

Poly(D-glutamic acid)-Fe(II) 복합물의 형성과 안정도 상수에 관하여

曹鍾守[†] · 金養雄

전남대학교 고분자 공학과
(1987. 3. 30 접수)

Poly(D-glutamic acid)-Fe(II) Complex Formation and Its Stability Constant

Chong-Su Cho[†] and Seon-Ung Kim

Department of Polymer Engineering, Chonnam
National University, Kwangju 505, Korea

(Received March 30, 1987)

요 약. 수용액에서 Fe(II)-poly(D-glutamic acid) (PGA) 복합물 형성이 pH와 농도에 따라서 흡수와 원이색성 분광 광도계로 확인되었으며, 철 이온과 복합물 형성에 의한 PGA의 구조 변화와 안정도 상수도 검토되었다. PGA와 Fe(II) 사이에 복합물이 형성된 후 pH 4.3에서는 α -helix를 파괴(α -helix 파괴 효과)하고 pH 5.7에서는 α -helix를 유도(α -helix 유도 효과)하는 것을 알 수 있었다. α -helix의 PGA 구조가 random coil의 PGA 구조 보다 전 안정도 상수 값이 큰 것으로 보아 random coil의 PGA 구조에서 더욱 안정된 복합물을 형성하고 있음을 알 수 있었다.

ABSTRACT. Fe(II)-poly(D-glutamic acid) (PGA) complex in aqueous solution has been investigated as functions of pH and concentration of Fe(II) by using absorption and circular dichroism spectroscopies. The helix-breaking interaction occurred at pH 4.3 while the helix-directing one occurred at pH 5.7 after forming complex between PGA and Fe(II). The relationship between conformation change of PGA by forming complex with Fe(II) and complex constants for the above system was studied. As a result, stability constants in random coil structure of PGA are larger than those in α -helix structure. This result indicates that the random coil structure of PGA-Fe(II) complex shows more stable complex than α -helix one.

서 론

생체내에는 여러 종류의 금속이온이 존재하여 단백질과 상호작용하면서 산소의 운반과 저장, 촉매작용, 질소의 고정, 근육의 수축, 광합성 등의 중요한 역할을 담당하고 있다는 것이 밝혀진 이래¹⁻⁴ 이러한 복잡한 생물학적인 기능을 좀더 쉽게 이해하기 위하여 생체외에서 복합물 형성에 관한 연구가 단백질의 모델화합물로서 간

단한 poly(α -amino acid)인 poly(D-glutamic acid) (PGA), poly(L-lysine) (PLL) 등을 이용하여 많이 진행되어 왔다. Wada 등⁵에 의하여 처음으로 PGA가 금속이온과 복합물을 형성함으로써 PGA의 2차구조가 변한다는 것이 밝혀진 이래 Inoue 등⁶, Branca 등⁷에 의하여서도 확인되었다. 또한 Sigel 등⁸은 PGA-Cu(II)계에서, Pispisa 등⁹은 PGA-Fe(III)계에서 PGA의 구조 변화와 촉매 기능과의 관계가 검토되었다. PLL

에서는 Hatano 등¹⁰⁻¹¹에 의하여 집중적으로 PLL-Cu(II)계에서 PLL의 구조 변화와 부제산화 반응과의 관계가 검토되었고 Palumbo 등¹²에 의하여서도 PLL에 Cu(II)가 배위함으로 PLL의 α -helix가 random coil로 전이됨이 밝혀졌다. 이처럼 고분자의 2차구조에 따라 촉매작용이 다르게 나타난다는 것이 밝혀진 이래 다른 연구자들도, 고분자와 금속과의 복합물 형성에 있어서 고분자의 2차구조에 영향을 주는 요소로서 pH, 이온강도, 배위자의 종류, 금속이온의 종류, 농도, 고분자 측쇄의 길이등에 관하여 수 많은 연구가 진행되어 왔으나 복합물 형성에 따른 고분자의 2차구조와 안정도 상수와의 관계에 대하여 살펴 본 것을 찾아 볼 수 없어 본 연구에서는 PGA-Fe(II)복합물 형성에 있어서 PGA의 구조변화와 안정도 상수와의 관계를 살펴보고자 한다.

