

제 1996년도
추천연구사업
최종보고서

α_1 -Antitrypsin 및 Ovalbumin의 폴딩기작
규명 및 구조디자인 연구
(Studies on the Protein Folding and
Design of α_1 -Antitrypsin and
Ovalbumin)

연구기관
생명공학연구소

과학기술처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “ α_1 -Antitrypsin 및 Ovalbumin의 폴딩기작 규명 및 구조디자인 연구”의 추천연구사업보고서로 제출합니다.

1997. 12. 31

주관연구기관 : 생명공학연구소

과제책임자 : 유 명 희

참여연구원 : 임 하 나

정 연 희

서 은 주

이 승 남

안 희 영

요 약 문

I. 제 목

α_1 -Antitrypsin 및 Ovalbumin의 폴딩기작 규명 및 구조 디자인 연구

II. 사업(연구개발)의 목적 및 필요성

본 연구에서는 설핀저해제인 α_1 -antitrypsin에 대해 안정성이 증가된 변이들을 보다 많이 확보하고, 분자의 어떠한 변화(어느 부위를 어떻게)를 통해 안정화에너지(ΔG)를 얼마만큼 올릴 수 있는가를 분석하고자 한다. 또한 이들을 한 분자에 합성시켜 안정성 증대를 최대화한 후 구조 및 활성을 유지할 수 있는 한계가 어느 정도인지를 조사하여 보며, 변이 단백질의 열역학적 안정성 (conformational stability) 및 unfolding 또는 refolding 과정의 kinetics 조사, 저해활성 조사 등을 통해 설핀저해제 분자의 폴딩 및 안정화 법칙을 이해하고자 한다. 또한 이미 안정하고 활성이 없는 설핀인 ovalbumin을 대상으로 α_1 -antitrypsin 연구를 통해 확보된 변이 위치에서 α_1 -antitrypsin의 3차구조와 ovalbumin 구조를 비교하여 ovalbumin 안정성에 영향을 줄 수 있는 부위를 선정하고 domain 별로 변화를 시도한 후 분자가 불안정화 되면서 폴딩패턴이 α_1 -antitrypsin의 패턴과 비슷해 지는 디자인을 선택하여 저해제로의 전환을 시도하여 밝혀진 법칙을 점검하고 동시에 또 다른 법칙을 이해하고자 한다.

III. 사업(연구개발)의 내용 및 범위

- α_1 -antitrypsin native 구조의 최대 안정화
- Ovalbumin의 안정화와 비교 분석

IV. 사업수행(연구개발)결과

α_1 -antitrypsin의 변이스크린을 통해 분자의 어떠한 변화(어느 부위를 어떻게)를 통해 안정화에너지 (ΔG)를 얼마만큼 올릴 수 있는가를 분석하였으며, 제조된 α_1 -antitrypsin 변이들과 구조적으로는

유사하지만 α_1 -antitrypsin보다 훨씬 더 안정하고 저해제활성이 없는 ovalbumin과 안정성에너지를 비교분석하였다. 기존의 소수성 코아에 존재하는 내열성변이외에 부위별 (3차구조상 같은 위치)로 스크린하여 약 80개의 내열성변이를 확보하였으며, 이들 변이를 포함하는 변이단백질을 분리, 정제하고 특성을 규명하고 있으며, 이들 중 일부는 조합하여 복합돌연변이를 제조하여 안정성 최대화를 시도하고 있다. 이들중, Triple(T59A,T68A,A70G), Muti-7 (F51L,T59A,T68A,A70G,M374I,S381A,K387R), Multi-7/F189V 등의 Cm (unfolding transition의 midpoint) 값이 3.1, 4.8, 5.2 M 로서 $\Delta\Delta G$ (kcal/mol)값이 각각 3.4, 8.0, 8.7 이었다. 특히 Multi-7의 경우는 unfolding 및 refolding 속도를 측정하여 보았는데, Wild-type과 비교하여 refolding에는 크게 영향을 주지 않았지만 unfolding 속도는 상당히 느리게 하였다. 또한 Multi-7 변이는 보다 stable한 latent 구조로의 전환을 느리게하였으므로 native 구조를 보다 더 안정하게 하는 효과가 있었음을 알 수 있었다. Multi-7 변이는 저해제 활성에는 크게 영향을 주지 않았다. α_1 -antitrypsin 분자는 disulfide bond가 없는데 반해 ovalbumin은 73번 시스틴과 120번 시스틴 사이에 S-S 결합이 존재하므로 직접 stability를 비교할 수 없기 때문에 이들 시스틴을 알라닌으로 치환하여 S-S 결합을 할 수 없는 ovalbumin을 제조하여 Multi-7 α_1 -antitrypsin과 stability를 비교하였다. 그 결과 urea gradient gel electrophoresis에서 unfolding trnasion이 거의 같은 urea 농도에서 일어나는 것으로 미루어 두 분자의 stability는 거의 같다고 볼 수 있다.

V. 사업수행(연구개발)결과의 활용계획

본 연구결과는 국제저명학술지인 J. Biological Chemistry에 게재될 예정이다. 안정성 변이에 대한 연구는 단백질의 구조-기능 이해에 크게 기여하며, 변이를 이용하여 3차구조의 안정성 및 폴딩조절의 요인을 규명할 수 있다. 본 연구의 결과는 폴딩 및 안정성에 결합이 있는 다른 변이단백질들의 기초연구에도 활용될 수 있다. 또한 이와 같이 저해제 설핀중 prototype인 α_1 -antitrypsin을 대상으로 연구한 결과는 다른 유용 설핀(저해제 계열 : antithrombin, antichymotrypsin, plasminogen activator inhibitor 등; 비저해제 계열 : maspin 등)의 디자인 연구에 기초가 되며 직접적으로 응용될 수도 있어 파급효과가 크다고 본다.

목 차

제 1 장 서론	5
제 2 장 국내외 기술개발 현황	7
제 3 장 사업(연구개발)수행 내용 및 결과	9
제 4 장 사업(연구개발)목표 달성도 및 대외기여도	22
제 5 장 연구개발결과의 활용 계획	22
제 6 장 참고문헌	23

제 1 장 서 론

본 연구의 대상단백질인 설핀(Serine Protease Inhibitor) 계열의 단백질은 α_1 -antitrypsin (α_1 AT), antithrombin-III (AT-III), antichymotrypsin (ACT), plasminogen inhibitor-1 (PAI-1) 등을 포함하고 있으며, 인체 혈장내의 프로테아제/저해제의 평형을 유지시키는 데 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다.

설핀계열의 단백질 연구는 두가지 측면에서 필요하다고 볼 수 있다. 첫째, 설핀계 단백질들은 생체내에서 여러가지 중요한 기능을 수행하며 일부는 치료용 단백질제로 사용되고 있다. 이들에 대한 유전적 변이는 호흡기종(emphysema)이나 혈전증(thrombosis), angioedema, 혹은 간질환(cirrhosis) 등을 유발한다. 이들 설핀단백질들이 결핍되어 일어나는 질병을 치료하기 위해서 아직까지는 인체혈청에서 분리된 단백질을 사용하지만 원료인 혈액의 제한, 에이즈 및 감염 바이러스와 같은 물질의 오염문제 때문에 유전공학기법을 이용한 재조합단백질을 치료제로 개발하는 것이 현재의 추세이다. 또한 보다 효능이 높고 경제적인 유용물질로 만들어 내기 위해 단백질의 구조 연구를 통해 자연형의 단백질을 개량하는 것이 세계적인 추세이다.

설핀 계열의 단백질들은 프로테아제 저해제 기능외에도 ligand와 결합하여 세포내 특정 기능을 조절할 것으로 간주되고 있다. 예를 들어 α_1 AT는 cholesterol과 결합하고, hormone binding globulin들은 hormone delivery를 담당하며, ACT는 치매에 중요한 Alzheimer peptide를 assembly하는 데 일조를 하는 것으로 간주되고 있다. 또한 최근에 보고된 바에 의하면 PAI-1은 프로테아제저해제의 기능 이외에도 세포의 움직임에 중요한 ECM (extracellular matrix) ligand와 수용체의 상호작용을 방해함으로써 세포이동을 조절하는 기능을 지니고 있음이 밝혀졌다.

