(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0028853
(43) 공개일자 2011년03월22일

(51) Int. Cl.
C12N 9/96 (2006.01) *C12N 9/98* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0086468
(22) 출원일자 2009년09월14일
심사청구일자 2009년09월14일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
(72) 발명자
정광환
경기도 성남시 분당구 이매동 삼성아파트 1025-503
이건아
인천광역시 부평구 부평1동 두산위브아파트 104동 1005호
최아름
울산 광역시 동구 방어동 1093-5번지 크리스탈빌 402호
(74) 대리인
이원희

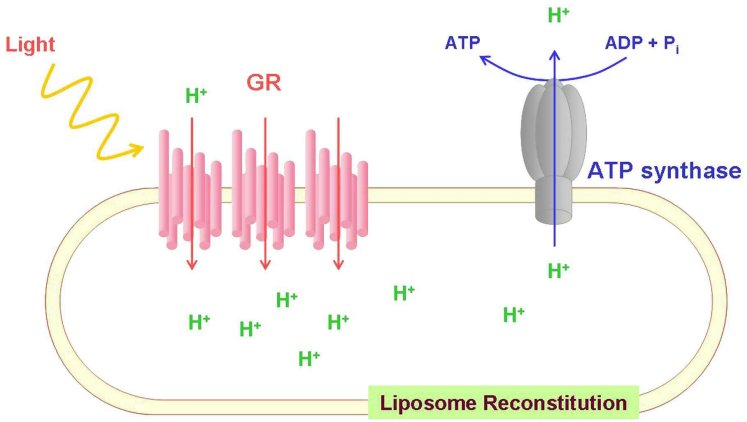
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 글레오박터 로돕신 및 ＡＴＰ 합성효소가 방향성을 갖도록 장착된 ＡＴＰ 합성용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 글레오박터 로돕신(*Gloeobacter* rhodopsin: 이하, GR) 및 ATP 합성효소가 방향성을 갖도록 장착된 ATP 합성용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 1) 막 안쪽으로부터 막 바깥쪽으로 양성자(H^+)를 배출하는 막단백질인 GR을 *E. coli*에서 대량 발현시킨 후, 2) 상기 세포를 파쇄하여 반전된(inverted) 막으로 만들고, 3) Pi를 첨가하고 빛을 비추어서, GR에 의해 양성자 막구배를 형성할 수 있고, 4) 상기 막구배로부터 *E. coli*의 막단백질인 ATP 합성효소를 통해 ATP를 합성하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 ATP 합성용 조성물 및 ATP 합성 방법은 생물질을 대량합성하기 위해 사용되는 많은 양의 ATP를 안정적으로 공급할 수 있고, 또한, 본 발명의 ATP 합성용 조성물은 재생하여 사용될 수 있으므로, 비용이 저렴하다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 11-2008-11-004-00
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관
연구사업명 미생물유전체활용기술개발사업
연구과제명 녹색광 수용체를 이용한 광에너지 전환 연구
기여율
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2008년 05월 01일 ~ 2011년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

양성자를 펌핑인(Pumping in) 하도록, 내향성을 갖도록 배향된 글레오박터 로돕신(*Gloeobacter* rhodopsin: 이하, GR) 및 상기 펌핑된 양성자의 농도구배에 의해 막 외부에서 ATP를 생성하도록, 외향성을 갖도록 배향된 ATP 합성효소를 포함하는 반전된 막 소포(inverted membrane vesicle)를 포함하는 ATP 합성용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 글레오박터 로돕신은 글레오박터 비올라세우스(*Gloeobacter violaceus*) 유래인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

1) 서열번호 1로 기재되는, GR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

2) 단계 1)의 재조합 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 형질전환체를 제조하는 단계;

3) 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 GR의 발현을 유도하는 단계;

4) 단계 3)의 GR이 과발현된 형질전환체로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 단계; 및

5) 단계 4)의 분리된 원형질체로부터 반전된 막 소포(inverted membrane vesicle)를 제조하는 단계를 포함하는 GR 및 ATP 합성효소가 방향성을 갖도록 장착된 ATP 합성용 조성물의 제조방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 단계 2)의 숙주세포는 *E. coli*인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제 1항의 ATP 합성용 조성물에 Pi를 첨가한 후, 광을 조사하는 단계를 포함하는 상기 ATP 합성용 조성물을 이용하여 ATP를 합성하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 Pi의 첨가량은 최종농도가 1 pM 내지 100 nM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 파장이 440 nm 이상인 가시광선을 조사하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인공 ATP 합성용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 살아있는 세포는 끊임없이 일을 하며 따라서 에너지가 필요하다. 에너지는 고도로 구조화된 구조물의 유지, 세포 소기관의 합성, 움직임, 전기적 전류의 형성, 빛의 생성 등 많은 과정에 이용된다. 여러 대사산물 중에서 상기 에너지로 사용되는 하나가 ATP이다. ATP는 이화작용과 동화작용을 잇는 화학적 연결고리로, 세포의 에너지 흐름을 구성하는 요소 중 하나이다. ATP는 ADP와 P_i 또는 AMP와 PP_i로 발열전환되며, 이것들은 많은 다른 기질의 흡열 전환과 짝지워져 있다. ATP가 가수분해되면 ATP의 인산화기, 파이로인산화기, 아데닐릴기를 기질로 이동하는데, 이러한 '작용기 전달(Group transfer)'이 바로 ATP가 동화반응에 필요한 에너지를 공급하는 원리이다.

