

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000664-0

식물 역병 방제물질 및 친환경적 방제법 개발  
Development of novel drugs and eco-friendly  
control method for *Phytophthora* diseases

한양대학교

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물역병 방제물질 및 친환경적 방제법 개발에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014 년 10 월 22 일

주관연구기관명 : 한양대학교

주관연구책임자 : 윤 문 영

세부연구책임자 : 윤 문 영

연 구 원 : 이 상 춘

연 구 원 : 조 준 행

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김 영 진

# 요 약 문

## I. 제 목

식물 역병 방제물질 및 친환경적 방제법 개발

## II. 연구개발의 목적

농작물 역병주의 생장억제를 유도하는 펩타이드의 발굴을 통한 친환경 항균물질 개발

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 1) 농작물 역병주 미소관(Microtubule) 형성  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 클로닝 및 발현, 정제 시스템 구축
- 2) Phage display 방법을 통한 농작물 역병주  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 코딩한 phage 스크리닝 및 특성 분석
  - 농작물 역병주 미소관형성 저해 phage 스크리닝
- 3) 역병주 미소관 형성 저해 phage에 대한 펩타이드 서열 분석, 합성 및 특성 분석
- 4) 역병주 세포막 투과 효율 증대를 위한 CPP Conjugated Peptide(CCP) 개발
  - CCP의 역병주 생장 억제 활성 검정 및 특성분석
- 5) 대상 농작물 역병주 방제 능력 검정 및 현장 적용성 테스트
  - 농작물 역병주 생장억제 활성 분석 및 대상 농작물과의 결합저해 효과 분석
  - 친환경 CCP 항균물질의 효능 검정 (온실, 포장검정)

## IV. 연구개발결과

1. 역병주 미소관 형성 subunit  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 유전자 클로닝 및 단백질 확보
2. Phage display를 통한 역병주  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 결합 phage 스크리닝 및 특성분석
  - 1) 13개의  $\alpha$ -tubulin 결합 phage, 2개의  $\beta$ -tubulin 결합 phage 발굴
  - 2) Phage에 대한 각 tubulin과의 결합력 측정
3. 역병주 미소관 형성 저해 phage 스크리닝 및 특성 분석
  - $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 저해 스크리닝을 통한 15개 phage 중 8개의 미소관 형성 저해 phage 발굴
4. 역병주 미소관 형성 저해 펩타이드 합성 및 특성 분석
  - 1) 높은 IC50 값을 형성하는 4개의 미소관 형성 저해 펩타이드 합성 및 결합력 분석
  - 2) 합성된 펩타이드를 이용한 미소관 형성 저해 효과 검정
  - 3) TEM 이미지 분석을 통한 역병주 미소관 형성 저해 확인
5. 역병주 내 펩타이드 전달을 위한 CPP Conjugated Peptide(CCP) 개발
  - 1) CPP와 미소관 형성 저해 펩타이드 결합을 통한 CCP 합성 및 특성분석
  - 2) CCP 미소관 형성 억제 활성 분석
6. 역병주 생장억제 활성 분석

- 1) Paper disc 방법을 이용한 역병주 생장억제 활성 분석
- 2) 역병주 life cycle 단계별 활성 저해 검증을 통한 CCP 저해 메카니즘 분석

7. 온실 검정을 통한 항균물질로서의 CCP 효능 검증

- 식물 내 역병균 감염에 따른 CCP 처리시 역병균 생장 억제 확인

V. 연구성과

- 논문 ; 5건 (논문 1건 추가 준비 중)
- 특허출원 ; 2건 (특허출원 1건 추가 준비 중)
- 학술대회발표 ; 6건

## SUMMARY

### (영문요약문)

#### I. Title

Development of novel drugs and eco-friendly control method for *Phytophthora* diseases

#### II. Research Purpose

Development of eco-friendly control agent through growth inhibition of *P. capsici*

#### III. Research Contents

- Cloning, Expression of the  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin from *P. capsici*
- Screening of  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin specific binding probe towards *P. capsici*  
; Identification of binding peptides to *P. capsici* tubulins and determine the binding affinity using M13 bacteriophage
- Screening of inhibitory peptides against microtubule formation of *P. capsici*
- Screening of eco-friendly antifungal agents that induced membrane break down of *P. capsici* and block its crop infection.
- Identification of antifungal activity of *P. capsici*  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin binding peptides
- Identification of control of *P. capsici* and field applicability test  
; Analysis of *P. capsici* growth inhibition activity  
; Verification of Smart-peptides as antifungal agents

#### IV. Research Results

- Cloning, Expression and Purification of the  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin from *P. capsici* were achieved.
- Screening, characterization of  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin binding peptides  
; Identified 13 of  $\alpha$ -tubulin binding peptides, 2 of  $\beta$ -tubulin binding peptides  
; Determined the binding affinities of 15 peptides
- Identification, characterization of inhibitory peptides against microtubule formation  
; Among the 15 tubulin binding peptides, a total 8 of inhibitory peptides were identified and characterized.
- Development of CPP Conjugated Peptide(CCP) for the delivery of the peptides into the *P. capsici*  
; Conjugation and optimization of cell penetration peptide (CPP) with the identified Inhibitory peptides were achieved.
- In vitro analysis of inhibitory CCP against microtubule formation through,  
; Absorbance

- ; SDS-PAGE, Western Blotting Test
- ; TEM image analysis
- Analysis of *P. capsici* growth inhibition activity
  - ; Analysis of *P. capsici* growth inhibition activity using paper disc method
  - ; Analysis of germination, zoospore inhibition activity
- Verification of CCP as antifungal agents by plant test.

#### V. Research Outcomes

- Papers ; 5 (1 additional paper)
- Patents ; 2 (1 additional patent)
- Conference ; 6

## CONTENTS

1. Research outline
2. Research Trend in Korea and abroad
3. Research contents and results
4. Achievement of research purpose and contribution of the related field
5. Research outcomes and application plan
6. Information of abroad science technology in the process of research
7. References

## 목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌



# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목표 및 주요내용

1. 연구개발의 목표 ; 농작물 역병에 대한 새로운 항균물질 및 친환경적 방제법 개발  
; 농작물 역병주의 생장억제를 유도하는 펩타이드 발굴을 통한 친환경 항균물질 개발
2. 연구개발의 주요내용
  - 가. 농작물 역병주 미소관(Microtubule) 형성  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 클로닝 및 발현, 정제
  - 나. 농작물 역병주 미소관 형성  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 특이적으로 결합하는 프로브 발굴  
; Phage display(M13 bacteriophage)를 이용한 결합 프로브 스크리닝  
; 결합프로브의 특성분석 (결합력, 특이성 등)
  - 다. 농작물 역병주 미소관형성을 억제하는 펩타이드 발굴  
; 미소관 억제 활성분석 및 특성분석(IC<sub>50</sub> 등)
  - 라. 펩타이드의 농작물 역병주 세포막 투과를 위한 CPP Conjugated Peptide(CCP) 발굴  
; 세포내 전달 펩타이드(Cell Penetrating Peptides, CPP)와 역병주 미소관형성을 억제하는 펩타이드의 결합을 통한 CCP 개발
  - 마. 농작물 역병주 생장억제를 유도하는 항역병물질 발굴
  - 바. 대상 농작물 역병주 방제 능력 검증 및 현장 적용성 테스트  
; 농작물 역병주 생장억제 활성 분석 및 대상농작물과 결합저해 분석  
; 친환경 CCP 항균물질의 효능 검증(온실, 포장검정)

## 제 2 절 연구개발의 필요성

1. 고추는 우리나라 대부분의 지역에서 재배되고 있으며 조미 채소로써 그 소비량이 타 작물에 비해 높은 편임. 고추에 발생하는 병해는 현재 28종이 기록되어 있으며, 그 중 주요 병해는 역병, 모자이크병, 탄저병, 불마름병, 시들음병, 흰가루병 등이 고추의 노지재배와 온실재배에서 수량의 감소 및 품질 저하 요인으로 작용하고 있음. 고추의 생산량은 연간 약 36만 톤으로 노지 고추의 경우 역병과 탄저병에 의해 예상 수확량의 약 30% 정도의 감수요인으로 작용하고 있고 이를 금액으로 환산할 때 약 3,000억 원 정도의 손실이 발생하고 있음. 특히, 고추의 주요 병원균인 고추 역병균(*Phytophthora capsici*)의 경우, 토양전염 병원균으로서 고추뿐만 아니라 오이, 수박, 가지 등 재배되고 있는 다양한 경제 작물들에 대하여 병을 일으키고 경제적 손실을 일으키는 병원균임(그림 1).

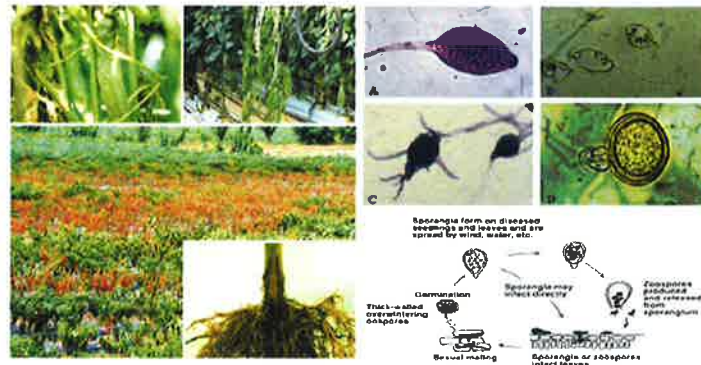


그림 1. 역병주(*P. capsici*)에 의한 고추역병 발생 및 역병주 life cycle

: 고추 역병균은 작물을 완전히 죽일 수 있는 강력한 병원균이며, 6월 20일경 비가 2~3일간 계속되면서 20~23℃로 유지될 때 토양 내역 병원균들이 증식을 시작하여 유주자낭을 형성하고 그 속에 유주포자를 형성함. 장마로 인해 포장에 과습하게 되면 유주자낭에서 포자가 배출되어 흠뻑기를 한 흠 가까운 줄기 쪽으로 이동하여 침입함. 고추 역병균에 감염되면 줄기 들레와 뿌리가 까맣게 썩어 지상부가 시들어 죽게 되는데 비가 그치는 때가 되면 지상부가 말라서 역병에 의한 전형적인 피해증상을 볼 수 있음.

2. 고추 역병의 발병은 대부분 장마철에 일어나고, 이 시기에 농약의 살포가 어려운 문제를 가지고 있으며 고추의 연작을 통하여 병원균의 밀도가 증가함에 따라 해마다 피해의 규모가 증가하고 있음. 이는 장마철 이전에 존재하는 고추 역병균 초기 전염원 농도가 장마철을 거치면서 급격하게 증가하기 때문임. 또한 고추역병은 일단 발생하면 토양 전염성이 강하여 방제가 어렵고, 전체가 말라죽게 됨. 세계 고추의 30% 이상이 역병 피해를 입고 있는데 일단 감염되면 적용약제를 살포해도 거의 효과가 없기 때문에 예방 위주로 병균을 피할 수밖에 없음.

3. 현재 가장 효과적인 방제 방법은 화학적 방제로 메틸브로마이드(브롬화메탄)를 사용하는 것임. Metalaxyl은 수용성으로 침투이행성이 높으나 저항성 균주의 출현이 가장 큰 문제점으로 대두됨. 따라서 초기 전염원의 농도를 줄이는 방향으로 방제를 하고 있으나, 장마가 시작되면 약제가 희석되고 약제의 지속성에 문제가 발생하여 방제효과가 낮아지게 됨. 또한 인체에의 독성이 극히 적은 잔류 농약으로 비교적 안전하다고 하나 과도한 농약의 사용으로 인한 환경오염 뿐 아니라 인체에도 위협이 되고 있음.

4. 합성농약의 대체 약제 확보, 인축·환경독성 문제 해결 및 친환경 농산물 생산을 위한 종합적병해충관리(Integrated Pest Management, IPM)에서 가장 중요한 기술로서 생물농약(Biopesticide)이 제시됨. 생물방제제 (Biocontrol agent)라고도 일컬어지고 있는 생물농약은 자연계에 존재하는 생물체 및 그로부터 유래한 소재를 이용하여 농작물 생산 및 보존에 피해를 미치는 병원균, 해충 및 잡초 등을 방제하는 작물 보호제를 의미함(그림 2).



그림 2. 작물 보호제 분류도

5. 또한 유기합성 농약의 사용은 환경에 대한 부담이나 농산물에 대한 잔류성 및 토양 용탈에 따른 2차 오염 발생 때문에 생물학적 방제와 같은 친환경적 방제방법으로 점차 대체되고 있는 추세임(표 1).

년도	~ 1940	~ 1980	~ 2010	2010 ~
시대적 목표	생산성 향상	생산성 향상	품질향상	안전성 향상
합성농약의 안전성	고독성, 보통독성	고독성, 보통독성	보통독성, 저독성 농약 잔류	보통독성, 저독성
사회적 관심	식량난 해결	식량자급도 향상, 농약 저항성 문제 해결, 환경오염 문제 해결	친환경농업 잔류 문제까지도 해결	생태보전형 농업
사용농약	DDT, BHC	합성농약	합성농약	합성농약
대체농약	없음	없음	생물농약, 친환경 농자재	생물농약

표 1. 우수한 작물보호제의 변화 현황

6. 특히 미생물 기원 생리활성물질은 다양하며 농작물에 사용할 경우 식물의 환경 내재성이 증강되고 식물의 면역기능의 활성화뿐만 아니라 수량증진, 숙기단축, 강력한 항 곰팡이성 물질 등을 생산함.

