TSPE16070-024-3

저온 적응관련 단백질의 구조 모델링을 통한 극지생물의 저온적응 기작 연구

KOPRI
극지연구소

The Scripps Research Institute

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “남극 고유생물의 저온적응 기작 규명과 활용가치 발굴” 과제의 위탁연구 “저온 적응관련 단백질의 구조 모델링을 통한 극지생물의 저온적응 기작 연구” 과제의 최종 보고서로 제출합니다.

KOPRI 극지연구소

2017. 01.31

총괄연구책임자 : 박 현

위탁연구기관명 :The Scripps Research Institute

위탁연구책임자 : 박 하 증

보고서 초록

<table>
<tr><td>과제관리번호</td><td></td><td>해당단계
연구기간</td><td>2014. 1. 1. ~
2016. 12. 31</td><td>단계 구분</td><td>(3) / (3)</td></tr>
<tr><td rowspan="2"><u>연구사업명</u></td><td>중 사 업 명</td><td colspan="4">극지연구소 연구·운영비지원 사업</td></tr>
<tr><td>세부사업명</td><td colspan="4">주요사업(기관목적사업)</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연구과제명</td><td>중 과 제 명</td><td colspan="4">기관고유사업</td></tr>
<tr><td>세부(단위)과제명</td><td colspan="4">저온 적응관련 단백질의 구조 모델링을 통한 극지생물의 저온적응 기작 연구</td></tr>
<tr><td>연구책임자</td><td>박 현</td><td>해당단계
참여연구원수</td><td>총 : 명
내부 : 명
외부 : 명</td><td>해당단계
연구비</td><td>정부: 천원
기업: 천원
계: 천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및
소속부서명</td><td colspan="2"></td><td>참여기업명</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="5">상대국명 : 미국 상대국연구기관명 : 스크립스 플로리다</td></tr>
<tr><td>위 탁 연 구</td><td colspan="5">연구기관명 : 극지연구소 연구책임자 : HaJeung Park</td></tr>
<tr><td colspan="4">요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)</td><td>보고서
면수</td><td>18</td></tr>
<tr><td colspan="6">KOPRI에서 밝힌 호냉성 균에서 유래한 단백질의 구조를 이용하여 이 단백질들의 기질 결합관계, 효소역학관계, 활성화 등에 대한 연구를 molecular dynamics (MD), in silico docking 등의 기법을 이용해 연구하였다. 그 결과로 첫째, UibX의 기질결합에 관한 모델을 만들고, 기질결합에 관여하는 잔기들을 확인하였고, 둘째, UbiA와 UbiX의 단백질 결합에 관한 단서를 마련하고, 셋째, OdoMMSH의 기질 결합부위와 보결 원자단의 결합부위 및 효소 역학 메카니즘의 연구, 넷째, Spo0A의 중합체 형성 및 활성 메카니즘에 관한 연구를 성공적으로 수행 하였다. 또한 호냉성 군에서 유래한 단백질이 갖는 불안전성으로 인한 단백질 결정화의 어려움과, 단백 결정의 회절 문제를 해결하기 위한 기법을 연구하였다. 특히, 결정의 탈수화를 유도함으로 결정의 회절현상이 현저히 향상되는 것을 확인하고, 탈수화에 필수적인 조건을 확립하였다. 호냉성 균의 저온 적응 메카니즘에 관여하는 센서 도메인에 대한 연구로, PAS 도메인을 가지는 단백질을 data base에서 확인, annotation하는 과정을 거쳤고, 일부 단백질에 대해서 클로닝 및 분리, 정제 기법을 확립하였다.</td></tr>
<tr><td rowspan="2">색 인 어
(각 5개 이상)</td><td>한 글</td><td colspan="4">결정 탈수화, 컴퓨터 시뮬레이션, 단백결정화, 단백질 모델링, 단백질 구조</td></tr>
<tr><td>영 어</td><td colspan="4">molecular dynamics simulation, crystal dehydration, in silico docking, crystallization, modeling, protein structure</td></tr>
</table>

요 약 문

Ⅰ. 제 목

저온 적응관련 단백질의 구조 모델링을 통한 극지생물의 저온적응 기작 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

호냉성 유래 단백질은 저온 활성화의 특성상 단백질의 구조가 불안정한 것으로 알려져 있고, 단백질의 결정화가 까다로운 것으로 알려져 있다. 따라서 본 과제에서는 이러한 문제를 극복하고 단백질의 구조를 바탕으로 한 연구의 수행을 위해 생물정보학적 접근을 이용해 호냉성 박테리아 유래 저온 적응 단백질을 탐색하고 새로운 유용 타깃을 선정하며, 난 결정화 혹은 난 회절성 저온 적응 단백질 등, 삼차 구조분석이 까다로운 타깃의 구조-기능 연구를 위해, 고해상도의 상동 모델과 *ab initio* 모델 구축하고, 이를 통해 저온성 단백질의 구조-기능 상관관계를 이해하고, 저온 적응 단백질의 분자적 진화를 컴퓨터를 이용한 분석과 통계적인 연구를 통해 규명.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 저온성 박테리아에서 타깃 선정을 위해 저온 적응 단백질에 대한 생물정보적 접근

2. 결정화 스크리닝 및 구조결정 처리량 극대화

3. 주요 과제의 타깃 단백질의 구조적/기능적 메커니즘 이해를 위한 컴퓨터를 이용한 시뮬레이션 연구

Ⅳ. 연구개발 결과

1. *Colwellia psychrerythraea* 34H의 PAS 도메인을 가지 센서 단백질 (48 개)의 조사 및 상동 구조 모델링을 바탕으로 한 센서 도메인 boundary 확인 및 상호 유사성에 바탕을 둔 타겟 선정, PAS 도메인을 가진 4 종의 대표 단백질

에 대한 cloning 및 단백질 분리 정제 기법 확립.

2. 결정화에 성공한 단백질 결정의 물리적 변화 유도를 통한 회절한계 극복 및 데이터의 질적 향상을 위한 기법 마련.

3. 시뮬레이션을 통한 효소 역학적 원리에 대한 가설 확립 및 가설을 증명할 수 있는 실험 기법 제안

가. UbiX기질의 전구체 합성에 관여하는 UbiA에 대한 단백질 일차/이차 구조 분석과 삼차구조 모델링을 통한 UbiX와 결합가능성 제시.

