

단백질 모델 화합물들의 압력에 따르는 용해도의 변화

宋宜謙 · 金 健

고려대학교 이과대학 화학과

(1984. 8. 13 접수)

Effect of Pressure on the Solubilities of Protein Model Compounds

Sunho Song[†] and Keon Kim

Department of Chemistry, Korea University, Seoul 132, Korea

(Received August 13, 1984)

요 약. N-아세틸-*l*-페닐 알라닐-*l*-페닐 알라닌 메틸 에스테르(APhPhMe)와 N-아세틸-*l*-페닐 알라닌메틸에스테르(APhMe) 그리고 N-아세틸-*l*-페닐알라닐-*l*-알라닌메틸에스테르(APhAlMe)를 모델화합물로 사용하여 단백질 변성을 연구하였다. APhPhMe는 압력이 증가하면 물에서의 용해도가 증가하였고 APhMe는 반대로 크게 감소하였지만 APhAlMe는 측정된 온도에서 거의 변화가 없었다. APhPhMe의 부피 변화는 20, 30, 40, 50°C에서 각각 -0.9, -1.47, -1.09, -1.52ml/mole 이었고 APhMe는 20, 30, 40°C에서 +6.0, +7.0, +7.5ml/mole 이었지만 APhAlMe는 세 온도 모두 0에 가까웠다. 이러한 결과를 소수성 상호작용과 펩티드 결합에 의한 수소결합으로 설명하였다. 즉 펩티드 결합만 존재하거나, 비교적 큰 소수성 작용기 1개와 펩티드 결합 1개가 동시에 있을 경우에는 펩티드 결합사이의 수소결합이 소수성 상호 작용보다 우세하였고, 펩티드 결합과 소수성 작용기가 동시에 1개씩 증가할때는 소수성 상호작용이 우세한 것 같다.

ABSTRACT. N-Acetyl-1-phenylalanyl-1-phenylalanine methyl ester (APhPhMe), N-acetyl-1-phenylalanine methyl ester (APhMe) and N-acetyl-1-phenylalanyl-1-alanine methyl ester (APhAlMe) were used as model compounds to investigate a protein denaturation under various temperatures and pressures. Overall, the solubility of APhPhMe in water increased with increasing pressure and that of APhMe decreased. However, the solubility of APhAlMe was nearly same. The values of volume change of APhPhMe were -0.9, -1.47, -1.09, -1.52ml/mole at 20, 30, 40 and 50°C, respectively, and those of APhMe were +6.0, +7.0, +7.5ml/mole at 20, 30 and 40°C, respectively. But those of APhAlMe were nearly zero at the measured temperature. The experimental result seems to be explained by the hydrophobic interaction and hydrogen bond of peptide bonds. In the compounds which have only peptide bonds and which have both a pretty large hydrophobic group and a peptide bond in the molecules, the hydrogen bond between peptide bonds is more dominant than the hydrophobic interaction. However, when the number of peptide bond and hydrophobic group increase simultaneously, the hydrophobic interaction seems to be more dominant.

