

높은 cAMP 농도에서 cAMP 수용성 단백질의 열 안정화

- 단 보 -

강종백*¹ · 최 영²

경원대학교 화학과

Cyclic AMP Receptor Protein Adopts the Highly Stable Conformation at Millimolar cAMP Concentration

Jong Back Gang*¹ and Young Choi²

Department of Chemistry, Kyungwon University, Sungnam, Kyunggi-do, Korea(south)

Abstract

Cyclic AMP receptor proteins(CRP) activate many genes in *Escherichia coli* by binding of cAMP with not fully known mechanism. CRP existed as apo-CRP in the absence of cAMP, CRP:(cAMP)₂ at low(micromolar) cAMP concentration, or CRP:(cAMP)₄ at high(millimolar) concentration of cAMP. This study is designed to measure the thermal stability of S83G CRP, which substituted glycine for serine at amino acid 83 position, with CD spectrapolarimeter at 222nm by the constant elevation of temperature from 20°C to 90°C at 1°C/min. The non-linear regression analysis showed that melting temperatures were 68.4, 72.0, and 82.3°C for no cAMP, 0.1mM cAMP, and 5mM cAMP, respectively. Result showed the strong thermal stability of CRP by binding of additional cAMP molecules to region between the hinge region and helix-turn-helix(HTH) motif at 5mM cAMP concentration.

Key words – Cyclic AMP receptor protein(CRP), Molar ellipticity, Thermal stability of protein, Non-linear regression analysis.

Cyclic AMP receptor protein(CRP)은 bacteria의 많은 유전자(gene)의 발현(expression)을 조절(regulation)하는 역할을 한다[4,9]. CRP가 유전자의 발현을 조절하기 위해 cAMP와 결합하여 형성된 CRP:cAMP 복합체가 promoter 주위의 결합부위에 결합한다.[14] CRP는 209개 아미노산으로 이루어진 subunit으로 homodimer로 존재하고 분자량은 45,000g/mol 이다. N-terminal domain은 1-135 아미노산을 포함하고 한 쌍의 짧은 helices(A,B), 8개의 anti-

parallel β -roll, 1개의 긴 α -helix(C)로 구성되어 있고 cAMP의 결합에 관여한다. C-terminal domain은 136-209 아미노산을 포함하고 2쌍의 짧은 antiparallel β -strand, 3개의 α -helices(D, E, F)로 구성되어 있고 DNA와 결합에 관여한다 [9,15,16].

Heyduk과 Lee의 결과[7]에 의하면 CRP의 형태는 cAMP가 결합하지 않은 apo-CRP 그리고 한 분자의 cAMP가 결합된 CRP-(cAMP)₁와 두 분자의 cAMP가 결합된 CRP-(cAMP)₂ 형태로 존재하며 CRP-(cAMP)₁가 활성인 형태이다. 그러나 결합부위를 가진 DNA가 존재할 때 CRP:cAMP:DNA 복합체의 결정구조에서 N-terminal cAMP binding pocket에 결합된 cAMP 이외에 cAMP가 hinge

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 031-750-5409, Fax : 031-750-5389
E-mail : jbgang@kyungwon.ac.kr

region과 helix-turn-helix 사이에서 syn conformation으로 결합된 것이 발견되었다[13]. 그래서 CRP의 형태로 apo-CRP, CRP:(cAMP)₂, 그리고 CRP:(cAMP)₄ 형태로 존재한다고 보고하였다. 또한 Mukhopadhyay et al[12]에 의하면 millimole 농도의 cAMP에서 chymotrypsin에 의한 단백질 절단으로 생성되는 α-CRP의 양이 감소하는 것으로 보아 chymotrypsin 절단부위인 hinge region 주위에 cAMP의 결합 가능성을 보여주었다.

