

미각수식단백질 Neoculin의 X선 결정 구조: 단맛과 맛수식 효능을 중심으로

류미라
기능성연구단

Crystal Structure of Neoculin: Insights into its Sweetness and Taste-modifying Activity

Mee-Ra Rhyu

Food Function Research Center

단맛을 나타내는 대부분의 화합물은 저분자물질이지만, thaumatin, monellin 및 brazzein과 같은 몇몇 '단맛단백질'이 알려져 있으며, miraculin과 같이 그 자체로는 아무런 맛을 띠지 않으나 신맛물질의 신맛을 단맛으로 바꾸는 미각수식활성(taste modifying activity)을 나타내는 단백질도 보고되어 있다. 서말레시아 원산의 Curculigo 과일(*Curculigo latifolia*)에 함유된 neoculin은 단맛을 띠는 동시에 신맛을 단맛으로 변환시키는 산(酸)유도성 감미활성(sucrose와 비교할 때 mol 비로 약 1만 배)을 나타내는 미각수식 단백질로 활성본체는 2개의 다른 subunit으로 구성된 heterodimer로, 본 논문의 저자들에 의해 neoculin으로 명명되었다.

東京大學 K. Abe 교수(농학생명과학연구과 응용생명화학전공) group은 미각수식 단백질로서는 세계 최초로 neoculin의 입체구조를 X선 결정 구조해석을 통해 밝히고 이 단백질의 작용 메커니즘을 ligand·수용체의 입체구조를 중심으로 해석함으로써 관련 학계의 큰 주목을 받았다. X선 결정 구조해석은 식품분야에서는 비교적 생소한 기술이지만 단백질 기능 해석을 위한 주된 실험법의 하나로, 특히 미각수식단백질의 기능해석에 최초로 성공적으로 활용되었다는데 본 연구의 큰 의미가 있다.

경제발전과 더불어 삶의 질 향상에 대한 관심이 높아졌으며 최근의 분자생화학적, 신경생리학적 기술의 진보로 식품성분의 혀에서부터

뇌에 이르는 체내 인지 기작에 대한 다양한 정보가 제공됨에 따라 미각에 관한 연구는 최근 주목을 받고 있다. 미각연구는 고열량식이나 식염섭취조절 등을 통한 대사성질환 예방차원에서 새로운 접근법으로 높은 가치를 지니고 있을 뿐 아니라 미각 조절용 새로운 식품 첨가물 개발과 같은, 산업적 가치 또한 매우 높다. 본 연구는 neoculin의 미각수식활성을 ligand·수용체의 입체구조를 통해 해석한 것으로 향후 단맛물질과 관련된 체내기능조절 및 미각조절물질 개발에 필수적인 연구방법을 제시하고 있어 식품학적 견지에서 매우 의미 있는 기술이라 생각된다.

Abe 교수는 이 연구를 비롯한 일련의 분자수준에서의 미각연구에 대한 업적을 인정받아 2009년 4월 22일 AChemS(Association for Chemoreception Sciences)에서 수여하는 “Flavors and Fragrances Award for Outstanding Research on the Molecular Basis of Taste”를 수상하였으며 여기 소개하는 내용은 세계 각국에서 모인 수 백명의 관련 연구자들을 압도한 그날 수상강연 중의 일부내용에 지나지 않는다.

Neoculin의 입체구조에 관한 연구결과는 Journal of Molecular Biology 359, 148-158 (2006)에 보고되어 정보의 신규성 면에서는 시간이 지난 감이 없지 않으나 미각연구분야에서 국제적으로 권위 있는 상을 약 한달 여 전에 수상한 것을 계기로 그 연구기술을 한국 독자에게 소개하는 것은 나름대로의 의미 있는 일이라 생각된다.

본 논문은 The Japanese Journal of Taste and Smell Research(2007. vol 14, No.2, pp.187-192)에 게재된 Neoculin의 X선 결정 구조 해석에 관한 종합적 논고를 토대로 알기 쉽게 옮겨 놓은 것이다.

