

## 연차 보고서( 1차 )

|                |   |     |     |
|----------------|---|-----|-----|
| 사업명            | KAIST Grand Challenge 30 Project                        |     |     |
| 과제명            | (국문) 생체막과 단백질 밀집 간 역학 연구                                |     |     |
|                | (영문) Dynamics between bio-membrane and protein crowding |     |     |
| 연구책임자          | 정용원   | 소 속 | 화학과 |
| 총수행기간<br>(1단계) | 2018. 01 . 01. ~ 2022 . 12 . 31 . ( 5 년)                |     |     |
| 당해연도<br>협약기간   | 2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31. ( 1년)                     |     |     |
| 당해년도<br>사업비(원) | 25,000 천원   |     |     |

자체연구협약서(KAIST Grand Challenge 30 Project)제5조에 의거하여  
연차보고서 2부를 제출합니다.

2019 년 01월 09일

연구책임자: 정용원 (인)



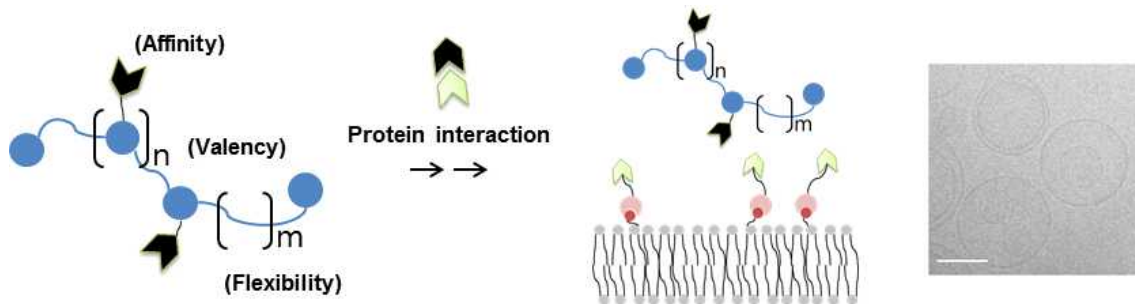
한국과학기술원 총장 귀하

# I. 해당 연도 추진 현황

## I-1 기술개발 추진 내용

**최종 목표:** 세포의 내/외부를 구분하는 세포막 상에서 다수의 단백질이 모여서 이루는 군집(clustering) 혹은 밀집(crowding) 현상의 이해는 생체막의 원리를 수립하기 위한 중요한 난제 중 하나이다. 본 연구에서는 단백질 밀집 현상의 정밀한 조절에 따른 생체막의 굴곡(curvature), 분열(fission), 융합(fusion) 등의 역학을 조사하여 자연계의 세포막 조절의 근본적인 원리를 이해해 보고자 한다.

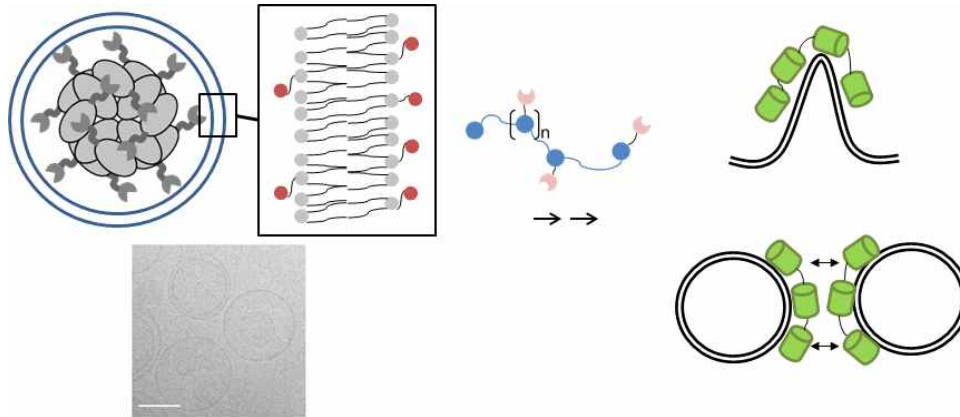
**기술개발 추진 내용:** 광학적 분석 분해능의 한계를 극복하기 위하여 본 연구에서는 단일 단백질 수준에서 단백질 밀집 현상이 정밀하게 디자인된 인공 단백질 조립체를 이용할 것이다. 또한 이를 잘 정립된 생체막 모델에 적용하여 단백질 밀집의 생체막 역학에의 역할을 관찰할 것이다. 이와 함께 전자현미경 방법을 통하여 생체막 역학 변화를 수 나노 크기의 분해능으로 분석하여 단백질 밀집에 의한 직접적 생체막 변화를 최초로 관찰하고자 한다.



