

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지유전자원 기반 신규활성 항생제 후보 물질 발굴에 관한 연구” 과제의 위탁연구 “극지생물유래 변형효소 구조분석 및 신규항생물질의 타겟 결합 연구에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2019 . 02 . 05

(본과제) 총괄연구책임자	:	이 준 혁
위탁연구기관명	:	중앙대학교
위탁연구책임자	:	박 현 호
위탁참여연구원	:	김 창 민

## 보고서 초록

위탁연구과제명	극지생물유래 변형효소 구조분석 및 신규항생물질의 타깃 결합연구				
위탁연구책임자	박현호	해당단계 참여연구원수	2	해당단계 연구비	20,000,000
연구기관명 및 소속부서명	중앙대학교 약학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약 (연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- MurA의 총 20종의 항생제 타깃 유전자 클로닝하여 발현 construct제작</li> <li>- KpPBP1A의 총 10종의 항생제 내성균주 페니실린 결합 단백질 유전자 클로닝하여 발현 constructs 제작</li> <li>- AccA 외 15종 단백질의 발현을 확인함.</li> <li>- 박테리아 발현 단백질외에 Insect cell 발현 단백질 찾고 있음</li> <li>- 발현 단백질중 AccA외 총 10종의 단백질 정제성공</li> <li>- 구조연구에 필요한 단백질 양 만큼 정제성공</li> <li>- Quick two step chromatography 방법을 이용하여 순도높은 단백질 정제 시스템 구축함</li> <li>- 정제된 표적 변형효소 농축하여 총 7종의 단백질 10mg/ml의 농도로 준비함.</li> </ul>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	단백질 발현, 단백질 정제, 항생제 내성균주			
	영어	Protein expression, Protein purification, Antibiotic organism			

# 요 약 문

## I. 제 목

극지생물유래 변형효소 구조분석 및 신규항생물질의 타깃 결합연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 극지생물유래 변형효소의 발현, 정제 시스템 구축 및 3차구조 분석
- 신규항생물질의 타깃과의 정량적 정성적 결합력 분석

## III. 연구개발의 내용 및 범위

극지생물유래 변형효소 단백질의 full-length 뿐만 아니라 알려진 domain들 별로 expression constructs 제작 (박테리아, Insect cell, Mammalian cell expression 용을 각각 제작)

박테리아, Insect cell, Mammalian cell expression 시스템을 각각 test하여 최적의 발현 시스템을 찾아내고 구축함

다양한 chromatography 방법을 이용하여 각 단백질을 위한 최적의 정제 시스템 확립

정제된 표적 변형효소를 농축하여 구조분석을 위한 준비진행

## IV. 연구개발결과

MurA의 총 20종의 항생제 타깃 유전자 클로닝하여 발현 construct제작  
KpPBP1A의 총 10종의 항생제 내성균주 페니실린 결합 단백질 유전자 클로닝하여 발현 constructs 제작

AccA 외 15종 단백질의 발현을 확인함.

박테리아 발현 단백질외에 Insect cell 발현 단백질 찾고 있음

발현 단백질중 AccA의 총 10종의 단백질 정제성공

구조연구에 필요한 단백질 양 만큼 정제성공

Quick two step chromatography 방법을 이용하여 순도높은 단백질 정제 시스템 구축함

정제된 표적 변형효소 농축하여 총 7종의 단백질 10mg/ml의 농도로 준비함.

## V. 연구개발결과의 활용계획

박테리아 시스템에서 얻기 힘들어 생화학적 연구에 어려움이 있었던 많은 단백질의 발현에 적용 가능

극지생물유래 변형효소의 3차구조는 극지생물의 환경적응, 극지생물의 행동이해등의 연구에 많은 도움이 됨

산업재산권 및 지적재산권 확보

국내외 타깃 구조기반 신규 항생물질개발연구에 본보기가 될수 있음

# S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

## I. Title

Structure determination of enzyme and interaction analysis of antibiotics

## II. Purpose and Necessity of R&D

(The title may be changed if necessary.)

## III. Contents and Extent of R&D

(The title may be changed if necessary.)

## IV. R&D Results

(The title may be changed if necessary.)

## V. Application Plans of R&D Results

(The title may be changed if necessary.)

# 목 차

## 제 1 장 서론

- \* 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- \* 국·내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과가 국·내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- \* 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

- \* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전에서의 기여도 등을 기술

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- \* 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- \* 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 참고문헌

- \* 보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다.

## 본 문

### 제 1 장 서론

- 새로운 항생제 개발 요구
  - 국민 건강을 위협하는 기존 항생제 내성균의 등장에 따른 차세대 항생제 개발 요구
  - 기존의 항생제 개발 방법의 한계(배양되는 방선균에서만 연구, 반복적인 동일 물질 발견)를 극복할 수 있는 신종 방선균 또는 새로운 실험적 방법 요구
- 극지유전자원 기반 항생물질 변형효소 선별
  - 극지생물 유래 유전자와 단백질 정보 기반 항생물질 변형효소 스크리닝
  - 변형효소 활성과 항생물질 구조를 고려한 타겟 효소-항생물질 계열 매칭
  - 항생물질 변형효소: 항생제의 화학구조를 바꾸어 활성에 영향을 주는 생물 효소. 알려진 것들로는 Hydroxylase, Glycosyl transferase, Isomerase, Acyltransferase, methyltransferase, Sulfotransferase 등이 있음
- 항생물질 변형효소 단백질 생산
  - 극지 유래 효소단백질의 발현 증진을 위한 벡터 설계
  - 효소단백질 생산성 향상을 위한 숙주 개발과 이를 통한 단백질 생산이 필요함
  - 극지생물유래 변형효소 및 신규항생물질 타겟의 구조분석을 위해 단백질 생산 시스템 및 정제 시스템 구축이 필요함

본 위탁연구에서는 정제 발현 시스템을 구축하고 이를 바탕으로 표적단백질 구조분석 및 저분자 물질과의 결합에 대한 연구를 진행하였음

### 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 극지 에서 분리한 다양한 방선균(생산하는 2차 대사산물 화학구조의 다양성과 양적 풍부함으로 인하여 산업적으로 가장 중요하게 인식되는 미생물), 곰팡이류 또는 시아노박테리아 균주 및 유전체 정보 확보로 신규활성 물질 라이브러리 구축 및 탐색연구 시작 가능
- 극지연구소에서는 미생물 균주은행인 Polar and Alpine Microbial Collection을 운영하여 다양한 유용 극지 미생물자원을 기 확보
- 극지연구소에서는 다년간 기관고유사업을 통해 극지생물 40종(유전자 5만여 종)의 유전자원 확보 (남극생물 유전자 정보 데이터베이스 오픈 (<http://antagen.kopri.re.kr/>))
- 극지연구소에서는 극지 방선균의 (Streptomyces sp. PAMC26508) 전체 유전자

