

## 항 단실 항체의 카르보닐탄소 유래 시그날의 귀속

김하형<sup>†\*</sup> · 이광표<sup>\*</sup> · 加藤晃一 · 荒田洋治

<sup>\*</sup>중앙대학교 약학대학, 東京大學 藥學部

(Received August 16, 1995)

### Assignment of the Carbonyl Carbon Resonances in Anti-Dansyl Antibodies

HaHyung Kim<sup>†\*</sup>, Kwang Pyo Lee<sup>\*</sup>, Koichi Kato and Yoji Arata

<sup>\*</sup>College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo, Hongo, Tokyo 113, Japan

**Abstract**—The anti-dansyl antibodies were specifically labeled with stable isotope by growing hybridoma cells in serum-free medium. Assignments of the observed carbonyl carbon resonances have been determined by using <sup>13</sup>C-<sup>1</sup>N double labeling method in order to assign the Leu resonances. However, when the identical dipeptide appears more than twice in the polypeptide sequences, we applied the proteolytic fragments in the fragment-specific method. Carboxypeptidase B-treated antibody has also been used to assign the Lys-447 in C terminal amino acid. These unambiguously assigned carbonyl carbon resonances in antibodies are thought to be useful in elucidating not only the structure of antibodies but also the structure-function relationship in the antibody by <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy.

**Keywords** □ IgG, stable-isotope labeling, assignment of carbonyl carbon resonances, <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy.

면역글로부린 G (IgG) 는 분자량 약150 kDa의 다기능 단백질로서, 2개의 heavy chain 과 2개의 light chain 으로 구성되어 있다. Heavy chain은 V<sub>H</sub>, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> domain으로 구성되어 있고, light chain 은 V<sub>L</sub>과 C<sub>L</sub> domain으로 구성되어 있다. C<sub>H1</sub> 과 C<sub>H2</sub> domain 사이는 hinge영역에 의해 연결되어 있으며 프로테아제처리로 항원에 특이적으로 결합하는 기능을 갖는 Fab 프라그먼트와 보체계 혹은 세포표면에 존재하는 receptor등의 분자와 결합하는 Fc 프라그먼트를 얻을 수 있다.

IgG의 고차구조를 연구하는 데에는 그 원자좌표를

나타내는 X선결정구조해석<sup>1,2)</sup>이 유력한 방법이다. 그러나, IgG가 본질적으로 유연한 단백질로서의 성질을 갖고 있음을 고려할 때<sup>3)</sup> 결정화하는데 있어서의 어려움과 결정중에 있어서의 분자의 불균일성 그리고 분자간의 상호작용의 영향에 의한 분자의 고정화 등으로 인해 본래의 IgG의 기능발현이 이루어지는 수용액중에서의 동적인 고차구조를 정확하게 반영하고 있다고는 볼 수 없다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 본 연구실에서는 불균일한 분자종의 철저한 분리·정제법을 확립하여 수용액중에서의 IgG의 고차구조를 각각의 원자에서 유래하는 시그날을 프로브로하여 해석하는 물리화학적 방법을 <sup>13</sup>C-NMR 분광법을 이용하여 확립하였다.<sup>3, 8)</sup>

본 연구에서는 안정동위체표지 아미노산을 이용하여 각 아미노산 유래의 시그날을 선택적으로 추출한 후 그 시그날이 어느 원자단에 유래하는가를 결정하는 방법(귀속방법)에 대하여 연구하였다. 구체적으로,

<sup>†</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-820-5606 (팩스) 02-820-5606

<sup>\*</sup> 현주소 : Oxford Glycobiology Institute, University of  
Oxford, OX1 3QU, England

Kainosho등<sup>9)</sup>에 의해 발표된  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  이중표지법 즉, 아미노산 선택적으로 카르보닐 탄소와 아마이드 질소에  $^{13}\text{C}$ 와  $^{15}\text{N}$ 을 각각 도입하여, 일차구조상 인접한 아미노산 잔기들의  $^1\text{J}_{\text{CN}}$  coupling을 관측하는 방법을 이용하였다. 그러나 같은 배열의 디펩티드가 존재하여  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  이중표지법에 의해 시그날의 귀속이 되지 않는 경우에는 각종의 프로테아제를 이용하여 hinge 영역에 대한 절단부위가 다른 Fc 프래그먼트를 얻어 스펙트럼을 비교분석하였다. Heavy chain의 C말단 아미노산 잔기의 귀속에는 carboxypeptidase B 처리를 하여 얻어진 IgG를 이용하였다.

