

## 소수성 코어 residue가 변이된 유비퀴틴 단백질의 urea에 의한 unfolding 반응에서 보이는 m-value의 변화에 대한 분석

박순호\* · 백미진  
강릉대학교 치과대학 생화학 및 분자생물학교실  
(2005. 8. 26 접수)

### Analysis of the m-value Change in the Equilibrium Unfolding of Hydrophobic Core Variant Ubiquitin

Soon-Ho Park\* and Mi-Jin Baek

Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Dentistry, Kangnung National University, Gangneung, 210-702, South Korea  
(Received April 26, 2005)

**요약.** 단백질의 native state의 안정성을 측정하는 것은 단백질의 구조나 기능을 탐색하는데 필수적인 실험이다. 단백질의 native state의 안정성을 측정하는 방법은 변성제에 의한 unfolding 실험의 결과를 Linear Extrapolation Method(LEM)로 분석하는 방법이 가장 많이 사용되고 있다. LEM분석은 단백질의 구조적인 안정성을 반영하는 자유에너지인  $\Delta G_{\text{fold}}^{\text{native}}$ 와 자유에너지의 변성제농도 의존도인 m-value라는 두 가지 값을 제공한다. 이중 m-value는 단백질이 unfolding 될 때 용액에 노출되는 solvent accessible surface area(SASA)에 비례하는 것으로서 폴딩 반응의 구조적인 특성을 반영하는 상수로 알려져 있다. 단백질 unfolding 실험에서 대부분의 경우 m-value는 변하지 않으나 몇몇 특이한 경우에는 m-value가 커지거나 작아지는 것이 관찰되며 이러한 변화는 단백질의 native state나 unfolded state의 구조가 변한 경우이거나 폴딩 반응의 메커니즘이 변한 경우로 해석되고 있다. 소수성 코어 residue가 변이된 유비퀴틴인 HubWA에 대한 unfolding 실험에서도 m-value가 변하는 것이 관찰되었다. HubWA의 unfolding 실험은 주로 pH 5인 용액에서 실시되었으며 이 조건에서 HubWA는 two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 것으로 알려져 있다. 그런데 단백질의 이차구조의 변화를 측정하는 far-UV circular dichroic 분광법으로 관찰한 HubWA의 pH 7, 9 용액에서의 unfolding 실험에서 관찰된 m-value가 pH 5에서 관찰된 m-value보다 작은 것이 관찰되었다. 이렇듯 pH 7과 9에서의 m-value가 pH 5에서의 m-value보다 감소하는 현상은 단백질의 삼차구조의 변화를 관찰할 수 있는 형광분광법으로 측정한 unfolding 실험으로부터 pH 9에서는 native state의 구조의 변화에 기인하며, pH 7에서는 폴딩 intermediate의 population이 증가하기 때문인 것으로 보여진다.

**주제어:** 단백질 unfolding 실험, m-value, 단백질 native구조의 안정성, 유비퀴틴

**ABSTRACT.** Protein stability measurement is essential to study the relationship between the structure and the function of proteins. Protein stability is usually estimated by linear extrapolation method (LEM) analysis of denaturant-induced unfolding measurements. Through LEM, the native stability of protein ( $\Delta G_{\text{fold}}^{\text{native}}$ ) is obtained. Furthermore, LEM provides the m-value which is known to reflect the change in the solvent accessible surface area (SASA) when a protein unfolds. The m-values are normally observed constant upon mutation or change in solvent conditions. However, the m-value changes have been observed in several experiments. It has been interpreted that the change in m-value is due to: (1)

change in the structure of the native or unfolded state, or (2) accumulation of folding intermediates which reduces the cooperativity of folding reaction. The change in  $m$ -value was observed in the unfolding measurements of hydrophobic core variant ubiquitin, HubWA. The unfolding measurements of ubiquitin were normally performed at pH 5. At this solvent pH, HubWA observed to follow a two-state folding mechanism. However, unfolding of HubWA observed by far-UV circular dichroism, a spectral probe that measures secondary structural change, showed that the  $m$ -value at pH 7 and 9 are significantly smaller than that observed at pH 5. Based on the unfolding of HubWA observed by fluorescence spectroscopy, a spectral probe that measures tertiary structural change, the decrease in  $m$ -value at pH 9 is considered due to the change in structure of the native state, while the decrease in  $m$ -value at pH 7 is considered due to the accumulation of folding intermediates.

**Keywords:** Protein Unfolding Experiment  $M$ -value, Structural Stability of Native State, Ubiquitin

## 서 론

단백질은 native 삼차 구조를 이루었을 때 비로소 생물학적인 기능을 수행하게 된다. 단백질의 삼차원 구조는 정전기적 결합, 수소성결합, 수소결합, 반 네르 발스 결합과 같은 비공유성 결합에 의하여 유지되고 있으며, 따라서 각 비공유성 결합이 단백질의 구조적인 안정성에 미치는 영향을 측정하는 것은 단백질의 구조와 기능을 연구하는데 있어서 필수적이라고 할 수 있다. 단백질 삼차구조의 안정성을 구하기 위하여 널리 쓰이는 방법으로 단백질 삼차원 구조를 변성제를 사용하여 가역적으로 unfolding시키는 실험이 있다.<sup>1</sup> 이 실험은 단백질이 녹여져 있는 용액에 urea나 guanidinium chloride와 같은 화학적 변성제를 가하여 변성제의 농도가 증가함에 따라 단백질의 native 구조가 와해되는 정도를 여러 가지 분광학적 방법으로 측정하여 얻은 결과를 linear extrapolation method(LEM)로 분석하는 것이다.<sup>2,3</sup>