7. 역병방제현황을 볼 때, 현재 가장 효과적이고 친환경적인 방제 방법은 저항성 품종의 육성 및 고추 역병에 대한 저항성 인자의 발굴이지만 이들의 실용화까지는 오랜 시간이 걸려서 실제 농가에서 바로 사용할 수 있는 새로운 방제법의 개발이 시급함.

8. 고추역병을 일으키는 병원균은 토양 전염성 식물병으로 현재까지는 화학적 방제에 많이

의존함. 그러나 이런 유기합성 농약의 오남용은 저항성 균주의 출현, 오존층의 파괴, 토양과 작물내의 잔류 등의 문제를 야기 시키며, 가장 널리 사용되는 토양 훈증제는 토양 미생물을 파괴 시키므로 이를 해결하기 위한 환경 친화적인 방제방법 개발에 집중되고 있음(표 1).

따라서 길항균을 이용한 생물적 방제, 저항성 고추품종을 재배하는 것이 가장 효과적인 역병방제법이라고 할 수 있음. 그러나 친환경 농업 실천농가의 경우 고추역병에 대한 관리방법이 미흡한 실정이며 이로 인해 막대한 수확량 감소로 경제적 손실을 보고 있는 상황임.

9. 역병은 국내 발작물인 고추뿐만 아니라 시설재배 신선채소 등의 농작물에 심각하게 발생하여 피해를 주며 이 균을 방제하기 위하여 다량의 화학농약이 소모되며 국내의 농약 사용량은 OECD 국가 중 최상위권에 머물러 있어 친환경이면서 환경에 무해한 저독성 천연 작물보호제 및 치료제의 개발이 중요함.

10. 이와 같은 새로운 개념의 작물보호·치료제의 개발을 위하여 기존의 항균활성 화합물 외에 새로운 개념의 무독성 작물방제제를 필요로 하는데 본 연구에서 수행하고자 하는 역병 표면 부착 특이적 저분자 역병인식마커를 이용한 역병 활성 억제 물질의 개발은 매우 효과적 일 것으로 기대됨. 따라서 고추역병의 경우 장마철에 사용이 가능한 친환경적인 방제방법의 개발은 화학적 방제의 약점을 보완할 수 있고, 화학적 방제의 살포횟수를 줄이는 효과를 줄 수 있어 경제적 효과뿐만 아니라 농생태 환경개선에 중요한 기여를 할 것임(그림 3). 이러한 방법을 이용한 친환경적 방제제는 토양, 식물, 익충 및 인축에 안전하며 잔류걱정 및 약해가 없어 생육시기에 관계없이 사용 가능한 장점이 있음.



그림 3. 친환경적 저독성 역병균 방제제 개발촉진 요인

11. 국내외 기술동향을 고려하여 불 때 국가차원에서 바이오 융합 농업 기술에 대한 장기적이며 체계적인 지원이 절실함. 우리나라에서 장마의 시작을 전후하여 초기 전염원의 농도를 줄여줄 수 있다면 고추역병의 대발생을 예방할 수 있을 것으로 예측됨. 따라서 장마의 시작을 전후하여 초기 전염원의 농도를 줄일 수 있는 선택적이며 빠르게 작용하고 독성이 낮으면서 경제적이며 안전한 새로운 친환경 저독성 작물보호·치료제의 개발이 필요함. 또한 친환경농산물에 대한 관심이 높아져 무분별한 화학 농약의 사용보다는 고추 병해에 대한 친환경 작물보호제를 이용하여 고추 재배농가의 피해를 줄이고, 고추의 생산량 및 품질을 향상시킬 수 있는 작물보호제의 개발이 필수적임. 따라서 본 연구에서는 고추 역병주에 대해 항균활성이 우수한 펩타이드 및 압타머를 이용하여 농업 생태계에 있어 안전하고, 고추 역병 방제에 대해 기존의 농약과 비교하여 불 때 단기간에 효과적인 상용화 및 산업화를 위한 병원균을 방제할 수 있는 환경에 무해하면서 저독성 천연 작물방제제를 개발하고자 하며 아울러 독성평가를 통해 개발제품의 안전성을 확보하고자 함.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절. 고추역병 방제 기술 현황

#### 1. 병원균 유입차단

: 병이 발생되지 않은 건전한 포장으로 병원균이 유입되는 것을 방지.

#### 2. 돌려짓기(윤작)

: 근본적으로 고추역병 예방 방법으로 비기주식물로 3~5년간 돌려짓기하여 토양 중 역병균의 밀도를 낮추는 방법임.

#### 3. 고추밭 토양관리

가. 수확 후 이병 잔재물 제거

나. 가을갈이

다. 지력증진

라. 화학비료 과용 금지

: 지금까지 다수확을 위하여 화학비료에 의존한 농업의 연속으로 토양화학성이 악화되어 연작피해 발생이 점차적으로 늘어나고 있는데 최근 고추의 역병 피해도 이와 같은 이유로 볼 수 있음.

마. 토양소독

: 돌려짓기가 어려울 때 토양을 소독하는 방법을 선택할 수도 있으나 그 처리방법과 조건 및 경제적 측면에서 농가 부담이 큰 어려운 방법임.

: 밧사미드 처리에 따른 문제점

- 유용미생물까지 사멸되어 병원균 침입 시 저항력이 낮아 피해가 급속히 진전됨.

#### 4. 저항성품종 재배

: 고추역병 저항성 품종으로는 10여종이 보급되어 재배되고 있는데 일반품종에 비해 역병 방제가가 90%정도로 높으나 고추의 맛과 품질이 다소 떨어지며 바이러스에는 약함.

#### 5. 접목재배

: 우수한 품종의 고추 맛을 그대로 유지하고 역병피해를 줄일 수 있는 방법으로 접목재배를 하는데 반면 노동력 및 생산비가 많이 소요되므로 경제적 부담이 큼.

#### 6. 화학적 방제

: 화학적 방제는 주로 농약에 의존하는 병 방제 수단으로 농업에서 가장 손쉽게 사용되는 방제법으로 병원균을 직접 죽이거나 생장 및 번식을 억제시킴. 역병방제를 위해서는 무엇보다 병이 발생되기 전에 예방적으로 살포하는 것이 가장 효과적이며 병 발생 후 치료효과가 거의 없음.

## 제 2 절 국내외 방제 기술 동향

1. 미생물 자체를 이용하거나 미생물이 생산하는 생리활성물질에 대한 국내의 연구개발은 외국에 비해 30~50년 뒤늦은 1985년부터 연구가 보고됨.
2. 2003년 첫 제품 등록 후 현재 30품목 (살균15, 살충14, 제초1)이 등록
3. 토양에서 작물 생육을 촉진시키는 동시에 병 발생을 억제하는 4종의 미생물 균주를 발견, 배양과정을 통해 미생물 비료를 개발 함. ('05 농촌진흥청 작물과학원)
4. 오이흰가루병에 대한 미생물 농약의 상품화 완료 ('07 농업과학기술원)
5. 최근 한국농업과학기술원이 개발한 바실러스 아밀로리퀴화시엔스 EXTN-1이라는 미생물 농약은 식물이 가진 방어능력을 활성화해 식물 스스로 병 저항성을 갖게 하는 한편 식물 성장을 촉진하는 효과를 지닌 미생물 균주이다. 기존 화학농약의 1/10 수준에 기술비가 머물기 때문에 경제적인 측면에서도 유리한 점이 많음.
6. 미생물자체를 이용한 생물농약으로 식물병원균에 대해 증식억제, 기생, 항균작용 등 미생물농약이 실용화 되어 널리 이용됨.
7. 등록된 미생물로서 살균성 세균 10종, 곰팡이 11종, 바이러스 11종 등으로 총 80여종의 미생물이 등록 되었고 세계적으로 114종 이상의 미생물 농약이 등록되어 사용되고 있음 (Copping.L.G. 2005).

## 제 3 절 국내외 연구현황

1. *Bacillus amyloliquefaciens* 균주를 이용한 결구 상추의 밑둥썩음병에 대해 수화제형의 제제로 개발하여 2005년 동아대학교에서 생물적 방제 실용화 단계에 있음.
2. 방성균을 이용한 오이와 담배의 흰가루병 방제가 충남대에서 연구된 바 있으며 식물선충과 길항세균을 이용한 원예작물의 토양병 방제기술에 대한 연구가 서울대학교에서 진행 중임.
3. 일부 농가에서는 저항성 품종이나 저항성 대목을 사용하기도 하지만 생산량이 다수확 품종에 비해 다소 떨어지는 것으로 알려져 있음.
4. 역병주를 방제하기 위하여 Metam sodium, Chloropicrin을 이용하여 역병주에 대한 방제

기술 연구가 진행됨. (Hausbek and Lamour, 2004)

5. *Bacillus licheniformis* LS234, LS523, LS674 균주를 이용하여 농작물 고추로부터 역병주를 80%이상 생장을 억제한 것이 발표됨. (Aravind 2009)
6. *Bacillus megaterium* IISRBP 17 균주와 *Bacillus subtilis* ME488의 경우, 함께 처리하였을 때, 흑고추의 줄기와 뿌리에 감염되어 있는 역병주에 대해 효과적인 방제효과를 보였다고 발표됨. (Chung 2008, Jiang 2006)



### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

◆ 역병주 결합마커로 미소관 subunit 선별

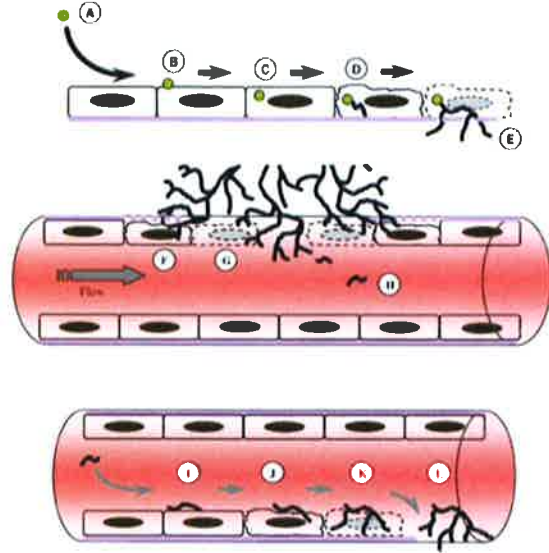


그림 1. 식물세포에서의 역병주 감염 경로. A : 포자 생성, B : 포자가 식물세포에 부착, C : 빠르게 endocytosis 일어남, D : 포자로부터 germination(발아)과정이 일어나 균사가 생김, E : 균사가 성장하면서 세포를 뚫고 나옴, F-G : 균사가 성장하면서 식물세포 파괴, H : 균사의 일부가 떨어져 나옴, I : 떨어져 나온 균사가 식물세포에 부착, J-K : 균사가 세포내로 들어가 성장하면서 식물세포 파괴, L : 다른 세포로 이동

그림 1과 같은 과정을 통해 식물에 역병주의 감염이 이루어짐. 역병주의 포자나 균사에 의해 식물세포에 감염이 일어나며 균사의 성장에 의해 세포가 파괴되면서 뿌리, 줄기, 잎 등이 썩고 시드는 현상이 나타남.

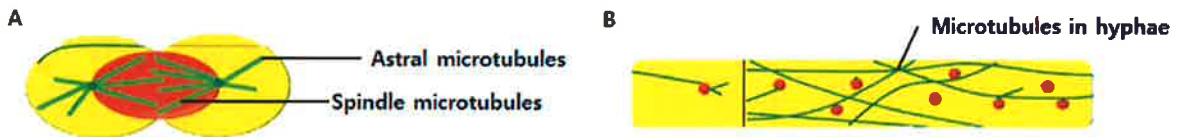


그림 2. 역병주 내 미소관(초록색). A : 포자 세포분열 과정, B : 균사 내의 미소관 형태.

포자의 세포분열시 포자 내에서 astral 미소관, spindle 미소관이 작용하면서 세포분열이 일어나며(그림 2. A), 균사의 경우, 균사내의 미소관의 polymerization, depolymerization에 의하여 균사의 길이가 조절됨(그림 2. B).

역병주 내의 미소관은 그림 2에서처럼 역병주 포자의 분열, 균사의 성장 등에 중요한 역할을 함.  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin은 미소관을 형성하는 subunit으로 GTP에 의하여 polymerization 되면서 미소관을 형성하게 됨. 미소관의 polymerization을 효과적으로 저해할 수 있다면 역병주가 식물에 감염되는 과정에서 포자가 퍼져나가는 것을 막고, 균사의 성장을 막을 수 있어 역병이 번지는 것

을 막을 수 있음. 따라서 미소관 형성을 억제하는 것은 역병 방제제를 개발하는데 있어 좋은 접근법이라 할 수 있음. 또한 미소관을 이루는 subunit인  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 경우 매우 좋은 결합 마커라 할 수 있음.

본 연구에서는 미소관을 이루는 subunit인  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 결합하면서 미소관 형성을 저해하는 펩타이드를 발굴하였음. 이들 펩타이드를 역병주의 각 성장 단계에 처리하였을 때, 포자의 세포분열이 활발히 일어나는 발아 단계와 균사의 성장이 일어나는 균사체 단계에서 역병주 성장 저해 효과를 확인함.

