(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0028771
(43) 공개일자 2013년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 15/31 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0024036(분할)
(22) 출원일자 2013년03월06일
심사청구일자 2013년03월06일
(62) 원출원 특허 10-2011-0047474
원출원일자 2011년05월19일
심사청구일자 2011년05월19일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박연일
대전광역시 유성구 은구비남로 55 열매마을7단지 705동 401호
(74) 대리인
최규환

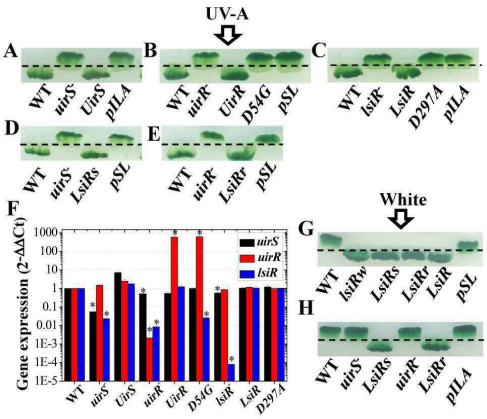
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **시네코시스티스 PCC 6803의 UirR 유전자를 이용하여 UV-A 광에 대한 주광성을 조절하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *uirS*, *uirR* 또는 *lsiR* 유전자의 발현을 조절하여 UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하는 방법, 시네코시스티 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 야생형의 시네코시스티스에서 과발현시켜 백색광 또는 적색광에 대해 음성 주광성을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법, *uirS*, *uirR* 또는 *lsiR* 유전자가 넉아웃되어 UV-A 광에 대한 양성 주광성을 나타내는 시네코시스티스 종, 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 포함하는, UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하기 위한 조성물 및 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 포함하는, 백색광 또는 적색광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하기 위한 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008205 2011
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린 사업
연구과제명	남세균 유전체 기반 작물형질 개량용 유용유전자원 발굴
주관기관	충남대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

시네코시스티스(Synechocystis sp.) PCC 6803 유래의 UirR(UV-A intensity response Regulator) 유전자의 발현을 조절하여 UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 uirR 유전자를 넉아웃시켜 UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 양성 주광성을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 uirR 유전자를 넉아웃시킨 시네코시스티스 종을 lsiR 유전자로 형질전환시켜 음성 주광성을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 uirR 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

uirR 유전자가 넉아웃되어 UV-A 광에 대해 양성 주광성을 나타내는 시네코시스티스 종.

청구항 6

제5항에 있어서, 시네코시스티스(Synechocystis sp.) PCC 6803인 것을 특징으로 하는 시네코시스티스 종.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시네코시스티스(Synechocystis sp.) PCC 6803의 UV-A 광에 대한 주광성을 조절하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *uirS*, *uirR* 또는 *lsiR* 유전자의 발현을 조절하여 UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하는 방법, 시네코시스티 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 야생형의 시네코시스티스에서 과발현시켜 백색광 또는 적색광에 대해 음성 주광성을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법, *uirS*, *uirR* 또는 *lsiR* 유전자가 넉아웃되어 UV-A 광에 대한 양성 주광성을 나타내는 시네코시스티스 종, 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 포함하는, UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하기 위한 조성물 및 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 포함하는, 백색광 또는 적색광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하기 위한 조성물에 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. 시네코시스티스(Synechocystis sp)와 같이 광합성을 하는 원핵생물의 경우에도 빛은 아주 중요한 요소로서 작용한다. 시네코시스티스는 지구상의 해양 및 담수 생태계에서 큰 비중을 차지하는 생물체인 동시에 광운동(photomovement) 및 광합성에 관련된 연구의 모델 생물체이다. 많은 시네코시스티스에서 주광성(phototaxis), 광활동성(photokinesis), 광혐오반응(photophobic response)의 세 가지 유형의 광반응을 관찰할 수 있다. 이 중 주광성 운동은 빛의 방향에 따라 이동하는 움직임을 말하며, 빛을 향해 이동하는 경향을 갖는 양성 주광성(positive phototaxis)과 빛으로부터 멀어지려는 경향의 이동성을 갖는 음성 주광성(negative phototaxis)으로 분류할 수 있다. 대부분의 시네코시스티스는 낮은 광량에서는 양성 주광성을 보이고, 높은 광량에서는 음성 주광성을 보인다. 이렇게 빛에 의존적으로 나타나는 생리학적인 반응을 "photosensory transduction"이라고 하며, 광수용체(photoreceptor)에 의한 자극의 인지와 세포내 신호 전달 또는 신호 증폭, 마지막으로 자극에 대한 반응으로 나뉠 수 있다.

[0003] 식물에서 나타나는 대표적인 광수용체로서 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. 피토크롬은 약 120 kDa의 단백질이며 N-말단에 빛을 인지하는 부분으로서 크로모포어(chromophore)가 결합하는 부위를 갖고, C-말단 부위에 히스티딘 키나아제 도메인(histidine kinase domain)을 갖는다. 피토크롬의 크로모포어는 open-chain tetrapyrrole의 구조를 갖는다.

[0004] 시네코시스티스 6803에서 알려진 여러 가지 광수용체는 cph Ⅰ(cyanobacteria phytochrome Ⅰ; slr0473 위치), cphⅡ(cyanobacteria phytochrome Ⅱ; sll0821 위치) 그리고 plpA(cyanobacteria phytochrome Ⅲ; sll1124 위치)가 존재한다. 지금까지 잘 알려진 Cph Ⅰ은 일반적인 식물의 피토크롬과 유사한 구조를 갖는 반면 CphⅡ는 약간 다른 구조적 차이를 보인다. CphⅡ는 145 kDa의 크기이며 N-말단 부위에는 식물 피토크롬의 N-말단 부위와 유사한 아미노산 서열이 존재하지만, C-말단 부위에는 키나아제 도메인이 존재하지 않는다.

[0005] 광합성 원핵생물인 시아노박테리아는 빛에 대해 앞쪽으로 또는 뒤로 멀리 움직이는 것을 조절하는 다중의 광수용체를 갖는데, 이러한 시아노박테리아의 양성 주광성 시스템에 관해서는 연구가 많이 이루어져 있는 반면, 음성 주광성을 조절하는 광수용체 및 광수용체의 하향의 신호 구성 요소에 대해서는 지금까지 잘 밝혀지지 않았다. 특히, 본 발명에서와 같이 ETR1-연관된 시아노박테리오크롬 좌(slr1212/uirS) 및 두개의 인접한 반응조절자 좌(slr1213/uirR 및 slr1214/lsiR)가 UV-A에 의해 활성화되고, 음성 주광성을 증진시키는데 관여하는 내용에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 시네코시스티스 PCC 6803에서 UV-A 광의 조사에 의해 *UirS*, *UirR* 또는 *LsiR*가 활성화되어 음성 주광성을 나타내는 것을 확인하였고, 세 유전자 각각을 넉아웃시킨 돌연변이체는 UV-A 광의 조사에 양성 주광성을 나타내는 것을 확인하였으며, 이 세 유전자의 야생형은 음성주광성을 상보(complemented)할 수 있으나 미스센스 돌연변이체는 음성 주광성을 상보하지 못하는 것을 확인하였으며, *lsiR* 유전자 과발현은 UirS/UirR의 기능에 상관없이 음성주광성을 유도함을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 시네코시스티스(Synechocystis sp.) PCC 6803 유래의 *uirS*, *uirR* 또는 *lsiR* 유전자의 발현을 조절하여 UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 야생형의 시네코시스티스에서 과발현시켜 백색광 또는 적색광에 대해 음성 주광성을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 *uirS*, *uirR* 또는 *lsiR* 유전자가 넉아웃되어 UV-A 광에 대한 양성 주광성을 나타내는 시네코시스티스 종을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 포함하는, UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하기 위한 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 포함하는, 백색광 또는 적색광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 산소적 광합성(oxygenic photosynthesis)을 하여 광합성 기구들이 고등식물과 거의 유사하면서도 게놈이 매우 단순하여 유전자 조작이 매우 간편한 시네코시스티스의 UV-A 광에 의한 유전자의 발현 및 조절을 분자적 수준에서 규명한 것으로, 생명 현상의 이해라는 측면 뿐만 아니라, 여러 응용 분야에서 기초 자료로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0013] **도 1**은 재조합 시네코시스티스 UirS-GAF holoprotein의 분자 및 분광적 특징을 보여주는 그림이다. **A**, 시네코시

스티스로부터 Puv 및 Pg 형태에서 His_6UirS-GAF 용액의 사진 **B**, PCB-생산 대장균 및 시네코시스티스 세포로부터 분리된 재조합 UirS-GAF 및 자리 지정(site-directed) 돌연변이체인 Cys533Gly (C533G), Cys561Ala (C561A) 및 Cys533Gly/Cys561Ala (C553G/C561A)의 아연(Zn^{2+})-의존적인 형광발광 (Zn)과 SDS/PAGE 겔의 쿠마시 브릴리언트 블루(CBB) 염색. PCB-생산 대장균(E) (**C-G**) 및 시네코시스티스(S) 세포(**C-D**)로부터 분리된 정제된 재조합 UirS-GAF 흡수(**C, E** 및 **F**) 및 흡수 차이(**D**, **G**) 스펙트럼. UV-A 광(UV-A)를 제외한 녹색(G) 조명(**D**) 및 변성된 Puv의 녹색조명을 제외한 암조건(D) 또는 변성된 Pg의 암조건을 제외한 녹색 조명(**G**)에 대한 스펙트럼 차이가 **C** 및 **E** 및 **F** 패널로부터 각각 측정되었다. 패널 **E-G**에서, 재조합 UirS-GAF는 암조건에서 산성 우레아(8M, pH 2.0)에 의해서 변성시킨 후 녹색 조명을 조사하였다.

도 2는 시네코시스티스의 야생형 및 주광성 돌연변이체의 주광성 및 *uirS/uirR/lsiR* 유전자 발현을 나타낸다. **A-B**, 단일 방향성의 UV-A, 녹색(G), 청색(B) 또는 적색(R) 광에 2일 동안 노출시킨 시네코시스티스 야생형 WT 및 *uirS*$^-$, *uirR*$^-$, *lsiR*$^-$, *cya1*$^-$*2*$^-$, *pixJ1*$^-$ 및 *cph2*$^-$ 돌연변이체의 감광 운동성. **C-D**, 야생형 및 **A-B**로부터의 돌연변이체로부터 *uirS*, *uirR*, 및 *lsiR* 유전자의 전사체 수준. 1% BG11-한천 배지에서 자란 지수기 세포 (exponential phase cells)를 Ag^+가 첨가된 또는 5 μM $AgNO_3$ 가 없는 10% 글루코스가 첨가된 새로운 배지에 도말한 다음 단일 방향성 UV-A(170 μWcm^{-2}) 또는 16 μmol m^{-2}s^{-1}의 청색, 녹색 또는 적색 (**A**, **C** 및 **D**) 조명 하에서 2일 동안 배양하였다. **B**에서, 다양한 UV-A 세기(0 - 450 μWcm^{-2})가 제공되었다. 화살표는 빛의 방향을 가리키고, 점선은 조명을 비추기 전 세포의 초기 위치를 나타낸다. **C** 및 **D**에서, 동시에 정량적 PCR 분석을 보여준다. 데이터는 평균±표준편차(n = 3 - 5) 이다. 별표* 는 $p<0.05$를 의미한다.