정보를 분석 (PLoS One. 2013 Jul 23;8(7):e68824)

- 항생물질의 수산화 변형에 관여하는 효소인 Cytochrome P450(CYPs) 유전자군 20종 이상 확인 및 특성 분석 (Int J Mol Sci. 2016년 5월, Int J Mol Sci. 2016년 12월)
- 국산 24호 신약 탄생, 동아에스티의 신약 슈퍼항생제 시백스트로는 2014년 7월 미국 FDA(식품의약청)의 승인을 받았고, 2015년 국내 신약 허가 승인. 국산신약으로 미국에 진출한 것은 지난 2003년 LG생명과학의 팩티브 이후 두 번째
- 국산 항생제 신약 개발, 2015년 국내 23호 신약 탄생 (자보란테정, 동화약품). 자보란테정은 '자보플록사신 D-아스파르트산염'을 주성분으로 하는 퀴놀론계 항생제로써 만성기관지염, 폐기종을 포함하는 만성폐쇄성폐질환 급성악화에 사용하는 제품

### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

□ 성과목표 1: 극지생물유래 변형효소의 발현시스템 구축

○ 세부목표 1-1: 극지생물유래 변형효소 단백질의 full-length 뿐만 아니라 알려진 domain들 별로 expression constructs 제작 (박테리아, Insect cell, Mammalian cell expression 용을 각각 제작)

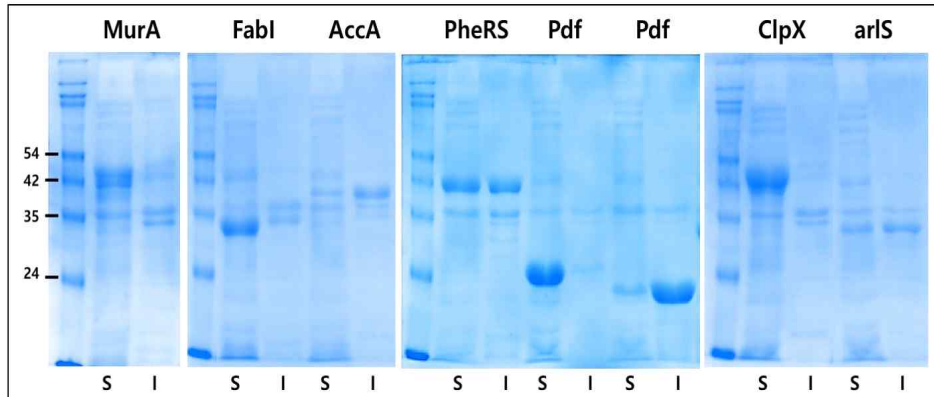
1. 페니실린 결합 타깃 단백질 (항생제 내성균주)의 발현 construct 제작을 위한 아미노산 서열 분석
2. 페니실린 결합 타깃 단백질 (항생제 내성균주)의 발현 construct 제작



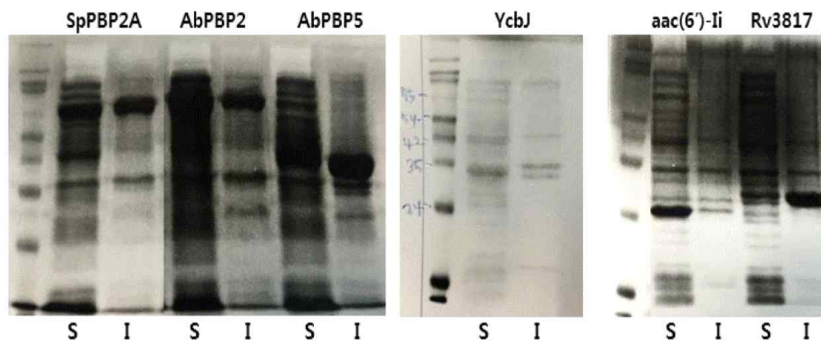


Penicillin binding proteins (항생제 내성균주)									
cloning name	Protein	Gene	Uniprot	Da	length (bp)	length (aa)	enzyme site (pET28a)	PCR	Cloning
1 KpPBP1A	Bifunctional penicillin-binding protein 1a: transglycosylase/transpeptidase	mrcA	A6TF20	88,188	2418	805	BamHI/XhoI		
2 KpPBP1C	Penicillin binding protein 1C (PBP 1C)	pbpC	A6TCD8	81,870	2244	747	NdeI/XhoI		
3 KpPBP2_1	Peptidoglycan D,D-transpeptidase MrdA	mrdA	A6T696	66,620	1785	594	NdeI/BamHI		
4 KpPBP2_2	Peptidoglycan D,D-transpeptidase MrdA	mrdA	A6T9H5	66,340	1785	594	NdeI/XhoI		
5 KpPBP3_1	Peptidoglycan D,D-transpeptidase fts I	fts I	A6TAZ4	59,310	1635	544	EcoI/XhoI		
6 SpPBP2A	>WP_000762607.1 >CA669780.1 penicillin-binding protein 2a [Streptococcus pneumoniae ATCC 700669]	SPJ_2018	C1CGU2	71,990	1968	655	NdeI/XhoI	O	O
7 AbPBP3	>WP_000667907.1 >ABO12897.2 putative D-ala-D-ala-carboxypeptidase penicillin-binding protein [Acinetobacter baumannii ATCC 17978 dacD]		G1C763	46,590	1260	419	NdeI/XhoI	O	O
8 AbPBP1B	>WP_000667412.1 MULTISPECIES: penicillin-binding protein 1B [Acinetobacter] >ABO12707.2 hypothetical protein A15_2284 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]		G1C7C5	85,040	2310	769	NdeI/XhoI	O	
9 AbPBP2	>WP_000809155.1 >ABO1452.2 penicillin-binding protein 2 [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]	pbpA	G1C6X4	69,710	1899	632	NdeI/XhoI	O	
10 AbPBP5	>WP_000197255.1 >ABO12853.2 D-ala-D-ala-carboxypeptidase; penicillin-binding protein 5 (precursor) [Acinetobacter baumannii ATCC 17978]		G1C735	39,890	1095	364	NdeI/XhoI	O	O

