

아미노-말단 리보플라빈 생성효소 단백질의 형광 특성

김류련 · 이정환 · 남기석 · 고경원 · 이찬용*

충남대학교 생화학과

Spectrofluorometric Characteristics of the N-Terminal Domain of Riboflavin Synthase

Ryu-Ryun Kim, Jeong-Hwan Yi, Ki Seok Nam, Kyung Won Ko, and Chan Yong Lee*

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Republic of Korea

(Received February 17, 2011 / Accepted March 23, 2011)

Riboflavin synthase catalyzes the formation of one molecule of each riboflavin and 5-amino-6-ribitylamino-2,4-pyrimidinedione by the transfer of a 4-carbon moiety between two molecules of the substrates, 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine. The most remarkable feature is the sequence similarity between the N-terminal half (1-97) and the C-terminal half domain (99-213). To investigate the structure and fluorescent characteristics of the N-terminal half of riboflavin synthase (N-RS) in *Escherichia coli*, more than 10 mutant genes coding for the mutated N-terminal domain of riboflavin synthase were generated by polymerase chain reaction. The genes coding for the proteins were inserted into pQE vector designed for easy purification of protein by 6X-His tagging system, expressed, and the proteins were purified. Almost all mutated N-terminal domain of riboflavin synthases bind to 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine and riboflavin as fluorescent ligands. However, N-RS C47D and N-RS ET66,67DQ mutant proteins show colorless, indicating that fluorescent ligands were dissociated during purification. In addition, most mutated proteins show low fluorescent intensity comparing to N-RS wild type, whereas N-RS C48S posses stronger fluorescent intensity than that of wild type protein. Based on this result, N-RS C48S can be used as the tool for high throughput screening system for searching for the compound with inhibitory effect for the riboflavin synthase.

Keywords: fluorescence, lumazine, riboflavin, riboflavin synthase, vitamin B₂

Vitamin B₂로 널리 알려진 리보플라빈(riboflavin)은 다양한 종의 세균, 곰팡이 및 녹색 식물에서 합성되지만, 동물들은 합성할 수 없으므로 이들로부터 섭취해야 한다(11). 리보플라빈의 생리적 활성화된 형태인 FMN (flavin mononucleotide)과 FAD (flavin adenine dinucleotide)는 조효소로서, 호흡에 관여하는 여러 가지 flavo-protein 등 대사 작용에서 많은 부분을 차지하는 산화-환원 작용에서 전자 운반체(electron carrier)의 중요한 역할을 수행한다(4, 11).

리보플라빈 생합성 과정의 가장 마지막 단계에서 작용하는 리보플라빈 생성효소(riboflavin synthase)는 기질인 두 분자의 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine과 결합 후, 매우 독특한 자리 옮김(dismutation) 반응을 거쳐(Fig. 1), 한 분자의 리보플라빈과 한 분자의 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione

을 만들어 낸다(5, 18, 19). 이때 생겨난 피리미딘 유도체는 다시 리보플라빈 생합성 과정에 재사용된다. 리보플라빈 생성효소의 활성화 부위(active site)에는 제공 부위(donor site)와 수용 부위(accepter site)가 존재한다(4, 10). 두 부위에 각각 한 분자의 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine이 결합되면, 제공 부위의 친핵성 잔기에 의하여 효소 반응이 개시되며, 제공 부위의 4-탄소 단위(4-carbon unit)가 수용 부위로 이동하여, 결과적으로 제공 부위에는 pyrimidine 유도체, 수용 부위에는 리보플라빈이 생성된다(1, 4)(Fig. 1).

대장균(*Escherichia coli*) 리보플라빈 생성효소의 아미노-말단 도메인 절반(N-terminal domain half)과 카복시-말단 도메인 절반(C-terminal domain half)의 내부 자체 아미노산 서열(intra-molecular amino acid sequence)은 매우 유사하다(2, 3, 20). 아미노-말단 도메인(N-RS)의 아미노산 1-97 잔기의 서열과 카복시-말단 도메인(C-RS)의 아미노산 98-213 잔기의 서

* For correspondence. E-mail: cylee@cnu.ac.kr; Tel: +82-42-821-5482; Fax: +82-42-822-7548

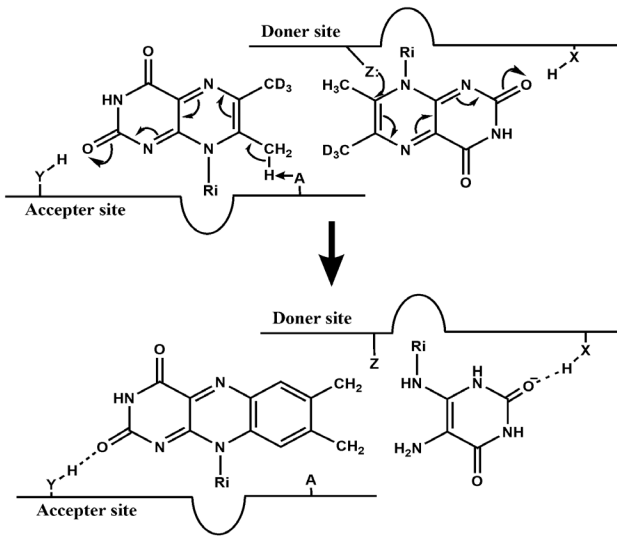


Fig. 1. Reaction mechanism of riboflavin synthase. The first steps of the reaction mechanism proposed by Beach and Plaut (1), where XH and YH are hydrogen bond donors on the protein. Z is a nucleophile and A is a proton acceptor.

열을 비교하면, 24개의 아미노산이 동일하며 20개의 아미노산이 유사하다(Fig. 2). 따라서, 이 효소는 위상학적으로 매우 비슷한 두 개의 도메인으로 접히게 되며(10, 14), 두 개의 동일한 기질이 리보플라빈 생성 효소의 기질로 작용하므로 기질은 아미노-말단 도메인과 카복시-말단 도메인에 대해 비슷한 결합 능력을 가짐을 예측할 수 있다.