실 험

poly(D-glutamic acid) (PGA)의 합성

PGA는 γ -methyl-D-glutamate를 Kawai 등¹³의 방법에 의해 NCA 법으로 γ -methyl-D-glutamate N-carboxy anhydride를 만든 후 이것을 dioxane 중에서 triethylamine를 개시제로 사용하여 중합하고 다시 염기로 탈 methyl화 하여 합성하였다. 점도식¹⁴ $[\eta] = 2.24 \times 10^{-3} M^{0.53}$ 으로 구한 PGA의 평균 분자량은 약 100,000이었고 이때 점도는 dichloroacetic acid(DCA)를 용매로 25°C에서 측정되었다.

시 약

본 실험에 사용된 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 日本 純正化學株式會社の 純正一級시약이 그대로 사용되었으며 0.1N-NaOH 표준용액은 Anachemia Montcal社의 특급시약이 그대로 사용되었다.

circular dichroism(CD) 측정

250nm~200nm 사이에서 PGA-Fe(II)복합물 형성에 의한 PGA 구조 변화는 CD spectroscopy JASCO 500-A model로 측정되었으며 이때 0.1 mm 석영 cell이 사용되었다.

ultraviolet(UV) 측정

PGA-Fe(II)복합물의 UV spectra는 UV spectroscopy(Varian社 Super Scane 3 model)로 측정되었다.

PGA-Fe(II)복합물에 대한 안정도 상수는 Gregor 등¹⁵⁻¹⁶이 변형한 Bjerrum 법에 의하여 측정되었다.

결과 및 고찰

Fe(II)함량에 따른 PGA의 구조변화

Fig. 1은 PGA가 완전 α -helix 구조를 갖는 pH 4.3에서 Fe(II)와의 복합물에서 PGA의 구조 변화를 CD spectra로 살펴 본 것으로 그림에 나타난 바와 같이 PGA 단독에서는 전형적인 α -helix가 되는데 철의 함량이 많아짐에 따라 α -helix가 44.8%에서 25.4%로 감소되었다. Fig. 1의 결과를 222nm에서 흡수를 나타내는 α -helix를 가지고 계산한 helicity와 철의 함량과의 관계를 Fig. 2에 또한 나타냈다.

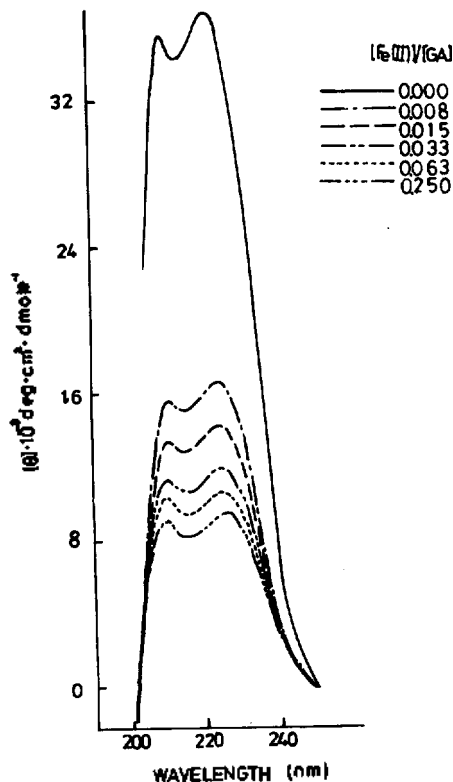


Fig. 1. CD spectra of PGA-Fe(II) as a function of $[\text{Fe(II)}]/[\text{GA}]$ ratio at pH=4.3 and at 25°C: $\text{Fe(II)} = (\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

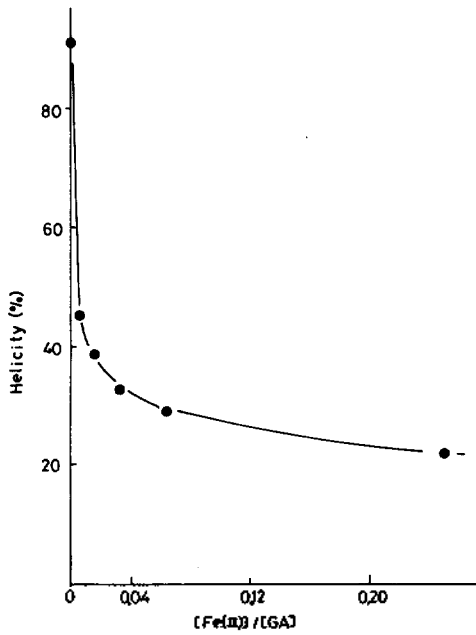


Fig. 2. Percent helicity of PGA plotted against the [Fe(II)]/[GA] ratio at pH=4.3 and at 25°C.

