

생명현상 및 기능연구사업
Studies on Life and Function

NMR 분광학을 이용한 생체분자 구조해석에 관한 연구

NMR Structural Investigation on Functionally
Important Biomolecules

생 명 공 학 연 구 소

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ NMR 분광학을 이용한 생체분자 구조해석에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2000. 9. 15

주관연구기관명 : 생명공학 연구소

주관연구책임자 : 한 규 훈

연 구 원 : 목 헌

연 구 원 : 박 규 환

연 구 원 : 석 재 은

연 구 원 : 이 현

연 구 원 : 조 지 현

연 구 원 : 이 시 형

연 구 원 : 김 도 형

협·공동연구기관명 (1) : 포항공대

협·공동연구책임자 (1) : 최관용, 성영철

협·공동연구기관명 (2) : 미국 유타대

협·공동연구책임자 (2) : B. M. Olivera

협·공동연구기관명 (3) : (주) 종근당

협·공동연구책임자 (3) : 전형식

요 약 문

I. 제 목

NMR 분광학을 이용한 생체분자 구조해석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- (1) 인간 암의 50% 이상에 깊이 관여된 p53 단백질의 Transcriptional Activation Domain (TAD) 의 동력학적 구조적 특성을 규명하여 이러한 "unstructured" 단백질의 일반적 구조모델을 정립하고 항암제 개발에 필요한 기초 지식을 제공한다. (포항공대와 협동연구)
- (2) Neuroscience (신경과학) 연구에 중요한 모델단백질인 nicotinic acetylcholine receptor 단백질과 기질간의 결합기전을 밝히기위하여 바다달팽이 추출 독소단백질인 α -/aA-conotoxin 과 이들의 유사펩타이드들의 정밀 3차원 구조를 NMR 분광학적으로 규명하고, 그에 근거한 신경 및 신경근육 조절제 개발에 필요한 기초지식을 제공한다. (미국 University of Utah 와 협동연구)
- (3) 당뇨병 치료제 개발에 요긴한 혈당강하 작용이 있는 올리고당의 조성 및 구조를 밝혀 국내 생명공학 산업체 연구를 지원한다. (종근당(주) 과 협동연구)
- (4) 이상의 연구를 통해 21세기 인체유전체 연구 (Human Genome Project) 중 structural genomics (or proteomics) 연구에 필수적인 기법인 다차원 NMR 분광학적 (Multidimensional NMR Spectroscopy) 단백질 구조연구 분야의 국내 기술기반을 구축한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- (1) Human p53 TAD 의 N-15 labeling 및 multidimensional NMR 분광법에 의한 동력학적 구조 고찰.
- (2) 다양한 α -conotoxin 시료 (PIVA, GI analogs, EI, AuIB, U11) 의 합성, 정제 및 NMR 실험을 통한 3차원 구조 계산.
- (3) Heteronuclear two-dimensional NMR 기법을 이용한 올리고 당 CKD711 의 조성 및 구조규명
- (4) 우수한 해외 학술논문 발표

IV. 연구개발결과

(1) Transcriptional Activation Domain 분야:

N-15 labeling 된 full-length human p53 TAD 재조합 단백질 시료에 세계 최첨단의 three-dimensional NMR 분광기법인 N-15 edited TOCSY-HSQC, NOESY-HSQC 및 HNHA 를 구사하여 p53 TAD 가 unbound 된 상태에서 단순히 unstructured 되어있지않고 target 단백질 인식에 중요한 amphipathic helix를 함유하고 있음을 밝혀냄으로써 TAD 의 구조-활성 관계에 관한 새로운 비전을 제시함: 해외 우수 학술지인 Journal of Biological Chemistry 지에 게재됨:

J. Biol. Chem., **275**, 29426-29432 (2000).

(2) Conotoxin 분야: 해외 우수 학술지에 논문게재됨.

가. α A-conotoxin PIVA 구조규명:

Biochemistry, **36**, 1669-1677 (1997).

나. Anti-toxic α -conotoxin GI-15 의 구조규명:

Biochemistry, **38**, 11895-11904 (1999)

다. Neuronal α -conotoxin AuIB의 구조규명:

J. Biol. Chem., **275**, 8680-8685 (2000).

라. α/δ subtype selectivity를 가진 α -conotoxin EI 의 구조규명:

J. Biol. Chem. (수정중) (2000년 9월 현재).

(3) 혈당강화 작용이 있는 올리고당 CKD711 의 구조규명 완료

-> 올리고당을 이용한 혈당강화제 개발 ((주) 종근당)에 이바지함.

V. 연구개발결과의 활용계획

추가연구를 통하여 더욱 더 정확한 TAD의 구조-활성 관계 정립 모색 및 nicotinic acetylcholine receptor 단백질과 ligand 간의 상호반응 기전 규명 후, 이에 근거한 structure based drug design 을 통한 항암제 및 신경 조절제제의 설계를 시도하고자 함.

S U M M A R Y

High-resolution NMR spectroscopic techniques have been applied to investigate the structure and dynamics of various biomolecules. Results show that an unbound *full-length* p53 transactivation domain is populated with an amphipathic helix and two nascent turns. The helix is formed by residues Thr18–Leu26, while the two turns by residues Met40–Met44 and Asp48–Trp53, respectively. It is remarkable that these local secondary structures are selectively formed by functionally critical and positionally conserved hydrophobic residues present in several acidic transactivation domains. This observation suggests that such local structures are general features of acidic transactivation domains and may represent specificity determinants (Ptashne, M., and Gann, A. A. F. (1997), *Nature*, **386**, 569–577) that are important for transcriptional activity. The nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are a well-studied family of ligand-gated ion channels comprising a diverse set of molecular subtypes. A large variety of ligands bind to such diverse nAChRs via a mechanism that is yet to be understood. A better understanding of the ligand-binding mechanism would be possible if a suitable three-dimensional structure of nAChR were available. Small peptide toxins of *Conus* origin known as the α - and α A-conotoxins are highly useful tools for exploring ligand–nAChR interactions. A well-defined sub-group of α -conotoxins, referred to as the α 3/5 sub-family conotoxins are major antagonists against neuromuscular receptors. On the other hand, more recently found α A-conotoxins differ from the α 3/5 sub-family conotoxins in the amino acid sequences as well as in their three-dimensional structures. The α A-conotoxins, nevertheless, also target neuromuscular nAChRs like the α 3/5 sub-family. A third sub-family of α -conotoxins known as the α 4/7 sub-family has also been found and is, except for α -conotoxin EI, specific for neuronal nAChRs. Structural comparison among various nAChR ligands is one way of identifying important residues or pharmacophores involved in receptor binding. Unfortunately, varying sizes and physicochemical properties of most nAChR ligands prevent straightforward comparison of their three-dimensional structures. Here, we report high-resolution NMR structures of various α -conotoxins and their analogs in order to delineate receptor–ligand interactions of nAChR. Finally, heteronuclear two-dimensional NMR methods enabled us to assign all the resonances in an oligosaccharide CKD711 with a blood glucose level lowering effect .

