

Deinococcus radiodurans 박테리오피토크롬 특이 항체들의 생산

김태림 · 한태룡 · 부성희*
경희대학교 생명공학원 식물대사연구센터

Production of Bacteriophytochrome Specific Antibodies of *Deinococcus radiodurans*

Tae-Lim Kim, Tae-Ryong Hahn and Seong Hee Bhoo*

Graduate School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea

Received April 19, 2010; Accepted April 27, 2010

To analyze the surface properties of bacteriophytochrome (BphP), five (2B8, 2C11, 3B2, 3D2, 3H7) anti-BphP monoclonal antibodies were produced by using full-length of BphP of *Deinococcus radiodurans*. 2B8 and 2C11 preferentially recognized the epitopes at N-terminal region of BphP, whereas 3B2, 3D2 and 3H7 showed preferential affinities to the epitopes of C-terminal region of BphP.

Key words: bacteriophytochrome, *deinococcus radiodurans*, monoclonal antibody

피토크롬은 외부의 빛 신호를 흡수하여 하부에 신호를 전달할 수 있는 photo-sensory protein이다. 식물 피토크롬은 최고 660 nm 파장의 원적색광을 흡수할 수 있는 생물학적으로 활성화된 Pfr 형태와 최고 730 nm 파장의 적색광을 흡수할 수 있고 생물학적으로 비활성화된 상태인 Pr 형태가 가역적으로 photoconversion 될 수 있기 때문에 상황에 따라 하부에 다양한 신호를 전달하는 스위치 역할을 한다[Vierstra과 Davis, 2000]. 식물 피토크롬은 일반적으로 P2/PAS, P3/GAF, P4/PHY domain들이 N-terminal photosensory core domain(PCD)을 구성하고 있으며, C-terminal 조절 부분은 protein kinase domain으로 이루어져 있다[Wanger JR, 2005]. Linear tetrapyrrole인 bilin은 피토크롬의 N-terminal chromophore binding domain(CBD)에 공유결합하여 빛의 인식과 photoconversion을 가능하게 한다[Karniol 등, 2005].

피토크롬은 기존의 이론에서는 고등식물에만 존재한다고 알려져 있었으나 최근 cyanobacteria, proteobacteria, actinobacteria, fungi, slime mould 등에서 여러 가지 피토크롬 유사 광수용체들이 발견되었다. 특히, 그 중 heterotrophic eubacteria인 *Deinococcus radiodurans*과 *Pseudomonas aeruginosa* 등에서 발견된 피토크롬 유사 광수용체들을 BphP이라 명명하였다. 이들 중 *Deinococcus radiodurans* BphP(DrBphP)은 755 아미노

산들로 구성되어 있다[Davis 등, 1999]. BphP는 식물 피토크롬과 유사한 N-terminal 부위 구조로 구성되어 있으나 C-terminal 부위에는 식물 피토크롬과는 다른 histidine kinase domain(HKD)이 존재하고 있다[Karniol 등, 2005; Giraud과 Verméglio 2008]. 그리고 DrBphP는 biliverdin(BV)과의 결합 시 다른 요소의 도움이 없이 결합하여 가역적인 Pr/Pfr isoform을 형성한다[Vierstra과 Davis, 2000; Bhoo 등, 2001; Rockwell 등, 2006].

BphP의 구조 및 기능에 대한 연구가 활발하게 진행 중인데 최근 DrBphP의 C-terminal PHY domain이 spectral integrity과 단백질 안정성 유지에 필요하며 chromophore의 잔기의 변화는 Pfr 상태에 영향을 미치며 photoconversion의 proton exchange cycle에 영향을 준다고 보고된바 있다[Yoon 등, 2008; Wanger 등, 2008]. 또한 *Pseudomonas aeruginosa* BphP(PaBphP)의 PCD의 크리스탈 구조 연구를 통해서 BV chromophore의 configuration 안정화에 중요한 역할을 하는 잔기들과 구조가 알려졌고[Yang 등, 2008; 2009], DrBphP는 CBD의 Pr 상태에서의 구조가 밝혀졌다[Wanger 등, 2005; Wanger 등, 2007; Yang 등, 2007]. 하지만 DrBphP의 경우 PHY domain이 빠진 상태의 불완전한 photoconversion을 보이는 CBD만의 구조만이 알려졌을 뿐이고 나머지 구조에 대해서는 아직 잘 밝혀진 바가 없다. 따라서 DrBphP의 나머지 부위에 대한 구조 연구가 더 필요하다. 이러한 구조 및 기능 연구에는 항원생성기 mapping 등에 항체를 이용하기도 하는데 현재까지 DrBphP에 대한 특이적 단일클론성 항체를 제작했다는 보고는 전무한 상태이다. 최근 우리는 DrBphP에 대한 5개의 단일클론성 항체를 생산하였고 이들은 각각 N-terminal과 C-terminal 부위에 나누어 다른

