

소수성 상호작용이 HubWA 단백질의 폴딩 반응에 끼치는 영향

박순호

강릉원주대학교 치과대학 치의학과 생화학 및 분자생물학
(접수 2019. 7. 2; 게재확정 2019. 9. 4)

Contribution of Hydrophobic Interactions to HubWA Folding Reaction

Soon-Ho Park

Biochemistry and Molecular Biology Group, Department of Dentistry, College of Dentistry,
Research Institute of Oral Sciences, Gangneung-Wonju National University,
Gangneung 25457, Korea. E-mail: spark9@gwnu.ac.kr
(Received July 2, 2019; Accepted September 4, 2019)

요 약. 단백질 폴딩 연구에 유용하도록 유비퀴틴 단백질의 페닐알라닌 45를 트립토판으로, 발린 26을 알라닌으로 변이시킨 HubWA 단백질을 모델로 삼아 소수성 상호작용이 단백질 폴딩 반응에 끼치는 영향을 탐구하였다. HubWA의 소수성 아미노산 중 14 개를 알라닌으로 치환한 변이 단백질을 제조하였고 이들 중 폴딩 연구에 적절한 4 개의 변이 단백질(V5A, I13A, V17A, I36A)을 얻어서 폴딩 반응의 진행 과정을 stopped-flow 장치로 측정하였다. 변이 단백질 V17A의 폴딩 반응은 HubWA와 마찬가지로 three-state 메커니즘을 따르며, V5A, I13A, I36A의 반응은 two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 것으로 관찰되었다. 이는 HubWA 단백질의 폴딩 반응은 지엽적으로 구조적인 안정성을 지닌 부분이 존재하는 중간 단계가 먼저 형성된 다음 이들이 서로 퍼즐을 맞추는 것과 같은 방식으로 폴딩이 일어나는 collision-diffusion 메커니즘을 따르다가 소수성이 약한 아미노산으로 치환하였을 때 구조적인 안정성을 지닌 중간 단계가 관찰되지 않지만 폴딩 핵의 형성과 핵 주위로 native 구조가 형성되는 반응이 짝지어져 일어나는 nucleation-condensation 메커니즘으로 전환되는 것으로 해석되었다. 이러한 관찰은 단백질의 폴딩 경로는 지엽적인 구조의 안정성에 따라 서로 다른 메커니즘을 띌 수 있음을 시사한다.

주제어: 단백질 폴딩, 소수성 붕괴, 폴딩 핵

ABSTRACT. The role of hydrophobic residues on protein folding reaction was studied by folding kinetics measurements in conjunction with protein engineering. The HubWA, which was derived from human ubiquitin by mutating the residues at 45 (Phe to Trp) and 26 (Val to Ala), was used as a mutational background. Fourteen hydrophobic residues were mutated to alanine. Among fourteen variants generated, only four variant proteins (V5A, I13A, V17A, and I36A) were suitable for folding study. The folding kinetics of these variants was measured by stopped-flow fluorescence spectroscopy. The folding kinetics of HubWA and V17A was observed to follow a three-state on-pathway mechanism. On the other hand, folding kinetics of V5A, I13A, and I36A was observed to follow a two-state mechanism. Based on these observations, transition of protein folding reaction from collision-diffusion mechanism to nucleation-condensation mechanism was discussed.

Key words: Protein folding, Hydrophobic collapse, Folding nucleus

서 론

수용성 구형 단백질(soluble globular protein)의 삼차원 입체구조(native conformation)의 형성 과정인 단백질 폴딩(folding) 반응은 폴리펩타이드 사슬이 생화학적 기능을 수행하는데 있어서 필수적인 과정이다. 아미노산 100여 개 정도로 이루어진 작은 단백질의 경우 실험관 안에서 폴딩 반응과 풀어짐(unfolding) 반응이 가역적으로 일어나는 것이 관찰되었다.¹ 이러한 관찰은 단백질 삼차원 입체구조를 이루는 정보는 단백질의 아미노산 서열에 저

장되어 있다는 점과 폴딩 반응은 열역학적으로 가장 안정된 구조에 도달하는 과정임을 시사한다.

단백질의 삼차원 입체구조(native conformation)는 비공유결합인 수소결합, 정전기적 상호작용, van der Waals 결합, 그리고 소수성 상호작용에 의하여 안정성을 유지한다. 단백질 폴딩 반응은 특정 아미노산 서열을 가진 폴리펩타이드가 풀어져 있는 상태에서 폴딩 반응의 초기에 고유한 삼차원 입체구조에서 발견되는 비공유결합(native interaction)의 일부가 폴딩 핵을 형성하고 폴딩 핵 주위로 고유한 입체구조가 축조되는 과정이 짝지어져서 열역학적

으로 가장 안정된 구조를 이룬다는 nucleation-condensation 모델로 설명되거나 폴딩 핵 주위로 2차 구조를 상당히 지닌 안정된 중간 단계가 형성되고 중간 단계에 존재하는 구조물들이 마치 퍼즐조각처럼 맞춰지는 diffusion-collision 모델로 설명된다.¹² 이렇듯 단백질 폴딩 과정에서 비공유결합의 역할이 크므로 단백질 폴딩 과정을 이해하기 위하여서는 단백질의 삼차원 입체구조를 안정화 시키는 비공유결합이 형성되는 과정을 밝혀야 할 필요가 있다. 본 연구에서는 단백질 입체구조의 안정화에 기여하는 비공유결합 중 소수성 상호작용이 폴딩 반응에 끼치는 영향을 탐구하였다.

소수성 상호작용은 단백질 폴딩 반응의 초기에 소수성 아미노산이 서로 뭉치는 소수성 붕괴(hydrophobic collapse) 현상에 관여한다. 소수성 붕괴 과정은 구조적으로 특이적으로 일어나서 폴딩 반응을 이끌어 갈 수 있다는 의견과 비특이적으로 일어난 연후에 고유한 구조를 탐색하는 경우의 수를 줄여주는 역할을 할 것이라는 의견이 있다.³ 따라서 소수성 붕괴 과정이 폴딩 반응의 초기에 어떠한 역할을 하는지 탐구할 필요가 있다. 본 연구에서는 유비쿼터 단백질의 변형 단백질인 HubWA를 모델로 하여 소수성 아미노산이 변이된 변이 단백질의 폴딩 과정을 HubWA의 폴딩 과정과 비교하여 소수성 상호작용이 단백질 폴딩 반응에 끼치는 영향을 탐구하고자 한다.