리보플라빈 생성효소를 X-선 결정학 방법으로 규명한 구조에서도 아미노-말단과 카복시-말단 도메인의 기질 결합 부위는 위상학적으로 근접한 위치에서 매우 유사하게 접히게 된다(10, 21). 이러한 정보는 각각의 도메인에 한 분자씩의 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine 기질이 결합함을 지지하지만(5, 8),

이러한 결과가 아미노-말단 혹은 카복시-말단 중 어느 쪽이 공여 부위 혹은 수용 부위로 작용하는지 등에 대한 리보플라빈 생성효소와 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine 사이의 상호작용에 관한 중요한 직접적인 정보를 아직도 제시해주지 못하고 있다. 특이한 점은, 단백질의 4차 구조가 동종삼량체(homotrimer)인 리보플라빈 생성효소는 달리(2, 21), 아미노-말단 도메인의 리보플라빈 생성효소(N-RS)는 동종이량체(homodimer)의 상태로 존재한다는 점이다(14, 21).

이 논문에서는 형광을 띠는 최소 단위의 형광 단백질 발굴의 일환으로 변이된 아미노-말단 도메인의 리보플라빈 생성효소의 단백질들의 형광의 관찰을 통한 리간드와의 결합세기, 고속다중 스크리닝 법(high-throughput screening system), 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer)로서의 응용 가능성 등을 조사하고자 대장균 리보플라빈 생성효소의 아미노-말단 도메인의 다양한 돌연변이 단백질을 코딩하는 유전자들을 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 활용한 위치지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 통하여 증폭시킨 후, pQE30 벡터에 삽입한 재조합 플라스미드를 제조하고, 발현시켜 그 단백질들을 분리-정제하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

제한효소와 T4 DNA ligase는 New England Biolabs (USA) 제품을 사용하였으며 DNA polymerase는 GeNet Bio (Korea) 제품을 사용하였고, 프라이머들은 Genotech (Korea)에 합성을 의뢰했다.

균주 및 플라스미드

E. coli XL-1 Blue는 클로닝 균주로, *E. coli* M15은 단백질 발현 균주로 사용되었다. 또한 pQE30 플라스미드(QIAGEN,

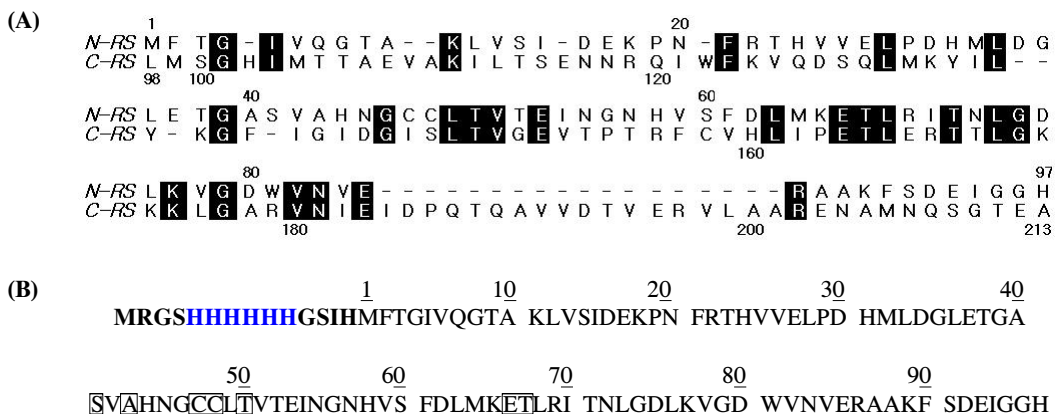


Fig. 2. (A) Amino acid sequence similarity between N-terminal and C-terminal half of riboflavin synthase (RS) from *E. coli*. Identical amino acid sequences are shown in shadowed typeface. (B) 6X-His-tagged N-RS amino sequences. The attached 6X-His tagged amino sequences from pQE30 are shown in bold. The boxed amino acids were changed to relevant amino acids by site-directed mutagenesis. The numbers are the position of amino acid from original N-terminal domain of riboflavin synthase.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains/Plasmids	Relevant characteristics	Source
Strains		
<i>E. coli</i> XL-1 Blue	Cloning strain	Stratagene
<i>E. coli</i> M15[pREp4]	Expression strain	QIAGEN
Plasmids		
pQE30	Expression vector	
pERN	pNCO113 containing the gene for the wild type N-terminal domain of <i>E. coli</i> riboflavin synthase	Reference 3
pERN-A43L	pNCO113 containing the gene for the A43L mutant N-terminal domain	Reference 9
pERN-C48S	pNCO113 containing the gene for the C48S mutant N-terminal domain	Reference 9
pERN-ET66,67DQ	pNCO113 containing the gene for the ET66,67DQ mutant N-terminal domain	Reference 9

USA)를 클로닝과 단백질 발현 벡터로 사용했다(Table 1).

배양액 및 배양조건

대장균(*Escherichia coli*)은 ampicillin (100 µg/ml)과 kanamycin (25 µg/ml)이 첨가된 Luria-Bertani (LB) 배지에서 배양하였다. 재조합 *E. coli* 균주들은 37°C에서 600 nm의 흡광도가 0.6이 될 때까지 배양한 후, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 최종 농도 0.1 mM 되게 첨가하고 30°C에서 7시간 동안 추가적으로 배양시켜 단백질 발현을 유도하였다. 세포추출물들은 원심분리를 통해 얻은 뒤, -75°C 초저온냉장고에 보관했다가 필요 시에 녹여 사용하였다.

