

## 정전기적 상호작용이 단백질 폴딩 반응에 끼치는 영향

김대원 · 박순호\*

강릉원주대학교 치과대학 치의학과 생화학 및 분자생물학 교실, 구강과학연구소  
(접수 2014. 8. 21; 게재확정 2014. 9. 23)

### Contribution of Electrostatic Interactions to Protein Folding Reaction

Dae Won Kim and Soon-Ho Park\*

Department of Dentistry Biochemistry and Molecular Biology Group, College of Dentistry,  
Research Institute of Oral Sciences, Gangneung-Wonju National University, 7 Jukheon-gil Gangneung-si,  
Gangwon-do, 210-702, Korea. \*E-mail: spark9@gwnu.ac.kr  
(Received August 21, 2014; Accepted September 23, 2014)

**요 약.** 단백질 폴딩 반응에서 정전기적 상호작용의 역할을 라이신 29를 알라닌으로 치환한 변이 유비퀴틴을 사용하여 탐색하였다. 유비퀴틴의 입체구조에서 라이신 29의 결사슬은 글루탐산 16과 아스파르산 21의 결사슬과 근접한 거리에 있어서 결사슬끼리 정전기적 상호작용을 통하여 삼차원 입체구조를 안정화시킬 것으로 예측되었다. 라이신을 알라닌으로 치환하여 정전기적 상호작용을 제거하였을 때 유비퀴틴의 native state의 구조적 안정성이 ~20% 감소한 점은 라이신 29에 의한 정전기적 상호작용이 단백질 삼차구조의 안정성에 상당히 기여하고 있다는 점을 시사하였다. 폴딩 반응의 진행 과정을 stopped-flow 장치로 측정된 folding kinetics 실험은 이전에 관찰된 것과 마찬가지로 unfolded state에서 native state로 진행되는 과정에 중간단계를 거치는 three-state on-pathway 메커니즘을 따르는 것으로 나타났다. 더욱이 라이신 29에 의한 정전기적 상호작용이 중간단계의 구조적 안정성에 기여하는 정도가 native state의 구조적 안정성에 기여하는 정도의 ~55%인 것으로 나타났다. 이는 유비퀴틴 폴딩의 중간단계의 구조도 라이신 29에 의한 정전기적 상호작용에 의하여 상당히 안정화 된다는 것을 의미하며 따라서 정전기적 상호작용이 단백질 삼차원 입체구조의 골격이 완성된 폴딩의 마지막 단계에 형성되어 단백질 native state의 안정성에만 기여하는 것이 아니라 중간단계가 형성되는 폴딩 반응의 초기에도 형성되어 폴딩 반응을 이끌어가는 데도 기여한다는 것을 의미한다.

**주제어:** 단백질 폴딩 중간단계, 정전기적 상호작용

**ABSTRACT.** The contribution of electrostatic interactions to protein folding reaction was studied by using mutant ubiquitin with lysine to alanine mutation at residue position 29. Based on the three dimensional structure of ubiquitin, lysine 29 is located close to negatively charged glutamate 16 and aspartate 21 and considered to stabilize the native state of ubiquitin by electrostatic interactions between these residues. The equilibrium unfolding experiment showed that the native stability was decreased by about ~20% upon mutation. This observation indicates lysine 29 indeed forms electrostatic interactions with nearby residues. Folding kinetics measurements using stopped-flow device and quantitative analysis of kinetics data indicate that ubiquitin folds from unfolded state to native state via intermediate state as observed previously. This intermediate state was observed to form immediately after the initiation of folding reaction. The folding intermediate was shown to be destabilized considerably upon lysine to alanine mutation. These observations indicate that electrostatic interactions can form early stage of protein folding and hence lead the folding reaction.

**Key words:** Protein folding intermediate, Electrostatic interaction

### 서 론

단백질의 삼차원 입체구조(three-dimensional structure, native structure, native state)가 형성되는 과정인 단백질 폴딩(protein folding) 반응은 단백질의 native state를 안정화시키는 여러 가지 결합들이 누적적으로 형성되는 과정이라고 할 수 있다.<sup>1,2</sup> 이들 결합 중 단백질의 native state의

안정화에 기여하는 결합은 주로 비공유결합으로 수소결합(hydrogen bond), 소수성 상호작용(hydrophobic interaction), 반데르발스 결합(van der Waals interaction), 그리고 정전기적 상호작용(electrostatic interaction)이 있다. 수소결합은 극성 원자 사이에 수소 원자가 위치할 때 생성되며 펩티드 결합의 아미노기와 카르복실기 사이에서 주로 형성된다. 소수성 상호작용은 비극성 그룹이 물분자와 접촉을

피하기 위하여 단백질 삼차구조의 내부에서 서로 결집하는 과정에서 비극성 그룹을 둘러싸고 있던 물 분자가 자유롭게 됨으로 인하여 전체적인 엔트로피가 증가하는 기제를 통하여 단백질의 삼차원 구조의 안정성에 기여한다. 반데르발스 결합은 근거리에 위치한 원자 사이에서 유도된 쌍극자 상호작용(induced dipole interaction)에 의해 나타나는 인력에 의하여 단백질의 삼차원 구조의 안정화에 기여한다. 정전기적 상호작용은 서로 다른 전하를 띠는 아미노산 잔기들 사이에서 일어나는 인력에 의하여 단백질의 삼차원 구조를 안정하게 한다. 이들 비공유결합에서 방향성이 없는 소수성 상호작용과 반데르발스 결합과는 달리 수소결합과 정전기적 결합은 서로 짝이 되는 작용기가 방향에 맞게 배열되어야만 결합이 극대화 된다.

단백질 분자의 골격을 이루는 펩티드기에서 주로 나타나는 수소결합은 단백질의 이차구조인 알파-나선( $\alpha$ -helix)이나 베타-주름판( $\beta$ -sheet) 구조를 안정하게 하는 주된 비공유결합으로 규칙적으로 나타나는 성질이 있다. 즉  $\alpha$ -helix에서  $i$  번째 있는 아미노산 잔기의 카르복실기는  $i+4$  번째에 위치한 아미노산 잔기의 아미노기와 수소결합을 하며,  $\beta$ -sheet 구조에서는 서로 마주보는 펩티드 골격에 있는 아미노기와 카르복실기 사이에서 수소결합이 형성된다. 반면에 정전기적 상호작용은 단백질의 일차구조에서 서로 멀리 떨어진 아미노산 결사슬 사이에서 나타나기 때문에 반복적이고 규칙적으로 나타나지 않고 서로 다른 극성의 전하를 띠는 아미노산 결사슬이 단백질 입체구조 안에서 근접하게 배치되었을 때 일어난다. 따라서 정전기적 상호작용은 단백질의 삼차원구조가 형성되는 과정인 폴딩 반응의 초기에 형성되어 폴딩 반응을 이끌어가는 역할을 할 수 있거나 또는 삼차원 입체구조의 골격이 다른 비공유결합에 의하여 거의 이루어진 다음에 형성되어 단백질 폴딩 반응을 이끌어가지는 않고 단지 삼차원 구조를 안정화시키는 역할만 할 수도 있다. 본 연구에서는 정전기적 상호작용이 유비퀴틴 단백질의 폴딩 반응에 어떻게 작용하는지 탐구하여 보았다.