C O N T E N T S

CHAPTER I. INTRODUCTION -----	7
Section 1. Transcriptional Activation Domain	
Section 2. α -Conotoxins	
Section 3. CKD711	
Section 4. Structural Genomics	
CHAPTER II. CURRENT STATUS -----	10
CHAPTER III. RESULTS -----	14
Section 1. Transcriptional Activation Domain	
Section 2. α -Conotoxins	
Section 3. CKD711	
CHAPTER IV. PERSPECTIVES -----	21
CHAPTER V. REFERENCES -----	22
APPENDIX [publications attached] -----	24

목 차

제 1 장 서론 -----	7
제 1 절 Transcriptional Activation Domain	
제 2 절 α -Conotoxins	
제 3 절 올리고 당	
제 4 절 Structural Genomics	
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	10
제 1 절 Transcriptional Activation Domain	
제 2 절 α -Conotoxins	
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	14
제 1 절 Transcriptional Activation Domain	
제 2 절 α -Conotoxins	
제 3 절 올리고 당	
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 -----	18
제 1 절 연구개발목표 달성도	
제 2 절 대외기여도	
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	21
제 1 절 Transcriptional Activation Domain	
제 2 절 α -Conotoxins	
제 3 절 올리고 당	
제 6 장 참고문헌 -----	22
부록 [게재논문] -----	24

제 1 장 서론 : 연구의 목적

제 1 절 Transcriptional Activation Domain

생체 내에서 DNA 가 단백질로 발현되는 과정에서 핵심적으로 작용하는 단백질들이 transcriptional factor (TF) 단백질들이다. TF 들은 transactivation domain (TAD), DNA 결합부위, protein-protein 인식부위 그리고 oligomerization domain 등의 몇 가지 domain 을 포함하는 거대한 단백질이다. TF 단백질들의 구조-활성 관계의 정립은 이 단백질들이 암 등 중요한 질병에 관련되어있다는 점 때문에 대단히 중요한 연구분야로 자리잡고 있다 (Mitchell & Tjian, 1989; Kussie et al., 1996; Ptashne and Gann, 1997). TF 단백질들의 구조-활성 관계의 정립을 위하여 그간 X-선 회절학 및 NMR 분광법으로, 여러 transcriptional factor 들의 oligomerization domain 과 DNA-binding domain 에 관한 구조는 철저하게 연구되었으나 (Cho et al., 1994; Lee et al., 1994; Clore et al., 1995), 불행하게도 transcriptional initiation 에 직접 관여되어있는 TAD 의 구조에 관한 연구는 이 단백질들이 특정한 3차원 구조를 갖고있지 않다는 점 때문에 거의 이루어지지 못하고 있다.

특히, TAD 는 보통 globular 단백질들과 달리, 특정한 3차원 구조를 갖고있지 않음에도 불구하고 독립적인 기능 (transcription activity) 을 가지고 있다는 점 때문에 구조생물학적 연구관점에서 아주 특이한 단백질이다. 단백질-단백질간의 인식작용은 서로 보완적인 모양을 가진 두 개의 분자간의 결합에 의해서 이루어져야 하는데, TAD 는 특정한 3차원 구조를 갖지 않는 “unstructured” protein 이면서도 특정한 target protein 만을 인식하는 protein-protein interaction 능력을 가지고있기 때문에 TAD 의 구조-기능 관계에 대한 현재까지의 연구결과는 구조생물학연구의 기본전제인 shape complementarity 에 정면으로 위배되고 있다. 따라서, unstructured 상태에 있는 TAD 가 어떻게 transcription 기능을 가질 수 있는가에 대한 해답을 찾는 것은 암의 발병기전을 이해하기 위해 아주 중요할 뿐만 아니라 단백질의 구조-기능 관계에 대한 새로운 구조생물학적 패러다임을 구축한다는 점에서 대단히 의미 있는 연구이다. 본 연구의 개시 시점 당시 TAD 에 대한 생물학적 기능연구에 관한 연구결과는 방대하였으나 (Triezenberg, 1995; Ptashne and Gann, 1997), 이 단백질의 구조에 대한 정보는 전세계적으로 거의 전무한 상태였고, 이로인해 TAD 의 transcriptional activation 기능과 “unstructured (무구조)” 간의 상관관계 혹은 TF 단백질들의 transactivation 기능에 대해 molecular level 에서 이해가 불가능하였다 (Ptashne and Gann, 1997).

본 과제에서는 첨단 NMR 분광기법을 이용하면 3차원구조가 없는 단백질의 경우에도 각 아미노산의 2차 구조 및 동력학적 성질을 밝혀낼 수 있다는 점에 착안하여 (Farrow et al., 1994) 인류 암의 50% 이상에 관련된 p53 단백질의 TAD에 관한 구조연구를 수행하고자 하였다. TAD 의 구조에 관한 연구는 넓은 의미에서는 최근 몇 년 전부터 발견되기 시작한 일정한 3차원구조를 갖지 않는 단백질 (loosely-folded proteins) (Kriwacki et al., 1996; Daughdrill et al., 1997; Plaxco & Gross, 1997) 에 대한 구조적 정보를 얻고, 이러한 단백질에 대한 구조-기능 상관관계를 정립함으로써, 현재 우리가 알고있는 단백질 구조-활성 상관관계에 관한 지식을 더욱 더 완성시키는 연구가 될 것이

다.

제 2 절 α -Conotoxins

21 세기 생명공학 연구에서 추구하는 중요한 한 분야가 뇌과학 혹은 신경과학 연구 (brain neuroscience) 이다. 뇌과학 연구는 다방면에서 연구가 이루어지고있지만 신경신호를 전달하는 데 핵심적인 매개체인 막 단백질 (membrane proteins) 에 대한 연구없이 정확한 신경신호전달에 관한 지식을 얻을 수 없다. 막 단백질 중 가장 잘 알려져있고 신경과학 연구에서 중요한 모델 단백질이 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) 이다 (Sargent, 1993; Karlin & Akabas, 1995). 이 막 단백질에 대한 연구는 지난 수 십 여년간 진행되어오고있고, nAChR 에 결합하는 agonist 및 antagonist 도 여러종류가 알려져있지만, 그 중에서 1980 연대 초부터 발견되기시작한 바다달팽이 (*Conus*) 유래의 peptide toxin 인 α -conotoxin 은 nAChR receptor 의 여러 가지 subtype 에 대한 선택적 결합능을 갖기 때문에 nAChR을 연구하는 데 특히 요긴한 물질이다 (Olivera et al., 1990; Myers et al., 1993; Groebe et al., 1997; Hann et al., 1997; McIntosh et al., 1999). 본 연구에서는 여러 가지 α -conotoxin 들의 정밀 3차원 구조를 규명하고 nAChR receptor 와의 결합기작을 단백질 구조적 측면에서 고찰함으로써 수용체-기질 인식기작에 관한 정보를 얻어내고, 궁극적으로는 이러한 정보를 이용한 structure based drug design 기법을 시도함으로써 다양한 신경조절제 개발을 시도하고자 한다. nAChR-ligand 간의 인식기작에 대한 연구에서 얻어지는 기초지식은 nAChR 와 같은 4-helix membrane receptor sub-family protein 에 대한 연구에도 유용한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

