



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년02월12일
(11) 등록번호 10-0883190
(24) 등록일자 2009년02월04일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0079980

(22) 출원일자 2007년08월09일

심사청구일자 2007년08월09일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020010083915 A

KR100346072 B1

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

이상열

경남 진주시 망경동 한보아파트 106동 1806호

이중로

경남 진주시 망경동 동신아파트 1동 401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동완

전체 청구항 수 : 총 5 항

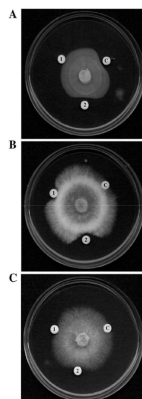
심사관 : 장제환

(54) 열-안정성 항균 활성 단백질을 함유하는 항균제제

(57) 요약

본 발명은 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서 추출된 열-안정성 항균 활성 단백질을 함유하는 항균제제에 관한 것으로, 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 열-안정성 항균 활성 단백질(AtHS1)을 유효성분으로 함유하는 항균제제는 식물 병원성 진균 및 식물 병원성 박테리아인 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*), 스탕필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성을 지닌다.

대표도



(72) 발명자

강재숙

경남 진주시 상봉서동 1068-7

정지현

경남 진주시 칠암동 칠암한주아파트 1309호

장호희

경남 사천시 사천읍 선인리 대경 파미르 102동 20
2호

문정찬

경남 사천시 용현면 장송 892번지

박진호

경남 사천시 벌리동 주공아파트 206동 1402호

이영미

경남 진주시 지수면 청원리 491

김선영

경남 진주시 가좌동 가좌2 주공아파트 213동 1205
호

박성철

광주 북구 두암동 주공아파트 302동 1103호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 열-안정성 항균 활성 단백질(AtHS1)을 유효성분으로 함유하는 항균제제

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 항균제제는 식물 병원성 진균 및 식물 병원성 박테리아인 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성을 지님을 특징으로 하는 항균제제

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 항균제제는 식물 병원성 진균류인 아스페르길루스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아스페르길루스 파라시티쿠스(*Aspergillus parasiticus*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 디디멜라 브리오니아(*Didymella bryoniae*), 페니실리움 베르루코숨 바르. 베르루코숨(*Penicillium verrucosum* var. *verrucosum*), 리조크토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 트리코테르마 하르시아눔(*Trichoderma harzianum*), 트리코테르마 비리데(*Trichoderma viride*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대한 항진균 활성을 지님을 특징으로 하는 항균제제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 항균제제의 열-안정성 항균 활성 단백질의 농도는 0.001~10 mM임을 특징으로 하는 항균제제

청구항 5

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 열-안정성 항균 활성 단백질을 유효성분으로 하여 안정화제, 계면활성제, 보존제, pH 조절제 등에서 선택된 첨가제를 물 또는 수용성 유기 용매에 용해시켜 제 1항의 항균제제를 제조하는 방법

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)에서 추출된 열-안정성 항균 활성 단백질을 함유하는 항균제제에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 고등식물은 열 쇼크 또는 병원균 공격과 같은 환경적인 스트레스로부터 식물체 자신을 보호하는 것이 가능하며 이는 농작물 성장 및 생산성에 밀접한 관련이 있다. 따라서 식물은 스트레스 저항성에 관련된 방어 메커니즘을 지니 식물 병원체의 성장을 저해하는 여러 항균 식물 단백질 및 펩티드가 식물체 내에 존재한다. 최근 상기 항균 단백질을 다양한 식물체 소스로부터 분리시킬 수 있게 되었다.

<3> 상기한 바와 같이 식물체로부터 항균 단백질을 추출 분리하는 방법은 이미 여러 특허 문헌에 개시되어 있으며 이를 살펴보면 다음과 같다.

<4> 대한민국 공개특허공보 제1995-18043호 '황기의 잎으로부터 추출한 항균단백질'에서는 황기의 종자와 잎으로부터 분리한 신규 항균성 단백질 및 이를 이용하여 식물병을 방제하는 방법을 개시하고 있으며, 대한민국 공개특허공보 제2003-87640호 '신규 단백질, 이를 코딩하는 유전자 및 이들의 이용방법'에서는 벼의 2대 병해인 도열병균이나 라이족토니아병균 등의 식물병원균의 성장을 억제할 수 있는 신규한 항균단백질을 노랑느타리의 추출액으로부터 분리하는 방법 및 상기 단백질의 아미노산 서열이 개시되어 있다.

