

## 연차 보고서( 2차)

사업명	KAIST Grand Challenge 30 Project		
과제명	(국문) AI로 본 생물의 건축학		
	(영문) Integrative computational analysis on Architecture in Biology		
연구책임자	송지준	소 속	생명과학과
총수행기간 (1단계)	2017. 5. 1. ~ 2021. 12. 31. ( 4년 7개월)		
당해연도 협약기간	2018. 1. 1. ~ 2018. 12. 31. ( 1년)		
당해년도 사업비(원)	25,000,000		

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

2019 년 1 월 16 일

연구책임자: 송지준 (인)



한국과학기술원 총장 귀하

## ◇ 연차보고서 작성 요령

### I. 해당 연도 추진 현황

#### I-1 기술개발 추진 내용

혐기성 환경에서 AdhE는 대장균의 생장에 중요한 효소로서 해당과정으로부터 생긴 acetyl-CoA로 에탄올을 만든다. 동시에 NADH가 NAD<sup>+</sup>로 변환되며 이 작용이 대장균으로 하여금 해당과정을 지속적으로 수행할 수 있게 한다. 본 연구팀은 이 대장균의 lysate 으로부터 나선형의 다량체를 형성하고 있는 AdhE를 발견했다. 이를 바탕으로 초저온전자현미경 (cryo-EM) 기법을 도입하여 AdhE의 고해상도 구조를 획득하였고, 다량체 형성에 대한 분자적 메커니즘을 이해했으며, 다량체를 형성하는 것이 실제 기능과 어떤 상관관계를 가지는지에 대한 생화학적 실험을 수행하였다.

#### I-2 해당 연도 추진 실적

AdhE는 나선형 다량체를 형성하기 때문에 recombinant protein을 정제했을 때 순수하지만 heterogeneous한 단백질을 얻게 된다(그림 1A). 이는 X-ray 결정학 기법을 도입했을 때 해결하기 어려운 문제이므로 본 연구팀은 cryo-EM을 이용하여 AdhE의 삼차원 구조를 규명하였다. 오창의 KBSI에서 cryo-EM 실험을 수행하였고 Titan Krios 전자현미경을 사용하였다. CCD로는 Falcon III detector가 사용되었으며 고해상도의 데이터를 얻기 위해 electron dose를 분할할 수 있는 movie mode를 사용하였다. 데이터 수집 이후 cisTEM을 사용하여 데이터 처리를 수행하였다 (그림 1B). cisTEM을 사용하여 AdhE의 3D volume을 얻은 뒤 AdhE와 homology가 있는 dehydrogenase protein 구조를 기반으로 하여 phenix에서 Realspace refinement를 진행했다. 최종적으로 3.45Å의 구조를 얻었고 6개의 AdhE와 2개의 alcohol dehydrogenase domain이 존재하는 것을 확인하였다 (그림 1C, 1E). 3D volume과 구조를 자세히 확인해 보았을 때에도 단백질의 2차구조가 세밀하게 보이며 아미노산 잔기가 정확히 fitting 된 것을 확인하였다 (그림 1D). 고해상도의 3차원 구조로부터 본 연구팀은 AdhE가 어떻게 나선형 다량체를 형성하는지에 대해 알 수 있었다. AdhE는 aldehyde dehydrogenase와 alcohol dehydrogenase, 두 개의 domain으로 구성되어 있으며 linker로 연결되어 있다

(그림 1F). 두 개의 AdhE는 Aldehyde dehydrogenase를 통해 dimer가 된다 (그림 1G). 이때 linker가 다른 Aldehyde dehydrogenase domain에 의해 안정화 된다. 두 개의 dimer는 alcohol dehydrogenase domain을 통해 tetramer를 형성하며 이것이 곧 한 바퀴의 다량체를 구성하게 된다 (그림 1H). 다량체 형성의 원리를 이해함으로써 본 연구팀은 다량체 형성을 저해할 수 있는 돌연변이 디자인을 할 수 있었다.

