(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0087927
(43) 공개일자 2010년08월06일

(51) Int. Cl.
C07K 14/195 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0006998
(22) 출원일자 2009년01월29일
심사청구일자 2009년01월29일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울 광진구 군자동 98 세종대학교
(72) 발명자
임하나
서울특별시 강남구 신사동 556-25 401호
정연홍
서울특별시 동작구 사당2동 우성아파트 209-1202
(74) 대리인
특허법인 신성

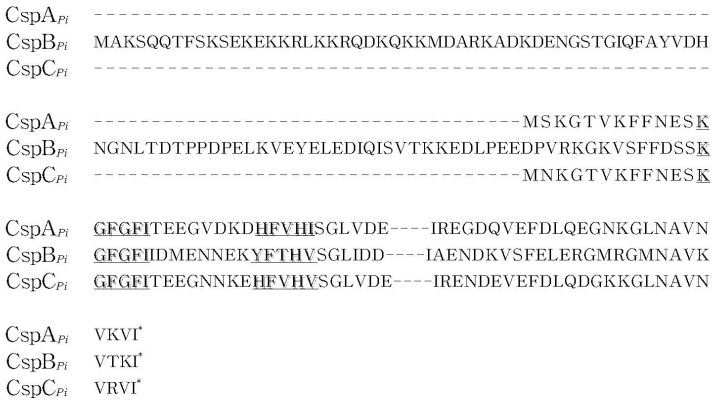
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 저온 저항성을 부여하는 단백질

(57) 요 약

본 발명은 저온 저항성을 부여하는 단백질 및 그 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R01-2006-000-11154-0
부처명	과학기술부
연구사업명	기초과학연구사업
연구과제명	극지 생물의 분자 샤페론에 의한 저온적응 기작 연구
주관기관	세종대학교 산학협력단
연구기간	2006. 03. 01 ~ 2009. 02. 28

특허청구의 범위

청구항 1

저온 저항성을 부여하는 서열번호 1의 단백질.

청구항 2

제 1항의 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2에 기재된 유전자.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단백질은 Polaribacter irgensii으로부터 유래한 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 5

제 1항의 단백질의 C-말단 쪽으로 부가적인 아미노산을 더욱 포함하는 서열번호 3의 단백질.

청구항 6

제 5항의 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 4에 기재된 유전자.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 저온 저항성을 부여하는 단백질 및 그 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 환경적으로 저온 현상이 발생 하였을 때 세포 내에서 생존을 위협할 수 있는 여러 가지 반응들이 일어난다. 저온 현상은 생존력을 감소시켜, 막의 유동성을 감소시키고, DNA와 RNA의 이차 구조가 안정화되어 전사와 번역을 억제시킨다. 또한 단백질들의 폴딩 과정을 비효율적으로 느리게 진행시킨다. 리보좀은 리보좀 결합 인자들에 의해 단백질 번역을 감소시킨다(Phadtare, 2004. Curr. Issues Mol. Biol. 6: 125-136). 이러한 저온 환경의 도전을 받게 되면 세포들은 저온(cold) 유도된 단백질들을 발현 한다 (Jones *et al.*, (1987). J. Bacteriol. 169: 2092-2095). 이러한 저온 유도된 단백질들 중에는 저온 쇼크(shock) 단백질들(Csps) 이 가장 풍부하게 발현된다. Csp는 핵산 결합 쇼크 도메인인 cold shock domain (CSD) 을 가지고 있다. 이러한 CSD는 β-barrel를 구성하는 five antiparallel β-strands 구조로 구성되어 있다 (도 1). CSD는 RNA 결합 모티프, RNP1과 RNP2,

으로 알려진 잘 보존된 아미노산 서열을 가지고 있다 (Landsman, (1992). Nucleic Acids Res. 20: 2861-2864). 이 RNA 결합 모티프는 single-stranded DNA (ssDNA)와 RNA에 결합을 할 수 있게 해주는 역할을 수행하고 있다 (Lopez and Makhatadze, (2000). Biochem. Biophys. Acta 1479: 196-202). 즉 CSD의 활성을 가지게 하는 곳이 RNP1과 RNP2 이다. RNP1과 RNP2는 핵산 결합 활성을 가지고 있어서 세포 성장 과정에서 저온 현상에 직면했을 때 형성된 핵산의 2차 구조를 풀어 주어 전사와 번역이 진행될 수 있도록 해준다. 따라서 저온 충격 시 세포의 성장은 당분간 중지되었다가 Csp이 발현되고 저온 순응(acclimation) 되면 세포 성장을 서서히 재개하게 된다.

[0003] Csps는 다양한 박테리아(psychrophiles, mesophiles, and thermophiles) 에서 보고되어 있다 (Ermolenko, D. N., and Makhatadze, G. I. (2002). Cell. Mol. Life Sci. 59: 1902-1913). 가장 많이 연구되어진 예들로 *Escherichia coli*에서는 9개의 Csp homologues를 가지고 있고 (Yamanaka *et al.*, 1998,Mol. Microbiol. 27: 247-255) *Bacillus subtilis*에서도 3개의 Csps를 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Graumann *et al.*, 1996,J. Bacteriol. 178: 4611-4619).

[0004] 저온 현상 (cold shock)에 의해 Csp 유전자들이 전부 유도되지는 않는다. 9 종의 *Escherichia coli* Csps에서 오직 4 종의 Csps (CspA, CspB, CspG, CspI) 만이 저온 현상에 의해 induce 되는 것으로 알려져 있다 (Nakashima *et al.*, 1996,J. Bacteriol. 178: 2994-2997; Wang *et al.*, 1999,*J. Bacteriol.* 181: 1603-1609.). 저온의 환경에서 두 개 또는 세 개의 저온 유도된 Csp 유전자들이 결손되어도 세포 생존에 영향을 주지 않는다. *E. coli* ΔcspAΔcspBΔcspG triple-결손 균주에서는 의해 다른 Csps가 과발현되어 저온 저항성에 기여한다. *E. coli* triple-결손 균주 보충의 역할을 하는 기작으로서 CspE의 발현이 나타나는 것이다. 하지만 *E. coli* ΔcspA ΔcspB ΔcspE ΔcspG quadruple-결손 균주에서는 cold sensitivity 하게 자라게 된다. 37℃에서는 성장이 지속적으로 이루어지지만 낮은 온도에서는 성장이 느리게 진행되거나 억제되는 양상을 보인다.

[0005] Csps은 70 아미노산 잔기로 이루어진 약 7 kDa의 molecular sizes를 가지고 있는 작은 단백질들이다. 이러한 Csps의 역할과 기능이 가장 많이 알려진 것은 *E. coli* Csps 이다. *E. coli* CspA의 CspA family 는 RNA 2차 구조의 불안정화에 의해 RNA chaperone 으로서 기능을 가지고 있다 (Jiang *et al.*, 1997,J. Biol. Chem. 272: 196-202). 그래서 전사를 조절하며 효율적인 번역을 이끌어 낼 수 있다. 하지만 *E. coli* CspD는 세포 성장이 정지된 상태이거나 영양의 결핍이 일어나는 동안 유도되어 발현이 되는 것이 알려졌고 (Yamanaka and Inouye, 1997,J. Bacteriol. 179: 5126-5130), CspD 는 DNA 복제 저해제로서 기능을 가지고 있는 것이 알려졌다 (Yamanaka *et al.*, 2001,Mol. Microbiol. 39: 1572-1584). CspD를 제외하고 대부분의 Csp homologues의 과발현에 의해 cold sensitive phenotype을 나타내는 *E. coli* ΔcspA ΔcspB ΔcspE ΔcspG quadruple-deletion strain의 cold sensitive가 억제되는 것이 확인되었다 (Xia *et al.*, 2001). 이러한 결과는 CspD가 다른 Csps과 높은 서열 동일성(homology)를 가지고 있음에도 불구하고 독특하고 다른 기능을 가지고 있음을 알 수 있다. Csps이 높은 보존된 서열들을 가지고 있더라고 organism이나 단백질들에 의해 Csps의 기능이 달라질 수 있다. Csps의 기능과 역할의 연구가 mesophiles과 thermophiles로부터 발견된 Csps에서 어느 정도 알려져 있다. 하지만 극한 저온 환경에서 생존하고 있는 psychrophiles에서 분리한 Csps은 아직까지 알려진 바가 없다. 최근에는 저온에서 성장하는 박테리아에서 Csp을 분리해서 그 기능을 알아보는 연구가 시도되고 있다. 또한 초저온에서 성장하는 극지 (남극과 북극) 미생물에서 Csps을 분리하고 기능을 연구할 필요가 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로 본 발명의 목적은 저온 저항성을 부여하는 단백질을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 저온 저항성을 부여하는 서열번호 1의 단백질을 제공한다.

[0009] MAKSQ QTFSK SEKEK KRLKK RQDKQ KKMDA RKADK DENGS TGIQF AYVDH NGNLT DTPPD PELKV EYELE DIQIS VTKKE DLPEE

DP(서열번호 1)

[0010] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 저온 저항성 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2에 기재된 유전자인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.

[0012] 본 발명의 다른 일 구체예에 있어서, 상기 단백질은 Polaribacter irgensii으로부터 유래한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 본 발명의 저온 저항성 단백질의 C-말단 쪽으로 부가적인 아미노산을 더욱 포함하는 서열번호 3의 단백질을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 서열번호 3의 저온 저항성 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 4에 기재된 유전자인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 본 발명의 저온 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산서열을 가진 것을 특징으로 한다. 또, 서열번호 1 또는 서열번호 3의 아미노산서열에 대해서, 이들 아미노산서열을 가진 단백질이 표시하는 저온 저항성 활성이 손상되지 않는 범위 내에서, 1이상의 아미노산의 결실, 치환 및 부가의 적어도 1종의 변이가 도입된 변이 저온 저항성 단백질도 본 발명에 관한 저온 저항성 단백질에 포함된다.

[0017] 또, 본 발명에는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 아미노산서열을 가진 저온 저항성 단백질을 코딩하는 유전자가 포함되고, 그 유전자서열로서는 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 것을 들 수 있다. 또, 이들 서열번호 2 또는 서열번호 4의 염기서열을 변이시켜서 얻게 되는 상기한 저온 저항성 단백질을 코딩하는 변이 유전자도 본 발명에 관한 저온 저항성 유전자에 포함된다.

[0018] 또, 본 발명에는, 상기 저온 저항성 유전자를 함유하는 재조합벡터, 상기 재조합벡터에 의해서 형질전환된 형질전환체가 포함된다. 또한, 본 발명에는, 이 형질전환체를 배양하여, 얻게 되는 배양물로부터 저온 저항성 단백질을 분리하는 것을 특징으로 하는 저온 저항성 단백질의 제조방법이 포함된다.

[0019] 본 발명의 저온 저항성 유전자는 Polaribacter irgensii의 균체로부터 분리된 것이다. 먼저, 저온 저항성 유전자를 가진 균주로부터 염색체 DNA를 취득한다. 염색체 DNA의 분리방법은 공지의방법을 사용할 수 있다.

[0020] 예를 들면, Polaribacter irgensii 균주를 LB배지, 또는 M9배지에 적당한 탄소원을 첨가한 것 등에서 배양한 후, 예를 들면, 마머(Marmer)등의 방법(Journal of Molecular Biology, 3권, 208페이지, 1961년) 등에 의해 염색체 DNA를 조제한다. 이 방법에 의해 얻게 된 염색체 DNA를 적당한 제한효소(예를 들면 Sau3AI 등)를 사용해서 분해하고, 적당한 단편길이를 가진 분해물에 대해서, 이들을 연결가능한 제한효소(예를 들면 BamHI 등)로 절단한 벡터에 연결하여, 유전자 라이브러리를 제작한다. 여기서의 적당한 단편길이란, 통상의 플라스미드벡터를 사용할 때는 4000~25000염기쌍 정도, 코스미드 또는 파지(phage)벡터를 사용할 때는 15000~30000의 염기쌍정도이다. 적당한 길이의 DNA단편을 분리하여 취하는 방법으로서는, 자당밀도구배를 사용하는 방법이나 아가로즈겔을 사용하는 방법(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory출판(1982년)) 등 공지의 방법을 사용하면 된다.

[0021] 이하 본 발명을 설명한다.

