



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0134792
(43) 공개일자 2013년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0058565
(22) 출원일자 2012년05월31일
심사청구일자 2012년05월31일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)
(72) 발명자
정광환
경기도 성남시 분당구 이매동 101(25/5) 이매촌 1021-102
김소영
서울특별시 마포구 합정동 431-18번지 현진아트빌라 401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

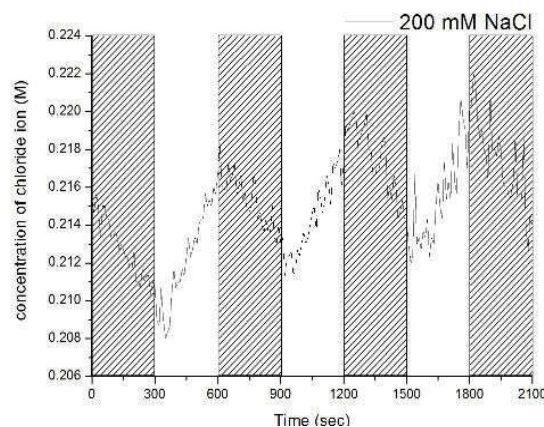
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 포함하는 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하기 위한 조성물 및 세포에 관한 것으로, 본 발명은 기존에 보고된 고세균 유래 로돕신과 비교하여 염화이온 수송 방향이 반대인 신규한 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 제공한다. 본 발명의 해양 미생물 유래 해양미생물-유래 로돕신 단백질은 저농도의 염화이온 농도에서 단백질이 기능적으로 작동하여 세포 외부로 염화 이온을 펌핑하므로, 염화 이온 농도 조절 실패로 야기되는 질병의 증상 완화 등 다양한 분야에서 산업적으로 이용 가능하다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

김세준

경기도 과천시 중앙동 주공아파트 112-504

배기호

강원도 원주시 반곡동 반곡아이파크아파트 115-101

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2010-00757

부처명 교육과학기술부

연구사업명 해외우수연구기관 유치사업

연구과제명 Fraunhofer IZFP-Yonsei BME Joint Research Center 유치사업

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2010.12.01 ~ 2012.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2011-220-C00057

부처명 교육과학기술부

연구사업명 글로벌네트워크지원사업

연구과제명 부유미생물 군집에서 새로운 광감지 전달기능 발굴 및 생체에너지 전환기전 연구

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 포함하는 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하기 위한 조성물.

청구항 2

서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 해양미생물-유래 로돕신 단백질이 세포막에 있는 것을 특징으로 하는 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포.

청구항 3

다음의 단계를 포함하는 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포의 제조방법:

- (a) 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 형질전환체를 배양하여 상기 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 발현시켜 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포를 수득하는 단계.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 숙주세포는 대장균인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 할로로돕신(Halorhodopsin, HR)은 고세균의 일종인 할로박테리움살리나룸(*Halobacterium salinarum*), 나트로모나스 파라오니스(*Natronomonas pharaonis*) 등에서 발견된 광활성의 타입 I 레티날 결합 단백질로 염화 이온을 수송하는 단백질로 알려져 있다(Spudich et al., 2000; Spudich and Jung, 2005 및 Schobert, B. and Lanyi, J.K., 1982; Zimanyi, L. and Lanyi, J.K., 1989).

[0003] 할로로돕신은 박테리오로돕신(Bacteriorhodopsin, BR)에서 유래되었으나 BR에서 광유도 프로톤 펌프에 중요한 두 개의 잔기인 Asp-85 및 Asp-96 중 프로톤 수용자로 작용하는 Asp-85가 Thr 잔기로 치환되어 있다(Dioumaev et al., 2003; Dioumaev et al., 2002). BR에서 Asp-85를 Thr 잔기로 치환한 단일 잔기 돌연변이 단백질은 HR과

동일한 염화 이온 수송 능력을 갖는다고 알려져 있다.

