(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0078777
(43) 공개일자 2008년08월28일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0112892
(22) 출원일자 2007년11월06일
심사청구일자 2007년11월06일
(30) 우선권주장
1020070018752 2007년02월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
국민대학교산학협력단
서울특별시 성북구 정릉동 861-1 국민대학교내
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
(72) 발명자
이정국
서울 마포구 염리동 삼성아파트 108동 604호
이해진
경기 남양주시 와부읍 덕소리 신암아파트 101동 1202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
현종철

전체 청구항 수 : 총 9 항

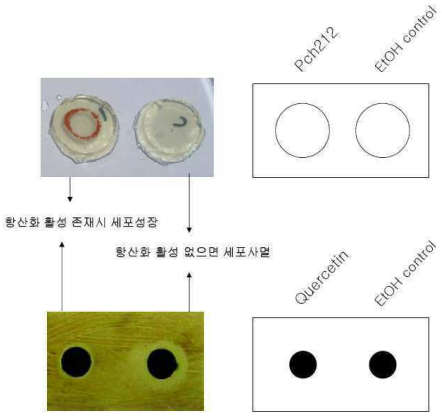
(54) 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용한 항산화제의탐색방법, 및 그에 의해서 탐색된 항산화제

(57) 요 약

본 발명은 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용한 항산화제의 탐색방법 및 상기 방법에 의해서 탐색된 항산화제에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 클로로필리드가 첨가된 필터 디스크 또는 배지 블럭 중에서의 특정 돌연변이 세균의 성장 상태를 모니터링함으로써 항산화제를 용이하게 선별해내는 탐색방법 및 상기 방법에 의해서 탐색된 항산화제에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용하여 상기 돌연변이 세균의 성장 상태를 모니터링함으로써 항산화제를 대량으로 용이하게 탐색할 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 항산화제 탐색방법은 양친성 항산화제의 선별적 탐색에 매우 유용하며, 따라서 치료용 의약품뿐만 아니라, 각종 식품 및 화장품의 첨가제에 응용되는 독성이 적고 효과적인 항산화제를 탐색하여 제품화하는데 적용가능하다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김의진

서울 서대문구 홍제1동 158-19

성문희

대전 유성구 장대동 283-4 갤러리빌 2차 902호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	10580
부처명	서울특별시
연구사업명	서울시 산학연 협력사업(2005년 기술기반구축사업)
연구과제명	바이오소재 산업화 혁신클러스터
주관기관	국민대학교 산학협력단
연구기간	2007년 08월 01일 ~ 2008년 07월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 (superoxide dismutase)를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제되고, 산소 하에서 수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질인 클로로필리드 환원효소 (chlorophyllide reductase)를 발현하도록 형질전환된 돌연변이 세균을 평판 배지 상에서 배양하는 단계;

상기 평판 배지 상에 탐색하고자 하는 항산화제 후보물질 및 클로로필리드 (chlorophyllide)가 첨가된 복수 개의 필터 디스크를 위치시키는 단계; 및

상기 돌연변이 세균의 성장이 관찰되는 필터 디스크를 선별하는 단계를 포함하는 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용한 항산화제의 탐색방법.

청구항 2

세균 배양용 평판 배지에 클로로필리드를 첨가한 후, 상기 평판 배지를 블럭 형태로 잘라내어 클로로필리드가 첨가된 복수 개의 배지 블럭을 제조하는 단계;

상기 복수 개의 배지 블럭을 세균 배양을 위한 페트리 디쉬 (Petri-dish) 상에 위치시키는 단계;

상기 복수 개의 배지 블럭 상에, 탐색하고자 하는 항산화제 후보물질과, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제되고, 산소 하에서 수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질인 클로로필리드 환원효소를 발현하도록 형질전환된 돌연변이 세균을 가하는 단계; 및

상기 돌연변이 세균의 성장이 관찰되는 배지 블럭을 선별하는 단계를 포함하는 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용한 항산화제의 탐색방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 돌연변이 대상 세균은 로도박터 스페로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides*), 로도스피릴룸 루부름 (*Rhodospirillum rubrum*), 로도슈도모나스 팔루스트리스 (*Rhodopseudomonas palustris*), 알로크로마티움 비노숨 (*Allochromatium vinosum*), 크로비움 테피둠 (*Chlorobium tepidum*) 또는 클로로플렉서스 아우란티아쿠스 (*Chloroflexus aurantiacus*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 돌연변이 세균은 로도박터 스페로이데스 2.4.1 SodB1[KCTC 11069BP]인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 돌연변이 세균은 클로로필리드의 존재시, 1 ~ 3% 농도의 산소 조건 하에서 과산화수소를 생성하지 않으며, 수퍼옥사이드 음이온을 생성하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 필터 디스크 또는 상기 평판 배지에의 클로로필리드의 첨가량은 0.1mM 내지 100mM인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 필터 디스크는 5㎜ 내지 20㎜의 직경 및 0.1㎜ 내지 1㎜의 두께를 갖고, 상기 배지 블럭은 10㎜ 내지 30㎜의 직경 및 5㎜ 내지 15㎜의 두께를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 돌연변이 대상 세균의 형질전환은,

수퍼옥사이드 디스뮤테이즈를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제된 제1 재조합 벡터 및 산소 하에서 수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질을 발현하는 제2 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;

상기 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 발현 벡터 각각을 사용하여 제1 재조합 벡터가 도입된 제1 형질전환 대장균 (E. coli) 및 제2 재조합 발현 벡터가 도입된 제2 형질전환 대장균을 제조하는 단계; 및

상기 제1 및 제2 형질전환 대장균과 상기 돌연변이 대상 세균을 접합 (conjugation)시킴으로써 상기 돌연변이 세균을 제조하는 단계에 의해서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 따른 방법에 의해서 탐색된 항산화제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용한 항산화제의 탐색방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 클로로필리드가 첨가된 필터 디스크 또는 배지 블럭 중에서의 특정 돌연변이 세균의 성장 상태를 모니터링함으로써 항산화제를 용이하게 선별해내는 탐색방법 및 상기 방법에 의해서 탐색된 항산화제에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 일반적으로, 활성산소 또는 유해산소는 인체 내에서 산화작용을 일으키며, 그로 인해서 세포막, DNA 및 다양한 세포 구조물에 손상을 초래하며, 암, 동맥경화증, 당뇨병, 뇌졸중, 심근경색증, 간염, 신장염, 아토피, 파킨슨병 등과 같은 다양한 질병에 직간접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다. 활성산소의 일종인 수퍼옥사이드(superoxide)는 생체가 산소를 대사하는 과정에서 전자를 하나 더 받아 환원된 것으로서, 그 반응성이 높아 생체 구성물질인 핵산, 단백질, 지질을 비가역적으로 파괴시킨다. 특히, 수퍼옥사이드는 Fe^{3+} 이온이 존재할 때, Fe^{3+} 이온을 Fe^{2+} 이온으로 환원시키고, 환원된 Fe^{2+}은 과산화수소와의 반응을 통하여 하이드록시 라디칼(hydroxy radical)을 형성한다. 이렇게 형성된 하이드록시 라디칼은 생체 DNA와 반응해서 생체 돌연변이를 유발하거나 단백질의 Fe-S 중심체를 파괴하고, 지질의 과산화를 유발시키는 등 생명체의 대사 및 항상성을 저해한다는 사실이 잘 알려져 있다 (Imlay, J. A., 2003, Ann. Rev. Microbiol. 57: 395-418).

<3> 따라서, 수퍼옥사이드를 비롯한 활성산소들의 세포 독성을 감소시키거나 직접 활성산소들을 불활성화시킬 수 있는 항산화 물질들에 대한 중요성이 부각되었으며, 항산화제를 탐색해 내기 위한 다양한 방법들이 개발되고 있다. 예를 들어, 시험관에서의 산화환원 반응에 따른 색 또는 형광의 변화, DNA 사슬 절단 또는 활성산소들과 특이적으로 반응하는 스핀트랩물질 등을 이용하여 항산화 물질들을 분석 및 개발하고 있지만, 이러한 방법들을 통하여 개발된 항산화제는 대부분 실제 생체 내 흡수 대사에 따른 생체이용률이 낮거나 생체에의 독성 때문에 사용이 제한되었고, 생체 외에서 항산화활성을 조사하는 방법을 사용하기 때문에, 생체에서의 효능, 안전성 및 항산화 특이성 등을 2차, 3차 스크리닝을 통해 검증하여야 했다.

<4> 또한, 우수한 항산화제로 기능할 수 있기 위해서는 높은 항산화 활성 이외에도, 생체막 투과성 및 생체 이용률이 우수해야 하지만, 조직 흡수 및 세포막 통과 특성이 비교적 우수한 지용성 항산화제의 경우에는 세포막에 대부분 국한되어 존재하므로 실제 활성산소가 생성되는 곳에서의 항산화 작용을 수행하기 어려우며, 또한 지용성의 특성으로 물에 녹지 못하여 체외로의 배출이 안되어 과량의 항산화제나 산화된 항산화제가 체내에 축적되어 독성을 나타낼 수 있다. 반면에, 수용성 항산화제의 경우에는 산화된 항산화제의 체외로의 배출은 잘 이루어지나, 생체막투과성이 낮아, 세포막 보호작용이나, 세포내 소기관으로 이동에 어려움등의 문제점이 있었다. 따라서, 항산화제의 사용 용도에 따라 수용성 및 지용성의 특성을 모두 구비하여 용도에 적합한 제제화가 용이한 양친성 항산화제의 개발이 요구되고 있다.

