

Review

구조 생물학을 이용한 Antifreeze protein의 최근 연구동향

이준혁<sup>1</sup> · 이성구<sup>1</sup> · 김학준<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>극지연구소 극지생명과학연구부  
(406-840) 인천광역시 연수구 갯벌로 12

<sup>2</sup>과학기술연합대학원 대학교 극지과학과  
(406-840) 인천시 연수구 송도동 7-50 송도테크노파크 갯벌타워

Recent Advances in Structural Studies of Antifreeze Proteins

Jun Hyuck Lee<sup>1</sup>, Sung Gu Lee<sup>1</sup>, and Hak Jun Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>*Korea Polar Research Institute, KORDI  
Incheon 406-840, Korea*

<sup>2</sup>*Department of Polar Science, University of Science and Technology  
Incheon 406-840, Korea*

**Abstract :** Antifreeze proteins (AFPs) have ice binding affinity, depress freezing temperature and inhibit ice recrystallization which protect cellular membranes in polar organisms. Recent structural studies of antifreeze proteins have significantly expanded our understanding of the structure-function relationship and ice crystal growth inhibition. Although AFPs (Type I-IV AFP from fish, insect AFP and Plant AFP) have completely different fold and no sequence homology, they share a common feature of their surface area for ice binding property. The conserved ice-binding sites are relatively flat and hydrophobic. For example, Type I AFP has an amphipathic, single  $\alpha$ -helix and has regularly spaced Thr-Ala residues which make direct interaction with oxygen atoms of ice crystals. Unlike Type I AFP, Type II and III AFP are compact globular proteins that contain a flat ice-binding patch on the surface. Type II and Type III AFP show a remarkable structural similarity with the sugar binding lectin protein and C-terminal domain of sialic acid synthase, respectively. Type IV is assumed to form a four-helix bundle which has sequence similarity with apolipoprotein. The results of our modeling suggest an ice-binding induced structural change of Type IV AFP. Insect AFP has  $\beta$ -helical structure with a regular array of Thr-X-Thr motif. Threonine residues of each Thr-X-Thr motif fit well into the ice crystal lattice and provide a good surface-surface complementarity. This review focuses on the structural characteristics and details of the ice-binding mechanism of antifreeze proteins.

**Key words :** antifreeze protein, ice binding protein, NMR, structural biology, X-ray crystallography

1. 서 론

극지에 서식하는 생물체는 낮은 온도에서 살아가기 위해서 몇 가지 문제점을 극복해야만 한다. 그 문제점들로는 줄어든 효소 활성, 줄어든 생체막 유동성, 단백질의 불활

성화 및 잘못된 접힘, 세포내에서의 얼음결정 형성 등이다. 이중에서도 특히, 생체 내에서의 얼음결정의 생성은 얼음결정의 성장에 의한 물리적인 손상 뿐만 아니라 조직의 탈수현상을 유발하여 극지 생물체에 심각한 손상을 입힌다. 이를 극복하면서 낮은 온도에서 살아가기 위해 많은 극지 생물체들은 Antifreeze protein(AFP: 결빙방지단백질)을 가지고 있다. AFP는 생체 내에서의 얼음 결정의 성장

\*Corresponding author. E-mail : hjkim@kopri.re.kr

및 재결정을 억제함으로써 영하의 온도에서도 극지의 생물체들을 보호하고 살아 갈 수 있게 해준다(Davies and Sykes 1997; Davies *et al.* 2002; D'Amico *et al.* 2006).

AFP는 일반적으로 평평한 얼음 결합부위를 가지고 작은 얼음 결정의 특정 면에 결합하여 얼음 결정의 성장과 재결정화를 억제하는 물질로써, 얼음에 결합하여 녹는점과 어는점의 차이를 만든다. 이를 thermal hysteresis (TH) 라고 하며 AFP의 활성을 측정하는 하나의 지표로 사용되고 있으며, nanoliter osmometer 기기를 사용해서 측정할 수 있다. AFP의 또 다른 특징은 자동차에 사용되는 일반 부동액과는 달리 농도에 비례하여 어는점을 낮추지는 않는다. 따라서 AFP는 아주 낮은 농도에서 효과적으로 어는점을 낮출 수 있고 이로 인해 생체 내에서 동결 과정 중에 발생하는 삼투압에 의한 손실을 최소화 할 수 있다(Jia and Davies 2002).

AFP가 얼음 결정의 성장을 방지하고 재결정화를 억제한다는 독특한 특성은 다양한 상업적인 분야에 이용되고 있다. 예를 들면 농업분야에서는 작물의 냉해를 방지하는 목적으로 AFP를 작물 내에서의 발현을 시도하고 있고, 어

업분야에서는 상업적으로 유용한 Atlantic salmon (*Salmo salar*) 혹은 goldfish (*Carassius auratus*) 같은 물고기에 AFP를 발현시킨 형질전환 물고기를 만들어서 추운 지역에서도 양식을 가능하게 하고자 하는 시도가 진행되고 있다. 뿐만 아니라, 의학 분야에서는 Cryosurgery와 혈액, 줄기세포, 제대혈, 장기, 생식세포의 냉동보존액의 첨가물로써 AFP의 사용에 대한 연구가 진행되고 있다. 그리고 식품분야에서도 더욱 부드러운 질감의 아이스크림 냉동 보관을 위한 제품생산에 사용되고 있다. 화장품 분야에서는 동상예방을 위해 AFP가 첨가된 기능성 화장품이 이미 판매 되고 있다.

처음으로 차가운 바다에 서식하는 물고기로 부터 AFP가 발견된 이후로 곤충, 식물, 곰팡이류, 미생물에서 다양한 type의 새로운 AFP들이 발견되고 있다(Table 1). 물고기 유래의 AFP들은 구조적인 차이점에 기초해서 크게 다섯 개의 타입(antifreeze glycopeptide, 그리고 type I to IV AFPs)으로 구분된다. 최근에는 AFP의 삼차 구조 분석을 통해 얼음결합 부위를 예상하고 실제 어떤 아미노산이 얼음과 직접적으로 상호작용을 하는지를 규명하는 연구가

**Table 1. Structural comparison of Type I, Type II, Type III, Type IV, Insect AFP and AY30 AFP**

	Antifreeze Protein							
	Type I	Type II		Type III	Type IV	Insect AFP		Yeast AFP (AY30)
		Calcium dependent	Calcium independent			Left handed	Right handed	
PDB code	1WFA	2PY2	2ZIB	1MSI	NA <sup>a</sup>	1L0S	1EZG	NA <sup>a</sup>
UniProtKB reference	P04002	Q91992	A0ZT93	P19614	P80961	Q9GTP0	O16119	C7F6X3
Source	<i>Pseudopleuronectes americanus</i>	<i>Clupea harengus</i>	<i>Brachyopsis rostratus</i>	<i>Macrozoarces americanus</i>	<i>Myoxocephalus octodecimspinosus</i>	<i>Choristoneura fumiferana</i>	<i>Tenebrio molitor</i>	<i>Leucosporidium</i> sp.
Number of amino acid residue	82	147	168	66	128	108	112	261
Disulfide bond	No disulfide bridge	5 disulfide bridges	5 disulfide bridges	No disulfide bridge	No disulfide bridge	4 disulfide bridges	7 disulfide bridges	No cysteine residue
Signal sequence <sup>b</sup>	Signal peptide (residues 1-23)	Signal peptide (residues 1-18)	Signal peptide (residues 1-18)	No signal peptide	Signal peptide (residues 1-20)	Signal peptide (residues 1-18)	Signal peptide (residues 1-28)	Signal peptide (residues 1-20)
Secondary structure	1 $\alpha$ -helix	3 $\alpha$ -helices and 9 $\beta$ -strands	2 $\alpha$ -helices and 5 $\beta$ -strands	4 $\alpha$ -helices and 9 $\beta$ -strands	4 $\alpha$ -helices	13 $\beta$ -strands	7 $\beta$ -strands	2 $\alpha$ -helices and 14 $\beta$ -strands
Characteristics of three dimensional structure	Alanine rich	Homology to the C-type lectin domain	Homology to the C-type lectin domain	Globular protein and rich in $\beta$ -structure	Four helix bundle structure and homology to the N-terminal domain of a human apolipoprotein	Left handed $\beta$ -helical structure	Right handed $\beta$ -helical structure	Left handed $\beta$ -helical structure

