



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년09월02일
(11) 등록번호 10-1061482
(24) 등록일자 2011년08월26일

(51) Int. Cl.

C12P 21/02 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0036536

(22) 출원일자 2010년04월20일

심사청구일자 2010년04월20일

(56) 선행기술조사문헌

Biochemistry(2010) Vol.49, pp.3343-3350
(2010.03.)

Photochem. Photobiol.(2008) Vol.84, No.4,
pp.977-984

Biochemistry(2006) Vol.45, pp.10998-11004

(73) 특허권자

서강대학교산학협력단

서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교

(72) 발명자

정광환

경기도 성남시 분당구 이매동 삼성아파트
1025-503

최아름

울산광역시 동구 방어동 1093-5번지 크리스탈빌
402호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

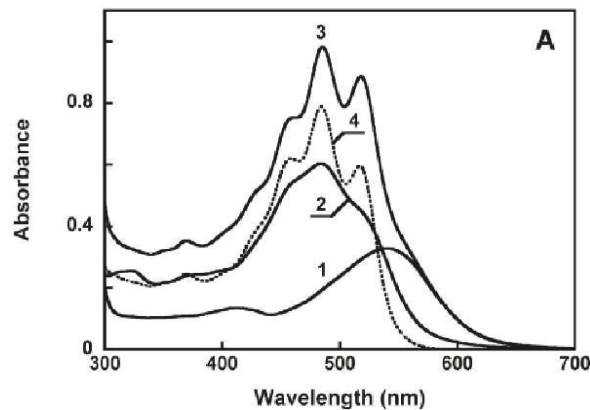
심사관 : 정재철

(54) 카로테노이드가 재구성된 글레오박터 로돕신

(57) 요약

본 발명은 살리니잔틴과 특이적인 결합을 통해 재구성되는 글레오박터 로돕신에 관한 것으로, 광-수확 안테나(light-harvesting antenna) 역할을 하는 카로티노이드(carotenoid)인 살리니잔틴 및 글레오박터 로돕신이 특이적으로 결합하여, 살리니잔틴으로 흡수된 광 에너지가 글레오박터 로돕신의 레티날 단백질로 전달함으로써, 상기 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체를 광-수확률이 증가되어 빛에너지를 이용한 로돕신의 활성화 및 이를 이용한 센서에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

세르게이 발라쇼브

미국 캘리포니아 92697 엘바인 캘리포니아대학 생
리학 및 생물물리학과

야노스 라니

미국 캘리포니아 92697 엘바인 캘리포니아대학 생
리학 및 생물물리학과

엘레오노라 이마세바

미국 캘리포니아 92697 엘바인 캘리포니아대학 생
리학 및 생물물리학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 11-2008-11-004-00

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 교육과학기술부 21C 프론티어연구개발사업

연구과제명 녹색광 수용체를 이용한 광에너지 전환 연구

기여율

주관기관 한국 생명공학기술원

연구기간 2008년 05월 01일 ~ 2011년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

글레오박터 로돕신을 발현하는 세포의 배양 배지에 살리니잔틴을 첨가하는 단계를 포함하는, 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체의 제조 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 글레오박터 로돕신은 서열번호 2로 기재되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 글레오박터 로돕신을 발현하는 세포는 자연적으로 글레오박터 로돕신을 발현하는 세포 또는 서열번호 2로 기재되는 글레오박터 로돕신을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 발현벡터로 형질전환된 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

- 1) 서열번호 2로 기재되는 글레오박터 로돕신을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 발현벡터를 제조하는 단계; 및,
- 2) 살리니잔틴을 생산하는 세포에 단계 1)에서 제조한 발현벡터를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체의 제조 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 형질전환은 리포펙타민(Lipofectamine), 도진도(Dojindo)사의 힐리맥스(Hilymax), 퓨젠(Fugene), 제트 피이아이(jetPEI), 이펙텐(Effectene) 및 드림펙트(DreamFect)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 상용화된 형질도입용 시약을 이용하는 방법; 칼슘-인산(calcium-phosphate), 양전하성 고분자, 리포솜, 나노입자, 뉴클레오펙션(nucleofection), 전기 천공법(electroporation), 열 충격(heat shock), 마그네토펙션(magnetofection)을 이용하는 방법; 및 레트로 바이러스를 이용하는 방법으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1항 또는 제 4항의 방법으로 제조된 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체.

