

## 유비퀴틴 단백질의 부분적으로 폴딩된 구조에 대한 분광학적 분석

박 순 호\*

강릉대학교 치과대학 치의학과

(2003년 8월 21일 접수, 2003년 10월 8일 수리)

Hydrophobic core가 변이된 유비퀴틴 단백질이 pH 2 용액에서 보이는 구조적인 특성을 여러 분광학적 방법으로 측정하였다. 낮은 pH값을 갖는 용액에서 이 변이 유비퀴틴의 intrinsic tryptophan fluorescence emission spectrum은 unfolded 상태보다 약간 blue shift되어 있고 또한 그 intensity도 상당히 낮게 나타났다. 이는 이 용액 조건에서 이 변이 유비퀴틴의 삼차구조가 약간 남아 있는 것을 의미한다. 같은 용액에서 이 변이 유비퀴틴의 far-UV circular dichroic spectrum은 native 상태나 unfolded 상태의 spectrum과 현저히 달랐으며 220 nm에서의 molar ellipticity 값을 통하여 볼 때 pH 2인 용액에서 상당량의 이차구조를 지니고 있었다. 또한 같은 용액에서 이 변이 유비퀴틴은 hydrophobic dye인 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid(ANS)의 fluorescence emission intensity를 증가시키고 fluorescence emission maximum이 짧은 파장에서 나타나게 하였다(blue shift). 이러한 현상은 pH 2 용액에서 이 변이 유비퀴틴의 hydrophobic core가 느슨하여져서 hydrophobic dye인 ANS가 결합할 수 있는 구조를 띠고 있음을 나타낸다. 이러한 분광학적인 관찰은 이 변이 유비퀴틴이 pH 2인 용액에서 상당량의 이차구조를 지니고 있지만 hydrophobic core는 느슨하게 형성된 molten globule과 같은 형태를 지니고 있음을 나타낸다. 이 변이 유비퀴틴의 molten globule 형태는 단백질 폴딩 반응의 경로를 연구할 수 있는 좋은 모델이 될 수 있을 것으로 생각된다.

**Key words:** 유비퀴틴, molten globule, folding intermediate, hydrophobic core, mean hydrophobicity, mean net charge

### 서 론

단백질의 삼차구조를 밝히는 것은 그 단백질의 생물학적 기능을 탐색하는데 필수적이라고 할 수 있다. 단백질이 생물학적 활성을 갖는 native 삼차구조 형성에 대한 정보는 각 단백질의 아미노산 서열에 저장되어 있다는 것은 이미 오래 전에 알려져 있으나<sup>1)</sup> 단백질이 native 삼차구조를 이루는 과정인 폴딩 반응의 메커니즘은 확실히 밝혀지지 않았고 따라서 아직까지 아미노산 서열로부터 단백질의 삼차구조를 믿을 수 있게 예측할 수 있지 않다. 특히 최근에 활발히 진행되고 있는 genome project에 의하여서 유전자의 염기서열과 그로부터 추론한 단백질 아미노산의 서열에 대한 정보는 기하급수적으로 축적되고 있으나 그 삼차원 구조를 결정하는 핵자기공명분광법이나 X-ray crystallography 방법은 비교적 느린 상태이다. 따라서 단백질 폴딩 반응의 메커니즘을 밝혀서 아미노산의 서열로부터 단백질의 삼차구조를 믿을 수 있게 예측하여 그 생물학적 기능을 탐색하는 연구는 Genomics 연구나 Proteomics 연구와 연계되어 시급히 해결해야 할 현대 생물학의 중요한 과제라고 할 수 있다.

단백질 폴딩에 대한 연구는 폴딩반응의 중간형태인 folding intermediate의 구조를 탐색하는 방향으로 크게 다음과 같이 두 가지 방향으로 진행되고 있다. 첫째, two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 단백질에 대하여 단백질 공학기법(protein engineering)

과 폴딩 kinetics 실험을 연계하여 폴딩 반응의 transition-state의 구조를 탐색하는 방법이 Fersht와 그의 colleague에 의하여서 제안되었고,<sup>2)</sup> 여러 two-state 폴딩 단백질에 대하여서 적용되었다.<sup>3,4)</sup> 둘째, 단백질에 따라 native 상태의 안정성을 감소시키는 낮은 pH값을 갖는 용액이나 저 농도의 화학변성제(chemical denaturant)를 함유하는 용액에서 native 상태도 unfolded 상태도 아닌 부분적으로 폴딩이 되어있는 molten globule 형태를 띠고 있음이 알려져 있다. 이러한 molten globule 형태가 단백질 folding intermediate로 여겨지고 있고 molten globule의 구조를 분석함으로써 단백질 폴딩 반응의 과정을 밝히려는 연구가 진행되고 있다.<sup>10,11)</sup>

