

타이로신 기반 펩타이드 재료

Tyrosine-Based Peptide Materials

이재훈 · 남기태 | Jaehun Lee · Ki Tae Nam

Department of Materials Science & Engineering, Seoul National University,
1 Gwanak-ro, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
E-mail: nkitae@snu.ac.kr

1. 서론

나노스케일 단위 혹은 나노스케일의 규칙적 배열을 가지는 거시적 단위에서 자발적으로 형성되는 정렬된 구조는 나노기술에서 매우 중요한 이슈 중 하나이다.^{1,2} 하향식 공정(bottom up process)에서 분자 단위의 간단한 빌딩 블록(building blocks)들은 크고 더 복잡한 초분자(supramolecular) 조립구조를 형성하기 위해 특정한 배열 방향으로 서로 상호 작용한다.^{3,4} 이 때 빌딩 블록들은 조직되어 정렬된 구조를 형성하기 위해 다양한 비공유성 결합을 이용한다. 정전기적 인력, 수소 결합, 소수성 상호작용, pi-pi 상호작용과 같은 비공유성 결합은 각각의 힘은 공유결합보다 약하지만 정교하게 디자인된 빌딩블록을 이용하면 다양한 비공유성 결합을 함께 유도할 수 있고 자기조립을 가능하게 한다.

펩타이드와 단백질은 자연계 생체 시스템의 구성단위로 자기조립을 통해 생명 물질의 기본 구조를 형성하고, 더 나아가 인공적으로 합성한 유기 재료에서 얻을 수 없는 화학적 활성, 기계적 물성을 보여주기도 한다. 이러한 성질은 기존의 과학적, 기술적 한계를 극복할 수 있는 새로운 소재 개발의 밑거름을 제공하고 있다. 펩타이드와 단백질은 그 구성 성분인 20가지 아미노산의 서열을 바꿔줌으로써 2차, 3차 구조를 형성할 수 있기 때문에 특정한 구조나 모양으로 조립되는 것이 가능하다. 하지만 단백질 재료의 경우 대량 생산 및 추출이 매우 어렵고, 주변 환경에 의해 그 구조가 쉽게 변형되는 단점을 가지고 있었다. 뿐만 아니라 대부분의 단백질은 그 구조를 분석하기 힘들다는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점 때문에 단백질을 대신하여 쉽게 합성이 가능하며 좀 더 안정적인 짧은 펩타이드를 이용한 연구들이 지난 15년 동안 활발히 이루어졌다. 생체 단백질의 활성 부위 혹은 기능성을 가진 부분의 아미노산 서열을 모방하거나 인공적으로 합성한 펩타이드⁵를 사용하거나, 정전기적 인력을 이용한 양친매성 펩타이드⁶ 혹은 아밀로이드 단백질에서 유래한 다이페닐알라닌(diphenylalanine) 기반 펩타이드⁷가 많이 연구되어 왔다. 최근 본 연구진은 서울대학교 화학생물공학부 이윤식 교수 연구팀과 공동 연구를 통해 페닐알라닌과 구조가 흡사한 타이로신(tyrosine)을 기반으로 2차원 펩타이드 자기조립 현상을 발견하였다.⁸

타이로신은 일반적으로 신경계의 도파민이나 노르아드레날린과 같은 스트레스의 방어에 작용하는 신경전달 물질의 생성 원료로 알려져 있다. 본 연구진은 아밀로이드를 형성하는 단백질 중 하나인 beta₂-globulin의 아미노산 서열을 7개 단위로 나누어 시뮬레이션(Tango prediction)을 통해 beta sheet 응집이 쉽게 일어나는 서열을 확인하였다. 그 결과 타이로신이 3개 이상 함유된 서열들이 가장 beta sheet 응집이 일어날 가능성이 높았고 이를 통해 타이로신이 자기조립 과정에서 중요한 역할을 할 수 있음을 확인하였다. beta₂-globulin 이외에

Author



이재훈

2012 서울대학교 재료공학부 (학사)
2012-현재 서울대학교 재료공학부 (석박통합과정)



남기태

2000 서울대학교 재료공학부 (학사)
2002 서울대학교 재료공학부 (석사)
2007 미국 Massachusetts Institute of Technology, 재료공학부 (박사)
2007-2010 미국 The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory (박사후 연구원)
2010-현재 서울대학교 재료공학부 조교수

도 타이로신은 벼룩의 다리와 잠자리의 날개 근육에 많이 존재하는 탄성 단백질인 레실린(resilin)⁹과 글루텐(gluten)¹⁰에서 중요한 기능을 한다. 탄성 단백질에 존재하는 타이로신은 서로 공유결합을 이루어 단백질 접힘 구조를 유도하고, 이는 단백질이 높은 강도(stiffness)와 저장 탄성률(storage modulus)을 가지게 도와준다.

