

아미노산의 치환이 단백질 folding 에 미치는 영향

권 대 영
(이화학연구소)

I. 서 론

단백질의 구조연구와 단백질의 기능성 변환 연구는 오래전부터 활발하게 진행되어 왔다. 단백질의 구조연구는 x-선 회절분석기(x-ray crystallography)와 핵자기 공명분석(NMR)의 발달로 많은 단백질의 구조가 밝혀져 있으나 단백질의 기능성 개선 연구는 그리 발달되지 않았다. 단백질의 기능성 증진 연구는 식품분야에서 제일 먼저 시작되었는데, Kinsella는 대두분리 단백을 이용하여 초산화 또는 인산화를 통하여 단백질의 물리화학적 특성을 개선하였다¹⁾. 그러나 단백질의 화학적 특성(효소활성도, 항원-항체결합 반응능력, 호르몬의 제어능력 그리고 이들 단백질의 안정성 등) 개선에는 미치지 못하고, 단순한 물리적 특성(거품 형성능, 소화력, 다른 소재와의 결합력, 에멀전 형성능력 등)의 개선밖에 미치지 못하였다²⁾. 그렇지만 최근 분자생물의 발전에 힘입어 단백질 연구의 필요성이 급격히 대두되고 있으며, 실제로 연구가 가장 활발한 분야가 단백질 관련 분야이다.

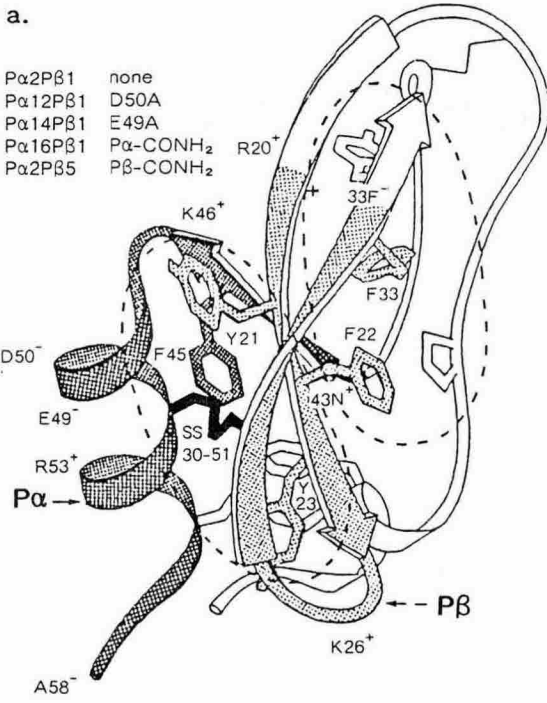
DNA의 전사(transcription)와 조절(regulation)에 관련된 DNA 결합(binding) 단백질을 비롯 oncogene(발암작용에 관여하는 유전자)에 관련된 단백질(oncogenic protein), AIDS 바이러스 활성화에 관여하는 tat-protein, 면역 특이성(immuno-specificity)에 관여하는 면역 단백질, 그리고 단백질의 folding pathway에 관한 모델 단백질의 연구가 그 기능과 관련하여 활발하게 진행되고 있다.

식품분야에서는 대두 amylase의 기능성 증진,

전분 가공용 효소의 열안정성 증진, protease, lipase의 기능성 증진과 열안정성 증진에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다³⁾.

이러한 연구의 방법으로 간단한 단백질은 그 전체를 이용하나 분자량이 조금 큰 단백질은 대부분 단백질의 모델을 만들어 연구하고 있다. 그 이유는 原 단백질(authentic protein)이 물에 잘 녹지 않거나 결정화시킬 수 없어서 구조분석이 쉽지 않기 때문이다^{4,5)}. 단백질의 folding 연구는 단백질 구조분석 연구와 단백질 공학(protein engineering)의 가장 기초연구이며, DNA, 의학, 농학, 효소연구에 있어서 가장 중요하다. 단백질 folding의 최종 목표는 단백질의 구조와 기능과의 관계를 확립하는 것이다. 이 목적을 달성하기 위하여 folding intermediate의 구조를 분석하는 것은 단백질 folding의 첫번째 해결해야 할 과제이다. 이 연구를 위하여 세종류의 단백질(ribonuclease, lysozyme 및 trypsin inhibitor)이 제일 많이 연구되고 있다. 그러나 이중에서 단백질 folding pathway intermediate 연구가 가장 잘되어 있는 것이 소췌장(bovine pancreatics) trypsin inhibitor(BPTI)의 S-S 결합(disulphide bond)에 의한 refolding 형태이다(그림 1)^{6,7)}.

BPTI의 folding에 있어서 가장 최초로 intermediate를 형성하는 것이 30의 아미노산 Cys와 51의 Cys과의 S-S 결합에 의한 folding intermediate([30-51]로 표시한다)이다⁹⁾. Oas와 Kim은 일찍이 [30-51]의 유사화합물(analogue)를 합성하였는데(여기서는 P α P β 라 부른다)⁵⁾. 이는 먼저 BPTI의 α -helix 부분(P α)과 β -sheet 부분(P β)



b. Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys
 -Met-Arg-Thr-Ala-Gly-Gly-Ala P α : [43-58]
 Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-
 -Leu-Cys-Gin-Thr-Phe P β : [20-33]

그림 1. **a.** Schematic drawing of BPTI⁸⁾ showing the regions of BPTI corresponding to P α P β . It has six positive charges and four negative charges. Most of the hydrophobic cores in BPTI is contained in the region of BPTI. Some important amino acids are described on the BPTI as one-letter abbreviation of amino acid. The numbers after one-letter abbreviation are the amino acid sequential numbers. **b.** Amino acids sequences corresponding to P α and P β . Abbreviations on the left upside are the names of BPTI mutants.

