

Suppression of a Residue 173 Mutant Form on Aggregation of Tryptophan Synthase α -Subunits from *Escherichia coli*

Jae Kap Jeong, Hoo Hwi Park and Woon Ki Lim*

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received August 26, 2022 /Revised August 30, 2022 /Accepted August 31, 2022

Aggregation of normally soluble proteins can cause disease-related problems. Tryptophan synthase α -subunit (α TS) in *E. coli* adopts one of most popular structural scaffolds, the TIM barrel fold. Previous mutagenesis of the α TS gene resulted in many aggregation-prone mutant proteins. Here, Y173F (Tyr at residue 173 to Phe) substitution, which imparts increased stability, was tested for its ability to suppress aggregation of aggregation-prone mutant proteins (Y4C, S33L, P28L, P28S, G44S, D46N, P96L, and P96S). Aggregation was suppressed in all eight severe aggregate-forming mutants (all differing in their mutation positions), by the Y173F replacement. P28L α TS, which was available in pure form, was further analyzed and showed reduced secondary structure content, lower stability, and a looser structure with more exposed hydrophobic surface compared to the wild type protein. A double mutant P28L/Y173F protein showed almost no indication of these changes compared to the wild type protein. We hypothesized that Tyr at position 173 in α TS is positioned at the hydrophobic core and may serve to suppress the aggregation of this protein caused by other residues. Important residue (s) could be working widely in the prevention/suppression of protein aggregation.

Key words : Protein aggregate, protein folding, stability, suppression, tryptophan synthase

서 론

수용성 단백질이 비정상적인 불용성 응집(aggregate)으로 전환되면 생물에서나 바이오산업 분야에서 여러 문제를 야기한다[3, 4] 단백질 응집은 단백질의 불안정한 3차 구조나 3차구조 형성과정(folding)이 관여하는 것으로 보이나 일반화된 이론은 아직 미흡하다[7]. 대장균 트립토판 중합효소 α 소단위체(α TS)는 가장 흔한 구조의 하나인 TIM 배럴 구조를 가지고 있다. 대장균에서 유전공학적 방법으 과량 수용성인 상태로 발현되나, 많은 응집 형성 돌연변이가 알려져 있다. 이전의 연구에서 Y173F 잔기 치환 α TS이 단백질의 안정성과 도메인 협동성을 매우 높여 주었음으로[4, 5], 여기서는 이러한 성질이 여러 자리의 돌연변이에 의해 유발된 응집 형성을 억제할 수 있는 지 살펴보고자 했다.

재료 및 방법

시약, 박테리아 균주 및 플라스미드, 클로닝

모든 시약은 Sigma Chemical Co (MO, USA), New England BioLab (MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 대장균 균주 RB797와 플라스미드 *ptactrPA*는 단백질의 대량발현 과정에 사용하였다[8]. 잔기 173자리에 Phe 코돈을 갖는 *trpA* BssHII-SalI 절편을 응집을 일으키는 돌연변이 코돈을 포함하는 *ptactrPA* 플라스미드의 해당부위와 교체 하였다[8].

단백질의 발현 및 분리

야생형 및 잔기치환 단백질들을 대량 발현시키고 분리한 방법은 이미 보고된 방법을 따랐다[9]. 단백질을 5% 당으로 발현 유도한 후, 세포를 파쇄한 후 원심분리기로 용해층과 침전층으로 구분한 후 SDS-PAGE을 시행하였다. 응집된 P28L로부터의 단백질 분리는 6 M 요소를 첨가한 후 4°C에서 1시간 용해시켜 변성시킨 후, 원심분리시켜 상층액을 5 mM EDTA, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl-fluoride (PMSF), and 10 mM β -mercaptoethanol (β -ME)이 포함된 10 mM KPO₄ (pH 7.8) 용액에 투석하여 재변성시켰다. 그 뒤 황산암모늄((NH₄)₂SO₄) 침전법과 이온크로마토그래피 HPLC로 분리하였다[8]. 정제된 단백질의 순도는 SDS-PAGE로 확인하였다. 순수 정제된 야생형의 α 소

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2289, Fax : +82-51-513-9258

E-mail : wklm@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

단위체의 농도는 $E^{1\%}_{278nm} = 4.4$ 를 사용하여 결정하였다.