Neoculin

Neoculin은 113 amino 산 잔기로 구성된 산성 subunit(neoculin acidic subunit, NAS) (pI 4.0-6.0)와 114 amino 산 잔기로 구성된 염기성 subunit (neoculin basic subunit, NBS) (pI 7.5-9.5)이 disulfide 결합으로 결합된 heterodimer를 형성하고 있다. NAS와 NBS는 아미노산 level에서 77%에 이르는 높은 homology를 나타내나 등전점이 크게 다르다. 그 이유로는 두 subunit 간에 산성아미노산 잔기 수에는 차이가 없으나 염기성아미노산 수가 NBS에는 14개인데 반해 NAS에는 7개뿐이며, 또한 NAS에는 N결합형 당쇄부가의 콘센서스배열이 존재하여, 81번째의 Asn 잔기에 부가된 당쇄의 구조도 밝혀져 있으며 최근 대장균 및 국균을 이용한 발현계 구축으로 neoculin의 감미활성 뿐 아니라 미각수식활성도 확인되었다. 입체구조에 대해서는 감미단백질에 대해 보고된 것은 있으나 neoculin이나 동일한 미각수식단백질 miraculin에 대해 보고된 사례는 없으며, neoculin의 경우 이전에 결정화가 시도된 적은 있으나 구조해석에는 이르지 못하였다.

이상과 같은 배경으로 본 논문에서는 감미인식 메커니즘을 입체구조 측면에서 이해하기 위해 X선 결정 구조해석으로 밝힌 neoculin의 입체구조에 대해 설명하고 이어서 분자동력학을 이용한 computer simulation을 실시한 결과, 산성조건하에서의 입체구조변화에 대해 얻은 흥미 있는 결과를 얻었으므로 이에 대해 보고하고자 한다.

X선 결정 구조해석

단백질의 기능을 이해하기 위해서는 그 입체구조의 파악이 필수이다. X선 결정 구조해석은 단백질 입체구조 해석에 있어 일반적인 수법으로, 단백질이 규칙적으로 배열한 결정에 X선을 조사하여 산란시키므로써 분자의 정렬방법과 구조를 얻는 방법이다. 본 논문에서 언급하는 neoculin의 입체구조는 이 X선 결정 구조해석 수법을 이용해 resolution 2.76 Å에서 해석에 성공한 것이다.

1. Neoculin의 전체구조

이번에 밝힌 neoculin heterodimer의 전체구조를 Fig. 1에 나타내었다. 이 구조를 NAS, NBS 각각의 subunit에 대해 살펴보면, 4줄의 β -stands로 구성된 3개의 β sheet가 triangular prism상으로 배치된 구조를 취하고 있다. 모든 β sheet는 역방향이며, 최후의 12번째의 β -stands는 다

른 한쪽의 subunit에서 온 것으로 구성되어 있다. 또한 이 두개의 subunit, NAS, NAB의 구조는 서로 매우 유사하며 양자를 겹쳐보면 거의 일치했다. 이상으로 neoculin은 2개의 구조적으로 유사한 subunit으로 구성된 dimer라는 것이 밝혀졌다.

2. Lectin 구조와 비교

Neoculin과 mannose 결합 lectin의 결정구조에서의 40% 이상의 높은 아미노산 homology에서 추정된 바와 같이 이들 결정구조의 전체적 topology는 매우 유사하였으나 세부적으로는 다음과 같이 큰 차이를 나타내는 부위가 밝혀졌다.

2.1. Disulfide 결합 · C말단 영역

Disulfide 결합에 대해서는 neoculin 분자내의 8개의 모든 cystein 잔기가 disulfide 결합을 형성하고 있어 1 분자 당 4개의 disulfide 결합이 존재했다. 구체적으로는 Cys29-Cys52 사이에 형성된 subunit 내 disulfide 결합이 NAS, NBS 쌍방에 1개씩, 한쪽의 subunit에서 Cys77과 다른 쪽의 Cys109 사이에 형성된 subunit 간 disulfide 결합이 2개로 합계 4개이다. 이중 subunit 내 disulfide 결합은 mannose 결합 lectin에서도 관찰되지만, subunit 간 disulfide 결합은 mannose 결합 lectin에서는 발견되지 않으며 neoculin 특이적인 것이다. 이와 같은 neoculin 특이적인 subunit 간 disulfide 결합 때문에 각 subunit의

