



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월11일

(11) 등록번호 10-1500952

(24) 등록일자 2015년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/195 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0042165

(22) 출원일자 2014년04월09일

심사청구일자 2014년04월09일

(56) 선행기술조사문헌

GenBank Accession Number WP_016949128
(2013.06.27.)

GenBank Accession Number WP_009787187
(2013.05.25.)

Beronda L. Montgomery 등. Molecular
Microbiology. Vol. 64, No. 1, 페이지 16-27
(2007.)

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

박연일

대전광역시 유성구 은구비남로 34 열매마을8단지
808동 601호

조성미

대전광역시 유성구 대학로75번길 28

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 8 항

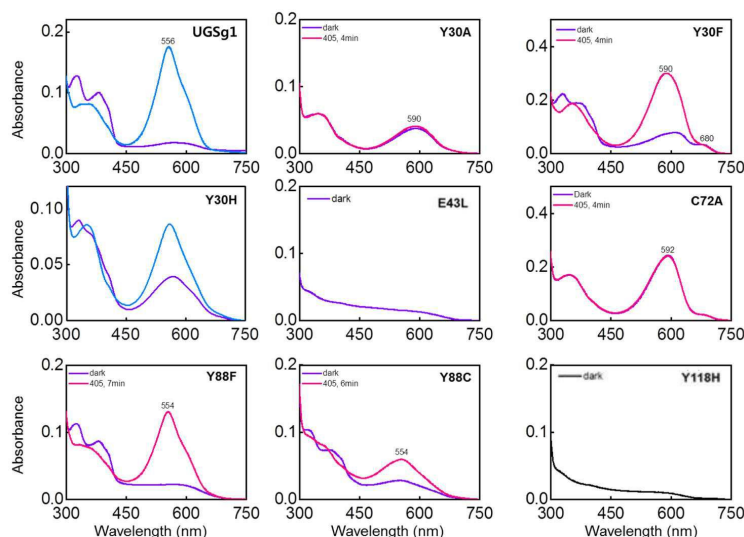
심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 남세균 유래 자외선/녹색 광호변성 색소 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 마이크로콜레우스 종 (*Microcoleus* sp.) 유래의 광수용체 기능을 가지는 GAF (cGMP-specific phosphodiesterase, adenylyl cyclase and FhlA) 도메인 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 마이크로콜레우스 종 유래의 자외선/녹색 광호변성 색소 UGS (UV/Green light photoreversible Sensor) 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포, 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 생산하는 방법, 상기 방법에 의해 생산된 GAF 도메인 또는 UGS 단백질 및 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 유효성분으로 포함하는 자외선 차단용 화장료 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008205

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 차세대유전체 연구사업단

연구사업명 차세대바이오그린21 사업

연구과제명 남세균 유전체 기반 작물형질 개량용 유용유전자원 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.01.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 마이크로콜레우스 종 (*Microcoleus* sp.) 유래의 광수용체 기능을 가지는 GAF (cGMP-specific phosphodiesterase, adenylyl cyclase and FhlA) 도메인.

청구항 2

제1항의 GAF 도메인을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 8

제7항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 9

제7항의 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 GAF 도메인을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 GAF 도메인을 생산하는 방법.

청구항 10

제9항의 방법에 의해 생산된 GAF 도메인.

청구항 11

제10항의 GAF 도메인을 유효성분으로 포함하는 자외선 차단용 화장품 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 남세균 유래 자외선/녹색 광호변성 색소 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 마이크로콜레우스 종 (*Microcoleus* sp.) 유래의 광수용체 기능을 가지는 GAF (cGMP-specific phosphodiesterase, adenylyl cyclase and FhlA) 도메인 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 마이크로콜레우스 종 유래의 자외선/녹색 광호변성 색소 UGS (UV/Green light photoreversible Sensor) 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포, 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 생산하는 방법, 상기 방법에 의해 생산된 GAF 도메인 또는 UGS 단백질 및 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 유효성분으로 포함하는 자외선 차단용 화장품 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 빛은 광합성을 통해 식물체에 에너지를 제공할 뿐만 아니라 외부 자극원으로서 식물의 환경 적응 및 생존에 직접적인 영향을 준다. 산소발생형 광합성 생물 중 피코에리트린(phycoerythrin)을 광수확 색소로 가지고 있지 않은 남세균, 엽록소 b를 보조색소로 갖는 녹조류와 육상 고등식물은 청색광과 적색광을 광합성의 주요 광원으로 사용하지만, 자외선과 녹색광은 엽록체에 의해 흡수되지 못하기 때문에 광합성에 이용될 수 없다. 따라서 피코에리트린이 없는 남세균, 녹조류와 육상 고등식물이 자외선과 녹색광을 흡수할 경우 광합성 빛 이용효율을 현저하게 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다.
- [0003] 식물에서 나타나는 대표적인 광수용체로는 피토크롬(phytochrome)과 크립토크롬(cryptochrome)을 들 수 있다. 식물과 조류의 세포질에 존재하는 피토크롬은 빛의 질적인 면을 인지하여 분자적인 반응을 야기한다. 피토크롬은 적색광과 원적색광을 흡수하여 개화나 발아와 같은 광주기와 관련된 기작을 조절한다. 이러한 피토크롬은 약 120kDa의 크기를 갖는 단백질이며 아미노-말단에 빛을 인지하는 부분으로서 발색단(chromophore)이 결합하는 부위를 갖고, 카복시-말단 부위에는 히스티딘 키나제 도메인(histidine kinase domain)을 갖는다. 피토크롬의 발색단은 개방형 사슬의 테트라피롤(open-chain tetrapyrrole) 구조를 갖는다. 남세균 중 시네코시스티스 종(*Synechocystis* sp.) PCC6803에서 알려진 광수용체로는 Cph I (cyanobacteria phytochrome I; slr0473 위치), CphII (cyanobacteria phytochrome II; sl10821 위치) 및 plpA (cyanobacteria phytochrome III; sl11124 위치)가 있다.
- [0004] 이 중에서 지금까지 잘 알려진 Cph I 은 일반적인 식물의 피토크롬과 유사한 구조를 갖는 반면 CphII는 약간 다른 구조적 차이를 보인다. CphII는 145kDa의 크기이며 아미노-말단 부위에는 식물 피토크롬의 아미노-말단 부위와 유사한 아미노산 서열이 존재하지만, 카복시-말단 부위에는 키나제 도메인이 존재하지 않는다.
- [0005] 한편, 최근 들어 남세균을 대상으로 광수용체를 규명하려는 연구가 시도되었는데, 그 결과 남세균인 시네코시스티스 종(*Synechocystis* sp.) PCC6803과 노스톡 평티포르메(*Nostoc punctiforme*, ATCC 29133)에서 자외선, 청색, 녹색, 오렌지, 및 적색을 흡수하는 광수용체 시아노박테리오크롬(CBCR, cyanobacteriochrome)이 다수 보고되었다.
- [0006] 다수의 남세균 유래 광수확 단백질은 약 30kDa으로 크기가 작고 흡수할 수 있는 영역이 자외선에서 적외선에 이르기까지 넓다. 생물체 유래 재생성 자외선 차단제 조성물은 재생성이 획기적으로 개선되고 환경 친화적이며, 자외선의 효과적인 차단효과도 볼 수 있는 우수한 제품을 제조할 수 있다.
- [0007] 한편, 한국등록특허 제1256475호에는 '남세균 피토크롬 단백질을 함유하는 자외선-특이적 광수용체'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0969325호에는 '홍조류로부터 비독성 자외선 차단용 추출물을 제조하는 방법 및 이를 이용한 비독성 자외선 차단제'가 개시되어 있으나, 본 발명의 남세균 유래 자외선/녹색 광호변성 색소 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 마이크로콜레우스 종(*Microcoleus* sp.) 유래 광수확 색소 단백질 UGS를 분리 및 동정하고, UGS 단백질 구성 요소 중 GAF 도메인이 자외선/녹색광 가역적인 광수용체 기능이 있음을 확인하였다. GAF 도메인의 아미노산 잔기 치환에 의한 8종의 변이체 연구를 통해 발색단과 GAF 도메인과의 결합 환경을 결정하는 잔기, 발색단의 광전환 성질을 부여하는 잔기 등 주요 위치들을 분석하고, 야생형과 아미노산 변이체 각각의 분광학적 특성을 확인하여 본 발명의 GAF 도메인 및 상기 도메인을 포함하는 UGS 단백질이 신규한 자외선/녹색 광호변성 색소인 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 마이크로콜레우스 종(*Microcoleus* sp.) 유래의 광수용체 기능을 가지는 GAF (cGMP-specific phosphodiesterase, adenylyl cyclase and Fh1A) 도메인 및 상기 도메인을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진, 마이크로콜레우스 종 유래의 자외선/녹색 광호변성 색소 UGS (UV/Green light photoreversible Sensor) 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