위치지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)에 의한 돌연변이 단백질의 제조

기존의 pNCO 벡터에 포함되어 있던 N-RS 야생형 및 N-RS A43L, N-RS C48S, N-RS ET66,67DQ 등의 돌연변이 단백질을 코딩하는 유전자들(9) 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머를 활용하여 PCR로 증폭시킨 후 pQE30 벡터에 삽입되었다(Table 1). 중합효소 연쇄반응에 의한 DNA 증폭 중 생길 수 있는 돌연변이 오류를 최소화하기 위하여 교정(proof-reading) 기능을 지닌 Ex-Tag DNA polymerase를 사용하였고 아미노 말단 리보플라빈 생성효소 유전자가 삽입

된 재조합 플라스미드 pERN (3)을 주형으로 사용하였다. PCR에 사용된 프라이머들은 Table 2에 기재하였다.

상기의 돌연변이 이외의 다른 위치지정 돌연변이는 기존에 알려진 논문의 방법(12)을 변형하여 다음과 같이 수행하였다. 돌연변이 중합효소 연쇄반응은 pQE 벡터 염기 서열 및 제한효소 인식 부위를 포함하는 정방향(forward)과 역방향(reverse)으로 향하는 제한효소 인식부위 프라이머(flanking primer)와 특정 아미노산을 다른 부위로 변화시키게 하는 돌연변이 프라이머(mutant primer)를 사용하여, 두 차례의 PCR을 수행하였다(Fig. 3). 첫 번째 PCR 단계에서는 정방향 프라이머와 돌연변이 프라이머를 사용하여 25 사이클을 증폭시켰다. 이 PCR 증폭 DNA 산물을 PCR Purification kit (Solgent, Korea)을 사용해 정제한 후, 다음 PCR 단계의 프라이머로써 사용하였다. 두 번째 PCR 단계에서는 앞서 정제한 첫 번째 PCR 산물과 역방향 프라이머를 이용하여 25 사이클 재증폭하였다. 두 차례의 PCR을 통해 얻어진 산물을 제한효소 *Bam*HI과 *Pst*I으로 절단하는 반응 후, PCR Purification kit를 사용하여 정제한 후 동일한 제한효소로 절단한 pQE30 벡터에 ligation 시킨 후(Fig. 3), ligation 혼합물은 *E. coli* XL-1 Blue competent cell에 형질전환 시켰다. 모든 돌연변이 된 아미노-말단 리보플라빈 생성효소 단백질을 코딩 하는 유전자가 삽입된 재조합 DNA는 플라스미드 DNA 방법으로 추출되어 Genotech (Korea)

Table 2. Primers for site-directed mutagenesis of N-terminal domain of riboflavin synthase. Codons specifying modified amino acid residues are shown in bold type. Novel restriction sites are underlined

Primer	Amino acid replacement	Novel restriction site	Nucleotide sequence
Forward	None	<i>Bam</i> HI	5'-GAG GAG AAA GGA TCC ATG TTT ACG G-3'
Reverse	None	<i>Pst</i> I	5'-GTC CTG CAG TTA GTG TCCGCC-3'
1	S41→C	<i>Kas</i> I	5'-GCA GCA ACC GTT ATG CGC CAC acA gGC gCC GGT TTC-3'
2	S41→V	<i>Kas</i> I	5'-GCA GCA ACC GTT ATG CGC CAC Gac gGC gCC GGT TTC-3'
3	S41→W	<i>Kas</i> I	5'-GCA GCA ACC GTT ATG CGC CAC ccA gGC gCC GGT TTC-3'
4	T50→A	<i>Hin</i> fI	5'-GAC ATG aTT <u>cCC</u> GTT AAT TTC CGT CAC GGc CAG GCA-3'
5	T50→W	<i>Hin</i> fI	5'-GAC ATG aTT <u>cCC</u> GTT AAT TTC CGT CAC cca CAG GCA-3'
6	T50→N	<i>Hin</i> fI	5'-GAC ATG aTT <u>cCC</u> GTT AAT TTC CGT CAC GiT CAG GCA-3'
7	C47→A	<i>Hph</i> I	5'-C CGT CAC GGT gAG GCA GgA ACC GTT ATG CGC C-3'
8	C47→D	<i>Hph</i> I	5'-C CGT CAC GGT gAG GCA Ggc ACC GTT ATG CGC C-3'
9	C47→S	<i>Hph</i> I	5'-C CGT CAC GGT gAG GCA Gtc ACC GTT ATG CGC C-3'

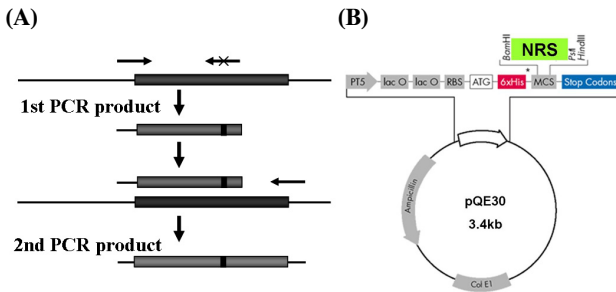


Fig. 3. Generation of mutant proteins of N-terminal domain of riboflavin synthase (N-RS). (A) The PCR fragment for cloning mutant variants; (B) Fragment inserted into plasmid DNA pQE30. The arrows indicate the flanking forward and reverse primers as well as mutant primer.

에 보내져 Automatic DNA Sequencer ABI 3730 XL (Applied Biosystem, USA)로써 자동 DNA 서열 분석 순서(automatic DNA sequencing protocol)에 따라 DNA 염기서열이 확인되었다.

