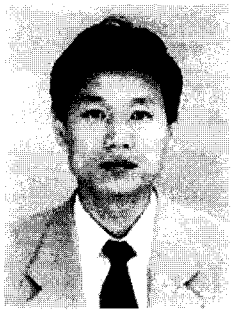
동 물 학 논 단

구조로부터 기능에 이르기까지

- 단백질 구조 기능 해석의 새로운 시점 -



박 장 수

1983년 부산대학교 화학과 (이학사)
1985년 부산대학교 대학원 화학과(이학석사)
1991년 일본 요코하마 국립대학 생명과학과(이학박사)
1997~1999년 미국 Indian University Medical School (Visiting Professor)
1992~현재 부산대학교 자연과학대학 화학과 부교수

1. 단백질 기능 발현의 메카니즘은 입체구조를 기초로 했을 때 비로소 정확하게 이해할 수 있다.

최근 「구조 생물학」이라고 하는 귀에 익숙하지 않은 단어를 자주 접할 기회가 많아졌다는 것을 느낄 수 있다. 「*Nature-structural Biology*」라는 *Nature*의 새로운 자매지의 창간이 이와 같은 흐름을 상징하고 있다.

그러면, 구조 생물학이란 대체 무엇일까? 구조 생물학은 앞으로의 생물학의 발전에 결정적 영향을 미칠 가능성을 가진 새로운 흐름이라 할 수 있다. 소위 분자생물학이 유전자 염기 배열의 해석을 기초로 생명을 이해하려고 하는 것에 대하여, 구조 생물학은 분자, 혹은 초분자계의 입체구조를 기초로 생명활동을 이해하려고 하는 것이다 (*Fig. 1*).

어떤 단백질의 기능을 이해하려고 하는 경우, 그 유전자의 염기 배열을 알면 아미노산 배열의

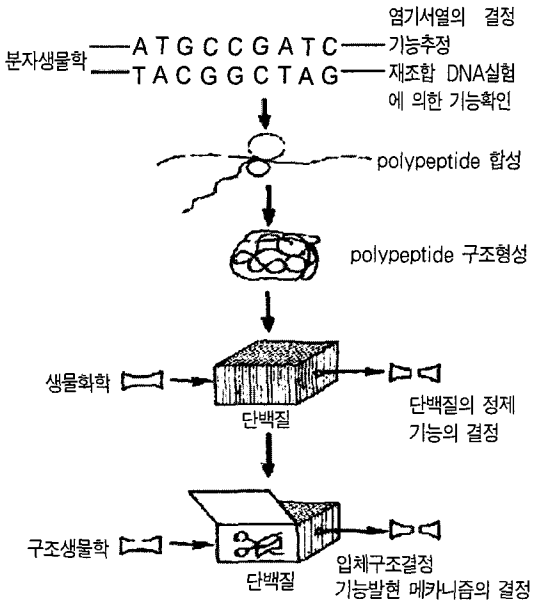


Fig. 1. 단백질 기능 해석을 위한 여러 가지 시도. 구조 생물학은 black box를 엿보고 싶어한다.

상동성으로부터 기능을 추정할 수도 있다. 그러나 이것만으로는 이 단백질의 기능을 완전히 알았다고는 할 수 없다. 역시 단백질을 정제해서 활성을 조사해 볼 필요가 있다. 이것은 전통적인 생화학적 접근법이며, 이 단계에서 단백질의 기능은 명확하게 밝혀졌다고 할 수 있다. 그러나, 우리가 알고 있는 것은 이 단백질에 어떤 input을 주면 일정의 output이 나오게 된다는 것이다. 이 경우, 단백질은 단순한 black box에 지나지 않으며, 생명이라는 드라마 중의 특정 장면에 활약하는 것이 왜 이 단백질이 아니면 안 되는 것인가에 대해서는 전혀 알 수 없다.

