

## 트립토판 중합효소 알파 소단위체 Pro<sup>28</sup> → Leu 잔기 치환체의 구조 변화

김은주 · 신혜자<sup>1</sup> · 임운기\*

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과  
<sup>1</sup>동서대학교 응용공학부 환경공학전공

### Evidences for structural changes of Pro<sup>28</sup> → Leu mutant tryptophan synthase $\alpha$ -subunit

Eun Ju Kim, Hae-Ja Shin<sup>1</sup> and Woon Ki Lim\*

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea  
<sup>1</sup>Environmental Engineering Major, Division of Applied Engineering, DongSeo University, Pusan, 616-010

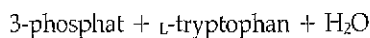
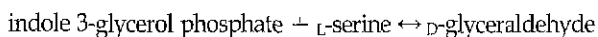
#### Abstract

A mutant tryptophan synthase  $\alpha$ -subunit, where Pro28 was replaced with Leu, tends to be expressed in recombinant *E. coli*. CD and fluorescence spectra of this protein indicate some changes in secondary and tertiary structure. Wild type protein was more or less affected by Ca<sup>2+</sup> ion in regards of the fluorescent properties of its native, unfolded and intermediate forms, but the mutant protein was not at all. The dramatic structural changes may be related to the aggregation of this mutant protein.

**Key words** – Tryptophan synthase  $\alpha$ -subunit, protein aggregate, CD, fluorescence

#### 서 론

단백질 응집은 의학 및 생명공학의 주요한 문제 중의 하나이다[1,2]. 치매 등의 질병들은 정상적으로는 수용성인 단백질이 비수용성인 단백질로 응집되면서 일어난다[3,12]. 이는 또한 유전공학적 방법으로 단백질을 과량 생산하는 과정에서 흔히 일어난다[13,15]. 트립토판 중합효소는  $\alpha_2\beta_2$  복합체로 존재하며, 다음 반응( $\alpha\beta$  반응)을 촉매하여 L-tryptophan를 합성한다.



$\alpha$  소단위체(분자량=28,600Da)는 트립토판 생합성에서 indole 3-glycerol phosphate를 indole과 D-glyceraldehyde 3-phosphate로 분해( $\alpha$  반응)하며, 조효소나 이황화결합을 가지고 있지 않아 폴딩 연구에 좋은 재료가 되고 있다[12]. 트립토판 중합효소  $\alpha$  소단위체는 잔기 1-188의 N-domain과 잔기 189-286의 C-domain으로 나누어진 두개의 폴딩 domain( $\alpha 1$ 과  $\alpha 2$ )으로 구성되어 있다. 이를 밝혀진 barrel motif의 3차구조와 비교하면 N-domain은 N-말단으로부터 helix 5개와 sheet 6개로 이루어져 있고, C-domain( $\alpha 2$ )은 3개의 helix와 2개의 sheet로 구성된다. 대장균의 트립토판 중합효소 알파 소단위체는 대장균내에서 유전공학적인 방법으로 과량 발현시켰을 때 수용성인 상태로 발현되나, 28

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : (051) 510-2289, Fax : (051) 513-9258  
E-mail : wkim@hyowon.cc.pusan.ac.kr

번 잔기가 프롤린에서 류신으로 치환되었을 때 (P28L) 단백질이 응집형태로 대부분 존재한다[10]. 본 연구에서는 응집의 원인을 규명하는 일환으로 P28L 단백질의 구조적인 변화를 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 시약, 박테리아 및 플라스미드

모든시약은 순도가 높은 것을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 트립토판 중합효소 알파 소단위체의 대량발현은 *trpA* (tryptophan synthase  $\alpha$ -subunit) 유전자를 포함하는 플라스미드 *ptactrpA*를 사용하였다[18,10]. 이 플라스미드는 D-젓당에 의해 대량발현하는 *tac* 전사조절인자를 가지고 있다.

