

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013년 8월 8일 (08.08.2013)



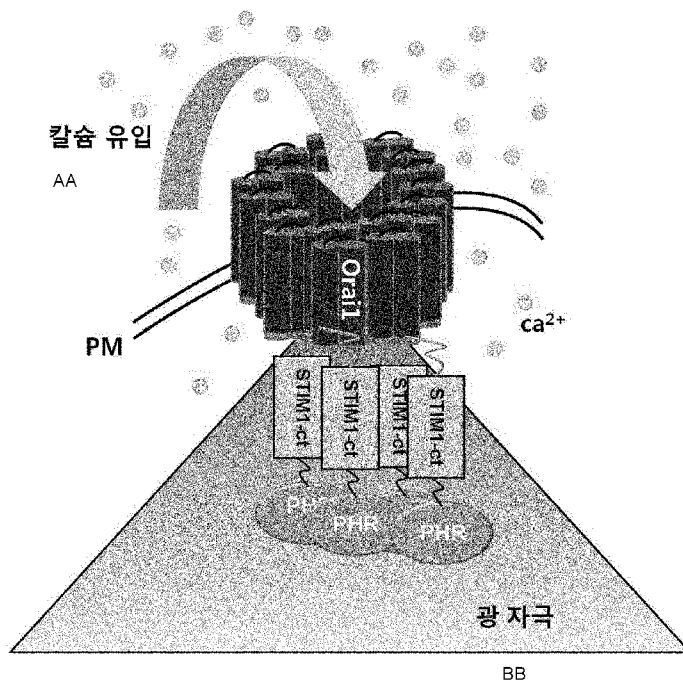
(10) 국제공개번호
WO 2013/115482 A1

- (51) 국제특허분류: *C07K 19/00* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/010979
- (22) 국제출원일: 2012년 12월 17일 (17.12.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2012-0009458 2012년 1월 31일 (31.01.2012) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-701 대전시 유성구 구성동 373-1, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 허원도 (HEO, Won-do); 305-701 대전시 유성구 구성동 373-1, Daejeon (KR). 이상규 (LEE, Sang-kyu); 137-044 서울시 서초구 반포 4동 866-7 대우디오빌 619호, Seoul (KR). 경태윤 (KYUNG, Tae-yoon); 137-043 서울시 서초구 반포 3동 신반포 6차 아파트 215동 501호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 박영준 (PARK, Young-Zoon); 137-885 서울시 서초구 서초 3동 1719-3 태흥빌딩 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) Title: FUSION PROTEIN CAPABLE OF CONTROLLING CALCIUM ION CONCENTRATION IN CELLS BY LIGHT, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 빛에 의해 세포내 칼슘 이온 농도의 제어가 가능한 융합단백질 및 그의 용도



AA ... Inflow of calcium
BB ... Light stimulus

(57) Abstract: The present invention relates to a method and a kit for reversibly inhibiting a protein function using light-induced nanocluster formation, and provides a fusion protein, wherein a light-induced heterodimerized protein is connected to the N-terminal or C-terminal of stromal interaction molecule 1 (STIM1) protein or to a cytosolic fraction cleaved from the N-terminal of the STIM1 protein to a transmembrane domain.

(57) 요약서: 본 발명은 표광유도 나노클러스터 형성을 이용한 단백질 기능의 가역적 저해방법 및 키트에 관한 것으로서, STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 제공한다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 빛에 의해 세포내 칼슘 이온 농도의 제어가 가능한 융합단백질 및 그의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 융합단백질 및 그의 용도에 관한 것으로서, 더 상세하게는 빛에 의해 세포내 칼슘 이온 농도의 제어가 가능한 융합단백질 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 칼슘은 수많은 세포 기능을 조절하는 세포내 신호 전달자로서 다양한 역할을 하는데, 예를 들어, 수정, 세포사멸, 감각신호전달, 근육수축, 운동성, 엑소사이토시스, 및 체액 분비와 같은 여러 가지 세포 과정에서 중요한 역할을 수행한다. 세포내 자유 칼슘 이온의 농도는 여러 가지 칼슘 펌프, 이온 채널 및 칼슘-버퍼링 단백질의 조화된 작용에 의해 유지된다. 작용제(agonist)로 자극되었을 때, 세포질 내의 칼슘 이온(Ca^{2+})의 농도는 소포체(ER)와 같은 칼슘 이온 축적 기능을 수행하는 세포내 기관으로부터의 칼슘 이온의 방출 또는 세포외 공간으로부터의 칼슘 이온 유입에 의해 급속하게 높아진다.
- [3] 세포 내 칼슘 이온의 농도를 조절하기 위해, 종래에는 칼슘 이오노포어(ionophore)를 이용하여 왔다. 상기 칼슘 이오노포어로 대표적인 물질은 이오노마이신(ionomycin)이 있는데, 이오노마이신은 스트렙토마이세스 콩글로바투스(*Streptomyces conglobatus*)에서 유래한 물질로서 칼슘 이온의 세포내 농도를 증가시키고 생물학적 막을 통한 칼슘 이온의 수송을 이해하기 위한 연구수단으로 사용되고 있고, 포블 12-미리스트레이트 13-아세테이트(PMA)과 함께 사용될 경우 T 세포와 같은 면역세포의 활성화를 야기하는 것으로 있다(Davis, L. and P. E. Lipsky, *J. Immunol.*, 136(10): 3588-3596, 1986).
- [4] 세포 내의 칼슘 이온 농도의 조절은 세포의 소포체 막에 존재하는 막투과 단백질인 STIM1(stromal interaction molecule 1) 그리고 이와 상호작용하는 세포막 단백질이자 칼슘 채널 형성 단백질인 Orai1에 의해 조절된다(Soboloff *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 281(30): 20661-20665, 2006). 구체적으로, 세포의 ER 내부의 칼슘 이온의 농도가 낮아지면 STIM1은 중합체를 형성하여 세포막에 존재하는 Orai1과 반응하여 Orai1으로 하여금 칼슘채널을 형성하여 칼슘 이온이 세포 내부로 유입되도록 한다(도 1). 이오노마이신은 STIM1의 중합체 형성을 유발하여, 세포 내로의 칼슘 유입을 유도한다(도 2).
- [5] 한편, Luik 등은 이오노마이신에 의해 복합체를 형성하는 STIM1 단백질의 ER 루멘 내 도메인에 라파마이신(rapamycin)과 같은 라팔로그(rapalogue)에 의해 헤테로 이합체를 형성할 수 있는 FRB(FKBP-rapamycin-binding) 도메인과

FKBP(FK506 binding protein) 도메인을 각각 삽입하여 제조한 재조합 융합단백질들을 세포 내에서 발현시킨 뒤, 상기 라팔로그를 처리할 경우, 라팔로그에 의한 이형 복합체 형성에 의해 칼슘 이온노포어 없이도 세포질로의 칼슘 이온 유입이 촉진됨을 입증한 바 있다(Luik *et al.*, *Nature*, 454(7203): 538-542, 2008).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 그러나, 종래 방법들은 특정 항생제를 처리하는 방법으로서, 시험관내 조건에서만 사용될 수 있고, 항생제 자체가 비가역적 반응을 유발하거나 가역적인 반응을 유발하더라도 세포에 독성을 미치기 때문에 반복적인 실험이 불가능하다는 단점을 가지고 있다.
- [7] 본 발명은 상기 문제점을 포함한 다양한 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 시험관 내 조건은 물론 생체 내 조건에서도 사용가능하고, 세포 내 칼슘 농도를 가역적으로 조절할 수 있는 융합 단백질 및 그의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제 해결 수단

- [8] 본 발명의 일 관점에 따르면, STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질이 제공된다.
- [9] 상기 융합단백질에 있어서, 상기 STIM1 단백질은 동물 또는 식물 유래의 STIM1 단백질일 수 있고, 상기 동물 유래의 STIM1 단백질은 포유동물 유래의 STIM1 단백질일 수 있으며, 상기 포유동물 유래의 STIM1 단백질은 영장목, 식육목, 식충목, 설치목, 토끼목, 우제목, 기제목, 장비목 유래의 STIM1 단백질일 수 있다.
- [10] 상기 융합단백질에 있어서, 상기 광유도 이합체 형성 단백질은 광유도 이형이합체 형성 단백질 및/또는 광유도 동형이합체 형성단백질일 수 있다. 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질은 CIB(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein), CIBN(N-terminal domain of CIB), Phy(phytochrome), PIF(phytochrome interacting factor), FKF1(Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1), GIGANTEA, CRY(chrytochrome) 또는 PHR(phytolase homologous region)일 수 있고, 상기 동형이합체 형성 단백질은 CRY 또는 PHR일 수 있다. 종래에는 CRY 또는 PHR은 광조사와 무관하게 동형이합체를 형성하는 것으로 알려졌으나, 본 발명자에 의해 광조사에 의해 동형이합체를 형성하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, CRY 또는 PHR은 광조사에 의해 이형이합체를 형성할 뿐만 아니라 동형이합체도 형성할 수 있는 단백질이다.

- [11] 아울러, 상기 융합단백질에 있어서, 형광단백질이 추가로 연결될 수 있다. 이때, 상기 형광단백질은 상기 STIM1 단백질 또는 상기 세포질성 단편과 상기 광유도 이합체 형성 단백질 사이에 삽입되거나, 상기 광유도 이합체 형성 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 연결될 수 있다. 이 때, 상기 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)일 수 있다. 여기서, 상기 녹색형광단백질은 EGFP(enhanced green fluorescent protein), Emerald(Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 509-544, 1998), Superfolder(Pedelacq *et al.*, *Nat. Biotech.*, 24: 79-88, 2006), GFP(Prendergast *et al.*, *Biochem.*, 17(17): 3448-3453, 1978), Azami Green(Karasawa, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 278: 34167-34171, 2003), TagGFP(Evrogen, Russia), TurboGFP(Shagin *et al.*, *Mol. Biol. Evol.*, 21(5): 841-850, 2004), ZsGreen(Matz *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 17: 969-973, 1999) 또는 T-Sapphire(Zapata-Hommer *et al.*, *BMC Biotechnol.*, 3:5, 2003)일 수 있고, 상기 황색형광단백질은 EYFP(enhanced yellow fluorescent protein, Tsien, *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 509-544, 1998), Topaz(Hat *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1: 627-633, 2002), Venus(Nagai *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 20(1): 87-90, 2002), mCitrine(Griesbeck *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 276: 29188-29194, 2001), Ypet(Nguyet and Daugherty, *Nat. Biotechnol.*, 23(3): 355-360, 2005), TagYFP(Evrogen, Russia), PhiYFP(Shagin *et al.*, *Mol. Biol. Evol.*, 21(5): 841-850, 2004), ZsYellow1(Matz *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 17: 969-973, 1999) 또는 mBanana(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004)일 수 있으며, 상기 적색형광단백질은 mRuby(Kredel *et al.*, *PLoS ONE*, 4(2):e4391, 2009), mApple(Shaner *et al.*, *Nat. Methods*, 5(6): 545-551, 2008), mStrawberry(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), AsRed2(Shanner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004) 또는 mRFP(Campbell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(12): 7877-7882, 2002)일 수 있고, 상기 주황형광단백질은 Kusabira Orange(Karawawa *et al.*, *Biochem. J.*, 381(Pt 1): 307-312, 2004), Kusabira Orange2(MBL International Corp., Japan), mOrange(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), mOrange2(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), dTomato(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), dTomato-Tandem(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), TagRFP(Merzlyak *et al.*, *Nat. Methods*, 4(7): 555-557, 2007), TagRFP-T(Shaner *et al.*, *Nat. Methods*, 5(6): 545-551, 2008), DsRed(Baird *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 11984-11989, 1999) DsRed2(Clontech, USA), DsRed-Express(Clontech, USA), DsRed-Monomer(Clontech, USA) 또는 mTangerine(Shaner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*,

