

mCherry에서 한 개의 아미노산 치환에 의한 근적외선 형광 단백질의 발견

김예지, 송경주, 이화진, 김도현*, 김진태**, 정민섭
 홍익대학교 화학공학과, 명지대학교 기계공학과*, 건국대학교 전자공학과**

Single Amino Acid Replacement transforms mCherry to a Far-red fluorescence protein

Yeji Kim, Kyungju Song, Hwajin Ee, Dohyun Kim*, Jintae Kim** and Minsub Chung
 Department of Chemical Engineering, Hongik University, Department of Mechanical Engineering, Myongji University*, Department of Electronics Engineering, Konkuk University**

요약

포유세포를 이미지화 할 때 헤모글로빈 때문에 근적외선 형광단백질이 유용하다. 형광단백질의 형광 성질은 단백질의 내부구조와 관련이 있다. 적색 형광단백질(Red fluorescent protein, RFP) 중 가장 널리 쓰이는 mCherry는 수소 결합 네트워크를 형성하고 있지 않아서 이 수소결합 네트워크를 복구하고자 avGFP와의 구조를 비교했고 양성자 와이어와 관련된 몇 가지 중요한 아미노산 잔기를 찾았다. 그 결과 mCherry의 197번째 Ile 아미노산을 Thr으로 바꾼 돌연변이(I197T)를 만들어 냈고, 이 돌연변이는 적색편이 된(red-shift) 형광을 냈다. 이와 관련된 변이된 RFP들에 대한 자세한 광학적, 광변환적 성질을 아래에 나타내었다. 이 연구는 단분자성 근적외선 형광단백질을 개발하는데 좋은 방향을 제시할 것이다.

서론

깊은 곳에 있는 포유세포를 이미지화 할 때 근적외선 형광단백질(fluorescent protein, FP)이 유용하게 사용되는데 이는 포유세포가 헤모글로빈 때문에 600nm이하 파장대의 빛을 흡수하기 때문이다 [1]. 또한 오렌지색이나 적색 형광단백질과 결합하여 다색 이미지화를 할 때 사용하기 위해 제대로 된 근적외선 형광단백질이 필요하다. 하지만 안정된 근적외선 단백질을 만들려는 시도는 아직 제대로 성공하지 못했다. 포유세포를 이미지화 하기에 이상적인 형광단백질의 조건은 첫째로 600nm이상의 빛에서 들떠야 하고 단백질이 잘못된 곳에 붙는 것과 응집현상을 방지하기 위해 단분자성이어야 한다.

개발된 근적외선 형광단백질에는 mPlum[2], mNeptune[3], E2-Crimson[4] 등이 있다. DsRed에서 파생된 mPlum은 들뜸과 방출 스펙트럼이 593nm와 644nm로(Table 1) 가장 유명한 단분자성 근적외선 형광단백질이다. 하지만 발색단 합성 부반응으로 생성된 녹색 중간체로 인해 광학적 성질이 복잡하다는 단점이 있다[5]. E2-Crimson은 가장 적색을 띄는 형광단백질로 들뜸/방출이 611/646nm이다. 하지만 단분자가 아닌 네분자성이기 때문에 단백질 분산이나 위치, 상호작용을 연구하고자 할 때 불편해진다.

mCherry는 단분자성 RFP중 가장 보편적으로 사용되어 그 특성이 잘 알려져 있다[6]. 이러한 mCherry를 이의 단분자성을 유지하면서 더 붉게 만들기 위해 결정적인 역할을 하는 아미노산 잔기를 찾는 작업을 하였다. 형광단백질의 들뜸/방출 파장대의 변형은 발색단(Chromophore)

Protein	mCherry	I197T	mPlum
Excitation max (nm)	587	593	593
Emission max(nm)	611	617	644
Quantum yield	0.22	0.03	0.1
Extinction coefficient	72000	66000	41000

Table 1

의 공유결합 구조를 통해 조작될 수 있으며 발색단과 인접한 작용기의 수소결합과 전자적 상호작용에 의해 결정된다. 그래서 우리는 mCherry 발색단 주위의 끊어진 수소결합 네트워크에 주목했고(Fig. 1) 197번째의 Ile(I197)과 199번째의 Leu(L199)을 극성 아미노산인 Ser이나 Thr으로 바꾸어 양성자 와이어를 연결하기 위한 작업을 하였다. 그 결과 중 하나로 아미노산 한 개만을 바꾼 mCherry-I197T 돌연변이가 파장이 더 적색편이 되어 615nm의 빛을 방출하는 것을 관찰하였다. mCherry-I197T에 대한 분석은 발색단의 양성자화 상태를 포함하여 red-shift된 방출에 기여하는 간단한 메커니즘을 제시할 것이다.