<5> 한편, 자색비유황세균인 로도박터 속 미생물은 광합성 세균의 일종으로서 조류 (algae)나 식물의 광합성과는 달리 그 과정 중에 산소를 발생시키지 않으며, 다양한 대사조건, 즉 호기적 조건, 혐기 어둠조건, 혐기 광조건 모두에서 성장할 수 있다는 장점을 갖는다. 특히, 혐기 광 조건에서는 박테리오클로로필 색소가 함유된 광기구를

이용해 장파장의 빛을 받아서 세포막과 연관된 일련의 전자전달 과정이 발생되고, 이를 통해 빛에너지가 화학에너지로 전환되며, 발생된 화학에너지는 이산화탄소의 고정을 포함한 세포대사 활동에 필요한 에너지로 사용된다. 광합성 세균에 있어서, 박테리오클로로필을 합성하는 대사과정을 매개하는 효소 중 하나로 bchX, bchY 및 bchZ의 세 개의 유전자에 의해서 만들어지는 다량체 단백질은 클로로필리드 환원 활성을 가지는 것으로 알려져 있다.

<6> 대한민국 공개특허공보 제2007-59485호에서는, 로도박터 스페로이데스로부터 유래한 수퍼옥사이드 생성 효소로서의 다량체 단백질을 개시하고 있으며, 상기 다량체 단백질은 양친매성 기질인 클로로필리드가 존재하면 생체 내외에서 수퍼옥사이드를 생성하므로, 상기 다량체 단백질을 발현하는 세포를 선택적으로 사멸시킬 수 있게 된다. 그러나, 상기 문헌은 상기 다량체 단백질의 수퍼옥사이드 생성 시약으로서 기능만을 언급하고 있을 뿐, 이를 이용하여 구체적으로 항산화제 탐색방법에 적용하기 위한 사항들에 대해서 방향을 제시하고 있지 못하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 이에, 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는, 간편한 방법에 의해서 양친성 항산화제를 선별적으로 대량 탐색할 수 있는 항산화제의 탐색방법을 제공하는 것이다.

<8> 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는, 상기 항산화제의 탐색방법에 의해서 탐색된 항산화제를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<9> 본 발명은 상기 첫 번째 기술적 과제를 달성하기 위한 일 방법으로서,

<10> 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 (superoxide dismutase)를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제되고, 산소 하에서 수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질인 클로로필리드 환원효소 (chlorophyllide reductase)를 발현하도록 형질전환된 돌연변이 세균을 평판 배지 상에서 배양하는 단계;

<11> 상기 평판 배지 상에 탐색하고자 하는 항산화제 후보물질 및 클로로필리드 (chlorophyllide)가 첨가된 복수 개의 필터 디스크를 위치시키는 단계; 및

<12> 상기 돌연변이 세균의 성장이 관찰되는 필터 디스크를 선별하는 단계를 포함하는 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용한 항산화제의 탐색방법을 제공한다.

<13> 또한, 본 발명은 상기 첫 번째 기술적 과제를 달성하기 위한 다른 방법으로서,

<14> 세균 배양용 평판 배지에 클로로필리드를 첨가한 후, 상기 평판 배지를 블럭 형태로 잘라내어 클로로필리드가 첨가된 복수 개의 배지 블럭을 제조하는 단계;

<15> 상기 복수 개의 배지 블럭을 세균 배양을 위한 페트리 디쉬 (Petri-dish) 상에 위치시키는 단계;

<16> 상기 복수 개의 배지 블럭 상에, 탐색하고자 하는 항산화제 후보물질과, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제되고, 산소 하에서 수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질인 클로로필리드 환원효소를 발현하도록 형질전환된 돌연변이 세균을 가하는 단계; 및

<17> 상기 돌연변이 세균의 성장이 관찰되는 배지 블럭을 선별하는 단계를 포함하는 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용한 항산화제의 탐색방법을 제공한다.

<18> 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 세균은 로도박터 스페로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides*), 로도스피릴룸 루부름 (*Rhodospirillum rubrum*), 로도슈도모나스 팔루스트리스 (*Rhodopseudomonas palustris*), 알로크로마티움 비노숨 (*Allochromatium vinosum*), 크로비움 테피둠 (*Chlorobium tepidum*) 또는 클로로플렉서스 아우란티아쿠스 (*Chloroflexus aurantiacus*)일 수 있다.

<19> 본 발명의 바람직한 다른 실시예에 따르면, 상기 돌연변이 세균은 로도박터 스페로이데스 2.4.1 SodB1[KCTC 11069BP]일 수 있다.

<20> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 돌연변이 세균은 클로로필리드의 존재시, 1 ~ 3% 농도의 산소 조건 하에서 과산화수소를 생성하지 않으며, 수퍼옥사이드 음이온을 생성하는 활성을 가질 수 있다.

<21> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 필터 디스크 또는 상기 평판 배지에의 클로로필리드의 첨가량은 0.1mM 내지 100mM일 수 있다.

<22> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 상기 필터 디스크는 5㎜ 내지 20㎜의 직경 및 0.1㎜ 내지 1㎜의 두께를 갖고, 상기 배지 블럭은 10㎜ 내지 30㎜의 직경 및 5㎜ 내지 15㎜의 두께를 가질 수 있다.

<23> 본 발명의 바람직한 또 다른 실시예에 따르면, 돌연변이 대상 세균의 형질전환은,

<24> 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제된 제1 재조합 벡터 및 산소 하에서 수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질을 발현하는 제2 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;

<25> 상기 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 발현 벡터 각각을 사용하여 제1 재조합 벡터가 도입된 제1 형질전환 대장균 (E. coli) 및 제2 재조합 발현 벡터가 도입된 제2 형질전환 대장균을 제조하는 단계; 및

<26> 상기 제1 및 제2 형질전환 대장균과 상기 돌연변이 대상 세균을 접합 (conjugation)시킴으로써 상기 돌연변이 세균을 제조하는 단계에 의해서 수행될 수 있다.

<27> 한편, 본 발명은 상기 두 번째 과제를 달성하기 위해서,

<28> 상기 방법에 의해서 탐색된 항산화제를 제공한다.

<29> 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

<30> 본 발명은 클로로필리드 (chlorophyllide) 및 돌연변이 세균을 이용하여 다양한 후보물질들 중에서 항산화제를 선택적으로 탐색하기 위한 방법 및 그로부터 탐색된 항산화제에 관한 것으로서, 클로로필리드가 첨가된 필터 디스크 또는 배지 블럭 중에서의 특정 돌연변이 세균의 성장 상태를 모니터링함으로써 항산화제를 용이하게 선별해내는 탐색방법에 관한 것이다.

<31> 본 발명자들은 1 ~ 3%의 산소 농도 조건 하에서 과산화수소는 생성하지 않으면서도 수퍼옥사이드 음이온만을 선택적으로 생성할 수 있는 로도박터 스페로이데스 유래의 다량체 단백질에 대해서 개시한 바 있다 (대한민국 공개특허번호 제2007-59485호). 따라서, 본 발명에서는 이러한 다량체 단백질을 발현할 수 있으면서도, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 (superoxide dismutase)를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제된 돌연변이 광합성 세균인 로도박터 스페로이데스 2.4.1 SodB1 (KTCC에 2007년 2월 12일자로 기탁. 기탁번호: KCTC 11069BP)을 제조하고, 이를 항산화제의 탐색에 응용하는 방법을 제공하고자 한다.

<32> 즉, 본 발명에 따른 돌연변이 세균은 서열번호 1의 bchX 유전자, 서열번호 2의 bchY 유전자 및 서열번호 3의 bchZ 유전자, rrnB 프로모터 및 N-말단 히스티딘 잔기 포함 태크 등을 포함하는 재조합 발현 벡터에 의해서 형질전환됨으로써 대한민국 공개특허번호 제2007-59485호에 개시된 바와 같은 다량체 단백질을 발현할 수 있으며, 이러한 다량체 단백질은 클로로필리드를 기질로 사용하는 환원 효소로 작용하여 결과물로서 수퍼옥사이드 음이온을 생성하게 된다.

<33> 한편, 야생형 세균에 있어서는 생성된 수퍼옥사이드 음이온을 과산화수소로 변환하는 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 (superoxide dismutase)가 발현되므로, 수퍼옥사이드 음이온에 대한 세포 독성이 완화될 수 있지만, 본 발명에 따른 돌연변이 세균은 이러한 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제되므로, 상대적으로 야생형 세균에 비해서 수퍼옥사이드 음이온에 의한 세포 독성이 크게 나타나게 된다.

<34> 따라서, 본 발명에 따른 돌연변이 세균은 클로로필리드에 대한 다량체 단백질의 효소 작용 결과로 생성된 수퍼옥사이드 음이온으로 인하여 사멸하게 되지만, 탐색하고자 하는 후보물질들 중에서 항산화제로서의 활성을 갖는 특정 후보물질이 존재하게 되는 경우에는 수퍼옥사이드 음이온의 세포 독성을 억제하게 되며, 돌연변이 세균이 성장 가능하게 되므로, 돌연변이 세균의 성장 여부에 의해서 항산화제로서의 활성을 갖는 후보물질을 용이하게 선별해낼 수 있는 것이다.

<35> 구체적으로, 본 발명에 따른 항산화제의 탐색방법은, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 (superoxide dismutase)를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제되고, 산소 하에서

수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질인 클로로필리드 환원효소 (chlorophyllide reductase)를 발현하도록 형질전환된 돌연변이 세균을 평판 배지 상에서 배양하는 단계; 상기 평판 배지 상에 탐색하고자 하는 항산화제 후보물질 및 클로로필리드 (chlorophyllide)가 첨가된 복수 개의 필터 디스크를 위치시키는 단계; 및 상기 돌연변이 세균의 성장이 관찰되는 필터 디스크를 선별하는 단계를 포함하며, 도 1에는 이러한 방법에 대한 공정 개요도를 개략적으로 도시하였다.

