

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0063922 (43) 공개일자 2012년06월18일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 14/195</i> (2006.01) <i>C07K 14/24</i> (2006.01) <i>C12N 15/31</i> (2006.01) <i>C12N 15/63</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0125101 (22) 출원일자 2010년12월08일 심사청구일자 2010년12월08일	(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 정광환 경기도 성남시 분당구 양현로 192, 삼성아파트 1025동 503호 (이매동) 김소영 서울특별시 마포구 월드컵로7길 49, 현진아트빌라 401호 (합정동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 양부현

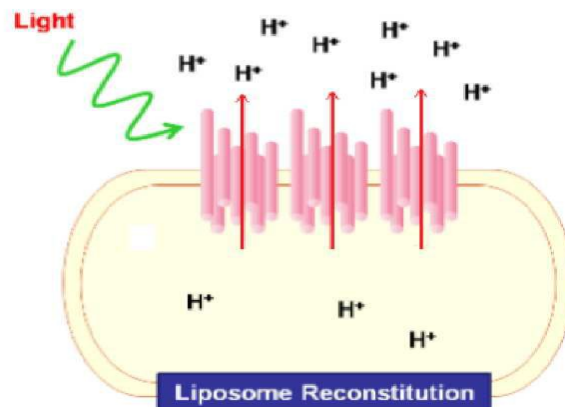
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **신규 프로테오로돕신 단백질**

(57) 요약

본 발명은 우리나라 서해안에서 발견한 신규 로돕신에 관한 것으로, 구체적으로 막을 사이에 두고 양성자(H⁺)를 수송하는 능력을 가진 막단백질인 신규 로돕신의 유전자 서열 및 아미노산 서열에 관한 것이다. 본 발명의 신규 로돕신은 수소이온의 펌핑이 가능하므로, 세포 막전위 조절을 통한 통증완화 등 다양한 분야에서 산업적으로 이용 가능하다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

정주혜

서울특별시 송파구 올림픽로 99, 엘스아파트 154
동 204호 (잠실동)

박승란

서울특별시 서대문구 통일로 279-79 (현저동, 한
성과학고등학교)

어수진

서울특별시 서대문구 통일로 279-79 (현저동, 한
성과학고등학교)

김연태

서울특별시 서대문구 통일로 279-79 (현저동, 한
성과학고등학교)

강기모

서울특별시 서대문구 통일로 279-79 (현저동, 한
성과학고등학교)

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제1서열에 기재된 아미노산 서열을 갖는 로돕신 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 로돕신 단백질은 최대흡수파장이 500 nm 내지 600 nm인 것을 특징으로 하는 로돕신 단백질.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 로돕신 단백질은 최대흡수파장이 537 nm인 것을 특징으로 하는 로돕신 단백질.

청구항 4

상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 핵산 분자.

청구항 6

- (a) 대한민국 서해바다 해수의 메타게놈으로부터 유래한 로돕신 단백질을 인코딩하는 상기 제 5 항의 핵산 분자; 및
- (b) 상기 핵산 분자에 작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 벡터.

청구항 7

상기 제 6 항의 벡터를 포함하는 형질전환체.

청구항 8

하기 단계를 포함하는 로돕신 단백질 제조방법:

- (a) 상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 단계 (a)의 재조합 발현벡터가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (b)의 형질전환체를 배양하는 단계.

청구항 9

하기 단계를 포함하는 스페로플라스트(spheroplast) 제조방법:

- (a) 상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)에서 형질전환된 숙주세포에서 세포벽을 제거하여, 스페로플라스트를 분리하는 단계.

청구항 10

하기 단계를 포함하는 상기 제 1 항의 로돕신의 수소이온 펌핑을 이용한 숙주세포의 막전위 조절 방법:

- (a) 상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- (b) 상기 단계 (a)에서 형질전환된 숙주세포에 빛을 가하여, 상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 활성화시키는 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 빛은 500 nm 내지 600 nm의 파장을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 빛은 537 nm인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 대한민국 서해 바다에서 발견한 신규 프로테오로돕신 단백질의 아미노산 서열 및 핵산 서열에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프로테오로돕신(proteorhodopsin, PR)은 해양성 γ -프로테오박테리아(γ -proteobacteria)의 메타게놈분석(metagenomic analysis)에 의해 확인된(Bet al., 2000; Bet al., 2001), 광활성의 타입 I 레티날 결합 단백질이다(Spudich et al., 2000; Spudich and Jung, 2005). γ -프로테오박테리아의 SAR86 그룹에서 PR이 최초로 확인(Bet al., 2000)된 후, 다수의 프로테오로돕신 변이체들이 몬테레이 만(Monterey Bay), 하와이 오션 타임(Hawaii Ocean Time, HOT), 팔머 스테이션(Palmer station, Antarctica)(Bet al., 2001), 지중해(Mediterranean Sea), 홍해(Red Sea)(Sabehi et al., 2003), 및 사가수해(Sargasso Sea)(Venter et al., 2004)에서의 γ -프로테오박테리아 및 α -프로테오박테리아에서 발견되었다. PR은 최대 흡수 파장(absorption maxima)에 기초하여 블루(490nm)에서 그린(525nm)에 걸치는 스펙트럼 범위를 갖는 몇 개의 하위 패밀리로 분류될 수 있다(Man et al., 2003). 이러한 분포는 깊이에 따라 층상으로 형성되는 것을 보이는데, 그린광 흡수 색소는 표면에 블루광 흡수 색소는 더 깊은 곳에 위치한다 (Bet al., 2001). 두 개의 PR 하위 패밀리, 즉 GPR(Green proteorhodopsin) 및 BPR(Blue proteorhodopsin)은 78 % 아미노산 서열 상동성을 나타낸다. PR은 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).

