

변형 유비퀴틴 단백질을 이용하여 탐구한 이온이 단백질 구조의 안정성에 미치는 영향

박순호

강릉원주대학교 치과대학 치의학과
(접수 2015. 9. 1; 게재확정 2015. 11. 16)

Contribution of Ions to Protein Stability Studied by Using a Variant Ubiquitin as a Model Protein

Soon-Ho Park

Department of Dentistry: Biochemistry and Molecular Biology Group, College of Dentistry, Research Institute of Oral Sciences, Gangneung-Wonju National University, Gangwon-do, 25457, Korea

E-mail: spark9@gwnu.ac.kr

(Received September 1, 2015; Accepted November 16, 2015)

주제어: 단백질 안정성, 정전기적 상호작용, Hofmeister series 효과

Key words: Protein stability, Electrostatic interaction, Hofmeister series effect

서 론

단백질의 삼차원 입체구조(three-dimensional structure, native structure)를 안정하게 유지하는 일은 정제된 단백질의 저장 수명을 늘려줄 수 있기 때문에 산업적으로 매우 유용하다. 단백질의 안정성을 증가시키기 위하여 단백질을 저장하는 용액에 여러 가지 다양한 물질을 첨가하는 방법이 사용되는데,¹ 이러한 물질에는 이온도 포함된다. 특히 이온이 세로 내에서 비교적 높은 농도로 존재하는 점을 고려하면 매우 유용한 단백질 입체구조 안정제라 할 수 있다. 이온은 전하를 띠고 있으므로 단백질 입체구조의 안정성에 관여하는 정전기적 상호작용에 영향을 끼칠 수 있다. 또한 이온은 Hofmeister series 효과로 불리는 성질을 통하여 단백질의 구조적 안정성에 영향을 끼친다.^{2,3} 그러나 이온이 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과를 통하여 단백질 구조 안정성에 기여할 시 두 효과가 누적적으로 작용하는지, 협력적으로 작용하여 각각 따로 작용할 때보다 더 강하게 작용하는지 또는 한 요소가 다른 요소의 영향을 압도하는지에 대한 것은 잘 알려지지 않았다.

이온은 정전기적 인력(attractive electrostatic interaction)을 차벽(screen)하여 단백질의 구조적인 안정성을 떨어뜨리거나 정전기적 척력(repulsive electrostatic interaction)을 차벽하여 단백질의 구조적인 안정성을 증가시킬 수 있다. Hofmeister series 효과는 이온이 정전기적 상호작용과는

다른 메커니즘으로 단백질의 용해도와 단백질의 구조적 안정성에 미치는 효과이다. Hofmeister series 이온은 kosmotropic 이온과 chaotropic 이온으로 구분된다. Kosmotropic 이온은 단백질의 용해도를 감소시키며 구조적 안정성은 증가시킨다. 반면에 chaotropic 이온은 단백질의 용해도를 증가시키고 구조적인 안정성을 떨어뜨린다. Hofmeister series 효과는 주로 음이온에서 강하게 나타나는 것으로 알려져 있다.³ Fig. 1은 Hofmeister series 음이온을 보여주며 왼쪽으로 갈수록 더 강한 kosmotropic 이온이 분포하고 오른쪽으로 갈수록 더 강한 chaotropic 이온이 분포하며 두 성질의 경계는 Br⁻과 NO₃⁻ 사이 임을 보여준다. Kosmotropic 이온이 단백질의 구조나 용해도에 끼치는 영향은 이온이 단백질 용액의 주된 용매인 물의 벌크 구조(bulk water structure)를 변화시키는 것이 아니라 이온이 용질인 단백질과 용매인 물과의 상호작용, 고분자를 둘러싼 첫 번째 수화 껍질(first hydration shell)과 이온의 상호작용에 의하여 나타나는 것으로 여겨지고 있다.³ Kosmotropic 이온의 경우 용매인 물에 강하게 수화되는 성질로 인하여 계의 엔트로피를 감소시키는 효과를 가져온다. 단백질의 unfolded state는 노출된 소수성 결사슬에 물 분자가 강한 수소결합 클러스터를 이루어 계의 엔트로피가 감소된 상태인데 kosmotropic 이온이 존재하면 이온 주위에도 물 분자가 강하게 수화됨으로 인하여 계의 엔트로피는 더욱더 감소하는 효과가 나타난다. 즉 kosmotropic 이온이 존재할 때

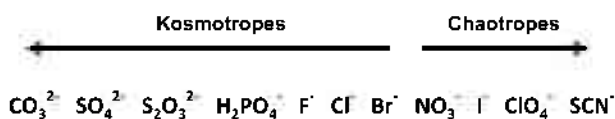


Figure 1. The Hofmeister series anions. Left-headed and right-headed arrows indicate kosmotropic and chaotropic anions, respectively.

