

TiO₂ Nanoparticle에 특이적으로 결합하는 Peptide의 Alanine Scanning Mutant의 성질에 관한 연구

서민희 · 채희권¹ · 명희준*
한국의외국어대학교 생명공학과, ¹화학과

Characterization of Alanine Scanning Mutants of a Peptide Specifically Binding to TiO₂ Nanoparticles. Seo, Min Hee, Hee Kwon Chae¹, and Heejoon Myung*. *Departments of Bioscience and Biotechnology and ¹Chemistry, Hankuk University of Foreign Studies, Yong-In 449-791, Korea* – We have previously reported the isolation and characterization of peptides binding to TiO₂ nanoparticles from phage display peptide libraries. One of the peptides (PEP9) was selected and mutant peptide-displaying phages were produced by alanine scanning mutagenesis. The mutant phages were subjected to binding analysis to TiO₂ nanoparticles. When the proline at residue 4 was substituted by alanine, the binding activity was reduced to 10% of that of wild type PEP9. Substitution of valine at residue 2, serine at residue 3, and isoleucine at residue 5 also decreased the binding to 40%. Based on these observations, we concluded that the three dimensional structure generated by residues 2-5 was the critical factor for the binding between PEP9 and the nanoparticle.

Key words: TiO₂, nanoparticle, phage display, peptide, alanine scanning

TiO₂는 반도체의 성질을 가지는 화합물로, 페인트나 화장품의 백색 안료로 사용되며 그 입자크기가 20 nm 이하가 되면 매우 독특한 성질이 나타난다. 태양광이나 형광등에서 발생하는 400 nm이하의 자외선을 받으면 이 입자들은 유기물 분해기능, 항균 살균기능, 친수 (hydrophilic)기능에 의한 자정(self-cleaning)효과 및 김서림 방지 효과를 갖는다.

본 연구진은 이러한 TiO₂의 nanoparticle에 결합하는 peptide를 phage display peptide library[1, 2]로부터 선별하여 그 성질을 보고한바 있다[7]. 그중의 하나인 PEP9은 S-V-S-P-I-S-H의 아미노산으로 구성되어 있으며, 7, 15, 25 nm 크기의 TiO₂에 결합하고, 그 결합은 dose-dependency를 나타내는 것으로 미루어 특이적인 결합으로 보고 되었다. 그러나, 이러한 결합을 제공하는 원동력이 무엇인지는 밝히지 못했다. 이것은 본 연구진의 실험뿐 아니라, 이러한 일을 최초로 시도했던 Belcher 그룹의 연구에서도 보고 된 바가 없다[3-5]. 따라서, 본 연구에서는 각 아미노산을 alanine으로 치환[11] 했을 때에 TiO₂에 대한 결합력의 변화를 측정하여 결합의 성질을 밝히고자 했다.

Alanine scanning mutagenesis를 위한 oligomer는 Table 1에 나타내었다. 각 oligomer를 95°C에서 15분간 denaturation 한 뒤 서서히 상온으로 내려 annealing 하였다. Vector인 pCANTAB5E(Amersham, USA)를 *Sfi* I과 *Not* I 으로 digestion 한 후 primer annealing을 수행한 PEP-9/

PEP-9-1/PEP-9-2/PEP-9-3/PEP-9-4/PEP-9-5/PEP-9-6/PEP-9-7 각 insert와 ligation을 수행한 후(Fig. 1) *E. coli* TG1 (NEB, USA)에 CaCl₂를 이용하여 transformation 하였다. 각 8종류의 recombinant phagemid를 overnight culture한 후 5 ml의 2XYT에 넣고 log phage 까지 키웠다. Helper phage M₁₃KO₇ 2×10¹⁰ pfu를 첨가하여 37°C에서 한 시간 더 키운 후 1500×g로 원심 분리했다. 가라앉은 cell에 50 mg/ml의 ampicillin과 25 µg/ml 이 포함된 2XYT 5ml을 넣고 resuspension 한 후 14시간동안 37°C에서 shaking incubation 했다. 1.5ml tube에 담고 상온에서 원심 분리 한 후 (10770 × g, 5분) 상층액에 PEG/NaCl (20% polyethylene glycol-8000, 2.5M NaCl)을 total volume의 1/5로 넣어주고 상온에서 15분 방치한 후 4°C에서 15분간 원심분리(13680 ×g) 하고, supernatant 는 pipette 을 사용하여 완전히 제거했다. 남은 pellet을 TBS buffer (50 mM Tris-Cl(pH 7.5), 150 mM NaCl)에 녹여 4°C에서 보관했다.