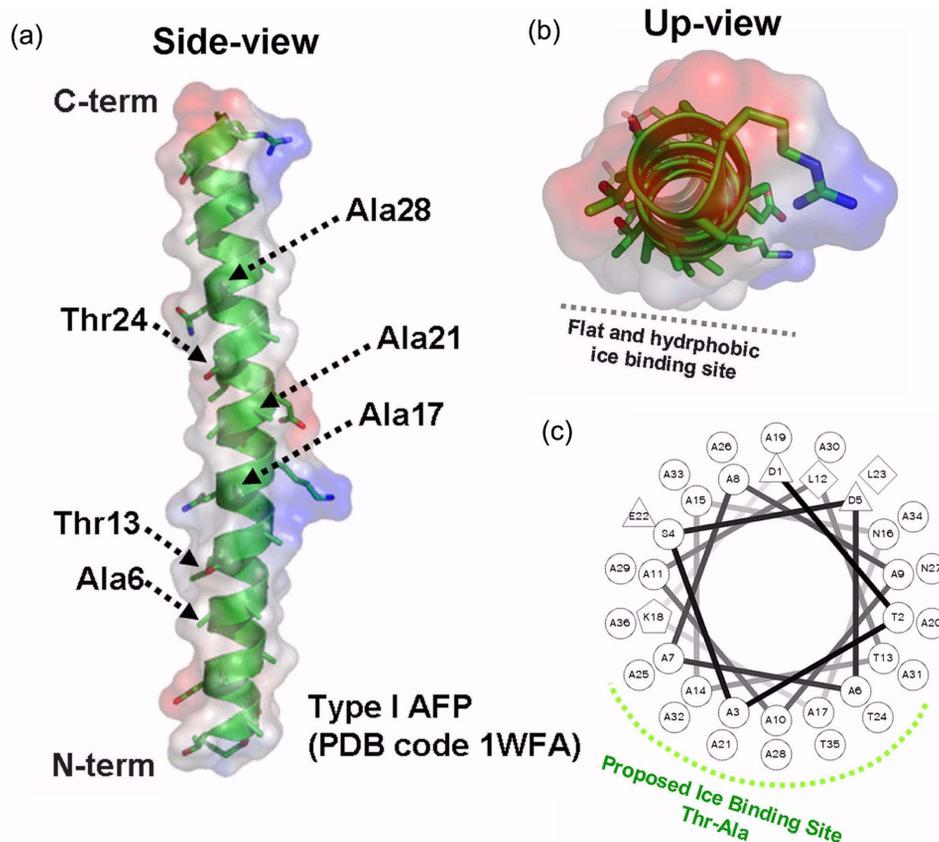
<sup>a</sup>NA, Not Available

<sup>b</sup>Signal peptide cleavage site was predicted using SignalP 3.0 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

활발하게 수행되고 있다. 비록 지난 20년 이상 동안 많은 AFP와 얼음의 상호 작용을 연구하는 논문들이 발표 되고 있지만, 일반적인 다른 효소와 달리 얼음이 결합된 AFP의 복합체 구조를 규명할 수 없기 때문에 아직까지는 AFP와 얼음결정과의 상호 작용을 분자수준에서 직접적으로 관찰할 수 있는 방법이 없다. 하지만 AFP의 구조와 기능의 상관관계를 밝히기 위해 Nuclear Magnetic Resonance, X-ray crystallography, Molecular modeling, Ice etching technique 그리고 다른 Spectroscopic 방법들을 이용한 다양한 연구들이 행해지고 있다. 뿐만 아니라 알려진 AFP 삼차 구조 정보로 부터 얼음결합 부위라고 예상되어지는 아미노산의 돌연변이를 만들어서 어떤 아미노산이 얼음과의 상호 작용에 중요한지를 밝히는 연구가 진행되고 있다 (Davies et al. 2002). 본 review에서는 현재까지 알려진 각각의 type별로 AFP의 삼차 구조를 소개하고 밝혀진 삼차 구조 정보로 부터 새롭게 규명된 AFP의 얼음결합기작을 소개하고자 한다.

## 2. Type I AFP

Type I AFP는 winter flounder 혹은 shorthorn sculpin 같은 물고기의 혈장과 피부세포에서 처음 발견되어졌다. 그 중에서 winter flounder에 존재하는 HPLC6 AFP의 고해상도 삼차 구조가 AFP 중에서 가장 먼저 밝혀져 연구가 많이 되어져 왔다(Sicheri and Yang 1995). Type I HPLC6 AFP는 총 37개의 아미노산을 가지고 있고 그 중에 23개나 되는 많은 수의 Alanine(전체 아미노산 서열의 약 62%)을 가지고 있다. 전체적인 삼차구조는 하나의 긴 amphipathic  $\alpha$ -helix로 이루어져 있고, 이 helix는 Ice Binding Motif(IBM)라고 알려진 Thr-Ala 잔기의 반복으로 이루어져 있다. 그리고 하나의 salt bridge(Lys18-Asp22)와 수소결합에 의해  $\alpha$ -helix의 구조가 안정화 된다. 지금까지 Ice etching 실험과 돌연변이를 이용한 얼음결합 활성측정 실험들에 의해 Type I HPLC6 AFP의 예상 얼음 결합부위가 제안되었다. 이 예상되어진 얼음결합부



**Fig. 1.** Structure of Type I HPLC6 AFP (a) Electrostatic surface potential representation of Type I AFP with N- and C-terminus labeled. The putative ice-binding site is located at the front surface, (b) The C-terminus of the protein is oriented towards the viewer, (c) Helical wheel representation of Type I HPLC6 AFP. The proposed Thr-Ala ice-binding face is shown at the bottom. The helical wheel diagram presents the hydrophilic residues as circles, hydrophobic residues as diamonds, potentially negatively charged as triangles, and potentially positively charged as pentagons

위는 구조적으로 flat한 형태를 가지며 이 부위에 존재하는 Thr-Ala 잔기의 side chain들이 얼음결정의 물 분자와의 수소 결합과 hydrophobic interaction에 중요하다 (Fig. 1).