<36> 상기 방법은 돌연변이 세균의 배양 이후 클로로필리드 및 항산화제 후보물질을 필터 디스크를 이용하여 첨가하는 방법이지만, 다른 한편으로는 클로로필리드가 첨가된 배지 블럭을 제조한 다음 돌연변이 세균 및 항산화제 후보물질을 첨가하는 방법도 가능하다.

<37> 즉, 본 발명에 따른 또 다른 항산화제의 탐색방법은, 세균 배양용 평판 배지에 클로로필리드를 첨가한 후, 상기 평판 배지를 블럭 형태로 잘라내어 클로로필리드가 첨가된 복수 개의 배지 블럭을 제조하는 단계; 상기 복수 개의 배지 블럭을 세균 배양을 위한 페트리 디쉬 (Petri-dish) 상에 위치시키는 단계; 상기 복수 개의 배지 블럭 상에, 탐색하고자 하는 항산화제 후보물질과, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제되고, 산소 하에서 수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질인 클로로필리드 환원효소를 발현하도록 형질전환된 돌연변이 세균을 가하는 단계; 및 상기 돌연변이 세균의 성장이 관찰되는 배지 블럭을 선별하는 단계를 포함하며, 도 2에는 이러한 방법에 대한 공정 개요도를 개략적으로 도시하였다.

<38> 특히, 본 발명에 따른 항산화제 탐색방법은 수용성 및 지용성 특성을 동시에 지니는 양친성 항산화제의 탐색에 용이하다. 즉, 항산화제 후보물질이 수용성 특성을 보유하지 못하는 경우에는 필터 디스크 또는 배지 블럭에 대한 용해도가 떨어져서 세포로의 확산성이 낮고, 지용성 특성을 보유하지 못하는 경우에는 세포막 투과도가 떨어져서 세포 흡수도가 낮기 때문에, 수퍼옥사이드 음이온에 의한 독성을 효과적으로 억제할 수가 없게 된다. 따라서, 본 발명에 따른 항산화제 탐색방법에 의할 경우 양친성 항산화제인 항산화제 후보물질들이 돌연변이 세균의 성장을 효과적으로 야기하게 된다.

<39> 본 발명에서 돌연변이 대상으로서 사용가능한 세균은, 클로로필리드 환원효소를 발현하는 세균으로서, 이에 제한되는 것은 아니지만, 로도박터 스페로이데스 (*Rhodobacter sphaeroides*), 로도스피릴룸 루부름 (*Rhodospirillum rubrum*), 로도슈도모나스 팔루스트리스 (*Rhodopseudomonas palustris*), 알로크로마티움 비노숨 (*Allochromatium vinosum*), 크로비움 테피둠 (*Chlorobium tepidum*) 또는 클로로플렉서스 아우란티아쿠스 (*Chloroflexus aurantiacus*) 등의 광합성 세균을 예로 들 수 있다.

<40> 이러한 돌연변이 대상 세균의 형질전환은, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제된 제1 재조합 벡터 및 산소 하에서 수퍼옥사이드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질을 발현하는 제2 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계; 상기 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 발현 벡터 각각을 사용하여 제1 재조합 벡터가 도입된 제1 형질전환 대장균 (E. coli) 및 제2 재조합 발현 벡터가 도입된 제2 형질전환 대장균을 제조하는 단계; 및 상기 제1 및 제2 형질전환 대장균과 상기 돌연변이 대상 세균을 접합 (conjugation)시킴으로써 상기 돌연변이 세균을 제조하는 단계에 의해서 수행될 수 있다.

<41> 예를 들어, 본 발명자들은 돌연변이 대상 세균으로서 로도박터 스페로이데스를 선택하고, 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 유전자를 파괴하기 위한 제1 재조합 벡터 및 전술한 서열번호 1의 bchX 유전자, 서열번호 2의 bchY 유전자 및 서열번호 3의 bchZ 유전자, rrnB 프로모터 및 N-말단 히스티딘 잔기 포함 태그 등을 포함하는 제2 재조합 발현 벡터를 제조한 다음, 제조된 제1 재조합 벡터 및 제2 재조합 발현 벡터를 사용하여 대장균 (E.coli)을 형질전환시킴으로써 제1 및 제2 형질전환 대장균을 제조하였다. 이어서, 상기 제1 및 제2 형질전환 대장균과 로도박터 스페로이데스를 접합 (conjugation)시킴으로써 돌연변이 세균을 제조하였다. 제조된 돌연변이 세균은 클로로필리드를 환원시키는 다량체 단백질을 발현하면서도 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제된 SodB1 변이체였으며, 이를 로도박터 스페로이데스 2.4.1 SodB1 (Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 SodB1)로 명명하고, KTCC에 2007년 2월 12일자로 기탁하였다 (미생물 기탁번호 : KCTC 11069BP).

<42> 본 발명에 따라서 제조된 돌연변이 세균은 다량체 단백질을 발현하며, 발현된 다량체 단백질은 클로로필리드를 환원시켜서 1 ~ 3% 농도의 산소 조건 하에서 과산화수소는 생성하지 않으면서도 수퍼옥사이드 음이온을 생성하는 활성을 가질 수 있다. 종래의 통상적인 수퍼옥사이드 생성 물질들인 메틸 바이올로젠, 플럼바진, 메나디온 등은 결과물로서 수퍼옥사이드 뿐만 아니라 과산화수소를 생성하게 된다. 생성된 과산화수소는 철 이온 (Fe^{2+})과 반응하여 하이드록시 라디칼을 생성하여 지방을 변성시키거나 DNA 변이를 야기하며, 세포막 투과성이 높고

상대적으로 안정하여 과산화수소가 생성된 세포 이외의 다른 세포에도 영향을 미칠 수 있다는 문제점들이 있기 때문에 카탈라제 (catalase) 등을 별도로 처리하여 제거해 주어야 하는 문제점이 있었다. 그러나, 본 발명에 따라서 제조된 돌연변이 세균이 발현하는 다량체 단백질은 과산화수소는 생성하지 않으면서도 수퍼옥사이드 음이온을 생성하는 활성을 지니기 때문에, 종래기술의 한계점을 효과적으로 극복할 수 있게 된다.

<43> 한편, 본 발명에 따른 항산화제 탐색방법에 있어서, 상기 필터 디스크 또는 상기 평판 배지에의 클로로필리드의 첨가량은 0.1mM 내지 100mM일 수 있는데, 이는 클로로필리드의 첨가량이 0.1mM 미만인 경우에는 민감도가 너무 낮아지는 문제점이 있고, 100mM을 초과하는 경우에는 세포에 독성을 야기할 수 있다는 문제점이 있어서 바람직하지 않다.

<44> 상기 평판 배지 또는 페트리 디쉬 상에 놓이게 되는 필터 디스크 또는 클로로필리드가 첨가된 배지 블럭의 크기는 탐색하고자 하는 후보물질의 개수 또는 시각적 관찰의 용이성 등을 고려하여 다양하게 조절가능하지만, 예를 들어 상기 필터 디스크는 5mm 내지 20mm의 직경 및 0.1mm 내지 1mm의 두께를 갖고, 상기 배지 블럭은 10mm 내지 30mm의 직경 및 5mm 내지 15mm의 두께를 가질 수 있다.

<45> 또한, 본 발명은 상기 두 번째 과제를 달성하기 위해서, 상기 방법에 의해서 탐색된 항산화제를 제공한다.

<46> 예를 들어, 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 탐색방법에 의해서 탐색된 항산화제 중에서 Pch212는 양친성을 지니며, 따라서 DMSO 및 수용성 완충용액 모두에 대해서 우수한 용해도를 갖는다. 또한, 도 4의 세균 성장 관찰 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 종래의 통상적인 항산화제인 지용성 퀴세틴 (quercetin) 또는 지용성 토코페롤 (tocoperol)보다 훨씬 우수한 항산화 효능을 갖는다.

효 과

<47> 본 발명에 따르면, 돌연변이 세균 및 클로로필리드를 이용하여 상기 돌연변이 세균의 성장 상태를 모니터링함으로써 양친성 항산화제를 대량으로 용이하게 선별 탐색할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<48> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 하기 실시예에 의해서 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

<49> **실시예 1: 돌연변이 세균의 제조**

<50> **1.1 다량체 단백질 발현 돌연변이 세균의 제조**

<51> bchX (서열번호 1), bchY (서열번호 2), bchZ (서열번호 3) 유전자에 대해서 중합효소 연쇄 반응을 통하여 N-말단에 히스티딘 태그 또는 스트렙 태크를 연결하였다. 전방 프라이머 (primer)는 번역 시작 코돈인 ATG 코돈을 변형시켰다. 이를 위하여 bchX는 서열번호 4, bchY는 서열번호 5, bchZ는 서열번호 6의 프라이머를 제작하여 사용하였다. 후방 프라이머는 HindIII 위치를 제조하여 bchX, bchY 및 bchZ를 위하여 각각 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 9의 프라이머를 제작하여 사용하였다. 다음 표 1의 밑줄은 제한효소 위치를 만들기 위하여 임의로 변형시킨 염기서열을 나타내고, 굵게 표시한 염기 서열은 해당 제한효소의 인식서열이다.

