

발간등록번호

11-1541000-001696-01

식중독 예방 및 치료를 위한
Listeria 균의 phage 저항 체계 연구
(Study of Listeria phage defense system
for prevention and treatment of food poisoning)

서울대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식중독 예방 및 치료를 위한 *Listeria* 균의 phage 저항 체계 연구” 과제의
보고서로 제출합니다.

2013년 2월 21일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 배의영

연 구 원 :

연 구 원 :

연 구 원 :

연 구 원 :

요 약 문

I. 제 목

식중독 예방 및 치료를 위한 *Listeria* 균의 phage 저항 체계 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

식중독 원인균인 *Listeria monocytogenes*와 같은 병원균 감염에 대한 예방 및 치료를 위해 기존의 항생제를 이용한 치료법의 대안이 될 수 있는 phage 치료법 (phage therapy) 관련 원천기술개발을 연구의 목적으로 하였다. 병원균의 phage 저항 체계인 CRISPR-Cas system의 작용 기작 규명을 통해 병원균의 phage 저항 기능 약화 및 phage 치료법의 효능 강화 연구가 가능하며, 이를 위해 CRISPR-Cas system의 핵심 구성요소인 Cas 단백질의 구조 및 기능을 밝히고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

병원균 phage 저항 체계의 구성요소인 CRISPR 핵산과 Cas 단백질을 생산하여 분리 및 정제하고 이들의 생화학적 특성을 분석하였다. Cas 단백질의 CRISPR 핵산에 대한 결합여부 및 촉매 활성 등을 조사하였고 X-선 결정학을 이용하여 Cas 단백질의 삼차원적 구조를 규명하였다. 당초 연구개발계획서의 내용대로 연구의 성공률을 높이고 위험 요소 분산을 위해 *Listeria monocytogenes*와 유사한 CRISPR-Cas system을 보유한 병원균에 대해서도 동시에 연구를 진행하였다.

IV. 연구개발결과

*Listeria monocytogenes*에 존재하는 4종의 Cas 단백질의 유전자를 모두 확보하였으나 그 기능 및 구조 연구에 적합할 정도의 단백질 생산 및 정제가 여의치 않아 대안으로서 *Listeria monocytogenes*와 유사한 Cas 단백질을 보유한 병원균인 *Streptococcus pyogenes*를 대상으로 연구를 진행하였다. *Streptococcus pyogenes*의 Cas 단백질 중 하나인 Csn2 단백질의 비특이적 DNA 결합성을 규명하였고 삼차원적 구조를 결정하였으며 칼슘 결합 단백질임을 증명하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

Csn2 단백질에 관한 연구결과는 SCI급 해외학술지에 게재하였으며 후속연구결과도 논문 게재를 준비 중이다. Csn2 단백질의 삼차원적 구조는 Protein Data Bank에 2건의 생명정보로서 등록하였으며 연구를 통해 농학석사 1명을 배출하였다.

SUMMARY

(영문요약문)

I. Title

Study of *Listeria* phage defense system for prevention and treatment of food poisoning

II. Purpose

To prevent and treat the infection by pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes*, we intended to develop a new technology related to phage therapy, which can be used as an alternative to the conventional approaches using antibiotics. The elucidation of the mechanism of the CRISPR-Cas system, a bacterial phage defense system can make it possible to increase the efficacy of the phage therapy by inhibiting bacteria's phage resistance. To do this, we performed structural and functional studies for Cas proteins, core components of the CRISPR-Cas system.

III. Contents

We produced and purified CRISPR nucleic acids and Cas proteins, main components of the CRISPR-Cas system, and analyzed their biochemical properties. The Cas proteins were tested for their affinities to nucleic acids, and their three dimensional structures were also determined. We also carried out the characterization of homologous Cas proteins from other bacteria to accomplish the goal of this research project more effectively.

IV. Results

We obtained genes for the four *Listeria monocytogenes* Cas proteins, but their purification were not successful. As an alternative, we decided to study *Streptococcus pyogenes* that contains Cas proteins similar to those from *Listeria monocytogenes*. Csn2, one of the *Streptococcus pyogenes* Cas proteins, has DNA and calcium binding affinities. We also solved its crystal structure, and showed that Csn2 can form a protein complex with Cas1, another *Streptococcus pyogenes* Cas protein.

V. Contribution

We published the structure and function of the Csn2 protein in the international research journal and are preparing another manuscript now. We also deposited two Csn2 structures in the Protein Data Bank. One master-degree student graduated with the results about the Csn2 protein.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Abstract

Chapter 2. Background

Chapter 3. Results

Chapter 4. Contribution

Chapter 5. Accomplishment

Chapter 6. Information

Chapter 7. Equipment

Chapter 8. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적

가. 연구개발의 궁극적 목표

- 1) 식중독 원인균인 *Listeria monocytogenes*와 같은 병원균 감염에 대한 예방 및 치료를 위해 기존의 항생제를 이용한 치료법의 대안이 될 수 있는 phage 치료법 (phage therapy) 관련 원천기술개발.
- 2) 병원균의 phage 저항 체계인 CRISPR-Cas system의 작용 기작 규명을 통해 병원균의 phage 저항 기능 약화 및 phage 치료법의 효능 강화 연구.
- 3) 병원균의 phage 저항 체계인 CRISPR-Cas system의 핵심 구성요소인 Cas 단백질을 병원균 제어의 표적 물질로서 발굴.

나. 연구개발의 구체적 목표

- 1) 식중독 원인균인 *Listeria monocytogenes*와 같은 병원균에 존재하는 phage 저항 체계인 CRISPR-Cas system의 작용 기작 규명.
- 2) CRISPR-Cas system의 작용 기작 규명 연구에 필요한 충분한 양과 높은 순도의 Cas 단백질 생산법 확립.
- 3) CRISPR-Cas system의 핵심 구성요소인 Cas 단백질의 기능 및 구조 규명.

2. 연구개발의 필요성

가. 생명산업기술개발로서의 필요성

- 1) *L. monocytogenes*는 식품매개 병원균 중 가장 높은 치사율을 가진 세균으로서 *L. monocytogenes*의 감염에 의해 매년 미국에서만 2,500 여건의 발병과 500 여건의 사망이 보고될 정도로 식품 안전에 가장 큰 위협임 (J Microbiol Immunol Infect 40: 4-13 (2007)).
- 2) *L. monocytogenes*의 치료를 위해 기존의 항생제 치료법의 대안으로서 bacteriophage를 이용하여 병원균을 사멸시키는 phage 치료법이 상업적으로 개발되었으나 (J Food Prot 73: 32-8 (2010)), *L. monocytogenes*에 존재하는 CRISPR (Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats)라고 이름 붙여진 phage 저항 체계로 인해 그 효과가 제한적이며 보다 큰 효과를 위해서 이 phage 저항 체계의 무력화가 필수적으로 요구됨.
- 3) *L. monocytogenes*에 존재하는 phage 저항 체계의 구성 요소 중 그 기능에 핵심적인

역할을 담당하는 물질을 신약 표적으로서 발굴하고 연구하며, 이를 바탕으로 phage 저항 체계를 약화시킴으로써 *L. monocytogenes* 감염에 대한 치료 및 예방법으로서 phage 치료법의 효능을 강화하는 것이 필요.

나. 높은 응용 가능성에 따른 연구개발의 필요성

- 1) phage에 대한 세균의 저항 체계인 CRISPR-Cas system을 응용하여 세균 자체 내의 유전자를 외부에서 침입한 유전물질로 인식할 수 있게 한다면 고등생물에서 RNAi와 같이 세균에서 유전자 발현을 조절하는 실험적 기술로서 이용될 수 있음.
- 2) 다양한 산업 현장에서 세균이 이용되거나 최종 산물로 생산되고 있으나, 세균의 바이러스에 해당하는 phage에 의한 오염이 효율성 및 생산성 제고에 커다란 장애가 되고 있으므로, CRISPR-Cas system을 연구함으로써 세균의 면역 체계를 강화하여 감염에 대한 저항성을 높일 수 있다면 세균 이용 산업에 큰 도움이 될 수 있음.
- 3) *L. monocytogenes* 감염에 의한 식중독 이외에도 다양한 병원성 세균에 존재하는 phage 저항체계의 약화에 이용되어 해당 병원성 세균의 억제 기작으로서 이용될 수 있음.

다. 학술적 필요성

- 1) phage에 대한 세균의 저항 체계인 CRISPR-Cas system은 그 자체로서 생명현상에 대한 중요한 기초 연구의 대상이며 기존에 널리 알려진 세균의 방어 체계들과는 달리 한번 감염된 외부 유전물질의 일부 서열을 기억하였다가 이를 이용하여 차후의 감염에 대응하는 일종의 획득면역 (acquired immunity) 체계이므로 기초 연구 주제로서의 참신성 및 중요성이 더욱 높다고 할 수 있음.
- 2) CRISPR-Cas system은 그 작용 기작에 있어서의 고등생물 RNAi system과의 유사성으로 인해 더욱 주목받고 있는 연구 주제이므로 학술적으로도 그 연구 필요성이 매우 높음 (그림 1).

3. 연구개발의 범위

가. *L. monocytogenes*의 phage 저항 체계 연구

- 1) *L. monocytogenes*의 phage 저항 체계의 구성요소인 CRISPR 핵산과 Cas 단백질의 생산 및 정제.
- 2) *L. monocytogenes*의 phage 저항 체계의 핵심 구성요소인 Cas 단백질의 촉매 활성 및 기능 규명.
- 3) *L. monocytogenes*의 phage 저항 체계의 핵심 구성요소인 Cas 단백질의 삼차원적 구조 규명 및 분석.

나. *L. monocytogenes*와 유사한 phage 저항 체계의 연구

- 1) 연구의 성공률을 높이고 위험 요소 분산을 위해 *L. monocytogenes*와 유사한 CRISPR-Cas system을 보유한 병원균을 연구 대상으로 선정.
- 2) *L. monocytogenes*와 유사한 CRISPR-Cas system을 보유한 병원균 phage 저항 체계의 핵심 구성요소인 Cas 단백질의 생산.
- 3) *L. monocytogenes*와 유사한 CRISPR-Cas system을 보유한 병원균 phage 저항 체계의 핵심 구성요소인 Cas 단백질의 기능 및 삼차원적 구조 규명.