< 다중 단백질 조립체와 리피드막과의 결합 >

다양한 기능성 단백질을 정밀하게 조립하여 단일 단백질 수준에서 단백질 모임을 조절 할 수 있는 인공 단백질 조립체들을 개발하고, 이들 조립체들을 이용하여 단백질 밀집의 정밀한 조절 뿐 아니라 기능성 도입으로 원하는 생체막 모델에의 적용이 가능할 것이다.

또한 굴곡, 융합, 분열과 같은 생체막 역학 변화를 직접적으로 관찰하기 위하여 저온 전자현미경(Cryo-EM)을 이용할 것이다. 저온 전자현미경은 거대 단백질에서부터 단일 바이러스 구조까지 분자 수준의 분해능을 가지는 분석을 가능하게 한다. 이에 본 연구에서는 저온 전자현미경 분석법을 적용하여 단백질 밀집 조절과 생체막 역학 변화를 나노미터 수준의 분해능으로 관찰하고자 한다.



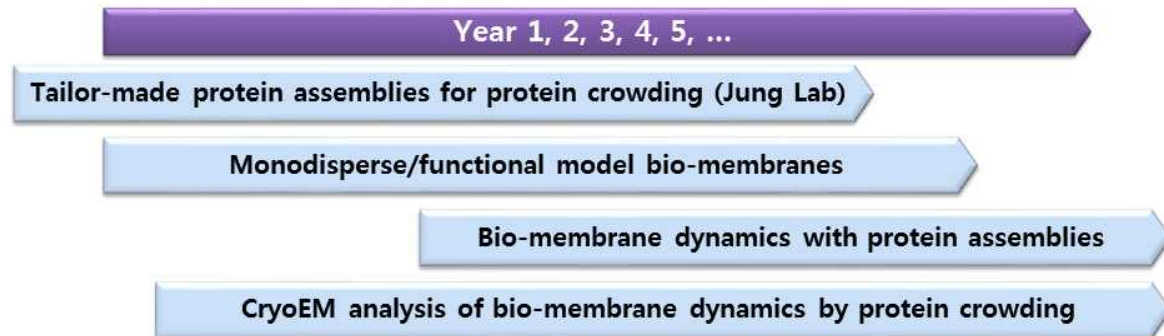
< 생체막 역학의 CryoEM 분석 >

연차별 연구 내용:

**Research contents**

- I. Fabrication of monodisperse protein assemblies with defined multi-valency and functionality for bio-membrane introduction**
- II. Reconstitution of monodisperse/functional model bio-membranes**
- III. Induction of bio-membrane dynamics with protein assemblies**
- IV. Study on bio-membrane dynamics with CryoEM**

[ Structure ]



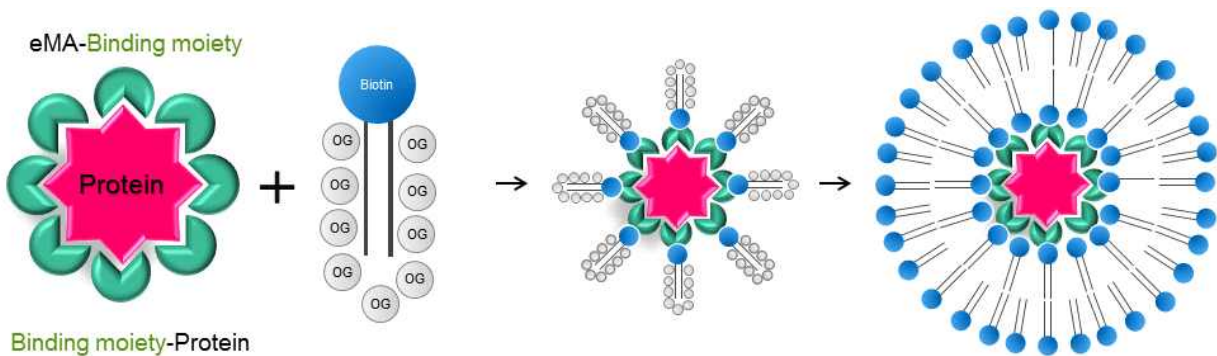
당해연도 주요 연구 개발 내용:

