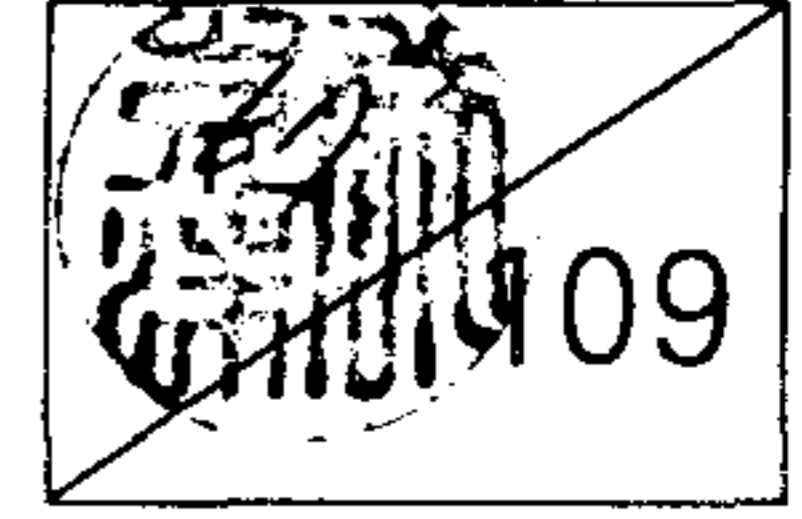


GOVP1199511045

BSG 71140-724-1

제 1 차 년 도
최 종 보 고 서



단백질 폴딩 및 분자적인식기작 연구

A study on the Protein Folding and Molecular
Recognition Mechanisms

연 구 기 관
한국과학기술연구원
부설 생명공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 “단백질 폴딩 및 분자적 인식기작 연구”에 관한 제 1차년도 최종보고서로 제출합니다.

1995. 6. .

주관연구기관명 : KIST 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 함경수 (책임연구원)

연 구 원 : 유명희 (책임연구원)

“ : 김길룡 (책임연구원)

“ : 홍효정 (선임연구원)

“ : 이기녕 (선임연구원)

“ : 권기선 (선임연구원)

“ : 이상철 (선임연구원)

“ : 이동건 (선임연구원)

“ : 김희선 (선임연구원)

“ : 강상원 (선임연구원)

“ : 서은주 (연 구 원)

“ : 최은아 (연 구 원)

위탁과제 책임자 : 서정선 (서울대학교 부교수)

서세원 (서울대학교 부교수)

여 백

요 약 문

I. 제목

단백질 폴딩 및 분자적인식기작 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

○ 수용체-ligand 상호인식기작 연구

B형 간염바이러스의 감염에 의한 간염은 전세계적으로 특히 국내에서 주 사망원인중의 하나인 간암의 전기단계로 그 예방과 치료가 심각히 거론되고 있으나, 아직 그 간염바이러스의 감염 경로라든지 불분명한 현실로 B형 간염바이러스의 수용체 탐색도 아직 확고히 밝혀지지 않고 있다. 그러므로 간염바이러스 감염의 기본적인 경로로 수용체 탐색을 위한 model system에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

본 연구는 B형 간염바이러스가 숙주세포와의 인식, 결합에 관여하는 표면항원중의 preS1 부위를 유전공학적 기법을 이용해 재조합된 대장균에서 발현시킨 후 분리, 정제하고 이 ligand를 이용하여 B형 간염바이러스 수용체와 ligand와의 상호인식 기작에 대한 model system을 확립하고자 행하였다.

○ 단백질 폴딩 연구

단백질의 작용기작을 이해하기 위해서는 단백질의 구조 및 그 주변에 깔려있는 물리화학적 작용에 대한 이해가 수반되어야 한다. 단백질-단백질 상호작용, 단백질-ligand 상호작용등에 있어서 특이성은 표면활성부위의 분자적 인식 (molecular recogni-

tion) 을 통해 부여되며, 활성이 있는 3차구조의 폴딩은 아미노산 서열에 의해 결정된다. 따라서 인식구조를 밝히고 폴딩기작을 규명하는 것은 단백질구조-기능 관계의 이해와 기능개선 연구에 필수 불가결하다. 본 연구에서는 호흡기종 치료제인 α 1-antitrypsin 에 대한 내열성변이를 대상으로 폴딩 및 안정성에 영향을 주는 요인을 규명하고자 한다. 호흡기종 치료제인 α 1-antitrypsin은 현재까지는 인체 혈액에서 분리하여 환자에게 투여되고 있지만, 원료의 제한 및 바이러스 감염 등의 문제가 있다. 또한 대장균에서 재조합 단백질의 형태로 생산할 경우에는 단백질응집 형태로 생산되는 문제점이 있다. 따라서 α 1-antitrypsin의 폴딩에 대한 연구는 활성이 높은 재조합단백질 생산에 중요하며, 아미노산 치환이 단백질 3차구조에 미치는 영향을 밝히고 나아가서 단백질의 폴딩과 안정성에 영향을 주는 요인의 규명에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

III. 연구개발내용 및 범위

○ 수용체-ligand 상호인식기작 연구

B형 간염바이러스의 수용체 탐색을 위한 Model system의 확립을 위해 다음과 같은 기초연구들이 진행되었다.

1. 전반적인 실험에 필요한 human hepatoma cell line인 HepG2 와 Negative control로 사용하기 위한 MRC5의 배양조건을 확립 하였으며, HepG2의 single cell을 획득하기 위한 trypsin-EDTA 사용조건을 확립하였다.
2. Binding assay와 수용체 visualization에 사용한 MBP-preS1 과 negative control로 MBP, β -gal-preS2를 각각 분리정제하여

획득하였다. 또한 각각의 단백질을 binding assay등에 사용하기 위해 ^{125}I -Iodination 하였으며, 또한 preS2와 preS를 획득 혹은 확보하였다.

3. Binding assay등에 사용한 HBsAg preS1 peptide 확보를 위하여 아미노산 서열이 중복된 9개의 다른 종류의 peptide를 Fmoc(Na-fluorophenylmethoxycarbonyl)을 Na-amino 보호기를 사용하는 solid phase법으로 합성하였으며, RP HPLC(C18 column)로 분리·정제하였다.
4. Cell binding 실험을 위하여 HepG2와 negative control로 MRC5을 $2 \times 10^5/\text{well}$ 이 되게 준비한 후 Iodination된 MBP-preS1, MBP, β -gal-prS2, preS2-S를 각각 다른 CPM 농도별로 사용하였으며, specific binding은 total binding에서 nonspecific binding을 뺀 수치로 나타내었다.
5. HepG2 cell내에 HBV infection에 관여하는 preS1 binding protein의 존재여부를 FITC로 labelling된 anti-rabbit-IgG-FITC와 MBP-preS1 그리고 MBP에 대한 polyclonal antibody를 사용하여 confocal Microscopy로 확인하고 있다.

○ 단백질 폴딩 연구

1. 인간 α 1-antitrypsin (α 1AT) 안정성 증진 변이 분석
2. α 1AT 안정성 증진 변이에 의한 유전적 폴딩결함의 억제
3. 다른 Serpin (Serine Protease Inhibitor) 시스템 탐색

IV. 연구수행 결과 및 건의

○ 수용체-ligand 상호인식기작 연구

1. Binding assay를 위해선 세포의 정상적인 형태를 유지시키면서 single cell 획득을 위한 최소의 trypsin-EDTA 농도를 얻기 위해, trypsin-EDTA 농도를 0.05% 부터 0.25% 까지 변화시키면서 cell morphology와 single cell 획득 여부를 관찰한 결과 Trypsin-EDTA 농도는 0.2 - 0.25%임이 밝혀졌다.
2. 본 실험에서는 HBV cellular receptor와 VAP(Virion Attachment Protein)와의 상호인식 기작과 구조관계 연구를 위하여 preS1 sequence(119 amino acid residue. adr)을 5개씩 amino acid residue로 overlapping 시키면서 15-16 amino acid residue로 구성된 총 9개의 각기 다른 peptide를 합성하여, reverse phase HPLC를 사용하여 90% 이상의 순도를 가지는 각각 10mg의 peptide를 획득하였다.
3. HepG2-preS1 ligand binding assay를 실행한 결과, ^{125}I -labelled MBP-preS1이 1×10^6 CPM 이상에서 전형적인 Specific binding 포화 곡선을 그렸다. Competition binding assay의 결과, 일정농도 (1×10^6 CPM ^{125}I -MBP-preS1)에서 F35.25 [Mab against preS1 (21-47)]의 경우 약 82%의 inhibition을 보였으며, preS1 합성 peptide의 경우 preS1(27-42), preS1(32-47)에서 각기 61%, 74%의 inhibition의 효과가 나타났다.
4. HepG2 cell내에 preS1과의 binding에 관여하는 단백질의 가시화를 위해 MBP-preS1과 negative control인 MBP를 사용하여 실험 중에 있으며, 여러 종류의 competitor에 대한 effect도 조사할 예정이다.

○ 단백질 폴딩 연구

본 연구에서는 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin(AT)을 대상으로 폴딩 및 안정성에 영향을 주는 요인을 규명하기 위해 내열성변이들을 체계적으로 스크린하였다. 단백질의 폴딩 및 안정성 결정에 중요한 소수성 중심부위 (hydrophobic core)에 가능한 모든 내열성 변이를 망라하기 위하여, 혼합 올리고뉴클레오티드 (doped oligonucleotides)를 이용하여 소수성 중심부위에 집중적으로 무작위 돌연변이를 시도하였다. 내열성 변이들은 분리·정제된 재조합 AT의 안정성을 현저히 증가시켰으며 저해제로서의 활성에는 거의 영향을 미치지 않았다. 변이가 refolding 속도에는 전혀 영향을 주지않고 unfolding 속도만 감소시켰으므로 변이들의 영향은 native state를 특이적으로 stabilized (lower energy)한 것임을 보여주고 있다. 변이단백질은 자연형보다 active site loop sequence peptide (14-mer)와 complex를 이루는 속도가 느린데, 이는 단백질의 3차구조에서 A β -sheet가 좀더 닫혀있는 상태를 암시한다. AT 단백질의 내열성 변이들의 아미노산치환 패턴을 살펴보면, 변이 AT 분자에서는 소수성코어의 특정부위 측쇄의 크기가 작아짐으로써 3차구조의 packing을 양호하게 하였을 가능성이 높다. 한편 이들 내열성 변이들은 유전적 폴딩결함을 억제하였다. 유전적 내림의 변이인 Z 타입 (Glu342 \rightarrow Lys) $\alpha 1$ AT는 단백질 폴딩과정에서 저해가 생겨 native state의 단백질을 생산할 수 없고 따라서 간세포에서 응집되고 혈장으로 분비되지 않는데, 안정성이 증진된 변이들에 의해 Z타입의 폴딩저해가 억제되었다. 이는 $\alpha 1$ AT의 폴딩과정에서 kinetic partitioning이 일어나며 Z타입 변이는 폴딩의 마지막 단계를 저해하여 폴리펩티드가 응집되는 방향으로 유도하는 반면, 안정성 증진변이는 평형을 native

state이 더 많이 생기는 쪽으로 유도함으로써 polypeptide들이 kinetically trapped되는 것을 줄이는 효과가 있음을 보여주고 있다. 현재까지 얻어진 안정성 증진변이들의 정확한 기작을 이해하고 이를 토대로 다른변이들을 설계하기 위해서는 변이단백질들의 구조를 밝히는 것이 무엇보다도 시급하다.

Summary

I. Title

A Study on the Protein Folding and Molecular Recognition Mechanisms

II. Goal and Importance

The hepatitis B virus(HBV) is a major cause of chronic inflammatory liver disease and liver cirrhosis associated with the development of hepatocellular carcinoma which is one of major cause of death in Korea. A specific mechanism and receptor for hepatic HBV infection have not yet been found.

Attempts have been made to establish an in vitro model of HBV that allows infection of the virus to be examined.

In the present report, We tried to establish an in vitro recognition model of HBV receptor-ligand using pre-S1 domain of hepatitis B surface antigen(HBsAg).

○ Protein Folding Studies.

Structural and physicochemical studies of proteins are essential to understanding functional mechanism of proteins. The amino acid sequence of a protein determines the folding of tertiary structure that provides functionally important surface patches for molecular recognition such as protein-protein interaction and protein-ligand interaction. Understanding the mechanism of protein folding is thus basic to identifying structure-function relationship and improving biological

functions. Goal of the present research is to identify factors crucial to folding and stability of α 1-antitrypsin, a therapeutic protein for emphysema. α 1-antitrypsin has been conventionally obtained from human blood, but there has been some problems like viral infection and limitation of sources in a conventional approach. Alternative source of human α 1-antitrypsin is the recombinant proteins, but expression of the α 1-antitrypsin in *Escherichia coli* accumulated the polypeptides as inclusion bodies. This problem made researchers seek for an efficient reactivation method for recombinant α 1-antitrypsin. Characterization of the factors influencing the folding and stability of α 1-antitrypsin will shed light on understanding structure-function relationship of the protein.

III. Contents and Scope

- Study on the recognition mechanism between receptor and ligand
- 1. We have established culture condition for human hepatoma cell line, HepG2 and MRC5 as a negative control and also established using condition for trypsin-EDTA for obtaining single of hepG2.
- 2. MBP-preS1 for binding assay and receptor visualization and MBP, β -gal-preS2 as a negative control were obtained. Each protein for binding assay was labeled with ^{325}I .

3. HBsAg preS1 peptides for binding assay were synthesized by an optimized solid phase technique using Fmoc and these were subjected to RPHPLC(C18 column) to purify.
4. For HepG2 cell-binding assay, subconfluent HepG2 cells (2×10^5 cells per well) and MRC as a negative control (2×10^5 cells per well) were incubated with MBP-preS1, MBP, β -gal-preS2, preS2-S which all were labeled with different specific activity(^{125}I). Specific binding represents the differences between total binding and nonspecific binding.
5. Confocal microscopy was used to confirm whether preS1 binding protein which involved in the process of HBV infection is existed using anti-rabbit-IgG-FITC, MBP-preS1 and polyclonal antibody against MBP.

○ Protein Folding Studies

1. Characterization of stable mutations of human α 1-antitrypsin
2. Suppression of genetic folding defect of α 1-antitrypsin by stable mutations
3. Preliminary studies on other serpin systems

IV. Results and Discussion

- Study on the recognition mechanism between receptor and ligand

1. 0.2 to 0.25 percentage of trypsin-EDTA was identified as a minimum concentration for obtain a HepG2 single cell with normal morphology.
2. For HBV cellular receptor-VAP(Virion Attachment protein) recognition mechanism and structure related studies, total 9 different preS1 peptides (15-16 amino acid residues) were synthesized and were subjected to RPHPLC to purify and all peptides (~10mg each) were eluted as a major peak (>90%).
3. From HepG2-preS1 ligand binding assay, typical saturation curve of specific binding was shown at above 1×10^6 cpm of ^{125}I -MBP-preS1.

From competition binding assay, F35.25(Mab against preS1(21-47)], preS1(27-42) and preS1(32-47) inhibited the attachment of HepG2 cells to ^{125}I -MBP-preS1(1×10^6 cpm) by 82%, 61%, and 74%, respectively.
4. In order to visualize HepG2 surface membrane components involved in binding by preS1, confocal microscopic works are on going by using anti-rabbit-IgG-FITC, MBP-preS1, polyclonal antibody against MBP, and various competitors.

○ Protein Folding Studies

In order to obtain single amino acid substitutions influencing the folding and stability of α 1-antitrypsin, thermostable mutations were identified by doped oligonucleotide-induced random mutagenesis targeted at the

hydrophobic core, which was followed by screening under the condition where the wild-type inhibitor was heat-deactivated. Characterization of purified recombinant α_1 -antitrypsin that was produced in *Escherichia coli* revealed that the mutations increased the stability towards urea denaturation, but did not affect association rate constants with porcine pancreatic elastase. The mutation (F51L) increased the conformational stability of the molecule by decreasing unfolding rate significantly without altering the refolding rate. The mutant protein was more resistant than the wild type protein to the insertion of the tetradecapeptide mimicking the sequence of the reactive center loop, indicating that the mutation increases the closing of the central β -sheet, the A-sheet, in the native state. The pattern of various single amino acid substitutions revealed that decreasing the volume of hydrophobic side-chain at each identified sites may be critical for enhancing stability of α_1 -antitrypsin, presumably by allowing a more favorable tertiary packing. The F51L mutation suppressed the folding defect of the Z-type (E342K) genetic variation, which causes aggregation of the molecule in the liver. It appears that a kinetic partitioning occurs between the productive folding pathway and a folding trap: while the Z mutation induces a partitioning into the folding trap, a more favorable partitioning into the productive pathway is induced by F51L mutation. Further characterization of various

thermostable mutations and structural determination of the mutant proteins will be essential for designing beneficial mutations of α_1 -antitrypsin.

Contents

I. Introduction-----	21
II. Study on the recognition mechanism between receptor and ligand-----	24
1. Introduction-----	24
2. Establishment of Cell Culture System-----	27
2.1 Material -----	27
2.1.1 Establishment of Cell line-----	27
2.1.2 Reagents-----	27
2.2 Culture Method-----	27
2.2.1 preparation of media-----	27
2.2.2 Cell Culture-----	28
2.3 Results and Discussion-----	28
3. Expression and Production of HBV PreS ligand-----	30
3.1 Material-----	30
3.1.1 Recombinant Strain-----	30
3.1.2 Reagents-----	30
3.2 Methods-----	31
3.2.1 Isolation of MBP - PreS1-----	31
3.2.2 Isolation of β -galactosidase - PreS2-----	33
3.2.3 Isolation of maltose binding protein-----	35

3.3 Synthesis, isolation and purification of HBV PreS ligand-----	38
3.4 Results and Discussion-----	38
4. Binding assay of HepG2 - PreS1 ligand-----	41
4.1 Materials-----	41
4.1.1. Reagents-----	41
4.2 Methods-----	41
4.2.1 Idoination of HBV - PreS ligand-----	41
4.2.2 Binding assay-----	42
4.2.3 Visualization of HBV receptor by confocal microscopy-----	42
4.3 Results and Discussion-----	43
5. The expression & the production of HBV preS ligand---	49
6. The screening of HBV preS1 binding protein -----	51
References-----	54
 III. Protein Folding-----	 55
1. Introduction-----	55
2. Materials and Methods-----	60
2.1 Materials-----	60
2.2 Methods-----	61
3. Results and Discussion-----	69
3.1 Characterization of stable mutations of human α1-antitrypsin-----	69

3.2 Suppression of genetic folding defect of α 1-antitrypsin by stable mutations-----	79
3.3 Preliminary studies on other serpin systems-----	81
4. Conclusions-----	83
References-----	85
Sub-project (I)-----	89
Sub-project (II)-----	99

목 차

제 1 장 총론-----	21
제 2 장 수용체-ligand 상호인식기작 연구-----	24
제 1 절 서론 -----	24
제 2 절 Cell culture System의 확립-----	27
1. 실험재료-----	27
1) Cell line의 확립-----	27
2) 시약-----	27
2. 배양방법-----	27
1) 배지준비-----	27
2) 세포배양-----	28
3. 결과 및 고찰-----	28
제 3 절 HBV PreS ligand의 발현 및 생산-----	30
1. 실험재료-----	30
1) 재조합 균주-----	30
2) 시 약-----	30
2. 실험방법-----	31
1) MBP - PreS1 융합단백질의 분리-----	31
2) β - galactosidase - PreS2 융합단백질의 분리-----	33
3) Maltose binding Protein의 분리-----	35
3. HBV PreS ligand 합성, 분리, 정제 및 확보-----	38
4. 결과 및 고찰-----	38

제 4 절 HepG2 - PreS1 ligand binding assay-----	41
1. 실험재료-----	41
1) 시약-----	41
2. 실험방법-----	41
1) HBV - PreS ligand의 iodination-----	41
2) Binding assay-----	42
3) Confocal Microscopy에 의한 HBV receptor의 Visualization-----	42
3. 결과 및 고찰-----	43
제 5 절 HBV PreS ligand의 발현 및 생산-----	49
제 6 절 Yeast the hybrid system을 이용한 liver cDNA library의 HBV preS1 binding protein의 screening--	51
제 3 장 단백질 폴딩 연구 -----	55
제 1 절 서 론-----	55
제 2 절 실험재료 및 방법-----	60
1. 실험재료-----	60
2. 실험방법-----	61
제 3 절 결과 및 고찰-----	69
1. 인간 α 1-antitrypsin (α 1AT) 안정성 증진 변이 분석---	69
2. α 1AT 안정성 증진변이에 의한 유전적 폴딩결함의 억제-	79
3. 다른 Serpin (Serine Protease Inhibitor) 시스템 탐색	81
제 4 절 결 론-----	83
참고문헌-----	85

위탁연구보고서 (I)-----	89
위탁연구보고서 (II)-----	99

제 1 장 총 론

단백질의 작용기작을 이해하기 위해서는 단백질의 구조 및 그 저반에 깔려있는 물리화학적 작용에 대한 이해가 수반되어야 한다. 단백질-단백질 상호작용, 단백질-ligand 상호작용등에 있어서 특이성은 표면활성 부위의 분자적 인식 (molecular recognition)을 통해 부여되며, 활성이 있는 3차구조의 폴딩은 아미노산 서열에 의해 결정된다. 따라서 인식구조를 밝히고 폴딩기작을 규명하는 것은 단백질구조-기능 관계의 이해와 기능개선 연구에 필수불가결하다.

본 연구에서는 단백질의 물리화학적 성질 및 구조연구를 통한 접근방법을 이용하여 단백질 폴딩 및 단백질의 분자적인식 기능이 생명현상을 어떻게 조절하는가에 대한 이해를 도모하고자 한다.

단백질의 폴딩은 일반적으로 풀어진 폴리펩타이드 사슬이 3차구조적으로 열역학적 측면에서 안정한 상태로 진행되는 일련의 과정으로 알려져있다. 그러나 실제로 *in vivo*에서는 이와는 다르게 compartmentation, machinery (chaperone 포함) 및 protein-protein interaction 이 관여하여 kinetically control 되리라고 주장되고 있다. 단백질 폴딩 기작을 연구함에 의해서 단백질의 구조와 기능의 연관관계를 이해할 수 있으며 이로부터 기능 (예, 안정성)을 보강할 수 있는 방법을 깨우치고, 나아가 기능성 단백질 개량의 차원에서 molecule의 design이 가능하다고 할 수 있다.

본 연구의 대상단백질인 serpin (serine protease inhibitor) 계열의 단백질에서도 kinetic intermediate가 부분적으로 확인된 바 있으며 더구나 몇몇 Serpin의 경우는 native state의 단백질이

열역학적으로 최대로 안정된 상태가 아님이 밝혀짐에 따라 이의 폴딩이 kinetically control 됨이 확실하다 할 수 있으며, 따라서 단백질 폴딩 기작의 규명에 좋은 model system이라 할 수 있다.

본 연구의 대상 단백질인 serpin은 X선 3차구조가 결정되어 있는 여러가지 인간의 유전적 질병에 관련되어 있는 단백질들을 (α_1 -antitrypsin, antithrombin III 등) 포함하고 있다. 이들은 체내의 preteinase/proteinase inhibitor 평형을 유지시키는데 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다. 또한 실제로 이들에 대한 폴딩변이에 의한 질병이 보고된 바 있다. 따라서 이러한 폴딩 변이를 이용하여 우선적으로 질병의 원인기작을 규명하고 추후에 replacement therapy 등에 응용 가능한 대상이다. 또한 내열성 변이를 이용하여 serpin의 3차구조의 안정성 조절의 요인을 규명할 수 있을 것으로 예측된다.

한편, 수용체와 ligand 사이의 인식기작은 여러 세포생장인자들, 호르몬, 신경자극, 바이러스 등의 ligand들과 이에 대한 수용체들의 구조적특성을 규명함으로써 연구되고 있으며, 여기에 관련하여 합성펩타이드를 이용한 기질로서 가능성을 타진하고 불필요한 신호전달체계를 저해하는 펩타이드를 탐색함으로써 질병의 예방 및 치료제 개발이 시도되고 있다. 이러한 기초연구는 그 지역의 특수한 사회적 상황과 필요성에 의하여 그 진행속도가 촉발된다. 한 예로 선진국의 경우 HIV(human immunodeficiency virus)의 수용체가 CD4임이 밝혀지게 되어 짧은 시간안에 HIV의 gp120과 CD4의 구조적 특성과 인식작용기작이 규명되었고 현재는 이 결과의 응용단계에서 AIDS의 예방 및 치료제 개발에 박차를 가하고 있다. 국내에서 질병에 의한 주 사망원인 중 하나인 간암과 관련있는 간염바이러스 감염은 사회적으로 매우 심각한 상태에 있으므로, 아직까지 밝혀지지 않은 간염바이러스들의 수용체 규명과

구조적 특성연구를 통한 수용체-항원 사이의 인식기작 연구는 기초연구 뿐만아니라 인식저해제 개발면에서도 국내에서 연구되어야 할 중요한 분야라고 판단된다. 특히, 이 분야에 대한 연구는 선진국에서 집중적으로 투자하지 않고 있는 분야이므로, 조속히 연구를 실행하면 국제적으로 경쟁할 수 있을 것이라 생각된다.

단백질들의 구조적특성 연구를 통한 단백질 상호간의 분자인식기작 규명은 단백질공학기술을 필수적으로 요구하며, 단백질의 구조와 기능관계의 기초연구나 단백질의 기능증진에 의한 단백질 의약품의 개발에 가장 중요한 분야이다. 또한 이 분야는 multi-discipline이 요구되므로, 국내의 단백질공학 분야중 최첨단기술의 국내정착 및 발전을 목표로 삼고 있는 본 연구소의 중장기 발전과 부합된다고 판단된다.

제 2 장 수용체-ligand 상호인식기작 연구

제 1 절 서 론

단백질의 작용기작을 이해하기 위해서는 단백질의 구조 및 그 주변에 깔려있는 물리화학적 작용에 대한 이해가 수반되어야 한다. 단백질-단백질 상호작용, 단백질-ligand 상호작용 등에 있어서 특이성은 표면활성부위의 분자적 인식을 통해 부여되며, 활성이 있는 3차 구조의 폴딩은 아미노산 서열에 의해 결정된다. 따라서 인식구조를 밝히고 폴딩기작을 규명하는 것은 단백질구조-기능 관계의 이해와 기능개선 연구에 절대적으로 필요하다.

본 연구에서는 단백질의 물리화학적 성질 및 구조연구를 통한 접근방법을 이용하여 단백질의 분자적 인식기능이 생명현상을 어떻게 조절하는가에 대한 이해를 도모하고자 했으며, target 질병은 B형 간염 바이러스를 선택했으며 그의 수용체(receptor)와 ligand의 상호인식기작에 연구목표를 두고 있다.

Virus receptor는 virus host range와 tissue tropism을 결정지으며, virus binding은 단순한 인식 그리고 virus attachment protein (VAP)에 의해 single cell surface molecule에 attachment하는 것으로 여겨졌다. Virus-host interaction에 대한 이해가 확대되면서, virus receptor에 대한 정의가 변하고 있다. Virus-receptor는 virus binding과 viral infection에 관여하는 host surface component를 지칭하고 있다. 1980년 중반까지도 확실히 밝혀진 유일한 virus receptor는 myxovirus와 paramyxovirus의 sialic acid였으며, 기술의 발달로 더 많은 virus receptor가 밝혀지고 있다. 또한 binding은

multistep process라는 결과가 축적되고 있다. 그리고 몇몇virus의 경우 하나이상의 receptor를 인식하는 것으로 알려지고 있다.