- [0004] HR은 올-트랜스(all-trans) 레티날을 발색단(chromophore)으로 사용한다. 광센서 수용체에서 사용되는 발색단중에서 레티날의 가장 주목할만한 상이한 특성은 아포단백질(apoprotein)과의 상호작용에 따라 이의 흡수 스펙트럼에서의 변이가 크다는 것이다(Birge, 1990; Ottolenghi and Sheves, 1989). 레티날의 시프 염기(Schiff base)는 메탄올에서 440 nm의 최대 흡수 파장을 나타내지만, 마이크로 환경의 단백질에서는 더욱 긴 파장으로 이동된다(Yan et al., 1995).
- [0005] all-trans 레티날은 β -카로틴의 15,15' C=C 결합의 중앙 절단에 의해 생성되어(Spudich et al., 2000), β -카로틴은 2 분자의 레티날을 생성한다. 이러한 효소적 절단(cleavage)은 분자 산소에 의존하며, 보조인자(cofactor)가 요구되지 않기 때문에, 이 효소는 15, 15'- β -카로틴-디옥시게나아제라고 명명되었다(Lintig and Vogt, 2004).
- [0006] 기존 연구들에 따르면 할로로돕신은 특정 파장의 광 조사시 세포 외부에서 내부로 염화 이온을 수송하는 능력을 갖는다(Schobert, B. and Lanyi, J.K., 1982). 이 때 필연적으로 수소 이온이 간접적으로 함께 세포 내부로 수송되는 특징이 있다고 알려져 있다. 상기 고세균 유래 할로로돕신은 높은 염화이온 농도에서만 단백질이 기능적으로 작동한다.
- [0007] 최근 프로테오로돕신(proteorhodopsin, PR)과 유사한 서열을 갖는 신규 로돕신 단백질이 해양 α -프로테오 박테리아(α -proteobacteria) HIMB114에서 발견되었다. 상기 단백질은 프로톤 수용자로 작용하는 Asp 잔기 위치가 Thr 잔기로 치환되어 있으므로 염화 이온 수송 단백질일 것으로 추정되나 그 기능이 알려지지 않았고, 다른 할로로돕신과의 서열 상동성보다 프로테오로돕신과의 상동성이 더 높은 것으로 나타났다.
- [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.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 해양 미생물 유래 로돕신 단백질 중에서 염화 이온을 수송하는 기능을 갖는 신규한 로돕신 단백질을 발견하고자 노력하였다. 그 결과, 기존에 보고된 고세균 유래 로돕신의 염화 이온수송과 다른 방향성, 즉 세포 내부에서 세포 외부로 염화이온을 수송하는 기능을 갖는 로돕신 단백질을 발견하고 기능을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명의 목적은 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하기 위한 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포를 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포의 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 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 포함하는 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하기 위한 조성물을 제공한다.

- [0015] 본 발명자들은 해양 미생물 유래 로돕신 단백질 중에서 염화 이온을 수송하는 기능을 갖는 신규한 로돕신 단백질을 발견하고자 노력하였다. 그 결과, 기존에 보고된 고세균 유래 로돕신의 염화 이온수송과 다른 방향성, 즉 세포 내부에서 세포 외부로 염화이온을 수송하는 기능을 갖는 로돕신 단백질을 발견하고 기능을 규명하였다.
- [0016] 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.
- [0017] 본 발명의 해양미생물-유래 로돕신 단백질은 세포막에 위치하여 염화 이온을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 기능을 한다.
- [0018] 본 발명의 해양미생물-유래 로돕신 단백질에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 해양미생물-유래 로돕신 단백질과 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0019] 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 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.
- [0020] 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); 아스파르테이트(-3.5); 아스파라긴(-3.5); 라이신(-3.9); 및 아르기닌(-4.5).
- [0021] 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.
- [0022] 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); 아스파테이트(+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).
- [0023] 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.
- [0024] 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.
- [0025] 바람직하게는, 본 발명의 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열이다.
- [0026] 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 발명의 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 열라인된

트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 일라인먼트에 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. BLSAT는 <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.

- [0027] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우에는, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있으며, 예컨대, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및/또는 미네랄 오일을 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0028] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-100000 mg/kg이다.
- [0029] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약제학적 조성물은 체내 염분 조절과 관련된 질환의 예방 또는 치료에 적용할 수 있다. 상기 체내 염분 조절과 관련된 질환은 낭포성 섬유증, 천식, 폐기종, 만성기관지, 부비동염, 변비, 체장염, 체장 부전증, 폐질환, 간질환, 유전성 폐기종, 유전성 혈색소증, 유전성 혈관부종, 고콜레스테롤증, 카일로마이크로혈증, 무 베타리포단백혈증(abetalipoproteinemia), 진성 당뇨병, 부갑상선 기능 저하증, 갑상선 기능 항진증 및 퇴행성 신경계 질환으로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 질환이고, 보다 바람직하게는 낭포성 섬유증이다.
- [0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 해양미생물-유래 로돕신 단백질이 세포막에 있는 것을 특징으로 하는 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 포함하는 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포의 제조방법을 제공한다:
- [0033] (a) 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- [0034] (b) 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- [0035] (c) 상기 형질전환체를 배양하여 상기 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 발현시켜 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포를 수득하는 단계.
- [0036] 본 발명의 해양미생물-유래 로돕신 단백질의 제조방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

