

금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 단백질의 분배 향상

정봉현* · 박영훈

한국과학기술연구원 유전공학연구소 생물화학공정연구실

Enhanced Partitioning of Proteins in Metal-Affinity Aqueous Two-Phase Systems

Chung, Bong Hyun* and Young Hoon Park

Biochemical Process Lab., Genetic Engineering Research Institute, KIST,
P.O. Box 17, Daeduk Science Town, Taejeon 305-606, Korea

Abstract — In metal-affinity aqueous two-phase systems, protein partitioning is affected by a variety of parameters such as pH, the number of surface-accessible histidines, and the amount and partition coefficient of metallated polyethylene glycol(PEG) ligand. To enhance partitioning of proteins with surface-accessible histidines, we have synthesized and used a (Cu(II)-iminodiacetic acid)₂-PEG20,000 (Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000) as well as Cu(II)IDA-PEG5,000 as an affinity ligand. The partition coefficient of Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 in a PEG5,000/dextran two-phase system was 30.1, which corresponded to a 3.8-fold increase over that of Cu(II)IDA-PEG5,000. The partitioning experiments were performed on four proteins, horse cytochrome c, *S. cerevisiae* cytochrome c, horse myoglobin, and sheep myoglobin. Partitioning of proteins which convey surface-accessible histidines was enhanced dramatically by the addition of Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 ligand. These results demonstrate that enhanced partitioning of metal-binding proteins in an aqueous two-phase system can be achieved by using an appropriate metallated PEG ligand.

최근 polyethylene glycol(PEG)/dextran 혹은 PEG/salt solution의 액 이상분계 시스템에서 금속 이온과 단백질과의 친화성을 이용하여 단백질을 분리하는 방법이 개발되었다(1). 금속 이온과 강한 친화력이 있는 iminodiacetic acid(IDA)와 polyethylene glycol monomethyl ether(MPEG)를 화학적으로 결합하여 새로운 수용성 chelating agent인 IDA-PEG를 합성한 후 Cu(II) 이온을 부착시켜 단백질 분리를 위한 친화성 리간드로 이용하였으며, PEG/dextran, PEG/salt 액 이상분계 시스템에서 소량의 Cu(II)IDA-PEG complex를 첨가함으로써 표면에 histidine을 함유하고 있는 cytochrome c, myoglobin, hemoglobin 등을 선택적으로 PEG상으로 분배시킬 수 있었다(2-4). 또한, 유전자 조작에 의해 bovine somatotrophin과 효모 cytochrome c의 α -helix상에 metal-binding site인

His-X₃-His를 인위적으로 도입한 후 금속 친화성 액 이상 분계 시스템에서 분배계수를 상당히 높일 수 있었다(5, 6). Chung과 Frances(7)는 Cu(II) 이온 이외에 ferric 이온과 phosphate group과의 친화성을 이용하여 표면에 phosphoserine을 갖고 있는 ovalbumin, phosvitin 등의 phosphoprotein 분리를 Fe(III) IDA-PEG가 첨가된 PEG/dextran 이상분계 시스템에서 성공적으로 수행한 바 있다.

금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 단백질 분리 효과를 높이기 위해서는 우선 분리하고자 하는 단백질의 분배계수를 증가시켜야 한다. 따라서, 본 연구에서는 PEG/dextran 이상분계 시스템에서 기존의 Cu(II)IDA-PEG5,000보다 분배계수가 높은 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000을 친화성 리간드로 이용함으로써 표면에 histidine을 갖고 있는 단백질들의 분배를 향상시킬 수 있는 방법을 개발하였다. Horse cytochrome c, *S. cerevisiae* cytochrome c, horse myoglobin, sheep myoglobin을 모델 시스템으로 하여 Cu(II)IDA-PEG5,

Key words: Metal-affinity two-phase system, partitioning, metallated PEG ligand

*Corresponding author

000 및 $\text{Cu(II)}_2\text{IDA}_2\text{-PEG20,000}$ 에 대해 분배 실험을 수행 하여 분배계수를 비교하였으며, pH, Cu(II) 이온농도가 단백질 분배에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용된 단백질들은 모두 Sigma(미국)에서 구입하였으며, Polyethylene glycol 5,000 mono-methyl ether는 Aldrich(미국)에서 Polyethylene glycol 20,000은 Shinyo(일본)에서 각각 구입하였다. $\text{Cu(II)IDA-PEG5,000}$ 및 $\text{Cu(II)}_2\text{IDA}_2\text{-PEG20,000}$ 은 Buckmann 등(8) 및 Van Dam 등(9)의 방법에 따라 제조하였다.

