

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

정정판

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 10월 28일 (28.10.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/123283 A9

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/573 (2006.01) G01N 33/534 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/002508
- (22) 국제출원일: 2010년 4월 21일 (21.04.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0035895 2009년 4월 24일 (24.04.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 서울 성북구 안암동 5가 1 고려대학교, 136-701 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 곁
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 한성옥 (HAN, Sung-Ok) [KR/KR]; 서울시 성북구 길음 1동 대우푸르지오 아파트 210동 201호, 136-785 Seoul (KR). 조우재 (CHO, Woo Jae) [KR/KR]; 경기 성남시 분당구 서현동 효자촌임광아파트 312동 801호, 463-766 Gyeonggi-do (KR).

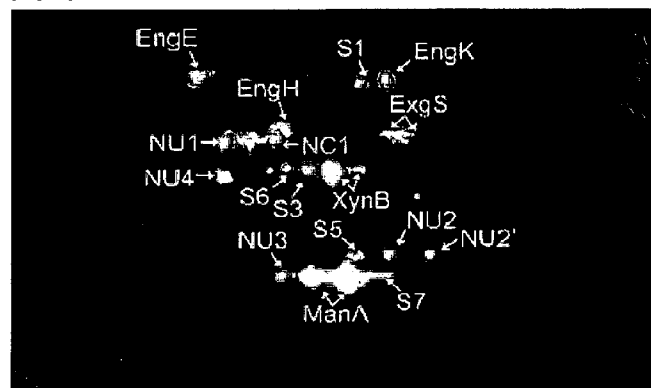
- (74) 대리인: 구현서 (KOO, Hyun-Seo); 서울시 송파구 방이동 22 대우유토피아빌딩 1910호 수특허법률사무소, 138-050 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: FLUORESCENTLY MARKED COHESIN MARKER, AND A CELLULOSOME-FORMING-ENZYME DETECTION METHOD EMPLOYING THE SAME

(54) 발명의 명칭: 형광 표지된 코히신 마커 및 그것을 이용한 셀룰로솜 형성 효소 탐색방법

[Fig. 6]



(57) Abstract: The present invention relates to a cohesin biomarker and to a cellulosome-forming-enzyme detection method employing the same, and more specifically it relates to a method for selectively detecting only cellulosome-forming enzymes by using a biomarker comprising the cohesin of a scaffold protein in the bond between the cohesin domain of the scaffold protein and the dockerin domain of the cellulosome-forming enzyme which is a cellulosome-forming mechanism.

(57) 요약서: 본 발명은 코히신 바이오마커 및 이를 이용한 셀룰로솜 형성 효소의 탐색 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 셀룰로솜 형성 기작인 셀룰로솜 형성 효소의 도커린 도메인과 지지체 단백질의 코히신 도메인간의 결합 중 지지체 단백질의 코히신을 바이오마커로 이용하여 선택적으로 셀룰로솜 형성 효소만을 탐색하는 방법에 관한 것이다.



WO 2010/123283 A9

**공개:**

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
- 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일:

2011 년 3 월 17 일

(15) 정정사항에 관한 정보:

2011 년 3 월 17 일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 형광 표지된 코히신 마커 및 그것을 이용한 셀룰로솜 형성 효소 탐색방법

기술분야

- [1] 본 발명은 코히신 바이오마커 및 이를 이용한 셀룰로솜 형성 효소의 탐색 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 셀룰로솜 형성 기작인 셀룰로솜 형성 효소의 도커린 도메인과 지지체 단백질의 코히신 도메인간의 결합 중 지지체 단백질의 코히신을 바이오마커로 이용하여 선택적으로 셀룰로솜 형성 효소만을 탐색하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 목질계 섬유소는 식물의 세포벽의 구성 성분이며 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 복합체로 이루어져 있다. 셀룰로오스는 β -1,4-glucose 복합체이며 자연상태에서 가장 풍부한 재생가능한 물질이다 (Reiter *et al.* Curr Opin Plant Biol 5 (2002) 536-42). 비록 화학적 구성은 단순하지만 효율적으로 셀룰로오스를 분해하기 위해서는 여러개의 다른 효소들의 작용이 필요하다 (Ximenes *et al.* Hemicellulases and biotechnology. Recent Res Develop Microbiol 2 (1998) 165-176). 헤미셀룰로오스에는 β -1,4-xylose 인 자일란과 β -1,4-glucose, mannose인 글루코만난 등이 있다. 대부분의 셀룰로오스를 분해할 수 있는 혐기성 미생물들은 셀룰로솜이라는 효소복합체를 형성한다 (Roy H. Doi, The Chemical Record 1(2001) 24-32). 셀룰로솜은 결정형 셀룰로오스나 자일란, 만난, 펙틴과 같은 다양한 기질에 대하여 작용하고 셀룰로솜 형성 효소들과 지지체 단백질로 이루어져 있다. 셀룰로솜의 형성은 하나의 셀룰로솜 형성 효소의 도커린 도메인과 지지체 단백질의 여러개의 코히신 도메인중 하나의 결합으로 이루어진다. 모든 셀룰로솜 형성 효소들은 도커린 도메인을 가지고 있고 도커린 도메인이 없는 효소들은 비 셀룰로솜 형성 효소이다 (Bayer *et al.* Annual Review of Microbiol 58 (2004) 521-554).
- [3] 본 발명은 여러 단계가 아닌 형광 표지된 코히신마커를 사용하여 한번의 결합 단계만으로도 간단하게 셀룰로솜 형성 효소들을 확인을 할 수 있다.
- [4] 한편, 프로테오믹스(proteomics)는 생명체의 어떤 특정 상태에서 발현되는 모든 단백질 즉 단백질체(proteome)를 연구하는 학문으로 단백질체의 발현을 연구하는 발현 프로테오믹스(expression proteomics)와 단백질 간의 상호작용 및 기능(protein-protein interactions, post-translational modification) 등을 연구하는 기능적 프로테오믹스(functional proteomics)가 있다 (Blackstock, *et al.* Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends Biotechnol 17 (1999) 121-7). 현재까지 가장 많이 사용되고 있는 프로테오믹스 기술은 이차원 전기영동(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis : 2-DE)이다. 이

방법은 단백질을 먼저 등전점(isoelectric focusing : IEF)에 따라 분리한 후 SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 상에서 분자량에 따라 분리하는 기술이다 (O'Farrell *et al.* High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250 (1975) 4007-21). 단백질을 2-DE 겔에서 분리한 후 염색을 하고 발현이 차이가 나는 단백질의 스팟을 오려내어 트립신(trypsin)으로 겔내 절단(in-gel digestion)을 수행한다. 얻어진 단백질을 펩타이드 단위로 절단한 후 질량분석기(LC-MS-MS)를 이용하여 질량값을 얻고, 얻어진 질량값을 데이터 베이스에서 조사하여 단백질을 동정한다. 이차원 전기영동법은 좋은 해상도와 번역 후 변이(post-translational modification)의 변화, 단백질 가수분해(proteolysis)에 의한 변화 등을 알 수 있다 (도면 4 참조).