그리고 최근에는 기존에 알려진 Type I AFP 보다 antifreeze 활성이 훨씬 뛰어난 hyperactive Type I AFP가 winter flounder에서 새롭게 발견되었다. hyperactive Type I AFP는 195개의 아미노산을 가지고 있으며 이 중에 약 60%가 Alanine 잔기로 이루어져 있다. 아직까지 hyperactive Type I AFP의 고해상도 삼차구조가 밝혀지지 않았지만 Circular Dichroism spectroscopy 실험을 통해 이 단백질이 대부분  $\alpha$ -helix로 이루어져 있음을 규명하였다. 그리고 analytical ultracentrifugation과 모델링 결과에 의하면 hyperactive Type I AFP는 짧은 kinked loop으로 이어진 두개의  $\alpha$ -helix로 이루어져 있으며 alanine rich region에 의한 side-by-side dimer를 이루는 것으로 예측된다. 그리

고 Type I AFP가 얼음결정의 C축에 결합하여 전형적인 hexagonal bipyramidal 모양의 얼음 결정을 만드는 것과 달리 hyperactive Type I AFP는 lemon 형태의 다른 모양의 얼음 결정을 만드는 것으로 알려졌다. 이는 hyperactive Type I AFP의 얼음 결정과의 결합부위가 Type I AFP와는 달리 얼음결정의 여러 면에 결합하여 더 효과적으로 얼음결정의 성장을 억제하는 것으로 생각된다(Patel and Graether 2010).

### 3. Type II AFP

Type II AFP는 sea raven, smelt, herring 물고기들에서 발견되는데, 지금까지 알려진 AFP 중에서 가장 사이즈 크고, 여러 개의 cysteine residue를 가지며 disulfide bond에 의해 단백질의 구조가 안정화 된다(Gronwald *et al.* 1998; Nishimiya *et al.* 2008).  $Ca^{2+}$  의존형 herring Type

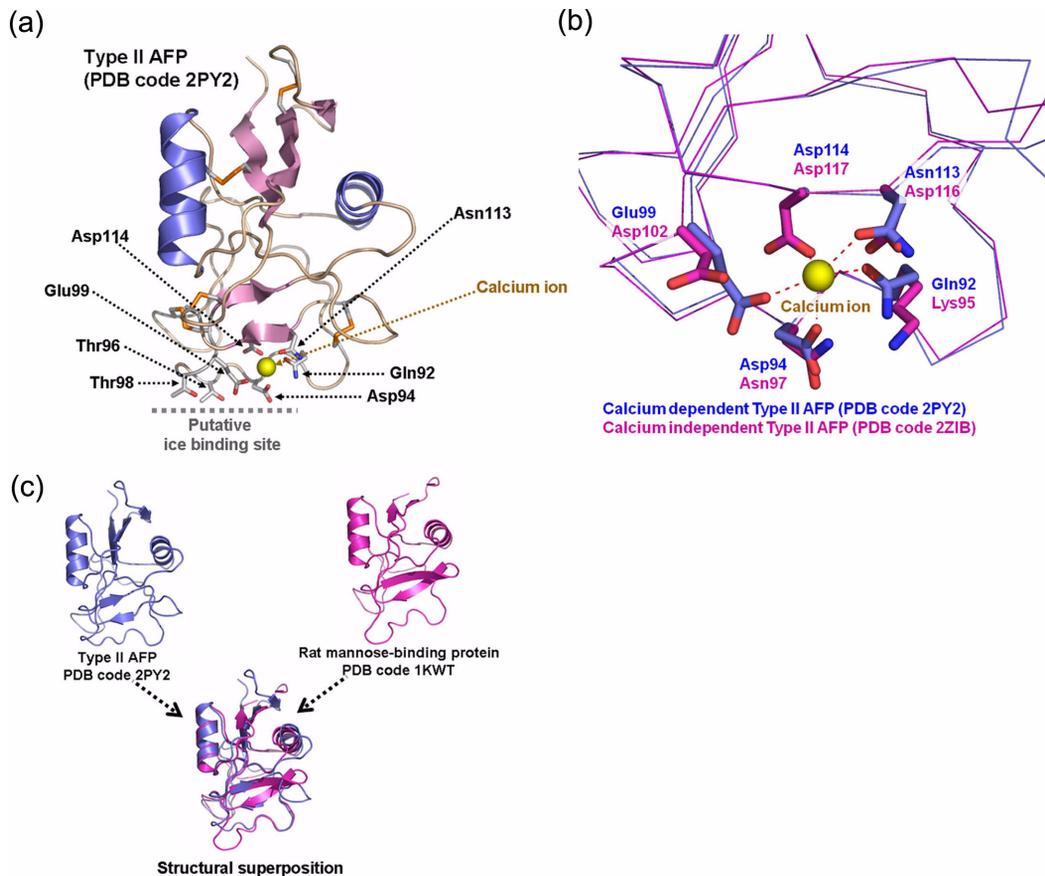


Fig. 2. Overall structure of Type II AFP (a) Cartoon diagram of the calcium dependent Type II AFP (PDB code 2PY2) with calcium binding site and putative ice-binding site. The proposed ice binding residues (Thr96 and Thr98) and  $Ca^{2+}$  binding sites (Gln92, Asp94, Glu99, Asn113 and Asp114) are shown in stick form. The bound  $Ca^{2+}$  is shown as a yellow sphere, (b) Superposition between calcium dependent Type II AFP (PDB code 2PY2) and calcium independent Type II AFP (PDB code 2ZIB). The side chains of calcium binding residues and equivalents are shown in stick representation, (c) Structural superposition of the Type II AFP (slate blue) and the rat mannose-binding protein (violet)

II AFP는 두개의  $\alpha$ -helix와 아홉 개의  $\beta$ -strand로 이루어진 하나의 globular한 구조를 가지고 있다(Liu *et al.* 2007)(Fig. 2a). 구조 연구의 결과로부터 Type II AFP가 아미노산 서열에 있어서는 유사점이 낮지만(sequence identity 20%) 삼차 구조적으로는 칼슘농도에 의존해서 당에 결합하는 단백질의 모듈로써 알려져 있는 C-type lectin 단백질과 유사하다는 사실을 규명하였다. 이와 같은 사실은 Type II AFP가 sugar binding lectin 단백질의 삼차구조 골격을 이용해서 진화되었음을 나타내고 있다(Fig. 2c).

$\text{Ca}^{2+}$  의존형 herring Type II AFP(hAFP)의 구조를 자세히 살펴보면 5개의 disulfide bond가 존재하며 1개의 calcium이 결합되어져 있다. hAFP와 구조적으로 가장 유사한 단백질은 lithostathine(pdb code: 1qdd; RMSD=1.7 Å for 122 C $\alpha$  atoms)이고 다음으로 유사한 단백질 구조는 mannose-binding protein(pdb code: 1sl6; RMSD=2.2 Å for 124 C $\alpha$  atoms)이다. lithostathine과 mannose-binding protein은 구조적으로는 hAFP와 유사하지만 ice binding activity를 가지지는 않는다. 반대로 hAFP 또한 carbohydrate binding activity를 가지지는 않는다. 이는 두 단백질이 구조 골격은 유사하지만 기능은 완전히 다른 단백질로 divergent evolution을 겪은 것으로 예측된다. hAFP와 C-type lectin 단백질의 또 다른 차이점은 hAFP는 5개의 disulfide bond를 가지지만 C-type lectin 단백질은 3개 혹은 4개의 disulfide bond를 가진다는 것이다. hAFP의 구조 정보를 기반으로 얼음 결합 부위로 예상되는 아미노산의 돌연변이 단백질을 제작하여 TH 값을 측정 한 결과 Thr96, Leu97, Thr98, 그리고 Thr115 잔기가 얼음 결합에 중요하다는 사실을 알게 되었다. 재미있는 것은 이 잔기들 모두가  $\text{Ca}^{2+}$  결합 부위 근처에 위치하고 있

다는 사실이다. 따라서  $\text{Ca}^{2+}$  결합이 hAFP의 얼음 결합 부위의 올바른 구조를 형성하는데 중요하고 더 나아가 얼음 결합능력을 향상시킨다는 사실을 규명하였다(Liu *et al.* 2007).