액 이상분계 시스템에서 단백질 분배 실험

40%(w/w) MPEG5,000 stock solution 0.7 g, 14%(w/w) dextran stock solution 1.3 g, 1 mg/ml 농도의 단백질 stock solution 2 g을 혼합하여 충분히 교반한 후 15분 동안 원심분리하여 PEG/dextran 액 이상분계 시스템을 완성하였다. 단백질 stock solution은 0.4 M NaCl/0.1 M sodium phosphate 완충 용액을 이용 1 mg/ml 농도로 제조하였으며 pH는 5, 6.5 및 8로 하여 단백질 분배 실험을 수행하였다. 금속 친화성을 이용한 단백질 분배 실험은 MPEG5,000의 일부를 $\text{Cu(II)IDA-PEG5,000}$ 혹은 $\text{Cu(II)}_2\text{IDA}_2\text{-PEG20,000}$ 으로 대체한 액 이상분계 시스템에서 수행하였다. 액 이상분계 시스템의 최종 조성은 MPEG 7%, dextran 4.6%, 단백질 농도 0.5 mg/ml, 0.05 M sodium phosphate, 0.2 M NaCl이다.

분석 방법

본 연구에서 사용된 cytochrome c, myoglobin의 농도는 액 이상분계 시스템의 top phase 및 bottom phase로부터 0.2 ml씩 취한 sample을 2.8 ml 증류수로 희석한 다음 409 nm에서, 그리고 Cu(II) 이온농도는 발색 반응후 435 nm에서 absorbance를 측정하여 각각 분석하였다(10). 분배계수 $K=(\text{top phase에서의 단백질 농도}/\text{bottom phase에서의 단백질 농도})$ 로 정의된다.

결과 및 고찰

$\text{Cu(II)IDA-PEG5,000}$ 및 $\text{Cu(II)}_2\text{IDA}_2\text{-PEG20,000}$

의 분배계수

친화성 액 이상분계 시스템에서 분리하고자 하는 단백질의 분배는 친화성 리간드의 농도 및 분배계수에 의해 영향을 받는다(11). 즉, 친화성 리간드 농도 및 분배계수의 증가에 따라 단백질 분배계수도 증가하므로, 단백질 분배를 향상시키기 위해서는 많은 양의 친화성 리간드를 첨가하거나, dextran 혹은 salt 용액상(bottom phase)보다는 PEG상(top phase)으로 리간드의 분배를 높여주어야 한다. 기존의 금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 주로 사용되어 온 리간드인 $\text{Cu(II)IDA-PEG5,000}$ 의 분배계수(top phase에서 Cu(II) 이온농도/bottom phase에서 Cu(II) 이온농도)는 본 연구에서 사용된 PEG/dextran 조성에서 8.0인 반면, $\text{Cu(II)}_2\text{IDA}_2\text{-PEG20,000}$ 의 분배계수는 30.1로써 Cu(II)IDA-PEG 에 비해 3.8배 높았다. 이것은 PEG molecular weight가 증가할수록 소수성이 상대적으로 높아지며, 따라서 친수성이 높은 dextran상보다는 PEG상으로 더 많은 양이 분배되는 것에 기인하는 것으로 판단된다. $\text{Cu(II)}_2\text{IDA}_2\text{-PEG20,000}$ 은 Van Dam 등(9)에 의해 금속 친화성을 이용한 단백질 침전에 사용된 바 있다. 즉, 표면에 histidine을 많이 포함하고 있는 myoglobin, hemoglobin 용액에 $\text{Cu(II)}_2\text{IDA}_2\text{-PEG20,000}$ 을 첨가함으로써 단백질 침전을 유도하여 단백질을 분리하는 새로운 방법을 개발하였다. 본 연구에서는 PEG/dextran 이상분계 시스템에서는 $\text{Cu(II)}_2\text{IDA}_2\text{-PEG20,000}$ 을 첨가하여도 단백질 침전이 발생되지 않았으므로 친화성 단백질 분배를 위한 리간드으로써 사용될 수 있었다.

