

고체상 핵자기공명 분광법을 이용한 막단백질의 구조연구

김용애*

한국외국어대학교 화학과

(2004. 6. 15 접수, 2004. 7. 30 승인)

Structural Studies of Membrane Protein by Solid-state NMR Spectroscopy

Yongae Kim*

Department of Chemistry, Hankuk Univ. of Foreign Studies

San89, Mohyun, Yong-In, 449-791, Korea

(Received Jun. 15, 2004, Accepted Jul. 30, 2004)

요 약 : genomics의 정보해석이나 신경전달물질 또는 약의 전달체계에서 아주 중요한 역할을 담당하는 막단백질의 구조연구는 기존의 X-ray나 용액상 핵자기공명분광법으로 수행하기 어려우나 지방질 이분자층이나 여러분자층에서 움직이지 않게 정렬시킨 단백질시료를 이용하여 특이하게 고안된 home-built solid-state NMR probe를 이용하면 구조를 연구할 수 있다. 이 논문에서는 박테리오파지인 pf1의 growth, 분리, 정제 및 pf1에서의 coat protein의 분리, 정제과정과 최종적으로 분리 정제된 pf1의 coat protein의 인산지방질 이분자층에서의 구조를 고체상 핵자기공명 분광법을 이용하여 연구하고자 한다.

Abstract : Structural studies of membrane proteins, importantly involving interpretation of genomics information, many signaling pathway and major drug target for drug discovery, are having difficulty in characterizing the function using conventional solution nmr spectroscopy and x-ray crystallography because phospholipid bilayers hindered fast tumbling and crystallization. Here, we studied the structure of the pf1 coat protein in oriented phospholipid bilayers by home-built solid-state NMR probe. Bacteriophage pf1 was purified from Pseudomonas Aeruginosa and coat protein of bacteriophage pf1 was isolated from DNA and other proteins.

Key words : Membrane protein, Solid-state NMR, Home-built solid-state NMR probe, Bacteriophage pf1 coat protein, protein purification

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)31-330-4604 Fax : +82+(0)31-330-4566

E-mail : yakim@hufs.ac.kr

1. 서 론

발현된 폴리펩티드의 30%에 해당하는 막관련 단백질들은 genomics로부터의 정보를 해독하거나 이온, 물, 또는 신경전달물질들의 전달에 아주 중요한 역할을 함에도 불구하고 protein data bank의 단백질 중 1%만이 막단백질의 구조이다. 이는 이들 막 관련 단백질의 구조연구가 기존의 방법인 x-ray 결정학이나 용액상 핵자기공명분광법으로 관측하기 어렵기 때문인데 이는 막단백질의 구조적인 완전성과 기능성에 필요한 지방질들은 결정화를 방해하고 용액상에서 전체적인 재배향 속도를 아주 느리게 만들기 때문이다.^{1,4} 그러나 짧은 탄화수소 사슬을 가지는 지방질과 긴 탄화수소 사슬의 지방질 둘다를 가지는 바이셀이나 이분자층판 또는 여러층의 이분자층에서 움직이지 않도록 배향시킨 단백질시료를 만들어 특이하게 고안된 flat-coil-probe를 이용하면 고체상 핵자기공명분광법으로 구조연구가 가능하다.

박테리오파지 pf1은 박테리아인 PsAr을 S자형 성장곡선의 초기까지 키운후 감염시켜 자손을 복제하는 전체과정 중에 미리 만들어놓은 필요한 단백질들을 PsAr의 막에 끼워놓고 마지막에 PsAr의 막을 빠져나오면서 이들 단백질로 DNA을 보호하는 껍질을 형성하고 나오게 되는데 막단백질의 표준시료로 이 pf1의 coat protein을 사용하였다. 실험에 사용한 pf1 coat protein은 여러 단계의 원심분리와 투석, CsCl Gradient를 포함하는 분리정제과정을 거쳐 PsAr로부터 pf1 박테리오파지를 정제하고 이후 두 단계의 FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography)를 이용하여 pf1 박테리오파지의 coat protein만을 DNA와 다른 단백질로부터 순수하게 분리 정제하여 사용하였다. 고체상 핵자기공명분광기의 프로브는 400 MHz 89 mm WB 자석의 ¹H과 ¹⁵N 공명주파수에 튜닝하고 매칭하도록 고안하여 실험실에서 직접 제작하여 사용하였다.