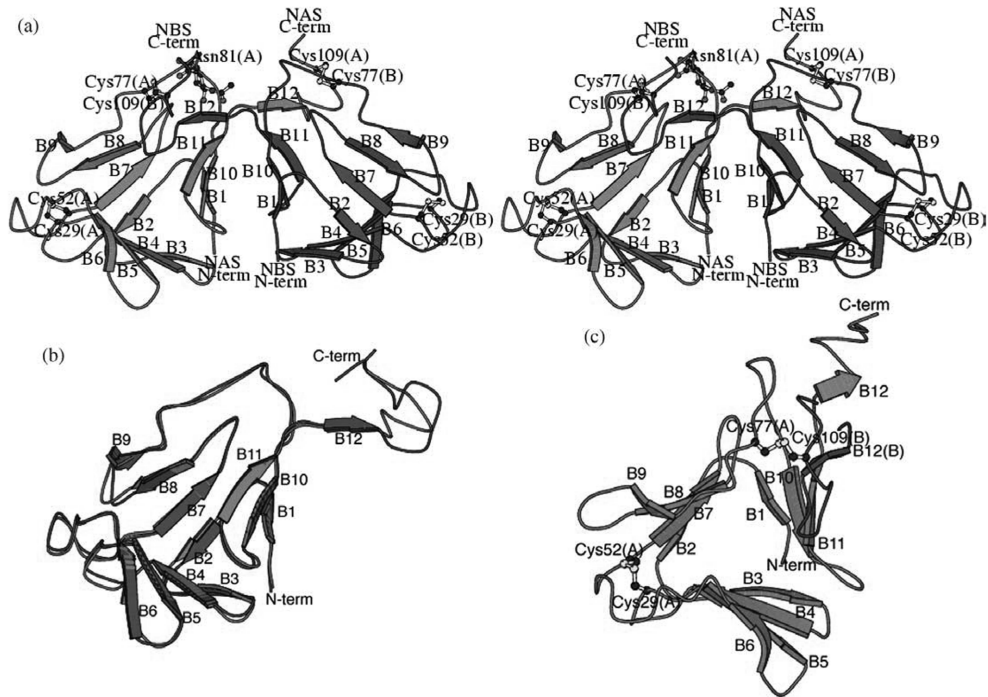


Fig. 1. Ribbon diagram of neoculin. Neoculin acidic subunit (NAS) is shown in pink and neoculin basic subunit (NBS) in blue. (a) Overall structure of neoculin heterodimer. The b-strands in each subunit are labelled from B1 to B12. The cysteine residues forming disulfide bonds and the sugar molecule bound to Asn81 of NAS are shown as ball-and-stick models. (b) Superposition of the two subunits, NAS and NBS. (c) The fold of the neoculin subunit. NAS is shown from the interface of the dimer

C말단 영역은 neoculin과 lectin간에 크게 다른 구조였다. NAS의 1-103잔기, NBS의 1-104잔기와 lectin의 대응하는 영역간의 C^a의 r.m.s.d. (Root Mean Square Deviation: 주쇄의 원자의 변화)는 1.26-1.82 Å이었다. 이에 대해 양자의 C말단 영역간을 포함하는 전체길이의 C^a의 r.m.s.d.은 3.5 Å이상으로 큰 값을 나타내어 C말단 영역의 구조가 neoculin과 lectin은 크게 다르다는 것이 밝혀졌다. 이 차이는 NAS, NBS에서의 12번째 β-stands인 B12가 100-102, 103

잔기의 3-4 잔기로 구성되어있어, 그 C말단 측의 큰 turn은 앞서 설명한 neoculin 특이적 subunit 간 disulfide 결합에 의해 고정되어있는데 반해 lectin에서의 대응하는 C말단 영역은 또 다른 쪽의 subunit 표면에 곧게 뻗어있는 구조 때문에 생겨난 것이었다.

2.2. 정전 potential

Neoculin과 lectin의 구조에서의 큰 차이는 단

백질표면의 정전 potential에서도 나타났다. 1차 구조상, NAS와 NBS에는 5개의 염기성아미노산 잔기만 보존되어있을 뿐이고 NBS와 lectin 사이에는 거의 보존되어 있지 않았다. 이와 같이 분자표면의 아미노산 잔기도 neoculin의 subunit 간, neoculin과 lectin 간에서 모두 보존되어 있지 않기 때문에 이와 같은 정전 potential의 차이가 생기고 있었다.