단백질 정제

모든 단백질 정제 과정은 4°C에서 수행하였다. 얼린 세포를 완충용액 A (50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 300 mM sodium chloride, 10 mM imidazole)에 녹인 뒤, lysozyme 1 mg/ml의 농도로 넣고, DNase I 과 PMSF를 1 mM 되도록 첨가시키고, 30분간 배양시켰고 이를 두 번의 초음파 분쇄과정을 통해 세포를 파쇄시킨 뒤, 원심분리하여 얻은 상등액을 0.4 μm pore의 membrane으로 걸러서 세포파쇄물(lysate)을 준비하였다. 동일한 완충용액 A로 미리 평형 시킨 Ni-NTA 컬럼에 준비된 세포파쇄물을 1 ml/min의 속도로 흘려 보냈다. 단백질이 결합된 컬럼에 imidazole의 농도를 각각 20 mM, 40 mM, 60 mM로 증가시킨 A 완충용액으로 세척한 뒤, 완충용액 B (50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 300 mM sodium chloride, 500 mM imidazole)를 사용하여 컬럼에 결합된 단백질을 용출시키거나 혹은 단백질이 결합된 컬럼을 Fast Protein Liquid Chromatography (BioLogic LP, Bio-Rad, USA)와 연결한 뒤, 완충용액 A를 이용하여 280 nm의 흡광도가 일정할 때까지 세척하고, 완충용액 B를 점차적으로 증가시켜 용출시켰다. 각각의 분별 용액(fraction)들은 SDS-PAGE를 통해 확인하여 선별하였다. 정제된 단백질에 포함된 과량의 imidazole salt를 제거하기 위해 과량의 완충용액 A에 밤새 투석시킨 뒤, 농도 및 흡광도를 측정하였다.

단백질의 농도 결정

정제된 단백질의 농도는 280 nm에서의 몰·흡광계수 6,000 M⁻¹cm⁻¹를 사용하여 계산하였다(3, 17).

형광분광 분석

완충용액 A에 녹아있는 단백질들을 10 μM의 동일한 농도로 준비하고, Fluorescence spectrophotometer FS-2000 (Hitachi,

Japan)를 사용하여 408 nm에서 excitation 값을 고정시키고, 방출 스펙트라(emission spectra)를 스캐닝하였다. 10 μM로 준비된 시료에 각각 1 M, 2 M, 3 M, 5 M로 urea의 농도를 첨가한 후 스펙트리를 측정하였다.

아미노-말단 리보플라빈 생성 효소 단백질의 3차원적 구조 모델링

Chembioffic (Cambridge Soft, USA)의 하위 프로그램인 Chemfinder, Chemdraw 그리고 chem3D 프로그램과 Bioclipse 프로그램을 별도로 이용하였다. PDB (protein databank)에서 얻은 데이터 베이스를 이용하여 용액 상태의 *E. coli* 아미노-말단 리보플라빈 생성효소(N-RS) 야생형은 3D 구조를 Bioclipse 프로그램으로 확인 후, 야생형 리보플라빈 생성효소의 핵심부분인 리간드와 반응하는 부분을 확대하여 이를 기초하여 3차 구조를 그렸다. Chemfinder로 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine과 riboflavin을 데이터 베이스로부터 받고 나머지 Trp, Ser, Asp, Cys, Val, Gly 등을 웹 데이터베이스로부터 받아 그것들을 2D 상태인 chemdraw를 이용하여 X, Y 평면상에 그렸다. 이것을 Chem 3D 파일로 옮긴 후 3D 상태의 이미지를 구축하였다. 상호관계의 거리를 확실히 하기 위해서 치수기능을 이용하여 정확한 치수를 기입하여 거리를 조정하였으며 야생형의 경우 Bioclipse에서 치수를 확인하여 쉽게 그릴 수 있으나 돌연변이체의 경우 그 거리를 예측하여야 하는데 이는 계산기 프로그램의 기능을 사용하여 그 거리를 예측하였다. 그리고 원자간의 기본적인 안정화 상태를 만족시키기 위해서 Chembiooffice의 추가된 기능인 MMFF94 기능을 이용하여 원자간의 각종 약한 결합을 계산하여 그 거리에 맞게 이미지화 시켰다.

결과 및 고찰

야생형 또는 돌연변이 아미노-말단 리보플라빈 생성 효소를 코드 하는 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 재료 및 실험에서 기술한 방법(Fig. 3)으로 얻었고, 이들을 과발현시켜 다량의 단백질을 얻었다. SDS-PAGE를 통한 이들의 대략적인 분자량은 13 kDa이었는데, 이는 재조합 단백질의 아미노산 서열로 예측된 질량과 일치한 결과이다. 또한, 정제된 단백질은 25 kDa 부근에서도 band가 나타났는데(Fig. 4), 이는 아미노-말단 리보플라빈 생성 효소가 강력한 동중이량체(homodimer)를 형성(3, 9)하기 때문에 나타난 결과로 추정된다.

대부분의 야생형 및 돌연변이형 정제된 아미노-말단 도메인의 리보플라빈 생성효소(N-RS) 단백질들은 노란색을 지녔는데, 이는 isoalloxazine ring의 존재로 노란색을 띠는 리간드인 리보플라빈이 단백질에 결합되어 있는 전단백질(holoprotein) 상태로 존재하기 때문이다. 하지만, N-RS C47D와 N-RS ET66,67DQ 돌연변이 단백질들은 분리과정 중 무색을 띄었으며, 이는 이들 잔기의 변화로, 리간드와 결합 능력이 감소했음을 나타내는 결과이다. 이전의 보고(5, 21)에 의하면 Cys47과 Thr67은 lumazine 및 riboflavin의 ribityl 그룹과의 수소 결합

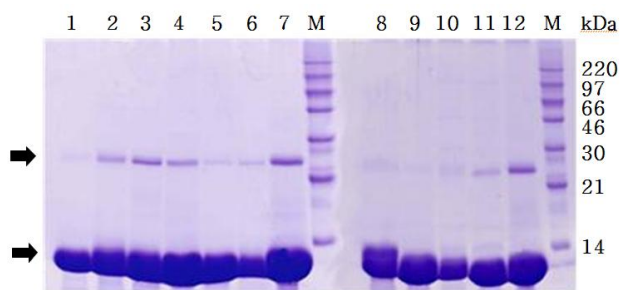


Fig. 4. SDS-PAGE analysis of wild type and mutated proteins of N-terminal domain of riboflavin synthase (N-RS). The recombinant N-terminal riboflavin synthases were analyzed by Coomassie blue-stained 15% acryl-amide gel: Lanes: 1, NRS-S41C; 2, N-RS S41V; 3, N-RS S41W; 4, N-RS T50A; 5, N-RS T50N; 6, N-RS T50W; 7, N-RS wt; 8, N-RS C47S; 9, N-RS A43L; 10, N-RS ET66,67DQ; 11, N-RS C48S; 12, N-RS wt; M, protein size marker. Upper arrow indicates dimer and lower one does monomer of N-terminal of riboflavin synthase.