[0022] 본 발명은 Polar microorganism 인 Polaribacter irgensii KOPRI 22228 균주의 cold shock 단백질들의 저온 저항성에 대한 역할과 기전을 제공하는 것이다.

[0023] 먼저 *Polaribacter irgensii* ATCC 700398 균주의 genomic sequences에서 CSD의 conserved sequence를 가지는 3개의 유전자를 찾아내었다. 이를 기초로 하여 primers를 디자인하고 PCR를 이용하여 *csp* 유전자의 cloning을 수행하였다. 그에 따라 *Polaribacter irgensii*로부터 3종의 cold shock 단백질s의 (CspA, CspB, CspC) genes을 얻을 수 있었다. 확보한 $Csps_{Pi}$의 서열을 확인한 결과 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$는 189 bp 의 coding DNA sequence를 가지고 있었으며 상호간 homology가 81 % 로 높게 나타나는 것을 분석할 수 있었으며 $CspB_{Pi}$는 450 bp의 size를 가지고 있었으며 cold shock domain이 위치하고 있는 앞부분의 N-말단 엑스트라 도메인이 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 이 N-말단 도메인의 경우에는 기존에 알려진 다른 유전자들과 동종성이 없는 특유의 서열로서, *Polaribacter irgensii*와 유연관계가 매우 높은 균주에서만 $CspB_{Pi}$와 유사한 서열이 발견되나 이에

대한 연구는 전혀 없는 상태이다. $Csps_{Pi}$를 *E. coli* 균주에 형질전환시키고 단백질 과발현을 진행하였다.

[0024] $Csps_{Pi}$가 저온 저항성을 가지고 있고, 저온 처리 시 세포 생존을 도와 줄 수 있을 것인지 검증하기 위해 $Csps_{Pi}$-과발현된 *E. coli* 세포들을 천천히 얼려주었다가 다시 녹여주는 과정을 반복 수행하여 생존한 세포 숫자를 CFU를 통해 측정하였다. 그 결과 $Csps_{Pi}$가 저온 저항성을 나타냄을 확인하였다. 이 과정에서 놀랍게도 $CspB_{Pi}$는 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$에 비하여 매우 강력한 저온 저항성을 나타냄을 관찰하였다.

[0025] $CspB_{Pi}$가 이런 강력한 저온 저항성을 나타내는 이유를 찾기 위해 $Csps_{Pi}$의 서열을 비교하였다. $CspB_{Pi}$는 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$에 비하여 cold shock domain 외에 N-말단 엑스트라 도메인이 위치하고 있음을 확인하고 그에 따라 $Csps_{Pi}$의 domain swapping을 통하여 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$의 CSD의 N-말단에 $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인을 서브-클로닝을 통하여 돌연변이체들을 제작하였다($CspBA_{Pi}$, $CspBC_{Pi}$). 또한 $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인만을 단독으로 지니는 돌연변이체를 제작하였다 ($CspBN_{Pi}$). DNA 시퀀싱을 통해 3종의 도메인 swapping mutants ($CspBA_{Pi}$, $CspBC_{Pi}$, $CspBN_{Pi}$)의 서열을 확인하고 단백질 과발현을 통해 단백질 크기를 확인하였다. 저온 저항성을 확인하는 과정은 앞서 수행했던 $Csps_{Pi}$의 실험방법과 동일하게 하여 진행하였고 그 결과 $CspBA_{Pi}$, $CspBC_{Pi}$, $CspBN_{Pi}$ 모두에서 $CspB_{Pi}$와 유사한 정도의 강력한 저온 저항성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인이 $Csps_{Pi}$의 저온 저항성을 강하게 나타나게 하는 것을 알수 있었다. 좀 더 명확한 확인을 위하여 $CspB_{Pi}$의 CSD의 활성 부위인 RNP1과 RNP2의 site-directed mutagenesis를 통하여 RNA 2차 구조 언폴딩 활성이 감소하는 돌연변이체들($CspB_{Pi}$ F15R, $CspB_{Pi}$ F28R)을 제작하였다. 앞서 저온 저항성을 확인하는 과정과 동일하게 실험을 수행하여 $CspB_{Pi}$ F15R, $CspB_{Pi}$ F28R 모두에게서 저온 저항성을 가지고 있음을 확인하였다. 그러므로 $CspB_{Pi}$의 핵산 결합 활성을 가지고 있는 CSD이 매우 강한 저온 저항성을 가지게 하는 것이 아니고 $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인이 저온 저항성을 강하게 나타나게 하는 것으로 다시 확인하였다. $Csps_{Pi}$가 핵산 결합 활성을 가지고 있으며 저온에서 세포 생존률을 증가시킬 수 있게 하고 그 역할로 전사와 번역을 유도해 주는 지 살펴보기 위하여 정제 실험을 수행하였다. $Csps_{Pi}$의 정제실험은 이온 교환 컬럼을 통해 이루어졌으며 centricon으로 size-fractionation을 하여 $Csps_{Pi}$의 단백질의 정제를 할수 있었다. 정제된 $Csps_{Pi}$를 단일 가닥 올리고(dT)에 결합을 이루는지 분석을 하였다. 그 결과 $Csps_{Pi}$는 올리고(dT)와 결합을 이루고 있음을 확인하였다. 이것으로 $Csps_{Pi}$는 ssDNA와 결합을 할수 있는 것을 알수 있었다. 일반적으로 cold shock 단백질들은 RNA chaperone 으로서 가장 주요한 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있고 저온에서 mRNA의 전사와 번역을 유도해 내는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. $Csps_{Pi}$도 ssRNA에 결합하여 RNA chaperone 으로서의 역할을 하거나 ssDNA와 결합하여 DNA 합성 저해제로 기능을 할 가능성이 있었다.

[0026] *E. coli* strian에서 ΔcspA ΔcspB ΔcspE ΔcspG quadruple-deletion strain BX04가 cold sensitive 하다는 연구 보고가 있었다. 이 균주를 이용하여 $Csps_{Pi}$가 이 균주의 cold-sensitivity를 complementation 할 수 있는지 살펴보아 $Csps_{Pi}$의 저온 저항성 기능을 확인할 수 있다.

[0027] *Polaribacter irgensii* KOPRI 22228의 cold shock 단백질들이 저온 저항성을 나타내며 $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인이 매우 강한 저온 저항성을 가지게 하는 것을 확인하였다. 현재까지 CSD이 아닌 엑스트라 도메인에서 저온 저항성을 나타내는 경우는 현재까지 보고된 바가 없었다. 따라서 $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인이 매우 중요한 cold shock 단백질 으로서 가치를 가지고 있으며, 다른 유용한 bacteria 균주에 형질 전환시켜 균주의 동결 저장 효율을 높이거나, 저온 발효 공정에 이용하고, 작물의 냉해 저항성 등의 연구에 응용을 해 볼 수 있을 것이다. 즉 여러 유용한 생물체에 저온 저항성을 가지게 하는 기능을 실험적으로 확인할 수 있을 것이다.

효 과

[0028] 본 발명의 유전자를 다른 유용한 박테리아 균주에 형질 전환시켜 균주의 동결 저장 효율을 높이거나, 저온 발

효 공정에 이용하고, 작물의 냉해 저항성 등의 연구에 응용을 해 볼 수 있을 것이다. 즉 본 발명의 유전자는 여러 유용한 생물체에 저온 저항성을 가지게 하는 기능을 할 수 있을 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것이므로 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에서 사용된 *Polaribacter irgensii* KOPRI 22228은 한국해양연구원 부설 극지연구소에서 얻어 북극 니올슨 다산 기지 근처의 해안에서 채취하였다. 형질전환을 위해 사용된 *Escherichia coli* BL21(DE3)는 Novagen, Inc.에서 구입하였다. 정제과정에서 사용된 Q-sepharose™ fsat flow resin과 binding assay에 사용된 oligo(dT)-Cellulose Type 7은 Amersham Biosciences Co.에서 구입하였다. Centricon 30은 Amicon Inc.으로부터 구입하였고, isopropyl-β-D-1-thiogalactoside (IPTG) 는 Duchefa로부터 구입하였다. Complementation에 사용한 *E. coli* strain 중 JM83과 BX04는 Sangita Phadtare Lab. (Univ. of Medicine & Dentistry of New Jersey) 에서 얻었다.

[0031] 실시예 1: Csp_{Pi} 클로닝, 발현 및 정제

[0032] 북극에서 채취한 균주의 16S rRNA 유전자 서열 분석결과 *Polaribacter irgensii*로 동정되었다. 유전자 서열이 가장 유사한 균주인 *Polaribacter irgensii* ATCC 700398 균주의 genomic sequences에 근거하여 프라이머들를 제작하고 polymerase chain reaction (PCR) 을 수행하였다. PCR의 어닐링 단계에서 온도를 다양하게 변화를 줄 수 있는 gradient PCR를 이용하였다. 먼저 *Poribacter irgensii* KOPRI 22228의 genomic DNA을 분리하여 각각 아래의 한 쌍씩의 primers를 사용하여 PCR을 수행하였다. Primer 서열 : $CspA_{Pi}$ F1N, TTATAAC CATATG AGT AAA GGT ACA GTA AAG TTT TTC A(서열번호 5), B63*B, CG GGATCC T TAG ATA ACT TTT ACG TTA ACT GCA TTT AAT(서열번호 6), $CspB_{Pi}$ F1N, AGT AAGCTT ATG GCA AAA TCG CAG CAG ACC T(서열번호 7), B150*B, CC GGATCC TTA TAT TTT GGT AAC TTT AAC TGC ATT CAT T(서열번호 8), $CspC_{Pi}$ F1N, CTTTATT CATATG AAT AAA GGT ACC GTA AAA TTT TTC AATG(서열번호 9), B63*B, CT GGATCC TTA TAT AAC TCT TAC GTT TAC TGC GTT T(서열번호 10). Gradient PCR 조건은 94 ℃에서 1 분, 53 ℃ ~ 56 ℃에서 1 분, 68 ℃에서 3 분을 30 cycles 반복하여 Csp 유전자를 증폭시켰다. $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$의 경우에는 제한 효소로 *Nde*Ⅰ과 *BamH*Ⅰ을 사용하여 double-digestion 시켜주고 189 bp size의 DNA 절편을 pAED4 발현 벡터 (Doering, 1992)에 클로닝하였다. $CspB_{Pi}$의 경우에는 제한 효소로 *Hind*Ⅲ과 *BamH*Ⅰ을 사용하여 double-digestion 시켜주고 450 bp size의 DNA 절편을 같은 pAED4 발현 벡터에 클로닝하였다. 클로닝을 통해 얻어진 각 $Csps_{Pi}$ 유전자들은 DNA 시퀀싱를 통해 염기 서열을 확인하였다.

[0033] $Csps_{Pi}$의 재조합 플라즈미드들을 competent *E. coli* BL21(DE3) 세포 안으로 형질 전환을 시켜주었다. 형질 전환된 세포들을 100 ㎍/㎖ 앰피실린이 포함된 Luria-Bertani (LB) 배지 플레이트에서 자라게 하였다. 37℃ 에서 성장시킨 플레이트에서 단일 콜로니를 같은 항생물질이 포함된 5 ㎖ liquid LB 배지에 같은 온도에서 오버나잇으로 자라게 하였다. 오버나잇 액체 배양에서 1 ㎖ 을 같은 항생물질이 포함된 새로운 50 ㎖ LB 배지 액체배지에 트랜스퍼하여 같은 온도에서 vigorous shaking 하에 성장하게 하였다. 세포들이 Shimadzu UVmini-1240 UV-vis Spectrophotometers를 이용하여 세포들의 덴시티가 OD_{600} 0.4~0.6 까지 자라게 한 다음, 0.1 mM IPTG를 첨가하여 재조합 단백질들을 유도를 시켜주었다. 그리고 vigorous shaking 상태에서 37℃ 에서 2 시간을 더 자라게 하였다.

