



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월30일

(11) 등록번호 10-2038353

(24) 등록일자 2019년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6812 (2013.01)

G01N 21/64 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0005699

(22) 출원일자 2018년01월16일

심사청구일자 2018년01월16일

(65) 공개번호 10-2019-0087204

(43) 공개일자 2019년07월24일

(56) 선행기술조사문헌

Mohd Mohsin et al., 'Genetically encoded FRET-based nanosensor for in vivo measurement of leucine', Biosensors and Bioelectronics, 2013, Vol. 50, pp 72-77. 1부.*

Wooseok Ko et al., 'Engineering a periplasmic binding protein for amino acid sensors with improved binding properties', Org. Biomol. Chem., 2017, Vol. 15, pp 8761-8769. 1부.*

Amanda Mitchell, 'Development of a Novel Genetically Encoded FRET System Using the Unnatural Amino Acid Anap, Boston College Morrissey College of Arts and Sciences Graduate School, 2016.08. 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

이현수

경기도 김포시 김포한강3로 290-13, 601동 1902호(장기동, 고창마을 한양수자인 리버팰리스)

교우석

서울특별시 서초구 잠원로 88, 302동 708호(잠원동, 신반포아파트)

(74) 대리인

특허법인엠에이피에스

전체 청구항 수 : 총 6 항

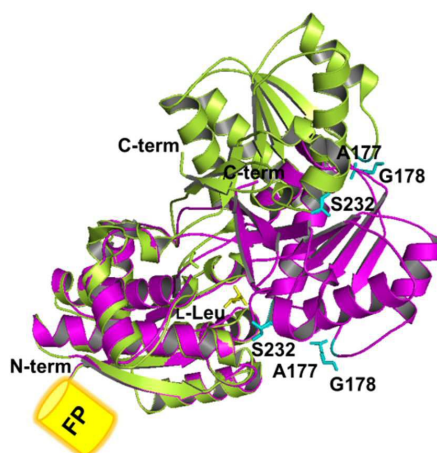
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 L-류신 검출용 FRET 센서, 및 이를 이용하는 L-류신 검출 방법

(57) 요약

L-류신 검출용 FRET 센서, 상기 L-류신 검출용 FRET센서를 이용한 L-류신 검출 방법, 및 상기 L-류신 검출용 FRET센서를 포함하는 L-류신 검출용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

G01N 33/54373 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201732016.01

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국생명공학연구원

연구사업명 글로벌프론티어사업

연구과제명 L-DOPA를 생합성하여 단백질에 도입하는 지능형 바이오시스템의 설계 및 합성

기 여 율 1/1

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

형광 공여체가 도입된 L-류신-결합 단백질; 및 형광 수용체 단백질을 포함하는, L-류신 검출용 FRET 센서로서, 상기 형광 공여체는 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신이며,

상기 형광 수용체 단백질은 황색 형광 단백질 (YFP), 변형된 황색 형광 단백질 (mYFP), 증강된 황색 형광 단백질 (eYFP), 녹색 형광 단백질 (GFP), 변형된 녹색 형광 단백질 (mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질 (eGFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 변형된 적색 형광 단백질 (mRFP), 증강된 적색 형광 단백질 (eRFP), 청색 형광 단백질 (BFP), 변형된 청색 형광 단백질 (mBFP), 증강된 청색 형광 단백질 (eBFP), 남색 형광 단백질 (CFP), 변형된 남색 형광 단백질 (mCFP), 증강된 남색 형광 단백질 (eCFP), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것이며,

상기 형광 공여체는 상기 L-류신-결합 단백질의 A177 또는 G178 위치에 도입된 것인,

L-류신 검출용 FRET 센서.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 형광 수용체 단백질은 상기 L-류신-결합 단백질의 N-말단에 연결된 것인, L-류신 검출용 FRET 센서.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 상기 L-류신 결합 단백질의 Trp18이 Val로 치환된 것이고; Met21이 Glu로 치환된 것이며;

상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신 외에 L-메티오닌도 추가 검출할 수 있는 것인, L-류신 검출용 FRET 센서.

청구항 8

제 1 항, 제 6 항, 및 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 L-류신 검출용 FRET 센서를 이용하는, L-류신의 검출

방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

L-류신의 농도에 따른 상기 FRET 센서의 FRET 비율의 변화를 측정함으로써 L-류신을 검출하는 것인, L-류신의 검출 방법.

청구항 10

제 1 항, 제 6 항, 및 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 L-류신 검출용 FRET 센서를 포함하는, L-류신 검출용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은, L-류신 검출용 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 센서, 상기 L-류신 검출용 FRET센서를 이용한 L-류신 검출 방법, 및 상기 L-류신 검출용 FRET센서를 포함하는 L-류신 검출용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 주변세포질 결합 단백질(periplasmic binding proteins, PBPs)은 세균 및 고세균에서 발견되는 널리 분포된 단백질 슈퍼패밀리의 구성원이며, 주화성(chemotaxis) 및 용질의 세포내 흡수를 매개한다. PBPs는 세포질 막-연관 단백질에 기질을 전달하며, 이것은 기질의 전좌(translocation)를 매개한다. 상기 단백질은 탄수화물, 비타민, 아미노산, 지질, 및 금속 이온과 같은, 필수 영양소들을 공급하는 데 있어 중요한 역할을 한다. PBPs는 흔히 지로 연결된 두 개의 구형 도메인으로 구성되어 있으며, 그들의 리간드-결합 위치는 상기 두 개의 도메인 사이에 위치하고 있다. 이러한 구조는 상기 단백질이 그들의 리간드의 유무에 따라 두 가지 다른 형태를 취할 수 있도록 하며, 구조적 변화는 일반적으로 PBPs의 구조적 특성 상 비정상적으로 크다.

[0003] 이러한 수용체는 그들의 동원(cognate) 리간드에 대해 높은 결합 친화도 및 특이성을 갖는다. 따라서, PBPs는 다양한 생체 분자를 특이적으로 검출하기 위한 바이오센서들을 개발하기 위해 고안되었으며, PBPs의 구조적 변화는 전기 신호, 자기 응답, 및 형광으로 변환된다. 이들 중에서, 형광-기반 센서는 민감도가 높고 엔지니어링이 용이하기 때문에 광범위하게 개발되어 왔다. 환경적으로 민감한 형광체인, 트립토판이 형광의 변화를 통한 리간드 결합에 따라 PBPs에서의 구조적 변화를 검출하는 데에 사용되었다. 상기 형광 신호를 향상시키기 위해, 환경적으로 민감한 형광체가 PBPs에 화학적 또는 유전적으로 도입되어, 리간드 결합을 성공적으로 검출하였다. 또 다른 PBP-기반 센서 설계 전략으로써, 형광 공여체 및 형광 수용체를 사용하여 리간드 결합에 따라 야기되는 두 개의 형광체 간의 거리 변화를 통해 형광 공명 에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET)의 변화를 측정함으로써 PBPs의 구조적 변화를 검출할 수 있다. 이러한 전략들을 사용하여, 말토오스, 글루코오스, 무기 인산염, 인산염, 및 티아민과 같은, 자연적으로 발생하는 소형 분자들이 마이크로몰 범위에서 성공적으로 검출되었다. 다수의 PBP-기반 형광 센서들이 보고되었음에도 불구하고, PBP에서 특정 잔기(트립토판 또는 시스테인)를 표적으로 하는 점, 형광 단백질 융합을 위해 N- 및 C-말단의 특정 위치를 요구하는 점, 및 리간드 결합 시 변화하는 낮은 신호들로 인하여, 다른 PBPs에서의 응용은 제한되었다. 그러므로, 생체분자에 대한 단백질 센서의 개발에 대한, 일반적으로 적용 가능한 전략들의 수요가 높다.

[0004] 일본공개특허 제2007-145478호는, 인산화 단백질 번역 측정용 시약에 대해 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본원은, L-류신 검출용 FRET 센서, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서를 이용한 L-류신 검출 방법, 및 상기 L-류신 검출용 FRET 센서를 포함하는 L-류신 검출용 조성물을 제공하고자 한다.

[0006] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본원의 제 1 측면은, 형광 공여체가 도입된 L-류신-결합 단백질(L-leucine binding protein, LBP); 및 형광 수용체 단백질을 포함하는, L-류신 검출용 FRET 센서를 제공한다.

[0008] 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 L-류신 검출용 FRET 센서를 이용하는, L-류신의 검출 방법을 제공한다.

[0009] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 L-류신 검출용 FRET 센서를 포함하는, L-류신 검출용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본원의 일 구현예에 따르면, 형광 비천연 아미노산을 L-류신-결합 단백질(L-leucine binding protein, LBP)에 유전자 도입하고, 상기 L-류신-결합 단백질을 황색 형광 단백질(yellow fluorescent protein, YFP)과 함께 융합하여 FRET 쌍 (FRET pair)을 형성함으로써 L-류신을 선택적으로 검출할 수 있는 FRET 센서를 제조할 수 있다.

[0011] 본원의 일 구현예에 따른 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는, L-류신을 제외한 나머지 19 개의 천연 아미노산 또는 D-류신에 대해서는 변화를 나타내지 않으며, L-류신에 대해서 선택적으로 작용한다.

[0012] 본원의 일 구현예에 따른 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는, 형광 비천연 아미노산이 상기 표적 단백질인 L-류신 결합 단백질의 임의의 자리에 위치될 수 있으며, FRET 수용체로서 하나의 형광 단백질이 사용된다는 장점을 갖는다. 이는 두 개의 형광 단백질을 요구하는 기존의 FRET 센서가 가지는 단점인, 큰 크기와 융합에 대한 제한적 위치를 개선하는 것이다.

[0013] 본원의 일 구현예에 따른 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는, 종래 센서와 비교하여 L-Leu 결합 시 FRET 신호의 변화가 더 높았고, 상기 FRET 센서의 조작을 통해 L-Leu에 대한 강한 결합 친화력 및 더 우수한 특이성을 갖는 돌연변이 단백질을 만들어냈다.

[0014] 본원의 일 구현예에 따른 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 우수한 FRET 변화를 나타냈으며, 간단한 돌연변이 유발에 의해 용이하게 조작될 수 있으며, 형광을 특징으로 한다. 또한, 이러한 L-류신 검출용 FRET 센서 설계 전략은 다른 PBP 및 수용체에도 적용될 수 있으므로, 생화학적으로 흥미로운 소형 분자를 검출하기 위한 단백질 센서를 설계하는 데에 있어 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, (a) CouA [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine]의 화학 구조 및 (b) L-Leu FRET 센서 단백질 설계의 모식도이다. 상기 모식도에서, 리간드-프리 형태 (PDB ID: 1USG) (녹색) 및 리간드-결합 형태 (PDB ID: 1USK) (마젠타)에서 LBP의 결정 구조가 중첩되어 있으며, LBP의 N-/C-말단, FP 융합의 위치, 및 CouA 결합 부위가 도시되어 있다.

도 2의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, CouA와 FP의 스펙트럼 중첩을 나타낸 것으로, (a) CouA 및 EGFP의 표준 흡수 및 방출 스펙트럼 및 (b) CouA 및 YFP의 표준 흡수 및 방출 스펙트럼을 나타낸다.

도 3의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, 정제된 FRET 센서 단백질의 SDS-PAGE 분석을 나타낸 것으로, 각각 A177 또는 G178에서 CouA를 함유하는 (a) EGFP-LBP 및 (b) YFP-LBP 돌연변이는 상응하는 tRNA/CouRS 쌍 및 CouA(1 mM)의 존재 하에 발현되었으며 Ni-NTA 친화성 크로마토 그래피로 정제되었다. 정제된 FRET 센서 단백질은 SDS-PAGE로 분석되었고, 쿠마시 염색 및 형광에 의해 시각화되었다.

도 4(a)는, 본원의 일 실시예에 있어서, EGFP₄-LBP-WT(왼쪽)와 EGFP₄-LBP-G178CouA(오른쪽)의 MALDI-TOF MS 분석을 나타낸 것이다. EGFP₄-LBP-WT와 EGFP₄-LBP-G178CouA 사이의 예상 질량 차이는 188 Da이며 관찰된 질량 차이는 188 Da이다.

도 4(b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, YFP₁₀-LBP-WT(왼쪽) 및 YFP₁₀-LBP-G178CouA(오른쪽)의 MALDI-TOF MS 분석을 나타낸 것이다. YFP₁₀-LBP-WT와 YFP₁₀-LBP-G178CouA 사이의 예상 질량 차이는 188 Da이며 관찰된 질량

차이는 196 Da이다.

도 5의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-Leu 결합 시 설계된 FRET 센서 단백질의 형광 스펙트럼을 나타낸 것으로, 각각 (a) EGFP-LBP FRET 센서 단백질 및 (b) YFP-LBP 센서 단백질에 대한 형광 스펙트럼은 360 nm에서 여기와 함께 표시된 L-Leu 농도에서 측정되었다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 L-Leu(지시 농도)].

도 6의 (a) 내지 (d)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-Leu 결합 시 FRET 센서 단백질의 FRET 비율(I_{FP}/I_{CouA}) 변화를 나타낸 것이다. I_{CouA} 및 I_{EGFP} 는 360 nm에서 여기 시 468 nm 및 518 nm에서 측정되었고, I_{CouA} 및 I_{YFP} 는 360 nm에서 여기 시 468 nm 및 537 nm에서 측정되었다. ΔR 은 R(각 L-Leu 농도에서의 FRET 비율)과 R_0 (L-Leu이 존재하지 않을 때의 FRET 비율) 사이의 차이를 나타낸다. FRET 비율 변화가 계산되었으며 각 농도에 대해 플롯되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM 센서 단백질, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 L-Leu(지시 농도)].

도 7은, 본원의 일 실시예에 있어서, 천연 아미노산과 D-Leu에 대한 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA의 선택도 분석을 나타낸 것이다. FRET 비율은 각 아미노산의 존재 및 부재 하에, 360 nm에서 여기 시, I_{CouA} , 468 nm 및 I_{YFP} , 537 nm에서 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM YFP₋₁₀-LBP-G178CouA, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 10 μ M 아미노산].

도 8(a)는, 본원의 일 실시예에 있어서, (a) L-Leu와 복합체를 이루는 LBP의 X-선 결정 구조에서 리간드 결합 부위를 나타낸 것이다. W18 및 리간드 L-Leu가 표시되어 있다. 도면은 PDB ID 1USK에서 캡처되었다.

도 8(b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-Leu 결합을 위한 W18에서 돌연변이를 포함하는 FRET 센서 단백질의 평가를 나타낸 것이다. 각 단백질의 FRET 비율 변화는 I_{CouA} , 468 nm 및 I_{YFP} , 537 nm에서 L-Leu의 존재 및 존재 하(50 μ M)에서 360 nm에서의 여기와 함께 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM FRET 센서 단백질, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 50 μ M L-Leu].

도 9의 (a) 내지 (h)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-Leu, L-Ile, L-Met, L-Phe 및 L-Val에 대해 설계된 돌연변이를 이용한 선택성 분석을 나타낸 것이다. FRET 비율은 360 nm에서의 여기 시, 각각의 아미노산의 존재 하(50 μ M) 및 부재 하에서 I_{CouA} , 468 nm 및 I_{YFP} , 537 nm에서 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM FRET 센서 단백질, 50 mM 인산 버퍼(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 50 μ M 아미노산].

도 10의 (a) 및 (b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, 천연 아미노산과 D-Leu에 대한 조작된 FRET 센서 단백질을 이용한 선택성 분석을 나타낸 것이다. 각각의 단백질의 FRET 비율 변화는 각 아미노산의 존재 및 부재 하에 360 nm에서 여기 시 I_{CouA} , 468 nm 및 I_{YFP} , 537 nm에서 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM FRET 센서 단백질, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 10 μ M 아미노산].

도 11(a)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-Leu와 복합체를 이루는 LBP의 X-선 결정 구조에서 리간드 결합 부위를 나타낸 것이다(W18, M21 및 N230이 표시되어 있음).

도 11(b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, M21E 또는 M21D 돌연변이를 포함하는 돌연변이 FRET 센서 단백질의 결합 특성 평가를 나타낸 것이다. 각 단백질의 FRET 비율 변화는 I_{CouA} 468 nm, 468 nm 및 I_{YFP} , 360 nm에서의 여기(500 nm) 및 L-Leu의 부재 시 537 nm에서 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM FRET 센서 단백질, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 500 nM L-Leu].

도 11(c)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-Leu로 적정된 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-M21E의 형광 스펙트럼 및 FRET 비율 변화를 나타낸 것이다. FRET 비율은 360 nm에서 여기 시 I_{CouA} , 468 nm 및 I_{YFP} , 537 nm에서 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-M21E, 50 mM 인산 완충액 (pH 9.0), 50 mM NaCl 및 L-Leu(지시 농도)].