- [0011] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 유효성분으로 포함하는 자외선 차단용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명에 따르면, 남세균 마이크로콜레우스 종 (*Microcoleus* sp.) 유래의 자외선/녹색 광호변성 색소 UGS 단백질 및 상기 단백질 구성 요소 중 광수용체 기능을 가지는 GAF 도메인은 자외선과 녹색광을 흡수할 수 있는 새로운 광수확 색소로서, 상기 색소를 생물 유래 자외선 차단제의 생산 원료로 이용하거나, 가시광선 중 녹색광을 광합성 에너지 변환에 이용하지 못하는 남세균, 녹조류, 고등식물 등에 도입하여 빛 에너지 전환 효율 증가를 통한 작물의 생산성 제고에 이용할 수 있으므로, 본 발명의 신규한 색소 단백질은 산업적으로 매우 유용할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 마이크로콜레우스 유래 UGS 단백질의 도메인 구조와 잘 보존된 시스테인 모티프를 보여주는 그림이다. (a)는 1개의 GAF 도메인과 1개의 히스티딘 키나제(HisKA), 히스티딘 ATP 가수분해효소(HATPase), 수신자 도메인(REC, receiver domain)으로 구성되어 있는 UGS 단백질 모식도이다. (b)는 자외선/녹색 광수용체 MbL3738g1(UGSg1), MbR3854g4, NpF2164g3, slr1212 및 slr1393g3 단백질의 GAF 도메인 아미노산 서열을 나타낸 것으로 시스테인 모티프에 CY 잔기가 보존되어 있고, 아스파르트산 모티프에 DTYL이 보존되어 있는 것을 보여주는 그림이다. 삽입된 시스테인은 각 단백질에서 서로 다른 위치에 존재한다.
- 도 2는 피코시아노빌린(PCB)을 생산하는 대장균으로부터 분리된 GAF 도메인의 아미노산이 치환된 재조합 단백질 His6UGSg1, His6UGSg1-Y30A, His6UGSg1-Y30F, His6UGSg1-E43L, His6UGSg1-C72A, His6UGSg1-Y88F, His6UGSg1-Y88C 및 His6UGSg1-Y118H 용액의 사진이다.
- 도 3은 피코시아노빌린(PCB)을 생산하는 대장균에서 분리된 UGSg1과 아미노산 변이체 Y30A, Y30F, Y30H, E43L, C72A, Y88C, Y88F 및 Y118H의 쿠마시 브릴리언트 블루(CBB) 염색과 아연(Zn^{2+})-의존적인 형광발광을 보여주는 사진이다.
- 도 4는 마이크로콜레우스 유래 재조합 단백질 UGSg1과 8종의 아미노산 변이체의 분광학적 특성을 보여주는 그래프(4a), UGSg1의 단백질 구조변화 후의 흡수 차이 그래프(4b) 및 UGSg1과 8종의 아미노산 변이체의 실온 방출 형광 스펙트럼(4c)을 나타낸 것이다.
- 도 5는 pBAD/mycHisC 벡터에 GAF 도메인(*UGSg1*)의 염기서열이 연결된 재조합 플라스미드의 벡터 맵을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 마이크로콜레우스 종 (*Microcoleus* sp.) 유래의 광수용체 기능을 가지는 GAF (cGMP-specific phosphodiesterase, adenylyl cyclase and Fh1A) 도메인 및 상기 도메인을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0018] 본 발명에 따른 GAF 도메인 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리 활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [0019] 본 발명에 따른 상기 GAF 도메인을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95%

이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진, 마이크로콜레우스 중 유래의 자외선/녹색 광호변성 색소 UGS (UV/Green light photoreversible Sensor) 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0021] 본 발명에 따른 UGS 단백질의 범위는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 4로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 상기 UGS 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함되는데, 구체적으로는 전술한 내용과 같다.

[0023] 본 발명의 상기 UGS 단백질은 전술한 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 GAF 도메인을 구성 요소로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 GAF 도메인을 코딩하는 유전자 또는 UGS 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0025] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0026] 본 발명에서, 상기 GAF 도메인을 코딩하는 유전자 또는 UGS 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.

[0027] GAF 도메인을 코딩하는 유전자 또는 UGS 단백질을 코딩하는 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장대균과 균주 등이 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 숙주세포에서, 상기 숙주세포는 피코시아노빌린(PCB) 발색단을 형성하는 단백질 발현용 대장균(LMG-pPL-PCB)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍

스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

- [0032] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일 구현 예에 따른 숙주세포에서, 상기 숙주세포는 피코시아노빌린(PCB) 발색단을 형성하는 단백질 발현용 대장균(LMG-pPL-PCB)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 유효성분으로 포함하는 자외선 차단용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 자외선 차단용 화장품 조성물은 마이크로콜레우스 종 (*Microcoleus* sp.) 유래 GAF 도메인 또는 UGS 단백질을 유효성분으로 포함하며, 상기 GAF 도메인 또는 UGS 단백질은 자외선을 흡수하는 능력이 있으므로, 흡수형 자외선 차단제 제품의 원료로 이용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 화장품 조성물에는 상기 유효성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 크림, 로션, 스프레이타입, 고형타입, 젤타입, 무스타입, 파운데이션, 또는 파우더타입의 화장품 제형으로 제조될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로 히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0042] 본 발명의 화장품 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] 재료 및 방법

[0045] 1. 마이크로콜레우스 B353 균주 배양

[0046] 흔들말목 (*Oscillatoriales*)의 마이크로콜레우스 종 (*Microcoleus* sp.) B353은 러시아 Khilganta의 탄산호수에서 채집되어진 사상형의 남세균으로서, 담수나 해수에 분포하는 대부분의 남세균과는 달리 고알칼리 및 고염도의 환경에 적응하여 생육이 가능한 세균이다. 본 발명에 사용할 마이크로콜레우스 종 IPPAS-B353는 러시아 아카데미 식물생리학 연구소 미세조류 은행(Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Science, Moscow; GenBank ac. no. DQ222209)으로부터 제공받았다.

[0047] 마이크로콜레우스 B353 균주는 백색광($20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)하에 30°C 온도 조건으로 한천배지(KCl 1.0g/l ; NaHCO_3 16.8g/l ; K_2HPO_4 0.5g/l ; NaNO_3 2.5g/l ; K_2SO_4 1.0g/l ; NaCl 30g/l ; MgSO_4 0.1g/l ; CaCl_2 0.04g/l ; FeSO_4 0.01g/l ; EDTA 0.08g/l ; Trace metal (A5+Co) 1ml ; pH 9.8; 2% Agar)에서 배양하였다.

