(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0021827
(43) 공개일자 2012년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/08 (2006.01) *A01N 63/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0080018
(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

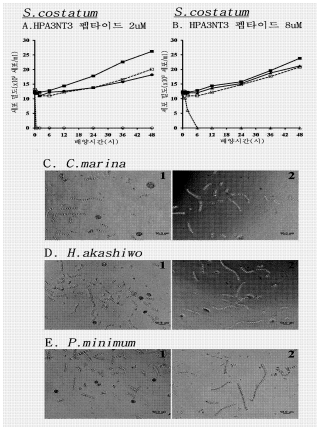
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **항적조 활성을 가지는 ＨＰＡ３ＮＴ３ 펩타이드 및 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 생물체 유래의 천연 항적조 펩타이드에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드는 탁월한 항적조 활성을 나타내며, 이러한 항적조 활성은 적조유발 생물에만 선택적으로 나타나며, 자연 분해가 가능하며, 세포 독성이 없으므로 해양 생태계에 안전하고 유용한 항적조제로써 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



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 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는, HPA3NT3 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, HPA3NT3 펩타이드는 서열번호 2로 기재되는 HPA3 펩타이드의 9번째 글루탐산(Glu)과 13번째 세린(Ser)을 라이신(Lys)으로 치환한 서열인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제 2항에 있어서, HPA3 펩타이드는 서열번호 1로 기재되는 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드의 16번째 글루타민(Gln)과 18번째 아미노산인 아스파르트산(Asp)을 트립토판(Trp)으로 치환한 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 HPA3NT3 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 5

제 1항에 있어서, 상기 HPA3NT3 펩타이드는 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대하여 항적조 활성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 6

1) 서열번호 1로 기재되는 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드의 16번째 글루타민(Gln)과 18번째 아미노산인 아스파르트산(Asp)을 트립토판(Trp)으로 치환하여 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3 펩타이드를 제조하는 단계; 및

2) 단계 1)에서 제조된 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3 펩타이드의 9번째 글루탐산(Glu)과 13번째 세린(Ser)을 라이신(Lys)으로 치환하는 단계를 포함하는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드의 제조방법.

청구항 7

제 1항의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물.

청구항 8

제 7항에 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 9

제 7항에 있어서, 상기 적조 방제용 조성물은 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대하여 항적조 활성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 적조 방제용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

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

배 경 기 술

[0002] 적조는 플랑크톤이 번식하기에 알맞은 환경을 만나 대량 번식한 결과, 이들이 가지고 있는 다양한 색소로 인하여 해수의 색깔이 붉게, 혹은 녹색, 갈색으로 변하게 될 때 우리는 이런 현상을 통칭 적조라 부르고 있다. 우리나라 남해안 일대에 7월?9월 사이에 장마철이나 비가 온 뒤에는 바다의 색깔이 적갈색으로 변하여 바다에 살고 있는 굴, 조개, 홍합 등의 양식자원을 때로는 물고기까지 패사하게 만든다. 또한, 유독성 식물 플랑크톤을 먹은 어패류를 사람이 먹게 되면 여러 가지 패독현상을 일으키게 된다.

[0003] 씨. 폴리크리코이데스 종은 푸에르토 리코(Puert) 연안에서 처음 발견되었으며(Margalef, 1961), 이후 북미 대서양 연안의 뉴저지주 바메가트(Bamegat)만과 미국 캘리포티아 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. akshiwo*), 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 해양 박테리아가 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 농업부분에서 사용되는 농약에 의해 야기되는 문제점들처럼 해양생태계나 바다에서 생산되는 먹거리들을 통해 인체에까지 축적될 것이다.

[0005] 이러한 문제점들을 고려해볼 때 자연분해가 가능하며 인체나 자연 생태계에 무해한 항적조제로써 사용될 수 있는 것으로는 펩타이드나 단백질제제가 있다. 이들은 또한 유전자 조작을 통하여 대량 발현하여 생산단가를 줄

일 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 카테나튬(*Chattonella catenatum*)에 대해 살조효과를 확인된 바 있다. 그러나 상기 펩타이드는 낮은 농도에서 세포독성이 높게 나타나는 것으로 보고되어 있다.

[0007] 이에 본 발명자들은 헬리코박터 파이오리 유래의 HP(2-20) 펩타이드를 모체로 하여 소수성 부분을 증가시킨 유사체(HPA3) 펩타이드와 HPA3 펩타이드의 불규칙한 구조를 가지는 N-말단 부분을 절단시킨 후 양이온을 증가시킨 유사체인 HPA3NT3 펩타이드 중 HPA3NT3 펩타이드가 적조생물에 탁월한 항적조 활성을 띠고 세포 독성(용혈활성)에 대한 안정성을 가지고 있어 무독성의 항적조제로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 우수한 항적조 활성을 갖는 HPA3NT3 펩타이드, 이의 제조방법 및 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는, HPA3NT3 펩타이드를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0011] 아울러, 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드는 적조유발 해조류에 선택적으로 탁월한 항적조 작용을 나타내며, 세포 독성을 나타내지 않으므로 해양생태계에 안전한 항적조제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성을 보여주는 현미경사진이다:

도 1의 A는 침편모조강인 씨. 마리나(*C. marina*)에 대한 항적조 활성을 보여주는 현미경사진이다;

1: 펩타이드를 처리하지 않은 대조군;

2: HP(2-20) 처리군;

3: HPA3 처리군;

4: HPA3NT3 펩타이드 처리군;

도 1의 B는 에이치.아카쉬우(*H.akashiwo*)에 대한 항적조 활성을 보여주는 현미경사진이다;

1: 펩타이드를 처리하지 않은 대조군;

2: HP(2-20) 처리군;

3: HPA3 처리군; 및

4: HPA3NT3 펩타이드 처리군.

도 2는 와편모 조류인 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)와 피. 미니멈(*P. minimum*)에 대한 펩타이드의 항적조 활성을 보여주는 현미경 사진이다:

도 2의 A는 펩타이드를 처리하지 않은 대조군에서 펩타이드의 항적조 활성을 보여주는 현미경 사진이다;

1: 와편모 조류인 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*);

2: 피. 미니멈(*P. minimum*);

도 2의 B는 HPA3 펩타이드 처리군에서의 항적조 활성을 보여주는 현미경 사진이다;

1: 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*);

2: 피. 미니멈(*P. minimum*);

도 2의 C는 HPA3NT3 펩타이드 처리군에서의 항적조 활성을 보여주는 현미경 사진이다;

1: 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*); 및

2: 피. 미니멈(*P. minimum*).

도 3은 에스. 코스타툼(*S. costatum*)의 성장에서 항적조 펩타이드의 비-억제 활성을 보여주는 그림이다:

A: 펩타이드를 처리하지 않은 대조군;

B: HPA3 펩타이드를 128마이크로몰(μM) 처리한 군; 및

C: HPA3NT3 펩타이드를 128마이크로몰(μM)을 처리한 군.

도 4는 HPA3NT3 펩타이드의 선택적인 항적조 활성을 보여주는 그림이다:

A: HPA3NT3 펩타이드를 2마이크로몰(μM) 처리하였을 때, 배양 시간에 따른 에스. 코스타툼(*S. costatum*)의 세포 밀도를 나타낸 그래프이다;

B: HPA3NT3 펩타이드를 8마이크로몰(μM) 처리하였을 때, 배양 시간에 따른 에스. 코스타툼(*S. costatum*)의 세포 밀도를 나타낸 그래프이다;

C: 씨. 마리나(*C. marina*)와 에스. 코스타툼(*S. costatum*)를 동시 배양한 후, HPA3NT3 펩타이드를 4 μM 처리한 후 관찰한 그림이다;

D: 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)와 에스. 코스타툼(*S. costatum*)를 동시 배양한 후, HPA3NT3 펩타이드를 1 μM 처리한 후 관찰한 그림이다; 및

E: 피. 미니멈(*P. minimum*)과 에스. 코스타툼(*S. costatum*)를 동시 배양한 후, HPA3NT3 펩타이드를 8 μM 처리한 후 관찰한 그림이다.