- <5> 따라서 본 발명자들도 아라비돕시스(*Arabidopsis*)에서 분리된 열-안정 단백질(AtHS1)의 항진균 및 항균 특징을 측정 관찰하였다. 상기 단백질은 아라비돕시스에서 처음으로 분리되었고 상기 단백질의 아미노산 서열은 포플러 SP1과 높은 상동성을 지닌다. 포플러 SP1 유전자는 다양한 염도, 추위 및 열 스트레스와 같은 비-생물적 스트레스에 노출된 후에 높게 발현되었다. SP1은 가열, 프로테아제 및 세정제 등의 처리에 저항성을 지닌다.
- <6> 본 발명은 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)로부터 분리된 AtHS1 단백질의 항균 활성 및 관련 단백질 패밀리를 밝히고 있으며, 본 발명자들이 분리한 항균 단백질을 응용하여 분리된 단백질을 유효성분으로 함유하는 항균성 제제 또는 백신 개발이 가능할 것으로 판단된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 아라비돕시스 탈리아나로부터 분리된 AtHS1 단백질의 항균 활성 및 관련 단백질 패밀리를 규명코자 한 것이며, 분리한 항균 단백질을 응용하여 분리된 단백질을 유효성분으로 함유하는 항균성 제제 또는 백신을 개발코자 하는 것이다.

과제 해결수단

- <8> 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 열-안정성 항균 활성 단백질(AtHS1)을 유효성분으로 함유하는 항균제제를 제공하는 것이다.
- <9> 상기 항균제제는 식물 병원성 진균 및 식물 병원성 박테리아인 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성을 지님을 특징으로 한다.
- <10> 상기 항균제제는 식물 병원성 진균류인 아스페르길루스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 아스페르길루스 파라시티쿠스(*Aspergillus parasiticus*), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 디디멜라 브리오니아에(*Didymella bryoniae*), 페니실리움 베르루코숨 바르. 베르루코숨(*Penicillium verrucosum* var. *verrucosum*), 리조코토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 트리코테르마 하르지아눔(*Trichoderma harzianum*), 트리코테르마 비리데(*Trichoderma viride*), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)에 대한 항진균 활성을 지님을 특징으로 한다.
- <11> 상기 항균제제의 열-안정성 항균 활성 단백질의 농도는 0.001~10 mM임을 특징으로 한다.
- <12> 또한 상기 열-안정성 항균 활성 단백질을 유효성분으로 하여 안정화제, 계면활성제, 보존제, pH 조절제 등에서 선택된 첨가제를 물 또는 수용성 유기 용매에 용해시켜 항균 제제를 제조함을 특징으로 한다.

효 과

- <13> 본 발명의 효과는 아라비돕시스 탈리아나로부터 분리된 AtHS1 단백질의 항균 활성을 이용하여 분리된 단백질을 유효성분으로 함유하는 항균성 제제 또는 백신을 개발한 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <14> 항균 활성을 지닌 열-안정 단백질(AtHS1)은 완충액에 의한 추출 및 두 단계의 크로마토그래피 분리에 따라 아라비돕시스 탈리아나 식물로부터 분리된다. MALDI-TOF 분석 결과는 분리된 단백질이 포플러 SP1과 높은 서열 상동성을 지님을 밝혀냈다. 상기 단백질의 정확한 항균 특징을 측정하기 위해 단백질을 암호화하는 cDNA가 아라비돕시스 탈리아나 및 cDNA 라이브러리로부터 분리되었고 AtHS1로 명명하였다.
- <15> AtHS1 mRNA는 살리실산, 자스몬산과 같은 외부 스트레스의 노출에 의해 유도되었다. 또한 본 발명자들은 대장균(*Escherichia coli*)에서 발현된 재조합 AtHS1의 항균 활성을 분석하였다. 상기 단백질은 피토프thora 인페스탄스(*Phytophthora infestans*) 및 피토프thora 니코티아나에(*Phytophthora nicotianae*)를 제외하고는 병원성 진균 계통을 저해하였고, *E. coli* 및 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성을 나타냈다. 이러한 결과는 AtHS1이 항균제제 개발을 위한 가능성을 지니는 것이다.
- <16> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- <17> 항균 활성을 지닌 열-안정한 단백질은 DEAE-셀룰로오스 및 C₁₈-역상 HPLC를 이용하여 아라비돕시스 탈리아나로부터 수득되었다. 아라비돕시스 잎은 먼저 미세한 가루로 분쇄한 후 추출 완충용액에 현탁되었다. 원심분리

전 용해 가능한 단백질이 열-안정 단백질을 수득하기 위해 고온에서 배양되었다.