2. 자연계에서의 전자 전달과 타이로신의 역할

위와 같이 타이로신은 다양한 단백질의 접힘 구조와 자기 조립에 기여할 뿐만 아니라 산화 환원 반응에 활성이 있는 펩놀 그룹을 가지고 있어서 전자 및 수소 이온을 함께 전달하는(proton-coupled electron transfer, PCET) 반응을 수행하며 이는 생명체에서 신호 전달이나 생물 에너지학에서 매우 중요한 부분을 담당한다.¹¹ PCET라는 용어는 1981년 Ru^{IV}(bpy)₂(py)(O)²⁺ (Ru^{IV}=O²⁺)와 Ru^{II}(bpy)₂(py)(OH₂)²⁺ (Ru^{II}-OH₂²⁺)간에 일어나는 불균등화반응(comproportionation)에서 전자와 수소이온이 함께 전달되는 기본 과정을 설명하기 위해 등장했다.¹² 그 이후로 PCET 메커니즘은 위 반응뿐만 아니라 전자와 수소이온을 함께 전달하는 모든 반응, 반쪽 반응에 대하여 광범위하게 사용되고 있다(그림 1). 좀 더 PCET의 정확한 정의를 내리자면 수소 이온과 전자가 다른 오비탈로부터 시작해서 각각 다른 오비탈로 전달되는 메커니즘으로 전자와 양성자가 단계적으로 전달되는 메커니즘과는 대비된다.

다중전자, 다중수소이온 PCET 반쪽 반응은 높은 에너지를 가지는 반응 중간체를 거치지 않고 전자 및 수소이온의 전달을 가능하게 하여 화학 및 생물 분야의 많은 에너지 전환 및 저장 반응에 관여한다. 특히, 자연계에서 에너지 저장 및 생산(광합성, 호흡)에 필수적인 반쪽 반응들은 PCET 메커니즘과 탄화수소, 당, 합산소물(oxygenates)에 존재하는 높은 에너지의 C-H 결합을 활용한다. Photosystem II¹³, class I ribonucleotide reductase¹⁵, mitochondrial cytochrome

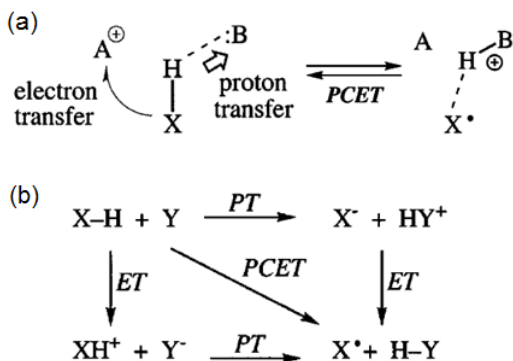


그림 1. (a) Scheme for PCET (b) Square scheme for PCET. Reproduced with permission from ref.14.

C oxidase¹⁶, DNA photolyase¹⁷ 와 같은 효소의 기작에 사용되고 있는 PCET 반응은 결국 산화 환원 반응에 활성을 띠는 아미노산인 타이로신, 트립토판, 시스테인을 통해 이루어진다. 높은 분해능으로 결정 구조가 밝혀진 photosystem II의 예시를 통해 PCET 반응과 타이로신의 역할에 대해 좀더 살펴보자.

3. Photosystem II와 타이로신

최근 학계의 큰 관심을 받는 인공 광합성 물 분해 반응은 자연계의 photosystem II로부터 영감을 얻은 것이다. Photosystem II는 엽록체의 소수성 thylakoid membrane에 존재하는 효소 단백질로 약 650 kDa의 크기의 단위체가 두 개 모인 이합체로 존재하며, 내부의 oxygen-evolving complex(OEC)에서 물을 산화시켜 산소 기체를 생산하는 기능을 한다. 전체 반응은 한 분자의 O₂를 생산하기 위해 4개의 전자가 필요하며 pH 7에서 0.884 V(vs NHE)이상의 전위가 필요한 높은 과전압을 요구하는 반응이다.