도 5는 형광 라벨한 HPA3NT3 펩타이드를 순차적으로 초점을 맞춰 적조에서의 위치를 보여주는 그림이다:

도 5의 A는 형광 라벨한 HPA3NT3 펩타이드 처리 농도에 따라 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에서의 펩타이드의 위치를 관찰한 그림이다;

도 5의 B는 형광 라벨한 HPA3NT3 펩타이드 처리 농도에 따라 씨. 마리나(*C. marin*a)에서의 펩타이드의 위치를 관찰한 그림이다; 및

도 5의 C는 형광 라벨한 HPA3NT3 펩타이드 처리 농도에 따라 피. 미니멈(*P. minimum*)에서의 펩타이드의 위치를 관찰한 그림이다.

도 6은 에이치. 아카쉬우 알에이-020(*H. akashiwo* RA-020)에서 HPA3NT3 처리한 후, 배양 시간에 따른 클로로필 에이의 변화를 보여주는 그래프이다:

■: 펩타이드를 처리하지 않은 대조군;

▲: HPA3 펩타이드를 처리한 군; 및

●: HPA3NT3 펩타이드를 처리한 군.

도 7은 적조의 세포막을 HPA3NT3 펩타이드가 투과함을 보여주는 그래프이다:

●: 에이치. 아키쉬우(*H. akashiwo*)에 HPA3NT3 펩타이드 0.25 μM를 처리한 군;

○: 에이치. 아키쉬우(*H. akashiwo*)에 HPA3NT3 펩타이드 0.5 μM를 처리한 군;

▲: 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 HPA3NT3 펩타이드 256 μM를 처리한 군; 및

△: 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 HPA3NT3 펩타이드 512 μM를 처리한 군.

도 8은 HPA3와 HPA3NT3 펩타이드의 물고기 적혈구에 대한 적혈구 용혈 현상을 보여주는 그래프이다:

■: HPA3 펩타이드를 처리한 군;

◆: HPA3NT3 펩타이드를 처리한 군; 및

▲: 멜리틴(Melittin)을 처리한 군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0015] 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는, HPA3NT3 펩타이드를 제공한다.

[0016] 상기, HPA3NT3 펩타이드는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기, HPA3NT3 펩타이드는 서열번호 2로 기재되는 HPA3 펩타이드의 9번째 글루탐산(Glu)과 13번째 세린(Ser)을 라이신(Lys)으로 치환한 서열인 것이 바람직하며, 상기 HPA3 펩타이드는 서열번호 1로 기재되는 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드의 16번째 글루타민(Gln)과 18번째 아미노산인 아스파르트산(Asp)을 트립토판(Trp)으로 치환한 서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0017] 또한, 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 것이 바람직하며, 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대하여 항적조 활성을 나타내지 않는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0018] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 양친매성 항적조 펩타이드를 합성하기 위하여, 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드와 상기 HP(2-20) 펩타이드의 16번째 아미노산인 글루타민(Gln)과 18번째 아미노산인 아스파르트산(Asp)을 트립토판(Trp)으로 치환한 유사체 HPA3 펩타이드, 및 HPA3에서 구조적으로 불규칙한 N-말단 부위를 절단한 후 양이온을 증가시키기 위하여 9번째 글루탐산(Glu)과 13번째 세린(Ser)을 라이신(Lys)으로 치환한 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드를 제조하였다(표 1 참조).

[0019] 또한, 상기 실시예에서 제조한 HPA3 펩타이드와 HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성을 측정하기 위하여, 본 발명자들은 적조생물에 대한 상기 두 종류의 펩타이드의 50% 생육 저해농도(50% of inhibitory concentration, IC_{50})를 측정하였다. 그 결과, 실험에 사용된 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*), 피. 미니멈(*P. minimum*), 피. 미캔스(*P. micans*), 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*), 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo* RA-020), 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo* RA-018), 샤또넬라 에스피(*Chattonella sp*), 씨. 마리나(*C. marina*), 및 에스. 코스타툼(*S. costatum*) 적조생물에 대하여, HPA3 펩타이드에 비하여 HPA3NT3 펩타이드는 보다 낮은 농도에서 조류의 생육을 저해하는 것을 확인할 수 있었다(표 2 참조). 즉, HPA3NT3 펩타이드는 HPA3에 비하여 우수한 항적조 활성이 있음을 확인할 수 있었다.

[0020] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, HPA3NT3 펩타이드의 셀룰로우스 세포벽을 갖고 있지 않은 씨. 마리나(*C. marina*) 및 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에 대한 항적조 활성을 관찰하였다. HP(2-20) 펩타이드, HPA3 펩타이드, 및 HPA3NT3 펩타이드(32 μM/웰)를 처리한 적조에서는 펩타이드 처리 2분 후, 거의 모든 생물체가 다 터져, 생물체 내의 물질이나 소기관들이 밖으로 유출되었으며, 특히 HPA3NT3 펩타이드의 활성이 가장 우수하였다(도 1 참조).

[0021] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드의 셀룰로우스(celluose) 세포벽이 있

는 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)와 피. 미니멈(*P.minimum*)에 대한 항적조 활성을 관찰하였다. 배양된 씨. 폴리크리코이데스와 피. 미니멈의 배지에, HPA3 펩타이드, 및 HPA3NT3 펩타이드를 첨가하여 배양한 후 관찰한 결과, 세포벽이 없는 적조에 비하여, 펩타이드가 활성을 보이는 시간은 1시간 정도 더 늦지만 HPA3NT3 펩타이드가 무처리군과 HPA3 펩타이드를 처리한 군에 비하여, 우수한 항적조 활성을 보였다(도 2 참조).

[0022] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드를 유익한 규조류에 처리하여, HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성이 적조생물에 선택적으로 작용하는 것을 확인하고자 하였다. 에스. 코스타튬을 배양한 후, HPA3NT3 펩타이드 및 HPA3 펩타이드를 처리한 후, 광학현미경으로 관찰한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 3일 동안 배양하여도 상기 규조류의 변화가 관찰되지 않았다(도 3 참조). 즉, HPA3NT3 펩타이드는 적조 현상을 유발하는 생물에 선택적으로 항적조 활성을 보이며, 에스. 코스타튬과 같은 유해하지 않은 규조류에는 아무런 영향을 끼치지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0023] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드의 선택적인 항적조 활성을 확인하기 위하여, 적조 현상을 유발하는 생물과 그렇지 않은 유익한 규조류를 공동배양한 후, HPA3NT3 펩타이드와 HPA3 펩타이드를 각각 처리한 결과, 처리 2일 후 유익한 규조류인 에스. 코스타튬에는 변화가 보이지 않았으나, 유해한 적조 생물인 씨. 마리나, 에이치. 아카쉬우, 및 피. 미니멈은 생물체내의 물질이나 소기관들이 사라진 것을 관찰할 수 있었다. 즉, HPA3NT3 펩타이드의 적조생물에 대한 선택적인 항적조 활성을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

[0024] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드가 적조 생물의 세포막에 결합하여 항적조 활성을 나타내는 것인지를 확인하기 위하여, HPA3NT3 펩타이드에 형광물질을 표지한 후, 배지에 첨가하여 배양하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 셀룰로우스 벽이 있는 씨. 마리나와 에이치. 아카쉬우에서는 최외각의 세포막에 형광물질이 표지된 펩타이드가 관찰되었으며, 셀룰로우스 벽이 없는 적조생물인 피. 미니멈에서는 셀룰로우스 층 바로 안쪽에 펩타이드가 위치하는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드는 적조 생물이 세포막에 결합하여, 적조생물을 파괴하는 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다(도 5 참조).

