Journal of the Korean Chemical Society
2021, *Vol. 65, No. 6*
Printed in the Republic of Korea
https://doi.org/10.5012/jkcs.2021.65.6.489

Note

아미노 말단 절반 라이오보플라빈 신테이스 변이 단백질의 분광학적 분석

오동현 · 김류련 · 김재성 · 이찬용*
충남대학교 생화학과
(접수 2021. 10. 5; 게재확정 2021. 10. 26)

Spectroscopic Analysis of Amino-Terminal Half of Riboflavin Synthase Variant Proteins

Eugeney Oh, Ryu-Ryun Kim, Jae-Seong Kim, and Chan Yong Lee*
*Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea. *E-mail: cylee@cnu.ac.kr*
(Received October 5, 2021; Accepted October 26, 2021)

주제어: 대장균, 라이오보플라빈 신테이스, 루마진
Key words: *Escherichia coli*, Lumazine, Riboflavin Synthase

라이오보플라빈(riboflavin)은 수용성인 비타민 B_2로 널리 알려져 있으며 이것의 생리활성 물질들인 FMN(flavin mononucleotide)과 FAD(flavin adenine dinucleotide)는 조효소로서 대사 작용에서 중요한 역할을 수행한다.[1,2] 라이오보플라빈 생합성 과정의 마지막 단계의 반응에 관여하는 라이오보플라빈 신테이스(riboflavin synthase)는 기질인 두 분자의 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine(이하 루마진으로 약술)과 결합 후, 특이한 자리 옮김(dismutation) 반응을 거쳐(*Fig*. 1), 각각 한 분자의 라이오보플라빈과 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione생성물을 만들어 내는 반응에 관여하는 효소이다.[3–5] 라이오보플라빈 신테이스의 활성 부위(active site)에는 공여 부위(donor site)와 수용 부위(acceptor site)가 존재한다.[1,6] 두 부위에 각각 한 분자의 루마진이 결합되면, 공여 부위의 친핵성 아미노산 잔기에 의하여 효소 반응이 개시되며, 공여 부위의 4-탄소 단위(4-carbon unit)가 수용 부위로 이동하여, 결과적으로 제공 부위에는 pyrimidine 유도체, 수용 부위 에는 라이오보플라빈이 생성된다(*Fig*. 1).[2,7]

대장균(*Escherichia coli*) 라이오보플라빈 신테이스 단백질의 아미노-말단 도메인 절반(N-terminal domain half)과 카복시-말단 도메인 절반(C-terminal domain half)의 아미노산 서열(amino acid sequence) 사이에는 단백질 자체 내부의 아미노산 상동성(intra-molecular amino acid identity)를 갖는다.[8–10] 아미노-말단 도메인 절반(이하 N-RS로 약칭) 1-97번 아미노산 잔기의 서열과 카복시-말단 도메인 절반(이하 C-RS로 약칭)의 98-213번 아미노산 잔기의 서열을 비교하면, 24 개 아미노산이 동일하며 20 개의 아미노산이 유사하다.[6,11] X-선 결정학 방법으로 분석한 결과 N-RS와 C-RS의 기질 결합 부위는 근접한 위치에서 매우 유사하게 접히게 된다.[6,11,12]

이러한 정보는 효소 단백질 각각의 도메인에 한 분자의 루마진 기질이 결합함을 시사하지만,[3,13] 이 결과가 N-RS 혹은 C-RS 중 어느 쪽이 공여 혹은 수용 부위로 작용하는지 등에 대한 라이오보플라빈 신테이스 효소와 기질인 루

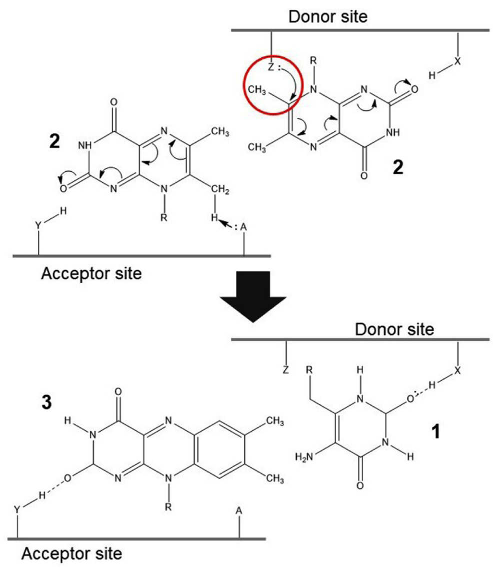


***Figure* 1.** Reaction mechanism of riboflavin synthase. The first step of the reaction mechanism proposed by Plaut *et al.*,[5] where XH and YH are hydrogen bond donors on the protein, Z: is a nucleophile and A: is a proton acceptor. Riboflavin synthase binds two molecules of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine (2) as substrate and yields one molecule of 5-amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione (1) and one molecule of riboflavin (3) as products.