Molten globule 형태는 상당한 양의 이차구조( $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet)를 가지고 있으나 소수성 내부는 완전히 형성되어 있지 않는 느슨한 구조를 가지고 있으며 hydrophobic dye인 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid(ANS)와 결합하는 성질을 가지고 있다. 이렇듯 크게 두 가지 방향으로 단백질 폴딩에 대한 연구가 진행되고 있지만 아직까지 하나의 단백질에 대하여 평형상태에서 관찰되는 molten globule의 구조와 폴딩 반응의 transition state의 구조를 직접 비교한 연구는 이루어지지 않았다. 이는 폴딩 transition state의 연구가 가능한 단백질은 폴딩 반응이 매우 cooperative하여 two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 단백질이며 이러한 단백질은 molten globule을 형성하는 것이 관찰되어 있지 않기 때문이다. 따라서 폴딩 반응의 transition state에서 형성되는 구조와 molten globule 구조를 비교할 수 있는 two-state folding kinetics를 보이면서 평형상태에서 molten globule 형태도 될 수 있는 모델 단백질의 개발이 시급하다. 본

\*연락처

Phone: 82-33-640-2458; Fax: 82-33-642-6410

E-mail: spark9@kangnung.ac.kr

연구에서는 낮은 pH값을 갖는 용액에서 보이는 여러 가지 분광학적 결과를 토대로 하여 hydrophobic core에 위치한 valine이 alanine으로 치환된 변이 유비퀴틴이 molten globule을 형성함을 보이며 따라서 평형상태에서 형성되는 molten globule의 구조와 폴딩 kinetics 실험을 통하여 얻어지는 transition state의 구조를 비교 분석하기에 적합한 모델 단백질임을 보이고자 한다.

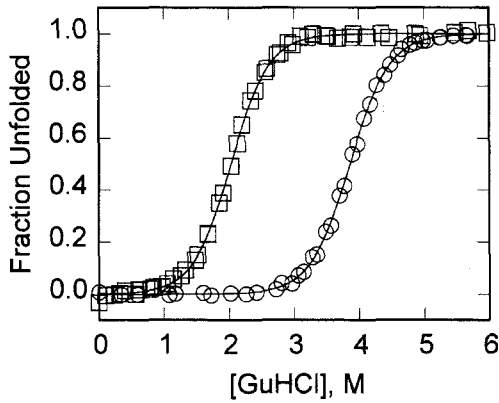
유비퀴틴은 76개의 아미노산으로 이루어진 비교적 작은 단백질로서 다섯 개의 strand가 이루는  $\beta$ -sheet와 하나의  $\alpha$ -helix (residues 23-34)로 이루어진 native 구조를 가지고 있다.<sup>12,13</sup> 유비퀴틴은 prosthetic group이나 disulfide결합을 가지고 있지 않고 수용액에서 noncovalent 결합에 의한 oligomer를 형성하지 않는다. 따라서, 유비퀴틴은 폴딩 반응이 disulfide결합의 교환이나 ligand의 결합, 그리고 oligomerization 반응 등과 서로 짝지워져서 일어나지 않으므로 순수하게 conformation 변화만을 연구하기에 적절한 모델 단백질이다. 유비퀴틴의 폴딩 반응은 매우 cooperative하여 평형상태에서는 오로지 native 상태와 unfolded 상태만 존재하는 전형적인 two-state 폴딩 메커니즘을 갖는 단백질로 Fersht 등이 제안한 단백질 공학과 폴딩 kinetics 실험을 접목한 방법으로 폴딩 transition state의 구조를 탐색하는 연구에 적합한 단백질이다. 그런데 유비퀴틴의 molten globule 형태는 고농도의 메탄올을 함유한 용액에서 나타나며, 따라서 알코올의 농도가 매우 높은 용액에서의 유비퀴틴 molten globule의 구조에 대한 연구가 수행되어져 있다.<sup>14-17</sup> 그러나 메탄올이나 에탄올을 고농도로 함유하고 있는 용액은 단백질 polypeptide chain이  $\alpha$ -helix를 이루게 하는 성질이 있어서 수용액에서는  $\beta$ -strand를 이루려는 성질이 강한 아미노산 서열도 고농도의 메탄올을 포함하는 용액에서는  $\alpha$ -helix를 이루는 경우가 있으며 유비퀴틴의 경우 고농도의 메탄올을 함유하는 용액에서 residue 39부터 72까지가 native 상태에서는 보이지 않는  $\alpha$ -helix구조를 보인다.<sup>17</sup> 따라서 고농도의 메탄올을 함유한 유기용매의 성질이 강한 용액에서 나타나는 구조가 수용액 상태에서 폴딩 반응의 중간단계에서 나타나는 형태라고 보기는 무리가 따른다고 할 수 있다. 그런데 근래에 mean hydrophobicity에 대한 mean net charge의 비가 낮은 단백질들에서 molten globule 형태가 많이 나타난다고 보고 되어있다.<sup>18</sup> 이는 site-directed mutagenesis를 통하여 단백질의 mean hydrophobicity를 떨어뜨리면 유비퀴틴과 같은 폴딩 반응이 cooperative한 단백질도 molten globule을 형성할 수 있음을 시사하며 molten globule의 구조에 대한 연구를 유기용매의 성격이 강한 용액이 아닌 수용액에서 실시해 볼 수 있는 가능성을 제시한다.