LEM은 단백질의 변성제에 의한 구조의 변환이 매우 cooperative하여 평형상태에서 native state(N)와 unfolded state(U)만 존재하는 two-state transition(N $\rightleftharpoons$ U)이라는 가정을 바탕으로 하여 각 변성제 농도에서의 native state와 unfolded state의 평형상수( $K_{eq} = [U]/[N]$ )로부터 구한 native state와 unfolded state 사이의 자유에너지의 변화( $\Delta G_{NU} = -RT \ln K_{eq}$ )가 변성제의 농도에 대하여 직선의 관계( $\Delta G_{NU} = \Delta G_{NU}^0 - m_{eq}[\text{denaturant}]$ )를 나타내고 있다는 관찰에 입각한 것이다. 이러한 관계를 통하여서 각 변성제 농도에서의 자유에너지를 변성제가 없는 상태로 외삽(extrapolation)하여 변성제가 존재하지 않는 생리적인 상태에서의 단백질의 native 구

조의 안정성을 정량적으로 나타내는 자유에너지인  $\Delta G_{NU}^0$ 를 얻게 된다. 이렇게 LEM을 통하여 얻은  $\Delta G_{NU}^0$ 값의 비교를 통하여 어떤 특정 단백질이 pH나 염의 농도 등이 다른 용액에서 보이는 구조적 안정성의 차이를 정량적으로 비교하여 볼 수 있다. 또한 site-directed mutagenesis에 의하여 제조된 변이 단백질의  $\Delta G_{NU}^0$  값을 같은 조건에서의 wild type 단백질의  $\Delta G_{NU}^0$  값과 비교하여 어떠한 아미노산이 특정 단백질의 삼차원 구조에 끼치는 영향을 정량적으로 측정할 수 있다. 그런데 LEM 분석에서는  $\Delta G_{NU}^0$ 뿐만 아니라 변성제의 농도에 따라  $\Delta G_{NU}$ 가 변하는 정도를 나타내는  $m_{eq}$ 도 나타난다. 이 상수는  $m$ -value<sup>4</sup>라고 불리며 단백질의 native 구조가 unfolding 될 때 노출되는 solvent accessible surface area(SASA)에 비례하는 것으로 알려져 있다.<sup>5,7</sup> 따라서  $m$ -value는 단백질이 unfolding 될 때의 구조적인 변화를 반영하는 상수라고 할 수 있다. 그런데 용액의 조건을 바꾸거나 단백질의 아미노산을 치환한 다음 실시한 unfolding 실험에서 종종  $m$ -value가 증가하거나 감소하는 현상이 발견되고 있으며 이러한  $m$ -value의 변화는 다음과 같이 해석되고 있다. 첫째,  $m$ -value의 변화는 단백질의 native 삼차구조나 또는 unfolded ensemble이 용액의 성질이 달라짐에 따라서 변하거나 또는 돌연변이의 생성에 의하여서 변하기 때문에 나타난다는 해석이다. 즉  $m$ -value의 증가는 용액의 조건이 바뀌거나 돌연변이가 일어났을 때 native state의 구조에는 변화가 거의 없는 반면 unfolded state가 길게 늘어진 ensemble을 이루는 상태가 되어 SASA가 더 커질 때 나타날 수 있다고 생각되고 있으며, 또한  $m$ -value의 감소는 unfolded state의 구조에는 변화가 없으나 native 구조

가 느슨하여져서 상당량의 SASA가 unfolding 반응이 시작되기 이전에 이미 노출되어 있는 상태여서 unfolded ensemble state가 되면서 노출될 SASA가 상대적으로 적어지기 때문이라는 해석과 고농도의 변성제가 있는 용액에서도 SASA가 완전히 노출되어 있지 않는 unfolded ensemble을 이루고 있기 때문이라는 해석이 있다.<sup>6</sup> 둘째, m-value의 변화는 어떤 단백질의 unfolding 반응이 two-state 반응 메커니즘을 따르지 않는 경우에 즉 unfolding 반응의 cooperativity가 떨어지는 multi-state 반응일 경우에도 나타난다는 해석이다.<sup>8</sup> 실제로 three-state 반응 메커니즘(N $\rightleftharpoons$ I $\rightleftharpoons$ U)을 따르는 단백질의 unfolding 반응도 하나의 sigmoidal transition만 관찰되어서 two-state 반응 메커니즘을 전제로 한 LEM으로 분석이 가능하였으나 용액의 조건에 따라 m-value가 심하게 변하는 경향이 관찰되었으며 이 때 m-value의 변화는 intermedie(I)의 population과 직접적인 관계가 있다는 보고가 있다.<sup>9,10</sup> 그러나 unfolding 실험을 LEM으로 분석할 때 나타나는 m-value의 변화는 위 두 가지 이유가 섞여서 나타날 수 있는 점도 무시할 수 없다.

본 연구에서는 소수성 코어에 위치한 아미노산을 치환한 유비퀴틴인 HubWA의 urea에 의한 unfolding 실험에서 용액의 pH가 변화함에 따라 m-value가 감소하는 현상이 발견되며 이러한 관찰은 위에서 열거한 두 가지 이유가 모두 해당되고 있음을 보여주고자 한다. 본 연구에서 사용한 변이 유비퀴틴은 pH 5인 용액에서 실시한 folding kinetics를 측정할 실험에서 folding intermediate가 전혀 관찰되지 않는 매우 cooperative한 two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 것으로 알려져 있다.<sup>11</sup> 그러므로 이 변이 유비퀴틴은 Fersht와 그의 동료들에 의해서 제안된 site-directed mutagenesis에 의해서 제조된 변이 단백질의 folding kinetics 측정을 통하여 two-state folding 단백질이 폴딩 과정에서 거치는 transition-state의 구조를 밝히는 실험에 적합하다고 할 수 있다.<sup>12,13</sup> 또한 본 연구에서 사용한 변이 유비퀴틴은 비생리적인 조건인 강한 산성(pH 2)을 띠는 용액에서 native state도 아니고 unfolded state도 아닌 molten globule 구조를 띠는 것이 관찰되었다.<sup>14</sup> Molten globule 이 구조적인 측면에서 보면 단백질 폴딩 과정에서 folding transition-state가 형성되기 전에 나타나는 형태라는 점을 고려한다면<sup>15</sup> 이 변이 유비퀴틴은 폴딩 kinetics 실험을 통하여 얻은 transition-state의 구조와 평형실험