- [5] 이에, 본 발명자들은 형광 표지된 코히신 바이오마커를 사용하여 셀룰로솜 형성 효소들을 간편하고 선택적으로 탐색할 수 있음을 확임 함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로 본 발명의 목적은 셀룰로솜 형성 유전자를 선택적으로 탐색할 수 있는 바이오마커를 제공하는 것이다.
- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 셀룰로솜 형성 효소들을 선택적으로 탐색하는 방법을 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명은 또 다른 목적은 타겟단백질을 용이하게 분리, 정제하는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 코히신과 상호작용하는 표적물질의 검출방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 코히신(cohesin) 도메인을 유효성분으로 하는 셀룰로솜 형성 효소 탐색용 마커 조성물을 제공한다.
- [11] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 코히신 도메인은 형광물질 및 방사성 동위원소로 구성된 군으로부터 선택된 표지수단이 표지된 것이 바람직하고 형광물질이 표지된 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 아니한다.
- [12] 본 발명의 코히신 도메인을 형광표지하는 형광물질은 특별히 한정되는 것은 아니나, 알렉사 플루오르(등록상표) 647, TAMRA(카르복시테트라메틸로다민), TMR(테트라메틸로다민), 로다민그린(Rhodamine Green), 알렉사 플루오르(Alexa fluor)(등록상표) 488, YOYO1, 에보블루(EVOblue)(등록상표) 50, 피코에리스린(phycoerythrin, PE), 텍사스 레드(Texas Red, TR), 로다민(tetramethylrhodamine isothiocyanate, TRITC), 플루오레신카복실산(fluorescein carboxylic acid, FCA), 플루오레신 티오우레아(fluorescein thiourea, FTH), 7-아세톡시쿠마린(acethocoumarin)-3-1,

플루오레신-5-1, 플루오레신-6-1,
2',7'-디클로로플루오레신(dichlorofluorescein)-5-1, 2',7'-디클로로플루오레신-6-1,
디하이드로테트라메틸로사민(dehydrotetramethyllosamine)-4-1, 테트라메틸로다민
(tetramethylrhodamine)-5-1, 및 테트라메틸로다민-6-1로 이루어진 군으로부터
선택된 것일 수 있다.

- [13] 본 발명의 바람직한 실시예에서는 알렉사 플루오로 647을 사용하였다. 상기 형광 물질은 석시니미딜 에스터구조(succinimidyl ester)를 가지고 있어 효과적으로 상기 코히신 단백질의 일차 아민(amine)들에게 결합하여 안정적인 형광염료-단백질 결합을 형성 한다.
- [14] 또한 본 발명의 단백질은 상기 단백질과 형광물질을 연결시켜주는 링커를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 상기 링커는 형광편광 측정을 용이하게 하는 역할을 하는 것으로, 이러한 효과를 갖는 어떠한 물질도 링커로서 사용가능하며, 예컨대, 아미노카프로산 등을 링커로 사용할 수 있다.
- [15] 본 발명의 코히신 도메인에 표지가능한 방사성 동위원소의 예는 각각 ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I , ^{76}Br , ^{124}I 또는 ^{75}Br 과 같은 수소, 탄소, 질소, 산소, 할로젠족 의 동위원소를 포함한다. 이들 동위원소들은 배양 중에 첨가되거나, 단백질에 존재하는 수소 등과 치환하여 표지될 수 있다.
- [16] 또한 본 발명의 코히신 도메인을 분리 및 정제방법은 특별히 한정되는 것은 아니나, 투석, 환외여과, 및 이온-교환 컬럼 크로마토그래피와 같은 전하 차이를 이용하는 방법, 친화 크로마토그래피 또는 역상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 친수성 차이를 이용하는 방법을 이용할 수 있다.
- [17] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 코히신 도메인은 셀룰로솜을 형성하는 혐기성 미생물마다 다르나 본 발명에서 사용한 혐기성 미생물인 *Clostridium cellulovorans*의 지지체 단백질 CbpA의 코히신 도메인 1내지 도메인 9(Roy H. Doi, The *Clostridium cellulovorans* cellulosome: An enzyme complex with plant cell wall degrading activity. The Chemical Record 1(2001) 24-32) 중에서 선택된 하나 이상의 도메인인 것이 바람직하고, 도메인 6인 것이 더욱 바람직하나, 셀로로솜 형성 효소 탐색 기능을 가지는 이들의 절편이나 이들 도메인의 하나 이상의 결손, 치환, 역위 등을 가지는 이들의 돌연변이체도 본 발명의 셀로로솜 형성 효소 탐색용 마커 조성물에 포함된다.
- [18] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 도메인 6는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 및 서열번호: 1에 개시된 아미노산 서열과의 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다.
- [19] 본 발명에서 폴리펩티드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율 (예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%) 의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시에 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의

적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 Proc. Natl Acad. Sci USA85:2444-2448), 및 BLAST (BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA) 로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) 에서 이용가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

- [20] 또한 본 발명은 a) 셀룰로오스 분해 미생물을 배양하여 단백질을 얻는 단계;b) 상기 단백질을 분리하는 단계;c) 상기 분리된 단백질에 제1항 또는 제2항의 코히신(cohesin) 도메인을 유효성분으로 하는 마커 조성물을 처리하는 단계; 및 d)상기 마커와 단백질의 복합체를 확인하는 단계를 포함하는 셀룰로좀 형성 효소 탐색 방법을 제공한다.
- [21] 본 발명의 탐색 방법에 있어서, 상기 셀룰로오스 분해 미생물은 혐기성 균인 것이 바람직하고, 상기 셀룰로오스 분해 미생물은 클로스트리디움 셀룰로보란스, 클로스트리디움 써모셀럼, 클로스트리디움 셀룰로라이티쿰, 클로스트리디움 아세토뷰틸라이쿰, 클로스티리디움 조슈, 클로스티리디움 파피로솔벤스, 아세티비브리오 셀룰로라이티커스, 박테로이즈 셀룰로솔벤스, 루미노코코스 알버스, 루미노코코스 플라브파시언스, 루미노코코스 석시노진스, 뷰틸리비브리오 피브리솔벤스, 네오클리마스틱 파트리시얼럼, 오피노마이시스 조이오닐, 또는 오피노마이시스 피씨-2 인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [22] 본 발명의 탐색방법에 있어서, 상기 단백질을 분리하는 방법은 전기영동, 이차원 전기영동인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [23] 또한 본 발명은 클로스트리디움 셀룰로보란스부터 분리된 코히신 6 도메인 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22b-Coh6를 제공한다.
- [24] 또한 본 발명은 a) 표적 단백질에 도커린 도메인을 추가하는 단계; 및 b) 상기 표적 단백질-도커린 도메인 복합체에 본 발명의 코히신(cohesin) 도메인을 처리하는 단계를 포함하는 도커린 재조합체의 탐색 방법을 제공한다.
- [25] 본 발명은 예를 들면 셀룰로좀 형성 원리에 따라 셀룰로좀을 셀룰레이즈에 국한 시키지 않고 셀룰로좀 형성원리인 코히신-도커린 결합을 이용한다고 하였을 때, 라이페이스(lipase)에 인공적으로 도커린 도메인을 추가하였을 경우 상기 발명한 코히신 마커를 이용하여 라이페이스의 이동 경로를 실시간으로 탐색하거나 특정 라이페이스가 어느 부위에서 집중되어 작용하는지 탐색 할 수 있다.

