생명과학회지
Korean J. Life Science, 9(3), 328~332, 1999

트립토판 중합효소 알파 소단위체의 *in vitro* 구조재형성시 Ca^{2+}과 Mg^{2+}이온의 단백질 응집체 형성 촉진 효과

천광호 · 김종원 · 신혜자* · 임운기†

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과
*동서대학교 환경공학과

The Stimulatory Effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} Ions on the Formation of Protein Aggregate during *in vitro* Refolding of Tryptophan Synthase α-Subunit

Kwang-Ho Chun, Jong-Won Kim, Hae-Ja Shin* and Woon-Ki Lim†

Department of Molecular Biology, College of Natural Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
**Department of Environmental Engineering, DongSeo University, Pusan, 616-010, Korea*

Abstract

The effect of cations on the formation of protein aggregates was examined by *in vitro* refolding of mutant tryptophan synthase α-subunit in which Pro 24 was replaced by Leu. NH_4^+, K^+ and Na^+ had no effect, but Mg^{2+} and Ca^{2+} stimulated the formation of protein aggregates in dose-dependent manner. It is suggested that Mg^{2+} and Ca^{2+} may be implicated in the formation of protein aggregates *in vivo*.

Key words – Tryptophan synthase α-subunit, in vitro Refolding, Ca^{2+} and Mg^{2+} ions, Protein aggregate

서 론

유전공학적인 방법에 의해 단백질을 세포에서 과량 발현시켰을 때, 많은 경우 과량 발현된 단백질이 세포내에서 비활성 및 불용성의 단백질 응집체 (protein aggregate 또는 inclusion body로 불리기도 함)로 형성된다[12]. 단백질 응집 (protein aggregation)과 관련된 현상은 순수생명연구와 의학 및 생명공학산업에 매우 중요한 연구 대상으로 여겨지고 있다. 단백질 응집 현상을 잘 이해하게 되면 유용한 활성단백질을 대량으로 얻는 데 활용할 수 있기 때문이다[12]. 또한 근래에는 단백질 응집이 주요 질병의 원인으로 알려지고 있기 때문이다[11]. amyloidosis (예를 들면, 치매, Huntingtons' related disease, prion-transmissable spongy form encephalophathies 등)은 정상적으로는 수용성인 단백질이 비수용성 단백질을 형성함에 따라 세포나 조직에 구조적 또는 기능적 이상이 초래되는 질환을 나타낸다.

단백질 응집체의 형성 기작은 아직 정확히 알려져 있지 않지만, 자연구조체 (native form)를 만드는 구조형성 (folding) 과정에서 나타나는 중간구조체 (intermediate

†Corresponding author

structure)간의 상호작용에 의해 일어나는 것으로 보인다 [2]. 잔기 치환에 의해 단백질 응집체 생성체의 양이 증가하거나 또는 감소할 수 있는 데 이는 단백질 응집체의 형성에도 단백질의 3차원적 구조 형성과 마찬가지로 단백질의 1차구조가 중요한 역할을 하고 있음을 나타낸다[10]. 또한 온도, 산도, ionic strength, chaperone, protease, 조효소와 같은 결합물질 등과 같은 환경 조건에 영향을 받는다[10].

최근에 일부 양이온이 단백질 응집체 생성을 촉진시킨다는 보고가 있었다. 신경내분비 단백질인 7B2와 glutathione S-transferase (GST) fusion 단백질은 Ca^{2+}의 존재하에서 단백질 응집체로 침착되었다 [6]. 또한 치매 등과 같은 신경질환과 관련있는 microtubule 결합 단백질인 tau도 Mg^{2+}, Ca^{2+}, Al^{3+} 및 Fe^{2+}에 의해 단백질 응집체로 전환된다는 보고가 있었다 [13]. 그러나, 이 실험들은 수용성인 자연구조체에 대한 영향을 살펴본 것으로 아직 구조형성과정에서 단백질 응집체 형성에 미치는 양이온의 효과가 보고된 바 없다.

본 연구에서는 구조형성과정에서 단백질 응집체 형성에 미치는 Mg^{2+}과 Ca^{2} 이온의 영향을 조사하였다. 잔기28번 프롤린이 류신으로 치환된 트립토판 중합효소 알파 소단위체 (tryptophan synthase α-subunit)는 대장균에서 과량 발현되었을 때 단백질 응집체를 형성하는 데, 이를 활용한 *in vitro* 구조재형성 (refolding) 방법에 의해 Mg^{2+}과 Ca^{2+} 이온이 단백질 응집체 형성을 촉진시키는 사실을 밝혔다.

