



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0034856

(43) 공개일자 2015년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/195 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0114046

(22) 출원일자 2013년09월25일

심사청구일자 2013년09월25일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

신관우

서울 강남구 선릉로 221, 402동 1201호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

김희연

경기 하남시 덕산로 39, 104동 602호 (덕풍동, 한솔리치빌아파트1단지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 10 항

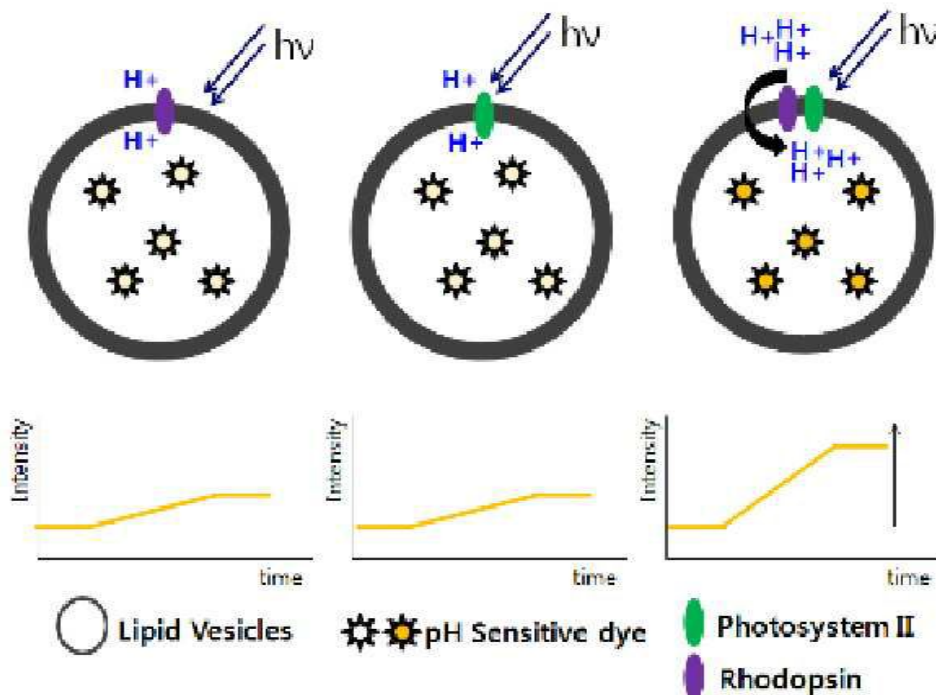
(54) 발명의 명칭 이중의 감광 단백질이 재조합된 양성자-수송 베시클 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 다음을 포함하는 양성자-수송 베시클(vesicle) 및 이의 제조방법에 관한 것이다: (a) 단일 인지질 이중 층 리포솜; (b) 로돕신(rhodopsin) 단백질; 및 (c) 광계 II(photosystem II) 단백질; 그리고, 상기 로돕신 단백질 및 광계 II 단백질은 상기 리포솜의 이중 층에 삽입되어 위치한다. 본 발명은 이중의 감광 단백질이 리

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3



포즘의 이중 층에 삽입되어 위치함으로써, 각 감광 단백질의 다른 빛의 흡수 대역을 활용하여 가시광선 전 영역의 흡수 파장대역을 갖게 된다. 이로 인해, 종래 생물체나 인공 베시클에서 특정 파장만을 활용하는 한정적인 효율성을 개선시켰으며, 파장 영역을 가시광선 전 파장 범위로 확대하는 것이 가능하게 된다. 한편, 본 발명의 로돕신 단백질 및 광계 II 단백질의 융합 시스템을 이용하여 종래 단백질의 인지질 막 내외부의 수소 이온의 펌핑 능력 효율을 향상시키고 이를 통해 ATP의 세포 외 생산에 적용하거나 광촉매 및 태양전지 등의 다양한 분야에서 산업적으로 이용 가능할 것으로 기대된다.

(72) 발명자

정광환

경기 성남시 분당구 양현로 192, 1021동 102호 (이매동, 이매촌삼성아파트)

이길용

서울 구로구 경인로 643, 201동 204호 (신도림동, 신도림2차동아아파트)

안태규

서울특별시 강남구 청담동 삼익아파트 132-21

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201331025

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견 연구자 지원사업 도약 연구

연구과제명 인공세포 구조 및 기능 모사 연구

기 여 율 1/1

주관기관 (재)한국연구재단

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

다음에 포함하는 양성자-수송 베시클(vesicle):

- (a) 단일 인지질 이중 층 리포솜;
- (b) 로돕신(rhodopsin) 단백질; 및
- (c) 광계 II(photosystem II) 단백질; 그리고,

상기 로돕신 단백질 및 광계 II 단백질은 상기 리포솜의 이중 층에 삽입되어 위치한다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 로돕신 단백질은 미생물-유래 로돕신 단백질인 것을 특징으로 하는 양성자-수송 베시클.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 광계 II 단백질은 식물-유래 단백질인 것을 특징으로 하는 양성자-수송 베시클.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 로돕신 단백질은 가시광선의 파장 범위 중 녹색 파장인 500-600 nm의 빛을 흡수하여 양성자를 발생시키는 것을 특징으로 하는 양성자-수송 베시클.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 광계 II 단백질은 가시광선의 파장 범위 중 청색 파장인 400-500 nm 및 적색 파장인 600-700 nm의 빛을 흡수하여 양성자를 발생시키는 것을 특징으로 하는 양성자-수송 베시클.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 식물은 시금치, 애기장대, 벼 및 옥수수로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 양성자-수송 베시클.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 양성자-수송 베시클(vesicle)의 제조방법:

- (a) 광계 II(photosystem II) 단백질을 준비하는 단계;
- (b) 로돕신(rhodopsin) 단백질을 준비하는 단계;
- (c) 지질을 수화(hydration)시켜 베시클(vesicle)을 준비하는 단계;
- (d) 상기 단계 (c)의 베시클을 동결 및 융해시키는 단계;

- (e) 상기 단계 (d)의 결과물을 계면활성제와 반응시키는 단계; 및
- (f) 상기 단계 (e)의 결과물과 상기 단계 (a)의 광계 II 단백질 및 상기 단계 (b)의 로돕신(rhodopsin) 단백질을 반응시키는 단계.

청구항 8

- 제 7 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 로돕신 단백질의 준비는 다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:
- (i) 미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- (ii) 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- (iii) 상기 형질전환체를 배양하여 상기 미생물-유래 로돕신 단백질을 발현시켜 로돕신 단백질을 수득하는 단계.