- <18> 상층액은 DEAE-셀룰로오즈 상에 적가되었고, 항진균 활성을 지닌 단편은 HPLC 시스템 상에서 C₁₈ 컬럼을 이용하여 정제되었다. 본 발명은 항균 활성을 나타내는 피크 분획을 수득하였고(도 1A) 분획은 감압 하에 동결 건조되었다(도 1B). 도 1C는 정제된 단백질에 따른 단일 밴드를 나타낸 것이다. 정제된 단백질은 고온에서 안정하였기 때문에 본 발명은 AtHS1(Arabidopsis thaliana Heat-Stable protein 1)로 명명하였다.
- <19> 본 발명자들은 *D. bryoniae*, *T. harzianum* 및 *B. cinerea*에 대한 정제 AtHS1의 항진균 활성에 대해 실험하였다. 상기 단백질은 다양한 진균 세포에 대해 저해제 효과를 나타내었다.
- <20> MALDI-MS 분석은 본 발명의 정제 수득된 단백질의 아미노산 서열이 이미 공지된 가설적 단백질의 아미노산 서열(GenBank 수탁번호 NP_566569)과 정확하게 일치하였다(도 3A). 따라서 본 발명의 단백질은 이미 공지된 것으로 판단되어 본 발명에서는 분리된 단백질의 항균 활성 특징 및 이를 이용한 제제에 특징을 지닌 것이다.
- <21> 포플러 SP1과 높은 서열 상동성을 나타내었다. 프로브로서 AtHS1을 사용하여 본 발명자들은 살리실산(SA)과 자스몬산(JA)으로 아라비도시스 세포 현탁액을 처리함으로써 유전자의 발현 수준을 조사하였다(도 3B, C). SA- 및 JA-매개된 식물체 면역은 식물체 방어 반응에서 중심적인 역할을 한다. 세포가 SA로 처리되었을 때 AtHS1 전사체의 수준은 급격하게 증가하였으나 시간에 경과함에 따라 감소하였다. 대조적으로 JA-처리된 세포에서 AtHS1 mRNA 수준은 현저하게 증가하였고 6시간 동안 높은 수준을 유지하였다. 이전의 연구는 포플러 SP1 유전자가 염도, 추위, 열 및 건조 스트레스 후에 축적된다고 보고하였다. 본 발명은 AtHS1이 환경적인 스트레스 및 병원균에 대항하는 항균 단백질로서 역할을 확인한 것이다.
- <22> 또한 단백질의 항균 활성을 분석하기 위해서 GST-AtHS1 융합 단백질은 pGEX 벡터에서 발현되었고, 재조합 단백질은 분리되었다. 재조합 AtHS1 단백질을 사용하여 본 발명자들은 병원성 박테리아 및 진균 스트레인에 대한 항균 에세이를 수행하였다(표 1).

표 1

진균 및 박테리아 세포에 대한 재조합 AtHS1의 저해 효과

병원체	단백질(EC ₅₀) ^a (μM)
진균	
아스페르길루스 플라부스(<i>Aspergillus flavus</i>)	10
아스페르길루스 파라시티쿠스(<i>Aspergillus parasiticus</i>)	20
보트리티스 시네레아(<i>Botrytis cinerea</i>)	10
디디멜라 브리오니아에(<i>Didymella bryoniae</i>)	10
페니실리움 베르루코숨 바르. 베르루코숨(<i>Penicillium verrucosum</i> var. <i>verrucosum</i>)	40
피토프토라 인페스탄스(<i>Phytophthora infestans</i>)	NA
피토프토라 니코티아나에(<i>Phytophthora nicotianae</i>)	NA
리조크토니아 솔라니(<i>Rhizoctonia solani</i>)	20
트리코테르마 하르지아눔(<i>Trichoderma harzianum</i>)	10
트리코테르마 비리데(<i>Trichoderma viride</i>)	10
칸디다 알비칸스(<i>Candida albicans</i>)	10
박테리아	
에스케리키아 콜리(<i>Escherichia coli</i>)	10
스타필로코커스 아우레우스(<i>Staphylococcus aureus</i>)	10
^a EC50 50% 저해에 대한 유효 농도 NA, < 160 μM 농도에서 활성적이지 않음	

<23>

- <24> 상기 단백질은 병원체 박테리아 균주인 *E. coli* 및 *S. aureus*에 대한 항균 활성을 나타내었다. 또한 상기 단백질은 인간 및 식물 병원성 진균 *C. albicans*, *B. cinerea*, *D. bryoniae*, *T. harzianum* 등에 대한 강력한 항균 활성을 나타내었다(표 1).

- <25> 이러한 결과로부터 정제된 또는 재조합된 AtHS1 모두 유사한 항균 활성을 보임을 나타내고 있다. 그러나 세포 벽 성분으로 키틴을 포함하지 않는 *P. infestans* 및 *P. nicotianae*의 성장은 저해되지 않는다(표 1). 본 발명은 AtHS1은 키틴, 진균 세포의 벽 성분 중 하나와 상호작용하거나 인식됨을 규명하였다.
- <26> 한편 본 발명은 AtHS1과 막 사이의 상호작용을 조사하기 위해 염료 누출 시험을 수행하였다. AtHS1은 멜리틴과 비교했을 때 인공적인 리포솜에 대해서 현저한 효과는 나타나지 않았고 이는 조절자로서 리포솜과 상호작용한다.
- <27> 본 발명은 인간의 RBCs 및 인간의 각질세포 HaCaT 세포로 용혈 및 세포 독성시험을 수행함으로써 포유류 세포 상의 AtHS1의 세포독성 효과를 실험하였다. 상기 단백질은 용혈 활성(표 2) 및 세포독성을 나타내지 않았다.