- [0037] 단계 (a): 재조합 벡터의 제조
- [0038] 본 발명의 염화이온(Cl^-)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포를 제조하기 위한 첫 번째 단계로, 서열목록 제 2서열의 아미노산 서열로 이루어진 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 발현 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조한다.
- [0039] 본 발명의 해양미생물-유래 로돕신 단백질의 뉴클레오타이드 서열은 이전에 언급한 내용과 동일하므로, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0040] 본 명세서에 있어서, 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.
- [0041] 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.
- [0042] 본 발명의 해양미생물-유래 로돕신 단백질의 제조에 관여하는 효소들을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 발현 조절서열에 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.
- [0043] 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, DH5 α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위(Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터(pL^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 벡터에 사용되는 프로모터는 lacUV5 프로모터이다.
- [0044] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 다량의 아세트인 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.
- [0045] 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, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pET22b, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUCP19 등), 파지(예: λ gt4? λ B, λ -Charon, λ Δ z1 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.
- [0046] 본 발명의 발현 벡터는 프로모터서열 및 발현 대상 유전자(구조 유전자)의 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 서열들이 5'-3' 순서대로 연결되는 것이 바람직하다.
- [0047] 바람직하게는, 상기 발현 벡터는 lacUV5 프로모터 서열 및 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 작동적으로(operatively) 결합된다.
- [0048] 한편, 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및

테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

- [0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 사용된 선택표지는 암피실린이다.
- [0050] 본 발명의 벡터는 해양미생물-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 발명은 pKJ900 벡터를 사용하였다.
- [0051] 단계 (b): 형질전환체의 제조
- [0052] 이어, 상기 단계 (a)의 재조합 벡터를 숙주세포에 도입하여 형질전환체를 제조한다.
- [0053] 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 쉐린겐시스와 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.
- [0054] 바람직하게는, 상기 숙주세포는 *E. coli*이고, 보다 바람직하게는 *E. coli* 균주 UT5600이다.
- [0055] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acac. 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.
- [0056] 단계 (c): 세포의 수득
- [0057] 마지막으로, 상기 형질전환체를 배양하여 상기 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 발현시켜 염화이온(Cl⁻)을 세포 내에서 세포 외로 방출하는 세포를 수득한다.
- [0058] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 항생제를 첨가한 LB 배지에 종배양물을 1:100으로 희석하고 600 nm에서 0.4의 흡광도에 이를때까지 배양한 후, IPTG를 첨가하여 단백질의 발현을 유도하고 올-트랜스(all-trans) 레티날을 첨가하여 배양한다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0060] (a) 본 발명은 해양미생물-유래 로돕신(rhodopsin)-유사 단백질을 유효성분으로 포함하는 체내 염분의 비정상적 조절과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0061] (b) 본 발명은 기존에 보고된 고세균 유래 로돕신과 비교하여 염화이온 수송 방향이 반대인 신규한 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 제공한다.
- [0062] (c) 본 발명의 해양 미생물 유래 해양미생물-유래 로돕신 단백질은 저농도의 염화이온 농도에서 단백질이 기능적으로 작동하여 세포 외부로 염화 이온을 펌핑하므로, 염화 이온 농도 조절 실패로 야기되는 질병의 증상 완화 등 다양한 분야에서 산업적으로 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0063] 도 1은 로돕신 단백질을 숙주세포에서 발현하기 위해 사용한 플라스미드의 맵(지도)을 나타낸다.
- 도 2는 해양 미생물 유래 해양미생물-유래 로돕신 단백질의 아미노산 서열과 기존에 알려진 할로로돕신과 프로

테오로돕신의 서열상동성을 비교한 것이다. 상기 단백질은 프로테오로돕신과 높은 서열 상동성을 가지나 프로톤 수용체로 작동하는 Asp 잔기가 할로로돕신과 유사한 Thr 잔기로 치환되어 있다.

도 3는 해양미생물-유래 로돕신 단백질을 발현시키고 스펙트럼 분석한 결과를 보여준다. 정제된 해양미생물 유래 해양미생물-유래 로돕신 단백질의 흡수 스펙트럼은 전형적인 로돕신 밴드 폭(-100 nm 반밴드 폭; semibandwidth)을 나타내었고, pH 7에서의 최대 흡수 파장을 측정한 결과 564 nm에서 단일 피크를 보여준다.

도 4은 광 조사시 미생물 유래 해양미생물-유래 로돕신해양미생물-유래 로돕신 단백질을 포함하는 스페로플라스트에서 세포 외부로 염화이온을 펌핑하는 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 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.