HubWA는 유비쿼터 단백질의 변형 단백질로 폴딩 반응을 연구하는데 있어서 야생형 유비쿼터 단백질보다 더 적합하게 만들어진 단백질이다.⁴⁻⁶ HubWA의 폴딩 반응은 three-state on-pathway 메커니즘($U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$)을 따르는 것으로 밝혀졌다.⁶ 따라서 HubWA와 그 변이 단백질의 폴딩 반응을 비교하는 것은 HubWA를 구성하는 아미노산이 폴딩 반응의 각 단계(초기 $U \rightleftharpoons I$ 및 후기 $I \rightleftharpoons N$ 단계)에 끼치는 영향을 연구해볼 수 있는 기회를 제공하므로 HubWA는 폴딩 반응의 초기에 소수성 붕괴가 일어나는 $U \rightleftharpoons I$ 단계를 연구하기에 적절한 모델 단백질이다. 본 연구에서는 HubWA를 모델로 삼아 소수성 아미노산이 폴딩 과정에 기여하는 정도를 밝히기 위하여서 소수성이 강한 아미노산인 발린(valine), 류신(leucine), 아이소류신(isoleucine)을 이들 아미노산보다는 소수성이 상대적으로 약한 알라닌(alanine)으로 치환한 위치특정 돌연변이(site-specific mutant) 단백질을 제조하고, 돌연변이 단백질의 폴딩 과정을 HubWA의 폴딩 반응과 비교하여 탐구하고자 한다.

실 험

재료

위치 특정 돌연변이 생성(site-specific mutagenesis)의 주형으로 HubWA 유전자가 들어있는 pET-HubWA 플라스미드

를 사용하였다.⁷ Stratagene (La Jolla, USA)의 QuikChange site-directed mutagenesis Kit를 이용하여 소수성 아미노산 Ile3, Val5, Ile13, Val15, Val17, Ile23, Ile30, Ile36, Leu43, Leu50, Leu56, Ile61, Leu67, Leu69가 각각 알라닌으로 치환된 14 개의 변이 플라스미드를 제조하였고, DNA 염기서열을 측정하여 변이를 확인하였다(supplementary Fig. 1). 돌연변이 제조에 이용된 DNA oligomer는 Genotech(대전, 대한민국)에서 구입하였다. 변이 플라스미드를 대장균 BL21(DE3) 균주에 접종하여 형질전환을 시켰고 변이 단백질은 Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 사용하여 발현시켰다. 변이 단백질은 이전에 발표된 방법으로 정제하였다.⁷ 정제된 변이 단백질은 SDS-PAGE로 전개한 다음 Coomassie brilliant blue로 염색하여 순수하게 정제된 것을 확인하였다(supplementary Fig. 2). 변이 단백질의 이름은 변이 전 아미노산의 한 글자 이름(one letter code), 서열 순서, 알라닌의 한 글자 이름 순서로 나열하여 I3A, V5A, I13A, V15A, V17A, I23A, I30A, I36A, L43A, L50A, L56A, I61A, L67A, L69A로 각각 명명하였다. 초고순도(ultrapure) 요소(urea)는 ICN Biochemicals Inc.(Aurora, USA)에서 구입하였다. 그 외 시약은 시약등급(reagent grade)또는 그보다 더 순도가 높은 것을 사용하였다.

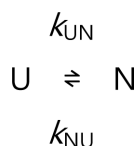
단백질 구조분석, 스펙트럼 측정 및 폴딩 Kinetics 측정

HubWA 단백질에 존재하는 소수성 아미노산의 native 상태에서 용액과 접촉하는 표면적(SASA, solvent accessible surface area)의 계산과 1.8Å 이내 거리에 존재하는 소수성 아미노산 잔기의 확인은 유비쿼터의 입체구조⁸를 바탕으로 NAOMI 프로그램⁹을 사용하여 구하였다. 용액에 완전히 노출되었을 때의 SASA는 소수성 아미노산의 아미노 말단과 카르복실말단이 알라닌인 세 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드(알라닌-소수성 아미노산-알라닌)의 SASA로부터 구하였다.

단백질의 형광 스펙트럼과 far-UV circular dichroic(CD) 스펙트럼의 측정은 이전에 기술한 방법을 사용하였다.⁷ Stopped-flow 장치를 이용한 폴딩 kinetics의 측정도 이전에 기술한 HubWA의 폴딩 kinetics를 측정한 방법을 이용하였다.⁶ 지수함수로 나타난 refolding 반응과 unfolding 반응은 nonlinear least square 방법으로 분석하여 속도상수(rate constant)와 진폭(amplitude)를 얻었다. 요소 농도에 따른 속도상수의 변화는 rate profile (Fig. 3A, 3C, 3E, 3G)로, 진폭 및 평형에 도달했을 때의 형광신호는 표준화하여 amplitude profile (Fig. 3B, 3D, 3F, 3H)로 나타내었다. 단백질이 완전히 풀어진 상태의 형광신호를 1로, native 상태의 형광신호를 0으로 삼아 형광신호를 표준화 하였다.

폴딩 메커니즘의 분석

Stopped-flow 장치로 측정한 V5A, I13A, I36A의 folding과 unfolding 반응은 two-state 폴딩 메커니즘에 입각하여 분석하였다(Scheme 1).



Scheme 1.

Scheme 1에서 U와 N은 각각 unfolded 상태와 native 상태를 나타내며, k_{UN} 과 k_{NU} 는 각각 folding 반응과 unfolding 반응의 속도상수를 나타낸다. Folding과 unfolding 속도상수 k_{UN} 과 k_{NU} 에 자연로그를 취한 값은 요소의 농도에 대하여 직선의 관계에 있는 것으로 알려져 있다(수식 1과 2).¹⁰⁻¹²

$$\ln k_{UN} = \ln k^{\circ}_{UN} + (m^{\ddagger}_{UN}/RT)C \tag{1}$$

$$\ln k_{NU} = \ln k^{\circ}_{NU} + (m^{\ddagger}_{NU}/RT)C \tag{2}$$

수식 1과 2에서 k°_{UN} 와 k°_{NU} 은 각각 요소의 농도가 0 M일 때의 folding과 unfolding 속도상수이며, m^{\ddagger}_{UN} 와 m^{\ddagger}_{NU} 는 각각 folding과 unfolding 속도상수의 요소 농도에 대한 기울기이다. C는 요소의 농도이며, R과 T는 각각 기체상수와 절대온도를 나타낸다. Rate profile은 수식 1과 2를 이용하여 얻은 각 요소 농도에서의 folding과 unfolding 반응의 속도상수로부터 실제로 관찰되는 속도상수(λ)를 구하여 분석하였다(수식 3).