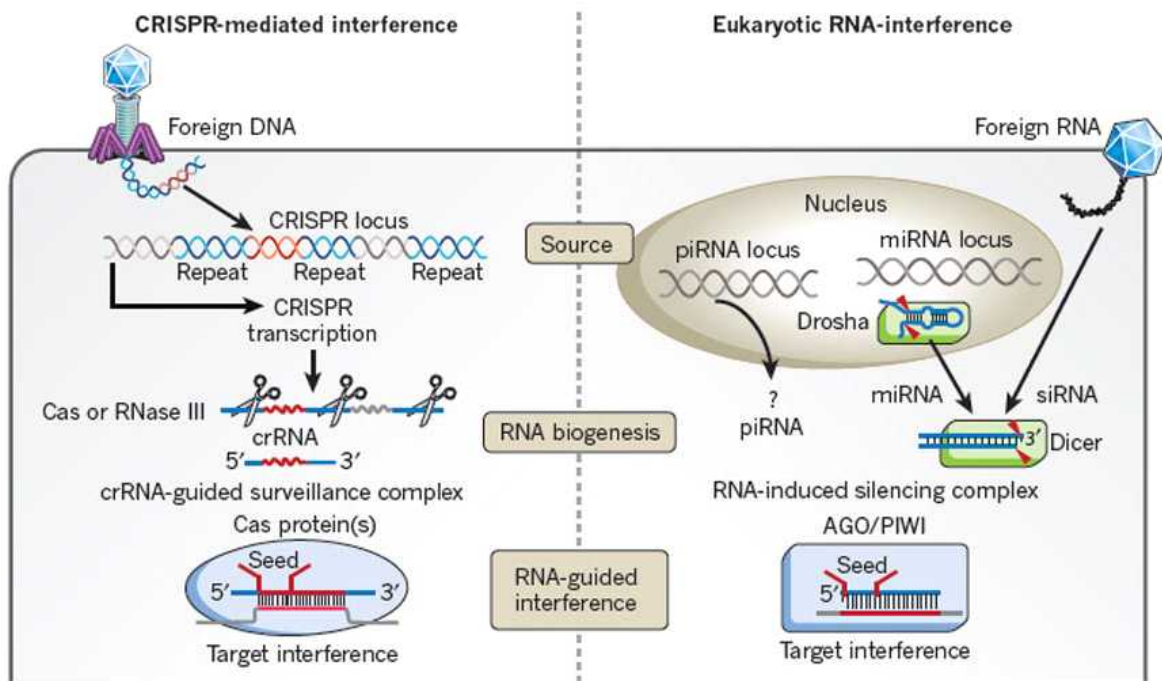


그림 1. 세균의 phage 저항 체계인 CRISPR-Cas system과 고등생물의 RNAi system의 유사성 (Nature 482: 331-8 (2012)).

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외 관련분야 현황

가. *L. monocytogenes*의 phage 치료법 관련 현황

- 1) *L. monocytogenes*의 치료를 위해 기존의 항생제 치료법의 대안으로서 phage를 이용하여 병원균을 사멸시키는 phage 치료법이 상업적으로 개발되었음 (J Food Prot 73: 32-8 (2010)).
- 2) phage 치료법을 이용한 *L. monocytogenes* 감염의 치료를 위해 네델란드 EBI Food Safety社의 LISTEXTM와 미국 Intralytix社의 ListShieldTM 등 총 2종의 phage 상품이 개발되어 미국 FDA의 승인을 얻음 (출처: 네델란드 EBI Food Safety社와 미국 Intralytix社 홈페이지).

나. 세균의 phage 저항 체계로서 CRISPR-Cas system 연구 관련 현황

- 1) CRISPR는 bacteria와 archaea의 genome에 존재하는 특이한 DNA 서열이며, 1987년 *Escherichia coli*에서 처음 발견된 이후 (J Bacteriol 169: 5429-33 (1987)), 지금까지 genome 서열 분석이 완료된 세균의 약 40%, 고세균의 약 80%에서 발견되었음.
- 2) CRISPR는 동일한 서열의 짧은 repeat들과 다양한 서열을 가지는 짧은 spacer들로 이루어져 있는데, repeat들 사이사이에 spacer들이 하나씩 끼워져 있는 구조이며 cas (CRISPR-associated)라고 이름 붙여진 CRISPR에 인접한 다양한 유전자들도 발견되었는데 (Mol Microbiol 43: 1565-75 (2002)), 이들은 CRISPR가 존재하는 미생물 genome에서만 선택적으로 발견 (그림 2).

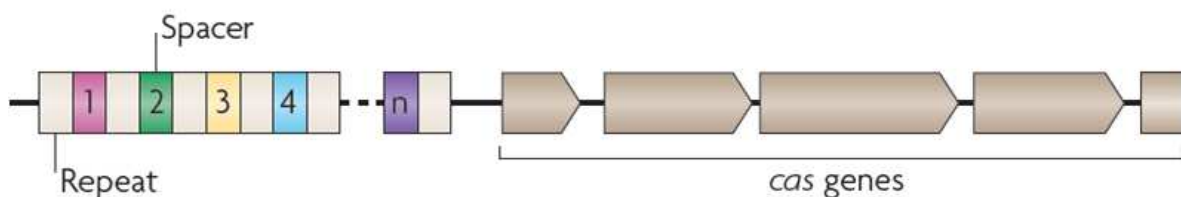


그림 2. 세균의 phage 저항 체계인 CRISPR-Cas system의 모식도 (Nat Rev Genet 11:181-190 (2010)).

- 3) 생물정보학적 기술을 이용한 연구들로부터 CRISPR의 spacer들 중 일부가 phage의 유전자와 동일한 염기서열을 가지고 있다는 것이 규명되었고 (Microbiology 151: 2551-61 (2005), J Mol Evol 60: 174-82 (2005), Microbiology 151: 653-63

(2005)), 이로부터 CRISPR와 cas 유전자로부터 유래한 Cas 단백질들이 고등생물의 RNAi와 같이 세균에서 phage에 대한 저항 체계로서 기능할 것이라는 가설로 이어짐 (그림 3).

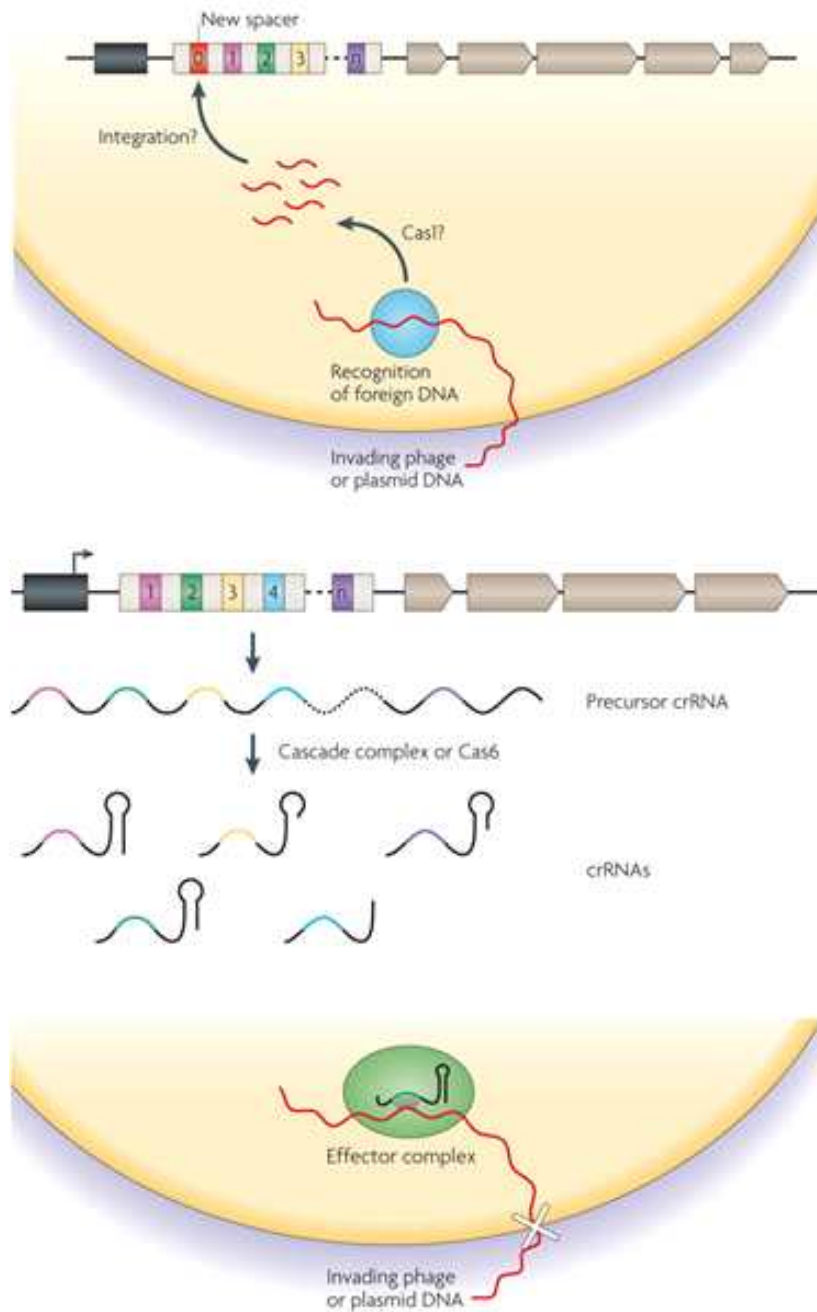


그림 3. CRISPR-Cas system의 작용 기작 예상도 (Nat Rev Genet 11:181-190 (2010)).

4) 세균의 phage 저항 체계로서 CRISPR의 기능은 *Streptococcus thermophilus*를 이용하여 처음으로 실험적으로 규명되었는데 (Science 315: 1709-12 (2007)), 이 연구에서는

*S. thermophilus*에 특정한 phage를 감염시킨 후, 이 phage의 유전자 서열 중의 일부가 *S. thermophilus*가 가지고 있는 CRISPR에 spacer로서 삽입되었음을 확인하였고, spacer가 삽입되어 ‘면역화’된 *S. thermophilus*는 같은 종류의 phage에 대해 저항성을 가지고 있음을 실험적으로 증명.