광합성을 통해 물이 분해되는 과정을 살펴보면 빛에 의해 물이 산화되고 여기서 얻어진 전자를 redox-active cofactor를 거쳐 plastoquinone으로 전달하게 된다. 이렇게 환원된 plastoquinone은 thylakoid membrane에서 전자 전달 셔틀 역할을 한다. 즉, 엽록소는 빛을 흡수하여 OEC에 존재하는 P680이라는 감광제를 여기시키고 이 때 분리된 전자는 망간칼슘 클러스터에서 플라스토퀴논으로 흐르게 된다. 이 과정에서 타이로신 Yz가 물을 분해하는 촉매인 망간칼슘 클러

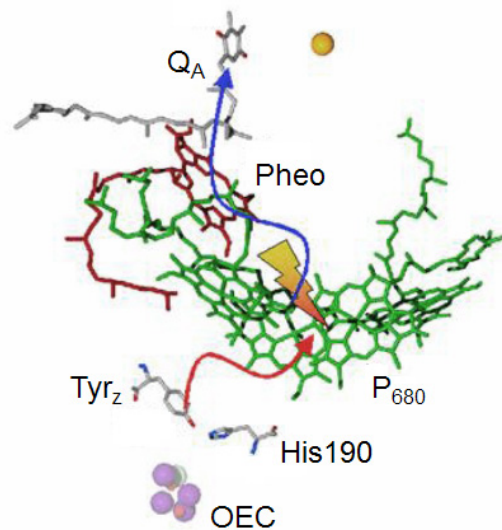


그림 2. Schematic depiction of electron flow among the major cofactors of PSII. Blue arrow indicates the flow of electrons from P680 after photo-excitation towards the acceptor plastoquinone (Q_A), red arrow indicates the flow of electrons to P680 from the OEC via Yz.¹⁸

스터에서 P680으로의 전자 전달을 매개하며 이 과정에서 물이 산화되어 산소 기체가 발생한다(그림 2). 이때 타이로신 라디칼이 형성되는 데에는 수소 이온의 전달이 매우 중요한데 이는 pKa 값과 산화환원이 밀접하게 연결되어 있어서 PCET 메커니즘을 동반하게 된다. PSII의 경우에는 Yz의 페놀 그룹과 인접한 위치에 His190이 존재하여 수소 결합을 이

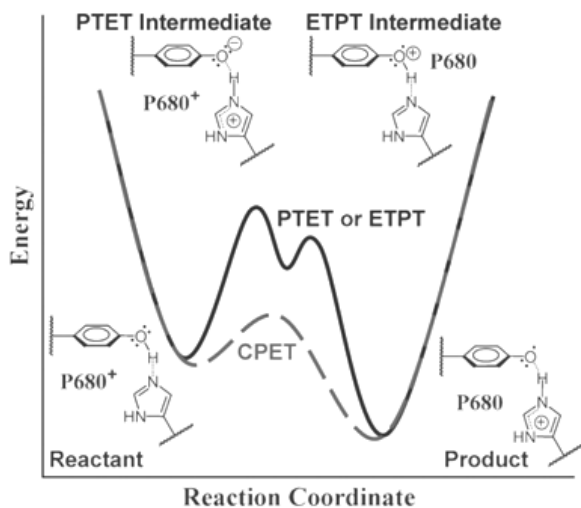


그림 3. Conceptual reaction coordinate diagram for the oxidation of Yz by P680. The concerted proton electron transfer (CPET same as PCET) has a single transition state and no intermediate state. Both of the stepwise mechanisms involve a high energy intermediate. Reproduced with permission from ref.21.

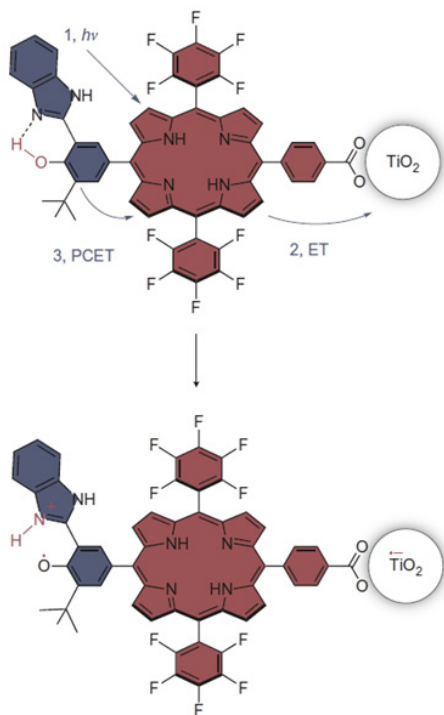


그림 4. Bioinspired artificial photosynthesis system consisting of three covalently linked redox subunits.²³

루며 원활한 수소 전달을 가능하게 해준다(그림 3).^{19,20} 즉, 타이로신은 P680과 망간칼슘 클러스터 사이에 존재하여 여기된 전자, 양공이 재결합하는 것을 막아주고 물로부터 전달되는 전자를 효율적으로 P680에 전달하여 높은 효율로 물 분해가 가능하도록 돕는다.

