Appl. Chem. Eng., Vol. 32, No. 1, February 2021, 10-14
https://doi.org/10.14478/ace.2020.1095

Article

형광 단백질 mCherry-I202T의 pH 감응성 분석

이상민 · 정민섭†

홍익대학교 화학공학과
(2020년 11월 19일 접수, 2020년 12월 9일 심사, 2020년 12월 11일 채택)

Characterization of pH Dependent Properties of mCherry Mutant, I202T

Sangmin Lee and Minsub Chung†

Department of Chemical Engineering, Hongik University, Seoul 04066, Republic of Korea
(Received November 19, 2020; Revised December 9, 2020; Accepted December 11, 2020)

초 록

DsRed에서 유래한 적색 형광 단백질들 중 하나인 mCherry는 GFP와 유사한 3차 구조를 가진 잘 알려진 적색 형광 단백질 중 하나이며, 수소결합 네트워크를 형성하고 있지 않아서 pH 변화에 민감하지 않다. 반면 mCherry의 발색단 근처에서 돌연변이를 야기 시켜 만든 mCherry-I202T는 mCherry 단백질의 202번째 아미노산인 이소루신(Ile)을 트레오닌(Thr)으로 치환함으로써 모체와는 다르게 추가적인 수소결합을 형성하여, 주위 pH에 더욱 민감하게 반응할 뿐 아니라 적색 편이된 형광을 보였다. 수소결합이 확장된 I202T의 pH 민감성을 검증하기 위해 산성과 염기성 pH 범위에서 I202T의 UV-vis 흡광 스펙트럼 변화와 가역성을 확인하고, 그를 pH sensor에 적용 가능한지 그 가능성을 검증하고자 하였다.

Abstract

mCherry is one of the well-understood red fluorescent proteins which has a similar tertiary structure as GFPs, but pH resistant due to the lack of hydrogen bond network. Whereas mCherry-I202T showed far-red fluorescence and also pH sensitive property because of the additional hydrogen bond formed by substituting Ile of 202 amino acid sequence on mCherry with Thr. In order to verify the pH sensitive characteristic of mCherry-I202T owing to the extension of hydrogen bond, UV-vis spectrum was measured over the range of acidic to basic pH. We also demonstrate further possibilities of applying mCherry-I202T as a pH sensor.

***Keywords**: Far-red fluorescent proteins, mCherry, Mutagenesis, H-bond network, pH sensor*

1. 서 론

mCherry는 DsRed에서 유래한 적색 형광 단백질들 중 하나이며, 그 결과 DsRed보다 향상된 밝기 및 광안정성을 보이며, 특히 안정한 단량체(monomer)로 존재하여 안정적인 형광 특성과 빠른 발색단 성숙도, 탁월한 내산성이 장점이다[1-3]. mCherry는 단백질의 안쪽에 존재하는 발색단을 주위 환경으로부터 차단하듯이 감싸는 β-barrel 구조로 이루어져 있다[4]. β-barrel 구조는 barrel간의 수소결합을 이루고 있으므로, 외부 용액의 pH에 민감성을 보인다. 또한, 발색단의 페놀기는 pH 변화에 민감한 이온화 상태 평형에 존재하기 때문에 pH에 의존적인 형광성을 보인다. 이런 특성을 이용하여 형광의 밝기 변화를 통해 녹색형광단백질(GFP)을 pH 센서로 활용한 사례가 보고된 바 있다[5]. 단백질 pH 센서는 특히 유전자 재조합을 통해 세포 이미징과 동시에 세포 또는 소기관 내 pH 측정이 가능하여 매우 유용하게 활용될 수 있다[6].

mCherry는 발색단 주위에 수소결합 네트워크를 형성하고 있지 않기 때문에 용액의 pH에 상관없이 일정한 형광을 발하는 장점으로 작용하기도 하지만, pH 센서로 사용할 수는 없었다. 그래서 본 연구진은 단백질 내부 수소결합을 연결하기 위해 발색단(chromophore)근처에서 mCherry 단백질의 202번째 소수성 아미노산인 isoleucine을 수산화기를 가진 threonine으로 치환함으로써 수소결합 네트워크를 형성할 수 있었으며, 그 결과보다 적색 편이된 원적색 형광을 발하는 특성을 관찰할 수 있었다[7]. β-barrel 구조를 가진 형광단백질들은 주로 이합체나 사합체(tetramer) 등 올리고머화를 하여, 광학적 특성이 복잡해지는 문제가 있으나, 상술한 바와 같이 mCherry는 단량체로 많은 장점이 있으며 I202T 변종도 안정한 단량체로 존재함을 확인하였다. I202T는 이러한 mCherry의 장점들을 그대로 가진 pH 센서 단백질로서, 위치를 확인하고자 하는 단백질 유전자와 연결해서 해당 단백질의 위치를 확인하거나 세포 내 물질의 메커니즘, 유전자 발현을 확인하는 등