### 1. *Phytophthora capsici* $\alpha$ , $\beta$ -tubulin 발현 및 정제

가. 역병주에서 발현되는 미소관 subunit  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 클로닝

고추 역병주 *Phytophthora capsici*(*P. capsici*)를 V8 액체배지에 계대 배양하여 30 °C에서 *P. capsici* 균총을 plate전체에 고루 자라도록 4-5일 동안 배양함. 다 자란 균주는 원심 분리 후 수분이 제거 된 균체를 확보함. 수분이 제거된 균체에 액체질소를 첨가하여 급속히 냉각시킨 후 그라인더를 사용하여 냉각된 역병주 균체를 파쇄시켜 powder 형태로 만듦. 이를 1g 씩 취하여 trizol 용액으로 추출하여 전체 mRNA를 추출함.

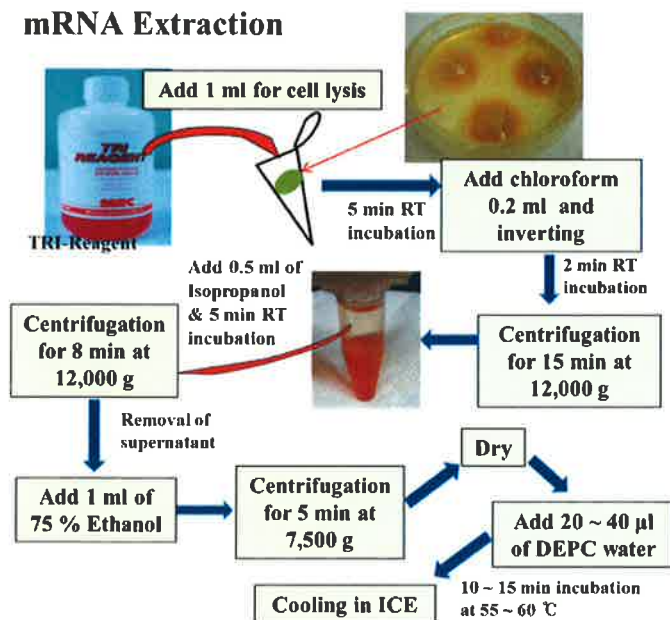


그림 3. *Phytophthora capsici*로부터 mRNA 추출

위의 단계에서 total mRNA를 reverse transcription PCR 을 통하여 *P. capsici*의 cDNA를 합성하여 클로닝에 이용함(그림. 4).

Oligo-dT primer (10 pMol)	5 $\mu$ l	➔	4 °C	2 min
dNTPs (2.5 mM)	4 $\mu$ l		42 °C	59 min
5x buffer	4 $\mu$ l		70 °C	15 min
RTase	0.5 $\mu$ l		4 °C	5 min
Template RNA	2 $\mu$ l			

그림 4. *P. capsici*의 cDNA 합성시 PCR 조건.

합성된 cDNA template를 이용하여 *P. capsici*  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin을 클로닝하기 위해 각각의 tubulin 특이적인 primer를 design하여 제작함(표. 1).

표 1. 각 미소관 subunit( $\alpha$ , $\beta$ )의 specific primer 서열.

$\alpha$ -tubulin	Forward	5'-CATATGCGTGAGGTCATCTCCATCC-3'
	Reverse	5'-GCGGCGCTTAGTACTOCTCGCCCAGTTCT-3'
$\beta$ -tubulin	Forward	5'-AAGCGGCGCCTACATCATCTCGTCCATCTCT-3'
	Reverse	5'-AAGCGGCGCCTACATCATCTCGTCCATCTCT-3'

합성한 cDNA를 주형가닥으로 사용하고, 위에서 제작한  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 특이적인 primer를 이용하여 PCR 과정을 진행하여 약 1400bp 크기의  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 유전자를 확인하였음(그림. 5).

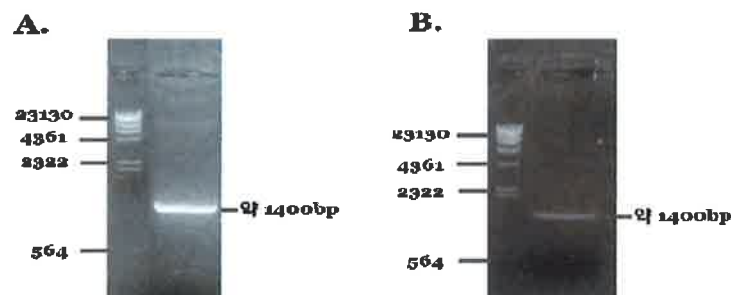


그림 5. 미소관  $\alpha$ ,  $\beta$  tubulin의 PCR 결과

A.  $\alpha$ -tubulin 유전자, 약 1400bp, B.  $\beta$ - tubulin 유전자, 약 1400bp

Agarose gel상에서 각각의 band를 gel purification 과정을 거쳐  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 유전자를 정제하였음.  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 대해서는 Nde I, Not I,  $\beta$ -tubulin에 대해서는 Sal I, Not I의 제한효소를 각각 37°C에서 1시간 30분 동안 반응시켜준 다음 전기영동을 통하여 확인하였음. 그리고 제한효소 처리 되어진 유전자를 Gel purification을 통하여 분리 정제하였음.

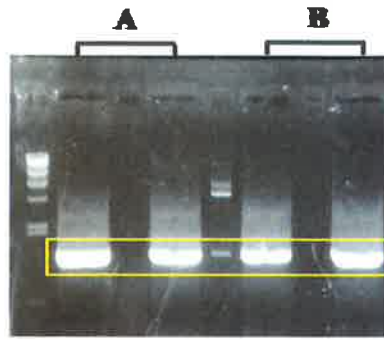


그림 6. 미소관  $\alpha$ ,  $\beta$  tubulin의 제한효소 처리 후 전기영동 결과.

A. 미소관  $\alpha$ /Nde I, Not I, B. 미소관  $\beta$ /Sal I, Not I

제한효소를 이용하여 클로닝 사이트 유전자 확보 후 미소관 subunit인 tubulin 유전자를 각각 박테리아 과발현 벡터(pET-28a)와 ligation함. 그 후 서열 분석을 통하여 정확한 유전자 삽입 및 클로닝이 제대로 되었는지 확인함으로써 과량발현 체제를 구축함.

나. 역병주에서 발현되는 미소관 subunit  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 정제

클로닝한  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 발현 플라스미드를 발현숙주인 BL21(DE3)에 형질전환시킨 후, 0.5mM IPTG, 18°C 조건하에서 약 12시간동안 대장균을 배양하여  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 대량생산을 유도하고 SDS-PAGE 전기영동을 통하여 발현된 단백질을 확인하였음(그림.7).

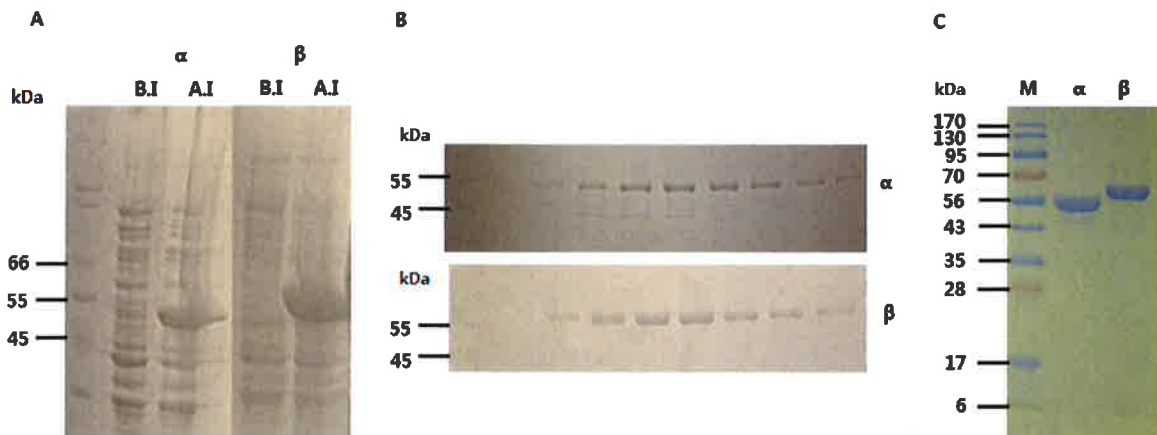


그림 7. *P. capsici*의  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin. A. 과발현 테스트 B. Affinity chromatography를 통한  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 정제 C. 최종적으로 얻은  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin

$\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 의 발현테스트 완료 후 affinity chromatography 방법을 이용하여  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin을 분리, 정제하였음. 발현된  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 N-말단 지역에 위치한 6-his tag을 이용하여 금속이온( $\text{Ni}^{2+}$ )이 결합되어있는 sepharose resin과의 affinity를 이용하여 특이적으로  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin을 분리, 정제하였음(그림 7).

$\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin은 대장균에서 inclusion body를 형성하여 불용성 단백질 상태로 발현되기 때문에 단백질 정제 시 denaturation condition을 사용하여 정제하였음. 단백질 정제과정 중 column 상에서 refolding과정을 거쳐  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin을 각각 renaturation 시켜줌. 단백질 생산량은  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 각각 1.2 mg/1 L culture 및 1.5 mg/1 L culture 의 단백질을 확보하였음.

## 2. *P. capsici* $\alpha$ , $\beta$ -tubulin의 polymerization으로 인한 미소관 형성

확보된  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin이 제대로 renaturation되었는지를 확인해 보기 위하여 GTP를 이용한 polymerization test로 activity를 측정함.  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 경우, GTP의 존재 하에서 polymerization이 일어남(그림 8). 이를 확인하기 위하여 350nm에서 흡광도를 측정하였음. 미소관이 형성됨에 따라 흡광도의 증가를 확인함. 12% SDS-PAGE를 통하여 polymerization이 되고 남은  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 양을 측정하였음. 그림 6. B를 보면, 시간에 따라 polymerization이 되면서 반응에 참여하지 않은  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 양이 점차 감소되는 것을 확인할 수 있었음.

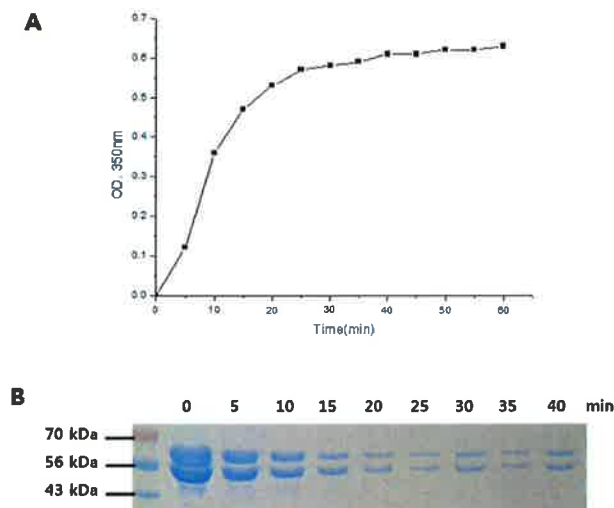


그림 8. Polymerization assay를 통한  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 미소관 형성 rate. A. 흡광도의 변화를 통한 미소관 형성 rate B. 12% SDS-PAGE를 통한 미소관 형성 rate.

## 3. *P. capsici* $\alpha$ , $\beta$ -tubulin 인식용 펩타이드 스크리닝

### 가. Phage display

$\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 인식용 펩타이드를 스크리닝 하기 위하여 phage display 방법을 이용함(그림 9). 약  $2.7 \times 10^8$  개의 서로 다른 서열의 펩타이드가 표면에 노출된 M13 박테리오파지 라이브러리를 이용하여 특이적 조건의 1-5라운드 펩타이드 선별단계(표 2)를 수행하여 결과적으로  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 스크리닝 하였음.

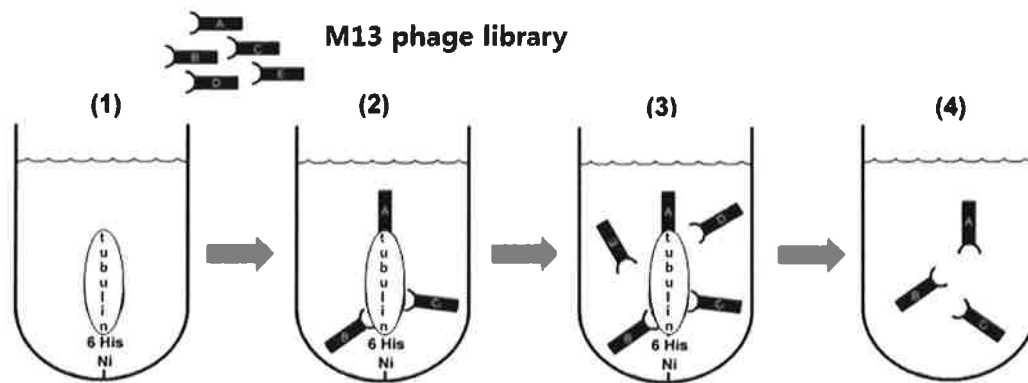


그림 9. Phage display를 이용한  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 단백질 인식용 펩타이드 발굴 모식도

특이적인 펩타이드 서열을 선별하기 위하여  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 실험 농도를 결정하였음.  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 단백질을 serial dilution하여 96well 표면에 고정 시킨 후 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 방법을 사용하여  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 최적 사용 농도를 결정하였음. 단백질 고정 후 1차 antibody 인 anti-6His antibody를 이용하여 결합 시킨 후 HRP가 연결된 2차 항체를 이용하여 발생된 신호를 검출하여 분석하였음. 그 결과 검출 신호가 약 2 ug/well 농도에서 포화되는 것을 관찰 하였고 차후 펩타이드 선별 실험에서 이 농도를 사용하였음(그림 10).

