(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0027290
(43) 공개일자 2009년03월17일

(51) Int. Cl.
C12N 9/12 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0092392
(22) 출원일자 2007년09월12일
심사청구일자 2007년09월12일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
윤대진
경남 사천시 용현면 선진리 517번지
(74) 대리인
김동완

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질키나제

(57) 요 약

본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(AtCK)에 있어서, 상기 효소는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 세린/트레오닌 키나제 도메인, 서열번호: 3의 아미노산 서열을 지니는 칼모듈린 결합 도메인 및 퇴화된 EF-핸드를 포함함을 특징으로 하는 AtCK 효소를 제공하는 것이다. 또한 상기 서열번호: 2의 세린/트레오닌 키나제 도메인의 인산화 활성은 RXXT/S 모티프에 의해 활성화됨을 특징으로 한다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(AtCK)에 있어서, 상기 효소는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 세린/트레오닌 키나제 도메인, 서열번호: 3의 아미노산 서열을 지니는 칼모듈린 결합 도메인 및 퇴화된 EF-핸드를 포함함을 특징으로 하는 AtCK 효소

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 서열번호: 2의 세린/트레오닌 키나제 도메인의 인산화 활성은 RXXT/S 모티프에 의해 활성화됨을 특징으로 하는 AtCK 효소 (상기 식에서 X는 임의의 아미노산임)

청구항 3

제 1항의 AtCK 효소는 Ca^{2+} 농도 의존적으로 칼모듈린 단백질과 결합 활성화됨을 특징으로 하는 방법

청구항 4

제 1항의 AtCK 효소를 통한 타겟 단백질의 인산화는 2~4 mM의 Mn^{2+} 존재시 활성화됨을 특징으로 하는 방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(AtCK)에 있어서, 상기 효소는 세린/트레오닌 키나제 도메인, 칼모듈린 결합 도메인 및 퇴화된 EF-핸드를 포함함을 특징으로 하는 AtCK 효소에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 식물 세포는 복잡하나 효율적인 인식 및 신호 변환 기관으로 인해 정확하고 특이적인 방식으로 다양한 신호에 반응한다. 인식 후 신호는 인산이노시톨, cADPR, 디아실 글리세롤 및 칼슘과 같은 2차 메신저 농도 변화를 통해 번역된다. 칼슘은 식물과 동물 시스템 모두에서 2차 메신저로 작용하고 특이적이고 정확한 방식으로 수많은 다양한 자극에 결합된다. 칼모듈린(CaM)은 편재하는 Ca^{2+}-결합 단백질 및 1차 세포내 Ca^{2+}-신호 수용체이다. CaM은 칼모듈린-결합 단백질(CaMBP)의 활성을 조절하여 다양한 자극에 대한 생리적 반응을 생성함으로서 신호를 변환시킨다.

<3> 식물 세포에서 칼슘 신호-관련 단백질 키나제는 2가지 주요 카테고리 즉 Ca^{2+}-의존적 단백질 키나제(CDPK) 및 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(CaMK)로 분류될 수 있다. 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질의 인산화는 칼슘/칼모듈린-매개 신호를 증폭시키고 다양화시키는데 중추적인 것으로 판단되고 광범위한 생리 발달 과정에 관련된다. 동물 시스템과 유사하게 단백질 인산화는 식물 내의 광, 병원체 침입, 호르몬, 온도 스트레스 및 영양분 결핍을 포함한 많은 신호에 대한 반응에 관련되었다. 또한 식물 게놈도 포유류 다기능성 단백질인 CaMKⅡ에서 관찰된 바와 같은 세린/트레오닌 키나제 촉매작용 도메인 및 인접 CaM 결합 도메인을 포함한 CaMK를 암호화함이 보고되었다. CaMK가 그의 조절 기전에 대해 보고되었으나 식물 내 CaMK의 생화학적 및 생물학적 역할은 아직 규명되지 않았다.

<4> 따라서 본 발명은 CaMK의 생화학적 및 생물학적 역할을 분석하기 위해 아라비돕시스에서 분리된 Ca^{2+}-의존적 CaM-결합 활성 및 Ca^{2+}/CaM 의존적 기질 인산화 활성을 지닌 아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(*Arabidopsis thaliana* calcium/calmodulin-dependent protein kinase, AtCK)(GenBank 등록 번호; AAC69927)의 칼모듈린 결합 활성 도메인 및 인산화 활성 도메인을 분리하고 Ca^{2+}-의존적 활성을 측정함으로서 본

발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<5> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 Ca^{2+}-의존적 CaM-결합 및 Ca^{2+}/CaM 의존적 기질 인산화 활성을 지닌 아라비돕시스 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(AtCK)(GenBank 등록 번호; AAC69927)의 3차원적 단백질 토폴로지를 분석하고, 상기 단백질 내의 활성 도메인 부위를 분리 측정한 것이다.

과제 해결수단

<6> 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(AtCK)에 있어서, 상기 효소는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 세린/트레오닌 키나제 도메인, 서열번호: 3의 아미노산 서열을 지니는 칼모듈린 결합 도메인 및 퇴화된 EF-핸드를 포함함을 특징으로 하는 AtCK 효소를 제공하는 것이다.

<7> 또한 상기 서열번호: 2의 세린/트레오닌 키나제 도메인의 인산화 활성은 RXXT/S 모티프에 의해 활성화됨을 특징으로 한다.

<8> 한편 본 발명의 AtCK 효소는 Ca^{2+} 농도 의존적으로 칼모듈린 단백질과 결합 활성화됨을 특징으로 하며, AtCK 효소를 통한 타겟 단백질의 인산화는 2~4 mM의 Mn^{2+} 존재시 활성화됨을 특징으로 한다.

효 과

<9> 본 발명의 효과는 Ca^{2+}-의존적 CaM-결합 및 Ca^{2+}/CaM 의존적 기질 인산화 활성을 지닌 아라비돕시스 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(AtCK)(GenBank 등록 번호; AAC69927)의 3차원적 단백질 토폴로지를 분석하고, 상기 단백질 내의 칼모듈린 결합 활성 도메인 및 인산화 활성 도메인을 분리함으로서, 상기 단백질의 Ca^{2+}-의존적 활성의 조절 및 식물체 내의 Ca^{2+}-의존적 CaM-결합 및 Ca^{2+}/CaM 의존적 기질 인산화의 조절을 통해 식물체 내의 타겟 단백질의 발현 조절을 가능케 한 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<10> 단백질 인산화는 진핵세포가 세포외 신호를 세포내 반응으로 변환시키는 주요 기전 중 하나이다. 칼슘/칼모듈린(Ca^{2+}/CaM)-의존적 단백질 인산화는 다양한 세포 내 처리과정에 포함되었으나 식물 내 Ca^{2+}/CaM-의존적 단백질에 대해 잘 알려져 있지 않다.

<11> 프로브로서 홍당무 과산화효소-결합 대두 칼모듈린 이소폼(SCaM-1)을 이용한 아라비돕시스 발현 라이브러리로부터 본 발명은 아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(*Arabidopsis thaliana* calcium/calmodulin-dependent protein kinase, AtCK)를 암호화하는 전체-길이 cDNA 클론을 분리하였다.