둘째, 설핀계열 단백질들은 구조적으로 상당히 흥미로운 관점을 제공하고 있다. 단백질의 native 구조란 열역학적으로 가장 안정된 상태이며 생물학적 기능을 지닌 각 단백질 고유의 3차구조를 일컫는다. 설핀의 native 구조는 열역학적으로 가장 안정된 상태가 아니고 긴장된 상태(strained, metastable)이며, kinetically trap된 폴딩단계의 중간산물이라는 실험적 증거가 축적되고 있다. 이러한 것은 단백질 폴딩기작연구라는 측면에서 볼 때 설핀단백질이 다른 일

반적인 단백질에서 쉽게 볼 수 없는 관점을 제공하고 있다는 이점이 있다. 하지만 보다 직접적인 효과는 설핀의 긴장된 상태의 native 구조가 설핀의 기능과 밀접한 관계가 있다는 것이다. 따라서 설핀계 단백질들에 대한 단백질공학을 성공적으로 수행하기 위해서는 설핀의 폴딩기작에 대한 이해가 필요하며 긴장된 상태에 대한 구조적인 기작과 안정성 조절요인을 보다 체계적으로 분석하는 것이 필요하다.

설핀계열의 단백질들은 프로테아제 저해제의 기능이 있는 저해제 계열(inhibitory serpins)과 저해제 활성이 없는 비저해제 계열(non-inhibitory serpins)로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 저해제 설핀중 prototype인 α_1 -antitrypsin과 비저해제의 대표적인 ovalbumin을 대상으로 폴딩기작 규명 및 구조 디자인을 연구하는 것을 목적으로 한다.

최근 serpin의 안정성에 영향을 주는 변이들의 분석이 본 연구팀을 포함하여 세계적으로 활발히 진행되고 있는 실정이며, 변이단백질들의 구조를 밝히는 것이 동시에 수행되어 안정성에 영향을 주는 요인을 규명하는 데 크게 기여했다. 한편 natural variant들의 분석 결과, 3차구조에서 안정성과 폴딩을 조절할 것으로 예상되는 regulatory domain이 제안되었다(Stein & Carrell, *Nature Struct. Biol.* 2:96-113, 1995). 하지만 새로운 변이들을 설계하기 위해서는 구조 안정화 법칙에 대한 보다 정확한 이해와 serpin의 폴딩기작에 대한 이해가 수반되어야 한다.

한편 단백질들의 기능 기작에 관한 생화학적 구조학적 연구들이 병행되어 serpin의 구조적인 변화에 의해 야기되는 분자적 기작에 대한 지식의 증가는 질병의 원인 규명에 대한 전망을 밝게해줄 것이며, 효과적인 치료제들을 디자인하여 개발하는 것이 앞으로 추세가 될 것이다. 본 연구는 이러한 노력들에 큰 기여를 할 것이다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

국외의 경우 설핀계열의 유전적 변이가 폐기종, 혈전증 및 간질환 등의 질병과 연관이 있어서 유럽 및 미국을 중심으로 오래전부터 꾸준히 유전적 변이들 중심으로 연구가 진행되어 왔다(설핀단백질의 유전적 결함에 대한 review; Stein & Carrell, *Nature Structural Biology*, 2: 96-113, 1995).

X-ray 결정구조는 설핀계열 단백질의 구조-기능적 관점의 이해에 대한 토대를 제공한다. 최근에 활성이 있는 형태의 α_1 -antichymotrypsin의 결정구조(Wei *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 1:251-258, 1994)와 antithrombin 구조(Schreuder *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 1: 48-54, 1994; Carrell *et al.*, *Structure* 2:257-270, 1994)가 밝혀졌으며, prototype인 α_1 -antitrypsin의 경우 활성형 결정구조가 본 연구실이 제공한 변이 단백질을 이용하여 국내팀에서 밝혀졌으며(Song *et al.*, *FEBS Lett.* 377: 150-154, 1995; Ryu *et al.*, *Structure* 4: 1181-1192, 1996), MRC 그룹에서도 본 연구실에서 얻은 변이를 이용하여 밝힌 바 있다 (Elliott *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3: 676-681, 1996).

α_1 -antichymotrypsin (ACT)은 SERPIN 기능외에 Alzheimer's disease에서 보여지는 brain amyloid deposit의 생성을 조절할 수 있는 기능을 갖고 있음이 밝혀졌다. α_1 -antichymotrypsin (ACT)은 치매(Alzheimer's disease)에서 보여지는 brain amyloid deposit의 주된 구성물질인 amyloid β (A β) peptide에 대한 specific affinity가 있어서 amyloid-like filament의 생성을 촉진하는 pathological chaperone기능이 있음이 최근에 보고되었다(Ma *et al.*, *Nature* 372:92-94, 1994; Eriksson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2313-2317, 1995; Janciauskiene *et al.*, *Nature Structural Biol.* 3: 668-670, 1996).

혈전증의 주요 저해제인 antithrombin-III는 heparin과 결합함으로써 thrombin과의 결합상수가 1000배 이상 증가하는데, 이때 heparin과의 결합에 의해 reactive site loop와 heparin binding site의 구조적인 변화가 수반됨이 알려졌다(Stein and Carrell, *Nature Struct. Biol.* 2:96-113, 1995). 또한 antithrombin의 활성을 조절하는 heparin에 의해 유도되는 구조적인 변화에 대해 모델이 제안되기는 하였지만(Boeckel *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 1:423-425, 1995), 자세한 기작은 아직 밝혀지지 않았다.

최근에 보고된 바에 의하면 PAI-1은 프로테아제저해제의 기능이외에도 세포의 움직임에 중요한 ECM (extracellular matrix) ligand vitronectin과 수용체 integrin의 상호작용을 저해함으로써 세포이동을 조절하는 기능을 지니고 있음이 밝혀졌다 (Stefansson & Lawrence, Nature 383: 441-443, 1996).

국내에서 설핀계열의 단백질을 체계적으로 연구하는 그룹은 본 연구실 외에도 서울대학교 서세원교수 연구팀에서 설핀계열 단백질들에 대해 X-ray 결정구조에 대한 연구를 수행하고 있으며, 한국과학기술원 유욱준교수 및 서울의대 내과 박선양교수 연구팀에서 antithrombin의 한국형 유전적변이에 대한 연구가 진행중이다. 본 과제 연구팀은 생화학적, 분자생물학적, 및 물리화학적 연구방법을 모두 사용하여 단백질의 안정성을 분석 개량하고 세포내에서의 단백질의 폴딩 및 분비관계를 밝히는 연구를 하고 있다. 본 연구의 대상인 설핀계열의 단백질 α_1 -antitrypsin의 열에 대한 안정성이 증진된 돌연변이들을 분리하는 시스템을 확립하여, 물리화학적으로 더 안정한 변이들을 분리하였으며, α_1 -antitrypsin native구조의 긴장된 상태의 요인으로 소수성내부에서 아미노산잔기 측쇄들의 locking을 제안한 바 있다(Kwon *et al.*, J. Biol. Chem. 269:9627-9631, 1994; Lee *et al.*, Nature Struct. Biol. 3, 497-500, 1996; PCT 특허 출원, PCT/KR 94/00048). 또한 호흡기종 (emphysema)을 일으키는 유전적 요인중의 하나인 Z-타입 (E342K) α_1 -antitrypsin의 작용기작으로서 단백질의 폴딩이 야생형에 비하여 수백배 늦어지게 됨에 따라 생성되는 것으로 밝혀졌다(Yu *et al.*, Nature Struct. Biol. 2:363-367, 1995). 한편 안정성이 증진된 돌연변이 F51L은 Z 타입 돌연변이의 폴딩을 촉진시킬 수 있었는데 (Kim *et al.*, J. Biol. Chem. 270:9627-9631, 1995; Kang *et al.*, J. Biol. Chem. in press), 이것은 antitrypsin의 안정성과 폴딩사이에 깊은 관계가 있음을 암시하고 있다. 이 외에도 본 연구팀은 X-ray crystallography 전문가팀 (서울대 서세원박사, 본 연구소 류성언박사)과 공동연구로 두개의 변이 α_1 -antitrypsin의 X-선 결정구조를 밝힌 바 있다(Song *et al.*, FEBS Lett. 377: 150-154, 1995; Ryu *et al.*, Structure 4, 1181-1192, 1996).