도 12(a)는, 본원의 일 실시예에 있어서, L-Met로 적정된 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18V-M21E의 형광 스펙트럼 및 FRET 비율 변화를 나타낸 것이다. FRET 비율은 360 nm에서 여기 시 I_{CouA}, 468 nm 및 I_{YFP}, 537 nm에서 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100nM YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18V-M21E, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 L-Met(지시된 농도)].

도 12(b)는, 본원의 일 실시예에 있어서, 20 개의 천연 아미노산 및 D-Met에 대한 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18V-M21E의 선택성 분석을 나타낸 것이다. FRET 비율 변화는 각각의 아미노산이 존재하지 않고(10 μM) 360 nm에서 여기 시 I_{CouA}, 468 nm 및 I_{YFP}, 537 nm에서 계산되었다. 각각의 데이터 포인트는 세 번의 독립적인 실험의 평균을 나타낸다[분석 조건: 100 nM YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18V-M21E, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 10 μM 아미노산].

도 13은, 본원의 일 실시예에 있어서, 소 태아 혈청 (FBS)로 적정된 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA의 형광 스펙트럼 및 FBS에서 L-Leu 농도의 결정을 나타낸 것이다. 형광 스펙트럼은 360 nm 여기 시 FBS의 각 농도에서 측정되었다. 유도된 방정식을 사용하여 각 FBS 샘플에서 L-Leu의 농도가 결정되었다[분석 조건: 100 nM YFP₋₁₀-LBP-G178CouA, 50 mM 인산 완충액(pH 9.0), 50 mM NaCl 및 FBS(지시된 농도, 시판 FBS에 대한 상대 농도)].

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0017] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 “연결”되어 있다고 할 때, 이는 “직접적으로 연결”되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 “전기적으로 연결”되어 있는 경우도 포함한다.
- [0018] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 “상에” 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.
- [0019] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [0020] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0021] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [0022] 본원 명세서 전체에서, “비천연 아미노산”은 20가지 통상의 아미노산, 파이로리신 또는 셀레노시스테인이 아닌 아미노산을 지칭하며; 용어 “비천연 아미노산”과 유사한 의미로 사용될 수 있는 다른 용어는 “비천연적으로 코딩된 아미노산”, “자연적으로 존재하지 않는 아미노산” 등이 있다. “비천연 아미노산”은 천연적으로 코딩된 아미노산의 변형에 의해 자연적으로 발생하나, 그 자체가 번역 복합체에 의해 성장하는 폴리펩티드 내로 도입되는 않는 아미노산을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 천연적으로 코딩된 아미노산이란, 20가지 통상의 아미노산 또는 파이로리신 또는 셀레노시스테인을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본원 명세서 전체에서, “핵산”은 단일-또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오시드, 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오티드 및 그의 중합체를 지칭한다. 달리 구체적으로 제한하지 않는 한, 본 용어는 참고 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고, 천연 발생의 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 구체적으로 제한하지 않는 한, 본 용어는 또한

PNA(펩티도핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA 유사체(포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 등)를 비롯한 올리고뉴클레오타이드도 지칭한다. 달리 명시하지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 그의 보존적으로 변형된 변이체 및 상보적 서열뿐만 아니라, 명확히 특정된 서열을 포함한다.

[0024] 본원 명세서 전체에서, "폴리펩티드", "펩티드", 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 즉, 단백질에 대한 기술 사항은 동등하게 펩티드의 기술 사항 및 폴리펩티드의 기술 사항에도 적용되며, 반대의 경우도 마찬가지이다. 본 용어는 자연적으로 존재하는 아미노산 중합체뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본원에서 사용되는 바, 본 용어는 전체 길이의 단백질을 비롯한, 아미노산 잔기가 공유 펩티드 결합에 의해 연결되어 있는 임의 길이의 아미노산 쇄를 포함한다.

[0025] 본원 명세서 전체에서, FRET (형광공명에너지전이, fluorescence resonance energy transfer)의 기재는, 단파장 형광 단백질인 공여체 (donor)가 외부에서 에너지를 흡수하면, 상기 공여체의 여기 에너지가 빛 에너지로 방출되는 대신, 소정의 거리 안에 위치한 장파장 형광 단백질인 수용체 (acceptor)가 발광 없이 전달되어, 수용체의 장파장 형광만이 방출되는 현상을 의미한다. FRET에 의한 수용체 형광의 발생 또는 공여체 방출광의 소멸현상 (photobleaching)이 나타나려면 상기 공여체와 수용체가 매우 짧은 거리 (10 nm 미만)에 위치해야한다. 특정 파장의 빛을 내는 형광 단백질인 상기 공여체와 이 발광 에너지와 공명을 일으켜 에너지를 흡수할 수 있는 형광 단백질인 상기 수용체가 소정의 거리 이내로 가까워지면, 외부에서 상기 공여체를 여기시키기 위해 조사된 빛 에너지가 상기 공여체로부터 상기 수용체로 발광 없이 전달되어 공여체의 고유한 파장의 발광이 감소하고, 공여체로부터 에너지를 전달받은 수용체가 자신의 고유한 파장대의 빛을 발광하는 FRET 현상이 일어난다.

[0027] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.

[0029] 본원의 제 1 측면은, 형광 공여체가 도입된 L-류신-결합 단백질(L-leucine binding protein, LBP); 및 형광 수용체 단백질을 포함하는, L-류신 검출용 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 센서를 제공한다.

[0030] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는, 상기 형광 수용체 단백질과 상기 L-류신-결합 단백질의 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터를 준비하는 단계; 상기 발현 벡터의 핵산 서열 중 일부를 종결 코돈으로 치환하는 단계; 상기 발현 벡터에 상기 형광 공여체를 도입하는 단계; 상기 발현 벡터를 숙주세포에 의해 공동-형질전환시켜 FRET 센서를 획득하는 단계에 의해 제조되는 것일 수 있다.

[0031] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신을 제외한 나머지 19 개의 천연 아미노산 또는 D-류신에 대해서는 변화를 나타내지 않으며, L-류신에 대해서만 선택적으로 작용하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신에 의해 구조적 변화가 야기됨과 동시에 FRET 비율이 증가함으로써, L-류신과 구조적으로 유사한 아미노산인 D-류신을 포함하는 다른 아미노산에 대해서 L-류신만을 선택적으로 검출할 수 있다.

[0032] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열은 당업계에서 공지된 방법에 따라 선택적으로 또는 비선택적으로 변형될 수 있으며, 예를 들어, TAG, TGA, TAA, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 종결 코돈에 의하여 치환되는 것일 수 있다.

[0033] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열의 치환은 위치-특이적 돌연변이에 의해 수행되는 것일 수 있다.

[0034] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 숙주세포는 구체적으로 대장균일 수 있다. 예를 들어, 상기 종결 코돈으로 치환된 코돈을 가지는 단백질의 유전자를 포함하는 플라스미드, 적합한 tRNA 유전자를 포함하는 플라스미드, 및 적합한 아미노아실 tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 플라스미드를 숙주세포, 예를 들어, 대장균 내로 도입하여 형질전환 대장균을 제조하고, 상기 형질전환 대장균을 상기 형광 공여체가 포함된 배지에서 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체는 비천연 아미노산일 수 있으며, 예를 들어, 상기 비천연 아미노산은 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신 [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, CouA], 3-(6-아세틸나프탈렌-2-yl아미노)-2-아미노프로피온산 [3-(6-acetylnaphthalen-2-ylamino)-2-aminopropanoic acid], 아리코돈-2-yl알라닌[acridon-2-ylalanine], 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0036] 예를 들어, 상기 비천연 아미노산은 상기 아미노아실 tRNA 합성효소에 의하여 tRNA에 결합할 수 있고, 상기 비

천연 아미노산과 결합된 상기 tRNA는 상기 치환된 핵산 서열을 인식하여 코딩되는 단백질에 상기 비천연 아미노산을 코딩하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 비천연 아미노산은 단백질의 임의의 말단 위치 또는 임의의 내부 위치를 비롯한, 단백질 상의 임의의 위치에 존재할 수 있다. 상기 비천연 아미노산이 도입된 단백질은 생합성적으로 생산될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 "생합성적으로" 라는 것은 폴리뉴클레오티드, 코돈, tRNA, 및 리보솜 중 1개 이상을 사용하는 것을 포함하여, 세포성 번역 시스템을 사용한 방법을 의미하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 종래의 FRET 센서의 경우 형광 단백질의 도입이 N-말단 또는 C-말단에 한정되는 것인 반면, 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체로서 형광 비천연 아미노산은 상기 L-류신-결합 단백질의 어떠한 자리에도 혼입될 수 있다. 예를 들어, 상기 형광 공여체로서 형광 비천연 아미노산은 상기 L-류신-결합 단백질의 A177 또는 G178 위치에 유전자 융합을 통해 도입될 수 있다.

[0038] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체의 도입은 아미노산 돌연변이에 의해 달성되는 것일 수 있다.

[0039] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 수용체 단백질은 황색 형광 단백질 (YFP), 증강된 황색 형광 단백질 (eYFP), 변형된 황색 형광 단백질 (mYFP), 녹색 형광 단백질 (GFP), 변형된 녹색 형광 단백질 (mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질 (eGFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 변형된 적색 형광 단백질 (mRFP), 증강된 적색 형광 단백질 (eRFP), 청색 형광 단백질 (BFP), 변형된 청색 형광 단백질 (mBFP), 증강된 청색 형광 단백질 (eBFP), 남색 형광 단백질 (CFP), 변형된 남색 형광 단백질 (mCFP), 증강된 남색 형광 단백질 (eCFP), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있다.

[0040] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 수용체 단백질은 상기 L-류신-결합 단백질의 N-말단에 연결된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 형광 수용체 단백질은 구체적으로 황색 형광 단백질 또는 증강된 녹색 형광 단백질일 수 있으며, 상기 황색 형광 단백질 또는 증강된 녹색 형광 단백질이 상기 L-류신-결합 단백질의 N-말단에 융합되어 FRET 쌍 (FRET pair)를 형성하는 것일 수 있다.

[0041] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신 외에 L-메티오닌도 추가 검출할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서에서 상기 L-류신 결합 단백질의 Trp18이 Val로 치환되고, Met21이 Glu로 치환될 경우, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신 외에 L-메티오닌도 추가 검출할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0043] 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 L-류신 검출용 FRET 센서를 이용하는, L-류신의 검출 방법을 제공한다. 본원의 제 2 측면에 따른 L-류신의 검출 방법에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 2 측면에 동일하게 적용될 수 있다.

[0044] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는, 형광 공여체가 도입된 L-류신-결합 단백질 및 형광 수용체 단백질을 포함하는 것일 수 있다.

[0045] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서를 이용하여 L-류신을 검출하는 방법은, 상기 형광 수용체 단백질과 상기 L-류신-결합 단백질의 융합 단백질을 발현하는 발현 벡터를 준비하는 단계; 상기 발현 벡터의 핵산 서열 중 일부를 종결 코돈으로 치환하는 단계; 상기 발현 벡터에 상기 형광 공여체를 도입하는 단계; 상기 발현 벡터를 숙주세포에 의해 공동-형질전환시켜 FRET 센서를 획득하는 단계; 및 상기 획득된 FRET L-류신과의 반응을 통하여 L-류신을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0046] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-류신을 검출하는 것은, L-류신의 농도에 따른 상기 FRET 센서의 FRET 비율의 변화를 측정함으로써 수행되는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 FRET 비율의 변화는, L-류신(리간드)의 농도가 0 일 때의 FRET 비율 (R_0)에 대한 L-류신(리간드)의 농도가 x일 때의 FRET 비율 (R_x)을 측정함으로써 다음과 같은 식에 의하여 계산되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다:

[0047]
$$\text{FRET 비율 변화} = \Delta R/R_0 = R_x - R_0/R_0$$

[0048] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신을 제외한 나머지 19 개의 천연 아미노산 또는 D-류신에 대해서는 변화를 나타내지 않으며, L-류신에 대해서만 선택적으로 작용하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신에 의해 구조적 변화가 야기됨과 동시에 FRET 비율이 증가함으로써, L-류신과 구조적으로 유사한 아미노산인 D-류신을 포함하는 다른 아미노산에 대해서 L-류신만을 선택적으로

검출할 수 있다.

- [0049] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열은 당업계에서 공지된 방법에 따라 선택적으로 또는 비선택적으로 변형될 수 있으며, 예를 들어, TAG, TGA, TAA, 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 종결 코돈에 의하여 치환되는 것일 수 있다.
- [0050] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 핵산 서열의 치환은 위치-특이적 돌연변이에 의해 수행되는 것일 수 있다.
- [0051] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 숙주세포는 구체적으로 대장균일 수 있다. 예를 들어, 상기 종결 코돈으로 치환된 코돈을 가지는 단백질의 유전자를 포함하는 플라스미드, 적합한 tRNA 유전자를 포함하는 플라스미드, 및 적합한 아미노아실 tRNA 합성효소 유전자를 포함하는 플라스미드를 숙주세포, 예를 들어, 대장균 내로 도입하여 형질전환 대장균을 제조하고, 상기 형질전환 대장균을 상기 형광 공여체가 포함된 배지에서 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체는 비천연 아미노산일 수 있으며, 예를 들어, 상기 비천연 아미노산은 L-(7-하이드록시쿠마린-4-yl)에틸글리신 [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine], 3-(6-아세틸나프탈렌-2-yl)아미노-2-아미노프로피온산 [3-(6-acetylnaphthalen-2-ylamino)-2-aminopropanoic acid], 아리코돈-2-yl알라닌[acridon-2-ylalanine], 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0053] 예를 들어, 상기 비천연 아미노산은 상기 아미노아실 tRNA 합성효소에 의하여 tRNA에 결합할 수 있고, 상기 비천연 아미노산과 결합된 상기 tRNA는 상기 치환된 핵산 서열을 인식하여 코딩되는 단백질에 상기 비천연 아미노산을 코딩하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 비천연 아미노산은 단백질의 임의 말단 위치 또는 임의의 내부 위치를 비롯한, 단백질 상의 임의의 위치에 존재할 수 있다. 상기 비천연 아미노산이 도입된 단백질은 생합성적으로 생산될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 "생합성적으로" 라는 것은 폴리뉴클레오티드, 코돈, tRNA, 및 리보솜 중 1개 이상을 사용하는 것을 포함하여, 세포성 번역 시스템을 사용한 방법을 의미하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 종래의 FRET 센서의 경우 형광 단백질의 도입이 N-말단 또는 C-말단에 한정되는 것인 반면, 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체로서 형광 비천연 아미노산은 상기 L-류신-결합 단백질의 어떠한 자리에도 혼입될 수 있다. 예를 들어, 상기 형광 공여체로서 형광 비천연 아미노산은 상기 L-류신-결합 단백질의 A177 또는 G178 위치에 유전자 융합을 통해 도입될 수 있다.
- [0055] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 공여체의 도입은 아미노산 돌연변이에 의해 달성되는 것일 수 있다.
- [0056] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 수용체 단백질은 황색 형광 단백질 (YFP), 변형된 황색 형광 단백질 (mYFP), 증강된 황색 형광 단백질 (eYFP), 녹색 형광 단백질 (GFP), 변형된 녹색 형광 단백질 (mGFP), 증강된 녹색 형광 단백질(eGFP), 적색 형광 단백질 (RFP), 변형된 적색 형광 단백질 (mRFP), 증강된 적색 형광 단백질 (eRFP), 청색 형광 단백질 (BFP), 변형된 청색 형광 단백질 (mBFP), 증강된 청색 형광 단백질 (eBFP), 남색 형광 단백질 (CFP), 변형된 남색 형광 단백질 (mCFP), 증강된 남색 형광 단백질 (eCFP), 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0057] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 수용체 단백질은 상기 L-류신-결합 단백질의 N-말단에 연결된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 형광 수용체 단백질은 구체적으로 황색 형광 단백질 또는 증강된 녹색 형광 단백질일 수 있으며, 상기 황색 형광 단백질 또는 증강된 녹색 형광 단백질이 상기 L-류신-결합 단백질의 N-말단에 융합되어 FRET 쌍 (FRET pair)를 형성하는 것일 수 있다.
- [0058] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신 외에 L-메티오닌도 추가 검출할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서에서 상기 L-류신 결합 단백질의 Trp18이 Val로 치환되고, Met21이 Glu로 치환될 경우, 상기 L-류신 검출용 FRET 센서는 L-류신 외에 L-메티오닌도 추가 검출할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [0060] 본원의 제 3 측면은, 본원의 제 1측면에 따른 L-류신 검출용 FRET 센서를 포함하는, L-류신 검출용 조성물을 제공한다.
- [0061] 본원의 제 3 측면에 따른 L-류신 검출용 조성물에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 3 측면에

동일하게 적용될 수 있다.