[0003] 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). 몇몇 프로테오박테리아(proteobacteria)는 β-카로틴을 합성하고 이를 레티날로 전환하여 기능적 활성인 PR을 생성할 수 있는 것으로 추정된다(Lintig and Vogt, 2000; Sabehi et al, 2005).

[0004] 박테리ород옵신(Bacteriorhodopsin, BR)과 같이, PR은 광-유도 프로톤 펌프이다(Bet al., 2000; Friedrich et al., 2002; Dioumaev et al., 2003). 이러한 기능에 있어서 중요한 두 개의 잔기는 프로톤 수용자로 작용하는 Asp-97과 시프 염기에 프로톤 공여자로 작용하는 Glu-108이다. 이들 잔기는 BR에서 Asp-85 및 Asp-96에 대응한다(Dioumaev et al., 2003; Dioumaev et al., 2002). 모든 타입 I 로돕신에서, 레티날 발색단의 기능적 광이성화(photoisomerization)는 all-trans 로부터 13-cis 로의 변환에 의해 발생된다(Spudich et al., 2000). PR의 광사이클의 중간체는 BR의 것과 유사하고 이의 프로톤 전달 기능과도 일치한다(Dioumaev et al., 2002). PR의 광사이클은 K, M1, M2, N, 및 PR' (O)라는 적어도 5개의 중간체를 포함한다(Varo et al., 2003; Friedrich et al., 2002). 재조합 DNA 및 인 비트로 생화학적 분석에 기초한 연구에 의해 PR이 빠른 광사이클 및 프로톤 펌핑 활성을 갖는다는 것을 알게 되었다.

[0005] 지금까지 여러 해양에서 800개가 넘는 서로 다른 PR 유전자들이 확인되었고, 투광층의 미생물의 13%, 바다 지표수 군집 전체의 50% 이상이 PR을 갖는 박테리아로 밝혀졌다(Sabehi G et al., PLoS Biol. 3:e273, 2005).

[0006] 이에, 본 발명자들은 우리나라 서해 미생물의 메타게놈으로부터 기존에 보고된 것과 상이한 로돕신으로 추정되는 단백질을 동정하고, 이의 활성을 조사한 결과, 수소 이온을 펌핑하는 로돕신의 활성을 가지는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0007] 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

[0008] 본 발명자들은 우리나라 서해바다 미생물의 메타게놈으로부터 신규한 프로테오로돕신을 발견하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 기존에 보고된 프로테오로돕신과 상이한 로돕신으로 추정되는 단백질을 동정하고, 이의 활성을 조사한 결과, 수소 이온을 펌핑하는 로돕신의 활성을 가지는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 신규한 프로테오로돕신 단백질을 제공하는 것에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 로돕신 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 제공하는 것에 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 로돕신 단백질을 인코딩하는 핵산 분자 및 이에 작동적으로 결합된 프로모터를 포함하는 벡터를 제공하는 것에 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것에 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 로돕신 단백질을 제조하는 방법을 제공하는 것에 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용한 스페로플라스트를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 우리나라 서해바다 미생물의 메타게놈으로부터 신규한 프로테오로돕신을 발견하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 기존에 보고된 프로테오로돕신과 상이한 로돕신으로 추정되는 단백질을 동정하고, 이의 활성을 조사한 결과, 수소 이온을 펌핑하는 로돕신의 활성을 가지는 것을 확인하였다.

[0016] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열목록 제 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 우리나라 서해바다

해수의 메타게놈으로부터 유래한 로돕신 단백질을 제공한다.