청구항 7

제 6항의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체를 포함하는 센서.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 카로테노이드가 재구성되는 글레오박터 로돕신 단백질 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 카로테노이드(carotenoid)는 클로로필-기반 광생성 기구에서 스펙트럼의 청록색 부위에서의 빛-수확 및 광방호(光防護)에서 주된 역할을 담당한다(1-5). 레티날 단백질에서 빛-수확 구성요소로서의 그들의 존재는 최근에서야 확립되었는데, 살리니박터 루버(*Salinibacter ruber*)의 잔토로돕신은 상기 복합체의 첫 번째 예시가 되었다(비특허문헌 6). 카로테노이드 박테리오루버린(carotenoid bacterioruberin)(비특허문헌 8, 비특허문헌 9)은 상기 알케안 할로루브럼(*archaeon Halorubrum*)의 고대로돕신과 같은 빛-수확 기능이 없는 다른 펌프에 결합하지만(비특허문헌 9, 비특허문헌 10), 상기 고세균의 레티날-기반의 빛-을 이용한 양자 펌프인 박테리오로돕신(비특허문헌 7)은 카로테노이드를 포함하지 않는다. 광-유도 양자 펌프 잔토로돕신의 구성성분인 살리니잔틴(*Salinixanthin*)(비특허문헌 11)은 극호염성 박테리움 *S. 루버*(*extremely halophilic eubacterium S. ruber*)의 주요한 카로테노이드이다(비특허문헌 12). 상기 C_{40} 카로테노이드는 한쪽 말단에 11개 이중 결합 사슬의 아실 글리코사이드를 갖고, 다른 한쪽 말단에 4-옥소(케토)기의 고리가 결합되어있다. 잔토로돕신(비특허문헌 6)에 결합하였을 때, 살리니잔틴은 빛-수확 안테나로서 제공된다(비특허문헌 6, 비특허문헌 10). 살리니잔틴은 흡수된 양자들의 40-45%를 레티날로 단명하는 카로테노이드의 S_2 상태 및 레티날의 S_1 상태를 포함하는(비특허문헌 13, 비특허문헌 14) 펨토 초(10^{-15} s) 공정(비특허문헌 14)내에 빠르게 전달한다(비특허문헌 6, 비특허문헌 13). 3개 이상의 결레 이중 결합을 갖는 카로테노이드 및 폴리엔에서, 가장 낮은 여기 상태 $S_1(2^1A_g^-$ -유사)은 대칭금지이다(비특허문헌 3, 비특허문헌 15-비특허문헌 17). 청록 범위에서의 강한 흡수 밴드는 전이 상태에서 S_2 상태($1^1B_u^+$ -유사)로 온 것이다. S_1 상태의 카로테노이드는 S_2 상태에서부터 빠른 내부 전환의 결과로서 생성된다. S_1 상태의 카로테노이드의 에너지 수준은 레티날의 S_1 상태의 에너지 수준보다 낮아서(비특허문헌 3, 비특허문헌 13), 레티날 크로모포어(retinal chromophore)의 에너지 제공자로서 역할을 수행할 수 없다. 이는 S_2 및 S_1 상태가 에너지 제공자로서 역할을 하는 빛-수확 복합체에서 카로테노이드-박테리오 염록체 쌍과 다르다(비특허문헌 3, 비특허문헌 18). 시프 염기로 양자화된 레티날 단백질에서(박테리오로돕신 및 잔토로돕신과 같은) 가장 낮은 여기 상태는 가시광선 범위에서 폭넓고 강한 흡수 밴드를 나타내는 1^1B_u -유사 상태인 것으로 강하게 짐작된다(비특허문헌 19). 상기 상태는 카로테노이드의 S_2 상태로서 큰 진동자 세기 및 큰 전이에 의해 특징화된다(비특허문헌 19). 잔토로돕신에서 살리니잔틴 및 레티날 크로모포어 사이의 짧은 거리 및 그들의 상호간에 알맞은 방위(비특허문헌 13, 비특허문헌 20)는 크로모포어의 두 개 접합 사슬 사이의 유의한 전자기적 연결(비특허문헌 21)을 야기하고[ca. $160-210\text{ cm}^{-1}$ (비특허문헌 14)], 카로테노이드에서 레티날 크로모포어로 여기 에너지를 효과적으로 전달한다(비특허문헌 13). 단순 단일-크로모포어 카로테노이드 안테나는 레티날 단백질의 빛-수확 능력을 배가시키고, 특히 레티날 크로모포어의 흡수가 낮은 청록 범위에서 추가적 광학적 횡단면을 제공한다. 카로테노이드의 결합은 그의 흡수 스펙트럼에서 진동전자 밴드의 심화 및 비대칭 형태의 4-케토 고리 및 접합 사슬의 부동화를 가리키는 광학 활성의 출현을 동반한다(비특허문헌 22). 상기 형태는 레티날에 의해 조절된다. 가수분해를 통한 후자의 제거는 결합된 카로테노이드의 특징적인 스펙트럼 특성을 제거한다(비특허문헌 6, 비특허문헌 22, 비특허문헌 23).

[0003] 시아노박테리움 글레오박터 비올라세우스(비특허문헌 46)에서 발현되는 글레오박터 로돕신이 카로테노이드와 결합하여 카로테노이드-레티날 단백질 복합체를 형성한다는 보고는 아직 전무하다.

[0004] 본 발명자들은 글레오박터 로돕신의 광흡수율을 증가시키는 방법을 연구하던 중, 극 호염균인 살리니박터 루버에서 분리한 카로테노이드인 살리니잔틴이 글레오박터와 결합하여 복합체를 형성하는 것을 흡수 분광 분석을 통해 확인하였고, 살리니잔틴이 글레오박터 로돕신의 레티날 단백질로 에너지를 전달하는 것을 형광 스펙트럼 분석을 통한 여기 스펙트럼으로 확인하였으며, 광-흡수 안테나로서 기능하는 살리니잔틴이 글레오박터 로돕신과 재구성되어 광흡수 효율이 증가된 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005]