2. 실험 방법

2.1. pf1 박테리오파지의 배양과 pf1 및 coat protein의 분리 및 정제:

LB plate에서 키운 single colony의 PsAr은 15 mL의 LB에서 overnight 동안 키운이후 1 L의 M9 media로 옮겨 계속키운다. 600 nm에서의 OD가 0.35 ~ 0.45되면 pf1 stock solution으로 감염시킨다. 이때 media에는 각종 mineral salts, metal salts, Thamine, DNA, 비타민등을 첨

가해주고 전체적으로 ¹⁵N labeled 또는 선택적으로 ¹⁵N 표지를 위한 목적에 따라 (NH₄)₂SO₄ 만 또는 ¹⁵N labeled 아미노산을 질소 제공원으로 첨가해 준다. OD가 더 이상 증가하지 않고 평형상태에 이르면 Growth를 끝내고 7 Krpm에서 30분동안 원심분리하여 박테리아를 1차 제거하고 MW 8000의 PEG/NaCl을 이용하여 pf1 박테리오파지를 침전시킨다. 침전시킨 pf1은 13 Krpm의 원심분리로 분리하고 완충용액으로 씻어낸 후 2번째 PEG을 하고 다시 원심분리한다. 얻어진 pellet은 borate buffer에 녹여 농도를 결정한 후 CsCl에 녹여 70 Krpm에서 5시간동안 원심분리하여 높은 순도의 pf1 박테리오파지를 얻는다. 이후 Dialysis를 거쳐 최종적으로 박테리오파지 pf1을 정제한다. 총 8일동안 키우고 분리 정제한 박테리오파지 pf1은 100 mM의 SDS와 phosphate buffer에 녹여 sonication 함으로써 DNA와 coat protein을 포함하는 단백질들로 녹이고 SephacrylS200 column과 FPLC를 이용하여 DNA와 그의 단백질로 분리하고 SDS는 제거가 어려우므로 상대적으로 제거가 쉬운 Cholate buffer로 교환하기위해 SephacrylS100 column을 사용하여 두번째 FPLC를 실행하였다.

2.2. 인산지방질 이분자층에서 배향시킨 단백질과 고체상 NMR 실험

pf1 coat protein과 인산지방질 이분자층 혼합물 POPC/POPG는 1.2/100의 몰비율로 섞어 sonicator (Sonicos사 500 W, microtip)를 사용하여 vesicle을 만들고 cholate 세척제를 제거하기 위해 cholate가 없는 완충액과 증류수를 사용하여 Dialysis를 거친후 Ultrafiltration (Amicon Stirred Cell)을 하여 1~2 mL로 농축하여 multilamellar vesicle을 만든다. 농축된 multilamellar vesicle은 29장의 얇은 유리판 (11 mm x 20 mm)위에 나눠 건조시킨 후 93%의 incubator에서 O/N 동안 재수화시켜 고체 nmr을 측정하였다. 사용된 장비는 Bruker 400 MHz 고체상 핵자기공명분광기와 실험실에서 자체 제작한 11 mm x 20 mm x 5 mm의 사각코일을 가진 double resonance probe를 사용하였다. 이때 ¹⁵N NMR frequency는 40.5 MHz이고 1D ¹⁵N CPMOIST NMR 실험과 2D PISEMA 실험등을 수행하였다. 외부 chemical shift 보정시료와 cross polarization 그리고 2D PISEMA 실험 set-up은 Ammonium Sulfate, N-acetyl Leucine등을 이용하였다.