AdhE가 다량체를 형성하는 것은 이전에 잘 알려져 있었으나 이러한 다량체가 실제 기능과 어떤 관계가 있는지에 대해선 알지 못했다. 하지만 고해상도의 삼차원 구조를 바탕으로 본 연구팀은 다량체 구조와 기능의 관계에 대해 설명할 수 있는 돌연변이를 디자인할 수 있었다. AdhE의 alcohol dehydrogenase domain 사이에는 hydrophobic interaction이 존재하며 F670이 결정적인 역할을 하는 것을 발견하였다 (그림 2A). 670번째 페닐알라닌을 발린, 알라닌, 글루탐산으로 치환하는 돌연변이를 만들어 다량체 형성을 저해하고자 했다. negative staining EM으로 확인했을 때 모든 돌연변이에 대해 나선형 다량체가 확인되지 않았다 (그림 2B). 더불어 size exclusion chromatogram을 확인했을 때에도 wild type AdhE와 달리 모든 mutant가 dimer 위치 (~200kDa)에서 elution 되었다 (그림 2C). 이를 통해 F670 돌연변이가 AdhE의 다량체 형성을 효과적으로 저해하는 것을 확인하였다. 다량체가 형성되지 않았을 때 AdhE의 acetyl-CoA reductase activity를 측정하기 위한 assay를 실행하였다. Michaelis-Menten equation을 이용하여 wild type과 mutant의 kinetics를 측정했을 때, 기질에 대한 친화도는 유의미하게 변하지 않았으나, 효소의 활성만이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다 (그림 2D). mutant의 활성이 발린, 알라닌, 글루탐산 순서로 감소하는 것을 보았을 때, alcohol dehydrogenase 간 hydrophobic interaction이 AdhE 활성에 중요한 역할을 수행하는 것을 알 수 있었다 (그림 2D). 구조에 기반한 생화학적 실험을 통해 AdhE의 다량체 형성이 효소 활성에 필수적이라는 것을 알 수 있었다.

본 연구팀은 AdhE의 구조생화학적 연구를 통해 AdhE의 고해상도 구조와 더불어 다량체 형성이 갖는 생물학적 의미에 대해 탐색하였다. 선행 연구들은 병원성 대장균의 경우 AdhE가 대사작용에 중요할 뿐만 아니라 병원성에도 큰 영향을 주는 것을 확인하였다. 본 연구는 AdhE에 돌연변이를 도입했을 때 효소 활성이 단계적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 Glasgow 대학교의 Andrew Roe 교수팀과 협업을 진행하고자 한다. 해당 돌연변이를 병원성 대장균에 도입했을 때 물질대사와 병원성에 어떤 변화가 생기는지 알아보는 in vivo 실험이 진행 중이다. 구조생화학적 연구와 협업으로 얻은 in vivo 데이터는 대장균의 대사와 병원성에 있어서 AdhE의 생물학적 의미를 보다 자세히 설명할 수 있을 것으로 기대된다.

