



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0055677  
(43) 공개일자 2020년05월21일

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C12N 15/86 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)<br/>C07K 14/47 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C12N 15/86 (2013.01)<br/>A01K 67/0275 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0144969</p> <p>(22) 출원일자 2019년11월13일<br/>심사청구일자 2019년11월13일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>1020180139283 2018년11월13일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인<br/>기초과학연구원<br/>대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)</p> <p>(72) 발명자<br/>허원도<br/>대전광역시 유성구 엑스포로123번길 65-38, 210동<br/>501호(도룡동, 스마트시티)</p> <p>김성수<br/>경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 705호(평거동,<br/>들말대경아파트)<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>유미특허법인</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 광감도가 향상된 CRY2 변이체 및 그 용도

(57) 요약

서열번호 1의 N<sub>277</sub>SEGE<sub>281</sub> 서열 중 음전하를 가지는 E279 및 E281 중 적어도 어느 하나를 알라닌(A), 이소류신(I), 류신(L), 발린(V), 페닐알라닌(F), 메티오닌(M), 및 트립토판(W)으로 이루어진 중성 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환하거나, 서열번호 1의 N<sub>277</sub>SEGE<sub>281</sub> 서열 중 S278 및 G280 중 어느 하나를 트립토판(W) 및 페닐알라닌(F)으로 이루어진 별키한 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환한 CRY2 변이체가 제공된다.

대표도 - 도1

```
--1 MKMDKKTIVW FRDLRIEDN PALAAAHEG SVFPVFIWCP EEQGQFYFGR ASRWWWKQSL
-61 AHLSQLKAL GSDTLIKTH NTISAILDCI RVTGATKVVF NHLYPDVSIV RDHTVKEKLV
121 ERGISVQSYN GDLLYEPWEI YCEKGKPFIS FNSYWKKCLD MSIESVMLPP PWRLMPITAA
181 AEAIWACSIE ELGLENEAEK PSNALLTRAW SPGWSNADKL LNEFIEKQLI DYAKNSKKVV
241 GNSTSLSPY LHFGEISVRH VFQCARMQOI IWARDKNSEG EESADLFLRG IGLREYSRYI
301 CFNFPFTHQ SLLSHLRFFP WDADVDFKA WRQGRGTGYPL VDAGMRELWA TGWMHNRIRV
361 IVSSFAVKFL LLPWKWGMKY FWDTLDDADL ECDILGWQYI SGSIPDGHEL DRLDNPALQG
421 AKYDPEGEYI RQWLPELARL PTEWIIHPWD APLTVLKASG VELGTNYAKP IVDIDTAREL
481 LAKAISRTRE AQIMIGAA
```

(52) CPC특허분류

**C07K 14/4703** (2013.01)

**C07K 14/705** (2013.01)

**A01K 2227/105** (2013.01)

**A01K 2267/0318** (2013.01)

**C07K 2319/03** (2013.01)

**C12N 2800/107** (2013.01)

(72) 발명자

**이상규**

서울특별시 서초구 서초대로 17, 619호(방배동, 방  
배대우디오빌)

**경대윤**

인천광역시 연수구 해돋이로120번길 16, 20동 210  
2호(송도동, 송도풍림아이원2단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 IBS-R001-D1-2018-a00

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 기초과학연구원

연구사업명 본원 연구단 연구사업

연구과제명 의식, 인지 및 사회성에 대한 뇌의 기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 기초과학연구원

연구기간 2018.01.01~2018.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 N<sub>277</sub>SEGE<sub>281</sub> 서열 중 음전하를 가지는 E279 및 E281 중 적어도 어느 하나를 알라닌(A), 이소류신(I), 류신(L), 발린(V), 페닐알라닌(F), 메티오닌(M), 및 트립토판(W)으로 이루어진 중성 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환하거나,

서열번호 1의 N<sub>277</sub>SEGE<sub>281</sub> 서열 중 S278 및 G280 중 어느 하나를 트립토판(W) 및 페닐알라닌(F)으로 이루어진 별 키타한 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환한 CRY2 변이체.

#### 청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 E281을 알라닌(A), 이소류신(I), 류신(L), 발린(V), 페닐알라닌(F), 메티오닌(M), 및 트립토판(W)으로 이루어진 중성 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환한 CRY2 변이체.

#### 청구항 3

제1 항에 있어서,

상기 중성 아미노산 그룹은 알라닌(A)인 CRY2 변이체.

#### 청구항 4

제1 항에 있어서,

상기 치환은 E281A를 포함하는 CRY2 변이체.

#### 청구항 5

제1 항에 있어서,

상기 서열번호 1의 카르복시 말단에 아르기닌(R), 아스파르트산(D), 프롤린(P), 아스파라긴(N), 알라닌(A) 및 류신(L)으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 7개 내지 9개의 아미노산으로 이루어진 서열이 삽입된 CRY2 변이체.

#### 청구항 6

제5 항에 있어서,

상기 삽입된 서열은 서열번호 2 내지 서열번호 16인 펩타이드로 이루어진 CRY2 변이체.

#### 청구항 7

제6 항에 있어서,

상기 치환은 E281을 알라닌(A), 이소류신(I), 류신(L), 발린(V), 페닐알라닌(F), 메티오닌(M), 및 트립토판(W)으로 이루어진 중성 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환한 CRY2 변이체.

#### 청구항 8

제6 항에 있어서,

상기 중성 아미노산 그룹은 알라닌(A)인 CRY2 변이체.

#### 청구항 9

제6 항에 있어서,

상기 치환은 E281A를 포함하는 CRY2 변이체.

#### 청구항 10

제6 항에 있어서,

상기 치환은 E281A이고, 상기 삽입된 서열은 서열번호 5 또는 6인 CRY2 변이체

#### 청구항 11

제1 항 내지 제10항 중 어느 한 항의 변이체를 코딩하는 유전자.

#### 청구항 12

제11 항의 유전자를 포함하는 발현벡터.

#### 청구항 13

제12 항의 발현벡터에 의해 트랜스펙션된 트랜스펙션체.

#### 청구항 14

제1 항 내지 제10 항 중 어느 한 항의 CRY2 변이체 및 상기 CRY2 변이체의 N-말단 또는 C-말단에 결합한 STMI1 단백질을 포함하는  $Ca^{2+}$  모듈레이터.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 기재는 광감도가 향상된 CRY2 변이체 및 그 용도에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 단백질의 이량체화(dimerization)은 세포막 수용체, 인산화효소 및 전사인자와 같은 신호전달 경로 단백질을 조절하는 필수적인 분자 메커니즘이다(Ali, M.H. et al., Bioorg Med Chem, Vol. 13, pp. 5013-5020, 2005; Hashimoto, K. et al., Phys Biol Vol. 8, 035007, 2011). 따라서 단백질 이량체화를 조절할 수 있는 합성 도구는 다양한 생물학적 이벤트를 연구하는데 매우 높은 가치를 지니고 있다. 일정 조건하에 단백질 이량체화를 유도하는 가장 널리 사용되는 접근법은 화학적으로 유도된 호모-접합(homo-association) 시스템이다 (Fegan, A. et al., Chem Rev, Vol. 110, pp. 3315-3336, 2010). 다만 낮은 시공간적 해상도와 다양성과 같은 화학 물질의 단점 때문에 단백질 활성의 동적 성질을 연구하는 데 사용하는 것이 제한되어 있다. 상기 단점을 해결하기 위한 하나의 방법은 CRY2의 광 유도 이량체화 특성을 통해 특정 시간 및 공간에서 표적단백질의 이량체화를 조절하는 것이다. (Bugaj, L.J. et al., Nat Methods, Vol. 10, pp. 249-252, 2013; Chang, K.Y. et al., Nat Commun Vol. 5, pp. 4057, 2014; Kim, N. et al. Chem Biol, Vol. 21, pp. 903-912, 2014; Kyung, T. et al., Nat Biotechnol, Vol. 33, pp. 1092-1096, 2015; Nguyen, M.K. et al., Nat Chem Biol, Vol. 12, pp. 431-436, 2016; Taslimi, A. et al. Nat Commun, Vol. 5, pp. 4925, 2014).

[0003] 그러나, 야생형 CRY2 단백질 또는 현재까지 알려진 CRY2 변형체의 이량체화는 제한적인 조건과 높은 광 조사 조건하에서만 가능하다고 알려져 있다(Taslimi, A. et al., Nat Commun Vol. 5, pp. 4925, 2014; Lee, S. et al. Nat Methods Vol. 11, pp. 633-636, 2014; Che, D.L. et al., ACS Synth Biol Vol. 4, pp. 1124-1135, 2015).

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0004] 본 개시는 낮은 조도하에서도 이량체화 반응을 일으킬 수 있는 CRY2 변이체를 제공하고자 한다.

[0005] 본 개시는 CRY2 변이체를 코딩하는 유전자를 제공하고자 한다.

- [0006] 본 개시는 CRY2 변이체를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 제공하고자 한다.
- [0007] 본 개시는 CRY2 변이체를 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터에 의해 트랜스펙션된 트랜스펙션체를 제공하고자 한다.
- [0008] 본 개시는 CRY2 변이체와 융합되어  $\text{Ca}^{2+}$ 의 방출을 광 조사에 의해 제어할 수 있는  $\text{Ca}^{2+}$  모듈레이터를 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

- [0009] 실시예들에 따른 CRY2 변이체는 서열번호 1의  $\text{N}_{277}\text{SEGE}_{281}$  서열 중 음전하를 가지는 E279 및 E281 중 적어도 어느 하나를 알라닌(A), 이소류신(I), 류신(L), 발린(V), 페닐알라닌(F), 메티오닌(M), 및 트립토판(W)으로 이루어진 중성 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환하거나, 서열번호 1의  $\text{N}_{277}\text{SEGE}_{281}$  서열 중 S278 및 G280 중 어느 하나를 트립토판(W) 및 페닐알라닌(F)으로 이루어진 별키한 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환한 CRY2 변이체이다.
- [0010] 실시예들에 따른  $\text{Ca}^{2+}$  모듈레이터는 CRY2 변이체 및 상기 CRY2 변이체의 N-말단 또는 C-말단에 결합한 STIM1 단백질질을 포함한다.
- [0011] 기타 본 발명의 측면들의 구체적인 사항은 이하의 상세한 설명에 포함되어 있다.

### 발명의 효과

- [0012] 실시예들에 따른 CRY2 변이체는 낮은 광 조도하에서도 이량체화될 수 있다. 따라서, 살아있는 세포 내에서 미세한 세포 신호 전달을 효과적으로 조절하는 모듈레이터로 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 야생형 애기장대(Arabidopsis thaliana) 크립토크롬 2(CRY2)의 폴리펩타이드(서열번호 1)이다.
- 도 2는 SWISS MODEL에 의해 예측된 애기장대 CRY2의 인접한 두 개의 돌출 루프를 나타내는 모델 구조이다.
- 도 3은  $\text{Ca}^{2+}$  모듈레이터(CRY2 변이체-STIM1)의 개략도 및 빛에 의한 CRAC( $\text{Ca}^{2+}$  Release Activated  $\text{Ca}^{2+}$ ) 채널의 온/오프 기작을 나타내는 개략도이다.
- 도 4는 CRY2 변이체를 함유하는  $\text{Ca}^{2+}$  모듈레이터에서 Fura-2를 사용하여 측정된 광 자극  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (x-축, 어두운 상태)과  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (y-축, 광 자극)에서의 상관 관계를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 광 자극시 포화 R-GECO1 수준에 도달하기위한 절반 최대 시점 (x- 축)과 각 표시된 변형에 대해 어두운 (y-축)에서 기저 R-GECO1 수준 (각 변형에 대해  $n \geq 100$ ) 사이의 상관 관계를 나타내는 플롯(plot)이다.
- 도 6은 다양한 광 밀도( $1-50 \mu\text{W mm}^{-2}$ )에 기반한 최대 R-GECO1 형광 강도를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 각각의 지시된 광 밀도로 광 자극시의 반응성 세포 집단의 정도를 나타내는 열 도표(Heat Plot)이다.
- 도 8은 상이한 광 밀도로 자극시 유도된  $\text{Ca}^{2+}$  유입 효율을 나타내는 그래프이다.
- 도 9는 다양한 광 밀도에서 평균 최대 R-GECO1 형광 수준을 보여주는 그래프이다.
- 도 10은 맞춤형 경두개 조명 시스템을 나타낸다.
- 도 11은 비 침습적 광 자극에 의한  $\text{Ca}^{2+}$  모듈레이터의 발현 및 활성화를 나타내는 개략도이다.
- 도 12는 c-Fos-양성 세포를 나타내는 이미지들이다.
- 도 13은 OptoSTIM1 변이체를 발현하는 c-Fos-양성 (+) 세포의 정량화된 집단을 보여주는 요약 도표이다. ( $P < 0.0001$ ; Sidak의 테스트).
- 도 14는 두 개의 다른 뇌 영역에서 monSTIM1 활성화가 있거나 없는 c-Fos 염색된 세포의 이미지를 나타낸다.

