(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0115522
(43) 공개일자 2014년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C07K 14/405* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0030077
(22) 출원일자 2013년03월21일
심사청구일자 2014년02월04일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박연일
대전광역시 유성구 은구비남로 34, 808동 601호 (노은동, 열매마을 아파트)
송지영
대전광역시 유성구 은구비남로 34, 808동 601호 (노은동, 열매마을 아파트)
조성미
대전광역시 유성구 대학로75번길 28, 402호(궁동, 장현빌라)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **남세균 유래 광수학 색소 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 남세균 유래의 신규한 광수학 색소 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 남세균인 마이크로콜레우스 종(*Microcoleus* sp.)에서 유래한 광수학 색소 GAF2, GAF3 및 GAF4 각각의 유전자, 단백질 및 이를 이용하여 광합성 이용 효율을 증대시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 자외선과 녹색광을 흡수할 수 있는 새로운 광수확 색소를 발굴한 것으로서 가시광선 중 녹색을 광합성 에너지 변환에 이용하지 못하는 남세균, 녹조류, 고등식물 등의 광합성 식물에 도입함으로써 빛에너지 전환효율을 획기적으로 증대시킴으로써 작물의 생산성 제고에 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2011-0031343
부처명 교육과학기술부/한국연구재단
연구관리전문기관 차세대바이오매스연구단
연구사업명 글로벌프론티어 사업
연구과제명 에너지미세조류 광합성 특성 분석을 통한 광합성 기구 개량
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF2 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자는 남세균인 마이크로콜레우스 B353 유래인 것을 특징으로 하는 광수확 색소 GAF2 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 광수확 색소는 600 내지 605nm 파장대의 오렌지색을 흡수하는 것을 특징으로 하는 광수확 색소 GAF2 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF2 도메인.

청구항 5

서열번호 3의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF3 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 유전자는 남세균인 마이크로콜레우스 B353 유래인 것을 특징으로 하는 광수확 색소 GAF3 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

상기 광수확 색소는 600 내지 605nm 파장대의 오렌지색을 흡수하는 것을 특징으로 하는 광수확 색소 GAF3 폴리뉴클레오티드.

청구항 8

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF3 도메인.

청구항 9

서열번호 5의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF4 폴리뉴클레오티드.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 유전자는 남세균인 마이크로콜레우스 B353 유래인 것을 특징으로 하는 광수확 색소 GAF4 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 광수확 색소는 자외선/녹색광의 광가역적 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 광수확 색소 GAF4 폴리뉴클레

오티드.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 자외선/녹색광의 광가역적 활성은 자외선 흡수 시 녹색광을 흡수할 수 있는 상태가 되며, 녹색광 흡수 시 다시 자외선을 흡수할 수 있는 상태로 되돌아가는 것을 특징으로 하는 광수확 색소 GAF4 폴리뉴클레오티드.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 광수확 색소는 흡수된 에너지를 다른 색소분자에 전달할 수 있는 보조색소인 것을 특징으로 하는 광수확 색소 GAF4 폴리뉴클레오티드.

청구항 14

서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF4 도메인.

청구항 15

서열번호 1의 염기서열을 가지는 GAF2 폴리뉴클레오티드;

서열번호 3의 염기서열을 가지는 GAF3 폴리뉴클레오티드; 및

서열번호 5의 염기서열을 가지는 GAF4 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서열번호 9의 염기서열을 가지는 자외선/녹색광 수확색소 유전자.

청구항 16

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 GAF2 도메인;

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 GAF3 도메인; 및

서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 GAF4 도메인을 포함하는 서열번호 10의 아미노산 서열을 가지는 자외선/녹색광 수확색소 단백질.

청구항 17

제15항의 자외선/녹색광 수확색소 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 18

제17항의 재조합 벡터를 식물에 도입하여 광합성 이용 효율을 증대시키는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 식물은 피코에리트린을 광수확 색소로 가지고 있지 않은 남세균, 엽록소 b를 보조색소로 갖는 녹조류 및 육상고등식물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 광합성 이용 효율을 증대시키는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 광합성 이용 효율 증대는 자외선/녹색광 수확색소 유전자 도입을 통해 자외선 및 녹색광을 광합성의 광원으로 이용함으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 광합성 이용 효율을 증대시키는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 남세균 유래의 신규한 광수학 색소 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 남세균인 마이크로콜레우스 종(*Microcoleus* sp.)에서 유래한 광수학 색소인 GAF2, GAF3, GAF4 및 이를 이용하여 광합성 이용 효율을 증대시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 빛은 광합성을 통해 식물체에 에너지를 제공할 뿐만 아니라 외부 자극원으로서 식물의 환경 적응 및 생존에 직접적인 영향을 준다. 산소발생형 광합성 생물 중 피코에리트린을 광수확 색소로 가지고 있지 않는 남세균, 엽록소 b를 보조색소로 갖는 녹조류와 육상고등식물은 청색광과 적색광을 광합성의 주요 광원으로 사용하지만, 자외선과 녹색광은 엽록체에 의해 흡수되지 못하기 때문에 광합성에 이용될 수 없다. 따라서 피코에리트린이 없는 남세균, 녹조류와 육상고등식물이 자외선과 녹색광을 흡수할 경우 광합성 빛 이용효율을 현저하게 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다.

[0003] 식물에서 나타나는 대표적인 광수용체로는 피토크롬(phytochrome)과 크립토크롬(cryptochrome)을 들 수 있다. 식물과 조류의 세포질에 존재하는 피토크롬은 빛의 질적인 면을 인지하여 분자적인 반응을 야기한다. 피토크롬은 적색광과 원적색광을 흡수하여 개화나 발아와 같은 광주기와 관련된 기작을 조절한다. 이러한 피토크롬은 약 120 kDa의 크기를 갖는 단백질이며 N-말단에 빛을 인지하는 부분으로서 크로모포어(chromophore)가 결합하는 부위를 갖고, C-말단 부위에는 히스티딘 키나아제 도메인(histidine kinase domain)을 갖는다. 피토크롬의 크로모포어는 개방형 사슬의 테트라피롤(open-chain tetrapyrrole) 구조를 갖는다. 남세균 중 *Synechocystis* sp. PCC6803에서 알려진 광수용체로는 cph Ⅰ(cyanobacteria phytochrome Ⅰ; slr0473 위치), cph Ⅱ(cyanobacteria phytochrome Ⅱ; sll0821 위치) 및 plpA(cyanobacteria phytochrome Ⅲ; sll1124 위치)가 있다.

[0004] 이 중에서 지금까지 잘 알려진 Cph Ⅰ은 일반적인 식물의 피토크롬과 유사한 구조를 갖는 반면 Cph Ⅱ는 약간 다른 구조적 차이를 보인다. Cph Ⅱ는 145 kDa의 크기이며 N-말단 부위에는 식물 피토크롬의 N-말단 부위와 유사한 아미노산 서열이 존재하지만, C-말단 부위에는 키나아제 도메인이 존재하지 않는다.

[0005] 한편, 최근 들어 남세균을 대상으로 광수용체를 규명하려는 연구가 시도되었는데, 그 결과 남세균인 *Synechocystis* sp. PCC6803과 *Nostoc punctiforme* ATCC 29133에서 자외선, 청색, 녹색, 오렌지, 및 적색을 흡수하는 광수용체 cyanobacteriochrome (CBCR)가 다수 보고 되었다(Song JY 등. 2011. Near-UV cyanobacteriochrome signaling system elicits negative phototaxis in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. Proc Natl Acad Sci 108:10780-10785; Rockwell NC 등. 2012. Phycoviolobilin formation and spectral tuning in the DXCF cyanobacteriochrome subfamily. Biochemistry 51:1449-1463).

[0006] 이와 같이 다양한 광수용체가 남세균에서 발견되고 있으나, 아직까지 다수의 광수용체를 포함하는 다중 광수용체 단백질(multi-GAF domain holoprotein)에 대해서는 잘 밝혀지지 않고 있다. 특히, Phytochrome subfamily에 해당하는 GAF 도메인을 3개 갖는 광수용체 단백질이 자외선과 녹색광에 의해서 형태변환이 수반될 뿐만 아니라 흡수된 빛 에너지가 인접한 GAF 도메인으로 에너지 전달이 된다는 내용에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0041408호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 마이크로콜레우스(*Microcoleus* sp.) 유래 광수학 색소 단백질을 구성하는 4개의 광수용체 후보(GAF domain) 중에서 2번과 3번은 오렌지색(605 nm)을 흡수하는 색소이며, 4번은 자외선/녹색광의 광가역적 활성에 의해 형태 변환이 가역적으로 일어남을 확인하였다. 특히 GAF 4번의 아미노산 잔기 치환에 의한 7종의 변이체 연구를 통해 768번 시스테인은 자외선/녹색광 흡수에 필수적이며, 713번 시스테인과 769번 타이로신은 흡수 영역을 결정하는데 관여하는 것을 확

인하였다. 741번의 타이로신은 광전환을 위해 반드시 존재해야 하며, 현재까지 연구되지 않았던 674번 타이로신은 GAF 도메인의 광흡수 및 전환에 관여하는 새로운 모티프일 가능성이 있음을 확인하였다. 또한 2, 3, 4번의 GAF가 서로 연결된 GAF2/3/4 재조합 단백질은 자외선과 오렌지색을 흡수함을 확인하였다. 실온에서 엽록소 형광 분석을 통해서 GAF2/3/4 단백질에서 방출되는 형광이 GAF2 및 GAF3과 동일함을 밝힘으로써 GAF4에서 흡수된 녹색 빛이 GAF2와 3으로 도메인 간 전이(domain transfer)됨을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF2 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자는 남세균인 마이크로콜레우스 B353 유래일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 광수확 색소는 600 내지 605nm 파장대의 오렌지색을 흡수할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF2 도메인을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF3 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자는 남세균인 마이크로콜레우스 B353 유래일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 광수확 색소는 600 내지 605nm 파장대의 오렌지색을 흡수할 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF3 도메인을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 서열번호 5의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF4 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자는 남세균인 마이크로콜레우스 B353 유래일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 광수확 색소는 자외선/녹색광의 광가역적 활성을 가질 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 자외선/녹색광의 광가역적 활성은 자외선 흡수 시 녹색광을 흡수할 수 있는 상태가 되며, 녹색광 흡수 시 다시 자외선을 흡수할 수 있는 상태로 되돌아가는 광전환일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 광수확 색소는 흡수된 에너지를 다른 색소분자에 전달할 수 있는 보조색소일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF4 도메인을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 가지는 GAF2 폴리뉴클레오티드; 서열번호 3의 염기서열을 가지는 GAF3 폴리뉴클레오티드; 및 서열번호 5의 염기서열을 가지는 GAF4 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서열번호 9의 염기서열을 가지는 자외선/녹색광 수확색소 유전자를 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 GAF2 도메인; 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 GAF3 도메인; 및 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 GAF4 도메인을 포함하는 서열번호 10의 아미노산 서열을 가지는 자외선/녹색광 수확색소 단백질을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 자외선/녹색광 수확색소 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 식물에 도입하여 광합성 이용 효율을 증대시키는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물은 피코에리트린을 광수확 색소로 가지고 있지 않은 남세균; 염록소 b를 보조색소로 갖는 녹조류; 및 육상고등식물로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 광합성 이용 효율 증대는 식물에 자외선/녹색광 수확색소 유전자 도입을 통해 자외선 및 녹색광을 광합성의 광원으로 이용함으로써 이루어질 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명은 자외선과 녹색광을 흡수할 수 있는 새로운 광수확 색소를 발굴한 것으로서 상기 색소를 가시광선 중 녹색을 광합성 에너지 변환에 이용하지 못하는 남세균, 녹조류, 고등식물 등의 광합성 식물에 도입함으로써 빛에너지 전환효율을 획기적으로 증대시킴으로써 작물의 생산성 제고에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 마이크로콜레우스 유래 GHP 단백질의 도메인 구조와 잘 보존된 CH 모티브를 보여주는 그림이다. 도 1a는 4개의 GAF 도메인과 1개의 Methyl accepting chemotaxis protein (MCP)로 구성되어 있는 GHP 단백질 모식도이다. 도 1b는 GHP의 4개의 GAF 도메인과 남세균 피토크롬 Cph1 및 자외선/녹색 광수용체 UirS의 GAF 도메인의 아미노산 서열을 나타낸 것으로 CH 모티브에 GAF1에는 시스테인 잔기가 없으며, GAF2와 3은 CH를, 그리고 GAF4는 CY 잔기를 가짐을 보여준다. 또한 UirS에 있는 DXCF 모티브 대신에 Cys713을 가지고 있다.