*Corresponding author
Phone: +82-31-201-2434; Fax: +82-31-201-2157
E-mail: shbhoo@khu.ac.kr

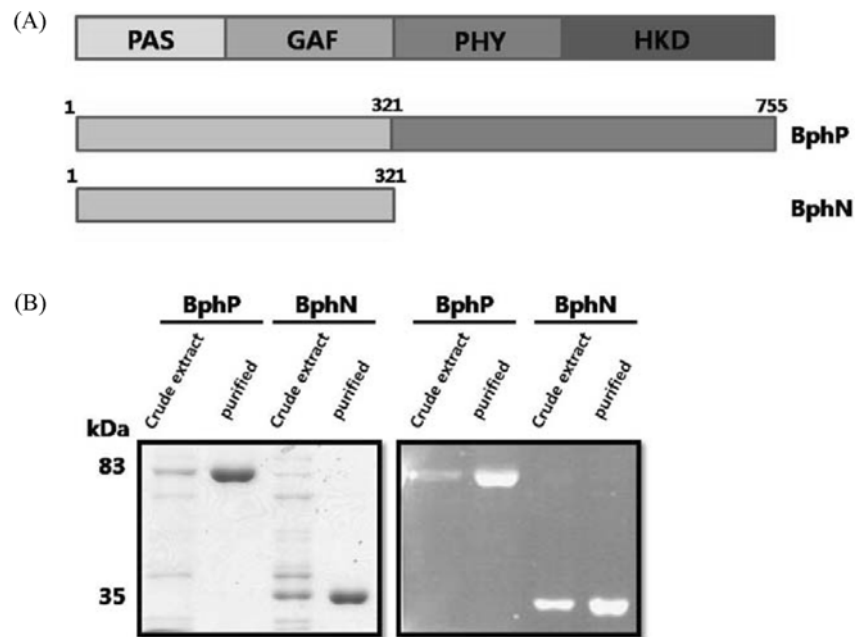


Fig. 1. Purification of DrBphP and DrBphN by Normal His tag column chromatography. (A) Schematic representation of the constructs used for BphP expression. FL, full-length (1-755 amino acid, BphP); ΔPHY/HKD (1-321 amino acid, BphN) (B) BphP and BphN apoprotein were purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography and, incubated with BV for 20 min. Then it was subjected to SDS-PAGE and either detected for the bound BV by zinc-induced fluorescence (right) or stained for protein with Coomassie Blue (left). 1: Crude extract of BphP, 2: Purified BphP, 3: Crude extract of BphN, 4: Purified BphN. Purification Condition -Binding & Washing: pH 8.0, 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazole -Elution: pH 8.0, 100 mM Tris, 200 mM NaCl, 150 mM Imidazole

항원생성기를 인식하여 작용한다는 것을 확인하였다. 이 5개의 항체들은 아직 밝혀지지 않은 DrBphP의 구조 및 기능을 파악 하는데 유용할 것으로 기대한다.

