



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0047634
(43) 공개일자 2019년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/12 (2006.01) C12P 5/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1205 (2013.01)
C12P 5/026 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0129179
(22) 출원일자 2018년10월26일
심사청구일자 2018년10월26일
(30) 우선권주장
1020170140730 2017년10월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이곤호
경상남도 진주시 천수로 315, 106동 1206호
(74) 대리인
특허법인태백

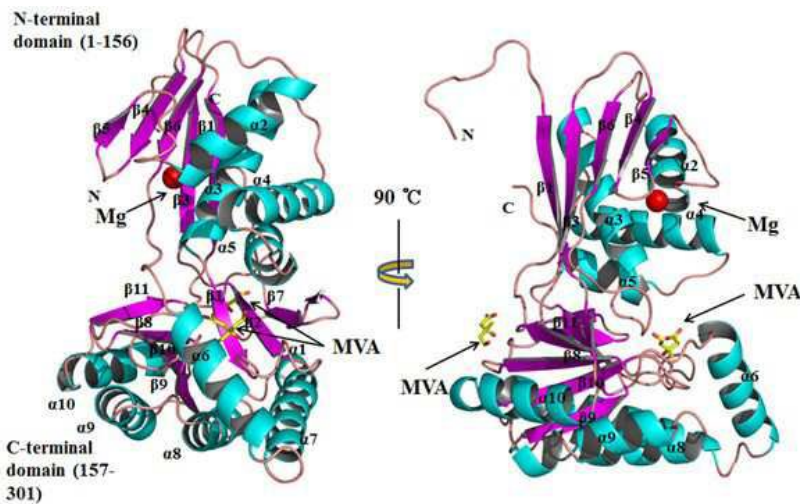
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **MmMVK-메발론산 복합체의 3차원 결정 구조 및 기질저해 저항성 돌연변이 메발론산 인산화효소**

(57) 요약

본 발명은 *MmMVK*-메발론산(mevalonate) 복합체의 3차원 결정 구조 및 기질저해 저항성 돌연변이 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *MmMVK*)에 관한 것으로서, 본 발명자는 고세균의 메발론산 인산화효소 단백질과 기질인 메발론산 복합체의 삼차원 구조를 엑스선결정법의 방법으로 결정 분석하였다. 이 삼차원 구조에서 지금까지 알려진 기질결합자리와 다른 두 번째의 기질 결합자리를 발견하였다. 이 새로운 결합자리의 아미노산 잔기를 돌연변이 했을 때 기질농도에 따른 효소의 활성이 억제되는 자기저해에 저항성을 가지는 돌연변이 단백질을 발견하였다. 돌연변이 단백질의 효소활성분석과 삼차원 구조를 결정하였다. 새롭게 개발된 돌연변이 메발론산 인산화효소 단백질은 이소프렌 생합성 경로인 메발론산 경로에서 이소프렌 생합성의 율속단계 효소로서 이소프렌 생합성의 수율 향상에 도움을 줄 것으로 예상된다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12Y 207/01036 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3D3A1A01913246

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기후변화대응기술개발

연구과제명 메탄가스를 이용한 고부가가치 이소프렌의 생물학적 제조기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *MmMVK*)와 메발론산(mevalonate) 기질이 결합하고 있는 *MmMVK*-메발론산 복합체의 3차원 결정 구조로서,

상기 메발론산(mevalonate) 기질은 *MmMVK*의 N-terminal 도메인과 C-terminal 도메인 사이의 힌지(hinge) 부위에 결합하고, *MmMVK*의 Pro159, Lys292, Pro293 및 Glu295로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산과 결합하는 *MmMVK*-메발론산 복합체 3차원 구조결정.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소는 메타노사르키나 마제이(*Methanosarcina mazei*) 유래인 것을 특징으로 하는 *MmMVK*-메발론산 복합체 3차원 구조결정.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 *MmMVK*-메발론산 복합체는 단사정계의 공간 그룹(monoclinic space group)이 $P2_12_12_1$ 이고, 유니트 셀 차원(unit-cell parameters)이 $a=43.4 \text{ \AA}$, $b=96.55 \text{ \AA}$, $c=133.71 \text{ \AA}$ 이고, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 인 것을 특징으로 하는 *MmMVK*-메발론산 복합체 3차원 구조결정.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 *MmMVK*-메발론산 복합체는 *MmMVK*와 메발론산(mevalonate) 기질의 결합에 의해 열린 구조를 형성하는 것을 특징으로 하는 *MmMVK*-메발론산 복합체 3차원 구조결정.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 *MmMVK*-메발론산 복합체 3차원 구조결정을 이용하여, 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *MmMVK*)의 활성을 촉진하는 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 6

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *MmMVK*)에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 중 Pro159, Lys292, Pro293 및 Glu295로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 잔기를 알라닌(alanine)으로 치환한 돌연변이 메발론산 인산화효소.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소는 메타노사르키나 마제이(*Methanosarcina mazei*) 유래인 것을 특징으로 하는 돌연변이 메발론산 인산화효소.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 돌연변이 메발론산 인산화효소는 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 이루어진 것을 특징으로 하는 돌연변이 메발론산 인산화효소.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 돌연변이 메발론산 인산화효소는 메발론산 기질저해 저항성 돌연변이인 것을 특징으로 하는 돌연변이 메발론산 인산화효소.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 돌연변이 메발론산 인산화효소를 숙주세포에서 발현시키는 단계를 포함

하는 이소프렌(isoprene) 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *Mm*MVK-메발론산(mevalonate) 복합체의 3차원 결정 구조 및 기질저해 저항성 돌연변이 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *Mm*MVK)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2-메틸-1,3-뷰타다이엔으로도 공지된 이소프렌(isoprene)은 휘발성 5-탄소 탄화수소이다. 이소프렌은 미생물, 식물 및 동물 종을 포함하는 다양한 유기체에 의해 생성된다. 메발론산 경로(MVA pathway) 및 비메발론산(또는 메발론산 독립적) 경로(MEP pathway)의 이소프렌 생합성에 대한 2개의 경로가 존재한다(도 1). MVA 경로는 진핵 생물, 고세균 및 고등 식물의 시토플라스트에 존재한다. MEP 경로는 대부분의 박테리아, 녹조류 및 고등 식물의 엽록체에서 발견된다.

[0003] 이소프렌 화합물은 생체 유래 고무의 원재료로 사용될 수 있다. 이소프렌은 아세틸CoA에서 메발론산을 거쳐 이소프렌이 생합성되는 대사경로인 메발론산 경로의 최종 산물로서 이후의 여러 생체 물질의 전구 물질로 사용되며 생체 유지에 필수 불가결한 물질이다.

[0004] 상기 메발론산 경로에서 율속단계의 효소로 메발론산의 인산화에 관련하는 효소인 메발론산 인산화효소는 상기 이소프렌 생합성 경로에서 메발론산 하부 대사산물에 의해 효소 활성이 억제되는 피드백 억제(feedback inhibition)가 일어나는 것으로 알려졌다. 다만, 고세균인 메타노사르키나 마제이(*Methanosarcina mazei*) 유래 메발론산 인산화효소는 기존에 알려진 바와 다르게 이소프렌 생합성 경로에서 메발론산 하부 대사산물에 의한 피드백 억제가 일어나지 않는다고 보고되었다(*Appl Environ Microbiol.* 2011 Nov; 77(21): 7772-7778).

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) PCT 공개특허 WO 2006-063752 (2006.06.22 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 *Mm*MVK-메발론산(mevalonate) 복합체의 3차원 결정 구조 및 기질저해 저항성 돌연변이 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *Mm*MVK)를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *Mm*MVK)와 메발론산(mevalonate) 기질이 결합하고 있는 *Mm*MVK-메발론산 복합체의 3차원 결정 구조로서, 상기 메발론산(mevalonate) 기질은 *Mm*MVK의 N-terminal 도메인과 C-terminal 도메인 사이의 힌지(hinge) 부위에 결합하고, *Mm*MVK의 Pro159, Lys292, Pro293 및 Glu295로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산과 결합하는 *Mm*MVK-메발론산 복합체 3차원 구조결정을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 *Mm*MVK-메발론산 복합체 3차원 구조결정을 이용하여, 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *Mm*MVK)의 활성을 촉진하는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *Mm*MVK)에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 중 Pro159, Lys292, Pro293 및 Glu295로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 잔기를 알라닌(alanine)으로 치환한 돌연변이 메발론산 인산화효소를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 돌연변이 메발론산 인산화효소를 숙주세포에서 발현시키는 단계를 포함하는 이소프렌(isoprene) 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 *Mm*MVK-메발론산(mevalonate) 복합체의 3차원 결정 구조 및 기질저해 저항성 돌연변이 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *Mm*MVK)에 관한 것으로서, 본 발명자는 고세균의 메발론산 인산화효소 단백질과 기질인 메발론산 복합체의 삼차원 구조를 엑스선결정법의 방법으로 결정 분석하였다. 이 삼차원 구조에서 지금까지 알려진 기질결합자리와 다른 두 번째의 기질 결합자리를 발견하였다. 이 새로운 결합자리의 아미노산 잔기를 돌연변이 했을 때 기질농도에 따른 효소의 활성이 억제되는 자기저해에 저항성을 가지는 돌연변이 단백질을 발견하였다. 돌연변이 단백질의 효소활성분석과 삼차원 구조를 결정하였다. 새롭게 개발된 돌연변이 메발론산 인산화효소 단백질은 이소프렌 생합성 경로인 메발론산 경로에서 이소프렌 생합성의 율속단계 효소로서 이소프렌 생합성의 수율 향상에 도움을 줄 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 이소프렌 생합성 경로를 나타낸다.

도 2는 *Mm*MVK 대장균 발현벡터 제조 과정을 나타낸다.

도 3은 *Mm*MVK 대장균 대량 발현 및 순수분리 정제 결과를 나타낸다.

도 4는 *Mm*MVK 결정을 나타낸다. 마름모형다면체(b)와 직각다면체형(c) 결정의 모양.

도 5는 *Mm*MVK 결정의 회절이미지를 나타낸다.

도 6은 *Mm*MVK와 기질인 mevalonate 복합체의 결정과 조효소인 ATP 유사체인 AMPPNP 복합체의 결정을 유사한 결정조건에서 결정화한 복합체 결정의 회절이미지를 나타낸다.

도 7은 *Mm*MVK apo 단백질의 삼차원 구조를 나타낸다.

도 8은 *Mm*MVK와 mevalonate 복합체 구조를 나타낸다. N-terminal 도메인과 C-terminal 도메인 사이에 기질인 mevalonate가 결합되어 있음을 볼 수 있다.