최근 Ana Moore 그룹에서는 이러한 타이로신과 히스티딘의 수소 결합을 통한 효과적인 PCET를 모방하는 시스템을 구축하고자 다음 그림 4와 같이 benzimidazole phenol-porphyrin-TiO₂ 세 부분으로 구성된 하이브리드 물질을 합성하였다.²² 첫 번째 전자 전달은 빛에 의해 여기된 Porphyrin의 전자는 TiO₂로 전달되었고, 이어서 두 번째 전자 전달은 benzimidazole phenol로부터 porphyrin 라디칼 양이온으로 일어났다. 이 때 두 번째 전자 전달은 benzimidazolium cation과 phenoxy 라디칼의 존재를 확인함으로써 수소 이온 전달과 효과적인 PCET 반응으로 진행되었음을 보여주었다. 이 연구는 최대한 OEC에 존재하는 타이로신 Yz과 비슷한 환경을 인공적으로 합성하여 구현하였고, 실제로 더 효율적인 전자 전달이 가능하였음을 보여주어 앞으로 인공 광합성 물 분해 연구에 많은 참고가 될 것으로 예상된다.

4. 타이로신 펩타이드의 2차원 자기조립 현상 및 분자 구조

본 그룹에서는 pi-pi 상호작용과 수소 결합을 통해 자기조립이 가능하고, PCET(proton-coupled electron transfer) 반응을 매개할 수 있는 타이로신과 이황화결합을 통해 접힘 구조를 제어하며 산화 환원 반응에 활성이 있는 시스테인을 기본 아미노산으로 선택하여 다음과 같은 펩타이드 라이브러리를 구성하였다(표 1). 각 펩타이드는 HEPES 버퍼에 녹여 열처리를 해준 후 실리кон 처리된 유리 위에 물방울을 만들어 관찰하였다. 샘플을 전자투과현미경으로 관찰한 결과 표 1과 같은 구조를 가지고 있음을 확인하였고, 그 중에 양말단에 두 개의 타이로신과 가운데 시스테인이 들어간 서열(YYCYY)의 경우에 큰 크기의 시트가 형성되는 것을 발견하였다. 더 나아가 이 펩타이드는 실리кон 처리된 유리 위에 놓여진 물방울에서 대면적으로 2차원 자기 조립되어 facet을 형성시켰다. 그 후 각 위치의 아미노산의 역할을 확인하기 위하여 표 1과 같이 다른 아미노산으로 대체하여 실험한 결과 YYACAYY 서열이 가장 facet 형성이 빠름을 확인하였고 이 펩타이드 서열을 사용하여 더욱 자세한 자기조립 현상 매커니즘을 연구하였다(그림 6).

자기 조립된 2차원 필름을 AFM로 관찰한 결과 1.4 nm 두께의 얇은 층들이 여러 장 쌓여있는 것을 발견하였고 시간이 지남에 따라 그 두께가 두꺼워짐을 알 수 있었다. 또한 Raman spectroscopy 분석을 통해 단량체에서는 존재하지 않았던

표 1. Peptide Library

Sequence	Observed Structure
YY	Nanofiber
YYY	Nanofiber, nanosphere
YYYY	Random aggregates
YCY	Random aggregates
CYY	Nanofiber
YYCYY	Large sheet
YYAYY	Planar structure
CYYCYC	Random aggregates
YYACAYY	Large sheet
YYAKAYY	Planar structure
YYAEAYY	Planar structure
YYACAYA	Random aggregates
YYACAAY	Random aggregates
YAACAYY	Random aggregates
AYACAYY	Random aggregates

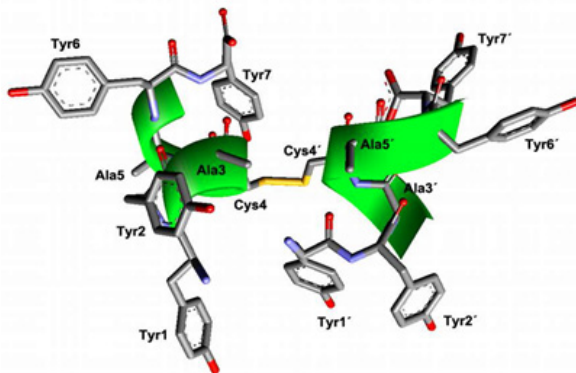


그림 5. Lowest energy NMR structure of dimeric peptide.