항생제 타겟 유전자 (Staphylococcus aureus subsp. aureus NCTC 8325)								
	Gene	Protein	length	amino acid	kDa	enzyme site (pET28a)	Cloning	Expression
1	MurA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1260	419	45	NdeI/XhoI	O	O
2	MurA	UDP-N-acetylglucosamine 1-carboxyvinyltransferase	1266	421	45	BamHI/XhoI		
3	MurI	glutamate racemase	801	266	30	BamHI/XhoI	O	O
4	MurG	UDP-N-acetylglucosamine--N-acetylmuramyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl-undecaprenol N-acetylglucosamine transferase	1071	356	40	BamHI/XhoI		
5	WakK	Sensor protein kinase WakK (N-term deletion)	1221	406	47	NdeI/XhoI	O	O
6	WalR	Transcriptional regulatory protein WalR	702	233	27	BamHI/XhoI	O	O
7	UppS	Isoprenyl transferase	771	256	30	BamHI/XhoI	O	O
8	FtsZ	Cell division protein FtsZ	1173	390	41	NdeI/BamHI		
9	FabI	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADPH] FabI	771	256	28	BamHI/XhoI	O	O
10	AccA	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	945	314	35	BamHI/XhoI	O	O
11	AccD	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	858	285	32	BamHI/XhoI	O	O
12	PheRS	Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit	1059	352	40	BamHI/XhoI	O	O
13	Pdf	Peptide deformylase	552	183	20	NdeI/XhoI	O	O
14	Pdf	Peptide deformylase	489	162	18	NdeI/XhoI	O	O
15	Map	Methionine aminopeptidase	759	252	28	BamHI/XhoI	O	O
16	ClpX	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	1263	420	46	BamHI/XhoI	O	O
17	ClpP	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	588	195	22	HindIII/XhoI	O	X
18	gyrA	DNA gyrase subunit A	1623	540	61	BamHI/XhoI	O	X
19	gyrB	DNA gyrase subunit B	1653	550	61	NdeI/XhoI	O	
20	arlS	Signal transduction histidine-protein kinase ArlS	834	277	32	NdeI/XhoI	O	O



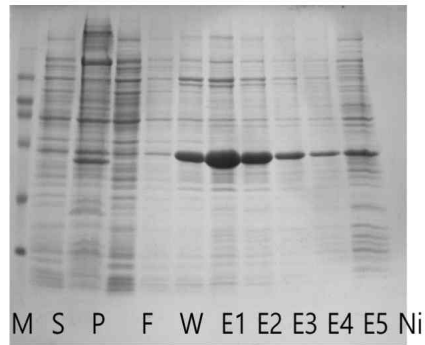
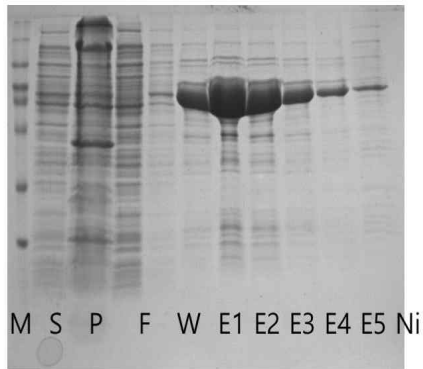
2. 2차 발현 최적화 실험을 통한 표적단백질 발현 시스템 구축



## ClpX (LB1L), arls (LB1L)

(ClpX : 420 a.a, pET28a, 46.297Kd, PI=4.55, coeffi : 0.327)

(arls : 277 a.a, pET28a, 32.199Kd, PI=6.68, coeffi : 0.356)



□ 성과목표 2: 극지생물유래 변형효소의 정제 시스템 구축

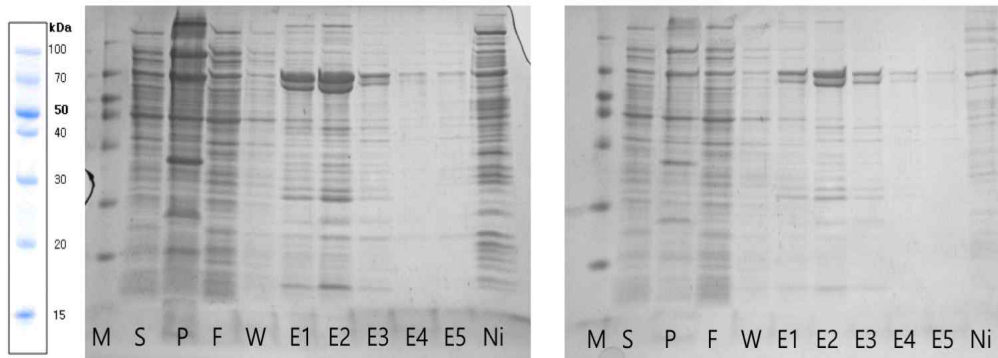
○ 세부목표 2-1: 다양한 chromatography 방법을 이용하여 각 단백질을 위한 최적의 정제 시스템 확립

## SpPBP2A (LB3L)

(SpPBP2A : pET28a, 71.975Kd, PI = 5.23, coeffi : 1.045)

Old sonicator

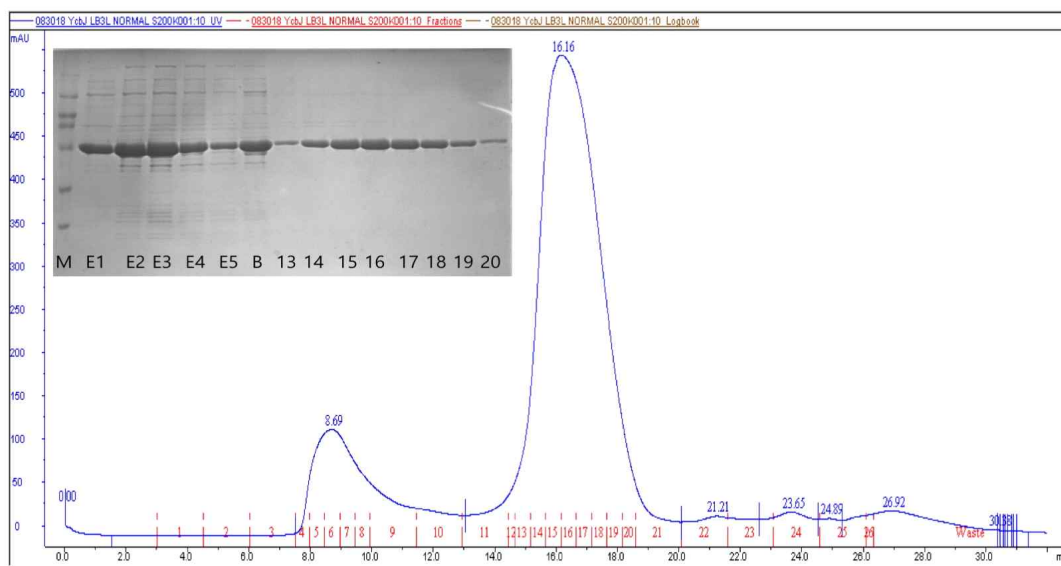
New sonicator



Power	10%
Time	20s/40s
Cycle	24
Total Time	24min

## YcbJ (LB3L)

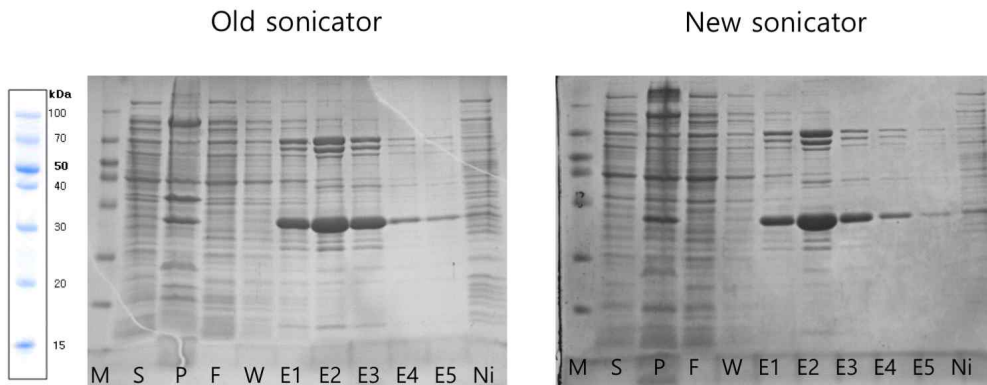
(YcbJ : pET28a, 34.480Kd, PI=4.75, coeffi : 1.738)



