(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0011761
(43) 공개일자 2009년02월02일

(51) Int. Cl.[9]
C07K 14/195 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0075677
(22) 출원일자 2007년07월27일
심사청구일자 2007년07월27일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
(72) 발명자
최아름
서울시 마포구 대흥동 468-1 202호
김소영
서울시 마포구 합정동 431-18번지 401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

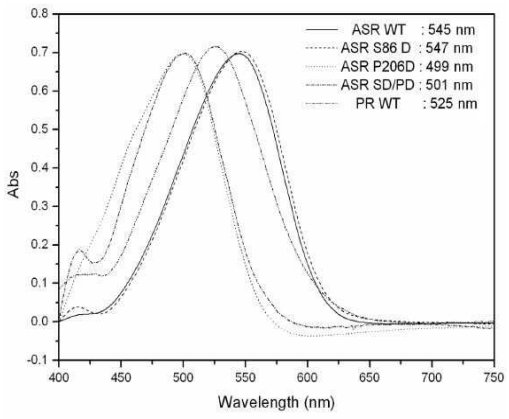
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 최대흡수파장이 변화된 Anabaena 센서 로돕신돌연변이 단백질

(57) 요 약

본 발명은 최대흡수파장이 변화된 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질에 관한 것이다. 본 발명은 서열목록 제 1 서열에서 206번째 아미노산 Pro 이 Asp 또는 Glu 으로 치환된 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 제공한다. 본 발명의 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질은 이의 최대흡수파장이 야생형 *Anabaena* 센서 로돕신 단백질의 것에 비해 블루-쉬프트(blue-shift) 되어 있기 때문에 에너지가 높은 단파장의 광을 조사하여 *Anabaena* 센서 로돕신의 센서 기능을 유도하여야 하는 경우에 매우 유용하게 적용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

윤사룡

서울시 영등포구 당산동 대우 메종아파트 101동 606호

배기호

서울시 성북구 보문동6가 153번지 한영맨션 5동 103호

정광환

경기도 성남시 분당구 이매동 삼성아파트 1025-503호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10816
부처명	서울특별시
연구사업명	서울시 산학연 협력사업(2006년 기술기반구축사업)
연구과제명	나노 기술을 이용한 바이오 융합산업 혁신클러스터
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2006년 08월 01일 ~ 2008년 07월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제 1 서열에서 206번째 아미노산 Pro 이 Asp 또는 Glu로 치환된 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질.

청구항 2

상기 제 1 항의 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열목록 제 2 서열 또는 제 3 서열인 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 4

(a) *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 인코딩하는 상기 제 2 항의 핵산 분자 및 (b) 상기 핵산 분자에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 벡터.

청구항 5

상기 제 4 항의 벡터를 포함하는 형질전환체.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 최대 흡수 파장이 블루-쉬프트 되어 변화된 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 광활성 레티닐화 단백질의 4가지 패밀리가 1971-1981년 동안 *Halobacterium salinarum* 의 세포질 막에서 발견되었다. 먼저 확인된 2가지 종류의 패밀리 단백질은 광-유도된 이온 수송체(ion transporter) 박테리오로돕신(bacteriorhodopsin, BR) [18] 및 할로로돕신(halorhodopsin, HR) 이다. BR 및 HR는 각각 광에너지를 사용하여 프로톤 및 염소(chloride)를 세포막을 통과하여 수송한다[19]. 다른 2가지 종류의 패밀리는 센서 로돕신(sensory rhodopsin, SR) I 및 II인데, 이들은 수송 단백질이 아니며, 광센서 단백질이다. SR I 및 SR II는 막 전달 단백질을 통해 신호를 세포 운동성 기구로 전달하는, 오렌지(orange) 및 블루-그린(blue-green) 광에 대한 유인제 및 반발제 광주성(phototaxis) 수용체이다[10].

<3> 고미생물의 수송 로돕신 및 센서 로돕신은 원자 구조 및 기능의 면에서 연구가 매우 잘 이루어져 있으며, 가장 잘 연구된 막 단백질들 중 하나이다[8, 17, 24, 26, 27].

<4> 최근, 다른 영역에서의 발현과 결합한 지놈 프로젝트 연구 결과에 의해 고미생물(archaeal) 영역외에서의 고미생물 로돕신의 상동성 있는 단백질을 발견하였다. 바다 피코플랑크톤(picoplankton)으로부터 얻어진 DNA 라이브러리에 의해 미개척의 프로테오박테리아 종인 SAR86에서 상동성 있는 서열을 발견하였다[3]. *Escherichia coli* 에서 이종의 옵신(opsin) 유전자를 발현시키면 레티날에 결합하여 수송 로돕신의 매우 빠른 광사이클 특성(15 ms)으로 효과적인 프로톤 수송을 행하는 광활성 색소를 생성하는 단백질을 생산한다[2]. 광사이클 속도는 Monterey Bay picoplankton으로부터 직접 만들어진 막에서 검출된 프로테오로돕신에서 수행하였다 [3]. 따라서 이 실험은 진정세균(eubacteria) 수송 로돕신의 존재를 확인한 것이다.

<5> 추가적인 상동성을 갖는 옵신 (아포단백질) 서열은 시아노박테리아(cyanobacteria)에서 발견되었다 [7]. 시아노박테리아의 로돕신 (할로단백질) 색소에 의해 센서 로돕신이 진정세균에서도 존재한다는 것을 확인하였다 [14]. 옵신 동족체(homolog)를 코딩하는 유전자는 Kazusa Institute, Japan에서 *Anabaena (Nostoc)* sp. PCC7120의 지놈 서열분석 프로젝트를 통해서 발견되었다. 옵신 유전자를 *E. coli*에서 발현시키고 all-*trans* 레티날에 결합시켜 543 nm에서 최대 흡수파장을 갖는 핑크 색소를 형성하였는데, 이는 광 적응된 *Anabaena* 로돕신

에서 레티날의 all-*trans* 및 13-*cis* 형태의 혼합물이다[12]. 또한, *Anabaena* 로돕신의 최대 흡수 파장은 암조건-적응된 형태에서 549 nm인 것으로 보고되었다 [6].

<6> *E. coli* 막에서 *Anabaena* 로돕신은 pH 6.8에서 M 광중간체 및 110 ms 반감기 사이클을 갖는 광화학적 사이클을 나타내었고, 흥미롭게도 13-*cis* 광사이클을 나타내었다 [4, 12, 21]. 지놈에서 동일한 프로모터하에서 존재하는 16 bp에 의해 분리된 *Anabaena* 옵신 유전자 및 다른 ORF (open reading frame)가 발견되었다. 이 오페론은 261-아미노산(옵신) 및 125-아미노산(14 kDa) 단백질을 각각 코딩하는 것으로 예측되었다.

<7> *Anabaena* 로돕신과 용해성 변환단백질(transducer)가 *E. coli* 에서 공동발현되었을때, 광 사이클이 20% 까지 증가하였는데, 이는 두 단백질간의 물리적 접촉을 암시하는 것이다. 이 색소는 *E. coli* 에서 발현시켰을때 검출가능한 정도의 프로톤 수송 활성은 나타내지는 않았고, BR(박테리오로돕신)의 프로톤 도너인 Asp96 이 *Anabaena* 로돕신에서 Ser86으로 교체되어 있었다. 일반적으로 BR 에서는 발색단(chromophore)인 all-*trans* 레티날이 막 내부 깊숙이 위치한 라이신(lysine) 잔기의 ε-아미노기에 시프 염기(Schiff base)를 통해서 공유결합적으로 연결되어 있다. 세포가 빛을 받으면, 박테리오로돕신에 결합된 all-*trans* 레티날이 광자(photon)를 흡수하고 13-*cis*-레티날로 광이성화(photoisomerization)를 진행하여, 프로톤을 플라스마막을 통해 밖으로 이동시키면서 all-*trans* 레티날로 다시 회복된다. 암조건하에서 시프 염기는 프로톤화되지만, 레티날이 광이성화되면 이 그룹의 pKa를 낮추고 이의 프로톤을 Asp85(프로톤 수용자) 잔기 근처로 방출하고, 연속적인 프로톤 도약(hop)을 개시하여 최종적으로 프로톤을 막의 외부 표면으로 방출시킨다[5]. 프로톤이 펌핑된 후, 시프 염기는 Asp96(프로톤 공여자)으로부터 프로톤을 얻고, Asp96는 다시 세포질로부터 프로톤을 얻는다. BR의 경우와 대조적으로, *Anabaena* 로돕신은 프로톤 공여자가 Ser86 잔기로 대체되어 있다.