[0065] 실시예

[0066] 실시예 1: 대장균 형질전환체의 제조

[0067] 해양 미생물(α -proteobacteria HIMB14) 유래 할로로돕신-유사 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한 재조합 플라스미드를 *E. coli* 균주 UT5600(NEB, 영국)에 도입하였다. 상세하게는, N말단에 NdeI 제한 효소 서열을 첨가하고, C말단에 NotI 제한 효소 서열을 첨가한 할로로돕신-유사 단백질의 유전자 서열을 합성 의뢰(Genescript, U.S.A)하여 이를 제한효소로 잘라 발현 벡터에 도입하였다. *E. coli* 균주 UT5600는 막단백질 프로테아제의 한 종류가 결손된 것으로 막 단백질의 안정적 발현에 유용하게 사용된다. 먼저 *E. coli* 균주 UT5600의 수용능을 CaCl_2 을 이용한 방법(Molecular cloning : A laboratory manual pp 58-59)으로 향상시켰고, 발현벡터(도 1)와 혼합한 후 열 충격을 주어 형질전환 하였다. 상기 발현벡터에 포함된 항생제 내성 유전자에 적합한 항생제인 암피실린(ampicillin, USB, 미국)을 최종농도 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 LB 배지에 도말하여 콜로니를 형성하였다.

[0068] 실시예 2: 대장균에서 해양미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질의 발현 및 막 소포체(membrane vesicle)의 제조

[0069] 해양미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질의 흡수분광분석(absorption spectroscopy) 측정을 위해 *E. coli* 균주 UT5600에서 재조합 플라스미드를 사용하여 발현하였다. 상기 '대장균 형질전환체의 제조'에서 선별된 대장균 형질전환체를 밤샘 배양한 후 1 L 플라스크 내에서 암피실린(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 첨가한 500 mL의 LB에 1:100으로 희석하고, 35°C 배양기에서 600 nm에서 0.4 흡광도 유닛이 될 때까지 배양하였다. 수소이온 수송 측정을 위한 단백질을 얻기 위해, IPTG(Isopropyl- β -D-thio-galactoside)를 최종농도 0.8 mM로 첨가하여 단백질 발현을 유도하고, 이때 올-트랜스(all-trans) 레티날을 최종농도 5 μM 로 첨가하였다. 다음, 4시간 후 세포들을 원심분리로 회수하고 150 mM NaCl을 함유하는 50 mM Tris-HCl(pH 7.0)에 재현탁하였다. 로돕신-발현된 대장균 형질전환체들을 4°C에서 소니케이션(sonication)에 의해 용해(lysis)시키고, 저속 원심분리기(3,600 $\times$ g, 15분)로 세포 부스러기들을 제거하였다. 최종적으로, 막 소포체를 95,000 $\times$ g, 4°C에서 1시간 동안 침전시키고, 150 mM NaCl을 포함하는 50 mM Tris(pH 7.0)을 사용하여 4°C에서 재현탁하였다. 배양액을 추출버퍼[1% 나트륨 도데실 말토사이드(dodecylmaltoside: DM), 150 mM NaCl, 50 mM Tris 버퍼(pH 7.0)]에서 4°C에서 4-6시간 동안 약하게 진동하여 로돕신을 막으로부터 추출하였다. 추출된 단백질은 30,000 $\times$ g에서 원심분리한 후 상등액을 취하여 수득하였다. 수용체 단백질을 갖지 않는 막은 동일한 과정을 통해 제조하였고 대조군으로서 사용하였다.

[0070] 실시예 3: His-태그된 로돕신의 정제 및 분리

[0071] C-말단에서 6-히스티딘 잔기를 포함하는 단백질은 Ni^{2+} -NTA 아가로스 비드(Qiagen, Valencia, CA, 미국)를 사용하여 분리하였다. 해양미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질을 포함하는, 상기 '세포에서 해양미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질의 발현 및 막 소포체(membrane vesicle)의 제조'의 방법으로 제조된 대장균 형질전환체의 막을 150 mM NaCl, 10 mM 이미다졸 및 50 mM Tris(pH 7.0)을 포함하는 1% DM에서 용해시킨 다음, 비드(beads)와 함께 4°C에서 16시간 동안 항온반응하였다. 단백질-결합된 비드를 25 mM 이미다졸, 0.02% DM, 및

50 mM Tris-버퍼(pH 7)로 세척하였고, 250 mM 이미다졸, 0.02% DM, 및 50 mM Tris-버퍼(pH 7)로 용출하였다. 이를 통해 얻어진 0.02% DM에 녹여진 단백질을 이용하여 최대 흡수 파장을 측정하였다.