<12> AtCK의 예측 구조는 세린/트레오닌 단백질 키나제 촉매 도메인, 추정 칼모듈린-결합 도메인 및 추정 Ca^{2+}-결합 도메인을 포함한다. 재조합 AtCK는 *E. coli* 내에서 발현되었고 Ca^{2+}-의존적 방식으로 칼모듈린에 결합되었다. CaM의 AtCK에 결합하는 능력은 겔 이동 변화 및 경쟁 분석에 의해 더욱 확인되었다.

<13> AtCK는 3 mM Mn^{2+} 존재시 그의 최대 수치의 자가인산화를 나타내었다. 다른 Ca^{2+}/CaM-의존적 단백질 키나제(CaMK)에서 종전 관찰된 바와 같이 AtCK가 CaM에 결합된 칼슘 조절이 존재하는 경우 AtCK에 의한 미엘린 염기 단백질(MBP)의 인산화가 증가되었다. 옥수수 및 담배 CaMK와는 대조적으로 3 μM 이상으로 칼모듈린 농도를 증가시키는 것은 AtCK의 기질 인산화 활성을 억제하였다. 따라서 이러한 결과는 AtCK가 식물 내 CaM-매개 신호전달에 관련된 신규한 아라비돕시스 Ca^{2+}/CaM-의존적 단백질 키나제임을 나타낸다.

<14> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<15> *AtCK* cDNA의 분리

<16> Ca^{2+}/CaM-매개 신호전달 경로의 분자적 구성요소를 확인하기 위해 본 발명은 프로브로서 홍당무 과산화효소(HRP)-결합 SCaM-1을 이용하여 아라비돕시스 cDNA 발현 라이브러리 선별하였다. 50개의 양성 클론이 약 5 × 10^5 재조합 파지로부터 수득되었다. 클론의 cDNA 서열 분석 및 GenBank 내 알려진 서열과의 비교는 일부 알려진 식물 CaMBP, CaMBP로서의 종전 알려지지 않은 기능을 지닌 일부 클론 및 일부 신규한 CaMBP를 나타내었다. 신규한 CaMBP 클론 중에서 본 발명은 전체-길이 추정 세린/트레오닌 단백질 키나제(GenBank 등록 번호; AAC69927)를 암호화하는 하나의 클론을 확인하였다. 본 발명은 이러한 클론을 AtCK(아라비돕시스 탈리아나 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(*Arabidopsis thaliana* calcium/calmodulin-dependent protein kinase)로 명명하였다. AtCK는 세린/트레오닌 키나제 촉매작용 도메인, 추정 칼모듈린 결합 도메인 및 퇴화된 EF-핸드와 같은 다른 식물 CaMK의 여러 보존된 위상학적 특성을 포함한다(도 1A). 촉매작용 도메인 내에 포유류 CaMKⅡ 및 그의 상동체 내 자가인산화 사이트와 유사한 5 RXXT/S 공통서열 모티프가 존재한다(도 1B). 촉매작용 도메인의 바로 다운스트림의 다른 알려진 CaMK과 상동적인 하나의 추정 Ca^{2+}-의존적 칼모듈린 결합 도메인(CaMBD)이 존재한다. CaMBD의 추가 다운스트림은 2개의 퇴화된 EF-핸드가 존재한다.

<17> 아라비돕시스 게놈 내 *AtCK* 유전자의 카피 수 및 이소폼수를 조사하기 위해 프로브로서 전체 길이 *AtCK* cDNA를 이용한 서던 블럿 분석이 수행되었다(도 2A). 2개의 혼성화 밴드가 *EcoR*I 분해된-게놈 DNA를 포함한 래인 내에서 검출되었고, 3개의 밴드가 *Hind*Ⅲ 분해후 확인되었고 *Xba*Ⅰ 및 *Xho*Ⅰ 처리후 하나의 밴드만이 존재하였다(도 2A). AtCK 내 알려진 제한 효소 사이트를 기반으로 이들 결과는 *AtCK*가 단일 카피 유전자이고 아라비돕시스 게놈 내 다른 이소폼을 지니지 않음을 나타낸다. AtCK의 아미노산 서열에 기반한 계통수는 옥수수 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제(MCK 1 및 MCK2)와 가장 가까운 친족임을 나타낸다(도 2B).

<18> AtCK 내 CaMBD의 지도화

<19> 알려진 CaMBD의 구조적 특징을 기반으로 추정 CaMBD가 키나제 도메인과 퇴화된 EF-핸드 사이의 AtCK 내(서열번호: 1의 잔기 399~448)에 존재하는 것으로 예측되었다. CaMBD를 확인하고 지도화하기 위해 전체-길이 AtCK(D0) 및 AtCK의 7개 절단된 컨스트럭트(D1~D7)가 글루타치온 S-전이효소(GST)에 융합된 E. coli 내에서 발현되었다. 단백질은 정제되고 CaM-중첩 분석에 이용되었다(도 3). 추정 CaMBD를 포함한 5개 재조합 단백질(D0~D3 및 D6)이 Ca^{2+}-의존적 방식으로 CaM::HRP와 상호작용한 반면 GST 단독 및 본 발명에서 예측된 CaMBD가 부재한 3개의 단백질(D4, D5 및 D7)은 결합에 실패하였다(도 3B). 이들 결과는 CaM이 Ca^{2+}-의존적 방식으로 예측되는 AtCK CaMBD에 결합됨을 입증한다.

<20> AtCK CaMBD의 특성화

<21> AtCK의 CaMBD 내에서 본 발명은 소수성 잔기가 ^{428}Ala부터 ^{445}Glu까지의 헬릭스를 따라 친수성 잔기로부터 분리되는 염기성 양친매성 헬릭스 구조를 발견하였다. 따라서 CaM이 AtCK의 18-아미노산 범위에 결합될 수 있는지 여부를 검증하기 위해 이들 영역에 상응하는 펩타이드가 합성되었고 비-변성 조건 하에서 CaM 이동 변화 분석에 이용되었다. 예측된 바와 같이 펩타이드-CaM 복합체를 나타내는 고분자량의 밴드는 Ca^{2+} 존재시 관찰되었다. 더욱이 펩타이드/CaM 복합체 수치는 합성 펩타이드의 농도 증가와 함께 증가되었다. 이러한 고분자량 복합체는 EGTA 존재시 검출되지 않았다(도 4B).