20mM Tris (pH8.0) 150mM NaCl buffer

## Rv3817 (LB3L)

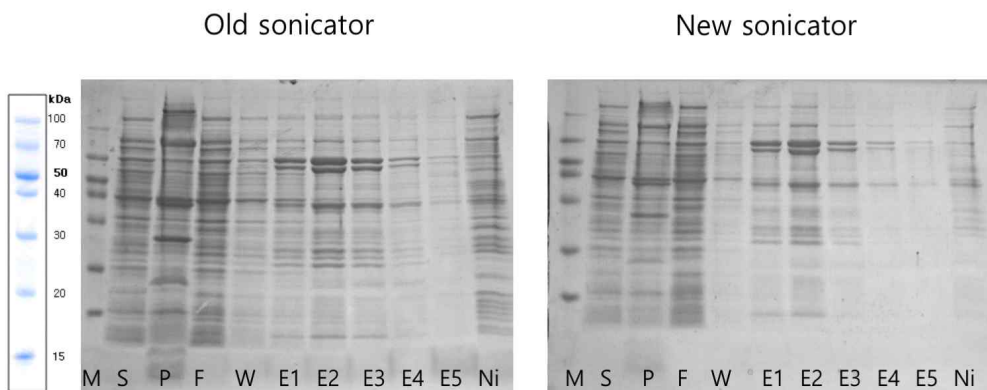
(Rv3817 : pET28a, 27.209Kd, PI = 6.31, coeffi : 2.107)



Power	34%
Time	5s/55s
Cycle	48
Total Time	48min

## AbPBP5 (LB3L)

(AbPBP5 : pET28a, 39.878Kd, PI = 7.02, coeffi : 0.791)

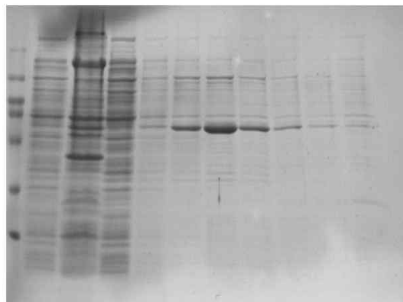


Power	20%
Time	7s/53s
Cycle	60
Total Time	60min

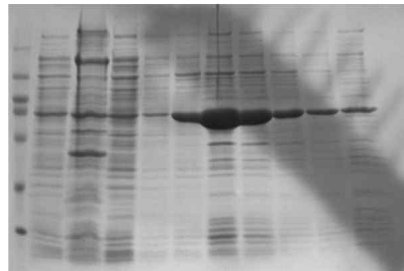
## AccA (LB1L), PheRS (LB1L)

(AccA : 314 a.a, pET28a, 35.069Kd, PI=5.20, coeffi : 0.654)

(PheRS : 352 a.a, pET28a, 40.106Kd, PI=5.48, coeffi : 0.515)



M S P F W E1 E2 E3 E4 E5 Ni

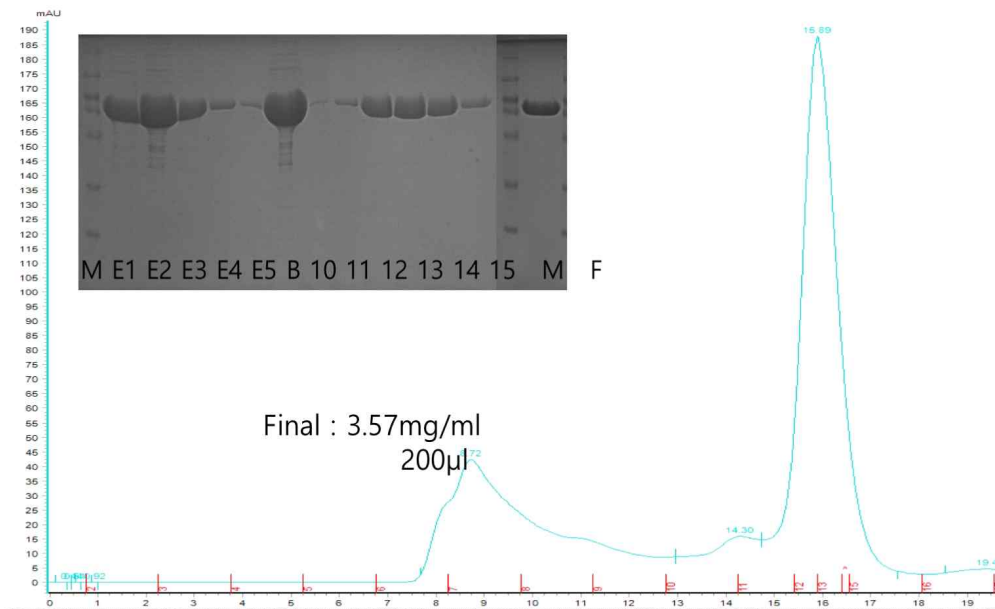


M S P F W E1 E2 E3 E4 E5 Ni

- 세부목표 2-2: 정제된 표적 변형효소를 농축하여 구조분석을 위한 준비진행

## MurA (LB2L)

(MurA : 419 a.a, pET28a, 45.074Kd, PI=5.49, coeffi : 0.524)



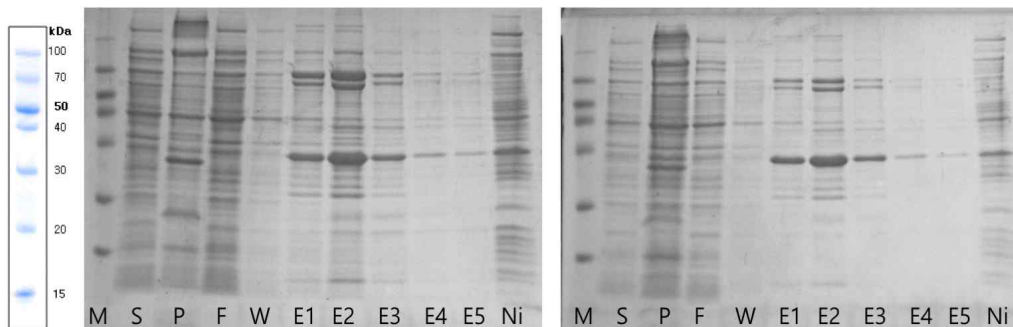
20mM Tris (pH8.0) 150mM NaCl buffer

## arls (LB3L)

(arls : pET28a, 32.199Kd, PI = 6.68, coeffi : 0.356)