## 재료 및 방법

**재료.** 아미노산 서열상 45번째 위치의 phenylalanine이 tryptophan으로 치환된 유비퀴틴(F45W 유비퀴틴)은 단백질 삼차구조의 변환을 연구하기에 유용한 intrinsic fluorescence probe를 가지고 있으면서 wild type과 삼차구조, 구조의 안정성, 생물학적 활성이 유사함이 알려져 있으며 유비퀴틴 폴딩 연구에 많이 사용되었다.<sup>19-22</sup> 본 연구에서는 F45W 유비퀴틴을 wild

type 유비퀴틴이라 칭한다. 따라서 V26A 유비퀴틴은 F45W 유비퀴틴을 background로 하여 아미노산 서열상 26번째 valine이 alanine으로 치환된 변이 유비퀴틴(V26A 유비퀴틴)을 지칭한다. V26A 유비퀴틴은 wild type 유비퀴틴과 일치하는 far-UV Circular Dichroic(CD) spectrum을 보이는 것으로 보아 mutation이 peptide backbone의 native 구조에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. 재조합 유비퀴틴 단백질은 Khorasanizadeh 등<sup>19</sup>이 기술한 방법에 최종적으로 Sephacryl S-100 column chromatography 과정을 더하여서 정제하였다. 정제된 유비퀴틴은 SDS-PAGE후 coomassie brilliant blue로 염색하여 densitometer로 분석하여 98% 이상 순수한 것으로 판명되었다. 단백질 unfolding 실험에 사용된 초 순수 grade guanidinium chloride는 ICN에서 구입하였으며 기타 시약들은 reagent grade이거나 더 높은 grade를 사용하였다.

**방법.** Fluorescence emission, Far-UV CD spectra는 25 mM acetate 용액에서 측정하였다. 그 pH 값이 2에서 5 사이의 용액은 0.5 M acetate용액, HCl, 그리고 물을 섞어서 원하는 pH값과 최종 acetate 농도가 25 mM되는 용액을 만들었다. 이 용액에 유비퀴틴 stock용액을 가한 뒤 25°C water bath에 1시간 이상 방치한 다음 spectrum을 측정하였다. Unfolded 상태의 spectrum은 25 mM acetate, 6 M guanidinium chloride (pH 5) 용액에서 측정하였다. 평형 상태에서의 단백질 unfolding 실험은 25 mM acetate, pH 5 용액에 유비퀴틴을 가한 native solution과 25 mM acetate, 6 M guanidinium chloride (pH 5) 용액에 native solution과 같은 농도가 되도록 유비퀴틴을 가하여 제조한 unfolded solution을 준비한 다음, 먼저 native solution에서 일정 부피의 용액을 제거하고 제거한 부피만큼 unfolded solution을 가하여서 3분 이상 섞어주어 완전히 평형에 도달한 다음 spectrum을 측정하는 방법으로 denaturant의 농도를 점차 높여주면서 측정하고 또한 그 반대인 unfolded solution부터 시작하여 denaturant의 농도를 점차 낮추어주는 방향으로도 같은 실험을 실시하였으며 두 실험에서의 결과는 일치하였다. Denaturant의 농도는 용액의 refractive index를 측정하여 결정하였다.<sup>23</sup> Fluorescence emission spectrum은 Jasco FP-6500 spectrofluorometer를 사용하여 측정하였다. 유비퀴틴의 intrinsic tryptophan fluorescence spectrum은 tryptophan side-chain을 295 nm의 광으로 여기시켜 나오는 fluorescence emission spectrum을 300 nm에서 450 nm까지 측정하였으며 단백질의 농도는 3~6  $\mu$ M이었다. ANS의 fluorescence emission spectra는 350 nm에서 여기시켜 400 nm에서 650 nm까지에서 나오는 fluorescence emission spectrum을 측정하였으며 단백질의 농도는 3~6  $\mu$ M이었고 ANS는 단백질보다 열 배 높은 농도로 가하였다. Fluorescence spectrum 측정 시 JeioTech DTRC-620 circulating water bath를 사용하여 cuvette 내의 용액의 온도가 25°C로 유지되게 하였다. Far-UV CD spectra는 Jasco J-810 spectropolarimeter로 측정하였다. CD spectra 측정은 0.1 cm pathlength를 갖는 cell을 사용하였으며 단백질의 농도는 50  $\mu$ M 이상이었다. Far-UV CD spectrum의 측정 시 용액의 온도는 spectropolarimeter에 장착된 peltier type 온도조절기를 사용하여 25°C로 유지되게 하였다.