도 15는 monSTIM1을 발현하는 c-Fos 양성 세포의 백분을 나타내는 그래프이다. ( $P < 0.0001$ ; Sidak's tests).

도 16은 관찰 공포 학습 패러다임을 설명하기 위한 개략도이다.

도 17은 프리징의 평균 시간을 나타내는 요약 데이터이다.

도 18은 24 시간 메모리 테스트 ( $P$  값은 Tukey의 테스트에 의해 결정됨) 동안 프리징 시간을 백분율을 나타내는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하 본 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 실시예들에 대하여 상세히 설명한다. 실시예는 여러가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 여기에서 설명하는 구체적인 실시예로만 한정되지 않는다.
- [0015] 본 개시에서 사용되는 일부 용어들의 정의가 아래에 달리 정의되지 않은 한, 본원에 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 가진다.
- [0016] 본 개시에서 기술된 기법 및 공정들은 일반적으로 통례적인 방법에 따라 수행되며, 이는 본원 전체에 제시된다. 일반적으로, 본 개시에 사용된 명명 및 분자 생물학, 생화학, 분석 화학 및 세포 배양에서의 실험 절차들은 당해 기술 분야에서 널리 공지되어 있으며 통상적으로 사용되는 바와 동일하다.
- [0017] **변이체**
- [0018] 본 개시는 부위 특이적인 돌연변이 유발에 의해 열적으로 안정화된 CRY2 폴리펩타이드를 제공한다. 본 개시에서 는 생물정보 분석 및 컴퓨터를 이용한 단백질 설계를 통해 기존에 알려져 있지 않던 신규 위치에서 가장 최적의 아미노산을 합리적으로 예측한 후 부위-특이적인 돌연변이 유발에 의해 돌연변이를 제조하였다.
- [0019] 도 1은 야생형 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 크립토크롬 2(CRY2)의 폴리펩타이드(서열번호 1)이다.
- [0020] 본 개시에서 용어 '야생형'은 종의 구성원들에서 가장 공통적인 아미노산 서열을 가진 네이티브 CRY2를 의미한다. 본 개시에서, 야생형 CRY2는 아미노산 498개 길이의 (서열번호 1, 도 1) 폴리펩타이드이다.
- [0021] 본 개시에서 '단편'은 CRY2 활성을 가진 CRY2 폴리펩타이드의 기능성 단편을 지칭한다. 또한, 서열번호 1의 서열과 85% 이상의 서열 동일성을 가진 CRY2 폴리펩타이드의 기능성 단편을 지칭한다. CRY2 폴리펩타이드의 단편은 또한 본 발명에 따른 하나 이상의 치환을 적어도 가진다. 적어도 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성이 바람직하다. 단편은 온전한 폴리펩타이드 서열 및 구조의 일부로만 구성되는 폴리펩타이드로 의도되며, 변이체의 C-말단 결손 또는 N-말단 결손이 존재할 수 있다. 이러한 기능성 단편은 본 발명에 따른 대상 CRY2 단백질의 세포 결합 영역과 핵과린 결합 세그먼트를 보유할 수 있다.
- [0022] 본 개시에서 '서열 동일성'은 동일한 아미노산 잔기가 전술한 바와 같은 본 발명에 따른 CRY2 폴리펩타이드에서 발견되는 것을 의미한다. CRY2 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 명시된 연속 세그먼트를 정렬하여 기준 분자에 해당되는 특정 아미노산 서열과 비교하였을 때, 야생형 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) CRY2 폴리펩타이드가 기준으로서 사용된다. 서열 동일성의 %는, 양쪽 서열에서 동일한 아미노산 잔기가 존재하는 위치의 수를 측정함으로써 일치된 위치의 수를 산정하고, 이를 기준 분자와 비교하는 세그먼트의 전체 위치 개수로 나누고, 이에 100을 곱하여, 서열 동일성의 %를 산출함으로써, 계산한다. 서열 정렬 방법은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 본원에 사용되는 기준 서열은 본 발명에 따른 특정 대응되는 야생형 애기장대 CRY2 단백질을 지칭한다. 바람직하게는 서열 동일성은 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상 또는 100%이다. 당해 기술 분야의 당업자라면, 본 발명에 따른 CRY2 단백질의 전장에서 나머지 15% 이하의 아미노산은 예를 들어 CRY2 종의 다른 소스를 이용하거나 또는 당해 기술 분야에 일반적으로 공지된 적합한 비-CRY2 펩타이드 서열 또는 태그의 부가로 인해, 가변적일 수 있음을, 이해할 것이다.
- [0023] 본 발명자는 야생형 애기장대의 CRY2의 이량체 인터페이스에 기여하는 돌출 루프가 CRY2의 광감도와 밀접하게 관련이 있음을 확인하였다. 특히 이량체화된 두 개의 돌출 루프 사이에 밀접하게 접촉하는 5개의 아미노산으로 이루어진 N<sub>277</sub>SEGE<sub>281</sub> 서열이 중요한 역할을 함을 확인하였다. 특히 이들 5개의 아미노산의 상호작용을 감소시킬 경우 이량체화(또는 호모 접합(homo-association))의 광의존성을 감소시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0024] 특히, 이들 서열에서 잠재적인 정전기적 상호 작용을 감소시키기 위해 음전하를 가지는 글루탐산(E279 또는 E281)을 알라닌(A), 이소류신(I), 류신(L), 발린(V), 페닐알라닌(F), 메티오닌(M), 및 트립토판(W)으로 이루어

진 중성 (또는 소수성) 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환함으로써 광감도를 증대할 수 있음을 확인하였다.

[0025] 또한, N<sub>277</sub>SEGE<sub>281</sub>에서 S278 또는 G280을 트립토판(W) 및 페닐알라닌(F)으로 이루어진 별키한 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환함으로써 광감도를 증대할 수 있음을 확인하였다.

[0026] 따라서, 본 개시에서 가능한 변이체는 아래 표 1에 개시된 다양한 변이체 중 어느 하나일 수 있다.

표 1

[0027]

| 돌연변이 개수     | 돌연변이 종류                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 개 위치 돌연변이 | E279A, E279I, E279L, E279V, E279F, E279M, E281A, E281I, E281L, E281V, E281F, E281M, S278W, S278F, G280W, G280F                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 2개 위치 돌연변이  | (E279A, E281A) (E279A, E281I) (E279A, E281L) (E279A, E281V) (E279A, E281F) (E279A, E281M) (E279A, S278W) (E279A, S278F) (E279A, G280W) (E279A, G280F) (E279I, E281A) (E279I, E281I) (E279I, E281L) (E279I, E281V) (E279I, E281F) (E279I, E281M) (E279I, S278W) (E279I, S278F) (E279I, G280W) (E279I, G280F) (E279L, E281A) (E279L, E281I) (E279L, E281L) (E279L, E281V) (E279L, E281F) (E279L, E281M) (E279L, S278W) (E279L, S278F) (E279L, G280W) (E279L, G280F) (E279V, E281A) (E279V, E281I) (E279V, E281L) (E279V, E281V) (E279V, E281F) (E279V, E281M) (E279V, S278W) (E279V, S278F) (E279V, G280W) (E279V, G280F) (E279F, E281A) (E279F, E281I) (E279F, E281L) (E279F, E281V) (E279F, E281F) (E279F, E281M) (E279F, S278W) (E279F, S278F) (E279F, G280W) (E279F, G280F) (E279M, E281A) (E279M, E281I) (E279M, E281L) (E279M, E281V) (E279M, E281F) (E279M, E281M) (E279M, S278W) (E279M, S278F) (E279M, G280W) (E279M, G280F) (E281A, S278W) (E281A, S278F) (E281A, G280W) (E281A, G280F) (E281I, S278W) (E281I, S278F) (E281I, G280W) (E281I, G280F) (E281L, S278W) (E281L, S278F) (E281L, G280W) (E281L, G280F) (E281V, S278W) (E281V, S278F) (E281V, G280W) (E281V, G280F) (E281F, S278W) (E281F, S278F) (E281F, G280W) (E281F, G280F) (E281M, S278W) (E281M, S278F) (E281M, G280W) (E281M, G280F) (278W, 280W) (278W, 280F) (278F, 280W) (278F, 280F) |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3개 위치 돌연변이 | <p>(E279A, E281A, 278W) (E279A, E281A, 278F)(E279A, E281A, 280W) (E279A, E281A, 280F) (E279A, E281I, 278W) (E279A, E281I, 278F)(E279A, E281I, 280W) (E279A, E281I, 280F) (E279A, E281L, 278W) (E279A, E281L, 278F)(E279A, E281L, 280W) (E279A, E281L, 280F) (E279A, E281V, 278W) (E279A, E281V, 278F)(E279A, E281V, 280W) (E279A, E281V, 280F) (E279A, E281F, 278W) (E279A, E281F, 278F)(E279A, E281F, 280W) (E279A, E281F, 280F) ,(E279A, E281M, 278W) (E279A, E281M, 278F)(E279A, E281M, 280W) (E279A, E281M, 280F) (E279I, E281A, 278W) (E279I, E281A, 278F)(E279I, E281A, 280W) (E279I, E281A, 280F) (E279I, E281I, 278W) (E279I, E281I, 278F)(E279I, E281I, 280W) (E279I, E281I, 280F) (E279I, E281L, 278W) (E279I, E281L, 278F)(E279I, E281L, 280W) (E279I, E281L, 280F) (E279I, E281V, 278W) (E279I, E281V, 278F)(E279I, E281V, 280W) (E279I, E281V, 280F) (E279I, E281F, 278W) (E279I, E281F, 278F)(E279I, E281F, 280W) (E279I, E281F, 280F) ,(E279I, E281M, 278W) (E279I, E281M, 278F)(E279I, E281M, 280W) (E279I, E281M, 280F) (E279I, E281M, 280F) (E279L, E281A, 278W) (E279L, E281A, 278F)(E279L, E281A, 280W) (E279L, E281A, 280F) (E279L, E281I, 278W) (E279L, E281I, 278F)(E279L, E281I, 280W) (E279L, E281I, 280F) (E279L, E281L, 278W) (E279L, E281L, 278F)(E279L, E281L, 280W) (E279L, E281L, 280F) (E279L, E281V, 278W) (E279L, E281V, 278F)(E279L, E281V, 280W) (E279L, E281V, 280F) (E279L, E281F, 278W) (E279L, E281F, 278F)(E279L, E281F, 280W) (E279L, E281F, 280F) ,(E279L, E281M, 278W) (E279L, E281M, 278F)(E279L, E281M, 280W) (E279L, E281M, 280F) (E279L, E281M, 280F) (E279L, E281A, 278W) (E279L, E281A, 278F)(E279L, E281A, 280W) (E279L, E281A, 280F) (E279V, E281A, 280F) (E279V, E281I, 278W) (E279V, E281I, 278F)(E279V, E281I, 280W) (E279V, E281I, 280F) (E279V, E281L, 278W) (E279V, E281L, 278F)(E279V, E281L, 280W) (E279V, E281L, 280F) (E279V, E281V, 278W) (E279V, E281V, 278F)(E279V, E281V, 280W) (E279V, E281V, 280F) (E279V, E281F, 278W) (E279V, E281F, 278F)(E279V, E281F, 280W) (E279V, E281F, 280F) ,(E279V, E281M, 278W) (E279V, E281M, 278F)(E279V, E281M, 280W) (E279V, E281M, 280F) (E279V, E281M, 280F) (E279F, E281A, 280F) (E279F, E281I, 278W) (E279F, E281I, 278F)(E279F, E281I, 280W) (E279F, E281I, 280F) (E279F, E281L, 278W) (E279F, E281L, 278F)(E279F, E281L, 280W) (E279F, E281L, 280F) (E279F, E281V, 278W) (E279F, E281V, 278F)(E279F, E281V, 280W) (E279F, E281V, 280F) (E279F, E281F, 278W) (E279F, E281F, 278F)(E279F, E281F, 280W) (E279F, E281F, 280F) ,(E279F, E281M, 278W) (E279F, E281M, 278F)(E279F, E281M, 280W) (E279F, E281M, 280F) (E279F, E281M, 280F) (E279M, E281A, 280F) (E279M, E281I, 278W) (E279M, E281I, 278F)(E279M, E281I, 280W) (E279M, E281I, 280F) (E279M, E281L, 278W) (E27M, E281L, 278F)(E279M, E281L, 280W) (E279M, E281L, 280F) (E279M, E281V, 278W) (E279M, E281V, 278F)(E279M, E281V, 280W) (E279M, E281V, 280F) (E279M, E281F, 278W) (E279M, E281F, 278F)(E279M, E281F, 280W) (E279M, E281F, 280F) ,(E279M, E281M, 278W) (E279M, E281M, 278F)(E279M, E281M, 280W) (E279M, E281M, 280F) (E279M, E281M, 280F)(E279A, S278W, G280W) (E279A, S278F, G280W) (E279A, S278W, G280F) (E279A, S278F, G280F) (E279I, S278W, G280W) (E279I, S278F, G280W) (E279I, S278W, G280F) (E279I, S278F, G280F) (E279L, S278W, G280W) (E279L, S278F, G280W) (E279L, S278W, G280F) (E279L, S278F, G280F) (E279V, S278W, G280W) (E279V, S278F, G280W) (E279V, S278W, G280F) (E279V, S278F, G280F) (E279F, S278W, G280W) (E279F, S278F, G280W) (E279F, S278W, G280F) (E279F, S278F, G280F) (E279M, S278W, G280W) (E279M, S278F, G280W) (E279M, S278W, G280F) (E279M, S278F, G280F) (E279M, S278F, G280F) (E281A, S278W, G280W) (E281A, S278F, G280W) (E281A, S278W, G280F) (E281A, S278F, G280F) (E281I, S278W, G280W) (E281I, S278F, G280W) (E281I, S278W, G280F) (E281I, S278F, G280F) (E281L, S278W, G280W) (E281L, S278F, G280W) (E281L, S278W, G280F) (E281L, S278F, G280F) (E281V, S278W, G280W) (E281V, S278F, G280W) (E281V, S278W, G280F) (E281V, S278F, G280F) (E281F, S278W, G280W) (E281F, S278F, G280W) (E281F, S278W, G280F) (E281F, S278F, G280F) (E281M, S278W, G280W) (E281M, S278F, G280W) (E281M, S278W, G280F) (E281M, S278F, G280F) (E281M, S278F, G280F)</p> |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4개 위치 돌연변이 | (E279A, E281A, S278W, G280W) (E279A, E281I, S278W, G280W) (E279A, E281L, S278W, G280W) (E279A, E281V, S278W, G280W) (E279A, E281F, S278W, G280W) (E279A, E281M, S278W, G280W) (E279I, E281A, S278W, G280W) (E279I, E281I, S278W, G280W) (E279I, E281L, S278W, G280W) (E279I, E281V, S278W, G280W) (E279I, E281F, S278W, G280W) (E279I, E281M, S278W, G280W) (E279L, E281A, S278W, G280W) (E279L, E281I, S278W, G280W) (E279L, E281L, S278W, G280W) (E279L, E281V, S278W, G280W) (E279L, E281F, S278W, G280W) (E279L, E281M, S278W, G280W) (E279V, E281A, S278W, G280W) (E279V, E281I, S278W, G280W) (E279V, E281L, S278W, G280W) (E279V, E281V, S278W, G280W) (E279V, E281F, S278W, G280W) (E279V, E281M, S278W, G280W) (E279F, E281A, S278W, G280W) (E279F, E281I, S278W, G280W) (E279F, E281L, S278W, G280W) (E279F, E281V, S278W, G280W) (E279F, E281F, S278W, G280W) (E279F, E281M, S278W, G280W) (E279M, E281A, S278W, G280W) (E279M, E281I, S278W, G280W) (E279M, E281L, S278W, G280W) (E279M, E281V, S278W, G280W) (E279M, E281F, S278W, G280W) (E279M, E281M, S278W, G280W) |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

