



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0132634
(43) 공개일자 2014년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/195 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0052131
(22) 출원일자 2013년05월08일
심사청구일자 2014년04월23일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이찬용
대전 서구 만년로 25, 103동 801호 (만년동, 강변
아파트)
강경숙
대전 서구 동서대로 967, 1동 1002호 (내동, 코오
롱아파트)
(74) 대리인
특허법인이름

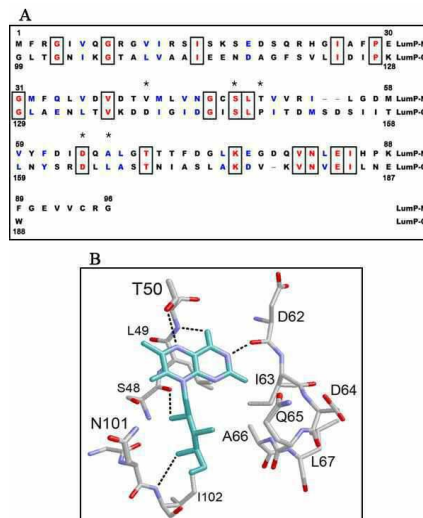
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 루마진 단백질 돌연변이체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 루마진 단백질의 N-말단 부위의 1개 이상의 아미노산이 트립토판으로 치환된, 루마진 단백질 돌연변이체에 관한 것으로서, 상기 루마진 단백질의 N-말단은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 한다. 본 발명은 상기 루마진 단백질 돌연변이체를 코딩하는 DNA, 상기 DNA를 포함하는 재조합 벡터를 제공할 수 있고, 상기 단백질 돌연변이체는 루마진 리간드와 결합함으로써 형광을 발현하는 특성이 있어, 세포 내 동력학을 연구하는 표지 단백질을 발굴하는 것에 중요한 역할을 하는 분자영상화용 프로브로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 313058051HD020

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술평가원

연구사업명 생물산업기술

연구과제명 발광유전자원 확보 및 발광인자들의 활성개선 (대과제: 발광유전자 발현시스템 구축 및 형질 전환 식물개발)

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.24 ~ 2018.12.23

특허청구의 범위

청구항 1

루마진 단백질의 N-말단 부위의 1개 이상의 아미노산이 트립토판으로 치환된, 루마진 단백질 돌연변이체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 루마진 단백질의 N-말단은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는, 루마진 단백질 돌연변이체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 루마진 단백질 돌연변이는 V41W, S48W, T50W, D64W, 및 A66W로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 루마진 단백질 돌연변이체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 루마진 단백질 돌연변이체를 코딩하는 DNA.

청구항 5

제4항의 DNA를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 루마진 단백질 돌연변이체를 포함하는, 형광공명에너지전이(Förster Resonance Energy Transfer)를 이용한 분자영상화용 프로브.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 루마진 단백질 돌연변이체, 상기 돌연변이체를 코딩하는 DNA, 상기 DNA를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 돌연변이체를 포함하는 분자영상화용 프로브에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 신약개발과정에서 쓰여지는 형광 발생체는 크게 형광화합물과 형광단백질로 구분할 수 있다. *in vivo* 형광 (Fluorescence) 광학영상법은 외부 광원에서 형광 단백을 여기 시키는 특정 파장의 빛을 CCD (Charge Coupled Device) 카메라로 획득하는 방식으로 영상화한다. 형광 단백질(예, Green Fluorescent Protein: GFP) 유전자가 발현된 세포나 박테리아 등은 *in vivo* 영상화할 때 이러한 방법을 이용하는 것과 마찬가지로 발광세균의 형광단백질인 루마진 단백질(Lumazine protein)을 활용하여, 형광 (Fluorescence), 생물발광 (Bioluminescence), PET, MRI 등의 영상 기법을 이용하여 암 등 질병의 조기진단, 치료 약제 개발, 유전자/세포치료의 모니터링 등에 활용될 수 있다. 따라서, 새로운 형광 단백질 돌연변이체의 제조에 관한 요구가 높아지고 있는 실정이다.