유비퀴틴은 76 개의 아미노산으로 이루어진 작은 구형 단백질로서 단백질 삼차구조의 안정성을 연구하는데 자주 이용된 모델 단백질로서 열량계를 이용하여 열역학적 안정성을 측정한 실험이 있으나 단백질 폴딩 과정을 추적하는 실험은 삼차원 구조를 측정할 수 있는 탐침자의 부재로 인하여 어려움이 있었다.<sup>3</sup> 그런데 45번째 위치의 페닐알라닌을 트립토판으로 치환하여 형광분광계로 삼차구조를 추적할 수 있는 pseudo-wild type 유비퀴틴(WT\* 유비퀴틴)이 제조되고 난 다음 유비퀴틴의 폴딩 과정을 탐색하는 연구가 활발하게 되었다.<sup>4</sup> Khorasanizadeh et al.은 WT\* 유비퀴틴의 폴딩 과정을 연구하여 유비퀴틴이 비록

작은 단백질이며 평형상태에서의 실험을 통하여서는 two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 것으로 관찰되지만 stopped-flow 장치를 이용하여 폴딩 과정을 추적하면 적어도 하나의 중간단계(folding intermediate, I)가 존재하며, 이 중간단계는 수명이 매우 짧지만(transient folding intermediate) 폴딩 반응의 초기에 소수성 붕괴(hydrophobic collapse)가 일어날 때 형성되며 폴딩 반응의 경로 바깥(off-pathway,  $I \rightleftharpoons U \rightleftharpoons N$ )에 있어서 폴딩 과정을 방해하는 것이 아니라 폴딩 반응의 경로 상(on-pathway,  $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ )에 있어서 폴딩 반응을 이끌고 있다고 해석하였다.<sup>5</sup>

본 연구에서는 단백질 폴딩 반응을 연구하기에 적절한 모델이 되며 또한 폴딩 반응 메커니즘이 비교적 잘 알려진 WT\* 유비퀴틴을 기반으로 하여 전하를 띠는 아미노산을 전하를 띠지 않는 아미노산으로 치환한 변이 유비퀴틴 단백질을 제조하여 정전기적 상호작용이 단백질 삼차원 구조의 안정성 및 형성 과정에 미치는 영향을 탐색하고자 한다. 이러한 연구는 단백질 삼차구조를 안정화시키는 비공유결합의 일종인 정전기적 상호작용이 폴딩 반응 과정에서의 역할은 어떠한지 탐색하는데 유용한 정보를 줄 것으로 기대된다.

## 실 험

### 재료

본 연구에서는 45번째 페닐알라닌을 트립토판으로 치환하여 형광분석법으로 폴딩 반응을 연구할 수 있게 만든 유비퀴틴(WT\* 유비퀴틴)<sup>4</sup>과 WT\* 유비퀴틴의 29번째 라이신을 알라닌으로 치환한 변이 유비퀴틴을 사용하였다. 본 연구에 사용된 29번째 라이신이 알라닌으로 치환된 변이 단백질은 K29A 유비퀴틴으로 명명하였다. WT\*와 K29A 유비퀴틴은 Khorasanizadeh et al.이 사용한 방법을 사용하여 얻었다.<sup>4,5</sup> 정제된 단백질은 coomassie brilliant blue로 염색한 SDS-PAGE 겔에서 약 97% 정도의 순도를 보였다. 단백질 변성 실험에 사용된 초순수 요소(urea)는 ICN Biochemical Inc. (Aurora, USA)에서 구입했으며 그 외 시약은 reagent grade를 사용하였다.

### 평형상태에서 요소에 의한 변성 실험(urea-induced equilibrium unfolding experiment)

본 연구에서는 정전기적 상호작용이 단백질 폴딩 반응에 끼치는 영향을 알아보는 것이 주 목적이므로 전하를 띠지 않는 요소를 단백질 변성제로 사용하였다. 용액의 온도는 25 °C를 유지하였으며, pH를 5로 유지하기 위하여 25 mM acetate 완충용액을 사용하였다. 단백질의 변성 실험은 25 mM acetate 완충용액에 0~10 M의 요소가 함유된 용액을 사용

하였다. 단백질 변성 실험에 사용된 단백질 시료는 기존에 발표된 방법을 이용하여 제조하였다.<sup>6</sup> 삼차구조의 변성과정은 각각 다른 농도의 요소 용액에 들어있는 유비퀴틴에 280 nm의 자외선을 조사한 다음 355 nm에서 나오는 형광을 측정하여 추적하였다. 요소의 농도는 요소를 포함하는 용액의 굴절도를 측정하여 얻었다.<sup>7</sup> WT\*와 K29A 유비퀴틴의 농도는 하나의 트립토판을 지닌 단백질의 경우 280 nm에서 molar extinction coefficient가  $6970 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ 인 점을 이용하여 결정하였다.<sup>8</sup> 요소가 없는 용액에 들어있는 유비퀴틴을 요소의 농도를 증가시키면서 구조를 변성시키는 unfolding 실험과 고농도의 요소 용액에 변성된 유비퀴틴을 요소의 농도를 감소시키면서 다시 폴딩되게 하는 refolding 실험을 실시하여 두 실험의 결과가 서로 일치하면 변성 반응이 가역적인 것으로 판단하였으며<sup>7</sup> 이 실험에서 사용된 WT\*와 K29A 유비퀴틴은 가역적인 폴딩 반응을 하는 것으로 관찰되었다. 변성 실험에서 유비퀴틴의 농도는 약 10 mM 정도였으며 이 농도에서는 유비퀴틴이 서로 엉켜 집합체(aggregate)를 형성하는 현상은 일어나지 않았다. 형광 스펙트럼은 Thermo electron사의 Aminco-Bowman series 2 luminescence spectrometer (Madison, USA)를 사용하여 측정하였다.