- [26] 또한 목적단백질을 코딩하는 유전자를 본 발명의 도커린 서열과 융합시켜 생체내에서 발현시켜 생성된 융합 단백질로부터 본 발명의 코히신 도메인을 이용하여 목적단백질을 분리, 정제하는 방법에 있어서, 목적단백질을 코딩하는 유전자와 기타의 펩티드나 단백질을 코딩하는 유전자의 연결점에 15-21개의 아미노산을 코딩하는 DNA서열을 도입하여 목적단백질과 기타의 펩티드나 단백질의 사이에 15-21개의 아미노산으로 구성된 도커린펩티드를 생성하고 이에 의한 단백질 물성 변화를 이용하여 등전점침전정, 금속염의 친화성 선별정제, 극성 이용정제, 소수성 이용정제, 친수성 이용정제, 항체친화성 이용정제, 및 유기용매 분별정제법 중 하나이상의 공정을 거쳐 융합단백질로부터 목적단백질을 분리, 정제하는 방법을 제공한다.
- [27] 예를 들어 본 발명의 기타의 펩티드나 단백질을 코딩하는 유전자의 뒤쪽으로 7-15개의 아미노산을 코딩하는 DNA서열은 도커린 유전자로, 코딩하는 단백질의 뒤쪽으로 도커린 서열(서열번호 8)을 결합함으로써 도커린과 코히신의 상호작용을 통한 정제할 수 있다.
- [28] 상기 분리정제 방법에 있어서, 융합 단백질을 절단 반응하여 목적 단백질에 융합된 기타 단백질에 친화펩티드가 포함되도록 절단한 후 금속염을 이용한 친화성 선별방법을 이용하여 목적단백질을 분리, 정제하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [29] 또한 본 발명은 (i) 나노고단위복합체 형성 물질, 코히신 도메인 1내지 도메인 9 중에서 선택된 하나 이상의 코히신 도메인과 도커린을 동일한 장 또는 계에 제공하는 단계;(ii) 상기 코히신과 도커린의 상호작용에 의해 나노고단위복합체를 형성하는 단계; 및 (iii) 상기 나노고단위복합체의 형성여부를 측정하여 상기 상호작용을 판별하는 단계를 포함하는 친화펩타이드를 이용한 물질의 상호작용 탐색 방법을 제공한다.
- [30] 본 발명에서 '나노고단위복합체'란 친화펩타이드 서열인 코히신과 도커린의 상호작용을 통하여 쉽게 관찰할 수 있는 거대한 복합체를 의미하고,
- [31] '나노고단위복합체 형성물질'은 상기 나노고단위복합체를 형성할 수 있는 성질 및 기능을 가지고 있는 모든물질을 의미한다.
- [32] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 나노고단위복합체 형성 물질의 예는 셀로로솜 형성 효소이고, 나노고단위복합체는 셀로로솜인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [33] 또한 본 발명은 (i) 나노고단위복합체(nano-assembly matrix) 형성 물질, 도커린 및 코히신의 라이브러리를 동일한 장(field) 또는 계(system)에 제공하는 단계;(ii) 상기 도커린 및 코히신 라이브러리의 상호작용에 의해 나노고단위복합체를 형성하는 단계;(iii) 상기 나노고단위복합체의 형성여부를 측정하여 도커린과 코히신간 상호작용을 판별하는 단계; 및 (iv) 상기 코히신과 상호작용하여 나노고단위복합체를 형성하는 도커린을 표적물질로, 선택, 분리 및 동정하는 단계를 포함하는 코히신과 상호작용하는 표적물질의 검출방법을 제공한다.

[34] 이하, 본 발명을 설명한다.

[35] 본 발명은 목질계 섬유소를 분해하는 혐기성 미생물 클로스트리디움 셀룰로보란스에서 생성되는 셀룰레이즈 복합체인 셀룰로솜 형성 효소들을 셀룰로솜 형성 원리인 도커린 도메인과 코히신 도메인과의 관계를 이용하여 간단하게 셀룰로솜 형성 효소들만을 탐색하는 기법이다. 보다 자세하게는 목질계 섬유소를 에너지원으로 사용하는 혐기성 미생물들은 섬유소들을 더욱 효과적으로 분해하기 위하여 호기성 미생물과는 다르게 셀룰레이즈 복합체인 셀룰로솜을 형성한다 (Bayer *et al.* The cellulosome: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. Annual Review of Microbiol 58 (2004) 521-554). 셀룰로솜의 형성원리는 셀룰로솜 형성 효소의 도커린 도메인과 지지체 단백질의 코히신 도메인간의 상호 결합으로 복합체를 형성한다. 물론 셀룰로솜 형성 효소들 외에도 비 셀룰로솜 형성 효소들도 같이 생성되고 이 두가지의 효소들의 조합이 상승효과를 가져와 더욱 효율적으로 섬유소를 분해하게 된다. 상기 기법은 지지체 단백질의 코히신 도메인을 형광표지하여 한 단계의 결합 과정만으로 셀룰로솜 형성 효소들만을 선택적으로 탐색할 수 있다.

[36] 본 발명에서 "셀룰로솜 형성 효소들"은 비 셀룰로솜 형성 효소들과는 다르게 두번 반복된 단백질 서열(도커린 도메인)을 가지고 있고 이 도커린 도메인이 지지체 단백질의 코히신 도메인과의 단백질-단백질 결합으로 셀룰로솜을 형성하는 효소들을 의미한다 (Bayer *et al.* The cellulosome: multienzyme machines for degradation of plant cell wall polysaccharides. Annual Review of Microbiol 58 (2004) 521-554).

[37] 본 발명으로 유전자서열 분석이 끝나지 않은 목질계 섬유소를 에너지원으로 이용하는 혐기성 미생물들의 셀룰로솜 형성 효소들을 쉽게 탐색하고 더 나아가 발견된 셀룰로솜 형성 효소들을 인위적으로 조작하여 지구상에 풍부한 재생 가능한 목질계 섬유소를 가치 있는 에너지원인 당이나 에탄올로 변환하는 효율적인 섬유소 분해 시스템 구축에 효율적인 탐색 기법이 될 것이다.

[38] 목질계 섬유소를 에너지원으로 사용하는 혐기성 미생물들은 더욱 효율적으로 섬유소를 분해하기 위하여 셀룰레이즈 복합체인 셀룰로솜을 형성한다. 셀룰로솜은 호기성 미생물에게서는 발견되지 않으며 섬유소 이용 혐기성 미생물에만 발현되는 특징이 있다. 셀룰로솜의 형성은 셀룰로솜 형성 효소의 도커린 도메인과 지지체 단백질의 코히신 도메인간의 상호 결합으로 이루어진다.

[39] 본 발명에서는 유전자 서열분석이 끝나지 않은 혐기성 미생물인 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지지체 단백질에서 코히신 도메인을 분리하고 형광표지 하여 셀룰로솜 형성 효소만을 간편하고 효과적으로 탐색할 수 있음을 확인하였다.

[40] 본 발명의 일 실시예에서는 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지노믹디엔에이를 주형으로한 PCR반응을 통하여 코히신 6 도메인 유전자를

얻었고, 얻어진 상기 유전자를 대장균 단백질 발현 벡터에 서브 클로닝하여 재조합 벡터를 제작하였다.

- [41] 이후, 상기 코히신 6도메인 유전자가 삽입된 재조합 벡터를 이용하여 대장균에 형질 전환 시켰다. 이후, 상기 유전자를 발현하고 정제하여 순수한 상기 단백질을 얻었으며 형광염료로 표지하고 클로스트리디움 셀룰로보란스에서 생성되는 세포벽 분해 단백질을 pH 4 ~ 7 범위의 IPG (immobilized pH gradient) 스트립을 이용하여 이차원 전기영동 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)을 수행하였다. 이후 겔 (gel)을 코마시 블루 (Coomassie Blue) 염색을하여 단백질의 발현 양상을 조사하고 형광표지된 코히신 마커와 결합시켜 도커린을 가진 셀룰로솜 형성 효소들만을 선택적으로 확인 하였다. 그 결과 40 ± 10 스팟들중 14 ± 3 의 셀룰로솜 형성 효소를 탐색 할 수 있었다. 이 후 분석된 스팟을 LC/MS/MS기기 분석으로 신규 셀룰로솜 형성 효소들을 동정 하였다.

- [42] 상기 바이오마커들은 이차원 전기영동법으로 검출하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

- [43] 또한, 상기 셀룰로솜 효소 탐색법을 사용하면 기존의 방법과는 다르게 한번의 결합 단계로 매우 효율적으로 탐색할 수 있음을 확인 할 수 있었다.