에 관여하는 바, 이들이 돌연변이 되었을 때 현저히 낮은 lumazine 혹은 riboflavin과의 결합세기를 약화시킨 것으로 사료된다.

아미노-말단 도메인의 리보플라빈 생성효소 단백질의 리간드와의 결합을 확인하기 위하여 10 μ M의 정제된 단백질에 각각의 농도로 urea를 첨가해 주면서 형광 방출 스펙트럼(fluorescence emission spectra)를 측정하였다. N-RS A43L 단백질의 형광 스펙트럼은 Fig. 5A에서 보는 바와 같이 470 nm에서의 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine peak 뿐만 아니라, 520 nm 부근의 riboflavin peak도 지니고 있으며 이는 정제된 단백질에 lumazine과 riboflavin이 결합되어 있다는 사실을 지지해주는 결과이다.

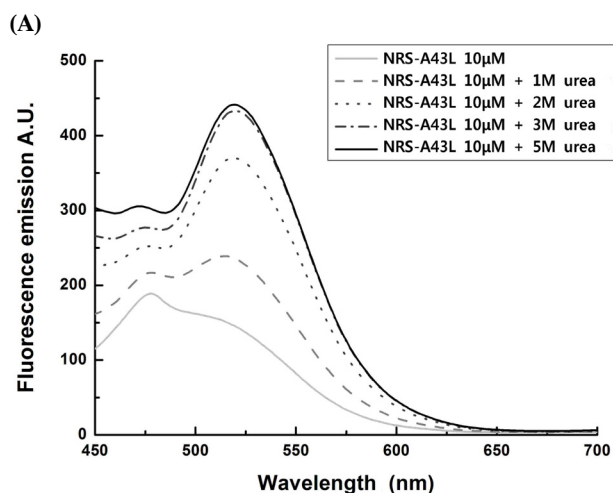


Table 3. The urea concentration at which maximal fluorescence intensity of N-terminal domain of riboflavin synthase wild type and mutant variants

N-RS proteins	Urea concentration
N-RS wt	3 M
N-RS A43L	5 M
N-RS C48S	2 M
N-RS S41C	3 M
N-RS S41W	5 M
N-RS C47A	5 M
N-RS C47S	3 M
N-RS T50A	3 M
N-RS T50N	5 M
N-RS T50W	8 M

또한 urea를 첨가함에 따라 470 nm 또는 520 nm에서의 형광 세기(fluorescence intensity)가 증가한 바, 이는 형광성 리간드가 리보플라빈 생성 효소와 결합되면서 파생되는 형광 세기(fluorescence intensity)가 감소하는 쉐광(quench) 효과 때문인 것으로 사료된다(3, 17). 즉 리보플라빈 생성효소의 기질인 lumazine과 생성물인 riboflavin이 아미노-말단 도메인 리보플라빈 생성효소 단백질과 결합된 채로 쉐광(quench) 되어 있다가, urea에 의해 단백질로부터 해리되면서 원래의 리간드의 형광성인 lumazine은 470 nm에서 리보플라빈은 520 nm에서 형광세기가 각각 증가 된 것으로 해석된다. Urea가 첨가 되면 결합된 리간드가 해리되면서 최대 형광세기가 N-RS A43L은 478 nm에서 515 nm로, N-RS C48S는 476 nm에서 483 nm로 각각 장파장으로 이동하는 현상을 보이는데, 이는 리간드가 리보플라빈 생성 효소에서 해리되면 형광 세기가 장파장으로 이동된다는 기존의 보고(3, 17)와 일치하는 결과이다. 각 돌연변이 단백질들은 최대 형광 세기를 갖게 되는 urea

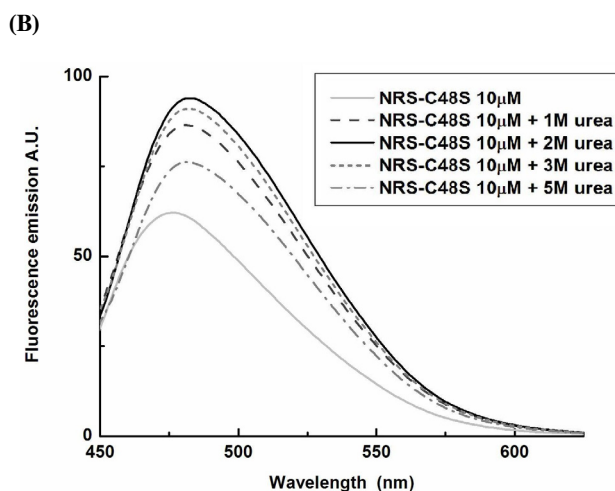


Fig. 5. Fluorescence spectra of N-terminal domain of riboflavin synthase mutant variants with adding of urea. Protein concentration, 10 μ M. Excitation, 408 nm. (A) N-RS A43L protein; (B) N-RS C48S mutant proteins.

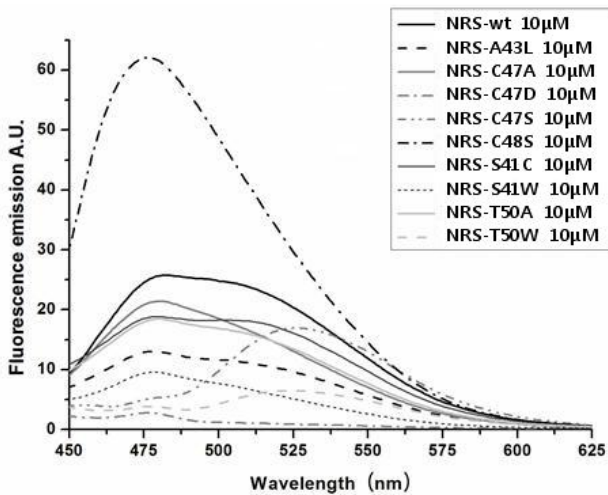


Fig. 6. Fluorescence spectra of N-terminal domain of riboflavin synthase as well as mutant variants. Protein concentration, 10 μ M. Excitation, 408 nm.