유비퀴틴의 평형상태에서의 변성 실험의 결과는 폴딩 반응이 매우 협동적(cooperative)이어서 중간단계는 관찰되지 않고 오직 native state와 unfolded state만 존재하는 two-state 폴딩 메커니즘을 따른다는 가정에 바탕을 두고 개발된 방법인 수식 1로 표현되는 linear extrapolation method (LEM)로 분석하였다.<sup>9,10</sup>

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

수식 1에서 Y는 각 변성제 농도에서 관찰되는 스펙트럼 신호를 나타내며,  $\Delta G_{NU}^{\circ}$ 는 변성제의 농도가 0일 때의 변성 반응의 자유에너지이며, [C]는 변성제의 농도를 의미하며,  $m_{NU}$ 는 m-value라고 불리는 변성 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 각각 변성제의 농도 변화에 따른 native state와 unfolded state의 스펙트럼 신호의 변화를 나타내는 상수로서 스펙트럼 신호의 기준선(baseline)의 기울기를 의미한다. R은 기체상수,  $8.313 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ , 이고 T는 절대온도를 나타낸다. 단백질 변성 실험을 통하여 얻는 단백질 삼차구조의 안정성인  $\Delta G_{NU}^{\circ}$ 로부터 two-state 폴딩 반응의 중간점(midpoint)인  $C_m$ 은  $G_{NU}^{\circ}$ 이  $m$ 과  $C_m$ 의 곱으로 표현되는 점을 이용하여 얻었다.<sup>5</sup>

## Stopped-flow 기기를 이용한 폴딩 반응의 측정

Refolding 과정은 stopped-flow fluorescence spectroscopy를 이용하여 고농도의 요소 용액에서 변성된 단백질 용액을 빠른 시간에 과량의 저농도의 요소 용액과 섞어 refolding 조건을 만들어준 다음 시간의 경과에 따른 형광 변화를 측정하여 추적하였고, unfolding 과정은 완충용액이나 저농도의 요소 용액에서 변성이 되지 않은 단백질을 빠른 시간에 과량의 고농도 요소용액과 섞어주어 unfolding 조건을 만들어준 다음 시간의 경과에 따른 형광의 변화를 측정하여 추적하였다. 모든 측정은 형광측정기를 장착한 BioLogic Science Instruments사(Claix, France)의 SFM-4 stopped-flow 기기를 이용하였다. 본 연구에서 stopped-flow 기기의 dead-time은 N-acetyltryptophanamide의 형광을 N-bromosuccinimide로 quenching하는 방법으로 측정하여 2 ms 임을 확인하였다.<sup>11</sup> 용액의 온도는 평형상태에서의 변성실험과 마찬가지로  $25^{\circ}\text{C}$ 로 유지했으며 pH를 5로 유지하기 위해서 25 mM acetate를 완충용액으로 사용하였다. Refolding 반응의 진행은 세 개의 지수함수로 나타났으며 nonlinear least square 방법으로 분석하여 각 지수함수로부터 속도상수(rate constant)와 진폭(amplitude)을 얻었다. Unfolding 반응의 진행은 하나의 지수함수로 나타났으며 이 또한 마찬가지로 nonlinear least square 방법으로 분석하여 속도상수와 진폭을 얻었다.

## 폴딩 반응의 진행과정 분석

각 요소 농도에서 폴딩 반응의 과정을 보여주는 속도상수와 변화의 폭은 Khorasanizadeh et al.이 분석한 것과 같이 three-state on-pathway ( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ ) 메커니즘으로 분석하였다.<sup>5</sup> Three-state 메커니즘을 이루는 각 기본 반응(elementary reaction)의 microscopic 속도상수를  $k_{IJ}$ 로 정의하면  $U \rightleftharpoons I$  elementary reaction의 정반응과 역반응의 microscopic 속도상수는 각각  $k_{UI}$ ,  $k_{IU}$ 이고  $I \rightleftharpoons N$  elementary reaction의 정반응과 역반응의 microscopic 속도상수는 각각  $k_{IN}$ ,  $k_{NI}$ 라 할 수 있다. 각 속도상수에 자연로그를 취한 값은 요소의 농도에 대하여 직선의 관계가 있는 점(수식 2)을 이용하여 각 요소 농도에서 속도상수를 계산하였다.<sup>12-14</sup>

$$\ln k_{IJ} = \ln k_{IJ}^{\circ} + (m_{IJ}^{\ddagger}/RT)[C] \quad (2)$$

수식 2에서  $k_{IJ}^{\circ}$ 는 요소의 농도가 0 M일 때의 속도상수이고, [C]는 요소의 농도,  $m_{IJ}^{\ddagger}/RT$ 는 직선방정식의 기울기로  $\ln k_{IJ}$ 의 요소 농도에 따른 변화를 나타낸다. R과 T는 각각 기체상수와 절대온도를 나타낸다.

Stopped-flow 장치를 이용하여 얻는 관찰값인 각 요소 농도에서의 폴딩 반응의 속도상수와 진폭을 three-state 반응의 속도식을 분석하는 수식으로부터 계산한 이론값과 비교하는 방법을 통하여서 관찰값이 이론값을 얻게 해주는

단백질 폴딩의 메커니즘에 부합하는지 또는 그렇지 않은지 판단하였다.<sup>15</sup> 이론값은 Excel(Microsoft, USA) 프로그램으로 계산하였고, SigmaPlot(Systat, USA) 프로그램으로 관찰값과 이론값을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

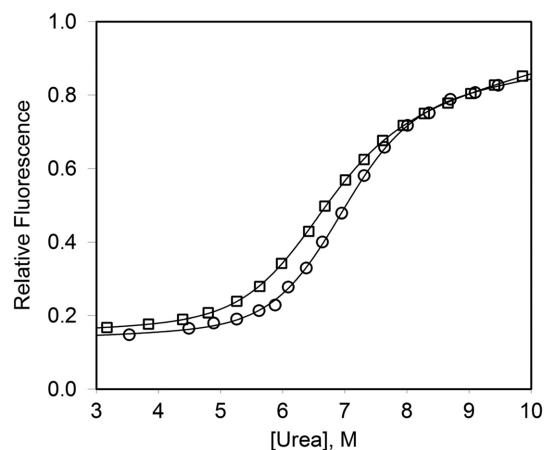
아미노산의 곁사슬 중 전하를 갖는 것들은 극성을 띠어 친수성이므로 단백질 삼차구조의 표면에 위치하게 된다. 이들 전하를 띠는 곁사슬은 반대 극성의 전하를 띠는 곁사슬과 정전기적 상호작용을 통하여서 단백질의 삼차원 입체구조를 안정화시키는 것으로 알려져 있다. 그런데 정전기적 상호작용이 단백질 구조를 안정화 시킨다는 점은 잘 알려져 있으나 정전기적 상호작용이 단백질의 삼차원 입체구조가 형성되는 과정인 폴딩 과정에는 어떻게 작용하는지는 그리 많은 정보가 축적되어있지는 않다. 정전기적 상호작용이 단백질 폴딩 과정의 초반부에 작용하여 삼차원 구조를 이루는 과정을 이끌어가는 역할을 할 것인지 아니면 단백질 삼차원 구조의 골격이 소수성 상호작용, 수소결합, 반데르발스 결합 등에 의하여 완성된 연후인 후반부에 가세하여 단백질의 삼차원 입체구조를 더욱 더 안정화시키는 역할만을 할 것인지에 대한 것은 연구하여볼 필요가 있다고 하겠다.