금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 단백질 분배

금속 친화성 액 이상분계 시스템을 이용한 단백질 분리의 원리는 단백질 표면에 존재하는 histidine imidazole ring의 deprotonated nitrogen과 Cu(II) 이온과의 친화성을 이용하여 metallated PEG 리간드를 포함하는 PEG/dextran, PEG/salt 이상분계 시스템에서 표면에 histidine을 지니고 있는 단백질들을 PEG상으로 선별적으로 분배시키는 것이다. Histidine imidazole ring의 Cu(II) 결합 부위는 수소 이온도 경쟁적으로 결합할 수 있으므로 pH도 단백질 분배에 영향을 주는 주요 변수가 된다. 이러한 특성을 고려하여 Suh와 Frances(3)는 기존의 친화성 액 이상분계 시스템의 모델식을 수정하여 금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 단백질 분배계수를 예측할 수 있는 다음과 같은 모델 식을 유도한 바 있다.

Table 1. Number of surface-accessible histidines contained in proteins used in this study

protein	number of accessible histidines
horse cytochrome c	1
<i>S. cerevisiae</i> cytochrome c	2
horse myoglobin	4
sheep myoglobin	5

$$\ln\left(\frac{K}{K_0}\right) = n \ln\left[\frac{1 + K_a' \frac{(R+1)}{\left(R + \frac{1}{K_M}\right)} C_M + K_H C_H}{1 + K_a'' \frac{(R+1)}{(K_M R + 1)} C_M + K_H C_H}\right]$$

여기서, K=metallated PEG 리간드 첨가시 단백질 분배계수, K₀=리간드를 첨가하지 않았을 때 단백질 분배계수, K_M=Cu(II) 이온의 분배계수, K_a'=top phase에서의 stability constant, K_a''=bottom phase에서의 stability constant, K_H=수소이온의 association constant, R=top phase 부피/bottom phase 부피, C_M=첨가된 metallated PEG 리간드의 농도, C_H=수소이온 농도, n=단백질 표면의 histidine수를 각각 나타낸다.

위의 모델 식에서 알 수 있듯이 단백질 분배계수는 단백질 표면 histidine수가 많을수록, 그리고 pH, 리간드 농도 및 리간드의 분배계수가 높을수록 증가하게 된다. Histidine수는 단백질에 따라 변하게 되며, pH와 리간드 농도는 인위적으로 조절할 수 있으나 리간드 분배계수는 리간드 특성에 기인하므로 단백질 분배를 향상시키기 위해서는 분배계수가 높은 리간드의 개발이 요구된다고 할 수 있다. 따라서, 금속 친화성 리간드로써 Cu(II)IDA-PEG5,000에 비해 분배계수가 월등히 높은 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000의 사용은 큰 장점을 갖는다.

본 연구에서 사용된 단백질들의 표면에 존재하는 histidine수는 Table 1과 같다. 이 data는 3 Å probe에 접근할 수 있는 표면적 계산을 통한 X-ray crystal 구조로부터 결정된 것이다(1). Fig. 1, 2, 3은 pH 5.0, 6.5, 8.0, Cu(II) 이온농도 0~8×10⁻⁴ M에서 sheep myoglobin, horse myoglobin 및 *S. cerevisiae* cytochrome c의 ln(K/K₀)값들을 Cu(II)IDA-PEG5,000 리간드를 사용했을 때와 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 리간드를