[0025] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성이 적조 생물의 광합성을 저해함으로써 유도되는 것인지를 확인하기 위하여, 적조 생물의 클로로필 에이(chlorophyll a)의 함량을 측정하고자 하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 에이치. 아카쉬우 알에이-020 적조 생물에 HPA3NT3 펩타이드와 HPA3 펩타이드를 각각 처리한 후, 클로로필 에이의 함량을 측정한 결과, 배양시간이 길어질수록 HPA3NT3 펩타이드를 처리한 군에서 클로로필 에이의 함량이 HPA3 펩타이드를 처리한 군과 아무것도 처리하지 않은 무처리 대조군에 비하여 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드는 적조 생물의 광합성을 저해하여, 적조 생물의 사멸의 유도할 수 있음을 확인하였다(도 6 참조).

[0026] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드가 세포막을 투과하는지를 확인하기 위하여, 적조 생물 에이치. 아카쉬우를 배양한 뒤, 핵을 염색하는 싸이톡스 그린(SYTOX green)을 배지에 첨가하여 반응시킨 후, HPA3NT3 펩타이드를 0.25, 0.5μM 첨가한 후, 형광의 세기를 형광 분광기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, HPA3NT3 펩타이드의 농도가 증가할수록 형광의 세기가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면, 유해하지 않은 규조류인 에스. 코스타튬에 HPA3NT3 펩타이드를 256, 512 μM을 첨가한 후, 형광의 세기는 0에 가까웠다. 즉, HPA3 펩타이드는 적조 생물 선택적으로 세포막을 투과하는 성질이 있으며, 이로 인하여 싸이톡스 그린의 형광 세기가 에이치. 아카쉬우에서만 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 7 참조).

[0027] 또한, 본 발명의 구체적인 실험예에서 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드의 세포독성을 확인하기 위하여, 물고기의 적혈구를 희석한 후, 펩타이드를 첨가한 후, 적혈구의 파괴 정도를 트리톤 X-100(Triton X-100)의 적혈구 파괴능을 기준으로 본 발명의 펩타이드의 적혈구 파괴능을 비교하였다. 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 벌의 독성성분으로써 용혈작용이 알려진 멜리틴(melittin)을 첨가시에는 20 μM 이하에서부터 100%의 용혈반응이 관찰되었으나, HPA3 펩타이드를 첨가하였을 때는 용혈반응이 20 μM 이하에서는 거의 발생되지 않았으나, 64 μM 이상을 처리하였을 때에는 약 80%의 용혈반응이 관찰되었다. 그러나 HPA3NT3 펩타이드를 첨가하였을 때에는 128 μM 농도에서도 용혈반응이 10% 이하로, 거의 발생하지 않은았는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드는 세포 독성이 거의 없다는 것을 확인할 수 있었다(도 8 참조).

[0028] 따라서, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드는 세포 독성이 거의 없으며, 유해하지 않은 규조류에는 영향을 미치지 않고, 적조 생물에만 선택적으로 항적조 활성을 보였으며, 이러한 항적조 활성은 HPA3NT3 펩타이드가 적조

생물의 세포막에 투과적으로 침투하여 발생하며, 또한 적조 생물 내의 클로로필 에이의 함량을 감소시킴으로써, 적조 생물의 파괴를 유발하므로, HPA3NT3 펩타이드를 적조 방제용 조성물로써 유용하게 사용할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드의 제조방법을 제공한다.

[0030] 1) 서열번호 1로 기재되는 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드의 16번째 글루타민(Gln)과 18번째 아미노산인 아스파르트산(Asp)을 트립토판(Trp)으로 치환하여 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3 펩타이드를 제조하는 단계; 및

[0031] 2) 단계 1)에서 제조된 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3 펩타이드의 9번째 글루탐산(Glu)과 13번째 세린(Ser)을 라이신(Lys)으로 치환하는 단계.

[0032] 상기의 방법에 의해서 제조된 HPA3NT3 펩타이드는 세포독성이 없으며, 적조 유발하는 조류에 선택적으로 항적조 활성을 보였으며, 이러한 항적조 활성은 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드가 적조 생물의 세포막에 결합한 뒤, 투과하며 적조 생물의 사멸을 유도하며, 아울러 적조 생물의 광합성을 저해하여 적조를 방제할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0033] 아울러, 본 발명은 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 HPA3NT3 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 적조 방제용 조성물을 제공한다.

[0034] 상기, HPA3NT3 펩타이드는 서열번호 3으로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기, HPA3NT3 펩타이드는 서열번호 2로 기재되는 HPA3 펩타이드의 9번째 글루탐산(Glu)과 13번째 세린(Ser)을 라이신(Lys)으로 치환한 서열인 것이 바람직하며, 상기 HPA3 펩타이드는 서열번호 1로 기재되는 헬리코박터 파이오리로부터 유래한 HP(2-20) 펩타이드의 16번째 글루타민(Gln)과 18번째 아미노산인 아스파르트산(Asp)을 트립토판(Trp)으로 치환한 서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0035] 또한, 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 것이 바람직하며, 에스. 코스타튬(*S. costatum*)에 대하여 항적조 활성을 나타내지 않는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0036] 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드는 세포 독성이 거의 없으며, 유해하지 않은 규조류에는 영향을 미치지 않고, 적조 생물에만 선택적으로 항적조 활성을 보였으며, 이러한 항적조 활성은 HPA3NT3 펩타이드가 적조 생물의 세포막에 투과적으로 침투하여 발생하며, 또한 적조 생물 내의 클로로필 에이의 함량을 감소시킴으로써, 적조 생물의 파괴를 유발하므로, HPA3NT3 펩타이드를 적조 방제용 조성물로써 유용하게 사용할 수 있다.

[0037] 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 있다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0039] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] **<실시예 1> 펩타이드의 합성 및 분리정제**

[0041] 본 발명자들은 양친매성 항적조 펩타이드를 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).

[0042] 펩타이드의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)를 아미노기 보호 용기로 이용하는 메리필드(Merrifield)의 액상 고상법을 사용하여 합성하였다. 본 발명의 펩타이드에서 카르복실말단이 $-NH_2$ 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-헥시카르보이미드법(N-hydroxybenzo triazole-dicyclo-hexycarbodiimide)(HOBt-DCC)에 의하여 수행하였다.

[0043] 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(dichoromethane, DCM)으로 여러번 씻어준 다음 질소 가스로 건조시켰다. 건조된 레진에 트리플루오로아세틱산:페놀:티오아니졸:물:트리이소프로필실란(trifluoroacetic acid(TFA) : phenol : thioanisole : H_2O : triisopropylsilane = 85: 5: 5: 2.5: 2.5(vol./vol.)) 용액을 가하고 4시간 동안 반응시켜 보호기를 제거하고, 레진으로부터 펩타이드를 분리시킨 다음, 차가운 디에틸 에테르(diethyl ether)로 30분 동안 반응 시킨뒤 원심분리기로 펩타이드를 침전시킨뒤 다시 디에틸 에테르로 침전된 펩타이드를 한번 더 씻어준뒤 침전시키고 공기중에 말린다. 상기 방법으로 얻은 크루드(crude)한 형태의 펩타이드를 pH 8인 암모늄 바이카보네이트(ammonium bicarbonate)에 녹여 아세토니트릴을 그레디언트(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 디그래데이션(Edman degradation)방법으로 아미노산 분석기(Hitachi 8500 A)로 아미노산의 조성을 측정하고, MALDI(Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) 질량 분석법을 이용하여 펩타이드의 분자량을 측정하였다.

