(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월05일
(11) 등록번호 10-2210877
(24) 등록일자 2021년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C07K 2319/60 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0120443
(22) 출원일자 2019년09월30일
심사청구일자 2019년09월30일
(56) 선행기술조사문헌
ACS SYNTH. BIOL. 2017, VOL.6; 10, P. 1825_1833
[HTTPS://DOI.ORG/10.1021/ACSSYNBIO.7B00112]
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
국민대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
(72) 발명자
정상택
경기도 성남시 분당구 정자일로 100, A동 1907호 (정자동, 미켈란쉐르빌)
고상환
서울특별시 성북구 솔샘로16길 11, 302호(정릉동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

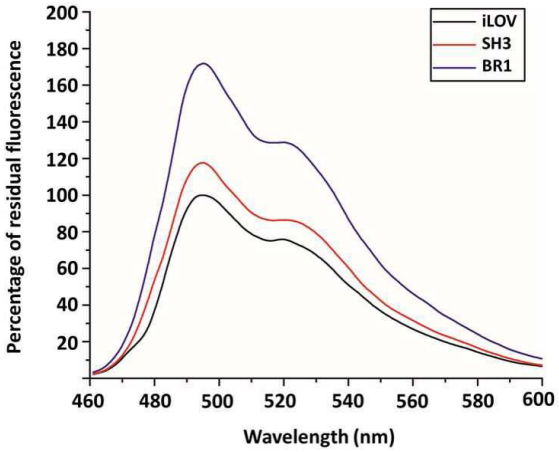
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **형광세기가 향상된 애기장대 유래 플라빈 모노뉴클레오타이드 결합 단백질 변이체들**

(57) 요 약

본 발명은 iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 iLOV 변이체의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 iLOV 변이체는 기존의 LOV 단백질 또는 iLOV 단백질 보다 형광세기 및 양자수율이 증가되어 산소의 존재 유무에 상관없이 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 발현된 목적 단백질을 분리정제하는데 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

이상민

경기도 가평군 청평면 잠곡로 7, 201호

황보라

경기도 고양시 덕양구 통일로 1060-13(내유동, 청담힐타운 5단지)

나정현

서울특별시 성동구 마조로 57, 106동 301호(마장동, 금호어울림아파트)

(56) 선행기술조사문헌

ACS SYNTHETIC BIOLOGY,2014, VOL.4(4), P. 371_377.

KR101833896 B1

THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, 2017, VOL.121(43),P.10018_10025

Biochemistry 2003, 42, 6726-6734

명 세 서

청구범위

청구항 1

iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체로서, 상기 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열의 일부를 포함하며, 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 5번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 Y(Tyrosine)로 치환된 것을 포함하는 iLOV 변이체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 iLOV 및 iLOV 변이체는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래인 것을 특징으로 하는 iLOV 변이체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 야생형 iLOV의 아미노산 서열 중 79번째 아미노산인 K(Lysine)가 E(Glutamate)로; 84번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 L(Leucine)로; 91번째 아미노산인 D(Aspartate)가 N(Asparagine)으로; 및 104번째 아미노산인 L(Leucine)이 Q(Glutamine)로 치환된 것을 추가적으로 포함하는 iLOV 변이체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 야생형 iLOV의 아미노산 서열 중 29번째 아미노산인 E(Glutamate)가 G(Glycine)로, 78번째 아미노산인 K(Lysine)가 R(Arginine)로; 및 109번째 아미노산인 H(Histidine)가 R(Arginine)로 치환된 것을 추가적으로 포함하는 iLOV 변이체.

청구항 5

제 1 항의 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자.

청구항 6

제 5 항의 핵산분자를 포함하는 벡터.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 벡터는 상기 핵산분자를 리포터 유전자로서 포함하며, 발현하고자 하는 목적 단백질을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 8

제 6 항의 벡터를 포함하는 숙주세포.

청구항 9

제 1 항의 iLOV 변이체, 제 5 항의 핵산분자 또는 제 6 항의 벡터를 포함하는 형광 발색용 조성물.

청구항 10

제 7 항의 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 목적 단백질의 발현을 분석하는 방법.

청구항 11

제 7 항의 벡터를 발현시켜 목적 단백질을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 목적 단백질을 분리하는 단계;를 포함하는 목적 단백질의 분리정제 방법.

청구항 12

하기의 단계를 포함하는 iLOV 변이체의 제조방법:

a) 제 1 항의 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

b) 상기 숙주세포에 의해 발현된 iLOV 변이체를 회수하는 단계.

청구항 13

하기의 단계를 포함하는 iLOV 변이체의 스크리닝 방법:

a) 제 1 항의 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자에 추가적으로 무작위적인 점 돌연변이를 가한 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자의 라이브러리를 구축하는 단계; 및

b) 상기 라이브러리에서 서열목록 제2서열의 iLOV 단백질 보다 형광세기가 증가된 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자를 선별하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 형광 세기가 향상된 플라빈 모노뉴클레오타이드 결합 형광 단백질 변이체에 관한 것으로, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 형광 단백질 변이체 발굴에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 형광 단백질은 생명과학, 의학, 약학 연구를 위한 유전자에 코딩될 수 있는 표지자 (reporter)로써 다양한 연구 분야에 널리 응용되고 있으며, 특히 세포나 동물, 식물에서 단백질의 발현, 활성, 분비 등을 실시간으로 분석하는데 유용하게 이용되고 있다. 형광 단백질은 특정 파장의 빛에 의해 활성화되었다가 낮은 에너지 수준으로 변화되는 과정에서 다른 파장의 빛을 방출하는 단백질이며, 대표적인 예로 GFP (Green fluorescent protein)는 바다에 사는 해파리에게서 발견된 것으로 생명과학 연구에 필수적인 도구로 사용되고 있으며, 해당 기술 연구에 대해 2008년 노벨상이 수여되었다.

[0004] 단백질 유전자에 GFP를 생성하는 유전자를 결합시키면, 세포나 조직에서의 유전자 발현을 GFP 형광을 이용하여 추적 관찰할 수 있으며, 암을 일으키는 특정 단백질의 유전자에 녹색 형광 단백질의 유전자를 삽입해서 실험용 생물체의 세포에 주입할 경우, 시간이 흐르면서 암의 크기나 위치를 추적할 수 있어서 생물체를 해부할 필요 없이 청색 빛을 비추어 육안으로 확인할 수도 있다.