1. 서 론

단백질의 안정성에 영향을 미치는 여러 요인 중에서 소수성 상호작용과 펩티드 결합의 수소 결합이 커다란 영향을 미치지만 그중에서 소수성 상호작용이 주된 요인이라는 것이 거의 모든 과학자들의 일치된 견해이다.¹ 온도나 용매 때문에 생기는 단백질의 변성은 이 소수성 상호작용으로 설명이 잘되지만², 압력에 의한 변성은 소수성 상호작용만으로 설명하는데 문제점이 많다.³ 간단한 지방족 화합물⁴이나 방향족 화합물⁵을 소수성 상호작용의 모델로 하여 얻은 열역학적 자료와 압력에 의한 단백질의 변성과는 다음과 같은 차이가 있다. 첫째로는 단백질 변성에 수반되는 부피의 변화가 매우 작다는 점인데 이것은 단백질 변성때 소수성 작용기의 일부만이 물쪽으로 드러난다는 주장과, 지방족 작용기와 방향족 작용기가 부피 변화에 있어서 반대의 효과를 보일 것이라는 견해^{6,7}가 아세트페논의 실험 자료⁵와 어느 정도 일치하고 있다. 둘째로는 모델화합물의 결과가 2,000~3,000 기압에서 물에 대한 최대 용해도를 갖는데 이것은 단백질의 변성이 대부분 더 높은 압력에서 일어난다는 점을 설명하지 못하고 있다. 이에 반하여 전형적인 수소 결합 화합물인 디케토포페라진 (이하 DKP 라 약함)의 경우 작은 양의 부피 변화와 4,500기압에서 최소의 용해도를 보인다고 보고⁸ 하였는데 이 경우도 단백질의 변성을 알아내는데 미흡한 점이 많다. 특히 1-페닐-2-아세트아미도-3-부탄온(이하 PAB 라 약함)의 경우 구조상으로 소수성 상호작용이 훨씬 더 크게 작용하리라 예상하였지만 DKP와 똑같은 결과를 보여 주었다.⁹ 따라서 소수성 상호작용이나 수소 결합 어느 하나만으로 압력에 의한 단백질 변성을 설명하지 못하고 있다.

본 연구자는 펩티드 결합과 소수성 작용기를 동시에 갖고 있는 화합물인 N-아세틸-L-페닐알라닌 메틸에스테르(이하 APhMe 라 약함)와 여기에서 소수성 작용기와 펩티드기가 같은수로 증가한 N-아세틸-L-페닐 알라닐-L-페닐알라닌 메틸 에스테르(APhPhMe) 그리고, N-아세틸-L-

페닐알라닐-L-알라닌 메틸 에스테르(APhAlMe)를 모델화합물로 하여 높은 압력에서의 용해도 변화로부터 압력에 의한 단백질 변성의 기초 자료를 제공하고자 한다.

2. 실험

물질의 합성. N-아세틸-L-페닐 알라닌(APhOH)은 Weinstein의 방법¹⁰을 이용하였고 L-알라닌 메틸에스테르 염화물(AIMeCl)은 Zaslal의 방법¹¹으로 APhMe는 APhOH로부터 Huang의 방법¹²으로, APhPhMe는 Kim¹³의 방법으로 합성하였다. APhAlMe는 APhOH와 AIMeCl을 디서크로헥실카르보디이미드로서 축합시켰다.¹⁴ 합성한 물질은 IR(Perkin Elmer 599B)과 NMR(Varian EM 360A, 60MHz)로 확인하였고, 물에서 두번씩 재결정하여 측정 시료로 사용하였다.

압력장치. Harwood Eng. Co. 제품⁹을 사용하였고 온도 조절은 Polyscience 제품인 Polytemp. (온도조절 범위 $\pm 0.1^\circ\text{C}$)로서 하였으며 압력의 최종 전달 물질은 n-헥산 (Hayashi Pure Co. HPLC 용)을 사용하였다.

용해도 측정. 용해도는 Cary 17DX 자외선분광광도계(Varian Co.)로서 측정하였으며 사용셀은 원통형 석영셀로서 그 길이와 물질의 최대 흡수 파장 및 흡광계수는 Table 1과 같다. 최대흡수 파장 및 흡광계수는 온도와 압력에 따라 변하지 않았다.

용매의 압축에 대한 보정. 높은 압력에서는 용액의 수축 정도가 상당히 크기 때문에 일정한 압력하에서 용액의 흡광도는 용액의 수축에 대한 보정을 해야 한다. 그러나 용액에 있는 용질의 양이 상당히 작으므로 용액의 수축은 용매의 수축과 같다고 보고 용매인 물의 비부피를 Kell¹⁵과 Lind¹⁶의 값으로 보정하였다.