[0003] 루마진 단백질(Lumazine protein)은 형광성 리간드인 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine과 1:1로 결합하는 21

kDa의 monomer이다. 효소 활성이 없는 이 형광 단백질은 해양 발광 박테리아인 *Photobacterium leiognathi*의 발광반응에서 optical transponder의 기능을 한다. 아미노산 서열을 기초로 하여 비교하면, 단백질은 위상학적으로 매우 비슷하게 folding 되어지는 두 개의 domain으로 이루어지나, 그 중 한 domain만이 lumazine 유도체들과 결합하여 photoemitter의 기능을 갖는 것으로 알려지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 루마진 단백질의 N-말단 부위의 1개 이상의 아미노산이 트립토판으로 치환된 루마진 단백질 돌연변이체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0005] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0006] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 루마진 단백질의 N-말단 부위의 1개 이상의 아미노산이 트립토판으로 치환된, 루마진 단백질 돌연변이체를 제공한다.
- [0007] 본 발명의 일 구현예로, 상기 루마진 단백질의 N-말단은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0008] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 루마진 단백질 돌연변이는 V41W, S48W, T50W, D64W, 및 A66W로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 루마진 단백질 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 DNA를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 루마진 단백질 돌연변이체를 포함하는, 형광공명에너지전이(Förster Resonance Energy Transfer, 이하 'FRET' 이라 함)를 이용한 분자영상화용 프로브를 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 발현 (expression)된 단백질과 리간드인 lumazine이 결합함으로써 형광을 띠게 되는 것에 착안한 본 발명은, 상기 단백질의 어느 아미노산이 ligand 결합과의 삼차원적 구조변이를 유도할 것인지에 관한 정보를 제공해 줄 수 있고, 궁극적으로 세포내에서 빛을 발하여 세포내의 동력학을 연구하는 데 쓰여질 표지 (reporter) 단백질을 발굴하는 데 주요한 역할을 할 수 있다. 생물발광은 cellular viability의 표지 역할을 할 수 있고, Flow Cytometry와 측정 방법과 연계되어 세포내의 luminescence intensity로써 세균의 밀도 측정을 하는 등 초감도 센싱 기술을 활용한 정확한 세균의 계수를 결정할 수 있을 것이며, 외부의 독성화합물에 대한 반응성을 보인다면 bioluminescence를 이용한 중금속 등의 검출에 이용 될 수 있을 것이다.
- [0013] 또한, Green Fluorescent Protein (GFP)이 진핵세포에서의 유전자 발현 및 단백질 상호작용에 관한 연구에 있어서 많이 활용되긴 하나 원핵세포에서만 발현되는 시스템을 찾을 필요가 있어, 해양세균의 lux 유전자인 형광을 내는 lumazine protein에 대한 연구를 심도있게 추구할 필요성이 요구된다. 이러한 연구 개발을 위하여서는 이들 분석에 사용될 대상인 세균의 발광 유전자 및 그것이 코드 하는 단백질에 대한 좀 더 자세한 분자 생물학적, 생화학적 연구가 요구되어 왔다. 따라서, 본 발명은 발광 세균의 lux 유전자를 이용한 초고속 정밀 바이오 분석 시스템 기술 기반을 구축할 수 있다. 상기 목표의 성취를 위하여서는 lux 유전자와 lumazine protein의 발현 시스템을 탐색 하는 것이 선결 조건인데, 본 발명에서는 single colony에서도 빛을 내게 되는 대장균 형질전환체를 얻음으로써 세균 수와 발광세기와의 상관관계 수립, 세포의 고정화, 강력한 형광을 나타내는 유전자의 제조 등을 바탕으로 하여 초고속 바이오시스템 기술 구축 (multichannel luminometer, cell morphology monitoring, toxicity testing)의 기반을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 루마진 단백질의 N-말단 영역에 있는 ASN 101 및 Ile 102 아미노산이, Ser 48, Thr 50, Asp 64 및 Ala 66와 함께 lumazine 리간드의 결합에 관여하는 것을 보여주는 도면이다. 도 1A에 Trp(tryptophan) 아미노산으로 치환된 아미노산은 *로써 표시하였다.
- 도 2는 N-LumP 118 루마진 단백질의 아미노산 서열이며, Trp(tryptophan) 아미노산으로 치환된 아미노산을 밑줄로써 나타내었다.
- 도 3은 N-LumP 118 A66W와 루마진 리간드의 결합에 따른 광학적 특성 분석 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 각 돌연변이 단백질들이 루마진 리간드와 결합할 때의 파장길이 및 형광세기를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 각 돌연변이 단백질에 트립토판의 형광방출 스펙트럼을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 루마진 단백질의 N-말단 부위의 1개 이상의 아미노산이 트립토판으로 치환된, 루마진 단백질 돌연변이체에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명자들은, 루마진 단백질 돌연변이체를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 최소의 크기로써 형광 리간드와 강력하게 결합하여 빛을 내는 아미노 말단 영역 단백질(아미노산 118번 까지)만을 포함하는 14 kDa 단백질을 중합 효소 연쇄반응 (Polymerase Chain Reaction) 등의 분자생물학적 방법으로 제조하고, 단백질공학의 일환으로 위치지정 돌연변이 (Site Directed Mutagenesis)를 통해 lumazine protein의 리간드 결합자리로 추정되는 아미노산 잔기를 트립토판 (tryptophan) 아미노산으로 대체하여 돌연변이 (mutant) 단백질들을 분리·정제하여 제조된 단백질이 아미노산 트립토판의 삼차원적 위상이 상이함으로써, 루마진 리간드와 결합함에 따라 다른 파장영역에서 리간드의 형광세기를 가지는 것을 확인함으로써, 본 발명의 루마진 단백질 돌연변이체가 형광공명전이의 도구로써 유용하게 쓰여질 가능성이 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0017] 따라서 본 발명은 루마진 단백질 돌연변이체로서, 상기 돌연변이체는 루마진 단백질의 N-말단 부위의 1개 이상의 아미노산이 트립토판으로 치환된 것을 특징으로 하는 돌연변이체를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [0018] 루마진 단백질은 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine과 1:1로 결합하는 21 kDa의 monomer이다. 효소 활성이 없는 이 형광 단백질은 해양 발광 박테리아인 Photobacterium leiognathi의 발광반응에서 optical transponder의 기능을 한다. 아미노산 서열을 기초로 하여 비교하면, 단백질은 위상학적으로 매우 비슷하게 folding 되어지는 두 개의 domain으로 이루어지나, 그 중 한 domain만이 lumazine 유도체들과 결합하여 photoemitter의 기능을 갖는 것으로 알려지고 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로, 상기 루마진 단백질의 N-말단은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 것을 특징으로 한다. 상기 단백질은 118개의 아미노산으로 이루어지는 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 루마진 단백질 돌연변이는 V41W, S48W, T50W, D64W, 또는 A66W일 수 있으나, 루마진 단백질의 N-말단 부위의 1개 이상의 아미노산이 트립토판으로 치환된 것이라면 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 루마진 단백질 돌연변이체를 코딩하는 DNA를 제공할 수 있고, 상기 DNA를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0022] 따라서, 본 발명의 실시예에서는, 다양한 아미노 말단 영역 (N-termianal)의 lumazine protein 생성을 위하여 위치 지정 돌연변이 (Site Directed Mutagenesis)를 수행하였다. 상기 위치 지정 돌연변이에 수행된 아미노산 잔기로는 E. coli의 riboflavin synthase의 활성부위인 C48과 match되는 amino acid인 Ser 48과 lumazine과 인접할 것으로 밝혀진 Thr 50 등이며, S48W와 T50W 등의 돌연변이 단백질들을 코드하는 유전자를 PCR의 방법으로 제조하여 plasmid vector에 클로닝하고 재조합된 E. coli에서 발현시켜 이들 단백질을 분리 정제하였다. 이러한 실험에 의해 생성된 mutant 단백질 중에는 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine과 결합하여 높은 형광으로부터 무형광을 갖거나 여러 영역의 파장에서 형광세기를 갖는 등 다양한 특성의 결합 도메인을 지닌 단백질들이 구축