[0005] 또한, 의약 단백질 연구에서 목적 단백질 유전자에 녹색 형광 단백질 유전자를 융합한 후 동물에게 삽입하면 녹색 형광 단백질을 통해 목적 단백질의 삽입 여부를 쉽게 확인할 수도 있다.

[0006] 이외에도 GFP 유전자 결합을 통해 신경회로의 분석, 세포막 연구, 바이러스 감염 메커니즘 등의 생명과학적 연구들이 매우 활발하게 수행되고 있으며, 살아있는 동물에 GFP를 도입한 형광성 동물 개발도 보고되었다.

[0007] 현재 이용되고 있는 GFP를 포함한 대부분의 형광 단백질들은 형광 빛을 방출할 수 있는 형광 발색단(chromophore) 형성을 위해 산소 존재가 필수적이라는 한계점을 가지고 있다. 따라서 산소가 결핍된 세포내 환경, 산소가 없는 조건에서 생존을 유지하는 혐기성 미생물 (anaerobic bacteria), 세포의 과도한 성장으로 주위의 산소가 결핍된 환경 등에서는 사용하기가 어렵다.

[0008] 반면, 산소의 존재나 산소결핍 유무에 관계없이 생명과학, 의학, 약학 분야에 적용하여 형광 표지자로 이용이 가능한 플라빈 기반 형광 단백질 (Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))이 발견되었으나, 상기 플라빈 기반 형광 단백질(Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))은 형광의 세기가 높지 않아 사용하기가 어렵다는 단점이 있다.

[0009]

[0010] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 산소의 존재나 산소결핍 유무에 관계없이 생명과학, 의학, 약학 등의 분야에서 널리 활용될 수 있는 플라빈 기반 형광 단백질 (Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))을 발굴하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)로부터 유래한 LOV 단백질의 변이체인 iLOV 단백질을 기반으로 일부 아미노산 서열을 다른 아미노산 서열로 치환하여 최적화함으로써 LOV 또는 iLOV 단백질 보다 형광세기가 크게 향상된 변이체를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체를 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자를 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는데 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공하는데 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 iLOV 변이체, 핵산분자 또는 벡터를 포함하는 형광 발색용 조성물을 제공하는데 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 목적 단백질의 발현을 분석하는 방법을 제공하는데 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터를 발현시켜 목적 단백질을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된 목적 단백질을 분리하는 단계;를 포함하는 목적 단백질의 분리정제 방법을 제공하는데 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 iLOV 변이체의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 목적은 iLOV 변이체의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

[0024] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0026] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체를 제공한다.

[0028] 본 발명자들은 산소의 존재나 산소결핍 유무에 관계없이 생명과학, 의학, 약학 등의 분야에서 널리 활용될 수 있는 플라빈 기반 형광 단백질 (Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))을 발굴하고자 예의 노력을 한 결과, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)로부터 유래한 LOV 단백질의 변이체인 iLOV 단백질을 기반으로 일부 아미노산 서열을 다른 아미노산 서열로 치환하여 최적화함으로써 LOV 또는 iLOV 단백질 보다 형광세기가 크게 향상

된 변이체를 확인하였다.

[0030] 본 명세서에서 용어 “LOV 단백질” 또는 “LOV protein”은 고등식물, 미세조류(microalgae), 곰팡이 및 박테리아 등에 있어서 환경 조건을 감지하는 센서 도메인을 의미하며, Light-oxygen-voltage의 약자에 해당한다. 본 발명에서는 상기 LOV 단백질은 바람직하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 플라빈 기반 형광 단백질 (Flavin-based fluorescent proteins (FbFPs))이며, 보다 바람직하게는 서열목록 제1서열을 포함한다.

[0031] 본 명세서에서 용어 “iLOV 단백질”, “iLOV protein” 또는 “flavoprotein improved LOV”은 상기 LOV 단백질의 변이체를 의미하며, 바람직하게는 서열목록 제1서열의 아미노산 서열에서 8번째, 23번째, 40번째, 66번째, 84번째 및 89번째 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것이며, 보다 바람직하게는 서열목록 제2서열을 포함한다.

[0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열의 일부를 포함하며, 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 5번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 Y(Tyrosine)로 치환된 것을 포함한다.

[0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 5번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 Y(Tyrosine)로 치환 및 추가적으로 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 79번째 아미노산인 K(Lysine)가 E(Glutamate)로; 84번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 L(Leucine)로; 91번째 아미노산인 D(Aspartate)가 N(Asparagine)으로; 및 104번째 아미노산인 L(Leucine)이 Q(Glutamine)로 치환된 것을 포함한다.

[0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 5번째 아미노산인 F(Phenylalanine)가 Y(Tyrosine)로 치환 및 추가적으로 서열목록 제2서열의 iLOV의 아미노산 서열 중 29번째 아미노산인 E(Glutamate)가 G(Glycine)로, 78번째 아미노산인 K(Lysine)가 R(Arginine)로; 및 109번째 아미노산인 H(Histidine)가 R(Arginine)로 치환된 것을 포함한다.

[0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 서열목록 제3서열 또는 제4서열의 아미노산 서열을 포함한다.

[0036] 본 발명의 iLOV 변이체는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 LOV 단백질의 변이체인 iLOV 단백질과 비교하여 10% 이상, 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 더 바람직하게는 40% 이상, 가장 바람직하게는 50% 이상 형광 세기가 증가된 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체들은 iLOV 단백질과 비교하여 93% 내지 277% 증가된 형광 세기를 나타내었다(도 4).

[0038] 본 발명의 iLOV 변이체는 또한 상기 LOV 단백질 또는 iLOV 단백질과 비교하여 증가된 양자수율을 나타낸다.

[0039] 양자수율(quantum yield)은 빛의 흡수에 이어 일어나는 발광 또는 광전자 방출 등에서, 흡수한 광자의 수에 대하여 방출한 광자의 수 또는 광전자 수의 비율을 나타내는 값이다. 즉 양자수율이 높을수록 흡수한 빛 광자가 다시 방출되는 광자로 전환율이 높은 것을 의미한다. 따라서 양자수율이 높은 단백질은 결국 밝은 형광단백질임을 나타낸다. 양자수율이 높은 형광단백질은 적은양이 있어도 형광이 상대적으로 높게 측정될 수 있으며 이는 민감도 증가로 연결된다.