3. 결 과

흡광도 및 용해도. 측정된 흡광도는 Table 2 (APhMe), Table 3 (APhPhMe), Table 4 (APhAlMe)에 있다. 물의 수축효과를 고려한 용해도를 Table 5와 Fig. 1(APhMe), Table 6

과 Fig. 2 (A_{Ph}PhMe), 그리고 Table 7 과 Fig. 3(A_{Ph}AlMe)에 실었다. 용해도는 A_{Ph}Me의 경우 압력이 증가할수록 크게 감소하였고 이것은 DKP⁸와 PAB⁹와 똑같은 경향을 보여주고 있다. A_{Ph}PhMe의 용해도는 압력이 증가하면 용해도가 증가하고 3,500 kgcm⁻² 이상에서는 완만한 증가현상을 보이며 A_{Ph}AlMe의 경우 거의 변화가 없다. 상대적인 경향성을 보여주기 위하여 Fig. 4에 DKP, PAB, A_{Ph}Me, A_{Ph}PhMe 그리고 A_{Ph}AlMe의 1kg·cm⁻²에 대한 각각의 상대적 용해도를 나타내었다.

부피변화. 부피변화를 나타내기 위하여 수용액에서 용질의 용해도가 활동도와 같다는 가정과,

Table 1. Experimental conditions

	λ_{max} (nm)	ϵ_{max} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Length of cell (cm)
A _{Ph} PhMe	258	387.3 ¹³	3.35
A _{Ph} Me	258	161.9	0.1
A _{Ph} AlMe	256.5	266.0	1.0

Table 2. Absorbancy of A_{Ph}Me in water

Press. (kg·cm ⁻²)	20°C	30°C	40°C
1	0.681	0.833	1.021
	0.682	0.841	1.020
500			0.983
			0.981
1000	0.454	0.475	0.729
	0.454	0.475	0.731
1500	0.412	0.420	0.632
	0.410	0.419	0.628
2000	0.355	0.363	0.534
	0.352	0.363	0.534
2500	0.313	0.311	0.459
	0.312	0.309	0.459
3000	0.293	0.288	0.413
	0.290	0.288	0.414
3500	0.283	0.265	0.378
	0.288	0.266	0.378
4000	0.262	0.247	0.341
	0.262	0.248	0.341
4500		0.230	0.311
		0.231	0.311

고체 상태의 물질의 활동도가 1이라 가정하였다.

Table 3. Absorbancy of A_{Ph}PhMe in water

Press. (kg·cm ⁻²)	20°C	30°C	40°C	50°C
1	0.420	0.355	0.457	0.523
	0.423	0.347	0.452	0.526
	0.421		0.453	
1000	0.447	0.402	0.495	0.580
	0.447	0.405	0.494	
	0.446	0.402		
1500	0.459	0.421	0.516	0.599
	0.458	0.418	0.513	0.599
	0.459		0.513	
2000	0.472	0.439	0.521	0.635
	0.472	0.440	0.520	0.637
	0.472	0.441	0.522	
2500	0.487	0.455	0.537	0.657
	0.488	0.457	0.531	0.656
	0.488		0.536	
3000	0.500	0.461	0.548	0.669
	0.503	0.464	0.549	0.669
	0.501	0.464		
3500	0.514	0.471	0.564	0.677
	0.514	0.475	0.563	0.677
4000	0.524	0.473	0.581	0.665
	0.525	0.473	0.580	0.695
4500	0.530		0.594	

Table 4. Absorbancy of A_{Ph}AlMe in water

Press. (kg·cm ⁻²)	20°C	30°C	40°C
1	1.871	1.845	2.120
	1.872	1.846	2.116
500	1.939		2.198
	1.940		2.220
1000	1.983	1.932	2.233
	1.979	1.932	2.237
1500	2.011	1.961	2.268
	2.008	1.957	2.273
2000	2.037	1.995	2.309
	2.037	1.997	2.300
2500	2.073	2.045	2.367
	2.084	2.043	2.367
2650	2.076		
	2.084		
3000		2.036	
		2.038	
3300	2.102		
	2.107		
3500		2.063	
		2.069	
4000	2.172	2.102	
	2.175	2.096	
4500	2.180	2.124	
		2.126	

Table 5. Solubilities of APhMe in water ($\times 10^4$ mole fraction)