실험

1. Mutagenesis와 클로닝

우선 E.coli의 코돈에 적합화된 mCherry유전자가 pET15b 벡터(Novagen)의 NcoI과 BamHI 사이에

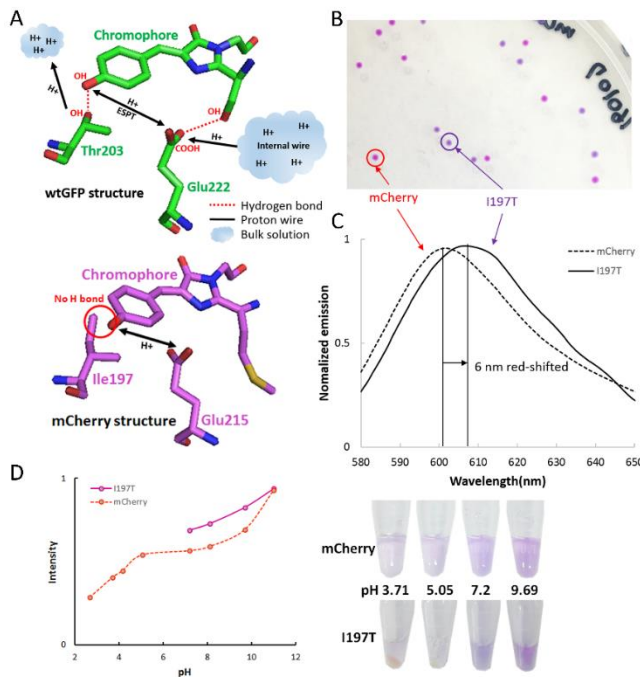


Figure 1 (A) avGFP와 mCherry의 발색단과 그 주위 구조의 비교. 붉은색 등그라미가 끊어진 수소결합 네트워크를 표시하고 있다. (B) mCherry와 I197T 돌연변이의 콜로니 색상 비교. (C) mCherry(점선)와 I197T(실선)의 정규화된 방출 스펙트럼. I197의 최대 방출이 6nm정도 적색편이 되었다. (D) mCherry와 I197T의 pH의존도(왼쪽)와 pH에 의한 응집현상(오른쪽). I197T가 pH6 이하인 산성용액에서 응집했기 때문에 형광을 측정할 수 없었다.

Figure 2 pET15b벡터와 수정된 mCherry벡터 서열정렬의 비교. 중요한 영역은 밑줄로 표시하였다. 같은 염기는 검정색으로 강조하였다.

결과와 토론

1. mCherry 수소결합 네트워크의 복구를 통해 red-shift된 방출 스펙트럼.

*Aequorea victoria*라는 해파리에서 발견된 녹색 형광단백질(green fluorescence protein, avGFP)의 발색단 주위는 수소결합 네트워크를 형성하고 있다. 그리고 이것이 양성자의 이동을 가능하게 하고 발색단의 이온화 성질을 결정한다[7]. DsRed에서 파생된 mCherry의 수소결합 네트워크는 avGFP와는 다르다. 이에 대한 그림을 Figure 1(A)에 나타냈다. avGFP와 mCherry 둘 다 페놀형의 발색단을 갖고 있고 이것이 Glu과 수소결합을 하고 있다. 하지만 가장 눈에 띄는 차이점은 GFP의 발색단과 Thr203이 수소결합을 하는 부분이 mCherry에는 존재하지 않다는 것이다. GFP의 Thr203에 해당하는 아미노산은 mCherry에서 Ile197인데 Ile이 수소결합을 이룰 수 없기 때문이다. 그래서 우리는 Ile197을 Ser, Thr, His과 같은 극성 아미노산으로 바꾸면 양성자 와이어가 복구 될 것이라 생각하였다.

클로닝 되어서 His tag이나 트립신 분절부위 없이 오직 순수하게 발현되도록 하였다. Lac operator는 Figure 2에 나온 것처럼 삭제되어 콜로니 상에서 단백질이 발현되도록 하여서 분별을 더 쉽게 하였다. mCherry 클로닝 후에 Pfu DNA Polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 PCR 증폭을 통해 site directed mutagenesis를 하였고 그 결과물들은 Dpn I (Takara, Shiga, Japan)처리되었다. 그 후에 *Escherichia coli* BL21(DE3)가 mCherry나 이의 돌연변이로 열 충격을 이용하여 형질전환 되었다. 이렇게 형질전환 된 박테리아는 암피실린 항생제가 첨가된 Luria-Bertani(LB) 한천배지 위에서 37°C의 환경에서 하룻밤(16시간) 동안 자랐고 형질전환 된 박테리아 콜로니는 적색을 띄었다.