- (비특허문헌 0001) Frank, H. A., and Cogdell, R. J. (1996) Photochem. Photobiol. 63, 25764.
- (비특허문헌 0002) Cogdell, R. J. et al., (1999) The Structure and Function of the LH2 Complex from Rhodopseudomonas acidophila Strain 10050, with Special Reference to the Bound Carotenoids. In The Photochemistry of Carotenoids (Frank, H. A., Young, A. J., Britton, G., and Cogdell, R. J., Eds.) pp 71-80, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- (비특허문헌 0003) Polivka, T., and Sundström, V. (2004) Chem. Rev. 104, 2021071.
- (비특허문헌 0004) Wilson, A. et al., (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 120752080.
- (비특허문헌 0005) Berera, R., et al., (2009) Biophys. J. 96, 2261267.
- (비특허문헌 0006) Balashov, S. P. et al., (2005) Science 309, 2061064.
- (비특허문헌 0007) Oesterheld, D., and Stoeckenius, W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 2853 2857.
- (비특허문헌 0008) Yoshimura, K., and Kouyama, T. (2008) J. Mol. Biol. 375, 1267281.
- (비특허문헌 0009) Mukohata, Y. et al., (1991) Photochem. Photobiol. 54, 1039045.
- (비특허문헌 0010) Boichenko, V. A. et al., (2006) Biochim. Biophys. Acta 1757, 1649656.
- (비특허문헌 0011) Lutnaes, B. F. et al., (2002) J. Nat. Prod. 65, 1340343.
- (비특허문헌 0012) Anton, J. et al., (2002) Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 48591.
- (비특허문헌 0013) Balashov, S. P. et al., (2008) Biophys. J. 95, 2402414.
- (비특허문헌 0014) Polvka, T. et al., (2009) Biophys. J. 96, 2268277.
- (비특허문헌 0015) Hudson, B. S., and Kohler, B. E. (1972) Chem. Phys. Lett. 14, 299 304.
- (비특허문헌 0016) Schulten, K., and Karplus, M. (1972) Chem. Phys. Lett. 14, 30509.
- (비특허문헌 0017) Christensen, R. L. (1999) The electronic states of carotenoids. In The Photochemistry of Carotenoids (Frank, H. A., Young, A. J., Britton, G., and Cogdell, R. J., Eds.) pp 137-157, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- (비특허문헌 0018) Cong, H. et al., (2008) J. Phys. Chem. B 112, 106890703.
- (비특허문헌 0019) Birge, R. R., and Zhang, C.-F. (1990) J. Chem. Phys. 92, 7178195.
- (비특허문헌 0020) Luecke, H. et al., (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 165616565.
- (비특허문헌 0021) Scholes, G. D. (2003) Annu. Rev. Phys. Chem. 54, 577.
- (비특허문헌 0022) Balashov, S. P. et al., (2006) Biochemistry 45, 109981004.
- (비특허문헌 0023) Imasheva, E. S. et al., (2008) Photochem. Photobiol. 84, 97784.
- (비특허문헌 0024) Luecke, H. et al., (1999) J. Mol. Biol. 291, 89911.
- (비특허문헌 0025) Litvin, F. F. et al., (1978) Nature 271, 47678.
- (비특허문헌 0026) Sineshchekov, O. A., and Litvin, F. F. (1988) Mechanisms of Phototaxis of Microorganisms. In Molecular Mechanisms of Biological Effects of Optical Radiation (in Russian), pp 212-227, Nauka, Moscow.
- (비특허문헌 0027) Ruiz-Gonzales, M. X., and Marin, I. (2004) J. Mol. Evol. 58, 34858.
- (비특허문헌 0028) Spudich, J. L., and Jung, K.-H. (2005) Microbial Rhodopsins: Phylogenetic and

Functional Diversity. In Handbook of photosensory receptors (Briggs, W. R., and Spudich, J. L., Eds.) pp 1-23, Wiley-VCH, Darmstadt, Germany.

- (비특허문헌 0029) Frigaard, N.-U. et al., (2006) Nature 439, 84750.
- (비특허문헌 0030) Brown, L. S., and Jung, K.-H. (2006) Photochem. Photobiol. Sci. 5, 53846.
- (비특허문헌 0031) Sharma, A. K. et al., (2006) Trends Microbiol. 14, 46369.
- (비특허문헌 0032) Adamian, L. et al., (2006) Photochem. Photobiol. 82, 1426435.
- (비특허문헌 0033) Fuhrman, J. A. et al., (2008) Nat. Rev. Microbiol. 6, 488 494.
- (비특허문헌 0034) Beja, O. et al., (2000) Science 289, 1902906.
- (비특허문헌 0035) Beja, O. et al., (2001) Nature 411, 78689.
- (비특허문헌 0036) Venter, J. C. et al., (2004) Science 304, 664.
- (비특허문헌 0037) Gomez-Consarnau, L. et al., (2007) Nature 445, 21013.
- (비특허문헌 0038) Sharma, A. K. et al., (2009) ISME J. 3, 72637.
- (비특허문헌 0039) Vogeley, L. et al., (2004) Science 306, 1390393.
- (비특허문헌 0040) Miranda, M. R. M. et al., (2009) Biophys. J. 96, 1471481.
- (비특허문헌 0041) Waschuk, S. A. et al., (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 6879883.
- (비특허문헌 0042) Sineshchekov, O. A. et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 8689 8694.
Article Biochemistry, Vol. 48, No. 46, 2009 10955
- (비특허문헌 0043) Mongodin, E. F. et al., (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102, 181478152.
- (비특허문헌 0044) Giovannoni, S. J. et al., (2008) Environ. Microbiol. 10, 1771782.
- (비특허문헌 0045) Sharma, A. K. et al., (2008) Environ. Microbiol. 10, 1039056.
- (비특허문헌 0046) Nakamura, Y. et al., (2003) DNA Res. 10, 13745.
- (비특허문헌 0047) Dioumaev, A. K. et al., (2002) Biochemistry 41, 5348358.
- (비특허문헌 0048) Imasheva, E. S. et al., (2006) Photochem. Photobiol. 82, 1406413.
- (비특허문헌 0049) Takaichi, S., and Mochimaru, M. (2007) Cell. Mol. Life Sci. 64, 2607619.
- (비특허문헌 0050) Britton, G. et al., (2004) Carotenoids Handbook, Birkhauser Verlag, Berlin.
- (비특허문헌 0051) Goodwin, T. W. (1984) The Biochemistry of the Carotenoids, Vol. II Animals, Chapman and Hall, London.
- (비특허문헌 0052) Davis, C. M. et al., (1995) J. Biol. Chem. 270, 5793804.
- (비특허문헌 0053) Frank, H. A. (1999) Incorporation of carotenoids into reaction center and light-harvesting pigment-protein complexes. In The Photochemistry of Carotenoids (Frank, H. A., Young, A. J., Britton, G., and Cogdell, R. J., Eds.) pp 223-234, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- (비특허문헌 0054) Kouyama, T. et al., (1985) Biophys. J. 47, 434.
- (비특허문헌 0055) Balashov, S. P. et al., (1988) Photochemical processes of light energy transformation in bacteriorhodopsin. In Physicochemical Biology Reviews (Skulachev, V. P., Ed.) pp 1-61, Harwood Academic Publishers GmbH, Basingstoke, U.K.
- (비특허문헌 0056) Song, L. et al., (1993) Science 261, 89194.
- (비특허문헌 0057) Mowery, P. C. et al., (1979) Biochemistry 18, 4100107.