제 3 절 올리고 당 CKD711

(주) 종근당은 제주도 방선균에서 분리한 천연 올리고 당 (일명 CKD711) 이 혈당조절 활성이 있음을 발견하였고, 이를 이용한 신규 당뇨병치료제의 개발을 위해 CKD711 의 정확한 화학 구조 규명의 필요성을 인지하여 본 연구진과 공동으로 구조규명 연구에 착수하였다.

제 4 절 The Human Genome Project

인류 역사 이래 최고의 소용돌이를 몰고 온 인체유전자 연구 (human genome project) 가 post-genome 시대에 접어들며 단순한 유전자지도를 밝혀내는 수준을 넘어섭에 따라, 이제 이들 유전자들이 발현시키는 단백질들의 구조-기능 관계 규명에 대한 필요성이 그 어느 때보다 절실하게 요구되고있다. 이러한 structural genomics 연구를 위하여 현재 인류에게 부여된 두 가지의 구조규명 방법은 X-선 회절학과 NMR 분광학 뿐이라는 사실에서 보여지듯이 NMR 분광학적 단백질 구조연구기법에 대한 know-how 의 축적은 structural genomics 의 원만한 추진을 위해 필수적인 사항이다. 특히, TAD 의 경우에서와 같이 전체 단백질의 30% 정도를 차지하는 unstructured 단백질의 구조연구가

다른 구조생물학 기법으로는 불가능하다는 점은 NMR 분광학적 단백질 구조연구기법의 국내정착이 중요함을 시사하고있다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 Transcriptional Activation Domain

TAD 는 세포성장기능 조절과 밀접하게 연관된 transcription 초기과정에 관여하는 단백질이고 무엇보다도 암의 발병기전에 관련되어 있기 때문에, 이에 대한 분자생물학적, 생화학적 연구결과는 실로 방대한 양이 축적되어있고 현재도 대단히 빠른 속도로 관련 연구가 진행되고 있다 (Triezenberg, 1995; Ptashne and Gann, 1997). 그럼에도 불구하고, TAD 의 구조-기능 관계에 대한 실마리는 최근까지 찾아지지 못하고 있는 데 그 가장 큰 이유는 대부분의 학자들이 그간 구조생물학의 제 1 인자 격인 X-선 회절법에서 보여주는 "경직된 (rigid) " 단백질 구조에 너무 익숙해져버려 많은 NMR 분광학 연구결과가 지적하고 있는 사실, 즉, 단백질을 포함한 모든 생체분자는 생체내의 용액조건에서는 동력학적 상태 (dynamic conformational ensemble) 로 존재한다는 점을 간과하여왔다는 점을 보여준다.

제 2 절 α -Conotoxins

nAChR 은 신경신호전달에 관련된 대단히 중요한 단백질이기 때문에 전세계 여러 연구실에서 지난 수십 년간 이 단백질에 관련된 연구를 수행해오고 있다. 그럼에도 불구하고, nAChR 의 정확한 기질 인식기작 및 이 단백질이 어떻게 신경신호전달 mechanism 에 관여하는 가에 대하여는 아직도 알려지지 않은 점들이 많다. nAChR을 포함한 이온채널 막 단백질들의 정확한 (high resolution) 3차원구조를 규명하는 것이 지극히 어렵기 때문이다. 현재까지 전 세계적으로 규명된 막 단백질의 수는 불과 10 여개 정도이고, 그나마 모두 정확한 분자인식 기작에 대한 정보를 제공하거나 제약개발에 유용할 정도로 정확한 수준의 구조가 얻어진 경우는 단 한 경우 (K ion channel protein) 뿐이다. 이러한 연유로 대부분의 막 단백질 혹은 수용체 단백질 등에 대한 연구는 단백질 전체의 구조를 규명하려는 방향보다는 이러한 단백질들의 활성부위 (active site) 에 결합하는 요긴한 기질을 발견하고 그것들이 막 단백질과 어떻게 인식작용에 관여하는 가를 연구하는 방향으로 전개되어오고 있다. 또한, site directed mutagenesis 및 affinity labeling 기법을 통해서도 nAChR 의 활성부위 (ligand binding site) 나 ion channel gate 부위에 대한 연구결과가 얻어지고있다. nAChR 에 선택적으로 결합하는 여러 가지 기질들의 사용은 분자량이 250 kDa 이나되는 nAChR 이온채널 막 단백질이 어떻게 신경신호전달에 관여하는 가를 규명하는 연구에 대단히 요긴하다.

지난 10 여 년간 이스라엘의 연구팀을 비롯한 몇 개 팀에서 nAChR을 공략하는 다른 기질 (acetylcholine, bungarotoxin, curare 등)을 이용하여 nAChR-기질 인식기작 연구를 수행해오고 있으나 이러한 nAChR 기질들은 다양한 nAChR subtype 에 대한 선택성이 없거나 약하여, nAChR subtype 과 기질간의 인식작용에 관한 광범위하고 정확한 정보를 제공해주지 못하는 한계점을 가지고 있다. 최근들어 다양한 α -conotoxin 의 발견에 힘입어 이들을 이용한 nAChR-기질 인식기작 연구가 급속히 진척되고 있다

(Groebe et al., 1997; Han et al., 1997; Hann et al., 1997; Jacobsen et al., 1997; Shon et al., 1997; McIntosh et al., 1999). 현재 nAChR 과 기질간의 정확한 인식기작을 규명하는 데 가장 어려운 점은 nAChR 의 3차원구조가 규명되지 못하고 있다는 점이다. 비록, 초저온 전자현미경에 의한 low resolution 구조가 있기는 하나 정확한 단백질-기질 인식기작을 규명하기에는 아직도 충분히 high resolution 구조가 아니다 (Unwin, 1996; Miyazawa, 1999). 한편, nAChR 의 3차원구조는 없으나 그간 많은 affinity labeling, site directed mutagenesis를 통한 연구에서 nAChR 내의 어떤 아미노산 잔기들이 기질과의 결합하는 지는 꽤 많이 밝혀진 상태이다 (Park et al., 2000). 그러나, nAChR 의 3차원 구조가 없으므로 이러한 nAChR 의 잔기들이 3차원 공간에 어떻게 배열되어있고, 또 기질의 어떤 부위와 결합에 참여하는 가 하는 점에 대해서는 아직 답을 얻지못하고 있는 상태이다.