을 BPTI의 구조근접지도(contact map; 그림 2)에 근거하여 design 한 다음 화학합성하여 30-51의 S-S 결합에 의하여 연결하여 BPTI의 analogue를 만들었다(그림 1). Authentic [30-51]은 물에 잘 녹지 않으나 이 단백질 모델(P α P β)은 물에 매우 잘

녹으며, 서로 엉키지도 않는다⁵⁾. 따라서 2D-NMR에 의한 구조분석 연구가 가능하다¹⁰⁾. NMR 분석결과 P α P β 의 구조는 원래의 [30-51]과 매우 비슷한 형태를 보여주고 있으며, 또한 이 결과는 왜 [30-51]이 BPTI의 folding에 있어서 첫번째 S-S 결합 중 가장 많이 차지하고 있으며, 그리고 folding에 있어서 반드시 intermediate를 거쳐서 folding되는 이유를 밝혀냈다⁵⁾. P α P β 는 BPTI의 절반가량으로(전체 58개의 아미노산중 30개의 아미노산) 구성되어 있으며, 대부분 소수기 중심(hydrophobic core)를 포함하고 있다(그림 1).

P α 는 BPTI의 아미노산 43-58의 16개 아미노

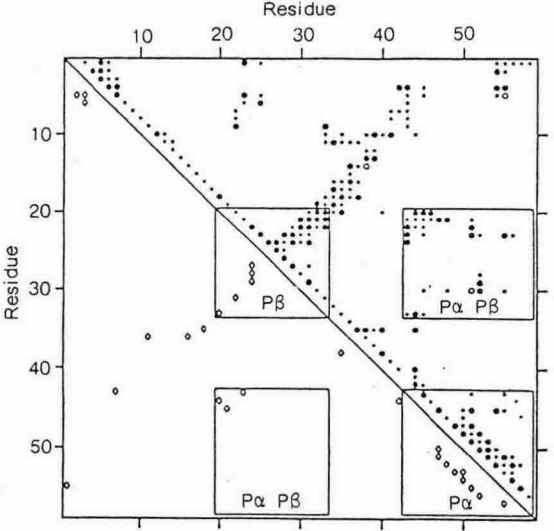


그림 2. A contact plot of BPTI based on X-ray diffraction data. Van der Waals interactions between any atom of a residue and the atoms of other residues are indicated above the diagonal. If the distance between two atoms is less than 150% of the sum of their van der Waal's radii, a small dot is shown; less than 100% is indicated by a large dot. Radii were used as previously described. Disulfide bonds are designated with open circles. Intra-residue van der Waal's interactions, and those between residues *i* and *i*+1 have been omitted for clarity. Hydrogen bonds between residues are indicated below the diagonal.

산으로 구성되어 있으며, α -helix 와 43-46의 짧은 β -chain 으로 구성되어 있다. 원래의 Cys-55는 Ala 로 대체하여 $P\alpha$ 에는 Cys-51만 남게되어 하나의 thiol 기만 갖도록 하였다. $P\alpha$ 는 14개의 아미노산으로 BPTI 의 antiparallel β -sheet 에 해당한다. 아울러 $P\beta$ 에는 Cys-30 하나의 thiol 기만 갖고 있다. $P\alpha P\beta$ 에는 네개의 산기(acidic group)이 있다. $P\alpha$ 의 C-terminal 기인 Ala-58 과 Glu-49, Asp-50 및 $P\beta$ 의 C-terminal 기인 Phe-33 의 카복실기(carboxyl group)이다. 그리고 $P\alpha P\beta$ 에는 여섯개의 amide 가 있다. Arg-21, Lys-26, Lys-46, Arg-53 및 $P\alpha$ 의 N-terminal 인 Asn-43 과 $P\beta$ 의 N-terminal 인 Arg-20 이다.

낮은 pH 에서는 아미노산의 산기가 중성인 상태로 있지만 pH 가 증가하면 산기의 양자(proton; H^+)가 없어지면서(deprotonation) 음전하(negative charge)를 띠게 된다. 낮은 온도인 상태에서 중성인 pH 에서는 $P\alpha P\beta$ 가 90% 이상 folding 이 되지만 낮은 pH 에서는 folding 이 되지 않은 것으로 나타났다⁵⁾. 이는 $P\alpha P\beta$ 의 음전하가 단백질의 folding 구조를 안정시키기 때문에 낮은 pH 에서는 구조가 불안정한 것으로 알려졌다^{5,11)}. 따라서 이러한 음전하(negative charge)와 양전하(positive charge)간의 정전기력(electrostatic interaction)이 단백질 모델(peptide model)의 folding 구조와 안정성에 어떻게 영향을 미치는가를 연구하는 것은 매우 흥미있는 일이다. 위 acidic group 의 electrostatic interaction 을 연구하기 위하여 $P\alpha$ 의 Glu-49 와 Asp-50 을 Ala 으로 치환하고, C-terminal 의 COOH 기를 amide 기(-NH₂)로 blocking 을 하였으며(CO-NH₂), $P\beta$ 의 카복실기도 역시 amide 기로 치환하여 모든 산기의 음전하를 중성으로 치환하였다. 이렇게 하여 얻은 이들 변이 펩타이드($P\alpha P\beta$)를 쉽게 구분하도록 다음과 같이 약자를 사용하였다. 즉 Asp-50과 Glu-49를 Ala 로 치환한 것을 차례로 $P\alpha_{12}P\beta_1$ 와 $P\alpha_{14}P\beta_1$ 라 부르고, $P\alpha$ 의 C-terminal 기(Ala-58)와 $P\beta$ 의 C-terminal 기(Phe-33)의 카복실기를 amide 기로 blocking 한것을 각각 $P\alpha_{16}P\beta_1$ 와 $P\alpha_2P\beta_5$ 라 약하여 사용하였다. 아울