Old sonicator

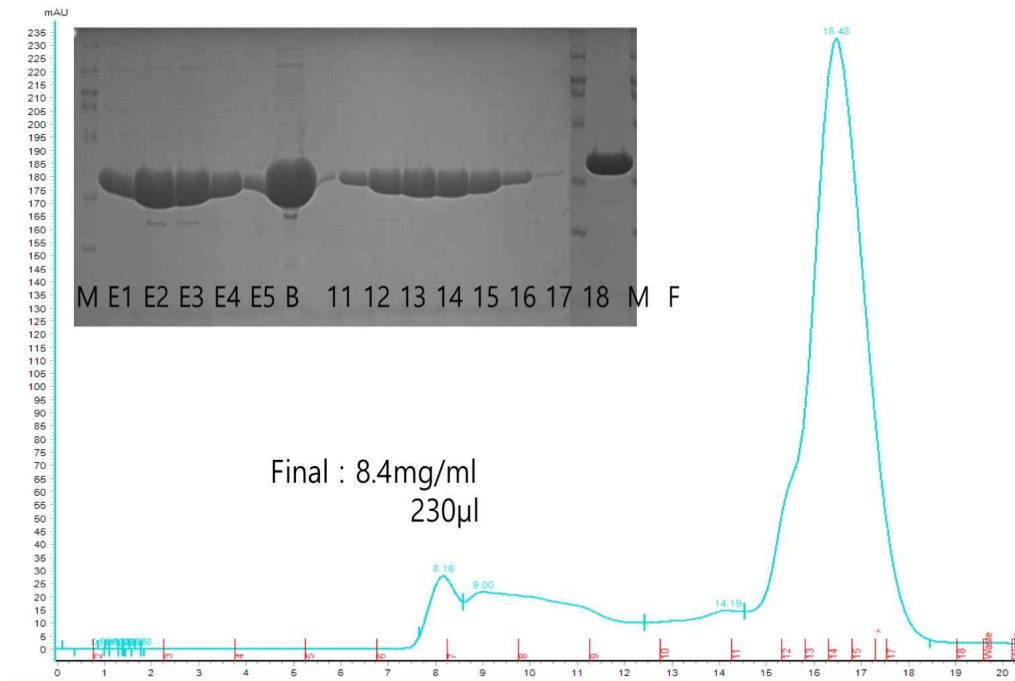
New sonicator



Power	60%
Time	1s/19s
Cycle	35
Total Time	11min 40s

## Pdf-1 (LB1L)

(Pdf-1 : 183 a.a, pET28a, 20.559Kd, PI=5.68, coeffi : 0.435)



20mM Tris (pH8.0) 150mM NaCl buffer

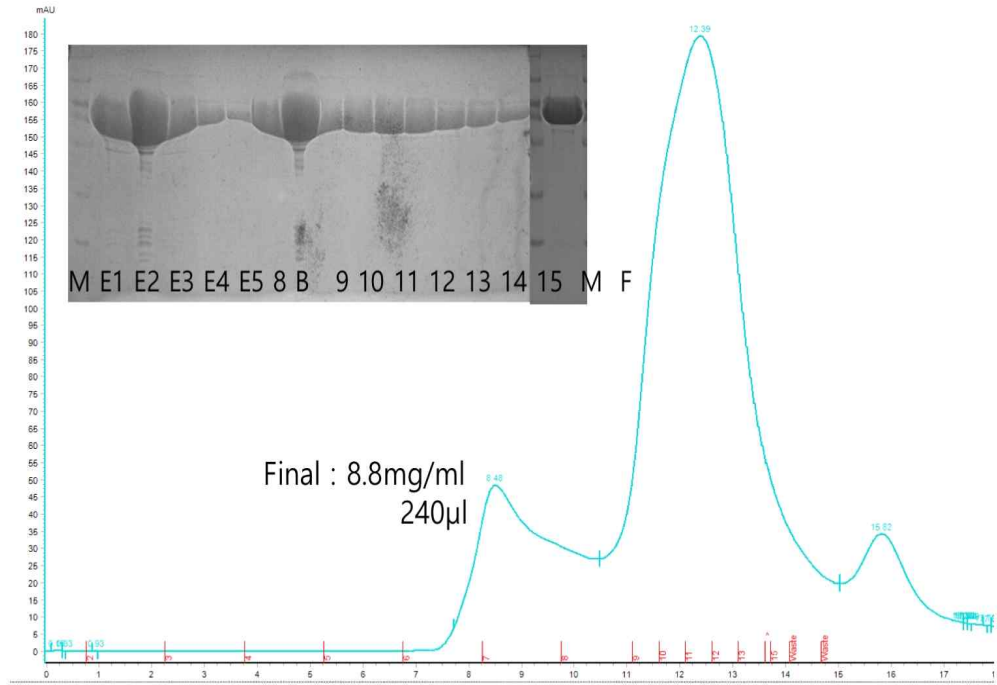


10 49 109 259 311

# ClpX (LB2L)



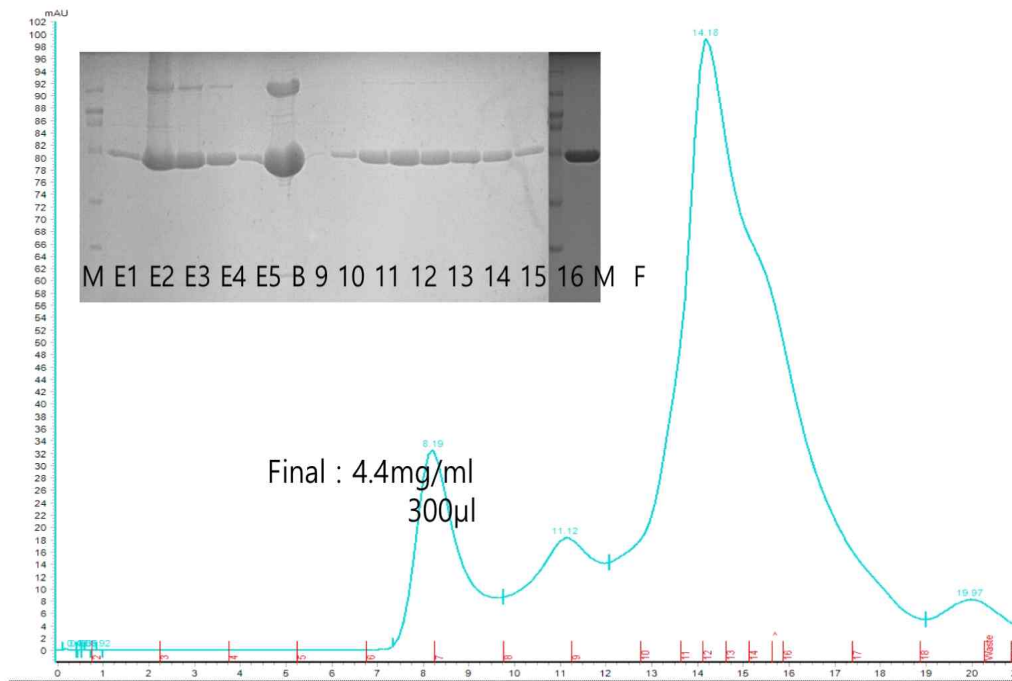
(ClpX : 420 a.a, pET28a, 46.297Kd, PI=4.55, coeffi : 0.327)