[0034] Csp 단백질의 정제를 위하여 1 L 라지 배양을 통해 얻은 세포들을 Hanil Supra 22K 원심분리에서 10,000 rpm으로 원심분리를 하여 세포 수확을 하고 40 ㎖ 의 10 mM potassium dihydrogen phosphate buffer, pH 6.5 에서 재부유시켜 주었다. 세포들 90 % (1 min 30 sec × 1 time) 로 BANDELIN SONOPULS에서 소니케이션하여 라이시스시켜 주고 Hanil Micro 17R+ 원심분리기에서 4℃, 15 분 간 10,000 rpm에서 원심분리를 통해 상등액 분획과 펠렛 분획을 분리하였다. 분리한 상등액 분획들을 4℃ 에서 10 mM potassium dihydrogen phosphate buffer, pH 6.5 를 이용하여 투석을 진행시켜 주었다. 같은 반응 버퍼를 이용하여 preequilibrated 이온 교환 컬럼인 Q-sepharose™ fast flow에 로딩시켜 주었다. 0~1 M NaCl 구배로 elution 하였다. $CspA_{Pi}$ 와 $CspC_{Pi}$ 는 30 kDa의

molecular cut-off를 진행시키는 Centricon 30을 통해 filter를 통과한 분획을 취해 특정의 size-fractionation을 수행하였다.

[0035] 실시예 2: $Csps_{Pi}$-과발현 세포의 저온 저항성 측정

[0036] 2-1. $Csps_{Pi}$-과발현 세포들의 성장 패턴

[0037] $Csps_{Pi}$의 발현 플라즈미드로 competent *E. coli* BL21(DE3) 세포들을 형질 전환을 시켜주고, 세포를 37℃에서 vigorous shaking 상태에서 자라게 한 후 OD_{600} 0.4~0.6 에서 0.1 mM IPTG을 첨가하여 $Csps_{Pi}$를 유도시킨 후에 1시간 별로 UV/visible 분광기를 이용하여 OD 값을 측정하였다.

[0038] 2-2. 콜로니 형성에 대한 $Csps_{Pi}$-과발현의 효과

[0039] Csp_{Pi} 플라즈미드를 함유하는 *E. coli.* BL21(DE3) 세포를 100 ㎍/㎖ 앰피실린이 포함된 LB 배지 플레이트에서 37℃ 로 오버나잇으로 자라게 한 다음 단일 콜로니를 0.1 mM IPTG를 첨가해 준 플레이트와 그렇지 않은 플레이트에 스트리킹하였다. 각 플레이트들을 16℃, 실온, 30℃, 그리고 37℃ 에서 각각 자라게 하였다. 37℃ 에서는 12~18 시간을, 30℃ 에서는 24 시간을, 실온에서는 48 시간을, 그리고 16℃ 에서는 72~80 시간을 자라게 한 후, Csp를 발현하는 균주와 Csp를 발현하지 않는 균주의 성장 정도를 비교하였다.

[0040] 2-3. 반복된 동결 및 해동 사이클에 대한 생존률

[0041] 형질 전환된 세포에 0.1 mM IPTG을 첨가하여 2 시간의 유도를 진행시킨 다음에 각 세포들을 -20 ℃ 에서 2 시간 천천히 얼려주는 과정과 상온에서 30 분 간 천천히 녹여주는 과정을 3회 반복하였다. 각 사이클마다 세포들을 희석시킨 다음에 100 ㎍/㎖ 앰피실린이 포함된 LB 배지 플레이트에 스프리딩하고 37℃ 에서 약 12~15시간을 자라게 하였다. 각 플레이트들에서 자란 콜로니 숫자를 측정하여 세포 생존률을 측정하였다.

[0042] 실시예 3: $Csps_{Pi}$ 돌연변이화

[0043] 3-1. $Csps_{Pi}$ 도메인 스와핑 돌연변이화

[0044] $CspB_{Pi}$가 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$에 비하여 상대적으로 강력한 저온 저항성을 나타내는 것을 관찰하였다. 먼저 $CspB_{Pi}$와 다른 $Csps_{Pi}$의 서열들을 비교하였다. $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$는 다른 기존에 알려진 Csp들과 유사하게 Cold shock domain (CSD) 만으로 이루어진 것에 반하여, $CspB_{Pi}$의 경우에는 N-말단 부위에 엑스트라 도메인 부분을 지니고 있었다. PCR를 통하여 N-말단 엑스트라 도메인을 코딩하는 유전자 부위를 증폭하였다. Primer 서열 : NdeⅠF, CGG GAA TTC AGT TTG CAT ATG TAG ATC AC(서열번호 11); NdeⅠB, GTG ATC TAC ATA TGC AAA CTG AAT TCC CG(서열번호 12), $CspB_{Pi}$NF, GGA ATT CCA TAT GGC AAA ATC GCA GCA GAC CTT TAG(서열번호 13), $CspB_{Pi}$87NB, GAG TAT CCA TAT GAT CTT CTT CGG GAA GGT CTT CTT TTT T(서열번호 14). PCR 조건은 94 ℃에서 1 분, 51 ~ 59 ℃에서 1 분, 68 ℃에서 3분, 30 cycles을 반복하였다. 증폭된 PCR product를 NdeⅠ으로 자른 후 단독으로 pAED4에, 혹은 $CspA_{Pi}$나 $CspC_{Pi}$ 유전자 앞에 클로닝하였다. 제작된 돌연변이체들은 DNA 시퀀싱을 통해 변화된 염기 서열을 확인하였다.

[0045] 3-2. $CspB_{Pi}$ 사이트-디렉티드 돌연변이화

[0046] $CspB_{Pi}$의 CSD의 핵산 결합 부위인 두 곳의 RNP1과 RNP2의 중요한 아미노산을 치환시킨 돌연변이체를 제작하였다. Site-directed mutagenesis에 의해 RNP1의 아미노산 서열 15 번 째의 phenylalanine과 RNP2의 아미노산 서열 28 번 째 (아미노산 번호는 *E. coli* CspA 를 기준으로 하였음) 의 phenylalanine을 각각 arginine으로 치환시켜주었다. 제작된 substitution mutants는 DNA 시퀀싱을 통해 변화된 염기서열을 확인하였다.

[0047] 실시예 4: Oligo(dT)-Binding assays of $Csps_{Pi}$ Oligo(dT)-결합 분석

[0048] 정제한 $Csps_{Pi}$을 oligo(dT)-Cellulose Type 7 beads를 이용하여 핵산 결합을 살펴보는 실험을 수행하였다. 먼저 정제된 $Csps_{Pi}$의 단백질s을 binding buffer (10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 7.4% glycerol) 에 4 ℃ 에서 overnight으로 투석을 하였다. 그리고 oligo(dT)-bead를 멸균된 증류수로 RT, 1 시간을 배양시켜 주었다. 다음으로 30 초의 centrifuge를 통해 상등액을 버리고 결합 버퍼와 혼합을 진행하였다. 다시 30 초의 centrifuge를 통해 상등액을 버리고 정제된 $Csps_{Pi}$ 단백질s (5㎎/㎖) 과의 결합을 진행 시켜주었다. 이 과정은 4 ℃ 에서 4 시간동안 rotation을 진행하였다. Binding buffer를 이용하여 세척 과정을 2 번 반복한 후 15% 또는 20% SDS-PAGE로 확인하였다. 이 과정에서 대조군으로 BSA (0.5 ㎎/㎖) 를 이용하여 $Csps_{Pi}$의 결합 여부를 비교하였다.

[0049] 실시예 5: BX04 (ΔcspA ΔcspB ΔcspE ΔcspG quadruple-deletion strain)의 저온 민감성

[0050] ΔcspA ΔcspB ΔcspE ΔcspG quadruple-deletion 균주(BX04)가 야생형 *E. coli* 균주에 비하여 저온 민감(sensitive)하다고 보고되어있다 (Xia *et al.*, 2001). 따라서 quadruple-deletion strain BX04를 확보하여 cold sensitive 한 것을 확인하기 위하여 LB 배지 플레이트에 스트리킹하여 15℃, RT, 30℃, 그리고 37 ℃에서 자라게 한 후 야생형 균주인 JM83의 성장 패턴과 비교하였다.

[0051] 실시예 6: BX04 by $Csps_{Pi}$에 의한 BX04의 저온 민감성의 컴프리멘테이션

[0052] $Csps_{Pi}$가 ΔcspA ΔcspB ΔcspE ΔcspG quadruple-deletion strain BX04의 저온 민감성을 극복하고 야생현인 strain JM83와 유사하게 저온 저항성을 나타내는 것을 확인하고자 하였다. Quadruple-deletion strain BX04 competent cells에 $Csps_{Pi}$를 형질 전환을 시켜주었다. 형질 전환된 세포를 LB medium plates에서 37℃ 로 오버나잇으로 배양 한 다음 단일 콜로니를 따서 새로운 LB medium plates에 옮겨 16℃, 20℃, 30℃, 그리고 37℃ 에서 배양한 후 성장 정도를 관찰하였다.

[0053] 상기의 실시예는 결과는 다음과 같다.

[0054] 1. $Csps_{Pi}$ 유전자들의 클로닝

[0055] 극지 미생물 *Polaribacrer irgensii* KOPRI 22228의 Cold shock 단백질들 (Csps)이 저온 저항성을 나타내는지, 만일 그렇다면 그 기작을 규명하기 위해 *Polaribacrer irgensii* ATCC 700398 균주의 유전자 서열을 조사한 결과 세 개의 cold shock domain (CSD) conserved sequences를 가지는 유전자를 찾을 수 있었다. CSD은 일반적으로 Csp의 핵산 결합 자리로서 Csp의 기능을 발휘하게 한다 (Jones *et al*,. 1987). *Polaribacrer irgensii* ATCC 700398 균주의 서열들을 중심으로 프라이머를 제작하여 3종의 Cold shock 단백질 ($CspA_{Pi}$, $CspB_{Pi}$, $CspC_{Pi}$) 유전자들을 polymerase chian reaction (PCR)를 이용하여 증폭하였다. PCR은 어닐링 단계에서 온도의 조건을 다르게 해주는 gradient PCR를 이용하였고 각각 다른 53℃, 54℃, 55℃, 그리고 56℃ 에서 모두 특정 산물들을 얻을 수 있었다. 이 과정에서 얻은 각 *csps* 의 DNA 절편들을 DNA 시퀀싱을 통해 염기 서열을 확인하고 각 절편들의 크기를 확인하였다. $CspA_{Pi}$ 유전자와 $CspC_{Pi}$ 유전자의 크기는 189 bp 이며 $CspB_{Pi}$ 유전자의 크기는 450 bp 인 것을 확인하였다 (도 3). 또한 산물들에서 얻은 DNA 절편들의 서열을 *Polaribacrer irgensii*의 유전자 서열들과 비교하였을 때 뉴크레오타이드 서열상 높은 homology를 가지고 있음을 알 수 있었다. 아미노산 서열 역시 높은 homology를 가지고 있었다.

[0056] 2. CspsPi 의 단백질 과발현

[0057] $Csps_{Pi}$의 역할을 알아보기 위해 $Csps_{Pi}$ 유전자들을 발현 벡터인 pAED4에 클로닝하였고, *E. coli* BL21(DE3) 세포들에서 inducible expression을 살펴보았다. Antibiotics가 첨가된 liquid LB medium에 small culture를 통해 600 nm의 optical density가 0.4~0.6 까지 자라게 한 뒤 0.1 mM IPTG을 넣고 4 시간을 더 자라게 하였다. IPTG 첨가 후 0, 1, 2, 4 시간 시료를 채취하여 Csp의 발현을 SDS-PAGE로 확인한 결과 2 시간정도 가장 많은 양이 생성되었다 (도 4). 0.1 mM, 0.5 mM, 1 mM IPTG를 다양하게 첨가하여도 $Csps_{Pi}$의 발현은 여전히 이루어 지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] 3. 세포 성장에 대한 $Csps_{Pi}$-과발현의 효과

[0059] 대조군 발현 벡터인 pAED4를 넣어준 세포에서는 여전히 세포 성장이 잘 진행되어 세포 mass가 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 $Csps_{Pi}$-과발현 세포에서는 pAED4 보다 매우 낮은 수준에서 cell mass가 정체되다가 4~5 시간 후에 다시 성장이 재개되었다 (도 5C). 이러한 결과는 저온 충격 시 4~5 시간 정도 성장이 멈추었다가 다시 재개되는 것과 유사한 패턴을 보였다. 플레이트 상에서의 성장을 살펴보았을 때에도 IPTG가 결핍된 LB plates 에서는 *E. coli* strains이 여전히 세포 성장이 이루어지고 있으며 콜로니의 숫자가 많이 나타나는 것을 볼 수 있었다. 그러나 $Csps_{Pi}$-과발현 세포에서는 세포 성장이 느리게 진행되고 있음을 볼 수 있었다(도 5A). 이 결과로 앞서 보았던 $Csps_{Pi}$-과발현 세포에서는 전사와 번역이 조절되고 있음을 다시 예상해 볼 수 있었다.