단백질 구조 풀림 평형(equilibrium unfolding) 연구

구조풀림 평형실험은 0.2 mM EDTA, 1 mM β -ME, 10 mM KPO_4 용액(pH 7.8)에 있는 단백질(0.15-0.2 mg/ml)에 요소(urea)를 첨가한 후 25°C에서 12시간 평형시킨 후 측정했다. 형광은 275 nm 흥분광선으로 303 nm에서 형광광도분도계 F-4500 (Shimadzu, Japan)로 측정했다. 원편광이색성(CD, circular dichroism)은 260~205 nm에서 0.5 mm cell을 사용하여 J-715 원편광이색성 분광계(spectropolarimeter) (JASCO, Japan)로 측정하였다. 데이터 분석은 기술된 논문에 따라 처리했다[1, 6].

ANS (1-anilino-8-naphthalenesulfonate) 결합 및 트립신 처리

메탄올에 녹인 ANS의 농도는 370 nm에서의 흡광도(몰 흡광계수 $6800 M^{-1}cm^{-1}$)로 측정했다. 단백질에 12시간 요소를 첨가한 후 단백질 물수의 50배 ANS를 첨가하여 2시간 후에 측정하였다. ANS는 370 nm 흥분광선으로 490 nm 형광을 측정하였다. 트립신 처리는 단백질을 상온에서 10 μ g 트립신을 넣고 30분 후 Shodex (Japan) KW-804 칼럼을 사용한 HPLC로(0.5 ml/min) 280 nm에서 측정하였다.

결 과

여러가지 단일 잔기치환 트립토판 중합효소 α 소단위체 (α TS) 응집에 억제효과를 보이는 Y173F 치환

이전의 연구에서 Y4C (41번 Tyr이 Cys로 치환), P28L, P28S, S33L, G44S, D46N, P96L, P96S은 심한 응집 성질을 보여주었다[8]. 이들 치환체에 미치는 영향을 보기 위해 이들 치환체에 Y173F가 추가된 이중 치환체를 만들었고, 대장균에서 발현시켜 용해형과 응집형의 양을 SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 1). 8가지 모두에서 Y173F의 추가 치환으로 응집형에서 용해형으로 발현 패턴이 바뀌었다. Y173F 치환이 응집을 억제하는 것을 알 수 있다.

α TS의 발현 및 정제

응집 단백질들의 분리정제는 요소 또는 KSCN를 첨가하여 용해한 후 구조 재접힘이 일어난 후 정제한다[8, 9]. 단일 치환체 중 P28L치환체를 제외한 다른 치환 단백질로부터는 충분한 양을 얻을 수 없었다. 따라서 P28L를 대상으로 상세한 연구를 진행하였다.

α TS의 이차구조

극자외선 원편형이색성(far UV CD)를 사용하여 α 나선 구조, β 병풍구조, 무질서구조(random coil) 등의 이차구조 함량을 측정하였다(Fig. 2). 야생형(WT)은 222 nm에서 최