의 농도가 각각 상이함을 보이는 데(Table 3), 이는 최고 형광 세기를 보이는 urea의 농도가 높을수록, N-RS 돌연변이 단백질과 리간드와의 결합 및 소수성 상호작용(hydrophobic interaction) 정도가 강한 것으로 추정된다.

정제된 야생형 및 돌연변이 단백질들을 excitation 408 nm에서 고정하여 형광 방출 스펙트라(fluorescence emission spectra)를 측정된 결과, 대부분의 돌연변이 단백질들은 야생형 보다 낮은 형광 세기를 가지고 있는데, 특히 Fig. 6에서 보는 바와 같이 N-RS C47의 경우 그 형광 세기가 가장 낮음을 확인 할 수 있었다. 이는 앞에서의 설명과 같이 이 단백질이 분리·정제 동안 무색을 띠는 것으로 비추어 형광성을 띠는 리간드가 해리되었기 때문으로 풀이되며, 또한 N-RS C47S 및 N-RS T50W 돌연변이 단백질인 경우 가장 장파장으로 이동함을 보였다.

특이하게 N-RS C48S 돌연변이 단백질은 야생형 단백질보다 2배 이상의 형광세기를 보이는 데(Fig. 6), 이는 리보플라빈 생성효소의 super-family인 루마진 단백질(lumazine protein)에서 이유를 유추할 수 있다. 발광 세균에 특유한 루마진 단백질(13)은 리보플라빈 생성효소와 비슷한 염기서열을 가지고 있으며, lux 유전자군(operon)의 상류에 유전자가 존재한다(22). 루마진 단백질은 리보플라빈 생성효소의 기질인 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine과 리간드로서 결합함으로써 이들은 효소작용을 하지 않으나 형광성의 특징을 가진다(6). 한 분자의 루마진 단백질에 한 분자의 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine이 결합될 수 있으며, 이 단백질의 4차 구조는 단량체(monomer)로 존재한다(16). 이러한 특징을 갖는 루마진 단백질의 48번 아미노산 잔기는 모든 루마진 단백질에서 Ser으로 보존되어 있다(15, 22).

리보플라빈 생성효소의 Cys48은 lumazine ring의 C7 α 의 methylene 그룹과 수소 결합을 하는 것으로 알려져 있다(14).

Cys48은 lumazine에 근접하여 이런 작용을 통해 형광성 리간드의 쇄광을 파생시켰으나, 아미노 말단 리보플라빈 생성효소 단백질의 Cys48 잔기의 Ser로의 변이가 형광성 리간드와 결합하여도 형광성을 지니지 않는 리보플라빈 생성효소의 특성에서 형광성을 갖는 루마진 단백질의 특징을 지닌 아미노산으로의 변화에 기인하여 야생형 보다 강한 형광성을 지닌 단백질로 전환 된 것으로 추정된다. 이러한 N-RS C48S 돌연변이 단백질의 형광 세기 강화 특성은 효과적인 효소 저해제를 발굴하는 고속다중 발굴시스템(high-throughput screening system)으로써 활용될 수 있을 것이다.

6,7-dimethyl-8-ribityllumazine 분자와 결합된 아미노-말단 리보플라빈 생성효소의 3차 구조 예측과 이들 N-RS 야생형과 N-RS C48S, T50A, T50W 돌연변이 단백질의 형광성의 변화와 구조와의 상관관계를 유추하기 위하여 Chemoffice 프로그램을 이용하여 이들 단백질의 리간드 결합부위의 3차 구조를 모델링 하였다(Fig. 7). 아미노산 잔기를 배열한 후 기존의 X-선 결정(14)에 의한 N-RS의 3차 구조를 활용하여 돌연변이된 각각의 아미노산 잔기를 공유 결합시켰다. 1차 구조를 이룬 펩타이드의 역학적 에너지를 최소화 시키는 리보플라빈 생성효소 구조로 만들기 위해 MM2 기능을 사용하였으며 접힌 구조가 형성된 리보플라빈 생성효소와 기질인 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine molecules가 이루는 3차 구조를 형성하기 위해 또 다시 에너지를 최소화 시켰다. 역학적 에너지만을 고려하여 예측한 이 데이터 및 3-D 모델링은 분자의 상동성을 고려한 3차 구조와 기존의 X-선 결정학(14)에 의하여 규명된 리보플라빈 생성효소의 3차 구조와 유사 하였으며, 기존의 알려진 리보플라빈 생성효소의 Thr50과 기질인 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine 분자의 수소결합을 예측한 데이터(14, 21)와 동일하게 나타났다.

아미노-말단 리보플라빈 생성 효소와 이들의 리간드인 lumazine은 단백질의 펩타이드의 골격에 위치하는 산소 또는 질소와 수소결합을 이룬다. Thr50의 side chain의 산소 원자는 lumazine의 ring 시스템의 5번 질소의 imido 그룹과 Thr50의 amide group의 수소는 lumazine ring 4번 산소와 수소 결합을 하고 있는 것으로 알려져 있다(10, 14). 따라서 Thr50 아미노산의 Ala과 Trp로의 치환은 리간드와의 이들 단백질의 2차 구조에는 영향이 없지만 전체적인 3차 구조에는 영향을 주어 결합의 거리 및 배향에 변이를 초래함으로써(Fig. 7), Fig. 6에서 보는 바와 같이 형광의 세기 및 최대 파장에 많은 영향을 미친 것으로 사료된다.