[0040] 본 발명의 iLOV 변이체는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 LOV 단백또는 이의 변이체인 iLOV 단백질과 비교하여 4% 이상, 바람직하게는 5% 이상, 보다 바람직하게는 6% 이상, 보다 더 바람직하게는 7% 이상, 가장 바람직하게는 8% 이상 양자수율이 증가된 것을 특징으로 한다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체들은 iLOV 단백질과 비교하여 8% 내지 22% 증가된 양자수율을 나타내었다(도 7).

[0042] 또한, 본 발명의 iLOV 변이체는 상기 LOV 단백질 또는 iLOV 단백질과 비교하여 증가된 열적 안정성을 나타낸다.

[0043] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 iLOV 변이체는 온도가 크게 증가(45℃)되었음에도 불구하고, 높은 열적 안정성을 나타내어(도 8), 높은 온도 조건에서도 활용이 가능한 장점을 갖는다.

[0044] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자, 이를 포함하는 벡터 또는 상

기 벡터를 포함하는 숙주세포를 제공한다.

[0045] 본 발명의 핵산분자는 단리된 것이거나 재조합된 것일 수 있으며, 단일쇄 및 이중쇄 형태의 DNA 및 RNA뿐만 아니라 대응하는 상보성 서열이 포함된다. "단리된 핵산"은 천연 생성 원천에서 단리된 핵산의 경우, 핵산이 단리된 개체의 게놈에 존재하는 주변 유전 서열로부터 분리된 핵산이다. 주형으로부터 효소적으로 또는 화학적으로 합성된 핵산, 예컨대 PCR 산물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오타이드의 경우, 이러한 절차로부터 생성된 핵산이 단리된 핵산분자로 이해될 수 있다. 단리된 핵산분자는 별도 단편의 형태 또는 더 큰 핵산 구축물의 성분으로서의 핵산 분자를 나타낸다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들면, 전서열 또는 분비 리더(leader)의 DNA는 폴리펩타이드가 분비되기 전의 형태인 전단백질(preprotein)로서 발현되는 경우 폴리펩타이드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 폴리펩타이드 서열의 전사에 영향을 주는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 배치될 때 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로 "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우 인접하여 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나 인핸서는 인접하여 위치할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 방법에 따라 사용한다.

[0046] 본 명세서에서 용어 "벡터"는 핵산 서열을 복제할 수 있는 세포로의 도입을 위해서 핵산 서열을 삽입할 수 있는 전달체를 의미한다. 핵산 서열은 외생(exogenous) 또는 이종(heterologous)일 수 있다. 벡터로서는 플라스미드, 코스미드 및 바이러스(예를 들면 박테리오파지, AAV 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 당업자는 표준적인 재조합 기술에 의해 벡터를 구축할 수 있다(Maniatis, et al., *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988; 및 Ausubel et al., In: *Current Protocols in Molecular Biology*, John, Wiley & Sons, Inc, NY, 1994 등).

[0047] 본 명세서에서 용어 "발현 벡터"는 전사되는 유전자 산물 중 적어도 일부분을 코딩하는 핵산 서열을 포함한 벡터를 의미한다. 일부의 경우에는 그 후 RNA 분자가 단백질, 폴리펩타이드, 또는 펩타이드로 번역된다. 발현 벡터에는 다양한 조절서열을 포함할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절서열과 함께 벡터 및 발현 벡터에는 또 다른 기능도 제공하는 핵산 서열도 포함될 수 있다.

[0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 벡터는 상기 핵산분자를 리포터 유전자로서 포함하며, 발현하고자 하는 목적 단백질을 추가로 포함한다.

[0049] 본 명세서에서 용어 “목적 단백질” 또는 “target protein”은 적당한 숙주세포를 이용하여 이를 확인 또는 생산하고자 하는 단백질을 의미한다.

[0050] 본 발명의 핵산분자를 리포터 유전자로 활용할 경우, 상기 목적 단백질의 발현 여부를 형광으로 분석함으로써 상기 목적 단백질의 발현을 분석하거나 목적 단백질을 생산하여 이를 용이하게 분리정제하는데 활용할 수 있다.

[0051] 본 명세서에서 용어 "숙주세포"는 진핵생물 및 원핵생물을 포함하며, 상기 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 코딩되는 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질 전환 가능한 생물을 의미한다. 숙주세포는 상기 벡터에 의해 형질감염(transfected) 또는 형질전환(transformed) 될 수 있으며, 이는 외생의 핵산분자가 숙주세포 내에 전달되거나 도입되는 과정을 의미한다.

[0052] 본 발명의 숙주세포는 바람직하게는 세균(bacteria)세포, 이스트(yeast), 포유동물 세포(CHO 세포, HeLa 세포, HEK293 세포, BHK 세포, COS7 세포, COP5 세포, A549 세포, NIH3T3 세포, MDCK 세포, WI38 세포 등)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 iLOV 변이체, 상기 핵산분자 또는 상기 벡터를 포함하는 형광 발색용 조성물을 제공한다.

[0056] 상기 형광발생용 조성물은 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 발현된 목적 단백질을 분리정제거나, 특정 조직, 세포 또는 분자를 이미징하기 위한 키트에 포함되어 제작될 수도 있다.

[0058] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 벡터를 발현시키는 단계를 포함하는 목적 단백질의 발현을 분석하는 방법을 제공한다.

[0060] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 벡터를 발현시켜 목적 단백질을 생성시키는 단계; 및 상기 생성된

목적 단백질을 분리하는 단계;를 포함하는 목적 단백질의 분리정제 방법을 제공한다.

[0062] 상술한 바와 같이, 본 발명의 핵산분자를 리포터 유전자로 활용할 경우, 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 발현된 목적 단백질을 분리정제하는데 활용할 수 있으며, 본 발명의 iLOV 변이체를 다른 단백질이나 분자에 결합 또는 융합하여 형광을 이용하여 이들의 위치를 확인하거나 정량하는데 활용할 수 있다.

[0064] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 iLOV 변이체의 제조방법을 제공한다:

[0065] a) 상기 iLOV 변이체를 코딩하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주세포를 배양하는 단계; 및

[0066] b) 상기 숙주세포에 의해 발현된 iLOV 변이체를 회수하는 단계.

