



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0148429  
(43) 공개일자 2022년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/46 (2006.01) A01N 63/50 (2020.01)  
A23K 20/195 (2016.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/461 (2013.01)  
A01N 63/50 (2022.01)  
(21) 출원번호 10-2021-0055432  
(22) 출원일자 2021년04월29일  
심사청구일자 2021년04월29일

(71) 출원인  
경상국립대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
박찬일  
경상남도 통영시 광도면 죽림2로 31, 305동 601  
호(통영죽림3차 대우푸르지오)  
손하정  
경상남도 고성군 고성읍 남포로 10, 104동 302호  
(고성코아루더파크)  
(74) 대리인  
최규환

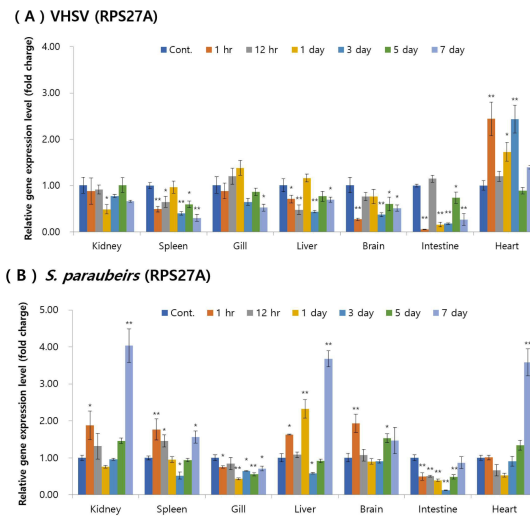
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 강도다리 유비퀴틴 유래의 신규한 항균 펩티드 및 이의 용도

### (57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 강도다리(*Platichthys stellatus*) 유비퀴틴 유래의 항균 펩티드 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 상기 항균 펩티드는 어류에 대한 항생제 대체 물질로 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

### 대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

**A23K 20/195** (2016.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                 |
|-------------|---------------------------------|
| 과제고유번호      | 1525011400                      |
| 과제번호        | 2018043012                      |
| 부처명         | 해양수산부                           |
| 과제관리(전문)기관명 | 해양수산과학기술진흥원                     |
| 연구사업명       | 포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(해수부) |
| 연구과제명       | 해양수산생물 유전체정보 분석 및 활용기반 구축 (2단계) |
| 기 여 율       | 1/1                             |
| 과제수행기관명     | 경상국립대학교 산학협력단                   |
| 연구기간        | 2021.03.01 ~ 2021.12.31         |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 강도다리(*Platichthys stellatus*) 유비퀴틴 유래의 항균 펩티드.

#### 청구항 2

제1항의 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 3

제2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

#### 청구항 4

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

#### 청구항 5

제3항의 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 과발현시키는 단계를 포함하는 항균 펩티드의 생산방법.

#### 청구항 6

제5항의 방법에 의해 생산된 항균 펩티드.

#### 청구항 7

제1항 또는 제6항의 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 그람 양성 및 그람 음성의 병원균에 대하여 항균 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 그람 양성 병원균은 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*) 또는 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*)이며, 그람 음성 병원균은 비브리오 할베이(*Vibrio harveyi*) 또는 비브리오 캄프벨리(*V. campbellii*)인 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

#### 청구항 10

제1항 또는 제6항의 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 강도다리(*Platichthys stellatus*) 유래의 유비퀴틴 단백질과 관련있는 신규한 항균 펩티드 및 이의 용도에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 항균 펩티드(Antimicrobial peptide, AMP)는 선천면역의 중요한 구성요소로, 광범위한 항세균, 항진균, 항바이러스 및 항암 활성을 가지는 천연의 물질로 항생제의 직면한 문제인 약물 저항성을 극복할 수 있을 것으로 사료되고 있다. 그러나, 이러한 장점에도 불구하고, 천연의 AMPs는 높은 생산 단가, 짧은 생체 내 반감기 및 체내

독성 때문에 항생제를 대체하기에 문제가 있고, 상기와 같은 문제점들을 극복할 수 있는 AMP의 개발이 요구되고 있다. 현재, 20,000개 이상의 AMP 서열이 DRAMP (Data Repository of Antimicrobial Peptides, <http://dramp.cpu-bioinfor.org/>) 데이터베이스에 등록되어 있으나, 0.4% 미만의 AMP만 임상적으로 실험되고 있다.