3. 결 과

3.1. pf1 박테리오파지 Growth와 pf1 및 coat protein의 분리 및 정제

최종 정제 후 얻은 박테리오파지 pf1의 양은 271 nm에서의 흡광도를 ($\epsilon = 2.07$) 이용하여 측정하였으며 모두 ^{15}N labeled pf1은 1 L growth당 ~200 mg 선택적으로 ^{15}N labeled된 pf1은 PsAr ~250 mg 이었다. 두단계의 FPLC를 이용하여 DNA와 그의 protein들을 분리정제한 FPLC 크로마토그램은 Fig. 1에 나타내었다. 1차 FPLC에서는 분자량이 큰 DNA가 먼저 용출되고 이후 7520 copy의 주류단백질인 coat protein과 나머지 미량의 protein들이 용출됨을 보인다.

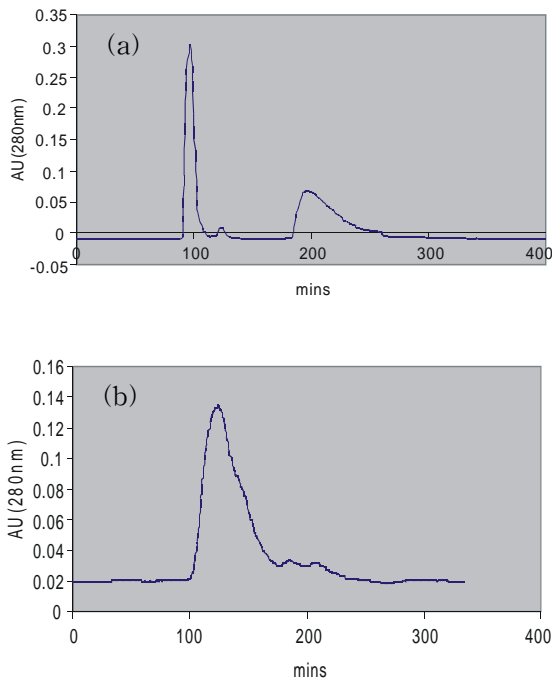


Fig. 1. (a) FPLC Chromatogram of pf1 bacteriophage dissolved in SDS. Sephacryl S200 (bed volume: 320 mL, flow rate: 1 mL/min) column was used. Elution time for high molecular weight DNA is 100 min and that for coat protein (7250 copy) is 200 min. (b) 2nd FPLC chromatogram of pf1 coat protein in exchanged buffer, Cholate. Sephacryl S100 (bed volume: 320 mL, flow rate: 1 mL/min) column was used. Elution time for 7250 copies of coat protein is near 100 min.

3.2. 인산지방질 이분자층에서 배향시킨 단백질과 고체상 NMR실험

인산 지방질 이분자층에서 배향시킨 pf1 coat protein의 인산 지방질 이분자층내에서의 단백질의 배향정도는 Fig. 2의 ^{15}N 1D 고체상 nmr spectrum으로 90%이상 배향 되었음을 알 수 있다. Pf1 박테리오파지 coat protein의 ^{15}N 1D solid-state NMR과 2D PISEMA spectrum은 Fig. 2과 3에 나타내었다. ^{15}N 1D Solid-state NMR Spectra (a)는 인산