제 3 장 내용 및 결과

(1) 이론적 접근방법

설핀저해제는 프로테아제를 만나게 되면 1:1 복합체를 형성하게 되는데, 이 과정은 프로테아제가 reactive center loop와 결합한 후 주 β -sheet인 A sheet에 삽입되어 안정된 복합체를 이루게 된다. 따라서 설핀계열의 저해제는 reactive center loop의 구조적인 변화와 이에 수반된 분자전체의 구조적 변화(stressed form \rightarrow relaxed form)에 의해 그들의 활성을 조절한다. 이때 native 구조의 긴장된 상태는 loop의 삽입을 촉진시키는 데 이용된다. 설핀계열의 비저해제인 ovalbumin 경우는 native 상태가 긴장이 없는 안정된 상태이며 따라서 저해제 활성도 없다. 기존의 실험 결과 α_1 -antitrypsin의 경우에 변이를 통해 안정성을 증가시킬 수 있었는데, 이때 저해제활성은 그대로 유지함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 얻어진 변이의 안정성 증가 정도가 작기 때문(활성을 저해할 만큼 크지 않음)이라고 생각할 수도 있고, 아니면 설핀저해제의 안정성과 활성 관계에 대한 기존의 이해가 충분치 못하기 때문일 수도 있다.

따라서 본 연구에서는 α_1 -antitrypsin에 대해 안정성이 증가된 변이들을 보다 많이 확보하고, 이들을 한 분자에 합성시켜 안정성 증대를 최대화한 후 구조 및 활성을 유지할 수 있는 한계가 어느 정도인지를 조사하여 보며, 동시에 설핀저해제 분자의 폴딩 및 안정화 법칙을 이해하고자 한다. 또한 이미 안정하고 활성이 없는 ovalbumin을 대상으로 α_1 -antitrypsin 연구를 통해 얻은 결과를 이용하여 불안정화 및 저해제로 전환 디자인을 시도하여 배운 법칙을 점검하고 동시에 또 다른 법칙을 이해하고자 한다.

이와 같이 저해제 설핀중 prototype인 α_1 -antitrypsin과 비저해제의 대표적인 ovalbumin을 대상으로 연구한 결과는 다른 유용 설핀(저해제 계열 : antithrombin, antichymotrypsin, plasminogen activator inhibitor 등; 비저해제 계열 : maspin 등)의 구조 디자인 연구에 기초가 되며 직접적으로 응용될 수도 있어 파급효과가 크다고 본다.

(2) 실험적 접근방법

1) α_1 -Antitrypsin의 활성 측정 및 내열성 측정

야생형과 복합돌연변이형의 α_1 AT가 포함된 벡터 pFEAT30를 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환 시킨 후, 이를 M9ZB 배지에 접종하여 37°C에서 600 nm에서의 흡광도 0.6까지 배양하였다. 여기에 IPTG를 0.4 mM 첨가하여 37°C에서 3시간 더 배양한 후, 원심분리기로 세포를 수확하여 완충

용액(50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0)에 현탁시키고, 0°C에서 초음파로 파쇄하였다. 파쇄액을 원심분리하여 상등액만을 취해 활성 측정에 사용하였다. α_1 -AT의 활성 측정은 저장 완충용액(50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 50%glycerol, pH 8.0)에 들어있는 elastase 10 μ l와 기질인 *N*-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide를 최종종도 0.1 mM이 되도록 가하여 동일한 완충용액을 최종 0.5 ml이 되게 넣어준 후, 410 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 α_1 -AT의 잔여 활성을 측정하였다. 또한, 야생형과 변이형의 열안정성을 비교하기 위해 세포 추출상등액을 75°C로 유지하다가 시간별로 분취하여 잔여 α_1 -AT활성을 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

2) α_1 -AT의 안정성 및 폴딩 분석

Fluorescence spectroscopy: 폴딩과정에서 urea에 의한 단백질의 3차구조의 변화를 감지하기 위하여 tryptophan을 probe로 이용하여 fluorescence를 측정하였다. 280 nm에서 excitation 시킨후 360 nm에서 emission을 측정하였다. 일정농도 (0-8 M)의 urea가 포함된 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol(final pH 6.5) buffer에 정제된 단백질을 동일한 양(20 μ g/ml)을 넣고 25°C에서 8시간 방치하여 평형에 도달하게 한 후 fluorescence를 측정하였다. fluorescence에 의해 측정된 값은 two-state unfolding model에 따라 fitting하였다. 먼저 측정된 값으로부터 각 urea 농도에서 unfold된 비율을 구하고 transition region을 구하고 transition region을 0 M urea까지 linear extrapolation하여 folded/unfolded state 사이의 자유에너지 차이를 계산한다. Linear extrapolation은 Sigma plot ver. 5.0을 이용하여 식에 따라 측정된 fluorescence를 urea농도에 computer fit하여 실시하였다.

CD spectroscopy: 단백질의 2차구조의 변화를 감지하기 위하여 일정농도 (0-8 M)의 urea가 포함된 10 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol (final pH 6.5) buffer에 정제된 단백질을 동일한 양(50 μ g/ml)을 넣고 25°C에서 8시간 방치하여 평형에 도달하게 한 후 222 nm에서의 ellipticity변화를 측정하였다. JASCO J-700 Spectropolarimeter를 이용하였고 0.1 cm path length quartz cell을 사용하여 CD signal을 측정하였다.

3) In vitro translation and Transverse Urea Gradient (TUG) Gel Electrophoresis: 폴딩과정중 응집문제점을 극소화하기 위해 소량의 단백질을 방사성동위원소로 표지한 후 TUG gel system을 이용하여 분석한다. 이 방법은 활성이 있는 형태의 단백질을 얻기위해 세포분쇄액에서 단백질이 합성됨과 동시에 폴딩이 일어나는 것을 이

용하는 것으로서, refolding 단계를 거치지 않고 활성형 (native) 단백질을 얻을 수 있다는 이점이 있다.

In vitro translation -- 폴딩과정중 aggregation 문제점을 극소화하기 위해 소량의 단백질을 방사성동위원소 (^{35}S -Met)로 표지한 후 TUG gel system을 이용하여 분석하였다. $\alpha 1$ -AT 유전자의 *in vitro* transcription은 SP6/T7 transcription system (Boehringer Mannheim)을 사용하여 37 °C에서 1시간 동안 수행하였다. *in vitro* translation은 rabbit reticulocyte lysate system (Promega)을 이용하여 30 °C에서 1시간 동안 수행하였다. 대표적인 translation mixture에는 20 uCi [^{35}S]-methionine, 0.5 ug mRNA, 그리고 17.5 ul의 reticulocyte lysate가 함유되어 있다. 방사성동위원소로 표지된 translation product를 TUG gel에 running하고 autoradiography를 통하여 관찰하였다.

Transverse Urea Gradient (TUG) Gel Electrophoresis -- 폴딩과정에서 단백질의 hydrodynamic한 volume의 변화를 감지하기 위하여, 전기영동되는 방향에 수직으로 0M 부터 8M 까지의 urea gradient gel을 만들었다(Goldenberg, 1989). 네 개의 slab gel (100 X 80 mm)을 multigel caster (Hoefer Scientific Instruments)에서 gradient maker와 single-channel peristaltic pump를 사용하여 동시에 만들었다. Native한 단백질 혹은 8M urea에서 변성된 단백질(20 ug)을 gel의 윗쪽에 loading 한 다음, 25 °C에서 3시간 동안 10 mA의 일정한 전류를 걸어 전기영동하였다.