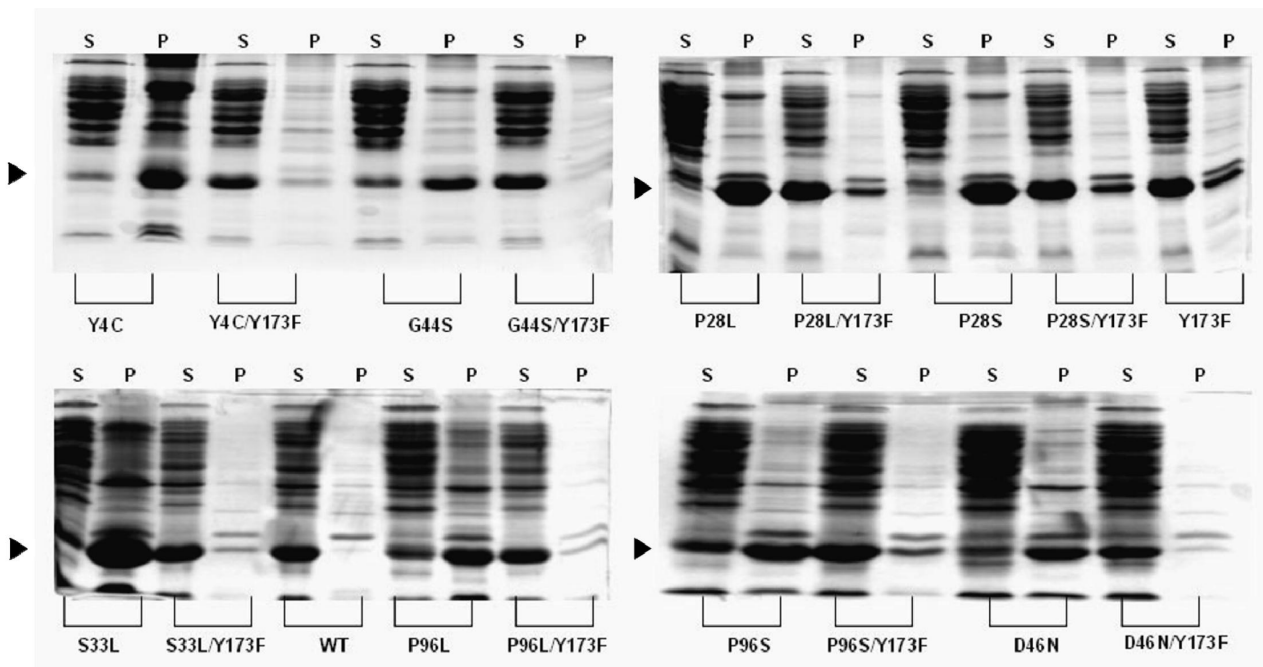


Fig. 1. Suppression of aggregate formation of various mutant α TSs in *E. coli* by Y173F substitution. Tryptophan synthase α -subunits (α TSs, arrow heads) were overexpressed from *E. coli* containing recombinant plasmids as described in “Materials and Methods”. Cells were lysed by sonication and pelleted by centrifugation. Pellets (P) and soluble supernatants (S) were separated on 12% SDS-PAGE.

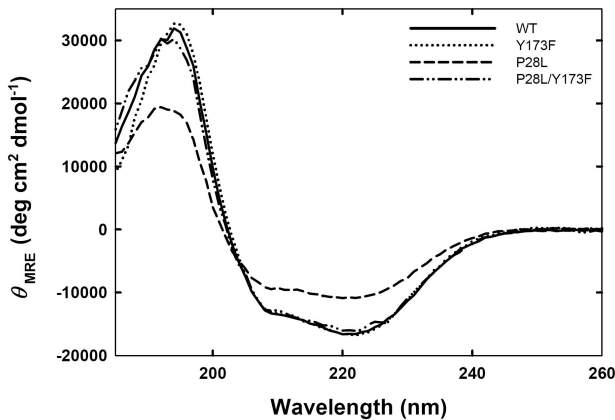


Fig. 2. Far UV-CD spectra of wild type (WT), P28L, Y173F, and P28L/Y173F mutant proteins. Proteins were equilibrated for 4 hr in 10 mM KPO₄ (pH 7.8), 0.2 mM EDTA, and 1 mM β-mercaptoethanol. The CD spectra were measured from 260 to 180 nm at averaging time of 1 s using a 0.05 cm pathlength cell. The CD signal was converted to MRE.

저치, 208 nm 근처에서 굴곡, 195 nm 근처에서 최대치를 보여주는 데, 이는 α/β motif 단백질의 특징이다. P28L은 비슷한 패턴을 보여주는 데 전반적인 타원도(ellipticity)가 30%정도 감소되었다. 이는 구조의 전반적인 변화를 나타낸다. 반면 P28L/Y173F는 패턴과 세기에 있어 야생형과 비슷한 양상을 보여주는 데 이는 이 단백질의 구조가 야생형과 비슷하게 회복되었음을 나타낸다.

αTS의 요소 유도 구조풀림(urea-induced equilibrium unfolding)

단백질의 안정도를 요소 변성 평형실험으로 조사하였다. 단백질 변성제인 요소를 여러 농도에서 첨가한 후 단백질의 구조를 형광과 CD로 측정하였다(Fig. 3). 얻어진 데이터는 자연구조체(N), 풀린구조체(U), 중간구조체(I)의 3상 모델에 잘 들어맞았다. 야생형(실선)은 2 M 요소에서 구조가 풀리기 시작해서 5 M 근처에서 모두 풀린 구조로 전환되었다. P28L (검은 원)는 안정도가 많이 감소한데 비해 P28L/Y173F (빈 원)는 야생형과 비슷하게 회복되었다.