(비특허문헌 0058) Fischer, U., and Oesterhelt, D. (1979) Biophys. J. 28, 21130.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 광-수확률을 증가시키고, 로돕신을 광활성화 시킬 수 있는 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 글레오박터 로돕신을 발현하는 세포의 배양 배지에 살리니잔틴을 첨가하는 단계를 포함하는, 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체의 제조 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은

[0009] 1) 서열번호 2로 기재되는 글레오박터 로돕신을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 발현백터를 제조하는 단계; 및,

[0010] 2) 살리니잔틴을 생산하는 세포에 단계 1)에서 제조한 발현백터를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체를 제공한다.

[0012] 아울러, 본 발명은 상기 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체를 포함하는 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 광-수확 카로테노이드 안테나 역할을 담당하는 살리니잔틴이 글레오박터 로돕신의 레티날로 에너지를 전달하여 광-수확률을 높이며, 높은 에너지의 빛을 이용하여 로돕신을 광활성화시킬 수 있으므로, 로돕신을 이용한 센서에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 글레오박터 로돕신 및/또는 살리니잔틴의 흡수 스펙트럼을 나타낸 도이다(1: 글레오박터 로돕신, 2: 살리니잔틴, 3: 글레오박터 로돕신+살리니잔틴, 4: 스펙트럼 3-스펙트럼 1)

도 2는 도 1의 스펙트럼 1 내지 3의 이차 유도체의 흡수 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 3은 살리니잔틴에 의한 글레오박터 로돕신의 적정 흡수 스펙트럼 그래프이다(하여 흡광도를 상기와 동일한 방법으로 측정하였다(스펙트럼 1-7: 각각 0, 4, 8, 11, 13, 16 또는 19 μ M의 살리니잔틴 첨가)).

도 4는 도 3의 스펙트럼 1 내지 7의 이차 유도체의 흡수 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 5는 보정된 720 nm의 방출에 대한 여기 스펙트럼을 나타낸 형광 분광 분석 결과를 나타낸 도이다(1: 글레오박터 로돕신, 2: 글레오박터 로돕신+살리니잔틴)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명의 용어 "글레오박터 로돕신(Gloeobacter rhodopsin)"은 시아노박테리움(*cyanobacterium*)인 글레오박터 비올라세우스(*Gloeobacter violaceus*)에서 분리된 타입 I의 레티날(retinal) 결합 단백질을 의미한다. 상기 글

레오박터 로돕신은 다른 박테리아에서 발견되는 박테리오토돕신(bacteriorhodopsin)과 마찬가지로 막 단백질로서 막통과 도메인(transmembrane domain)을 갖고 있으며, 발색단(chromophore)으로 작용하는 레티날과 결합하면 광-유도(light-driven) 프로톤 펌핑(proton pumping)기능을 갖게 되고, 세포가 색깔을 띠게 된다.

- [0017] 본 발명에서 용어 "살리니잔틴(salinixanthin)"은 호염성균인 살리니박터 루버(*Salinibacter ruber*)에서 생산되는 카로테노이드를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서, 용어 "작동가능하게 연결된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사 조절 인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0019] 본 발명은 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체의 제조 방법을 제공한다.
- [0020] 상기 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 하기 방법 I 또는 방법 II로 제조되는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다:
- [0021] 방법 I
- [0022] 글레오박터 로돕신을 발현하는 세포의 배양 배지에 살리니잔틴을 첨가하는 단계를 포함하는, 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체의 제조 방법.
- [0023] 방법 II
- [0024] 1) 서열번호 2로 기재되는 글레오박터 로돕신을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 발현백터를 제조하는 단계; 및,
- [0025] 2) 살리니잔틴을 생산하는 세포에 단계 1)에서 제조한 발현백터를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체의 제조 방법.
- [0026] 상기 글레오박터 로돕신은 서열번호 2로 기재되는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 상기 글레오박터 로돕신을 발현하는 세포는 자연적으로 글레오박터 로돕신을 발현하는 세포 또는 서열번호 2로 기재되는 글레오박터 로돕신을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된 발현백터로 형질전환된 세포인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않으며 글레오박터 로돕신을 발현하는 세포라면 모두 사용가능하다.
- [0028] 상기 살리니잔틴은 살리니박터 루버로부터 분리한 것을 사용하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않으며 살리니잔틴을 자연적 또는 인위적으로 생산하는 세포로부터 분리하여 사용할 수 있다.
- [0029] 상기 형질전환은 리포펙타민(Lipofectamine), 도진도(Dojindo)사의 힐리맥스(Hilymax), 퓨젠(Fugene), 제트 피이아이(jetPEI), 이펙텐(Effectene) 및 드림펙트(DreamFect)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 상용화된 형질도입용 시약을 이용하는 방법; 칼슘-인산(calcium-phosphate), 양전하성 고분자, 리포좀, 나노입자, 뉴클레오펙션(nucleofection), 전기 천공법(electroporation), 열 충격(heat shock), 마그네토펙션(magnetofection)을 이용하는 방법; 및 레트로 바이러스를 이용하는 방법으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행되는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 구체적 실시예에서, 글레오박터 로돕신의 흡수 분광 스펙트럼은 살리니잔틴을 첨가하였을 때, 살리니잔틴의 흡수 분광 스펙트럼과 유사하게 변화되었고(도 1 참조), 살리니잔틴으로 재구성된 글레오박터 로돕신은 살리니잔틴보다 좁은 패턴의 흡수 스펙트럼을 가지며(도 2 참조), 살리니잔틴의 첨가량의 증가와 비례하여 재구성된 글레오박터 로돕신의 빛 흡수량도 ca. 1:1 카로테노이드: 레티날 화학양론으로 포화될 때 까지 추가로 증가하였다(도 3 내지 도 5 참조). 또한, 살리니잔틴으로 재구성되거나 되지 않은 글레오박터 로돕신의 형광 분광 분석으로 여기 스펙트럼을 분석한 결과, 살리니잔틴이 글레오박터 로돕신의 레티날 단백질로 약 50 %의 에너지를 전달해 주고, 살리니잔틴으로 재구성된 글레오박터 로돕신의 여기 스펙트럼은 521, 488, 458 nm에서 추가적으로 관찰되어, 레티날 크로모포어의 545 nm에서의 흡수 최대값이 레드 쉬프트(red-shift)되는 것을 확인하였다(도 6).
- [0031] 상기 결과로부터, 글레오박터 로돕신에 잔토토돕신이 보조적인 빛-수확 카로테노이드 안테나로서 결합하여 글레오박터 로돕신의 광-흡수 효율을 증가시키고, 청-록 범위의 스펙트럼을 빨간색 부위의 스펙트럼으로 스펙트럼의