[0048] 2. 게놈 DNA 분리 및 자외선/녹색광 호변성 색소(UGS) GAF 도메인 클로닝

[0049] 게놈 DNA 분리는 지수 생장기의 마이크로콜레우스 B353 세포를 원심분리($3,500\text{rpm}$, 15분, 4°C) 하여 세포를 수확한 후 $200\mu\text{l}$ TEN 완충액(10mM Tris-Cl, 150mM NaCl 및 100mM EDTA)에 현탁시켰다. 여기에 $10\mu\text{l}$ 리소자임(20mg/ml)을 첨가하여 37°C 에서 15분 반응시켜 세포를 파괴한 뒤, 10% SDS $5\mu\text{l}$ 을 첨가하여 흔들어 주었다. 이 반응물질에 $5\mu\text{l}$ 프로테아제 K($20\mu\text{g/ml}$)을 첨가하고 60°C 에서 1시간 반응시킨 후 $400\mu\text{l}$ 페놀을 첨가한 뒤, 원심분리($3,500\text{rpm}$, 3분, 상온)하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 상등액과 동일량의 페놀:클로로포름:아이소아밀 알코올을 첨가하여 상온에서 3-5분 흔들어 주었다. 다시 원심분리($3,500\text{rpm}$, 3분, 상온)한 후, 얻어진 상등액은 $20\mu\text{l}$ 3M 아세트산나트륨(pH 5.2), $400\mu\text{l}$ 에탄올과 혼합한 뒤, 원심분리($3,500\text{rpm}$, 3분, 상온)를 통해 DNA만 수득하였다.

[0050] UGS(UV/Green light photoreversible Sensor)의 GAF 도메인을 클로닝하기 위해, 먼저 각 GAF 도메인의 단백질 서열이 보존될 수 있도록 프라이머(하기 표 1 참조)를 제작하였으며 이때 양 말단에 어댑터로서 제한효소 인식 부위를 삽입하였다. 사용되어진 제한효소는 클로닝하고자 하는 염기서열 내에 존재하지 않는 것으로 선택하였으며, 본 연구에는 *Pst*I와 *Eco*RI를 사용하였다. 제작된 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 통하여 각 GAF 도메인을 코딩할 수 있는 각각의 염기서열 절편을 얻었다. 이후 DH5a 대장균에 서브클로닝(subcloning)을 하여 벡터 pBAD/mycHisC (Invitrogen, 미국)와 중합효소 연쇄반응을 통해 얻어진 각각의 GAF 도메인의 염기서열이 연결된 재조합 플라스미드를 얻었다(도 5). 이후, 플라스미드를 추출하고 염기서열분석법을 통해 제작된 플라스미드 내에 염기서열이 정확하게 삽입되었는지 확인하였다. 목적하는 서열이 보존되었는지 최종 확인한 후, 피코시아노빌린(PCB, phycocyanobilin) 발색단을 형성하는 단백질 발현용 대장균(LMG-pPL-PCB)에 형질전환하였다.

표 1

[0051] PCR용 프라이머 서열정보

유전자	프라이머	서열정보(5'→3') (서열번호)
MbL3738g1	정방향	CATCTGCAGTGCAGCAAACCCCTCGATCTC (5)
	역방향	CATGAATTCAGCCAGGAACCTCACTTTTA (6)
MbL3738 Y30A	정방향	TCTCGTCGCACGCTTTTTC (7)
	역방향	GGAAAAAGCGTGCAGACGAGAA (8)
MbL3738 Y30H	정방향	TCTCGTCCACCGCTTTTTC (9)
	역방향	GGAAAAAGCGTGGACGAGAA (10)
MbL3738 Y30F	정방향	TCTCGTCTTTGCTTTTTC (11)
	역방향	GGAAAAAGCGAAAGACGAGAA (12)
MbL3738 E43L	정방향	TGTCGCTTTGTCCGTCACCTCC (13)
	역방향	GGTGACGGACAAAGCGACATAGGT (14)
MbL3738 C72A	정방향	GACTCGATGCCAGTGCAGTGAA (15)
	역방향	CACTCGCACTGGCATCGAGTC (16)
MbL3738 Y88F	정방향	TCAAGATACCTTTCTACAAGA (17)
	역방향	TCTGTAGAAAGGTATCTTGA (18)
MbL3738 Y88C	정방향	GTTCAAGATACCTGCCTACAAGA (19)
	역방향	TCTGTAGGCAGGTATCTTGAAC (20)
MbL3738 Y118H	정방향	GCGGGTTTGTACTGCCATCTA (21)
	역방향	CTAACAGCCCTAGATGGCAGTC (22)

[0052] 3. PCB 생성 대장균에서 자외선/녹색광 호변성 색소(UGS) GAF 도메인 발현 및 순수분리

[0053] 형질전환된 단백질 발현용 대장균은 RM 액체배지(2% casamino acids; 1X M9 salts; 1mM MgCl_2 ; 0.2% Glucose; 0.1mM Thiamine) 100ml 에 항생제 앰피실린($200\mu\text{g/l}$)과 카나마이신($50\mu\text{g/l}$)을 첨가하고 $\text{OD}_{600}=0.1$ 이 되도록 접

중하여 OD₆₀₀=0.4~0.6이 될 때까지 37℃에서 배양하였다. LB배지 500ml에 RM배지 100ml을 첨가하고 배양한 단백질을 발현용 대장균을 섞어준 뒤, FAC 25 μM, ALA 25 μM, IPTG 0.1mM, 엠퍼실린 200μg/ℓ 및 카나마이신 50μg/ℓ를 첨가하여 28℃에서 1시간 배양하였다. 0.2% 아라비노스를 처리하여 28℃에서 5시간 배양한 뒤, 7000rpm, 4℃에서 원심분리하여 단백질 발현용 대장균을 수확하고 -70℃에 세포를 냉동 보관하였다. 단백질을 추출하는 모든 과정은 4℃, 암조건에서 수행하도록 하였다. 세포용해용액(50mM Tris (pH 7.85), 100mM NaCl, 10% Glycerol 및 0.1% NP40) 20ml에 Complete, EDTA-free 프로테아제 저해제(Roche, 스위스) 0.5 타블렛, 0.1mM DTT를 첨가하여 1시간 30분가량 초음파 세포 파쇄기로 단백질 발현용 대장균을 깨뜨린 후 15,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 상등액에 Ni-NTA 아가로스 비드(Quiagen, 독일) 500μl를 넣고 4℃ 암조건에서 1시간 30분간 섞어주어 단백질과 결합시켰다. 3,500rpm, 4℃에서 2분간 원심분리하여 단백질이 결합된 비드를 가라앉히고 상등액을 제거한다. 결합한 비드를 Poly-Prep 크로마토그래피 컬럼(Bio-Rad, 미국)에 옮겨 세척버퍼(50mM Tris (pH 7.85), 300mM NaCl, 10% Glycerol, 20mM imidazole 및 0.1% NP40) 10ml를 5번 통과시켜 결합한 단백질 이외의 용액을 제거하였다. 용출버퍼(50mM Tris (pH 8.0), 300mM NaCl 및 250mM imidazole) 1.5ml를 통과시켜 단백질을 추출하고 아미콘 초원심 분리기용 필터 유닛 10K 멤브레인(Millipore, 미국)을 이용해 원심분리 함으로써 농축된 단백질을 얻어냈다. 분리된 순수한 단백질을 흡수 및 형광 스펙트럼을 측정하는데 사용하였다.