22: 1567-1572, 2004)일 수 있으며, 상기 청록색형광단백질은 ECFP(enhanced cyan fluorescent protein, Cubitt *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 20: 448-455, 1995), mECFP(Ai *et al.*, *Biochem. J.*, 400(3): 531-540, 2006), mCerulean(Koushik *et al.*, *Biophys. J.*, 91(12): L99-L101, 2006), CyPet(Nguyet and Daugherty, *Nat. Biotechnol.*, 23(3): 355-360, 2005), AmCyan1(Matz *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 17: 969-973, 1999), Midori-Ishi Cyan(Karawawa *et al.*, *Biochem. J.*, 381(Pt 1): 307-312, 2004), TagCFP(Evrogen, Russia) 또는 mTFP1(Ai *et al.*, *Biochem. J.*, 400(3): 531-540, 2006)일 수 있고, 상기 청색형광단백질은 EBFP(enhanced blue fluorescent protein, Clontech, USA), EBFP2(Ai *et al.*, *Biochemistry*, 46(20): 5904-5910, 2007), Azurite(Mena *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 24: 1569-1571, 2006) 또는 mTagBFP(Subach *et al.*, *Chem. Biol.*, 15(10): 1116-1124, 2008)일 수 있고, 상기 원적색형광단백질은 mPlum(Wang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 16745-16749, 2004), mCherry(Shanner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), dKeima-Tandem(Kogure *et al.*, *Methods*, 45(3): 223-226, 2008), JRed(Shagin *et al.*, *Mol. Biol. Evol.*, 21(5): 841-850, 2004), mRaspberry(Shanner *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22: 1567-1572, 2004), HcRed1(Fradkov *et al.*, *Biochem. J.*, 368(Pt 1): 17-21, 2002), HcRed-Tandem(Fradkov *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 22(3): 289-296, 2004) 또는 AQ143(Shkrob *et al.*, *Biochem. J.*, 392: 649-654, 2005)일 수 있으며, 상기 테트라시스테인 모티프는 Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys(서열번호 1)의 서열을 포함하는 폴리펩티드로서, 상기 Xaa는 시스테인을 제외한 아미노산일 수 있다.

- [12] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 제공된다.
- [13] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 제공된다. 상기 벡터는 상기 융합단백질을 발현할 수 있는 재조합 발현벡터일 수 있다.
- [14] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 벡터로 숙주 세포를 형질전환시킨 형질전환 숙주세포가 제공된다. 상기 형질전환 숙주세포는 상기 융합단백질을 세포질 내에 발현할 수 있다.
- [15] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현하는 비인간 형질전환 동물이 제공된다.
- [16] 상기 비인간 형질전환 동물은 곤충류, 환형동물, 연체동물, 완족류, 선형동물, 강장동물, 해면류, 축색류, 척추동물일 수 있고 상기 척추동물은 어류, 양서류, 파충류, 조류 또는 포유류일 수 있으며, 상기 곤충류는 초파리(*Drosophila*)일 수 있고, 상기 선형동물은 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)일 수 있으며, 상기 어류는 지브라피쉬(zebrafish)일 수 있고, 상기 포유류는 영장목, 식육목, 식충목, 설치목, 우제목, 기제목 또는 장비목일 수 있고, 상기 설치목은 레트 또는 마우스일 수 있다.
- [17] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 벡터로 형질전환되어 상기

융합단백질을 발현하는 형질전환 식물이 제공된다. 상기 형질전환 식물은 겉씨식물 또는 속씨식물일 수 있고, 상기 속씨식물은 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물일 수 있으며, 상기 외떡잎 식물은 벼과, 나리과 또는 난초과일 수 있고, 상기 쌍떡잎 식물은 콩과, 박과, 국화과, 가지과, 장미과 또는 십자화과일 수 있으며, 상기 콩과는 대두, 녹두, 완두, 또는 팥일 수 있고, 상기 박과는 박, 수박, 호박, 오이, 멜론 또는 참외일 수 있으며, 상기 국화과는 국화, 상추, 민들레, 쑥갓 또는 쑥일 수 있고, 상기 가지과는 담배, 고추, 가지, 토마토일 수 있으며, 상기 장미과는 사과, 배, 복숭아, 장미 또는 딸기일 수 있고, 상기 십자화과는 무우, 배추, 유채, 갓, 고추냉이(horseradish) 또는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)일 수 있다.

- [18] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 제조된 형질전환 숙주세포를 준비하는 단계; 상기 형질전환 숙주세포를 칼슘을 포함하는 배지에서 배양하는 배양단계; 및 상기 배양중인 형질전환 숙주세포에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 세포질 내의 칼슘 이온 농도를 가역적으로 증가시키는 방법이 제공된다.
- [19] 상기 방법에 있어서, 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 Cry 또는 PHR일 수 있다.
- [20] 상기 방법에 있어서, 상기 숙주세포는 동물세포 또는 식물세포일 수 있고, 상기 동물세포는 곤충류, 환형동물, 연체동물, 완족류, 선형동물, 강장동물, 해면류, 축색류, 척추동물 유래의 것일 수 있고, 상기 척추동물은 어류, 양서류, 파충류, 조류 또는 포유류일 수 있으며, 상기 곤충류는 초파리(*Drosophila*)일 수 있고, 상기 선형동물은 예쁜꼬마선충(*C. elegans*)일 수 있으며, 상기 어류는 지브라피쉬(zebrafish)일 수 있고, 상기 포유류는 영장목, 식육목, 식충목, 설치목, 우제목, 기제목 또는 장비목일 수 있고, 상기 설치목은 레트 또는 마우스일 수 있다..
- [21] 상기 방법에 있어서, 상기 융합단백질은 추가로 형광단백질을 포함할 수 있다. 이때, 상기 형광단백질은 상기 STIM1 단백질 또는 상기 세포질성 단편과 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질 사이에 삽입되거나, 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 C-말단 또는 N-말단에 연결될 수 있다. 상기 형광단백질은 상술한 바와 같다.
- [22] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 동형이합체 형성

단백질이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현하는 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물을 준비하는 단계; 및 상기 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물의 특정 기관 또는 조직에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 식물 또는 비인간 동물의 특정 기관 또는 조직에서의 세포질 내 칼슘 이온 농도를 가역적으로 증가시키는 방법이 제공된다.

- [23] 상기 방법에 있어서, 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 Cry 또는 PHR일 수 있다.
- [24] 상기 방법에 있어서, 상기 형질전환 식물은 겉씨식물 또는 속씨식물일 수 있고, 상기 속씨식물은 외떡잎 식물 또는 쌍떡잎 식물일 수 있으며, 상기 외떡잎 식물은 벼과, 나리과 또는 난초과일 수 있고, 상기 쌍떡잎 식물은 콩과, 박과, 국화과, 가지과, 장미과 또는 십자화과일 수 있으며, 상기 콩과는 대두, 녹두, 완두, 또는 팥일 수 있고, 상기 박과는 박, 수박, 호박, 오이, 멜론 또는 참외일 수 있으며, 상기 국화과는 국화, 상추, 민들레, 쑥갓 또는 쑥일 수 있고, 상기 가지과는 담배, 고추, 가지, 토마토일 수 있으며, 상기 장미과는 사과, 배, 복숭아, 장미 또는 딸기일 수 있고, 상기 십자화과는 무우, 배추, 유채, 갓, 고추냉이(horseradish) 또는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)일 수 있다. 상기 비인간 형질전환 동물은 곤충류, 환형동물, 연체동물, 완족류, 선형동물, 강장동물, 해면류, 축색류, 척추동물일 수 있고, 척추동물은 어류, 양서류, 파충류, 조류 또는 포유류일 수 있으며, 상기 포유류는 영장목, 식육목, 식충목, 설치목, 우제목, 기제목 또는 장비목일 수 있다.
- [25] 상기 방법에 있어서, 상기 융합단백질은 추가로 형광단백질을 포함할 수 있다. 이때, 상기 형광단백질은 상기 STIM1 단백질 또는 상기 세포질성 단편과 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질 사이에 삽입되거나, 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 N-말단에 연결될 수 있다. 상기 형광단백질은 상술한 바와 같다.
- [26] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 이형이합체 형성 단백질이 연결된 제1융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 제1유전자컨스트럭트를 포함하는 제1발현벡터 및 STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질의 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질과 광조사에 의해 이형이합체를 형성하는 짝 단백질이 연결된 제2융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 제2유전자컨스트럭트를 포함하는 제2발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 제조된 형질전환

숙주세포를 준비하는 단계; 상기 형질전환 숙주세포를 칼슘을 포함하는 배지에서 배양하는 배양단계; 및 상기 배양중인 형질전환 숙주세포에 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질과 상기 짝 단백질 사이의 이형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 세포질 내의 칼슘 이온 농도를 가역적으로 증가시키는 방법이 제공된다.

- [27] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 이형이합체 형성 단백질이 연결된 제1융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 제1유전자컨스트럭트를 포함하는 제1발현벡터 및 STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질과 광조사에 의해 이형이합체를 형성하는 짝 단백질이 연결된 제2융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 제2유전자컨스트럭트를 포함하는 제2발현벡터로 형질전환된 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물을 준비하는 단계; 및 상기 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물의 특정 기관 또는 조직에 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질과 상기 짝 단백질 사이의 이형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 식물 또는 비인간 동물의 특정 기관 또는 조직에서의 세포질 내 칼슘 이온 농도를 가역적으로 증가시키는 방법이 제공된다.

- [28] 상기 방법에 있어서, 상기 제1융합단백질 및/또는 제2융합단백질은 추가로 형광단백질을 포함할 수 있다. 이때, 상기 형광단백질은 상기 STIM1 단백질 또는 상기 세포질성 단편과 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질 및/또는 상기 짝 단백질 사이에 삽입되거나, 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질 및/또는 상기 짝 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 연결될 수 있다. 아울러, 상기 제1융합단백질과 상기 제2융합단백질에 각각 포함되는 형광단백질은 서로 다른 파장의 빛을 방출하여, 복합체 형성 여부를 확인하는데 사용될 수 있다. 상기 형광단백질은 상술한 바와 같다.

- [29] 상기 방법에 있어서, 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질은 CIB, CIBN, PhyB, PIF, FKF1, GIGANTEA, CRY 또는 PHR일 수 있다.

- [30] 상기 방법에 있어서, 상기 짝 단백질은 상기 광유도 이형 이합체 형성 단백질과 광조사에 의해 이형 이합체를 형성할 수 있는 단백질로서, CIB, CIBN, PhyB, PIF6, FKF1, GIGANTEA, CRY 또는 PHR일 수 있고, 상기 광유도 이형 이합체 형성 단백질이 CIB 또는 CIBN일 경우 CRY 또는 PHR이며, 상기 광유도 이형 이합체 형성 단백질이 PhyB일 경우 PIF이고, 상기 광유도 이형 이합체 형성 단백질이 FKF1일 경우 GIGANTEA이며, 반대로 상기 광유도 이형 이합체 형성 단백질이 CRY 또는 PHR일 경우 CIB 또는 CIBN일 수 있고, 상기 광유도 이형

이합체 형성 단백질이 PIF일 경우 PhyB이며, 상기 광유도 이형 이합체 형성 단백질이 GIGANTEA일 경우 FKF1이다. 상기 PIF는 PIF3 또는 PIF6일 수 있다.