<8> 이러한 관찰은 막단백질인 변환단백질(transducer)과의 막통과(transmembrane) 나선-나선(helix-helix) 상호작용에 의해 신호를 전달하는 고미생물 센서 로돕신[8]과는 다르게, *Anabaena* 로돕신이 자연적인 환경하에서 광센서 수용체로서 기능하며, 125 아미노산 잔기로 이루어진 세포질 용해성 단백질이 광수용체로부터의 신호를 전달한다[12]는 점을 신빙성 있게 암시하는 것이다.

<9>

<10> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<11> 본 발명자들은 *Anabaena* 센서 로돕신에서 광의 최대흡수파장이 야생형의 것과 비교하여 짧게 변화된 돌연변이 단백질을 찾기 위해 연구 노력한 결과, 서열목록 제1서열로 표현되는 야생형 *Anabaena* 센서 로돕신 단백질에서 206번째 아미노산인 Pro을 Asp 또는 Glu로 치환한 돌연변이 로돕신 단백질이 야생형 *Anabaena* 센서 로돕신 단백질의 것 보다 광의 최대 흡수 파장이 짧아진다는 것을 실험적으로 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

<12> 따라서, 본 발명의 목적은 *Anabaena* 센서 로돕신 단백질의 광의 최대 흡수 파장이 야생형의 것보다 짧아진 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 제공하는 것에 있다.

<13> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 인코딩하는 핵산분자를 제공하는 것에 있다.

<14> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 인코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는 것에 있다.

<15> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 인코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것에 있다.

<16> 본 발명의 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

<17> 본 발명의 일 양태에 따르면, 서열목록 제1서열에서 206번째 아미노산인 Pro 이 Asp 또는 Glu 으로 치환된

Anabaena 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 제공한다.

<18> 본 발명자들은 *Anabaena* 센서 로돕신에서 최대 흡수 광의 파장이 야생형의 것과 비교하여 짧게 변화된 돌연변이 단백질을 찾기 위해 연구 노력한 결과, 서열목록 제1서열로 표현되는 야생형 *Anabaena* 센서 로돕신 단백질에서 레티날 결합 포켓을 구성하는 아미노산 중의 하나인 206번째 아미노산인 Pro을 Asp 또는 Glu으로 치환한 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질이 *Anabaena* 센서 로돕신 야생형 단백질 보다 최대 흡수 광의 파장이 짧아진다는 것을 실험적으로 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

<19> 본 발명의 명세서에서 용어 "*Anabaena* 센서 로돕신 단백질"은 7개의 막통과(transmembrane) 도메인을 가지며 발색단(chromophore)으로서 all-*trans* / 13-*cis* 레티날이 결합된 *Anabaena* 미생물의 광흡수 색소 단백질을 의미한다.

<20> *Anabaena* 센서 로돕신을 갖는 세포에 광을 조사하면 로돕신에 결합되어 있던 all-*trans* 레티날이 광자(photon)를 흡수하여 13-*cis* 레티날의 형태로 변화하게 되는 광이성화(photoisomerization)을 거치고, 13-*cis* 레티날은 다시 원래의 all-*trans* 레티날로 회복된다. 이러한 과정에서 발생되는 구조적 변화(conformational change)에 의해 발생되는 신호는 세포막에 존재하는 변환단백질(trnasducer)를 통해 세포안으로 전달된다.

<21> 바람직하게는 본 발명의 "*Anabaena* 센서 로돕신의 야생형 단백질"은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열으로 표현된다.

<22> 본 발명의 명세서의 서열목록 제1서열에서의 "206번째" 아미노산은 다른 미생물 로돕신들에서 레티날-결합 포켓을 구성하는 약 22개의 보존된 아미노산 잔기들 중의 하나이다. 상기 미생물 로돕신의 보존된 서열인 레티날-결합 포켓을 구성하는 아미노산들은 로돕신이 흡수하는 광의 특성 및 이온 수송이나 센서에 의한 신호 전달 기능을 조절하는데 있어서 중요한 역할을 한다.

<23> 본 발명의 야생형 *Anabaena* 센서 로돕신의 206번째 아미노산인 Pro을 Glu 또는 Asp 으로 치환시킨 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질(이하, "Pro206Glu" 또는 "Pro206Asp"로 기재함)은 이의 최대흡수파장이 *Anabaena* 센서 로돕신 야생형 단백질의 것에 비해 약 46 nm "블루-쉬프트(blue-shift)"되어 있다.

<24> 본 발명의 명세서에서 용어"블루-쉬프트"란 로돕신의 최대흡수파장이 가시광선에서 파란색 방향인 짧은 쪽으로 이동되었다는 의미이다. 본 발명의 "Pro206Glu" 또는 "Pro206Asp" *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질은 이의 최대흡수파장이 *Anabaena* 센서 로돕신 야생형 단백질의 것에 비해 블루-쉬프트 되어 있기 때문에, 에너지가 높은 단파장의 광을 조사하여 *Anabaena* 센서 로돕신의 센서 기능을 유도하여야 하는 경우, 예를 들어 물이나 용매를 투과하여 센서를 작동시켜야 할 때 본 발명의 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 발현시켜서, 광이 수분이 있는 얇은 층을 통과하여야만 *Anabaena* 센서 로돕신 단백질의 광센서 기능을 유도할 수 있는 경우에 매우 유용하게 적용할 수 있다.

<25> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 서열목록 제1서열에서 206번째 아미노산 Pro 이 Asp 또는 Glu으로 치환된 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 제공한다.

<26> 본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다 (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

<27> 가장 바람직하게는, 본 발명의 핵산 분자는 서열목록 제2서열(Pro206Asp) 또는 제3서열(Pro206Glu) 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

<28> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 인코딩하는 상술한 본 발명의 핵산 분자 및 (b) 상기 핵산 분자에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 벡터를 제공한다.

<29> 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

<30> 본 발명의 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질을 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포 또는 진핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵

산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

<31> 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자가 원핵 세포 유래이고, 배양의 편의성 등을 고려하여, 원핵 세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다.

<32> 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, *tac* 프로모터, *lac* 프로모터, *lac*UV5 프로모터, *lpp* 프로모터, p_L^{λ}프로모터, p_R^{λ}프로모터, *rac*5 프로모터, *amp* 프로모터, *recA* 프로모터, SP6 프로머터, *trp* 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli* (*예*, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (p_L^{λ}프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 숙주 세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 츄린겐시스의 독소단백질 유전자의 프로모터 (*Appl. Environ. Microbiol.* 64:3932-3938(1998); *Mol. Gen. Genet.* 250:734-741(1996)) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다.

<33> 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHC79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4?λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

<34> 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열)을 일반적으로 갖는다.

<35> 본 발명에 이용될 수 있는 진핵 세포용 발현 벡터는 당업계에 공지된 다양한 벡터로부터 선택할 수 있다. 예를 들어, SV40 벡터, 파필로마 바이러스 벡터, YIp5, YCp19, 엡스테인-바 바이러스 벡터, pMSG, pAV009/A^+, pMAMneo-5, 배큘로바이러스 pDSVE, pSecTag2B 또는 yT&A 벡터의 구조를 기본적인 백본으로 가질 수 있다.

<36> 본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 히스톤 탈아세틸화 효소의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His (hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.

<37> 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6x His이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼 (Novagen, USA)을 이용하여 소망하는 히스톤 탈아세틸화 효소를 신속하고 용이하게 얻을 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질은 C-말단에 6개의 히스티딘(His) 잔기가 융합(His-태그(tagged))되어 있다. 이러한 본 발명의 His-태그된 로돕신 단백질은 Ni^{2+}-NTA 아가로스 비드(Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 정제한다.

<38> 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

<39> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다. 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

<40> 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포 및 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 등이 이용될 수 있다.

<41> 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

<42> 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 *Anabaena* 센서 로돕신의 돌연변이 단백질을 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 *lac* 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

<43> 본 발명의 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질은 야생형 단백질에 비해 광의 최대 흡수 파장이 블루-쉬프트 되어, 에너지가 강한 단파장의 광을 최대흡수파장으로 하여야만 하는 경우에 매우 유용하게 사용할 수 있다는 점에서 이점이 있다.