<22> 또한 본 발명은 알려진 Ca^{2+}/CaM-의존적 효소인 포스포디에스테라제(PDE)로의 경쟁 분석을 수행함으로서 CaM에 대한 합성 펩타이드의 결합을 분석하였다. PDE 활성화는 AtCK 펩타이드의 존재(100 nM) 또는 부재 하에 증가되는 용량의 CaM로 측정되었다. 이들 측정으로부터 PDE의 활성화에 필요한 펩타이드의 SCaM-1의 펩타이드로부터의 해리 상수(K_d) 수치가 계산되었다. PDE 활성화 곡선은 펩타이드 존재시 우측으로 이동되었고, 이는 CaM 결합에 대한 경쟁이 PDE와 펩타이드 사이에 발생했음을 나타낸다(도 4C). 최대-반 PDE 활성을 달성하는데 필요한 CaM(SCaM-1)의 농도는 펩타이드 부재시 9.7 nM 및 펩타이드 존재시 20 nM로 약 2-배 차이를 나타내었다. SCaM-1에 의한 PDE 활성화에 의해 측정된 펩타이드의 K_d 수치는 84.5 nM인 것으로 측정되었다. 이들 결과는 AtCK 내 428~445 사이의 잔기가 Ca^{2+}-의존적 CaM 결합에 충분함을 나타낸다.

<23> Ca^{2+}에 직접 결합하지 않는 AtCK

<24> 본 발명은 시험관 내 $^{45}Ca^{2+}$ 결합 분석을 이용하여 AtCK가 Ca^{2+}에 직접 결합되는지 여부를 측정하였다. 다른 식

물 CCaMK와 달리 도 3의 정제된 재조합 AtCK 서브유니트는 Ca^{2+}에 결합되지 않는다. SCaM-1은 양성 대조군으로서 동시에 조사되었고 Ca^{2+}에 대한 강한 결합을 나타내었다(도 5). 이들 결과로부터 본 발명은 AtCK의 퇴화된 EF-핸드가 다른 식물 CaMK의 칼슘 결합 도메인과 달리 키나제 활성 조절에 별개의 역할을 지님을 예측하였다.

<25> 자가인산화시 Mn^{2+}를 요구하는 AtCK

<26> AtCK의 촉매작용 기능을 이해하기 위해 본 발명은 자가인산화 반응시 GST::전체-길이 AtCK 융합 단백질의 키나제 활성을 연구하였다. 어떠한 2가 양이온이 AtCK의 보조인자인지 시험하기 위해 본 발명은 증가하는 농도의 Mn^{2+}, Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 존재시 자가인산화를 분석하였다. 본 발명은 Ca^{2+}가 AtCK 자가인산화를 활성화하지 않고 Mg^{2+}는 단지 미약한 효과를 지님을 발견하였다. 반면 Mn^{2+}는 저농도로 AtCK를 강하게 활성화시켰다(도 6A 및 6B). 최대 AtCK 자가인산화 활성은 3 mM Mn^{2+}에서 관찰되었다. 이러한 결과는 Ca^{2+}가 자가인산화를 자극하는 다른 식물 CaMK와는 대조적이다. Ca^{2+} 결합 결과를 토대로 AtCK의 초기 활성화는 Ca^{2+} 유입에 대한 간접적 반응에 의해 자극되는 것으로 판단된다.

<27> AtCK 기질 인산화 활성을 활성화시키는 칼슘-결합 칼모듈린

<28> 본 발명은 칼모듈린이 칼슘-의존적 방식으로 AtCK에 결합됨을 확인하였다. 또한 본 발명은 Ca^{2+}/CaM이 AtCK의 키나제 활성을 조절할 수 있는지 여부를 조사하였다. 본 발명은 세린/트레오닌 키나제의 일반적인 기질인 미엘린 염기 단백질(MBP)을 인산화시키는 능력을 측정함으로서 GST::전체-길이 AtCK 융합 단백질의 키나제 활성을 측정하였다. 도 7A 및 7B에 나타난 바와 같이 일정한 Ca^{2+} 조건 하에서 증가된 함량의 칼모듈린이 AtCK의 키나제 활성을 자극하였다. 이러한 활성은 3 μM의 칼모듈린 농도에서 포화되었다. 또한 연꽃 CaMK에서 종전 관찰된 바와 같이 과량의 칼모듈린은 키나제 활성을 억제하였다. 그러나 백합 및 담배 CaMK는 CaM에 의한 저해된 조절을 나타내지 않았다. CaM이 부재한 Ca^{2+} 또는 EGTA의 존재 하에서 본 발명은 기본 수준의 활성을 검출하였고 이는 Ca^{2+} 단독이 AtCK의 기질 인산화 활성을 자극할 수 없음을 의미한다. 따라서 칼슘-결합된 CaM이 AtCK의 기질 인산화 기능을 활성화시키고 AtCK가 다른 식물 CaMK와 비교시 별개의 조절적 기전을 지닌다.

<29> Ca^{2+}/칼모듈린-의존적 단백질 인산화는 동물의 많은 중요한 세포 처리과정의 조절에 관련된다. 그러나 식물 내 Ca^{2+}/칼모듈린-의존적 단백질 키나제의 확인, 기능 및 조절은 충분하게 이해되지 않았다. 최근 백합, 담배, 개자리 및 연꽃 유래 CaMK에 대한 연구는 본 발명의 아라비돕시스 연구에 기반이 되는 토대를 제공하였다. 아라비돕시스 내 본 발명의 cDNA 발현 라이브러리 선별로부터 본 발명은 종전 확인된 CaMK와 함께 보존된 위상학을 나타내는 칼모듈린 결합 단백질 키나제 AtCK를 분리하였다. AtCK는 N-말단 영역 내 보존된 세린/트레오닌 키나제 촉매작용 서브유니트 및 추정 칼모듈린 결합 도메인을 포함한다. CaM::HRP 중첩 분석을 이용한 결실 지도화는 428~445의 아미노산 잔기를 포함한 단편이 CaM과 상호작용하기에 충분한 반면 이러한 사이트가 부재한 단편을 그렇지 않음을 나타내었다. 더욱이 본 발명은 CaMBD가 분자의 하나의 측면에 위치한 염기성 및 극성 잔기 및 헬릭스 바퀴 돌출부를 유발하는 다른 측면 상의 소수성 아미노산을 지님을 발견하였다. 이들 모델 내에서 소수성 아미노산 잔기는 1 (^{431}Leu), 5 (^{435}Ala) 및 10 (^{440}Ala)에 위치하고, 일부 염기성 잔기는 이들 사이에 분산된다. 이러한 패턴은 공통서열 CaM 결합 모티프 또는 1-5-10 모티프로 알려져 있다. 더욱이 본 발명은 1-5-10 모티프에 상응하는 합성 펩타이드를 고안하고 겔 이동 변화 분석 및 PDE 경쟁 분석에 의해 CaM와의 상호작용을 분석하였다. 본 발명은 AtCK의 이러한 영역이 CaM 결합에 충분하고 이러한 상호작용은 칼슘에 의존적임을 발견하였다. 다른 CaMK는 AtCK와 유사한 CaMDB 및 키나제 도메인 및 Ca^{2+}-의존적 CaM 결합 특성을 포함한 것으로 나타났다. AtCK의 CaMBD는 다른 CaMK와 보존된 위상학 및 생화학적 특성을 공유한다. AtCK의 옥수수 상동체는 Ca^{2+} 존재시 자가인산화를 수행하고 Ca^{2+}/CaM 결합 후 기질을 인산화시킨다. 그러나 Ca^{2+}는 AtCK 자가인산화 활성을 자극하지 않았다. 자가인산화는 키나제 활성을 개시함으로서 CaMK의 분자내 조절 기전이 되는 것으로 판된단다. 더욱이 백합 CaMK의 C-말단 EF-핸드에 대한 Ca^{2+}의 결합은 CaM-결합 친화성 증가를 유발하고 및 자가저해를 방출한다. AtCK에 직접 결합할 수 없는 칼슘의 무능력은 별개의 조절 기전이 이들 두 식물 사이에 작용함을 나타낸다. AtCK의 자가인산화 기능이 다른 CaMK와는 차별적으로 조절되나 기질 인산