표 1

<52>

서열번호	구분	서열목록(5' → 3')	비고
4	전방 프라이머	CACC**GGATCC**CGGATGCA	BamHI 인식 서열
5	전방 프라이머	GGCAGGA**GGATCC**GCCAGACC	BamHI 인식 서열
6	전방 프라이머	GATC**TAGATC**TCGTGCAG	BglII 인식 서열
7	후방 프라이머	CGCGCG**AAGCTT**TCGAGA	HindIII 인식 서열
8	후방 프라이머	TGTCAT**AAGCTT**GCACGA	HindIII 인식 서열
9	후방 프라이머	CGG**AAGCTT**CGCTCATTG	HindIII 인식 서열

<53> 중합효소 연쇄 반응으로 얻어진 조각을 bchX와 bchY의 경우 BamHI과 HindIII 로 오려내어 pRSET-C 벡터 (Invitrogen)의 BamHI과 HindIII 지역을 절단하고 여기에 접합하여 각각 pRSET-HisX, pRSET-HisY를 제작하였다. DNA 조각을 얻기 위한 절단을 위해 해당 제한효소 (restriction endonuclease, TAKARA)를 사용하였고, 조각의 접합을 위해서는 T4 DNA 라이게이즈 (ligase, TAKARA)를 사용하였다. 또한, bchZ의 경우 BglII

와 HindIII 지역으로 오려내어 pRSET-C의 BamHI과 HindIII 지역을 이용하여 접합하여 pRSET-HisZ를 제작하였다. pRSET-C 벡터의 BamHI 위치로부터 142 bp 상위에 있는 XbaI 위치를 이용하여 pRSET-HisX, pRSET-HisY 및 pRSET-HisZ에서 각각의 XbaI과 HindIII 조각을 얻어 pRK415에 로도박터 스페로이데스의 rrnB 프로모터를 함유하고 있는 벡터에 접합하여 pRK-HisX, pRK-HisY 및 pRK-HisZ 구조물을 제작하였다. 이들 벡터는 세포 내에서 rrnB 프로모터 (서열번호 10)에 의해 전사되고 N-말단에 히스티딘 태그가 융합된 해당 단백질을 발현시킨다. 이들 각각의 구조물을 대장균 S17-1로 형질전환한 다음 로도박터 스페로이데스에 접합법 (conjugation)을 통해서 가동화하였다. 형질전환체를 얻기 위해 벡터 플라스미드를 선별할 수 있는 항생제 테트라사이클린 (tetracycline)을 첨가한 시스트롬 최소 배지에 도말하였으며, 항생제 저항성을 가지는 균주들을 확보하였다. 각각의 BchX, BchY, BchZ 단백질의 발현은 히스-태그에 대한 항체를 이용한 웨스턴 블롯팅을 통해 확인할 수 있었다.

<54> 단백질 발현 여부를 확인하기 위해서, 이 균주들로부터 BchX (서열번호 11), BchY(서열번호 12) 및 BchZ (서열번호 13) 단백질을 과발현시켜 단백질을 분리하였다. pRK-HisX, pRK-HisY, 및 pRK-HisZ 구조물을 포함하는 각 균주들은 혐기 조건에서 1L 배양병을 부틸 합성 고무 뚜껑으로 막고 배지를 질소 가스로 치환하여 배양하였다. 분리과정은 5% 수소, 5% 이산화탄소, 90% 질소를 포함하고 있는 혐기상자 (Anaerobic chamber, model 10, COY, Grass Lake, MI) 안에서 이루어졌다. 세포 내에 있는 수용성의 과발현 단백질을 얻기 위해 초음파 파쇄기 (sonicator, Sonifier 250, Branson, Sweden)를 이용하여 4 ℃에서 10 분간 세포를 파쇄하였고, 이를 4 ℃에서 12,000 g로 원심분리하여 수용성 세포질액을 얻은 후 니켈-친화 크로마토그래피 (Qiagen)를 제조사의 방법에 따라 이용하여 분리하였다. 세포질액을 니켈 레진 (resin)에 붙인 후, 이미다졸 (imidazole)과의 친화도 경쟁을 통해 BchX, BchY 및 BchZ 단백질을 수득하였으며, 단백질의 용출을 위하여 150 mM의 이미다졸과 300 mM 염화나트륨이 포함된 50 mM 인산이수소나트륨 (NaH_2PO_4) 버퍼 (pH 7.9)를 사용하였다. 각각의 단백질의 확인은 12% 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 전기영동을 통하여 이루어졌으며, BchX는 40 kDa, BchY는 58 KDa, BchZ는 57 kDa의 밴드를 확인할 수 있었다 (도 3).

<55> 도 3은 로도박터 스페로이데스로부터 BchX 단백질, BchY 단백질 및 BchZ 단백질을 분리하기 전 후의 전기영동 (SDS-PAGE)을 수행한 12% 폴리아크릴아미드 겔 사진이다. 각 1번은 각각의 단백질이 발현된 세포의 전체 단백질을 나타내고, 각 2번에서 보이는 단백질들은 니켈-친화 크로마토그래피 컬럼을 통과한 니켈에 대한 친화성이 없는 일반 단백질에 해당되며, 각 3번은 분리된 단백질(BchX, BchY, BchZ)에 해당된다. 각각의 단백질의 크기를 확인하기 위하여 표준 분자량을 갖는 단백질을 함께 전기영동하였다.

<56> 이러한 bchX, bxhY 및 bchZ 유전자를 하나의 벡터 상에 위치시키고, 이 플라스미드를 접합법 (conjugation)을 통해서 가동화시킴으로서 BchX 단백질, BchY 단백질 및 BchZ 단백질이 모두 발현되어 클로로필리드 환원효소를 구성할 수 있는 형질전환 돌연변이 세균을 제조하였다.

<57> **1.2 SodB1 변이체의 제조**

<58> 실시예 1.1에서 제조된 돌연변이 세균을 사용하여 하기와 같은 방법에 의해서 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈를 암호화하는 유전자 서열에 돌연변이를 포함함으로써 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈의 활성이 억제된 SodB1 변이체를 제조하였다.

<59> Fe형의 수퍼옥사이드 디스뮤테이즈 (Fe-SOD)를 코드하는 sodB 유전자를 pLO1 자살벡터를 사용한 상동 재결합 (homologous recombination)을 유도하는 방법을 통해 파괴하였다. sodB 유전자의 StuI 위치에 항생제 스트렙토마이신과 스펙티노마이신 (streptomycin/spectinomycin) 저항성 유전자를 포함하는 전사 및 번역 종결 구조물을 끼워 넣어 자살 벡터 (suicide vector)에 클로닝하여 pLO1-B1을 제작하였다. 이 구조물을 사용하여 상동 재결합시 유전자 중간에 위치하는 스트렙토마이신과 스펙티노마이신 저항성 유전자에 의해 스트렙토마이신과 스펙티노마이신에 대해서만 저항성을 가지고 벡터에 의한 카나마이신 저항성이 없는 이중교차 (double crossover) 상동 재결합이 일어난 콜로니 (colony)를 선별하여 sodB1 결손 변이주를 확보하였다.

<60> 이 다량체 단백질을 발현하는 SodB1 변이체인 로도박터 스페로이데스 2.4.1 SodB1 (Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 SodB1)을 KTCC에 2007년 2월 12일자로 기탁하여 KCTC 11069BP를 부여받았다.

<61> **실시예 2: 클로로필리드의 분리**

<62> 실시예 1에서 제조된 돌연변이 세균으로부터 발현되는 다량체 단백질에 대한 기질인 클로로필리드를 분리하기 위하여 로도박터 스페로이데스의 bchZ 유전자를 상동 재결합 (homologous recombination)을 유도하는 방법을 통해 파괴하였다. bchZ 유전자가 결손된 변이주를 제작하기 위해 bchZ 유전자 안에 있는 제한 효소인 BamHI을 이

용하였다. BalI 과 PstI 을 이용하여 bchZ 유전자 부근을 얻은 후 BamHI 지역에 항생제 카나마이신 (kanamycin) 저항성 유전자를 포함하는 전사 및 번역 종결 구조물을 끼워 넣어 자살 벡터 (suicide vector)인 pSUP202에 클로닝하여 pSUP-BZ를 제작하였다. 이 구조물을 사용하여 상동 재결합 시 유전자 중간에 위치하는 카나마이신 저항성 유전자에 의해 카나마이신에 대해서만 저항성을 가지고 벡터에 의한 테트라사이클린 저항성이 없는 이중교차 (double crossover) 상동 재결합이 일어난 콜로니 (colony)를 선별하여 bchZ 결손 변이주를 확보하였다. 이 bchZ 결손 변이주는 디메틸설폭사이드 (dimethylsulfoxide)를 최종 전자전달 수용체로 사용하는 혐기 어둠조건에서 성장시켰을 경우 초록색의 클로로필리드를 배지 내에 축적시켰으며, 이를 분광 광도계 (spectrophotometer, UV-2550, Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였을 때 기존에 보고된 바와 같이 663 nm의 파장에 대한 흡광도를 나타내었다. 배지 내에 축적되어있는 클로로필리드를 분리하기 위하여, 배지를 디에틸에테르 (diethylether)로 추출하였고, 이를 질소를 이용하여 건조시킨 후 디메틸설폭사이드에 녹여 반응에 사용하였다.