효 과

<44> 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명의 *Anabaena* 센서 로돕신 돌연변이 단백질은 *Anabaena* 센서 로돕신 야생형 단백질에 비해 흡수광의 최대흡수파장이 블루-쉬프트 되어, 에너지가 강한 단파장의 광을 사용하여야만 하는 경우에 매우 유용하게 적용할 수 있는 이점이 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<45> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<46> **실시예**

<47> **실험 재료 및 방법**

<48> **세균 균주 및 플라스미드**

<49> *E. coli* 형질전환체(transformants)들은 엠피실린(ampicillin, 100 μg/ml) 및 클로람페니콜(chloramphenicol)의 존재하에서 LB (Luria-Bertani) 배지에서 온도 35℃로 유지하여 배양하였다[9]. 센서 로돕신(sensory rhodopsin) 컨스트럭트는 *E. coli* 균주 UT5600에서 pMS107 의 PlacUV5 프로모터[12] 하에서 발현시켰다. DH5α를 사용하여 *Anabaena* sp. 7120 (provided by James Golden, Texas A&M University, College Station, TX, U.S.A.)의 지놈 DNA로부터 오페론 유전자를 클로닝하였다. *Anabaena* sp. 7120 세포는 BG11 [12, 15] 배지에서 온도 25℃로 유지하면서 배양하였다.

<50> **레티날 신타아제(Retinal Synthase) 및 다양한 옵신(Opsins)을 코딩하는 플라스미드의 제조**

<51> 제한효소 및 T4 DNA 리가아제는 NEB (MA, U.S.A.)로부터 구입하였고 PFU DNA 폴리머라아제는 Vivagen (Sungnam, Korea)로부터 구입하였다. 올리고뉴클레오타이드는 Cosmogentech 사 (Seoul, Korea)로부터 구입하였다. 엠피실린, 클로람페니콜 및 all-*trans* 레티날은 Sigma 사 (St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였다. 돌연변이 ASR_S86D, ASR_P206D, 및 ASR_P206E 및 이중 돌연변이 ASR_S86D/P206D는 야생형 유전자를 주형으로 사용한 메가프라이머(megaprimer)의 변형방법에 의한 2-단계 PCR 돌연변이유발 방법을 사용하여 제조하였다[13, 20]. PCR는 PFU 폴리머라아제를 사용하여 95 ℃에서 1분, 55 ℃에서 1분 및 72 ℃에서 3분으로 30 사이클을 수행하였다. PCR 프러덕트를 정제 분리한 후 NdeI 및 NotI으로 절단하고, IPTG 유도의 조절하의 *E. coli* 발현 벡터안으로 도입하였다. 포인트 돌연변이는 최종 제작된 발현 벡터내에서 PCR-제조된 인서트를 DNA 시퀀싱

하여 확인하였다. His는 단백질의 C-말단에 부착된 6개의 히스티딘 잔기를 갖는 태그를 지칭한다.

<52> ***E. coli* 세포에서 미생물의 센서 로돕신의 발현**

<53> ASR 돌연변이는 프로톤 펌핑(proton pumping) 측정을 위해 *E. coli* 균주 UT5600에서 플라스미드 pKJ900-ASR를 사용하여 발현시켰고, 웨스턴 블로팅 및 흡수 분광분석(absorption spectroscopy)을 위해서는 *E. coli* 균주 β-UT에서 플라스미드 pKJ900-ASR을 사용하여 발현시켰다. β-UT 세포는 4개의 카로티노이드 생합성 유전자를 포함하는 플라스미드를 가진다[16, 28]. 형질전환체를 밤샘 배양한 후 1:100으로 희석하고, 35 ℃ 및 600 nm 에서 0.4 흡광도 유닛이 될 때까지 배양하였다. 프로톤 수송 측정을 위한 단백질을 얻기 위해, all-*trans* 레티날을 0.2 % L-아라비노오스와 함께 최종 농도 5 mM이 될 때 까지 첨가하였다. 레티날-생성된 흡수 스펙트럼을 측정하기 위해, 아포-단백질을 레티날을 첨가하지 않고 유도하였다. β-UT 세포는 0.2 % L-아라비노오스 및 1 mM IPTG로 35 ℃에서 3시간 동안 유도하였다.

<54> **막 소포체(membrane vesicle)의 제조**

<55> 다양한 옵신(opsin)의 컨스트럭트를 함유하는 세포들은 1-L 플라스크내에서 엠피실린(50 ㎍/㎖) 및 클로람페니콜(34 ㎍/㎖)을 첨가한 500 ㎖의 LB에 접종하여, 자이레이토리 쉐이커(gyratory shaker)상에서 180 rpm으로 37 ℃ 유지하에 16 시간 배양하였다. 세포들을 A_{600nm} = 0.4에서 1 mM IPTG 및 0.2 % L-아라비노오스를 첨가하여 유도(induction)하였다. 12 시간 후 세포들을 원심분리로 회수하고 150 mM NaCl을 함유하는 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)에 재현탁하였다. 로돕신-발현된 *E. coli* 세포들을 4 ℃에서 소니케이션(sonication)에 의해 용해(lysis)시키고, 저속 원심분리기(2,000 × g, 15 min)로 세포 부스러기들을 제거하였다. 최종적으로, 막들을 100,000 × g, 4 ℃에서 1 시간 동안 침전시키고, 150 mM NaCl을 포함하는 50 mM Tris (pH 7.0)을 사용하여 4 ℃에서 재현탁하였다. 배양액을 추출버퍼 (1 % 소디엄 도데실 말토사이드[DM], 150 mM NaCl, 50 mM Tris-buffer [pH 7.0])안에서 4 ℃에서 4-6 시간 동안 약하게 진동하여 로돕신을 막으로부터 추출하였다. 추출된 단백질은 20,000 × g에서 원심분리한 후 상등액을 취하여 수득하였다. 수용체 단백질을 갖지 않는 막은 동일한 과정을 통해 제조하였고 대조군으로서 사용하였다.

<56> **His-태그된 로돕신의 정제 및 분리**

<57> C-말단에서 6-히스티딘 잔기를 포함하는 단백질은 Ni_2^+-NTA 아가로스 비드(Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. *Anabaena* 센서 로돕신을 포함하는 *E. coli* 막을 150 mM NaCl, 10 mM 이미다졸 및 50 mM Tris (pH 7.0)을 갖는 1 % DM 안에서 용해시키고 비드(beads)와 함께 4 ℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 단백질-결합된 비드를 50 mM 이미다졸로 세척하였고, 250 mM 이미다졸, 0.1 % DM, 및 50 mM Tris-버퍼로 용출시켰다.

<58> **웨스턴 블로팅 분석**

<59> 500 ㎖ 배양액으로부터 세포 펠렛을 회수하고, 버퍼(50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.0)로 1회 세척한 후, 4,000 × g 및 4 ℃ 에서 15 분간 원심분리하였다. 세포들을 소니케이션에 의해 파쇄시켰고, 파쇄되지 않은 세포와 큰 크기의 세포 부스러기들을 저속 원심분리에 의해 제거하였으며, 세포막을 100,000 × g에서 1 시간동안 초고속원심분리를 수행하여 분리해내었다. 분리한 막을 버퍼 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.0)로 재현탁하였다. 20 ㎍의 단백질을 포함하는 세포 라이세이트(lysate) 및 막 준비물을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅 분석을 수행하는데 사용하였다. 1차 항체로써 항 6× His 모노클로날 항체를 1:3,000 희석하여 사용하였고, 2차 항체로써 항 마우스 IgG HRP 컨쥬게이트를 1:5,000 희석하여 사용하였다. 반응을 보이는 밴드는 ECL 웨스턴 블로팅 검출 시약을 사용하여 시각화하였다.

<60> **프로톤 펌핑 측정**

<61> 세포의 프로톤 펌핑을 측정하기 위해, *Anabaena* 센서 로돕신을 발현하는 *E. coli* 세포를 4 ℃에서 5,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 펠렛으로 분리한 후, 상온에서 비버퍼화 용액 (10 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4 \cdot 7HO_2$, 100 mM $CaCl_2$)으로 2회 세척하였다 [29]. 샘플을 와이드-밴드 간섭 및 열-보호 ($CuSO_4$ 및 유리) 필터와 조합한 150-왓트 텅스텐 할로겐 램프를 사용하여 500± 20 nm에서 100 왓트/m^2 로 광을 조사하였다. pH는 컴퓨터화된 Horiba F51 pH 미터로 모니터링하였다.