도 9는 활성자리에 결합한 mevalonate를 나타낸다. 원래의 알려진 활성자리에 결합하고 있는 mevalonate의 구조와 분명한 전자밀도함수($F_o - F_c > 3\sigma$)를 확인할 수 있었다(오른쪽: 주변 잔기와의 수소결합을 점선으로 표시). 그리고, 활성자리의 표면에 깊게 결합되어 있음을 볼 수 있었다(왼쪽).

도 10은 활성자리가 아닌 곳에 결합하고 있는 mevalonate의 구조를 나타낸다. 활성자리의 뒤쪽, N-terminal과 C-terminal 도메인의 hinge 부분에 결합하고 있는 mevalonate를 전자밀도함수($F_o - F_c > 2.5\sigma$)로 나타내었다(오른쪽: 수소결합은 점선, mevalonate는 노란색, *Mm*MVK는 녹색). 활성자리 뒤쪽 표면에 결합되어 있음을 볼 수 있다(왼쪽).

도 11은 두 번째 활성자리에 결합한 mevalonate(노란색)와 apo 구조(오렌지색)와 복합체(녹색) 구조의 비교 결과를 나타낸다. mevalonate가 결합하기 전 구조와 결합한 후의 구조를 비교해보면 결합부위 부근의 아미노산 잔기의 구조에 변화가 있음을 볼 수 있다. 아미노산 잔기 Glu295와 Lys292 (빨간색 화살표로 표시)가 각각 겹사슬이 130도, 90도 만큼 회전하여 mevalonate 방향으로 움직였음을 볼 수 있었다.

도 12는 두 번째 mevalonate 결합부위의 도메인 hinge center 부분을 나타낸다.

도 13은 농도에 따른 *Mm*MVK 효소의 초기반응속도를 나타낸다. 농도가 높아짐에 따라 15 mM 이상의 mevalonate 농도에서 초기반응속도가 감소함을 볼 수 있다.

도 14는 두 번째 기질 결합 부위의 아미노산 잔기를 나타낸다. 돌연변이 제작을 위하여 선택된 잔기를 박스(빨간색)로 표시하였다.

도 15는 *Mm*MVK 돌연변이 단백질의 기질농도변화에 따른 효소반응속도 결과를 나타낸다. 야생형과 돌연변이 단백질의 mevalonate 농도에 따른 반응속도를 측정한 결과, 돌연변이 159/292, 295/292 와 159/292/295 세 개 돌연변이는 그 반응속도가 감소하지 않음을 볼 수 있다(위). 반응속도를 제일 높은 활성값과 기질 50 mM 일 때의 활성값을 막대그래프로 나타냈다(아래).

도 16은 야생형 *Mm*MVK 단백질의 저농도와 고농도의 mevalonate 조건에서 결정화 결과를 나타낸다.

도 17은 돌연변이 K295A/E292A *Mm*MVK 단백질의 저농도와 고농도 mevalonate 조건에서 결정화 결과를 나타낸다.

도 18은 *MmMVK* 구조의 비교 결과를 나타낸다. 두 번째 기질 결합 구조와 고농도(50 mM 기질) 결합 복합체 구조가 가장 큰 구조적인 차이를 보인다.

도 19는 *MmMVK* 2nd mevalonate 구조와 *MmMVK* + 50 mM mevalonate 구조의 단백질 표면을 나타낸다. 활성자리를 비교하면 *MmMVK* 2nd mevalonate 구조가 *MmMVK* + 50 mM mevalonate 구조보다 더 열린 구조인 것을 볼 수 있다. 표면적의 차이를 살펴보면 *MmMVK* 2nd mevalonate 구조가 426.9 Å² 더 크다(왼쪽 두 도면). 두 번째 mevalonate 결합부위를 비교하면 *MmMVK* + 50 mM mevalonate 구조에서 결합부위가 좁아져서 mevalonate가 결합할 수 없음을 볼 수 있다(오른쪽 두 도면).

도 20은 *MmMVK*의 열린구조에서 닫힌구조로 구조변화를 나타낸다. C-terminal 도메인은 잘 겹쳐지지만, N-terminal 도메인은 접합부분(초록색)을 지나는 회전축(오렌지색)에 대하여 시계반대방향으로 약 10도 회전하여 닫힌구조로 변환함을 볼 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *MmMVK*)와 메발론산(mevalonate) 기질이 결합하고 있는 *MmMVK*-메발론산 복합체의 3차원 결정 구조로서, 상기 메발론산(mevalonate) 기질은 *MmMVK*의 N-terminal 도메인과 C-terminal 도메인 사이의 힌지(hinge) 부위에 결합하고, *MmMVK*의 Pro159, Lys292, Pro293 및 Glu295로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산과 결합하는 *MmMVK*-메발론산 복합체 3차원 구조결정을 제공한다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소는 메타노사르키나 마제이(*Methanosarcina mazei*) 유래일 수 있으며, UniProt ID: Q8PW39 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 *MmMVK*-메발론산 복합체는 단사정계의 공간 그룹(monoclinic space group)이 P2₁2₁2₁이고, 유니트 셀 차원(unit-cell parameters)이 a=43.4 Å, b=96.55 Å, c=133.71 Å이고, α=β=γ=90° 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 *MmMVK*-메발론산 복합체는 *MmMVK*와 메발론산(mevalonate) 기질의 결합에 의해 열린 구조를 형성할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 *MmMVK*-메발론산 복합체 3차원 구조결정을 이용하여, 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *MmMVK*)의 활성을 촉진하는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *MmMVK*)에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 중 Pro159, Lys292, Pro293 및 Glu295로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 아미노산 잔기를 알라닌(alanine)으로 치환한 돌연변이 메발론산 인산화효소 및 이의 기능적 동등물을 제공한다.
- [0019] 상세하게는, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 메발론산 인산화효소는 메타노사르키나 마제이(*Methanosarcina mazei*) 유래일 수 있으며, UniProt ID: Q8PW39 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 상세하게는, 상기 돌연변이 메발론산 인산화효소는 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 서열번호 2로 이루어진 돌연변이 메발론산 인산화효소는 Lys292/Glu295 돌연변이이며, 서열번호 3으로 이루어진 돌연변이 메발론산 인산화효소는 Pro159/Lys292/Glu295 돌연변이이다.
- [0021] 상세하게는, 돌연변이 메발론산 인산화효소는 메발론산 기질저해 저항성을 갖을 수 있다.
- [0022] 본 발명의 "기능적 동등물"에는 본 발명의 돌연변이 메발론산 인산화효소 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 상기 효소 기능을 유지하는 것 모두를 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 돌연변이 메발론산 인산화효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 돌연변이 메발론산 인산화효소를 숙주세포에서 발현시키는 단계를 포함하는 이소프렌(isoprene) 생산방법을 제공한다.

[0024] 상기 돌연변이 메발론산 인산화효소를 숙주세포에서 발현시키는 단계는 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0025] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0026] <실험예>

[0027] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0028] 1. 단백질 발현과 분리 정제

[0029] 메타노사르키나 마제이(*Methanosarcina mazei*; *M. mazei*) 유래 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; *MmMVK*)의 유전자는 *M. mazei* 게놈 DNA로부터 제한 효소 NdeI과 BamHI 자리(진한 글자)를 포함하는 프라이머 5' -GCG **CAT ATG** GTT TCA TGT TCT GCG CCC-3' 와 5' -GCG **GGA TCC** TCA ATC GAC CTT CAA CCC-3' 를 사용하여 PCR로 증폭하였다. 900 bp 크기의 PCR 산물을 아미노말단에 히스티딘 태그와 트롬빈 프로테아제 자리를 (MGSSHHHHHHSSGLVLPGRSH) 가진 단백질로 발현하기 위하여 발현 벡터 pET-28a (Novagen, Madison, Wisconsin, USA)에 삽입하였다. 발현 벡터에 삽입된 *MmMVK* 유전자는 DNA 서열 확인 방법으로 확인되었다. 이론적인 단백질의 분자량은 약 33.6 kDa이고 이론적인 등전점(isoelectric point)는 6.6이다.

[0030] 단백질 발현을 위하여 서열이 확인된 *MmMVK* 발현 벡터를 대장균 BL21(DE3) 균주에 형질전환하였다. 형질 전환된 대장균을 먼저 10 ml의 Luria-Bertani (LB) 액체 배지에서 하루 밤동안 배양하고, 이를 항생제 카나마이신(30 ug/ml)이 포함된 1000 ml M9 최소 배지에 접종한 후에 섭씨 30도에서 파장 600 nm 흡광도가 0.6이 될 때까지 배양한다. 그리고 셀레노메티오닌(seleno-methionine) (Acros Organics, New Jersey, USA) 40 ug/ml과 다른 17가지의 L-아미노산을 첨가하였다. 그리고, 0.4 mM 농도의 isopropyl β-D-1 thiogalactopyranoside (IPTG)를 사용하여 단백질 발현을 섭씨 30도에서 하루 동안 유도하였다. 하루 유도 후에 대장균을 원심분리(6000 rev/min, 6 min, 섭씨 4도)하여 수확하였다. 세균 덩어리를 결합버퍼(50 mM sodium phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM β-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂)에 고르게 섞은 후에 초음파로 파쇄하였다. 파쇄한 세균 용액을 원심분리(12000 rev/min, 1 h)한 후에 상층의 맑은 용액을 필터하고(qualitative filter paper, Advantec, Japan) 니켈-NTA 비드(bead)의 칼럼에 부어 넣었다. 먼저, 칼럼을 10 칼럼 부피의 결합버퍼로 씻은 후에 20 칼럼 부피의 세척버퍼(50 mM sodium phosphate pH 8.0, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂)로 씻었다. 재조합 *MmMVK* 단백질은 용리버퍼 (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 300 mM imidazole, 5 mM β-mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂)로 칼럼에서 용리하였다. 단백질을 포함하는 부분들을 SDS-PAGE로 확인하고, 이를 모아 농축한 후에 울트라필터링 농축기Corning Spin-X UF concentrator with 30K molecular-weight cutoff (Corning Inc., New York, USA)를 사용하여 버퍼를 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂ 로 교환하였다. 그리고, *MmMVK*는 음이온 교환수지 칼럼 Resource 15Q column (GE Healthcare, Piscataway, New Jersey, USA)를 사용하여 NaCl 농도 0-300 mM로 선형 변화하여 버퍼 (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂)에서 분리하였다. *MmMVK*를 포함한 부분을 모아 같은 방법으로 농축한 후에, 마지막으로 버퍼 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂)에서 Superdex 200 column (GE Healthcare)를 사용한 겔크로마토그래피로 분리정제하였다. 모든 분리정제 과정은 단백질을 안정화시키는 것으로 생각되는 얼음으로 차게 한 버퍼를 사용하여 상온에서 실행하였다. 단백질의 농도는 Bradford assay (Bradford, 1976) 방법으로 결정되었다. 결정화를 위하여 히스티딘 태그는 제거하지 않았다.