[0003] 어류 양식 산업에서, 공중보건에 대한 관심 증가 및 항생제 사용의 규제로 인해 AMP가 주목받고 있다. 어류는 다양한 병원체에 노출되는 환경에 서식하므로 새로운 항균 펩티드를 발견하는데 중요한 자원으로 사용될 수 있다.

[0004] 유비퀴틴은 세포주기, 단백질 발현 및 세포사멸과 같은 면역 관련 기능의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, 단백질 합성 및 펩티드 결합 형성에 연관된 리보솜과도 연관되어 있는 것으로 보고되어 있다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2018-0039393호에는 '극지 어류 유래의 신규한 항생 펩타이드'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2013-0109543호에는 '황다랑어 유래의 새로운 항미생물성 펩타이드 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 강도다리 유비퀴틴 유래의 신규한 항균 펩티드 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 강도다리(*Platichthys stellatus*) 유래의 유비퀴틴 관련 펩티드(RPS27A)를 제작하여 항균활성 및 숙주의 적혈구에 대한 세포독성을 확인한 결과, 상기 강도다리 유래 항균 펩티드가 그람 양성균 및 그람 음성균에 대해 항균활성을 나타내며, 숙주의 적혈구에 대해서는 용혈활성을 나타내지 않음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 강도다리(*Platichthys stellatus*) 유비퀴틴 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 형질전환시켜 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 과 발현시키는 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 항균 조성물을 제공한다.

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

### 발명의 효과

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

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 건강한 강도다리 어체의 각 조직에서 RPS27A의 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 2는 VHSV(A) 또는 스트렙토코커스 파라우베리스(*Streptococcus parauberis* PH0710, B)를 인공 감염시킨 후 강도다리 어체의 각 조직에서 RPS27A의 발현 수준 변화를 확인한 결과이다.

도 3은 RPS27A의 세포 독성을 알아보기 위한 강도다리 적혈구 용혈 실험 결과이다.

도 4는 RPS27A의 생물막 형성 억제능을 확인한 결과이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 강도다리(*Platichthys stellatus*) 유비퀴틴 유래의 항균 펩티드를 제공한다.
- [0018] 본 발명자는 강도다리(*Platichthys stellatus*) 유래의 유비퀴틴(ubiquitin) 연관 단백질에서 항균 서열이 예상되는 아미노산 서열을 기반으로 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 항균 펩티드를 제작하였으며 이를 RPS27A로 명명하였다.
- [0019] 본 발명에 따른 강도다리 유래의 항균 펩티드의 범위는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열로 표시되는 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 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩티드와 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 펩티드를 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 항균 활성을 의미한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 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] 본 발명은 또한, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0022] 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.
- [0023] 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<sub>λ</sub> 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(λ)의 좌향 프로모터(pL<sub>λ</sub> 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0024] 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.
- [0025] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카바니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0026] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0027] 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 추린젠시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세스스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0028] 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.

[0029] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주세포가 원핵세포인 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 진핵 세포인 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.

[0030] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환하여 항균 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 과발현하는 단계를 포함하는 항균 펩티드의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 항균 펩티드를 제공한다.

[0031] 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 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.

[0032] 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.

[0033] 본 발명의 상기 항균 펩티드는 전술한 바와 같으며, 그람 양성균 또는 그람 음성균 등의 세균에 대한 생육 저해 활성을 가진 항균 펩티드이다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물을 제공한다. 상기 항균 조성물은 어류용 항균 조성물로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] "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 이니아(*Streptococcus iniae*) 또는 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*)이고, 그람 음성균은 비브리오 할베이(*Vibrio harveyi*) 또는 비브리오 캄프벨리(*V. campbellii*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명은 또한, 상기 항균 펩티드를 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제를 제공한다. 상기 사료첨가제는 항균 활성을 가지는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하며, 어류의 면역증강 효과를 유도할 수 있다.