### 실험방법

**시약 및 재료** - mouse monoclonal anti-dansyl IgG2a(s), IgG2a, IgG2b를 생산하는 Cell line 27-1B 10.7<sup>10)</sup>, 27-13.6<sup>11)</sup>, 27-35.8<sup>11)</sup>은 L. A. Herzenberg 교수(Stanford대학)로부터 제공 받았다. 다음 시약들은 구입 후 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다. L-[ $^{15}\text{N}$ ] Leu(Isocommerz GmbH사), L-[1- $^{13}\text{C}$ ]Leu(CIL사), 그 이외의 다른 안정표지아미노산(ICON Service사), acetic acid, DTT, V8 protease(WAKO사), clostripain(Sigma사), carboxypeptidase B(Funa-koshi사).

**IgG의 환원 알킬화** - IgG를 2 mM EDTA를 포함하는 1.5 M Tris-HCl(pH 8.5)에 투석후, 10 mM DTT존재하에 실온에서 1시간 반응시켜, disulfide 결합을 환원 하였다. 그 후 22 mM iodoacetic acid를 가하여 실온에서 20분, 차광조건에서 반응을 행하여 알킬화 하였다. 10 mM DTT를 넣어 반응을 정지시켰다. 반응액은 PBS(10 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, pH7.2)중에서 24시간 투석하였다.

**IgG의 프로테아제처리 및 프래그먼트의 분리** - Yamaguchi등<sup>12)</sup>이 발표한 방법과 동일하게 IgG를 papain, V8 protease에 의해 처리한 후, Mono Q HPLC 칼럼(Pharmacia)을 이용하여 NaCl의 농도를 0~400 mM의 범위에서 변화시켜 Fc 프래그먼트를 분리하였다. IgG2b의 경우에는 Mono Q칼럼으로 분리한 후 불완전분해물을 다시 Superose 12칼럼(Pharmacia)을 이용하여 제거하였다. 분리한 프래그먼트는 전기이동<sup>13)</sup>으로 순도를 확인하였다.

**IgG의 carboxypeptidase B처리** - IgG를 5 mM

phosphate buffer (pH7.3), 0.2 M NaCl에 녹인 후, 농도를 25 mg/ml로 하여 IgG와 carboxypeptidase B의 몰비를 20 : 1로 하여 37°C에서 2시간 반응시켰다. 반응은 10 mM EDTA로 정지하였다. TLC plate silica gel 60(Merck)위에 반응액을 적하하여, 2-propanol :  $\text{NH}_4\text{OH}$  = 66 : 33(v/v)으로 전개시킨 후, 아미노산표준품과의 Rf치를 비교하여 유리된 C말단잔기를 확인하였다.

**NMR 측정시료** - 시료용액중의 단백질 농도는 0.3 mM로 하고, 5 mM phosphate buffer, 200 mM NaCl, 3 mM  $\text{NaN}_3$  (pH7.3)를 포함하는 90%  $^1\text{H}_2\text{O}$ /10%  $^2\text{H}_2\text{O}$  용액으로 치환하여 최종부피를 2 ml로 하였다. NMR 측정에는 직경 10 mm의 시료관을 사용하였다.