나. 저온성 효소 (UbiX, DddC)의 기질결합 및 효소 역학 메커니즘에 관한 컴퓨터 시뮬레이션 연구 수행으로 논문의 질적 향상에 기여.

다. *Paenisporosarcina* sp. Spo0A의 활성상태인 인산화 Spo0A의 활성기전에 관한 컴퓨터 시뮬레이션 연구 수행으로 논문의 질적 향상에 기여.

Ⅴ. 연구개발 결과의 활용계획

저온성 단백질에 대한 중온성 또는 호열성 단백질과의 비교 연구는 저온적응 단백질의 분자적인 진화와 그 진화의 방향에 대한 정보를 제공하고 이를 이용하여 기능 개선형 저온성 단백질 제작 및 상업화에 대한 기초연구 자료로 이용 가능.

Summary

The main project (KOPRI) aim to conduct biochemical and structural studies on cold-adapted proteins of artic organisms that are expressed for their survival and more specifically to overcome cold stress. The sponsored research (TSRI) plans to maximize the productivity of the main research (KOPRI) through i) verification of cold-adapted proteins in pychrotrophic bacteria, ii) increase throughput of crystallization hits exploiting the infra structures of Scripps Florida, iii) achieve full understanding of mechanism of cold-adapted proteins through computational chemistry simulation analyses such as molecular mechanics analysis (MM), molecular dynamics analysis (MD), and *in silico* docking analysis.

Quantitative studies show cold-adapted proteins tend to have amino acid substitutions, which increase structural flexibility in order to enhance protein function at low temperature [1]. Such proteins have low tendency of producing high quality crystals as increased flexibility is adverse for crystallization and growth. This can be remedied by the following approach:

I) Increasing the throughput of crystal screening process and also by increasing the size of crystal screening matrices,

II) Bioinformatics analyses such as secondary structure prediction, disorder region prediction, and domain identification provides critical information to design crystallizable gene expression constructs,

III) Compile previous crystallization conditions that are used for cold-adapted proteins and identify condition biases.

In structural/functional study aspect, impact of a specific amino acid substitution can be delineated through MD simulations where atomic scale vibrations or movements of proteins will be accurately predicted and compared to amino acid substitutions in ortholog proteins of mesophilic and thermophilic bacteria. This information will enhance the understanding of functional mechanism of cold-adapted proteins. Furthermore quantitative analyse will yield the information of evolutionary pressure imposed on the cold-adapted proteins, that is a tug-of-war between preservation of protein function and adaptation to low temperature. By careful statistical study can provide evolutionary trend of cold adaptation, which can be applied to generate artificial cold-adapted proteins or improved cold-adapted proteins through mutations.

KOPRI 극지연구소

Contents

Chapter 1 Introduction ·····7

Chapter 2 Current Status of Technical Developments ·····8

Chapter 3 Research Results ·····8

Chapter 4 Achievements and Contributions ·····15

Chapter 5 Future plans Related to This Research·····16

Chapter 6 references·····16

KOPRI 극지연구소

목 차

제 1 장 서론 ·····7

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ·····8

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ·····8

제 4장 목표 달성도 및 관련분야 대외기여도 ·····15

제 5장 연구개발결과의 활용 계획 ·····16

제 6 장 참고문헌 ·····16

KOPRI
극지연구소

제 1 장 서론

극지의 저온 환경은 물의 점성감소, 분자 확산율 감소, 화학 반응 감소 등을 유도하여 생화학적 대사과정을 방해함으로 생물이 서식하기에 부적절할 것으로 보이나, 이러한 환경에서도 서식하고 번성하는 극지생물의 연구는 단순한 과학적 흥미를 떠나 경제적 가치를 부가할 의학적 /산업적 기술의 개발로 이어질 수 있다 [1]. 일례로, 극지 생물에서 특이하게 발견되는 결빙 방지 단백질 (AFP)의 발견은 저온에 약한 특정 식물이 냉해를 견딜 수 있는 종으로의 형질 변화에 응용될 수 있을 것이다 [2-3]. 극지 생물은 대사의 전단계에 걸쳐서 저온에 적응하기 위한 진화의 과정을 거쳤으며, 이러한 진화의 과정은 전체 유전자 염기 서열의 분석으로 일부 확인할 수 있다 [1]. 하지만, 유전자의 변화가 실제 단백질 수준에서 어떠한 영향을 미치는가는 단백질의 기능을 생화학적으로 분석하는 과정을 거쳐야 완전히 해명할 수 있다. 특히, 이런 생화학 분석 과정에서 단백질의 삼차 구조를 분석하는 일은 기능을 이해하는데 결정적인 단서를 제공하므로, 구조분석에 더 많은 연구가 이루어져야 할 것이다.

단백질의 3차원 구조 분석기법으로는 X-선 회절법 (X-ray Crystallography), 자기공명기법 (Nuclear Magnetic Resonance), 동결 전자 현미경 (Cryo-EM) 그리고 컴퓨터를 이용한 상동성 모델 (homology modeling) 혹은 *ab initio* 모델 등 있으며, 각각의 분석기법은 장단범을 가지고 있다. 자기공명기법의 경우 단백질 시료의 동위 원소 치환이 까다롭고, 구조분석에 오랜 시간이 걸리며, 특히 질량이 큰 단백질 (약 45kDa 이상)의 경우 구조분석이 불가능한 단점이 있다. 동결 전자 현미경 기법의 경우는 고해상도의 구조를 얻기가 힘든 단점이 있다. X-선 회절법은 고해상도의 구조를 빠른 시간 내에 분석할 수 있는 반면, 단백질의 결정화가 분석의 전제 조건이다. 상동성 모델의 경우 이미 알려진 구조의 data base를 이용하여 타깃 단백질의 삼차 구조를 '예측'하는 방법으로 아미노산 서열의 유사성이 높은 경우 구조의 예측이 수월하지만 정확성의 검증은 실험적인 방법으로만 가능하다.