- Monodisperse/functional model bio-membranes: 골드 나노파티클과 케이지 단백질을 backbone으로 한 균일한 모델 바이오 리포솜 제작을 위한 backbone 파티클 개발.
- CryoEM analysis of bio-membrane dynamics by protein crowding: 모델 리포솜의 CryoEM 분석

I-2 해당 연도 추진 실적

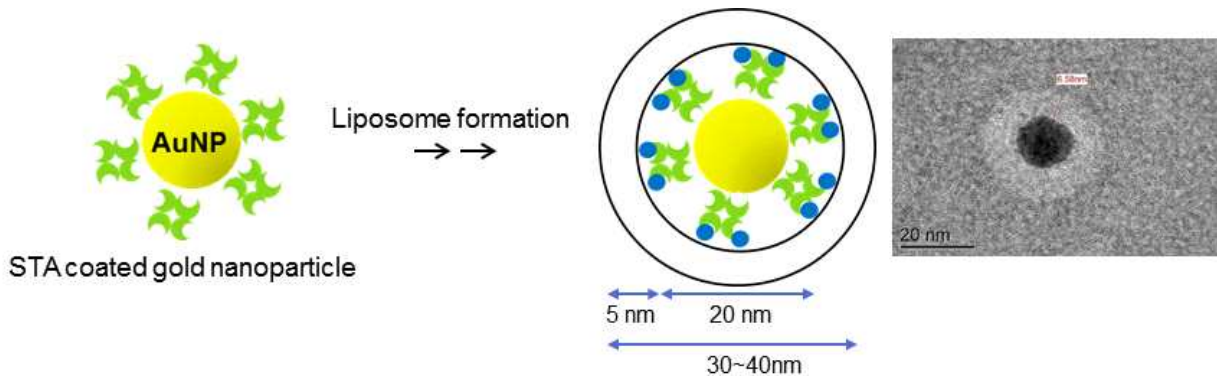
- Monodisperse/functional model bio-membranes

균일한 크기를 가지는 모델 생체막의 개발을 위하여 본 연구에서는 케이지 형태를 가지는 기능성 결합 단백질 파티클을 제작하고 균일하게 결합하는 리피드 케미컬을 활용하고자 한다. 이를 위하여 케이지 단백질에 바이오틴 결합 아비딘 단백질을 fusion하고 바이오틴을 포함하는 리피드를 결합 시켰다. 이때 수용액 내 리피드의 안정화를 위하여 detergent 인 octyl glucoside (OG)를 활용하였다. 리피드와 결합한 단백질 케이지 코어에 추가적인 리피드를 첨부하고 OG를 천천히 제거하는 과정에서 균일한 크기의 단일막 리포솜을 제작하려 한다.