[0037] 본 발명의 사료첨가제에는 아미노산, 무기염류, 비타민, 향생물질, 향균물질, 향산화, 향곰팡이 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.

[0038] 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.

[0039] 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( $\alpha$ -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.

[0040] 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 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.

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## [0044] 재료 및 방법

### [0045] 1. Next Generation Sequencing (NGS) 분석

[0046] 유전자 서열의 확보를 위해 Next Generation Sequencing (NGS) 분석을 수행하였다. 먼저 스트렙토코커스 파라우베리스(*Streptococcus parauberis*)로 인위감염 시킨 강도다리의 주요 조직(백혈구, 적혈구, 간, 신장, 비장)으로부터 총 RNA를 분리하여 cDNA로 합성하였고, 농도와 순도 등의 항목에 대한 품질확인(QC)을 통해 시퀀싱 전 분석용 샘플의 적합성을 확인하였다. QC로 검증된 샘플들은 (주) DNAlink (Korea)에 의뢰하여 전사체 시퀀싱과 1차 어셈블리를 수행하였고, 가공된 데이터들은 (주) 인실리코젠(Korea)에 의뢰하여 2차 어셈블리를 수행하여 최종적으로 RPS27A의 코딩 서열(coding sequence, CDS)을 확인하였다.

### [0048] 2. 정상어체 조직 분리 및 총 RNA 분리

[0049] 실험어는 경상북도 포항시 사설 양식장에서 구입하였으며, 평균 전장  $21.5 \pm 1.3$  cm과 체중은  $128.7 \pm 18.2$  g 인 것을 사용하였다. 인위감염에 사용된 VHSV (Viral hemorrhagic septicemia)와 스트렙토코커스 파라우베리스는 국립수산물과학원으로부터 제공받았으며,  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 와  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에 순치하였다. 조직 별 발현분석을 위해 건강한 5개체의 강도다리를 Benzocain (Sigma, USA)으로 마취하고 해부하여 체신(trunk kidney), 두신(head kidney), 비장, 간, 장, 아가미, 눈, 뇌, 근육, 심장, 피부, 위를 적출하였다. 적출한 조직들은 균질화한 후, TRIzol 기반의 RNAiso (TaKaRa, Japan)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 총 RNA를 추출하였다.

### [0051] 3. 정량적 실시간 PCR (Quantitative real-time PCR)

[0052] RPS27A의 mRNA의 발현 수준은 SYBR green 방법으로 분석하였으며, Thermal Cycler Dice<sup>®</sup> Real Time System III (Takara)를 사용하였다. 상대적 발현 분석을 위해, RPS27A 특이적 프라이머[forward: GCCAAATCCAGGACAAAGA (서열번호 2) 및 reverse: TCTTCTGGGGTGGTGTAG (서열번호 3)]를 사용하였고,  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  방법을 사용하여 계산하였다.

### [0054] 4. 인위감염 샘플 조직 분리

[0055] 병원체로 인위감염시킨 후 RPS27A의 발현특성을 확인하기 위해 강도다리를  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ 와  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 에 순치하였고, 스트렙토코커스 파라우베리스 PH0710 ( $1 \times 10^6$  CFU/fish) 또는 VHSV ( $1 \times 10^6$  copies/fish)를 각각 PBS에 현탁한 뒤, 피하주사 하였으며, 대조구는 동량의 PBS를 피하주사 하였다. 병원체와 PBS를 각각 주사한 후 1, 12시간, 1, 3, 5 및 7일 차에 각각의 실험구와 대조구로부터 무작위로 5개체를 선정하여 신장, 비장, 아가미,

간, 뇌, 장, 심장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 조직은 실험에 사용하기 전까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 총 RNA 분리와 cDNA 합성, 정량적 실시간 PCR은 전술한 방법들과 동일하게 수행하였다.