전환을 야기하는 것을 확인하였다.

- [0032] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 구체적 실시예에서 글레오박터 로돕신 및 살리니잔틴이 특이적으로 결합하여 재구성되는 것을 흡수 분광 스펙트럼 분석을 통해 확인하였으며, 형광 흡수 스펙트럼 분석을 통해 여기 스펙트럼을 분석한 결과, 살리니잔틴으로 재구성된 글레오박터 로돕신에서 광흡수 효율이 증가한 것을 확인하였으므로, 본 발명의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 센서의 광흡수율을 증진시키는데 사용될 수 있다.
- [0034] 아울러, 본 발명은 상기 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체를 포함하는 센서를 제공한다.
- [0035] 본 발명의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 다수의 기술적 적용성이 있다. 예를 들어, 이들은 광발색성 적용, 광전 적용 및/또는 광수송 적용이 있는 기구 또는 장치에 포함될 수 있다.
- [0036] 광발색성 적용 하에, 본 발명의 글레오박터로돕신-살리니잔틴 복합체는 광학 데이터 저장, 간접계 측정 및/또는 광학에서의 그의 흡광 특성에 대해 이용될 수 있다. 광발색성 적용에는, 이에 제한되지 않으나, 홀로그램 필름이 포함된다. 본 발명의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 광학 데이터 저장 장치, 예컨대 2-D 저장장치, 3-D 저장장치, 홀로그램 저장장치, 연관 저장장치 등에 이용될 수 있다. 본 발명의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 정보 프로세싱, 예컨대 광학 쌍안정/광 스위칭, 광학 필터링, 신호 조건화, 신경망, 공간 광변조기, 상온주계이션(phase conjugation), 패턴 인식, 간접계 측정 등을 위한 장치에 이용될 수 있다.
- [0037] 광수송 적용 하에서, 본 발명의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 막을 통과하는 그의 광유도성 양자 수송, 예컨대 포토볼틱 장치(photovoltaic device)에 이용될 수 있다. 한 가지 상기 포토볼틱 장치는 프로테오로돕신을 포함하는 광구동 에너지 생성기로서, 광 에너지를 화학 에너지로 전환시킬 수 있다. 본 발명의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 또한 반응기 내 ATP 생성, 해수의 탈염 및/또는 태양광의 전기로의 변환을 위한 장치에 이용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 글레오박터 로돕신-살리니잔틴 복합체는 또한 2D 조화파 발생, 방사선 유무 확인(radiation detection), 바이오센서 적용 등을 위한 장치에 이용될 수 있다.
- [0039] 하나의 실시예에서, 본 발명은 광학 정보 캐리어에 적합한 재료를 제공한다. 특히, 상기 재료는 광학 데이터 저장 재료 또는 위조방지 광학 데이터 캐리어에 적합하다.
- [0040] 하나의 실시예에서, 본 발명은 광학 정보 저장 및 프로세싱에 적합한 재료를 제공한다.
- [0041] 하나의 실시예에서, 본 발명은 광학 데이터 저장(기록) 용 재료를 제공하며, 상기 재료는 데이터를 보유하면서 상기 데이터의 비파괴적인 검출(검독)을 가능하게 하며, 데이터의 광학적인 소거 후 재사용가능하다.
- [0042] 하나의 실시예에서, 본 발명은 위조업자가 모방하기 어려운 광학 정보 캐리어 재료를 제공한다.
- [0043] 하나의 실시예에서, 본 발명은 노광시 색상이 변화하는 위조방지 잉크를 제공한다.
- [0044] [실시예]
- [0045] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0046] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0047] **실시예 1. 글레오박터 로돕신의 제조**
- [0048] 글레오박터 로돕신(서열번호 1)을 암호화하는 유전자(서열번호 2)를 발현하는 발현벡터로 형질전환된 대장균(Escherichia coli)으로부터 글레오박터 로돕신을 공지의 방법을 사용하여 발현 및 정제하였다(비특허문헌 40). 간략하게, 글레오박터 로돕신이 형질전환된 대장균을 밤새 배양한 후, 이를 1/100로 희석하여 600 nm 파장에서 O.D. 값이 0.4가 될 때까지 30℃에서 배양하였다. 상기에서 배양된 세포를 5-10 μM의 all-trans-레티날(Sigma, USA) 및 1 mM IPTG(Applichem, USA)으로 30℃에서 6시간 동안 단백질 발현을 유도(induction)하였다. 상기에서