에서 얻은 folding intermediate인 molten globule의 구조를 비교하여 단백질 폴딩 반응의 진행 과정을 연구하여 볼 수 있는 좋은 모델 단백질이라고 할 수 있다. 그런데 HubWA의 transition-state의 구조를 측정하기에 적절한 용액의 조건을 찾기 위하여서 용액의 pH 값이 서로 다른 조건에서 urea에 대한 unfolding 실험에서 얻은 m-value가 약 30% 정도 차이가 나는 점이 발견되었다. 본 논문은 소수성 코어 residue가 치환된 변이 유비퀴틴의 unfolding 반응의 m-value가 용액의 pH 값에 따라 변하는 이유가 용액의 pH에 따라서 native state의 구조가 변한 경우와 folding intermediate가 나타남에 따른 folding 반응의 cooperativity가 변하는 경우로 설명할 수 있다는 것을 보이하고자 한다.

## 실 험

**재료.** 본 연구에 사용된 단백질은 wild type 유비퀴틴의 45번째 페닐알라닌을 트립토판으로 치환하여 folding 반응을 형광분광기로 관찰할 수 있게 만든 pseudo wild type(WT<sup>\*</sup>) 유비퀴틴<sup>16</sup>의 26번째 발린을 알라닌으로 치환시킨 변이 유비퀴틴이다.<sup>11</sup> 이 변이 유비퀴틴은 이 후에 폴딩 반응의 transition-state의 구조를 연구하기 위한 site-directed mutagenesis의 모체로 사용될 것이며 단백질의 호칭상의 혼동을 피하기 위하여 HubWA로 부르기로 한다. HubWA의 정제는 기존에 발표된 wild type 유비퀴틴의 정제 방법을 따랐으며<sup>14</sup> 정제된 HubWA의 순도는 coomassie brilliant blue로 염색한 SDS-PAGE gel 상에서 약 98% 정도로 관찰되었다. 초순수 정제된 urea는 ICN Biomedical Inc.(Aurora, USA)에서 구입했으며 그 외의 시약은 reagent grade이거나 또는 그 보다 더 나은 grade를 사용하였다.

**Urea에 의한 unfolding 실험.** Equilibrium unfolding 실험에 사용된 단백질 용액의 준비는 기존에 발표된 방법을 따랐으며<sup>14</sup> 이렇게 준비된 단백질 용액에 대하여 삼차구조의 변환은 295 nm로 여기 시킨 다음 355 nm에서의 형광스펙트럼의 변화를 통하여서 얻었고 이차구조의 변환은 225 nm에서의 far-UV circular dichroic(CD) 스펙트럼의 변화를 통하여서 측정하였다. 본 연구는 pH가 다른 용액에서 단백질 native state의 안정성을 측정하는 것으로서 정전기적 결합이 native state의 안정성에 끼치는 영향을 무시할 수 없으므로

전하를 띠지 않는 urea를 guanidinium chloride 대신 변성제로 사용하였으며 urea의 농도는 용액의 굴절률 측정을 통하여서 구하였다.<sup>17</sup> Native state를 urea농도를 증가시키면서 unfold시키는 실험과 고농도의 urea에 unfold된 단백질을 urea 농도를 희석하여 refold시키는 실험을 실시하여 두 실험의 결과가 일치하면 구조 변환 반응이 가역적인 것으로 판단하였다.<sup>17</sup> 형광 스펙트럼은 JASCO FP6500 spectrofluorometer(Tokyo, Japan)를 사용하였고 far-UV CD 스펙트럼은 JASCO J-810 spectropolarimeter(Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 모든 측정은 상온(25 °C)에서 실시하였으며 pH가 5, 7, 9일 때 각각 25 mM acetate, 25 mM phosphate 그리고 25 mM borate를 완충용액으로 사용하였다. 고농도의 denaturant를 함유한 용액에서 HubWA의 280 nm에서의 molar extinction coefficient는 6970 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>로 계산되었으며<sup>18</sup> 이렇게 계산된 molar extinction coefficient를 이용하여 HubWA의 농도를 측정하였다. 실제 실험에서의 HubWA의 농도는 형광스펙트럼을 측정할 때는 3 μM 이었으며 far-UV CD스펙트럼을 측정할 때는 약 10 μM이었다.

**Two-state 폴딩 반응의 LEM 분석.** 단백질의 unfolding 실험에서 얻어지는 결과는 수식 1로 표현되는 단백질의 폴딩 반응이 매우 cooperative하여 중간단계는 관찰되지 않고 오로지 native state와 unfolded state만 존재하는 two-state 폴딩 메커니즘을 따른다는 가정에 바탕을 두고 있는 LEM에 의하여 분석하였다.<sup>23</sup>

$$Y = \frac{(a_1 + b_1[C]) + (a_2 + b_2[C]) \exp((\Delta G_{NL}^{\circ} - m_{eq}[C])/RT)}{1 + \exp((\Delta G_{NL}^{\circ} - m_{eq}[C])/RT)} \quad (1)$$

수식 1에서 Y는 각 변성제 농도에서 관찰되는 스펙트럼 신호를 나타내며,  $\Delta G_{NL}^{\circ}$ 는 변성제의 농도가 0일 때의 unfolding 반응의 자유에너지이며, [C]는 변성제의 농도를 의미하며,  $m_{eq}$ 는 m-value라고 불리는 unfolding 반응의 자유에너지의 변성제 농도에 따른 변화를 나타내며,  $a_1$ 과  $a_2$ 는 각각 변성제의 농도가 0일 때의 native state와 unfolded state의 스펙트럼 신호를 나타내며, 끝으로  $b_1$ 과  $b_2$ 는 변성제의 농도 변화에 따른 native state와 unfolded state의 스펙트럼 신호의 변화를 나타내는 상수로서 스펙트럼 신호의 기준선(baseline)을 의미한다.