## 5. 펩티드 합성

항균 활성이 있을 것으로 예측된 RPS27A의 아미노산 서열[TPKKNKHKKVVL (서열번호 1)]은 GL Biochem Ltd (China)에 의뢰하여 합성하였다. 합성된 펩티드(항균 펩티드)는 다음과 같으며, PBS (phosphate-buffered saline) 버퍼에 녹여 실험에 사용하였다.

## 6. 병원성 세균

RPS27A 펩티드의 항균 활성을 분석하기 위해서, 스트렙토코커스 파라우베리스(*Streptococcus parauberis*) PH0710, 스트렙토코커스 파라우베리스 KSP28, 스트렙토코커스 이니아(*S. iniae*) FP5228, 비브리오 캄프벨리(*Vibrio campbellii*) KCCM40684 및 비브리오 할베이(*V. harveyi*) ATCC14126를 사용하였다. 각 균주를 BHIA (brain heart infusion agar)에 도말하여  $28^{\circ}\text{C}$  또는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양 후 획득한 콜로니를 BHIB (brain heart infusion broth)에서  $28^{\circ}\text{C}$  또는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하였다. 그 후, 4,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 각 균주의 농도는 540 nm에서 흡광도 0.15가 되도록 PBS로 희석하여  $1 \times 10^5$  CFU/fish 까지 재현탁하였다.

## 7. 최소저해농도(Minimal inhibitory concentration, MIC) 분석

RPS27A의 최소저해농도(MIC)를 확인하기 위해 2.5% 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)에 용해시킨 펩티드를 96 well-plate에서 PBS를 이용하여 2배 단계 희석법으로 희석하였다. 모든 균주가  $1 \times 10^5$  CFU/fish가 되도록 MH (Mueller Hinton) 배지로 희석하였고 50  $\mu\text{l}$ 의 균주를, 2배 단계 희석시킨 펩티드(7.81-250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 50  $\mu\text{l}$ 와 혼합하여  $28^{\circ}\text{C}$  또는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 배양하였다. 배양 후 VICTOR3 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. MIC 실험은 정확성을 높이기 위해 3반복 수행하였다.

## 8. 생물막 억제능 분석

항균 펩티드가 세균의 생물막(biofilm) 형성에 영향을 미치는지 확인하기 위해 상기에서 언급한 병원성 세균을 BHIA에  $1 \times 10^5$  CFU/fish 농도로 준비하고 M9 배지(Welgene, Precision Solution™, Korea)를 첨가하였다. 각 균주를 96-well plate에  $28^{\circ}\text{C}$  또는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하고 PBS로 세척한 후 상이한 농도(7.81-250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 펩티드를 첨가한 다음  $28^{\circ}\text{C}$  또는  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 추가 배양하였다. 배양 후 상청액을 제거하고 150  $\mu\text{l}$  무수에틸알코올(absolute ethanol)을 첨가하여 실온에서 30분 배양하였다. 그 후, PBS로 세척 후, 1% 크리스탈 바이올렛(Crystal violet, Sigma-Aldrich)으로 10분 염색하고 증류수로 세척 한 뒤, 150  $\mu\text{l}$ 의 30% 아세트산 용액을 첨가하여 실온에서 10분 배양하고, 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 사용된 대조군은 PBS와 2.5% ACN이다. 모든 실험은 정확성을 높이기 위해 3반복 수행하였다.

## 9. 세포독성 분석

헤파린(heparin) 처리된 주사기를 이용해 강도다리로부터 혈액을 채혈하고 Leibovitz's L-15 배지에 첨가해 주었다. 그 후, 53% 퍼콜(percoll) 용액을 이용하여 퍼콜 구배법을 수행하고, 400xg에서 15분간 원심분리하여 적혈구를 분리하였다. 분리한 적혈구를 PBS로 3회 세척한 후, 상이한 농도의(7.81-250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 항균 펩티드와 각각 100  $\mu\text{l}$ 씩 혼합하여 30분간 실온 배양하였다. 이 때 음성 대조군은 PBS, 양성 대조군은 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 배양 후 1,000xg에서 10분간 원심분리하고, 상청액을 96-well plate에 옮겨 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 10. 통계분석

[0073] 모든 시료는 3반복으로 수행하였으며, 결과는 평균±표준편차로 보고하였다. 통계 분석은 SPSS 소프트웨어 version 19(IBM, USA)를 사용하여 수행하였으며, 결과는 ANOVA(one-way analysis of variance)를 사용하여 검증하고, 결과값 간의 비교를 위해 Tukey's test를 사용하였다(\* $p < 0.05$  및 \*\* $p < 0.01$ ).