도 2는 PCB를 생산하는 대장균으로부터 분리된 재조합 His6GHP-GAF2, His6GHP-3, His6GHP-4 및 His6GHP-GAF2/3/4 용액을 나타낸 사진이다.

도 3은 대장균에서 분리된 GHP의 GAF2, GAF3, GAF4 및 GAF2/3/4 도메인 단백질(도 3a)과 아미노산 치환에 의한 GAF4 도메인 단백질의 7종류 변이체(도 3b)의 쿠마시 브릴리언트 블루(CBB) 염색과 아연(Zn2+)-의존적인 형광발광을 보여 주는 사진이다.

도 4는 재조합 마이크로콜레우스 GHP의 분광학적 특성을 보여주는 그래프이다. PCB-생산 대장균으로부터 분리된 재조합 His6GHP-GAF2, His6GHP-GAF3, His6GHP-GAF4 및 His6GHP-GAF2/3/4의 흡수(A), 단백질 구조변화 후의 흡수(B), 이들 사이의 흡수 차이(C), 및 실온 방출형광 스펙트럼(D)을 나타낸 것이다.

도 5는 GHP 단백질의 GAF4 도메인의 보존되어있는 모티브 아미노산의 치환을 통해 만들어진 단백질 변이체 7종류의 흡수스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 6는 GHP 단백질의 GAF 도메인간의 빛 에너지 흡수와 전달을 보여주는 모식도로서 GAF4에 의해서 녹색광이 흡수된 후 GAF2 혹은 GAF3으로 빛 에너지가 전달되는 것을 모식화한 것이다.

도 7은 pBAD/mycHisC에 각각의 GAF 도메인의 염기서열(GAF2, GAF3, GAF4 또는 GAF2/3/4)이 연결된 재조합 플라스미드의 벡터 맵을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명은 신규한 광수확 색소인 GAF2, GAF3, GAF4 및 GAF2~GAF4를 모두 포함하는 자외선/녹색광 수확색소 단백질을 제공함에 그 특징이 있다.

[0032] 보다 구체적으로 본 발명은, 특정 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF2, GAF3, GAF4 각각의 폴리뉴클레오티드와 이들을 모두 포함하는 자외선/녹색광 수확색소 유전자; 및 특정 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF2, GAF3, GAF4 각각의 도메인과 이들을 모두 포함하는 자외선/녹색광 수확색소 단백질을 제공한다.

[0033] 본 발명에서 '광수확 색소'는 광합성에서 빛을 흡수하고 그 에너지를 반응중심에 전달하는 역할을 하는 색소를 총칭하는 개념으로, 집광성 색소(light harvesting pigment)로도 불린다.

[0034] 본 발명에서 '자외선/녹색광 수확색소'는 자외선과 녹색광을 흡수할 수 있는 색소를 의미한다. 하기에서는 이러한 자외선/녹색광 수확색소(UV/Green Light Harvesting Pigment)를 간략하게 'GHP'로 명명하였다.

[0035] 본 발명자들은 사상형 남세균인 *Microcoleus* sp. B353의 유전체 분석 결과를 바탕으로, 상기 미생물의 GHP 단백질이 4개의 GAF 도메인과 1개의 주화성 조절단백질(methyl accepting chemotaxis protein: MCP)을 가지고 있는 것을 최초로 규명하였으며, 특히 상기 4개의 GAF 도메인 중 3개의 도메인이 광수용체 기능이 있는 것을 확인하였고, 본 발명에서는 이들을 각각 GAF 2, GAF 3 및 GAF 4로 명명하였다.

[0036] 먼저, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF2 폴리뉴클레오티드 또는 상기 염기서열의 변이체를 제공한다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0037] 본 기술분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 70% 이상 상동성이 유지되는 염기서열이 본 발명에서 목적하는 유전자 발현을 위한 광수확 활성을 보유하는 한, 본 발명의 GAF2 폴리뉴클레오티드와 균등물로서 본 발명의 권리 범위에 속함을 쉽게 이해할 수 있을 것이다.

[0038] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 GAF2 폴리뉴클레오티드는 남세균에서 유래한 것일 수 있으며, 자세하게는 마이크로콜레우스 종(*Microcoleus* sp.) 유래일 수 있으며, 더욱 자세하게는 마이크로콜레우스 B353(*Microcoleus*

sp. B353) 유래일 수 있다.

[0039] 이러한 상기 GAF2 폴리뉴클레오티드는 600 내지 605nm 파장대의 오렌지색을 흡수하는 광수확 색소 기능을 가질 수 있다.

[0040] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF2 도메인을 제공한다.

[0041] 본 발명에서 상기 GAF2 도메인은, 야생형뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 광수확 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 용어 "상동성"이란 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 광수확 색소 GAF2 도메인(폴리펩티드)은 서열번호 2의 서열로 정의되는 야생형 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[0043] 본 기술 분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 90% 이상의 상동성이 유지되고 본 발명에서 광수확 활성을 보유하는 한 균등한 도메인(폴리펩티드)임을 쉽게 이해할 것이다.

[0044] 본 발명의 GAF2 도메인(폴리펩티드)은 광수확 활성을 보유하는 한 이들의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 여기서 변이체란 천연 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다.

[0045] 이러한 변이체는 야생형과 실질적으로 동등한 활성을 갖는 기능적 상동체 또는 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키는 변형을 가지는 단백질을 포함한다. 바람직하게는 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체이다. 예를 들어, 온도, 수분, pH, 전해질, 환원당, 가압, 건조, 동결, 계면장력, 광선, 동결과 해동의 반복, 고농도 조건 등의 물리적 요인과 산, 알카리, 중성염, 유기용매, 금속이온, 산화환원제, 프로티아제 등의 화학적 요인의 외부 환경에 대한 구조적 안정성이 증대된 변이체이다. 또한 아미노산 서열상의 변이로 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[0046] 본 발명의 GAF2 도메인(폴리펩티드)은 마이크로콜레우스 B353(*Microcoleus* sp. B353)으로부터 직접 분리하여 제조하거나, 화학적으로 합성하거나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다.

[0047] 먼저, 본 발명의 GAF2 도메인(폴리펩티드)은 마이크로콜레우스 B353으로부터 직접 분리하여 제조할 수 있다. 세포에 함유된 본 발명의 GAF2 도메인(폴리펩티드)의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다.

[0048] 또한 본 발명의 GAF2 도메인(폴리펩티드)은 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩티드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 폴리펩티드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다. 특히, 바람직한 폴리펩티드의 제조방법은 고체상 합성방법(solid phase syntheses)을 이용하는 것이다. GAF2 도메인(폴리펩티드)은 보호된 아미노산간의 응축반응(condensation reaction)에 의하여 통상의 고체상 방법으로, C-말단으로부터 시작하여 그 서열에 따라 순차적으로 진행하면서 합성할 수 있다. 응축 반응 후 보호기 및 C-말단 아미노산이 연결된 담체를 산분해(acid decomposition) 또는 아미놀리시스(aminolysis)와 같은 공지의 방법에 의해 제거할 수 있다. 상기 언급된 폴리펩티드 합성법은 관련 서적에 상세히 기술되어 있다.

[0049] 또한 본 발명의 GAF2 도메인(폴리펩티드)은 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, 본 발명의 GAF2 도메인(폴리펩티드)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(핵산)를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 본 발명의 GAF2 도메인 단백질이 발현되도록 숙주세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 상기 단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다.

[0050] 본 발명은 또한, 서열번호 3의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF3 폴리뉴클레오티드 또는 상기 염기서열의 변이체를 제공한다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는

염기서열을 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 GAF3 폴리뉴클레오티드는 남세균에서 유래한 것일 수 있으며, 자세하게는 마이크로콜레우스 종(*Microcoleus* sp.) 유래일 수 있으며, 더욱 자세하게는 마이크로콜레우스 B353(*Microcoleus* sp. B353) 유래일 수 있다.

[0052] 이러한 상기 GAF3 폴리뉴클레오티드는 600 내지 605nm 파장대의 오렌지색을 흡수하는 광수확 색소 기능을 가질 수 있다.

[0053] 본 발명은 또한, 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF3 도메인(폴리펩티드)을 제공한다.

[0054] 본 발명에서 상기 GAF3 도메인(폴리펩티드)은, 야생형뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 광수확 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다.

[0055] 본 발명은 또한, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 광수확 색소 GAF4 폴리뉴클레오티드 또는 상기 염기서열의 변이체를 제공한다. 구체적으로, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 GAF4 폴리뉴클레오티드는 남세균에서 유래한 것일 수 있으며, 자세하게는 마이크로콜레우스 종(*Microcoleus* sp.) 유래일 수 있으며, 더욱 자세하게는 마이크로콜레우스 B353(*Microcoleus* sp. B353) 유래일 수 있다.

[0057] 본 발명의 상기 GAF4 폴리뉴클레오티드는 자외선/녹색광의 광가역적 기능을 가질 수 있다.

[0058] 본 발명에서 상기 자외선/녹색광의 광가역적 기능이란 자외선 흡수 시 녹색광을 흡수할 수 있는 상태가 되며, 녹색광 흡수 시 다시 자외선을 흡수할 수 있는 상태로 되돌아가는 광의 형태 변환을 수반할 수 있는 기능을 의미한다.

[0059] 상기 GAF4 폴리뉴클레오티드는 또한 흡수된 에너지를 다른 색소분자에 전달할 수 있는 보조색소 기능을 가질 수 있다.

[0060] 본 발명은 또한, 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 광수확 색소 GAF4 도메인(폴리펩티드)을 제공한다.

[0061] 본 발명에서 상기 GAF4 도메인(폴리펩티드)은, 야생형뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 광수확 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다.

[0062] 본 발명은 또한, 상기 GAF2, GAF3 및 GAF4 유전자를 모두 포함하는 서열번호 9의 염기서열을 가지는 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 유전자 또는 상기 염기서열의 변이체를 제공한다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 9의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명의 상기 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 유전자는 남세균에서 유래한 것일 수 있으며, 자세하게는 마이크로콜레우스 종(*Microcoleus* sp.) 유래일 수 있으며, 더욱 자세하게는 마이크로콜레우스 B353(*Microcoleus* sp. B353) 유래일 수 있다.

[0064] 본 발명은 또한, 상기 GAF2, GAF3 및 GAF4 도메인을 모두 포함하는 서열번호 10의 아미노산 서열을 가지는 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 단백질을 제공한다.

[0065] 본 발명에서 상기 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 단백질은, 야생형뿐만 아니라 90% 이상의 아미노산 상동성을 가지고 광수확 활성을 가지는 기능적 상동체를 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명은 또한, 상기 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0067] 본 발명의 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 유전자는 이를 발현하는 벡터에 의해 제공되어 단백질로 발현될 수 있다.

[0068] 본 발명에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0069] 본 발명에서 "작동가능하게 연결된 (operably linked)"는 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0070] 본 발명의 벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트, 분비시그널 등을 포함할 수 있으며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 유전자 작제물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다.

[0071] 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당 업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 예컨대 플라스미드, 코즈미드, 파지 입자, 바이러스 벡터 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있으며, 바람직하게는 피코시아노빌린 크로모포어를 형성하는 단백질 발현용 대장균인 LMG-pPL-PCB를 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명의 벡터는 선별 마커(selection market)를 추가로 포함할 수 있다. 선별 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별, 즉, 목적 유전자의 삽입 여부를 확인하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선별 마커를 발현하는 세포만 생존하거나, 다른 표현 형질을 나타내므로, 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.

[0073] 본 발명은 또한, 상기 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다. 본 발명의 형질전환체는 벡터를 프로모터가 작용할 수 있는 양태로 숙주세포 내에 도입시키는 것에 의해 구축될 수 있다.