본 연구는 높은 농도의 cAMP 하에서 CRP-(cAMP)₂ 형태[7] 혹은 CRP:(cAMP)₄ 형태[13]로 존재할 때 즉 hinge region 주위에 cAMP의 추가적인 결합이 CRP의 열 안정성에 어떤 영향을 주는지에 관하여 CD spectropolarimeter을 사용하여 222nm의 파장에서 molar ellipticity 값을 관찰하였다. 그러나 야생형 CRP의 경우에 확인되지 않은 이유로 여러 번의 실험에서 분석 가능한 결과를 얻을 수 없었다. 이런 이유 때문에 molar ellipticity를 이용한 CRP의 변성에 관한 논문이 발표되지 않은 이유로 여겨진다. 그래서 돌연변이 S83G CRP를 이용하여 cAMP가 없을 때 그리고 낮은 농도와 높은 농도의 cAMP 하에서 열 안정성을 관찰하였다. 본 연구에 사용된 S83G CRP는 cAMP binding pocket를 이루는 아미노산의 하나인 serine 83번을 glycine으로 치환된 돌연변이 CRP이다. S83G CRP는 야생형 CRP와 비교해서 낮은 농도의 cAMP에서 절반 정도의 β-galactosidase 활성을 나타냈다[11].

CRP 단백질의 분리는 crp 유전자가 expression vector인 pRE2에 클론된 pRE2crp와 온도에 민감한 repressor 단백질을 포함하는 pRK248을 이용하였다[5]. 그리고 숙주세포로 CA8445를 이용하였으며 37°C에서 배양한 후 42°C에서 heat induction하여 대량으로 생산하였다. 이어 P-11, Hydroxyapatite, CM sephadex, Affi-gel blue 등의 수지를 이용하여 분리한 뒤 12.5% SDS-PAGE로 확인한 결과 95% 이상 순수하였다. 그리고 분리된 CRP의 확인을 위하여 cAMP의 존재 유무에 따라 proteolytic digestion을 통하여 CRP를 확인하였다[1].

CRP 절단반응은 TB[transcription buffer, 40mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 1M DTT, 5% glycerol]에서 CRP 단백질과 chymotrypsin의 무게 비율을 200 : 1이 되게 사용하였다. cAMP의 농도는 각각 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 3, 그리고 5mM이며 37°C에서 30분간 항온 후

chymotrypsin으로 20분간 반응시켰다.

Fig. 1의 proteolytic digestion 결과에서 보듯이 모든 CRP들에서 cAMP가 존재하지 않을 때 α-CRP 밴드를 볼 수 없다[10] 이것은 cAMP가 존재하지 않을 때 S83G CRP와 야생형 CRP의 구조가 크게 다르지 않다는 것을 보여준다. 그리고 야생형 CRP와 S83G CRP 경우에 0.1~1mM cAMP 농도에서 cAMP가 증가함에 따라 생성되는 α-CRP의 양이 증가함을 볼 수 있다. 그러나 높은 cAMP 농도에서(3~5mM) 야생형 CRP의 경우에 생성되는 α-CRP의 양이 감소하였다(Fig. 1-A). S83G CRP의 경우도 야생형 CRP와 유사하게 5mM cAMP의 농도에서 α-CRP의 양이 감소함을 볼 수 있다(Fig. 1-B). 이것은 높은 cAMP 농도일 때 CRP-(cAMP)₄형태로서 chymotrypsin 절단 부위인 아미노산 135번 가까이에 cAMP가 결합했기 때문이다[13]. 또한 Fig. 2에서 보듯이 cGMP가 존재할 때 CRP의 구조적인 변화를 관찰하였다. 야생형 CRP와 S83G CRP의 경우에 chymo-

