XXXXXXXXXXXXX

극지 빙하미생물의 아포 (spore) 형성 기작관련 단백질 구조 연구

Studies on protein structure for the spore formation mechanism of microorganisms in polar glaciers

KOPRI
극지연구소

2017. 12. 06

한 국 해 양 과 학 기 술 원
부 설 극 지 연 구 소

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 빙하미생물의 아포 (spore) 형성 기작관련 단백질 구조 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12. 06

연 구 책 임 자 : 이 준 혁

참 여 연 구 원 : 이 성 구

참 여 연 구 원 : 강 정 호

참 여 연 구 원 : 박 선 하

참 여 연 구 원 : 이 창 우

참 여 연 구 원 : 고 혜 연

KOPRI 극지연구소

보고서 초록

과제관리번호	PE16390	해당단계 연구기간	2014. 10. 13 ~ 2017. 10. 12	단계 구분	최종 (3년)
연구사업명	중 사 업 명	극지연구소 창의연구 사업			
	세부사업명	Seed형 선행과제			
연구과제명	중 과 제 명	극지 빙하미생물의 아포 (spore) 형성 기작관련 단백질 구조 연구			
	세부(단위)과제명	극지 빙하미생물의 아포 (spore) 형성 기작관련 단백질 구조 연구			
연구책임자	이준혁	해당단계 참여연구원수	총 : 6 명 내부 : 3 명 외부 : 3 명	해당단계 연구비	정부: 300,000 천원 기업: 천원 계: 300,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	극지연구소 극지유전체사업단	참여기업명	해당 없음		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위 탁 연 구	연구기관명 :	연구책임자 :			

요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)	보고서 면수	62

1. 빙하 미생물 유전자 정보로부터 스포어 형성에 관련된 단백질 확보
   - 미국 루이지애나 대학의 Brent C. Christner 교수 연구실과의 공동연구를 통해 기 확보된 빙하 미생물 2종 (Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 와 Paenisporosarcina sp. Strain TG-20) 으로 부터 스포어 형성관련 단백질 타겟 86 종 선정, 이 중 15 개 발현 및 3 종 삼차구조 해석
   - 극지 빙하샘플 미생물과의 비교 연구를 위하여 열수 분출공에서 분리한 고온성 균주 Bacillus licheniformis Strain 9F 박테리아 균주에서 타겟 단백질 2 종 발현 및 1종 결정화 성공

2. Spo0A regulation domain (Spo0A-R) 정제, 결정화 및 구조해석
   - Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 유래의 inactive 상태의 Spo0A regulation domain (PaSpo0A-R) 구조 해석
   - 모델링 실험을 통해 phosphorylation에 의해 active form 으로 변환될 때 중요한 구조적 변화 확인
   - phosphorylation에 의해 PaSpo0A 단백질이 dimer를 형성하고 dimer 형태로 타겟 DNA에 결합하여 스포어 형성에 관여하는 다른 유전자의 발현을 조절함

3. dihydrodipicolinate reductase 효소의 구조해석
   - Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 유래의 dihydrodipicolinate reductase 효소 (PaDHDPR) 자체 구조와 NADPH/DPA 가 결합된 구조 해석
   - 구조적으로 PaDHDPR 효소가 어떤 기작에 의해 NADPH를 조효소로 선호하는지 규명
   - PaDHDPR 효소의 기질 결합에 중요한 잔기 확인

색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	빙하미생물, 아포, 단백질 구조, 저온적응, X-선 결정학
	영 어	Glacier microbe, Spore, Protein structure, Cold-adaptation, X-ray crystallography

KOPRI 극지연구소

요 약 문

Ⅰ. 제 목

극지 빙하미생물의 아포 (spore) 형성 기작관련 단백질 구조 연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

기후변화에 의해 극지 빙하는 녹고 있고 이 빙하 속에 존재하는 미생물들의 출현에 대비하는 기초연구가 필요한 실정이다. 빙하 미생물이 어떻게 빙하 속에서 오랜 시간동안 생존해 가는지를 분자 수준에서 이해하고자 한다. 본 연구과제에서는 빙하미생물의 생존 전략중에 하나인 스포어 형성 기작을 이해하고 스포어 형성에 중요한 핵심 단백질들의 구조 및 생화학적 특성을 규명하였다.

KOPRI 극지연구소

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

남극 테일러 빙하샘플로부터 분리한 호냉성 박테리아인 Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 와 Paenisporosarcina sp. Strain TG-20에 대한 유전자 분석을 수행하여 스포어 형성에 관여하는 것으로 알려진 타겟 유전자 정보를 확보하였다. 스포어 형성에 관여하는 핵심 단백질들을 재조합으로 발현 및 정제를 수행하였다. 정제된 단백질들의 삼차구조 분석 및 생화학적 특성을 규명하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

1. PaSpo0A regulation domain (PaSpo0A-R) 정제, 결정화 및 구조해석

스포어 형성 신호 전달은 다양한 단백질들의 인산화와 탈인산화에 의해 신호가 전달되고 조절되어 지는 것으로 알려져 있다. 남극 빙하에서 발견된 Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 미생물 유래의 Spo0A 단백질 (PaSpo0A)은 스포어 형성에 있어서 중요한 전사조절 인자로서 역할을 한다고 알려져 있다. 하지만 어떤 기작에 의해서 스포어 형성 신호가 전달되어져 스포어 형성에 필요한 단백질들의 발현을 유도하는지는 명확하게 알려진 바가 없다. 본 연구에서는 PaSpo0A 단백질의 regulator 도메인(PaSpo0A-R)을 발현하여 구조분석을 수행하였다. 인산화 되지 않은 PaSpo0A-R 단백질은 inactive 상태의 구조 모습을 가지

고 있고 기존의 인산화된 Bacillus stearothermophilus 의 BsSpo0A 구조와 비교했을 때 Leu85 잔기의 구조적 변화를 관찰 할 수 있었다. 그리고 구조분석과 cross-linking 실험을 통해 PaSPo0A-R 단백질이 약한 dimer 형태를 가질 수 있다는 사실을 알아냈다. 이를 근거로 모델링 구조분석을 통해 full-length PaSpo0A 단백질이 dimer 형태로 타겟 DNA와 결합할 것인지를 설명 할 수 있었다.

2. dihydrodipicolinate reductase 효소의 구조해석

dipicolinate (DPA)는 스포어의 5-10%를 차지하는 화학물질로써 박테리아의 스포어형성에 중요한 물질 중의 하나이다. Dyhydrodipicolinate reductase (DHDPR) 효소는 DPA 형성과정중에 작용하는 효소로써 NAD(P)H를 조효소로 이용한다고 알려져 있다. 본 연구과제에서는 Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 미생물 유래의 PaDHDPR 효소를 재조합으로 생산하여 삼차구조 분석 및 생화학적 특성 규명을 수행하였다. 규명된 PaDHDPR 효소 구조는 두 개의 도메인으로 이루어져 있는데, N-말단의 NAD(P)H 결합도메인과 C-말단의 기질결합 도메인으로 나누어진다. 그리고 C-말단 도메인에 의해 PaDHDPR은 tetramer 형태를 가지게 된다. 생화학적 특성 분석 결과에 의하면 PaDHDPR은 조효소로써 NADH 보다 NADPH에 보다 강한 선호도를 가진다. NADPH가 결합된 PaDHDPR 구조분석 결과 PaDHDPR은 NADPH 결합에 특이적인 잔기를 가지고 있는 것을 밝혔다.

3. GerE 단백질의 구조 및 기능 연구

GerE 단백질은 전사조절 단백질 중의 하나로서 타겟 DNA의 promoter 지역에 결합하여 스포어 coat 단백질의 발현을 유도한다고 알려져 있다. 본 연구과제 에서는 Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 빙하미생물 유래의 PaGerE 단백질의 구조 및 기능연구를 수행하였다. PaGerE 단백질은 helix-turn-helix 구조를 가지며 DNA 결합에 중요하다고 생각되어지는 잔기들을 확인하였다. 그리고 EMSA 실험을 통하여 Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 미생물의 유전자 서열 중에서 PaGerE가 결합되어 질 것으로 예상되어지는 부분과의 상호작용을 확인하였다.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

극지 빙하미생물의 스포어 형성관련 단백질의 삼차 구조분석은 분자수준에서 극지 생물의 생존 전략 이해에 도움을 준다. 급속도록 진행되고 있는 빙하의 후퇴로 인해 고대 빙하속 박테리아 병원균의 증가가 초래 될 수 있으며 이에 따른 생태계 변화에 대한 기초 연구로 활용가능하다. 그리고 스포어를 형성하는 병원균에 대한 항생제 또는 및 신약 개발 분야에서 분자수준의 단백질 삼차구조 정보제공 가능하다. 더 나아가 빙하 미생물로부터 산업적으로 유용한 저온 활성 단백질의 발굴 및 응용 연구가 가능하다.

SUMMARY

Ⅰ. Title

Studies on protein structure for the spore formation mechanism of microorganisms in polar glaciers

Ⅱ. Purpose and Necessity of R&D

Polar glaciers are melting due to climate change, and basic research is needed to prepare for the emergence of microorganisms in these glaciers. We want to understand at a molecular level how glacier microorganisms survive in ice for a long time. In this research project, we understand the spore formation mechanism, one of the survival strategies of glacial microorganisms, and identify the structural and biochemical characteristics of several key proteins important for spore formation.

KOPRI 극지연구소

Ⅲ. Contents and Extent of R&D

Paenisporosarcina sp., Strain TG-14 is a psychrophilic bacterium isolated from the Antarctic Taylor glacial sample. Gene analysis for this bacteria was performed to obtain target gene information known to be involved in spore formation. Expression and purification of key proteins involved in spore formation were carried out. Moreover, analysis of the tertiary structure of the purified proteins and their biochemical characteristics were performed.

Ⅳ. R&D Results

1. Purification, crystallization and structural analysis of PaSpo0A regulation domain (PaSpo0A-R)

Signal transduction for spore formation is known to be signaled and regulated by phosphorylation and dephosphorylation of various proteins. Spo0A protein from Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 (PaSpo0A) is known to act as an important transcriptional regulator in spore formation. However,

it is unclear how Spo0A transmits signals to induce the expression of proteins necessary for spore formation. In this study, structural analysis was performed by expressing the regulator domain of PaSpo0A protein (PaSpo0A-R). The non-phosphorylated PaSpo0A-R protein had an inactive structure and it was able to observe structural changes of the Leu85 residue compared to the active state of BsSpo0A structure (Spo0A from Bacillus stearothermophilus). Structural analysis and cross-linking experiments have shown that the PaSPo0A-R protein can have a weak dimer form. Based on this modeling structure analysis, we could explain how the full-length PaSpo0A protein binds to target DNA in the form of dimer.

2. Structural analysis of dihydrodipicolinate reductase enzyme

Dipicolinate (DPA) is a chemical that occupies 5-10% of spore component and it is one of the important substances in the spore formation of bacteria. Dyhydrodipicolinate reductase (DHDPR) enzyme is involved in the DPA formation and it is known to use NAD (P) H as a cofactor. In this study, PaDHDPR from Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 was recombinantly produced and analyzed its tertiary structure and biochemical characterization. The identified PaDHDPR enzyme structure consists of two domains, the NAD (P) H binding domain at the N-terminus and the substrate binding domain at the C-terminus. The purified PaDHDPR is a tetramer formed by the C-terminal domain interaction. Biochemical characterization results indicate that PaDHDPR has a stronger preference for NADPH than NADH as a cofactor. Structural and sequence analysis of PaDHDPR revealed that PaDHDPR has specific residues for NADPH binding.

3. Study of structure and function of GerE protein

The GerE protein is one of the transcriptional regulatory proteins and it is known to bind to the promoter region of the target DNA to induce the expression of spore coat protein. In this study, the structural and functional analysis on PaGerE was performed. The PaGerE protein has a helix-turn-helix structure and residues that are thought to be important for DNA binding were identified. Using the EMSA experiment, the interaction between PaGerE and promoter DNA region was confirmed.

Ⅴ. Application Plans of R&D Results

Structural analysis of the spore-forming proteins from polar glacier

microorganisms helps to understand the survival strategies of polar organisms at the molecular level. The rapid retreat of glaciers can lead to an appearance of bacterial pathogens in ancient glaciers. In addition, structure information of spore forming proteins may give an information for drug development and antibiotics against pathogens that form spores. Furthermore, it is possible to find industrially useful cold active proteins from glacier microorganisms.

KOPRI
극지연구소

CONTENTS

ABSTRACT ····· 2
SUMMARY ····· 5
CONTENTS ····· 7
List of Tables ····· 11
List of Figures ····· 12

Chapter 1. Introduction ····· 14
Section 1. Objective of this study ····· 14
Section 2. Necessity of this study ····· 15
1. Technical aspects ····· 15
2. Economic and industrial aspects ····· 16
3. Social and cultural aspects ····· 17

Chapter 2. Current R&D Status in Korea and Other Nations ····· 19
Section 1. Current R&D status in Korea ····· 19
Section 2. Current R&D status in other nations ····· 21
1. USA ····· 21
2. EU ····· 22

Chapter 3. R&D Implementation Contents and Results ····· 27
Section 1. Materials and Methods ····· 27
1. Collection of microorganisms from polar glacier ····· 27
2. Target protein selection ····· 28
3. Expression and purification of recombinant protein ····· 30
4. Structural and functional analysis ····· 31
Section 2. Results ····· 32
1. Structural studies on key transcription factor protein ····· 32
2. Studies on the regulator proteins during germination ····· 41

KOPRI 극지연구소

3. Structural and functional studies on dihydrodipicolinate reductase····· 52

Chapter 4. Degree of R&D Goal Achievement and Degree of Contribution to Outside Research Institute ····· 57

Section 1. Degree of R&D goal achievement ····· 57

1. R&D goal and contents ····· 57

2. R&D achievement ····· 58

Chapter 5. Application Plans of R&D Results ····· 66

Chapter 6. References ····· 71

KOPRI
극지연구소

목 차

초록 ····· 2
요약문 ····· 3
목차 ····· 10
표 목록 ····· 12
그림 목록 ····· 13

제 1 장 서론 ····· 15
제 1 절 연구개발의 목적 ····· 15
제 2 절 연구개발의 필요성 ····· 17
1. 기술적 측면 ····· 17
2. 경제·산업적 측면 ····· 18
3. 사회·문화적 측면 ····· 18

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ····· 19
제 1 절 국내 연구동향 ····· 19
제 2 절 국외 연구동향 ····· 21
1. 미국 ····· 23
2. 유럽 ····· 25

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ····· 27
제 1 절 연구개발 방법 ····· 27
1. 빙하미생물 샘플 확보 ····· 27
2. 단백질 타겟 선정 ····· 30
3. 재조합 단백질 발현 및 정제 ····· 32
4. 구조 분석을 통한 활성 또는 결합 부위예측 및 반응기작 설명 ····· 33
제 2 절 연구개발 결과 ····· 34
1. 핵심 전사 조절 단백질의 구조 분석 ····· 34
2. 스포어 상태에서 다시 분열단계로 넘어가는 단계의 조절 단백질 연구 ····· 45

KOPRI 극지연구소

2. 스포어 상태에서 다시 분열단계로 넘어가는 단계의 조절 단백질 연구 ····· 45
3. 스포어 형성 신호물질 중 하나인 디피콜산 관련 단백질 연구····· 49

제 4장 연구개발목표 달성도 ····· 56
제 1 절 연구목표 달성도 ····· 56
1. 연구목표 및 연구내용 ····· 56
2. 연구개발 성과 ····· 57

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ····· 59

제 6 장 참고문헌 ····· 60

KOPRI
극지연구소

표 목록 (List of Tables)

Table 2-1. 아포 형성에 관련된 유전자 리스트 ····· 22
Table 2-2. 국내외 아포 관련 연구 현황 요약 ····· 25
Table 4-1. 본 연구개발의 최종목표 ····· 56
Table 4-2. 연차별 연구개발 목표 및 내용 ····· 57
Table 4-3. 본 연구개발의 정성적 성과 ····· 58

KOPRI
극지연구소

그림 목록 (List of Figures)

Fig. 1-1. 아포 형성 Gram positive 박테리아의 두 가지 형태적 변화 ····· 15
Fig. 1-2. 극지방의 bacterial 유래 아포를 연구한 논문 수의 연도별 변화 추이 ····· 16
Fig. 1-3. 기후변화에 의한 고대 빙하 미생물 출현 ····· 17
Fig. 2-1. 전자 현미경 이용 P. alvei의 endospore 형성에 인돌 영향 조사 ····· 20
Fig. 2-2. 단계별 아포 형성 (sporulation) 과정 ····· 21
Fig. 2-3. 모세포에서의 주기별 관련 유전자의 발현 양상 ····· 23
Fig. 2-4. 국가별 논문 발표조사 ····· 23
Fig. 2-5. 빙하를 이루고 있는 얼음결정 사이의 작은 얼지 않은 공간에서 살아가고 있는 빙하 미생물 확인 ····· 24
Fig. 3-1. 2012년 미국 루이지에나 대학의 Brent C. Christner 교수 연구실에서 빙하 미생물 분리 작업 모습 ····· 28
Fig. 3-2. 빙하 미생물(*Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 와 *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-20)의 현미경 사진 ····· 29
Fig. 3-3. 빙하 미생물(*Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14)의 전자 현미경 사진 ····· 29
Fig. 3-4. 단백질 구조분석 연구 work flow ····· 34
Fig. 3-5. 스포어 형성 초기단계의 신호전달 체계 ····· 35
Fig. 3-6. 불활성 상태 PaSpo0A-R (탈인산화된 상태)와 활성 상태 BsSpo0A (인산화된 상태)의 구조적 비교 ····· 36
Fig. 3-7. 이합체 형성에 관여하는 수신 도메인의 인터페이스 ····· 37
Fig. 3-8. Analytical ultracentrifugation (AUC)를 이용한 PaSpo0A-R 과 PaSpo0A전체의 분석 ····· 38
Fig. 3-9. 단백질결정 배열에서 확인된 PaSpo0A의 이합체 ····· 38
Fig. 3-10. Spo0A와 DNA 결합체 컴퓨터 모델 ····· 39
Fig. 3-11. Spo0B의 정제과정과 결정화 및 회절실험 ····· 40
Fig. 3-12. PaSpo0F의 단백질 서열과 구조 ····· 42
Fig. 3-13. 탈인산화 상태 (불활성화)와 인산화 상태 (활성화)상태의 PaSpo0F 구조 비교 ····· 42
Fig. 3-14. 구조해석을 위한 GerE의 결정화와 회절실험 ····· 43
Fig. 3-15. Analytical ultracentrifugation (AUC)를 GerE의 다량체 형성여부 분석 ··· 44
Fig. 3-16. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 실험을 통한 GerE의 결합부위

KOPRI 극지연구소

확인 ····· 44
Fig. 3-17. GPR의 결정화와 회절 실험, GPR의 전체적인 구조 ····· 45
Fig. 3-18. GPR의 구조적 특징 ····· 46
Fig. 3-19. 9F_GPR의 정제와 단백질 결정화 및 회절 실험 ····· 47
Fig. 3-20. 디히드로디피콜린산 (DHP) 관련 모식도 ····· 49
Fig. 3-21. DHDPS와 DHDPR를 함께 이용한 활성측정 결과 ····· 50
Fig. 3-22. ITC 분석을 통한 NADH와 NADPH 결합능 확인 ····· 51
Fig. 3-23. NADH와 NADPH에 따른 활성 비교 ····· 52
Fig. 3-24. NADPH와 DPA가 결합한 DHDPR의 구조모델 ····· 52
Fig. 3-25. DHDPR의 구조적 특징 ····· 53
Fig. 3-26. DHDPR의 NADPH 결합 부위 ····· 53
Fig. 3-27. DHDPR의 활성 자리 스테레오 그림 ····· 54
Fig. 3-28. DHDPR의 돌연변이 실험 ····· 55

KOPRI
극지연구소

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

아포 형성 미생물은 저온, 강한 UV, 빈 영양상태 등 극한 스트레스 환경에서 아포를 형성하여 스스로를 보호한다. 스트레스 환경에서는 완전히 생육이 억제되어 아포 형태를 유지하다가, 성장하기 좋은 조건이 주어지면 영양세포로 분화가 촉진되는 Division cycle로 전환한다 (Fig. 1-1). 이러한 아포 형성 미생물은 극한 환경에 저항하기 위해서 starvation 관여 단백질, 아포 형성 단백질, chaperones, reduce metabolism 관여 단백질 등 다양한 스트레스 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있다. 많은 아포 연구에도 불구하고 미생물이 어떤 인자에 의해 환경 스트레스 조건에서 오래도록 아포를 형성하고 성장을 하는지에 대해서는 알려지지 않은 부분이 많이 있다. 따라서 전체적인 아포 형성 메커니즘에 관한 심도 있는 연구가 필요하다.