재료 및 방법

시약, 박테리아 및 플라스미드

모든시약은 순도가 높은 것을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 대장균 lon$^-$clpP$^-$ 균주는 많은 inclusion body를 형성하는 데 사용하였다. 이 균주는 inclusion body을 다른 균주에 비해 많이 생성한다 (천광호와 임운기, 미발표 결과). 트립토판 중합효소 알파 소단위체의 대량발현은 *trpA* (tryptophan synthase α-subunit) 유전자를 포함하는 플라스미드 ptactrpA를 사용하였다[7]. 이 플라스미드는 D-젖당에 의해 대량발현하는 *tac* 전사조절인자를 가지고 있다. 자연형 (wild type)은 미량의 inclusion body를 형성함으로 inclusion body가 많이 형성되는 잔기28번 Pro가 Leu로 치환된 mutant *trpA*를 사용하였다 [5].

단백질의 과량생산 및 inclusion body분리

단백질의 과량발현은 플라스미드를 가진 대장균을 20ml TYS (1% bactotrypton, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) 배지에서 약16시간 배양한 후, 이를 새로운 1ℓ TYS배지에 옮겨 2시간 후 젖당 (최종농도 1%)을 넣고 24시간 더 배양하였다. 대장균을 원심분리로 수확한 후 50mM TrisHCl (pH 7.8)용액에서 현탁하고 원심분리하여 용액을 제거하는 방법으로 2회 반복하여 여분의 배지성분을 제거하였다. 수확한 대장균을 같은 용액 5ml에 현탁하고 초음파 파쇄기로 세포를 깬 후 원심분리 (28,000×g, 20분)로 inclusion body인 침전물을 얻었다. 침전물을 같은 용액으로 3회 씻었다.

in vitro 구조재형성 및 전기영동

inclusion body를 50mM TrisHCl, pH 7.8, 6M urea 용액에 용해시켰다. 용해되지 않은 것은 원심분리로 제거하였다. 37℃의 50mM TrisHCl, pH 7.8 완충용액에 요소의 농도가 0.6M 되도록 희석하여 구조재형성이 시작되도록 하였다. 이 때 이온의 효과를 보기 위해서는 이온을 희석 완충용액에 첨가하였다. 30분간 반응 후에 얼음에 넣어 반응을 정지시킨 후 원심분리로 수용성 단백질과 단백질 응집체를 분획하였다. 얼음에 넣어 둔 시간은 시료에 따라 수분의 시간차이가 있었으나 두 분획간의 양에 영향을 미치지 않았다 (데이타 생략). 두 분획간에 존재하는 단백질의 양은 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophosis) 방법으로 전개하여 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하였다[4].

결과 및 고찰

구조형성과정에서 단백질 응집체 형성에 미치는 이온들의 영향을 조사하기 위하여 본 연구에서는 *in vitro* 구조재형성방법을 사용하였다. 잔기28번 프롤린이 류신으로 치환된 트립토판 중합효소 알파 소단위체는 대장균에서 많은 단백질 응집체로 형성된다. 이 단백질 응집체를 분리하여 *in vitro*에서 구조재형성실험을 행하였다. 단백질 응

집체를 6M 요소(urea)로 변성시킨 후 이를 50mM TrisHCl (pH 7.8)로 요소의 농도가 0.6M이 되도록 희석하여 구조재형성이 일어나도록 하였다. 구조재형성에 미치는 이온의 효과를 보기 위하여 요소의 농도를 희석할 때 이온이 첨가된 완충용액을 사용하였다. 수용성 구조로 구조재형성된 단백질과 단백질 응집체는 원심분리기로 분리하여 SDS-PAGE로 전개하여 두 분획간의 양을 비교하였다.

구조재형성시에 단백질 응집체 형성에 미치는 양이온의 효과를 보기 위해 NH_4Cl, KCl, NaCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$ 각각을 5mM 넣었다 (Fig. 1). NH_4Cl, KCl, NaCl,는 효과가 없었으며, $MgCl_2$와 $CaCl_2$는 단백질 덩어리의 생성을 현저히 촉진시켰다.