## 결과 및 고찰

단백질의 폴딩 연구에 있어서 native state의 구조적인 안정성을 측정하는 것은 필수적인 실험이므로 HubWA의 urea에 의한 unfolding 실험을 실시하여 native 구조의 안정성을 구하여 보았다. 먼저 단백질 이차 구조의 변환을 측정할 수 있는 225 nm에서 far-UV CD 신호가 urea의 농도에 따라 변하는 transition curve를 측정하였다(Fig. 1). Fig. 1은 용액의 pH 값이 5, 7, 9일 때 urea에 의한 HubWA의 unfolding 반응을 보여 준다. Urea에 의한 HubWA의 이차구조의 변환은 unfolding 반응(Fig. 1의 열린 기호)과 refolding 반응(Fig. 1의 닫힌 기호)이 서로 일치하는 가역적인 반응이었으며 Fig. 1에서 보듯이 하나의 sigmoidal curve로 나타나는 전형적인 two-state 반응의 양상을 보여서 LEM에 의한 분석이 가능하였다. Table 1은 이러한 unfolding 반응을 LEM으로 분석한 결과를 보여준다. Table 1에서  $C_m$ 은 구조변환반응의 중간점(transition midpoint)을 나타내며 단백질 native 구조의 변성제에 대한 민감도를 나타내는 척도로 생각할 수 있다. 즉  $C_m$  값이 낮은 단백질이 높은 단백질보다 변성제의 농도가 더 낮은 용액에서 삼차구조가 와해되기 시작하는 것으로 생각할 수 있다. 또한 변성제가 존재하지 않는 조건에서의 단백질의 삼차구조의 안정성을 나타내는  $\Delta G_{NL}^{\circ}$ 는  $C_m$ 과  $m_{eq}$ (m-value)의 곱으로 구할 수 있으며 더 큰 양의 값을 가질수록 더 안정한 native 구조라고 할 수 있다.

Table 1에서 보던 용액의 pH 값이 7일 때  $C_m$ 은 5일 때 보다 약 1.5정도 크게 나타남에도 불구하고 m-value와  $C_m$ 의 곱으로 얻을 수 있는  $\Delta G_{NL}^{\circ}$ 은 오차범위 내에서 서로 같은 것으로 나타나 보이며 pH 9인 용액에서는 pH 5인 용액과  $C_m$ 은 유사하나  $\Delta G_{NL}^{\circ}$ 는 약 1 kcal/mol 정도 작은 것으로 나타났다. 이것은 HubWA의 unfolding 측정에서 m-value가 용액의 pH 값이 5일 때는 1.18로 나타나나 7과 9일 때는 그보다 약 30% 정도 감소한 0.86과 0.87로 크게 차이가 있기 때문이다. 이러한 unfolding 반응의 m-value의 변화는 다음 두 가지로 해석이 가능하다. 첫째, pH 7과 9인 용액에서의 m-value가 pH 5인 용액에서의 m-value보다 작은 것은 m-value가 단백질이 unfold될 때 주위 용액에 노출되는 표면의 면적에 비례하는 점으로 비추어 볼 때 pH 7과 9에서의 unfolded state ensemble은 pH 5일 때의 unfolded

state ensemble보다 SASA가 더 작은 상태이기 때문이라고 생각할 수 있다. 그런데 Fig. 1에서 보여지듯이 모든 pH에서 native state와 unfolded state의 far-UV CD signal이 거의 일치하는 것을 관찰할 수 있으며 이는 HubWA의 각 pH에서의 구조적인 특성이 적어도 이차구조에 있어서는 차이가 나지 않다는 것을 의미한다. 그러나 unfolded state의 구조적인 차이점을 far-UV CD signal로는 구별하기가 힘든 경우인 이차구조는 유사하나 삼차구조는 차이가 나는 경우를 무시할 수는 없을 것으로 생각된다. 둘째, m-value의 변화가 단백질 unfolding 반응의 cooperativity가 변하기 때문으로 생각하여 볼 수 있다. 이것은 변이 staphylococcal nuclease(SNase)의 unfolding 실험<sup>9</sup>과 실제로는 three-state(U=I=N) 메커니즘을 따르는 단백질도 겉보기에는 two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 것처럼 보일 수 있다는 simulation 분석에 근거를 두고 있다.<sup>8</sup> Simulation 분석은 three-state 반응을 two-state model로 분석한 경우에 intermediate(I)의 population이 변함에 따라 m-value가 변하는 것을 보여주고 있다. 그러나 단백질의 이차구조의 변환만 보여주는 Fig. 1의 결과로만은 HubWA unfolding 실험의 m-value의 변화가 위 두 가지 가능성 중 어디에 더 가까운지 구별하기가 쉽지 않다고 할 수 있다.

Fig. 2는 HubWA의 urea의 농도에 따른 구조적인 변환을 트립토판 residue의 형광스펙트럼의 변화를 통하여 측정된 것을 보여주고 있다. 트립토판 residue의 형광스펙트럼은 단백질 삼차구조의 변환을 측정하는데 널리 이용되므로<sup>10</sup> Fig. 2의 결과는 Fig. 1에서 측정된 urea에 의한 HubWA의 이차구조의 변환 결과를 보완하여 볼 수 있다. 먼저 pH 5에서 형광스펙트럼으로 측정된 HubWA의 폴딩 반응은 하나의 sigmoidal 패턴을 보이며 Table 1에 열거된 LEM으로 분석한 상수들이 far-UV CD 분광법으로 측정된 것과 일치하는 것을 볼 수 있다. 구조변환 반응을 두 개 이상의 spectral probe로 측정하여 그 결과가 서로 일치하는 것은 단백질의 구조변환 반응이 two-state 메커니즘을 따르는 경우로 해석된다.<sup>20</sup> 따라서 HubWA는 pH 5에서는 관찰 가능한 폴딩의 중간단계(folding intermediate)가 존재하지 않는 two-state 폴딩 메커니즘을 따른다고 할 수 있으며 이것은 folding kinetics를 측정된 실험의 결과와 일치한다.<sup>11</sup> 또한 pH 9의 경우도 Table 1에서 보여지듯이 far-UV CD 분광법으로 측정된 unfolding 반