ANS (1-anilino-8-naphthalenesulfonate) 결합

ANS는 단백질의 소수성표면에 결합할 때 형광의 청색 이동과 청색 세기 증가가 일어난다. P28L 단백질은 0~2 M 요소에서 야생형에 비해 25%정도 형광세기가 증가하였는데, 이 단백질의 자연구조체가 소수성 표면이 증가되어 ANS가 더 많이 결합되었음을 나타낸다. 한편 P28L/Y173F는 그 성질이 야생형으로 회복되었다(Fig. 4). 이는 소수성표면이 증가한 P28L 자연구조체가 P28L/Y173F에

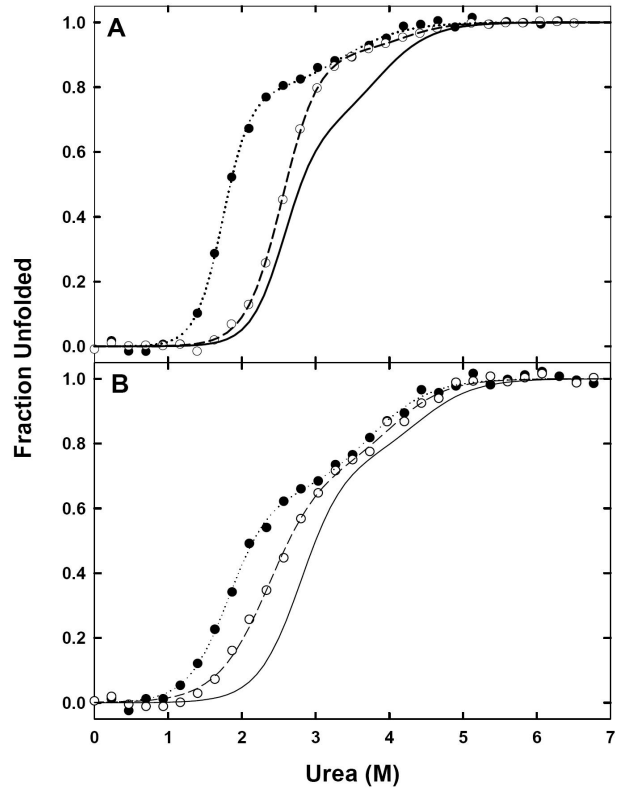


Fig. 3. Urea-induced equilibrium unfolding curves of αTSs. The urea-induced equilibrium unfolding was measured by fluorescence (A) and by CD spectrophotometers (B). The wild type (solid line), P28L (closed circle, dot), and P28L/Y173F (open circle, dashed line) αTSs (0.15 mg/ml) in 10 mM KPO₄ (pH 7.8), 0.2 mM EDTA, and 1 mM β-mercaptoethanol were incubated at 25 °C for 12 hr in the absence or presence of indicated concentration of urea. Fluorescence was measured at 303 nm with excitation at 275 nm and CD was monitored at 222 nm. The observed fluorescence changes were converted to F_{app}, apparent fraction of unfolding. The curves were fitted to three-state model.

서 야생형 상태로 되돌아갔음을 시사한다.

단백질의 트립신에 대한 민감도

αTS를 트립신으로 약하게 처리하면 188과189번 자리가 잘려 1-188(α-1 절편), 189-268(α-2 절편)로 잘려진다[6]. 이후 추가적으로 70과71번 자리가 잘려 1-70, 71-188, 189-268으로 세 토막 나는 등 분해가 더 진행된다. 구조차이를 살피기 위해 트립신을 처리하고 크기배제 크로마토그래피 HPLC로 분석하였다(Fig. 5). 15분 처리시 P28L은 많은 단백질이 잘려 작은 절편으로 전환된 데 비해, P28L/Y173F는 거의 변화가 없음을 보여주고 있다. 이는 P28L은 188/189, 70/71 부분의 구조가 불안정해졌으며, P28L/Y173F는 안정한 상태로 되돌아갔음을 나타낸다.