청구항 9

- 제 8 항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

- 제 7 항에 있어서, 상기 단계 (f)의 상기 단계 (e)의 결과물은 상기 단계 (a)의 광계 II 단백질 및 상기 단계 (b)의 로돕신(rhodopsin) 단백질과 물 비 300-700:1의 비율로 혼합되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 미생물-유래 로돕신(rhodopsin) 단백질 및 식물-유래 광계 II(photosystem II) 단백질이 재조합(reconstitution)된 양성자-수송 베시클(vesicle) 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 생명체 내에서의 신호전달, 에너지 생성 등 중요한 생명현상들의 대부분은 세포 안과 밖의 이온 농도차에 의해 발생한다. 이러한 작용을 하는 광 감각 단백질로서, 광계 II 및 로돕신 단백질이 대표적이다. 광감각 단백질은 구조변화를 통해 세포안과 밖의 이온차이를 형성하고 이를 통해 에너지 생성 및 신호전달에 핵심적인 역할을 담당한다. 따라서, 구조분석을 통해 불치병 치료 및 태양전지 및 광촉매 등에 활용되고 있다.
- [0003] 하지만, 각 단백질의 구조변화는 빛의 파장에 크게 의존하여, 그 한계점을 가진다. 이에, 광계 II 및 로돕신 단백질을 세포 재조합 기술을 통해 인공진화를 구현하여, 단백질의 작동 파장 범위를 가시광선의 전 범위로 확장시키는 것이 중요하다. 이를 통해, 기존의 기술로는 적용할 수 없었던 넓은 파장범위의 고효율 태양전지, 광촉매 또는 의학적인 치료에 획기적인 발전을 유도 할 수 있다.
- [0004] 막단백질 재조합(reconstitution of membrane proteins)기술은 이미 1971년 Kagawa와 Racker에 의하여 인공적인 인지질분자로 이루어진 리포솜에 삽입하는 기술이 처음 알려진 이후, 세포막연구 및 막단백질 관련 연구에 다양한 목적으로 널리 활용되고 있다(J. Biol. Chem. 246, 1971, 5477; Int. J. Biochem. 20, 1988, 889).
- [0005] 그리고, 종래 발명 및 연구는 단일의 광 감지 단백질을 세포막에 삽입하여, 단백질의 상태를 확인하고, 기존의 현상을 재현하는 것에 그치고 있어, 가시광선의 일부 파장 범위만 이용하는 단점이 있었다.
- [0006] 그러나, 두 가지 이상의 이종의 단백질을 하나의 인지질 베시클 내에 재조합하여, 빛에 대한 감광성을 극대화하고, 이온을 분리시키는 기능을 확장시키는 기술은 아직 발표된 바 없다.
- [0007] 이에, 본 발명자들은 이종의 단백질이 동시에 작동 가능하게 된다면, 가시광선 전 파장, 그리고 자외선 및 적외선 일부분 까지도 단백질의 기능을 수행할 수 있음을 인식하게 되었다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 1. Morio Nagata, Mizuki Amano, Takashi Joke, Kaoru Fujii, Ayumi Okuda, Masaharu Kondo, Shuichi Ishigure, Takehisa Dewa, Kouji Iida, Francesco Secundo, Yutaka Amao, Hideki Hashimoto, and Mamoru Nango “Immobilization and Photocurrent Activity of a Light-Harvesting Antenna Complex II, LHCII, Isolated from a Plant on Electrodes” ACS Macro Lett. Vol. 1. pp. 296299, 2012
- (비특허문헌 0002) 2. Antoine Tr, Paul-AndrSiegenthaler “Reconstitution of Photosynthetic Structures and Activities with Lipids” Advances in Photosynthesis and Respiration, Vol. 6. pp. 175-189 2004.
- (비특허문헌 0003) 3. Girard P, PJ, Lenoir G, Falson P, Rigaud JL, Bassereau P. “A new method for the reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles” Biophys J. Vol. 86. pp. 419-29, 2004
- (비특허문헌 0004) 4. Ranaghan MJ, Schwall CT, Alder NN, Birge RR. “Green proteorhodopsin reconstituted into nanoscale phospholipid bilayers (nanodiscs) as photoactive monomers” J Am Chem Soc. Vol. 133 pp. 18318-27, 2011
- (비특허문헌 0005) 5. Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. “Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor” Science. Vol. 289, pp. 749-745, 2000.
- (비특허문헌 0006) 6. Umena Y, Kawakami K, Shen JR, Kamiya N. “Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 ” Nature. Vol. 473. pp. 55-60. 2011.
- (비특허문헌 0007) 7. David Joly, Sridharan Govindachary, MFrugata “Photosystem II Reconstitution into Proteoliposomes and Methodologies for StructureFunction Characterization” Photosynthesis Research Protocols Methods in Molecular Biology Vol. 684, 2011, pp 217-245
- (비특허문헌 0008) 8. BO., E.N. Spudich, J.L. Spudich, M. Leclerc, E.F. DeLong, “Proteorhodopsin phototrophy in the ocean” Nature Vol. 411. pp. 786-789, 2001.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 이중의 단백질을 단일한 세포막에 재조합하여, 넓은 가시광선에 대한 이온 수송의 고효율 특성을 갖는 양성자 수송 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 미생물-유래 로돕신(rhodopsin) 단백질 및 식물-유래 광 감지 단백질인 광계II(photosystem II) 단백질을 단일 세포막에 재조합(reconstitution)한 결과, 상기 로돕신 단백질 및 광계II(photosystem II) 단백질의 각기 다른 빛의 흡수 대역을 활용하여 가시광선 전 영역의 흡수 파장대역을 갖고, 각 단백질이 빛에 반응하여 전하를 매우 효과적으로 분리할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명의 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 양성자-수송 베시클(vesicle)을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상술한 본 발명의 양성자-수송 베시클(vesicle)의 제조방법을 제공하는 데 있다.

- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.
- 과제의 해결 수단**
- [0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 양성자-수송 베시클(vesicle)을 제공 한다: (a) 단일 인지질 이중 층 리포솜; (b) 로돕신(rhodopsin) 단백질; 및 (c) 광계 II(photosystem II) 단백질; 그리고, 상기 로돕신 단백질 및 광계 II 단백질은 상기 리포솜의 이중 층에 삽입되어 위치한다.
- [0015] 본 발명자들은 이중의 단백질을 단일한 세포막에 재조합하여, 넓은 가시광선에 대한 이온의 수송의 고효율 특성을 갖는 양성자 수송 시스템을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 미생물-유래 로돕신(rhodopsin) 단백질 및 식물-유래 광 감지 단백질인 광계II(photosystem II) 단백질을 단일 세포막에 재조합(reconstitution)한 결과, 상기 로돕신 단백질 및 광계II(photosystem II) 단백질의 각기 다른 빛의 흡수 대역을 활용하여 가시광선 전 영역의 흡수 파장대역을 갖고, 각 단백질이 빛에 반응하여 전하를 매우 효과적으로 분리할 수 있음을 확인하였다.
- [0016] 본 발명의 양성자-수송 베시클(vesicle)은 기본적으로 (a) 단일 인지질 이중 층 리포솜; (b) 로돕신(rhodopsin) 단백질; 및 (c) 광계 II(photosystem II) 단백질을 포함하고, 상기 로돕신 단백질 및 광계 II 단백질은 상기 리포솜의 이중 층에 삽입되어 위치한다.
- [0017] 본 명세서에서, 용어 “양성자-수송 베시클”은 막단백질인 감광 단백질에 의해 양성자(H^+)를 생성하고 운송하는 베시클을 의미한다.
- [0018] 본 명세서에서, 용어 “리포솜”은 자기 스스로 회합하는 콜로이드 입자들의 구형 인지질 베시클을 의미한다. 수용성 헤드(친수기)와 불용성 테일(소수기)을 가진 양친매성 분자로 구성된 리포솜은 이들의 상호작용에 의하여 자발적으로 결합하여 정렬된 구조를 보이는데, 그 크기와 적층성(Lamellarity)에 따라 SUV(Small Unilamellar Vesicle), LUV(Large Unilamellar Vesicle) 및 MLV(Multi Lamellar Vesicle)로 분류되나, 본 발명에 포함되는 리포솜은 SUV(Small Unilamellar Vesicle) 또는 LUV(Large Unilamellar Vesicle)이다. 이와 같이 다양한 적층성을 나타내는 리포솜은 세포막과 유사한 이중막 구조를 갖는다.
- [0019] 본 발명의 양성자-수송 베시클에 이용되는 인지질은 양쪽 친화성 지질로 이용된 것으로서, 천연 인지질 및 합성 인지질을 포함하며, 바람직하게는 탄소수 12-24개인 지방산 사슬을 갖는 인지질류를 포함한다. 예를 들어, 본 발명에 이용될 수 있는 인지질은 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine, PC; 천연 또는 합성) 또는 레시틴, 디팔미토일포스파티딜콜린, 포스파티딕에이드(Phosphatidic acid, PA), 리소포스파티딜콜린(Lysophosphatidylcholine, LPC), 포스파티딜세린(Phosphatidylserin, PS), 포스파티딜에탄올아민(Phosphatidylethanolamine, PE), 포스파티딜글리세롤(Phosphatidylglycerol, PG), 포스파티딜이노시톨(Phosphatidylinositol, PI), 포스포콜린(Phosphocholine) 포스포에탄올아민(Phosphoethanolamine), 스펅고마이엘린(Sphingomyelin), 카디올리핀(Cardiolipin), 이를 가수분해하여 제조된 지방산(인산기를 갖는 지방산), 그 유도체 또는 이들의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 이용되는 인지질은 POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 및 POPE(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)이다.
- [0021] 본 발명의 양성자-수송 베시클 제조에 이용되는 유기용매는 메탄올, 에탄올, n-프로판올, 부탄올 또는 클로로포름 등을 사용하며, 바람직하게는 클로로포름이다.
- [0022] 본 명세서에서, 용어 “로돕신 단백질”은 생물학적 광수용체 세포에 존재하는 생물학적 색소(biological pigment)이다. 로돕신 단백질은 세포질에서 합성되어 세포막에 위치하여 빛을 지각하는 역할을 한다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 로돕신 단백질은 미생물-유래 로돕신 단백질이다.
- [0024] 본 명세서에서, 용어 “미생물 유래 로돕신 단백질”은 “프로테오로돕신”과 혼용되어 사용되는데, 프로테오로돕신(proteorhodopsin, PR)은 일반적으로 원통형 채널을 형성하는 7 개의 지질막-편재 α -헬릭스의 구조를 가진 막 통과 단백질이다. 프로테오로돕신은 해양성 γ -프로테오박테리아(γ -proteobacteria)의 메타게놈분석(metagenomic analysis)에 의해 확인된, 광활성의 타입 I 레티날 결합 단백질로서, γ -프로테오박테리아의