마진 사이에 상호작용에 관한 중요한 직접적인 증거를 제시해주지 못하고 있다. 그러나 N-RS가 라이보플라빈 혹은 루마진과 결합한 X-선 결정학 방법으로 규명된 구조에서 보면 이들 리간드에서 7번 위치의 C7α의 methylene 그룹과 가장 가까이에 있어 *Fig.* 1의 공여 부위에서 친핵제(nucleophile)로 작용하는 Z로 작용하는 아미노산은 Cys 48로 추정되고 있다.

라이보플라빈(riboflavin)은 Vitamin B_2로 널리 알려져 있으며 다양한 종의 세균, 곰팡이 및 녹색 식물에서 합성되지만, 동물들은 합성할 수 없으므로 이들로부터 섭취해야 한다.[2] 또한 장내 세균들은 비타민의 내부 자체 생합성에 의존하기 때문에 라이보플라빈 생합성 경로는 항균 화학제제의 발굴 대상이 될 가능성으로 주목 받고 있는 데 이는 라이보플라빈 합성 효소들의 결합 성질과 활성 부위에 대한 상세한 규명은 항균 활성 억제제의 이론적 설계를 위한 출발점이 될 수 있기 때문이다.

본 연구에서는 아미노-말단 영역 라이보플라빈 신테이스(N-RS) 단백질의 구조와 분광학적 특성을 조사하고 변이된 아미노-말단 도메인의 라이보플라빈 신테이스 변이 단백질들의 흡광과 형광의 특성을 관찰함으로써 리간드와의 결합, 고속-다중 스크리닝법(high-throughput screening system), 형광 공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer)로서의 응용 가능성 등을 탐색하고자 한다. 이를 위하여 저자들의 연구[14]에 의하여 이루어진 대장균 라이보플라빈 신테이스의 아미노-말단(N-RS) 도메인의 돌연변이 단백질을 코드 하는 유전자들이 삽입된 제조된 재조합 플라스미드를 발현시켜 그 단백질들을 분리, 정제하였다.

X-ray crystallization에 관한 연구[6,14]에 의하면 라이보플라빈 신테이스 효소의 Cys 48은 활성 부위(active site)에 존재함으로써 친핵체로 작용될 가장 가능성이 큰 아미노산으로 추정되고 있다. 따라서 본 연구에서는 야생형 아미노절반 라이보플라빈 신테이스 단백질(N-RS Wt)과 Cys 48번 아미노산이 Ser으로 돌연변이된 아미노 절반 라이보플라빈 신테이스 단백질(N-RS C48S), 그리고 Cys 48 아미노산 바로 옆에 존재하는 Ala 43이 Leu으로 돌연변이 된 아미노말단 라이보플라빈 신테이스 단백질(N-RS A43L)에 대한 루마진 혹은 라이보플라빈과 결합시의 흡광 및 형광 스펙트럼, pH변화에 따른 흡광도 양상을 조사하여 이들 단백질의 구조적 변이를 탐색하고자 하였다. 이를 위해 우선 수행한 실험은 야생형 또는 돌연변이 아미노-말단 라이보플라빈 신테이스 단백질을 코드하는 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드를 과발현(over-expression)시키고 이온 교환 크로마토그라피(ion exchange chromatography) 및 Gel filtration으로 분리, 정제하여 다량의 단백질을 얻었다. SDS-PAGE 에서의 이들의 대략적인 분자량은 13 kDa

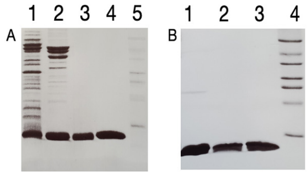


***Figure* 2.** (A) Purification of the N-RS C48S protein. 1. supernatant of cell extract, 2. after Sepharose, 3. after sephadex, 4. after ultra-filtration, 5. protein size marker. (B) Purified proteins. 1, N-RS Wt; 2, N-RS A43L, 3, N-RS C48S; 4, protein size marker 14, 21, 30, 46, 66, 97, and 200 kDa, respectively. Expressed and purified proteins of wild type and mutant N-RS proteins are shown at 13 kDa size position on SDS-PAGE in *Fig.* 2A and B.