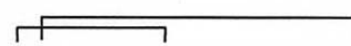

본 연구에서 연구대상으로 삼고있는 α -conotoxin 은 nAChR 의 다양한 subtype 에 선택적 활성을 보이기때문에, α -conotoxin 의 발견은 nAChR 연구에 대단히 획기적인 발견이다. 표 1 에서 보여지는 바와 같이 현재까지 알려진 α -conotoxin 대략 10 여종이다. α -conotoxin 은 분자내의 disulfide bridge 의 pattern 에 따라 크게 3 가지 type 으로 세분되는 데 이 중 $\alpha 3/5$ sub-family 와 αA sub-family 는 신경근육계에 (neuromuscular junction) 존재하는 nAChR를 공략하는 반면에 $\alpha 4/7$ sub-family 는 뇌 및 중추 신경계에 (neuronal) 존재하는 nAChR를 공략한다.

α -Conotoxin 중 가장 먼저 (1981년) 발견된 것은 α -conotoxin GI 인데, 본 연구진과 공동으로 α -conotoxin 에 관한 연구를 수행하고있는 미국의 University of Utah 연구진이 *Conus geographus* 라는 바다 달팽이에서 발견하였다 (표 1 참조). 가장 최근에 발견된 것은 CnI 로 1997 년에 불란서 연구진에 의해 발견되었고 현재도 새로운 toxin 이 계속 발견되고있다. 사실, 표 1 에 주어진 α -conotoxin 들 중에서, CnI (불란서) 과 EpI (호주) 을 제외하면, 나머지 α -conotoxin 은 모두 University of Utah 연구진에 의해 발견되었을 정도로, 본 연구진과 공동연구를 수행하고있는 Utah 연구진은 conotoxin 의 생물학적 연구분야에서 세계적인 선구자적 연구팀이다. 이점은 본 연구를 수행함에 있어서 국제경쟁력을 확보한다는 차원에서 대단히 중요한 요소이며, 이러한 국제공동 연구 덕택에, 지난 5 년간 본 연구팀이 α -conotoxin 의 구조규명 및 nAChR 과의 인식기작 연구를 성공리 수행하여 동 분야에서 세계 최고 group 중의 하나로서 국제경쟁력을 갖출 수 있었다.

본 연구실에서는 1995 년부터 α -conotoxin 의 3차원 구조규명 연구를 수행하기 시작하였으며, EI, AuIB, PIVA, EIVA 및 GI 의 anti-toxic analog 인 GI-15 등 5 개 α -conotoxin 의 정밀 3 차원구조를 규명하여 *Biochemistry*, *Journal of Biological Chemistry* 등의 해외 우수 학술지에 발표하였고 (첨부 논문 참조), Protein Data Bank 에도 deposit 하였다. 본 연구진이 구조를 규명한 5 종류의 α -conotoxin 외에, α -conotoxin GI 의 구조는 Utah 의 Gray 박사에 의해 그리고, α -conotoxin MII 의 구조는 현재 미국 Case Western Reserve University 에 재직하는 한국계 미국인인 손기준 박사가 University of Utah 에 post-doc 으로 재직시 규명하였다. 결국 미국의 University of Utah 와 별개로 구조가 규명된 α -conotoxin 은 MI (일본), CnI (불란서), PnI (호주 University of Queensland), EpI (호주 University of Queensland) 의 4 가지뿐

인 셈이다. 최근 영국 연구팀이 α -conotoxin SI 의 구조를 규명하였으나 사실 SI 의 구조는 굳이 구조를 규명하지 않아도 이미 알려진 α 3/5 sub-family 의 구조에 한 개의 아미노산만 치환하면 homology modeling 기법으로 얻어질 수 있다.

표 1. 현재까지 발견된 α - 및 α A-conotoxin

Name ^a	Sequence ^b	Specificity ^c	Reference ^d
α 3/5 sub-family			
GI	 E CC NPAC GRHYS C*	α_1/γ	17,40,49,50,69,70
MI	GR CC HPAC GKNYS C*	α_1/γ	19, 71
SI	I CC NPAC GPKYS C*	None	8
SIA	Y CC HPAC GKNFD C*	α_1/γ	48
CnIA	GR CC HPAC GKYY S C*	$\alpha_1/\gamma, \alpha_1/\delta$	24
CnIB	CC HPAC GKYY S C*	$\alpha_1/\gamma, \alpha_1/\delta$	24
α 4/7 sub-family			
EI	RDO CC YHPTCNMSNPQ IC*	α_1/δ	13
MII	G CC SNPVCHLEHSN LC*	α_3/β_2	14, 21, 46
PnIA	G CC SLPPCAANNPD YC*	α_3/β_2	16,18,54,55
PnIB	G CC SLPPCALSNPD YC*	α_7/α_7	16,18,20,54,55
AuIA	G CC SYPPCFATNSD YC*	α_3/β_4	15
AuIB	G CC SYPPCFATNP D C*	α_3/β_4	15
AuIC	G CC SYPPCFATNSG YC*	α_3/β_4	15
EpI	G CC SDPRCNMNNPD YC*	$\alpha_3/\beta_2, \alpha_3/\beta_4$	22, 72
α A sub-family			
PIVA	 G CC GSYPNAACHPC SCK DROSYCGQ*	$\alpha_1/\gamma, \alpha_1/\delta$	10-12
EIVA	G CC GPYONAACHOC GCKVGR OY CDROSGG*	$\alpha_1/\gamma, \alpha_1/\delta$	11

a. The first capital letter indicates the species origin.

b. The asterisk indicates an amidated C-terminus.

c. For the α 3/5 sub-family and α -conotoxin EI the specificity is for *Torpedo* receptor.

d. References include reports of three-dimensional structures when available.