$\text{Ca}^{2+}$  의존형 herring Type II AFP(hAFP) 구조와  $\text{Ca}^{2+}$  비의존형 longsnout poacher(*Brachyopsis rostratus*) Type II AFP(lpAFP) 구조의  $\text{Ca}^{2+}$  결합부위 구조를 비교해 보면 hAFP의  $\text{Ca}^{2+}$  결합에 중요한 아미노산 잔기들이(Gln92, Asp94, Glu99 그리고 Asn113) lpAFP는 다른 잔기(Lys95, Asn97, Asp102 그리고 Asp116)에 의해 대체되어 있는 것을 알 수 있다(Fig. 2b). 이 결과로부터  $\text{Ca}^{2+}$  결합에 중요한 아미노산 잔기들을 알 수 있을 뿐만 아니라 이 아미노산 잔기들은 Type II AFP를 크게 두 가지 타입( $\text{Ca}^{2+}$  의존형과  $\text{Ca}^{2+}$  비의존형)으로 나눌 때 중요한 지표로 사용될 수 있다(Nishimiya *et al.* 2008).

그리고 극지가 아닌 중위도 지방인 일본의 담수에 서식하는 빙어(Japanese Smelt, *Hypomesus nipponensis*)에서도 Type II AFP(Hni AFP)가 발견되었다. 재미있게도 Hni AFP는  $\text{Ca}^{2+}$ 과 결합을 하지만 EDTA를 이용해서  $\text{Ca}^{2+}$ 을 제거하더라도 여전히 Antifreeze activity를 가지고 있다는 사실을 규명하였다. 이는 Hni AFP는  $\text{Ca}^{2+}$ 과 결합은 하지만 Antifreeze activity는  $\text{Ca}^{2+}$ 에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 시사한다(Yamashita *et al.* 2003).

#### 4. Type III AFP

Antarctic eelpout(*Macrozoarces americanus*)에서 발견되는 Type III HPLC12 AFP의 삼차 구조는 3개의 antiparallel의  $\beta$ -strand 두개가  $\beta$ -sandwich 형태를 이루고 있는 globular 형태를 가진다. Type III AFP의 구조는 많

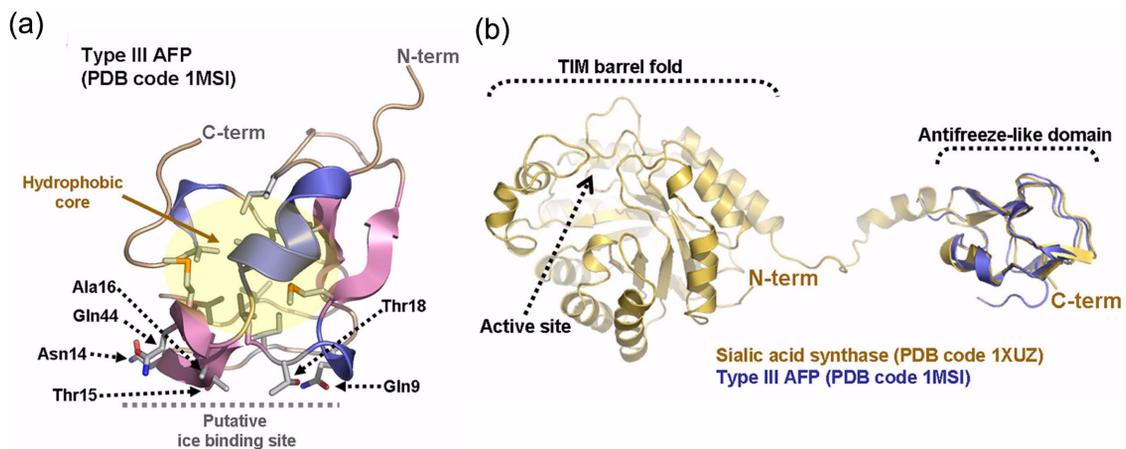


Fig. 3. Overall structure of Type III HPLC12 AFP (a) Cartoon representation of the Type III AFP showing the putative ice-interacting residues, (b) Superposition of the Type III AFP (slate blue) and the sialic acid synthase (yellow)

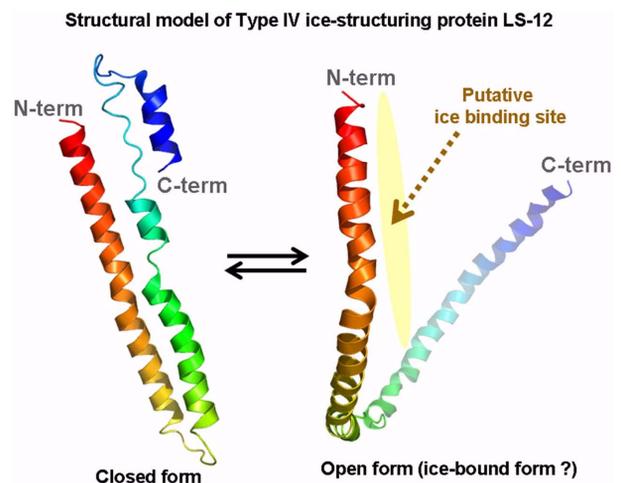
은 부분이 loop 형태로 이루어져 있지만 가운데 부분의 hydrophobic interaction과 수많은 수소 결합을 통해 매우 안정한 구조를 가지고 있다(Fig. 3a). Type III AFP는 매우 넓은 pH 영역에서 활성을 가지는데 이는 Type III AFP가 pH에 의한 단백질 denaturation에 민감하지 않고 구조적으로 안정하다는 사실을 나타낸다. 비슷한 시기에 두 개의 Type III AFP의 구조가 다른 두개의 랩에서 하나는 X-선 결정학 방법(Jia *et al.* 1996)에 의해서 그리고 다른 하나는 NMR 방법(Sonnichsen *et al.* 1996)에 의해 해석이 되어 졌다. 이 두 가지 Type III AFP isoform은 62%의 아미노산 sequence identity를 가지고 매우 유사한 삼차 구조를 가지고 있다. 재미있게도 Type III AFP 구조는 sialic acid synthase의 C-terminal domain과 유사한 폴드를 가지고 있다(Hamada *et al.* 2006)(Fig. 3b). 이는 진화적으로 하나의 같은 구조적인 폴드로 부터 서로 다른 기능을 가지는 두개의 다른 단백질로 나누어 져서 진화된 것으로 생각된다.

