

Effects of Temperature and Urea on *in vitro* Aggregation of Tryptophan Synthase α -Subunits

Myung Won Park, Jae Kap Jeong, Hae Ja Shin¹ and Woon Ki Lim[†]

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

¹Environmental Engineering Major, Division of Applied Engineering, Dongseo University, Busan, 617-716, Korea

Protein aggregation could be problematic as causes of diseases and hindrance in the production of useful recombinant proteins. Aggregation of mutant tryptophan synthase α -subunits was examined by treatment with urea and at high temperature. Large amorphous aggregate seemed to appear by heat treatment, while more various aggregates in size were formed by treatment with urea at low concentration. The result indicates that different aggregate in size could be formed depending on the treatment condition, suggesting different mechanisms underlying aggregation processes.

Key Words: Aggregate, Dimer, Mutant, Tryptophan synthase

서 론

정상적으로 수용성인 단백질이 불용성의 덩어리 (aggregate)를 형성하면 치매 (Alzheimer's disease), 광우병 (bovine spongiform encephalopathy) 등 심각한 질병을 초래한다^{6,12,17}. 단백질 덩어리의 형성은 유전공학적인 방법으로 단백질을 생산하는 과정에서도 흔히 접하는 문제이기도 하다⁷. 단백질 덩어리는 단백질의 불안정한 3차 구조나 3차 구조 형성과정 (folding)의 중간 구조체에 의해 형성되는 것으로 보이나 그 구체적인 기작은 아직 밝혀져 있지 않다. 단백질 덩어리로는 무정형, 아밀로이드 (amyloid), 3D 도메인 교환에 의한 중합 등이 알려져 있다.

트립토판 중합효소 α -소단위체는 유전공학적인 방법으로 대장균에서 단량체 (monomer)로 과량 생산되어 왔다. 그러나, 비정상적인 이량체 (dimer)가 생성되는 잔기치환체 또한 발견된 바 있다⁸. 139번 잔기가 트립토판 (F139W)으로 치환된 α -소단위체의 24번 잔기 트레오닌을 알라닌, 세린 또는 리신으로 추가 치환한 돌연변이체들은 (T24A/F139W, T24S/F139W, T24K/F139W) 이량체로도 발견되었다. 두 개의 잔기가 효소 반응에 관여하는 경우, 각 잔기의 치환체는 효소활성도가 없

지만 3D 도메인 교환에 의해 생긴 다중체 (multimer)는 효소 활성도가 다시 나타날 수 있다¹³. 이량체의 구조를 밝히기 위한 연구의 일환으로 본 연구에서는 트립토판 중합효소의 촉매기인 49와 60번 잔기가 치환된 E49G와 D60N 치환체를 이량체를 형성하는 잔기치환체에 추가적으로 치환하여 삼중 치환체를 만들었다. 이 치환체의 *in vitro*에서의 다량체 및 단백질 덩어리의 생성에 미치는 온도와 요소의 영향을 조사하여 본 논문에서 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약, 박테리아 균주 및 플라스미드

모든 시약은 순도가 높은 것 (ultrapure)을 Sigma사 (USA)로부터 구입하여 사용하였다. 대장균 균주 RB797 (*F' lacI^q proL8/arg Nal^r Fir^r recA sup lac proXIII*)는 트립토판 중합효소 단백질을 발현하는데 사용하였다. *trpA* 유전자를 포함하고 있는 플라스미드 *ptactrpA*는 단백질의 대량발현과정에 사용하였다¹⁰. *trpA* 유전자는 _D-젓당에 의해 대량발현이 유도되는 *tac* 전사조절인자를 가지고 있다¹⁰.

2. 클로닝 및 형질전환

E49G나 D60N 잔기치환 돌연변이 부분을 139번과 24번 잔기가 치환된 플라스미드의 해당부위와 교체하여 삼중잔기 치환체를 클로닝하였다. 이 때 플라스미드 제한효소 *Clai*I과 *Bss*III로 자른 다음 분리하여 결합시키고, 이를 대장균에 CaCl₂ 방법으로 형질전환시켰다¹⁵.