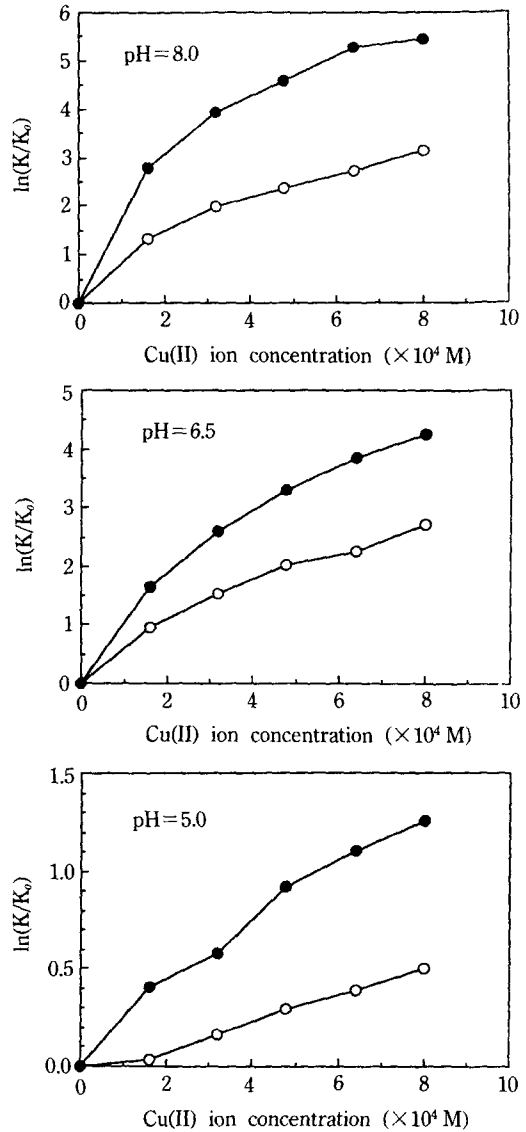


Fig. 1. Metal-affinity partitioning of sheep myoglobin with Cu(II)IDA-PEG5,000 (○) or Cu(II)₂IDA₂-PEG 20,000 (●) ligand at various pH's and Cu(II) ion concentrations.

사용하였을 때의 결과를 비교한 것이다. Suh와 Frances(3)의 결과와 마찬가지로 Cu(II) 이온농도, pH가 높아짐에 따라, 그리고 표면에 histidine이 많은 단백질의 경우에 높은 ln(K/K₀)의 값을 보여주었다. 또한 동일한 Cu(II) 이온농도에서 Cu(II)IDA-PEG5,000 리간드와 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 리간드가 단백질 분배에 미치는 영향을 보려면 예상했던 바와 마찬가지로

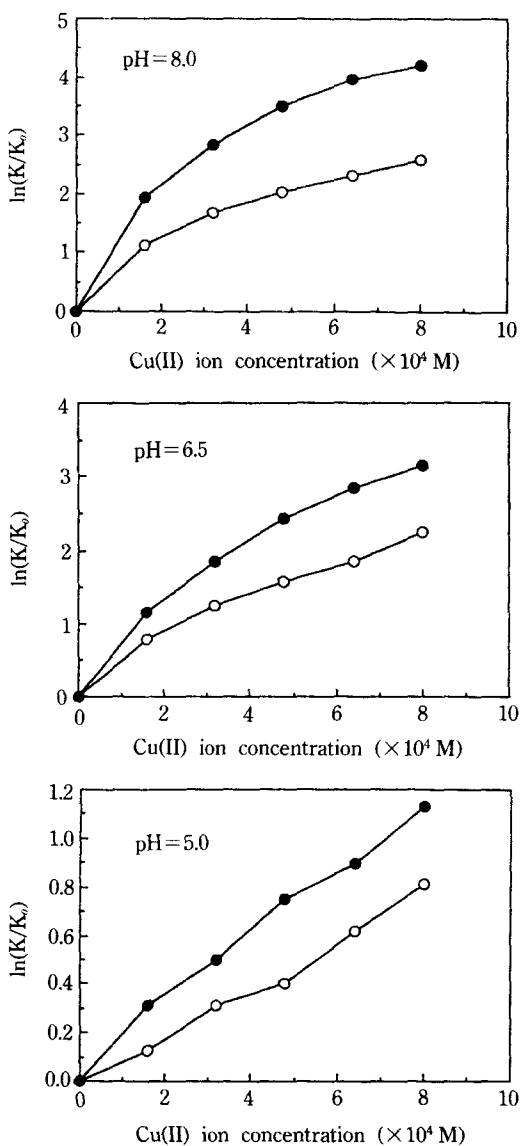


Fig. 2. Metal-affinity partitioning of horse myoglobin with Cu(II)IDA-PEG5,000 (○) or Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 (●) ligand at various pH's and Cu(II) ion concentrations.