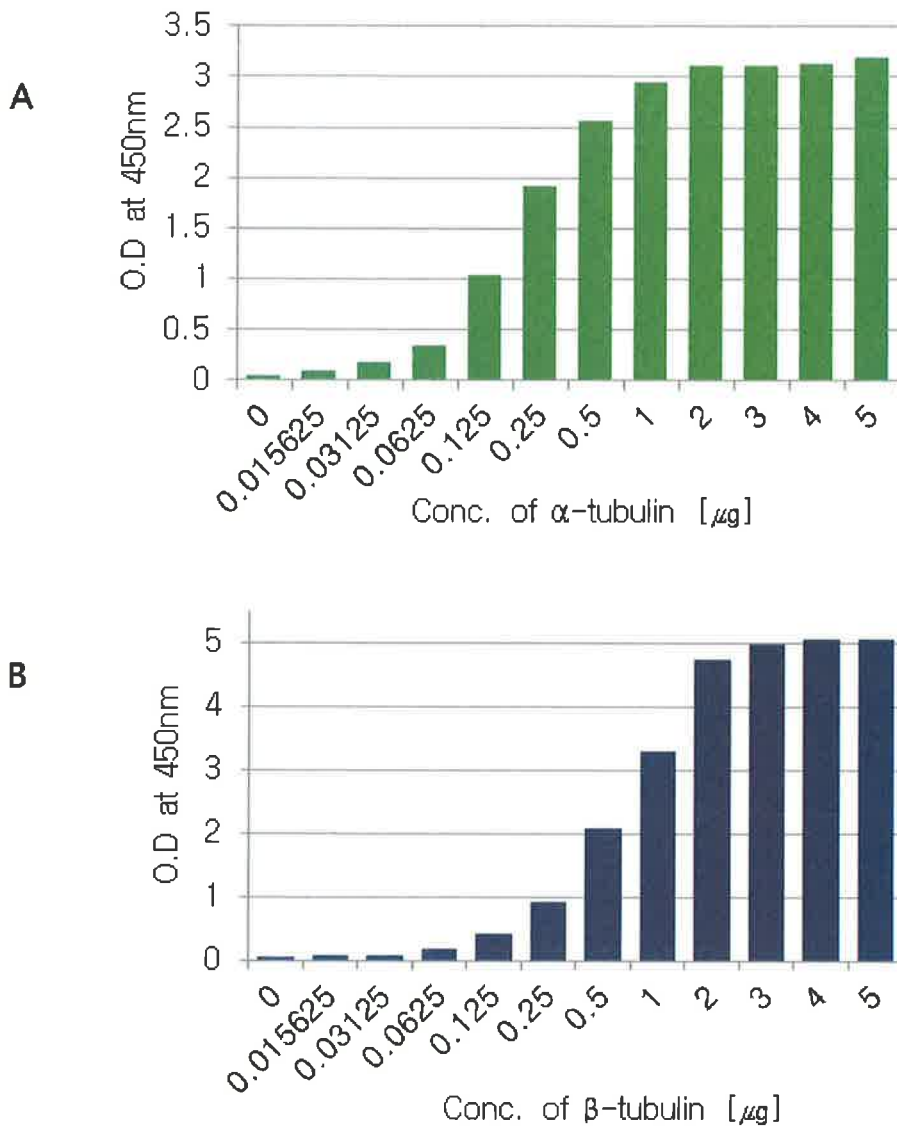


그림 10. Phage display의 tubulin 농도 최적화를 위한 ELISA. A.  $\alpha$ -tubulin, B.  $\beta$ -tubulin

강한 결합력을 가지는 펩타이드 선별을 위하여 5라운드의 실험 조건을 설정하고 각 라운드별로 서로 다른 실험 조건에서 펩타이드 스크리닝을 진행하였음(표.2). 먼저  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin을 96well 표면에 고정하기 위하여 2 ug/well 농도를 상온에서 1시간 반응하여 표면에 고정시켰음. 그 후 비 특이적 결합을 방지하기 위하여 2 % BSA를 이용하여 96well 표면의 빈곳을 blocking 하여 보호하였음. 각 라운드 종료 후 약한 결합을 나타내는 페이지들을 TBST(50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20) 버퍼를 사용하여 제거 후 화학적인 방법으로 용출하여 다음 라운드 실험에 이용하였음.

표 2.  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 인식용 펩타이드 선별을 위한 실험 조건

	1st	2nd	3rd	4th	5th
Conditions	0.1% Tween-20	0.3% Tween-20	0.5% Tween-20	0.5% Tween-20 + 50mM NaCl	0.5% Tween-20 + 50mM NaCl
Binding Time	60min	40min	20min	10min	10min
Titering of Phage (pfu/ $\mu$ l)	1.22x10 <sup>2</sup>	5.43x10	1.82x10 <sup>2</sup>	1.45x10 <sup>2</sup>	4.77x10
Titering of Phage Amplification (pfu/ $\mu$ l)	8.05x10 <sup>8</sup>	2.52x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>8</sup>	8.2x10 <sup>8</sup>	-

#### 나. DNA sequencing을 위한 클로닝

최종 5라운드 스크리닝을 종료 후, 박테리오페이지에 디스플레이된 펩타이드의 서열을 분석하기 위하여 박테리오페이지 DNA를 분리하였음. 먼저 박테리오페이지 배양을 위하여 대장균 ER2738 균주에 접종하여 12시간 배양 후 생성된 plaque를 취하여 LB 배지에서 5시간 배양하였음. 그리고 원심 분리 후 상층액을 획득하여 PEG-NaCl 용액을 첨가하여 세포를 용해하고 원심 분리 후 상층액에 존재하는 DNA를 70% ethanol을 이용하여 세척 후 분리함. 분리된 DNA를 확인하기 위하여 아가로스 전기영동을 사용해 확인하였음. 전기영동 확인 후 분리된 DNA는 M13 박테리오페이지 특이적 프라이머인 M13-96 gIII primer를 이용하여  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 각각에 결합하는 phage DNA를 분리하여 펩타이드 서열을 분석하였음.

### 3. $\alpha$ , $\beta$ -tubulin 결합 펩타이드 서열 및 특성 분석

계획서상에서 제시하였던 친환경적 방제제로 펩타이드/압타머 개발의 경우, 펩타이드 또는 압타머를 개발한다는 의미로 연구계획서에 작성을 하였으며, 펩타이드는 아미노산 서열로 구성되어 있기 때문에 생체내에서 안정함. 또한 크기가 1nm 이하로 작은 크기를 가지고 있음. 본 연구에서는 역병주내에 존재하는 결합마커인 미소관 subunit에 결합하기 위해서 역병주 세포막을 통과해야 함. 이러한 부분에서 작은 크기를 가지는 것이 미소관 subunit에 결합하기 위한 장점으로 작용함. 펩타이드는 결합마커와의 특이적 결합이 가능하며 높은 결합력을 가짐. 또한 고 민감도를 위하여 다양한 형태로 변형이 가능함. 이러한 펩타이드의 장점을 이용하여 본 연구에서는 펩타이드 기반 방제물질을 발굴함.

Phage display 5라운드 종료 후  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 인식용 펩타이드 서열을 분석하여 각각 15개 이상의 펩타이드를 확보하였음(표 3, 4).



표3.  $\alpha$ -tubulin 인식용 펩타이드 서열

	Sequence	Frequency	Kd <sup>app</sup>
1	ITMSVPAHNAKE	39/169	34.26 pM
2	TNTSWDPQYNPD	11/169	80.10 pM
3	NHFVPYSNRFNA	11/169	120.44 pM
4	NFTINGKTHRLW	6/169	298.31 pM
5	NAITLLSPPLHK	5/169	57.12 pM
6	SSHNHDSYHGTK	2/169	476.37 pM
7	LMNPATMKTSSG	1/169	360.04 pM
8	TNEADEPASEIG	1/169	47.65 pM
9	SNMKPSMEYSSR	1/169	273.39 pM
10	IGNSWPLRSHSW	1/169	144.89 pM
11	SYNTFMYERASK	1/169	562.07 pM
12	MVHSKASMWPGK	1/80	690.04 pM
13	KVYAINSWTNY	1/80	1.2 nM

표 4.  $\beta$ -tubulin 인식용 펩타이드 서열

	Sequence	frequency	Kd <sup>app</sup>
1	TNPQARWHEYNF	61/112	41.94 pM
2	NPIGDNYSGTGL	10/112	37.13 pM

$\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 인식용 펩타이드의 특이성 테스트를 위하여 phage 상태의 펩타이드를 이용하여 BSA에 대한 특이성을 검정하였음. 이중  $\alpha$ -tubulin 인지용 펩타이드 13개,  $\beta$ -tubulin 인지용 펩타이드 2개를 포함한 총 15개의 펩타이드 서열이 BSA와 비교하여 특이적 결합을 하는 것으로 보임. 이들 15개 펩타이드 서열에 대하여 ELISA 방법으로 binding affinity를 구함(표 3, 4).

#### 4. $\alpha$ , $\beta$ -tubulin에 결합하는 펩타이드에 대한 미소관 형성 저해 검정.

$\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 결합하는 펩타이드에 대하여 미소관 형성을 저해하는지 test를 하기 위하여 미소관 형성을 저해한다고 알려져 있는 chemical 인 benomyl에 대하여 저해 test를 진행하여 control로 이용함(그림11).

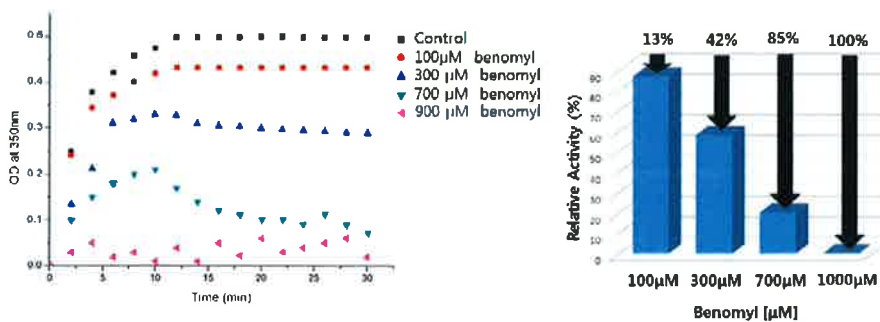


그림 11. 알려진 미소관 형성 저해활성을 가진 chemical 인 benomyl에 대한 *P.capsici* microtubule에 대한 저해 활성 검정.

$\alpha$ -tubulin에 결합하는 13개의 서열,  $\beta$ -tubulin에 결합하는 2개의 서열의 페이지를 각각 10 nM 수준까지 증폭을 시킴.  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 각 0.25 mg/ml, 총 0.5 mg/ml을 polymerization buffer(80 mM PIPES pH 7.4, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 % v/v glycerol)에 섞어준 후, 증폭한 페이지를 넣어줌. 그 후 2.5 mM GTP를 넣어 미소관이 형성되는 정도를 O.D 350 nm 에서 40분 동안 관찰하여 미소관이 형성되는 정도를 측정하여 각 페이지가 미소관 형성 저해 효과가 있는지 분석함.

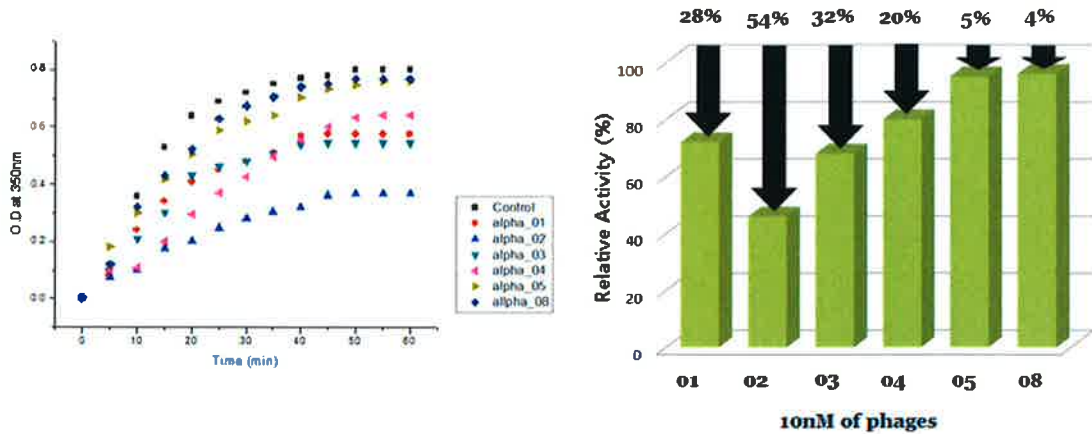


그림 12.  $\alpha$ -tubulin 단백질에 결합하는 13개의 페이지에 대한 미소관 형성을 저해 검정.