이 염들은 물에서 양이온과 음이온으로 해리됨으로 어떤 이온에 의한 효과인지를 구분하기 위해 Mg^{2+}와 Ca^{2+}를 chelating하는 것으로 알려져 있는 EDTA를 동량 처리하여 그 효과를 보았다 (Fig. 2). 5mM EDTA만을 넣었을 때 영향을 미치지 아니하였으며, 5mM EDTA를 $MgCl_2$나 $CaCl_2$와 같이 첨가하였을 때 $MgCl_2$나 $CaCl_2$만을 넣었을 때에 비해 단백질 응집체의 형성이 현저히 감소하였다. 약간의 단백질 덩어리 생성은 불충분한 양의 EDTA에 의한 것이거나 음이온인 Cl^-에 의한 것일 수 있다. 이를 구분

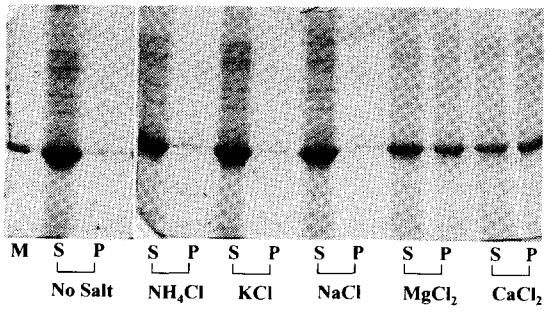

Fig. 1. Effect of salts on the formation of protein aggregates during *in vitro* refolding.
The protein aggregates containing tryptophan synthase α- subunit P28L mutant protein were isolated from *E. coli*, and solubilized in 6M urea. The solubilized protein aggregates were diluted to 0.6M urea with 50mM TrisHCl buffer (pH 7.8) in the absence or in the presence of 5mM NH_4Cl, KCl, NaCl, $MgCl_2$ or $CaCl_2$, and incubated at 37℃ for 30min. The solubilized (S) and pelleted fraction (P) were obtained by centrifugation, and electrophoresed by SDS-PAGE. M represents the purified tryptophan synthase α-subunit.

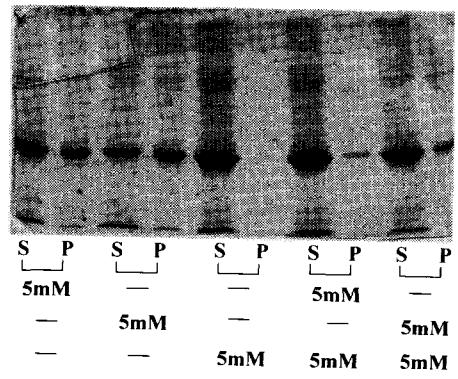

Fig. 2. Effect of EDTA on $MgCl_2$ or $CaCl_2$-stimulatory formation of protein aggregates.
Experiment was performed as described in Fig. 1. 5mM EDTA was added alone or together with 5mM $MgCl_2$ or $CaCl_2$.

하기 위하여 5mM의 $MgCl_2$에 NaCl를 추가로 첨가시키며 그 효과를 보았다 (Fig. 3). NaCl을 10mM까지 증가시켰음에도 단백질덩어리의 생성에는 별 변화가 없었다. 이는 앞의 효과가 불충분한 EDTA의 양에 의한 것임을 시사한다. 이상의 실험결과는 단백질 응집체의 생성이 양이온인Mg^{2+}와 Ca^{2+}에 의해 촉진되었다는 것을 나타낸다.

양이온의 효과를 확실히 하기 위하여 $MgCl_2$를 1, 5, 10mM의 농도로 처리하였다 (Fig. 4). 1mM에서는 약간의

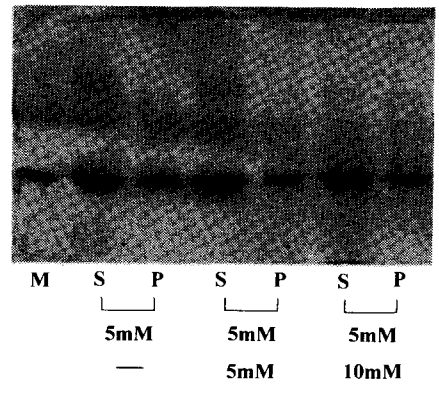

Fig. 3. Effect of NaCl on $MgCl_2$-stimulatory formation of protein aggregates.
Experiment was performed as described in Fig. 1. 5 or 10mM NaCl was added together with 5mM $MgCl_2$. M repsresents the purified α-subunit.