응과 형광분광법으로 측정된 unfolding 반응의 결과가 서로 일치하는 것으로 보아 역시 folding intermediate가 관측되지 않는 two-state 폴딩 메커니즘을 따른다고 할 수 있다. 그러므로 pH 5와 pH 9에서 m-value가 서로 다른 것은 각 pH에서 native state의 구조나 unfolded ensemble state의 구조적인 차이가 있기 때문이라고 생각할 수 있다. 그런데 Fig. 2에서 보면 unfolded state의 구조를 반영하는 urea 농도가 6 M 이상일 때 나타나는 unfolded baseline의 형광스펙트럼이 pH 5와 9에서 서로 겹치는 것을 볼 수 있다. 이 두 pH에서의 unfolded baseline은 HubWA의 삼차구조가 urea가 없는 용액에서도 이미 상당히 와해되어 있어서 고농도의 urea에서는 완전히 unfolded state가 되어있을 것으로 생각되는 pH 2에서의 unfolded baseline(Fig. 2의 열린 삼각형)과도 일치하며 또한 삼차구조를 이룰 수 없어서 형광을 띠는 결가지가 주위 용액에 완전히 노출되어있는 N-acetyltryptophanamide(NATA)가 고농도의 urea에서 보여주는 형광 신호(Fig. 2의 닫힌 삼각형)<sup>21</sup>와도 겹치는 것으로 보아 HubWA의 unfolded state는 트립토판 결가지가 주변의 용매에 완전히 노출되어 있는 구조라고 할 수 있다. 더욱이 Fig. 1에서 보았듯이 고농도의 urea용액에서 far-UV CD 신호도 서로 일치하는 점으로 보아 pH 5와 9인 용액에서 unfolded state의 HubWA는 구조적인 특성이 서로 같은 즉 SASA가 완전히 노출된 unfolded ensemble 구조를 띠고 있다고 생각할 수 있다. 그러므로 용액의 pH가 5에서 9로 바뀔 때 나타나는 m-value의 감소는 unfolded state의 구조적인 차이이기 보다는 native state의 구조적인 차이에 기인한다고 추측하여 볼 수 있다. Urea가 없는 pH 5와 pH 9 용액에서 native state HubWA의 far-UV CD 신호가 같은 점으로 보아(Fig. 1) native state의 이차구조가 용액의 pH에 따라 차이가 나는 것으로 보이지는 않는다. 그런데 Fig. 3에서 보듯이 HubWA가 pH 9인 용액에 있을 때의 형광의 세기는 pH 5인 용액에서의 형광의 세기보다 더 강하게 나타난다. HubWA는 unfold 될 때 형광의 세기가 증가하므로 pH 9에서 native state가 pH 5에서의 native state보다 미소하나마 더 느슨하게 되어 있는 것으로 생각할 수 있다. 따라서 pH 9에서의 m-value가 pH 5에서의 m-value보다 작은 것은 pH 9일 때 native state HubWA의 삼차구조가 조금은 느슨하게 되어 있어 pH 5일 때보다 용액이 침투할 수 있는 표면이 더 노출된 구조를 이루고

있어서 native state에서 unfolded state로 구조가 변환될 때 SASA가 pH 5일 때보다 상대적으로 더 적게 되기 때문인 것으로 생각할 수 있다. 이러한 native state에서의 구조적인 변화는 용액의 pH가 5일 때 보다는 9일 때 전하를 띠는 아미노산의 곁가지들의 정전기적인 척력이 더 강하게 작용하기 때문일 것으로 생각된다.

용액의 pH가 7일 때의  $m$ -value가 5일 때의  $m$ -value보다 작은 것은 용액의 pH가 9일 때의  $m$ -value가 5일 때의  $m$ -value보다 작아지는 것과는 다른 이유에서 기인하는 것으로 보인다. HubWA의 native state에서의 far-UV CD 스펙트럼과(Fig. 1)과 형광스펙트럼(Fig. 3)이 pH 5와 pH 7에서 서로 일치하는 것으로 보아 이 두 pH에서 native state의 구조적인 차이는 없는 것으로 보인다. 그런데 형광분광법으로 측정된 pH 7일 때의 unfolding 반응은 다른 pH에서의 unfolding 반응과는 상당히 다른 양상을 보인다. 먼저 pH 7인 용액에서의 HubWA의 transition curve가 pH 5나 9에서의 transition curve보다 urea의 농도가 더 높은 쪽으로 이동한 것은 far-UV CD 스펙트럼으로 측정된 것(Fig. 1)과 같은 결과로서 HubWA의 native state가 pH 7에서 pH 5나 9보다 더 안정된 구조를 갖기 때문이라고 할 수 있다. 이러한 현상은 유비쿼틴의 등전점이 약 7.5 정도이며 따라서 용액의 pH가 등전점에 가까운 중성 pH에서

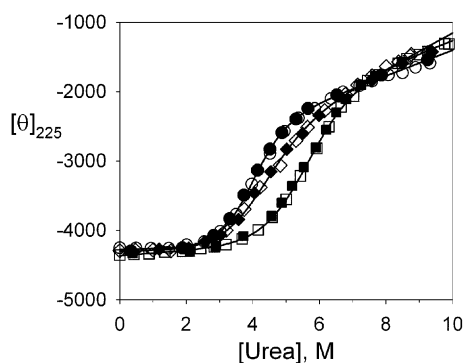


Fig. 1. Urea-induced equilibrium unfolding of HubWA probed by far-UV circular dichroic spectroscopy in varying solvent pH. Circles, squares and diamonds represent the equilibrium unfolding of HubWA measured at pH 5, 7 and 9, respectively. Closed symbols represent the measurements obtained by equilibrium refolding. Superimposition of unfolding and refolding measurements indicates that the conformational transition is reversible at each solvent pH. Solid lines are the nonlinear least squares fit of the equilibrium unfolding based on a two-state folding model.