[0075] 실시예 1. RPS27A의 유전자 발현 프로파일링

[0076] 건강한 강도다리에서 RPS27A의 mRNA는 체신, 위, 심장, 아가미, 피부 조직에서 풍부하게 발현되는 것이 확인되었다(도 1).

[0077] RPS27A의 mRNA 발현 수준은 VHSV를 인공 감염시킨 경우 심장 조직에서 감염 1시간 후 및 3일 후에 가장 높은 발현을 보였고(도 2A), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*)를 인공 감염시킨 경우 신장, 간, 심장 조직에서 감염 7일 후에 가장 높은 발현을 보여주었다(도 2B)

[0079] 실시예 2. 항균 활성 분석

[0080] 항균 활성 분석에 사용한 합성한 RPS27A 항균 펩티드의 순도는 98%였다. 그람 양성 및 그람 음성균에 대한 RPS27A 항균 펩티드의 MIC 값은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0081] 다양한 병원균에 대한 RPS27A의 항균 활성

| Bacterial strain                       | Gram | ℃  | RPS27A ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) |
|----------------------------------------|------|----|------------------------------------|
| <i>Streptococcus parauberis</i> PH0710 | (+)  | 37 | 7.81-15.63                         |
| <i>Streptococcus parauberis</i> KSP28  | (+)  | 37 | 15.53-31.25                        |
| <i>Streptococcus iniae</i>             | (+)  | 28 | 31.25-62.5                         |
| <i>Vibrio harveyi</i>                  | (-)  | 28 | 7.81-15.63                         |
| <i>Vibrio campbellii</i>               | (-)  | 28 | 31.25-62.5                         |

[0082] RPS27A는 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*), 스트렙토코커스 파라우베리스(*S. parauberis*) PH0710, 스트렙토코커스 파라우베리스 KSP28, 비브리오 캄프벨리(*Vibrio campbellii*) 및 비브리오 할베이(*V. harveyi*)의 성장을 저해하는 것으로 확인되어 항균 활성이 있음을 알 수 있었다.

[0084] 실시예 3. 세포 독성 분석

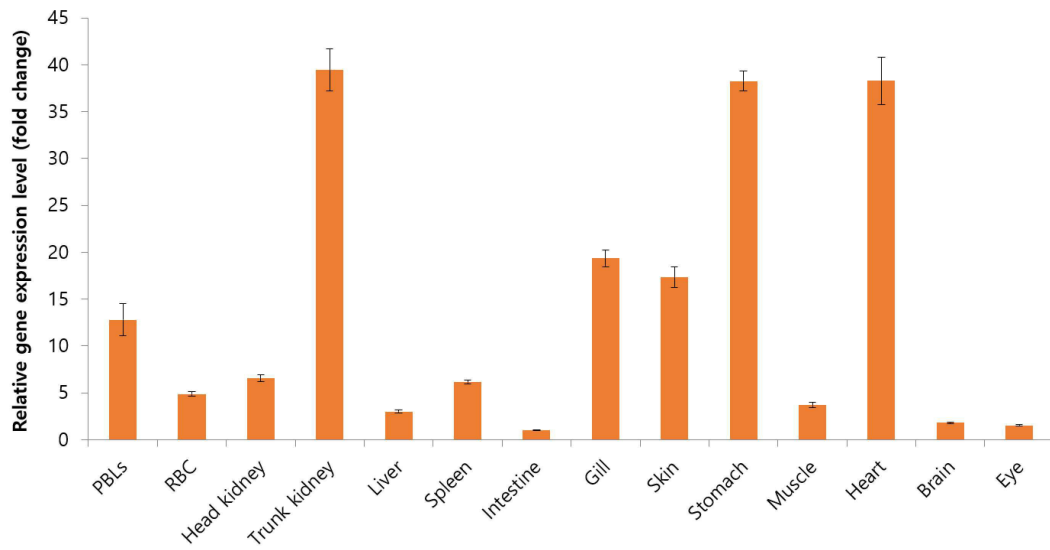
[0085] 본 발명자는 RBCs를 이용하여 RPS27A 항균 펩티드의 용혈 활성을 측정하였다. 그 결과, 도 3에서 확인되는 것과 같이 RPS27A 및 S30FAU 항균 펩티드는 최고 처리 농도인 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 용혈활성이 전혀 나타나지 않는 것으로 확인되어, 세포 독성이 없는 항균 펩티드임을 알 수 있었다.