[0063] 이하, 본원의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 본원의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것 일뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0065] **[실시예]**

[0066] 상업적으로 이용 가능한 모든 화학 물질들 및 DNA 올리고머들은 상업적인 공급원으로부터 획득되었으며, 더 이상의 정제 없이 사용되었다. 모든 자외선-가시광선 흡수 스펙트럼은 Jasco V-660 분광광도계로 측정되었고, 형광 스펙트럼은 Hitachi F-7000 형광 분광광도계를 사용하여 측정되었다.

[0068] **FRET 센서 설계**

[0069] 먼저, 표적 단백질이 상기 FRET 센서 단백질의 설계를 위해 선택되었다. 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*)으로부터 류신-결합 단백질(leucine-binding protein, LBP)이 구조적으로 잘 특성화되어 있으며, 리간드(L-Leu) 결합에 따라 큰 구조적 변화를 나타내기 때문에 표적 단백질로서 선택되었다. LBP는 세 개의 힌지(hinge)로 연결된 두 개의 구형 도메인으로 구성되어 있으며, LBP의 결정 구조는 리간드-프리 형태와 리간드-결합 형태로 보고되었다. 상기 N-말단 및 C-말단의 위치에 기초하여, 상기 N-말단이 FRET 변화를 최대화하기 위한 형광 단백질의 융합을 위해 선택되었다. 다음으로, 형광 비천연 아미노산인, CouA가 상기 LBP에 도입되었다. CouA는 상기 아미노산이 박테리아 발현 시스템과 양립이 가능하고, 화학적 합성에 의하여 쉽게 제조될 수 있기 때문에 선택되었다. CouA의 도입 위치는 도 1에서 나타낸 바와 같이, FRET 변화를 극대화하기 위하여 상기 도메인에서 N-말단 및 각각의 잔기(A142-E242) 사이의 거리를 측정함으로써 선택되었다. 상기 잔기 사이의 거리는 apo-형태 및 리간드-결합 형태에 대한 PyMol 소프트웨어를 사용하여 측정되었고, 차이가 계산되었다(표 1). 세 개의 잔기들(A177, G178, 및 S232)은 거리에서 가장 큰 변화를 나타냈으며, 이들 잔기들 중에서, A177 및 G178이 CouA로의 치환을 위해 선택되었다. 잔기 S232는 상기 두 도메인의 계면에 위치하며, 결합 친화도에 영향을 줄 수 있기 때문에 배제되었다(도 1).

표 1

Residue	Distance from Asp1 in the ligand-free form (Å)	Distance from Asp1 in the ligand-bound form (Å)	% change of the distance (%)
A142	58.95	55.59	5.70
I143	56.24	52.03	7.49
I144	57.05	50.20	12.01
H145	55.27	46.74	15.43
D146	56.32	44.80	20.45
K147	55.87	44.59	20.19
Q148	52.97	40.80	22.98
Q149	49.59	39.06	21.23
Y150	47.73	38.24	19.88
G151	50.29	41.64	17.20
E152	51.62	43.93	14.90
G153	48.15	42.34	12.07
L154	47.36	43.01	9.18
A155	50.85	46.49	8.57
R156	50.58	47.37	6.35
S157	47.31	46.13	2.49
V158	48.87	48.28	1.21
Q159	51.95	51.20	1.44
D160	49.97	51.03	-2.12
G161	48.13	50.95	-5.86
L162	51.28	53.85	-5.01
K163	53.35	55.83	-4.65
A164	50.72	55.47	-9.37
A165	51.09	57.47	-12.49
N166	54.89	59.73	-8.82
A167	55.55	59.08	-6.35
N168	58.80	60.65	-3.15
V169	58.27	58.03	0.41
V170	61.89	60.27	2.62
F171	61.41	57.76	5.94
F172	59.00	54.22	8.10
D173	60.24	52.91	12.17

[0070]

G174	59.45	50.01	15.88
I175	61.00	49.39	19.03
T176	61.34	47.21	23.04
A177	59.00	44.06	25.32
G178	61.11	44.71	26.84
E179	63.41	48.41	23.66
K180	65.18	49.99	23.30
D181	67.61	53.49	20.88
F182	66.07	54.15	18.04
S183	69.42	57.91	16.58
A184	69.58	58.76	15.55
L185	66.05	56.77	14.05
I186	66.43	58.26	12.30
A187	69.85	61.73	11.62
R188	68.34	61.24	10.39
L189	65.62	60.11	8.40
K190	68.39	63.31	7.43
K191	70.65	65.68	7.03
E192	67.87	64.32	5.23
N193	66.81	64.28	3.79
I194	63.17	60.66	3.97
D195	61.06	59.77	2.11
F196	57.72	56.19	2.65
V197	56.80	53.28	6.20
V198	53.47	49.83	6.81
Y199	53.82	47.44	11.85
G200	51.40	44.32	13.77
G201	51.95	41.92	19.31
Y202	51.98	40.19	22.68
Y203	53.38	41.39	22.46
P204	56.81	42.69	24.85
E205	57.97	45.40	21.68
M206	56.49	46.32	18.00
G207	58.24	46.82	19.61
Q208	61.58	49.14	20.20
M209	61.29	51.09	16.64

[0071]

L210	60.55	51.71	14.60
R211	63.44	52.97	16.50
Q212	65.86	55.34	15.97
A213	64.71	56.62	12.50
R214	65.28	57.72	11.58
S215	68.57	59.33	13.48
V216	69.94	61.98	11.38
G217	68.43	62.39	8.83
L218	65.83	60.65	7.87
K219	63.54	60.31	5.08
T220	60.94	57.88	5.02
Q221	57.28	55.16	3.70
F222	55.50	51.71	6.83
M223	51.85	48.60	6.27
G224	50.00	45.10	9.80
P225	46.60	41.66	10.60
E226	45.00	38.57	14.29
G227	47.44	37.87	20.17
V228	50.29	40.96	18.55
G229	48.53	40.17	17.23
N230	49.90	38.53	22.79
A231	51.42	39.45	23.28
S232	54.58	40.62	25.58
L233	54.98	43.29	21.26
S234	56.56	45.77	19.08
N235	58.54	45.42	22.41
I236	60.25	46.36	23.05
A237	60.40	48.98	18.91
G238	60.93	50.38	17.31
D239	61.02	52.99	13.16
A240	60.68	52.88	12.85
A241	56.91	49.64	12.77
E242	56.67	51.75	8.68

[0072]

[0074]

다음으로, FRET 수용체로서 형광 단백질(fluorescent proteins, FPs)이 고려되었다. 종래에는, 에머랄드 녹색 형광 단백질(emerald green fluorescent protein, EGFP)가 사용되었으며, CouA-EGFP 쌍은 좋은 FRET 신호를 나타냈다. CouA의 방출 스펙트럼과 EGFP의 흡수 스펙트럼은 우수한 스펙트럼 중첩을 나타낸다(도 2). 본원에서, FRET 수용체로서 황색 형광 단백질(yellow fluorescent protein, YFP)가 고려되었다. YFP의 흡수 스펙트럼이 CouA의 방출 스펙트럼과 EGFP의 흡수 스펙트럼보다 덜 중첩되었음에도 불구하고(도 2), YFP의 흡광 계수는 2 배 더 크며, 이것은 중첩이 덜 되는 점을 보상한다. 최적화를 위하여, 상이한 길이의 서로 다른 3 개의 링커들이 설계되었으며, 이들은 상기 형광 단백질과 상기 LBP 사이에 삽입되었다. 부가적인 링커 서열을 도입하는 대신, 형광 단백질의 C-말단에 있는 유연 서열(flexible sequence)을 각각 0 개, 4 개, 7 개, 및 10 개씩 순차적으로 제거하여 상이한 길이의 링커 총 16 개를 생성하였다(표 2).

표 2

Sensor proteins	Amino acid sequences in the linker region
EGFP ₀ -LBP-A177CouA	EGFP-AAAGITHGMDELYK-LBP
EGFP ₄ -LBP-A177CouA	EGFP-AAGITHGMMD-LBP
EGFP ₇ -LBP-A177CouA	EGFP-AAGITH-LBP
EGFP ₁₀ -LBP-A177CouA	EGFP-AAG-LBP
EGFP ₀ -LBP-G178CouA	EGFP-AAGITHGMDELYK-LBP
EGFP ₄ -LBP-G178CouA	EGFP-AAGITHGMMD-LBP
EGFP ₇ -LBP-G178CouA	EGFP-AAGITH-LBP
EGFP ₁₀ -LBP-G178CouA	EGFP-AAG-LBP
YFP ₀ -LBP-A177CouA	YFP-AAGITHGMDELYK-LBP
YFP ₄ -LBP-A177CouA	YFP-AAGITHGMMD-LBP
YFP ₇ -LBP-A177CouA	YFP-AAGITH-LBP
YFP ₁₀ -LBP-A177CouA	YFP-AAG-LBP
YFP ₀ -LBP-G178CouA	YFP-AAGITHGMDELYK-LBP
YFP ₄ -LBP-G178CouA	YFP-AAGITHGMMD-LBP
YFP ₇ -LBP-G178CouA	YFP-AAGITH-LBP
YFP ₁₀ -LBP-G178CouA	YFP-AAG-LBP

[0075]

[0077]

FRET 센서 단백질의 발현 및 정제

[0078]

상기 설계된 FRET 센서 단백질의 발현을 위한 플라스미드를 구축하기 위해, 상이한 링커 서열을 갖는 FP-융합 LBP를 인코딩하는 유전자를 pBAD 벡터에 삽입하여 pBAD-EGFP-LBP 및 pBAD-YFP-LBP 플라스미드를 생성하였다. 형광 단백질은 LBP의 N-말단에 융합되었으며, His₆-tag가 단백질 정제를 위해 LBP의 C-말단에 도입되었다. LBP에서 A177 또는 G178에 대한 코돈은 CouA의 도입을 위한 앰버 정지 코돈(TAG)으로 대체되었다. 상기 FRET 센서 단백질을 발현시키기 위해, 각각의 pBAD 플라스미드가 pEvol-CouRS과 함께 대장균 C321.A 균주로 공동-형질전환되었다.

[0079]

상기 LBP 유전자는 E. coli DH10βTM(Invitrogen 사, California USA)로부터 증폭되었으며, EGFP 및 YFP 유전자는 유전자 합성에 의해 상업적인 공급원으로부터 획득되었다. 상이한 링커 길이를 갖는 상기 FP-LBP (fluorescent proteins-leucine binding protein) 융합 유전자는 오버랩 연장 PCR에 의해 합성되었으며, pBAD/Myc-His(Invitrogen 사)에 삽입되어 pBAD-EGFP-LBP-WT 또는 pBAD-YFP-LBP-WT를 생성시켰다. 엔지니어링을 위해 앰버 코돈(TAG)을 상기 LBP 유전자 및 다른 모든 돌연변이의 177 위치 또는 178 위치로 도입하는 것은 제조사의 프로토콜(Invitrogen 사, California USA)에 따라, 위치-특이적 돌연변이에 의해 수행되었다.

[0080]

지정된 돌연변이를 갖는 FP-LBP 융합 유전자를 함유하는 각각의 pBAD 플라스미드는 pEvol-CouA-RS로 E. coli C321.A 균주(Addgene 사)에 공동-형질전환되었다. 형질전환된 세포들은 암피실린(100 µg/mL) 및 클로람페니콜(35 µg/mL)이 보충된 LB 브로스(lysogeny broth) 배지에서 증폭되었고, 초기 배양액이 37°C에서 암피실린(100 µg/mL), 클로람페니콜(35 µg/mL), 및 1 mM CouA [L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine]가 보충된 100 mL LB를 접종하기 위해 사용되었다. 단백질 발현은 0.2% L-아라비노스를 첨가하여 0.8(550 nm)의 광학 밀도에서 유도되었고, 배양은 37°C에서 밤새 진행되었다. 세포들은 4°C에서 10 분 동안 4,000 rpm에서 원심분리하여 수확되었으며, 추가 진행 때까지 -80°C에서 보관되었다. 각각의 세포 펠렛은 용해 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM 이미다졸, 및 pH 8.0)에서 재현탁되고 초음파 처리되었다. 표적 단백질은 제조사의 프로토콜(Qiagen 사, Hilden Germany)에 따라, 자연 조건 하에 Ni-NTA 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다. 정제된 단백질은 분석 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, 및 pH 9.0)에 대해 3 회 투석하여 상기 정제된 단백질에 결합된 L-Leu를 제거하였다.

[0081]

상기 FRET 센서 단백질(YFP₁₀-LBP-G178CouA, 서열번호1)은 CouA(1 mM)의 존재 하에 발현되었으며 Ni-NTA 친화

성 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다. 상기 정제된 단백질은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 분석되었다. 모든 돌연변이에 대하여, 전장(full-length) 단백질은 CouA 존재 하에 발현되었고, CouA의 도입은 형광 젤 이미징에 의해 확인되었다(도 3). 선택된 돌연변이는 MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) 질량 분광법(mass spectrometry, MS)에 의해 추가로 특성 분석 되었으며, CouA의 정량적인 도입이 확인되었다(도 4).

[0083] **FRET 센서 단백질의 FRET 변화 측정**

[0084] 다음으로, 형광 단백질의 C-말단에 있는 유연 서열을 순차적으로 제거한, 각각의 돌연변이 단백질(16 개의 단백질)이 표적 리간드인 L-Leu에 대한 FRET 센서로서 평가되었다. 16 개의 돌연변이 단백질은 각각 다음과 같다: EGFP₀-LBP-A177CouA, EGFP₋₄-LBP-A177CouA, EGFP₋₇-LBP-A177CouA, EGFP₋₁₀-LBP-A177CouA, EGFP₀-LBP-G178CouA, EGFP₋₄-LBP-G178CouA, EGFP₋₇-LBP-G178CouA, EGFP₋₁₀-LBP-G178CouA, YFP₀-LBP-A177CouA, YFP₋₄-LBP-A177CouA, YFP₋₇-LBP-A177CouA, YFP₋₁₀-LBP-A177CouA, YFP₀-LBP-G178CouA, YFP₋₄-LBP-G178CouA, YFP₋₇-LBP-G178CouA, YFP₋₁₀-LBP-G178CouA.

[0085] 제조된 FRET 센서 단백질 샘플(100 nM)은 L-Leu 또는 L-Met를 함유하는 분석 버퍼(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl 및 pH 9.0)에서 적정되었다. 각 샘플에 대한 형광은 360 nm의 여기 파장에서 420 nm 내지 600 nm까지 스캔되었으며, FRET 비율(R, I_{CouA}/I_{YFP})이 각각의 형광 스펙트럼으로부터 계산되었다. CouA(I_{CouA}), EGFP(I_{EGFP}), 및 YFP(I_{YFP})의 형광 강도는 360 nm에서 여기시키면서 468 nm, 518 nm 및 537 nm에서 측정되었다. FRET 비율 변화는 다음 방정식을 사용하여 계산되었다:

[0086] FRET 비율 변화 = $\Delta R/R_0 = R_x - R_0/R_0$

[0087] 여기서, R₀는 [리간드] = 0에서의 FRET 비율이고, R_x는 [리간드] = x에서의 FRET 비율이다. FRET 센서 단백질의 선택성을 확인하기 위해, 각 센서 단백질(100 nM)의 FRET 비율 변화가 360 nm의 여기 파장에서 각각의 아미노산이 없는 상태(지시된 농도) 및 존재 하에 분석 완충액에서 측정되었다. 모든 측정은 독립적으로 세 번 수행되었으며, 데이터는 평균화되었다. 상기 FRET 센서 단백질의 해리 상수는 Origin 소프트웨어를 사용하여 계산되었다.

[0088] 각 FRET 센서 단백질은 L-Leu로 적정되었으며, 형광 스펙트럼은 기록되었다(도 5). FRET 비율 변화($\Delta R/R_0$)는 계산되었으며[FRET 비율 변화 = $\Delta R/R_0 = (R_x - R_0)/R_0$], 상이한 농도의 L-Leu에 대하여 플로팅되었다.