- [44] 또한 본 발명에서 개발되어진 코히신 마커의 이용을 확인하여 단백질의 정제 및 나노 고단위복합체 형성을 확인하기 위한 코딩단백질의 뒤쪽에 도커린 꼬리를 달아준 융합단백질은 클로스트리디움 유래의 써모셀럼의 EgE 활성부위 유전자와 클로스트리디움 유래의 EngB 유전자의 도커린 모듈을 연결한 키메라 EgE 유전자를 클로닝하기 위하여 시그널 펩타이드 부분을 제외한 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머(Forward primer)의 5'에는 제한효소 Not1, 역방향프라이머(Rreverse primer)의 5'에는 제한효소 Spe1 인식서열이, 중첩프라이머 (Overlap primer)의 5'에는 각각 중첩 서열이 삽입되도록 프라이머를 합성하였다. 이후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 스플라이스 중첩 연장 (SOE: Splice Overlap Extension) 기술에 의해 PCR을 수행하였고 코히신과 셀룰로오스 결합 모듈이 포함되어진 골격단백질은 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체 (primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로즈 결합 모듈 (Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 유전자를 클로닝하기 위해 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer)의 5'에는 제한효소 Not1, 역방향 프라이머(Rreverse primer)에는 제한효소 Spe1 인식서열이 각각 삽입된 프라이머로 합성하였다.

발명의 효과

- [45] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 클로스트리디움 셀룰로보란스에서

생성되는 셀룰로솜 형성 효소들을 상시 형광 표지된 코히신마커를 이용하여 간단하고 선택적으로 탐색할 수 있음을 확인하였다. 본 발명에 따라 아직까지 유전자 서열분석이 완료 되지 않은 셀룰로솜을 생성하는 미생물의 셀룰로솜 형성 효소 탐색에 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였으며, 상기 방법에서의 탐색을 통하여 더욱 많은 셀룰로솜 형성 효소에 관한 정보를 얻을 수 있을 것으로 예상되고 이는 자연상태에서 가장 풍부하고 재생가능한 목질계 바이오매스를 효율적으로 분해하여 고부가 가치의 산물로 바꿀수 있는 인공적 효소 복합시스템 개발에 매우 유용한 발명인 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [46] 도 1은 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지지체 단백질 CbpA의 코히신 6 도메인 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이며;
- [47] 도 2는 본 발명에서 제시된 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지지체 단백질 CbpA의 코히신 6 도메인 유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET22b-Coh6의 도식도이며;
- [48] 도 3은 본 발명에서 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지지체 단백질 CbpA에서 코히신 6 도메인을 정제하고 15% SDS-PAGE로 분리한 그림이며;
- [49] 도 4는 본 발명에서 클로스트리디움 셀룰로보란스의 세포막 분비 효소들을 정제하고 10% Chemical gradient SDS-PAGE로 분리한 그림이며;
- [50] 도 5는 본 발명에서 혐기성 미생물 클로스트리디움 셀룰로보란스의 세포막 분비 단백질을 이차원 전기영동으로 분리한 그림이며; 그리고
- [51] 도 6은 본 발명에서 혐기성 미생물 클로스트리디움 셀룰로보란스의 세포막 분비 단백질을 이차원 전기영동으로 분리한 하고 형광 표지된 코히신마커를 부착 시켜 셀룰로솜 형성 단백질을 선택적으로 탐색한 그림이다.
- [52] 도 7(A)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이고, (A) Lane 1, 1kbp DNA 마커; Lane 2, 키메라 CelE PCR 산물이며,
- [53] 도 7(B)는 본 발명에서 아가로스 겔 전기영동을 수행하여 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 유전자의 PCR 산물을 확인한 그림이고, (B) Lane 1, 1kbp DNA 마커; Lane 2, miniCbpA PCR 산물이다.
- [54] 도 8은 본 발명에서 코히신과 도커린의 상호작용을 이용한 친화성단백질 정제 방법을 도식화 하였으며 이의 결과를 나타낸 그림이며,
- [55] 도 9는 본 발명에서 코히신과 도커린의 상호작용을 이용한 고분자나노복합체 형성에의 이용을 위한 Native PAGE를 이용한 효소 복합체의 형성 확인을 나타낸 그림이고, 도 9에서 Lanes: 1, EngE; 2, EngD, 3, Coh6; 4, EngE와 Coh6 혼합물; 5, EngD와 Coh6의 혼합물을 나타내고,
- [56] 도 10은 본 발명에서 코히신과 도커린의 상호작용을 이용한 고분자나노복합체

형성에의 이용을 위한 ELIA (enzyme-Linked interaction assay) 방법을 통한 코히신과 도커린의 상호작용을 확인한 그림이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [57] 이하 비한정적인 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기의 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 의도로 기재된 것으로서, 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [58] 실시예 1: 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지지체 단백질 CbpA의 코히신 도메인 6 번 유전자의 증폭
- [59] 코히신 마커를 제작하기 위하여 코히신 도메인을 대량으로 획득하기 위해 클로스트리디움 셀룰로보란스의 지노믹디엔에이로부터 코히신 도메인 6 부분의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer) GGGGATCC TGTTAAACTGTAACAGCTACA(서열번호 2)의 5에는 제한효소 *Bam*HI, 역방향 프라이머 (Reverse primer) CCCCCTCGAG TTGACTTGGTTCTATTGTAACGC(서열번호 3)의 5에는 제한효소 *Xho*I 인식 서열이 삽입되도록 프라이머를 디자인하여 합성하였다. 이후 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 436 bp의 코히신 6 도메인 유전자가 포함되어 있는 PCR밴드를 확인 할 수 있었고 도면 1에 도시하였다.
- [60]
- [61] 실시예 2: 코히신 도메인 유전자의 클로닝 및 정제
- [62] 상기 실시예 1에서 얻은 코히신 증폭산물을 0.8% 아가로즈 겔 상에서 전기영동하였고 아가로즈 겔 상의 DNA 절편은 gel extraction kit (Elpis, Korea)를 사용하여 회수하였다. 이후, 제한효소 *Bam*HI, *Xho*I으로 절단한후 대장균 단백질 발현 벡터인 pET-22b (Novagen, USA)에 라이게이션 (ligation)시켜 에스세리시아 콜라이 (대장균, *E.coli*) BL21 DE3에 형질전환 하였고 완성된 벡터는 도 2에 도시하였다. 이후, 형질 전환된 대장균을 옴피실린 (50 µg/mL)이 포함된 루리아-버타니 배양액에 접종하여 37°C에서 A₆₀₀=0.6이 될 때 까지 배양 후 아이소 프로필-β-D-시오갈락토파이라노사이드 (IPTG)를 전체 농도가 0.5 mM이 되게 첨가한후 30 °C에서 8 시간 배양했다. 이후, 대장균을 원심분리 (4,000 X g, 20 분)하여 분리한후 10 mL 라이시스 버퍼 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole, pH 8.0)로 녹인후 초음파로 분쇄 하였다. 이후, 불용성 단백질을 원심분리 (10,000 X g, 30 분) 하여 제거하고 수용성 단백질을 분리하여 재조합 단백질에 포함된 히스티딘 표지를 사용하여 친화성 크로마토 그래피를 사용하여 코히신 6 도메인을 정제하였고 SDS-PAGE를 확인하여 17kDa의 크기를 확인하고 도 3에 도시하였다.
- [63]
- [64] 실시예 3: 코히신 도메인의 형광표지 및 검출
- [65] 상기 실시예 2에서 확보한 코히신 도메인을 셀룰로솜 형성 효소들의 탐색을

위한 바이오마커로 사용하기 위하여 Alexa Fluor 647 단백질 표지 키트 (Molecular Probes, USA)를 사용하여 항광 표지 하였다. 형광 표지된 코히신은 ProXPRESS 2D (Perkin Elmer, USA) 이미지 장치로 탐색 하였다. 형광 염료는 650 nm파장을 최대한 흡수 하고 668 nm의 파장을 방출한다.