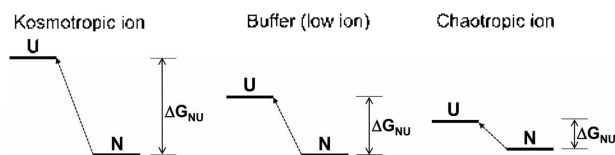


Figure 2. Stability of proteins in the presence of ions. The energy between unfolded state (U) and the native state (N) are denoted as ΔG_{NU} . Dotted arrow shows the uphill that should be overcome to unfold the native state.

unfolded state는 이온이 없을 때보다 더 불안정하게 되며 따라서 unfolded state와 native state의 자유에너지 차(ΔG_{NU})로 나타나는 난백질 삼차원 입체구조의 안정성은 kosmotropic 이온이 있을 때 더 커지게 된다고 할 수 있다(Fig. 2). 반면에 chaotropic 이온은 용매인 분자보다 용질인 단백질의 극성 부분(주로 펩타이드 결합)과 더 강하게 결합하여 unfolded state를 이온이 없을 때보다 더 안정하게 하므로 unfolded state와 native state의 자유에너지 차가 작아지게 되며 따라서 단백질의 삼차원 입체구조의 안정성이 감소하는 효과가 나타난다고 할 수 있다.³

유비퀴틴은 76 개의 아미노산으로 이루어진 작은 단백질로 site-directed mutagenesis 방법으로 특정 아미노산을 다른 아미노산으로 치환한 다양한 변형 유비퀴틴을 이용하여 폴딩 과정이나 구조적인 안정성을 탐구하는 모델 단백질로 유용하게 사용되고 있다.^{4,5} 이들 변형 유비퀴틴 중 45번째 아미노산인 페닐알라닌을 트립토판으로 치환하여 형광분광기로 구조적 변화를 측정할 수 있으며 여기에 더하여 26번째 아미노산인 발린을 알라닌으로 치환하여 삼차원 입체구조의 안정성이 상당히 감소한 변형 유비퀴틴(HubWA로 명명됨)은 이온의 농도가 낮은 산성(pH 2) 용액에서 native state와는 다른 형광스펙트럼을 띠는 변형 상태가 되는 것이 관찰되었다.⁶ 유비퀴틴은 중성 pH에서 양전하를 띠는 라이신과 아르기닌이 각각 7 개와 4 개, 음전하를 띠는 아스파르트산과 글루탐산이 각각 5 개와 6 개 있어서 전기적으로 중성을 띠지만 산성용액(pH 2)에서는 라이신과 아르기닌만이 전하를 띠게 된다. 삼차원 입체구조가 WT유비퀴틴 보다 약화된 HubWA의 경우 산성(pH 2) 용액에서 라이신과 아르기닌에 의한 11 개의 양전하가 띠는 척력에 의하여 변형이 일어난다고 할 수 있다. Fig. 3은 산성용액에서 양전하가 집중된 native 상태

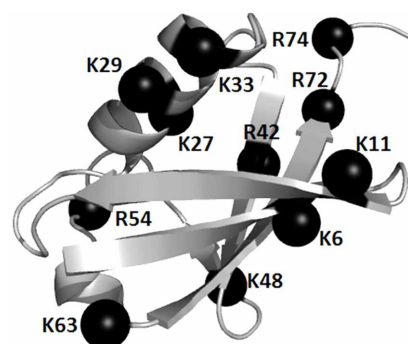


Figure 3. Structure of human ubiquitin. Peptide backbone is shown as ribbon. Alpha-carbons of positively charged residue are shown as spheres. Residue numbers from the amino terminus are shown after one letter code of lysine (K) and arginine (R).

유비퀴틴의 구조를 보여준다. 산성용액에서 α -helix에 위치한 세 개의 양전하가 띠는 척력은 α -helix의 구조를 불안정하게 하며, β -sheet에 있는 네 개의 양전하도 β -sheet를 불안정하게 할 수 있다. 또한 이들 양전하는 서로 접하고 있는 α -helix와 β -sheet에 척력을 미쳐 전체적으로 삼차원 입체구조의 안정성을 떨어뜨려 HubWA를 변형시킬 수 있을 것으로 보여진다.

