

Isotope Exchange로 본 단백질의 Folding

김기선

한국과학기술연구원 생체구조연구센터

1. 서론

단백질이 어떻게 polypeptide로부터 folding 되는가 하는 것은 과학적인 수준을 넘어 철학적인 의문으로 까지 제기되고 있다. 이러한 양상은 단백질의 folding 이 눈으로 볼 수 없는 짧은 순간에 이루어지기 때문에 각자가 생각하고 있는 단백질의 folding mechanism이 다르기 때문에 오는 현상이라고 생각된다. 현재, 이 시간의 벽을 넘어서기 위한 노력이 배가되고 있으나 아직 단백질 folding 초기단계를 규명하는 데는 크게 못 미치고 있는 상황이다. 전통적으로 단백질 folding 은 기술적인 어려움 때문에 folding 측면에서보다는 reversible unfolding 실험으로부터 정보를 얻어왔다. 이러한 실험은 단백질을 특정 환경에 두어 평형이 이루어 졌을 때 변화된 단백질의 특성을 분석하여 열역학적 측면에서 두 상태, 즉 단백질의 folded state와 unfolded state 만이 존재함을 가정하고 이들의 비율로부터 열역학적 수치를 얻어내는 방법이다. 이는 단백질 folding process의 구조적 정보를 주지는 못하나 단백질 고유의 정적구조 (static structure)와 열역학적 관계를 규명하는데는 큰 공헌을 하였다. 특히 열 함량 (heat capacity)을 통한 소수성과 친수성 표면 (surface area)의 노출 정도의 정량적 분석은 많은 정보를 주고 있다(1). 다른 방법으로는 단백질을 unfolded state로부터 folded state로 folding을 유도하고 특정신호 (fluorescence, ellipticity, exchangeable protons etc.)의 변화를 구조적 측면에서 분석하는 방법이다. 현재, 단백질 folding 시작 후 1 ms정도의 정보를 얻을 수 있으나 측정할 수 있는 신호의 분포가 고르지 못하거나 (fluorescence, ellipticity) 짧은 시간에 측정할 수 없는 분석적 결함 (exchangeable protons) 때문에 얻을 수 있는 정보는 한정되어 있다. 특히, 중요한 단백질 folding process는 짧은 시간에 이루어지며 단백질 분자와

이를 둘러싸고 있는 용매 (solvent)와의 상호작용 (intermolecular interactions)은 아주 짧은 시간에 일어나고 단백질의 folding에 가장 중요한 단계라고 생각된다(2). 이는 특히 hydrophobic interaction이라는 현상으로 알려져 있으며 아직 분석적으로 이의 정확한 정의는 되어있지 않은 상태이다. 단백질 folding의 기작을 밝히기 위해 시간의 벽을 넘고 물리적으로 해석이 가능한 다른 방법을 찾고 있으나 아직 미흡한 상태이다.

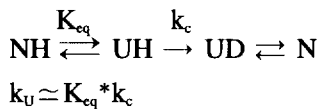
단백질은 생리적 환경에서 동적인 상태로 존재하는데, 항상 이를 둘러싼 용매와 상호작용을 하며 또한 folding과 unfolding을 가역적으로 반복하고 있다. 이러한 단백질의 특성을 이용하면 용매와의 상호작용 (intermolecular interaction)의 연구 및 단백질 folding 연구에 큰 도움이 될 것이다.

2. 단백질의 동적 성질과 isotope exchange

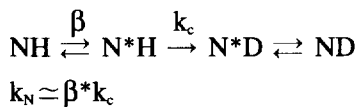
단백질은 열역학적으로 두 상태, 즉 folded state와 unfolded state로 존재하는데 이들의 존재비율은 단백질 분자를 둘러싼 micro-environment에 따른다. 이런 열역학적인 해석은 일정 환경에서 두 상태의 단백질들이 공존하며 folding과 unfolding을 반복하고 있다고 볼 수 있다. Folding-unfolding exchange는 단백질 분자 전체의 micro-environment 변화를 의미하며 이는 이론적으로 분자를 구성하고 있는 모든 amino acids의 micro-environment가 동시에 변화한다고 할 수 있다. 이러한 global flexibility는 단백질의 기능과는 큰 관계가 없는 아주 느린 과정이다. 실제로 단백질의 기능 즉, 효소의 반응 또는 신호전달인자와 수용체의 결합 등에서 이루어지는 단백질의 구조적 변화 (conformational change)는 보다 빠른 시간에 일어나는 동적 성질의 결과이다(3). 이 두 형태의 동적 성질을