이었는 데, 이는 재조합 단백질의 아미노산 서열로 예측된 질량과 일치하는 결과이다(*Fig.* 2).

Fig. 1에서 보는 바와 같이 라이보플라빈 신테이스 효소의 기질과 생성물은 각각 루마진과 라이보플라빈이다. 분리, 정제된 이들 단백질에는 이 효소의 여러 아미노산과 수소결합으로 루마진과 라이보플라빈이 결합되어 있으므로 순수 단백질과 이들 리간드와의 결합 특성을 조사하기 위하여 ligand exchange 로써 리간드 분자들이 없는 순수한 N-RS 단백질들만을 얻고자 분리, 정제된 단백질에 결합되어 있는 루마진 혹은 라이보플라빈을 urea 처리를 한 후 투석 과정을 통하여 제거하였다.

Fig. 3A에서 보는 바와 같이 흡광도 파장 주사(absorbance wavelength scanning)에 의하여 루마진이 제거된 순수 단백질을 확인 하였으며, 뒤의 실험 방법에 기술된 바와 같이 이들 순수 N-RS 단백질들과 루마진을 재결합(reconstitution)시키는 과정을 수행하였다. *Fig.* 3B에서 보는 바와 같이 흡광도 파장 주사에 의하면 410 nm에서 흡광 피크를 가지는 전형적인 루마진의 특성 피크가 나타났으며 유리된 루마진에 비하여 약간 장파장으로 이동하는 경향을 보였다. 재결합된 생성물의 흡광 스펙트럼을 분석한 결과, 루마진의 특성 피크인 410 nm에서의 흡광도를 바탕으로 루마진의 몰·흡광 계수 10,000 $M^{-1}cm^{-1}$를 활용하여 농도를 계산하면 이들 단백질들과 결합하는 리간드가 원하는 바대로 1:1비율로 재결합되었음을 확인하였으며(*Fig.* 3B), 이렇게 생성된 단백질-리간드 복합체(protein-ligand complex)를 이용하여 이들 복합체에서의 루마진의 pK_a를 측정하기 위하여 pH 적정(titration)을 수행하였다.

루마진 화합물은 알칼리성일 때 루마진의 7 번 위치의 methyl그룹의 hydrogen이 해리되어 methylene 구조를 가지며(*Scheme* 1), 루마진의 화학구조가 바뀜으로써 흡광도 파장 주사 양상(absorbance wavelength scanning) 이 달라진다. 이를 활용하면 pK_a 값을 구할 수 있는데 유리된 루마진(free lumazine) 및 N-RS Wt과 N-RS C48S와 결합된 루마진 화합물의 pH 변화에 따른 흡광 양상을 조사하여

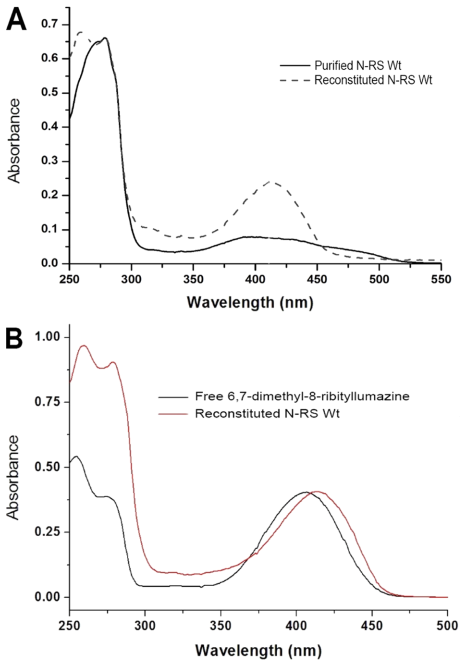
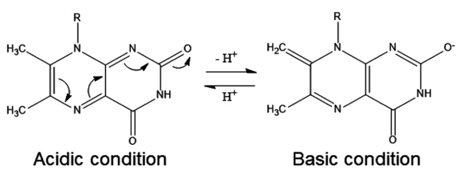


***Figure* 3.** (A) Absorbance spectra of purified N-RS Wt and N-RS Wt reconstituted with 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine. (B) Absorbance spectra of free 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine and N-RS Wt with 6,7 dimethyl-8-ribityllumazine. The concentration of proteins is 17 μM, respectively.

pK_a 값을 계산하였다. *Fig*. 4A에서 보는 바와 같이 유리된 상태의 루마진은 pH 값이 증가할수록 리간드 고유의 410 nm의 스펙트럼이 310 nm 부근으로 옮겨진다. 반면에 N-RS Wt에 결합된 루마진은 pH 값이 alkaline 쪽으로 증가할수록 루마진의 410 nm에서 310 nm로 옮겨지는 스펙트럼 외에 360 nm 부근의 파장에서 또 다른 피크가 나타남을 볼 수 있다(Fig. 4B). 이는 알칼리성에서는 methylene 음이온 형태를 가짐으로써 루마진 화합물내의 이중결합 된 conjugation 변이가 유발되기 때문이다(*Scheme* 1).