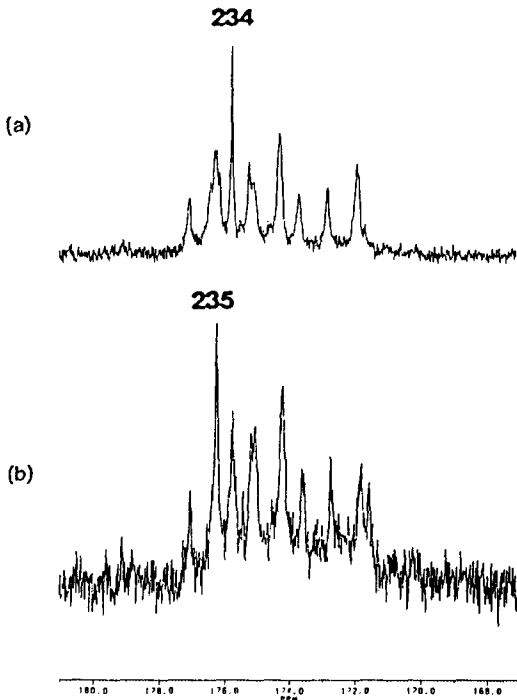
**NMR 측정조건** - Bruker AM 400분광기를 이용하여 WALTZ 16 composite pulse에 의해 proton decoupling을 행한 후 측정하였다. 스펙트럼 폭 24,000 Hz, 데이터 포인트 32 K, 펄스의 repetition time을 1초로 하였다.  $T_2$ 가 긴 시그날을 선택적으로 검출하기 위하여 CPMG pulse계<sup>14)</sup>를 이용하였다. 이 경우는 스펙트럼 폭 1500 Hz, 데이터 포인트 8 K, 펄스의 repetition time을 3초로 하였다. FID는 지수함수 혹은 가우스 함수처리를 한 후, Fourier변환을 시켰다. 화학적 이동은 내부표준액으로 dioxane으로 부터의 ppm으로 나타내었다. 측정온도는 30°C로 하였다.

### 결과 및 고찰

**위치특이적인 카르보닐 탄소 유래  $^{13}\text{C}$ -NMR 시그날의 귀속** - L-[1- $^{13}\text{C}$ ] Leu과 L-[ $\alpha$ - $^{15}\text{N}$ ] Leu을 4 : 6의 비율로 비표지의 Leu대신에 배지중에 넣고, 세포배양중의 아미노산대사에 의한  $^{15}\text{N}$ 표지체의 회색을 억제하기 위하여  $\beta$ -chloro-L-analnine과 L-Ala을 배지 1리터당 각각 16 mg, 100 mg씩 넣어 세포배양을 하여 IgG2a(s)를 얻었다. IgG2a(s)를 clostripain으로 처리하고 Mono Q 컬럼으로 분리하여 얻은 Fc프래그먼트의  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼을 Fig. 2(a)에 나타내었다. 한편, L-[1- $^{13}\text{C}$ ] Leu과 [ $^{15}\text{N}$ ] Gly을 비표지의 Leu, Gly대신에 배지중에 넣고 세포배양을 하여, Leu의 카르보닐 탄소와 Gly의 아마이드 질소가 각각  $^{13}\text{C}$ 와  $^{15}\text{N}$ 으로 표지된 IgG2a(s)를 얻었다. 위와 같은 방법에 의해 얻은 Fc프래그먼트의  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼을 Fig. 2(b)에 나타내었다. Fig.

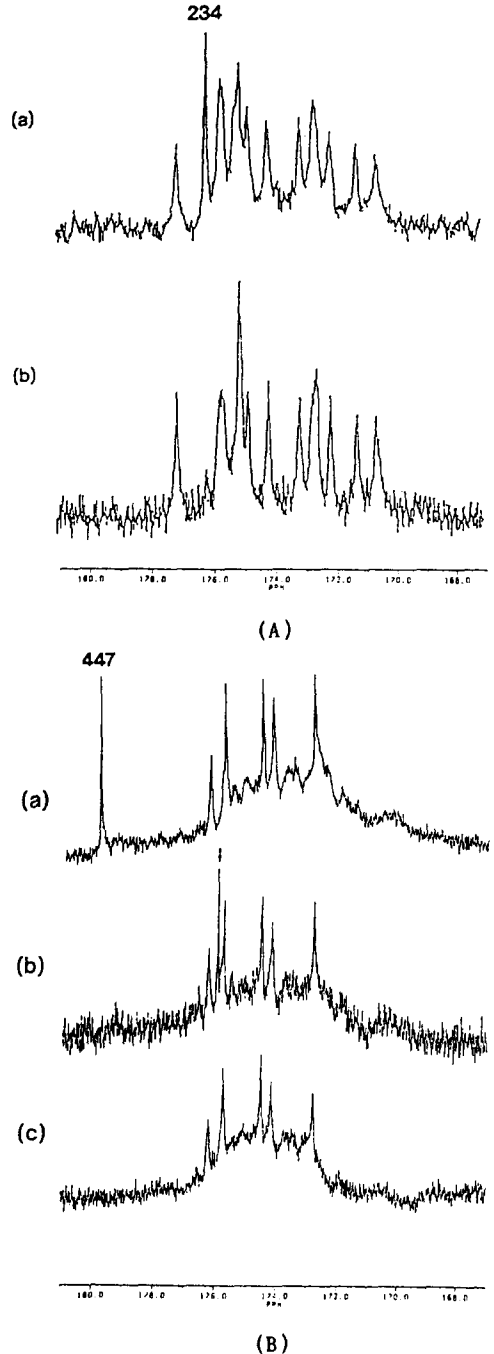
- (a) Cys-<sup>229</sup>-Pro-<sup>234</sup>-Ala-<sup>235</sup>-Pro-Asn-Leu-Leu-Gly-Gly-Pro-<sup>238</sup>
- (b) Cys-<sup>229</sup>-Pro-<sup>234</sup>-Ala-<sup>236</sup>-Pro-Asn-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-<sup>238</sup>
- (c) Ser-<sup>440</sup>-Phe-Ser-Arg-Thr-Pro-Gly-Lys-<sup>447</sup>