4) Folding과 unfolding의 kinetics

Unfolding kinetics를 측정하기 위해서 일정농도의 urea가 포함된 buffer에 정제된 단백질을 일정량 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 되도록 섞고 시간에 따른 fluorescence 변화로부터 unfolding kinetics를 측정하였다. Refolding kinetics를 측정하기 위해서 7 M urea에서 단백질을 5분 동안 unfolding시킨 다음 지정된 농도의 urea에서 refolding이 시작되도록 하였다. 각 시간에서 측정된 fluorescence값으로부터 식에 따라 각 농도의 relaxation time을 구하고 relaxation time과 농도의 관계에서 extrapolation하여 0 M urea에서의 relaxation time을 구하였다.

5) 단백질분해효소와 복합체 형성

Multi-7 $\alpha 1$ AT이 단백질분해효소와 복합체를 형성함을 SDS-저항성 $\alpha 1$ AT-단백질분해효소 복합체를 분석하여 조사할 수 있었다. 분리 정제된 $\alpha 1$ AT을 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0인 완충용액에서 돼지 췌장 elastase와 다양한 몰비(1:0.1 - 1:0.4)로 37°C에서 10분간 반응시킨 뒤 trichloroacetic acid로 침전시킨 후 SDS-PAGE를 하여 분

석하였다. 단백질 band는 Coomassie Brilliant Blue 염색을 하여 볼 수 있었다.

(3) 연구내용

1) 최종목표

- 설핀계 단백질의 폴딩기작 규명 및 구조디자인

2) 당해년도 내용

- α_1 -antitrypsin native 구조의 최대 안정화
- Ovalbumin의 안정화와 비교 분석

(4) 연구 결과

1) 복합돌연변이 α_1 -antitrypsin의 안정성

기존의 소수성코아에 존재하는 내열성변이(그림 1)외에 부위별(3차구조 상 같은 위치)로 스크린하였으며, 이들 변이를 포함하는 변이단백질을 분리, 정제하고 특성을 규명하고 있으며, 이들 중 일부는 조합하여 복합 돌연변이를 제조하여 안정성 최대화를 시도하고 있다.

몇몇 복합변이들의 열에 대한 안정성은 표 1에 정리되어 있다. 이들 중 Triple(T59A,T68A,A70G) 변이와 Multi-7, 그리고 Multi-8에 대해서는 urea에 의한 변성실험을 시도하여 conformational stability를 측정하였다. 변이 α_1 AT의 equilibrium unfolding transition을 25 °C에서 urea 농도를 증가시키면서 조사하였다. 그림 2에서 보는 것처럼 unfolding을 단백질 내(Trp194)의 형광도를 측정하여 확인한 결과, 표준형단백질의 경우 전이의 중간점이 1.8 M이었으며, 변이단백질들의 경우 안정성 증진 정도는 표2에 정리되어 있다. 그림 2는 Multi-7 α_1 -antitrypsin을 대상으로 unfolding을 fluorescence(2A) 및 CD(2B) spectroscopy를 이용하여 추적한 것이다. 모든 변이 α_1 -antitrypsin의 경우 자연형 단백질에 비해 안정성이 크게 증가함을 보여주고 있다.

표 1. α_1 -antitrypsin 복합변이의 열안정성

Mutants	Mutation sites	Half-life(min)
Multi-7	F51L,T59A,T68A,A70G,M374I,S381A,K387R	10
Multi-8	Multi-7/F189V	20.5
Multi-8	Multi-7/N314D	21.3
Multi-9	Multi-7/F189V,N314D	43.2
Multi-9	Multi-7/A34G,S36R	115.4
Multi-13	Multi-7/A34G,S36R,F189V,L303M,Q305P,K335T	132.2
Multi-13	Multi-7/A34G,S36R,F189V,L303M,Q305P,K335G	384.7
Multi-13	Multi-7/A34G,S36R,F189V,L303M,Q305P,N314D	197.4

표 2. 복합돌연변이의 안정성 (Urea-induced equilibrium unfolding)

Mutants	C _m (M)	$\Delta \Delta G$ (kcal/mol)
Wld Type	1.9	0
Triple(T59A,T68A,A70G)	3.1	3.4
Muti-7	4.8	8.0
Multi-7/F189V	5.2	8.7

* $\Delta \Delta G = \Delta C_m \times 2.6$ (wild-type m value)

2) Unfolding Refolding Kinetics of Multi-7

내부 형광도 변화 (Tryptophan 194 fluorescence)를 지표로 하여 변이 α_1 AT의 kinetic unfolding과 refolding 실험을 수행하였다. 변이 α_1 AT의 unfolding은 각각의 돌연변이의 추가적 효과로 예상되듯이 대단히 지연되었다(그림 3). 변이 α_1 AT의 refolding은 표준형 α_1 AT의 경우와 같이 두개의 refolding phase가 관찰되었는데 변이에 의해 그다지 변하지 않았음을 알 수 있었다. 이러한 결과들은 내열성 돌연변이의 주된 영향은 unfolding rate을 지연시킴을 나타내고 있으며, 변이에 의해 native state가 더 안정화되었음을 의미하고 있다.

3) Multi-7 변이 단백질의 저해제 활성

단백질분해효소와 변이 α 1AT과의 복합체 형성

돼지의 췌장 elastase와 α 1AT간의 association rate constant는 돌연변이에 영향을 받지 않았다. 그러나, 단백질분해효소의 결합에서 A sheet 안으로 loop의 삽입율은 serpin 저해제와 해당 단백질분해효소간의 안정한 복합체 형성에 대단히 중요할 것으로 여겨진다. A sheet 열기를 α 1AT 내열성 돌연변이가 지연시키기 때문에 복합체 형성시에도 loop 삽입율을 감소시켜 저해활성에 영향을 줄 것으로 추정되었다. 복합체 형성에서 α 1AT의 내열성 돌연변이의 영향을 조사하기 위하여, 표준형과 변이 α 1AT를 돼지 췌장 elastase와 반응시켜 단백질분해효소- α 1AT 복합체를 inhibitory pathway와 substrate pathway중 어느 쪽으로 얼마나 치우치는지를 조사하였다. 그림 4에서 보는 바와 같이, α 1AT이 elastase와 결합하여 SDS-resistant 단백질분해효소-저해제 복합체를 형성하는 것은 돌연변이에 그다지 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

뿐만아니라 stoichiometry of inhibition(S.I.)을 측정한 결과 돌연변이에 의해 α 1AT의 활성이 그다지 영향을 받지않았음을 알 수 있다 (그림 5, 표 3).

표 3. Kinetic parameters in the interaction of α ₁-antitrypsin with porcine pancreatic elastase

α ₁ -antitrypsin	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	K_i (pM)	S. I.
wild-type	5.11 ± 0.7	95 ± 24	1.7
Multi-7	5.03 ± 1.0	117 ± 29	1.7

4) Ovalbumin과 변이 α ₁-antitrypsin의 stability 비교

α ₁-antitrypsin 분자는 disulfide bond가 없는데 반해 ovalbumin은 73번 시스틴과 120번 시스틴 사이에 S-S 결합이 존재하므로 직접 stability를 비교할 수 없기 때문에 이들 시스틴을 알라닌으로 치환하여 S-S 결합을 할 수 없는 ovalbumin을 제조하여 Multi-7 α ₁-antitrypsin과 stability를 비교하였다. 그 결과 urea gradient gel electrophoresis에서 unfolding transition이 거의 같은 urea 농도에서 일어나는 것으로 미루어 두 분자의 stability는 거의 같다고 볼 수 있다 (그림 6).