이들의 pK_a 값의 비교를 보면, 유리 상태의 루마진은 7.85이고 N-RS Wt에 결합된 상태의 pK_a 값은 8.00로 약간 높게 나타났다. N-RS C48S에 결합된 루마진은 N-RS Wt와 결합했을 때와 비슷한 흡광 양상을 보였으나(Fig. 4C) pK_a 값은 N-RS 보다 훨씬 큰 9.15로 나타났다. 라이보플라빈 신테이스의 Cys 48은 루마진 고리의 C7α의 methylene 그룹과 수소결합을 하는 것으로 알려져 있으며,[11] 또한 저자들의



***Scheme* 1.** The structure of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine under acidic and basic condition. R is represented for ribityl group.

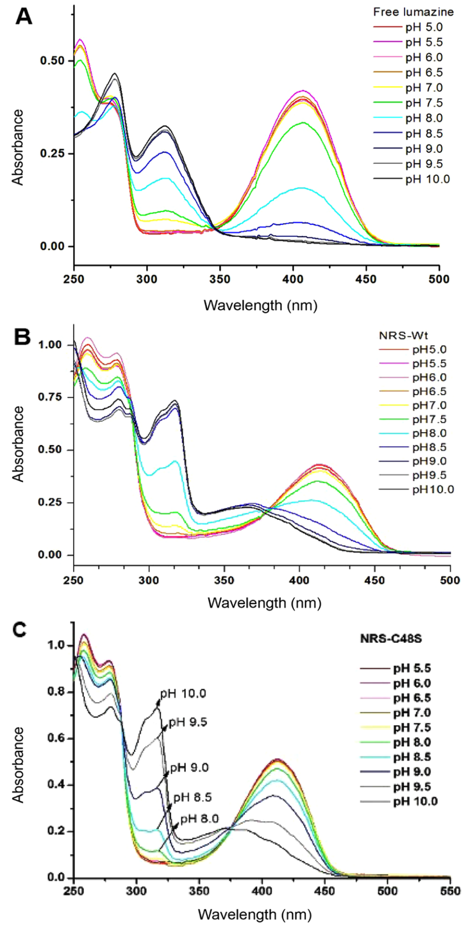


***Figure* 4.** (A) Titration of free 6,7-dimetyl-8-ribityllumazine; $pK_a = 7.85 \pm 0.05$. (B) pH titration of N-RS Wt reconstituted with 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine; $pK_a = 8.00 \pm 0.05$. (C) pH titration of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine with NRS-C48S; $pK_a = 9.15 \pm 0.12$.

NMR을 이용한 라이보플라빈 신테이스에 관한 연구결과[13]에 따르면 루마진의 6α 위치에서 1.3 ppm의 up-field shift가 나타난다. 이는 Cys의 side chain에 있는 -SH 그룹이 6α 위치의 methyl 그룹과 상호작용을 일으키면서 생긴 변화인데 이러한 작용을 하는 -SH 그룹이 Ser으로 변환되어 -OH그룹으로 대체됨으로써 pK_a 값이 상승한 것으로 추정된다.

Fig. 5A에서는 유리된 루마진(free lumazine)과 N-RS 야생형 및 돌연변이 N-RS와 결합 시 410 nm에서 여기시켰을 때의 형광 스팩트럼을 보여준다. 유리된 루마진의 480 nm의 형광 세기가 야생형 혹은 돌연변이형 N-RS단백질과 결합하면 그 형광세기가 급격이 쇄광(quench)되는 양상을 보였다. 또한 형광의 피크가 약간 장파장으로 이동하는 경향을 보였는데 이에 대한 상세한 분석을 위하여 N-RS 단백질과 결합된 루마진의 형광 양상을 분석하기 위하여 이들을 확대하여 *Fig*. 5B에 나타냈다. N-RS C48S 돌연변이 단백질은 야생형 단백질 보다 2배의 형광세기를 보이는