Press. (kg·cm ⁻²)	20°C	30°C	40°C
1	7.585	9.302	11.44
	7.596	9.392	11.43
500			10.79
			10.77
1000	4.858	5.101	7.859
	4.858	5.101	7.878
1500	4.336	4.435	6.701
	4.313	4.424	6.606
2000	3.679	3.776	5.578
	3.647	3.776	5.578
2500	3.199	3.191	4.729
	3.188	3.170	4.729
3000	2.957	2.918	4.203
	2.927	2.918	4.212
3500	2.824	2.655	3.803
	2.873	2.664	3.803
4000	2.585	2.446	3.391
	2.585	2.455	3.391
4500		2.255	3.064
		2.264	3.064

Table 6. Solubilities of APhPhMe in water ($\times 10^6$ mole fraction)

Press. (kg·cm ⁻²)	20°C	30°C	40°C	50°C
1	5.837	4.946	6.390	7.344
	5.879	4.835	6.320	7.385
	5.850		6.329	
1000	5.969	5.386	6.658	7.835
	5.969	5.425	6.644	
	5.954	5.386		
1500	6.028	5.549	6.827	7.961
	6.014	5.508	6.786	7.961
	6.028		6.786	
2000	6.104	5.699	6.790	8.314
	6.104	5.711	6.779	8.341
	6.104	5.724	6.804	
2500	6.212	5.825	6.905	8.485
	6.221	5.850	6.827	8.471
	6.221		6.980	
3000	6.298	5.825	6.957	8.534
	6.334	5.866	6.969	8.534
	6.309	5.866		
3500	6.401	5.889	7.081	8.539
	6.401	5.936	7.069	8.539
4000	6.451	5.846	7.211	8.667
	6.463	5.846	7.200	8.667
4500	6.460		7.301	

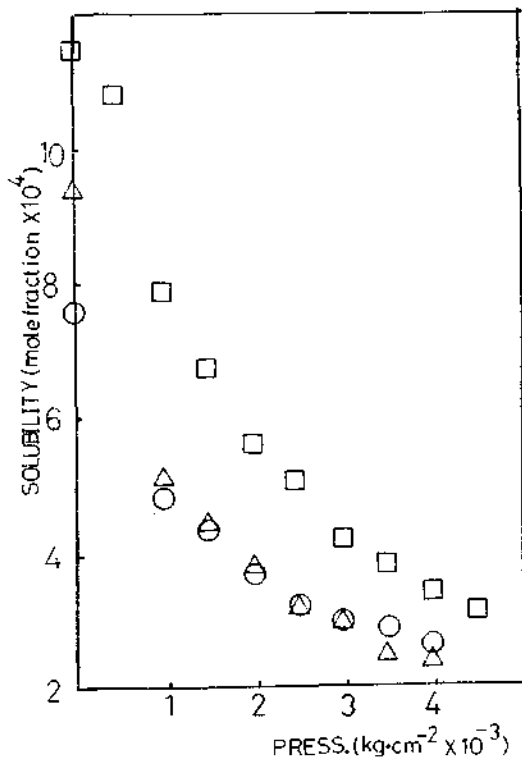


Fig. 1. Solubilities of APhMe in water. (○: 20°C, △: 30°C, □: 40°C).

Table 7. Solubilities of APhAlMe in water ($\times 10^4$ mole fraction)

Press. (kg·cm ⁻²)	20°C	30°C	40°C
1	1.268	1.254	1.446
	1.269	1.255	1.443
500	1.287		1.469
	1.288		1.484
1000	1.290	1.263	1.465
	1.289	1.263	1.468
1500	1.288	1.260	1.464
	1.286	1.258	1.467
2000	1.285	1.263	1.468
	1.285	1.265	1.463
2500	1.289	1.277	1.484
	1.296	1.275	1.484
2650	1.286		
	1.291		
3000		1.255	
		1.257	
3300	1.283		
	1.286		
3500		1.258	
		1.261	
4000	1.304	1.267	
	1.306	1.263	
4500	1.296	1.268	
		1.269	