$$\lambda = k_{UN} + k_{NU} \tag{3}$$

Amplitude profile은 속도상수의 비로부터 평형상수(K_{eq})를 구하여 native 상태의 비율(f_N)과 unfolded 상태의 비율(f_U)을 구하여서 분석하였다(수식 4-6).

$$K_{eq} = k_{UN}/k_{NU} \tag{4}$$

$$f_N = K_{eq} / (1 + K_{eq}) \tag{5}$$

$$f_U = 1/(1 + K_{eq}) \tag{6}$$

HubWA와 V17A의 폴딩 kinetics는 중간상태(intermediate state)가 있는 것으로 관찰되었고, 중간상태가 폴딩 반응의 경로상에 있는 three-state on-pathway ($U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$) 반응으로 분석한 이전 연구의 결과를 차용하였다.⁶ 폴딩 반응의 반응 좌표(reaction coordinate)는 수식 7을 이용하여 구한 활성에너지(E_a)와 폴딩 kinetics를 분석하여 얻은 U \rightleftharpoons I 반응과 I \rightleftharpoons N 반응의 자유에너지(ΔG°_{UI} , ΔG°_{IN})를 조합하여 구하였다.

$$E_a = -RT \ln(k^{\circ}_{IU}/A_0) \tag{7}$$

수식 7에서 k°_{IU} 는 변성제의 농도가 0일 때의 속도상수, A_0 는 에너지 장벽이 없을 때의 속도상수로 관례적으로 사용되는 값인 10^9 sec^{-1} 로 가정하였다.⁵ 반응의 진행을 나타내는 x-축은 β 값(Table 2, 3)을 사용하였다.

결 과

단백질의 폴딩 과정에서 특정 비공유결합의 역할을 알아보는 연구는 모델 단백질의 폴딩 과정을 탐구한 결과를 바탕으로 폴딩 과정에서 역할을 알고자 하는 아미노산을 알라닌으로 치환한 변이 단백질을 제조하여 변이 단백질과 모델 단백질의 폴딩 과정을 비교하는 방법(folding kinetics analysis in conjunction with protein engineering)이 이용된다.¹³ 본 연구에서는 폴딩 메커니즘이 밝혀진 HubWA를 모델 단백질로 삼아 소수성 아미노산이 단백질 폴딩 과정에 끼치는 영향을 알아보려고 하였다.

HubWA는 총 22 개의 소수성 아미노산을 가지고 있는데 이들 중 HubWA 입체구조에 존재할 때의 SASA가 이 아미노산이 용액에 완전히 노출되었을 때 SASA의 20% 이하로 소수성 상호작용에 크게 기여할 것으로 여겨지는 14개의 아미노산이 변이 시킬 아미노산으로 선택되었다(Table 1). 선택된 아미노산 Ile3, Val5, Ile13, Leu15, Val17, Ile23, Ile30, Ile36, Leu43, Leu50, Leu56, Ile61, Leu67, Leu69를 위치 특정 돌연변이 제조법을 사용하여 각각 알라닌으로 치환하였다. 제작된 14 개의 변이 단백질 중 10 개의 변이 단백질 I3A, V5A, I13A, V17A, I23A, I30A, I36A, L50A, L67A, L69A가 분리되었다. 네 개의 변이 단백질 L15A, L43A,

Table 1. Hydrophobic residues for mutation in HubWA^a

Residue	SASA ^b	Hydrophobic residues within 1.8Å
Ile3	0	Met1, Leu15, Val17, Ile61, Leu67
Val5	0	Leu15, Ile30, Leu43, Leu69
Ile13	1	Leu15, Ile30
Leu15	1	Ile3, Val5, Ile13, Val17, Val26, Ile30
Val17	0	Met1, Ile3, Leu15, Val26, Leu56
Ile23	0	Leu43, Leu50, Leu56, Tyr59
Ile30	0	Val5, Ile13, Leu15, Val26, Ile36, Leu43, Leu69
Ile36	20	Ile30, Leu69, Leu71
Leu43	0	Val5, Ile23, Val26, Ile30, Leu50, Leu67, Leu69
Leu50	0	Ile23, Leu43, Phe45, Tyr59, Ile61, Leu67
Leu56	0	Met1, Val17, Ile23, Val26, Ile61
Ile61	0	Met1, Ile3, Phe45, Leu56, Tyr59, Leu67
Leu67	0	Ile3, Leu43, Phe45, Ile61
Leu69	0	Val5, Ile30, Ile36, Leu43, Leu71

^aSASA of hydrophobic residues was calculated based on the ubiquitin three-dimensional structure determined by X-ray crystallography.⁸

^bSASA stands for solvent accessible surface area.

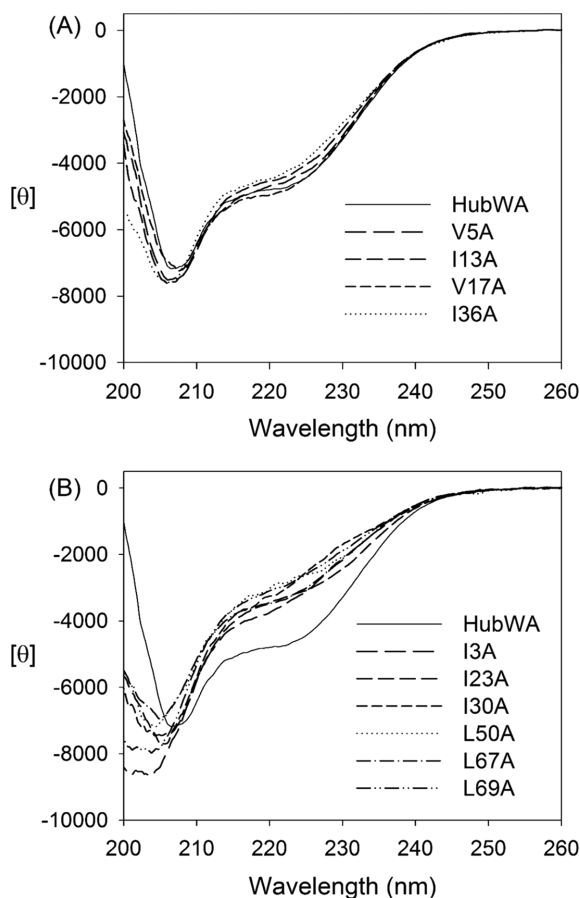


Figure 1. Far-UV circular dichroic spectra of HubWA and hydrophobic residue variants. Panel A shows the spectra of HubWA, V5A, I13A, V17A, and I36A. Panel B shows the spectra of HubWA, I3A, I23A, I30A, L50A, L67A, and L69A. The designation of each spectrum is shown on the lower right corner of each panel.