산성용액에서 변형된 HubWA에 약한 kosmotropic anion인 Cl^- 가 가해지면 refolding 되는 것이 관찰되었다.⁶ 이는 Cl^- 에 의한 정전기적 척력을 차벽하는 효과와 Hofmeister series 효과가 모두 HubWA의 구조적인 안정성을 높이는데 기여하기 때문인 것으로 여겨진다. 이러한 현상은 HubWA가 알짜전하를 띠지 않는 중성 용액에서 HubWA의 구조적 안정성에 정전기적 상호작용은 거의 영향을 주지 않는 경우와 대비된다. 이온에 의한 HubWA의 구조적 안정성의 증가는 중성용액에서는 Hofmeister series 효과만 주로 나타나지만, 산성용액에서는 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과가 모두 나타난다고 할 수 있다. 따라서 산성용액에서 Cl^- 에 의하여 refolding된 HubWA는 단백질 구조 안정성에 미치는 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과가 단순히 누적적(additive)인지 혹은 두 효과의 영향이 협력적(cooperative)으로 일어나 두 효과를 단순히 합한 것보다 더 크게 나타나는 지를 알아볼 수 있는 좋은 모델 단백질이 될 것으로 여겨졌다. 산성용액에서 변형된 HubWA의 경우 chaotropic anion에 의해서도 정전기적 척력이 차벽되어 refolding이 일어날 수 있으리라 예측되나 chaotropic ion의 경우 농도가 증가할수록 정전기적 척력을 차벽하여 refolding을 일으키는 경향과 Hofmeister series 효과에 의하여 단백질을 변형시키는 경향이 서로 상충되게 작용하므로 단백질 구조 안정화에 미치는 이온의 효과를 설명하기가 어려울 것으로 여겨졌다. 따라서 본 연구는 kosmotropic 이온이 단백질의 삼차원 입체구

조의 안정성에 끼치는 효과에 집중하였다.

실 험

재료

본 연구에서 사용된 모델 단백질인 변형 유비퀴틴인 HubWA는 이전에 발표한 방법으로 정제하였고⁶ coomassie brilliant blue로 염색한 SDS-PAGE 젤을 통하여 순도가 97% 이상임을 확인하였다. 단백질의 안정성을 얻는 변성 실험에 사용된 초순수 요소(ultrapure urea)는 ICN Biomedical Inc.(Aurora, USA)에서 구입했으며 그 외 시약은 reagent grade를 사용하였다.

형광 및 편광 스펙트럼 측정

형광 스펙트럼(fluorescence emission spectrum)은 JASCO FP6500 분광형광계(Tokyo, Japan)를 사용하였고, 편광 스펙트럼(Circular Dichroic spectrum)은 JASCO J-810 분광편광계(Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 스펙트럼 측정의 세세한 사항은 이전에 발표한 방법을 따랐다.⁶

단백질의 안정성 측정

본 연구에서는 이온이 단백질 삼차원 입체구조의 안정성에 끼치는 영향을 알아보는 것이 주 목적이므로 단백질 변성 실험에는 전하를 띠지 않는 요소를 사용하였다. HubWA의 변성 실험은 요소의 농도를 증가시킬 때 나타나는 HubWA의 구조적인 변화가 형광 신호의 증가를 일으키는 점을 이용하여 측정된 이전에 발표한 방법을 사용하였다.⁶ 이온의 농도에 따른 안정성은 공정한 비교를 위하여 수식 1로 구할 수 있는 이온강도(ionic strength, IS)를 사용하였다.

$$IS = 1/2 \sum c_i Z_i^2 \quad (1)$$

수식 1에서 c_i 와 Z_i 는 각각 이온의 몰 농도와 가수를 의미한다.

HubWA의 요소에 의한 변성은 형광신호의 증가로 나타났으며, 형광신호의 증가는 S-자(sigmoid) 형태로 관찰되었다(Fig. 5). 이러한 관찰은 요소에 의한 HubWA의 구조 변화가 native state와 unfolded state만 존재하는 two-state 폴딩 메커니즘을 따른다는 점을 나타낸다.^{7,8} 본 연구에서는 요소에 의한 HubWA의 구조 변화를 two-state 폴딩 메커니즘을 기반으로 한 linear extrapolation method(LEM)로 분석하였다(수식 2).^{7,8}

$$Y = \frac{(a_1 + b_1[C]) + (a_2 + b_2[C])\exp((\Delta G_{NU}^{\circ} - m_{NU}[C])/RT)}{1 + \exp((\Delta G_{NU}^{\circ} - m_{NU}[C])/RT)} \quad (2)$$

수식 2에서 Y는 각 변성제 농도에서 관찰되는 형광 신호.