SAR86 그룹에서 PR이 최초로 확인된 후, 다수의 프로테오로돕신 변이체들이 몬테레이 만(Monterey Bay), 하와이 오션 타임(Hawaii Ocean Time, HOT), 팔머 스테이션(Palmer station, Antarctica), 지중해(Mediterranean Sea), 홍해(Red Sea), 및 사가수해(Sargasso Sea)에서의 γ -프로테오박테리아 및 α -프로테오박테리아에서 발견되었다.

[0025] 본 발명에 이용되는 미생물-유래 로돕신 단백질에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 미생물-유래 로돕신 단백질과 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.

[0026] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사를 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사를 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

[0027] 변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스(hydrophobic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신(+4.5); 발린(+4.2); 루이신(+3.8); 페닐알라닌(+2.8); 시스테인/시스테인(+2.5); 메티오닌(+1.9); 알라닌(+1.8); 글라이신(-0.4); 쓰레오닌(-0.7); 세린(-0.8); 트립토판(-0.9); 타이로신(-1.3); 프롤린(-1.6); 히스티딘(-3.2); 글루타메이트(-3.5); 글루타민(-3.5); 아스파르트레이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).

[0028] 단백질의 상호적인 생물학적 기능(interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유했을 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[0029] 한편, 유사한 친수성 값(hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌(+3.0); 라이신(+3.0); 아스파르트레이트(+3.0 ± 1); 글루타메이트(+3.0 ± 1); 세린(+0.3); 아스파라긴(+0.2); 글루타민(+0.2); 글라이신(0); 쓰레오닌(-0.4); 프롤린(-0.5 ± 1); 알라닌(-0.5); 히스티딘(-0.5); 시스테인(-1.0); 메티오닌(-1.3); 발린(-1.5); 루이신(-1.8); 아이소루이신(-1.8); 타이로신(-2.3); 페닐알라닌(-2.5); 트립토판(-3.4).

[0030] 친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

[0031] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H. Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

[0032] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 1 서열이다.

[0033] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명에 이용되는 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다.

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0034] 본 명세서에서, 용어 “광계 II(photosystem II) 단백질”은 엽록체의 틸라코이드에 있는 막단백질로서 광 감각 단백질이다.

[0035] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 광계 II 단백질은 식물-유래 단백질이고, 보다 바람직하게는 상기 식물은 시금치, 애기장대, 벼 및 옥수수로 구성된 군으로부터 선택되고, 보다 더 바람직하게는 시금치 또는 애기장대이다.

[0036] 막 단백질로서, 미생물-유래 로돕신 단백질 및 식물-유래 광계 II 단백질은 조사된 빛에 의하여 분해된 물로부터 생성된 양성자(H^+)를 세포막 내 외부로 수송할 수 있는 단백질이며, 특히 가시광선의 파장 범위에서 가장 효과적인 기능을 수행한다.

[0037] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 로돕신 단백질은 가시광선의 파장 범위 중 녹색 파장인 500-600 nm의 빛을 흡수하여 양성자를 발생시킨다.

[0038] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 광계 II 단백질은 가시광선의 파장 범위 중 청색 파장인 400-500 nm 및 적색 파장인 600-700 nm의 빛을 흡수하여 양성자를 발생시킨다.

[0039] 본 발명에 이용되는 로돕신 단백질의 경우, 청색 및 적색의 파장 범위(400-500 nm, 600-700 nm)에서는 그 효율이 녹색(500-600 nm)에 비해 현저히 감소하는 데, 이는 로돕신 흡수 스펙트럼이 녹색 부분에 큰 흡수를 하기 때문이다(도 2). 반면에, 식물은 이와 반대로 녹색에서는 태양 빛을 산란 시키고, 청색과 적색의 빛을 흡수하여, 광합성 기능의 첫 번째 과정인 물 분해 과정을 시작하게 된다. 로돕신과 반대로 식물의 광계 II 단백질은 적색과 청색에서의 빛 흡수율이 녹색에 비해 높은 것을 확인할 수 있다(도 2).

[0040] 본 발명의 양성자-수송 베시클은 이종의 단백질인 미생물-유래 로돕신 단백질 및 식물-유래 광계 II 단백질이 리포솜의 이중 층에 삽입되어 위치하여, 가시광선 전 파장, 그리고 자외선 및 적외선 일부분 까지도 단백질의 기능을 수행함으로써, 넓은 파장 범위에 대한 양성자 수송의 고효율 특성을 갖는 양성자 수송 시스템을 달성할 수 있다.

[0041] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 양성자-수송 베시클(vesicle)의 제조방법을 제공한다: (a) 광계 II(photosystem II) 단백질을 준비하는 단계; (b) 로돕신(rhodopsin) 단백질을 준비하는 단계; (c) 지질을 수화(hydration)시켜 베시클(vesicle)을 준비하는 단계; (d) 상기 단계 (c)의 베시클을 동결 및 융해시키는 단계; (e) 상기 단계 (d)의 결과물을 계면활성제와 반응시키는 단계; 및 (f) 상기 단계 (e)의 결과물과 상기 단계 (a)의 광계 II 단백질 및 상기 단계 (b)의 로돕신(rhodopsin) 단백질을 반응시키는 단계.

[0042] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 양성자-수송 베시클을 제조하기 위한 공정이기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 반복 기재에 따른 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0043] 양성자-수송 베시클을 제조하기 위한 본 발명의 방법을 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0044] (a) 광계 II(photosystem II) 단백질의 준비

[0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)의 광계 II 단백질의 준비는 다음의 단계를 포함 한다: (ㄱ) 식물 잎과 밀크 파우더 또는 소르비톨(sorbitol), NaCl, $MgCl_2$, 트리신(Tricine), KOH, PMSF, 벤즈아미딘(benzamidine) 및 ϵ -아미노카프론산(aminocaproic Acid)을 포함하는 버퍼 A 용액과 반응시키는 단계; (ㄴ) 상기 단계 (ㄱ)의 결과물을 여과 및 원심 분리하고 상청액 제거 후 상기 단계 (ㄱ)의 버퍼 A 용액과 반응시키는 단계; (ㄷ) 상기 단계 (ㄴ)의 결과물을 원심 분리하고 상청액 제거 후 NaCl, $MgCl_2$, 트리신, KOH, PMSF, 벤즈아미딘 및 ϵ -아미노카프론산을 포함하는 버퍼 B 용액과 반응시키는 단계; (ㄹ) 상기 단계 (ㄷ)의 결과물을 원심

분리하고 상청액 제거 후 NaCl, MgCl₂ 및 Hepes KOH를 포함하는 버퍼 C 용액과 반응시키는 단계; (口) 상기 단계 (ㄷ)의 결과물을 원심 분리 후 액화 질소를 이용하는 동결된 틸라코이드 막을 수득하는 단계; 및 (ㅂ) 상기 단계 (口)의 동결된 틸라코이드 막을 용해하고 수크로오스, Hepes 및 계면활성제를 포함하는 구배 용액과 반응시키고 수크로오스 밀도를 이용하여 광계 II 단백질을 분리하는 단계.