5) 이후로 다양한 세균 또는 고세균에 존재하는 CRISPR-Cas system에 관한 연구 결과가 발표되었으며, Cas 단백질의 기능 및 구조에 대한 연구 결과의 발표도 증가되는 추세임 (Nature 482: 331-8 (2012)).

2. 국내 관련분야 현황

가. *L. monocytogenes*의 phage 치료법 관련 현황

1) 다양한 병원성 세균에 침투하여 숙주의 사멸을 유도하는 phage에 대한 연구는 다수의 국내 연구실에서 수행되고 있으나 세균의 phage 저항 체계인 CRISPR에 대한 연구는 상대적으로 찾아보기 어려움.

2) *L. monocytogenes*에 대한 국내 연구 결과는 다수 보고되어 있으나 병원균의 phage therapy와 관련된 연구는 찾기 어려우며 병원균의 phage 저항 체계에 대한 연구도 드문 편임.

나. 세균의 phage 저항 체계로서 CRISPR-Cas system 연구 관련 현황

1) 식물 병원균인 *Xanthomonas oryzae*의 genome sequencing 연구 등 일부 국내 연구진이 주도 또는 참여한 세균의 genome sequencing 연구에서 CRISPR 서열이 발견된 적이 있으나 이에 대한 보다 직접적 연구는 최근까지 찾아보기 힘들 (Nucleic Acids Res. 33: 577-86 (2005)).

2) 최근 본 연구과제 책임자의 연구실을 비롯하여 한국과학기술원 오병하 교수 연구실 및 전남대학교 김정선 교수 연구실에서 CRISPR-Cas system의 핵심 구성 요소인 Cas 단백질에 관한 연구가 보고되었음 (PLoS One. 7: e33401 (2012), Proteins. 80: 2573-82 (2012), Proteins. doi: 10.1002/prot.24183 (2012), Proteins. 80:1 895-900 (2012)).

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

1. *L. monocytogenes*의 Cas 단백질 연구

가. *L. monocytogenes*의 Cas 단백질 유전자 확보

1) *L. monocytogenes*의 phage 저항 체계인 CRISPR-Cas system에는 총 4종의 Cas 단백질들이 발견되며 그들의 이름과 특징은 다음 표1에 나열하였음.

표 1. *L. monocytogenes*의 Cas 단백질의 종류와 특징.

종류	특징
Csn1	- CRISPR 핵산을 처리하는 효소일 것으로 예상됨. - 특정한 종류의 CRISPR-Cas system에만 특이적으로 존재.
Csn2	- CRISPR의 생성에 관여할 것으로 예상됨. - 특정한 종류의 CRISPR-Cas system에만 특이적으로 존재.
Cas1	- nuclease 또는 integrase로 예상됨. - 모든 CRISPR-Cas system에 존재하는 일반적 Cas 단백질.
Cas2	- nuclease로 예상됨. - 모든 CRISPR-Cas system에 존재하는 일반적 Cas 단백질.

2) *L. monocytogenes*의 Cas단백질 유전자를 확보하기 위하여 3종의 *L. monocytogenes* strain들을 국내 연구자로부터 공여 받았으며 이들을 다음 표 2에 나열하였음.

표 2. 본 연구를 위해 확보한 *L. monocytogenes* strain.

확보한 <i>L. monocytogenes</i> strain 종류
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 15315
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19114
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115

나. *L. monocytogenes* Csn1 단백질의 생산

1) 확보한 3종의 *L. monocytogenes* strain을 대상으로 PCR을 수행하여 CRISPR-Cas system의 존재유무를 확인하는 동시에 Csn1 단백질 유전자 (4014 bp)의 증폭을 시도하였으며 아래 그림 4에서 확인할 수 있는 바와 같이 *L. monocytogenes* ATCC 15315에서만 Csn1 단백질의 유전자 증폭에 성공하였음 (ATCC 15315 Lane 2, 3).

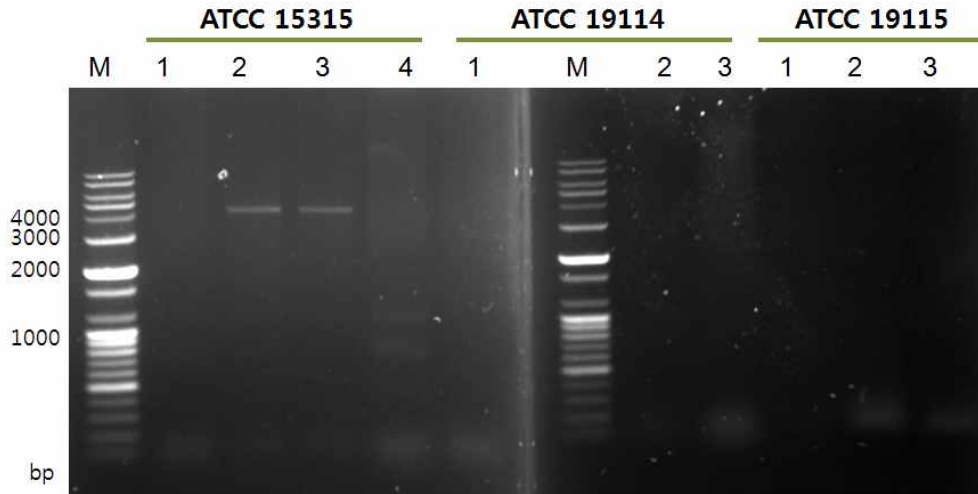


그림 4. PCR을 이용한 *L. monocytogenes* Csn1 단백질 유전자의 증폭.

- 2) 증폭된 *L. monocytogenes* ATCC 15315의 Csn2 단백질 유전자를 *E. coli*에서의 생산하기 위해 *E. coli* 과다발현용 Vector에 Cloning을 시도하였으나 Ligation 반응 후에 Transformation된 *E. coli* colony를 찾을 수 없었음
- 3) 반복된 실험에서도 성공적인 결과를 얻을 수 없었으며, 이는 *L. monocytogenes* ATCC Csn2 단백질 유전자가 *E. coli*에서 Toxic한 효과를 내기 때문인 것으로 사료됨.

다. *L. monocytogenes*의 Csn2 단백질의 생산

- 1) 확보한 3종의 *L. monocytogenes* strain 중 Csn1 단백질의 증폭에 성공한 *L. monocytogenes* ATCC 15315를 대상으로 PCR을 수행하여 Csn2 단백질 유전자 (696 bp)의 증폭을 시도하였으며 아래 그림 5에서 확인할 수 있는 바와 같이 유전자 증폭에 성공하였음.

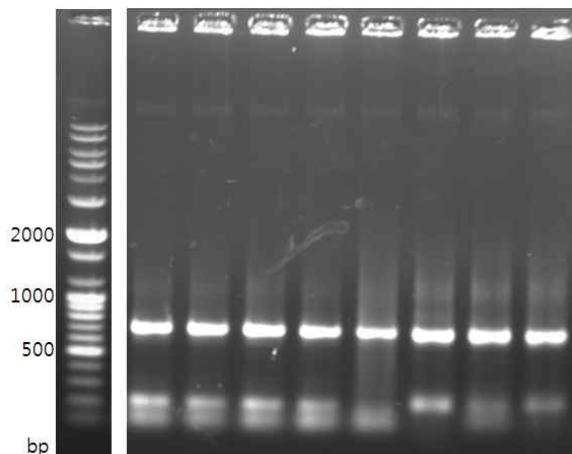


그림 5. PCR을 이용한 *L. monocytogenes* Csn2 단백질 유전자의 증폭.

2) 증폭된 Csn2 단백질의 유전자를 이용하여 *E. coli*에서 Csn2 단백질의 생산을 목적으로 다음의 그림 5와 같이 N-terminal에 Hisidine (His)-Maltose binding protein (MBP) tag이 있고 Tag과 Csn2 단백질 사이에는 Tobacco etch virus (TEV) protease site가 있는 구조를 가지는 Construct에 Cloning하였음.

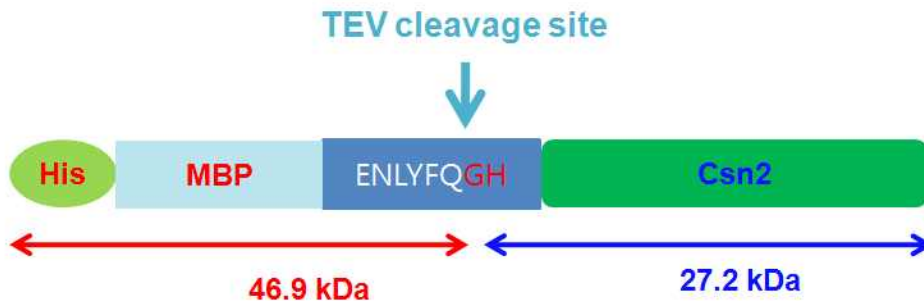


그림 6. *E. coli*에서 Csn2 단백질 생산을 위한 Construct.

3) Coning 후 Sequencing을 통해 Csn2 단백질 유전자의 서열을 확인하였는데, Genome 서열이 이미 알려진 *L. monocytogenes* F6854 strain과 비교할 때, 총 6개 아미노산에 차이가 있음을 발견하였음 (그림 7).