<62> **흡수 분광 분석(Absorption Spectroscopy)**

<63> *E. coli* 막에서 레티날-생성 흡수를 측정하기 위해 상위 분광기(difference spectroscopy)를 사용하였다. 레티날 용액을 첨가한 후에, 스펙트럼을 Shimadzu 2450 스펙트로미터로 매 3 분 마다 기록하였고, 이 후에는 추가적인 흡광 변화(absorption change)가 발생하지 않았다. 상이한 pH 값에서의 λ_{max} 를 야생형 및 돌연변이형의 *Anabaena*로 재구성한 스펙트럼에 따라 측정하였다. 상이한 pH 값에서 알칼리성 및 산성 형태의 혼합형태의 최대 흡수지점은 두가지 형태의 상대적인 농도에 선형적으로 의존하지 않았는데, 이는 이들 두 스펙트럼의 상이한 구조 및 반-밴드(half-bands) 때문이었다.

<64> **실험 결과**

<65> **내부 및 외부 레티날의 존재하에서 다양한 로돕신의 생성**

<66> 다수의 고세균-타입의 로돕신이 고세균(Archaea), 진정세균(Eubacteria) 및 진핵세포로부터 최근 확인되었다[25] (도 1 참조). 이온 수송 및 센서 기능에 대해 연구가 수행된 몇 가지의 세균 로돕신을 나타내었다. 7개의 막통과 나선형태 도메인을 아미노산 잔기 서열 상동성에 근거하여 정렬하였다. 이들 세균 로돕신의 기능을 이해하기 위해 *E. coli*에서 이들 7개-막통과 단백질을 과별현시키려 하였다. Dr. Kamo's 그룹이 *E. coli*에서 세균 로돕신을 과발현시키는데 최초로 성공하였다 [22]. 본 발명자들은 all-*trans* 레티날을 외부적으로 추가하거나 또는 내재적으로 합성시켜 다양한 옵신(opsin)을 *E. coli* 내에서 발현시켰고, Ni_2^+-NTA 레진을 사용하여 비-변성화 세정제(DM)내에서 색소를 정제하였다. *E. coli* 내에서 레티날 신타아제(retinal synthase)와 공동 발현시킨 경우 또는 레티날을 외부에서 첨가한 경우에 인 비보에서의 로돕신에 대한 재생산 효과를 관찰하였다. 마우스 레티날 신타아제를 공동발현시키는 것은 미생물 로돕신의 생성을 많이 증가시키지는 못하였는데, 이는 웨스턴 면역블로팅으로 확인하였다(도 2).

<67> 본 발명의 컨스트럭트에서, 면역활성 에피토프를 제공하기 위해 6개-히스티딘 잔기를 코딩하는 서열을 C-말단에 포함시켰다. 웨스턴 분석은 ASRs 돌연변이 모두가 발현되었고 돌연변이들의 발현 수준이 야생형의 것과는 차이가 있다는 것을 나타내었다(P206E 돌연변이에서는 증가되었고, S86D, P206D/S86D 돌연변이에서는 감소되었다; 데이터는 제시하지 않음). 또한, BPR로부터 N-말단의 18 아미노산 리더 서열이 존재하는 경우에 발현수준은 증가하였다. *Anabaena* 센서 로돕신의 경우에 단백질 발현 수준은 리더 서열의 부존재하에서 외부 레티날을 사용한 경우에 최대치를 나타내었다(도 2).

<68> **흡수 스펙트럼 및 ASR의 pKa 값의 측정**

<69> *Anabaena* 센서 로돕신 (ASR) 단백질은 다른 단백질들과 높은 동일성을 나타낸다. ASR에서의 시프 염기(Schiff-base) 프로톤 수용자는 프로톤 펌프의 것과 동일하지만, 프로톤 도너(BR에서 D96)은 세린(serine) 잔기로 교체되어 있다. ASR은 시프 염기(Schiff-base)-라이신(K210)의 1-나선 회전 앞에서 프롤린(P206)을 갖는데, 이는 다른 공지된 미생물 로돕신 모두에서 발견되는 아스파틸 잔기를 대체하는 것이다.

<70> 본 발명자들은 *E.coli* 에서 6-히스티딘 태그를 갖는 야생형 및 모든 돌연변이 *Anabaena* 센서 로돕신을 발현시키고 Ni_2^+-NTA 레진을 사용하여 도데실말토피란노사이드(dodecylmaltopyranoside)에서 로돕신을 정제하였다. 이전의 데이터에서 정제된 야생형 ASR 단백질의 흡수 스펙트럼은 전형적인 로돕신 밴드 폭(~100-nm 반 밴드 폭)을 나타내었고, 본 발명에서는 545 nm에서 단일 피크를 가졌다(도 3). 프로톤 펌핑 로돕신에 대한 참조로써 PR의 흡수 스펙트럼을 나타내었다(도 3). 도 2 및 도 3은 상온에서 측정한 야생형(WT) ASR, 및 P206D, S86D, S86S/P206D 돌연변이 ASR의 가시선 흡수 스펙트럼을 나타낸다.

<71> pH 7.0 에서 S86D 돌연변이로부터 얻은 흡수 스펙트럼은 야생형 ASR의 것과 유사하였다. 그러나, P206D의 최대 흡수파장은 야생형의 것과 비교하여 블루-쉬프트(blue-shift)되었다. 스펙트럼 변이의 pKa를 결정하기 위해 도데실말토피란노사이드(dodecylmaltopyranoside, DM)에서 야생형과 돌연변이 ASRs로부터 pH-적정 곡선을 얻었다. 야생형 ASR에서 pH 4.0 내지 11.0 사이에서 스펙트럼 변화는 잔토로돕신(xanthorhodopsin) 처럼 매우 작았고[1, 11], P206D는 pH 4.0 및 pH 11.0 사이에서 어떠한 스펙트럼 변화도 나타내지 않았다(도 4).

<72> **프로톤 펌핑의 측정**

<73> ASR는 *E. coli*에서 발현되었을 때 검출가능한 정도의 프로톤 펌핑을 나타내지는 않았다. 본 발명자들은 ASR과 프로톤 펌프 사이의 레티날과의 접촉에서의 차이점이 중요한 것으로 가정하였고, 2-단계 메가 프라이머 PCR 방법에 의해 86 (프로톤 도너) 및 206 위치가 변화된 ASR 돌연변이 단백질을 제조하였다. *Anabaena* 센서 로돕신은 *E. coli* 막에서 프로톤을 전달하지 못한다고 보고되었다. 86 또는 206 위치가 프로톤 펌핑에 중요하다면, 중요

한 프로톤 펌핑이 이들 돌연변이 단백질들에서 검출되어야 한다.

<74> 본 발명자들은 *E. coli* 스페로플라스트(sphaeroplast)내에서 활성을 보기 위해 프로테오로돕신(proteorhodopsin)을 대조군으로서 사용하였다. *E. coli* 스페로플라스트내에서 빛에 의해 구동되는 프로톤 펌프 프로테오로돕신을 포함하는 세포내에서의 빛에 의해 pH 감소가 유도되었기 때문에 프로톤이 방출되었음은 분명하였다. P206D, S86D 및 P206D/S86D 돌연변이들을 포함하는 세포들은 야생형 ASR과 같이 프로톤을 방출하지 않았다(도 5). *E. coli* 막에서, 프로톤 유입은 에너지화된 *E. coli* 세포의 기존 전기화학적 전위에 의해 발생된다. m-클로로-카르보닐시아나이드-페닐하이드라진(chloro-carbonylcyanide-phenylhydrazine, CCCP) 화합물은 막을 통과하여 프로톤 기울기를 없애버린다. 본 발명자들은 *E. coli* 세포내에서 CCCP를 가지고 프로톤 유입을 검사하였고, 그 결과는 다른 것들과 유사하였다(데이타 제시하지 않음).

<75> ***E. coli* 으로부터 레티날-재구성한 ASR 막의 흡수 스펙트럼**

<76> All-*trans* 레티날을 야생형 및 P206E 돌연변이 ASR가 보강된 *E. coli* 막으로부터 준비한 하이드록실아민 표백 막에 첨가하였다. 흡수 스펙트럼을 매 5 분 간격으로 모니터링하였다. 5 분에서, 550 nm (WT) 및 524 nm (P206E) 밴드에서의 피크가 분명히 나타났고 인큐베이션 동안 증가하였다. 백색광을 조사한 후, 최대 흡수파장은 야생형(WT)에서 540 nm로, P206E 돌연변이에서는 500nm로 이동하였다. ASR 단백질내에서 13-*cis* 형태와 13-*cis* 레티날의 all-*trans* 로의 회복이 느린 것처럼 보였으며, 평형 형태[23]의 하나를 검출한 것이다.