되었다.

[0023] 그 결과, 야생형 (Wild Type) 및 T50W 돌연변이 단백질의 경우 lumazine ligand와 결합할 경우 native한 리간드의 형광세기 (fluorescence intensity)를 가지고 있음을 확인하였다. 상기 돌연변이 단백질은 형광 공명 에너지 전이 (FRET; Fluorescence Resonance Energy Transfer)의 도구로써 매우 유용하게 쓰여 질 가능성을 보였다. 따라서, 본 발명은 루마진 단백질 돌연변이체를 포함하는 형광공명에너지전이를 이용한 분자 영상화용 프로브를 제공할 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0025] [실시예]

[0026] 실시예 1. 재료 준비

[0027] cloning strain으로 이용되는 *Escherichia coli* XL-1 blue는 Stratagene으로부터 구매하여 사용했다. Lumazine 단백질을 코딩하는 DNA gene은 Hamburg 대학의 Illarinov 박사로부터 공급받았다. pQE30 벡터는 Qiagen Inc.로부터 구매하여 사용하였다. 제한 효소 및 리가아제(ligase)는 New England Biolabs(USA)로부터 구매하였고, Taq polymerase는 Genet Bio(Korea)로부터 공급받았다.

[0028] 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine 역시 Hamburg 대학 Illarinov 박사가 합성한 것을 이용하였다.