이 black box속에서는 단백질이 구성아미노산의 잔기을 사용하여 교묘하게 작용하고 있는 것이다. 그 작용의 상황이 보여 질 때 처음으로 단백

질 기능 발현의 메카니즘을 이해했다고 말할 수 있지 않을까. 그러나, 그 상황은 원자의 분해능을 가진 입체 안경으로만 볼 수가 있다. 구조 생물학은 이와 같은 안경을 통해서 생명의 드라마를 감상하는 것을 목표로 하고 있다. 배우의 연기와 표정이 보여질 때 비로소 드라마는 우리들의 마음을 사로잡을 수 있는 것이다.

2. 단백질의 입체구조가 차례차례 결정되어 지고 있다.

역사적으로 볼 때, 구조 생물학을 결코 새로운 것이 아니다. 생물학의 혁명은 구조 생물학의 등장에 의해 시작되었다고 해도 좋을 것이다. Waston-Crick이 제안한 DNA 2중 나선 구조가 유전학에 역사적 전환을 가져와, 분자 생물을 융성케 한 기초를 만들었다. 이것은 구조 생물학의 가장 빛나는 성과 중의 하나 이지만, 이것에 앞서 Pauling에 의한 단백질 2차구조, Perutz에 의한 헤모글로빈의 X-선 결정구조 해석에 힘입은 바가 크다. 그러나, 당시 기술로는 생체분자의 입체구조를 결정하는 것은 쉬운 일이 아니었다. 단백질 전체의 입체구조결정의 유일한 방법은 X선 결정구조 해석이었지만 그러기 위해서는 수년에서 길어질 경우 10년 단위의 시간이 걸렸다. 유전자의 염기배열 해석이 가져온 압도적인 정보량의 앞에서, X선 결정구조 해석은 상대적으로 그 존재감이 희미하다고 해도 과언은 아닐 것이다.

그와 같은 상황에 현재 커다란 변화가 찾아와 있다. 제일 큰 원인은 생체 분자의 입체구조 해석법의 급속한 진보이다. 방사광으로부터 나온 강력한 X선원과 해석법의 발전에 의해 X선 결정구조 해석의 속도는 매우 빠르게 변화되었으며, 대상도 virus 및 막 단백질에 이르기까지 확대되었다. 한편, 핵자기 공명(NMR)에 의한 수용액중의 입체구조결정법이 확립됨에 따라 단백질의 입체구조 결정의 흐름을 한층 가속시키게 되었다. 이렇게 해서 1990년에는 132개이던 protein data bank (단백질을 중심으로 한 생체분자의 원자좌표가 등록되어 있음)의 등록수가, 현재에는 10배 이상이 되어 있을 만큼 급속한 속도로 단백질의 입체구조가 알려지고 있다. 십 수년 전에만 하더라도 입체구조가 알려진 단백질이 그리 많지 않았지만 최근에는 우리에게 알려진 단백질의 대부분이 입체구조가 알려져 있거나 그 해석 중에 있다. 이런 이유로 지금은 생물학자들도 매우 자연스럽게 입체구조에 관하여 의논할 수 있게 되었다.

한편, 유전자공학이 발전함으로써 단백질의 아미노산을 바꾸어 놓는다든지 chimera 단백질을 제작한다든지 하는 것들을 간단히 행할 수 있게 되었다. 이 방법을 사용하면, 단백질의 기능과 안전성을 변화 또는 디자인하는 것을 마음대로 할 수 있다. 이것을 효과적으로 행하기 위해서는 단백질의 입체구조정보, 나아가서는 기능발현의 구조적 기초에 관한 정보가 필수적이며, 따라서, 여러 분야로부터 단백질의 정밀한 입체구조가 요구되어지기에 이르는 것이다.

3. 단백질의 snapshot으로부터 작용하는 상태를 상상할 수 있다.