[0028] 표 1에서 언급된 다양한 돌연변이 중에서도 E281을 알라닌(A), 이소류신(I), 류신(L), 발린(V), 페닐알라닌(F), 메티오닌(M), 및 트립토판(W)으로 이루어진 중성 (또는 소수성) 아미노산 그룹에서 선택된 어느 하나로 치환하는 돌연변이가 광감도 증대에 가장 효과적이라는 것은 도 2에 도시된 애기장대 CRY2의 인접한 두 개의 돌출 루프 구조(SWISS-MODEL에 의해 예측된 구조)에서 E281이 구조적으로 가장 밀접하게 위치하는 것으로부터 입증된다.

[0029] 한편, 도 1에 예시된 서열번호 1의 카르복시 말단에 아르기닌(R), 아스파르트산(D), 프롤린(P), 아스파라긴(N), 알라닌(A) 및 류신(L)으로 이루어진 그룹에서 선택된 적어도 7개 내지 9개의 아미노산으로 이루어진 삽입 서열(CRY2clust)을 추가로 삽입할 경우 광감도를 보다 더 상승적으로 증대시킬 수 있다.

[0030] 구체적인 삽입 서열(CRY2clust)은 아래 표 2의 서열번호 2 내지 16일 수 있다.

[0031] 이들 삽입 서열(CRY2clust)의 효과에 대해서는 본 발명자의 선행 출원인 KR2019-0000080에 개시되어 있으며 그 내용은 본 명세서내에서 통합된다.

표 2

| 구분                  | 서열번호 | 서열       |
|---------------------|------|----------|
| 9개의 아미노산 삽입<br>(A9) | 2    | ARDPPDLN |
|                     | 3    | ARDPPIDN |
|                     | 4    | ARDPPADN |
|                     | 5    | ARDPPKDN |
|                     | 6    | ARDPPDDN |
| 8개의 아미노산 삽입<br>(A8) | 7    | ARDPDLN  |
|                     | 8    | ARDPIDN  |
|                     | 9    | ARDPADN  |
|                     | 10   | ARDPKDN  |
|                     | 11   | ARDPDDN  |
| 7개의 아미노산 삽입<br>(A7) | 12   | ARDPPDL  |
|                     | 13   | ARDPPDI  |
|                     | 14   | ARDPPDA  |
|                     | 15   | ARDPPDK  |
|                     | 16   | ARDPPDD  |

[0033]  $\text{Ca}^{2+}$  모듈레이터

[0034] 도 3에  $\text{Ca}^{2+}$  모듈레이터의 개략도 및 빛에 의한 CRAC( $\text{Ca}^{2+}$  Release Activated  $\text{Ca}^{2+}$ ) 채널의 온/오프 기작을 나타내는 개략도이다.

[0035] CRAC( $\text{Ca}^{2+}$  Release Activated  $\text{Ca}^{2+}$ ) 채널의 온/오프를 제어할 수 있는 STIM1 (Stromal Interaction Molecule 1) 단백질과 실시예들에 따른 CRY2 변이체를 융합하여  $\text{Ca}^{2+}$  모듈레이터(이하 OptoSTIM1)를 구성할 수 있다. EGFP는

Ca<sup>2+</sup> 모듈레이터의 동작을 형광으로 확인하기 위하여 용합한 단백질이다.

- [0036] 빛(hv)에 의해 CRY2가 이량체화되면 STIM1 또한 호모 결합(homo-association) 되고 호모 결합된 STIM1이 CRAC 채널을 온(open) 시키고 세포 내로 Ca<sup>2+</sup> 이온의 플럭스가 발생한다.
- [0037] 빛에 의한 반응은 가역적(reversible)으로 일어나서 빛을 제거하면 CRY2가 단량체로 분리되고 결국 STIM1 또한 단량체로 분리되어 CRAC가 오프(closed)된다.
- [0038] 실시예들에 따른 Ca<sup>2+</sup> 모듈레이터를 구성하는 실시예들에 따른 CRY2 변이체는 낮은 광 조사만으로도 이량체화가 가능하기 때문에 비침습적인 방식으로 세포에 빛을 조사하여도 동작이 가능하게 된다. 특히, 광감도가 가장 뛰어난 CRY2<sup>E281A</sup>-A9 변이체를 포함하는 Ca<sup>2+</sup> 모듈레이터를 monSTIM1으로 명명한다.
- [0039] STIM1의 구체적인 기작 및 서열은 논문들(Soboloff, J. et al. Nat Rev Mol Cell Biol 13, 549-565 (2012) & Yang, X. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 5657-5662 (2012))에 개시되어 있다.
- [0040] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실험예들을 제시하나, 하기 실험예들은 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 실험방법
- [0042] 플라스미드 구조체(Plasmid Construction)
- [0043] 본 실험예들에서 OptoSTIM1은 CRY2 (아미노산 1-498)의 C- 말단의 광분해효소 상동성 영역 (photolyase homology region, PHR) 및 STIM1 (아미노산 238-668)을 포괄하며, 이들 각각은 대응하는 정방향 및 역방향 돌연변이 유발 올리고뉴클레오타이드와 두 개의 플랭킹(flanking) 프라이머를 사용하는 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통해 돌연변이 유발되었다. CRY2의 폴리머라제 연쇄 반응을 통해 돌연변이 유발되었다. CRY2의 돌연변이 유발에 사용되는 플랭킹 프라이머 및 돌연변이 유발 올리고 뉴클레오타이드는 다음과 같다.
- [0044] 플랭킹 프라이머, 5'-GTA ACC GGT CAT GAA GAT GGA CAA AAA GAC CAT CGT CTG-3 '(정방향) 및 5'-CTC CGC CTC CCC CAC TGA ATT CGG CAG CAC CGA TCA TAA TC-3 '(역방향)
- [0045] E279A, 5'-AAC AGC GCC GGC GAA GAA AGC GCC GAT CTG TTC CTG-3 '(정방향) 및 5'-GCT TTC TTC GCC GGC GCT GTT TTT ATC GCG AGC CCA-3'(역방향)
- [0046] G280W, 5'-AAC AGC GAA TGG GAA GAA AGC GCC GAT CTG TTC C-3 '(정방향) 및 5'-GCT TTC TTC CCA TTC GCT GTT TTT ATC GCG AGC CCA-3'(역방향)
- [0047] E281A, 5'-GAA GGC GCC GAA AGC GCC GAT CTG TTC CTG-3 '(정방향) 및 5'-GCT TTC GGC GCC TTC GCT GTT TTT ATC GCG AG-3' (역방향)
- [0048] CRY2 변이체를 코딩하는 PCR-증폭된 서열을 AgeI 및 EcoRI 부위 또는 BspEI 및 BamHI 부위에서 OptoSTIM1 (CRY2) 벡터에 클로닝하였다. 올리고머 변이체 CRY2olig(E490G) 및 CRY2clust (A9)을 함유하는 OptoSTIM1 또한 동일한 방법으로 구성하였다. CRY2 E281A 및 올리고머 변이체 (E490G 또는 A9)를 모두 갖는 OptoSTIM1의 구축을 위해, CRY2(E281A) 변이체를 암호화하는 서열을 AgeI 및 SacI 부위에서 OptoSTIM1 (CRY2-A9) 또는 OptoSTIM1 (CRY2 E490G)에 삽입하였다.
- [0049] 세포 배양 및 트랜스펙션(Cell culture and transfection)
- [0050] HeLa 세포 및 HEK293T (ATCC)를 가습된 10 % CO<sub>2</sub> 분위기에서 37° C에서 10 % 태아 소 혈청 (FBS; Invitrogen) 이 보충된 DME(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, PAA Laboratories GmbH) 배지에서 유지시켰다. 제조사의 지시에 따라 마이크로포레이터 (Neon Transfection System; Invitrogen) 또는 리포펙타민(Lipofectamine) LTX (Invitrogen)를 사용하여 세포를 트랜스펙션시켰다.
- [0051] 생 세포 이미징(Live-cell imaging)
- [0052] 제조된 세포를 96-웰 폴리머 커버 슬립 바닥 플레이트 (μ- 플레이트 96 웰 ibiTreat; ibidi) 상에 플레이팅하였다. OptoSTIM1 활성화를 위한 청색광 조명을 사용하는 R-GECO1 형광 이미징은 인버티드된 Eclipse Ti body (Nikon)에 장착되고 CFI Plan Apochromat VC 대물 렌즈 (60 × / 1.4 개구수(NA))가 장착된 니콘 AIR 공초점 현미경(Nikon Instruments)과 디지털 줌 니콘 이미징 소프트웨어 (NIS 요소 AR 64 비트 버전 3.21; 실험실 이

미징)을 사용하여 수행하였다. 이미지 처리 동안, Chamlide TC 시스템 (Live Cell Instruments, Inc., Korea)에서 배양함으로써 세포를 10 % CO<sub>2</sub> 및 37 °C로 유지시켰다. 이미징 직전에, 배지를 OPTIMEM (Invitrogen)으로 교체하였다. 청색광 여기(blue light photo excitation) (전력 밀도, 500  $\mu\text{W mm}^{-2}$ )는 488nm 레이저를 5 초 간격으로 1분 동안 전달하였다.

[0053] Fura-2 이미징 및 캘리브레이션

[0054] HeLa 세포를 Fura-2 AM (Invitrogen)과 함께 30 분 동안 실온에서 배양하여 로딩하고, 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide)에 용해시키고, DMEM에서 2  $\mu\text{M}$ 로 희석하고, 각 단계에서 5 분 동안 3 회 세척하였다. LAMBDA DG-4 램프 (Sutter Instrument Company) 및 40x / 0.75 NA CFI Plan Fluor 대물 렌즈를 사용하여 340nm 및 380nm 필터된 형광등으로 간헐적으로 여기하여 Fura-2 이미징을 수행하였다. 510nm 방출 필터를 통과한 방출된 빛은 Nikon DS-Qi1 흑백 디지털 카메라로 수집하였다. 유리  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 는  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = K_{d\text{EGTA}} \times (R - R_{\text{min}})/(R_{\text{max}} - R) \times F380_{\text{max}}/F380_{\text{min}}$  공식에 따라 계산되었으며, 여기서  $K_{d\text{EGTA}}$ 는 Fura-2의 해리 상수이며,  $R_{\text{min}}$  및  $R_{\text{max}}$ 는 체로 프리(zero free)  $\text{Ca}^{2+}$  및 포화  $\text{Ca}^{2+}$ 에서의 비율, 및  $F380_{\text{max}}$  및  $F380_{\text{min}}$ 은 각각 380nm의 여기 파장에 서 체로 프리  $\text{Ca}^{2+}$  및 포화 프리  $\text{Ca}^{2+}$ 에 대한 형광 강도이다.  $K_{d\text{EGTA}}$ 는 제조사의 지시에 따라 Fura-2  $\text{Ca}^{2+}$  이미징 교정 키트 (Invitrogen)를 사용하여 결정하였다.