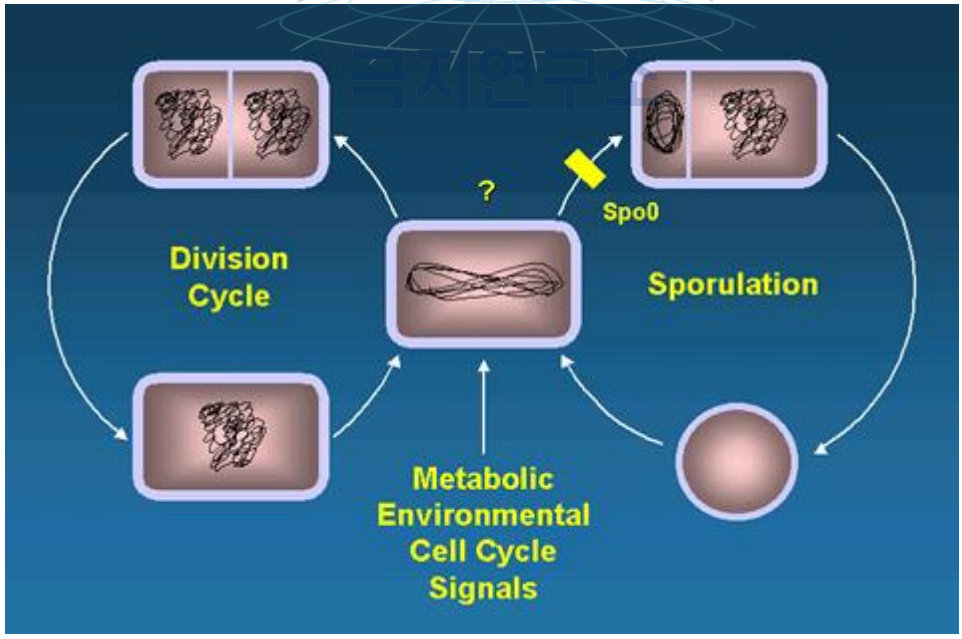


Fig. 1-1. 아포 형성 Gram positive 박테리아의 두 가지 형태적 변화. 환경스트레스 상황시 박테리아는 아포를 형성하며 주변상황이 좋아 질 때 까지 아포형태로 존재하다가 성장하기에 좋은 조건이 주어지면 Division cycle로 전환하게 됨

극지연구소는 2012년 미국 루이지에나 주립대학교 Brent C. Christner 교수 연구팀과 공동연구로 극지 빙하샘플을 확보하였고 호냉성 박테리아인 Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 와 Paenisporosarcina sp. Strain TG-20을 분리하였다. 극지방의 아이스 코어로부터 얻어진 이 빙하 미생물 2종의 경우 아포를 형성하고 있었고, 기초 유전자 분석 연구로부터 아포 형성관련 단백질 타겟 유전자를 확보 할 수 있었다.

본 연구의 목표는 극지 빙하미생물 유래 아포 형성 관련 단백질의 고해상도 삼차구조 해석 및 기능연구를 통해서 빙하미생물의 아포 형성 메커니즘과 비생물적(abiotic) 스트레스 내성 메커니즘을 이해하는 것이다. 현재까지 식중독을 일으키거나 탄저균으로 분류된 아포 형성 병원성 미생물에 대한 연구는 많이 진행되어 있는 반면 극지방 미생물을 이용한 연구는 최근 증가 추세에 있지만 미미한 상태이다(Fig 1-2). 급속도로 진행되고 있는 지구 온난화와 빙하 후퇴로 인해 많은 빙하 속 아포 형성 미생물의 발아율이 증가되고 있기에 본 연구는 기후변화에 의한 고대 빙하미생물 출현 및 생태계 변화에 대비하는 기초연구결과 제공을 목표로 하고 있다.

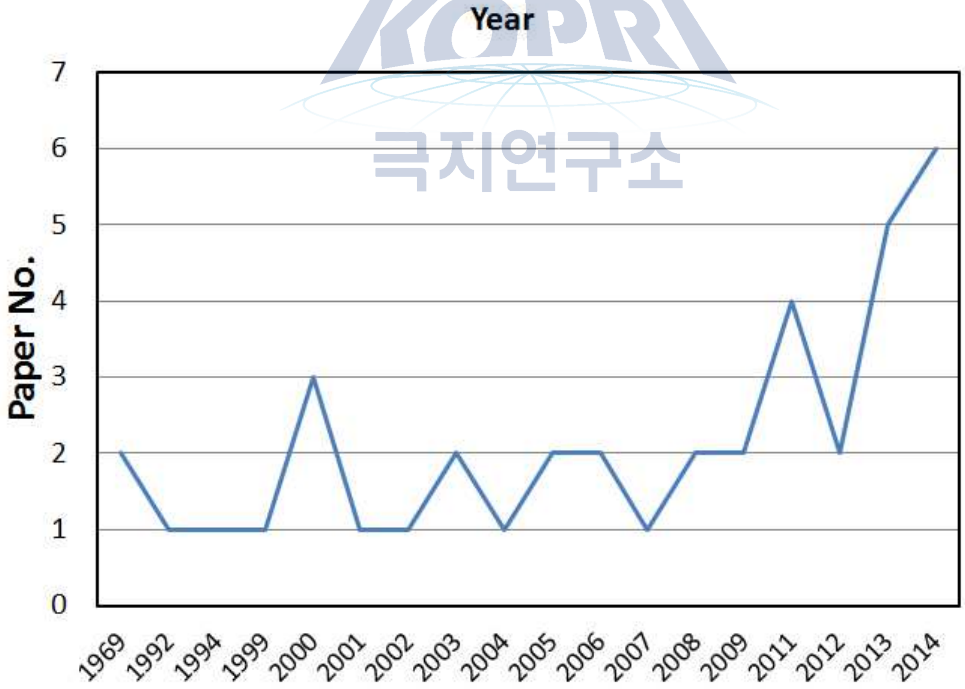


Fig. 1-2. 극지방의 bacterial 유래 아포를 연구한 논문 수의 연도별 변화 추이(Key words : bacterial spore and antarctica)

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

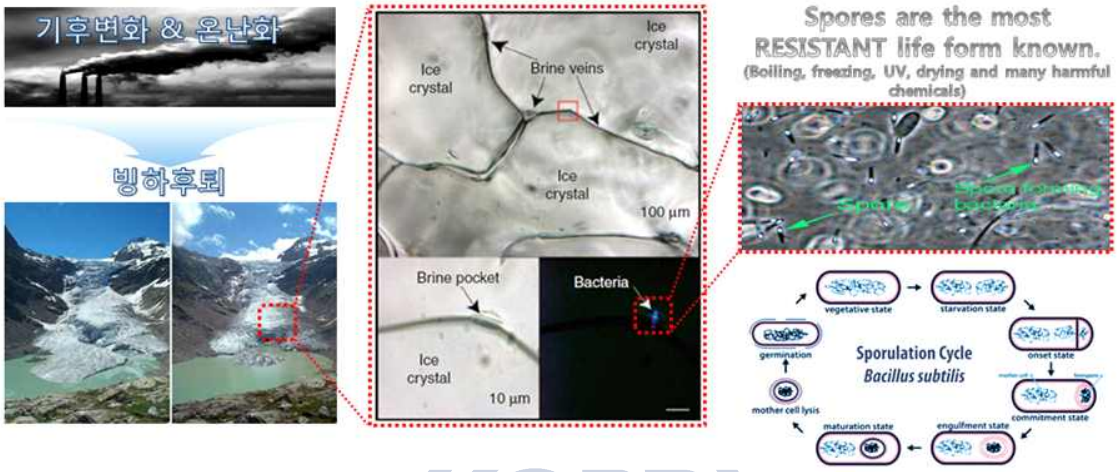


Fig 1-3. 기후변화에 의한 고대 빙하 미생물 출현

빙하 미생물 연구는 극지 생태계의 형성과 적응, 진화 규명 및 생명의 기원에 중요한 연구 결과 제공 측면에서 매우 중요하다. 기후 변화에 따른 빙하 속 아포 형성 미생물의 발아율이 증가되면서 빙하 유래의 많은 아포 형성 미생물들이 보고되고 있는 추세이다 (Fig. 1-3). 급속도로 지구 온난화와 빙하 후퇴가 진행되고 있기 때문에 고대 빙하 속 병원성 미생물의 증가가 초래될 수 있다. 따라서 극지 생태계 변화를 미리 예측하기 위한 모델 미생물 확립이 필요하고, 생태계 변화에 대응 방안 마련을 위한 기초 연구가 요구된다.

미생물의 아포 형성은 극한 상황에서 살아남기 위한 생존 전략의 하나로 아포 형성 미생물은 극저온 및 고온에서도 살아남을 수 있다. 이러한 아포 껍질 (spore coat)의 환경 스트레스 내성은 미생물의 생존 전략을 이해하는 중요한 요소이며 더 나아가 우주 생물의 존재 가능성을 뒷받침하는 자료로 사용 가능하다. 극지 빙하미생물의 아포 형성 관련 단백질의 삼차 구조 분석은 분자 수준에서 극지 생물의 생존 전략의 이해를 가능하게 한다. 단백질은 모든 생명현상을 관장하고 있는 물질로서 유전자 정보로부터 알 수 없는 단백질 수식, 극지 환경에서의 생물의 단백질 발현변화 및 삼차구조 분석은 극지생명현상을 이해하는 결정적 열쇠가 될 것이다. 뿐만 아니라 극지 미생물의 저온 적응 메커니즘을 분자수준에서 이해하는 것은 호냉

성 미생물의 진화 연구에 유용한 모델을 제시할 것으로 기대된다.

2. 경제·산업적 측면

빙하 미생물의 아포 형성 메커니즘을 분자 수준에서 이해하는 것은 아포를 형성하는 탄저균, 보툴리즘 식중독균 등 유사 병원성 미생물에 대한 기초 연구 자료를 제공하는 측면에서 중요하다. 아포 형성에 관여하는 핵심단백질의 3차원 구조와 기능의 상관관계 연구를 통해서 병원성 미생물의 성장을 억제하기 위한 항생제 또는 신약 개발에 중요한 과학적 기반 정보를 제공할 수 있다. 또한 빙하 미생물로부터 산업적으로 유용한 저온 활성 단백질의 발굴 및 실용화 연구가 가능하며, 극지 생명현상의 이해와 해석 정보를 바탕으로 새로운 신생명자원을 개발하기 위한 창조산업의 기반자원을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

빙하 미생물 연구결과 공유는 미생물, 빙하연구, 기후변화 연구 등 다양한 학문 분야에서의 공동연구 계기를 마련하여 BT, IT, NT 등 융합학문을 촉진시킴으로써 극지생명 연구 분야에서 국가의 국제적 위상 제고에 기여할 것이다. 유전체, 단백체 등 극지 고유의 생명정보 확보를 통한 극지연구의 저변확대와 극지생명 연구기술 분야 세계 1위의 국제적 선도 기관으로의 도약이 가능할 것이다.

KOPRI 극지연구소

3. 사회·문화적 측면

지구 온난화의 가속으로 빙하가 녹고 있고 이와 더불어 빙하 속에 갇혀 있던 고대 미생물 또한 다시 깨어나고 있다. 빙하 미생물이 더 퍼지기 전에 빙하 미생물을 분리 동정함으로써 어떤 종류의 병원성 미생물이 빙하 속에 있는지 파악하고 대응책을 마련하여야 한다.

본 연구의 결과는 급속도로 진행되고 있는 지구온난화가 극지생물의 생장과 환경적응에 미치는 영향을 분석하고 극지 생태계 보호 전략을 수립하기 위한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 연구동향

우리나라에서는 경남대학교 황영일박사 팀과 최선욱박사 팀에서 항생물질 생성 균주인 Streptomyces의 아포 형성과 이차대사산물 생성을 조절하는 유전자를 선별하여 기능을 밝힌 연구 결과를 발표하였다 (Lee et al., 2008, Park and Choi, 2015). 서울대학교 김병기박사 팀 또한 Streptomyces coelicolor에서 항생물질 생성과 아포 형성에 관여하는 단백질을 발견하고, 이 단백질이 결여된 돌연변이에서 항생물질인 actinorhodin의 생성과 아포형성이 크게 증가하는 것을 확인하였다 (Kim et al., 2013).

대구 한의대학교 권애란박사 팀은 식중독 균인 Staphylococcus aureus로부터 SpoVG homologue를 분리하여 대장균에서 대량 발현시켜 단백질 결정과 X-ray diffraction data를 얻는데 성공하였다. SpoVG 단백질은 아포 형성 미생물인 Bacillus subtilis에서 처음으로 발견되었고, stationary phase에서 아포 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다 (kim et al., 2010).

영남대학교 이진태박사 팀은 인돌 (indole)이 gram positive 미생물 중 하나인 Paenibacillus alvei의 아포 성숙을 억제하여 항생제, 낮은 pH 및 에탄올에 노출되었을 때 이 미생물의 생존을 감소시키고 뿐만 아니라 내열성에도 영향을 미치는 것을 발견하였다 (kim et al., 2011) (Fig. 2-1).

고려대학교 류지훈박사 팀은 식중독 균으로 알려진 *Bacillus cereus*의 아포 형성 억제 방법 연구를 통해 식혜의 간헐 멸균법을 제시하였다 (kim *et al.*, 2012). 한국생명공학연구원은 Paenibacillus polymyxa의 genome sequence로부터 아포 형성에 특이적인 신호를 감지하고 전달하는 Sporulation histidine kinases 유전자를 선별하였고, 아포 형성능력을 없앤 돌연변이 균주를 이용하여 이 유전자들의 기능을 연구한 결과를 발표하였다 (Park *et al.*, 2012).

KOPRI 극지연구소

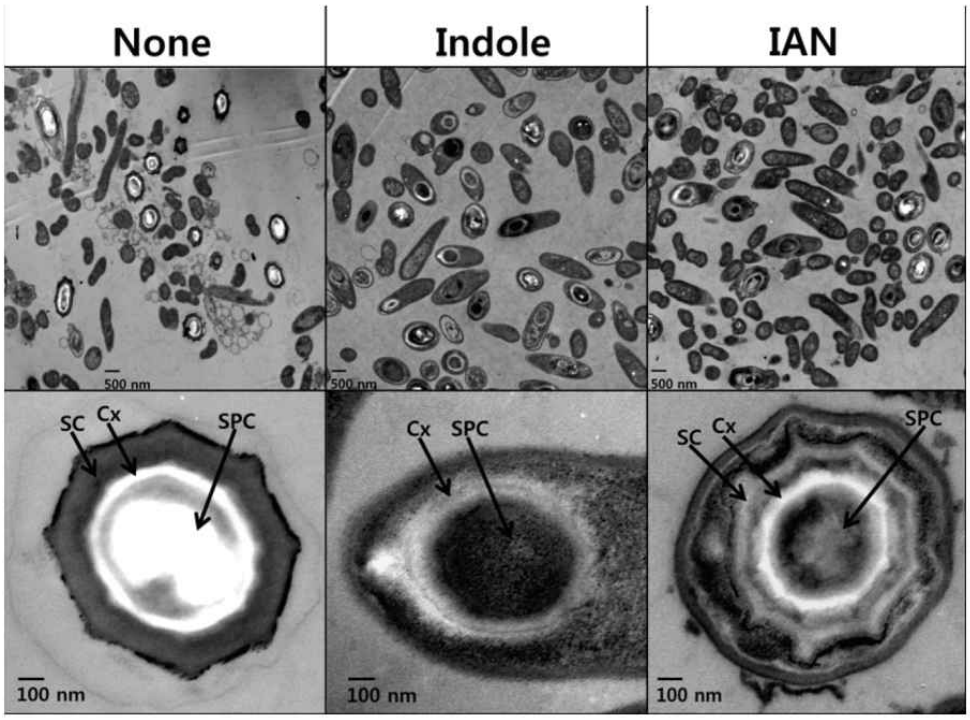


Fig. 2-1. 전자 현미경 이용 P. alvei의 endospore 형성에 인돌 영향 조사. SC, spore coat; Cx, cortex; SPC, spore core (kim et al., 2011)

KOPRI 극지연구소

최근 한양대학교는 탄저병의 원인 균주인 Bacillus anthracis에서 특정 유전자 돌연변이체를 제작하였을 때 아포 형성과 발아가 지연되는 결과를 발표하였다. 이 유전자는 탄저병 치료를 위한 잠재적 바이오 마커인 endopeptidase로 밝혀졌다 (Kim *et al.*, 2017). 하지만 이렇게 다양한 아포형성 관련 연구에도 불구하고 환경 스트레스와 아포 형성의 상관관계와 관련된 국내 연구는 전무한 상황이다.

제 2 절 국외 연구동향

아포 연구는 약 100년 전 100 ℃의 끓는 물에서도 살아남을 수 있는 Bacillus anthracis가 아포를 형성하는 것을 알게 되면서 시작되었다. 이후 아포 형성이 어떻게 열과 다른 스트레스에 대해 저항성을 갖는지에 대한 연구가 진행되었다 (Bartholomew et al., 1950) (Fig. 2-2). 아포 연구의 대표종인 Bacillus subtilis의 아포를 연구하기 위한 염색방법이 개발되었고 연구되었고 (Driks, 1999), 아포 형성의 주기 및 관련 유전자들을 밝히는 연구 등이 진행 되고 있다 (Fig. 2-3, Table 2-1).

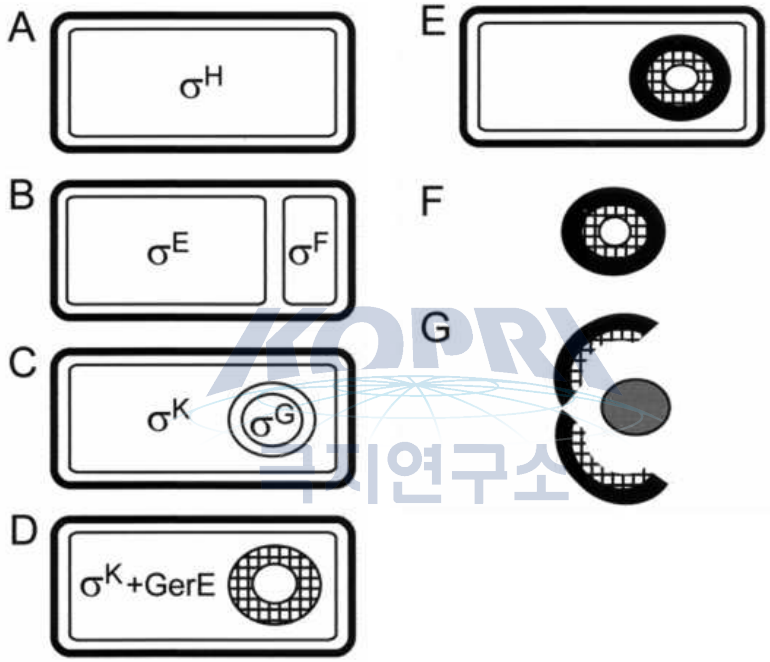


Fig. 2-2. 단계별 아포 형성 (sporulation) 과정. (A) 이포형성 초기 σ^H 활성이 증가함. (B) 다음 단계에서 비댕칭형의 격막이 형성되면서 세포를 모세포와 전아포 두 부분으로 나눔. 전이포 단계에서 σ^F 이 모세포에서는 σ^E 이 활성을 나타냄. (C) 전아포는 세포막으로 둘러쌓임. σ^G 가 전아포에서 활성을 가지고 σ^K 는 모세포에서 별현됨. (D) 피질 (cortex) 형성 (격자 모양). (E) 외피 형성이 보임 (검은색). (F) 아포 형성의 마지막 단계에서 모세포는 녹고 성숙된 아포를 외부로 유출함. (G) 영양분이 풍부할 때 아포는 다시 살아나고 자람