호냉성 유래 단백질은 저온 활성화의 특성상 단백질의 구조가 불안정한 것으로 알려져 있고, 단백질의 결정화가 까다로운 것으로 알려져 있다. 따라서 본 과제에서는 이러한 문제를 극복하고 단백질의 구조를 바탕으로 한 연구의 수행을 위해, 생물 정보학적 접근을 이용한 호냉성 박테리아 유래한 저온 적응 단백질을 탐색하고, 새로운 유용 타깃을 선정하였다. 또한 난 결정화 혹은 난 회절성 저온 적응 단백질 등, 삼차 구조분석이 까다로운 타깃의 구조-기능 연구를 위해, 고해상도의 상동 모델과 *ab initio* 모델 구축하고, 이를 통해 저온성 단백질의 구조-기능 상관관계를 이해하고, 저온 적응 단백질의 분자적 진화를 컴퓨터를 이용한 분석과 통계적인 연구를 통해 규명 하고자 한다.

과제	연차별 연구내용		
	1차년도 (2014년)	2차년도 (2015년)	3차년도 (2016년)
저온 적응관련 단백질의 구조 모델링을 통한 극지생물의 저온적응 기작 연구	-저온성 박테리아에서 타깃 선정을 위해 저온 적응 단백질에 대한 생물정보학적 접근	-호냉성균에서 PAS 도메인을 가지 센서 단백질의 구조 연구를 위한 단백질 발현/정제	-호냉성균에서 PAS 도메인을 가지 센서 단백질의 구조 연구
	-결정화 스크리닝 및 구조 결정 처리량 극대화	-난결정성 단백질의 결정화/ 구조분석 시도	-결정의 물리적 변화 유도를 통한 회절한계 극복 기법 확립
	-타깃 단백질의 구조적/기능적 메커니즘 이해를 위한 컴퓨터를 이용한 시뮬레이션 연구	-저온성 효소 (DddC, UbiX, UbiA)의 기질결합 및 효소 역학 메커니즘 연구	-저온성 효소 (Spo0A)의 활성 및 중합체 형성 메커니즘 연구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

호냉성 생물 유래 단백질의 구조 연구가 국외에서 산발적으로 되고 있으나, 특정 대사 회로 혹은 동일 기능 단백질군 모두를 대상으로 하는 체계적인 연구는 아직 이루어지지 않은 상태이다. 특히, 본 연구에서 실시하는 실험적 구조 연구와 컴퓨터 시뮬레이션을 동시에 접목한 연구는 두 연구 기법의 장단점을 서로 보완할 수 있어 더 나은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

KOPRI 극지연구소

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

모든 생물은 주변의 환경을 감지하기위한 센서를 가지고 있다. 극지의 저온 환경에 적응하기위해 호냉성균인 *Colwellia psychrerythraea*도 주변 환경을 감지하기 위한 sensor를 발현할 것으로 예상된다. Per-ARNT-Sim (PAS) 도메인은 세포내 신호전달에 관련하는 단백질에서 다수 발견되며 물리/화학적 변화를 감지하는 센서 도메인인 PAS 도메인이 활성화되면 효력을 내는 기능 도메인의 구조 변화를 유도하여 활성을 내는 것으로 알려져 있다 (그림 1) [4-5].

PAS 도메인의 구조는 전생물 종에서 그 접힘 구조가 유사하여 상동성 구조 모델링을 하기 유리하다. 상동성 구조 모델링은 단백질의 일차 구조, 즉 아미노산의 서열을 바탕으로 이차 구조를 예측하고, 또 이것을 바탕으로 접힘 구조를 예측하는 실험 방법으로 이미 알려진 방대한 구조 data base를 바탕으로 점점 정확도가 높아져 아미노산 서열의 동일 정도가 25%, 유사성이 50%일 경우 접힘 구조를 정확하게 예측할 수 있다 [8].

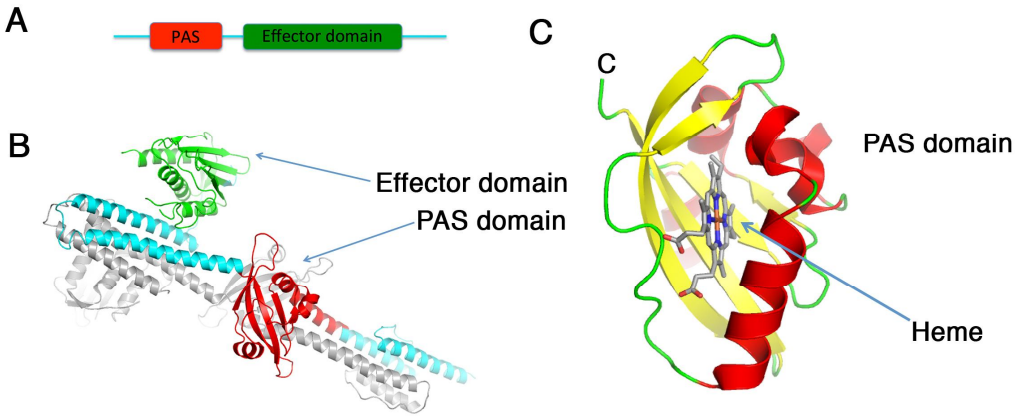
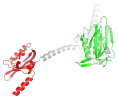


그림 1. PAS 도메인의 구조. **A**) 전형적인 PAS 도메인을 갖는 단백질의 1차구조. **B**) PAS 도메인 단백질인 *Streptococcus* VicK의 삼차구조. 기능 도메인은 Histidine Kinase의 기능을 함. PAS 도메인에 결합하는 기질은 아직 알려지지 않았음 [6]. **C**) *E. coli* DOS의 PAS 도메인. 산소분자를 인식하기 위한 Heme이 PAS에 보결 원자단으로 존재함 [7].

*Colwellia psychrerythraea*의 게놈에서 PAS 도메인으로 annotation된 오십 개의 단백질을 선정하였다. PAS 도메인의 경우, 아미노산의 서열이 다양하여 일차 구조만으로 도메인의 확인이 쉽지 않아 상동성 모델을 만들어 annotation을 확인하는 작업을 하였고 그중 45개의 단백질이 실제로 PAS도메인을 보유한 것을 확인하였다. 이렇게 준비된 단백질 중 지질 결합 단백질, 이차 구조의 접힘이 좋지 않게 예측된 단백질, 분자량이 큰 단백질을 제외하였고, 이 중에서 아미노산의 서열을 통해 이미 그 기능을 예측할 수 있는 단백질을 타깃으로 선정하였다 (**표 1**).