러 모델 펩타이드를 이들 변이 펩타이드와 구별하기 위하여 $P\alpha_2P\beta_5$ 라 칭하였다.

이 논문에서는 이러한 $P\alpha P\beta$ 모델과 변이 펩타이드를 $P\alpha$ 와 $P\beta$ 로부터 산화시켜 만든 다음 펩타이드의 열안정성을 증가시키기 위한 단백질의 구조안정 인자를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

모델 및 변이 펩타이드를 생산하기 위하여 $P\alpha_2$, $P\alpha_{12}$, $P\alpha_{14}$, $P\alpha_{16}$ 과 $P\beta_1$, $P\beta_5$ 를 Applied Biosystems Model 430A 의 peptide synthesizer 를 통하여 t-Boc 방법으로 합성하였다¹²⁾. PAM(4(oxy-methyl) phenyl acetoimidomethyl) 수지를 이용하였으며, 수지로부터 peptide 를 분리하는데 TFM-SA(trifluoromethane sulphonic acid; 13, 14)를 사용한 다음 Sephadex G-10 column 에 5% 초산용액을 이용하여 염을 제거하였다. 각각의 $P\alpha$ 와 $P\beta$ 를 DTT 로 환원시켜 polymer 를 제거한 다음 50 °C에서 Vydax column(preparative)을 이용한 역상 HPLC 를 이용하여 순수분리 하였다. 분리하기 위한 용매 gradient 는 0.1%의 TFA(trifluoroacetic acid)를 함유한 water/90% acetonitrile 이다.

$P\alpha P\beta$ 복합체는 각각의 $P\alpha$ 와 $P\beta$ 로부터 5M GuHCl(guanidine hydrochloride)를 함유한 0.2M Tris-buffer, pH 8.4, 25°C에서 48 시간 동안 자연산화 시킴으로 얻을 수 있다. GuHCl 은 $P\beta$ homodimer 가 생겨 침전되는 것을 방지하기 위하여 첨가하였다⁵⁾. HPLC 로 반응이 완결됨을 확인한 뒤 $P\alpha P\beta$ 를 $P\alpha$ -homodimer($P\alpha P\alpha$)와 $P\beta$ -homodimer($P\beta P\beta$)로부터 앞서 언급한 바와 같은 HPLC 조건에서 gradient 만 각각의 펩타이드에 따라 최적화 하여 분리한 다음 5% 초산용액으로 씻은 다음 동결건조하여 desiccator 에 보관하였다.

모델 및 변이 펩타이드($P\alpha P\beta$ s)의 확인은 MIT 화학과에 있는 Mass Spectrometry(NIH facility)로 분석하였다. 각각의 펩타이드에 대한 분자질량(molecular mass)의 분석실험 결과는 $P\alpha_2P\beta_1$ 의

분석값은 3352.3(계산값, 3351.8); $P\alpha_{12}P\beta_1$, 3308.5(3307.7); $P\alpha_{14}P\beta_1$, 3294.1(3293.7); $P\alpha_{16}P\beta_1$, 3351.9(3350.8); $P\alpha_2P\beta_5$, 3352.1(3350.8)과 같다. 따라서 각각의 펩타이드는 원하는 펩타이드임이 확인되었다.

모든 CD 실험은 AVIV Model 60DS CD spectrometer를 사용하여 ellipticity(θ)를 측정하였으며, 이값을 근거로 mean residue ellipticity($[\theta]$)를 계산하였다¹⁵⁾. 사용된 cell의 path length는 1mm이고, cell의 온도조절은 HP Model 89100A Peltier temperature controll unit를 사용하여 0°C에서 80°C까지 조절하였다. CD 작업하기에 적당한 펩타이드의 농도는 0.15mg, peptide/1ml, CD buffer이다(T. G. Oas가 이론적으로 계산한 값). CD 용액은 펩타이드의 저장용액(stock solution; 5mg, peptide/1ml, 1mM HCl)을 이온강도(ionic strength)가 다른 두개의 완충용액(0.2M Na_2SO_4 , 10mM Na_2HPO_4 , pH 6.0 과 10mM Na_2HPO_4 , pH 6.0)에 녹였다. 실제로 CD 측정에 사용된 펩타이드 농도는 펩타이드 $P\alpha_2P\beta_1$, $P\alpha_{12}P\beta_1$, $P\alpha_{14}P\beta_1$, $P\alpha_{16}P\beta_1$, $P\alpha_2P\beta_5$ 에 대하여 각각 24.8, 24.2, 22.6, 27.2, 28.7 μM 이었다. 실제 0°C에서의 $[\theta]_{218}$ (파장 218에서 측정 한 mean residue ellipticity 값)은 펩타이드 농도 0.015mM에서 0.3mM 사이에서는 농도에 따라 변하지 않는다¹⁵⁾. 펩타이드 농도는 Edeloeh 법¹⁶⁾에 의하여 0.2M phosphate buffer(pH 6.0), 6M GuHCl에 녹여서 AVIV Model 118DS spectrophotometer의 275.5nm에서 tyrosine과 cystine 흡광도를 측정하여 계산하였다¹⁶⁾. pH는 H_2SO_4 와 HCl를 이용하여 실온에서 맞추었고, CD 값 측정 전후에 pH를 측정 한 결과 pH 변동은 0.1 unit 이하였다. 그리고 모든 CD 용액은 CD 측정하기 전에 탈기하였다⁵⁾.