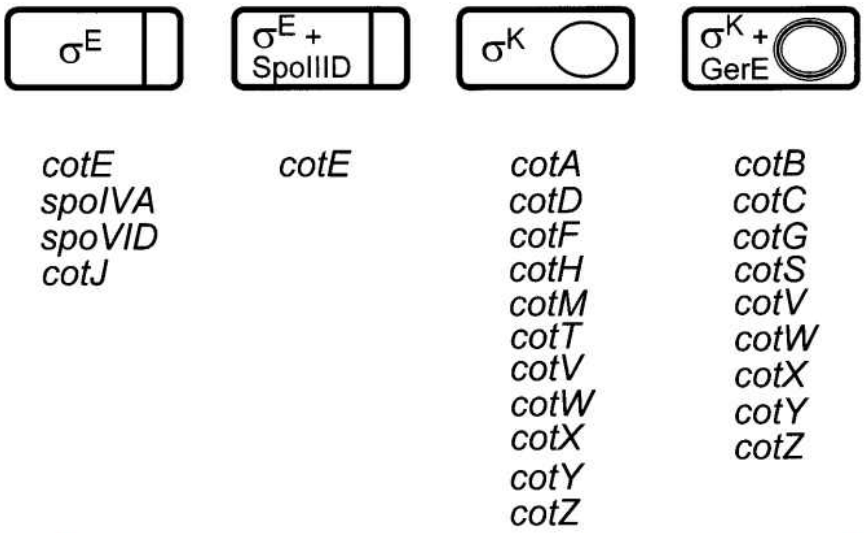


Fig. 2-3. 모세포에서의 주기별 관련 유전자의 발현 양상. 각 단계에서의 전사 요소 및 발현

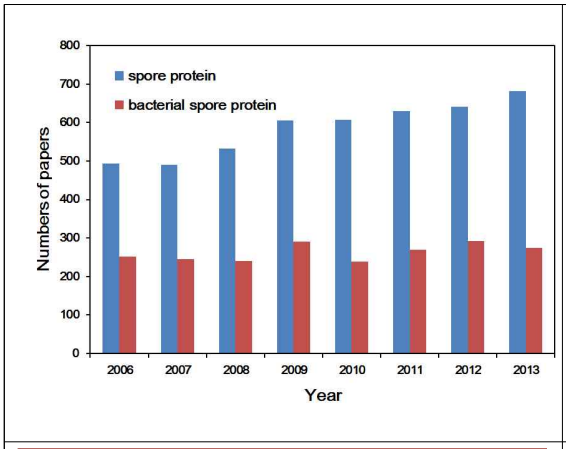
TABLE 1. The known coat and morphogenetic genes

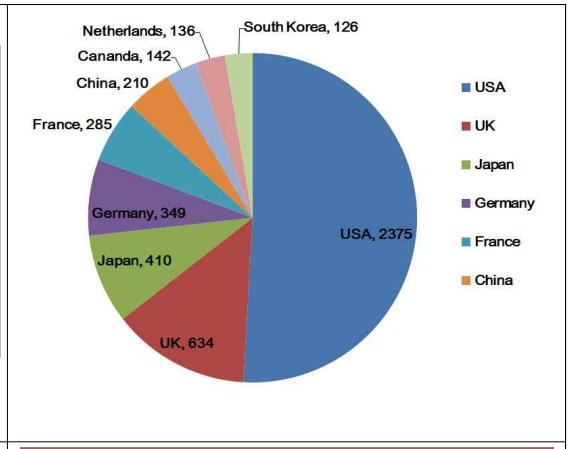
Gene	Size of product (kDa)	Genetic control	Map position (degrees)	Coat layer[b]	Morphogenetic role[c]	Comments[c]
cotA	65	σ^K	52	OC	None known	Controls brown pigment
cotB	59	σ^K + GerE	314	OC	None known	
cotC	12	σ^K + GerE	168	OC	None known	
cotD	11	σ^K	198	OC	None known	
cotE	24	σ^E, σ^E + SpoIIID	150	OC	Required for outer coat assembly	
cotF	5, 8	σ^K	356	?	None known	Proteolytically processed
cotG	24	σ^K + GerE	314	OC	Controls CotB assembly	Nine tandem copies of 13-aa repeat
cotH	42.8	σ^K	314	IC	Controls OC protein assembly	Near *cotB* and *cotG*
cotJA	9.7	σ^E	62	Matrix	None known	Interacts with CotJC
cotJC	21.7	σ^E	62	Matrix	None known	Interacts with CotJA
cotK	6	?	164	?	None known	Putative coat protein
cotL	5.4	?	164	?	None known	Putative coat protein
cotM	14	σ^K	164	OC	Controls outer coat assembly	α-Crystallin-like
cotS	41	σ^K + GerE	270	IC	None known	CotE dependent
cotT	7.8	σ^K	108	IC	Controls inner coat assembly	Proteolytically processed
cotV	14	σ^K σ^K + GerE	107	?	None known	Putative coat protein
cotW	12	σ^K, σ^K + GerE	107	?	None known	Putative coat protein
cotX	18.6	σ^K, σ^K + GerE	107	OC	Controls outer coat assembly	Insoluble fraction
cotY	17.9	σ^K, σ^K + GerE	107	OC	May control outer coat assembly	Insoluble fraction
cotZ	16.5	σ^K, σ^K + GerE	107	OC	May control outer coat assembly	Insoluble fraction
spoIVA	55	σ^E	204	NCP	Attaches the precoat to the forespore	
spoVID	65	σ^E	244	NCP	Involved in coat attachment	
sodA	25	?	221	NCP	Involved in coat morphogenesis	

[a] Only the sigma factors and major positive regulators are listed. See the text for a more complete description of the genetic control.
[b] Assignments of coat proteins to coat layers have been directly demonstrated only for CotE and CotS. Otherwise, the assignments are inferences. IC, inner coat; OC, outer coat; NCP, not considered a coat protein.
[c] These comments must be read in conjunction with the caveats discussed in the text. aa, amino acid.

Table 2-1. 아포 형성에 관련된 유전자 리스트

특히 Bacterial 아포 형성 관련 단백질에 대한 연구가 계속해서 증가하고 있음을 볼 수 있다. 본 분야의 국가별 논문 발표조사를 보면, 2005년부터 2013년까지 미국에서만 2375편의 논문이 발표 되었고, 영국이 634편으로 2위, 일본에서 410편의 논문을 발표함으로써 3위를 차지하였다. 우리나라는 상대적으로 적은 126편의 논문이 발표되었으나 bacterial 아포 protein에 대한 연구는 거의 전무한 상태이다 (Fig. 2-4).





번호	주요연구기관명	논문수
1	University of Connecticut Health Center	266
2	Harvard University	164
3	Scripps Research Institute	98
4	Institut Pasteur, Paris	85
5	Johns Innes centre	76
6	Sir William Dunn School of Pathology	71
7	University of Oxford	71
8	Massachusetts Institute of Technology	65
9	UC Berkeley	63
10	University of California, San Diego	55

번호	저자명	논문수
1	Setlow, P.	281
2	Losick, R.	142
3	Setlow, B.	83
4	Errington, J.	77
5	Hoch, J.A.	76
6	Moran, C.P.	55
7	Driks, A.	50
8	Piggot, P.J.	45
9	Grossman, A.D.	43
10	Henriques, A.O.	43

Fig. 2-4. 국가별 논문 발표조사

KOPRI 극지연구소

Bacterial 아포 형성 단백질에 대한 가장 많은 논문을 발표한 기관은 University of Connecticut Health Center로 1위를 차지하였고, Harvard University가 두 번째로 많은 논문을 발표하였다. 또한 Scripps Research Institute, Institut Pasteur, Paris 등 미국을 비롯한 유럽의 여러 대학과 기관에서 연구가 꾸준히 진행되고 있다. 아포 관련 연구는 University of Connecticut Health Center의 Peter Setlow 박사가 281편으로 가장 많은 논문을 발표하였고, 뒤를 이어 Harvard University의 Richard Losick 박사가 142편의 논문을 발표하였다. 그 외에 세계 여러 기관에서 비슷한 수준으로 연구를 진행하고 있다.

1. 미국

2006년 미국 Prof. Pun To Yung 팀은 그린랜드의 약 300년 된 ice core에 (94m) 존재하는 endospore 연구를 진행하고 아포 성장 시작에 관한 연구 결과를 발표하였으며 (Yung et al., 2007) (Fig. 2-5), Prof. Paul G. Falkowski 팀은 남극 Beacon Valleley의 약 8백만년전 빙하로부터 미생물의 존재를 밝히고 배양에 성공하였다

(Bidle et al., 2007). 아포 형성 미생물인 Bacillus를 비롯한 여러 미생물의 아포 구조 및 조직, 아포 형성 메커니즘, 아포 형성 유전자 발현 조절 및 신호전달 기작 등에 관한 다양한 연구가 결과가 발표되고 있다.

아포 형성 관련 단백질의 구조 생물학적 연구도 활발히 진행되고 있다. University of California at San Diego 의 Prof. Kottayil IVarughese 팀은 Bacillus subtilis 의 sporulation 을 조절하는 신호 전달 경로에 관여하는 Spo0F 라는 단백질의 3 차 구조를 밝혔다 (Madhusudan et al., 1996).

오클랜드 아동병원 연구소의 James ABrannigan 박사 팀과 Scripps Research Institute 의 HKottayil I.Varughese 박사팀은 아포 형성 단백질과 DNA 복합체의 삼차구조를 밝혀 아포 형성을 분자적 관점에서 보다 잘 이해할 수 있도록 했다 (Lee et al., 2008, Zhao H et al., 2002). 최근에는 시카고의 Anderson, W.F. 박사 팀에서 약물 타겟이며 동시에 박테리아 sporulation 에 필수적인 lytic transglycosylase 효소의 삼차 구조를 아포 형성 병원성 미생물로부터 해석하였다 (Nocadello, S et al., 2016).

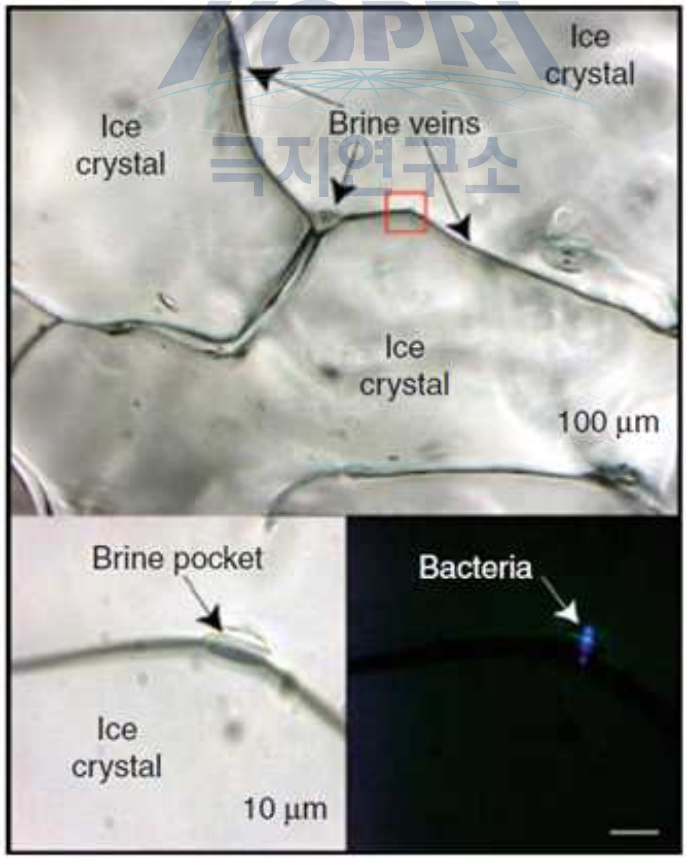


Fig. 2-5. 빙하를 이루고 있는 얼음결정 사이의 작은 얼지 않은 공간 (Brine pocket) 에서 살아가고 있는 빙하미생물 확인 (Junge *et al.*, 2011)

2. 유럽

영국은 미국 다음으로 아포 관련 연구가 많이 진행되고 있다. 아포 형성 관련 단백질 구조에 관한 연구를 살펴보면, 1999년 University of York에서 Bacillus subtilis의 spore coat 합성에 관여하는 효소와 효소-nucleotide 복합체의 삼차구조를 해석하였고 (Simon J. Charnock and Gideon J. Davies, 1999), 같은 대학의 Prof. James A Brannigan팀은 sporulation 마지막 단계에서 아포 성숙을 조절하는 DNA 결합 단백질의 구조를 해석하여 이 단백질이 Bacillus subtilis의 아포 형성에 근본적인 전사 조절인자임을 밝혔다 (Valérie M.-ADucros et al., 2001). 뿐만 아니라 Bacillus subtilis의 아포 형성 단계에서 모세포와 전아포에서 발현된 두 단백질이 intercellular channel complex를 형성하는 것이 밝혀졌다 (Vladimir M. Levdikov et al., 2012).

독일 Max Planck Institute for Developmental Biology의 Kornelius Zeth박사 팀에서는 아포 발달 과정 중 유전자 발현을 마지막으로 조절하는 전사조절인자의 단백질 삼차구조를 밝히고, 단백질 서열과 구조 유사성을 다른 박테리아와 비교하여 진화 연구에 도움이 되는 결과를 발표하였다 (Iris Asen et al., 2008).

많은 아포 연구에도 불구하고 빈영양상태 및 환경 스트레스 조건에서 어떻게 오래도록 아포 형태로 살아남는지에 대한 연구가 미비하며 전체적 메커니즘을 연구하기 위한 구조 생물학적 연구가 더욱 필요한 실정이다.

아래 Table 2-2은 국내외 연구 현황에 대한 요약 자료이다.

Table 2-2. 국내외 아포 관련 연구 현황 요약

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
경남대학교 (황영일, 최선욱)	Streptomyces의 아포 형성과 이차대사산물 생성 조절 유전자 기능연구	성과 활용의 예 없음
서울대학교 (김병기)	Streptomyces coelicolor 아포 형성 단백질 결여 돌연변이체 제작 및 균주 특성 분석	성과 활용의 예 없음
대구한의대 (권애란)	아포 형성 단백질 homologue를 식중독균으로부터 정제, 발현, 단백질 결정화 성공	성과 활용의 예 없음
영남대학교 (이진태)	Indole이 Paenibacillus alvei의 아포 성숙에 미치는 영향 분석, 스트레스 저항성과 생존 능력 감소 확인	성과 활용의 예 없음

KOPRI 극지연구소

고려대학교 (류지훈)	아포 형성 억제 방법연구를 통해 식혜의 간헐 멸균법 제시	성과 활용의 예 없음
한국생명공학연구원	Paenibacillus polymyxa의 아포 형성 관련 신호전달 유전자 선별 및 돌연변이 균주를 이용한 유전자 기능 분석	성과 활용의 예 없음
한양대학교 (채영규)	탄저병 원인균인 Bacillus anthracis의 돌연변이체 제작, 아포 형성과 발아 지연 확인	성과 활용의 예 없음
University of Connecticut Health Center	아포 형성 박테리아인 Bacillus를 이용한 연구가 진행중. 1) 아포 형성을 통한 가열 또는 산화제에 대한 저항성 메카니즘 연구; 2) 아포 형성 메카니즘 연구; 3) 세포막 내에 존재하는 아포의 구조와 조직 연구	성과 활용의 예 없음
Harvard University	아포를 형성하는 Bacillus subtilis의 분화, morphogenesis, multicelluarity에 대한 연구가 진행중. 아포 형성 유전자의 발현 조절 메카니즘 및 세포내 새로운 신호에 대한 연구	성과 활용의 예 없음
Newcastle University, Centre for Bacterial Cell Biology in Newcastle	생화학적 유전학적 현미경관찰을 이용해 Bacillus subtilis에 대한 세포 형태에 대한 연구를 진행중	성과 활용의 예 없음
The Scripps Research Institute	Bacillus subtilis의 신호전달과 세포 분화 기작 연구	성과 활용의 예 없음
Loyola University Health System	B. anthracis, B. subtilis, C. difficile 에서의 아포 내구성 연구 세포벽 구조형성의 분자적 메카니즘 연구 및 병원균에서의 보호성 아포 구조 연구	성과 활용의 예 없음
University of California at San Diego	Bacillus subtilis의 아포 형성 조절 신호전달 단백질의 3차 구조 해석	성과 활용의 예 없음
Children's Hospital Oakland Research Institute	아포 형성 단백질과 DNA복합체 3차 구조 해석	성과 활용의 예 없음
Northwestern University	병원성 미생물인 Bacillus anthracis와 Clostridium difficile로부터 약물 타겟인 동시에 아포 형성과 관련된 효소의 3차 구조 해석	성과 활용의 예 없음
University of York	Bacillus subtilis의 spore coat 합성 효소, 아포 성숙 조절 단백질, 아포 형성 단계에서 발현되는 단백질 complex 구조 해석	성과 활용의 예 없음
Max Planck Institute	아포 발달 마지막 단계의 전사조절인자 단백질 구조 해석	성과 활용의 예 없음

KOPRI 극지연구소

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 방법

1. 빙하미생물 샘플 확보

○ 극지 빙하샘플로부터 분리한 호냉성 박테리아인 *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 와 *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-20에 대한 기초 유전자 분석 연구를 조사함 (SCI 논문 2편).

- Draft Genome Sequence of *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14, a Psychrophilic Bacterium Isolated from Sediment-Laden Stratified Basal Ice from Taylor Glacier, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. (2012) Journal of bacteriology 194, 6656-6657. (IF: 3.825)
- Draft Genome Sequence of *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-20, a Psychrophilic Bacterium Isolated from the Basal Ice of Taylor Glacier. (2012) Journal of bacteriology 194, 6636. (IF: 3.825)

KOPRI 극지연구소

Fig. 3-1. 2012년 미국 루이지애나 대학의 Brent C. Christner 교수 연구실에서 빙하 미생물 분리 작업 모습

KOPRI
극지연구소

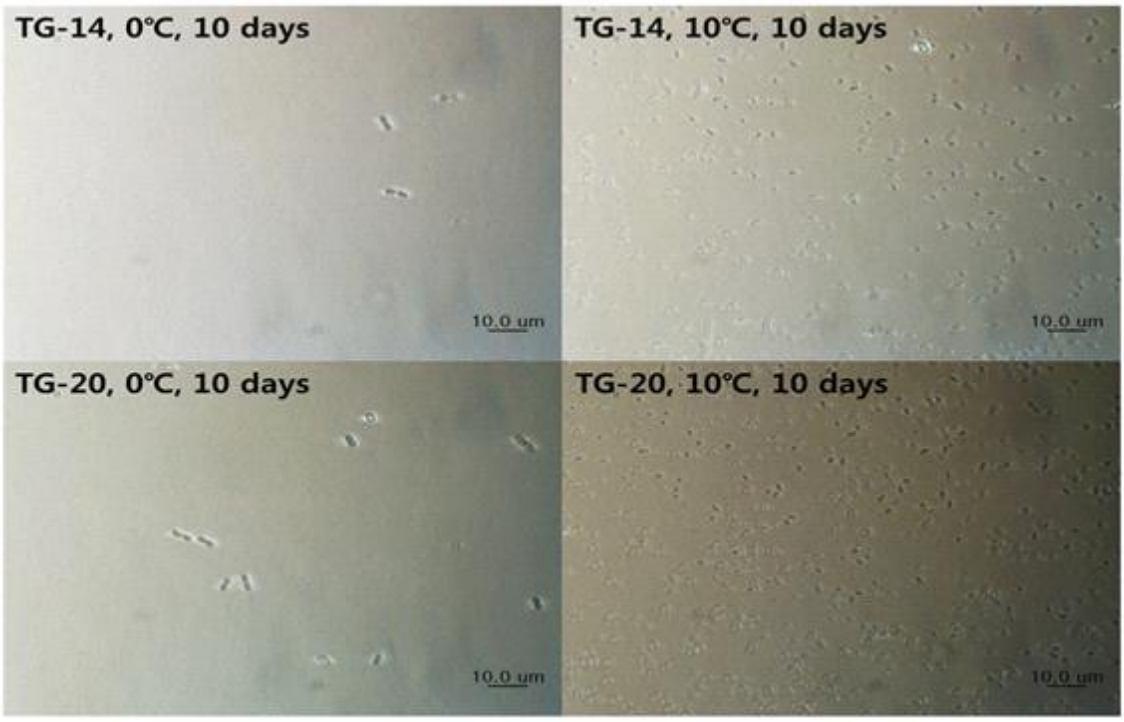


Fig. 3-2. 빙하 미생물 (*Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 와 *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-20) 의 현미경 사진. 저온에서 (0-10도) 잘 자라는 것을 확인

KOPRI 극지연구소

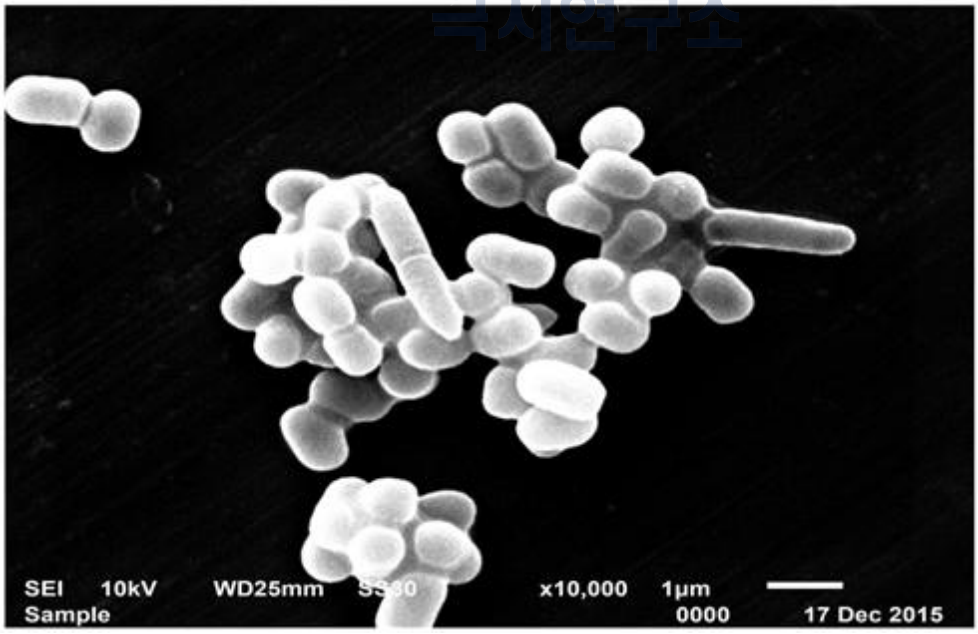


Fig. 3-3. 빙하 미생물 (*Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14) 의 전자 현미경 사진. 영하 5도의 얼어있는 배지에서도 생존