정전기적 상호작용의 단백질 폴딩 과정에서의 역할을 알아보기 위하여 단백질 폴딩 반응을 연구하는데 모델 단백질로 자주 사용되었던 유비퀴틴 단백질의 삼차원 입체구조<sup>16</sup>를 관찰하였다. 유비퀴틴 단백질은 76 개의 아미노산으로 이루어진 매우 작은 단백질로서 양전하를 띠는 아미노산인 라이신과 아르기닌 잔기가 각각 7 개와 4 개, 음전하를 띠는 아스파르트산과 글루탐산 잔기가 각각 5 개와 6 개가 있어서 이들 전하를 띠는 아미노산들이 유비퀴틴의 표면에서 서로 정전기적 상호작용을 하고 있을 것으로 기대되었다. 이들 전하를 띠는 아미노산 중에서 Figure 1에서 보듯이 29번째 위치에 있는 라이신(K29)은 16번째 위치에 있는 글루탐산(E16)과 21번째 위치에 있는 아스파르트산(D21)과 삼차원 입체구조에서 서로 가까이 위치하여서 정전기적 상호작용을 할 것으로 여겨졌다. 따라서 본 연구에서는 K29를 전하를 띠지 않는 곁사슬을 가진 아미노산인 알라닌으로 치환하여 정전기적 상호작용이 단백질 폴딩 과정에 미치는 영향을 탐색하였다. 더욱이 K29의 곁사슬은 상당부분이 용액에 노출되어 있어서 정전기적 상호작용 외에 다른 비공유결합은 그리 많이 하지 않을 것으로 생각되며 알라닌으로 치환할 시 정전기적 상호작용을 잃는 것 외에 다른 비공유결합은 크게 영향을 받지 않을 것으로 여겨졌다.



**Figure 1.** Structure of human ubiquitin. Peptide backbone is shown as ribbon. Side-chains of glutamate 16 (E16), aspartate 21 (D21), and lysine 29 (K29) are shown as spheres.

정전기적 상호작용의 영향을 알아보기 위하여서 먼저 평형상태에서 단백질의 변성 실험을 실시하여 유비퀴틴 단백질의 삼차원 입체구조의 안정성을 측정하였다. 단백질 변성 실험의 변성제로는 강력한 변성제인 guanidinium chloride가 주로 사용되나 guanidinium chloride는 전하를 띠고 있어서 전하를 띠는 아미노산 곁사슬과 상호작용을 하므로 정전기적 상호작용이 단백질 폴딩에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에는 적합하지 않다. 따라서 본 연구에서는 전하를 띠지 않는 요소를 변성제로 사용하였다. Figure 2는 WT\*와 K29A 유비퀴틴의 요소에 의한 평형상태에서의 변성 실험의 결과를 보여주며 형광 변화가 트립토판이 아미노산 상태일 때 나타나는 단조로운 곡선이



**Figure 2.** Urea-induced equilibrium unfolding of WT\* and K29A ubiquitin. Circles and squares represent the unfolding of WT\* and K29A ubiquitin respectively. The lines are the nonlinear least squares fit of the equilibrium unfolding measurements by the linear extrapolation method (LEM).

**Table 1.** Analysis of urea-induced equilibrium unfolding of WT\* and K29A ubiquitin by linear extrapolation method (LEM)

Proteins	$m_{\text{NU}}$	$C_m$	$\Delta G^{\circ}_{\text{NU}}$
WT* ubiquitin	$4.79 \pm 0.18$	$6.84 \pm 0.04$	$32.8 \pm 1.4$
K29A ubiquitin	$4.05 \pm 0.09$	$6.44 \pm 0.02$	$26.1 \pm 0.7$

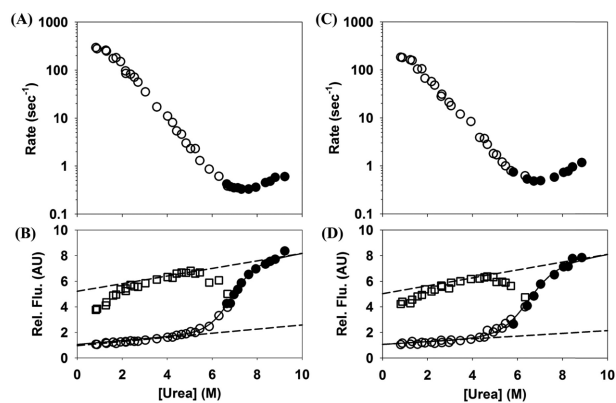
The units for  $m_{\text{NU}}$ ,  $C_m$ , and  $\Delta G^{\circ}_{\text{NU}}$  are  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ , M, and  $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , respectively.

아니라 S-자 모양을 띠는 것은 형광 변화가 단백질의 구조적인 변화에 기인하기 때문이라고 할 수 있다.<sup>10</sup> 이러한 관찰은 크기가 작은 단백질의 평형상태에서의 unfolding 실험에서 나타나는 전형적인 결과로 하나의 S자형 곡선은 two-state transition을 기반으로 한 LEM으로 분석할 수 있다.<sup>9,10</sup> WT\*와 K29A 유비퀴틴의 요소에 의한 변성 실험을 LEM으로 분석한 결과는 Table 1에 정리하였다. 평형상태에서의 변성 실험의 결과에서 두드러진 점은 K29A 유비퀴틴이 WT\* 유비퀴틴에 비하여서 변성의 중간점이 ~0.4 M 정도 더 낮게 나타나는 점이다. 이는 K29A 유비퀴틴이 WT\* 유비퀴틴보다 더 낮은 농도의 요소 용액에서 변성이 된다는 것을 나타내는 것이며 라이신을 알라닌으로 치환하여 양전하를 제거했을 때 유비퀴틴 삼차원입체구조의 안정성이 더 낮아졌다는 것을 의미한다. LEM에 의한 정량적 분석에서 폴딩 자유에너지가 변이에 의하여서 약  $6.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  정도 줄어든 것으로 분석되었는데 이는 삼차원 입체구조의 안정화 자유에너지가 라이신을 알라닌으로 치환했을 때 ~20% 정도 감소하였음을 나타낸다. K29를 알라닌으로 치환할 시 발생한 삼차원 입체구조 안정성의 감소는 라이신 29가 형성하는 정전기적 상호작용이 유비퀴틴 삼차원 입체구조의 안정성에 상당히 기여하고 있음을 나타낸다고 할 수 있다.