[0072] 실시예 4: 스페로플라스트의 제조

[0073] 해양미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질을 발현하는, 상기 '대장균 형질전환체의 제조'에서 선별한 형질전환체를 배양배양한 후, 1 L 플라스크 내에서 앰피실린($50 \mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 500 ml의 LB에 1:100으로 희석하고, 35 °C 배양기에서 600 nm에서 0.4 흡광도 유닛이 될 때까지 배양하였다. 프로톤 수송 측정을 위한 단백질을 얻기 위해, IPTG를 최종농도 0.8 mM로 첨가하여 단백질 발현을 유도하고, 이때 올-트랜스 레티날을 최종농도 5 μM 으로 첨가하였다. 그런 다음, 4시간 후 세포들을 원심분리로 회수하고 30 mM Tris(pH 8.0), 20% 수크로오스(sucrose) 용액에 라이소자임(lysozyme)을 넣어 15분 동안 가볍게 마그네틱바(magnetic bar)를 이용하여 혼합하였다. 이를 3,600×g로 15분 동안 원심분리하고, 100 mM KPi(pH7.0), 20% 수크로오스 용액에 풀어서 1 ml 주사기에 옮겼다. 이를 빠르게 혼합하는 200 ml 50 mM KPi(pH7.0)에 한 방울씩 떨어뜨렸다. 여기에 Na-EDTA, MgSO_4 를 순차적으로 넣어준 후 30,000×g에서 원심분리한 후 펠렛을 모으고 이를 펌핑 측정에 사용하였다.

[0074] 실시예 5: 해양 미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질의 최대흡광도 측정

[0075] 상기 His-태그된 로돕신의 정제 및 분리에서 제조한 단백질에서 광흡수 스펙트럼을 스펙트로미터 상위 분광기(Shimadzu 2450, 일본)로 750 nm에서 350 nm까지 각 0.5 nm 간격으로 측정하였다. 상이한 pH 값(pH 4, pH 7 및 pH 10)에서의 최대흡수파장을 측정하였다. pH를 조절하기 위하여 로돕신이 담겨진 용액에 1 M HCl, 1 M NaOH 용액을 이용하여 첨가하였다.

[0076] *E. coli*에서 해양미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질을 발현시키고 Ni^{2+} -NTA 레진을 사용하여 도데실말토피라노사이드(dodecylmaltopyranoside)에서 로돕신을 정제하였다. 정제된 해양미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질의 흡수 스펙트럼은 전형적인 로돕신 밴드 폭(-100 nm 반밴드 폭; semibandwidth)을 나타내었고, pH 7에서의 최대 흡수 파장을 측정한 결과 564 nm에서 단일 피크를 가졌다(도 3).

[0077] 실시예 6: 해양 미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질의 수소이온 및 염화이온 펌핑 측정

[0078] 세포의 수소이온 및 염화이온 펌핑을 측정하기 위해, 상기 '스페로플라스트의 제조'의 방법으로 제조된 해양미생물 유래 할로로돕신-유사 단백질을 발현하는 대장균 형질전환체의 스페로플라스트를, 상온에서 비버퍼화 용액(10 mM NaCl, 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mM CaCl_2)으로 2회 세척하였다. 30,000×g에서 원심분리한 후 펠렛을 서로 다른 염화 이온 농도를 갖는 비버퍼화 용액((3, 10, 50, 100 및 200) mM NaCl, 10 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mM CaCl_2)에 재현탁하였다.

[0079] 샘플을 와이드-의드 간섭 및 열-보호(CuSO_4 및 유리) 필터와 조합한 150-วัต트 텅스텐 할로겐 램프를 사용하여 $500 \pm 20 \text{ nm}$ 에서 $100 \text{ 와트}/\text{m}^2$ 로 광을 조사하였다. pH는 컴퓨터화된 Horiba F51 pH 미터로 모니터링하였고, 염화이온 펌핑은 사이언티픽 오리온3 스타(Scientific Orion3 Star) pH 미터(Thermo, 미국) 및 오리온(Orion) 9617BNWP 클로라이드 조합 전극으로 측정하였다.

[0080] 측정 결과 광 조사 하에서 수소 이온이 만들어진 스페로플라스트 내부로 들어오는 것과 염화 이온이 스페로플라스트 밖으로 방출되는 것을 확인하였다. 결과는 도 4에서 확인할 수 있다.