우리는 전체 길이의 DrBphP 유전자와 DrBphP의 N-terminal 부위의 1~321 아미노산까지의 BphN 유전자를 pET28 vector에 삽입하였고(Fig. 1A), BL21 competent cell을 이용하여 대장균에서 발현시켰다. 그 후 pET28 vector에 포함된 His tag 단백질을 이용하여 Ni²⁺-NTA affinity chromatography(QIAGEN)으로 단백질 정제를 수행하였다. 이 발현된 BphP 단백질과 BphN 단백질에는 BV의 결합에 중요한 역할을 하는 PAS와 GAF domain 및 Cys-24 잔기가 모두 포함되어 있기 때문에 그 자체로만으로 BV와의 결합이 가능하다. 이는 zinc blot을 통해 단백질의 발현과 정제를 쉽게 확인할 수 있다. 따라서 우리는 정제된 BphP 단백질과 BphN 단백질에 BV를 첨가하여 10분간 상온에서 항온처리 시킨 후 SDS-PAGE를 수행하였고 그 후 coomassie staining과 zinc blot을 실시하였다. 그 결과 BphP, BphN 단백질의 발현 및 정제를 확인할 수 있었다(Fig. 1B).

우리는 ATGEN에 BphP에 대한 단일클론성 항체의 제작을 의뢰하였고 그 결과 5개의 단일클론성 항체 후보를 만들어냈다. 생후 6주된 female BALB/c 마우스의 복강에 항원을 Complete Freund's adjuvant와 혼합하여 intra peritoneal injection을 실시한 후 마우스를 희생시켜 B림프구와 골수종 세포를 혼합하여 세포융합 시켜 배양하였다. 그 후 HAT배지와 HT배지를 같이주며 ELISA에 의해 융합세포의 항체생성을 확인하였다. Fusion plate ELISA 테스트를 실시하여 총 24개의 후보 클론을 항원으로 injection 하였던 BphP 단백질과 BphN

단백질로 다시 ELISA 테스트하여 그 결합 정도를 확인하였다(Table 1). 그 결과 2B8, 2C11 클론은 BphP 단백질과 BphN 단백질에서 모두 비슷한 높은 수치로 발색되는 것으로 보아 BphP 단백질의 N-terminal 부위를 인식하는 것으로 보이는 결과가 나왔다. 하지만 3B2, 3D2 클론은 BphP 단백질에서는 높은 수치를 보이고, BphN 단백질에서는 0에 가까운 수치를 나타내는 것으로 보아 BphP 단백질의 C-terminal 부위를 인식하는 것으로 보였다. 이들과는 다르게 3H7의 경우에는 BphP 단백질에서 높은 수치를 보이고 BphN 단백질에서도 어느 정도의 낮은 수치를 나타내는 것으로 보아 BphP 단백질 C-terminal 쪽 외에 N-terminal 부위도 어느 정도 인식하는 것으로 추정되었다. 그 후 이 5개의 클론에 대하여 1st cloning plate ELISA 테스트, 2nd cloning plate ELISA 테스트를 실시하였고 최종적으로 ascites를 생성하여 항체의 정제를 진행하였다. 그 결과 5개의 단일클론성항체를 확보하였다.

우리는 정제가 된 항체들이 우리가 발현 및 정제한 BphP 단백질과 BphN 단백질에 대해서도 같은 결과로서 적용되는지 확인해보기 위하여 Western blot을 실시하였다 정제된 BphP 단백질과 BphN 단백질 5 mg에 대한 각각의 단일클론성 항체들을 1st 항체로서 2% skim milk에 대해 1:1000의 비율로 사용한 후 2nd 항체로서 HRP-mouse 항체(SIGMA)를 1:10000 비율로 처리 하여 Western blot을 실시하였다. 그 결과, 2B8과 2C11은 ELISA 테스트와 마찬가지로의 결과로 BphP 단백질과 BphN 단백질 모두 결합하는 결과가 나왔다(Fig. 2). 따라서 이 2가지는 모두 BphP의 N-terminal 부위에 결합하는 것이라고 생각할 수 있었다. 그리고 3B2, 3D2는 BphP 단백질에 대해서는 band가

Table 1. Fusion plate ELISA confirm (250 ng/well Full and N-terminal protein coating). The measurement of intensity of 24 clones