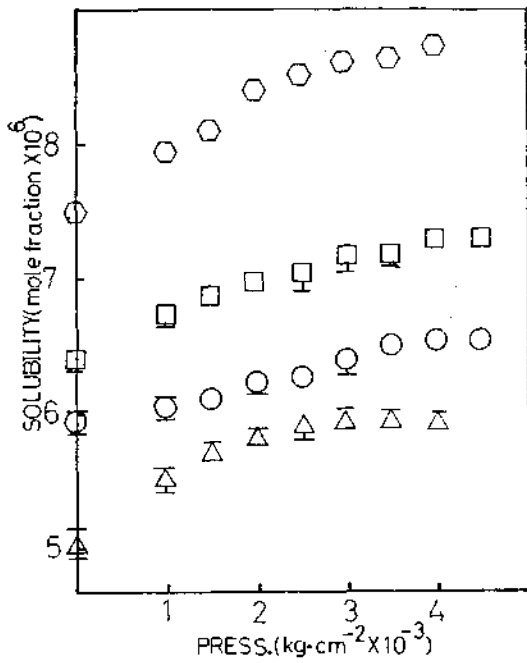


Fig. 2. Solubilities of APhPhMe in water. (○ : 20°C, △ : 30°C, □ : 40°C, ◇ : 50°C).

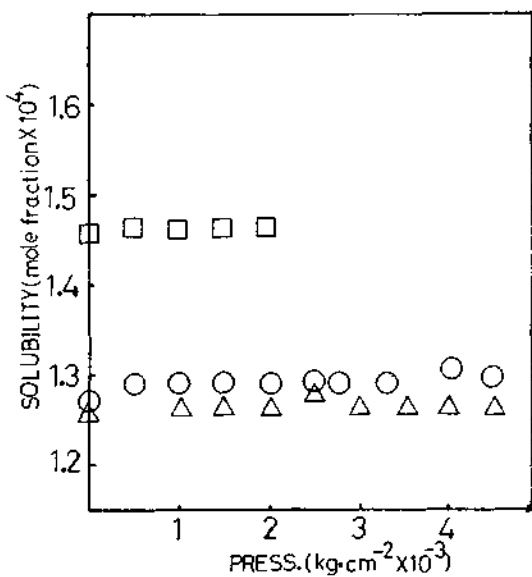


Fig. 3. Solubilities of APhAlMe in water. (○ : 20°C, △ : 30°C, □ : 40°C).

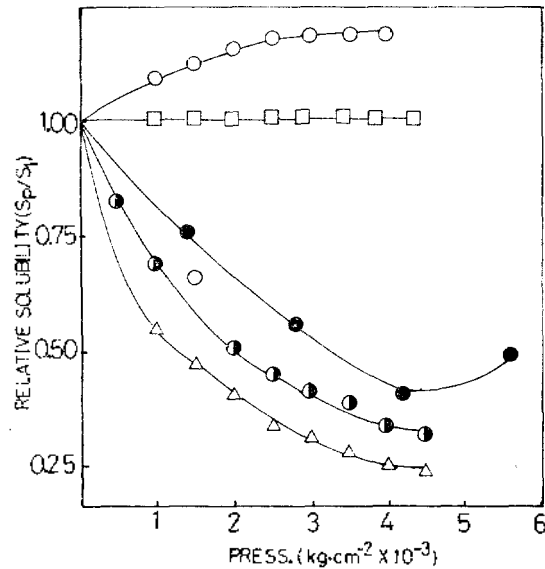
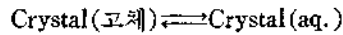


Fig. 4. Relative solubility of APhPhMe (○), APhMe (△), APhAlMe (□), PAB (●)⁹ at 30°C and DKP (●)⁸ at 25°C.