[0003] 박테리아, 미토콘드리아 및 엽록체에서의 ATP 합성은 막 간에 양성자(Δp) [때때로 Na^+ 이온 (ΔpNa^+)]의 전기화학적 기울기가 형성되면 막-결합 F_1F_0-ATP 합성효소를 통해 양성자가 이동하면서 합성된다(Capaldi RA & Aggeler R, *Trends Biochem. Sci.* 27:154-160, 2002; Dimroth P, *Biochim. Biophys. Acta* 1318:11-51, 1997; Neumann S *et al.*, *J. Bacteriol.* 180:3312-3316, 1998; Reidlinger J & Muller V, *Eur. J. Biochem.* 223:275-283, 1994; Yoshida M *et al.*, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:669-677, 2001). 상기 F_1F_0 효소는 막 관련 머리부인 F_1과 내재성 막 구획인 F_0로 구성된다. 상기 F_1은 $\alpha_3\beta_3\gamma\ \delta\ \varepsilon$, F_0는 ab_2C_{10-14}의 서브유닛으로 구성되어있다. 이 분자 기구는 F_0을 통한 이온의 수송과 F_1의 ATP 합성을 연결한다. 다양한 생물의 ATP 합성효소 분자의 생화학적인 연구를 위해서, 한 연구 그룹에서는 통성 써모알칼리필러스 바실러스 종에서 ATP 합성효소를 분리하였으며(Olsson K *et al.*, *J. Bacteriol.* 185:461-465, 2003; Peddie CJ *et al.*, *J. Bacteriol.* 181:3172-3177, 1999), 정제된 효소를 프로테오리포솜(proteoliposome)에 재구성하여 이온 이동 연구에 이용하였는데 이 연구로 ATP 합성효소가 ATP를 합성하는 데에 커플링 이온으로써 양성자를 이용한다는 것을 밝혀내었다(Gregory M *et al.*, *J. Bacteriol.* 185(15):4442-4449, 2003).

[0004] 한편, 미생물이 ATP를 얻기 위한 전단계로 막간 양성자 구배를 형성할 때 세포막의 전자전달계를 이용한 호흡과정을 이용하지만, 일부 미생물의 경우 로돕신 이라는 막단백질의 도움을 얻기도 한다. 로돕신은 광활성의 막에 박힌 레티닐리덴(retinylidene) 단백질로, 동물과 미생물에 고루 분포되어 있는 빛의 수용체 단백질이다. 1930년대에 소의 눈에서 처음으로 로돕신이 발견되었는데 동물의 눈에서 로돕신은 시각을 담당하는 기능을 하지만(Spudich JL, *Trends Microbiol.* 14(11):480-487, 2006), 미생물에서는 수소 이온이나 염소 이온을 펌핑하거나 세포를 움직이는 데에 이용되고 또 색순응에 관여하기도 한다(Spudich JL & Jung KH, *In Handbook of Photosensory Receptors*, ed. (2005) W.R. Griggs and J.L. Spudich, pp. 1-24). 미생물 로돕신 중에서, SAR86 그룹의 해양 γ-프로테오박테리움에서 발견된 프로테오로돕신(proteorhodopsin; 이하, PR)은 세포 내에서 빛에 의한 양성자 펌프 기능을 한다(Beja O *et al.*, *Science* 289:1902-1906, 2000; Beja O *et al.*, *Nature.* 411:786-789, 2001;). 지금까지 여러 해양에서 800개가 넘는 서로 다른 PR 유전자들이 확인되었고, 투광층의 미생물의 13%, 바다 지표수 군집 전체의 50% 이상이 PR을 갖는 박테리아로 밝혀졌다(Sabehi G *et al.*, *PLoS Biol.* 3:e273, 2005).