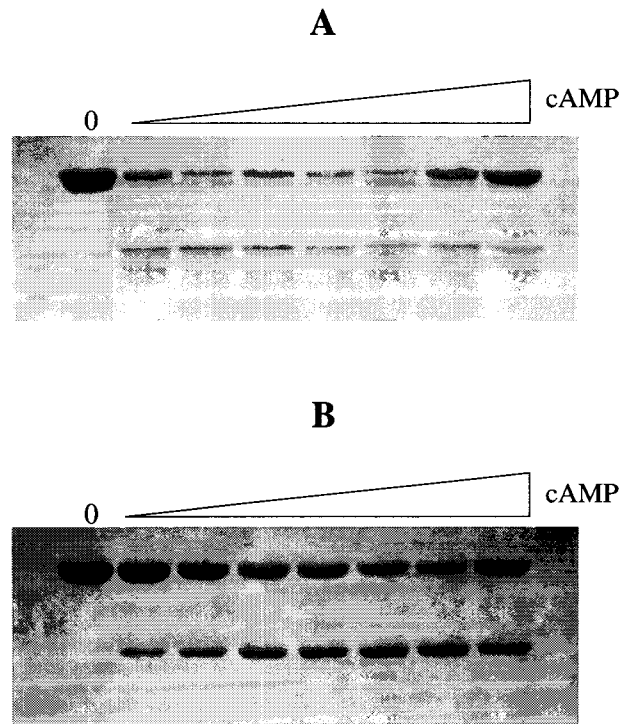


Fig. 1. Proteolytic digestion of wild-type CRP(A) and S83G CRP(B).

Lane 1 contains CRP protein without cAMP. Lanes 2 through 8 contain 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 1, 3, 5mM cAMP, respectively. Reaction condition was mentioned in the text.

trypsin에 의한 절단실험에서 전혀 α -CRP 생성을 관찰할 수 없었다. 이것은 야생형과 S83G CRP 모두 cGMP의 결합에 의한 CRP의 구조가 cAMP 결합에 의한 구조와 다르다는 것을 의미한다.

단백질 변성실험은 222nm의 고정된 파장에서 온도를 20°C에서 90°C까지 1°C/min 일정하게 증가하면서 S83G CRP에 대한 변성과정을 molar ellipticity 값을 측정하였다. 그리고 그래프에 나타내는 모든 값들은 용액 자체의 기여를 제거한 순수한 CRP 단백질에 의한 값들이다. Molar ellipticity는 Jasco 710 spectropolarimeter(Basic Science Research Institute)로 측정하였으며 path length 0.1mm인 round cell을 사용하였다. 용액은 TB를 사용했으며 사용된 단백질의량은 0.3mg/ml 이고 cAMP의 농도는 각각 0, 0.1 그리고 5mM이다. 온도평형을 위해 샘플을 cell에 주입한 후 20°C에서 30분간 항온하였다. 그리고 샘플의 안정성과 잡음 정도를 보기 위해 200~260nm 파장범위에서 CD spectra와 HT를 동시에 5회씩 측정하였다.

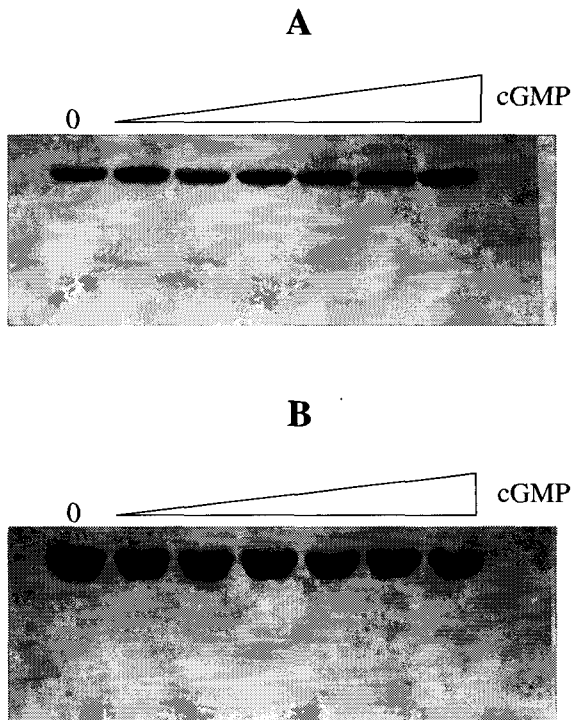


Fig. 2. Proteolytic digestion of wild-type CRP(A) and S83G CRP(B). Lane 1 contains CRP protein without cGMP. Lanes 2 through 7 contain 0.25, 0.5, 1, 3, 5, 10mM cGMP, respectively.

