

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0021683

(43) 공개일자 2021년03월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6815 (2013.01)

G01N 21/6428 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0100880

(22) 출원일자 2019년08월19일

심사청구일자 2019년08월19일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이현수

경기도 김포시 김포한강3로 290-13, 601동 1902호(장기동, 고창마을 한양수자인 리버팰리스)

(74) 대리인

특허법인엠에이피에스

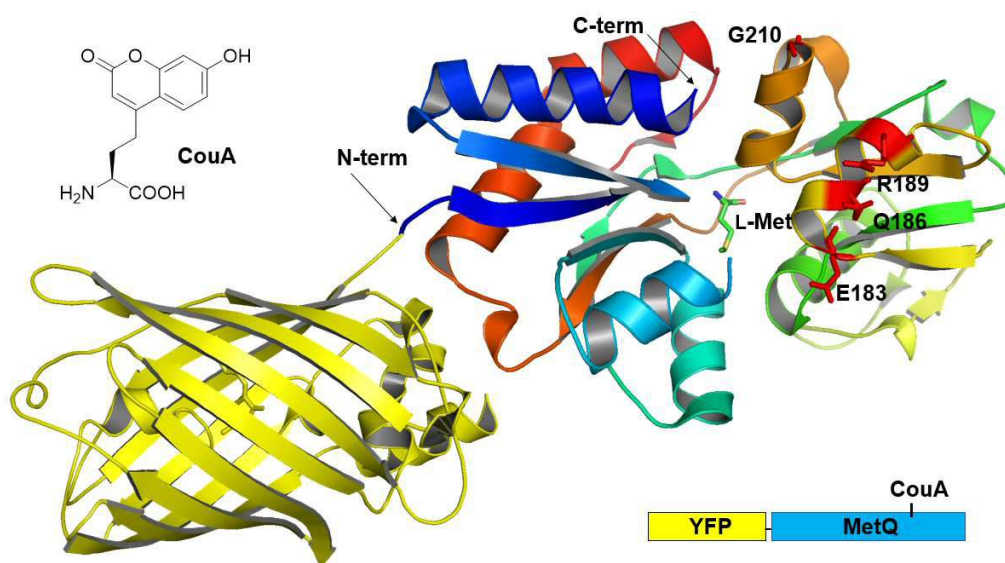
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 L-메티오닌 검출용 센서 및 이를 이용하는 L-메티오닌 검출 방법

(57) 요약

형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기반한 L-메티오닌 검출용 센서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서를 이용한 L-메티오닌 검출 방법, 및 상기 L-메티오닌 검출용 센서를 포함하는 L-메티오닌 검출용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2021/6439 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015M3A6A8065833
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국생명공학연구원
연구사업명	글로벌프론티어사업
연구과제명	L-DOPA를 생합성하여 단백질에 도입하는 지능형 바이오시스템의 설계 및 합성
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1A6A1A03024940
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원(이공계분야)
연구과제명	바이오계면연구소
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서강대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질; 형광 공여체로서 비천연 아미노산; 및 형광 수용체로서 형광 단백질

을 포함하는, L-메티오닌 검출용 센서로서,

형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기반하여 시료 중 L-메티오닌을 검출하는 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 비천연 아미노산은 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신, 3-(6-아세틸나프탈렌-2-yl아미노)-2-아미노프로피온산, 아리코돈-2-yl알라닌, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 형광 단백질은 황색 형광 단백질 (YFP), 변형된 황색 형광 단백질 (mYFP), 증강된 황색 형광 단백질 (eYFP), 녹색 형광 단백질 (GFP), 변형된 녹색 형광 단백질 (mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질 (eGFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 변형된 적색 형광 단백질 (mRFP), 증강된 적색 형광 단백질 (eRFP), 청색 형광 단백질 (BFP), 변형된 청색 형광 단백질 (mBFP), 증강된 청색 형광 단백질 (eBFP), 남색 형광 단백질 (CFP), 변형된 남색 형광 단백질 (mCFP), 증강된 남색 형광 단백질 (eCFP), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 서열번호 1의 40 번 위치의 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 또는 메티오닌인 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 메티오닌-결합 단백질은 서열번호 2 내지 서열번호 6 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 서열번호 1의 59 번 위치의 아미노산은 알라닌, 류신, 또는 페닐알라닌인 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 메티오닌-결합 단백질은 서열번호 7 내지 서열번호 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 서열번호 1의 112 번 위치의 아미노산은 알라닌, 류신, 또는 아스파르트산인 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 메티오닌-결합 단백질은 서열번호 10 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 비천연 아미노산은 서열번호 1 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 154 번, 157 번, 160 번, 또는 181 번 위치로 치환된 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 11

제 1 항에 있어서,

상기 형광 단백질은 서열번호 1 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 N-말단에 연결된 것인, L-메티오닌 검출용 센서.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 L-메티오닌 검출용 센서를 이용하는, L-메티오닌의 검출 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,

L-메티오닌의 농도에 따른 상기 센서의 FRET 비율의 변화를 측정함으로써 L-메티오닌을 검출하는 것인, L-메티오닌의 검출 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 따른 L-메티오닌 검출용 센서를 포함하는, L-메티오닌 검출용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은, 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기반한 L-메티오닌 검출용 센서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서를 이용한 L-메티오닌 검출 방법, 및 상기 L-메티오닌 검출용 센서를 포함하는 L-메티오닌 검출용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아미노산(amino acids, AAs)은 모든 생명체에 대해 단백질 및 필수 영양소의 빌딩 블록이다. 상기 아미노산은 또한 세포 항상성과 관련된 중요한 생체 분자의 합성에 관여하고 있으며, 알츠하이머 및 당뇨병과 같은 인간의 질병과 관련이 있다. 이러한 아미노산의 생화학적 중요성으로 인해, 아미노산 분석을 위한 많은 노력이 있었다. 아미노산의 가장 일반적인 분석 방법은, 아미노산의 화학적 변형과 결합된 액체 크로마토 그래피 또는 질량 분석법(mass spectrometry)이다. 대안적으로, UV/vis 또는 형광 분광 분석법을 기반으로 하는 화학적 센서 및 단백질 센서가 아미노산 분석을 위해 개발되었다. 최근, 주성분 분석(principal components ana, PCA) 및 선형 판별 분석(linear discriminant analysis, LDA)과 같은 화학 측정 기술과 함께 일련의 센서가 사용되는 아미노산 분석을 위한 어레이-기반 센서가 개발되었다. 이러한 방법들은 유용하기는 하지만, 비용이 높고 각각의 아미노산의 화학 선택성이 낮으며, 생물학적 샘플과의 비상용성(incompatibility)의 단점을 갖고 있으며, 다중 센서, 아미노산 변형 및 시간-소모적 공정이 요구된다. 또한, 아미노산의 화학특이적 및 입체특이적 검출을 가능하게 하는 방법은 거의 없다.

[0004] 한편, L-메티오닌(L-Met)은 티오에테르 그룹을 포함하는 필수 아미노산이다. L-메티오닌은 단백질의 촉매 작용에는 관여하지 않지만, DNA를 비롯한 다양한 생체 분자에 메틸기를 전달하는 보조인자 S-아데노실 메티오닌(S-adenosylmethionine, SAM)의 생합성을 위한 전구체이다. 암 세포는 DNA 메틸화를 위해 SAM을 과잉 섭취하기 때문에, 메티오닌 제한은 암 성장 조절을 위한 전략으로 알려져 있다.

[0005] 최근, L-메티오닌과 S-아데노실 메티오닌이 단백질 포스파타이즈 2(protein phosphatase 2)를 메틸화시킴으로써 자가포식과 세포 성장에 관여한다고 보고되었다. 또한, L-메티오닌을 비롯한 여러 아미노산의 세포 내 농도가 아미노산 수용체에 의해 감지되고, 감지된 신호는 세포 성장의 주요 조절인자인 라파마이신 복합체 1(mTORC1)의 기전 표적(mechanistic target)으로 전달된다. L-메티오닌의 생화학적 중요성으로 인하여, 많은 L-메티오닌이 보고되었다. 보고된 각각의 방법은 장점이 있고 특정 용도에 대해 유용하지만, 혈청과 같은 복합 혼합물에서 L-메티오닌 농도를 특이적으로 측정할 수 있는 방법은 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) P. Cavuoto and M. F. Fenech, Cancer Treat. Rev., 2012, 38,726-736.
(비특허문헌 0002) E. Cellarier, X. Durando, M. P. Vasson, M. C. Farges,A. Demiden, J. C. Maurizis, J. C. Madelmont andP. Chollet, Cancer Treat. Rev., 2003, 29, 489-499.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본원은, 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기반한 L-메티오닌 검출용 센서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서를 이용한 L-메티오닌 검출 방법, 및 상기 L-메티오닌 검출용 센서를 포함하는 L-메티오닌 검출용 조성물을 제공하고자 한다.

[0009] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본원의 제 1 측면은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질; 형광 공여체로서 비천연 아미노산; 및 형광 수용체로서 형광 단백질을 포함하는, L-메티오닌 검출용 센서로서, 형광 공명 에너지 전이 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기반하여 시료 중 L-메티오닌을 검출하는 것인, L-메티오닌 검출용 센서를 제공한다.

[0012] 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1측면에 따른 L-메티오닌 검출용 센서를 이용하는, L-메티오닌의 검출 방법을 제공한다.

[0013] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 1측면에 따른 L-메티오닌 검출용 센서를 포함하는, L-메티오닌 검출용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본원의 구현예들에 따르면, FRET용 단백질로서 메티오닌-결합 단백질에 황색 형광 단백질(fluorescent protein, YFP) 및 형광 비천연 아미노산으로서 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신 [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, CouA]를 도입함으로써 시료 중 메티오닌을 선택적으로 검출할 수 있는 FRET-기반 센서를 제조할 수 있다.

[0016] 본원의 구현예들에 따른 L-메티오닌 검출용 센서는, 상기 황색 형광 단백질 및 형광 비천연 아미노산을 도입한 메티오닌-결합 단백질의 결합 위치에서 잔기를 돌연변이시킴으로써, 종래 천연 아미노산, D-메티오닌, 및 L-글리신을 포함하는 다양한 아미노산들 중에서 L-메티오닌만을 선택적으로 검출할 수 있다.