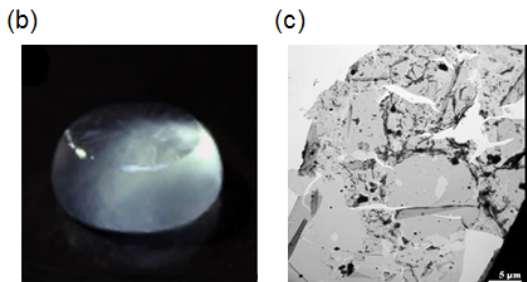
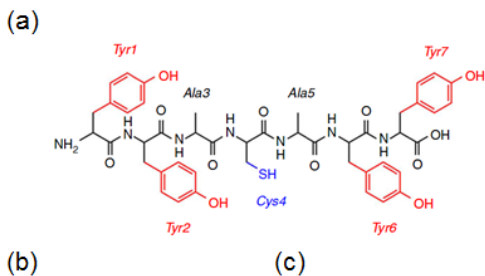


그림 6. (a) Chemical structure of YYACAYY, (b) An oblique view of the droplet with a single large facet, (c) TEM image of large 2D films.

이황화결합이 생긴 것을 확인하였다. 즉, YYACAYY는 물/공기 계면의 산소에 의하여 산화되어 이황화결합이 형성되고, 이는 이합체 구조를 만들어 2차원 자기 조립에 영향을 끼치는 것을 알 수 있다. 또, 시스테인 위치에 글루탐산 (glutamic acid) 혹은 라이신(lysine)으로 치환하여 실험한 결과 facet이 형성되지 않았다. 이러한 이합체의 분자구조 분석을 위해 2D-NMR 분석을 한 결과 그림 5와 같이 펩타이드의 backbone이 right-handed 알파 나선 구조로 안정화됨을 밝혔다. 또, 이합체의 높이는 Tyr2와 Tyr6' 사이의 거리 약 1.4 nm로 확인되었다. 이는 AFM에서 관찰한 한 층의 펩타이드 필름의 두께와 같은 값으로 이합체가 펩타이드 필름의 빌딩 블록으로 작용하고 있음을 강하게 암시한다. 펩타이드 facet 형성을 *in-situ*로 관찰하기 위해 thioflavin-T로 펩타이드 자기조립 구조를 염색한 후 형광 현미경 분석법을 이용하였다. 처음에 형성된 작은 펩타이드 자기조립 조각들이 물방울의 상단 중앙으로 이동함을 관찰하였고 이를 통해 결과적으로 물방울 전체가 펩타이드 필름에 의해서 덮이게 되는 것을 알 수 있었다. 이는 물방울의 곡률에 따른 증발 속도의 차이에 의해 유발되는 물방울 내부의 대류 현상에 의한 것으로 예상되었다.

타이로신 기반 펩타이드 필름은 타이로신이 가진 redox-active한 성질로 인하여 효소와 흡사한 촉매효과를 낼 수 있는 가능성이 있다. 본 그룹에서는 펩타이드 필름에서 생성된 타이로신 라디칼이 자연계와 같이 화학 반응을 개시하거나 촉진시킬 수 있는지 조사하였다. 타이로신 라디칼 생성은 이미 자연계의 photosystem II, ribonucleotide reductase 등 다양한 효소에서 원활한 전자 전달에 중요한 과정으로 알려져 있다. 특히 ribonucleotide reductase와 galactose oxidase에서 타이로신 라디칼은 주변의 시스테인과 함께 전자 전달 역할을 수행한다. 자연계의 효소에서 이처럼 중요한 역할을 하는 타이로신이지만 실제로 타이로신 라디칼을 재료적인 측면에서 사용하는 것에는 한계점이 있다. 이는 자연계에서 사용되는 타이로신 라디칼의 경우 단백질 내부의 안정한 소수성 환경에서 lifetime이 길고, 또 구조적으로 잘 설계된 전자 전달 통로를 통해 전자 전달이 이루어지기 때문일 것이다. 본 그룹에서는 펩타이드 필름에서 잘 정렬되어 있는 타이로신 그룹이 자연계와 같은 효과를 내어줄 수 있을 것이라 기대하였다. 펩타이드 필름에서 생성된 타이로신 라디칼을 활용하기 위한 모델 반응으로 피롤 중합반응을 선택하였다. 펩타이드 필름의 촉매 효과를 확인하기 위하여 fluorine-doped tin oxide (FTO) 기판 위에 필름을 옹기고, 0.9 V(vs NHE)의 전압을 가해준 결과 펩타이드 필름이 없는 기판에 비해 훨씬 더 빠른 속도로 폴리피롤이 중합되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 펩타이드 필름의 촉매 효과는 서열을 바꿔주고 새로운 자기조립 구조를 형성시킴으로써 더욱 향상될 수 있을 것이다.