[0074] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 형질전환은 핵산 분자를 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO4) 침전, 염화칼슘(CaCl2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포좀법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 포함될 수 있으나 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0075] 발현벡터로 형질전환되는 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다. 본 발명에서 이용될 수 있는 숙주세포로는 효모, 진균, 세균 또는 조류가 가능하며, 예를 들면, 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*), 아스페르길러스(*Aspergillus*), 파라코커스 (*Paracoccus*), 플라보박테리움(*Flavobacterium*), 아그로박테리움 (*Agrobacterium*), 알칼리제네스 (*Alcaligenes*), 에르위니아 (*Erwinia*), 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) 등이 있다. 바람직하게는 대장균(*Escherichia coli*)이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0076] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터를 식물에 도입하여 광합성 이용 효율을 증대시키는 방법을 제공한다.

[0077] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 식물은 자외선 또는 녹색광을 광합성의 광원으로 사용하지 못하는 것으로서, 자세하게는 피코에리트린을 광수확 색소로 가지고 있지 않은 남세균, 염록소 b를 보조색소로 갖는 녹조류 및 육상고등식물 등을 예시할 수 있다.

[0078] 상기 피코에리트린을 광수확 색소로 가지고 있지 않은 남세균의 종류로는 *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Prochlorococcus* sp.등을 예시할 수 있으며; 상기 염록소 b를 보조색소로 갖는 녹조류의 종류로는 Chlaymydomonas 속, Chlorella 속, Nannochloropsis 속, Ettlia 속 등을 예시할 수 있으며; 상기 육상고등식물의 종류로는 옥수수, 사탕수수, 면화, 담배, 벼, 보리, 감자 등을 예시할 수 있으나, 특별히 이를 한정하는 것은 아니다.

[0079] 본 발명에서 상기 광합성 이용 효율 증대는 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 유전자 도입을 통해 자외선 및 녹색광을 광합성의 광원으로 이용함으로써 이루어질 수 있으며, 그러한 구체적인 예는 하기 실시예를 통해 설명한

다.

[0080] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0081] **<실시예>**

[0082] **<재료 및 방법>**

[0083] **1. 마이크로콜레우스 B353 균주 배양**

[0084] *Oscillatoriales*목의 *Microcoleus* sp. B353는 러시아 Khilganta의 탄산호수에서 채집되어진 사상형의 남세균으로서, 담수나 해수에 분포하는 대부분의 남세균과는 달리 고알칼리, 고염도의 환경에 적응하여 생육 가능하다. 본 발명자들은 하기 실험에서 사용할 *Microcoleus* sp. IPPAS-B353는 러시아 아카데미 식물생리학 연구소 미세조류 은행(Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science, Moscow; GenBank ac. no. DQ222209)으로부터 제공받았다.

[0085] 마이크로콜레우스 B353(*Microcoleus* B353) 균주는 백색광 (20 μmolm-2s-1)하에 30℃ 온도 조건으로 한천배지 (KCl 1.0g/L; NaHCO3 16.8g/L; K2HPO4 0.5g/L; NaNO3 2.5g/L; K2SO4 1.0g/L; NaCl 30g/L; MgSO4 0.1g/L; CaC12 0.04g/L; FeSO4 0.01g/L; EDTA 0.08g/L; Trace metal (A5+Co) 1ml; pH 9.8; 2% Agar)에서 배양하였다.

[0086] **2. 게놈 DNA 분리 및 자외선/녹색광 수확색소(GHP) GAF 도메인 클로닝**

[0087] 게놈 DNA 분리는 지수 생장기의 마이크로콜레우스 B353(*Microcoleus* B353) 세포를 원심분리(3,500 rpm, 15분, 4℃) 하여 세포를 수확한 후 200 μl TEN 완충액(10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA)에 현탁시켰다. 여기에 10μl lysozyme(20 mg/ml)을 첨가하여 37℃에서 15분 반응시켜 세포를 파괴한 뒤, 10% SDS 5 μl을 첨가하여 흔들어 주었다. 이 반응물질에 5μl protease K(20 ug/ml)을 첨가하고 60℃에서 1시간 반응시킨 후 400μl 페놀을 첨가한 뒤, 원심분리(3,500 rpm, 3분, 상온)하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 상등액과 동일량의 페놀:클로로포름:아이소아밀 알코올을 첨가하여 상온에서 3-5분 흔들어 주었다. 다시 원심분리(3,500 rpm, 3분, 상온)한 후, 얻어진 상등액은 20μl 3M sodium acetate (pH 5.2), 400 μl 에탄올과 혼합한 뒤, 원심분리(3,500 rpm, 3분, 상온)를 통해 DNA만 수득하였다.

[0088] 자외선/녹색광 수확색소(GHP)의 GAF 도메인을 클로닝하기 위해, 먼저 각 GAF 도메인의 단백질 서열이 보존될 수 있도록 프라이머(하기 표 1 참조)를 제작하였으며 이때 양 말단에 어댑터로서 제한효소 인식부위를 삽입하였다. 사용되어진 제한효소는 클로닝하고자 하는 염기서열 내에 존재하지 않는 것으로 선택하였으며, 본 연구에는 XhoI과 EcoRI를 사용하였다. 제작된 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응 통하여 각 GAF 도메인을 코딩할 수 있는 각각의 염기서열 절편을 얻었다. 이후 DH5a 대장균에 서브클로닝(subcloning)을 하여 벡터 pBAD/mycHisC (Invitrogen, USA)와 중합효소 연쇄반응을 통해 얻어진 각각의 GAF 도메인의 염기서열이 연결된 재조합 플라스미드를 얻었다(도 7 참조). 이후, 플라스미드를 추출하고 염기서열분석법을 통해 제작된 플라스미드 내에 염기서열이 정확하게 삽입되었는지 확인하였다. 목적하는 서열이 보존되었는지 최종 확인한 후, 피코시아노빌린(phycocyanobilin: 이하 간략하게 'PCB'로 표기함) 크로모포어를 형성하는 단백질 발현용 대장균 (LMG-pPL-PCB)에 형질전환하였다 (Gambetta, G.A. and J. C. Lagaris. 2001. Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. Proceedings of National Academy of Science, USA. 98, 10566-10571).

표 1

[0089] PCR에 사용된 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열		서열번호
GAF2	포워드	5‘-GTACTCGAGACGGGTGATTGAGCGGATTC-3’	11
	리버스	5‘-GTGAATTCGATGACTTGGGCTACGGTG-3’	12
GAF3	포워드	5‘-GTACTCGAGCCGCATCCGTCAATCCCTC-3’	13
	리버스	5‘-GTGAATTCGTTCAGAGATTCCCGAAT-3’	14
GAF4	포워드	5‘-CATCTCGAGTCGGGAATCTCTGAACTTAG-3’	15
	리버스	5‘-CATCTGCAGCGGGAATCTCTGAACTTAG-3’	16
GAF2/3/4	포워드	5‘-GTACTCGAGACGGGTGATTGAGCGGATTC-3’	17
	리버스	5‘-CATCTGCAGCGGGAATCTCTGAACTTAG-3’	18

[0090] **3. PCB 생성 대장균에서 자외선/녹색광 수확색소(GHP) GAF 도메인 발현 및 순수분리**

[0091] 형질전환된 단백질 발현용 대장균은 RM 액체배지 (2% casamino acids; 1X M9 salts; MgCl2 1mM; 0.2% Glucose; Thiamine 0.1mM) 100ml에 항생제 앰피실린(200ug/L)와 카나마이신(50ug/L)을 첨가하고 OD600=0.1이 되도록 접종하여 OD600=0.4~0.6이 될 때까지 37℃에서 배양하였다. LB배지 500mL에 RM배지 100mL을 첨가하고 배양한 단백질 발현용 E. coli를 섞어준 뒤, FAC 25uM, ALA 25uM, IPTG 0.1mM, 앰피실린 200ug/L, 카나마이신 50ug/L를 첨가하여 28℃에서 1시간 배양하였다. 0.2% Arabinose를 처리하여 28℃에서 5시간 배양한 뒤, 7000rpm, 4℃에서 원심분리하여 단백질 발현용 E. coli를 수확하고 70℃에 세포를 냉동 보관하였다. 단백질을 추출하는 모든 과정은 4℃, 암조건에서 수행하도록 하였다. 세포용해버퍼(50mM Tris pH 7.85, 100mM NaCl, 10% Glycerol, 0.1% NP40) 20mL에 Complete, EDTA-free protease inhibitor(Roche, Switzerland) 0.5 tablet, 0.1mM DDT를 첨가하여 1시간 30분가량 초음파 세포 파쇄기로 단백질 발현용 대장균을 깨드린 후 15000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 상등액에 Ni-NTA Agarose(Quiagen, Germany) bead 500ul를 넣고 4℃ 암조건에서 1시간 30분간 섞어주어 단백질과 결합시켰다. 3500rpm, 4℃에서 2분간 원심분리하여 단백질이 결합된 bead를 가라앉히고 상등액을 제거한다. 결합한 비드를 Poly-Prep chromatography column(Bio-Rad, USA)에 옮겨 세척버퍼(50mM Tris pH 7.85, 300mM NaCl, 10% Glycerol, 20mM imidazole, 0.1% NP40) 10mL를 5번 통과시켜 결합한 단백질이외의 용액을 제거하였다. Eultion buffer(50mM Tris pH8.0, 300mM NaCl, 250mM imidazole) 1.5mL을 통과시켜 단백질을 추출하고 Amicon Ultra centrifugal filter units 10K membrane(Millipore, USA)을 이용해 원심분리 함으로써 농축된 단백질을 얻어냈다. 분리된 순수한 단백질을 흡수 및 형광 스펙트럼을 측정하는데 사용하였다.

[0092] **4. 전기영동 및 Zn^{2+} 블러팅**

[0093] 12% SDS-PAGE gel을 제작하여 분리 정제된 단백질 3ul와 4X sample buffer 1ul를 섞어 100℃에서 5분간 가열하였다. 하나의 lane당 4ul씩 로딩하고 120mV로 2시간 전기영동을 수행하였다. Zn2+ 블러팅은 20mM Tris pH 7.35, 20mM Zinc acetate 용액에 5분간 암조건에서 반응한 뒤 UV하에서 밴드를 확인하였다. 쿠마시 브릴리언트 블루용액(CBB)으로 1시간 염색한 뒤, 탈염색 용액으로 12시간 이상 반응시켰다.

[0094] **5. 흡수스펙트럼 측정**

[0095] UV-vis spectrophotometer S-3100 (Scinco, Korea)기계를 이용하고 LabPro 소프트웨어를 이용하여 190~1100nm 영역에서 흡수되는 스펙트럼을 측정하였다. 초기값은 Tris pH 8.0용액으로 설정하였다. 750nm의 값으로 영점보정 한 뒤 Origin 8.0으로 300~800nm내의 흡수 스펙트럼을 그렸다.

[0096] **6. 실온 형광 측정**

[0097] Fluorescence spectrometer LS-55 (Perkin Elmer, USA)를 이용하여 형광 스펙트럼을 측정하였다. 560nm으로 excitation하고 500nm에서 750nm사이에 emission되는 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 초기값은 Tris pH 8.0으로 설정하였다. 750nm 값으로 영점보정한 뒤 Origin 8.0으로 형광 스펙트럼을 그렸다.

[0098] <실시예 1>

[0099] 마이크로콜레우스 B353으로부터 신규한 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 유전자 동정

[0100] 본 발명자들은 마이크로콜레우스 B353의 신규 유전체를 분석하였으며, 이러한 유전체 분석 결과를 바탕으로 *Synechocystis* sp. PCC6803의 Cph1과 ETR1의 상동성을 갖는 유전자를 BLAST 검색하였다.

[0101] 그 결과, 21개의 상동성 유전자를 검출할 수 있었으며, 그 중 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 단백질이 4개의 GAF 도메인과 1개의 주화성 조절단백질(methyl accepting chemotaxis protein: MCP)로 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한 상기 GHP 단백질은 4개의 GAF 도메인 중 3개의 도메인이 광수용체 기능이 있는 것으로 하기 실험을 통해 확인하였고, 이들을 각각 GAF2, GAF3 및 GAF4로 명명하였다(도 1 참조).