표 2

항균 단백질 AtHS1의 용혈 활성

단백질 농도 (μ M)	% 용혈							
	100	50	25	12.5	6.25	3.12	1.56	0.78
AtHS1	0	0	0	0	0	0	0	0
멜리틴	100	100	100	100	95	76	38	18

- <28> 따라서 본 발명자들은 상기 단백질이 다양한 세균 세포에 대한 현저한 항균 활성을 지니나, 인간 세포 상에서는 세포 독성도 나타내지 않음을 나타내었다.
- <29> AtHS1의 기능을 더욱 규명하기 위해 본 발명은 AtHS1의 타겟 지역을 실험하고자 로다민-표지된 AtHS1로 2 가지 유형의 진균 세포에 처리하였다. 표본은 공초점 현미경하에 시각화되었다(도 4). 로다민-표지된 AtHS1은 *C. albicans* 및 *F. oxysporum*의 세포질에서 축적되었다(도 4). 따라서 본 발명자들은 tRNAs에 대항하는 AtHS1의 리보뉴클레아제 활성을 분석하였다. 260 nm에서 흡광도는 5 μ M는 0.054, 10 μ M는 0.096 및 15 μ M는 0.114 증가되었고, 이는 AtHS1이 리보뉴클레아제 활성을 지님을 나타낸다. 따라서 본 발명자들은 AtHS1이 세포성장을 저해하는 세균 세포에서 세포질 구성성분과 상호작용함을 규명하였다.
- <30> 세균 병원체와 감염균에 저항하기 위해서 식물체는 항균 단백질, 분해효소, 이차 대사산물, 막-상호작용 단백질, 리보솜 단백질 및 항-섭식(anti-feedant) 단백질의 생성과 관련된 다양한 방어 반응을 진화시켜왔다. 이러한 관찰과 본 발명의 자료에 기초하여 본 발명은 AtHS1이 강력한 항균제제로 유용함을 규명한 것이다.
- <31> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <32> 재료
- <33> 키틴, 셀룰로오스, 키토산, 커드란, 펩티도글리칸(*S. aureus* 유래), LPS(리포다당질)¹(*E. coli* 0111:B4 유래), PE (L- α -포스파티딜에탄올아민)(V 타입, *E. coli* 유래) 및 콜레스테롤(CH)은 모두 Sigma Chemical Co.(St Louis, MO)로부터 구입되었다. PG (L- α -포스파티딜-DL-글리세롤) 및 PC(난황 L- α -포스파티딜에탄올아민)은 Avanti Polar Lipids(Alabaster, AL)로부터 취득되었다. 칼세인(Calcein)은 Molecular Probes(Eugene, OR)로부터 구입되었다. 모든 다른 시약은 분석적인 등급이다.
- <34> 식물체 재료
- <35> 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 식물체는 22°C 및 70% 상대습도에서 16/8 h 광/암 주기를 지닌 생장 챔버에서 재배되었다. 아라비도시스 탈리아나로부터의 조직은 절개되었고, 항균성 분석을 위한 용해 가능한 단백질을 준비하기 위해 사용되었다.
- <36> (실시예 1) 항진균 활성을 지닌 열-안정 단백질의 정제
- <37> 아라비도시스 탈리아나 식물체는 완충용액 A (25 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.4)에서 균질화되었다. 균질 현탁액은 원심분리되었고 용해된 추출물은 10분 동안 90°C에서 가열되었다. 항균 단백질은 DEAE-

sepharose 및 C₁₈ RP-HPLC 상에서 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 성공적으로 정제되었다. 상청액은 DEAE-sepharose 고속 양이온-교환 컬럼 (4.6 X 10 cm, Amersham Pharmacia Biotech)에 즉시 적가되었다. 단계적 변화 과정은 분류를 위해서 사용된다. 항진균 활성이 없는 분획은 0.2 M NaCl로 세척되었고, 항진균 활성을 지니는 분획은 0.3 M NaCl로 용출되었다. 분획은 수집되었고 10 mM 탄화수소암모늄(pH 8.0)으로 투석되었다. 동결 건조된 용출액은 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 포함하는 초순수로 현탁된 후 미리 0.1% (v/v) TFA를 포함하는 10% 아세토니트릴(ACN)로 안정화된 C₁₈ 컬럼(4.6 X 250 mm; Vydac, Hesperia, CA) 상에서 정제되었다.

<39> 2개의 선형 용리 그래디언트는 하기와 같이 10분 동안 10% ACN으로 용리된 후에 사용되었다: 90분 이상 10-40% CAN 및 50분 이상 40-60% CAN. 유속은 40℃, 1 ml/min에서 일정한 수치를 유지하였고, 흡광도는 214 nm에서 모니터링 되었다. AtHS1의 정제하는 동안 시종일관, 단백질의 항진균 활성은 진균의 성장 저해 영역을 측정함으로써 분석되었다.