2. 단백질 타겟 선정

○ 극지 빙하미생물인 *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14, *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-20 그리고 비교 미생물인 *Bacillus licheniformis* Strain 9F에 존재하는 아포 형성 타겟 유전자의 클로닝 및 발현 실험

○ 기 알려진 스포어 관련 단백질들 간의 서열 비교를 통한 타겟 선정

***Paenisporosarcina* sp. TG-14**

	locus_tag	product_name	length	Restriction	cloning	Expression	solubility	Crystallization	Diffraction	Structure determination
1	TG14_00620	small acid-soluble spore protein H	180	Nde1/Xho1	O	X				
2	TG14_02190	Small, acid-soluble spore protein H	180	Nde1/Xho1	O	X				
3	TG14_13390	small acid-soluble spore protein, H-type	183	Nde1/Xho1	O	O	X			
4	TG14_17660	protein sspF	189	Nde1/Xho1	O	X				
5	TG14_14400	small acid-soluble spore protein	204	Nde1/Xho1	O	X				
6	TG14_13270	small acid-soluble spore protein alpha/beta type	207	Nde1/Xho1	O	X				
7	TG14_13820	small acid-soluble spore protein SspI	210	Nde1/Xho1	O	X				
8	TG14_05970	small acid-soluble spore protein Tlp	222	Nde1/Xho1	O	X				
9	TG14_13560	DNA-binding response regulator (GerE)	228	Nde1/Xho1	O	O	O	O	O	O
10	TG14_22070	small acid-soluble spore protein Tlp	237	Nde1/Xho1	O	X				
11	TG14_31640	hypothetical protein	288	Nde1/Xho1	X					
12	TG14_31670	hypothetical protein	315	Nde1/Xho1	O	X				
13	TG14_32900	spore coat protein gerQ	327	Nde1/Xho1	O	O	O	X		
14	TG14_26660	hypothetical protein	369	Nde1/Xho1	O	X				
15	TG14_15810	hypothetical protein	375	Nde1/Xho1	O	O	X			
16	TG14_09020	hypothetical protein	405	Nde1/Xho1	O	X				
17	TG14_32890	cell wall hydrolyse involved in spore germination	420	Nde1/Xho1	O	X				
18	TG14_35610	hypothetical protein	426	Nde1/Xho1	O					
19	TG14_22100	hypothetical protein	489	Nde1/Xho1	O	X				
20	TG14_36390	spore coat protein E	531	Nde1/Xho1	X					
21	TG14_35560	stage V sporulation protein T	537	Nde1/Xho1	O	X				
22	TG14_09030	CotZ	540	Nde1/Xho1	O	O	X			
23	TG14_35120	hypothetical protein	573	Nde1/Xho1	O	X				
24	TG14_29980	spore germination protein GerD	594	Nde1/Xho1	O	X				
25	TG14_26330	spore coat protein	630	Nde1/Xho1	X					
26	TG14_30000	germination-specific amidase	714	Nde1/Xho1	O	X				
27	TG14_15660	stage 0 sporulation protein (Spo0A)	792	Nde1/EcoR1	O	O	O	O	O	O
28	TG14_31630	hypothetical protein	774	Nde1/Xho1	O	O	X			
29	TG14_06090	hypothetical protein	774	Nde1/Xho1	O	X				
30	TG14_31660	hypothetical protein	777	Nde1/Xho1	X					

KRPI 극지연구소

31	TG14_18780	sporulation specific amidase	801	Nde1/Xho1	O	O	X			
32	TG14_26580	poylsaccharide deacetylase	804	EcoR1/Xho1	O	X				
33	TG14_09810	hypothetical protein	810	Nde1/Xho1	O	O	X			
34	TG14_16640	hypothetical protein	834	EcoR1/Xho1	O	X				
35	TG14_27140	hypothetical protein	843	Nde1/Xho1	O	O	X			
36	TG14_23900	hypothetical protein	846	Nde1/Xho1	O	X				
37	TG14_08270	hypothetical protein	852	EcoR1/Xho1	O	X				
38	TG14_15830	hypothetical protein	903	Nde1/Xho1	X					
39	TG14_09000	Stage V sporulation protein AD	1002	EcoR1/Xho1	X					
40	TG14_29900	hypothetical protein	1086	Nde1/Xho1	X					
41	TG14_29890	hypothetical protein	1104	Nde1/Xho1	X					
42	TG14_04220	hypothetical protein	1107	Nde1/Xho1	X					
43	TG14_35270	glycoside hydrolase family 18	1137	EcoR1/Xho1	X					
44	TG14_28270	hypothetical protein	1164	EcoR1/Xho1	O	X				
45	TG14_04230	hypothetical protein	1239	Nde1/Xho1	X					
46	TG14_18770	hypothetical protein	1290	EcoR1/Xho1	X					
47	TG14_19040	stage V sporulation protein AF	1323	Nde1/Xho1	X					
48	TG14_29910	spore germination protein	1476	EcoR1/Xho1	X					
49	TG14_33560	tage IV sporulation protein A	1479	EcoR1/Xho1	X					
50	TG14_34520	stage V sporulation protein B	1506	EcoR1/Xho1	X					
51	TG14_04240	unnamed protein product	1593	Nde1/Xho1	X					
52	TG14_31650	GerA spore germination protein	1614		X					
53	TG14_35570	membrane-spanning protein	1623	Nde1/Xho1	O	X				
54	TG14_36350	hypothetical protein	1434	Nde1/Xho1	X					
55	TG14_03760	periplasmic binding protein	948	Nde1/Xho1	O	O	O	X		
56	TG14_16650	germination protease	1050	Nde1/Xho1	X					
57	TG14_22980	sporulation sigma factor SigE	708	Nde1/Xho1	O	O	X			
58	TG14_16370	RNA polymerase sigma factor RpoD	1131	EcoR1/Xho1	O	O	O	X		
59	TG14_15190	RNA polymerase sigma factor SigB	789	Nde1/Xho1	O	X				
60	TG14_05080	RNA polymerase sigma factor SigW	564	Nde1/Xho1	O	X				
61	TG14_15240	RsbT antagonist protein rsbS	363	Nde1/Xho1	O	X				
62	TG14_19050	sporulation protein	783	EcoR1/Xho1	O	O	X			
63	TG14_04490	RNA polymerase sigma factor SigD	774	Nde1/EcoR1	X					

64	TG14_18780	sporulation specific amidase	801	Nde1/Xho1	O	O	X			
65	TG14_26580	poylsaccharide deacetylase	804	EcoR1/Xho1	O	X				
66	TG14_36510	sporulation initiation phosphotransferase F	360	Nde1/Xho1	O	O	O	O	O	O
67	TG14_27070	Hypothetical protein (Spo0B)	531	Nde1/Xho1	O	O	O	O	O	On going
68	TG14_04880	carbon storage regulator, CsrA	222	Nde1/Xho1	O	X				
69	TG14_06910	S-ribosylhomocysteinase	471	EcoR1/Xho1	O	O	O	O	X	
70	TG14_24730	MarR family transcriptional regulator	444	Nde1/Xho1	O	O	O	On going		
71	TG14_23660	transcriptional repressor CodY	780	Nde1/Xho1	O	O	O	O	X	
72	TG14_25180	RNA polymerase factor sigma-70	648	Nde1/Xho1	O	O	O	X		
73	TG14_30190	Adenylate kinase	654	Nde1/Xho1	O	O	O	X		
74	TG14_14660	Translocase, ftsK	1413	Nde1/Xho1	On going					
75	TG14_23950	tage III sporulation protein E	1422	Nde1/Xho1	On going					
76	TG14_32890	ell wall hydrolyse involved in spore germination		Nde1/Xho1	On going					
77	TG14_23930	dihydrodipicolinate synthase		Nde1/Xho1	On going					
78	TG14_33810	dihydrodipicolinate reductase		Nde1/Xho1	On going					
79	TG14_19940	dihydrodipicolinate synthase		EcoR1/Xho1	On going					

KCPRI 크진연구소

***Paenisporosarcina* sp. TG-20**

	length(bp)	Enzyme site	Cloning	Expression	Solubility	Crystallization	Diffraction	Structure determination
GPR	1020	Nde1/Xho1	O	O	O	O	O	On going
GerD	528	Nde1/Xho1	O	O	O	X	X	
YfiY	888	Nde1/Xho1	O	O	O	X	X	
Soj	762	Nde1/EcoR1	X					
SirA	456	EcoR1/Xho1	O	O	X			
Spo0A	792	Nde1/Xho1	O	O	X			
Spo0F	360	Nde1/Xho1	O	X				

***Bacillus*_9F**

	length(bp)	Enzyme site	Cloning	Expression	Solubility	Crystallization	Diffraction	Structure determination
GerD	498	Nde1/Xho1	O	X				
SirA	903	Nde1/Xho1	O	X				
SleB	429	Nde1/Xho1	O	X				
GPR	1107	Nde1/Xho1	O	O	O	O	O	On going
Soj	762	Nde1/Xho1	O	O	X			
SirA	438	Nde1/Xho1						
Spo0A	801	Nde1/Xho1	O	O	O	X	X	
Spo0F	375	Nde1/Xho1	O	O	X			

3. 재조합 단백질 발현 및 정제

KOPRI 극지연구소

가. 극지빙하 유래 아포 형성관련 단백질의 클로닝 및 기초 조사

- 생물 정보학적인 방법을 통하여 타겟 단백질에 대한 도메인 및 2차 구조 분석

나. 타겟 단백질의 유전자 확보

다. 재조합 단백질 발현 및 정제 프로토콜 확립

- 분석된 정보에 따라 전체 단백질 또는 도메인으로 구분하여 대장균에서 대량 발현을 시도
- 발현된 단백질의 solubility 와 folding을 향상 시키고 정제를 용이하게 하기 위해 다양한 fusion 단백질의 형태로 발현 시도 (His tag fusion: pET vectors, GST fusion: pGEX vectors, MBP fusion: pMAL vectors)
- 대장균에서 발현되지 않은 단백질과 당 단백질 같은 경우에는 효모 또는 baculovirus를 이용한 진핵 생물 발현 시스템을 이용하여 발현 시도
- 발현된 단백질에 대하여 affinity chromatography, ion exchange chromatography, gel filtration chromatography 등의 방법을 통하여 단백질 정제

- 수용성으로 발현되지 않는 단백질에 대해서는 계면 활성제를 이용한 추출 방법 및 refolding 방법을 통하여 정제
- 단백질의 정성분석: dynamic light scattering, native gel, mass spectrometry 등을 이용하여 단백질의 순수도 및 결정화 여부를 확인. 성공적인 단백질 결정화를 위해서는 homogeneous 상태의 단백질이 요구 되어 지기 때문에 위의 3가지 방법을 통해 단백질의 상태를 확인하고 최적의 buffer 조건을 결정 할 수 있음

4. 구조 분석을 통한 활성 또는 결합 부위예측 및 반응기작 설명

가. 타겟 단백질의 구조 분석을 위한 결정화 조건 탐색

- 정제된 단백질을 이용하여 1만 2천 가지 이상의 조건을 Screening 하여 단백질 결정을 확보
- 확인된 단백질 결정을 X-선 회절 데이터를 측정할 수 있는 결정으로 최적화

나. 단일 결정으로부터 X-선 회절 데이터 수집

- 포항가속기 연구소 (PAL), 일본의 Photon factory 또는 미국의 Argonne National Laboratory's Advance Photon Source (APS) 방사광을 이용하여 고에너지의 X-선으로부터 단백질 결정의 회절 데이터 수집
- Se-Met 치환된 단백질에서 multi-wavelength anomalous diffraction (MAD) data를 얻어 phase 문제를 해결

다. 타겟 단백질의 고해상도 삼차구조 해석 및 분석

- 단백질 구조 결정: Solve, Resolve, MOLREP, Auto Sharp, arp/wARP, CNS, REFMAC, BUSTER-TNT 등의 program을 이용하여 phase계산과 refinement를 수행
- 단백질의 3차 구조를 결정한 후 활성 부위, 상호작용에 중요한 부위를 확인 및 활성을 향상 시킬 수 있는 돌연변이 위치 디자인
- 구조정보를 통해 찾아낸 활성 또는 상호작용 부위를 돌연변이 단백질들을 이용한 생화학적 실험을 통해 검증

KOPRI 극지연구소

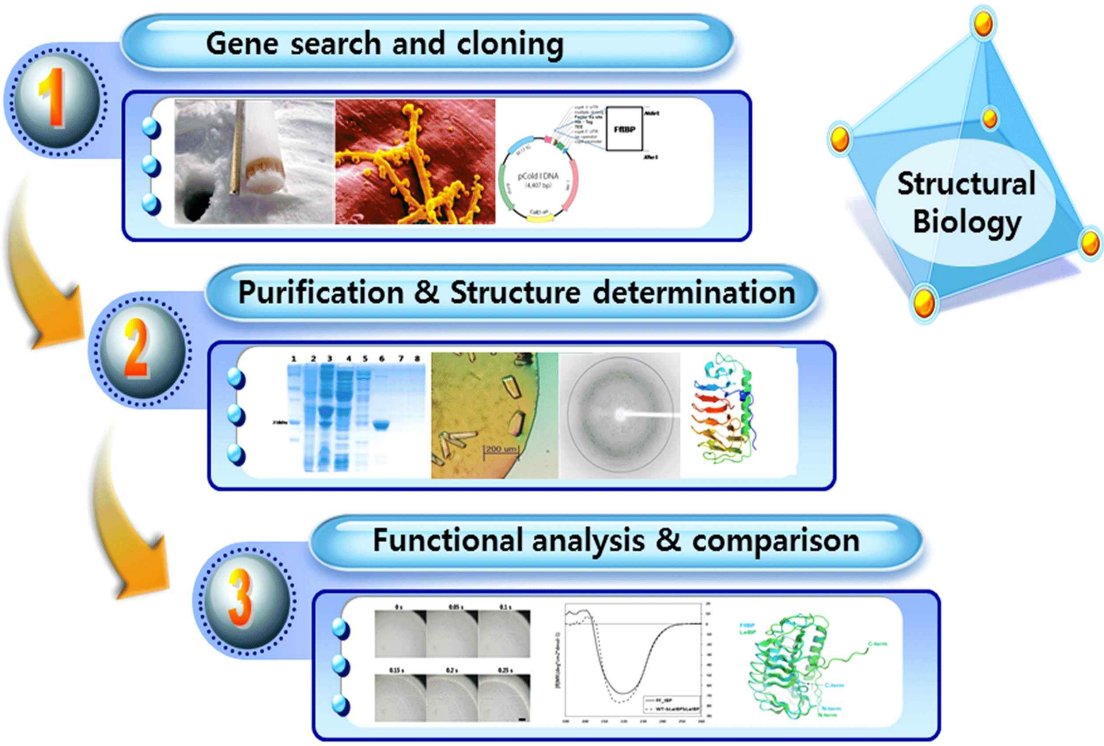


Fig. 3-4 단백질 구조분석 연구 work flow

KOPRI 극지연구소

제 2 절 연구개발 결과

1. 핵심 전사 조절 단백질의 구조 분석

가. *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 미생물 유래 Spo0A regulation domain (Spo0A-R) 구조 기능 연구

- Spo0A의 인산화에 의해 유도되는 구조적 변화와 그에 따른 신호전달 메카니즘 연구

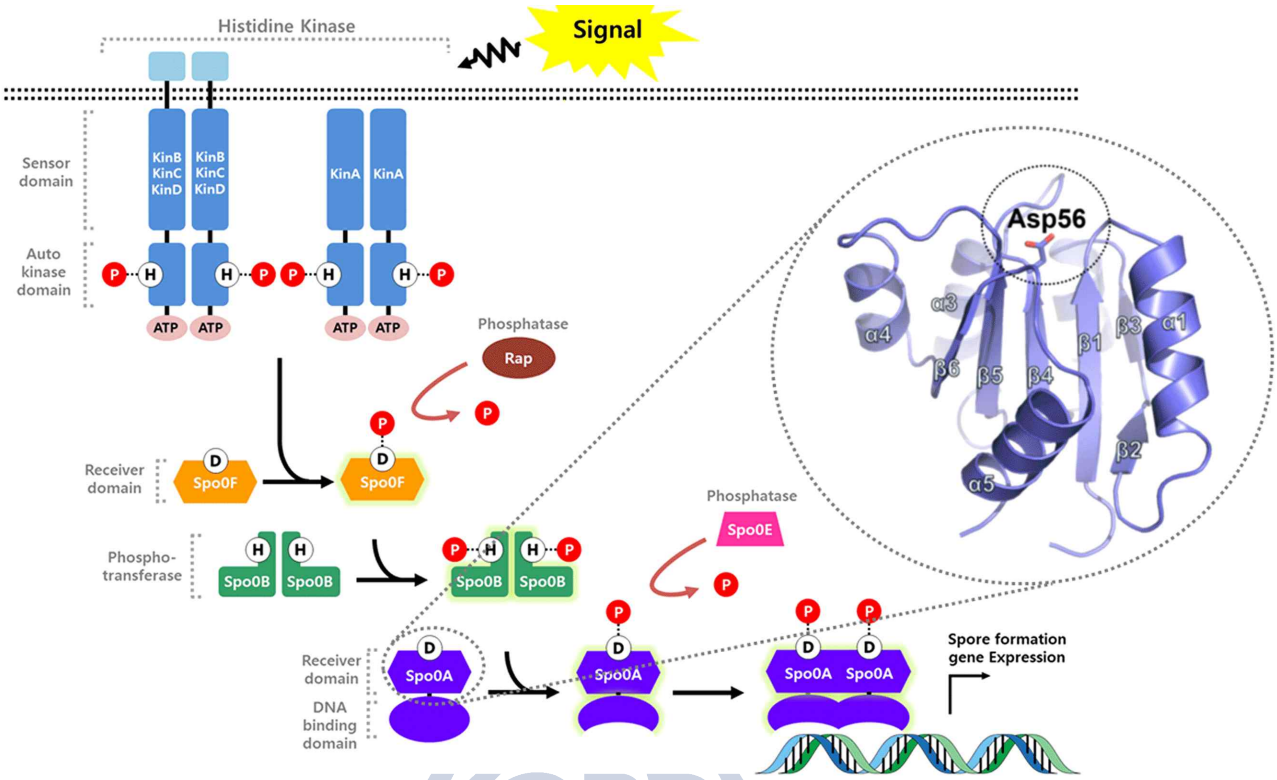


Fig. 3-5. 스포어 형성 초기단계의 신호전달 체계. 스포어 형성 초기단계에서 중요한 역할을 하는 단백질의 인산화 및 탈인산화를 위한 상호작용 그림, 확대된 둥근 원안은 본 과제에서 규명한 Spo0A 단백질의 삼차 구조 모습