#### 단백질의 과량생산 및 정제

단백질의 과량발현은 플라스미드를 가진 대장균을 20ml TYS (1% bactotrypton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) 배지에서 약16시간 배양한 후, 이를 새로운 1ℓ TYS매체에 옮겨 2시간 후 젓당 (최종농도 1%)을 넣고 24시간 더 배양하였다. 대장균을 원심분리하여 용액을 제거하는 방법으로 2회 반복하여 여분의 배지성분을 제거하였다. 수확한 대장균을 같은 용액 5ml에 현탁하고 초음파 파쇄기로 세포를 깨 후 원심분리 (24,000×g, 20분)로 inclusion body인 침전물을 얻었다. 침전물을 같은 용액으로 3회 씻었다. inclusion body인 침전물을 얻은 후 50mM TrisHCl, pH 7.8, 6M urea 용액에 용해시켰다. 용해되지 않은 것은 원심분리로 제거하였다. 용해된 단백질을 10mM KPO<sub>4</sub> (pH 7.8), 5 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 10mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 0.2mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) 용액에 투석하여 구조가 재형성되도록 하였다. 이로부터의 단백질 정제는 자연형의 단백질의 분리와 같은 방법으로 하였다[10,14]. 정제 순도는 SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophosis) 방법으로 확인하였다[8].

#### Spectrophotometry

Circular dichroism (CD)은 JASCO J-715로 100nm/min의 속도로 측정하였으며[5], 형광은 275nm에서 excitation시켰으며, Hitachi사의 모델 F-4500으로 측정하였다[7].

### 결과 및 고찰

Inclusion body의 형성이 폴딩과정에서의 중간체들이나 misfolding된 단백질들에 의해 일어난다고 알려져 있어 이들의 형성정도에 따라 *in vivo* 폴딩의 기작을 변화를 유추해 볼 수 있다[10].

Fig. 1은 트립토판 중합효소  $\alpha$  소단위체 자연형과 P28L

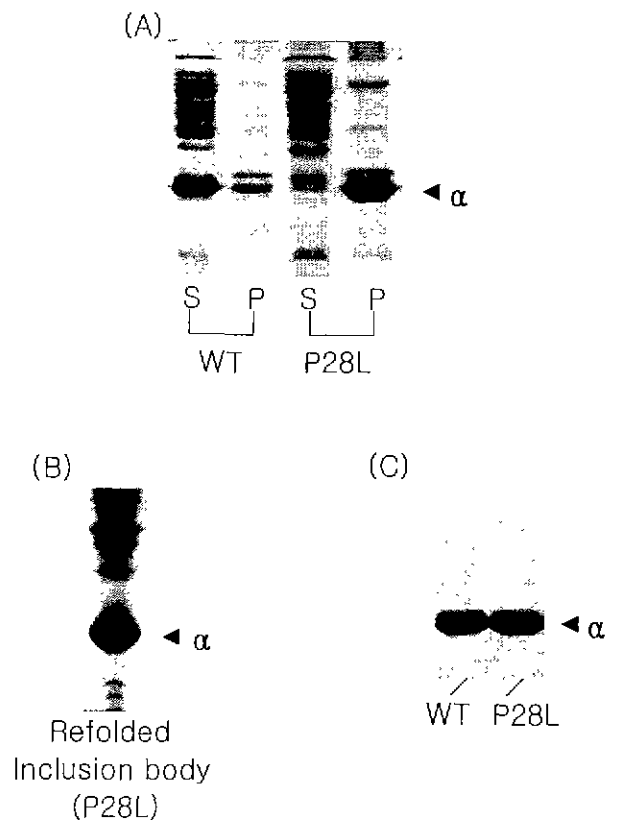


Fig. 1. SDS-PAGE of the wild type (WT) and mutant (P28L)  $\alpha$  subunits.

(A) The  $\alpha$ -subunits were overexpressed by lactose and lysed as described in materials and methods. 50 $\mu$ g of each supernatant and pellets of crude extracts were electrophoresed by SDS-PAGE. The pellet amount is equivalent to that of supernatant in term of volume. (S) and (P) were implicated supernatant and pellet, respectively. (B) The insoluble pellet (P28L) was resuspended in 6M urea, and kept at room temperature for 30min and then recentrifuged at 24,000g for 45min to remove insoluble materials. The inclusion body solubilized in 6M urea was dialysed, and then centrifuged. (C) Purified wild type and 28L mutant protein. urther purification were performed by HPLC.

치환 단백질을 과량발현하여 수용성 상태와 inclusion body 상태로 분리하여 SDS-PAGE로 전개한 것이다. 자연형은 과량발현시 대부분 수용성(S)으로 발현되었으며, inclusion body (P)로는 거의 나타나지 않았다. 이와는 달리 잔기 28번을 류신으로 치환한  $\alpha$  소단위체의 경우는 inclusion body로 나타남을 볼 수 있다(Fig. 1 (A)). Inclusion body를 형성하는 P28L  $\alpha$  소단위체를 6M urea 용액에 시킨후 요소의 농도가 0.6M 되도록 희석하여 구조재형성이 시작되도록 하였다(Fig. 1 (B)). 수용성의 자연형단백질과 구조 재형성된 P28L 돌연변이체 단백질을 이온크로마토그래프로 순수분리하였다(Fig. 1 (C)).