유도된 세포들은 회수하여 50 mM Tris(pH 7.0) 및 150 mM NaCl 내에서 희석시키고, 4℃에서 소니케이션(Branson sonifier 250)을 수행하여 파쇄시킨 다음, 저속(3,220 g/20 분) 원심분리기(Eppendorf centrifuge 5810R)에 의해 세포 부스러기를 제거하였다. 이후, 상등액을 Ni^{2+} -NTA 아가로오스(QuiaGen)과 혼합한 후 저속 진탕기(shaker)로 4℃에서 밤샘 혼합시켰다. 혼합물을 25 mM 이미다졸(Sigma)의 20 배 부피로 세정하고 0.02% DM을 포함하는 동일한 버퍼내의 250 mM 이미다졸로 용출시켰다. 글로에박터 로돕신을 포함하는 분획(fraction)을 회수하고 이미다졸을 제거하고 정제된 글로에박터 로돕신 단백질을 농축하기 위해서 Amicon Ultra-4 10,000 MWCO 원심분리 필터(Millipore)로 농축시켰다. 농축된 단백질의 농도를 BCA Protein Assay Kit(Pierce, 미국)를 이용하여 결정하여 실험에 사용하였다.

[0049]

[0050]

실시예 2. 살리니잔틴의 제조

[0051]

살리니박터 루버(*Salinibacter ruber*)의 세포막으로부터 아세톤/메탄올 혼합액(7:3)을 이용하여 살리니잔틴을 분리하였다. 세포막의 지질은 차가운 아세톤으로 침전시켜 제거시켰으며, 분리된 살리니잔틴은 -20℃에서 에탄올에 녹여서 보관하였다.

[0052]

실시예 3. 흡수분광분석(Absorption Spectroscopy)을 통한 글레오박터 로돕신 및 살리니잔틴의 재구성(reconstitution) 확인

[0053]

본 발명자들은 0.2 M의 하이드록시라민으로 처리하기 전, 후의 글레오박터 로돕신(16 μM), 살리니잔틴(8 μM) 또는, 글레오박터 로돕신(16 μM) 및 살리니잔틴(8 μM)에서 공지의 기술을 사용하여 541 nm에서의 흡광계수의 최대값을 측정하였다(13). 흡광계수의 최대값은 스펙트럼의 변화로부터 추정되었으며, 흡수 스펙트럼은 4 mm×10 mm 셀에서 Shimadzu 1701 분광계로 기록되었다(4 mm 경로). 빛 세기(N)로 교정된 형광 및 형광 여기 스펙트럼은 공지의 기술에 따라 SLM-Aminco 분광형광계로 기록되었다(비특허문헌 13). 상기 흡광도 측정시 버퍼조건은 0.02% DDM(pH 7.2) 및 100 mM NaCl이었다.

[0054]

그 결과, 글레오박터 로돕신의 541 nm에서의 흡광계수의 최대값은 $\text{ca. } 50000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 일 것으로 평가되었다. 도 1에서 나타난 바와 같이, 계면활성제(DDM)에 용해시킨 글레오박터 로돕신이 단독으로 존재할 때, pH 7.2에서 541 nm에서 최대값의 단일 흡수량을 갖는 스펙트럼을 나타내었다(도 1의 스펙트럼 1). 또한, 살리니잔틴이 단독으로 존재시, 부실하게 결정된 진동 전자 최대값을 가졌다(도 1의 스펙트럼 2). 상기 글레오박터 로돕신 단백질에 살리니잔틴의 첨가하였을 때, 생성된 산물의 스펙트럼은 두 첨가물의 특이적 결합을 나타내는 카로테노이드 진동 전자 밴드에 특징적인 피크의 좁아짐을 확인하였다(도 1의 스펙트럼 3 및 4). 카로테노이드의 결합은 ~5분의 이상수에서 일어났다(데이터 보여주지 않음). 결합된 카로테노이드의 양은 흡수 스펙트럼의 이차 유도체의 진폭으로부터 평가할 수 있다(도 2). 비처리된 글레오박터 로돕신, 비결합된 살리니잔틴 및 살리니잔틴으로 재구성된 글레오박터 로돕신의 이차 유도체의 비교에서 알 수 있듯이(도 2의 스펙트럼 1-3), 결합에 따른 흡수 밴드의 좁은 피크는 그들의 이차 유도체의 진폭의 증가를 초래하였다.

[0055]

또한, 본 발명자들은 상기에서 확인한 글레오박터 로돕신 및 살리니잔틴의 특이적 결합의 화학양론을 분석하기 위하여 16 μM 의 글레오박터 로돕신에 0, 4, 8, 11, 13, 16 또는 19 μM 의 살리니잔틴을 첨가하여 흡광도를 상기와 동일한 방법으로 측정하였다(도 3 및 4에서 각각 스펙트럼 1-7).

[0056]

살리니잔틴의 첨가량 증가시 이용가능한 결합 부위가 $\text{ca. } 1:1$ 카로테노이드: 레티날 화학양론으로 포화될 때 까지 추가적 결합을 야기하였다(도 3). 결합된 카로테노이드의 양은 자유 카로테노이드에 대한 진폭의 값이 0이 되는 파장인, 541 nm에서 진폭을 나타낸 후(도 4), 흡수 스펙트럼의 이차 유도체로부터 평가하여 적정곡선을 나타내었다(도 5).