[66]

[67] 실시예 4: 클로스트리디움 셀룰로보란스 에서의 세포밖 분비 효소의 획득

[68] 클로스트리디움 셀룰로보란스 (ATCC 35269)를 혐기성 상태에서 1 % Avicel (결정형 셀룰로오스)가 들어간 배양액을 사용하여 6 일간 37°C에서 배양하였다. 이후, 배양액을 Avicel을 이용하여 친화력 크로마토그래피 방법으로 정제 하였다. 배양액을 Avicel이 패키징 되어 있는 컬럼에 넣어 흘려보낸 후 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)으로 세척 후 다시한번 12.5 mM phosphate buffer (pH7.0)으로 세척 하였다. 이후, 물로 효소들을 정제 받았다. 이후, 울트라 필터레이션 (Milipore, USA, cut off 10 kDa)을 하여 농축 하고 SDS-PAGE로 확인하였고 도 4에 도시하였다.

[69]

[70] 실시예 5: 이차원 전기영동 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)

[71] 상기 실시예 4에서 확보한 효소들을 각각의 효소들 하나하나로 분리시키기 위하여 이차원 전기영동 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis)을 실시하였다. IPG (immobilized pH gradient) 스트립 (pH 4 ~ 7) (GE Healthcare BioSci, USA)은 Destreak rehydration solution (GE Healthcare BioSci, USA) 125 μ l를 첨가하여 16 시간 동안 재수화(rehydration)하였다. IEF (Isoelectric focusing)는 Ettan IPGphor II 전기영동 시스템 (GE Healthcare BioSci, USA)을 이용하여 20 °C에서 다음과 같이 수행하였다. 첫 번째 단계로 전압을 100 V에서 100 Vhr, 200 V에서 200 Vhr, 300 V에서 300 Vhr, 500 V에서 500 Vhr로 단백질이 겔 내로 들어가게 하였으며 1000 V에서 1000 Vhr, 1000 V에서 5000 V까지 5000 Vhr가 될 때까지 증가시키고 5000 V에서 23000 Vhr가 될 때까지 완전히 포커싱 (focusing) 하였다. 이차원 전기영동을 하기 전에, 스트립은 1% dithiothreitol (DTT)가 포함된 평형 버퍼(equilibration buffer: 75 mM Tris-HCl, 6 M urea, 2 % SDS, 29.3% glycerol, 0.002% Bromophenol blue)에서 15 분간 반응시켰고, 4% 요오드아세트아마이드(iodoacetamide)가 포함된 평형 버퍼에서 15분간 반응시켰다. 평형이 끝난 스트립은 SDS-PAGE 겔(10 cm, 10%)의 윗부분에 넣고 Mini protean tetra cell 이차원 전기영동 시스템(Bio-Rad, USA)을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 이차원 전기영동한 겔은 고정 용액으로 단백질을 고정시켰다 (10 % acetic acid, 25 % isopropanol). 그 결과, 겔 당 약 40 ± 10 스팟을 수득 하였고 도 5에 도시 하였다.

[72]

[73] 실시예 6: 형광표지된 코히신마커를 이용한 셀룰로솜 형성 효소들의 탐색

[74] 상기 실시예 5에서 얻은 이차원 전기영동이 완료된 겔을 PVDF membrane에

blotting 후 2 % blocking 용액 (TBS-T (5 mM Tris-Cl pH 8.0, 0.138 mM NaCl, 1 % Tween 20) 완충액 + 2 % 탈지분유)에 1시간동안 셰이커 위에서 blocking 시키고 용액을 제거하였다. 이후, 2 % blocking 용액에 2 μ g 형광표지된 코히신을 첨가하고 1시간 동안 셰이커 위에서 결합 시키고 용액을 제거한다 이후, TBS-T 완충액을 첨가하고 셰이커 위에서 30 분간 10 분마다 한번씩 새로운 TBS-T 로 교체해주며 결합하지 않고 남아있는 코히신 마커들을 제거하였다. 이후, 이미지 장치인 ProXPRESS 2D (Perkin Elmer, USA)를 사용하여 검출하고 탐색된 단백질은 LC/MS/MS기기를 이용하여 서열분석을 통한 동정하고 표기하고 도 6에 도시하였다. 그 결과 간단한 방법으로 기존에 알려진 셀룰로솜 형성 효소 외에도 아직 발견되지 않은 신규 셀룰레이즈로 추정되는 셀룰로솜 형성 효소를 발견하였고 표 1에 정리 하였다.

[75] 표 1

단백질 ^a	분자량(kDa)	pI	부분적 서열	상동성 ^b
NC1	75	4.9	SQIDYALGSTGR	<i>Clostridium cellulolyticum</i> Endoglucanase G
NC2	70	4.7	TTYNSPYVVTLDLFLGSF VDCPGSDSFTVVYPSNYT DVALFLVA	<i>Clostridium cellulolyticum</i> H10Glycoside hydrolase family 26 (Precursor)
NU1	70	4.7	DESLTSLGL DTVWSASNVC	NS
NU2	48	5.8	MFKTLEPVQSTSNDLSCLQ TW	NS
NU2	48	6	MKTSNDLLY	NS
NU3	45	4.8	SSGLFDYNMTTTLVELLFG SETLVT	NS
NU4	65	4.5	WQEVGELEVELDVGELM VLGSSLVGGWADLGLN	NS

[76] 상기 표 1은 본 발명의 방법에 의하여 클로스트리디움 셀룰로보란스에서 신규 발견된 셀룰로솜 형성 효소를 나열한 것이다. 표에서 ^a NC는 신규 셀룰로솜 형성효소로 추정되는 단백질 이고 NU는 기능을 알지 못하는 신규 셀룰로솜 형성 단백질을 나타내고, ^b NS는 일치 하는 정보가 없음을 의미한다.

- [77] 실시에 7: 펩타이드의 상호작용 통한 단백질 정제 및 나노고단위복합체 형성 확인
- [78] 본 발명에서 개발되어진 코히신 마커의 이용을 확인하기 위하여 단백질의 정제 및 나노 고단위복합체 형성을 확인 하였다. 코딩단백질의 뒤쪽에 도커린 꼬리를 달아준 융합단백질은 다음과 같이 제조되었다.
- [79] 클로스트리디움 유래의 서머셀럼의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (CelE) 유전자와 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 엔도-베타-1,4-글루칸아제-비 (EngB)의 도커린 (dokerin) 부위를 갖는 키메라 엔도-베타-1,4-글루칸아제-이 (chimeric CelE) 유전자를 클로닝하기 위하여 키메라 CelE의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer)의 5'에는 제한효소 BamHI, 역방향 프라이머 (Reverse primer)의 5'에는 제한효소 NotI 인식서열이 각각 삽입된 프라이머 (Forward primer - 5'AAAGGATCC GTCGGGAACAAAGCTTTTG3'(서열번호 4); Reverse primer - 5'CCCGCGGCCGC TCATAAAAGCATTTTTTTAAGAACA3'(서열번호 5), 밑줄은 제한효소 자리를 의미)를 합성하였다. 이 후, 상기 합성된 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 1.3kbp의 클로스트리디움 유래의 키메라 CelE 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 이를 도면 7(A)에 도시하였다.
- [80] 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 셀룰로솜 기본골격소단위인 소형 셀룰로오스 결합단백질 에이 (miniCbpA) 유전자를 클로닝하기 위하여 miniCbpA의 염기서열을 참고로 하여 정방향 프라이머 (Forward primer)의 5'에는 제한효소 BamHI, 역방향 프라이머 (Reverse primer)의 5'에는 제한효소 NotI 인식서열이 각각 삽입된 프라이머 (Forward primer - 5'CCCGGATCC AGCAGCGACATCATCAATGTC3'(서열번호 6); Reverse primer - 5'CCCGCGGCCGCTCATATAGGATCTCCAATATTTA3'(서열번호 7), 밑줄은 제한효소 자리를 의미)를 합성하였다. 그 결과 1.6kbp의 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 miniCbpA 유전자가 포함되어 있는 PCR 밴드를 확인할 수 있었고 이를 도면 7(B)에 도시하였다.
- [81] 상기 융합단백질을 이용하여, 소형 셀룰로소-결합 단백질이 가진 셀룰로스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로스 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 실행하였다.
- [82] 셀룰로스-결합 모듈(Cellulose binding module; CBM)과 셀룰로스 사이의 상호작용을 이용한 단백질 정제를 위해 셀룰로스 (Sigmacell Type 50, SIGMA)를 첨가하여 1시간동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 1몰 소듐 클로라이드(sodium chloride) 0.02몰 트리스 버퍼 (pH 8.0)로 세 번 행구어 낸 후 0.05몰 트리스 버퍼 (pH 12.5)로 용리하였다. 이의 SDS-PAGE는 10% poly-acrylamide gel을 사용하여 효소 단백질을 전기영동하였다.
- [83] 그 결과 58kDa위치에 정제되어진 miniCbpA 단백질 밴드를 확인하였다. 이 결과를 도면 8에 도시하였다. 단백질의 정제를 위하여 코딩단백질의 뒤쪽에