표 1. *Colwellia psychrerythraea* PAS 도메인 단백질 타깃

번호	상동성 구조 모델	유전자 번호	예측 기능 도메인
1		Q483T7	Transcription activator
2		Q489Q4	Cyclic di-GMP phosphodiesterase
3		Q47UF9	His Kinase
4		Q47UF6	Cyclic di-GMP phosphodiesterase
5		Q485A7	His Kinase

이렇게 선정된 타깃에 대한 유전자 cloning과 단백질 발현 및 정제를 실시한 결과 Q47UU6 유래 단백질의 분리 정제만 가능 하였다. 따라서, 타깃의 범위를 core PAS domain만으로 축소하여 cloning, 발현 및 분리를 시도하였고, 그 결과 5종의 단백질에 대한 분리가 성공적으로 이루어졌다 (**표 2**). 이 결과를 바탕으로 대량의 단백질을 분리하고 결정화 작업을 수행할 예정이다.

표 2. 새로 선정된 타겟의 PAS domain의 분리 정제 결과

Target Protein	Predicted Function	Vector	Cloning/ Expression	Purification
Q47UF9	unknown	pET24b	success	fail
Q47UU6	digualylate cyclase	pET24b	success	success
Q485A7	histidine kinase	pET24b	success	fail
Q486E7	unknown	pET24b	success	fail
Q486I1	unknown	pET24b	success	fail
Q485X2	unknown	pET24b	success	fail
Q47UF6-PAS	cyclic dGMP phosphodiesterase	pET24b	success	success
Q47UF7-PAS1	Methyl-accepting chemotaxis protein	pET24b	success	fail
Q47UF9-PAS	unknown	pET24b	success	success
Q486E7-PAS	unknown	pET24b	success	success
Q47UF7-PAS2	Methyl-accepting chemotaxis protein	pET24b	success	success

KOPRI 극지연구소

단백질 결정이 큼에도 불구하고 회절이 잘되지 않는 경우에 대비하여, 단백질이나 다른 대분자의 결정의 물리적 변화를 유도하여 회절의 한계를 극복할 수 있다. 결정의 물리적 변화는 여러 가지 방법으로 유도할 수 있지만, 신뢰도가 높은 방법으로 알려진 탈수 방법(Dehydration)을 사용하며, Scripps FL에 장비가 구축되어 있는 Free Mounting System (FMS)를 이용하였다. 모델로 사용된 결정은 처리하지 않은 경우 회절이 ~15A에서 이루어 졌지만, 75%로 탈수 후에는 회절한계가 3A까지 낮아져 어려움 없이 구조분석을 할 수 있었다 (**그림 2**). 또한 탈수된 결정의 물리적인 변화에 관한 관찰을 통해 탈수가 단백질 결정에 미치는 영향을 조사할 수 있었다.

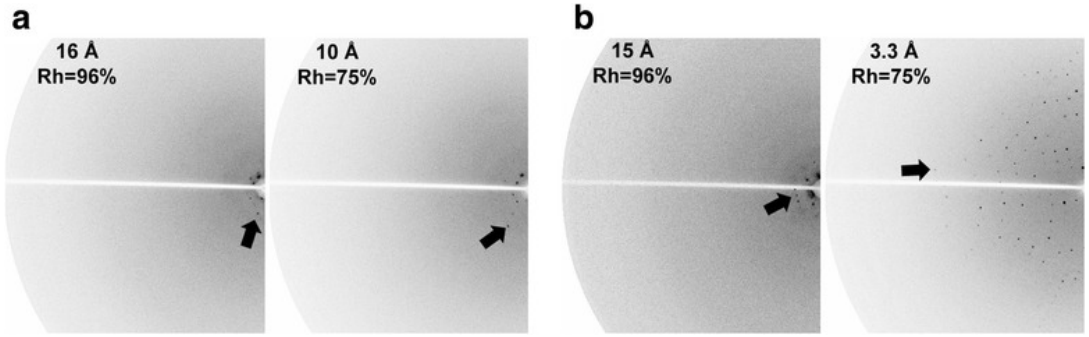


그림 2. 결정의 탈수로 회절 현상이 향상됨. (A) 대부분의 경우 탈수에 의한 회절 향상이 이루어지지 않은 경우. (B) 약 12 %의 결정은 탈수에 의한 물리적 변화로 회절현상이 상당히 좋아짐.

Dehydrogenase의 역할을 하는 효소로 DMSP의 분해 경로에 관여하여 황의 환경계 순환에 중요한 역할을 한다 [10-11]. UbiX 관련 프로젝트에서는 이 단백질이 UbiA와 결합할 가능성에 대하여 유추하고 그 부위의 확인을 위해 이미 알려진 *E. coli*의 UbiA를 이용하여 상동성 모델를 구축하고, 여러 종에서 발현되는 UbiA의 아미노산 서열을 비교하여 아미노산이 변이가 없는 보존 잔기가 단백질 표면에서 negarive charge patch를 형성하는 것을 확인하였고 이것이 UbiX의 positive charge patch와 상보적으로 결합할 가능성을 제시하였다 (**그림 3**).