2. 단백질 제조와 성질결정

mCherry와 그 돌연변이인 I197T의 DNA를 가지고 있는 E.coli는 암피실린이 포함된 10mL LB배지에서 하룻밤 동안 자랐고 같은 조건의 400mL 배지로 스케일업 되었다. OD600 0.4에서 0.6사이에 도달하면 셰이킹 인큐베이터의 온도를 24°C로 냉각시켜서 20시간동안 발현했다. 단백질은 fast protein liquid chromatography(FPLC, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 25mM Tris+150mM NaCl pH7.4 버퍼의 환경에서 size exclusion column (Superdex™ 200 Increase 10/300 GL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)을 통해 정제되었고 그 후에 Hitrap Q HP column(GE Healthcare)을 이용한 음이온 교환으로 정제되었다. 이렇게 정제된 단백질은 Vivaspin(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 한외여과를 통해 25mM Tris pH7.4 버퍼로 교환되었다. 흡수 스펙트럼 실험은 UV-vis spectrophotometer(Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)을 이용하였다. 들뜸과 방출과 같은 형광측정실험은 fluorescence spectrophotometer(Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, California, USA)를 이용하였다.



그 결과 Thr으로 바꾼 것이 흥미로운 성질을 보였다. I197T 돌연변이의 콜로니에서 짙은 보라색이 나타났고 최대 방출이 mCherry보다 6nm 더 red-shift되었다(Fig. 1(B)(C)). 이러한 색의 차이는 mCherry와 I197T, 그리고 mPlum을 나란히 비교한 사진에서 더 두드러진다(Fig. 3(B)). 양성자 와이어가 연결됨에 따라 I197T 돌연변이가 pH 수용액에 더 민감하게 되었다. I197T 돌연변이는 pH5 이하 수용액에서 뭉침 현상이 있었으나 mCherry에서는 일어나지 않았다(Fig. 1(D)). mCherry는 양성자 와이어가 끊겨 있기 때문에 pH5에서 10까지 범위에서 형광 발광이 조금씩 변했는데 이는 대부분의 avGFP 변종들과 반대되는 성질이다[8]. 하지만 I197T의 경우를 보면 그 변화가 원래보다 덜 가파른 것이 관찰되었다(Fig. 1(E)). 하지만 이는 pH6이하에서는 응집 때문에 발광을 관찰할 수 없었기 때문이다. mCherry와 달리 pH에 민감성을 보이는 것은 용매 안에서 수소결합 네트워크가 복구되었다는 것을 명확히 증명한다. 이러한 결과로 mCherry에서 pH저항성의 근원을 찾아내었고 산성 환경에서 단백질 응집의 메커니즘을 밝혀내었다.

I197S 돌연변이는 옅은 보라색을 나타내었고 매우 낮은 흡광을 하였는데 이는 아마 발색단의 손상 때문이라고 생각한다. Thr과 Ser이 같은 히드록시기를 갖고 있지만, Thr이 메틸기를 더 갖고 있어서 Ile과 더 비슷한 길이를 갖게 되었고 따라서 Ser보다는 전체 단백질 구조에 덜 영향을 끼쳤기 때문일 것이다.

2. mCherry-I197T의 분광 성질.

수소결합에 의해 red-shift된 I197T는 mPlum의 red-shifting 메커니즘과 비슷하다. mPlum에서는 Glu13과 발색단 사이의 수소결합이 발색단의 컨주게이션 결합을 더 길게 만들어서 red-shift된 방출을 야기한다[5]. I197T에서도 Thr197과 발색단의 페놀기 말단이 수소결합을 이루어 컨주게이션 시스템을 이루어 비슷한 효과를 내는 것이다. 수소결합은 방출 스펙트럼에 주로 영향을 주는데 mCherry와 I197T 돌연변이의 거의 완전히 겹치는 흡수 스펙트럼(Fig. 3(A))은 수소결합이 야기하는 red-shifting 메커니즘을 뒷받침한다[5]. 흡수 스펙트럼을 보면 mCherry와 I197T 둘 다 발색단이 탈양성자화된 페놀기를 가지는 것을 알 수 있는데 이 때문에 근처의 히드록시기와 수소결합을 하는 것이다. 흥미롭게도 mCherry, I197T, 그리고 mPlum의 흡수 스펙트럼이 530에서 630nm 범위에서 거의 일치한다(Fig. 3(A)). 하지만 이들의 방출 스펙트럼은 mCherry가 611nm, I197T는 617nm, mPlum은 644nm로 매우 차이가 나는 것을 볼 수 있다(Fig. 3(C)와 table 1).