도 3은 효모 투-하이브리드 분석 및 시험관내 풀-다운 분석을 이용한 UirS, UirR 및 LsiR 사이에서 분자 상호작용을 나타낸다.

A, 투-하이브리드 분석에 사용된 UirS(S), UirR(R1) 및 LsiR(R2)의 도메인 구조. 괄호안의 숫자는 잔기의 시작과 종결을 가리킨다. **B**, 분열 유비퀴틴 분석. 0.075 mM 메티오닌(methionine)이 첨가된 SD/-TLUAH 배지를 이용한 성장 분석, SD/-TLU(+AH)에서 세포의 적색/백색 분석 및 베타-갈락토시다아제(β-galactosidase) 활성(β-GAL) 시험. **C**, 효모 투-하이브리드 분석 **B** 및 **C**에서, 다른 세포 밀도에서 -Ade/His/Leu/Trp (4중의) dropout 배지를 이용한 성장 분석(Growth) 및 β-갈락토시다아제 활성(β-GAL)을 이용한 검사 **D**, 시험관 내 풀-다운 분석을 이용한 UirS 및 UirR 및 LsiR 사이의 직접적인 상호작용. 정제된 His_6-UirS△ 단백질은 친화성 수지에 고정시킨 후, GST-UirR(R1, 레인 1), GST(레인 2) 또는 GST-LsiR(R2, 레인 3) 단백질과 함께 배양시켰다. 분자량 마커(kDa)의 위치는 왼쪽에 있다.

도 4는 luxAB 리포터, 주광성 및 EMSA 분석을 이용한 *LsiR* 프로모터 분석 결과이다.

A, *lsiR*(P1 ~ P5) 프로모터 절편 유도성 *luxAB* 리포터 균주 및 프로모터 없는 대조구 (CO)-유도성 *luxAB* 리포터 균주로부터의 발광. 백색광 하에서 자란 지수기 단계 세포는 단일 방향성의 UV-A (170 μW/cm^2)에 16시간 동안 노출되었다. 왼쪽의 숫자는 번역 +1 개시 자리에 대한 *lsiR* 프로모터 절편의 뉴클레오티드의 위치를 가리킨다. **B**, 단일 방향성의 UV-A 조명하에서 2일 동안 시네코시스티스 야생형, *lsiR*$^-$ 돌연변이 및 *lsiR*(P1 ~ P5) 프로모터 절편 유도성 lsiR을 포함하는 상보된 *lsiR*$^-$ 돌연변이체의 감광 이동성 **C**, 정제된 GST-UirR 단백질과 함께 배양된 *lsiR* 프로모터 절편(E1 ~ E2)의 전기영동 이동성 시험. 30fmol의 비오틴-표지된 DNA 부분 E1 (영역 -534에서 -452, 레인 1 ~ 8) 및 E2 (영역 -462에서 -347, 레인 9 및 10)은 증가된 농도의 정제된 GST-UirR (레인 1에서 0ng, 레인 2에서 20ng, 레인 3에서 50ng, 레인 4에서 100ng, 및 레인 5 ~ 7 및 10에서 250ng)과 함께 3시간 동안 배양되었다. 특이적 (비표지된 E1 부분의 200배 초과량, 레인 6) 및 비특이적 억제자 (lsiR ORF 절편의 200배 초과, 영역 +361 에서 457, 레인 7)가 포함되었다. 대조구 레인 8에서, GST(x 250ng)는 UirS-GST 대신에 포함되었다.

도 5는 야생형, *uirS* 위치 돌연변이, 및 시네코시스티스의 상보된 세포 라인에서 *uirS/uirR/lsiR* 유전자의 UV-A 주광 이동성 및 전사체 수준을 나타낸다.

A, 시네코시스티스 야생형, *uirS*$^-$ 돌연변이체, *uirS*$^-$ 돌연변이 배경에서 *uirS1* 과발현자(*UirS*) 및 벡터 대조구(pILA)의 주광성 **B**, 야생형, *uirR*$^-$ 돌연변이체, *uirR*을 발현하는 상보된 *uirR*$^-$ 돌연변이체 (*UirR*), 자리 지정 돌

연변이체 D54G (*D54G*) 및 벡터 대조구 (pSL1210)의 주광성 **C**, 야생형, *IsiR*⁻ 돌연변이체, 및 *IsiR*를 발현하는 상보된 *IsiR*⁻ 돌연변이체(*LsiR*), 자리 지정(site-directed) 돌연변이체 D297A(*D297A*) 및 벡터 대조구(pILA)의 주광성 **D-E**, 야생형, *uirS*⁻, *uirR*⁻ 및 *uirS*⁻(*LsiRs*) 및 *uirR*⁻(*LsiRr*) 돌연변이 백그라운드에서 *IsiR* 과발현자와 벡터 대조구(pSL1210; *pSL*)의 주광성 **F**, 시네코시스티스 야생형, *uirS*⁻, *uirR*⁻, *IsiR*⁻ 돌연변이체, 각각의 돌연변이 백그라운드에서 *UirS, UirR, LsiR, UirR(D54G),* 및 *LsiR(D297A)* 과발현체의 *uirS*, *uirR*, 및 *IsiR* 유전자의 전사체 수준. 세포는 단일 방향성 UV-A 조명(170 μW/cm^2) 하에서 2일 동안 배양되었다. **G**, 야생형 (*LsiRw*), *uirS*⁻(*LsiRs*), *uirR*⁻(*LsiRr*) 및 *IsiR*⁻ (*LsiR*) 돌연변이 배경에서 야생형, *IsiR* 과발현체 및 벡터 대조구 (pSL1210; *pSL*)의 주광성 **H**, 야생형, *uirS*⁻ 및 *uirR*⁻, 및 *uirS*⁻(*LsiRs*) 및 *uirR*⁻(*LsiRr*) 돌연변이 백그라운드에서 *IsiR* 과발현체 및 벡터 대조군(pILA)의 주광성. 균주는 2일 동안 단일 방향성의 UV-A(170 μWcm^{-2}) (A-E) 또는 백색광 (16 μmol m^{-2}s^{-1})(G-H)에서 배양되었다.

도 6은 시네코시스티스에서 UV-A 음성 주광성 신호전달 경로에 대한 제안된 모델을 나타낸다.

UV-A 노출시, 원형질막에 위치한 광감지 히스티딘 키나아제 UirS의 Puv형태는 묶여있는 UirR의 방출을 촉발하는 녹색광 흡수 형태(Pg)로 광전환된다. UirS로부터 그것의 방출, 이합체화(dimerization) 및 궁극적으로 *IsiR* 프로모터와 상호작용을 선호하는 자유 UirR의 인산화는 UirS 스스로 또는 알려지지 않은 HiK 또는 단순 조절 HPT 단백질에 의해서 수행될 수 있다. 그 다음에 인산화된 UirR 이합체는 LsiR 단백질 축적을 야기하는 *IsiR* 전사를 활성화한다. 음성 주광성은 세포의 중심부 및 말단 면에서 LsiR의 차별적인 활성을 요구하는데, 이것은 주변의 근접 UV 및 R 스펙트럼 영역에 걸친 다양한 광센서에 의해 매개될 수 있는 것을 본 발명자가 예상한다 (본문의 자세한 설명 참조). $UirR_b$, 결합 UirR; $UirR_f$, 자유 UirR; $UirR_f$*, 인산화된 자유 UirR; $UirR_b$*, 인산화된, 결합 UirR; $LsiR_f$, 자유 LsiR; $LsiR_f$*, 인산화된 자유 LsiR.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 시네코시스티스(Synechocystis sp.) PCC 6803 유래의 *UirS*(*UV-A intensity response Sensor*), *UirR*(*UV-A intensity response Regulator*) 또는 *LsiR*(*light and stress integrating Regulator*) 유전자의 발현을 조절하여 UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0015] 바람직하게는 상기 *uirS*, *uirR* 또는 *IsiR* 유전자를 넉아웃시켜 UV-A 광에 대한 시네코시스티스 종의 양성 주광성을 유도하는 것이며, 상기 *uirS*, *uirR* 또는 *IsiR* 유전자를 넉아웃시킨 시네코시스티스 종을 *IsiR* 유전자로 형질전환 또는 상보(complementation)시켜 음성 주광성을 유도하는 것이다.

[0016] 본 발명의 야생형 시네코시스티스 PCC 6803는 청색(464nm), 녹색(527nm) 및적색(650nm) 광을 조사하면 광원을 향해 움직이는 양성 주광성을 나타내며, UV-A 광을 조사하면 광원을 피해 가려는 음성 주광성을 나타내었다. 이것은 UV-A 광 센서인 *UirS*와 두개의 인접한 반응 조절자인 *UirR* 및 *LsiR*의 조절에 의해 이루어진다. 본 발명의 시네코시스티스 PCC 6803의 UV-A 광에 대한 주광성 관련 유전자인 *uirS, uirR* 또는 *IsiR* 유전자를 넉아웃시킨 돌연변이체는 UV-A 광에 대해 양성 주광성을 나타내었고, 이 세 유전자의 돌연변이체 각각은 *IsiR* 유전자에 의해 음성 주광성이 상보되는 것을 확인할 수 있었다.

[0017] 본 발명의 일구현 예에 따른 상기 *uirS, uirR* 및 *IsiR* 유전자는 각각 서열번호 1, 2 및 3의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1, 2 또는 3의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 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.

[0018] 또한, 본 발명은 시네코시스티스 PCC 6803 유래의 *LsiR* 유전자를 야생형의 시네코시스티스에서 과발현시켜 백색광 또는 적색광에 대해 음성 주광성을 유도하는 방법을 제공한다. 야생형의 시네코시스티스는 백색광 또는 적색광에서 양성 주광성을 나타내는데, 여기에 *LsiR* 유전자를 과발현시키면 음성 주광성을 나타내게 되는 것이다.