간염은 바이러스 감염, 박테리아 감염 및 물리화학적인 요인에 의해 간에 염증이 생기는 현상으로 바이러스에 의한 감염이 가장 일반적이다. 바이러스 감염에 의한 간염은 A형, B형, C형, D형, E형, F형 등등 새로운 형이 계속 보고되고 있다. 그중 B형 간염바이러스 (hepatitis B virus:HBV)에 의하여 감염되는 B형 간염은 전 세계적, 특히 극동아시아 및 아프리카 지역의 풍토병으로 알려질 정도로 심각하며, 2억 정도의 만성 보균자가 전세계적으로 퍼져 있음이 보고되어지고 있고 국내의 경우 전체 인구의 약 10% 이상이 만성보균자로 알려지고 있다. HBV감염은 간염과 간경화증의 주된 원인이며, 최근에는 HBV의 감염이 국내 주사망원인 중의 하나인 간암을 유발할 수 있다고 보고되고 있어 HBV감염이 사회적으로 커다란 문제로 대두되고 있다 (1)(2)(3).

따라서 B형 간염바이러스 감염예방을 위해 혈장백신, 유전자 재조합백신 등이 개발 되었으며, 보다 효과적인 예방을 위한 백신개발에 많은 연구가 진행되고 있다. 다른 바이러스 질병과 마찬가지로, B형 바이러스 감염은 virion이 하나 혹은 아마 서너가지 viral 표면단백질들을 통해 세포표면 구조에 특이적으로 반응함으로써 시작되는 것으로 생각된다. HBV는 cell line에서 propagated 되지 않으며 단지 사람과 고등영장류(침팬지)에만 감염이 가능하다고 알려지고 있다. HBV replication과 cellular injury는 간으로 한정되고 있으며, hepatocyte가 감염의 주 target cell로 간주되고 있다. 반면 HBV의 주 extrahepatic replication에 대해선 잘 알려져 있지 않고 있다(4).

HBV envelope는 single env gene에 의해 encode되는 protein의

domain이 hepatocyte에 attach하는 HBV의 potential site로 알려지고 있다. Target cell의 attachment에 관여하는 viral structure에 대해 선 잘 밝혀지고 있음에도 불구하고 HBV의 세포수용체는 연구가 잘 안 되어 있으며, 감염을 유도하는 생화학적 기작에 대해서도 알려진 것이 거의 없는 실정이다. Hepatocyte 이외 nonhepatic origin의 많은세포 즉 hematopoietic cell, β -lymphocyte lineage, 그리고 peripheral blood lymphocyte들이 preS1 amino acid(21-47 region)에 대한 수용체가 존재한다는 보고도 있다(5). 또한 laege envelope protein의 preS1 domain이 immunoglobulin A(IgA)의 α chain의 Fc mocety와 부분적으로 아미노산 서열이 유사(6)하기 때문에 사람 간세포에 attach하는데 관여하는 수용체가 같다는 보고가 있다(7). 반면 preS1 domain을 인식하는 부위를 포함하고 있는 interleukin 6가 HBV-cell interaction을 mediate하며(8), transferrin receptor가 preS2 protein을 통해 HBV가 hepatocyte에 binding 하는데 중요한 역할을 하며, preS2 domain이 있는 HBsAg particle이 T cell과 binding하는 데도 관여한다고 보고되었다(9). 또한 사람의 간 plasma membrane에 존재하는 34 KDa 단백질인 Endonexin이 HBsAg와 결합한다는 보고도 있다. 이 small HBsAg와 특이적 Ca^{2+} -dependant manner로 결합하여, 이것은 Ca^{2+} -dependent phospholipid binding proteins(Annexins)의 family member 이다.

Budkowska등은 hepatocyte receptor인식에 관여하는 Viral envelope의 preS1 그리고 preS2 epitope와 결합하는 normal human serum에서 HBV binding factor를 밝혀냈으며, 이것이 membrane component의 soluble fragment이며 human liver cell에 HBV가 attach하는것을 증재하는 HBV receptor와 관련되어 있다고 보고하였다(10).

제 2 절 Cell culture System의 확립

1. 실험재료

1) Cell line의 확보

본 실험에 필요한 human hepatoma cell line인 HepG2 cell은 ATCC로부터 확보 하였으며, negative control로 사용하기 위한 human fibroblast cell line인 MRC5는 서울대 의과대학 내의 한국 세포주 은행(KCLB)으로 부터 분양받아 대량배양을 하여 실험에 필요한 Cell line을 확보하였다.

2) 시약

배양배지(11)(12)인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium)과 Fetal Bovine Serum (FBS), Trypsin-EDTA, Antibiotic-antimycotic (penicillin G sodium, streptomycin sulfate)은 Gibco사로 부터 구입 하였으며, Sodium bicarbonate, HEPES 등은 Sigma사(U.S.A)에서 구입 하였다.

2. 배양방법

1) 배지준비

Cell culture용 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagles Medium)에 sodium bicarbonate(3.7g/l), HEPES(4.8g/l), Antibiotics (penicillin G sodium, streptomycin sulfate) 1%(v/v)를 각각 첨가하여 1 liter가 되게 한 후 121℃에서 20분간 autoclave 하고 membrane

filter(0.2 μ m)로 진공여과 한 후 4°C에 보관하여 사용하였다. 실험 시에는 37°C에서 30분간 pre-incubation한 후 사용하였으며, 혈청으로는 FBS(Fetal Bovine Serum)를 첨가 하였고, 성장억제물질을 불활성화 시키기 위해 56°C에서 30분간 처리한 후 -20°C에서 동결보존 하였으며, 배지에 첨가할 때는 해동시켜서 10%(v/v)의 비율로 사용하였다.

2) 세포배양

HepG2 cell stock(-70°C)을 37°C에서 녹인 후 cell을 serum free media로 2-3번 세척하여 hemocytometer로 세포수를 측정한 후 10% (v/v) FBS가 첨가된 배지가 있는 Tissue culture flask(T-flask)에 접종 하였다. 접종된 flask는 CO₂(5%) incubator(37 °C)에서 5일간 배양한후 현미경상 세포의 성장상태가 confluent monolayer 상태가 확인 되면 세포간의 contact inhibition에 의한 세포성장의 억제를 막기위해 trypsin-EDTA를 처리한 후 계대배양을 하면서 실험에 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

Binding assay 그리고 HepG2 cell상 에서 preS1 ligand와 결합하는 단백질을 visualization 하고 확인 하기 위해서는 single cell의 확보가 필요하다고 생각하였다. 특히 binding assay를 위해선 cell수를 조절하는것이 정량적인 측면에서 매우 중요하다고 여겨진다. 본 실험에서는 cell의 정상적인 morphology를 유지시키면서 single cell 획득을 위한 최소 trypsin-EDTA농도를 알아보기 위해 trypsin-EDTA 농도를 0.05%에서 0.25%까지 변화시키면서 cell morphology와 single cell 획득여부를 관찰하였으며(Fig 1A, 1B), 그 결과 적정trypsin-EDTA 농도는 0.20 - 0.25% 임을 확인 하였다.

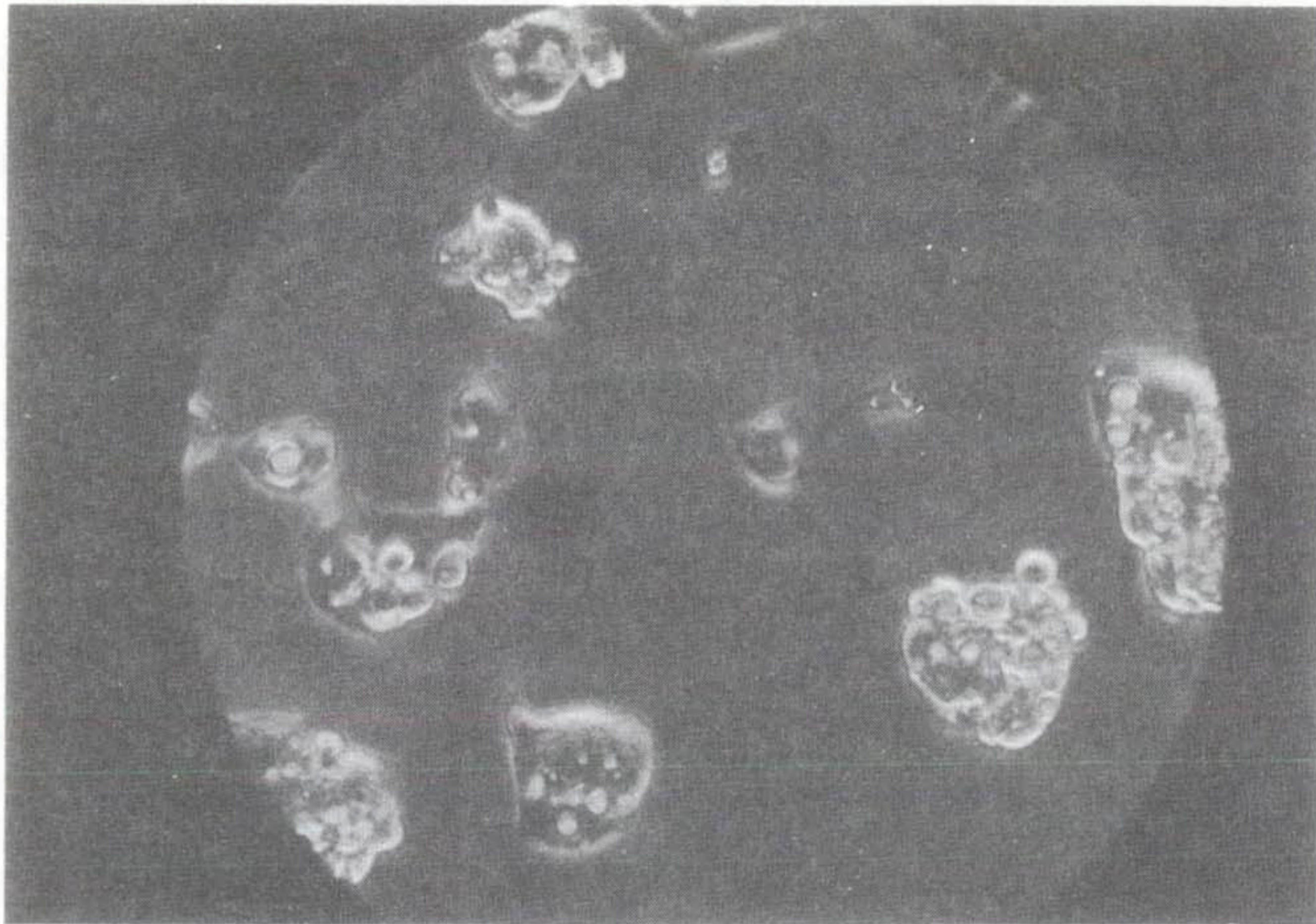


Fig 1A. 0.05% Trypsin, 0.53mM EDTA.4Na로 처리한 후 이틀동안 culture한 HepG2 cell

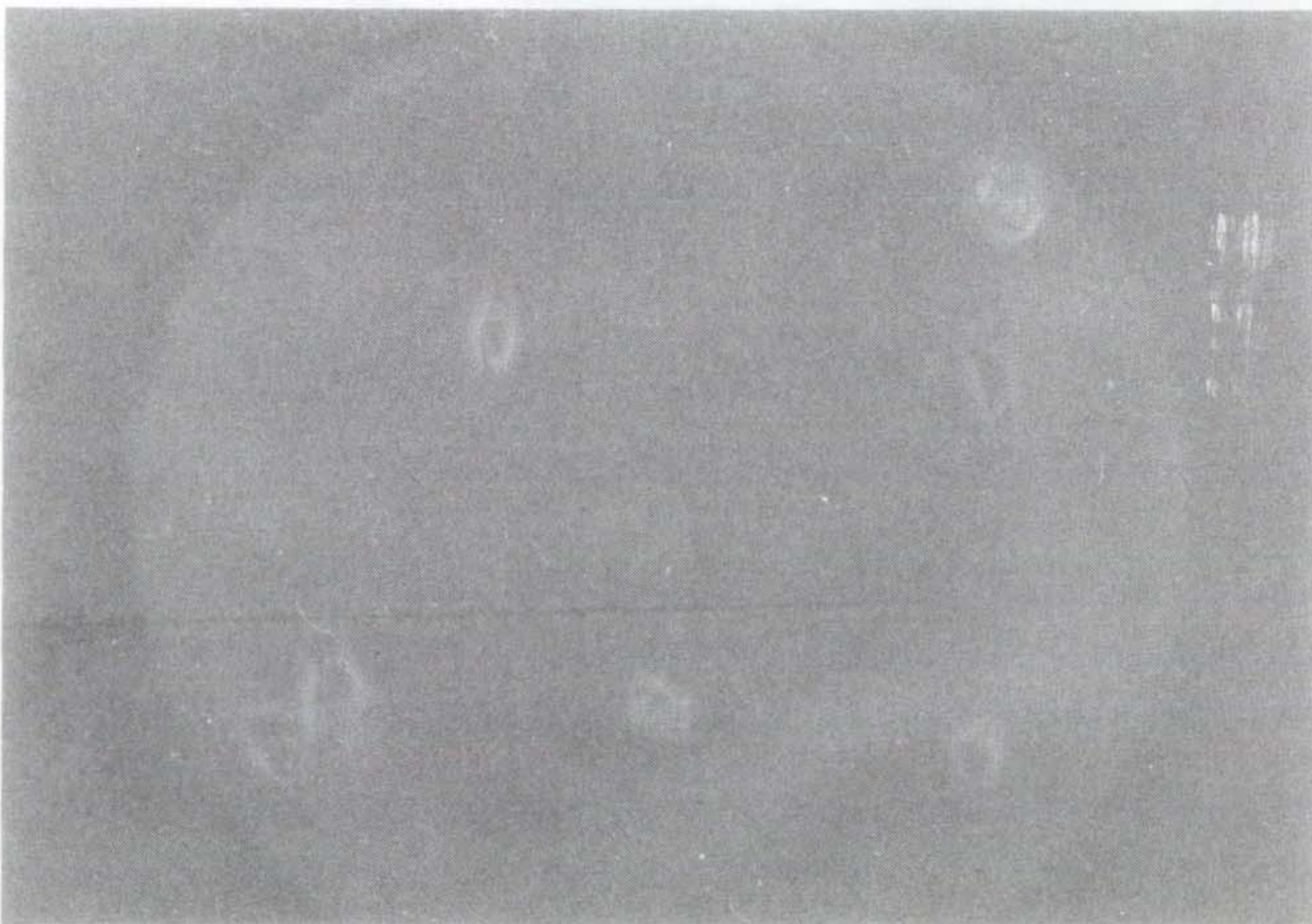


Fig 1B. 0.25% Trypsin, 2.65mM EDTA.4Na로 처리한 후 이틀동안 culture한 HepG2 cell

제 3 절 HBV preS ligand의 발현 및 생산

1. 실험재료

1) 재조합 균주

Maltose binding protein(MBP)을 생산하는 재조합 균주인 E coli DH5 α (pMAL-CRI)는 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소 분자세포 생물 연구그룹으로부터 분양 받았으며, β -galactosidase-preS2 융합 단백질(13)을 생산하는 재조합균주 E coli JM109 및 MBP-preS1 융합단백질(14)을 생산하는 재조합균주는 단백질 공학연구그룹의 홍효정 박사팀으로부터 분양받아 대량배양 하였다.

2) 시약

배양배지의 구성성분인 yeast extract, tryptone 등은 Difco Lab(U.S.A)에서 DEAE-Sephacel, Sephacryl S200등은 Pharmacia-LKB Biotechnology사(Uppsala Sweden) 에서, 그리고 TPEG-Sepharose는 Sigma사(U.S.A)에서 구입하였으며, Amylose resin은 Biolabs사(U.S.A)에서 구입하였다. 전기영동시약인 acrylamide, N, N'-methylene-bis(acrylamide), Sodium dodecyl sulfate (SDS), TEMED, Coomassie-brilliant blue R-250등도 sigma사(U.S.A)에서 구입하였다. preS1에 대한 단일클론항체(F32.25)는 Immunotech S A사(France)에서 구입하였다. 또한 Western blotting에 사용되는 Secondary antibody인 Antimouse-IgG-horse raddish peroxidase conjugate는 Sigma사(U.S.A)에서 구입하였으며, preS2에 대한 단일클론항체는 서울의대 정홍근 박사로부터 분양받아 사용하였다.

2. 실험방법

1) MBP-preS1 융합단백질의 분리

재조합 융합단백질인 MBP-preS1을 E coli JM109에서 발현시켰으며, 다음 방법에 의하여 융합단백질을 분리하였다.

먼저 20ml의 LB배지(Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)에 1mM Ampicillin을 첨가한 후, seed culture를 12시간 하였으며, 이것을 2l의 LB배지에 접종한 후 3시간동안 배양하고, 1mM IPTG(Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranoside)를 첨가하고 3시간 동안 진탕배양하였다. 그 배양액을 8,000rpm에서 원심분리하여 균체를 분리하고, 그 균체를 lysis buffer(20mM Tris buffer containing 1mM EDTA, 1mM PMSF, 200mM NaCl)에 현탁시켜 초음파 파쇄기(Soniprep 150, England)를 사용하여 파쇄시킨 다음, 12,000 rpm에서 원심분리하여 상층액을 취하였다.

이 상층액을 4°C에서 40% (NH₄)₂SO₄로 처리한 후 12,000rpm으로 4°C에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 20mM Tris, 1mM EDTA, 25mM NaCl buffer, pH7.4로 투석하였다. 투석액은 다시 12,000rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 취하여, 20mM Tris, 1mM EDTA, 25mM NaCl buffer, pH7.4로 평형시킨 DEAE-Sephacel column (2.5 x 7 cm)에 loading시킨 다음 이 column을 같은 완충용액으로 280 nm 에서 흡광도가 0.05 이하가 될 때까지 씻은후, 25mM NaCl이 첨가된 완충용액 250ml와 400mM NaCl이 첨가된 용액 250ml를 사용한 linear gradient로 용출 시켰다(Fig 2).

그 용출액을 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동과 Western blotting으로 확인한 후 융합단백질이 존재하는 분획을 모아

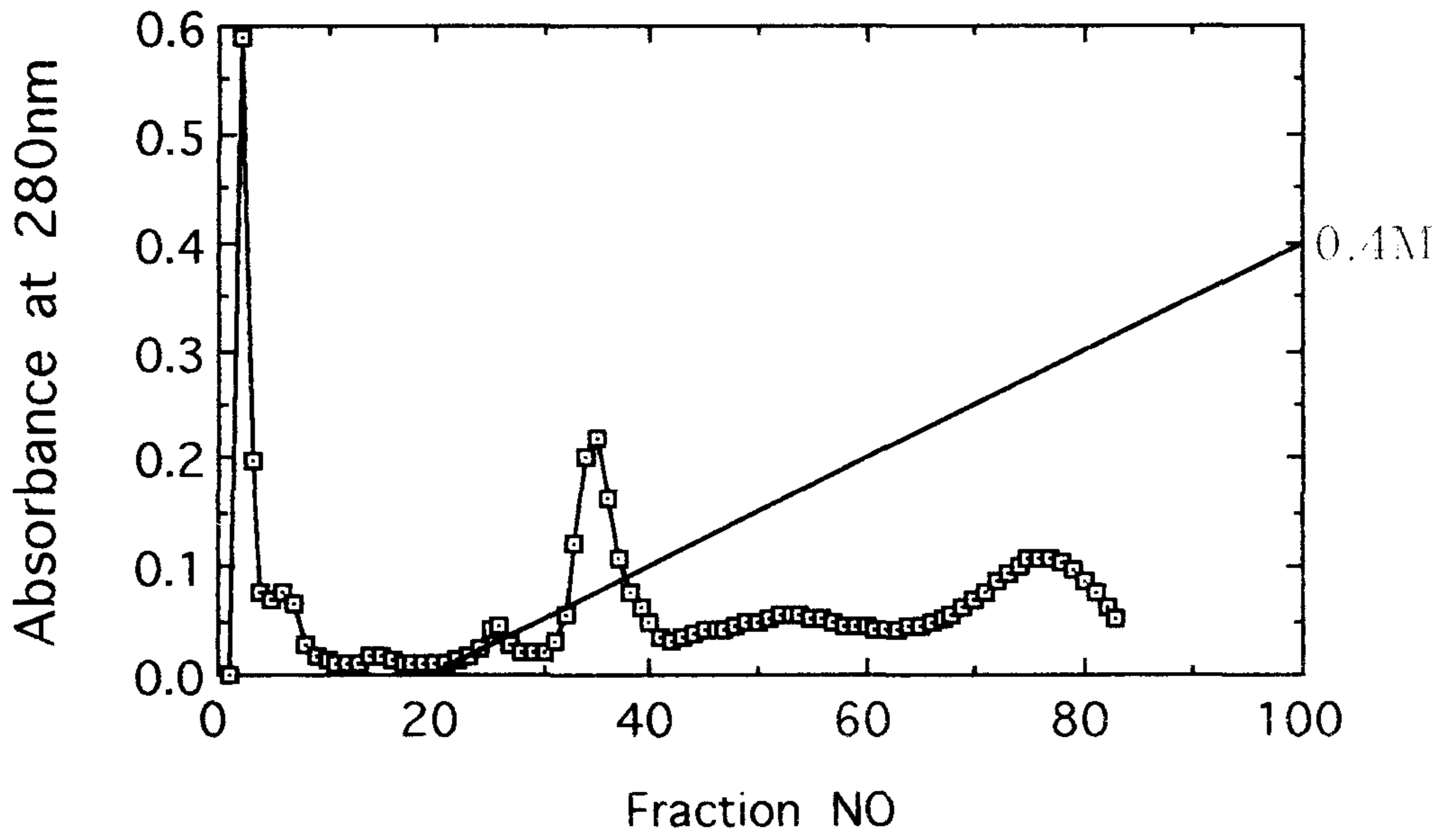


Fig 2. Anion-exchange chromatography elution profile from DEAE-Sephacel column

Ultrafiltration system(Amicon, Danvers, U.S.A)을 이용하여 농축시켰다. 이 농축액(10 ml)을 200 mM Tris, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl buffer, pH 7.4로 평형 시킨 Sephacryl S200 column(2.5X7cm)에 loading 한 후 같은 완충용액으로 elution 하여 융합단백질을 분리하였다(Fig 3, 4).

2) β -galactosidase-preS2 융합단백질의 분리

재조합 융합단백질인 β -galactosidase-preS2도 E coli JM109에서 발현시켰으며, 다음과 같은 방법으로 분리·정제하였다.

먼저 MBP-preS1 융합단백질의 분리에서와 마찬가지로 20ml의 LB 배지(Tryptone 1%, Yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%)에 1mM Ampicillin을 첨가하여 seed culture를 12시간 하였다. Seed culture한 것을 2l의 LB배지에 접종한후 3시간 동안 배양하고, 1mM IPTG(Isopropyl- β -D-Thiogalacto-pyranoside)를 첨가한 다음 3시간동안 진탕배양을 하였다. 배양액을 8,000rpm, 20분간 원심분리하여 균체를 모으고, 그 균체를 lysis buffer(20mM Tris, 10mM MgCl₂ buffer, pH7.4)용액에 현탁 시킨 후 초음파파쇄기(Soniprep 150, England)를 이용하여 균체를 파쇄시킨 다음, 12,000rpm으로, 20분간 원심분리하여 그 상등액을 분리하였다. 이 상등액에 10mM β -mercaptoethanol 및 1.6M NaCl을 첨가하여 20mM Tris, 10mM MgCl₂, 10mM β -mercaptoethanol, 1.6M NaCl buffer, pH7.4 완충용액으로 평형 시킨 TPEG (p-aminophenyl- β -D-thiogalactosidase)-Sephrose column(2.5 x 7 cm)에 loading 하고 위의 완충용액으로 280 nm 에서의 흡광도가 0이 될때 까지 씻은후, elution buffer(100mM Sodium borate buffer containing 10mM β -mercaptoethanol, pH 10)로 elution 하고 Tris buffer, pH 7.4 로 중

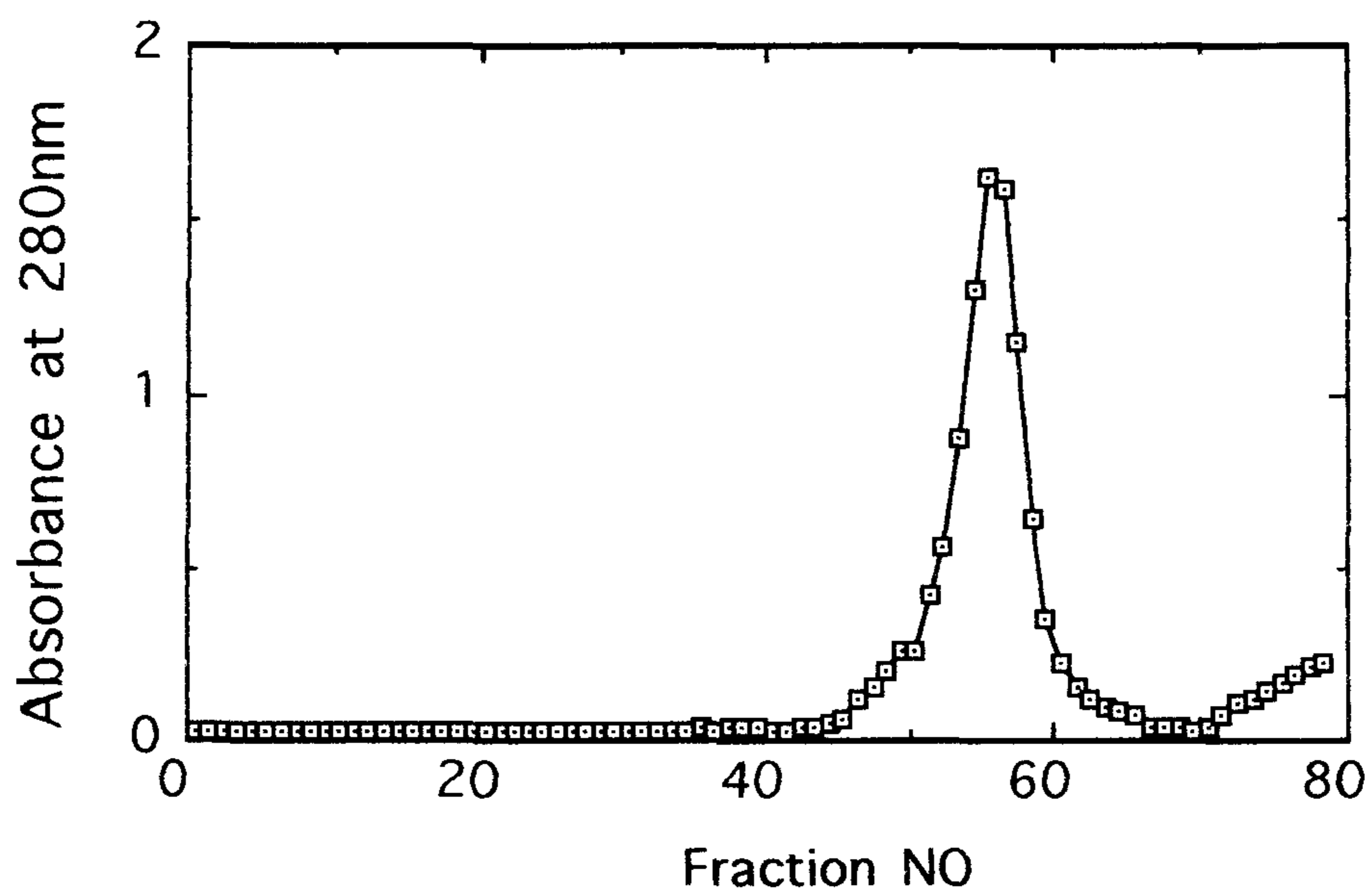


Fig 3. Sephacryl S200 gel filtration elution profile

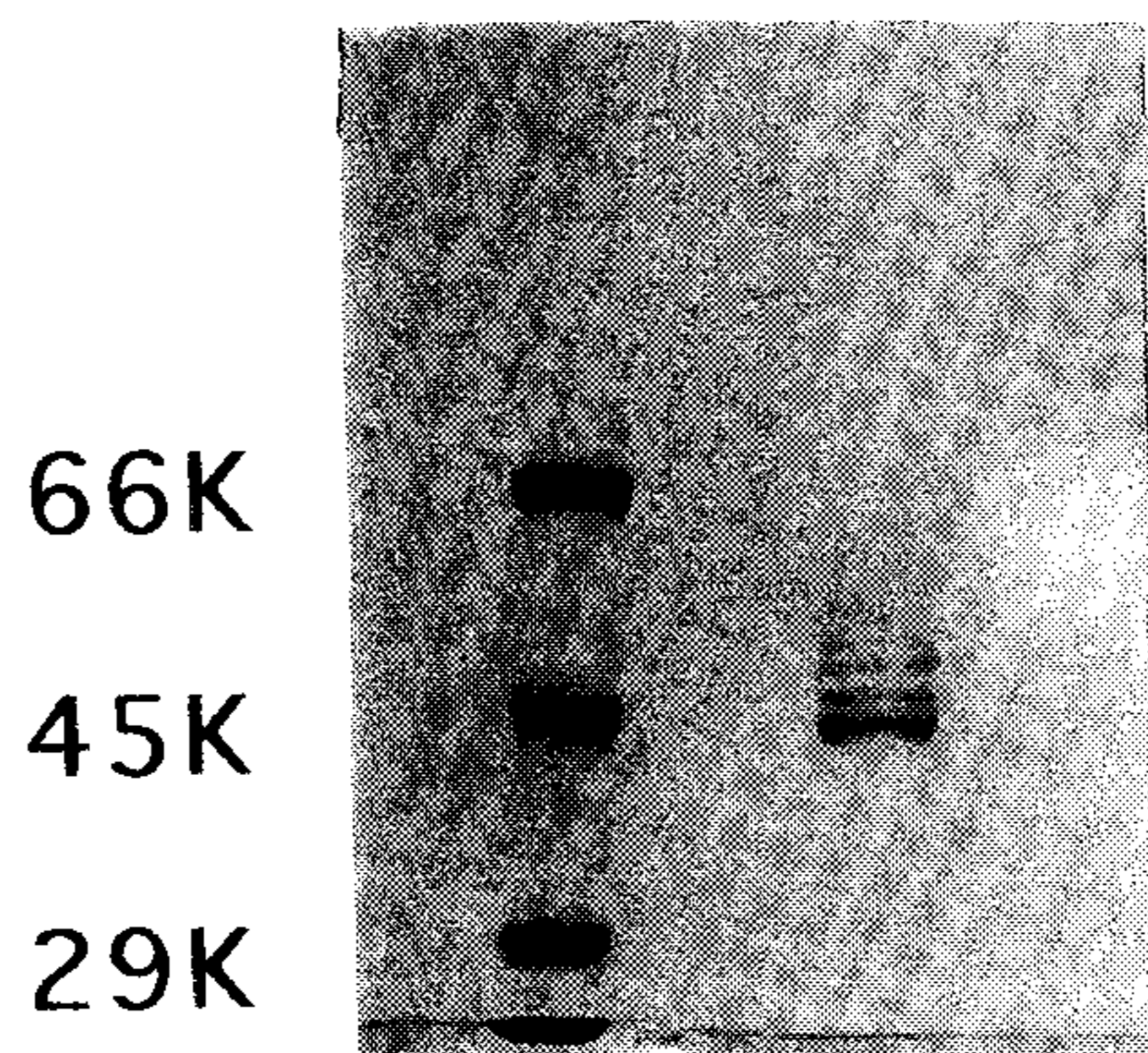


Fig 4. Purification of MBP-preS1 analyzed by 10% SDS-PAGE and Western-blotting

화시켜 용합단백질을 분리하였다.