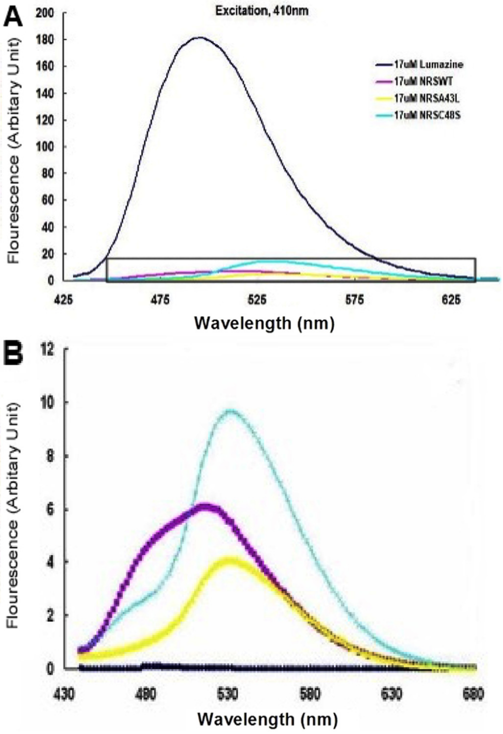
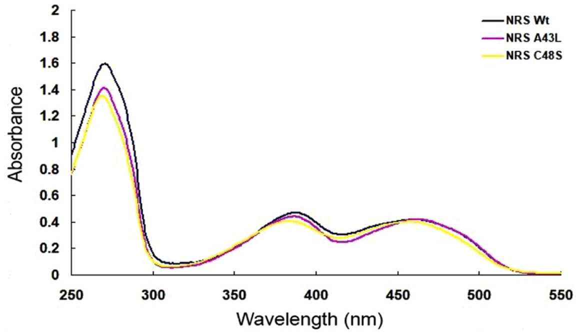


***Figure* 5.** (A) Fluorescence emission spectra of free 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine and its protein complex with purified N-RS Wt, N-RS A43L, and N-RS C48S by reconstitution of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine. (B) Enlargement of the box area in *Figure* A.



***Figrure* 6.** Absorbance spectra of purified N-RS Wt, N-RS A43L, and N-RS C48S after reconstitution with riboflavin.

데, 이는 라이보플라빈 신테이스의 super-family인 루마진 단백질(lumazine protein)에서 그 이유를 유추할 수 있다. 발광 세균에 특유한 루마진 단백질[15]은 라이보플라빈 신테이스와 비슷한 아미노산 서열을 가지고 있으며, *lux* 유전자군(operon)의 상류에 유전자가 존재한다.[16,17]

루마진 단백질은 효소작용을 하지 않으나 라이보플라빈 신테이스 효소의 기질인 루마진과 리간드로서 결합함으로써 이들은 형광성을 갖는 특징이 있으며,[18] 한 분자의 루마진 단백질에 한 분자의 루마진이 결합될 수 있다.[19] 이러한 형광성을 갖는 루마진 단백질의 48번 아미노산 잔기는 모든 루마진 단백질에서 Ser으로 보존되어 있다.[15] 또한 라이보플라빈 신테이스 효소의 Cys 48잔기는 전술 한 바와 같이 루마진 분자 고리의 6α methyl 그룹과 상호작용을 하고 C7α의 methylene 그룹과 수소결합을 하는 것으로 알려져 있다. Cys48은 루마진에 근접해 위치하여 이런 작용을 통해 형광성 리간드의 쇄광을 파생시켰으나, 위치지정 돌연변이에 의하여 아미노 말단 라이보플라빈 신테이스의 48번 아미노산 Cys이 Ser으로 변이되어 리간드와 결합하여도 형광성을 지니지 않는 라이보플라빈 신테이스의 특성에서 형광성을 갖는 루마진 단백질의 특징을 지닌 아미노산으로 변화되었기 때문에 야생형 보다 강한 형광성을 지닌 단백질로 전환된 것으로 추정된다. 라이보플라빈은 라이보플라빈 신테이스 효소의 생성물로서 isoalloxazine ring을 지녀 370 nm와 445 nm에서 커다란 흡광 피크를 갖는다. *Fig*. 4에서 리간드를 제거한 N-RS Wt, N-RS A43L과 N-RS C48S 단백질들을 라이보플라빈과 결합시킨 후 흡광도의 파장 스펙트럼을 조사한 결과 *Fig*. 6에서 보는 바와 같이 야생형 및 돌연변이형 N-RS 공히 동일한 파장의 흡광 세기와 피크를 갖는 것으로 나타났다. 이들 피크 280 nm, 370 nm, 그리고 445 nm에서 여기시켰을 때의 형광 양상을 조사하고 이를 *Fig*. 7에 나타냈다.