[0005] 또 다른 미생물인 글레오박터 비올라세우스(*Gloeobacter violaceus*)는 단세포 시아노박테리움으로 스위스의 석회질 암석에서 분리되었다(Rippka R *et al.*, *Arch. Microbiol.* 100:419-436, 1974). 16S rRNA 서열에 기초한 계통 연구에 따르면, 이 박테리아는 매우 오래전에 일반적인 시아노박테리아 계통 가지로부터 분리되어 나왔는데, 이것은 초기 시아노박테리아의 원시적 특성의 일부분이 남아있음을 시사하였다(Nelissen B *et al.*, *J Mol Evol.* 42(2):194-200, 1996; Nelissen B *et al.*, *Mol Biol Evol.* 12(6):1166-1173 1995). 광합성을 하는 글레오박터는 틸라코이드 막이 없는 대신, 세포막에 광합성 기구와 호흡 시스템이 모두 갖추어져 있다(Rippka R *et al.*, *Arch. Microbiol.* 100:419-436, 1974). 서열 상동성을 비교한 결과 글레오박터의 게놈에서 미생물 로돕신과 상동성이 있는 유전자를 찾았으며 PR과 같이 양성자를 펌핑하는 것을 밝혔고, 이 로돕신의 이름을 글레오박터 로돕신(*Gloeobacter* rhodopsin: 이하, GR) 이라고 명명하였다.

[0006] ATP는 세포와 생명체가 살아가는 데 있어 꼭 필요한 에너지를 제공하는 물질이다. 최근에는 생물질을 대량합성하기 위해 많은 양의 ATP가 사용되는데, ATP를 합성하는 데는 많은 비용이 들고 또한 한번 사용하면 재생하여 사용될 수 있는 성질의 것이 아니다. 하지만 생체의 ATP 합성용 조성물을 이용하면 ATP를 계속해서 공급할 수

있고 또한 재생도 가능할 것이다.

[0007] 본 발명자들은 이에 착안하여, GR을 *E. coli*에서 대량 발현시킨 후 세포를 파쇄하여 반전된(inverted) 막으로 만들고, GR에 의해 형성된 양성자 막구배가 *E. coli*의 ATP 합성효소를 통해 형성되도록 함으로써 ATP 합성용 조성물을 구축함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 글레오박터 로돕신(*Gloeobacter* rhodopsin: 이하, GR) 및 ATP 합성효소가 방향성을 갖도록 장착된, 반전된 막 소포를 포함하는 ATP 합성용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 반전된 막 소포의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 ATP 합성용 조성물을 이용하여 ATP를 합성하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 양성자를 펌핑인(Pumping in) 하도록, 내향성을 갖도록 배향된 글레오박터 로돕신(*Gloeobacter* rhodopsin: 이하, GR) 및 상기 펌핑된 양성자의 농도구배에 의해 막 외부에서 ATP를 생성하도록, 외향성을 갖도록 배향된 ATP 합성효소를 포함하는 반전된 막 소포(inverted membrane vesicle)를 포함하는 ATP 합성용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 GR 및 ATP 합성효소를 포함하는 반전된 막 소포의 제조방법을 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 상기 ATP 합성용 조성물을 이용하여 ATP를 합성하는 방법을 제공한다.

효 과

[0014] 본 발명의 ATP 합성 조성물 및 ATP 합성 방법은 생물질을 대량합성하기 위해 사용되는 많은 양의 ATP를 안정적으로 공급할 수 있고, 또한, 본 발명의 ATP 합성용 조성물은 재생하여 사용될 수 있으므로, 비용이 저렴하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.

[0016] 본 발명에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.

[0017] "작동 가능하게 연결된"은 프로모터에서 전사가 개시하고 암호화 서열을 통해 종료암호로 진행하는데 작용하도록 단편이 배열되는 것을 나타낸다.

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명의 구체적인 실시예에서, GR 과발현용 벡터를 *E. coli*에 형질도입하여 과발현시켰다. 상기 과발현된 세

포로부터 원형질체(protoplast)를 수득한 후, French Press를 이용하여 GR이 과발현된 *E. coli* 막 분획을 수득하였다. 상기 막 분획을 추출 완충용액에 재현탁함으로써, GR이 발현된 *E. coli*의 반전된 소포-반전된 막(inverted vesicle-inverted membrane)을 수득하였다. 이로써, 막 안쪽으로부터 막 바깥쪽으로 양성자(H^+)를 배출하는 막단백질인 GR이 *E. coli* 막에 결합한 채로 반전됨으로써 도 1과 같이, 막 바깥쪽으로부터 막 안쪽으로 양성자를 유입시켜서 양성자 막구배를 형성할 수 있고, *E. coli*의 막단백질인 ATP 합성효소를 통해 ATP를 합성할 수 있을 것이다.