[31] 상기 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물은 상술한 바와 같다.

[32] 본 발명자들은 광유도 이합체 형성 단백질인 PHR을 STIM1의 세포막 통과 도메인 이하를 제거한 세포질성 단편(cytosolic fragment)의 N-말단에 연결한 융합단백질을 암호화하는 유전자 컨스트럭트를 제조하여(도 3 참조), 이를 동물세포에 형질도입한 후, 칼슘 이온 포함 배지에서 배양하다가 PHR의 동형이합체 형성을 유도하는 450~520 nm의 파장을 갖는 빛을 조사할 경우, STIM1 단백질의 클러스터가 형성되고(도 4 내지 6 참조), 칼슘 이온이 세포내로 유입되어 세포질내 칼슘이온의 농도가 증가함을 입증하였을 뿐만 아니라(도 7 및 8 참조), 이를 이용하여 칼슘 반응 단백질의 세포 내 위치의 변화를 확인함으로써(도 9 및 10 참조), 본 발명을 완성하였다.

[33] 따라서, 본 발명의 방법 및 키트는 살아 있는 세포 및 개체 내에서 세포 내의 칼슘 이온의 농도를 시공간적으로 조절함으로써, 칼슘에 의한 신경 활성화, 발생, 세포이동, 면역반응 및 인슐린 분비 등 생리학적 기능을 연구 및 이들 연구를 위한 모델 동식물을 제조하는 매우 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[34] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 세포, 동물 또는 식물의 세포질 내 칼슘이온 농도를 시공간적으로 그리고 가역적으로 조절할 수 있다. 물론 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

[35] 도 1은 STIM1 단백질과 그와 상호작용하는 Orai1 단백질에 의해 세포 내 칼슘 농도가 조절되는 기전을 개략적으로 도시한 개요도이다.

[36] ER: 소포체(endoplasmic reticulum); 및

[37] PM: 세포막(plasma membrane).

[38] 도 2는 이오노마이신에 의해 STIM1 단백질의 복합체 형성되는 것을 형광현미경으로 촬영한 사진(a) 및 이오노마이신 처리 후 시간에 따른 STIM1 단백질 복합체의 수를 측정한 그래프(b)이다.

[39] 도 3은 STIM1 단백질(좌측)과 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질(우측)의 구조를 개략적으로 도시한 개요도이다.

[40] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 STIM1 단백질의 복합체 형성 여부를 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 분석을 통해 조사한 그래프이다.

[41] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 칼슘 이온이 세포내로 유입되는 과정을 개략적으로 도시한 개요도이다.

[42] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후

광조사 전후의 STIM1 단백질의 복합체가 형성여부를 비교한 형광현미경 사진이다.

- [43] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전 후의 STIM1 단백질 복합체의 수를 비교한 그래프이다.
- [44] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전후의 융합단백질의 복합체 형성(상부 판넬) 및 세포 내 칼슘(하부 판넬)을 이미징한 형광현미경 사진이다.
- [45] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의한 세포 내 칼슘 이온의 농도 변화를 시간의 경과에 따라 기록한 그래프이다.
- [46] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전후의 PKC γ -C2 도메인의 위치의 변화를 촬영한 형광현미경 사진이다.
- [47] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전후의 PKC γ -C2 도메인의 위치를 세포막에서의 형광강도를 기록함으로써 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [48] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.
- [49] 본 문서에서 사용되는 "광유도 이합체 형성 단백질(light-induced heterodimerized protein)"은 특정 파장의 빛을 조사할 경우 동형 이합체를 형성하거나 짝 단백질 이형이합체(heterodimer)를 형성하는 단백질을 의미한다.
- [50] 본 문서에서 사용되는 "짝 단백질(partner protein)"은 특정 파장의 빛을 조사할 경우 광유도 이형이합체 형성 단백질과 상호작용하여 이형이합체를 형성하는 대상 단백질을 의미한다.
- [51] 본 문서에서 사용되는 "이형이합체(heterodimer)"는 서로 다른 두 가지 단백질이 상호작용에 의해 하나의 복합체(complex)를 형성한 것을 의미한다.
- [52] 본 문서에서 사용되는 "동형이합체(homodimer)"는 같은 단백질이 서로 두 개가 상호작용하여 하나의 복합체(complex)를 형성한 것을 의미한다.
- [53] 본 문서에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된(operably linked to)"은 특정 폴리뉴클레오티드가 그 기능을 발휘할 수 있게 다른 폴리뉴클레오티드에 연결된 것을 의미한다. 즉, 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결되었다는 것은 당해 프로모터의 작용에 의해 mRNA로 전사되고 당해 단백질로 번역까지 될 수 있게 연결되었다는 것을 의미하고, 특정 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 다른 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되었다는 것은 당해 특정 단백질이 다른 단백질과 융합단백질의 형태로 발현될 수 있게 연결되었다는 것을 의미한다.
- [54] 본 문서에서 사용되는 "CIB"는 크립토크롬-상호작용 염기성

헬릭스-루프-헬릭스 단백질(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein)을 의미하며, 대표적으로 애기장대의 CIB1(GenBank No.: NM_119618)가 있다.

- [55] 본 문서에서 사용되는 "CIBN"은 상기 CIB의 N-말단으로서 광조사시 크립토크롬(cryptochrome, CRY)와 상호작용하는 부위를 의미한다.
- [56] 본 문서에서 사용되는 "CRY"는 크립토크롬(chryptochrome) 단백질을 의미하며, 대표적으로 애기장대의 CRY2(GenBank No.: NM_100320)가 있다.
- [57] 본 문서에서 사용되는 "PHR"은 상기 CRY의 N-말단 부위로서 파이토티아제 상동성 지역(phytolase homologous region)을 의미하며, 광조사시 상기 CIB 또는 CIBN과 상호작용한다(Kennedy *et al.*, *Nat. Methods*, 7(12): 973-975, 2010).
- [58] 본 문서에서 사용되는 "Phy"는 파이토크롬(phytochrome) 단백질을 의미하고, 대표적으로 애기장대의 PhyA(GenBank No.: NM_001123784), PhyB(GenBank No.: NM_127435) 등이 있으며, PIF(phytochrome interacting factor)와 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Min *et al.*, *Nature*, 400: 781-784, 1999)
- [59] 본 문서에서 사용되는 "PIF"는 파이토크롬 상호작용 인자(phytochrome interacting factor)을 의미하며, 대표적으로 애기장대의 PIF1(GenBank No.: NM_001202630), PIF3(GenBank No.: NM_179295), PIF4(GenBank No.: NM_180050), PIF5(GenBank No.: NM_180690), PIF6(GenBank No.: NM_001203231) 또는 PIF7(GenBank No.: NM_125520)이 있다.
- [60] 본 문서에서 사용되는 "FKF"는 플라빈-결합, 켈치 반복, F-박스(Flavin-binding, Kelch repeat, F-box) 단백질을 의미하고, 대표적으로 애기장대의 FKF1(GenBank No.: NM_105475)이 있으며, 광조사시 GIGANTEA 단백질과 상호작용하는 것으로 알려져 있다(Sawa *et al.*, *Science*, 318(5848): 261-265, 2007).
- [61] 본 문서에서 사용되는 "GIGANTEA"는 파이토크롬 신호전달에 관련되어 있고, 꽃의 개화시기를 조절하는 단백질로 알려져 있다.
- [62] 본 문서에서 사용되는 "테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)"는 Cys-Cys-Xaa-Xaa-Cys-Cys(서열번호 1)의 서열을 포함하는 폴리펩티드로서, Xaa는 시스테인을 제외한 아미노산으로서, 상기 Xaa의 종류와 폴리펩티드의 길이에 따라, 형광패턴이 달라진다(Adams *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 6063-6077, 2002).
- [63] 본 문서에서 사용되는 "형질전환 식물" 또는 "형질전환 동물"은 외래 유전자를 게놈 내에 도입하여 상기 외래 유전자를 발현하거나 또는 특정 유전자가 발현되지 않도록 결손시킨 유전자 조작된 식물 또는 동물을 의미한다. 형질전환 동물의 경우 통상의 경우 생식세포를 유전자 조작하여 제조될 수 있으나, 체세포에 대한 유전자 조작 이후 핵치환에 의한 복제동물 제조방법으로 제조될 수 있고, 형질전환 식물의 경우 더 간단하게, 체세포를 외래 유전자를 포함하는 아그로박테리아로 감염시킨 후 탈분화 및 재분화의 과정을 거쳐서 제조될 수

있다. 상기 형질전환 동물 및 형질전환 식물의 제조방법은 당업계에 잘 알려져 있다(Jaenisch, R and B. Mintz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71(4): 1250-1254, 1974; Cho *et al.*, *Curr. Protoc. Cell Biol.*, 42: 19.11.1-19.11.22, 2009; Johnston, S. A. and D. C. Tang, *Meth. Cell Biol.*, 43 Pt A: 353-365, 1994; Sasaki *et al.*, *Nature* 459(7246): 523-527, 2009; Vaek *et al.*, *Nature*, 328(6125): 33-37, 1987).

[64] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하면 다음과 같다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 또한 설명의 편의를 위하여 도면에서는 구성 요소들이 그 크기가 과장 또는 축소될 수 있다.

[65] 도 1은 STIM1 단백질과 그와 상호작용하는 Orai1 단백질에 의해 세포 내 칼슘 농도가 조절되는 기전을 개략적으로 도시한 개요도이다. STIM1 단백질은 소포체 (ER) 내의 칼슘 이온 농도의 변화를 감지하여 칼슘 이온 농도가 낮아지면 복합체를 형성한다. 복합체를 형성한 STIM1 단백질은 세포막(PM)에 존재하는 칼슘채널의 포어 형성 서브유닛인 Orai1 단백질과 상호작용을 하여 Orai1을 활성화시킴으로써 칼슘채널이 형성되게 되며, 이어 세포 외부에 존재하는 칼슘 이온이 세포질 내로 유입되게 된다.

[66] 도 2는 이오노마이신에 의해 STIM1 단백질의 복합체 형성되는 것을 형광현미경으로 촬영한 사진(a) 및 이오노마이신 처리 후 시간에 따른 STIM1 단백질 복합체의 수를 측정한 그래프(b)이다. 이오노마이신은 STIM1 단백질의 복합체를 형성시킴으로서 칼슘채널을 형성, 칼슘의 유입을 유도하는 것으로 알려져 있다. 실제, STIM1 단백질에 형광단백질인 황색형광단백질(YFP)을 연결한 융합단백질을 암호화하는 유전자컨스트럭트를 제조하고 이를 세포에 형질도입한 후, 이오노마이신을 처리한 결과, 이오노마이신 처리 전에는 세포질 내에 분산되어 있는 형광패턴이 이오노마이신 처리 후 강한 강도를 갖는 점의 형태로 변화하여 STIM1 단백질의 복합체 형성을 확인할 수 있었고, 강한 형광점의 수를 계수한 결과 이오노마이신 처리 직후 급격하게 증가하였다가 시간이 경과할수록 점차 감소함을 확인하였다.