용액화과정.



$$\begin{aligned} \text{평형상수 (K)} &= \frac{\text{Crystal (aq.)의 활동도}}{\text{Crystal (고체)의 활동도}} \\ &= \text{Crystal (aq.)의 활동도} \\ &= \text{Crystal (aq.)의 용해도} = S \end{aligned}$$

따라서 자유에너지 변화 $\Delta G = -RT \ln S$ 이며 용해도는 Kauzmann이 제시한바대로 물분율로 표시하였고 부피 변화는 다음식으로 부터 구하여 그 결과를 Table 8에 나타내었다.

$$\Delta V = \left(\frac{\partial G}{\partial P} \right)_T = -RT \left(\frac{\partial \ln S}{\partial P} \right)_T \quad (1)$$

4. 논 의

변성 상태를 열역학적인 관점에서 볼때 평형상수에 대한 일정한 온도에서의 압력의 효과는 식 (1)로 나타낼 수 있다. 여기에서의 부피 변화는 반응물질 자체의 부피 변화와, 반응물질과 용매 사이의 상호 작용에 의한 부피 변화의 합이다. 또 식 (1)은 온도와 평형상수 사이의 관계인 식

(2)와 일치한다.

$$\left(\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right)_p = \frac{\Delta H}{RT^2} \quad (2)$$

여기에서 ΔH 는 반응 과정에 수반되는 엔탈피 변화이다.

식(1)에 의하면 압력이 증가하면 계의 부피가 감소하는 방향으로 계의 반응이 진행될 것이다. 즉 수소결합, 소수성 상호작용, 그리고 이온결합 등을 수반하여 좀 더 구조화된 상태를 형성할 것으로 기대할 수 있다. 여러 실험의 결과는^{4,8,17} 상대적으로 수소 결합, 소수성 상호작용, 이온결합에 의해 이루어진 부피변화, 엔탈피 변화의 예를 보여주었고 그때 일어나는 결합을 형성할 때의 ΔV 와 ΔH 의 부호는 Table 9와 같다. 소수성 상호작용에 의해 생기는 부피 변화가 1,000~3,000 기압에서 반전되지만 수소 결합에 의해 형성될 때의 변화는 소수성 상호작용과 이온결합의 결과와 반대이다. 그러므로 압력이 증가하면 수소결합 형성이 더 잘 일어나고 소수성 상호작용과 이온결합이 약해짐을 알 수 있다.¹⁷

모델 화합물로 사용한 APhMe, APhPhMe 그리고 APhAlMe 모두 큰 소수성기를 갖고 있으므로 펩티드 기에 의한 효과보다 훨씬 더 크게 작용하리라 예상할 수 있다. 그러나 에스테르형인 APhMe의 결과가 거의 비슷한 구조를 갖고 있는 케톤 형의 PAB⁹와 비슷한 경향을 보여주고 있으나 이것이 전형적인 수소결합 화합물인 DKP와 똑같은 경향을 보여주고 있다는 것은 상당히 흥미로운 일이다. 전형적인 수소결합 화합물인 DKP는 DKP 자체가 C=O...H-N 사이의 수소결합에 의하여 고분자 형태로 이루어졌으며 이 DKP-DKP 사이의 수소결합은 수용액에서 압력을 받으면 DKP-물 사이의 수소결합보다 강해져서 용해도가 감소하다가 4,500 기압 이상에서는 용해도가 증가하는데 이것은 높은 압력에서 물의 구조 변화에 기인한 것으로 설명하고 있다.⁸ 이런 점을 미루어 볼때 PAB와 APhMe는 비록 소수성기가 더 크지만 펩티드기와 카르보닐기가 물과 효과적으로 수소결합을 잘하고 있으며 이 수소결합이 소수성기가 물쪽으로 드리키는 것을 방해하고 있는 것처럼 보인다. 그

Table 8. Volume changes of APhPhMe, APhMe and APhAlMe in water (ml·mole⁻¹)

	20°C	30°C	40°C	50°C
APhPhMe	-0.90	-1.47	-1.09	-1.52
APhMe	+6.0	+7.0	+7.5	
APhAlMe	Nearly 0			

Table 9. Signs of ΔV and ΔH accompanying hydrogen bond, hydrophobic bond and ionic bond formation¹⁷

	ΔV	ΔH
Hydrogen bonds	-	-
Hydrophobic bonds	+*	+
Ionic bonds	+	+ or -

*Reversed at pressures above 1000~3000 atm.