[0019] 또한, 본 발명은 *uirS*, *uirR* 또는 *lsiR* 유전자가 넉아웃되어 UV-A 광에 대한 양성 주광성을 나타내는 시네코시스티스 종을 제공하며, 바람직하게는 상기 시네코시스티스 종은 시네코시스티스(Synechocystis sp.) PCC 6803인 것이나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 또한, 본 발명은 시네코시스티스(Synechocystis sp.) PCC 6803 유래의 *lsiR* 유전자를 포함하는, UV-A 광, 백색광 또는 적색광에 대한 시네코시스티스 종의 주광성을 조절하기 위한 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 *lsiR* 유전자를 포함하며, 상기 유전자로 *uirS*, *uirR* 또는 *lsiR* 유전자가 넉아웃된 시네코시스티스 종을 형질전환시킴으로써 UV-A 광에서 시네코시스티스 종의 음성 주광성을 유도할 수 있는 것이며, 야생형의 시네코시스티스 종에 *lsiR* 유전자를 과발현시켜 백색광 또는 적색광에서 음성 주광성을 유도할 수 있는 것이다.

[0021] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0022] **재료 및 방법**

[0023] **균주 및 배양**

[0024] 운동성의 시네코시스티스(Synechocystis sp.) PCC 6803 야생형은 스펙티노마이신, 클로람페니콜, 카나마이신, 및 젠타마이신 저항성 부여 유전자를 포함하는 형질전환체와 돌연변이체를 생성하는데 사용되었다. 모든 균주들은 백색광(10 $\mu molm^{-2}s^{-1}$)하에 28℃에서 10 mM TES-KOH (pH 8.0)로 완충된 1% BG-11 한천배지에서 10~20 $\mu g\ ml^{-1}$의 적절한 항생제와 같이 또는 항생제 없이 배양되었다.

[0025] **운동성 분석**

[0026] 지수적으로 성장하는 시네코시스티스 세포의 주광성은 UV-A, 청색, 녹색, 및 적색 광원을 이용한 단일 방향 조명에 노출시킨 10 mM 글루코스를 함유하는 1% BG11-한천배지 표면에서 자라는 세포를 이용하여 2일 후에 분석하였다.

[0027] **시네코시스티스 고밀도 135K 유전자칩 분석**

[0028] 유전자 발현 프로파일링은 3,673개 전사체를 수용하도록 고안된 시네코시스티스 고밀도 135k NimbleGen사의 마이크로어레이를 이용하여 수행하였다(http://www.nimblegen.com/).

[0029] **효모에서 단백질-단백질 상호작용 분석**

[0030] UirS, UirR, 및 LSIR 중에서 단백질 상호작용은 효모 메이팅에 기반한 분리된 유비퀴틴 시스템 및 효모 Matchmaker™ GAL4 Two-Hybrid system(Clontech)을 이용하여 조사하였다.

[0031] **시험관 내 GST 풀-다운(Pull-Down) 분석**

[0032] His_6-UirS△, GST-표지된 UirR 및 LsiR 단백질을 니켈 친화성 크로마토그래피와 글루타티온 세파로오스 4B(GE)를 이용해서 정제하였다. 정제된 His_6-UirS△ 단백질을 Ni-NTA 금속-친화성 수지(Qiagen)에 고정된 후, 정제된 GST 또는 GST-UirR 또는 GST-LsiR과 인큐베이션하였다. His_6-UirS△에 결합된 GST 융합 단백질은 토끼의 항-GST 항체(Santa Cruz)를 이용한 PVDF 막(Millipore)에서 웨스턴 블랏분석법으로 검출하였다.

[0033] **DNA-단백질 복합체에 대한 겔이동(Gel Mobility Shift) 분석**

[0034] *IsiR*의 프로모터 부분에 -534 ~ -452 (E1) 및 -462 ~ -367 (E2) 영역을 포함하는 바이오틴 표지된 DNA 절편,E1의 특이적(비표지된 E1 절편)및 비특이적(*IsiR* ORF 내의 +361 ~ +457 영역) 경쟁자는 표 S2의 프라이머를 이용한 PCR에 의하여 준비하였다. 제조사의 절차에 따라서 화학발광 조명 쉬프트 EMSA 키트(Pierce Biotechnology)를 이용하여 겔이동(Gel Mobility Shift)분석을 하는데 정제된 GST-UirR 단백질을 이용하였다.

[0035] **실시예 1: UirS는 UV-A/녹색 광전환 가능한 시아노박테리오크**롬(cyanobacteriochrome)이다.

[0036] 시네코시스티스에서 음성 주광성을 촉발하는 광수용체로서 하나의 잠재적인 후보는 시네코시스티스의 *slr1212* 위치에 코딩되었다 (이후 이 실험에 근거해서 *uirS*는 UV-A 세기 반응센서(*UV*-A *i*ntensity *r*esponse *S*ensor)로 명명되었다). 애기장대 에틸렌 수용체 *ETR1*의 에틸렌 결합 도메인과 유사한 영역를 갖는 광수용체의 시아노박테리오크롬(CBCR) 패밀리 중 하나인 UirS은 두개의 N-말단 막관통(transmembrane,TM) 나선, 두 개의 PAS 도메인(PAS1 및 PAS2), GAF 도메인, 그리고 C-말단에 히스티딘 키나아제(HiK)를 포함하는 이례적인 H-박스를 갖는다. 앞선 연구에서 UirS의 두개의 막관통(TM) 나선은 에틸렌 결합 활성(activity) 역할을 하고, UirS의 GAF 도메인은 청색/녹색 전환가능한 CBCR을 생산하기 위해서 선형의 테트라피롤 피코시아노빌린(tetrapyrrole phycocyanobilin, PCB)과 결합한다는 사실이 밝혀졌다(Ulijasz et al. (2009) J. Biol. Chem. *284,* 29757-29772). 시네코시스티스 에틸렌 생합성에 대해 알려진 경로가 없기 때문에, UirS는 자연으로부터 생물적 (식물 및/또는 다른 유기체 유래의 에틸렌) 및 다른 비생물적(빛)인 두 개의 신호를 통합할 수도 있다.

[0037] 서열 정렬은 UirS가 PCB-결합 GAF 도메인 내에 두 개의 보존된 시스테인 잔기를 갖는 CBCRs 서브패밀리에 속하는 것을 보여준다(Rockwell, N.C., and Lagarias, J.C. (2010) ChemPhysChem *11,* 1172-1180). CBCRs의 다른 주목할 만한 예는, 서모시네코코커스 엘롱가투스(*Thermosynechococcus elongatus*) 유래의 TePixJ/Tll0569 및 Tlr0924와 시네코시스티스 유래의 SyPixJ/TaxD1/Sll0041이다. 돌연변이 유발 연구는 두 개의 시스테인 잔기가 CBCRs 패밀리의 B/G 광순환(photocycle)에서 요구된다는 사실을 확립해왔다(Ulijasz et al. (2009) J. Biol. Chem. *284,* 29757-29772). UirS의 광-감지 활성(light-sensing activity)에 대한 두 개의 시스테인 잔기의 중요성을 시험하기 위하여, 본 발명자는 PCB-생산 대장균 세포에서 GAF 및 UirS만의 구조체(UirS-GAF)의 단일(Cys533Gly, C533G; Cys561Ala, C561A) 및 이중(C533G/C561A) 돌연변이를 발현시켰다. 야생형 재조합체 UirS-GAF는 UV-A/자색(Puv) 및 녹색(Pg) 스펙트럼 부분에서 가장 효과적으로 흡수하는 두 개의 광호환성 형태를 취하였다 (도 1A). 흥미롭게도 382 nm에서 Puv 형태의 최대 흡수는 앞서 보고된 것과 비교하여 UV-A 영역 쪽으로 18 nm 청색이동되었다(Ulijasz et al. (2009) J. Biol. Chem. *284,* 29757-29772). UV-A를 갖는 Puv의 조사(170 μW/cm^2)는 Pg를 생산하였고, 이 Pg의 녹색 영역 (534 nm)에서 최대 흡수는 UV-A (325 nm 및 382 nm)에서 두 개의 더 작은 피크 및 B-흡수(414 nm) 숄더(shoulder)가 수반되었다(도 1C). G 광(16 μmol m^{-2}s^{-1})을 갖는 Pg 조사는 Puv 스펙트럼을 복원하였다. B/G CBCRs에 대한 연구와 유사하게도 모든 피토크롬 및 CBCRs에 보존된 잔기인 Cys561의 돌연변이 유발은 C561A 및 C533G/C561A 돌연변이체 모두에 대하여 UV-A에 가까운 또는 가시 최대 흡수의 결여에 의해 보여졌던 것처럼 공유 PCB 결합이 없는 결과를 보였다. 이것은 두 돌연변이체에 대하여 빌린(bilin) 결합 폴리펩타이드를 검출하는데 사용하는 방법인 SDS 겔에서 Zn^{2+}-의존적 형광의 결핍에 의해서 확인되었다(도 1B). 이 연구는 두 개의 시스테인과 PCB 발색단(chromophore) 사이의 티오에테르(thioether) 결합을 함축하는 B/G CBCR에 대한 다른 연구를 뒷받침한다(Ulijasz et al. (2009). J. Biol. Chem. *284,* 29757-29772).

[0038] 변성 연구는 재조합 UirS-GAF에 결합한 빌린(bilin) 발색단(chromophore) 구조를 확인하기 위해서 수행되었다. 암상태에서 산성 요소(8M 요소/염산, pH 2.0)로 변성시킬 때, Puv는 564 및 603 nm에서 이중 피크를 갖는 G-흡수성 종으로 변형되었다(도 1E, 검은선). 이런 극단적인 스펙트럼 이동은 위에서 본 B/G CBCR의 Pb 상태의 산성 변성과 유사했다. 암상태에서 UirS-GAF의 Pg 상태의 변성은 550 nm에서 단일의 주 피크를 갖는 구별되는 G-흡수종을 생산했다(도 1F, 검은선). 두 변성된 샘플에 녹색광(G light)의 조사는 변성 Pg 상태가 광활성적인 반면에 변성 Puv는 그렇지 않다는 사실을 밝혀냈다(도 1E 및 F, 녹색선). 재조합 UirS-GAF의 변성 Pg 형태의 녹색광 마이너스 암조건 차이 스펙트럼(green light-minus dark difference spectrum)은 산성 변성된 TePixJ-GAF의 것과 구분이 가지 않았다(도 1G). PCB-합성 대장균으로부터 분리된 재조합 UirS-GAF가 시네코시스티스 세포에서 생산된 것과 같은 특징을 갖는지 조사하기 위해서, 본 발명자는 시네코시스티스 세포에서 IPTG-유도성 *trc* 프로모터의 조절 하에서 His-표지된 UirS-GAF를 발현시켰다. 시네코시스티스 세포로부터 UirS-GAF의 흡수 및 차이 스펙트럼은 대장균 세포에서 발현된 UirS-GAF의 것과 거의 동일하다는 것을 입증했는데, 이것은 PCB가 UirS의 PVB 발색단(chromophore)의 자연적인 전구체라는 사실을 설명한다(도 1C 및 1D). 이를 종합해 보면, 이 데이타는

UirS가 이중의 티오에테르-결합된 15Z-피코비올로빌린(PVB) 발색단(chromophore)을 갖는데, 이것의 15E 상태로의 광이성질체화는 이러한 티오에테르 결합들 중 하나의 절단을 시작한다는 결론을 뒷받침한다.