[0020] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 방법으로 제조된 도 1의 형태를 갖는, 상기 ATP 합성용 조성물은 Pi와 빛을 제공받자 1분 동안 1 mg의 GR에 의해 1.00016E-06 내지 5.09027E-07 mole 사이의 ATP의 양을 생성하였다(표 1 참조). 또한, 상기 ATP 합성용 조성물이 생성하는 ATP의 양이 반으로 줄어드는 시간(T_f)은 2.12일이었고, 10일 이내에서 생성량이 지수적으로 감소하였다(표 2 및 도 2 참조).

[0021] 이로부터, 본 발명의 ATP 합성용 조성물이 ATP 합성에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0022] 본 발명은 양성자를 펌핑인(Pumping in) 하도록, 내향성을 갖도록 배향된 글레오박터 로돕신(*Gloeobacter* rhodopsin: 이하, GR) 및 상기 펌핑된 양성자의 농도구배에 의해 막 외부에서 ATP를 생성하도록, 외향성을 갖도록 배향된 ATP 합성효소를 포함하는 반전된 막 소포(inverted membrane vesicle)를 포함하는 ATP 합성용 조성물을 제공한다.

[0023] 상기 글레오박터 로돕신은 막 안쪽으로부터 막 바깥쪽으로 양성자(H^+)를 배출하는 막단백질로, 글레오박터 비올라세우스(*Gloeobacter violaceus*) 유래로, NCBI 접근번호 BAC88139의 단백질일 수 있다.

[0024] 상기 ATP 합성용 조성물의 GR은 막 바깥쪽으로부터 막 안쪽으로 양성자를 유입시켜서 양성자 막구배를 형성할 것이다. 또한, 상기 ATP 합성 효소는 *E. coli*의 막에 내재적으로 포함된 막단백질로 반전된 막 소포에 고농도로 유입된 양성자를 막 바깥쪽으로 배출하면서 ATP를 합성할 것이다. 본 발명의 ATP 합성용 조성물은 1분 동안 1 mg의 GR에 의해 3.68904E-12 내지 8.82043E-11 mole 사이의 ATP의 양을 생성할 수 있었다(표 1 참조).

[0025] 본 발명의 ATP 합성용 조성물의 안정성(stability)은 GR과 ATP 합성효소의 안정성과 밀접한 연관이 있으며, 시간의 경과에 따른 ATP 생성량의 변화(ATP 생성량의 감소)를 측정함으로써 간접적으로 확인하였다. 본 발명의 ATP 합성용 조성물이 생성하는 ATP의 양이 반으로 줄어드는 시간(T_f)은 2.12일이었고, 10일 이내에서 생성량이 지수적으로 감소하였다(표 1, 표 2 및 도 2 참조).

[0026] 또한, 본 발명은

[0027] 1) 서열번호 1로 기재되는, 글레오박터 로돕신(*Gloeobacter* rhodopsin: 이하, GR)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동 가능하게 연결된 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

[0028] 2) 단계 1)의 재조합 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 형질전환체를 제조하는 단계;

[0029] 3) 단계 2)의 형질전환체를 배양하여 GR의 발현을 유도하는 단계;

[0030] 4) 단계 3)의 GR이 과발현된 형질전환체로부터 원형질체(protoplast)를 분리하는 단계; 및

[0031] 5) 단계 4)의 분리된 원형질체로부터 반전된 막 소포(inverted membrane vesicle)를 제조하는 단계를 포함하는, GR 및 ATP 합성효소를 포함하는 반전된 막 소포의 제조방법을 제공한다.

[0032] 단계 2)의 숙주세포는 반전된 막 소포의 제조기술을 적용할 수 있는 세포는 어느 것이든 사용될 수 있고, 바람직하게는 *E. coli*가 사용될 수 있다.

[0033] 단계 5)의 반전된 막 소포의 제조기술은 세포 파쇄 시 프렌치프레서를 이용하여 반전된 막 소포를 만들기 위한 압력조절 및 단백질 안정화를 위한 용액상의 각 물질의 농도 등이 핵심이고, 이러한 제조기술은 통상 연구하고자 하는 단백질을 통해 이동하는 이온이나 물질의 농도를 측정하는 등 단백질의 생화학적 특성을 연구하기 위해 많이 사용된다.

[0034] 아울러, 본 발명은 상기 ATP 합성용 조성물에 Pi를 첨가한 후, 광을 조사하는 단계를 포함하는 상기 ATP 합성용 조성물을 이용하여 ATP를 합성하는 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 ATP 합성용 조성물은 1분 동안 1 ㎎의 GR에 의해 3.68904E-12 내지 8.82043E-11 mole 사이의 ATP의 양을 생성할 수 있었고(표 1 참조), 상기 ATP 합성용 조성물이 생성하는 ATP의 양이 반으로 줄어드는 시간(T_f)은 2.12일이었고, 10일 이내에서 생성량이 지수적으로 감소하였다(표 1, 표 2 및 도 2 참조).