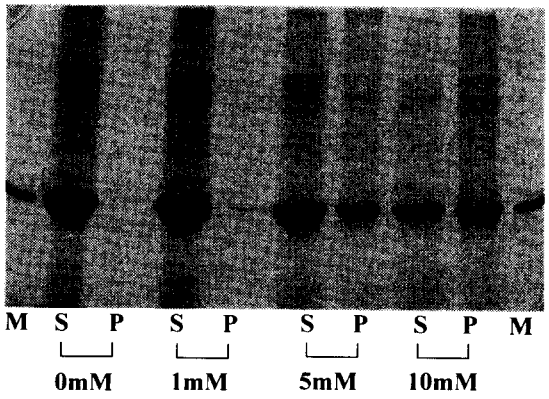

Fig. 4. Dose-dependent effect of $MgCl_2$ on the formation of protein aggregates.
Experiment was performed as described in Fig. 1. The solubilized protein aggregates were diluted to 0.6M urea with 50mM TrisHCl buffer (pH 7.8) in the presence of 0, 1, 5 or 10mM $MgCl_2$. The solubilized (S) and pelleted fraction (P) were obtained by centrifugation, and electrophoresed by SDS-PAGE. M represents the purified tryptophan synthase α- subunit.

효과가 있고, 5mM에서 단백질의 현저한 형성이 관찰되고, 10mM에서는 더욱 증가하는 것을 알 수 있다. 이 효소의 구조재형성시에 $MgCl_2$가 농도 의존적으로 단백질 응집체 형성을 촉진시키고 있다. $MgCl_2$의 증가시 ionic strength가 증가한다. 일반적으로 ionic strength는 단백질의 여러가지 성질에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나[9], 본 연구에서의 $MgCl_2$의 농도 효과는 ionic strength의 증가에 의한 것은 아닌 것으로 판단된다. 그림 3에서 볼 수 있듯이 $MgCl_2$를 5mM로 고정하고 NaCl를 10mM까지 증가시켰음에도, 즉 ionic strength를 증가시켰음에도 영향이 없었기 때문이다.

단백질 응집체 형성에 미치는 이온의 효과에 대한 연구 사례는 많지 않다. amyloidosis 질환과 관련된 단백질에 대해 일부 양이온이 단백질 응집체 생성을 촉진시킨다는 보고가 있었다. 신경내분비 단백질인 7B2와 lutathione S-transferase (GST) fusion 단백질은 Ca^{2+}에 의해 단백질 응집체로 되었다[6]. 치매 등의 신경장애에 관련있는 microtubule 결합 단백질인 PHF-tau (paired helical filament tau)도 Mg^{2+}나 Ca^{2+}에 의해 단백질 응집체가 생성된다고 보고된 바 있다[13]. 그러나 이 실험들은 수용성인 자연구조체에 대한 영향을 살펴본 것으로 구조형성과정에서 단백질 응집체 형성에 미치는 이온의 효과를 본 것은 우리가 문헌을 조사한 바로는 없다.

Mg^{2+}, Ca^{2}는 Ba^{2+}과 더불어 chaotropic cation로도 알려져 있다. 이들은 물에 용해되었을 때 물의 구조를 변화시켜 surface tension을 증가시키며, 이러한 성질이 다른 용질인 단백질의 특성을 변화시키는 것으로 알려져 있다[1]. 이러한 관점에서 볼 때 구조재형성시 단백질 응집체 양을 증가시키는 효과는 변성된 단백질이 물에 노출된 많은 소수성 부위들이 chaotropic cation에 의해 안정화되어 상대적으로 단백질 분자간에 상호작용을 촉진한 것으로 추측된다.