[0060] 4. $Csps_{Pi}$의 저온 저항성

[0061] IPTG를 첨가하여 2 시간을 자라게 한 cells을 천천히 얼려주는 과정과 역시 천천히 녹여주는 과정을 반복하는 실험을 수행하였다. 자세히 설명하면 2 시간을 -20 ℃에서 천천히 얼려준 다음에 상온에서 30 분을 천천히 녹여주는 방법으로 3 회 반복 실험을 하였다. 이것은 cell 의 온도의 급변화로 cold shock를 주는 효과와 냉동 상태를 야기 시키는 조건을 만들어 준 것이다. 그 결과 $Csps_{Pi}$-과발현 경우에는 세포 생존이 대조군 발현 벡터인 pAED4에 비해 증가되어 있음을 확인할 수 있었다. 이것으로 $Csps_{Pi}$-과발현 경우에는 저온에 대하여 저항성을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다. 여기서 괄목한 점은 $CspB_{Pi}$는 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$에 비하여 상대적으로 매우 높은 세포 생존률이 나타나서 저온에 강한 저항성을 나타냄을 확인할 수 있었다 (도 6).

[0062] $CspB_{Pi}$가 다른 Csps에 비해 매우 강한 저온 저항성을 나타내므로, 높은 저온 저항성을 나타내게 하는 단백질 부위를 규명하기 위해 먼저 $Csps_{Pi}$의 서열을 비교하였다. $CspB_{Pi}$의 크기가 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$에 비하여 큰 것을 확인하였고 (도 7) 그 차이로 $CspB_{Pi}$는 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$와 달리 CSD가 위치한 C-말단 도메인의 앞부분에 독특한 N-말단 엑스트라 도메인이 위치하고 있음을 알 수 있었다 (도 8A). 이는 기존에 알려진 Csp와도 달리 독특한 구성이며 psychromonas arctia CspA를 예로 들어 비교하였다. 따라서 이 부위의 역할을 검증하기 위하여 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$의 앞부분에 $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인을 붙이고 저온 저항성이 증진되는지 살펴보기로 하였다 (도 8B). $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인을 증폭할 수 있는 프라이머를 제작하고 양 끝에 *Nde* I 제한 자리를 추가적으로 함유시켰다. 그리고 PCR을 이용하여 서브-클로닝하였다. 또한 $CspB_{Pi}$의 CSD의 역할이 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$에 비하여 상대적으로 강한 활성 부위로 존재하는지를 확인하기 위하여 $CspB_{Pi}$의 CSD 중 RNP1과 RNP2의 중요한 서열을 치환시키는 site-directed mutagenesis를 통해 15 번째와 28 번째 아미노산을 Phenylalanine에서 Arginine으로 치환시켜 주었다 (도 8C). 이 site-directed mutagenesis에서 Phenylalanine을 Arginine으로 치환시켜 주는 것은 RNP-modif가 핵산 결합 자리로서 여전히 작용을 하고 있지만 RNA 이차구조를 풀어주는 역할을 없애주기 위함이다.

[0063] $CspB_{Pi}$가 매우 높은 저온 저항성을 나타내는 기작을 이해하기 위하여 상기한 돌연변이체들을 제작하고, 각 돌연변이체들(CspBA, CspBC, CspBN)의 저온 저항성을 측정하였다. 각 $Csps_{Pi}$ 발현 플라즈미드들을 *E. coli* BL21(DE3) 에 형질 전환 시킨 후 액체 배양을 하여 세포의 optical density가 600 nm 에서 0.4~0.6 까지 자라면 0.1 mM IPTG를 첨가하여 발현을 진행하였다 (도 9A~C). 그리고 세포들을 -20℃ 에서 2시간을 얼려주는 과정과 상온에서 30분을 녹여주는 과정을 반복하였다. 그 결과 $CspB_{Pi}$의 N-말단 도메인을 함유하는 모든 돌연변이체들(CspBA, CspBC, CspBN) 에서 $CspB_{Pi}$와 비슷한 정도로 저온 저항성을 나타내는 것을 확인하였다. 심지어는 CSD 없이 N-말단 도메인만 지니는 CspBN의 경우에도 매우 높은 저온 저항성을 나타내었다. 또한 이것은 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$에 비하여 강한 저온 저항성을 나타내는 것을 다시 확인하였다 (도 9D&9F). 따라서 $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인이 저온에 대하여 저항성을 매우 강하게 나타내게 하는 부위로 규명할 수 있었다. 또한 $CspB_{Pi}$의 CSD가 위치한 C-말단 부분의 두 곳의 RNP-modif를 치환시킨 돌연변이체들에서도 매우 높은 저온 저항성을 나타내는 것을 같은 실험 방법으로 확인하였다 (도 9E&9G). 따라서 $CspB_{Pi}$의 핵산 결합 자리가 위치한 C-말단 CSD 부분이

아닌 N-말단 엑스트라 도메인이 저온 저항성을 매우 강하게 나타나게 하는 부위임을 확인하였다.

[0064] 5. CspsPi 단백질 정제

[0065] $Csps_{Pi}$의 기능을 연구하기 위해 $Csps_{Pi}$의 정제 실험을 수행하였다. $Csps_{Pi}$를 과발현한 후 세포 라이시스를 하여 세포 추출물을 얻고, 원심분리를 통하여 $Csps_{Pi}$가 상등액 분획에 위치하고 있음을 확인하였다. $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$의 단백질s은 Q sepharose (Amersham Co.) 상에서 anion exchange column을 통해 부분적으로 정제하였다. $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$ 역시 매우 작은 단백질들이라는 점에 착안하여 centricon 30을 이용하여 size-fractionation을 수행하여 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$를 순수 정제를 하였다.

[0066] 6. $Csps_{Pi}$ 의 Oligo(dT)-결합 분석

[0067] Cold shock 단백질의 cold shock domain에는 단일 가닥 핵산 결합 활성을 가지고 있어 ssRNA나 ssDNA와 결합을 할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그리고 CSD의 RNP modif (RNP1, RNP2) 가 Csp의 핵산 결합 활성을 나타내는데 중요한 역할을 담당한다. 정제한 $Csps_{Pi}$가 핵산 결합 활성을 가지고 있는지 알아보기 위해 oligo(dT)-결합 분석을 수행하였다. 먼저 oligo(dT)-Cellulose를 이용하여 $Csps_{Pi}$이 ssDNA와 결합을 이루는지 살펴보았다. Oligo(dT)는 단일 가닥-poly(T) 뉴크레오타이드들을 가지고 있어서 만일 $Csps_{Pi}$가 단일 가닥 DNA에 결합을 할 수 있는 능력이 있다면 oligo(dT)에 결합하여 레진에 부착될 것이다. 실험 결과 $Csps_{Pi}$ 는 oligo(dT)와 결합을 이룰 수 있음을 확인하였고 대조군으로 사용한 BSA는 oligo(dT)와 결합을 하지 않은 비결합 상태인 것을 확인하였다 (도 10). 즉 $Csps_{Pi}$는 oligo(dT) 서열을 갖는 단일 가닥 DNA 결합 활성을 가지고 있음을 확인하였다.

[0068] 7. 저온-민감성의 컴프리멘테이션

[0069] (ΔcspAΔcspBΔcspEΔcspG) Csp-quadruple-deletion strain BX04 가 저온 저항성을 가지고 있지 않고 cold sensitive 하다라는 보고 (Xia *et al.*, 2001) 를 참고하여 $Csps_{Pi}$가 이 균주의 cold sensitivity를 보완할 수 있는지 확인하기로 하였다. 먼저 Csp quadruple-deletion strain BX04가 cold sensitive 한 정도를 확인하기 위하여 야생형 균주인 JM83 과 나란히 LB plates에 스트리킹하여 16℃, RT, 30℃, 그리고 37 ℃에서 자라게 하였다. 그 결과 30℃ 와 37℃ 에서는 JM83 과 BX04 모두 정상적으로 잘 자라고 있는 것을 관찰하였다 (도 11A & B). 하지만 상온에서는 JM83은 여전히 잘 자라고 있지만 BX04는 세포 성장이 억제되어 천천히 자라고 있고 있음을 관찰할 수 있었다 (도 11C). 온도가 가장 낮은 16 ℃ 에서는 JM83은 다른 온도일 때보다 천천히 자라고 있는 것을 확인하였고 BX04는 거의 자라지 못 한 상태인 것을 확인하였다 (도 11D). 이것은 BX04가 cold sensitive 하다는 것을 보여주었다.

[0070] $Csps_{Pi}$의 저온 저항성을 확인하는 실험과 마찬가지로 $Csps_{Pi}$의 과발현이 BX04에서 저온 저항성을 부여할 수 있는지 실험을 수행하였다. 그 결과 $Csps_{Pi}$를 넣어준 균주는 저온에서의 성장이 증진되어 상온과 15℃에서도 모두 잘 성장하는 것으로 확인하였지만, BX04 자체는 cold sensitive 한 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0071] 도 1은 Bacillus subtilus CspB의 구조를 나타낸 그림. 도 1에서 리본은 β-strand이고, ball & stick 모델 : RNP1, RNP2 잔기들이다.

[0072] 도 2는 Polaribacter irgensii KOPRI 22228의 성장 패턴을 보여주는 그림. *Polaribacter irgensii* 를 Zobell 배지에 도말하여 각각 4 ℃, 10 ℃, 15 ℃, 20 ℃, 25 ℃, 30 ℃, 37 ℃ 에서 일 주일간 배양한 후 colony의 지름을 측정하였다.

[0073] 도 3은 $Csps_{Pi}$ 의 아미노산 서열을 나타내는 그림. $CspA_{Pi}$, $CspB_{Pi}$, $CspC_{Pi}$를 암호화하는 유전자를 PCR을 통하여 클로닝하였다. $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$는 DNA 절편은 189 bp 의 크기를 가지며, 아미노산 서열로 치환하면 63 개의 아미노산으로 이루어진 것을 알 수 있었다. 또한 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$는 상호간 homology가 81%로 높게 나타나는 것을 알 수 있었다. $CspB_{Pi}$의 DNA 절편은 450 bp 크기이고, 아미노산 150 개로 구성된 단백질화하고 있었다. 세 개의

$Csps_{Pi}$ 모두 CSD를 가지고 있으며 2 곳의 RNP-모티프(밑줄로 표시된 부분의 서열) 를 가지고 있음을 확인하였다. RNP-모티프는 CSD의 활성 부위로서 핵산 결합에 직접적으로 관여하는 부위이다.

[0074] 도 4는 $Csps_{Pi}$-과발현의 시간 경과를 보여주는 그림. 미드-로그 phage 세포에 0.1 mM IPTG를 첨가한 후 0 시간, 1 시간, 2 시간, 4 시간 별로 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 를 하여 $Csps_{Pi}$의 과발현을 확인하였다. 대조군 벡터 pAED4를 함유하는 세포에서는 $Csps_{Pi}$-발현이 나타나지 않는데 반하여, $Csps_{Pi}$-발현 벡터를 함유하는 세포에서는 IPTG 첨가 후에 $Csps_{P}$-발현이 진행되는 것을 확인하였다. 발현된 Csp 단백질의 젤 상의 이동 위치를 화살표로 표시하였다. (A) $CspA_{Pi}$-과발현이 진행되어 작은 약 7kDa 의 단백질이 과발현 되었음을 확인하였다. (B) $CspB_{Pi}$-과발현이 진행되어 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$에 비하여 상대적으로 큰 약 22kDa 크기의 단백질이 과발현 되었음을 확인하였다. (C) $CspC_{Pi}$-과발현이 진행되어 $CspA_{Pi}$와 비슷한 분자량의 단백질이 과발현 된 것을 확인하였다.