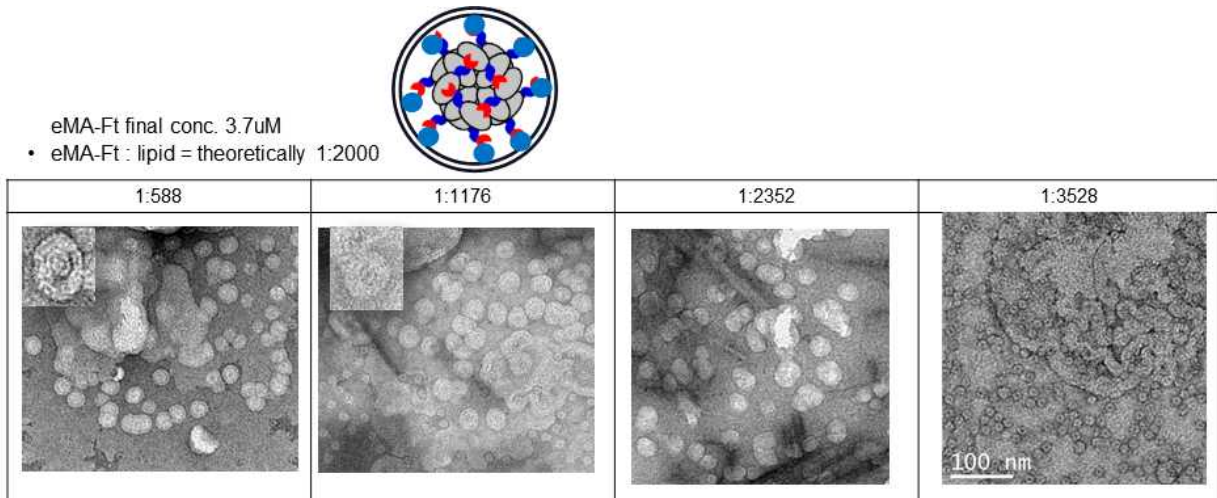
< 단백질 파티클 코어 기반 모델 리포솜 제작 >

케이지 단백질과 함께 바이오틴 결합이 가능한 아비딘이 코팅된 골드 나노파티클을 또한 제작 하였다. 골드 나노파티클은 TEM 분석시 코어 파티클의 분석이 용이하며, Centrifuge등의 방법을 통하여 파티클의 정제가 가능하다. 본 연구에서는 제작된 바이오틴 코팅 리포솜과 아비딘 코팅 골드 나노파티클의 혼합 시 단일 막 리포솜으로 코팅된 골드 나노파티클의 형성을 낮은 yield로 관찰 하였다.



< 단백질 파티클 코어 기반 모델 리포솜 제작 >

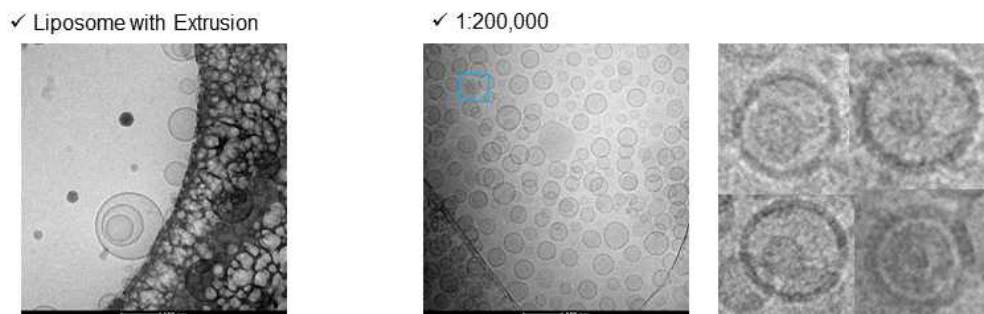
또한 본 연구의 1차년에서 페리틴 단백질 케이지를 활용하여 리포솜을 제작 하였다. 표면에 24개의 바이오틴 결합 아비딘 단백질을 포함하는 페리틴 케이지 단백질을 제작하고 바이오틴 리피드를 활용하여 표면 리포솜을 제작하였다. 15 nm 크기를 가지는 페리틴 단백질을 활용할 경우 아래 그림과 같이 30 nm 크기의 리포솜을 제작할 수 있었다.



< 페리틴 단백질 기반 모델 리포솜 제작 >

- CryoEM analysis of bio-membrane

제작된 리포솜 및 파티클 포함 리포솜을 CryoEM으로 분석 하였다. 다양한 Grid 를 활용하였으며 아래 그림에서와 같이 리포솜 layer 및 내부 단백질이라 할 수 있는 이미지를 관찰 할 수 있었다. Layer의 관찰이 가능하여 multi-layer 구조를 관찰 할 수 있었으나 내부 단백질의 경우 정밀한 구조적 분석에는 어려움을 보여주었다.



< 리포솜 CryoEM 분석 >

II. 기술개발결과 (해당사항 없음)

### III. 결론 및 차년도 계획

**결론:** 균일한 기능성 생체막 모델 리포솜을 제작하기 위하여 다양한 코어 파티클을 개발하였으며 표면 리포솜 생성 방법을 통하여 낮은 yield이나 균일한 리포솜을 관찰하였다. 또한 CryoEM 방법을 활용하여 리포솜 Layer구조를 정밀하게 관찰하였다.

**차년도 계획:** 단백질 코어 파티클의 다양화를 통하여 모델 리포솜 형성을 최적화하고, yield 향상 및 정제 방법의 개발을 통해 파티클 포함 생체막 mimic 리포솜을 개발할 것이다. 또한 정밀한 리포솜 구조 관찰을 위하여 리포솜 purity의 향상 및 단백질 동시 관찰을 위한 연구를 지속적으로 수행할 것이다.

### IV. 기타

시험분석료 사용 잔액 발생으로 연구활동비를 감액하고 연구장비재료비를 증액 사용