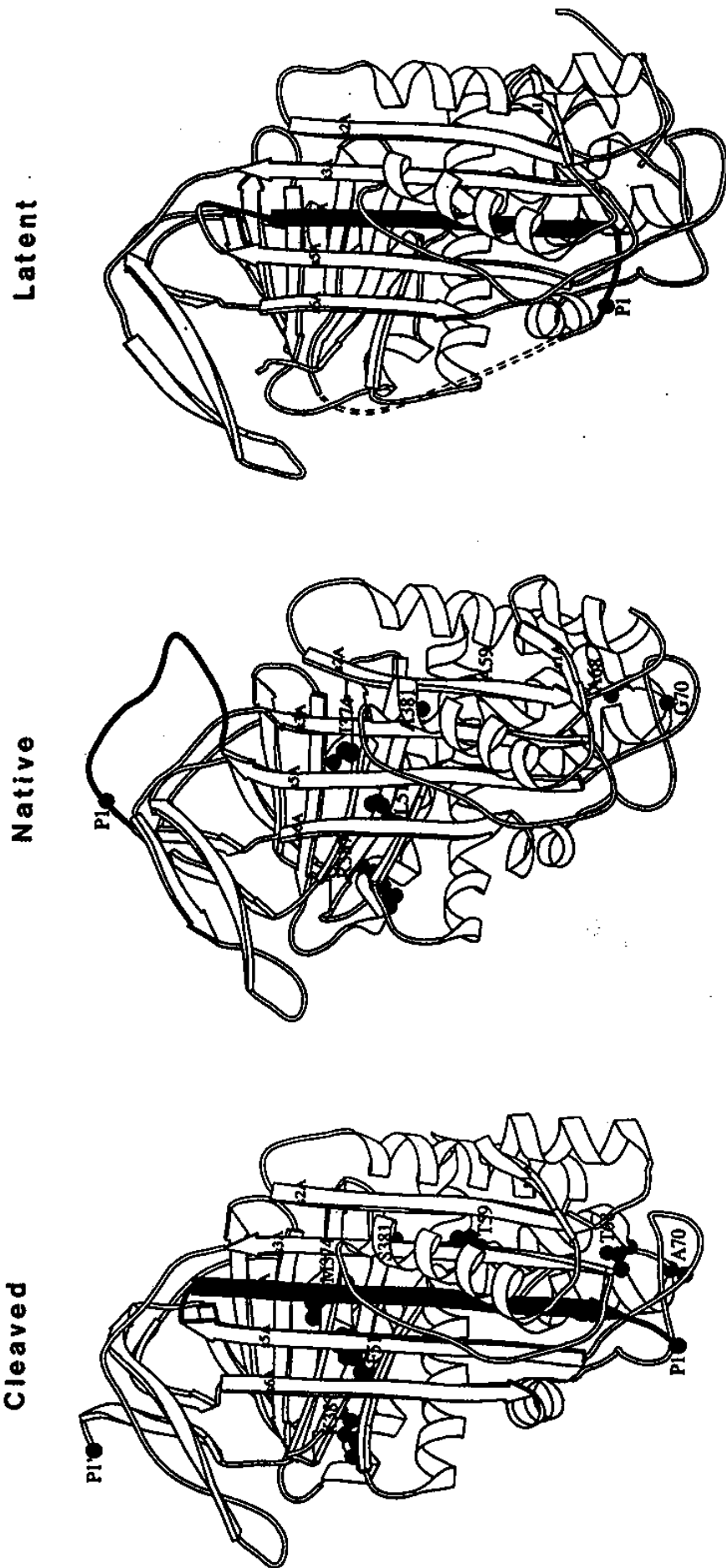


그림 1. 자연형, cleaved, latent α_1 AT. Multi-7의 7 가지 변이의 위치가 표시되어 있음.

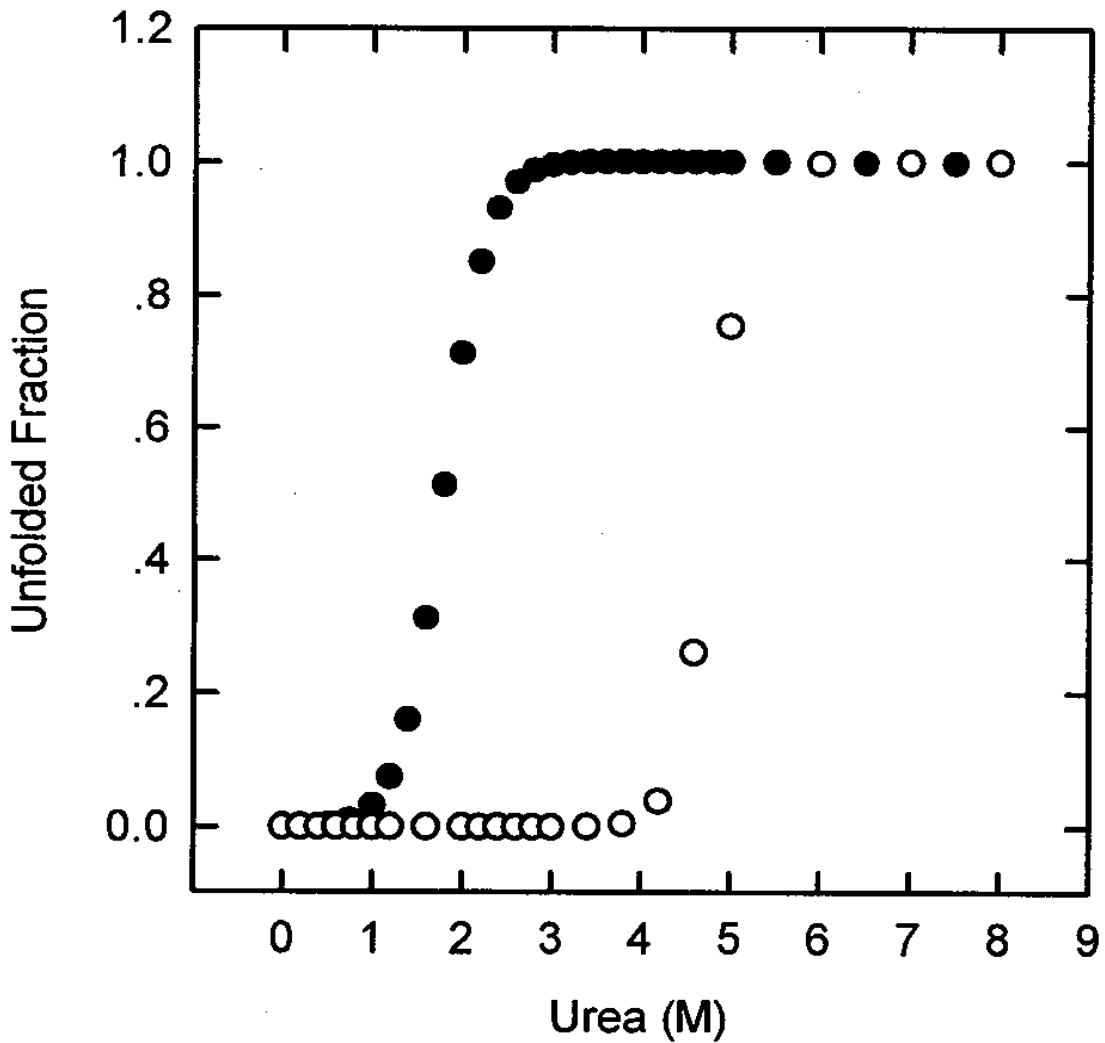


그림 2A. 변이 $\alpha 1\text{AT}$ 의 구조적 안정성 (Fluorescence Intensity) 360 nm에서 fluorescence emission intensity의 증가로 측정된 표준형과 돌연변이 $\alpha 1\text{AT}$ 의 urea-induced unfolding transition ($\lambda_{\text{ex}}=280$ nm, excitation과 emission의 slit width는 5 nm). 각 시료는 8시간동안 25°C에서 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM β -mercaptoethanol의 10 mM 인산칼륨 완충용액(최종 pH, 6.5)에 평형화시켰으며 단백질 농도는 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 임.