<40> 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 디디멜라 브리오니아에(*Didymella bryoniae*) 및 트리코데르마 하르시아눔(*Trichoderma harzianum*)에 대한 항진균성 에세이는 수집된 분획으로 수행되었다. 단백질의 순도는 U.K. Laemmli *et al.*, J. Mol. Biol. 80:573-599 1973의 방법을 따르는 15% SDS-PAGE 겔 상에서 단일 밴드의 존재에 의해서 확인되었다. SDS-PAGE 후에 단백질 밴드는 A. Stensballe *et al.*, Proteomics 1:955-966, 2001에 따른 MALDI-TOF/MS에 의해서 확인되었다.

<41> (실시예 2) AtHS1 유전자의 클로닝 및 *E. coli*에서 단백질의 발현

<42> 열-안정 단백질의 전체-길이 유전자는 PCR을 이용하여 아라비도시스 탈리아나 cDNA 라이브러리로부터 분리되었고 그 후에 pGEM-T Easy vector(Promega, WI) 내로 라이게이트되었다. GST-융합 시스템은 *E. coli* 균주 BL21(pLysS)에서 융합 단백질을 생성하기 위해서 이용되었다. GST-AtHS1 융합 단백질은 글루타치온-아가로즈 친화력 겔로 정제되었고, 본래의 AtHS1는 트롬빈 처리에 의해서 절단되었다. 용출된 단백질은 25 mM Hepes(pH 7.2)로 투석되었다.

<43> (실시예 3) 노던 블롯 분석

<44> 총 RNAs는 1, 3 및 6시간 동안 여러 유형의 외부 스트레스에 처리시킨 배양된 세포의 아라비도시스 현탁액으로부터 추출되었다. J. R. Lee *et al.*, Mol. Cells. 23:161-169, 2007에 기술된 바와 같이, 총 RNA의 20 µg은 1.2% 포름알데히드 아가로즈 겔 상에서 분리되었고 나일론 멤브레인(Amersham)으로 이동되었다. 블롯팅은 프로브로서 [α -³²P]ATP-표지된 AtHS1 cDNA를 사용하여 혼성화되었다.

<45> (실시예 4) 인간 적혈구(hRBCs)의 용혈

<46> 용혈 활성은 헤파린 상에서 건강한 제공자로부터 수집된 hRBCs를 사용하여 AtHS1를 위해 평가되었다. 신선한 hRBCs는 PBS(1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 135 mM NaCl, pH 7.4)에서 3회 세척되었다. PBS에 용해된 AtHS1 단백질은 PBS에 현탁된 쇼크 hRBCs 100 µl에 첨가되었다(최종 RBC 농도, 8% v/v). 표본은 37℃에서 60분 동안 교반되면서 배양된 후 800×g에서 10분 동안 원심분리되었다. 상청액의 흡광도는 414 nm에서 측정되었다. PBS(A_{blank}) 및 0.1% 트리톤 X-100(A_{triton})에서 hRBCs는 음성 및 양성 대조군 각각을 위해 사용되었다. 용혈 비율은 하기 방정식에 따라서 계산되었다. 각 측정은 3회 실시되었다.

<47>
$$\% \text{ 용혈} = [(A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / (A_{\text{triton}} - A_{\text{blank}})] \times 100$$

<48> (실시예 5) 항진균 활성에 대한 에세이

<49> 본 발명은 정제하는 동안 수집된 분획의 항진균 활성을 분석하기 위하여 방사성 성장 저해 에세이를 사용하였다. 또한 본 발명은 J.R. Lee *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 353:672-678, 2007에 기술된 바와 같이 효과적인 농도를 구하기 위해서 96-웰 플레이트에서 미량희석 에세이를 수행하였다. 하기 진균 균주가 이용되었다: 아스페르길루스 플라부스(*Aspergillus flavus*)(KCTC 6905), 아스페르길루스 파라시티쿠스(*Aspergillus parasiticus*)(KCTC 6598), 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)(KCTC 7270), 페니실리움 베르루코숨 바르. 베르루코숨(*Penicillium verrucosum* var. *verrucosum*)(KCTC 6265), 트리코데르마 비리데(*Trichoderma viride*)(KCTC 6047) 및 트리코데르마 하르시아눔(*Trichoderma harzianum*)(KCTC 6043)은 한국생명공학연구원에게서 수득되었고, 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*)(KACC 40573), 디디멜라 브리오니아에(*Didymella bryoniae*)(KACC 40669), 피토프토라 인페스탄스(*Phytophthora infestans*)(KACC 40718), 피토프토라 니코티아나

에(*Phytophthora nicotianae*)(KACC 40164) 및 리조크토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*)(KACC 40138)는 농업생명공학연구원으로부터 획득되었다.