[C]는 변성제의 농도, m_{NU} 는 변성제 농도에 따른 자유에너지의 변화, a_1 과 a_2 는 각각 변성제의 농도가 0일 때의 native state와 unfolded state의 형광 신호, b_1 과 b_2 는 각각 변성제의 농도 변화에 따른 native state와 unfolded state의 형광 신호 변화를 나타낸다. 상수 a_1 과 b_1 으로 native 신호의 기준선(native baseline)을 a_2 와 b_2 로 unfolded 신호의 기준선(unfolded baseline)을 나타낼 수 있다. R은 기체상수, $1.987 \text{ cal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$, 이고 T는 절대온도를 나타낸다. Two-state 폴딩 반응의 중간점(midpoint)인 C_m 은 ΔG_{NU}° 가 m_{NU} 와 C_m 의 곱으로 표현되는 점을 이용하여 얻었다. ΔG_{NU}° 는 변성제의 농도가 0일 때의 자유에너지로서 단백질 삼차구조의 안정성을 반영하므로 여러 가지 다른 용액 조건에서 실시한 변성 실험에서 얻은 ΔG_{NU}° 값을 통하여 각 조건에서 단백질의 안정성의 차이를 비교할 수 있다.

결과 및 고찰

HubWA는 산성용액(pH 2)에서 구조적인 변성이 일어나며 이렇게 변성된 상태에서 Cl⁻를 가해주면 다시 native state로 구조의 변화가 일어나는 것이 관찰되었다.⁶ 이러한 관찰은 양전하의 척력이 단백질의 삼차구조의 안정성에 지대한 영향을 주는 상황에서 이온의 역할을 알아보는 데 요긴한 모델 단백질이 될 수 있음을 의미한다. 본 연구는 여러 가지 kosmotropic 이온이 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과에 의하여 단백질 구조 안정성에 끼치는 영향을 탐구하는 것이 주목적으로 정전기적 척력이 거의 작용하지 않아 Hofmeister series 효과만 주로 관찰할 수 있는 중성 용액과 정전기적 척력이 강하게 작용하여 Hofmeister series 효과와 정전기적 상호작용의 효과를 모두 관찰할 수 있는 산성용액에서 각 이온이 HubWA의 구조적 안정성에 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 목적에 입각하여 pH 2 용액에서 변성된 HubWA가 Cl⁻ 이외의 kosmotropic 이온이 존재할 때도 native state로 구조전환이 일어나는지 먼저 탐색하였다. Fig. 4는 pH 2 용액에 여러 가지 다른 이온이 존재하는 상황에서 측정된 HubWA의 far-UV Circular Dichroic(CD) 스펙트럼을 보여준다. 용액의 pH가 2이고 이온의 농도가 낮은 상태에서 관찰된 HubWA의 far-UV CD 스펙트럼(Fig. 4 점선)은 native 상태의 스펙트럼(Fig. 4 실선)과는 현저하게 다르게 나타났는데 이 용액에 0.4 M KCl(Fig. 4 짧은 대시)이나 0.2 M Na₂SO₄ (Fig. 4 긴 대시)를 가하면 native 상태의 스펙트럼과 일치하는 스펙트럼을 보였다. 또한 0.4 M KBr(Fig. 4 대시-점)을 가하였을 때에는 224 nm 이하에서 흡광도가 너무 높아 양질의 스펙트럼은 구하기 어려웠으나 224~260 nm에서의 스펙트럼은 pH 2일 때의 스펙트럼보다는 native 상태의 스펙트럼과 일치

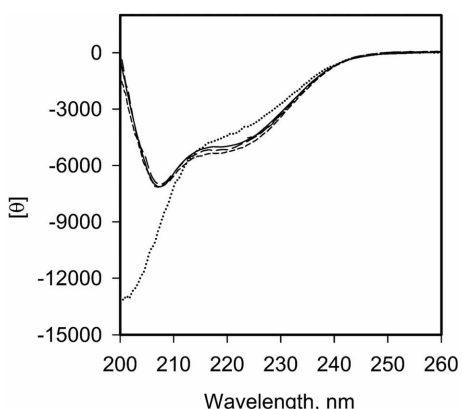


Figure 4. Far-UV Circular Dichroism spectra of HubWA. The solid line illustrates the spectrum of the native state HubWA in pH 5 and low salt solution. The dotted line is the spectrum of HubWA measured in pH 2 and low salt solution. The spectra in the presence of 0.4 M KCl, 0.2 M Na₂SO₄, and 0.4 M KBr at pH 2 are illustrated in short dash, long dash, and dash with dot lines, respectively. The molar ellipticity, [θ], has a unit of deg·cm²·dmol⁻¹.

