

## 24번 잔기가 치환된 트립토판 중합효소 $\alpha$ 소단위체들의 구조폴림 성질

정지은 · 박후회 · 신혜자\* · 임운기†

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과

\*동서대학교 환경공학과

### Unfolding Property of Residue 24-Substituted Tryptophan Synthase $\alpha$ -Subunits

Ji-Eun Jeong, Hoo-Hwi Park, 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

#### Abstract

The doubly altered mutant tryptophan synthase  $\alpha$ -subunits, in which Thr 24 was replaced by Ser, Leu or Lys in addition to F139W substitution, were purified. Urea- induced unfolding equilibrium curves of these proteins, monitored by fluorescence intensity of tryptophan, show that the alterations of residue 24 resulted in marked changes in folding properties, suggesting the importance of this residue in folding of this protein.

**Key words** – Tryptophan synthase  $\alpha$  subunit, Folding, Mutant

#### 서 론

단백질은 번역과정으로 1차구조인 화학결합이 형성되면, 단백질 구조형성 (folding)하여 독특한 3차원적 구조를 형성하게 된다[1]. 이 분야는 많은 연구가 진행되었지만 아직 그 구체적인 기작은 아직 밝혀지지 않고 있다.

대장균의 트립토판 중합효소  $\alpha$  소단위체는 잔기 1-188의 N 말단 도메인 (domain)과 잔기 189-286의 C 말단 도메인으로 나누어진 두 개의 구조형성 도메인 (folding domain) (각각  $\alpha$ 1과  $\alpha$ 2으로 불리기도 함)으로 구성되어 있다[4,8]. 이를 밝혀진 barrel motif의 3차 구조와 비교하면 N 말단 도메인은 N-말단으로부터 helix 5개와 sheet 6개

로 이루어져 있고, C 말단 도메인은 3개의 helix와 2개의 sheet로 구성된다[5]. 최근에  $\alpha$  소단위체의 잔기 139번과 258번 페닐알라닌을 트립토판으로 각기 치환하여 두 구조형성 도메인을 개별적으로 조사하여 보고한 바에 따르면, 구조형성 중간체 (folding intermediate)의 구조가 N 말단 도메인은 변형된 구조를 가지고 C 말단 도메인은 완전히 구조형성된 상태로 있거나 완전히 구조를 가지지 않는 변성된 상태로 존재하는 두 종류가 혼합된 형태라고 제한된 바 있다[2].

이전의 보고에서 TS24/FW139, TA24/FW139 및 TK24/FW139 단백질은 FW139에 비해 inclusion body의 양이 증가되는 것으로 보아 단백질의 구조형성에 중요할 것이

† Corresponding author

라고 제안된 바 있다[9]. 본 연구에서는 이 단백질들을 정제하여 요소에 대한 변성곡성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 시약, 박테리아 균주 및 플라스미드

모든 시약은 순도가 높은 것(ultrapure)을 Sigma사로부터 구입하여 사용하였다. 대장균 균주 RB797 (*F'*, *lacI<sup>f</sup>*, *proL8/arg*, *Nal<sup>r</sup>*, *Rif<sup>r</sup>*, *recA*, *sup*, *lac*, *proXIII*)는 단백질들을 발현하는데 사용하였다 [9]. *trpA* 유전자를 포함하고 있는 플라스미드 *ptactrpAMK-M13*는 단백질의 과광발현에 사용하였다[11]. 139번 잔기가 트립토판으로의 치환, 24번잔기의 치환, 이들의 이중 치환의 생산 방법은 이미 보고되었다 [10,11].

### 단백질의 과생산 및 분리방법

야생형 및 돌연변이 단백질들은 다른 논문 [7]에서 기술한 바와 같이 대장균 RB797에서 과생산하고 분리하였다. 단백질을 SDS-PAGE로 전개하여 Coomassie brilliant blue R250으로 염색하여 본 결과 95%이상의 순도를 보여 주었다.