그 결과,  $\alpha$ -tubulin에 결합하는 총 13개의 페이지 중에서 6개의 페이지가 미소관 형성 저해 활성을 보였고, 각각 alpha\_01 페이지는 28%, alpha\_02 페이지는 54%, alpha\_03 페이지는 32%, alpha\_04 페이지는 20%, alpha\_05 페이지는 5%, alpha\_06 페이지는 4%의 저해 효과를 나타냄. 6개의 페이지 중 alpha\_02 페이지가 미소관 형성을 저해하는데 있어 가장 큰 활성 보여줌(그림 12).

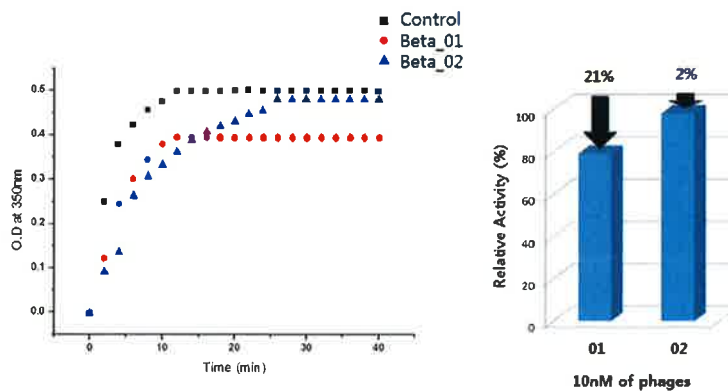


그림 13.  $\beta$ -tubulin 단백질에 결합하는 13개의 페이지에 대한 미소관 형성을 저해 검정.

또한,  $\beta$ -tubulin에 결합하는 2개의 phage에 대해서는 beta\_01 페이지의 경우 21%, beta\_02 페이지의 경우 2%의 미소관 형성 저해 활성을 나타냄 (그림13).

### 5. 미소관 형성 저해 페이지 서열에 대한 peptide 합성.

앞선 저해실험 결과를 바탕으로, 미소관 형성 저해활성이 가장 큰  $\alpha$ \_P1,  $\alpha$ \_P2,  $\alpha$ \_P3,  $\beta$ \_P1 4개의 페이지 서열에 대하여 펩타이드 합성을 실시함(그림 14).

### 6. 합성한 peptide를 이용한 미소관 형성 저해활성 검정 및 IC<sub>50</sub> 값 결정.

합성한 4개의 peptide에 대하여 *P. capsici* 미소관 형성 저해활성 검정을 하여 IC<sub>50</sub> 값을 결정함.  $\alpha$ \_P1의 경우는 3.09 $\mu$ M,  $\alpha$ \_P2의 경우는 890nM,  $\alpha$ \_P3의 경우는 1.13 $\mu$ M,  $\beta$ \_P1의 경우에는 9.31 $\mu$ M의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내는 것을 확인함(그림 14). 그림 9에서 알려진 미소관 저해제인 benomyl의 결과와 비교하였을 때, benomyl의 경우에는 300-700 $\mu$ M에서 IC<sub>50</sub> 값이 나오는 반면, alpha\_01, beta\_01의 경우에는 수  $\mu$ M, alpha\_02의 경우 nanomolar 수준의 IC<sub>50</sub> 값을 가지는 것으로 보아, benomyl과 비교하여 훨씬 낮은 IC<sub>50</sub> 값을 가지는 것을 확인함.

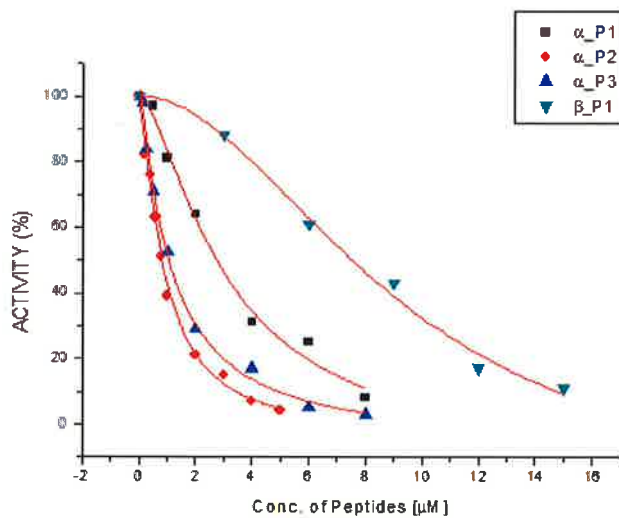


그림 14. 각 펩타이드의 미소관 형성 저해 IC<sub>50</sub> 값 결정.

### 7. 합성한 펩타이드의 특성 분석.

그림 15에서 표기된 아미노산 서열은 아미노 말단부터 나타냄. N-말단에는 아미노말단의 반응성 제거를 위해 아세틸화(Acetylation)를 시켰고 C-말단에는 칼복시말단에 FITC를 부착하기 위해 아미노산 K(Lysine, 라이신)를 첨가함. 추후 실험에서 기능성 펩타이드를 부착하기 위하여 아미노산 C(Cysteine, 시스테인)를 첨가함.

Peptide	Sequence	Binding affinity (Kd)
$\alpha$ _P1	Ac - <u>ITMSVPAHNAKE</u> (G C G K -FITC)	81.12 $\pm$ 17 nM
$\alpha$ _P2	Ac - <u>TNTSWDPQYNPD</u> (G C G K -FITC)	56.48 $\pm$ 20 nM
$\alpha$ _P3	Ac - <u>NHFVPTS NR FNA</u> (G C G K -FITC)	135 $\pm$ 7 nM
$\beta$ _P1	Ac - <u>TNPQARWHEYNF</u> (G C G K -FITC)	75 $\pm$ 12 nM

그림 15. 합성한 펩타이드 서열 및 결합력.

각 펩타이드의  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 단백질에 대한 결합력 분석을 위하여 펩타이드를  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 단백질이 고정된 플레이트에 농도별로 희석하여 넣어줌. 각 well의  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 단백질에 결합한 펩타이드 양을 측정함으로써 각 펩타이드의 결합력을 추론하는 방법은 앞서 설명한 ELISA 방법과 비슷하게 수행함. 그러나 FITC가 합성된 펩타이드의 경우, 1차 항체, 2차 항체, TMB 기질 용액의 첨가 등 페이지 펩타이드 실험에서와 같이 신호를 나타낼 표지자가 별개로 필요하지 않아서  $\alpha$ -tubulin 단백질과 펩타이드를 결합시킨 후 세척하여 fluorometer로 펩타이드에 연결되어진 FITC의 최대 파장 (Excitation 495nm, Emission 520nm)에서 각 펩타이드 농도의 형광세기를 측정함. 해당 농도의 FITC 신호강도는 그래프화 시켜서 펩타이드의 kd 값을 결정함. 그 결과 그림 15와 같은 Kd 값을 구함.

각 펩타이드가  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin 단백질에 특이적으로 결합하는지 알아보기 위하여 specificity test를 진행함. specificity test는 *Homo sapiens*의  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 대하여 수행함. Specificity test를 위하여 본 연구실에서 보유 중인 *H.sapiens*  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 유전자를 발현하여 단백질을 분리, 정제함. specificity test에 사용한 각 단백질을 최종적으로 농축하여 12% SDS-PAGE를 이용하여 분석함. (그림 16).

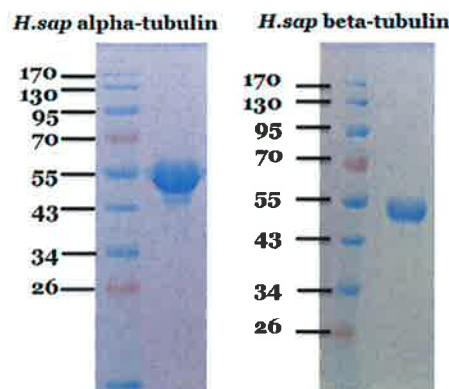


그림 16 Specificity test를 위하여 *H. sapiens*  $\alpha$ -tubulin,  $\beta$ -tubulin의 분리·정제

Specificity test 역시 합성된 펩타이드의 결합력을 test한 방법과 동일한 방법을 이용하여 측정함.

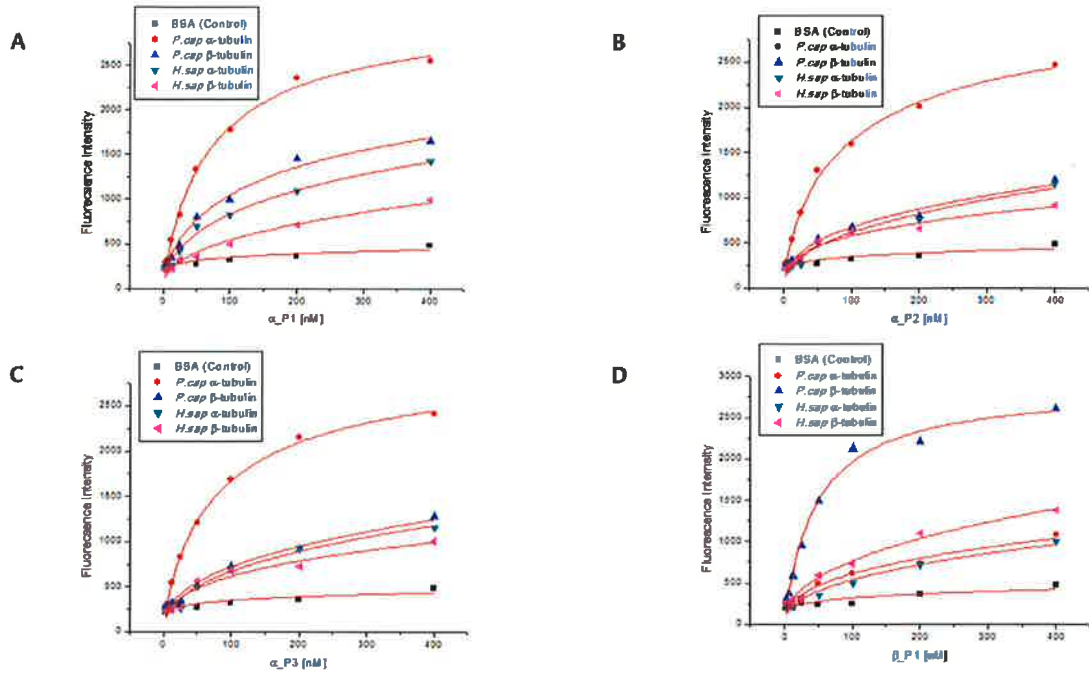
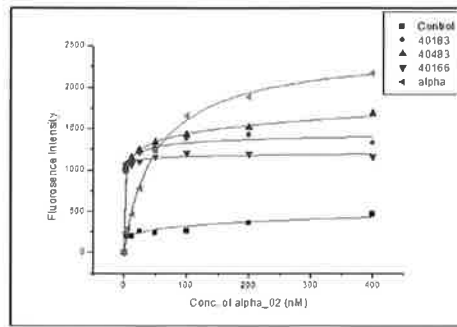


그림 17. 각 펩타이드의 *P. capsici*  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 대한 cross-reaction test, *H. sapiens*,  $\beta$ -tubulin에 대한 specificity test A.  $\alpha$ \_P1, B.  $\alpha$ \_P2, C.  $\alpha$ \_P3, D.  $\beta$ \_P1

그 결과, 각 펩타이드는 *P.capsici*  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 특이적으로 결합하는 것으로 나타남(그림 17).

펩타이드를 방제제로 사용할 경우 대부분의 펩타이드가 방제효과를 보이고 분해가 되지만 낮은 가능성으로 농작물에 잔류할 경우 사람이 농작물을 섭취했을 때 잔류한 펩타이드가 사람의 tubulin에 영향을 미치지 않아야 하기 때문에 *H. sapiens* tubulin으로 특이도 검정을 실시함. 그림 17 따르면, 4개의 펩타이드 모두 *P. capsici* tubulin에 특이적으로 결합하는 것을 확인 함. 이는 발굴한 4개의 펩타이드 모두 방제제로 이용할 경우 펩타이드가 잔류된 농작물을 섭취하여도 인간의 tubulin에 영향을 미치지 않는다는 것을 뜻함.



40183 = *Phytophthora cinnamomi*  
 40166 = *Phytophthora cactorum*  
 40483 = *Phytophthora capsici*

그림 18. Phytophthora 다른 species에 대한 결합 test.

이 중,  $\alpha_2$ 에 대하여 *phytophthora capsici*를 포함하여 phytophthora의 다른 species인 *phytophthora cinnamomi*, *phytophthora cactorum*의 cell lysate에 대하여 결합을 하는지 test 진행함. phytophthora 다른 species에 대하여 앞서 specificity test를 진행한 protein들과 비교하여 더 많은 결합을 하는 것으로 나타났지만, *phytophthora capsici*에 가장 강하게 결합하는 것을 확인함(그림 18).

## 8. 저해활성 검증

$\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 polymerization과정에서 peptide를 처리하였을 때 inhibition되는 정도를 흡광도의 변화와 함께 12% SDS-PAGE를 이용하여 확인하였음.  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 GTP를 첨가한 후, 시간에 따른 변화를 관찰하였음. 그 결과,  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin이 polymerization 되었을 때 생성되는 미소관의 경우, size가 너무 커서 SDS-PAGE 상으로 확인을 할 수 없지만, polymerization에 참여하지 않은 남은  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 양을 확인 할 수 있었음. 그림 17에서 확인해 보면, 시간이 지남에 따라 미소관이 형성되어 남아 있는  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 양이 점점 줄어드는 확인할 수 있음.