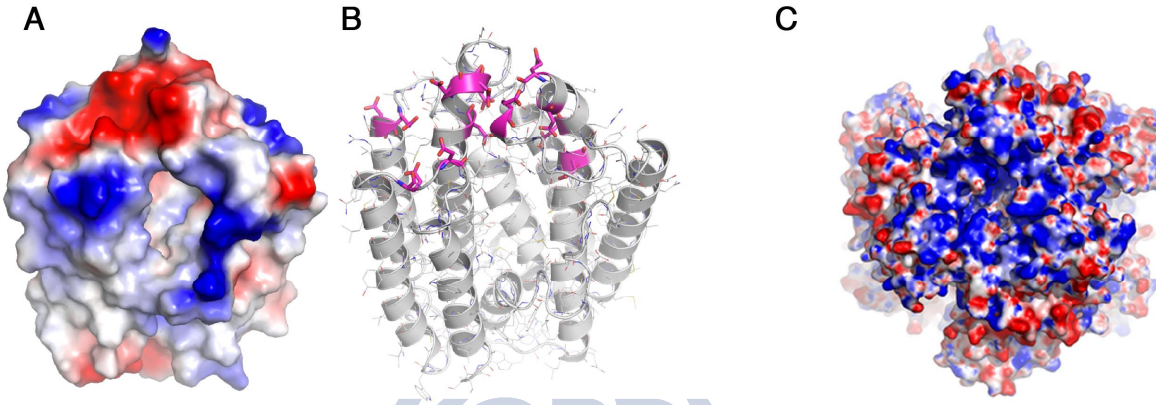


그림 3. *Colwellia psychrerythraea* UbiA의 상동성 모델. A)와 B) 기질 결합부 주변 음전하를 띤 아미노기가 전 생물 종에서 잘 보존된 것을 확인하였음. C) UbiX X-선 단백질 구조. 기질이 결합할 것으로 예측되는 부위의 electropotential이 UibA와 반대로 양전하를 띠고 있음.

KOPRI 극지연구소

단백질 표면의 엔탈피 정도, 단백질 간의 동종 결합 정도, 구조의 안정 상태 등이 결정 형성에 주요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다, Maltose Binding Protein (MBP)는 단백질의 결정에 적합한 인자를 보유하여, 결정을 도와주는 결정 보조인자로 알려져 있다. 따라서 난 결정성 단백질로 판명된 타깃 단백질을 MBP와 키메라로 만들어 결정을 만드는 실험을 수행하였다 (**표 3**).

표3. 결정 형성인자인 MBP와 키메라를 구성한 타깃 단백질 List

Target Protein	Vector	Modification	Cloning/ Expression	Purification	Crystal
Q482K1	pET28a	MBP Chimera	success	success	in progress
Q47XI4	pET28a	MBP Chimera	success	success	in progress
Q487G3	pET28a	MBP Chimera	success	success	in progress

컴퓨터 시뮬레이션 중에 steered molecular dynamics (SMD)기법은 단백질의 기질에 steered force라는 인위적인 힘을 가하여 오랜 시간이 소요되는 시뮬레이션의 시간을 단시간

으로 줄이는 동시에 가한 힘과 기질이 움직이는 속도를 계산할 수 있어 기질이 단백질에 어떠한 힘으로 결합하는지, 기질의 결합 경로가 어떻게 되는지를 알아내는 실험 방법이다 [9-10]. DddC는 그 기질의 결합에 대한 연구가 전무하여 SMD의 기법을 통해 기질-단백질의 결합 방식/경로를 파악하는 도구로 사용하였다. 그 결과 *Colwellia psychrerythraea* DddC 의 기질인 MMSA가 결합 모델을 구축하였다 (**그림 4**). 이 모델의 구조 분석을 통해 MMSA의 결합에 중요한 역할을 하는 잔기들을 확인 하였다. 또한 보존 잔기인 R103과 R279가 MMSA에 대한 gatekeeper 역할을 한다는 것을 기질 결합 속도와 당김 에너지 변화를 통해 확인하였고, 이 잔기들이 기질과 수소결합을 하여, 올바른 결합을 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

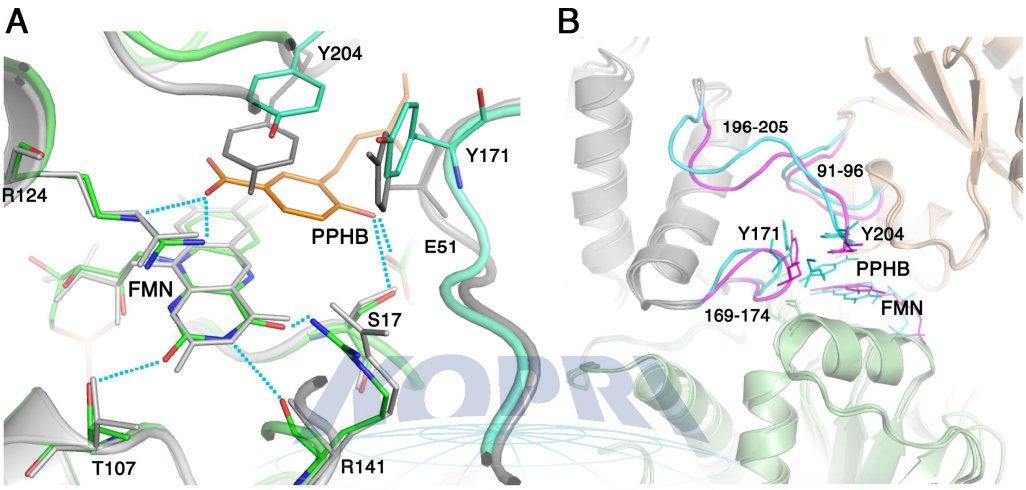


그림 4. *Colwellia psychrerythraea* UbiX의 기질 결합모델. **A**) UbiX의 기질인 PPHB가 Y204와 FMN 사이에 intercalation된 결합이 일어남을 SMD로 보여줌. **B**) UbiX의 잔기 196-205와 196-174부위의 유연성 구조가 PPHB의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 보임.

*Odo*MMSDH의 기질 결합연구에서는 thiohemiacetal intermediate 상태를 KPORI에서 밝힌 구조를 바탕으로 모델을 만들고 시뮬레이션을 통해 안정화된 구조를 모델링하였다 (**그림 5**). 그결과 (*S*)- (*R*)-thio hemiacetal 라세믹 중간단계 모두 Cys280에 결합하는데 아무런 문제가 없으며, 두 stereoisomer가 차별 없이 단백 효소에 결합한다는 것을 밝혔다. 또한 모델링된 구조를 이용하여 기질 결합에 관여하는 잔기의 위치를 파악하고, 효소 역학적 메카니즘을 밝혔다.