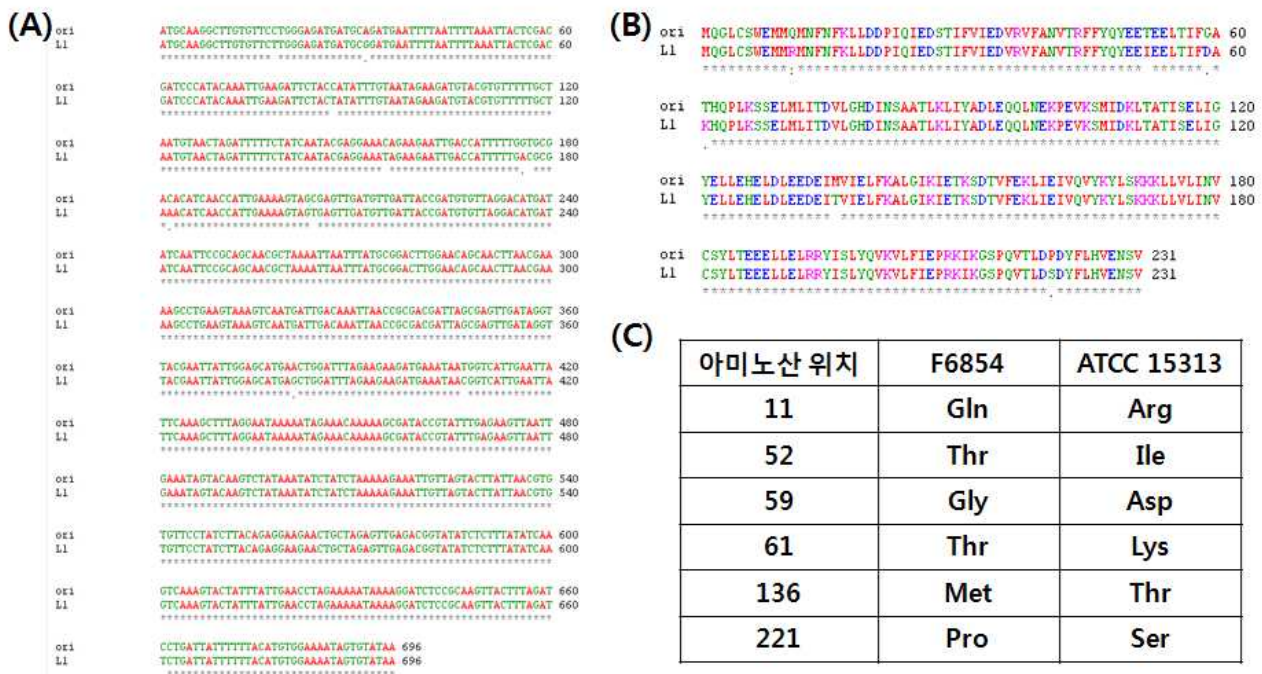


그림 7. *L. monocytogenes* ATCC 15313 및 F6854 Csn2 서열 비교 (A) DNA 서열 (B) 아미노산 서열 (C) 상이한 아미노산 잔기 목록.

4) 위와 같이 서열을 확인한 Csn2 단백질의 유전자를 IPTG를 이용하여 *E. coli*에서 과다 발현한 후, His-tag과 Ni-column의 상호작용을 이용하는 Affinity chromatography를 수행하였음 (그림 8).

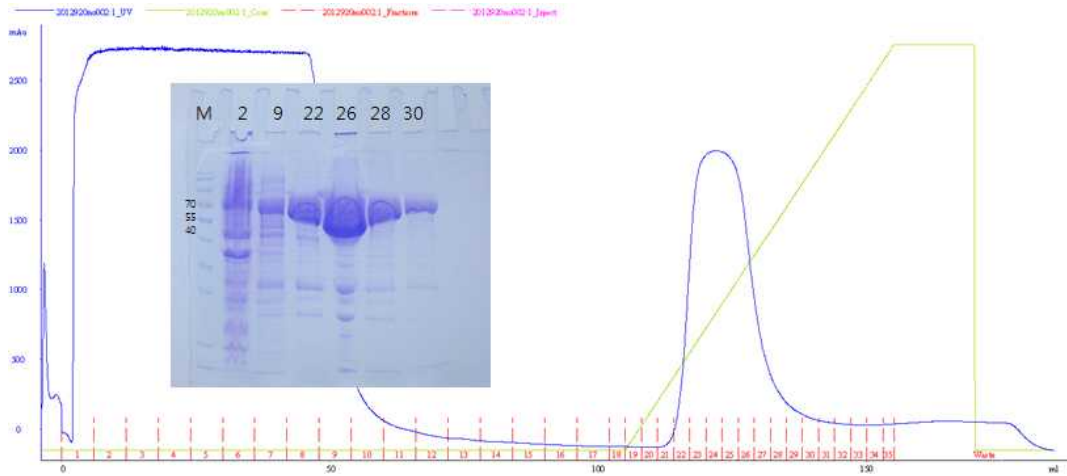


그림 8. *L. monocytogenes* Csn2 단백질의 첫 번째 Affinity chromatography와 SDS-PAGE 결과.

- 5) 위의 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 대부분의 Csn2 단백질이 예상대로 Column에 결합하였으며 Imidazole gradient를 이용하여 Elution에 성공하였음.
- 6) 이렇게 얻은 Csn2 단백질의 N-terminal tag를 제거하기 위해 TEV protease를 처리하고, 제거된 N-terminal tag과 Csn2 단백질 부분을 분리하기 위해 Ni-column을 이용하는 Affinity chromatography를 다시 한 번 수행하였음 (그림 9).

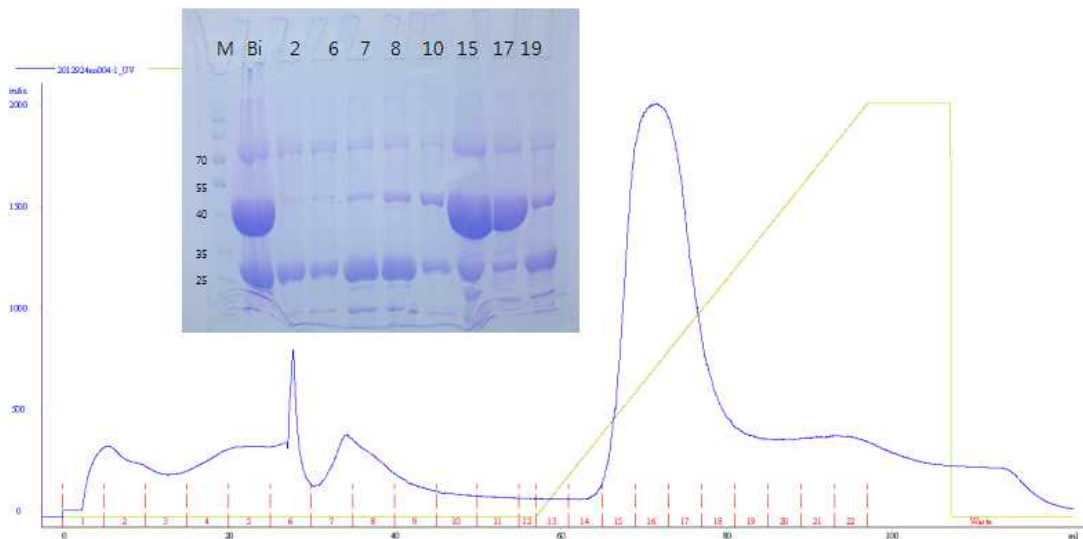


그림 9. *L. monocytogenes* Csn2 단백질의 두 번째 Affinity chromatography와 SDS-PAGE 결과.

- 7) 위에서 볼 수 있는 바와 같이 TEV protease에 의한 N-terminal tag의 제거가 비교적 성공적이었으나 상당수의 Csn2 단백질을 N-terminal tag과 함께 Elution되었으며, 앞서 Elution된 Csn2도 N-terminal tag이 제거되지 않은 단백질과 혼합되어 있는 상태임을 확인하였음.

8) 위에서 얻은 Csn2 단백질을 Size-exclusion chromatography를 이용하여 보다 순수한 형태로 정제를 시도하였음 (그림 10).

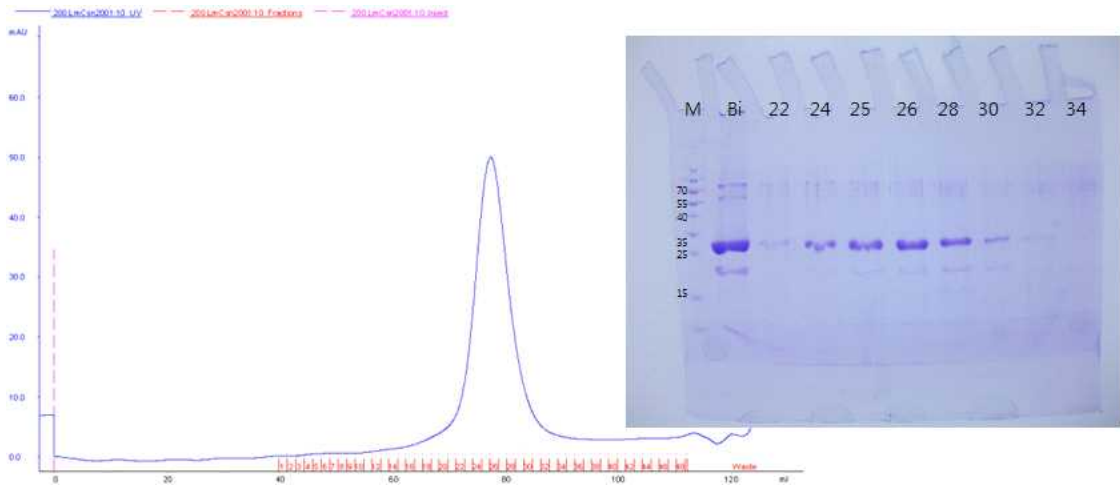


그림 10. *L. monocytogenes* Csn2 단백질의 Size-exclusion chromatography 및 SDS-PAGE 결과.

9) Size-exclusion chromatography 결과로부터 *L. monocytogenes* Csn2 단백질이 후속 실험에 필요한 정도의 충분한 양과 순도로 정제되지 않았음을 발견하였고, 이는 반복적인 실험에서도 확인됨.

라. *L. monocytogenes*의 Cas1 단백질의 생산

1) 확보한 3종의 *L. monocytogenes* strain을 대상으로 PCR을 수행하여 Cas1 단백질 유전자 (867 bp)의 증폭을 시도하였으며 아래 그림 11에서 확인할 수 있는 바와 같이 *L. monocytogenes* ATCC 15315에서만 Cas1 단백질의 유전자 증폭에 성공하였음.

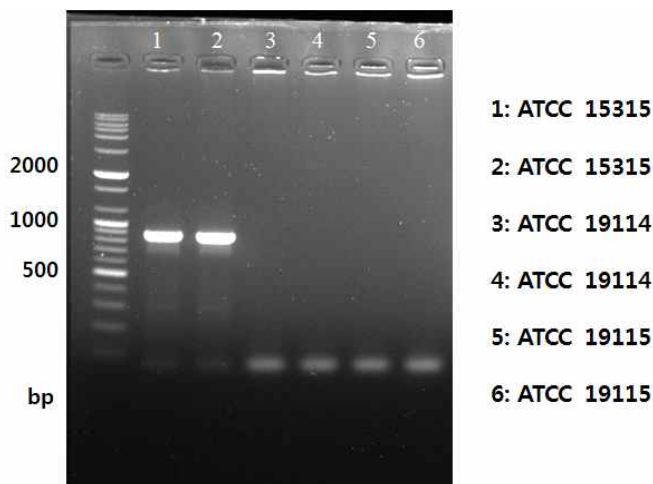


그림 11. PCR을 이용한 *L. monocytogenes* Cas1 단백질 유전자의 증폭.