[0055] 동물실험

[0056] KAIST 동물 관리 및 사용위원회 (대전)의 지침에 따라 모든 마우스를 처리하고 관리하였다. 모든 생체 내 마우스 실험은 Jackson Laboratory에서 구입한 8-13 주령 수컷 C56BL/6J 마우스에서 수행되었다. 마우스를 음식 펠릿 및 물에 자유롭게 접근할 수 있는 우리에 수용하고, 22 °C 및 40 % 습도에서 12 시간 명암주기 (오전 8시 내지 오후 8시)로 유지시켰다. 모든 행동 실험은 하루 중 같은 시간에 명암주기의 광 주기(phase) 동안 수행하였다.

[0057] 렌티바이러스의 준비

[0058] *CaMKII $\beta$*  프로모터를 함유하는 렌티바이러스 벡터에 대한 플라스미드를 플라스미드 구조체 설명에서 설명한 바에 따라 제조하였다. AgeI 및 EcoRI 부위를 사용하여 교환 PCR-증폭된 CRY2 변이체(CRY2<sup>E281A</sup>-A9, CRY2<sup>D387A</sup>)를 pLenti-*CaMKII $\alpha$* -EGFP-CRY2-STIM1로 클로닝함으로써 다른 변이체에 대한 플라스미드를 생성하였다. PacI 및 BamHI 부위를 사용하여 pLenti-*CaMKII $\beta$* -EGFP-CRY2-STIM1에 PCR 증폭된 *GfABC1D* 프로모터를 클로닝 교환함으로써 *GfABC1D* 프로모터를 함유하는 플라스미드를 생성하였다. 렌티바이러스 벡터를 PEI 형질 감염 시약을 사용하여 렌티바이러스 생산에 필요한 VSV-G 및  $\Delta$ 와 함께 HEK293T 세포주 내로 공동 트랜스펙션시켰다. 72 시간 트랜스펙션 후, 상청액을 수집하고 5 분 동안 2,000 rpm으로 원심 분리한 다음 0.45  $\mu\text{M}$  여과 유닛(밀리 포어)을 통해 여과하였다. 렌티바이러스의 정제를 위해, 4 °C에서 2 시간 동안 초 원심 분리(ultracentrifugation)(25,000 rpm)에 의해 수행하였다. 초 원심 분리 후, 상청액을 제거하고 펠릿을 인산 완충 식염수 (PBS)에 재현탁시키고, 분취하여 -80 °C에서 보관하였다. 렌티바이러스의 적정은 제조사의 지시에 따라 Lenti-XTM qRT-PCR 적정 키트 (Takara)를 사용하여 측정하였다. 바이러스 역가는 각각 *CaMKII $\alpha$*  프로모터 함유 OptoSTIM1 및 monSTIM1 바이러스에 대해  $7.88 \times 10^{11}$  및  $2.23 \times 10^{12}$  게놈 카피  $\text{ml}^{-1}$ 이고, *GfABC1D* 프로모터 함유 monSTIM1 및 OptoSTIM1(CRY2<sup>D387A</sup>)에 대해서는  $6.81 \times 10^{11}$  및  $8.42 \times 10^{11}$  게놈 카피  $\text{ml}^{-1}$ 이었다.

[0059] 정위 주사 및 생체 내 광 자기 광 자극 조건

[0060] 8 주령 수컷 C56BL/6J 마우스를 사용하여 정위성 바이러스 주사를 수행하였다. 정위 지침에 따라 수술 절차를 수행하였다. 수술 전에, 수술 도구를 핫 비드 멸균기에서 240°C에서 멸균시켰다. 온도 조절기(Live Cell Instrument)를 사용하여 37 °C로 유지된 모든 마우스를 0.022 ml/g 애버틴(Avertin)으로 마취시키고 정위 장치(Neurostar, Germany)에 넣었다. 다음의 좌표(브레그마에 대한)가 광학 자극을 위해 사용되었다: 체 감각 피질(S1) : 1.0 mm 전후방 (AP), 2.2 mm 중간 측 (ML) 및 -1.2 내지 -0.7 mm 배측 배엽 (DV); ACC : 1.0 mm AP,  $\pm$  0.3 mm ML 및 -1.0 mm DV; 등 해마 (HPC) : -2.0 mm AP, 1.3 mm ML 및 1.8 mm DV; 시상 (TH) : -1.0 mm AP, 1.3 mm ML 및 3.4 mm DV. 렌티바이러스는 10  $\mu\text{l}$  해밀톤 마이크로주사기(Hamilton Avertin Company, USA) 및 33-게이지 주사 바늘(NanoFil Needle Assortment, blunt; World Precision Instruments, USA)을 사용하여 0.075  $\mu\text{l/min}$ 의 속도로 주입하였다. 주사 후, 바늘을 단계적으로 (단계 당 0.2 mm, 각각 1 초) 회수하기 전에

10 분 동안 제자리에 유지시켰다. 주사 후 4 주에, 고체 LED 여기 시스템 (Live Cell Instrument)을 사용하여 전달된 473nm 광을 사용하여 광유전학적 자극(optogenetic stimulation) 실험을 수행하였다. 관찰 공포 학습 및 면역 조직 화학 실험을 위한 빛 조명의 지속 시간은 30 분이었다.

[0061] 조직학적 처리 및 면역조직화학

[0062] 빛 조명 1 시간 후 (어두운 조건에서 수행된 실험을 제외하고) 마우스를 0.022 ml/g의 에버틴으로 마취시키고, 먼저 인산 완충 식염수(PBS) 및 이어서 PBS 내의 4 % 파라포름알데히드 10 ml로 심근 관류하였다(perfused transcardially). 뇌를 추출하고 4 % PFA에서 4 °C에서 밤새 배양하였다. 뇌를 PBS로 옮기고, 진동마이크로톰 (vibratome(Leica))을 사용하여 60- $\mu$ m 관상 슬라이스를 제조하였다. 면역 염색을 위해, 슬라이스를 0.2 % Triton X-100 및 5 % 정상 염소 혈청을 함유하는 PBS에 1 시간 동안 놓은 후, 용액을 0.1 % Triton X-100 및 2 % 정상 염소 혈청을 함유하는 PBS에 희석된 1 차 항체로 교체하였다. 4 °C에서 밤새 인큐베이션 한 후, 슬라이스를 0.2 % 트윈 -20을 함유하는 PBS (각각 10 분)로 5 번 행구고, 2 차 항체와 함께 1 시간 배양하였다. 이어서, 조직 섹션을 0.2 % 트윈 -20을 함유하는 PBS로 세척하고 DAPI (Vector Laboratories)를 함유하는 VECTASHIELD 안티 페이드 장착 매체를 사용하여 현미경 슬라이드에 장착하였다. Nikon AIR 공초점 현미경 (Nikon Instruments)을 사용하여 10x 및 60x 대물 렌즈로 형광 이미지를 캡처 하였다. 모든 60 $\times$  이미지는 이미지 평면 당 3 $\mu$ m 깊이를 비닝(binning)함으로써 z- 스택으로 획득되었다. 면역 조직 화학에 사용된 항체는 다음과 같다. 닭 항-GFP 1 차 항체 (1 : 2000, Thermo Fisher Scientific) 및 Alexa 488-접합 된 항-치킨 2 차 항체(1 : 2000, Thermo Fisher Scientific) 변이체가 EGFP-CRY2(변이체)-STIM1을 염색하기 위해 사용되고, 토끼 폴리클로날 항-c-Fos 1 차 항체 (1 : 1000; Abcam) 및 Alexa 594-접합 된 항-토끼 2 차 항체(1 : 2000; Thermo Fisher Scientific)가 사용되었다. c-Fos<sup>+</sup> 세포를 분석하기 위해, 본 발명자들은 각각의 마우스 샘플에서 5 개 이상의 관상 뇌 부분을 정량하여 DAPI<sup>+</sup> 및 포워딩 EGFP 신호를 함유한 c-Fos<sup>+</sup> 세포의 수를 계산하는데 사용하였다. "Sidak의 다중 비교 테스트"를 사용하여 통계적 유의성을 평가하였다.

[0063] 관찰의 두려움

[0064] 관찰된 공포 컨디셔닝 테스트는 투명한 플렉시 글라스(Plexiglas) 분배기에 의해 2 개의 챔버의 중간에서 분리된 2 개의 동일한 챔버 (18  $\times$  17.5  $\times$  38 cm)로 구성된 챔버에서 수행되었다. 케이지의 바닥은 패시브 피쳐 케이지 (Coulbourn Instruments)와 비슷한 1cm 간격의 스테인리스 스틸 5mm 막대로 구성하였다. 막대 아래의 공간은 실험 중에 소리와 냄새가 공유되도록 하였다. 관찰 공포 학습 실험을 시작하기 전에, 마우스를 3 일에 걸쳐 10 분 동안 처리하였다. 시험 당일, 마우스를 시험 직전에 1 시간 동안 행동 챔버에 습관화시켰다. 경 두개 광 자극(transcranial light stimulation)을 위해, 관찰자 마우스를 30 분 동안 청색광 (1mW cm<sup>-2</sup>)으로 조명 한 후, 다음 챔버에서 다른 마우스(시연자)를 포함하는 장치 챔버로 옮겼다. 시연자로서, 동일한 스테인 (stain)(C57BL/6J)의 10-12 주령 마우스를 사용하였다. 모든 실험에서, 관찰자 및 시연자 마우스는 혈연관계가 없는 마우스이며, 별도의 케이지에 수용되었다. 관찰자 및 시연자 마우스 모두 5 분 동안 장치에 적응시킨 후, 프로그래밍 된 동물 충격기(shocker)(Coulbourn Instruments)를 사용하여 시연자 마우스에만 2 초 쏘크(1 mA)를 10초 간격으로 4 분 동안 전달하였다. 2 일(훈련 후 24 시간)에, 관찰자 마우스를 맥락 기억 시험에 액세스하기 위해 관찰 두려움 학습에 사용된 동일한 챔버에 놓고, 4 분 동안 관찰하였다. 공포 반응은 비디오 기록되고 정량화되었다. 데이터는 맹목적으로 확보되지 않았지만 다른 두 명의 맹검 조사관(blinded investigators)은 결과의 신뢰성을 확인했다. 통계적 유의성은 "투키의 테스트(Tukey's test)"를 사용하여 평가되었다.

[0065] 오픈 필드 테스트

[0066] 시험 세션 직전에 모든 마우스를 시험실에 30분 동안 습관화시켰다. 마우스를 1mW cm<sup>-2</sup>의 전력 밀도에서 1 시간 동안 청색광 (473nm)으로 조명하여 OptoSTIM1을 경 두개로 활성화시키고 30 분 시험 세션 동안 오픈-필드 박스로 순차적으로 옮겼다. 중앙에서 이동 한 총 거리, 속도 및 시간은 자동 적외선 (IR) 감지 시스템 (Optimouse 1)을 사용하여 정량화하였다. 통계적 유의성은 "투키의 다중 비교 테스트(Tukey's multiple comparisons test)"를 사용하여 평가되었다.

[0067] 정량화 및 통계학적 분석

[0068] 니콘에서 제공한 실험실 이미징 소프트웨어인 NIS-요소 AR 64 비트 버전 3.21을 사용하여 이미지를 촬영하고 분석했다. R-GECO1 강도의 변화를 정량화하기 위해 시간 측정 도구를 사용하였다. R-GECO1의 초기 강도는 이전에 사용했던 100 및 500 (A.U.)으로 설정하였다. optoSTIM1 변이체의 활성화에 필요한 빛의 임계 밀도는 R-GECO1

형광 강도 대비 2 배 이상의 변화에 기초하여 결정되었다.

[0069] 광 자극없이 영상화 1 분 이내에 optoSTIM1 변이체를 발현하는 세포에서 R-GECO1 강도의 최대 표준 편차는 0.187973이었다. 따라서, 이전 연구에서 검출 한계에 해당하는, 활성화 한계로 2 배 변화를 취하고  $5\sigma$  보다 큰 기저 R-GECO1 형광 강도를 취하면, 활성화를 검출하는데 있어서 I 형 에러의  $10^{-6}$  확률보다 적을 것이다. 통계적 유의성은 "two-tailed Student's t-test (양측 스튜던트 t-검정)"에 의해 평가하였다.