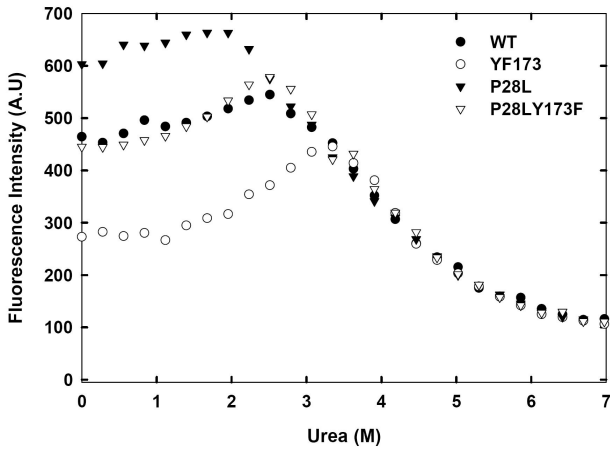


Fig. 4. ANS binding fluorescence of α TSs. The proteins were pre-equilibrated for 12 hr in the presence of urea and then incubated for 2 hr with the addition of 50-fold molar excess of ANS. ANS binding fluorescence was monitored at 490 nm with an excitation at 370 nm.

고찰

본 연구에서는 대장균 트립토판 중합효소 α 소단위체 (α TS)에서 Y173F 치환이 다양한 단백질 돌연변이체의 응집을 억제하고 있음을 보여주고 있다. 감소된 이차구조함량과 소수성 표면의 증대가 응집된 단백질의 특징으로 보고된 바 있다[2]. P28L α TS도 이와 비슷한 성질을 보여준다. 규명된 야생형과 P28L/Y173F 치환 α TS의 X-ray 분자구조를 살펴보면 Pro²⁸는 첫번째 α 나선과 첫번째 β 병풍구조 사이의 연결 루프에 위치하며 TIM 배럴의 전반적인 구조유지에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다[5]. 이 자리 Pro이 Leu으로 치환되면 이 잔기 주위의 부분 구조에 변화가 초래되고, 이것이 본 연구에서 관찰된 소수성 표면 증대를 포함한 전반적인 구조 변화로 연결된 듯 하다. Tyr¹⁷³은 두 개 도메인 사이에 소수성코어를 차지하는 6번째 β 병풍구조에 위치한다. 이 자리의 Tyr이 Phe으로 치환되면서 소수성코어를 더 강화된 것으로 보인다. 한편 속도가 늦어진 폴딩 과정은 분자간 응집 가능성을 높일 수 있다[2]. N도메인에 위치한 Pro²⁸와 Tyr¹⁷³ 잔기는 C 도메인과 상호작용하는 자리에 있으므로 도메인 간의 폴딩과정에도 영향을 미치리라 추정된다. 본 연구에서는 소수성 코어에 위치하는 Tyr¹⁷³ 잔기가 응집을 유도하는 여러 다른 잔기 자리를 억제할 수 있음을 보여주었다. 이와 같이 단백질에는 단백질 응집을 보다 광범위하게 억제하는 잔기가 있을 가능성이 있다.