L56A, L61A은 대장균에서 불용성의 응집체를 형성하여 분리하지 못하였다.

Fig. 1A는 V5A, I13A, V17A, I36A의 far-UV CD 스펙트럼이 HubWA의 스펙트럼과 겹치는 것을 보여준다. 이러한 관찰은 V5A, I13A, V17A, I36A의 펩타이드 골격의 입체구조가 HubWA와 같다는 것을 나타낸다. 또한 Fig. 2A에 보여지듯이 이들 변이 단백질의 형광 스펙트럼은 형광의 극대치를 보여주는 파장이 ~340 nm로 native 구조의 HubWA가 보여주는 형광의 극대치 파장인 338 nm (Fig. 2A와 2B 점선)에 매우 가깝게 나타났다.⁷ 이는 V5A, I13A, V17A, I36A 단백질의 삼차원 입체구조가 HubWA와 실질적으로 같다는 것을 의미한다. Fig. 2A에서 형광의 세기가 서로 다르게 나타난 점은 트립토판의 결사슬이 놓인 미세 환경에 약간의 차이가 있기 때문으로 여겨졌다. 따라서 V5A, I13A, V17A, I36A의 폴딩 반응을 HubWA의 폴딩 반응과 비교하면 변이된 아미노산이 폴딩 반응에 끼치는 영향을

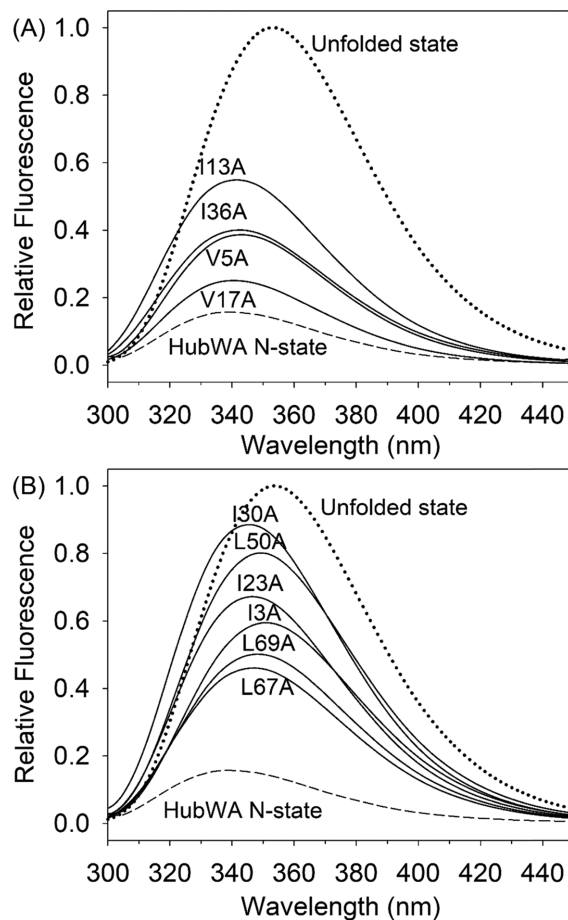


Figure 2. Fluorescence emission spectra of hydrophobic residue variants. Panel A shows the spectra of the native state of I13A, I36A, V5A, and V17A reading downward at 340 nm as solid lines, and the spectrum of unfolded state of HubWA as dotted line. Panel B shows the spectra of I30A, L50A, I23A, I3A, L69A, and L67A reading downward at 350 nm as solid lines, and the spectrum of unfolded state of HubWA as dotted line. HubWA native state spectrum is shown as broken line on panels A and B.

탐구할 수 있을 것으로 여겨졌다. 반면에 Fig. 1B에 그려진 I3A, I23A, I30A, L50A, L67A, L69A의 far-UV CD 스펙트럼은 특히 210 nm 이하의 파장에서 변이 단백질들끼리 서로 잘 겹치지 않는 것으로 관찰되었으며, HubWA의 스펙트럼과는 크게 차이가 나는 것으로 관찰되었다. 또한 Fig. 2B에서 보여지듯이 이들 변이 단백질의 형광 극대치는 ~350 nm로 HubWA가 변성제에 의하여 완전히 풀렸을 때의 형광 극대치인 353 nm와 가까웠다.⁷ 이러한 관찰은 이들 변이 단백질의 펩타이드 골격의 구조가 HubWA의 펩타이드 골격의 구조와 다르며 특히 트립토판 잔기가 위치해 있는 부분은 용액에 노출되어 있다는 것을 나타내며, I3A, I23A, I30A, L50A, L67A, L69A는 HubWA와는 다른 입체구조를 형성한다는 것을 의미한다. 따라서 이들 변

Table 2. Kinetic parameters of HubWA and V17A folding reaction^a

Proteins	k_{UI}^0	m_{UI}^\ddagger	k_{IU}^0	m_{IU}^\ddagger	k_{IN}^0	m_{IN}^\ddagger	k_{NI}^0	m_{NI}^\ddagger	ΔG_{UI}^0	ΔG_{IN}^0	ΔG_{UN}^0	β_{TS1}	β_I	β_{TS2}
HubWA	95.0	-0.72	0.08	0.39	11.0	-0.35	0.25	0.20	-4.2	-2.2	-6.4	0.43	0.67	0.88
V17A	25.5	-0.72	0.69	0.40	10.2	-0.19	0.44	0.23	-2.1	-1.9	-4.0	0.47	0.73	0.85

Free energies of folding are calculated as $\Delta G_{UI}^0 = -RT \ln(k_{UI}^0/k_{IU}^0)$, $\Delta G_{IN}^0 = -RT \ln(k_{IN}^0/k_{NI}^0)$, and $\Delta G_{UN}^0 = \Delta G_{UI}^0 + \Delta G_{IN}^0$. β -values are calculated as $\beta_{TS1} = -m_{UI}^\ddagger / m_{eq}$, $\beta_I = (m_{IU}^\ddagger - m_{UI}^\ddagger) / m_{eq}$, and $\beta_{TS2} = (m_{IU}^\ddagger - m_{UI}^\ddagger - m_{IN}^\ddagger) / m_{eq}$, where $m_{eq} = m_{IU}^\ddagger - m_{UI}^\ddagger + m_{NI}^\ddagger - m_{IN}^\ddagger$. The units for rate constant and free energy are sec^{-1} and kcal/mol, respectively.