2) 증폭된 Cas1 단백질의 유전자를 이용하여 *E. coli*에서 Cas1 단백질의 생산을 목적으로

다음의 그림 12와 같이 N-terminal에 His-MBP tag가 있고 Tag과 Csn2 단백질 사이에는 TEV protease site가 있는 구조를 가지는 Construct에 Cloning하였음.



그림 12. *E. coli*에서 Cas1 단백질 생산을 위한 Construct.

3) 위와 같이 Cloning한 Cas1 단백질의 유전자를 대상으로 *E. coli*에서 IPTG를 이용한 과다발현을 Small-scale로 시험하였으며 그 결과가 성공적이었음 (그림 13).

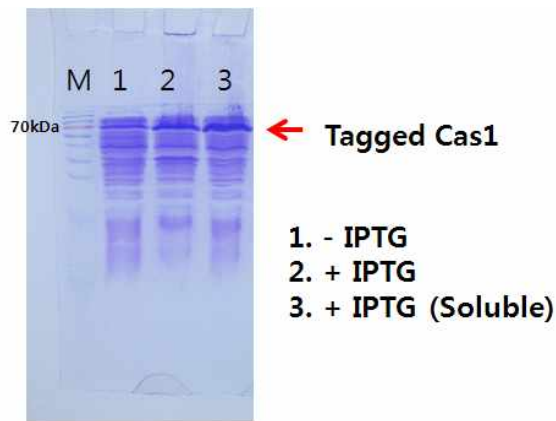


그림 13. Cas1 단백질의 과다발현 시험.

4) 위의 실험 후, N-terminal tag과 함께 Cas1 단백질을 *E. coli*에서 과다발현한 후, Ni-column을 이용하는 Affinity chromatography를 수행하였음 (그림 14).

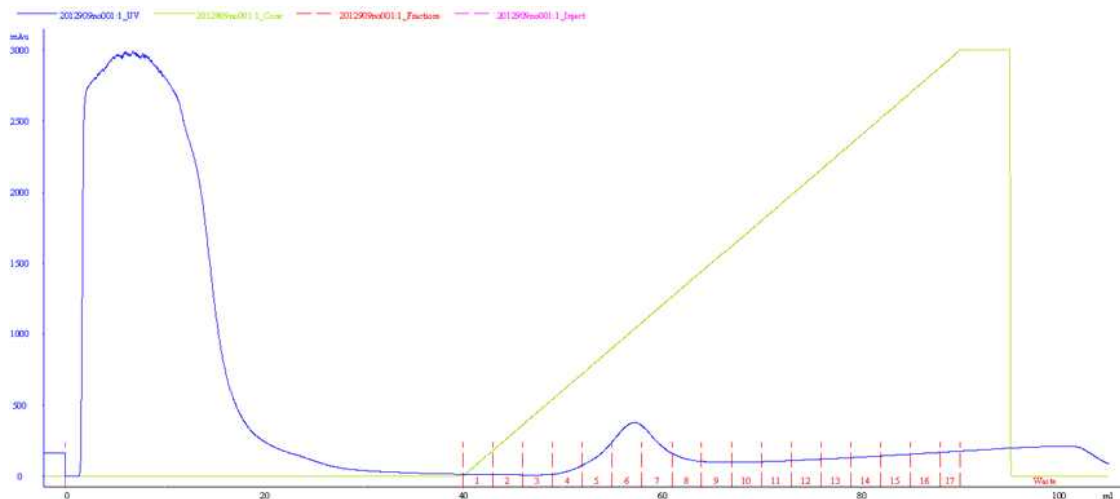


그림 14. *L. monocytogenes* Cas1 단백질의 첫 번째 Affinity chromatography.

5) 위에서 볼 수 있는 바와 같이 대부분의 Cas1 단백질이 Column에 결합하지 않고 바로 Elution되었으며, 이는 Cas1 단백질이 Soluble aggregate로 존재하기 때문일 수 있고 이 결과로부터 발현된 Cas1 단백질이 후속 실험에 적합하지 않음을 알 수 있었음.

마. *L. monocytogenes*의 Cas2 단백질의 생산

- 1) 확보한 3종의 *L. monocytogenes* strain을 대상으로 PCR을 수행하여 Cas2 단백질 유전자 (342 bp)의 증폭을 시도하였으며 아래 그림 15에서 확인할 수 있는 바와 같이 *L. monocytogenes* ATCC 15315에서만 Cas2 단백질의 유전자 증폭에 성공하였음.

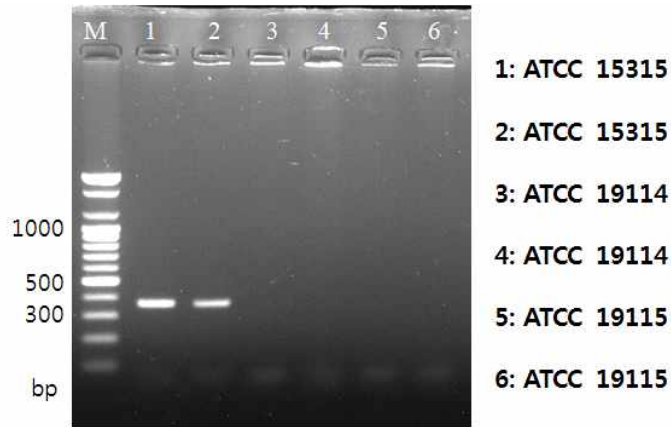


그림 15. PCR을 이용한 *L. monocytogenes* Cas2 단백질 유전자의 증폭.

- 2) 증폭된 Cas2 단백질의 유전자를 이용하여 *E. coli*에서 Cas2 단백질의 생산을 목적으로 다음의 그림 16와 같이 His-MBP tag이 있고 Tag과 Cas2 백질 사이에는 TEV protease site가 있는 구조를 가지는 Construct에 Cloning하였음.



그림 16. *E. coli*에서 Cas2 단백질 생산을 위한 Construct.

- 3) 위와 같이 Cloning한 Cas2 단백질의 유전자를 대상으로 *E. coli*에서 IPTG를 이용한 과다발현을 Small-scale로 시험하였으며 그 결과가 성공적이었음 (그림 17).

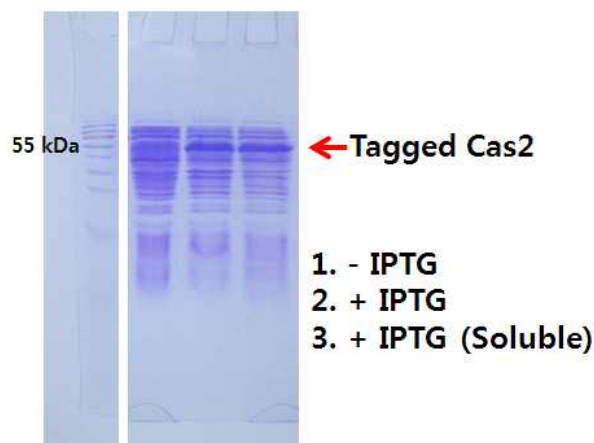


그림 17. Cas2 단백질의 과다발현 시험.

4) 위의 실험 후, N-terminal tag과 함께 Cas1 단백질을 *E. coli*에서 과다발현한 후, His-tag과 Ni-column의 상호작용을 이용하는 Affinity chromatography를 수행하였음 (그림 18).

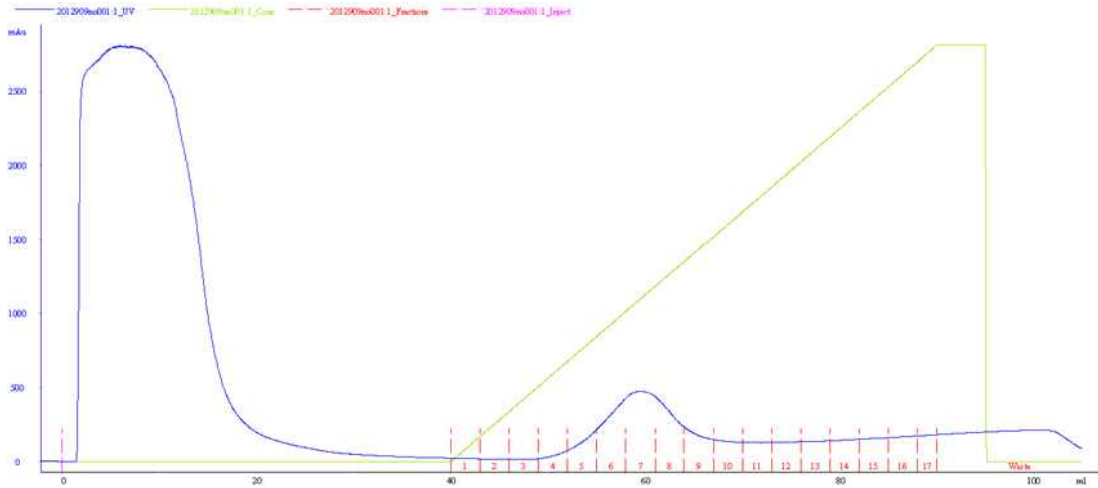


그림 18. *L. monocytogenes* Cas1 단백질의 첫 번째 Affinity chromatography.

5) Cas1 단백질과 마찬가지로 대부분의 Cas 2 단백질이 Column에 결합하지 않고 바로 Elution되었으며, 이는 Cas 2 단백질이 Soluble aggregate로 존재하기 때문일 수 있고 이 결과로부터 발현된 Cas2 단백질이 후속 실험에 적합하지 않음을 알 수 있었음.