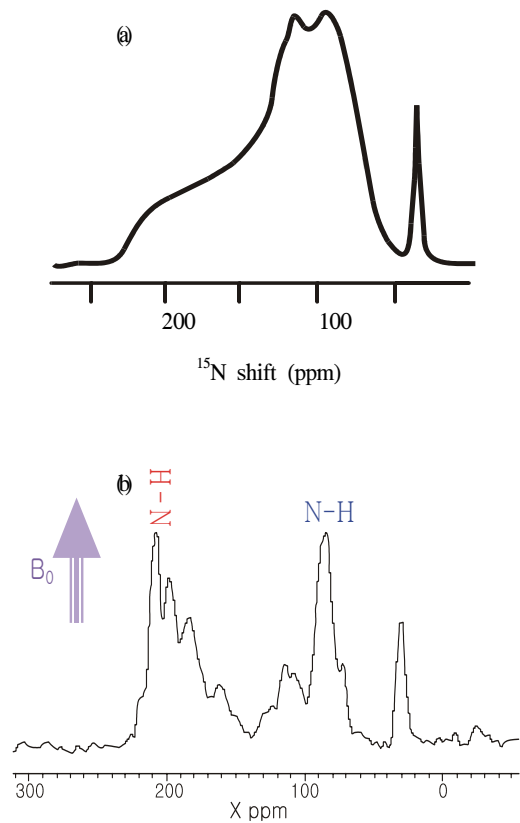


Fig. 2. 1D ^{15}N Solid-state NMR Spectra (a) Unoriented phospholipids bilayers with uniformly ^{15}N labeled pf1 coat proteins. Amino peak of 30 ppm, isotropic resonance of 120 ppm, and powder pattern of randomly oriented amide resonances are distinguished very well. (b) Oriented phospholipids bilayers with uniformly ^{15}N labeled pf1 coat proteins. Amide N-H resonances are divided into perpendicular and parallel to the external magnetic field. Amino peak (30 ppm) and isotropic resonances (~100 ppm) are also shown.

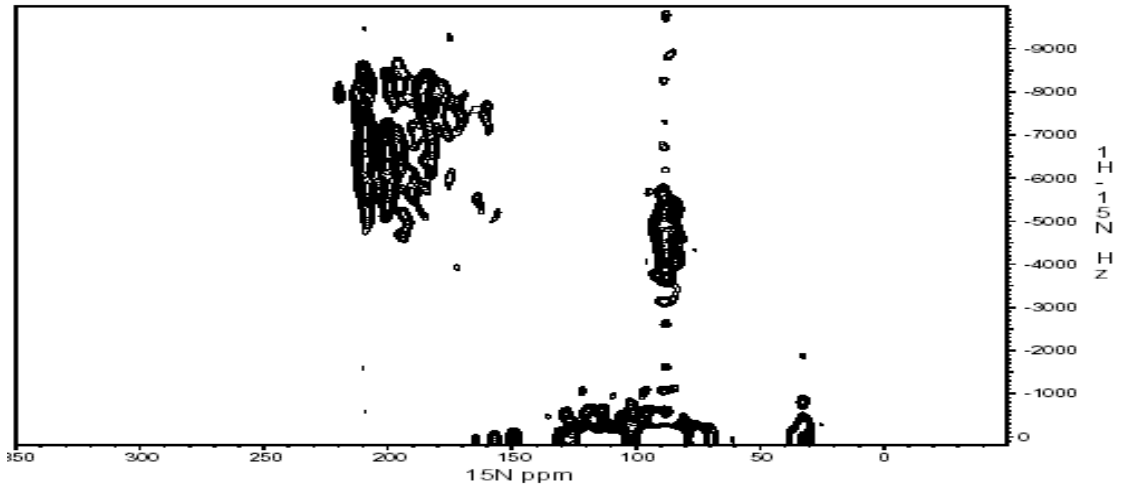


Fig. 3. 2D ^{15}N PISEMA Solid-state NMR Spectra of oriented phospholipids bilayers with uniformly ^{15}N labeled pf1 coat proteins using glass plates. Amide N-H resonances that are parallel to the external magnetic field, ∞ -helix that is parallel to the magnetic field, are near 200 ppm of chemical shift and 7000 Hz of ^1H - ^{15}N dipolar couplings. Amide N-H resonances that are perpendicular to the external magnetic field, ∞ -helix that is perpendicular to the magnetic field, are near ~ 85 ppm of chemical shift and 4000 Hz of ^1H - ^{15}N dipolar couplings. Amino peak (30 ppm) and isotropic resonances (~ 100 ppm) are also shown like a 1D ^{15}N Solid NMR spectra and its ^1H - ^{15}N dipolar coupling constant is ~ 0 .

지방질 이분자층에서 배향되지 않은 uniformly ^{15}N labeled pf1 coat protein의 spectrum이다. 30 ppm 근처의 아미노 peak와 120 ppm의 isotropic resonance 외에 외부 자장에 대해 무작위하게 배향된 powder pattern을 보여 준다. (b)는 같은 인산지방질 이분자층에서 외부자장(B_0)에 대해 잘 배향된 (a)번과 같은 단백질의 spectrum으로 아미노와 isotropic resonance를 제외한 아미드 N-H가 외부 자장에 대해 대략 평행하게 배향된 잔기와 대략 수직으로 배향된 잔기가 선명하게 나뉘어져 보임을 알 수 있다.