이상에서 본 바와 같이 nAChR을 공략하는 α -conotoxin 의 구조-활성 관계에 대한 연구를 수행하고있는 연구팀은 전 세계적으로 5 팀 정도이다. 특히, 호주 University of Queensland 의 연구진은 본 연구실의 가장 강력한 경쟁상대로, 그들도 PnI, EpI 등의

두 개의 α -conotoxin 의 구조를 규명했을 뿐만 아니라 이미 α -conotoxin 에 대한 alanine scanning 등 analog 합성 등을 통해 제약개발 가능성을 타진하는 연구를 수행하고 있다. 호주 이외에 일본, 영국 연구진은 그리 두드러진 연구결과를 발표하고 있지는 않아서 일단은 주 경쟁상대는 아닐 것으로 보이나, 논문 등에 발표되지 않는 어떤 연구를 수행하고 있는 지는 확실치 않다. 불란서의 연구진도 불과 1 개의 toxin 의 구조를 연구하였다는 면에서는 그리 대단한 경쟁상대로 보이지는 않으나, 불란서의 Pasteur Institute 이 nAChR 에 관한 연구를 지난 수십 년간 해오고 있다는 점에서 보면 앞으로 불란서 연구진도 강력한 연구경쟁 상대가 될 가능성은 충분히 있다고 보여진다.

국내에서는 본 연구진 이외에는 α -conotoxin 에 관한 연구는 수행하고 있지 않으나, 최근 일본에서 ω -conotoxin 의 합성 및 구조연구를 주제로 박사학위를 취득한 광주과학기술원의 김재일 박사가 conotoxin 에 관한 연구를 계획하고 있는 것으로 알려져있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 Transcriptional Activation Domain

(1) p53 TAD 는 73 개의 아미노산으로 구성되어있어 2-D NMR 기법으로는 resonance assignment 가 불가능하므로, heteronuclear 3-D NMR 실험을 위하여 최소배지 조건하에서 N-15 labeled p53 TAD를 생산하였다.

(2) N-15 label 된 p53 TAD에 3-D N-15 edited TOCSY-HSQC, NOESY-HSQC 기법 등을 사용하여 proline을 제외한 모든 아미노산에 대한 resonance assignment를 얻고, N-15 T1, T2 relaxation times, N-15/H-1 heteronuclear NOE, CSI (chemical shift index), coupling constants, temperature coefficient를 측정함으로써 p53 TAD 의 구조가 기존의 학설에서 말하듯, 단순한 "unstructured" proteins 이 아님을 밝혀내는 데 성공하였다. 즉, TAD 는 "unstructured"라고 일반적으로 알려져있으나, NMR 분광학을 통하여 자세히 관찰하면 TAD 가 구조가 전혀없다는 통념과는 달리 unbound state 에서도 작은 양이지만 단백질의 활성화에 직결되는 아미노산들이 amphiphatic helix 나 turn 같은 2차 구조를 형성한다는 사실을 밝힘으로서 단백질 구조-활성 연구분야에서 새로운 패러다임 (new view on protein structure) 을 제공하였다.

(3) 이러한 기존 학설의 흐름을 변경시킬만한 흥미로운 결과를 세계적인 최고의 생물학 권위지인 Cell 지에 게재하고자 논문을 제출하였으나, 최종심사에서 associate editor 와의 견해차이로 결국 채택되지 못하였고, 현재 해외 우수학술지인 J. Biol. Chem. 에 게재된 상태이다 (첨부 논문 참조). 이상의 논문 게재 과정에서 시간적으로는 논문 1 편을 발표하기 위하여 많은 시간이 소모되긴 하였으나, transcription 분야에서 세계 최고의 전문가들과 열띤 학술적 공방 속에서 배운 점이 많았다. 특히, 아직 대부분의 생물학자가 단백질의 구조가 well-defined 된 tertiary structure 가 있을 때에만 기능과의 연관성을 생각할 수 있다고 믿고있다는 점이다.

제 2 절 α -Conotoxins

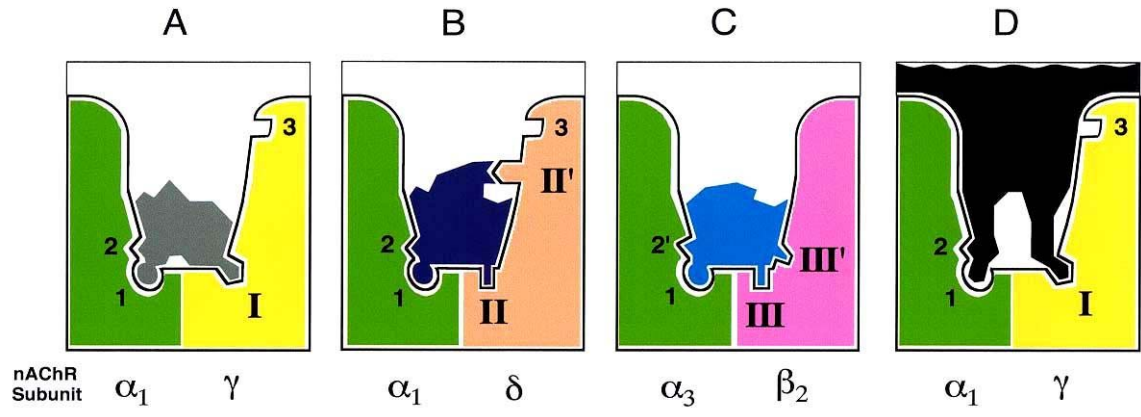
(1) 모든 α - α A-conotoxin 및 그 analog 의 구조규명은 다양한 2-D NMR 실험 (COSY, TOCSY, NOESY/ROESY, PE COSY)을 통한 resonance assignment 와 NOE에서 얻어진 distance 및 torsion angle restraint 등을 사용하여, Distance Geometry (DG), Restrained Molecular Dynamics (RMD), Energy Minimization (EM) 계산과 MARDIGRAS/CORMA 에 의한 NOE back calculation 및 R-factor 계산, PROCHECK 에 의한 구조타당성 검사 등을 통하여 추진되었다.

(2) 특히, PIVA 의 구조는 3 개의 disulfide bridge 를 갖으면서도 2 개의 disulfide bridge를 갖는 다른 α -conotoxin 들처럼 nAChR을 공략하는 α A type conotoxin 의 구조규명이었다는 점에서 흥미로운 연구결과이다 (첨부 논문 참조). 또한, GI-15 의 구조연구 결과는 nAChR 의 α -subunit 의 특정부위가 모든 α -conotoxin 들과 결합하는 공통부위 (alpha subunit selective face, ASSF) 라는 가설을 설정하는 데 핵심적으로 작용하였다. 또한, 이 연구에서는 GI-15 의 구조와 native 의 α -conotoxin GI 구조를 비교함으로써 왜 어떤 ligand 는 독소로 작용하고 다른 ligand 는 항독소로 작용할 수 있는가의 근거를 밝혀냈다. α -Conotoxin GI-15 의 경우, 두 번째 disulfide bridge 의 부재로 인하여 C-terminal tail 이 flexible 하므로, 이러한 dynamic 한 성질을 묘사하기 위해 HSQC 에 의한 C-13 T1, T2 relaxation time 도 측정하였다 (첨부 논문 참조). α -Conotoxin AuIB 의 경우, 얻어진 구조를 α 3 β 2 receptor subtype 에 선택적으로 작용하는 MII 의 구조와 비교하여 어떤 toxin residue 가 β 2 subunit specific 한지를 밝혀내는 흥미있는 결과가 나왔다 (첨부 논문 참조).