† Corresponding Author: Hongik University,
Department of Chemical Engineering, Seoul 04066, Republic of Korea
Tel: +82-2-320-1677 e-mail: minsubc@hongik.ac.kr

pISSN: 1225-0112 eISSN: 2288-4505 @ 2021 The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry. All rights reserved.

의 용도로 활용될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 I202T의 pH 민감성이 pH sensor로 적용되기 위해 유의미한 pH 감응성과 일정한 경향성을 보이는지 검증하고자 하였다. 이를 위해 모체인 mCherry와 같은 조건에서 pH 반응성을 비교하였으며, 이를 통해 Ile202Thr 아미노산 변이의 효과를 정밀하게 분석할 수 있을 것이다. 또한, probe로서 sensor로 사용하기 위해 가역적인 변화가 가능한 pH 범위와 가장 민감하게 반응하는 범위를 확인하고자 하였다. 최종적으로, 특정한 pH 범위에서 I202T의 UV-vis 스펙트럼과 응집 정도를 확인하고 그 민감 정도와 가역성이 pH sensor에 유용하게 적용될 수 있을지 검증하였다.

2. 실 험

2.1. 돌연변이 유발 및 복제

먼저, 대장균에 코돈 최적화 된 mCherry 유전자를 NcoI와 BamHI 부위 사이의 pET15b 벡터(Novagen)에 클로닝하여 단백질이 His 태그와 트립신 절단 부위 없이 원래 형태로 발현될 수 있도록 하였다. mCherry 클로닝 후 Pfu DNA Polymerase (Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR 증폭으로 site-directed mutagenesis를 수행하고 PCR 산물을 Dpn I (Takara, Shiga, Japan) 제한효소로 분해했다. 대장균 균주 BL21 (DE3)은 열 충격에 의해 mCherry 또는 그 돌연변이에 대한 플라스미드로 형질 전환되었다. 형질 전환된 박테리아는 암피실린이 포함된 Luria-Bertani (LB) 한천 배지에서 37 ℃로 유지하면서 16 h 동안 배양되었으며, 플라스미드가 함입된 대장균 콜로니는 붉은 색을 띄는 것으로 선별해낼 수 있었다.

2.2. 단백질 발현 및 분석

mCherry와 그 돌연변이 I202T DNA를 포함하는 *E. coli*를 암피실린이 포함된 10 mL LB 배지에서 37 ℃에서 밤새 배양한 다음, 암피실린이 포함된 400 mL LB 배지에서 플라스크 배양하였다. OD600이 0.6~0.8에 도달하면 진탕 배양기 온도를 24 ℃로 낮춰 20 h 동안 더 배양한 후, 원심분리하였다. TE buffer에 풀어진 세포용액을 -80℃의 초저온고에서 20 min간 냉동한 후에 32 ℃의 항온조에서 30 min간 녹이는 과정을 3번 반복하여 세포벽을 약하게 만들어준 후, sonication하여 대장균을 파괴하였다. 침전물을 제외한 단백질 용액을 0.45 μm pore size membrane filter로 걸러준 후 4 ℃에 보관하였다. 단백질은 25 mM Tris 및 150 mM NaCl pH 7.4 버퍼에서 Hitrap Q HP 컬럼(GE Healthcare)을 사용한 음이온 교환 크로마토그래피와 크기 배제 컬럼(Superdex^{TM} 200 증가 10/300 GL, GE Healthcare)이 있는 고속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC, GE Healthcare)를 사용하여 정제하였다. 정제된 단백질은 Vivaspin (5K cut-off, GE Healthcare)을 사용한 한외 여과에 의해 25 mM Tris pH 7.4 완충액으로 교환되었다.