Fig. 7A에서 보는 바와 같이 유리된 라이보플라빈의 경우 280 nm에서 여기 될 때 370 nm의 형광 피크가 없었으나 N-RS Wt, N-RS A43L, N-RS C48S의 경우 피크가 나타났으며 이는 이들 단백질의 81 번 위치에 아미노산 트립토판이 존재하기 때문으로 사료되며 N-RS C48S 돌연변이 단백질의 형광이 가장 큰 것은 이 단백질에서 라이보플라빈이 외부에 존재하고 트립토판이 단백질 구조상 가장 외부에 위치하기 때문인 것으로 추정된다. 370 nm 및 445 nm의 유리된 라이보플라빈의 여기 피크(excitation peak)에서는 N-RS C48S의 형광 세기가 유리된 라이보플라빈 형광 세기와 비슷한 것으로 나타났다. 이는 유리된 루마진의 경우 N-RS와 결합하게 되면 그 형광 세기가 크게 쇄광(quench)되는 결과와는 다른 양상으로서, 이는 루마진이 라이보플라빈에 비하여 크기가 작아 단백질에 결합되어 숨겨지는 것과 달리 상대적으로 분자 크기가 큰 라이보플라빈이 단백질과 결합하는 경우에는 쇄광의 정도가 작은 것으로 추정된다. 370 nm와 445 nm에서의 여기의 경우 모두 일관되게 N-RS C48S의 라이보플라빈의 형광세기가 최대이며 N-RS Wt과 N-RS A43L의 경우 비슷한 형광 세기를 나타냈다(Fig. 7B와 7C).

루마진 분자와 결합된 아미노-말단 라이보 플라빈 신테이스의 3차 구조 예측과 이들 N-RS 야생형과 N-RS C48S 돌연변이 단백질의 형광성의 변화와 구조와의 상관관계를

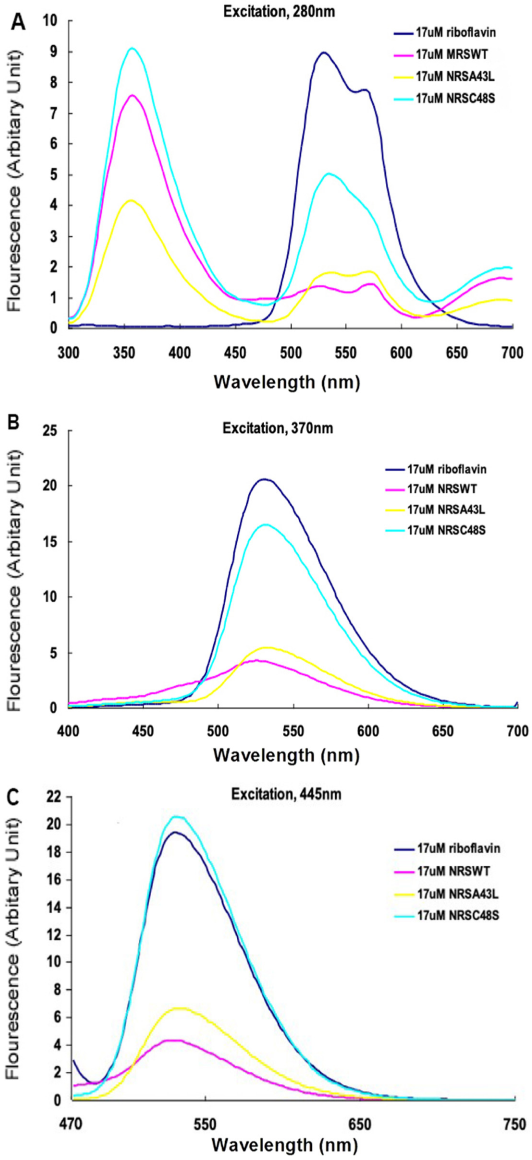


***Figure* 7.** (A) Fluorescence emission spectra of free riboflavin as well as purified N-RS Wt, N-RS A43L, and N-RS C48S with reconstitution of riboflavin. Excited at 280 nm. (B) Excited at 370 nm. (C) Excited at 445 nm.