먼저 자연형과 P28L 치환 단백질의 구조 변화 정도를 CD와 형광으로 측정하였다. 222nm 부위의 CD는 2차구조의 함량을 나타냄으로 P28L 잔기 치환체는 상당한 정도로 2차구조의 양이 감소하였음을 시사한다(Fig. 2). 단백질의 형광은 방향족 잔기에 의해서 나타나는 데 이를 둘러싸고 있는 분자환경에 의해 영향을 받음으로 3차 구조 변화 척도로 쓰여지고 있다[16]. 트립토판 중합효소 알파 소단위체의 형광 성질은 주로 티로신(이 단백질은 트립토판이 없음)에 의한 것이다[9]. P28L 잔기 치환 단백질의 형광의 세기가 자연형에 비해 상당한 정도로 감소되었다(Fig. 3) 이는 또한 3차구조에서도 상당한 구조의 변화가 있을 수 있음을 시사한다. CD나 형광의 감소된 세기는 단백질 양의 차이에 기

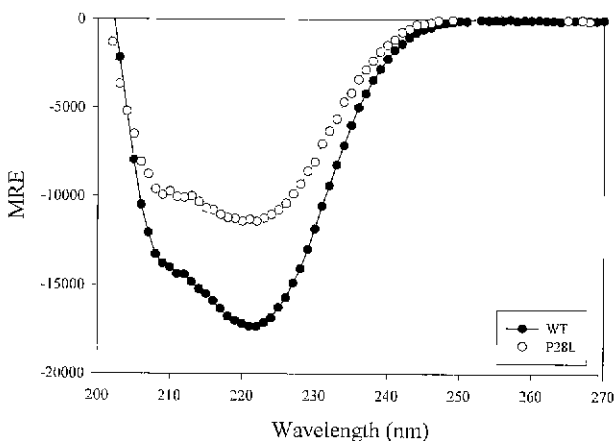


Fig. 2. The secondary structural of WT and P28L. The circular dichroism of WT (●, —) and P28L (○, ---) were monitored from 270 to 180nm with a scanning speed of 100nm/min and accumulated and averaged for each spectrum. The final protein concentration was 150  $\mu$ g/mL.

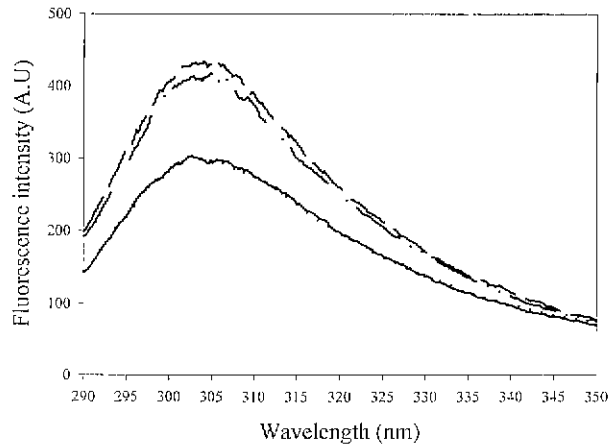


Fig. 3. The Effect of Ca<sup>2+</sup> on the tertiary structure of the protein. Changes in the intrinsic Tyr fluorescence of WT and P28L: The protein in 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 1mM  $\alpha$ -mercaptoethanol was added in the absence or the presence of 50  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, and incubated for 5 ~ 6h at 25°C. Fluorescence intensity was measured at the emission wavelength of 303nm with excitation wavelength of 275nm. Lines: WT (—), WT + Ca<sup>2+</sup> (---), P28L (—·), P28L + Ca<sup>2+</sup> (---·)

인할 수도 있다[4]. 또한 단백질 분해 효소 등에 의해서 변화된 단백질에 의할 수도 있다[6]. 이를 확인하기 위하여 SDS-PAGE로 전개하여 양과 단백질 밴드 양상을 비교하였으나 단백질 양이나 크기에 있어 차이를 볼 수 없었다. 따라서 실험적인 에러에 의한 것은 아니다. 그러나 자연형의 구조와는 다른 구조를 갖는 multimer의 가능성은 배제할 수 없다.