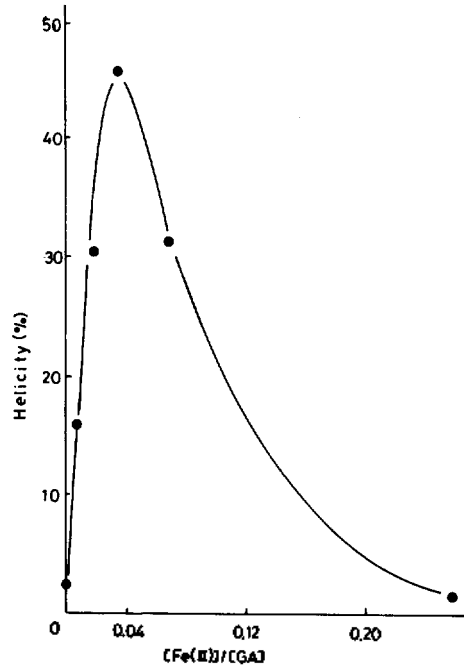


Fig. 4. Percent helicity of PGA plotted against the [Fe(II)]/[GA] ratio at pH=5.7 and at 25°C.

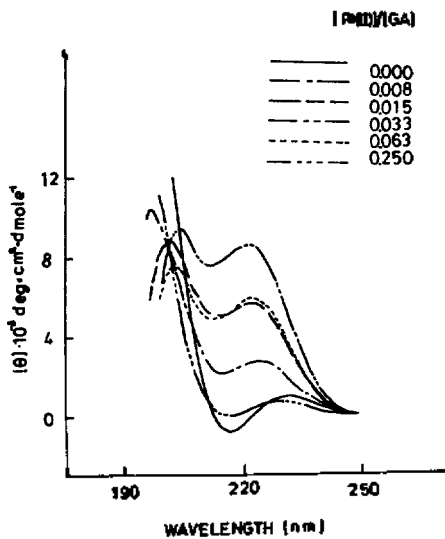


Fig. 3. CD spectra of PGA-Fe(II) as a function of [Fe(II)]/[GA] ratio at pH=5.7 and 25°C: Fe(II) = (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O.

pH5.7에서 PGA의 구조 변화

Fig. 3은 PGA가 거의 random coil 형태를 갖는 pH5.7에서 철(Fe(II))의 배위에 따른 PGA

의 구조변화를 나타낸 것으로 PGA의 단독에서는 random coil 형태를 보여주고 있으나 철의 함량이 많아짐에 따라 α-helix가 증가하다가 [Fe(II)]/[GA]의 값이 0.033을 넘으면서 부터는 감소하는 것을 볼 수 있었다. 여기에 대한 철의 함량과 helicity와의 관계를 나타낸 것이 Fig. 4이다. Fig. 4에 나타난 바와같이 철의 함량이 증가함에 따라 helicity가 증가하다가 [Fe(II)]/[GA]의 값이 0.033을 넘으면서 부터는 감소했다. 이상과 같이 철이온과의 복합물 형성에 의하여 PGA의 구조 변화가 있었는데 pH4.3에서는 철의 함량이 많아짐에 따라 α-helix가 파괴되었고 pH5.7에서는 α-helix가 유도됨을 알 수 있었다. 이는 pH4.3에서는 철이 주로 PGA의 main chain에 있는 질소에 배위되고 pH5.7에서는 PGA의 side chain에 있는 carboxyl기의 산소에 배위되기 때문¹⁷⁾이라고 생각된다.