Fig. 3에서 보듯이 S83G CRP에서 일반적으로 온도에 따른 단백질의 변성에서 볼 수 있는 그래프를 보여준다. 그리고 70°C 가까이에서 급격한 molar ellipticity 값의 상승을 볼 수 있다. 이 결과는 UV spectrophotometer을 이용하여 일정한 파장에서 온도를 증가시키며 측정한 CRP 단백질의 변성 그래프와 동일한 경향을 보여준다[8]. 또한 Fig. 4에서 0.1mM cAMP가 존재할 때 S83G CRP의 변성 그래프가 Fig. 3과 비교해서 오른쪽으로 이동했음을 볼 수 있다. 이것은 cAMP의 결합으로 CRP의 N-terminal domain 부위가 열에 안정한 즉 compact한 구조로 변화되었음을 의미한다[2]. 그리고 Fig. 5에서 5mM cAMP가 존재할 때 90°C에서 molar ellipticity가 계속 증가하는 그래프를 나타내는 것으로 보아, 단백질의 변성이 90°C보다 더 높은 온도에서 끝남을 예상할 수 있다. Analytical gel chromatography 기술[6]을 이용한 연구에 의하면 낮은 cAMP 농도에서(micromolar cAMP 농도) 거의 elution volume의 변화를 관찰 할 수 없었으나 높은 농도의 cAMP에서(millimolar cAMP 농도) 아주 뚜렷한 변화가 관찰되었다. 이것은 첫 번째 cAMP가 CRP의 결합부위인 cAMP binding pocket에 결합할때는 거의 구조적인 변화가 크지 않으나 추가적인 cAMP의 결합으로 매우 구조적으로 압축된 compact한 구조로 변화되었음을 의미한다.

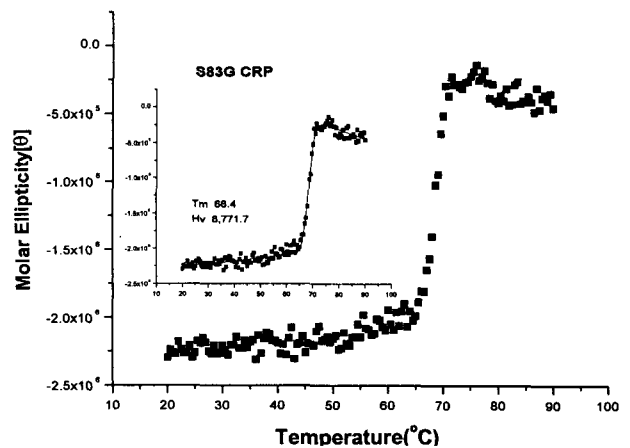


Fig. 3. Molar ellipticity of S83G CRP at 222nm with the elevation of temperature from 20 to 90°C. Temperature was increased constantly at 1°C/min. Melting temperature(Tm) and vant Hoff enthalphy(Hv) were determined by Non-linear regression of Origin 6.0(shown in small graph).