mPlum은 다색 표지 연구를 할 때 문제가 될 수도 있는 녹색 형광을 내는 요소를 가지고 있다[5]. 흡수 스펙트럼에서 395nm와 500nm에서 강한 밴드가 있는 것을 보면 알 수 있다(Fig. 3(A)). 이는 발색단의 성숙 과정에서 적색과 녹색이 둘 다 막다른 생산물이기 때문이다[9]. 최근에 Glu16을 Pro로 바꾼 것으로 성숙 문제를 해결했다[10]. 반대로 mCherry와 I197T는 이러한 녹색 형광을 나타내는 것이 발견되지 않았다.

우리는 mCherry, I197T 그리고 mPlum의 성질 값을 비교하기 좋게 table 1에 나타내었다. I197T의 최대 흡수파장과 흡광계수는 mCherry, mPlum의 것과 거의 비슷했다. 하지만 611nm의 빛을 방출하는 mCherry와 다르게 I197T는 617nm의 빛을 방출했다. mCherry와 I197T의 들뜸 파장의 차이가 6nm이긴 하지만 같은 Stokes shift를 보인다. 이것은 수소결합의 도입이 red-shift된 들뜸을 발생하고 결과적으로 색에 변화가 나타난 것이라고 볼 수 있다. 흡광계수가 거의 비슷한 것과는 달리 형광 양자수율을 보면 I197T가 0.03으로 mCherry의 0.22보다 확연히 낮다. 이는 많은 양의 흡수된 에너지

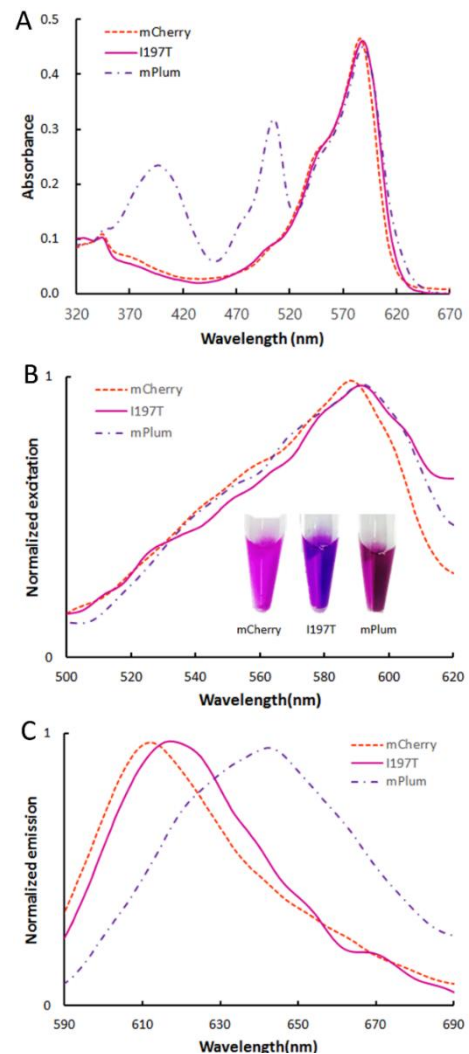


Figure 3 0.5mg/mL 일정한 농도에서 mCherry(주황색 점선), I197T(분홍색 실선), mPlum(보라색 점선)의 정규화된 흡수(A), 들뜸(B), 방출(C) 스펙트럼

지가 비복사 방출 것으로, 보통 발색단의 회전을 안정화시킨 효과이다. 이는 Thr이 Ile보다 살짝 작은 크기이기 때문에 발색단에게 회전할 공간을 마련해주었기 때문으로 보인다.

3. 올리고머화 경향에 대한 비교.