<63> **실시예 3: 항산화제의 탐색**

<64> 도 1 및 2에 도시된 바와 같이, 클로로필리드 (0.1 ~ 100 mM)를 첨가한 평판 배지를 만든 후, 이 평판 배지를 아주 작은 배지 블럭으로 잘라내어 빈 평판 배지에 올려두고 이 블록에 항산화 시료와 SodB1 변이 세균을 가하거나, 또는 직접 필터 디스크에 클로로필리드 (0.1 ~ 100 mM)를 가한 뒤 여기에 원하는 농도의 항산화 후보물질을 가한 다음, 다량체 단백질을 발현하는 SodB1 변이 세균인 로도박터 스페로이데스 2.4.1 SodB1 [KCTC 11069BP]을 시스트롬 (Sistrom) 최소 평판배지 [20 mM 인산이수소칼륨 (KH_2PO_4), 3.8 mM 황산암모늄 ($(NH_4)_2SO_4$), 34 mM 숙신산, 0.59 mM L-글루탐산, 0.30 mM L-아스파르트산, 8.5 mM 염화나트륨, 1.05 mM 니트릴로트리아세트산 (nitrilotriacetic acid), 1.2 mM 염화마그네슘 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 0.23 mM 염화칼슘 ($CaCl_2 \cdot 7H_2O$), 25 μM 황산제일철 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 0.16 μM 몰리브덴산암모늄 ($(NH_4)6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$), 4.7 μM EDTA, 38 μM 황산아연 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), 9.1 μM 황산망간 ($MnSO_4 \cdot H_2O$), 1.6 μM 황산동 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 0.85 μM 질산코발트(II) ($Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), 1.8 μM 붕산 (H_3BO_3), 8.1 μM 니코틴산, 1.5 μM 티아민염산염, 41 nM 비오틴 (biotin) [Sistrom, W. R, 1962. J. Gen. Microbiol. 28: 607-616]에 도말하였다.

<65> 그 결과, 탐색하고자 하는 항산화제 후보물질에 항산화 활성이 존재하는 경우에는 배지 블럭 또는 필터 디스크 주위에서만 세포가 자라 붉은색의 세균이 관찰되는데 반하여, 항산화제 후보물질에 항산화 활성이 존재하지 않는 경우에는 모든 세포가 사멸되어 붉은색의 세포성장을 볼 수 없었다. 또한, 탐색하고자 하는 항산화제 후보물질에 항산화 활성이 존재하는 경우에는 필터 디스크 주위에서도 세포가 자라 붉은색의 세균이 관찰되는데 반하여, 항산화제 후보물질에 항산화 활성이 존재하지 않는 경우에는 필터 디스크 주변의 세포가 사멸되었다 (도 4).

<66> 세포 성장이 관찰되는 돌연변이 세균의 배양물을 에탄올, 메탄올, 디에틸에테르 (diethylether), 아세톤 및 클로르포름으로 각각 추출하고, 이들 추출물들을 질소를 이용하여 건조시켰다. 얻어진 추출물을 Pch212로 명명하였으며, 그 항산화 활성을 기존 항산화제와 비교하기 위해서 적당한 농도로 에탄올 또는 디메틸설폭사이드 용매에 용해시켜서 항산화 활성을 관찰하였고, 관찰 결과를 도 5에 도시하였다.

<67> 도 5에 도시된 바와 같이, 음성대조군인 에탄올이나 디메틸설폭사이드는 세포성장을 나타내지 않는 반면에, 강력한 항산화활성을 갖는 지용성 퀴세틴 (quercetin)이나 지용성 토코페롤은 부분적인 세포의 성장을 보여 주었고, Pch212는 세포의 사멸을 가장 효과적으로 방지하였다. 또한, Pch212의 양친성을 확인하기 위해서, DMSO 및 수용성 완충용액에 용해시켜 본 결과, 두 가지 용매 모두에 대해서 우수한 용해도를 나타내었다.

<68> **실시예 4: Pch212의 수퍼옥사이드 음이온에 대한 항산화 효과 확인**

<69> 양친성 항산화제 검색법으로 검색된 항산화제 Pch212의 항산화 활성을 시토크롬 환원방법으로 확인하였다. 시토크롬 환원방법은 기존 방법을 응용하여 수행하였다 (McCord and Fridovich, 1969, J. Biol. Chem. 244: 6049-6055).

<70> 분석을 위해 반응 완충용액 [100 mM HEPES-KOH(pH 7.4), 5 mM 염화마그네슘 ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), 5 mM 디티오쓰레이톨 (dithiothreitol), 20 mM 크레아틴 포스페이트 (creatine phosphate), 0.2 mg/mL 크레아틴 포스포키나제 (creatine phosphokinase), 1 mM ATP, 30 mM NADH]을 준비하였다. 고무 뚜껑으로 밀폐된 5 mL의 유리병 내에 버퍼와 100 mM의 잔틴 (xanthine), 0.004 U의 잔틴 산화제 및 실시예 3에서 탐색된 항산화제 Pch212를 넣은 후 이를 밀봉하고 질소로 치환시켰다. 20 μM의 시토크롬 *c* (cytochrome *c*)를 가하고 550 nm에서 흡광도의 증가

를 통해 그 환원 정도를 측정하였으며, 21000 $M^{-1}cm^{-1}$의 흡광계수 (extinction coefficient)를 이용하여 수치화 하였다. 이때, 수퍼옥사이드 음이온을 제거하는 항산화 활성은 시토크롬의 환원 정도 차이를 통하여 확인할 수 있었다 (도 6).

산업이용 가능성

<71> 본 발명은 치료용 의약품뿐만 아니라, 각종 식품 및 화장품의 첨가제에 사용되는 독성이 적고 효과적인 항산화제를 탐색하여 제품화하는데 적용가능하다.

도면의 간단한 설명

<72> 도 1은 본 발명에 따른 항산화제 탐색방법에 대한 일 예로서, 클로로필리드 (chlorophyllide)가 첨가된 복수 개의 필터 디스크를 사용하여 항산화제를 탐색하는 방법에 대한 개략적인 공정도이다.

<73> 도 2는 본 발명에 따른 항산화제 탐색방법에 대한 다른 예로서, 복수 개의 배지 블럭을 사용하여 항산화제를 탐색하는 방법에 대한 개략적인 공정도이다.

<74> 도 3은 BchX, BchY 및 BchZ 유전자를 스트랩텍을 함유한 재조합 단백질로 대장균에서 발현시키고 정제한 후, 12% 폴리아크릴아미드 겔로 전기영동 (SDS-PAGE)을 수행한 사진이다.

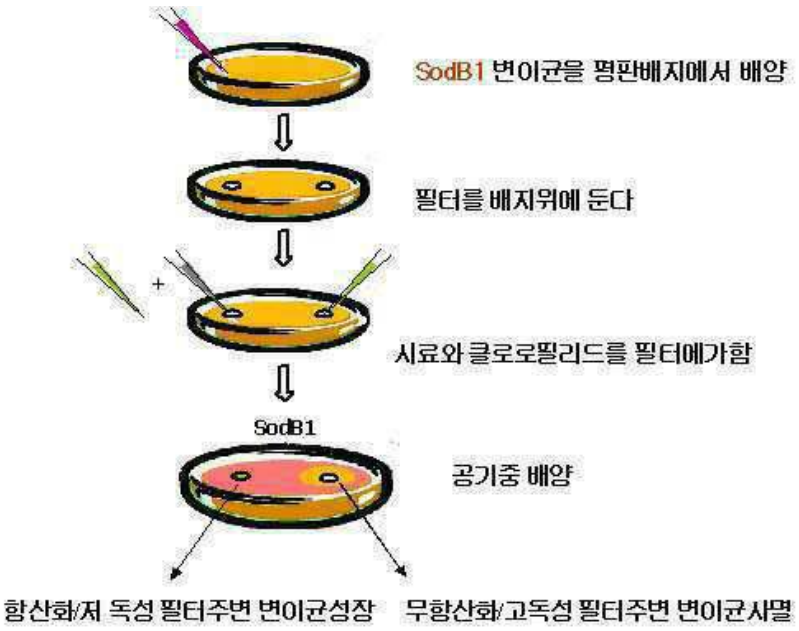
<75> 도 4는 본 발명에 따라서 배지 블럭을 사용하여 항산화제를 검색할 경우, 후보물질에 항산화 활성이 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우의 세균 성장 관찰 결과를 비교 대조하여 도시한 사진이다.

<76> 도 5는 본 발명에 따라서 탐색된 항산화제인 Pch212의 항산화 활성을 기존 항산화제의 항산화 활성과 비교하기 위한 세균 성장 관찰 결과를 도시한 사진이다.

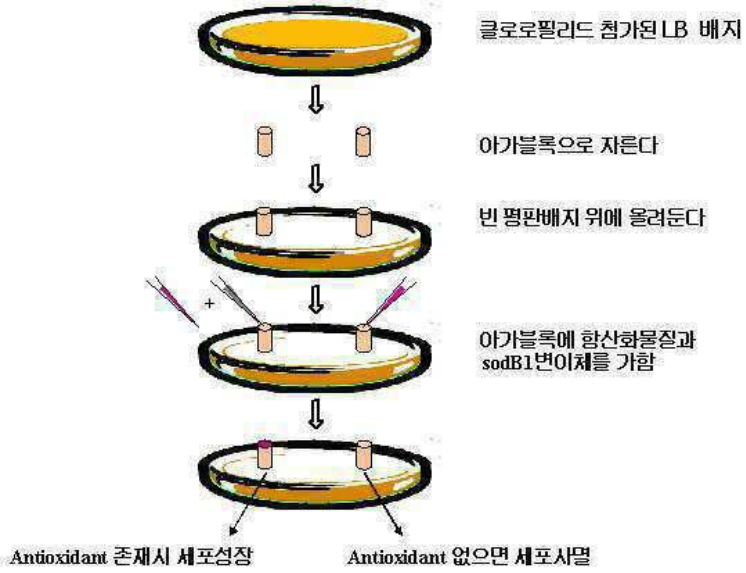
<77> 도 6은 본 발명에 따라서 탐색된 항산화제인 Pch212의 항산화 활성을 시토크롬 환원방법으로 확인한 결과를 도시한 그래프이다.