UV spectra를 통한 PGA-Fe(II)복합물

Fig. 5는 PGA-Fe(II)복합물을 pH4.3과 5.7에서 UV spectra로 살펴 본 것으로서 Fig. 5에 나타난 바와같이 pH4.3이나 5.7에서 PGA의

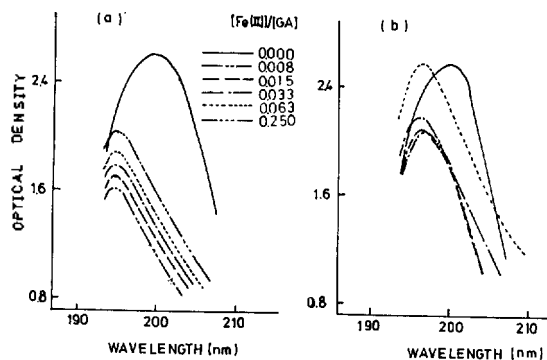


Fig. 5. Absorption spectra of PGA-Fe(II) as a function of $[\text{Fe(II)}]/[\text{GA}]$ ratio at pH=4.3 (a) and pH=5.7 (b): $\text{Fe(II)} = (\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

단독은 200nm에서 흡수 peak를 나타내나 PGA-Fe(II)복합물에서는 복합물의 형성으로 인하여 195nm인 단파장으로 shift되는 경향을 살필 수 있었다. 이는 PGA와 Fe(II)이 복합물의 형성으로 전자 전이가 일어나기 때문이라고 생각된다.

생성곡선과 평균배위수

Fe(II)이온과 PGA의 복합물 생성반응계에 대한 pH적정 곡선으로부터 Gregor 등의 변형 Bjerrum 법¹⁸에 의해 금속이온들에 배워진 배위자의 평균수인 Bjerrum의 생성함수(\bar{n})를 구하고 $-\log \frac{[\text{H}^+\text{A}]}{[\text{H}^+]}$ 에 대하여 plot하여 변형된 Bjerrum의 생성곡선을 Fig. 6에 나타내었으며 Fig. 6에 나타낸 곡선으로부터 구한 값들을 Table 1에 나타내었다. Table 1에 나타난 바와 같이 철의 함량이 증가함에 따라 입체장해를 나타낸 $\log b_1/\log b_2$ 값과 전 안정도 상수 K 값은 감소하다가 증가하는 것을 볼 수 있었으며 helix (%)는 역으로 증가하다가 감소하는 것을 볼 수 있었다.

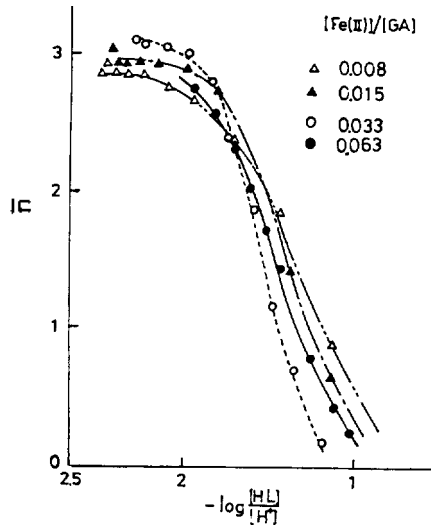


Fig. 6. Modified Bjerrum plots for PGA-Fe(II) as a function of $[\text{Fe(II)}]/[\text{GA}]$ ratio at pH=5.7 and at 25°C.

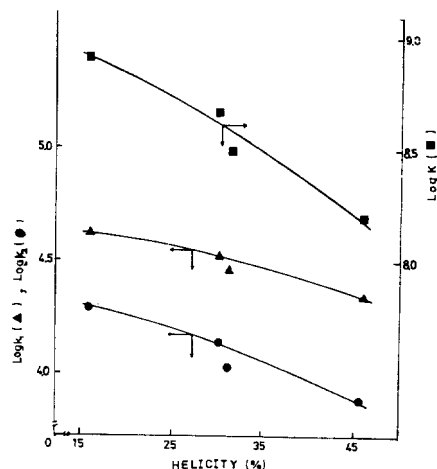


Fig. 7. Complexation constants of PGA-Fe(II) plotted against helicity of PGA at pH=5.7 and at 25°C.