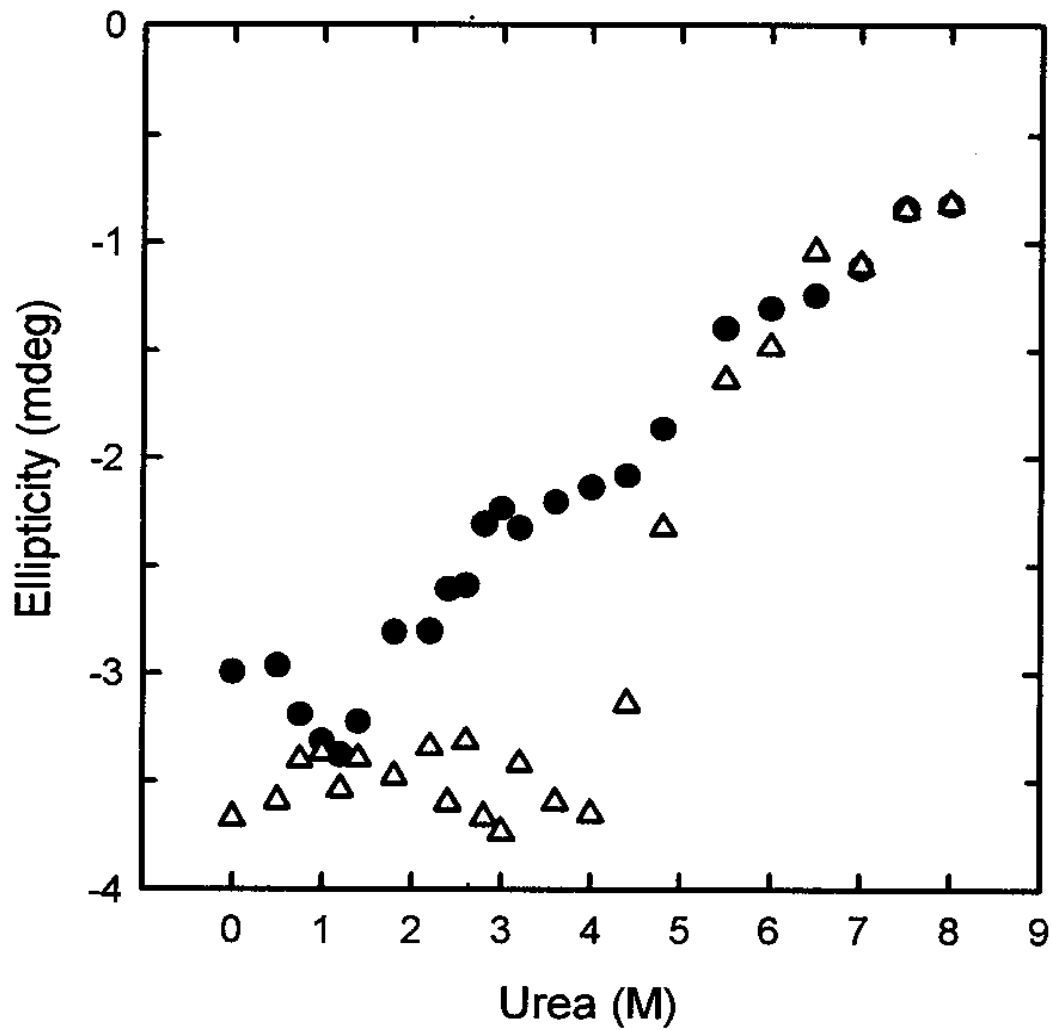


그림 2B. 변이 α 1AT의 구조적 안정성 (CD spectroscopy) CD signal의 변화로 측정한 표준형(●)과 Multi-7 돌연변이(Δ) α 1AT의 urea-induced unfolding. α 1AT 단백질의 구조적 변화의 지표로서 222 nm에서 CD ellipticity의 감소를 측정하였음(25°C). 단백질 농도는 50 μ g/ml임.

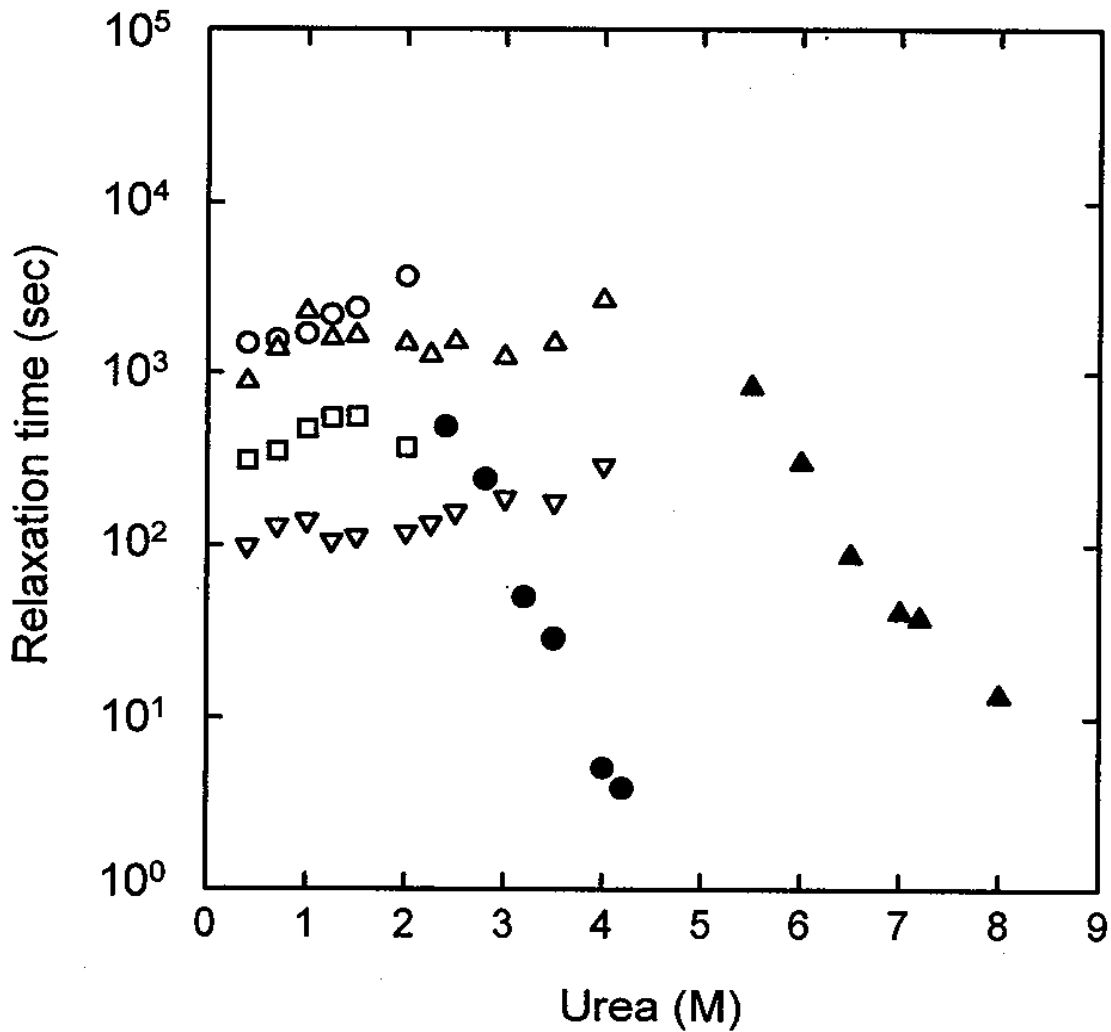
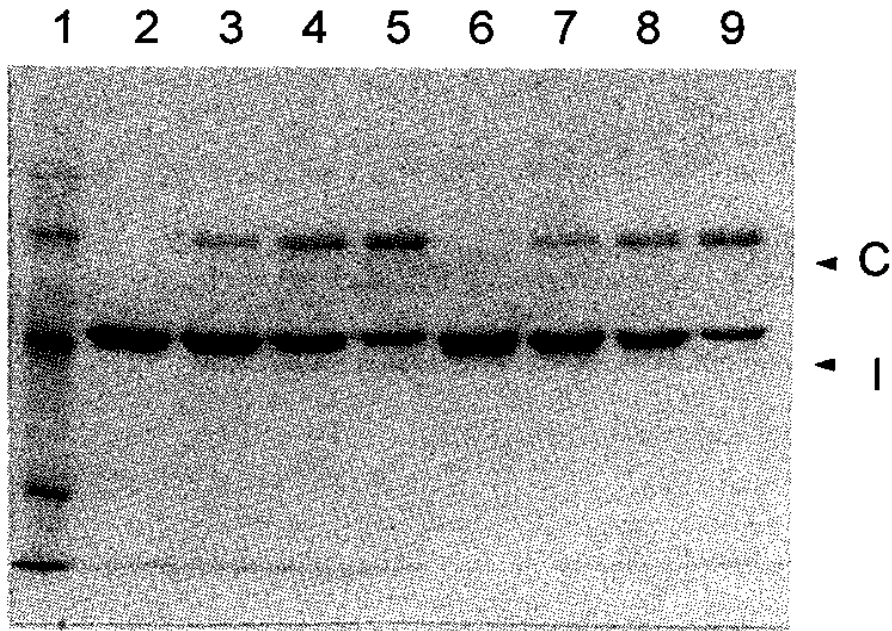