흡광도 측정은 UV-vis 분광 광도계(Thermo Scientific^{TM} Multiskan^{TM} GO Microplate Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)에서 수행하였다. Citric acid와 ethanolamine buffer를 0.2 M부터 2 M까지 10배수 간격으로 제조하여 pH 표준 용액을 준비하였다. 정제가 끝난 단백질 농도를 DDW를 이용해 0.45 nM/μl 농도로 일정하게 맞추고, pH 표준 용액들을 1 : 1 비율로 배합하여 스펙트럼을 측정하였다.

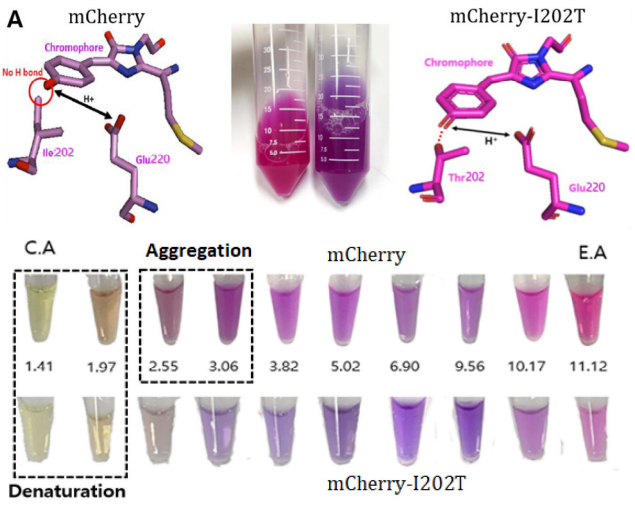

Figure 1. (A) Structure around the chromophore of mCherry. The important mutation point to recover H-bond wire is indicated. The color difference between original mCherry and I202T is compared (center). (B) The visible colorimetric change of mCherry (top) and I202T (bottom) over wide pH range is demonstrated. C.A. is citric acid for decreasing pH, while for elevating pH, ethanol amine (E.A.) was used.

3. 결과 및 고찰

3.1. I202T 아미노산 치환을 통한 수소결합 네트워크 복원 및 특성 변화

mCherry는 그 모체가 되는 DsRed로부터 여러 단계를 거쳐 유도 진화를 통해 수립되어, 내산성, 안정성과 같은 우수한 형질들, 특히 사합체를 이루는 DsRed와 달리 단량체로 존재하는 특성을 갖고 있다[1,8]. DsRed 발색단은 GFP 발색단과 유사하지만 트리 펩타이드 서열의 첫 번째 아미노산 잔기인 Ser 대신 Gln이 있는 이미다졸린 고리를 특징으로 하는데, 그로 인해 연장된 π 전자 conjugation에 의해 GFP에 비해 적색 편이된 absorbance를 보인다. mCherry는 이러한 DsRed의 발색단 서열(Gln66-Tyr67-Gly68)에서 첫 번째 아미노산 잔기가 다시 메티오닌으로 바뀐 발색단 서열(Met71-Tyr72-Gly73)을 가지며, N-말단에 5개의 아미노산이 추가됨으로써 5가 더해진 아미노산 서열 번호를 갖게 된다. 하지만 다양한 RFP 변종마다 일관된 번호 비교를 위해서 많은 RFP들의 모태였던 DsRed를 기준으로 번호를 매기는 관습이 생겼으며, 각 형광단백질들의 공통 중요 부분인 발색단을 기준으로 3개의 아미노산들이 66-67-68번을 갖도록 번호를 매기기도 한다. 이런 이유 때문에, 예를 들어 Figure 1A의 202번째 Ile은 발색단 기준으로 번호를 매기면 197번으로 통용될 수도 있다. 본 연구에서는 mCherry만을 대상으로 하고 있기 때문에 발색단을 기준으로 하지 않고 mCherry 자체 서열을 기준으로 한 아미노산 번호를 사용할 것이다. 발색단의 Met71 이외에도 mCherry는 DsRed로부터 7개의 주요 아미노산 서열 - V12I, R22H, T152S, K168Q, M187K, Y199N, D201N - 이 더 변이되었고, C-말단에 GMDELYK 서열이 더해져 있다[1].

mCherry의 발색단 주변의 수소결합 네트워크가 Figure 1A에 나와 있다. 발색단의 끝에는 72번 타이로신에서 유래한 페놀기가 있어 수소 이온을 주고받을 수 있으며 수소 결합 네트워크에 참여할 수 있다. mCherry에서 220번 글루탐산으로부터 연결된 수소결합 네트워크가 소수성 아미노산인 202번 이소루신에서 단절된 양상을 확인할 수 있다.