[0089] L-Leu 적정 실험(도 6)을 기반으로, YFP₋₁₀-LBP-G178CouA([L-Leu] vs FRET 비율 변화)의 피팅 방정식이 파생되었다. 상기 방정식을 이용하여, FBS에서의 L-Leu의 농도가 계산되었다. YFP₋₁₀-LBP-G178CouA(100 nM)는 인산 완충 용액(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl, 및 pH 9.0)에 희석된 FBS(0.00025-, 0.0005-, 0.001-, 0.005-, 및 0.01-배 희석)로 적정되었으며, 각각의 샘플은 5 분 동안 실온에서 배양되었다. 360 nm의 여기 파장에서 형광이 측정되었으며, FRET 비율 변화가 계산되었다. 유도된 방정식 및 계산된 FRET 비율 변화를 이용하여, L-Leu의 농도가 결정되었다.

[0090] 모든 센서 단백질에 대해, FRET 비율 변화는 L-Leu 농도에 따라 증가하고 약 10 μ M 내지 50 μ M에서 포화되었다(도 6). YFP 융합을 갖는 상기 돌연변이 단백질은 EGFP 융합을 갖는 돌연변이보다 유의하게 더 큰 FRET 변화를 나타내었고, 178 위치는 CouA 통합을 위한 위치로서 177 위치보다 더 나은 결과를 나타내었지만, 그 차이는 미미 하였다. 흥미롭게도, 상기 링커의 FRET 비율 변화에 대한 영향은 중요하였으며, 동일한 링커는 EGFP 및 YFP 융합과 상이한 FRET 비율 변화를 보였다. 상기 FRET 비율 변화는 다음과 같은 순서로 나타났다: EGFP에 대해 EGFP₋₄ $\geq$ EGFP₀ > EGFP₋₇ $\geq$ EGFP₋₁₀, YFP에 대해 YFP₋₁₀ > YFP₋₄ > YFP₋₇ $\geq$ YFP₀, 상기 링커 의존성은 YFP 융합에 대해 더욱 높았다. YFP₀-LBP-G178CouA의 FRET 비율은 YFP의 C-말단에서 10 개의 아미노산을 제거할 때 2.5 배 증가하였다(YFP₋₁₀-LBP-G178CouA). 가장 큰 FRET 비율 변화는 EGFP 융합에 대해 EGFP₋₄-LBP-G178CouA, 및 YFP 융합에 대해 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA에서 관찰되었으며, 값은 각각 0.9 및 1.5였다.

[0091] EGFP₋₄-LBP-G178CouA는 EGFP에 융합된, 종래에 개발되었던 Gln 센서와 유사한 FRET 비율 변화를 나타냈으며, 본원의 센서 설계 전략이 다른 수용체에도 적용될 수 있음을 증명하였다. 놀랍게도, YFP로 EGFP를 대체하면 FRET

비율 변화가 1.5 배 이상 증가하였다. 또한, 각각의 FP에 대한 최적의 링커 서열은 상이했고, FRET 비율 변화에 대한 링커 영향은 EGFP- 및 YFP-융합 구조물에 따라 상이했다. 추가적인 조사를 위해 상기 센서의 Forster 거리(r_0)가 계산되었으며, 그것은 CouA-EGFP의 경우 49.2 Å, CouA-YFP의 경우 48.3 Å이었다. 상기 FRET 효율은 r_0 과 두 형광체 사이의 거리로 표현할 수 있다. EGFP-LBP-G178CouA 돌연변이와 YFP-LBP-G178CouA 돌연변이의 경우, 리간드 결합 전후 두 형광체 사이의 거리는 도 2에 나타난 FRET 실험으로부터 계산되었다(표 3). EGFP₋₄-LBP-G178CouA와 비교하여, YFP₋₁₀-LBP-G178CouA에서 두 개의 형광체는 상기 apo- 및 상기 리간드-결합 형태 모두에서 더 가까웠으며, 거리 변화는 상기 FRET 비율 변화에서 예상된 바와 같이, 1.5 배 더 컸다. 표 3에서 계산된 거리는 LBP의 N-말단에 융합된 EGFP와 YFP가 동일한 링커 내의 다른 위치에 있다는 것을 나타냈다. 2 개의 형광 단백질(EGFP, YFP)의 아미노산 서열은 유사하지만, 표면의 일부 잔기가 다르므로, FRET 효율에서 공간적으로 다른 위치 및 차이를 초래할 수 있다. EGFP₋₄-LBP-G178CouA와 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA의 FRET 비율 변화 사이의 차이점에 대한 다른 요소는 배향 인자(orientation factor, K^2)일 수 있으며, 이것은 상기 공여체의 방출 쌍극자 및 상기 수용체의 흡수 쌍극자의 방향에 의존한다. 상기 배향 인자는 에너지 전달 전에 회전 확산에 의해 상기 공여체와 상기 수용체가 무작위 배정된다고 가정 할 경우, Forster 거리를 계산할 때 2/3으로 가정한다. EGFP-LBP-CouA 및 YFP-LBP-CouA에 대한 r_0 의 계산을 위해, 동일한 값이 사용되었다. 그러나, 형광 단백질의 형광단은 구조적으로 견고하며, 이러한 추정은 실제 가치와는 거리가 멀 수 있다. 양자 화학 연구를 바탕으로 한 최근의 연구는 상기 가설을 뒷받침하지만, 보다 상세한 연구 또는 토론은 이러한 연구의 범위를 벗어난다. 그러므로, EGFP와 YFP 융합의 FRET 비율 차이의 변화에 대한 본원의 설명은, 상기 두 개의 형광 단백질의 공간적으로 다른 위치 및/또는 r_0 의 계산을 위한 배향 요소의 추정 오류이다.

표 3

Sensor proteins	Distances between two fluorophores		Distance changes
	Apo-form	L-Leu bound form	
EGFP ₀ -LBP-G178CouA	65.13 nm	57.85 nm	7.28 nm
EGFP ₋₄ -LBP-G178CouA	66.59 nm	58.75 nm	7.84 nm
EGFP ₋₇ -LBP-G178CouA	65.22 nm	59.70 nm	5.52 nm
EGFP ₋₁₀ -LBP-G178CouA	65.30 nm	59.65 nm	5.65 nm
YFP ₀ -LBP-G178CouA	64.20 nm	57.79 nm	6.41 nm
YFP ₋₄ -LBP-G178CouA	64.25 nm	55.74 nm	8.51 nm
YFP ₋₇ -LBP-G178CouA	64.47 nm	57.98 nm	6.49 nm
YFP ₋₁₀ -LBP-G178CouA	64.48 nm	52.68 nm	11.8 nm

[0092]

[0094]

FRET 센서 단백질의 결합 친화도 및 특이성

[0095]

상기 적정 실험 결과로부터, YFP₋₁₀-LBP-G178CouA 및 L-Leu에 대한 EGFP₋₄-LBP-G178CouA의 해리 상수를 획득하였다. 해리 상수 값은 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA의 경우 405 ± 56 nM이었고 EGFP₋₄-LBP-G178CouA의 경우 334 ± 17 nM이었다. 상기 두 개의 센서는 거의 동일한 결합 친화력을 가지며, N-말단 융합에 사용된 형광 단백질의 차이가 상기 FRET 센서 단백질의 결합 친화력의 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. 상기 보고된 값($K_d=400$ nM)에 대한 이들의 결합 친화력의 비교는, CouA 및 FP 융합이 최소 섭동을 유발하고 LBP의 결합 친화도에 영향을 주지 않았음을 확인한다. 다음으로, L-Leu에 대한 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA의 결합 특이성을 다른 모든 천연 아미노산 및 D-Leu에 대한 FRET 비율 변화를 측정하여 평가 하였다. FRET 비율 변화는 10 μ M에서 L-Leu에 대해

1.37이었고, 동일한 농도에서 다른 모든 시험된 아미노산에 대해 0.16 미만 이었다(도 7). 상기 센서는 구조적으로 유사한 지방족 아미노산인, L-Ile, L-Val 및 L-Met에 대해 약한 친화성을 나타냈으며, D-Leu를 비롯한 다른 아미노산에 대해서는 무시할 수 있을만한 친화성을 나타냈다.

[0097] **L-Leu에 대한 특이성 향상을 위한 센서 엔지니어링**

[0098] 상기 FRET 센서 단백질은 L-Leu 결합 시 우수한 FRET 신호를 나타냈지만, 상기 센서는 구조적으로 유사한 아미노산을 여전히 인식하였으며, 이것은 LBP의 고유한 특성이다. 결합 특이성을 향상시키기 위해, YFP₋₁₀-LBP-G178CouA(서열번호 1)는 L-Leu 결합 부위에서 잔기를 돌연변이 시킴으로써 조작되었다. LBP의 X-선 결정 구조로부터, Trp18은 상기 수용체와 L-Leu 사이의 상호 작용에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다[도 8의 (a)]. Trp18은 위치-특이적 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)에 의해 다른 아미노산(Tyr, Phe 및 Cys를 제외한 16 개의 아미노산)으로 돌연변이 되었으며 [W18L, W18P, W18V, W18A, W18I, W18M, W18H, W18G, W18S, W18T, W18E, W18Q, W18D, W18N, W18K, W18R], 각각의 돌연변이는 발현되고, 정제되었으며, 결합 특이성이 테스트되었다. 먼저, 상기 정제된 돌연변이는 L-Leu 결합에 대해 평가되었고, 7 개의 돌연변이[W18L, W18P, W18V, W18A, W18I, W18M, W18H]는 1.0 초과의 FRET 비율 변화를 나타내었다[도 8의 (b)]. 상기 7 개의 돌연변이는 그 후 50 μ M에서 L-Ile, L-Met, L-Phe, 및 L-Val에 대한 결합 친화도에 대해 테스트되었으며, W18P 또는 W18L 돌연변이를 함유하는 두 개의 돌연변이 [YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18L(서열번호 2), YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18P(서열번호 3)]는 L-Ile, L-Met, L-Phe, 및 L-Val 및 원래의 FRET 센서 단백질의 L-Leu에 대한 비교 가능한 결합 친화도에 대해 감소된 결합 친화도를 나타냈다(도 9). 이러한 돌연변이 센서들은 모든 천연 아미노산과 D-Leu에 대해 평가되었으며, 10 μ M에서 L-Leu를 제외한 다른 모든 아미노산에 대해 가장 낮은 친화도를 나타냈다(도 10).

[0100] **L-Leu에 대한 친화도 향상을 위한 센서 엔지니어링**

[0101] LBP를 조작하는 동안, Glu에 대한 Met21 돌연변이(M21E mutation)가 수용체의 결합 친화도를 유의하게 증가시키는 것이 발견되었다. 동일한 실험을 반복하였고 돌연변이에 의한 결합 친화성의 증가가 실제임을 증명하는 동일한 결과를 나타냈다. LBP의 X-선 구조가 상기 결과를 설명하기 위해 주의 깊게 관찰되었으며, 상기 리간드-결합 구조는 모호하지 않은 설명을 보여주었다. 상기 구조에서, Asn230은 Met21 근처에서 발견되었고, Met을 Glu로 대체한 경우 Asn230과 Glu21은 수소 결합을 형성하여 리간드 결합 구조를 안정화시키고 결합 친화성을 증가시켰다[도 11의 (a)]. Asp는 또한 동일한 위치에 도입되었고, 상기 돌연변이의 결합 친화도가 측정되었다[도 11의 (b)]. 대조적으로, 상기 M21D 돌연변이는 결합 친화성이 감소 되었는데, Asp21과 Asn230이 너무 멀리 떨어져서 수소 결합을 형성하기 어려운 것으로 예측된다. 상기 M21E 돌연변이(YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-M21E, 서열번호 4)의 결합 친화도는 L-Leu를 이용한 적정 실험에서 평가되었으며, 해리 상수는 28.4 ± 3.7 nM로, WT LBP보다 14 배 낮았다[도 11의 (c)].

[0103] **다른 아미노산의 인식을 위한 센서 엔지니어링**

[0104] 도 9에 제시된 결과로부터, W18P 또는 W18L 돌연변이를 함유하는 2 개의 돌연변이는 개선된 L-Leu 특이성을 갖는 센서로서 확립되었다. W18V는 그 결과에서 흥미로운 또 다른 돌연변이였으며, 상기 W18V 돌연변이 FRET 센서 단백질은 유사한 친화력으로 L-Met와 L-Leu를 인식했다. 상기 W18V 돌연변이의 결합 친화력을 증가시키기 위해, 상기 M21E 돌연변이가 도입되었고, W18V 및 M21E 돌연변이를 갖는 FRET 센서 단백질 [YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18V-M21E(서열번호 5)]이 L-Met로 적정 실험되었다[도 12의 (a)]. FRET 비율 변화는 포화 상태에서 1.4까지 증가하였고, L-Met에 대한 센서의 해리 상수는 2.8 ± 0.15 μ M이었다. L-Leu에 대한 상기 센서의 결합 친화도는 L-Leu에 대한 WT LBP의 결합 친화도보다는 약간 낮았고, 상기 센서는 L-Leu를 제외한 다른 천연 아미노산을 인식하지 못했으며 D-Met에 대한 친화도가 가장 낮았다[도 12의 (b)]. 따라서, 본원의 센서 설계 전략은 우수한 친화성 및 선택성으로 다른 천연 분자들을 인식 할 수 있는 수용체를 성공적으로 설계 할 수 있도록 하였다.

[0106] **FRET 센서 단백질의 응용**

[0107] 인산 완충액(50 mM NaH₂PO₄, 50 mM NaCl 및 pH 9.0) 중 L-아미노산 및 D- 아미노산의 스톱 용액(10 μ M)이 표시된 비율(총 부피 200 μ L)로 혼합되었다. 다음으로, 동일한 인산 완충액에서 상응하는 FRET 센서 단백질(100 nM, 최종 농도)을 첨가되었고, 360 nm의 여기 파장에서 형광이 측정되었다. L-Leu 및 L-Met 적정 실험으로부터 유도된 방정식을 사용하여, 광학 순도가 결정되었다.

[0108]

표적 단백질인 LBP를 조작함으로써, 상기 수용체의 리간드 특이성 및 결합 친화력이 개선될 수 있으며, 수용체의 결합 분자가 L-Met로 확장 될 수 있다. 확립된 돌연변이 센서 중 일부는 생물학적 샘플에서 L-Leu 농도를 측정하고 형광으로 Leu 및 Met의 광학 순도를 결정하는 데 사용된다. 도 6 및 도 12의 적정 곡선으로부터, L-Leu에 대한 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA, 및 L-Met에 대한 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18V-M21E의 피팅 방정식이 도출되었고, Leu 및 Met의 L-Leu 농도 및 광학 순도가 측정되었다. 소 태아 혈청(FBS)의 L-Leu 농도는 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA로 측정되었다. FBS는 단백질, 영양소, 호르몬 및 외인성 물질의 복합체이며, FBS 자체는 360 nm의 여기 파장에서 형광을 띤다. 그럼에도 불구하고, 상기 FRET 센서 단백질은 표적 분석물에 강한 결합 친화력을 가지며, 리간드 결합 시 높은 FRET 변화를 나타내므로, FBS에서의 L-Leu 농도는 미세한 교정과 함께 용이하게 측정되었다. YFP₋₁₀-LBP-G178CouA는 상이한 농도의 FBS와 혼합되어 형광 신호가 측정되었다(도 13). 상기 결과로부터, L-Leu 농도는 문헌 값(80 μ M)에 필적하는 $62.3 \pm 3.1 \mu$ M으로 결정되었다.

[0109]

또한, YFP₋₁₀-LBP-G178CouA 및 YFP₋₁₀-LBP-G178CouA-W18V-M21E를 사용하여 Leu 및 Met의 광학 순도가 측정되었다. 광학 순도는 입체 중심을 갖는 화합물의 중요한 물리적 특성이며, 전형적으로 편광계에 의해 측정된 특정 회전으로부터 계산된다. 그러나, 상기 방법은 일반적으로 시료의 고농도(전형적으로 밀리몰 및 많은 경우 10 mM 초과) 및 10 mL 용량 이상의 시료를 필요로 한다. 상기 FRET 센서 단백질이 Leu 및 Met의 광학 순도를 측정하는 데 사용될 수 있음을 입증하기 위해, 아미노산의 L-이성질체 및 D-이성질체를 규정된 농도로 혼합하고, 형광 강도를 측정하여 L- 이성질체의 백분율을 계산하였다. 측정된 백분율은 이론 값과 비교되었다(표 4). 상기 센서는 D-이성질체에 대한 친화도가 적으며, 아미노산의 광학 순도를 형광 강도로부터 높은 정확도로 쉽게 측정 할 수 있었다. 거울상 이성질체의 광학 순도를 측정하는 데 사용할 수 있는 기술이 제한되어 있다는 것을 고려하면, 상기 간단한 실험은 설계된 센서를 사용하는 형광 기반 방법이 아미노산의 광학 순도를 측정하는 데 유용한 대안이 될 수 있음을 나타낸다. 또한, LBP 또는 다른 아미노산 수용체의 추가 조작은 다른 아미노산들의 광학 순도를 측정하기 위해 확장 할 수 있다.