[0046] 본 발명에 이용되는 광계 II 단백질은 당업계에 공지된 다양한 식물을 이용하여 식물로부터 틸라코이드 막을 수득하고 이로부터 수크로오스 구배 방법을 이용하여 광계 II 단백질을 분리하여 이용한다.

[0047] (b) 로돕신(rhodopsin) 단백질의 준비

[0048] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 로돕신 단백질의 준비는 다음의 단계를 포함 한다: (i) 미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; (ii) 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및 (iii) 상기 형질전환체를 배양하여 상기 미생물-유래 로돕신 단백질을 발현시켜 로돕신 단백질을 수득하는 단계.

[0049] 미생물-유래 로돕신 단백질을 준비하기 위한 본 발명의 방법을 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0050] (i) 재조합 벡터의 제조

[0051] 우선, 본 발명의 방법은 미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계를 포함한다.

[0052] 본 발명의 미생물-유래 로돕신 단백질의 뉴클레오타이드 서열은 당업계에 공지된 다양한 미생물-유래 로돕신 단백질의 뉴클레오타이드 서열을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 서열목록 제 1 서열이다.

[0053] 본 명세서에서, 용어 “발현 벡터”는 발현 벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현 벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘다의 요소를 함유한다.

[0054] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0055] 본 발명의 미생물-유래 로돕신 단백질의 제조에 관여하는 효소들을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 상기에서 “작동가능하게 연결된다(operably linked to)”는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 또한, “발현 조절 서열(expression control sequence)”이란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 개시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0056] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, lacUV5 프로모터, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL^λ 프로모터, pR^λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*(예, HB101, BL21, DH5α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pL^λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0057] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 아세트아민 환원효소를 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 lac 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG(Isopropylthio-β-D-Galactoside)를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

- [0058] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pKJ900(pBR322 유래), pUC18, pTrc99A, pSTV28, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHCT9, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λ -Charon 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있으나, 바람직하게는 pKJ900(정재용 *et al.*, Spectroscopic and photochemical analysis of proteorhodopsin variants from the surface of the Arctic Ocean *FEBS Letters* (2008) 582:1679-1684)를 사용한다.
- [0059] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.
- [0060] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카바미실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0061] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 사용된 선택표지는 암피실린 및/또는 클로람페니콜이다.
- [0062] 본 발명의 벡터는 미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 유전자가 효소 과발현 기능을 포함하여 최소한의 길이를 가지도록 RBS(Ribosomal binding site) 및 효소발현에 꼭 필요한 부분을 포함하는 염기서열만을 서열로 정하여 삽입시키는 것이 숙주세포의 대사부담(metabolic burden)을 줄이는 측면에서 바람직하며, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서는 pKJ900 벡터를 사용하였다.
- [0063] (ii): 형질전환체의 제조
- [0064] 이어, 본 발명의 방법은 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계를 포함한다.
- [0065] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* UT5600, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 숙주세포를 이용할 수 있으며 이에 한정되지 않는다.
- [0066] 바람직하게는, 상기 숙주세포는 *E. coli*이고, 보다 바람직하게는 *E. coli* 균주 UT5600이다.
- [0067] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법(Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다.
- [0068] (iii): 로돕신 단백질의 수득
- [0069] 그리고, 본 발명의 방법은 상기 형질전환체를 배양하여 상기 미생물-유래 로돕신 단백질을 발현시켜 로돕신 단백질을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0070] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 항생제를 첨가한 LB 배지에 종배양물을 1:100으로 희석하고 600 nm에서 0.4의 흡광도에 이를 때까지 배양한 후, IPTG를 첨가하여 단백질의 발현을 유도하고 전-트랜스(all-trans) 레티날을 첨가하여 배양하고, 로돕신-발현 세포로부터 로돕신 단백질을 수득한다.
- [0071] 본 발명의 양성자-수송 베시클의 제조방법에서 상기 (a) 광계 II(photosystem II) 단백질을 준비하는 단계와 (b) 로돕신(rhodopsin) 단백질을 준비하는 단계는 그 시계열적 단계가 달라지더라도 본 발명의 목적 및 효과가 달라지는 것이 아니므로, 상기 단계 (a) 및 (b)의 시계열적 단계의 변화도 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0072] (c) 베시클(vesicle)의 준비
- [0073] 그 다음, 본 발명의 방법은 지질을 수화(hydration)시켜 베시클(vesicle)을 준비하는 단계를 거친다.
- [0074] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (c)의 지질은 POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 및 POPE(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)이고, 보다 바람직하게는

상기 POPC 및 POPE가 물(mol) 비 3-5:1의 비율로 혼합된다.

[0075] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 수화는 Tris, NaCl, $MgCl_2$ 및 $CaCl_2$ 가 포함된 버퍼를 이용하여 실시한다.

[0076] (d) 베시클의 동결 및 용해

[0077] 이어, 본 발명의 방법은 상기 단계 (c)의 베시클을 동결 및 용해시키는 단계를 거친다.

[0078] 동결 과정은 합성된 베시클을 단일라멜라(unilamellar) 형태로 만들기 위하여 실시하며, 본 발명에서는 액화질소를 이용하여 실시한다.

[0079] 용해 과정은 40-60℃에서 실시하며, 용해 과정을 통해 베시클의 크기를 일정하게 할 수 있다.

[0080] (e) 상기 단계 (d)의 결과물의 계면활성제와 반응

[0081] 그 다음, 본 발명의 방법은 상기 단계 (d)의 결과물을 계면활성제와 반응시키는 단계를 실시한다.

[0082] 상기 계면활성제는 당업계에 공지된 다양한 계면활성제를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 DM(n-dodecyl-β-D-maltopyranoside)을 이용한다.

[0083] (f) 상기 단계 (e)의 결과물과 광계 II 단백질 및 로돕신(rhodopsin) 단백질의 반응

[0084] 마지막으로, 본 발명의 방법은 상기 단계 (e)의 결과물과 상기 단계 (a)의 광계 II 단백질 및 상기 단계 (b)의 로돕신(rhodopsin) 단백질을 반응시키는 단계를 거친다.

[0085] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (f)의 상기 단계 (e)의 결과물은 상기 단계 (a)의 광계 II 단백질 및 상기 단계 (b)의 로돕신(rhodopsin) 단백질과 물 비 300-700:1의 비율로 혼합되고, 보다 바람직하게는 물 비 400-600:1의 비율로 혼합되며, 보다 더 바람직하게는 물 비 450-550:1의 비율로 혼합된다.

[0086] 본 발명의 또 다른 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (a)의 광계 II 단백질 및 상기 단계 (b)의 로돕신(rhodopsin) 단백질은 물 비 1:1의 비율로 혼합된다.