X선 결정구조해석은 정밀입체구조 결정법의 제1인자이다. 그러나 약점도 있다. 결정 중에서 단백질은 열적인 움직임을 제거하면 움직임이 없다. 그렇기 때문에 보통의 방법으로는 단백질이 활동하고있는 상황을 결정구조 중에 추적하는 것은 불가능하다. 그래서 고안되어진 것중 우선 가능한 것은, 효소와 기질유사 분자(저해제)복합체의 결정을 만들어 그것의 구조를 결정(結晶)하는 것이다. 이것은 효소반응 중간체의 구조가 정지해서 보여지는 것에 해당되는 것이다.

근년에 미토콘드리아 H+-ATP 합성효소 F1 subunit의 결정구조가 밝혀졌는데 (Abrahams et al., 1994), 이것은 Fig. 2에 나타난 것처럼 에너지 변환에 관여하는 거대한 막 단백질의 수용성 domain을 가용화 한 것이다. F1은 $\alpha 3\beta 3\gamma\delta\varepsilon$ 이라고 하는 5종류, 9개의 subunit로 구성되어 있으며 분자량은 약 37만 정도의 거대한 구조체 이다. F1에는 Fig. 2의 상단에 나타나는 것처럼 ATP분해활성이 있으며, 촉매부위는 $\alpha 3\beta 3$부위에 있는 것으로 알려져 있다. 특히 흥미로운 것은 3곳에 있다고 생각되어지는 촉매부위가 기능 발현과 어떻게 관계되어져 있는가 하는 것이다. 이 단백질의 결정화(結晶化)는 기질유사 분자인 5-

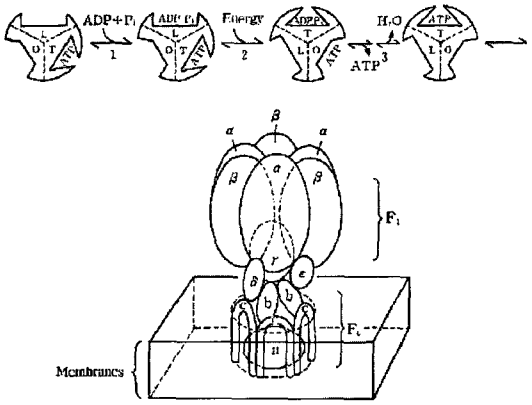


Fig. 2. H^+-ATP 합성효소의 개념도(하) (Campbell, 1999)와 X선 결정 구조 해석의 결과로부터 예견된 3개 촉매부위의 역할(상) (Abrahams et al., 1994). α, β, γ, δ, ε, a, b, c와 subunit들의 종류, F_1, F_0은 수용성 domain과 비수용성 domain을 표시함. 위의 그림에서 L은 기질과의 약한 결합부위, T은 강한 결합부위, O는 기질과도 생성물과도 결합하지 않는 부위, 촉매부위 3곳은 각각 L, T, O구조를 순차적으로 가짐으로서 ATP을 연속적으로 합성해간다.

아데닐 이미도 2인산 (AMP-PNP)과 분해 산물인 ADP가 공존하고 있는 조건에서 행하여졌다. 이렇게 하여 얻어진 결정구조는 이 효소가 어떻게 작용하고 있는가를 예측하게 한다. 효소의 촉매부위는 α와 βsubunit 사이에 있으며, 3곳의 촉매부위 모두가 다른 구조를 가지고 있다. 1곳은 ATP 유사체가, 다른 한곳은 ADP가 결합하고 있고 마지막 촉매부위에는 아무 것도 결합하고 있지 않았다. 이 결과는 Fig. 2의 상단에 나타난 것처럼, 3개의 촉매부위가 3개의 순차구조 (기질의 결합, 촉매반응의 실행, 생성물의 유리와 1대 1로 대응)를 가지면서 ATP를 합성해 가는 (역 방향으로 작용하면 분해해 나감) 것을 시사하고 있다. 이런 생각은 $\alpha 3\beta 3$가 120°씩 회전하면서 ATP을 합성해 간다는 회전 모델 설을 지지하는 것이다.