III. 결과 및 고찰

펩타이드 $P\alpha_{12}P\beta_1$, $P\alpha_{14}P\beta_1$, $P\alpha_{16}P\beta_1$ 및 $P\alpha_2$

$P\beta_5$ 에 대한 0°C에서 pH 6.0과 2.0에서의 CD spectrum은 그림 3에 나타났다. pH 6.0에서는 모든 CD spectrum이 α -helix의 구조형태를 보여주고 있다. 즉 218과 204nm에서 강한 최저값을 나타내고 있다. 그러나 pH를 낮추면 218nm에서의 최저값은 심하게 줄어들며(그림 3), 아울러 온도를 올려주면 50°C까지 218nm에서의 최저값이 크게 줄어 들었다. 높은 온도와 산성에서는 204nm에서의 최저값은 크게 변하지 않으나 218nm에서의 최저값은 사라짐을 알 수 있다. 이 결과는 모든 펩타이드가 중성 pH와 낮은 온도에서 α -helical 구조를 형성하고 있음을 알 수 있다¹⁶⁾. 따라서 pH와 온도가 단백질 folding에 영향을 줄을 다시한번 확인할 수 있다. 중성 pH인 pH 6.0에서의 각 펩타이드의 218nm에서의 $-\theta$ 를 보면 $P\alpha_{16}P\beta_1$ 의 가장 높은 값을 나타내고 있어서 가장 folding이 잘됨을 알 수 있다(그림 3c). 다음으로 $P\alpha_2P\beta_1$ (이 논문에서는 앞서 논문(5)의 그림 2a의 결과와 똑같은 결과를 얻었기에 모델 펩타이드의 CD spectrum은 생략함)이 높고, 그 다음이 $P\alpha_{14}P\beta_1$, $P\alpha_2P\beta_5$ 순으로 높으며, $P\alpha_{12}P\beta_1$ 이 가장 낮은 $-\theta$ 값을 보여주고 있다. 이는 중성 pH에서 $P\alpha_{12}P\beta_1$ 이 가장 folding이 되지 않음을 알 수 있다. 그러나 낮은 pH에서는 $P\alpha_2P\beta_5$ 이 다른 펩타이드보다 가장 folding이 잘되었다.

펩타이드 음전하를 띠는 아미노산을 변형시킨 단백질의 pH에 따른 $[\theta]$ 변화를 그림 4에 나타났다. 여기서 $[\theta]_{218}$ 대신 $[\theta]_{220}$ 을 사용한 이유는 비록 $[\theta]_{218}$ 이 최저값을 나타내지만 모든 펩타이드의 고온(40°C)과 저온(0°C) 및 중성 pH(pH 6.0)와 산성 pH(pH 2.0)에서의 $[\theta]$ 값의 차이가 가장 큰 파장이 220nm이기 때문에 $[\theta]_{220}$ 값을 사용하였다^{11,17)}. pH 2.0에서부터 pH 8.0까지의 pH 변화를 보면 모든 펩타이드가 $[\theta]_{220}$ 값이 pH 3.0과 5.0 사이에서 급격히 증가하였는데 이는 Glu-49, Asp-50의 카복실기와 Ala-58과 Phe-33의 C-terminal 카복실기의 deprotonation이 pH 3.0과 5.0에서 이루어지기 때문이다. NMR 분석결과는 이 네개의 기가 pH 3.0과 5.0 사이에서 적정점을 갖고 있다(18, 19 참조).