- 코히신과 상호결합을 하는 도커린 꼬리를 달아서 융합단백질을 제조하였다.
- [84] 본 발명에서의 단백질 정제 및 나노고분자복합체의 형성 확인을 위하여 코히신과 본 단백질과의 복합체 형성을 위하여 제작되어진 골격단백질인 클로스트리디움 유래의 셀룰로보란스의 기본 골격 소단위체 (primary scaffolding subunit)인 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Cellulose-binding protein A) 중 셀룰로즈 결합 모듈 (Cellulose binding module; CBM)과 두 개의 코히즌 모듈(Cohesin module)을 가진 소형 셀룰로즈-결합 단백질-에이(Mini-Cellulose-binding protein A) 유전자에 포함되어진 CBD와의 cellulose와의 결합을 이용한 것으로써 또한 이의 단백질 발현 및 정제 방법의 위에서 언급한 것과 같은 동일한 방법을 이용하였으며 융합단백질의 용출을 위하여 Ca^{2+} 이온을 이용하였다.
- [85] 또한 본 발명에서의 코히신 마커의 나노고단위복합체 형성으로의 이용을 위하여 코히신과 도커린의 결합을 확인하기 위한 실험으로서는 native PAGE를 통한 코히신, 도커린의 결합을 확인함으로써 나노고단위복합체 형성에 적합한 펩타이드 모듈임을 확인하였다. 이 결과를 도면 9에 도시하였다. 또한 엘리아(enzyme-linked interaction assay)를 통하여 펩타이드의 상호작용을 확인하였다. 마이크로 플레이트에 2시간동안 25°C에서 코히신을 코팅하여 3%의 BSA 단백질이 포함되어진 TrisNC buffer(50mM Tris, 100mM NaCl, 2mM CaCl_2 , 및 0.02% sodium azide, pH 7.5)에서 다른 물질들과의 결합을 저해하였다. TrisNC buffer를 이용하여 3회 세척 후 코히신과 도커린의 결합을 위하여 도커린을 포함한 셀룰라아제를 첨가하여 이를 2시간 동안 반응하였다. 반응후 3번의 세척 후 셀룰라아제 활성을 특정함으로써 코히신과 도커린의 활성을 확인하였다. 이 결과를 도면 10에 도시하였다.

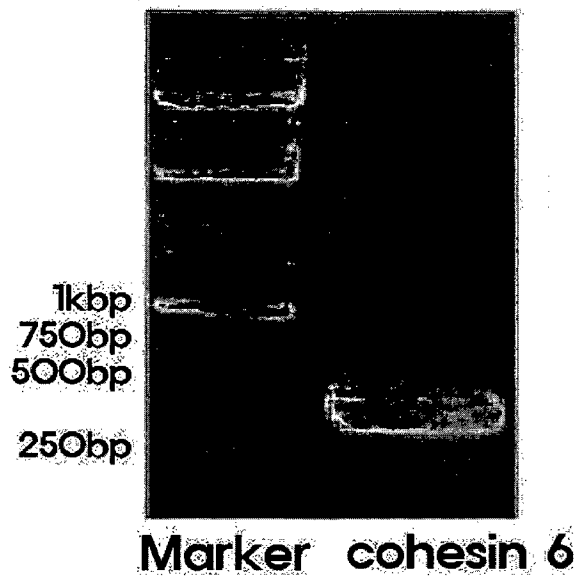
청구범위

- [청구항 1] 코히신(cohesin) 도메인을 유효성분으로 하는 셀로로즘 형성 효소 탐색용 마커 조성물.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 코히신 도메인은 형광물질 및 방사성 동위원소로 구성된 군으로부터 선택된 표지수단이 표지된 것을 특징으로 하는 셀로로즘 형성 효소 탐색용 마커 조성물.
- [청구항 3] 제 1항 또는 제2항에 있어서, 상기 코히신 도메인은 코히신 도메인 1내지 도메인 9 중에서 선택된 하나 이상의 도메인인 것을 특징으로 하는 셀로로즘 형성 효소 탐색용 마커 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 코히신 도메인은 도메인 6인 것을 특징으로 하는 셀로로즘 형성 효소 탐색용 마커 조성물.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서, 상기 도메인 6는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 셀로로즘 형성 효소 탐색용 마커 조성물.
- [청구항 6] a) 셀룰로우즈 분해 미생물을 배양하여 단백질을 얻는 단계;
b) 상기 단백질을 분리하는 단계;
c) 상기 분리된 단백질에 제1항 또는 제2항의 코히신(cohesin) 도메인을 유효성분으로 하는 마커 조성물을 처리하는 단계; 및
d)상기 마커와 단백질의 복합체를 확인하는 단계를 포함하는 셀로로즘 형성 효소 탐색 방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 코히신 도메인은 형광물질로 표지된 것을 특징으로 하는 셀로로즘 형성 효소 탐색 방법.
- [청구항 8] 제 6항에 있어서, 상기 셀룰로우즈 분해 미생물은 혐기성 균인 것을 특징으로 하는 셀로로즘 형성 효소 탐색 방법.
- [청구항 9] 제 6항 또는 제8항에 있어서, 상기 셀룰로우즈 분해 미생물은 클로스트리디움 셀룰로보란스, 클로스트리디움 써모셀럼, 클로스트리디움 셀룰로라이티쿰, 클로스트리디움 아세토뷰틸라이쿰, 클로스티리디움 조슈, 클로스티리디움 파피로솔벤스, 아세티비브리오 셀룰로라이티커스, 박테로이즈 셀룰로솔벤스, 루미노코코스 알버스, 루미노코코스 플라브파시언스, 루미노코코스 석시노진스, 뷰틸리비브리오 피브리솔벤스, 네오콜리마스틱 파트리시얼럼, 오피노마이스즈 조이오닐, 및 오피노마이스즈 피씨-2로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 하는 셀로로즘 형성 효소 탐색 방법.
- [청구항 10] 제 6항에 있어서, 상기 코히신 도메인은 코히신 도메인 1내지 도메인 9 중에서 선택된 하나 이상의 도메인인 것을 특징으로 하는