유추하기 위하여 Chem office 프로그램을 이용하여 이들 단백질의 리간드 결합부위의 3차 구조를 모델링 하였다 (*Fig.* 8). 아미노산 잔기를 배열한 후 기존의 X-선 결정[11]에 의한 N-RS의 3차 구조를 활용하여 돌연변이 된 각각의 아미노산 잔기를 공유 결합시켰다. 1차 구조를 이룬 펩타이드의 역학적 에너지를 최소화시키는 라이보플라빈 생성효소 구조로 만들고 접힌 구조가 형성된 라이보플라빈 신테이스와 기질인 루마진 분자가 이루는 3차 구조를 형성하기 위해 또 다시 에너지를 최소화시켰다. 역학적 에너지만을 고려하여 예측한 이 데이터 및 3-D 모델은 분자의 상동성을 고려한 3차 구조와 기존의 X-선 결정[11]에 의하여 규명된 라이보플라빈 신테이스의 3차 구조와 유사하였다.

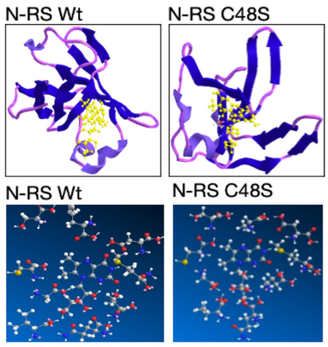


***Figure* 8.** 3-D model of wild type and mutant N-terminal domain of riboflavin synthase bound to 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine.

이와 같은 결과들을 고려할 때 라이보플라빈 생성 효소와 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. 또한 이들 3-D 구조와 형광의 세기 변화, 형광 세기의 이동 등의 특성은, 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 개발에 유용하게 활용될 것으로 사료된다.

실험 방법

N-RS 돌연변이 단백질을 코드하는 유전자의 제조

돌연변이 단백질을 코드하는 유전자들을 위치지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)과 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction)으로 증폭시킨 후 벡터에 삽입한 재조합 플라스미드의 제조 과정은 저자의 이전 보고에 기술되었다.[14]

배양액 및 배양조건

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

단백질 정제

단백질 분리 정제는 4 °C에서 수행되었다. 얼린 세포 5 g씩을 A 완충 용액(0.5 mM EDTA와 0.5 mM dithiothreitol이 첨가된 50 mM Tris hydrochloride, pH 7.2)에 녹인 후 초음파로 세포를 분쇄시킨 후 원심분리 시켰다. 10배 부피의 A 완충용액에 투석을 한 후 A 완충용액으로 미리 평형화시킨 Q-Sepharose Fast Flow(2 × 18 cm) column에 결합시키고 100 ml의 A 완충용액으로 세척 후 0~0.5 M NaCl의 분획으로 첨가된 A 완충용액으로 용출시켰다. N-RS 단백질들이 담겨있는 분획물 부분을 모아 0.02% sodium azide와 0.5 mM dithiothreitol이 담겨 있는 50 mM sodium/potassium phosphate완충용액(B 완충용액)에서 밤새 투석시킨 후에 Superdex 75 column(2 × 60 cm)에 통과시킨 후 완충용액 B 360 ml로 용출시켰다. N-RS 야생형 및 돌연변이 단백질들이 담겨있는 분획물들은 ultrafiltration(YM 10 membrane, Amicon) 으로 농도를 응축시켰다. 정제된 단백질에서 리간드가 제거된 순수 단백질의 제조는 전의 보고에 따랐다.[3] 간략히 기술하면 다음과 같다. 100 mM phosphate, pH 7.0에 담겨있는 N-RS Wt, N-RS A43L, 그리고 N-RS C48S 용액을 4 mM dithiothreitol과 6 M urea가 첨가된 100 mM phosphate pH 7.0에서 투석을 이들 단백질에 결합되어 있는 리간드들을 제거한 후, 이들 단백질의 refolding을 위하여 0.3 mM dithiothreitol이 포함된 100 mM phosphate pH 7.0에서 재투석을 실시하였고 ultrafiltration으로 단백질 용액을 농축시켰다. 정제된 단백질의 농도는 280 nm에서의 몰·흡광 계수 6,000 $M^{-1}cm^{-1}$를 사용하여 계산하였다.[9,20]

흡광 및 형광 분석

UltraSpec 2000 분광광도계(Spectrophotometer)를 사용하여 250 nm에서 550 nm까지 파장 주사(wavelength scanning)을 수행하여 흡광 스펙트라(absorbance spectra)를 측정하였다. A 완충용액에 녹아 있는 단백질들을 17 μM의 동일한 농도로 준비하고, 동일한 농도의 루마진 혹은 라이보플라빈을 결합시키고 이들 결합된 단백질과 유리된 루마진 혹은 라이보플라빈의 형광 세기를 형광분광광도계(Fluorescence spectrophotometer FS-2000)를 사용하여 280 nm, 370 nm, 410 nm, 445 nm에서 여기 파장을 고정시키고, 방출 스펙트라를 주사하였다.

