ser Ser Ser Ala Asp

115 120 125

Pro Phe Phe Ile Gly Phe Pro Gly Gln Thr Ile Lys Phe Asp Tyr Val

130 135 140

Ser Ser Gly Thr Thr Pro Pro Ala Thr Gly Asn Leu Val Thr Phe Ser

145 150 155 160

Asn Glu Cys Gly Phe Ser Lys Trp Arg Ile Val Ser Gln Gly Leu Arg

165 170 175

Met Glu Leu Ala Asn Ser Asp Glu Glu Asn Asp Gly Trp Phe Glu Ala

180 185 190

Val Arg Phe Asn Trp Arg Asn Asn Pro Ala Asp Ile Cys Phe Thr Pro

195 200 205

Ile Asp Gly Thr Leu Gly Gly Ala Lys Thr Thr Asp Phe Ala Val Ala

210 215 220

Pro Ser Pro Val Gly Met Tyr Ala Leu Lys Asp Met Ala Met Val Glu

225 230 235 240

Gln Pro Gly Tyr Thr Thr Gly Leu Leu Lys Asp Leu Lys Asn His Glu

245 250 255

Phe Met Leu His Pro Gln Ser Thr Thr His Asp Pro Ile Ile Leu Glu

260 265 270

Gln Ser Tyr Glu Gly Thr Ile Gly Thr Thr Ala Ala Asp Asp Met Tyr

275 280 285

Tyr Ser Val Thr Ser Glu Val Phe Glu Leu Gly Asn Thr Val Arg Gly

290 295 300

Asn Thr Met Lys Asn Ser Leu Val Asp Asn Asn Met Asp Trp Ile Tyr

305                      310                      315                      320  
 Leu Arg Leu His Cys Arg Thr Asn Asn Gly Thr Thr Ser Asn Gly Ser  
                          325                      330                      335  
 Lys Leu Ile Val Asn Ala Ile Gln Asn Leu Glu Val Ser Phe Asn Pro  
                          340                      345                      350  
 Ser Ser Asp Phe Ala Ala Phe Gln Thr Ile Asn Lys Met His Pro Gln  
  
                          355                      360                      365  
 Gln Lys Lys Val Asp Asp Gln Leu Asn Asn Ser Ala Glu Ala Ser Asn  
                          370                      375                      380  
 Lys Arg Gln Lys Thr Gly Gly Gly  
 385                      390