하였다. 이러한 관찰은 낮은 pH에서 변성된 HubWA의 구조가 Cl⁻, Br⁻, 그리고 SO₄²⁻를 가해주었을 때 다시 native 상태의 구조로 되돌아 온다는 것을 의미한다. 따라서 다양한 농도의 이온이 있는 상태에서 단백질 변성 실험을 통하여 구한 삼차원 입체구조의 안정성을 비교함으로써 이온이 단백질 구조의 안정성에 끼치는 영향을 탐구해볼 수 있을 것으로 사료되었다.

Fig. 5에서 보듯이 HubWA의 요소에 의한 변성 실험의

결과는 용액의 pH나 가해진 이온에 관계없이 모두 단순한 S-자형 곡선으로 나타났다. 이러한 결과는 단백질의 구조적인 변성이 전형적인 two-state transition 양상으로 일어난다는 것을 의미한다.⁷⁸ Fig. 5의 각 패널에서 실선은 two-state transition에 기반을 둔 LEM(수식 2)을 적용하여 분석한 결과를 보여주며 실험 결과와 분석값이 잘 겹치는 것을 보여준다. 이는 요소에 의한 변성 실험을 two-state transition으로 분석하는 것이 적절하다는 점을 나타낸다. Table 1과 2는 분석 결과를 보여준다. Table 1과 2에서 보듯이 HubWA의

Table 1. Analysis of urea-induced equilibrium unfolding of HubWA in various salt concentrations at pH 5

Salt	Concentration	m _{NL}	C _m	ΔG ^o _{NL}
KCl	0.0	1.17	3.94	4.61
KCl	0.2	1.17	4.09	4.79
KCl	0.4	1.18	4.21	4.97
KCl	0.6	1.13	4.60	5.20
KCl	0.8	1.11	5.00	5.55
KCl	1.0	1.12	5.24	5.87
KBr	0.5	1.18	4.31	5.09
KBr	1.0	1.21	4.73	5.72
Na ₂ SO ₄	0.1	1.18	4.47	5.27
Na ₂ SO ₄	0.3	1.15	5.84	6.72
Na ₂ SO ₄	0.5	1.21	6.79	8.22

The units for m_{NL}, C_m, and ΔG^o_{NL} are kcal·mol⁻¹·M⁻¹, M, and kcal·mol⁻¹, respectively. Concentration of salt is M. Errors for m_{NL} and C_m were estimated to be ~5%. Cumulative errors for ΔG^o_{NL} was ~7%.