pH에 따른 흡광 분석 적정(Titration)

단백질을 pH 5.0부터 pH 10.0까지 0.5간격의 완충용액을 이용해 희석시킨 후, 흡광 주사를 통해 pH 적정을 수행하였다. pH 적정결과를 이용하여 각 야생형과 돌연변이 단백질의 pKa값을 Dynafit program을 이용하여 분석하였다.

N-RS 단백질의 3차원적 구조 모델링

Chembiooffic(Cambridge Soft, USA)의 하위 프로그램인 Chemfinder, Chemdraw 그리고 chem3D와 Bioclipse 프로그램을 별도로 이용하였다. PDB(protein databank)에서 얻은 데이터 베이스를 이용하여 용액 상태의 대장균 아미노-말단 라이보플라빈 신테이스의 3D 구조를Bioclipse 프로그램으로 확인 후, 야생형 라이보플라빈 신테이스(N-RS Wt) 핵심 부분인 리간드와 반응하는 부분을 확대하여 이를 기초하여 3차 구조를 그렸다. Chemfinder로 루마진과 라이보플라빈을 데이터 베이스로부터 받고 Chem 3D 파일로 옮긴 후 3D 상태의 이미지를 구축하였다.

Acknowledgments. 본 연구는 충남대학교 자체연구사업 학술연구비에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드린다.

REFERENCES

1. Marcus, R.; Coulston, A. M. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th ed.; Gilman, A. G.; Rall, T. W.; Nies, A. S.; Tayler, P. Eds.; Pergamon Press: NewYork, 1990; 1534.
2. Fischer, M.; Bacher, A. *Nat. Prod. Rep.* **2005**, *22*, 324.
3. Fischer, M.; Bacher, A. *Biochem. Biophys*. **2008**, *474*, 252.
4. Plaut, G. W. *J. Biol. Chem*. **1963**, *238*, 2225.
5. Plaut, G. W., Beach, R. L.; Aogaichi, T. *Biochemistry* **1970**, *9*, 771.
6. Liao, D. I.; Wawrzak, Z.; Calabrese, J. C.; Vitanen, P. V.; Jordan, D. B. *Structure* **2001**, *9*, 399.
7. Beach, R. L.; Plaut, G. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 2913.
8. Eberhardt, S.; Richter, G.; Gimbel, W.; Werner, T.; Bacher, A. *Eur. J. Biochem*. **1996**, *242*, 712.
9. Eberhardt, S.; Zingler, N.; Kemter, K.; Richter, G.; Gimbel, W.; Cushman, M.; Bacher, A. *Eur. J. Biochem*. **2001**, *268*, 4315.
10. Schott, K.; Kellerman, J.; Lottspeich, F.; Bacher, A. *J. Biol. Chem*. **1990**, *265*, 4204.
11. Meining, W.; Eberhardt, S.; Bacher, A.; Ladenstein, R. *J. Mol. Biol*. **2003**, *331*, 1053.
12. Truffault, V.; Coles, M.; Diercks, T.; Abelmann, K.; Eberhardt, S.; Luttgan, H.; Bacher, A.; Kessler, H. *J. Mol. Biol*. **2001**, *309*, 949.
13. Kim, R. R.; Illarionov, B.; Joshi, M.; Cushman, M.; Lee, C. Y.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Fischer, M. *J. Amer. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2983.
14. Lee, C. Y.; Illarionov, B.; Woo, Y. E.; Kempter, K.; Kim, R. R.; Eberhardt, S.; Cushman, M.; Fischer, M.; Eisenreich, W.; Bacher, A. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2007**, *40*, 239.
15. O'Kane, D. J.; Prasher, D. C. *Mol. Microbiol*. **1992**, *6*, 443.
16. Woo, Y. E.; Kim, S. Y.; Lee, C. Y. *Kor. J. Microbiol*. **2005**, *41*, 306.
17. Meighen, E. A. *Microbiol. Rev*. **1991**, *55*, 123.
18. Gast, R.; Lee, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**, *75*, 833.
19. O'Kane, D. J.; Woodward, B.; Lee, J.; Prasher, D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 1100.
20. Otto, M.; Bacher, K. A. *Eur. J. Biochem*. **1981**, *115*, 511.