Table 1. Complexation constants of Poly(D-glutamic acid) -Fe(II) Complex at pH=5.7

$T_{\text{Fe(II)}}/T_{\text{HL}}$	Helix (%)	$\log b_1$	$\log k_1$	$\log b_2$	$\log k_2$	$\log B$	$\frac{\log b_1}{\log b_2}$	$\log K$
0.008	15.7	-0.99	4.61	-1.31	4.29	-2.30	0.76	8.90
0.015	30.1	-1.06	4.52	-1.46	4.14	-2.54	0.74	8.66
0.033	45.5	-1.24	4.36	-1.72	3.88	-2.96	0.72	8.24
0.063	31.4	-1.15	4.45	-1.57	4.03	-2.72	0.73	8.48

$$b_1 = \frac{[\text{FeA}_1][\text{H}^+]}{[\text{Fe}^{2+}][\text{H}^+\text{A}]}, \quad b_2 = \frac{[\text{FeA}_2][\text{H}^+]^2}{[\text{FeA}_2][\text{H}^+\text{A}]}, \quad B = b_1 \times b_2, \quad k_1 = \frac{b_1}{K_s}, \quad k_2 = \frac{b_2}{K_s}, \quad B = k_1 k_2 K_s^2.$$

Helicity 와 안정도 상수와의 관계

Fig. 7 은 helicity 와 안정도 상수와의 관계를 나타낸 것으로 Fig. 7 에 나타낸 바와같이 $\log k_1$ 는 helicity 가 증가함에 따라 큰 변화는 없었으나 $\log k_2$ 에서는 변화를 볼 수 있었는데 이것이 전 안정도 상수 K 값에 영향을 미치고 있다고 생각되며 helicity 가 증가함에 따라 전 안정도 상수값이 감소하는 경향을 볼 수 있었는데 이것은 PGA 가 α -helix 의 구조보다는 random coil 형태에서 더욱 안정된 복합물을 형성하고 있기 때문이라고 생각된다.

결 론

PGA 와 Fe(II) 복합물 형성에 따른 구조 변화와 안정도 상수와의 관계에 대한 연구 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. PGA-Fe(II) 복합물 형성에 있어서 철의 함량이 많을수록 pH4.3 에서는 α -helix 를 파괴하고(α -helix 파괴효과) pH5.7 에서는 α -helix 를 유도함을 알 수 있었으며 α -helix 보다 random coil 형태에서의 PGA 가 더욱 안정된 복합물을 형성함을 알 수 있었다.

인 용 문 헌

1. M. F. Perutz, M. G. Rossman, A. F. Cullis, H. Muirhead, G. Will and A. C. T. Nortz, *Nature*, **185**, 416 (1960).
2. J. C. Kendrew, *Sci. Am.*, **205**, 96 (1961).
3. M. F. Perutz, H. Muirhead, J. M. Cox and L.

- C. C. Coaman, *Nature*, **219**, 131 (1968).
4. 三枝武夫, 土田英俊, 平井英史編, “高分子金屬錯體” 化學增刊, p.105, 化學同人 (1978).
5. H. Takesada, H. Yamazaki and A. Wada, *Biopolymers*, **4**, 713 (1966).
6. S. Inoue, K. Yamaka and M. Miura, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **45**, 1314 (1973).
7. M. Branca, M. E. Marini and B. Pispisa, *Biopolymers*, **15**, 2219 (1976).
8. H. Sigel and G. Blauer, *Helvetica Chimica Acta*, **51**, 1246 (1968).
9. M. Barteri, M. Farinella and B. Pispisa, *Biopolymers*, **16**, 2569 (1977).
10. T. Nozawa and M. Hatano, *Makromol. Chem.*, **141**, 21 (1971).
11. T. Nozawa and M. Hatano, *Makromol. Chem.*, **141**, 31 (1971).
12. M. Palumbo, A. Cosani, M. Terbojevich and E. Peggion, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 937 (1977).
13. T. Komoto, Y. Kojima, T. Kawai, *Makromol. Chem.*, **179**, 1861 (1978).
14. 中島章夫, 田中清治, 第17回 高分子學會 年次大會 講演要旨集, p.473 (1968).
15. H. P. Gregor, L. B. Luttinger, and E. M. Loebl, *J. Phy. Chem.*, **59**, 366 (1955).
16. E. M. Loebl, L. B. Luttinger, and H. P. Gregor, *J. Phy. Chem.*, **59**, 5591 (1955).
17. T. Hiraoki, M. Kaneko and K. Hikichi, *Polymer Journal*, **11**, 397 (1979).
18. J. Bjerrum, “Metal-Ammine Formation in Aqueous solution”, Hasse and Son, Copenhagen p.49, (1957).