- [0017] 본 명세서에서 ‘메타게놈’이란 한 종의 게놈, 유전체를 말하는 것이 아니라, 한 환경단위의 모든 종의 유전체를 말한다. 일종의 혼합유전체를 말하는데, 이것은 오믹스적으로 생물학이 발전하는 과정에서 한 종을 정의할 때 기능적으로 기존의 한 종뿐만 아니라, 다양한 종이 서로 상호작용하여 완전한 종을 만든다는 관점에서 나온 용어이다. 기술적으로는 빠른 서열해석법을 이용해서, 종에 관계없이 모든 DNA, RNA를 해석하여, 한 환경 내에서 모든 종을 동정하고, 상호작용, 대사 작용을 규명하는 기법의 대상이다.
- [0018] 본 발명은 도 1 및 서열목록 1에서 나타내는 신규 프로테오로돕신의 아미노산 서열과 같이 야생형 프로테오로돕신에 비해 167번째 아미노산인 Trp이 Tyr으로, 188번째 아미노산인 Thr이 Ala으로, 191번째 아미노산인 Trp이 Tyr으로 및 194번째 아미노산인 Iso이 Val으로 치환되어 있으며, 본 발명인 신규 프로테오로돕신 단백질의 최대흡수파장이 야생형 프로테오로돕신에 비해 9 nm "레드-쉬프트(red-shift)"되어 있다(도 2 참조).
- [0019] 본 명세서에서 용어 “레드-쉬프트”란 로돕신의 최대흡수파장이 가시광선에서 적색 방향인 긴 쪽으로 이동되었다는 의미이다. 본 발명의 신규 프로테오로돕신 단백질은 이의 최대흡수파장이 야생형 프로테오로돕신 단백질에 비해 레드-쉬프트 되어 있기 때문에, 에너지가 낮은 장파장의 광을 조사하여 프로테오로돕신의 펌프 기능을 유도하여야 하는 경우에 유용하게 적용할 수 있다.
- [0020] 본 발명인 로돕신 단백질 아미노산 서열은 바람직하게는 a) 서열목록 1로 기재되는 아미노산 서열; b) 서열목록 1로 기재되는 아미노산 서열과 95% 이상 상동성을 가지는 아미노산 서열; c) 서열목록 2에 기재된 염기 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; d) 서열목록 1에 기재된 아미노산 서열에서 하나 또는 그 이상의 아미노산이 치환, 결실, 삽입 및/또는 첨가된 아미노산 서열로 구성되며, 서열목록 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질의 아미노산 서열; 및 e) 서열목록 2에 기재된 염기서열을 포함하는 DNA와 엄격한 조건하에서 혼성화 되는 DNA에 의해 코딩되는 아미노산 서열이며, 서열목록 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 기능적으로 동일한 단백질의 아미노산 서열 중 하나를 포함하나, 가장 바람직하게는 서열목록 1에 기재된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0021] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 로돕신 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).
- [0023] 본 발명의 바람직한 양태에 의하면, 본 발명의 로돕신 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 보다 바람직하게는, 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0024] 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 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, blastn, 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.
- [0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 로돕신 단백질을 인코딩하는 핵산 분자 및 상기 핵산 분자에

작동적으로 결합된(operatively linked) 프로모터를 포함하는 벡터를 제공한다.

- [0026] 본 발명에 있어서, 용어 "발현벡터"는 발현벡터의 전사에 제공되는 추가단편에 작동가능하게 연결된 관심의 폴리펩티드를 암호화하는 단편으로 구성되는 선형 또는 원형의 DNA 분자이다. 그와 같은 추가단편은 프로모터 및 종료암호 서열을 포함한다. 발현벡터는 하나 이상의 복제 개시점, 하나 이상의 선택마커, 폴리아데닐화 신호 등을 또한 포함한다. 발현벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유도되거나, 또는 둘 다의 요소를 함유한다.
- [0027] 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.
- [0028] 본 발명의 로딩신을 인코딩하는 핵산 분자는 원핵세포 또는 진핵세포에서 작동하는 프로모터에 작동적으로 연결(operatively linked)된다. 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0029] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 본 발명의 핵산 분자가 원핵 세포 유래이고, 배양의 편의성 등을 고려하여, 원핵 세포를 숙주로 하는 것이 바람직하다.
- [0030] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, 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 λ의 좌향 프로모터 (pL^λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 숙주세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 슈린겐시스의 독소단백질 유전자의 프로모터 (Appl. Environ. Microbiol. 64:3932-3938(1998); Mol. Gen. Genet. 250:734-741(1996)) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다.
- [0031] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예: λgt10, λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0032] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열(예: 소성장 호르몬 터미네이터 및 SV40 유래 폴리 아데닐화 서열)을 일반적으로 갖는다.
- [0033] 본 발명에 이용될 수 있는 진핵 세포용 발현 벡터는 당업계에 공지된 다양한 벡터로부터 선택할 수 있다. 예를 들어, SV40 벡터, 파필로마 바이러스 벡터, YIp5, YCp19, 엡스테인-바 바이러스 벡터, pMSG, pAV009/A⁺, pMAMneo-5, 배콜로바이러스 pDSVE, pSecTag2B 또는 yT&A 벡터의 구조를 기본적인 백본으로 가질 수 있다.
- [0034] 본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 히스톤 탈아세틸화 효소의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질(NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [0035] 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질은 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, 6x His이 이용된 경우에는 Ni-NTA His-결합 레진 컬럼(Novagen, USA)을 이용하여 소망하는 히스톤 탈아세틸화 효소를 신속하고 용이하게 얻을 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 로딩신은 C-말단에 6개의 히스티딘(His)

잔기가 융합(His-태그(tagged))되어 있다. 이러한 본 발명의 His-태그된 로돕신 단백질은 Ni^{2+} -NTA 아가로스 비드(Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 정제한다.