### 요소첨가에 따른 단백질의 변성도

단백질의 구조형성 성질을 조사하기 위하여 단백질 용액 (0.2-0.4 mg/ml)에 여러가지 농도의 요소 (urea)를 첨가하여 25°C에서 5-6시간 평형시킨 후 295 nm의 흡광으로 328 nm에서의 형광 (Hitachi F-4500)을 측정하였다[2]. 사용한 용액은 10 mM potassium phosphate (pH 7.8), 0.2 mM EDTA, 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol이었다. 단백질의 농도는 microbiuret 방법으로 측정하였다 [5].

### 데이터의 분석

얻어진 데이터는 분석을 위해  $F_{app}$  (apparent fraction of unfolding)으로 전환하고, 이를  $N \leftrightarrow I \leftrightarrow U$ 의 three state model로 fit하였다[3]. 여기서 N, I, U는 각각 native, intermediate, unfolded 구조를 나타내며,  $F_{app} = K_{NI} (Z + K_{IU}) / [1 + K_{NI} (1 + K_{IU})]$ 의 공식을 사용하였다. 여기에서  $K_{NI}$ 는  $[I]/[N]$ ,  $K_{IU}$ 는  $[U]/[I]$ 이며, Z는 1 구조의 fractional intensity를 나타낸다.

## 결과 및 고찰

트립토판 중합효소  $\alpha$  소단위체의 구조 형성에서 잔기 24번의 역할을 보기 위해 여기서는 24번의 잔기가 알라닌, 세린, 리신으로 치환되고 잔기 139번 페닐알라닌이 트립토판으로 치환된 T24A/F139W, T24K/F139W 및 T24S/F139W 단백질을 사용하였다. FW139는 139번 자리의 페닐알라닌이 트립토판으로 치환된 돌연변이체로 야생형의 효소와 여러 가지 효소 활성의 특성과 구조형성 성질이 거의 동일한 것으로 이미 보고된 바 있다[2].

가장 일반적으로 쓰이고 있는 단백질의 구조형성에 관한 평형연구는 단백질 용액에 변성물질인 요소 등을 여러 가지 다른 농도로 첨가하여 그 구조의 변화를 측정하는 것이다. 본 연구에서 사용된 형광변화는 자외선 흡광도나 CD (circular dichroism)의 방법에 비해 훨씬 적은 양의 단백질을 필요로 하고 3차 구조의 변화를 민감하게 측정할 수 있는 장점이 있다[3].

그림 1은 4가지 단백질에 대한 이 연구 결과를 보여주고 있다. 3가지 24번 잔기치환 단백질과 여기에서 표준으로 사용되고 있는 F139W 단백질 모두 2-state model보다는 3-state model이 더 잘 맞아 들었다. 따라서 4 가지 단백질 모두는 하나의 intermediate를 가지고 있는 것으로 나타났다. F139W 단백질의 이러한 성질은 이미 보고된 바와 같으며, 약 2M 요소 농도에서 구조가 풀리기 시작하여 약 5M 요소 농도에서 변성이 완결되는 특성도 이미 보고된 바와 같다. 그러나, 24번 잔기 치환된 3가지 단백질들은 F139W 단백질에 비해 훨씬 낮은 요소 농도인 약 0.5-1 M에서 변성되기 시작하여 F139W 단백질과 비슷한 4.5-5M 농도에서 거의 완결되는 변성곡성을 보여 주고 있다. 이 데이터는 3가지 단백질 모두 안정도가 F139W 단백질에 비해 떨어졌음을 나타낸다. 특히 N 말단 도메인에 대한 안정도에 큰 영향을 보여주고 있다. 그 결과 intermediate의 존재가 더 확연히 나타나고 있다.