이와 같은 방법으로,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  펩타이드를  $IC_{50}$  농도만큼( $\alpha_2 = 890nM$ ,  $\alpha_3 = 1.14 \mu M$ ) 처리한 후, 시간에 따른 polymerization 정도를 확인하였음. 그림 17과 비교해 보면 펩타이드를  $IC_{50}$  농도만큼 처리하였을 때 미소관 형성이 저해되어 남아있는  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 양이 증가한 것을 확인하였음. 또한 펩타이드 농도를 다르게 하여 저해효과를 측정 한 결과, 펩타이드의 농도가 증가함에 따라 polymerization되는 정도가 감소하여 남아있는  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 양이 증가한 것을 확인 할 수 있었음.

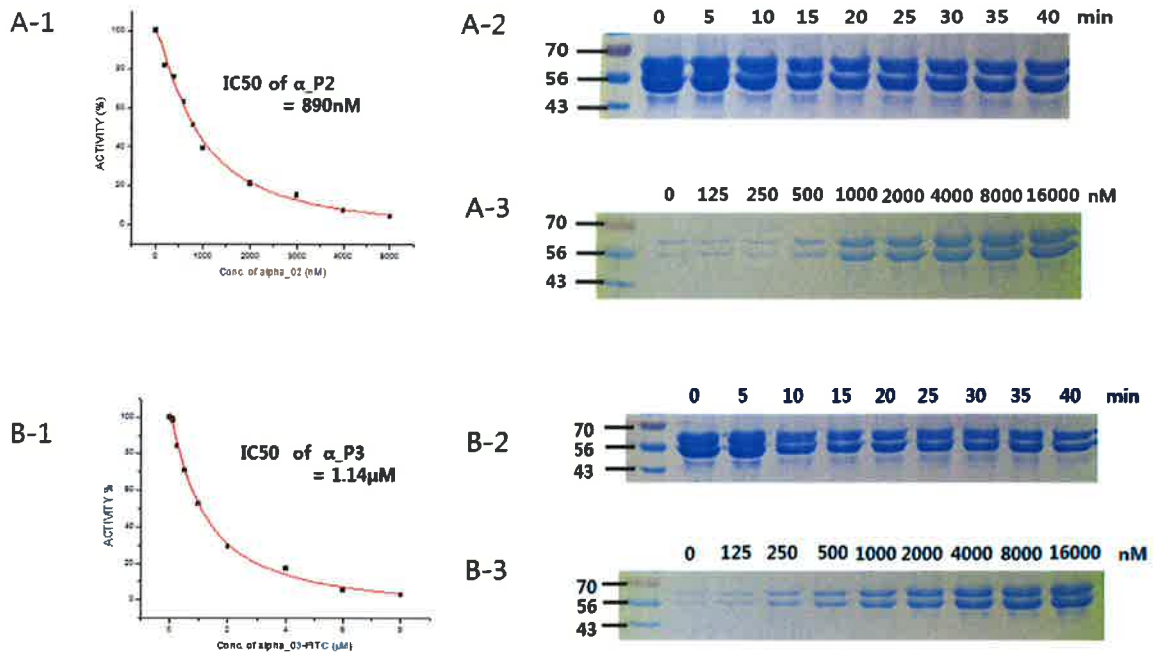


그림 19. Inhibition assay A-1.  $\alpha_P2$ 의  $IC_{50}$  값 결정, A-2. 890 nM의  $\alpha_P2$ 를 처리하였을 때 시간에 따른 inhibition의 변화, A-3.  $\alpha_P2$ 를 농도에 따라 처리했을 때의 inhibition의 변화. B-1.  $\alpha_P3$ 의  $IC_{50}$  값 결정, B-2. 890 nM의  $\alpha_P3$ 를 처리하였을 때 시간에 따른 inhibition의 변화, B-3.  $\alpha_P3$ 를 농도에 따라 처리했을 때의 inhibition의 변화.

이를 같은 조건에서 western blot을 이용하여 확인하였음.  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 경우, 정제를 위하여 cloning 과정에서 6His-taq이 존재하기 때문에 1차 항체로 His-antibody를 1 : 1000으로 희석하여 western blot에 이용하였음. western blot의 경우에도  $\alpha_P2$ ,  $\alpha_P3$ peptide를 처리하여 peptide의 농도가 증가함에 따라 polymerization이 저해되어 미소관을 형성하지 못한  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin의 양이 증가하는 것을 확인 할 수 있었음. 이를 같은 조건에서 western blot을 이용하여 확인하였음.

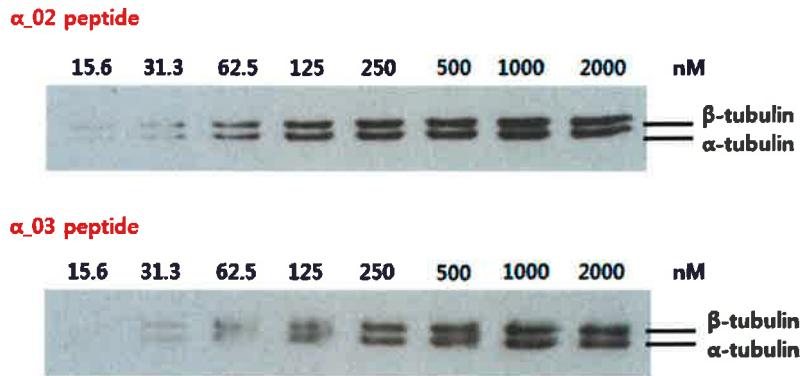


그림 20. Western Blot을 통한 Inhibition assay

## 9. TEM 이미지 분석

in vitro 상에서 확실한 저해 효과를 확인하기 위하여  $\alpha$ \_P2를 직접 처리하여 TEM 분석을 통하여 더욱 확실한 저해효과를 확인함(그림 19). in vitro 상에서  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin polymerization 이 잘 일어남을 확인 후(그림 21. A),  $IC_{50}$ 정도의 농도인  $1\mu M$ 의  $\alpha$ \_P2를 처리한 결과 그림 19. A와 다르게 미소관의 형성이 억제된 것을 확인할 수 있음(그림 21. B). 또한 미소관 형성을 완전히 저해할 수 있는 농도인  $10\mu M$ 의  $\alpha$ \_P2를 처리한 결과 미소관을 완전히 관찰하지 못함(그림 21. C).



그림 21. TEM 분석. A. 미소관 형성 반응, B. 미소관 형성 반응 +  $1\mu M$   $\alpha$ \_P2, C. 미소관 형성 반응 +  $10\mu M$   $\alpha$ \_P2

## 10. 세포내 전달 펩타이드와 미소관형성 저해 펩타이드의 결합

in vitro 상에서 미소관형성 저해효과를 보인  $\alpha$ \_P2,  $\alpha$ \_P3을 *P. capsici*에 직접 처리하여 저해효과를 확인함.

paper disc에 각 peptide를 농도별로 처리하여 V8 고체배지에 *P. capsici*와 함께 접종하여 그 저해효과를 알아봄. *P. capsici*에 직접 펩타이드를 처리한 결과, 저해활성을 나타내지 않았음.

이 문제를 해결하기 위하여 CPP(Cell Penetrating Peptide) 서열로 알려진 Arginine9



(Arg9)을 이용함. Arg9의 경우 amino group을 포함하도록 합성을 진행함. amino group을 포함한 Arg9과 SPDP를 반응시켜 Pyrimidylthiol activation된 형태의 Arg9을 만듦. 이를 sulfhydryl group이 포함된 펩타이드와 반응시켜 Arg9과  $\alpha$ \_P2,  $\alpha$ \_P3을 결합시킴(그림 22).

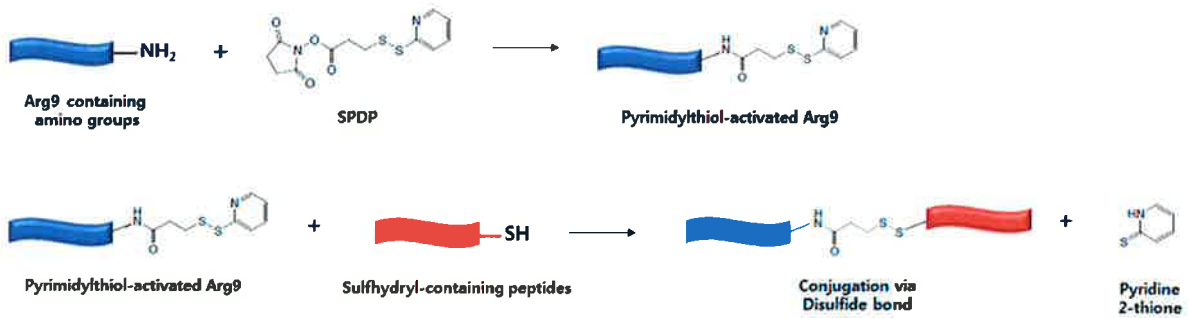


그림 22. Arg9과 펩타이드 결합 원리

이 때, 각 단계별로 순수한 펩타이드를 얻기 위하여 HPLC를 이용함.

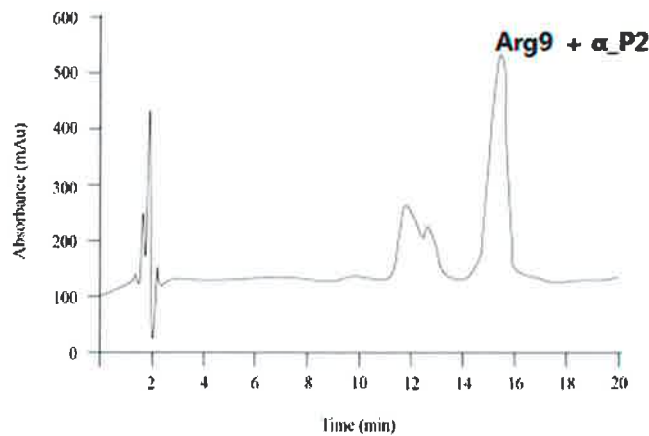


그림 23. HPLC를 이용한 Arg9과  $\alpha$ \_P2의 합성.

역병주 미소관 저해 펩타이드와 CPP를 이용하여 최종적으로 CCP(CPP Conjugated Peptide)를 개발함.

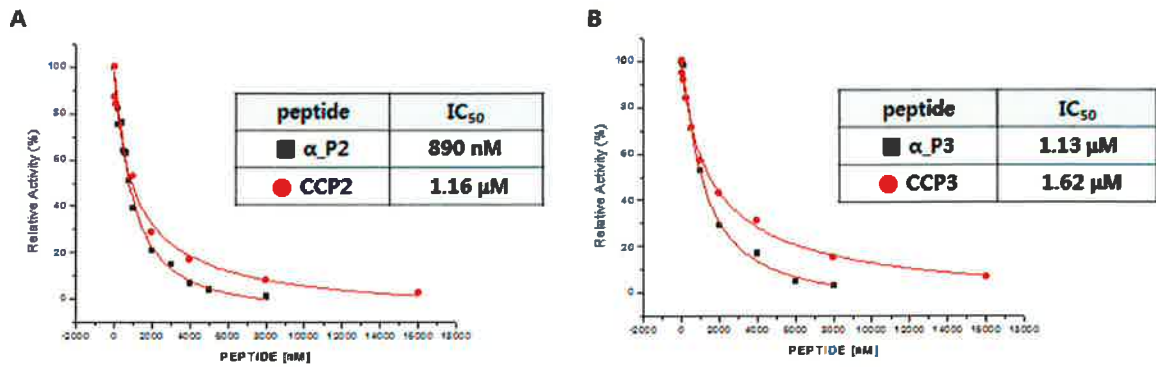


그림 24. 미소관형성 저해 펩타이드와 CCP의 IC<sub>50</sub> 값 비교. A : α\_P2와 CCP2의 IC<sub>50</sub>. B : α\_P3와 CCP3의 IC<sub>50</sub>.

미소관형성 저해 펩타이드와 CCP의 미소관 형성 저해 활성을 비교함. α\_P2의 경우 890 nM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었고, CCP2의 경우 1.16 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냄(그림 24. A). α\_P3의 경우 1.13 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었고, CCP3의 경우 1.62 μM의 IC<sub>50</sub> 값을 나타냄(그림 24. B). 이로써 미소관 형성 저해 펩타이드와 CCP가 유사한 IC<sub>50</sub> 값을 나타냄.

CCP의 경우, 미소관 형성 저해 활성은 그대로 유지가 되면서 역병주 세포막 투과가 가능한 새로운 형태의 펩타이드 방제제로 효과가 기대됨.

## 11. 역병주 저해 효과 검증

전달 시스템으로 CPP 서열을 이용한 CCP2와 CCP3를 *P. capsici*에 처리하여 저해활성을 paper disc방법으로 확인하였음. paper disc에 각 펩타이드를 loading한 후 V8 고체 배지 위에 역병주와 함께 배양시켜 역병주가 자라는 거리를 비교하여 저해 활성을 테스트하였음. Arg9와 α\_P2, α\_P3를 처리하였을 때 *P. capsici* 성장을 억제하지 못하였으나, CCP2와 CCP3의 경우 *P. capsici*이 자라는 거리가 줄어들어 저해활성을 가지는 것을 확인함(그림 25 A, B). *P. capsici*의 저해제로 알려진 Metalaxyl을 Control로 사용하여 CCP2와 CCP3를 농도별로 처리하여 농도가 증가함에 따라 역병주가 자라는 거리가 줄어드는 것을 확인함(그림 25 C, D). 마지막으로 20 μM의 metalaxyl, CCP2, CCP3를 처리하여 확실한 저해효과를 확인함(그림 25 E).