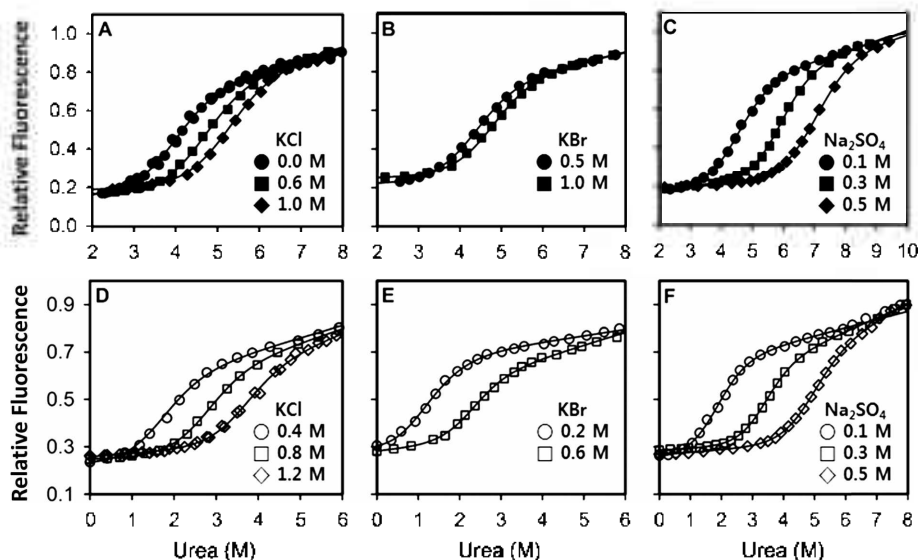


Figure 5. Urea-induced equilibrium unfolding of HubWA. Panels A, B, C are the equilibrium unfolding of HubWA in the presence of KCl, KBr, and Na₂SO₄ at pH 5, respectively. Panels D, E, F are the equilibrium unfolding of HubWA in the presence of KCl, KBr, and Na₂SO₄ at pH 2, respectively. Symbols denote the representative urea-induced equilibrium unfolding measurements at various ion concentrations. The concentration of ions are designated at the lower right corner of each panel. Solid lines are the result of a LEM analysis based on a two-state transition model.

Table 2. Analysis of urea-induced equilibrium unfolding of HubWA in various salt concentrations at pH 2

Salt	Concentration	m_{NU}	C_m	$\Delta G_{\text{NU}}^\circ$
KCl	0.2	1.22	1.01	1.23
KCl	0.4	1.16	1.59	1.84
KCl	0.6	1.17	2.34	2.74
KCl	0.8	1.22	2.71	3.31
KCl	1.0	1.12	3.46	3.88
KCl	1.2	1.22	3.61	4.40
KBr	0.2	1.18	0.99	1.17
KBr	0.4	1.13	1.83	2.07
KBr	0.6	1.25	2.19	2.74
KBr	0.8	1.25	2.72	3.40
KBr	1.0	1.31	3.00	3.93
Na ₂ SO ₄	0.1	1.17	1.62	1.90
Na ₂ SO ₄	0.3	1.16	3.31	3.84
Na ₂ SO ₄	0.5	1.15	4.80	5.52
Na ₂ SO ₄	0.6	1.16	5.88	6.82

The units for m_{NU} , C_m , and $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ are kcal·mol⁻¹·M⁻¹, M, and kcal·mol⁻¹, respectively. Concentration of salt is M. Errors for m_{NU} and C_m were estimated to be ~4%. Cumulative errors for $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ was ~6%.

요소에 의한 변성 실험에서 나타난 m_{NU} 값은 $\sim 1.18 \pm 0.05$ 로 일정하게 나타났다. 단백질의 변성 실험에서 얻은 m_{NU} 값은 native 상태에서 unfolded 상태로 될 때 용액에 노출되는 표면적(solvent accessible surface area)의 증가를 반영하는 것으로 알려진 상수이다.⁹⁻¹¹ 하나의 단백질을 이용한 실험에서 여러 용액 조건에서 m_{NU} 값이 일정하게 나타난 점은 각 조건에서 단백질의 변성 과정에 native state나 unfolded state 외의 제 3의 구조나 단백질응집체(protein aggregate)가 나타나지 않는다는 점을 의미한다.¹¹ 따라서 요소에 의한 변성 실험으로 얻은 $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ 는 HubWA의 구조적 안정성만 반영한다고 할 수 있다. Transition의 중간점을 나타내는 C_m 은 단백질의 구조적인 안정성을 반영하며 각 용액 조건에 따라 다양하게 나타나고 있음을 알 수 있다. 단백질의 구조적 안정성을 비교할 때는 m_{NU} 와 C_m 의 값으로 구할 수 있는 $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ 가 보편적으로 사용된다.⁵

Fig. 6는 각기 다른 이온의 농도에서 요소에 의한 변성 실험으로 구한 $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ 를 그린 것이다. 본 연구에서는 Cl⁻이나 Br⁻처럼 1가 이온뿐만 아니라 SO₄²⁻와 같은 2가 이온도 사용하였으므로 광범한 비교를 위하여 이온강도(ionic strength, 수식 1)에 따른 $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ 를 비교하였다. Fig. 6의 단원 기호(closed symbols)는 pH가 5인 용액에서 KCl(○), KBr(□), 그리고 Na₂SO₄(△)의 이온강도에 따른 HubWA의 $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ 의 변화를 보여준다. HubWA의 $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ 는 KCl과 KBr의 이온강도가 증가함에 따라 비교적 완만하게 증가하는 직선의 형태를 보이며 서로 겹쳐지는 것으로 관찰되었다. KCl