4. 전기영동 및 Zn²⁺ 블러팅

12% SDS-PAGE 겔을 제작하여 분리 정제된 단백질 3μl와 4X 샘플 버퍼 1μl를 섞어 100℃에서 5분간 가열하였다. 하나의 레인 당 4μl씩 시료를 로딩하고 120mV로 2시간 전기영동을 수행하였다. Zn²⁺ 블러팅은 20mM 트리스(pH 7.35), 20mM 아세트이트 아연 용액에 5분간 암조건에서 반응한 뒤 UV하에서 밴드를 확인하였다. 쿠마시 브릴리언트 블루용액(CBB)으로 1시간 염색한 뒤, 탈염색 용액으로 12시간 이상 반응시켰다.

5. 흡수 스펙트럼 측정

UV-vis 분광광도계(spectrophotometer) UV-1601(Shimadzu, 일본) 기계를 이용하고 UVProbe 2.21 프로그램을 이용하여 200~1,100nm 영역에서 흡수되는 스펙트럼을 측정하였다. 초기값은 트리스(pH 8.0) 용액으로 설정하였다. 750nm의 값으로 영점 보정하였고, 오리진 8.0 프로그램(Originlab, 미국)으로 300~800nm내의 흡수 스펙트럼을 그렸다.

6. 실은 형광 측정

형광 분석기(fluorescence spectrometer) LS-55(Perkin Elmer, 미국) 장비를 이용하여 형광 스펙트럼을 측정하였다. 540nm와 390nm로 단백질들을 여기(excitation)시키고 200nm에서 1100nm 사이에 방출되는 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 초기값은 트리스(pH 8.0) 용액으로 설정하였다. 750nm 값으로 영점 보정한 뒤 아미노산 변이체의 형광정도를 상대적으로 비교하고자 각 들뜸 파장 (15Z 형태의 390nm와 15E 형태의 540nm)의 흡수율을 0.1로 보정하여 오리진 8.0 프로그램으로 형광 스펙트럼을 그렸다.

실시예 1. 마이크로콜레우스 B353으로부터 신규한 자외선/녹색광 호변성 색소(UGS) 유전자 동정

본 발명자들은 마이크로콜레우스 B353의 신규 유전체를 분석하였으며, 이러한 유전체 분석 결과를 바탕으로 시네코시스티스 종(*Synechocystis* sp.) PCC6803의 Cph1과 ETR1의 상동성을 갖는 유전자를 BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 검색하였다.

그 결과, 21개의 상동성 유전자를 검출할 수 있었으며, 그 중 자외선/녹색광 호변성 색소(UGS, UV/Green light photoreversible Sensor) 단백질이 1개의 GAF 도메인과 히스티딘 키나제(histidine kinase), ATP 가수분해효소(ATPase), 수신자 도메인(REC, receiver domain)으로 구성되어 있는 것을 확인하였다. 또한 상기 UGS 단백질의 GAF 도메인이 광수용체 기능이 있는 것을 확인하였고, 이를 UGSg1으로 명명하였다(도 1a).

- [0063] **실시예 2. 마이크로콜레우스 B353 균주 유래의 자외선/녹색광 호변성 색소(UGS)의 분류학상 위치 규명**
- [0064] 아미노산 서열의 정렬분석 결과, 1번 GAF 도메인은 한 개의 보존된 시스테인 잔기를 갖는 시아노박테리오크롬(CBCRs, cyanobacteriochromes) 서브패밀리에 속하는 것을 알 수 있었다. 일반적으로 첫 번째 시스테인 잔기는 히스티딘과 함께 CH 모티프를 갖는 것으로 알려져 있는데, 이러한 모티프가 본 발명에서 규명한 상기 UGSg1에 존재하는지 분석한 결과, UGSg1은 히스티딘 대신에 타이로신을 갖는 CY 변이체(variant)임을 확인할 수 있었다(도 1b). 기존에 알려진 시아노박테리오크롬은 시스테인 잔기의 수와 그 위치에 따라서 3종류의 서브패밀리로 구분되는데, 서브패밀리 1은 하나의 시스테인 잔기가 시스테인 모티프에 위치하며 대표적으로 시네코시스티스 중 PCC6803의 Cph1이 있다. 서브패밀리 2와 3은 공통적으로 시스테인 모티프에 하나의 시스테인을 갖는데, 서브패밀리 2는 아스파르트산 모티프에 두 번째 시스테인 잔기를 갖지만 서브패밀리 3의 경우 아스파르트산 모티프에 타이로신 잔기를 갖는 대신 아미노산 변이가 높은 지역에 삽입된 시스테인 잔기를 갖는다. 따라서, UGSg1은 시아노박테리오크롬 서브패밀리 3에 속하며 하나의 잘 보존된 첫 번째 시스테인 잔기(117번째 아미노산)와 아미노산 서열의 변이가 높은 지역에 위치하는 삽입된-시스테인 잔기(insert Cys, 72번째 아미노산)를 갖는 것으로 확인되었다.
- [0065] **실시예 3. 마이크로콜레우스 B353 균주 유래의 UGSg1 도메인은 자외선/녹색 광가역적 시아노박테리오크롬임을 규명**
- [0066] 분리된 단백질을 고농도로 농축하여 광수용체로서 어떠한 파장의 빛을 흡수하는지 확인하고자 UV-분광광도계를 이용하여 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 바닥상태(native 15Z)의 UGSg1은 327nm 및 381nm에서 피크를 보였고, UV(~380nm)를 비추게 되면 554nm의 빛을 흡수할 수 있는 형태(native 15E)로 변하는 것이 확인되었다. 이 형태에 다시 녹색광 영역의 빛을 비추게 되면 327nm 및 381nm를 흡수할 수 있는 바닥상태(native 15Z)로 되돌아가는 것이 확인되었다(도 4a). 따라서 본 발명의 UGSg1은 자외선/녹색의 광순환이 가능함을 알 수 있었다.
- [0067] UGSg1의 산성 조건에서 변성 연구는 결합한 빌린(bilin) 발색단(chromophore) 구조를 확인하기 위해서 수행되었다. 암상태에서 산성 요소(8M 요소/염산, pH 2.0)로 변성시킬 때, UGSg1은 광변환 활성을 나타내었고 결합 발색단은 파이크사이아노빌린(PCB)임을 확인하였다(도 4b). 상기의 결과를 종합해 보면, UGSg1은 PCB와 티오에테르(thioether)-결합된 광수용체 단백질로 자외선과 녹색광에 의해 광전환이 일어난다.
- [0068] **실시예 4. 마이크로콜레우스 UGSg1 도메인의 주요 아미노산 잔기의 기능 규명**
- [0069] UGSg1의 도메인은 시아노박테리오크롬 서브패밀리 3에 속한다. UGSg1 도메인의 발색단과 결합할 수 있는 시스테인 잔기는 72번째와 117번째에 존재한다. 아미노산 변이가 높은 지역의 72번째 시스테인 잔기를 알라닌으로 치환한 변이체(C72A)는 광전환이 일어나지 않으며 590nm에서 피크를 보였다. 이 결과는 발색단과 단백질내 시스테인잔기의 티오에테르 결합을 방해하는 저해제(IAM)를 처리하였을 때와 같은 결과를 보인다. 따라서 삽입된 시스테인(C72)은 UGSg1이 발색단과 결합하여 1) 자외선과 녹색광을 흡수할 수 있는 형태로 만들어주는데 주요한 역할을 하며 2) 자외선과 녹색광의 광전환 성질을 결정하는데 필수적인 반응위치임을 알 수 있다. 반면 UGSg1의 아미노 말단쪽의 타이로신 잔기(Y30)을 알라닌, 페닐알라닌, 히스티딘으로 치환한 변이체에서 다양한 형태의 스펙트럼이 형성되는 것을 확인하였다. 이 위치의 타이로신 잔기는 앞선 연구에서 타이로신이 히스티딘으로 치환된 경우에 형광이 증가한다고 알려져 있었다. 하지만 UGSg1의 경우 30번째 타이로신은 발색단과의 결합시 광전환 효율 및 발색단의 흡수 형태를 결정해 주는데 영향을 줄 수 있다. Y30A의 경우 광전환이 일어나지 않지만, C72A와 같은 형태의 흡수패턴을 보인다. Y30F의 경우 광전환이 일어나고 자외선을 조사하여 15E 형태로 전환된 경우, 흡수 스펙트럼의 피크가 590nm로 나타났으며 이러한 결과는 C72A의 결과와 일치한다. 따라서 Y30의 하이드록시(-OH)기가 없어지게 되며 삽입 시스테인 잔기(C72)가 발색단과 결합하는 환경에 영향을 주어 시스테인 잔기가 발색단과 결합하는 것을 방해함을 유추할 수 있다. 따라서 Y30 잔기는 발색단과 단백질의 티오에테르 결합 환경을 결정해 주는 주요한 잔기임을 확인할 수 있다. 이상의 결과는 Y30을 히스티딘으로 전환한 Y30H 변이체의 흡수 스펙트럼 분석을 통해서도 확인이 가능하다.
- [0070] 서브패밀리 3에 속하는 UGSg1의 아미노산 서열을 다중서열 정렬을 통해 비교해보면 서브패밀리 2의 두 번째 시스테인잔기가 보존되어 있는 위치에 타이로신(Y88)이 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있다. 서브패밀리 2의 단백질과 서브패밀리 3의 단백질이 발색단과 결합하여 광전환을 일으키는 작용기작을 이해하고자 Y88을 페닐알라닌(Y88F)과 시스테인(Y88C)으로 치환하여 흡수 스펙트럼을 비교하였다. Y88F는 UGSg1과 같은 결과를 보여주었다.