[67] 도 3은 STIM1 단백질(좌측)과 본 발명의 일실시예에 따른 융합단백질(우측)의 구조를 개략적으로 도시한 개요도이다. STIM1 단백질은 단일 통과 소포체(ER) 막 단백질로서 N-말단 쪽이 소포체강(ER lumen) 쪽에 위치하고 C-말단이 세포질(cytosol)에 위치한다. N-말단으로부터 EF hand, SAM(sterile-alpha-motif), 막통과 도메인(TM domain), 두 개의 이중나선(coiled coil, CC), 세린/프롤린 풍부지역 및 라이신 풍부지역을 포함하고 있다(도 3의 좌측). 본 발명자들은 상기 STIM1 단백질의 N-말단부터 막통과 도메인까지의 부분이 제거되고, 상기 제거된 부분이 형광단백질인 mCerulean에 연결된 광조사 이합체 형성 단백질인 PHR(Cryptochrome의 N-말단 부위)로 대체된 융합단백질을 암호화하는 유전자

컨스트럭트(mCerulean-PHR-STIM1-ct)를 제조하였다. 이렇게 제조된 유전자컨스트럭트를 동물세포에 형질도입하여 발현시킬 경우, 발현된 융합단백질은 막통과 도메인이 없어서 세포질에 존재하게 된다(수정란에 기재한 바와 같이 원하는 시간대에 STIM1 융합 단백질을 활성화 시키기 위함입니다).

- [68] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 STIM1 단백질의 복합체 형성 여부를 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 분석을 통해 조사한 그래프이다. 상기 분석을 위해 STIM1의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 제거되고, 이 부분이 mCitrine이 연결된 PHR로 대체된 융합단백질을 암호화하는 유전자컨스트럭트를 추가로 제작하여, 상기에서 사용한 mCerulean-PHR-STIM1-ct 유전자컨스트럭트와 함께 세포에 형질도입하여 두 가지 융합단백질을 발현시킨 후 광조사를 한 후, mCitrine의 형광과 mCerulean의 형광의 강도의 비를 계산하였다. 그 결과, 광 조사 전에는 형광비가 1이었으나 광조사 후 약 1.1 내지 1.2 사이의 값을 나타내게 되었다. 이는 두 융합단백질이 복합체를 형성하여 mCerulean의 형광에너지가 mCitrine로 전이되는 전형적인 형광 공명 에너지 전이현상(fluorescence resonance energy transfer)을 나타내는 것이다. 이로써, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에서 사용한 PHR이 광조사와 무관하게 동형이합체를 형성한다는 기존의 보고와는 달리 광조사에 의해 동형 이합체를 형성한다는 놀라운 사실을 최초로 규명하였다.
- [69] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의해 칼슘 이온이 세포내로 유입되는 과정을 개략적으로 도시한 개요도이다. 광조사에 의해 PHR 끼리 상호작용을 함으로써 결국 전체 STIM1 단백질을 포함한 융합단백질이 복합체를 형성하게 되고, STIM1 단백질과 상호작용하는 세포막의 Orai1 단백질이 칼슘채널의 포어를 형성함으로써 칼슘 이온이 세포 내로 유입될 수 있다.
- [70] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전후의 STIM1 단백질의 복합체가 형성여부를 비교한 형광현미경 사진이다. 상기에서 제조한 mCerulean-PHR-STIM1-ct 유전자컨스트럭트로 형질전환시킨 세포에 광조사하기 전과 후의 형광현미경 이미지를 촬영하였다. 그 결과 광조사 전 세포질 내에 골고루 분산되어 있던 형광페턴이 광조사 후 강한 형광점이 다수 나타나는 패턴으로 변화함을 알 수 있었다. 이는 결국 광조사에 의해 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질이 복합체를 형성하였음을 보여주는 것이다.
- [71] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전 후의 STIM1 단백질 복합체의 수를 비교한 그래프이다. 상기 실험결과에서 나타난 강한 형광점의 갯수를 STIM1 융합단백질의 클러스터 수로 간주하여 이를 계수하였다. 그 결과 광조사 전에는 융합단백질의 클러스터 수가

0에 가까웠으나, 광조사 후 융합단백질의 클러스터의 수가 70여개로 증가하였다.

- [72] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전후의 융합단백질의 복합체 형성(상부 판넬) 및 세포 내 칼슘(하부 판넬)을 이미징한 형광현미경 사진이다. 형광단백질로 mCherry를 사용한 융합단백질을 암호화하는 유전자컨스트럭트 mCherry-PHR-STIM1-ct를 제조한 후, 이를 세포에 형질도입한 후 광조사 전과 후의 상기 형광단백질의 형광을 형광현미경으로 이미징하였다. 그 결과, 상기 도 7에서 관찰된 것과 마찬가지로 광조사 전에는 세포질 내에 고루 분산된 형광 패턴(상부 판넬 좌측)이 광조사 후 강한 형광점의 형태로 변화하였다(상부 판넬 우측). 이러한 STIM1 융합단백질의 복합체 형성에 의해 실제 세포내 칼슘 이온의 농도가 변화했는지 확인하기 위해, 칼슘이온을 직접 이미징할 수 있는 Fluo3-AM 시약을 세포에 처리한 후 이의 형광 이미지를 촬영하였다. 그 결과 광 조사 전에는 세포내 부분 부분 강한 점의 형태로 형광이 나타난 반면(하부 판넬 좌측), 광조사 후에는 전반적으로 형광의 강도가 증가하였고, 강한 형광점의 수도 증가함을 알 수 있었다(하부 판넬 우측). 따라서, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질이 광조사에 의해 복합체를 형성함은 물론 칼슘채널을 형성하여 칼슘 이온을 세포질 내로 유입함을 입증하였다.

- [73] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사에 의한 세포 내 칼슘 이온의 농도 변화를 시간의 경과에 따라 기록한 그래프이다. 본 발명자들은 mCerulean-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트로 형질전환된 세포와 공벡터로 형질전환된 세포에 광조사를 한 후 세포내 칼슘 농도를 Fluo3-AM에 의한 형광 강도로 측정하였다. 그 결과 mCerulean-PHR-STIM1-ct를 발현하는 세포의 경우 광조사 후 형광 강도가 8배 정도 증가하였다가, 시간의 경과에 따라 다소 완만한 곡선으로 감소한 반면, mCerulean-PHR-STIM1-ct를 발현하지 않는 세포의 경우 형광의 변화를 관찰할 수 없었다.

- [74] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전후의 PKC γ -C2 도메인의 위치의 변화를 촬영한 형광현미경 사진이다. 본 발명자들은 mCherry-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트와 YFP-PKC γ -C2 도메인 컨스트럭트를 각각 제조한 뒤 세포에 공형질도입한 후, 광조사 전후의 형광 패턴의 변화를 관찰하였다. 그 결과 STIM1 융합단백질에 의한 형광의 변화는 상기 도 8의 결과와 동일하였고, PKC γ -C2 도메인의 경우 광조사 전에는 세포질 내에 전반적으로 분산된 양상의 형광패턴이었으나(하부 판넬 좌측), 광조사후에는 세포막 부근의 형광이 더 강하게 나타나(하부 판넬 우측), PKC γ -C2 도메인이 세포막쪽으로 이동하였음을 나타냈다.

- [75] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질을 세포 내에서 발현시킨 후 광조사 전후의 PKC γ -C2 도메인의 위치를 세포막에서의 형광강도를 기록함으로써 나타낸 그래프이다. 광조사 후의 PKC γ -C2의 세포막으로의 이동

여부를 PKC γ -C2와 연결된 황색형광단백질(YFP)의 형광의 강도를 측정함으로써 조사하였다. 그 결과, 광조사 후 100 초 정도 경과 후에 세포막에서의 형광강도가 증가하였으며, 300초가 될 때까지 계속 유지됨을 알 수 있었다.

[76] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질 및 이를 이용한 광조사에 의한 세포내 칼슘 이온 농도의 증가방법은 세포 내에서의 칼슘 이온 의존적인 다양한 생화학적 반응을 연구하는데, 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[77] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[78] **실시예 1: 벡터의 제작**

[79] **1-1: mCerulean-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트의 제작**

[80] 인간 STIM1 유전자(GenBank 등록번호: NM_003156)의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지가 절단된 세포질성 단편(a.a. 238-685)의 N-말단에 CRY2 유전자(GenBank No.: NM_100320)의 PHR에 해당하는 1-498 아미노산이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(PHR-STIM1)를 제조한 후, 이를 pmCerulean-C1 벡터(Clontech, USA)에 삽입하여 mCerulean-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트를 제작하였다(도 3).

[81] **1-2: mCitrine-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트의 제작**

[82] 상기 실시예 1-1에서 제조한 PHR-STIM1 폴리뉴클레오티드를 pmCitrine-C1 벡터(Clontech, USA)에 삽입하여 mCitrine-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트를 제작하였다.

[83] **1-3: mCherry-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트의 제작**

[84] 상기 실시예 1-1에서 제조한 PHR-STIM1 폴리뉴클레오티드를 pmCherry-C1 벡터(Clontech, USA)에 삽입하여 mCherry-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트를 제작하였다.

[85] **1-4: YFP-PKC γ -C2 컨스트럭트의 제작**

[86] YFP 형광단백질이 포함된 pcDNA3 벡터에서 YFP 앞에 PKC γ (GenBank No. NM-002739)의 C2 도메인(a.a 156-284)을 융합하여 YFP-PKC γ -C2 컨스트럭트를 제작하였다.

[87] **실험예 1: 광유도에 의한 PHR 포함 STIM1 융합단백질의 동형이합체 형성 여부 확인**

[88] 상기 실시예 1-1 및 1-2에서 각각 제조한 mCerulean-PHR-STIM1-ct와 mCitrine-PHR-STIM1-ct로 HeLa 세포를 공형질전환시킨 후, G418 500 μ g/ml을 함유한 DMEM 배지에서 37°C, 10% CO₂ 조건에서 배양하다가, 파장 450-520 nm의 빛의 조사 전후로 mCerulean과 mCitrine에 의한 형광을 각각 측정한 후, mCerulean 형광강도/mCitrine 형광강도의 비를 구하였다(도 4). 그 결과, 광조사

전에는 형광강도의 비가 약 1이었으나, 광조사후 그 값이 상승하여 약 1.1 내지 1.2 사이에서 진폭을 가지고 오르락내리락하였다. 이는 전형적인

FRET(fluorescence resonance energy transfer) 현상으로서 두 융합단백질이 광조사에 의해 복합체를 형성함을 간접적으로 입증하는 것이다. 이는 두 융합단백질 사이에 포함된 PHR이 광조사에 의해 동형이합체를 형성하였음을 의미하는데, 종래에 PHR이 광조사와 무관하게 동형이합체를 형성한다고 보고된 것과 전혀 다른 결과이다. 이로써, 본 발명자들은 PHR이 광조사시 CIB와 이형이합체를 형성할 뿐만 아니라, 동형이합체를 형성함을 최초로 규명한 것이다. 따라서, PHR은 다른 광유도 이합체 형성 단백질을 사용하지 않고도 단독으로 STIM1의 복합체 형성 및 그에 의한 칼슘 이온의 세포내 유입을 유도할 수 있으므로, 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [89] 이어, 본 발명자들은 상기 융합단백질이 실제 복합체를 형성하는지 확인하기 위해, 실시예 1-3에서 제조한 mCherry-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트로 HeLa 세포를 형질전환시킨 후, G418 500 µg/ml을 함유한 DMEM 배지에서 37°C, 10% CO₂ 조건에서 배양하다가, 파장 450-520 nm의 빛의 조사 전후로 형광현미경 이미지를 획득하였다(도 6). 그 결과 빛 조사전에는 세포질 내에 mCherry에 의한 형광이 골고루 분산되어 있는 양상을 나타내다가(좌측), 광조사 후에 형광이 다수의 점의 형태로 강하게 나타남을 발견하였다(우측). 이는 형광단백질을 포함하는 융합단백질이 서로 상호작용하여 복합체를 형성하였음을 의미한다. 본 발명자들은 상기 형광강도가 증가된 점의 개수를 융합단백질의 복합체의 수로 간주하고 이를 계수하였으며, 그 결과 광조사전에는 0에 가까운 세포당 복합체의 수가 광조사 후 70여개로 증가함을 확인하였다(도 7).