20mM Tris (pH8.0) 150mM NaCl buffer

## Fabl (LB2L)

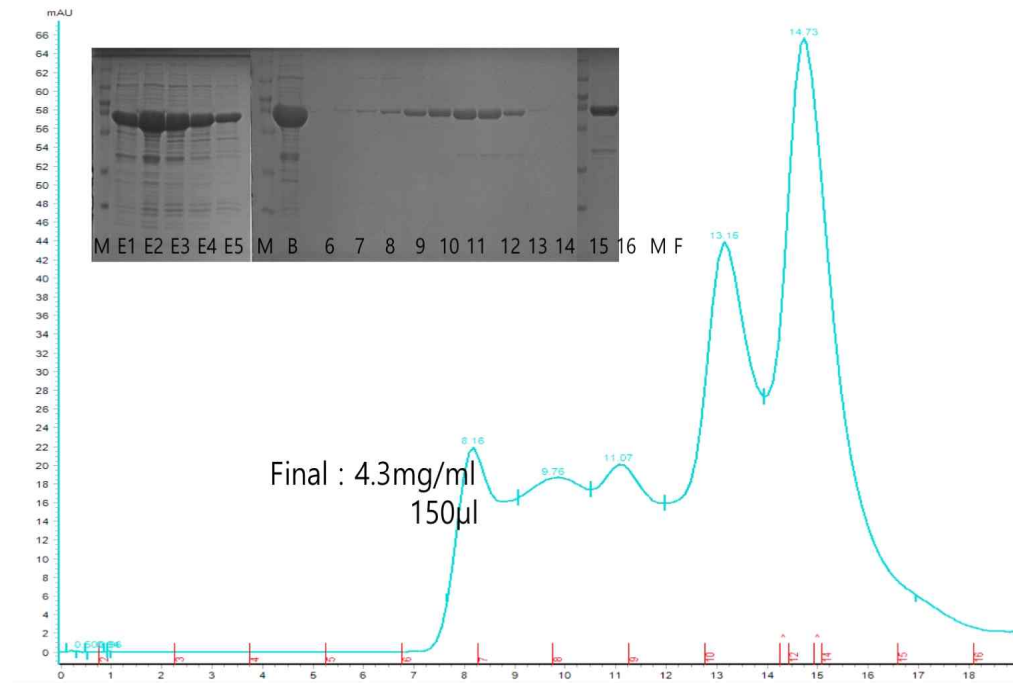
(Fabl : 256 a.a, pET28a, 28.021Kd, PI=5.64, coeffi : 0.479)



20mM Tris (pH8.0) 150mM NaCl buffer

## PheRS (LB2L)

(PheRS : 352 a.a, pET28a, 40.106Kd, PI=5.48, coeffi : 0.515)



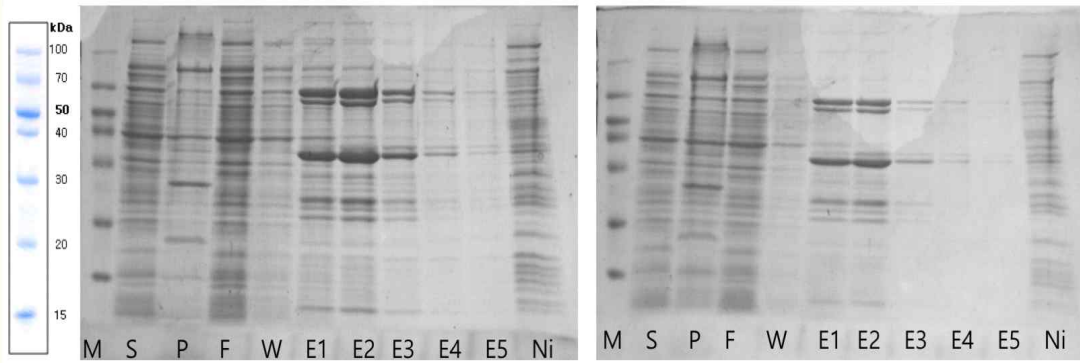
20mM Tris (pH8.0) 150mM NaCl buffer

## AccA (LB3L)

(AccA : pET28a, 35.069Kd, PI = 5.20, coeffi : 0.654)

Old sonicator

New sonicator



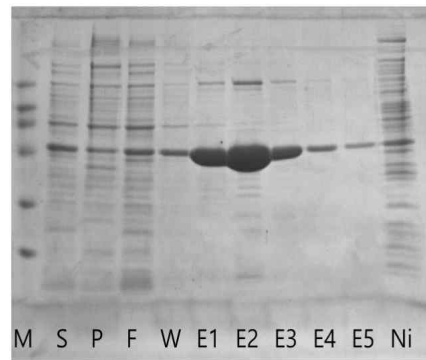
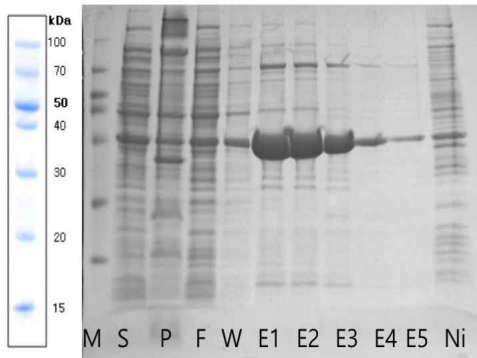
Power	25%
Time	5s/55s
Cycle	72
Total Time	72min

## Ycbj (LB3L)

(Ycbj : pET28a, 34.480Kd, PI = 4.75, coeffi : 1.738)