치매환자에서 나타나는 paired helical filament tau (PHF-tau)의 응집을 칼슘이 촉진할 수 있는 것으로 알려져 있다 [17]. 따라서 P28L 단백질의 경우에도 Ca<sup>2+</sup> 이온이 침전에 관여하는 지를 조사하였다. 단백질 용액에 이온을 첨가한 후 원심분리하여 단백질 침전 여부를 조사하였으나 침전된 단백질을 확인할 수 없었다(데이터 생략). 따라서, P28L 치환 단백질의 응집은 칼슘이온에 의한 것은 아닌 것으로 보인다. 그러나 칼슘이온이 어떻게 구조에 영향을 미치는 지를 살펴보았다. 칼슘 이온이 형광에 미치는 영향을 조사한 결과(Fig. 3), 자연형의 경우는 칼슘이온에 의해 형광의 세기가 약간 감소하였으나 P28L 잔기 치환체의 경우는 전혀 변화가 없었다. 이는 자연형의 경우 칼슘이온과의 결합이 일어나고 있으나, P28L 잔기치환체의 경우는 칼슘이온과

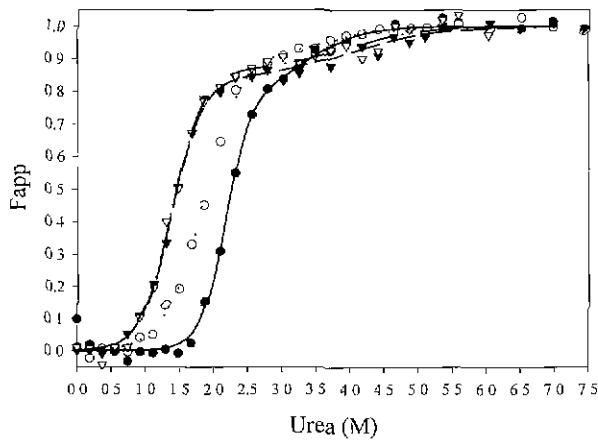


Fig. 4. Urea-induced unfolding equilibrium curves of WT and P28L.

Urea-induced equilibrium unfolding : The protein in 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.8) containing 1mM  $\alpha$ -mercaptoethanol was added with various concentration of urea in the absence or the presence of 50  $\mu$ M  $\text{CaCl}_2$ , and incubated for 5 ~ 6h at 25 $^\circ\text{C}$ . Fluorescence intensity was measured at the emission wavelength of 303nm with excitation wavelength of 275nm. Data was fit to three state model. Lines are fit curves : WT(●, —), WT +  $\text{Ca}^{2+}$  (○, ---), P28L (▼, —), P28L +  $\text{Ca}^{2+}$  (▽, ---).

결합이 없거나 결합하여도 어떤 이유로 형광에 영향을 미치지 않고 있음을 나타낸다. 또한 이 두 단백질의 안정도 및 평형 상태의 unfolding 성질에 미치는 칼슘이온의 영향을 조사하였다(Fig. 4). 이 또한 칼슘이온이 형광에 미치는 영향과 비슷한 결과를 보여주었다. 자연형의 경우는 칼슘이온에 의해 안정도가 크게 떨어졌다. 반면에 P28L 잔기 치환체의 경우는 칼슘이온에 의해 영향을 받지 않았다. 자연형의 경우 3가지 형 즉, unfolded, folded, intermediate의 모델에 잘 맞는 것으로 알려져 있다[11]. 본 데이터도 이 모델에 잘 맞고 있다. 이 모델에 따르면, 칼슘이온이 unfolded 형이나 intermediate형과 더 잘 결합하여 이 구조를 안정화시키는 것으로 보인다. 그 결과 전체적으로 안정도를 감소시킨 것으로 보인다. 반면, P28L 잔기 치환체의 경우는 이러한 변화를 보여주지 않고 있으므로 칼슘이온과의 상호결합이 없는 것처럼 보인다. 따라서 치매환자에서 나타나는 paired helical filament tau (PHF-tau)의 응집에서 처럼 칼슘이 P28L 잔기 치환체를 응집시키지는 않으며 오히려 반대로 어떠한 상호작용도 보여주지 않고 있다. 본 실험의 결

과는 P28L 잔기 치환 트립토판 중합효소 알파 소단위체가 native, folding, intermediate구조에서 상당한 변화가 있음을 나타낸다. 이러한 변화가 이 단백질의 응집에 관여하는 것으로 보인다.