<50> (실시예 6) 항균 활성에 대한 예제

<51> *E. coli*(미국 American Type Culture Collection; ATCC 25922) 및 *S. aureus* (ATCC 25923)에 대한 AtHS1의 항균 활성은 Y. Park *et al.*, Biotechnol Lett. 27:193-199, 2005에 기술된 방법에 따라 96-웰 플레이트에서 수행된 미량희석 예제를 이용하여 측정되었다.

<52> (실시예 7) 공초점 레이저 주사 현미경 검사

<53> 본 발명은 단백질의 세포 분포를 분석하기 위해서 공초점 레이저 주사 현미경 검사를 이용하였다. 균질의 세포 현탁액(10^4 분세포자/ml)은 폴리-L-리신-코팅된 글라스 슬라이드 상에 흡착되고 플레이트는 세포를 슬라이드에 부착시키기 위해 45분 동안 실온에 정치되었다. 그 후 슬라이드는 PBS로 세척되고, 로다민-표지된 AtHS1은 세포에 첨가되었다. 30분 동안 배양 후에 슬라이드는 PBS로 수차례 세척된 후 Zeiss(Gottingen, Germany) 레이저 주사 현미경(LSM 510META)을 이용하여 검사되었다.

<54> (실시예 8) 리보뉴클레아제 활성에 대한 AtHS1의 예제

<55> 효모 및 *E. coli* tRNA에 대한 AtHS1의 활성은 산에 용해되는 생성물을 측정함으로써 측정된다. AtHS1 단백질은 1시간 동안 37°C에서 완충용액(100 mM Tris-HCl 완충용액, pH 7.5) 150 μ l에서 tRNA 200 μ g으로 배양되었다. 반응은 매우 차가운 3.4% 과염소산 350 μ l의 첨가에 의해서 종결되었다. 15분 동안 얼음 위에서 배양된 후, 샘플은 4°C에서 15분 동안 15,000 $\times$ g로 원심분리되었다. 적당하게 희석된 후, 상층액의 흡광도는 260 nm에서 측정되었다.

<56> (실시예 9) 염료 누출

<57> 리포솜에 대한 AtHS1의 상호작용 및 투과는 칼세인 누출을 측정함으로써 검사되었다. 칼세인-포획된 리포솜은 하기에 따라 염료 누출 실험에서 사용을 위해 준비되었다. 칼세인-포획된 LUVs(대형 단층 소포)는 염료 완충용액(70 mM 칼세인, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.4)에서 건조된 지질을 잘 섞어서 준비된 PE/PG (7:3, w/w) 및 PC/CH (10:1, w/w)으로 구성되었다. 현탁액은 9 사이클 동안 액화 질소에서 동결-해동되었고, Avanti Mini-Extruder(Avanti Polar Lipids inc., Alabaster, AL)로 폴리카보네이트를 통해 30회 압출되었다. 칼세인-포획된 소낭은 Sephadex G-50 컬럼 상에서 겔 여과 크로마토그래피에 의해 자유 칼세인으로 분리되었다. 칼세인-포획된 LUVs의 농도는 인 예제를 이용하여 3회 측정되었다. 100 μ M 지질을 포함하는 현탁액에서 포획된 LUVs는 다양한 단백질 농도(1.56-50 μ M)에서 배양되었다. 방출된 형광은 490 nm 자극 파장 및 520nm 방출 파장으로 LS55 Luminescence 분광계(Perkin Elmer)를 이용하여 측정되었다. 100% 누출은 Triton X-100을 첨가함으로써 0.1%의 최종 농도에 도달되었다. 자발적인 누출은 이 시간 스케일 상에서 무시해도 무방하다. 모든 실험은 실온에서 수행되었다. 염료-누출의 백분율은 하기 식으로 계산된 펩티드에 의해 유발되었다.

<58>
$$\% \text{ 염료 누출} = [(F - F_0) / (F_t - F_0)] \times 100$$

<59> F는 단백질 첨가 후 5분에서 도달된 형광 농도이고 F₀ 및 F_t 각각은 단백질과 Triton X-100이 없을 시의 형광 농도이다.

도면의 간단한 설명

<60> 도 1은 역상(RP) HPLC 및 SDS-PAGE 분석에 의해 최종 AtHS1 정제를 나타낸 것이다. RP-HPLC는 Shimadzu 시스템에 연결된 vydac C₁₈ 컬럼으로 처리되었다. 도 1(A)는 C₁₈ 컬럼을 사용하여 역상 HPLC에 의해 분리된 타겟 피크(화살표)를 포함하는 분획을 나타낸다. 도 1(B)는 C₁₈ 컬럼을 사용하여 다시 RP HPLC에 의해 정제된 단백질을 나타낸다. 도 1(C)는 아라비도시스로부터의 정제된 열-안정 단백질의 SDS-PAGE 분석을 나타낸다. 상기 단백질은 15% SDS-PAGE에 의해 다시 용해되었고 쿠마시 블루(Coomassie Blue)로 염색되었다.