[0081] 참고문헌

- [0082] 1. Spudich J.L. and K.H. Jung, (2005) "Microbial rhodopsins : Phylogenetic and functional diversity. In Handbook of photosensory receptors", Briggs, WR and Spudich JL (ed), Wiley-VCH, Weinheim, pp.1-24.
- [0083] 2. Schobert, B. and Lanyi, J. K. (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump, *J Biol Chem* 257, 10306-10313.

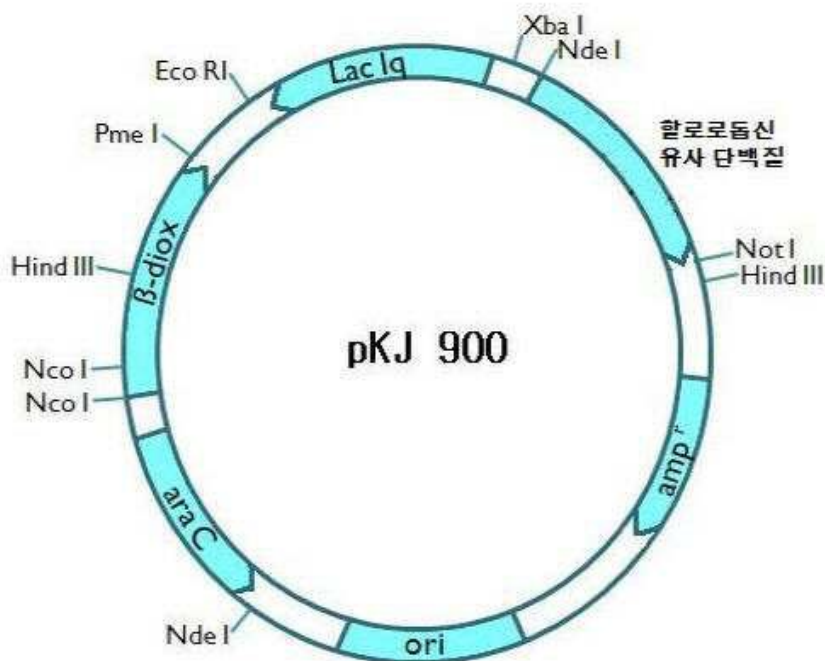
[0084] 3. Zimanyi, L. and Lanyi, J. K. (1989) Halorhodopsin: a light-driven active chloride transport system, *Ann N Y Acad Sci* 574, 11-19.

[0085] 4. Lanyi, J. K., Duschl, A., Varo, G., and Zimanyi, L. (1990) Anion binding to the chloride pump, halorhodopsin, and its implications for the transport mechanism, *FEBS Lett* 265, 1-6.

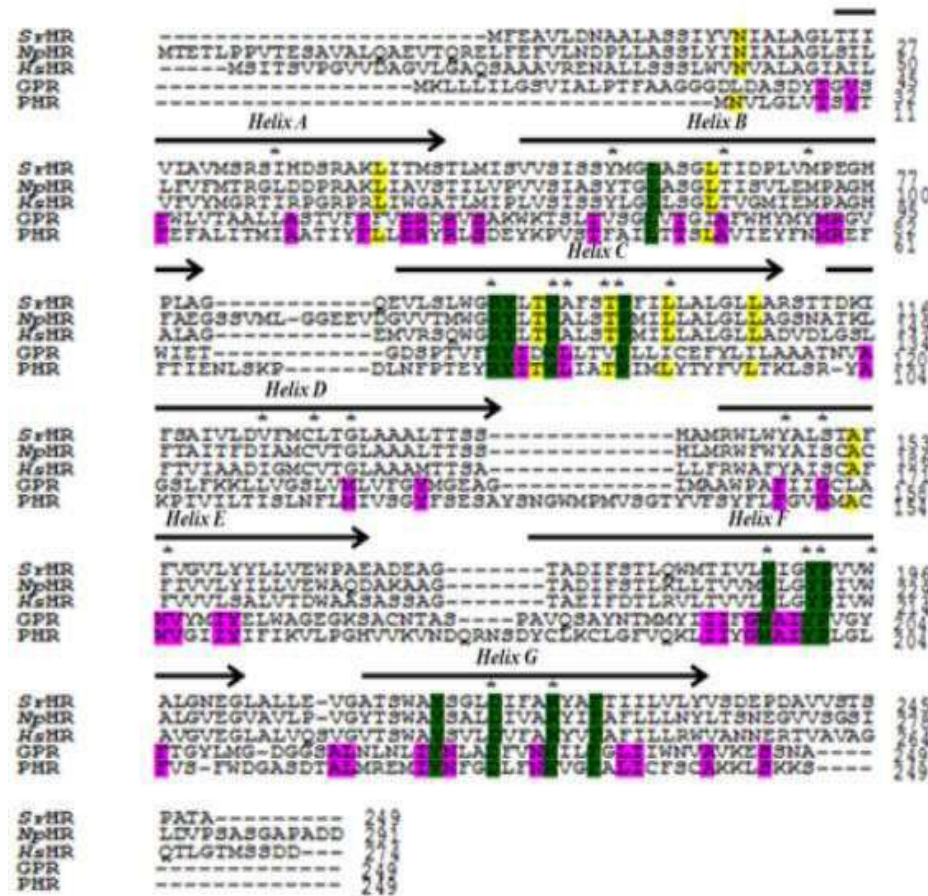
[0086] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