[0087] 실시예 4. 생물막 형성 억제능

[0088] RPS27A 항균 펩티드는 실험에 사용된 모든 세균들에 대해서 생물막 형성 억제능이 없는 것으로 확인되었다(도 4). 또한, 용매 독성을 확인하기 위해 사용한 아세트니트릴(ACN) 2.5%는 PBS 대조군과 유의적인 차이가 없음을 알 수 있었다.

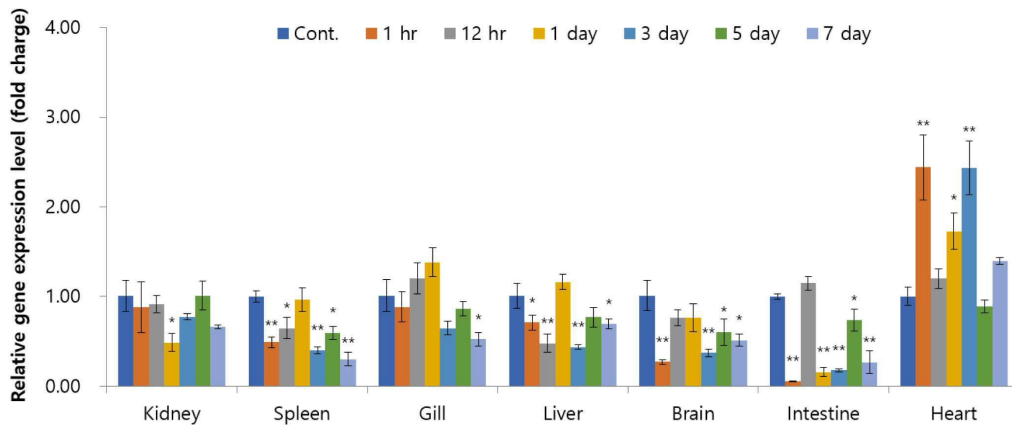
도면

도면1

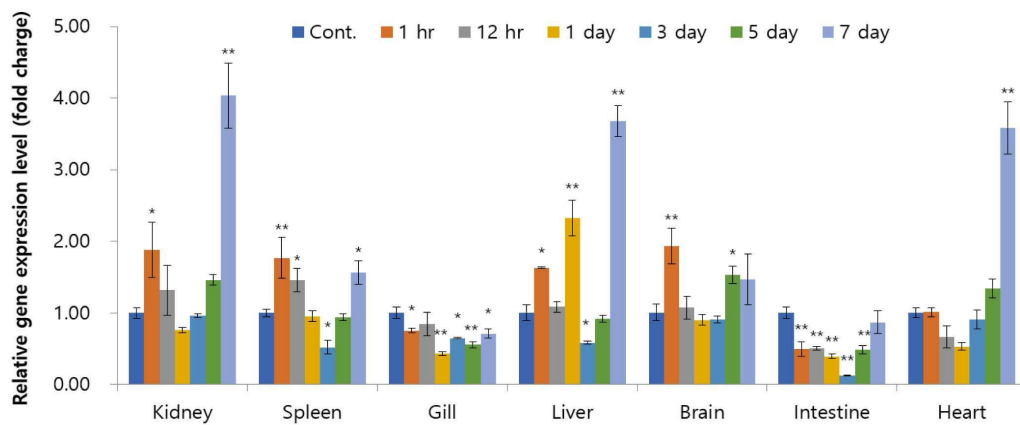


도면2

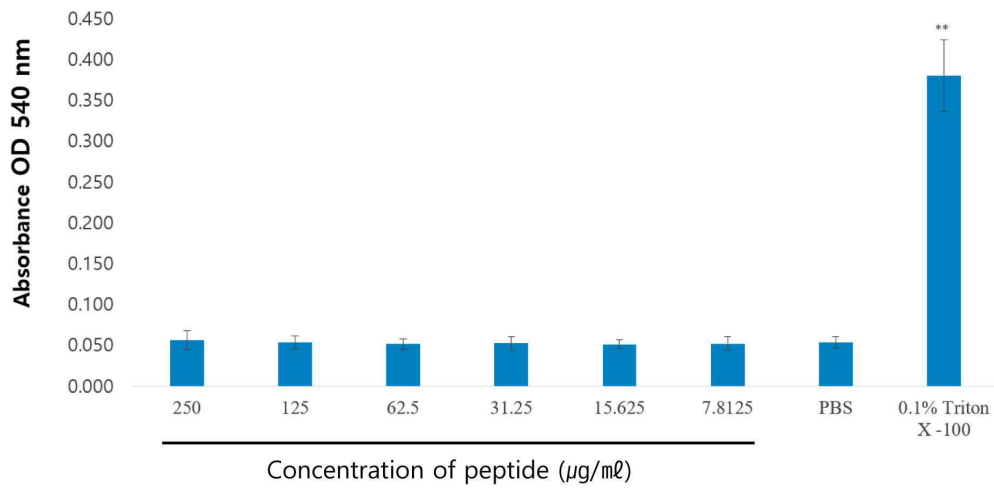
( A ) VHSV (RPS27A)



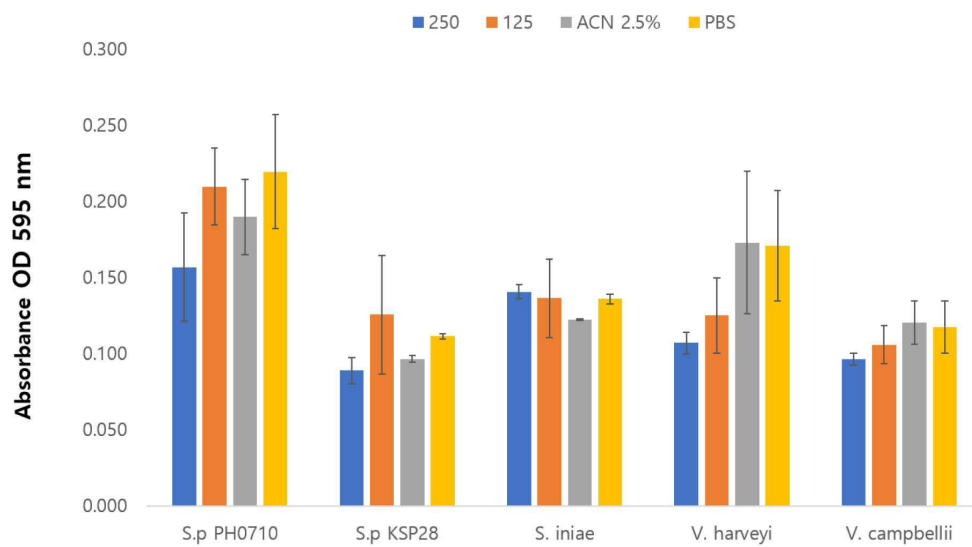
( B ) *S. parauberis* (RPS27A)



도면3



도면4



### 서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Novel antimicrobial peptide from ubiquitin of starry flounder and  
uses thereof
- <130> PN21097
- <160> 3
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Platichthys stellatus

<400> 1

Thr Thr Pro Lys Lys Asn Lys His Lys Arg Lys Lys Val Lys Leu

1 5 10 15

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gccaaaatcc aggacaaaga 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

tcttcttggg ggtggtgtag 20