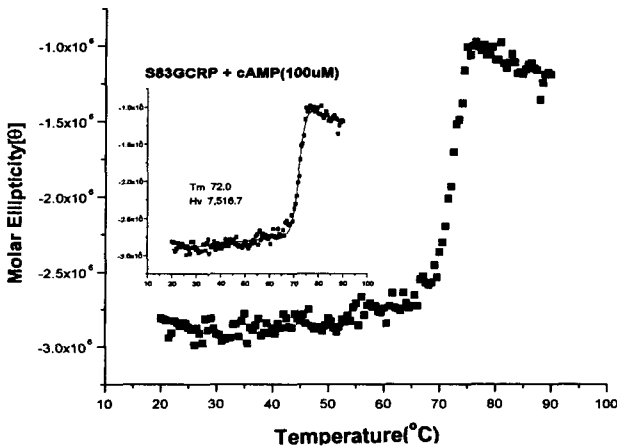


Fig. 4. Molar ellipticity of S83G CRP at 222nm with 0.1mM cAMP. Same reaction condition and method were used as Fig. 3 except that 0.1mM cAMP was added before incubation.

CRP 단백질이 native form(N)과 denatured form(D) 즉 변성과정이 $N \rightleftharpoons D$ 사이에서 일어난다는 가정에서 Santoro와 Bolen[14]이 제안한 단백질 변성에 관한 관계식을 Origin 6.0 프로그램의 non-linear regression 방법으로 melting temperature(T_m) 값과 vant Hoff enthalphy(Hv)을 결정하였다. 분석한 결과에 의하면 S83G CRP의 T_m 값이 cAMP가 없을 때 68.4°C이며 그리고 0.1mM cAMP의 농도에서 72°C였다. 그리고 5mM cAMP 농도에서 T_m 값이 82.3°C이다. 5mM cAMP의 경우에 Fig. 5의 그래프에서 보듯이 90°C에서 단백질의 변성이 끝나지 않은 상태이기 때문에 non-linear regression 분석에 필요한 변성된 상태에 해당되는 변수들의 값은 0.1mM cAMP의 값을 이용하였다. 0.1mM cAMP 농도에서 T_m 값이 cAMP가 없을때와 비교해서 약 4°C 증가했지만 5mM cAMP 농도에서 T_m 값은 cAMP가 없을때와 비교해서 14°C 증가했음을 알 수 있다. 그래서 hinge region 주위에 추가적인 cAMP의 결합으로 S83G CRP의 열 안정성이 10°C 증가함을 알 수 있다. 이 결과는 앞에서 언급[6]한 높은 농도의 cAMP에서 CRP가 열에 안정한 compact한 구조로 변화 되었기 때문이다.

본 실험의 결과를 야생형 CRP에 그대로 적용하기 어렵지만 Shi et al[15]에 의하면 DSC를 이용한 여러 pH에서 T_m 값이 야생형 CRP, S128A CRP 그리고 T127L CRP에서 거의 차이가 없었다. 이것은 cAMP가 없을 때 특정 위치에 아미노산 치환이 T_m 에 크게 영향을 주지 않는다는 것을

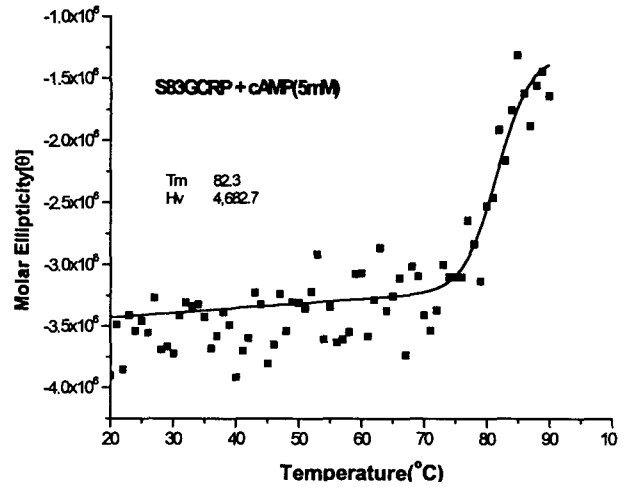


Fig. 5. Molar ellipticity of S83G CRP at 222nm with 5mM cAMP. Same reaction condition and method were used as Fig. 3 except that 5mM cAMP was added before incubation. T_m and Hv were determined by using some of parameters from Fig. 4, which corresponded to the denatured protein.