3) Maltose binding protein의 분리

1mM ampicillin이 첨가된 배지(tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%) 10ml에 seed culture를 37℃에서 12시간 배양후, 250ml 배지에 본 배양을 하고, 3시간후 IPTG(Isopropyl-β-D-Thiogalacto-pyranoside)를 첨가한 후 12시간 배양하였다.

배양용액을 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 균체를 모은후 lysis buffer(20mM Tris, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 200mM NaCl buffer, pH7.4)용액에 현탁시킨후 초음파파쇄기(Soniprep 150, England)로 파쇄시킨 후 12,000rpm에서 30분간 원심분리 하여 그 상등액을 분리하였다.

분리한 상등액을 Amicon(PM 10) filtration으로 5 ml로 농축하여 1 ml를 20mM Tris, 0.2M NaCl, 10mM β-mercaptoethanol buffer, pH 7.4로 평형 시킨 Amylose resin 1ml 에 가하고 4℃에서 24시간동안 반응 시켰다. 그후 microfuge를 이용하여 위의 buffer로 resin을 세척한 후 10mM Maltose 2ml를 첨가하고 4℃에서 다시 24시간 동안 incubation한 후, 2,000rpm 에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 취하였다. 이와 같이 하여 분리한 Maltose binding protein은 10% SDS-PAGE gel 상에서 단일 band로 확인하였다(Fig 5).

4) 전기영동법

SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)은 Laemmli법(15)에 의하여 수행하였으며, 10% polyacrylamide gel을 사용하였고 단백질의 size marker로 bovine serum albumin(BSA, 66K), egg albumin(45K),

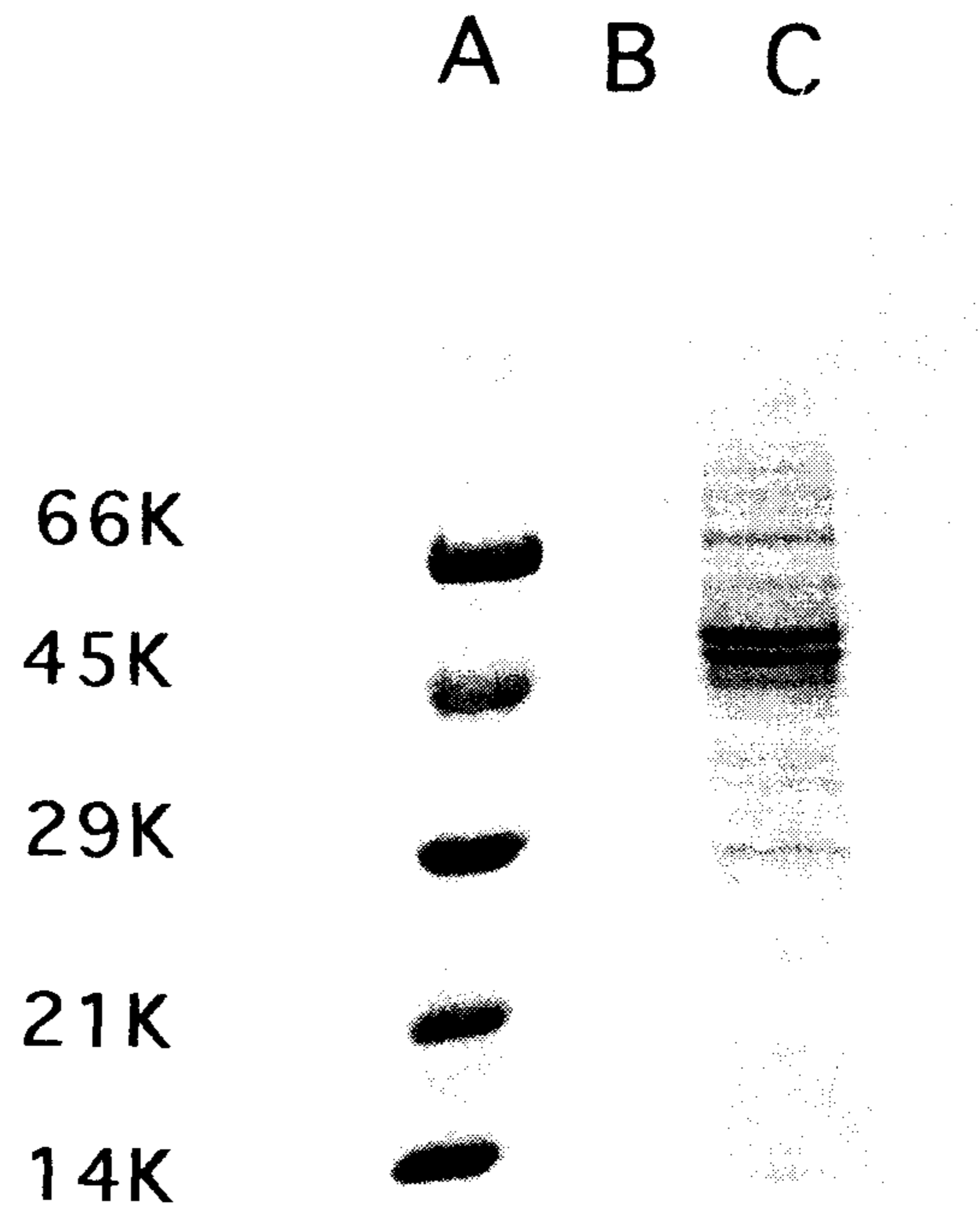


Fig 5. Purification of Maltose Binding Protein(MBP) analyzed by 10% SDS-PAGE

- A. molecular weight standards
- B. Maltose Binding Protein
- C. total proteins

carbonic anhydrase(29K), trypsin inhibitor(20.1K) 및 α -lactalbumin(14.2K)의 혼합물을 사용하였으며, β -galactosidase-preS2 단백질의 경우는 Myosin(205K), β -galactosidase(116K), BSA(66K), egg albumin(45K), carbonic anhydrase(29K)의 혼합물을 사용하였다.

5) 분석방법

단백질의 정량은 Lowry방법(16)에 의해 수행하였으며, 표준시약의 경우 Bovine serum albumin을 사용하였다.

6) Western-blotting법

우선 분리정제한 단백질을 10% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 그 gel을 nitrocellulose membran에 옮기고, 그 membrane을 3% casein이 포함된 TBS용액(100mM Tris, 1.5M NaCl buffer, pH7.4)에 상온에서 2시간동안 incubation 하였다. 다음 이 membrane을 TBST용액(0.05% Tween이 첨가된 TBS)으로 희석한 Monoclonal antibody가 들어 있는 Vinyl bag으로 옮기고 상온에서 2시간동안 incubation한후 TBST용액으로 membrane을 3번 세척하였다. 다음 HRP(horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody를 0.3% casein이 함유된 TBST용액에 희석하여 넣고 membrane을 2시간동안 상온에서 incubation 한다음, 또 TBST용액으로 씻어준 다음 마지막으로 TBS용액으로 한번 씻어준다. 그런후 Immunostaining용액(18.8ml TBS, 1.2ml 4-Chloro-1-naphthol stock:30mg/10ml methanol, 30 μ l 30% hydrogen peroxide)에 넣어서 발색 시켰다.

3. HBV PreS ligand 합성, 분리, 정제 및 확보

Binding assay에 필요한 preS1 sequence(119 amino acid residues, adr type)중에서 12번 아미노산 잔기로 부터 5개씩 아미노산 잔기를 overlapping 시키면서 15-16 아미노산으로 구성된 총 9개의 각기 다른 peptide를 합성(Research Genetics, Inc USA)하였으며, reverse phase HPLC를 사용하여 90% 이상의 순도를 가지는 각각 약 10mg의 peptide를 획득하였다(Table 1, Fig 6).

4. 결과 및 고찰

Virus life cycle에서의 initial event는 host cell상의 specific receptor와의 결합으로 여겨지고 있다. Cellular receptor를 인식하는 구조를 virion attachment proteins(VAP)라고 부르며 B형 간염바이러스의 경우 preS1, 그리고 preS2 specific domain이 관여되어 있다고 알려져 있다(17). 본 실험에서는 HBV cellular receptor와 VAP와의 상호작용과 구조-기능관계 연구를 위하여 preS1 region을 중심으로 9개의 다른 peptide를 합성 분리·정제하였다. 그리고 HBV의 preS1 단백질을 MBP에 융합시켜서 E coli에서 발현시킨후, gel-filtration 이나 affinity chromatography를 이용하여 분리·정제하였고 같은 방법으로 preS2 단백질도 β -galactosidase에 융합시켜서 E coli에서 발현시켰다. 그리고 negative control로 사용하기 위한 maltose binding protein의 경우도 E coli에서 발현시켜 affinity chromatography로 분리·정제하였다.

Table 1. Amino acid sequence of synthetic pre-S1 peptides.

Peptide	Amino acid sequence
PreS(12-27)	M G T N L S V P N P L G F F P D
PreS(17-31)	S V P N P L G F F P D H Q L D
PreS(22-36)	L G F F P D H Q L D P A F G A
PreS(27-42)	D H Q L D P A F G A N S N N P D
PreS(32-46)	P A F G A N S N N P D W D F N
PreS(37-51)	N S N N P D W D F N P N K D Q
PreS(42-56)	D W D F N P N K D Q W P E A N
PreS(47-61)	P N K D Q W P E A N Q V G A G
PreS(89-103)	P A A P P P A S T N R Q S G R
PreS(21-47)	P L G F F P D H Q L D P A F G A N S N N P D W D F N P

[preS1(32-46)]

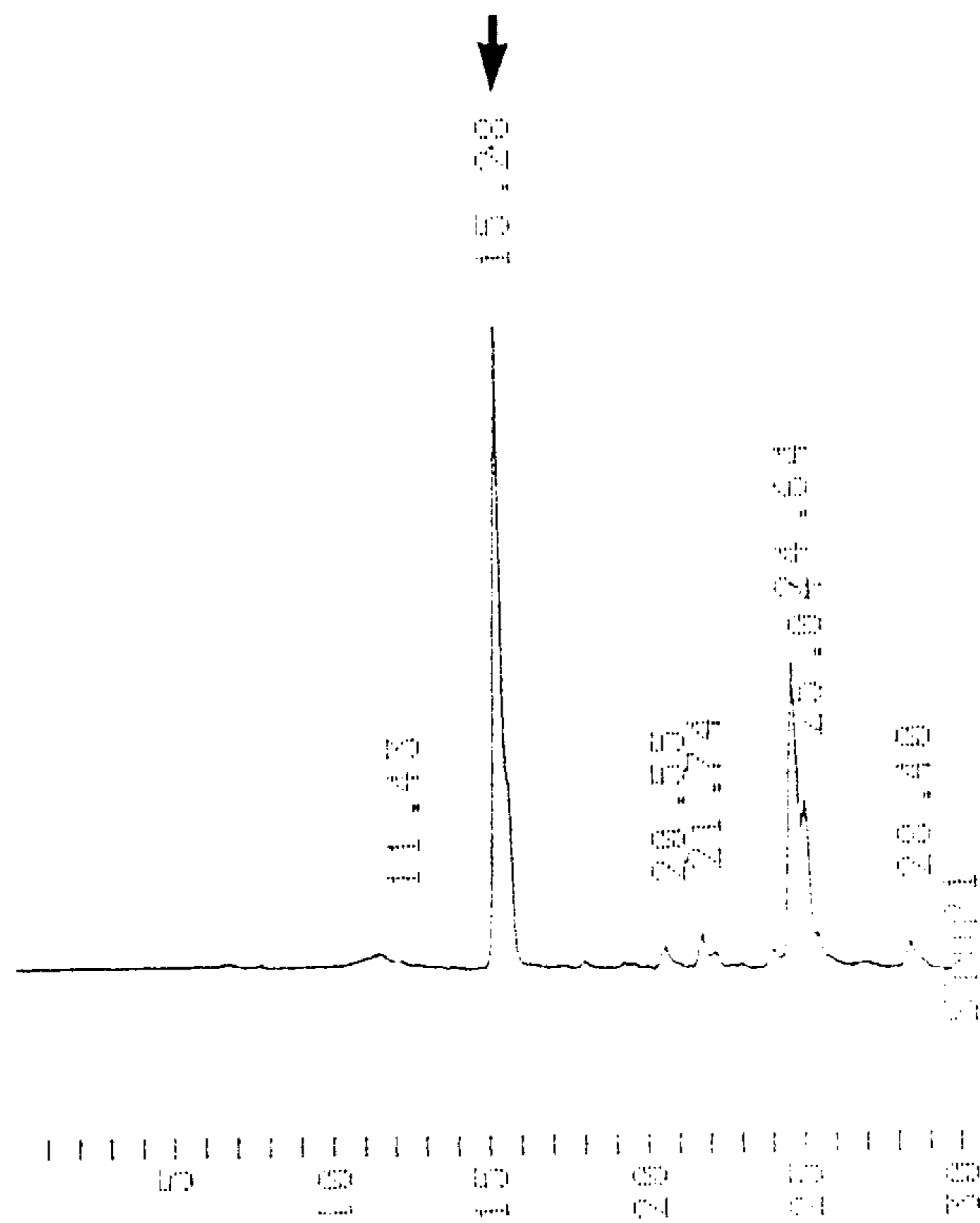


Fig 6. Elution profile of synthetic preS1(32-46) peptide on C18-reverse phase HPLC

제 4 절 HepG2-preS1 ligand binding assay

1. 실험재료

1) 시약

Binding assay에 사용할 ligand의 labelling에 사용할 ^{125}I iodine은 Amersham사(England)에서 구입하였으며, Iodination에 사용된 Iodo-beads iodination reagent는 Pierce사(U.S.A)로 부터 구입하였다.

2. 실험방법

1) HBV-preS ligand의 iodination

상기에서 분리·정제한 MBP-preS1, β -gal-preS2, preS2-S, MBP(Maltose binding protein)를 각각 500 μg 씩 준비한 후 iodination을 하였으며, 그 방법으로는 다음과 같다.

먼저 Iodo-beads를 반응 vial에 넣고 20mM Tris-HCl 완충용액 (pH7.4) 200 μl 를 가한 후 ^{125}I 원액(10 μl , 1mCi)을 20mM Tris-HCl 완충용액(pH7.4) 100 μl 로 희석한 용액을 각vial에 20 μl 씩 첨가한 후 실온에서 5-10분간 pre-incubation 시키고, 상기의 단백질을 각 반응 vial에 첨가한 후 30분간 실온에서 방치하였다. 30분후 Iodo-beads를 반응액으로 부터 분리하고, 그 상등액을 24시간 투석한 후 free iodine을 제거하였으며 binding assay에 필요한 iodinated ligand를 준비하였다.

2) Binding assay

먼저 binding assay에 필요한 HepG2, MRC5(negative control) cell line을 2×10^5 /well이 되도록 배양하였으며, 현미경상 가장 상태가 좋은 well을 선택하여 이것을 Ice bath(4°C)위에 1시간정도 pre-incubation 시킨 후 그 상태에서 ^{125}I -labelling한 MBP-preS1, β -gal-preS2, preS2-S, MBP등을 각각 γ -counter(BEKMAN Gamma5500)로 농도를 측정하고 농도별로 희석하여 첨가한 후 2시간동안 binding 시켰다. 다음 DMEM 배지를 버린후 PBS완충용액으로 5번 씻고, Trypsin-EDTA (0.25% Trypsin, 2.65mM EDTA-4Na)로 5분간 처리한 후 γ -counter로 측정하였다. Non-specific binding의 측정은 상기의 과정에서 ^{125}I -label한 단백질들을 첨가하기 전에 $100\mu\text{g}$ 의 labelling하지 않은 단백질을 첨가하여 2시간 incubation한 후 상기의 과정과 같이 행하였다.

Competition assay의 경우는 1×10^6 CPM의 ^{125}I -MBP-preS1의 일정농도에서 행하였으며 competition binding assay의 기본은 상기의 과정과 동일하며, competitive ligand는 앞에서 합성한 preS1(12-61)부위의 15-16개의 아미노산으로 구성된 8개의peptide와 negative control로 preS2(89-103)부위의 peptide 그리고 negative control로 maltose binding protein을 각각 $100\mu\text{g}$ 씩 함께 첨가하여 competition binding을 시켰으며, preS1(21-47)을 인식하고 있는 antibody(F35.25)도 $10\mu\text{g}$ 첨가하여 competitive binding assay를 행하였다.

3) Confocal Microscopy에 의한 HBV receptor의 visualization

Well plate에 살균된 coverglass를 넣고 HepG2 cell을 10^5 개정도를 seeding하고 24시간동안 배양하여 confocal microscopy에 필요한 세포를 준비하였다. Coverglass에 흡착되어 배양된것을 새로운 well

에 옮겨놓고, 남아있는 배지를 조심스레 제거한 다음 PBS용액(2ml)으로 3번 세척하고, 3.7% paraformaldehyde를 1ml 첨가하여 cell을 고정시킨후 30분뒤에 제거하였다. 다음 0.2% Triton X-100로 고정화된 세포를 15-30분 동안 permeabilization한 후 다시 제거하여 cell을 준비하여 두고, ligand sample을 2% gelatin 50 μ l, NRS(normal rabbit serum)25 μ l, FBS(fetal bovine serum)10 μ l.에 MBP-preS1 40 μ g, MBP 40 μ g을 첨가한 것을 위에서 준비한 cell에 첨가하여 2시간 동안 방치한 후 PBS용액으로 3번 세척하였다. 그위에 rabbit anti-MBP antibody를 첨가한 후 다시 2시간동안 반응 시키고 PBS용액으로 3번 세척하고 Goat anti-rabbit-IgG-FITC를 1/50로 희석한 sample 1ml를 첨가하여 2시간동안 반응시킨 후 다시 PBS용액으로 3번 세척하였다. 한편 깨끗이 세척한 slide glass에 10% glycerol 40 μ l를 떨어뜨리고 위에서 준비한 cover glass를 들어내어 수분을 제거한 후 slide glass로 덮고 manicure sealing을 한 후 confocal microscopy로 사진을 찍었다.

3. 결과 및 고찰

상기와 같이 MBP-preS1을 사용하여 binding assay를 하였으며, negative control로 MBP, β -gal-preS2, preS2-S 단백질을 분리, 정제하여 사용하였다. Positive control로는 binding이 알려져 있는 HepG2 cell line을 사용하였으며, negative control로는 MRC5 cell line을 사용하였다. 예상한대로 HepG2 세포와의 binding assay에서 preS1 대신 MBP-preS1의 사용 가능성을 시사하였으며, HepG2와 MRC5 모두에서 MBP를 포함한 negative control, 즉 β -gal-preS2, preS2-S등은 binding에 관여하지 않음을 확인할 수 있었다(Fig.7).

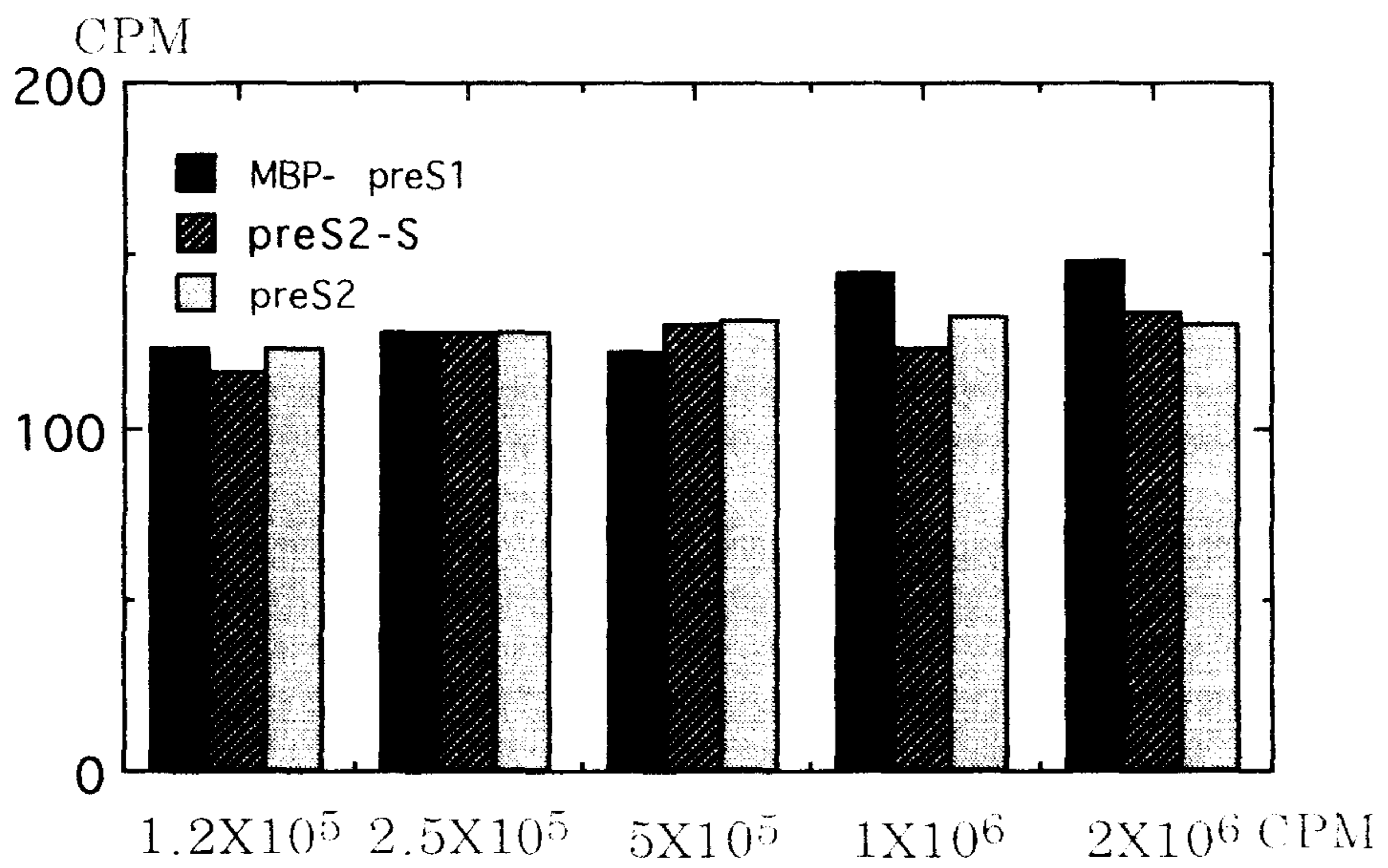


Fig 7. The effect of MRC5 binding assay at various CPM

한편 각기 다른 농도에서 binding assay를 실행한 결과, ^{125}I -labelled MBP-preS1은 $1 \times 10^6 \text{CPM}$ 이상에서 전형적인 binding 포화 곡선이 나타났다(Fig. 8A, 8B). Competition binding assay에서는 일정농도($1 \times 10^6 \text{CPM}$, ^{125}I -MBP-preS1)를 사용하였으며 percent inhibitor study를 F35.25(as a positive control), MBP(as negative control) 및 9종류의 preS1 부위의 합성peptide를 사용하였다. 그 결과 F35.25[Mab against preS1 (21-47)]의 경우는 약 82%의 inhibition을 보인 반면 negative control로 사용한 MBP 그리고 preS1(12-27), preS1(17-31), preS1(22-36), preS2(89-103)의 경우는 inhibition 효과가 매우 낮거나(3% 미만) 거의 inhibition 효과가 나타나지 않음을 알수 있었으며, 그밖의 preS1 합성peptide의 경우 preS1(27-42)와 preS1(32-47)에서 각각 61%, 74%의 inhibition 효과가 나타났다(Fig. 9).

이와같은 결과로 미루어 보아 B형 간염바이러스의 감염에 관여하는 VAP(Virion Attachment Protein)는 preS1임을 확인할 수 있었으며, 그 중에서도 특히 아미노산 잔기 27-47 부위가 HBV receptor binding에 관여하는 것으로 생각되어진다.

HepG2 cell내의 preS1과 binding에 관여하는 단백질의 가시화를 위해 MBP-preS1과 negative control인 MBP를 사용하여 confocal microscopy를 사용하였다(Fig. 10).