라이신 29에 의한 정전기적 상호작용이 폴딩 반응의 과정에 끼치는 영향은 어떠한지 폴딩 반응의 진행 과정을 stopped-flow fluorescence spectroscopy로 측정하였다. 요소로 변성된 WT\*와 K29A 유비퀴틴을 stopped-flow 장치를 이용하여 재빨리 요소의 농도를 낮추어주어 폴딩 반응이 일어날 수 있도록 유도한 다음 반응의 진행 경과를 측정한다. refolding 실험은 세 개의 과정으로 관찰되는, 즉 세 개의 지수함수로 나타나는 특징을 보였는데 이는 guanidinium chloride를 변성제로 사용한 실험과 같은 결과였다.<sup>4</sup> Khorasanizadeh et al.은 guanidinium chloride를 사용한 실험에서 나타난 세 개의 과정 중 두 개의 느린 과정은 guanidine chloride의 농도에 관계없이 속도와 진폭이 일정하며 그 속도가 proline isomerization 속도와 유사한 점을 들어 입체구조의 변화에 의한 것이 아니라 proline isomerization에 의한 것으로 해석하였다.<sup>5</sup> Guanidinium chloride 대신 요소를 사용한 이 실험에서도 나중 두 과정이 요소의 농도에 관

계없이 속도는 proline isomerization과 유사하고 진폭 또한 전체 진폭의 5% 정도로 일정하였다. 따라서 WT\*와 K29A 유비퀴틴의 폴딩 과정에서 관찰되는 두 개의 느린 과정은 입체구조의 변화에서 오는 것이 아니라 proline isomerization 과정에서 비롯된 것이라고 해석할 수 있다. 본 연구에서도 Khorasanizadeh et al.이 한 것과 마찬가지로 두 개의 느린 과정은 proline isomerization에 의한 것으로 여겨 이후 분석에 포함하지 않았다. Native state의 유비퀴틴을 stopped-flow 장치를 이용하여 재빨리 요소의 농도를 높여주어 unfolding 반응이 일어날 수 있도록 유도한 다음 측정된 결과는 이 전에 관찰된 것과 마찬가지로 하나의 지수 함수로 관찰되었다.<sup>4,5</sup>

Folding kinetics 실험의 결과는 변성제 농도의 변화에 따른 폴딩 과정의 속도상수의 로그값(rate profile)과 진폭(amplitude profile)으로 나타난다. Figure 3A는 stopped-flow 장비로 측정된 WT\* 유비퀴틴의 rate profile이다. Figure 3A에서 열린 원은 refolding 실험에서 얻었고 닫힌 원은 unfolding 실험에서 얻었으며 유비퀴틴의 폴딩 반응이 가역적이므로 서로 겹치는 요소 농도에서 매끄럽게 이어져야 하는데 이 그림은 실제로 그러함을 보여준다. WT\* 유비퀴틴의 rate profile은 요소 농도가 2.5 M 이상일 때 이러한 실험에서 전형적으로 보여지는 V자 형 곡선을 보인다.<sup>13</sup>



**Figure 3.** Folding kinetics measurements of WT\* and K29A ubiquitin. The rate profiles of WT\* and K29A ubiquitin are shown on panel A and C, respectively, and the amplitude profiles of WT\* and K29A ubiquitin are shown on panel B and D, respectively. In panels A and C, open circles represent the rates measured in refolding experiments and the closed circles represent the rates measured in unfolding experiments. Rate constants are shown in log scale. In panels B and D, open circles represent relative fluorescence at the long refolding time, closed circles represent relative fluorescence at the long unfolding time, and open squares represent the amplitude of the main refolding phase. Dashed lines in panels B and D represent the baselines for the native state (lower) and unfolded state (upper). Lines in panel B and D were drawn by using the parameters in Table 1 and baselines (dashed lines) in these experiments. Rel. Flu. denotes relative fluorescence. Fluorescence of the native state was set to 1.

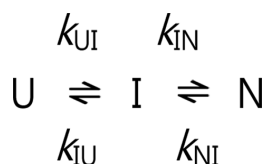
그런데 WT\* 유비퀴틴의 rate profile은 요소 농도가 2.5 M 이하로 낮아지면 완벽한 V자 형에서 벗어나서 약간 아래로 휘어지는 양상을 보인다. Figure 3C는 K29A 유비퀴틴의 rate profile을 보여주는데 K29A 유비퀴틴의 폴딩 반응도 refolding 실험과 unfolding 실험이 매끄럽게 이어지는 양상을 보인다. 또한 K29A 유비퀴틴의 rate profile도 변성제 농도가 2 M 이하일 때 V자형 곡선에서 벗어나 약간 아래로 휘어지는 양상을 보인다. 이렇게 rate profile이 낮은 변성제 농도에서 휘어지는 현상을 roll-over 효과라고 부른다.<sup>17</sup> 이러한 roll-over 효과는 guanidinium chloride를 사용한 WT\* 유비퀴틴의 폴딩 실험에서도 관찰되었다.<sup>4,5</sup> 따라서 이 실험에서 나타나는 roll-over 현상은 변성제와는 무관하게 일어나는 현상이라고 생각할 수 있다.

Figure 3B는 WT\* 유비퀴틴의 amplitude profile을 보여준다. Figure 3B에서 열린 원(refolding 실험)과 닫힌 원(unfolding 실험)은 폴딩 반응이 시작한 후 충분한 시간이 지난 다음에 관찰된 형광 신호이며 따라서 이 신호는 평형상태에서 측정된 변성 실험 결과(Figure 2)와 일치하여야 한다. 즉 두 실험에서 사용한 기기가 다르므로 baseline은 다르게 나타나지만  $m_{NU}$  및  $C_m$ 은 일치하여야 한다. Figure 3B의 실선은 Table 1에 나타난 평형 상태에서 측정된 변성 실험의  $m_{NU}$ 와  $C_m$ 을 사용하여 그린 것으로 관찰된 값(열린 원과 닫힌 원)과 일치하고 있음을 보여준다. Figure 3B의 네모는 refolding 실험에서 관찰된 첫 번째 과정의 진폭을 나타낸다. 먼저 rate profile에서 직선을 보이는 구간인 2.5 M 이상의 요소 농도에서는 진폭의 관찰치가 unfolded baseline과 refolded baseline의 폭과 일치하는 것을 보여준다. 또한 5 M 이상의 요소 농도에서 진폭이 unfolded baseline과 refolded baseline의 폭보다 작게 나타나는데 이 구간은 unfolding transition이 일어나는 구간으로 전체 amplitude는 unfolded baseline에서 열린 원까지이기 때문이다. 따라서 요소의 농도가 2.5 M 이상에서는 관찰된 진폭은 two-state 폴딩 메커니즘일 때 기대되는 진폭과 일치한다고 할 수 있다. 그런데 rate profile에서 roll-over 현상이 관찰된 요소의 농도가 2.5 M 이하인 구간에서의 진폭은 unfolded baseline과 refolded baseline의 폭보다 작으며 요소의 농도가 낮을수록 진폭(네모에서부터 native baseline까지)이 더 작아지는 것이 관찰되었다. 이는 unfolded baseline에서 관찰 가능한 과정이 시작하는 곳(네모) 사이에 stopped-flow 장치로는 관찰되지 않는 과정이 있음을 나타낸다. 즉 매우 빠른 과정이 stopped-flow 장치의 dead-time인 2 ms 이전에 일어나고 있으며 이 과정의 진폭은 요소의 농도에 따라 변한다는 점을 나타낸다. 이렇게 stopped-flow 장치로 관찰이 가능치 않은 과정을 burst phase라 부르며 이 때 관찰되지 않은 진폭을 missing amplitude라고 한다.<sup>4,5</sup> Figure 3D에 그려진

K29A 유비퀴틴의 amplitude profile도 낮은 농도의 요소에서 missing amplitude의 진폭이 WT\* 유비퀴틴의 그것보다는 약간 작게 나타난 점을 제외하고는 WT\* 유비퀴틴의 그것과 유사하게 관찰되었다.