공간분포에 대한 단백질추적 연구나 단백질 상호작용 분석과 같이, 표지로서 사용되는 단백질에 있어서 올리고머화는 매우 좋지 않은 영향을 미친다. 그래서 우리는 크기배제 크로마토그래피를 이용하여 단분자 표준으로 mCherry, 이량체 표준으로는 avGFP를 사용하여 I197T 돌연변이의 올리고머화 정도를 측정하였다. 놀랍게도 I197T의 용리점이 mPlum과 mCherry보다 더 빠르게 나왔고 avGFP보다 느리게 나와서(Fig. 4) 살짝 이량체화가 된 것을 나타내었다. 형광단백질의 올리고머화는 보통 단백질 표면의 소수성 부분이나 정전기 효과라고 알려져있다. 하지만 Ile197은 단백질 내부에 있는 발색단 옆에 존재하기 때문에 Ile197의 돌연변이로 인한 올리고머화 성질은 무시할 수 있다. 한가지 가능성은 앞서 7 이하의 pH에서 응집된 것처럼, 이 크로마토그래피 조건(pH7.4)에서 I197T가 부분적으로 응집된 효과로 볼 수도 있을 것이다.

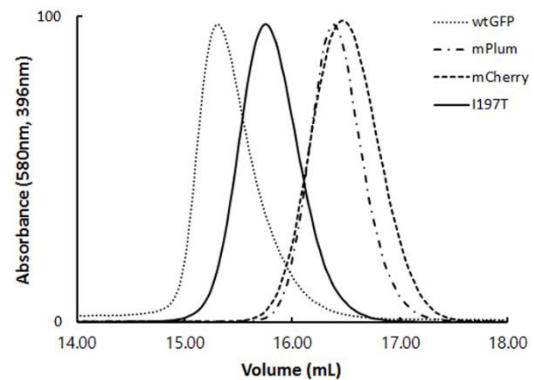


Figure 4 크기배제 FPLC를 해서 용리점을 정규화한 것. I197T(실선), mCherry(갈색 점선), mPlum (점선), 그리고 이량체인 avGFP(점선). mCherry와 avGFP는 각각 단량체와 이량체 통제변인 역할을 한다.

결론

우리는 mCherry에서 한가지 아미노산의 변화가 red-shift에 미치는 영향에 대해 자세히 연구하였다. 이를 통해 RFP의 단량체 성질, 높은 pH 저항성, 좋은 성숙도 등에 대해 이해를 하였다[6]. I197T돌연변이의 분광 성질에 의하면 이러한 red-shift는 mPlum과 비슷한 메커니즘으로 발색단의 폐놀기와 새로운 수소결합을 통해 만들어 낼 수 있다. 게다가 Ile197의 Thr으로의 변화는 양성자와 와이어를 활성화시켜 GFP같이 pH에 민감하게 되었다[11]. 우리의 발견은 mCherry로부터 더 발전된 근적외선 형광단백질을 개발하는데 가능성을 열었다. 발색단의 직접적인 개발이나 주위의 정전기적 성질의 변화는 표지 형광단백질로서의 성질을 더 발전시킬 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Stamatas, G. N., Southall, M. and N. Kollias (2006) In Vivo Monitoring of Cutaneous Edema using Spectral Imaging in the Visible and Near Infrared. *J. Invest. Dermatol.* 126: 1753–1760.
2. Wang, L., Jackson, W. C., Steinbach, P. A. and R. Y. Tsien (2004) Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 16745–9.
3. Lin, M. Z. et al. (2009) Article Autofluorescent Proteins with Excitation in the Optical Window for Intravital Imaging in Mammals. *Chem. Biol.* 16: 1169–1179.
4. Strack, R. L. et al. (2009) A Rapidly Maturing Far-Red Derivative of DsRed-Express2 for Whole-Cell Labeling. *Biochemistry* 48: 8279–8281.
5. Abbyad, P., Childs, W., Shi, X. and S. G. Boxer (2007) Dynamic Stokes shift in green fluorescent protein variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 20189–20194.
6. Shaner, N. C. et al. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22: 1567–72.
7. Chattoraj, M., King, B. A., Bublitz, G. U. and S.G. Boxer (1996) Ultra-fast excited state dynamics in green fluorescent protein: multiple states and proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8362–7.
8. Heikal, A. A., Hess, S. T., Baird, G. S., Tsien, R. Y. and W. W. Webb (2000) Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 11996–2001.
9. Strack, R. L., Strongin, D. E., Mets, L., Glick, B. S. and R. J. Keenan (2010) Chromophore formation in DsRed occurs by a branched pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 132: 8496–505.
10. Moore, M. M. et al. (2012) Recovery of Red Fluorescent Protein Chromophore Maturation Deficiency through Rational Design. *PLoS One* 7: e52463.
11. Kneen, M., Farinas, J., Li, Y. and a S. Verkman (1998) Green fluorescent protein as a noninvasive intracellular pH indicator. *Biophys. J.* 74: 1591–9.