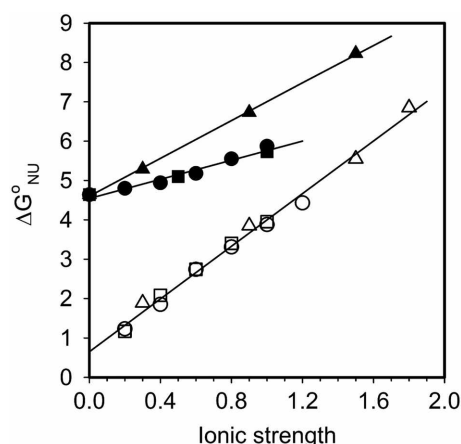


Figure 6. The dependence of $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ on ionic strength for various ions. Circles, squares, and triangles denote the dependence of $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ on KCl, KBr, and Na₂SO₄, respectively. Closed and open symbols represent the dependence of $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ on ionic strength at pH 5 and 2, respectively. Solid lines are the result of a linear regression.

과 KBr의 이온강도에 대한 $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ 를 하나의 직선으로 분석하면 기울기는 1.22, R²(결정계수, coefficient of determination)는 0.98로 분석되었다. Na₂SO₄의 경우 이온강도가 증가함에 따라 KCl이나 KBr의 경우에서와 같이 $\Delta G_{\text{NU}}^\circ$ 가 직선의 형태로 증가하는 양상을 보이며, 기울기는 KCl이나 KBr이 존재할 때보다 더 큰 값을 가지는 것으로 나타났다(기울기 = 2.40, R² = 0.99).

이온강도에 따른 단백질의 구조적인 안정성이 직선으로 나타나는 점은 이들 이온에 의하여 단백질의 구조적 안정성이 증가하는 것이 이온이 HubWA의 특정부위에 특이적으로 결합(specific binding)하기 때문에 일어나는 것은 아니라는 것을 의미한다. 만약 이온과 단백질의 특이적인 결합이 관여한다면 이온강도에 따른 단백질의 구조적인 안정성이 직선으로 나타나는 것이 아니라 쌍곡선(hyperbolic curve)으로 나타나야 하는데 실험을 실시한 이온의 농도 구간에서는 쌍곡선이라기 보다는 직선에 훨씬 가깝게 나타났다. 또한 X-ray crystallography 방법으로 구한 WT 유비퀴틴의 입체 구조에서도 이온이 특정부위에 결합한다는 증거는 보이지 않았다.¹² 용액의 pH가 5인 조건에서 HubWA는 11 개의 양전하와 11 개의 음전하를 띠어 전기적으로 중성이므로 이 상태에서 단백질 구조적 안정성에 끼치는 이온의 역할은 정전기적 상호작용보다는 Hofmeister series 효과가 주된 효과일 것으로 여겨진다. 특히 Cl⁻와 Br⁻에 의한 안정성의 증가보다 Na₂SO₄에 의한 안정성의 증가가 더 큰 폭으로 일어나는 점은 Fig. 1에서 보여진 바와 같이 SO₄²⁻가 Cl⁻나 Br⁻보다 더 강한 kosmotropic 이온임을 반영한다고 할 수 있다. 반면에 Cl⁻와 Br⁻는 kosmotropic 효과가 그리 차이가

나지 않는 이온이기 때문에 이 실험에서는 그 효과를 구별할 수 없었다고 생각되었다.