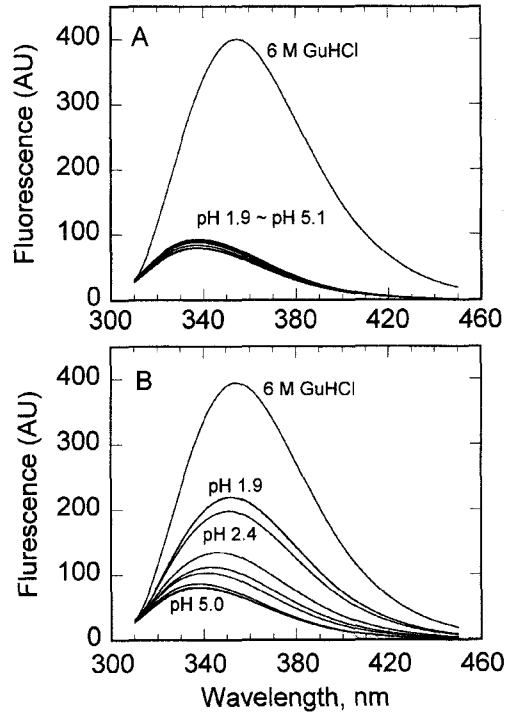
**Fig. 1. Guanidinium chloride-induced unfolding of wild type and V26A ubiquitin.** Circles and squares represent the unfolding data for wild type and V26A ubiquitin, respectively. Lines are nonlinear least squares fit of the unfolding data to a two-state ( $N \rightleftharpoons U$ ) transition model.

**결과 및 고찰**

근래에 Uversky는 molten globule 형태는 mean net charge에 대한 mean hydrophobicity가 낮은 단백질에서 잘 나타나고 있다고 보고하였다.<sup>18)</sup> 이는 site-directed mutagenesis를 통하여 hydrophobicity를 낮추어 준다면 유비퀴틴과 같이 매우 cooperative한 폴딩 반응을 하는 단백질에서도 molten globule과 같은 구조를 관찰할 수 있다는 가능성을 제시한다. 본 연구는 이러한 가능성을 시험해보기 위하여 유비퀴틴 삼차구조의 소수성 내부(hydrophobic core)에 위치한 valine 26이 alanine으로 치환되어 mean net charge에 대한 mean hydrophobicity의 비가 wild type 유비퀴틴에 비하여 떨어지는 변종 유비퀴틴에서 molten globule과 유사한 구조가 나타나는 가 관찰하였다.

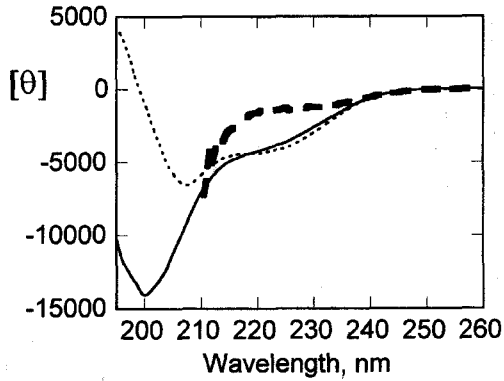
Fig. 1에서 보듯이 V26A 유비퀴틴은 native 상태의 안정성이 매우 떨어져서 wild type 단백질이 변성되는 약 4 M guanidinium chloride의 농도보다 낮은 농도인 약 2 M guanidinium chloride 농도에서 삼차구조의 변성이 일어난다. 이는 mutation에 의하여서  $\Delta G^\circ$ 가 약 3 kcal/mol 정도 감소했음을 나타낸다. 즉 mean hydrophobicity의 감소가 native 상태의 V26A 유비퀴틴의 안정도에 크게 영향을 주고 있음을 알 수 있다. 이는 Valine residue의 두개의 methyl-기가 단백질의 소수성 내부(hydrophobic core)에서 여러 noncovalent 결합(hydrophobic interaction, van der Waals interaction)에 관여하고 있음을 나타낸다.

Fig. 2는 wild type 유비퀴틴과 V26A 유비퀴틴이 용액의 pH가 감소할 때와 완전히 unfolded 상태인 고농도의 guanidinium chloride 용액에서 나타나는 tryptophan side-chain의 fluorescence emission spectra를 보여준다. 유비퀴틴은 native 상태일 때 fluorescence emission maximum이 338 nm이며 이것은 tryptophan side-chain이 유기용매와 유사한 단백질의 내부에 위치해 있음을 나타낸다. 유비퀴틴이 unfolded 상태에 있는 6 M guanidinium chloride 용액에서는 fluorescence emission maximum이 355 nm에서 나타나며 tryptophan side-chain이 수용액에 완전히 노출되어 있을 때 나타나는 전형적인



**Fig. 2. Intrinsic tryptophan fluorescence emission spectra of wild type and V26A ubiquitin.** Panel A illustrates the spectra of wild type ubiquitin. These illustrated spectra were obtained, reading upward at 340 nm, in the solutions with pH of 5.1, 4.7, 4.2, 3.2, 2.9, 2.5, 2.2, 1.9, and solution containing 6 M guanidinium chloride. Panel B illustrates the spectra of V26A ubiquitin. These illustrated spectra were obtained, reading upward at 340 nm, in the solutions with pH of 5.0, 4.6, 4.0, 3.4, 3.0, 2.8, 2.4, 2.2, 1.9, and solution containing 6 M guanidinium chloride. AU stands for arbitrary unit.