[0039] **실시예 2: UirS 및 반응 조절자인 UirR 및 LsiR은 음성의 광지향**성(photoorientation)에 대한 광감지 신호 시스템을 구성한다.

[0040] 많은 전형적인 두개-구성요소(two-component) 신호전달 시스템에 대하여, 입력(input) 센서 키나아제 (HiK) 및 동일 종류의 출력(output) 반응 조절자 (response regulator, RR) 쌍을 코딩하는 유전자들은 종종 서로 가까이에 위치하고 같은 전사 단위에 속한다 (Alm et al. (2006) PLoS Comput. Biol. *2,* e143). *UirS* 는 시네코시스티스 게놈(genome) 내에 두개-구성요소 시스템의 16개의 유전자군 중 하나로 발견되고(Ashby, M.K., and Houmard, J. (2006) Microbiol. Mol. Biol. Rev. *70,* 472-509), 이 게놈(genome)은 RRs를 코딩하는 두개의 다운스트림(downstream) 유전자인 *slr1213* (이후에 본 발명에 기초한 UV-A 강도 반응 조절자(*UV*-A *i*ntensity *r*esponse *R*egulator)로서 *uirR*로 지명됨) 및 *slr1214* (이후에 본 발명에 기초한 빛 및 스트레스를 통합하는 조절자(*l*ight and *s*tress *i*ntegrating *R*egulator)로서 *lsiR*로 지명됨)를 포함한다(도 2). 시네코시스티스 *uirR*은 AraC 서브패밀리 전사인자를 코딩하고, N-말단 리시버(receiver) 도메인 및 C-말단 DNA-결합(DB) 도메인으로 구성된다. 대장균에서 AraC 서브패밀리들은 전형적으로 MarA, SoxS 및 Rob와 같은 스트레스 반응의 활성자로서 역할을 하지만(Martin et al. (2008) J. Mol. Biol. *380,* 278-284), 시네코시스티스에서 그들의 기능적인 역할은 알려져 있지 않다. *lsiR* 위치의 생산물 (LsiR)은 C-말단 CheY-같은 반응 조절자 도메인을 갖는 시네코시스티스 게놈에서 여섯개의 PatA 조절자 중 하나이다. 시네코시스티스의 다른 PatA 단백질은 주광성 오페론을 코딩하는 TaxP1(PixG/Sll0038) 및 PixE(Slr1693)를 포함한다. 아나베나(*Anabaena*) 및 믹소코커스 잔서스(*Myxococcus xanthus*)에서 PatA 단백질은 이질세포(heterocyst), 선모(pili) 및 자실체(fruiting bodies) 형성의 역할을 수행하는 것처럼 보여지고 있다(Youderian et al. (2003) Mol. Microbiol. *49,* 555-570).

[0041] UirS-GAF의 Puv 형태의 흡수범위를 갖는 음성 주광성의 활동 스펙트럼의 강한 오버랩과 AraC 및 PatA 반응 조절자 패밀리가 스트레스 반응 및 운동성 신호 시스템에 참여한다는 증거에 근거하여(Martin et al. (2008) J. Mol. Biol. *380,* 278-284), 본 발명자는 시네코시스티스 *uirS/uirR/lsiR* 위치가 UV-A광 하에서 음성 주광성을 조절하는 광지각 신호 시스템을 구성한다는 가설을 세웠다. 이 가설을 테스트하기 위하여, *uirS/slr1212*, *uirR/slr1213*, 및 *lsiR/slr1214* 유전자에서 넉아웃(knock-out)된 돌연변이체는 PCR에 기초한 유전자 융합 전략(strategy)에 기초한 PCR을 이용하여 구축하였다. 양성 주광성 센서 (*pixJ1*) 및 아데닐레이트(adenylate)/구아닐레이트(guanylate) 시클라제(cyclases) (*cya1/2*) 유전자에 결함이 있는 돌연변이체를 대조구로 사용하였다; *pixJ1*$^{-}$ 세포는 음성 주광성을 나타낸 반면, *cya1*$^{-}$ (및 *cya1*$^{-}$*2*$^{-}$) 세포는 단일의 청색 및 적색광 하에서 비운동성을 나타내었다(Bhaya et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *98*, 7540-7545, Terauchi, K., and Ohmori, M. (1999) Plant Cell Physiol. *40,* 248-251). 시네코시스티스 야생형(WT) 및 돌연변이체의 주광성 운동은 다른 광질의 단일 방향 조명을 사용하여 1% 소프트 한천 배지 상의 세포 콜로니의 움직임으로 평가되었다. 앞선 보고와 일치하게도, 야생형 세포는 청색(464 nm), 녹색(527 nm) 및 적색(650 nm) 광원을 향하여 움직였지만 (양성 주광성), 선택된 광강도에서는 UV-A 광(355 nm, 음성 주광성)으로부터 멀어졌다(도 2A)(Choi et al. (1999) Photochem. Photobiol. *70,* 95-102). 이와 비교하여, 녹아웃(knock-out) 돌연변이체 *uirS*$^{-}$, *uirR*$^{-}$, 및 *lsiR*$^{-}$는 UV-A광 하에서도 파장-독립적 양성 주광성을 보였다. 예상했던 것처럼, *cya1*$^{-}$*2*$^{-}$ 세포는 비운동성인 반면에 *pixJ1*$^{-}$ 세포는 모든 광조건 하에서 음성 주광성을 나타냈다. UirS의 에틸렌 결합 활성이 UirS의 기능에 중요한지 평가하기 위해, 하기 농도에서 애기장대 ETR1 및 UirS/Slr1212 둘 다에 대하여 에틸렌 결합의 강한 억제제로 작용하는 은이온(Ag^{+})을 20 μM 함유한 1% 고체 한천 상에서 또는 다양한 농도의 에틸렌 가스 하에서 야생형과 돌연변이체의 주광성을 비교하였다(Rodriguez et al. (1999) Science *283,* 996-998). 은이온(Ag^{+}) 및 에틸렌은 실험된 모든 균주의 주광성 표현형에 영향을 미치지 않았다(도 2A). 그러므로 UirS에 결합하는 에틸렌은 UVA-독립적 음성 주광성에 요구되지 않았다. 종합해보면, 이러한 조사는 *uirS/uirR/lsiR* 위치는 음성 주광성을 촉진하는 에틸렌-독립적 UV-A 신호 시스템을 구성한다.

[0042] 가시광 하에서 시네코시스티스의 감광 반응은 광 강도 의존적이다: 청색(470 nm) 및 넓은 범위의 적색(600 - 700 nm) 광의 광 강도가 증가됨에 따라 야생 시네코시스티스 세포는 양성, 비운동성 및 음성 주광성을 나타낸다. UV-A하에서 광강도 역전(reversal)이 또한 발생하는지 테스트하기 위하여, 야생형 및 *uirS*$^{-}$, *uirR*$^{-}$

및 *lsiR*⁻ 돌연변이체의 주광 운동성을 단일 방향 UV-A 조명의 다른 광 강도하에서 시험하였다. 대조구로서, UV-A 광 하에서 양성 및 음성 주광성을 모두 나타낸다고 보고된 *cph2*⁻ 돌연변이체를 동시에 분석하였다(Moon et al. (2011) FEBS Lett. *585*, 335-340). 야생형 세포는 약한 양성(매우 낮은 광 하에서, < 10 μW cm^{-2}) 및 강한 음성(강한 및 매우 강한 광 세기 하에서, > 150 μW cm^{-2}) 주광성, 및 비운동성(중간 광 세기 하에서, 70 ~ 120 μW cm^{-2}) 표현형을 보였다(도 2B). 그에 비해, *uirS*⁻, *uirR*⁻ 및 *lsiR*⁻ 돌연변이체는 음성 주광성이 관찰된 가장 높은 광 세기(> 400 μW cm^{-2})를 제외한 모든 UV-A 광강도 하에서 양성 주광성을 나타냈다. 예상된 것처럼, *pixJ1*⁻ 돌연변이체는 높은 광 세기(> 150 μW cm^{-2}) 하에서 음성 주광성 및 낮은(< 150 μW cm^{-2})광 세기 하에서 비운동성 표현을 나타낸 반면에 *cya1 2*⁻ 돌연변이체는 UV-A의 모든 광강도 하에서 비운동성을 보였다. 흥미롭게도, *cph2*⁻ 돌연변이체는 *uirS*⁻, *uirR*⁻ 및 *lsiR*⁻ 돌연변이체와 표현형이 유사했지만, *cph2*⁻ 세포에 대한 더 낮은 광 강도에서 주광성의 역전(reversal) (양성에서 음성 방향으로)이 발생하였다. 이 실험은 UirS, UirR, LsiR 및 Cph2 모두 UV-A 하에서는 음성 주광성을 지지하나, 매우 높은 UV-A 광 강도 하에서 또 다른 음성 주광성 감지 시스템이 활성화 된다는 사실을 보여준다.

[0043] **실시예 3: *lsiR*의 UirS 조절된 전사는 PixJ 및 Cph2 신호에 독립적이다.**

[0044] 135K 고밀도 시네코시스티스 DNA 마이크로어레이(microarray)를 사용하여, 본 발명자는 기능적인 *uirS*, *uisR* 및 *lsiR* 위치에 의존적인 UVA-조절 유전자를 조사하였다. 본 발명자는 *uirS*⁻, *uirR*⁻ 및 *lsiR*⁻ 돌연변이체 세포 라인을 단일 방향성 UV-A 광 하에서 야생형과 비교했을 때 15개 유전자가 2배 및 $P < 0.01$ 이하로 다르게 발현되는 사실을 발견하였다 (표 1).