러나 이것에 대한 직접적인 증거는 없다. 이 APhMe로부터 펩티드기와 작은 소수성기인 메틸기가 한개씩 증가한 APhAlMe의 부피 변화는 거의 없다. 또한 펩티드기와 큰 소수성 작용기인 벤질기가 있는 APhPhMe의 경우 음의 부피변화를 보여주는 사실은 소수성 상호작용이 더 우세함을 알 수 있다. 이것은 아마도 펩티드기와 카르보닐기가 물과 수소결합을 잘하고 있고 물과 소수성기들의 접촉에 의해 소수성 상호작용이 동시에 이루어졌을 것으로 생각되는데, 소수성기가 많기 때문에 수소결합이 소수성기와 물과의 접촉을 차폐시키지 못한 것으로 생각된다.

부피 변화의 값이 상당히 작다는 점은 이미 각 작용기에 대한 부피변화의 크기¹⁴들이 그대로 합인 효과로 나타나지 않음을 보여주고 있으며 이러한 사실은 이미 발표된 결과^{4,5}와 일치하고 있다. 또 부피가 작은것은 일부만이 물과 접촉하여 일어날 수 있고, 소수성 상호작용과 수소결합의 부피 변화 효과가 반대의 효과를 보여주기 때문에 정량적인 값은 모르지만 서로 상쇄효과를 보여준 것으로 생각되며 이것은 단백질의

부피 변화가 작은점과 일치한다.

5. 결 론

높은 압력에서 단백질의 안정성이 소수성 상호작용과 펩티드 결합에 의한 수소 결합을 동시에 고려해야 한다는 점은 여러차례 언급^{9,13}되어 왔다. 본 연구자는 여기에서 다음과 같이 결론을 내릴 수 있다.

첫째, 벤질기와 펩티드기가 한개씩 있는 경우와 펩티드기만을 갖고 있는 화합물(APhMe, PAB, DKP)의 경우 펩티드기에 의한 수소결합이 소수성 상호 작용보다 더 우세하지만, 펩티드기와 작은 소수성기인 메틸기가 증가하는 경우 그 효과가 거의 상쇄된다. 그리고 더 큰 소수성기가 작용할때는 소수성 상호작용이 더우세하다.

둘째, 부피 변화가 상당히 작은것은 그 일부만이 불과 접촉했을 경우와, 소수성 상호작용과 수소결합이 서로 반대의 효과를 보여줬을 것으로 생각되며 이는 단백질의 부피 변화가 작은점과 일치한다.

인 용 문 헌

1. W. Kauzmann, *Adv. Protein Chem.*, **14**, 1 (1959).
2. C. Tanford, "The Hydrophobic Effect," 2nd Ed., John Wiley and Sons, N. Y., (1980).
3. K. Hermans, "High Pressure Chem.," 467, H. Kelm Ed., D. Reidel Pub. Co., Boston, (1978).
4. K. Kim, Ph. D. Thesis, Princeton Univ. (1979).
5. S. W. Kang, Master Thesis, Korea Univ. (1982).
6. G. Weber, F. Tanaka, B. Y. Okamoto and H. G. Drickamer, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **71**, 1264 (1974).
7. O. D. Kasarda, *Biochem. Biophys. Acta*, **217**, 535 (1970).
8. K. Suzuki, M. Tsuchiya and Y. Kondo, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **43**, 3083 (1970).
9. 이인자, 강상욱, 신두순, 김건, 대한화학회지, **26**(5), 296(1982).
10. B. Weinstein and A. E. Pritchard, *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1015 (1972).
11. M. Zaslal, J. Kolc, F. Korenczki, V. B. Cerneckij and F. Sorm, *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, **32**, 843 (1967).
12. H. T. Huang, R. J. Foster and C. Niemann, *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 105 (1952).
13. 김동운, 송선호, 최원식, 김건, 이공논집, **24**, 183 (1983).
14. Sunho Song, Master Thesis, Korea Univ. (1984).
15. G. S. Kell and E. Whalle, *J. Chem. Phys.*, **62**(9), 349 (1975).
16. T. Griendley and J. E. Lind Jr., *J. Chem. Phys.*, **54**, 3983 (1971).
17. K. Suzuki and Y. Taniguchi, *Symp. Soc. Exp. Bio.*, **26**, 103 (1972).