[0031] 2. 결정화

[0032] *MmMVK*의 결정화는 초기에 결정성장용 스크린 용액 Crystal Screen, Crystal Screen 2, Index (Hampton Research, California, USA), Wizard Screens I and II, Cryo Screens I and II (Emerald BioStructures, Bainbridge Island, Washington, USA)과 실험실 제조 용액을 사용하여 마이크로배치 결정화 방법을 섭씨 18도에서 사용하여 수행하였다. 1 μl 단백질 용액 (10 mg/ml, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂)과 1 μl 스크리닝 용액을 같이 섞어서 72-well 마이크로 플레이트에서 알스오일(Al's oil) 아래 균등화시켰다. 처음으로 Index 용액 No. 82에서 단백질 결정이 만들어 졌다. 단백질 결정 조건을 최적화하기 위하여 염과 침전제

의 농도를 변화시켜 매달린 방울 증기확산법 (hanging drop vapor diffusion method)을 사용하였다. 최상의 결정을 결정화 용액 0.32 M $MgCl_2$, 0.08 M bis-tris pH 5.5, 16%(w/v) PEG 3350의 조건에서 얻을 수 있었다. 방울 크기는 단백질 3 μ l와 결정화 용액 3 μ l을 사용하였다. ATP, ADP, AMPNP, 메발론산과의 복합체 결정은 이들을 각각 apo-MmMVK 결정에 5 mM 농도로 들어있는 용액에 결정을 1분에서 30 분정도 담근 후에 열려서 회절 실험을 수행하였다.

[0033] **3. 엑스선 회절 데이터 수집과 데이터 분석**

[0034] 엑스선 회절 실험을 하기위하여 먼저 결정을 10 초 정도 저온 보존 용액 (0.32 M $MgCl_2$, 0.08 M bis-tris pH 5.5, 17%(w/v) PEG 3350, 10% glycerol)에 담근 후에 액체 질소에 재빨리 담귀 얼린다. 엑스선 회절 실험을 대한민국 포항공속기연구소의 빔라인 5C에서 ADSC Quantum 210 CCD 검출기를 사용하여 절대온도 100도에서 수행하고 회절데이터를 수집하였다. MAD (multiple anomalous dispersion) 데이터를 수집하기 위하여 엑스선 파장 0.97947 Å (peak), 0.97954 Å (edge) and 0.97179 Å (remote)의 세 가지 파장을 사용하여 각각 180 개의 이미지를 1도의 진동각과 노출시간 1초로 데이터를 수집하였다. 모든 회절 데이터는 HKL-2000 suite (Otwinowski & Minor, 1997) 프로그램을 사용하여 분석하였다.

[0035] **4. 자리지정 돌연변이**

[0036] MmMVK 특정 아미노산 잔기를 Stratagene의 자리지정 돌연변이 키트(Agilten technologies, Inc., Santa Clare, CA, USA)를 사용하여 생산자의 방법을 따라 알라닌으로 돌연변이 하였다. MmMVK의 아미노산 잔기 159, 292, 293, 295와 159/293, 159/295, 159, 292, 295/292, 그리고 159/292/295 각각 단일, 이중, 삼중 돌연변이를 만들었다.

[0037] **5. MmMVK 활성 측정**

[0038] MmMVK 효소의 활성 측정은 섭씨 30도에서 96-well 플레이트를 사용하였다. 각각의 용액은 50 mM Tris, 50 mM NaCl pH 7.6 용액 100 μ l로 0.5 mM PEP, 0.5 mM DTT, 0.32 mM NADH, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ATP, 2 U of LDH, 2 U of PK를 포함하고 있다. 효소 반응은 80 nM의 정제한 MmMVK 단백질을 더하여 시작하였다. 효소 반응의 측정은 파장 340 nm의 흡광도를 측정하여 NADH의 농도를 반응의 정도로 측정하였다. 이 반응에 사용한 메발론산을 메발로락톤을 KOH와 1.5:1(mol:mol)로 섞은 후에 섭씨 37도에서 하루밤동안 반응하여 만들고 pH 7.0으로 맞추어 사용하였다.

[0039] **6. 구조 결정 및 정밀화**

[0040] apo-MmMVK 단백질의 구조는 seleno-methione을 유도체를 사용하여 SAD (single anomalous dispersion)의 방법으로 구조를 결정하였다. apo-MmMVK 고해상도의 구조는 SAD에 의하여 결정된 구조를 사용하여 CCP4 program Suite의 MolRep 프로그램을 사용하여 분자치환법으로 구조를 결정하였다. 구조는 Phenix 프로그램으로 정밀화하였고, Coot 프로그램으로 수동으로 모델을 구축하였다. 수 차례의 정밀화과정과 모델 구축과정을 한 후에 R-factor가 20% 정도이며 더 이상 모델이 좋아지지 않을 때 구조를 완성한다. 최종 모델의 질은 PROCHECK 프로그램으로 확인한다. ATP 혹은 ADP, 메발론산과의 복합체 구조는 분자치환법으로 apo-MmMVK 모델을 사용하여 결정하였다. 구조 정밀화와 모델 빌딩은 같은 방법으로 수행하였다.

[0041] **<실시예 1> MmMVK 대장균 발현벡터 제조, 대장균 대량 발현 및 순수분리 정제**

[0042] **1. MmMVK 대장균 발현벡터 제조**

[0043] *Methanosarcina mazei*의 메발론산 인산화효소(mevalonate kinase; MmMVK)를 발현벡터 pET-28a에 서브클로닝하고, PCR로 유전자를 증폭한 후, 제한효소 NdeI과 BamHI으로 자른 후 벡터에 ligation하고 XL1(Blue) 균주에 형질전환하여 LB/Kan 배지에서 선별하였다. 선별된 균주는 DNA mini-prep을 하여 벡터를 준비하고 PCR과 제한효소 mapping을 통하여 벡터에 삽입된 유전자의 조각을 확인하였다(도 2).

[0044] **2. MmMVK 대장균 대량 발현 및 순수분리 정제**

[0045] 니켈친화, 이온교환수지, 겔여과 크로마토그래피의 방법으로 MV 단백질을 순수 분리 정제할 수 있었다. 최종 분리된 단백질의 순도는 Native-PAGE와 SDS-PAGE로 확인할 수 있었다(도 3).

[0046] **<실시예 2> MmMVK 결정화 및 구조 결정**

[0047]

1. *Mm*MVK 결정화 및 X-선 회절데이터 수집

[0048]

*Mm*MVK 단백질을 10 mg/ml의 농도로 결정화를 시도하여 결정을 얻을 수 있었다. *Mm*MVK 단백질은 16% PEG3350, 0.32 M MgCl₂, 0.08 M Bis-Tris pH 5.5의 조건에서 hanging drop vapor diffusion 방법으로 결정화 하였다. 결정의 모양이 직각다면체형(orthogonal)과 마름모형다면체(rhombohedral)의 두 가지가 한 용액속에 생겼으나 마름모형 다면체만 성공적으로 얻어 회절데이터를 수집할 수 있었다(도 4). 마름모형다면체를 사용하여 X-선 회절 데이터를 2.08 Å 해상도까지 수집하였다 (도 5).

[0049]

또한, *Mm*MVK와 기질인 mevalonate 복합체의 결정과 조효소인 ATP 유사체인 AMPPNP 복합체의 결정을 유사한 결정 조건에서 결정화하였다. 이 복합체 결정으로부터 높은 해상도의 회절데이터를 얻을 수 있었다(도 6).

[0050]

2. *Mm*MVK 단결정의 X-선 회절데이터 및 구조 결정

[0051]

(1) *Mm*MVK apo 구조 결정 및 분석

[0052]

*Mm*MVK의 삼차원 구조는 MAD (multiple anomalous dispersion) 방법으로 결정하였고, *Mm*MVK apo 삼차원 구조를 모델링하고 삼차원 구조를 결정하였다. 최종적으로 1.91 Å 해상도로 *Mm*MVK apo 단백질의 구조를 결정하였다(표 1). 최종 R factor는 25%이고 Ramachandran plot에서 98%의 아미노산 잔기의 구조가 허용되는 부분에 있음을 확인할 수 있었다. *Mm*MVK 단백질은 이량체로 존재하고 있으며, 각각의 단백질 분자는 베타병풍과 알파나선 구조가 상호작용되어 있는 구조로 되어있다(도 7).

표 1

[0053]

Data	Se-Met			Native
	peak	edge	remote	
Space group	P21212			P21212
Unit-cell parameters (Å)	a = 97.11, b = 135.915, c = 46.03, α = β = γ = 90 °			a = 97.295, b = 135.359, c = 45.867, α = β = γ = 90 °
Distance (mm)	310			280
Exposure time (S)	1			1
Oscillation	1			1
No. of images	180			180
Wavelength (Å)	0.97947	0.97954	0.97179	0.97945
energy (eV)	12658.4	12657.4	12758.4	12658.6
Resolution (Å)	50 - 2.08 (2.12 - 2.08)	50 - 2.08 (2.12 - 2.08)	50 - 2.08 (2.12 - 2.08)	40 - 1.91 (1.94 - 1.91)
Unique reflections	37136 (1420)	37243 (1019)	38177 (1847)	47072 (1688)
Completeness (%)	98.5 (76.8)	97.4 (53.7)	99.7 (98.4)	97.8 (72.2)
Rmerge (%)	8.5 (63.3)	7.7 (82.1)	7.4 (0.0)	9.3 (70.9)
Redundancy	7.1 (6.2)	7.1 (5.8)	7.1 (5.7)	6.9 (5.9)
I/s (I)	13.7	12.4	10.8 (12.6)	14.4 (13.6)
Figure of merit ^b	0.51/0.68			
Refinement				
Resolution (Å) ^c				40.93 - 1.91 (1.94 - 1.91)
R _{work} /R _{free} (%) ^d				25.3/30.2
No. of nonhydrogen atoms				4710
No. of water molecules				166
Magnesium ions				2
root mean square deviations				
Bond length (Å)				0.023
Bond angle (Å)				1.95
Average B factor (Å ²)				
Protein				41.523
Water				43.146
Magnesium ions				34.5

Ramachandran plote				
Most favorable residues (%)				92.5
Additional allowed residues (%)				6.9
Generously allowed residues (%)				0.6

(2) *Mm*MVK-mevalonate 복합체 구조의 결정

*Mm*MVK와 기질인 mevalonate와의 복합체 구조를 해상도 1.4 Å 해상도로 결정하였다(표 2). 이 복합체 구조에서 N-terminal 도메인(1-156)과 C-terminal 도메인(157-301) 사이에 위치하는 활성자리에 기질인 mevalonate가 결합되어 있음을 전자밀도를 통하여 확인할 수 있었다. 또한, 특이하게도 활성자리가 아닌 곳에 두 번째의 mevalonate가 결합되어 있음을 볼 수 있었다(도 8).