이 소수성 Ile과 비슷한 구조를 가지며 히드록시기를 갖는 Thr으로 바꿔줌으로써 수소 결합 네트워크가 연결될 것을 기대할 수 있었으며, 동시에 보다 적색 편이되어 원적색에 가까운 색이 된 것을 Figure 1A의 가운데 사진과 같이 육안으로도 확연히 관찰할 수 있었다.

수소결합 네트워크가 연결됨에 따라 외부 용액의 pH에 변화에 어느 정도 민감하게 반응하는지 확인하기 위해서, 약산, 약염기이면서 완충용량이 커 안정적으로 pH를 유지시킬 수 있는 citric acid와 ethanolamine 용액을 사용하여 가시적 색변화와 응집성을 시각적으로 비교하였다(Figure 1B). mCherry는 중성에서 약산성인 pH 3.82까지 특별한 색 변화를 보이지 않다가, pH 2.55와 3.06에서 응집이 일어나기 시작하면서 황색이 섞여 나타나는 것이 관찰되었으며, 더 강한 산성인 pH 1.41과 1.97에서 완전히 denature되면서 응집이 보이지 않는 맑은 미황색으로 변하는 것을 볼 수 있었다. pH 2~3에서 형성된 응집은 다시 pH를 중성으로 올려줘도 다시 녹지 않는 것으로 미루어 볼 때, mCherry끼리 응집하면서 비가역적인 소수성 결합이 형성되어 다시 풀리지 않는 형태의 응집 반응으로 해석할 수 있다. I202T의 변화 양상도 비슷한 경향을 보였지만 중성부터 pH 2.55까지 보다 점진적인 색 변화를 보였고, 특히 pH 2.55와 3.06에서도 비가역적인 응집이 형성되지 않기 때문에 다시 pH를 중성으로 올려주면 원래 색상으로 돌아오는 가역적인 변화 특성을 갖고 있다. 하지만 강산성에서는 역시 모두 denaturation되어 mCherry와 구분되지 않는 것을 관찰할 수 있었다. 염기성 pH에서는 mCherry와 I202T 모두 보다 짧은 파장의 적색으로 변하였으며, 여러 번 중성과 염기성 색상을 오갈 수 있는, 마치 지시약과 같은 가역성을 보여주었다. 일반적으로 단백질들이 등전점에 도달해서 정전기적 반발이 없어지면서 응집성이 높아지는 경향이 있지만, mCherry의 등전점은 pI 5.3이기 때문에 산성 환경에서 응집이 일어나는 메커니즘은 정전기적 반발보다는 산성 환경에서 전체적인 단백질 구조가 와해되면서 소수성 결합이 유도되는 영향이 더 클 것으로 추측할 수 있다.

이처럼 mCherry와 I202T가 넓은 pH 범위에서 광학적 특성이 변화한다는 것을 확인할 수 있었다. 강한 산성과 염기성 영역에서 모두 두드러진 색상 변화를 보여서 pH 센서로서의 가능성을 보였고, 그 중에서도 I202T는 가역적인 변화를 관찰할 수 있어 더욱 유용할 것으로 보인다. Ile202Thr 치환에 의한 수소결합 도입으로 mCherry의 장점이었던 내산성을 잃는 대신, I202T는 단분자성의 장점을 유지하면서 pH 민감성을 획득하였음을 볼 수 있다. 특히 세포 내 환경을 측정하는 용도로는 단백질이 응집하게 되면 세포 활동에 악영향을 줄 수 있기 때문에, pH 3 이하 측정에서는 mCherry 사용을 피해야 할 것이다. 반면 pH 4~9의 약산성~약염기성 영역에서는 색상 변화가 명확하지 않아 보다 정밀한 기기를 활용한 분석을 통해 측정이 가능할 것으로 보이며, I202T가 mCherry보다 점진적인 변화를 보이기 때문에 더 민감할 것으로 기대된다. 더 정확한 광학적 특성 변화를 관찰하기 위해 UV-vis 분광계를 사용한 스펙트럼 분석을 진행하였다.