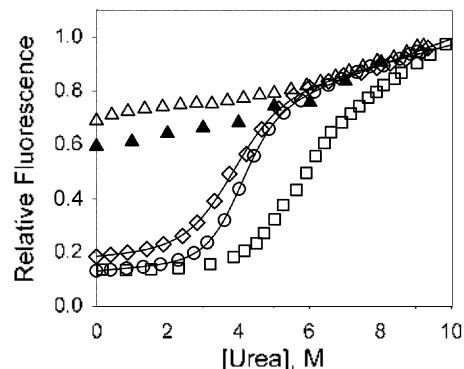


Fig. 2. Urea-induced equilibrium unfolding of HubWA probed by fluorescence emission spectroscopy in varying solvent pH. Circles, squares, diamonds and triangles represent the equilibrium unfolding of HubWA at pH 5, 7, 9 and 2, respectively. Closed triangles represent the fluorescence signal of N-acetyltryptophanamide (NATA) in the varying urea concentrations. Solid lines are the nonlinear least squares fit of the equilibrium unfolding based on a two-state folding model.

전하를 띠는 아미노산의 곁가지들이 정전기적인 척력이 가장 약하기 때문일 것으로 생각된다. 그런데 HubWA가 거의 unfold 되어 있는 상태로 보이는 고농도(7 M 이상)의 urea가 존재하는 용액에서의 형광의 세기는 pH 5나 9에서 보다 pH 7일 때 더 낮게 나타나며 또한 7 M 이후의 signal의 변화는 pH 5나 9인 용액에서 보다 pH 7인 용액에서 더 급하게 일어나고 있으며 10 M urea에 이르러서야 비로소 서로 일치되는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 관찰은 단순히 unfolded baseline이 측정된 용액의 pH에 따라 다소 달라지기 때문이라고 해석할 수도 있다. 그러나 HubWA가 보여주는 unfolded baseline은 pH 2, 5, 9에서 일치하고 있으며 이 baseline은 트립토판 곁가지가 용액에 완전히 노출되었을 때의 형광의 세기로 볼 수 있는 NATA의 형광 신호(Fig. 2 닫힌 삼각형)와도 일치하는 것을 볼 수 있다. 그러므로 pH 2, 5, 9인 용액에서 나타나는 unfolded baseline이 HubWA가 완전히 unfold 되었을 때 보여줄 수 있는 공통된 unfolded baseline이라고 생각할 수 있다. 따라서 7 M 근처의 urea 용액에서 HubWA의 형광의 세기가 용액의 pH가 7일 때 2, 5, 9일 때보다 낮게 나타나는 이유는 단순히 unfolded baseline의 차이로 보기 보다는 HubWA의 구조에 기인한 것이라고 생각할 수 있다. 즉 HubWA가 pH 7이

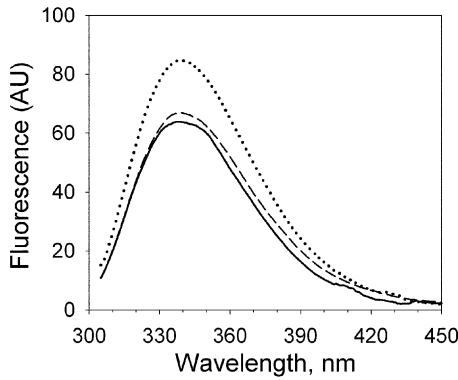


Fig. 3. Fluorescence emission spectra of HubWA. Spectra were measured in the same protein concentration (3  $\mu$ M). Solid, dashed and dotted lines represent the fluorescence emission spectra of HubWA at pH 5, 7 and 9 in the absence of urea, respectively. AU stands for arbitrary unit.

면서 7 M urea를 지니고 있는 용액에서 완전히 unfold 되어있지 않은 폴딩의 중간단계(folding intermediate)가 존재하고 있을 가능성을 배제할 수 없다.

단백질의 unfolding 실험에서 스펙트럼 신호의 변화가 일어나는 즉 구조의 변환이 일어나는 변성제의 농도 구간을 전이 구역(transition zone)이라고 한다. HubWA의 경우 pH 5와 9에서는 3과 5 M urea 농도 사이에서 transition zone이 나타나고 있다. 그런데 transition zone에서의 스펙트럼 신호의 변화는 pH 9보다는 pH 5에서 더 급하게 일어나는 것을 Fig. 1과 2에서 볼 수 있으며 이 때 m-value는 transition zone에서 스펙트럼 신호의 변화가 더 급격히 일어나는 pH 5일 때 더 크게 나타나는 것을 Table 1을 통해서 알 수 있다. 이것은 transition zone에서의 스펙트럼 신호의 변화도가 완전한 unfolding 반응의 m-value가 더 작으며 또한 용액에 노출되는 SASA가 더 적은 경우와 상응한다고 할 수 있다. 용액의 pH가 7일 때 HubWA의 transition zone은 약 4.5-7 M urea 농도에서 나타나고 있다. 그