*논문 접수: 2003년 11월 30일

수정재접수: 2003년 12월 11일

[†]별책 요청 저자: Woon Ki Lim, Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University Jangjeon-dong, Keumjeong-district, Busan 609-735, Korea
Tel: 051-510-2289, Fax: 051-513-9258
e-mail: wklim@pusan.ac.kr

이 논문은 2002년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2002-015-CP0342).

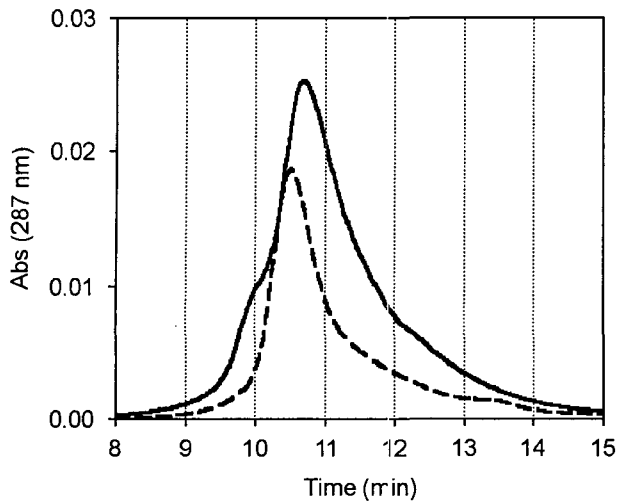


Fig. 1. Size-exclusion HPLC of mutant tryptophan synthase α -subunits. T24A/E49G/F139W and T24A/D60N/F139W were analysed on size-exclusion HPLC using Protein KW-804 (Shodex) column in 10 mM KPO_4 buffer (pH 7.8) containing 0.2 mM EDTA and 1 mM β -mercaptoethanol at a flow rate of 1 ml/min. T24A/E49G/F139W (dot line) protein was eluted only at a retention time of 10.5 min. But T24A/D60N/F139W (solid line) was eluted at the retention times of 10.7 and 9.8 min.

3. 단백질의 분리 및 전기영동

야생형 및 잔기치환 단백질들을 대장균에서 대량발현시키고 분리한 방법은 이미 보고된 방법에 따랐다¹¹⁾. 황산암모늄 ($(NH_4)_2SO_4$) 침전법과 이온크로마토그래피 HPLC로 분리하였다¹¹⁾. 정제된 단백질의 순도는 SDS-PAGE를 실시하여 Coomassie Brilliant BlueR로 염색하여 확인하였다. 순수 정제된 야생형의 α -소단위체의 농도는 $E^{1\%}_{278nm} = 4.4$ 를 사용하여 결정하였다^{1,5)}. 잔기치환 단백질의 경우에는 야생형을 표준으로 microbiuret 방법을 사용하였다⁷⁾.

4. 단백질의 온도 및 요소 처리

모든 처리는 0.2 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol, 10 mM phosphate buffer (pH 7.8) 용액에 있는 단백질을 사용하였다. 단백질의 열처리는 항온수조에서 언급된 온도와 시간 동안 처리하였다. 요소용액은 사용직전에 만들어 사용하였다. 비변성 (native) PAGE는 아크릴아마이드 7.5%, pH 8.9에서 100 V의 전압과 50 mA의 전류로 4°C에서 전개하였다⁹⁾.

결 과

1. α -소단위체의 이량체 형성

트립토판 중합효소의 촉매기인 49와 60번 잔기가 치환된 E49G와 D60N 치환체가 이량체를 형성하는 잔기치환체에 추가적으로 치환하여 삼중치환체를 만들었다. 즉, T24A/E49G/

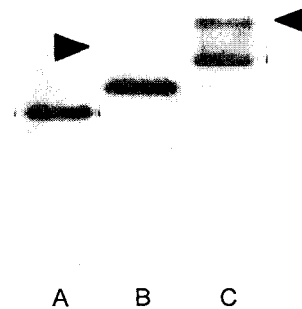


Fig. 2. Native PAGE of α -subunits. The wild type (A) and mutant proteins (10 μ g) were run on native PAGE. The dimeric forms (arrow head) was manifest for T24A/D60N/F139W (C), but was a little formed for T24A/E49G/F139W (B).