[0070] 실험결과

[0071] Ca<sup>2+</sup> 기저(basal) 농도 측정

[0072] 도 4는 CRY2 변이체를 함유하는 Ca<sup>2+</sup> 모듈레이터에서 Fura-2를 사용하여 측정된 광 자극 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>(x-축, 어두운 상태)과 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>(y-축, 광 자극)에서의 상관 관계를 나타내는 그래프이다.

[0073] 도 4의 결과로부터, 야생형 CRY2, E297A 변이체 대비 G280W, E281A, A9(서열번호 2), (E281A, E490G) 및 (E281A-A9)의 경우 기저 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>의 농도가 낮은 반면 광 자극에 의한 최대 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>의 농도가 높게 나타나는 것으로 보아 광 기반 이량체에 의한 STIM1의 활성화가 제대로 동작하고 있음을 알 수 있다.

[0074] 활성화 및 비활성화 속도 측정

[0075] 도 5는 광 자극시 포화 R-GECO1 수준에 도달하기 위한 절반 최대 시점 (x-축)과 각 표시된 변형에 대해 어두운 (y-축)에서 기저 R-GECO1 수준 (각 변형에 대해  $n \geq 100$ ) 사이의 상관 관계를 나타내는 플롯(plot)이다.

[0076] 도 5를 참조하면, E281A의 경우 다른 변이체와 비교하여 자극 후 더 높은 최대 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>를 생성했지만, 활성화 ( $Ta_{1/2} = 62$ 초) 및 비활성화( $Td_{1/2} = 7$ 분) 동역학은 원래의 CRY2와 유사함을 알 수 있다. E281A-A9의 경우 비활성화 시간이 가장 높게 나타나는 것을 확인할 수 있다.

[0077] 광민감도 측정

[0078] 도 6 내지 도 9는 광 민감도를 측정한 결과를 나타내는 도면들이다.

[0079] 도 6은 다양한 광 밀도( $1-50 \mu W mm^{-2}$ )에 기반한 최대 R-GECO1 형광 강도를 나타내는 그래프이다. 도 6에서 청색광은 488nm 레이저를 사용하여(각 광 밀도에서 각 변형에 대해  $n \geq 100$ ) 1분 동안 5초 간격으로 각각의 지시된 전력 밀도로 전달되었다

[0080] 도 7은 각각의 지시된 광 밀도로 광 자극시의 반응성 세포 집단의 정도를 나타내는 열 도표(Heat Plot)이다. 도 8은 상이한 광 밀도로 자극시 유도된 Ca<sup>2+</sup> 유입 효율을 나타내는 그래프이다. 도 9는 다양한 광 밀도에서 평균 최대 R-GECO1 형광 수준을 보여주는 그래프이다.

[0081] 도 6 내지 도 9의 결과를 참조하면, N<sub>277</sub>SEGE<sub>281</sub> 서열에서 E279 또는 E281을 돌연변이시킨 경우 낮은 광 밀도에 대해서도 효과적으로 반응하여 남아 있어서 야생의 CRY2 대비 높은 광 감도를 나타냄을 알 수 있다. 그 중에서도 monSTIM1 (CRY2<sup>E281A</sup>-A9)은 발현 세포의 약 47 %가  $1 \mu W mm^{-2}$ 의 광도에 효과적으로 반응하여 남아 있다는 점에서 빛에 훨씬 더 높은 감도를 보였으며, CRY2보다 약 55 배 높은 감도를 나타냄을 확인할 수 있다.

[0082] 비침습적 광 자극

[0083] monSTIM1이 비 침습적 빛 조명에 반응하여 온전한 뇌의 뉴런에서 Ca<sup>2+</sup> 의존적 분자 활성을 유도 할 수 있는지를 확인하기 위하여, 약  $1mW cm^{-2}$ 의 청색광을 마우스의 머리에 전달할 수 있는 LED 솔리드 스테이트 어레이가 케이 지 뚜껑에 부착 된 광 조명 케이지를 설계했다(도 10). 비디오 관독을 통해 빛 자체가 우리 안에 있는 생쥐의 비정상적인 행동이나 운동을 유발하지 않음을 확인했다.

[0084] 이어서, 도 11에 도시되어 있는 바와 같이 비 침습적 광 자극에 의한 Ca<sup>2+</sup> 모듈레이터의 발현 및 활성화를 진행 하였다. S1 피질 영역을 표적으로하는 *CaMKII α* 프로모터 (흥분성 뉴런) 또는 *GFABC1D* 프로모터 (아스트로사이트)의 제어하에 발현된 상이한 OptoSTIM1 변이체로 패키징된 렌티바이러스. 주사 4 주 후, 마우스를 가정용 케

이지에서 LED 광으로 조명하고 이어서 희생시켰다. 다음으로, somatosensory 피질 (S1)의 흥분 뉴런을 OptoSTIM1(CRY2), monSTIM1(CRY2<sup>E281A</sup>-A9), 또는 빛에 둔감 한 OptoSTIM1 (CRY2<sup>D387A</sup>)의 렌티바이러스 구조물로 형질 도입하였다. 4 주 후, 마우스를 피부 또는 면도를 제거하지 않고 30 분 동안 청색광에 노출시킨 후, 1 시간 후에 희생시키고  $Ca^{2+}$ -의존성 즉각적인 초기 유전자 인 c-Fos의 발현 수준에 대해 평가하였다 그 결과가 도 12 및 도 13에 도시되어 있다. 도 12 및 도 13을 참조하면, monSTIM1을 발현하는 마우스는 대조군과 비교하여 c-Fos 발현의 유의미한 유도를 나타내었고, c-Fos 신호는 monSTIM1을 발현하는 세포에 주로 편재되었다. 우리는 다음으로 뇌의 또 다른 주요 세포 유형 인 성상 세포에서 monSTIM1의 기능성을 검증하고자했다. *Gfabc1d* 프로모터의 제어하에 발현된 monSTIM1의 활성화는 c-Fos의 발현을 효율적으로 유도하였다. 구체적으로, c-Fos는 monSTIM1을 발현하는 성상 세포 집단의 74 %에서 검출되는 반면, 대조군은 눈에 띄는 c-Fos 유도를 보이지 않았다.

[0085] 깊은 뇌 모듈레이터로서의 monSTIM1의 적합성을 평가하기 위해, 우리는 대뇌 피질의 자극에 사용된 것과 같은 조건 하에서 해마(HPC)와 뇌의 시상(TH) 영역에서 monSTIM1 표현 성상 세포에서 c-Fos 발현을 조사하였다. 그 결과가 도 14 및 도 15에 도시되어 있다. 도 14 및 도 15의 결과로부터 HPC와 TH 지역에서 각각 monSTIM1을 발현하는 세포 집단의 57 %와 44 %가 광 자극을 이용한 c-Fos 발현을 나타냄을 확인할 수 있었으며, 비침습적인 monSTIM1의 활성을 통해 뇌 내에서  $Ca^{2+}$ 의 유입과 다운 스트림 신호 전달을 효과적으로 유도할 수 있음을 확인할 수 있었다.

#### [0086] 행동 특성 관찰

[0087] 마지막으로, 우리는 비 침습적 인 광 전달을 통해  $Ca^{2+}$  신호의 유도가 살아있는 쥐(awake mice)의 특정 행동에 영향을 미치는지 여부를 조사했다. 우리는 전대상 피질(anterior cingulate cortex, ACC)에서 전압 의존적 L-타입  $Ca^{2+}$  채널 (Cav1.2, *Cacna1c*)의 활동이 생쥐의 사회적 두려움 학습(예: 관찰 두려움 반응)에 관여한다는 것을 이미 입증했다. Cav1.2 유전자의 ACC-제한된 결실을 갖는 마우스는 시냅스 전달 장애 또는 뉴런 흥분성으로 인한 감소된 관찰 두려움을 보여주었다. 그러나,  $Ca^{2+}$  신호의 직접적인 활성화와 관찰의 두려움 사이의 인과 관계는 테스트되지 않았다. 따라서, 본 발명자들은 monSTIM1 또는 광-비민감성 OptoSTIM1(CRY2<sup>D387A</sup>)을 사용하여 ACC에서 흥분성 피라미드 뉴런을 표적으로 삼고 사회적으로 전염된 공포 반응을 조사하였다.

[0088] 도 16은 관찰 공포 학습 패러다임을 설명하기 위한 개략도이다. 이들 실험에서, 관찰자 마우스 만이 홈 케이지에서 30 분 동안 조명되었고, 관찰자 및 시연자 마우스는 투명한 플렉시글라스 파티션에 의해 분리된 관찰 공포 행동 챔버로 이동되었다. 마우스를 5 분 동안 장치에 습관화시키고, 관찰자에서 느낌, 경험의 대리 프리징 반응(vicarious freezing response)을 유발시키기 위해 반복적 인 발 충격을 4 분 동안 10 초 간격으로 시연자에게만 적용하였다. 특히, monSTIM1이 활성화된 마우스는 훈련 기간 (4 분) 동안 상당히 높은 프리징 수준을 나타냈다.

[0089] 24 시간 후, 동일한 컨디셔닝 챔버에 다시 노출된 관찰자들의 데이터를 측정 한 결과가 도 17 및 도 18에 예시되어 있다. 도 17 및 도 18의 결과로부터 동일한 컨디셔닝 챔버에 노출된 관찰자 마우스는 대조군 마우스와 비교하여 증가된 맥락 공포 기억을 보였으며, 이는 ACC에서  $Ca^{2+}$  신호가 단기간 및 장기간의 사회적 공포 반응에 기여했음을 알 수 있다. ACC에서 monSTIM1의 활성화가 오픈 필드 테스트에서 운동 능력이나 공포와 유사한 행동을 유발하지 않았음을 감안할 때, ACC에서 monSTIM1 매개  $Ca^{2+}$  유도가 선택적으로 생쥐에서 사회적으로 전염된 공포 반응을 증대시킨다는 것을 알 수 있다.

[0090] 이들 실험으로부터 CRY2의 변이체를 적용한  $Ca^{2+}$  모듈레이터가 뛰어난 광 감도 및 기저  $[Ca^{2+}]_i$ 의 최소한의 변화를 보여주는 것을 확인할 수 있었다. 이로부터 비 침습성 광 전달 시스템으로 monSTIM1을 충분히 활성화시켜 뇌 영역의 뉴런 및 성상 세포에서 후속  $Ca^{2+}$  신호 전달을 유도하여 특정 뇌 기능 및 상응하는 동물 행동의 조절을 가능하게 하는 것을 확인할 수 있었다.

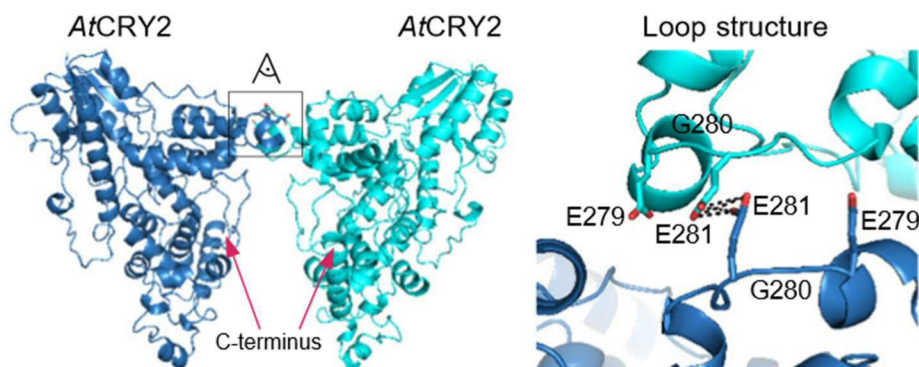
[0091] 상기에서는 실험예에 대하여 설명하였지만, 권리범위는 이에 의해 한정되는 것이 아니다. 구현되는 형태는 발명의 상세한 설명 및 첨부한 도면의 범위 안에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고 이 또한 권리 범위에 속하는 것은 당연하다.