중성 pH와는 달리 산성 pH에서는 HubWA가 양전하만 띠므로 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과가 모두 HubWA의 안정성에 기여하게 될 것으로 여겨진다. 따라서 pH 2 용액에서 HubWA의 구조적 안정성을 측정하면 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과가 서로 누적적인지, 두 작용이 구조적 안정성을 더욱 더 강하게 하는 시너지 효과를 보이는 지 등을 알아볼 수 있을 것으로 여겨졌다. Fig. 6에서 열린 기호(open symbols)는 용액의 pH가 2일 때 이온강도에 따른 ΔG_{fold} 의 변화를 보여준다. 용액의 pH가 2일 때도 pH 5일 때와 마찬가지로 이온강도가 증가함에 따라 HubWA의 구조적 안정성의 증가가 직선으로 관찰되었으며, 흥미롭게도 세가지 이온에서 측정된 결과가 서로 겹쳐지는 것이 관찰되었다. 세가지 이온에서의 결과를 하나의 직선으로 가정하였을 때 기울기는 3.35, R^2 는 0.99로 분석되었다. 용액의 pH가 2일 때 얻은 이온강도에 따른 HubWA의 구조적 안정성도 중성 pH에서 측정된 것과 마찬가지로 직선으로 나타난 점은 HubWA의 구조적 안정성이 HubWA의 특정 부위에 이온이 특이적으로 결합하여 나타난 것이라기 보다 이온에 의한 정전기적 척력의 차벽과 Hofmeister series 효과에 의한 것이라는 점을 시사한다. 그런데 세 가지 이온에 의한 효과가 서로 겹쳐지게 나타난 것은 pH 5인 용액에서의 관찰된 결과와 Fig. 1에서 보여진 것처럼 SO_4^{2-} 가 Cl^- 나 Br^- 보다 kosmotropic 효과가 더 크다는 점과는 배치되는 결과이다. Jungwirth와 그 동료들은 아미노 말단에 아세틸기를 결합시켜 양전하를 띠지 않게 만든 triglycine과 아세틸화 하지 않아 아미노 말단이 양전하를 띤 triglycine에 Hofmeister series 음이온을 가하였을 때 양전하를 띤 triglycine의 경우 가해진 음이온과 양전하의 상호작용이 상대적으로 강해져서 Hofmeister series 효과가 교란되는 현상을 보고하였다.¹³ 산성 용액에서 양전하만 가진 HubWA의 경우에도 음이온과 양전하의 상호작용이 강하여서 Hofmeister series 효과가 두드러지게 나타나지 않는 반면 정전기적 척력을 차별하는 효과가 상대적으로 더 크게 영향을 미치기 때문에 Fig. 6에서 보여진 결과가 나왔을 것으로 여겨진다. 이온강도에 따른 HubWA의 안정성이 증가하는 정도가 pH 5일 때보다 pH 2일 때 더 큰 점(기울기 1.22와 2.40 대 3.35)과 pH 2에서 각 이온에 의한 안정성의 증가가 서로 일치하는 점은 HubWA의 양전하 주위에 음이온의 분포가 늘어나 정전기적 척력을 차별하는 효과가

매우 커서 Hofmeister series 효과를 압도하여 정전기적 상호작용만 두드러지게 관찰된 것이라는 해석을 지지하며, 이온에 의한 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과가 서로 누적적이거나 협력적으로 작용하지는 않는다는 점을 나타낸다고 할 수 있다. HubWA의 이온에 의한 안정성을 측정하는 이 연구의 결과는 이온에 의한 단백질 구조의 안정성은 이온의 종류뿐만 아니라 단백질의 전하를 띤 상태에도 크게 영향을 받는다는 점을 시사한다.

이온이 단백질의 용해도, 단백질의 구조적인 안정성에 끼치는 영향은 오랫동안 관심의 대상이 되어왔다. 그러나 본 연구는 이온이 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과에 의하여 단백질의 구조적인 안정성에 영향을 끼치지만 정전기적 상호작용과 Hofmeister series 효과가 서로 누적적이거나 협력적이지 않으며, 이온이 단백질의 구조적 안정성에 끼치는 영향은 이온 자체의 성질뿐만 아니라 단백질의 전하를 띤 상태에도 크게 영향을 받는다는 것을 시사한다. 단백질의 구조적 안정성을 향상시키기 위하여 이온을 사용할 때에는 이온에 의한 안정화 효과와 더불어 보존하려는 단백질의 성질도 고려하여야 할 것으로 여겨진다.

REFERENCES

1. Timasheff, S. N.; Arakawa, T. In *Protein structure, a Practical Approach*; Creighton, T. E. Ed.; IRL Press at Oxford University Press: Oxford, England, 1990; p 331.
2. Baldwin, R. L. *Biophysical Journal* **1996**, *71*, 2056.
3. Zhang, Y.; Cremer, P. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2006**, *10*, 658.
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. Schellman, J. A. *Biopolymers* **1978**, *17*, 1305.
8. Pace, C. N. *Methods Enzymol.* **1986**, *131*, 266.
9. Tanford, C. *Adv. Prot. Chem.* **1970**, *24*, 1.
10. Shortle, D. *Adv. Prot. Chem.* **1995**, *46*, 217.
11. Myers, J. K.; Pace, C. N.; Scholtz, J. M. *Protein Sci.* **1995**, *4*, 2138.
12. Vijay-Kumar, S.; Bugg, C. E.; Cook, W. J. *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 531.
13. Paterová, J.; Rembert, K. B.; Heyda, J.; Kurra, Y.; Okur, H. I.; Liu, W. R.; Hilty, C.; Cremer, P. S.; Jungwirth, P. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 8150.