3.2. 산성 영역 pH 변화에 따른 색 및 흡광 스펙트럼 변화 분석

Figure 1에서 확인한 가시적 색상 변화를 보다 정확하게 비교하기 위해서, mCherry와 I202T의 pH에 따른 경향성을 UV-vis 흡광 스펙트럼을 통하여 비교하였다. 산성 영역에서는 denaturation과 응집반응이 주로 일어나는 반면, 염기성에서는 청색 편이가 주로 일어나는 등 스펙트럼의 변화 양상이 다르기 때문에 편의상 산성과 염기성 영역의 스펙트럼을 따로 비교하였다. 정확한 스펙트럼 변화 비교를 위해 실험에 사용한 단백질 농도는 모두 0.45 nmol/ul로 통일하여 각 파장의 흡광계수의 변화를 용이하게 추적할 수 있었다. 가시적 색 변화 실험과 마찬가지로 시트르산의 농도 조절을 통해서 pH를 변화시켰다.

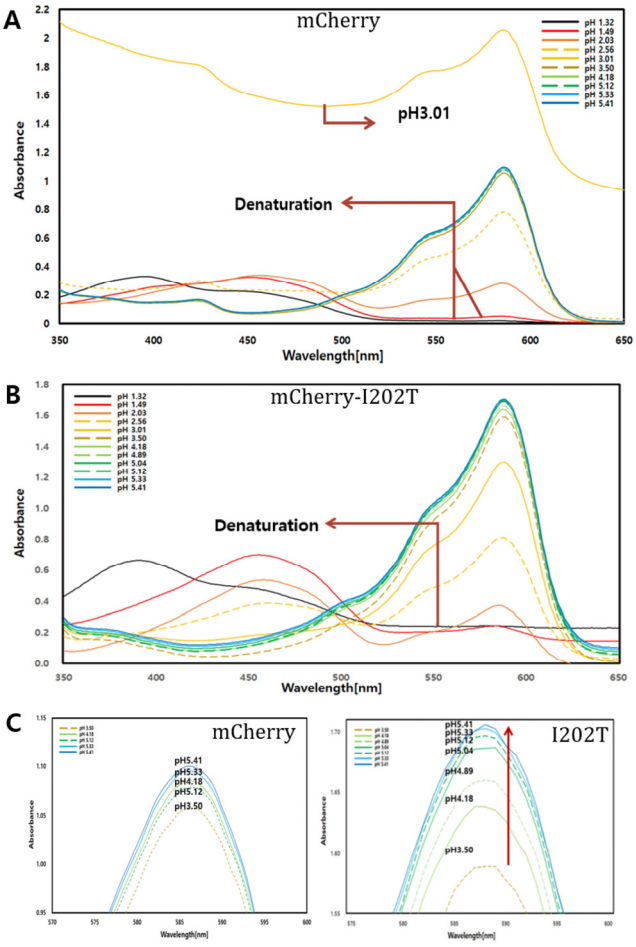

Figure 2. UV-vis absorbance spectra over acidic pH range of mCherry (A) and I202T (B). The detailed change around the absorption maxima is compared (C).

mCherry는 중성에서 고유의 585 nm 최대 흡광 peak과 그 아래 545 nm 어깨 peak이 중첩된 스펙트럼을 갖는데, pH 5.41부터 3.50까지 거의 같은 변하지 않는 스펙트럼을 보였다(Figure 2A). pH 3에서 Figure 1B 실험과 같이 비가역적 응집이 일어나는데, 이렇게 형성된 거대 응집물이 빛을 무작위로 산란시키면서, 전파장에서 흡광도가 대폭 증가하게 된다. pH 2.03 이하일 때 denaturation이 일어나면서 응집이 풀리면서 580 nm peak이 사라지고 400~450 nm 영역에서 흡광도가 증가하면서 전혀 다른 패턴의 스펙트럼으로 변화하게 된다. 형광단백질의 β-barrel 구조가 와해됨에 따라 발색단 주위에 위치하던 아미노산들과의 상호작용이 사라지고 발색단이 강산성 용액에 그대로 노출되면서, 450 nm에서 최대 흡광계수를 갖는 양성자화된 발색단 자체의 흡광 스펙트럼이 드러나는 것으로 해석된다.