## 도면

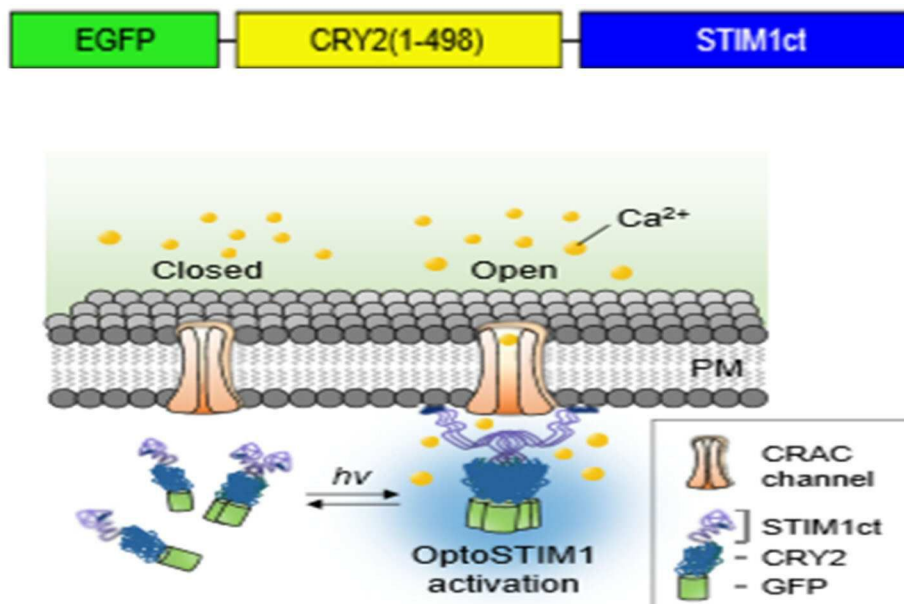
### 도면1

```
--1 MKMDKKTIVW FRRDLRIEDN PALAAAAHEG SVFPVFIWCP EEEGQFYFGR ASRWWMKQSL
-61 AHLSQLKAL GSDLTLIKTH NTISAILDCI RVTGATKVVF NHLYDPVSLV RDHTVKEKLV
121 ERGISVQSYN GDLLYEPWEI YCEKGKPFST FNSYWKKCLD MSIESVMLPP PWRLMPITAA
181 AEAIWACSIE ELGLENEAEK PSNALLTRAW SPGWSNADKL LNEFIEKQLI DYAKNSKKVV
241 GNSTSLSPY LHFGEISVRH VFQCARMKQI IWARDKNSEG EESADLFLRG IGLREYSRYI
301 CFNFPFTHEQ SLLSHLRFFP WDADVDFKA WRQGRTGYPL VDAGMRELWA TGMWHRIRV
361 IVSSFAVKFL LLPWKWGMKY FWDTLDDADL ECDILGWQYI SGSIPDGHEL DRLDNPALQG
421 AKYDPEGEYI RQWLPELARL PTEWIIHPWD APLTVLKASG VELGTNYAKP IVDIDTAREL
481 LAKAISRTRE AQIMIGAA
```