**Fig. 1**—Amino acid sequences of (a) IgG2a(s), (b) IgG 2b, and (c) C-terminal amino acid sequences of IgG2a.



**Fig. 2**—The 100 MHz <sup>13</sup>C-NMR spectra of Fc fragment of IgG2a(s).

2(a)스펙트럼의 176.3 ppm의 시그널과 Fig. 2(b)스펙트럼의 176.3 ppm의 시그널과의 비교로 부터, Fig. 2(a)의 176.6 ppm 시그널에 <sup>13</sup>C-<sup>15</sup>N 이중표지법에 의한 <sup>1</sup>J<sub>CN</sub> coupling의 이중선이 관측되었다. 이 결과와 Fig. 1(a)에 나타난 아미노산의 일차배열로 부터 Fig. 2(b)의 176.3 ppm유래의 시그널을 Gly이 인접한 Leu-235잔기 유래의 카르보닐 탄소로 귀속하였다. 같은 방법으로 Fig. 2(b)스펙트럼과 Fig. 2 (a)스펙트럼의 175.7 ppm의 시그널의 비교로 부터 Fig. 2(b)의 시그널에 <sup>1</sup>J<sub>CN</sub> coupling에 의한 이중선이 관측되어 Fig. 2(a)의 175.7 ppm 시그널을 Leu이 인접한 Leu-234잔기 유래



**Fig. 3**—The 100 MHz <sup>13</sup>C-NMR spectra of Fc fragment of (A) IgG2b, (B) IgG2a. All spectra of (B) were obtained by using a CPMG pulse sequence  $\pi/2-(\tau-\pi-\tau)_n$ . With  $\tau=10$  ms and  $n=2$ .

의 카르보닐 탄소로 귀속하였다.

**프래그먼트 특이적인 카르보닐 탄소 유래 <sup>13</sup>C-NMR**

**시그널의 귀속** - Fig. 3(A)에 Leu잔기의 카르보닐 탄소를  $^{13}\text{C}$ 으로 표지한 IgG2b를 환원 알킬화 후, papain 및 V8 protease처리에 의해 얻어진 Fc프래그먼트의  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼을 나타내었다. Fig. 3(A)의 (a)는 papain처리에 의해 얻어진 N말단이 Cys-229로 부터 시작하는 Fc프래그먼트의 스펙트럼을 나타내며, Fig. 3(A)의 (b)는 Fig. 3 (a)에서 얻어진 Fc프래그먼트를 다시 V8 protease처리하여 얻어진 N말단이 Gly-236로부터 시작하는 Fc프래그먼트의 스펙트럼을 나타낸다. 즉, Fig. 3(A)의 (a)의 Fc프래그먼트의 Cys-229로부터 Glu-235에 해당하는 부위가 Fig. 3(A)의 (b)의 Fc프래그먼트의 스펙트럼에서는 결여되어있다. 두 스펙트럼을 비교한 결과, 176.0 ppm의 시그널만이 Fig. 3(A)의 (b)의 스펙트럼에서는 관측되지 않았다. Fig. 1(b)에 나타난 일차배열의 의하면, Cys-229로부터 Glu-235 사이에 존재하는 Leu잔기는 Leu-234뿐임을 알 수 있다. 이 결과로부터 이 176.0 ppm의 시그널을 Leu-234유래의 카르보닐 탄소로 귀속하였다.