[0087] 이러한 방법으로, 이중 감광 단백질이 재조합(reconstitution)된 양성자-수송 베시클을 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0088] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0089] (a) 본 발명은 미생물-유래 로돕신(rhodopsin) 단백질 및 식물-유래 광계 II(photosystem II) 단백질이 재조합(reconstitution)된 양성자-수송 베시클(vesicle) 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0090] (b) 이중의 감광 단백질이 단일 인지질 이중 층 리포솜의 이중 층에 삽입되어 위치함으로써, 각 감광 단백질의 다른 빛의 흡수 대역을 활용하여 가시광선 전 영역의 흡수 파장대역을 갖게 된다.

[0091] (c) 이로 인해, 종래 생물체나 인공 베시클에서 특정 파장만을 활용하는 한정적인 효율성을 개선시켰으며, 파장 영역을 가시광선 전 파장 범위로 확대하는 것이 가능하게 된다.

[0092] (d) 한편, 본 발명의 로돕신 단백질 및 광계 II 단백질의 융합 시스템을 이용하여 종래 단백질의 인지질 막 내 외부의 수소 이온의 펌핑 능력 효율을 향상시키고 이를 통해 ATP의 세포 외 생산에 적용하거나 광촉매 및 태양 전지 등의 다양한 분야에서 산업적으로 이용 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0093] 도 1은 수크로오스 구배(sucrose gradient) 방법에 의해 식물-유래 광계 II 단백질을 분리한 결과를 보여주는 사진이다.

도 2는 광계 II 단백질 및 로돕신 단백질의 가시광선 흡광도를 보여준다.

도 3은 광계 II 단백질, 로돕신 단백질을, 그리고 광계 II 단백질 및 로돕신 단백질을 세포막에 재조합 시킨 경우의 상대적인 수소이온 펌핑능력을 보여준다.

도 4는 광계 II 단백질과 로돕신 단백질을 각각 재조합 시켜 촬영한 형광현미경 사진이다.

도 5는 광계 II 단백질(중앙), 로돕신 단백질(좌측), 그리고 광계 II 단백질 및 로돕신 단백질(우측)을 하나의 인지질체에 재조합 시켜 촬영한 형광현미경 사진이다.

도 6은 광계 II 단백질 및 로돕신 단백질을 하나의 인지질체에 재조합하는 과정을 보여준다.

도 7은 광계 II 단백질 및 로돕신 단백질을 하나의 인지질체에 재조합시켜 가시광선 영역에서의 흡광이 증가 및 확장되는 것을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실시예 1 : 광계II(PSII) 단백질 복합체 추출 및 정제

식물 단백질 복합체는 필요에 따라 시금치 또는 애기장대를 이용하였으며, 광계 II 단백질 복합체를 정제 분리하는 방법은 다음과 같다:

첫 번째로, 광계 II 단백질 복합체를 분리하기 위하여 다음 표 1과 같은 버퍼 용액을 준비 하였다:

표 1

버퍼 A	0.5% 밀크 파우더 또는 소르비톨(Sorbitol), 0.4 M NaCl, 0.2% MgCl ₂ , 20 mM 트리신(Tricine)/ KOH pH 7.8, 0.2 mM PMSF, 0.2 mM 벤즈아미딘(Benzamidine), 1 mM ε-아미노카프론산(aminocaproic Acid)
버퍼 B	0.15 M NaCl, 0.5% MgCl ₂ , 20 mM 트리신/ KOH pH 7.8, 0.2 mM PMSF, 0.2 mM 벤즈아미딘, 1 mM ε-아미노카프론산
버퍼 C	15 mM NaCl, 0.5% MgCl ₂ , 20 mM Hepes KOH pH 7.5
버퍼 D	0.4 M 소르비톨, 15 mM NaCl, 5 mg MgCl ₂ , 10 mM Hepes KOH pH 7.5
계면활성제	0.25-4 % α-DM (보통: 3%), 15 mM NaCl, 5 mg MgCl ₂

식물 단백질 복합체 분리 정제를 위하여, 먼저 식물의 틸라코이드 막 분리를 진행하였으며 모든 과정은 4℃/암실에서 진행하였다. 구체적으로, 면도 칼을 이용하여 식물 잎을 1 cm 간격으로 자른 후 사전에 준비된 버퍼 A 용액과 반응 시켰다. 15분 후 0.5-1 mm 포어(pore) 크기의 필터로 여과 시킨 후 여과된 용액을 4℃/1000g으로 5분간 원심 분리 하였다. 상청액을 제거 후 버퍼 A와 반응 시킨 후 볼텍스 믹서로 흔들어 주었다. 그 후 4℃/1,000g으로 5분간 원심 분리하였다. 상청액 제거 후에 버퍼 B와 반응 시키고 볼텍스 믹서로 혼합한 후 4℃/1,000g에서 원심 분리 하였다. 그 후 상청액 제거 후 버퍼 C와 반응 시키고 볼텍스 믹서로 혼합한 뒤, 4℃/1,000g에서 원심 분리 한 후 액체 질소에 넣어 온도를 낮추고, 사용 전 까지 -80℃로 보관 하였다.

광계 II 단백질 복합체 분리를 위하여 식물 잎으로부터 추출된 틸라코이드 막을 이용하며 수크로오스 구배(sucrose gradient) 방법을 사용하였다. 구체적으로, -80℃의 틸라코이드 막을, 4℃로 온도를 맞춘 후, 구배용액(gradient solution)(0.5 M 수크로오스, 20 mM Hepes pH 7.8 및 계면활성제 DM 0.03%)을 준비하고, 온도는 4℃로 유지하였다. 그 후, 틸라코이드 지질 막과 구배 용액을 반응 시켰다. 이후 4℃/18,000g으로 원심 분리 후 상청액을 제거 하였다. 그 후, 10 mM Hepes pH 7.8 및 5 mM EDTA와 반응 시킨 후 4℃/18,000g으로 원심 분리하였다. 10 mM Hepes pH 7.7 및 0.6% DM과 반응 시키고, 볼텍스 믹서를 이용하여 반응 시킨 뒤 상청액을 유지한 상태로 구배 튜브(gradient tube)에 옮겼다. 그 후 수크로오스 밀도(sucrose density)를 통하여 식물 단백질 복합체를 분리 정제하였다. 각 층에 들어가는 수크로오스 용액은 기본 20 mM Hepes pH 7.8, 0.03%에 0.1M부터 1M 수크로오스까지 5단계로 분리하였다(도 1). 그 다음, 4℃/120,000g에서 24 시간 동안 원

심 분리하였다. 추출한 단백질 농도는 80% 아세톤(acetone)과 반응시켜 단백질 안에 포함되어있는 엽록소인 클로로필(chlorophyll) 농도로 결정하였다. 농도를 구하는 식은 다음 수식식 1과 같다:

[수식식 1]

$$[Chl] = [(20.2 * A_{645} + 9.02 * A_{663}) * V_a] / V_s$$

여기서 A_{645} , A_{663} 는 흡수 스펙트럼의 645 nm, 663 nm의 흡광도 값이고, V_a 는 추가된 80% 아세톤양 그리고 V_s 는 샘플의 양이다.

실시예 2 : 로돕신 발현 및 정제

(1) 대장균 형질전환체의 제조

프로테오로돕신 단백질을 코딩하는 유전자(서열목록 제 1 서열)를 포함한 벡터인 플라스미드 pKJ900-PR을 *E. coli* 균주 UT5600(NEB, 영국)에 도입하였다. UT5600 균주는 막단백질 프로테아제의 한 종류가 결손된 것으로 막 단백질의 안정적 발현에 유용하게 사용된다. 먼저, *E. coli* 균주 UT5600의 수용능을 $CaCl_2$ 시약을 이용한 방법으로 항상 시키고, 발현 벡터와 섞은 후 열충격을 주어 형질전환시켰다. 상기 발현벡터에 포함된 항생제 내성 유전자에 적합한 항생제인 암피실린(ampicillin)(USB)을 최종농도 50 $\mu g/ml$ 로 도말된 LB 배지에 도말하여 콜로니를 형성시켰다.