[0036] 상기 Pi의 첨가량은 최종농도가 1 pM 내지 100 nM인 것이 바람직하나, 상기 ATP 합성용 조성물의 양에 따라 조정될 수 있다.

[0037] 상기 광은 파장이 440 ㎚ 이상인 가시광선을 조사하는 것이 바람직하다.

[0038] 상기 ATP 합성용 조성물은 10일 이내에 지수적으로 감소하면서 ATP를 합성하였으므로, 0 내지 10일간 작동가능할 것이다.

실 시 예

[0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0040] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **<실시예 1> 대장균에서 GR의 과발현**

[0042] **<1-1> GR 과발현 대장균의 제조**

[0043] 글레오박터 로돕신(*Gloeobacter* rhodopsin: 이하, GR) 단백질(서열번호 2)을 과발현하기 위한, GR을 암호화하는 서열번호 1로 기재되는 핵산을 포함하는 벡터의 제조과정은 다음과 같다. NCBI 접근번호 BAC88139의 GR을 글레오박터 비올라셔스(Gloeobacter violaceous)의 게놈 DNA에서 PCR로 증폭하였으며 이때 사용된 degenerate 프라이머쌍은 다음과 같다: 서열번호 3으로 기재되는 정방향 프라이머 5'-ATGTTGATGACCGTATTTTCTTCTGC-3' 및 서열번호 4로 기재되는 역방향 프라이머 5'-CTAGGAGATAAGACTGCCTCCCCG-3'. 유전자 증폭을 위한 PCR은 *pfu* polymerase (Koschem, Korea)를 이용하여 95℃에서 1분, 54℃에서 1분, 72℃에서 2분 30초로 하여 30 싸이클을 반응시켰다. PCR로 증폭된 유전자산물은 6-His-tag과 함께 *Xba* Ⅰ, *Not* Ⅰ 제한효소 및 라이게이즈(New English Lab, USA)를 이용하여 pKJ900 벡터의 *lacUV5* 프로모터 하위에 삽입되었다(Kim *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1777(6):504-513, 2008). 상기 벡터는 앰피실린 내성 유전자를 가지고 있으므로, *E. coli* 스트레인중의 하나인 *DH5*α(UT5600, New England Biolabs, USA)에 도입된 후 50 ㎛M의 앰피실린(USB Corp, USA)이 함유되어 있는 LB Agar 배지에서 선택되었다. 상기 선택된 형질전환체를 50 ㎍/㎖ 앰피실린(USB Corp, USA)을 첨가한 500 ㎖ LB 배지에 접종하고, 1 ㎜ IPTG와 5 ㎛M all-trans retinal(sigmaaldrich, USA)을 넣고 4시간 동안 교반 인큐베이터에서 배양하였다(30℃, 200 rpm). 5000 rpm에서 15분간 원심분리하여 로돕신이 발현된 분홍색을 띄는 *E. coli* 펠렛을 얻었다.

[0044] **<1-2> 원형질체 수득**

[0045] 건조전 중량(Wet weight)으로 3 g 정도의 세포를 50 ㎜ Tris-HCl(pH 8.2), 0.5 ㎜ PMSF 용액에 재현탁하였고, 3.6 ㎎의 리소자임을 넣어 준 후 상온에서 45분간 휘저음하였다. 이어서, DNase Ⅰ(2 ㎎)과 $MgCl_2$(최종농도 5 ㎜)를 첨가하고 상온에서 15분간 휘저음하였다. 4℃, 180,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리하여 원형질체(protoplast)를 얻었다.

[0046] **<실시예 2> GR이 과발현된 *E. coli* 막 분획의 수득**

[0047] 상기 원형질체 펠렛을 4 ㎖의 추출 완충용액[50 ㎜ potassium phosphate buffer(pH 7.8), 0.5 ㎜ PMSF, 2 ㎜ $MgCl_2$, 1 ㎜ DTT]에 재현탁하였다. 미리 차갑게 해 둔 French Pressure Cell Press(SLM Aminco, USA)를 이용하여 원형질체를 파쇄하였다(2 passage, 20,000 Ib/in^2). 파쇄되지 않은 세포는 8,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 제거하였고, 상층액을 취하여 180,000 rpm에서 45분간 원심분리하여 막을 얻었다. 이를 4 ㎖의 추출 완충

용액에 재현탁함으로써, 반전된 소포-반전된 막(inverted vesicle-inverted membrane)을 수득하였다. 이로써, 도 1의 형태를 갖는, GR이 발현된 *E. coli* 막 소포를 제조하였다.