Lectin의 분자표면은 산성영역이 주이다. 한편 NBS에서는 염기성아미노산 잔기의 불균일성이 특징적이었다. NBS에는 7개의 Arg 잔기, 4개의 Lys 잔기, 3개의 His 잔기의 합계 14개의 염기성아미노산 잔기가 존재하였다. 이들 중 6개(His11, His14, Lys28, Arg47, Arg48, Arg53)는 NBS표면에 있어서 염기성 패치를 형성하고 있었으며 이와 같은 전하를 갖는 아미노산 잔기의 큰 패치는 lectin에서는 볼 수 없는 것이었다.

2.3. Mannose 결합부위

Lectin에서 mannose 결합부위에 대응하는 영역에서도 차이가 보였다. 단자엽식물의 mannose 결합형 lectin에는 각 subunit에 4개씩 보존되어 있는 아미노산 잔기로 된 mannose 결합부위(콘센서스 배열)이 존재한다. NAS, NBS에서 이들에 대응하는 6개의 영역 모두에서 1개의 아미노산 치환이 일어나 있었다. 그래서 neoculin이 mannose 결합능을 갖지 않는 이유는 mannose와의 결합에 필요한 아미노산 잔기가 빠져있기 때문으로 확인되었다.

3. 감미활성 부위

3.1 Neoculin 구조와 다른 감미단백질 입체구조 비교

지금까지 동정되어 온 감미단백질은 아미노산 잔기의 수(54잔기의 brazzein 부터 202잔기의 thaumatin)뿐 아니라, 아미노산 배열상의 homology도 거의 보이지 않았다. 또한 neoculin과 이미 구조가 알려진 감미단백질인 monellin, thaumatin, brazzein 간에는 β -stands가 풍부한 구조라고 하는 대체적인 유사성 이외에는 특징적인 구조상의 유사성은 보이지 않았다. Disulfide 결합도 neoculin은 4줄이라는 많은 disulfide 결합을 가지며, thaumatin, brazzein도 각각 8개, 4개의 disulfide 결합을 가지지만 monellin에는 disulfide 결합은 보이지 않았다. 따라서 neoculin의 전체구조로부터 감미단백질 공통적인 감미활성부위 및 특징은 명확히 밝힐 수 없었다.

3.2 Neoculin 감미활성부위에 대한 고찰

NBS에 존재하는 6개의 염기성아미노산 잔기로 이루어진 단백질 분자표면의 염기성 패취도 neoculin에 특이적으로 보이는 특징이었다. 염기성 패취에 대해서도, thaumatin, brazzein, lysozyme 같은 단백질에서 염기성영역이 감미활성에 기여하고 있다고 보고되었다. 또한 감미단백질 monellin, 미각수식단백질 miraculin도 또한 염기

성단백질이다. 이같은 사실로부터 NBS에서 볼 수 있는 염기성아미노산 패치는 neoculin의 감미활성이나 미각수식활성 어느 쪽인가에, 양쪽 모두에 기여하고 있는 것으로 생각할 수 있다. 이 염기성영역에는 pKa가 6.0인 2개의 His 잔기가 함유되어 있다. Neoculin은 중성영역(pH 7.0)에서 약한 감미활성을 나타내며, 산성영역(pH 3.0)에서 강한 감미가 유도되는 사실에서, pH 3.0부터 pH 7.0 영역에서 하전상태가 변하는 아미노산 잔기가 미각수식활성에 관여할 가능성을 생각할 수 있다. 결국, 상기의 NBS에 보이는 2개의 His 잔기(His11, His14)가 neoculin의 감미·미각수식활성에 중요한 가능성도 있을 것이다. 단, NBS의 homodimer는 감미활성이나 미각수식활성, 어느 쪽의 활성도 갖지 않는 것으로 밝혀져 있으므로, NAS와의 heterodimer인 것이 이들 활성을 갖기 위해 필요한 것으로 생각할 수 있다. 각 subunit의 역할을 밝히기 위해서는 상기 His 잔기, subunit 간에서 보존되어 있지 않은 아미노산 잔기의 각종변이체의 해석이 필수적이다. 변이체 후보로서는 달리, 이들 이외의 3개의 His 잔기, 마찬가지로 산성영역에서 protonation 되기 때문에 미각수식활성의 기여를 생각할 수 있는 Asp 잔기(Glu 잔기는 neoculin에는 존재하지 않음)의 변이체를 생각할 수 있다. 감미활성과 미각수식활성의 활성중심이 같을 가능성도 있지만 어느 쪽이든 한쪽 활성화만을 갖는 변이체를 만드는 일이 가능하다면 활성화 mechanism, 수용체와의 결합 mechanism에 대한 새로운 지견