[0036] 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.

[0037] 본 발명의 다른 양태에 의하면 본 발명은 상기 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[0038] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *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 균주 등이 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포 및 사람 세포(예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 등이 이용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 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. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

[0041] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현될 수 있으며, 이러한 경우에는 본 발명의 로돕신을 얻게 된다. 예를 들어, 상기 발현 벡터가 lac 프로모터를 포함하는 경우에는 숙주 세포에 IPTG를 처리하여 유전자 발현을 유도할 수 있다.

[0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 로돕신 단백질 제조방법을 제공한다:

[0043] (a) 상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터를 제조하는 단계;

[0044] (b) 상기 단계 (a)의 재조합 발현벡터가 숙주세포에 형질도입된 형질전환체를 제조하는 단계; 및

[0045] (c) 상기 단계 (b)의 형질전환체를 배양하는 단계.

[0046] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면 상기 단계 (b)의 숙주세포는 바람직하게는 *E. coli*를 사용하고, 가장 바람직하게는 *E. coli* 균주 UT5600을 사용한다.

[0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (c)의 배양을 위한 배지는 본 발명의 형질전환체에 적합한 배지를 당업자에게 공지된 상용 배지 중에서 선별하여 사용하는 것이 바람직하다.

[0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (c)의 형질전환체를 배양한 후 정제단계를 추가적으로 수행할 수 있는데, 상기 정제과정을 단순화시키면서 정제효율을 높이기 위한 방법으로 발현벡터를 제작할 때 친화도 컬럼크로마토그래피를 위한 특정 융합 서열을 사용하고, 정제과정에서는 레진에 결합된 융합 단백질만을 선별분리를 하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 융합 서열로는 바람직하게는 히스티딘 태그, 글루타치온 태그, 칼모듈린 태그, 말토스 태그를 사용할 수 있고, 가장 바람직하게는 히스티딘 태그를 사용할 수 있다. 한편 컬럼 충전용 레진은 사용 태그에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에서는 히스티딘 태그와 Ni^{2+} -NTA 아가로스 비드 레진을 사용한 결과만을 제시하지만 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0049] 상기 제조방법과 관련하여 보다 구체적인 사항은 하기 실시예에서 설명하도록 한다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 스페로플라스트(spheroplast) 제조방법을 제공한다:
- [0051] (a) 상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0052] (b) 상기 단계 (a)에서 형질전환된 숙주세포에서 세포벽을 제거하여, 스페로플라스트를 분리하는 단계.
- [0053] 본 명세서에서 ‘스페로플라스트’는 세포벽을 거의 다 제거한 균세포를 지칭한다. 본 발명에서 형질전환된 숙주세포의 세포벽을 제거하여 스페로플라스트를 제조하는 이유는 세포막을 제거함으로써 세포막 내의 로돕신을 제외한 이온 등의 조절 기관을 제거하여 로돕신 고유의 수소이온 펌핑 능력을 확인하기 위함이다.
- [0054] 상기 제조방법과 관련하여 보다 구체적인 사항은 하기 실시예에서 설명하도록 한다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면 본 발명은 하기 단계를 포함하는 상기 제 1 항의 로돕신의 수소이온 펌핑을 이용한 숙주세포의 막전위 조절 방법을 제공한다:
- [0056] (a) 상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 프로모터에 작동 가능하게 연결된 유전자 컨스트럭트를 포함하는 재조합 발현벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0057] (b) 상기 단계 (a)에서 형질전환된 숙주세포에 빛을 가하여, 상기 제 1 항의 로돕신 단백질을 활성화시키는 단계.
- [0058] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 빛의 파장은 500 nm 내지 600 nm를 가지며, 가장 바람직하게는 537 nm 이다.
- [0059] 상기 막전위 조절 방법과 관련하여 보다 구체적인 사항은 하기 실시예에서 설명하도록 한다.