화 활성은 유사한 방식으로 Ca^{2+}/CaM에 의해 활성화된다. 또한 CaM에 의한 AtCK의 활성화는 과도한 농도의 SCaM-1 내에서 억제되었다. 고농도의 CaM 내에서의 억제된 활성은 백합 및 연꽃에서도 관찰되었으나 옥수수 및 담배에서는 그렇지 않아TEk. AtCK 및 옥수수 CaMK가 유사한 아미노산 서열을 지님에도 불구하고(서열 동일성에 있어서 MCK1에 대해 65% 및 MCK2에 대해 70%) AtCK는 백합 및 연꽃과 더욱 유사한 방식으로 조절된다. 따라서 AtCK의 조절은 종전 확인된 CaMK와 별개의 특징과 보존된 특징 모두를 지닌다. AtCK의 정확한 분자적 특성 및 기능적 분석 연구는 식물 내 Ca^{2+}/CaM 매개된 신호 변환의 중요한 정보를 제공할 것이다.

<30> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<31> (실시예 1) CaM 상호작용 분석

<32> CaM-결합 단백질을 분리하기 위해 홍당무 과산화효소(HRP)-결합 대두 칼모듈린 이소폼(SCaM-1)이 아라비돕시스 cDNA 발현 라이브러르를 선별하는 프로브로 사용되었다. AtCK의 CaM-결합 도메인(CaMBD)을 지도화하기 위해 8개의 컨스트럭트가 생성되었고(D0, ^{1}M-^{595}R; D1, ^{1}M-^{448}L; D2, ^{1}M-^{520}A; D3, ^{143}Y-^{595}R; D4, ^{1}M-^{142}K; D5, ^{143}Y-^{398}Q; D6, ^{399}A-^{448}L; D7, ^{449}V-^{595}R), pGEX-5X 시리즈 벡터(Amersham Biosciences) 내로 삽입되었다. 수득된 정제된 재조합 단백질(1 ㎍)은 Lee, S. H. *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1433:56-67, 1999에 기술된 바와 같이 CaM-결합 활성에 대해 분석되었다.

<33> (실시예 2) 서던 블럿 분석

<34> 게놈 DNA는 표준 방법에 의해 아라비돕시스 탈리아나로부터 추출되었다. 10 ㎍의 추출 DNA가 적당한 제한 엔도뉴클레아제로 분해되었고 1% 아가로스 겔 상에서 크기 분획화되었고 Hybond-N^{+} 멤브레인(Amersham) 상에 옮겨졌다. 혼성화는 65℃에서 밤새 ^{32}P-ATP-표지 *AtCK* 전체 길이 프로브를 포함한 Church 완충액(0.5 M Na_2HPO_4(pH 7.2), 1 mM EDTA, 1% (w/v) BSA 및 7% (w/v) SDS) 내에서 수행된 후 60℃에서 0.2X SSC, 0.1% (w/v) SDS로 세척되었다. 세척된 블럿은 -70℃에서 밤새 방사능사진 촬영되었다.

<35> (실시예 3) 합성 펩타이드로의 CaM 이동 변화 분석 및 포스포디에스테라제 경쟁 분석

<36> AtCK의 CaMBD 내 18-아미노산 범위에 상응하는 펩타이드(^{428}ATPLRRAALKALAKALTE^{445})가 상업적으로 합성되었다(한국 펩트론). CaM 이동 변화 분석은 Kim, M. C. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:19304-19314, 2002에 기술된 바와 같이 Ca^{2+}의 존재 및 부재 하에 303 pmol SCaM-1 및 증가되는 농도의 AtCK 펩타이드로 수행되었다. 주기 뉴클레오타이드 포스포디에스테라제(PDE) 분석은 Kim, M. C. *et al.*, J. Biol. Chem. 277:19304-19314, 2002에 기술된 바와 같이 AtCK 펩타이드의 존재(100 nM) 또는 부재 하에 증가된 농도의 SCaM-1(5～200 nM)를 지닌 초기 500 ㎕ 반응 부피 내에서 수행되었다. 펩타이드로부터의 SCaM-1의 해리 상수(K_d)는 Erickson-Viitanen, S. and DeGrado, W. F. Meth. Enzymol. 139:455-478, 1987에 기술된 바와 같이 계산되었다.

<37> (실시예 4) $^{45}Ca^{2+}$ 결합 분석

<38> CaM 상호작용 분석에 사용된 정제된 재조합 단백질(1 ㎍)이 13% SDS/PAGE 상에서 분리되고 니트로셀룰로즈 멤브레인 상에서 전기블럿되었다. 전극 완충액을 제거하기 위해 멤브레인은 10 mM 이미다졸 pH 6.8, 60 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$ 및 0.05% Tween-20으로 3회 세척되었다. 멤브레인은 실온에서 10분간 1 mM Ci/l $^{45}Ca^{2+}$(7.5로 적정된 pH를 지닌 세척 완충액 내)과 인큐베이트되었고 탈이온수로 세척되고 건조되고 방사능사진 촬영되었다.

<39> (실시예 5) 자가인산화 및 기질 인산화 분석

<40> 정제된 GST::AtCK(5 ㎍)가 20 ㎕의 총 반응 부피 내 다양한 농도의 $MgCl_2$, $MnCl_2$ 또는 $CaCl_2$의 존재 하에 자가인산화 완충액에 첨가되었다. 반응을 착수하기 위해 10 μCi의 γ-^{32}P-ATP가 첨가되었고 반응 혼합물은 30℃에서 20분간 인큐베이트되었다. 반응은 P81 인-셀룰로즈 종이(Watman) 상에 10 ㎕의 반응 혼합물 점을 찍거나 6 ㎕의 4X SDS 표본 완충액을 첨가함으로서 중지되었다. P81 종이는 45분간 75 mM 인산으로 빈번하게 교환하면서 완전히 세척되었다. 종이는 건조되고 칵테일-O를 포함한 섬광 바이알 내에 놓이고 액체 섬광 계수기(Beckman) 내에서 계산이 기록되었다. 반응이 SDS 표본 완충액의 첨가에 의해 중지된 경우 혼합물은 100℃에서 2분간 비

등되었고 12.5% SDS/PAGE 상에서 분리되었다. 겔은 건조되고 방사능사진촬영을 위해 노출되었다.