표 1

단일 방향의 UV-A 광 (170 mWcm^{-2})을 2일 동안 노출시킨 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 *uirS* (*slr1212*), *uirR* (*slr1213*) 및 *lsiR* (*slr1214*)에서 돌연변이에 반응하여 상향 조절된(> 2배) 또는 하향 조절된(< 2배) 유전자 목록

Strain	ID	Gene	Definition	Expression[1]
Up-regulated				
uirS⁻	slr1667		target gene of sycrp1	64.55 ± 9.97
	slr1929	pilA6	type 4 pilin-like protein	4.19 ± 0.54
	slr1928	pilA5	type 4 pilin-like protein	3.41 ± 0.30
	slr1668		target gene of sycrp1	3.05 ± 0.30
	sll1543		hypothetical	2.52 ± 0.19
	slr5037		hypothetical	2.44 ± 0.48
	ssr2848		unknown	2.31 ± 0.30
	sll0374	urtE	urea transport system ATP-binding protein	2.19 ± 0.28
uirR⁻	slr0798	ziaA	zinc efflux pump	2.04 ± 0.61
	slr5037		hypothetical	2.01 ± 0.14
lsiR⁻	sll1611		unknown	2.12 ± 0.58
Down-regulated (< 2-fold)				
uirS⁻	sll1924	sycrp2	cAMP receptor protein sycrp1 homolog	0.46 ± 0.04
	slr1215		hypothetical	0.24 ± 0.04
	slr1214		PatA subfamily	0.09 ± 0.02
uirR⁻	ssr2227		putative transposase	0.47 ± 0.15
	slr1215		hypothetical	0.22 ± 0.04
	slr1214		PatA subfamily	0.03 ± 0.01
lsiR⁻	ssr2227		putative transposase	0.29 ± 0.09

[1]야생형에 대한 상대적인 유전자 발현

[0045]

[0046] 이들 중 4개 유전자가 하위 조절된 반면 11개가 상위 조절되었다. 잘 알려진 광수용체(*pixJ1*, *cph2*, *pixD* 및 *s111629*), 아데닐레이트 시클라아제(adenylate cyclase)(*cya1*), 필리 생합성/조립 단백질(*pilA1-A4*), 필리 모터(motor)(*pilT1*) 또는 연축 운동성 단백질(*pilT2*)을 코딩하는 잘 알려진 주광 운동성-연관 유전자의 어떤 것도 돌연변이체에서 잘못 조절되지 않았다(데이터 미제시). 이것은 *UirS*/*UisR*/*LsiR* 신호 시스템의 전사적 타겟으로서 이 유전자들을 배제시킨다. 본 발명자들이 세 돌연변이체에 대하여 공통으로 상향 조절된 유전자를 확인하지 않았음에도 불구하고, *lsiR*의 하향 조절이 UVA-처리된 $uirS^-$ 및 $uirR^-$ 라인에서 관찰되었는데, 이는 음성 UV-A 주광성 반응을 위한 *lsiR* 발현 조건임을 시사한다.

[0047] UVA-의존적인 *lsiR* 발현이 UirS 및 UirR 모두에 필요하다는 것을 qRT-PCR 분석에 의해서 확인하였고, $uirS^-$ 및 $uirR^-$ 돌연변이체에서 *lsiR* 전사 수준은 무시해도 될 정도라는 것을 밝혔다 (도 2B). $uirR^-$ 및 $lsiR^-$ 돌연변이체($p < 0.05$)에서 *uirS* 전사 수준은 야생형의 ~50%인데, 이것은 LsiR에 의한 *uirS* 발현의 가능한 양성 피드백(feedback) 조절을 함축한다. 예상외로, UVA-처리된 $uirS^-$ 세포에서 *uirR* 발현이 유지었다(아마도 50% 보다 훨씬 높게). 이러한 데이터는 *lsiR*이 결여된 *uirS* 및/또는 *uirR*의 발현은 야생형에서 음성 UVA-의존적 주광성 표현형을 유지하는데에 불충분하다는 것을 나타낸다. 이 신호 경로에서 PixJ1, Cya1 및 Cph2의 연관성을 측정하기 위해서, 본 발명자는 다음으로 $pixJ1^-$, $cya1^-2^-$ 및 $cph2^-$ 돌연변이 라인에서 *uirS* 위치 유전자의 전사 수준을 시험하였다. UV-A광 하에서 세 유전자 모두의 발현은 세 돌연변이체에서 야생형($p < 0.05$)의 그것과 유사함을 입증하였다 (도 2C). 이러한 실험은 본 발명에서 연구된 UV-A 전사적 조절 경로는 PixJ1, Cph2 및 Cya1 신호 활성의 독립성을 입증했다(Terauchi, K., and Ohmori, M. (1999) Plant Cell Physiol. *40,* 248-251).

[0048] *lsiR* 발현의 상향 조절은 UVA-특이적인 가설을 확인하기 위해, *uirS* 위치 유전자 발현의 광생물학적 비교 분석을 하였다. 도 2D에서 보여준 것처럼, *lsiR*는 오직 UV-A 조명 하에서만 발현되었으나, *uirS* 및 *uirR*은 조사된 모든 광체계 하에서 기본적으로 발현되었다. UV-A하에서 *lsiR* 전사 수준은 청, 녹, 또는 적색 광 하에서 보다 14~25배 더 높았다. 이러한 결과에 근거하여, UirS는 *LsiR*가 UirR에 의존적으로 전사 활성 역할을 수행함으로써 UV-A 센서로서 역할을 한다는 것이 명확해 졌다.

[0049] **실시예 4: UirS는 호모이량체화하고(homodimerizes) 또한 UirR 및 LsiR과 상**호작용한다

[0050] UirS, UirR 및 LsiR이 표준의 두개-구성요소 신호전달 시스템으로 기능한다면, 단백질-단백질 상호작용 및/또는 인-전이는 UirS HiK 및 하나 또는 두 개의 RRs 사이에서 발생할 것으로 기대할 수도 있다. 이런 점에 있어서, 보존된 His 인-공여자 및 Asp 인-수여자 자리는 UirS 및 두 반응 조절자 각각에 존재한다. 운이 없게도 His 키나아제 자기인산화 활동은 TM-제거된 UirS (UirS△)에서 검출되지 않았고, UV-A 조명이 있거나 없는 경우 UirR 또는 LsiR로 UirS△ 인 전이도 관찰되지 않았다. 이것은 히스티딘(histidine) 자기인산화 활동을 보이는 애기장대 ETR1 단백질에 대한 유사한 연구와 대조적인 것인데, 본 발명자는 히스티딘(histidine) 키나아제는 ETR1 시그널링(signaling)에 요구되지 않는다는 사실에 주목한다(Wang et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA *100,* 352-357). 본 발명자는 다음으로 UirS△ 및 UirR/LsiR 단백질이 효모 메이팅 기초한 분열된(split) 유비퀴틴과 상호작용할 수 있는지를 시험관 풀-다운 분석과 더불어 투-하이브리드 분석 시스템(two hybrid system)으로 실험하였다. 완전한 길이의 UirS 및 절단된 UirS△ (도 3A)를 이용하여, 효모 분열 유비퀴틴 분석은 UirS (및 UirS△)가 히스티딘(histidine) 영양요구(auxotrophy), 적/흰 및 베타-갈락토시다아제(β-galactosidase)(β-GAL) 분석 (도 3B) 기초한 호모-올리고머라이즈(homo-oligomerize)가 가능하다는 사실을 보여준다. 이러한 결과는 HiKs는 전형적으로 호모이량체화(homodimerize)한다는 앞선 발견과 일치한다(Tomomori et al. (1999) Nat. Struct. Biol. *6,* 729-734). UirS가 UirR 및/또는 LsiR와 상호작용할 수 있는지 조사하기 위하여, 상응하는 폴리펩타이드(polypeptides)는 GAL4 전사 인자 활성자 또는 투-하이브리드 분석(two hybrid assays)을 위한 DNA 결합 도메인에 유전적으로 융합되었다(도 3A). 도 3C에서 보여주는 것과 같이, UirS△는 완전한 길이의 UirR 및 LsiR 폴리펩타이드와 상호작용했다. 절단 분석은 이러한 상호작용이 UirR의 RR 도메인과 함께 UirS의 HiK 도메인의 강한 친화력을 반영하는 반면 UirS의 PAS-GAF 영역은 LsiR과 함께 UirS과 상호작용에 역할을 하는 것을 보여 주었다. UirS 및 UirR 또는 LsiR의 쌍(pairwise) 상호작용은 시험관 내 풀-다운 분석에 의하여 더 입증되었다. 이러한 실험들은 GST-UirR 및 GST-LsiR이 His-tagged UirS△를 풀-다운할 수 있는 것을 보여 주었다(도 3D). 시네코시스티스 세포에서 풀-다운 분석에 의해 UirS 및 두 RRs 사이의 상호작용을 검출하

려는 시도는 지금까지 성공하지 못했지만(아마도 이 단백질의 낮은 단백질 함량 때문), 본 발명은 UirS가 구별되는 HiK 및 PAS 도메인을 통하여 UirR 및 LsiR 모두와 상호작용한다는 이론을 지지한다.

[0051] **실시예 5: *lsiR* 전사 수준의 UVA-의존적 축적은 DNA 결합 반응 조절자 UirR**에 의해서 매개된다

[0052] 본 발명자의 유전적, 광생물학적, 생화화적 데이타에 근거하여, 본 발명자는 UirS가 UirR의 *lsiR* 프로모터-결합 활성을 조절해서 *lsiR* 발현을 조절한다는 가설을 세웠다. 그러므로 본 발명자는 LUX 리포터 카셋의 DNA 절편 업스트림의 nested series를 클로닝하여 프로모터 영역에서 UVA-반응 *cis*-활성 요소를 스크린했다(도 4A). 사실, *uirR* 정지코돈(stop codon)부터 *lsiR*의 번역 개시 자리까지 완전한 534 bp 유전자간 영역을 갖는 P1-유도된 리포터 균주는 프로모터 없는(promoterless) 대조구인 리포터 균주보다 ~6배 더 큰 생물발광(bioluminescence) 수준을 보였다. 이와 대조적으로, 더 절단된 프로모터 구조체 (P2에서 P5)를 가지는 다른 네 균주 중 어떤 것도 Lux 발현에서 눈에 띄는 향상을 보이지 않았다. *lsiR* 발현에 대한 전체 유전자간 영역의 중요성은 *lsiR* ORF의 발현을 유도하는 같은 nested series를 갖는 *lsiR*⁻ 돌연변이체의 상보성에 의하여 확인되었다. 이러한 실험은 오직 P1 구조체만이 음성 UV-A 주광성을 회복시킨다는 사실을 보여주었다(도 4B). 그러므로 본 발명자는 *lsiR* 프로모터의 -534 에서 -439 bp 영역이 UVA-조절된 전사 인자 UirR에 대한 인식자리를 포함한다고 결론 내린다.