이 얻어질 수 있음을 기대할 수 있다.

3.3. Neoculin 감미수용(reception)

Neoculin의 감미는 사람 감미수용체(hT1R2-hT1R3)에 의해 수용된다는 사실이 HEK 세포에 의한 calcium imaging법을 사용해 밝혀졌으며 또한 최근 사람 감미수용체에서 neoculin 수용부위를 mouse와 사람의 키메라 수용체(mouse는 neoculin을 수용하지 않음)를 이용해 해석해본 결과, 최소한 hT1R3의 N 말단 세포외 영역이 필요하다는 사실이 시사되었다. 이 이상의 해석을 하기위해 수용체와의 결합 mechanism에 대한 새로운 지견이 앞으로 얻어질 것이 기대된다.

4. 산성조건에서의 Neoculin의 입체구조변화

Neoculin은 산에 의해 감미가 유도되므로 산성조건하에서 입체구조변화를 일으키는 것으로 생각할 수 있다. 여기서 입체구조해석에 이어, 분자동력학을 이용한 computer simulation을 실시하여 pH 의존적인 구조변화에 대해 고찰하였다.

Neoculin heterodimer에는 16개의 Asp 잔기, 5개의 His 잔기가 존재하며, Glu 잔기는 1개도 존재하지 않는다. 또한 결정구조로부터 이들 아미노산 잔기는 중성조건하에서 protonation 되어 있지 않다. 한편으로 그런 분자표면에 존재하고 있어 산성조건하(pH 2.5 부근)에서는 모

든 잔기가 protonation 되는 것으로 생각해, 분자동역학(MD) simulation을 실시하였다.

처음에 generalized Born(GB) model을 사용한 MD simulation을 산성조건, 중성조건에서 실시하였다. 중성조건하의 초기구조를 토대로 얻어진 구조는 결정구조에 가까운 구조였던 것에 비해 Asp 잔기, His 잔기를 protonation 시킨 산성조건하의 초기구조를 토대로 한 것에서는 주로 2개의 구조가 얻어졌다. 1개의 결정구조보다 약간 subunit 사이가 열린 구조로, 다른 하나는 더욱 subunit 간에 크게 열린 구조였다. GB model을 이용한 MD simulation은 근사계산이므로 보다 정확한 계산을 실시하여 선택한 대표구조의 정확도를 검토할 필요가 있다고 생

각했다. 그래서 각각 3개씩의 대표구조를 골라, 주변에 물분자를 배치한 후에 MD simulation을 실시하였다. 그 결과, GB model을 사용한 MD simulation과 같이, 중성조건하에서 neoculin의 입체구조는 결정구조에 가까운데 반해, 산성조건하에서 neoculin의 입체구조는 중성에서의 닫힌구조(closed form)에 비해 subunit 간에 열린 구조(open form)를 취하기 쉬움을 알 수 있었다(Fig. 2).