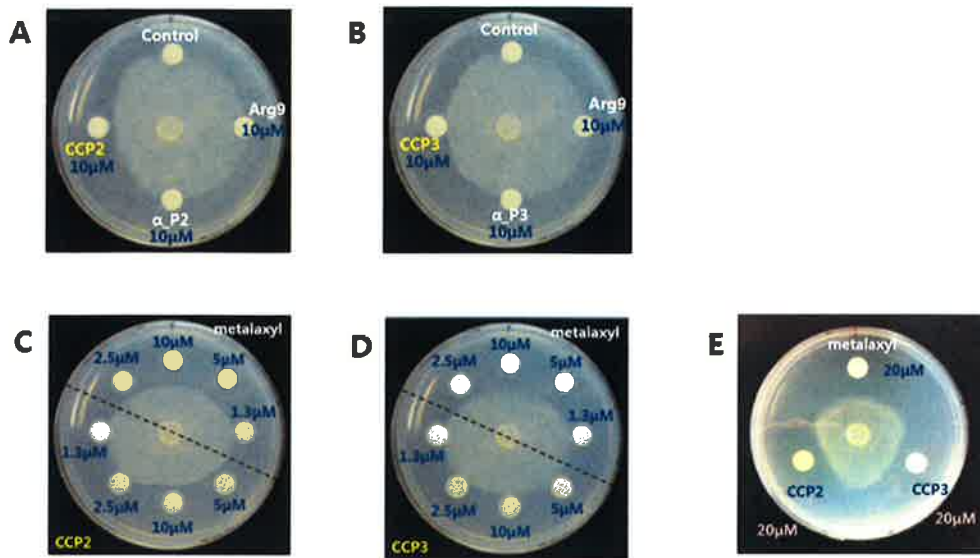


그림 25. *P.capsici*에 대한 a\_P2, a\_P3, CCP2, CCP3의 항균활성 테스트.

*P. capsici*의 life cycle(그림 26)에서 어떤 과정에서 저해작용이 일어나는지 관찰하기 위하여 각 *P. capsici* 성장 단계별로 CCP2, CCP3을 처리함. 그림 25에서 이미 *P. capsici*의 균사단계에서의 저해활성을 확인하였기 때문에 유주자낭, 운동포자, 발아 단계에 CCP를 처리하여 저해 활성을 관찰하였음. 그 결과, CCP2, CCP3 모두 germination 단계에 처리하였을 때 *P. capsici*의 성장이 저해되는 것을 관찰함.

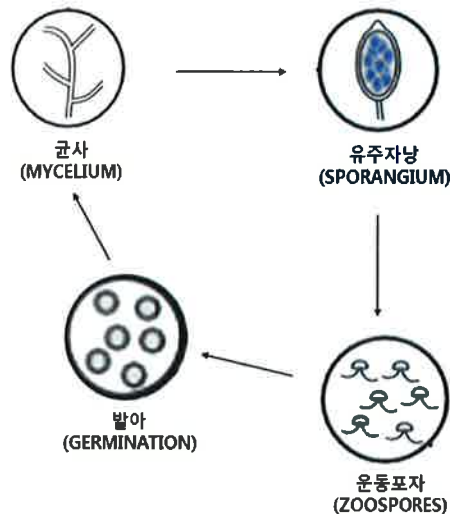


그림 26. 역병주 life cycle

그림 27를 보면, 저해제를 처리하지 않은 Control과 비교하여 CCP2와 CCP3를 처리하였을 때, *P. capsici*의 길이가 줄어들며 전체적으로 성장이 억제된 것을 확인할 수 있음.

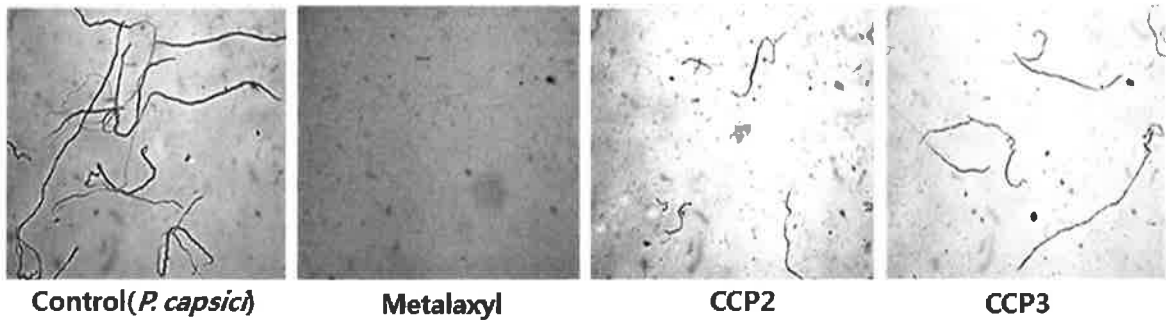


그림 27. Germination 단계에서의 CCP2와 CCP3의 저해활성 검증

*in vitro* 상에서 미소관 형성 저해를 보였던 펩타이드의 경우, 실제 역병주에 처리하였을 때 역병주의 성장 억제 효과를 보이지 않았으나(그림 25), CCP의 경우 역병주 성장 억제 활성을 가지는 것을 확인함. 이는  $\alpha$ \_P2,  $\alpha$ \_P3의 경우 단독으로 처리하였을 때, 역병주의 세포막을 통과하지 못하여 역병주 내에 존재하는 미소관에 결합하지 못하여 저해 활성을 나타내지 못하였으나 CPP 서열인 Arg9을 펩타이드와 연결함으로 Arg9이  $\alpha$ \_P2와  $\alpha$ \_P3를 역병주 세포막을 통과할 수 있도록 해 줌으로 미소관 subunit에 결합하여 미소관형성을 저해하여 역병주 성장을 억제한 것으로 보임.

## 12. 역병주 감염 농작물에의 치료효과 검증

실제 역병주에 감염된 농작물에 대한 CCP2, CCP3의 역병주 방제효과를 확인함. 먼저 50  $\mu$ M의 metalaxyl, CCP2, CCP3를 고추 잎에 주입하고 2-3시간동안 흡수시킴. 고추 잎에 역병주를 2일 동안 감염시킴. 5일 후 고추 잎을 관찰하였음.

그림 28에서, Control로 방제제를 처리 하지 않은 고추 잎의 경우 역병주에 감염된 부분이 고추 잎에 전체적으로 퍼진 것을 확인 할 수 있음. 반면 metalaxyl을 처리한 고추 잎의 경우 역병주에 의한 감염된 부분이 거의 나타나지 않음. CCP3의 경우 control과 유사한 감염부위를 나타내어 방제효과를 볼 수 없었음. 반면 CCP2를 처리한 고추 잎을 보면 control과 비교하여 역병주에 감염된 부분이 훨씬 감소된 것을 확인함.

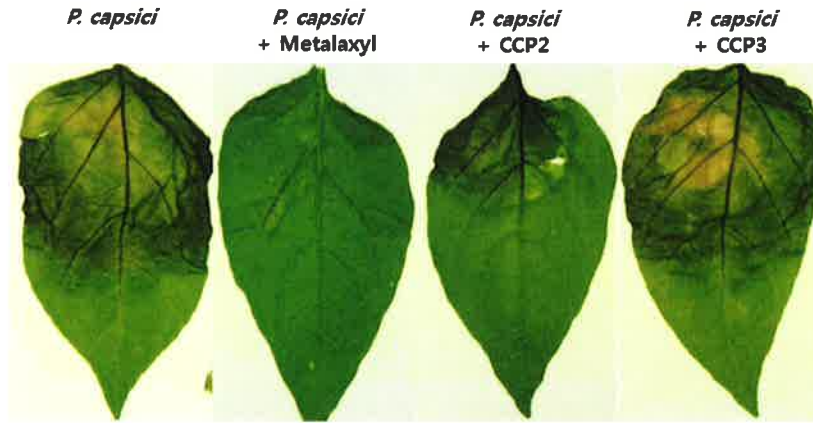


그림 28. 고추 잎에서의 역병주 피해 assay

*P. capsici*에 감염된 농작물에서 CCP2를 처리하였을 때 *P. capsici*의 감염 속도를 늦추면서 *P. capsici*에 감염된 부위가 현저히 줄어드는 것을 확인하였음. 이는 CCP2가 역병 방제물질로 이용가능성을 보여줌. metalaxyl과 같은 화학적 방제제의 경우 비특이적 결합을 통한 방제효과를 나타내기 때문에 역병균의 방제효과 뿐 아니라 비특이적 결합을 통한 부작용이 발생할 수 있으나, CCP2의 경우 역병주 미소관에 특이적으로 결합하여 피해 활성을 일으키기 때문에 이러한 비특이적 결합에 의한 부작용을 감소시킬 수 있음. 또한 CCP2의 경우 농작물 잔류의 위험성이 매우 낮음. CCP2의 경우 아미노산으로 구성된 펩타이드이기 때문에 농작물에 잔류하였을지라도 체내에서 쉽게 분해가 되며 독성을 일으킬 가능성이 현저히 낮음.

이 연구에서는 식물역병 방제물질로 펩타이드 기반 방제물질을 개발하였으며, 이를 이용하는 방법으로 친환경적 방제법을 개발하였음. 펩타이드 기반 방제물질의 대량생산을 통하여 실제 농작물에 처리하였을 때 역병주의 예방 또는 치료효과를 나타낼 것이며, 실용화 가능성이 충분히 있다고 사료됨.

방제 효과 검정을 하기 위하여 두 가지 형태의 재배 방법을 사용함. 고추 품종 부감을 원예용 상토에서 4주 동안 직접 기르는 방법과 N : P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> : K<sub>2</sub>O 가 20 : 10 : 20으로 혼합된 영양액에 고추의 유묘를 재배하고 고추역병균의 유주자가 포함된 원예용 상토에 이식하여 재배하는 방법을 사용함.

방제 효과 검정은 고추 역병의 유주자와 선발된 펩타이드를 혼합하여 처리하고 2주동안 관찰하여 고추의 시들음 증상이 나타나는 수를 조사하고 이를 대조구와 비교하여 통계처리함.

동시처리에서 방제효과를 나타내는 펩타이드는 토양에 효과를 나타내는 농도로 병원균 처리 전 1, 3, 5, 7일에 처리하고 이 토양에 고추 역병균의 유주자를 처리하여 방제효과를 조사함. 또한 고추 역병균의 유주자를 펩타이드 처리 전 1, 3, 5, 7일에 처리하고 후에 약효를 나타내는 농도로 펩타이드를 처리하고 방제효과를 조사함. 결과는 대조구와 비교하여 통계 처리함.

고추의 열매에서 실험이 필요한 경우, 고추 역병균 유주자 현탁액과 펩타이드를 혼합하여 주사기를 이용하여 고추의 과실에 주사하고 고추역병의 병진 전을 유관으로 관찰하고 사진으

로 기록함. 과실에서 동일한 방제 효과가 나타날 경우, 앞서 사용한 전/후 처리 방법을 이용하여 효과를 검증함.

현재 in vivo에서 역병 방제효과 검정의 경우 역병의 방제효과가 제대로 나타나지 않음. 이는 현재 실험실내에서 합성 가능한 펩타이드의 농도가 50  $\mu$ M 수준으로 in vivo 검정에서 활성을 보이기에 낮은 농도로 사료됨. 하지만 그림 3에서와 같이 고추 잎에서의 방제 효과를 확인한 바 증폭된 농도에서는 펩타이드 방제제가 역병 방제효과를 나타낼 것으로 기대됨. 이를 위해서 펩타이드의 대량생산이 필요함. 현재 실험실 수준에서 펩타이드의 대량생산은 어려운 일이나 산업체에 기술이전을 통한 기업수준의 대량생산이 이루어진다면, 아미노산, 링커의 원가는 매우 경제적이기 때문에 현저히 낮은 비용으로 대량생산이 가능함.

고추 작물에 있어서 역병은 탄저병과 함께 가장 큰 피해를 입히는 병해로 꼽힘. 역병은 5월 중·하순부터 발생하여 7월의 장마 이후 급격히 만연함. 역병주의 격막이 없는 실같은 균사와 여러 모양의 포자를 형성함. 포자의 경우 강우에 의하여 포장에 존재하는 병원균의 이동과 침입이 용이하게 됨. 포자 중 유주자의 경우 운동성이 존재하기 때문에 물을 따라 유영하여 기주체에 도달, 식물체에 침입하게 됨. 작물의 생육후기에 주위환경이 악화되면 유주자는 운동성을 잃고 다른 종류의 포자와 결합하여 난포자를 형성함. 역병주는 난포자의 형태로 토양 속에서 월동하여 다음해의 전염원이 되는데 난포자는 주위환경에 대한 저항력이 대단히 강하여 토양 내에서 2~8년간 생존이 가능함. 역병을 방제하기 위해 메타실수화제, 캡타폴수화제, 쿠퍼수화제, 옥사프로수화제, 옥사딕실, 쿠퍼수화제, 알리젯수화제, 리도밀 디치수화제, 리도밀동수화제를 살포함. 이러한 화학적 방제약제는 지속적인 처리가 필요하며, 정확한 농도로 희석을 사용해야함. 또한 과도한 약제처리는 작물의 약제과다 흡수에 의한 잔류량이 문제가 됨.