(2) 세포에서 프로테오로돕신의 발현 및 막 소포체(membrane vesicle)의 제조

프로테오로돕신은 흡수분광분석(absorption spectroscopy)과 수소이온 펌핑(proton pumping) 측정을 위해 *E. coli* 균주 UT5600에서 플라스미드 pKJ900-PR를 사용하여 발현시켰다. 선별된 형질전환체를 밤샘 배양한 후 1L 플라스크 내에서 암피실린(50 $\mu g/ml$) 및 클로람페니콜(34 $\mu g/ml$)을 첨가한 500 ml의 LB에 1:100으로 희석하고, 35℃ 배양기에서 600 nm에서 0.4 흡광도 유닛이 될 때까지 배양하였다. 수소이온 수송 측정을 위한 단백질을 얻기 위해, IPTG를 최종농도 0.8 mM로 첨가하여 단백질 발현을 유도하고, 이때 전 트랜스(all-trans) 레티날을 최종농도 5 μM 으로 첨가하였다. 그 다음, 4시간 후 세포들을 원심분리로 회수하고 150 mM NaCl을 함유하는 50 mM Tris-HCl(pH 7.0)에 재현탁 하였다. 로돕신-발현된 *E. coli* 세포들을 4℃에서 소니케이션(sonication)에 의해 용해(lysis)시키고, 저속 원심분리기(3,600×g, 15 min)로 세포 부스러기들을 제거하였다. 최종적으로, 막들을 95,000×g, 4℃에서 1시간 동안 침전시키고, 150 mM NaCl을 포함하는 50 mM Tris (pH 7.0)를 사용하여 4℃에서 재현탁 하였다. 배양액을 추출 버퍼(1% 나트륨 도데실 말토사이드(dodecylmaltoside: DM), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-버퍼(pH 7.0))에서 4℃에서 4-6시간 동안 약하게 진동하여 로돕신을 막으로부터 추출하였다. 추출된 단백질은 30,000×g에서 원심 분리한 후 상등액을 취하여 수득하였다. 수용체 단백질을 갖지 않는 막은 동일한 과정을 통해 제조하였고 대조군으로 사용하였다.

(3) His-태그된 프로테오로돕신의 정제 및 분리

C-말단에서 6-히스티딘 잔기를 포함하는 단백질은 Ni^{2+} -NTA 아가로스 비드(Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. 프로테오로돕신을 포함하는 *E. coli* 막을 150 mM NaCl, 10 mM 이미다졸 및 50 mM Tris(pH 7.0)를 포함하는 1% DM에서 용해시킨 다음, 비드(beads)와 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 단백질-결합된 비드를 50 mM 이미다졸로 세척하였고, 250 mM 이미다졸, 0.02% DM 및 50 mM Tris-버퍼로 용출시켰다. 이를 통해 얻어진 0.02% DM에 녹여진 단백질을 이용하여 최대 흡수 파장을 측정하였다.

실시예 3 : 광계II(PSII) 단백질 복합체의 세포막 제조법

막 재조합을 통한 인공진화를 구현할 프로테오리포좀(proteoliposome)을 준비하기 위하여, 서브-마이크론(sub-micron) 크기의 세포막 합성이 필요하였다. 구체적으로, POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) 및 POPE(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) 인지질을 몰(mol) 비율 80:20 그리고 총 지질(lipid) 양을 5 mg으로 하여, 클로로폼에 녹인 후 둥근플라스크에 넣고, 아르곤 또는 질소

가스를 이용하여, 클로로폼(유기용매)을 제거 하였다. 그 후, 진공 상태에서 3시간 정도 보관 하여, 추가적으로 남아 있는 유기 용매를 모두 제거하였다. 10 mM HEPES pH 7.4 용액을 플라스크에 1 mL 넣어 반응 시킨 후 상온에서 볼텍스 믹서를 통해 1시간 반응 시켰다. 그 다음, 액체 질소에 넣어 완전히 얼려 지질의 상변화를 일어나게 만들어 준 뒤, 물에 넣어 상온으로 되돌렸다. 다음과 같은 작업을 5회 걸친 후에, 100 nm 폴리카보네이트 필터(polycarbonate filter)를 통과 시켜 100 nm의 세포막을 합성 하였다. 그 다음, 계면활성제인 DM과 지질의 비율이 2%(w/w)가 되도록 계면활성제 용액을 넣어 반응 시켰다. 1시간 동안 반응 시킨 뒤 PS II 단백질을 삽입하였다. 이때, 단백질 농도는 단백질 추출 시 계산된 농도를 사용하도록 하고, 단백질과 지질의 비율이 1:500으로 만들었다. 그리고, 투석(dialysis) 및 SM2 바이오-비드(bio-bead)를 통해 계면활성제를 제거하여, 단백질을 세포막 사이에 삽입시켜 프로테오리포솜을 완성시켰다. 그 다음, 현미경으로 관찰이 용이하게 하기 위하여 완성된 프로테오리포솜을 ITO 글라스에 떨어뜨린 후 진공상태에서 12시간 정도 두었다. 이어, 15 mM Hepes pH 7.4 및 10 mM MgCl₂ 용액과 반응 시킨 뒤 양 전극에 1.5V, 10 Hz 의 교류 전기를 4시간 정도 흘려주어, 10-100 마이크론의 프로테오리포솜을 완성시켰다. 형광현미경으로의 관찰을 위해 PSII의 자체 형광인 클로로필(chlorophyll)의 형광을 이용하였다. 여기 파장은 488 nm의 레이저를 이용하였으며, 650 nm-700 nm의 형광 밴드패스필터를 이용하여 샘플을 확인하였다. 도 4의 좌측이 다음과 같은 방법으로 합성한 프로테오리포솜의 형광 현미경사진이다.

실시예 4 : 막단백질 프로테오로돕신이 포함된 인지질 기반 프로테오리포솜의 준비

막단백질인 프로테오로돕신(PR)을 인공적으로 합성된 베시클(vesicle) 막에 재조합(reconstitution)시키기 위하여, 먼저 막단백질이 포함되어 있지 않은 베시클을 준비하였다. 베시클은 다양한 지질로부터 인공적으로 합성이 가능하지만 본 발명에서는 POPC(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)와 POPE(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)가 특정 비율로 섞여있는 지질 혼합물(lipid mixture)로부터 베시클을 합성하였다. 상기 지질 혼합물을 건조시켜 지질 필름을 만들었고, 20 mM Tris 및 150 mM NaCl를 포함하는 버퍼(pH 7.01)를 사용하여 부드럽게 수화(hydration)시켰다. 막단백질과 재조합을 시키기 전, 합성된 베시클을 단일라멜라(unilamellar) 형태로 만들기 위하여 액체질소를 이용하여 동결(freezing) 및 51°C에서의 용해(thawing) 과정을 거치고 일정한 크기의 베시클을 분리하였다. 일정한 크기의 베시클을 얻기 위해서 폴리카보네이트 필터를 통한 압출(extrusion)을 진행하였다. 이렇게 합성된 막단백질이 포함되지 않은, 일정한 크기의 단일라멜라 베시클을 DM(n-dodecyl-β-D- maltopyranoside)과 일정 시간 반응시킨 후 프로테오로돕신과 반응시켰다.

20 mM Tris, 150 mM NaCl 및 0.02% DM이 포함된 버퍼(pH 7.01)에 녹아있는 정제된 프로테오로돕신은 위 과정에서 합성된 베시클과 4°C에서 반응 후 버퍼에 포함되어있는 DM을 제거하기 위해 50 kDa MWCO를 가진 투석관(dialysis tubing)을 이용해 4°C 조건으로 4일 이상 버퍼(20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.01)에서 투석을 진행시켰다. 그 후, 15 mM Hepes pH 7.4 및 10 mM MgCl₂ 용액과 반응 시킨 뒤 양 전극에 1.5V, 10 Hz의 교류 전기를 4시간 정도 흘려주어, 10-100 마이크론의 프로테오리포솜을 완성시켰다. 샘플을 형광현미경으로 확인하기 위해 프로테오로돕신은 Alexa488의 형광색소를 이용하였다. Alexa488 형광분자의 카르복실기(carboxyl group)와 프로테오로돕신의 라이신 잔기(lysine residue)를 반응시켜 녹색의 형광이 발생되도록 하였다. 여기 파장은 488 nm의 레이저를 사용하였으며, 520 nm-550 nm의 형광 밴드패스필터를 이용하여 샘플을 확인하였다. 도 5의 제일 좌측이 다음과 같은 방법으로 합성한 프로테오리포솜이다.