[0075] 도 5는 세포 성장에 대한 $Csps_{Pi}$-과발현의 효과를 보여주는 그림. (A) $Csps_{Pi}$-과발현이 콜로니 형성에 주는 영향으로, $Csps_{Pi}$-과발현이 진행되면 세포 성장이 서서히 진행되고 콜로니 형성이 억제되는 것을 확인하였다. A의 왼쪽 그림은 -IPTG를 오른쪽 그림은 +IPTG를 나타낸다.(B) 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에서 $Csps_{Pi}$-과발현이 제대로 진행되었는지 확인하였다. 왼쪽 레인부터 M.W., pAED4, $CspA_{Pi}$,$CspB_{Pi}$, $CspC_{Pi}$를 각각 나타낸다.(C) ITPG 첨가 후 1시간별로 600 nm 에서 세포의 optical density를 측정하였다.

[0076] 도 6은 $Csps_{Pi}$-과발현 세포의 저온 저항성을 보여주는 그림. $Csps_{Pi}$-과발현 세포들을 얼려주는 과정과 녹여주는 과정을 반복한 후 시료의 CFU를 측정하여 세포의 생존률을 측정 하였다.

[0077] 도 7은 $Csps_{Pi}$의 다중 서열 배열을 나타내는 그림, $Csps_{Pi}$의 서열을 비교하고 또한 다른 종의 CSD의 활성을 가지게 하는 부위인 RNP1과 RNP2의 서열과 위치를 박스로 표시하였다. Csp의 한 예로 psychromonas arctica CspA의 서열과도 비교하였다. 다른 Csps와 달리 $CspB_{Pi}$는 N-말단 엑스트라 도메인 서열을 가짐을 알 수 있었다.

[0078] 도 8은 $CspB_{Pi}$도메인 스와핑을 보여주는 그림. (A) $CspA_{Pi}$, $CspB_{Pi}$, $CspC_{Pi}$의 도메인 구조를 비교한 것으로, $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$는 CSD 만으로 이루어져 있는데 반하여 $CspB_{Pi}$의 경우에는 CSD의 N-말단에 특유의 엑스트라 서열이 있었다. (B) 도메인-스와핑 디자인으로, $CspB_{Pi}$의 N-말단 엑스트라 도메인을 $CspA_{Pi}$와 $CspC_{Pi}$의 CSD 의 N-말단에 붙여 주는 construct를 디자인하였다. 또한 $CspB_{Pi}$ 의 N-말단 도메인만을 가지고 CSD가 없는 construct도 제작하였다. (C) $CspB_{Pi}$ CSD의 site-directed mutagenesis으로, $CspB_{Pi}$의 CSD의 활성 부위인 RNP1과 RNP2는 핵산 결합 활성을 가지고 있다. RNP1과 RNP2의 중요한 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시켜주는 site-directed mutagenesis를 기획하였다. 15 번째와 28 번째의 Phe을 Arg으로 바꾸어주었다.

[0079] 도 9는 $Csps_{Pi}$ 돌연변이체들의 저온 저항성을 보여주는 그림. (A) $Csps_{Pi}$의 돌연변이체($CspBA_{Pi}$, $CspBC_{Pi}$, $CspBN_{Pi}$, $CspB_{Pi}$ F15R, $CspB_{Pi}$ F28R) 의 발현 확인. 20% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에서 $Csps_{Pi}$ variants의 과발현을 확인하였다. 화살표는 돌연변이체 $Csps_{Pi}$의 이동위치를 표시한다. A에서 왼쪽 레인부터 M.W, pAED4, $CspBA_{Pi}$, $CspBC_{Pi}$, $CspBN_{Pi}$, $CspB_{Pi}$ F15R, $CspB_{Pi}$ F28R(B, C) $Csps_{Pi}$ mutants 의 과발현이 진행되는 시기에 세포 성장이 억제되었다. (D, E) $Csps_{Pi}$ 돌연변이체의 과발현이 진행된 세포들에서 저온 저항성을 확인하기 위해 얼린 후 녹이는 과정을 반복적으로 수행하였다. 그 결과 $Csps_{Pi}$ 돌연변이체-과발현 세포들에서 $CspB_{Pi}$ 과 유사한 정도의 저온 저항성을 나타내는 것을 확인하였다.

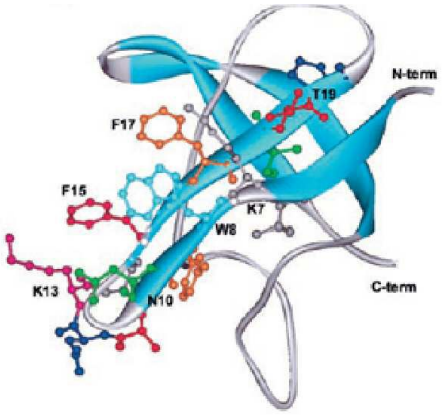
[0080] 도 10은 $Csps_{Pi}$의 Oligo(dT)-결합 분석 그림. $Csps_{Pi}$이 핵산 결합 활성을 가지고 있는 지 oligo(dT)-결합 분석을 수행하여 확인하였다. 정제한 $Csps_{Pi}$를 이용하여 oligo(dT)-beads와 결합을 시켰다. 대조군으로서 BSA를 이용하여 $Csps_{Pi}$의 결합 여부를 비교하였다. 결과는 15% 또는 20% SDS-PAGE로 확인하였다. $Csps_{Pi}$의 위치는 화살표로 표시하였다.

[0081] 도 11은 BX04의 저온 민감성을 보여주는 그림. JM83과 BX04를 LB 플레이트에서 스트리킹하여 배양 하였다. (A) 37℃ 에서 ~18시간 (B) 30℃ 에서 ~24시간 (C) 상온에서 ~48시간 (D) 16℃ 에서 ~80시간 배양함. 각 plate

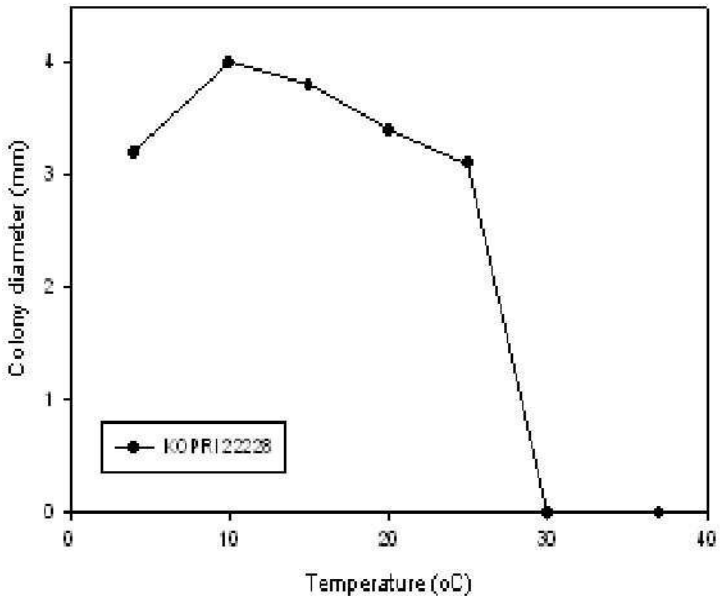
의 좌측 : JM83, 우측 : BX04.