KOPRI 극지연구소

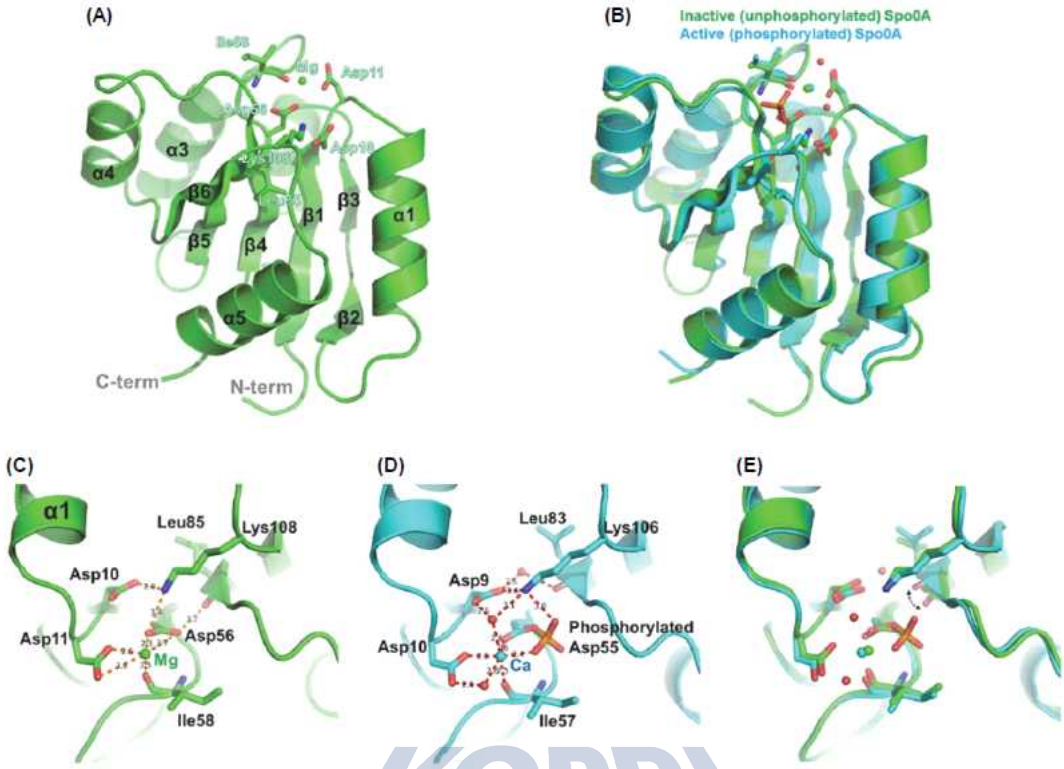


Fig. 3-6.. 불활성 상태 PaSpo0A-R (탈인산화된 상태)와 활성 상태 BsSpo0A (인산화된 상태)의 구조적 비교. (A) 불활성화 상태의 PaSpo0A-R, 마그네슘 이온이 결합해 있음을 볼 수 있음. (B) 활성화 상태의 BsSpo0A-R (PDB code 1QMP)와 겹침을 통한 비교, 인산화에 의한 영향으로 β5-α4 고리 부분의 변화와 α1-β2 고리 부분의 변화함을 확인 할 수 있음. (C) 불활성 상태의 PaSpo0A-R 확대. (D) 활성 상태의 BsSpo0A-R 확대 (E) C와 D의 그림을 겹쳐서 잔기의 변화 확인. Leu85 main chain의 carbonyl oxygen이 인산화에 따라 움직임을 확인

KOPRI 극지연구소

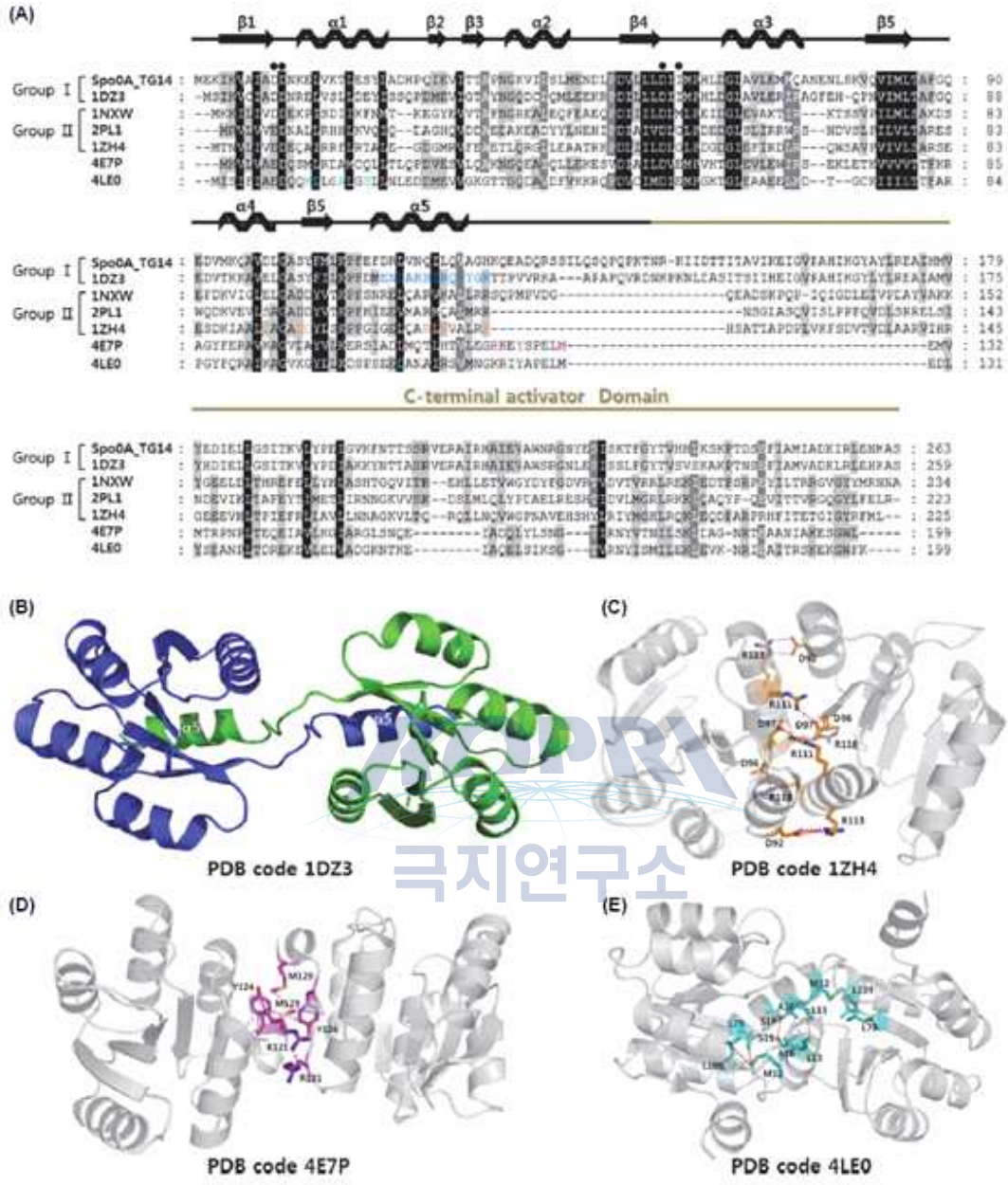


Fig. 3-7. 이합체 형성에 관여하는 수신 도메인의 인터페이스. (A) 이합체를 이루는 수신 도메인을 지니는 단백질들의 서열 비교 (Spo0A, NarL, DesR, KdpE, PhoP, YycF, KdpE) (B) BsSpo0A-R (PDB code 1DZ3)의 경우, α5나선을 스와핑하여 이합체 형성 (C) KdpE (PDB code 1ZH4)의 경우, α4-β5-α5 간의 인터페이스를 통해 이합체 형성 (D) Response regulator spr1814 (PDB code 4E7P)의 경우, N말단 수신 도메인과 C말단 DNA 결합 도메인 사이의 연결 부분을 통해 이합체를 이룸 (E) DesR (PDB code 4LE0)의 경우, α1과 α5 나선의 소수성 결합을 통해 이합체를 형성

KOPRI 극지연구소

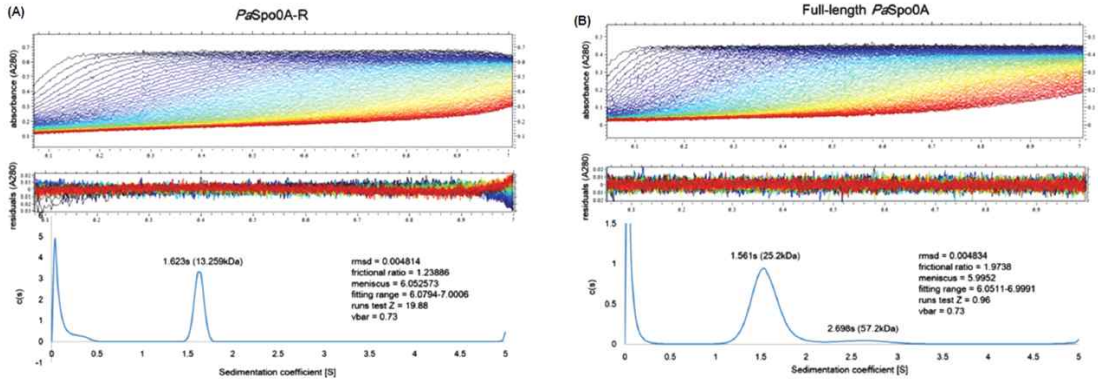


Fig. 3-8. Analytical ultracentrifugation (AUC)를 이용한 PaSpo0A-R 과 PaSpo0A전체의 분석 (A) PaSpo0A-R 단량체 확인 (B) 전체 PaSpo0A 또한 단량체로 확인

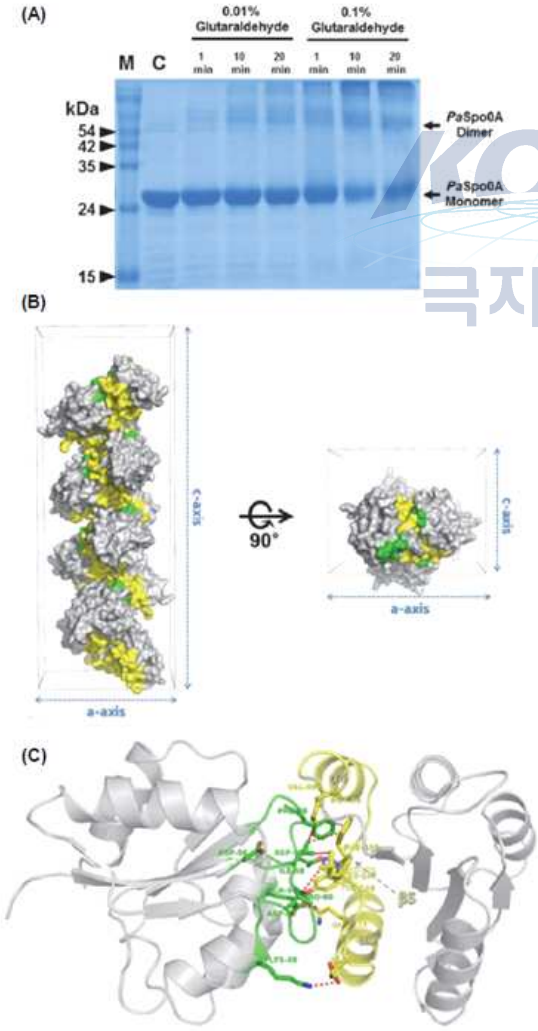


Fig. 3-9. 단백질결정 배열에서 확인된 PaSpo0A의 이합체 (A) Glutaraldehyde를 이용한 crosslinking 실험은 PaSpo0A 부분적으로 이합체 또는 다량체를 형성함을 보여줌 (B) 단백질 결정의 배열에서 Asp56과 인접한 부분은 초록색, α4-β5-α5 부분은 노란색으로 나타냄 (C) 소수성 결합들과 수소결합이 두 부분의 인터페이스를 이룸

KOPRI 극지연구소

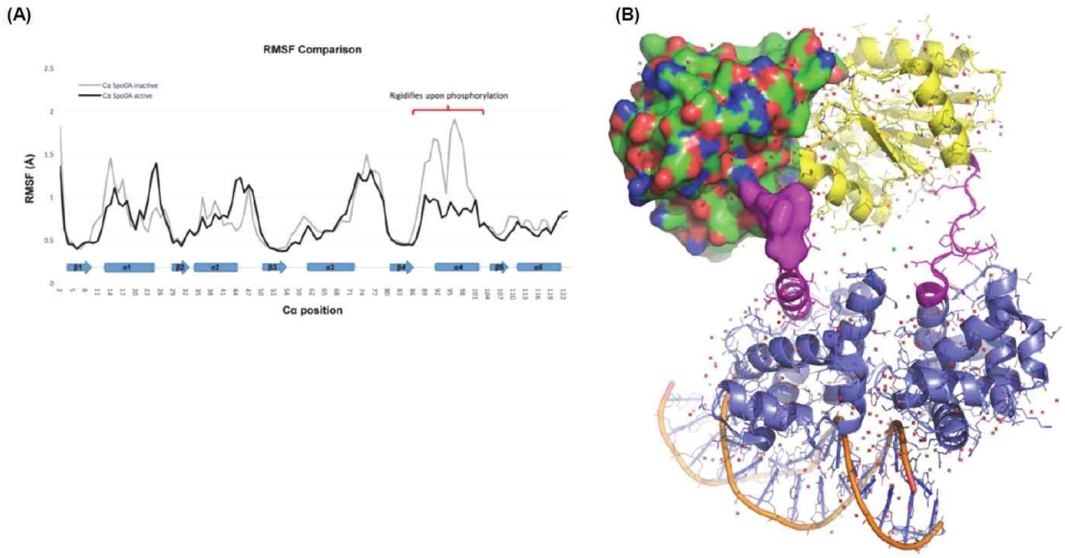
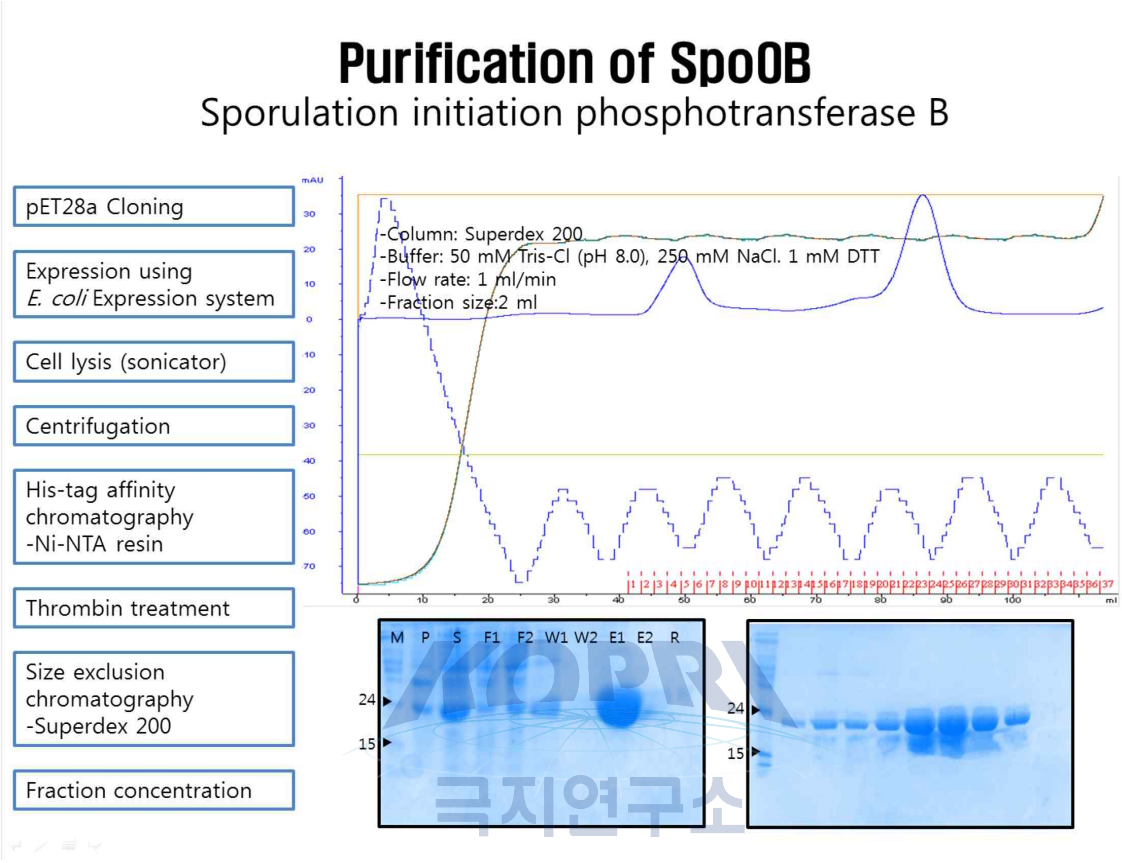


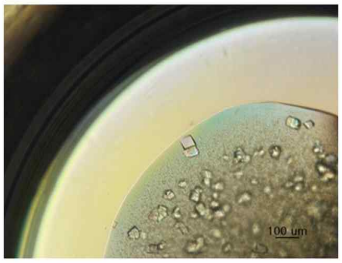
Fig. 3-10. Spo0A와 DNA 결합체 컴퓨터 모델 (A) 인산화에 따른 Spo0A-R의 RMSF 비교, 빨간색으로 표시한 부분에서 커다란 변동을 보임 (B) 모델링을 통해 전체 Spo0A가 본 연구에서 제시한 이량체를 이루고 DNA에 결합해있는 모델을 제시

KOPRI
극지연구소

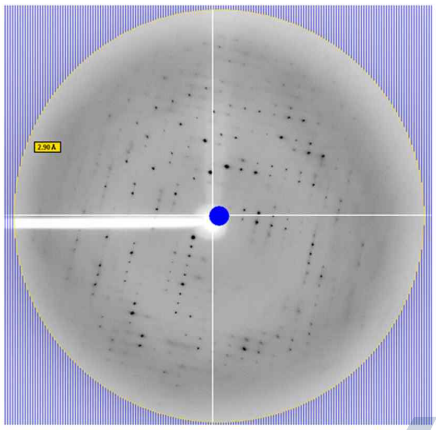
나. *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 미생물 유래 Spore 형성 초기단계 인산화전달효소 B (Spo0B) 정제 및 결정화 성공



Crystallization of TG-14_Spo0B



0.05 M Ammonium Sulfate
0.05 M Bis-Tris:HCl pH 6.5
30% (v/v) Pentaerythritol Ethoxylate (15/4 EO/OH)



Spo0B Data collection

Shell Lower limit	Upper Angstrom	Average I	Average error	Average stat.	Norm. Chi**2	Linear R-fac	Square R-fac	Rmeas	Rpim	CC1/2	CC*
50.00	7.86	8286.8	167.2	109.4	3.710	0.048	0.059	0.054	0.024	0.994	0.999
7.86	6.24	4754.3	77.6	39.8	3.894	0.052	0.061	0.058	0.024	0.998	0.999
6.24	5.46	2803.4	44.2	25.2	3.920	0.055	0.065	0.060	0.024	0.998	0.999
5.46	4.96	2971.1	47.2	25.9	3.552	0.051	0.056	0.055	0.022	0.998	0.999
4.96	4.60	2872.5	45.0	25.0	3.511	0.051	0.056	0.055	0.022	0.998	1.000
4.60	4.33	2679.7	43.5	25.3	3.453	0.053	0.058	0.058	0.022	0.997	0.999
4.33	4.11	1972.7	33.7	21.8	3.348	0.057	0.060	0.062	0.023	0.998	1.000
4.11	3.94	1516.6	27.9	19.4	3.164	0.062	0.062	0.067	0.026	0.997	0.999
3.94	3.78	1248.9	25.0	18.6	2.635	0.062	0.060	0.067	0.025	0.997	0.999
3.78	3.65	908.6	21.6	17.4	2.728	0.075	0.070	0.082	0.031	0.997	0.999
3.65	3.54	787.6	21.3	18.0	2.528	0.082	0.071	0.089	0.033	0.997	0.999
3.54	3.44	532.8	18.4	16.5	2.489	0.102	0.087	0.111	0.042	0.995	0.999
3.44	3.35	455.2	18.1	16.6	2.274	0.116	0.101	0.125	0.047	0.992	0.998
3.35	3.27	374.4	17.2	16.1	2.143	0.130	0.099	0.140	0.053	0.995	0.999
3.27	3.19	292.7	17.4	16.7	2.021	0.157	0.120	0.170	0.064	0.993	0.998
3.19	3.12	218.8	16.3	15.8	1.999	0.201	0.137	0.217	0.082	0.992	0.998
3.12	3.06	162.5	16.4	16.1	1.931	0.266	0.190	0.288	0.109	0.983	0.996
3.06	3.00	125.6	15.7	15.5	1.860	0.330	0.214	0.357	0.134	0.983	0.996
3.00	2.95	84.8	15.7	15.6	1.739	0.453	0.324	0.491	0.186	0.958	0.989
2.95	2.90	64.6	15.6	15.5	1.719	0.586	0.376	0.635	0.242	0.942	0.985
All reflections		1516.1	32.5	22.8	2.663	0.067	0.062	0.073	0.028		

Fig. 3-11. Spo0B의 정제과정과 결정화 및 회절실험

KOPRI
극지연구소

다. *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 미생물 유래 Spore 형성 초기단계 인산화전달효서 F (Spo0F)의 구조 연구