[90] 실험예 2: 광유도에 의한 칼슘 유입 여부 확인

- [91] 본 발명자들은 상기 융합단백질의 복합체 형성에 따라, 칼슘의 세포내로의 유입이 유도되는지 확인하기 위해, 상기 실시예 1-3에서 제조한 mCherry-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트로 HeLa 세포를 형질전환시킨 후, G418 500 µg/ml을 함유한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하다가, 파장 450-520 nm의 빛의 조사 전후로 형광현미경 이미지를 획득하는 한편(도 8 상부 판넬), 칼슘을 이미징할 수 있는 형광물질인 Fluo3-AM(Sigma, USA)를 광조사 30분 전에 4.52 µg/ml로 처리한 후, 형광 패턴의 변화를 형광현미경으로 촬영하였다(도 8 하부 판넬). 그 결과 광 조사 전에는 세포내 부분 부분 강한 점의 형태로 형광이 나타난 반면(하부 판넬 좌측), 광조사 후에는 전반적으로 형광의 강도가 증가하였고, 강한 형광점의 수도 증가함을 알 수 있었다(하부 판넬 우측). 따라서, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질이 광조사에 의해 복합체를 형성함은 물론 칼슘채널을 형성하여 칼슘 이온을 세포질 내로 유입함을 입증하였다.

- [92] 아울러, 본 발명자들은 mCherry-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트로 형질전환된 세포와 공백터(pmCherry-C1 vector)로 형질전환된 HeLa 세포에 광조사를 한 후

세포내 칼슘 농도를 Fluo3-AM에 의한 형광 강도로 측정하였다. 그 결과 도 9에서 나타난 바와 같이, mCherry-PHR-STIM1-ct를 발현하는 세포의 경우 광조사 후 형광 강도가 8배 정도 증가하였다가, 시간의 경과에 따라 다소 완만한 곡선으로 감소한 반면, mCherry만 발현하는 세포의 경우 형광의 변화를 관찰할 수 없었다. 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 칼슘 이온의 세포질 내 유입은 형광단백질에 의한 영향이 아니라, PHR 및 STIM1을 포함하는 융합단백질에 의한 것임을 입증하는 것이다.

[93] **실험예 3: 광유도에 의한 칼슘 의존성 생화학적 변화의 확인**

[94] 본 발명자들은 상기 광조사에 의한 칼슘의 세포질내 유입에 의해 세포내 생화학적 변화를 조사할 수 있는지 확인하기 위해, 칼슘에 의해 활성화되는 PKC γ -C2의 거동을 조사하였다. 구체적으로 상기 실시예 1-4에서 제조된 YFP-PKC γ -C2 컨스트럭트와 실시예 1-3에서 제조된 mCherry-PHR-STIM1-ct 컨스트럭트로 HeLa 세포를 공형질전환시킨 후, G418 500 μ g/ml을 함유한 DMEM 배지에서 37°C, 10% CO₂ 조건에서 배양하다가, 파장 450-520 nm의 빛의 조사 전후로 형광현미경 이미지를 취득하는 한편(도 10 상부 판넬), PKC γ -C2의 위치를 융합파트너인 황색형광단백질(YFP)의 형광을 검출함으로써 분석하였다(도 10 하부 판넬). 그 결과 STIM1 융합단백질에 의한 형광의 변화는 상기 실험예 2의 결과와 동일하였고, PKC γ -C2 도메인의 경우 광조사 전에는 세포질 내에 전반적으로 분산된 양상의 형광패턴이었으나(하부 판넬 좌측), 광조사후에는 세포막 부근의 형광이 더 강하게 나타나(하부 판넬 우측), PKC γ -C2 도메인이 세포막쪽으로 이동하였음을 알 수 있었다. 본 발명자들은 PKC γ -C2의 위치의 변화를 세포막에서의 형광의 강도를 측정함으로써 분석하였다(도 11). 그 결과도 마찬가지로 광 조사후 일정 시간(약 100 초) 경과 후, 세포막에서의 형광 강도가 약 5배 정도 증가하는 것으로 나타났다.

[95] 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 융합단백질 및 이를 이용한 광조사에 의한 세포내 칼슘 이온 농도의 증가방법은 세포 내에서의 칼슘 이온 의존적인 다양한 생화학적 반응을 연구하는데, 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[96] 본 발명은 상술한 실시예 및 실험예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

산업상 이용가능성

[97] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 세포, 동물 또는 식물의 세포질 내 칼슘이온 농도를 시공간적으로 그리고 가역적으로 조절할 수 있다. 물론 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

서열목록 Free Text

[98] 전자파일로 첨부하였음

청구범위

- [청구항 1] STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 광유도 이합체 형성 단백질은 광유도 이형이합체 형성 단백질 또는 광유도 동형이합체 형성단백질인, 융합단백질.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 광유도 이형이합체 형성 단백질은 CIB(cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix protein), CIBN(N-terminal domain of CIB), Phy(phytochrome), PIF(phytochrome interacting factor), FKF1(Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1), GIGANTEA, CRY(chrytochrome) 또는 PHR(phytolylase homologous region)인, 융합단백질.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 CRY(chrytochrome) 또는 PHR(phytolylase homologous region)인, 융합단백질.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
형광단백질을 추가적으로 포함하는, 융합단백질.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)인, 융합단백질.
- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 8] 제7항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.
- [청구항 9] 제8항의 벡터로 숙주세포를 형질전환시킨 형질전환 숙주세포.
- [청구항 10] 제8항의 벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현할 수 있는 비인간 형질전환 동물.
- [청구항 11] 제8항의 벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현할 수 있는 형질전환 식물.

- [청구항 12] STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 제조된 형질전환 숙주세포를 준비하는 단계; 상기 형질전환 숙주세포를 칼슘을 포함하는 배지에서 배양하는 배양단계; 및 상기 배양중인 형질전환 숙주세포에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 세포질 내의 칼슘 이온 농도를 가역적으로 증가시키는 방법.
- [청구항 13] STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도 동형이합체 형성 단백질이 연결된 융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자컨스트럭트를 포함하는 발현벡터로 형질전환되어 상기 융합단백질을 발현하는 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물을 준비하는 단계; 및 상기 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물의 특정 기관 또는 조직에 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질의 동형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 식물 또는 비인간 동물의 특정 기관 또는 조직에서의 세포질 내 칼슘 이온 농도를 가역적으로 증가시키는 방법.
- [청구항 14] 제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 광유도 동형이합체 형성 단백질은 CRY 또는 PHR인, 방법.
- [청구항 15] 제12항에 있어서, 상기 숙주세포는 동물세포 또는 식물세포인, 방법.
- [청구항 16] 제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 융합단백질은 형광단백질을 추가로 포함하는, 방법.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP),

청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP),
원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인
모티프(tetracysteine motif)인, 방법.

[청구항 18]

STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1
단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된
세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도
이형이합체 형성 단백질이 연결된 제1융합단백질을 암호화하는
폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된
제1유전자컨스트럭트를 포함하는 제1발현벡터 및 STIM1(stromal
interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의
N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic)
단편의 N-말단 또는 C-말단에 상기 광유도 이형이합체 형성
단백질과 광조사에 의해 이형이합체를 형성하는 짝 단백질이
연결된 제2융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가
프로모터에 작동가능하게 연결된 제2유전자컨스트럭트를
포함하는 제2발현벡터로 숙주세포를 형질전환하여 제조된
형질전환 숙주세포를 준비하는 단계;
상기 형질전환 숙주세포를 칼슘을 포함하는 배지에서 배양하는
배양단계; 및
상기 배양중인 형질전환 숙주세포에 상기 광유도 이형이합체 형성
단백질과 상기 짝 단백질 사이의 이형이합체 형성을 유도할 수
있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 세포질 내의
칼슘 이온 농도를 가역적으로 증가시키는 방법.

[청구항 19]

STIM1(stromal interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1
단백질의 N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된
세포질(cytosolic) 단편의 N-말단 또는 C-말단에 광유도
이형이합체 형성 단백질이 연결된 제1융합단백질을 암호화하는
폴리뉴클레오티드가 프로모터에 작동가능하게 연결된
제1유전자컨스트럭트를 포함하는 제1발현벡터 및 STIM1(stromal
interaction molecule 1) 단백질 또는 상기 STIM1 단백질의
N-말단으로부터 막통과 도메인까지 절단된 세포질(cytosolic)
단편의 N-말단 또는 C-말단에 상기 광유도 이형이합체 형성
단백질과 광조사에 의해 이형이합체를 형성하는 짝 단백질이
연결된 제2융합단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가
프로모터에 작동가능하게 연결된 제2유전자컨스트럭트를
포함하는 제2발현벡터로 형질전환된 형질전환 식물 또는 비인간
형질전환 동물을 준비하는 단계; 및
상기 형질전환 식물 또는 비인간 형질전환 동물의 특정 기관 또는

조직에 상기 광유도 이형이합체 형성 단백질과 상기 짝 단백질 사이의 이형이합체 형성을 유도할 수 있는 파장의 빛을 조사하는 광조사단계를 포함하는 식물 또는 비인간 동물의 특정 기관 또는 조직에서의 세포질 내 칼슘 이온 농도를 가역적으로 증가시키는 방법.

[청구항 20]

제18항 또는 제19항에 있어서,
상기 광유도 이형이합체 형성 단백질은 CIB, CIBN, PhyB, PIF, FKF1, GIGANTEA, CRY 또는 PHR인, 방법.

[청구항 21]

제18항 또는 제19항에 있어서,
상기 짝 단백질은 CIB, CIBN, PhyB, PIF6, FKF1, GIGANTEA, CRY 또는 PHR인, 방법.