표 4

Sample	[L-isomer] (μ M)	[D-isomer] (μ M)	Theoretical ee [%]	Measured ee [%]	
				Leu	Met
1	0	10.0	-100	-99.75 (± 0.19)	-99.42 (± 0.21)
2	1.0	9.0	-80	-79.10 (± 0.86)	-79.19 (± 0.76)
3	2.5	7.5	-50	-51.35 (± 2.05)	-51.12 (± 0.55)
4	4.0	6.0	-20	-21.12 (± 1.44)	-19.93 (± 2.91)
5	5.0	5.0	0	-0.12 (± 1.88)	0.74 (± 1.78)
6	6.0	4.0	20	19.03 (± 0.72)	18.47 (± 2.82)
7	7.5	2.5	50	49.25 (± 1.02)	50.80 (± 2.16)
8	9.0	1.0	80	81.18 (± 2.52)	79.58 (± 3.54)
9	10.0	0	100	99.73 (± 3.33)	99.63 (± 4.06)

[0110]

[0111]

요약하면, L-류신-결합 단백질은 리간드 결합 시 FRET 변화에 의해 L-Leu를 검출하도록 조작되었다. EGFP 또는 YFP를 FRET 수용체로서 상기 단백질의 N-말단의 융합시키고, 형광 비천연 아미노산인 CouA를 유전적으로 단백질에 혼입시켰다. CouA가 178 위치에 결합되고, YFP가 N-말단에 융합되었을 때, 상기 FRET 센서 단백질은 FRET 비율에서 2.5 배의 증가를 나타냈다. 공학적 LBP는 L-Leu에 대한 기질 특이성을 상당히 개선시켰고, 다른 19 개의 천연 아미노산 및 D-Leu와의 적은 FRET 변화를 나타냈다. 추가적인 조작은 상기 FRET 센서 단백질이 L-Leu에 대해 더욱 민감하였으며(14 배), 상기 FRET 센서 단백질은 L-Met 또한 우수한 결합 친화력으로 인식하였다. 선택된 돌연변이 센서는 FBS 내의 L-Leu 농도를 측정하는 데에 적용되었고, 상기 센서의 형광 강도로부터 Leu 및 Met의 광학 순도가 결정되었다. 이러한 FRET-기반 센서 설계 전략은 자연적인 수용체를 쉽게 조작하여

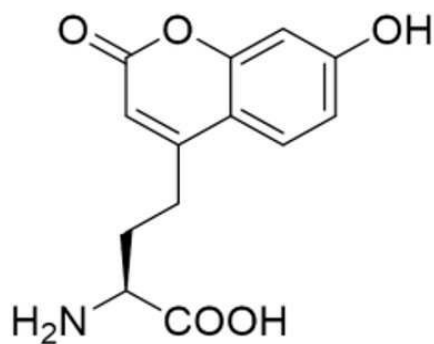
결합 친화성 및 특이성을 향상시키고, WT 수용체에 대해 리간드가 아닌, 다른 천연 분자들을 인식할 수 있도록 하였다. 상기 설계 전략은 다른 천연 수용체에도 적용될 수 있으며, 이는 상기 수용체가 생화학적으로 흥미로운 분자들을 감지할 수 있도록 할 수 있다.

[0113] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

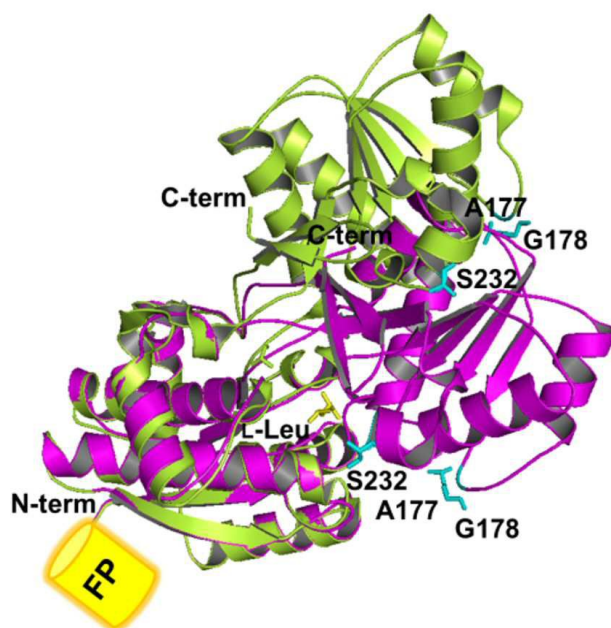
[0114] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