관찰할 수 있으며 구조적인 해석이 가능한 방법으로 isotope exchange를 들 수 있다. Isotope exchange는 치환될 수 있는 원자를 가진 분자를 isotope로 치환된 용매에 녹임으로써 isotope와 치환되는 속도를 측정하는 방법이다. 단백질에는 exchangeable protons (peptide amide protons)가 고루 분포되어 있어 단백질을 중수(deuterium oxide)나 삼중수(tritium oxide)에 넣고 단백질에 있는 proton이 줄어드는 속도를 liquid scintillation counter(4), UV spectrophotometer(5), mass spectrometer(6)나 NMR spectrometer(7)등을 이용하여 측정한다. 현재는 NMR이 주로 쓰이고 있으며 이 결과는 구조적으로 해석이 가능하다. Isotope exchange는 두 가지 형태로 일어나게 되는데 아래 도표와 같이 unfolded state exchange와 folded state exchange로 나눌 수 있다(8).

Unfolded state exchange:



Folded state exchange:



N : folded state U: unfolded state

N* : exchangeable folded state

H : proton, D: deuterium

k_U : unfolded state exchange rate constant

k_N : folded state exchange rate constant

K_{eq} : folding-unfolding equilibrium constant

k_c : chemical exchange rate constant (다른 구조적인 shielding이 없을 때의 exchange rate constant)

β : probability factor that a proton is exposed to water and catalyst

Unfolded state exchange는 단백질의 unfolding이 선행된 후 일어나며 protein stability와 밀접한 관계를 가지고 있다. Folded state exchange는 전체적인 단백질의 fold는 유지하면서 일부 exchangeable protons가 용매에 노출되어 치환되는 것으로 protein의 breathing현상과 밀접한 관계를 가지고 있으나 큰 물분자가 단백질 내에 침투하는지, 침투한다면 어떻게 가능한지에 대해 생화학 뉴스

해서는 논란이 계속되고 있다. 그러나 확실한 것은 exchange rate의 차이가 exchangeable proton주위의 local structure에 대한 정보를 준다는 것이다. 즉, packing이 잘되어 있는 부위에 있는 protons는 용매에 노출이 적어 낮은 exchange rates를 갖는다. Unfolded state exchange와 folded state exchange가 동시에 일어나며 측정할 수 있는 exchange rates는 두 상태의 exchange rates의 합이다. 그러나 exchangeable protons주위의 local structure에 따라 어느 한 mechanism이 주를 이루게 된다. 어떤 부위에 있는 exchangeable protons는 단백질의 unfolding이 선행되어야 만이 치환이 일어나며 어떤 부위의 exchangeable protons는 folding이 되어 있는 상태에서 이루어진다. 이는 단백질을 크게 두 부위로 나눌 수 있음을 암시하며 단백질의 folding에 중요한 정보를 제공한다. 만약, 단백질이 불안정해지면 상대적으로 unfolded state exchange가 주를 이루게되며 안정한 경우 folded state exchange가 주를 이루게된다. 단백질의 일반적인 구조와 기능을 유지하면서 안정도를 변화시킬 경우, unfolding에 의하여 치환이 일어나는 부위인 core의 exchange rate는 크게 변하는 반면 그 외의 부분은 변화가 없음을 관찰하였다. 이는 단백질의 안정도는 core의 rigidity에 비례함을 보여주며 단백질의 기능과 관련된 부위는 folded state exchange가 일어나는 동적인 부위임을 알 수 있다. Exchange rate에 의해 규정된 단일 domain 단백질의 core에 해당하는 부위는 또한 단백질 folding 초기에 가장 먼저 용매로부터 보호되는 부위와 일치함을 보여 isotope exchange를 이용하여 기술적으로 어려운 folding의 정보를 얻을 수 있음을 보여준다. 특히 unfolded state exchange가 빠른 molten globule과 같은 상태에서의 isotope exchange는 단백질 folding의 초기상태에 대한 정보를 줄 수 있다(9). 또한 molten globule이 아주 동적인 것을 감안한다면 용매와의 상호작용에 대한 정보를 얻을 수 있으리라 기대된다.