**Heavy chain C말단잔기의 카르보닐 탄소 유래  $^{13}\text{C}$ -NMR 시그널의 귀속** - IgG2a의 His, Ile, Lys, Met, Tyr의 카르보닐 탄소를  $^{13}\text{C}$  표지한 IgG2a의 CPMG 스펙트럼을 Fig. 3(B)의 (a)에 나타내었다. Carboxypeptidase B는 일반적으로 C말단의 Lys 혹은 Arg만을 선택적으로 절단하는 성질이 알려져 있다. Carboxypeptidase B로 처리한 표지 IgG2a의  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼의 경우, 가장 저자장측의 179.8 ppm의 시그널이 선택적으로 소실하고, 화살표로 표시한 175.9 ppm에 새로운 시그널이 나타났다(Fig. 3(B)의 (b)). 박층크로마토그래피에 의해 carboxypeptidase B처리한 IgG2a로부터 Lys잔기만이 절단되었음을 확인 하였다. 즉, Fig. 3(B)의 (b)의 175.9 ppm의 시그널은 IgG2a로부터 유리된 L-( $\alpha$ - $^{13}\text{C}$ ) Lys의 카르보닐 탄소에 유래함을 알 수 있다(Fig. 1(c)). 더욱이, 이 IgG2a를 protein A 칼럼으로 재정제하여  $^{13}\text{C}$ -NMR을 측정한 결과 유리된 Lys 잔기유래의 179.8 ppm 시그널만이 소실하였다(Fig. 3(B)의(c)). 이와같은 결과로부터 179.8 ppm에 유래하는 시그널을 heavy chain의 C말단 Lys-447유래의 카르보닐 탄소로 귀속하였다.

## 결 론

항체생산세포의 무혈청배양법에 의하여 아미노산타

입별로 카르보닐 탄소를  $^{13}\text{C}$ 으로 표지한 IgG분자로 부터 선택적으로 시그널을 추출하여 특정잔기의 카르보닐 탄소에 유래하는 시그널을 귀속하였다. 우선  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  이중표지법에 의한 위치특이적인 귀속방법을 이용하여 IgG2a(s)의 Leu-234잔기와 Leu-235잔기를 귀속하였다. 그러나 분자량이 150 kDa에 이르는 IgG의 경우 같은 배열의 디펩티드가 다수 존재하여 이  $^{13}\text{C}$ - $^{15}\text{N}$  이중표지법에만 의해서는 정확한 시그널의 귀속이 되지 않는 경우가 많이 있다. 이와 같은 경우에는 각종 프로테아제처리에 의해 hinge영역이 절단되어 N말단이 다른 Fc프래그먼트의 스펙트럼을 비교 분석하였다. 즉 프래그먼트 특이적인 귀속방법을 이용하여 IgG2b의 Leu-234잔기를 귀속하였다. 또한 IgG의 C말단에 존재하는 아미노산 잔기의 경우에는 carboxypeptidase B 처리 전후의 스펙트럼을 비교하여 IgG2a의 Lys-447잔기를 귀속하였다. Marquart등<sup>15)</sup>에 의하면 human myeloma IgG1 Kol의 X선결정구조해석의 결과 Ala-231 이하의 Fc 부분의 정보가 얻어지지 않고 있으며, Deisenhofer<sup>16)</sup>에 의한 human IgG의 Fc 프래그먼트의 결정구조의 해석에서는 Thr-223~Gly-237 및 C말단 근처의 Thr-444~Lys-447에 해당하는 분절이 그 전자밀도상의 소실로 인해 어떠한 정보도 얻어지지 않고 있다. 또한 Duncan등<sup>17)</sup>에 의하면 Leu-234는 IgG가 항원과의 결합 후 발현되는 생물활성기능에 필요한 Fc receptor와의 결합에 있어서 중요한 모티프(Leu-234~Pro-238)에 포함된 잔기이다. 그러므로 본 연구에 의해 얻어진 IgG의 카르보닐 탄소유래 시그널의 추출 및 그 귀속결과는 X선결정구조해석에서는 얻을 수 없는 잔기에 관한 정보를 얻을 수 있으며, 수용액 중에서의 IgG의 구조화학적 연구뿐만 아니라 구조와 기능과의 관계를 NMR을 이용하여 해석하는 데 유용한 프로브로 이용될 수 있을 것이다.