<61> 도 2는 진균의 성장에 대한 정제된 AtHS1의 저해제 활성을 나타낸 것이다. 저해제 AtHS1은 *D. bryoniae*(A), *T. harzianum*(B) 및 *B. cinerea*(C)로 방사상 성장저해 시험이 수행되었다. 종이 디스크는 음성 대조군(디스크 C; 25 mM Hepes 완충용액, pH 7.2) 또는 정제된 AtHS1의 150 μ g (디스크 1) 또는 300 μ g (디스크 2)과 함께 완

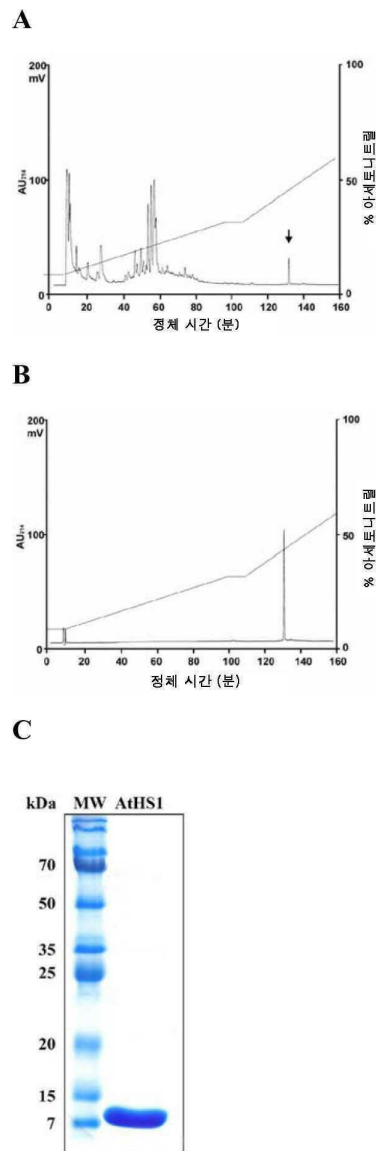
충용액으로 로드되었다.

<62> 도 3은 AtHS1의 추론된 아미노산 서열 및 AtHS1 유전자의 발현 수준을 나타낸 것이다. 도 3(A)는 MALDI-MS 분석에 의해 특성화된 단백질의 아미노산 서열이 아라비돕시스 가설적 단백질(GenBank 수납 번호 NP_566569)과 정확하게 일치함을 나타낸다. 도 3(B) 및 도 3(C)는 0, 1, 3 및 6시간 동안 1 mM 살리실산(B) 및 200 μ M 자스몬산(C)으로 처리된 후 아라비돕시스 세포 현탁액으로부터 추출된 총 RNA를 나타낸다. 처리되지 않은 세포의 발현 수준은 대조군(0 시간)으로서 사용되었다. 리보솜 RNA의 에티뮴 브로마이드 염색에 의해 표시되었을 때 RNA는 동등한 양으로 로드되었다.

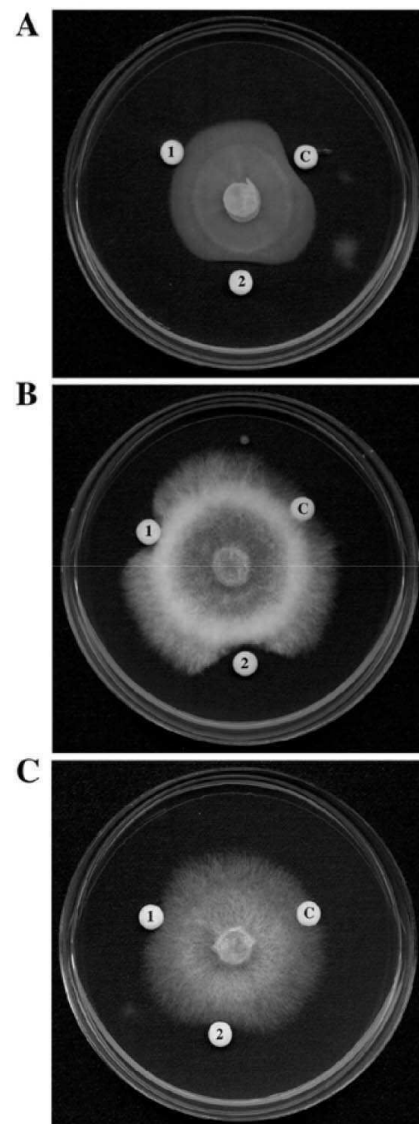
<63> 도 4는 로다민-표지된 AtHS1으로 접종된 진균의 공초점 레이저 현미경 사진이다. *C. albicans* 세포(B) 및 *F. oxysporum* 균사(C)는 20분 동안 로다민-표지된 AtHS1 20 μ M으로 배양되었다. 패널 1은 형광 이미지를 나타내고 패널 2는 형광 마이크로 그래프에서 나타난 동일한 세포의 밝은 영역이다. 패널 3은 병합된 이미지를 나타낸다.