즉, Y88의 하이드록시기는 발색단과 단백질간의 결합 및 광전환 효율에 아무런 영향을 주지 않음을 알 수 있다. 반면, Y88C 변이체는 발색단과 단백질간의 결합정도가 약 2~3배 가량 감소함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 Y88 잔기가 단백질과 발색단의 결합을 결정하지는 않지만 시스테인에 의한 티오에테르 결합이 형성되면서 주변 아미노산간의 결합력에 영향을 주어 광전환 효율에 영향을 주는 것을 알 수 있다. 서브패밀리 2의 시스테인 잔기가 발색단과의 결합을 결정하는 주요한 위치임에 반해, 같은 위치의 서브패밀리 3의 타이로신 잔기는 광전환 효율에는 영향을 줄 수 있으나 결합을 결정하지 않음을 알 수 있다. 이러한 결과는 서브패밀리 3의 아미노산 서열 내의 삽입된 지역에 의해 단백질과 발색단간의 결합 환경이 변화했기 때문으로 생각되어진다.

[0071]

그 밖의 43번째 글루타메이트와 118번째 타이로신을 치환한 변이체의 흡수스펙트럼 결과는 주목할 만하다. 지금껏 첫 번째 시스테인 잔기(C117)는 발색단과 단백질간의 결합에 가장 중요한 위치로 판단되어 왔다. 하지만 43번째 글루타메이트를 류신으로 치환한 E43L 변이체와 첫 번째 시스테인 잔기의 바로 옆에 위치하는 Y118을 히스티딘 치환한 Y118H 변이체의 흡수 스펙트럼과 아연 불량의 결과는 이 두 아미노산 잔기가 발색단과 단백질간의 결합에 중요한 잔기임을 설명해 주고 있다. 단백질의 결정을 통해 정확한 각 잔기의 위치와 발색단과의 간격 및 반응 부위를 확인하진 못했으나, E43와 Y118 잔기는 1) 발색단과 단백질간의 결합 여부를 결정하거나 2) C117이 발색단의 3번째 탄소와의 결합을 하는 전기적 환경 혹은 물리적 환경을 변화시킬 가능성이 있음을 유추할 수 있다.

[0072]

실시예 5. 마이크로콜레우스 B353 균주 유래의 자외선/녹색광 호변성 색소의 UGSg1 도메인의 아미노산 치환체의 형광 변화 분석

[0073]

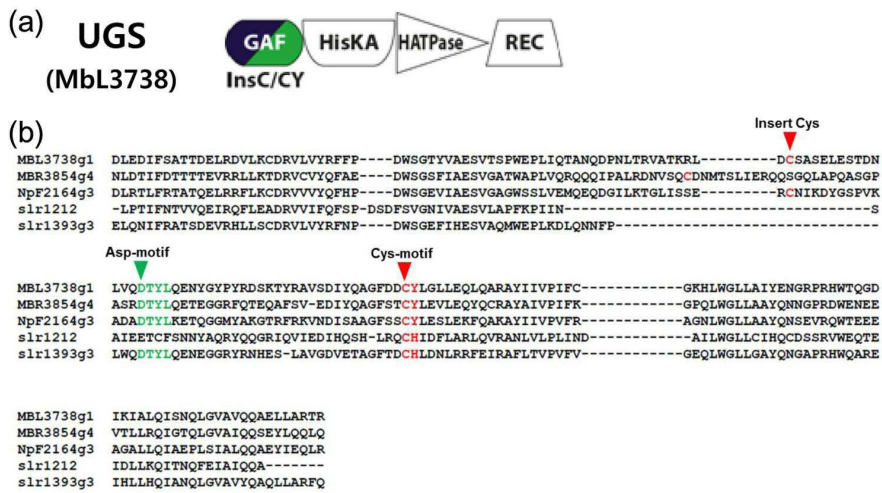
UGSg1의 8종 아미노산 변이체의 흡수 스펙트럼 결과를 바탕으로 형광 스펙트럼을 측정하였다. 발색단과의 결합이 이루어지지 않은 E43L와 Y118H의 변이체를 제외한 6종의 아미노산 변이체를 15Z 형태(자외선을 흡수할 수 있는 상태)와 15E 형태(녹색광을 흡수할 수 있는 상태)에서 형광 스펙트럼을 측정하였다(도 4c). 그 결과 C72A와 Y30A에서 가장 높은 형광을 보이는 것을 알 수 있다. 이 두 변이체의 흡수스펙트럼의 결과는 광전환이 일어나지 않으며 590nm의 피크를 보였다. 이들의 상대적 형광 발생 정도는 UGSg1과 동일한 결과를 보이는 Y88F와 비교해 보면 약 6~7배 가량 증가했으며 약 640nm에서 피크를 보였다.