## 문 헌

- 1) Huber, H., Deisenhofer, J., Colman, P. M., Matushima, M. and Palm, W.: Crystallographic structure studies of an IgG molecule and an Fc fragment. *Nature(London)* **264**, 415 (1976).
- 2) Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., Day, J., Greenwood, A. and McPherson, A.: The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma. *Nature*

- (London) **360**, 369 (1992).
- 3) Kim, H. H., Matsunaga, C., Yoshino, A., Kato, K. and Arata, Y.: Dynamical structure of the hinge region of immunoglobulin G as studied by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonances spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **236**, 300 (1994).
  - 4) Kato, K., Matsunaga, C., Igarashi, T., Kim, H. H., Odaka, A., Shimada, I. and Arata, Y.: Complete assignment of the methionyl carbonyl carbon resonances in switch variant anti-dansyl antibodies labeled with  $[1-^{13}\text{C}]$  Methionine. *Biochemistry* **30**, 270 (1991).
  - 5) Kim, H. H., Kato, K., Higuchi, A., Nomura, N., Noguchi, H. and Arata, Y.:  $^{13}\text{C}$ -NMR spectral analysis of the structures of mouse immunoglobulin G1 carrying allotypes a and j. *J. Immunol. Methods* **153**, 223 (1992).
  - 6) Kim, H. H., Yamaguchi, Y., Masuda, K., Mastunaga, C., Yamamoto, K., Irimura, T., Takahashi, N., Kato, K. and Arata, Y.: O-glycosylation in hinge region of mouse immunoglobulin G2b. *J. Biol. Chem.* **269** 12345 (1994).
  - 7) Kato, K., Lian, L., Barsukov, I. L., Derrick, J. P., Kim, H. H., Tanaka, R., Yoshino, A., Shiraishi, M., Shimada, I., Arata, Y. and Roberts G. C. K.: Model for the complex between protein G and an antibody Fc fragment in solution. *Structure* **15**, 79 (1995).
  - 8) Kim, H. H., Kato, K., Yamato, S., Igarashi, T., Mastunaga, C., Ohtsuka, H., Higuchi, A., Nomura, N., Noguchi, H. and Arata, Y.: Application of  $^{13}\text{C}$ -NMR spectroscopy to paratope mapping for large antigen-Fab complexes. *FEBS Lett.* **346**, 246 (1995).
  - 9) Kainosho, M. and Tsuji, T.: Assignment of the three methionyl carbonyl resonances in *Streptomyces* subtilisin inhibitor by a carbon-13 and nitrogen-15 double-labeling technique. A new strategy for structural studies of proteins in solution. *Biochemistry* **21**, 6273 (1982).
  - 10) Igarashi, T., Sato, M., Kastube, Y., Takio, K., Tanaka, T., Nakanishi, M. and Arata, Y.: Structure of a mouse immunoglobulin G that lacks the entire  $\text{C}_{\text{H}}1$  domain: protein sequencing and small-angle x-ray scattering studies. *Biochemistry* **29**, 5727 (1990).
  - 11) Oi, V. T., Vuong, T. M., Hardy, R., Reidler, J., Dangle, J., Herzenberg, L. A. and Stryer, L.: Correlation between segmental flexibility and effector function of antibodies. *Nature(London)* **307**, 136 (1984).
  - 12) Yamaguchi, Y., Kim, H. H., Kato, K., Masuda, K., Shimada, I. and Arata, Y.: Proteolytic fragmentation with high specificity of mouse immunoglobulin G. *J. Immunol. Methods* **181**, 259 (1995).
  - 13) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**, 680 (1970).
  - 14) Meiboom, S. and Gill, D.: Modified spin-echo method for measuring nuclear relaxation times. *Rev. Sci. Instrum.* **29**, 688 (1958).
  - 15) Marquart, M., Deisenhofer, J., Huber, R. and Palm, W.: Crystallographic refinement and atomic models of the intact immunoglobulin molecule Kol and its antigen-binding fragment at 3.0 Å and 1.9Å resolution. *J. Mol. Biol.* **141**, 369 (1980).
  - 16) Deisenhofer, J.: Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9Å and 2.8Å resolution. *Biochemistry* **20**, 2361 (1981).
  - 17) Duncan, A. R., Woof, J. M., Patridge, L. J., Burton, D. R. and Winter, G.: Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG. *Nature(London)* **332**, 563 (1986).