[0068] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 iLOV 변이체의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0069] a) 상기 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자에 추가적으로 무작위적인 점 돌연변이를 가한 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자의 라이브러리를 구축하는 단계; 및

[0070] b) 상기 라이브러리에서 서열목록 제2서열의 iLOV 단백질 보다 형광세기가 증가된 iLOV 변이체 또는 이를 코딩하는 핵산분자를 선별하는 단계.

[0072] 본 발명의 스크리닝 방법은 형광표지세포분리(FACS) 스크리닝, 또는 유세포 분석 기술을 사용할 수 있다. 유세포 분석을 실시하기 위한 기기는 당업자에게 공지이다. 그러한 기기의 예로는 FACSAria, FACS Star Plus, FACScan 및 FACSort 기기(Becton Dickinson, Foster City, CA), Epics C(Coulter Epics Division, Hialeah, FL), MOFLO(Cytomation, Colorado Springs, Colo.), MOFLO-XDP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN)를 들 수 있다. 일반적으로 유세포 분석 기술에는 액체 시료 중의 세포 또는 다른 입자의 분리가 포함된다. 전형적으로는 유세포 분석기의 목적은 분리된 입자를 이들의 하나 이상의 특성(예를 들면 표지된 리간드 또는 다른 분자의 존재)에 대해서 분석하는 것이다. 입자는 센서에 의해 하나씩 통과되며, 크기, 굴절, 광산란, 불투명도, 조도, 형상, 형광 등에 기초하여 분류된다.

발명의 효과

[0074] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0075] (ⅰ) 본 발명은 iLOV(flavoprotein improved LOV) 대비 형광세기가 증가된 iLOV 변이체를 제공한다.

[0076] (ii) 또한, 본 발명은 iLOV 변이체의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0077] (iii) 본 발명의 iLOV 변이체는 기존의 LOV 단백질 또는 iLOV 단백질 보다 형광세기 및 양자수율이 증가되어 산소의 존재 유무에 상관 없이 목적 단백질의 발현 여부를 확인하거나 발현된 목적 단백질을 분리정제하는데 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0079] 도 1은 iLOV 1, 2차 라이브러리를 이용하여 sorting한 과정을 나타낸다.

도 2는 iLOV 1차 스크리닝 결과로 나온 라이브러리의 enrichment test를 나타낸다.

도 3은 iLOV 2차 스크리닝 결과로 나온 라이브러리의 enrichment test를 나타낸다.

도 4는 iLOV 1, 2차 라이브러리에서 선별된 SH3 및 BR1의 FACS 형광 세기를 나타낸다.

도 5는 iLOV 변이체들의 돌연변이가 도입된 위치를 나타낸다.

도 6은 SH3 및 BR1의 발광형광 패턴 분석을 나타낸다.

도 7은 SH3 및 BR1의 양자 수득률을 나타낸다.

도 8은 SH3 및 BR1의 열적안정성 분석을 나타낸다.

도 9는 SH3 및 BR1의 열적안정성 분석에서 실제 형광 세기를 나타낸다.

도 10은 iLOV 변이체들과 iLOV 및 야생형 LOV의 서열을 비교한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0080] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0082] **실시예**

[0083] **<실시예 1> iLOV 변이체 라이브러리 (library) 제작**

[0084] 애기장대(*arabidopsis thaliana*) 유래의 FMN-based fluorescent protein (iLOV)을 합성하여 *Bam*HI, *Hin*dIII (New England Biolab) restriction enzyme들 site들을 이용하여 PEQ-80 vector (Qiagen)로 옮겨 iLOV 발현용 플라스미드를 완성하였다. 이 플라스미드를 template로 하고 error prone PCR 기법을 이용하여 각각에 변이를 도입하였다. Error prone PCR을 위한 Primer는 5`- CATCACCATCACCATCACGGATCC-3`, 5`-AAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTG-3`를 사용하였고 Error rate은 0.5% error가 들어 갈 수 있도록 조정하여 library insert를 제조하였다. 제조된 library insert를 발현용 vector에 넣기 위해 *Bam*HI, *Hin*dIII (New England Biolab) 제한효소 처리를 하여 같은 제한효소로 처리된 PEQ-80L vector와 ligation을 하였다. 그 후 대장균 Jude1 ((F' [Tn*10*(Tet^{r}) proAB^{+} *lacI*^{q} Δ(*lacZ*)M15] *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)f80d*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 deoR recA1 araD139* Δ(*ara leu*)7697 *galU galKrpsLendA1nupG*)에 transformation 하여 거대 iLOV 변이체 라이브러리를 구축하였다. 또한 1차 발굴한 변이체를 이용하여 2차 라이브러리를 구축하였다.

[0086] **<실시예 2> 박테리아 배양 및 유세포 분리기 (flow cytometry)를 이용한 iLOV 변이체 라이브러리 탐색**

[0087] 구축된 iLOV 변이체 라이브러리 탐색을 위하여 대장균 Jude1 세포에 형질전환되어 있는 변이체 라이브러리 세포 1 ml을 37℃ 250 rpm shaking 조건으로 2% (w/v) glucose에 Antibiotics는 ampicillin (40 μg/mL)이 포함된 Terrific Broth(TB) 배지에 각각 넣어 주고 4시간 배양을 하였다. 진탕배양된 라이브러리 세포를 TB 배지에 1:100으로 접종한 후 37℃ 250 rpm shaking 으로 OD_{600}가 0.5에 도달할 때까지 배양 하였다. 그 후 cooling을 위해 20분 동안 25℃에서 배양한 후 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG)를 넣어 발현유도를 하였다. 배양이 끝난 후 세포를 회수하여 PBS로 두 번 세척한 후 유세포 분리기 (Flow cytometry: S3 sortor (Bio-rad))를 이용하여 높은 형광을 보이는 상위 2% 세포들을 회수하기 위해 sorting을 진행 하였고 형광이 높은 세포들의 순도를 높이기 위해서 sorting 받은 세포들을 다시 resorting하였다. resorting 받은 sample을 바로 ampicillin (40 μg/mL)이 포함된 TB+2% (w/v) glucose에 접종하여 overnight 배양을 하였고 다음 날 ampicillin (40 μg/mL)이 포함된 TB 배지에 1:100으로 접종하여 다음 라운드의 형광이 높은 세포들의 분류작업을 진행하였다. 이와 같은 방법으로 각각의 라이브러리를 4번에 거쳐 sorting 및 resorting을 진행 하였다(도 1). 라운드가 진행됨에 따라 detector의 민감도를 낮추어서 측정하였다(유세포 분리기의 detector의 민감도를 낮추어 좀 더 형광의 세기가 높은 것을 찾을 수 있다). 또한 위와 같은 방법으로 1차 라이브러리에서 발굴된 SH3 기반으로 2차 라이브러리를 구축하여 4번에 거쳐 sorting 및 resorting을 진행 하였다(도 1).