3. 결 론

Isotope exchange는 단백질의 folding을 연구하는데 좋은 정보를 제공하나 NMR을 이용함으로써 긴 측정 시간이 필요하여 이로 인한 artifact의 소지가 있고, exchangeable protons의 assignment가 선행되어야 구

조적인 정보를 얻을 수 있다. 또한 측정할 수 있는 exchange rate가 한정되어 있어 짧은 시간내에 일어나는 현상을 분석하기 어려운 단점이 있다. 이러한 문제점으로 인해 molten globule과 같은 상태에서의 실험에 한계가 있다. 그러나 stop-flow(10), electrospray ionization mass spectrometry(6)등을 이용하여 NMR결과를 보완하는 동시에 여러가지 용매를 이용하여 측정할 수 있는 exchange rate의 범위를 넓혀가고 있으며(11), denaturants 등을 이용하여 측정할 수 있는 exchange rate로부터 결과를 유추하고 있다(12).

Isotope exchange는 이외에도 folding intermediate의 규명(10), 단백질의 구조결정 시의 hydrogen bond의 위치 결정(13), ligand의 binding sites 결정(14) 등에 널리 쓰이고 있어 isotope exchange를 이용한 단백질의 동적 성질의 특성규명은 단백질의 구조생물학적 연구에 큰 공헌을 할 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Makhatadze, G. I., & Privalov, P. L. (1990) *J. Mol. Biol.* **213**, 375-384.; Makhatadze, G. I., Kim, K.-S., Woodward, C., & Privalov, P. L. (1993) *Protein Science* **2**, 2028-2036.
2. Kauzmann, W. (1959) *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63.; Dill, K. A. (1990) *Biochemistry* **29**, 7133-7155.
3. McCammon, J. A., Harvey, S. C. (1987) *Dynamics of proteins and nucleic acids*, Cambridge Univ. Press, Cambridge.
4. Englander, S. W., & Poulsen, A. (1969) *Biopolymer* **7**, 379-393.
5. Englander, J. J., Calhoun, D. B., & Englander, S. W. (1979) *Anal. Biochem.* **92**, 517-524.
6. Miranker, A., Robinson, C. V., Radford, S. E., Aplin, R. T., and Dobson, C. M. (1993) *Science* **262**, 896-900.

7. Wagner, G. (1983) *Q. Rev. Biophys.* **16**, 1-57.; Englander, S. W., & Kallenbach, N. R. (1983) *Q. Rev. Biophys.* **16**, 521-655.
8. Kim, K.-S., Fuchs, J. A., & Woodward, C. K. (1993) *Biochemistry* **32**, 9600-9608.; Kim, K.-S., & Woodward, C. K. (1993) *Biochemistry* **32**, 9609-9613.; Woodward, C. K., & Hilton, B. D. (1980) *Biophys. J.* **32**, 561-575.
9. Baum, J., Dobson, C., Evans, P., & Hanley, C. (1989) *Biochemistry* **28**, 7-13.; Jeng, M.-F., Englander, S. W., Elve, G., Wand, A., & Roder, H. (1990) *Biochemistry* **29**, 10433-10437.
10. Udgaonkar, J., & Baldwin, R. (1988) *Nature* **335**, 694-699.; Roder, H., Elöve, G., & Englander, S. W. (1988) *Nature* **335**, 700-704.
11. Zhang, Y.-Z., Paterson, Y., & Roder, H. (1995) *Protein Science* **4**, 804-814.
12. Bai, Y., Sosnick, T. R., Mayne, L., & Englander, S. W. (1995) *Science* **269**, 192-197.
13. W thrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York.
14. Paterson, Y., Englander, S. W., & Roder, H. (1990) *Science* **249**, 755-1759.



김 기 선

- 1981 서울대학교 농과대학 식품공학과 (학사)
 1983 한국과학기술원 생물공학과(석사)
 1983~1986 한국과학기술원 생물공학부 연구원
 1991 Dept. of Biochem., Univ. of Minnesota (Ph.D.)
 1992~1995 Protein Engineering Network of Centres of Excellence, Univ. of Alberta (Postdoctoral Fellow)
 1995~현재 한국과학기술연구원 생체구조연구센터 선임연구원