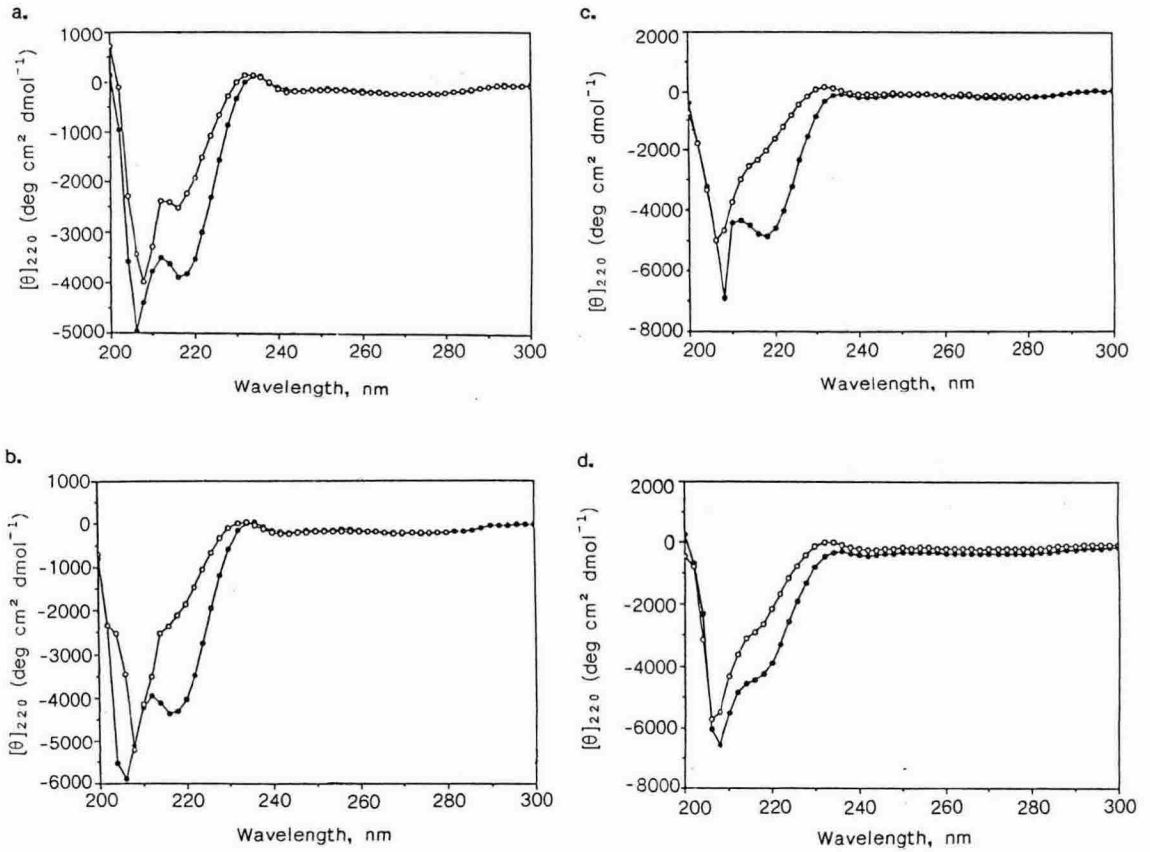


그림 3. CD spectra of $P\alpha_{12}P\beta_1$ (a), $P\alpha_{14}P\beta_1$ (b), $P\alpha_{16}P\beta_1$ (c), and $P\alpha_2P\beta_5$ (d) in 200mM Na_2SO_4 and 100mM Na_2HPO_4 at 0°C, pH 6.0(●), and pH 2.0(○).

각각의 펩타이드에 대하여 $[\theta]_{220}$ 에 미치는 온도의 영향을 보기 위하여 pH 6.0과 pH 2.0에서의 melting curve를 그림 5에 나타냈다. 온도곡선의 transition은 80°C까지 완전히 가역적으로 일어났다. pH 6.0에서의 $P\alpha_{12}P\beta_1$, $P\alpha_{14}P\beta_1$, $P\alpha_{16}P\beta_1$ 및 $P\alpha_2P\beta_5$ 에 대한 melting curve는 비슷한 형태를 띠고 있으나 전이점(transition point)은 차이가 났다. $P\alpha_{16}P\beta_1$ (그림 5c)의 전이점은 $P\alpha_2P\beta_1$ (5의 그림 2b 참조) 보다 비슷하거나 약간 높아 60°C이고, $P\alpha_2P\beta_1$ 와 마찬가지로 온도를 0°C까지 내려도 완전히 folding 되지 않았다. 그러나 이때 95% 이상

folding 됨을 계산을 통하여 알수 있다¹¹⁾. $P\alpha_{12}P\beta_1$ 와 $P\alpha_{14}P\beta_1$, $P\alpha_2P\beta_5$ 의 전이점은 40°C로 $P\alpha_2P\beta_1$, $P\alpha_{16}P\beta_1$ 보다는 낮았다. 낮은 pH에서의 각 펩타이드의 melting curve를 보면 전이점은 훨씬 낮아져 $P\alpha_{16}P\beta_1$ 의 경우 20°C까지 떨어졌고, 다른 펩타이드 경우는 이보다 더욱 낮았다. 산성 pH에서 단백질이 불안정하여 마치 $P\alpha_5$ ¹¹⁾, C-peptide analogue RN-54²⁰⁾의 “weak helix former”와 같았다. 펩타이드에 GuHCl(6M, pH 6.0)을 첨가하면 transition이 없어져 온도곡선이 거의 일직선이 되게 된다. 이는 detergent인 GuHCl이 펩타이드 구조를 거의 완