발명의 효과

- [0060] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0061] (a) 본 발명은 서열목록 제 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 우리나라 서해바다 해수의 메타게놈으로부터 유래한 로돕신 단백질을 제공한다.
- [0062] (b) 본 발명의 신규 로돕신은 기존에 보고된 야생형 프로테오로돕신에 비해 레드-쉬프트(red-shift)되어 있기 때문에 특정 파장의 광을 조사하여 숙주세포에서 로돕신의 수소 이온 펌프 기능을 유도하여야 하는 경우에 매우 유용하게 적용할 수 있다.
- [0063] (c) 본 발명의 신규 로돕신은 수소이온의 펌핑이 가능하므로, 세포 막전위 조절을 통한 통증완화 등 다양한 분야에서 산업적으로 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0064] 도 1은 본 발명의 신규 프로테오로돕신 단백질의 아미노산 서열을 나타낸다. 신규 프로테오로돕신 단백질은 가장 근접한 아미노산 서열을 나타내는 야생형 프로테오 로돕신에 비해 167번째 아미노산인 Trp이 Tyr으로, 188번째 아미노산인 Thr이 Ala으로, 191번째 아미노산이 Trp이 Tyr으로 및 194번째 아미노산인 Ile이 Val으로 치환되어 있다.
- 도 2는 신규 프로테오로돕신 단백질의 최대흡수파장을 나타낸다. 최대흡수파장이 야생형 프로테오로돕신에 비해 9 nm "레드-쉬프트(red-shift)"되어 있다.
- 도 3은 본 발명의 신규 로돕신을 포함하는 Spheroplast의 구조를 도시한 개요도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0066] 실시예

실험방법

대한민국 서해 해수 메타게놈으로부터 신규 로돕신의 획득

[0069] 제한효소 및 T4 DNA 리가아제는 NEB(MA, U.S.A.)로부터 구입하였고, *Pfu* DNA 폴리머라아제는 비바젠(Vivagen, Korea)로부터 구입하였다. 올리고뉴클레오타이드는 코스모진텍(Cosmogentech, Korea)로부터 구입하였다. 엠포실린, 클로람페니콜은 USB(U.S.A)사에서, all-trans 레티날은 Sigma 사(St. Louis, MO, U.S.A.)로부터 구입하였다. 서열목록 제1서열에 기재된 신규 로돕신은 우리나라 서해 해수 메타 게놈으로부터 획득하였다. 구체적으로, 우리나라 서해 해수를 여과한 후 걸러진 미생물(microbe)로부터 획득한 메타 게놈을 주형으로 PCR 방법을 사용하여 획득하였다. 이 때, 서열목록 제3서열에 기재된 정방향 프라이머 5'-CATATGAAATTACTGATATTAGG-3'와 서열목록 제4서열에 기재된 역방향 프라이머 5'-GCGGCCGCTTAGTGATGATGGTGTGATGAGCATTAGAAGATTCTTTAACAGC-3'를 사용하였고, 역방향 프라이머는 단백질을 발현 후 정제를 용이하게 하기 위하여 6-히스티딘 잔기를 코딩하는 염기서열을 첨가하였다. PCR은 *Pfu* 폴리머라아제를 사용하여 95℃에서 1분, 55℃에서 1분 및 72℃에서 2분 30초로 35 사이클을 수행하였다. PCR 산물을 정제 분리한 후 NdeI 및 NotI으로 절단하고, IPTG 유도의 조절 하에 *E. coli* 발현 벡터인 플라스미드 pKJ900(K.H. Jung et al., Screening and characterization of proteorhodopsin color-tuning mutations in *Escherichia coli* with endogenous retinal synthesis, *Biochimica et biophysica Acta*, 1777:504-513(2008))의 내부로 도입하였다. 신규 로돕신은 최종 제작된 발현 벡터내에서 PCR-제조된 인서트를 DNA 시퀀싱하여 확인하였다.

대장균 형질전환체의 제조

[0071] 신규 로돕신 단백질을 코딩하는 유전자를 포함한 벡터인 플라스미드 pKJ900을 *E. coli* 균주 UT5600(New England Biolabs, U.S.A)에 도입하였다. UT5600 균주는 막단백질 프로테아제의 한 종류가 결손된 것으로 막단백질의 안정적 발현에 유용하게 사용된다. 먼저 *E. coli* 균주 UT5600의 수용능을 CaCl_2 시약을 이용한 방법으로 향상시켰고, 실시예 1에서 제조한 발현벡터와 혼합한 후 열충격을 주어 형질전환시켰다. 상기 발현 벡터에 포함된 항생제 내성 유전자에 적합한 항생제인 엠포실린(ampicillin)(USB)을 최종농도 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 도말된 LB 배지에 도말하여 콜로니를 형성시켰다.