[0102] 또한, 참고로 본 발명에서 최초로 발견한 상기 GAF2, GAF3 및 GAF4 도메인에 대해, GAF2에 대한 염기서열(폴리뉴클레오티드)을 서열번호 1로 표시하였고, GAF2 폴리펩티드 서열을 서열번호 2로 표시하였다. GAF3의 염기서열(폴리뉴클레오티드)은 서열번호 3으로 표시하였고, GAF3 폴리펩티드 서열을 서열번호 4로 표시하였으며, GAF4에 대한 염기서열(폴리뉴클레오티드)을 서열번호 5로 표시하였고, GAF4의 폴리펩티드 서열은 서열번호 6으로 표시하였다. GAF/2/3/4에 대한 염기서열(폴리뉴클레오티드)을 서열번호 7로 표시하였고, GAF/2/3/4의 폴리펩티드 서열은 서열번호 8로 표시하였다.

[0103] 또한, 본 발명에서는 상기 GAF2, GAF3 및 GAF4를 포함하는 4개의 GAF 도메인과 1개의 주화성 조절단백질(methyl accepting chemotaxis protein: MCP)로 이루어진 자외선/녹색광 수확색소(GHP) 단백질의 서열도 분석하였는데, GHP의 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 9로 나타내었고, GHP의 폴리펩티드는 서열번호 10으로 나타내었다.

[0104] <실시예 2>

[0105] 마이크로콜레우스 B353 균주 유래의 자외선/녹색광 수확색소(GHP)는 자외선, 녹색 및 오렌지 색 흡수 색소임을 규명

[0106] 아미노산 서열 정렬분석 결과, 1번 GAF 도메인을 제외한 2와 3 및 4번 GAF 도메인 내에 한 개의 보존된 시스테인 잔기를 갖는 사이아노 박테리오크롬(cyanobacteriochromes, CBCRs) 서브패밀리에 속하는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 첫 번째 시스테인 잔기는 히스티딘과 함께 CH 모티브를 갖는 것으로 알려져 있는데(Rockwell, N.C., and Lagarias, J.C. (2010) ChemPhysChem 11, 1172-1180), 이러한 모티브를 본 발명에서 규명한 상기 GAF 도메인들에 존재하는지 분석한 결과, GAF 2와 GAF 3은 예상과 같이 CH 모티브를 갖지만 GAF4는 히스티딘 대신에 타이로신을 갖는 CY 변이체(variant)임을 확인할 수 있었다(도 1 참조).

[0107] 나아가 GAF 도메인의 광-감지 활성(light-sensing activity)에 대한 CH 및 CY 모티브의 시스테인 잔기의 중요성을 시험하기 위하여, 본 발명자는 PCB-생산 대장균 세포에서 GAF2, GAF3, GAF4 및 상기 세 개의 GAF 도메인이 연결된 GAF2/3/4를 발현시켰다. 대부분의 GAF 도메인은 암 상태에 안정화시킨 형태 (native 15Z form)에서 청색을 띠었다. GAF2, GAF3 및 GAF4 각각의 도메인과 3개의 도메인을 동시에 발현시킨 GAF2/3/4 단백질의 경우, GAF3번 단백질이 암조건에서 무색(15Z 형태)이었으며 UV에 노출시켰을 때 연한 분홍색(15E형태)로 변하는 광순환이 일어나는 것이 관찰되었다 (도 2 참조). 분리된 단백질을 12% SDS-PAGE gel에 전기 영동하여 CBB 염색과 Zinc blotting을 수행한 결과 3종류의 GAF 단백질에서 PCB 크로모포어가 결합된 것을 확인 할 수 있었다 (도 3 참조).

[0108] <실시예 3>

[0109] 마이크로콜레우스 B353 균주 유래의 광수확 색소 GAF4 도메인은 자외선/녹색 광가역적 시아노박테리오크롬임을 규명

[0110] 분리된 단백질을 고농도로 농축하여 광 수용체로서 어떠한 파장의 빛을 흡수하는지 확인하고자 UV-spectrophotometer를 이용하여 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 바닥상태의 GAF2와 GAF3 (native 15Z)의 경우 600-605nm 내외의 파장을 흡수하였고, 600nm 근처의 파장을 주었지만 흡수 파장 영역은 변하지 않았다. 반면 CY잔기를 갖는 GAF4는 바닥상태(native 15Z)에서 330nm, 386nm에서 peak을 보였고, UV (~380nm)를 비추게 되면 560nm의 빛을 흡수 할 수 있는 형태 (native 15E)로 변하였다. 이 형태에 다시 560nm의 빛을 비추게 되면

330nm, 386nm를 흡수할 수 있는 바닥상태(native 15Z)로 돌아가는 것을 확인하였다 (도 4A 참조). 따라서 3개의 GAF domain 중 GAF4만이 자외선/녹색의 광순환이 가능함을 알 수 있었다.

[0111] GAF 도메인의 산성 조건에서 변성 연구는 결합한 빌린(bilin) 발색단(chromophore) 구조를 확인하기 위해서 수행되었다. 암상태에서 산성 요소(8M 요소/염산, pH 2.0)로 변성시킬 때, GAF 도메인 2와 3에서는 광변환 활성을 볼 수 없었으나 GAF4 및 GAF2/3/4 에서는 광변환 활성을 나타내었다. 자외선 흡수 형은 603 nm에서 피크를 갖는 녹색광을 흡수하는 형으로 변형되었다(도 4B 참조). 변성된 샘플에 오렌지색 혹은 녹색광을 (G light)의 조사는 변성 Pg 상태가 광활성적인 것으로 나타났다(도 4B 참조). GAF3과 GAF2/3/4 재조합 GAF의 변성 형태의 녹색광 마이너스 암조건 차이 스펙트럼(green light-minus dark difference spectrum)은 산성 변성된 Cph1과 것과 동일한데(도 4C 참조), 이것은 PCB가 GAF4의 발색단임을 의미한다. 이를 종합해 보면, GHP가 GAF4 도메인을 통해서 PCB와 티오에테르-결합된 광수용체임을 의미하며m GAF2와 3의 발색단에 대해서는 Zn2+-의존적 형광 기법으로 검출된다는 점에서 PCB가 결합하고 있을 가능성이 매우 크다는 것을 알 수 있었다.

[0112] **<실시예 4>**

[0113] **마이크로콜레우스 B353 균주 유래의 자외선/녹색광 수확색소(GHP) GAF4 도메인에서 흡수된 녹색광은 에너지가 GAF2 또는 3으로 전달됨**

[0114] GAF4가 UV를 흡수하게 되면, GAF2와 GAF3과 흡수영역이 겹쳐지는 것에서 착안하여 각 단백질의 형광 스펙트럼을 측정하였다. 각 단백질에 전달된 빛 에너지는 흡수되고 나면 red shift된 형광을 방출하게 된다. 같은 몰수의 단백질을 정량하여 형광 스펙트럼을 측정한 결과 (560nm로 excitation하였을 때), GAF2와 GAF3 방출하는 형광의 양이 약 20FU로 비슷하였고 광전환은 일어나지 않았다. 하지만 GAF4의 경우 UV를 흡수하는 형태(15Z)일 때 10FU 미만의 낮은 값을 보였지만, 580nm를 흡수하는 형태(15E)일 때, 약 40FU의 값을 보였다. 이러한 결과는 Z와 E 형의 GAF4 단백질이 흡수한 빛 에너지가 형광으로 방출되는 효율이 다름을 의미한다. GAF2/3/4 (GAF2, 3, 4가 모두 연결된 단백질)의 경우, 바닥상태(15Z)형태 일 때 603nm에서 흡수 peak을 보였고, UV를 비추어 GAF4의 560nm를 흡수할 수 있는 형태(15E)일 때, peak은 거의 일치하였지만 560nm 쪽으로 넓어지는 흡수 스펙트럼을 관찰할 수 있었다(도 4D) 형광 스펙트럼에서도 GAF4의 형태와 유사하게 UV를 비춰주면(15E) 560nm영역을 흡수할 수 있는 형태로 변하므로 형광이 약 2배가량 증가하는 것을 알 수 있었다. 주목할 점은 GAF2/3/4의 흡수 스펙트럼에서 560nm를 흡수할 수 있음에도 불구하고 형광 값은 GAF4와 같은 정도로 방출되었다는 것이다. 반면 GAF2/3/4에 UV를 비추어 GAF2/3/4내의 GAF4가 560nm를 흡수할 수 있는 형태(15E)가 되었을 때는 GAF2와 3과 비슷한 양이 방출되었고, peak의 위치도 GAF2, 3번과 동일하였다. 이는 GAF4의 형광 스펙트럼의 peak이 640nm가량으로 GAF2, 3에 비해 왼쪽으로 이동되어있다는 것과 다른 점이다. 따라서 GAF2/3/4가 함께 있을 때, GAF2, 3은 GAF4가 UV에 의해 560nm를 흡수 할 수 있는 형태(15E)가 되었을 때 GAF4로부터 방출된 에너지를 전달받아 빛을 흡수하는 것으로 생각되어 진다. 이러한 결과는 각 단백질의 구조를 8M Urea를 이용하여 denaturation한 difference spectra에서도 나타난다. 3개의 GAF domain 중에 GAF4만이 PCB와 결합하여 photochromic activity가 있는 것으로 나타났다(도 4B). 따라서 GAF4의 CY잔기는 PCB chromophore의 C3 Cystein과 thioester결합을 형성하며, UV를 비추게 되면 chromophore의 C15를 cis형으로 변형시켜 560nm의 빛을 흡수할 수 있는 형태(15E)가 되고 560nm의 빛을 주면 C15을 trans형으로 변형시켜 UV빛을 흡수할 수 있는 형태(15Z)로 전환된다. 따라서 MBR3854는 GAF4에서 UV를 감지하면 GAF2, 3을 활성화시킬 수 있는 형태가 되어 신호를 전달하는 역할을 할 수 있음을 알 수 있었다(도 5).

[0115] **<실시예 5>**

[0116] **마이크로콜레우스 GAF4 도메인의 CY잔기의 Tyrosine은 광전환에 필수적인 아미노산 잔기임을 규명**

[0117] GAF4 도메인에는 크로모포어와 결합할 수 있는 시스테인 잔기가 713번째, 768번째에 존재한다. 앞선 연구에서 GAF 도메인의 크로모포어 결합이 이루어지는 모티프는 741번째와 768번째에 매우 잘 보존되어진 시스테인 잔기였다. 반면 GHP 단백질의 GAF4 도메인은 741번째에 시스테인 대신에 타이로신 잔기를 갖으며, 다른 GAF 도메인에서는 발견되지 않는 약 30아미노산이 삽입된 부위 내의 713번에 시스테인 잔기를 갖는다. 이로써 총 2개의 시스테인 잔기가 크로모포어 결합과 녹색/자외선에 의한 광순환에 관여하는 것으로 판단된다.

[0118] GAF4 도메인의 크로모포어 결합 및 광전환에 관여하는 주요한 아미노산 잔기를 알아보기 위해 기존에 알려진 모티프 내의 각 아미노산 잔기를 치환하는 연구를 수행하였다. GAF4에는 총 3개의 시스테인 잔기가 존재한다.