<41> 기질 인산화 분석을 위해 정제된 GST::AtCK(5 ㎍)가 20 ㎕의 총 반응 부피 내 MBP(1 ㎍)를 지닌 키나제 완충액(50 mM Tris-Cl pH 7.5, 1 mM DTT, 3 mM $MnCl_2$, 10 μCi의 γ-^{32}P-ATP) 내에서 인큐베이트되었다. 칼모듈린 농도를 증가시키면서 SCaM-1가 1 mM Ca^{2+} 또는 5 mM EGTA의 존재 하에 혼합물에 첨가되었다. 분석은 상기 기술된 바와 같이 지속되었다.

도면의 간단한 설명

<42> 도 1은 AtCK의 도메인 구조 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 도 1A는 AtCK의 기능적 도메인의 개략도이다. 도 1B는 AtCK의 추정된 아미노산 서열이다. 좌측의 번호는 아미노산 잔기를 나타낸다. 세린/트레오닌 키나제 촉매작용 도메인은 회색으로 표시되어 있다. 추정 CaM-결합 도메인은 흑색으로 표시되어 있다. 점선은 2개의 퇴화된 EF-핸드를 나타낸다. 추정 자가인산화 모티프(RXXT/S)는 밑줄쳐 있다.

<43> 도 2는 칼슘/칼모듈린 의존적 단백질 키나제의 서던 블럿 분석 및 계통적 관계를 나타낸 것이다. 도 2A는 AtCK의 서던 블럿 분석을 나타낸다. 10 ㎍의 추출 게놈 DNA가 *Eco*RI, *Hin*dⅢ, *Xba*I 및 *Xho*I로 분해되고 1% 아가로스 겔 상에서 분리되고 Hybond-N+ 멤브레인 상에 옮겨졌다. 혼성화는 ^{32}P-ATP-표지된 *AtCK* 전체 길이 cDNA 프로브로 수행되었다. kb 크기는 좌측에 나타나 있다. 도 2B는 AtCK와 다른 칼슘/칼모듈린-의존적 단백질 키나제 간의 계통적 관계를 나타낸다. 계통수는 DNASIS 프로그램에 의해 생성된 계통수로 나타나 있다.

<44> 도 3은 AtCK 내 CaMBD의 확인을 나타낸 것이다. 도 3A는 8개 AtCK 단편(D0~D7)이 GST 융합 단백질로서 발현되었다. 각 컨스트럭트의 CaM에 결합하는 능력이 우측 컬럼에 요약되었다(+, CaM에 결합; -, 그렇지 않음). 도 3B는 AtCK의 CaM-결합 분석을 나타낸다. GST 및 GST 융합 단백질(D0~D7)은 Ca^{2+} 존재 또는 부재 하에서 항-GST 항체로의 웨스턴 블럿팅 및 CaM-중첩에 의해 분석되었다.

<45> 도 4는 CaMBD를 나타내는 합성 펩타이드를 이용한 AtCK에 대한 CaM-결합 분석을 나타낸 것이다. 도 4A는 AtCK의 CaMBD의 헬릭스 바퀴 돌출부를 나타낸다. 소수성 잔기는 순환되고 염기성 아미노산은 *로 표기되었다. 도 4B는 CaM 이동 변화 분석을 나타낸다. SCaM-1은 0.1 mM $CaCl_2$(상단 패널) 또는 2 mM EGTA(하단 패널)의 존재시 표시된 몰비로 펩타이드와 혼합되었다. 화살표는 자유 CaM 및 펩타이드-CaM 복합체의 위치를 나타낸다. 도 4C는 SCaM-1-자극된 PDE 활성은 AtCK 펩타이드의 존재 하에서 감소된다. PDE 활성은 고정된 농도(100 nM)의 펩타이드의 존재 또는 부재 하에 SCaM-1 농도를 변화시키면서 측정되었다.

<46> 도 5는 직접적인 Ca^{2+} 결합 분석을 나타낸 것이다. 도 5A는 분석 후 쿠마시 브릴리언트 블루 염색된 멤브레인을 나타낸다. 도 5B는 $^{45}Ca^{2+}$ 결합 분석 후 정제된 CaM(SCaM-1), D0, D2, D3, D7 및 GST 재조합 단백질이 방사능사진이다.

<47> 도 6은 자가인산화 상의 다양한 양이온의 효과를 나타낸 것이다. 도 6A는 AtCK의 자가인산화 활성이 방사능사진 촬영에 의해 다양한 농도의 $MnCl_2$, $MgCl_2$ 및 $CaCl_2$의 존재 하에 측정되었다(A, 우측). 겔은 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색되고 건조되고 시각화를 위해 x-선으로 현상되었다. 도 6B는 ^{32}P-통합된 AtCK의 cpm은 액체 섬광 계수기로 기록되었다; Mn^{2+}, ●; Mg^{2+}, ○; Ca^{2+}, ■.

<48> 도 7은 AtCK의 Ca^{2+}/CaM-조절된 기질 인산화 활성을 나타낸 것이다. MBP(미엘린 염기 단백질) 인산화는 AtCK, 칼모듈린, SCaM-1의 존재 하에서 1 mM Ca^{2+}(●) 또는 5 mM EGTA(○)로 측정되었다. 기질 인산화 활성은 방사능사진 밴드의 강도로 측정된다(A, 우측). ^{32}P-통합된 MBP의 cpm은 액체 섬광 계수기로 기록되었다(B).