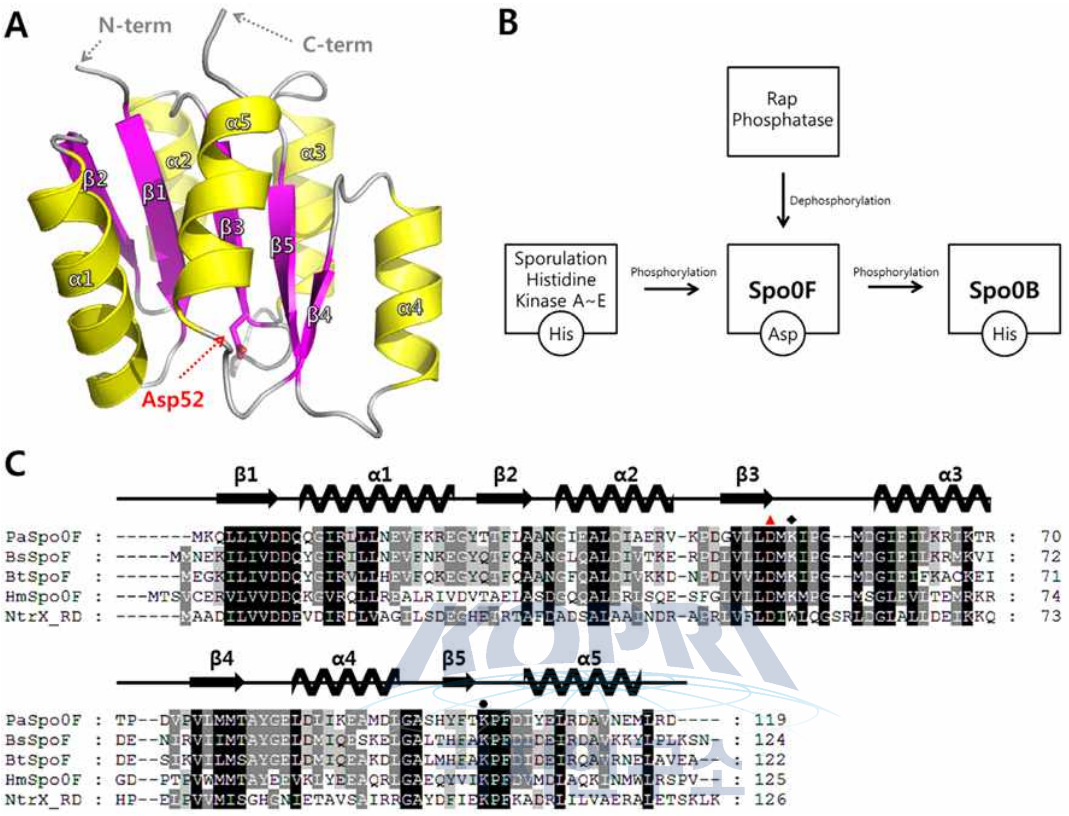


Fig. 3-12. PaSpo0F의 단백질 서열과 구조 (A) PaSpo0F의 전체적인 구조 (B) Spo0F의 인산화 신호 전달 모식도 (C)P PaSpo0F와 다른 신호 전달 단백질들 간의 서열 비교, 인산화 잔기인 Asp는 빨간색으로 표시

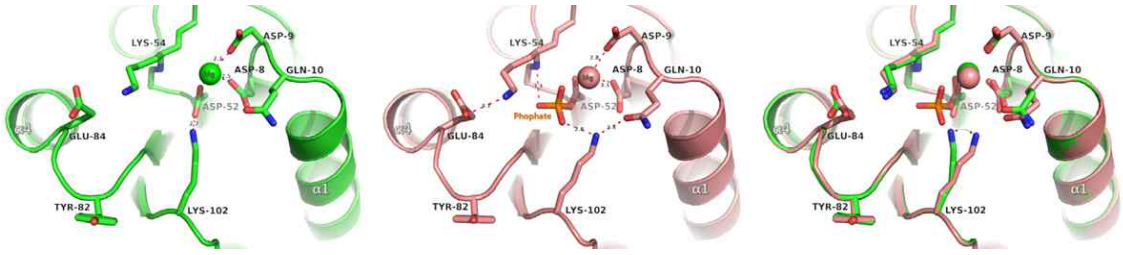


Fig. 3-13. 탈인산화 상태 (불활성화)와 인산화 상태 (활성화)상태의 PaSpo0F 구조 비교 (A) 탈인산화 상태의 PaSpo0F X-ray 결정 구조 (B) 인산화 상태의 PaSpo0F 모델링 구조 (C) PaSpo0F가 인산화됨에 따라 금속 결합 부위의 네트워크에 변화가 생김

다. *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 미생물 유래 Spore coat 발현 조절 단백질 (GerE) 정제, 결정화, 구조해석 연구

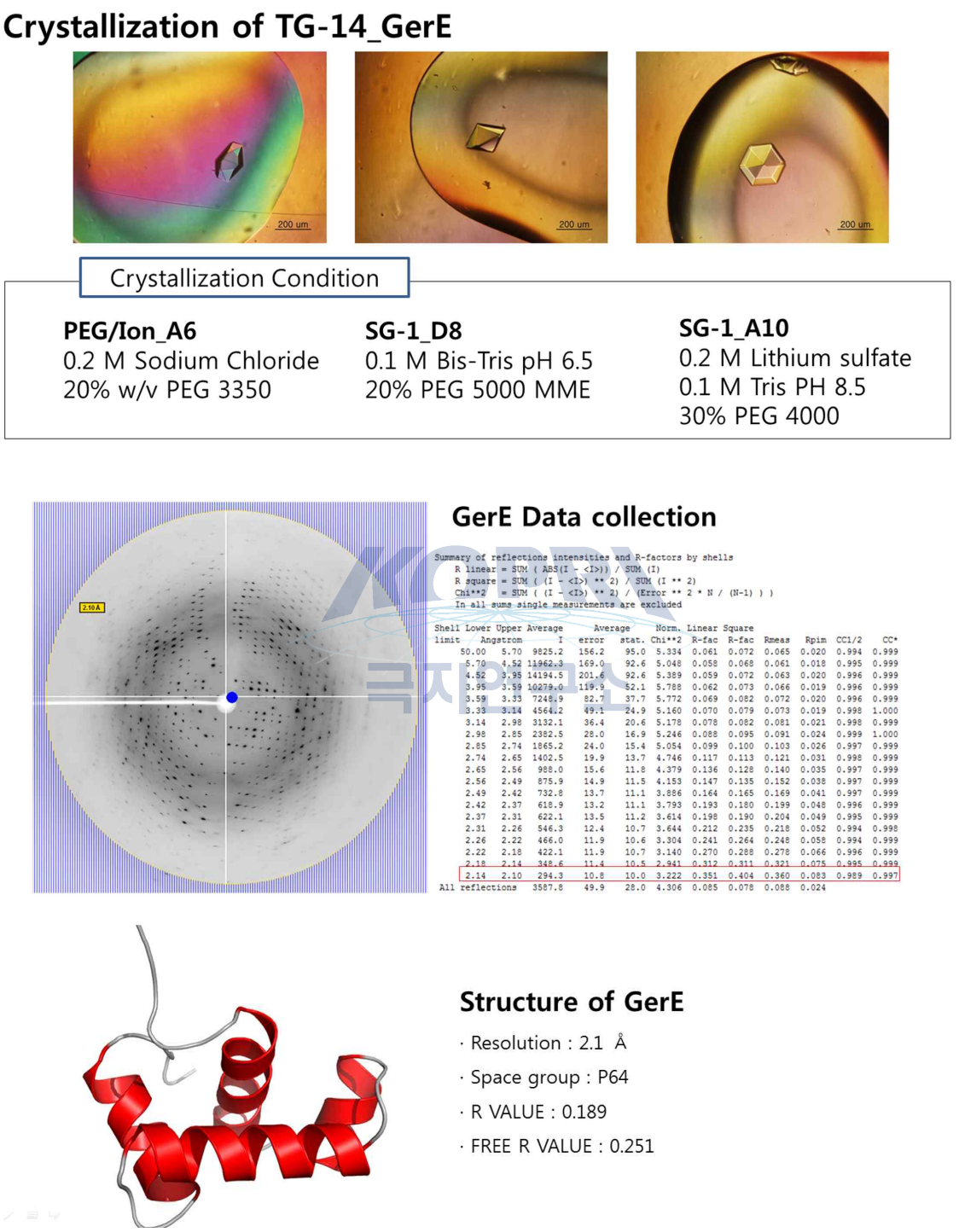


Fig. 3-14. 구조해석을 위한 GerE의 결정화와 회절실험. GerE의 결정화와 회절 실험 수행. 해석한 GerE의 구조를 보면 DNA와 결합하는 helix-turn-helix 모티프를 지니고 있음을 확

인할 수 있음

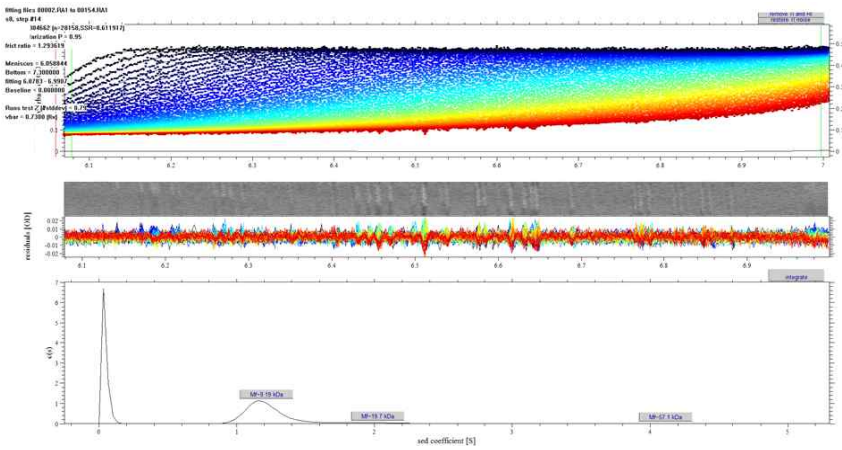


Fig. 3-15. Analytical ultracentrifugation (AUC)를 GerE의 다량체 형성여부 분석. 용액 상에서 95% 가량은 단일체로 확인되었지만 5% 가량은 이량체로 확인. DNA에 결합함 따라 이량체를 이룰 것으로 예상

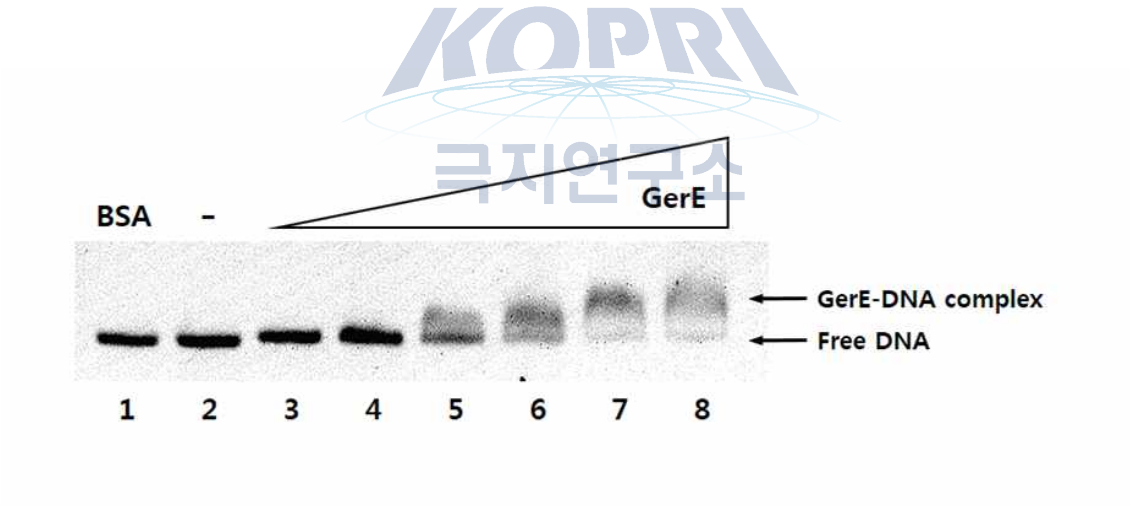
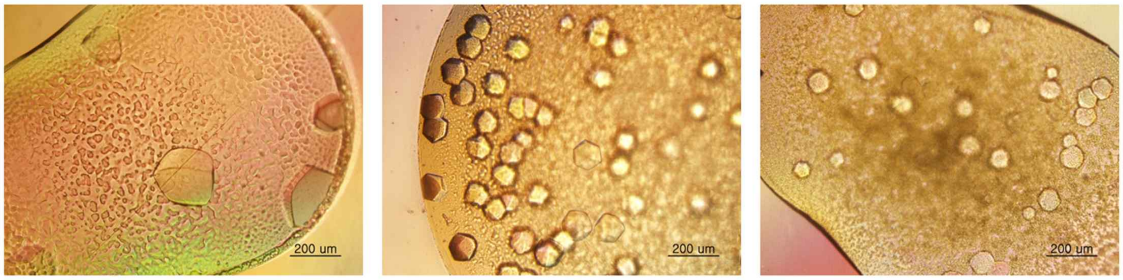


Fig. 3-16. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 실험을 통한 GerE의 결합부위 확인. CotB의 프로모터로 추정되는 부위에 GerE 단백질이 결합

2. 스포어 상태에서 다시 분열단계로 넘어가는 단계의 조절 단백질 연구

가. *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-20 미생물 유래 germination protease (GPR) 의 구조-기능 연구

Crystallization of TG-20_GPR

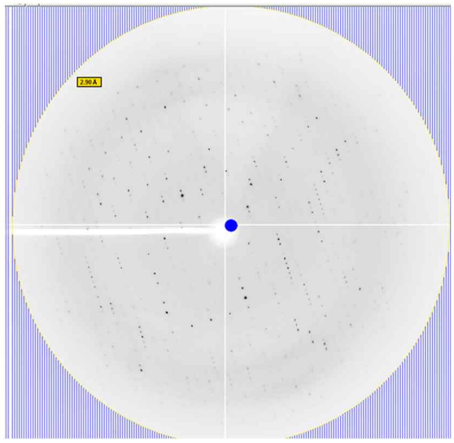


Crystallization Condition

SG-1_E5
3.5 M Sodium formate

SlatRx_A2 / MCSG2_B7
2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0
0.1 M Bis-Tris Propane pH 7.0

KOPRI 극지연구소



TG-20_GPR Data collection

Shell limit	Lower Angstrom	Upper Angstrom	Average I	Average error	Average stat.	Norm. Chi**2	Linear R-fac	Square R-fac	Rmeas	Rpim	CC1/2	CC*
	50.00	7.86	6239.3	124.7	89.0	4.796	0.060	0.068	0.064	0.022	0.994	0.998
	7.86	6.24	4029.3	48.9	28.1	4.442	0.063	0.070	0.065	0.017	0.997	0.999
	6.24	5.46	3210.5	33.6	20.1	4.353	0.066	0.074	0.068	0.017	0.998	1.000
	5.46	4.96	3866.3	39.4	23.2	4.455	0.065	0.073	0.067	0.016	0.998	1.000
	4.96	4.60	4806.8	46.8	26.0	4.523	0.064	0.070	0.065	0.016	0.998	1.000
	4.60	4.33	4293.4	43.5	25.5	4.501	0.067	0.071	0.069	0.016	0.999	1.000
	4.33	4.11	3127.1	31.7	20.0	4.305	0.072	0.075	0.074	0.017	0.999	1.000
	4.11	3.94	2360.7	26.2	18.3	4.222	0.079	0.080	0.082	0.018	0.999	1.000
	3.94	3.78	1837.0	21.3	15.4	3.928	0.086	0.085	0.089	0.020	0.998	1.000
	3.78	3.65	1535.8	19.4	14.6	3.741	0.095	0.089	0.097	0.022	0.999	1.000
	3.65	3.54	1465.1	18.8	14.3	3.624	0.099	0.093	0.102	0.023	0.998	1.000
	3.54	3.44	1056.9	15.9	12.9	3.350	0.117	0.108	0.120	0.026	0.998	0.999
	3.44	3.35	843.9	14.8	12.5	3.039	0.138	0.113	0.142	0.031	0.998	1.000
	3.35	3.27	668.4	13.5	11.9	2.812	0.161	0.140	0.165	0.036	0.998	0.999
	3.27	3.19	592.5	13.5	12.0	2.698	0.183	0.161	0.188	0.040	0.997	0.999
	3.19	3.12	500.8	13.0	11.8	2.506	0.212	0.180	0.217	0.047	0.997	0.999
	3.12	3.06	407.6	12.8	11.8	2.372	0.262	0.224	0.269	0.057	0.997	0.999
	3.06	3.00	337.9	12.5	11.8	2.264	0.306	0.288	0.314	0.067	0.995	0.999
	3.00	2.95	304.7	12.6	12.0	2.272	0.350	0.328	0.359	0.076	0.994	0.999
	2.95	2.90	244.7	12.5	12.0	2.176	0.427	0.432	0.437	0.093	0.993	0.998
All reflections			2024.4	27.2	19.0	3.391	0.093	0.082	0.096	0.022		

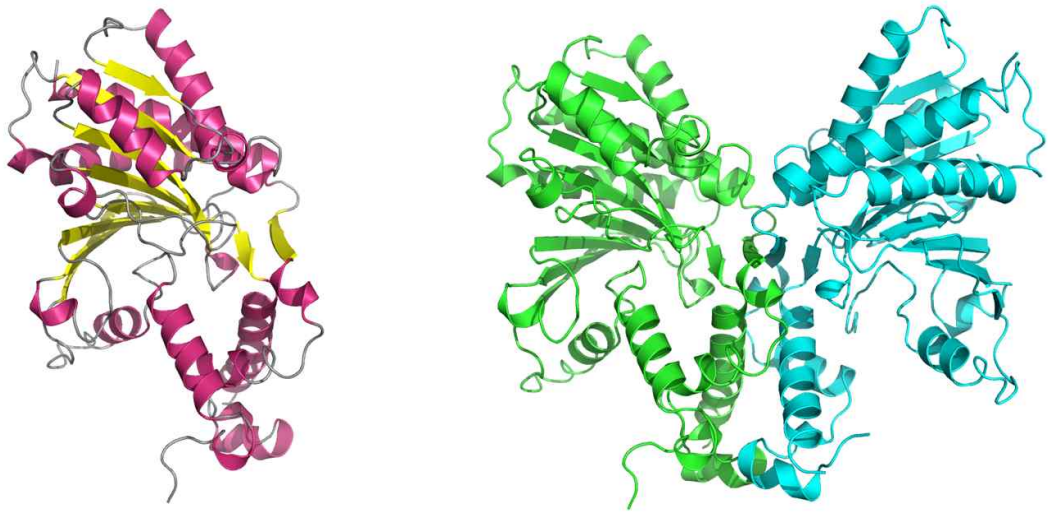


Fig. 3-17. GPR의 결정화와 회절 실험, GPR의 전체적인 구조. 이량체를 이루고 있음

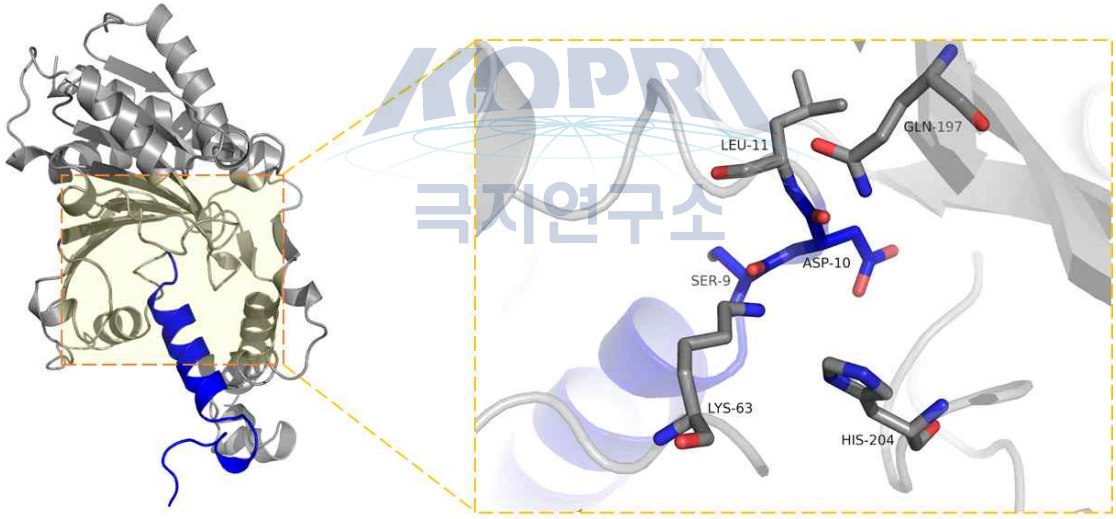
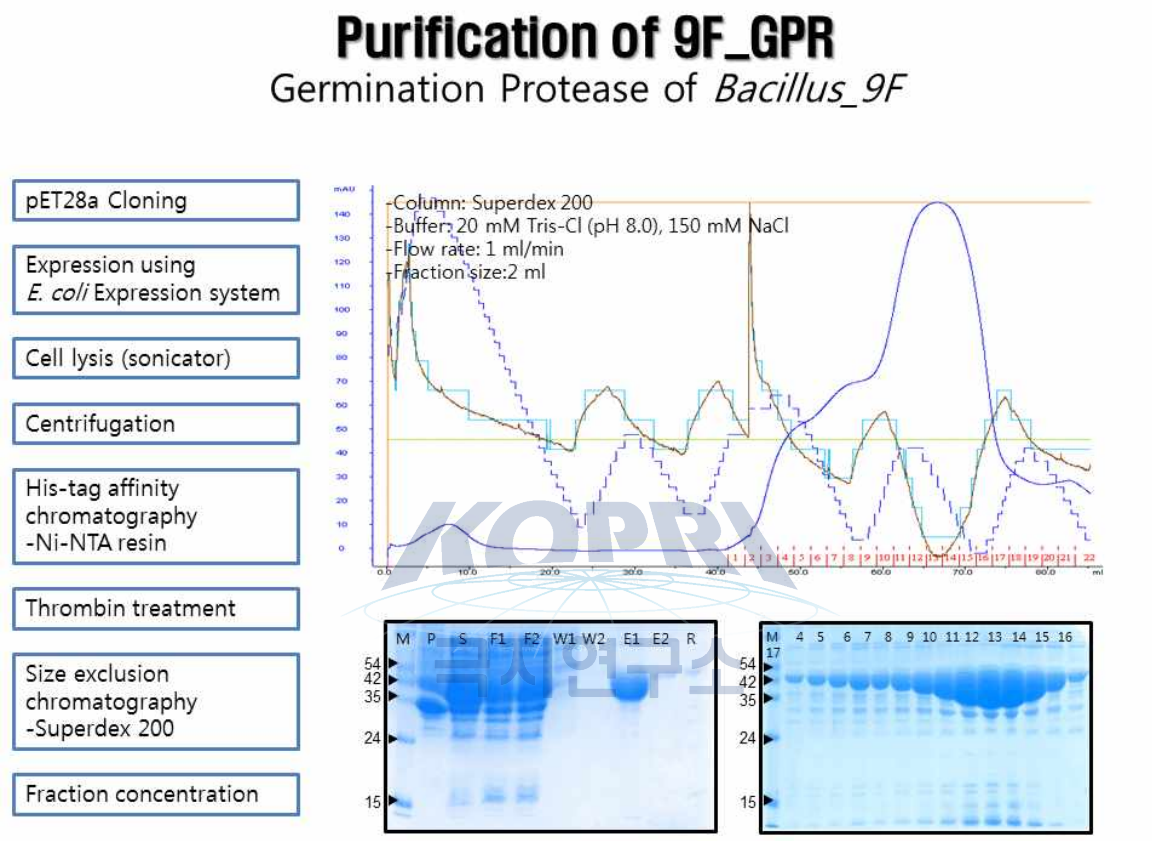