[0074]

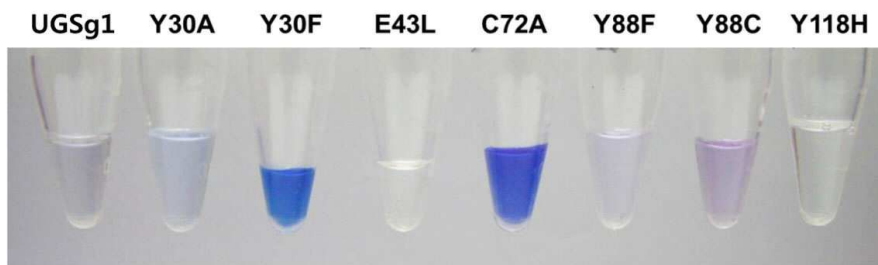
시아노박테리오크롬은 육상식물의 파이토크롬과 비교하여 다음과 같은 차이를 보인다: 1) 시아노박테리오크롬은 약 15~25KDa의 GAF 도메인만으로 광수확 및 광전환 능력을 갖고있어 박테리아의 신호전달과정에 중요한 역할을 수행할 수 있으나 육상식물의 파이토크롬은 PAS-GAF-PHY의 3 도메인이 다이머로 존재하여야 광신호 전달자로서 역할을 수행할 수 있으며 그 크기는 약 180~200KDa에 해당한다. 2) 시아노박테리오크롬은 자외선부터 적외선광에 이르는 매우 넓은 영역의 빛에 반응할 수 있으나 육상식물의 파이토크롬은 적색과 적외선광에만 반응한다. 따라서 시아노박테리오크롬의 GAF 도메인은 육상식물로의 도입이 유용한 단백질로 주목받고 있으며 본 연구에서 확인된 UGSg1의 여러 변이체 중 C72A나 Y30A와 같이 640nm의 형광을 항상 많이 발생시키는 GAF 도메인 단백질을 육상식물에서 발현시키게 되면 광합성 효율을 증가시킬 수 있을 것으로 기대되어진다.

도면

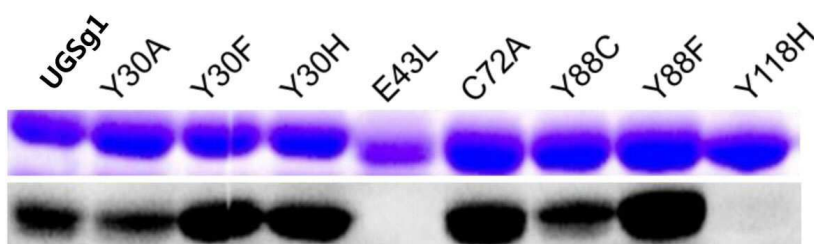
도면1



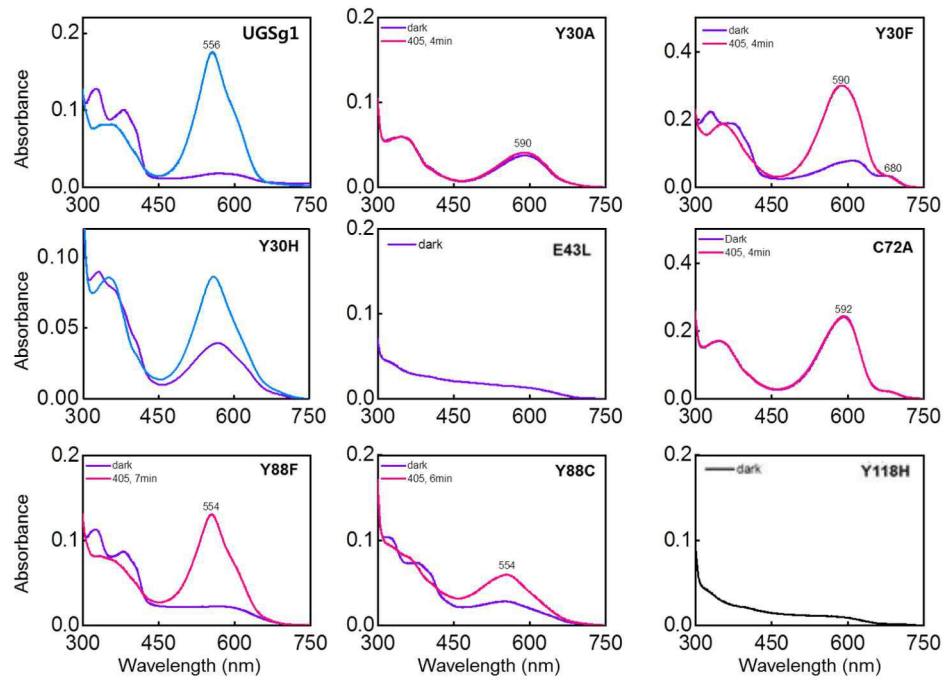
도면2



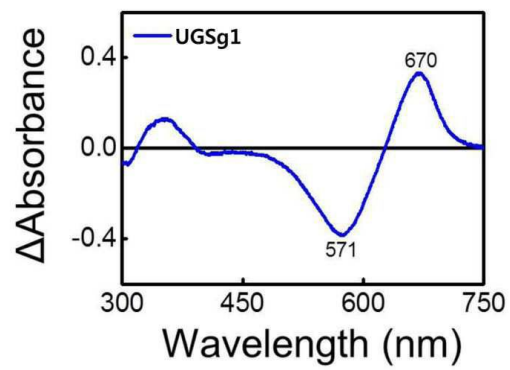
도면3



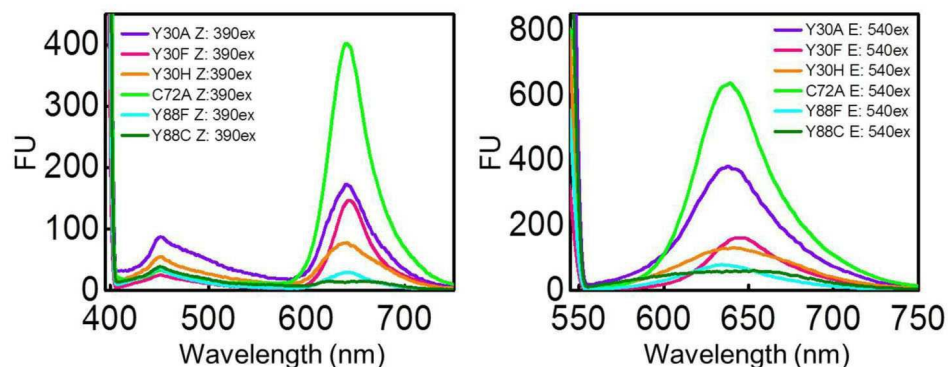
도면4a



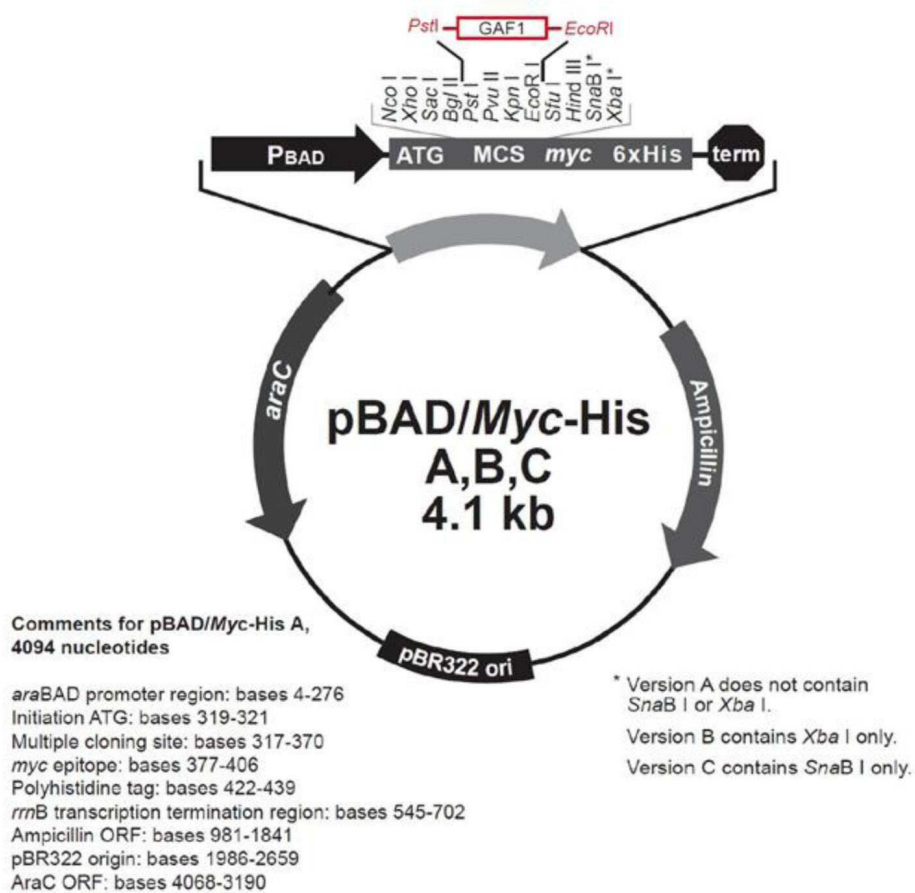
도면4b



도면4c



도면5



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> UV/Green photoreversible sensor protein from cyanobacterium and uses thereof
- <130> PN14072
- <160> 22