표 1은 그림1의 데이터를 재료 및 방법에 기술되어 있는 방법으로 data fit하여 얻은 매개변수의 수치를 보여주고 있다. native form과 intermediate form의 자유에너지의 차이 ( $\Delta G_{NI}^{H_2O}$ )는 F139W 단백질의 경우 6.9 kcal/mol 인 비해, T24A/F139W, T24K/F139W, T24S/F139W 단백질들은 각각 3.4, 2.3, 3.7로 나타났다. 잔기 24번 자리에 리

Table 1. Thermodynamic parameters for urea-induced equilibrium unfolding of F139W and some F139W containing mutant  $\alpha$ -subunits<sup>a</sup>

	$\Delta G^{H_2O}$	$\Delta G_{NI}^{H_2O}$	$A_{NI}$	$\Delta G_{IU}^{H_2O}$	$A_{IU}$	$Z$
F139W	12.6	6.9 ± 1.1	-2.5 ± 0.5	5.7 ± 0.6	-1.5 ± 0.1	0.3 ± 0.1
T24A/F139W	7.2	3.4 ± 1.0	-2.8 ± 0.9	3.8 ± 0.3	-1.1 ± 0.1	0.2 ± 0.0
T24K/F139W	5.7	2.3 ± 0.3	-1.8 ± 0.3	3.4 ± 0.4	-1.0 ± 0.1	0.3 ± 0.1
T24S/F139W	8.1	3.7 ± 0.7	-2.7 ± 0.6	4.4 ± 0.3	-1.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0

<sup>a</sup>  $\Delta G_{XY}^{H_2O}$  is the free energy difference between conformations X and Y in the absence of urea.  $A_{XY}$  is the urea dependence of the apparent free energy difference.  $\Delta G_{XY}^{app}$  is free energy difference between conformations X and Y, defined by  $\Delta G_{XY}^{app} = \Delta G_{XY}^{H_2O} + A_{XY}[\text{urea}]$ . Units for all free energy differences are kilocalories per mole.

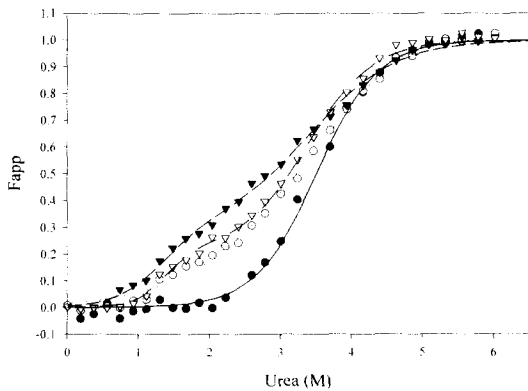


Fig. 1. Urea-induced unfolding equilibrium curves of F139W containing mutant  $\alpha$ -subunits.

The proteins at 0.2-0.4 mg/ml were added with various concentration of urea, and incubated for 5~6h at 25°C. Fluorescence intensity was measured at the emission wavelength of 328 nm with excitation wavelength of 295 nm. Data was fit to three state model as described in Materials and Methods. Lines are fit curves: F139W, (●, —); T24K/F139W, (▼, - -); T24S/F139W, (△, ···); T24A/F139W, (○, ---).

신이 가장 큰 감소를, 그 다음으로 알라닌, 세린의 순서로 N과 I간의 안정도를 변화시켰다. intermediate form과 unfolded form과의 자유에너지의 차이 ( $\Delta G_{IU}^{H_2O}$ )는 F139W 단백질의 경우 5.7 kcal/mol인 비해 T24A/F139W, T24K/F139W, T24S/F139W 단백질들은 각각 3.8, 3.4, 4.4이었다. 감소를 일으킨 순서는 N과 I간에 미친 영향과 같은 순서였으나, 감소 정도는 덜 심하였다. intermediate의 구조가 갖는 상대적인 형광값의 비를 나타내는 Z 수치는 상대적으로 큰 변화를 나타내지 않고 있다. 따라서 이는 intermediate의 구조에서 139번 잔기인 페닐알라닌의 환경이 상대

적으로 F139W의 구조와 거의 같음을 알 수 있다.