런데 transition zone에서의 스펙트럼 신호의 변화는 pH 5일 때보다 7일 때 더 완만하게 일어나고 있는 것을 관찰할 수 있다. 이것은 HubWA의 경우 urea 농도가 7 M인 용액에서 pH 7일 때 노출되는 SASA가 pH 5일 때 보다 적다는 것을 나타낸다. 즉 HubWA는 pH 7인 용액에서는 다른 pH에서 완전히 unfold 된 상태가 되는 urea농도에서도 완전히 unfold 되어 있지 않다고 볼 수 있다. 또한 pH 7에서 urea 농도가 7 M 이상일 때 보여지는 signal의 변화가 다른 pH에서 보여지는 unfolded baseline 보다 더 심한 경사를 보이는 것은 7 M urea에 이를 때까지 노출되지 않고 있던 부위가 7 M 이상 되는 고농도의 urea에서 노출되는 과정인 intermediate state에서 unfolded state로의 구조변환이 일어나기 때문이라고 생각할 수 있다. 즉 HubWA의 pH 7 용액에서의 unfolding 반응은 먼저 native state가 용액에 노출되지 않는 SASA 부위를 약간 가지고 있는 중간단계(intermediate state)를 거쳐서 용액에 노출되지 않는 SASA가 더 이상 존재하지 않는 완전히 unfold 된 상태로 구조의 변환이 일어나는 것으로 보여진다. 따라서 far-UV CD 분광법으로 관찰한 unfolding 실험에서 pH 7에서의 m-value가 pH 5일 때보다 작은 것은 folding 반응의 메커니즘이 cooperative한 two-state 폴딩 메커니즘에서 적어도 하나 이상의 intermediate 상태를 거치는 multi-state 폴딩 메커니즘으로 변화하기 때문이라고 해석하는 것이 더 타당할 것으로 여겨진다.

이상의 분석에서 보듯이 하나의 단백질도 용액의 pH 값에 따라 폴딩 메커니즘이 서로 다르게 나타날 수 있음을 알 수 있다. 단백질의 폴딩 반응은 매우 다양한 구조가 매우 빠르게 평형을 이루고 있는 것으로 생각되는 random coil 형태의 unfolded state에서 하나의 유일한 native state가 되는 반응으로서 그 정보는 native 구조의 안정성에 기여하는 여러 비공유결합 중 폴딩 반응의 핵(folding nucleus)이 되는 결합이 형성

Table 1. Two-state analysis of urea-induced equilibrium unfolding of hubWA in varying solvent pH.

Experimental conditions	$m_{cd}$ (kcal/mol/M)	$C_m$ (M)	$\Delta G_{NU}^{\circ}$ (kcal/mol)
Far-UV CD, pH 5	1.18 ± 0.01	3.91 ± 0.04	4.61 ± 0.27
Far-UV CD, pH 7	0.86 ± 0.01	5.45 ± 0.04	4.69 ± 0.10
Far-UV CD, pH 9	0.87 ± 0.01	4.08 ± 0.05	3.55 ± 0.08
Fluorescence, pH 5	1.19 ± 0.05	3.95 ± 0.07	4.67 ± 0.26
Fluorescence, pH 9	0.89 ± 0.01	3.84 ± 0.08	3.42 ± 0.11

되면 핵 주위에 있는 native 결합이 서로 cooperative 하게 형성되는 nucleation 후 condensation이 일어나는 양상을 띤다고 할 수 있다.<sup>22</sup> 또한 단백질의 native state가 매우 다양한 비공유결합으로 유지되고 있다는 사실을 고려한다면 folding nucleus는 하나의 단백질에 오직 하나씩만 있는 것이 아니라 여러 개가 있을 수 있으며(multiple folding nuclei) 단백질의 아미노산 서열 상의 여러 부위에 산재해 있을 것으로 생각할 수 있다(delocalized folding nuclei). 만약 folding nucleus가 산재되어 있고 이러한 folding nucleus들의 폴딩 반응을 시작시키는 능력이 서로 유사하여 어느 한 folding nucleus가 다른 folding nucleus에 대하여 우세하지 않다면 단백질 각 분자당 folding nucleus가 형성되는 부위가 매우 다양하게 나타날 수 있으며 따라서 폴딩 반응의 궤적 또한 매우 다양하게 나타나게 될 것이다.<sup>23</sup> 이러한 경우에는 특정한 구조를 갖는 intermediate (discrete intermediate)를 관찰할 가능성이 낮다고 할 수 있다. 실제로 소수성 코어가 작은 single domain 단백질의 경우 위에서 설명한 다양한 폴딩 궤적을 따라 폴딩 반응이 일어나는 현상이 우세하며 따라서 discrete folding intermediate의 population이 관찰될 만큼 나타나지 않고 오직 native state와 unfolded state만 관찰되는 two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 경우가 많이 관찰된다.<sup>24,25</sup> 그러나 폴딩 반응을 시작시킬 수 있는 능력이 유사한 folding nucleus도 주변 환경에 따라서 폴딩 반응을 시작시킬 수 있는 능력이 영향을 받을 수 있다. 특히 folding nucleus 근처에 전하를 띤 아미노산이 있을 경우 용액의 pH에 따라 이들 아미노산의 전기적인 인력이나 척력이 변함에 따라서 folding nucleus가 폴딩 반응을 시작 시키는 데 우호적이게 되거나 또는 비우호적이게 될 수 있다. 즉 용액의 성질에 따라서 본 연구의 pH 5인 용액에서처럼 단백질의 folding nucleus가 산재되어 분포하여 다양한 폴딩 궤적을 갖는 경우 folding intermediate가 관찰될 수 있을 만큼 그 population이 높지 않은 경우도 있지만 pH 7인 용액에서처럼 folding nucleus가 단백질의 어느 한 부위에 편중되어 폴딩 반응의 궤적이 단순하게 되어 특정 구조의 intermediate가 나타날 수 있을 만큼 그 population이 높아져서 변성제에 의한 unfolding 실험에서 m-value가 작아지는 경우도 있을 수 있다. 그러나 이 실험의 결과만 가지고서는 어떠한 residue가 m-value가 변하는 현상에 직접적으로 관여하고 있는 지 알기는 힘든

것으로 보인다. Folding nucleus를 이루는 residue와 그 주위의 전하를 띤 residue들이 HubWA의 폴딩 반응에 끼치는 영향에 대한 이해는 더 많은 실험이 필요하다고 할 수 있으며 이러한 실험의 선행 실험으로 HubWA에 대하여 site-directed mutagenesis와 폴딩 kinetics 측정을 통하여 folding nucleus의 아미노산 서열 상에서의 위치를 결정하는 실험이 진행되고 있다.