한편, *AMP-PNP*가 결합하고 있는 곳을 보면, recA의 ATP결합부위와 매우 비슷하다. 따라서, γ-인산의 가수분해는 촉매 부위에 존재하는 Gln

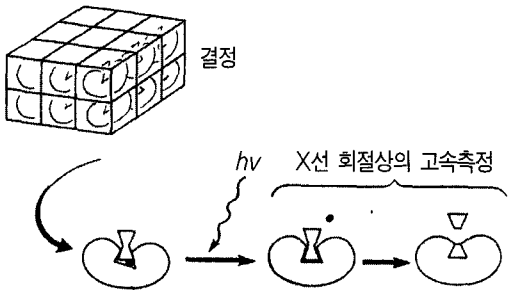


Fig. 3. 빛을 쪼이면 기질로 변화는 기질유사분자와 효소의 복합체 결정을 이용한 기능발현의 고속 X선 결정구조해석. ●▷◁: 광감수성기질유사체, ● : 광감수성부분.

이 물과 수소결합 함으로써 물을 활성화시키고 이 활성화된 물이 인산을 구핵 공격함으로써 일어나는 것도 명확히 밝혀졌다.

이와 같이 결정 (結晶)구조는 여러 상태에 있는 단백질의 snapshot을 보여줌으로써 단백질이 작용하는 상황을 상상할 수 있게 한다.

4. 함속에서 단백질을 작용시켜 고속사진을 찍는다.

앞에서 X선 결정 구조 해석은 움직이지 않는 분자만이 그 대상이 되는 것처럼 언급했다. 그러나 지금은 그것이 편견이 되려 하고 있다. 방사광이 발하는 강력한 연속 X선을 사용하여 Laue사진을 찍음으로써 ms (millisecond)보다도 짧은 시간에 결정구조의 snapshot을 얻는 것이 가능해지고 있다. 예를 들면 Fig. 3처럼 빛을 쪼이면 기질이 변화하는 것처럼 기질유사분자와 효소복합체의 결정 (結晶)을 만든다. 이것에 빛을 쪼임과 동시에 Laue법에 의해 매우 짧은 시간에 차례로 snapshot을 찍는다. 이러한 shot 구조해석을 행하면 효소가 작용하는 상황을 영화처럼 볼 수가 있다. 다만, 반응이 일어나고 있는 사이, 결정구조가 보존되어 있을 필요가 있다. 따라서, 예를 들어 단백질이 움직여도 결정 (結晶) 격자함을 부술 수는 없는 것이다.

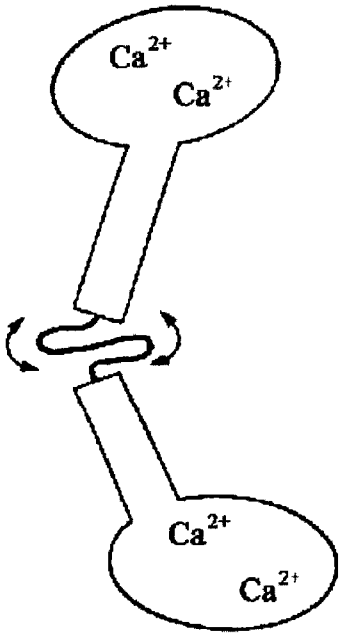


Fig. 4. NMR로 관찰된 Ca^{2+}결합 calmodulin의 동적 구조 개념도. 화살표는 운동이 심하게 일어나는 곳을 나타냄.

5. 단백질의 작용하는 현장을 본다.