도면

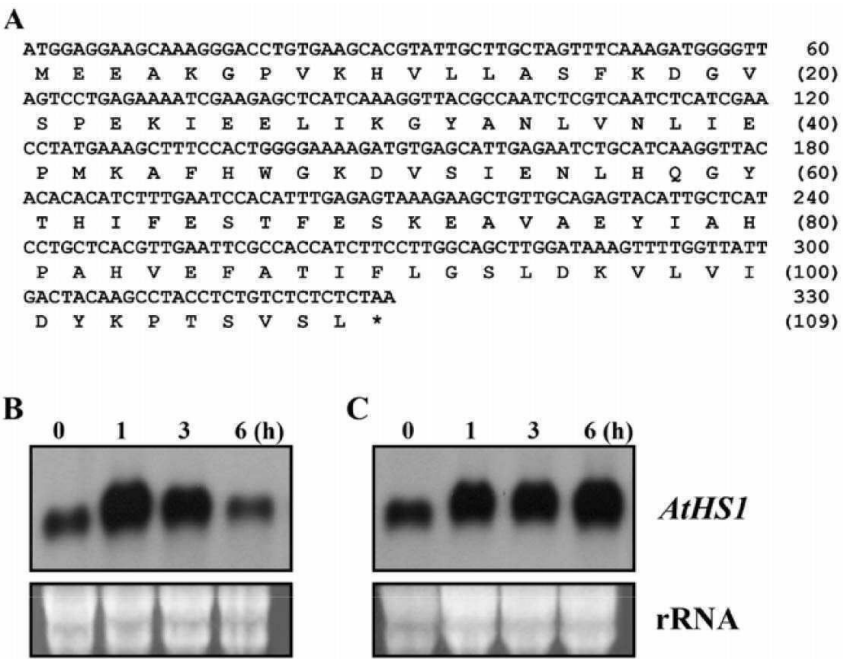
도면1



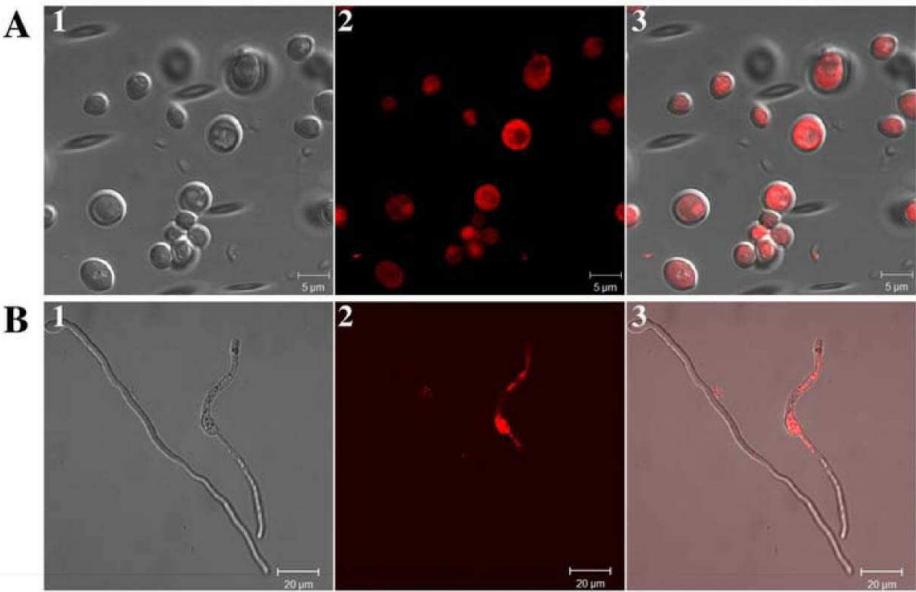
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Antibiotics preparation containing heat-stable protein having antimicrobial activity

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 109

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Glu Glu Ala Lys Gly Pro Val Lys His Val Leu Leu Ala Ser Phe
1 5 10 15

Lys Asp Gly Val Ser Pro Glu Lys Ile Glu Glu Leu Ile Lys Gly Tyr
20 25 30

Ala Asn Leu Val Asn Leu Ile Glu Pro Met Lys Ala Phe His Trp Gly
35 40 45

Lys Asp Val Ser Ile Glu Asn Leu His Gln Gly Tyr Thr His Ile Phe
50 55 60

Glu Ser Thr Phe Glu Ser Lys Glu Ala Val Ala Glu Tyr Ile Ala His
65 70 75 80

Pro Ala His Val Glu Phe Ala Thr Ile Phe Leu Gly Ser Leu Asp Lys
85 90 95

Val Leu Val Ile Asp Tyr Lys Pro Thr Ser Val Ser Leu
100 105