672번째 시스테인잔기를 알라닌으로 치환하였을 경우(도 5B), 아연 의존적인 반응과 흡수스펙트럼에서 GAF4와 동일한 결과를 보였다. 반면 674번째의 타이로신을 히스티딘으로 전환하였을 경우(도 5C), 아연 의존적인 반응을 통해 크로모포어와 결합함을 확인하였으나, 흡수 스펙트럼의 측정 결과 뚜렷한 흡수 피크를 보이지 않았다. 이러한 결과는 앞선 연구에서 밝혀진 바 없는 내용으로 672번째 시스테인과 674번째 타이로신을 포함하는 부분이 GAF 도메인의 흡수에 중요한 역할을 하는 새로운 모티프일 가능성을 보여준다. 최근 새롭게 제안된 삽입 염기서열내의 713번째 시스테인 잔기를 알라닌으로 치환한 경우(도 5D), PCB 크로모포어가 결합할 수 있지만, 흡수 스펙트럼 분석 결과 347nm와 623nm에서 최대 흡수 피크를 보였다. 이는 GAF4의 흡수영역과 비교하였을 때 매우 다르고 또한 광전환이 관찰되지 않았다. 이 결과를 바탕으로 713번째 시스테인은 GAF4 도메인의 흡수영역을 결정하며 광전환에 중요한 역할을 하는 것으로 판단되어 진다. GAF4는 741번째에 타이로신 잔기를 갖고 있으나 앞선 연구에서 밝혀진 다양한 GAF 도메인에서는 같은 자리에 시스테인 잔기가 잘 보존되어 있다. 741번째 타이로신을 시스테인으로 전환한 결과(도 5E), GAF4와 유사한 영역의 흡수 스펙트럼 결과를 보였으나 UV를 2분간 주어 15E 형태로 전환할 경우 여전히 400nm 이하의 영역이 높은 흡수 스펙트럼을 보였으며 녹색광을 주었을 때 15Z 형태로 전환이 되지 않는 비가역적인 흡수 스펙트럼 결과를 보였다. 반면 같은 위치의 타이로신을 페닐알라닌으로 치환하였을 경우(도 5F), GAF4의 흡수 스펙트럼의 결과와 동일하였다. 이로써 741번째 타이로신은 GAF4의 광전환에 중요한 역할을 수행하는 것으로 판단되며, 713번째 시스테인을 갖는 GAF 도메인의 경우 741번째에 타이로신 잔기로 매우 잘 보존되어 있음을 다른 남세균의 GAF 도메인에서도 확인하였다. 768번 시스테인을 세린으로 전환하였을 경우(도 5G), 크로모포어가 전혀 결합하지 못하였고 흡수 스펙트럼도 관찰되지 않았다. 769번 타이로신을 히스티딘으로 치환한 경우(도 5H), 크로모포어가 결합하였으나 흡수 스펙트럼 측정결과는 GAF4와 매우 달랐으며 광전환도 이루어지지 않았다. 따라서 713번 시스테인 잔기를 갖는 GAF 도메인의 경우 741번과 769번에 반드시 타이로신 잔기를 갖아야지만 제 기능을 수행할 수 있다고 판단되었다.

[0119] 지금까지의 결과를 정리하여 보면, GHP 단백질의 GAF4 도메인의 크로모포어 결합은 768번 시스테인에 의해 이루어지며, 713번 시스테인과 769번 타이로신은 흡수 영역을 결정하는데 관여하는 것으로 판단된다. 주목할 점은 741번 위치에는 반드시 시스테인이 아닌 다른 잔기가 위치해야 하며 많은 남세균에서 타이로신으로 매우 잘 보존되어 있음을 확인하였다. 또한 현재까지 연구되지 않았던 672번 시스테인과 674번 타이로신의 변이체 연구를 통해 GAF 도메인의 광흡수 및 전환에 관여하는 새로운 모티프가 존재함을 확인하였다.

[0120] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

[0121] cphⅠ: cyanobacteria phytochrome Ⅰ

cphⅡ: cyanobacteria phytochrome Ⅱ

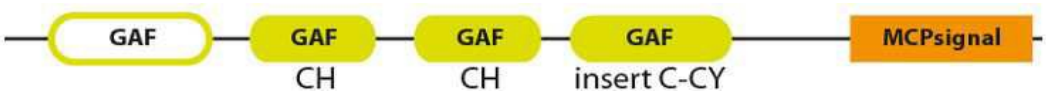
plpA: cyanobacteria phytochrome Ⅲ

GHP: UV/Green Light Harvesting Pigment

PCB: phycocyanobilin

도면

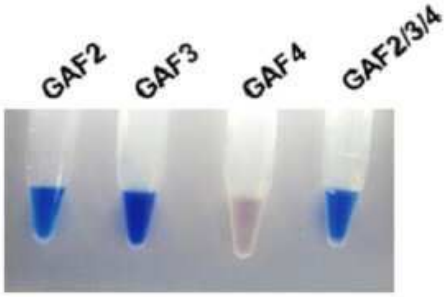
도면1a



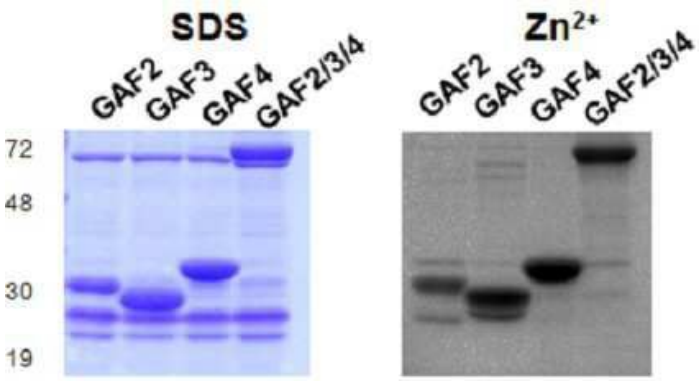
도면1b

```
GHP GAF2       NIDIIFRTTT KEVRLLLKCD RVAVYQFNPD ---FSGQFVA ESVTSGWVKL
GHP GAF3       DINSIFNVTT KEVRLLLQCD RIAVYQFNPD ---FSGQFVA ESVTPGWGKL
GHP GAF4       NLDTIFDTTT TEVRRLLKTD RVCVYQFAED ---WSGSFIA ESVGATWAPL
Slr1393 GAF3   ELQNIFRATS DEVRHLLSCD RVLVYRFNPD ---WSGEFIH ESVAQMWEPL
UirS GAF       DLPTIFNTVV QEIRQFLEAD RVVIFQFSPD SDFSVGNIVA ESVLAPFKPI
Cph1 GAF       NLRDFYDVIV EEVRRMTGFD RVMLYRFDEN ---NHGDVIA EDKRDDMEPY

                                                          Asp-motif
                                Insert Cys                    ▼
GHP GAF2       VG-------- ---------- -EEVER---- ---------V WKDTYLEENQ
GHP GAF3       VG-------- ------▼--- -PEVER---- ---------V WKDTYLEENQ
GHP GAF4       VQRQQQIPAL RDNVSQCDNM TSLIERQQSG QLAPQASGPA SRDTYLQETE
Slr1393 GAF3   KD-------- ---------- ---LQN---- ------NFPL WQDTYLQENE
UirS GAF       IN-------- ---------- ---------- --------SA IEETCFSNNY
Cph1 GAF       LG-------- ----LHYPES DIPQPARRLF IHNPIRVIPD VYGVAVPLTP

                                     Cys-motif
                                        ▼
GHP GAF2       GGRYANHETY AVSDIYTIGH DPCHVELLEQ FEARAYTLVP IFQGEHLWGI
GHP GAF3       GGRYAYRETY AVTDIYEAGH DPCHVELLEQ FEARAYTLVP IFQGETLWGI
GHP GAF4       GGRFQTEQAF SVEDIYQAGF STCYLEVLEQ YQCRAYAIVP IFKGPQLWGL
Slr1393 GAF3   GGRYRNHESL AVGDVETAGF TDCHLDNLRR FEIRAFLTVP VFVGEQLWGL
UirS GAF       AQRYQQGRIQ VIEDIHQSHL RQCHIDFLAR LQVRANLVLP LINDAILWGL
Cph1 GAF       AVNPSTNRAV DLTESILRSA YHCHLTYLKN MGVGASLTIS LIKDGHLWGL

GHP GAF2       LAAYQNDG-- -PREWQNSEV DLLQRIADQL GVALQQAETV TQLR
GHP GAF3       LAAYQNDG-- -PREWQEDEV QLLVRIADQL GVALQQAETV QELR
GHP GAF4       LAAYQNNG-- -PRDWENEEV TLLRQIGTQL GVAIQQSEYL QQLQ
Slr1393 GAF3   LGAYQNGA-- -PRHWQAREI HLLHQIANQL GVAVYQAQLL ARFQ
UirS GAF       LCIHQCDS-- -SRVWEQTEI DLLKQITNQF EIAIQQATLY EQAQ
Cph1 GAF       IACHHQTPKV IPFELRKACE FFGRVVFSNI SAQEDTETFD YRVQ
```