1980년대에 들어, Wutrich 교수 등의 노력에 의해 핵자기공명법(NMR)도 용액 중에서의 정밀입체구조결정에 사용할 수 있게 되었다. NMR의 강점은 무엇보다도 단백질이 작용하고 있는 조건하에서 구조결정을 할 수 있다는 것이다. 따라서, 당연히 단백질이 작용하고 있는 현장을 보는 것도 가능하다. 또한, NMR은 구조와 함께 다이나믹스에 관한 정보를 함께 제공하는데, 단백질의 어떤 부위가 어느 정도 움직이고 있는 가도 알 수 있다. 단백질의 각 부위의 운동성은 기능 발현을 이해하는 데 있어서도 중요하다.

예를 들면, calmodulin이라고 하는 Ca^{2+}와 특이하게 결합하는 단백질이 있다. Ca^{2+}결합형과 표적펩티드와의 복합체의 용액 중의 입체구조가 NMR에 의해서 결정되어졌다(Ikura et al., 1992). Ca^{2+}결합형 calmodulin 단독의 구조도 밝혀져 있는데, 그것에 의하면 Fig. 4에서처럼 중앙에 약간 구부러진 철 아령형의 구조를 가지고 있다. 양끝의 Ca^{2+}결합 domain을 연결하는 부분은 주로 α- helix

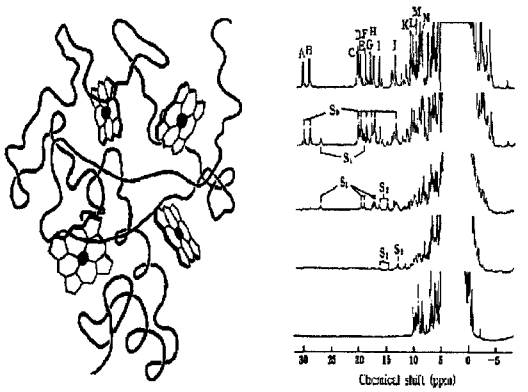


Fig. 5. 황산환원균 *Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F cytochrome* c_3의 결정구조(좌)와 400MHz ^{1}H-NMR spectra(우) (Park et al., 1997). 제일 상단은 완전 산화상태, 밑으로 내려올수록 환원이 진행된 상태, 제일 하단은 완전환원형임. 알파벳 A~N은 heme methyl signal을, Si은 5종류 spectra의 heme으로부터 유래한 signal의 예를 표시한 것임.

구조를 가지고 있지만, 중앙부근은 random 구조에 가깝게 되어있다. 이 단백질 중의 14N을 안전 동위체인 15N로 바꾸어서 amide 결합 15N의 스핀-격자이완시간(T1), 스핀-스핀이완시간(T2), nuclear Overhause effect(NOE)을 측정했다(Barbato et al., 1992). 이것들은 모두 운동성과 밀접하게 관련된 파라메타로서, 그 결과는 구조가 붕괴된 중앙부분의 불안정한 움직임이 다른 부분보다도 큰 것을 나타내고 있다. Ca^{2+}와 결합한 calmodulin은 더욱이 표적단백질과 결합해서 그들을 활성화하는 것이지만, 그럴 경우 불안정한 움직임의 많은 부분이 중요한 역할을 하지 않을까 하고 생각되어지고 있다.

다음으로, 단백질이 작용하고 있는 현장을 보자. 황산 환원균의 전자 전달단백질에는, 1분자내에 4개의 heme을 가지고 있는 cytochrome *c*3라고 하는 Fig. 5와 같은 단백질이 있다. 이 단백질을 수용액 속에서 환원시켜 가면 Fig. 5에 표시한 것처럼 1H-NMR spectra를 얻을 수 있다(Park et al., 1997). 제일상단의 완전산화형 spectra의 저자장(8~30 ppm)에서 볼 수 있는 signal은 상자성 때문에 shift한 heme methyl proton signal이다. 환원이