Target particle의 농도가 증가할수록 binding 하는 phage 양이 증가함을 증명하기 위하여 dose-dependency 실험을 수행하였다. 1.5 ml tube에 wild type 또는 각 mutant phage 200 µl (1.0 × 10⁸ pfu/ml)를 담고, target particle 15nm TiO₂ 를 각 농도별(0.05 mg/ml, 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml, 7.5 mg/ml) 로 넣고 잘 섞은 후 상온에서 1시간 30분간 binding 시켰다. Phage elution을 위하여 5분간 원심분리(14240 × g) 하여 phage가 binding된 TiO₂를 가라앉히고 supernatant 의 unbound phage는 버렸다. Wash buffer (TBST: 0.05% Tween 20 in 1 × TBS (1 × TBS : 50 mM Tris-Cl, pH7.5, 150 mM NaCl))로 3번 washing한 후, elution buffer (0.2 M Glycine-

*Corresponding author

Tel: 82-31-330-4098, Fax: 82-31-330-4566
E-mail: hjmyung@hufs.ac.kr

Table 1. Oligonucleotides used for alanine scanning mutagenesis

Oligoname	Sequences
PEP-9-f	5' CGG CCT CTG TTT CGC CGA TTT CTC ATG C 3'
PEP-9-r	5' GGC CGC ATG AGA AAT CGG CGA AAC AGA GGC CGG CT 3'
PEP-9-1-f	5' CGG CCT CTG TTT CGC CGA TTT CTG CTG C 3'
PEP-9-1-r	5' GGC CGC AGC AGA AAT CGG CGA AAC AGA GGC CGG CT 3'
PEP-9-2-f	5' CGG CCT CTG TTT CGC CGA TTG CTC ATG C 3'
PEP-9-2-r	5' GGC CGC ATG AGC AAT CGG CGA AAC AGA GGC CGG CT 3'
PEP-9-3-f	5' CGG CCT CTG TTT CGC CGG CTT CTC ATG C 3'
PEP-9-3-r	5' GGC CGC ATG AGA AGC CGG CGA AAC AGA GGC CGG CT 3'
PEP-9-4-f	5' CGG CCT CTG TTT CGG CTA TTT CTC ATG C 3'
PEP-9-4-r	5' GGC CGC ATG AGA AAT AGC CGA AAC AGA GGC CGG CT 3'
PEP-9-5-f	5' CGG CCT CTG TTG CTC CGA TTT CTC ATG C 3'
PEP-9-5-r	5' GGC CGC ATG AGA AAT CGG ACG AAC AGA GGC CGG CT 3'
PEP-9-6-f	5' CGG CCT CTG CTT CGC CGA TTT CTC ATG C 3'
PEP-9-6-r	5' GGC CGC ATG AGA AAT CGG CGA AGC AGA GGC CGG CT 3'
PEP-9-7-f	5' CGG CCG CTG TTT CGC CGA TTT CTC ATG C 3'
PEP-9-7-r	5' GGC CGC ATG AGA AAT CGG CGA AAC AGC GGC CGG CT 3'

HCl, pH 2.2) 100 μ l를 넣어주고, 10분을 넘지 않게 잘 흔들어준 후 5분간 원심분리 하여 (14,240 \times g) particle과 binding한 phage를 분리했다. 즉시 1M Tris-HCl buffer (pH 9.1) 15 μ l를 섞어 중화 했다. 이때 titration을 위하여 phage 1 μ l를 남겨 놓았다. Overnight culture한 host strain ER2738을

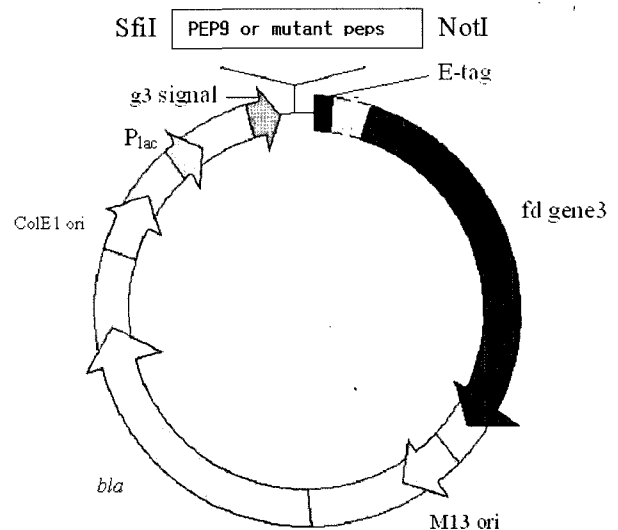


Fig. 1. Construction of pCANTAB5E vector for production of phages displaying PEP9 or mutant peptides. The oligomers encoding PEP9 or alanine-scanning mutant peptides were inserted between *Sfi* I and *Not* I sites to generate fusions to minor capsid protein gIIIp.