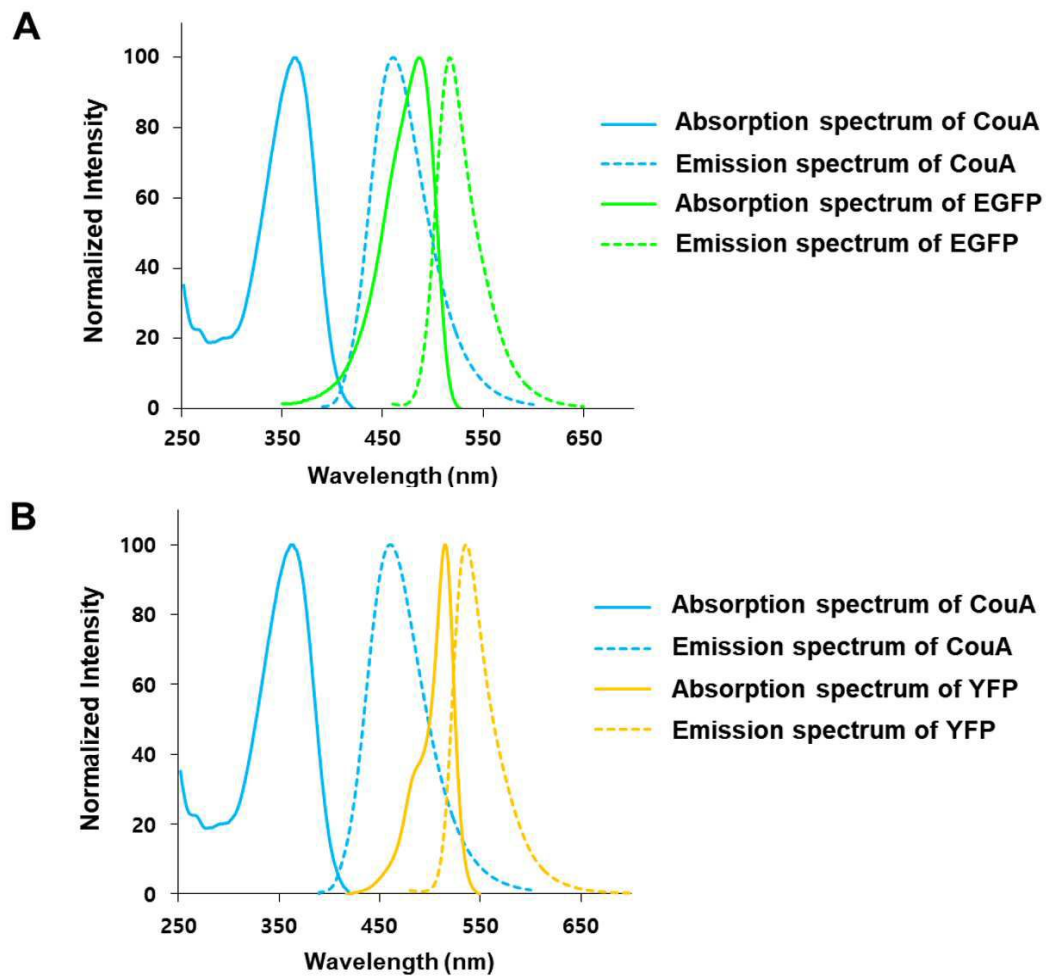
도면1a



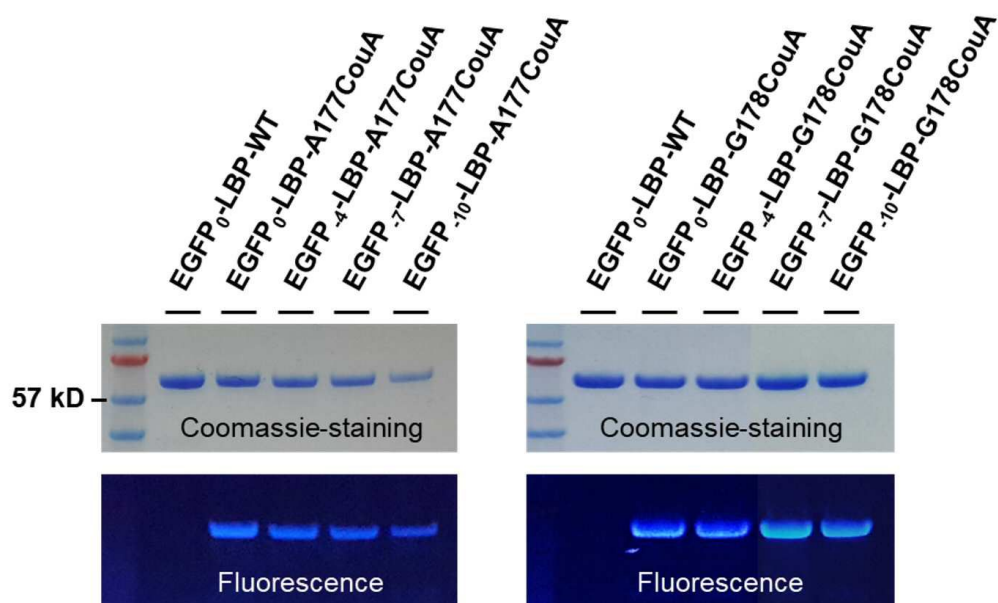
도면1b



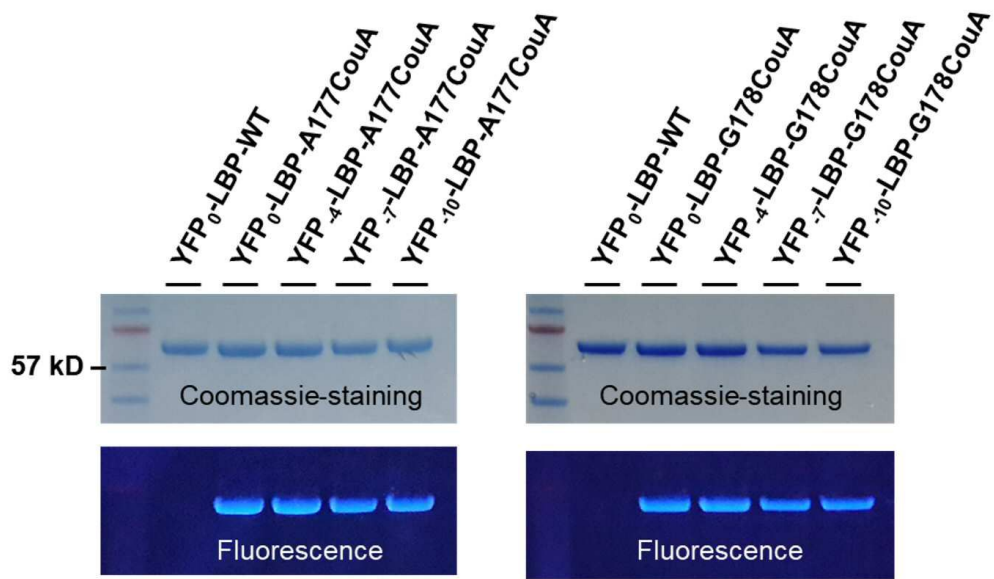
도면2



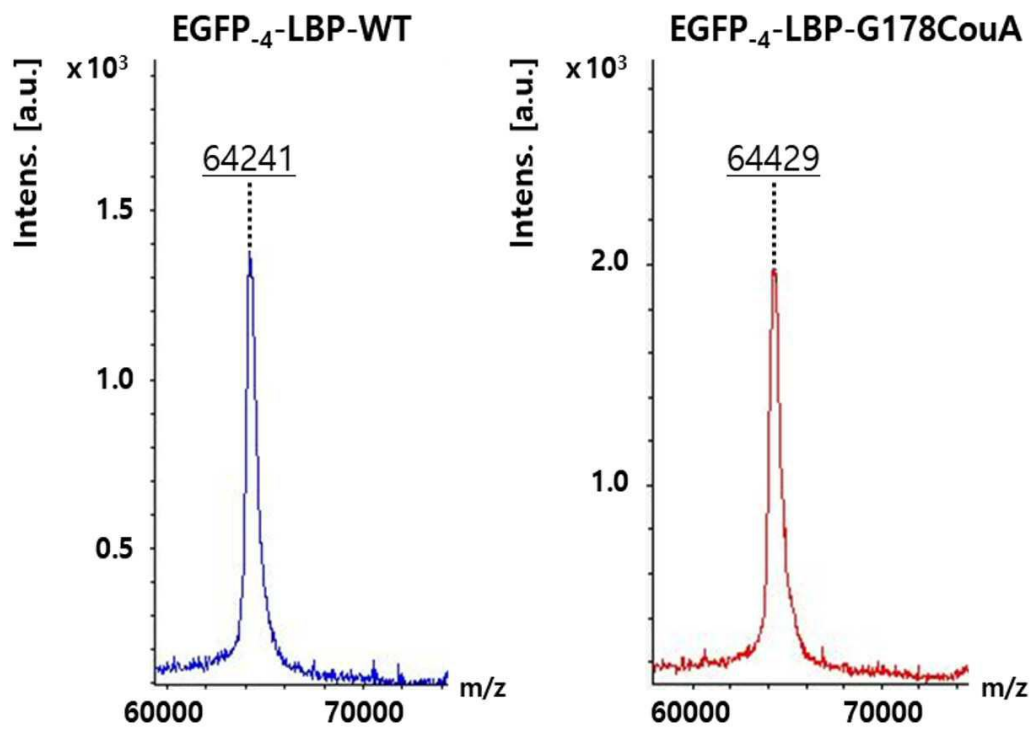
도면3a



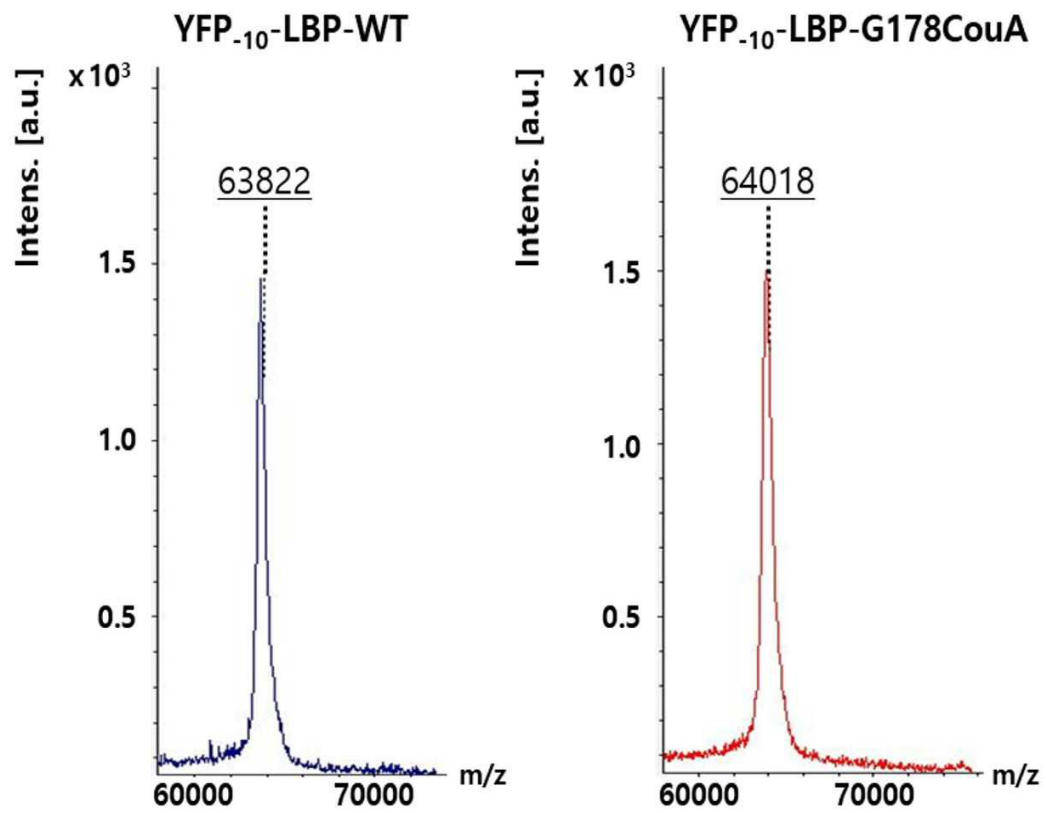
도면3b



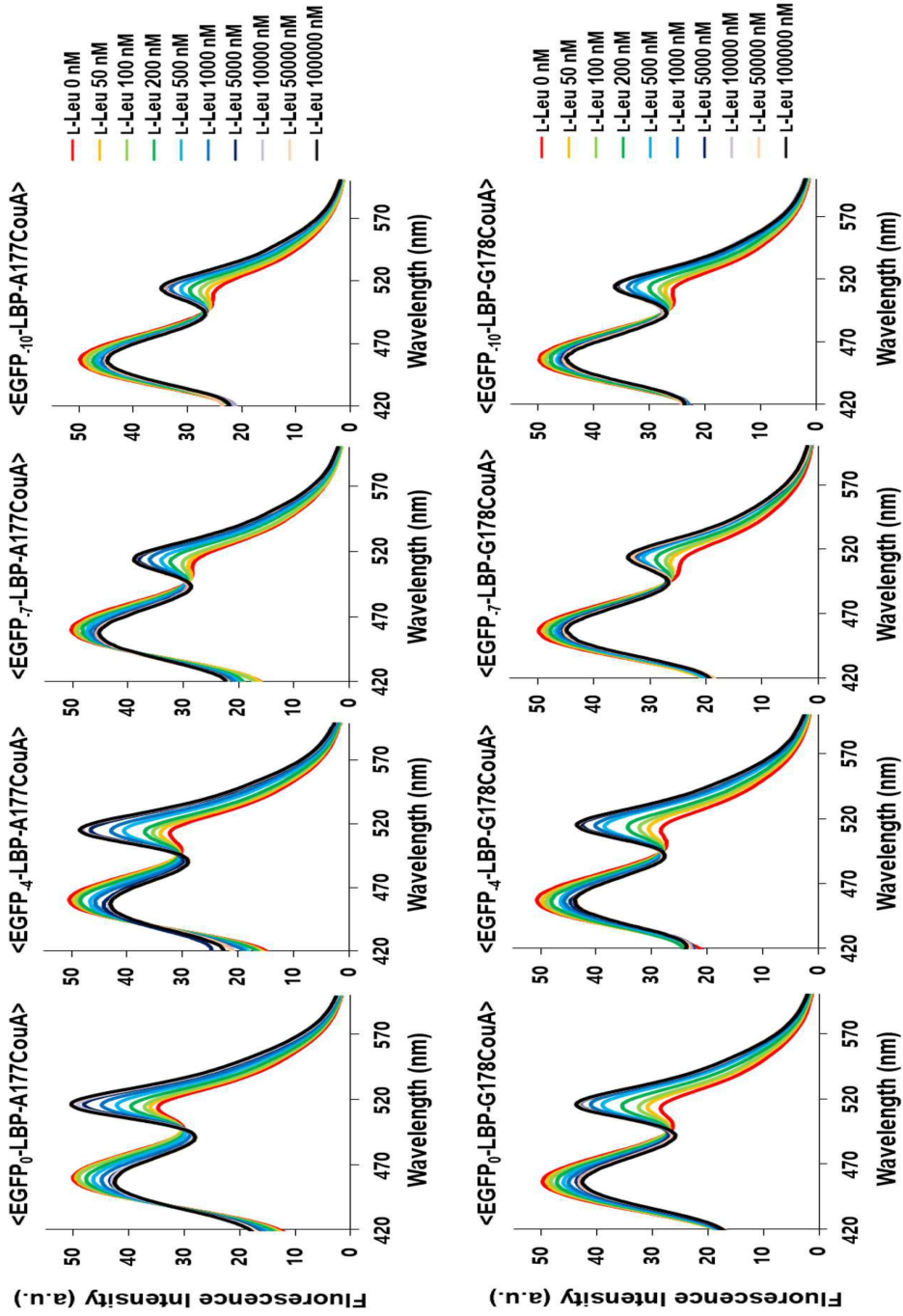
도면4a



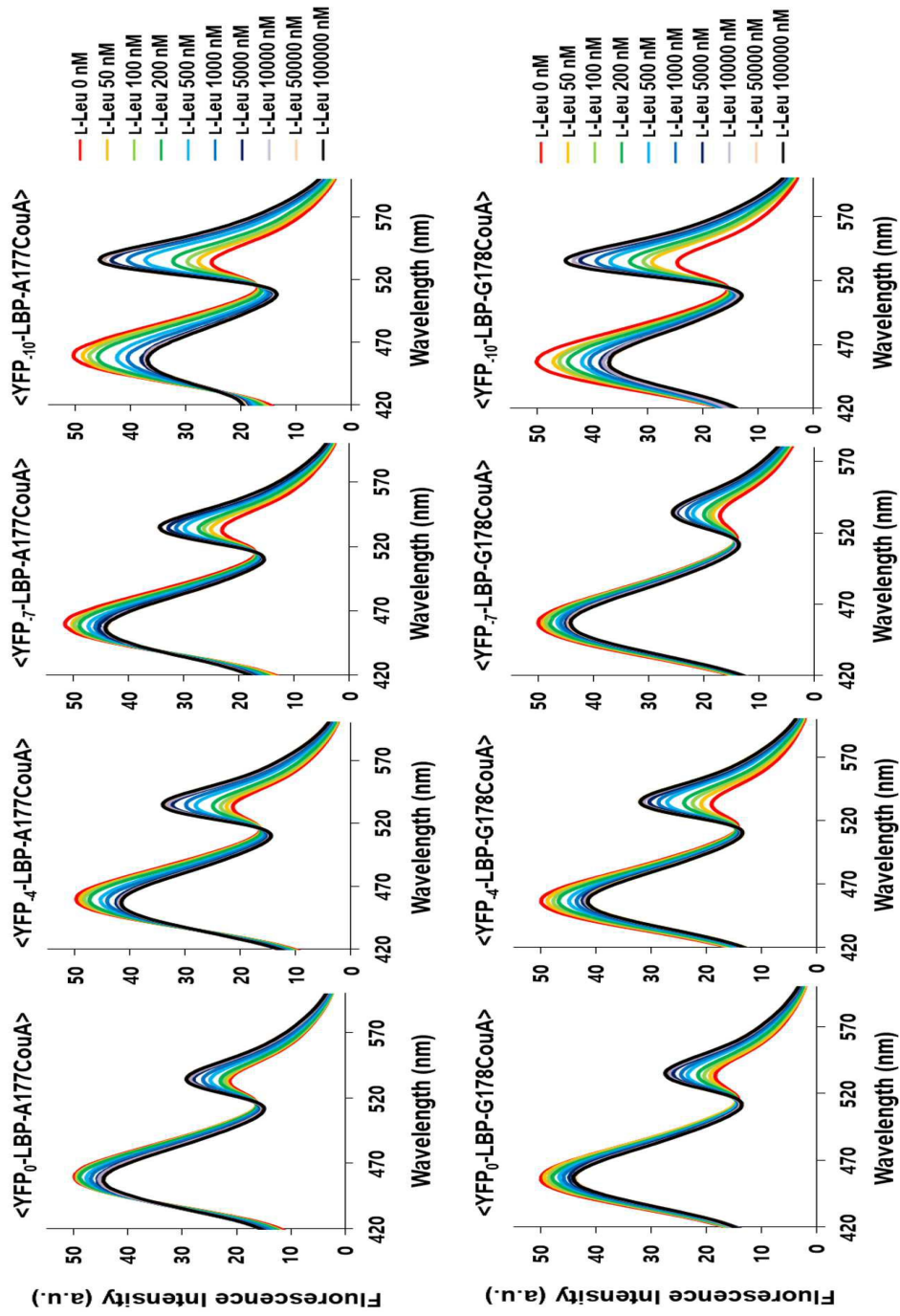
도면4b



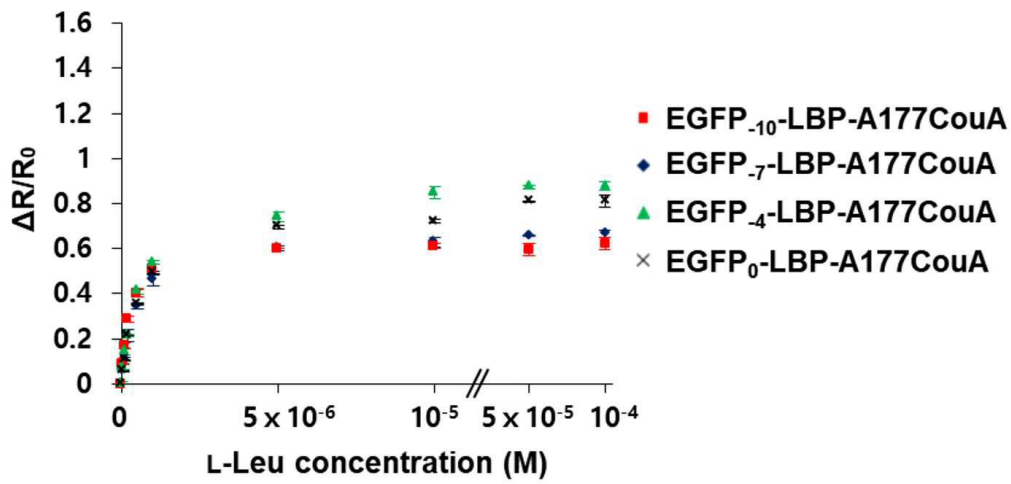
도면5a



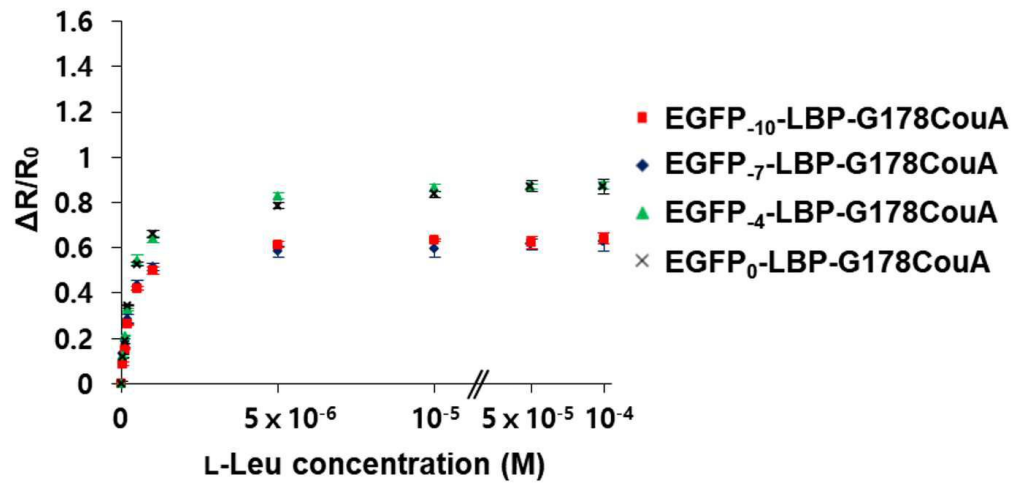
도면5b



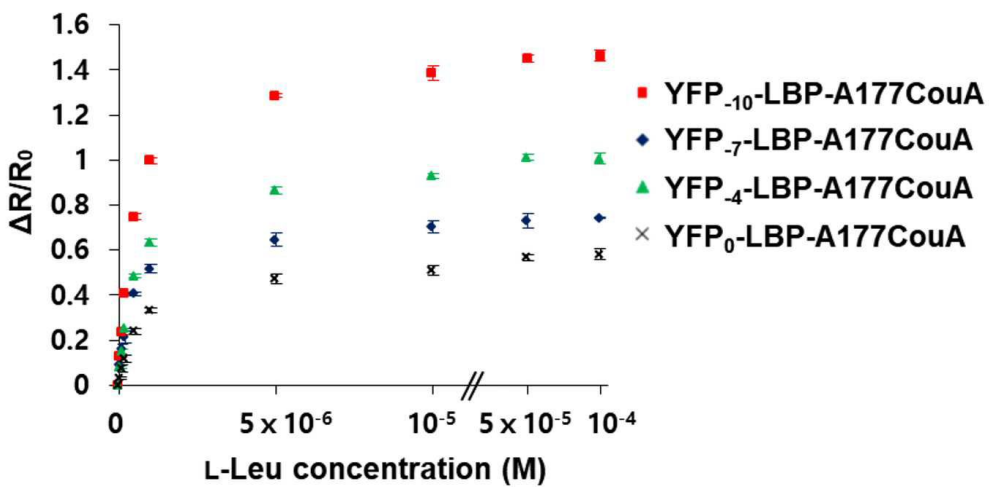
도면6a



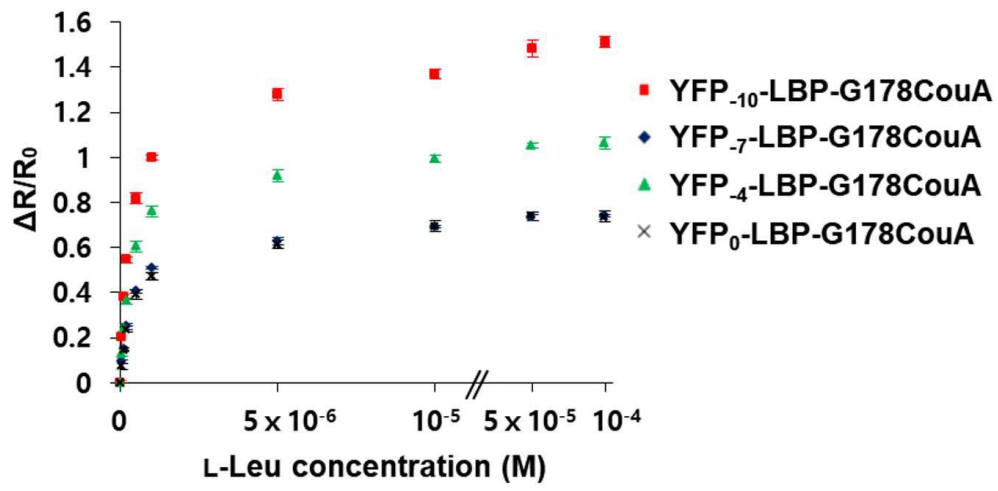
도면6b



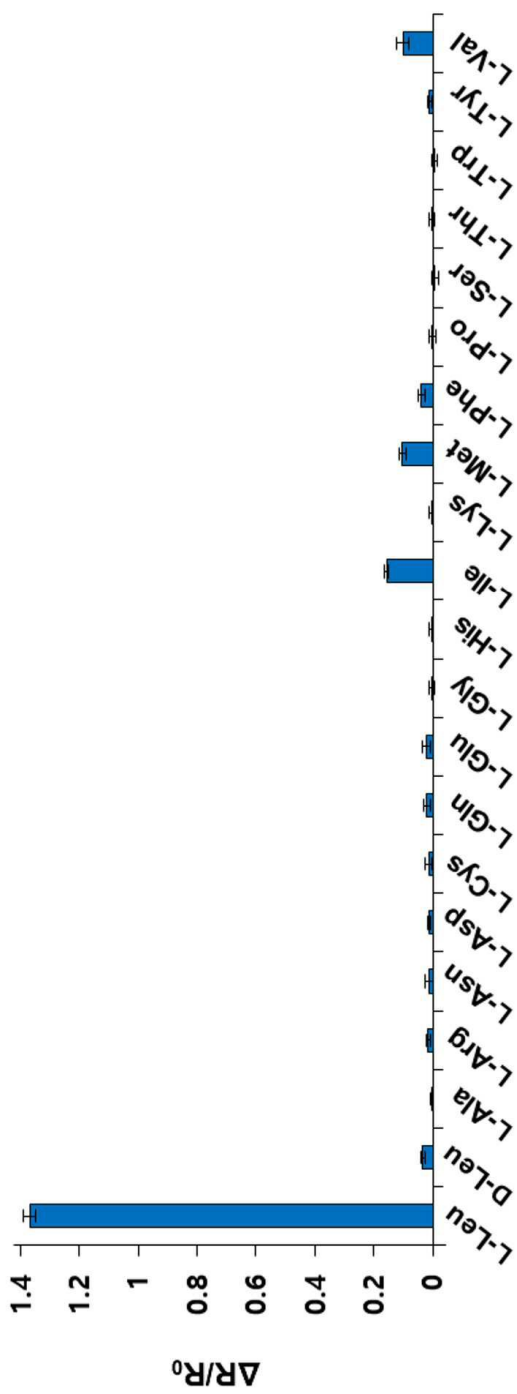
도면6c



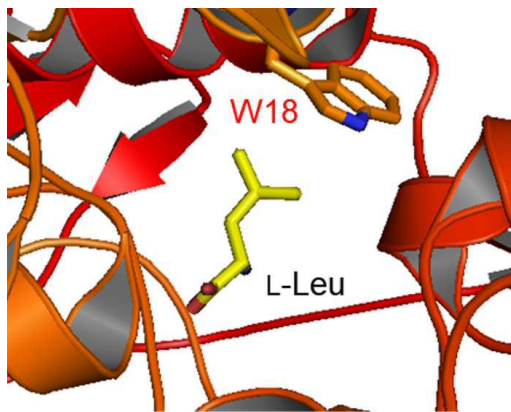
도면6d



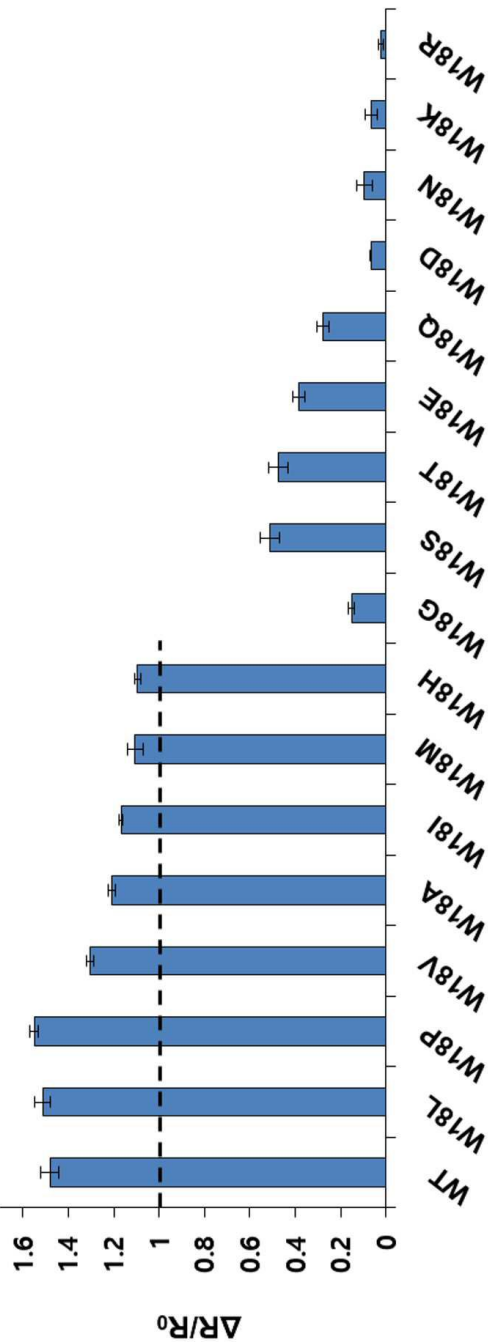
도면7



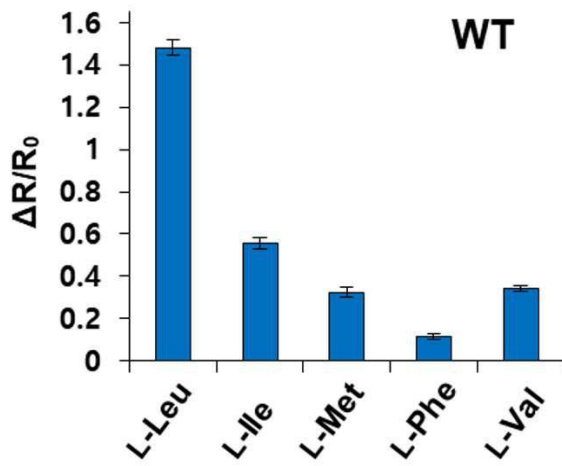
도면8a



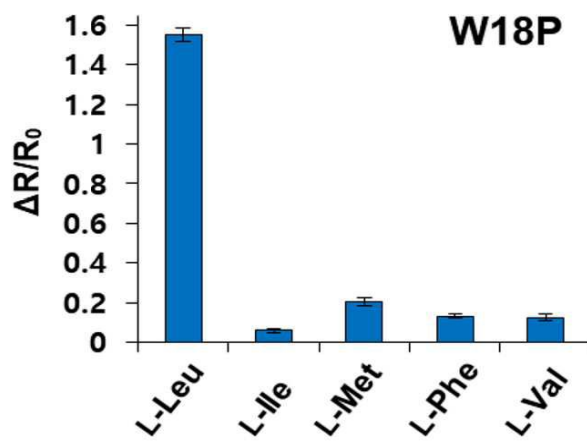
도면8b



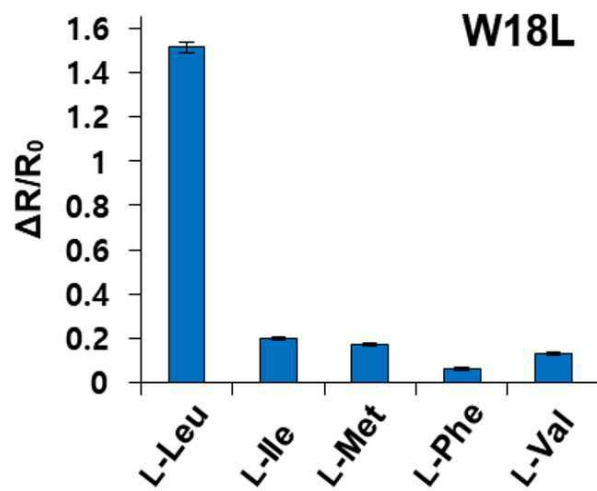
도면9a



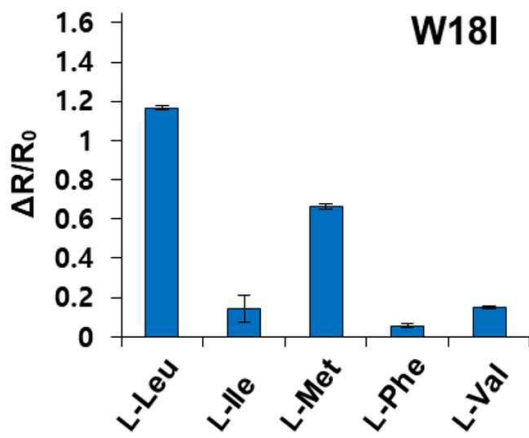
도면9b



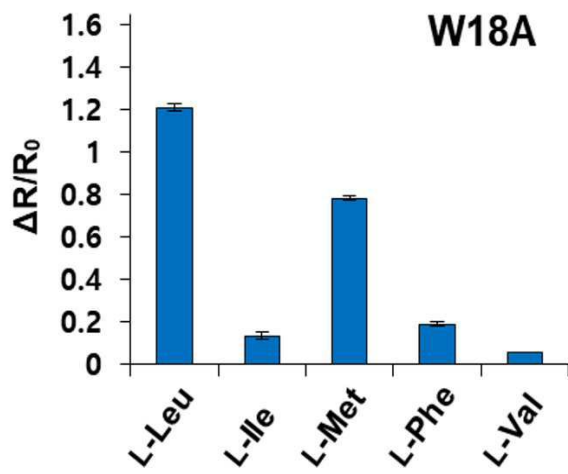
도면9c



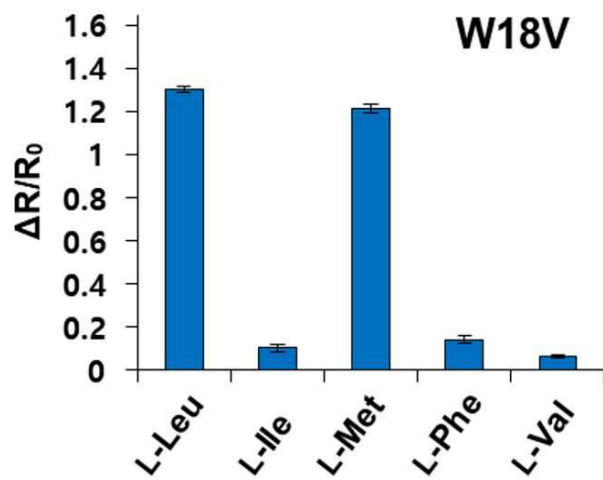
도면9d



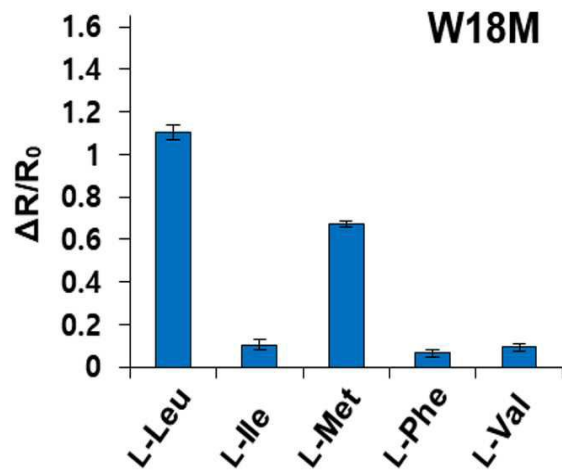
도면9e



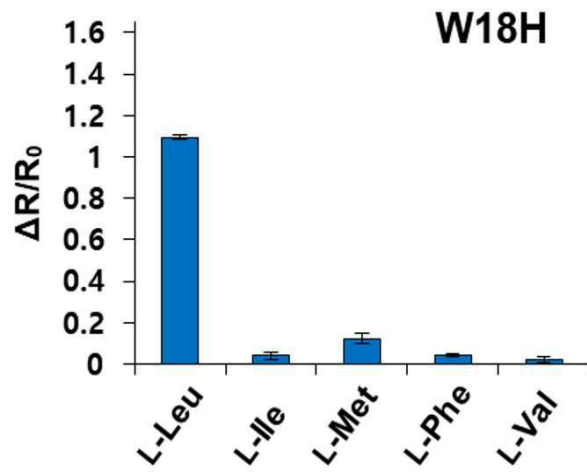
도면9f



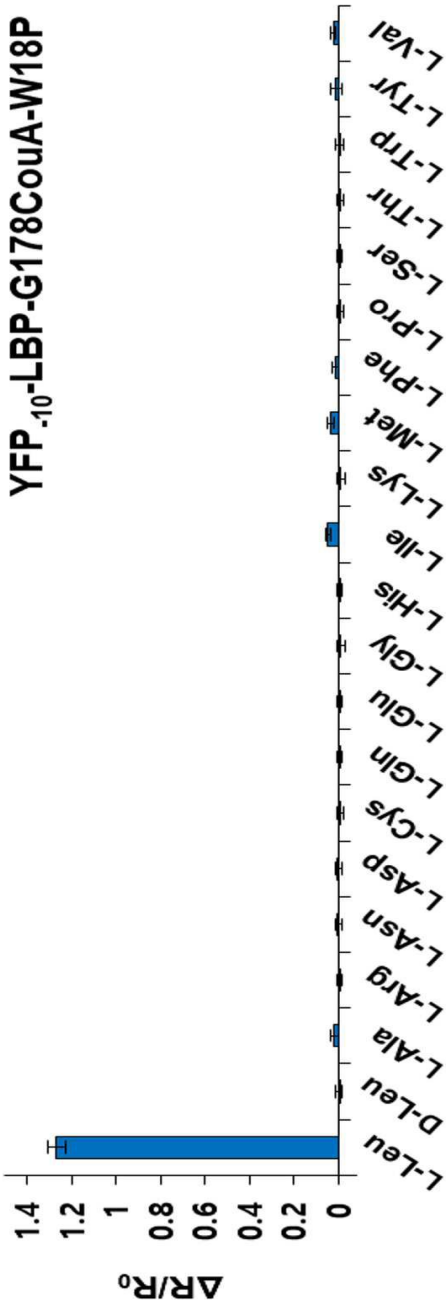
도면9g



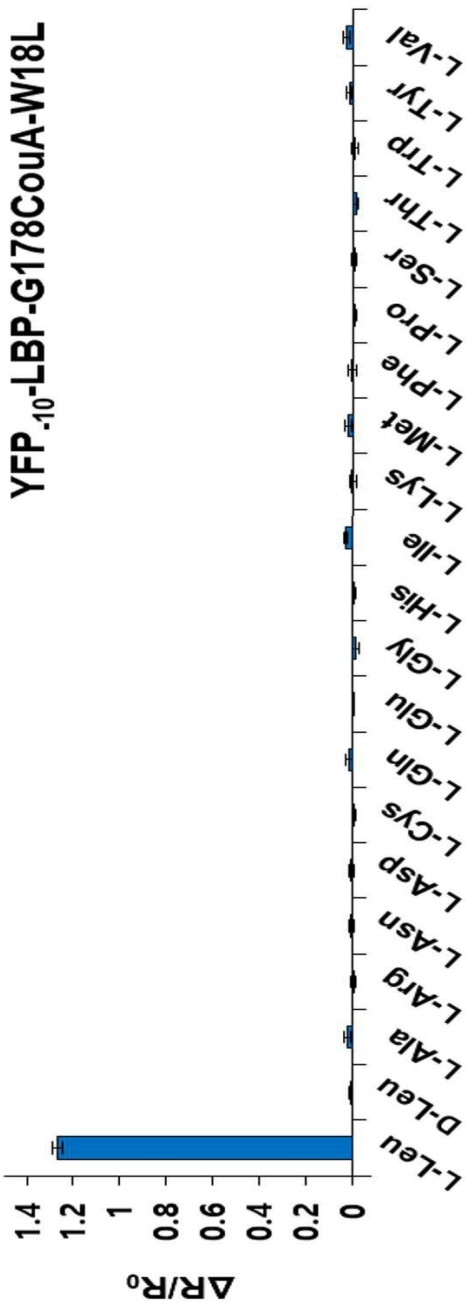
도면9h



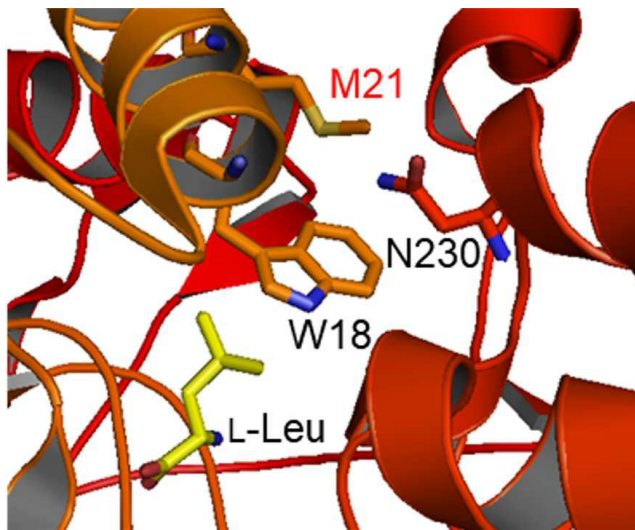
도면10a



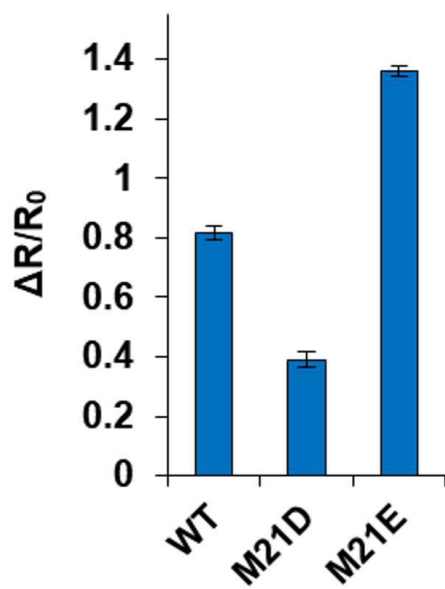
도면10b



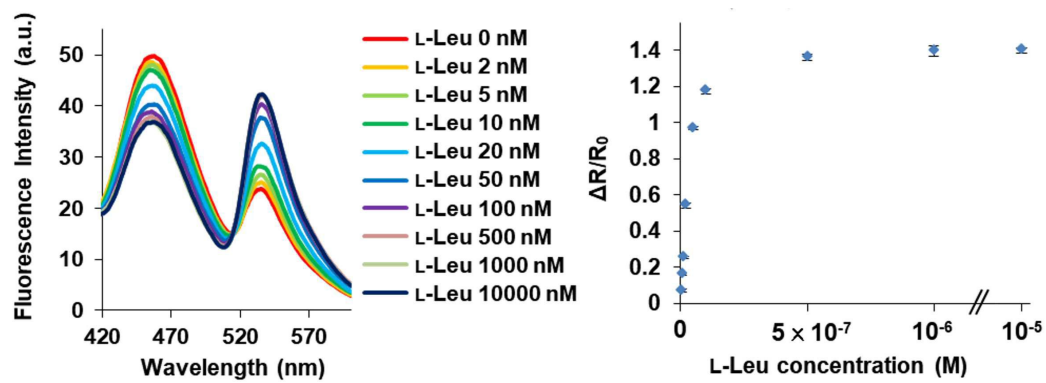
도면11a



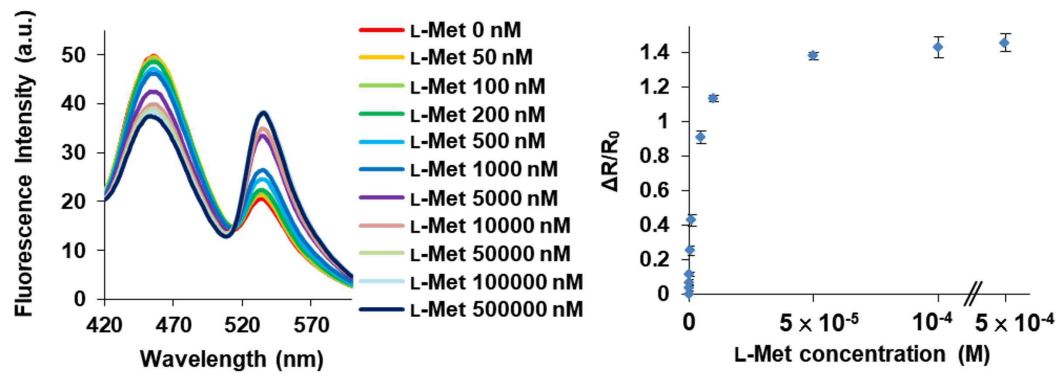
도면11b



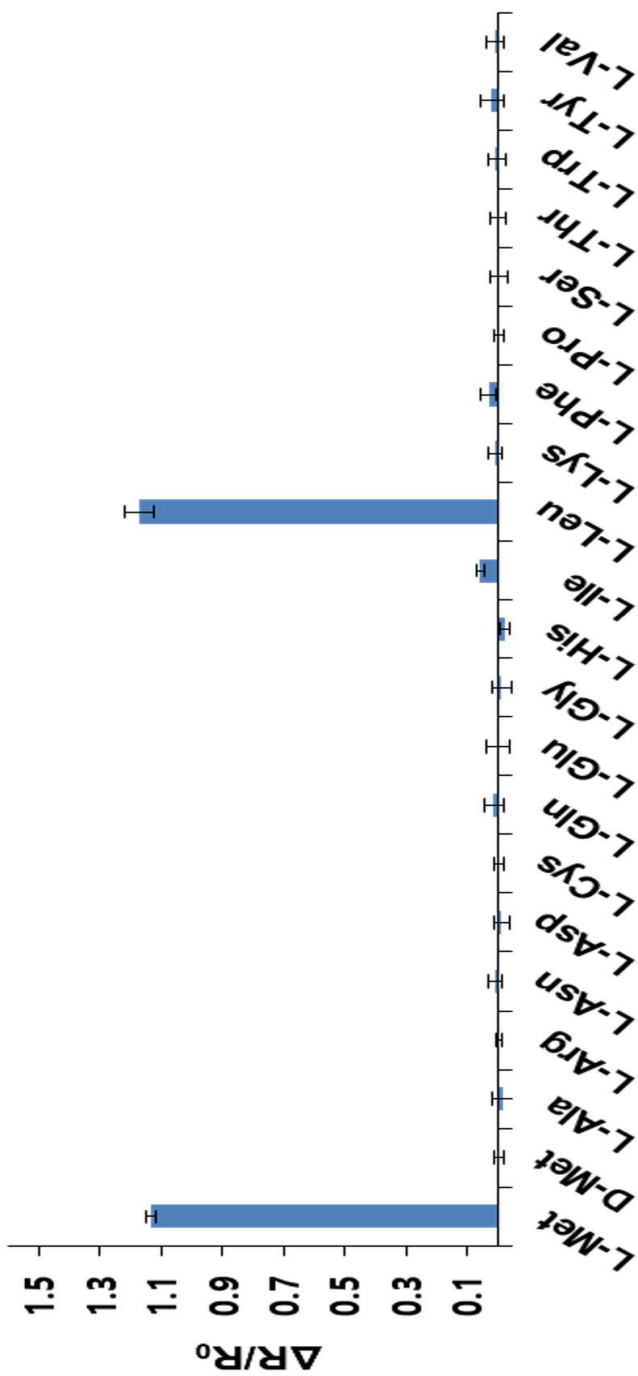
도면11c



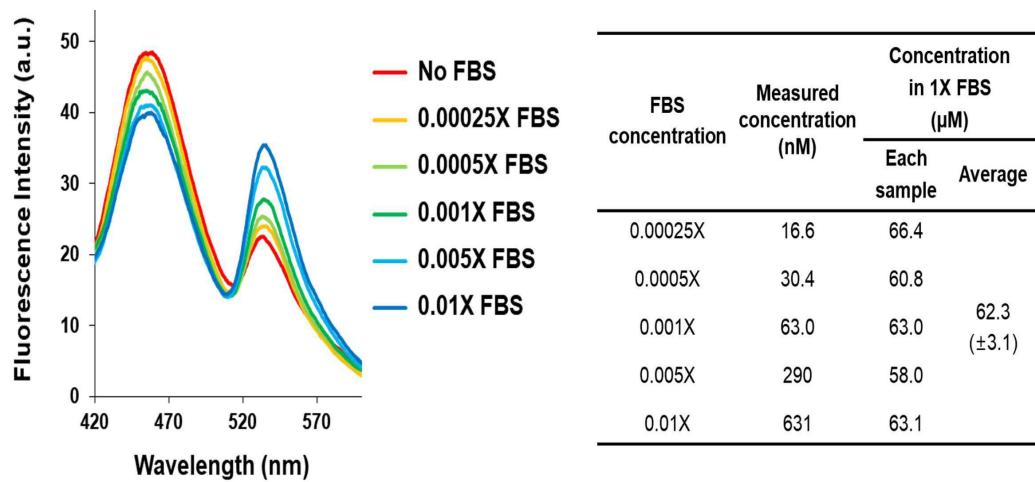
도면12a



도면12b



도면13



서열 목록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> FRET SENSOR FOR DETECTING L-LEUCINE AND DETECTING METHOD OF L-LEUCINE USING THE SAME

<130> DP20170584KR

<160> 18

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial YFP-10-LBP-G178CouA sequeunce

<400> 1

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val

1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe

50 55 60

Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg

65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

85 90 95

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly

145 150 155 160

Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val

165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro

180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu Ser

195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val

210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met

225 230 235 240

Ser Gly Pro Ile Ala Gln Trp Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg

245 250 255

Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys

260 265 270

Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val

275 280 285

Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly

290 295 300

His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp

305 310 315 320

Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr

325 330 335
 Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser
 340 345 350
 Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln
 355 360 365
 Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala

 370 375 380
 Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe
 385 390 395 400
 Phe Asp Gly Ile Thr Ala Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg
 405 410 415
 Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro
 420 425 430
 Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr
 435 440 445

 Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile
 450 455 460
 Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr
 465 470 475 480
 Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp
 485 490 495
 Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val
 500 505 510
 Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu

 515 520 525
 Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly
 530 535 540
 Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Asp Phe Gly
 545 550 555 560
 Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala Lys Gly Gly
 565 570 575
 His His His His His His

580

<210> 2

<211> 582

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial YFP-10-LBP-G178CouA sequeunce

<400> 2

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val

1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe

50 55 60

Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg

65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

85 90 95

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val

100 105 110

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

115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly

145 150 155 160

Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val

165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro

180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu Ser

195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val

210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met

225 230 235 240

Ser Gly Pro Ile Ala Gln Leu Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg

245 250 255

Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys

260 265 270

Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val

275 280 285

Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly

290 295 300

His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp

305 310 315 320

Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr