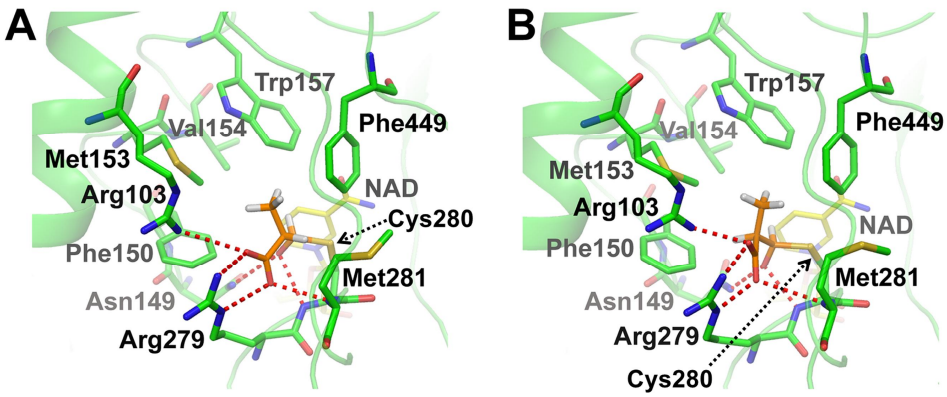


그림 5. *Odo*MMSDH의 thiohemiacetal intermediate 상태를 컴퓨터 시뮬레이션을 통해 모델링한 구조. 그림 A와 B는 (*S*)-(*R*)-thio hemiacetal 라세믹 중간단계를 보여줌. 기질의 중간단계는 Cys280의 황원자에 공유결합하고 있음. 두 라세믹 상태는 단백질 결합이 매우 유사하며, 결합에 영향을 미치지 않는 것으로 판단됨.

Hot Spot은 단백질의 표면에 존재하는 Pocket으로 기질 혹은 분자량이 작은 화합물의 결합이 이루어지는 부위를 일컫는다 [11]. Docking 실험은 컴퓨터상에서 단백질이 화합물과 결합하는 것을 예측하는 실험방법이다 [12]. DddC는 NAD cofactor와 MMSA기질 외에 CoA의 결합도 이루어지는데, CoA의 결합부위는 연구된 것이 없다. 따라서 Hot Spot Search와 Docking실험을 통하여 CoA의 결합 부위를 예측하는 실험을 진행한 결과 CoA가 NAD의 결합부위와는 반대쪽인 MMSA 결합부위 근처에 존재 할 것으로 예측되었다 (**그림 6**).

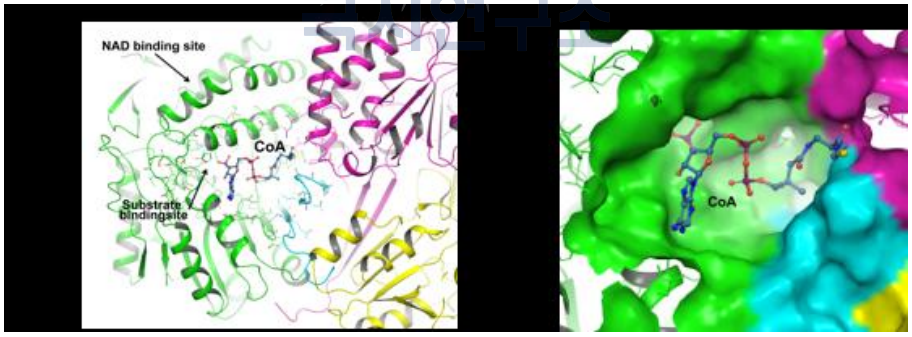


그림 6 (A) A ribbon model of DddC tetramer showing docked CoA binding. CoA binding was predicted by docking experiment and the position was refined through energy minimization. The pocket was constructed by three DddC monomers. **(B)** Surface model showing the predicted CoA binding pocket. The pocket is located near the substrate binding site opposite the NAD binding site. In both panels, each monomer is colored differently to show the monomer boundary.

DddC의 결정구조는 4중합체를 형성하고 있지만 유사 단백질들이 4중합체 혹은 2중합체로 존재하고 있으므로 [13-15], Size Exclusion Chromatography를 이용하여 DddC가 어떠한 중합체를 형성하는지 실험하였다. 그 결과 DddC는 2중합체를 형성하는 것으로 밝혀졌다 (**그림 7**).

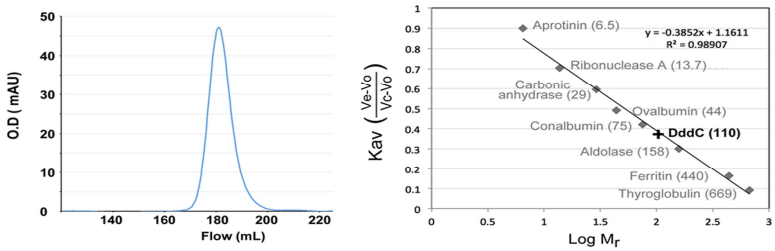


그림 7 Analytical size exclusion chromatography of *Odo*MMSDH (residues 1–498;calculated molecular weight of 54.0 kDa for polypeptide chain) showed that *Odo*MMSDH exists as a dimer in solution. Chromatograms of *Odo*MMSDH; eluting at 181.3 mL and corresponding to an apparent molecular weight of 110 kDa) and standards are shown. The numbers in parentheses show the actual molecular weight of proteins. Ve, Vo, and Vc represent elution volume, void volume (105 mL), and column volume (318.5 mL), respectively.

Spo0A는 two-component phosphorelay system에서 signal regulator의 역할을 하는 단백질로 Asp54 아미노산의 인산화 되면 중합체를 형성하게 되고, 그후 활성이 일어나는 것으로 알려져 있다 [16-18]. 하지만 아미노산의 인산화와 중합체 형성의 조절 기전에 대한 연결고리가 될 단서를 찾지 못한 상태이다. KOPRI에서 밝힌 비활성 상태 PaSpo0A의 단백질 결정 구조를 바탕으로 인산화된 단백질의 모델을 설립하고, 두 단백질 구조를 MD 시뮬레이션을 통해 관찰하였다. 그결과 비활성 상태와는 달리, 활성화된 단백질에서 α4-helix 가 현저히 안정화 되는 것을 확인하였다 (**그림 8**). α4는 Spo0A의 중합체 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고 [19], 따라서 인산화로 안정화된 α4-helix가 중합체 형성을 도운다는 것을 입증하였다. 또한 Spo0A중합체 형성이 기존에 알려진 signal regulator 단백질과는 다른 중합체를 이룬다는 것을 단백질 결정구조와 일차 아미노기 서열을 분석하여 밝혔다 [20] (**그림 9** 와 **표 4**).