[0044] 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.

표 1

[0045] 시험에 사용된 펩타이드의 아미노산 서열

펩타이드명	서열	분자량
HP(2-20)	AKKVFKRLEKLFSKIQNDK-NH2(서열번호 1)	2320.0
HPA3	AKKVFKRLEKLFSKIWNWK- NH2(서열번호 2)	2449.2
HPA3NT3	FKRLKKLFKKIWNWK- NH2(서열번호 3)	2062.6

[0046] **<실험예 1> 펩타이드의 항적조 활성 측정**

[0047] **<1-1> HPA3NT3 펩타이드의 적조생물에 대한 생육 50% 저해농도 측정**

[0048] 상기 <실시예 1>에서 합성한 펩타이드의 항적조 활성을 측정하였다. 구체적으로, 항적조 활성을 측정하기 위한 적조생물로 한국해양미세조류은행에서 분양을 받은 씨. 마리나(*C. marina*), 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*), 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*), 피. 미니멈(*P. minimum*), 그리고 에스. 코스타툼(*S. costatum*)을 사용하였다.

[0049] 상기 각 조류를 F2 배지[150 mg $NaNO_3$, 8.69 mg $NaH_2PO4?9H_2O$, 10 mg ferric EDTA, 0.22 mg $MnCl_2$, 0.11 mg $CoCl_2$, 0.0196 mg $CuSO_4?5H_2O$, ZnSO4?7H2O, 50 mg $Na_2SiO_3?9H_2O$, 0.012 mg $Na_2MoO_4?2H_2O$, 1 ㎍ Vitamine B_{12}, 1 ㎍ Biotin, 0.2 ㎍ Thiamine?HCl / 1ℓ 필터된 해수)에서 배양조건 온도 22℃, 염분 34‰, 그리고 조도 3,000 럭스(lux)이었고, 14 시간/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 펩타이드를 256 마이크로몰(μM)/웰(well) 농도로부터 시작하여 1/2배씩 희석하여 상기 균주가 접종된 플레이트에 첨가하였다. 상기 언급한 배양조건에서 36시간 동안 배양하면서 6시간 마다 적조생물 수를 헤모사이토메터(hemocytometer)를 이용하여 측정하여, 50% 생육 저해농도(50% of inhibitory concentration, 이하 'IC_{50}'라 약칭함) 값을 결정하였다.

[0050] 그 결과, HP(2-20), HPA3, 및 HPA3NT3 펩타이드 모두 적조생물에 대하여 활성을 보였지만 그 중 본 발명의 펩타이드인 HPA3NT3가 가장 강한 항적조 활성을 나타내었다(표 2). 따라서, 본 발명의 <실시예 1>에서 제조한 HPA3NT3 펩타이드는 항적조 활성이 뛰어난 펩타이드임을 알 수 있었다.

표 2

[0051] 적조유발 해양생물(해조류)에 대한 항적조 활성 측정

Strains	억제농도(μM)					
	HP(2-20)		HPA3		HPA3NT3	
	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}	IC_{50}	IC_{90}
와편모조류						
씨. 폴리크리토이데스(C. polykrikoides)	64	128	4	8	4	8
피. 미니멈(P. minimum D-120)	128	>256	16	32	4	8
피. 미캔스(P. micans D-077)	128	>256	16	32	4	8
침편모조강						
에이치. 아카쉬우(H. akashiwo RA-020)	32	128	2	2-4	0.5	1
에이치. 아카쉬우(H. akashiwo RA-018)	64	128	2	2-4	0.5	1
에이치. 아카쉬우(H. akashiwo)	64	128	2	4	0.5	1
샤또넬라 에스피(Chattonella sp. RA-005)	64	128	2	4	1	2
씨. 마리나(Chattonella marina)	32	64	4	8	2	4
규조류						
에스. 코스타툼(S. costatum B-796)	256	>256	128	>256	128	>256

[0052] **<1-2> HPA3NT3 펩타이드의 셀룰로우스 세포벽이 없는 적조에서의 항적조 활성 관찰**

[0053] 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드가 항적조 활성을 보이는 것을 광학 현미경 상에서 가시화하기 위하여, 침편모조강인 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*), 와편모조류인 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)와 피. 미니멈(*P. minimum*), 그리고 규조류인 에스. 코스타툼(*S. costatum*)을 F2 배지(배지조성은 상기 시험 예1에서 서술)에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 10^4/㎖의 농도로 24웰 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종한 뒤 HP(2-20), HPA3, 그리고 HPA3NT3 펩타이드를 32 μM/웰(well)의 농도로 상기 적조생물이 접종된 플레이트에 첨가하여 22℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 가시화하기 위하여 광학 현미경 상에서 관찰하였다.

[0054] 도 1에서 알 수 있듯이, 셀룰로우스(celluose) 세포벽을 가지고 있지 않은 적조유발 생물인 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에 아무것도 처리하지 않은 무처리군에서는 생물의 수가 유지되고, 외형적 변화가 없었지만, HP(2-20), HPA3, 및 HPA3NT3 펩타이드를 처리한 적조에서는 펩타이드 처리 2분 후 거의 모든 생물체가 다 터져 생물체내의 물질이나 소기관들이 밖으로 유출이 되었는데 특히 HPA3NT3 펩타이드의 활성이 가장 좋았다. 이로써 본 발명의 HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성을 확인할 수 있었다.

[0055] **<1-3> HPA3NT3 펩타이드의 셀룰로우스 세포벽이 있는 적조에 대한 항적조 활성 관찰**

[0056] 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드의 셀룰로우스 세포벽이 있는 적조에 대한 항적조 활성을 관찰하기 위하여, 와편모조류인 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)와 피. 미니멈(*P. minimum*)을 F2 배지(배지조성은 상기 실험예 1에서 서술)에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 10^4/㎖의 농도로 24웰 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종한 뒤 HP(2-20), HPA3, 및 HPA3NT3 펩타이드를 256 μM/웰(well)의 농도로 상기 적조생물이 접종된 플레이트에 첨가하여 22℃에서 36시간 동안 배양하였다. 배양 후, 가시화하기 위하여 광학 현미경 상에서 관찰하였다.

[0057] 또한, 도 2에서 볼 수 있듯이 셀룰로우스 세포벽을 가지고 있는 적조인 씨. 폴리크리코이데스(*C. polykrikoides*)와 피. 미니멈(*P. minimum*)에서는 셀룰로우스 세포벽이 없는 적조에 비하여 HPA3NT3 펩타이드가

활성을 보이는 시간은 1시간 정도로 더 늦었지만, 도 1의 결과와 유사하게, HPA3NT3 펩타이드가 HP(2-20), HPA3 펩타이드에 비하여 가장 좋은 활성을 보였다(도 2).

[0058] **<1-4> HPA3NT3 펩타이드의 유익한 규조류에 대한 펩타이드의 항적조 활성 관찰**

[0059] 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성이 적조현상을 유발하지 않는 해양생물에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 유해하지 않은 규조류인 에스. 코스타툼(*S. costatum*)을 F2 배지에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 10^4/㎖의 농도로 24웰 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종한 뒤 HP(2-20), HPA3, 및 HPA3NT3 펩타이드를 256 μM/웰(well)의 농도로 상기 적조생물이 접종된 플레이트에 첨가하여 22℃에서 72시간 동안 배양하였다. 배양 후, 가시화하기 위하여 광학 현미경 상에서 관찰하였다.