^aThis table has been rearranged from the previously published results by Park.⁶

이 단백질의 폴딩 과정을 HubWA의 폴딩 과정과 비교하기에는 적절하지 않다고 여겨졌다.

HubWA와 같은 입체구조를 보이는 V5A, I13A, V17A, I36A의 폴딩 반응을 stopped-flow 장치로 측정하였다. Fig. 3E와 3F는 V17A의 폴딩 실험을 보여준다. V17A의 폴딩 반응은 HubWA의 폴딩 반응과 유사하게 두 개의 폴딩 phase가 존재하여 three-state on-pathway 폴딩 메커니즘으로 분석한 결과가 이미 발표되었고⁶ 본 연구에서는 다른 변이 단백질의 폴딩 반응과 비교하기 위하여 차용하였다. Table 2은 HubWA와 V17A 데이터를 재정리한 것이다. Table 2에서 β 값은 폴딩 과정에서 나타나는 각 상태의 구조적인 밀집도를 나타내는 상수로서 unfolded 상태는 0, native 상태는 1, 그리고 이 둘 사이에 존재하는 상태의 값은 0과 1 사이의 값을 가지며, 폴딩 반응의 진행 과정을 반영하는 척도로 사용할 수 있다.¹⁴ Table 2에서 HubWA와 V17A의 β_{TS1} , β_I , β_{TS2} 값이 점점 증가하는 것은 폴딩 반응이 점점 더 구조적인 밀집도가 높은 native 구조로 진행하고 있음을 의미한다. V17을 알라닌으로 변이 시켰을 때 $U \rightleftharpoons I$ 반응의 folding 반응의 속도상수(k_{UI}^0)는 HubWA의 그것에 비하여 ~3.7배 감소하였고 unfolding 반응의 속도상수(k_{IU}^0)는 HubWA의 그것에 비하여 ~8.6배 증가하여 V17A의 ΔG_{UI}^0 가 HubWA의 그것에 비해 2.1 kcal/mole 감소하는 것으로 분석되었다. 반면에 $I \rightleftharpoons N$ 반응의 folding 속도상수는 HubWA의 그것과 비교할 때 거의 변화가 없었고 단지 unfolding 반응의 속도상수(k_{NI}^0)만 HubWA의 그것에 비하여 ~1.8배 증가한 정도였다. 이렇게 얻은 속도상수로부터 폴딩 반응 각 단계의 구조적인 안정성을 반영하는 자유에너지인 ΔG_{UI}^0 , ΔG_{IN}^0 과 native 상태의 구조적인 안정성을 반영하는 자유에너지 ΔG_{UN}^0 을 구할 수 있었다. V17을 알라닌으로 변이 시켰을 때 ΔG_{UI}^0 는 2.1 kcal/mole 감소하는 것으로 나타났는데 이는 ΔG_{UN}^0 의 감소분(~2.4 kcal/mol)의 ~90%에 해당하는 값이었다. 이러한 관찰은 변이가 주로 폴딩 반응의 초기 폴딩 핵이 형성되는 과정인 $U \rightleftharpoons I$ 과정에 영향을 끼쳤다는 점을 나타낸다. 반면에 폴딩 반응의 후반부에 일어나는 $I \rightleftharpoons N$ 과정의 자유에너지인 ΔG_{IN}^0 은 HubWA는 -2.2 kcal/mol이고 V17A는 -1.9 kcal/mol로 차이가 미미하였다.

Fig. 3A, 3C, 3G는 각각 V5A, I13A, I36A의 rate profile이며, Fig. 3B, 3D, 3H는 각각 V5A, I13A, I36A의 요소 농도에 따른 folding/unfolding phase의 진폭(네모)과 평형상태에 도달하였을 때의 형광신호(마름모)를 보여주는 amplitude profile이다. V5A, I13A, I36A의 rate profile은 V-자형으로 나타났으며 이는 two-state 폴딩 반응($U \rightleftharpoons N$)에서 관찰되는 전형적인 양상이다.¹¹ 또한 amplitude profile에서 단 하나의 진폭만 관찰되는 점도 V5A, I13A, I36A의 폴딩 반응이 two-state 임을 지지하는 결과라 할 수 있다. 이러한 관찰과 더불어 기호로 표시된 관찰 값이 실선으로 표시된 two-state 모델에 입각한 계산 값과 잘 일치하는 것으로 보아 V5A, I13A, I36A의 폴딩 반응은 two-state 메커니즘을 만족시킨다고 할 수 있다. Table 3에 V5A, I13A, I36A의 폴딩 반응을 two-state 메커니즘으로 분석한 결과를 정리하였다. V5A, I13A, I36A는 two-state 메커니즘을 따르므로 B_{TS} 만 구할 수 있었고, 세 변이 단백질의 β_{TS} 값은 ~0.78로 HubWA와 V17A의 β_I 값과 β_{TS2} 값의 사이에 있는 것으로 분석되었다. 이러한 결과는 HubWA와 V17A 폴딩 반응의 주 천이상태(TS2)보다는 덜하지만 V5A, I13A, I36A 폴딩 반응의 천이상태도 매우 밀집된 구조라는 것을 의미한다. 또한 V5A, I13A, I36A의 ΔG_{UN}^0 은 HubWA의 ΔG_{UN}^0 보다 ~4.3 kcal/mol 감소한 것으로 관찰되었으며 이 값은 HubWA의 ΔG_{UI}^0 (-4.2 kcal/mol)의 절대값과 거의 같은 값이었다.