표 2

	Apo	MEV complex
Data collection		
Beamline	PAL-5C	PAL-7A
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Unit-cell parameters (Å)	a = 97.295,	a = 43.4,
	b = 135.359,	b = 96.55,
	c = 45.867,	c = 133.71,
	α = β = γ = 90°	α = β = γ = 90°
Distance (mm)	280	160
Exposure time (S)	1	1
Oscillation	1	0.3
No. of images	180	740
Wavelength (Å)	0.97945	0.97933
energy (eV)	12658.6	12660
Resolution (Å)	40 - 1.91 (1.94 - 1.91)	50 - 1.40 (1.42-1.40)
Unique reflections	47072 (1688)	110905 (5400)
Completeness (%)	97.8 (72.2)	99.4 (98.6)
R _{merge} (%) ^a	9.3 (70.9)	7.4 (70.1)
Redundancy	6.9 (5.9)	8.5 (6.9)
I/s (I)	14.4 (13.6)	11.4
Refinement		
Resolution (Å) ^b	40.9 - 1.92	26.5 -1.40
R _{work} /R _{free} (%) ^c	25.3/30.1	20.3/23.1
No. of nonhydrogen atoms	4710	5154
No. of water molecules	166	528
magnesium ions	2	2
Mevalonate		3
root mean square deviations		
Bond length (Å)	0.023	0.028
Bond angle (°)	1.96	2.443
Average B factor (Å ²)		
Protein	40.95	20.06
Water	43.13	31.99
Magnesium ions	38.36	21.81
MEV		31.08
Ramachandran plot (%) ^d		
Residues in favoured regions	92.5	98.1

Residues in allowed regions	6.9	1.9
Residues in outlier regions	0.6	0

[0057] (3) 새로운 mevalonate 결합 부위

[0058] 이 복합체 구조에서 mevalonate는 두 개가 결합되어 있는데, 원래의 잘 알려진 활성자리에 결합하고 있는 것과 특이하게도 활성자리가 아닌 원래 활성자리의 뒷 부분에 결합되어 있는 것이 발견되었다(도 9 및 도 10). 활성자리가 아닌 곳에 결합하고 있는 mevalonate는 N-terminal 도메인과 C-terminal 도메인의 뒷부분으로 각각의 도메인이 움직일 수 있는 hinge 부위에 결합되어 있음을 볼 수 있었다(도 11 및 도 12).

[0059] 두 번째 결합부위의 구조를 Apo와 복합체 구조사이를 겹쳐 비교했을 때, mevalonate 결합에 의하여 Glu256, Lys292 두 개의 잔기의 구조가 변화하였음을 볼 수 있었다. MmMVK의 두 번째 mevalonate 결합부위는 열린구조와 닫힌구조로 변화하는 interdoamin hinge와 거의 일치하고 있다. 따라서, 두 번째 mevalonate 결합이 hinge 부분의 움직임과 상관관계가 있을 것으로 추측된다.

[0060] <실시예 3> MmMVK의 두 번째 기질 결합 부위의 돌연변이 및 기질 저해에 대한 구조적 변화 및 메커니즘 분석

[0061] 결정된 MmMVK와 mevalonate 기질 복합체 구조에서 기존에 알려진 활성자리가 아닌 두 번째 기질 분자가 결합한 것을 알게 되었다. 이 두 번째 결합자리의 기질 결합에 MmMVK의 효소활성에 대한 변화를 분석하기 위해서 이 부위 결합에 주요한 아미노산 잔기를 자리지정 돌연변이를 사용하여 찾아내고 이 부위의 돌연변이 단백질을 제조하여 MmMVK 효소활성의 변화를 분석하였다.

[0062] 1. 두 번째 기질 결합 부위의 발견

[0063] MmMVK와 mevalonate의 구조 분석을 통하여 기질인 mevalonate가 기존의 알려진 결합 부위가 아닌 그 반대편에 결합하여 있음을 발견하였다. 이 새로운 mevalonate 결합 부위는 MmMVK 효소의 조절작용과 연관이 있을 것으로 생각되었다.

[0064] 2. MmMVK의 기질 활성 저해

[0065] MmMVK의 활성을 기질의 농도에 따른 활성의 변화를 측정하였다. 그런데, 특이한 것은 MmMVK의 활성이 기질의 농도가 증가함에 따라 증가하다가 어떤 농도 이상이 되면 활성이 다시 감소함을 볼 수 있었다(도 13). 즉, 기질인 mevalonate의 농도가 15 mM 이상이 되면 활성이 감소함을 볼 수 있었다. 이것은 MmMVK 효소 활성이 기질의 특정 농도 이상에서 기질에 의한 자기저해(self-inhibition)에 의해서 활성 저해가 일어남을 가리킨다. 이런 자기활성저해를 삼차원 구조와 관련하여 분석하면 삼차원 구조에서 관찰된 바와 같이 두 번째 mevalonate 결합 때문에 활성의 저해가 일어날 수 있음을 암시한다. 열린상태에서 닫힌상태로 변화하여야 하는데 높은 농도에서 두 번째 결합자리의 기질의 결합에 의해서 닫힌상태로 전환하지 못해 효소 활성이 저해되지 않을까 생각된다. 자기저해에 대하여 두 번째 기질 결합 부위에 결합하는 기질이 관련되어 있을 것으로 생각되어 그 상관관계를 찾기 위해서 두 번째 결합 부위 아미노산의 자리지정 돌연변이 제작 및 효소 활성 분석 그리고 삼차원 구조 연구를 수행하였다.

[0066] 3. MmMVK의 기질 활성 저해

[0067] 이 두 번째 기질 결합 부위에서 mevalonate와 상호작용하는 아미노산 잔기 중에서 Pro159, Lys292, Pro293, Glu295를 선택하여 각각 alanine 잔기로 치환하는 단일자리 돌연변이와 Pro159Ala Lys292Ala, Pro159Ala Pro293Ala, Pro159Ala E295Ala, Lys292Ala Glu295Ala 이중돌연변이 그리고 Pro159Ala Lys292Ala Glu295Ala 삼중돌연변이를 자리지정 돌연변이 방법으로 제작하고, 각각의 돌연변이를 벡터 DNA 서열을 읽어 확인하였다(도 14). 그리고 이 각각의 돌연변이 단백질을 발현하여 순수분리정제 하였다.

[0068] 4. 두 번째 기질 결합 부위 돌연변이의 효소 활성 분석

[0069] 두 번째 기질 결합 부위와 효소의 자기저해와 관련이 있음을 확인하기 위해서 야생형 단백질과 각각의 돌연변이 단백질을 사용하여 효소의 활성을 측정하였다(도 15). 도 15에서 보는 바와 같이, 야생형과 단일돌연변이 일부 이중돌연변이에서는 기질의 농도가 증가함에 따라 그 초기반응속도가 감소함을 볼 수 있지만, 이중돌연변이 P159A/K292A, E295A/K292A와 삼중돌연변이 P159A/E295A/K292A는 그 초기반응속도가 감소하지 않음을 볼 수 있었다. 따라서, 이와같은 돌연변이 단백질의 활성 측정으로부터 두 번째 mevalonate 결합부위가 효소의 자기저해와 관련이 있다는 것을 알 수 있다.

[0070] 5. 고농도의 기질과 저농도의 기질 상태에서 *Mm*MVK 효소의 구조 결정 및 분석

[0071] *Mm*MVK는 높은 기질 농도(15 mM 이상)에서 효소활성이 감소한다는 결과를 바탕으로 기질에 의한 저해작용이 있을 것으로 추측하고, 특히 두 번째 기질 결합이 이와 관련되어 있을 것으로 예상되어 두 번째 기질 결합과 효소의 활성저해에 대한 기작을 규명하기 위해서 저농도와 고농도의 mevalonate를 사용하여 *Mm*MVK 구조 분석 연구를 수행하였다.

[0072] (1) *Mm*MVK 야생형 단백질의 재 결정화

[0073] 야생형 *Mm*MVK 단백질을 저농도와 고농도의 mevalonate와 복합체 구조를 결정하기 위해서 저농도로 5mM mevalonate, 고농도로 50 mM mevalonate를 사용하여 복합체 결정을 만들었다(도 16).

[0074] (2) *Mm*MVK 돌연변이 K295A/E292A 단백질의 결정화

[0075] 야생형과 같은 방법으로 돌연변이 단백질 K295A/E292A 단백질을 저농도와 고농도의 mevalonate를 사용하여 단백질 결정을 만들었다(도 17).

[0076] (3) 야생형과 돌연변이 *Mm*MVK와 저농도 및 고농도 mevalonate 결정의 회절데이터 모음

[0077] 야생형과 돌연변이 *Mm*MVK와 저농도 및 고농도 mevalonate 복합체 결정을 사용하여 X-선 회절실험을 수행하여 총 24 개의 회절데이터를 모았다. 그 회절 결과와 통계는 표 3과 같다.