Open form과 closed form을 비교하면, NAS, NBS의 각 subunit 구조 그 자체를 보존하고 있는데 비해 subunit 간의 거리가 커지는 결과가 되었다. 각 subunit의 1-99 잔기 및 전체에서의 r.m.s.d.를 시간경과와 더불어 구해보았더니 1-

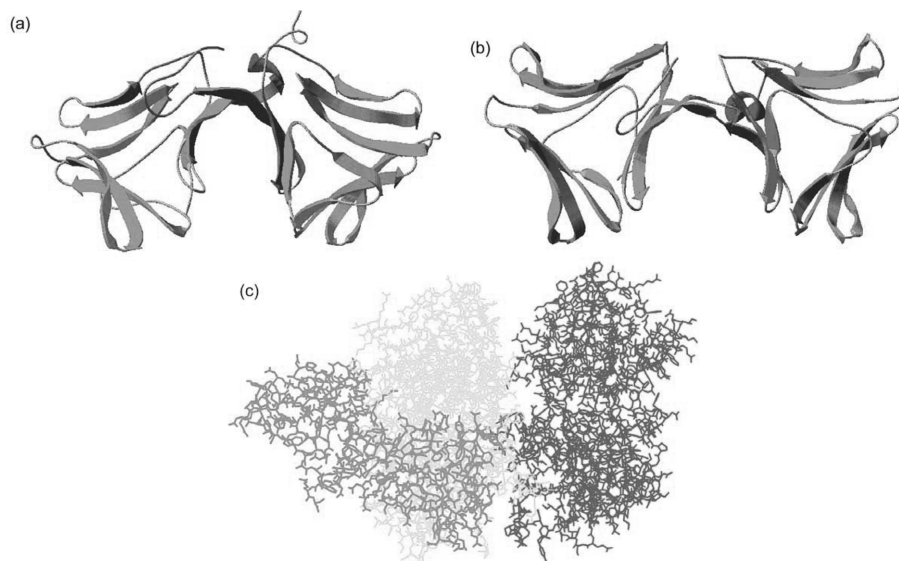


Fig. 2. Representative neoculin structures under two protonation conditions and the docking model between neoculin and hT1R2-T1R3, generated by molecular dynamics simulation. (a) Structure in the unprotonated state. (b) Structure in the protonated state. (c) Docking model between neoculin in the protonated state and hT1R2-T1R3. Neoculin is shown in green, hT1R2 is in magenta, and hT1R3 is in yellow

99 잔기에 대해서는 큰 변화가 보이지 않는 반면, 전체에서의 r.m.s.d.는 변화하였다. 이 결과도 subunit 별로 3차구조가 유지되어 있는 한편, 단백질 전체로서의 입체구조가 변화하고 있음을 시사하고 있다.

이상과 같이 Asp 잔기, His 잔기가 protonation 된 neoculin 분자는 이들 잔기가 protonation 되지 않은 경우에 비해 subunit 간에 열린 구조를 취하기 쉽다는 사실이 밝혀졌다. 또한 2개의 subunit 각각의 구조는 크게 변화하지 않음을 알았으며 구조변화의 주요원인으로 dimer 간의 상호작용의 영향을 생각할 수 있었다. 중성조건에서의 NAS, NBS는 각각 -3, +3의 charge를 가지나 산성조건하에서는 Asp 잔기, His 잔기가 protonation 되면 charge는 +7, +14로 되므로 이와 같은 charge의 변화가 subunit 간의 정전상호작용에 큰 변화를 가져올 것으로 예상되었다. 뿐만 아니라 결정구조로부터 neoculin에서 2개의 subunit 간의 상호작용은 mannose 결합형 lectin에서의 monomer 간의 상호작용에 비해 약한 것으로 나타나, heterodimer 유지에는 neoculin에 특별한 subunit 간의 S-S 결합(Cys77-Cys109)이 크게 기여하고 있음이 시사되었다. 이와 같은 구조상의 특징이 neoculin heterodimer 간에 유연성을 줄 것으로 생각되었다. 산성조건하의 simulation 결과와 같이 neoculin이 각 subunit의 구조는 유지한 채 큰 구조변화를 일으키는 것은 X선 결정 구조해석의 결과로부터도 충분히 일어날 수 있다고 말할 수 있다. 또한 subunit 간의 구조 변화는 charge의 변화

가 원인이라는 성질상, neoculin의 입체구조는 open form과 closed form의 평형상태인 것으로 생각할 수 있다.