[0017] 본원의 구현예들에 따른 상기 L-메티오닌 검출용 센서는, 형광 비천연 아미노산이 상기 표적 단백질의 임의의 자리에 위치될 수 있으며, FRET 수용체로서 하나의 형광 단백질이 사용된다는 장점을 갖는다. 이는 두 개의 형광 단백질을 요구하는 기존의 FRET-기반 센서가 가지는 단점인, 큰 크기와 용합에 대한 제한적 위치를 개선하는 것이다.

[0018] L-메티오닌은 암 세포 성장 및 자가포식(autophagy)에 관여하여 생화학적으로 중요하기 때문에, 본원의 구현예들에 따른 L-메티오닌 검출용 센서는 복잡한 생물학적 샘플에서 L-메티오닌의 정량 분석에 유용할 수 있으며, 중요한 생체 분자에 대한 단백질 센서의 개발을 위해 다른 저분자-결합 단백질에도 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은, 본원의 일 실시예에 있어서, L-메티오닌과 복합화된 황색 형광 단백질(YFP) 및 메티오닌-결합 단백질(MetQ)의 결정 구조를 나타내는 개략도이다.

도 2의 (a) 내지 (d)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-메티오닌의 존재 및 부재 하에서, CouA를 포함하는 YFP-MetQ 돌연변이체들의 형광 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 3은, 본원의 일 실시예에 있어서, 도 2의 데이터로부터 계산된 CouA를 포함하는 YFP-MetQ 돌연변이체들의 FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-메티오닌으로 적정한 YFP-MetQ-R189CouA의 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, D-메티오닌으로 적정한 YFP-MetQ-R189CouA의 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은, 본원의 일 실시예에 있어서, 20 가지 천연 아미노산 및 D-메티오닌에 대한 YFP-MetQ-R189CouA의 선택성

분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은, 본원의 일 실시예에 있어서, L-메티오닌, D-메티오닌 및 L-글리신에 대한 YFP-MetQ-R189CouA 돌연변이체의 선택성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-메티오닌으로 적정된 YFP-MetQ-R189CouA-H88F의 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, D-메티오닌으로 적정된 YFP-MetQ-R189CouA-H88F의 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은, 본원의 일 실시예에 있어서, 20 개의 천연 아미노산 및 D-메티오닌에 대한 YFP-MetQ-R189CouA-H88F의 선택성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은, 본원의 일 실시예에 있어서, FBS에서 L-메티오닌 농도를 측정하기 위해 FBS로 적정된 YFP-MetQ-R189CouA-H88F의 형광 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0022] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 “연결”되어 있다고 할 때, 이는 “직접적으로 연결”되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 “전기적으로 연결”되어 있는 경우도 포함한다.
- [0023] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 “상에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0024] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [0025] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0026] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [0027] 본원 명세서 전체에서, “비천연 아미노산”은 20가지 통상의 아미노산, 파이로리신 또는 셀레노시스테인이 아닌 아미노산을 지칭하며; 용어 “비천연 아미노산”과 유사한 의미로 사용될 수 있는 다른 용어는 “비천연적으로 코딩된 아미노산”, “자연적으로 존재하지 않는 아미노산” 등이 있다. “비천연 아미노산”은 천연적으로 코딩된 아미노산의 변형에 의해 자연적으로 발생하나, 그 자체가 번역 복합체에 의해 성장하는 폴리펩티드 내로 도입되는 않는 아미노산을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 천연적으로 코딩된 아미노산이란, 20가지 통상의 아미노산 또는 파이로리신 또는 셀레노시스테인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서, “핵산”은 단일-또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드 및 그의 중합체를 지칭한다. 달리 구체적으로 제한하지 않는 한, 본 용어는 참고 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 천연 발생의 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 구체적으로 제한하지 않는 한, 본 용어는 또한 PNA(펩티도핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA 유사체(포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 등)를 비롯한 올리고뉴클레오타이드도 지칭한다. 달리 명시하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 및 상보적 서열뿐만 아니라, 명확히 특정된 서열을 포함한다.

- [0029] 본원 명세서 전체에서, "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 즉, 단백질에 대한 기술 사항은 동등하게 펩티드의 기술 사항 및 폴리펩티드의 기술 사항에도 적용되며, 반대의 경우도 마찬가지이다. 본 용어는 자연적으로 존재하는 아미노산 중합체뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본원에서 사용되는 바, 본 용어는 전체 길이의 단백질을 비롯한, 아미노산 잔기가 공유 펩티드 결합에 의해 연결되어 있는 임의 길이의 아미노산 쇄를 포함한다.
- [0030] 본원 명세서 전체에서, FRET(형광 공명 에너지 전이, fluorescence resonance energy transfer)의 기재는, 단 파장 형광 단백질인 공여체(donor)가 외부에서 에너지를 흡수하면, 상기 공여체의 여기 에너지가 빛 에너지로 방출되는 대신, 소정의 거리 안에 위치한 장파장 형광 단백질인 수용체(acceptor)가 발광 없이 전달되어, 수용체의 장파장 형광만이 방출되는 현상을 의미한다. FRET에 의한 수용체 형광의 발생 또는 공여체 방출광의 소멸 현상(photobleaching)이 나타나려면 상기 공여체와 수용체가 매우 짧은 거리(10 nm 미만)에 위치해야 한다. 특정 파장의 빛을 내는 형광 단백질인 상기 공여체와 이 발광 에너지와 공명을 일으켜 에너지를 흡수할 수 있는 형광 단백질인 상기 수용체가 소정의 거리 이내로 가까워지면, 외부에서 상기 공여체를 여기시키기 위해 조사된 빛 에너지가 상기 공여체로부터 상기 수용체로 발광 없이 전달되어 공여체의 고유한 파장의 발광이 감소하고, 공여체로부터 에너지를 전달받은 수용체가 자신의 고유한 파장대의 빛을 발광하는 FRET 현상이 일어난다.
- [0032] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.
- [0034] 본원의 제 1 측면은, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질; 형광 공여체로서 비천연 아미노산; 및 형광 수용체로서 형광 단백질을 포함하는, L-메티오닌 검출용 센서로서, 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)에 기반하여 시료 중 L-메티오닌을 검출하는 것인, L-메티오닌 검출용 센서를 제공한다.
- [0035] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는, 상기 형광 수용체로서 형광 단백질과 상기 메티오닌-결합 단백질의 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터를 준비하는 단계; 상기 발현 벡터의 핵산 서열 중 일부를 종결 코돈으로 치환하는 단계; 상기 발현 벡터에 상기 형광 공여체로서 비천연 아미노산을 도입하는 단계; 상기 발현 벡터를 숙주세포에 의해 공동-형질전환시켜 센서를 수득하는 단계에 의해 제조되는 것일 수 있다.
- [0036] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는, L-메티오닌과 구조적으로 유사한 다른 아미노산에 대해서 상기 L-메티오닌을 선택적으로 검출할 수 있다. 예를 들어, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 L-메티오닌에 의해 구조적 변화가 야기됨과 동시에 FRET 비율이 증가함으로써, L-메티오닌과 구조적으로 유사한 다른 아미노산에 대해서 L-메티오닌만을 선택적으로 검출할 수 있다.
- [0037] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 40 번 위치의 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 또는 메티오닐일 수 있으며, 이에 따라 상기 메티오닌-결합 단백질들은 각각 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질들을 각각 MetQ-Y69A, MetQ-Y69V, MetQ-Y69I, MetQ-Y69L 또는 MetQ-Y69M로 표현될 수 있다.
- [0038] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 59 번 위치의 아미노산은 알라닌, 류신, 또는 페닐알라닌일 수 있으며, 이에 따라 상기 메티오닌-결합 단백질들은 각각 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질들을 각각 MetQ-H88A, MetQ-H88L 또는 MetQ-H88F 로 표현될 수 있다.
- [0039] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 112 번 위치의 아미노산은 알라닌, 류신, 또는 아스파르트산일 수 있으며, 이에 따라 상기 메티오닌-결합 단백질들은 각각 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질들을 각각 MetQ-N141A, MetQ-N141L 또는 MetQ-N141D로 표현될 수 있다.
- [0040] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열은 당업계에서 공지된 방법에 따라 선택적으로 또는 비선택적으로 변형될 수 있으며, 예를 들어, TAG, TGA, TAA, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 종결 코돈에 의하여 치환되는 것일 수 있다.

- [0041] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열의 치환은 위치-특이적 돌연변이에 의해 수행되는 것일 수 있다.
- [0042] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 숙주세포는 구체적으로 대장균일 수 있다. 예를 들어, 상기 종결 코돈으로 치환된 코돈을 가지는 단백질의 유전자를 포함하는 플라스미드, 적합한 tRNA 유전자를 포함하는 플라스미드, 및 적합한 아미노아실 tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 플라스미드를 숙주세포, 예를 들어, 대장균 내로 도입하여 형질전환 대장균을 제조하고, 상기 형질전환 대장균을 상기 형광 공여체가 포함된 배지에서 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 메티오닌-결합 단백질을 메티오닌을 결합할 수 있는 단백질이라면 제한없이 사용될 수 있으며, 구체적으로는 천연 메티오닌-결합 단백질, 또는 예를 들어, 서열번호 1 내지 서열번호 12 중 어느 하나로 표시되는 메티오닌-결합 단백질(MetQ)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0044] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산은 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신 [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, CouA], 3-(6-아세틸나프탈렌-2-yl아미노)-2-아미노프로피온산 [3-(6-acetylnaphthalen-2-ylamino)-2-aminopropanoic acid], 아리코돈-2-yl알라닌[acridon-2-ylalanine], 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 것일 수 있다.
- [0045] 예를 들어, 상기 비천연 아미노산은 상기 아미노아실 tRNA 합성효소에 의하여 tRNA에 결합할 수 있고, 상기 비천연 아미노산과 결합된 상기 tRNA는 상기 치환된 핵산 서열을 인식하여 코딩되는 단백질에 상기 비천연 아미노산을 코딩하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 비천연 아미노산은 단백질의 임의 말단 위치 또는 임의의 내부 위치를 비롯한, 단백질 상의 임의의 위치에 존재할 수 있다. 상기 비천연 아미노산이 도입된 단백질은 생합성적으로 생산될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 "생합성적으로" 라는 것은 폴리뉴클레오티드, 코돈, tRNA, 및 리보솜 중 1개 이상을 사용하는 것을 포함하여, 세포성 번역 시스템을 사용한 방법을 의미하는 것이나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0046] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산은 상기 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 154 번, 157 번, 160 번, 또는 181 번 위치로 치환된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 비천연 아미노산은 상기 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 154 번 위치의 글루탐산(Glu, E), 157 번 위치의 글루타민(Gln, Q), 160 번 위치의 아르기닌(Arg, R), 또는 181 번 위치의 글리신(Gly, G)에서 치환되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0047] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산은 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신 [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, CouA]일 수 있으며, 상기 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 CouA 가 상기 아미노산 서열의 154 번, 157 번, 160 번, 또는 181 번 위치로 치환된 것은 각각 E183CouA, Q186CouA, R189CouA 또는 G210CouA로 표현될 수 있다.
- [0048] 종래의 FRET-기반 센서는 형광 단백질이 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 한정되었으나, 본원의 일 구현예에 따른 FRET-기반 센서는 형광 공여체로서 형광 비천연 아미노산이 상기 메티오닌-결합 단백질의 어떠한 자리에도 혼입될 수 있다.
- [0049] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체의 도입은 아미노산 돌연변이에 의해 달성되는 것일 수 있다.
- [0050] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 단백질은 황색 형광 단백질 (YFP), 변형된 황색 형광 단백질 (mYFP), 증강된 황색 형광 단백질 (eYFP), 녹색 형광 단백질 (GFP), 변형된 녹색 형광 단백질 (mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질 (eGFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 변형된 적색 형광 단백질 (mRFP), 증강된 적색 형광 단백질 (eRFP), 청색 형광 단백질 (BFP), 변형된 청색 형광 단백질 (mBFP), 증강된 청색 형광 단백질 (eBFP), 남색 형광 단백질 (CFP), 변형된 남색 형광 단백질 (mCFP), 증강된 남색 형광 단백질 (eCFP), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 단백질은 상기 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 연결된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 형광 단백질로서 황색 형광체 단백질이 상기 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 융합되어 FRET 쌍 (FRET pair)를 형성하는 것일 수 있다.
- [0052] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 상기 서열번호 1을 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 서열번호 1의 59 번 위치의 히스타민(His, H)이 페닐알라닌(Phe, F)로 치환된 돌연변이체일 수 있다. 구체적으로, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는, 상기 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 형광 수용체로서 황색 형광 단백질이 연결되어 있고, 상기 서열번호 1을 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 서열번호 1의 160 번 위치의