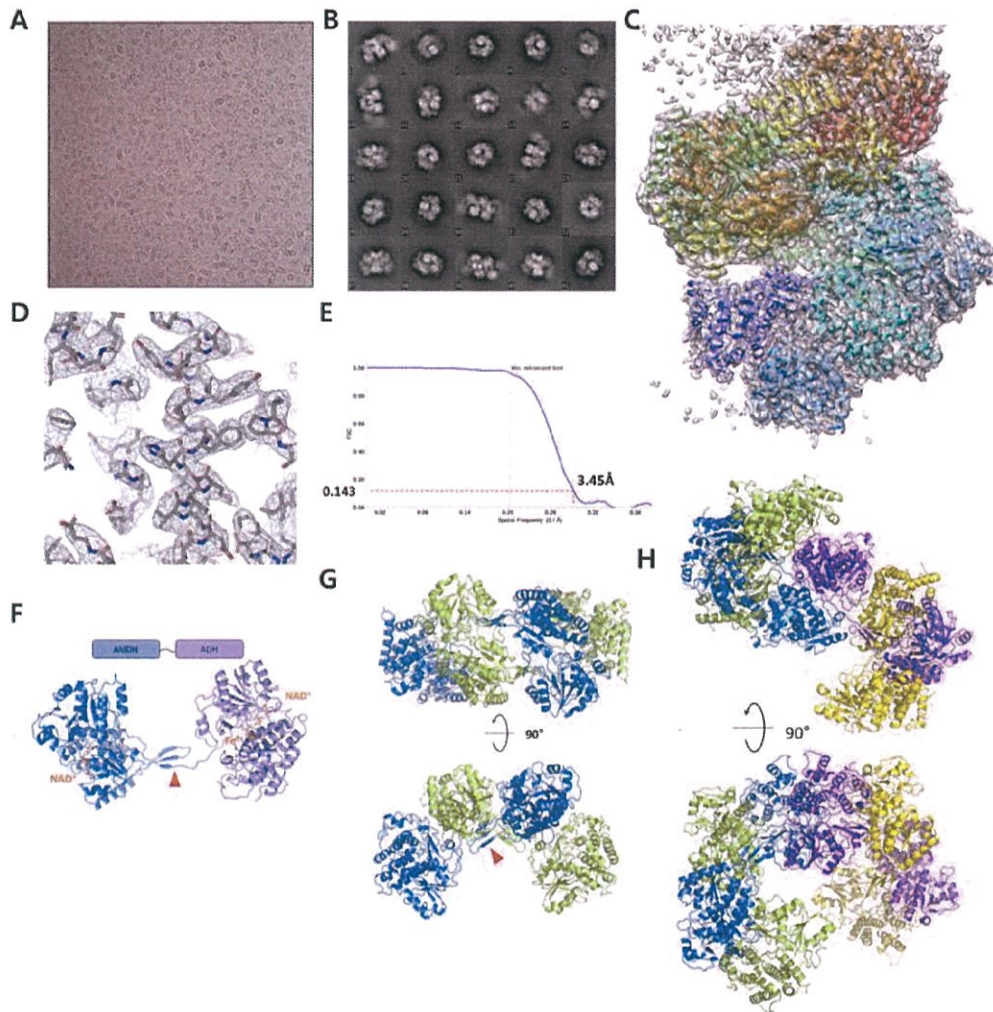


그림 1 AdhE의 구조 및 다량체 형성 원리 ! A. Titan Krios로 촬영한 AdhE의 Cryo-EM micrographs. 총 1300여 장을 데이터 프로세싱에 사용하였다. B. cisTEM을 사용한 2D classification 결과. C. 최종적으로 얻은 AdhE의 삼차원 구조. cisTEM 프로세싱을 통해 얻은 3D volume(회색)에 phenix로 refine한 구조가 fitting 되어 있다. D. 확대된 AdhE의 구조. 3D volume(회색 mash)에 아미노산이 fitting되어 있음. (회색은 탄소, 파란색은 질소, 빨간색은 산소를 표기함). E. cisTEM 프로세싱 결과로 나타난 FSC curve. F. AdhE 단량체의 구조. 파란색은 aldehyde dehydrogenase를, 보라색은 alcohol dehydrogenase를 표시하였다. 빨간 화살표는 linker 부분을 가리킨다. G. AdhE의 dimer 구조 (side view(위) 와 top view(아래)). H. AdhE의 tetramer 구조.

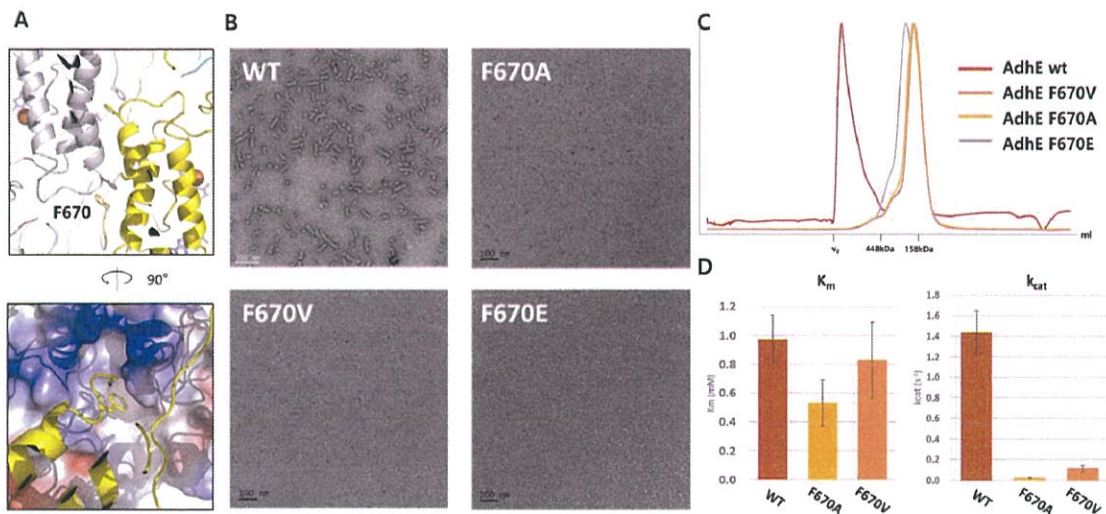


그림 2 AdhE mutant와 이에 대한 생화학적 실험! A. alcohol dehydrogenase 사이에 존재하는 hydrophobic interaction. F670은 막대로 표시되어 있다. B. wild type과 mutant에 대한 negative staining EM 사진. C. wild type과 mutant의 size exclusion chromatogram. 각 위치에 해당하는 marker를 표기하였다. D. wild type과 mutant에 대한 acetyl-CoA reductase activity assay.  $K_m$ 은 Michaelis constant를(좌),  $k_{cat}$ 은 turnover rate(우) 이다. F670E에 대해서는 활성이 전혀 관찰되지 않아 kinetics를 측정할 수 없었다.

## II. 기술개발결과

※ 해당 사항 없음

## III. 결론 및 차년도 계획

차년도에서는 2차년도에 동정한 AdhE 단백질 구조체의 구조를 바탕으로 기능을 연구하고, 세포내 다른 다양한 구조체를 탐색한다. .

## IV. 기타