세포에서 신규 로돕신의 발현 및 막 소포체(membrane vesicle)의 제조

[0073] 신규 로돕신은 흡수분광분석(absorption spectroscopy)과 수소이온 펌핑(proton pumping) 측정을 위해 *E. coli* 균주 UT5600에서 플라스미드 pKJ900을 사용하여 발현시켰다. 상기 '대장균 형질전환체의 제조'에서 선별된 형질전환체를 밤샘 배양한 후 1 L 플라스크내에서 엠포실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 클로람페니콜(34 $\mu\text{g}/\text{ml}$)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 all-trans 레티날을 최종농도 5 μM 으로 첨가하였다. 그런 다음, 4시간 후 세포들을 원심분리로 회수하고 150 mM NaCl을 함유하는 50 mM Tris-HCl(pH 7.0)에 재현탁하였다. 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)을 사용하여 4℃에서 재현탁하였다. 배양액을 추출버퍼(1% 소듐 도데실 말토사이드[dodecylmaltoside: DM], 150 mM NaCl, 50 mM Tris-buffer [pH 7.0])에서 4℃에서 4-6시간 동안 약하게 진동하여 로돕신을 막으로부터 추출하였다. 추출된 단백질은 30,000 × g에서 원심분리한

후 상등액을 취하여 수득하였다. 수용체 단백질을 갖지 않는 막은 동일한 과정을 통해 제조하였고 대조군으로서 사용하였다.

[0074] **His-태그된 로돕신의 정제 및 분리**

[0075] C-말단에서 6-히스티딘 잔기를 포함하는 단백질은 Ni^{2+} -NTA 아가로스 비드(Qiagen, Valencia, CA, U.S.A.)를 사용하여 분리하였다. 신규 로돕신을 포함하는, 상기 '세포에서 신규 로돕신의 발현 및 막 소포체(membrane vesicle)의 제조'의 방법으로 제조된 *E. coli* 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 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.

[0076] **스페로플라스트의 제조**

[0077] 신규 로돕신을 발현하는, 상기 '대장균 형질전환체의 제조'에서 선별한 형질전환체를 밤샘배양한 후, 1 L 플라스크내에서 엠펙실린(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 클로람페니콜(34 $\mu\text{g}/\text{ml}$)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 all-trans 레티날을 최종농도 5 μM 으로 첨가하였다. 그런 다음, 4시간 후 세포들을 원심분리로 회수하고 30 mM Tris(pH 8.0), 20% sucrose 용액에 라이소자임(lysozyme)을 넣어 15분 동안 가볍게 마그네틱바(magnetic bar)를 이용하여 저었다. 이를 3,600×g로 15분 동안 원심분리하고, 100 mM KPi(pH7.0), 20% 수크로오스(sucrose) 용액에 풀어서 1 ml 주사기에 옮겼다. 이를 빠르게 섞고 있는 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 모은 후, 이를 펌핑 측정에 사용하였다.

[0078] **실험결과**

[0079] **신규 로돕신의 최대흡광도 측정**

[0080] 상기 His-태그된 로돕신의 정제 및 분리에서 제조한 단백질에서 광흡수 스펙트럼을 스펙트로미터 상위 분광기(Shimadzu 2450, Japan)로 750 nm에서 350 nm까지 각 0.5 nm 간격으로 측정하였다. 상이한 pH 값(pH 4와 pH 7, pH 10)에서의 최대흡수파장을 측정하였다. pH를 조절하기 위하여 로돕신이 담겨진 용액에 1 M HCl, 1 M NaOH 용액을 이용하여 첨가하였다. *E. coli* 에서 신규 로돕신을 발현시키고 Ni^{2+} -NTA 레진을 사용하여 도데실말토피란노사이드(dodecylmaltopyranoside)에서 로돕신을 정제하였다. 정제된 신규 프로테로로돕신의 흡수 스펙트럼은 전형적인 로돕신 밴드 폭(~ 100 nm 반밴드 폭; semibandwidth)을 나타내었고, pH 7에서의 최대 흡수 파장을 측정한 결과 537 nm에서 단일 피크를 가졌다(도 2 참조).

[0081] **신규 로돕신의 수소이온 펌핑 측정**

[0082] 세포의 수소이온 펌핑을 측정하기 위해, 신규 로돕신을 발현하는 *E. coli* 세포를 4°C에서 5,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 펠렛으로 분리한 후, 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. 샘플을 화이트-외드 간섭 및 열-보호(CuSO_4 및 유리) 필터와 조합한 150-와트 텅스텐 할로겐 램프를 사용하여 500 ± 20 nm에서 100 와트/ m^2 로 광을 조사하였다. pH는 컴퓨터화된 Horiba F51 pH 미터로 모니터링하였다.

[0083] **참고문헌**

[0084] 1. Spudich J.L. and K.H. Jung, "Microbial rhodopsins : Phylogenetic and functional diversity. In Handbook of photosensory receptors", Briggs, WR and Spudich JL (ed), Wiley-VCH, Weinheim, 2005, pp.1-

24.