도면

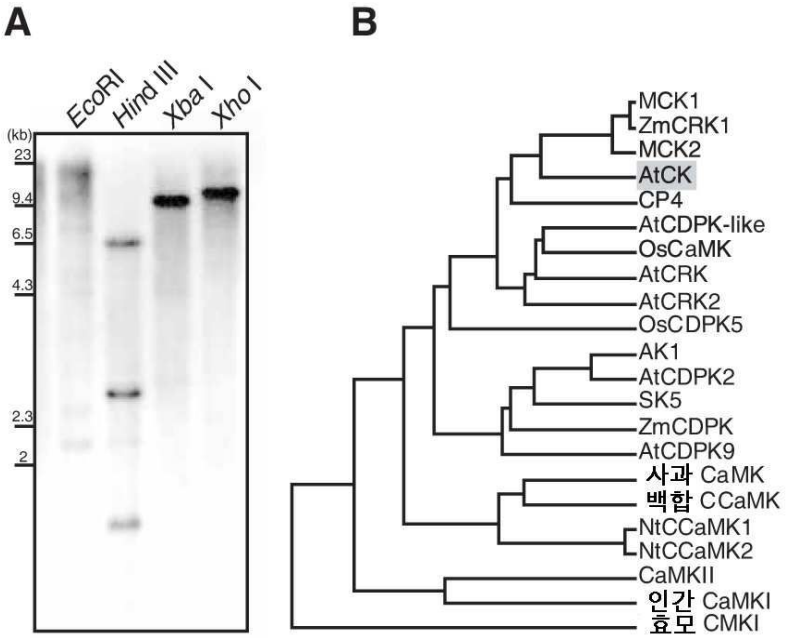
도면1



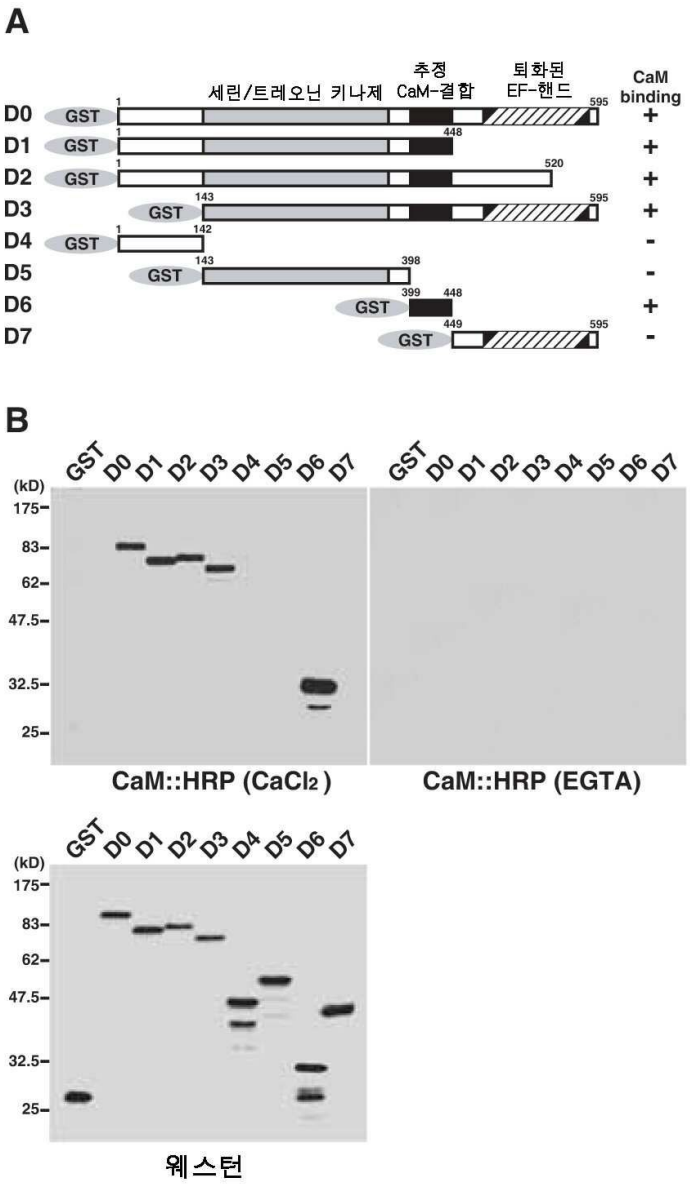
B

```
1   MGQCYGKVNQ SKQNGEEEAN TTTYVVSGDG NQIQPLTPVN YGRAKNTPAR
51  SSNPSPWPSP FPHGSASPLP SGVSPSPART STPRRFFRRP FPPPSPAKHI
101 KASLIKRLGV KPKEGPIPEE RGTEPEQSLD KSFGYGKNFG AKYELGKEVG
151 RGHFGHTCSG RGKKGDIKDH PIAVKIISKA KMTTAIAIED VRREVKLLKS
201 LSGHKYLIKY YDACEDANNV YIVMELCDGG ELLDRILARG GKYPEDDAKA
251 IVVQILTVVS FCHLQGVVHR DLKPENFLFT SSREDSDLKL IDFGLSDFIR
301 PDERLNDIVG SAYYVAPEVL HRSYSLEADI WSIGVITYIL LCGSRPFWAR
351 TESGIFRTVL RTEPNYDDVP WPSCSSEGKD FVKRLLNKDY RKRMSAVQAL
401 THPWLRDDSR VIPLDILIYK LVKAYLHATP LRRAALKALA KALTENELVY
451 LRAQFMLLGP NKDGSVSLEN FKTALMQNAT DAMRESRVPE ILHTMESLAY
501 RKMYFEEFCA AAISIHQLEA VDAWEEIATA GFQHFETEGN RVITIEELAR
551 ELNVGASAYG HLRDWVRSSD GKLSYLGFTK FLHGVTLRAA HARPR
```