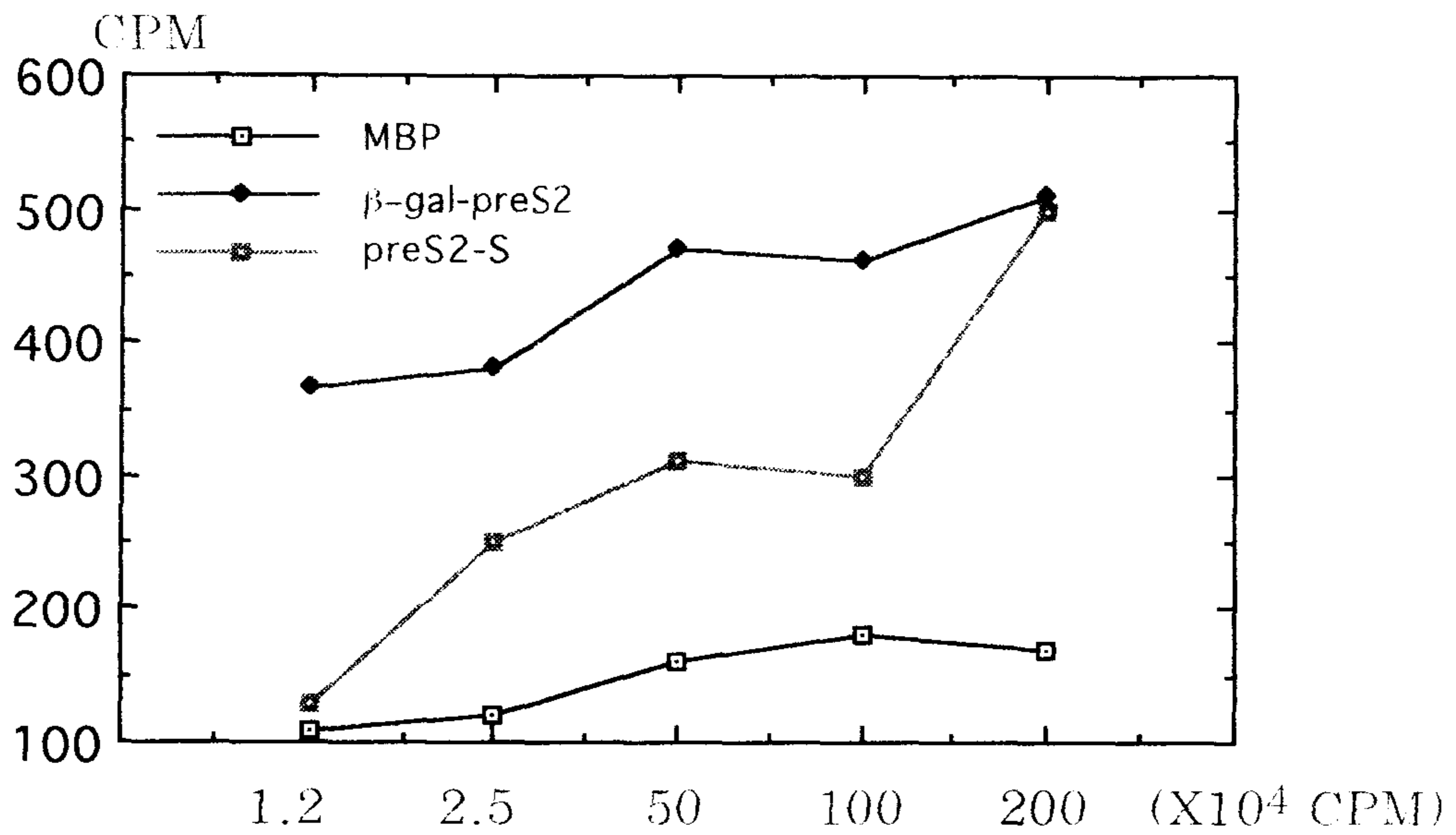


Fig 8A. HepG2 - preS ligand binding assay

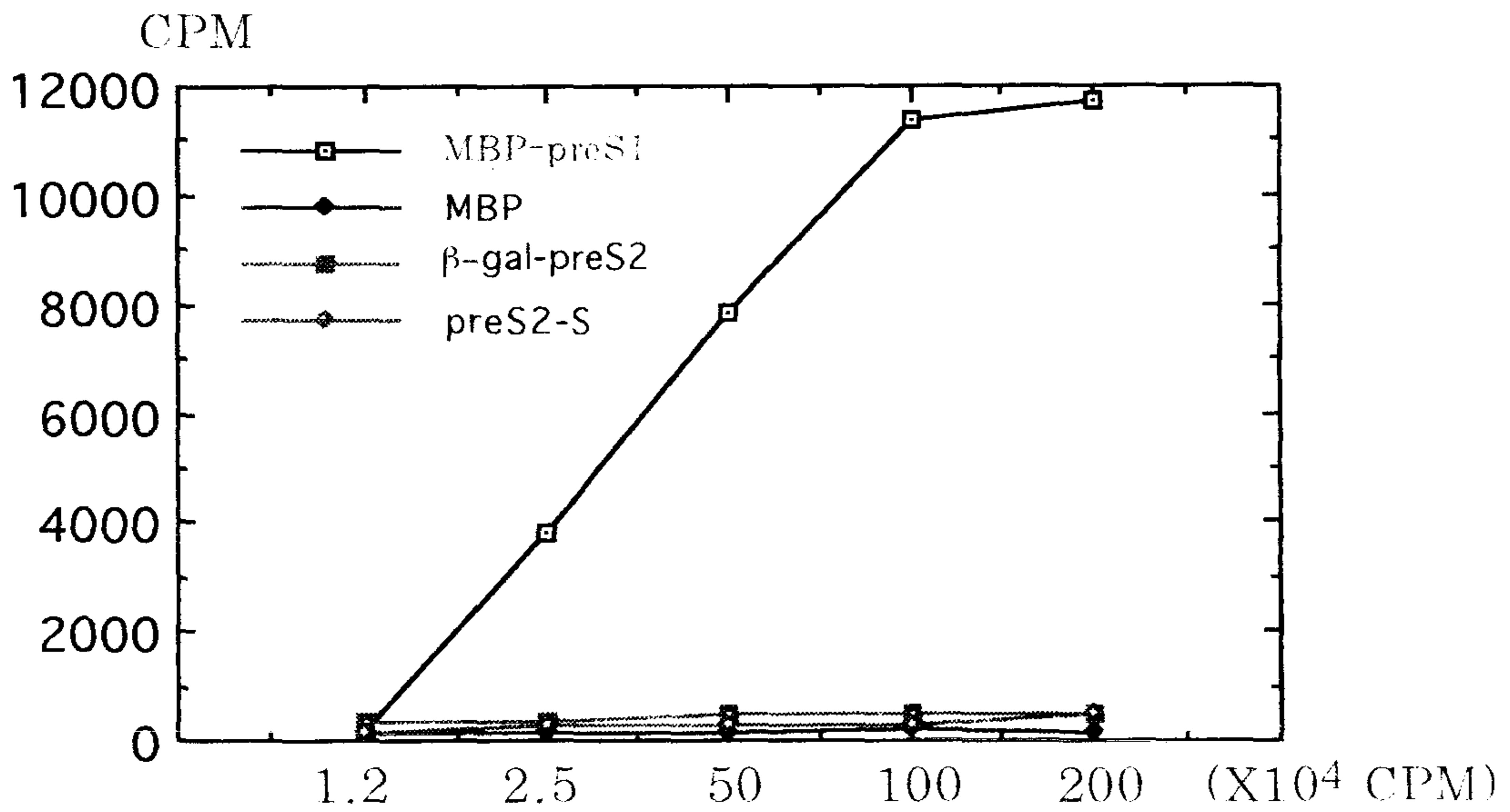


Fig 8B. HepG2 - preS ligand binding assay(Negative control)

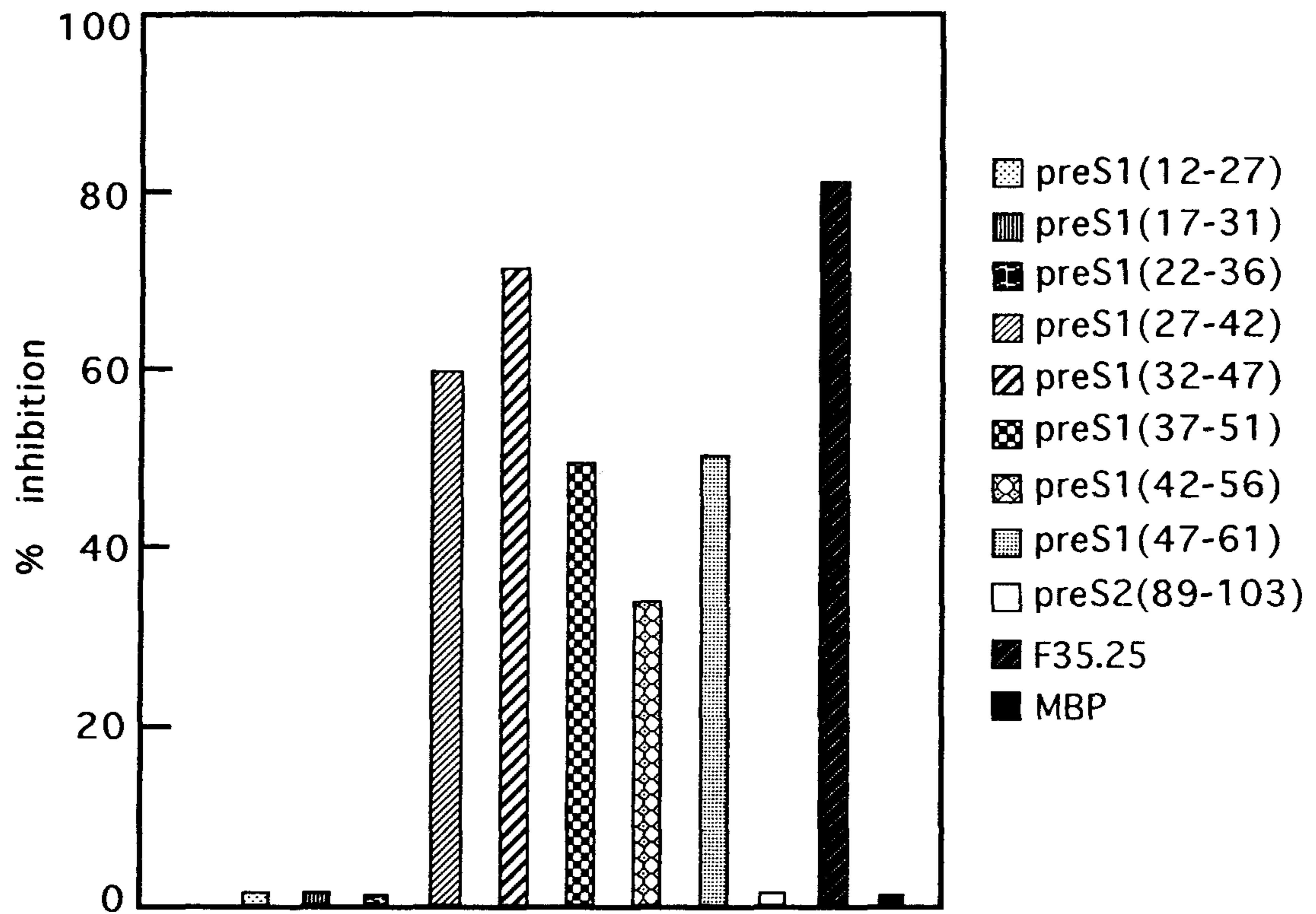
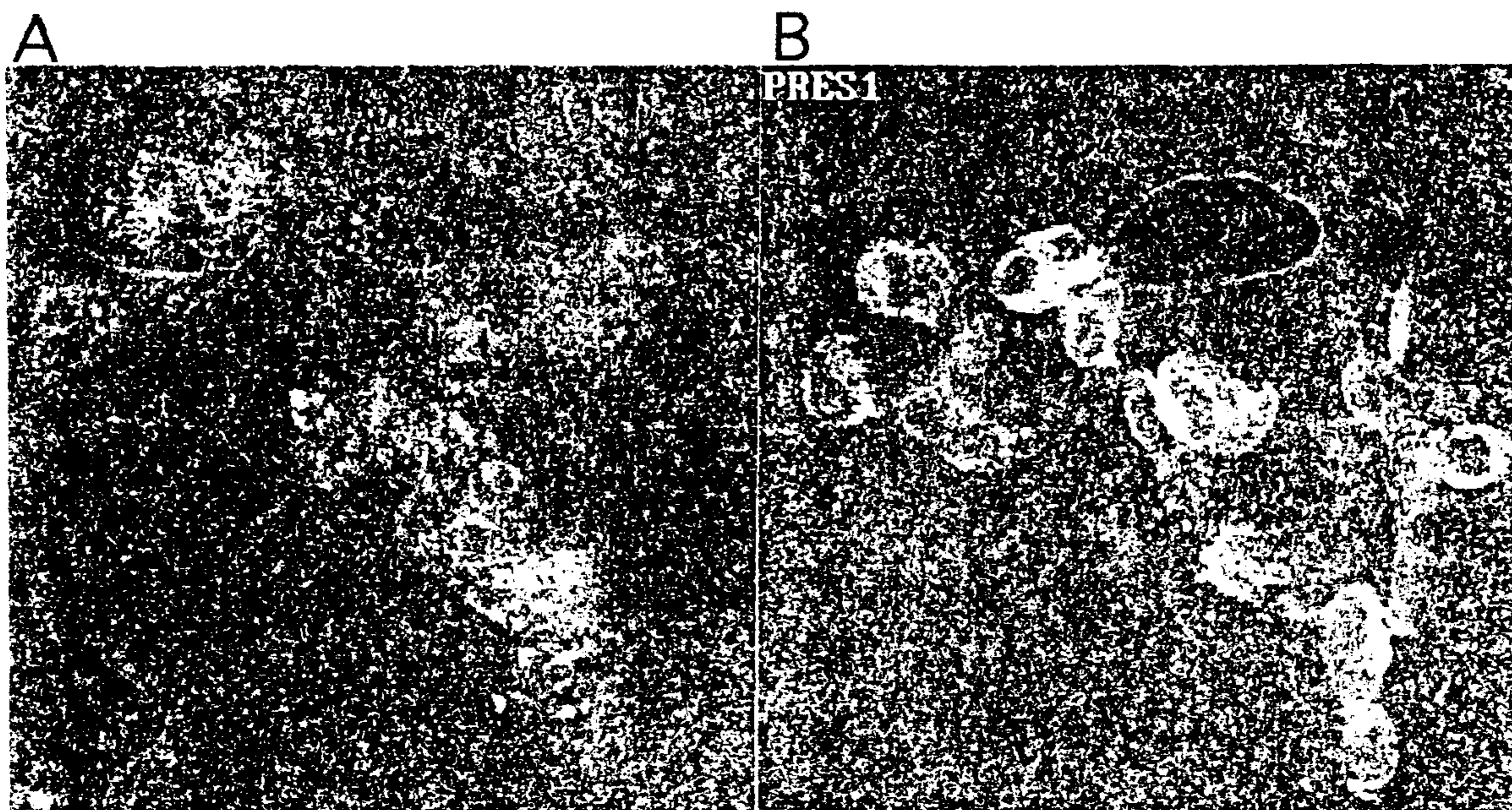


Fig 9. The effect of competition binding assay
 MBP-preS1(1X10⁶ CPM) was competition binding assay with synthetic peptides
 (100 μ g), MBP(100 μ g) and F35.25 antibody(10 μ g).



Sample	A	B
HepG2	+	+
2% gelatin +Normal rabbit serum +Fetal bovine serum (Nonspecific binding blocking step)	+	+
MBP-preS1	—	+
rabbit anti-MBP Ab	+	+
Goat anti-rabbit- IgG-FITC	+	+

Fig 10. The confocal microscopy for HBV-preS1 ligand binding

제 5 절 HBV PreS ligand의 발현 및 생산

preS1, preS2, preS1-preS2 단백질을 glutathione-S-transferase에 융합시켜 E.coli에서 발현시킨 후, 단백질 가수분해효소 thrombin(Novagene)으로 절단한 후 preS1 또는 preS1-preS2 단백질만을 gel filtration(Sephadex G-50) 또는 affinity chromatography (glutathione-agarose column)를 이용하여 분리·정제하였다(Fig. 11, 12).

preS1-preS2 단백질의 경우 preS1의 N-terminal의 2,3번째 아미노산을 치환한 후 N-terminal 또는 C-terminal 쪽에 His 갈기를 가지는 vector에 연결한 후 대장균에서 직접 발현시켜, 분리·정제중에 있다.

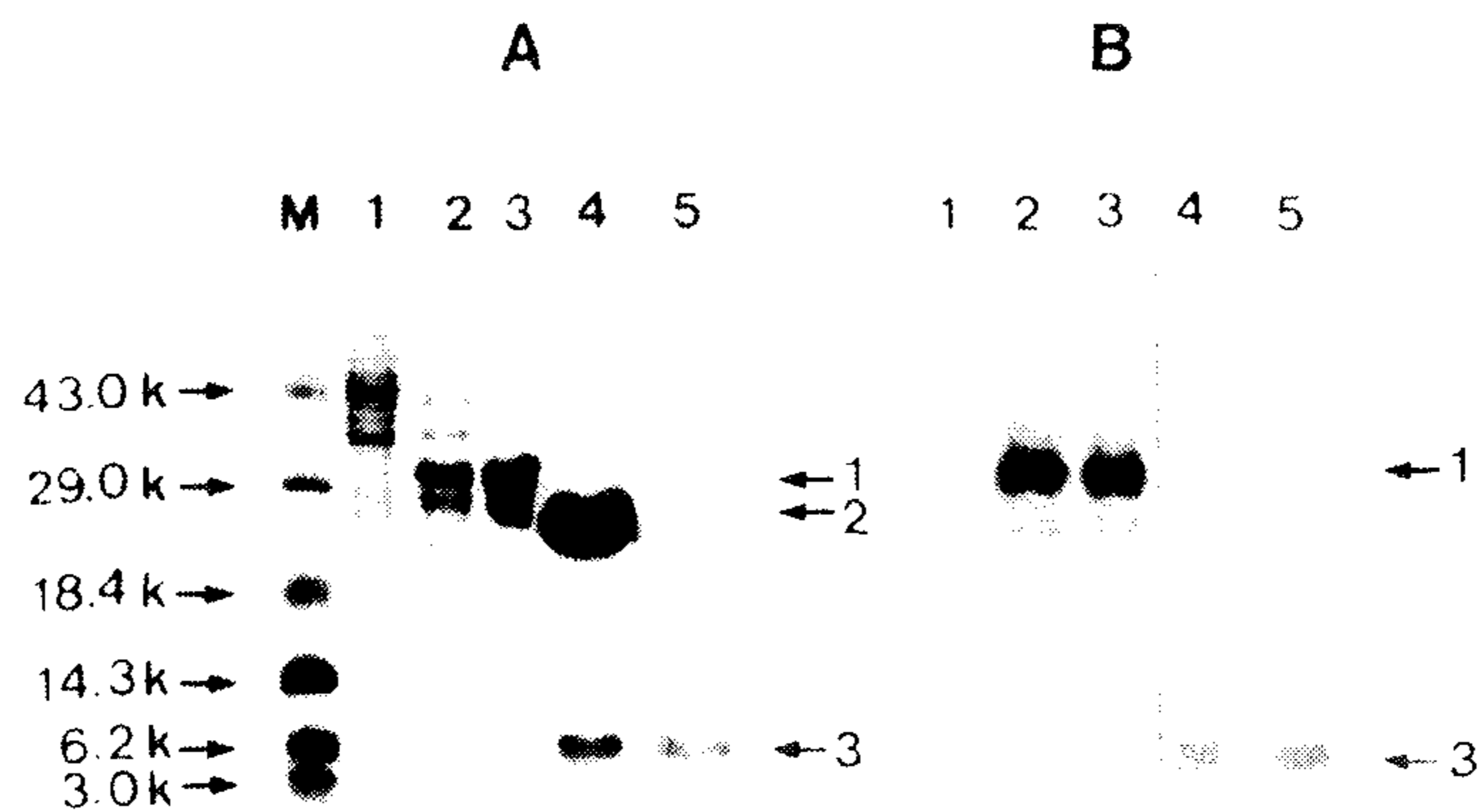


Figure 11. 15% SDS-PAGE (A) and Western analysis (B) of the purification of the GST fusion protein and preS1 peptide. Panels A and B : Lane M, molecular weight standards ; lanes 1 and 2, uninduced and induced recombinant cells harboring pGSTpreS1-56, respectively ; lanes 3, purified fusion protein containing 56 aa preS1 peptide ; lanes 4, the fusion protein digested with thrombin ; lanes 5, purified 56 aa preS1 peptide. Arrows 1, 2 and 3 indicate GST-preS1 (56 aa), GST and preS1 (56 aa) peptide, respectively.

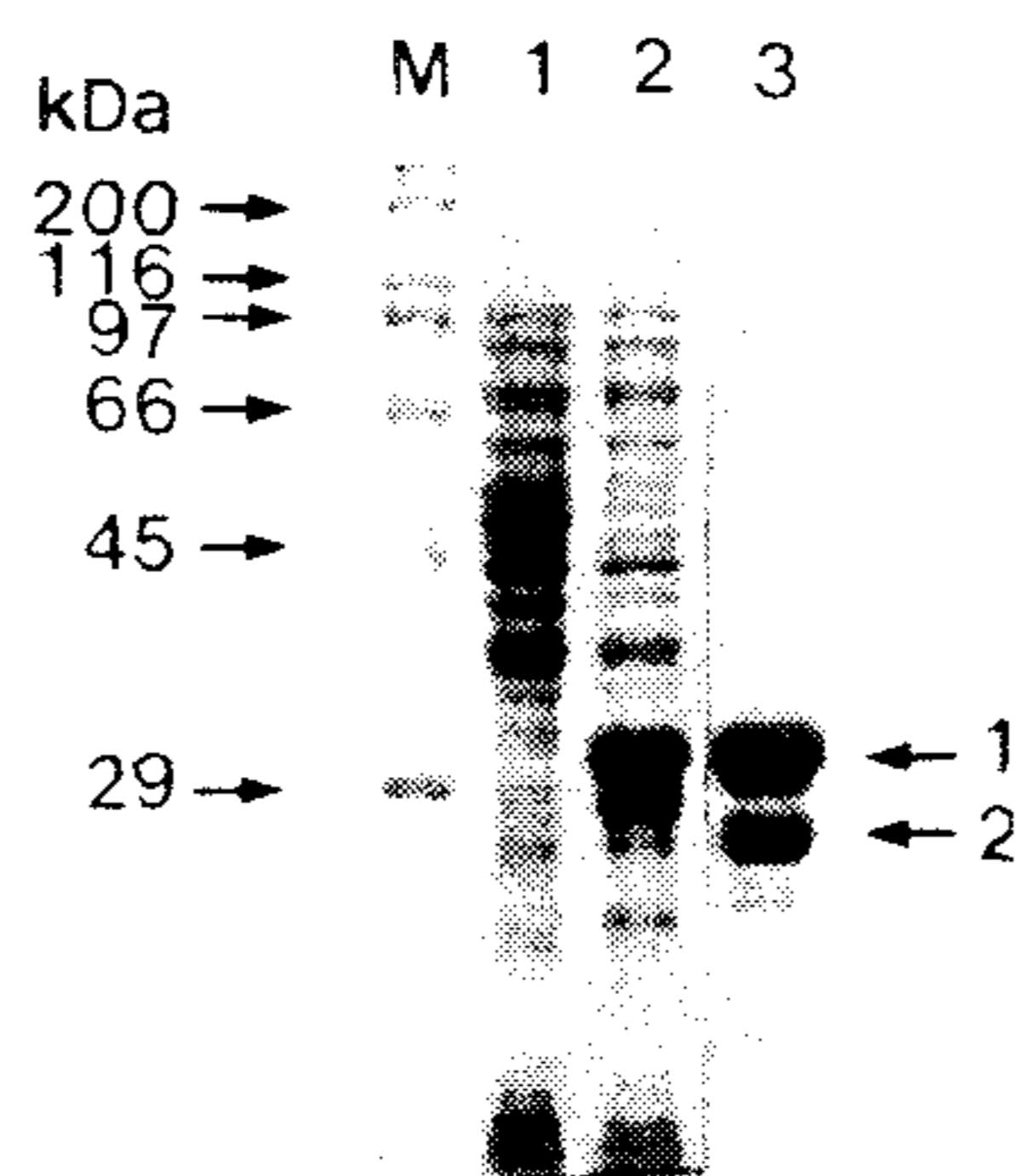


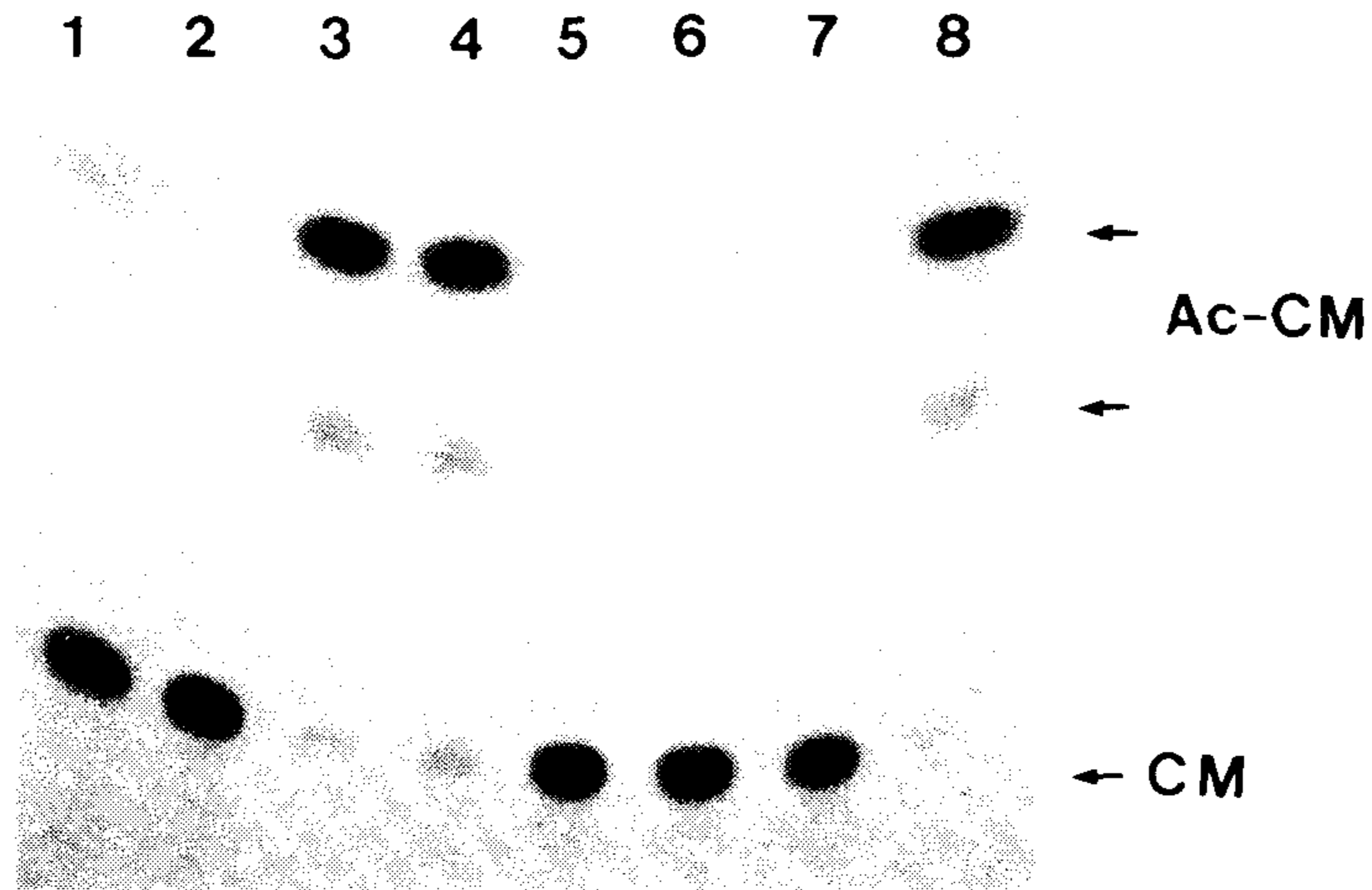
Figure 12. 12.5% SDS-PAGE of the purification of the GST-preS2 fusion protein. Lane M, molecular weight standards ; lanes 1 and 2, uninduced and induced recombinant cells harboring pGSTpreS2, respectively ; lanes 3, purified GST-preS2 fusion protein.