바. *L. monocytogenes*의 Cas 단백질 연구의 결론

1) 총 4종의 *L. monocytogenes*의 Cas 단백질 중 (표 1) Csn1 단백질의 유전자는 위의 *E. coli* 과다 발현용 construct의 생산에 실패하였고, 나머지 3종 (Csn2, Cas1, Cas2)의 Cas 단백질의 경우 *E. coli* 과다 발현용 construct의 생산에는 성공하였으나 그로부터 Cas 단백질의 구조 및 기능연구에 필요한 충분한 양과 순도의 단백질을 생산하는데 실패하였음

3) 이와 같은 결과들을 바탕으로 당초 연구계획서 상 대안으로서 제안하였던 대로 *L. monocytogenes*는 아니지만 *L. monocytogenes*의 Cas 단백질들과 유사한 Cas 단백질들을 보유한 또 다른 병원성 세균을 대상으로 연구를 진행하기로 결정함.

2. *Listeria innocua*의 Cas 단백질 연구

가. 대안으로서의 *L. innocua*의 Cas 단백질 연구

1) *L. innocua*는 *L. monocytogenes*와 같은 속 (屬, genus)에 속하는 세균으로 *L. monocytogenes*와의 비교 유전체 연구로부터 유사한 CRISPR-Cas system을 보유한 것

이 규명되었으므로 대안으로서 연구하기로 결정함 (BMC genomics. 11: 688 (2010)).

2) *L. innocua*의 Cas단백질 유전자를 확보하기 위하여 2종의 *L. innocua* strain들을 국내 연구자로부터 공여 받았으며 이들을 대상으로 PCR을 수행하여 *L. innocua* Csn1 단백질 유전자 (4005 bp)의 증폭을 시도하였으나 실패하였음.

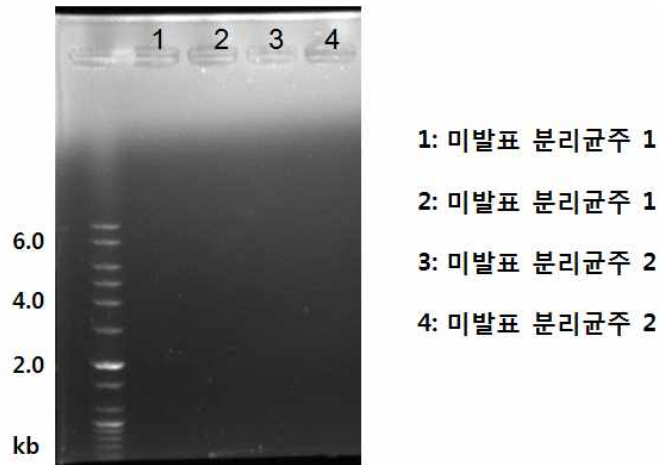


그림 19. PCR을 이용한 *L. innocua* Csn1 단백질 유전자의 증폭 시도.

3) 이로부터 공여 받은 2종의 *L. innocua* strain들 에는 CRISPR-Cas system이 존재하지 않음을 결론 내리고, 다른 종류의 병원성 세균을 대상으로 연구를 진행하기로 결정함.

3. *Streptococcus pyogenes*의 Cas 단백질 연구

가. 대안으로서의 *S. pyogenes*의 Cas 단백질 연구

1) *S. pyogenes*는 우리말로 화농성연쇄상구균이라고 하며 감염에 의해 다양한 염증성 질환을 일으키는 병원균임.

2) *S. pyogenes*는 *L. monocytogenes*와 같은 속 (屬, genus)은 아니지만 유사한 Cas 단백질들을 보유하고 있으며 (표 3), phage 저항 체계로서 CRISPR-Cas system의 기능이 처음 연구된 *Streptococcus thermophilus*와 같은 속 (屬, genus)이므로 연구 대상으로 선정.

표 3. *L. monocytogenes*와 *S. pyogenes* Cas 단백질의 비교.

종류	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. pyogenes</i>	Sequence identity
Csn1	1337 aa	1368 aa	44.4 %
Csn2	231 aa	220 aa	58.6 %
Cas1	288 aa	289 aa	68.1 %
Cas2	113 aa	113 aa	74.3 %

3) 지금까지 발견된 세균 및 고세균의 CRISPR-Cas system은 Cas 단백질의 유사성, CRISPR-Cas system의 구성요소, CRISPR의 Repeat 서열 등을 종합적으로 고려하여 다양한 Type 및 Subtype으로 분류할 수 있는데 (그림 20), 같은 Type 및 Subtype으로 분류되는 CRISPR-Cas system은 그 종이나 속에 상관없이 매우 유사한 것으로 결론지을 수 있음 (Nat Rev Microbiol 9: 467-77 (2011)).

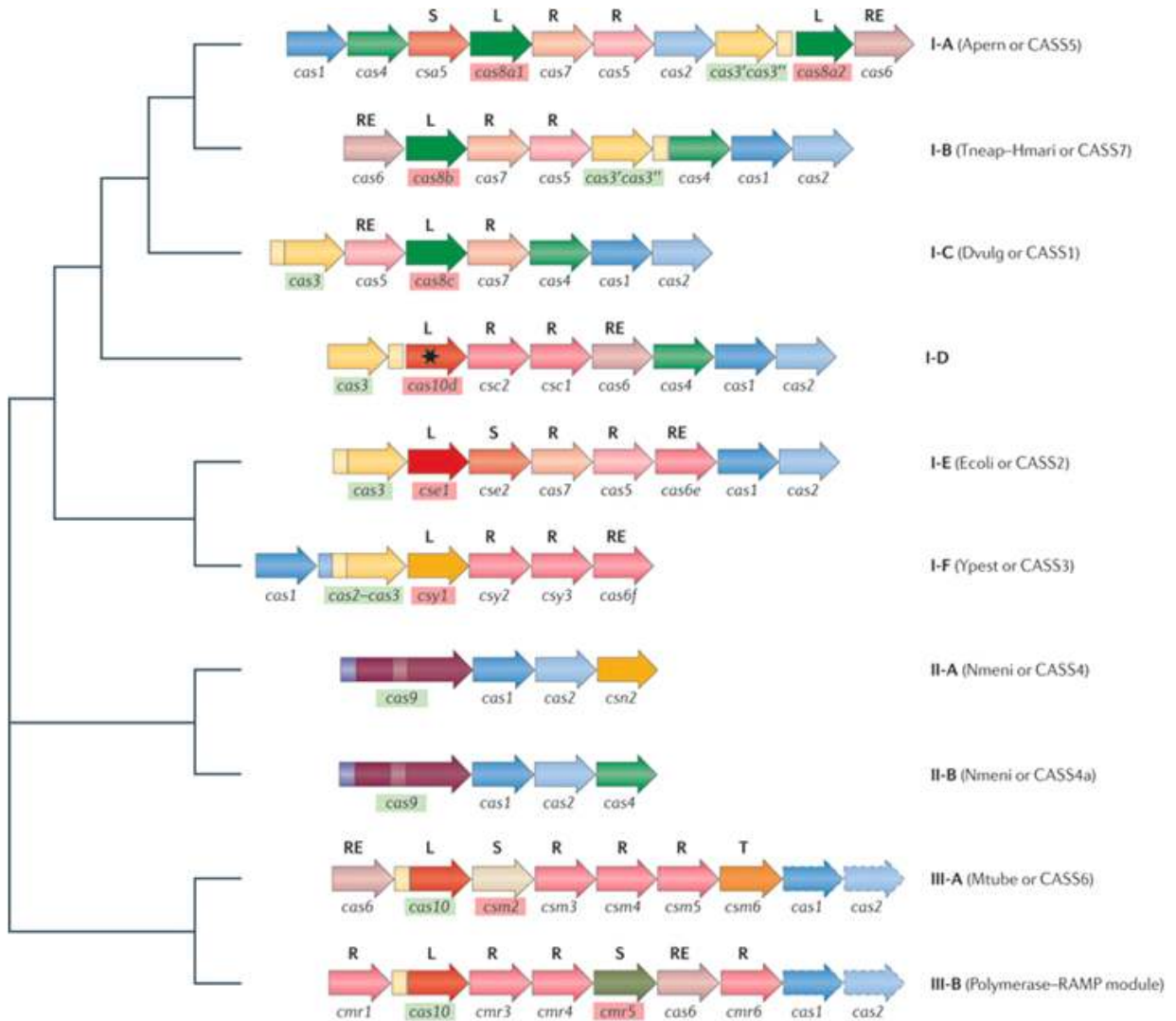


그림 20. CRISPR-Cas system의 Type 및 Subtype들 (Nat Rev Microbiol 9: 467-77 (2011)).

4) 연구 대상인 *L. monocytogenes*와 *S. pyogenes*의 CRISPR-Cas system은 모두 Type II의 Subtype II-A에 속하며, 매우 유사한 특성을 가지고 있음을 JCVI-CMR (J. Craig Venter Institute-Comprehensive Microbial REsource)의 Genome Properties Report에서도 알 수 있음 (그림 21).

Genome Properties Report

Download

Retrieve sequences of genes associated with All Steps

Organism (sort)	Phylum (class) (sort)	CRISPR system, Nmeni subtype (sort)	Assign By (sort)	Cas1 (R) (sort)	Cas2 (R) (sort)	Csn1 (R) (sort)	Csn2 (O) (sort)
Listeria monocytogenes 1/2a F6554	Firmicutes (Bacillales)	YES (more info)	RULES	Y	Y	Y	Y
Streptococcus pyogenes SF370 serotype M1	Firmicutes (Lactobacillales)	YES (more info)	RULES	Y	Y	Y	Y

Contact Us | © J. Craig Venter Institute

그림 21. *L. monocytogenes*와 *S. pyogenes* CRISPR-Cas system들의 유사성 (<http://cmr.jcvi.org>).

5) *L. monocytogenes*와 *S. pyogenes*의 Cas 단백질들은 각각 동일한 단백질 Family 또는 Superfamily에 속함이 규명되었음 (표 4)

표 4. *L. monocytogenes*와 *S. pyogenes* Cas 단백질이 속하는 단백질 Family 또는 Superfamily (Nat Rev Microbiol 9: 467-77 (2011)).