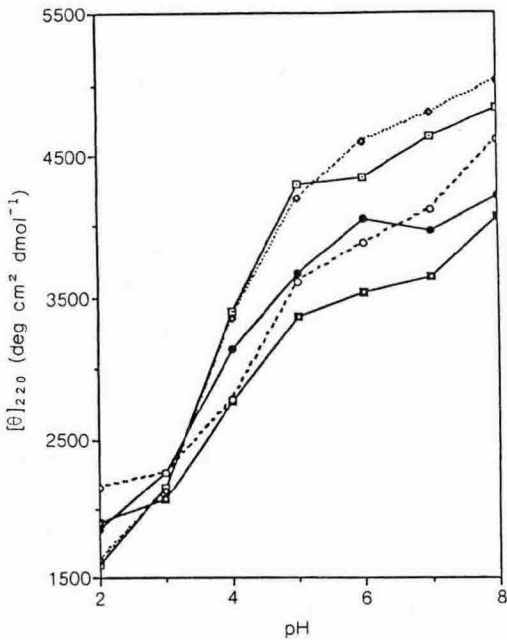


그림 4. pH dependence of $[\theta]_{220}$ for $P\alpha_2P\beta_1$ (□—□), $P\alpha_{12}P\beta_1$ (○—○), $P\alpha_{14}P\beta_1$ (●—●), $P\alpha_{16}P\beta_1$ (◇—◇), and $P\alpha_2P\beta_5$ (○---○) in 200mM Na_2SO_4 and 10mM Na_2HPO_4 at 0°C, pH 6.0.

표 1. T_m of $P\alpha_2P\beta_1$, $P\alpha_{12}P\beta_1$, $P\alpha_{14}P\beta_1$, $P\alpha_{16}P\beta_1$, and $P\alpha_2P\beta_5$ peptides in standard CD buffer(200mM Na_2SO_4 and 10mM Na_2HPO_4 , pH 6.0) and in lower salt buffer(10mM NaCl and 10mM Na_2HPO_4 , pH 6.0) which were determined from the melting curves.

| Peptides | T_m (°C) | |
|------------------------|--|---|
| | 200mM Na_2SO_4 10mM Na_2HPO_4 | 10mM NaCl 10mM Na_2HPO_4 |
| $P\alpha_2P\beta_1$ | 24.0±1.10 | 22.3±0.49 |
| $P\alpha_{12}P\beta_1$ | 15.8±1.17 | 7.6±2.18 |
| $P\alpha_{14}P\beta_1$ | 21.4±0.41 | 15.2±3.12 |
| $P\alpha_{16}P\beta_1$ | 29.4±1.30 | 33.0±0.41 |
| $P\alpha_2P\beta_5$ | 17.1±1.75 | 7.2±2.11 |

전히 파괴함을 알 수 있다. 그러나 전이점은 단백질의 열안정성의 정도를 나타내는 완전한 척도는 아니

다. 따라서 각 열안정성을 나타내는 펩타이드의 melting curve에서 midpoint of transition(T_m)을 BPTI model($P\alpha_2P\beta_1$; 5)과 leucine zipper²¹⁾의 경우에서와 같은 방법으로 구하였다.

표 1은 펩타이드의 T_m 을 표준 완충용액인 0.2M Na_2SO_4 , 10mM Na_2HPO_4 , pH 6.0과 10mM NaCl, 10mM Na_2HPO_4 , pH 6.0에서 나타냈다. $P\alpha_{16}P\beta_1$ 의 T_m (29°C)은 모델 $P\alpha_2P\beta_1$ 의 T_m (24°C)보다 높았다. 이는 α -helix의 C-terminal의 카복실기의 negative charge가 단백질 folding에 나쁜 영향을 미치고 있음을 의미한다. $P\alpha_{12}P\beta_1$, $P\alpha_{14}P\beta_1$, $P\alpha_2P\beta_5$ 의 T_m 은 모델 펩타이드 보다는 낮아서 각각 15.8, 21.4, 17.1이었다. 이는 Asp-50과 Glu-49 및 β -chain의 C-terminal의 카복실기의 negative charge가 folding이 잘 되도록 작용하고 있음을 보여준다. 특히 $P\alpha_{12}P\beta_1$ 보다 $P\alpha_{14}P\beta_1$ 의 T_m 이 높은 것으로 나타났다. 즉 Asp-50의 negative charge를 없앤 것이 Glu-49의 negative charge를 없앤 것 보다 훨씬 불안정하였다. 다시 말하면 Asp-50이 BPTI의 peptide folding에 있어서 Glu-49보다 중요함을 나타낸다. 이온강도가 낮은 완충용액에서는 $P\alpha_{16}P\beta_1$ 의 T_m 은 더욱 증가되고 $P\alpha_2P\beta_1$ 의 T_m 은 감소되어 차이가 커져 $P\alpha_{16}P\beta_1$ 가 더욱 안정된 상태를 확연히 증명해 주고 있다. 일반적으로 이온강도가 높은 완충용액에서는 낮은 이온강도에서 보다 단백질 구조가 안정되나, 열에 안정한 단백질은 낮은 이온강도에서 더욱 안정되고 불안정한 단백질은 더욱 불안정하여진다²²⁾. 따라서 낮은 이온강도에서 $P\alpha_{16}P\beta_1$ 을 제외한 다른 펩타이드의 T_m 은 줄어들었다.