Two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 단백질의 경우 rate profile이 V자 형 곡선을 보이며 amplitude profile도 unfolded 기준선에서 시작하여 native 기준선에서 끝나는 양상을 보여주는데 WT\*과 K29A 유비퀴틴의 폴딩 반응은 변성제의 농도가 낮은 구간에서 rate profile이 완벽한 V자 형에서 벗어나 roll-over 현상을 보이며 amplitude profile도 burst-phase에 해당하는 missing amplitude가 관찰되는 점으로 보아 unfolded state와 native state 외에 적어도 하나의 중간 단계가 있다는 것을 의미하는 것으로 해석할 수 있다. WT\*와 K29A 유비퀴틴의 폴딩 반응을 stopped-flow 장치로 측정하여 적어도 하나의 상태가 native와 unfolded 상태 사이에 존재한다는 관찰은 Figure 2에 보여진 two-state 폴딩 가정을 기반으로 하여 분석된 평형 상태에서의 변성 실험과는 서로 양립하지 않은 것으로 생각될 수 있다. 그러나 중간단계를 거쳐서 일어나는 반응에서 중간단계의 수명이 매우 짧다면 평형 실험에서는 그 존재를 확인할 수 없다는 점을 고려하면 폴딩 반응의 진행을 측정할 실험과 평형 상태에서 변성 실험이 양립할 수 있다고 할 수 있다. 즉 stopped-flow 장치를 이용한 폴딩 과정의 측정에서 관찰된 중간 단계는 이 장치의 dead-time보다 짧은 2 ms 이내에 생성되었다가 이내 native state로 전환되기 때문에 평형 상태에서는 존재하는 양이 적어서 관찰되지 않았다고 해석할 수 있다.

Stopped-flow 장치를 이용한 폴딩 실험에서 중간단계로 이르기까지의 과정은 dead-time에서 발생하여 관찰이 가능치 않으므로 몇 개의 상태가 존재하는지 알 수 없지만, 단 하나의 중간 단계가 존재한다고 가정하면 three-state on-pathway 메커니즘( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ ), three-state off-pathway 메커니즘( $I \rightleftharpoons U \rightleftharpoons N$ ) 그리고 triangular 메커니즘( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ )이 있을 수 있다. Three-state on-pathway 메커니즘은 중간단계가 폴딩 반응의 경로 상에 있어서 폴딩 반응의 과정에 포함되는 메커니즘인 반면 three-state off-pathway 폴딩 메커니즘( $I \rightleftharpoons U \rightleftharpoons N$ )은 unfolded state가 중간단계와 native state 사이에 존재하는 메커니즘으로 중간단계가 unfolded state로 되돌아온 다음에 native state가 되므로 중간단계의 형성은 폴딩 반응에 도움이 되지 않는 메커니즘이고 triangular 메커니즘은 unfolded state, 중간단계, native state가 서로 평형을 이루는 메커니즘이다. WT\* 유비퀴틴의 guanidinium chloride에 의한 폴딩 실험에서 Khorasanizadeh et al.도 중간 단계를 발견하였고 중간 단계가 unfolded state에서 native state로 진행되는 경로 상에 존재한다는 가정을 바탕으로 결과를



Scheme 1.

분석하여 three-state on-pathway 폴딩 메커니즘(Scheme 1)이 three-state off-pathway 메커니즘이나 three-state triangular 메커니즘보다 더 적합하다고 해석하였다.<sup>5</sup> 이들은 three-state on-pathway 메커니즘(Scheme 1)에 입각하여 계산한 각 elementary 반응의 상수들은 guanidinium chloride를 변성제로 사용한 WT\* 유비퀴틴의 폴딩 반응을 stopped-flow 장치로 관찰하여 얻은 속도 상수와 진폭을 잘 묘사하는 반면 off-pathway 메커니즘은 그리 잘 묘사하지 않으며, 또한 triangular 메커니즘은 on-pathway 메커니즘이나 off-pathway 메커니즘으로 환원될 수 있기 때문에 고려하지 않아도 되는 것으로 해석하였다. 따라서 본 연구에서 요소를 변성제로 사용한 WT\*와 K29A 유비퀴틴의 폴딩 반응을 stopped-flow 기기를 사용하여 측정된 관찰값도 Scheme 1을 바탕으로 계산한 이론값과 비교하는 방법으로 각 elementary 반응의 microstate 속도상수( $k_{ij}^{\circ}$ )와 속도상수의 요소 농도에 따른 변화( $m_{ij}^{\ddagger}$ )를 구하였다. Microstate 속도상수와 속도상수의 요소 농도에 따른 변화를 얻는 과정에서 three-state on-pathway( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ ) 반응의 첫 번째 elementary 반응( $U \rightleftharpoons I$ )은 stopped-flow 장치의 dead-time에 일어나서 관찰이 가능치 않으므로 Khorasanizadeh et al.이 가정했던 것과 마찬가지로  $k_{UI}^{\circ}$ 와  $m_{UI}^{\ddagger}$ 를 각각  $1.0 \times 10^4 \text{ sec}^{-1}$ 와 0으로 가정하였고,  $m_{IN}^{\ddagger}$ 도 거의 0에 가깝다는 이들의 경험적 발견을 차용하였다.<sup>5</sup> Figure 4의 실선은 WT\*와 K29A 유비퀴틴 폴딩 반응을 three-state on-pathway 메커니즘으로 분석한 결과이며 원과 네모로 표시된 실험값과 잘 겹쳐지므로 계산값이 실험값에 잘 부합하고 있음을 보여준다. 즉 WT\*와 K29A 유비퀴틴 폴딩 반응에서 나타나는 중간단계는 폴딩 반응의 경로상에 있다고 생각하는 것이 적절하다는 점을 나타낸다. 계산값을 도출한 각 elementary 반응의 상수는 Table 2에 정리하였고 이 상수로부터 각 elementary 반응의 m-value ( $m_{IU}$ 와  $m_{NI}$ ), 폴딩 자유에너지( $\Delta G_{IU}^{\circ}$ 와  $\Delta G_{NI}^{\circ}$ )를 구할 수 있으며 이 값은 Table 3에 정리하였다.