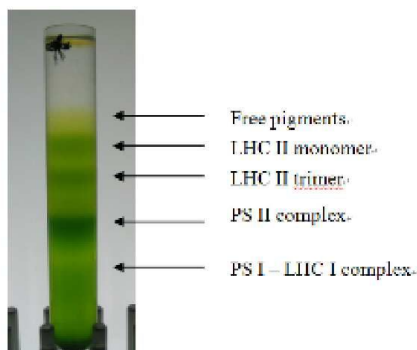
실시예 5 : 이중의 막단백질, 광계 II(PS II)와 프로테오로돕신이 포함된 리포솜 합성

균류와 식물류로부터 추출된 막단백질을 단일 세포막에 재조합하기 위하여 두 단백질의 최적 조건에서 반응시켰다. 위의 재조합 과정에서 사용한 농도의 POPC 및 POPE 지질 혼합물을 준비한 후 충분히 건조시키고, 15 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ 및 10 mM CaCl₂가 포함된 버퍼(pH 7.8)로 수화시켰다. 합성된 베시클은 위에서 설명된 동결-용해(freezing-thawing)과정을 거치고 일정한 크기로 분리 후 계면활성제와 반응하고 최종적으로 이중의 막단백질과 지질의 비율을 1:500로 하여 반응을 진행시켰다. 충분히 반응시킨 후 반응하지 않은 막단백질과 사용된 계면활성제를 제거하기 위해 15 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ 및 10 mM CaCl₂이 포함된 버퍼(pH 7.8)안에서 투석시켰다. 도 6은 이중의 막단백질을 하나의 세포막에 합성시키는 방법에 대한 모식도이다.

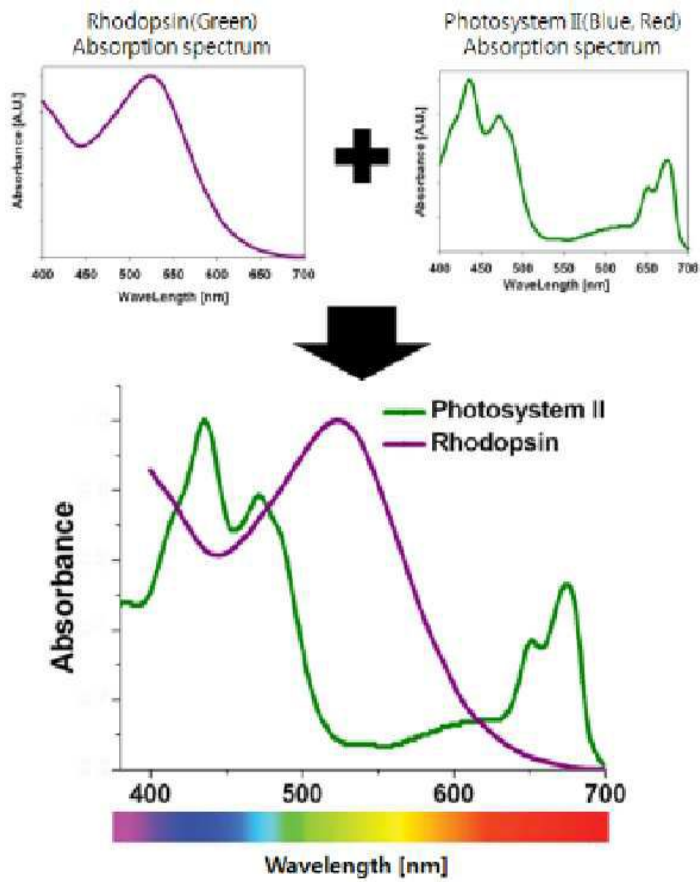
- [0119] 합성한 이종의 단백질이 세포막에 삽입된 것을 확인하기 위해 흡수스펙트럼 및 형광현미경을 이용하여 확인하였다. 합성되지 않은 광계 II와 프로테오로돕신을 제거하기 위해 합성된 샘플을 100,000 MW의 필터와 원심분리기를 사용하여, 제거 하였다. 이는 이종의 단백질 크기가 100,000 MW 보다 작아, 필터를 통과하게 되므로, 세포막에 삽입되지 않은 단백질이 필터를 통과하는 방법을 이용하였다. 그 후 합성된 샘플의 흡광도를 측정하여, 이종의 단백질이 모두 포함되어 있는지 확인하였다(도 7).
- [0120] 또한, 현미경을 이용하여, 이종의 막단백질의 재조합 상태를 확인하기 위해 만들어진 프로테오리포솜을 ITO 글라스에 떨어트려 다시 지질 필름 형태로 만든 뒤 2 mM HEPES 및 10 mM NaCl이 포함된 버퍼를 이용하여 1.5V, 10 Hz의 교류 전기 조건에서 팽윤(swelling)시켜 수십 마이크로 크기의 GUV(giant unilamellar vesicle)형태로 프로테오리포솜을 관찰하였다. 형광 현미경으로 관찰을 위해 프로테오로돕신은 Alexa488의 형광색소를 이용하였다. Alexa488 형광분자의 카르복실기와 프로테오로돕신의 라이신 잔기를 반응시켜 녹색의 형광이 발생되도록 하였다. PSII는 자체적으로 포함되어 있는 클로로필의 빨강색 형광색소를 사용 하였다.
- [0121] 따라서, 프로테오로돕신은 녹색, PSII는 빨강색의 형광으로 각각 다른 파장의 형광으로 확인할 수 있었다. 또한, Alexa488과 클로로필의 흡수 파장인 450-480 nm를 이용하여 형광 분자를 여기시켜 발생하는 형광을 각각 520-550 nm(녹색, Alexa488) 및 640-700 nm(빨강색, 클로로필)에서 밴드패스(bandpass) 필터를 이용하여 관찰하였다.
- [0122] 도 5는 모두 같은 샘플의 형광현미경 사진으로 녹색(왼쪽)은 프로테오로돕신의 형광이고, 빨강(중앙)은 PSII의 형광이며, 주황(오른쪽)은 두 사진을 병합한 사진이다.
- [0123] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