F139W, T24S/E49G/F139W, T24K/E49G/F139W, T24A/D60N/F139W, T24S/D60N/F139W, T24K/D60N/F139W를 얻었다. 이들을 대장균 내에서 발현시킨 결과 T24A/E49G/F139W, T24A/D60N/F139W만이 수용액 상태에서 과량 생산됨을 확인하였다. 따라서 이 두 잔기치환체를 대상으로 연구를 진행하였다.

먼저 T24A/E49G/F139W, T24A/D60N/F139W가 이량체를 형성하는지를 확인하기 위해 size-exclusion HPLC를 수행하였다 (Fig. 1). 이 두 가지 삼중치환체 단백질의 단량체는 각각 10.5, 10.7분에서 용출되었다. T24A/D60N/F139W는 9.8분에서 추가로 용출되는 단백질이 있음이 확인되었다. 이를 비변성 (nondenaturing, native) PAGE로 전개한 결과 이량체의 존재가 확인되었다 (Fig. 2). T24A/D60N/F139W같은 경우는 이량체와 거의 같은 양으로 존재하고 있다. 반면 T24A/E49G/F139W는 HPLC에서는 이량체를 확인할 수 없었지만 비변성 겔에서는 이량체가 소량 존재하는 것을 알 수 있다. 따라서, 이들 삼중치환체도 이중치환체와 마찬가지로 이량체가 생성됨을 알 수 있다.

2. 단백질 덩어리 형성에의 온도와 농도의 영향

단백질 덩어리 형성은 분자간 상호작용에 의한 것임으로 온도뿐만 아니라 단백질의 농도에 영향을 받는다. 따라서 단백질 농도의 변화에 따른 단백질 덩어리 형성을 유도하며 단백질 덩어리 형성을 살펴보았다. 온도를 45°C로 고정시키고 단백질의 농도를 서로 다른 4가지 농도, 즉 1, 4, 7, 10 mg/ml에서 시간별로 확인하였다 (Fig. 3). T24A/E49G/F139W의 경우 45°C에서는 1, 4 mg/ml 농도에서 30분까지 덩어리가 형성되지 않았지만, 7, 10 mg/ml에서는 15분에서 덩어리가 형성되기 시작하여 농도가 증가함에 따라 그 양 또한 증가하였다.