[0053] 다음으로 본 발명자는 UirR이 이 자리를 인지할 수 있는지를 테스트하기 위하여 재조합 UirR 및 비오틴-표지된 *lsiR* 프로모터 절편 E1 (-534 에서 -452 bp 영역) 및 E2 (-462 에서 -367 bp 영역)을 이용한 전기영동 이동성 분석을 수행하였다. 구분되는 DNA-단백질 복합체는 DNA 절편 E1 (레인 1 ~ 8)과 관찰되지만, 절편 E2 (레인 9 ~10)와는 관찰되지 않는다(도 4C). 과잉 비특이적 DNA 절편 (레인 7) 또는 GST 단백질 (레인 8)의 첨가는 단백질-DNA 복합체 형성을 억제하지 않는 반면, UirR의 E1에 결합은 과잉 특이적, 비표지된 DNA 절편 E1 (레인 6)에 의해 완전히 억제되었을 것이다. 이러한 결과는 *lsiR* ORF의 업스트림 -534에서 -462 bp 영역에 UirR 인지 서열의 존재를 뒷받침한다.

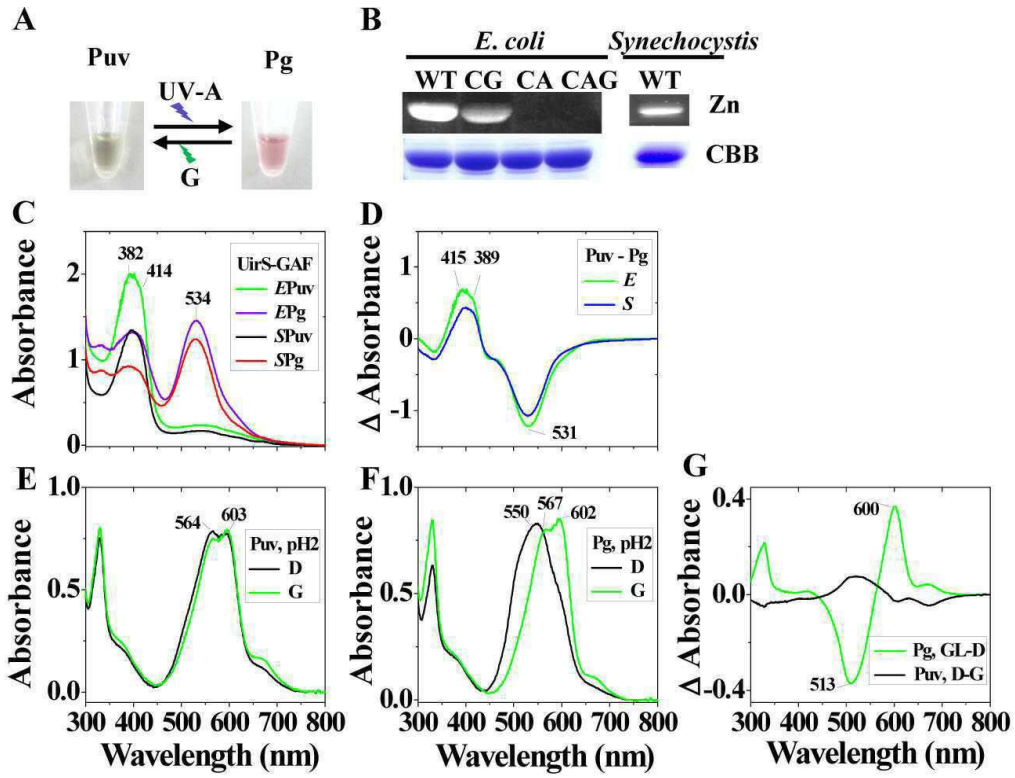
[0054] **실시예 6: LsiR는 양성에서 음성 주광성으로의 역전에 대해 역할을 수행하는** 반응 조절자이다.

[0055] *lsiR* 발현이 시험관 내 진정한 UirS/UirR 두개-구성요소 시스템에 의하여 조절되는지를 밝히기 위해서, 본 발명자는 이 유전자의 야생형 및 미스센스 돌연변이 형태를 이용하여 *uirS*⁻, *uirR*⁻ 및 *lsiR*⁻ 돌연변이에 대한 상보성 실험을 수행하였다. *sigE* 프로모터에 의해 조절된 야생형 *uirS*의 발현은 *lsiR* 전사 수준과 음성 주광성을 야생형의 것과 같이 복원시켜 *uirS*⁻ 돌연변이를 회복시킬 수 있었다 (도 5A 및 F, 표지된 *UirS*). *uirR*⁻ 배경에서 *uirR*의 *trc* 프로모터-유도 발현은 또한 음성주광성 및 *lsiR* 발현을 회복시켰다 (도 5B 및 F; 표지된 *UirR*). P1-영역 유도 *lsiR* 발현은 앞서 설명한 *lsiR*⁻ 라인의 주광성 표현형 기능 상실을 상보시킨 반면, *lsiR* 전사 수준을 야생형의 정도까지 회복시켰다(도 5C 및 G, 표지된 *LsiR*). UirS의 Hik 도메인 내에 His 잔기 및 UirR 및 LsiR의 RR 도메인에서 중요한 Asp 잔기가 상보성에 요구되는지 확인하기 위하여, 자리 지정(site-directed) 돌연변이 구조 UirS(H658Q), UirR(D54G) 및 LsiR(D297A)를 *uirS*⁻, *uirR*⁻ 및 *lsiR*⁻ 돌연변이체에 각각 삽입했다. 비록 본 발명자가 UirS(H658Q)를 발현하는 상보적인 균주를 생산할 수 없었지만, UirR(D54G) 및 LsiR(D297A)을 발현하는 균주는 획득하였다. 야생형 형태와 달리, 두개의 자리 지정(site-directed) 돌연변이체는 야생형 음성 UV-A 주광성 (도 5B 및 C)을 회복하는데 실패하였는데, 이것은 인산화 가능한(phosphorylable) Asp 잔기가 두 RRs에 대하여 신호 변환에 요구된다는 사실을 보여주었다. 이와 대조적으로, 야생형 *lsiR* 발현은 *uirS*⁻ 및 *uirR*⁻ 돌연변이를 보완할 수 있었다 (도 5D 및 E, 표지된 *LsiRs* 및 *LsiRr*). 이러한 실험은 기능적인 UirS 및 UirR 단백질이 없다고 하더라도 시네코시스티스의 음성 UV-A 광방향성은 LsiR의 발현에 의하여 얻어질 수 있다는 사실을 보여준다. 본 발명자는 다음으로 야생형, *uirS*⁻, *uirR*⁻ 및 *lsiR*⁻ 세포 라인에서 *lsiR*의 발현이 단일 방향성의 백색광 (도 5G 및 H) 또는 청색, 녹색 및 적색 조명 하에서 음성 주광성을 유도할 수 있는지를 조사하였다. 흥미롭게도, 야생형에서 lsiR의 발현 뿐만 아니라 trc (도 5G) 또는 psbA (도 5H) 프로모터에 의해 유발된 UirS 위치 돌연변이 백그라운드는 백색(도 5G 및 H) 및 적색 광 하에서 감광성 방향을 양성에서 음성으로 전환 시킬 수 있었지만, 청색(B) 및 L 광 하에서는 전환시킬 수 없었고, 이는 R 의존성은 있지만, lsiR 발현에 대하여 독립적인 시그널링 UirS 시스템을 가리킨다. *LsiR* 발현은 오직 광에 의해서만 조절되는 것이 아니라, 무기탄소 및 철 제한, 과산화수소(H_2O_2)에 노출 및 강한 광을 포함하는 복합적인 스트레스에 의해서 자극되었다(Li et al.

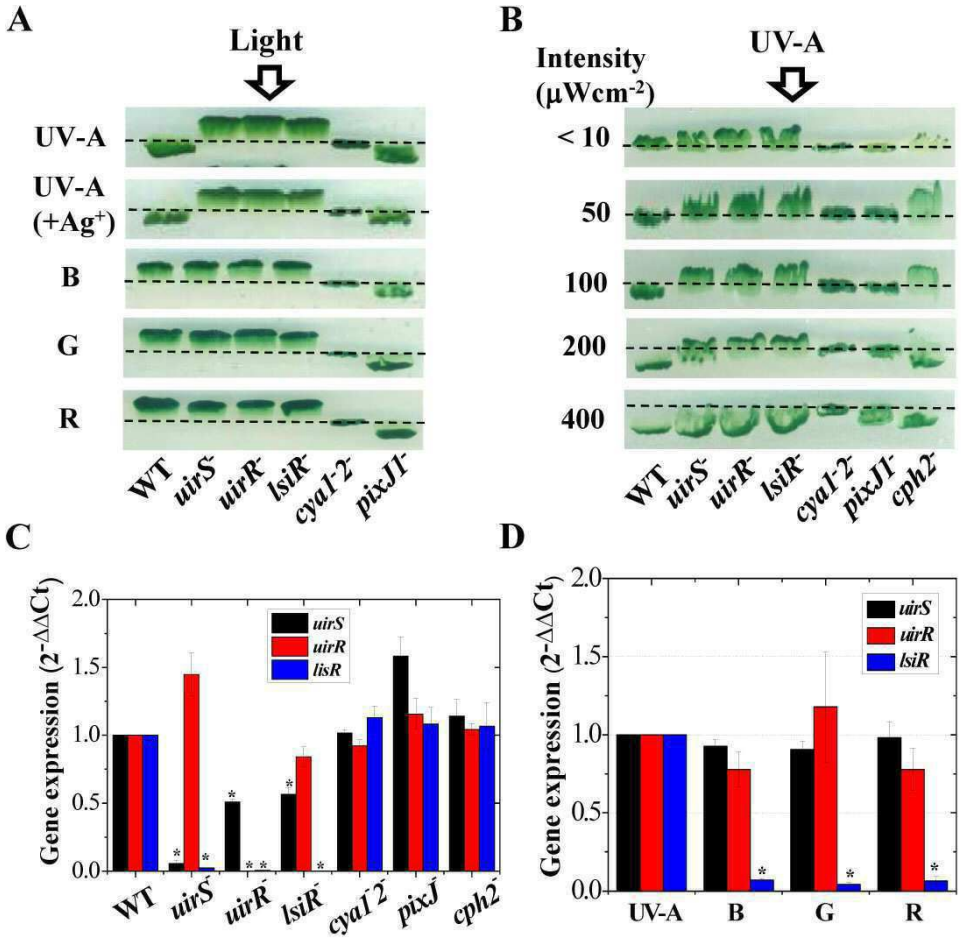
(2004) J. Bacteriol. *186,* 1331-1345). 이런 이유로, LsiR는 UirS UV-A 감지기가 없더라도 시네코시스티스의 움직임에 영향을 주는 광 및 스트레스 통합하는 조절자로서 기능을 한다.