BPTI의 folding intermediate 모델인 $P\alpha P\beta$ 는 Glu-49, Asp-50 및 β -sheet의 C-terminal의 negative charge와 α -helix의 dipole moment²²⁾에 의하여 생긴 δ^+ 와 electrostatic interaction에 의하여 안정화 되고, 또는 Glu-49와 Asp-50과 Arg-53 사이에 생긴 salt bridge에 의하여 안정화될 가능성이 있다. Helix dipole moment 이론은 ribonuclease의 C-peptide²²⁾와 BPTI의 $P\alpha_5$ ¹¹⁾에서 이미 제시된 바로 peptide bond의 연속성에 의하여 N

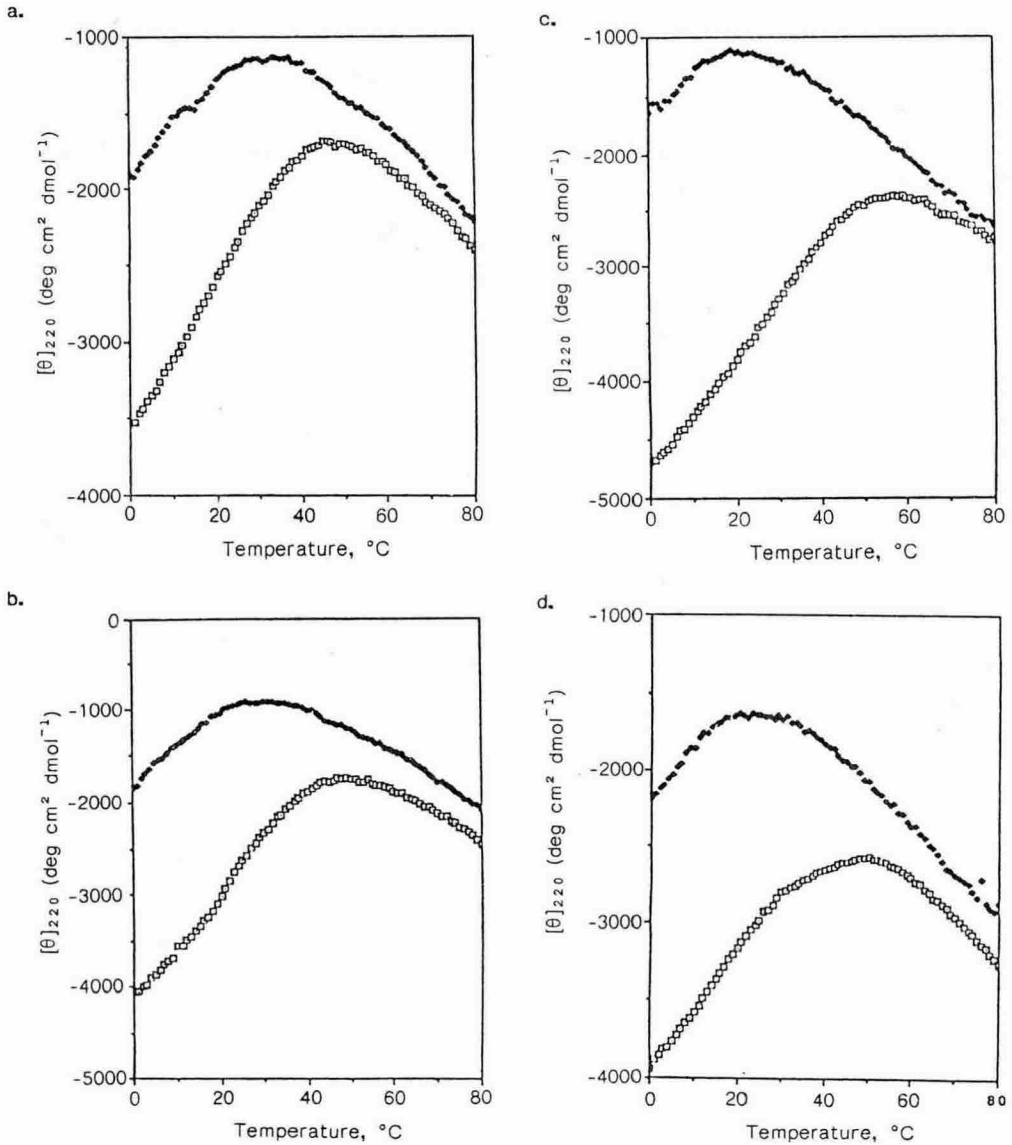


그림 5. Temperature dependence of $[\theta]_{220}$ for $P\alpha_{12}P\beta_1$ (a), $P\alpha_{14}P\beta_1$ (b), $P\alpha_{16}P\beta_1$ (c) and $P\alpha_2P\beta_5$ (d) in 200mM Na_2SO_4 and 10mM Na_2HPO_4 at pH 6.0(\square) and pH 2.0(\blacklozenge).

-terminal 에 δ^+ 를 띠고 C-terminal 에 δ^- 를 띠게 된다. $P\alpha_{14}P\beta_1$ 의 경우와 $P\alpha_{12}P\beta_1$ 은 salt bridge 가능성과 helix dipole moment 와의 electrostatic interaction 에 의하여 안정화됨과 동시에 $P\alpha_{12}P\beta_1$