Neoculin은 그 자신이 ‘달다’는 성질을 가질 뿐 아니라 산성조건하에서 강한 감미를 나타내는 미각 수식활성을 갖는다. 이번의 분자동역학 simulation에 의해 neoculin이 산성조건하에서 구조변화를 일으키는 것으로 나타나 이것이 미각 수식활성에 강하게 관여할 가능성을 생각할 수 있다. 앞으로는 neoculin의 pH 의존적인 입체구조변화의 실험적인 증명 및 사람 감미수용체와의 상호작용 mechanism 규명이 필수적이다.

결 론

본 논문에서는 미각수식단백질로서 처음으로 neoculin의 X선 결정 구조해석에 성공하고, 이어서 분자동역학 simulation으로 pH 의존적인 입체구조변화에 대해 해석한 결과를 해설하였다. 본 연구 결과로부터 미각수식활성이라는 특수한 활성에 대해 neoculin의 입체구조면에서 이해하는 단서를 찾았다고 말할 수 있다. 그러나 동시에, 전체적인 해석을 위해서는 이제 입구에 선 단계라고 말할 수 있을 것이다. 단백질의 기능을 해명하는데 있어 X선 결정 구조해석은 이미 주류의 방법이지만 단백질복합체나 막단백질에서 성공적으로 적용된 예는 아직 미미한 단계이다. 본 논문에서 취급한 neoculin에 대해서도 감미수용체와의 복합체의 X선 결

정 구조해석에 성공함으로써 처음으로 그 수용 mechanism에 다가갈 수 있다고 생각하고 있다.

참고논문

1. Shirasuka Y, Nakajima K, Asakura T, Yamashita H, Yamamoto A, Hata S, Nagata S, Abo M, Sorimachi H, Abe K, Neoculin as a new taste-modifying protein occurring in the fruit of *Curculigo latifolia*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1403-1407, 2004
2. Suzuki M, Kurimoto E, Nirasawa S, Masuda Y, Hori K, Kurihara Y, Shimba N, Kawai M, Suzuki E, Kato K, Recombinant curculin heterodimer exhibits taste-modifying and sweet-tasting activities, *FEBS Lett.*, **573**, 135-138, 2004
3. Nakajima K, Asakura T, Maruyama J, Morita Y, Oike H, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Sorimachi H, Arai S, Kitamoto K, Abe K, Extracellular production of neoculin, a sweet-tasting heterodimeric protein with taste-modifying activity, by *Aspergillus oryzae*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **72**, 3716-3723, 2006
4. Harada S, Otani H, Maeda S, Kai Y, Kasai N, Kurihara Y, Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of curculin. A new type of sweet protein having taste-modifying action, *J. Mol. Biol.*, **238**, 286-287, 1994
5. Shimizu-Ibuka A, Morita Y, Terada T, Asakura T, Nakajima K, Iwata S, Misaka T, Sorimachi H, Arai S, Abe K, Crystal structure of neoculin: insights into its sweetness and taste-modifying activity, *J. Mol. Biol.*, **359**, 148-158, 2006
6. Kaneko R, Kitabatake N, Structure-sweetness relationship in thaumatin: importance of lysine residues, *Chem. Senses*, **26**, 167-177, 2001
7. Jin Z, Danilova V, Assadi-Porter FM, Aceti DJ, Markley JL, Hellekant G, Critical regions for the sweetness of brazzein, *FEBS Lett.*, **544**, 33-37, 2003
8. Masuda T, Ide N, Kitabatake N, Structure-sweetness relationship in egg white lysozyme: role of lysine and arginine residues on the elicitation of lysozyme sweetness, *Chem. Senses*, **30**, 667-681, 2005
9. Nakajima K, Asakura T, Oike H, Morita Y, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Sorimachi H, Arai S, Abe K, Neoculin, a taste-modifying protein, is recognized by human sweet taste receptor, *Neuroreport*, **17**, 1241-1422, 2006
10. Koizumi A, Nakajima K, Asakura T, Morita Y, Ito K, Shimizu-Ibuka A, Misaka T, Abe K, Taste-modifying sweet protein, neoculin, is received at human T1R3 amino terminal domain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 585-589, 2007

류미라 농학박사

- 소속 한국식품연구원 기능성연구단
- 전문분야 식품화학, 식물성여성호르몬,
식품의 맛과 미각 연구
- E-mail mrrhyu@kfri.re.kr
- TEL 031-780-9268