I202T는 중성에서 mCherry보다 약 5 nm 만큼 적색 편이된 590 nm 최대 흡광 peak과 그 아래 550 nm 어깨 peak이 중첩된 스펙트럼을 갖는데, pH 5.41부터 3.50까지 서서히 593 nm peak의 흡광도가 감소하다가, pH 3부터 점진적으로 550~600 nm 영역의 peak이 작아지면서 450 nm peak이 커지는, mCherry에서와 비슷하지만 보다 점진적인 변화 양상을 보이다가, pH 1.32일 때 완전한 denaturation이 진행되는 것

을 확인하였다(Figure 2B). 단백질 구조가 denature 되기 전에는 적색 편이된 스펙트럼을 보이다가 완전히 와해되어 양성자화된 발색단이 드러난 후에는 mCherry와 동일한 스펙트럼을 보이는 것으로, 동일한 발색단이 Thr202의 영향으로 적색 편이되었음을 다시 한 번 확인할 수 있다.

mCherry와 I202T의 최대 흡수 파장인 590 nm 부근에서 더 자세히 살펴보면, pH 3.5까지 pH가 감소하면서 absorbance 또한 약간씩 감소하는 경향을 보였다(Figure 2C). 이는 pH가 산성으로 가면서 단백질 구조가 느슨해져 발색단으로 용액의 침투가 용이해지기 때문에 점차 590 nm peak의 흡광계수가 낮아지게 되는 것이라 유추할 수 있다. mCherry의 경우는 그 변화폭이 I202T에 비해 작은데, pH 5.41~4.18까지는 큰 변화가 없다가 pH 3.50에서 약 4.5% 정도 감소하는데 그치는 반면, I202T는 꾸준하고 점진적인 감소를 보여 pH 3.50에서 pH 5.41에 비해 약 7.7% 정도 감소하는데 이르게 된다. I202T의 이러한 일정한 감소는 수소결합이 복원됨에 따라 외부 pH에 다소 민감해진 것으로 볼 수 있고, 보다 민감하고 유용한 pH 탐침 역할을 기대할 수 있게 된다.

3.3. 염기성 영역 pH 변화에 따른 색 및 흡광 스펙트럼 변화 분석

약염기성 영역에서의 결과를 얻기 위해, ethanolamine 농도 조절을 통해서 pH를 변화시켰다. 염기성에서의 대표적인 특징은 mCherry와 I202T 모두 청색 편이 현상이 일어나 선홍색으로 변해간다는 것이다. 스펙트럼 상에서는 585 nm 최대 흡광 peak과 그 아래 545 nm 어깨 peak이 전체적으로 약 25 nm씩 낮은 파장 쪽으로 편이되면서 흡광계수가 약 15%씩 낮아지는 것으로 색상 변화를 확인할 수 있었다(Figure 3). 약염기 영역에서 이처럼 확연한 흡광 스펙트럼 변화로 상당히 민감한 pH 센서로서 작용할 수 있는 가능성을 보여준다.

mCherry는 약 pH 9.88일 때 편이 현상이 시작되어, pH 11.41일 때 완전히 청색 편이되는 것을 확인하였다(Figure 3A). I202T는 비교적 낮은 약 pH 9.20부터 편이 현상이 시작되어, pH 11.03에서 청색 편이를 마쳤다(Figure 3B). 이러한 청색 편이의 원인으로 짐작할 수 있는 것은, 염기성 환경에서 양성자가 부족해져서 발색단과 주변의 Glu220과 같은 잔기들이 점점 수소를 잃고 이온화되면서 발색단과 상호작용이 달라지는 영향이 클 것이다. 이때 좀 더 외부와 수소결합으로 잘 연결되어 있는 I202T가 더욱 양성자를 잘 내놓아서 더 낮은 pH에서부터 좀 더 민감하게 반응하는 것으로 해석할 수 있다. NaOH를 사용하여 더 강염기인 pH 12 이상이 되면 완전 denature 되어서 강산성(pH 1~2) 때와 비슷한 미황색이 된다.

최대 흡수 파장인 590 nm 부근에서 더 자세히 살펴보면, mCherry는 pH인 8.78까지 다소 흡광도가 상승하다가 다시 감소하는 경향을 보이나, 본격적으로 편이가 시작되는 pH 9.88 이전에는 큰 변화가 없었다(Figure 3C). I202T는 중성 pH인 7.41에서 가장 높은 absorbance를 보이며, 그보다 염기성으로 갈수록 지속적으로 흡광도가 하락하는 경향을 보여서 mCherry에 비해서는 더욱 일관성 있고 큰 변화 폭을 보이지만, 역시 편이가 시작되는 pH 9.20 이전에는 큰 변화가 없는데, pH 7과 8을 민감하게 구분하는 지시약이 거의 없다는 것을 고려하면 이미 약염기인 pH 9에서부터 큰 변화를 보이는 것은 충분히 유용한 수준의 민감성이라고 볼 수 있다.