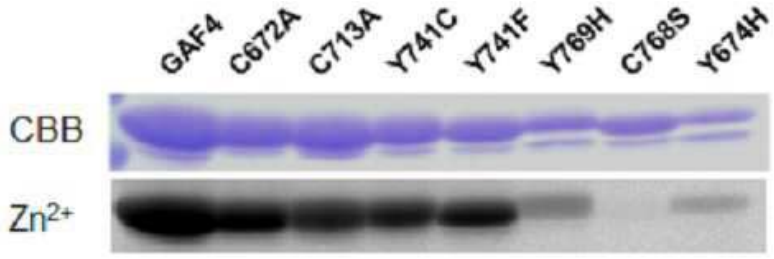
도면2



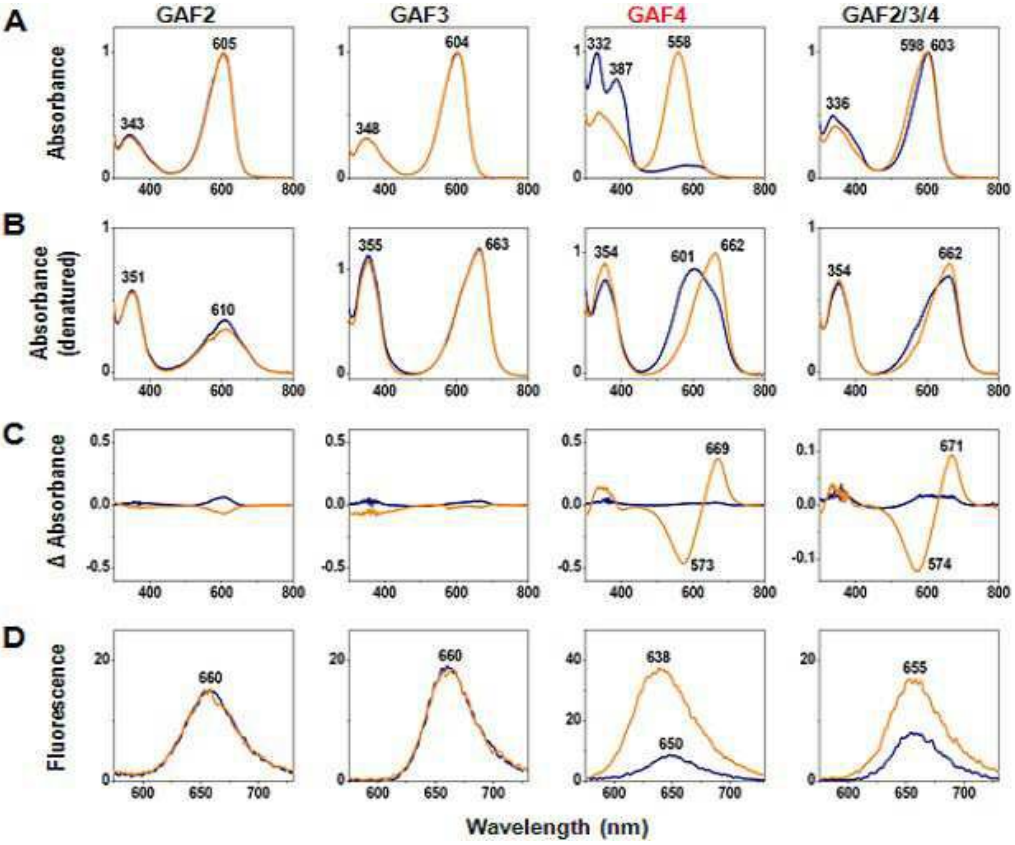
도면3a



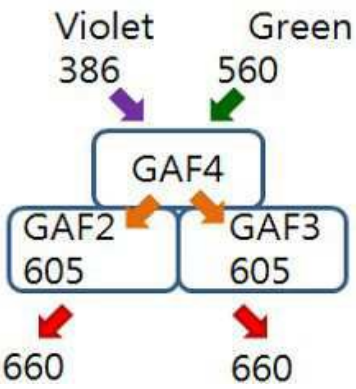
도면3b


GAF4
C672A
C713A
Y741C
Y741F
Y769H
C768S
Y674H
CBB
Zn2+

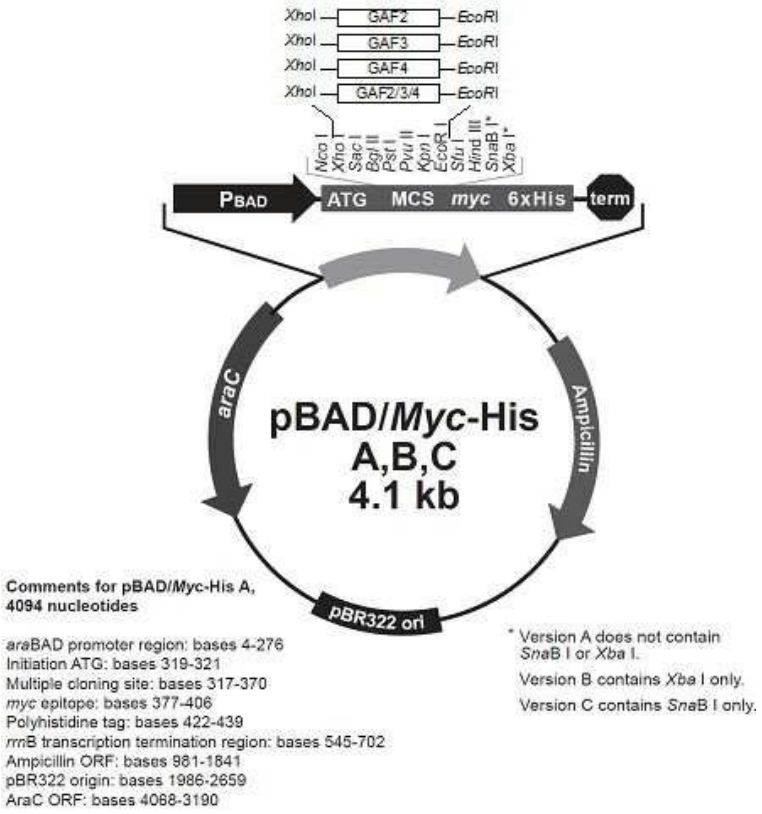
도면4


A
B
C
D
GAF2
GAF3
GAF4
GAF2/3/4
Absorbance
Absorbance (denatured)
Δ Absorbance
Fluorescence
Wavelength (nm)
343
605
348
604
332
387
558
336
598
603
351
610
355
663
354
601
662
669
573
671
574
660
638
650
655

도면6


Violet
386
Green
560
GAF4
GAF2
605
GAF3
605
660
660

도면7



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Light harvesting pigment from cyanobacterium and use thereof

<130> PN1212-588

<160> 18

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 558

<212> DNA

<213> Light harvesting pigment GAF2 polynucleotide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 1

cgggtgattg agcggattcg tcaatccctg aatatcgata ttatcttccg caccaccaca 60

aaggaagtcc ggttactgct gaaatgcgat cgcgtggccg tctatcaatt taaccccgac 120

tttagcggtc agtttgtggc tgagtccgtc acctccggct gggtgaaact cgttggcgag 180

gaggtcgaac gggtttggaa agatacctac ctcgaagaaa accaaggggg acgctacgcc 240

aaccatgaaa cctacgccgt cagtgatatc tataccatcg gtcatgaccc ctgtcacgtc 300

gaactcctcg aacagttcga ggcccgggcc tataccctag ttcccatttt ccaaggagaa 360

catctctggg ggattctcgc cgcctatcaa aacgacggtc cccgggaatg gcaaaatagc 420

gaagtggatt tgctgcaacg gattgccgac caattggggg tggccctgca acaagccgaa 480

accgtgaccc aactgcgtcg tcagtccgat cgcattcgcc aagccgccga gcgcgatcgc 540

accgtagccc aagtcatc 558

<210> 2

<211> 186

<212> PRT

<213> Light harvesting pigment GAF2 polypeptide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 2

Arg Val Ile Glu Arg Ile Arg Gln Ser Leu Asn Ile Asp Ile Ile Phe
1 5 10 15

Arg Thr Thr Thr Lys Glu Val Arg Leu Leu Leu Lys Cys Asp Arg Val
20 25 30

Ala Val Tyr Gln Phe Asn Pro Asp Phe Ser Gly Gln Phe Val Ala Glu
35 40 45

Ser Val Thr Ser Gly Trp Val Lys Leu Val Gly Glu Glu Val Glu Arg
50 55 60

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

Asn His Glu Thr Tyr Ala Val Ser Asp Ile Tyr Thr Ile Gly His Asp
85 90 95

Pro Cys His Val Glu Leu Leu Glu Gln Phe Glu Ala Arg Ala Tyr Thr
100 105 110

Leu Val Pro Ile Phe Gln Gly Glu His Leu Trp Gly Ile Leu Ala Ala
115 120 125

Tyr Gln Asn Asp Gly Pro Arg Glu Trp Gln Asn Ser Glu Val Asp Leu
130 135 140

Leu Gln Arg Ile Ala Asp Gln Leu Gly Val Ala Leu Gln Gln Ala Glu
145 150 155 160

Thr Val Thr Gln Leu Arg Arg Gln Ser Asp Arg Ile Arg Gln Ala Ala
165 170 175

Glu Arg Asp Arg Thr Val Ala Gln Val Ile

180 185

<210> 3

<211> 570

<212> DNA

<213> Light harvesting pigment GAF3 polynucleotide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 3

cgcatccgtc aatccctcga tatcaacagt atcttcaacg tcaccaccaa agaagtacga 60

ctgttgctgc aatgcgatcg catcgccgtc tatcaattca accccgactt tagcggtcag 120

tttgtggccg agtccgtcac tcccggctgg gggaaactcg tcggccccga agtcgaacga 180

gtctggaaag acacctacct cgaagaaaac cagggaggac gttatgccta ccgggaaacc 240

tacgccgtca ccgatatcta cgaagccggc catgacccct gtcacgtcga actcctcgaa 300

cagttcgagg cccgggccta taccctggtt cctattttcc aaggggaaac cctctggggc 360

attctcgccg cctatcaaaa cgacggccct cgggaatggc aagaggacga agtgcaactg 420

cttgtacgca tcgccgacca attaggggtc gccctgcaac aagccgaaac cgtccaggaa 480

ctgcgccgcc agtccgaacg aattgcccgc accgccgaac gggaacgcgc cgtcgctcag 540

gtcatcgaac ggattcggga atctctgaac 570

<210> 4

<211> 190

<212> PRT

<213> Light harvesting pigment GAF3 polypeptide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 4

Arg Ile Arg Gln Ser Leu Asp Ile Asn Ser Ile Phe Asn Val Thr Thr
1 5 10 15

Lys Glu Val Arg Leu Leu Leu Gln Cys Asp Arg Ile Ala Val Tyr Gln
20 25 30

Phe Asn Pro Asp Phe Ser Gly Gln Phe Val Ala Glu Ser Val Thr Pro
35 40 45

Gly Trp Gly Lys Leu Val Gly Pro Glu Val Glu Arg Val Trp Lys Asp
50 55 60

Thr Tyr Leu Glu Glu Asn Gln Gly Gly Arg Tyr Ala Tyr Arg Glu Thr

65 70 75 80

Tyr Ala Val Thr Asp Ile Tyr Glu Ala Gly His Asp Pro Cys His Val

85 90 95

Glu Leu Leu Glu Gln Phe Glu Ala Arg Ala Tyr Thr Leu Val Pro Ile

100 105 110

Phe Gln Gly Glu Thr Leu Trp Gly Ile Leu Ala Ala Tyr Gln Asn Asp

115 120 125

Gly Pro Arg Glu Trp Gln Glu Asp Glu Val Gln Leu Leu Val Arg Ile

130 135 140

Ala Asp Gln Leu Gly Val Ala Leu Gln Gln Ala Glu Thr Val Gln Glu

145 150 155 160

Leu Arg Arg Gln Ser Glu Arg Ile Ala Arg Thr Ala Glu Arg Glu Arg

165 170 175

Ala Val Ala Gln Val Ile Glu Arg Ile Arg Glu Ser Leu Asn

180 185 190

<210> 5

<211> 720

<212> DNA

<213> Light harvesting pigment GAF4 polynucleotide sequence from Microcoleus sp. B353

<400

> 5

cgggaatctc tgaacttaga caccatcttc gacaccacca ccaccgaagt ccgacgactc 60

ctcaaaactg atcgcgtctg tgtctatcaa ttcgccgaag actggagtgg gtcctttatt 120

gccgagtccg tcggggcgac ctgggccccc ctggtgcagc gacaacaaca aattcccgct 180

ctacgggaca atgtcagcca atgcgacaac atgacaagcc tgattgagcg gcaacagtcc 240

ggccaacttg ccccccaagc cagcggcccc gccagtcggg atacctatct gcaagagacg 300

gaaggggggac gcttccagac tgaacaagcc ttctccgttg aagatatcta tcaagcgggc 360

tttagcacct gttatctcga agtcctcgaa caatatcaat gtcgcgccta tgccattgtt 420

cccatcttca agggtcctca actctgggga ctcctggccg cctatcagaa caacgggcca 480

cgggactggg aaaacgagga agtcacccta ctgcggcaaa tcggaaccca actgggagtc 540

gccattcagc agagtgaata cctgcaacaa ctgcaagagc agtccctgca actcgaagct 600

gctgcccaac gggataaggc cgccaaagaa caactgcaaa aacgggctct ggaactgctg 660

atggccgtcc gcccagccct ggacggggat ttaacagtgc ggattcccgt gacagaagat 720

720

<210> 6

<211> 240

<212> PRT

<213> Light harvesting pigment GAF4 polypeptide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 6

Arg Glu Ser Leu Asn Leu Asp Thr Ile Phe Asp Thr Thr Thr Thr Glu
1 5 10 15

Val Arg Arg Leu Leu Lys Thr Asp Arg Val Cys Val Tyr Gln Phe Ala
20 25 30

Glu Asp Trp Ser Gly Ser Phe Ile Ala Glu Ser Val Gly Ala Thr Trp
35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Gln Cys Asp Asn Met Thr Ser Leu Ile Glu Arg Gln Gln Ser
65 70 75 80

Gly Gln Leu Ala Pro Gln Ala Ser Gly Pro Ala Ser Arg Asp Thr Tyr
85 90 95

Leu Gln Glu Thr Glu Gly Gly Arg Phe Gln Thr Glu Gln Ala Phe Ser
100 105 110

Val Glu Asp Ile Tyr Gln Ala Gly Phe Ser Thr Cys Tyr Leu Glu Val
115 120 125

Leu Glu Gln Tyr Gln Cys Arg Ala Tyr Ala Ile Val Pro Ile Phe Lys
130 135 140

Gly Pro Gln Leu Trp Gly Leu Leu Ala Ala Tyr Gln Asn Asn Gly Pro
145 150 155 160

Arg Asp Trp Glu Asn Glu Glu Val Thr Leu Leu Arg Gln Ile Gly Thr
165 170 175

Gln Leu Gly Val Ala Ile Gln Gln Ser Glu Tyr Leu Gln Gln Leu Gln
180 185 190

Glu Gln Ser Leu Gln Leu Glu Ala Ala Ala Gln Arg Asp Lys Ala Ala

195 200 205

Lys Glu Gln Leu Gln Lys Arg Ala Leu Glu Leu Leu Met Ala Val Arg

210 215 220

Pro Ala Leu Asp Gly Asp Leu Thr Val Arg Ile Pro Val Thr Glu Asp

225 230 235 240

<210> 7

<211> 1836

<212> DNA

<213> Light harvesting pigment GAF2/3/4 polynucleotide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 7