도면

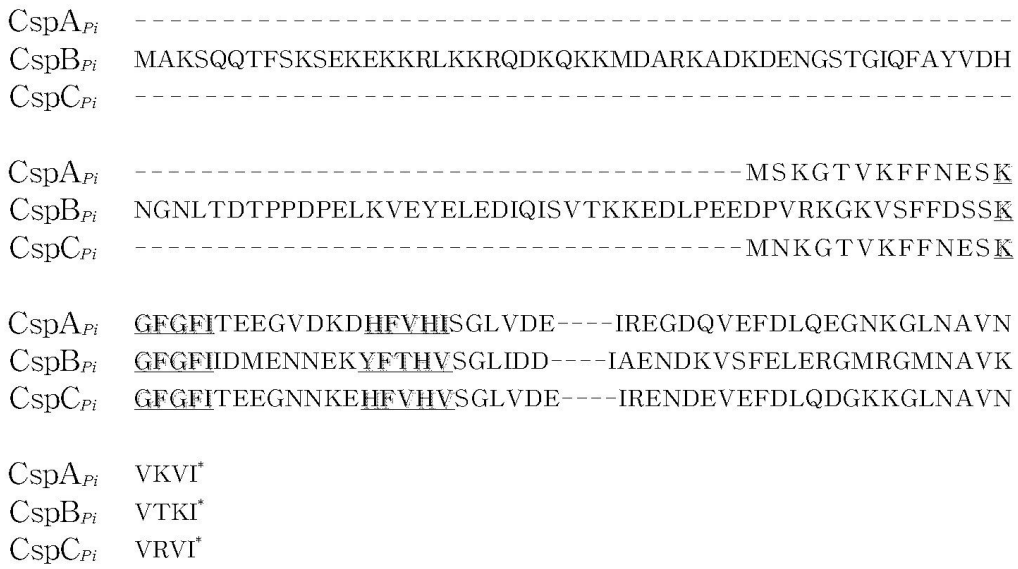
도면1



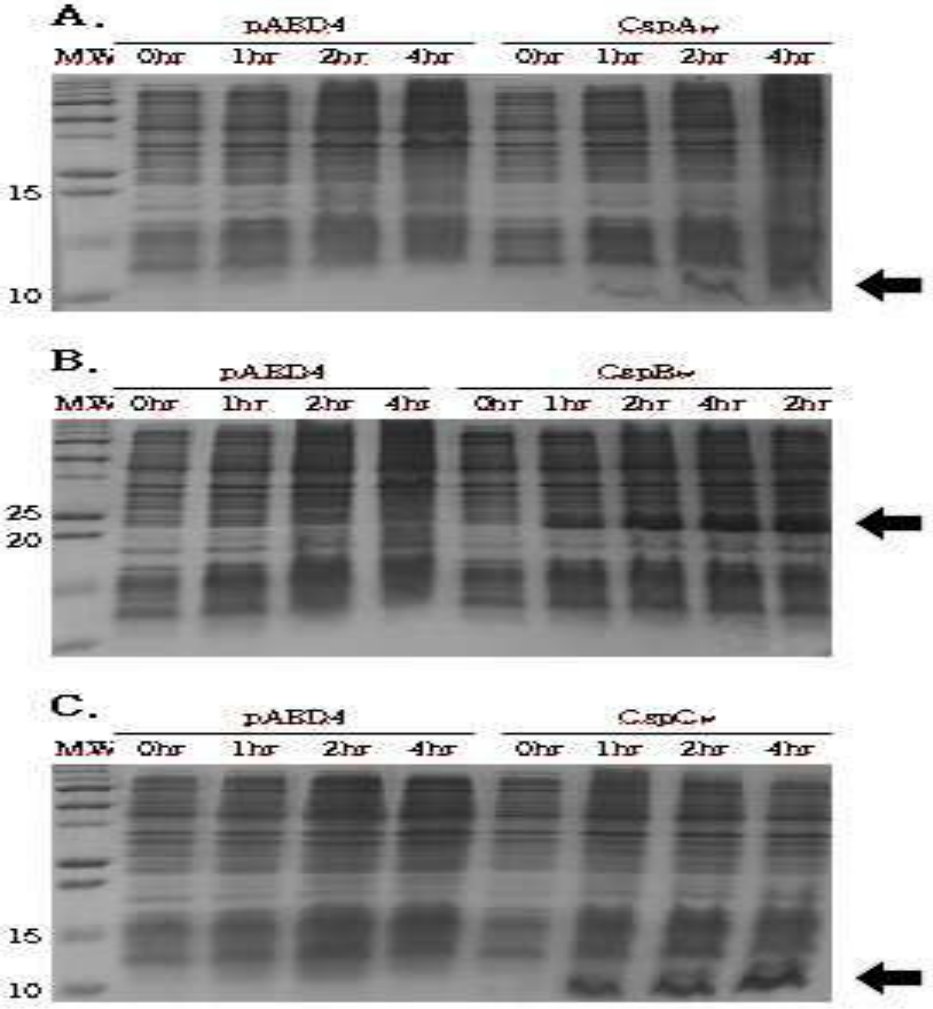
도면2



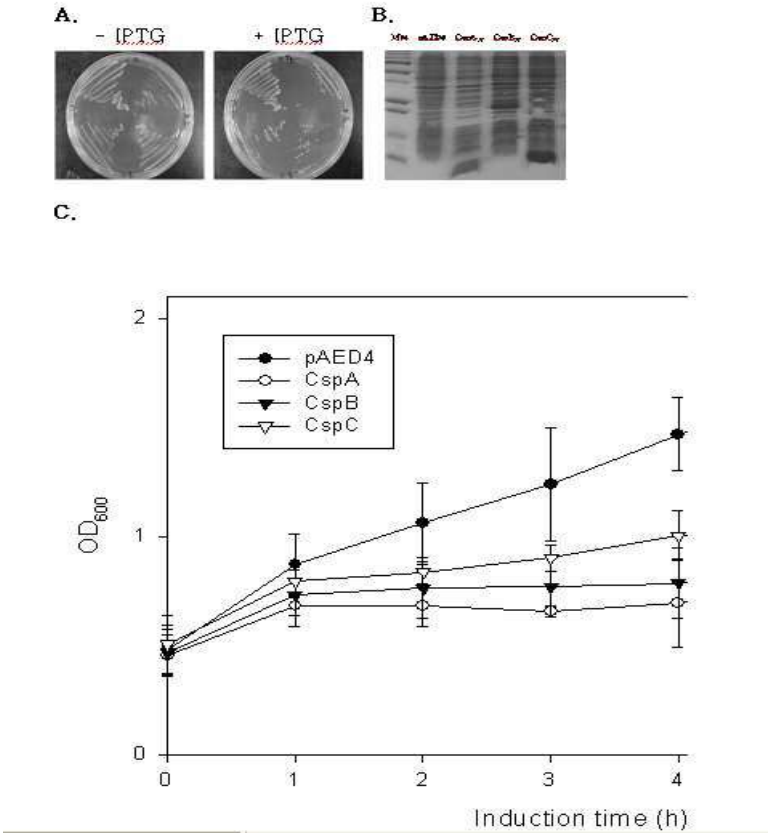
도면3


CspA$_{Pi}$ ----------
CspB$_{Pi}$ MAKSQQTFSKSEKEKKRLKKRQDKQKKMDARKADKDENGSTGIQFAYVDH
CspC$_{Pi}$ ----------
CspA$_{Pi}$ ----------MSKGTVKFFNESK
CspB$_{Pi}$ NGNLTDTPPDPELKVEYELEDIQISVTKKEDLPEEDPVRKGKVSFFDSSK
CspC$_{Pi}$ ----------MNKGTVKFFNESK
CspA$_{Pi}$ GFGFITEEGVDKDHFVHISGLVDE----IREGDQVEFDLQEGNKGLNAVN
CspB$_{Pi}$ GFGFIIDMENNEKYFTHVSGLIDD----IAENDKVSFELERGMRGMNAVK
CspC$_{Pi}$ GFGFITEEGNNKEHFVHVSGLVDE----IRENDEVEFDLQDGKKGLNAVN
CspA$_{Pi}$ VKVI*
CspB$_{Pi}$ VTKI*
CspC$_{Pi}$ VRVI*

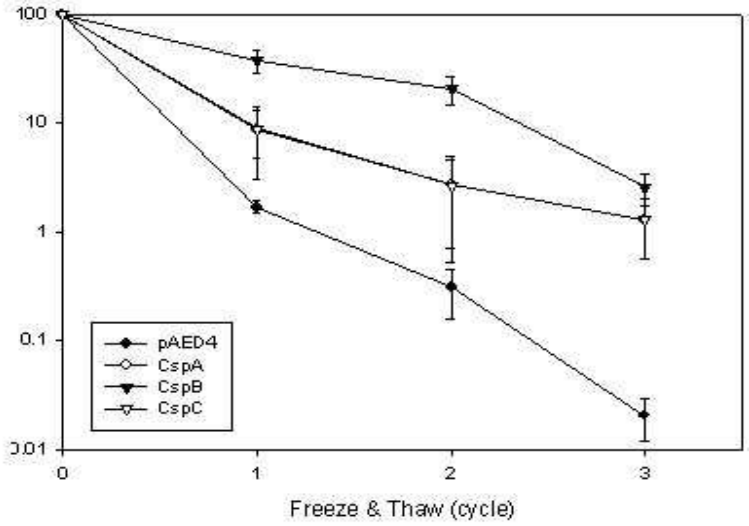
도면4

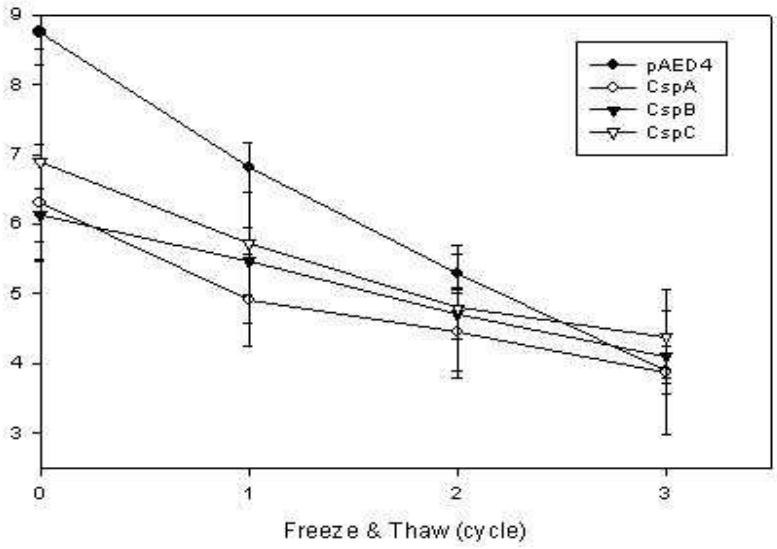

A.
pAED4
CspA
MW
0hr
1hr
2hr
4hr
0hr
1hr
2hr
4hr
15
10
B.
pAED4
CspB
MW
0hr
1hr
2hr
4hr
0hr
1hr
2hr
4hr
2hr
25
20
C.
pAED4
CspC
MW
0hr
1hr
2hr
4hr
0hr
1hr
2hr
4hr
15
10

도면5

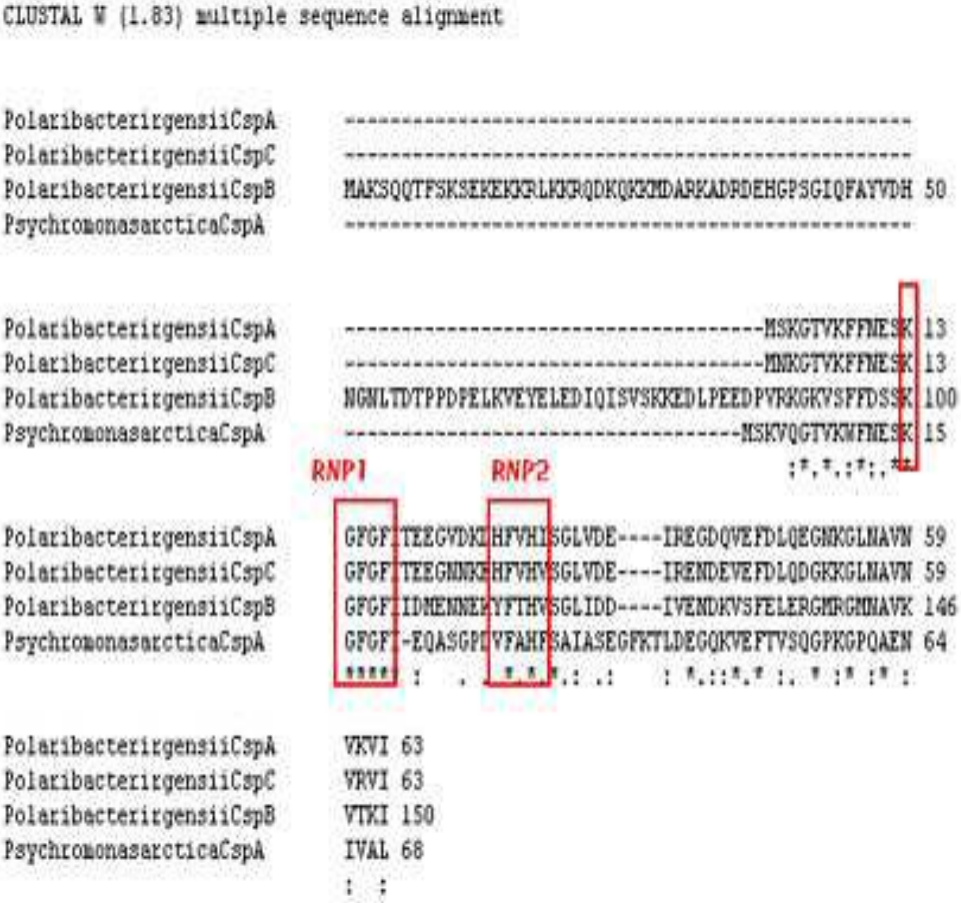

A.
- IPTG
+ IPTG
B.
C.
pAED4
CspA
CspB
CspC
OD600
Induction time (h)
0
1
2
3
4

도면6

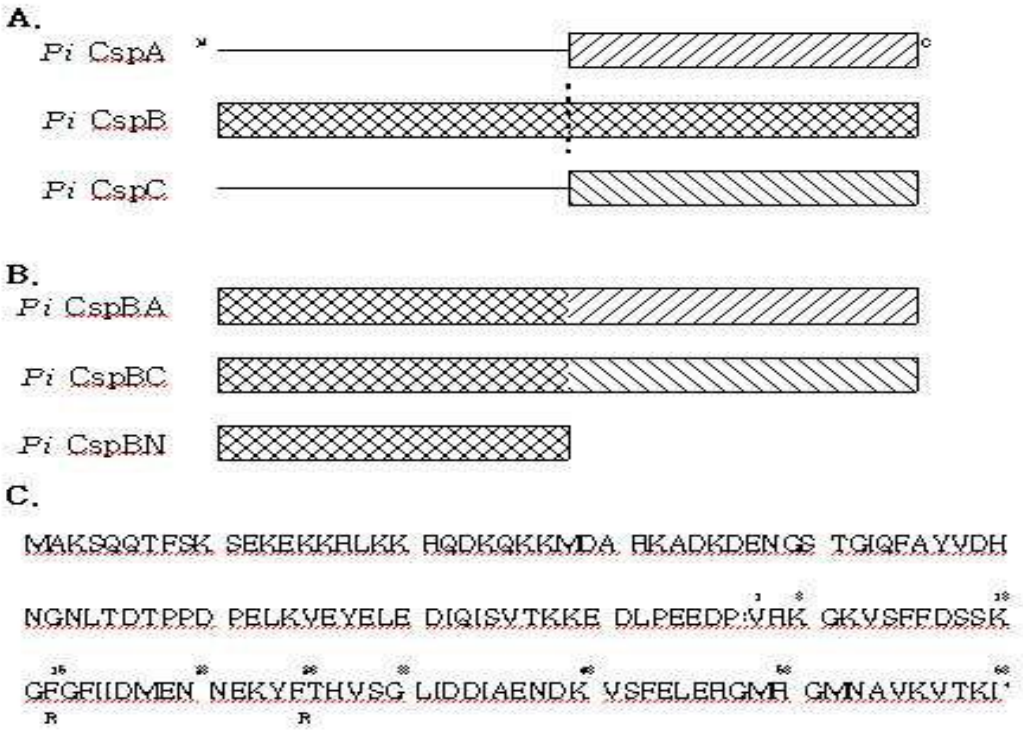

100
10
1
0.1
0.01
0
1
2
3
pAED4
CspA
CspB
CspC
Freeze & Thaw (cycle)


9
8
7
6
5
4
3
0
1
2
3
pAED4
CspA
CspB
CspC
Freeze & Thaw (cycle)