펩타이드 방제제의 경우, 결합마커에 대한 특이적 결합을 하기 때문에 비특이적 결합을 하는 화학적 방제제와 비교하여 같은 농도를 사용하였을 때 효율이 훨씬 좋다고 할 수 있음. 또한 펩타이드의 경우 과량으로 사용하여 농작물에 잔류할 경우, 펩타이드가 잔류된 농작물을 섭취하는 경우 체내에서 펩타이드가 분해되어 부작용을 일으키지 않음.

펩타이드 기반 친환경 방제제를 발굴하기 위하여 역병주 미소관 형성 subunit인  $\alpha$ ,  $\beta$ -tubulin에 결합하는 동시에 미소관 형성을 저해하는 펩타이드를 발굴함. 역병주 내에 존재하는 미소관 subunit가 결합마커이기 때문에 역병주 세포 투과성을 높이기 위하여 CPP(Cell Penetrating Peptide)를 이용한 CCP(CPP Conjugated Peptide)를 개발함. in vitro 상에서 CCP의 미소관 형성 저해 활성을 검증하였고, 실제 역병주의 성장이 억제되는 것을 확인하였음. 또한 역병주 감염 고추 잎에 대한 CCP의 역병주 방제효과를 입증함. 본 연구에서는 펩타이드 기반 친환경 방제제를 개발하기 위하여 위와 같은 기본 연구들을 수행하였으며 역병주 방제효과를 가진 새로운 펩타이드 기반 방제물질을 발굴함.

이를 산업화 하기 위하여 포장에서의 방제효과 검증, 포장시험용 시제품 생산, 안정성 시험, 대량생산 연구 등이 수행되어야 할 것이며, 이는 현재 과제에서 진행되기 힘든 부분이나 앞으로 펩타이드 기반의 친환경 방제물질의 개발 측면에서의 가능성이 열려 있음. 본 연구실차원에

서 펩타이드를 합성하기 위하여 장비, 비용적인 부분의 한계점이 존재하나, 펩타이드 방제제를 산업화하는 경우 본 연구실의 기술이전과 동시에 장비부분에서 초기 비용을 투자하게 된다면, 아미노산, linker 등 펩타이드를 합성하는 기본적인 재료비만 소모되기 때문에 현저히 낮은 비용으로 펩타이드 합성이 가능함.

본 연구에서는 역병주를 방제하기 위하여 역병주의 위와 같은 특성을 이용하여 포자의 형성을 막으며 균사의 성장을 억제하여 최종적으로 역병주의 성장을 억제하여 고추 등의 농작물에 감염되는 것을 막을 수 있는 결합마커인 미소단 subunit를 선택함. 또한 화학적 방제제의 단점을 극복하기 위하여 펩타이드 기반 친환경 방제제를 발굴함. 그림 3의 결과에서 펩타이드 방제제를 미리 살포한 후 역병균에 감염되었을 때 역병균의 성장이 감소한 것을 확인함.

현재 화학적 방제제의 경우, 사용량의 제한, 환경오염, 내성인자의 발생 그리고 농작물 잔류 등의 문제점이 존재함. 따라서 화학적 방제제의 사용량을 감소시키면서 역병의 방제효과를 동시에 볼 수 있는 시스템 구축이 필요함. 이에 본 연구에서 발굴한 펩타이드 기반 방제제를 사용할 경우 역병주의 성장을 억제할 뿐더러 화학적 방제제의 사용량을 감소시키면서 화학적 방제제에 의한 다양한 부작용 역시 감소시킬 수 있는 효과가 기대됨.

## 제 4 장 목표달성도

### 제 1 절 목표달성도

(단위 : 건수)

구분		특허		(예시)신품종				논문		기타
		출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입판매 신고	품종보호		SCI	비SCI	
						출원	등록			
1차 년도	목표							1		
	달성							<b>1</b>		
2차 년도	목표	1						1		
	달성	<b>2</b>						<b>2</b>		
3차 년도	목표	1	1					1		
	달성		<b>2(예정)</b>					<b>2</b>		
계	목표	2	1					3		
	달성	<b>2</b>	<b>2(예정)</b>					<b>5</b>		



## 제 5 장 연구개발 성과 및 활용계획

### 제 1 절 연구개발 성과

#### 1. 논문게재 성과

게재 연도	논문명	저자			학술지명	Vol	국내외 구분	SCI 구분	비고
		주저자	교신 저자	공동저자					
2012	Proteolytic assay-based screening identifies a potent inhibitor of anthrax lethal factor	HC Park	MY Yoon	SR Sung SM Lim JS Lee SK Kim	Microbial Pathogenesis	53	국외	SCI	
2012	Mechanism studies of substituted Triazol-1-yl-pyrimidine derivatives inhibition on <i>Mycobacterium tuberculosis</i> acetohydroxyacid synthase	PN Chien	MY Yoon	IP Jung, K.V. Reddy	Bulletin of the Korean Chemical Society	12	국내	SCI	
2013	Role of a highly conserved proline-126 in ThDP binding of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> acetohydroxyacid synthase	IA Baig	MY Yoon	V. Gedi SC Lee SH Koh	Enzyme and Microbial Technology	53	국외	SCI	

2014	Characterization and in Vitro Inhibition Studies of <i>Bacillus anthracis</i> FtsZ: A Potential Antibacterial Target	HC Park	MY Yoon	V. Gedi JH Cho, JW Hyun, KJ Lee, JW Kang, BJ So	Appl Biochem Biotechnol	172	국외	SCI	
2014	Development of Peptide as Novel Potent Inhibitors of <i>Phytophthora capsici</i> Microtubules	JY Moon	MY Yoon	IA Baig	Biochemical and Biophysical Research Communications		국외	SCI	Submission No. = BBRC-14-6131

※ 논문 1건 추가 준비 중

## 2. 특허 성과

출원된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2013	페이지 디스플레이 기법을 통한 <i>Phytophthora capsici</i> 의 alpha-tubulin과 결합하면서 동시에 미소관 형성을 저해하는 펩타이드 규명	윤문영 이상춘 문지영 조준행	대한민국	2013-0090484
2013	페이지 디스플레이 기법을 통한 <i>Phytophthora capsici</i> 의 beta-tubulin과 결합하면서 동시에 미소관 형성을 저해하는 펩타이드 규명	윤문영 이상춘 문지영 조준행	대한민국	2013-0090489

※ 특허 2건 등록 예정(2014.12)

## 제 2 절 연구개발 성과 활용계획

### 1. 포장에서 방제효과 검증

- 가. 온실에서 효과가 우수한 항역병 물질을 대상으로 포장에서 방제효과 실험 실시.
- 나. 고추를 재배하는 유기농 하우스에서 7일 간격 3회 처리를 하는 일반적인 살균제 등록 시험법에 따라 포장시험을 수행. 그 결과 현재 화학농약으로 사용되는 대조약제와 비교하여 우수한 약효 확인 및 대체 친환경 농약으로 개발 가능성 타진.

### 2. 포장시험용 시제품 생산

- 가. 포장시험용 시제품을 생산하기 위하여 상기연구에서 확립된 최적의 처방을 이용하여 동결건조된 형태의 원제를 주성분으로 하는 포장시험용 시제품 제작.

### 3. 친환경 방제제 확립을 위한 안정성 시험

- 가. 연구를 통하여 확립된 제품을 대상으로 약효 보증기간내의 제품의 안정성을 확보하고자 경시안정성시험을 수행할 예정.
- 나. 제품의 대한 독성시험을 위하여 처방검토 및 활성검토를 통하여 선발된 항역병물질을 대체 친환경 농약으로 개발하기 위해 농촌진흥청에서 고시한 독성시험기준과 방법에 준하여 수행함.
- 다. 또한 환경 친화적이면서도 품질에는 악영향을 미치지 않는 방제법 입증

### 4. 시제품 생산용 물질 대량생산 연구

- 가. Oligo-펩타이드 및 뉴클레오티드는 자동화 고체상합성법 (solid-phase) 이용해 대량합성할 수 있음.
- 나. Solid-phase기술은 컬럼 내의 Solid 물질을 통해 이중가닥 올리고가 순차적으로 첨가되는 방식을 이용하는 방법으로, 실험과정의 단순명료성, 자동화, 모든 서열에 대한 적용가능성 등 장점을 지님. 일관성 있는 재생산이 가능하며 낮은 비용으로 생산이 가능한 펩타이드 및 압타머를 이용함으로써 경제성도 높은바, 매우 유용함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 역병주를 방제하기 위하여 Metam sodium, Chloropicrin을 이용하여 역병주에 대한 방제 기술 연구가 진행됨. (Hausbek and Lamour, 2004)
2. *Bacillus licheniformis* LS234, LS523, LS674 균주를 이용하여 농작물 고추로부터 역병주를 80%이상 생장을 억제한 것이 발표됨. (Aravind 2009)
3. *Bacillus megaterium* IISRBP 17 균주와 *Bacillus subtilis* ME488의 경우, 함께 처리하였을 때, 흑고추의 줄기와 뿌리에 감염되어 있는 역병주에 대해 효과적인 방제효과를 보였다고 발표됨. (Chung 2008, Jiang 2006)

## 제 7 장 참고문헌

- K.H. Lamour, R. Stam, J. Jupe, E. Huitema, The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*, *Mol Plant Pathol* 13 (2012) 329-337.
- S. Sanogo, P. Ji, Integrated management of *Phytophthora capsici* on solanaceous and cucurbitaceous crops: current status, gaps in knowledge and research needs, *Canadian Journal of Plant Pathology* 34 (2012) 479-492.
- B.T. Oh, H. Hur, K.J. Lee, K. Shanthi, B.Y. Soh, W.J. Lee, H. Myung, S.K. Kannan, Suppression of phytophthora blight on pepper (*capsicum annuum L*) by bacilli isolated from brackish environment, *Biocontrol Science and Technology* 21 (2011) 1297-1311.
- S. Zhang, T.L. White, M.C. Martinez, J.A. McInroy, J.W. Kloepper, W. Klassen, Evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria for control of *Phytophthora* blight on squash under greenhouse conditions, *Biological Control* 53 (2010) 129-135.
- C.Z. Lan, P.Q. Liu, B.J. Li, Q.H. Chen, Q.Y. Weng, Development of a specific PCR assay for the rapid and sensitive detection of *Phytophthora capsici*, *Australasian Plant Pathology* 42 (2012) 379-384.
- D.S. Akgül, M. Mirik, Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains, *Journal of Plant Pathology* 90 (2008) 29-34
- R. Qi, T. Wang, W.Zhao, P. Li, J. Ding, Z. Gao, Activity of Ten Fungicides against *Phytophthora capsici* Isolates Resistant to Metalaxyl, *Journal of Phytopathology* 160 (2012) 717-722.
- Y. Bi, L. Chen, M. Cai, S. Zhu, Z. Pang, X. Liu, Two non-target recessive genes confer resistance to the anti-oomycete microtubule inhibitor zoxamide in *Phytophthora capsici*, *PLoS One* 9 (2014) e89336.
- B.P. Chatterji, B. Jindal, S. Srivastava, D. Panda, Microtubules as antifungal and antiparasitic drug targets, *Expert Opinion* 21 (2011) 167-186.
- C. Lamberth, F.M.Kessabi, R. Beaudegnies, L. Quaranta, S.Trah, G. Berthon, F. Cederbaum, G.K. Beiter, V. Grasso, S. Bieri, A. Corran, U. Thacker, Synthesis and fungicidal activity of quinolin-6-yloxyacetamides, a novel class of tubulin polymerization inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22 (2014) 3922-3930.
- Y. Yin, F. Qiao, L.Y. Jiang, S.F. Wang, S.Sha, X.Wu, P.C. Lv, H.L.Zhu, Design, synthesis and biological evaluation of (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl) acrylylpiperazine derivatives as a new class of tubulin polymerization inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22 (2014) 4285-4292.
- D.J. Craik, D.P. Fairlie, S. Liras, D. Price, The future of peptide-based drugs, *Chem Biol*

Drug Des 81 (2013) 136–147.

Z.D. Fang, J.G. Laskey, S. Huang, K.D. Bilyeu, R.O. Morris, F.J. Schmidt, J.T. English, Combinatorially selected defense peptides protect plant roots from pathogen infection, Proc Natl Acad Sci USA 103 (2006) 18444–18449.

H. Y. Park, K. J. Lee, S.J. Lee, M. Y. Yoon, Screening of peptides bound to breast cancer stem cell specific surface marker CD44 by phage display, Mol Biotechnol 51 (2012) 212–220.

B.S. Koo, H. Park, S. Kalme, H.Y. Park, J.W. Han, Y.S. Yeo, S.H. Yoon, S.J. Kim, C.M. Lee, M.Y. Yoon, Alpha- and beta-tubulin from *Phytophthora capsici* KACC 40483: molecular cloning, biochemical characterization, and antimicrotubule screening, Appl Microbiol Biotechnol 82 (2009) 513–524.

J.M. Kim, H.Y. Park, K.J. Choi, H. Jung, S.H. Han, J.S. Lee, J.S. Park, M.Y. Yoon, Screening of peptides bound to anthrax protective antigen by phage display, J. Microbiol. Biotechnol 16 (2006) 1784–1790.

B. Vulevic, J.J. Correia, Thermodynamic and structural analysis of microtubule assembly: The role of GTP hydrolysis, Biophysical Journal 72 (1997) 1357–1375.