5. 결론

본 특집에서는 크게 타이로신 기반 자기조립 펩타이드 구조체와 그 촉매 효과에 대해 살펴보았고 광합성에서 PCET 메커니즘을 통해 효율적인 전자 전달을 하는 타이로신에 대해 소개하였다. 이전에 발견된 펩타이드 자기조립의 경우 나노구조 혹은 마이크로 구조를 만드는 것은 쉬웠으나 산업적으로 활용 가능한 대면적 크기로 만드는 것은 불가능하였다. 하지만 타이로신 기반 펩타이드를 통해 대면적으로 필름을 합성하는 것을 성공하였고, 이는 펩타이드 재료의 새로운 가능성을 보여준 것이다. 뿐만 아니라 타이로신과 같은 redox-active하며 PCET 메커니즘을 이용가능한 펩타이드 물질로 이루어진 자기조립 구조체는 선택적 이온막, 전도성 유기필름, 신축성 소재, 인공 광합성 촉매, 효소 모방 촉매 등 수많은 곳에 활용될 수 있을 것이다.

참고문헌

1. S. Zhang, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 1171 (2003).
2. M. Lazzari, C. Rodríguez-Abreu, J. Rivas, and M. A. López-Quintela, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **6**, 892 (2006).
3. V. Berl, I. Huc, R. G. Khoury, and M. J. Krische, *Nature*, **407**, 723 (2000).
4. O. Ramström, T. Bunyapaiboonsri, S. Lohmann, and J.-M. Lehn, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1572**, 178 (2002).
5. M. Goodman, Bhumralkar, E. A. Jefferson, J. Kwak, and E. Locardi, *Biopolymers.*, **47**, 127 (1998).
6. J. D. Hartgerink, E. Beniash, and S. I. Stupp, *Science*. **294**, 1684 (2001).
7. M. Reches and E. Gazit, *Science.*, **300**, 625 (2003).
8. H.-S. Jang *et al.*, *Nat. Commun.*, **5**, 3665 (2014).
9. C. M. Elvin *et al.*, *Nature*, **437**, 999 (2005).
10. K. A. Tilley *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 2627 (2001).
11. D. R. Weinberg *et al.*, *Chem. Rev.*, **112**, 4016 (2012).
12. (a) N. Jordanova and S. Hammes-Schiffer, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 4848 (2002); (b) R. A. Binstead and T. J. Meyer, *J. Am. Chem. Soc.*, **109**, 3287 (1987); (c) B. T. Farrer, H. H. Thorp, C. Hill, and N. Carolina, *Inorg. Chem.*, **38**, 2497 (1999); (d) T. J. Meyer, and M. H. V Huynh, *Inorg. Chem.*, **42**, 8140 (2003).
13. L. Hammarström and S. Styring, *Energy Environ. Sci.*, **4**, 2379 (2011).
14. J. M. Mayer, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **55**, 363 (2004).
15. J. Stubbe and W. A. van der Donk, *Chem. Rev.*, **98**, 705 (1998).
16. Y.-R. Chen, M. R. Gunther, and R. P. Mason, *J. Biol. Chem.*, **274**, 3308 (1999).
17. Y. M. Gindt *et al.*, *Biochem*, **38**, 3857 (1999).
18. M. Retegan, N. Cox, W. Lubitz, F. Neese, and D. A. Pantazis, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16**, 11901 (2014).
19. K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, and S. Iwata, *Science.*, **303**, 1831 (2004).
20. C. J. Gagliardi *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, **254**, 2459 (2010).
21. M. Hambourger *et al.*, *Chem. Soc. Rev.*, **28**, 25 (2009).
22. J. D. Megiatto *et al.*, *Nat. Chem.*, **6**, 423 (2014).