Type III AFP와 얼음 결정의 결합 기작에 대한 여러 가지 가설이 있지만 가장 널리 믿어지는 가설은 Type III AFP의 납작한 형태의 Thr18 잔기가 위치한 부위가 얼음 결정의 prism plane에 딱맞게 결합하여 다른 물 분자의 접근을 막아 얼음결정의 성장을 방해한다는 것이다. 얼음결합부위로 예측되어진 주위의 아미노산들을(Gln9, Asn14, Ala16, Thr18 and Gln44) 다른 성질의 아미노산들로 치환하였을 때 현저하게 낮아진 TH 값과 달라진 얼음 결정 모양을 관찰할 수 있었다. 특히 Thr18을 Asn으로 바꾼 돌연변이 단백질은 친연형 단백질에 비해 약 10%의 TH 값을 보였다. 예상 얼음결합 부위의 가운데에 위치하는 Ala16 아미노산을 더 큰 side chain을 가지는 다른 아미노산으로 치환을 했을 때도 steric hindrance 때문에 얼음결합이 저해되는 것을 확인하였다. 그리고 Asn14를 짧은 길이의 Ser으로 치환된 돌연변이를 만들었을 때에도 얼음 결합능력이 현저히 떨어지는 것을 관찰하였다. 이 결과들은 예측한 얼음 결합 부위 아미노산(Gln9, Asn14, Ala16, Thr18 and Gln44)들이 실제로 얼음 결합에 중요한 역할을 한다는 사실을 뒷받침하고 있다(Jia *et al.* 1996).

## 5. Type IV AFP

Type IV LS-12 AFP는 longhorn sculpin의 혈장에서 처음 발견되었으며  $\alpha$ -helix bundle의 구조를 가지고 많은 수의 glutamate와 glutamine 잔기들을 가지는 특징을 가지고 있다. 혈장에서 발견되어 지는 것에서 예측할 수 있듯이 혈장으로 단백질이 secretion될 수 있게 하는 N-terminus에 약 20개의 아미노산으로 이루어진 signal sequence가 존재한다. 그리고 MALDI-TOF mass spectrometry 실험

결과로 부터 Type IV LS-12 AFP의 N-terminus 부위가 pyroglutamyl group에 의해 blocking 되어져 있다는 사실을 규명하였다(Zhao *et al.* 1998). Type IV LS-12 AFP은 human apolipoprotein A-I와 아미노산 서열 유사성(29% identity, 46% homology)을 가지고 있다(Gauthier *et al.* 2008). apolipoprotein A-I 단백질은 지질과 결합하여 지질의 혈액 내에서의 용해도를 증가시키고 같이 결합되어져서 지질을 간 혹은 다른 기관으로 수송하는 역할을 한다. apolipoprotein A-I은 지질과 결합하지 않았을 때와 지질과 결합했을 때의 구조가 다르다고 알려져 있다. 지질과 결합하지 않았을 때에는 four-helix bundle 구조를 가지는 반면 지질과 결합을 하면 각각의 helix들이 펼쳐진 open conformation을 가지게 된다. Open conformation에서는 apolipoprotein A-I에 결합된 지질이 각각의 amphipathic helix의 hydrophobic한 부분에 결합을 하여 open conformation을 유도함과 동시에 open conformation을 안정화 시킨다(Ajees *et al.* 2006). apolipoprotein A-I 단백질의 경우와 비슷하게 Type IV LS-12 AFP도 얼음 결합에 의해 구조 변화를 가질 것으로 가설을 세우고 homology modeling을 통해 Type IV LS-12 AFP의 두 가지 conformation(open conformation and closed conformation)의 모델 구조를 만들고 얼음결합 예상 부위를 모델 구조로 부터 예측하였다(Fig. 4).



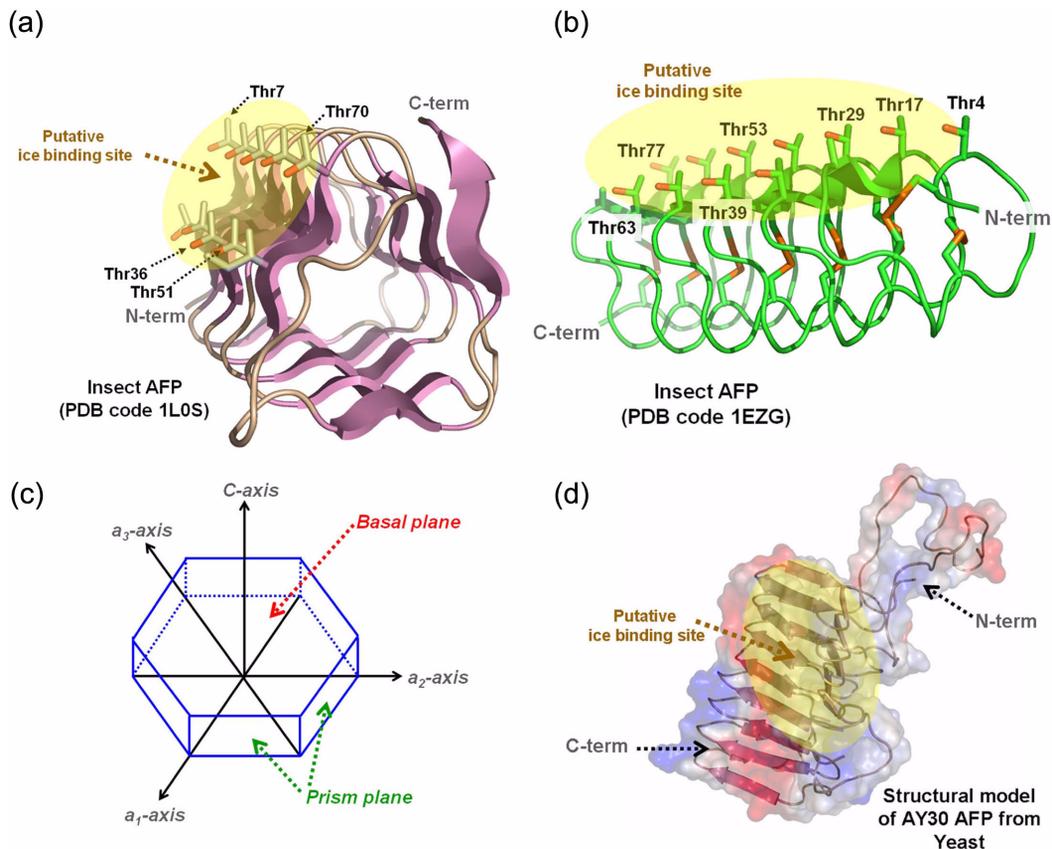
**Fig. 4.** A proposed model for opening mechanism of Type IV LS-12 AFP based on the apolipoprotein A-I structure. Structural model of free Type IV LS-12 AFP was generated using lipid free human apolipoprotein A-I structure (PDB code 2A01), while open conformation model was generated using lipid bound human apolipoprotein A-I structure (PDB code 1AV1). The Phyre modeling server (Kelley and Sternberg 2009) was used to model the structure of open and closed conformation of Type IV LS-12 AFP

Type IV LS-12 AFP의 또 다른 특성으로는 2 mM의 농도에서 0.5°C의 TH 값을 가지는 반면 높은 농도에서는 aggregation 혹은 침전되는 경향을 가진다는 것이다. 이 결과와 일치하게도 longhorn sculpin의 혈장에서도 Type IV LS-12 AFP가 낮은 농도로 존재한다. 한 가지 재미있는 사실은 Type IV AFP를 가지는 longhorn sculpin은 Type I AFP 또한 가지고 있다는 사실이다. 그렇다면 왜 longhorn sculpin 물고기는 완전히 서로 다른 두 가지 AFP를 가지는 것일까? 그 이유는 아마도 영하의 온도에서 혈액 중에 얼음 결정의 생성을 억제하기 위해서는 하나의 AFP 단백질의 발현 양을 조절하는 것 보다 두 가지 다른 AFP 단백질의 발현 양을 조절하는 것이 온도 변화에 적응하는데 유리하기 때문에 그렇게 진화되어져 왔을 것이라고 짐작하고 있다. 이와 비슷한 예로는 다른 종류의 물고기들도 비록 하나의 type의 AFP를 가지고 있다고 하더라도 여러 가지 isoform들의 발현을 통해 혈액에 필요한 AFP 양을

신속하게 조절하고 있다.