그림 3. 표준형(●, ○, ◻)과 Multi-7 돌연변이(▲, △, ▽), $\alpha 1$ AT의 unfolding (검은색 기호들)과 refolding(하얀색 기호들)의 kinetics. 형광 signal에 의한 urea-dependent refolding과 unfolding의 relaxation time을 plotting한 것임. Native나 unfolded state의 여러 농도의 urea에서 구조 변화를 보고자 한 것으로 형광광도($\lambda_{ex} = 280$ nm와 $\lambda_{em} = 360$ nm)가 새로운 평형상태에 도달하는 시간을 측정하였으며 최종 단백질 농도는 $5 \mu\text{g/ml}$ 임. Refolding을 보고자 native 단백질을 8 M urea에서 5분동안 unfold시켰고 refolding은 unfold된 단백질을 표시된 urea 농도에 넣어 시작하였음.

HLE



PPE

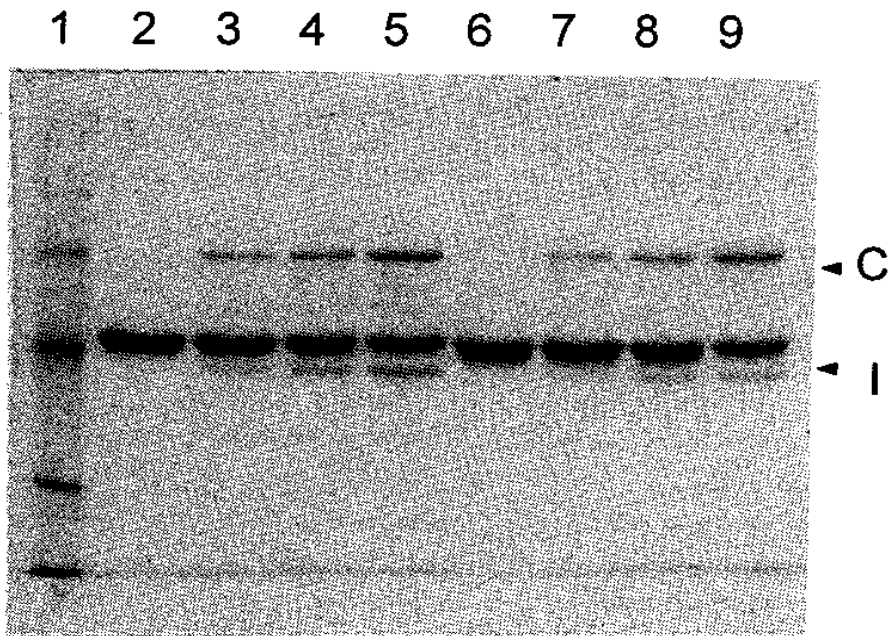


그림 4. Inhibitory complex stability에 대한 들연변이의 영향. α 1AT(4 μ g)을 37 $^{\circ}$ C 에서 50 mM Tris-Cl, 50 mM NaCl, pH 8.0에서 10분간 human leukocyte elastase (HLE) 또는 porcine pancreatic elastase (PPE) (각 lane 2에서 5, 6에서 9에 0, 0.4, 0.8, 1.6 μ g)을 처리 반응시켰음. SDS-resistant α 1AT-elastase 복합체의 형성을 10% SDS-PAGE로 분석하였고 분자량 표준시료로 이동거리를 표시하였음.

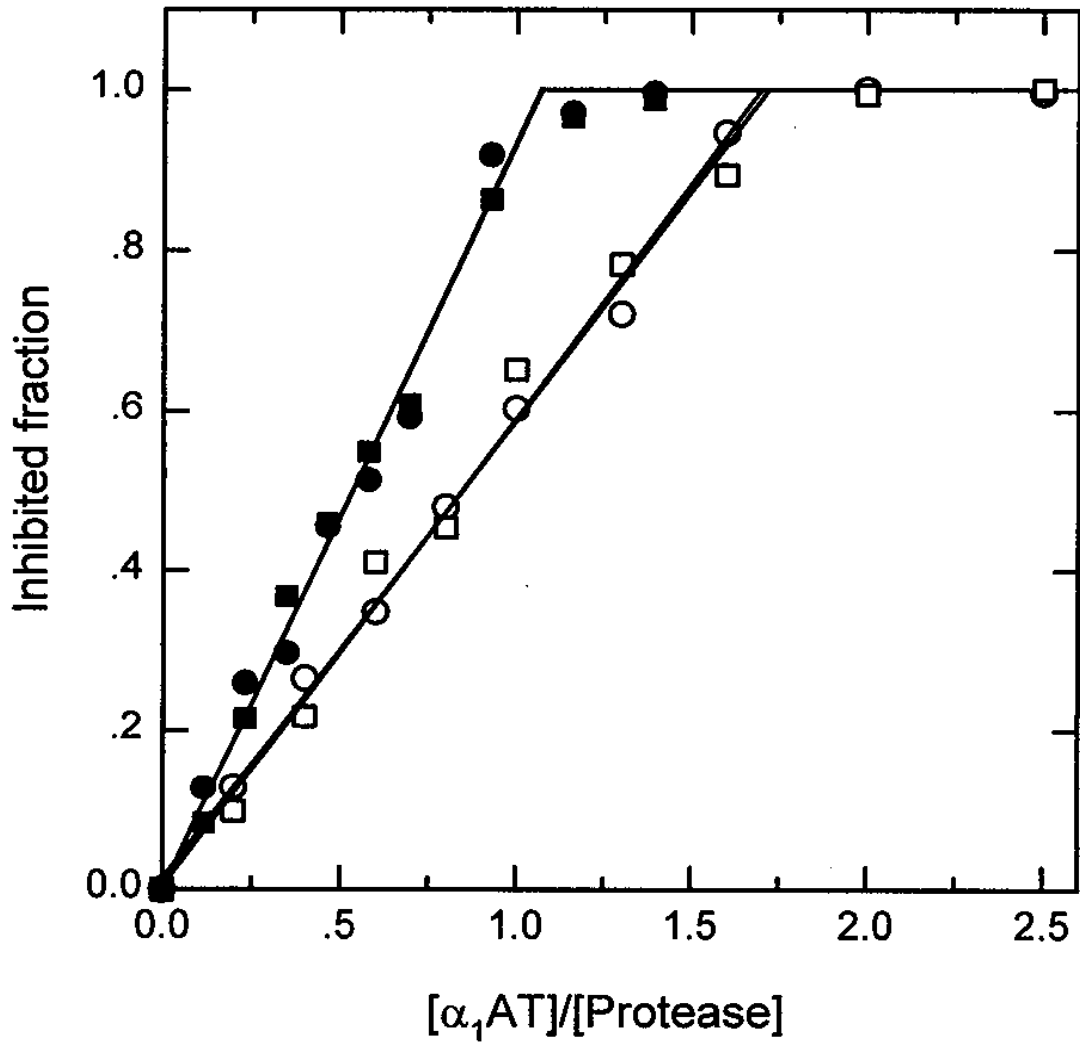
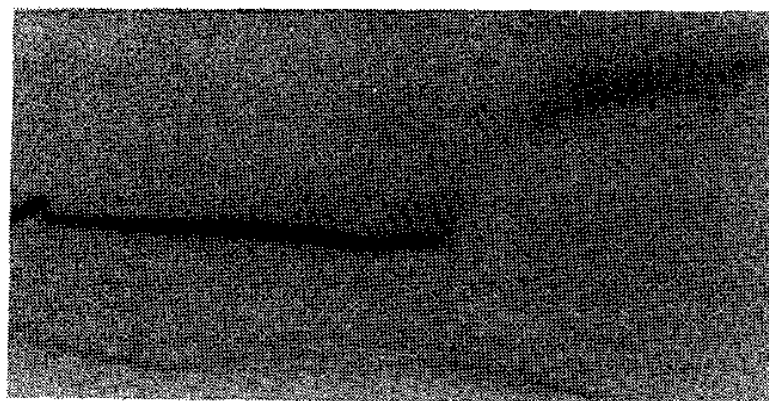