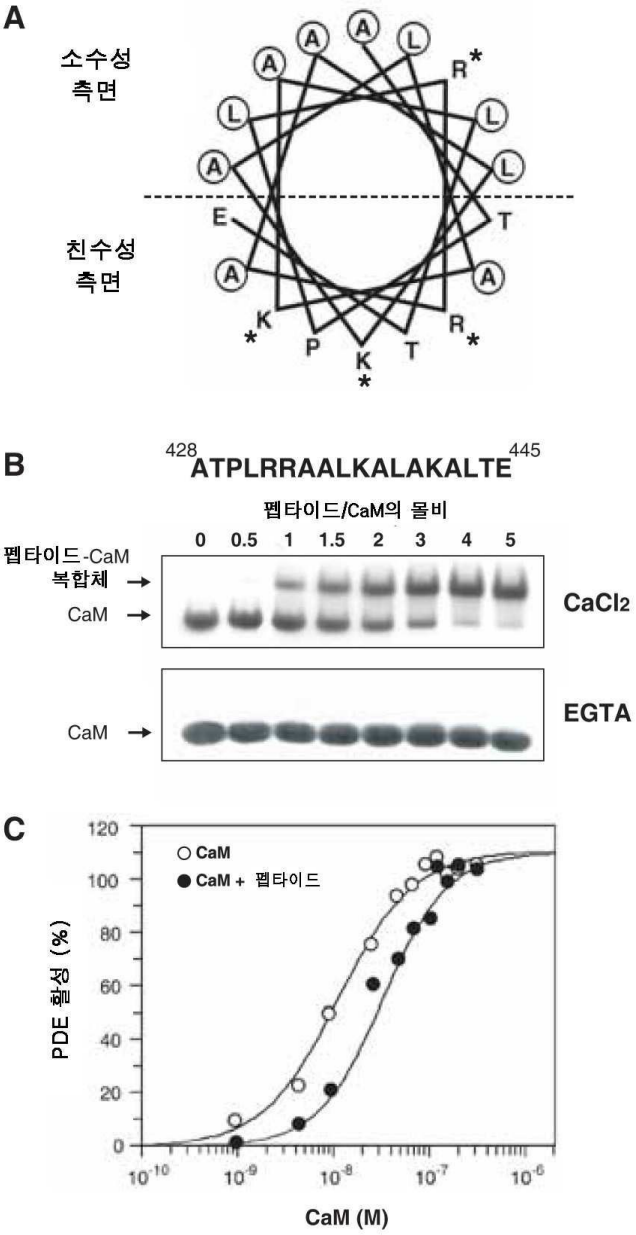
도면2



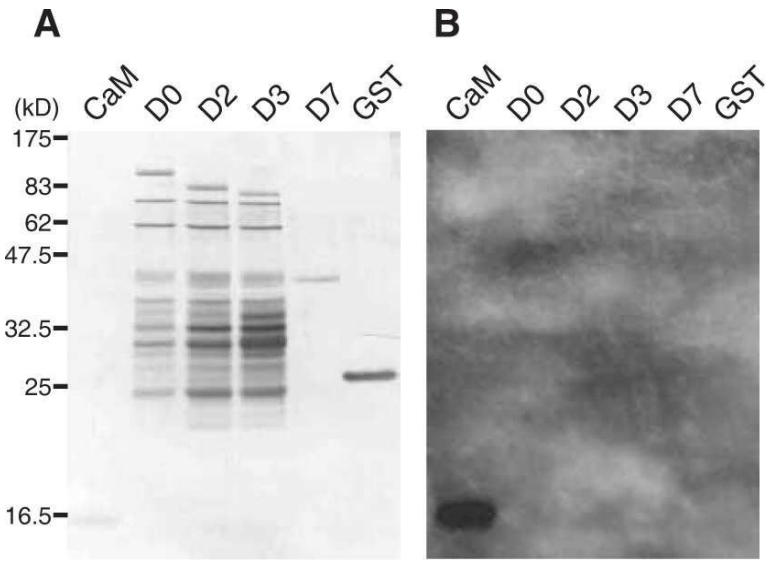
도면3


A
세린/트레오닌 키나제
추정 CaM-결합
퇴화된 EF-핸드
CaM binding
D0
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
GST
B
(kD)
175
83
62
47.5
32.5
25
CaM::HRP (CaCl2)
CaM::HRP (EGTA)
웨스턴

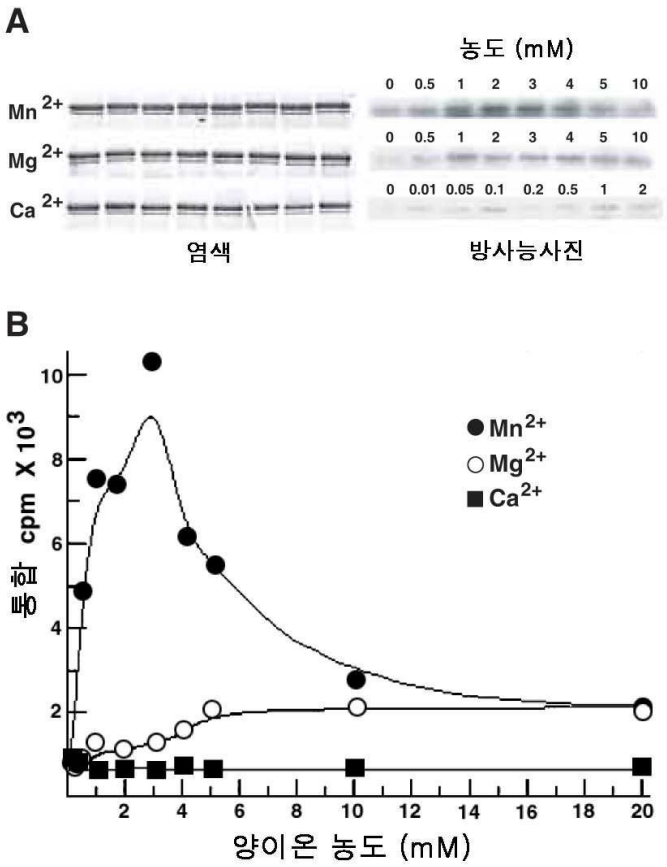
도면4


A
소수성
측면
친수성
측면
B
428 ATPLRRAALKALAKALTE 445
펩타이드/CaM의 몰비
0 0.5 1 1.5 2 3 4 5
펩타이드-CaM
복합체
CaM
CaCl2
CaM
EGTA
C
CaM
CaM + 펩타이드
PDE 활성 (%)
CaM (M)

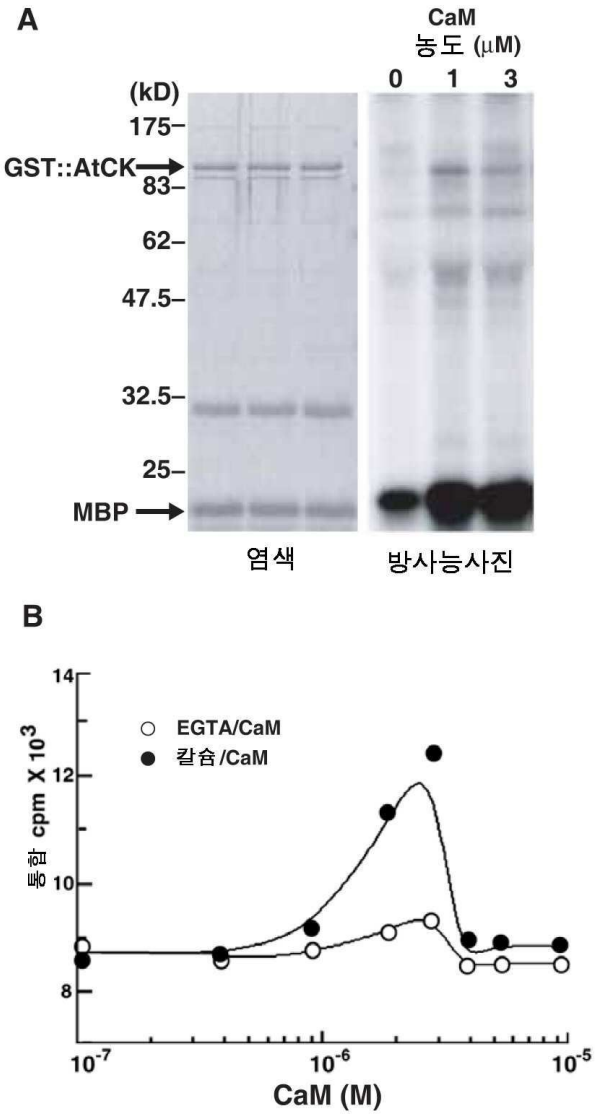
도면5


A
B
(kD)
CaM
D0
D2
D3
D7
GST
175
83
62
47.5
32.5
25
16.5

도면6


A
농도 (mM)
Mn 2+
Mg 2+
Ca 2+
0 0.5 1 2 3 4 5 10
0 0.5 1 2 3 4 5 10
0 0.01 0.05 0.1 0.2 0.5 1 2
염색
방사능사진
B
결합 cpm X 10^3
Mn2+
Mg2+
Ca2+
양이온 농도 (mM)

도면7



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Calcium/calmodulin-dependent protein kinase in Arabidopsis thaliana

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 595
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Gly Gln Cys Tyr Gly Lys Val Asn Gln Ser Lys Gln Asn Gly Glu
1 5 10 15