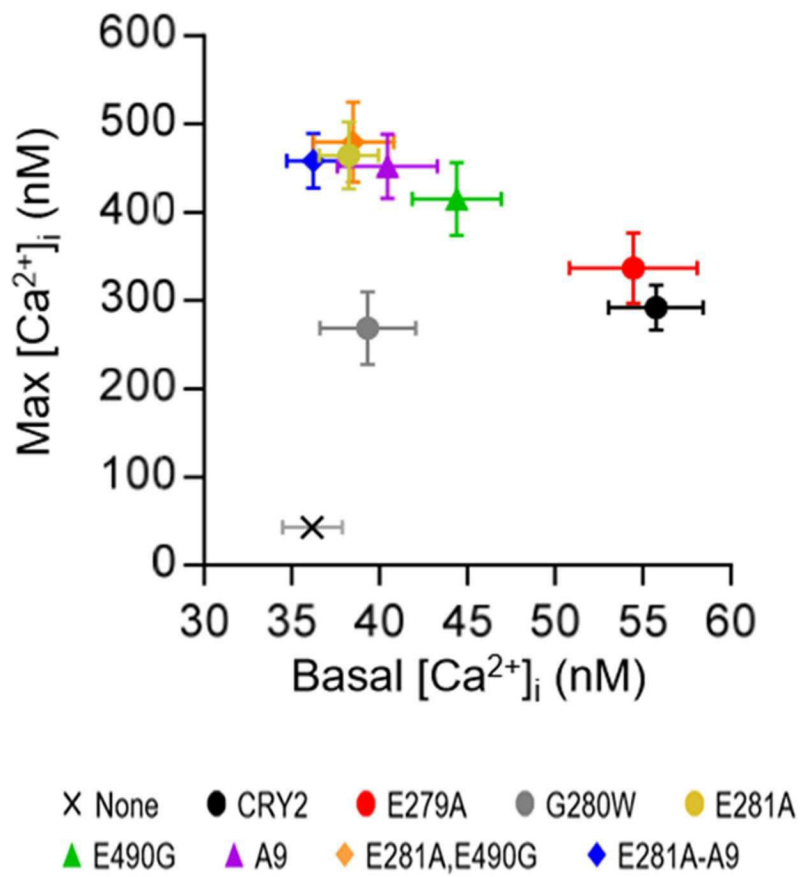
### 도면2



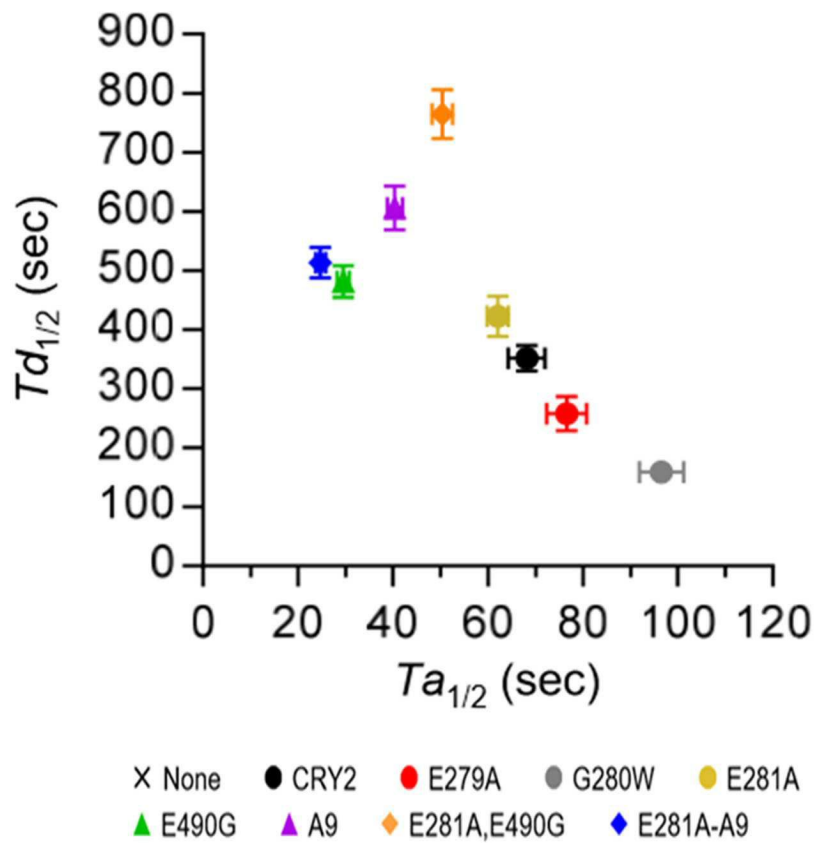
### 도면3



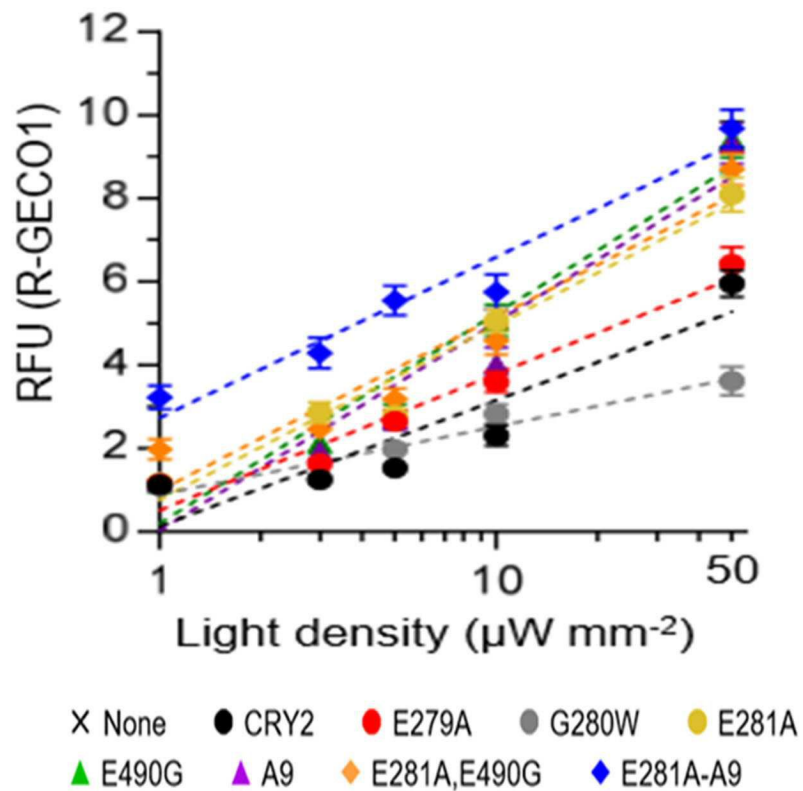
도면4



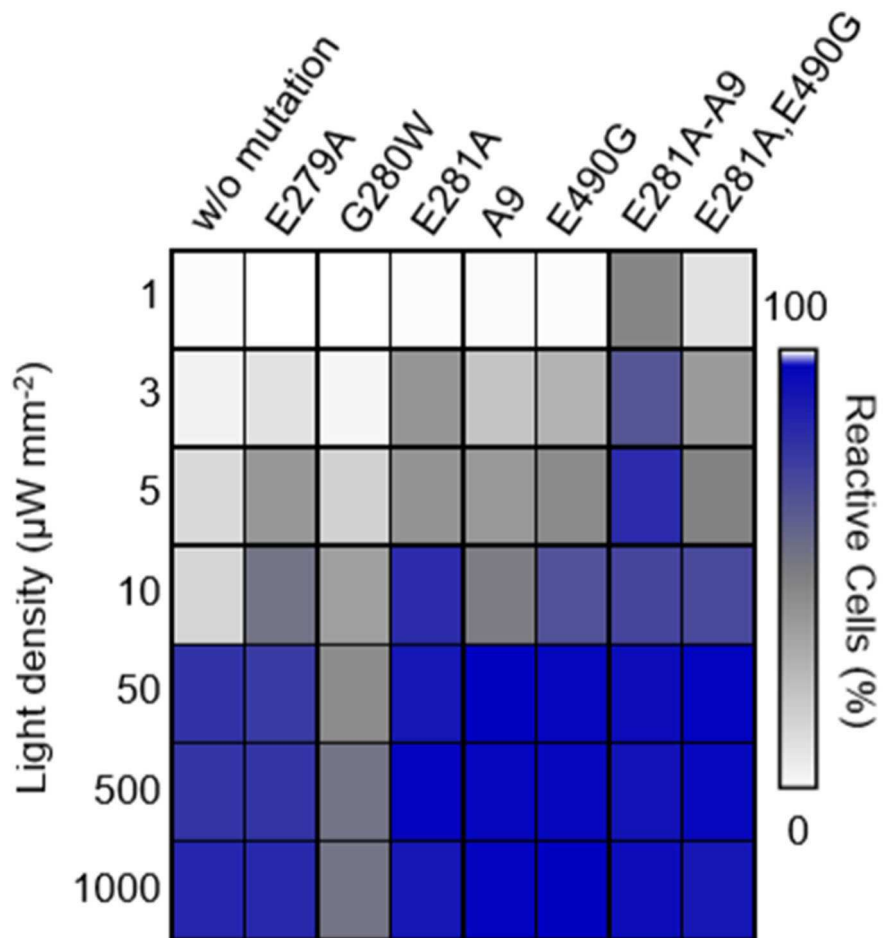
도면5



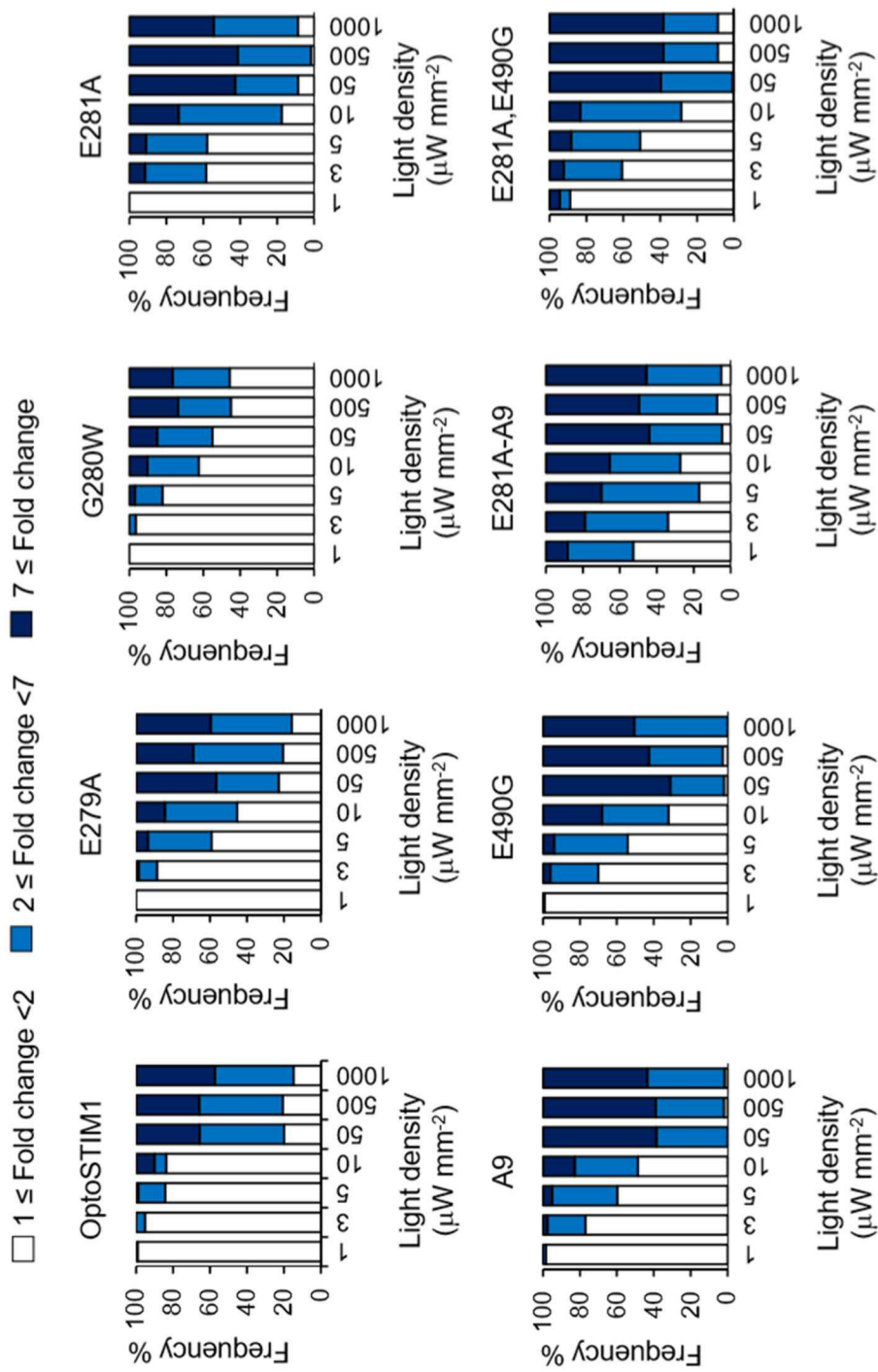
도면6



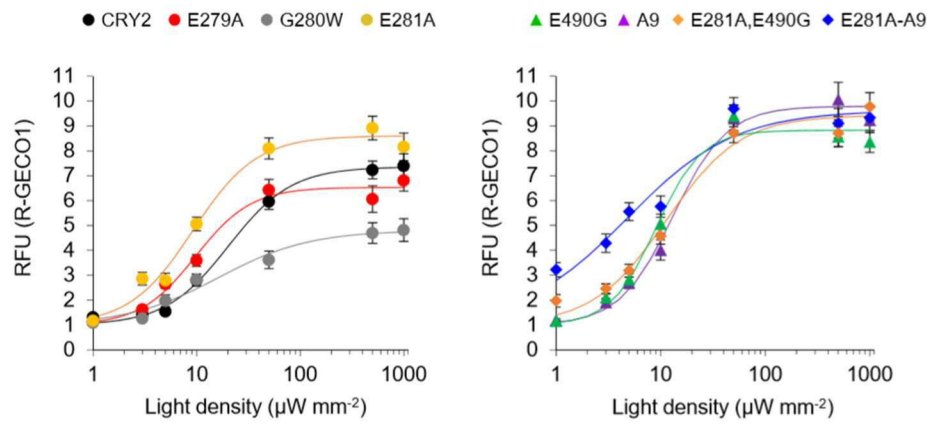
도면7



도면8



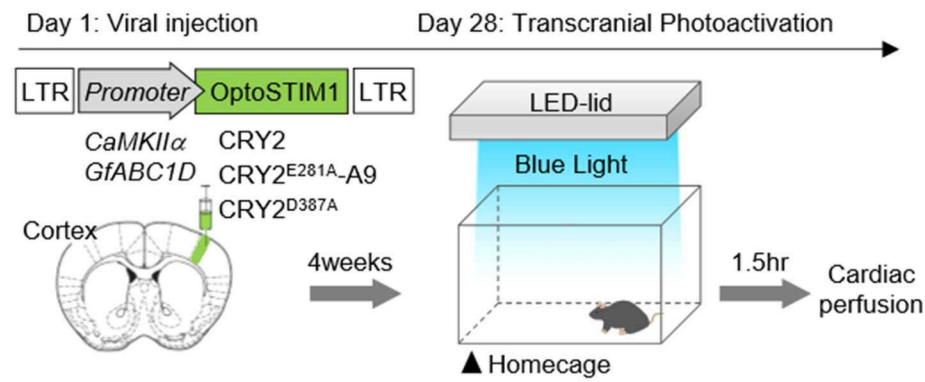
도면9



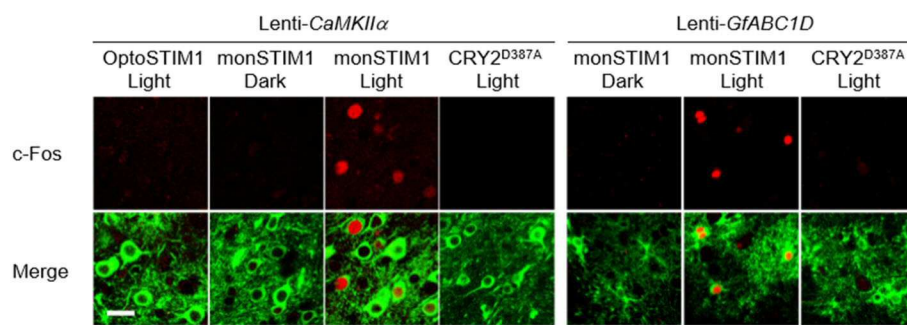
도면10



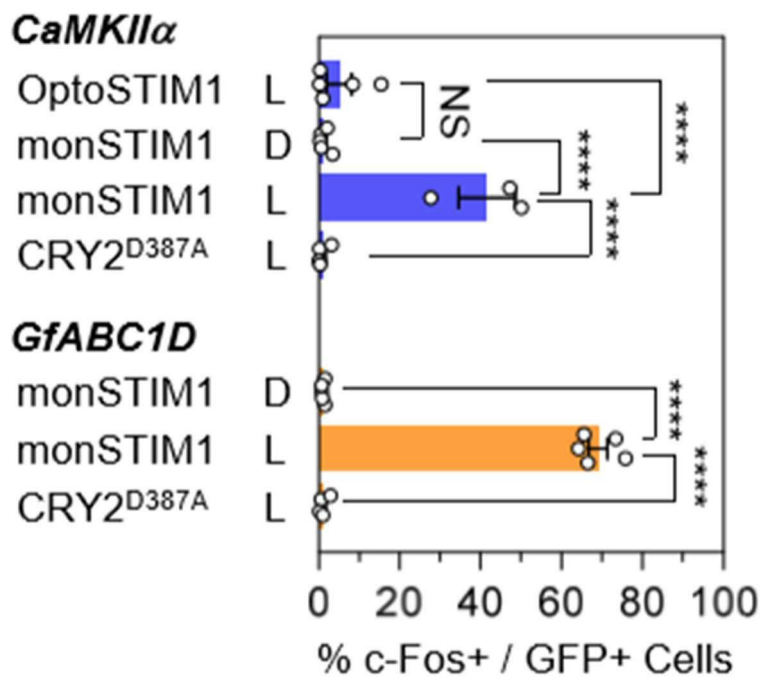
도면11



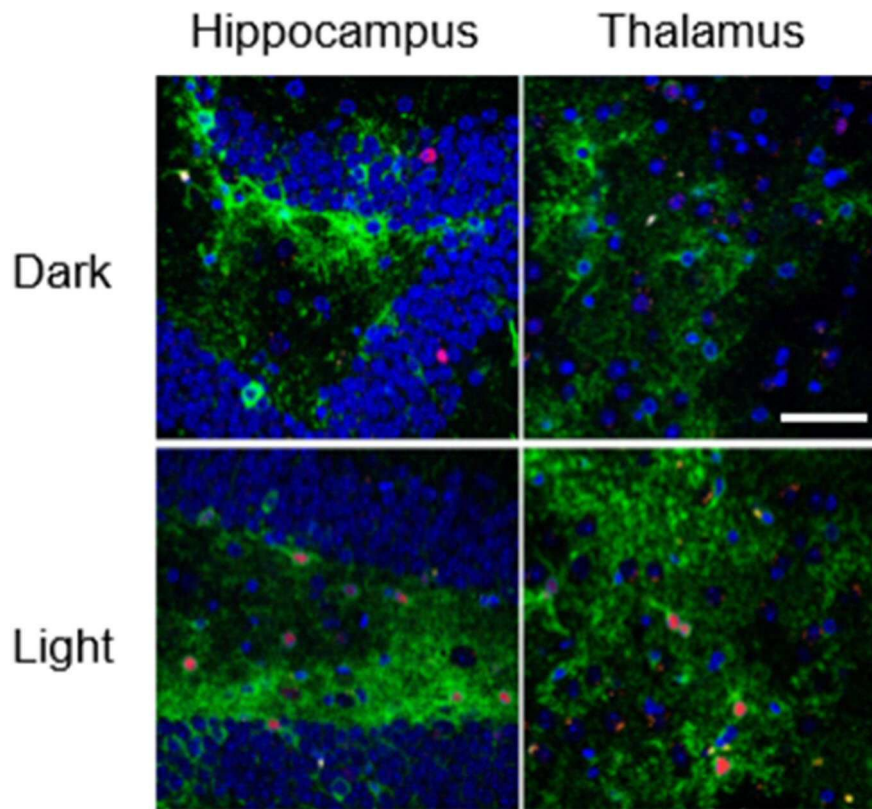
도면12



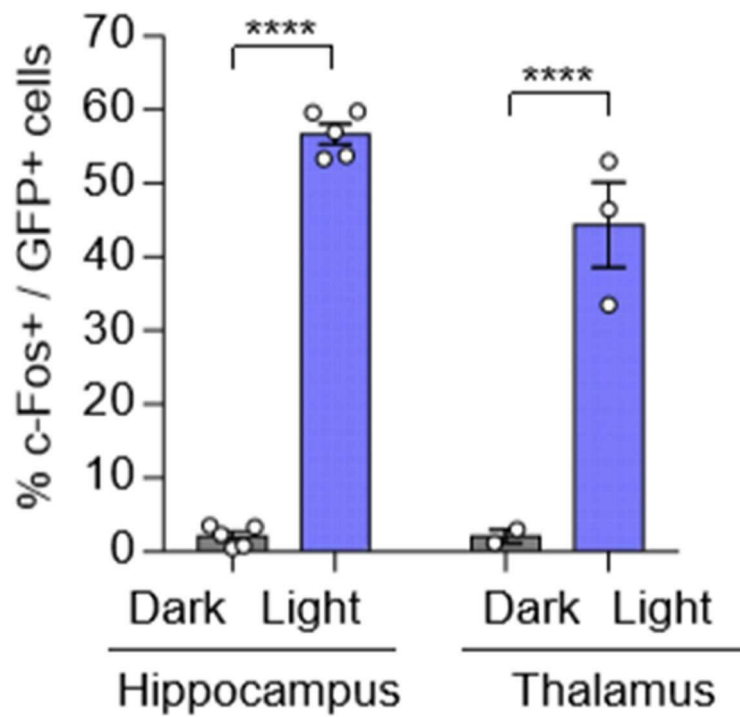
도면13



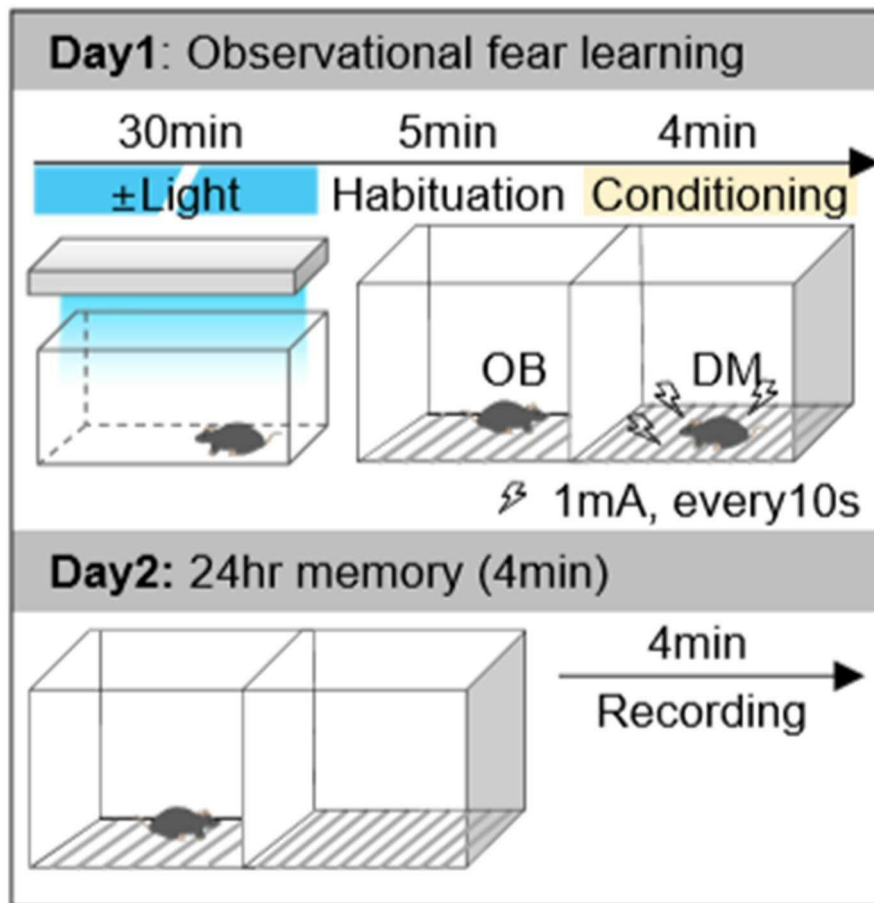
도면14



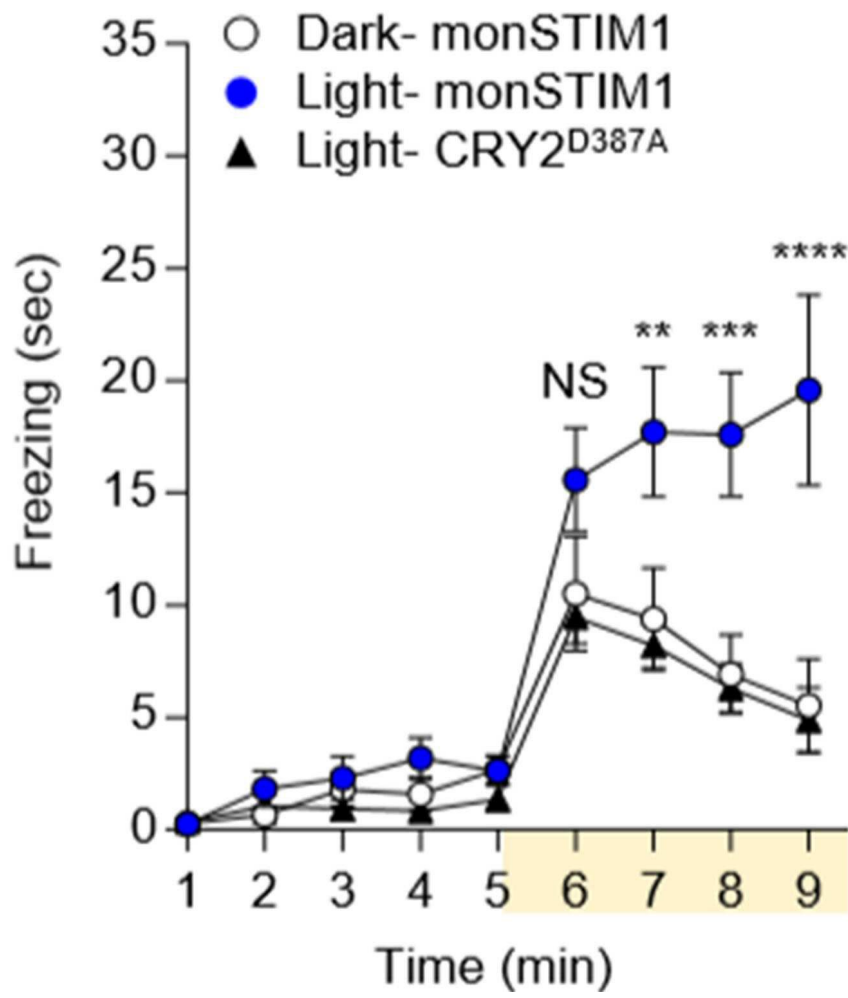
도면15



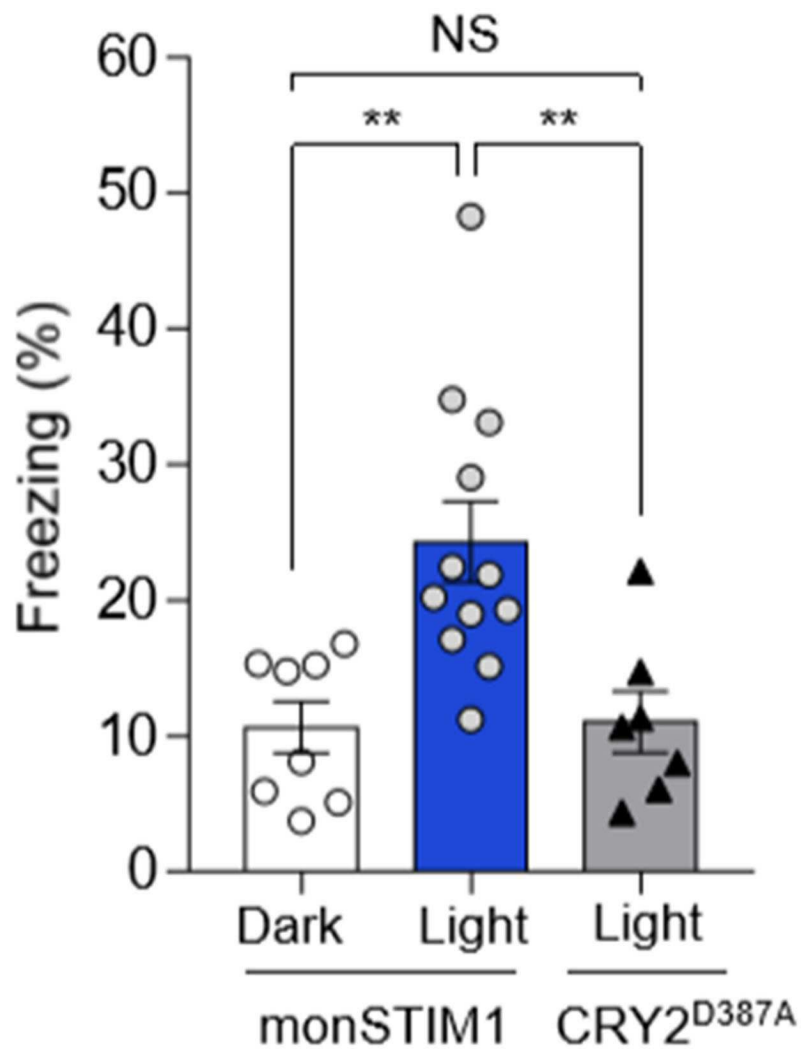
도면16



도면17



도면18



# 서열목록

- <110> INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE
- <120> Modified CRY2 with high photosensitivity and use of the same
- <130> DPP20194722KR
- <150> 10-2018-0139283
- <151> 2018-11-13
- <160> 16
- <170> koPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 498
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CRY2 of Arabidopsis thaliana
- <400> 1

Met Lys Met Asp Lys Lys Thr Ile Val Trp Phe Arg Arg Asp Leu Arg  
1 5 10 15  
Ile Glu Asp Asn Pro Ala Leu Ala Ala Ala Ala His Glu Gly Ser Val  
20 25 30  
Phe Pro Val Phe Ile Trp Cys Pro Glu Glu Glu Gly Gln Phe Tyr Pro  
35 40 45  
Gly Arg Ala Ser Arg Trp Trp Met Lys Gln Ser Leu Ala His Leu Ser  
50 55 60  
Gln Ser Leu Lys Ala Leu Gly Ser Asp Leu Thr Leu Ile Lys Thr His  
65 70 75 80  
Asn Thr Ile Ser Ala Ile Leu Asp Cys Ile Arg Val Thr Gly Ala Thr  
85 90 95  
Lys Val Val Phe Asn His Leu Tyr Asp Pro Val Ser Leu Val Arg Asp  
100 105 110  
His Thr Val Lys Glu Lys Leu Val Glu Arg Gly Ile Ser Val Gln Ser  
115 120 125  
Tyr Asn Gly Asp Leu Leu Tyr Glu Pro Trp Glu Ile Tyr Cys Glu Lys  
130 135 140  
Gly Lys Pro Phe Thr Ser Phe Asn Ser Tyr Trp Lys Lys Cys Leu Asp  
145 150 155 160  
Met Ser Ile Glu Ser Val Met Leu Pro Pro Pro Trp Arg Leu Met Pro  
165 170 175  
Ile Thr Ala Ala Ala Glu Ala Ile Trp Ala Cys Ser Ile Glu Glu Leu  
180 185 190  
Gly Leu Glu Asn Glu Ala Glu Lys Pro Ser Asn Ala Leu Leu Thr Arg  
195 200 205  
Ala Trp Ser Pro Gly Trp Ser Asn Ala Asp Lys Leu Leu Asn Glu Phe  
210 215 220  
Ile Glu Lys Gln Leu Ile Asp Tyr Ala Lys Asn Ser Lys Lys Val Val  
225 230 235 240  
Gly Asn Ser Thr Ser Leu Leu Ser Pro Tyr Leu His Phe Gly Glu Ile

245 250 255  
 Ser Val Arg His Val Phe Gln Cys Ala Arg Met Lys Gln Ile Ile Trp  
 260 265 270  
 Ala Arg Asp Lys Asn Ser Glu Gly Glu Glu Ser Ala Asp Leu Phe Leu  
 275 280 285  
 Arg Gly Ile Gly Leu Arg Glu Tyr Ser Arg Tyr Ile Cys Phe Asn Phe  
 290 295 300  
 Pro Phe Thr His Glu Gln Ser Leu Leu Ser His Leu Arg Phe Phe Pro  
  