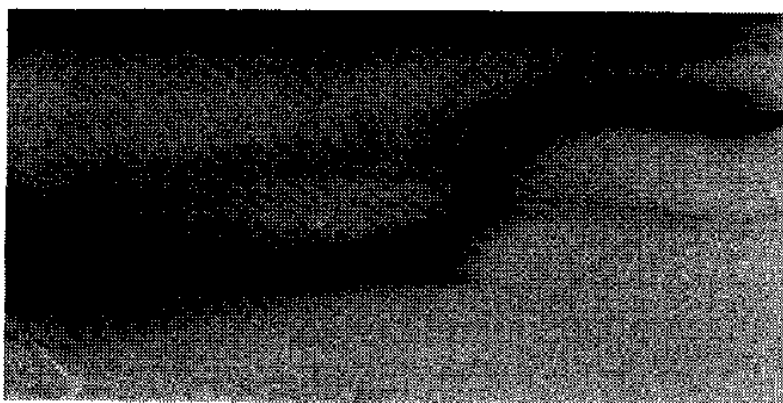
그림 5. 표준형(●, ○)과 Multi-7 α_1 AT 돌연변이(■, □)의 HLE(●, ■) 또는 PPE(○, □)에 대한 inhibition activity.

Multi-7



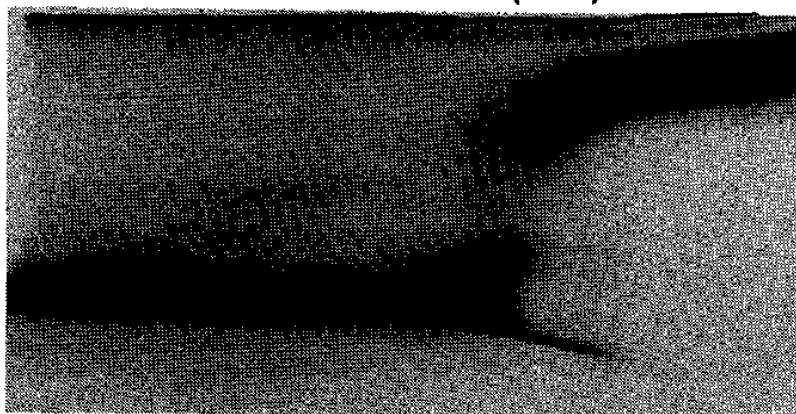
0M → 8M

Ovalbumin (C73A)



0M → 8M

Ovalbumin (Wt)



0M → 8M

그림 6. 변이 α_1 AT과 ovalbumin의 구조적 안정성. Ovalbumin 표준형과 C73A, 돌연변이 α_1 AT 단백질의 transverse urea gradient gel 전기영동. 순수 분리된 native 단백질을 6 mA의 일정전류 조건에서 3시간 동안 25°C에서 전기영동하였음. 단백질의 띠는 Coomassie blue로 염색하였음.

제 4 장 목표 달성도 및 대외 기여도

본 연구의 결과는 원래 목표인 α_1 -antitrypsin native 구조의 최대 안정화와 ovalbumin의 안정화와 비교 분석하는데 100% 달성하였으며 해외 저명 학술지인 Journal of Biological Chemistry에 발간중으로서, 국내외 단백질 폴딩연구분야에 큰 영향을 미칠 것이다.

제 5 장 결과의 활용계획

본 연구결과의 일부는 국제저명학술지인 J. Biological Chemistry에 게재될 예정이다. 안정성 변이에 대한 연구는 단백질의 구조-기능 이해에 크게 기여하며, 변이를 이용하여 3차구조의 안정성 및 폴딩조절의 요인을 규명할 수 있다. 본 연구의 결과는 폴딩 및 안정성에 결함이 있는 다른 변이단백질들의 기작연구에도 활용될 수 있다. 또한 이와 같이 저해제 설핀의 prototype인 α_1 -antitrypsin을 대상으로 연구한 결과는 다른 유용 설핀(저해제 계열 : antithrombin, antichymotrypsin, plasminogen activator inhibitor 등; 비저해제 계열 : maspin 등)의 구조디자인 연구에 기초가 되며 직접적으로 응용될 수도 있어 파급효과가 크다고 본다.

제 6 장 참고문헌

1. Stein, P. E., and Carrell, R. W. (1995) *Nature Struct. Biol.* 2, 96-113
2. Wei, A., Rubin, H., Cooperman, B. S. and Cheristianson, D. W. (1994) *Nature Struct. Biol.* 1, 251-258
3. Schreuder, H. A., de Boer, B., Dijkema, R., Mulders, J., Theunissen, H. J. M., Grootenhuis, P. D. J., and Hol, W. G. J. (1994) *Nature Struct. Biol.* 1, 48-54
4. Carrell, R. W., Stein, P. E., Fermi, G., and Wardell, M. R. (1994) *Structure* 2, 257-270
5. Song, H. K., Lee, K. N., Kwon, K.-S., Yu, M.-H., and Suh, S. W. (1995) *FEBS Lett.* 377, 150-154
6. Ryu, S.-E., Choi, H.-Y., Kwon, K.-S., Lee, K. N., and Yu, M.-H. (1996) *Structure* 4, 1181-1192
7. Elliott, P. R., Lomas, D. A., Carrell, R. W., and Abrahams, J. P. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 676-681
8. Ma, J. et al. (1994) *Nature* 372, 92-94
9. Eriksson, S., Janciauskiene, S., and Lannfelt, L. (1995) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2313-2317
10. Janciauskiene, S., Eriksson, S., and Wright, H. T. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 668-671
11. van Boekel, C. A. A., Grootenhuis, P. D. J., and Visser, A. (1995) *Nature Struct. Biol.* 1, 423-425
12. Stefansson, S., and Lawrence, D. A. (1996) *Nature* 383, 441-443
13. Kwon, K.-S., Kim, J., Shin, H. S., and Yu, M.-H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 9627-9631
14. Lee, K. N., Park, S. D., and Yu, M.-H. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 497-599
12. Ryu, S.-E., Choi, H.-J., Kwon, K.-S., Lee, K. N., and Yu, M.-H. (1996) *Structure* 4, 1181-1192
13. Carr, C. M., and Kim, P. S. (1993) *Cell* 73, 823-832
14. Lee, K. N., Shin, H. S., Kwon, K.-S., Park, S. D., and Yu, M.-H. (1993) *Mol. Cells.* 3, 71-74
15. Yu, M.-H., Lee, K. N., and Kim. J. (1995) *Nature Struct. Biol.* 2, 363-367
16. Kim, J., Lee, K. N., Yi, G.-S., and Yu, M.-H. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 9627-9631
17. Kang, H. A., and Yu, M.-H. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, In press.

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.