<77> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

<78>

<79> **참고 문헌**

<80> 1. Balashov, S. P., E. S. Imasheva, V. A. Boichenko, J. Anton, J. M. Wang, and J. K. Lanyi. 2005. Xanthorhodopsin: A proton pump with a light-harvesting carotenoid antenna. *Science* 309: 2061-2064.

<81> 2. Beja, O., E. N. Spudich, J. L. Spudich, M. Leclerc, and E. F. DeLong. 2001. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean. *Nature* 411: 786-789.

<82> 3. Beja, O., L. Aravind, E. V. Koonin, M. T. Suzuki, A. Hadd, L. P. Nguyen, S. B. Jovanovich, C. M. Gates, R. A. Feldman, J. L. Spudich, E. N. Spudich, and E. F. DeLong. 2000. Bacterial rhodopsin: Evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* 289: 1902-1906.

<83> 4. Bergo, V. B., M. Ntefidou, V. D. Trivedi, J. J. Amsden, J. M. Kralj, K. J. Rothschild, and J. L. Spudich. 2006. Conformational changes in the photocycle of Anabaena sensory rhodopsin: Absence of the Schiff base counterion protonation signal. *J. Biol. Chem.* 281: 15208-15214.

<84> 5. Brown, L. S. and K. H. Jung. 2006. Bacteriorhodopsin-like proteins of eubacteria and fungi: The extent of conservation of the haloarchaeal proton-pumping mechanism. *Photochem. Photobiol. Sci.* 5: 538-546.

<85> 6. Furutani, Y., A. Kawanabe, K. H. Jung, and H. Kandori. 2005. FTIR spectroscopy of the all-trans form of Anabaena sensory rhodopsin at 77 K: Hydrogen bond of a water between the Schiff base and Asp75. *Biochemistry* 44: 12287-12296.

<86> 7. Gartner, W. and A. Losi. 2003. Crossing the borders: Archaeal rhodopsins go bacterial. *Trends Microbiol.* 11: 405-407.

<87> 8. Gordeliy, V. I., J. Labahn, R. Moukhametzianov, R. Efremov, J. Granzin, R. Schlesinger, G. Buldt, T. Savopol, A. J. Scheidig, J. P. Klare, and M. Engelhard. 2002. Molecular basis of transmembrane signalling by sensory rhodopsin II-transducer complex. *Nature* 419: 484-487.

<88> 9. Heo, Y.-J., K. S. Ko, J.-H. Song, and Y.-H. Cho. 2005. Profiling pyocins and competitive growth advantages of various Pseudomonas aeruginosa strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15: 1368-1376.

<89> 10. Hoff, W. D., K. H. Jung, and J. L. Spudich. 1997. Molecular mechanism of photosignaling by

archaeal sensory rhodopsins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 223-258.

<90> 11. Imasheva, E. S., S. P. Balashov, J. M. Wang, and J. K. Lanyi. 2006. pH Dependent transition in xanthorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* (In press).

<91> 12. Jung, K. H., V. D. Trivedi, and J. L. Spudich. 2003. Demonstration of a sensory rhodopsin in eubacteria. *Mol. Microbiol.* 47: 1513-1522.

<92> 13. Jung, K. H. and J. L. Spudich. 1998. Suppressor mutation analysis of the sensory rhodopsin I-transducer complex: Insights into the color-sensing mechanism. *J. Bacteriol.* 180: 2033-2042.

<93> 14. Jung, K. H. and J. L. Spudich. 2004. Microbial rhodopsins: Transport and sensory proteins throughout the three domains of life. Section II Photobiology. In Horspool, W. M. and Lenci, F. (eds.). *CRC Handbook of Organic Photochemistry and Photobiology,* 2nd Ed. Vol 3:124-1-11.

<94> 15. Kim, J.-D. and C.-G. Lee. 2006. Diversity of heterocystous filamentous cyanobacteria (blue-green algae) from rice paddy fields and their differential susceptibility to ten fungicides used in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 240-246.

<95> 16. Kim, J.-D., W.-S. Lee, B. Kim, and C.-G. Lee. 2006. Proteomic analysis of protein expression patterns associated with astaxanthin accumulation by green alga Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae) under high light stress. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 1222-1228.

<96> 17. Luecke, H., B. Schobert, J. K. Lanyi, E. N. Spudich, and J. L. Spudich. 2001. Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: Insights into color tuning and transducer interaction. *Science* 293: 1499-1503.

<97> 18. Oesterhelt, D. and W. Stoeckenius. 1973. Functions of a new photoreceptor membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2853.

<98> 19. Oesterhelt, D. 1998. The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 489-500.

<99> 20. Seo, H. S. and S. H. Bhoo. 2006. Photochromism of phytochromes and Cph1 requires critical amino acids and secondary structure in the N-terminal domain. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 1441-1447.

<100> 21. Shi, L., S. R. Yoon, A. G. Jr. Bezerra, K. H. Jung, and L. S. Brown. 2006. Cytoplasmic shuttling of protons in Anabaena sensory rhodopsin: Implications for signaling mechanism. *J. Mol. Biol.* 358: 686-700.

<101> 22. Shimono, K., M. Iwamoto, M. Sumi, and N. Kamo. 1997. Functional expression of pharaonis phoborhodopsin in Escherichia coli. *FEBS Lett.* 420: 54-56.

<102> 23. Sineshchekov, O. A., V. D. Trivedi, J. Sasaki, and J. L. Spudich. 2005. Photochromicity of Anabaena sensory rhodopsin, an atypical microbial receptor with a cis-retinal light-adapted form. *J. Biol. Chem.* 280: 14663-14668.

<103> 24. Spudich, J. L. and H. Leucke. 2002. Sensory rhodopsin II: Functional insights from structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 540-546.

<104> 25. Spudich, J. L. and K. H. Jung. 2005. Microbial rhodopsins: Phylogenetic and functional diversity, pp. 1-24. In W. R. Briggs and J. L. Spudich (eds.). Handbook of Photosensory Receptors. Wiley-VCH.

<105> 26. Spudich, J. L., C. Yang, K. H. Jung, and E. N. Spudich. 2000. Retinylidene proteins: Structures and functions from archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 365-392.

<106> 27. Vogeley, L., O. A. Sineshchekov, V. D. Trivedi, J. Sasaki, J. L. Spudich, and H. Leucke. 2004. Anabaena sensory rhodopsin: A photochromic color sensor at 2.0A. *J. Biol. Chem.* 280: 14663-14668.

<107> 28. von Lintig, J. and K. Vogt. 2000. Filling the gap in vitamin A research. *J. Biol. Chem.* 275: 11915-11920.

<108> 29. Wang, W. W., O. A. Sineshchekov, E. N. Spudich, and J. L. Spudich. 2003. Spectroscopic and photochemical characterization of a deep ocean proteorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 278: 33985-33991.

도면의 간단한 설명

<109> 도 1은 다양한 미생물 로돕신의 아미노산 서열을 비교 정렬한 것을 나타낸 것이다. *Halobacterium salinarum, Haloterrigena, Natronomonas pharaonis (NpSRII), Anabaena, Guillardia,* 및 *Gloeobacter*로부터 얻어진 옵신들 사이의 1차적 서열 비교를 나타내었다. 보존된 잔기들은 검은색 박스로 표시하였다. (HsBR, *H. salinarum* 박테리오 로돕신(bacteriorhodopsin); NpSRII, *Natronomonas pharaonis* 센서 로돕신(sensory rhodopsin)Ⅱ; HsSRI, *H. salinarum* 센서 로돕신 I; MBP, Monterey Bay Proteorhodopsin; GR, *Gloeobacter* 로돕신; ASR, *Anabaena* 센서 로돕신; NR, *Neurospora* 로돕신; LR, *Leptosphaeria* 로돕신; CSRA, *Chlamydomonas* 센서 로돕신 A; GtSR, *Guillardia theta* 센서 로돕신). 돌연변이 위치(S86 및 P206)는 나선(helix) C 및 F에 존재한다. 나선 E에 존재하는 잔기 KWG는 균류(fungal) 로돕신에서 가장 잘 보존된 부분이다.