제 6 절 Yeast the hybrid system을 이용한 liver cDNA
library의 HBV preS1 binding protein의 screening

HBV(adw type) preS1-preS2를 gal4 binding domain에 연결시키고 liver cDNA library를 gal4 activation domain에 연결시킨 library를 yeast cell(*Saccharomyces cerevisiae* Hf7c)에 Lithium acetate 방법 (Itoh, et al, 1983)으로 cotransformation 시킨 후, β -galactosidase assay시 positive signal을 나타내는 colony를 검색함으로써, preS1 ligand에 interaction하는 단백질을 liver cDNA library로 부터 설명 중에 있다(Fig. 13, 14).

(DNA construct)	(ONPG assay)	
	A ₄₂₀ (average)	β-gal activity(%)
Gal4 binding domain	0.005	1 % <
Wild type Gal4 (1-881 aa.)	1.60	180 %
Gal4 binding domain preS1 preS2 S221	0.01	2 % <
Gal4 binding domain preS1 preS2	0.29	33 %
Gal4 binding domain preS1(119aa)	0.29	33 %
Gal4 binding domain preS1(90aa)	0.89	100 %
Gal4 binding domain preS1(56)	0.08	10 %
Gal4 binding domain preS1(56) preS2	0.18	20 %
Gal4 binding domain preS1(56) Ab(preS2)	0.16	20 %
Gal4 binding domain preS1(57-119)	0.003	1 % <
Gal4 binding domain preS1(57-119) preS2	0.002	1 % <
Gal4 binding domain preS1(57-119) Ab(preS2)	0.005	1 % <
Gal4 binding domain preS2	0.005	1 % <
Gal4 binding domain preS2 S221	0.003	1 % <
preS1(119aa)	0.01	1 % <

Fig13. Assay for β-galactosidase activity (ONPG assay) of yeast transformants



Reporter : G₅E1bCAT



	CAT activity
1 : RSV promoter + Gal4 binding domain + preS1(56)	0.21
2 : RSV promoter + Gal4 binding domain + preS1(57-119)	-
3 : RSV promoter + Gal4 binding domain + preS1(90)	3.90
4 : RSV promoter + Gal4 binding domain + preS1(119)	3.20
5 RSV promoter + Gal4 binding domain + (preS1+preS2)	-
6 RSV promoter + Gal4 binding domain only	-
7 : G ₅ E1bCAT	-
8 : RSV promoter + Gal4 binding domain + VP16	8.14

Fig14. Transient expression assay for transactivator activity of preS1 in HepG2 cells (CAT assay)

참 고 문 헌

- 1) Dejean, A. et al(1984) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5350
- 2) Flehmig, B. et al(1988) Viral hepatitis and liver disease, New York:Alan R Liss, 87-90
- 3) Melnick, J. L. et al(1983) Virus associated with human cancer, New York:Marcel Dekker, 337-367
- 4) Omata, M. (1990) Hepatology 12, 364-366
- 5) Neurath, A.R. et al(1990) Virology, 173, 448-457
- 6) Neurath, A.R. et al(1990) Virology, 178, 631-634
- 7) Peutisso, P. et al(1992) J. Gen. Virol, 73, 2041-2045
- 8) Neurath, A. R. et al(1992) J. EXP. Med, 175, 461-469
- 9) MacDonald, G. G. et al(1989) J. Biol. Chem, 264, 3256-3261
- 10) Budkowska, A. et al(1993) J. Virology. 67, 4316-4322
- 11) Buchini, R. et al(1990) J.Virol., 64, 3025-3032
- 12) Petit, M.A. et al(1991) Virology., 187, 211-222
- 13) Sang Chul Lee. et al(1990) Eur. J. Biochem., 187, 417-424
- 14) Sun Boon Rhyum. et al(1994) Mol. Cells., 4, 189-193
- 15) Laemmli, U.K. (1970) Nature., 227, 680
- 16) Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr, A.L. and Randall, R. J. (1951) J. Biol Chem. 193, 265
- 17) Neurath, A.R. et al(1986) Cell., 46, 429-436

제 3 장 단백질 폴딩 연구

제 1 절 서 론

단백질의 폴딩은 일반적으로 풀어진 폴리펩타이드 사슬이 3차 구조적으로 열역학적 측면에서 안정한 상태로 진행되는 일련의 과정으로 알려져 있다. 그러나 실제로 *in vivo*에서는 이와는 다르게 compartmentation, machinery (chaperone 포함) 및 protein-protein interaction 이 관여하며, kinetically control 되리라고 주장되고 있다. 단백질 폴딩 기작을 연구함에 의해서 단백질의 구조와 기능의 연관관계를 이해할 수 있으며 이로부터 기능(예, 안정성)을 보강할 수 있는 방법을 깨우치고, 나아가 기능성 단백질 개량의 차원에서 molecule의 design이 가능하다고 할 수 있다.

단백질 폴딩의 kinetic pathway 연구라는 관점에서 serpin (serine protease inhibitor) 계열의 단백질들은 특별히 흥미로운 시스템을 제공하고 있다. Serpin의 native 구조는 열역학적으로 가장 안정된 상태가 아니고 kinetically trap 된 intermediate라는 실험적 증거가 축적되고 있으며, 이는 단백질의 native conformation이 가장 안정된 구조가 아니라 폴딩경로에 의해 결정될 수 있음을 단적으로 보여주고 있다.

본 연구의 대상단백질인 serpin (serine protease inhibitor) 계열의 단백질은 α_1 -antitrypsin, antithrombinIII 등을 포함하고 있으며, 체내의 preteinase/proteinase inhibitor 평형을 유지시키는

데 중요한 역할을 하는 단백질로 알려져 있다. 또한 이들에 대한 유전적 변이들은 emphysema나 thrombosis, 혹은 간질환 등을 유발하며, 이 중에는 단백질 폴딩에 결함이 발견된 것도 있다. 이러한 폴딩변이에 대한 연구는 우선적으로는 질병의 원인기작을 규명하고, 나아가서 serpin 단백질 폴딩기작 연구에 크게 활용될 수 있다. 또한 안정성이 증진된 변이를 이용하여 serpin의 3차구조의 안정성 및 폴딩조절의 요인을 규명할 수 있을 것으로 예측된다.

$\alpha 1$ -antitrypsin ($\alpha 1$ -AT)은 혈장내에 존재하는 주된 프로테아제 저해제로서 간세포에서 합성된 후(1), 혈액내로 분비된다. $\alpha 1$ -AT는 트립신, 카이모트립신, 일레스타제, 콜라게네이즈, 트롬빈, 플라스민과 같은 대부분의 세린프로테아제에 대해 저해작용을 하지만(2), 주된 역할은 폐포에 있는 elastic fiber가 neutrophil elastase에 의해 분해되는 것을 막아주는 것이다(3). $\alpha 1$ -AT는 유전자의 선천적 결핍증이나 많은양의 흡연 또는 심한 환경공해로 인해 혈장내에서 활성이 있는 형태의 양이 상대적으로 감소하게 된다. 결과적으로 이에 따른 프로테아제-저해제 균형이 깨져 허파는 신축성을 잃게되고 난치병인 emphysema (호흡기종)로 발전하게 된다(4). 따라서 이와같은 질병을 치료하기 위해 $\alpha 1$ -AT를 혈액에서 분리정제하여 치료제로 사용하는 것이 FDA에 인가되어 있다(5).

인체 혈청에 존재하는 세린프로테아제 저해제들은 계열의 유사성이 높으며 이들을 serpin이라는 superfamily로 분류한다. 여기에는 $\alpha 1$ -AT를 비롯하여 antithrombin III, ovalbumin, $\alpha 1$ -antichymotrypsin, β -plasminogen activator, $\alpha 2$ -antiplasmin, C1 inhibitor 등이 속한다(6). $\alpha 1$ -AT의 결정구조 분석을 비롯하여(7) 이들 serpin에 관한 구조기능적 관점의 연구들이 꾸준히 진행되어왔다.

α 1-AT를 본보기로 하여 다양한 인체 serpin의 작용기작이 밝혀지고, 변이형들이 나타내는 병리현상을 분자수준에서 해석 가능하게 되었다.

α 1-AT의 일차구조는 아미노산 서열분석과 cDNA 서열분석에 의해 결정되었는데, 394개 아미노산으로 구성되어 있으며 아미노말단에는 24개의 소수성이 큰 아미노산잔기로 구성된 signal peptide가 존재한다 (6). α 1-AT 폴리펩타이드는 세계의 탄수화물 사슬이 달려 있으며 native상태의 α 1-AT는 단합체(monomer)로서 수용성이 큰 globular 형태의 단백질이다. Serpin의 활성부위는 대상 프로테아제의 의사 기질이라 볼 수 있으며, 저해제의 잠재성 절단부위인 P1-P1' peptide 결합부위를 중심으로 프로테아제와 복합체를 형성한다. 이 P1 위치는 serpin의 특이성을 결정하는 잔기로서 α 1-AT의 경우 Met, antithrombin의 경우 Arg이다. 이 활성부위는 비대상 프로테아제에 의해 절단될 수 있는데, 내열성이 높아지며 결정이 잘 생성되게 된다(8). 절단형 α 1-AT의 X선 결정분석 결과 80%의 아미노산이 3개의 β sheet와 8개의 α helix에 존재하는 상당히 ordered된 구조를 나타내며, 흥미로운 사실은 P1, P1'잔기가 70Å의 거리만큼 떨어져 있다는 것이다(7). Serpin super-family에 속하는 단백질들의 3차구조를 컴퓨터 모델링에 의해 비교해 본 결과, 주로 아미노 말단, 카르복시 말단, 혹은 hC-hD사이 부위에 펩타이드의 첨가가 대표적이다. 그러나 이와같은 변화는 이들 단백질의 globular fold에 큰 영향을 주지 않으며 결국 서로 매우 유사한 구조를 갖으리라 예상된다(9).

α 1-AT의 작용기작을 규명하기 위해서는 무엇보다 먼저 활성형 α 1-AT의 구조가 밝혀져야 하는데 아직 결정구조가 얻어지지 않고있다. 그러나 neutron scattering, X-ray scattering, FTIR, 및 컴퓨터 모

델링에 의해 활성형의 구조와 작용기작이 추정되었다(10-13). 활성형 $\alpha 1$ -AT는 절단형의 sheet A의 중간에 있는 s4A중 일부가 Ser359의 카르복시 말단쪽으로 추출되어 연결되어 있는 상태(stressed)로 존재하다가, 프로테아제의 공격을 받게되면 노출되어 있는 s4A의 부위가 절단됨에 의해 stressed(S)형태에서 부터 relaxed(R)형태로 전환되게 된다고 추정되었다. C1-inhibitor, $\alpha 1$ -antichymotrypsin, antithrombin, cortisol binding globulin과 thyroxine binding globulin들에서도 이와 같은 S \rightarrow R의 구조변화가 proton NMR과 CD연구에 의해 분석되었다(16,17). 반면에 serpin중 저해제 기능이 없는 ovalbumin이나 angiotensinogen등 에서는 이런 현상이 나타나지 않았다(18, 19). 이는 S \rightarrow R 구조변화가 저해제로서의 기능과 직접적으로 연관되었으리라는 추측을 가능하게 한다. serpin-프로테아제 복합체의 구조분석에 의해 $\alpha 1$ -AT의 활성부위의 구조는 loop형태로 돌출되어 있음이 밝혀졌고(20), ovalbumin의 결정구조분석으로 부터 이 loop(P10-P2')는 α -helix를 포함하고 있음을 알 수 있었다(21). 또한 최근 밝혀진 활성이 있는 형태의 $\alpha 1$ -antichymotrypsin의 결정구조에서는 loop 전체가 돌출되어 있었으며(22), dimeric antithrombin 구조에서도 loop의 대부분이 돌출되어 있고 아미노말단쪽 두 개의 아미노산이 A-sheet에 부분적으로 삽입되어 있음을 알 수 있었다(23, 24).

현재 호흡기종 치료용 $\alpha 1$ -AT단백질은 혈액제재로서 사용되고 있는데 이는 원료의 제한 및 바아러스 감염 문제와 반감기가 4-5일 뿐인 점 때문에 유전공학기법을 통한 생산이 안전하고 경제적인 것으로 간주되고 있다. 또한 $\alpha 1$ -AT의 genetic variation이 상당히 많이 존재하는데 이들 대부분이 $\alpha 1$ -AT의 혈중농도를 낮추거나 단백질생산을 불가능하게 하여 유전병의 원인이 되기도하는데(5), 이들 변이 α

1-AT에 대해서는 재료의 결핍으로 연구가 지극히 제한되어 있다.

본 연구실에서는 아미노산치환이 α 1-AT의 폴딩 및 안정성에 미치는 연구를 수행하기 위한 기초단계로서 대장균에서 응집 형태로 발현된 α 1-AT를 리폴딩을 거쳐 재활성화시키는 연구를 이미 성공적으로 행하였다. 보고된 바에 의하면 α 1-AT 유전자를 대장균 (25-28) 또는 효모 (29-31)에서 발현시켰을 때 탄수화물이 부착되지 않은 상태로 생산되는데, 이러한 형태의 α 1-AT는 활성은 지니고 있지만 안정도가 떨어짐에 의해 *in vivo*에서 반감기가 상당히 감소하고 *in vitro*에서는 내열성이 떨어지는 성질을 갖는다 (29). 이를 극복하기 위하여 본 연구실에서는 안정화된 α 1-AT를 개발하기 위하여, 이미 확보되어있는 인체 α 1-AT 대량생산용 벡터를 이용하여 무작위 돌연변이를 유도하여 내열성 변이를 선별한 바 있다 (32). 본 연구에서는 α 1-AT의 폴딩 및 안정성에 영향을 주는 요인을 이해하기 위하여 α 1-AT 단백질의 소수성코아 부분을 대상으로 안정성이 증가된 변이들을 체계적으로 탐색하였다. 이러한 연구의 결과는 다른 단백질의 구조기능 관계의 연구에도 좋은 모델이 될 것이다.

제 2 절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

균주 및 플라스미드 - 사용한 대장균 균주는 *E. coli* JM109 [*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *strA*, *sbcB*, Δ (*lac*, *proAB*), F' (*traD36*, *proAB*, *lacI^q*, *lacZ Δ M15*)], *E. coli* JM110 [*rpsL*, *thr*, *leu*, *thi*, *lacY*, *galK*, *galT*, *ara*, *tonA*, *tsx*, *dam*, *dcm*, *supE44*, Δ (*lac*, *proAB*), F' (*traD36*, *proAB*, *lacI^q* *Z Δ M15*)], *E. coli* CJ236 [*dut1*, *ung1*, *thi1*, *relA1* /pCJ105(Cm^r)], *E. coli* K12 strain HMS174 (F' , *recA*, r^-K12 , m^+K12 , *Rif*), 및 *E. coli* B strain BL21 (F' , *lon*⁻, *ompT*, r^-B , m^-B) 등이다. HMS174는 α 1-AT 발현 벡터의 클로닝 및 플라스미드 유지에 사용되었으며 BL21은 lon 프로테아제가 생성안되고 outer membrane의 프로테아제인 ompT가 결여되어서 재조합단백질의 발현 및 정제에 유리하게 사용될 수 있었다 (33). BL21(DE3)는 BL21 균주에 파지 람다의 유도체인 DE3가 lysogenic 상태로 포함되어 있는데 DE3는 *lacI*의 유전자, *lacUV5* 프로모터, 및 T7 RNA polymerase 유전자가 람다의 *int* 유전자 내에 삽입된 것이다. 본 연구에서 사용된 AT 발현용 플라스미드 pEAT8의 제조는 이미 발표된 바 있다 (34).

제한효소들, *E. coli* DNA polymerase I large (Klenow) fragment, T4 DNA ligase, Taq DNA polymerase 등은 New England Biolabs, Bethesda Research Laboratories, Promega Biotech, Amersham, Boehringer Mannheim 또는 KOSCO에서 구입하였다. DNA sequencing kit는 USB로부터, ³²P와 ³⁵S로 표지된 nucleotide들

은 Amersham으로부터 구입하였으며 sequencing primer와 oligonucleotide 들은 DNA synthesizer (Applied Biosystem, model 391)로 합성하여 사용하였다. 인체 α 1-AT, porcine pancreatic elastase, succinyl-(L-alanyl)₃-p-nitroanilide, anti-AT rabbit antibody, peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG goat antibody 등은 Sigma Chemical company로 부터 구입하였다.

2. 실험방법

1) 유전자 조작방법

유전자 조작에 필요한 모든 효소반응은 Maniatis 등 (35)의 방법에 의해 행하여졌다.

2) 단백질발현

플라스미드 pEAT8을 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켰을 때 AT가 발현되며, 생성된 재조합 AT 폴리펩티드는 아미노산서열의 첫 번째 잔기로 인체혈장에서 분리된 AT의 첫번째 아미노산인 글루타메이트 대신 메치오닌을 지니게되며 두번째 잔기부터는 서열이 똑같게 된다. 이와같은 야생형 재조합 AT의 아미노말단 서열은 단백질서열 분석실험에 의해 확인되었다 (Applied Biosystem 477A 사용). 플라스미드 pEAT8에 의해 발현되는 AT는 배양온도 37°C 이하에서는 주로 활성이 있는 용존된 (soluble) 형태로 생산되는 반면 40°C에서는 대부분이 단백질응집체 (inclusion bodies) 형태로 생산된다. 대장균에서 재조합 단백질을 추출하여 내열성 클론을 스크린하는 단계에서

는 세포 파쇄액의 가용성 분획에 다량의 재조합 AT를 집중시키기 위하여 37°C에서 발현을 유도하였고, 재조합 단백질의 분리·정제시에는 수율을 높이기 위하여 40°C에서 AT의 발현을 유도함으로써 AT가 응집체 내로 집중되도록 조작하였다. α 1-AT를 생산하는 플라스미드를 포함하고 있는 대장균 BL21(DE3)를 LB배지에 접종한 후 37°C에서 O.D.₆₀₀=0.7 - 0.8 까지 진탕배양한 후 (약 2시간), IPTG를 0.4 mM 되게 넣고 원하는 배양온도에서 3시간 배양함으로써 α 1-AT의 합성을 유도하였다. 배양액을 원심분리하여 세포를 수확한 후 완충용액 A에 현탁시켜 0°C 를 유지하면서 Ultrasonic Processor (Heat System)로 간헐적으로 30초간 파쇄시켰다.

3) DNA 서열분석

DNA 서열분석은 Sanger등의 chain termination 방법 (36)에 의해 행하였다.

4) 전기영동 및 면역블랏

SDS-polyacrylamide gel 전기영동은 Laemmli의 방법에 의해 행하였다 (37). Western blotting은 Towbin의 방법 (38)으로 anti-AT rabbit antibody peroxidase-conjugated 과 anti-rabbit IgG goat antibody를 사용하여 행하였다.

5) 변이유발법

단백질의 안정성은 다양한 상호작용에 의해 결정되기 때문에 특정한 아미노산잔기를 치환하는 방법보다는 무작위로 변이를 유도한 (random mutagenesis)후 원하는 형질을 스크린하는 방법을 택했다. 이러한 방법은 폴딩 및 안정성변이를 확보하는데 있어서 특정부위 변이유도법 (site-specific

mutagenesis)보다 훨씬 효과적이며, 또한 충분한 숫자의 변이를 스크린할 경우 전체적으로 변이들의 3차구조에서 분포(distribution)와 아미노산치환 양상(pattern)을 볼 수 있다는 이점이 있다.

올리고 뉴클레오티드를 이용한 특정부위 돌연변이 유도방법 -Kunkel의 방법 (39)을 변형하여 대상단백질의 유전자가 들어 있는 M13 클론으로 부터 얻어진 uridine 템플리트와 합성 올리고뉴클레오티드를 이용하여 수행하였다.

혼합올리고뉴클레오티드를 이용한 무작위 돌연변이 유도법 - 올리고 뉴클레오티드의 혼합합성법 (doped oligonucleotides)에 의해 무작위 돌연변이를 시도하였다. 각각 하나의 아미노산치환이 일어난 변이를 보다 효율적으로 얻기위해 doped oligonucleotide (92.5% 정상서열의 뉴클레오티드 + 그밖의 세종류의 뉴클레오티드는 각각 2.5%)를 사용하여 변이를 유발하였다. 선정된 변이유도 대상부위는 단백질의 안정성 결정에 중요한 소수성코아 부위로서 아미노산 서열상 48번 잔기에서 70번 잔기까지와 368번 잔기에서 391번 잔기까지이다. 이 부위의 무작위 변이유도를 위하여, Hutchison 등의 방법 (40)에 따라, 혼합합성 올리고 뉴클레오티드를 사용하였다. 즉, 올리고 뉴클레오티드의 화학 합성에 사용되는 네 종류 (A, T, C, G) 의 phosphoramidite 용액에 미량의 다른 세가지 phosphoramidite 용액을 오염시킨 후 합성에 사용하게 되면, 생산된 올리고뉴클레오티드의 서열상에 비정상적인 염기가 오염 정도에 따라 일정 비율로 삽입되게 된다. 이런 혼합합성 올리고뉴클레오티드를 부위특이 돌연변이법 (39)에 사용하게 되면 특정 부위에 대한 무작위 변이를 효율적으로 유도할 수 있다.

6) 스크리닝 방법

변이 라이브러리를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환시키고 37°C에

서 발현시켜서 $\alpha 1$ -AT를 생산한 후 이의 내열성을 조사하기 위하여 1차년도에 개발된 스크린 시스템을 이용하였다. 즉 96 well microplate에서 각 클론들을 배양과 동시에 $\alpha 1$ -AT를 생산유도하고, 균체를 용해시킨 다음 60 °C에서 1.5 시간 동안 열처리한 후, 잔여 $\alpha 1$ -AT의 활성도를 일련의 발색반응에 의해 측정하였다. 이 방법에 의하면 야생형은 붉은색으로 발색되며, 내열성 변이는 무색으로 나타나게 된다. 방법은 콜로니를 0.1mM 이소프로필 베타-치오갈락토사이드 (IPTG)가 첨가된 배지 (인산제2나트륨 6g, 인산칼리 3g, 염화암모늄 1g, 포도당 2g, 효모엑기스 0.2g, 카사미노산 3g을 1l에 녹인다) 0.1ml에 하루밤 배양하고, 25 μ l의 용해액 (250mM Tris pH 8.0, 25mM EDTA, 0.25% Triton X-100, 0.5mg/ml 리소짐)을 첨가하여 실온에서 1시간 방치하고, 60 °C에서 1.5 시간 동안 열처리하였다. 7nM 일래스타제액 (시그마 E0258) 25 μ l을 첨가하여 실온에서 1시간 반응시키고, 잔존 일래스타제의 활성을 1.2mM 숙신닐-알라닐-알라닐-알라닐-파라-니트로아닐리드 (시그마 S4760) 50 μ l를 첨가하여 실온에서 하루밤 반응시켰다. 반응액에 아질산나트륨 (0.2%를 2M 염산에 녹인다) 25 μ l를 첨가하여 3분간 방치하고, 2% 암모늄 설페이트를 25 μ l를 첨가하여 다시 3분 방치한다음, N-나프틸에틸렌디아민용액 (0.05%를 95% 에탄올에 녹인다) 50 μ l를 첨가하여 붉은 색 반응을 관찰 하였다. 붉은 색을 나타내지 않는 클론이 내열성의 AT를 생성하는 클론이므로, 이를 양성이라 하였다.

7) 분리정제 및 성질분석

재조합균주를 M9ZB배지 250ml에 접종하고, 37°C에서 600nm에서의 흡광도 0.8까지 배양한 뒤, IPTG를 0.4mM 첨가하여 40°C에서 3

시간 더 배양하였다. 배양액을 원심분리하여 세포를 수확하고, 수확한 세포를 리소짐이 0.1mg/ml로 첨가된 완충용액A (50mM 염화나트륨, 1mM 에틸렌디아민 4초산, 1mM 머캅토에탄올이 첨가된 50mM 트리 스, pH 8.0)에 현탁시키고, 0°C에서 초음파로 파쇄하였다. 파쇄액을 10 분간 원심분리 (10,000 x g)하여 불용성 과립형태의 AT가 함유된 침 전물을 얻었다. 이 침전물을 0.5% 트리톤 X-100이 첨가된 완충용액A 에 첨가하여 현탁시키고, 원심분리하여 침전물을 회수하는 과정을 2 회 반복하였다. 침전물을 8M 요소가 함유된 현탁용액 5ml에 녹여 30 분간 방치하고, 1mM 에틸렌디아민 4초산 및 1mM 머캅토에탄올이 첨가된 50mM 인산칼리용액 (pH 8.0)을 45ml 가하여 희석하였다. 30 분후 1mM 에틸렌디아민 4초산 및 1mM 머캅토에탄올이 첨가된 10mM 인산완충액 (pH 6.5)에서 투석하고, 투석액으로 평형화시킨 DEAE-세파셀 (Pharmacia LKB Biotechnology사) 컬럼에 투입하여 투석액에 염화나트륨 0-300 mM로 용출시켰다. 다시 고속 액체크로마 토그래피의 모노 Q 컬럼 (Pharmacia LKB Biotechnology사) 에서 투 석액에 소금 0-200 mM로 용출시켰다.

8) AT의 활성측정

α 1-AT의 활성측정은 Travis와 Johnson의 방법 (41)을 변형시켜 행하였다. 저장 완충용액 (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 50% glycerol, pH 8.0)에 들어있는 elastase (0.5 μ M stock) 10 μ l와 완충용 액 A (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8.0)에 들어있는 α 1-AT 용액과 10분동안 반응시키고, elastase의 기질인 succinyl-(L-alanyl)₃-p-nitroanilide (15 mM)을 20 μ l 가하고 동일한 완충용액을 넣어 최종 0.5 ml로 만들어 spectrophotometer를 사용하

여 410 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 elastase의 잔여활성을 결정하였다. 결합상수는 Beatty 등의 방법 (42)에 따라 동일 농도(8nM)의 일래스타제와 AT를 포함하는 반응 혼합액을 시간별로 (1분-10분) 분취하여 기질을 1mM 첨가하여 잔여 일래스타제 활성을 410nm 에서 측정한 후, 시간에 대한 일래스타제 농도의 역수를 그래프화하여 얻어진 직선의 기울기값으로 구하였다.

9) AT의 안정성 및 폴딩 분석

Fluorescence spectroscopy: 폴딩과정에서 urea에 의한 단백질의 3차구조의 변화를 감지하기 위하여 Tryptophan을 probe로 이용하여 fluorescence를 측정하였다. 사용된 spectrofluorometer는 Shimadzu RF-5000 model을 이용하였고, 280nm에서 excitation시킨 후 360 nm에서 emission을 측정 하였다. 일정농도 (0-8M)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 한후 fluorescence를 측정한다. Fluorescence에 의해 측정된 값은 two-state unfolding model에 따라 fitting하였다. 먼저 측정된 값으로부터 각 urea농도에서 unfold된 비율을 구하고 transition region을 0M urea까지 linear extrapolation하여 folded/unfolded state 사이의 자유에너지 차이를 계산한다. Linear extrapolation은 Sigmaplot ver. 5.0을 이용하여 식에따라 측정된 fluorescence를 urea농도에 computer fit하여 실시하였다.