cgggtgattg agcggattcg tcaatccctg aatatcgata ttatcttccg caccaccaca 60

aaggaagtcc ggttactgct gaaatgcgat cgcgtggccg tctatcaatt taaccccgac 120

tttagcggtc agtttgtggc tgagtccgtc acctccggct gggtgaaact cgttggcgag 180

gaggtcgaac gggtttggaa agatacctac ctcgaagaaa accaaggggg acgctacgcc 240

aaccatgaaa cctacgccgt cagtgatatc tataccatcg gtcatgaccc ctgtcacgtc 300

gaactcctcg aacagttcga ggcccgggcc tataccctag ttcccatttt ccaaggagaa 360

catctctggg ggattctcgc cgcctatcaa aacgacggtc cccgggaatg gcaaaatagc 420

gaagtggatt tgctgcaacg gattgccgac caattggggg tggccctgca acaagccgaa 480

accgtgaccc aactgcgtcg tcagtccgat cgcattcgcc aagccgccga gcgcgatcgc 540

accgtagccc aagtcatcga ccgcatccgt caatccctcg atatcaacag tatcttcaac 600

gtcaccacca aagaagtacg actgttgctg caatgcgatc gcatcgccgt ctatcaattc 660

aaccccgact ttagcggtca gtttgtggcc gagtccgtca ctcccggctg ggggaaactc 720

gtcggccccg aagtcgaacg agtctggaaa gacacctacc tcgaagaaaa ccagggagga 780

cgttatgcct accgggaaac ctacgccgtc accgatatct acgaagccgg ccatgacccc 840

tgtcacgtcg aactcctcga acagttcgag gcccgggcct ataccctggt tcctattttc 900

caaggggaaa ccctctgggg cattctcgcc gcctatcaaa acgacggccc tcgggaatgg 960

caagaggacg aagtgcaact gcttgtacgc atcgccgacc aattaggggt cgccctgcaa 1020

caagccgaaa ccgtccagga actgcgccgc cagtccgaac gaattgcccg caccgccgaa 1080

cgggaacgcg ccgtcgctca ggtcatcgaa cggattcggg aatctctgaa cttagacacc 1140

atcttcgaca ccaccaccac cgaagtccga cgactcctca aaactgatcg cgtctgtgtc 1200

tatcaattcg ccgaagactg gagtgggtcc tttattgccg agtccgtcgg ggcgacctgg 1260

gccccctgg tgcagcgaca acaacaaatt cccgctctac gggacaatgt cagccaatgc 1320

gacaacatga caagcctgat tgagcggcaa cagtccggcc aacttgcccc ccaagccagc 1380

ggccccgcca gtcgggatac ctatctgcaa gagacggaag ggggacgctt ccagactgaa 1440

caagccttct ccgttgaaga tatctatcaa gcgggcttta gcacctgtta tctcgaagtc 1500

ctcgaacaat atcaatgtcg cgcctatgcc attgttccca tcttcaaggg tcctcaactc 1560

tggggactcc tggccgccta tcagaacaac gggccacggg actgggaaaa cgaggaagtc 1620

accctactgc ggcaaatcgg aacccaactg ggagtcgcca ttcagcagag tgaatacctg 1680

caacaactgc aagagcagtc cctgcaactc gaagctgctg cccaacggga taaggccgcc 1740

aaagaacaac tgcaaaaacg ggctctggaa ctgctgatgg ccgtccgccc agccctggac 1800

ggggatttaa cagtgcggat tcccgtgaca gaagat 1836

<210> 8

<211> 612

<212> PRT

<213> Light harvesting pigment GAF2/3/4 polypeptide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 8

Arg Val Ile Glu Arg Ile Arg Gln Ser Leu Asn Ile Asp Ile Ile Phe
1 5 10 15

Arg Thr Thr Thr Lys Glu Val Arg Leu Leu Leu Lys Cys Asp Arg Val
20 25 30

Ala Val Tyr Gln Phe Asn Pro Asp Phe Ser Gly Gln Phe Val Ala Glu
35 40 45

Ser Val Thr Ser Gly Trp Val Lys Leu Val Gly Glu Glu Val Glu Arg
50 55 60

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

Asn His Glu Thr Tyr Ala Val Ser Asp Ile Tyr Thr Ile Gly His Asp
85 90 95

Pro Cys His Val Glu Leu Leu Glu Gln Phe Glu Ala Arg Ala Tyr Thr
100 105 110

Leu Val Pro Ile Phe Gln Gly Glu His Leu Trp Gly Ile Leu Ala Ala
115 120 125

Tyr Gln Asn Asp Gly Pro Arg Glu Trp Gln Asn Ser Glu Val Asp Leu
130 135 140

Leu Gln Arg Ile Ala Asp Gln Leu Gly Val Ala Leu Gln Gln Ala Glu

145 150 155 160

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

165 170 175

Glu Arg Asp Arg Thr Val Ala Gln Val Ile Asp Arg Ile Arg Gln Ser

180 185 190

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

195 200 205

Leu Leu Gln Cys Asp Arg Ile Ala Val Tyr Gln Phe Asn Pro Asp Phe

210 215 220

Ser Gly Gln Phe Val Ala Glu Ser Val Thr Pro Gly Trp Gly Lys Leu

225 230 235 240

Val Gly Pro Glu Val Glu Arg Val Trp Lys Asp Thr Tyr Leu Glu Glu

245 250 255

Asn Gln Gly Gly Arg Tyr Ala Tyr Arg Glu Thr Tyr Ala Val Thr Asp

260 265 270

Ile Tyr Glu Ala Gly His Asp Pro Cys His Val Glu Leu Leu Glu Gln

275 280 285

Phe Glu Ala Arg Ala Tyr Thr Leu Val Pro Ile Phe Gln Gly Glu Thr

290 295 300

Leu Trp Gly Ile Leu Ala Ala Tyr Gln Asn Asp Gly Pro Arg Glu Trp

305 310 315 320

Gln Glu Asp Glu Val Gln Leu Leu Val Arg Ile Ala Asp Gln Leu Gly

325 330 335

Val Ala Leu Gln Gln Ala Glu Thr Val Gln Glu Leu Arg Arg Gln Ser

340 345 350

Glu Arg Ile Ala Arg Thr Ala Glu Arg Glu Arg Ala Val Ala Gln Val

355 360 365

Ile Glu Arg Ile Arg Glu Ser Leu Asn Leu Asp Thr Ile Phe Asp Thr

370 375 380

Thr Thr Thr Glu Val Arg Arg Leu Leu Lys Thr Asp Arg Val Cys Val

385 390 395 400

Tyr Gln Phe Ala Glu Asp Trp Ser Gly Ser Phe Ile Ala Glu Ser Val
405 410 415
Gly Ala Thr Trp Ala Pro Leu Val Gln Arg Gln Gln Gln Ile Pro Ala
420 425 430
Leu Arg Asp Asn Val Ser Gln Cys Asp Asn Met Thr Ser Leu Ile Glu
435 440 445
Arg Gln Gln Ser Gly Gln Leu Ala Pro Gln Ala Ser Gly Pro Ala Ser
450 455 460

Arg Asp Thr Tyr Leu Gln Glu Thr Glu Gly Gly Arg Phe Gln Thr Glu
465 470 475 480
Gln Ala Phe Ser Val Glu Asp Ile Tyr Gln Ala Gly Phe Ser Thr Cys
485 490 495
Tyr Leu Glu Val Leu Glu Gln Tyr Gln Cys Arg Ala Tyr Ala Ile Val
500 505 510
Pro Ile Phe Lys Gly Pro Gln Leu Trp Gly Leu Leu Ala Ala Tyr Gln
515 520 525
Asn Asn Gly Pro Arg Asp Trp Glu Asn Glu Glu Val Thr Leu Leu Arg

530 535 540
Gln Ile Gly Thr Gln Leu Gly Val Ala Ile Gln Gln Ser Glu Tyr Leu
545 550 555 560
Gln Gln Leu Gln Glu Gln Ser Leu Gln Leu Glu Ala Ala Ala Gln Arg
565 570 575
Asp Lys Ala Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Arg Ala Leu Glu Leu Leu
580 585 590
Met Ala Val Arg Pro Ala Leu Asp Gly Asp Leu Thr Val Arg Ile Pro
595 600 605

Val Thr Glu Asp
610

<210> 9
<211> 3555
<212> DNA
<213> Light harvesting pigment GHP polynucleotide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 9

atgtctcctc gcgaatccac ctccccagcc acaaccaacc tctcggcccc cattgctaaa 60

agcttagaag aacaactcaa agcgattcgt cagcaggcgg ctaagattac ccaacccctc 120

caacaggcca acagcttaga ggcggcctgt cgggatgtgg tggtacaact tcagcaggtg 180

tttgagtgcg atcgcgccct catttaccgc ctgtgcgatc gcagtattga tgcctttatt 240

gaccaattcc aaaatcccat gtctggattg gccttcaatg gggggggaaa tggcgtcaat 300

cgtcctggtt taaatagcgc aattgaatct ggactgcctc taacaaatgc caatggtgcg 360

aatttaacgg ggactgtggt tgccgaagcc gtcggacgag gttggacacc atctttgggc 420

gatcgcctcc acattgccgc ctttggtttt gaaaccctag acgactatca aaacctgggg 480

tttatctcca tcgccgacca atctcgcacc aaccttaccc cacaccagca gcaaatcctc 540

gatcgctatc aagtccaagc ggccctaacc attcccctca aactgggtca aaaactttgg 600

ggggttttgt ctgtgcagca ttgtcgtaac ccctattcct ggtcagaacg agaaatcgcc 660

attttgcgac aagtggccgc cgaattaatt agtttccagc aaagtctcaa tggtcatggg 720

acttccatgc tagaccccaa cccccagcaa gttgaggatg tcctcgaacg gttgcgcaac 780

tcctttgacc gagttcaaga ccgcgatcgc agcgtagcac gggtgattga gcggattcgt 840

caatccctga atatcgatat tatcttccgc accaccacaa aggaagtccg gttactgctg 900

aaatgcgatc gcgtggccgt ctatcaattt aaccccgact ttagcggtca gtttgtggct 960

gagtccgtca cctccggctg ggtgaaactc gttggcgagg aggtcgaacg ggtttggaaa 1020

gatacctacc tcgaagaaaa ccaaggggga cgctacgcca accatgaaac ctacgccgtc 1080

agtgatatct ataccatcgg tcatgacccc tgtcacgtcg aactcctcga acagttcgag 1140

gcccgggcct ataccctagt tcccattttc caaggagaac atctctgggg gattctcgcc 1200

gcctatcaaa acgacggtcc ccgggaatgg caaaatagcg aagtggattt gctgcaacgg 1260

attgccgacc aattgggggt ggccctgcaa caagccgaaa ccgtgaccca actgcgtcgt 1320

cagtccgatc gcattcgcca agccgccgag cgcgatcgca ccgtagccca agtcatcgac 1380

cgcatccgtc aatccctcga tatcaacagt atcttcaacg tcaccaccaa agaagtacga 1440

ctgttgctgc aatgcgatcg catcgccgtc tatcaattca accccgactt tagcggtcag 1500

tttgtggccg agtccgtcac tcccggctgg gggaaactcg tcggccctga agtcgaacga 1560

gtctggaaag acacctacct cgaagaaaac cagggaggac gttacgccta ccgggaaacc 1620

tacgccgtca ccgatatcta cgaagccggc catgacccct gtcacgtcga actcctcgaa 1680

cagttcgagg cccgggccta taccctggtt cctattttcc aaggggaaac cctctggggc 1740

attctcgccg cctatcaaaa cgacggccct cgggaatggc aagaggacga agtgcaactg 1800

cttgtacgca tcgccgacca attaggggtc gccctgcaac aagccgaaac cgtccaggaa 1860

ctgcgccgcc agtccgaacg aattgcccgc accgccgaac gggaacgcgc cgtcgctcag 1920

gtcatcgaac ggattcggga atctctgaac ttagacacca tcttcgacac caccaccacc 1980

gaagtccgac gactcctcaa aactgatcgc gtctgtgtct atcaattcgc cgaagactgg 2040

agtgggtcct ttattgccga gtccgtcggg gcgacctggg ccccccctggt gcagcgacaa 2100

caacaaattc ccgctctacg ggacaatgtc agccaatgcg acaacatgac aagcctgatt 2160

gagcggcaac agtccggcca acttgccccc caagccagcg gccccgccag tcgggatacc 2220

tatctgcaag agacggaagg gggacgcttc cagactgaac aagccttctc cgttgaagat 2280

atctatcaag cgggctttag cacctgttat ctcgaagtcc tcgaacaata tcaatgtcgc 2340

gcctatgcca ttgttcccat cttcaagggt cctcaactct ggggactcct ggccgcctat 2400

cagaacaacg ggccacggga ctgggaaaac gaggaagtca ccctactgcg gcaaatcgga 2460

acccaactgg gagtcgccat tcagcagagt gaatacctgc aacaactgca agagcagtcc 2520

ctgcaactcg aagctgctgc ccaacgggat aaggccgcca aagaacaact gcaaaaacgg 2580

gctctggaac tgctgatggc cgtccgccca gccctggacg gggatttaac agtgcggatt 2640

cccgtgacag aagatgaaat gggaaccctg gccgactcct tcaacaacac cctgcaaagc 2700

ctgcgtaaaa tcgtcatgca ggtgcaaacc gccgccggac aggtggtgca aagctcccaa 2760

agtagtgacg cgtctctgat ggaattgtca gaccaagcgc aaaagcaatt cgaggaaatt 2820

agcaaaaccc tcgatcgcat tcaggatgtg gtgggcttca cccaaaccac tgccaacaac 2880

gcccaacagg tggaagtggc gctacagggg gccaaccgta ccctagaagc tggggatgat 2940

gccatgaacc gtaccgtgga ggggattgcc gacattcgcc aaaccgtggc cgccgccgcc 3000

aaagggattg cccgccttac ccagtcctcg caaaacatcg ctaaggtggt gaacctgatt 3060

aacaacttcg ccactcagac caacttattg gcgttgaatg cggccattga agccacccga 3120

gccggggaat atgggcgcgg ctttgcggtg gttgccgatg aggtgcgctc cctggctcgt 3180

cagtcagcgg atgcgaccac cgaaattgaa aatctggtcc aggaaattca ggcagaaacg 3240

aaggatgtga ccctggcgat ggaaatggcc tcggaacagg tgacgaaggg gacaaatctg 3300

gtgggcgaaa cccggcaaac tctcaatgag attgtgacgg cgacggccca aatcggggaa 3360

ctggtgcagg gaattaccca tgcgacgcag gtacaaacgg aacaagctca atcggtgaca 3420

gagatgatgc gctcaattgc agaaattgcc aaccaaacct cggaaaactc catcgcgatt 3480

tcctcgcgct ttaaggatgc tctgaccaca gctcaggagt tacaatcaag tgcgggacaa 3540

tttaaggtga gttag 3555

<210> 10

<211> 1184

<212> PRT

<213> Light harvesting pigment GHP polypeptide sequence from Microcoleus sp. B353