아르기닌(Arg, R)에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA가 치환되어 있으며, 상기 서열번호 1을 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 서열번호 1의 59 번 위치의 히스타민이 페닐알라닌으로 치환된 돌연변이체일 수 있으며, 이에 따라 19 가지의 천연 아미노산, D-메티오닌, 및 L-글리신을 포함하는 다양한 다른 아미노산 중에서 L-메티오닌만을 선택적으로 검출할 수 있다.

[0053] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 형광 수용체로서 황색 형광 단백질이 연결되어 있고, 상기 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열의 160 번 위치의 아르기닌(Arg, R)에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA가 치환되어 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 서열번호 9를 포함하는 메티오닌-결합 단백질; 공여체로서 비천연 아미노산; 및 형광 수용체로서 형광 단백질을 포함하고, 서열번호 9의 160 번 위치의 아르기닌(Arg, R)에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA가 치환되어 있으며, 형광 단백질은 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 13의 389번 위치의 아르기닌(Arg, R)에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA가 치환되어 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1측면에 따른 L-메티오닌 검출용 센서를 이용하는, L-메티오닌의 검출 방법을 제공한다.

[0058] 본원의 제 2측면에 따른 L-메티오닌의 검출 방법에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 2 측면에 동일하게 적용될 수 있다.

[0059] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는, 서열번호 1의 메티오닌-결합 단백질; 형광 공여체로서 비천연 아미노산; 및 형광 수용체로서 형광 단백질을 포함하는 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET)-기반 센서일 수 있다.

[0060] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서를 이용하여 L-메티오닌을 검출하는 방법은, 상기 형광 단백질과 상기 메티오닌-결합 단백질의 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터를 준비하는 단계; 상기 발현 벡터의 핵산 서열 중 일부를 종결 코돈으로 치환하는 단계; 상기 발현 벡터에 상기 형광 공여체를 도입하는 단계; 상기 발현 벡터를 숙주세포에 의해 공동-형질전환시켜 센서를 획득하는 단계; 및 상기 획득된 센서와 L-메티오닌과의 반응을 통하여 L-메티오닌을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0061] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌을 검출하는 것은, L-메티오닌의 농도에 따른 상기 센서의 FRET 비율의 변화를 측정함으로써 수행되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 FRET 비율의 변화는, L-메티오닌의 농도가 0 일 때의 FRET 비율 (R_0)에 대한 L-메티오닌의 농도가 x일때의 FRET 비율 (R_x)을 측정함으로써 다음과 같은 식에 의하여 계산되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다:

[0062]
$$\text{FRET 비율 변화} = \Delta R/R_0 = (R_c - R_0)/R_0$$

[0063] 여기서, R_0 는 [리간드] = 0에서의 FRET 비율이고, R_c 는 [리간드] = C에서의 FRET 비율일 수 있다.

[0064] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는, L-메티오닌과 구조적으로 유사한 다른 아미노산에 대해서 상기 L-메티오닌을 선택적으로 검출할 수 있다. 예를 들어, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 L-메티오닌에 의해 구조적 변화가 야기됨과 동시에 FRET 비율이 증가함으로써, L-메티오닌과 구조적으로 유사한 다른 아미노산에 대해서 L-메티오닌만을 선택적으로 검출할 수 있다.

[0065] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 40 번 위치의 아미노산은 알라닌, 발린, 이소류신, 류신, 또는 메티오닌일 수 있으며, 이에 따라 상기 메티오닌-결합 단백질들은 각각 서열번호 2 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0066] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 59 번 위치의 아미노산은 알라닌, 류신, 또는 페닐알라닌일 수 있으며, 이에 따라 상기 메티오닌-결합 단백질들은 각각 서열번호 7 내지 9 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포

함할 수 있다.

- [0067] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 112 번 위치의 아미노산은 알라닌, 류신, 또는 아스파르트산일 수 있으며, 이에 따라 상기 메티오닌-결합 단백질들은 각각 서열번호 10 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0068] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열은 당업계에서 공지된 방법에 따라 선택적으로 또는 비선택적으로 변형될 수 있으며, 예를 들어, TAG, TGA, TAA, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 종결 코돈에 의하여 치환되는 것일 수 있다.
- [0069] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열의 치환은 위치-특이적 돌연변이에 의해 수행되는 것일 수 있다.
- [0070] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 숙주세포는 구체적으로 대장균일 수 있다. 예를 들어, 상기 종결 코돈으로 치환된 코돈을 가지는 단백질의 유전자를 포함하는 플라스미드, 적합한 tRNA 유전자를 포함하는 플라스미드, 및 적합한 아미노아실 tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 플라스미드를 숙주세포, 예를 들어, 대장균 내로 도입하여 형질전환 대장균을 제조하고, 상기 형질전환 대장균을 상기 형광 공여체가 포함된 배지에서 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0071] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 메티오닌-결합 단백질을 메티오닌을 결합할 수 있는 단백질이라면 제한없이 사용될 수 있으며, 구체적으로는 천연 메티오닌-결합 단백질, 예를 들어, 서열번호 1 내지 서열번호 12 중 어느 하나로 표시되는 MetQ를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0072] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산은 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신 [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, CouA], 3-(6-아세틸나프탈렌-2-yl)아미노)-2-아미노프로피온산 [3-(6-acetylnaphthalen-2-ylamino)-2-aminopropanoic acid], 아리코돈-2-yl알라닌[acridon-2-ylalanine], 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 것일 수 있다.
- [0073] 예를 들어, 상기 비천연 아미노산은 상기 아미노아실 tRNA 합성효소에 의하여 tRNA에 결합할 수 있고, 상기 비천연 아미노산과 결합된 상기 tRNA는 상기 치환된 핵산 서열을 인식하여 코딩되는 단백질에 상기 비천연 아미노산을 코딩하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 비천연 아미노산은 단백질의 임의 말단 위치 또는 임의의 내부 위치를 비롯한, 단백질 상의 임의의 위치에 존재할 수 있다. 상기 비천연 아미노산이 도입된 단백질은 생합성적으로 생산될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 "생합성적으로" 라는 것은 폴리뉴클레오티드, 코돈, tRNA, 및 리보솜 중 1개 이상을 사용하는 것을 포함하여, 세포성 번역 시스템을 사용한 방법을 의미하는 것일 수 있다.
- [0074] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 비천연 아미노산은 상기 서열번호 1 내지 서열번호 12 중 어느 하나를 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 서열번호 1 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 154 번, 157 번, 160 번, 또는 181 번 위치로 치환된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 비천연 아미노산은 상기 서열번호 1 내지 서열번호 12 중 어느 하나의 154 번 위치의 글루탐산(Glu, E), 157 번 위치의 글루타민(Gln, Q), 160 번 위치의 아르기닌(Arg, R), 또는 181 번 위치의 글리신(Gly, G)에서 치환되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0075] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체의 도입은 아미노산 돌연변이에 의해 달성되는 것일 수 있다.
- [0076] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 단백질은 황색 형광 단백질 (YFP), 변형된 황색 형광 단백질 (mYFP), 증강된 황색 형광 단백질 (eYFP), 녹색 형광 단백질 (GFP), 변형된 녹색 형광 단백질 (mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질 (eGFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 변형된 적색 형광 단백질 (mRFP), 증강된 적색 형광 단백질 (eRFP), 청색 형광 단백질 (BFP), 변형된 청색 형광 단백질 (mBFP), 증강된 청색 형광 단백질 (eBFP), 남색 형광 단백질 (CFP), 변형된 남색 형광 단백질 (mCFP), 증강된 남색 형광 단백질 (eCFP), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0077] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 단백질은 상기 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 연결된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 형광 단백질로서 황색 형광체 단백질이 상기 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 융합되어 FRET 쌍 (FRET pair)를 형성하는 것일 수 있다.
- [0078] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 상기 서열번호 1을 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 서열번호 1의 59 번 위치의 히스타민(His, H)이 페닐알라닌(Phe, F)로 치환된 돌연변이체일 수 있다. 구체적으로, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는, 상기 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 형광 수용체로서 황색 형광 단백질이 연결되어 있고, 상기 서열번호 1을 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 서열번호 1의 160 번 위치의

아르기닌(Arg, R)에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA가 치환되어 있으며, 상기 서열번호 1을 포함하는 메티오닌-결합 단백질에서 서열번호 1의 59 번 위치의 히스타민이 페닐알라닌으로 치환된 돌연변이체일 수 있으며, 이에 따라 19 가지의 천연 아미노산, D-메티오닌, 및 L-글리신을 포함하는 다양한 다른 아미노산 중에서 L-메티오닌만을 선택적으로 검출할 수 있다.