<110> 도 2는 his-태그된(tagged) 다양한 미생물 로돕신의 웨스턴 블로팅 분석을 나타낸 것이다. *E. coli* β/UT5600 균주는 β-카로틴 합성용 pORANGE 플라스미드를 *E. coli* UT5600 균주안으로 형질전환시켜 제조하였다. pKJ900 플라스미드는 다양한 옵신 유전자와, β-카로틴으로부터 all-*trans* 레티날을 생성할 수 있는 마우스 디옥시게나아제(dioxygenase) 유전자를 포함한다. 야생형(WT) 및 리더(leader) 서열을 포함하는 로돕신 유전자를 pKJ900 안으로 삽입하여, 단백질 발현을 위해 *E. coli* β/UT 안으로 형질전환시켰다. 몇 개의 상이한 플라스미드에서 태그된 로돕신을 발현하는 *E. coli* UT5600 균주로부터의 막 단백질의 면역분석은 항-His 항체로 수행하였다. 막 단백질들은 15 % SDS-PAGE에 의해 분리하였고, PVDF 막상으로 전달시키고 6 X His-태그에 대한 항체를 이용하여 검사하였다. 레인 A, B는 외부로부터 추가된 레티날 시스템을 포함한다; 레인 C, D는 내부적으로 생합성된 레티날을 포함한다; 레인 A, C는 각각의 로돕신을 포함한다; 레인 B, D는 BPR로부터 유래된 19 리더 서열 ATGGGTAAATTATTACTGATATTAGGTAGTGCTATTGCACTTCCATCATTTGCT(MGKLLLILGSAIALPSFA)을 포함하는 각각의 로돕신을 포함한다. 각 로돕신은 SRI, SRⅡ, NR, ASR, 및 GtSR이다.

<111> 도 3은 야생형(WT) 및 돌연변이 ASRs의 흡수 스펙트럼을 나타내는 도면이다. *Anabaena* 센서 로돕신(ASR)의 정제된 C-말단 His-태그된 야생형 및 위치-지시된(site-directed) 돌연변이 단백질의 400-750 nm의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다. 정제한 야생형 ASR의 흡수 스펙트럼은 전형적인 로돕신 밴드너비(bandwidth)을 갖고 545 nm에서 단일의 최대 피크를 나타내고, 여러 돌연변이들은 야생형과 유사한 패턴을 나타내었다. 그러나, 각 돌연변이들은 서로 다른 최대흡수파장(absorption maximum)를 나타내었다. 레티날-결합 포켓에서의 P206D 및 S86D/P206D 돌연변이의 최대 흡수파장이 블루-쉬프트(blue-shift)된 것을 알 수 있다.

<112> 도 4는 상이한 pH에서 다양한 돌연변이 로돕신의 흡수스펙트럼을 보여주는 그래프이다. 정제된 C-말단 His-태그된 *Anabaena* 센서 로돕신(ASR)의 야생형 및 돌연변이의 400-800 nm의 흡수 스펙트럼을 나타낸다. 정제된 ASR의 흡수스펙트럼을 상이한 pH들에서 측정하였다. 각각의 최대 흡수 파장의 변화는 4 nm 보다 작았다. 스펙트럼으로부터의 피크 파장을 더욱 잘 관찰하도록, 단백질의 양을 달리하여 측정하였다.

<113> 도 5는 소포체(vesicle)내에서 야생형 및 돌연변이 ASRs의 광-유도된(light- induced) 프로톤 펌핑을 나타내는 도면이다. 프로테오로돕신(proteorhodopsin, MBP)은 프로톤 펌핑 활성에 대한 대조군으로 사용하였다. 440 nm 컷오프 필터의 존재하에서 매 60초 마다 광을 조사하였다. 암 적응(dark adaptation)을 위해, 단백질을 암 조건하에서 2 분간 유지하였다. 펌핑 활성은 pH 전극을 사용하여 각 돌연변이의 스패로플라스트(sphaeroplast) 현탁액내에서 pH를 변화시키면서 측정하였다.

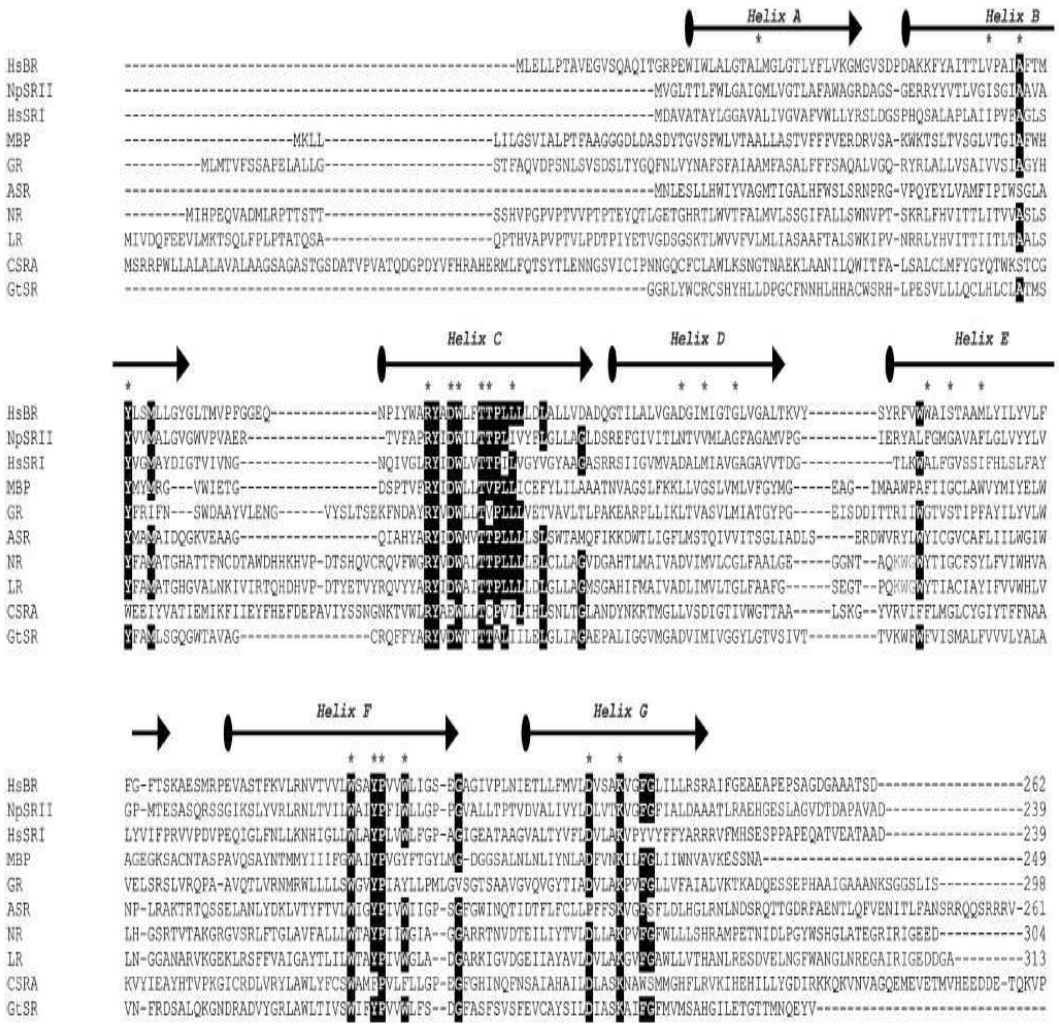
<114> 도 6은 WT ASR 및 P206E로부터 레티날-재구성한 막의 흡수 스펙트럼을 나타낸 것이다. all-*trans* 레티날을 UT5600으로부터의 3 ㎖ 하이드록실아민으로 표백한(bleached) 막에 첨가하였다. 암 조건하에서 재구성을 마친 후에 광-적응된 형태를 관찰하기 위해 광을 조사하였다. 야생형 ASR 및 이의 돌연변이형 막안으로 all-*trans* 레티날을 삽입시켜 재구성한 것에 대해 스펙트럼의 시간 연속을 나타내었다.