1/100 volume으로 2XYT broth에 첨가한 후 2시간 shaking incubation 했다(mid-log phase, OD600~0.5). Fresh culture한 ER2738(Amersham, USA) 200 μ l와 serial dilution 한 phage를 10 μ l, Agarose-Top 3 ml(45°C)를 혼합하여 X-gal 과 IPTG가 첨가된 LB plate에 부었다. 37°C에서 overnight incubation한 후, blue plaque을 확인했다.

그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 일단 8종의 phage가 모두 target양이 증가함에 따라 dose-dependent한 binding을 보이고 있음을 알 수 있다. 이 중 4번의 proline을 alanine으로

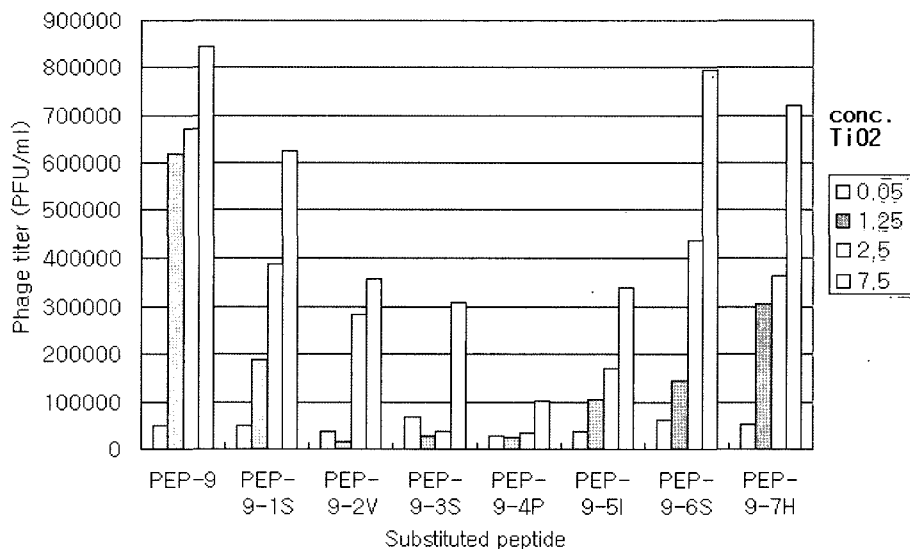


Fig. 2. Binding activity of alanine scanning mutant phages. The wild type PEP9 and 7 mutant phages are indicated in x axis. The binding was observed at increasing target TiO₂ concentrations; 0.05, 1.25, 2.5, and 7.5 mg/ml. The binding phages were eluted and titrated.

치환한 mutant의 경우 wild type PEP9에 비하여 약 10%로 감소된 binding을 나타내었다. 또한, 2번 valine, 3번 serine, 5번 isoleucine의 치환 peptide는 binding이 40%로 감소하였다. 반면에 1, 6, 7번의 serine, serine, histidine의 경우에는 alanine으로 치환된 후에도 binding activity에 큰 변화를 나타내지 않았다. Serine의 경우 uncharged polar한 amino acid인데, 3번과 1, 6번에서 다른 효과를 나타내는 것으로 미루어 polarity는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 또한, charge를 가진 histidine의 치환도 큰 변화를 수반하지 않는 것으로 보아 charge는 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

반면에, 2-5번까지의 amino acid는 hydrophobic과 hydrophilic한 amino acid가 섞여 있어서 hydrophobicity가 결정적 요인은 아님을 나타낸다. 주지하는 바와 같이 proline의 경우에는 peptide의 비틀림을 가져오는 독특한 성질이 있다. 이 proline의 치환이 binding에 가장 큰 영향을 미쳤고, 그 주위의 세 자리의 amino acid의 변화가 상당한 영향을 미친 점으로 미루어 볼 때, PEP9과 TiO₂ nanoparticle의 결합에는 이들 4개의 amino acid가 만들어 내는 3차원적 구조의 역할의 비중이 큰 것을 알 수 있었다. 본 실험에서 이용한 TiO₂는 구형의 구조를 가지고 있다. 나노 particle과 peptide의 크기를 비교하여 볼 때, particle 표면을 이루는 미세 구조를 peptide가 인식할 것으로 판단 된다. 그러나, 이 구조 중에서 peptide의 binding epitope이 되는 미세 구조가 무엇인지는 전자 현미경으로도 알아낼 수 없다. 한 가지 분명한 것은 그 표면 미세 구조가 각기 크기가 다른 TiO₂ nanoparticle(7, 15, 25 nm의 지름)에 공통으로 존재한다는 것이다[7].