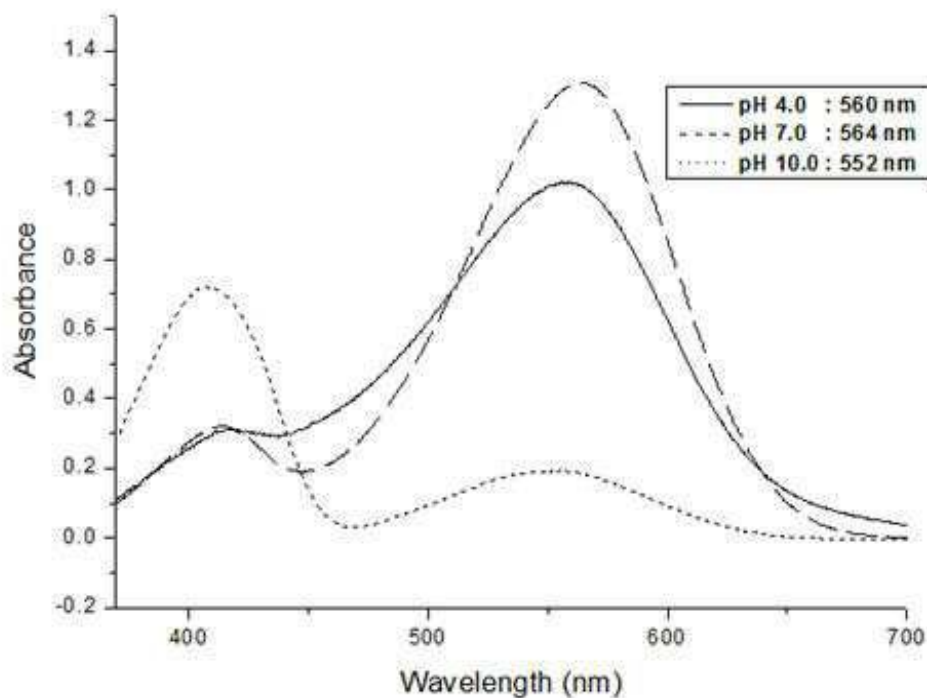
도면1



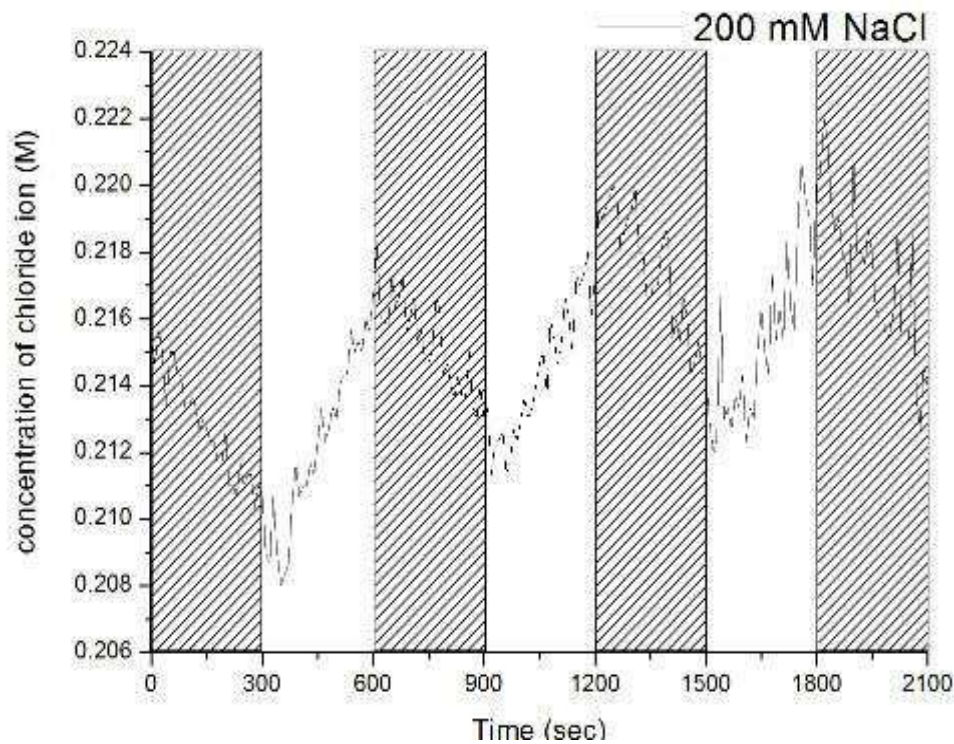
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> Compositions comprising Marine Microorganism-derived Rhodopsin Proteins
- <130> PN120315
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 768
- <212> DNA
- <213> Marine organism-derived Rhodopsin
- <400> 1

```

atgaatgtcc tgggtctggt cacctcctac acctttgaat ttgctctgat tacgatgatt      60
gtgcgacga tttactttct gctggaacgt tatcgctga gcgatgaata caaacggtc      120
tctacctttg caatcctgac cagtcactg gctgtgatcg aatacttcaa catgcgtgaa      180

ttttcacca ttgaaaacct gtcgaaaccg gacctgaatt ttccgacgga atatcgctac      240
attacctggc tgatcgcgac gccgattatg ctgtatacct acttcgttct gacgaaactg      300
    
```