[0089] **<실시예 3> 형광의 향상된 iLOV 변이체 선별**

[0090] iLOV의 1차 2차 라이브러리에서 4라운드의 sorting 및 resroting 과정으로 형광 세기가 향상된 그룹을 얻었는지 확인하였고(도 2 및 3), 확인된 그룹에서 개별 클론들을 분석하여 높은 형광을 보이는 iLOV 변이체들을 유세포 분리기를 이용한 형광 신호를 통하여 확인하였다. 그 중 iLOV의 형광세기 보다 높은 2개의 iLOV 변이체 (SH3, BR1)를 확보할 수 있었다(도 4 및 도 5).

[0092] **<실시예 4> 선별된 iLOV 변이체들의 발광패턴 분석**

[0093] iLOV 변이체들의 발광 패턴을 조사 하였다. 3 μM의 각 정제된 단백질에 450nm의 파장을 이용하여 전자를 들뜨게 하고, 그로 인해서 방출 되는 파장을 측정하였다. 470에서부터 600 nm 사이에 방출 파장을 측정한 결과 495 nm와 520 nm에서 두 개의 피크가 관찰 되었다. iLOV와 그 변이체의 전체적인 형광 패턴은 비슷했으며 SH3 및 BR1의 방출세기가 각각 20%, 70% 향상되었다(도 6).

[0095] **<실시예 5> iLOV 변이체들의 양자수율(quantum yield) 분석**

[0096] 양자수율(quantum yield)은 빛의 흡수에 이어 일어나는 발광 또는 광전자 방출 등에서, 흡수한 광자의 수에 대하여 방출한 광자의 수 또는 광전자 수의 비율을 나타내는 값이다. 즉 양자수율이 높을수록 흡수한 빛 광자가 다시 방출되는 광자로 전환율이 높은 것을 의미한다. 따라서 양자수율이 높은 단백질은 결국 밝은 형광단백질

임을 나타낸다. 양자수율이 높은 형광단백질은 적은양이 있어도 형광이 상대적으로 높게 측정될 수 있으며 이는 민감도 증가로 연결된다. Fluorescein을 기준 물질로 이용하여 iLOV 변이체의 양자수율을 측정하였다. 야생형 iLOV는 양자수율이 0.37인 것과 비교하여 SH3 및 BR1은 각각 0.40 및 0.45로 향상된 양자수율을 보였다(도 7).

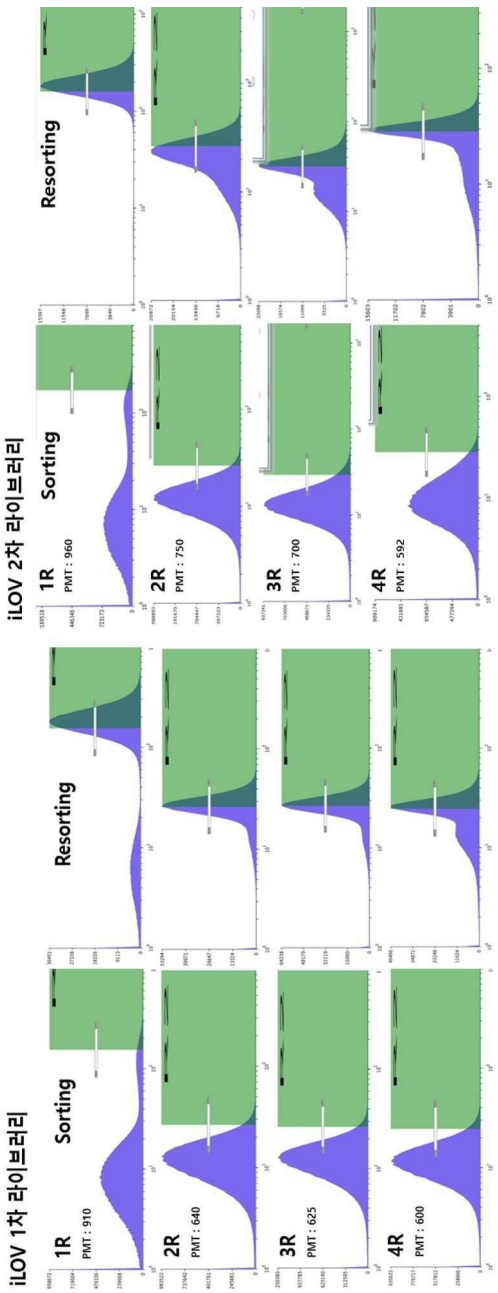
[0098] **<실시예 6> iLOV 변이체들의 열적안정성 분석**

[0099] 선별된 iLOV 변이체들의 열적 안정성을 측정해 보았다. 열적 안정성 실험은 단백질을 3 μM에서 37℃ 또는 45℃에서 노출시킨 뒤. 일정한 시간이 지나면 샘플을 취한 뒤 남아있는 형광단백질의 밝기를 측정하였다. 이때 형광단백질의 밝기가 온도에 의해서 영향을 받기 때문에 모든 측정에서 각 샘플은 25℃의 항온조에 30초간 인큐베이션 한 뒤 25℃로 온도가 고정된 큐벳에서 형광의 밝기를 측정하였다. 이때 샘플은 450 nm의 파장으로 들뜨게 하였고 495 nm의 발광을 측정하였다. iLOV와 비교하여 SH3는 열적안정성이 향상된 결과를 보였고 BR1은 낮은 열적안정성을 보였다(도 8). 하지만 BR1은 여전히 높은 형광 세기를 보였다(도 9).