Phage display는 protein과 protein의 interaction을 연구하는 데에 매우 유용한 방법이다[9]. 본 연구에서는 자연적으로는 만날 기회가 없는 두 물질인 무기 TiO₂와 유기 peptide의 결합에 대하여 관찰하였다. 이러한 결합을 결정하는 요소가 반드시 3차원적 구조뿐이라고 할 수는 없다. 비록 본 실험에서는 3차원 구조의 fit이 가장 큰 역할을 하는 것으로 나타났지만, 일반적인 protein과 protein의 interaction에서처럼, 3차원 구조의 fit 뿐 아니라, charge, hydrophobicity, van der Waals force 등 다른 힘이 작용할 가능성도 있다. 좀 더 다양한 target 무기물과 특정 peptide의 결합에서 유사한 연구가 이루어진 후에야 일반적으로 정의 할 수 있을 것이라 판단된다.

요 약

본 연구진은 phage display peptide library로부터 TiO₂ nanoparticle에 binding 하는 peptide를 선별하여 보고한 바 있다. 이 중의 하나인 PEP9을 선택하여 alanine scanning mutagenesis를 통하여 mutant peptide를 display하는 phage를 제작하여 TiO₂에의 binding을 조사하였다. 그 결과, 4번

위치의 proline이 alanine으로 치환된 peptide의 경우 binding activity가 10%로 감소하였고, 2번 valine, 3번 serine, 5번 isoleucine의 치환 peptide는 binding이 40%로 감소하였다. 이러한 사실로 미루어볼 때, PEP9과 TiO₂ nanoparticle의 결합에는 2, 3, 4, 5번의 아미노산이 만들어 내는 3차원적 구조가 중요한 역할을 하는 것으로 결론 내릴 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 한국외국어대학교 교내 연구비에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Cesareni G. 1992. Peptide display on filamentous phage capsids. A new powerful tool to study protein-ligand interaction. *FEBS Lett.* **307**: 66-70.
- Larocca, D. and A. Baird, 1999. Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage. *FASEB J.* **13**: 727-734.
- Lee, S.-W., C. Mao, C. E. Flynn, and A. M. Belcher. 2002. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science* **296**: 892-895.
- Mao, C., C. E. Flynn, A. Hayhurst, R. Sweeney, J. Qi, and A. M. Belcher. 2003. Viral assembly of oriented quantum dot nanowire. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**: 6946-6951.
- Mao, C., C. E. Flynn, D. J. Soils, B. D. Reiss, S. T. Kottmann, R. Y.Sweeney, A. Hayhurst, G. Georgiou, B. Invention, and A. M. Belcher, 2004. Virus-based toolkit for directed synthesis of magnetic and semi-conducting nanowires. *Science* **303**: 213-217.
- Roth, T. A., G. A. Weiss, C. Eigenbrot, and S. S. Sidhu. 2002. A minimized M13 coat protein defines the minimum requirements for assembly into the bacteriophage particle. *J. Mol. Biol.* **322**: 357-367.
- Seo, M. H., H. K. Chae, and H. Myung. 2005. Selection and characterization of peptides specifically binding to TiO₂ nanoparticles. *J. Microbiol. Biotechnol.(in press)*.
- Sidhu, S. S. and S. Sachdev. 2001. Engineering M13 for phage display. *J. Mol. Biol.* **18**: 57-63.
- Sidhu, S. S., W. J. Fairbrother, and K. Deshayes. 2003. Exploring protein-protein interactions with phage display. *Chembiochem.* **4**: 14-25.
- Weiss G. A. and S. S. Sidhu. 2000. Design and evolution of artificial M13 coat proteins. *J. Mol. Biol.* **300**: 213-219.
- Weiss, G. A., C. K. Watanabe, A. Zhong, A. Goddard, and S. S. Sidhu. 2000. Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 8950-8954.

(Received July 20, 2005/Accepted Nov. 16, 2005)