 305 310 315 320  
 Trp Asp Ala Asp Val Asp Lys Phe Lys Ala Trp Arg Gln Gly Arg Thr  
 325 330 335  
 Gly Tyr Pro Leu Val Asp Ala Gly Met Arg Glu Leu Trp Ala Thr Gly  
 340 345 350  
 Trp Met His Asn Arg Ile Arg Val Ile Val Ser Ser Phe Ala Val Lys  
 355 360 365  
 Phe Leu Leu Leu Pro Trp Lys Trp Gly Met Lys Tyr Phe Trp Asp Thr  
 370 375 380  
  
 Leu Leu Asp Ala Asp Leu Glu Cys Asp Ile Leu Gly Trp Gln Tyr Ile  
 385 390 395 400  
 Ser Gly Ser Ile Pro Asp Gly His Glu Leu Asp Arg Leu Asp Asn Pro  
 405 410 415  
 Ala Leu Gln Gly Ala Lys Tyr Asp Pro Glu Gly Glu Tyr Ile Arg Gln  
 420 425 430  
 Trp Leu Pro Glu Leu Ala Arg Leu Pro Thr Glu Trp Ile His His Pro  
 435 440 445  
 Trp Asp Ala Pro Leu Thr Val Leu Lys Ala Ser Gly Val Glu Leu Gly  
  
 450 455 460  
 Thr Asn Tyr Ala Lys Pro Ile Val Asp Ile Asp Thr Ala Arg Glu Leu  
 465 470 475 480  
 Leu Ala Lys Ala Ile Ser Arg Thr Arg Glu Ala Gln Ile Met Ile Gly  
 485 490 495  
 Ala Ala

<210> 2  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 2  
 Ala Arg Asp Pro Pro Asp Leu Asp Asn  
 1 5

<210> 3  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 3  
 Ala Arg Asp Pro Pro Asp Ile Asp Asn  
 1 5

<210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 4  
 Ala Arg Asp Pro Pro Asp Ala Asp Asn  
 1 5

<210> 5  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 5

Ala Arg Asp Pro Pro Asp Lys Asp Asn  
 1 5

<210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 6  
 Ala Arg Asp Pro Pro Asp Asp Asp Asn  
 1 5  
 <210> 7  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 7  
 Ala Arg Asp Pro Asp Leu Asp Asn  
 1 5  
 <210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 8  
 Ala Arg Asp Pro Asp Ile Asp Asn  
 1 5  
 <210> 9  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 9  
 Ala Arg Asp Pro Asp Ala Asp Asn  
 1 5  
 <210> 10  
 <211> 8

<212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 10  
 Ala Arg Asp Pro Asp Lys Asp Asn

1 5  
 <210> 11  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 11  
 Ala Arg Asp Pro Asp Asp Asp Asn

1 5  
 <210> 12  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide  
 <400> 12  
 Ala Arg Asp Pro Pro Asp Leu

1 5  
 <210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Additional Inserted Peptide

<400> 13  
 Ala Arg Asp Pro Pro Asp Ile

1 5  
 <210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Additional Inserted Peptide

<400> 14

Ala Arg Asp Pro Pro Asp Ala

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Additional Inserted Peptide

<400> 15

Ala Arg Asp Pro Pro Asp Lys

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Additional Inserted Peptide

<400> 16

Ala Arg Asp Pro Pro Asp Asp

1 5