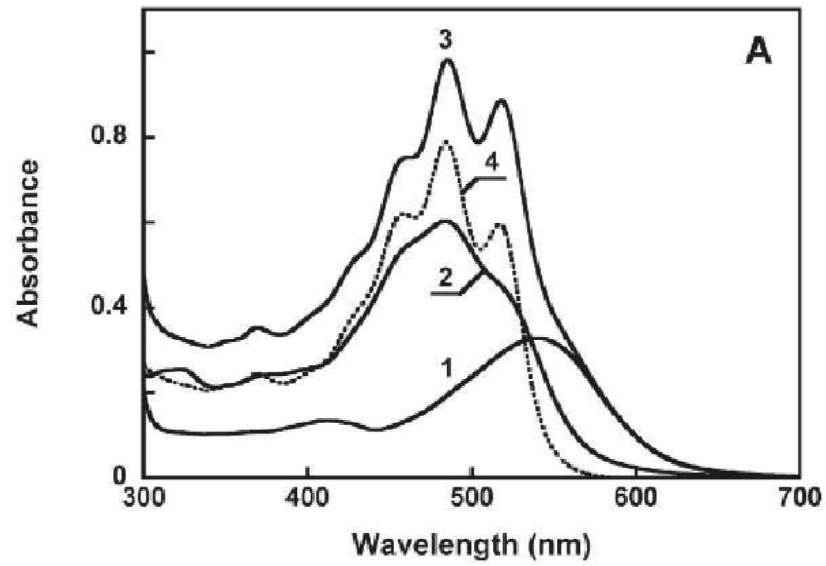
[0057]

아울러, 본 발명자들은 글레오박터 로돕신 및 살리니잔틴의 결합(재구성) 전, 후의 여기 스펙트럼의 최대값을 pH 4.5에서 공지의 방법으로 측정하였다(비특허문헌 13). 상기 결과로부터 살리니잔틴이 빛을 흡수하여 레티날로 약 50 %의 에너지를 전달해 주는 것을 확인하였다. 레티날 크로모포어의 545 nm에서의 흡수 최대값이 레드쉬프트(red-shift)되는 것을 확인하였다. 살리니잔틴으로 재구성된 글레오박터 로돕신의 여기 스펙트럼은 521,

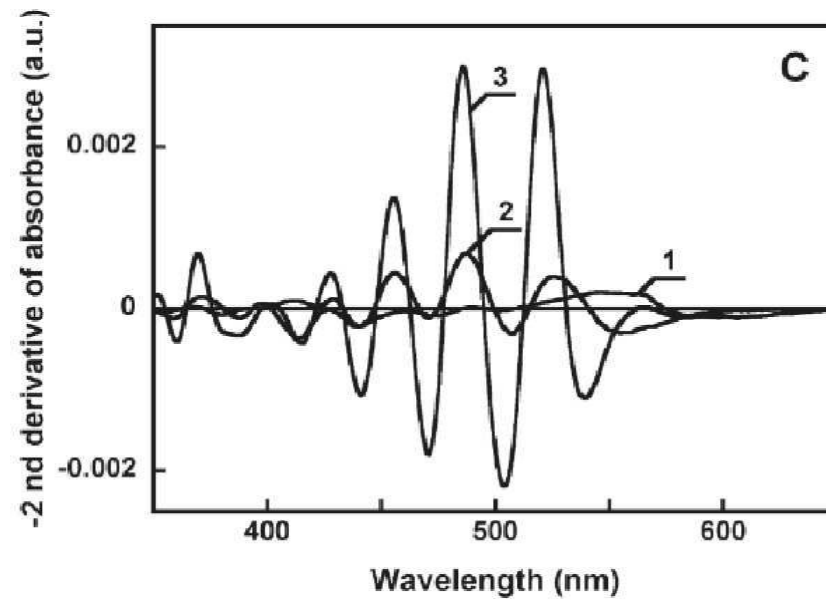
488, 458 nm에서 추가적으로 관찰되었다. 이는 살리니잔틴으로부터 레티날로 에너지의 전달이 있었음을 명백히 시사한다(도 6).