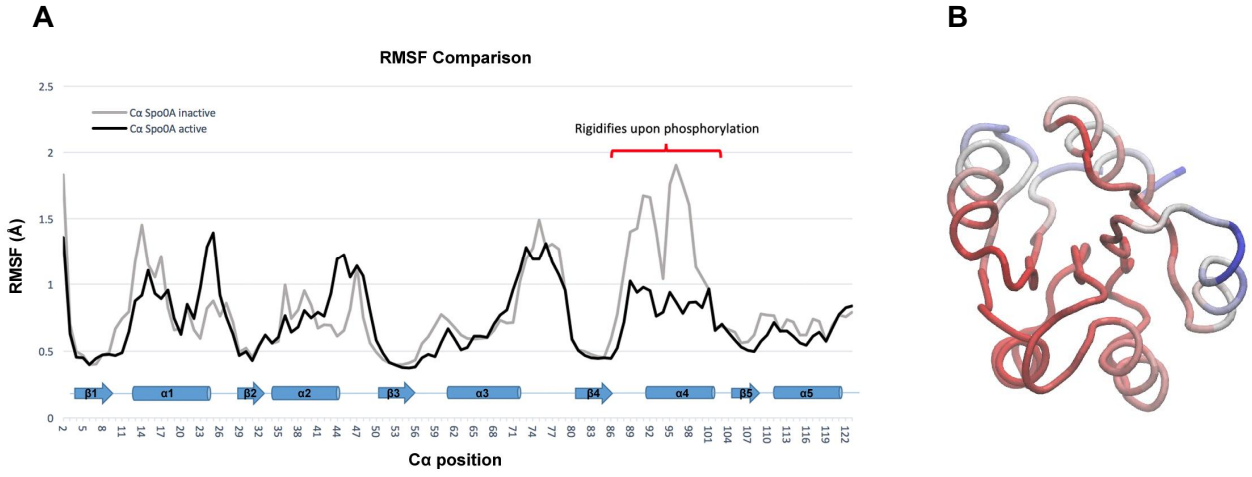


그림 8 활성화된 Spo0A와 비활성화된 Spo0A의 MD 시뮬레이션 결과를 RMSF (root mean square fluctuation)로 변환한 결과, 활성화된 단백질에서 α4-helix가 현저히 안정화되는 것을 알 수 있다 (A). 안정화되는 부위와 (red) 그렇지 않은 부위 (blue)를 실제 단백질 상에서 보여주는 그림 (B).

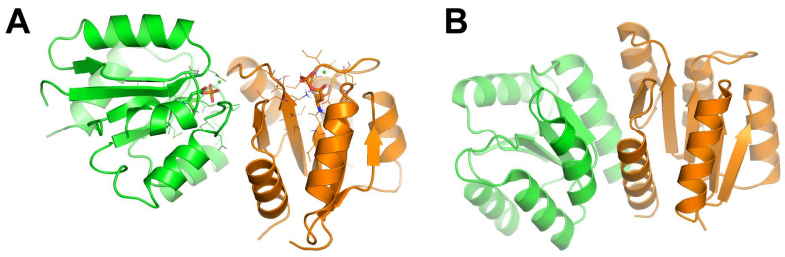


그림 9 중합체 모델을 단백질의 리본그림으로 비교하였다. 이번 연구에서 새로이 밝혀진 중합체 모델(A). 기존에 알려진 two component signal regulator 단백질의 중합체 모델 (B). α4-helix가 중합체 형성에 밀접하게 관여하는 것을 볼 수 있다.

표 4. Spo0A의 중합체 형성 모델 비교.

Model	mode of interaction	buried surface area	interface mediated by
A	New α4-β5-α5 model	11% of total surface area	mixed h-bond and hydrophobic interaction. The residues are conserved among Spo0A.
B	Conventional α4-β5-α5 model	11 ~ 15% of total surface area	highly conserved charged residues. The residues are not conserved in Spo0A.

KOPRI 극지연구소

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

목표	달성도	내용 및 대외 기여도
- 저온성 박테리아에서 타깃 선정을 위해 저온 적응 단백질에 대한 생물정보학적 접근	100%	○ *Colwellia psychrerythraea* 34H의 PAS 도메인을 가진 4 종의 대표 단백질에 대한 cloning 및 단백질 분리 정제 기법 확립.
- 결정화 스크리닝 및 구조결정 처리량 극대화	100%	○ 본 과제 연구 타깃 단백질 중 난 결정화 타깃 (Q47XI4)에 대한 결정화 성공, 총 1 건.
- 타깃 단백질의 구조적/기능적 메커니즘 이해를 위한 컴퓨터를 이용한 시뮬레이션 연구	100%	○ Docking/MD simulations 을 통하여 DddC의 기질 중 CoA의 결합 부위에 대한 가설 설정하고 이를 증명할 수 있는 실험 기법 제안, 총 3 건. ○ 본 과제에서 연구중인 저온성 효소 (UbiX, DddC, Spo0A)의 기질결합 및 효소 역학 메커니즘에 관한 컴퓨터 시뮬레이션 연구 수행으로 논문의 질적 향상에 기여, 총 3건.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1절. 학술적 활용계획

1. 저온성 단백질의 결정화 조건 데이터들을 이용하여 만든 스크리닝 매트릭스는 향후 저온성 단백질의 결정화에 이용될 수 있음. 컴퓨터를 이용한 저온성 단백질의 모델링과 시뮬레이션 분석을 통해 저온적응 단백질이 작용하는 메커니즘에 대한 이론적인 프레임을 구축할 뿐만 아니라, 극지 생물이 어떻게 저온적응 단백질을 이용해 영하의 환경에서 살아가는지 생화학적, 생물 물리학적으로 이해 가능.