이제까지의 가시적 변화와 흡광 스펙트럼 분석 결과로부터, I202T의 흡광 패턴이 가장 민감하게 변하는 영역은 산성(pH 2~4)과 염기성(pH 8~11) 조건이라는 것을 알 수 있었다. 특히 pH 센서로서 활용될 때에는 최대 흡광 파장인 590 nm에서의 변화를 감지하는 형태가 측

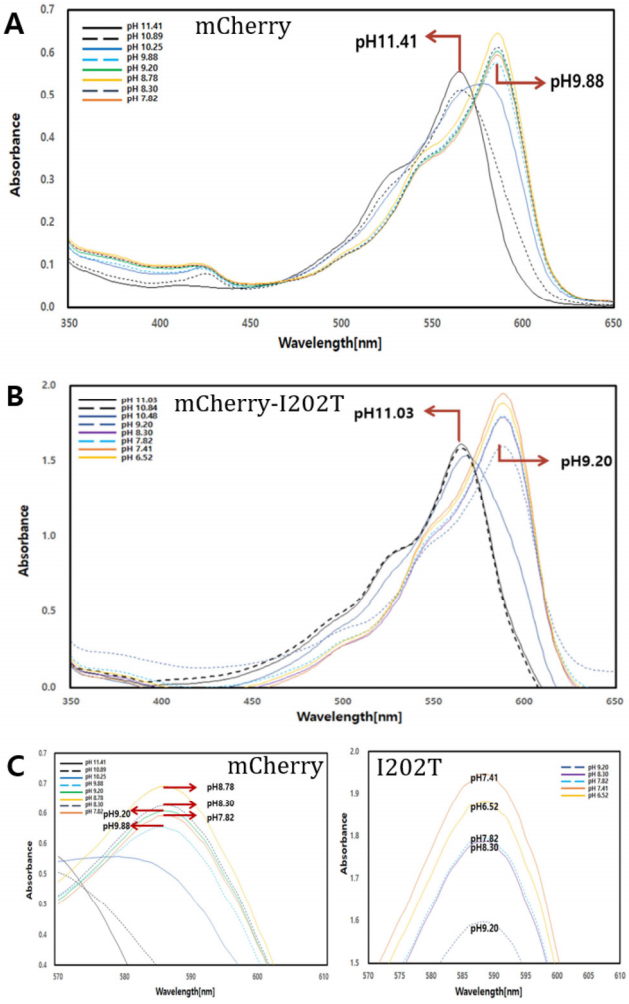

Figure 3. Uv-vis absorbance spectra over basic pH range of mCherry (A) and I202T (B). The detailed change around the absorption maxima is compared (C).

정장비의 단순성과 직관성, 민감도 면에서 가장 효율적일 것이다. 그래서 민감하고 연속적인 변화를 보이는 산성 영역과 염기성 영역을 분리하여, 590 nm에서의 흡광도를 A, pH를 P로 하여 각 범위의 흡광도 변화에 대한 수식을 아래와 같이 최소제곱법을 통해 유도하였다.

$$\text{pH } 2\sim4:\ A = 0.429\ P - 0.573 \tag{1}$$

$$A = -0.188\ P^3 + 1.490\ P^2 - 3.328\ P + 2.405 \tag{2}$$

$$\text{pH } 8\sim11:\ A = -0.071\ P^2 + 1.118\ P - 3.445 \tag{3}$$

산성영역은 pH 4에서부터 더 낮아지면서 거의 선형적으로 흡광도가 감소하기 때문에 단순한 1차 함수 관계인 (1) 식도 충분히 유용하게 예측할 수 있으나(R^2 = 0.970), pH 범위 양 끝에서 항상점에 도달하는 양상은 sigmoid 형태의 함수인 (2) 식이 더욱 잘 표현하고 있다(R^2 = 0.999). 염기성 영역은 청색 편이가 일어나면서 2차 곡선 형태의 (3) 식을 도출할 수 있었다(R^2 = 0.958).