[0029] 실시예 2. FRET용 프로브 단백질 제작

[0030] 2-1. 루마진 단백질의 아미노 말단 도메인 코딩 유전자의 PCR 반응

[0031] 최근 연구 결과, lumazine 단백질(그림 1A)의 N-말단 영역에 있는 ASN 101 및 Ile 102 아미노산이, Ser 48, Thr 50, Asp 64 및 Ala 66(그림 1B)와 함께 lumazine 리간드에 결합에 관여하는 것이 알려져 있다. 따라서 Asn 101 및 Ile 102 아미노산의 영역을 포함하는 N-말단 lumazine 단백질 (N-LumP 118)를 코딩하는 유전자를 합성하기 위해, pPh136 벡터가 template로 사용되고 있다. 따라서, N-LumP 118 forward 및 reverse 프라이머를 설계하였고, PCR 반응을 수행하였다.

[0032] 루마진 단백질(N-LumP 118)을 코딩하는 118th position의 아미노산을 증폭시키기 위해서, forward primer로 5'-CTTTAACAAGGATCCATACATATGTTAG-3' 및 reverse primer로 5'-GGGATATCAATCACTGCAGATTAACCTGCGTC-3' 를 이용하여 pPH136를 주형으로 하여 함께 사용하였다(Solgent). 상기 프라이머 서열 중 밑줄친 부분이 BamHI 및 Pst I 제한부위이다. PCR 조건은 pre-denaturation : 95℃, 5분, denaturation : 95℃, 30초, annealing : 60℃, 30초, extension : 72℃, 1분 20초, final extension : 72℃, 7 분으로 하여, 24시간동안 진행하였다.

[0033] 2-2. 루마진 단백질 아미노말단 도메인의 돌연변이 형성

[0034] N-말단 루마진(N-LumP 118)인 V41W, S48W, T50W, D64W, 및 A66W 돌연변이(하기 표 1 참조)를 PCR 반응으로 야생형 점돌연변이들의 118개의 genetic code로부터 생성했다. 돌연변이 형성에 사용된 프라이머들은 Solgent 및 Finnzymes cooperations로부터 구매했다. 상세한 트립토판 형성을 위한 PCR 반응은 저자의 선행논문에 설명되어 있다(Kim, S.Y., Kim, R.R., Choi, J.S., Kim, Y.D. and Lee, C.Y. Bull. Kor. Chem. Soc. 2010, 31, 1017; Kim, R.R., Lee, J.H., Ko, K.W., Nam, K.S. and Lee, C.Y. Kor.J.Microbiol. 2011, 47, 14). N-Lump 118 돌연변이를 코딩하는 DNA를 대량 생산한 후, pQE30 벡터와 결합된 DNA는 E.coli 로 주입하여 형질전환 시켰다. 그 다음, mini-prep을 통해 배양된 샘플들로부터 큰 부피의 DNA들이 추출되었다. 추출된 DNA 중 일부는 DNA sequence 확인을 위해 Solgent company에 DNA sequence 분석을 의뢰하였다.

표 1

[0035]

Oligonucleotides used as primer for site directed mutagenesis of the gene for N-terminal domain of lumazine protein from Photobacterium leiognathi - Restriction enzyme sites of <i>EcoRV</i> (GATATC) and <i>SnaBI</i> (TACGTA) are underlined
S48W
5'-ATGGCCTAAAATACGTACAACCTGTCAACCAACAACCATTAC
T50W
5'-CGCCTAAAATACGTACAACCCACAATGAACAACC
A66W
5' GTTGTCGTACCCAACCATTGATCGATATCAAAGTA
V41W forward
5'-TGGATGTTAGTAAATGGTTGTTTCATTGAC
V41W reverse
5'-AGTATCTACATCAACAAGTTGAAACATACCCTC
D64W forward
5'-TGGCAAGCATTGGGTACGA
D64W reverse
5'- GATATCAAAGTACACCATATCGCCTAAAATACG

[0036]

2-3. 리간드의 제거

[0037]

인산(100mM, pH 7.0) 수용액 및 N-LumP 단백질들을 4mM dithiothreitol 및 6M urea를 포함하는 인산(100mM, pH 7.0)에서 투석시켰다. 재접힘을 위해서, 아포프로테인을 100mM 인산(pH 7.0, containing 0.3mM dithiothreitol)에서 밤새 투석하였고, 초미세여과를 이용하여 농축시켰다.