도면

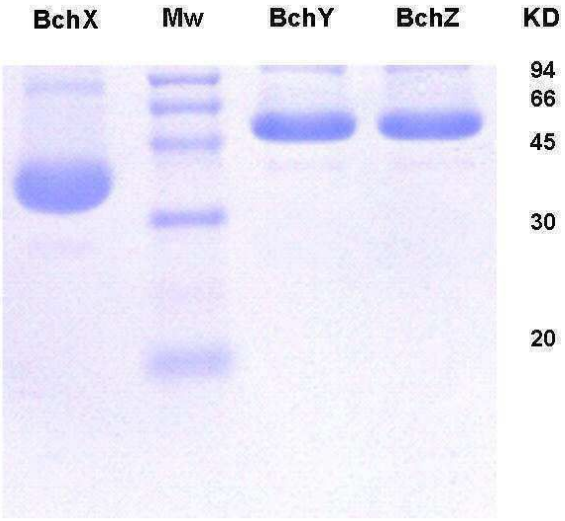
도면1



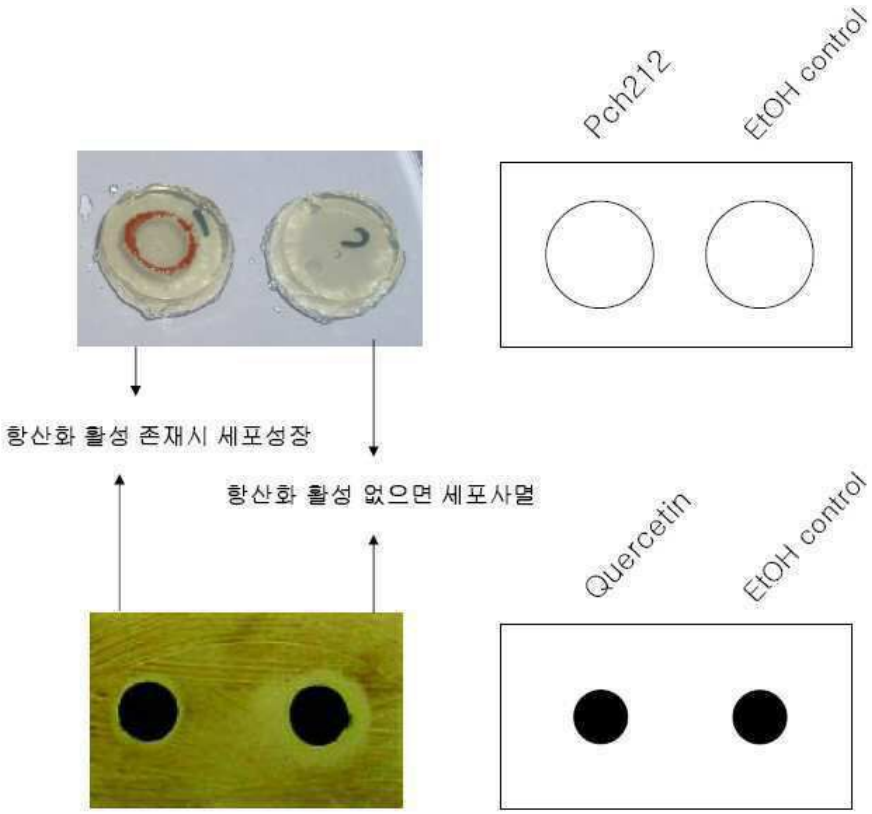
도면2


클로로필리드 첨가된 LB 배지
아가블록으로 자른다
빈 평판배지 위에 올려둔다
아가블록에 항산화물질과
sodB1변이체를 가함
Antioxidant 존재시 세포성장
Antioxidant 없으면 세포사멸

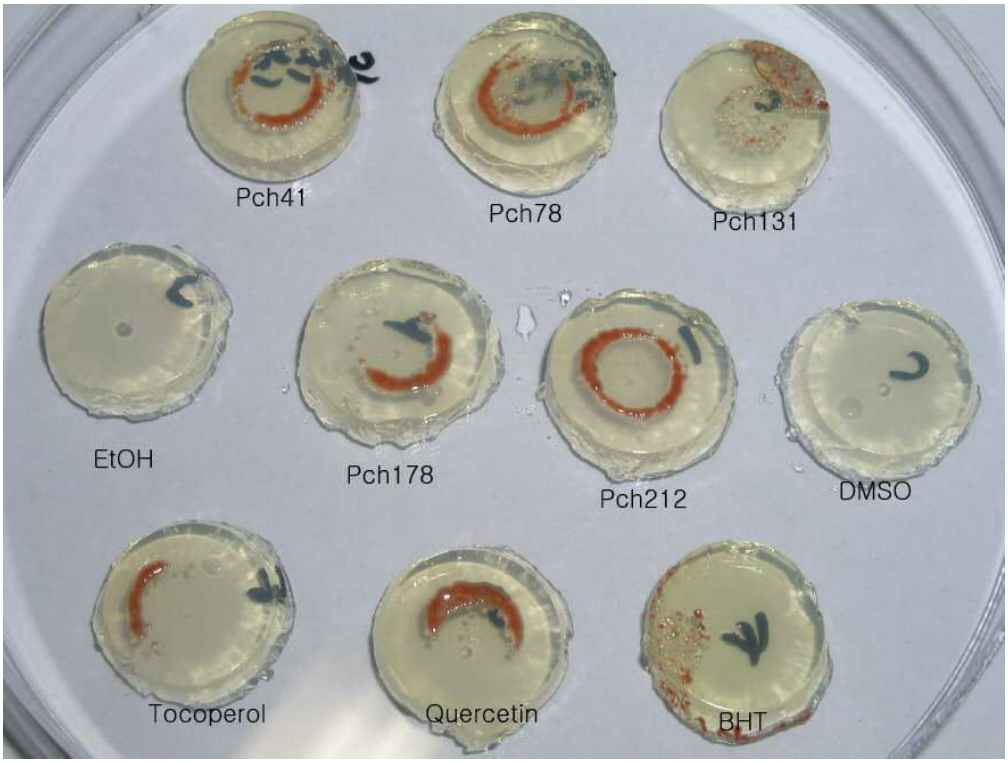
도면3


BchX
Mw
BchY
BchZ
KD
94
66
45
30
20

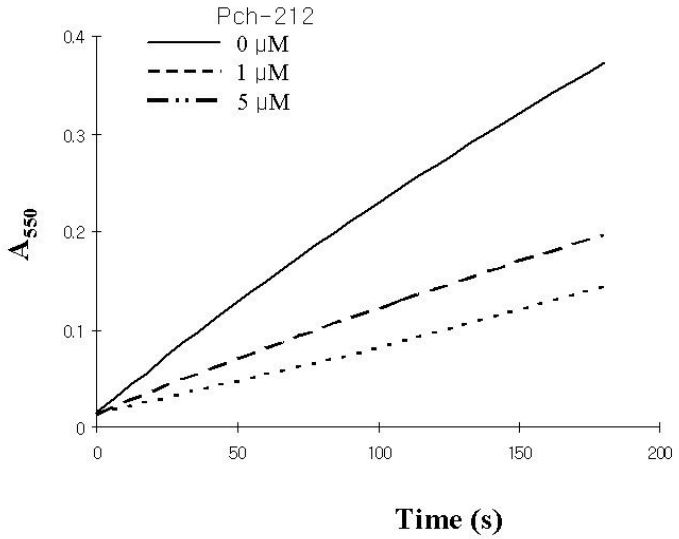
도면4


Pch212
EtOH control
항산화 활성 존재시 세포성장
항산화 활성 없으면 세포사멸
Quercetin
EtOH control

도면5


Pch41
Pch78
Pch131
EtOH
Pch178
Pch212
DMSO
Tocoperol
Quercetin
BHT

도면6



서열목록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
<120> METHOD FOR SCREENING ANTIOXIDANT USING MUTANT BACTERIA AND CHLOROPHYLLIDE, AND ANTIOXDANT SCREENED BY THE METHOD