[0079] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 형광 수용체로서 황색 형광 단백질이 연결되어 있고, 상기 서열번호 1 내지 12 중 어느 하나의 아미노산 서열의 160 번 위치의 아르기닌(Arg, R)에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA가 치환되어 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0080] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 서열번호 9를 포함하는 메티오닌-결합 단백질; 공여체로서 비천연 아미노산; 및 형광 수용체로서 형광 단백질을 포함하고, 서열번호 9의 160 번 위치의 아르기닌(Arg, R)에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA가 치환되어 있으며, 형광 단백질은 메티오닌-결합 단백질의 N-말단에 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-메티오닌 검출용 센서는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 13의 389번 위치의 아르기닌(Arg, R)에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA가 치환되어 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 1측면에 따른 L-메티오닌 검출용 센서를 포함하는, L-메티오닌 검출용 조성물을 제공한다.

[0084] 본원의 제 3 측면에 따른 L-메티오닌 검출용 조성물에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 3 측면에 동일하게 적용될 수 있다.

[0086] 이하, 본원의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 본원의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것 일뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0088] [실시예]

[0089] 본 실시예에서, 모든 화학 물질 및 DNA 올리고머는 상업적 출처로부터 취득되었으며, 추가 정제 없이 사용되었다.

[0090] 본 실시예에서, 모든 형광 스펙트럼은 Hitachi F-7000 형광분광광도계(Fluorescence Spectrophotometer)로 측정되었다.

[0092] 1. FRET-기반 센서의 설계

[0093] 메티오닌-결합 단백질로서 MetQ는 단백질 데이터뱅크(PDB)에서 검색되었으며, 상기 MetQ는 메티오닌 업테이크(uptake)에 대해 MetN, MetI 및 MetQ로 구성된 ABC 수송체 시스템의 성분을 형성하는 페리플라즘 아미노산 결합 단백질이다. 상기 MetQ는 구조적으로 특성화된 유일한 메티오닌-결합 단백질이기 때문에 L-메티오닌 센서 설계를 위해 선택되었다. 리간드-결합 형태 및 아포 형태인 MetQ의 2 가지 구조의 비교는 페리플라즘 결합 단백질(periplasmic binding proteins, PBPs)에 특징적인 중요한 구조 변화를 나타내었다.

[0094] 본 실험에서는 MetQ에서 신호서열(N-말단으로부터 29개의 아미노산)을 제거하고 실험을 수행하였다. 상기 신호서열이 제거된 MetQ는 서열번호 1 또는 서열번호 14로 표현하였다.

[0095] 또한, 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 L-(7-하이드록시쿠마린-4-일)에틸글리신 [L-(7-Hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, CouA]가, 형광 수용체로서 및 황색 형광 단백질(Yellow fluorescent protein, YFP)이 각각 FRET 쌍으로 선택되었다. 상기 MetQ의 구조에 기반하여, CouA 및 YFP 결합 위치가 고려되었다. 큰 크기의 YFP 때문에 단백질은 MetQ의 N-말단 또는 C-말단 중 하나로 도입되어야 했다. 상기 N-말단은 전체 구조의 가장자리에 위치하고, 상기 C-말단은 힌지(hinge) 영역 근처에 위치한다. 도 1은 L-메티오닌과 복합화된 YFP(PDB 1HUY)

및 MetQ(PDB 4YAH)의 결정 구조를 나타낸다. CouA로 대체하기 위해 4 개의 잔기가 선택되었고, N-말단이 YFP와 융합되었다.

[0096] 리간드 결합 시 FRET 신호 변화를 최대화하기 위해, YFP 융합을 위해 상기 N-말단을 선택하였다. 상기 MetQ는 두 개의 돌출부를 가지고 있으며, 상기 N-말단은 좌측 돌출부에 위치한다(도 1). 따라서, 더 큰 FRET 신호 변화를 위해 CouA 도입을 위한 위치가 우측 돌출부를 따라서 조사되었다. 메티오닌 결합 위치로부터 멀리 떨어져 있으며, 용매에 노출된 우측 돌출부의 4 개의 잔기인 E183, Q186, R189 및 G210은 리간드 결합 시 N-말단으로부터 최대 거리 변화를 일으킬 것으로 예상되었다.

[0098] FRER-기반 센서의 제조, 발현 및 정제

[0099] 상기 메티오닌-결합 단백질인 MetQ의 유전자는 *E.coli* DH5 α TM (Invitrogen, California, USA)로부터 증폭되었으며, 상기 YFP 유전자는 상업적 유전자 합성으로부터 획득되었다. 상기 YFP-MetQ 융합 유전자는 중첩 확장 PCR에 의해 합성되었으며 pBAD/Myc-His(Invitrogen)로 클로닝되어 pBAD-YFP-MetQ-WT를 생성시켰다. MetQ 엔지니어링을 위한 모든 돌연변이는 제조사의 프로토콜(Invitrogen, California, USA)에 따라 위치-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)에 의해 도입되었다.

[0100] 상기 MetQ에 형광 공여체로서 비천연 아미노산인 CouA를 도입하기 위해, MetQ의 E183(서열번호 1 내지 12에서 154 번 위치), Q186(서열번호 1 내지 12에서 157 번 위치), R189(서열번호 1 내지 12에서 160번 위치) 및 G210(서열번호 1 내지 12에서 181번 위치) 위치에 대한 각각의 코돈을 위치-특이적 돌연변이 유발에 의해 앰버 코돈(TAG)으로 대체하였다.

[0101] 지정된 돌연변이를 갖는 YFP-MetQ-R189TAG, YFP-MetQ-E183TAG, YFP-MetQ-Q186TAG, 및 YFP-MetQ-G210TAG 융합 유전자를 포함하는 각각의 pBAD 플라스미드가 pEvo1-CouA-RS28로 *E.coli* C321. Δ 균주(Addgene) 내로 공동 형질전환되었다. 형질전환된 세포는 암피실린(100 μ g/mL)과 클로람페니콜(35 μ g/mL)이 첨가된 LB(lysogeny broth) 배지에서 증폭되었으며, 암피실린(100 μ g /mL), 클로람페니콜(35 μ g /mL) 및 1 mM CouA가 보충된 100 mL LB 배지에 37°C에서 접종하기 위해 스타터 배양액(2 mL)이 사용되었다.

[0102] 4 개의 돌연변이체 단백질(YFP-MetQ-E183CouA, YFP-MetQ-Q186CouA, YFP-MetQ-R189CouA 및 YFP-MetQ-G210CouA)은 아미노아실-tRNACUA(aa-tRNA)/아미노아실-tRNA 합성 효소 쌍(CouRS)의 존재 하에서 CouA 및 1 mM의 CouA에 대해 발현되었다. 단백질의 발현은 광학 밀도가 0.8(550 nm)에 도달하였을 때 0.2% L-아라비노스를 첨가하여 유도되었으며, 그 배양물은 37°C에서 밤새 성장되었다. 세포는 4°C에서 5 분 동안 10,000 rpm으로 원심분리하여 수확되었고, 용해 버퍼(lysis buffer, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸 및 pH 8.0)에서 재분산되고 초음파처리 되었다.

[0103] 상기 돌연변이체 단백질은 제조사의 프로토콜(Qiagen, Hilden Germany)에 따라 자연 조건 하에서 Ni-NTA 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제되었고, 정제된 단백질은 인산염 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl 및 pH 9.0)에 8 회 투석하여 L-메티오닌을 제거하였다. 정제 수율은 15 mg 내지 20 mg이었다(YFP-MetQ-WT의 수율은 30 mg 내지 35 mg). SDS-PAGE 분석은 쿠마시 염색된 이미지에서 상기 단백질의 정확한 크기(55 kDa)를 나타냈으며, 형광 이미지에서 유전적으로 결합된 CouA로부터의 명확한 형광을 나타내었다.

[0105] 제조된 FRET-기반 센서의 특성 분석

[0106] 결합 친화도 및 선택성 분석

[0107] E183(서열번호 1 내지 12에서 154번 위치), Q186(서열번호 1 내지 12에서 157번 위치), R189(서열번호 1 내지 12에서 160번 위치) 및 G210(서열번호 1 내지 12에서 181번 위치)의 지정된 위치에서 CouA를 포함하는 상기 YFP-MetQ 돌연변이체는, 메티오닌 결합 시의 FRET 신호 변화를 측정함으로써 평가되었다.

[0108] 분석 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl 및 pH 9.0)에서 각각의 센서 단백질의 형광 스펙트럼을 각 아미노산의 존재(표시된 농도) 및 부재 시 360 nm 여기 하에서 420 nm 내지 600 nm에서 기록하였다. FRET 비율 및 FRET 비율 변화는 하기 식 1을 사용하여 각 형광 스펙트럼으로부터 계산되었다.