## 6. Insect AFP

Insect AFP는 극지의 곤충들에 존재하며 지금까지 알려진 AFP들 중에 가장 Antifreeze activity가 높다고 알려져 있어서 “hyperactive AFP”라고도 불린다. Insect AFP는 일반적인 다른 type의 fish AFP보다 약 10배에서 100배 이상의 Antifreeze 활성을 가지는데 그 이유가 다른 fish AFP가 얼음결정의 prism plane에 결합하는데 비해 Insect AFP는 basal plane에 결합해서 c 축으로의 얼음 결정성장을 억제하기 때문이다(Liou *et al.* 2000; Graether *et al.* 2000; Graether and Sykes 2004). Insect AFP는 구조적으로 크게 두 개의 그룹으로 나눌 수 있는데 하나는 left-handed  $\beta$ -helix의 구조(Fig. 5a)를 가지는 그룹과 다른 하나는 right-handed  $\beta$ -helix의 구조(Fig. 5b)를 가지는 그룹



**Fig. 5.** (a) The overall structure of insect AFP (left-handed  $\beta$ -helix) from spruce budworm. Putative ice binding sites (Thr5, Thr7, Thr21, Thr23, Thr36, Thr38, Thr51, Thr53 and Thr70) are represented in yellow, (b) Cartoon representation of insect AFP (Right-handed  $\beta$ -helix) from *Tenebrio molitor*. The regular array of Thr residues has been identified as the ice binding site, (c) Crystal axes and main facets of hexagonal ice crystal (d) Structural model of the AY30 AFP from *Leucosporidium* sp. The homology-modeling server Phyre (Kelley and Sternberg 2009) was used to generate the structural model of AY30 AFP using as a template the best fitting structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin protein (PDB code 1DAB). Yellow circle indicates the putative ice binding face of AY30. PyMOL (Delano 2002) was used to generate all figures

이다. *Choristoneura fumiferana*에 존재하는 Insect AFP (CfAFP)는 12-15개의 반복되어지는 아미노산 서열을 가지고, 전체적으로 left-handed  $\beta$ -helix의 구조를 가진다. CfAFP 구조의  $\beta$ -helix 안쪽에 hydrophobic core를 가지고 여러 개의 disulfide bond와 수소 결합을 통해 안정성을 유지한다.  $\beta$ -helix 구조의 단면은 삼각형 형태를 가지게 되고 세 개의 flat한 면 중 하나는 반복되어지는 Thr-X-Thr motif를 가진다. 특히 Thr-X-Thr(X 위치에는 다른 모든 아미노산이 위치 가능) 아미노산이 얼음결합에 직접적으로 관여한다고 알려졌다. CfAFP의 구조와 얼음 결정과의 결합구조 모델링을 통해 Thr의 OH group이 얼음결정의 lattice와 공간적으로 잘 맞추어진다는 사실을 규명하였다. 이를 “ice lattice occupation” model이라고 부른다. Thr-X-Thr motif의 첫 번째 Thr은 옆에 위치하는  $\beta$ -strand에 존재하는 Thr 잔기와 공간적으로 4.5 Å 떨어져 있으며, 같은  $\beta$ -strand에 존재하는 Thr 잔기와는 7.35 Å 떨어져 있게 된다. 이는 얼음 결정의 prism plane lattice(4.5×7.35 Å) 그리고 basal plane lattice(4.5×7.8 Å)의 공간적 위치와 거의 일치한다(Leinala *et al.* 2002).

Insect AFP의 얼음결합 기작을 규명하기 위해 ice etching technique을 이용한 연구들이 수행 되어져 왔다. ice etching technique 실험을 위해서는 먼저 single ice crystal hemisphere를 준비하고 AFP가 들어있는 용액 속에서 준비된 single ice crystal hemisphere를 성장하게 한 후 잠시 얼음 성장을 멈추고 승화를 시키면 AFP가 결합된 부위는 얼음 결정의 승화작용이 AFP에 의해 방해가 되어 그 부위는 그물 모양의 흔적을 남기게 된다. 이때 GFP가 fusion된 AFP를 이용하면 GFP의 형광을 통해 AFP의 결합부위를 더욱 보기 쉽게 관찰할 수 있다. 최근 ice etching technique 실험을 이용한 논문 결과에 의하면 Spruce Budworm로부터의 Insect AFP는 얼음 결정의 basal plane에 결합하여 c축으로의 얼음 결정의 성장을 억제하고 eel pout으로부터의 Type III AFP는 얼음 결정의 prism plane에 결합하여 a 축으로의 얼음결정 성장을 억제한다는 사실을 규명하였다(Fig. 5c). 하나의  $\alpha$ -helix로 이루어져서 일렬의 Thr 잔기가 얼음 결합 부위에 존재하는 Type I AFP와는 달리 Insect AFP는  $\beta$ -helix의 구조를 가지면서 여러 개의 Thr 잔기가 동시에 얼음 결정에 결합을 하게 되는 것이다. 다시 말해 Type I AFP는 얼음결정과의 lattice matching이 일차원적으로 일어나지만 Insect AFP는 이차원적으로 결합함으로써 Type I AFP 보다 훨씬 높은 Antifreeze activity를 가질 것으로 예상되어진다.

## 7. Plant AFP

식물에 존재하는 AFP들으로써 다른 AFP들에 비해 낮은

TH 값을 가지면서 얼음결정의 형성을 억제하기보다는 얼음의 재결정화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 그리고 진화적으로 식물의 Pathogenesis 관련된 단백질들과 아미노산 서열과 구조적으로 유사성을 가지고 있으며, 심지어 어떤 Plant AFP는 anti-fungal 활성을 나타내기도 한다. 1998년 Science지에 발표된 결과에 의하면 당근으로부터 새로운 plant AFP를 찾아서 그 cDNA를 담배 식물에 발현시켜 형질 전환된 저온 저항성 담배 식물을 제조하였다. 형질 전환된 담배 식물로부터의 추출물은 발현된 당근의 AFP를 가지고 있고 RI와 TH 활성을 나타내는 것을 확인하였다. 이 결과는 다른 작물에도 plant AFP의 유전자를 도입하여 추운 환경에서도 작물이 잘 자랄 수 있는 형질 전환된 식물을 만들 수 있다는 가능성을 제시한다(Worrall *et al.* 1998). 그리고 재미있게도 Carrot AFP는 polygalacturonase inhibitor proteins(PGIPs)와 높은 아미노산 서열 유사성을 가지고 있다. PGIPs는 leucine-rich-repeat(LRR) protein family에 속하며 LRR 단백질은 규칙적으로 반복되는 leucine 아미노산을 가지는 약 24개의 peptide가 10번에서 많게는 30번씩 반복된다. 비록 Carrot AFP는 polygalacturonase inhibitor 활성은 없지만 PGIPs로부터 Antifreeze activity를 가지는 단백질로 진화되어져 왔음을 짐작할 수 있다.