[0060] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 해양 생태계에 해를 주지 않은 규조류인 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 대한 HPA3NT3 펩타이드의 활성을 확인한 결과 다른 적조에서 활성이 좋은 HPA3와 HPA3NT3 펩타이드를 처리한 후, 3일이 경과하여도 규조류인 에스. 코스타툼을 전혀 억제하지 않음을 확인하였다(도 3).

[0061] **<1-5> HPA3NT3 펩타이드의 적조 생물과 규조류의 공동배양에 대한 항적조 활성 관찰**

[0062] 본 발명의 펩타이드가 적조생물에만 항적조 활성을 나타내는 것을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 유익한 규조류인 에스. 코스타툼(*S. costatum*)과 침편모조강인 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*), 및 피. 미니멈(*P. minimum*)를 각각 공동배양하였다. 규조류와 적조 생물을 각각 10^4/㎖의 농도로 24웰 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종한 뒤 에스. 코스타툼(*S. costatum*)과씨. 마리나(*C. marina*)가 접종된 플레이트에는 4 μM HPA3NT3 펩타이드 농도를, 코스타툼(*S. costatum*)과 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)가 접종된 플레이트에는 1 μM HPA3NT3 펩타이드 농도를, 그리고 에스. 코스타툼(*S. costatum*)과 피. 미니멈(*P. minimum*)이 접종된 플레이트에 8 μM HPA3NT3 펩타이드 농도를 첨가하여 22℃에서 48시간 동안 배양하였다.

[0063] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 해양 생태계에 적조를 유발하는 해로운 종과 해를 주지 않는 규조류를 공동배양한 후, HPA3NT3 펩타이드를 처리하였을 때 2 μM을 처리한 A보다 8 μM을 처리한 B에서 더 좋은 활성을 확인할 수 있었고, 두 경우 모두 에스. 코스타툼(네모)의 생존률은 높으면서 에이치. 아카쉬우(원), 피. 미니멈(세모)의 수가 감소함을 확인하였다. 이를 현미경을 통하여 보았을 때에도 동일하게, 규조류인 에스. 코스타툼은 모양을 그대로 유지하고 있는 반면 적조 유발 생물인 씨. 마리나(C), 에이치. 아카쉬우(D), 그리고 피. 미니멈(E)은 생물체가 터져있음을 확인하였다. 이로써, 펩타이드가 유해한 적조만을 선택적으로 억제함을 확인할 수 있었다(도 4).

[0064] **<실험예 2> HPA3NT3 펩타이드의 적조 세포 내 위치 확인**

[0065] 본 발명의 항적조 HPA3NT3 펩타이드와 10 mmol 탐라(TAMRA)(Molecular probe, Eugene, OR)라는 형광물질을 상온에서 1시간 동안 반응 시킨 후 HPLC를 통하여 표지된 펩타이드만을 분리하였다. 이렇게 분리한 표지된 TAMRA-HPA3NT3 펩타이드 0.5 μM를 10^4/㎖의 농도의 셀룰로우스 세포벽이 없는 적조인 씨. 마리나(*C. marina*), 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*), 및 셀룰로우스 세포벽이 있는 적조인 피. 미니멈 (*P. minimum*)와 22℃에서 5분 동안 반응시킨 후, F2 배지로 두 번 씻었다. 적조 생물에서의 펩타이드 위치를 확인하기 위하여, 적조 생물을 위에서부터 아래로 연속적으로 초점을 맞춰 컨포컬 현미경(confocal microscopy)을 이용하여 적조 생물을 관찰하였다.

[0066] 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 탐라가 표지된 HPA3NT3 펩타이드가 적조 세포막에 위치함을 확인할 수 있다. 특히 셀룰로우스 세포벽이 없는 적조인 씨. 마리나(*C. marina*)와 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에서는 최외각의 세포막에 위치하지만, 셀룰로우스가 있는 적조인 피. 미니멈(*P. minimum*)에서는 셀룰로우스 층 바로 안쪽에 펩타이드가 위치함을 확인하였다(도 5).

[0067] **<실험예 3> HPA3NT3 펩타이드의 광합성 저해실험**

[0068] 본 발명자들은 적조 생물의 클로로필 에이(Chlorophyll a)의 함량 측정을 통하여, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드의 항적조 활성을 확인하고자 하였다. 에이치. 아카쉬우 알에이-020을 F2 배지에 접종한 뒤 배양하였다. 배양된 적조생물을 10^5/㎖의 농도로 12웰 마이크로 타이트레이트 플레이트에 접종한 뒤 HPA3 펩타이드와 HPA3NT3 펩타이드를 각각 2 마이크로몰(μM)과 1 마이크로몰(μM)/웰(well)의 농도로 첨가한 후 22℃에서 6, 12, 24, 36, 48, 72시간 동안 배양하였다.

[0069] 배양 후, 샘플들을 원심분리 한 후, 추출용매인 90% 아세톤을 넣어가며 호모게나이즈(homogenizer)로 파쇄하였다. 파쇄된 샘플에서 클로로필 에이를 유리시키기 위해 -20℃에서 빛을 차단한 후 4시간 동안 방치하였다. 4시간 후 샘플을 원심분리하고 상등액을 조심히 취하였다. 그리고 상기 상등액에서 클로로필 에이양은 전체 세포의 흡광도와 하기의 <수학식 1>을 이용하여 간략히 측정하였다.

수학식 1

[0070]
$$Chl\ a(\mu g/ml) = \frac{(12.25(A_{663}-A_{750})-2.55(A_{620}-A_{750}))\times 총\ volume}{샘플\ volume}$$

[0071] 상기 <수학식 1>에서, A_{663}은 663 nm 파장에서의 흡광도이며, A_{620}은 620 nm 파장에서의 흡광도이고, A_{750}은 750 nm 파장에서의 흡광도를 나타낸다.

[0072] 그 결과, 에이치. 아카쉬우 알에이-020에 HPA3NT3 펩타이드를 처리한 시간이 길어질수록, HPA3 펩타이드를 처리한 군에 비하여 클로로필 에이의 양이 현저히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 즉, 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드가 적조생물의 생장을 저해함을 알 수 있었다.

[0073] **<실험예 4> HPA3NT3 펩타이드의 적조 세포막 투과실험**

[0074] 적조생물 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)를 버퍼를 이용하여 3번 씻은 후, 세포의 양을 5 × 10^5/웰(well) 이 되도록 맞추었다. 적조 생물 에이치. 아카쉬우에 핵을 염색하는 싸이톡스 그린(SYTOX green)(Molecular probe, Eugene, OR)의 농도가 1 μM이 되도록 넣어준 후, 96 웰 플레이트에 90 ㎕씩 분주하고 22℃에서 15분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 적조 플레이트에, HPA3NT3 펩타이드를 각각 0.25, 0.5μM 첨가한 후, 형광의 세기를 형광분광기를 이용하여 측정하였다. 유해하지 않은 규조류인 에스. 코스타툼의 경우, 상기와 동일한 방법으로 싸이톡스 그린을 배지에 첨가하여 반응시킨 후, HPA3NT3 펩타이드를 256 μM, 및 512 μM을 처리한 후, 30분 동안 싸이톡스-그린 형광의 세기를 측정하였다.

[0075] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 싸이톡스 그린은 스스로는 세포 안으로 들어가지 못하면서 핵과 결합해야 발광하는 형광물질인데 에이치. 아카쉬우(*H. akashiwo*)에서 HPA3NT3 펩타이드의 농도가 증가할수록 형광의 세기가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 펩타이드가 많을수록 적조 세포막에 더 많이 작용하여 싸이톡스 그린이 세포 안으로 들어가 핵과 결합하여 발광하는 양이 많은 것을 의미한다. 반면, 유해하지 않은 규조류인 에스. 코스타툼(*S. costatum*)에 HPA3NT3 펩타이드 256, 512 μM을 첨가한 후에도, 형광의 세기는 0에 가까웠다. 즉, HPA3NT3 펩타이드는 적조 생물의 세포막을 선택적으로 투과하는 성질이 있으며, 이로 인하여 파괴된 세포막을 통하여 싸이톡스 그린이 적조 생물 안으로 들어가 핵과 결합하여 형광 세기가 에이치. 아카쉬우(*H. akashwo*)에서만 증가하는 것을 관찰할 수 있었다(도 7 참조).