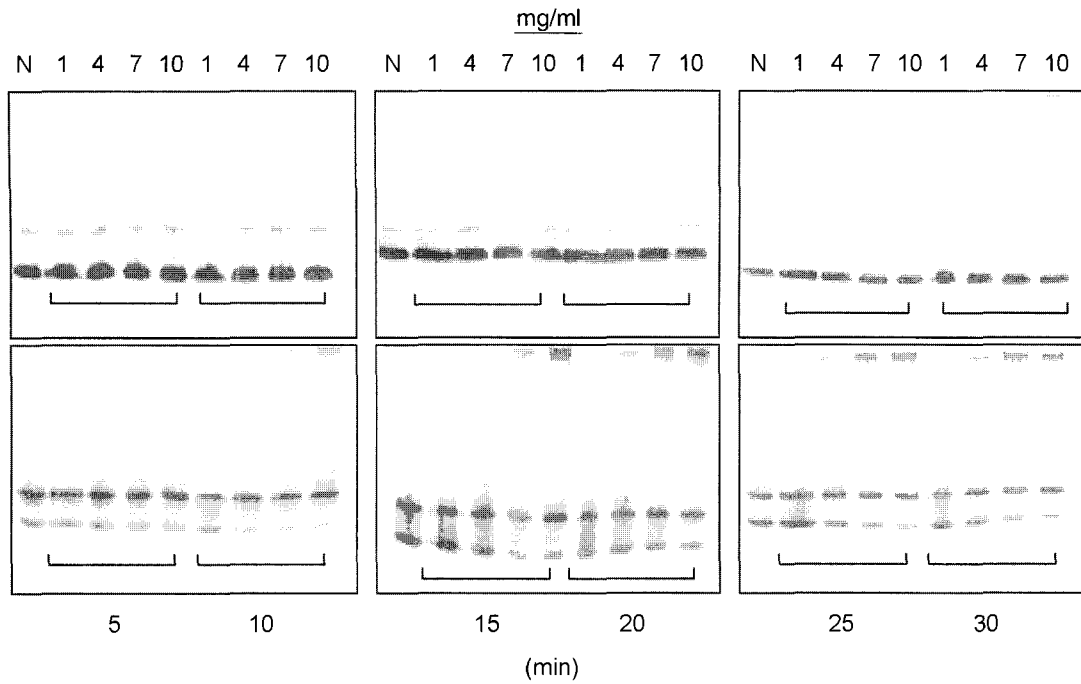


Fig. 3. Concentration dependency of protein aggregation at 45°C. T24A/E49G/F139W (top panels) and T24A/D60N/F139W (bottom panels) proteins at various concentrations were incubated at 45°C for the indicated time and then run on native PAGE. N, proteins before heat treatment.

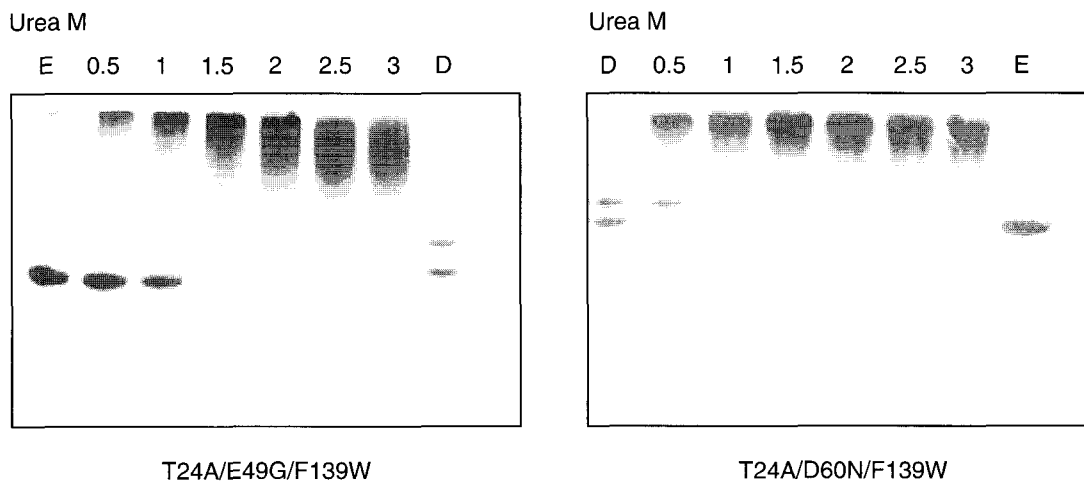


Fig. 4. Effect of various urea concentration on protein aggregation. The mutant proteins at 10 mg/ml were incubated at 25°C for 40 h in presence of the indicated concentration of urea. E, the native form of T24A/E49G/F139W; D, the native form of T24A/D60N/F139W.

T24A/D60N/F139W의 경우 4 mg/ml에서도 15분부터 덩어리가 보였으며, 7 mg/ml에서는 5분에 덩어리가 형성되기 시작하여 점차 그 양이 증가하였다. 단백질은 겔상에서 단량체보다 좀 더 위쪽으로 분포하기도 하나, 대체로 겔의 시작점에 위치하고 있다. 이는 대체로 열에 의해 생성된 덩어리들이 매우 크다는 것을 나타낸다. 덩어리가 일단 형성되기 시작하면 매우 큰 크기의 덩어리로 빠르게 진행되어지는 것을 암시한다.