Clone	Full	N	P(full)	Clone	Full	N	P(full)
1B6	1.0910	0.0660	1.3190	3C11	2.2030	1.9730	2.2590
1B11	2.3120	0.1560	2.3700	3D2	2.2350	0.0640	2.2830
1D6	2.1260	0.0550	2.3180	3D10	2.3910	0.1180	2.4280
2B8	2.2720	2.3400	2.4200	3D11	1.9360	1.6850	2.3130
2C11	2.2890	2.3480	2.4040	3F10	2.3590	0.0730	2.3570
2D9	2.1810	0.1430	2.2730	3G2	1.6760	0.0880	2.0510
2E3	1.5320	2.1720	1.8020	3G9	1.5370	0.0800	1.5580
2F7	2.3100	0.1220	2.4430	3H1	1.8520	1.7840	2.0950
2H8	1.0680	0.0650	1.3440	3H7	2.2620	0.4640	2.3490
3A4	2.2530	1.9180	2.3770	4B7	2.1590	1.9730	2.2620
3B2	2.1510	0.0980	2.2900	4E2	2.4060	0.2050	2.3770
3B3	1.9800	0.0700	2.1650	4E3	2.1900	0.0550	2.2650

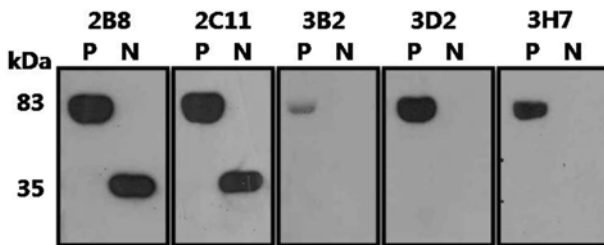


Fig. 2. Western blot analysis of selected monoclonal antibodies using purified BphP and BphN proteins. Purified BphP and BphN were subjected to SDS-PAGE and performed the Western blotting by purified monoclonal antibodies of Bphp (2B8, 2C11, 3B2, 3D2, 3H7). P; BphP, N; BphN

나왔으나 BphN 단백질에 대해서는 band가 나오지 않는 것으로 보아 BphP 단백질의 C-terminal 부위에 결합할 것이라는 결과를 얻을 수 있었다. 하지만 3H7의 경우에는 ELISA 테스트에서의 결과와는 다르게 오로지 BphP 단백질만을 인식하는 결과가 나왔다. 따라서 3H7은 BphP 단백질의 C-terminal 부위에만 결합한다는 것으로서 ELISA 테스트에서와는 다른 결과가 나왔다. 또한 각각의 항체들의 결합정도는 N-terminal 부위에 결합하는 2B8, 2C11이 가장 강하게 결합하였으며 C-terminal 부위를 인식한다고 생각되는 3D2는 그보다는 약하게 인식하는 band를 보였다. 그 다음으로 3H7, 3B2 순으로 강하게 결합하는 band가 나왔다. 따라서, 이 단일클론성 항체들은 C-terminal 부위보다는 N-terminal 부위의 항원생성기를 인식하는 것들이 더 강하게 결합하는 것으로 보인다.

이 항원결정기 mapping의 결과는 우리가 확보한 5개의 단일클론성 항체들이 BphP 단백질의 N-terminal 부위와 C-terminal 부위로 나누어 여러 가지 항원결정기를 인식하여 결합한다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이 5개의 단일클론성 항체들을 이용하여 아직 밝혀지지 않은 DrBphP의 표면구조와 역할을 알아가는데 도움이 될 수 있을 것이다. 특히, 3B2, 3D2, 3H7같은 C-terminal 부위에 붙는 항체의 경우는 아직 DrBphP의 Histine kinase domain(HKD)의 구조에 대한 연구가 더 필요하기 때문에 더욱 의미가 있다고 생각한다. DrBphP는 식물 피토크롬과 유사한 구조를 가지고 있는데, 특히 N-terminal 부위를 구성하는 PCD는 둘 다 모두 PAS, GAF, PHY domain을 포함