[0076] **<실험예 5> HPA3NT3 펩타이드의 세포독성 실험**

[0077] 본 발명에 따른 HPA3NT3 펩타이드가 세포독성을 나타내는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 HPA3NT3 펩타이드의 적혈구 파괴능을 조사하였다. 구체적으로, 물고기(광어, 완도)의 적혈구를 8%의 농도가 되도록 인산염 완충용액(PBS, pH 7.0)으로 3번 씻은 다음 희석하고, 여기에 본 발명에 따른 HPA3 펩타이드, HPA3NT3 펩타이드와 멜리틴(Melittin)으로 기재되는 항생 펩타이드를 128 마이크로몰(μM)/웰 농도로부터 1/2배로 연속적으로 희석

하여 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액을 1,000× *g*로 원심분리하여 그 상등액 속에 포함된 헤모글로빈의 양을 414 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 파괴 정도를 조사하기 위하여 1% 트리톤-X100(Triton X-100)을 첨가하여 흡광도를 측정하였고, 1% 트리톤 X-100의 세포 파괴능을 100%로 하여 이를 각 펩타이드의 적혈구 파괴능과 비교하여 하기 <수학식 2>에 따라 계산하였다.

수학식 2

[0078]
$$\%\ \text{적혈구 파괴능}(hemolysis)=\left(\frac{\text{흡광도 } A\text{-흡광도 } B}{\text{흡광도 } C\text{-흡광도 } B}\right)\times 100$$

[0079] 상기 <수학식 2>에서, 흡광도 A는 414 nm 파장에서 펩타이드 용액을 처리했을 때의 흡광도이며, 흡광도 B는 414 nm 파장에서 파괴능 0%인 PBS만 처리했을 때의 흡광도이고, 흡광도 C는 414 nm 파장에서 1% 트리톤 X-100의 흡광도를 나타낸다.

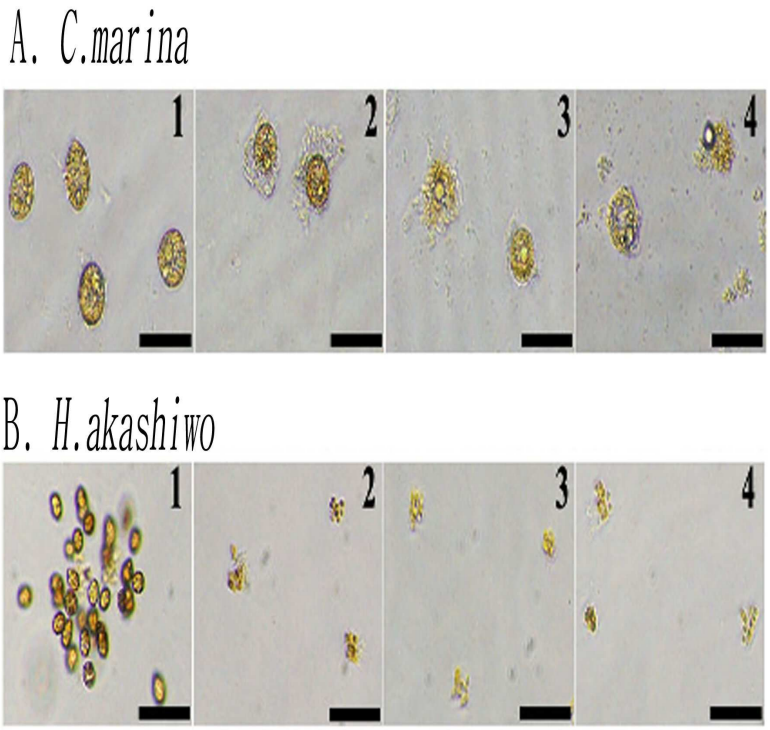
[0080] 그 결과, 본 발명의 HPA3NT3는 세포독성을 거의 나타내지 않는 반면, 양성 대조군으로 사용한 벌독인 멜리틴은 세포 독성이 매우 높게 나타났다. 또한, HPA3 펩타이드는 20 마이크로몰(μM) 이상으로 증가함에 따라, 용혈반응의 수치가 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다(도 8).

산업상 이용가능성

[0081] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에서 제조한 HPA3NT3 펩타이드는 세포독성이 없으며, 유해하지 않은 규조류에 대해서는 영향을 끼치지 않았으며, 적조유발 해조류에 선택적으로 탁월한 항적조 작용을 나타내었고, HPA3NT3 펩타이드의 세포막 투과성과 적조 생물의 클로로필 에이의 함량을 감소시켜 적조유발 생물의 사멸을 유발하므로, 해양 생태계에 안전한 항적조제로 유용하게 사용될 수 있다.