- [0085] 2. K.H. Jung, "The distinct signaling mechanisms of microbial sensory rhodopsins in Archaea, Eubacteria and Eukarya", Photochem. Photobiol., Vol. 83. pp. 63-69, 2007.
- [0086] 3. Fuhrman J.A., M.S. Schwalbach, U. Stingl, "Proteorhodopsins: an array of physiological roles?", Nat. Rev. Microbiol. Vol. 6. pp. 488-494, 2008.
- [0087] 4. BO., E.N. Spudich, J.L. Spudich, M. Leclerc, E.F. DeLong, "Proteorhodopsin phototrophy in the ocean", Nature Vol. 411. pp. 786-789, 2001.
- [0088] 5. Venter J.C., K. Remington, J.F. Heidelberg, A.L. Halpern, D. Rusch, J.A.Eisen, D. Wu, I. Paulsen, K.E. Nelson, W. Nelson, D.E. Fouts, S. Levy, A.H. Knap, M.W. Lomas, K. Neelson, O. White, J. Peterson, J. Hoffman, R. Parsons, H. Baden-Tillson, C. Pfannkoch, "Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea", Science Vol. 304. pp. 66-74, 2004.
- [0089] 6. D.B. Rusch et al., "The sorcerer II global ocean sampling expedition: northwest Atlantic through eastern tropical Pacific", PLoS Biology, Vol 5(3). e77, 2007.
- [0090] 7. Balashov S.P. and J.K. Lanyi, "Xanthorhodopsin: Proton pump with a carotenoid antenna", J. Struct. Biol., Vol. 165. pp. 37-46, 2007.
- [0091] 8. Miranda M.R., A.R. Choi, L. Shi, A.G. Jr. Bezerra, K.H. Jung, L.S. Brown, "The photocycle and proton translocation pathway in a cyanobacterial ion-pumping rhodopsin", Biophys J. Vol. 96. pp. 1471-1481, 2009.
- [0092] 9. Hagedorn R, D. Gradmann, P. Hegemann, "Dynamics of voltage profile in enzymatic ion transporters, demonstrated in electrokinetics of proton pumping rhodopsin. Biophys J. Vol. 95. pp. 5005-5013, 2008.
- [0093] 10. Waschuk S.A., A.G. Jr. Bezerra, L. Shi, L.S. Brown. "Leptosphaeria rhodopsin: Bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote" Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 102. pp. 68796883, 2005.

도면

도면1

```
>gb|ABL97415.1| pop proteorhodopsin [uncultured marine bacterium EB80_02D08]
Length=249

Score = 487 bits (1254), Expect = 5e-136, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 245/249 (98%), Positives = 247/249 (99%), Gaps = 0/249 (0%)

Query 1      MKLLILGSLVIALPTFAAGGGDLSDSYTGVSFWLVTAALLASTVFFFVERDRVSAKWK 60
Sbjct 1      MKLLILGSLVIALPTFAAGGGDLSDSYTGVSFWLVTAALLASTVFFFVERDRVSAKWK 60

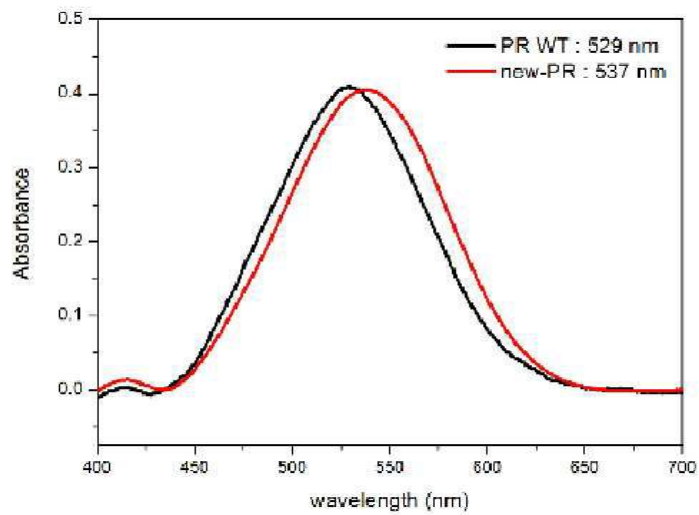
Query 61     SLTVSGLVTGIAFWHYMYMRGVNIETGDSPTVFRYIDWLLTVPLLCIFYLILAAATNVA 120
Sbjct 61     SLTVSGLVTGIAFWHYMYMRGVNIETGDSPTVFRYIDWLLTVPLLCIFYLILAAATNVA 120

Query 121    GSLFKLLVGSLSVLMVFGYMGEGAGIMAAPAFIIGCLAWVYMIYELWAGEGKSACNTASP 180
Sbjct 121    GSLFKLLVGSLSVLMVFGYMGEGAGIMAAPAFIIGCLAWVYMIYELWAGEGKSACNTASP 180

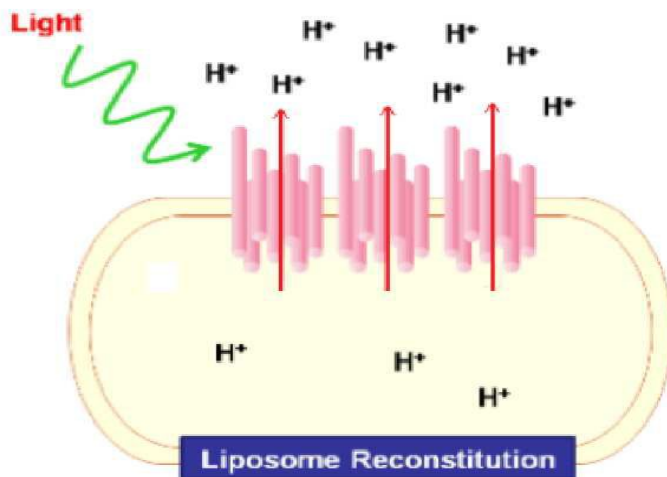
Query 181    AVQSAYTAAETIIIVGWAIYFVGYFTGYLMGDGGSALNLIYNLADFVNKILFGLIIWN 240
Sbjct 181    AVQSAYTAAETIIIVGWAIYFVGYFTGYLMGDGGSALNLIYNLADFVNKILFGLIIWN 240

Query 241    VAVKESSNA 249
Sbjct 241    VAVKESSNA 249
```