고 찰

본 연구에서는 소수성 상호작용이 단백질 폴딩 반응에 끼치는 영향을 탐구하기 위하여 HubWA를 모델 단백질로 삼아 소수성 아미노산이 알라닌으로 변이된 14 개의 변이 단백질을 제조하였다. 제작된 변이 단백질 14 개 중 V5A, I13A, V17A, I36A는 HubWA와 삼차원 입체구조가 같다는 점이 확인되었다. 이들 변이 아미노산 잔기는 근접한 거리(1.8 Å)에 ~3 개의 다른 소수성 아미노산 잔기와 접하고 있어서 변이에 의하여 잃어버리는 소수성 상호작용이 입체구조를 파괴할 만큼 크지는 않은 것으로 여겨졌다(supplementary Fig. 3). 따라서 V5A, I13A, V17A, I36A의 폴딩 과정을 HubWA의 폴딩 과정과 비교하여 소수성 상

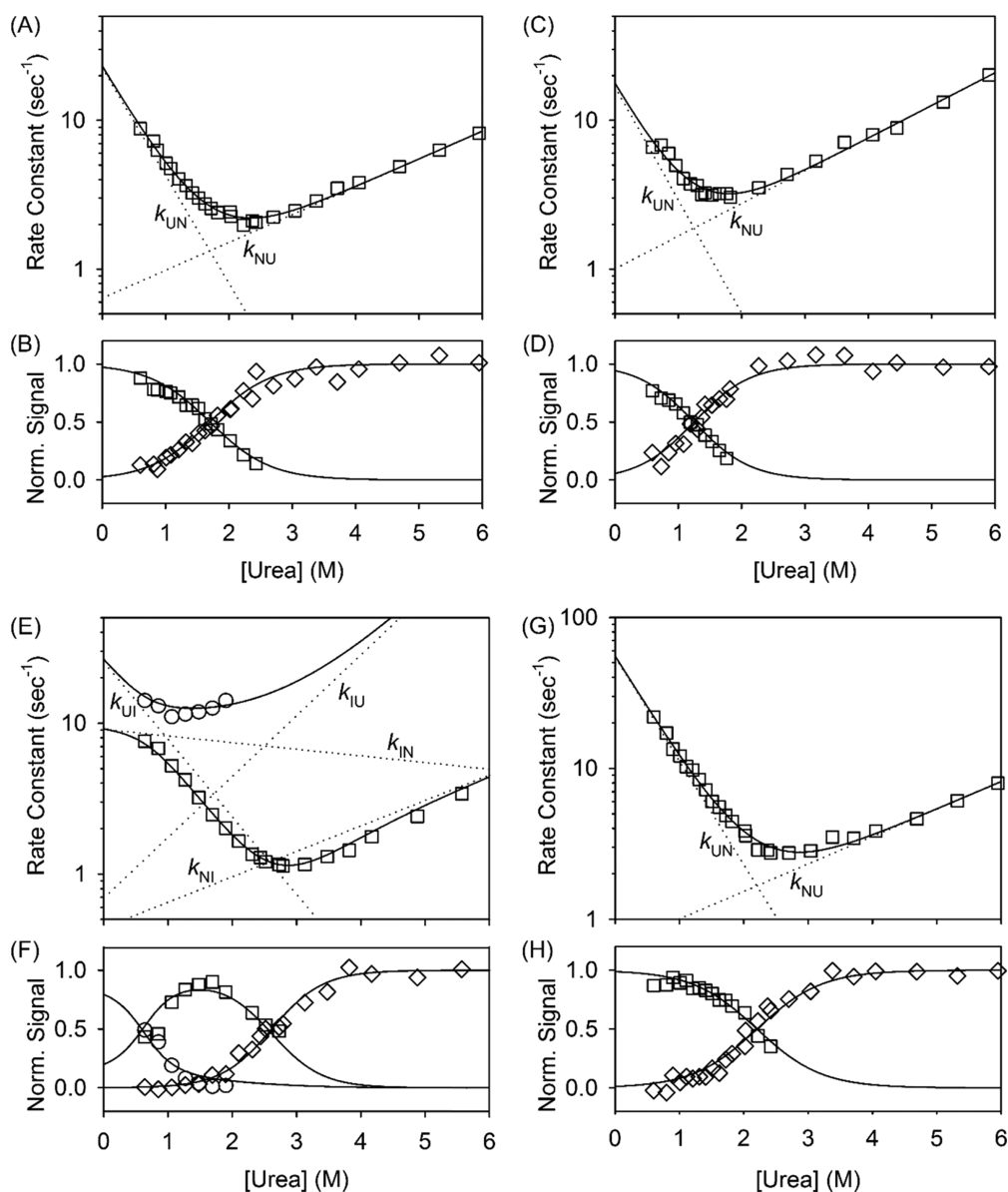


Figure 3. Quantitative analysis of folding kinetics. Panels A, C, E, and G are rate profile of V5A, I13A, V17A, and I36A, respectively, and panels B, D, F, and H are amplitude profile of V5A, I13A, V17A, and I36A, respectively. Squares in panel A, C, and G represent the rate constants of folding phase. Squares in panel B, D, and H represent the normalized amplitudes of the folding phase. Diamonds in panel B, D, and H represent the normalized signals at long time after mixing in stopped-flow device, which are equivalent to the signal at equilibrium. Circles and squares in panel E represent rate constants of the first and the second phase, respectively. Circles and squares in panel F represent the normalized amplitudes of the first and the second phases, respectively. Diamonds in panel F represent the normalized signal at long time after mixing in stopped-flow device. Solid lines in all panels represent the calculated values of rate constants and amplitude signals. Dotted lines in panels A, C, E, and G represent the microstate rate constants.

Table 3. Kinetic parameters of V5A, I13A, and I36A folding reaction

Proteins	k_{UN}^0	m_{UN}^\ddagger	k_{NU}^0	m_{NU}^\ddagger	ΔG_{UN}^0	β_{TS}
V5A	22.6	-0.99	0.64	0.26	-2.1	0.79
I13A	16.8	-1.03	1.00	0.30	-1.7	0.77
I36A	54.9	-0.94	0.66	0.25	-2.6	0.79

Free energies of folding are calculated as $\Delta G_{UN}^0 = -RT \ln(k_{UN}^0/k_{NU}^0)$. β -values are calculated as $\beta_{TS} = -m_{UN}^\ddagger/m_{eq}$, where $m_{eq} = m_{NU}^\ddagger - m_{UN}^\ddagger$. The units for rate constant and free energy are sec^{-1} and kcal/mol , respectively.