325 330 335

Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser

340 345 350

Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln

355 360 365

Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala

370 375 380

Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe

385 390 395 400

Phe Asp Gly Ile Thr Ala Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg

405 410 415

Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro

420 425 430

Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr

435 440 445
 Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile
 450 455 460
 Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr
 465 470 475 480
 Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp

 485 490 495
 Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val
 500 505 510
 Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu
 515 520 525
 Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly
 530 535 540
 Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Asp Phe Gly
 545 550 555 560

 Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala Lys Gly Gly
 565 570 575
 His His His His His His
 580
 <210> 3
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial YFP-10-LBP-G178CouA-W18P sequeunce
 <400> 3
 Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe

50	55	60	
Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg			
65	70	75	80
His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg			
85	90	95	
Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val			
100	105	110	
Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile			
115	120	125	
Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn			
130	135	140	
Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly			
145	150	155	160
Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val			
165	170	175	
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro			
180	185	190	
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu Ser			
195	200	205	
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val			
210	215	220	
Thr Ala Ala Gly Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met			
225	230	235	240
Ser Gly Pro Ile Ala Gln Pro Gly Asp Met Glu Phe Asn Gly Ala Arg			
245	250	255	
Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys			
260	265	270	
Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val			
275	280	285	
Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly			
290	295	300	

His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp

305 310 315 320

Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr

325 330 335

Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser

340 345 350

Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln

355 360 365

Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala

370 375 380

Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe

385 390 395 400

Phe Asp Gly Ile Thr Ala Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg

405 410 415

Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro

420 425 430

Glu Met Gly Gln Met Leu Arg Gln Ala Arg Ser Val Gly Leu Lys Thr

435 440 445

Gln Phe Met Gly Pro Glu Gly Val Gly Asn Ala Ser Leu Ser Asn Ile

450 455 460

Ala Gly Asp Ala Ala Glu Gly Met Leu Val Thr Met Pro Lys Arg Tyr

465 470 475 480

Asp Gln Asp Pro Ala Asn Gln Gly Ile Val Asp Ala Leu Lys Ala Asp

485 490 495

Lys Lys Asp Pro Ser Gly Pro Tyr Val Trp Ile Thr Tyr Ala Ala Val

500 505 510

Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu

515 520 525

Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly

530 535 540

Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Asp Phe Gly

545 550 555 560
 Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala Lys Gly Gly
 565 570 575
 His His His His His His
 580
 <210> 4
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial YFP-10-LBP-G178CouA-M21E sequeunce

 <400> 4
 Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe
 50 55 60
 Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg

 65 70 75 80
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95
 Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110
 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140

 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val

165	170	175	
Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro			
180	185	190	
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu Ser			
195	200	205	
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val			
210	215	220	
Thr Ala Ala Gly Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met			
225	230	235	240
Ser Gly Pro Ile Ala Gln Trp Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly Ala Arg			
245	250	255	
Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys			
260	265	270	
Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val			
275	280	285	
Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly			
290	295	300	
His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp			
305	310	315	320
Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr			
325	330	335	
Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser			
340	345	350	
Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln			
355	360	365	
Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala			
370	375	380	
Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe			