감사의 글

이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하

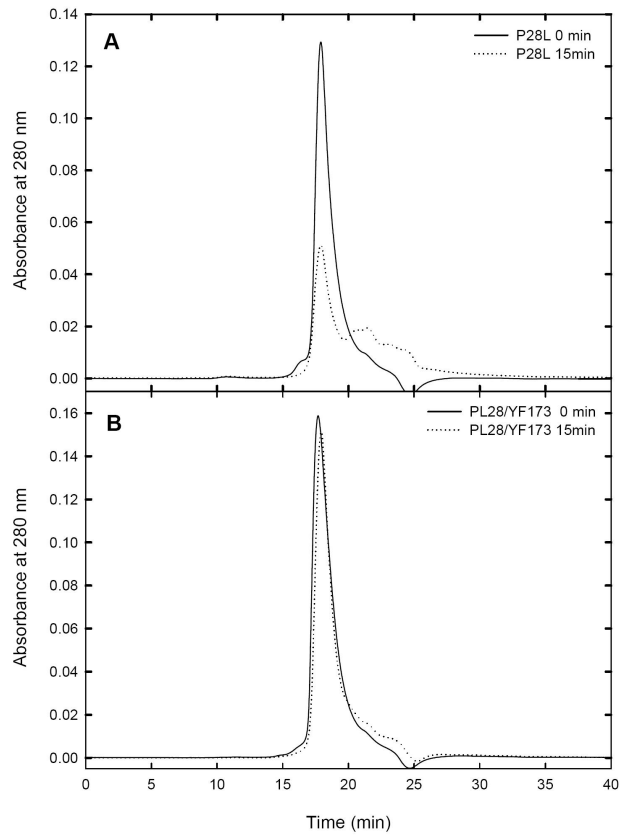


Fig. 5. Size-exclusion chromatography of trypsin-treated P28L and P28L/Y173F α TSs. P28L (A) and P28L/Y173F α TSs (B) at 1 mg/ml were treated with 10 μ g of trypsin for 15 min at room temp. α TSs without (solid lines) and with the treatment (dashed lines) were eluted at 0.5 ml/min through a size-exclusion HPLC, with monitoring absorbance at 280 nm.

여 연구되었음.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Beasty, A. M., Hurle, M. R., Manz, J. T., Stackhouse, T., Onuffer, J. J. and Matthews, C. R. 1986. Multiple replacements at position 211 in the α subunit of tryptophan synthase as a probe of the folding unit association reactions. *Biochemistry* **25**, 2965-2974.
2. Chiti, F., Taddei, N., Baroni, F., Capanni, C., Stefani, M., Ramponi, G. and Dobson, C. M. 2002. Kinetic partitioning of protein folding and aggregation. *Nat. Struct. Biol.* **9**, 137-143.
3. Goedert, M., Spillantini, M. G. and Davies, S. W. 1998.

- Filamentous nerve cell inclusions in neurodegenerative diseases. *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**, 619-632.
4. Hartl, R. U. 2017. Protein Misfolding diseases. *Ann. Rev. Biochem.* **86**, 21-26.
 5. Jeong, M. S., Jeong, J. K., Lim, W. K. and Jang, S. B. 2004. Structure of wild-type and P28L/Y173F tryptophan synthase α -subunits from *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **323**, 1257-1264.
 6. Jeong, J. K., Shin, H. J., Kim, J. W., Lee, C. H., Kim, H. D. and Lim, W. K. 2003. Fluorescence and folding properties of Tyr mutant tryptophan synthase α subunits from *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **300**, 29-35.
 7. Kim, P. S. and Baldwin, R. L. 1990. Intermediates in the folding reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 631-660.
 8. Lim, W. K., Shin, H. J., Milton, D. L. and Hardman, J. K. 1991. Relative activities and stabilities of mutant *E. coli* tryptophan synthase α subunits. *J. Bacteriol.* **173**, 1886-1893.
 9. Lim, W. K., Smith-Somerville, H. E. and Hardman, J. K. 1989. Solubilization and renaturation of overexpressed aggregates of mutant tryptophan synthase α subunits. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1106-1111.

초록 : 대장균 트립토판 중합효소 α 소단위체의 응집 형성에 미치는 잔기 173 치환체의 억제 효과

정재갑 · 박후휘 · 임운기*

(부산대학교 자연과학대학 분자생물학과)

수용성 단백질이 비정상적인 불용성 응집(aggregate)으로 전환되면 질환 등 여러 문제를 야기된다. 대장균 트립토판 중합효소 α 소단위체(α TS)는 가장 흔한 구조의 하나인 TIM 배럴 구조를 가지고 있다. 이전의 연구에서 불용성 응집이 일어나는 여러 잔기치환체(Y4C, S33L, P28L, P28S, G44S, D46N, P96L, P96S)를 얻었다. 본 연구에서는 높은 안정성과 도메인 협동성 성질을 보여주는 Y173F가 다른 잔기자리에 치환으로 유도된 응집 형성을 억제할 수 있는 지 여부를 조사했다. 8개 모두에서 억제효과를 보여 주었다. 단백질 분리가 가능한 P28L α TS를 분석한 결과, 이차구조함량의 감소, 안정성 감소, 소수성표면 증가 등의 구조변화특성을 보여주었다. Y173F가 첨가된 P28L/Y173F α TS는 야생형과 비슷한 구조로 회복되었다. 본 연구는 소수성 코아에 위치하는 Tyr¹⁷³ 잔기처럼 응집을 유도하는 여러 다른 잔기 자리를 보편적으로 억제하는 잔기가 존재할 수 있음을 시사해 준다.