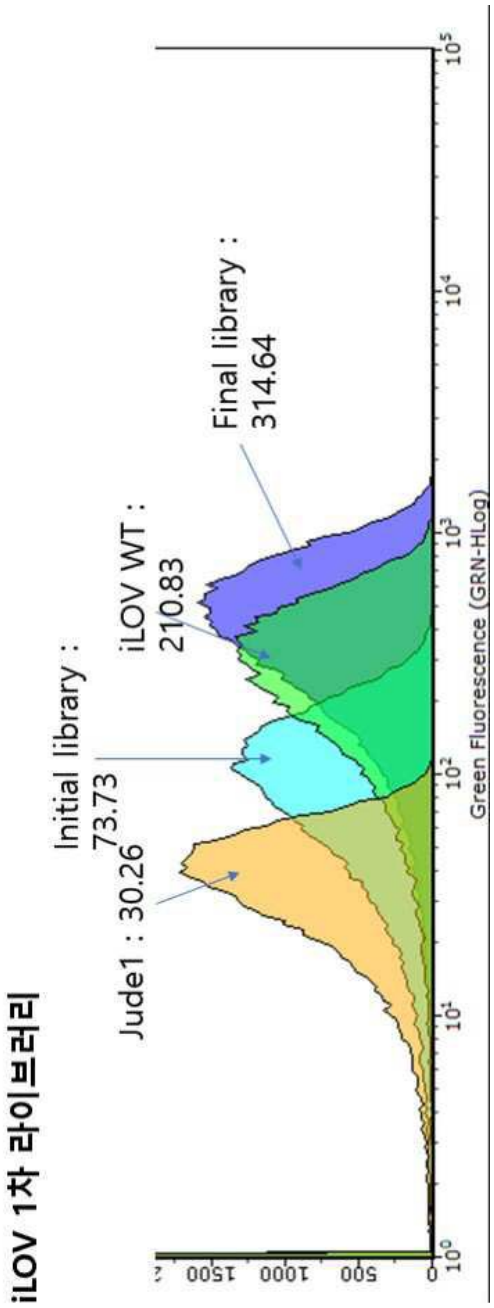
[0101] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

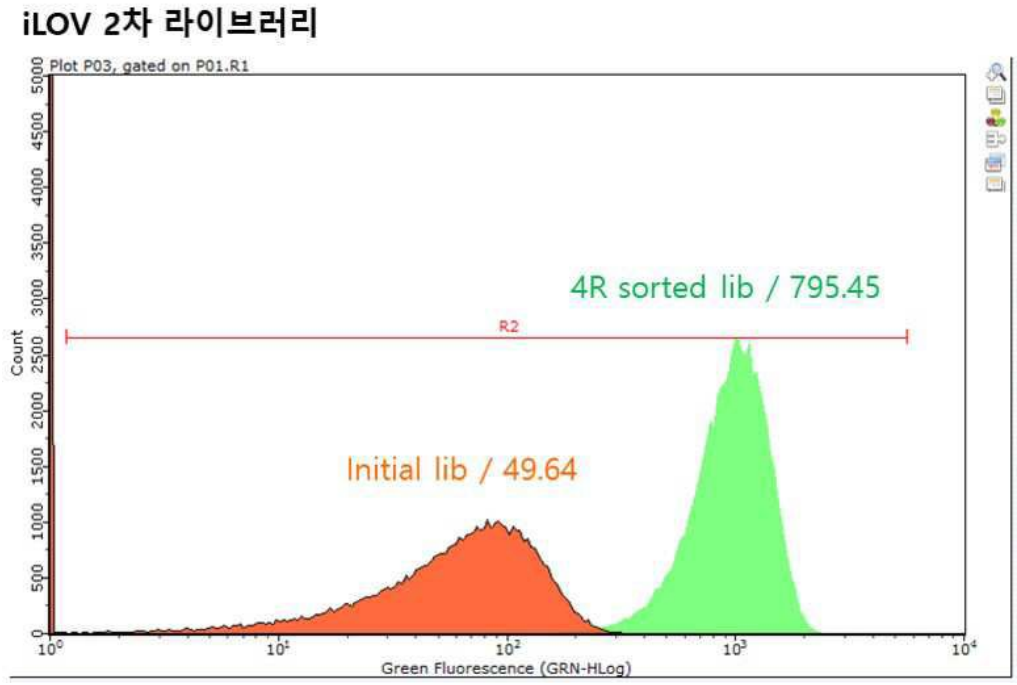
도면1


iLOV 1차 라이브러리
Sorting
Resorting
1R
PMT : 910
2R
PMT : 640
3R
PMT : 625
4R
PMT : 600
iLOV 2차 라이브러리
Sorting
Resorting
1R
PMT : 960
2R
PMT : 750
3R
PMT : 700
4R
PMT : 592

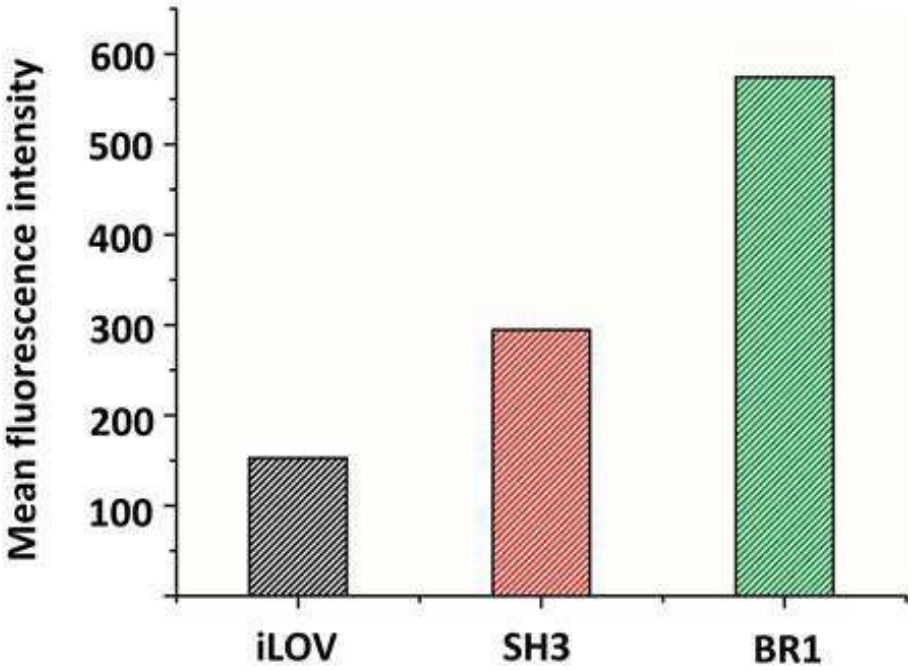
도면2


iLOV 1차 라이브러리
Initial library :
73.73
Jude1 : 30.26
iLOV WT :
210.83
Final library :
314.64
Green Fluorescence (GRN-HLog)
0
500
1000
1500
10^0
10^1
10^2
10^3
10^4
10^5