(3) α -Conotoxin EI 의 경우, 다른 neuronal toxin 과 같이 α 4/7 sub-family 에 속하면서도 neuromuscular toxin 으로 작용할 뿐만 아니라, neuromuscular nAChR 내의 α 1/ γ subunit interface를 선호하는 다른 neuromuscular toxin 과는 달리 α 1/ δ subunit interface를 선호하는 특이한 활성을 보이므로 규명된 EI 의 구조를 이용하여 α -conotoxin을 구성하는 여러 가지 아미노산 중, 어떤 잔기가 특정한 nAChR subtype을 인식하는 데 중요한 변수로 작용하는가를 규명해내는 데 성공했으며, 이를 근거로 α -conotoxin 은 ASSF 와 NASSF (non- α subunit selective face) 의 두 가지 면을 가진 마치 그리스 신 “야누스 (Janus)” 같은 분자임을 가설화하여 수정된 Macrosite Ligand-Binding Model 을 제시하였다 (그림 1). ASSF 는 모든 α -conotoxin 중 첫 번째 disulfide loop 에 존재하는 XP Ψ motif (X =H/N, P=Proline, Ψ =hydrophobic residue, A/T/V/P) 로 구성되어 있고, NASSF 는 두 번째 disulfide loop 에 존재하는 각기 다른 아미노산으로 구성되어 있다고 보여지는 것이다. 이러한 가설은 이미 다른 연구팀이 얻은 biochemical mutation 연구에 의한 결과와도 잘 일치하고 있다. 즉, ASSF 는 모든 α -conotoxin 을 nAChR 의 α -subunit 에 공통적으로 결합시키는 면에서 중요하고, NASSF 는 다른 α -conotoxin 이 다른 nAChR subtype specificity를 갖는 데 결정적으로 기여한다고 보여진다. 그림 1 에서 A, B, C, D panel 은 각각 α -conotoxin GI, EI, MII 및 α -bungarotoxin 이 nAChR 내의 ligand binding pocket 에 결합되어있는 상태를 도식화하여 표시한 것이다. 아리비아 숫자 1, 2 혹은 2'는 ASSF를 로마자 I, II, II', III, III' 등은 NASSF를 지칭한다. 아리비아 숫자 3 은 α A-conotoxin 의 결합지점으로, α -conotoxin 들은 이 결합지점을 갖고있지않다.

(4) 끝으로, α -conotoxin GI-16 과 U11 의 경우도 위와 같은 NMR 기법으로 resonance assignment 가 완료되었고, 구조계산이 진행중이다.

그림 1. Macrosite Ligand Binding Model for nAChR



제 3 절 올리고 당

올리고 당류는 anomeric proton 의 resonance overlap 이 심하여 NMR 로 구조를 해석하는 데 어려움이 많은 물질이다. 따라서, 흔히 사용되는 COSY, TOCSY, DEPT 등의 기법 외에 현재 국내보유 최고자장의 분광기인 600 MHz NMR 분광기에서 2-D H-1/C-13 HMQCTOCSY 같은 특수한 기법을 통하여서만 구조해석이 가능하였다. 핵자기 공명분광법을 이용하여 구조를 결정하는 본 실험의 목적은 크게 두 부분으로 나뉘어진다. 첫째는 CK-4416의 분자량 측정 결과 알 수 있는 5개의 당이 2, 3-epoxy-3-hydroxymethyl-4, 5, 6-trihydroxy cyclohexane의 양쪽에 어떻게 존재하는지 와 그 존재비는 어떤가 하는 점이며, 두 번째는 당의 종류, 그 연결 순서 및 연결 부위에 관한 것이다. 실험 결과 terminal 당은 anomer가 free rotation을 하여 α 와 β -form을 가진 D-glucose 이고 가운데 부분에 위치한 4개의 당 또한 α -D-glucose 임을 수소 및 탄소의 chemical shift 와 anomer 의 각각의 coupling constant ($^1J_{CH}$ 약 172 Hz) 를 비교한 결과 알 수 있었다.³⁴⁾ C-4의 chemical shift 는 mono α -D-glucose 일 경우 71 ppm 에 있으나 1→4 O-glucosidic bond 일 때는 이 부위에서 downfield shift 하는 경향이 있음이 보고되어 있고, 이는 anomer 에서도 같은 경향이 있으며, CK-4416에서와 잘 일치됨을 알 수 있었다. CK-4416의 구성 성분인 α -D-glucose (E-unit) 와 다른 2, 3-epoxy-3-hydroxymethyl-4, 5, 6-trihydroxy cyclohexane 과의 연결 부위는 HMBC 및 HMQC-NOESY 에서 확인하였으며 이곳이 CK-4416의 1→4 NH-bond인 다른 terminal 부위임을 알았다. 이상의 공명주파수 지정결과가 표 2 에 정리되어있다.

표 2. ^1H & ^{13}C Chemical Shifts of CK4416 at 25°C 600MHz (^1H / ^{13}C)

anomeric ^1H & ^{13}C coupling const.	H1	H2	H3	H4	H5	H6 (CH ₂)
<u>A</u> β -Glc	4.68	3.30	3.79	3.68	3.62	3.78 3.92
$^1J_{\text{CH}}$: 161.2 Hz $^3J_{\text{HH}}$: 8Hz	98.798	77.023	79.195	79.956	77.564	63.712
<u>A</u> α -Glc	5.26	3.60	3.97	3.68	3.96	3.84
$^1J_{\text{CH}}$: 172.5 Hz $^3J_{\text{HH}}$: 3.5Hz	94.930	74.315	76.224	80.050	72.968	63.495
<u>B</u> α -Glc	5.42	3.65	3.98	3.66	3.85	3.09 3.84
$^1J_{\text{CH}}$: 172.4 Hz	102.471	74.505	76.328	79.888	74.198	63.579
<u>C</u> α -Glc	5.41	3.66	3.98	3.68	3.86	3.88 3.82
$^1J_{\text{CH}}$: 172.8 Hz	102.685	74.573	76.328	80.020	74.224	63.453
<u>D</u> α -Glc	5.41	3.66	3.98	3.68	3.86	3.88 3.82
$^1J_{\text{CH}}$: 172.8 Hz	102.717	74.573	76.328	80.020	74.224	63.453
<u>E</u> α -Glc	5.40	3.63	3.74	2.78	3.77	3.91 3.94
$^1J_{\text{CH}}$: 171.1 Hz	103.070	75.551	76.454	62.233	76.033	63.997
<u>F</u> 3.67 4.01 ¹⁾	3.55	3.65		3.94	3.51	3.52 ³⁾
63.240 ¹⁾	56.845	62.130	68.502 ²⁾	74.127	73.492	73.599 ³⁾