[0048] **<실시예 3> ATP 검사**

[0049] **<3-1> 검사법**

[0050] 4 mℓ의 추출 완충용액에 녹인 시료에 최종농도가 5 mM이 되도록 P_i(Sigma-Aldrich, USA)를 첨가한 후, ≤440 nm 컷-오프 필터(Sigma Koki SCH-50S-44Y, Japan)를 사용하여 빛을 20분간 비추어 주어 광순응(light adaptation) 시켰다. 동시에 같은 농도의 시료에도 최종농도가 5 mM 이 되도록 P_i 를 첨가한 후 암순응(dark-adaptation) 시켰다. 20분 후 루미노미터를 이용하여 생성된 ATP의 양을 측정하였으며(ADENOSINE 5'-TRIPHOSPHATE (ATP) BIOLUMINESCENT ASSAY KIT, SIGMA, USA), 광순응 시료에서 생성된 ATP의 양에서 암순응된 시료에서 생성된 ATP의 양을 뺌으로써 값을 보정해주었다.

[0051] **<3-2> 1 mg의 GR에 의해 1 분 동안 생성되는 ATP의 양 측정**

[0052] GR의 양을 측정하기 위해서 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu UV-2550, Japan)를 이용하여 상기 ATP 합성용 조성물의 흡광량을 측정하였고 이로부터 얻어진 O.D.(optical density)값을 통하여 GR 단백질의 몰농도를 계산하였다. 1 mg의 GR에 의해 1분 동안 생성되는 ATP의 양을 실시예 3-1의 방법으로 측정하였다. 루미노미터를 이용하여 20분 동안 검사 1회당 총 생성된 ATP 양을 측정하고, 암순응 상태의 값을 빼줌으로써 값을 보정한 후, GR의 농도로 나누었는데, 계산 과정 및 결과를 표 1에 정리하였다.

[0053] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 3.68904E-12 내지 8.82043E-11 mole 사이의 ATP가 생성되었다.

표 1

[0054]

시료	GR1	GR2	GR3	GR4	GR5	GR6
1) L20 (R.L.I)	12,093,888	11,357,044	14,673,190	16,602,056	10,936,660	13,545,794
2) D20 (R.L.I)	7,550,470	10,403,830	1,400,263	2,027,044	545,492	10,177,552
3) L-D (R.L.I)	4,543,418	953,214	13,272,927	14,575,012	10,391,168	3,368,242
4) L-D (moles ATP/assay)	1.50929E-10	2.73458E-11	4.8762E-10	5.40183E-10	3.73075E-10	1.0879E-10
5) L-D (moles ATP/시료 4)	6.03717E-09	1.09383E-09	1.95048E-08	2.16073E-08	1.4923E-08	4.35159E-09
6) GR 몰농도(/)	2.523127693	3.706362839	2.840809253	3.062110251	2.89445798	3.573410689
7)GR /4	10.09251077	14.82545136	11.36323701	12.248441	11.57783192	14.29364276
8) moles ATP/분/	2.99092E-11	3.68904E-12	8.58242E-11	8.82043E-11	6.44465E-11	1.52221E-11

[0055] 1) L20은 GR 샘플에 P_i를 첨가하고 빛을 20분간 준 후에 측정한 것임

[0056] 2) D20은 GR 샘플에 P_i를 첨가하고 어둠에서 20분 둔 후에 측정한 것임

[0057] * R.L.I 는 Relative Light Intensity의 약자로써 루미노미터에 의해 측정된 상대적인 발광(luminescence) 세기의 값을 나타내어 준 것임

[0058] 3) L-D는 L20에서 D20의 값을 뺀 것임

[0059] 4) 미리 측정해 둔 ATP 검정곡선(calibration curve)으로부터 구한 값임. 단위는 assay 당 moles ATP

[0060] 5) 최종 시료의 부피가 4 mℓ이므로, 4 mℓ으로부터 생성된 총 ATP의 양을 계산한 것임

[0061] 6) 시료에 1 mℓ에 포함된 GR의 양

[0062] 7) 총 4 mℓ에 포함된 GR의 양(mg)

[0063] 8) [5) / 20 분] / 7). 단위는 moles ATP/분/mg.

[0064] **<3-3> 시간에 따른 ATP 생성 변화의 측정**

[0065] GR이 발현된 *E. coli* 막 소포가 4℃ 조건에서 보관되었을 때, 시간이 지남에 따라 ATP 생성량에 변화가 있는지 알아보았다. 표 1의 가장 ATP 생성 효율이 좋았던 시료 3개(GR3, GR4, GR5)를 시료가 처음 만들어진 날로부터 7일 및 65일에 각각 위와 같은 실험을 반복하였다. 정량값은 표 2에 기재하였고, 3개 시료의 평균값을 이용하여 시간에 따라 ATP 생성량의 변화를 플랏팅 하였다.