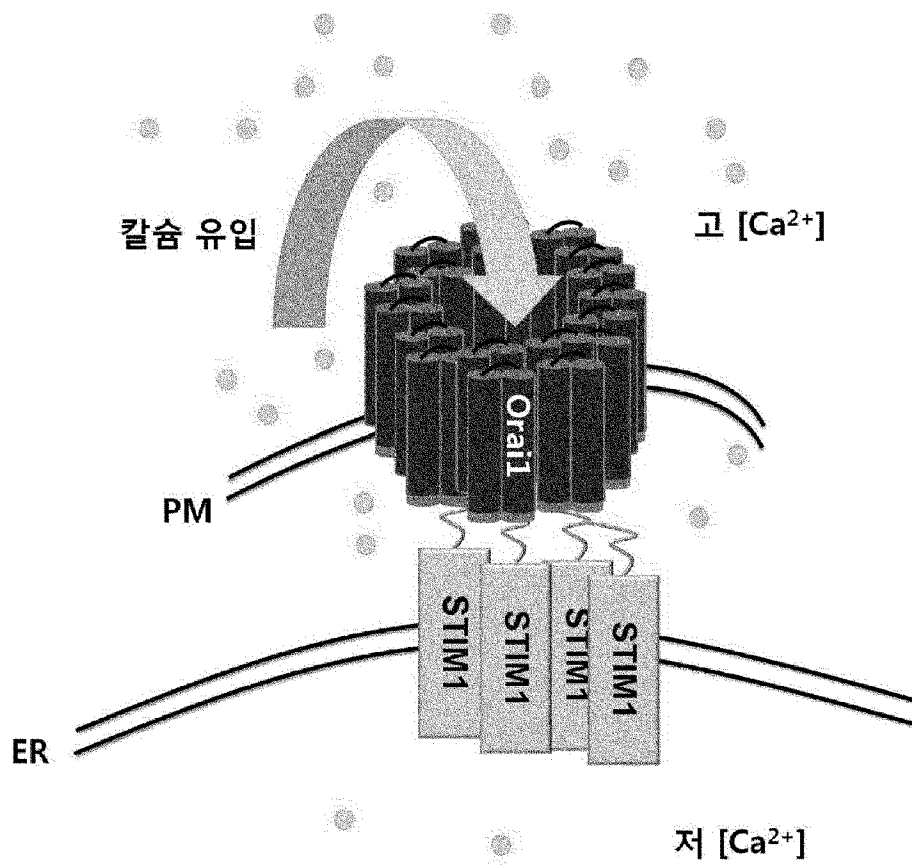
[청구항 22]

제18항 또는 제19항에 있어서,
상기 제1융합단백질 및/또는 제2융합단백질은 추가로 형광단백질을 포함하는, 방법.

[청구항 23]

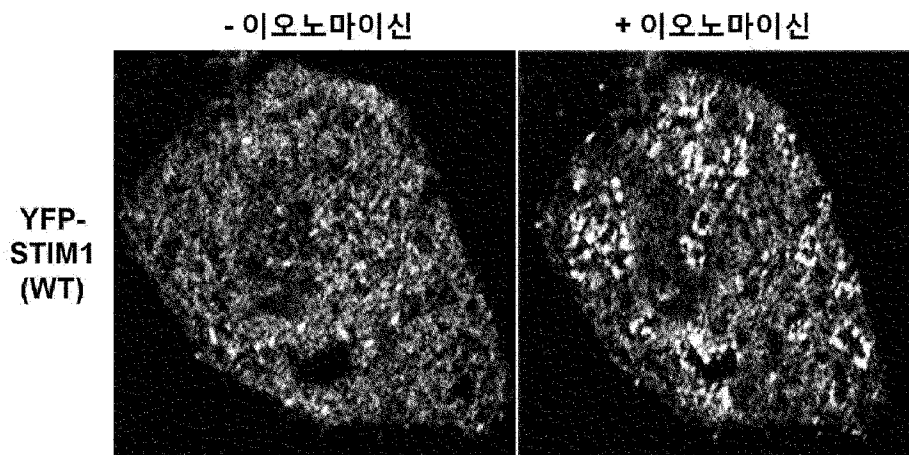
제23항에 있어서,
상기 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP),
황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP),
적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP),
주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP),
청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP),
청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP),
원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인
모티프(tetracystein motif)인, 방법.

[Fig. 1]

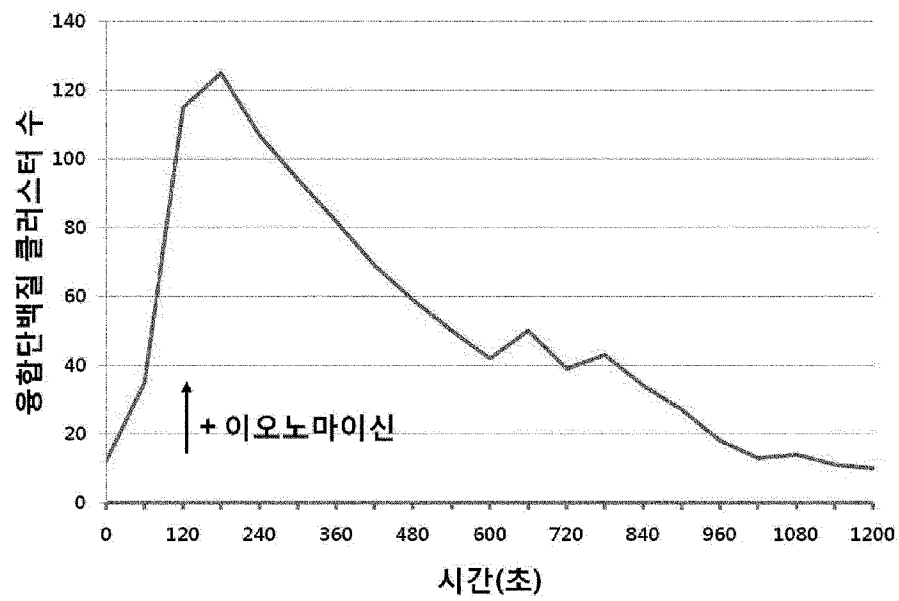


[Fig. 2]

a



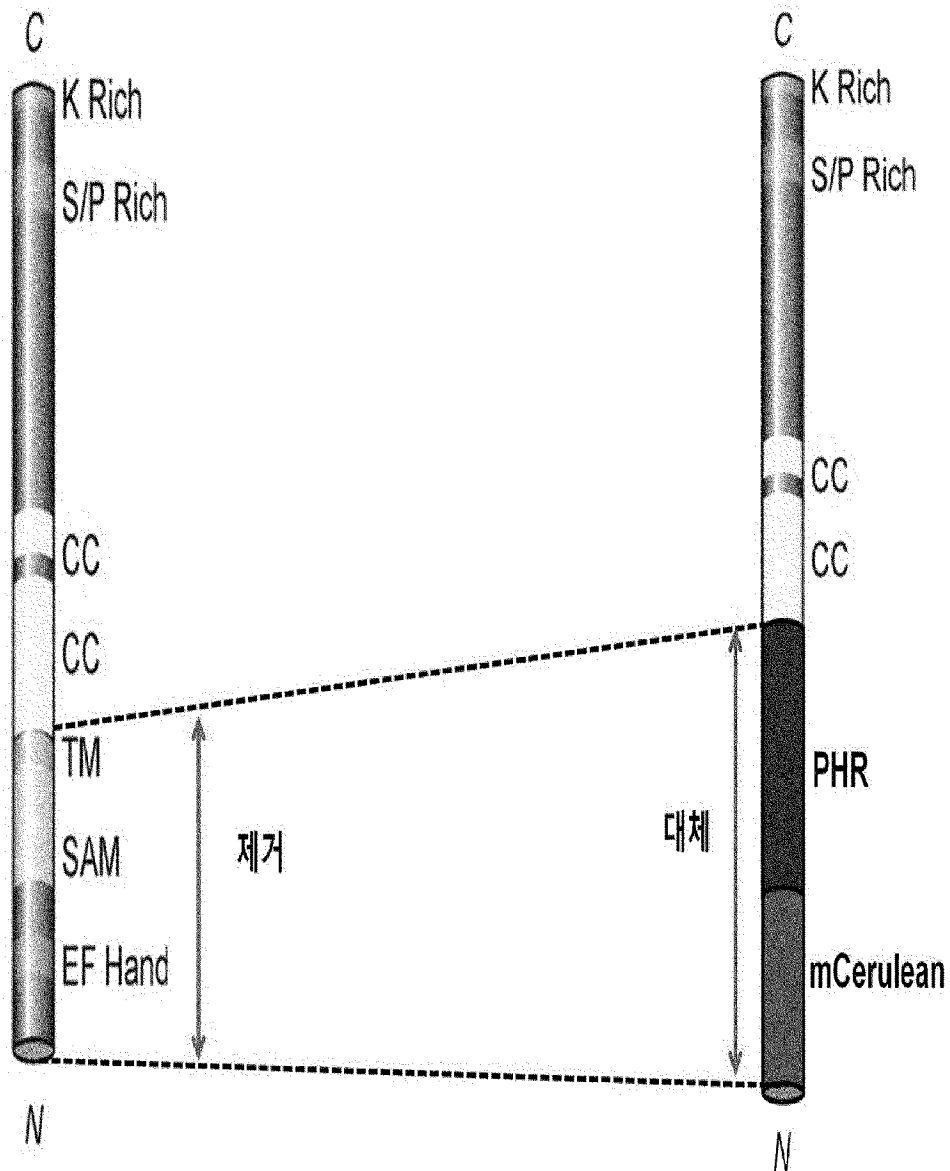
b



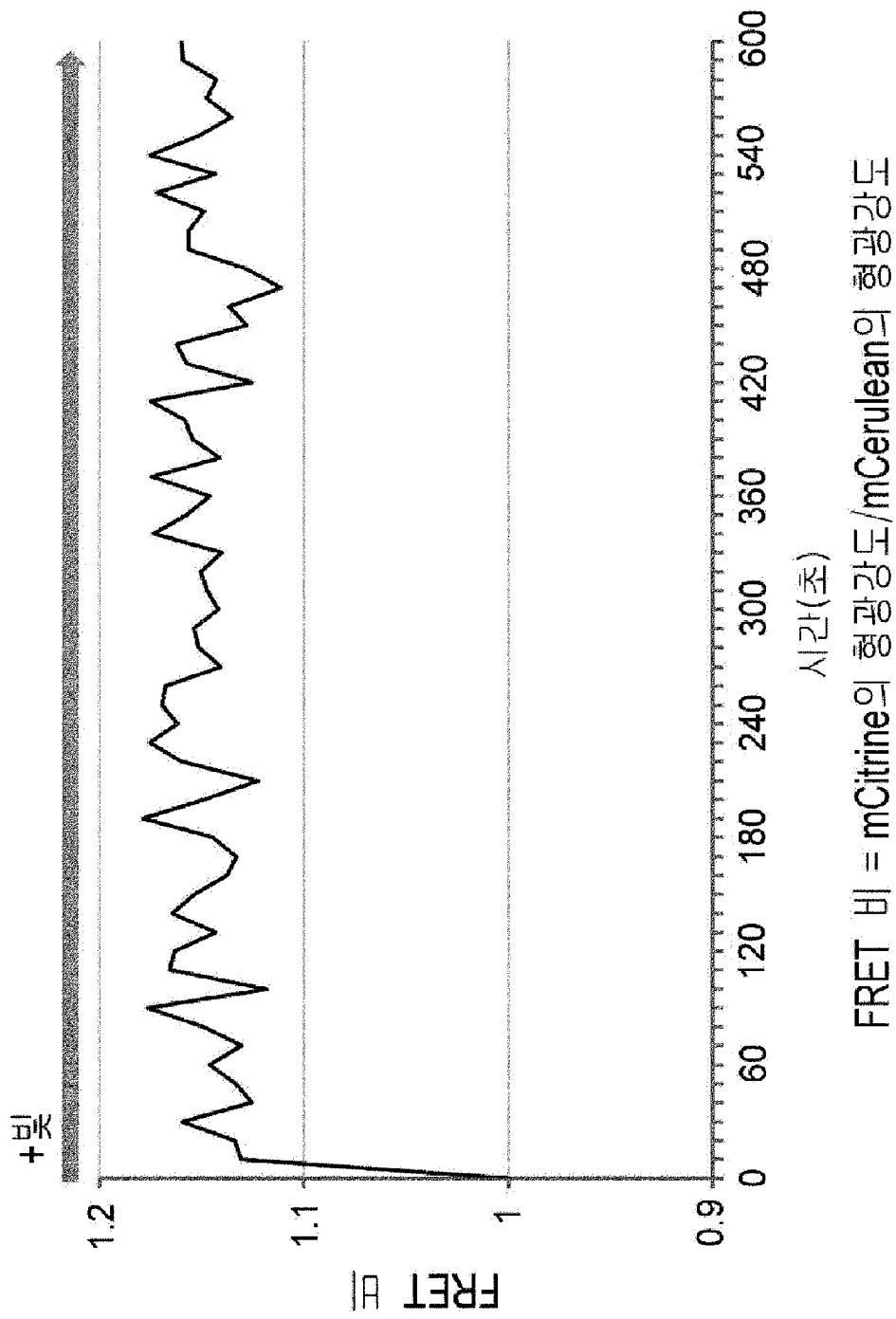
[Fig. 3]