호작용이 폴딩 과정에 끼치는 영향을 알아볼 수 있을 것으로 여겨졌다. 반면에 L15A, L43A, L56A, L61A는 대장균에서 불용성 응집체를 형성하여 단백질을 얻을 수 없었고, I3A, I23A, I30A, L50A, L67A, L69A는 HubWA와는 다른 입체 구조를 이루는 것으로 관찰되어 폴딩 반응을 연구하기에 적절치 않았다. 소수성 아미노산 하나를 변이시켰을 때 L15A, L43A, L56A, L61A와 같이 아예 폴딩 반응이 일어나지 않거나 I3A, I23A, I30A, L50A, L67A, L69A와 같이 HubWA와는 다른 입체구조를 이룬다는 것은 소수성 아미노산이 폴딩 과정에 기여하는 바가 매우 크다는 점을 시사한다.

Stopped-flow 장치로 측정한 HubWA와 V17A의 폴딩 kinetics는 확연하게 두 개의 과정이 관찰되어 three-state on-pathway 폴딩 메커니즘($U \rightleftharpoons I \rightleftharpoons N$)으로 분석하였다.⁶ Three-state on-pathway 메커니즘은 폴딩 반응의 초반에 폴딩 핵의 형성과 더불어 삼차원 입체구조의 일부분이 독립적으로 안정된 구조를 이루어 폴딩 과정에서 일시적으로 관찰 가능한 I 상태를 이루며, 그 후에 독립적으로 안정된 부분들이 서로 퍼즐 조각이 맞춰지 듯 상호작용하여 최종 삼차원 입체구조인 N 상태를 이루는 과정인 diffusion-collision 모델로 설명된다.² Three-state on-pathway 폴딩 메커니즘을 보이는 단백질은 $U \rightleftharpoons I$ 과정과 $I \rightleftharpoons N$ 과정을 구분하여 연구할 수 있는 기회를 제공한다. HubWA와 V17A의 폴딩 kinetics 실험 결과를 three-state on-pathway 모델에 입각하여 정량적으로 분석한 결과 소수성 아미노산 변이가 주로 $U \rightleftharpoons I$ 과정에 크게 영향을 미친 반면 $I \rightleftharpoons N$ 과정에는 거의 영향을 미치지 않는 점을 알 수 있었다. Table 2의 상수를 이용하여 구한 반응 좌표(Fig. 4)에서 보이듯이 주 천이 상태(TS2)의 에너지 장벽의 높이는 변화가 없고, N 상태는 I 상태가 불안정해진 정도만큼 불안정해진 것으로 나타났다. 이러한 관찰은 HubWA의 폴딩 반응이 소수성 상호작용이 HubWA 단백질 폴딩 반응의 초기 단계에 크게 영향을 끼친다는 것을 의미한다.

V5A, I13A, I36A 변이 단백질의 폴딩 반응은 전형적인 two-state 메커니즘으로 관찰되었다. Table 2는 이들 변이 단백질의 폴딩 반응을 two-state 메커니즘으로 분석한 결과를 보여준다. Table 2에서 보듯이 이들 변이 단백질의 β_{TS} 값은 서로 매우 유사한 값(~ 0.78)으로 관찰되었다. 이는 이들 세 변이 단백질이 완전히 풀어진 상태에서 서로 매우 유사한 형태의 천이상태를 거쳐서 고유한 삼차원 입체구조를 이룬다는 것을 시사한다. 이들 세 단백질의 구조적인 안정성(ΔG_{UN}°)은 HubWA의 그것보다 약 ~ 4.3 kcal/mol 정도 감소한 것으로 나타났다. 이 값은 HubWA의 ΔG_{UN}° 의 절대값인 4.2 kcal/mol과 유사하였다. V17A의 폴딩 반응에서처럼 이들 변이 단백질에서도 변이의 영향이

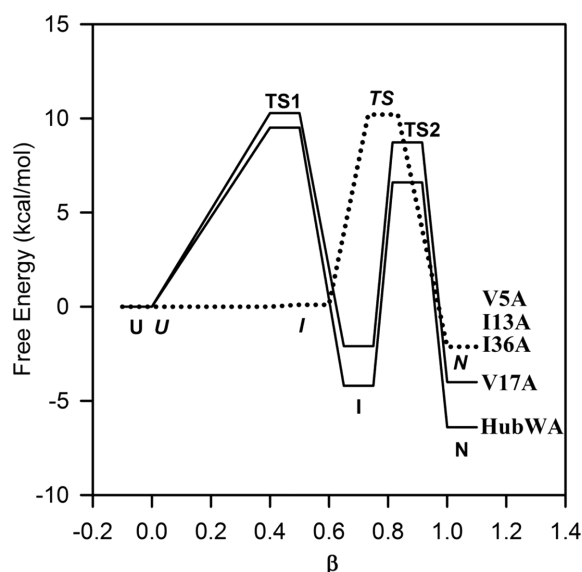


Figure 4. Free energy diagram illustrating the effect of hydrophobic residue to alanine mutation on the relative free energies of U, I and N states. Activation energies, $E_a = -RT \ln(k_{ij}^{\circ}/A_0)$, were calculated from the microstate rate constants, k° , in Table 1 and 2. Pre-exponential factor A_0 was used previously assumed value of 10^9 sec^{-1} .⁵ β -value was used as x-axis to designate the progress of reaction. Solid lines illustrate the free energy diagram for HubWA and V17A. Dotted line denotes the reaction progress of V5A, I13A, and I36A. States in the reaction progress for V5A, I13A, and I36A are written in italics. I state of V5A, I13A, and I36A is illustrated to have similar energy level as U state.