winter rye 혹은 bittersweet nightshade(*Solanum dulcamara*)과 같은 다른 식물에서 발견되어진 Plant AFP 또한 식물의 Pathogenesis 관련된 단백질들과 아미노산 유사성을 가진다. winter rye에서 발견되어진 AFP는 Chitinases 효소와 아미노산 유사성을 가지는데, antifungal activity, hydrolytic activity 그리고 ice-binding activity를 동시에 가진다. 하지만 한 단백질에 대한 각각의 서로 다른 활성들은 식물내 칼슘이온의 농도에 의해 조절된다고 알려져 있다. 20 mM 칼슘 농도에서는 Chitinase 효소의 활성이 칼슘이 없을 때 보다 5배 정도 증가한다고 알려져 있다. 하지만 반대로 칼슘이 존재하면 Antifreeze activity는 낮아진다. 정상적인 winter rye에서는 칼슘 농도가 매우 낮다 하지만 병원균에 감염된 winter rye는 cell wall로부터 칼슘을 분비하여 세포내의 칼슘농도를 높인다. 이때 winter rye AFP의 Chitinase 효소의 활성이 높아지게 되고 이 효소에 의해 병원균의 분해가 이루어지게 된다. 따라서 winter rye AFP 경우에는 Chitinase 효소의 활성과 Antifreeze activity 두 가지를 동시에 가지고 칼슘농도에 의해 각각의 활성이 조절되고 있는 것이다(Griffith and Yaish 2004; Atici and Nalbantoglu 2003).

## 8. 그 외 다른 AFP

최초의 박테리아 AFP는 남극의 *Moraxella catarrhalis*군

으로 부터 발견되었으며(Yamashita *et al.* 2002), 북극의 plant growth-promoting rhizobacteria 종류인 *Pseudomonas putida* GR12-2으로 부터도 secretion되는 AFP가 발견되었다(Muryoi *et al.* 2004). 그리고 최근 2008년 Biochemical Journal에 발표된 결과에 의하면 남극의 *Marinomonas primoryensis* 균 유래의 hyperactive calcium dependent AFP(MpAFP)를 클로닝하고 재조합 단백질을 정제하였고 더 나아가 삼차 구조 모델링을 시도하였다. 이 단백질의 Antifreeze activity를 가지는 322 아미노산 부위는 19개의 아미노산들의 반복으로 이루어져 있는데, XGTGND motif를 가진다. X 위치에는 주로 alanine 또는 glycine이 위치하고 굵은 글씨의 Thr과 Asn이 얼음결정과의 직접적인 상호 작용에 중요하다고 예측된다. 실험적으로 이 두 아미노산을 Tyr으로 치환된 돌연변이체를 만들어서 TH 활성을 비교했을 때 wild-type MpAFP 보다 현저히 낮은 활성을 나타내는 것을 관찰하였다. 이 단백질은 RTX (repeats-in-toxin) family 단백질과 아미노산 서열 유사성을 가지는데, RTX family 단백질들은 Gram-negative gammaproteobacteria에서 발견되는 secreted virulence factor 들이다. MpAFP는 calcium이 존재할 때 높은 TH 값을 가지며 trypsin에 의한 proteolysis에도 칼슘이 없을 때 보다 상대적으로 안정하다. 그리고 칼슘이 있을 때와 없을 때의 MpAFP의 이차 구조를 CD 실험으로 분석을 해 보면 칼슘이 있을 때는 주로  $\beta$ -sheet 구조를 가지는 것으로 나오지만 칼슘이 없을 때에는 대부분의 구조가 random-coil을 가지는 것으로 나타낸다. 이는 calcium이 MpAFP의 활성과 단백질 접힘을 유지하는데 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 뿐만 아니라 이 논문에서는 Calcium이 결합된 alkaline protease의  $\beta$ -roll 구조를 template로 한 homology modeling을 통해 MpAFP의 삼차 구조 모델을 만들었다. 이 모델 구조분석에 의하면 MpAFP는  $\beta$ -helical fold를 가지며  $\beta$ -helix의 안쪽 부위에 일렬의 calcium 결합부위를 가지고 있다. 얼음결합부위는 calcium 결합부위 반대쪽에 평행한 두 줄의 Thr과 Asp/Asn 아미노산들로 이루어져 있다(Garnham *et al.* 2008).

최근 일본 연구그룹에서는 서로 다른 두 가지 호냉성 곰팡이류(*Typhula ishikariensis*와 *Antarctomyces psychrotrophicus*)에서 새로운 AFP를 분리해 내고 두 AFP의 활성 및 생화학적 특성을 비교하였다. *Antarctomyces psychrotrophicus*로부터의 AFP는(AnpAFP) 약 28 kDa의 분자량을 가지며 glycosylation에 의해 translation modification이 되어 있다는 사실을 glycosidase에 의해 glycosylation 된 당을 제거함으로써 생기는 size 변화를 통해 규명하였다. 두 AFP 모두 bipyramidal 형태의 얼음결정을 유도하지만 AnpAFP는 type I-III AFP와 유사한 antifreeze activity를 가지는 반면

에 *Typhula ishikariensis* AFP(TisAFP)는 insect AFP와 유사하게 hyperactive antifreeze activity를 가진다. 그리고 TisAFP 경우에는 acidic 환경에서 높은 TH 활성을 나타내는 반면 AnpAFP는 alkaline 환경에서 높은 TH 활성을 나타낸다. 이같이 두개의 다른 psychrophile fungi들이 다른 생화학적 특징을 가지는 AFP를 가지다는 사실은 각각의 AFP가 다른 gene으로 부터 진화되어져 왔음을 의미한다(Xiao *et al.* 2010).

그리고 최근에는 북극 연못의 yeast(*Leucosporidium* sp.)에서 TH와 RI activity를 가지는 새로운 AFP(AY30)가 발견되었다. AY30 단백질은 261개의 아미노산으로 이루어져 있고 N-terminal signal sequence와 하나의 N-glycosylation site를 가진다(Lee *et al.* 2010). 삼차 구조 모델링 결과에 의하면 이 단백질은 곤충에서 발견되어지는 Insect AFP와 유사하게 전체적으로 left-handed  $\beta$ -helix 구조를 가질 것으로 예상된다. 하지만 Insect AFP는 disulfide bond에 의해 left-handed  $\beta$ -helix 구조가 안정화되지만 AY30 AFP 경우에는 단 하나의 Cysteine 아미노산 잔기도 가지고 있지 않기 때문에 disulfide bond 없이 left-handed  $\beta$ -helix 구조를 형성할 것으로 추측된다(Fig. 5d).

이 외에도 남극 alga(*Prasiola* sp.)와 ice sea diatom (*Navicula glaci*)에서도 새로운 AFP들이 발견되어 연구되고 있다(Raymond and Fritsen 2001; Gwak *et al.* 2010).

## 9. 결 론

영하의 온도에서 살아가는 많은 극지생물체들은 AFP를 발현함으로써 생체내의 얼음 결정의 형성을 억제 하면서 살아가고 있다. 비록 타입과 구조가 다르지만 지금까지 밝혀진 모든 AFP는 구조적으로 평평하고 hydrophobic한 얼음결합부위를 가지면서 얼음결정과 직접적인 상호 작용을 통해 어는점을 낮추고 얼음의 재결정을 억제한다. 현재까지 연구되어진 AFP들은 그것들의 구조적 특징 또는 source에 의해 grouping(Type I-V, Plant AFP) 되어져 왔다. 하지만 다양한 생물체들로 부터 AFP들이 새롭게 발견되어 지고 이들의 type을 결정하는데에는 기존의 grouping에 한계가 있다. 따라서 이들의 정확한 grouping 및 분자수준에서의 작용 기작을 설명하기 위해서는 AFP에 대한 더 많은 구조적인 연구가 필요하다. 뿐만 아니라, AFP의 구조분석은 AFP가 어떤 단백질로 부터 진화되어 왔는지를 밝히는데 유용하고 더 나아가 고해상도 삼차 구조 정보는 Antifreeze activity가 향상된 기능개선형 AFP의 제작과 이를 이용한 산업화에 도움을 줄 수 있다.