도면3



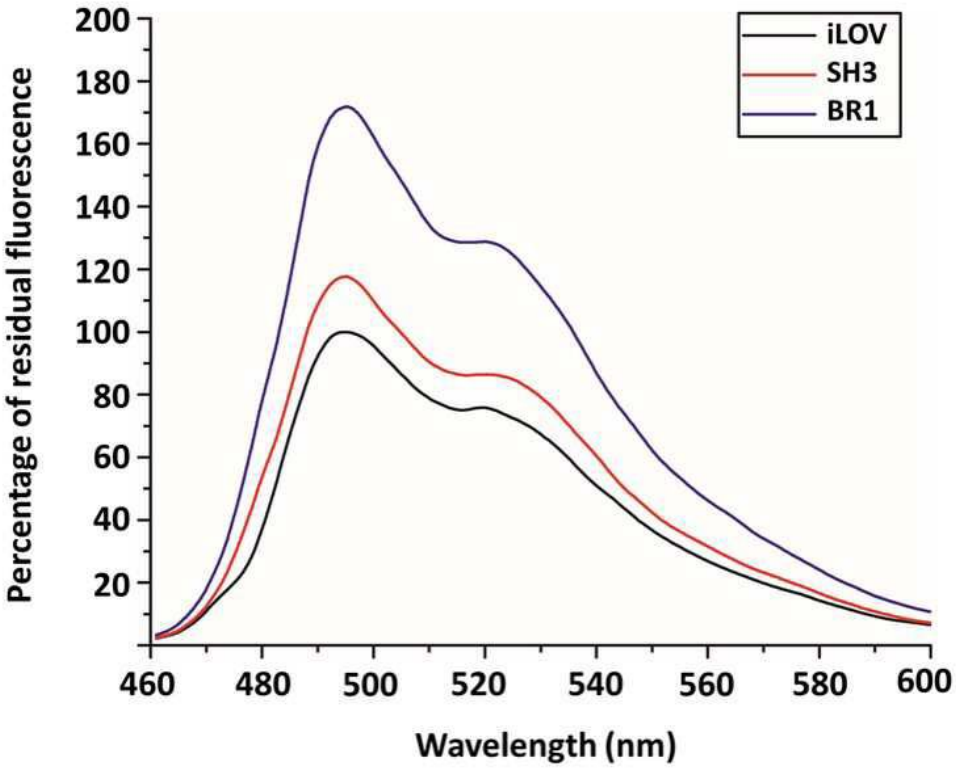
도면4



도면5

	돌연변이가 도입된 부분
SH3	F5Y, S8T, S23G, C40A, I66T, K79E, M89V, D91N, L104Q
BR1	F5Y, S8T, S23G, E29G, C40A, I66T K78R, F84L, M89V, H109R

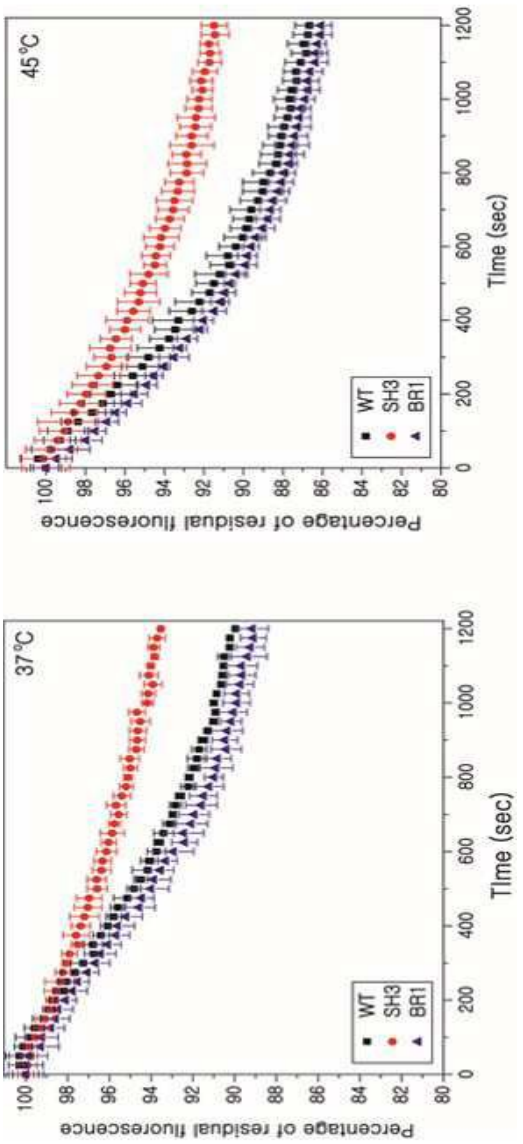
도면6



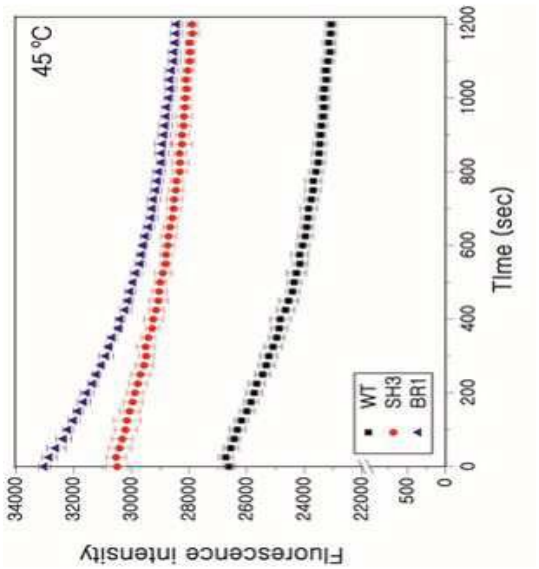
도면7

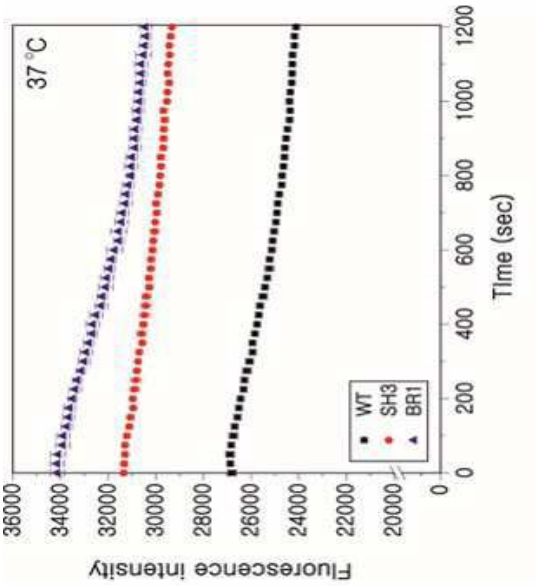
Name	Quantum Yield	Brightness
iLOV	0.37	4625
SH3	0.40	5000
BR1	0.45	5625