Ser41은 Thr50과 수소결합을 통하여 antiparallel β -pleated sheet 구조를 형성하고 있다(21). 이는 Ser41은 lumazine 결합 부위로부터 두 번째 꺾질에 위치하게 됨을 나타내고 단백질 이량체화의 영역에 존재하며(14), 반응물인 lumazine을 고정시키는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 이 아미노산이 Ala로 바뀐 경우에 효소의 활성도가 1% 이하로 감소함을 보였다(7). Ser41이 형광성을 지닌 아미노산인 Trp로 바뀌는 경우(S41W)에는 Fig. 6에서 보는 바와 같이 형광 세기만 감소하고 형광의 형태는 유사함을 보인 반면에, Thr50이 Trp로 돌연

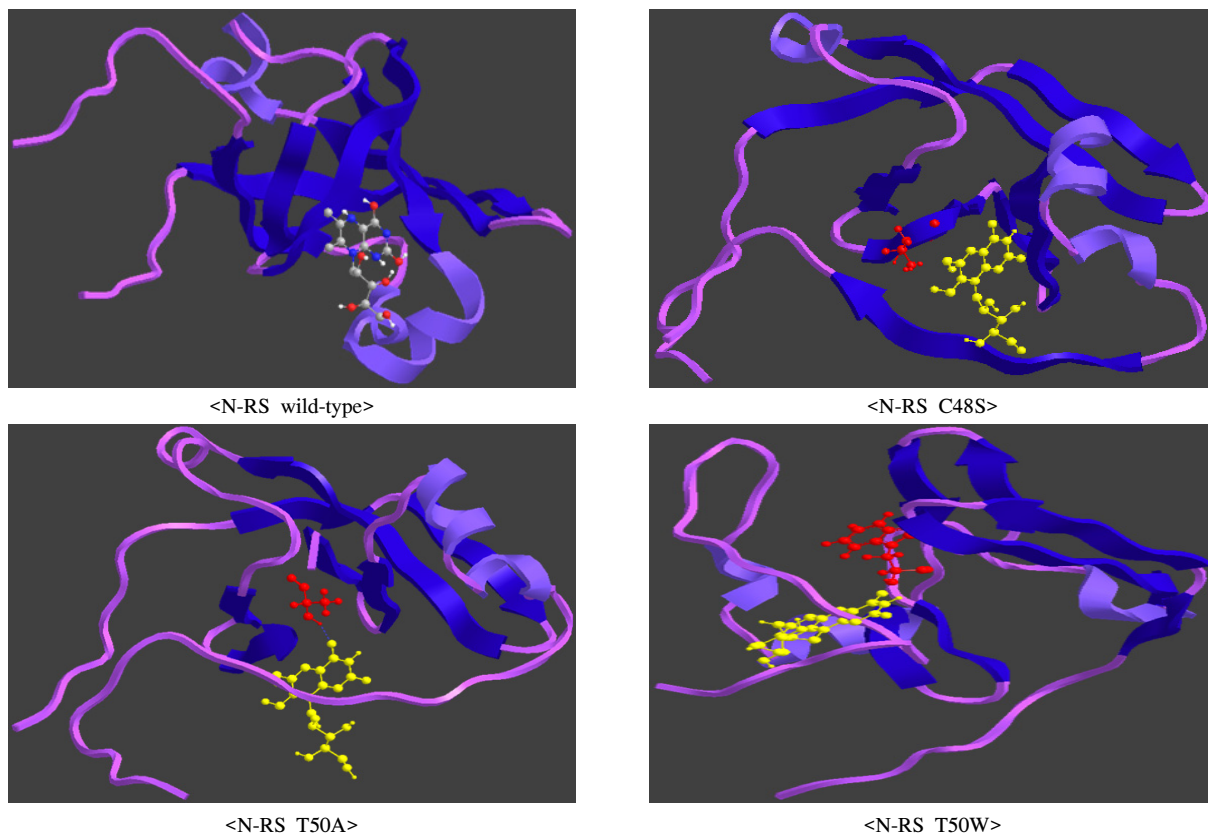


Fig. 7. Stereodiagram of the N-terminal domain of riboflavin synthase wild type and mutants with bound ligand 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine. These models were based on the previous published data (14).

변이 될 경우(T50W), 최대 형광의 과장이 바뀌는 것은 야생형과 달리 리간드와 형광성 아미노산 사이에 에너지 전환이 초래되었기 때문으로 사료된다.

이들 3-D 구조와 형광의 세기 변화, 형광 세기의 이동 등의 특성은, 가까운 미래에 수행될 형광 탐침자(fluorescence probe)를 이용한 형광 공명 에너지 전환(FRET: fluorescence resonance energy transfer)의 방법으로 단백질의 구조 및 리간드와의 결합 거리 및 배향에 관한 정보를 제공할 수 있어, 신약 개발 및 디자인에 유용하게 쓰여질 것으로 사료된다.

적요

리보플라빈 생성효소(riboflavin synthase)는 기질인 두 분자의 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine과 결합 후, 4-탄소 단위(4-carbon unit)의 자리 옮김 반응을 거쳐 한 분자의 리보플라빈과 한 분자의 pyrimidine 유도체를 형성하는 반응을 촉매한다. 대장균(*Escherichia coli*) 리보플라빈 생성효소의 아미노-말단 도메인 절반(N-terminal domain half)과 카복시-말단 도메인 절반(C-terminal domain half)은 매우 유사한 내부 자체 아미노산 서열(intra-molecular amino acid sequence)을 갖는다. 아미노말단 영역 리보플라빈 생성효소(N-RS) 단백질의 구조와 형광 특성을 알아보기 위하여 중합효소 연쇄 반응과