I202T는 일반적인 유기물 pH 지시약과 달리 단백질로서 생체친화

적이며, 특히 세포 단백질과 융합시켜 세포질이나 세포소기관 내 pH를 측정할 수 있는 장점을 가진다. 또한 보통 지시약들이 단일 pH 범위에서만 측정이 가능하지만, I202T는 산성과 염기성 영역 양쪽에서 사용이 가능하다는 것도 특징이다. 이러한 특성을 활용할 수 있는 예로서는, 암세포 세포질에 존재하는 단백질과 융합시켜 각종 항암제 처리에 의한 pH 변화를 측정하는 등의 용도로 사용할 수 있을 것이다. 일반적인 세포 내 단백질들이 흡수하지 않는 가시광선을 사용하여 측정할 수 있기 때문에 간섭 없이 측정할 수 있으며, 스펙트럼을 측정하거나 단일 파장을 모니터링하는 방식 모두 사용 가능하다.

4. 결 론

본 연구의 결과를 통해 수소결합 네트워크를 연결해줄 것으로 기대되는 Ile202Thr 변이가 mCherry의 pH 민감성을 어느 정도로 향상시키는지 확인할 수 있었다. 산성 영역에서는 강한 내산성을 가진 mCherry보다 I202T가 좀 더 많은 변화를 보였으며, mCherry는 pH 3 이하에서 비가역적 응집을 하는 것에 반해 I202T는 가역적으로 변화하기 때문에 pH 센서에 적용하기에 더 유용하다고 볼 수 있다. 염기성 영역에서는 청색 편이가 일어나면서 보다 뚜렷한 변화를 보였으며, I202T가 mCherry보다 더 낮은 pH에서 편이가 발생하는 것으로 미루어 보아, 치환한 Thr의 수산기가 pH 민강성에 영향을 미쳤다는 사실을 간접적으로 확인할 수 있었다.

결론적으로 본 연구를 통해서 I202T는 mCherry 보다 더 우수한 pH 민감성을 가지며, 더 넓은 pH 범위에서 더 큰 스펙트럼 변화와 가역성을 가진다는 것을 통해 I197T의 colormetric pH 센서 probe로의 적용 유용성 및 가능성을 검증하였다. 이후 추가적인 연구를 통해, 치환한 Thr의 수산기가 실험 결과에 영향을 미치는 메커니즘 확인 및 emission 측정 그리고 더욱 세세한 pH 범위에서의 fluorescence data를 정립한다면, mCherry의 장점을 유지한 적색 형광 단백질의 *in vivo* pH 센서 적용 가능성을 더욱 높일 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

이 연구는 한국연구재단의 기초연구사업 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드립니다(2017018140). 이상민과 정민섭은 삼성미래기술육성사업(SRFC-IT1401-52)과 홍익대학교 학술 연구진흥비에 의하여 지원되었습니다.

References

1. N. C. Shaner, R. E. Campbell, P. A. Steinbach, B. N. Giepmans, A. E. Palmer, and R. Y. Tsien, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein, *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1567-1572 (2004).
2. R. E. Campbell, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien, A monomeric red fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 7877-7882 (2002).
3. G. J. Bevis and B. S. Brooke, Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed), *Nat. Biotechnol.*, **20**(1), 83-87 (2002).
4. X. Shu, N. C. Shaner, C. A. Yarbrough, R. Y. Tsien, and S. J. Remington. Novel chromophores and buried charges control color in mFruits, *Biochemistry*, **45**, 9639-9647 (2006).
5. R. Bizzarri, C. Arcangeli, D. Arosio, F. Ricci, P. Faraci, F. Cardarelli, and F. Beltram, Development of a novel GFP-based ratiometric excitation and emission pH indicator for intracellular studies. *Biophys. J.*, **90**(9), 3300-3314 (2006).
6. M. Pereira, D. Tome, A. S. Domingues, A. S. Varanda, C. Paulo, M. A. Santos, and A. R. Soares, A fluorescence-based sensor assay that monitors general protein aggregation in human cells, *Biotechnol. J.*, **13**(4), 1700676 (2018).
7. Y. Kim, K. Song, H. Lee, D. Kim, J. Kim, and M. Chung, Single amino acid replacement transforms mCherry to a far-red fluorescent protein, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **21**(6), 720-725 (2016).
8. G. S. Baird, D. A. Zacharias, and R. Y. Tsien, Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**(22), 11984-11989 (2000).

Authors

Minsub Chung; Ph.D., Associate Professor, Department of Chemical Engineering, Hongik University, Seoul 04066, Korea; minsubc@hongik.ac.kr

Sangmin Lee; M.Sc., Research Assistant, Department of Chemical Engineering, Hongik University, Seoul 04066, Korea; e.sangmin3.6@gmail.com