도면

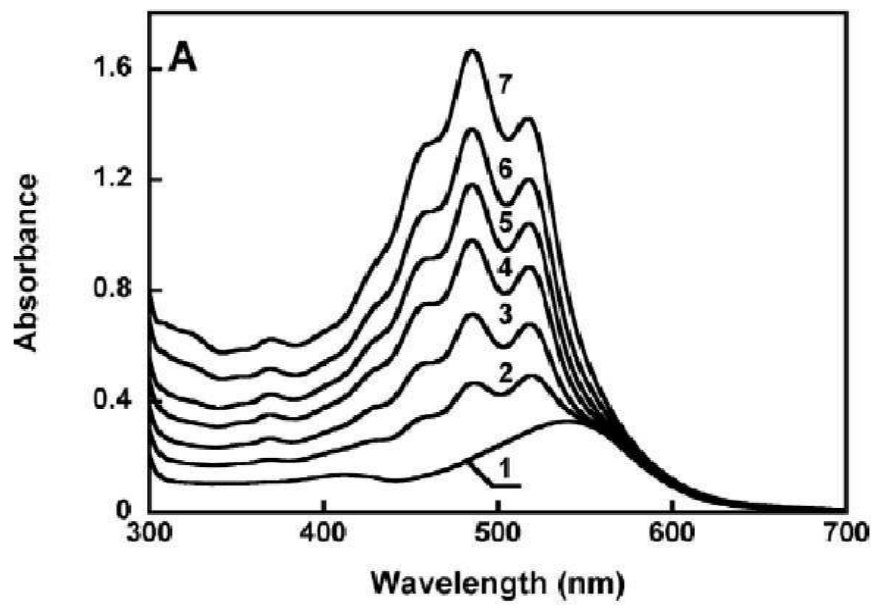
도면1



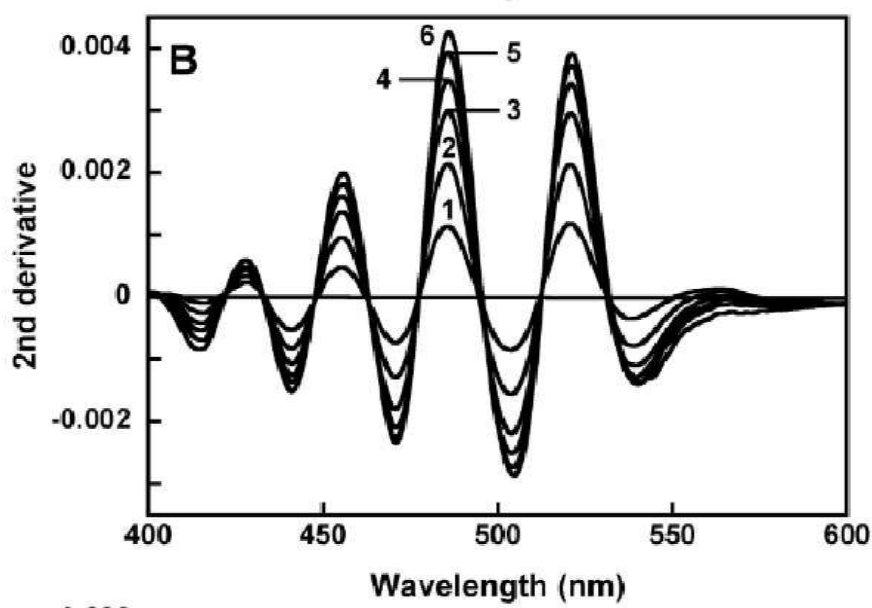
도면2



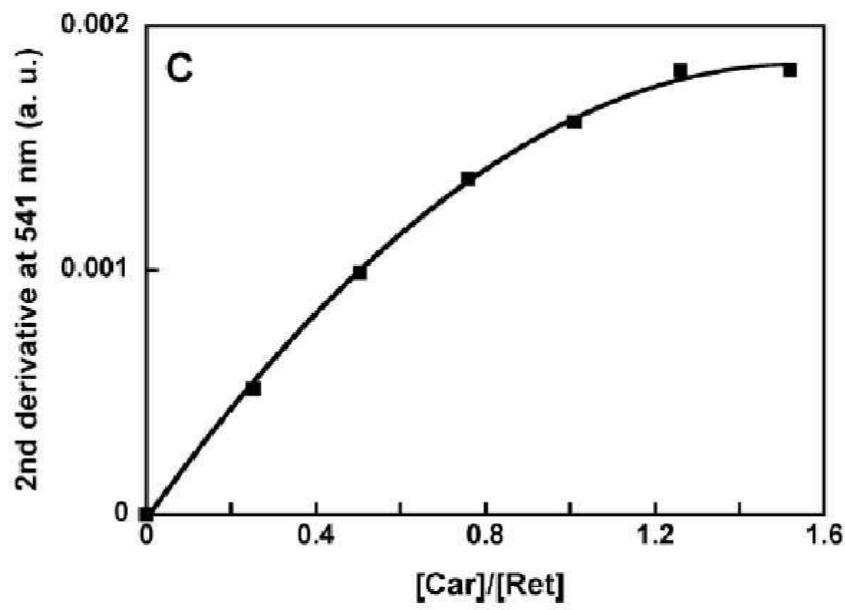
도면3



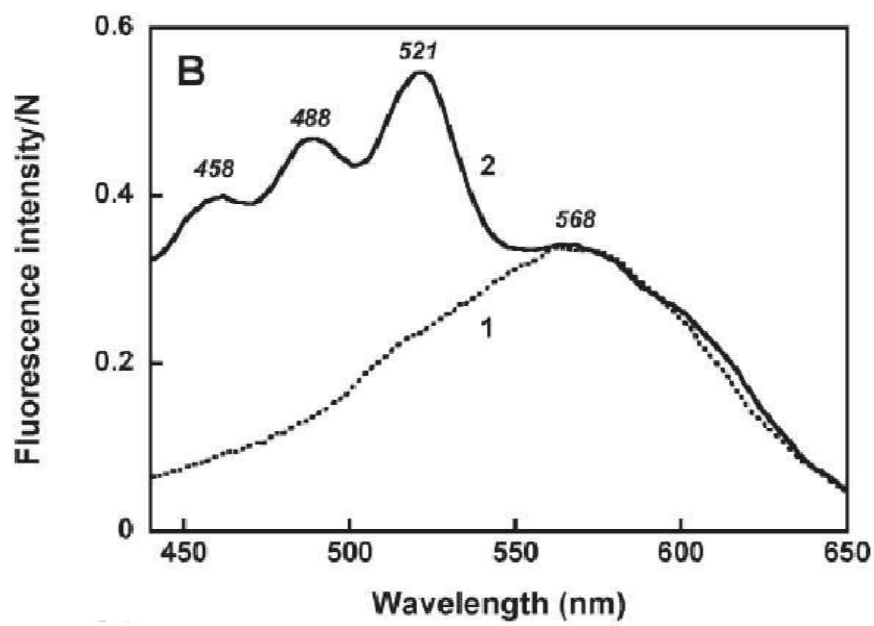
도면4



도면5



도면6



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)