2. 저온성 단백질에 대한 중온성 또는 호열성 단백질과의 비교 연구는 저온 적응 단백질의 분자적인 진화와 그 진화의 방향에 대한 정보를 제공하고 이를 이용하여 기능 개선형 저온성 단백질 제작 및 상업화에 대한 기초 연구 자료로 이용 가능.

2절. 경제적 활용계획

1. 생물 공학 분야에서 저온 활성 효소가 지닌 장점은 반응기의 온도를 낮게 설정이 가능하여 에너지 비용을 줄일 수 있고, 또한 열에 불안정한 화합물 또는 휘발성 화합물을 생성하는 반응에서 수득률을 높일 수 있음. 저온 활성 효소의 구조적/기능적 메커니즘의 이해는 상업화할 수 있는 기능 개선형 효소를 개발하는데 있어서 매우 유용한 정보를 제공할 것임.

KOPRI 극지연구소

제 6 장 참고문헌

1. Feller, G. (2013). Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology. Scientifica, 2013(2), 1-28. doi:10.1155/2013/512840

2. Cutler, A. J., Saleem, M., Kendall, E., Gusta, L. V., Georges, F., & Fletcher, G. L. (1989). Winter Flounder Antifreeze Protein Improves the Cold Hardiness of Plant Tissues. Journal of Plant Physiology, 135(3), 351-354. doi:10.1016/S0176-1617(89)80131-2

3. Georges, F., Saleem, M., & Cutler, A. J. (1990). Design and cloning of a synthetic gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells. Gene, 91(2), 159-165. doi:10.1016/0378-1119(90)90083-4

4. Möglich, A., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2009). Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains. Structure/Folding and Design, 17(10), 1282–1294. doi:10.1016/j.str.2009.08.011

5. Henry, J. T., & Crosson, S. (2011). Ligand-Binding PAS Domains in a Genomic, Cellular, and Structural Context. Annual Review of Microbiology, 65(1), 261–286. doi:10.1146/annurev-micro-121809-151631

6. Wang, C., Sang, J., Wang, J., Su, M., Downey, J. S., Wu, Q., et al. (2013). Mechanistic Insights Revealed by the Crystal Structure of a Histidine Kinase with Signal Transducer and Sensor Domains. PLoS Biology, 11(2), e1001493. doi:10.1371/journal.pbio.1001493

7. Park, Suquet, C., Satterlee, J. D., & Kang, C. (2004). Insights into Signal Transduction Involving PAS Domain Oxygen-Sensing Heme Proteins from the X-ray Crystal Structure of Escherichia ColiDos Heme Domain (EcDosH). Biochemistry, 43(10), 2738–2746. doi:10.1021/bi035980p

8. Kelley, L. A., & Sternberg, M. J. E. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. Nature Protocols, 4(3), 363–371. doi:10.1038/nprot.2009.2

9. Park, S., & Schulten, K. (2004). Calculating potentials of mean force from steered molecular dynamics simulations. The Journal of Chemical Physics, 120(13), 5946. doi:10.1063/1.1651473

10. Park, S., Khalili-Araghi, F., & Tajkhorshid, E. (2003). Free energy calculation from steered molecular dynamics simulations using Jarzynski's equality. The Journal of Chemical Physics, 119(6), 3559. doi:10.1063/1.1590311

11. Lidio M. C. Meireles, Alexander S. Dömling, Carlos J. Camacho (2010) ANCHOR: a web server and database for analysis of protein–protein interaction binding pockets for drug discovery, Nucleic Acids Res. 2010 July 1; 38

12 R.V. Guido, G. Oliva, A.D.Andricopulo, Virtual screening and its integration with modern drug designtechnologies, Curr Med Chem 15 (2008) 37-46.

13. Liu, Z.-J., Sun, Y.-J., Rose, J., Chung, Y.-J., Hsiao, C.-D., Chang,W.-R., Kuo, I., Perozich, J., Lindahl, R., and Hempel, J. 1997. Thefirst structure of an aldehyde dehydrogenase reveals novel interactions betweenNAD and the Rossmann fold.

KOPRI 극지연구소

*NatureStructural &Molecular Biology*4, 317-326.

14. Steinmetz, C.G., Xie, P., Weiner, H., and Hurley, T.D. 1997. Structure of mitochondrial aldehyde dehydrogenase: the genetic component ofethanol aversion. *Structure*5,701-711.

15. Johansson, K., Ramaswamy, S., Eklund, H., El-Ahmad, M., Hjelmqvist, L., and Jörnvall, H. 1998.Structure of betaine aldehyde dehydrogenase at 2.1 Å resolution. *Protein Science*7, 2106-2117

16. Koh, H.Y., Lee, S.G., Lee, J.H., Doyle, S., Christner, B.C.,and Kim, H.J. 2012. Draft genome sequence ofPaenisporosarcina sp. strain TG-14, a psychrophilic bacterium isolated fromsediment-laden stratified basal ice from Taylor Glacier, McMurdo Dry Valleys,Antarctica. *J. Bacteriol.*194, 6656-6657.

17. Grimsley, J.K., Tjalkens, R.B., Strauch, M.A., Bird,T.H., Spiegelman, G.B., Hostomsky, Z., Whiteley, J.M., and Hoch, J.A. 1994. Subunit composition and domain structure of theSpo0A sporulation transcription factor of Bacillus subtilis. *J. Biol. Chem.*269, 16977-16982.

18. Lewis, R.J., Brannigan, J.A., Muchová, K.n., Barák, I., andWilkinson, A.J. 1999. Phosphorylated aspartate in thestructure of a response regulator protein. *J.Mol. Biol.*294, 9-15.

19. Toro-Roman, A., Wu, T., and Stock, A.M.2005. A common dimerization interface in bacterial response regulators KdpE andTorR. *Protein Sci.*14, 3077-3088.

20. Lewis, R.J., Scott, D.J., Brannigan, J.A., Ladds, J.C.,Cervin, M.A., Spiegelman, G.B., Hoggett, J.G., Barák, I., and Wilkinson, A.J.2002. Dimer formation and transcription activation in the sporulation responseregulator Spo0A. *J. Mol. Biol.*316, 235-245.

KOPRI 극지연구소

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

KOPRI 극지연구소