STIM1

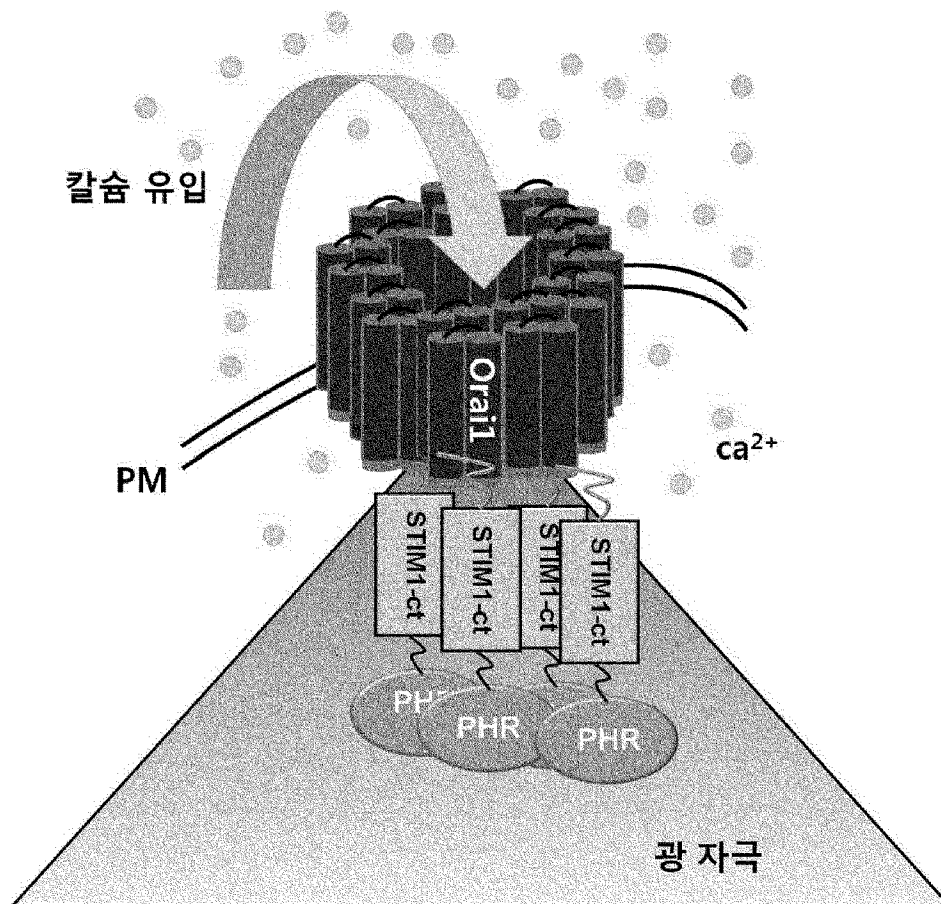
STIM1-ct



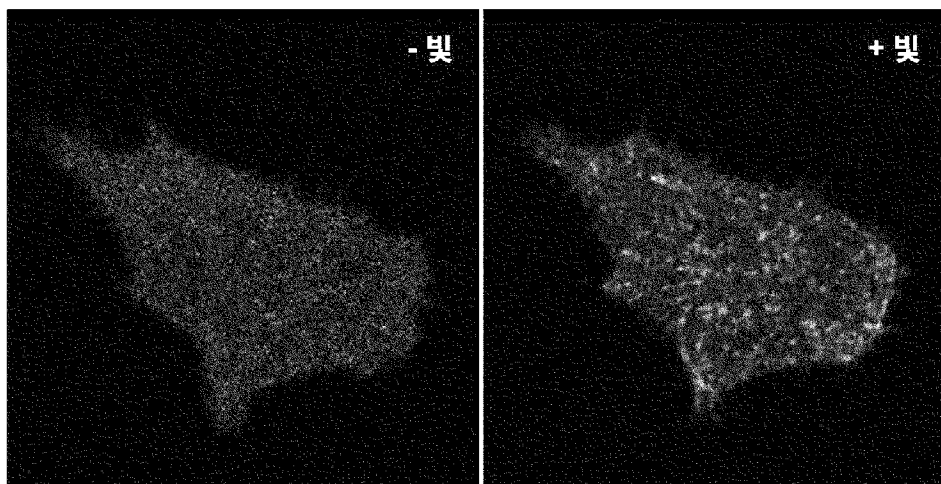
[Fig. 4]



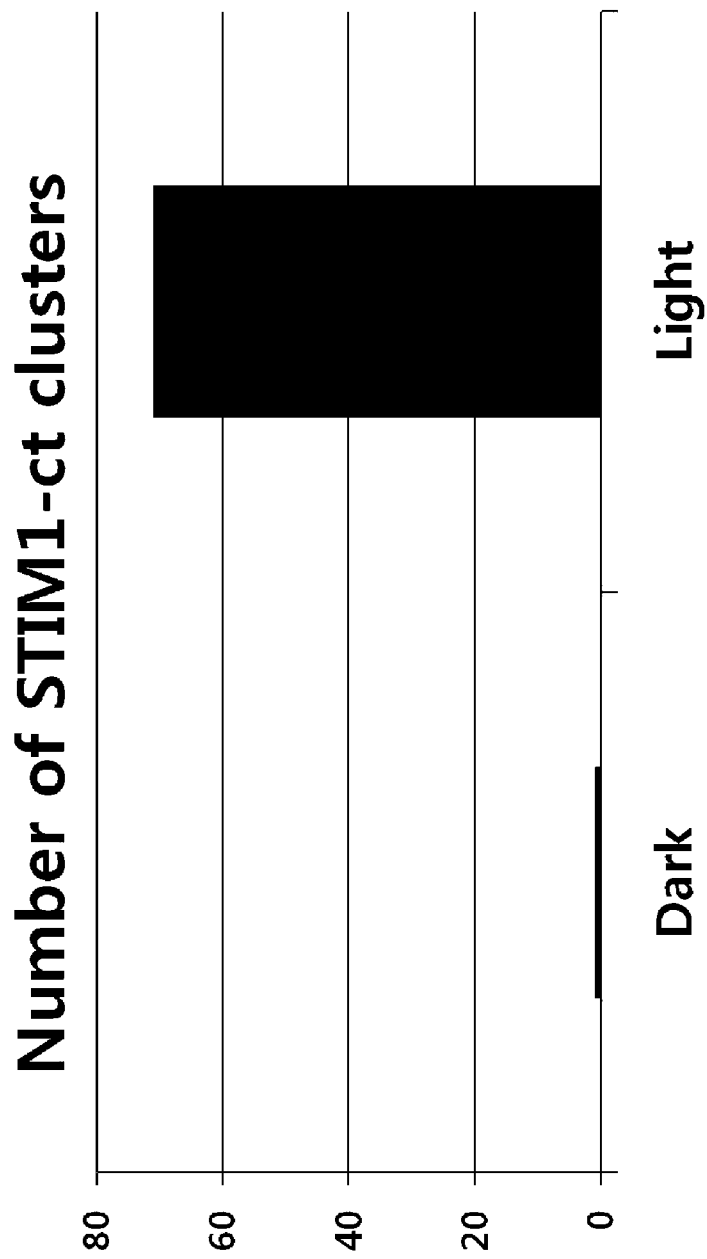
[Fig. 5]



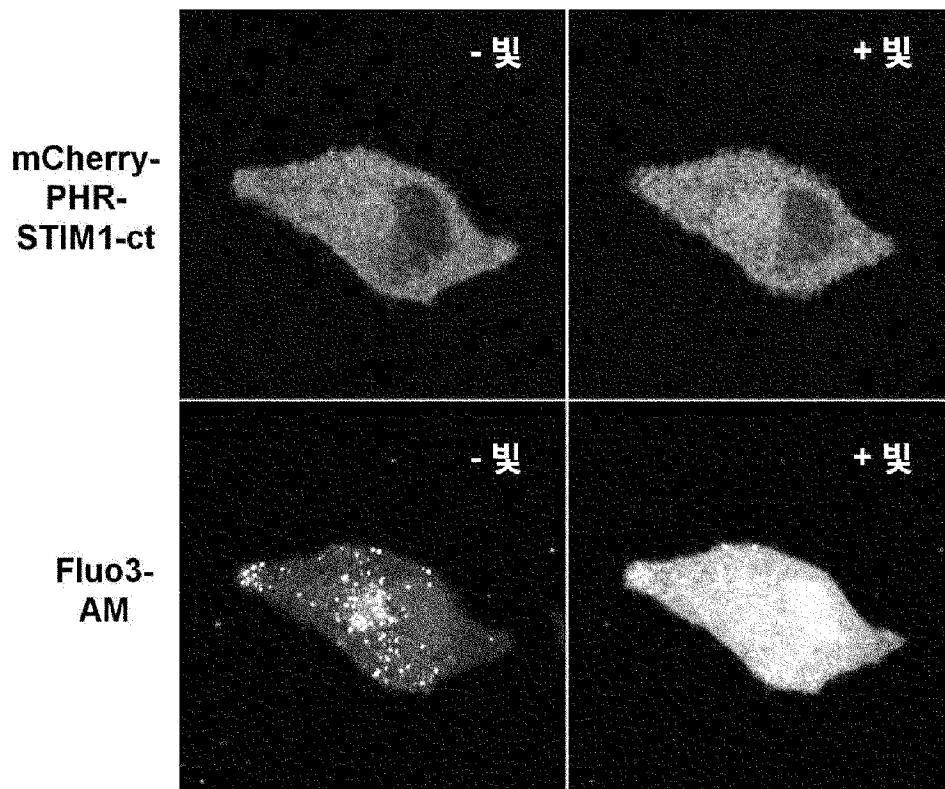
[Fig. 6]