의 T_m 이 $P\alpha_{14}P\beta_1$ 의 T_m 보다 낮은 것으로 보아 Arg-53 이 Glu-49 보다는 Asp-50 과 salt bridge 가능성이 보여주고 있으며, 이 salt bridge 는 펩타이드의 안정화에 크게 기여하였다. 이는 x-ray

crystallography 결과와 일치하는데, x-선 분석결과 결정형 BPTI의 α -helix에서 Arg-53과 Asp-50과의 salt bridge의 가능성을 제시하였다²³⁾. $P\alpha_{16}P\beta_1$ 의 Tm이 모델 BPTI보다 높은 것은 helix dipole moment에 의하여 $P\alpha_{16}P\beta_1$ 의 C-terminal에 δ^- 가 이미 형성되어 있고, 또 C-terminal에 negative charge가 있다. α -helix의 마지막은 Gly-56이다^{23,24)}. 비록 Ala-58은 α -helix를 구성하고 있지 않으나, negative charge와 δ^- 와의 반발력때문에 구조가 불안정하다. 따라서 Ala-58의 카복실기를 amide로 blocking하면 단백질 구조가 훨씬 안정하게 된다. 한편 $P\alpha_2P\beta_5$ 의 Tm은 $P\alpha_2P\beta_1$ 에 비하여 상당히 줄어들었는데, 이 역시 helix dipole moment 현상이다. x-ray crystallography의 결과 $P\beta$ 의 N-terminal과 C-terminal은 매우 근접한 위치에 있었다^{23,24)}. 동시에 N-terminal(Arg-20)에는 두개의 positive charge가 있고, 역시 dipole moment에 의하여 δ^+ 가 있으며, C-terminal(Phe-33)에는 1개의 negative charge와 δ^- 가 있다. 따라서 양끝의 정전하의 인력에 의하여 펩타이드 구조가 안정되었는데, C-terminal negative charge를 없애주므로 구조를 안정시켜 줄수 있는 인력이 없어지기 때문에 $P\alpha P\beta$ 의 구조가 현저히 불안정하였다.

결론적으로 S-S bond, salt bridge 및 단백질의 dipole moment에 착안하여 단백질공학 방법에 의한 의학 및 식품의 유용한 단백질을 design할 수 있으며, 그 방향을 제시할 수 있다.

IV. 요약

BPTI의 folding에 있어서 negative charge가 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 이 negative charge를 변형시켜 변이주에 대한 구조안정성 실험을 하였다. α -helix dipole은 단백질의 구조안정에 매우 중요한 역할을 하며, 동시에 negative charge가 folding안정성에 중요한 역할을 하여 side chain의 카복실기의 적정점 이상에는 안정된

구조를 형성하나 그 이하의 산성 pH에서는 불안하다.

V. 참고 문헌

1. Kinsella, J.E.: *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 242(1979)
2. Kim, N., Kwon, D.Y., and Nam, Y.-J.: *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **20**, 625(1988)
3. 農林水産省 食品流通局 技術室: *Jap. Food Sci.*, **28**, 79(1989)
4. Tong, L., de Vos, A.M., Milburn, M.V., Jancarik, J., Noguchi, S., Nishimura, S., Miura, K., Ohtsuka, E. and Kim, S.-H.: *Nature* **337**, 90(1989)
5. Oas, T.G. and Kim, P.S.: *Nature*, **307**, 329(1988)
6. Creighton, T.E.: *J. Molec. Biol.*, **113**, 275(1979)
7. Creighton, T.E., and Goldenberg, D.P.: *J. Molec. Biol.*, **179**, 497(1984)
8. Richardson, J.S.: *Methods in Enzymology*, **115**, 539(1985)
9. Creighton, T.E.: *J. Molec. Biol.*, **87**, 603(1974)
10. Oas, T.G., McIntosh, L.P., O'Shea, E.K., Dahlquist, F.W., and Kim, P.S.: *Nature*(in press) (1990)
11. Goodman, E.K. and Kim, P.S.: *Biochemistry*, **28**, 4343(1989)
12. Kent, S.B.H.: *Annual Rev. Biochem.*, **57**, 957(1988)
13. Yajima, H. and Fujii, N.: in *The Peptides*(Underfriend, S., and Meienhofer, J, eds.), Vol. 5, pp.66, Academic Press, New York(1983)
14. Tam, J.P., Heath, W.F. and Merrifield, R.B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5242(1986)

15. Woody, R.W.: in *The Peptides*(Udenfriend, S., and Meienhofer, J., eds.), Vol. 7, pp.15-14, Academic Press, New York(1985)
 16. Edeloch, H.: *Biochemistry*, **6**, 1948(1967)
 17. Curran, T.P., Ph. D. Thesis: Department of Chemistry, MIT(1988)
 18. Creighton, T.E.: in *Proteins(Structural and Molecular Principle)*, pp.6-28, Freeman, New York(1985)
 19. Tanford, C.: *Adv. Protein Chem.*, **17**, 69(1962)
 20. Shoemaker, K.R., Faairman, R., York, E.J., Stewart, J.M., and Baldwin, R.L.: in *Proceeding of the 10th American Peptide Symposium*(Marshall, C.R., eds.), pp.15-20, ESCOM, Leiden(1988)
 21. O'Shea, E.K., Rukowski, R. and Kim, P. S.: *Science*, **243**, 538(1989)
 22. Shoemaker, K.R., Kim, P.S., York, E.J., Stewart, J.M. and Baldwin, R.L.: *Nature*, **36**, 563(1987)
 23. Deisenhofer, J. and Steigemann: *Acta Crystallogr. Sect. B*, **31**, 238(1975)
 24. Wlodawere, A., Walter, J., Huber, R. and Sjolin, L.: *J. Mol. Biol.*, **180**, 301(1984)
-