이전의 보고[9]에서 TS24/FW139, TA24/FW139 및 TK24/FW139 단백질은 FW139에 비해 많은 양이 inclusion body로 과량발현되었음을 보였다. 본 연구 결과에서는 이들 단백질이 안정도에서 감소하고 intermediate가 보다 안정될 수 있을 가능성을 제시하여 주고 있는데, 이 두가지 성질의 변화가 inclusion body형성과 관련되어 있을 수도 있다.

3가지 단백질이 보여주고 있는 안정된 intermediate는 구조형성과 관련된 intermediate의 구조연구에 활용될 수 있을 것으로 기대되며, 이에 대한 보다 자세한 연구를 진행하고 있다.

## 요 약

대장균 트립토판 중합효소 (tryptophan synthase)  $\alpha$  소단위체의 24번 잔기인 트레오닌이 메티오닌, 알라닌 또는 세린으로 치환되고 잔기 139에 트립토판이 있는 단백질을 정제하여, 여러가지 요소 농도에 대한 트립토판 형광값의 변화를 측정하여 변성곡선을 얻었다. 이들 단백질들은 모두 F139W 단백질에 비해 구조형성 성질에 큰 변화를 일으켰으며, 잔기 24번은 구조형성에 중요한 것으로 추정된다.

## 감사의 글

이 연구는 1999년도 부산대학교 기초과학연구소 학술연구구조성비 (기성희비)지원에 의하여 수행되었음 (RIBS-PNU-99-402).

## 참 고 문 헌

1. Anfinsen, C. B. 1973. Principles that govern the

- folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
2. Choi, S. G. and J. K. Hardman. 1995. Unfolding properties of tryptophan-containing alpha-subunits of the *Escherichia coli* tryptophan synthase. *J. Biol. Chem.* **270**, 28177-28182.
  3. Eftink, M. R., and M. C. R. Shastry. 1997. Fluorescence methods for studying kinetics of protein-folding reactions. pp.258-286, in Brand, L. (ed), *Methods in Enzymology*, Vol. 278, Academic Press Inc. New York.
  4. Higgins, W., T. Fairwell and E. W. Miles. 1979. An active proteolytic derivative of the alpha subunit of tryptophan synthase. Identification of the site of cleavage and characterization of the fragment. *Biochemistry*, **22**, 4827.
  5. Hyde, C. C., S. A. Ahmed, E. A. Padlan, E. W. Miles and D. R. Davies. 1988. Three-dimensional structure of the tryptophan synthase  $\alpha_2\beta_2$  multienzyme complex from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **267**, 17857-17871.
  6. Leggett-Bailey, J. 1962. *Techniques in Protein Chemistry* p.249, Elsevier Scientific Publishing Co. Inc., New York.
  7. Lim, W. K, C. Brouillette. and J. K. Hardman. 1992. Thermal stabilities of mutant *Escherichia coli* of tryptophan synthase alpha subunits. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**, 34-41.
  8. Miles, E. W., K. Yutani and K. Ogasahara. 1982. Guanidine hydrochloride induced unfolding of the alpha subunit of tryptophan synthase and of the two alpha proteolytic fragments : evidence for stepwise unfolding of the two alpha domains. *Biochemistry* **21**, 2586-1592.
  9. Milton, D. L., M. L. Napier, R. W. Myers and J. K. Hardman. 1986. *In vitro* mutagenesis and overexpression of the *Escherichia coli* trpA gene and the partial characterization of the resultant tryptophan synthase mutant alpha subunits. *J. Biol. Chem.* **261**, 16604-16615.
  10. Park, H.-H., J.-W. Kim, H.-J. Shin, and W.-K. Lim. 1999. Effect of substituted residue 24 on folding of tryptophans synthase  $\alpha$  subunit. *Korean J. Life Science* **9**, 146-152.
  11. Sarker, K. D., and J. K. Hardman. 1995. Affinities of phosphorylated substrates for the *E. coli* tryptophan synthase alpha-subunit: roles of Ser-235 and helix-8' dipole. *Proteins: Structure, Function, and Genetics.* **21**, 130-139.