- [0110] FRET 비율 변화 = $\Delta R/R_0 = (R_c - R_0)/R_0$ (1)
- [0112] 여기서, R_0 는 [리간드] = 0에서의 FRET 비율이고, R_c 는 [리간드] = C에서의 FRET 비율이다.
- [0113] 모든 측정은 독립적으로 3 번 수행되었으며 데이터를 평균화하였다. 센서 단백질의 해리 상수는 Origin 소프트웨어를 사용하여 계산되었다.
- [0114] 각각의 돌연변이체의 형광 스펙트럼은 360 nm 여기 하에 L-메티오닌의 존재(10 μ M) 또는 부재 시 기록되었다. 도 2의 (a) 내지 (d)는, L-메티오닌의 존재 및 부재 하에서, CouA를 포함하는 YFP-MetQ 돌연변이체들의 형광 스펙트럼을 나타낸 그래프이다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 10 μ M L-메티오닌]. 상기 실시예에서 제조된 모든 센서 단백질은 468 nm에서 형광 강도가 감소하였고(I_{CouA}), 537 nm에서 형광 강도가 증가하는 중요한 스펙트럼 변화를 나타냈다(I_{YFP}). 상기 데이터로부터, FRET 비율(R , I_{YFP}/I_{CouA}) 및 FRET 비율 변화량($\Delta R/R_0$)이 계산되었다.
- [0115] 도 3은, 상기 도 2의 데이터로부터 계산된 CouA를 포함하는 YFP-MetQ 돌연변이체들의 FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다. FRET 비율은 L-메티오닌의 존재 및 부재 하에 360 nm에서 여기 시 $I_{CouA, 468\text{ nm}}$ 및 $I_{YFP, 537\text{ nm}}$ 에서 계산되었다. FRET 비율의 변화는 상기 식 1로부터 계산되었으며, 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다.
- [0116] 상기 돌연변이 센서 단백질에 대한 $\Delta R/R_0$ 값을 계산한 결과, 189 위치에서 CouA를 포함하는 YFP-MetQ-R189CouA의 $\Delta R/R_0$ 값($\Delta R/R_0 = 1.7$)이 가장 크다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 CouA의 도입을 위한 구조-기반의 합리적인 설계와 유용한 잔기들의 간단한 스크리닝이, 형광에서 현저한 변화를 갖는 L-메티오닌 결합에 반응하는 우수한 센서 단백질을 생성함을 보여준다.
- [0117] 상기 돌연변이체 센서 단백질인 YFP-MetQ-R189CouA는, 다양한 농도의 L-메티오닌에서 형광 스펙트럼을 기록함으로써 추가로 특성 분석되었다. 도 4는, L-메티오닌으로 적정한 YFP-MetQ-R189CouA의 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 메티오닌(표시된 농도)]. 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다.
- [0118] 이러한 결과로부터, $\Delta R/R_0$ 값을 계산하여 L-메티오닌 농도에 대해 플롯팅하였다. 이러한 결과는 MetQ가 해리 상수 $K_d = 25.9\text{ nM}$ 으로 L-메티오닌에 대해 강한 친화도를 갖는다는 것을 나타냈다. MetQ는 D-메티오닌 업테이크(uptake)에서도 기능을 하는 것으로 알려져 있으므로, 상기 센서 단백질을 D-메티오닌에 대한 결합 친화도를 평가하기 위해 테스트하였다. 동일한 적정 실험이 수행되었으며 $\Delta R/R_0$ 값을 플롯팅하여 해리 상수 $K_d = 9.2\text{ }\mu\text{M}$ 을 얻었다. 도 5는, D-메티오닌으로 적정한 YFP-MetQ-R189CouA의 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) FRET 비율 변화를 나타낸 그래프이다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 메티오닌(표시된 농도)]. 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다.
- [0119] D-메티오닌에 대한 MetQ의 결합 친화도가 L-메티오닌에 대한 결합 친화도보다 현저히 낮았지만, 상기 친화도는 여전히 D-메티오닌의 세포 업테이크(uptake)에 적합하였다. 상기 센서 단백질을 다른 천연 아미노산에 대한 선택성에 대해서도 평가하였다. 19 개의 천연 아미노산을 이용하여 형광이 측정되었으며, $\Delta R/R_0$ 값이 계산되었다. 도 6은, 20 가지 천연 아미노산 및 D-메티오닌에 대한 YFP-MetQ-R189CouA의 선택성 분석 결과를 나타낸다. FRET 비율은 각각의 아미노산의 존재 및 부재 하에 360 nm에서 여기 시 $I_{CouA, 468\text{ nm}}$ 및 $I_{YFP, 537\text{ nm}}$ 에서 계산되었다. FRET 비율의 변화는 식 1로부터 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 50 μ M 아미노산].
- [0120] 그 결과, 상기 센서는 50 μ M 농도에서 또한 유의한 FRET 변화를 가지며 D-메티오닌 및 L-글리신을 인식한다는 것이 나타났다. 전체적으로, 상기 설계된 센서 단백질인 YFP-MetQ-R189CouA는 강한 결합 친화도로 L-메티오닌 결합 시 큰 FRET 변화를 나타낸 반면, 상기 단백질은 D-메티오닌 및 L-글리신에 대해 약한 친화성을 보였고, L-메티오닌 특이적 감지를 위해 개선될 필요가 있었다.

[0122] **2. 향상된 선택성을 갖는 FRET-기반 센서의 설계**

[0123] D-메티오닌 및 L-글리신에 대한 MetQ의 친화도를 감소시키고 L-메티오닌만을 특이적 감지하기 위해, 상기 제조된 센서 단백질을 결합 위치 근처의 잔기를 돌연변이시킴으로써 조작하였다. Y69(서열번호 1 내지 서열번호 12의 40번 위치), H88(서열번호 1 내지 서열번호 12의 59번 위치), 및 N141(서열번호 1 내지 서열번호 12의 112번 위치)은 MetQ의 결정 구조에서 리간드 결합 위치에 위치하며 상기 단백질의 결합 친화도에 영향을 줄 것으로 예상되었다. 상기 YFP-MetQ-R189CouA에서의 잔기는 다른 아미노산으로 돌연변이 되었으며, $\Delta R/R_0$ 값은 각 돌연변이체 센서 단백질에 대해 L-메티오닌, D-메티오닌 및 L-글리신의 3 가지 상이한 농도에서 측정되었다.

[0125] **제조된 FRET-기반 센서의 특성 분석**

[0126] **결합 친화도 및 선택성 분석**

[0127] 도 7은, L-메티오닌, D-메티오닌 및 L-글리신에 대한 YFP-MetQ-R189CouA 돌연변이체의 선택성 분석 결과를 나타낸다. FRET 비율은 각각의 아미노산의 존재 및 부재 하에 360 nm에서 여기 시 $I_{\text{CouA}, 468 \text{ nm}}$ 및 $I_{\text{YFP}, 537 \text{ nm}}$ 에서 계산되었다. FRET 비율 변화는 상기 식 1로부터 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 아미노산(표시된 농도)].

[0128] 모든 돌연변이체에서, 3 개의 모든 아미노산에 대한 친화도는 감소되었지만, H88F 돌연변이를 갖는 돌연변이체는 L-메티오닌에 대한 친화도가 약간 감소하면서 D-메티오닌 및 L-글리신에 대해 최소값의 친화도를 보였다. 상기 H88F 돌연변이에 의해, D-메티오닌 및 L-글리신에 대한 친화도를 감소시킴으로써 상기 센서의 L-메티오닌에 대한 특이성이 현저하게 개선되었다.

[0129] 제조된 YFP-MetQ-R189CouA-H88F는 L-메티오닌 결합 시 큰 FRET 변화를 나타내었고 D-메티오닌을 포함한 다른 아미노산에서는 거의 변화가 없었다. 도 8 및 도 9의 데이터를 기반으로, 상기 센서는 0.1 μM 의 검출 한계로 0.5 μM 및 10 μM 의 범위에서 L-메티오닌 농도를 측정할 수 있을 것으로 예상되었다. 도 8은, L-메티오닌으로 적정된 YFP-MetQ-R189CouA-H88F의 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) FRET 비율 변화를, 도 9는 D-메티오닌으로 적정된 YFP-MetQ-R189CouA-H88F의 (a) 형광 스펙트럼 및 (b) FRET 비율 변화를 나타낸다. 그래프이다. 도 8 및 9에서, 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적인 실험의 평균을 나타내며, 분석 조건은 다음과 같다: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 Met(표시된 농도).

[0131] **FBS에서의 L-메티오닌 농도 측정**

[0132] 상기 센서 단백질은 복잡한 생물학적 샘플에서 L-메티오닌 농도를 측정하기 위해 사용되었다. FBS는 소 태아에서 추출한 혈액의 액체 부분으로 세포 배양에서 필수 영양소 공급원으로서 일반적으로 사용된다. FBS는 소 혈청 알부민, 성장 인자, 아미노산, 비타민, 당 및 지질을 비롯한 다양한 생체 분자로 형성된다. 아미노산 대사는 인간의 질병에 관여하기 때문에 혈액 샘플의 아미노산 농도 분석은 임상적으로 중요하다. 일반적으로, 복잡한 생물학적 샘플에서의 아미노산 농도는 o-프탈알데히드(o-phthalaldehyde, OPA)와 같은 알데히드로 아미노산을 유도체화한 후 HPLC로 측정되며, 이것은 노동집약적이며 시간소모적이다. L-메티오닌 결합으로부터 상기 센서 단백질의 FRET 신호 변화는 크고 L-메티오닌에 매우 특이적이며, 이것은 혈액 샘플에서 L-메티오닌 농도의 결정하는 데에 있어 최적이다.

[0133] 먼저, 도 8의 L-메티오닌 적정 실험으로부터 피팅식이 유도되었으며, FBS에서 L-메티오닌 농도를 결정하는데 사용되었다. 인산염 버퍼(50 mM NaH_2PO_4 , 50 mM NaCl 및 pH 9.0)로 상업용 FBS를 희석하여 상이한 희석 농도(0.0025 배, 0.005 배, 0.01 배 및 0.025 배 희석)의 FBS 샘플들을 준비하였다. 각 샘플은 동일한 버퍼에서 YFP-MetQ-R189CouA-H88F(100 nM)와 혼합되었고 5 분 동안 실온에서 배양되었다. 형광 스펙트럼은 360 nm 여기 하에서 기록되었으며, FRET 비율 변화를 계산하였다. 피팅식을 사용하여, L-메티오닌 농도를 확인하였다.

[0134] 도 10은, 20 개의 천연 아미노산 및 D-메티오닌에 대한 YFP-MetQ-R189CouA-H88F의 선택성 분석 결과를 나타낸 그래프이다. FRET 비율의 변화는 도 6에 나타난 방법으로 계산되었으며, 각각의 데이터 포인트는 3 번의 독립적

인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 50 μ M 아미노산].

[0135] 이러한 결과들로부터 FBS 중 L-메티오닌 농도가 18.3 μ M인 것으로 결정되었다. 상기 값은 혈액 중 L-메티오닌의 농도의 종래 보고된 범위(15 μ M 내지 30 μ M) 내였다.

[0137] **광학 순도 측정**

[0138] α -아미노산은 입체발생중심(stereogenic center)을 가지며, 아미노산의 광학 순도를 결정하는 것은 화학에서 중요한 분석 과정이다. 카이랄 HPLC 및 특정 회전 분석과 같은 현재 방법들에 대한 대안으로서, D-메티오닌과 L-메티오닌 혼합물의 광학 순도를 상기 센서 단백질을 사용하는 FRET 분석에 의해 결정하였다.