Fig. 3-18. GPR의 구조적 특징. GPR은 스포어 상태에서는 Zymogen 형태로 존재. 특정 신호에 의해서 N-term에 위치하고 있는 전도서열 (파란색)이 떨어져 나가고 활성화 상태가 됨. 절단 부위를 보면 Lys63과 Gln197이 상호작용을 하고 있음. 두 잔기뿐만 아니라 His 204 또한 Zymogen이 활성화 되는데 중요 역할을 할 것으로 보임

나. *Bacillus licheniformis* Strain 9F 박테리아 유래 Germination protease 단백질의 정제 및 결정화 성공

- 저온성 미생물인 *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-20 유래 GPR과 비교 연구를 위한 고온성 미생물의 GPR 연구의 필요성



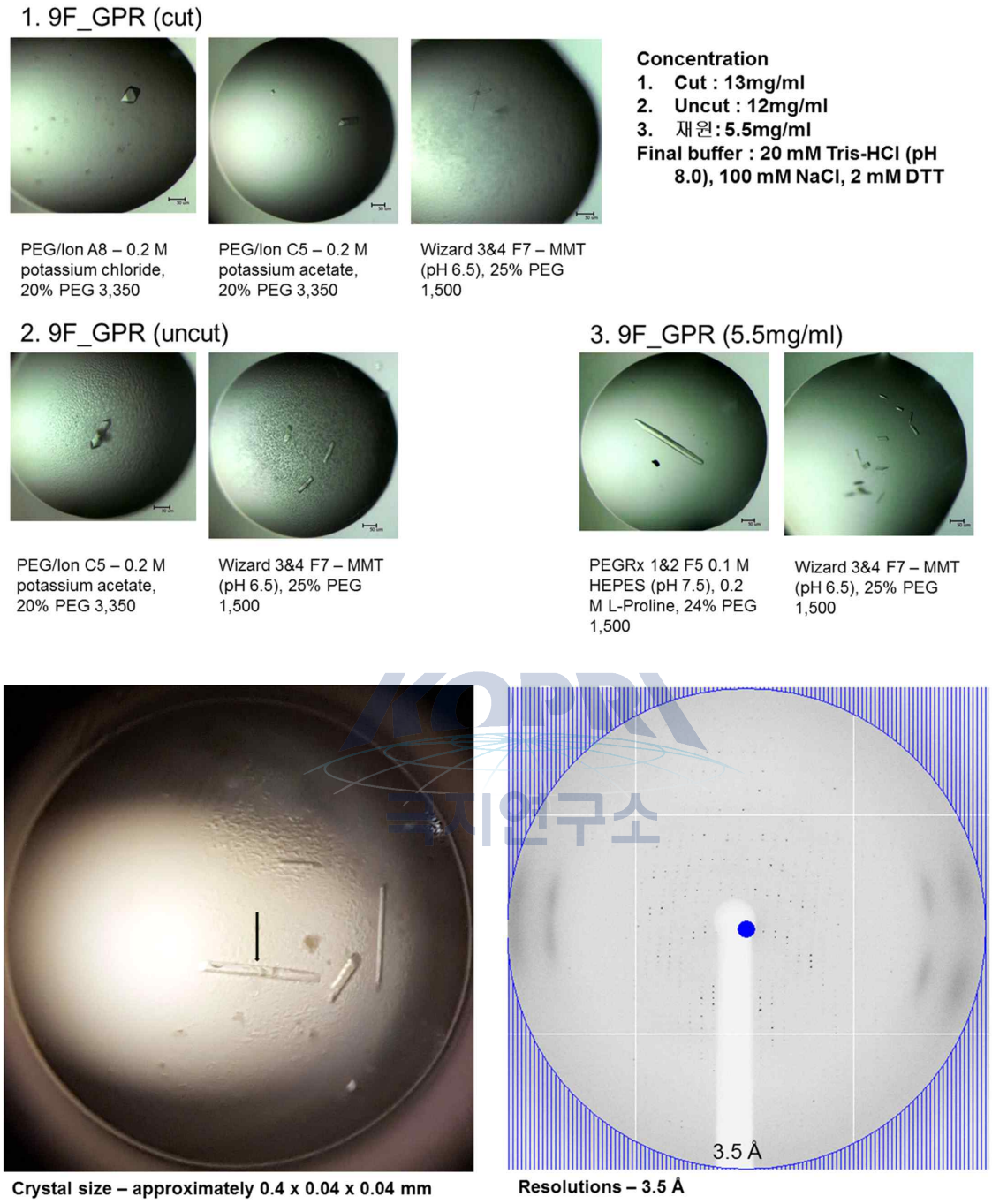


Fig. 3-19. 9F_GPR의 정제와 단백질 결정화 및 회절 실험

3. 스포어 형성 신호물질 중 하나인 디피콜산 (Dipicolic acid; DPA) 관련 단백질 연구

가. *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 미생물 유래 디히드로디피콜린산 합성효소 (Dihydrodipicolinate synthase; DHDPS)

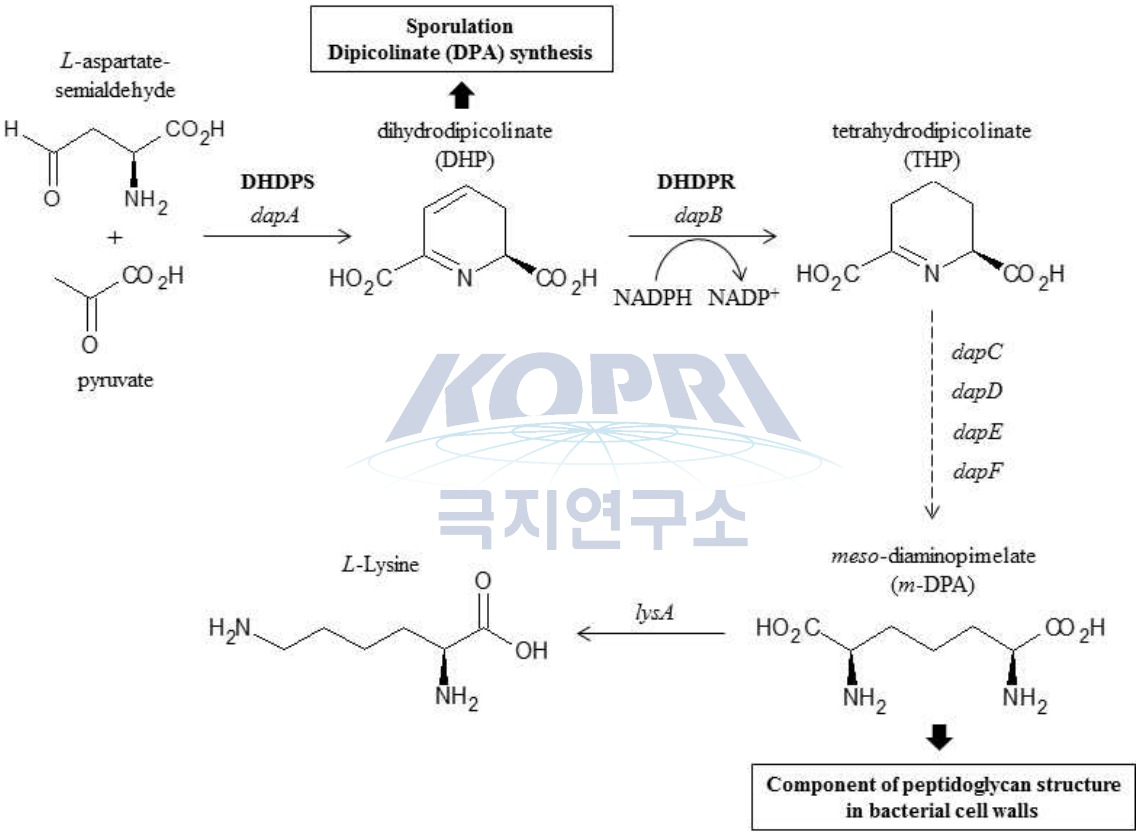


Fig. 3-20. 디히드로디피콜린산 (DHP) 관련 모식도. DHDPS는 pyruvate와 L-aspartate-semialdehyde (ASA)를 이용해 DHP를 합성함. DHP는 DPA 합성 경로의 선도 물질이며, Lysisne 합성 경로에도 포함 됨. 더욱이 Lysine 합성 경로의 meso-diaminopimelate (m-DPA)는 박테리아의 세포벽을 형성하는 펩티도글리칸의 주요 요소임

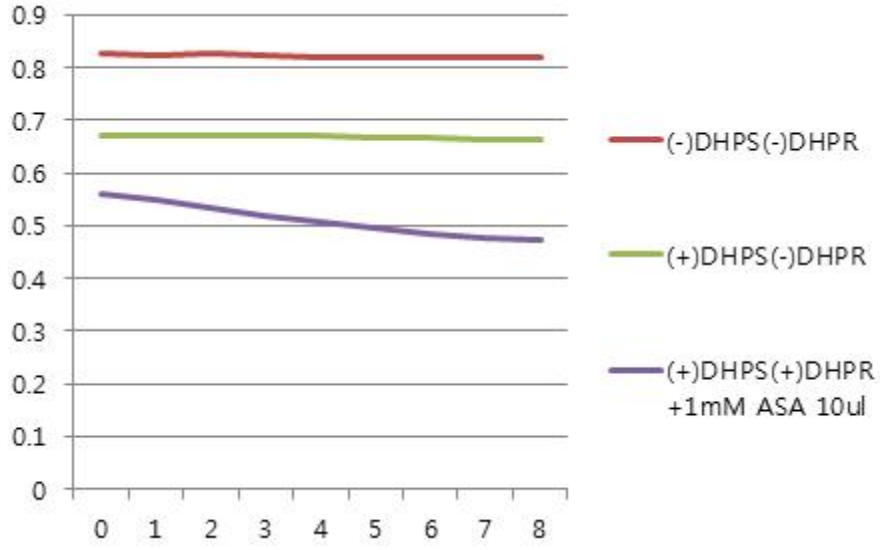


Fig. 3-21. DHDPS와 DHDPR를 함께 이용한 활성측정 결과. DHDPS의 생성물질인 DHP는 화학적으로 불안정하여 측정이 어려움. 따라서 DHP의 전구체인 ASA를 이용해 DHDPR과 DHDPS를 함께 반응시켜 DHDPR의 co-factor인 NAD(P)H의 감소량을 확인 하는 방법으로 효소 활성 측정

KOPRI
극지연구소

나. *Paenisporosarcina* sp. Strain TG-14 미생물 유래 디히드로디피콜린산 환원효소 (Dihydrodipicolinate reductase; DHDPR)

- DHDPR은 디피콜린산(DPA)의 생성을 촉진시킴
- NAD(P)H는 DHDPR의 co-factor로 작용
- DPA는 DHDPR의 억제제로 작용

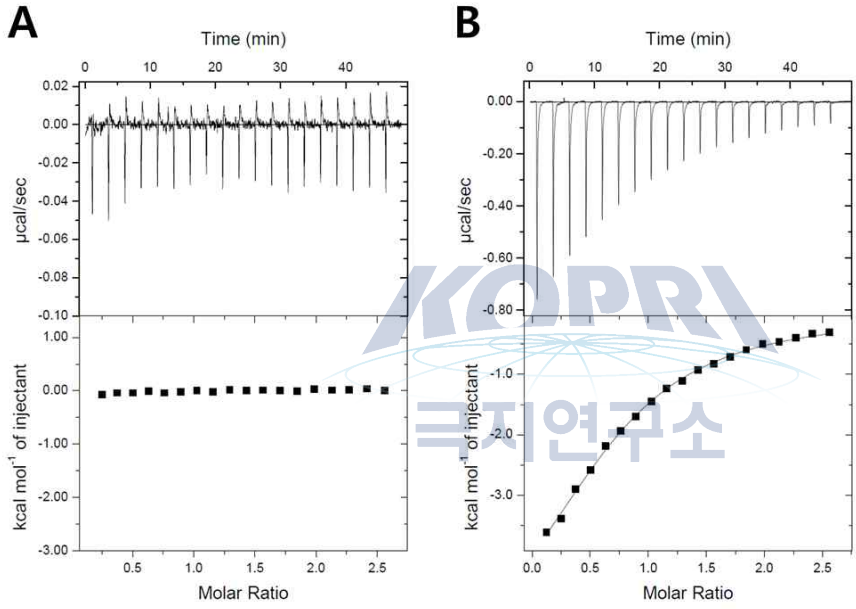


Fig. 3-22. ITC 분석을 통한 NADH와 NADPH 결합능 확인, (A) NADH에 비해 (B) NADPH에 대하여 월등한 결합 특성을 보임

Table. Kinetic parameters of *Pa*DHDPR

	NADPH (constant DHDP)	NADH (constant DHDP)	DHDP (constant NADPH)
K_m (μM)	22 ± 1.4	43 ± 8.9	12 ± 1.6
k_{cat} (s^{-1})	55 ± 1.2	7.1 ± 0.1	52 ± 1.1
k_{cat}/K_m (s^{-1}/μM)	2.5 ± 0.2	0.17 ± 0.04	4.4 ± 0.6

Data are presented as the mean ± SD of three different experiments.

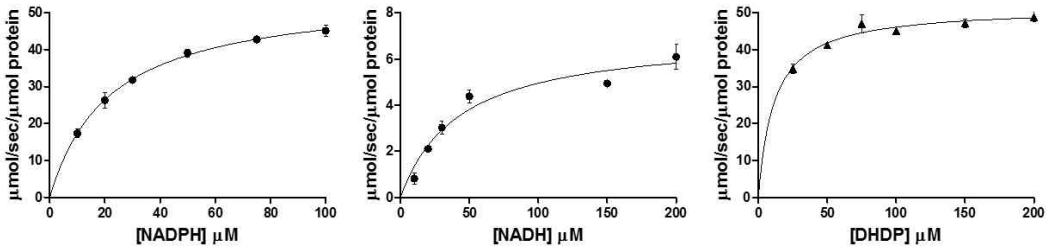


Fig. 3-23. NADH와 NADPH에 따른 활성 비교. NADPH가 NADH에 비해 월등하게 높은 활성을 나타냄

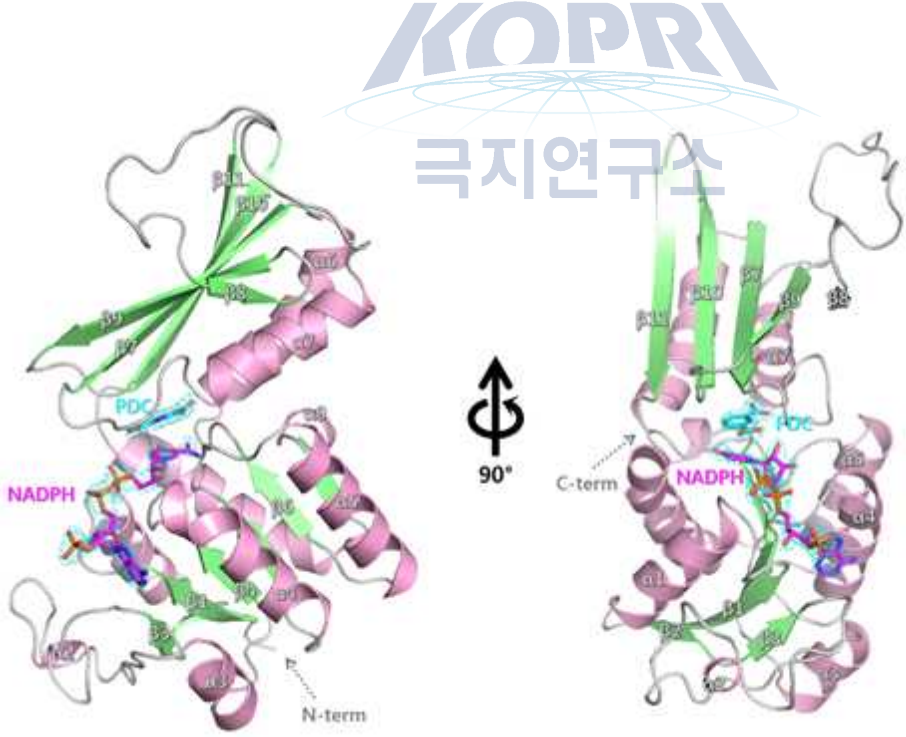


Fig. 3-24. NADPH와 DPA가 결합한 DHDPR의 구조모델. 기질이 결합하는 C-말단 도메인과 co-factor가 결합하는 N-말단 도메인으로 나누어짐.