Glu Glu Ala Asn Thr Thr Thr Tyr Val Val Ser Gly Asp Gly Asn Gln
20 25 30

Ile Gln Pro Leu Thr Pro Val Asn Tyr Gly Arg Ala Lys Asn Thr Pro
35 40 45

Ala Arg Ser Ser Asn Pro Ser Pro Trp Pro Ser Pro Phe Pro His Gly
50 55 60

Ser Ala Ser Pro Leu Pro Ser Gly Val Ser Pro Ser Pro Ala Arg Thr
65 70 75 80

Ser Thr Pro Arg Arg Phe Phe Arg Arg Pro Phe Pro Pro Pro Ser Pro
85 90 95

Ala Lys His Ile Lys Ala Ser Leu Ile Lys Arg Leu Gly Val Lys Pro
100 105 110

Lys Glu Gly Pro Ile Pro Glu Glu Arg Gly Thr Glu Pro Glu Gln Ser
115 120 125

Leu Asp Lys Ser Phe Gly Tyr Gly Lys Asn Phe Gly Ala Lys Tyr Glu
130 135 140

Leu Gly Lys Glu Val Gly Arg Gly His Phe Gly His Thr Cys Ser Gly
145 150 155 160

Arg Gly Lys Lys Gly Asp Ile Lys Asp His Pro Ile Ala Val Lys Ile
165 170 175

Ile Ser Lys Ala Lys Met Thr Thr Ala Ile Ala Ile Glu Asp Val Arg
180 185 190

Arg Glu Val Lys Leu Leu Lys Ser Leu Ser Gly His Lys Tyr Leu Ile
195 200 205

Lys Tyr Tyr Asp Ala Cys Glu Asp Ala Asn Asn Val Tyr Ile Val Met
210 215 220

```
Glu Leu Cys Asp Gly Gly Glu Leu Leu Asp Arg Ile Leu Ala Arg Gly
225                 230                 235                 240

Gly Lys Tyr Pro Glu Asp Asp Ala Lys Ala Ile Val Val Gln Ile Leu
                245                 250                 255

Thr Val Val Ser Phe Cys His Leu Gln Gly Val Val His Arg Asp Leu
            260                 265                 270

Lys Pro Glu Asn Phe Leu Phe Thr Ser Ser Arg Glu Asp Ser Asp Leu
        275                 280                 285

Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser Asp Phe Ile Arg Pro Asp Glu Arg
    290                 295                 300

Leu Asn Asp Ile Val Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro Glu Val Leu
305                 310                 315                 320

His Arg Ser Tyr Ser Leu Glu Ala Asp Ile Trp Ser Ile Gly Val Ile
                325                 330                 335

Thr Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Ser Arg Pro Phe Trp Ala Arg Thr Glu
            340                 345                 350

Ser Gly Ile Phe Arg Thr Val Leu Arg Thr Glu Pro Asn Tyr Asp Asp
        355                 360                 365

Val Pro Trp Pro Ser Cys Ser Ser Glu Gly Lys Asp Phe Val Lys Arg
    370                 375                 380

Leu Leu Asn Lys Asp Tyr Arg Lys Arg Met Ser Ala Val Gln Ala Leu
385                 390                 395                 400

Thr His Pro Trp Leu Arg Asp Asp Ser Arg Val Ile Pro Leu Asp Ile
                405                 410                 415

Leu Ile Tyr Lys Leu Val Lys Ala Tyr Leu His Ala Thr Pro Leu Arg
            420                 425                 430

Arg Ala Ala Leu Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Thr Glu Asn Glu Leu
        435                 440                 445

Val Tyr Leu Arg Ala Gln Phe Met Leu Leu Gly Pro Asn Lys Asp Gly
```

```
    450                 455                 460

Ser Val Ser Leu Glu Asn Phe Lys Thr Ala Leu Met Gln Asn Ala Thr
465                 470                 475                 480

Asp Ala Met Arg Glu Ser Arg Val Pro Glu Ile Leu His Thr Met Glu
                485                 490                 495

Ser Leu Ala Tyr Arg Lys Met Tyr Phe Glu Glu Phe Cys Ala Ala Ala
            500                 505                 510

Ile Ser Ile His Gln Leu Glu Ala Val Asp Ala Trp Glu Glu Ile Ala
        515                 520                 525

Thr Ala Gly Phe Gln His Phe Glu Thr Glu Gly Asn Arg Val Ile Thr
    530                 535                 540

Ile Glu Glu Leu Ala Arg Glu Leu Asn Val Gly Ala Ser Ala Tyr Gly
545                 550                 555                 560

His Leu Arg Asp Trp Val Arg Ser Ser Asp Gly Lys Leu Ser Tyr Leu
                565                 570                 575

Gly Phe Thr Lys Phe Leu His Gly Val Thr Leu Arg Ala Ala His Ala
            580                 585                 590

Arg Pro Arg
        595
```

<210> 2
<211> 262
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```
Tyr Glu Leu Gly Lys Glu Val Gly Arg Gly His Phe Gly His Thr Cys
  1               5                  10                  15

Ser Gly Arg Gly Lys Lys Gly Asp Ile Lys Asp His Pro Ile Ala Val
             20                  25                  30

Lys Ile Ile Ser Lys Ala Lys Met Thr Thr Ala Ile Ala Ile Glu Asp
         35                  40                  45
```

```
Val Arg Arg Glu Val Lys Leu Leu Lys Ser Leu Ser Gly His Lys Tyr
     50                  55                  60

Leu Ile Lys Tyr Tyr Asp Ala Cys Glu Asp Ala Asn Asn Val Tyr Ile
 65                  70                  75                  80

Val Met Glu Leu Cys Asp Gly Gly Glu Leu Leu Asp Arg Ile Leu Ala
                 85                  90                  95

Arg Gly Gly Lys Tyr Pro Glu Asp Asp Ala Lys Ala Ile Val Val Gln
            100                 105                 110

Ile Leu Thr Val Val Ser Phe Cys His Leu Gln Gly Val Val His Arg
        115                 120                 125

Asp Leu Lys Pro Glu Asn Phe Leu Phe Thr Ser Ser Arg Glu Asp Ser
    130                 135                 140

Asp Leu Lys Leu Ile Asp Phe Gly Leu Ser Asp Phe Ile Arg Pro Asp
145                 150                 155                 160

Glu Arg Leu Asn Asp Ile Val Gly Ser Ala Tyr Tyr Val Ala Pro Glu
                165                 170                 175

Val Leu His Arg Ser Tyr Ser Leu Glu Ala Asp Ile Trp Ser Ile Gly
            180                 185                 190

Val Ile Thr Tyr Ile Leu Leu Cys Gly Ser Arg Pro Phe Trp Ala Arg
        195                 200                 205

Thr Glu Ser Gly Ile Phe Arg Thr Val Leu Arg Thr Glu Pro Asn Tyr
    210                 215                 220

Asp Asp Val Pro Trp Pro Ser Cys Ser Ser Glu Gly Lys Asp Phe Val
225                 230                 235                 240

Lys Arg Leu Leu Asn Lys Asp Tyr Arg Lys Arg Met Ser Ala Val Gln
                245                 250                 255

Ala Leu Thr His Pro Trp
            260
```

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3
Ala Thr Pro Leu Arg Arg Ala Ala Leu Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu
1 5 10 15

Thr Glu Asn