(주) 1) CH₂ 2) =C= 3) CH

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

제 1 절 연구개발목표 달성도

번호	세부연구목표 (연구 계획서상에 기술된 연구목표)	달성내용	달성도 (%)
1	p53 transactivation domain	(1) p53 TAD 의 N-15 labeling	100
		(2) p53 TAD 의 3-D NMR 실험	100
		(3) p53 TAD 의 논문 게재 완료	100
2	conotoxin	(1) α-Conotoxin PIVA 구조규명 논문게재 완료	100
		(2) α-Conotoxin GI-15 의 NMR 실험 및 구조계산	100
		(3) α-Conotoxin GI-15 의 논문 게재 완료	100
		(4) α-Conotoxin GI-16 의 NMR 실험 및 해석	100
		(5) α-Conotoxin GI-16 의 구조계산 (진행중)	80
		(6) α-Conotoxin EI 의 NMR 실험 및 구조계산	100
		(7) α-Conotoxin EI 의 논문 제출	95
		(8) α-Conotoxin AuIB 의 NMR 실험 및 구조계산	100
		(9) α-Conotoxin AuIB 의 논문 게재 완료	100
		(10) α-Conotoxin U11 의 구조계산 (진행중)	90
3	올리고 당	(1) 구조해석 완료이후 대량생산 중	100
		(2) 구조규명에 관한 논문작성 중	90

제 2 절 대외기여도

Conotoxin 에 관한 본 연구책임자의 NMR 구조 연구 전문성을 국제적으로 인정받아 conotoxin 구조연구 분야에 관한 국제 학술지의 논문 심사위원으로 위촉되었으며, conotoxin 의 제약개발 잠재력과 관련, 국외 medicinal chemistry 학술지로부터 conotoxin 분야에 관한 review 게재 요청을 받았고, 국제학회에서 초청강연을 하였으며, 국내 생명공학 벤처회사 (주) 및 제약회사로부터 제약개발 공동연구 요청을 받았다.

(1) 논문게재 및 학술 발표 실적 요약

구분	논문게재			학술발표			특허출원			특허등록			기업화	기술료 수입	
	국내	국외	계	국내	국외	계	국내	국외	계	국내	국외	계	건수	건수	금액
1차년도 ('97)	0	1	1	0	1										
2차년도 ('98)	0	0	0	12	3										
3차년도 ('99)	0	3	3	4	1										
총계		4	4	16	6										

(2) 논문게재 실적

구분	국내/국외	논문제목	저자	학술지명 발행년도	권, pp	발행기관	주요내용
1차년도 ('97)	국외	NMR Structure Determination of a Novel Conotoxin, [Pro 7,13] α -conotoxin PIVA	Han, K. Hwang, K. Kim, S. Kim, S. Gray, W. R. Olivera, B. M. Shon, K.	Biochemistry (1997)	36, 1669 - 1677	American Chemical Society	세계 최초로 발견된 신경근육계 nAChR antagonist 인 α -conotoxin PIVA의 정밀 3차원 구조를 NMR 과 computer modeling으로 규명함.
2차년도 ('98)							
3차년도 ('99-00)	국외	NMR Solution Conformation of an Antitoxic Analogue of α -Conotoxin GI: Identification of a Common Nicotinic Acetylcholine Receptor α 1-Subunit Binding Surface for Small Ligands and α -Conotoxins	Mok, K. H., Han, K.	Biochemistry (1999)	38, 11895 - 11904	American Chemical Society	α -Conotoxin 의 analog 중 anti-toxic effect를 갖는 analog 15 의 구조를 NMR 과 computer modeling으로 규명, nAChR α -subunit에 결합하는 ligand motif를 발견함.
	국외	NMR Solution Conformation of α -Conotoxin AuIB, an α 3 β 4 Subtype-Selective Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonist	Cho, J. Mok, K. H. Olivera, B. M. McIntosh, J. M., Park, K. Han, K.	J. Biol. Chem. (2000)	275, 8680 - 8685	ASBMB	nAChR subtype 중 α 3 β 4에만 선택적으로 결합하는 α -conotoxin AuIB의 구조를 NMR 분광학과 computer modeling으로 규명함.
	국외	Local Structural Elements in the Mostly Unstructured Transcriptional Activation Domain of Human p53	Lee, H. Mok, K. H. Muhandiram, H. Park, K.H Suk, J. Kim, D.H. Chang, J. Sung, Y.C. Choi, K.Y. Han, K.H.	J. Biol. Chem. (2000)	275, 29426 - 29432	ASBMB	인간들의 암 중, 50% 이상에 관여되어있는 p53 단백질 transactivation domain을 N-15 label 시킨 후 3차원 NMR 분광법으로 그 동력학적 구조를 밝힘.

(3) 학술발표 실적

이하는 초청강연 만을 수록한 것이며, 이외의 학회 포스터 및 학술발표는 총 11 건 [국내 8, 국외 3] 입니다)

구분	국내/외	학술발표제목	발표자	발표장소	일시	주요내용
1차년도 ('97)	국외	[1] 제 25차 FAOBMB 초청강연: NMR Structural Investigation of Acetylcholine Receptor Targeting Conotoxins	한규훈	필리핀/마닐라	1997. 12. 4	연제 참조
2차년도 ('98)	국내	[1] 제 12 회 한국 자기공명학회 초청강연: Structure (?) of the Human p53 TAD	한규훈	경주/교육문화회관	1998. 2. 13	연제 참조
	국내	[2] '98 Symp. NMR in Biol. Sys. 초청강연 High resolution conformation of α -conotoxin EI, the only $\alpha/8$ Binder		서울/호암관	1998. 4. 8	
	국내	[3] 숭실대 분자설계연구센터 초청 세미나 Is NMR Any Good?		서울/숭실대	1998. 4. 14	
	국내	[4] 대한 화학회 81회 춘계총회 초청강연 Conotoxins tageting the nicotonic acetylcholine receptor: Solution conformation of α - and αA -conotoxins determined by NMR spectroscopy		서울/이화여대	1998. 4. 24	
	국내	[5] 한국생화학회 제 11회 학술토론회 The NMR Structure of the p53 Transcriptional Activation Domain: A Novel Structural Model for TADs in the Unbound State		설악산/대명콘도	1998. 6. 26	
	국외	[6] 제 18차 Intl. Conf. on Magnetic Resonance in Biological Systems 학회 초청강연: Mapping Out the Ligand Binding Site in the nAChR using α -/ αA -conotoxins		일본/동경	1998. 8. 25	
3차년도 ('99)	국내	[1] 목포대학교 화학과 특강 Conotoxins tageting the nicotonic acetylcholine receptor: Solution conformation of α - and αA -conotoxins determined by NMR spectroscopy	한규훈	목포/목포대	1999. 10. 8	연제 참조
	국내	[2] 제 48차 대한 약학회 초청강연 Probing Ligand Binding Sites in nAChR using Three Dimensional Structures of α -/ αA -Conotoxins		서울/교육문화회관	1999. 10.22	
	국내	[3] 충남대학교 생화학과 특강 Protein Structures by NMR Spectroscopy		대전/충남대	1999. 11.15	
	국외	[4] 2000 년 Int. Chemical Congress of Pacific Basin Societies 학회 초청강연 (2000. 12. 예정) Local Structural Elements in the Mostly Unstructured Transcriptional Activation Domain of Human p53		미국/하와이	2000. 12.16 (초청수락)	