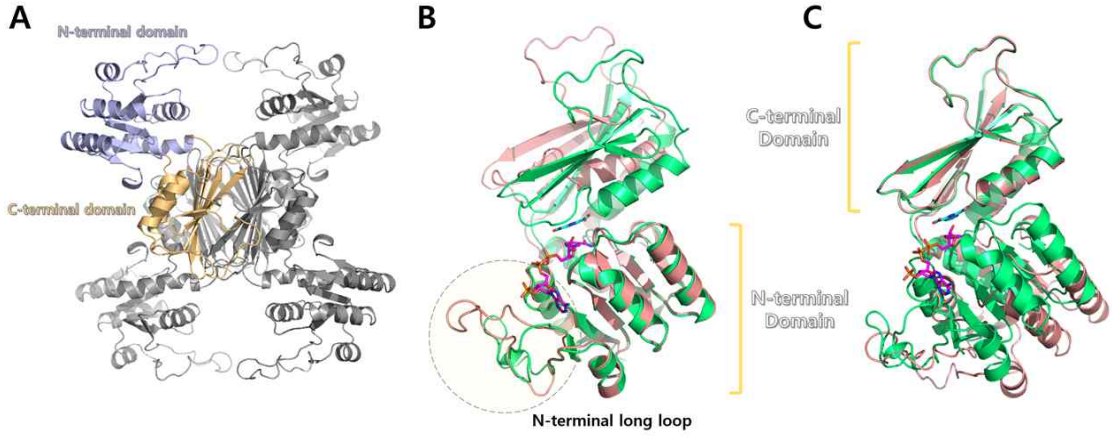


Fig. 3-25. DHDPR의 구조적 특징 (A) DHDPR은 사량체를 형성함, C-말단 도메인부분(살구색)이 마주하고 N-말단 도메인(연남색)이 바깥을 향하는 모양임 (B),(C) NADPH의 결합 여부에 따라 닫힘 또는 열림 상태가 됨. NADPH(자주색)가 결합함에 따라 N-말단부분의 고리부분에 변화가 생기고 닫힘 상태가 됨

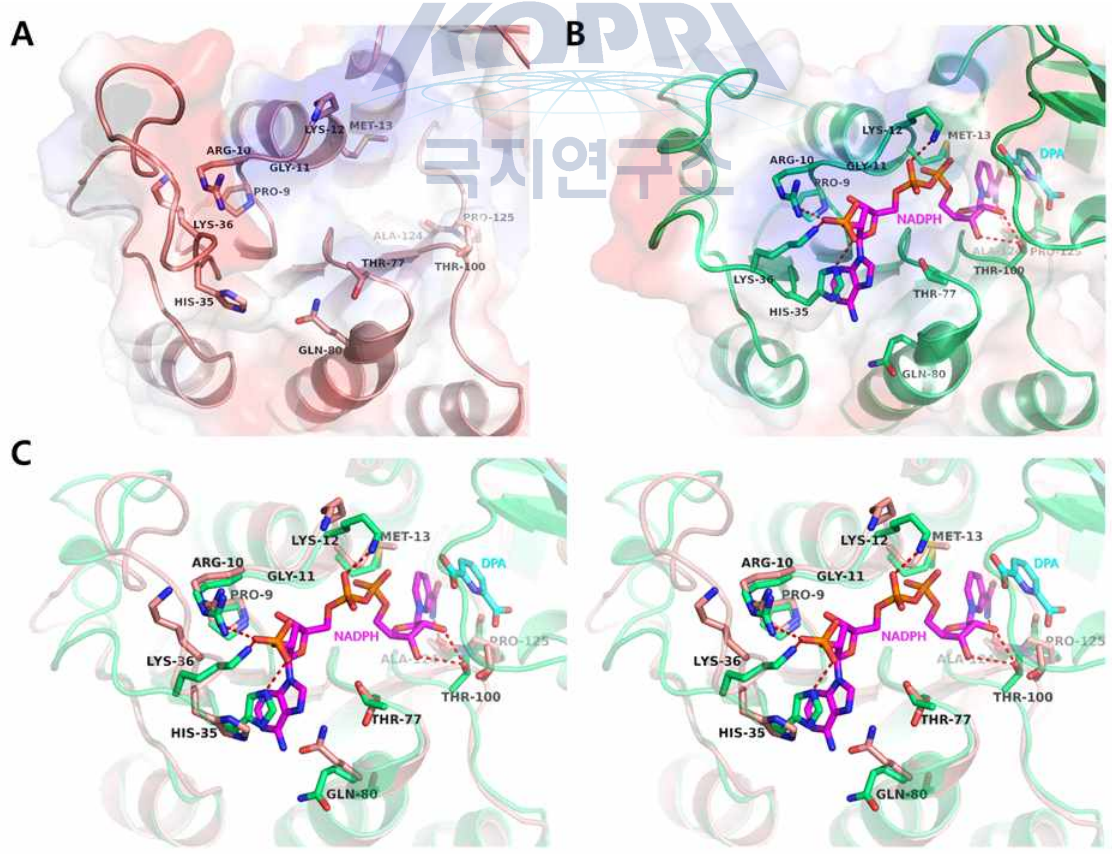


Fig. 3-26. DHDPR의 NADPH 결합 부위 (A) Apo 상태의 DHDPR N-말단 도메인

부분 (B) NADPH가 결합한 DHDPR의 N-말단 부분, NADPH의 인산기와 주요 잔기가 결합함 (C) N-말단의 긴 고리 부분이 NADPH가 결합하면서 커다란 구조적 변화를 이룸. 고리 부분에 존재하는 특정 잔기들 (His35, Lys36) 이 NADPH 아데닌쪽 인산기와 결합함. 해당 잔기는 NADPH 특이적인 결합에 주요한 역할을 할 것으로 예상됨

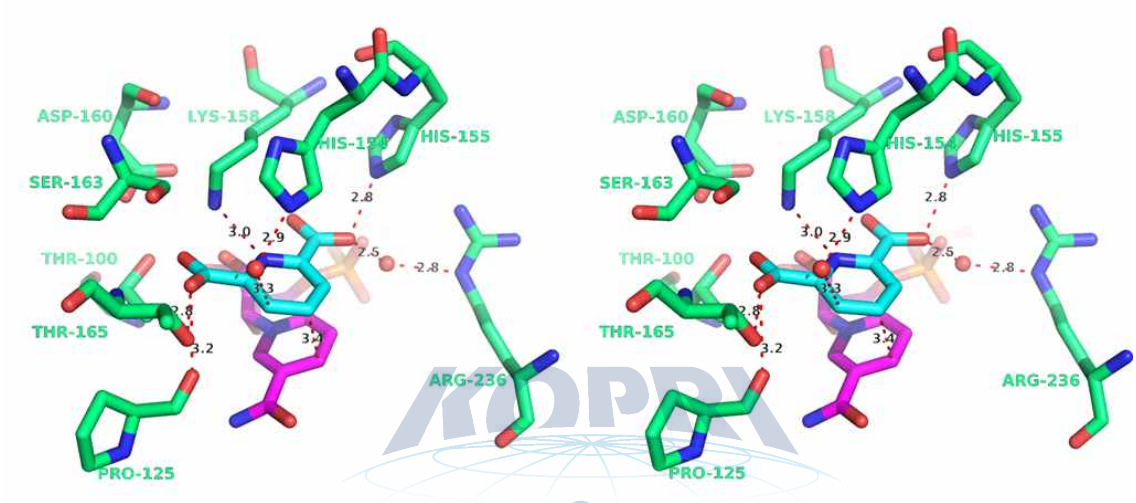


Fig. 3-27. DHDPR의 활성 자리 스테레오 그림. DHDPR의 억제제인 DPA가 DHDPR의 활성 부위에 결합해 있음. DHDPR의 활성의 주요 잔기는 보존되어 있으며 몇몇 잔기는 물분자를 매개하여 상호작용함

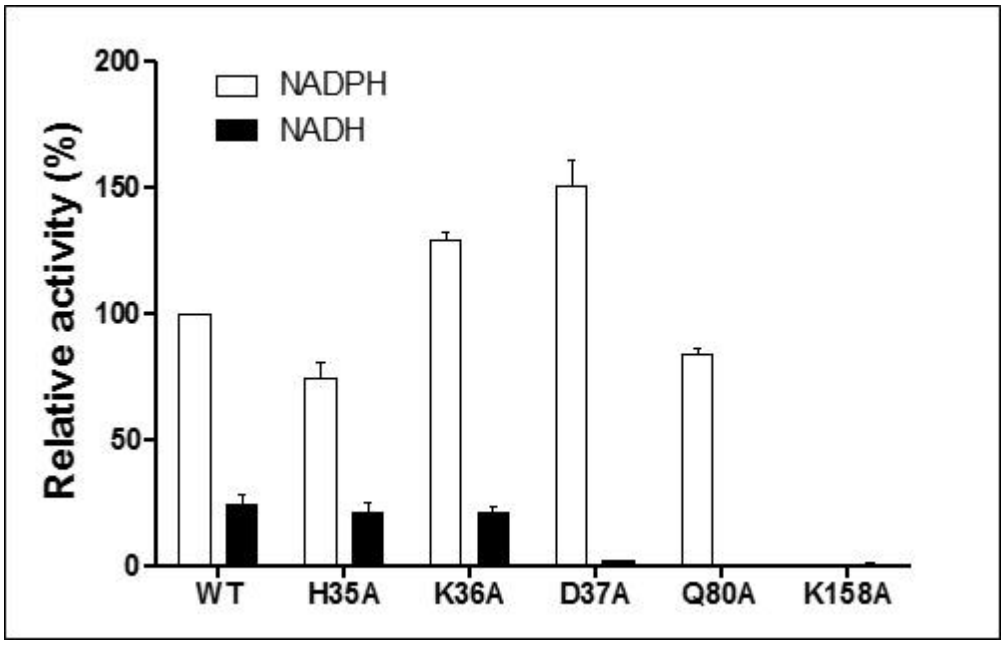


Fig. 3-28. DHDPR의 돌연변이 실험. NAD(P)H 결합에 중요한 잔기 선별 및 해당 잔기의 돌연변이를 이용한 DHDPR 활성 측정.

KOPRI
극지연구소

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구목표 달성도

1. 연구목표 및 연구내용

가. 연구개발의 최종목표

본 연구개발의 최종 목표는 극지 빙하미생물의 생존전략중의 하나인 아포 형성 메카니즘 이해하는 것이다 (Table 4-1).

Table 4-1. 본 연구개발의 최종목표

○ 최종목표: 극지 빙하미생물의 생존전략중의 하나인 아포 형성 메카니즘 이해	
- 극지방의 아이스 코어에서 존재하는 아포 형성 미생물이 어떻게 저온내성을 유지하게 되는지에 대한 해답 제시 - 아포의 구조적 특징 및 sporulation으로 전환되는 요소 규명 - 아포 형태에서 germination (dicision cycle) 으로 전환되는 요소를 찾고 최종적으로 아포 형성과 저온 적응과의 상관관계 분석	
○ 연차별 목표	
1차년도	극지 빙하샘플로부터 아포 상태로 있는 미생물의 분리 및 동정, 아포 형성에 관여하는 유전자 서열 확보 및 분석
2차년도	아포 상태일때와 세포분열 상태일때의 단백체 발현 양상 비교, 타겟 단백질의 고해상도 삼차구조 해석
3차년도	극지 빙하미생물의 아포 형성 메카니즘 제시

KOPRI 극지연구소

나. 연차별 연구개발 목표 및 내용

Table 4-2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	년도	연구개발목표	연구개발내용
1차년도	2014	극지 빙하샘플로부터 아포 상태로 있는 미생물의 분리 및 동정	- 극지 빙하속에 존재하는 호냉성 미생물 확보, 분리 및 동정 - 16S rRNA 유전자 분석을 통한 미생물 동정 - 아포 상태로부터 배양 가능한 조건 탐색
2차년도	2015	아포 형성에 관여하는 유전자 서열 확보 및 분석	- 아포 형성 관련 단백질 유전자 확보 - Blast search를 통해 구조 연구에 임팩트가 있는 단백질 타겟 선정 및 유전자 확보
		아포 상태일때와 세포분열 상태일때의 단백체 발현 양상 비교	- RNA-seq을 통한 저온 스트레스 조건 및 아포 형성시 유전자의 발현 정도 분석 - 아포 형성에 의해 유도되는 발현 단백체 특성 분석 - 아포 형성 신호전달관련 단백체 지도 구축
3차년도	2016	타겟 단백질의 고해상도 삼차구조 해석	- 타겟 단백질의 발현 및 정제 시스템 구축 - 고해상도 삼차구조 정보획득 - 구조적 특성 비교분석
		극지 빙하미생물의 아포 형성 메카니즘 제시	- 생명정보학을 이용한 유전체, 단백체 데이터 분석 - 아포 형성관련 상호신호전달 체계분석 - 스트레스 조건에서 아포의 구조 및 기능 변화 분석

2. 연구개발 성과

본 연구개발의 주요내용은 빙하 미생물 2종 (Paenisporosarcina sp. Strain TG-14와 Paenisporosarcina sp. Strain TG-20) 에 대한 유전자 정보 분석을 통해 스포어 형성에 관여하는 핵심단백질 유전자들을 찾고 이들을 재조합으로 발현하여 기능 분석 및 삼차 구조해석을 통해 빙하미생물의 스포어 형성 기작을 이해하는 것이다.

Table 4-3. 본 연구개발의 정성적 성과

정성적 목표		주요 연구개발 실적	달성도
1차년도 (2014)	극지 빙하샘플로부터 아포 상태로 있는 미생물의 분리 및 동정	- 빙하 미생물 2종 (Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 와 Paenisporosarcina sp. Strain TG-20) 확보 - 극지 빙하샘플 미생물과의 비교 연구를 위하여 열수 분출공에서 분리한 고온성 균주 Bacillus licheniformis Strain 9F 박테리아 균주 확보	100%
2차년도 (2015)	아포 형성에 관여하는 유전자 서열 확보 및 분석	- 빙하 미생물 2종 (Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 와 Paenisporosarcina sp. Strain TG-20) 유전자 정보분석을 통해 스포어 형성 핵심 유전자 확보, 스포어 형성관련 단백질 타겟 86 종 선정 - 고온성 스포어 형성 균주 Bacillus licheniformis Strain 9F 박테리아 유전자 분석을 통해 스포어 형성 관련 타겟 단백질 유전자 20종 선정	100%
	아포 상태일때와 세포분열 상태일때의 단백체 발현 양상 비교	- Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 박테리아에서 Real-time PCR을 이용하여 스포어 상태일때와 세포분열 상태일때의 핵심단백질 (dihydrodipicolinate reductase, Spo0A, Spo0F and GerE) 발현 양상 비교	
3차년도 (2016)	타겟 단백질의 고해상도 삼차구조 해석	- Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 유래의 inactive 상태의 Spo0A regulation domain (PaSpo0A-R) 구조 해석 - Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 유래의 dihydrodipicolinate reductase 효소 (PaDHDPR) 자체 구조와 NADPH/DPA 가 결합된 구조 해석 - Paenisporosarcina sp. Strain TG-14 유래의 GerE 단백질의 구조해석 - Paenisporosarcina sp. Strain TG-20 유래의 Germination protease (GPR) 단백질의 구조해석 - Bacillus licheniformis Strain 9F 유래의 Germination protease (GPR) 단백질의 구조해석	100%
	극지 빙하미생물의 아포 형성 메카니즘 제시	- 빙하 미생물의 스포어 형성 신호는 여러 가지 단백질의 인산화와 탈인산화에 의해서 조절 되고 이 과정 중에 핵심 단백질인 Spo0A 의 삼차구조 및 생화학적 연구를 통해 인산화에 의해 PaSpo0A 단백질이 이량체를 형성해서 타겟 DNA에 결합하여 스포어 형성에 관여하는 다른 유전자의 발현을 조절한다는 사실 규명	

KOPRI 극지연구소

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

○ 빙하 미생물의 단백체 및 단백질 구조연구는 극지생태계의 형성과 적응, 진화 규명으로 극지생태계 보존기술과 생명의 기원에 중요한 연구 결과 제공

○ 유전체, 단백체 등 극지고유 생명정보 확보를 통한 극지연구의 저변확대와 극지생명 연구 분야 세계 1위의 국제적 선도 기관으로 도약

○ 미지의 극지생명정보를 적극 확보하고 BT, IT 등 융합학문을 촉진시킴으로써 극지 생명공학 분야 국가 경쟁력 제고

○ 극지 지역을 중심으로 급속도로 진행되는 지구 온난화의 원인을 극지고유 생물을 중심으로 한 단백체학적 접근법을 사용하여 기후학과 생물학의 연계점을 제시

○ 궁극적으로는 극지의 환경변화가 극지생물에 미치는 영향을 생물의 생리를 직접적으로 조절하는 단백질 수준에서 대량의 정보를 획득하여 향후 극지생물을 중심으로 한 극지연구의 활성화를 유도

○ 빙하 미생물의 아포 형성 메카니즘의 분자 수준에서의 이해는 아포를 형성하는 다른 병원균에 대항하는 항생제 또는 신약 개발에 중요한 과학적인 기반정보 제공

○ 유전체, 단백체 등 극지고유 생명정보 확보를 통한 극지연구의 저변확대와 극지생명 연구 분야 세계 1위의 국제적 선도 기관으로 도약을 통한 국제사회에서의 국가 위상 제고

○ 극지 생명현상의 이해와 해석 정보를 바탕으로 새로운 신생명자원을 개발하기 위한 창조산업의 기반자원 제공

○ 극지생물에 대한 단백체 및 구조-기능 연구결과물은 기존의 유전체연구 뿐만 아니라 기후변화에 의한 영향연구 및 환경오염물질에 의한 변화를 종합적으로 이해하는 것이 필수적이므로 융복합 연구사업 또는 부처 R&D 사업으로 확대 가능성 있음

○ 극지 빙하미생물에 대한 다양한 학문분야에서의 공동연구 계기를 마련함

KOPRI 극지연구소

제 6 장 참고문헌

Bartholomew, J. W. & Mittwer, T. (1950). A simplified bacterial spore stain. Biotechnic & Histochemistry 25, 153-156.

Bidle, K. D., Lee, S., Marchant, D. R. & Falkowski, P. G. (2007). Fossil genes and microbes in the oldest ice on Earth. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 13455-13460.

Driks, A. (1999). Bacillus subtilis spore coat. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63, 1-20.

Junge, K., Christner, B. & Staley, J. T. (2011). Diversity of Psychrophilic Bacteria from Sea Ice-and Glacial Ice Communities. In Extremophiles Handbook, pp. 793-815. Springer.

Kennicutt II, M. C. & Chown, S. L. (2014). Six priorities for Antarctic science. Nature 512, 23-25.

Kim, H., Bang, J., Kim, Y., Beuchat, L. & Ryu, J. H. (2012). Reduction of Bacillus cereus spores in sikhye, a traditional Korean rice beverage, by modified tyndallization processes with and without carbon dioxide injection. Letters in applied microbiology 55, 218-223.

Trevors, J., Bej, A., Mojib, N., Van Elsas, J. & Van Overbeek, L. (2012). Bacterial gene expression at low temperatures. Extremophiles 16, 167-176.

Yung, P. T., Shafaat, H. S., Connon, S. A. & Ponce, A. (2007). Quantification of viable endospores from a Greenland ice core. FEMS microbiology ecology 59, 300-306.

Burbulys, D., Trach, K.A., and Hoch, J.A. 1991. Initiation of sporulation in B. subtilis is controlled by a multicomponent phosphorelay. Cell 64, 545-552.

Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. 2010. The mechanism of signal transduction by two-component systems. Curr. Opin. Struct. Biol. 20, 763-771.

Christner, B.C., Mosley-Thompson, E., Thompson, L.G., Zagorodnov, V., Sandman, K., and Reeve, J.N. 2000. Recovery and identification of viable bacteria immured in glacial ice. Icarus 144, 479-485.

Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., and Youngman, P. 2000. The transcriptional profile of early to middle sporulation in Bacillus subtilis. Proceedings of the National Academy of Sciences 97, 8063-8068.

Jiang, M., Shao, W., Perego, M., and Hoch, J.A. 2000. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in Bacillus subtilis. Mol. Microbiol. 38, 535-542.

LeDeaux, J.R., and Grossman, A.D. 1995. Isolation and characterization of kinC, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 177, 166-175.

LeDeaux, J.R., Yu, N., and Grossman, A.D. 1995. Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 177, 861-863.

Lee, J., Tomchick, D.R., Brautigam, C.A., Machius, M., Kort, R., Hellingwerf, K.J., and Gardner, K.H. 2008. Changes at the KinA PAS-A Dimerization Interface Influence Histidine Kinase Function† ,‡ . Biochemistry (Mosc). 47, 4051-4064.

Leonard, P.G., Golemi-Kotra, D., and Stock, A.M. 2013. Phosphorylation-dependent conformational changes and domain rearrangements in Staphylococcus aureus VraR activation. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 8525-8530.

Lewis, R.J., Brannigan, J.A., Muchova, K.n., Barak, I., and Wilkinson, A.J. 1999. Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein. J. Mol. Biol. 294, 9-15.

Lewis, R.J., Krzywda, S., Brannigan, J.A., Turkenburg, J.P., Muchova, K., Dodson, E.J., Barak, I., and Wilkinson, A.J. 2000a. The trans?activation domain of the sporulation response regulator Spo0A revealed by X-ray crystallography. Mol. Microbiol. 38, 198-212.

Lewis, R.J., Muchova, K.n., Brannigan, J.A., Barak, I., Leonard, G., and Wilkinson, A.J. 2000b. Domain swapping in the sporulation response regulator Spo0A. J. Mol. Biol. 297, 757-770.

Lewis, R.J., Scott, D.J., Brannigan, J.A., Ladds, J.C., Cervin, M.A., Spiegelman, G.B., Hoggett, J.G., Barak, I., and Wilkinson, A.J. 2002. Dimer formation and transcription activation in the sporulation response

KOPRI 극지연구소

regulator Spo0A. J. Mol. Biol. 316, 235-245.
Muchova, K., Lewis, R., Pere?ko, D., Brannigan, J., Ladds, J., Leech, A., Wilkinson, A., and Barak, I. 2004. Dimer?induced signal propagation in Spo0A. Mol. Microbiol. 53, 829-842.
Tzeng, Y.-L., Zhou, X.Z., and Hoch, J.A. 1998. Phosphorylation of the Spo0B Response Regulator Phosphotransferase of the Phosphorelay Initiating Development inBacillus subtilis. J. Biol. Chem. 273, 23849-23855.
Varughese, K.I., Tsigelny, I., and Zhao, H. 2006. The crystal structure of beryllofluoride Spo0F in complex with the phosphotransferase Spo0B represents a phosphotransfer pretransition state. J. Bacteriol. 188, 4970-4977.

KOPRI
극지연구소