[0038]

2-4. 형질전환 및 단백질 발현

[0039]

PCR 반응을 통해 얻은 pQE30을 포함하는 재조합 플라스미드(Cambridge Soft, USA)와 야생형 N-LumP 118을 코딩하는 유전자들은 E.coli Xl-1 blue에 주입되어 heat shock 방법을 이용하여 형질전환시켰고, 그 혼합물들은 암피실린(ampicillin)을 포함하는 플레이트 위에 접종하였다. 단백질 표현 레벨은 SDS-PAGE를 이용하여 분석되었다. 단백질 발현을 위한 배지는 다음과 같다: LB (10g tryptone, yeast-extract 5g, NaCl 10g/L) 및 TB (12g tryptone, yeast-extract 24g, 4mL glycerol, 2.31g KH₂PO₄, 12.54g K₂HPO₄/L). 야생형과 돌연변이 N-LumP 유전자에 의해 발현된 단백질들의 분자 무게를 알아낸 후, 상기 단백질들을 포함한 상청액을 Ni-NTA resin과 섞어 주었다. 6X-His tagging system을 이용한 정제 방법은 이전에 알려져있는 것을 사용하였다(Kim, R.R., Lee, J.H., Ko, K.W., Nam, K.S. and Lee, C.Y. Kor.J.Microbiol. 2011, 47, 14.).

[0040]

2-5. 단백질 정량(Quantification)

[0041]

정제된 단백질의 농도는 Qubit™(Invitrogen)을 사용하여 결정하였다. 각각의 결정된 단백질들은 100 μM까지 묽힌 후, 묽혀진 단백질 500 μL는 500 μM의 루마진 500 μL와 혼합하였다. 상기 혼합액을 4℃에서 하루동안 배양하고, 8시간동안 50mM NaH₂PO₄ 완충액 500mL(pH 7.0)에서 투석하였다.

[0042]

2-6. 리간드 결합

[0043]

상기 단백질과 리간드 루마진들을 투석액(50mM NaH₂PO₄ 완충액 500mL)에서 4℃의 농도에서 8시간 동안 투석시킨 후, 1:5의 농도비로 혼합하였다. 투석 후 단백질은 부피가 1mL가 될 때까지 농축시켜주었다.

[0044]

실시예 3. 방출 스펙트럼 분석

[0045]

상기 단백질들의 흡수 스펙트럼은 250nm 내기 650nm의 파장 범위에서 Agilent 8453 Spectrophotometer를 이용하여 측정되었다. FP-750 series Fluorescence Spectrometer (JASCO) 가 280nm에서 고정된 여기(excitation)장

태를 띠는 한 개의 트립토판 아미노산 잔기(N-LumP 118 V41W, S48W, T50W, D64W, A66W)를 가지고 있는 돌연변이 단백질들의 방출 스펙트럼 측정에 사용되었다.

[0046] 또한, 돌연변이 lumazine 단백질의 효과적인 분광 분석을 위해, Valine 41, Serine 48, Threonine 50, Aspartic Acid 64 및 Alanine 66 (그림 1B)과 같은 위치 지정 돌연변이가 수행되었다. 이 방법은 트립토판과 상기 아미노산간의 교체를 포함하고, 그 결과 N-LumP 트립토판 돌연변이가 합성되었다. 야생형 N-LumP 는 트립토판 아미노산을 가지고 있지 않기 때문에, 새롭게 생성된 트립토판 잔기의 형광 특성은 단백질의 동적 특성 조사를 위한 프로브 역할을 할 수 있다.

[0047] 야생형 및 돌연변이 N-LumP 광학적 특성 분석 실험으로, lumazine 리간드에 N-말단 lumazine 단백질의 결합의 가능성은 UV-visible 도메인에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 27 μ M N-LumP 118 A66W가 배양 후 lumazine 형광물질에 결합된다는 것을 알 수 있다. 루마진과 결합한 27 μ M N-LumP 118 A66W와 free lumazine 30 μ M 을 준비하였다. 그들은 다음 Agilent 8453 분광 광도계를 사용하여 스캔되었다. 그 결과, lumazine을 첨가하지 않은 N-LumP 118 A66W는 410nm에서 약한 피크 (chromophore의 특성)를 보였다. 그러나 lumazine과 함께 배양된 N-LumP 118 A66W는 410nm에서 강한 피크를 보였다(도 3).

[0048] 이러한 결과는 돌연변이 N-말단 lumazine이 배양하는 동안 lumazine 리간드에 결합하는 것을 알 수 있다. 정확한 결합 비율을 결정하기 위해, 최대 흡수 몰 흡광 계수 및 문헌값 ($\epsilon_{410} = 10,800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)을 lumazine의 양을 계산하기 위해 램버트 - 비어의 법칙 방정식에 대입하였다. 그 결과, 30 μ M의 값은 추론된 단백질의 농도에 해당되었다. 따라서, lumazine과 N-LumP 단백질의 결합 몰비는 1:1인 것으로 나타났다. 이 결과는 왜 배양없이 분리 및 정제된 단백질(410nm에서 약간의 발색단 피크를 보여주는 점선)이 lumazine 리간드와 완전히 해리되지 않는지를 보여주는 것이다.