<130> HP0738

<150> KR10-2007-0018752
<151> 2007-02-24

<160> 13

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1002
<212> DNA
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 1
atgacggatg cacccgaact gaaggcgttc gaccaacgcc tccgcgacga ggcggcggaa 60

gagccgacgc tcgaggtgcc gcaaggcgag ccgaagaaga agacgcaggt catcgcgatc 120

tacggcaagg gcggcatcgg caagagcttc acgctggcga acctcagcta catgatggcc 180

cagatcggca agcgcgtgct gctgatcggc tgcgacccga agtccgacac gacctcgctt 240

ctgttcggcg gcaaggcctg ccccacgatc atcgagacct cggccaggaa gaagctggcc 300

ggcgaagagg tccagatcgg cgacgtctgc ttcaagcgcg acggcgtctt cgcgatggag 360

ctgggcgggc ccgaggtggg ccgcggctgc ggcgggcgcg gcatcatcca cggcttcgaa 420

ctgctggaga agctcggctt ccacgactgg gacttcgact atgtgctgct cgacttcctg 480

ggcgacgtgg tctgcggcgg cttcggcctg cccatcgccc gcgacatggc gcagaaggtg 540

atcctcgtcg gatcgaacga cctccagtcg ctctatgtga cgaacaacgt ctgctcggcg 600

gtggaatatt tccgcaagct cggcggcaac gtgggcgtgg cggggctcgt catcaacaag 660

gacgacggca ccggcgaggc caaggccttc gccgaggcgg cggacattcc gatccttgcg 720

acgattccgg ccgacgagga tctgcgccgc aagtcggcga actatcagat cgtcggcatt 780

cccggcacgc aatggggacc tctcttcgag gggctggccc atgccgtggg cgaggcgccc 840

ccgatccggc cgaagccgct gtcgcaggat ggcctcctcg acctcttcac ccccgaggcg 900

atcggcgccg acttcaagct cgagcccgcc acggatgccg acatgcgcgg caagaacgcg 960

gccgcgaaga aatcgctgga agtgatctac gacgatgctt ga 1002

<210> 2
<211> 1509
<212> DNA
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 2
atgagccaga ccccaggcgg cgccccgatg gcgcccgagg ccatgggctg ccattccacg 60

gccgacatgg ccgccgcggc cagtgccgcg ggcaacggcg aactgatgga gcggttcaag 120

gccgactatc cggtcgggcc ccacgacaag ccgcagagca tgtgcccggc cttcgggtcg 180

ctgcgcaccg ggcttcggat gcggcgggtg ggcacgatca tctcgggttc ggcctgctgc 240

acctacggcc tctcgttcgt ctcgcatttc tacggcgcgc ggcggtcgat cggctatgtg 300

cccttcaatt cggaatcgct cgtcacgggc aagctgttcg aggacatccg cgaggcggtc 360

cacgagatgg ccgatccgca gcgctatgac gcgatcgtgg tgacgaacct ctgcgtgccg 420

accgcctcgg gcgtgccgct gcggctcctg ccctccgaga tcaacggcgt gcggatcgtg 480

ggcatcgacg tgccgggctt cggcgtgccg acccatgccg aggcgaagga cgtgctggcg 540

ggcgcgatgc tgaaatatgc ccgctccgag atcgaggcgg gcccggtgca ggcgccggtc 600

tcgggccggt ccgaccggcc gaccgtggcg ctgctgggcg agatgttccc ggccgatccg 660

gtgatgatcg gggcgctgct ggcgccgctg ggtcttgctg cggggcccgt ggtgccctgc 720

cgcgactggc gcgagctcta tgccgcgctc gacagtggcg tggccgcggc gatccatccc 780

ttctacacgg cctcggtccg cgagtttcag gccgcaggcc gcgccatcgt gggctctgcc 840

cccgtgggcc atgacggcac cgccgcctgg cttgccgcca tcggcgaggc ctatggcatc 900

gccgccgaca aggtggccgc cgcgcagaac gccttcctgc ccgcgatcag gggcgcgctg 960

gccggtgcgc cgatcaaggg gcgcatcacg ctctcgggct atgagggctc cgagctgatc 1020

gtggcgcgcc tgctgatcga gagcggcgcc gaagtgccct atgtgggcac cgccgcaggc 1080

aggacgccct ggagtgccgc cgaccgcgaa tggctcgagg cccggggcac ggtggtgaag 1140

ttccgcgcct cgctcgagga cgatctcgcc gcgatgcagg gcttcgagcc cgacctcgcc 1200

gtgggcacga ccccggtggt gcagaaggcc aagtcgctgg gcatcccgtc gctctacttc 1260

accaacctca tctcggcccg gccgctgatg gggccggccg gagcgggcag cctcgcgcag 1320

gtgatcaatg cggccatcgg caaccgcgag cggatgtcga agatgaaagc cttcttcgcc 1380

ggcgtaggcg agggggatac ggccggcatc tgggagggtg cgcccaacct gcgccccgac 1440

ttccgggccg cgcaccagaa gaagctcgag aaggccgccc gggccgccaa gtccgaggag 1500

atgatctga 1509

<210> 3
<211> 1476
<212> DNA
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 3
atgctcgtgc aggatcatga cagggcaggg ggctactggg gcgccgtcta tgccttctgt 60

gcggtgaagg ggcttcaggt ggtgatcgac ggccccgtgg gctgcgagaa cctgccggtg 120

acctcggtgc tgcattacac cgacgcgctg cccccgcacg agctgcccat cgtggtgacg 180

ggcctcggcg agagcgagat gagcgagggc accgaggcct cgatgagccg ggcctggaag 240

gtgctggatc cggcgctgcc cgcggtggtg gtcacgggct cgatcgccga gatgatcggc 300

ggcggcgtga cgccgcaggg cacgaacatc cagcgcttcc tgccccgcac catcgacgag 360

gaccagtggg aagcggccga ccgggcgatg acctggatct tctcggagtt cgggatgacc 420

aagggtcgca tgccgcccga agccaagcgc cccgaggggg cgaagccgcg ggtgaacatc 480

ctcgggccca tgtacggcgt cttcaacatg gcgtcggacc ttcacgagat tcgccgtctc 540

gtcgagggga tcggcgccga agtgaacatg gtgatgccct tgggcgcgca tctggccgag 600

atgcgacact tggtcaatgc cgacgccaac atcgtcatgt accgcgaatt cggccgcggg 660

ctggccgagg tgctgggcaa gccctacctc caggcccccа tcggggtcga gagcacgacc 720

gccttcctgc gccgcctggg cgagattctg ggcctcgatc cggagccctt catcgagcgc 780

gagaagcact cgacgctgaa gcccgtgtgg gatctgtggc ggagtgtcac gcaggacttc 840

ttcgggacgg ccaatttcgg aatcgtggcg accgaaactt atgcaagagg catccgaaac 900

tatctcgaag gcgatctcgg gctgccctgc gccttcgccg tggcccgcaa gaggggctcg 960

aagaccgaca acgaagcggt gcgcggactg atccgccagc accgtccgct cgtgctcatg 1020

gggtcgatca acgagaagat ttaccttgcg gaactgaaag ccggtcacgg cccgcaaccc 1080

tctttcatcg ctgcctcttt cccgggtgcg gcgatccggc gcgctaccgg aacgcccgtt 1140

atgggatatg caggtgctac gtggttactg caggaagttt gcaacgccct gttcgacgcc 1200

ctgttccaca ttctgcccct cgggacggag atggacagcg ccgccgccac accgacgaca 1260

ctgcgccgcg acttcccgtg ggatgccgat gcgcaagcgg ccctggaccg catcgtagag 1320

gagcatccgg ttctcacccg gatcagcgcc gcgcgtgcct tgcgcgacgc cgccgagaag 1380

gctgccctcg atgccggtgc cgagagggtc gtgagagaga ctgtcgaagc cctgcgtggg 1440

ccgggcttcg gcgagaggaa gggagagaac caatga 1476

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of bchX

<400> 4
caccggatcc cggatgca 18

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of bchY

<400> 5
ggcaggagga tccgccagac c 21

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer of bchZ

<400> 6
gatctagatc tcgtgcag 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of bchX

<400> 7
cgcgcgaagc tttcgaga 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of bchY

<400> 8
tgtcataagc ttgcacga 18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer of bchZ

<400> 9
cggaagcttc gctcattg 18

<210> 10
<211> 302
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> rrnB promoter

<400> 10
cgtcgcgcgc accctctgcg gcggccggac gactcaccgg aggctctgag tcgccgcgca 60

ggtcgggcga aaggggcggg tcgccggctc cgcggcaacg aaaaacgcca agatttcttg 120

gctgcgacat gaaattgtta cggagcccaa aaaatccgct tgcgcccggg gccgtctgct 180

cctagaaacc gcttcaccga gacgaagacc ggcagcgccg gacggagacg agggagcgga 240

tgacagaaac gtcggccgcg acaattgaag atgaggcgga cgggatcgct ggttgtctgg 300

cg 302

<210> 11
<211> 333

<212> PRT
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 11

```
Met Thr Asp Ala Pro Glu Leu Lys Ala Phe Asp Gln Arg Leu Arg Asp
  1               5                  10                  15

Glu Ala Ala Glu Glu Pro Thr Leu Glu Val Pro Gln Gly Glu Pro Lys
             20                  25                  30

Lys Lys Thr Gln Val Ile Ala Ile Tyr Gly Lys Gly Gly Ile Gly Lys
         35                  40                  45

Ser Phe Thr Leu Ala Asn Leu Ser Tyr Met Met Ala Gln Ile Gly Lys
     50                  55                  60

Arg Val Leu Leu Ile Gly Cys Asp Pro Lys Ser Asp Thr Thr Ser Leu
 65                  70                  75                  80

Leu Phe Gly Gly Lys Ala Cys Pro Thr Ile Ile Glu Thr Ser Ala Arg
                 85                  90                  95

Lys Lys Leu Ala Gly Glu Glu Val Gln Ile Gly Asp Val Cys Phe Lys
            100                 105                 110

Arg Asp Gly Val Phe Ala Met Glu Leu Gly Gly Pro Glu Val Gly Arg
        115                 120                 125

Gly Cys Gly Gly Arg Gly Ile Ile His Gly Phe Glu Leu Leu Glu Lys
    130                 135                 140

Leu Gly Phe His Asp Trp Asp Phe Asp Tyr Val Leu Leu Asp Phe Leu
145                 150                 155                 160

Gly Asp Val Val Cys Gly Gly Phe Gly Leu Pro Ile Ala Arg Asp Met
                165                 170                 175

Ala Gln Lys Val Ile Leu Val Gly Ser Asn Asp Leu Gln Ser Leu Tyr
            180                 185                 190

Val Thr Asn Asn Val Cys Ser Ala Val Glu Tyr Phe Arg Lys Leu Gly
        195                 200                 205

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