3. 단백질 덩어리 형성에의 요소 영향

요소는 단백질 변성제로 잘 알려져 있다. 그러나 이러한 변성 효과는 요소 농도에 영향을 받는다. 단백질 농도는 10 mg/ml로 고정하고, 요소를 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 M 첨가하여 25°C에서 40시간 반응시켰다. 반응 후 비변성 PAGE로 확인한 결과 T24A/E49G/F139W와 T24A/D60N/F139W 모두 0.5 M 부터 단백질 덩어리가 형성되기 시작하며, 요소 농도가 증가

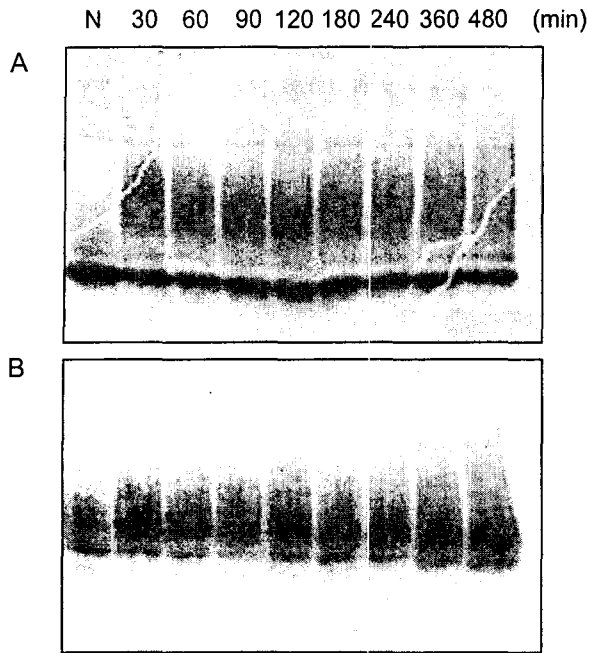


Fig. 5. Time course of urea-treated proteins in aggregation. T24A/E49G/F139W (A) and T24A/D60N/F139W (B) proteins (10 mg/ml) were incubated at 25°C in presence of 1.5 or 1.0 M of urea, respectively, for the indicated time. Samples were run on the native PAGE. N, proteins before urea treatment.

하면서 덩어리 양도 증가하였다 (Fig. 4). 온도를 처리했을 때에 비해 겔상에서 단백질이 넓게 분포함을 보여주고 있다. 이는 요소에 의해 높은 온도를 처리했을 때와는 달리 여러 가지 다양한 크기의 덩어리들이 생성되고 있음을 보여주고 있다.

다음으로 T24A/E49G/F139W와 T24A/D60N/F139W를 각각 요소 1.5 M과 1.0 M 처리시 시간에 따른 덩어리 변화를 살펴보았다 (Fig. 5). 초기 30분부터 이미 어느 정도 덩어리가 생성된 후 양이 거의 일정한 상태로 8시간까지 유지되고 있음을 보여주고 있다. Fig. 4에서 40시간 처리했을 때 생성된 양을 비교하여 보면, 8시간까지는 많은 양이 여전히 단량체로 남아 있는 반면 40시간 후에는 단량체는 보이지 않고 있다. 이는 8시간 후에 덩어리 형성이 지속해서 진행되고 있음을 나타낸다. 또한 앞서 확인한 중간 크기의 다양한 덩어리들을 확연히 확인할 수 있다 (Fig. 5).

본 연구결과 트립토판 중합효소는 낮은 농도의 요소 처리에 의해서도 단백질 덩어리가 생성됨을 알 수 있다. 온도에 의해서는 매우 큰 크기의 덩어리가 생기는 데 비해, 요소에 의해서는 다양한 크기의 덩어리가 생기고 있음을 보여주고 있다. 이러한 차이는 덩어리의 구조가 다를 수 있음을 시사해 준다. 온도 처리에 의해서는 무정형의 덩어리로, 요소에 의해서는 3D 도메인 교환에 의한 섬유상 덩어리로 추정된다. 요소 처리 특히 본 실험에 쓰여진 농도에서는 본 실험에 쓰여진 단

백질들이 완전 변성되지 아니하고 부분적인 구조 변화가 일어날 가능성이 높다⁸⁾.