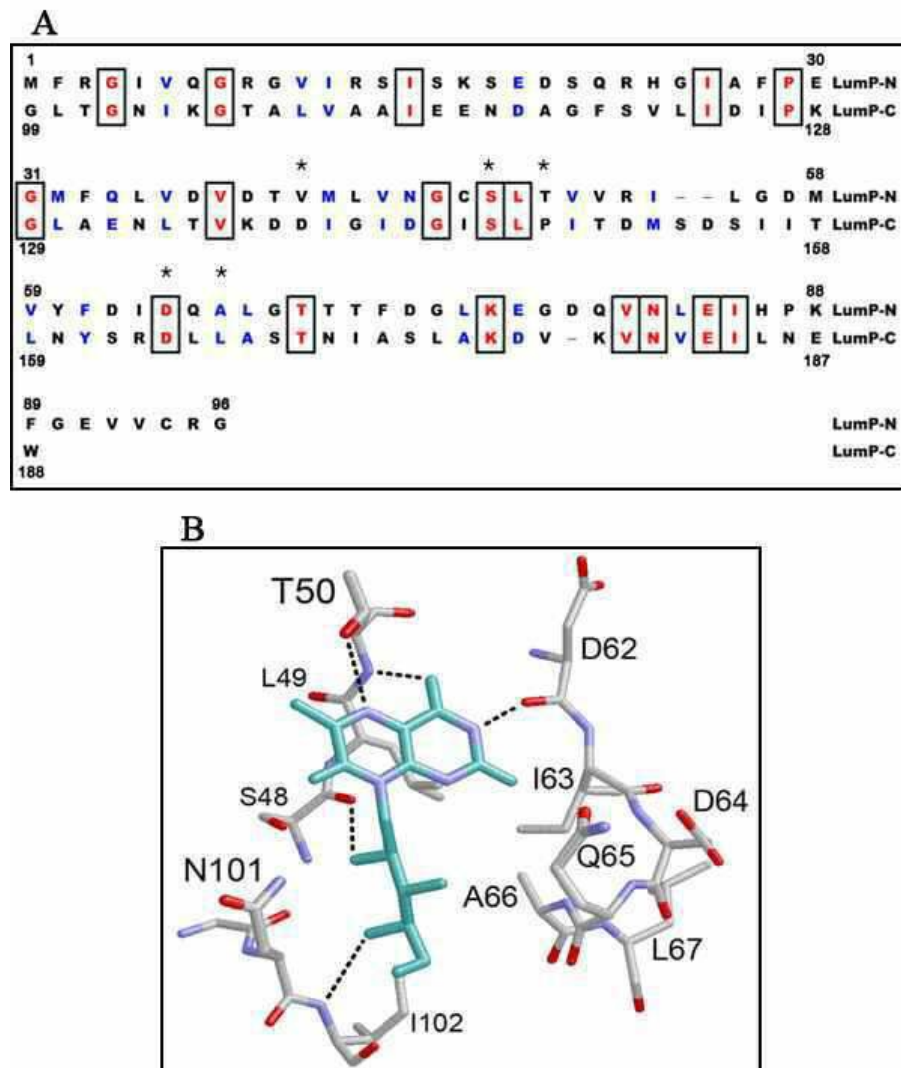
[0049] 이러한 조건에서, 루마진 리간드와 함께 배양된 N-LumP 118 단백질들의 결합특성을 분석하였다. 분리된 루마진 리간드들이 상기 단백질들과 결합하고, 루마진의 λ_{max} (최대 흡수)가 일반적인 경우보다 다소 길어진다는 것을 알 수 있었다. free 루마진과 상기 단백질들과 결합된 루마진 리간드들과의 파장은 다음과 같다: Lumazine, 407 nm; lumazine with N-LumP 118 wt, 412 nm; N-LumP 118 V41W, 412nm; N-LumP 118 S48W, 415 nm; N-LumP 118 T50W, 409 nm; N-LumP 118 D64W, 409 nm; N-LumP 118 A66W, 415 nm(도 4).

[0050] 이상에서 설명한 바와 같이, 각 돌연변이 N-말단 lumazine 단백질은 하나의 트립토판 아미노산이 포함되어 있는 것을 알 수 있다. 따라서 각 단백질에 트립토판의 3 차원 영역을 분석하기 위해서, 각 단백질에 트립토판의 형광 방출 스펙트럼(도 5)을 측정 하였다. 280nm에서 고정 여기를 보이는 lumazine 리간드를 위해 수행되었고, 모든 N-LumP 118 단백질과 각각의 형광 방출 스펙트럼이 스캔되었다. 상기 결과로부터, 각 돌연변이 단백질의 상대 형광 강도의 최대치는 각각의 발광 파장과 약간의 차이(도 5)를 보이는 것으로 관찰되었다. 특히, N-LumP 118 S48W가 V41W, T50W보다 가장 긴 방출 피크를 보이는 것으로 관찰되었다.