	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. pyogenes</i>
Csn1	COG3513	COG3513
Csn2	Spy1049-like	Spy1049-like
Cas1	COG1518	COG1518
Cas2	COG3512	COG3512

6) 또한, *Bacillus halodurans* Csn2 및 *Streptococcus agalactiae* Csn2 단백질에 대한 연구 결과로부터 이들 Cas 단백질들이 다른 속 (屬, genus)에 속하는 세균들로부터 유래한 것임에도 불구하고 그 기능과 구조가 매우 유사함이 증명되었고 이는 같은 Type 또는 Subtype의 CRISPR-Cas system에 속하는 Cas 단백질들은 다른 속의 세균으로부터 유래했음에도 서로 매우 유사할 수 있음을 보여주는 중요한 예임 (J Biol Chem. 286: 30759-68 (2011); J Struct Biol. 178:350-62 (2012))

7) 위의 사항들을 종합적으로 고려할 때, *L. monocytogenes*와 *S. pyogenes*는 매우 유사한 CRISPR-Cas system을 보유하고 있으며, 그들의 Cas 단백질들도 또한 유사할 것으로 결론지을 수 있으며, 따라서 *L. monocytogenes* Cas 단백질 연구에 대한 대안으로서 *S. pyogenes* Cas 단백질을 연구하는 것이 타당하다고 사료됨.

나. *S. pyogenes*의 Csn2 단백질의 생산

- 1) *S. pyogenes*의 Cas 단백질 생산을 위해 *S. pyogenes* M1 GAS strain의 genomic DNA로부터 총 4종의 Cas 단백질에 대한 유전자 모두를 PCR을 이용한 증폭을 통해 확보하는데 성공
- 2) 확보한 총 4종의 유전자 중 Csn1 유전자를 제외한 3종의 Cas 단백질 유전자 (Csn2, Cas1, Cas2)를 *E. coli*에서의 과다 발현에 적합한 construct로 제작하였고, 이 중 Csn2 단백질을 그 구조 및 기능연구에 필요한 충분한 양과 순도로 생산하는데 성공
- 3) *S. pyogenes* Csn2 단백질은 N-terminal의 His-MBP tag를 이용한 affinity chromatography, TEV protease를 이용한 His-MBP tag의 분리, gel filtration chromatography의 3단계로 이루어진 분리 및 정제법을 통해 생산하였으며 그 순도와 양을 다음의 Size-exclusion chromatography과 SDS-PAGE 결과로 판단 가능하였음 (그림 22)

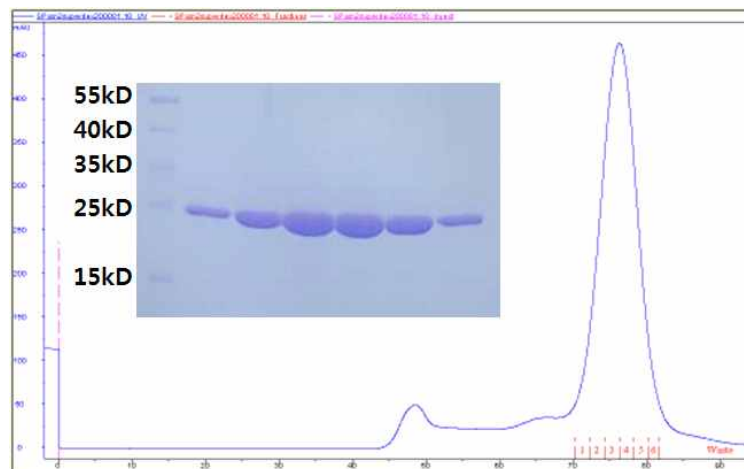


그림 22. *S. pyogenes* Csn2 단백질의 Size-exclusion chromatography과 SDS-PAGE 결과.

다. *S. pyogenes*의 Csn2 단백질의 구조 및 기능 규명

- 1) 정제한 *S. pyogenes* Csn2 단백질로부터 X-선 결정학을 통한 구조 규명에 필수적인 단백질 결정을 획득하였음 (그림 23).

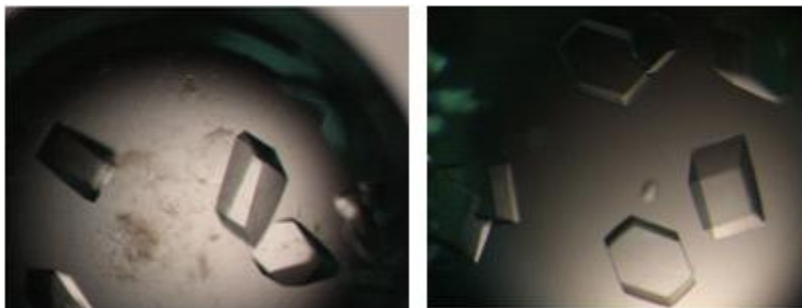


그림 23. *S. pyogenes* Csn2 단백질 결정들

4) 위에서 얻어진 결정으로부터 X-선 결정학을 이용하여 *S. pyogenes* Csn2 단백질의 결정 구조를 규명 (그림 24).

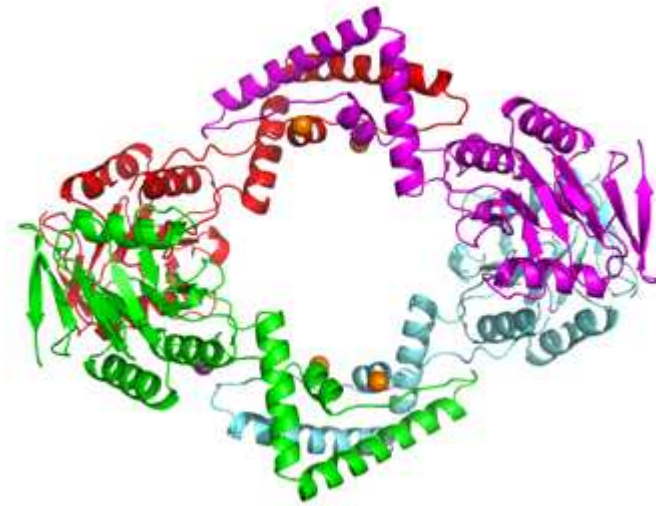


그림 24. *S. pyogenes* Csn2 단백질의 결정 구조

5) *S. pyogenes* Csn2 단백질은 tetramer로서 가운데가 비어 있는 다이아몬드 모양의 ring 구조를 가지고 있는데 ring의 내경 (inner diameter)이 DNA 이중 나선을 수용할 수 있을 만큼의 크기이고 ring의 내부표면에 양전하가 존재함이 예상되었으므로, *S. pyogenes* Csn2 단백질은 음전하를 가진 double-stranded DNA와의 결합할 가능성이 높다고 유추 가능.

6) 이로부터 Csn2 단백질이 이중 나선 DNA와 결합할 가능성이 높다는 것을 인식하게 되었으며 *S. pyogenes* Csn2 단백질과 이중 나선 DNA의 결합을 확인하기 위한 electrophoretic mobility shift assay (EMSA)를 수행하여 *S. pyogenes* Csn2 단백질이 이중 나선 DNA와 비특이적으로 결합함을 실험적으로 확인하였음 (그림 25).

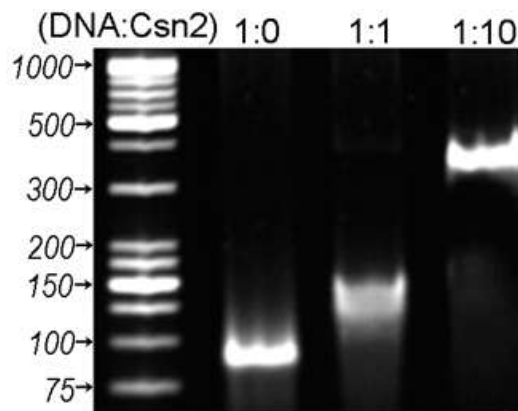


그림 25. *S. pyogenes* Csn2 단백질의 비특이적 이중 나선 DNA 결합성

7) *S. pyogenes* Csn2 단백질의 비특이적 이중 나선 DNA 결합성 규명을 통해 이 단백질이 CRISPR-Cas system의 phage 저항 작용에 있어서 phage DNA의 CRISPR 삽입 또는 재침입한 phage DNA의 파괴 등 중요한 phage 저항 단계에서 작용할 것임을 예상할 수 있음.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 목표달성도

가. 연구개발의 목표 및 내용

1) 당초 연구계획서 상의 연구개발의 목표 및 내용을 다음 표 5에 나열하였음.

표 5. 연구계획서 상의 연구개발의 목표 및 내용.

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2011	phage 저항 체계의 구성요소 생산	<ul style="list-style-type: none"> - <i>L. monocytogenes</i> 또는 <i>L. monocytogenes</i>의 genomic DNA 확보 - <i>L. monocytogenes</i> 또는 <i>L. monocytogenes</i>의 genomic DNA로부터 CRISPR DNA 및 <i>cas</i> 유전자 cloning - 다양한 형태 (double-stranded, single-stranded, hybrid)의 <i>L. monocytogenes</i> CRISPR 핵산 (DNA 및 RNA) 생산 - <i>L. monocytogenes</i>의 Cas 단백질을 대장균에서 과다 발현 - 과다 발현된 <i>L. monocytogenes</i>의 Cas 단백질을 분리 및 정제
		Cas 단백질의 특성 분석 및 신약 표적으로서 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - <i>L. monocytogenes</i> Cas 단백질과 CRISPR 핵산의 결합 여부 규명 - <i>L. monocytogenes</i> Cas 단백질의 CRISPR 핵산을 기질로 한 효소 활성 규명 - <i>L. monocytogenes</i> Cas 단백질의 삼차원적 구조 규명 및 분석 - <i>L. monocytogenes</i> Cas 단백질의 구조 분석을 통한 기능 예측 - <i>L. monocytogenes</i> Cas 단백질을 신약 표적 물질로 선정
		<i>L. monocytogenes</i> 의 Cas 단백질과 유사한 단백질 연구	<ul style="list-style-type: none"> - <i>L. monocytogenes</i>의 Cas 단백질과 유사한 단백질 생산 - <i>L. monocytogenes</i>의 Cas 단백질과 유사한 단백질 구조 규명

2) 연구의 성공률을 높이고 위험 요소 분산을 위해 *L. monocytogenes*와 유사한 CRISPR-Cas system을 보유한 병원균에 대해서도 동시에 연구를 진행하기로 당초 연구 계획서 상에 기술하였으며 연구 수행 중의 결과에 따라 대안으로서 제안하였던 대로 *L. monocytogenes*의 Cas 단백질들과 유사한 Cas 단백질들을 보유한 또 다른 병원성

세균인 *S. pyogenes*를 대상으로 연구를 진행하여 목표를 달성하였음.