Fig. 3은 pf1 박테리오파지의 coat protein의 총 46개의 아미노산 모두의 amide nitrogen이 ^{15}N 으로 치환된 단백질을 DOPC와 DOPG의 인산지방질 이분자층에서 유리판을 이용하여 배향시킨 후 위 얻은 2D PISEMA 고체상 nmr spectrum으로 외부자장에 평행하게 놓여있는 ∞ -helix에 속한 아미드 잔기들의 ^1H - ^{15}N dipolar coupling은 7000 Hz 부근의 큰값을 가지며 ^{15}N chemical shift는 200 ppm 근처에 있음을 나타내고 자장의 방향에 수직으로 놓여있는 다시말해 인산 지방질 이분자층 표면에 누워있는 ∞ -helix에 속한 아미드 잔기들의 ^1H - ^{15}N dipolar coupling 값은 4000 Hz 근방이며 ^{15}N chemical shift는 85 ppm 근처이다.

1D ^{15}N nmr에서의 마찬가지로 30 ppm 근처의 아미노 peak와 120~30 ppm 근처의 isotropic resonance는 0 Hz의 ^1H - ^{15}N dipolar coupling 값을 가짐을 알 수 있다.

4. 결론

박테리오파지 pf1은 PsAr을 이용하여 1 L growth당 ~ 250 mg의 큰 효율로 키워 분리/정제 할 수 있었으며 두 단계의 FPLC를 이용하여 pf1의 coat protein만 1 L growth당 ~ 50 mg 정도 효율적으로 분리할 수 있었다. 그리고 균일하게 ^{15}N 으로 표지한 pf1 coat protein은 DOPC와 DOPG의 인산지방질 이분자층에서 유리판을 이용하여 90% 이상 배향시킬 수 있었고 1D ^{15}N solid-state NMR과 2D PISEMA spectrum을 이용하여 pf1의 coat protein의 2차구조에 관한 정보를 고분해능으로 얻을 수 있었다.

감사의 글

이 연구는 2004년도 한국의외국어대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어졌으며 연구를 수행 할 수 있도록 미

국방문연구를 허락한 Univ. of California, San Diego의 Prof. Stanly J Opella 교수님께 감사드린다.

참고 문헌

1. C.M. Fraser, J. Gocayne, O. White, M. Adams, R. Clayton, R. Fleischmann, C. Bult, A. Kerlavage, G. Sutton, J. Kelly et al, *Science*, **270**: 397(1995).
2. S.J. Opella, C. Ma, and FM Marassi, *Methods in Enzymology*, **339**: 285(2001).
3. FM Marassi and SJ Opella, *Current Opinion in Structural Biology*, **8**: 640(1998).
4. SJ Opella, *Nature Structural Biology*, **4**: 845(1997).
5. Y Kim *Biochemistry News*, **21**: 253(2001).
6. FM Marassi, JJ Gesell, AP Valente, Y Kim, M Montal, SJ Opella, *J. Bio. NMR*, **14**: 141(1999).
7. SJ Opella, FM Marassi, JJ Gesell, AP Valente, Y Kim, M Montal, *Nature Structural Biology*, **6**: 374(1999).
8. SJ Opella, Y Kim, KG Valentine, FM Marassi, M Zasloff, M Montal, and WA Cramer, *J. Kor. Magn. Res. Soc.*, **2**: 120(1998).
9. SJ Opella, Y Kim, and P McDonnell, *Methods in Enzymology* **239**: 536(1994).
10. PA McDonnell, K Shon, and Y Kim, and SJ Opella, *J. Mol. Biol.* **233**: 447(1993).
11. PA McDonnell, K Shon, Y Kim, and SJ Opella, *J. Mol. Biol.*, **233**: 447(1993).
12. K Shon, Y Kim, LA Colango, and SJ Opella, *Science (Cover Story)* **252**: 1303(1991).
13. K Shon, P Schrader, Y Kim, B Bechinger, M Zasloff, and SJ Opella, *Biotechnology: Bridging Research and Applications*, 109(1991).