<115> 도 7은 Pro206Glu 및 Ser86Asp 돌연변이에 대한 3D 예측도이다. ASR의 X-레이 결정학적 구조 모델을 나타낸 것이다 (PDB entry 1XIO). 수소 결합 네트워크는 Swiss-Pdb 뷰어를 사용하여 나타내었다. 상측부와 하측부는 각각 세포외(extracellular) 및 세포내(cytoplasmic) 부분을 나타낸다. 각 돌연변이 잔기는 에너지 최소화 프로그램에 의해 최적화하여 도입하였고 야생형 ASR 구조와 함께 오버랩하였다. 노란색 분자는 레티날을 나타내며, 숫자는 수소 결합 거리를 옹스트롬(angstroms)으로 나타낸 것이다. Pro206Glu 돌연변이의 구조는 음으로 하전된 측쇄가 레티날의 환경을 변화시켰다는 것을 나타내었다. 그러나, Ser86Asp 모델 구조는 이 잔기가 레티날 로부

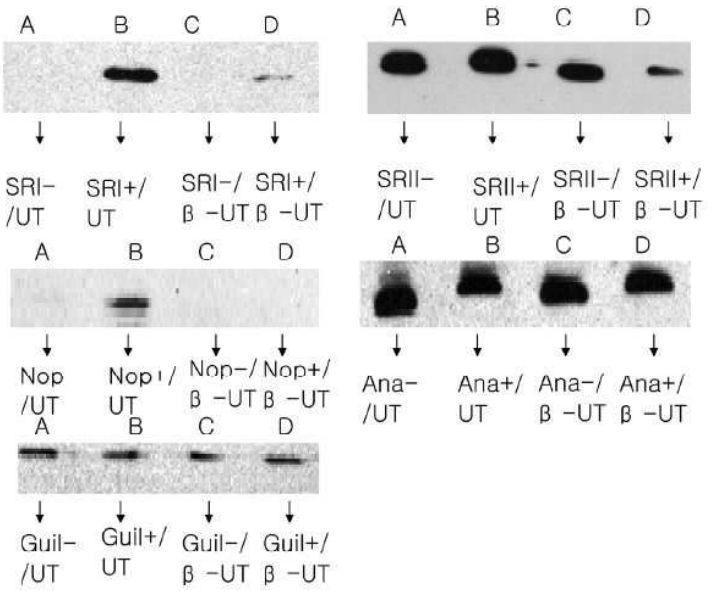
터 멀리 떨어진 것이라는 것을 보여준다.

도면

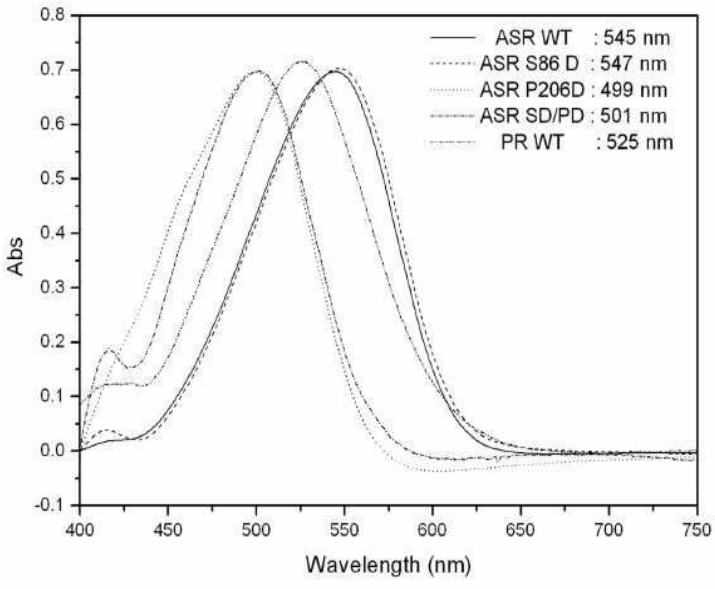
도면1



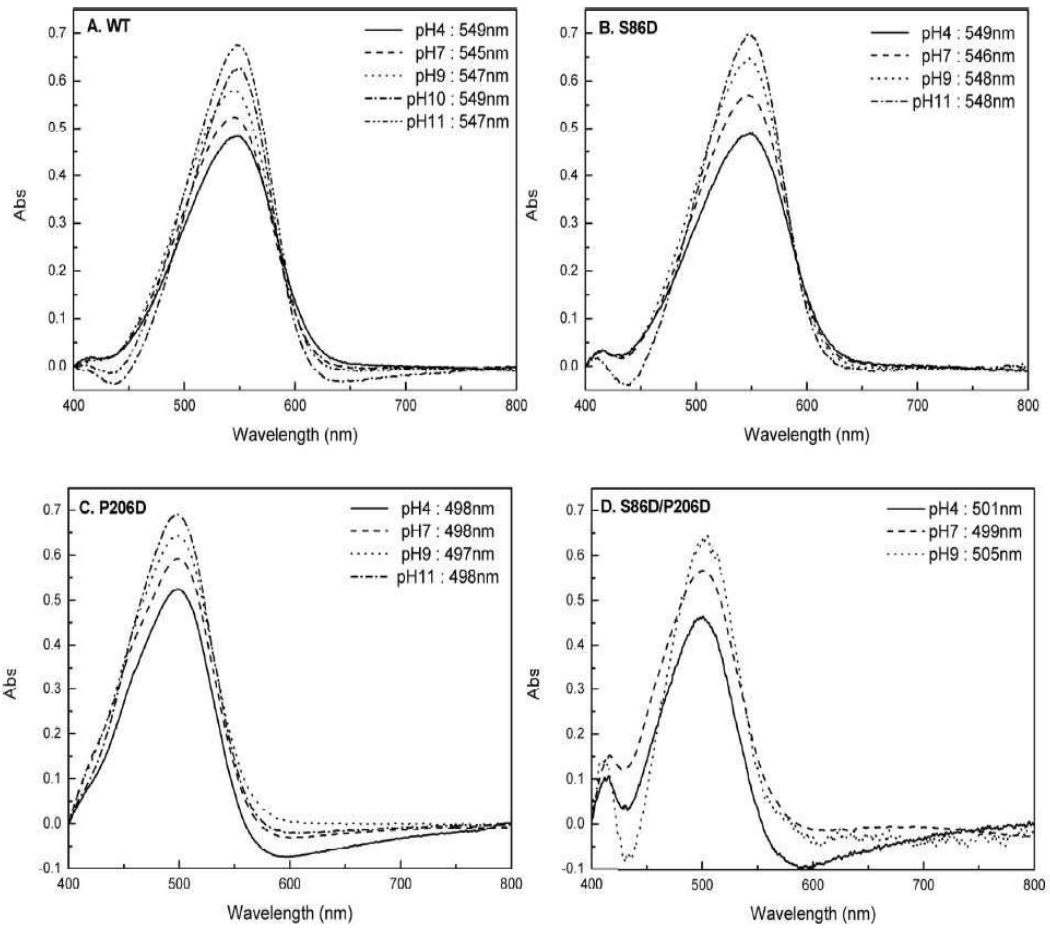
도면2


A
B
C
D
SRI−/UT
SRI+/UT
SRI−/β−UT
SRI+/β−UT
SRII−/UT
SRII+/UT
SRII−/β−UT
SRII+/β−UT
Nop−/UT
Nop+/UT
Nop−/β−UT
Nop+/β−UT
Ana−/UT
Ana+/UT
Ana−/β−UT
Ana+/β−UT
Guil−/UT
Guil+/UT
Guil−/β−UT
Guil+/β−UT

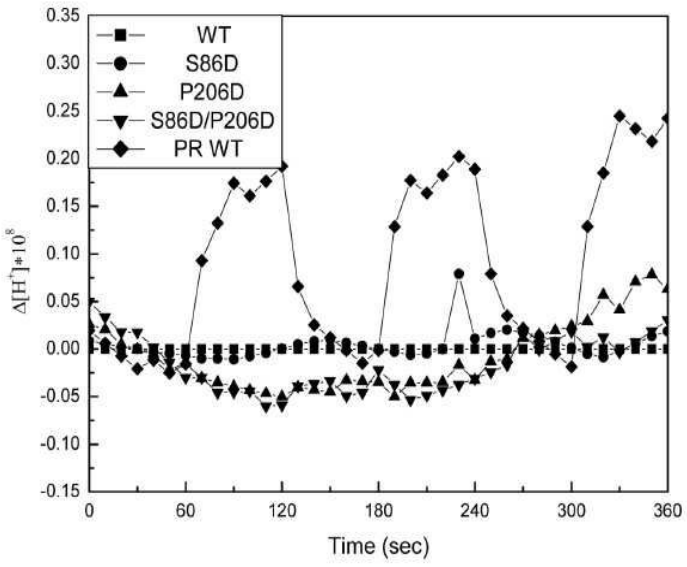
도면3


ASR WT : 545 nm
ASR S86 D : 547 nm
ASR P206D : 499 nm
ASR SD/PD : 501 nm
PR WT : 525 nm
Abs
Wavelength (nm)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
400
450
500
550
600
650
700
750