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 630

<212> DNA

<213> Microcoleus sp. B353

<400> 1

atgcggcaaa ccctcgatct cgaggatata tttagtcca ccaccgacga actacgggat 60

gtgttgaagt gcgacgcgt tctcgtctac cgctttttcc ctgattggag tggaaacctat 120

gtcgtgaat ccgtcacctc cccttgggaa ccactcattc aaacagccaa ccaagacccc 180

aacctgacgc ggggtggcaac caaacgactc gattgtagtg cgagtgaact agaaagcacc 240

gataacctag ttcaagatac ctatctacaa gaaaattatg gctatcccta ccgtgatagt 300

aaaacctacc gagccgtcag cgatatttat caagcgggtt ttgatgactg ctatctaggg 360

ctgttagaac aattgcaggc tctgtcttat attatcgtgc ctatcttctg cggtaagcac 420

ctctggggac tcctggccat ttacgaaaat ggctcgcccc gtcactggac tcaaggagat 480

attaaaatcg ccctacaaat tagtaaccag ttaggagttg ccgttcaaca agccgaactg 540

ttggctcgca cgcgtcaaca agccctagaa ctccagcagg ctaaagaagc cgcagacatg 600

gccaatcggg ctaaaagtga gttcctggct 630

<210> 2

<211> 210

<212> PRT

<213> Microcoleus sp. B353

<400> 2

Met Arg Gln Thr Leu Asp Leu Glu Asp Ile Phe Ser Ala Thr Thr Asp

1 5 10 15

Glu Leu Arg Asp Val Leu Lys Cys Asp Arg Val Leu Val Tyr Arg Phe

20 25 30

Phe Pro Asp Trp Ser Gly Thr Tyr Val Ala Glu Ser Val Thr Ser Pro

35 40 45

Trp Glu Pro Leu Ile Gln Thr Ala Asn Gln Asp Pro Asn Leu Thr Arg

50 55 60

Val Ala Thr Lys Arg Leu Asp Cys Ser Ala Ser Glu Leu Glu Ser Thr

65 70 75 80

Asp Asn Leu Val Gln Asp Thr Tyr Leu Gln Glu Asn Tyr Gly Tyr Pro
85 90 95

Tyr Arg Asp Ser Lys Thr Tyr Arg Ala Val Ser Asp Ile Tyr Gln Ala
100 105 110

Gly Phe Asp Asp Cys Tyr Leu Gly Leu Leu Glu Gln Leu Gln Ala Arg

115 120 125

Ala Tyr Ile Ile Val Pro Ile Phe Cys Gly Lys His Leu Trp Gly Leu
130 135 140

Leu Ala Ile Tyr Glu Asn Gly Arg Pro Arg His Trp Thr Gln Gly Asp
145 150 155 160

Ile Lys Ile Ala Leu Gln Ile Ser Asn Gln Leu Gly Val Ala Val Gln
165 170 175

Gln Ala Glu Leu Leu Ala Arg Thr Arg Gln Gln Ala Leu Glu Leu Gln
180 185 190

Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asp Met Ala Asn Arg Ala Lys Ser Glu Phe
195 200 205

Leu Ala
210

<210> 3

<211> 2109

<212> DNA

<213> Microcoleus sp. B353

<400> 3

atgcggcaaa ccctcgatct cgaggatata tttagtcca ccaccgacga actacgggat 60
gtgttgaagt gcgatcgctg tctcgtctac cgctttttcc ctgattggag tggaacctat 120
gtcgtgaat ccgtcacctc cccttgggaa ccactcattc aaacagccaa ccaagacccc 180
aacctgacgc ggggtggcaac caaacgactc gattgtagtg cgagtgaact agaaagcacc 240

gataacctag ttcaagatac ctatctacaa gaaaattatg gctatcccta ccgtgatagt 300
aaaacctacc gagccgtcag cgatatttat caagcgggtt ttgatgactg ctatctaggg 360
ctgttagaac aattgcaggc tctgtcttat attatcgtgc ctatcttctg cggttaagcac 420
ctctggggac tcttggccat ttacgaaaat ggtcggcccc gtcactggac tcaaggagat 480
attaaaatcg ccctacaaat tagtaaccag ttaggagtig ccgttcaaca agccgaactg 540

ttggctcgca cgcgtcaaca agccctagaa ctccagcagg ctaaagaagc cgcagacatg	600
gccaatcggg ctaaaagtga gttcctggct aatatgagtc atgaacttcg aacgccactc	660
aatgctattc taggtttctc ccaactgttg caacgttctg gcctgtcccc ccaggacaat	720
gagcaatatc tcaaaacaat tttgtccagt gggaacatt tgctgggggtt ggtgaatgaa	780
gttttagaga tgtctaaaat tgaagcagca cgggtgacac tgacttacca gaatgtagat	840
ttctataaac tcttggatgg tctctatcgc ctctgaagc tcaaagctga acgacaaaat	900
ctggatctat tcttcaatgt cacgaatgat attcctcgtt acatcaaaat tgatgatcaa	960
aaactaaaac aggtttctct caatttgttg ggaaatgcct tgaaattcac ggaacgggga	1020
caagttagct tgacagtgc cgcgaagccc cttgaatttc taactccaag gcttccagag	1080
tcaacgcgat cgcacctaac ttttgccatt gaagatacgg gaccggggat tgacgctgac	1140
gaaattgaac tcttgtttca accctttaca caaacgaact cggggctaca atcgcgaggt	1200
ggaacaggac taggactgtc aatttctcaa cagtttgtgc ggttgatggg aggcgaaatt	1260
caggtaaaaa gtaccattgg catggggctc tgttttagtt ttgagattcc tgttgagcta	1320
ggatcagcca gtgtatttca acaacaatcc cagttgcccg gccgggtcaa aggettaacc	1380
ccaggccagc gggactatcg gattctctgt gttgaagacg aaccaccaa tcaactgtc	1440
ctggtggaat ttctcaaatc catcggtttt aaggttcgtg ccgcgagtaa cggccgtgaa	1500
gcccttgaga tcgccccca atggcagcct gacctcattt ggatggatat gcgaatgccg	1560
gaactcaatg gctatgaagc cactcccaa attaaagcgc tgcctagtgt tcaagataca	1620
attattattg ctctcacggc cagcgccttt gaagaagaac gatccgcat tctagcttca	1680
ggatgtgatg actttatccg aaaacccttt cgtgaggtag agatcttagc gaagatacag	1740
cagtatcttg aagtggacta cgagtatgag ggagatatac agatgccgac cgagttagaa	1800
gcgtgcagtc tgcttggcat tcaagacct caattagatt ttgtaaaccg gggccgccag	1860
tcaactcagc cgagtgtgga gcaagtgcag cactggatta gtcagctacc ccaggcgctt	1920
gttaaccagc ttcacaggc agccttgtag ggaagtgatg atcaaatttt ggacctatta	1980
gccactattg aggaagcccg tgaggaggca gacctcgatg gggattgtcg ccagcttctc	2040
aagacttggg cccaagactt ccggtttgat cgaatccttg acatgacaca atacttcaa	2100
gagcgataa	2109
<210> 4	
<211> 702	
<212> PRT	
<213> Microcoleus sp. B353	