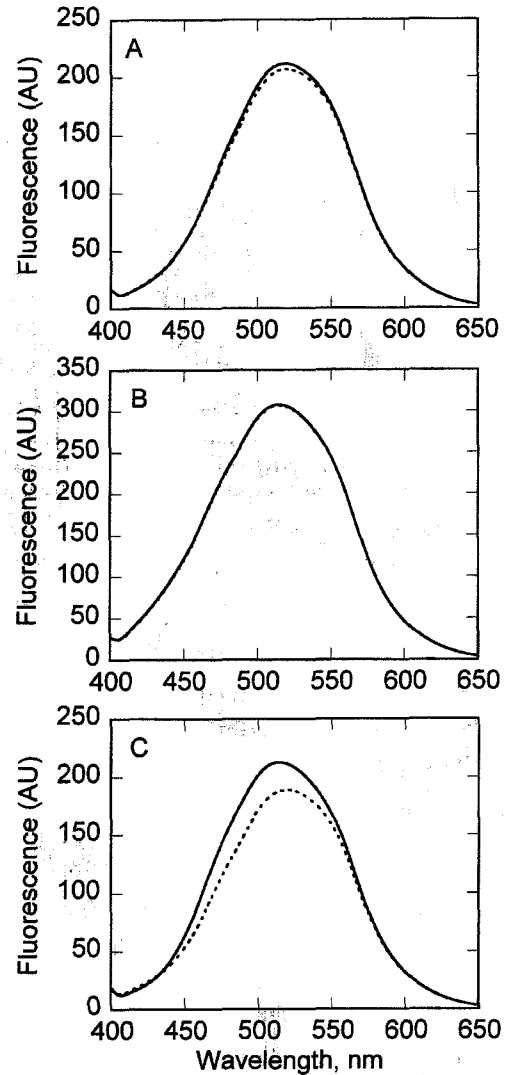
fluorescence emission maximum을 보인다. 또한 fluorescence emission intensity는 unfolded 상태의 유비퀴틴이 native 상태의 유비퀴틴보다 현저히 크게 나타났다. Fig. 2에서 보듯이 wild type 유비퀴틴은 용액의 pH가 변하여도 fluorescence spectrum의 변화가 거의 없으므로 단백질의 구조를 약화시키는 조건인 낮은 pH에서도 native 구조를 유지하고 있다고 보여 진다. 그런데 V26A ubiquitin의 경우 용액의 pH가 감소함에 따라서 fluorescence intensity가 현저히 증가하다가 pH값이 2.5 근처에서 일정한 fluorescence emission spectrum을 보인다. 또한 pH가 감소함에 따라 fluorescence emission maximum에서의 파장도 증가하다가 pH 값이 2.5 이하에서는 emission maximum의 파장이 일정하게 350 nm로 나타났다. 즉 낮은 pH 값에서의 V26A 유비퀴틴의 fluorescence emission intensity는 unfolded 상태의 fluorescence emission intensity에 비하여 상당히 작은 값을 보이며 maximum fluorescence emission에서의 파장은 unfolded 상태(355 nm)보다는 약간 작은 값을 보인다. 이는 pH 값이 2.5이하인 용액에서의 tryptophan side-chain이 수용액에 완전히 노출되지 않는 것을 나타낸다. 따라서 그림 2의 결과를 보면 V26A 유비퀴틴의 삼차구조는 용액의 pH가 낮아짐에 따라 unfolded 상태에 가깝게 변화되다가 pH값이 2.5 이하에서 unfolded 상태도 아니고 native 상태도 아닌 어떤 특정한 구조를 이룬다고 사료된다.



**Fig. 3.** Far-UV circular dichroic spectra of V26A ubiquitin. Spectra of the native state and unfolded state were obtained in 25 mM acetate, pH 5 (dotted line) and 25 mM acetate, pH 5/6 M guanidinium chloride (thick broken line), respectively. Solid line represents the spectrum of V26A ubiquitin in 25 mM acetate, pH 2. Molar ellipticity,  $[\theta]$ , has the unit of  $\text{deg cm}^{-1} \text{dmol}^{-1}$ .