Table 3. Calculated folding free energies and m-values of each conformational transition of WT\* and K29A ubiquitins

Proteins	$\Delta G_{IU}^{\circ}$	$m_{IU}$	$\Delta G_{NI}^{\circ}$	$m_{NI}$	$\Delta G_{NU}^{\circ}$	$m_{NU}$
WT* ubiquitin	2.6	3.31	30.1	1.42	32.7	4.73
K29A ubiquitin	0.4	2.93	28.4	1.42	28.8	4.35

Apparent equilibrium free energies (25 °C, 0 M urea) were calculated from the rate constants in Table 2 using the relationship that:  $\Delta G_{IU}^{\circ} = -RT \ln(k_{IU}^{\circ}/k_{UI}^{\circ})$ ;  $\Delta G_{NI}^{\circ} = -RT \ln(k_{NI}^{\circ}/k_{IN}^{\circ})$ ;  $\Delta G_{NU}^{\circ} = \Delta G_{IU}^{\circ} + \Delta G_{NI}^{\circ}$ ;  $m_{IU} = m_{IU}^{\ddagger} - m_{UI}^{\ddagger}$ ;  $m_{NI} = m_{NI}^{\ddagger} - m_{IN}^{\ddagger}$ ;  $m_{NU} = m_{IU} + m_{NI}$ . The unit for free energy is  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  and the unit for  $m_{IU}$ ,  $m_{NI}$ ,  $m_{NU}$  is  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

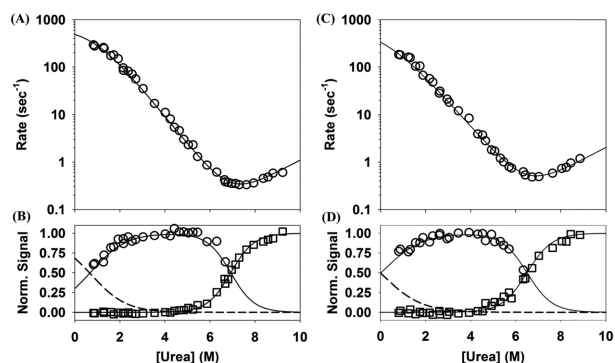


Figure 4. Analysis of folding kinetics of WT\* and K29A ubiquitin. Panels A and B represent the folding kinetics analysis for WT\* ubiquitin, panels C and D represent folding kinetics analysis for K29A ubiquitin. Panels A and C illustrate the rates of main folding phase. Lines represent the calculated folding rate based on a three-state on-pathway folding model. Panel B and D, circles represent normalized amplitudes of the main folding phase and squares represents the normalized signal at long refolding and unfolding time. Lines represent the calculated amplitude and signal at long folding time. Dashed line represents the calculated amplitude of burst phase (missing amplitude). Norm. signal denotes normalized signal. In the normalized signal, fluorescence signal for native state was set to 0 and unfolded state was set to 1.

Table 2. Folding kinetics of WT\* and K29A ubiquitin analyzed by a three-state on-pathway ( $U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$ ) model.

	WT* ubiquitin	K29A ubiquitin
$m_{UI}^{\ddagger}$	0	0
$k_{UI}^{\circ}$	$1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^4$
$m_{IU}^{\ddagger}$	3.31	2.93
$k_{IU}^{\circ}$	3500	8500
$m_{IN}^{\ddagger}$	0	0
$k_{IN}^{\circ}$	670	630
$m_{NI}^{\ddagger}$	1.42	1.42
$k_{NI}^{\circ}$	$3.5 \times 10^{-3}$	$6.5 \times 10^{-3}$

The unit for  $k_{UI}^{\circ}$ ,  $k_{IU}^{\circ}$ ,  $k_{IN}^{\circ}$ , and  $k_{NI}^{\circ}$  is  $\text{sec}^{-1}$ , and the unit for  $m_{UI}^{\ddagger}$ ,  $m_{IU}^{\ddagger}$ ,  $m_{IN}^{\ddagger}$ , and  $m_{NI}^{\ddagger}$  is  $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ .

평형 상태에서 요소에 의한 변성실험은 오직  $\Delta G_{NU}^{\circ}$ 와  $m_{NU}$ 만 제공하는 것과는 달리 폴딩 반응을 stopped-flow 장치로 측정된 kinetics 실험은 각 elementary 반응의 자유 에너지와 m-value를 제공하므로 아미노산의 변이가 폴딩 반응이 진행되는 과정에서 일어나는 각 단계에 끼치는

영향도 알아볼 수 있게 해준다. 단백질의 변성실험에서 얻을 수 있는  $m$ -value는 단백질이 변성될 때 용액에 노출되는 표면적(solvent accessible surface area, SASA)에 비례하는 것으로 알려졌다.<sup>18-20</sup> WT\* 유비퀴틴이 unfolded state에서 중간단계가 되는 과정의  $m$ -value는 3.31로 관찰되었고 이는 unfolded 상태에서 native 상태가 될 때의 전체  $m$ -value인 4.73의 ~70%이다. 즉 unfolded 상태에서 용액에 노출된 표면적이 중간단계로 되면서 ~70% 정도 줄어들었다고 할 수 있으며 이는 native 상태에서 중간단계로 될 때 SASA가 ~30% 증가하였다고 할 수 있으므로 중간단계는 native state에 비하면 약간 느슨해진 구조인 반면 unfolded 상태에 비하면 상당히 촘촘한 구조로서 native 상태에 가까운 구조를 띠고 있다고 할 수 있다. 그런데 unfolded 상태에서 중간단계로 될 때의 폴딩 자유에너지인  $2.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 은 unfolded 상태에서 native 상태로 될 때의 폴딩 자유에너지인  $32.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 보다 현저히 작은 값으로 WT\* 유비퀴틴 폴딩 반응에서 나타나는 중간단계는 native 상태에 가까운 구조이나 느슨하여 구조적인 안정성을 제공하는 비공유결합이 완벽하게 형성된 상태는 아니라고 할 수 있다. K29A 유비퀴틴의 중간단계 형성의  $m$ -value도 WT\* 유비퀴틴의  $m$ -value 변화와 비슷한 ~67%로 나타났다. 이러한 관찰은 WT\* 유비퀴틴의 중간단계와 K29A 유비퀴틴의 중간단계가 적어도 촘촘한 정도는 유사하다는 것을 나타낸다고 할 수 있다. 이는 단백질의 표면에 존재하는 전하를 띠는 아미노산 하나의 변이로 인하여 중간단계의 구조 자체는 크게 영향을 받지 않는다는 것을 나타낸다고 할 수 있다. K29A 유비퀴틴도 unfolded 상태에서 중간단계로 될 때의 폴딩 자유에너지가  $0.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 로 unfolded 상태에서 native 상태로 될 때의 폴딩 자유에너지인  $28.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 보다 현저히 작은 값으로 나타났다. 그런데 WT\*와 K29A 유비퀴틴의 중간단계의 폴딩 자유에너지의 차이는 WT\* 유비퀴틴의  $\Delta G_{IU}^{\circ}$  ( $2.6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )에서 K29A 유비퀴틴의  $\Delta G_{IU}^{\circ}$  ( $0.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )를 뺀 값인  $2.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 로서 이 값은 native 상태의 WT\*와 K29A 유비퀴틴의 폴딩 자유에너지의 차이인 WT\* 유비퀴틴의  $\Delta G_{NU}^{\circ}$  ( $32.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )에서 K29A 유비퀴틴의  $\Delta G_{NU}^{\circ}$  ( $28.8 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )를 뺀 값인  $3.9 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 의 ~55% 정도로 관찰되었다. 이는 라이신 29의 잔기가 형성하는 정전기적 상호작용이 native 상태의 안정성뿐만 아니라 중간단계의 안정성에도 상당히 기여하고 있다는 것을 의미한다. 이러한 관찰은 유비퀴틴 폴딩 반응에서 K29의 결사슬이 일차구조 상 멀리 떨어진 D21이나 E16 잔기의 결사슬과 폴딩 과정의 초기에도 정전기적 상호작용을 부분적으로 형성하며 따라서 폴딩 반응을 이끄는 역할도 부분적으로 한다는 것을 의미한다. 비록 유비퀴틴 폴딩 반응에서의 관찰이 다른 단백질의 폴딩 반응에 전적으로