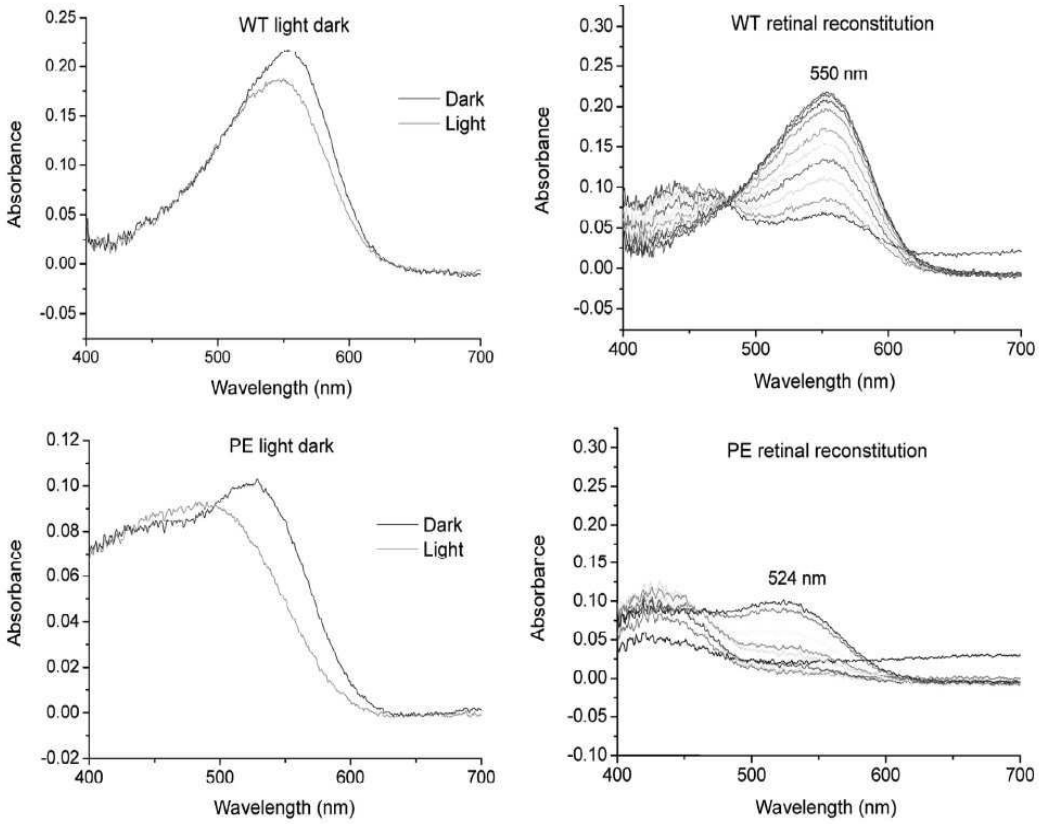
도면4


A. WT
pH4 : 549nm
pH7 : 545nm
pH9 : 547nm
pH10 : 549nm
pH11 : 547nm
B. S86D
pH4 : 549nm
pH7 : 546nm
pH9 : 548nm
pH11 : 548nm
C. P206D
pH4 : 498nm
pH7 : 498nm
pH9 : 497nm
pH11 : 498nm
D. S86D/P206D
pH4 : 501nm
pH7 : 499nm
pH9 : 505nm
Abs
Wavelength (nm)

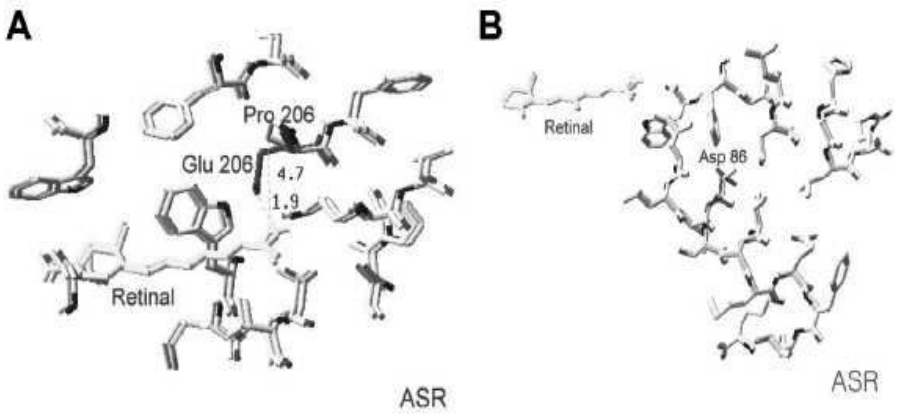
도면5


WT
S86D
P206D
S86D/P206D
PR WT
Δ[H+]*10^6
Time (sec)

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> Sogang University Corporation

<120> Mutant Anabaena Sensory Rhodopsin with Altered Absorption Maximum

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 261
<212> PRT
<213> Anabaena sp.

<400> 1

```
Met Asn Leu Glu Ser Leu Leu His Trp Ile Tyr Val Ala Gly Met Thr
  1               5                  10                  15

Ile Gly Ala Leu His Phe Trp Ser Leu Ser Arg Asn Pro Arg Gly Val
             20                  25                  30

Pro Gln Tyr Glu Tyr Leu Val Ala Met Phe Ile Pro Ile Trp Ser Gly
         35                  40                  45

Leu Ala Tyr Met Ala Met Ala Ile Asp Gln Gly Lys Val Glu Ala Ala
     50                  55                  60

Gly Gln Ile Ala His Tyr Ala Arg Tyr Ile Asp Trp Met Val Thr Thr
 65                  70                  75                  80

Pro Leu Leu Leu Leu Ser Leu Ser Trp Thr Ala Met Gln Phe Ile Lys
                 85                  90                  95

Lys Asp Trp Thr Leu Ile Gly Phe Leu Met Ser Thr Gln Ile Val Val
            100                 105                 110

Ile Thr Ser Gly Leu Ile Ala Asp Leu Ser Glu Arg Asp Trp Val Arg
        115                 120                 125

Tyr Leu Trp Tyr Ile Cys Gly Val Cys Ala Phe Leu Ile Ile Leu Trp
    130                 135                 140

Gly Ile Trp Asn Pro Leu Arg Ala Lys Thr Arg Thr Gln Ser Ser Glu
145                 150                 155                 160

Leu Ala Asn Leu Tyr Asp Lys Leu Val Thr Tyr Phe Thr Val Leu Trp
                165                 170                 175

Ile Gly Tyr Pro Ile Val Trp Ile Ile Gly Pro Ser Gly Phe Gly Trp
            180                 185                 190
```

Ile Asn Gln Thr Ile Asp Thr Phe Leu Phe Cys Leu Leu Pro Phe Phe
195 200 205

Ser Lys Val Gly Phe Ser Phe Leu Asp Leu His Gly Leu Arg Asn Leu
210 215 220

Asn Asp Ser Arg Gln Thr Thr Gly Asp Arg Phe Ala Glu Asn Thr Leu
225 230 235 240

Gln Phe Val Glu Asn Ile Thr Leu Phe Ala Asn Ser Arg Arg Gln Gln
245 250 255

Ser Arg Arg Arg Val
260

<210> 2
<211> 783
<212> DNA
<213> Anabaena sp.

<400> 2
atgaatttgg agagtctttt acactggatt tatgttgcgg gaatgacaat tggtgcattg 60

cacttttggt cacttagtcg aaatccgcgc ggtgttcccc agtacgaata ccttgtggcg 120

atgtttattc ccatttggtc gggactagcc tatatggcaa tggcaataga ccaaggtaaa 180

gttgaagcgg ctgggcaaat tgcccactat gcccgttata ttgattggat ggtgacaaca 240

ccattattac tgctatctct ttcttggaca gcgatgcagt ttatcaaaaa agattggaca 300

ctcattggtt ttttgatgag tacccagata gttgtaatta cctctgggtt aatcgcagat 360

ttatctgagc gcgattgggt gagatatcta tggtatatct gcggggtttg cgcttttctc 420

attattcttt ggggtatttg gaatccattg cgcgccaaaa ccagaactca aagttcagaa 480

ctagcgaact tatacgataa gcttgttact tattttacag tgctttggat aggctaccca 540

atagtctgga ttattggccc tagtggtttt ggctggataa atcaaactat agatacattt 600

ttgttttgtc tactggattt tttctccaag gttggattta gttttctgga tttacacggc 660

ttacgtaatc tcaatgattc ccgccaaact actggcgatc gctttgcgga aaatacttta 720

cagtttgtag aaaatattac attatttgct aactcacgac ggcaacaatc acgcagaaga 780

gtt 783