CD spectroscopy: 단백질의 2차구조의 변화를 감지하기 위하여 일정농도 (0-8M)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 8 시간 방치하여 평형에 도달하게 한후 222 nm에서의 ellipticity변화를 측정하였다. JASCO J-700 Spectropolarimeter를 이용하였고 0.1 cm path length quartz cell을 사용하여 CD signal을 측정하였다.

Transverse Urea Gradient (TUG) Gel Electrophoresis: 폴딩과 정에서 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 pump을 사용하여 동시에 만들었다. Native한 단백질 혹은 8M urea에서 변성된 단백질(20 μ g)을 gel의 윗쪽에 loading한 다음, 25 °C에서 3시간 동안 10 mA의 일정한 전류를 걸어주었다. 전기영동이 끝난 단백질은 Coomassie blue로 염색하여 관찰하였다.

10) Kinetics of Folding and Unfolding

Unfolding kinetics를 측정하기 위해서 일정농도의 urea가 포함된 buffer에 정제된 단백질을 일정량 (10 μ g/ml)이 되도록 manual mixing하고 시간에 따른 fluorescence 변화로부터 unfolding kinetics를 측정하였다. Refolding kinetics를 측정하기 위해서 7M urea에서 단백질을 5분 동안 unfolding시킨다음 지정된 농도의 urea에서 refolding이 시작되도록 하였다. 각 시간에서 측정된 fluorescence 값으로 부터 식에 따라 각 농도의 relaxation time을 구하고 relaxation

time과 농도의 관계에서 extrapolation하여 0M urea에서의 relaxation time을 구하였다.

11) *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 μCi [^{35}S]-methionine, 0.5 μg mRNA, 그리고 17.5 μl 의 reticulocyte lysate가 함유되어 있다. 방사성 동위원소로 표지된 translation product를 TUG gel에 running하고 autoradiography를 통하여 관찰하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 인간 α 1-antitrypsin (α 1AT) 안정성 증진 변이 분석

1) 분포 및 치환된 아미노산

엔티트립신의 폴딩 및 안정성에 영향을 주는 요인을 규명하기 위해 내열성변이들을 체계적으로 스크린하였다. 엔티트립신의 안정성을 조절하는 부위라 생각되는 소수성 core부위를 선정하여 올리고 뉴클레오티드의 혼합합성법 (doped oligonucleotides)에 의해 무작위 돌연변이를 시도하였다. 선정된 변이 위치는 아미노산 서열상 48번 잔기에서 70번 잔기 까지와, 368번 잔기에서 391번 잔기까지이다. 변이 빈도를 최적화 시키기 위해 각 phosphoramidite 용액에 나머지 3종의 phosphoramidite가 각각 2.5% 씩 오염되게 혼합하였다. 이렇게 합성한 올리고뉴클레오티드를 부위특이 돌연변이법으로 엔티트립신에 무작위 변이를 유도하고 대장균에서 발현시킨다음, 96-well plate 스크리닝 방법으로 내열성 변이를 선별하였다. 선별된 내열성 변이들을 확인한 결과 각각 51번 위치의 Phe이 Cys, Leu, Val으로 59번 Thr이 Ser, Ala으로 68번 Thr이 Ala으로 70번 Ala이 Gly으로 374번 Met이 Ile, Val, Leu으로 381번 Ser이 Ala으로 387번 Lys이 Arg으로 치환된 경우 열안정성이 야생형에 비해 최소 3배에서 16배까지 증가했음을 알 수 있었다. 선별된 내열성 변이들은 3차 구조에서의 위치에 따라 첫째, sheet-A와 상호작용하는 sheet-B상의 Phe51과 Met374번에서의 치환, 둘째, sheet-B상의 또 다른 면에 위치하는 Ser381과 Lys387에서의 치환, 셋째, helix-B상의 Thr59에서의 치환, 넷째, helix-B의 carboxyl 말단에 인접한 loop부위인 Thr68, Ala70에서의 아미노산 치

환으로 나눌 수 있었다 (표 1). 이들의 일반적인 경향은 아미노산의 소수성 성격은 유지하면서 크기가 감소되는 것이었고, 변이가 일어난 부위의 아미노산을 ovalbumin에서의 아미노산과 비교했을때 동일하거나 측쇄구조가 비슷한 아미노산으로 치환되었음을 알 수 있었다.

표 1. 선별된 내열성 AT변이들의 분포 및 치환된 아미노산

Group	Position	Residues in α_1 AT	Residues in Ovalbumin	Residues in Stable α_1 AT Mutants
Group 1	s6B/ 51	Phe	Phe	Cys, Leu, Val
	s4B/ 374	Met	Ile	Val, Ile, Leu
Group 2	s5B/ 381	Ser	Ala	Ala
	s5B/ 387	Lys	Arg	Arg
Group 3	hB/ 59	Thr	Ser	Ser, Ala
Group 4*	hB/ 68	Thr	Ala	Ala
	hC/ 70	Ala	Asp	Gly

2) Stability of F51L (Phe51 \rightarrow Leu) probed by fluorescence intensity.

열안정성 변이 단백질(F51L)을 순수 분리하여 변이가 엔티트립신의 구조적 안정성에 미치는 영향을 urea에 의한 변성 실험으로 조사하였다. urea에 의한 변성실험 결과 F51L 변이가 야생형에 비해 transition midpoint (C_m)값이 1.9M에서 2.8M로 urea에 대한 안정성이 증가되었음을 알 수 있었다 (Fig. 1). 단백질 안정화 자유에너지차이 ($\Delta\Delta G$)가 약 2 Kcal/mol 정도이었다.

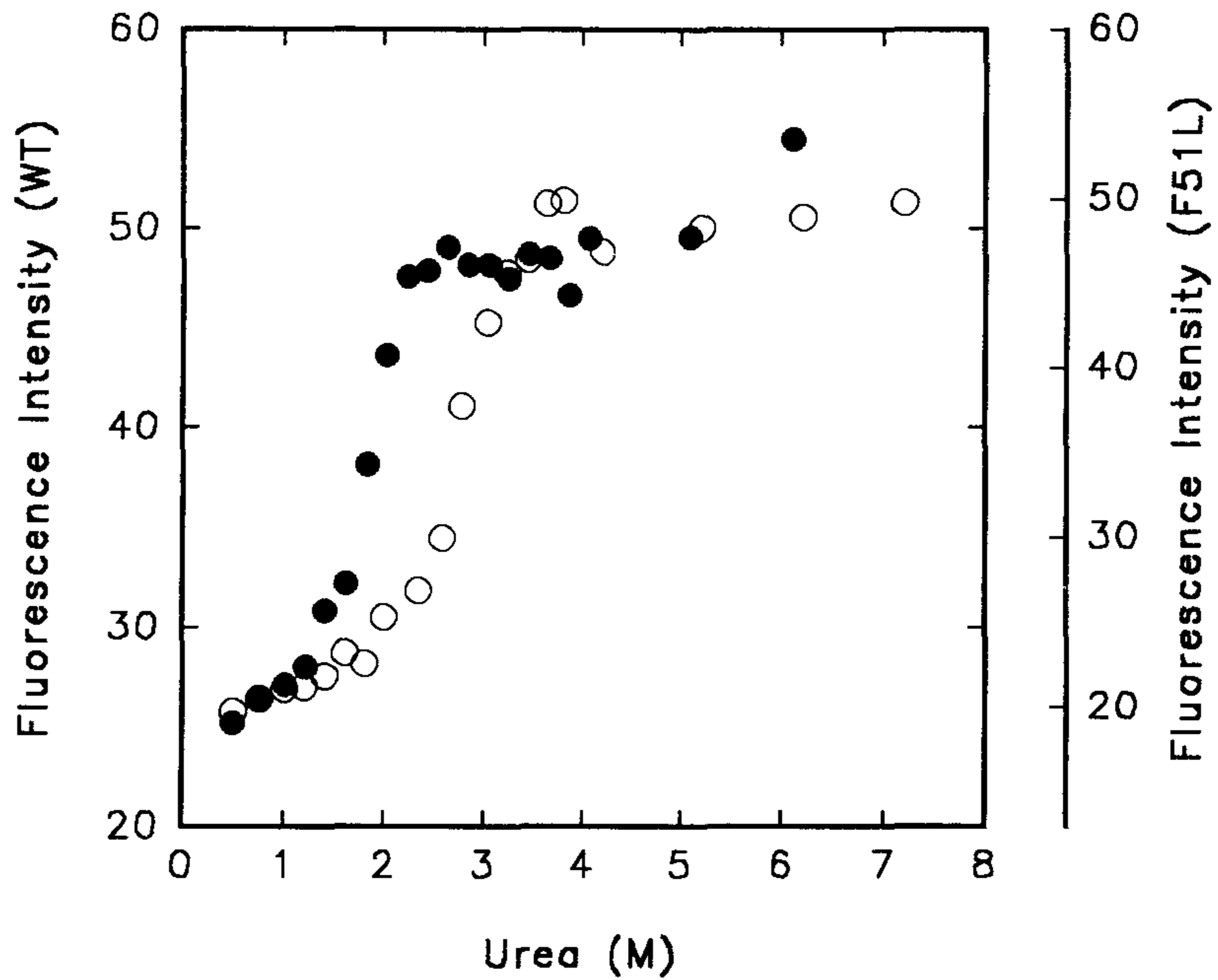


Fig. 1. 야생형(WT, ●)과 변이형(F51L, ○) 재조합 AT의 urea에 의한 변성실험. urea 농도에 따른 fluorescence intensity의 증가는 $\lambda_{ex}=280$ nm에서 excitation시키고, $\lambda_{em}=360$ nm에서의 emission fluorescence 량을 5 nm slit widths에서 측정하였다. 시료의 농도는 10 $\mu\text{g/ml}$ 이었고, transition midpoint는 야생형과 변이형(F51L)이 각각 1.9M, 2.8M urea이었다.

3) Stability of F51L mutant probed by CD spectroscopy.

단백질의 2차 구조에서의 변화를 감지하기 위하여 urea에 대한 야생형과 F51L 변이 단백질의 CD signal의 차이를 222nm에서 관찰하였다 (Fig. 2). F51L 변이가 야생형에 비해 urea에 대한 안정성이 역시 증가했음을 알 수 있고, 특이한 점은 엔티트립신의 urea에 대한 unfolding이 fluorescence signal에서는 볼 수 없었던 multiphasic하다는 것이다.

4) Stability of F51L in Transverse Urea Gradient Gel Electrophoresis.

Urea에 대한 엔티트립신의 unfolding and refolding transition을 0M부터 8M까지의 gradient gel에서 조사하였다. 낮은 urea농도에서는 단백질이 폴딩되어 있어서 빠르게 gel에서 진행하는 반면, 높은 농도에서는 단백질이 unfolding되어 보다 큰 hydrodynamic 한 volume을 갖게되어서 천천히 이동하게 된다. Fig. 3에서 보면 두개의 main transition이 존재함을 알 수 있고, F51L 변이는 unfolding과 refolding 모두에서 transition point가 높은 urea 농도로 이동하였음을 알 수 있다. transition midpoint 값이 야생형과 F51L 변이가 각각 2M과 3M임을 알 수 있고 이 결과는 Fig.1의 fluorescence를 probe로 이용한 결과와도 어느정도 일치함을 알 수 있다. 또한 F51L 변이는 unfolding이나 refolding의 초기단계에서만 영향을 주었고 높은 urea 농도에서의 transition에는 영향을 주지않음을 시사한다.

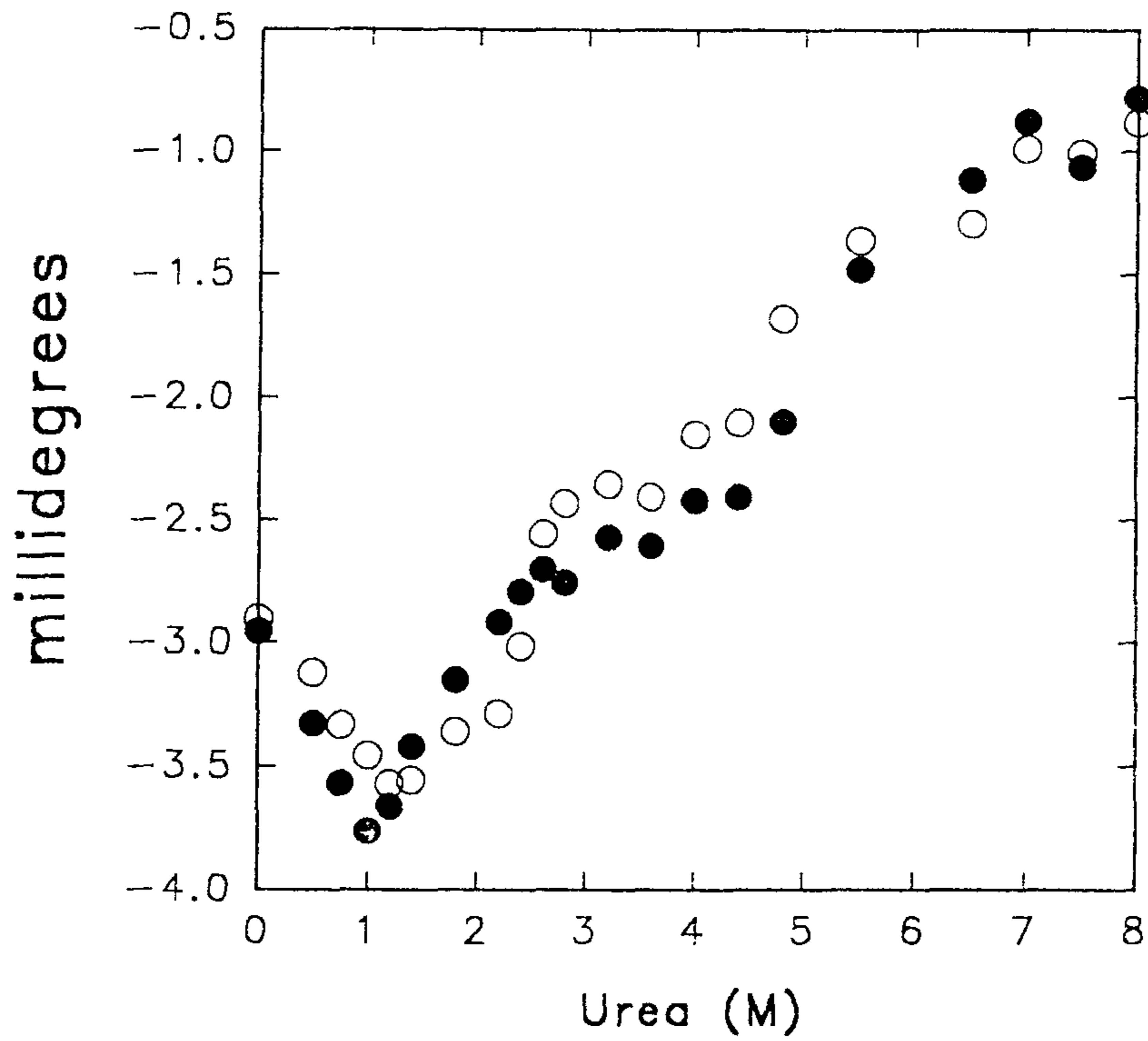


Fig. 2. CD signal의 변화로 측정한 야생형(WT, ●)과 변이형(F51L, ○) 재조합 AT의 urea에 대한 변성실험. 단백질의 2차 구조에서의 변화를 222 nm에서의 CD ellipticity의 변화로 측정하였고, 0.1-cm path length cell을 사용하였고 단백질의 농도는 50 $\mu\text{g/ml}$ 이었다.

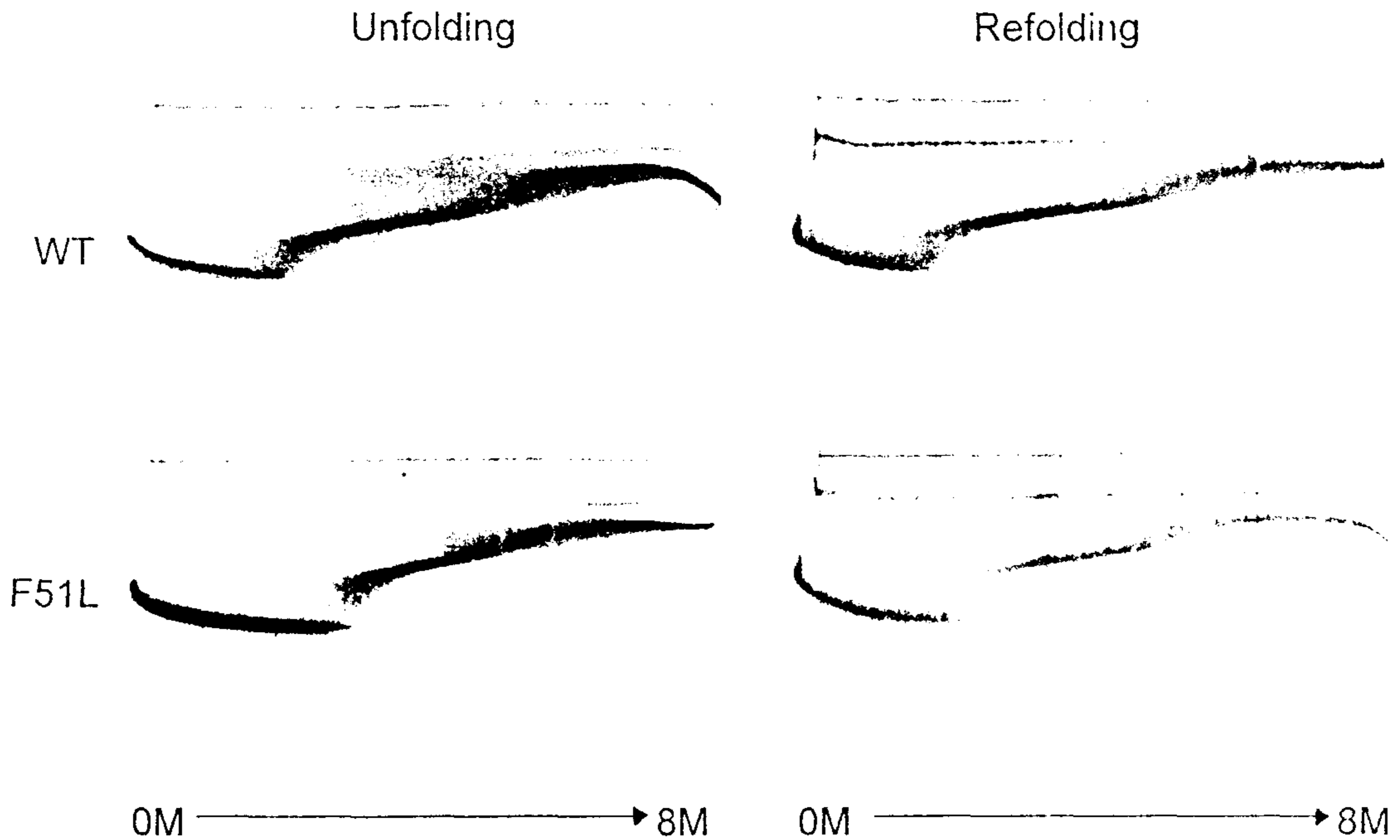


Fig. 3. 야생형(WT)과 변이형(F51L) AT의 transverse urea gradient gel electrophoresis. Gel을 전기영동되는 방향에 수직으로 0M부터 8M urea까지 농도구배가 되게 만들고, native(Unfolding) 혹은 8M에서 unfolding시킨(Refolding) AT를 gel의 윗쪽에 loading한 다음 23 °C에서 6 mA 전류로 3시간 동안 전기영동하였다. protein band는 Coomassie blue로 염색하여 관찰하였다.

5) Kinetic folding-unfolding studies.

Refolding kinetic study의 경우는 단백질을 완전히 denaturation 시킨 상황에서 urea의 농도가 희석되도록 한 후 fluorescence signal의 변화를 시간적으로 관찰하는 것이고, unfolding kinetic study는 native상태의 단백질을 일정농도의 urea용액에 넣어 unfolding과정을 시간적으로 관찰하는 것이다. Fig. 4는 F51L 변이가 refolding 속도에는 전혀 영향을 주지않고 unfolding 속도만 감소시켰음을 보여준다. 변이에의 영향은 native state의 에너지 준위를 낮춤으로써 특이적으로 단백질 안정화 자유에너지를 증가시켰다고 생각할 수 있다.

6) Binary Complex Formation with Reactive Center Loop Peptide.

F51L 변이 단백질의 urea에 의한 transition은 native한 folding 상태의 단백질이 unfolding되면서 open conformation으로 되는 상태를 의미하는데, 이는 major sheet인 A-sheet가 다른 엔티트립신 molecule의 reactive center loop을 받아들일 수 있는 상태임을 암시한다. 이를 증명하기 위하여 reactive center loop sequence와 거의 동일한 14-mer peptide를 합성하여 야생형과 변이형 사이에 complex를 형성하는데 있어서 차이가 있는지의 여부를 조사하였다. 변이단백질은 자연형보다 active site loop sequence peptide (14-mer)와 complex를 이루는 속도가 느린데 (Fig. 5), 이는 단백질의 3차구조에서 A β -sheet가 좀더 닫혀있는 안정한 상태임을 의미한다.

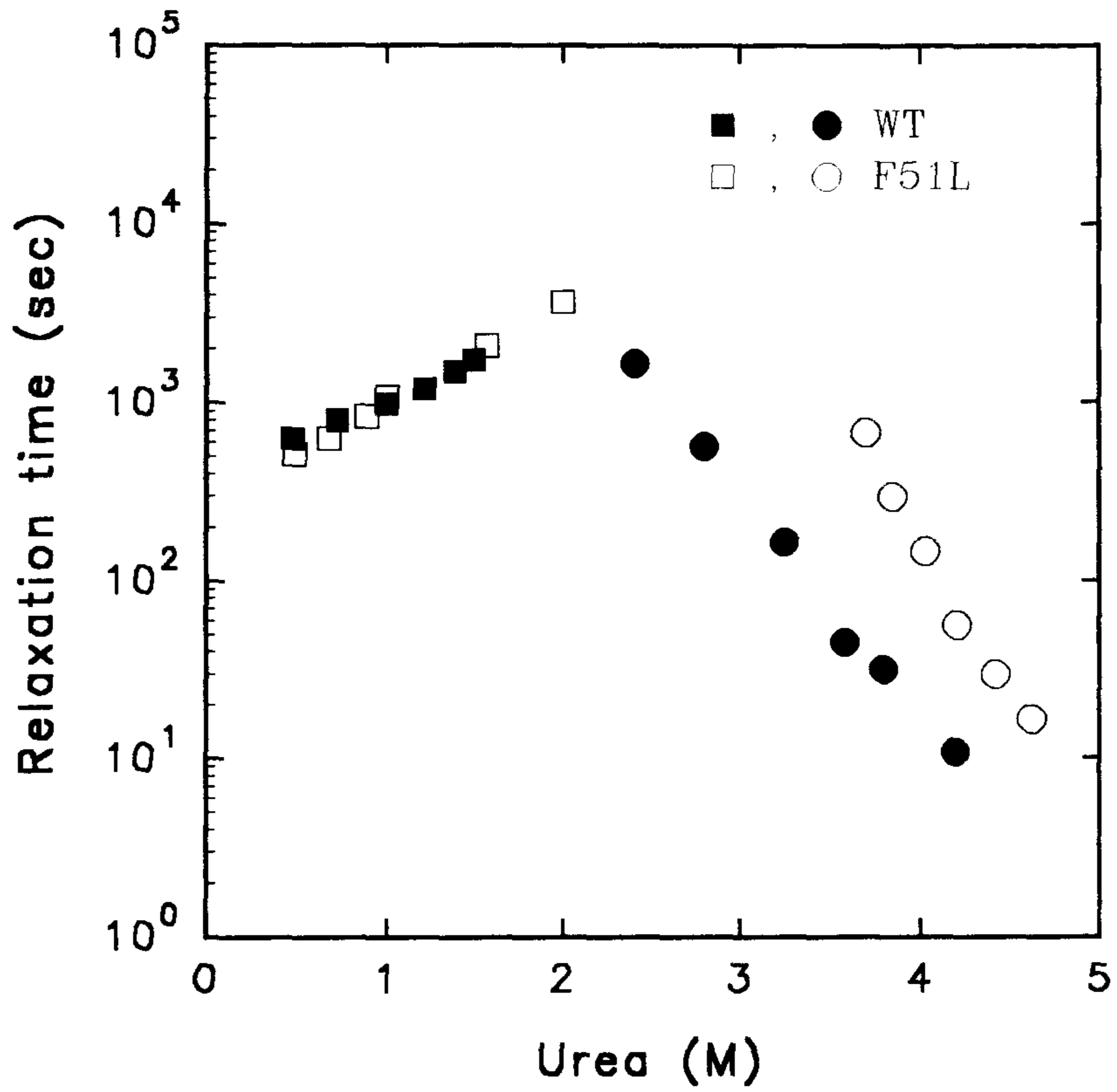


Fig. 4. Kinetics of unfolding and refolding of the wild-type (● and ■) and F51L (○ and □) recombinant AT proteins. native 혹은 unfolded 상태의 AT를 여러농도의 urea에 넣어 새로운 평형에 도달하는 데에 걸리는 시간을 fluorescence signal($\lambda_{ex}=280$ nm and $\lambda_{em}=360$ nm)로 조사하였다. 단백질의 최종농도는 10 μ g/ml이었다.

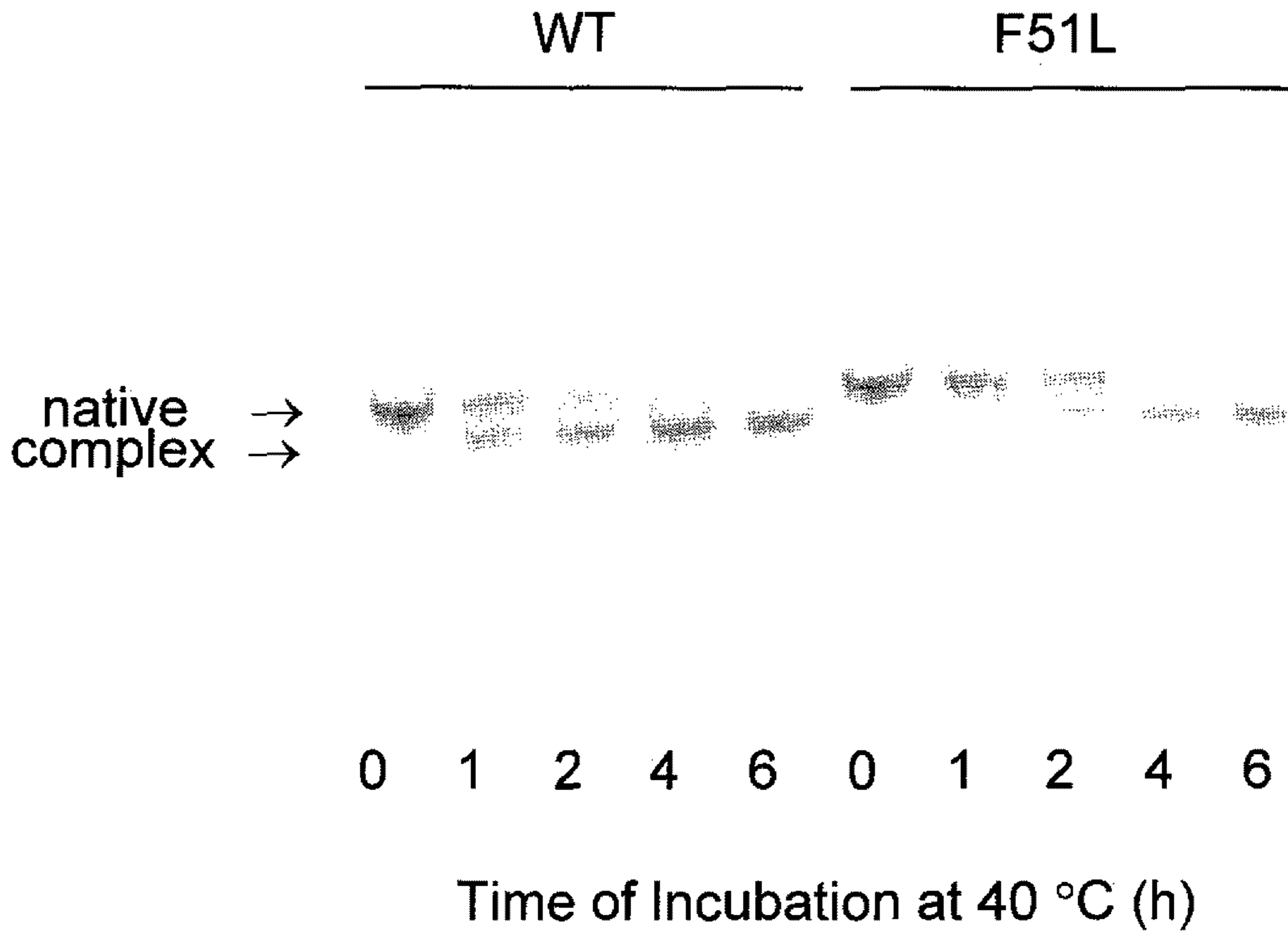


Fig. 5. Binary complex formation of wild-type (WT) and F51L AT with reactive center loop peptide. native AT와 14-mer peptide를 40 °C에서 10 mM phosphate (pH 6.5), 50 mM NaCl, and 1 mM EDTA buffer (protein concentration of 0.24 mg/ml; protein/peptide ratio of 1:230; total volume of 10 μ l)에 0-6시간 동안 방치한 다음, 13.5% native acrylamide gel로 분석하였다.