고 찰

단백질은 단백질 폴딩과정을 거쳐 일정한 3차 구조를 형성하여야만 정상적인 기능을 나타낼 수 있다. 그러나 어떠한 외부적인 환경에 의해 불완전한 3차 구조나 폴딩과정에서의 중간체들에 의해 단백질이 덩어리를 형성함^{4,2,3)}에 따라 세포나 조직에 구조적, 기능적인 이상을 초래하는 심각한 질병들에도 관여한다^{6,12,17)}. 또한 단백질 덩어리의 형성은 유전공학적 방법으로 단백질을 생산하는 과정에서도 흔히 접하는 문제이기도 하다⁷⁾. 하지만 이러한 단백질 덩어리 형성에 대한 구체적인 기작은 아직 밝혀져 있지 않다. 따라서 이러한 단백질 덩어리 형성에 대한 연구가 매우 중요함을 알 수 있다.

대장균 트립토판 중합효소 (tryptophan synthase) α -소단위체는 유전공학적인 방법으로 대장균에서 단량체 (monomer)로 광량 생산되어 왔다. 하지만 비정상적인 이량체 (dimer)가 생성되는 잔기치환체가 발견된 바 있다⁸⁾. 이러한 이량체를 형성하는 돌연변이체에 49번과 60번을 각각 돌연변이 시킨 것을 클로닝하여 삼중돌연변이체를 만들어 이들의 덩어리 형성에 미치는 온도와 요소의 영향을 조사하였다.

먼저 T24A/E49G/F139W, T24A/D60N/F139W가 이량체를 형성하는지를 확인하기 위해 size-exclusion HPLC와 비변성 (nondenaturing, native) PAGE로 전개한 결과 삼중돌연변이체 또한 이량체의 존재가 확인되었다.

단백질 덩어리 형성은 분자 간 상호작용에 의한 것임으로 온도뿐만 아니라 단백질의 농도에 영향을 받는다. 단백질 농도의 변화에 따른 단백질 덩어리의 형성을 유도하며 단백질 덩어리 형성을 살펴 본 결과 단백질 덩어리 형성에서 단백질 농도가 증가함에 따라 덩어리의 양 또한 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 단백질은 겔상에서 단량체보다 좀 더 위쪽으로 분포하기도 하나, 대체로 겔의 시작점에 위치하는 것으로 보아 대체로 열에 의해 생성된 덩어리들은 매우 크다는 것, 일단 덩어리가 형성되기 시작하면 매우 큰 크기의 덩어리로 빠르게 진행되어지는 것을 알 수 있었다.

요소는 단백질 변성제로 잘 알려져 있다¹⁴⁾. 요소를 처리하여 단백질 덩어리 형성을 관찰하여 보았다. 요소 농도가 증가하면서 덩어리 양도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 요소에 의한 덩어리의 형성은 온도를 처리했을 때에 비해 겔상에서 단백질이 넓게 분포하는 것으로 보아 이는 높은 온도를 처리했을 때와는 달리 여러 가지 다양한 크기의 덩어리들이 생성되고 있음을 보여주고 있다.

요소 1.5 M과 1.0 M 처리시 시간에 따른 덩어리 변화를

살펴보았다. 반응 시간 초기부터 덩어리가 형성이 되기 시작하여 8시간까지 덩어리의 형성 양이 일정함을 확인할 수 있었다. 하지만 앞서 40시간 처리했을 때와 덩어리 생성 양을 비교하여 보면, 8시간까지는 여전히 많은 양이 단량체로 남아 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 8시간 후에 덩어리 형성이 계속해서 진행되고 있음을 나타낸다.