## 사 사

본 연구는 극지 연구소 기본연구사업(PE10070)과 기초 기술연구회 공공수탁사업(PG10010)의 일환으로 수행되었습니다.

## 참고문헌

- Ajees A, Anantharamaiah GM, Mishra VK, Hussain M, Murthy HM (2006) Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:2126-2131
- Atici O, Nalbantoglu B (2003) Antifreeze proteins in higher plants. *Phytochemistry* **64**:1187-1196
- D'Amico S, Collins T, Marx J, Feller G, Gerday C (2006) Psychrophilic microorganisms: challenges for life. *EMBO Rep* **7**:385-389
- Davies PL, Sykes BD (1997) Antifreeze proteins. *Curr Opin Struct Biol* **7**:828-834
- Davies PL, Baardsnes J, Kuiper MJ, Walker VK (2002) Structure and function of antifreeze proteins. *Philos Trans Roy Soc B* **357**:927-935
- DeLano W (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA. <http://www.pymol.org/>. Accessed 11 Aug 2010
- Garnham CP, Gilbert JA, Hartman CP, Campbell RL, Laybourn-Parry, J, Davies PL (2008) A Ca<sup>2+</sup>-dependent bacterial antifreeze protein domain has a novel beta-helical ice-binding fold. *Biochem J* **411**:171-180
- Gauthier SY, Scotter AJ, Lin FH, Baardsnes J, Fletcher GL, Davies PL (2008) A re-evaluation of the role of type IV antifreeze protein. *Cryobiology* **57**:292-296
- Graether SP, Sykes BD (2004) Cold survival in freeze-intolerant insects: the structure and function of beta-helical antifreeze proteins. *Eur J Biochem* **271**: 3285-3296
- Graether SP, Kuiper MJ, Gagné SM, Walker VK, Jia Z, Sykes BD, Davies PL (2000) Beta-helix structure and ice-binding properties of a hyperactive antifreeze protein from an insect. *Nature* **406**:325-328
- Griffith M, Yaish MW (2004) Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends Plant Sci* **9**:399-405
- Gronwald W, Loewen MC, Lix B, Daugulis AJ, Sönnichsen FD, Davies PL, Sykes BD (1998) The solution structure of type II antifreeze protein reveals a new member of the lectin family. *Biochemistry* **37**:4712-4721
- Gwak IG, Jung WS, Kim HJ, Kang SH, Jin E (2010) Antifreeze Protein in Antarctic Marine Diatom, *Chaetoceros neogracile*. *Mar Biotechnol* **12**:630-639
- Hamada T, Ito Y, Abe T, Hayashi F, Güntert P, Inoue M, Kigawa T, Terada T, Shirouzu M, Yoshida M, Tanaka A, Sugano S, Yokoyama S, Hirota H (2006) Solution structure of the antifreeze-like domain of human sialic acid synthase. *Protein Sci* **15**:1010-1016
- Jia Z, Davies PL (2002) Antifreeze proteins: an unusual receptor-ligand interaction. *Trends Biochem Sci* **27**:101-106
- Jia Z, DeLuca CI, Chao H, Davies PL (1996) Structural basis for the binding of a globular antifreeze protein to ice. *Nature* **384**:285-288
- Kelley LA, Sternberg MJ (2009) Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* **4**:363-371
- Lee JK, Park KS, Park S, Park H, Song YH, Kang SH, Kim HJ (2010) An extracellular ice-binding glycoprotein from an Arctic psychrophilic yeast. *Cryobiology* **60**:222-228
- Leinälä EK, Davies PL, Jia Z (2002) Crystal structure of beta-helical antifreeze protein points to a general ice binding model. *Structure* **10**:619-627
- Liou YC, Tocilj A, Davies PL, Jia Z (2000) Mimicry of ice structure by surface hydroxyls and water of a beta-helix antifreeze protein. *Nature* **406**:322-324
- Liu Y, Li Z, Lin Q, Kosinski J, Seetharaman J, Bujnicki JM, Sivaraman J, Hew CL (2007) Structure and evolutionary origin of Ca(2+)-dependent herring type II antifreeze protein. *PLoS One* **2**:e548. doi: 10.1371/journal.pone.0000548
- Muryoi N, Sato M, Kaneko S, Kawahara H, Obata H, Yaish MW, Griffith M, Glick BR (2004) Cloning and expression of *afpA*, a gene encoding an antifreeze protein from the arctic plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2. *J Bacteriol* **186**:5661-5671
- Nishimiya Y, Kondo H, Takamichi M, Sugimoto H, Suzuki M, Miura A, Tsuda S (2008) Crystal structure and mutational analysis of Ca<sup>2+</sup>-independent type II antifreeze protein from longsnout poacher, *Brachyopsis rostratus*. *J Mol Biol* **382**:734-746
- Patel SN, Graether SP (2010) Structures and ice-binding faces of the alanine-rich type I antifreeze proteins. *Biochem Cell Biol* **88**:223-229
- Raymond JA, Fritsen CH (2001) Semipurification and ice recrystallization inhibition activity of ice-active substances associated with Antarctic photosynthetic organisms. *Cryobiology* **43**:63-70

- Sicheri F, Yang DS (1995) Ice-binding structure and mechanism of an antifreeze protein from winter flounder. *Nature* **375**:427-431
- Sönnichsen FD, DeLuca CI, Davies PL, Sykes BD (1996) Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetic of the protein-ice interaction. *Structure* **4**:1325-1337
- Worrall D, Elias L, Ashford D, Smallwood M, Sidebottom C, Lillford P, Telford J, Holt C, Bowles D (1998) A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization. *Science* **282**:115-117
- Xiao N, Suzuki K, Nishimiya Y, Kondo H, Miura A, Tsuda S, Hoshino T (2010) Comparison of functional properties of two fungal antifreeze proteins from *Antarctomyces psychrotrophicus* and *Typhula ishikariensis*. *FEBS J* **277**:394-403
- Yamashita Y, Nakamura N, Omiya K, Nishikawa J, Kawahara H, Obata H (2002) Identification of an antifreeze lipoprotein from *Moraxella* sp. of Antarctic origin. *Biosci Biotech Biochem* **66**:239-247
- Yamashita Y, Miura R, Takemoto Y, Tsuda S, Kawahara H, Obata H (2003) Type II antifreeze protein from a mid-latitude freshwater fish, Japanese smelt (*Hypomesus nipponensis*). *Biosci Biotechnol Biochem* **67**:461-466
- Zhao Z, Deng G, Lui Q, Laursen RA (1998) Cloning and sequencing of cDNA encoding the LS-12 antifreeze protein in the longhorn sculpin, *Myoxocephalus octodecimspinosus*. *Biochim Biophys Acta* **1382**:177-180

---

*Received Jan. 13, 2011*

*Revised Mar. 3, 2011*

*Accepted Apr. 28, 2011*