적용된다고 할 수는 없겠지만 이 실험은 정전기적 상호작용이 폴딩 반응을 이끌어가는 역할도 할 수 있다는 것을 나타내는 점에서 폴딩 반응을 이해하는데 유용한 정보가 될 수 있다고 할 수 있다.

단백질 폴딩 반응의 과정은 초기에 소수성 붕괴가 일어나 단백질 내부의 구조가 native state보다는 느슨한 molten globule 상태를 거쳐서 말기에 결사슬들이 단백질의 내부에서 소수성 상호작용이 극대화되어 내부가 매우 촘촘한 native state가 형성된다고 여겨지고 있다.<sup>21</sup> 이러한 과정은 아미노산 잔기가 100여 개 정도로 이루어진 작은 단백질의 경우 매우 매끄럽게 진행되어 중간단계가 거의 관찰되지 않아서 unfolded state와 native state만으로 이루어진 two-state 양상을 보인 경우가 많다. 이럴 경우 단백질의 native state를 안정화시키는 각 비공유결합의 폴딩 반응에서의 역할을 탐구하기가 용이하지 않게 된다. 그런데 본 연구에서 사용한 WT\* 유비퀴틴은 kinetics 실험에서 확연히 관찰되는 중간단계가 있으며 이 중간단계가 폴딩 반응의 경로 상에 있으므로 폴딩 과정의 각 단계에서 특정 비공유결합이 폴딩 반응에 기여하는 정도를 탐구해 볼 수 있는 좋은 단백질이라고 할 수 있다. WT\* 유비퀴틴을 모델로 삼아 본 실험에서 탐구한 정전기적 상호작용 외에도 특정 비공유결합의 폴딩 반응에서의 역할, 특히 특정 비공유결합이 중간단계가 형성되는 폴딩 반응의 초기에 끼치는 영향을 탐구해볼 수 있으리라 여겨진다.

## 결 론

WT\* 유비퀴틴 단백질의 K29를 알라닌으로 치환하여 정전기적 상호작용이 단백질의 native state의 안정성과 폴딩 반응의 과정에 끼치는 영향을 탐구하였다. 평형상태에서의 변성실험은 K29가 정전기적 상호작용을 통하여 유비퀴틴 단백질의 삼차원 구조의 안정성에 상당히 기여하고 있음을 나타내었다. 폴딩 과정을 stopped-flow 장치로 측정한 folding kinetics 실험은 K29A 유비퀴틴도 WT\* 유비퀴틴과 마찬가지로 변성제의 종류에 관계없이 unfolded 상태에서 native 상태로 되는 과정에 native 상태와 유사한 형태의 중간단계를 거치는 on-pathway three-state 폴딩 메커니즘을 따른다는 점이 관찰되었다. 더욱이 folding kinetics 실험을 통하여 얻는 중간단계의 구조적인 안정성을 바탕으로 한 분석에서 WT\* 유비퀴틴의 native 상태의 안정화에 기여하는 정전기적 상호작용은 중간단계의 구조적 안정화에도 어느 정도 기여하는 것이 관찰되었다. 이러한 관찰은 단백질의 폴딩 과정이 native 상태를 안정화 시키는 여러 가지 결합들이 누적적으로 형성되는 과정이라고 할 때 전하를 띠는 아미노산의 잔기 사이에서 형성되는 정



전기적 상호작용도 비록 특정 정전기적 상호작용을 하는 아미노산 잔기가 일차구조 상에서 멀리 떨어져 있다고 하더라도 폴딩 반응의 초반부 즉 소수성 붕괴가 일어날 때 형성되어 폴딩 반응을 이끌어가는 데 기여할 수 있다는 점을 시사한다.

## REFERENCES

1. Kim, P. S.; Baldwin, R. L. *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, *51*, 459.
2. Kim, P. S.; Baldwin, R. L. *Annu. Rev. Biochem.* **1990**, *59*, 631.
3. Wintrode, P. L.; Makhatadze, G. I.; Privalov P. L. *Proteins* **1994**, *18*, 246.
4. Khorasanizadeh, S.; Peters, I. D.; Butt, T. R.; Roder, H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 7054.
5. Khorasanizadeh, S.; Peters, I. D.; Roder, H. *Nat. Struct. Biol.* **1996**, *3*, 193.
6. Park, S.-H. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *37*, 676.
7. 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.
8. Gill, S. C.; von Hippel, P. H. *Anal. Chem.* **1989**, *182*, 319.
9. Schellman, J. A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1305.
10. Pace, C. N. *Methods Enzymol.* **1986**, *131*, 266.
11. Peterman, B. F. *Anal. Biochem.* **1979**, *93*, 442.
12. Tanford, C. *Adv. Prot. Chem.* **1970**, *24*, 1.
13. Mathews, C. R. *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 498.
14. Chen, B.; Baase, W. A.; Schellman, J. A. *Biochemistry* **1989**, *28*, 691.
15. Bachmann, A.; Kiefhaber, T. In *Protein Folding Handbook, Part I*; Buchner, J., Kiefhaber, T., Eds.; WILEY-VCH: Weinheim, Germany, 2005; p 379.
16. Vijay-Kumar, S.; Bugg, C. E.; Cook, W. J. *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 531.
17. Baldwin, R. L. *Fold. Des.* **1996**, *1*, R1.
18. Tanford, C. *Adv. Prot. Chem.* **1970**, *24*, 1.
19. Shortle, D. *Adv. Prot. Chem.* **1995**, *46*, 217.
20. Myers, J. K.; Pace, C. N.; Scholtz, J. M. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2138.
21. Wolynes, P. G.; Onuchic, J. N.; Thirumalai, D. *Science* **1995**, *267*, 1619.