V26A 유비퀴틴의 pH 2 용액에서 이차구조의 특성을 far-UV CD spectroscopy로 관찰하였다. Fig. 3에서 보듯이 이차구조가 손상되지 않은 native 상태의 V26A 유비퀴틴의 far-UV CD spectrum(짧은 점선)은 220 nm와 208 nm 근처에서 minimum molar ellipticity를 보이나 이차구조가 대부분 손상된 unfolded 상태의 far-UV CD spectrum(긴 점선)은 220 nm 근처에서 molar ellipticity가 native 상태의 그것보다 더 양의 값을 보이는 전형적인 random coil의 spectrum을 보인다.<sup>24)</sup> 그런데 pH 값이 2일 때의 far-UV CD spectrum은 220 nm 근처에서 완만하고 spectral minimum이 200 nm 근처로 옮겨간 모양을 보인다. 이러한 Far UV CD spectrum의 변화는  $\alpha$ -helix 구조가 상당히 와해되었기 때문으로 생각된다. 무엇보다도 명확한 사실은 pH 값이 2인 용액에서의 far-UV spectrum이 native 상태나 unfolded 상태의 그것과 현저히 다르다는 점이다. 즉 pH 값이 2인 용액에서의 V26A 유비퀴틴은 native 상태도 unfolded 상태도 아닌 구조를 가지고 있음을 보여주는 Fig. 2의 intrinsic tryptophan fluorescence spectrum의 결과와 일치한다. 더욱이 220 nm에서의 molar ellipticity 값은 이차구조의 양을 정량적으로 나타내는데, native state에서의 값과 pH 2 용액에서의 값이 약  $-4500 \text{ deg cm}^{-1} \text{dmol}^{-1}$ 로 유사하다. 이것은 V26A 유비퀴틴이 pH 값이 2인 용액에서 native 상태도 아니고 unfolded 상태도 아닌 그러나 상당한 양의 이차구조를 지니고 있다는 것을 의미한다. 이상의 fluorescence emission spectra와 CD spectra의 결과에서 보면 낮은 pH 값을 갖는 용액에서 V26A 유비퀴틴이 소수성 내부는 잘 packing되어 있지 않았지만 상당량의 이차구조를 가지고 있는 molten globule과 유사한 성질을 띠고 있다고 생각할 수 있다.

Molten globule 구조는 tertiary 구조가 견고하게 되어 있지 않아서 hydrophobic 부분이 상당히 노출되어 있고 따라서 hydrophobic dye인 ANS와 결합하는 성질이 있다. ANS는 hydrophobic 환경에서 fluorescence emission spectrum의 intensity가 증가하고 수용액에서 보다 더 짧은 파장에서 fluorescence emission maximum을 보인다. Fig. 4A와 4B에서



**Fig. 4.** Fluorescence emission spectra of V26A ubiquitin in the solution containing ANS. Panel A, B, and C represent the spectra in the solution of 25 mM acetate pH 5, 25 mM acetate, pH 5/6 M guanidinium chloride and 25 mM acetate pH 2, respectively. In each panel, dotted and solid lines represent the fluorescence emission spectra of ANS only and ANS in the presence of V26A ubiquitin, respectively. AU stands for arbitrary unit.

보듯이 V26A 유비퀴틴이 native 구조와 unfolded 구조를 이루는 조건에서 ANS의 fluorescence emission spectrum은 유비퀴틴 존재 유무에 관계없이 일정하게 나타난다. 그런데 Fig. 4C에서 보듯이 낮은 pH 값(pH 2)을 갖는 용액에서 ANS의 fluorescence emission intensity는 V26A 유비퀴틴이 있을 때가 V26A 유비퀴틴이 없을 때 보다 증가하였고 fluorescence emission maximum도 짧은 파장에서 나타난다. 이것은 V26A 유비퀴틴이 native 상태에서는 hydrophobic core가 견고하게 보존되어서 hydrophobic dye가 결합할 hydrophobic 표면이 존재하지 않고 unfolded 상태에서는 hydrophobic core가 완전히 와해되어서 ANS가 결합할 수 있는 hydrophobic 부분이 없음을 보여주는 반면에 pH 값이 낮은 용액에서는 hydrophobic dye가 결합할 수 있는 느슨한 hydrophobic core 구조를 가지고 있음