표 3

[0078]

	seWT_Apo	WT_5 mM ATP	WT_2nd MEV	WT_5mM MEV	WT_50 mM MEV 10 mM AMP	295_5mM MEV
Data collection						
Beamline	PAL-5C	PAL-5C	PAL-7A	PAL-7A	PAL-7A	PAL-7A
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2	C2	P2 ₁ 2 ₁ 2
Unit-cell parameters (Å)	a = 97.11,	a = 97.29,	a = 43.4,	a = 97.27,	a = 97.29,	a = 97.29,
	b = 135.92,	b = 135.36,	b = 96.55,	b = 134.01,	b = 135.36,	b = 135.36,
	c = 46.03,	c = 45.87,	c = 133.71,	c = 44.61,	c = 45.87,	c = 45.87,
	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	$\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Wavelength (Å)	0.97947	0.97945	0.97933	1	1	1
Resolution (Å)	50 - 2.08 (2.16 - 2.08)	40 - 1.91 (1.94 - 1.91)	50 - 1.40 (1.42-1.40)	50 - 1.64 (1.70 - 1.64)	50 - 2.33 (2.42 - 2.33)	50 - 2.25 (2.32 - 2.25)
Unique reflections	37064 (3509)	37064 (3504)	110281 (10897)	68913 (1252)	25263 (2477)	28218 (699)
Completeness (%)	98.5 (76.8)	99.18 (95.8)	98.9 (98.8)	95.9 (94.6)	99.3 (96.7)	96.1 (93.0)
R _{merge} (%) ^a	8.5 (63.3)	9.3 (70.9)	7.4 (70.1)	62.6 (67.3)	58.9 (86.3)	33.7 (35.6)
Redundancy	7.1 (6.2)	6.9 (5.9)	8.5 (6.9)	10.5 (11.7)	11.1 (9.4)	7.1 (7.2)
I/s (I)	13.7	14.4 (13.6)	11.4	248.03 (117.95)	164.58 (14.75)	75.11 (48.58)
Refinement						
Resolution (Å) ^b	45.7 - 2.08 (2.11 - 2.08)	40.9 - 1.91 (1.95 - 1.91)	26.5 - 1.40 (1.42 - 1.39)	33.0 - 1.64 (1.66 - 1.64)	37.7 - 2.33 (2.38 - 2.33)	33.09 - 2.25 (2.33 - 2.25)
R _{work} /R _{free} (%) ^c	20.12/26.87	18.6/23.9	18.2/20.9	24.54/27.79	17.39/24.91	18.25/25.8
No. of nonhydrogen atoms	4637	4879	5212	4503	4598	4729
No. of water molecules	88	333	553	0	178	191
Cl ⁻ ions	2	4	-	2	-	4
Mevalonate	-	-	3	-	2	-
root mean square deviations						
Bond length (Å)	0.007	0.007	0.016	0.007	0.008	0.008

Bond angle (°)	1.05	1.07	1.71	1.1	1.04	1.23
Average B factor (Å ²)						
Protein	55.6	44.4	25	27.7	43	37.3
Water	53.5	51.8	37.2	-	43.7	37
Cl ⁻ ions	54.3	49.2	-	57.6	-	42.6
MEV	-	-	47.2	-	44.3	-
Ramachandran plot (%) ^d						
Residues in faoured regions	97	98	98	97	98	98
Residues in allowed regions	2.7	2	2	2.3	2	1.8
Residues in outlier regions	0.3	0	0	0.7	0	0.2

[0079] (4) 야생형과 돌연변이 *Mm*MVK와 저농도(5 mM) 및 고농도(50 mM) mevalonate 복합체 구조의 비교

[0080] 결정된 각각의 구조를 살펴보면, 저농도의 mevalonate 결정 구조에서는 mevalonate가 결합되어 있지 않았다. 고농도의 mevalonate 복합체 구조에서는 mevalonate가 결합되어 있음을 볼 수 있었다. ATP 유사화합물인 AMPNPN 혹은 ATP의 결합을 볼 수 없었다. 돌연변이 K295A 구조는 야생형과 유사하였다.

[0081] *Mm*MVK apo, *Mm*MVK+5 mM ATP, *Mm*MVK+5 mM mevalonate, *Mm*MVK+ 50 mM mevalonate 복합체 구조를 *Mm*MVK 2nd mevalonate 구조에 겹쳐 비교했을 때, 그 구조의 주사슬의 rmsd 차이는 표 4에서와 같이 고농도 기질 복합체가 가장 큰 구조적인 차이를 보인다(도 18).

표 4

<i>Mm</i> MVK 2 nd mevalonate 구조에 겹침	rmsd 값 (주사슬만 비교)
<i>Mm</i> MVK apo	0.538 Å
<i>Mm</i> MVK + 5 mM ATP	0.545 Å
<i>Mm</i> MVK + 5 mM mevalonate	0.615 Å
<i>Mm</i> MVK + 50 mM mevalonate	1.192 Å

[0083] (5) *Mm*MVK의 열린(open) 구조와 닫힌(closed) 구조

[0084] *Mm*MVK 2nd mevalonate 구조와 *Mm*MVK + 50 mM mevalonate 구조를 비교했을 때, C-terminal 도메인은 차이가 거의 없지만 *Mm*MVK + 50 mM mevalonate 구조의 N-terminal 도메인은 *Mm*MVK 2nd mevalonate 구조보다 더 mevalonate 결합부위 쪽으로 움직인 것을 확인할 수 있었다(도 19).

[0085] 이들 도메인 움직임을 살펴보면 *Mm*MVK 2nd mevalonate 구조의 N-terminal 도메인이 아미노잔기 6-7, 32-33, 85-93, 144-145, 297-298의 접히는 잔기를 지나가는 회전축에 대하여 약 9.7도의 회전에 의하여 *Mm*MVK + 50 mM mevalonate 구조의 N-terminal 도메인과 겹쳐짐을 확인할 수 있었다(도 20).

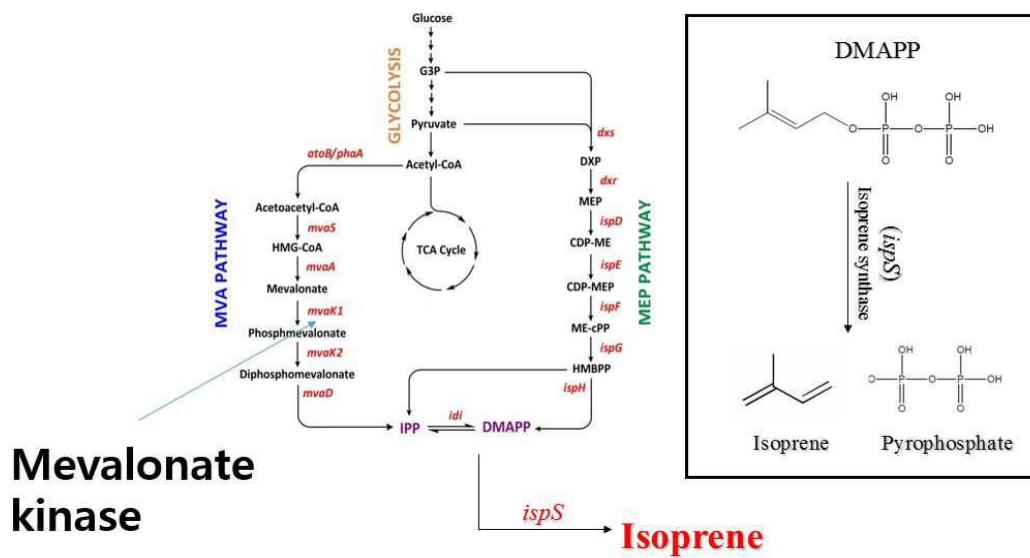
[0086] *Mm*MVK 2nd mevalonate 구조는 열린 구조로 두 번째 mevalonate 결합 부위가 회전하는 접힘부위와 인접하고 있는데, 이 부분에 mevalonate가 결합됨으로써 닫힌 구조로 변하지 않는 것으로 생각된다.

[0087] *Mm*MVK 2nd mevalonate 구조는 열린구조이고, *Mm*MVK + 50 mM mevalonate 구조는 닫힌 구조이다. 열린 구조는 효소활성이 낮고, 닫힌구조가 효소활성이 높다.

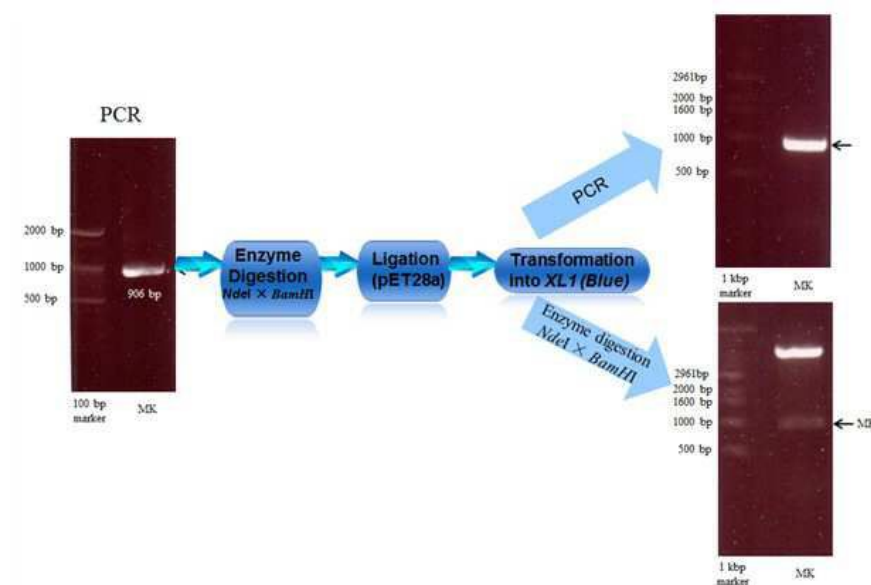
[0088] 따라서, *Mm*MVK는 기질결합에 따라 열린구조에서 닫힌구조로 변환하여 높은 효소활성을 가지게 되는데, 이러한 구조적인 변화가 못 일어나게 되면 효소활성이 낮고 효소작용이 되지 않는다.