표 2

[0066]

moles ATP/min/mg	GR3	GR4	GR5	평균
Day 0	8.58E-11	8.82E-11	6.44E-11	7.95E-11
Day 7	1.05E-11	1.08E-11	7.93E-12	9.74E-12
Day 65	2.48E-12	2.02E-12	3.16E-12	2.55E-12

[0067] 즉, 표 2에서 각 측정시간에 따른 3개 값의 평균값에 대하여 반감기(half-time; T_f) 값을 계산하였다. 상기 평균값을 하기 수학식 1을 이용하여 지수의 감소(exponential decay)로 근사(fitting)하였고, 이를 도 2의 작은 그래프로 기재하였다.

수학식 1

[0068] $$N_t = N_0 \times e^{(-\lambda t)}$$

[0069] N_t: t 시간 이후에 붕괴되지 않고 남아있는 양;

[0070] N_0: 붕괴될 수 있는 물질의 초기량;

[0071] λ: 붕괴상수(decay constant).

[0072] 또한, 도 2의 작은 그래프의 y 축을 log 스케일로 바꾸어, 도 2의 큰 그래프로 표시하였고, T_f 값은 수학식 2를 이용하여 상기 큰 그래프로부터 계산하였다.

수학식 2

[0073] $$T_{1/2} = \ln 2 \div \lambda = \ln 2 \times 3.06236 = 2.12\text{일}$$

[0074] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 시료를 준비한 날로부터 10일 이내에서 지수의 감소하고 있다는 것을 알 수 있었다(작은 그림). 10일 이후에는 지수함수적으로 줄어들지는 않았다. 또한, ATP의 양이 반으로 줄어드는 시간(T_f)을 계산해 본 결과 2.12일이었다.

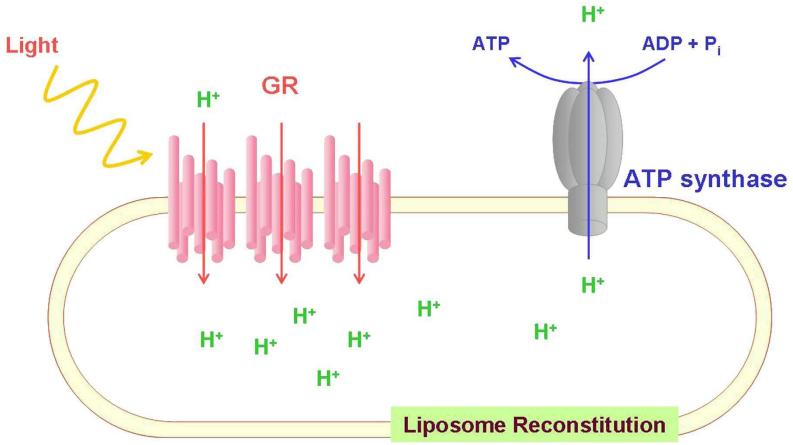
도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 GR과 ATP 합성효소를 리포좀으로 재구성 했을 때의 모식도를 나타낸 도이다.

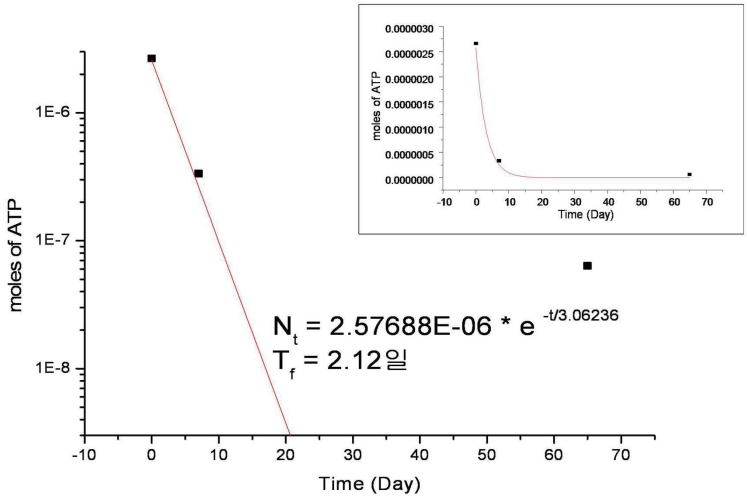
[0076] 도 2는 GR을 발현시킨 *E. coli* 막의 안정성을 나타낸 도이다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION SOGANG UNIVERSITY

<120> ATP synthesis system constructed with Gloeobacter rhodopsin and ATP synthase to have orientation