을 시사한다. 이상의 실험결과를 볼 때 mean net charge는 유지하면서 mean hydrophobicity를 감소시킨 V26A 유비퀴틴은 native구조를 약화시키는 낮은 pH값을 갖는 용액에서 molten globule 형태를 형성하고 있다고 할 수 있다. Mean hydrophobicity가 감소한 변이 단백질인 V26A 유비퀴틴이 낮은 pH 값을 갖는 용액에서 native 상태도 아니고 unfolded 상태도 아닌 molten globule상태를 보이는 것은 단백질의 삼차구조를 안정시키는 noncovalent결합과 단백질의 삼차구조를 약화시키는 charge repulsion이 molten globule 상태에서 적절한 균형을 이루기 때문으로 여겨진다. 낮은 pH값을 갖는 용액에서 양의 전하를 띠는 arginine, lysine, 아미노기 말단의 amino group은 그대로 전하를 가지고 있으나 음의 전하를 띠는 aspartate, glutamate, 그리고 카르복실기 말단의 carboxylate는 각각 aspartic acid, glutamic acid, carboxylic acid의 형태로 전하를 띠지 않는다. 따라서 낮은 pH값을 갖는 용액에서 단백질은 양의 net charge를 띠게 되며 따라서 charge repulsion이 크게 된다. 이러한 charge repulsion은 단백질의 native 상태를 유지하려는 hydrophobic interaction, van der Waals interaction, hydrogen bond와는 반대로 단백질의 삼차구조를 파괴하는 방향으로 작용하게 된다. Wild type 유비퀴틴의 경우에는 낮은 pH 값을 갖는 용액에서도 hydrophobic interaction, van der Waals interaction, backbone hydrogen bond들이 native 구조를 이루게 하는 결합력이 charge repulsion보다 강하여서 여전히 native 구조를 이루고 있으나 V26A 유비퀴틴의 경우 charge repulsion의 영향이 상대적으로 강해져서 molten globule 구조를 이룰 수 있게 된다고 여겨진다. Cytochrome c, Apomyoglobin,  $\beta$ -Lactamase의 경우에 낮은 pH를 갖는 용액에서 charge repulsion이 단백질의 삼차구조를 안정시키는 결합보다 상대적으로 강하여서 삼차구조가 완전히 변성된 형태를 띠게 되며 KCl과 같은 염을 가하여 charge repulsion을 약화시킬 때 (charge shielding effect) 비로소 molten globule의 형태를 띠게 된다고 보고 되어져 있다.<sup>25)</sup>

여러 연구에서 단백질의 삼차구조를 불안정하게 해주는 조건에서 나타나는 molten globule의 형태의 이차구조의 양이나 compactness 정도는 단백질의 종류에 따라서 다양하게 나타날 수 있다고 보고 되어져 있다.<sup>10)</sup> 이는 mean hydrophobicity와 mean net charge의 비가 각 단백질마다 다르기 때문에 서로 상반되는 interaction이 균형을 이루는 점이 다양하게 나타날 수 있다는 것을 의미한다. 따라서 hydrophobic residue의 mutation이 그 단백질의 삼차구조의 안정성에 미치는 영향에 따라서 하나의 단백질에서도 이차구조의 형성 정도와 compactness가 다른 여러 형태의 molten globule이 관찰될 수 있으며 단백질의 삼차구조를 안정시키는 각 결합의 폴딩 반응에 미치는 영향에 대한 연구를 여러 hydrophobic residue의 mutation에 의하여 생성되는 다양한 형태의 molten globule의 구조를 통하여 얻을 수 있다고 여겨진다.

Molten globule은 평형상태에서 얻어지는 구조로서 평형상태의 얻어지는 결과를 반응의 경로에 직접 연관시키는 데는 무리가 있다는 반론이 있을 수 있다. 이는 평형 상태에서의 결과는 반응의 initial state와 final state에만 의존하지 경로에 대한 정

보는 포함하지 않는다는 열역학법칙에 의거한다. Fersht와 그 colleague는 two-state 폴딩 단백질에 site-directed mutagenesis와 kinetics 실험을 연계하여 단백질 폴딩 반응의 transition state의 구조를 탐색하는 실험 방법을 제안하였고 그 후 여러 실험실에서 이 방법을 여러 two-state 폴딩 단백질에 적용하여 단백질의 native 상태를 안정시키는 결합의 폴딩 반응의 경로에 끼치는 영향을 연구하였다.<sup>2,9)</sup> 이러한 점에서 볼 때 two-state 폴딩 메커니즘을 보이면서 molten globule형태도 될 수 있는 V26A 유비퀴틴은 평형상태에서의 실험과 kinetics 실험을 모두 적용하여 폴딩 반응의 경로에 대한 전체적인 정보를 줄 수 있는 좋은 모델 단백질로 생각되어 진다.