도면

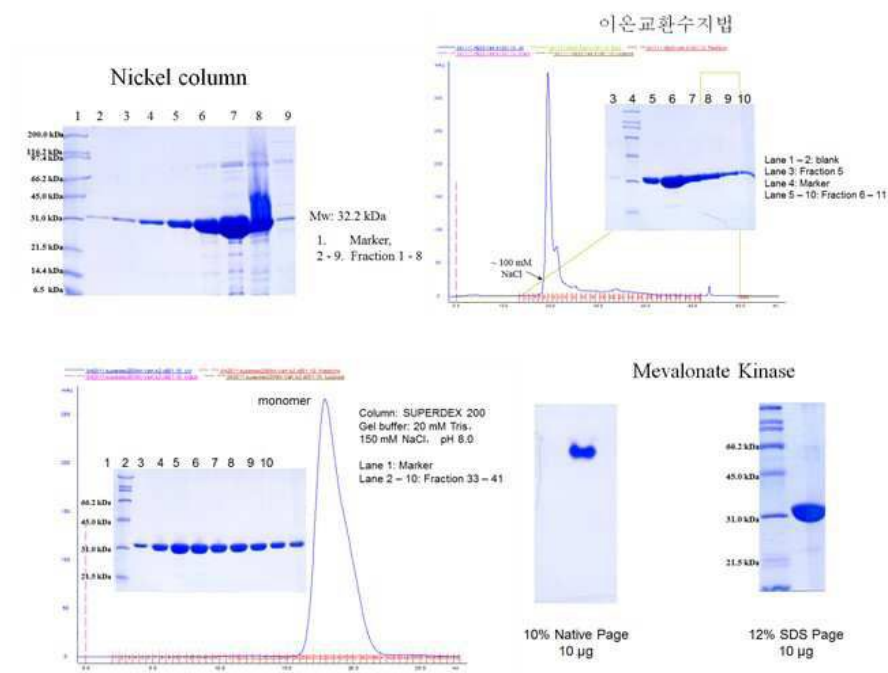
도면1



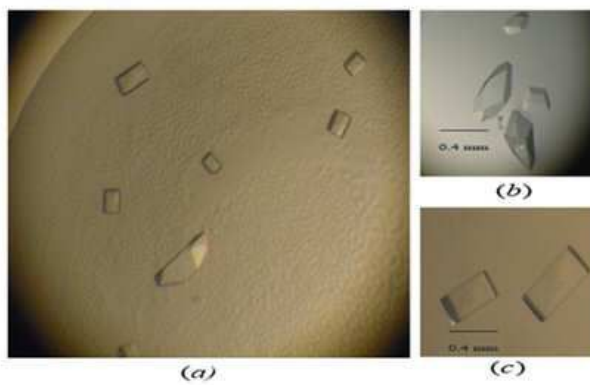
도면2



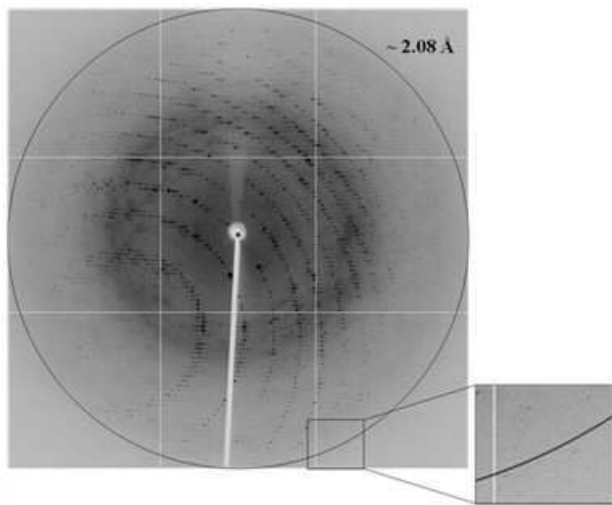
도면3



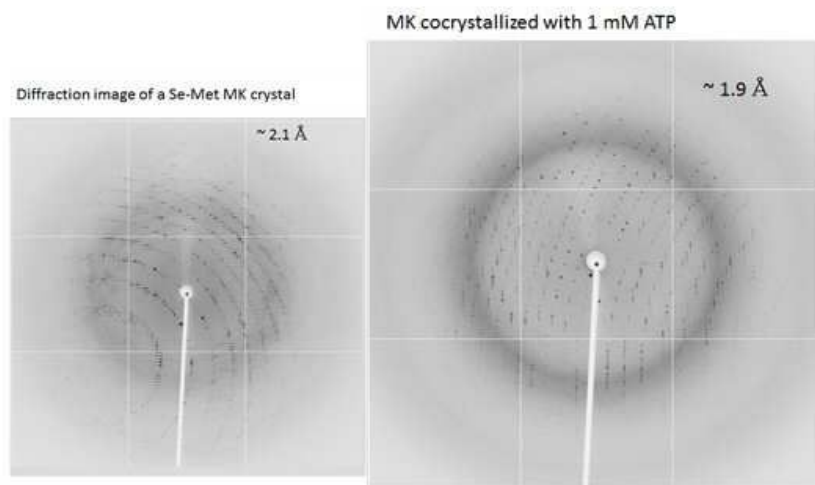
도면4



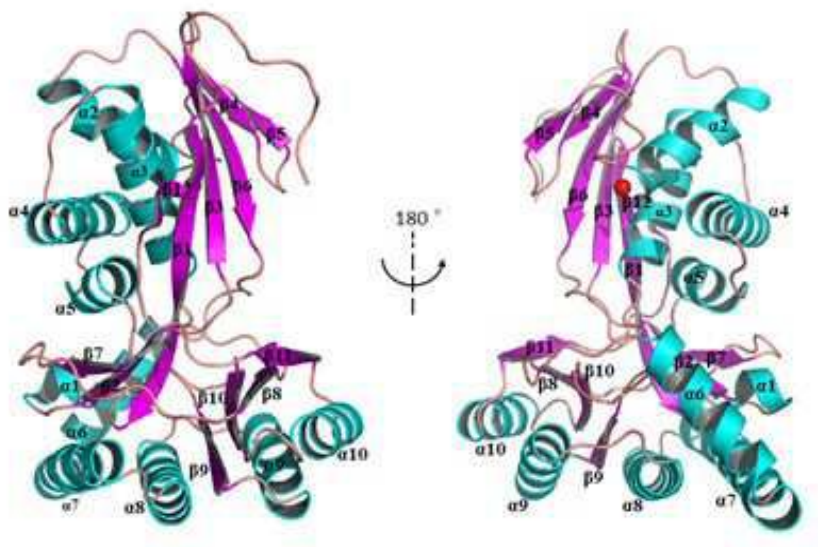
도면5



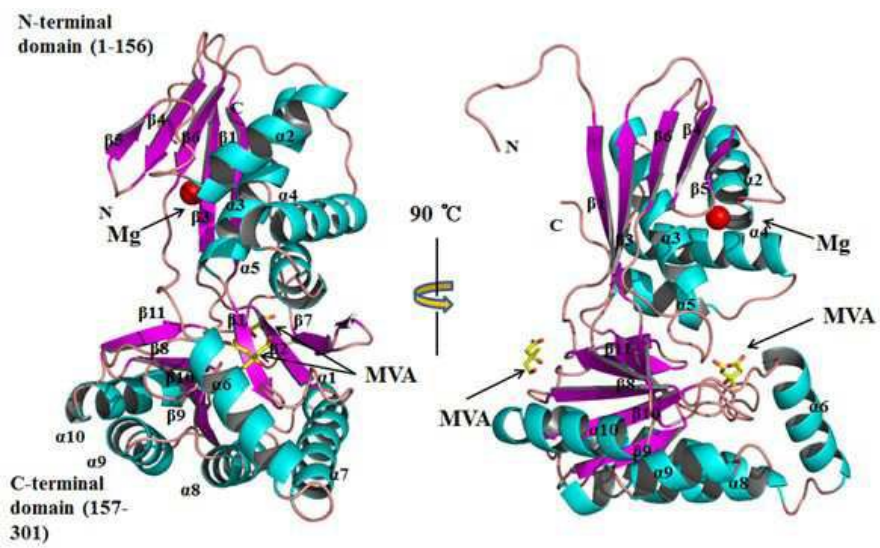
도면6



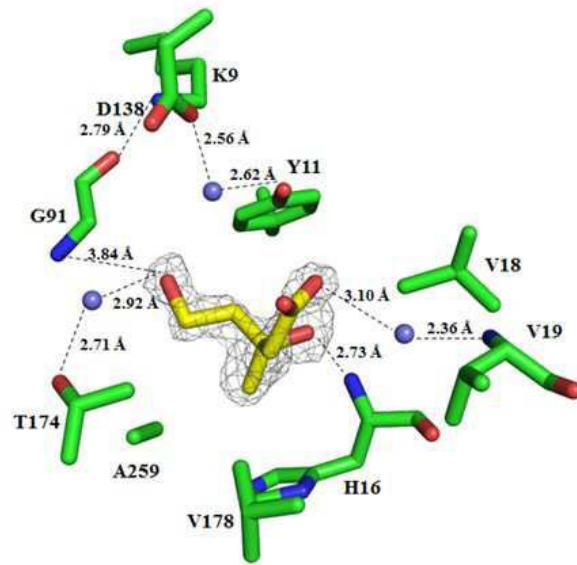
도면7



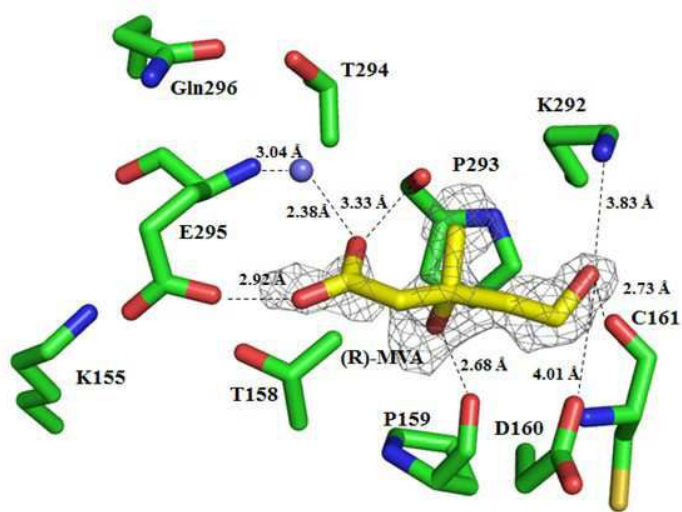
도면8



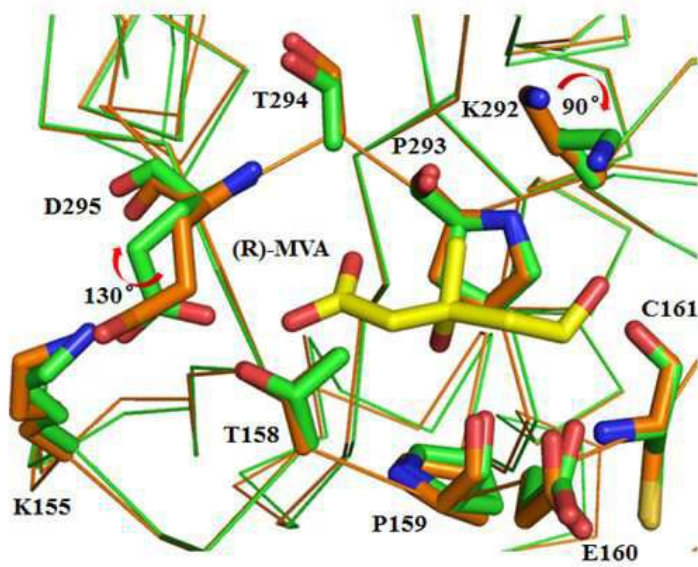
도면9



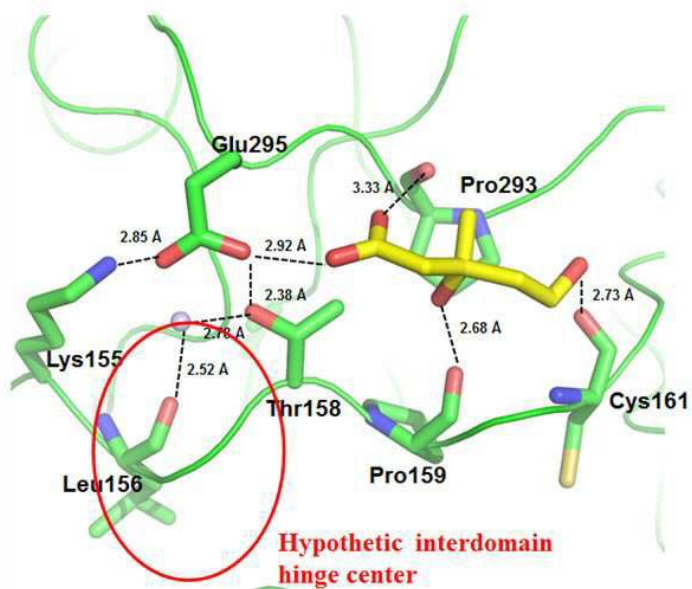
도면10



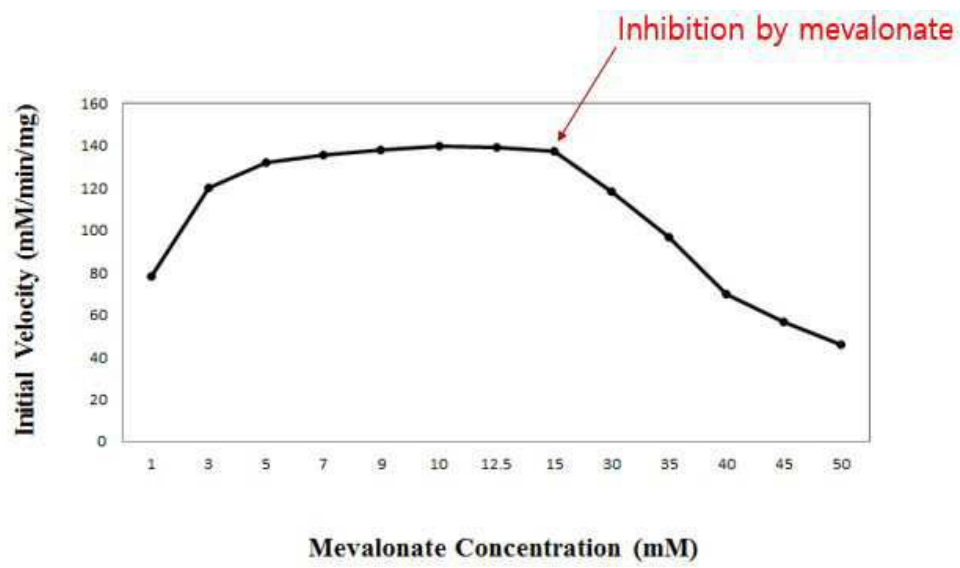
도면11



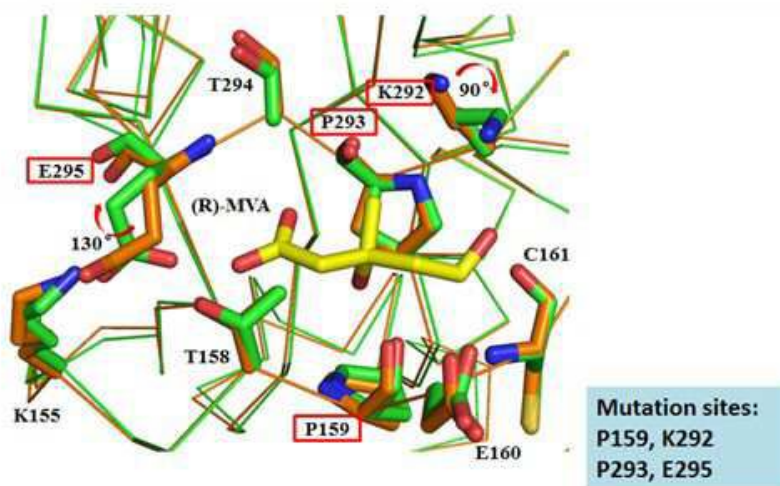
도면12



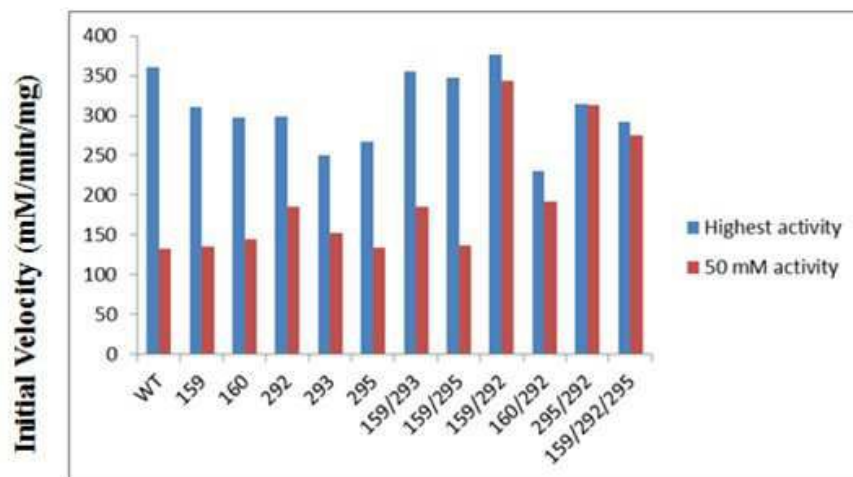
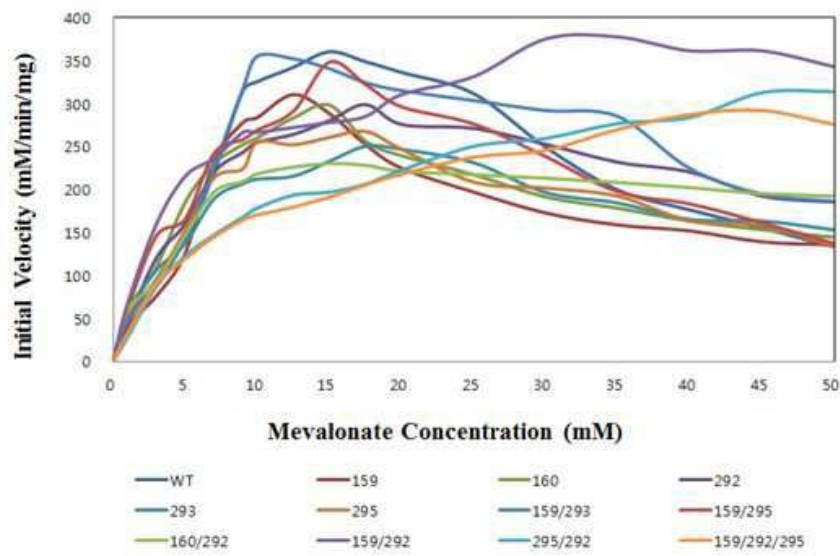
도면13



도면14



도면15



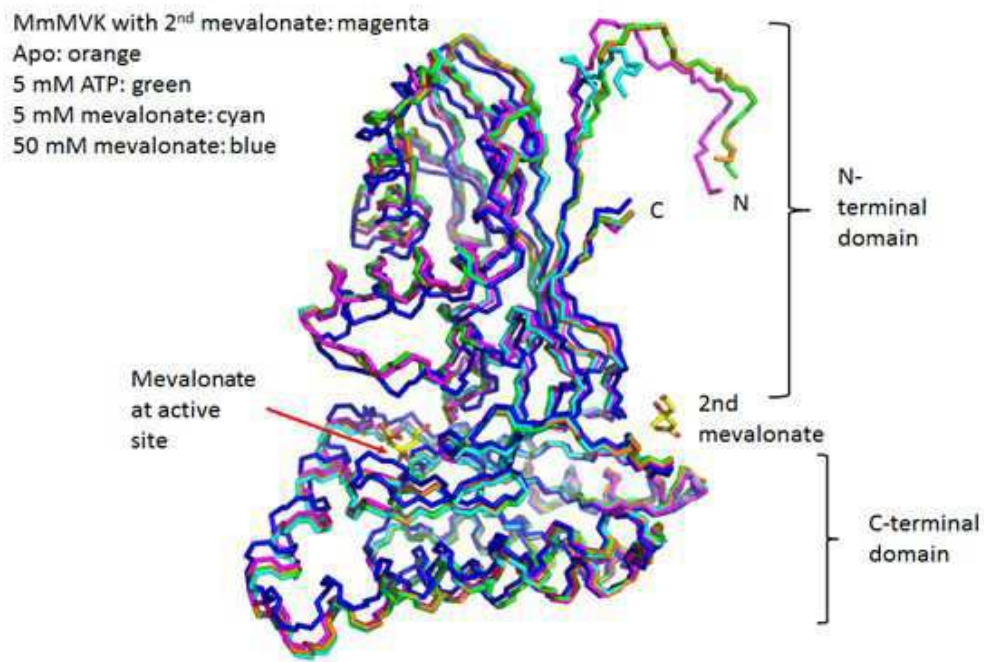
도면16

야생형 <i>MmMVK</i> 단백질 (10 mg/ml in 20 mM Tris pH 8.0, 2 mM DTT, 2 mM MgCl ₂ .)			
	저농도: 5mM MEV	저농도: 5mM MEV, 5mM AMPPNP	고농도: 50mM MEV, 10mM AMPPNP
결정 및 결정화 조건	 17% PEG 3350, 0.32 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5.	 14% PEG 3350, 0.32 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5.	 15% PEG 3350, 0.34 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5.
	 18% PEG 3350, 0.32 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5.	 19% PEG 3350, 0.32 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5.	 16% PEG 3350, 0.14 M MgCl ₂ , 0.1 M HEPES pH7.0.
	 19% PEG 3350, 0.32 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5.	 14% PEG 3350, 0.36 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5.	 17% PEG 3350, 0.14 M MgCl ₂ , 0.1 M HEPES pH7.0.
	 14% PEG 3350, 0.34 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5.		