Old sonicator

New sonicator



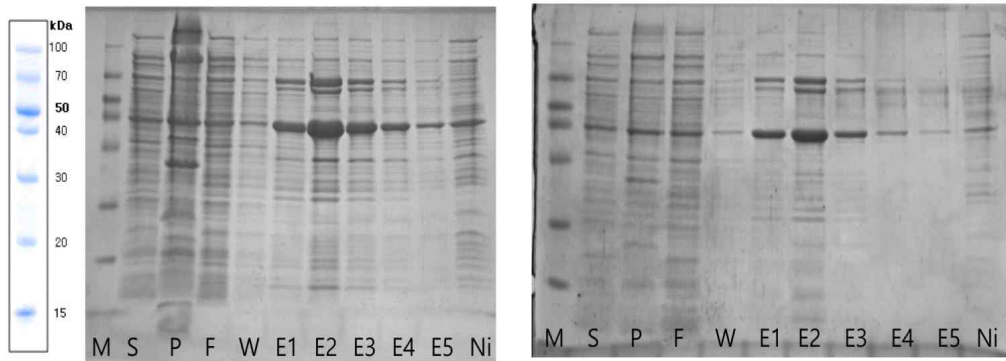
Power	15%
Time	5s/25s
Cycle	12
Total Time	6min

## PheRS (LB3L)

(PheRS : pET28a, 40.106Kd, PI = 5.48, coeffi : 0.515)

Old sonicator

New sonicator



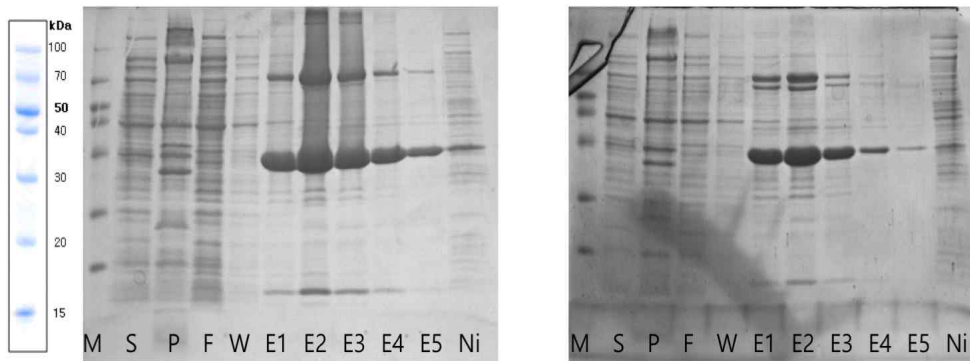
Power	40%
Time	3s/27s
Cycle	16
Total Time	8min

## FabI (LB3L)

(FabI : pET28a, 28.021Kd, PI = 5.64, coeffi : 0.479)

Old sonicator

New sonicator

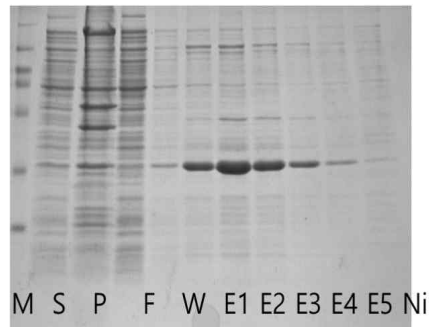
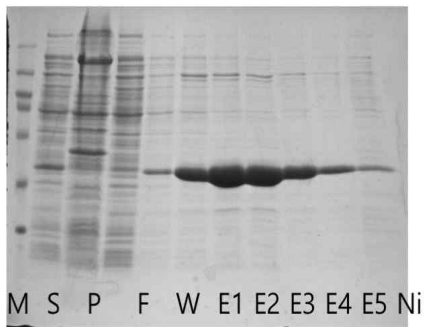


Power	30%
Time	5s/55s
Cycle	24
Total Time	24min

## Pdf-1 (LB1L), Pdf-2 (LB1L)

(Pdf-1 : 183 a.a, pET28a, 20.559Kd, PI=5.68, coeffi : 0.435)

(Pdf-2 : 162 a.a, pET28a, 18.101Kd, PI=4.62, coeffi : 0.329)

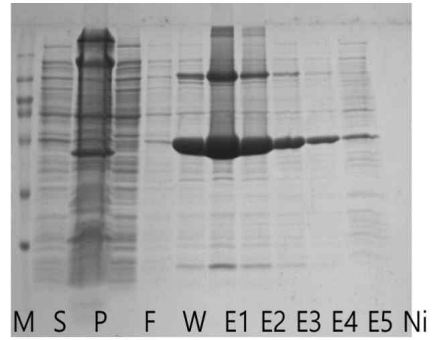
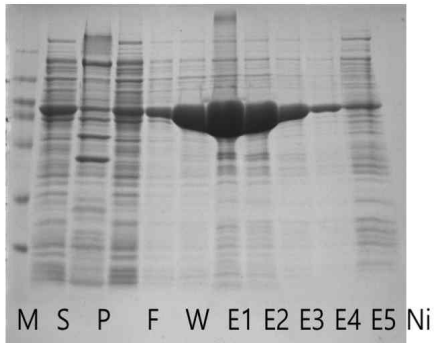




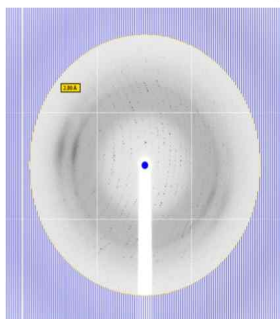
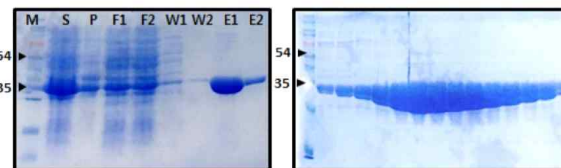
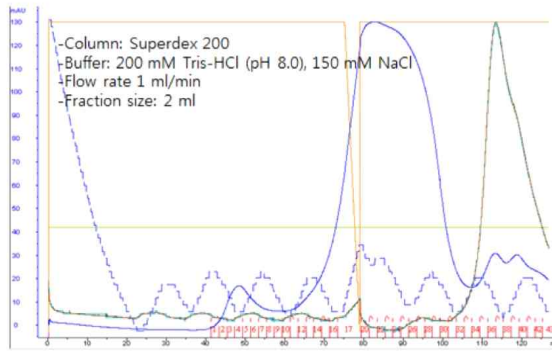
## MurA (LB1L), FabI (LB1L)

(MurA : 419 a.a, pET28a, 45.074Kd, PI=5.49, coeffi : 0.524)

(FabI : 256 a.a, pET28a, 28.021Kd, PI=5.64, coeffi : 0.479)



- pET28a Cloning
- Expression using *E. coli* Expression system
- Cell lysis (sonicator)
- Centrifugation
- His-tag affinity Chromatography -Ni-NTA resin
- Thrombin treatment
- Size exclusion Chromatography -Superdex 200
- Fraction concentration