도면8

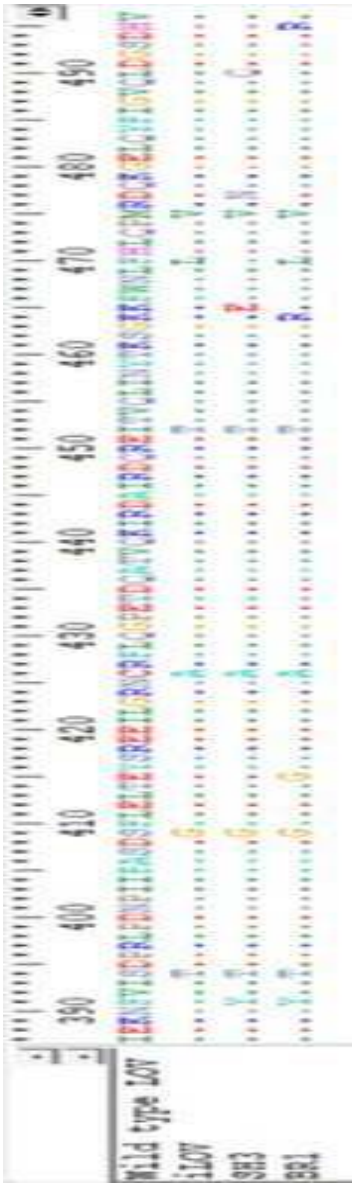

45°C
37°C
Percentage of residual fluorescence
Time (sec)
WT
SH3
BR1
100
98
96
94
92
90
88
86
84
82
80
0
200
400
600
800
1000
1200

도면9


45 °C
Fluorescence intensity
Time (sec)
WT
SH3
BR1


37 °C
Fluorescence intensity
Time (sec)
WT
SH3
BR1

도면10



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Flavin mononucleotide binding protein variants derived from Arabidopsis thaliana with enhanced fluorescence intensity

<130> HP8876

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 110

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Ile Glu Lys Asn Phe Val Ile Ser Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asn Pro
1 5 10 15

Ile Ile Phe Ala Ser Asp Ser Phe Leu Glu Leu Thr Glu Tyr Ser Arg
20 25 30

Glu Glu Ile Leu Gly Arg Asn Cys Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr
35 40 45

Asp Gln Ala Thr Val Gln Lys Ile Arg Asp Ala Ile Arg Asp Gln Arg
50 55 60

Glu Ile Thr Val Gln Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Lys Phe
65 70 75 80

Trp Asn Leu Phe His Leu Gln Pro Met Arg Asp Gln Lys Gly Glu Leu
85 90 95

Gln Tyr Phe Ile Gly Val Gln Leu Asp Gly Ser Asp His Val
100 105 110

<210> 2

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> iLOV

<400> 2

Ile Glu Lys Asn Phe Val Ile Thr Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asn Pro
1 5 10 15

Ile Ile Phe Ala Ser Asp Gly Phe Leu Glu Leu Thr Glu Tyr Ser Arg
20 25 30

Glu Glu Ile Leu Gly Arg Asn Ala Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr
35 40 45

Asp Gln Ala Thr Val Gln Lys Ile Arg Asp Ala Ile Arg Asp Gln Arg
50 55 60

Glu Thr Thr Val Gln Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Lys Phe
65 70 75 80

Trp Asn Leu Leu His Leu Gln Pro Val Arg Asp Gln Lys Gly Glu Leu

85 90 95

Gln Tyr Phe Ile Gly Val Gln Leu Asp Gly Ser Asp His Val

100 105 110

<210> 3

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SH3

<400> 3

Ile Glu Lys Asn Tyr Val Ile Thr Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asn Pro

1 5 10 15

Ile Ile Phe Ala Ser Asp Gly Phe Leu Glu Leu Thr Glu Tyr Ser Arg

20 25 30

Glu Glu Ile Leu Gly Arg Asn Ala Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr

35 40 45

Asp Gln Ala Thr Val Gln Lys Ile Arg Asp Ala Ile Arg Asp Gln Arg

50 55 60

Glu Thr Thr Val Gln Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Lys Glu Phe

65 70 75 80

Trp Asn Leu Phe His Leu Gln Pro Val Arg Asn Gln Lys Gly Glu Leu

85 90 95

Gln Tyr Phe Ile Gly Val Gln Gln Asp Gly Ser Asp His Val

100 105 110

<210> 4

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BR1

<400> 4

Ile Glu Lys Asn Tyr Val Ile Thr Asp Pro Arg Leu Pro Asp Asn Pro

1 5 10 15

Ile Ile Phe Ala Ser Asp Gly Phe Leu Glu Leu Thr Gly Tyr Ser Arg

20 25 30

Glu Glu Ile Leu Gly Arg Asn Ala Arg Phe Leu Gln Gly Pro Glu Thr

35 40 45

Asp Gln Ala Thr Val Gln Lys Ile Arg Asp Ala Ile Arg Asp Gln Arg

50 55 60

Glu Thr Thr Val Gln Leu Ile Asn Tyr Thr Lys Ser Gly Arg Lys Phe

65 70 75 80

Trp Asn Leu Leu His Leu Gln Pro Val Arg Asp Gln Lys Gly Glu Leu

85 90 95

Gln Tyr Phe Ile Gly Val Gln Leu Asp Gly Ser Asp Arg Val

100 105 110

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Error prone PCR primer (forward)

<400> 5

catcaccatc accatcacgg atcc 24

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Error prone PCR primer (reverse)

<400> 6

aagcttaatt agctgagctt ggactcctg 29