주로 $U \rightleftharpoons I$ 과정에서만 일어난다면 이들 세 변이 단백질의 U 상태와 I 상태의 에너지 준위가 거의 같을 것으로 생각할 수 있으며, 이들 변이 단백질의 폴딩 반응이 하나의 천이 상태만 보이는 two-state 메커니즘으로 관찰된 점이 이러한 해석을 지지한다고 여겨진다(Fig. 4 점선). 즉 V5A, I13A, I36A의 폴딩 반응은 반응의 초반에 U 상태보다 에너지 준위가 낮은 독립적으로 안정된 구조를 지닌 I 상태가 나타나지는 않지만 폴딩 반응의 초기에 고유한 삼차원 입체구조로 이끌 수 있는 폴딩 핵이 형성되고 이러한 폴딩 핵 주위로 native interaction이 축조되는 과정이 짝 지워져 일어나는 nucleation-condensation 모델을 따른다는 점을 시사한다.² Fig. 4에서 보듯이 V5A, I13A, I36A의 폴딩 천이상태의 β_{TS} 값(~ 0.78)이 HubWA와 V17A의 주된 천이상태의 β_{TS2} 값(~ 0.86)보다 작은 것은 폴딩 반응이 diffusion-collision 모델에서 nucleation-condensation 모델로 전환될 때 나타나는 전형적인 양상이라는 Gianni et al.의 해석과 일치한다.²

불용성 응집체를 형성하는 변이 단백질인 L15A, L43A, L56A, L61A에서 변이가 도입된 아미노산은 유비퀴틴의 삼차원 입체구조⁹에서 소수성 코어(hydrophobic core)에

위치하며 1.8 Å 거리에 다른 소수성 아미노산 ~6개와 상호작용을 하는 것이었다. 이들 변이 단백질의 경우 변이에 의하여 고유한 입체구조에 존재하는 소수성 상호작용이 매우 심하게 감소하고 따라서 안정한 폴딩 핵의 형성이 현저히 감소하여 고유한 구조로의 폴딩 반응이 진행되지 않은 것으로 여겨졌다. Fig. 1B에서 보여진 HubWA와는 다른 입체구조를 이루는 것으로 관찰된 변이 단백질(I3A, I23A, I30A, L50A, L67A, L69A)에서도 변이가 도입된 아미노산은 1.8 Å 거리에 ~5개 정도의 다른 소수성 아미노산과 접촉하고 있었다. 이들 변이 단백질들도 소수성 상호작용이 상당히 감소하여 폴딩 정보가 상당히 손상되었을 것으로 여겨진다. 즉 L15A, L43A, L56A, L61A의 경우 폴딩 핵의 형성이 일어나지 않아 폴딩 반응이 일어나지 못한 경우라면, I3A, I23A, I30A, L50A, L67A, L69A의 경우는 변이에 의하여 폴딩 핵의 형성 양상이 HubWA와 달라서 최종적으로 다른 구조에 다다른 것으로 여겨졌다. 이러한 결과는 특정 위치의 소수성 아미노산이 폴딩 반응의 초기에 폴딩 반응을 이끌어가는데 중요한 역할을 한다는 점을 시사한다. HubWA의 경우 매우 안정된 폴딩 핵을 이룰 수 있어서 폴딩 반응의 초기에 여러 부분적인 구조를 가진 중간상태가 형성되고 이후 부분적인 구조물이 퍼즐 조각이 맞춰지듯 고유한 입체구조를 형성해 가는 diffusion-collision 기제에 따라 폴딩 반응이 진행되며, 소수성 상호작용을 약간 감소시킨(약 ~2 kcal/mol 약화) V17A의 경우 중간 단계의 안정성은 감소하였지만 여전히 부분적인 구조물이 형성되고 이들이 퍼즐 조각을 맞추듯 고유한 입체구조를 형성해 가는 diffusion-collision 기제로 폴딩이 일어나는 것으로 생각할 수 있다. 반면에 V5A, I13A, I36A의 경우 소수성 상호작용의 약화(~4 kcal/mol 약화)에 의하여 부분적인 구조물이 형성되지는 않지만 폴딩 핵 주위로 고유한 구조가 축조되는 과정이 짝지어져서 일어나는 nucleation-condensation 기제로 폴딩 과정이 전환된 경우로 볼 수 있다. 이들 변이 단백질 제외한 그 외 변이 단백질의 경우 변이에 의하여 소수성 상호작용이 심하게 약화되고 폴딩 정보 또한 왜곡되어 약간 다른 구조를 형성하거나 아예 폴딩이 일어나지 않은 것으로 여겨진다.

단백질의 입체구조를 안정시키는 비공유결합 중 소수성 상호작용은 주로 엔트로피가 관여하는(entropy-driven)

비공유결합으로 단백질 삼차원 입체구조의 안정성에 기여하는 점은 잘 알려져 있지만, 폴딩 과정에는 어떻게 기여하는지 잘 알려져 있지 않았다. 특히 소수성 상호작용은 수소결합이나 정전기적 상호작용같이 명백한 공여자와 수여자가 존재하지 않아서 구조적인 특이성을 나타내는 것은 어려운 것으로 여겨졌다. 소수성이 강한 아미노산을 알라닌으로 치환한 변이 단백질을 이용한 본 연구는 소수성 상호작용이 폴딩 반응 초기 소수성 붕괴 과정에서 구조적인 특이성을 보이는 폴딩 핵을 형성하는데 상당한 기여를 하고 있음을 보여준다.

Acknowledgments. Publication cost of this paper was supported by the Korean Chemical Society.

Supporting Information. 추가적인 보완 정보를 이 논문의 온라인 판에 첨부하였다.

REFERENCES

1. Anfinsen, C. B. *Science* **1973**, *181*, 223.
2. Gianni, S.; Guydosh, N. R.; Khan, F.; Caldas, T. D.; Mayer, U.; White, G. W. N.; DeMarco, M. L.; Daggett, V.; Fersht, A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 13281.
3. Udgaonkar, J. B. *Arch. Biochem. Biophys.* **2013**, *531*, 24.
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. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2010**, *31*, 2877.
7. Park, S.-H. *J. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *37*, 676.
8. Vijay-Kumar, S.; Bugg, C. E.; Cook, W. J. *J. Mol. Biol.* **1987**, *194*, 531.
9. Brocklehurst, S. M.; Perham, R. N. *Protein Science* **1993**, *2*, 626.
10. Tanford, C. *Adv. Protein Chem.* **1970**, *24*, 1.
11. Matthews, C. R. *Methods Enzymol.* **1987**, *154*, 498.
12. Chen, B. L.; Baase, W. A.; Schellman, J. A. *Biochemistry* **1989**, *28*, 691.
13. Matouschek, A.; Kellis, J. T., Jr.; Serrano, L.; Fersht, A. R. *Nature* **1989**, *340*, 122.
14. Tanford, C. *Adv. Protein Chem.* **1968**, *23*, 121