단백질 구조의 변성제에 의한 unfolding 반응을 측정할 결과를 LEM으로 분석하는 방법은 단백질의 안정성을 구하는데 자주 사용되고 있으나 변이 단백질과 wild type 단백질의 안정성을 비교하거나 용액의 성질이 다를 때 나타나는 단백질의 안정성의 차이 등을 비교할 때에는 m-value의 차이에 따라 native나 unfolded state의 구조적인 특성이 다르게 되는 경우와 폴딩 메커니즘이 변하게 되는 경우 등이 나타날 수 있으므로 실험 결과를 해석함에 있어서 주의를 요한다고 할 수 있다.

## 결 론

소수성 코어 residue가 변이된 유비퀴틴인 HubWA의 urea에 의한 unfolding 반응의 결과를 LEM으로 분석한 결과 용액의 pH가 7과 9일 때 m-value가 5일 때보다 약 30% 정도 감소하는 현상이 관찰되었다. 용액의 pH가 5와 9에서는 서로 다른 spectral probe로 측정할 unfolding 반응이 서로 일치하는 것으로 보아 두 경우 모두 폴딩 intermediate가 관찰될 만큼 충분히 존재하지 않는 two-state 메커니즘을 따르는 것으로 보인다. 따라서 pH 5와 9에서의 m-value의 차이는 native state나 혹은 unfolded state의 구조가 서로 차이가 있기 때문으로 여겨지며 이 두 pH에서의 native state의 형광 스펙트럼에 차이가 있는 점으로 보아 용액의 수소이온 농도가 native state의 구조에 영향을 끼친 것으로 보인다. 반면에 용액의 pH가 7일 때에는 unfolding 반응이 일어나는 고농도의 urea 용액에서의 형광 스펙트럼이 다른 pH일 때의 형광 스펙트럼과 일치하지 않는 점으로 보아 폴딩 메커니즘이 단순한 two-state 메커니즘을 따르는 게 아니라 적어도 하나의 intermediate state가 존재하는 좀 더 덜 cooperative 한 폴딩 메커니즘을 따르는 것으로 보인다. 따라서 단백질의 구조를 연구하는데 필수적인 변성제에 의한 unfolding 실험을 LEM으로 분석할 때에는 native state



나 unfolded state의 구조적인 특성이 변하는 점과 폴딩 메커니즘이 변하게 되는 점들을 고려하면서 실험 결과를 분석하여야 한다.

이 논문은 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(R05-2003-000-12064-0).

### 인용문헌

1. Tanford, C. *Adv. Prot. Chem.* **1968**, *23*, 121.
2. Schellman, J. A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1305.
3. Pace, C. N. *Methods Enzymol.* **1986**, *131*, 266.
4. Green, R. F.; Pace, C. N. *J. Biol. Chem.* **1974**, *249*, 5388.
5. Tanford, C. *Adv. Prot. Chem.* **1970**, *24*, 1.
6. Shortle, D. *Adv. Prot. Chem.* **1995**, *46*, 217.
7. Myers, J. K.; Pace, C. N.; Scholtz, J. M. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2138.
8. Soulages, J. L. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 484.
9. Whitten, S. T.; Wooll, J. O.; Razeghifard, R.; Garcia-Moreno E., B.; Hilsner, V. J. *J. Mol. Biol.* **2001**, *309*, 1165.
10. Spudich, G.; Marqusee, S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 11677.
11. Khorasanizadeh, S.; Peters, I. D.; Roder, H. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 193.
12. Matouschek, A.; Kellis Jr. J. T.; Serrano, L.; Fersht, A. R. *Nature* **1989**, *340*, 122.
13. Fersht, A. R. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 79.
14. Park, S.-H. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *37*, 676.
15. Brooks III, C. L.; Gruebele, M.; Onuchic, J. N.; Wolynes, P. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 11037.
16. Khorasanizadeh, S.; Peters, I. D.; Butt, T. R.; Roder, H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7054.
17. Pace, C. N.; Shirley, B. A.; Thomson, J. A. In *Protein structure. a practical approach*; Creighton, T. E., Ed.; Oxford University Press: Oxford, England, 1990, p 311.
18. Gill, S. C.; von Hippel, P. H. *Anal. Chem.* **1989**, *182*, 319.
19. Eftink, M. R. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 482.
20. Pace, C. N. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1975**, *3*, 1.
21. Schmid, F. X. In *Protein structure. a practical approach*; Creighton, T. E., Ed.; Oxford University Press: Oxford, England, 1990, p 251.
22. Fersht, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 10869.
23. Shoemaker, B. A.; Wang, J.; Wolynes, P. G. *J. Mol. Biol.* **1999**, *287*, 675.
24. Jackson, S. E.; Fersht, A. R. *Biochemistry* **1991**, *30*, 10428.
25. Villegas, V.; Azuaga, A.; Catasús, L.; Reverter, D.; Mateo, P. L.; Avilés, F. X.; Serrano, L. *Biochemistry* **1995**, *34*, 15105.
26. Viguera, A. R.; Martínez, J. C.; Filimonov, V. V.; Mateo, P. L.; Serrano, L. *Biochemistry* **1994**, *33*, 2142.
27. Schindler, T.; Herrler, M.; Marahiel, M. A.; Schmid, F. X. *Nat. Struct. Biol.* **1995**, *2*, 663.
28. Yi, Q.; Baker, D. *Protein Sci.* **1996**, *5*, 1060.