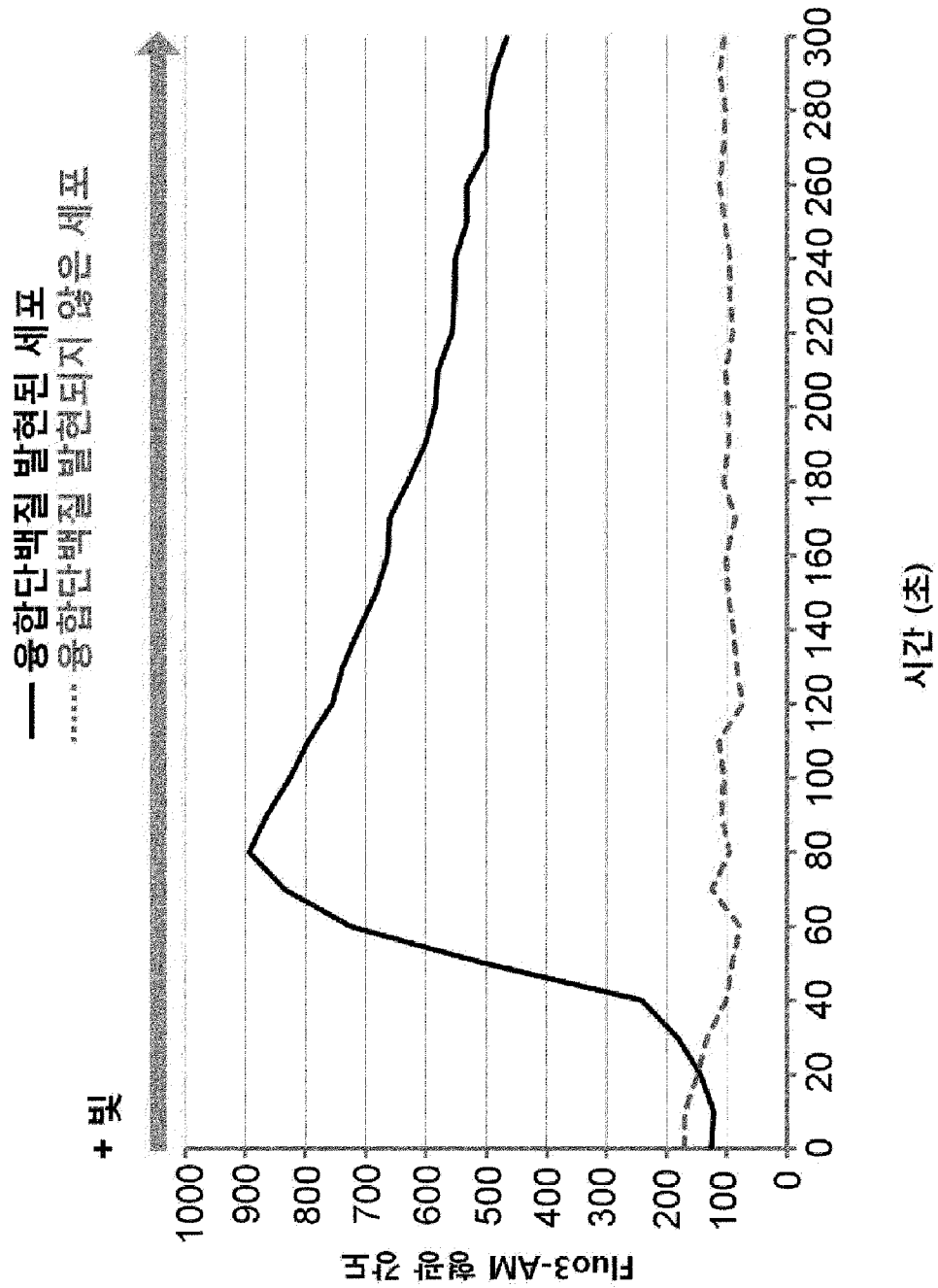
[Fig. 7]



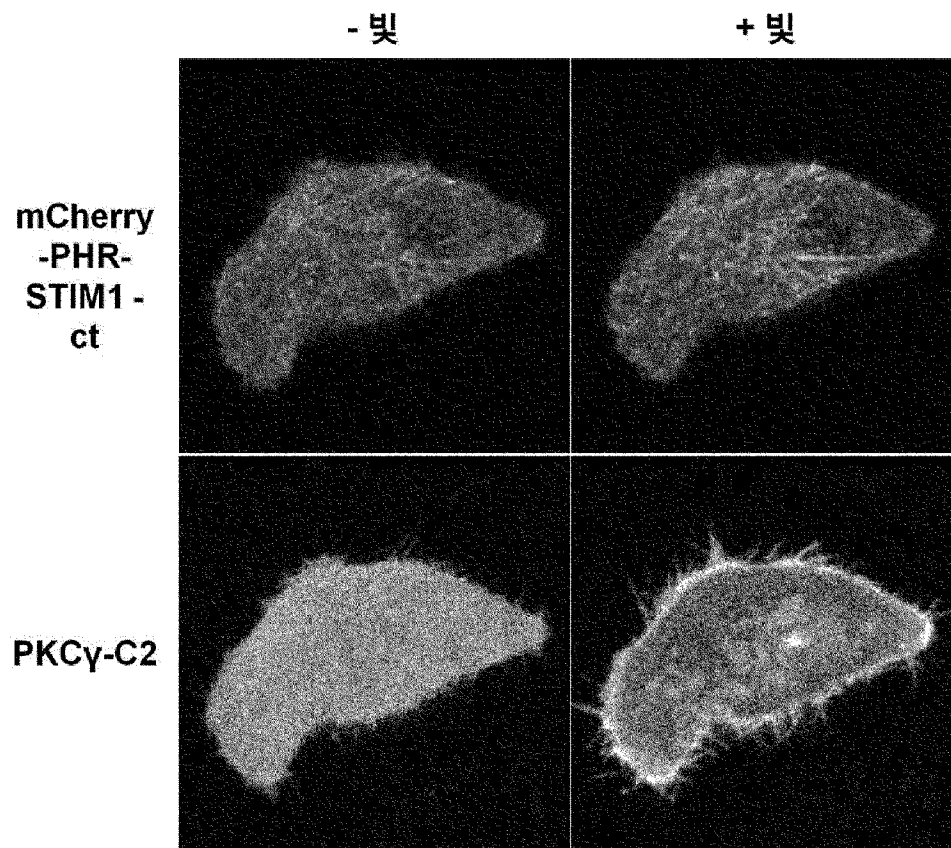
[Fig. 8]



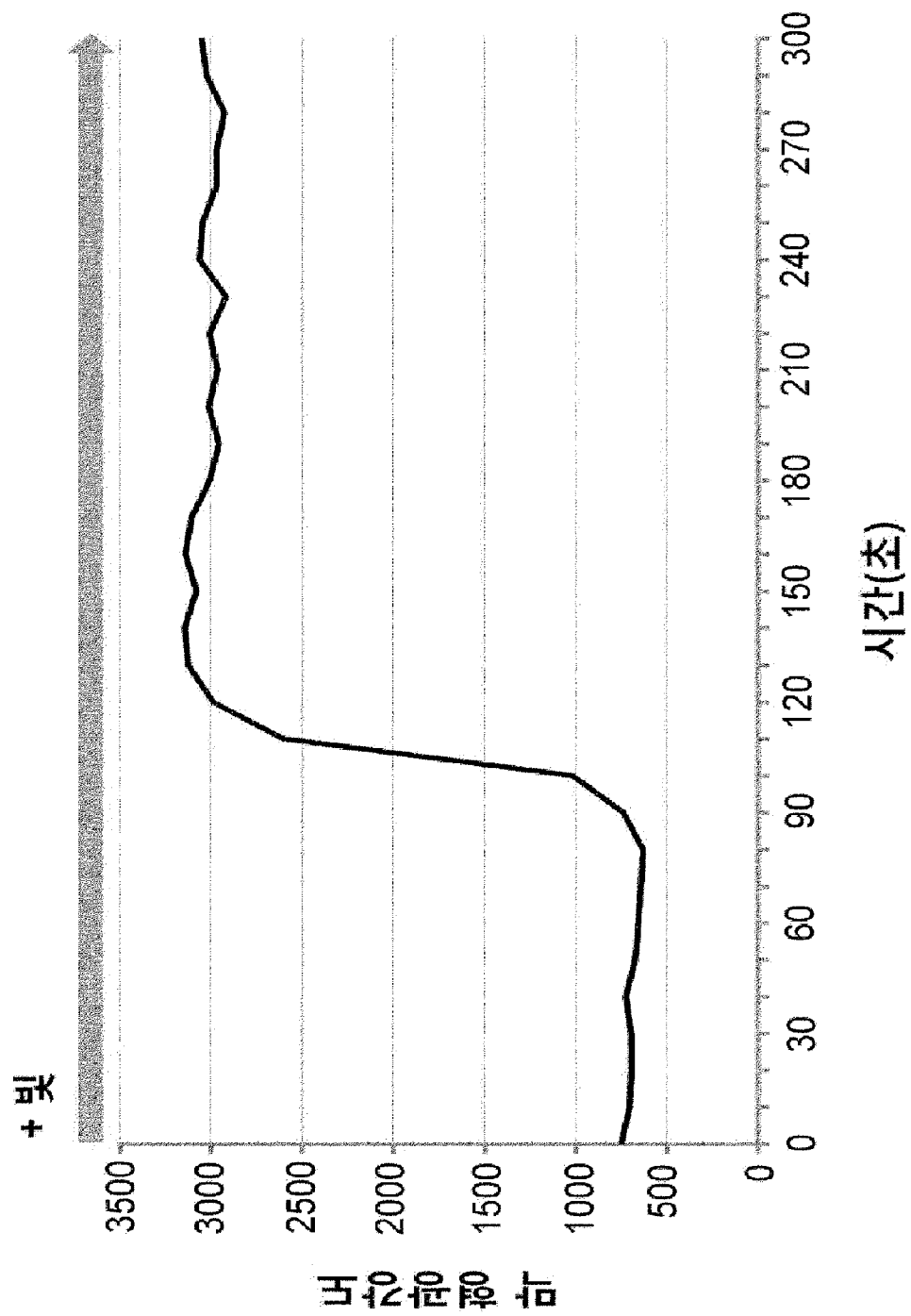
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/010979**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: STIM1, stromal interaction molecule 1, cryptochrome, calcium ion, fusion protein, photoinduction, heterodimerized, fluorescent protein

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIU, J. et al., "STIM is a Ca ²⁺ Sensor Essential for Ca ²⁺ -Store-Depletion-Triggered Ca ²⁺ Influx," 12 July 2005, Curr. Biol., vol. 15, pp. 1235-1241 See abstract, conclusion	1-23
A	SHEN, W-W. et al., "Local Cytosolic Ca ²⁺ Elevations are Required for Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) De-Oligomerization and Termination of Store-Operated Ca ²⁺ Entry," 21 October 2011, J. Biol. Chem., vol. 286(42), pp. 36448-36459 See abstract, figure 7	1-23
A	ROSENFELDT, G. et al., "Chemically Induced and Light-Independent Cryptochrome Photoreceptor Activation," January 2008, Mol. Plant, vol. 1(1), pp. 4-14 See abstract, result, figure 5	1-23



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 MARCH 2013 (29.03.2013)

Date of mailing of the international search report

01 APRIL 2013 (01.04.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/010979

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C07K 19/00(2006.01)i, C12N 15/62(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A01K 67/027(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 19/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: STIM1, stromal interaction molecule 1, cryptochrome, 칼슘이온, 융합단백질, 광유도, 이합체, 형광단백질		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LIOU, J. 외 6인, "STIM is a Ca ²⁺ sensor essential for Ca ²⁺ -store-depletion-triggered Ca ²⁺ influx," 12 July 2005, Curr. Biol., Vol. 15, pp. 1235-1241 요약, 결론 참조	1-23
A	SHEN, W-W. 외 2인, "Local cytosolic Ca ²⁺ elevations are required for Stromal Interaction Molecule 1 (STIM1) de-oligomerization and termination of store-operated Ca ²⁺ entry," 21 October 2011, J. Biol. Chem., Vol. 286(42), pp. 36448-36459 초록, 그림 7 참조	1-23
A	ROSENFELDT, G. 외 4인, "Chemically induced and light-independent cryptochrome photoreceptor activation," January 2008, Mol. Plant, Vol. 1(1), pp. 4-14 초록, 결과, 그림 5 참조	1-23
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 03월 29일 (29.03.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 04월 01일 (01.04.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 조영균 전화번호 82-42-481-8298

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음