<400> 10

Met Ser Pro Arg Glu Ser Thr Ser Pro Ala Thr Thr Asn Leu Ser Ala
1 5 10 15

Pro Ile Ala Lys Ser Leu Glu Glu Gln Leu Lys Ala Ile Arg Gln Gln
20 25 30

Ala Ala Lys Ile Thr Gln Pro Leu Gln Gln Ala Asn Ser Leu Glu Ala
35 40 45

Ala Cys Arg Asp Val Val Val Gln Leu Gln Gln Val Phe Glu Cys Asp
50 55 60

Arg Ala Leu Ile Tyr Arg Leu Cys Asp Arg Ser Ile Asp Ala Phe Ile
65 70 75 80

Asp Gln Phe Gln Asn Pro Met Ser Gly Leu Ala Phe Asn Gly Gly Gly
85 90 95

Asn Gly Val Asn Arg Pro Gly Leu Asn Ser Ala Ile Glu Ser Gly Leu
100 105 110

Pro Leu Thr Asn Ala Asn Gly Ala Asn Leu Thr Gly Thr Val Val Ala
115 120 125

Glu Ala Val Gly Arg Gly Trp Thr Pro Ser Leu Gly Asp Arg Leu His
130 135 140

Ile Ala Ala Phe Gly Phe Glu Thr Leu Asp Asp Tyr Gln Asn Leu Gly
145 150 155 160

Phe Ile Ser Ile Ala Asp Gln Ser Arg Thr Asn Leu Thr Pro His Gln
165 170 175

Gln Gln Ile Leu Asp Arg Tyr Gln Val Gln Ala Ala Leu Thr Ile Pro
180 185 190

Leu Lys Leu Gly Gln Lys Leu Trp Gly Val Leu Ser Val Gln His Cys
195 200 205

Arg Asn Pro Tyr Ser Trp Ser Glu Arg Glu Ile Ala Ile Leu Arg Gln

210 215 220

Val Ala Ala Glu Leu Ile Ser Phe Gln Gln Ser Leu Asn Gly His Gly

225 230 235 240

Thr Ser Met Leu Asp Pro Asn Pro Gln Gln Val Glu Asp Val Leu Glu

245 250 255

Arg Leu Arg Asn Ser Phe Asp Arg Val Gln Asp Arg Asp Arg Ser Val

260 265 270

Ala Arg Val Ile Glu Arg Ile Arg Gln Ser Leu Asn Ile Asp Ile Ile

275 280 285

Phe Arg Thr Thr Thr Lys Glu Val Arg Leu Leu Leu Lys Cys Asp Arg

290 295 300

Val Ala Val Tyr Gln Phe Asn Pro Asp Phe Ser Gly Gln Phe Val Ala

305 310 315 320

Glu Ser Val Thr Ser Gly Trp Val Lys Leu Val Gly Glu Glu Val Glu

325 330 335

Arg Val Trp Lys Asp Thr Tyr Leu Glu Glu Asn Gln Gly Gly Arg Tyr

340 345 350

Ala Asn His Glu Thr Tyr Ala Val Ser Asp Ile Tyr Thr Ile Gly His

355 360 365

Asp Pro Cys His Val Glu Leu Leu Glu Gln Phe Glu Ala Arg Ala Tyr

370 375 380

Thr Leu Val Pro Ile Phe Gln Gly Glu His Leu Trp Gly Ile Leu Ala

385 390 395 400

Ala Tyr Gln Asn Asp Gly Pro Arg Glu Trp Gln Asn Ser Glu Val Asp

405 410 415

Leu Leu Gln Arg Ile Ala Asp Gln Leu Gly Val Ala Leu Gln Gln Ala

420 425 430

Glu Thr Val Thr Gln Leu Arg Arg Gln Ser Asp Arg Ile Arg Gln Ala

435 440 445

Ala Glu Arg Asp Arg Thr Val Ala Gln Val Ile Asp Arg Ile Arg Gln

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Leu Leu Gln Cys Asp Arg Ile Ala Val Tyr Gln Phe Asn Pro Asp

485 490 495

Phe Ser Gly Gln Phe Val Ala Glu Ser Val Thr Pro Gly Trp Gly Lys

500 505 510

Leu Val Gly Pro Glu Val Glu Arg Val Trp Lys Asp Thr Tyr Leu Glu

515 520 525

Glu Asn Gln Gly Gly Arg Tyr Ala Tyr Arg Glu Thr Tyr Ala Val Thr

530 535 540

Asp Ile Tyr Glu Ala Gly His Asp Pro Cys His Val Glu Leu Leu Glu

545 550 555 560

Gln Phe Glu Ala Arg Ala Tyr Thr Leu Val Pro Ile Phe Gln Gly Glu

565 570 575

Thr Leu Trp Gly Ile Leu Ala Ala Tyr Gln Asn Asp Gly Pro Arg Glu

580 585 590

Trp Gln Glu Asp Glu Val Gln Leu Leu Val Arg Ile Ala Asp Gln Leu

595 600 605

Gly Val Ala Leu Gln Gln Ala Glu Thr Val Gln Glu Leu Arg Arg Gln

610 615 620

Ser Glu Arg Ile Ala Arg Thr Ala Glu Arg Glu Arg Ala Val Ala Gln

625 630 635 640

Val Ile Glu Arg Ile Arg Glu Ser Leu Asn Leu Asp Thr Ile Phe Asp

645 650 655

Thr Thr Thr Thr Glu Val Arg Arg Leu Leu Lys Thr Asp Arg Val Cys

660 665 670

Val Tyr Gln Phe Ala Glu Asp Trp Ser Gly Ser Phe Ile Ala Glu Ser

675 680 685

Val Gly Ala Thr Trp Ala Pro Leu Val Gln Arg Gln Gln Gln Ile Pro

690 695 700

Ala Leu Arg Asp Asn Val Ser Gln Cys Asp Asn Met Thr Ser Leu Ile

705 710 715 720

Glu Arg Gln Gln Ser Gly Gln Leu Ala Pro Gln Ala Ser Gly Pro Ala
725 730 735
Ser Arg Asp Thr Tyr Leu Gln Glu Thr Glu Gly Gly Arg Phe Gln Thr
740 745 750
Glu Gln Ala Phe Ser Val Glu Asp Ile Tyr Gln Ala Gly Phe Ser Thr
755 760 765
Cys Tyr Leu Glu Val Leu Glu Gln Tyr Gln Cys Arg Ala Tyr Ala Ile

770 775 780
Val Pro Ile Phe Lys Gly Pro Gln Leu Trp Gly Leu Leu Ala Ala Tyr
785 790 795 800
Gln Asn Asn Gly Pro Arg Asp Trp Glu Asn Glu Glu Val Thr Leu Leu
805 810 815
Arg Gln Ile Gly Thr Gln Leu Gly Val Ala Ile Gln Gln Ser Glu Tyr
820 825 830
Leu Gln Gln Leu Gln Glu Gln Ser Leu Gln Leu Glu Ala Ala Ala Gln
835 840 845

Arg Asp Lys Ala Ala Lys Glu Gln Leu Gln Lys Arg Ala Leu Glu Leu
850 855 860
Leu Met Ala Val Arg Pro Ala Leu Asp Gly Asp Leu Thr Val Arg Ile
865 870 875 880
Pro Val Thr Glu Asp Glu Met Gly Thr Leu Ala Asp Ser Phe Asn Asn
885 890 895
Thr Leu Gln Ser Leu Arg Lys Ile Val Met Gln Val Gln Thr Ala Ala
900 905 910
Gly Gln Val Val Gln Ser Ser Gln Ser Ser Asp Ala Ser Leu Met Glu

915 920 925
Leu Ser Asp Gln Ala Gln Lys Gln Phe Glu Glu Ile Ser Lys Thr Leu
930 935 940
Asp Arg Ile Gln Asp Val Val Gly Phe Thr Gln Thr Thr Ala Asn Asn
945 950 955 960
Ala Gln Gln Val Glu Val Ala Leu Gln Gly Ala Asn Arg Thr Leu Glu
965 970 975

Ala Gly Asp Asp Ala Met Asn Arg Thr Val Glu Gly Ile Ala Asp Ile
980 985 990

Arg Gln Thr Val Ala Ala Ala Ala Lys Gly Ile Ala Arg Leu Thr Gln
995 1000 1005

Ser Ser Gln Asn Ile Ala Lys Val Val Asn Leu Ile Asn Asn Phe Ala
1010 1015 1020

Thr Gln Thr Asn Leu Leu Ala Leu Asn Ala Ala Ile Glu Ala Thr Arg
1025 1030 1035 1040

Ala Gly Glu Tyr Gly Arg Gly Phe Ala Val Val Ala Asp Glu Val Arg
1045 1050 1055

Ser Leu Ala Arg Gln Ser Ala Asp Ala Thr Thr Glu Ile Glu Asn Leu

1060 1065 1070

Val Gln Glu Ile Gln Ala Glu Thr Lys Asp Val Thr Leu Ala Met Glu
1075 1080 1085

Met Ala Ser Glu Gln Val Thr Lys Gly Thr Asn Leu Val Gly Glu Thr
1090 1095 1100

Arg Gln Thr Leu Asn Glu Ile Val Thr Ala Thr Ala Gln Ile Gly Glu
1105 1110 1115 1120

Leu Val Gln Gly Ile Thr His Ala Thr Gln Val Gln Thr Glu Gln Ala
1125 1130 1135

Gln Ser Val Thr Glu Met Met Arg Ser Ile Ala Glu Ile Ala Asn Gln
1140 1145 1150

Thr Ser Glu Asn Ser Ile Ala Ile Ser Ser Arg Phe Lys Asp Ala Leu
1155 1160 1165

Thr Thr Ala Gln Glu Leu Gln Ser Ser Ala Gly Gln Phe Lys Val Ser
1170 1175 1180

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAF2 forward primer

<400> 11

gtactcgaga cgggtgattg agcggattc 29

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAF2 reverse primer

<400> 12

gtgaattcga tgacttgggc tacggtg 27

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAF3 forward primer

<400> 13

gtactcgagc cgcatccgtc aatccctc 28

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAF3 reverse primer

<400> 14

gtgaattcgt tcagagattc ccgaat 26

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAF4 forward primer

<400> 15

catctcgagt cgggaatctc tgaacttag 29

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAF4 reverse primer

<400> 16

catctgcagc gggaatctct gaacttag 28

<210> 17

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAF2/3/4 forward primer

<400> 17

gtactcgaga cgggtgattg agcggattc 29

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAF2/3/4 reverse primer

<400> 18

catctgcagc gggaatctct gaacttag 28