385	390	395	400
Phe Asp Gly Ile Thr Ala Glu Lys Asp Phe Ser Ala Leu Ile Ala Arg			
405	410	415	
Leu Lys Lys Glu Asn Ile Asp Phe Val Tyr Tyr Gly Gly Tyr Tyr Pro			

				420				425				430			
Glu	Met	Gly	Gln	Met	Leu	Arg	Gln	Ala	Arg	Ser	Val	Gly	Leu	Lys	Thr
435				440				445							
Gln	Phe	Met	Gly	Pro	Glu	Gly	Val	Gly	Asn	Ala	Ser	Leu	Ser	Asn	Ile
450				455				460							
Ala	Gly	Asp	Ala	Ala	Glu	Gly	Met	Leu	Val	Thr	Met	Pro	Lys	Arg	Tyr
465				470				475				480			
Asp	Gln	Asp	Pro	Ala	Asn	Gln	Gly	Ile	Val	Asp	Ala	Leu	Lys	Ala	Asp
485				490				495							
Lys	Lys	Asp	Pro	Ser	Gly	Pro	Tyr	Val	Trp	Ile	Thr	Tyr	Ala	Ala	Val

Gln Ser Leu Ala Thr Ala Leu Glu Arg Thr Gly Ser Asp Glu Pro Leu
500 505 510

Ala Leu Val Lys Asp Leu Lys Ala Asn Gly Ala Asn Thr Val Ile Gly
515 520 525

Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Asp Phe Gly
530 535 540

Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala Lys Gly Gly
545 550 555 560

565 570 575

His His His His His His

580

<210>	5
<211>	582
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	Artificial YFP-10-LBP-G178CouA-W18V-M21E sequence
<400>	5

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
1 5 10 15
Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

35

40

45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe

50

55

60

Gly Tyr Gly Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg

65

70

75

80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

85

90

95

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val

100

105

110

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

115

120

125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

130

135

140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly

145

150

155

160

Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val

165

170

175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro

180

185

190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Lys Leu Ser

195

200

205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val

210

215

220

Thr Ala Ala Gly Ala Asp Asp Ile Lys Val Ala Val Val Gly Ala Met

225

230

235

240

Ser Gly Pro Ile Ala Gln Val Gly Asp Glu Glu Phe Asn Gly Ala Arg

245

250

255

Gln Ala Ile Lys Asp Ile Asn Ala Lys Gly Gly Ile Lys Gly Asp Lys

260

265

270

Leu Val Gly Val Glu Tyr Asp Asp Ala Cys Asp Pro Lys Gln Ala Val

275 280 285
 Ala Val Ala Asn Lys Ile Val Asn Asp Gly Ile Lys Tyr Val Ile Gly
 290 295 300
 His Leu Cys Ser Ser Ser Thr Gln Pro Ala Ser Asp Ile Tyr Glu Asp
 305 310 315 320
 Glu Gly Ile Leu Met Ile Ser Pro Gly Ala Thr Asn Pro Glu Leu Thr

 325 330 335
 Gln Arg Gly Tyr Gln His Ile Met Arg Thr Ala Gly Leu Asp Ser Ser
 340 345 350
 Gln Gly Pro Thr Ala Ala Lys Tyr Ile Leu Glu Thr Val Lys Pro Gln
 355 360 365
 Arg Ile Ala Ile Ile His Asp Lys Gln Gln Tyr Gly Glu Gly Leu Ala
 370 375 380
 Arg Ser Val Gln Asp Gly Leu Lys Ala Ala Asn Ala Asn Val Val Phe
 385 390 395 400

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

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

530

535

540

Pro Leu Asn Trp Asp Glu Lys Gly Asp Leu Lys Gly Phe Asp Phe Gly

545

550

555

560

Val Phe Gln Trp His Ala Asp Gly Ser Ser Thr Ala Ala Lys Gly Gly

565

570

575

His His His His His His

580

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial GFP_BspH1 Forward primer sequence

<400> 6

tatatcatga gtaaaggaga agaacttttc actggagttg tc

42

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial LBP_His-tag Reverse primer sequence

<400> 7

atggtgatga tggatgatgac cacccttggc tgccgtggat gaacc

45

<210> 8

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial His-tag_Kpn1 Reverse primer sequence

<400> 8

tatggtacct caatggtgat gatggtgatg accacc

36

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial GFP_10AA deletion_LBP Forward primer sequence

<400> 9

cttgagtttg taactgctgc tggggctgac gatattaaag tcgccgtt 48

<210> 10

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial GFP_10AA deletion_LBP Reverse primer sequence

<400> 10

aacggcgact ttaatatcgt cagccccagc agcagttaca aactcaag 48

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial LBP_W18L mutation Forward primer sequence

<400> 11

ccgattgccc agctgggcga tatggaa 27

<210> 12

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial LBP_W18L mutation Reverse primer sequence

<400> 12

ttccatatcg cccagctggg caatcgg 27

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial LBP_W18P mutation Forward primer sequence

<400> 13

ccgattgccc agccgggcga tatggaa 27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial LBP_W18P mutation Reverse primer sequence

<400> 14

ttccatatcg cccggctggg caatcgg 27

<210> 15

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial LBP_M21E mutation Forward primer sequence

<400> 15

gcccagtggg gcgatgaaga atttaacggc gcg 33

<210> 16

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial LBP_M21E mutation Reverse primer sequence

<400> 16

cgcgccgtta aattcttcat cgccccactg ggc 33

<210> 17

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial LBP_W18V_M21E mutation Forward primer sequence

<400> 17

ccgattgccc aggtgggcga tgaagaattt aacggc 36

<210> 18

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial LBP_W18V_M21E mutation Reverse primer sequence

<400> 18

gccgttaaat tcttcacgc ccacctgggc aatcgg 36