agccgttatg ccaaaccgat tgtcatcctg accatcagtc tgaactttct gatgattgtg 360
tccggctatt tcagcgaatc tgcatactct aatggctgga tgccgatggt cagcggcacg 420
tatgtgtttt cctactttct gttcggcgtt ggtatggctt gctgggtcgg cattatctat 480
attttcatca aagtgtgcc gggatcatgtg gttaaagtta acgatcagcg taattcagac 540
tactgcctga aatgtctggg ctttgttcaa aaactgatta tctatggctg ggcaatctac 600

ccgtgggtc tgtttgtgc attctgggat ggtgcgtcgg acaccgccct gatgcgcgaa 660
atgatctaca acttcggcga cctgtttaac aaagttggtt ttgccctgat ctgcttctcc 720
tgtgcgaaaa aactgtccaa aaaatcccat caccatcacc atcactaa 768

<210> 2

<211> 249

<212> PRT

<213> Marine organism-derived Rhodopsin

<400> 2

Met Asn Val Leu Gly Leu Val Thr Ser Tyr Thr Phe Glu Phe Ala Leu

1 5 10 15

Ile Thr Met Ile Ala Ala Thr Ile Tyr Phe Leu Leu Glu Arg Tyr Arg

20 25 30

Leu Ser Asp Glu Tyr Lys Pro Val Ser Thr Phe Ala Ile Leu Thr Thr

35 40 45

Ser Leu Ala Val Ile Glu Tyr Phe Asn Met Arg Glu Phe Phe Thr Ile

50 55 60

Glu Asn Leu Ser Lys Pro Asp Leu Asn Phe Pro Thr Glu Tyr Arg Tyr

65 70 75 80

Ile Thr Trp Leu Ile Ala Thr Pro Ile Met Leu Tyr Thr Tyr Phe Val

85 90 95

Leu Thr Lys Leu Ser Arg Tyr Ala Lys Pro Ile Val Ile Leu Thr Ile

100 105 110

Ser Leu Asn Phe Leu Met Ile Val Ser Gly Tyr Phe Ser Glu Ser Ala

115 120 125

Tyr Ser Asn Gly Trp Met Pro Met Val Ser Gly Thr Tyr Val Phe Ser

130 135 140

Tyr Phe Leu Phe Gly Val Gly Met Ala Cys Trp Val Gly Ile Ile Tyr

145 150 155 160
 Ile Phe Ile Lys Val Leu Pro Gly His Val Val Lys Val Asn Asp Gln

 165 170 175
 Arg Asn Ser Asp Tyr Cys Leu Lys Cys Leu Gly Phe Val Gln Lys Leu

 180 185 190
 Ile Ile Tyr Gly Trp Ala Ile Tyr Pro Leu Gly Leu Phe Val Ser Phe

 195 200 205
 Trp Asp Gly Ala Ser Asp Thr Ala Leu Met Arg Glu Met Ile Tyr Asn

 210 215 220
 Phe Gly Asp Leu Phe Asn Lys Val Gly Phe Ala Leu Ile Cys Phe Ser

225 230 235 240

Cys Ala Lys Lys Leu Ser Lys Lys Ser

245