나. 평가의 착안점 및 기준

1) 당초 연구계획서 상의 평가의 착안점 및 기준을 다음 표 6에 나열하였음.

표 6. 연구계획서 상의 평가의 착안점 및 기준.

평가의 착안점 및 기준	비중
CRISPR 및 <i>cas</i> 유전자 cloning 성공 여부	10 %
CRISPR 핵산의 생산 성공 여부	15 %
Cas 단백질들의 발현, 분리 및 정제 성공 여부	25 %
Cas 단백질의 기능 규명 여부	20 %
Cas 단백질들의 분자 구조 규명 여부	30 %

2) 앞서 기술한 바와 같이 *S. pyogenes* CRISPR-Cas system을 대상으로 위와 같은 기준을 적용할 수 있을 것으로 사료됨.

다. 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

1) 당초 연구계획서 상의 연구목표 및 평가착안점에 입각하여 다음과 같이 연구개발목표의 달성도를 산출함 (표 7).

표 7. 연구개발목표의 달성도.

평가의 착안점 및 기준	비중	달성도	내용
CRISPR 및 <i>cas</i> 유전자 cloning 성공 여부	10 %	100 %	<i>L. monocytogenes</i> 와 <i>S. pyogenes</i> 의 CRISPR 및 4종의 <i>cas</i> 유전자 확보 성공
CRISPR 핵산의 생산 성공 여부	15 %	100 %	<i>L. monocytogenes</i> 와 <i>S. pyogenes</i> 의 CRISPR 핵산의 이중 나선 DNA 생산 성공
Cas 단백질들의 발현, 분리 및 정제 성공 여부	25 %	90 %	<i>S. pyogenes</i> 의 Csn2 단백질의 생산 성공
Cas 단백질의 기능 규명 여부	20 %	100 %	<i>S. pyogenes</i> 의 Csn2 단백질의 비특이적 이중 나선 DNA 결합성 및 칼슘 결합성 규명
Cas 단백질들의 분자 구조 규명 여부	30 %	100 %	<i>S. pyogenes</i> 의 Csn2 단백질의 삼차원적 구조 규명 및 분석 성공
합계	100 %	97.5 %	<i>S. pyogenes</i> 의 Csn2 단백질의 생산에 성공하였으나 <i>L. monocytogenes</i> Cas 단백질의 생산은 성공하지 못하였으므로 세 번째 평가 착안점에 10 % 달성도를 감함

2. 관련분야 기여도

가. 병원균의 phage 치료법 관련 기여도

- 1) 감염에 의해 다양한 염증성 질환을 일으키는 병원균인 *S. pyogenes*의 phage 저항 체계 연구를 통해 해당 병원균의 방제 및 치료법 개발에 직접 또는 간접적으로 기여할 수 있을 것으로 예상.
- 2) 그 구조가 밝혀진 *S. pyogenes*의 Csn2 단백질을 표적으로 하는 저분자 약물이 개발된다면 그 기능을 약화시키는 것이 가능하고, 결과로서 *S. pyogenes*의 phage 저항 기능이 약화되므로 병원균 사멸의 한 방법이 될 수 있음.

나. CRISPR-Cas system의 작용기작 규명 기여도

- 1) Csn2 단백질이 비특이적 이중 나선 DNA 결합성을 보유하고 있음일 규명함으로써 이 단백질이 CRISPR-Cas system의 phage 저항 작용에 있어서 phage DNA의 CRISPR 삽입 또는 재침입한 phage DNA의 파괴 등 중요한 phage 저항 단계에서 작용할 것임을 제시하고 있고 이는 CRISPR-Cas system의 작용 기작 규명에 기여할 수 있음.
- 2) *S. pyogenes*의 Csn2 단백질이 tetramer로 존재하며 가운데가 비어 있는 다이아몬드 모양의 ring 구조를 가지고 있고 ring의 내부표면에 양전하가 존재함을 규명함으로써 이러한 특성들이 다양한 세균에 존재하는 Csn2 단백질의 공통된 특성임을 확인.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

가. 연구성과 목표 대비 연구개발 성과

- 1) 당초 연구계획서 상의 연구성과 목표와 이에 대비하여 실제 연구개발 성과를 다음의 표 8에 나열하였음.

표 8. 연구성과 목표와 연구개발 성과 대비표.

구분	특허		신제품				생명정보 등록 및 기탁	논문		기타
	출원	등록	품종명 명칭등록	품종생 수입관 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
목표							1	1		
성과							2	1		
달성도							200 %	100 %		

- 2) 위의 표에 나열한 연구 성과는 아래 표 9에 상술하였음.

표 9. 연구개발 성과 내용.

성과 구분	내용
생명정보 등록 및 기탁	Protein Data Bank에 단백질 구조 정보 등록 (ID: 3TOC)
생명정보 등록 및 기탁	Protein Data Bank에 단백질 구조 정보 등록 (ID: 3V7F)
논문 (SCI)	Crystal structure of <i>Streptococcus pyogenes</i> Csn2 reveals calcium-dependent conformational changes in its tertiary and quaternary structure, PLoS One. 2012; 7(3):e33401

나. 기타 연구개발 성과

- 1) 당초 연구계획서 상의 연구성과 목표에 제시하지 않았지만 본 연구과제와 관련된 성과를 아래 표 10에 나열하였음.

표 10. 기타 연구개발 성과 내용.

성과 구분	내용
국내 학술대회 발표	한국 구조생물학회 학술대회/2012-06-26/Crystal Structure of <i>Streptococcus pyogenes</i> Csn2 Reveals Calcium-Dependent Conformational Changes in Its Tertiary and Quaternary Structure
국제 학술대회 발표	미국 세포생물학회 학술대회/2012-12-17/Crystal Structure of <i>Streptococcus pyogenes</i> Csn2 protein, a component of CRISPR-mediated bacterial immune system
연구인력양성	농학석사/2012-08/서울대학교 농생명공학부

2. 성과활용 계획

가. 추가연구 및 타연구에 활용 계획

- 1) *S. pyogenes* Csn2 단백질의 생산 및 특성 분석 연구를 통해 얻어진 노하우를 활용하여 *S. pyogenes*의 다른 Cas 단백질들에 대한 기능 및 구조연구도 수행하고자 계획 중임.
- 2) *S. pyogenes* Cas 단백질들 간의 상호작용 및 복합체 형성 여부와 이에 따른 구조 및 기능적 특성등도 분석하고자 함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 해외 연구 정보

가. Csn2 단백질 관련 해외 연구 정보

- 1) 독일 연구 그룹에서 *Streptococcus agalactiae* Csn2 단백질에 관한 연구 논문을 발표 (J Struct Biol. 178:350-62 (2012)).
- 2) 이 논문에서 저자들은 *S. agalactiae* Csn2 단백질의 삼차원적 구조와 비특이적 이중 나선 DNA 결합성을 규명하였으며 이는 본 연구진의 연구 결과와 대동소이함.
- 3) 이 논문에서 한 가지 특이할만한 사항은 저자들이 molecular dynamics simulation을 통해 제안한 *S. agalactiae* Csn2 단백질의 이중 나선 DNA 결합 방식으로 기존에 제시되었던 Csn2 tetramer의 중앙 ring을 통하여 결합하는 것 이외의 ring 바깥쪽과 결합하는 방식도 제안함 (그림 26).

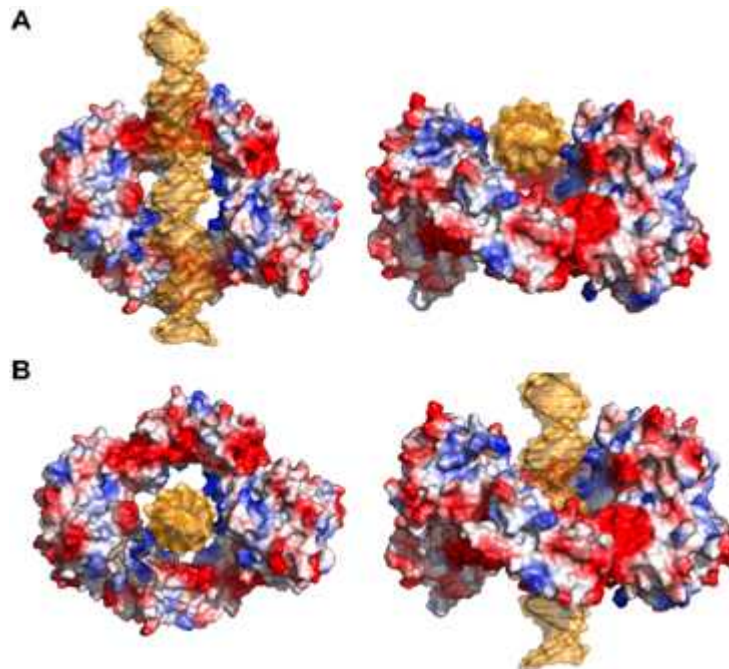


그림 26. 독일 연구진이 제안한 Csn2 단백질의 두가지 가능한 이중 나선 DNA 결합 방식 (J Struct Biol. 178:350-62 (2012)).

제 7 장 연구시설장비 현황

본 연구과제는 연구시설 및 장비 도입이 불가한 사업으로 해당 사항 없음

제 8 장 참고문헌

1. J Microbiol Immunol Infect 40: 4-13 (2007)
2. J Food Prot 73: 32-8 (2010)
3. Nature 482: 331-8 (2012)
4. J Bacteriol 169: 5429-33 (1987)
5. Mol Microbiol 43: 1565-75 (2002)
6. Nat Rev Genet 11:181-190 (2010)
7. Microbiology 151: 2551-61 (2005)
8. J Mol Evol 60: 174-82 (2005)
9. Microbiology 151: 653-63 (2005)
10. Science 315: 1709-12 (2007)
11. Nucleic Acids Res. 33: 577-86 (2005)
12. PLoS One. 7: e33401 (2012)
13. Proteins. 80: 2573-82 (2012)
14. Proteins. doi: 10.1002/prot.24183 (2012)
15. Proteins. 80:1 895-900 (2012)
16. BMC genomics. 11: 688 (2010)
17. Nat Rev Microbiol 9: 467-77 (2011)
18. J Biol Chem. 286: 30759-68 (2011)
19. J Struct Biol. 178:350-62 (2012)

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.