본 연구결과 트립토판 중합효소는 낮은 농도의 요소 처리에 의해서도 단백질 덩어리가 생성되고 온도에 의해서는 매우 큰 크기의 덩어리가 생기는 데 비해, 요소에 의해서는 다양한 크기의 덩어리가 생기고 있음을 보여주고 있다. 이는 처리 조건에 따라 여러 가지 형태의 덩어리가 생성될 수 있으며, 이러한 차이는 덩어리의 구조가 다를 수 시사해 준다. 온도 처리에 의해서는 무정형의 덩어리가, 요소 처리 특히 본 실험에 쓰여진 농도에서는 본 실험에 쓰여진 단백질들이 완전 변성되지 아니하고 부분적인 구조 변화가 일어날 가능성이 높아 요소에 의해서는 3D 도메인 교환에 의한 섬유상 덩어리로 추정된다¹³⁾.

참 고 문 헌

- 1) Adachi O, Kohn LD and Miles EW (1974): A rapid method for preparing crystalline β_2 subunit of tryptophan synthase of *Escherichia coli* in high yield. *J Biol Chem*, **249**: 7756-7763.
- 2) San Biagio PL, Martorana V and Emanuele A (1999): Interacting processes in protein coagulation. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **37**: 116-120.
- 3) Brian G, Lefebvre and Robinson AS (2003): Pressure treatment of tailspike aggregates rapidly produces on-pathway folding intermediates. *Biotechnol Bioeng*, **82**: 595-604.
- 4) Fink AL (1998): Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies, and amyloid. *Folding Des*, **3**: 9-23.
- 5) Faeder EJ and Hammes GG (1970): Kinetic studies of tryptophan synthase. Interaction of substrates with β subunit. *Biochemistry*, **9**: 4043-4049.
- 6) Bychkova VE and Ptitsyn OB (1995): Folding intermediates are involved in genetic diseases? *FEBS Letters*, **359**: 6-8.
- 7) Havel HA, Holden HM, Plaisted SM and Brems DN (1986): Characterization of an associated equilibrium folding intermediate of bovine growth hormone. *Biochemistry*, **21**: 6539-6543.
- 8) Kim JW, Kim EY, Park HH, Jung JE, Kim HD, Shin HJ and Lim WK (2001): Homodimers of mutant tryptophan synthase α -subunits in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Comm*, **289**: 568-572.
- 9) Leal WS (2000): Duality monomer-dimer of the pheromone-binding protein from *Bombyx mori*. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**: 521-529.
- 10) Leggett-Bailey J (1962): Techniques in protein chemistry pp. 249-265, Elsevier Scientific Publishing Co. Inc., New York.
- 11) Lim WK, Shin HJ, Milton DL and Hardman JK (1991): Relative activities and stabilities of mutant *Escherichia coli* tryptophan synthase α -subunits. *J Bacteriol*, **173**: 1886-1893.
- 12) Merlini G, Bellotti V, Andreola A, Palladini G, Obici L, Casarini S and Perfetti V (2001): Protein aggregation. *Clin Chem Lab Med*, **39**: 1065-1075.
- 13) Miles EW (1991): The tryptophan synthase $\alpha_2\beta_2$ multienzyme complex, pp. 115-124. In Nall BT and Dill KA (ed.), "Conformation and forces in protein folding", AAAS, Waldorf, MD.
- 14) Rudolph R and Lilie H (1996): *In vivo* refolding of inclusion body proteins. *FASEB J*, **10**: 49-56.
- 15) Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T (1989): The hanahan method for preparation and transformation of competent *E. coli*: high-efficiency transformation, pp. 1.82-1.84. In Sambrook J and Russell DW (ed.), "Molecular Cloning", 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 16) Sarker KD and Hardman JK (1995): Affinities of phosphorylated substrates for *E. coli* tryptophan synthase α -subunit: roles of Ser-235 and helix-8' dipole. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **21**: 130-139.
- 17) Selkoe KJ (1996): Amyloid β -protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, **271**: 18295-18298.