7) Summary of stability increase by various mutations

현재까지 모두 7종의 변이에 대한 분석을 행하였으며 각각의 변이에 의한 안정성 증진 정도는 표 2의 C_m 값과 $\Delta(\Delta G)$ 로 나타내어져 있다.

표 2. 각각의 변이들의 안정성 증진정도.

Groups	Mutations	$\Delta G(H_2O)^a$	m^b	C_m^c	ΔC_m^d	$\Delta(\Delta G)^e$
	WT	4.6	2.6	1.8		
Group 1	F51L	7.7	3.0	2.6	0.8	2.1
	M374I	7.2	2.6	2.7	0.9	2.3
Group 2	S381A	6.7	3.0	2.2	0.4	1.0
	K387R	2.7	1.2	2.2	0.4	1.0
Group 3	T59A	6.0	2.7	2.2	0.4	1.0
Group 4	T68A	4.6	2.2	2.2	0.4	1.0
	A70G	8.0	3.3	2.4	0.6	1.6

^a $\Delta G(H_2O)$, in kcal/mol.

^b Slope of ΔG versus concentration of denaturant, in kcal/mol/M.

^c Midpoint of the urea unfolding curve defined as $-\Delta G/m$, in M.

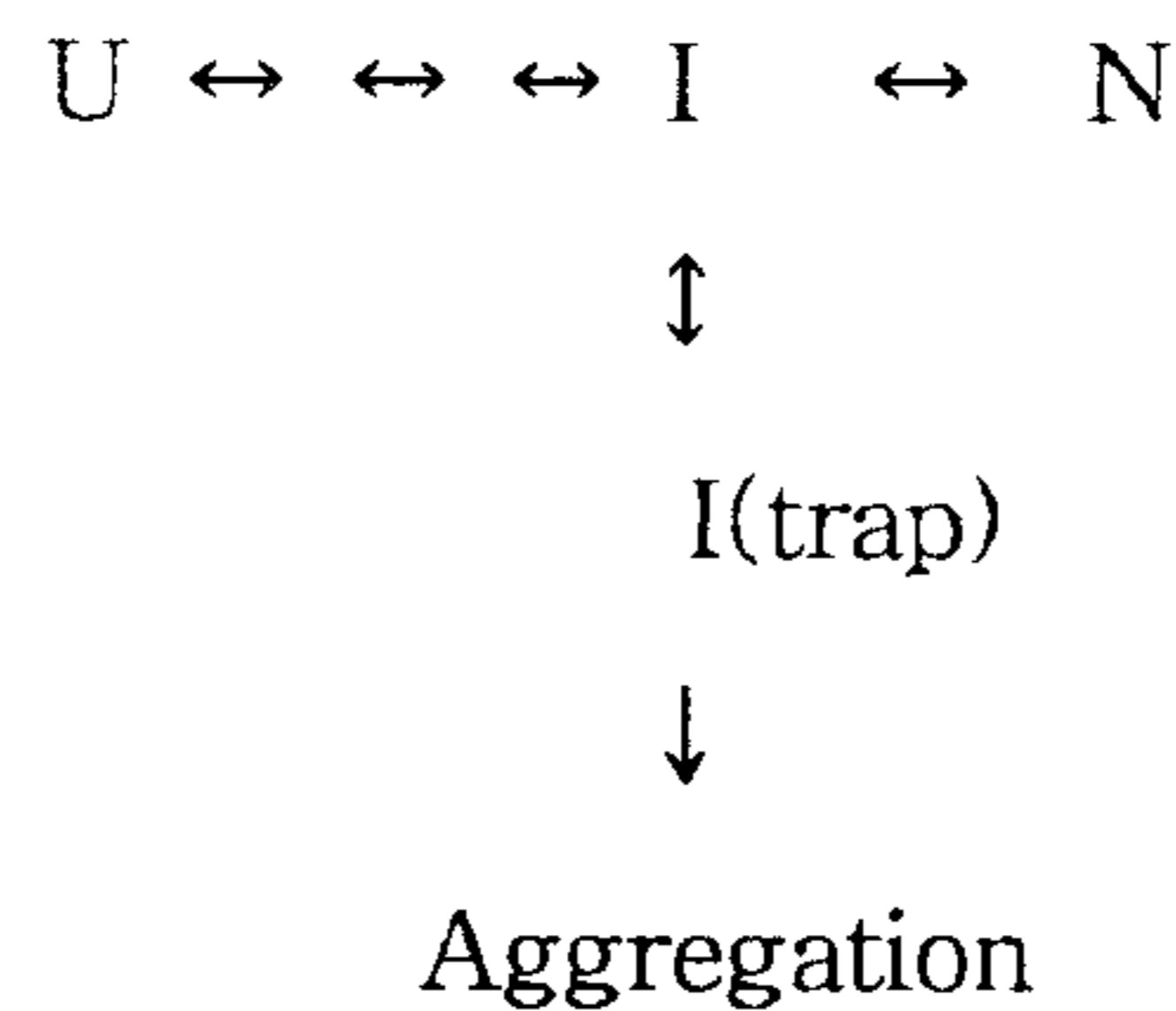
^d Difference between the C_m values.

^e From $C_m \times 2.6$ (the average of eight m values) in kcal/mol.

2. α 1AT 안정성 증진 변이에 의한 유전적 폴딩결함의 억제

유전적 내림의 변이인 Z 타입 (Glu342 \rightarrow Lys) α 1AT는 단백질 폴딩과정에 저해가 생겨 native state의 단백질을 생산할 수 없고 따라서 간세포에서 응집되고 혈장으로 분비되지 않음. 하지만 안정성이 증진된 변이들에 의해 Z타입의 폴딩저해가 억제되었다.

Fig. 6는 안정성 증진변이 F51L에 의해 Z타입의 폴딩저해가 일부 억제되어 native형태의 α 1AT이 생산됨을 보여주고 있다. 이는 α 1AT의 폴딩과정에서 아래의 scheme에서와 같이 kinetic partitioning이 일어나며 Z타입 변이는 폴딩의 마지막 단계를 저해하여 폴리펩티드가 응집되는 방향으로 유도하는 반면, 안정성이 증진된 변이는 평형을 native state이 더 많이 생기는 쪽으로 유도함으로써 polypeptide들이 kinetically trapped되는 것을 줄이는 효과가 있음을 보여주고 있다.



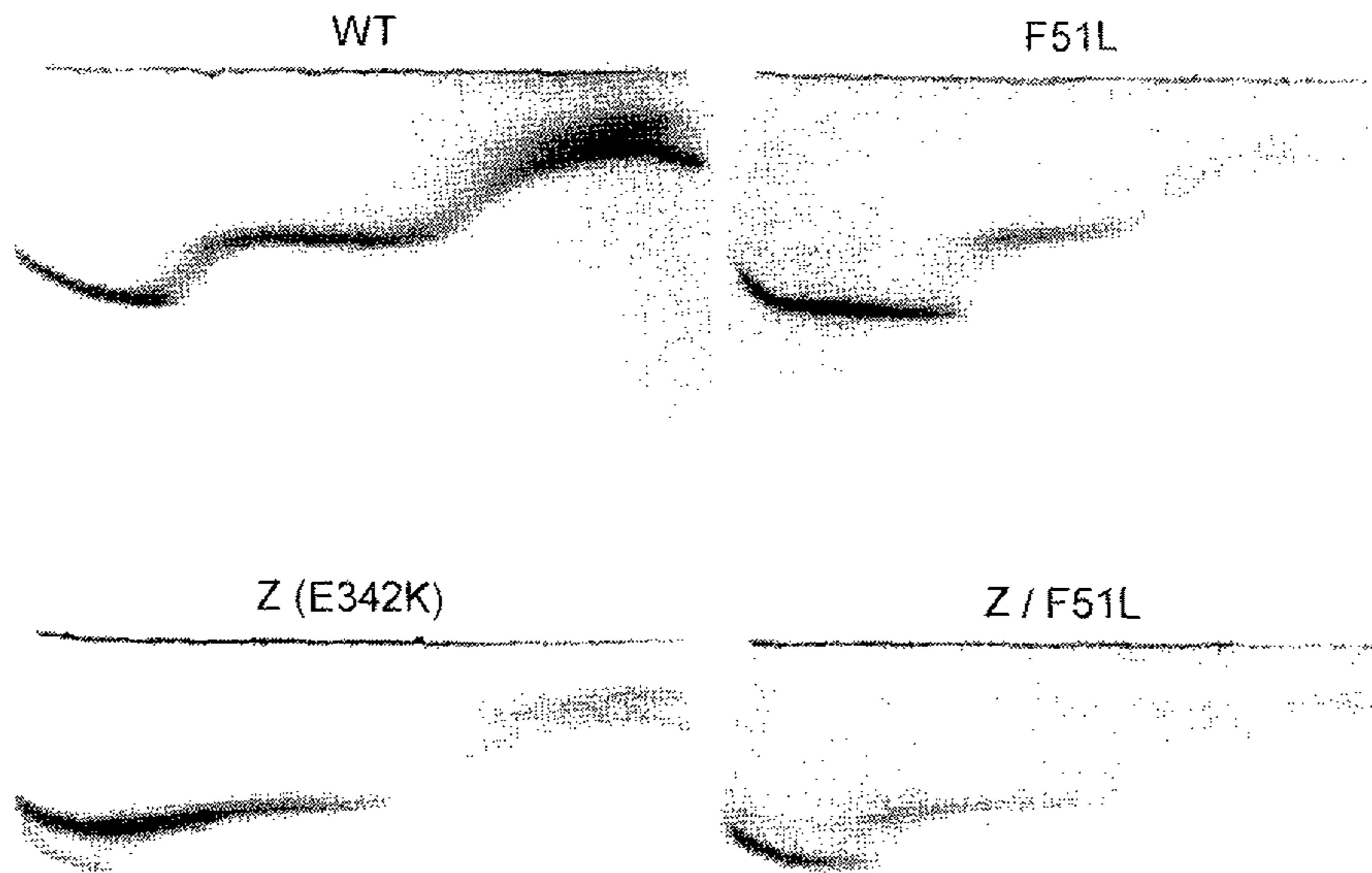


Fig. 6. Effect of the F51L mutation on the defect of Z variants.
*in vitro*에서 [³⁵S]methionine으로 1시간 동안 표지한 α1AT를 urea gradient gel을 통하여 분석하였다. [³⁵S]methionine으로 표지된 protein band는 autoradiography를 통하여 관찰하였다.

3. 다른 Serpin (Serine Protease Inhibitor) 시스템 탐색

1) 대장균에서의 인간 plasminogen activator inhibitor-I(PAI-I) 발현

인간 PAI-I 단백질의 대량 생산 및 분리 정제를 용이하게 하기 위해 대장균 발현 벡터인 pRSET(Invitrogen사 제품)에 인간 PAI-I의 cDNA 절편을 플라스미드 pPAI 1.3 (Dr. David J. Loskutoff, Scripps Research Institute)로 부터 얻어서 대장균 발현벡터인 pRSET(Invitrogen사 제품)에 연결하였다. 제조된 벡터 pRSET-PAI-I의 T7 프로모터로부터 6개의 histidine이 PAI-I 단백질의 N-단편에 태깅(tagging)된 융합 PAI-I 단백질이 발현되어 histidine의 nickel에 대한 친화력을 이용한 분리정제가 용이하게 되었다. Histidine-태깅된 PAI-I 융합 단백질은 nickel-agarose column을 통해 총 세포 파쇄물로부터 90% 정도의 순도로 효율적으로 정제되었고, urokinase형 plasminogen activator(u-PA)에 대한 저해활성도 유지하였다.

2) 효모에서의 인간 antithrombin III 발현 및 분비

Antithrombin III의 활성을 위해서는 탄수화물이 붙은 당화된 단백질 형태로 발현되어야 하므로, 고등 진핵 세포와 비슷한 합성후 변형 과정(post-translational modification)을 지닌 효모에서 인간 antithrombin III을 발현 분비하고자 하였다. 인간 antithrombin의 cDNA 절편을 pATIII (Dr. U. J. Yoo, KIST)로 부터 얻어서 *Kluveromyces maxianus*의 inulinase에서 유래된 단백질 분비 시그널

(signal sequence)에 연결한 다음 *Saccharomyces cerevisiae*의 GAL 프로모터로부터 발현되는 효모 발현 분비 벡터를 제조하였다.

제 4 절 결 론

본 연구에서는 인체 $\alpha 1$ -antitrypsin(AT)을 대상으로 폴딩 및 안정성에 영향을 주는 요인을 규명하기 위해 내열성변이들을 체계적으로 스크린하였다. 단백질의 폴딩 및 안정성 결정에 중요한 소수성 중심부위 (hydrophobic core)에 가능한 모든 내열성 변이를 망라하기 위하여, 혼합 올리고뉴클레오티드 (doped oligonucleotides)를 이용하여 소수성 중심부위에 집중적으로 무작위 돌연변이를 시도하였다. 내열성 변이들은 분리·정제된 재조합 AT의 안정성을 현저히 증가시켰으며 저해제로서의 활성에는 거의 영향을 미치지 않았다. 변이가 refolding 속도에는 전혀 영향을 주지않고 unfolding 속도만 감소시켰으므로 변이에의 영향은 native state를 특이적으로 stabilized (lower energy)한 것임을 보여주고 있다. 변이단백질은 자연형보다 active site loop sequence peptide (14-mer)와 complex를 이루는 속도가 느린데, 이는 단백질의 3차구조에서 A β -sheet가 좀더 닫혀있는 상태를 암시한다. AT 단백질의 내열성 변이들의 아미노산치환 패턴을 살펴보면, 변이 AT 분자에서는 소수성코어의 특정부위 측쇄의 크기가 작아짐으로써 3차구조의 packing을 양호하게 하였을 가능성이 높다. 한편 이들 내열성 변이들은 유전적 폴딩결함을 억제하였다. 유전적 내림의 변이인 Z 타입 (Glu342 \rightarrow Lys) $\alpha 1$ AT는 단백질 폴딩과정에서 저해가 생겨 native state의 단백질을 생산할 수 없고 따라서 간세포에서 응집되고 혈장으로 분비되지 않는데, 안정성이 증진된 변이들에 의해 Z타입의 폴딩저해가 억제되었다. 이는 $\alpha 1$ AT의 폴딩과정에서 kinetic partitioning이 일어나며 Z타입 변이는 폴딩의 마지막 단계를 저해하여 폴리펩티드가 응집되는 방향으로 유도하는 반면, 안정성 증

진변이는 평형을 native state이 더 많이 생기는 쪽으로 유도함으로써 polypeptide들이 kinetically trapped되는 것을 줄이는 효과가 있음을 보여주고 있다. 현재까지 얻어진 안정성 증진변이들의 정확한 기작을 이해하고 이를 토대로 다른 변이들을 설계하기 위해서는 변이단백질들의 구조를 밝히는 것이 무엇보다도 시급하다.

참고문헌

1. Fagerhol, M.K., and Cox, D. W. (1981) *Adv. Hum. Genet.* **11**, 1-62
2. Laurell, C. B., and Jeppsson, J.O. (1975) in *Protease Inhibitors in plasma* (Putnam, F. W., ed) Vol. I, Academic Press, New York, 229-264
3. Olsen, G. N., Harris, J. O., Castle, J. R., Waldeman, R.H., and Karmgard, H.J (1975) *J. Clin. Invest.* **55**, 427-435
4. Gadek, J.E. and Crystal, R.G. (1982) in *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Stanbury, J.B., et al., eds), McGraw-Hill, 1450-1467
5. Crystal, R.G. (1989) *Trends in Genetics* **5**(12), 411-417
6. Carrell, R.W., Jeppsson, J-O, Laurell, C-B, Brennan, S.O., Owen, M. C., Vaughan, L. and Boswell, D.R. (1982) *Nature*, **298**, 329-334
7. Lobermann et al. (1984) *J. Mol. Biol.* **177**, 531-556
8. Carrell, R.W., and Owen, M.C. (1985) *Nature* **317**, 730-732
9. Huber, R., and Carrell, R.W. (1989) *Biochemistry* **28**(23), 8951-8966
10. Smith, K.F., Harrison, R.A., and Perkins, S.J. (1990) *Biochem. J.* **267**, 203-212

11. Haaris,P.I., Chapman,D., Harrison,R.A., Smith,K.F., and Perkins, S.J.(1990) *Biochemistry* **29**, 1377-1380
12. Engh,R.A., Wright,H.T.,and Huber,R. (1990) *Protein Eng.* **3**, 469-477
- 13 Schulze, A.J., Baumann,U., Knof,S., Jaeger,E., Huber,R., and Laurell, C-B. (1990) *Eur. J. Biochem.* **194**, 51-56
14. Carrell,R.W., Pemberton,P.A., and Boswell,D.R. (1987a) *Cold Spring Harbor Symp. Biol.* **52**, 5277-535
15. Carrell,R.W., Christey,P.B., and Boswell,D. R. (1987b) in *Thrombosis and Haemostasis* (Verstraete,M., Vermylen,J., Lijnen,H.R., and Arnout,J., Eds.) pp1-15, Leuven University Press,Leuven,Belgium.
16. Gettins,P., and Horton,B. (1988) *Biochemistry* **27**, 3624-2639.
17. Bruch,M., and Weiss,V., and Engel,J. (1988) *J.Biol. Chem.* **32**, 18.
18. Gettins,P. (1989) *J.Biol. Chem.***264**, 3781
19. Stein,P.E., Tewkesbury,D.A., and Carrell,R.W. (1989) *Biochem. J.* **262**, 103-107
20. McPhalen,C.A., and James,M.N.G. (1987) *Biochemistry* **26**, 261-269
21. Stein,P.E., Leslie A.G.W., Finch,J.H., Turnell.W.G., McLagughlin, P.J., and Carell,R.W. (1990) *Nature* **347**, 99-102

22. Wei, A. et al. (1994) *Nature Struct. Biol.* 1, 251-257
23. Schreuder, H. A. et al (1994) *Natur Struct. Biol.* 1 48-55
24. Carrell, R. W. et al. (in press) *Structure*
25. Courtney,M., et al (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 669-673
26. Tessier,L-H, Jallat,S., Sauvageot,M., Crystal,R.G., and Courtney, M. (1986) *FEBS Lett.* 208, 183-188
27. Johansen,H., et al. (1987) *Mol. Biol. Med.* 4, 291-305
28. Sutiphong,J., Johansen,H., Sathe,G., Rosenberg,M., and Shatzman, A., (1987) *Mol. Biol. Med.* 4, 307-322
29. Travis,J., Owen,M., George,P., Carrell,R.W., Rosenberg,S., Hallewell, R. and Barr,P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 4384-4389
30. Rosenberg,S., Barr,P. J., Najarian,C. R. and Hallewell,A. (1984) *Nature* 312, 77
31. Cabezon,T., De Wilde,M., Herion,P., Lorian,R., and Bollen,A. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6594-6598
32. Kwon, K.-S., Kim, J., Shin, H. S., and Yu, M.-H. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 9627-9631

33. Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986) *J. Mol. Biol.* **189**, 113-130
34. Lee, K.N. et al. (1993) *Mol. Cells* **3**, 71-74
35. Maniatis, T., Fritsch, E.F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York.
36. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467
37. Laemmli, U.K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
38. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354
39. Kunkel, T.A. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492
40. Hutchison et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 710-714
41. Travis, J., and Johnson, D. (1981) *Methods in Enzymology*, **80**, 754-765
42. Beatty, K., Bieth, J., and Travis, J. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 3931-3934
43. Lomas, D. A. et al. (1992) *Nature* **357**, 605-607
44. Lomas, D. A. et al. (1993) *Biochemistry* **32**, 500-508

결과보고서

위탁과제명 : 내열성변이 α_1 -antitrypsin의 Plasma Kinetics

기간 : 1994. 6. 1. - 1995. 3. 31.

제출일 : 1995. 3. 31.

제출자 : 서울대학교 의과대학 생화학과 서정선

여 백

1. 서 론

α_1 -antitrypsin은 혈장단백질로서, 주요기능은 neutrophil elastase와 결합하여 활성을 억제하는 것이다. Neutrophil에서 분비되는 elastase와 같은 protease 등이 적절히 조절되지 못하면 폐의 결합조직 단백질이 비정상적으로 분해되고, 결과적으로 폐의 질병을 야기하게 된다. 따라서 protease와 inhibitor는 생체내에서 균형을 유지해야 하는데, 유전적결합이나 흡연, 공해 등에 의해 α_1 -antitrypsin의 양이 감소하거나, 활성을 잃게되면, elastase에 대한 균형이 파괴되어 기종(emphysema)에 걸리게 된다. 치료제로 사용하는 α_1 -antitrypsin은 혈액제제의 고질적인 문제점인 순수한 정제의 결함때문에 재조합 DNA 기술을 사용하여 미생물에서 생산하는 연구가 활발하다. 이러한 연구를 통해서 내열성 변이를 갖는 단백질을 생산할 수 있게 되는데, 내열성변이 단백질을 생체내에 투입했을때 혈장내에서 어느정도의 기간동안 활성을 유지하며 남아있는가에 대한 연구는 치료제를 목표로하는 단백질에 대해서 필수적인 과정이다. 또한 이러한 연구는 단백질의 내열성과 생체내의 안정성과의 관계로 규명해 줄 수 있을 것이다.

최근까지 E.coli에서 생산한 재조합단백질 α_1 -antitrypsin의 경우 glycosylation이 되지 않으므로 인해 그 열 안정성이 유지될 수 없었으며, 혈장내에서의 안정성이 human의 혈장내의 것보다 감소하였다. Yeast에서 생산한 glycosylation 된 재조합 human α_1 -antitrypsin도 열안정성이 감소하였으며, 혈장내의 수명도 감소한 것으로 보고되었다. 본 연구에서 사용하는 단백질은 E.coli에서 생산한 내열성 변이를 갖는 α_1 -antitrypsin으로써, 열안정성 실험결과가 자연형보다 안정성이 상당히 증가하였기 때문에 혈장내에서의 안정성 증진이 기대되는 바이다.

2. 실험 방법

2-1. 단백질 정제

재조합 human α_1 -antitrypsin 자연형과 human plasma에서 정제한 α_1 -antitrypsin을 control로 하여 내열성변이 (Phe51 → Leu)를 갖는 재조합 α_1 -antitrypsin 의 혈장내 잔존 수명을 조사한다. E.coli 균주로 부터 재조합 human α_1 -antitrypsin 자연형과 내열성변이를 갖는 단백질을 각각 대량 정제하여 각 1mg씩 확보하고, human plasma α_1 -antitrypsin를 정제하여 1 mg 준비한다. 세가지 단백질을 비교실험하는 것이 주된 관심이므로 같은 정도의 활성

을 갖는 형태로 분리정제하는 것이 필요하다. 또한 단백질 labeling 이후 specific activity를 비슷하게 유지해야 하며, 동물에 투입후 혈액채취의 시간 간격 및 양의 비교에 주의가 필요하다.

2-2. 단백질 labeling

세가지 단백질을 I^{125} 와 chloramine-T를 사용하는 방법으로 labeling한다. Labeling한 단백질을 Sephadex G-25 chromatography 등으로 분리하고, specific activity가 500-2000 cpm/ng 정도로 맞춘다.

- Fresh solution preparation

1. chloramine-T : 1 mg/ml in 0.05 M Na-phosphate, pH 7.5
2. sodium metabisulfite : 2.5 mg/ml in 0.05 M Na-phosphate, pH 7.5
3. NaI : 1 mg/ml in 0.1% BSA + 0.05 M Na-phosphate, pH 7.5

- Procedure

1. 0.5 mCi I^{125} + 50 ul 0.25 M Na-phosphate buffer
2. Protein solution mix
3. 20 ul chloramine-T solution mix (50 sec)
4. 20 ul Na-metabisulphite solution mix
5. 500 ul NaI solution mix (total volume, 650 ul)
6. gel-filtration on Sephadex G25 (12 cm x 0.6 cm) pre-equilibrated with 50 mM Na-phosphate including 0.1% BSA

각각 얻어진 label이 된 단백질을 농축하여 250 ul로 volume을 조정하여 radioactivity를 측정한 후 4 °C에서 보관하였다.

wild type : 6.98×10^5 cpm/ ul

human form : 3.88×10^5 cpm/ ul

F51L : 6.40×10^5 cpm/ ul

2-3. Plasma kinetics 측정

250 ul의 단백질 용액을 250 ul EBSS (Eagle's buffered saline solution)로 희석한 후, 쥐 한 마리당 100 ul (약 10^6 내지 10^6 cpm 정도의 단백질)을 각각 사용하여 3마리씩의 mice에 주사하고, 주사후 10초안에 혈액을 25 ul 채취하여 control로 한다. 적당한 시간 간격으로 sample을 25 ul씩 채취하여 radio activity를 조사 비교한다.

3. 결 과

*E. coli*에서 생산된 내열성이 증가된 재조합 변이 α_1 -antitrypsin의 혈장내 안정성을 자연형의 재조합 단백질 및 human 혈장에서 얻어진 단백질과 비교하였다. 각각 시료를 생쥐의 혈관에 투여한 후 시간이 지남에 따른 혈액내에서의 잔여량을 측정된 결과, Table 1에서 3까지 정리된 결과를 얻었다. 이들 데이터를 plot해 보면 Figure1과 같은데, 생체내에서 각각의 시료는 single exponential rate에 의해 decay됨을 알 수 있었다. *E. coli*에서 생산한 α_1 -antitrypsin의 혈장내 안정성은 human 혈장에서 얻어진 단백질보다 떨어지며, 자연형의 재조합 단백질과 거의 차이가 없었다. 본 연구에서 사용하는 내열성 변이 α_1 -antitrypsin은 *E. coli*에서 생산한 최초의 것으로써 혈장내 수명이 열안정성 실험결과와 상관관계가 있다면 혈장내의 안정성 증진이 예상되었으나, 자연형의 것과 크게 다를 바 없었다. 이와 같은 결과는 F51L변이에 의하여 증진된 안정성의 정도는 α_1 -antitrypsin의 혈장내에서의 안정도 증진에는 크게 기여하지 못함을 보여주는데, 이는 native구조의 안정성을 유지하는 요인이 체내에서의 clearance의 기작에 직접적인 영향을 미치지 않음을 암시하고 있다. 한편, 내열성 증진 변이 단백질도 glycosylation 결여로 인해 체내 안정성이 감소되었을 수도 있는데, 이는 glycosylation이 혈장내에서의 수명에 크게 영향을 줄 수 있음을 시사하며 glycosylation이 결여된 재조합 단백질의 일반적인 성질에 해당할 수 있다. 이와 같은 결과가 일반적임을 증명하기 위해서는 보다 많은 숫자의 변이단백질을 대상으로 혈장내에서의 수명을 체계적으로 조사해볼 필요가 있다.