진행되어짐에 따라 이러한 signal은 약하게 되며 새로운 일군의 signal이 나타나게 된다. 이처럼, 완전환원될 때까지는 5종류의 spectra가 나타나기도 하고 사라지기도 한다. 이것은 어떤 종의 화학교환을 보고 있는 것이 된다. 5종류의 spectra은 각각 완전 산화형, 1전자환원, 2전자환원, 3전자환원, 완전환원상태의 spectra에 대응한다. 이와 같이 5종류의 spectra가 구별되어 관측될 수 있는 것은 이들의 분자 사이에 비교적 늦은 속도로 전자 이동이 일어나고 있음을 나타낸다. 한편, 1전자환원에서는 분자내에 들어온 전자(電子)가 4개 heme의 어디엔가 확실히 존재할 것이지만(따라서, 4개의 산화환원분자종이 있음), 그들의 spectra는 구별되어 관측되어지지 않는다. 이것은 전자가 분자내의 heme을 빠른 속도로 돌아다니면서 움직이고 있다는 것을 나타낸다.

이와 같이 우리들은 단백질분자 사이의 전자이동 및 단백질분자 내에서의 전자이동을 직접 볼 수가 있다. NMR spectra은 동시에 구조 정보를 가지고 있기 때문에, 전자이동 메카니즘을 구조와의 관계로 해석할 수가 있다.

6. 컴퓨터는 단백질의 운명을 예측한다.

컴퓨터의 급속한 진보는 구조 생물학의 발전에 크게 기여를 하고 있다. 측정의 자동화, 복잡한 구조계산, 더욱이 결과의 graphic에 의한 표시는 고속연산처리능력을 가진 컴퓨터없이는 불가능한 일이다. 그것뿐만 아니라, 컴퓨터는 단백질 구조, 운동, 기능의 예측에도 힘을 발휘한다. 현재의 연산속도로는 아직 목표를 좁힌 simulation 만이 가능하다. 예를 들면, 기질의 분자구조와 이미 알고 있는 효소 구조의 원자좌표를 주면, 그 사이의 상호작용을 예측해서 촉매반응이 진행되는 상황을 graphics로 보여줄 수 있도록 될 것이다. 21세기에는 아미노산 배열을 제시하면 정확한 입체구조로 folding되어 가는 상태를 계산에 의해서 graphics로 나타낼 수 있을지도 모른다. 이와 같은 접근도 기능 해석의 강력한 무기가 될 것이다.

7. 단백질기능 해석은 다각적 중층적으로

지금까지 본 것처럼 구조 생물학은 단백질기능 해석에 새로운 시점을 도입한 것이다. 물론 이와 같은 방법론은 지금까지 쌓아온 여러 가지 기능 해석방법과 조합함으로써 커다란 힘을 발휘할 수 있다. 구조 생물학의 장기적 목표의 하나는 제1차 유전정보인 아미노산배열 속에 포함되어 있는 고차 구조정보의 해독이다. 제2의 유전정보라고도 할 수 있는 이것이 해독되어지면, 그것의 기능정보를 읽어 내는 것도 중요한 과제일 것이다.

참 고 문 헌

Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R. Walker, J. E. 1994 Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.

Barbato, G., Ikura, M., Kay, L. E., Pastor, R. W. Bax, A. 1992 Backbone Dynamics of Calmodulin Studied by 15N Relaxation Using Inverse Detected Two-Dimensional NMR Spectroscopy: The Central Helix is Flexible. *Biochemistry* **31**: 5269-5278.

Campbell, Mary K. 1999 Biochemistry. 3rd. Saunders College Publishing, p. 554.

Ikura, M., Clore, G. M., Gronenborn, A. M., Zhu, G., Klee, C. B., Box, A. 1992 Solution Structure of a Calmodulin-Target Peptide Complex by Multidimensional NMR. *Science* **256**: 632-638.

Park, J.-S., Ohmura, T., Katayama, A., Sagara, M., Niki, K., Cusanovich, M. A. Akutsu, H. 1997 A comparison of the redox potentials of cytochrome *c*3 from *Desulvibrio vulgaris* Hildenborough with thoes from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F: Effects of amino acid substitutions on the redox potentials. *J. Electroanal. Chem.* **438**: 231-236.