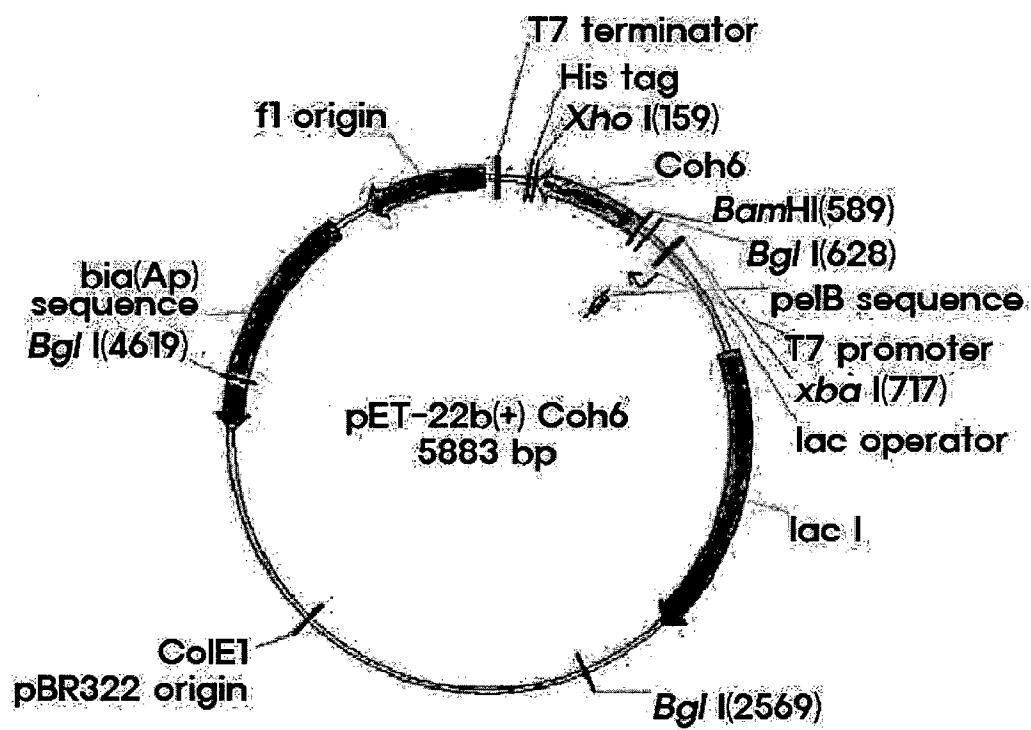
셀로로솜 형성 효소 탐색 방법.

- [청구항 11] 제 10항에 있어서, 상기 코히신 도메인은 도메인 6인 것을 특징으로 하는 셀로로솜 형성 효소 탐색 방법.
- [청구항 12] a) 표적 단백질에 도커린 도메인을 추가하는 단계; 및
b) 상기 표적 단백질-도커린 도메인 복합체에 제1항 또는 제2항의 코히신(cohesin) 도메인 마커를 처리하는 단계를 포함하는 도커린 재조합체의 탐색 방법.
- [청구항 13] 목적단백질을 코딩하는 유전자를 도커린 서열과 융합시켜 생체내에서 발현시켜 생성된 융합 단백질로부터 코히신 도메인을 처리하여 목적단백질을 분리, 정제하는 방법에 있어서, 목적단백질을 코딩하는 유전자와 상기 목적단백질과는 다른 펩티드나 단백질을 코딩하는 유전자의 연결점에 15-21 개의 아미노산을 코딩하는 유전자 서열을 도입하여 목적단백질과 다른 펩티드나 단백질의 사이에 15-21개의 아미노산으로 구성된 도커린 펩티드를 생성하고 이에 의한 단백질 물성 변화를 이용하여 융합단백질로부터 목적단백질을 분리, 정제하는 방법.
- [청구항 14] a) 나노고단위복합체 형성 물질, 코히신 도메인 1내지 도메인 9 중에서 선택된 하나 이상의 코히신 도메인과 도커린을 동일한 장 또는 계에 제공하는 단계;
b) 상기 코히신과 도커린의 상호작용에 의해 나노고단위복합체를 형성하는 단계; 및
c) 상기 나노고단위복합체의 형성여부를 측정하여 상기 상호작용을 판별하는 단계를 포함하는 친화펩타이드를 이용한 물질의 상호작용 탐색 방법.
- [청구항 15] a) 나노고단위복합체(nano-assembly matrix) 형성 물질, 도커린 및 코히신의 라이브러리를 동일한 장(field) 또는 계(system)에 제공하는 단계;
b) 상기 도커린 및 코히신 라이브러리의 상호작용에 의해 나노고단위복합체를 형성하는 단계;
c) 상기 나노고단위복합체의 형성여부를 측정하여 도커린과 코히신간 상호작용을 판별하는 단계; 및
d) 상기 코히신과 상호작용하여 나노고단위복합체를 형성하는 도커린을 표적물질로, 선택, 분리 및 동정하는 단계를 포함하는 코히신과 상호작용하는 표적물질의 검출방법.

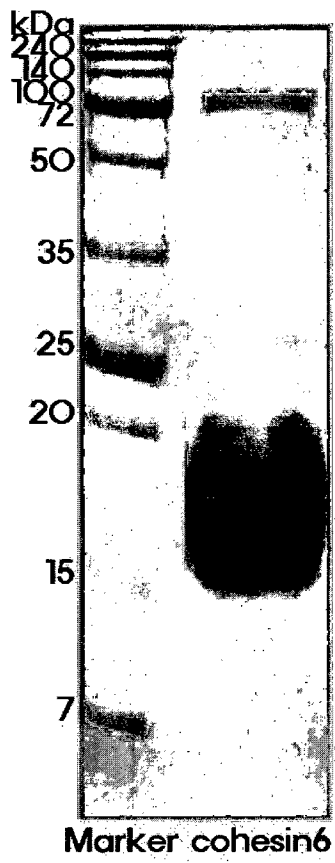
[Fig. 1]



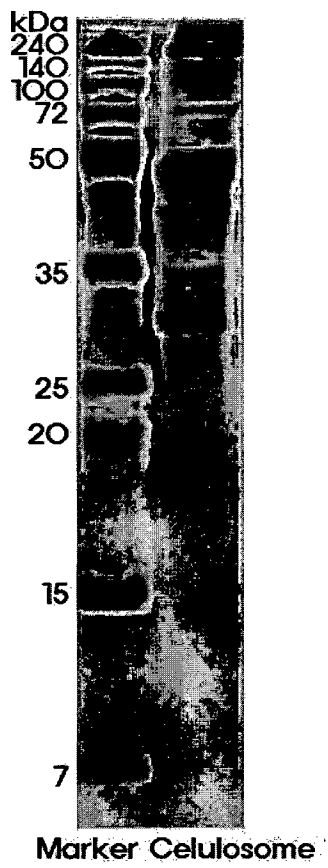
[Fig. 2]