Table 1 (human)

Time (min)	% initial
0	100
2	95
4	81
5	-
10	-
20	81
30	80
90	52
165	41

Table 2 (wild type)

Time (min)	% initial
0	100
2	94
4	89
5	70
10	52
20	52
30	50
55	30
105	10

Table 3 (F51L)

Time (min)	% initial
0	100
2	86
4	83
5	76
10	74
20	55
30	35
60	20
120	4

Table 1 (human)

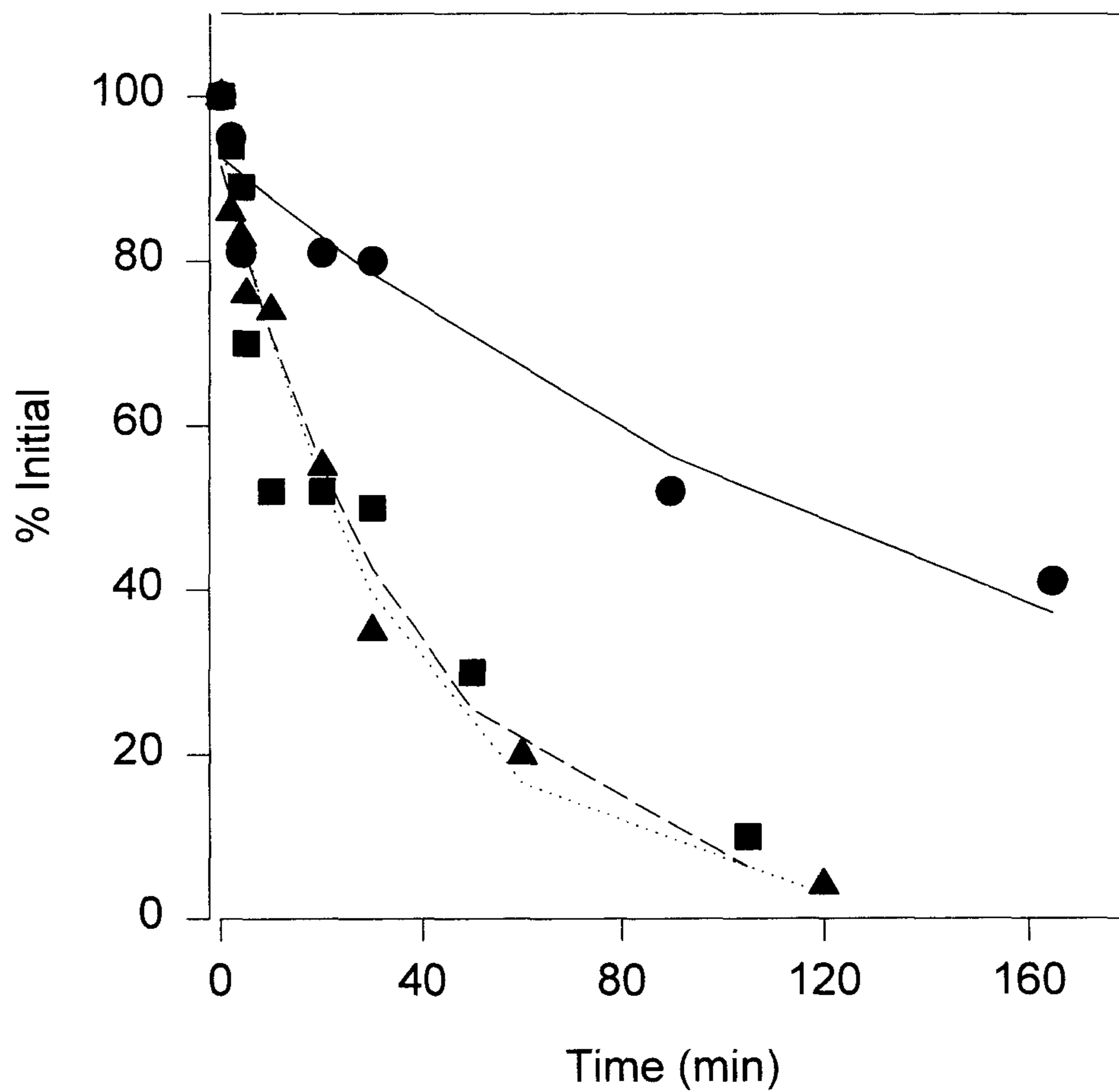
Time (min)	% initial
0	100
2	95
4	81
5	-
10	-
20	81
30	80
90	52
165	41

Table 2 (wild type)

Time (min)	% initial
0	100
2	94
4	89
5	70
10	52
20	52
30	50
55	30
105	10

Table 3 (F51L)

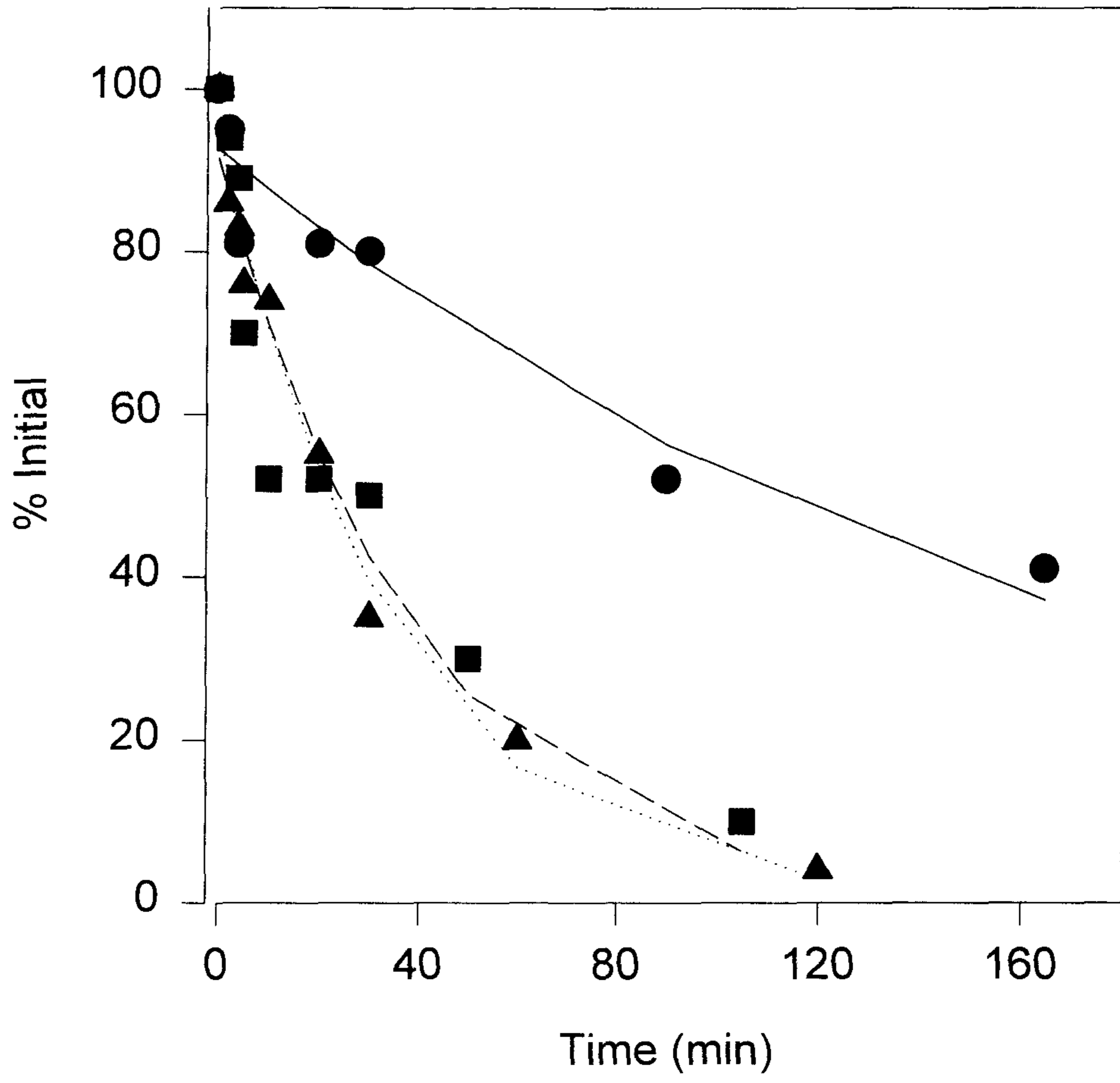
Time (min)	% initial
0	100
2	86
4	83
5	76
10	74
20	55
30	35
60	20
120	4



▲ Human

■ WT

● F51L



여 백

결과보고서

위탁과제명 : α_1 -antitrypsin의 내열성 변이와 구조 변화 연구

기간 : 1994. 6. 1 - 1995. 3. 31

제출일 : 1995. 3. 31

제출자 : 서울대학교 화학과 서 세 원

여 백

실험 방법

순수하게 정제된 변이 $\alpha 1$ -antitrypsin (T59A, T68A, A70G) 을 10 mg/ml의 농도로 25 mm ultrafiltration membrane을 이용하여 농축하였다. 이 intact $\alpha 1$ -antitrypsin의 삼차원 구조를 풀기 위해서 아직까지 발표되고 있지 않은 결정화에 성공하도록 중점을 두어 추진하였다. 초기 결정화 조건은 sparse matrix sampling과 screen II 실험 조건을 조사하여 확립하고, 이 결과를 토대로 조건을 더욱 세분화하여 가능한 high-resolution에서 회절하는 결정 형태를 얻도록 실험하였다. sparse matrix sampling에서는 두 조건, screen II 방법에서는 한 조건의 결정이 생성될 가능성을 발견할 수 있었다. 이 방법과 병행하여 기존의 Serpin (SERine Protease INhibitor)류들의 결정화 조건 주변도 실험하여 보았다. 매달린 방울 증기 확산 방법을 이용하였는데, Well용액의 polyethylene glycol, ammonium sulfate, MDP, propanol 등의 침전제, sodium chloride, lithium sulfate, magnesium sulfate, calcium chloride 등의 염류, Hepes, Mes, Citrate, Tris, Acetate 등의 완충 용액, dioxane, toluene sulfonic acid, KSCN 등의 첨가제들의 조성을 바꾸고, 단백질 용액 또한 완충 용액, 첨가제, 염류등을 바꾸며 실험하였다. 이 well 용액과 단백질 용액을 반반으로 섞어서 drop을 만들었고, 이 곳에 β -octylglucoside, tween 등의 non-ionic detergent를 첨가한 후에 수 주일 간 결정을 관찰해 가면서 적정 조건을 찾았다. 이 조건을 더욱 정밀화하여 조금 더 큰 결정을 기를 수 있었다. 보관 온도도 22 - 23 $^{\circ}$ C 뿐 만 아니라, 4, 17, 30 $^{\circ}$ C 에서도 보관을 하였고, 현미경을 이용하여 결정의 성장 정도를 관찰하였다. 이 결정을 0.7 mm의 capillary에 넣고, 양 끝에 mother liquor 를 넣은 후에 양초를 이용하여 끝을 잘 막았다. 이렇게 만든 후에 X-선 데이터를 수집하였다. 서울대학교 기기원의 FAST area detector를 사용하고, MADNES 프로그램을 써서 자료를 처리하였다. X-선 세기자료를 측정 후 분자치환법으로 구조를 풀었다. cleaved human $\alpha 1$ -antitrypsin과 우리가 밝히고자 하는 intact human $\alpha 1$ -antitrypsin간에는 활성 loop에 많은 구조 변화가 있을 뿐만 아니라, 그 주위에도 구조 변화가 있을 것이기 때문에 이미 알려진 cleaved human $\alpha 1$ -antitrypsin 뿐만 아니라, cleaved human $\alpha 1$ -antichymotrypsin, intact ovalbumin의 구조를 모두 이용하였다. 처음 단계로 rotation function을 풀고, 다음으로 translation function의 해를 구하였다. 다음 rigid-body refinement를 수행하고, 각원자의 위치를 정밀화한다. 사용하는 프로그램은 AMORE 와 X-PLOR이었다. 결정 격자내의 분자 위치 찾기, 분자 모델 정밀화 작업등의 모든 컴퓨터 작업은 Silicon Graphics Indigo2 workstation을 이용하였다. 현재 까지 정밀화된 분자 구조를 그리기 위해서 CHAIN, SETOR, O, Molscript등의 프로그램을 이용하였다.

실험 결과

α 1-antitrypsin의 결정화를 시도하여 sparse matrix sampling에서는 두 조건, screen 11 방법에서는 한 조건의 결정이 생성될 가능성을 발견할 수 있었다. 이 방법과 병행하여 기존의 Serpin (SERine Protease INhibitor)류들의 결정화 조건 주변도 실험하여 보았다. 이러한 결정화 실험의 결과 처음으로 다음과 같은 결정화 조건을 찾아냈다. 매달린 방울 증기 확산 방법을 이용하였는데, Well용액은 28 % PEG 4K, 100 mM Tris-HCl (pH 8.5), 200 mM Li_2SO_4 이고, 단백질 용액은 10 mg/ml의 농도의 50 mM Tris-HCl (pH 7.9) 상태였다. 일주일 이내에 0.5 mm X 0.05 mm X 0.05 mm 크기로 자랐다. 이 조건을 더욱 정밀화하여 조금 더 큰 결정을 기를 수 있었는데, 그 조건은 위 조건과 다른 것은 모두 같고, Well 용액의 침전제와 염류의 농도가 각각 28.5 % PEG 4K, 200 mM Li_2SO_4 이었다. 보관 온도는 22 - 23 °C 이고, 첫 번째 조건 보다는 조금 큰 0.8 mm X 0.1 mm X 0.08 mm의 결정을 길렀다 [그림 1]. 이 결정을 이용하여 X-선 데이터를 수집하였다. X-선 세기자료를 측정된 결과는 다음과 같다. 공간군은 monoclinic C2 이고, 각각의 단위 세포 상수는 $a=114.87 \text{ \AA}$, $b=39.96 \text{ \AA}$, $c=92.42 \text{ \AA}$, $\alpha=\gamma=90.0^\circ$, $\beta=102.82^\circ$ 이었다. 이 경우 asymmetric unit은 한 분자의 α 1-antitrypsin이 들어 있다. 이 때 결정내 수분 함량은 47.4 % [$V_M = 2.34 \text{ \AA}^3/\text{Da}$] 으로 단백질 결정에서 흔히 볼 수 있는 값이다. 이 결정은 대략 3.5 Å 까지 데이터를 모을 수 있었는데 각 resolution별로 데이터의 completeness는 표 I과 같다.

이러한 X-선 데이터를 가지고 위상문제를 해결하기 위하여 cleaved human α 1-antitrypsin 뿐만 아니라, cleaved human α 1-antichymotrypsin, intact ovalbumin의 구조를 모두 이용하여 분자 치환법을 프로그램 AMORE 와 X-PLOR로 시행하였다. 처음 단계로 rotation function을 풀고, 다음으로 translation function의 해를 구하였다. 각각의 모델을 이용한 분자 치환 해는 표 II와 같다. 표 III은 모델 정밀화 단계를 나타낸 것이다. 최종 모델의 현재 정밀도는 R-값과 이상적인 분자 정밀도에서 크게 벗어나지 않았다. 이 결과를 관찰해 보면, uncleaved human α 1-antitrypsin의 가장 관심의 대상이 되는 활성 loop의 구조가 현재 까지 알려진 intact human α 1-antichymotrypsin과 비슷한 것을 알 수 있다. intact human α 1-antitrypsin의 전체 구조를 간단한 리본 형태로 나타낸 것은 그림 2와 같다. 현재의 결과는 3.5 Å 정도 까지 회절하는 결정의 X-선 데이터로 얻은 것이고, 앞으로 더욱 좋은 결정을 기르는 한편, 위 조건의 결정을 방사광에서 나오는 강력한 X-선을 이용하여 데이터를 모은 후에, 훨씬 좋은 resolution으로 구조를 결정할 예정이다.

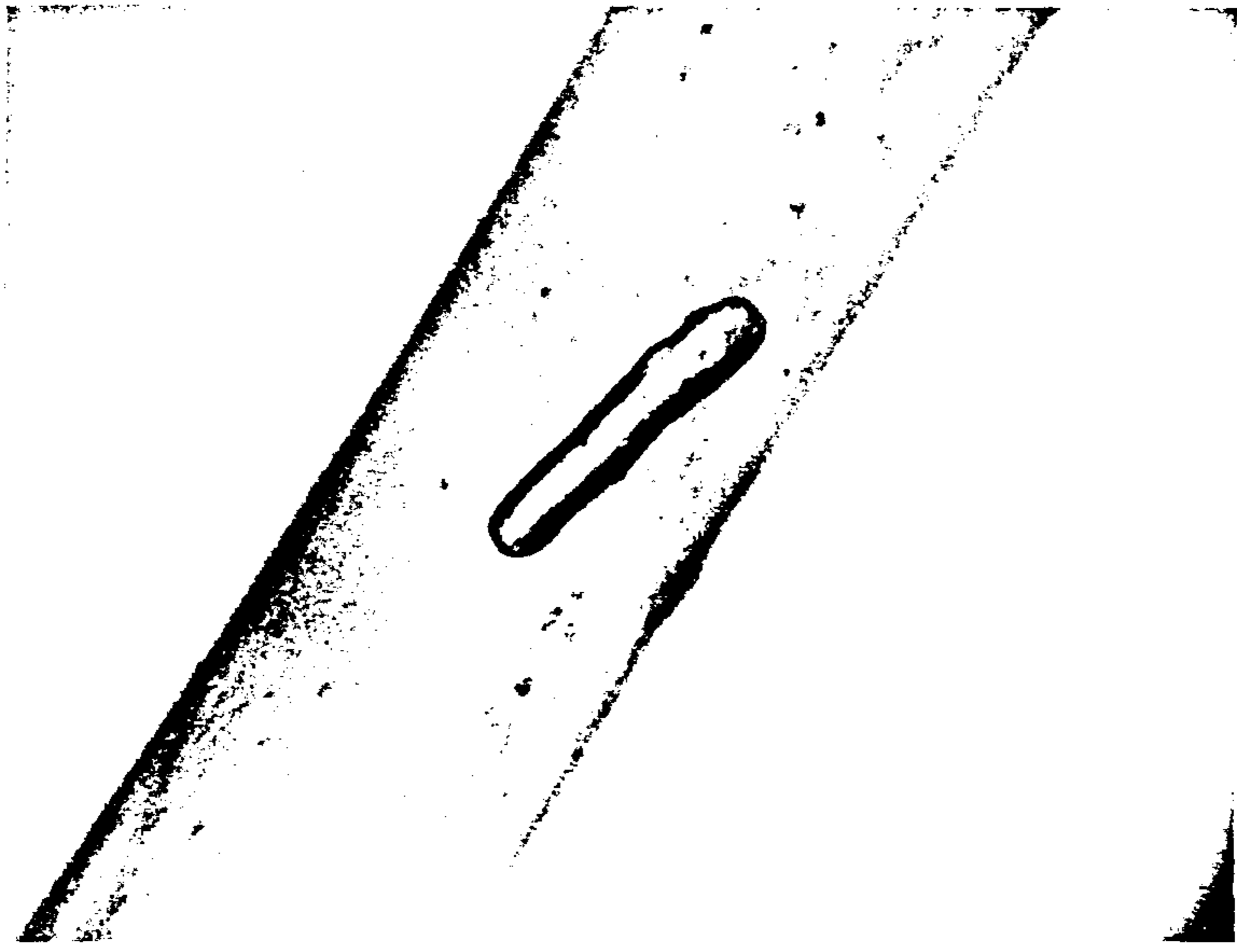


그림 1. capillary에 올려진 $\alpha 1$ -antitrypsin 결정 사진

표 1. 데이터 completeness

Resolution range (Å)	Completeness of each shell (%)	Accumulated completeness (%)
6.73 - 15.00	96.47	96.47
5.43 - 6.73	91.90	94.20
4.77 - 5.43	88.10	92.20
4.34 - 4.77	80.56	89.36
4.04 - 4.34	89.45	89.38
3.80 - 4.04	76.47	87.25
3.62 - 3.80	72.34	85.21
3.46 - 3.62	64.81	82.61

표 II. 각 모델을 이용한 분자 치환 해

[X-plor 해]

Model : Cleaved α 1-antitrypsin (pdb9pai.ent)

Rotation : ($\theta_1 = 354.450$, $\theta_2 = 70.227$, $\theta_3 = 156.860$)

Translation : ($X = 0.143$, $Y = 0.000$, $Z = 0.357$)

R-factor : 47.8 % (8.0 - 4.0 Å) Correlation coefficient : 0.2626

[AMORE 해]

Model : Cleaved α 1-antitrypsin (pdb9pai.ent)

Rotation : ($\alpha = 295.56$, $\beta = 64.70$, $\gamma = 55.66$) C.C. : 23.0 %

Translation : ($X = 0.3229$, $Y = 0.000$, $Z = 0.2500$) C.C. : 37.9 %

Fit : ($\alpha = 296.09$, $\beta = 63.03$, $\gamma = 54.84$, $X = 0.3225$, $Z = 0.2502$)

R-factor : 42.3 % (10.0 - 5.0 Å) Correlation coefficient : 42.3 %

Model : Cleaved α 1-antichymotrypsin (pdb2ach.ent)

Rotation : ($\alpha = 279.58$, $\beta = 77.40$, $\gamma = 237.32$) C.C. : 28.7 %

Translation : ($X = 0.3229$, $Y = 0.000$, $Z = 0.2500$) C.C. : 27.0 %

Fit : ($\alpha = 282.82$, $\beta = 80.76$, $\gamma = 237.28$, $X = 0.3195$, $Z = 0.2431$)

R-factor : 42.2 % (10.0 - 5.0 Å) Correlation coefficient : 42.2 %

Model : Uncleaved ovalbumin (pdbloua.ent)

Rotation : ($\alpha = 296.98$, $\beta = 67.44$, $\gamma = 51.98$) C.C. : 19.4 %

Translation : ($X = 0.3148$, $Y = 0.000$, $Z = 0.2386$) C.C. : 33.4 %

Fit : ($\alpha = 296.45$, $\beta = 67.50$, $\gamma = 53.26$, $X = 0.3216$, $Z = 0.2436$)

R-factor : 48.5 % (15.0 - 4.5 Å) Correlation coefficient : 41.9 %

표 III. 모델 정밀화의 단계 및 현재 결과

* 초기 모델: 중앙의 β -sheet 제거한 cleaved α 1-antitrypsin

Rigid body refinement (8.0 - 5.0 / 4.0 / 3.5 Å)

Rigid group 1 : R-factor 49.3 %

Rigid group 23 : R-factor 44.0 %

Rigid group 36 : R-factor 41.9 %

Positional refinement (8.0 - 3.5 Å)

1st refinement : R-factor 29.0 %

2nd refinement : R-factor 25.8 %

* 모델링: 전자 밀도에 맞추어 활성 loop의 모델링

1st refinement : R-factor 23.1 %

2nd refinement : R-factor 22.7 %

Prepstage refinement (8.0 - 3.5 Å)

R-factor 24.3 %

Slowcooling refinement (8.0 - 3.5 Å)

R-factor 19.9 %

* 현재 모델

R-factor : 19.9 % (8.0 - 3.5 Å, 2 σ cut off)

R. M. S. deviations from ideal geometry

Bond length : 0.019 Å

Bond angle : 2.829 °

Dihedral angle : 27.986 °

Improper angle : 2.327 °

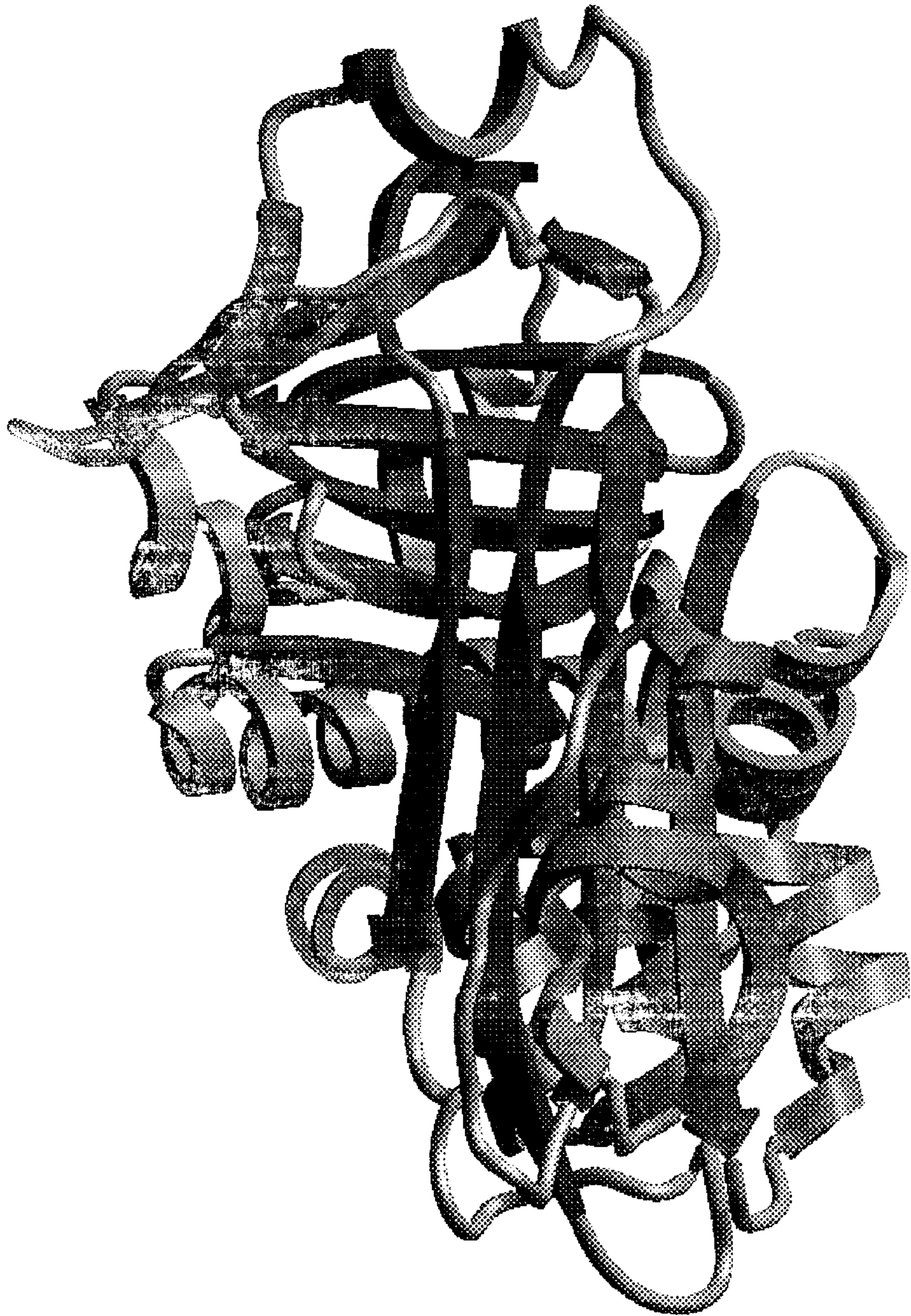


그림 2. intact human α 1-antitrypsin의 리본 그림