그러나, Ca^{2+}과 Mg^{2+} 이가 양이온이 단백질 재구조형성 과정에서 형성되는 중간구조체에 존재하는 음이온간에 결합하여 이 구조를 안정화시킴으로 자연구조체보다는 단백질 응집체로의 형성을 촉진시켰을 가능성도 있다. molten globule의 구조에서 보듯이 이온 결합은 단백질 구조형성 과정에서 후기에 형성되는 비공유 결합으로 알려져 있기 때문이다[3]. 본 실험에서는 여러가지 단백질이 혼합되어 있는 단백질 응집체을 사용하였음으로 트립토판 중합효소 알파 소단위체에 대한 직접적인 영향이 아니고, chaperone과 같은 다른 단백질에 의해 간접적으로 유도되었을 가능성도 있다[8].

본 연구에서 사용한 이온의 농도는 mM 수준으로 일부 세포에 관찰되는 생리적인 농도의 범위에 있다. 따라서, 세포내에서도 이온에 의해 단백질 응집체가 유발될 수 있다고 판단된다.

Ca^{2+}과 Mg^{2+}가 단백질 응집체 형성을 촉진시키는 기작에 대한 보다 자세한 연구는 단백질 응집 기작뿐만 아니라 트립토판 중합효소 알파 소단위체 구조형성 기작을 이해하는 데도 도움이 될 것이다.

요 약

구조형성과정에서 단백질 응집체 (protein aggregate) 형성에 미치는 양이온들의 영향을 조사하기 위하여 잔기 28번 프롤린이 류신으로 치환된 트립토판 중합효소 알파 소단위체 단백질 응집체를 분리하여 *in vitro*에서 구조재형성 (refolding) 실험을 행하였다. 일가 이온인 NH_4^+, K^+ 및

Na^+는 효과가 없었고, 이가 이온인 Mg^{2+}와 Ca^{2+}는 농도의 존적으로 구조재형성시에 단백질 덩어리 형성을 촉진시켰다. 이 결과는 생체내에서 형성되는 단백질 응집체에 Ca^{2+}과 Mg^{2+}가 관여할 가능성을 제시하고 있다,

감사의 글

본 연구는 부산대학교 기성회재원 학술연구조성비에 의해 연구되었습니다.

참 고 문 헌

1. Cacace, M. G., E. M. Landau and J. J. Ramsden. 1997. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quart. Rev. Biophys.* **30**, 241-277.
2. Kayed, R., J. Bernhagen, N. Greenfield, K. Sweimeh, H. Brunner, W. Voelter, and A. Kapurniotu. 1999. Conformational transitions of islet amyloid polypeptide (IAPP) in amyloid formation in vitro. *J. Mol. Biol.* **287**, 781-796.
3. Kim, P. S. and R. L. Baldwin. 1990. Intermediates in the foldintg reactions of small proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 631-660.
4. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophge T4. *Nature* **227**, 680-685.
5. Lim, W. K., H. E. Smith-Somerville, and J. K. Hardman, 1989. Solubilization and renaturation of overexpressed aggregates of mutant tryptophan synthase alpha subunits. *Appl. Environ. Micro. biol.* **55**, 1106-1111.
6. Linard, C. G., H. Tadros, F. Sirois, and M. Mbiday, 1995. Calcium-induced aggregation of neuroendocrine protein 7B2 in vitro and its modulation by ATP. *Mol. Cell. Biochem.* **151**, 39-47.
7. Milton, D. L., M. L. Napier, R. W. Meyer, and J. K. Hardman. 1986. *In vitro* mutagenesis and overexpression of the *E. coli* trpA gene and the partial characterization of the resultant tryptophan synthase mutant alpha subunits. *J. Biol. Chem.* **261**, 16604-16625.
8. Netzer, W. J. and F. U. Hartl. 1998. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends in Biochem. Sci.* **23**, 68-73.
9. Record, M. T. Jr., W. Zhang and C. F. Anderson. 1998. Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processed: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effcts, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts. *Adv. Protein Chem.* **51**, 281-353.
10. Rudolph, R. and H. Lilie. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* **10**, 49-56.
11. Tan, S. Y. and M. B. Pepys. 1994. Amyloidosis. *Histopathology* **25**, 403-414.
12. Thatcher, D. R. and A. Hitchcock. 1994. Protein folding in biotechnology. pp 229-261, In Pain, R. H. (ed), Mechanisms of protein folding. IRL press. Oxford.
13. Yang, L. S. and H. Ksiezak-Reding. 1999. Ca^{2+} and Mg^{2+} selectively induce aggregates of PHF-tau but not normal human tau. *J. Neurosci. Res.* **55**, 35-43.