위치지정 돌연변이를 통하여 10개 이상의 돌연변이 아미노-말단 리보플라빈 생성효소 단백질을 코드 하는 유전자를 증폭시켜 pQE30 벡터에 삽입한 재조합 플라스미드를 제조하여, 과발현시킨 후 분리 정제하였다. 대부분의 아미노-말단 도메인 리보플라빈 생성효소의 돌연변이 단백질들은 야생형과 같이 형광성 리간드인 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine 혹은 리보플라빈과 결합할 수 있는 능력을 지니고 있었으나, N-RS C47D, N-RS ET66,67DQ 돌연변이 단백질의 경우는 리간드와의 결합능력이 현저히 떨어져 형광을 띠지 않았다. 대부분의 돌연변이 단백질들의 형광 세기는 야생형 단백질(N-RS wt)보다 낮았으나, N-RS C48S는 예외적으로 야생형 단백질에 비해 2배 이상의 형광세기를 가졌다. 이와 같은 결과를 바탕으로 리보플라빈 생성효소와 형광성 리간드 사이의 상호작용을 예측할 수 있으며, N-RS C48S 돌연변이 단백질의 형광성을 활용하여 효과적으로 효소 저해제를 발굴할 수 있는 고속다중 스크리닝 법(high-throughput screening system)으로써 활용될 수 있을 것이다.

감사의 말

본 연구는 2009년도 충남대학교 자체연구사업 학술연구비에 의하여 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

참고문헌

1. Beach, R.L. and G.W. Plaut. 1970. Stereospecificity of the enzymatic synthesis of the *o*-xylene ring of riboflavin. *J. Am. Chem. Soc.* 92, 2913-2916.
2. Eberhardt, S., G. Richter, W. Gimbel, T. Werner, and A. Bacher. 1996. Cloning, sequencing, mapping and hyper-expression of the gene coding for riboflavin synthase of *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 242, 712-719.
3. Eberhardt, S., N. Zingler, K. Kemter, G. Richter, W. Gimbel, M. Cushman, and A. Bacher. 2001. Domain structure of riboflavin synthase. *Eur. J. Biochem.* 268, 4315-4323.
4. Fischer, M. and A. Bacher. 2005. Biosynthesis of flavo-coenzyme. *Nat. Prod. Rep.* 22, 324-350.
5. Fischer, M. and A. Bacher. 2008. Biosynthesis of vitamin B₂: Structure and mechanism of riboflavin synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* 474, 252-265.
6. Gast, R. and J. Lee. 1978. Isolation of the *in vivo* emitter in bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 833-837.
7. Illarionov, B., K. Kemter, S. Eberhardt, G. Richter, M. Cushman, and A. Bacher. 2001. Riboflavin synthase of *Escherichia coli*. Effect of single amino acid substitutions on reaction rate and ligand binding properties. *J. Biol. Chem.* 276, 11524-11530.
8. Kim, R.R., B. Illarionov, M. Joshi, M. Cushman, C.Y. Lee, W. Eisenreich, A. Bacher, and M. Fischer. 2010. Mechanistic insights on riboflavin synthase inspired by selective binding of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine exomethylene anion. *J. Amer. Chem. Soc.* 132, 2983-2980.
9. Lee, C.Y., B. Illarionov, Y.E. Woo, K. Kemter, R.R. Kim, S. Eberhardt, M. Cushman, M. Fischer, W. Eisenreich, and A. Bacher. 2007. Ligand binding properties of the riboflavin synthase from *Escherichia coli*. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40, 239-246.
10. Liao, D.I., Z. Wawrzak, J.C. Calabrese, P.V. Vitonen, and D.B. Jordan. 2001. Crystal structure of riboflavin synthase. *Structure* 9, 399-408.
11. Marcus, R. and A.M. Coulston. 1990. Water soluble vitamin. The vitamin complex and ascorbic acid. The pharmacological basis of therapeutics, pp. 1534-1536. In Gilman, Rall, Nies, and Talyer (eds.) 8th eds. Pergamon press, New York, USA.
12. Marini, F., A. Naem, and J.N. Lapeyre. 1993. An efficient 1-tube PCR method for internal site-directed mutagenesis of large amplified molecules. *Nucleic Acids Res.* 21, 2277-2278.
13. Meighen, E.A. 1991. Molecular biology of bacterial bioluminescence. *Microbiol. Rev.* 55, 123-142.
14. Meining, W., S. Eberhardt, A. Bacher, and R. Ladenstein. 2003. The structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase in complex with riboflavin at 2.6Å resolution. *J. Mol. Biol.* 331, 1053-1063.
15. O'Kane, D.J. and D.C. Prasher. 1992. Evolutionary origins of bacterial bioluminescence. *Mol. Microbiol.* 6, 443-449.
16. O'Kane, D.J., B. Woodward, J. Lee, and D.C. Prasher. 1991. Borrowed proteins in bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1100-1104.
17. Otto, M.K. and A. Bacher. 1981. Ligand-binding studies on light riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Eur. J. Biochem.* 115, 511-517.
18. Plaut, G.W. 1963. Studies on the nature of the enzymatic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* 238, 2225-2243.
19. Plaut, G.W., R.L. Beach, and T. Aogaichi. 1970. Studies on the mechanism of elimination of protons from the methyl groups of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by riboflavin synthetase. *Biochemistry* 9, 771-785.
20. Schott, K., J. Kellerman, F. Lottspeich, and A. Bacher. 1990. Riboflavin synthase of *Bacillus subtilis*. Purification and amino acid sequence of the alpha subunit. *J. Biol. Chem.* 265, 4204-4209.
21. Truffault, V., M. Coles, T. Diercks, K. Abelmann, S. Eberhardt, H. Luttgan, A. Bacher, and H. Kessler. 2001. The solution structure of the N-terminal domain of riboflavin synthase. *J. Mol. Biol.* 309, 949-960.
22. Woo, Y.E., S.Y. Kim, and C.Y. Lee. 2005. Expression, and generation of amino-terminal domain of the gene coding for the lumazine protein from *Photobacterium phosphoreum*. *Kor. J. Microbiol.* 41, 306-311.