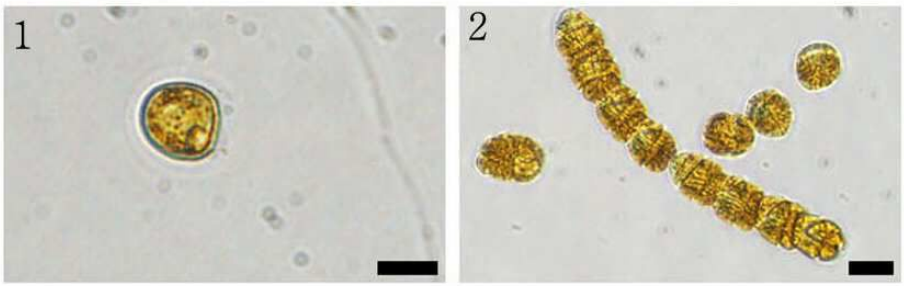
도면

도면1

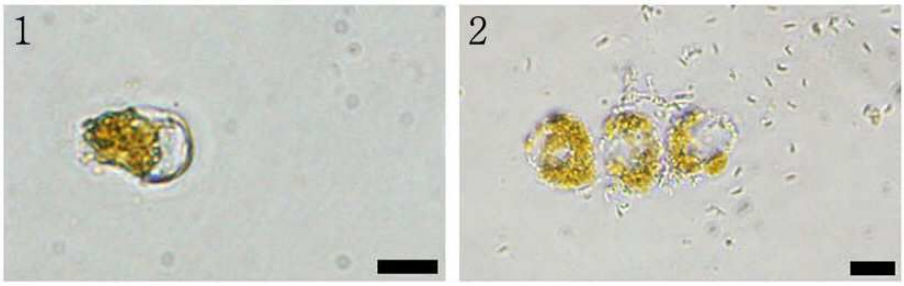


도면2

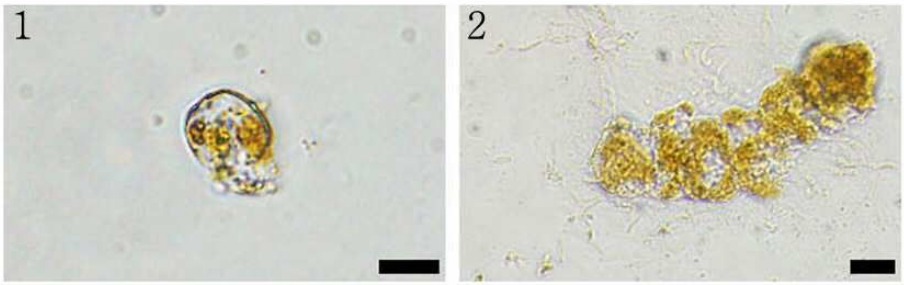
A.대조군



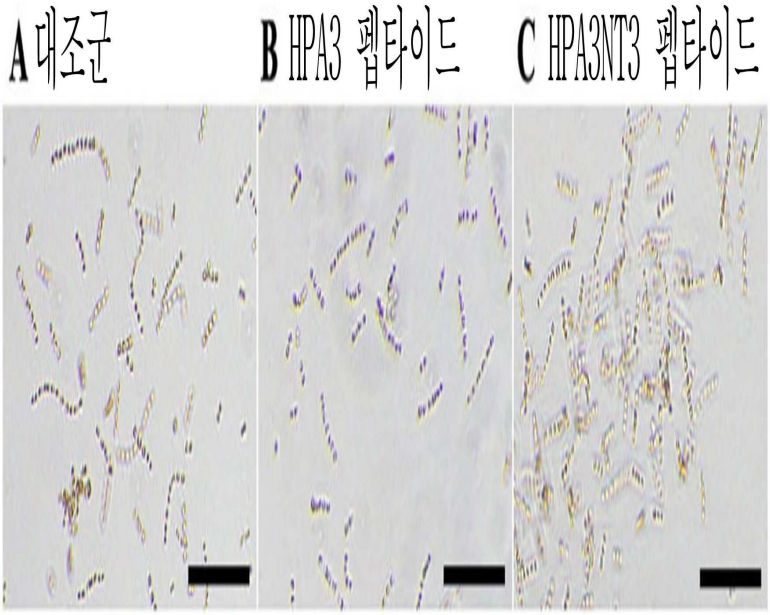
B.HPA3 처리군



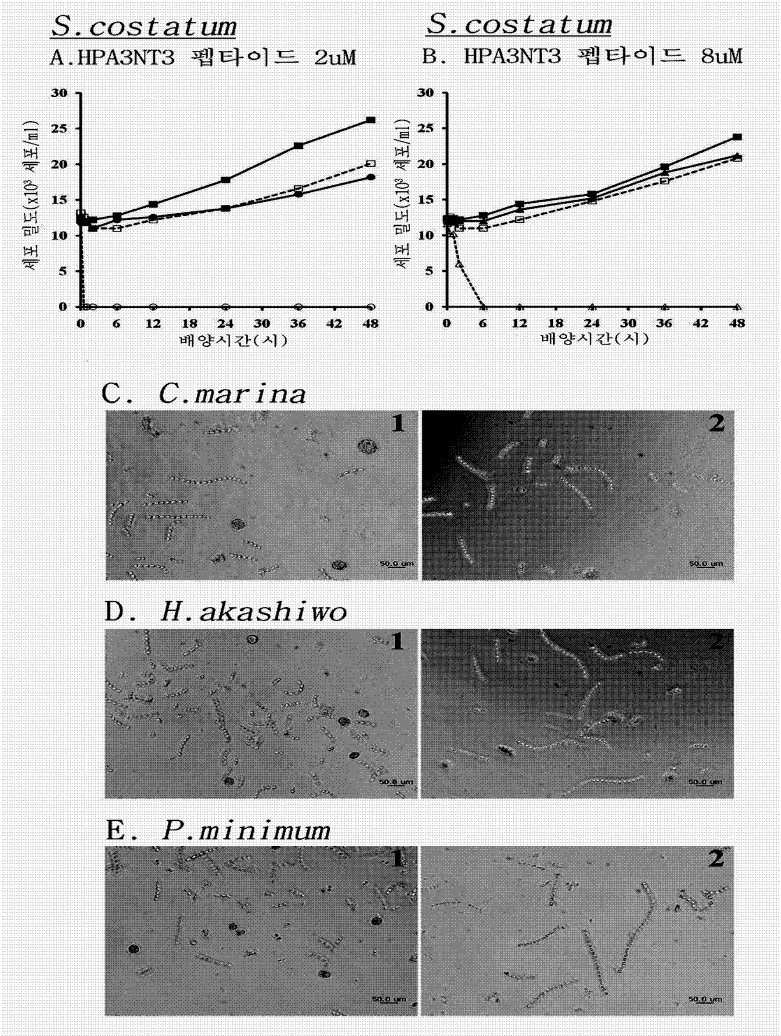
C.HPA3NT3 펩타이드 처리군



도면3

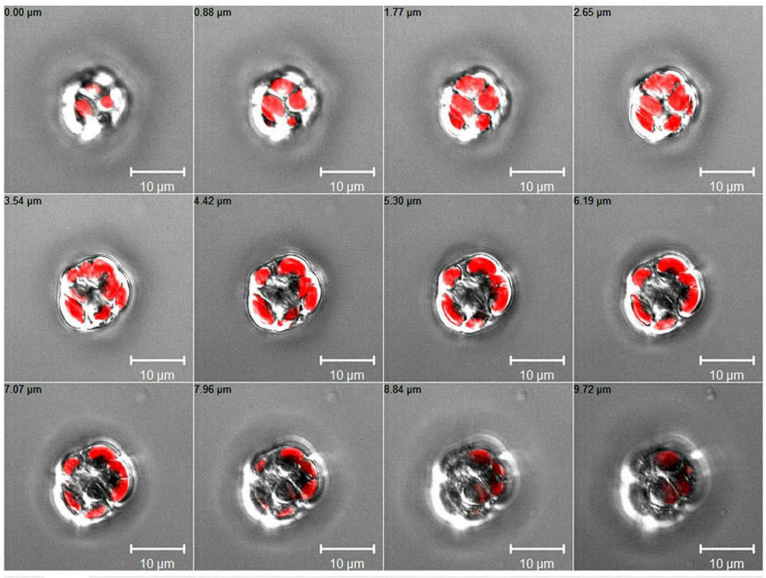

A 대조군
B HPA3 펩타이드
C HPA3NT3 펩타이드

도면4


S.costatum
A.HPA3NT3 펩타이드 2uM
S.costatum
B. HPA3NT3 펩타이드 8uM
세포 밀도(X)10⁴ 세포/ml)
배양시간(시)
C. C.marina
D. H.akashiwo
E. P.minimum