[0051] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

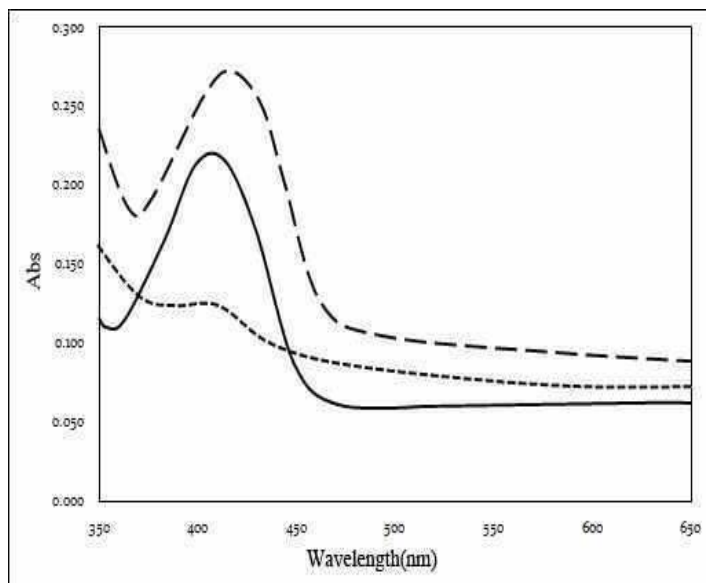
도면1



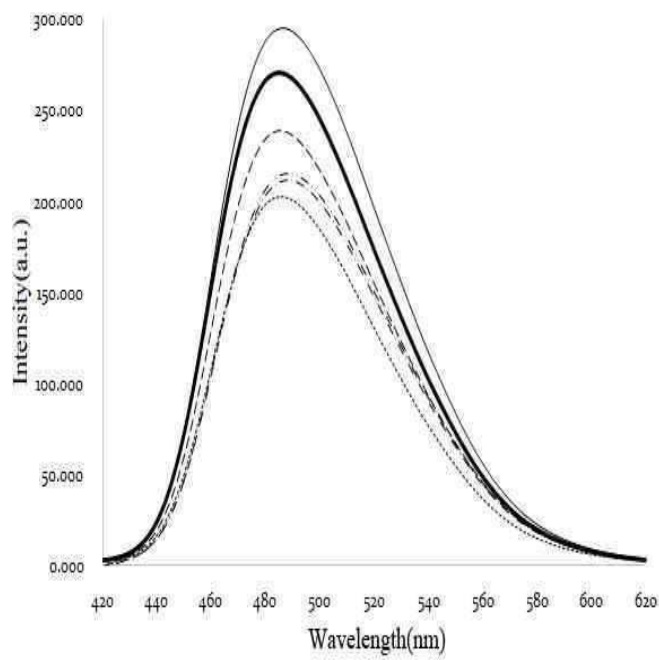
도면2

	M	R	G	S	H	H	H	7		
AAATTA	ACT	ATG	AGA	GGA	TCG	CAT	CAC	CAT	60	
H	H	H	G	S	V	M	F	R	G	17
CAC	CAT	CAC	GGA	TCC	GTA	ATG	TTT	AGA	GGT	90
<i>Bam</i> HI										
I	V	Q	G	R	G	V	I	R	S	27
ATT	GTT	CAA	GGT	CGT	GGT	GTT	ATT	CGA	TCC	120
I	S	K	S	E	D	S	Q	R	H	37
ATT	TCA	AAA	AGT	GAA	GAT	AGT	CAG	CGA	CAT	150
G	I	A	F	P	E	G	M	F	Q	47
GGG	ATT	GCA	TTC	CCT	GAG	GGT	ATG	TTT	CAA	180
L	V	D	V	D	T	<u>V</u>	M	L	Y	57
CTT	GTT	GAT	GTA	GAT	ACT	GTA	ATG	TTA	GTA	210
N	G	C	<u>S</u>	L	<u>T</u>	V	V	R	I	67
AAT	GGT	TGT	TCA	TTG	ACA	GTT	GTC	CGT	ATT	240
L	G	D	M	V	Y	F	D	I	<u>D</u>	77
TTA	GGC	GAT	ATG	GTG	TAC	TTT	GAT	ATC	GAC	270
Q	<u>A</u>	L	G	T	T	T	F	D	G	87
CAA	GCA	TTG	GGT	ACG	ACA	ACA	TTT	GAT	GGA	300
L	K	E	G	D	Q	V	N	L	E	97
TTA	AAA	GAA	GGC	GAT	CAG	GTA	AAC	CTA	GAG	330
I	H	P	K	F	G	E	V	V	G	107
ATC	CAC	CCT	AAA	TTT	GGT	GAA	GTG	GTT	GGC	360
R	G	G	L	T	G	N	I	K	G	117
CGT	GGT	GGA	TTA	ACA	GGA	AAT	ATT	AAA	GGC	390
T	A	L	V	A	A	I	E	E	N	127
ACT	GCG	CTG	GTC	GCA	GCA	ATA	GAA	GAG	AAT	420
D	A	G	*							130
GAC	GCA	GGT	TAA	TCT	GCAG	CCAAG	CTTAAT			450
<i>Pst</i> I										