도면

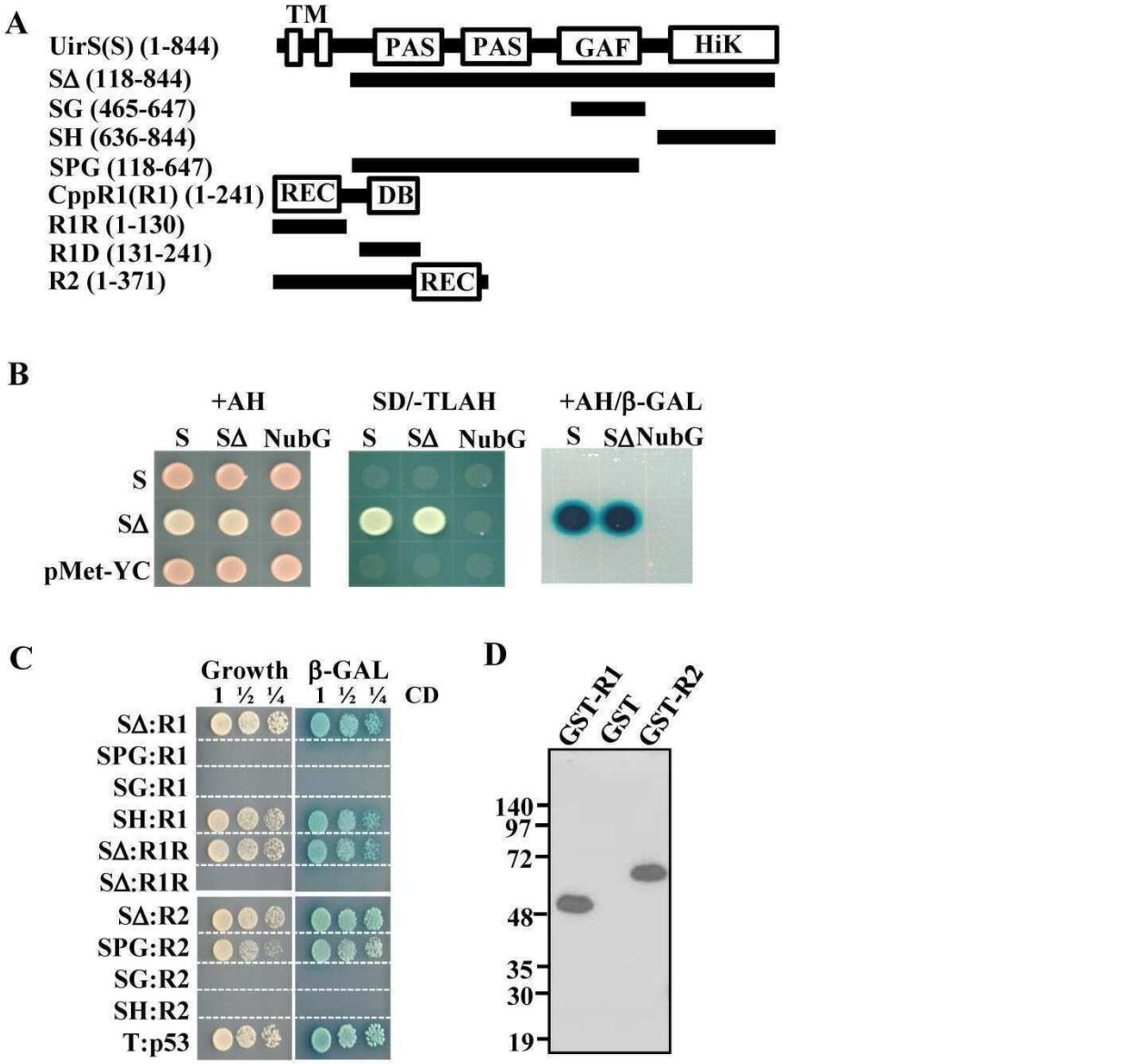
도면1



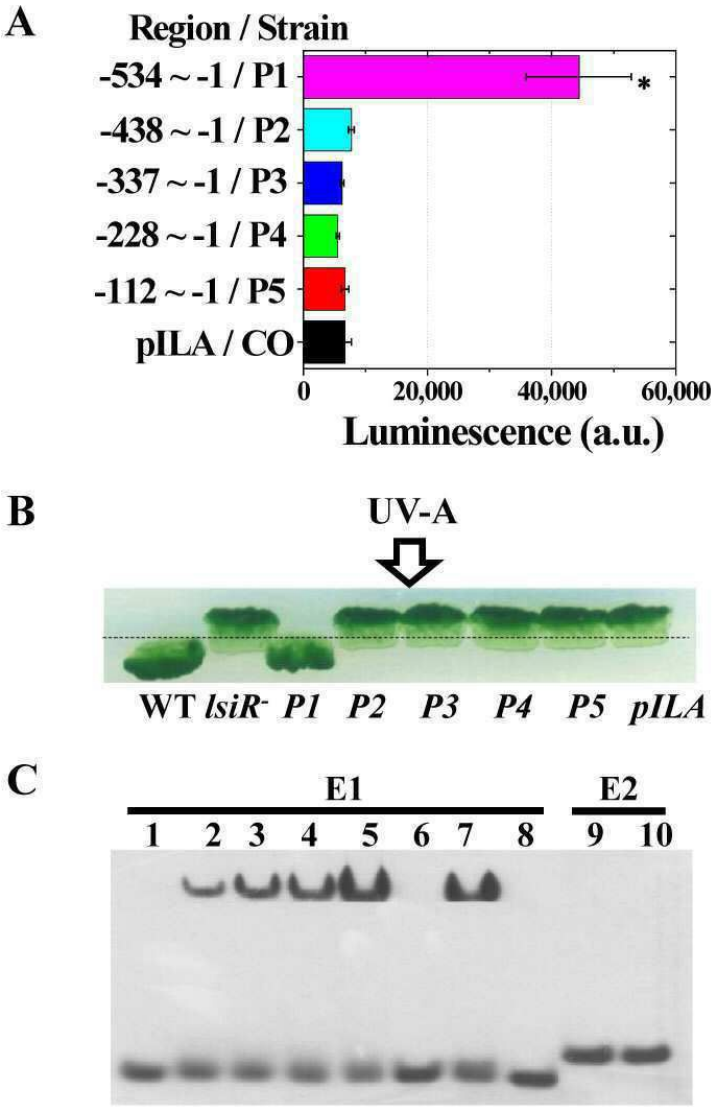
도면2


A
Light
UV-A
UV-A (+Ag+)
B
G
R
WT
uirS
uirR
lsiR
cya1-2
pixJ1
B
Intensity (μWcm-2)
UV-A
< 10
50
100
200
400
WT
uirS
uirR
lsiR
cya1-2
pixJ1
cph2
C
Gene expression (2-ΔΔCt)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
uirS
uirR
lisR
WT
uirS
uirR
lsiR
cya1-2
pixJ
cph2
D
Gene expression (2-ΔΔCt)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
uirS
uirR
lsiR
UV-A
B
G
R

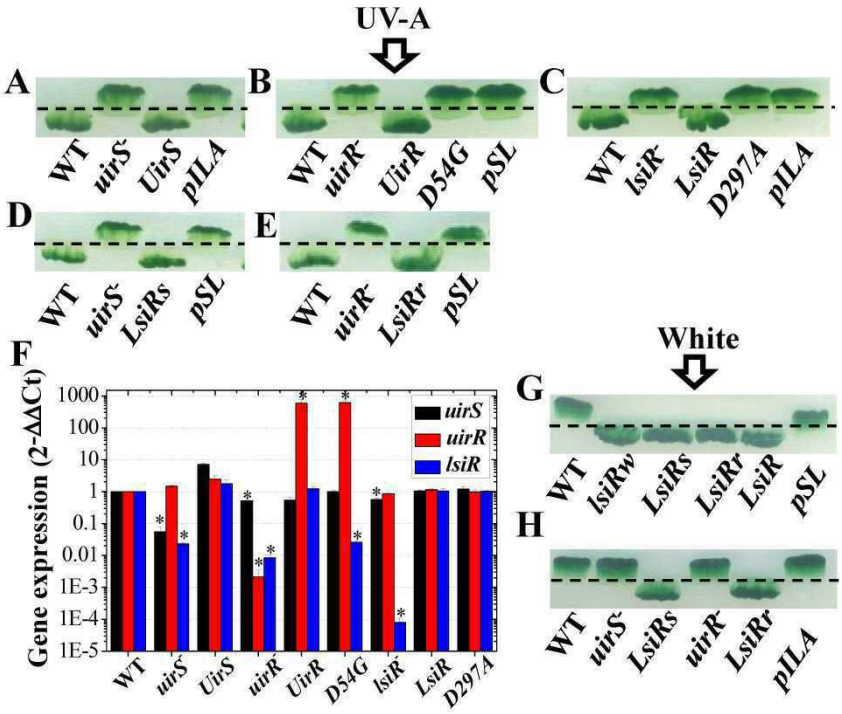
도면3


A
TM
UirS(S) (1-844)
PAS
PAS
GAF
HiK
SΔ (118-844)
SG (465-647)
SH (636-844)
SPG (118-647)
CppR1(R1) (1-241)
REC
DB
R1R (1-130)
R1D (131-241)
R2 (1-371)
REC
B
+AH
SD/-TLAH
+AH/β-GAL
S SΔ NubG
S SΔ NubG
S SΔNubG
S
SΔ
pMet-YC
C
Growth
β-GAL
1 ½ ¼
1 ½ ¼
CD
SΔ:R1
SPG:R1
SG:R1
SH:R1
SΔ:R1R
SΔ:R1R
SΔ:R2
SPG:R2
SG:R2
SH:R2
T:p53
D
GST-R1
GST
GST-R2
140
97
72
48
35
30
19