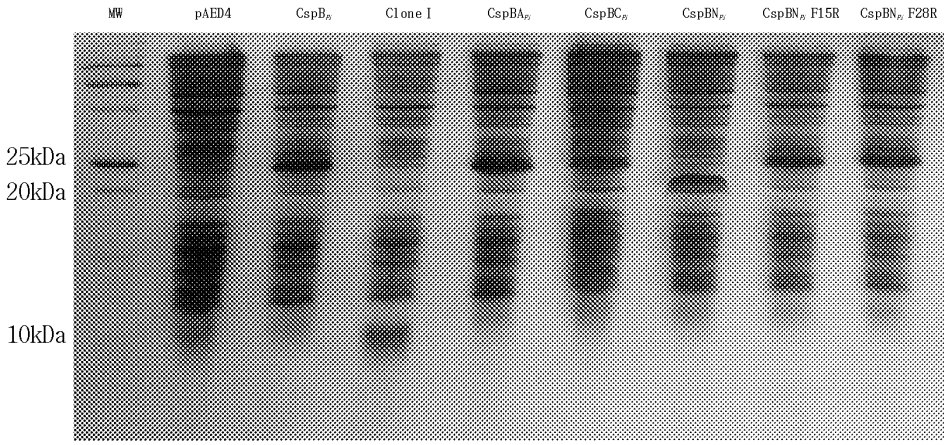
도면7


CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment
PolaribacterirgensiiCspA
PolaribacterirgensiiCspC
PolaribacterirgensiiCspB
PsychromonasarcticaCspA
RNP1
RNP2