[0139] 인산염 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl 및 pH 9.0) 중 L-메티오닌 및 D-메티오닌의 스톡 용액(10 μ M)이 표시된 비율(총 부피 200 μ L)로 혼합되었다. 동일한 버퍼 중 YFP-MetQ-R189CouA-H88F(100 nM, 최종 농도)가 첨가되었으며, 360 nm의 여기 하에서 형광을 측정하였다. L-메티오닌 적정 실험의 피팅식을 사용하여 광학 순도를 확인하여 표 1에 나타내었다.

표 1

Sample	[L-isomer] (μ M)	[D-isomer] (μ M)	Theoretical ee (%)	Measured ee (%)
1	0	10.0	-100	-99.95 ($\pm$ 0.043)
2	1.0	9.0	-80	-80.20 ($\pm$ 0.65)
3	2.5	7.5	-50	-48.27 ($\pm$ 0.35)
4	4.0	6.0	-20	-18.69 ($\pm$ 1.91)
5	5.0	5.0	0	-0.95 ($\pm$ 1.99)
6	6.0	4.0	20	22.21 ($\pm$ 4.33)
7	7.5	2.5	50	48.10 ($\pm$ 4.43)
8	9.0	1.0	80	78.31 ($\pm$ 4.98)
9	10.0	0	100	99.77 ($\pm$ 4.37)

[0141]

[0143] 도 11은, FBS에서 L-메티오닌 농도를 측정하기 위해 FBS로 적정된 YFP-MetQ-R189CouA-H88F의 형광 스펙트럼을 나타낸다. 상기 형광 스펙트럼은 FBS의 각 농도에서 360 nm 여기 하에서 기록되었다. 각 FBS 샘플에서 L-메티오닌의 농도는 도 8의 적정 실험으로부터 피팅식을 사용하여 결정되었다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산염 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 FBS(표시된 농도)].

[0144] 상기 결과로부터 각 샘플의 광학 순도를 결정하였으며, 그 값들을 근사하였다. 이러한 방법은 실험적으로 간단하고 적은 양의 샘플(1 μ g 미만)이 요구되며, 이것은 다른 방법에 비해 이점을 갖는다.

[0146] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만

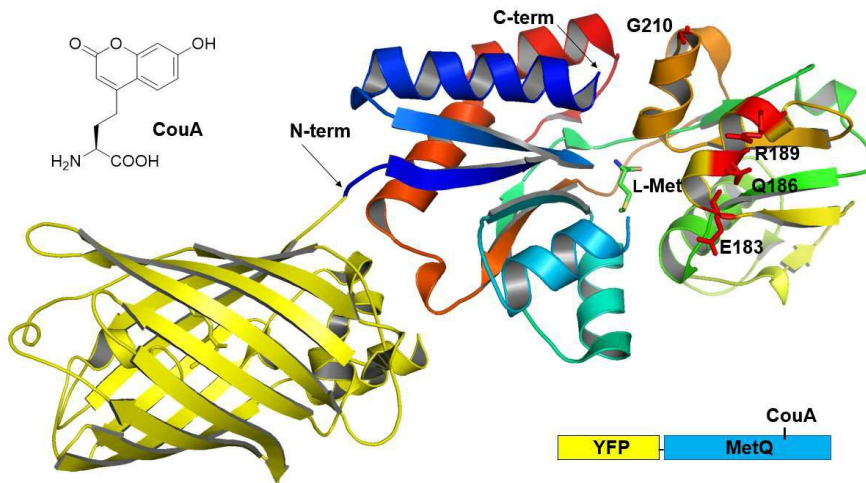
한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0147]

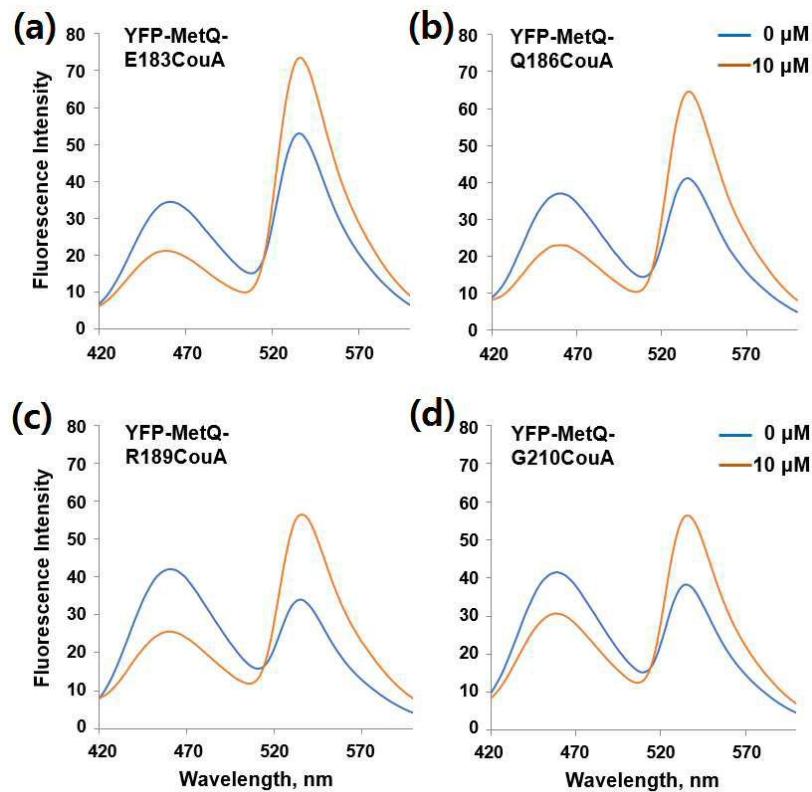
본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