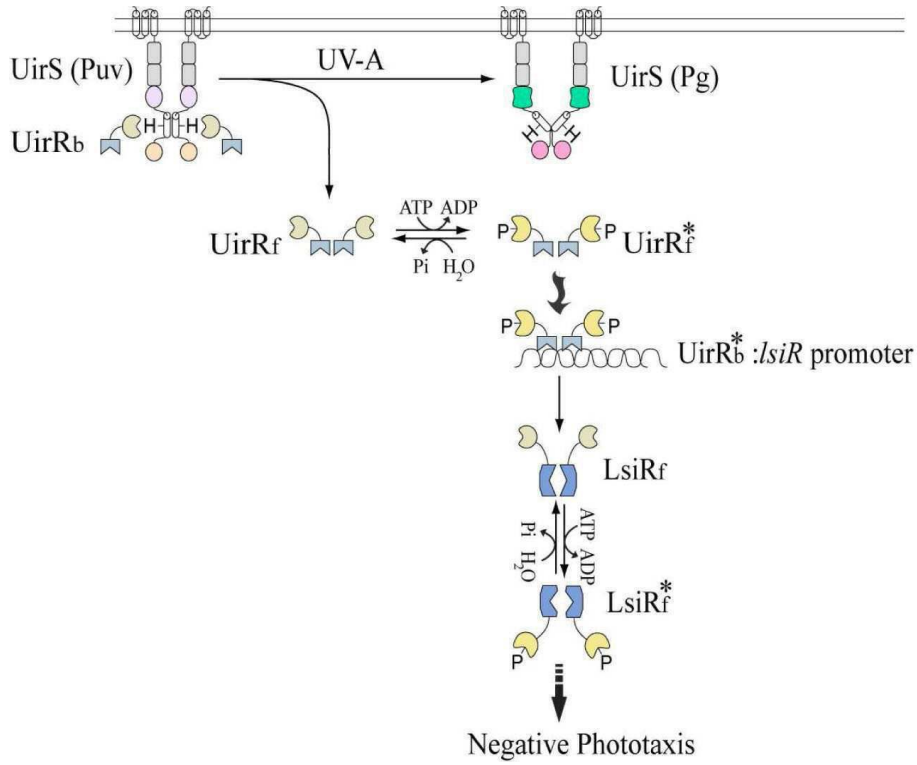
도면4


A
Region / Strain
-534 ~ -1 / P1
-438 ~ -1 / P2
-337 ~ -1 / P3
-228 ~ -1 / P4
-112 ~ -1 / P5
pILA / CO
*
0
20,000
40,000
60,000
Luminescence (a.u.)
B
UV-A
WT lsiR- P1 P2 P3 P4 P5 pILA
C
E1
E2
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

도면5



도면6



서 열 목 록

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

<120> Method for regulating phototaxis under UV-A illumination in Synechocystis sp. PCC 6803 using the UirR gene

<130> PN13052

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2535

<212> DNA

<213> Synechocystis sp. PCC 6803

<400> 1

atggcaatca ccgcatttac cctgggggat tttttccaag ccaacagcta tataccccac 60

ggccattgct acctttggca aactcccctg gtctggctcc acgtcagcgc tgatttttc 120

acggcgatcg cctactactc tattccctta actctgctct acttttgcg gaagcgccaa 180

gatattcctt ttcctaatat tattttcctg tttagtactt ttattttatg ctgtggcacc 240

agtcactttt ttgacattat caccctttgg taccctattt attggatatc cggtacagtc 300

aaagcctcca tggcgatcgt ctctattatc actgtgtttg aattaattca aattgtaccc 360

aatgccctaa atttaaaatc ccccacggaa ttagctaccc tcaatctggc tctaaatcaa 420

gaaattaaag aaaggcaaac agcggaaata gcattgcagg agttaaacaa taatcttgaa 480

aaaagagtgg aagaccgcac tacccaatta gcaaaaataa atcaacaatt agaacaggaa 540

attgaagata aaacccgggc aaaagaagat ctagaaaaaa ataaagatca attggcgcaa 600

ttggctgcta ttgtcgaatc ttcccaggac gcaattatta gtaaaaccct agatggtaac 660

atcaccagtt ggaacgagtc tgcggaaaga ttatttggct acacagcaga agaaatgatt 720

ggaagtcata tcaccaaact tattcctgag gaattaatct tggaagaaga ccttattgct 780

gaatgcatcc gccaaggtca gagaattaac acctacgaaa ctcaaagaca gcgtaaagat 840

ggtactaaaa ttgatgttgc cctgaccatt tctcccattc gagatgaaca caaaaatgta 900

gtgggagcct ccaaaattgt tagggatatt accgccagat tggatgtgga aaatgcccta 960

cgggaaagtc aatattttat tgaaaaatta gctaattatt ctccccagat tctttatatt 1020

ttagacccca ttgcttggaa aaatatttat gtcaattatc aatccttcga aatcctaggc 1080

tacactccag aagaatttaa aaatgggggа acggagctgt tgttaaatat tgtgcatccc 1140

gatgacatcc caacccttta cgaaaataag aatttttggc aaaagtccca ggaaggccaa 1200

gtgttgacca ctgaatatcg aatgcgccac aaaaatggtt cttggcggtg gctacgttct 1260

cgggaagtgg tttttgctag ggatgattat gggcaagtta ctaaggtttt gggcacagcc 1320

caggatatta gtgatagcaa agaacaggaa caaagacttt atgagcaagg ccgccgcgaa 1380

tcattattaa gggaaattac ccagcgtatc cgtcagtctt tagatctgcc aactattttt 1440
aacacagtag tgcaggaaat tcgtcagttt ttggaagcag atcgggtagt tatttttcag 1500
ttttcacccg actctgactt ttccgttggt aatattgtgg cagagtcggt attggctcca 1560
tttaagccaa tcattaatag tgcaattgaa gaaacttgtt ttagtaataa ctatgcccaa 1620
aggtatcagc agggcagaat tcaggtcatt gaggatattc accagtccca tcttaggcaa 1680
tgccacattg actttcttgc caggctacag gtcagggcaa acctagtgct accactaatt 1740
aatgatgcca ttttgtgggg cttattgtgt attcatcaat gtgacagttc tagagtttgg 1800

gaacaaacag aaattgatct gctcaagcag atcactaatc agtttgaaat tgccatccaa 1860
caggctactt tgtacgagca ggctcaacaa gaattggctt ctaaaaatca gctttttgta 1920
caattaacca acgaattaga gcaaaaaaaa gtattgctta aggaaattca tcatcgagtt 1980
aaaaacaatt tgcaaattat gtctagttta ctttatttgc aatttagtaa ggcttctcca 2040
gccatccagc aattgagtga ggaataccag aatcgcattc aatccatggc attgattcat 2100
gagcagttat atcgtagtga agacttagct aatattgatt ttagtcaata tcttaaaaat 2160
ttgactcaca atatctgcca aagttacggc tgtaatactg atagtattaa aattaaattg 2220

ttggttgaac aagttaaagt tcctttagag cagtccattc ctttgggatt aattattcag 2280
gaattagttt ccaatgcttt aaaacatgct ttcccaacga cggaagggga aatttcgatt 2340
aaattcactt caatgaacag tcactatagt ttacaggtgt gggataacgg agttggaatt 2400
tccagggata tagatttgga aaatacagat agtttgggca tgcaacttat ctacagccta 2460
actgaacaac tccagggaga attgcactat gaatatgtcg gtggcgctca atttgggttg 2520
gaattttcac tttag 2535

<210> 2
<211> 726
<212> DNA

<213> Synechocystis sp. PCC 6803
<400> 2

atggtaacca aaatactgat tgtagaggat gaaaggctag tggcccaaca cattgcccaa 60
ttattaaaaa gtgatggcta tgaaatttgt gtgatcgcca gtgatggagc aacggcgctg 120
aaaaaaattg ctgagtttta tccagatcta gttttactag atattcgtat taaaggagag 180
atcgacggga tagaggtggc ggaacggata aaatctcttt actccatccc cattgtttat 240
ctcacagctt tttctgatgg ggaaaccctg gagcgggccc agaaaaccaa tccccagggc 300

tatgtgatta agccttttcg gcgggaacaa ctattatcca ccgtggcgat cgccatagcc 360

aatcatcaac agcaacgaaa acctgaggaa gataccctct ccacgtcaac gggccattat 420

cgcctgcaac cgactttgga ctatatcgaa gagcatctcg accaaggaat taccgttgaa 480

tttctggccg gggcgatcgg catgagcaca gcctactttt gtcgcttttt ccaaaaggaa 540

atgggatgtt ccccctatca atttattatc caacaacggg ttgagcgggc caaagccata 600

ctactggaaa gagaattgtc cattagcgaa gtagctttga gatgcggctt cagttcccac 660

agtcaactta accaccattt tcgtaatctc ttgggcatta ccccgaaaga atatcgtagt 720

cgctag 726

<210> 3

<211> 1119

<212> DNA

<213> Synechocystis sp. PCC 6803

<400> 3

atgactgctg tgatcacccg ccaaattcct ggccaattcc tgcaaacctt aattaaggaa 60

aaagctaccg ggagactaac ggtatccaat cccctcgatg agttggtcac ctggcaggtc 120

tatcttggca aagggaaaat caattttgcc aacagtggtg taggggggaat gcaaagagtc 180

agatatctcc tgggtaatta cctgaacgaa aataaaatta gcctgccttc ccaaatctca 240

gatgactata aatatatctg tgatctttgg aaacaagaac tgatttcttt tcagcaaact 300

cgctcaattt taacccagtt tacccaggaa gcattggtgc acttttgtc tattcctatg 360

acccaatgtc actttgagca agaagatagc attaaagacc tatttctgaa tttagaatta 420

gctaaaacca cccaatcggt ggaacataaa attagatatt ggggagagtt atatccccag 480

atcaattcac ctttccagcg tcccttggtg gaggattggc aggaagtgaa aacgatgctg 540

aatttgagct atcgccgcag tgaacagtgg tgtgagcatt tattggaagg cttgggaaac 600

ttgtcttgtt tgtatgagct ggcccgaaaa actaacagca gtgttttaga gttggctttg 660

ttattttatc cacgggttaa atcgggagaa atcaaaatgt tgccctatca agaaatttca 720

gttgacgatg ccaacttccc cgtggtgatt tccgtcaaca atcgtccttc tgtacagaaa 780

attgtgcgag aaattttagg tcagcggggt tttaaagtgg tttgcattga cgatccctgc 840

cacgctttgg cggccgccat cagccataat ccccaattga ttctaattga cgctgagatg 900

ccggagatca gtggttatga gctttgccgt ttgttgcgaa aatcttctgc tgtgagggaa 960

actcccatta ttttactcaa ccaaaatgac ggggtaatgg agcaaattca agggcggtta 1020

gcgaaagcct ccggacagat caataaacag tttttatccc aggaattact gcaagtcaga 1080

aaaaactatt tagattctgt ccctgttctt tgtccctag 1119