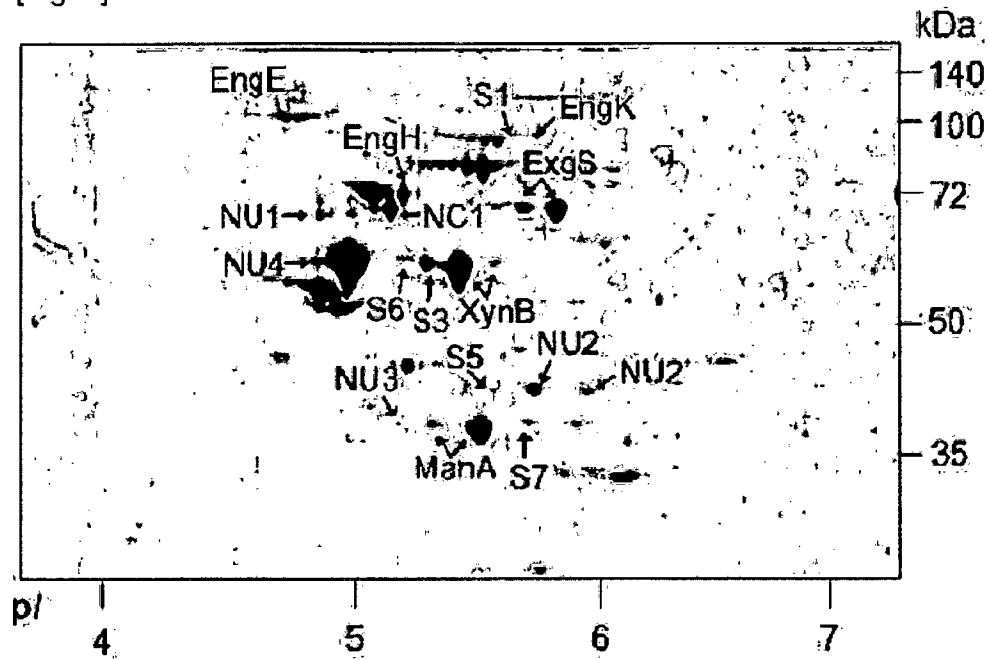
[Fig. 3]



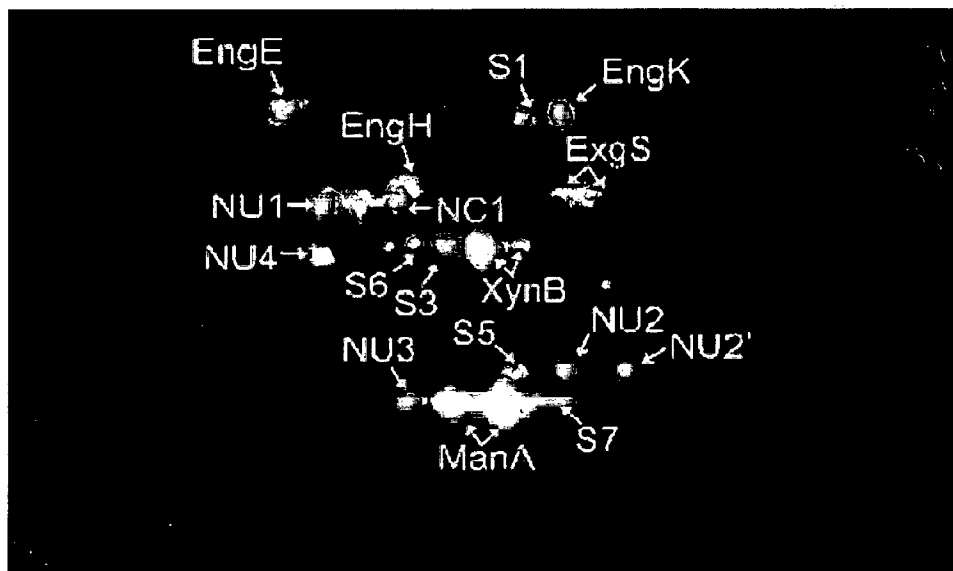
[Fig. 4]



[Fig. 5]

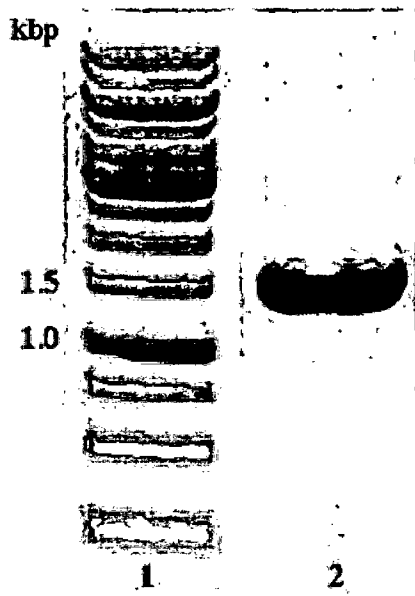


[Fig. 6]

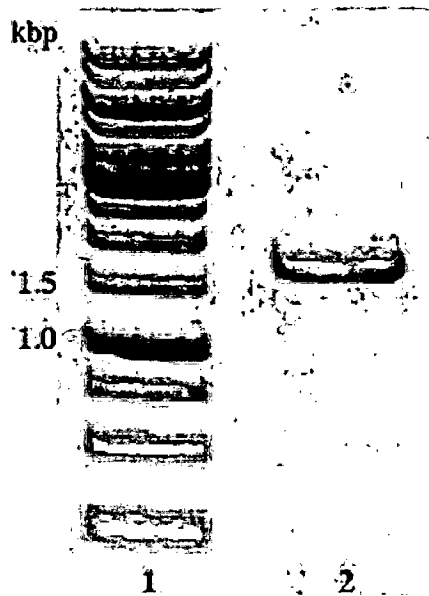


[Fig. 7]

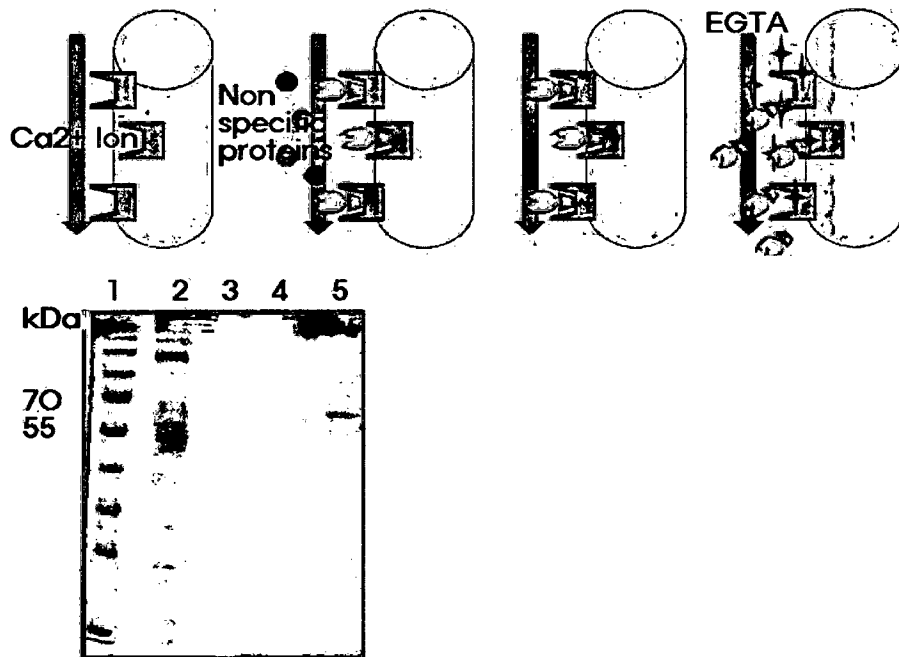
(A)



(B)



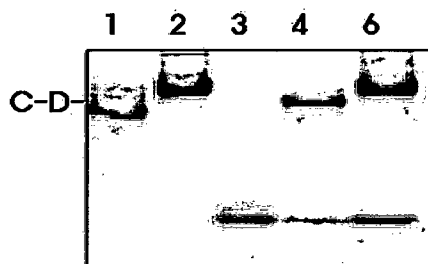
[Fig. 8]



[보기]

Lane1. Protein marker(Fermentas); Lane2. Wash1; Lane3. Wash2; Lane4. Wash3;
Lane5. Elution of mObpA SDS-PAGE staining with coomassie blue.

[Fig. 9]



[Fig. 10]