하는 매우 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 이 항체들의 Oat 피토크롬 단백질에서의 반응 여부를 확인해보았다. 하지만 이러한 BphP 단일클론성항체들은 5가지 모두 Oat PhyA와 Oat PhyB에는 결합하지 않는 결과를 보였다(Data not shown). 따라서 이 5개의 항체들은 기존의 Oat 피토크롬 항체들과는 다른 항원생성기를 인식하는 BphP 특이적인 새로운 항체임을 확인할 수 있었다. 하지만 이들은 다른 eubacteria들(*Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas putida* 등)의 BphP에는 결합 여부는 아직 확인해 볼 필요는 있다고 생각한다. 현재 DrBphP의 구조는 Pr form에서의 PAS와 GAF를 포함하는 PCD의 구조만이 밝혀졌었고, 그 후 PaBphP에서의 Pfr 형태에서의 PAS, GAF, PHY까지의 PCD의 구조가 밝혀지면서 photoconversion시의 chromophore binding 구조의 변화를 예상할 수 있게 되었다 [Yang 등, 2008; 2009]. 또한 Oat PhyA같은 경우에는 Pr형태와 Pfr형태전환에 따른 구조변화로 인하여 항원생성기와 단일클론성 항체간의 그 결합 친화도에 차이를 보인다고 보고된 바 있다[Natori 등, 2007]. 하지만 DrBphP의 경우 아직 PHY와 HKD의 구조 및 photoconversion시의 BphP 각 domain의 구조에 변화 대해서 정확히 밝혀진 것은 아니다. 따라서 우리가 확보한 5개의 단일클론성 항체들은 서로 다른 위치에 존재하는 항원생성기들을 인식할 것이라고 생각되기 때문에 앞으로 항원생성기 mapping등을 통하여 각각의 항체에 대한 인식부위를 확인하게 된다면 해당 domain의 구조 및 기능 연구에 유용하게 사용될 것으로 보인다. 또한 DrBphP의 photoconversion시의 결합 정도의 변화를 통해 구조 변화를 연구하는데 도움이 될 수 있다고 생각된다.

감사의 글

This work was supported by a grant from the KyungHee University in 2004(KHU 20040053)

참고문헌

Bhoo SH, Davis SJ, Walker J, Karniol B and Vierstra RD (2001) Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using

- a biliverdin chromophore. *Nature* **414**, 776-779.
- Davis SJ, Vener AV, and Vierstra RD (1999) Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* **286**, 2517-2520.
- Giraud E and Verméglio A (2008) Bacteriophytochromes in anoxygenic photosynthetic bacteria. *Photosynth Res* **97**, 141-153.
- Natori C, Kim JI, Bhoo SH, Han YJ, Hanazawa H, Furuya M and Song PS (2007) Differential interactions of phytochrome A (Pr vs. Pfr) with monoclonal antibodies probed by a surface Plasmon resonance technique. *Photochem Photobiol Sci* **6**, 83-89.
- Karniol R, Wanger JR, Walker JM and Vierstra RD (2005) Phylogenetic analysis of the phytochrome superfamily reveals distinct microbial subfamilies of photoreceptors. *Photosynth Res* **392**, 103-116.
- Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 837-858
- Vierstra RD and Davis SJ (2000) Bacteriophytochrome: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* **11**, 511-521.
- Wanger JR, Bruzelle JS, Forest KT and Vierstra RD (2005) A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome. *Nature* **438**, 325-331.
- Wanger JR, Zhang J, Bruzelle JS, Vierstra RD and Forest KT (2007) High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J Biol Chem* **282**, 12298-12309.
- Wanger JR, Zhang J, Stetten DV, Günther M, Murgida DH, Mroginski MA, Walker JM, Forest KT, Hildebrandt P and Vierstra RD (2008) Mutational analysis of *Deinococcus radiodurans* bacteriophytochrome reveals key amino acids necessary for the photochromicity and proton exchange cycle of phytochromes. *J Biol Chem* **283**, 12212-12226.
- Yang X, Stojkovic EA, Kuk J, Moffat K (2007) Crystal structure of the chromophore binding domain of an unusual bacteriophytochrome, RpBphP3, reveals residues that modulate photoconversion. *P Natl Acad Sci USA* **104**, 12571-12576.
- Yang X, Kuk J and Moffat K (2008) Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: Photoconversion and signal transduction. *P Natl Acad Sci USA* **105**, 14715-14720.
- Yang X, Kuk J and Moffat K (2009) conformational differences between the Pfr and Pr states in *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome. *P Natl Acad sci USA* **106**, 15639-15644.
- Yoon JM, Hahn TR, Cho MH, Jeon JS, Bhoo SH and Kwon YK (2008) The PHY domain is required for conformational stability and spectral integrity of the bacteriophytochrome from *Deinococcus radiodurans*. *Biochem Bioph Res Co* **369**, 1120-1124.