도면8

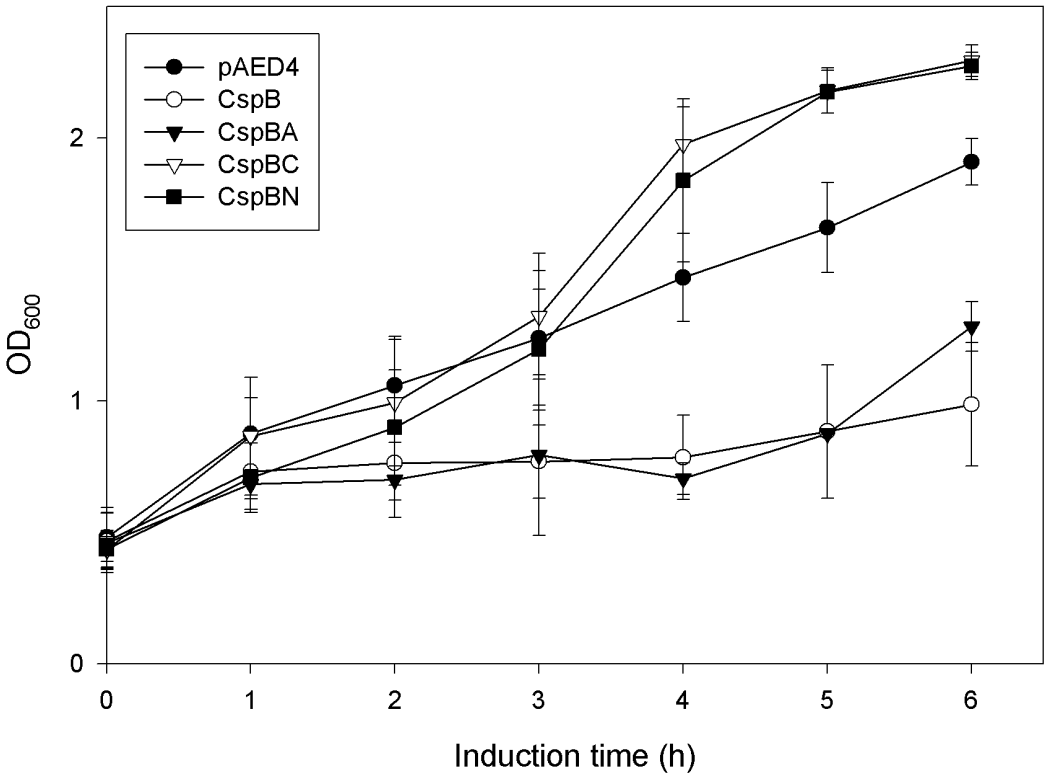


도면9a

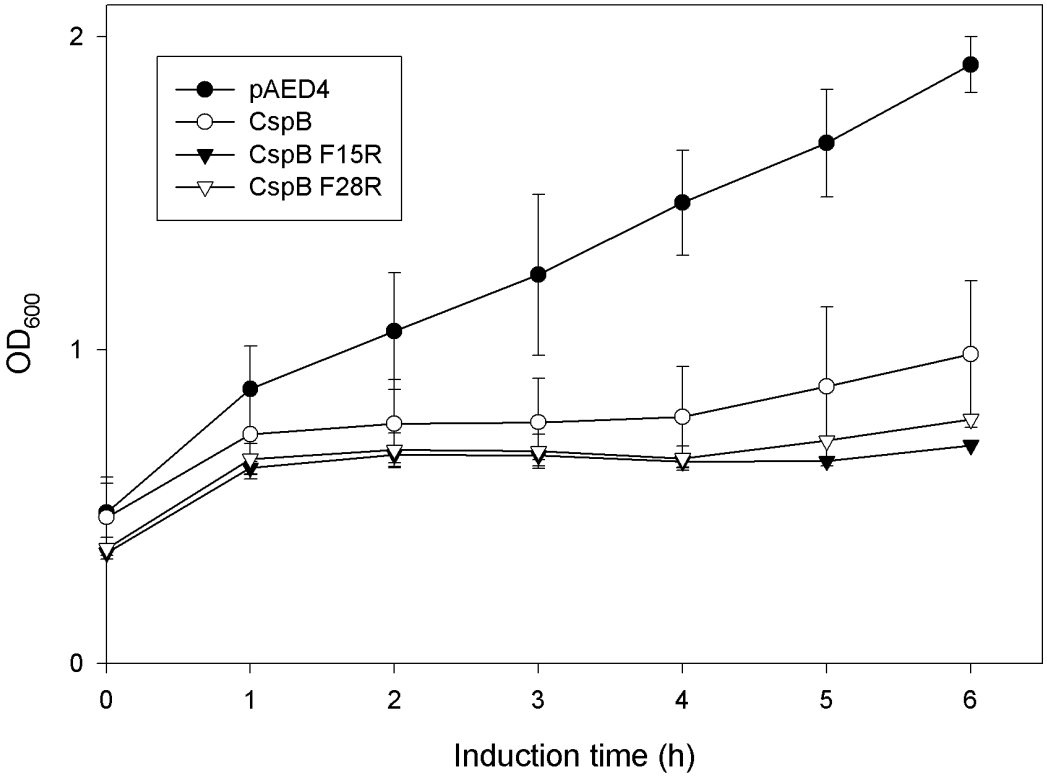


※Clone I : *Psychromonas arctica* CspA

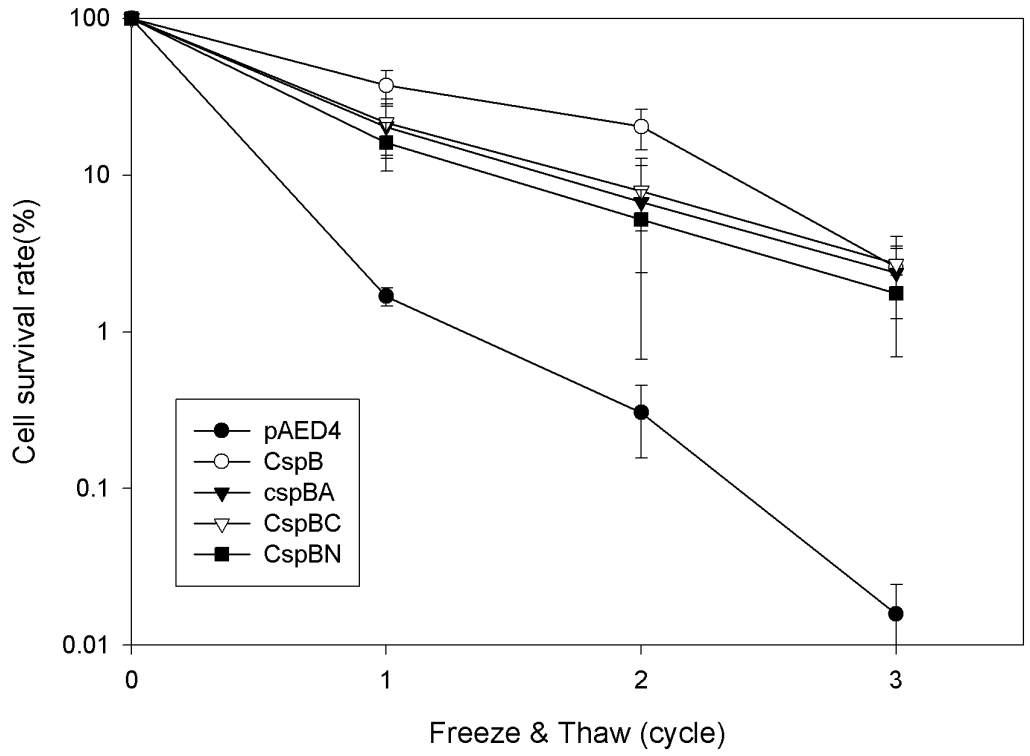
도면9b


pAED4
CspB
CspBA
CspBC
CspBN
OD600
Induction time (h)
0
1
2
3
4
5
6

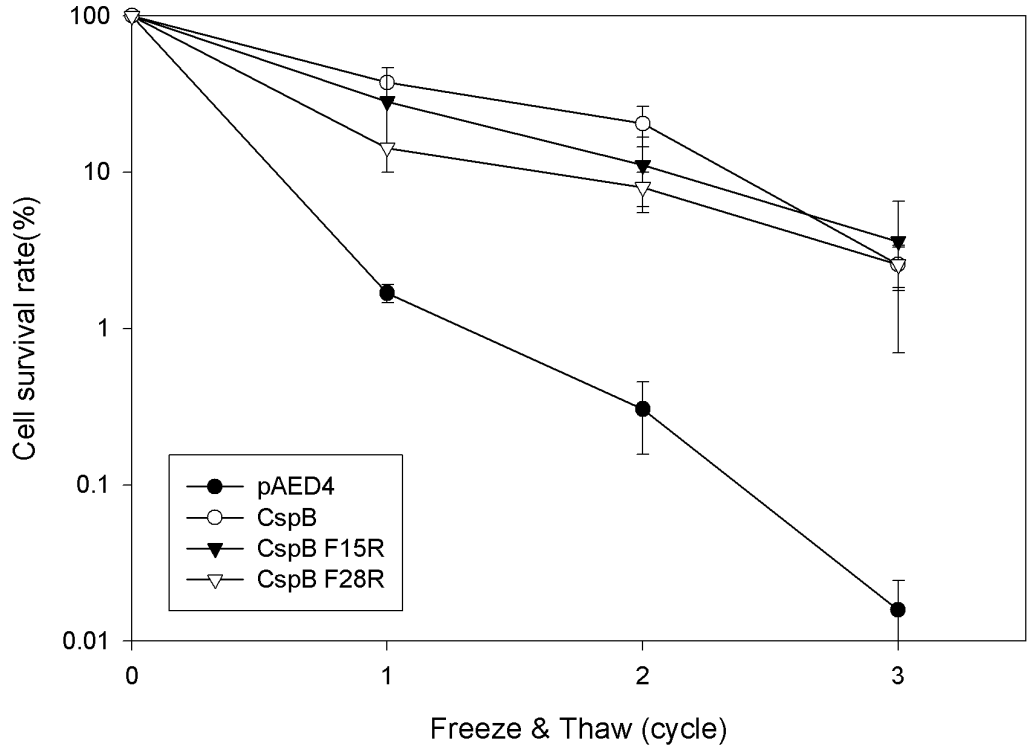
도면9c


pAED4
CspB
CspB F15R
CspB F28R
OD600
Induction time (h)
0
1
2
3
4
5
6

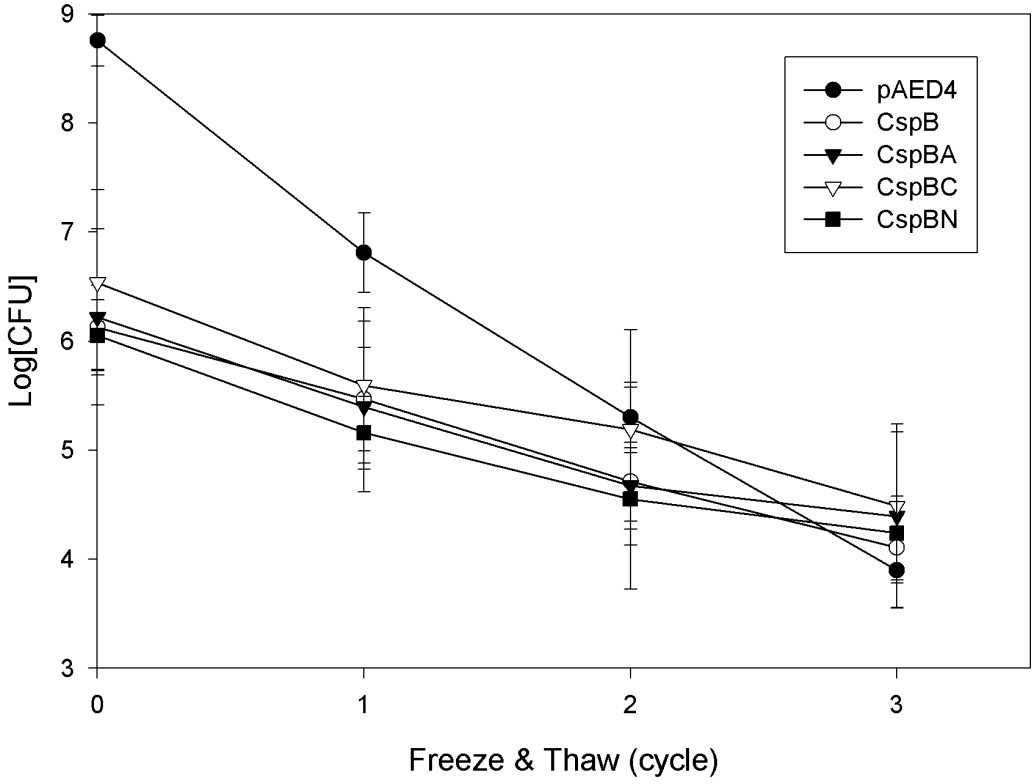
도면9d


100
10
1
0.1
0.01
Cell survival rate(%)
0
1
2
3
Freeze & Thaw (cycle)
pAED4
CspB
cspBA
CspBC
CspBN

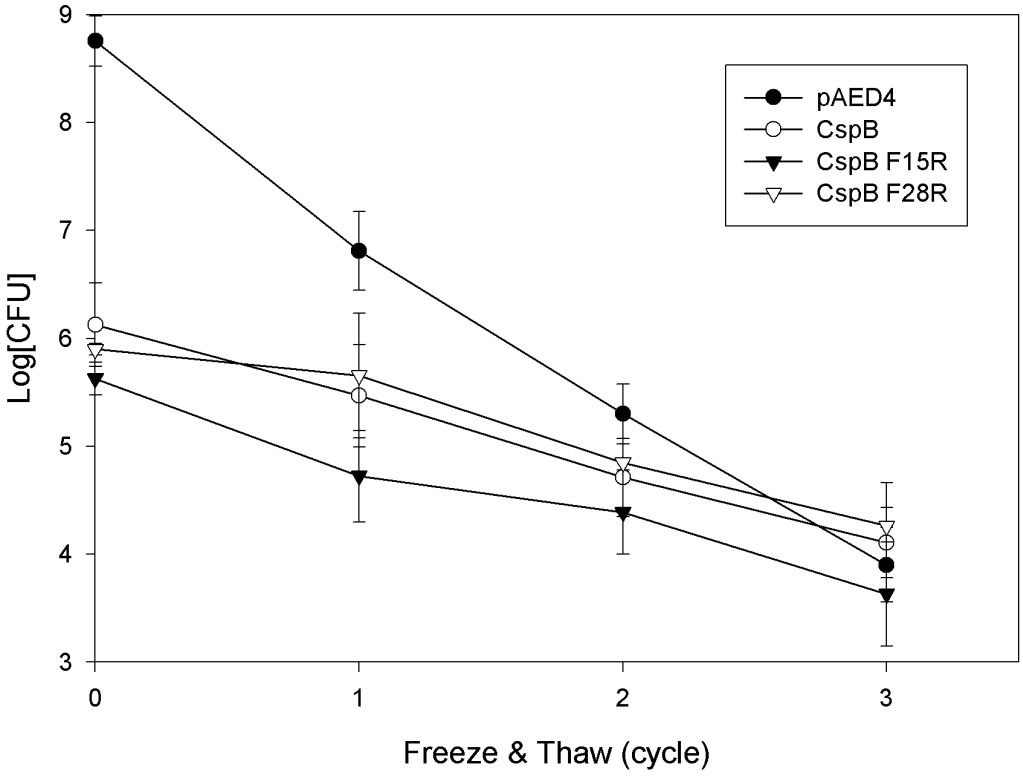
도면9e


100
10
1
0.1
0.01
Cell survival rate(%)
0
1
2
3
Freeze & Thaw (cycle)
pAED4
CspB
CspB F15R
CspB F28R

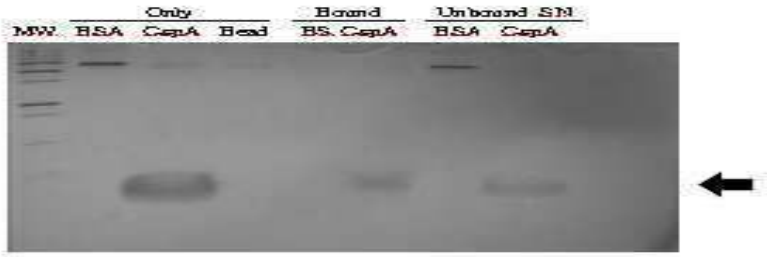
도면9f


pAED4
CspB
CspBA
CspBC
CspBN
Log[CFU]
Freeze & Thaw (cycle)

도면9g

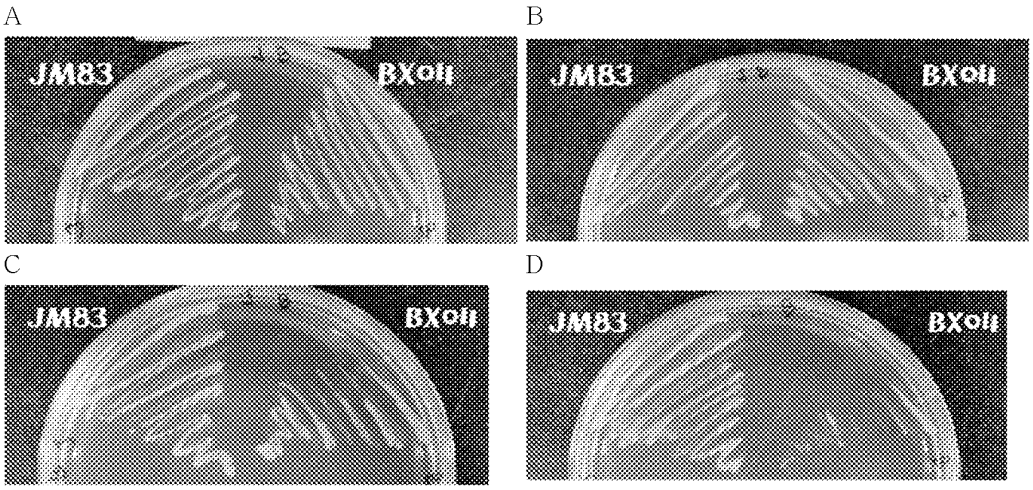

pAED4
CspB
CspB F15R
CspB F28R
Log[CFU]
Freeze & Thaw (cycle)

도면10


Only
Bound
Unbound SN
MW
BSA
CapA
Bead
BS.CapA
BSA
CapA


Only
Bound
Unbound SN
MW
BSA
CapC
Bead
BSA
CapC
BSA
CapC

도면11


A
B
C
D
JM83
BX011
JM83
BX011
JM83
BX011
JM83
BX011

서 열 목 록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
<120> PROTEIN WHICH CONFERS COLD-RESISTANCE

<160> 14

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 87
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> N-terminal extra domain

<400> 1
Met Ala Lys Ser Gln Gln Thr Phe Ser Lys Ser Glu Lys Glu Lys Lys
1 5 10 15

Arg Leu Lys Lys Arg Gln Asp Lys Gln Lys Lys Met Asp Ala Arg Lys
20 25 30

Ala Asp Lys Asp Glu Asn Gly Ser Thr Gly Ile Gln Phe Ala Tyr Val
35 40 45

Asp His Asn Gly Asn Leu Thr Asp Thr Pro Pro Asp Pro Glu Leu Lys
50 55 60

Val Glu Tyr Glu Leu Glu Asp Ile Gln Ile Ser Val Thr Lys Lys Glu
65 70 75 80

Asp Leu Pro Glu Glu Asp Pro
85

<210> 2
<211> 261
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Gene

<400> 2
atggcaaaat cgcagcaaac atttagtaag agtgaaaaag aaaagaaacg tttaaagaaa 60

cgtcaagaca agcaaaagaa aatggacgca agaaaagcgg acaaagatga aaatgggtca 120

acaggaatcc aatttgctta tgtagatcat aatgggaatt taacagatac tccaccagat 180

ccagaattaa aagtagaata cgaattagaa gatattcaga tttctgtaac taaaaaagaa 240

gatctaccag aagaagatcc t 261

<210> 3
<211> 149
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CSP B

<400> 3
Met Ala Lys Ser Gln Gln Thr Phe Ser Lys Ser Glu Lys Glu Lys Lys
1 5 10 15

Arg Leu Lys Lys Arg Gln Asp Lys Gln Lys Lys Met Asp Ala Arg Lys
20 25 30

Ala Asp Lys Asp Glu Asn Gly Ser Thr Gly Ile Gln Phe Ala Tyr Val
35 40 45

Asp His Asn Gly Asn Leu Thr Asp Thr Pro Pro Asp Pro Glu Leu Lys
50 55 60

Val Glu Tyr Glu Leu Glu Asp Ile Gln Ile Ser Val Thr Lys Lys Glu
65 70 75 80

Asp Leu Pro Glu Glu Asp Pro Val Arg Lys Gly Lys Val Ser Phe Phe
85 90 95

Asp Ser Ser Lys Gly Phe Gly Phe Ile Ile Asp Met Glu Asn Asn Glu

100 105 110

Lys Tyr Phe Thr His Val Ser Gly Leu Ile Asp Asp Ile Ala Glu Asn
115 120 125

Asp Lys Val Ser Phe Glu Leu Glu Arg Gly Met Arg Gly Met Asn Ala
130 135 140

Val Lys Val Thr Lys
145

<210> 4
<211> 453
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Gene

<400> 4
atggcaaaat cgcagcaaac atttagtaag agtgaaaaag aaaagaaacg tttaaagaaa 60

cgtcaagaca agcaaaagaa aatggacgca agaaaagcgg acaaagatga aaatgggtca 120

acaggaatcc aatttgctta tgtagatcat aatgggaatt taacagatac tccaccagat 180

ccagaattaa aagtagaata cgaattagaa gatattcaga tttctgtaac taaaaaagaa 240

gatctaccag aagaagatcc tgttagaaaa ggtaaagttt ccttttttga ctcttctaaa 300

ggttttggtt ttattataga tatggagaat aacgaaaaat attttacgca cgttagtggt 360

ttaatagatg atattgcaga aaacgataaa gtttcttttg aattagaaag aggaatgcgt 420

ggtatgaatg cagttaaagt taccaaaata taa 453

<210> 5
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
ttataaccat atgagtaaag gtacagtaaa gtttttca 38

<210> 6
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
cgggatcctt agataacttt tacgttaact gcatttaat 39

<210> 7
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
agtaagctta tggcaaaatc gcagcagacc t 31

<210> 8
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8

ccggatcctt atattttggt aactttaact gcattcatt 39

<210> 9
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 9
ctttattcat atgaataaag gtaccgtaaa atttttcaat g 41

<210> 10
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 10
ctggatcctt atataactct tacgtttact gcgttt 36

<210> 11
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 11
cgggaattca gtttgcatat gtagatcac 29

<210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 12
gtgatctaca tatgcaaact gaattcccg 29

<210> 13
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 13
ggaattccat atggcaaaat cgcagcagac ctttag 36

<210> 14
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 14
gagtatccat atgatcttct tcgggaaggt cttctttttt 40