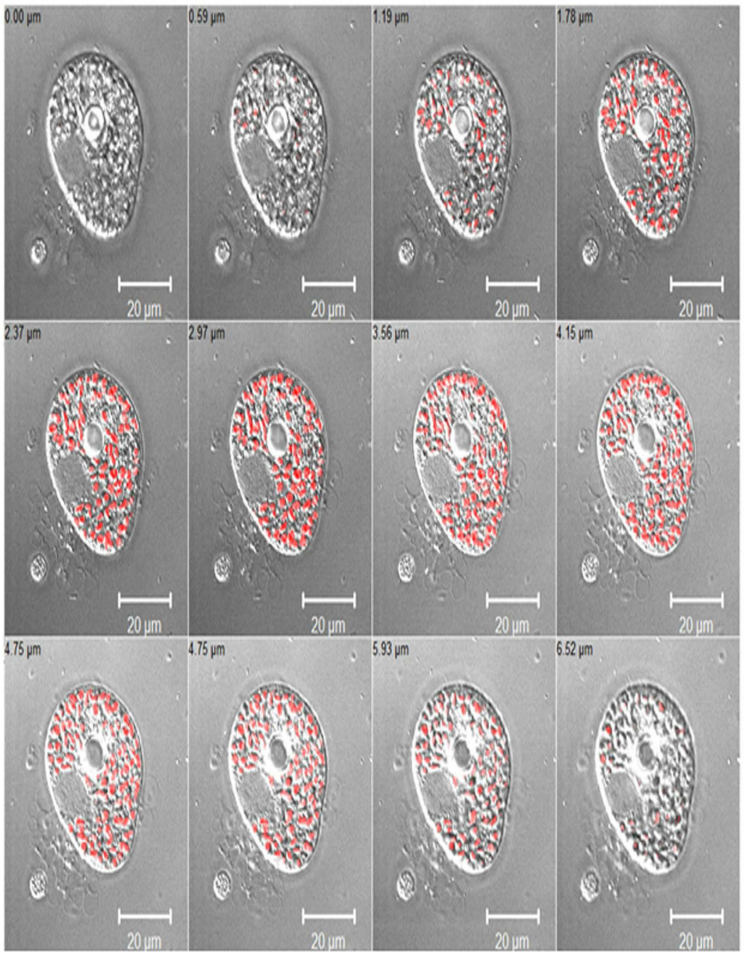
도면5a

H.akashiwo

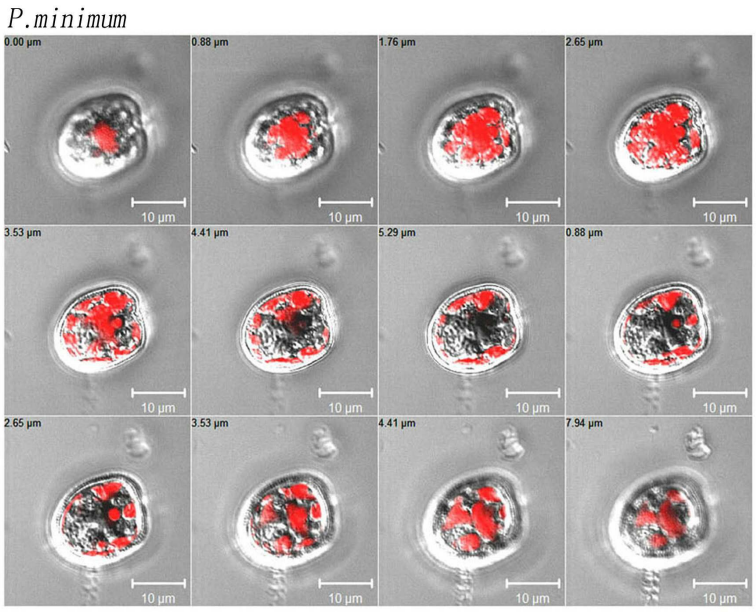


도면5b

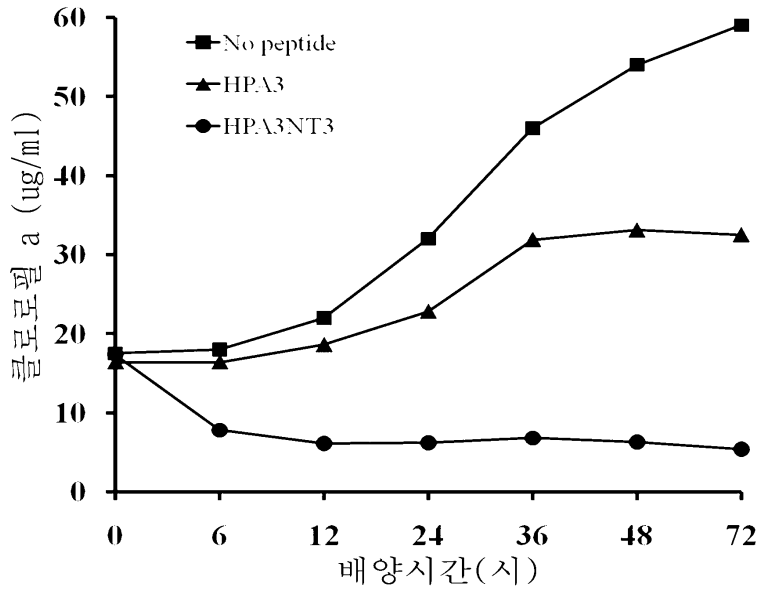
C. marina



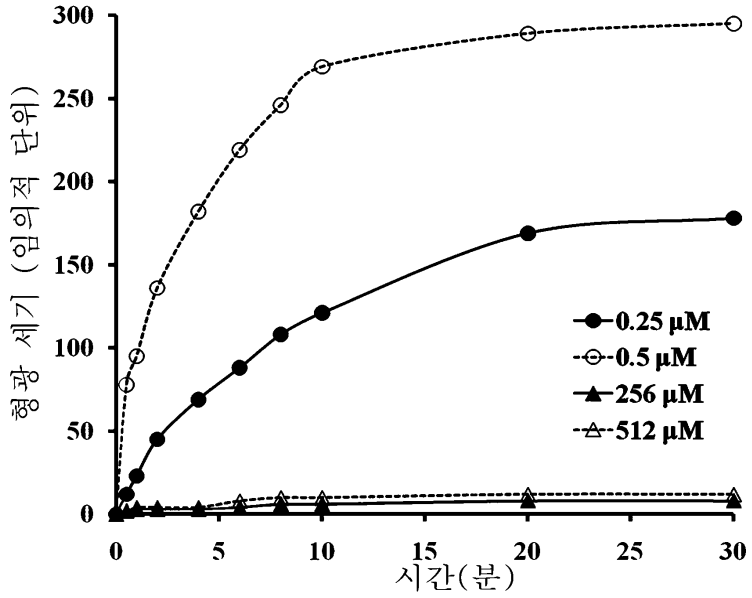
도면5c


P.minimum
0.00 μm
0.88 μm
1.76 μm
2.65 μm
3.53 μm
4.41 μm
5.29 μm
0.88 μm
2.65 μm
3.53 μm
4.41 μm
7.94 μm
10 μm

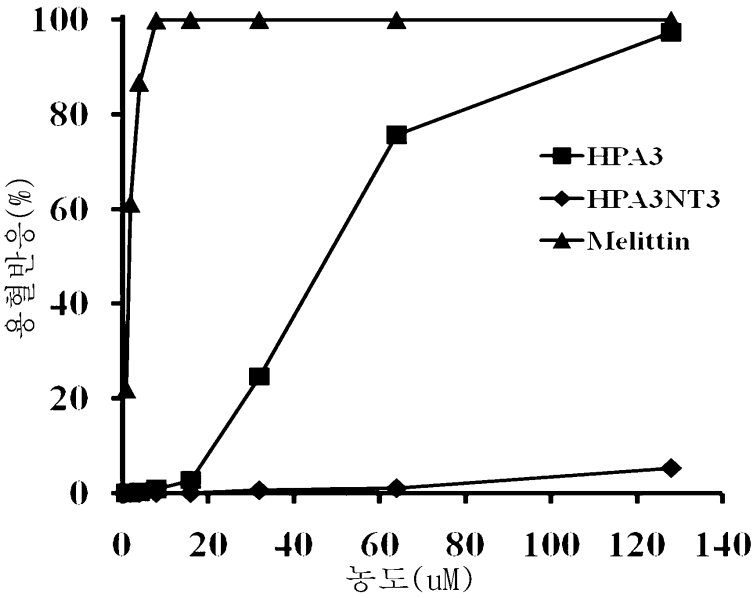
도면6


No peptide
HPA3
HPA3NT3
클로로필 a (ug/ml)
0
10
20
30
40
50
60
0
6
12
24
36
48
72
배양시간(시)

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Industry Academy Cooperation Foundation Chosun University

<120> HPA3NT3 peptide having antialgae activity against organism induced red tide and the use of the same

<130> 10p-07-52

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HP(2-20) peptide

<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> HPA3 peptide

<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> HPA3NT3 peptide

<400> 3

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

1 5 10 15