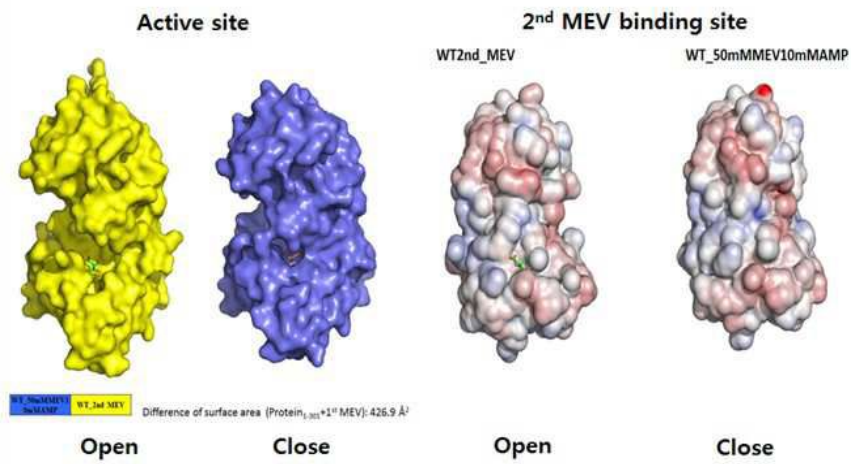
도면17

돌연변이 K295A/E292A <i>MmMVK</i> 단백질 (10 mg/ml in 20 mM Tris pH 8.0, 2 mM DTT, 2 mM MgCl ₂ .)			
	저농도: 5mM MEV	저농도: 5mM MEV, 5mM AMPPNP	고농도: 50mM MEV, 10mM AMPPNP
결정 및 결정화 조건	17% PEG 3350, 0.32 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH5.5	 14% PEG 3350, 0.32 M MgCl ₂ , 0.08 M Bis-Tris pH 5.5	16% PEG 3350, 0.14 M MgCl ₂ , 0.1 M HEPES pH7.0

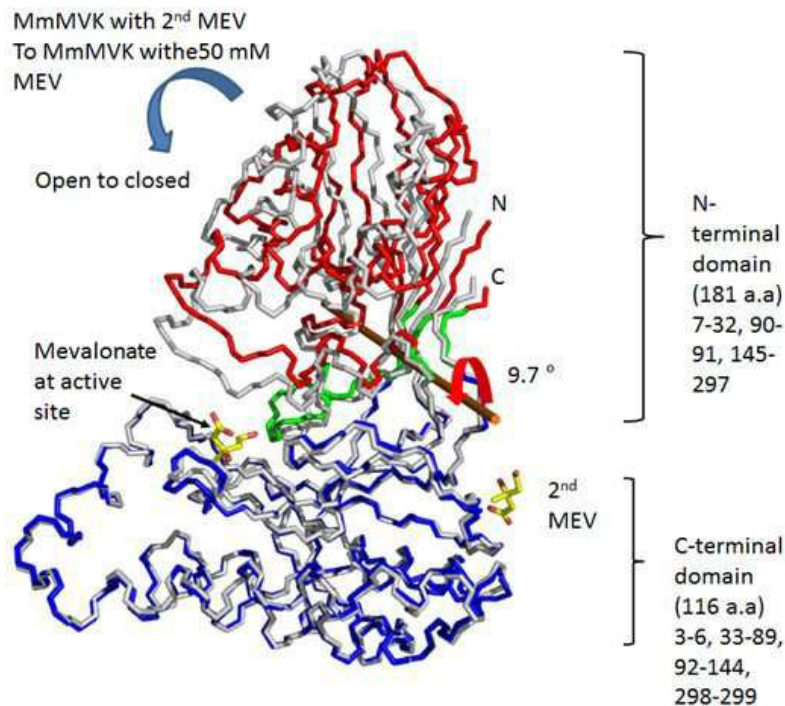
도면18



도면19



도면20



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Crystal structure of MmMVK-mevalonate complex and mevalonate kinase mutants resistant to substrate inhibition
- <130> ADP-2018-0394
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 301
- <212> PRT
- <213> Methanosarcina mazei
- <400> 1

Met Val Ser Cys Ser Ala Pro Gly Lys Ile Tyr Leu Phe Gly Glu His

1 5 10 15

Ala Val Val Tyr Gly Glu Thr Ala Ile Ala Cys Ala Val Glu Leu Arg

20 25 30

Thr Arg Val Arg Ala Glu Leu Asn Asp Ser Ile Thr Ile Gln Ser Gln

35 40 45
 Ile Gly Arg Thr Gly Leu Asp Phe Glu Lys His Pro Tyr Val Ser Ala
 50 55 60
 Val Ile Glu Lys Met Arg Lys Ser Ile Pro Ile Asn Gly Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Thr Val Asp Ser Asp Ile Pro Val Gly Ser Gly Leu Gly Ser Ser Ala
 85 90 95

 Ala Val Thr Ile Ala Ser Ile Gly Ala Leu Asn Glu Leu Phe Gly Phe
 100 105 110
 Gly Leu Ser Leu Gln Glu Ile Ala Lys Leu Gly His Glu Ile Glu Ile
 115 120 125
 Lys Val Gln Gly Ala Ala Ser Pro Thr Asp Thr Tyr Val Ser Thr Phe
 130 135 140
 Gly Gly Val Val Thr Ile Pro Glu Arg Arg Lys Leu Lys Thr Pro Asp
 145 150 155 160
 Cys Gly Ile Val Ile Gly Asp Thr Gly Val Phe Ser Ser Thr Lys Glu

 165 170 175
 Leu Val Ala Asn Val Arg Gln Leu Arg Glu Ser Tyr Pro Asp Leu Ile
 180 185 190
 Glu Pro Leu Met Thr Ser Ile Gly Lys Ile Ser Arg Ile Gly Glu Gln
 195 200 205
 Leu Val Leu Ser Gly Asp Tyr Ala Ser Ile Gly Arg Leu Met Asn Val
 210 215 220
 Asn Gln Gly Leu Leu Asp Ala Leu Gly Val Asn Ile Leu Glu Leu Ser
 225 230 235 240

 Gln Leu Ile Tyr Ser Ala Arg Ala Ala Gly Ala Phe Gly Ala Lys Ile
 245 250 255
 Thr Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Met Val Ala Leu Thr Ala Pro Glu
 260 265 270
 Lys Cys Asn Gln Val Ala Glu Ala Val Ala Gly Ala Gly Gly Lys Val
 275 280 285
 Thr Ile Thr Lys Pro Thr Glu Gln Gly Leu Lys Val Asp

290 295 300

<210> 2

<211> 301

<212> PRT

<213> Methanosarcina mazei

<400> 2

Met Val Ser Cys Ser Ala Pro Gly Lys Ile Tyr Leu Phe Gly Glu His

1 5 10 15

Ala Val Val Tyr Gly Glu Thr Ala Ile Ala Cys Ala Val Glu Leu Arg

20 25 30

Thr Arg Val Arg Ala Glu Leu Asn Asp Ser Ile Thr Ile Gln Ser Gln

35 40 45

Ile Gly Arg Thr Gly Leu Asp Phe Glu Lys His Pro Tyr Val Ser Ala

50 55 60

Val Ile Glu Lys Met Arg Lys Ser Ile Pro Ile Asn Gly Val Phe Leu

65 70 75 80

Thr Val Asp Ser Asp Ile Pro Val Gly Ser Gly Leu Gly Ser Ser Ala

85 90 95

Ala Val Thr Ile Ala Ser Ile Gly Ala Leu Asn Glu Leu Phe Gly Phe

100 105 110

Gly Leu Ser Leu Gln Glu Ile Ala Lys Leu Gly His Glu Ile Glu Ile

115 120 125

Lys Val Gln Gly Ala Ala Ser Pro Thr Asp Thr Tyr Val Ser Thr Phe

130 135 140

Gly Gly Val Val Thr Ile Pro Glu Arg Arg Lys Leu Lys Thr Pro Asp

145 150 155 160

Cys Gly Ile Val Ile Gly Asp Thr Gly Val Phe Ser Ser Thr Lys Glu

165 170 175

Leu Val Ala Asn Val Arg Gln Leu Arg Glu Ser Tyr Pro Asp Leu Ile

180 185 190

Glu Pro Leu Met Thr Ser Ile Gly Lys Ile Ser Arg Ile Gly Glu Gln

195 200 205
 Leu Val Leu Ser Gly Asp Tyr Ala Ser Ile Gly Arg Leu Met Asn Val
 210 215 220
 Asn Gln Gly Leu Leu Asp Ala Leu Gly Val Asn Ile Leu Glu Leu Ser
 225 230 235 240
 Gln Leu Ile Tyr Ser Ala Arg Ala Ala Gly Ala Phe Gly Ala Lys Ile
 245 250 255
 Thr Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Met Val Ala Leu Thr Ala Pro Glu
 260 265 270
 Lys Cys Asn Gln Val Ala Glu Ala Val Ala Gly Ala Gly Gly Lys Val
 275 280 285
 Thr Ile Thr Ala Pro Thr Ala Gln Gly Leu Lys Val Asp
 290 295 300
 <210> 3
 <211> 301
 <212> PRT
 <213> Methanosarcina mazei
 <400> 3
 Met Val Ser Cys Ser Ala Pro Gly Lys Ile Tyr Leu Phe Gly Glu His
 1 5 10 15
 Ala Val Val Tyr Gly Glu Thr Ala Ile Ala Cys Ala Val Glu Leu Arg
 20 25 30
 Thr Arg Val Arg Ala Glu Leu Asn Asp Ser Ile Thr Ile Gln Ser Gln
 35 40 45
 Ile Gly Arg Thr Gly Leu Asp Phe Glu Lys His Pro Tyr Val Ser Ala
 50 55 60
 Val Ile Glu Lys Met Arg Lys Ser Ile Pro Ile Asn Gly Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Thr Val Asp Ser Asp Ile Pro Val Gly Ser Gly Leu Gly Ser Ser Ala
 85 90 95
 Ala Val Thr Ile Ala Ser Ile Gly Ala Leu Asn Glu Leu Phe Gly Phe

100	105	110	
Gly Leu Ser Leu Gln Glu Ile Ala Lys Leu Gly His Glu Ile Glu Ile			
115	120	125	
Lys Val Gln Gly Ala Ala Ser Pro Thr Asp Thr Tyr Val Ser Thr Phe			
130	135	140	
Gly Gly Val Val Thr Ile Pro Glu Arg Arg Lys Leu Lys Thr Ala Asp			
145	150	155	160
Cys Gly Ile Val Ile Gly Asp Thr Gly Val Phe Ser Ser Thr Lys Glu			
165	170	175	
Leu Val Ala Asn Val Arg Gln Leu Arg Glu Ser Tyr Pro Asp Leu Ile			
180	185	190	
Glu Pro Leu Met Thr Ser Ile Gly Lys Ile Ser Arg Ile Gly Glu Gln			
195	200	205	
Leu Val Leu Ser Gly Asp Tyr Ala Ser Ile Gly Arg Leu Met Asn Val			
210	215	220	
Asn Gln Gly Leu Leu Asp Ala Leu Gly Val Asn Ile Leu Glu Leu Ser			
225	230	235	240
Gln Leu Ile Tyr Ser Ala Arg Ala Ala Gly Ala Phe Gly Ala Lys Ile			
245	250	255	
Thr Gly Ala Gly Gly Gly Gly Cys Met Val Ala Leu Thr Ala Pro Glu			
260	265	270	
Lys Cys Asn Gln Val Ala Glu Ala Val Ala Gly Ala Gly Gly Lys Val			
275	280	285	
Thr Ile Thr Ala Pro Thr Ala Gln Gly Leu Lys Val Asp			
290	295	300	