<130> 9P-08-03

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 897
<212> DNA
<213> Gloeobacter rhodopsin cDNA

<400> 1
ctaggagata agactgcctc ccgatttatt tgcagcagca cctattgcgg catgtggttc 60

actgctttct tgatctgctt ttgttttcac gagtgcaatc gcgaagacta gaagaccaaa 120

tacaggcttc gccagcacgt ctgcgatcgt atagccaacc tgaacgccga cagccgcgga 180

cgtaccggat actccaagca tgggtagaag gtatgcgatc gggtaaacac cccaggagag 240

caacagcagc caccgcatgt tgcggaccag ggtttgtaca gcagcgggct ggcggacaag 300

ggacctggac agttcgaccc acaacacata gaggatgtag gcgaagggaa tcgtgctgac 360

cgtaccccag atgatgcgag tcgtaatgtc gtcagaaatc tcgccggggt agcccgtggc 420

aatcatcaga actgaagcca ccgtcagttt gatcagcaag ggtcttgcct cctttgcagg 480

caacgtcagc actgccactg tctccaccag caacagaggc acggtcaaca gccaatccac 540

atagcggtag gcgtcgttga atttttcgct agtcagggaa tacacgccat tctccagaac 600

gtaggcagca tcccaactat tgaagatccg aaagtagtgg tacccagcga tactcacaac 660

aattgctgaa acaagcaagg ccaaccggta tcgttgaccg acgagtgcct gagcgctgaa 720

gaagaagagg gcagatgcga acattgccgc gatggcaaac gagaaagcgt tgtaaaccag 780

attgaactga ccataggtca gcgaatctga gaccgataag tttgaaggat cgacctgggc 840

aaaggttgat ccgagaaggg caagttcagg tgcagaagaa aatacggtca tcaacat 897

<210> 2
<211> 298

<212> PRT
<213> Gloeobacter rhodopsin amino acids

<400> 2

```
Met Leu Met Thr Val Phe Ser Ser Ala Pro Glu Leu Ala Leu Leu Gly
  1               5                  10                  15

Ser Thr Phe Ala Gln Val Asp Pro Ser Asn Leu Ser Val Ser Asp Ser
             20                  25                  30

Leu Thr Tyr Gly Gln Phe Asn Leu Val Tyr Asn Ala Phe Ser Phe Ala
         35                  40                  45

Ile Ala Ala Met Phe Ala Ser Ala Leu Phe Phe Phe Ser Ala Gln Ala
     50                  55                  60

Leu Val Gly Gln Arg Tyr Arg Leu Ala Leu Leu Val Ser Ala Ile Val
 65                  70                  75                  80

Val Ser Ile Ala Gly Tyr His Tyr Phe Arg Ile Phe Asn Ser Trp Asp
                 85                  90                  95

Ala Ala Tyr Val Leu Glu Asn Gly Val Tyr Ser Leu Thr Ser Glu Lys
            100                 105                 110

Phe Asn Asp Ala Tyr Arg Tyr Val Asp Trp Leu Leu Thr Val Pro Leu
        115                 120                 125

Leu Leu Val Glu Thr Val Ala Val Leu Thr Leu Pro Ala Lys Glu Ala
    130                 135                 140

Arg Pro Leu Leu Ile Lys Leu Thr Val Ala Ser Val Leu Met Ile Ala
145                 150                 155                 160

Thr Gly Tyr Pro Gly Glu Ile Ser Asp Asp Ile Thr Thr Arg Ile Ile
                165                 170                 175

Trp Gly Thr Val Ser Thr Ile Pro Phe Ala Tyr Ile Leu Tyr Val Leu
            180                 185                 190

Trp Val Glu Leu Ser Arg Ser Leu Val Arg Gln Pro Ala Ala Val Gln
        195                 200                 205

Thr Leu Val Arg Asn Met Arg Trp Leu Leu Leu Leu Ser Trp Gly Val
```

210 215 220

Tyr Pro Ile Ala Tyr Leu Leu Pro Met Leu Gly Val Ser Gly Thr Ser
225 230 235 240

Ala Ala Val Gly Val Gln Val Gly Tyr Thr Ile Ala Asp Val Leu Ala
245 250 255

Lys Pro Val Phe Gly Leu Leu Val Phe Ala Ile Ala Leu Val Lys Thr
260 265 270

Lys Ala Asp Gln Glu Ser Ser Glu Pro His Ala Ala Ile Gly Ala Ala
275 280 285

Ala Asn Lys Ser Gly Gly Ser Leu Ile Ser
290 295

<210> 3
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> degenerate forward primer

<400> 3
atgttgatga ccgtattttc ttctgc 26

<210> 4
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> degenerate reverse primer

<400> 4
ctaggagata agactgcctc cccg 24