## 요 약

28번 잔기가 프롤린에서 류신으로 치환된 트립토판 중합효소 알파 소단위체는 (P28L) 응집형태로 대부분 발현된다. 본 연구에서는 응집의 원인을 규명하는 일환으로 P28L 단백질의 구조적인 변화를 조사하였다. 이 단백질의 CD와 형광성질은 2차 및 3차 구조가 상당히 변화하였음을 시사하였다. 또한 칼슘 이온이 형광 및 평형 상태의 unfolding 성질에 미치는 영향을 조사한 결과, 자연형의 경우는 칼슘이온에 의해 변화하였으나, P28L 잔기 치환체의 경우는 전혀 변화가 없었다. 구조 변화가 이 단백질의 응집에 관여하는 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 부산대학교 기성회지원 학술연구조성비에 의해 연구되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. Andrew, D. G., M. W. Shauna and B. C. Jilian. 1996. Protein folding in vivo and renaturation of recombinant proteins from inclusion bodies. *Molecular Biotechnology* 6, 53-64.
2. Andrews, B., H. Adari, G. Hannig, E. Lahue, M. Gosselin, S. Martin, A. Ahmed, P. J. Ford, E. G. Hayman and S. C. Makrides. 1996. A tightly regulated high level expression vector that utilizes a thermosensitive lac repressor: production of the human T cell receptor V beta 5.3 in *Escherichia coli*. *Gene* 182, 101-109.
3. Carrell, R. W. and D. A. Lomas. 1997. Conformational disease. *Lancet* 350, 134-138.
4. Choi, S. G. and J. K. Hardman. 1995. Unfolding properties of tryptophan-containing alpha-subunits of the *Escherichia coli* tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.* 270, 28177-28182.

5. Clark, E. D. B. 1998. Refolding of recombinant proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**, 157-163.
6. Goldberg, M. E., R. Rudolph and R. Jaenicke. 1991. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry* **30**, 2790-2797
7. Kaye, R., J. Bernhagen, N. Greenfield, K. Sweimeh, H. Brunner, W. Voelter and A. Kapurniotu. 1999. Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. *J. Mol. Biol.* **287**, 781-796.
8. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
9. Laue, T. M., R. Lu, U. C. Krieg, C. T. Esmon and A. E. Johnson. 1989. Ca<sup>2+</sup>-dependent structural changes in bovine blood coagulation factor Va and its subunits. *Biochemistry* **28**, 4762-4771.
10. Lim, W. K., H. J. Shin, D. L. Milton and J. K. Hardman. 1991. Relative activities and stabilities of mutant *Escherichia coli* tryptophan synthase alpha subunits. *J. Bacteriol.* **173**, 1886-1893.
11. Marston, F. A. O. 1986. The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* **240**, 1-12.
12. Milton, D. L., J. D. Naier, R. M. Myers and J. K. Hardman. 1986. In vitro mutagenesis and overexpression of the *Escherichia coli* trpA gene and the partial characterization of the resultant tryptophan synthase mutant alpha-subunits. *J. Biol. Chem.* **261**, 16604-16615.
13. Netzer, W. J. and F. U. Hartl. 1998. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends in Biochem. Sci.* **23**, 68-73.
14. Sarker, K. D. and J. K. Hardman. 1995. Affinities of phosphorylated substrates for the *E. coli* tryptophan synthase alpha-subunit: roles of Ser-235 and helix-8' dipole. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **21**, 130-139.
15. Thomas, P. J., B. H. Qu and P. L. Pedersen. 1995. Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 456-459.
16. Wetzel, R. 1992. Part B: In Vivo Pathways of Degradation and Strategies for Protein Stabilization, pp. 43-48, In Ahern, T. J. and A. C. Manning. (eds.), *Stability of Protein Pharmaceuticals*, Vol. 3, Plenum, New York.
17. Yang, L. S. and H. Ksiazek-Reding. 1999. Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> selectively induce aggregates of PHF-tau but not normal human tau. *J. Neurosci. Res.* **55**, 35-43.
18. Zitzewitz, J. A. and C. R. Matthews. 1999. Molecular dissection of the folding mechanism of the alpha subunit of tryptophan synthase: an amino-terminal autonomous folding unit controls several rate-limiting steps in the folding of a single domain protein. *Biochemistry* **38**, 10205-10214.

(Received December 22, 2000; Accepted February 2, 2001)