```
    210                 215                 220

Gly Glu Ala Lys Ala Phe Ala Glu Ala Ala Asp Ile Pro Ile Leu Ala
225                 230                 235                 240

Thr Ile Pro Ala Asp Glu Asp Leu Arg Arg Lys Ser Ala Asn Tyr Gln
                245                 250                 255

Ile Val Gly Ile Pro Gly Thr Gln Trp Gly Pro Leu Phe Glu Gly Leu
            260                 265                 270

Ala His Ala Val Gly Glu Ala Pro Pro Ile Arg Pro Lys Pro Leu Ser
        275                 280                 285

Gln Asp Gly Leu Leu Asp Leu Phe Thr Pro Glu Ala Ile Gly Ala Asp
    290                 295                 300

Phe Lys Leu Glu Pro Ala Thr Asp Ala Asp Met Arg Gly Lys Asn Ala
305                 310                 315                 320

Ala Ala Lys Lys Ser Leu Glu Val Ile Tyr Asp Asp Ala
                325                 330
```

<210> 12
<211> 502
<212> PRT
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 12

```
Met Ser Gln Thr Pro Gly Gly Ala Pro Met Ala Pro Glu Ala Met Gly
  1               5                  10                  15

Cys His Ser Thr Ala Asp Met Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ala Gly Asn
             20                  25                  30

Gly Glu Leu Met Glu Arg Phe Lys Ala Asp Tyr Pro Val Gly Pro His
         35                  40                  45

Asp Lys Pro Gln Ser Met Cys Pro Ala Phe Gly Ser Leu Arg Thr Gly
     50                  55                  60

Leu Arg Met Arg Arg Val Gly Thr Ile Ile Ser Gly Ser Ala Cys Cys
 65                  70                  75                  80
```

Thr Tyr Gly Leu Ser Phe Val Ser His Phe Tyr Gly Ala Arg Arg Ser
85 90 95

Ile Gly Tyr Val Pro Phe Asn Ser Glu Ser Leu Val Thr Gly Lys Leu
100 105 110

Phe Glu Asp Ile Arg Glu Ala Val His Glu Met Ala Asp Pro Gln Arg
115 120 125

Tyr Asp Ala Ile Val Val Thr Asn Leu Cys Val Pro Thr Ala Ser Gly
130 135 140

Val Pro Leu Arg Leu Leu Pro Ser Glu Ile Asn Gly Val Arg Ile Val
145 150 155 160

Gly Ile Asp Val Pro Gly Phe Gly Val Pro Thr His Ala Glu Ala Lys
165 170 175

Asp Val Leu Ala Gly Ala Met Leu Lys Tyr Ala Arg Ser Glu Ile Glu
180 185 190

Ala Gly Pro Val Gln Ala Pro Val Ser Gly Arg Ser Asp Arg Pro Thr
195 200 205

Val Ala Leu Leu Gly Glu Met Phe Pro Ala Asp Pro Val Met Ile Gly
210 215 220

Ala Leu Leu Ala Pro Leu Gly Leu Ala Ala Gly Pro Val Val Pro Cys
225 230 235 240

Arg Asp Trp Arg Glu Leu Tyr Ala Ala Leu Asp Ser Gly Val Ala Ala
245 250 255

Ala Ile His Pro Phe Tyr Thr Ala Ser Val Arg Glu Phe Gln Ala Ala
260 265 270

Gly Arg Ala Ile Val Gly Ser Ala Pro Val Gly His Asp Gly Thr Ala
275 280 285

Ala Trp Leu Ala Ala Ile Gly Glu Ala Tyr Gly Ile Ala Ala Asp Lys
290 295 300

Val Ala Ala Ala Gln Asn Ala Phe Leu Pro Ala Ile Arg Gly Ala Leu

```
305                 310                 315                 320

Ala Gly Ala Pro Ile Lys Gly Arg Ile Thr Leu Ser Gly Tyr Glu Gly
                325                 330                 335

Ser Glu Leu Ile Val Ala Arg Leu Leu Ile Glu Ser Gly Ala Glu Val
            340                 345                 350

Pro Tyr Val Gly Thr Ala Ala Gly Arg Thr Pro Trp Ser Ala Ala Asp
        355                 360                 365

Arg Glu Trp Leu Glu Ala Arg Gly Thr Val Val Lys Phe Arg Ala Ser
    370                 375                 380

Leu Glu Asp Asp Leu Ala Ala Met Gln Gly Phe Glu Pro Asp Leu Ala
385                 390                 395                 400

Val Gly Thr Thr Pro Val Val Gln Lys Ala Lys Ser Leu Gly Ile Pro
                405                 410                 415

Ser Leu Tyr Phe Thr Asn Leu Ile Ser Ala Arg Pro Leu Met Gly Pro
            420                 425                 430

Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Gln Val Ile Asn Ala Ala Ile Gly Asn
        435                 440                 445

Arg Glu Arg Met Ser Lys Met Lys Ala Phe Phe Ala Gly Val Gly Glu
    450                 455                 460

Gly Asp Thr Ala Gly Ile Trp Glu Gly Ala Pro Asn Leu Arg Pro Asp
465                 470                 475                 480

Phe Arg Ala Ala His Gln Lys Lys Leu Glu Lys Ala Ala Arg Ala Ala
                485                 490                 495

Lys Ser Glu Glu Met Ile
            500
```

<210> 13
<211> 491
<212> PRT
<213> Rhodobacter sphaeroides

<400> 13

```
Met Leu Val Gln Asp His Asp Arg Ala Gly Gly Tyr Trp Gly Ala Val
  1               5                  10                  15

Tyr Ala Phe Cys Ala Val Lys Gly Leu Gln Val Val Ile Asp Gly Pro
             20                  25                  30

Val Gly Cys Glu Asn Leu Pro Val Thr Ser Val Leu His Tyr Thr Asp
         35                  40                  45

Ala Leu Pro Pro His Glu Leu Pro Ile Val Val Thr Gly Leu Gly Glu
     50                  55                  60

Ser Glu Met Ser Glu Gly Thr Glu Ala Ser Met Ser Arg Ala Trp Lys
 65                  70                  75                  80

Val Leu Asp Pro Ala Leu Pro Ala Val Val Val Thr Gly Ser Ile Ala
                 85                  90                  95

Glu Met Ile Gly Gly Gly Val Thr Pro Gln Gly Thr Asn Ile Gln Arg
            100                 105                 110

Phe Leu Pro Arg Thr Ile Asp Glu Asp Gln Trp Glu Ala Ala Asp Arg
        115                 120                 125

Ala Met Thr Trp Ile Phe Ser Glu Phe Gly Met Thr Lys Gly Arg Met
    130                 135                 140

Pro Pro Glu Ala Lys Arg Pro Glu Gly Ala Lys Pro Arg Val Asn Ile
145                 150                 155                 160

Leu Gly Pro Met Tyr Gly Val Phe Asn Met Ala Ser Asp Leu His Glu
                165                 170                 175

Ile Arg Arg Leu Val Glu Gly Ile Gly Ala Glu Val Asn Met Val Met
            180                 185                 190

Pro Leu Gly Ala His Leu Ala Glu Met Arg His Leu Val Asn Ala Asp
        195                 200                 205

Ala Asn Ile Val Met Tyr Arg Glu Phe Gly Arg Gly Leu Ala Glu Val
    210                 215                 220

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

225 230 235 240

Ala Phe Leu Arg Arg Leu Gly Glu Ile Leu Gly Leu Asp Pro Glu Pro
245 250 255

Phe Ile Glu Arg Glu Lys His Ser Thr Leu Lys Pro Val Trp Asp Leu
260 265 270

Trp Arg Ser Val Thr Gln Asp Phe Phe Gly Thr Ala Asn Phe Gly Ile
275 280 285

Val Ala Thr Glu Thr Tyr Ala Arg Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Glu Gly
290 295 300

Asp Leu Gly Leu Pro Cys Ala Phe Ala Val Ala Arg Lys Arg Gly Ser
305 310 315 320

Lys Thr Asp Asn Glu Ala Val Arg Gly Leu Ile Arg Gln His Arg Pro
325 330 335

Leu Val Leu Met Gly Ser Ile Asn Glu Lys Ile Tyr Leu Ala Glu Leu
340 345 350

Lys Ala Gly His Gly Pro Gln Pro Ser Phe Ile Ala Ala Ser Phe Pro
355 360 365

Gly Ala Ala Ile Arg Arg Ala Thr Gly Thr Pro Val Met Gly Tyr Ala
370 375 380

Gly Ala Thr Trp Leu Leu Gln Glu Val Cys Asn Ala Leu Phe Asp Ala
385 390 395 400

Leu Phe His Ile Leu Pro Leu Gly Thr Glu Met Asp Ser Ala Ala Ala
405 410 415

Thr Pro Thr Thr Leu Arg Arg Asp Phe Pro Trp Asp Ala Asp Ala Gln
420 425 430

Ala Ala Leu Asp Arg Ile Val Glu Glu His Pro Val Leu Thr Arg Ile
435 440 445

Ser Ala Ala Arg Ala Leu Arg Asp Ala Ala Glu Lys Ala Ala Leu Asp
450 455 460

Ala Gly Ala Glu Arg Val Val Arg Glu Thr Val Glu Ala Leu Arg Gly
465 470 475 480

Pro Gly Phe Gly Glu Arg Lys Gly Glu Asn Gln
485 490