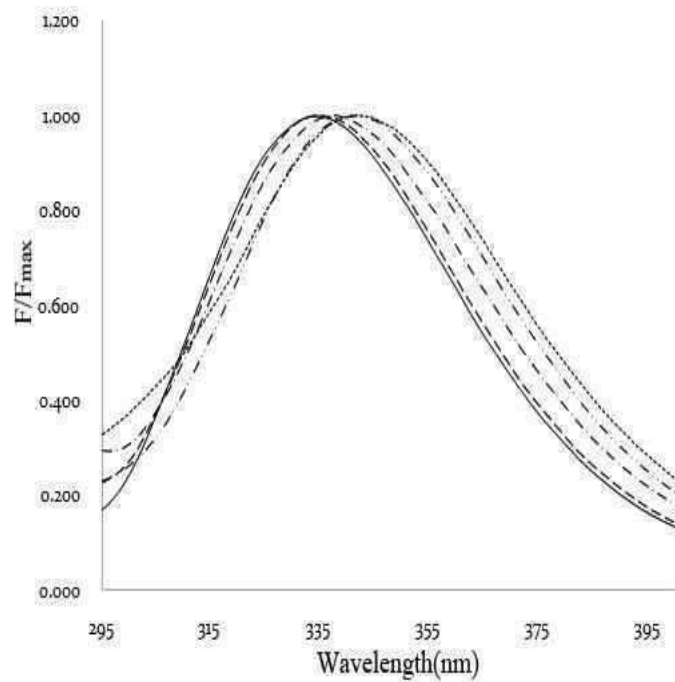
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> MUTATED LUMAZINE PROTEIN AND THE USE THEREOF
- <130> PB13-11380
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Photobacterium leiognathi
 <220><221> CDS
 <222> (10)..(399)
 <400> 1

aaattaact atg aga gga tgc cat cac cat cac cat cac gga tcc gta atg 51
 Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Val Met
 1 5 10

ttt aga ggt att gtt caa ggt cgt ggt gtt att cga tcc att tca aaa 99
 Phe Arg Gly Ile Val Gln Gly Arg Gly Val Ile Arg Ser Ile Ser Lys
 15 20 25 30

agt gaa gat agt cag cga cat ggg att gca ttc cct gag ggt atg ttt 147
 Ser Glu Asp Ser Gln Arg His Gly Ile Ala Phe Pro Glu Gly Met Phe
 35 40 45

caa ctt gtt gat gta gat act gta atg tta gta aat ggt tgt tca ttg 195

Gln Leu Val Asp Val Asp Thr Val Met Leu Val Asn Gly Cys Ser Leu
 50 55 60

aca gtt gtc cgt att tta ggc gat atg gtg tac ttt gat atc gac caa 243
 Thr Val Val Arg Ile Leu Gly Asp Met Val Tyr Phe Asp Ile Asp Gln
 65 70 75

gca ttg ggt acg aca aca ttt gat gga tta aaa gaa ggc gat cag gta 291
 Ala Leu Gly Thr Thr Thr Phe Asp Gly Leu Lys Glu Gly Asp Gln Val
 80 85 90

aac cta gag atc cac cct aaa ttt ggt gaa gtg gtt ggc cgt ggt gga 339
 Asn Leu Glu Ile His Pro Lys Phe Gly Glu Val Val Gly Arg Gly Gly
 95 100 105 110

tta aca gga aat att aaa ggc act gcg ctg gtc gca gca ata gaa gag 387
 Leu Thr Gly Asn Ile Lys Gly Thr Ala Leu Val Ala Ala Ile Glu Glu
 115 120 125

aat gac gca ggt t aatctgcagc caagcttaat

420

Asn Asp Ala Gly

130