의미한다. 그래서 cAMP가 없을 때 야생형 CRP의 T_m 은 S83G CRP와 큰 차이를 보이지 않겠지만, 낮은 농도의 cAMP에서 S83G CRP보다 약간 높은 T_m 값을 가질 것으로 예상되나 높은 cAMP 농도에서 S83G CRP에서 낮은 농도의 cAMP에서 결합을 이루지 못한 cAMP binding pocket에 추가적인 결합을 통하여 야생형 CRP의 높은 cAMP 환경과 유사한 상태에서 cAMP가 hinge region에 추가적으로 결합해서 야생형과 거의 동일한 compact 구조를 가져서 비슷한 열 안정화가 이루어 질 것으로 예상된다.

참고 문헌

1. Belduz, A. O., E. J. Lee and J. G. Harman. 1993. Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia Coli*: targeting positions of 72 and 82 of cyclic nucleotide binding pocket. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1827-1835.
2. Dong A, J. M. Malecki, L. Lee, J. F. Carpenter and J. C. Lee. 2002. Ligand-induced conformational and structural dynamics changes in *Escherichia coli* cyclic AMP receptor protein. *Biochemistry* **41**, 6660-6667.
3. Gunasekera, A., Y. W. Ebright and R. H. Ebright. 1992. DNA sequence determinants for binding of the

- Escherichia coli* catabolite gene activator protein. *J. Biol. Chem.* **267**, 14713-14720.
4. Harman, J. G. 2001. Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta.* **1547**, 1-17.
 5. Harman, J. G., K. McKenney and A. Peterkofsky. 1986. Structure-function analysis of three cAMP-dependent forms of the cAMP receptor protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 16332-16339.
 6. Heyduk, E., T. Heyduk and J. C. Lee. 1992. Global conformational changes in allosteric proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 3200-3204.
 7. Heyduk, T. and J. C. Lee. 1989. *Escherichia coli* cAMP receptor protein evidence for three protein conformational states with different promoter binding affinities. *Biochemistry* **28**, 6914-6924.
 8. Joo, J. H., M. J. Goo and J. B. Gang. 2000. Study on the structure of cAMP receptor protein(CRP) by temperature change. *Kor. J. Life Science* **10**, 279-285.
 9. Kolb, A., H. Buc, S. Garges and S. Adhya. 1993. Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein. *Ann. Rev. Biochem.* **62**, 749-795.
 10. Krakow, J. S. and I. Pastan. 1973. Cyclic adenosine monophosphate receptor: loss of cAMP-dependent DNA binding activity after proteolysis in the presence of cyclic adenosine monophosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 2529-2533.
 11. Lee, E. J., J. Glasgow, S.-F. Leu, A. O. Beluz and J. G. Harman. 1994. Mutagenesis of the cyclic AMP receptor protein of *Escherichia Coli*: targeting positions of 83, 127 and 128 of cyclic nucleotide binding pocket. *Nucleic Acid Res.* **22**, 2894-2901.
 12. Mukhopadhyay, J., R. Sur and P. Parrack 1999. Functional roles of the cyclic AMP-dependent forms of cyclic AMP receptor protein from *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **453**, 215-218.
 13. Passner, J. M. and T. A. Steitz. 1997. The structure of a CAP-DNA complex having two cAMP molecules bound to each monomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 2843-2847.
 14. Santoro, M. M. and D. W. Bolen. 1988. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. *Biochemistry* **27**, 8063-8068.
 15. Shi, Y., S. Wang and F. P. Schwarz. 2000. Inter-subunit association induces unique allosteric dependence of the T127L CRP mutant on pH. *Biochemistry* **39**, 7300-7308.
 16. Weber, I. T. and T. A. Steitz. 1987. Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP defined at 2.5 angstrom resolution. *J. Mol. Biol.* **198**, 311-326.

(Received June 10, 2003; Accepted October 20, 2003)