<400> 4

Met Arg Gln Thr Leu Asp Leu Glu Asp Ile Phe Ser Ala Thr Thr Asp
1 5 10 15

Glu Leu Arg Asp Val Leu Lys Cys Asp Arg Val Leu Val Tyr Arg Phe
20 25 30

Phe Pro Asp Trp Ser Gly Thr Tyr Val Ala Glu Ser Val Thr Ser Pro
35 40 45

Trp Glu Pro Leu Ile Gln Thr Ala Asn Gln Asp Pro Asn Leu Thr Arg
50 55 60

Val Ala Thr Lys Arg Leu Asp Cys Ser Ala Ser Glu Leu Glu Ser Thr
65 70 75 80

Asp Asn Leu Val Gln Asp Thr Tyr Leu Gln Glu Asn Tyr Gly Tyr Pro
85 90 95

Tyr Arg Asp Ser Lys Thr Tyr Arg Ala Val Ser Asp Ile Tyr Gln Ala
100 105 110

Gly Phe Asp Asp Cys Tyr Leu Gly Leu Leu Glu Gln Leu Gln Ala Arg
115 120 125

Ala Tyr Ile Ile Val Pro Ile Phe Cys Gly Lys His Leu Trp Gly Leu
130 135 140

Leu Ala Ile Tyr Glu Asn Gly Arg Pro Arg His Trp Thr Gln Gly Asp
145 150 155 160

Ile Lys Ile Ala Leu Gln Ile Ser Asn Gln Leu Gly Val Ala Val Gln
165 170 175

Gln Ala Glu Leu Leu Ala Arg Thr Arg Gln Gln Ala Leu Glu Leu Gln
180 185 190

Gln Ala Lys Glu Ala Ala Asp Met Ala Asn Arg Ala Lys Ser Glu Phe
195 200 205

Leu Ala Asn Met Ser His Glu Leu Arg Thr Pro Leu Asn Ala Ile Leu
210 215 220

Gly Phe Ser Gln Leu Leu Gln Arg Ser Gly Leu Ser Pro Gln Asp Asn
225 230 235 240

Glu Gln Tyr Leu Lys Thr Ile Leu Ser Ser Gly Glu His Leu Leu Gly
 245 250 255
 Leu Val Asn Glu Val Leu Glu Met Ser Lys Ile Glu Ala Ala Arg Val
 260 265 270
 Thr Leu Thr Tyr Gln Asn Val Asp Phe Tyr Lys Leu Leu Asp Gly Leu
 275 280 285
 Tyr Arg Leu Leu Lys Leu Lys Ala Glu Arg Gln Asn Leu Asp Leu Phe
 290 295 300

 Phe Asn Val Thr Asn Asp Ile Pro Arg Tyr Ile Lys Ile Asp Asp Gln
 305 310 315 320
 Lys Leu Lys Gln Val Leu Leu Asn Leu Leu Gly Asn Ala Leu Lys Phe
 325 330 335
 Thr Glu Arg Gly Gln Val Ser Leu Thr Val Thr Ala Lys Pro Leu Glu
 340 345 350
 Phe Leu Thr Pro Arg Leu Pro Glu Ser Thr Arg Ser His Leu Ser Phe
 355 360 365
 Ala Ile Glu Asp Thr Gly Pro Gly Ile Asp Ala Asp Glu Ile Glu Leu

 370 375 380
 Leu Phe Gln Pro Phe Thr Gln Thr Asn Ser Gly Leu Gln Ser Arg Gly
 385 390 395 400
 Gly Thr Gly Leu Gly Leu Ser Ile Ser Gln Gln Phe Val Arg Leu Met
 405 410 415
 Gly Gly Glu Ile Gln Val Lys Ser Thr Ile Gly Met Gly Ser Cys Phe
 420 425 430
 Ser Phe Glu Ile Pro Val Glu Leu Gly Ser Ala Ser Ala Ile Gln Gln
 435 440 445

 Gln Ser Gln Leu Pro Gly Arg Val Lys Gly Leu Thr Pro Gly Gln Arg
 450 455 460
 Asp Tyr Arg Ile Leu Val Val Glu Asp Glu Pro Thr Asn Gln Leu Leu
 465 470 475 480
 Leu Val Glu Phe Leu Lys Ser Ile Gly Phe Lys Val Arg Ala Ala Ser
 485 490 495

Asn Gly Arg Glu Ala Leu Glu Ile Ala Pro Gln Trp Gln Pro Asp Leu
500 505 510

Ile Trp Met Asp Met Arg Met Pro Glu Leu Asn Gly Tyr Glu Ala Thr

515 520 525
Pro Gln Ile Lys Ala Leu Pro Ser Cys Gln Asp Thr Ile Ile Ile Ala
530 535 540

Leu Thr Ala Ser Ala Phe Glu Glu Glu Arg Ser Ala Ile Leu Ala Ser
545 550 555 560

Gly Cys Asp Asp Phe Ile Arg Lys Pro Phe Arg Glu Val Glu Ile Leu
565 570 575

Ala Lys Ile Gln Gln Tyr Leu Glu Val Asp Tyr Glu Tyr Glu Gly Asp
580 585 590

Ile Gln Met Pro Thr Glu Leu Glu Ala Cys Ser Leu Leu Gly Ile Gln
595 600 605

Asp Pro Gln Leu Asp Phe Val Asn Pro Gly Arg Gln Ser Thr Gln Pro
610 615 620

Ser Val Glu Gln Val Gln His Trp Ile Ser Gln Leu Pro Gln Ala Leu
625 630 635 640

Val Asn Gln Leu His Gln Ala Ala Leu Gln Gly Ser Asp Asp Gln Ile
645 650 655

Leu Asp Leu Leu Ala Thr Ile Glu Glu Ala Arg Glu Glu Ala Asp Leu

660 665 670
Asp Gly Asp Cys Arg Gln Leu Leu Lys Thr Trp Ala Gln Asp Phe Arg

675 680 685
Phe Asp Arg Ile Leu Asp Met Thr Gln Tyr Ser Gln Glu Arg

690 695 700

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

catctgcagt gcggcaaacc ctcgatctc 29

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

catgaattca gccaggaact cactttta 28

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

tctcgtcgca cgctttttc 19

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ggaaaaagcg tgcgacgaga a 21

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

tctcgtccac cgctttttc 19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	primer	
<400>	10	
ggaaaaagcg	gtggacgaga	a
		21
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
tctcgtcttt	cgctttttc	
		19
<210>	12	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
ggaaaaagcg	aaagacgaga	a
		21
<210>	13	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
tgctcgcttg	tccgtcacct	cc
		22
<210>	14	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
ggtgacggac	aaagcgacat	aggt
		24
<210>	15	
<211>	23	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 gactcgatgc cagtgcgagt gaa 23
 <210> 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 cactcgcaact ggcatcgagt c 21
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 tcaagatacc tttctacaag a 21

 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 tcttgtagaa aggtatcttg a 21
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 gttcaagata cctgcctaca aga 23
 <210> 20

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 tcttgtaggc aggtatcttg aac 23

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 gcgggttttg actgccatct a 21

<210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 ctaacagccc tagatggcag tc 22