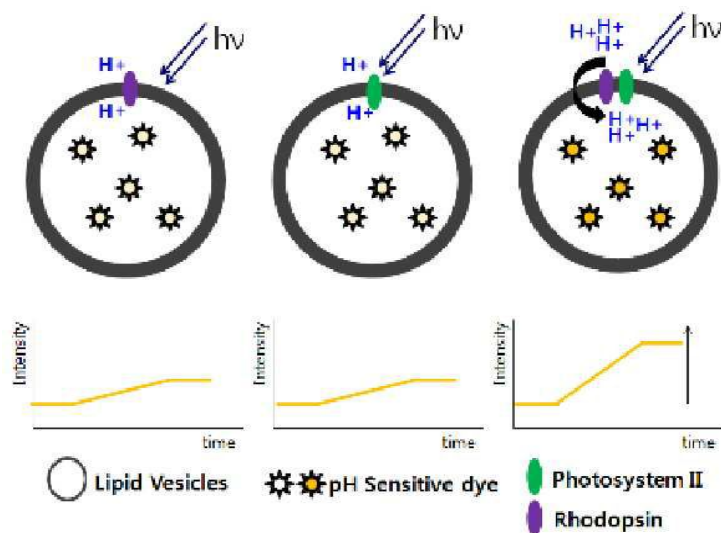
도면1



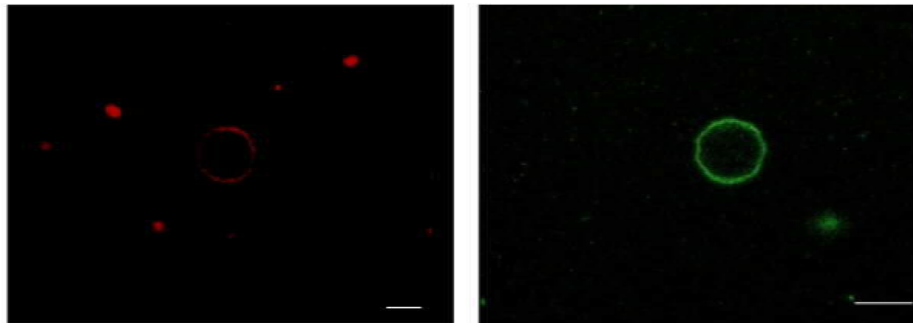
도면2



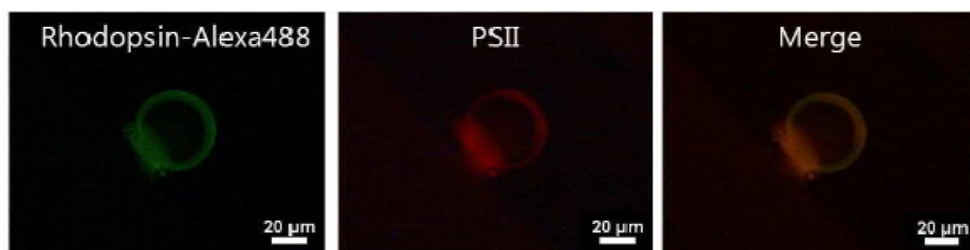
도면3



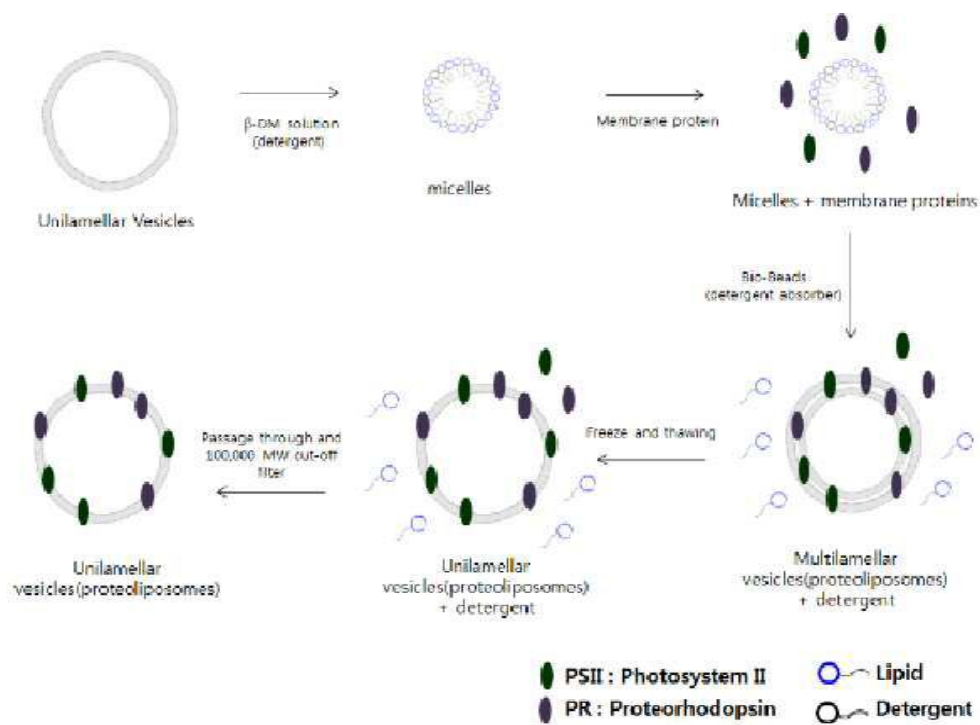
도면4



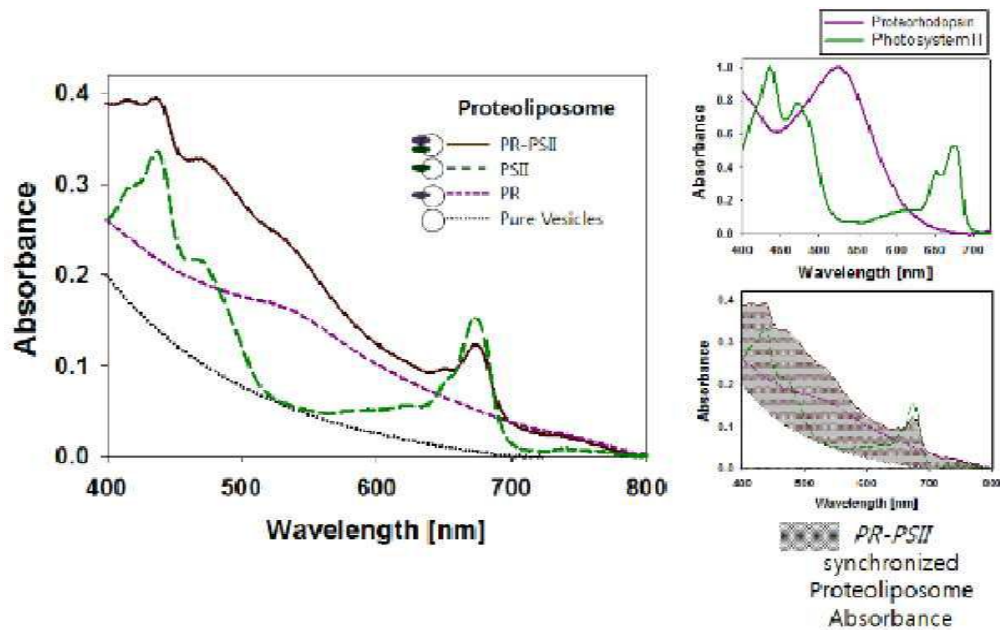
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Sogang University
- <120> Proton-transport Vesicles Reconstituted with Two Different
Light-sensitive Proteins from Different Biological Species and a
Method for Preparing Thereof
- <130> PN130496
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 750
- <212> DNA
- <213> proteo bacteria
- <400> 1

atgaaattat tactgatatt aggtagtgtt attgcacttc ctacatttgc tgcaggtggt	60
ggtgaccttg atgctagtga ttactctggt gtttcttttt ggtagttac tgctgcttta	120
ttagcatcta ctgtatTTTT cttgttgaa agagatagag tttctgcaa atggaaaaca	180
tcattaactg tatctggtct tggtactggt attgctttct ggcatatcat gtacatgaga	240
gggtatgga ttgaaactgg tgattcgcca actgtattta gataattga ttggttacta	300
acagttcttc tattaatatg tgaattctac ttaattcttg ctgctgcaac taatgttgct	360
ggatcattat ttaagaaatt actagttggt tctcttgta tgcttggtt tggttacatg	420

ggtgaagcag gaatcatggc tgcattgcct gcattcatta ttgggtgttt agcttgggta	480
tacatgattt atgaattatg ggctggagaa ggaaaatctg catgtaatac tgcaagtcct	540
gctgtgcaat cagcttaca cacaatgatg tatattatca tctttggttg ggcgatttat	600
cctgtaggtt atttcacagg ttacctgatg ggtgacggtg gatcagctct taacttaaac	660
cttatctata accttgctga ctttgtaac aagattctat ttggtttaac tatatggaat	720
gttgctgtta aagaatcttc taatgcttaa	750