도면2



도면3



서열 목록

- <110> Sogang University
- <120> New proteorhodopsin in Yellow sea
- <160> 4
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 249
- <212> PRT
- <213> proteo bacteria
- <400> 1

Met Lys Leu Leu Leu Ile Leu Gly Ser Val Ile Ala Leu Pro Thr Phe
1 5 10 15
Ala Ala Gly Gly Gly Asp Leu Asp Ala Ser Asp Tyr Thr Gly Val Ser
20 25 30
Phe Trp Leu Val Thr Ala Ala Leu Leu Ala Ser Thr Val Phe Phe Phe
35 40 45
Val Glu Arg Asp Arg Val Ser Ala Lys Trp Lys Thr Ser Leu Thr Val
50 55 60
Ser Gly Leu Val Thr Gly Ile Ala Phe Trp His Tyr Met Tyr Met Arg
65 70 75 80
Gly Val Trp Ile Glu Thr Gly Asp Ser Pro Thr Val Phe Arg Tyr Ile
85 90 95
Asp Trp Leu Leu Thr Val Pro Leu Leu Ile Cys Glu Phe Tyr Leu Ile
100 105 110
Leu Ala Ala Ala Thr Asn Val Ala Gly Ser Leu Phe Lys Lys Leu Leu
115 120 125
Val Gly Ser Leu Val Met Leu Val Phe Gly Tyr Met Gly Glu Ala Gly
130 135 140
Ile Met Ala Ala Trp Pro Ala Phe Ile Ile Gly Cys Leu Ala Trp Val
145 150 155 160
Tyr Met Ile Tyr Glu Leu Tyr Ala Gly Glu Gly Lys Ser Ala Cys Asn
165 170 175
Thr Ala Ser Pro Ala Val Gln Ser Ala Tyr Asn Ala Met Met Thr Ile
180 185 190
Ile Val Val Gly Trp Ala Ile Tyr Pro Val Gly Tyr Phe Thr Gly Tyr
195 200 205
Leu Met Gly Asp Gly Gly Ser Ala Leu Asn Leu Asn Leu Ile Tyr Asn
210 215 220
Leu Ala Asp Phe Val Asn Lys Ile Leu Phe Gly Leu Ile Ile Trp Asn
225 230 235 240
Val Ala Val Lys Glu Ser Ser Asn Ala
245

<210> 2

<211> 750
 <212> DNA
 <213> proteo bacteria
 <400> 2

atgaaattat tactgatatt aggtagtgtt attgcacttc ctacatttgc tgcaggtggt 60
 ggtgaccttg atgctagtga ttacactggg gtttcttttt ggtagttac tgctgcttta 120
 ttagcatcta ctgtatTTTT ctttgttgaa agagatagag tttctgcaa atggaaaaca 180
 tcattaactg tatctggctt tgttactggg attgctttct ggcatcatat gtacatgaga 240
 ggggtatgga ttgagactgg tgattcgcca actgtattta gataattga ttggttacta 300
 acagttcctt tattaatatg tgaattctac ttaattcttg ctgctgcaac taatgttgct 360

ggatcattat ttaagaaatt actagtggg tctcttgta tgcttggtt tggttacatg 420
 ggtgaagcag gaatcatggc tgcattggcct gcattcatta ttgggtgttt agcttgggta 480
 tatatgattt atgaactata tgctggagaa ggaaaatctg catgcaatac agcaagtcct 540
 gcggttcaat cagcttaca cgcaatgatg actatcatcg tcgtcggttg ggcaatttat 600
 cctgtaggtt atttcacagg ttacctaatg ggtgacggg gatcagctct taacttgaac 660
 cttatttata accttgctga ctttgttaac aagattctat ttggtttaat tatatggaat 720
 gttgctgtta aagaatcttc taatgcttaa 750

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 3

catatgaaat tattactgat attagg 26

<210> 4
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 4

gcggccgctt agtgatgatg gtgggatga gcattagaag attctttaac agc 53