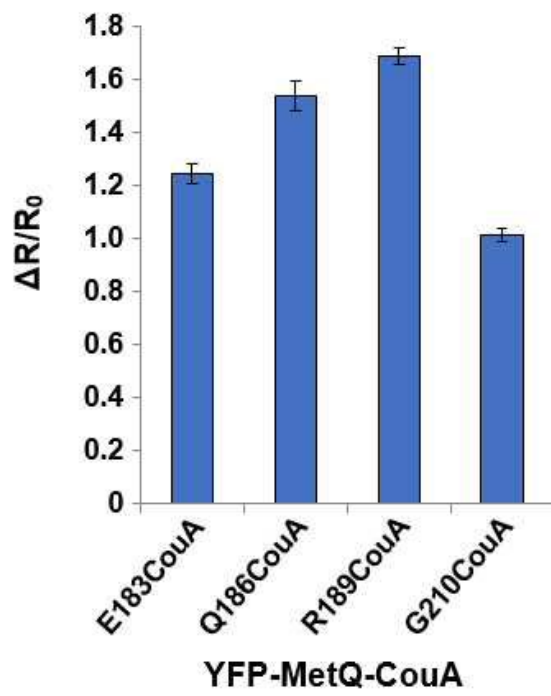
도면1



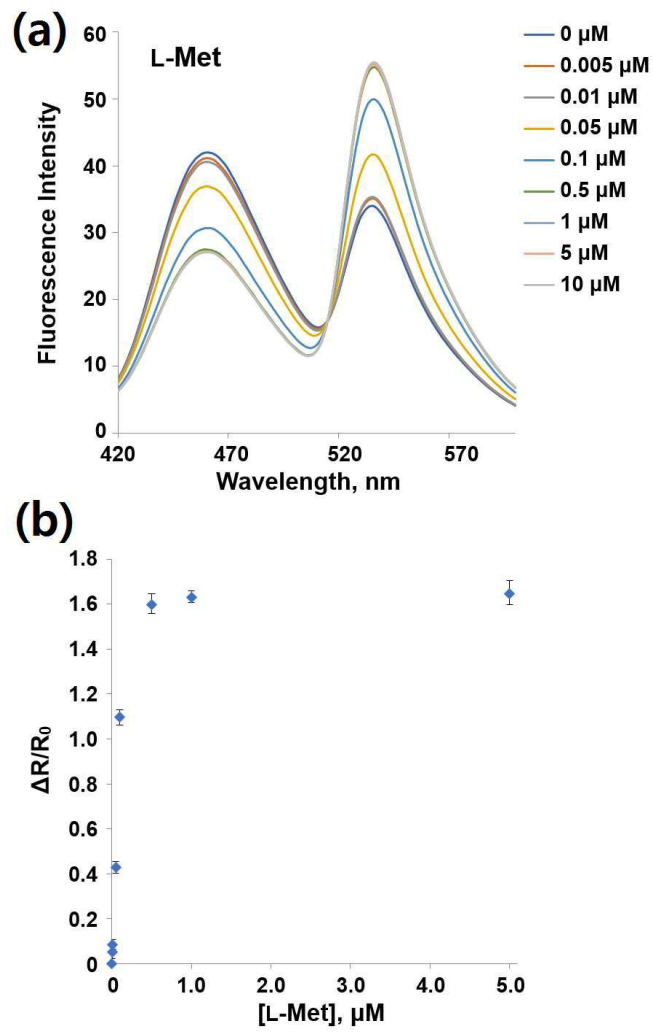
도면2



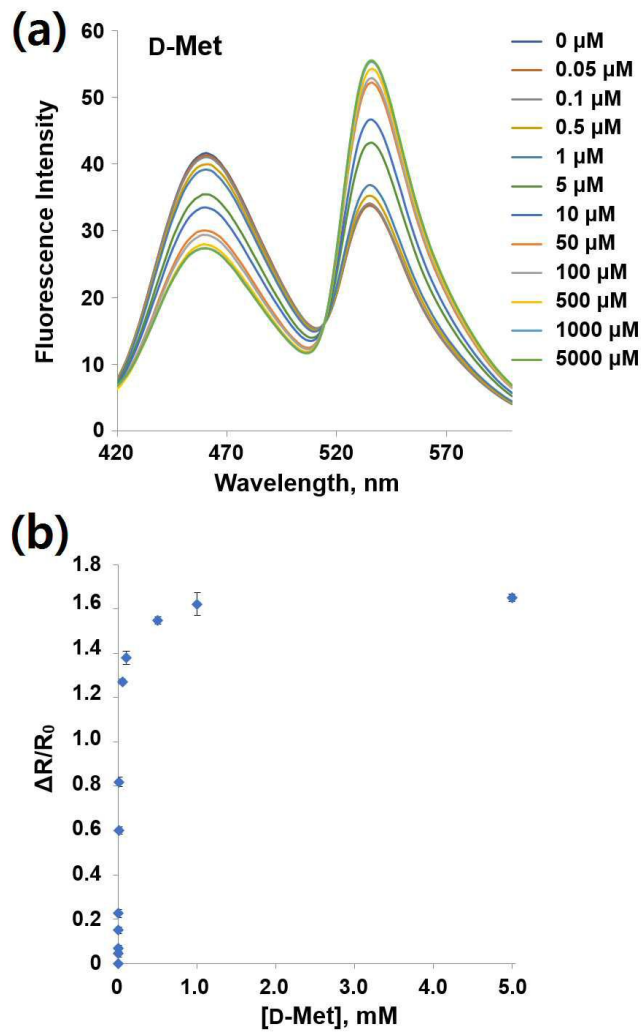
도면3



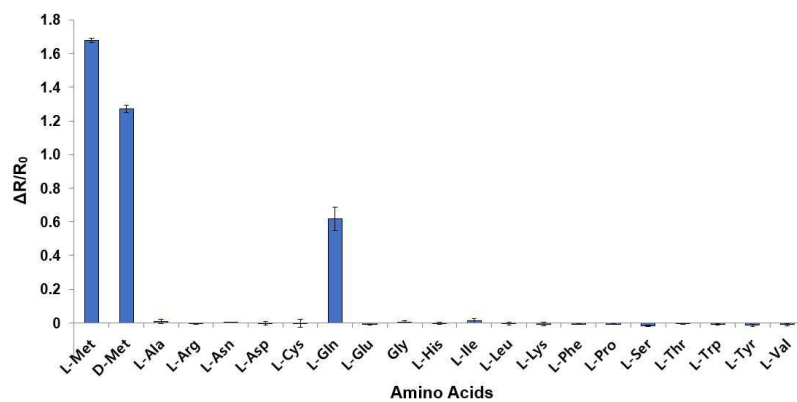
도면4



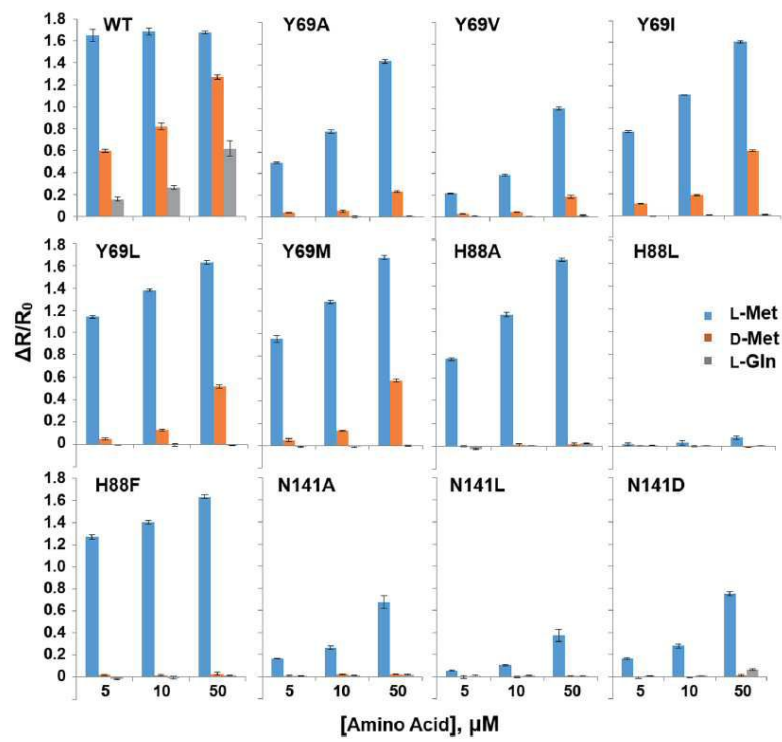
도면5



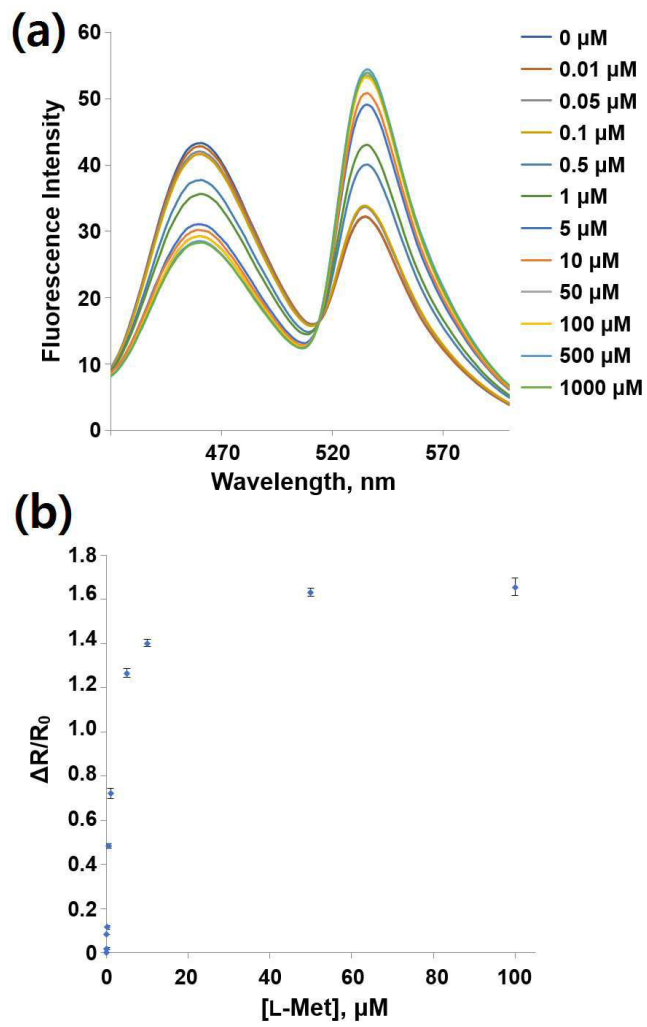
도면6



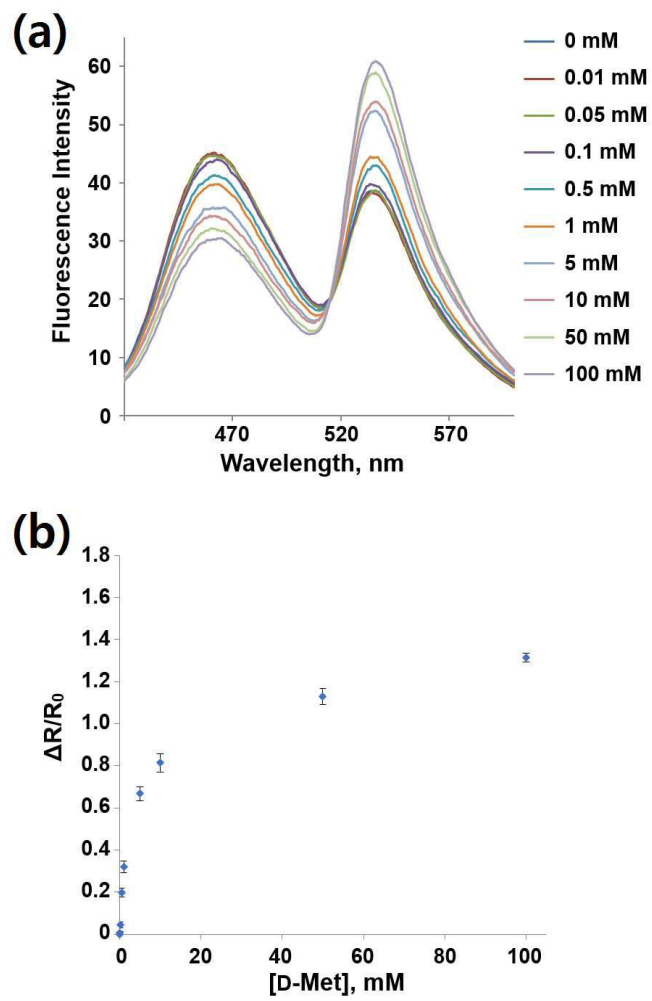
도면7



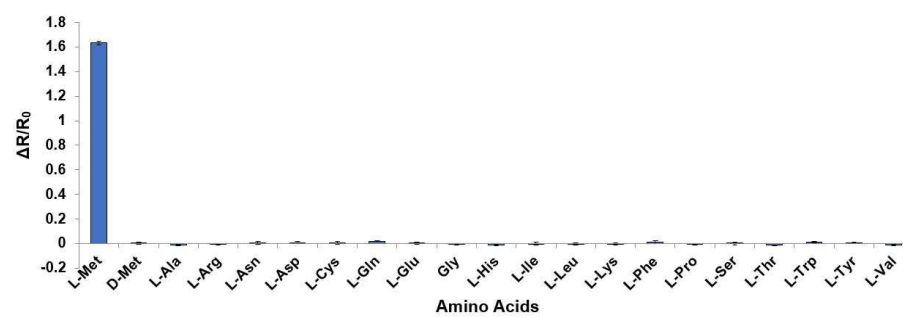
도면8



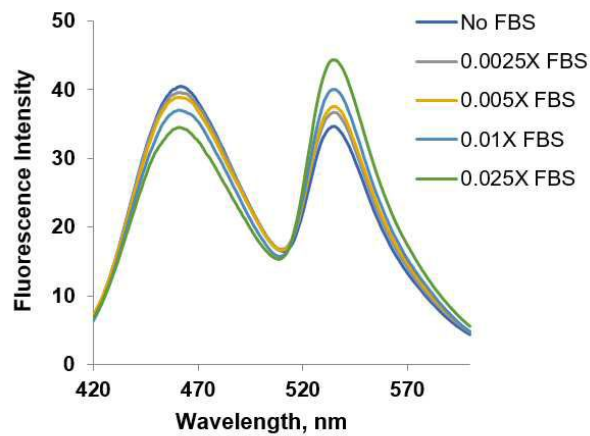
도면9



도면10



도면11



FBS Dilution	Measured concentration (nM)	Concentration in 1X FBS (μM)	
		Each sample	Average
0.0025X	39.7	15.9	18.3 (±3.5)
0.005X	75.2	15.0	
0.01X	196	19.6	
0.025X	565	22.6	

서열 목록

<110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION

<120> SENSOR FOR DETECTING L-METHIONINE AND DETECTING METHOD OF L-METHIONINE USING THE SAME

<130> DP20190458KR

<160> 15

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ

<400> 1

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val

1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val

Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Xaa Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser
35 40 45
Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln Xaa Lys Pro Tyr Leu Asp
50 55 60
Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr
65 70 75 80
Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp
85 90 95

Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Xaa
100 105 110
Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu
115 120 125
Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn
130 135 140
Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg
145 150 155 160
Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr

165 170 175
Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu
180 185 190
Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn
195 200 205
Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp
210 215 220
Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys
225 230 235 240

Gly Trp

<210> 2

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-Y69A

<400> 2

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val

1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val

20 25 30

Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Ala Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser

35 40 45

Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln His Lys Pro Tyr Leu Asp

50 55 60

Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr

65 70 75 80

Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp

85 90 95

Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Asn

100 105 110

Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu

115 120 125

Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn

130 135 140

Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg

145 150 155 160

Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr

165 170 175

Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu

180 185 190

Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn

195 200 205

Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp

210 215 220

Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys

225 230 235 240

Gly Trp

<210> 3

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-Y69V

<400> 3

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val

1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val

20 25 30

Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Val Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser

35 40 45

Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln His Lys Pro Tyr Leu Asp

50 55 60

Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr

65 70 75 80

Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp

85 90 95

Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Asn

100 105 110

Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu

115 120 125

Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn

130 135 140

Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg

145 150 155 160

Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr

165 170 175

Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu

180 185 190

Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn
195 200 205

Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp
210 215 220

Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys

225 230 235 240

Gly Trp

<210> 4

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-Y69I

<400> 4

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val

1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val

20 25 30

Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Ile Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser

35 40 45

Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln His Lys Pro Tyr Leu Asp

50 55 60

Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr

65 70 75 80

Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp

85 90 95

Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Asn

100 105 110

Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu

115 120 125

Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn

130 135 140

Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg
 145 150 155 160
 Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr
 165 170 175
 Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu
 180 185 190
 Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn
 195 200 205
 Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp
 210 215 220
 Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys
 225 230 235 240
 Gly Trp

<210> 5
 <211> 242
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-Y69L

<400> 5
 Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val
 1 5 10 15
 Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val
 20 25 30
 Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Leu Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser
 35 40 45
 Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln His Lys Pro Tyr Leu Asp
 50 55 60
 Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr
 65 70 75 80
 Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp
 85 90 95

Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Asn
100 105 110
Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu
115 120 125
Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn
130 135 140
Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg
145 150 155 160
Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr
165 170 175
Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu
180 185 190
Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn
195 200 205
Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp
210 215 220
Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys
225 230 235 240
Gly Trp

<210> 6

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-Y69M

<400> 6

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val
1 5 10 15
Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val

20 25 30
Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Met Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser
35 40 45

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

Gly Trp

<210> 7

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-H88A

<400> 7

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

<210> 8

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-H88L

<400> 8

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val

1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val

20 25 30

Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Tyr Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser

35 40 45

Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln Leu Lys Pro Tyr Leu Asp

50 55 60

Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr

65 70 75 80

Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp

85 90 95

Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Asn

100 105 110

Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu

115 120 125

Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn

130 135 140

Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg

145 150 155 160

Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr

165 170 175

Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu

180 185 190

Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn

195 200 205

Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp
210 215 220

Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys

225 230 235 240

Gly Trp

<210> 9
<211> 242
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> MetQ-H88F
<400> 9

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val
1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val
20 25 30

Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Tyr Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser

35 40 45

Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln Phe Lys Pro Tyr Leu Asp
50 55 60

Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr
65 70 75 80

Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp
85 90 95

Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Asn
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu
115 120 125

Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn
130 135 140

Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg
145 150 155 160

Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr
165 170 175
Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu
180 185 190
Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn
195 200 205
Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp
210 215 220
Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys
225 230 235 240
Gly Trp

<210> 10
<211> 242
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-N141A

<400> 10

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val
1 5 10 15
Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val
20 25 30
Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Tyr Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser
35 40 45
Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln His Lys Pro Tyr Leu Asp
50 55 60
Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr
65 70 75 80
Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp
85 90 95
Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Ala
100 105 110

Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu

115 120 125

Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn

130 135 140

Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg

145 150 155 160

Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr

165 170 175

Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu

180 185 190

Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn

195 200 205

Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp

210 215 220

Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys

225 230 235 240

Gly Trp

<210> 11

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MetQ-N141L

<400> 11

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val

1 5 10 15

Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys Tyr Gly Leu Asp Val

20 25 30

Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Tyr Val Leu Pro Asn Glu Ala Leu Ser

35 40 45

Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln His Lys Pro Tyr Leu Asp

50 55 60

Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val Ala Val Gly Asn Thr
65 70 75 80
Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys Ile Lys Ser Leu Asp
85 90 95
Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro Asn Asp Pro Thr Leu
100 105 110
Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val Gly Leu Ile Lys Leu
115 120 125
Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu Asp Val Val Glu Asn
130 135 140
Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala Pro Gln Leu Pro Arg
145 150 155 160
Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val Ile Asn Thr Thr Tyr
165 170 175
Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp Gly Ile Phe Val Glu
180 185 190
Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val Thr Arg Glu Asp Asn
195 200 205
Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp
210 215 220
Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys
225 230 235 240

Gly Trp

<210> 12
<211> 242
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> MetQ-N141D
<400> 12

Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly Ala Glu Gln Gln Val
1 5 10 15

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

<210> 13

<211> 479

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> YFP-MetQ-H88F

<400> 13

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu

1 5 10 15

Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly

20 25 30

Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile

35 40 45

Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60

Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys

65 70 75 80

Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu

85 90 95

Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu

100 105 110

Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly

115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr

130 135 140

Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145 150 155 160

Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser

165 170 175

Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly

180 185 190

Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu

195 200 205

Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe

210 215 220

Val Thr Ala Ala Gly Pro Asn His Ile Lys Val Gly Val Ile Val Gly

225 230 235 240

Ala Glu Gln Gln Val Ala Glu Val Ala Gln Lys Val Ala Lys Asp Lys

245 250 255

Tyr Gly Leu Asp Val Glu Leu Val Thr Phe Asn Asp Tyr Val Leu Pro

260 265 270

Asn Glu Ala Leu Ser Lys Gly Asp Ile Asp Ala Asn Ala Phe Gln Phe

275 280 285

Lys Pro Tyr Leu Asp Gln Gln Leu Lys Asp Arg Gly Tyr Lys Leu Val

290 295 300

Ala Val Gly Asn Thr Phe Val Tyr Pro Ile Ala Gly Tyr Ser Lys Lys

305 310 315 320

Ile Lys Ser Leu Asp Glu Leu Gln Asp Gly Ser Gln Val Ala Val Pro

325 330 335

Asn Asp Pro Thr Asn Leu Gly Arg Ser Leu Leu Leu Leu Gln Lys Val

340 345 350

Gly Leu Ile Lys Leu Lys Asp Gly Val Gly Leu Leu Pro Thr Val Leu

355 360 365

Asp Val Val Glu Asn Pro Lys Asn Leu Lys Ile Val Glu Leu Glu Ala

370 375 380

Pro Gln Leu Pro Arg Ser Leu Asp Asp Ala Gln Ile Ala Leu Ala Val

385 390 395 400

Ile Asn Thr Thr Tyr Ala Ser Gln Ile Gly Leu Thr Pro Ala Lys Asp

405 410 415

Gly Ile Phe Val Glu Asp Lys Glu Ser Pro Tyr Val Asn Leu Ile Val

420 425 430

Thr Arg Glu Asp Asn Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln

435 440 445

Ala Tyr Gln Ser Asp Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn

450 455 460

Gly Gly Ala Val Lys Gly Trp Gly Gly His His His His His His

465	470										475									
<210>	14																			
<211>	242																			
<212>	PRT																			
<213>	Artificial Sequence																			
<220><223>	MetQ-wild type																			
<400>	14																			
Pro	Asn	His	Ile	Lys	Val	Gly	Val	Ile	Val	Gly	Ala	Glu	Gln	Gln	Val					
1	5				10				15											
Ala	Glu	Val	Ala	Gln	Lys	Val	Ala	Lys	Asp	Lys	Tyr	Gly	Leu	Asp	Val					
20				25				30												
Glu	Leu	Val	Thr	Phe	Asn	Asp	Tyr	Val	Leu	Pro	Asn	Glu	Ala	Leu	Ser					
35				40				45												
Lys	Gly	Asp	Ile	Asp	Ala	Asn	Ala	Phe	Gln	His	Lys	Pro	Tyr	Leu	Asp					
50				55				60												
Gln	Gln	Leu	Lys	Asp	Arg	Gly	Tyr	Lys	Leu	Val	Ala	Val	Gly	Asn	Thr					
65	70				75				80											
Phe	Val	Tyr	Pro	Ile	Ala	Gly	Tyr	Ser	Lys	Lys	Ile	Lys	Ser	Leu	Asp					
85				90				95												
Glu	Leu	Gln	Asp	Gly	Ser	Gln	Val	Ala	Val	Pro	Asn	Asp	Pro	Thr	Asn					
100				105				110												
Leu	Gly	Arg	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Gln	Lys	Val	Gly	Leu	Ile	Lys	Leu					
115				120				125												
Lys	Asp	Gly	Val	Gly	Leu	Leu	Pro	Thr	Val	Leu	Asp	Val	Val	Glu	Asn					
130				135				140												
Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Ile	Val	Glu	Leu	Glu	Ala	Pro	Gln	Leu	Pro	Arg					
145	150				155				160											
Ser	Leu	Asp	Asp	Ala	Gln	Ile	Ala	Leu	Ala	Val	Ile	Asn	Thr	Thr	Tyr					
165				170				175												
Ala	Ser	Gln	Ile	Gly	Leu	Thr	Pro	Ala	Lys	Asp	Gly	Ile	Phe	Val	Glu					
180				185				190												
Asp	Lys	Glu	Ser	Pro	Tyr	Val	Asn	Leu	Ile	Val	Thr	Arg	Glu	Asp	Asn					

195 200 205
 Lys Asp Ala Glu Asn Val Lys Lys Phe Val Gln Ala Tyr Gln Ser Asp
 210 215 220
 Glu Val Tyr Glu Ala Ala Asn Lys Val Phe Asn Gly Gly Ala Val Lys
 225 230 235 240

Gly Trp

<210> 15
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> YFP
 <400> 15

Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly
 20 25 30
 Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
 35 40 45
 Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr

50 55 60
 Phe Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65 70 75 80
 Arg His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
 100 105 110
 Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
 115 120 125

Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
 130 135 140
 Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn

145 150 155 160
 Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser
 165 170 175
 Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
 180 185 190
 Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu

 195 200 205
 Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
 210 215 220
 Val Thr Ala Ala Gly
 225