Shell limit	Lower Angstrom	Upper Angstrom	Average I	Average error	stat. Chi**2	Norm. R-fac	Linear Square R-fac	Rmean	Rpim	CC1/2	CC*
50.00	7.59	1300.6	24.3	14.6	3.481	0.056	0.066	0.063	0.027	0.995	0.999
7.59	6.03	416.9	10.7	8.3	3.331	0.074	0.077	0.082	0.034	0.994	0.999
6.03	5.27	350.9	10.7	9.0	3.328	0.089	0.091	0.099	0.041	0.992	0.998
5.27	4.79	430.3	13.1	10.8	3.605	0.094	0.093	0.105	0.046	0.990	0.997
4.79	4.44	474.1	14.7	12.1	3.716	0.095	0.094	0.107	0.047	0.988	0.997
4.44	4.18	412.3	14.1	12.1	3.575	0.105	0.102	0.117	0.051	0.988	0.997
4.18	3.97	347.9	13.5	11.9	3.350	0.117	0.113	0.130	0.056	0.986	0.997
3.97	3.80	307.0	13.4	12.1	3.086	0.125	0.121	0.140	0.060	0.984	0.996
3.80	3.65	241.3	12.5	11.7	2.869	0.145	0.138	0.161	0.068	0.980	0.995
3.65	3.53	197.3	12.3	11.7	2.644	0.165	0.154	0.183	0.077	0.977	0.994
3.53	3.42	163.2	11.9	11.5	2.593	0.192	0.184	0.212	0.089	0.966	0.991
3.42	3.32	129.4	11.6	11.3	2.391	0.215	0.211	0.238	0.100	0.953	0.988
3.32	3.23	103.8	11.6	11.4	2.241	0.266	0.248	0.295	0.123	0.941	0.985
3.23	3.15	78.8	11.3	11.2	1.972	0.314	0.298	0.347	0.144	0.917	0.978
3.15	3.08	70.9	11.5	11.4	1.853	0.356	0.336	0.394	0.165	0.902	0.974
3.08	3.02	65.5	11.5	11.4	1.857	0.387	0.358	0.429	0.181	0.871	0.965
3.02	2.96	54.9	11.5	11.5	1.807	0.450	0.405	0.498	0.210	0.871	0.965
2.96	2.90	46.1	11.8	11.8	1.732	0.540	0.491	0.599	0.253	0.810	0.946
2.90	2.85	37.7	12.1	12.1	1.653	0.665	0.586	0.739	0.315	0.713	0.913
2.85	2.80	32.0	12.3	12.3	1.545	0.782	0.691	0.870	0.391	0.667	0.895
2.80	2.75	27.7	12.3	12.3	1.448	0.922	0.809	1.000	0.480	0.627	0.881
All reflections		267.3	12.9	11.5	2.628	0.127	0.089	0.141	0.060		

# 극시연구소

## 제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

년도	성과목표	세부목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도(2018 )	극지생물 유래 변형 효소 의 발현 시스 템 구축	○ 극지생물유래 변형 효소 단백질의 full-length 뿐만 아니 라 알려진 domain들 별로 expression constructs 제작 (박 테리아, Insect cell, Mammalian cell expression 용을 각각 제작)	50%	표 적 단 백 질 발현에 성공 했는가?
		박테리아, Insect cell, Mammalian cell expression 시스템을 각각 test하여 최적의 발현 시스템을 찾아내고 구축함	20%	
1차년도(2018 )	극지생물 유래 변형 효소 의 정제 시스 템 구축	○ 다 양 한 chromatography 방 법을 이용하여 각 단백 질을 위한 최적의 정제 시스템 확립	20%	표 적 단 백 질 정제에 성공 했는가?
		정제된 표적 변형효소를 농축하여 구조분석을 위한 준비진행	10%	

성과목표	세부목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
극지생물유래 변형효소의 발현시스템 구축	○ 극지생물유래 변형효소 단백질의 full-length 뿐만 아니라 알려진 domain들 별로 expression constructs 제작 (박테리아, Insect cell, Mammalian cell expression 용을 각각 제작)	1. 표적단백질 DNA 및 단백질 서열분석	표적단백질 서열 및 도메인 2차구조분석하여 단백질 발현에 이상적인 부분을 클로닝함
	박테리아, Insect cell, Mammalian cell expression 시스템을 각각 test하여 최적의 발현 시스템을 찾아내고 구축함	2. 단백질 도메인 및 2차구조분석  3. 클로닝	
극지생물유래 변형효소의 정제 시스템 구축	다양한 chromatography 방법을 이용하여 각 단백질을 위한 최적의 정제 시스템 확립	1. 이상적인 크로마토 그래피 조합을 테스트	이상적인 표적단백질 정제시스템을 구축하기 위하여 다양한 크로마토 그래피 시스템의 조합을 테스트하여 이상적인 시스템을 구축함
	정제된 표적 변형효소를 농축하여 구조분석을 위한 준비진행	2. 최적의 정제 시스템 확립을 위한 크로마토 그래피 조합을 찾고 시스템 구축함	
		1. 단백질 농축 2. 농축기를 이용한 단백질의 농축	4도에서 천천히 농축시켜 구조연구에 필요한 단백질을 정제함

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 가. 학술적 활용계획

- 박테리아 시스템에서 얻기 힘들어 생화학적 연구에 어려움이 있었던 많은 단백질의 발현에 적용 가능
- 극지생물유래 변형효소의 3차구조는 극지생물의 환경적응, 극지생물의 행동이해등의 연구에 많은 도움이 됨
- 고도의 기술력 갖춘 전문인력 확보 및 양성
- 산업재산권 및 지적재산권 확보
- 국내외 타깃 구조기반 신규 항생물질개발연구에 본보기가 될수 있음

### 나. 경제적 활용계획

- 다양한 발현 시스템에 대한 연구 결과는 in vitro에서 단백질을 대량으로 얻기 위한 모든 분야에 적용가능
- 단백질 발현/정제 기술의 개발 및 optimization은 단백질을 정제하여 사용하는 수많은 분야에 파급효과를 가져옴
- 3차구조를 바탕으로 새로운 항생물질을 만들어 내는 인간의 열망에 일조
- 밝혀질 극지생물유래 변형효소의 3차구조는 신규항생물질 개발을 위한 중요한 정보로 사용될것이고 신규항생물질의 경제적 파급효과는 큼.
- 신규항생물질의 개발은 인간의 삶의 질 향상과 막대한 경제적 가치 창출
- 단백질의 3차 구조뿐만 아니라 다양한 융합기술을 구사할 수 있는 우수 바이오 연구인력 양성

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 단백질 발현을 위해 bacmam system 이 보급되어 많이 사용하고 있음
- 표적단백질 정제 시스템에서는 새로운 다양한 affinity tag이 개발되고 있어 향후 이러한 관점에서 단백질 발현 정제시스템을 계속 업데이트 하는 것이 필요해 보임

## 주 의

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