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 Transcriptional Activation Domain

본 과제에서 얻어진 연구 결과는 다음 단계 연구에 중요한 기반자료로 사용되게 될 것이다. TAD 분야에서는 p53 TAD 와 유사한 Herpes Simplex Virus (HSV) 와 Human Foamy Virus 의 TAD 에 관한 구조연구를 계속하여 p53 TAD에서 얻어진 결과, 즉, unbound state에서 TAD의 general structural model 이 “unstructured” protein 이 아니라 적은 양이지만 아주 중요한 secondary structure를 가지고 있다는 사실을 재차 확인하고, mouse double minute-2 등과 같은 target protein 과 binding study 도 병행하여 bound state 에서는 과연 TAD 가 어떤 구조를 갖는 가에 대한 해답을 얻고자 연구를 계속 추진할 것이다. 향후연구에서는 미국 최고의 생명공학 메카인 NIH 연구팀과 밀접한 협력을 통해 세계최고의 800 MHz NMR 분광기를 이용하여, DNA binding domain 및 oligomerization domain 존재 하에서의 whole p53 단백질의 구조연구도 시도될 것이다.

제 2 절 α -Conotoxins

Conotoxin 분야 연구에서는 본 연구진의 α -conotoxin 구조연구에 관한 기초연구 수준이 거의 세계 최고수준에 도달하였고, 따라서, peptidomimetic analog 합성, 정제 및 활성-구조 연구, receptor 의 ligand-binding domain 합성 및 재조합 단백질 생산을 통해 receptor-toxin 인식 기작연구를 계속하여, 기초연구 지식기반을 견고히 하며, structure-based drug design을 시도하고자 한다. 특히, receptor-ligand 결합반응에 관한 molecular level 에서의 구체적인 정보를 얻어, structure-based drug design 에 의한 신경질환 치료제의 개발 가능성을 면밀히 검토할 계획이다. 이런 연구와 병행하여, 추후 제품개발 공동연구를 추진할 산업계의 파트너도 물색중이다.

제 3 절 올리고 당

(주) 종근당은 밝혀진 올리고 당의 구조를 근거로 이 제품을 대량생산하고있다.

제 6 장 참고문헌

- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P. D., and Pavletich, N. P. (1994). *Science*, **265**, 346–355
- Clore, G. M., Ernst, J., Clubb, E., Omichinski, J. G., Poindexter Kennedy, W. M., Sakaguchi, K., Appella, E., and Gronenborn, A. M. (1995). *Nature Struct. Biol.* **2**, 321–333
- Daughdrill, G. W., Chadsey, M. S., Karlinsey, J. E., Hughes, K. T., and Dahlquist, F. W. (1997). *Nature Struct. Biol.*, **4**, 285–291
- Farrow, N. A., Muhandiram, R., Singer, A. U., Pascal, S. M., Kay, C. M., Gish, G., Shoelson, S. E., Pawson, T., Forman–Kay, J. D., and Kay, L. E. (1994) *Biochemistry*, **33**, 5984–6003
- Groebe D.R., Gray W.R. and Abramson S.N. (1997) *Biochemistry* **36**, 6469–74.
- Han, K., Hwang, K.–J., Kim, S.–M., Kim, S.–K., Gray, W.R., Olivera, B.M., Rivier, J.E., and Shon, K.–J. (1997) *Biochemistry* **36**, 1669–77.
- Hann R.M., Pagan O.R., Gregory L.M., Jacome T. and Eterovic V.A. (1997) *Biochemistry* **36**, 9051–6.
- Jacobsen, R., Yoshikami, D., Ellison, M., Martinez, J., Gray, W.R., Cartier, G.E., Shon, K.–J., Grobe, D.R., Abramson, S.N., Olivera, B.M. and McIntosh, J.M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 22531–7.
- Karlin, A., and Akabas, M.H. (1995) *Neuron* **15**, 1231–44.
- Kriwacki, R. W., Hengst, L., Tennant, L., Reed, S. I., and Wright, P. E. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 11504–11509
- Kussie, P. H., Gorina, S., Marechal, V., Elenbass, B., Moreau, J., Levine, A. J., and Pavletich, N. P. (1996). *Science*, **274**, 948–953
- Lee, W, Harvey, T. S., Yin, Y., Yau, P., Litchfield, D., and Arrowsmith, C. H., (1994) *Nature Struct. Biol.* **1**, 877–890
- McIntosh, J. M., Santos, A. D., and Olivera, B. M. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **68**,

Mitchell P. J., and Tjian, R. (1989). *Science* **245**, 371–378

Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., and Unwin, N. (1999) *J. Mol. Biol.*, **288**, 765–786

Myers, R.A., Cruz, L.J., Rivier J.E. and Olivera, B.M. (1993) *Chem. Rev.* **93**, 1923–36.

Olivera, B.M., Rivier J., Clark, C., Ramilo, C.A., Corpuz, G.P., Abogadie, F.C., Mena, E.E., Woodward, S.R., Hillyard D.R. and Cruz L.J. (1990) *Science* **249**, 257–63.

Park et al., (2000) *J. Biol. Chem.* (under revision)

Plaxco, K. W., and Gross, M. (1997). *Nature*, **386**, 657–658

Ptashne, M., and Gann, A. A. F. (1997). *Nature*, **386**, 569–57

Sargent, P.B. (1993) *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 403–43.

Shon, K.-J., Koerber, S.C., Rivier, J.E., Olivera, B.M. and McIntosh, J.M. (1997) *Biochemistry* **36**, 15693–700.

Triezenberg, S. J. (1995) *Curr. Opinion Genet. Dev.*, **5**, 190–196

Unwin, N. (1996) *J. Mol. Biol.*, **257**, 586–596

주 의

1. 이 보고서는 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.