## 감사의 글

Recombinant human ubiquitin gene을 가지고 있는 plasmid를 제공한 Fox Chase Cancer Center의 Heinrich Roder 박사에게 감사드립니다. 본 연구는 강릉대학교 신진교수연구비로 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-229.
2. Matouschek, A., Kellis, J. T., Serrano, L. and Fersht, A. R. (1989) Mapping the transition state and pathway of protein folding by protein engineering. *Nature* **340**, 122-126.
3. Viguera, A. R., Serrano, L. and Wilmanns, M. (1996) Different folding transition states may result in the same native structure. *Nature Struct. Biol.* **3**, 874-880.
4. Martinez, J. C. and Serrano, L. (1999) The folding transition state between SH3 domains is conformationally restricted and evolutionarily conserved. *Nature Struct. Biol.* **6**, 1010-1016.
5. Kragelund, B. B., Osmark, P., Neergaard, T. B., Schiodt, J., Kristiansen, K., Knudsen, J. and Poulson, F. M. (1999) The formation of a native-like structure containing eight conserved hydrophobic residues is rate limiting in two-state protein folding of ACBP. *Nature Struct. Biol.* **6**, 594-601.
6. Grantcharova, V. P., Riddle, D. S. and Baker, D. (2000) Long-range order in the src SH3 folding transition state. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 7084-7089.
7. McCallister, E. L., Alm, E. and Baker, D. (2000) Critical role of  $\beta$ -hairpin formation in protein G folding. *Nature Struct. Biol.* **7**, 669-673.
8. Kim, D. E., Fisher, C. and Baker, D. (2000) A breakdown of symmetry in the folding transition state of protein L. *J. Mol. Biol.* **298**, 971-984.
9. Perl, D., Holtermann, G. and Schmid, F. X. (2001) Role of the chain termini for the folding transition state of the cold shock protein. *Biochemistry* **40**, 15501-15511.
10. Puitsyn, C. B. (1995) Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* **47**, 83-229.
11. Kuwajima, K. and Arai, M. (2000) In *Mechanisms of Protein Folding 2nd Edition: Frontiers in Molecular Biology, The molten globule state: the physical picture and biological*

- significance*, Oxford University Press, New York. pp. 138-174.
12. Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E. and Cook, W. J. (1987) Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **194**, 531-544.
  13. Weber, P. L., Ecker, D. J., Marsh, J., Crooke, S. T. and Mueller, L. (1988) NMR-derived structures of ubiquitin and ubiquitin mutants. *Transactions ACA* **24**, 91-105.
  14. Wilkinson, K. D. and Mayer, A. N. (1986) Alcohol-induced conformational changes of ubiquitin. *Arch. Biochem. Biophys.* **250**, 390-399.
  15. Pan, Y. and Briggs, M. (1992) Hydrogen exchange in native and alcohol forms of ubiquitin. *Biochemistry* **31**, 11405-11412.
  16. Stockman, B. J., Euvrard, A. and Scahill, T. A. (1993) Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of a partially denatured protein: The A-state of human ubiquitin. *J. Biomol. NMR* **3**, 285-296.
  17. Bernhard B., Brusweiler, R. and Ernst, R. R. (1997) Backbone dynamics and structural characterization of the partially folded A State of ubiquitin by <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **36**, 13043-13053.
  18. Uversky, V. N. (2002) Cracking the folding code. Why do some proteins adopt partially folded conformation, whereas other don't? *FEBS Lett.* **514**, 181-183.
  19. Khorasanizadeh, S., Peters, I. D., Butt, T. R. and Roder, H. (1993) Folding and stability of a tryptophan-containing mutant of ubiquitin. *Biochemistry* **32**, 7054-7063.
  20. Laub, P. B., Khorasanizadeh, S. and Roder, H. (1995) Localized solution structure refinement of an F45W variant of ubiquitin using stochastic boundary molecular dynamics and NMR distance restraints. *Protein Sci.* **4**, 973-982.
  21. Khorasanizadeh, S., Peters, I. D. and Roder, H. (1996) Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nature Struct. Biol.* **3**, 193-205.
  22. Krantz, B. A. and Sosnick, T. R. (2000) Distinguishing between two-state and three-state models for ubiquitin folding. *Biochemistry* **39**, 11696-11701.
  23. Nozaki, Y. (1972) In *Methods in Enzymology Vol. 26*. Academic Press, New York. p. 43.
  24. Greenfield, N. and Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroic spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108-4115
  25. Goto, Y., Calciano, L. J. and Fink, A. L. (1990) Acid-induced folding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 573-577.

---

#### Spectroscopic Analysis of Partially Folded State of Ubiquitin

Soon-Ho Park\* (*Department of Dentistry, College of Dentistry, Kangnung National University, Gangneung 210-702, Korea*)

**Abstract:** Hydrophobic core variant of ubiquitin appeared to have partially folded structure at pH around 2. The intrinsic tryptophan fluorescence emission maximum of this ubiquitin variant at pH 2 showed slight blue shift compare to that of unfolded state, suggesting that some residual tertiary structures remain in this solvent condition. At the same solvent condition, this ubiquitin variant binds with hydrophobic dye, 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS), which is known to bind to exposed hydrophobic surface. Furthermore, far-UV circular dichroic spectrum of this ubiquitin variant in the diminished pH was remarkably different from the far-UV CD spectrum of the native state or unfolded state. Based on the molar ellipticity at 220 nm, this ubiquitin variant at pH 2 appeared to have significant amount of secondary structures. All these observations suggest that this ubiquitin variant in the diminished solvent pH has loosely folded hydrophobic core with some secondary structures, which are key features of molten globule conformation. Since molten globule has long been considered as a protein folding intermediate, it is considered that this hydrophobic core variant ubiquitin will serve as a valuable model to study protein folding process.

---

Key words: ubiquitin, molten globule, folding intermediate, hydrophobic core, mean hydrophobicity, mean net charge

\*Corresponding author