분배계수가 높은 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000을 사용하였을 때가 Cu(II)IDA-PEG의 경우에 비해 pH 8.0, 8×10⁻⁴ M Cu(II) 이온농도에서 sheep myoglobin은 9.5배, horse myoglobin은 5.5배, *S. cerevisiae* cytochrome c는 3.5배 단백질 분배계수가 증가하였다. 이외에도 표면에 1개의 histidine을 갖고 있는 것으로 알려진 horse cytochrome c의 경우는 1.4배 단백질 분배계

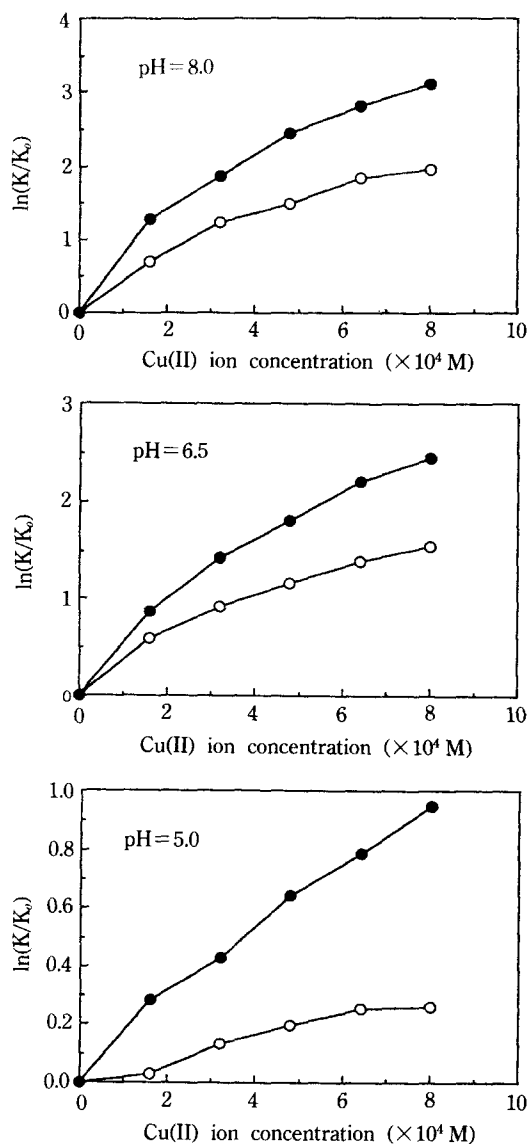


Fig. 3. Metal-affinity partitioning of *S. cerevisiae* cytochrome c with Cu(II)IDA-PEG5,000 (○) or Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 (●) ligand at various pH's and Cu(II) ion concentrations.

수가 증가하였다.

Fig. 4는 단백질 표면에 노출된 histidine수에 따른 ln(K/K₀)값을 보여 준다. Suh와 Frances식에서 볼 수 있듯이 일정한 pH 및 C_M(첨가된 metallated PEG 리간드 양)에서 ln(K/K₀)는 n(histidine수)에 대하여 1차 선형식을 갖는다. 그러나, *S. cerevisiae* cytochrome c의 경우 표면 histidine수에 비해 높은 ln(K/K₀)

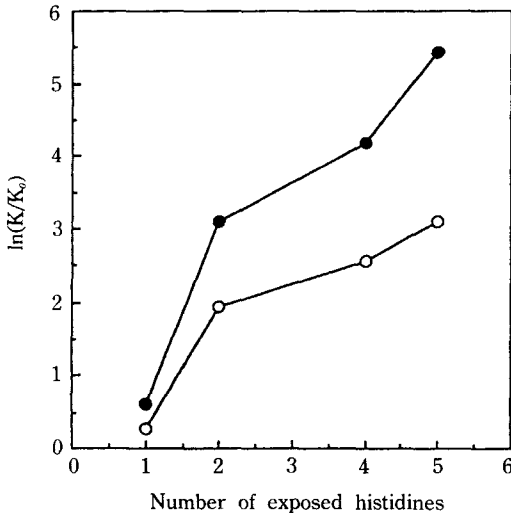


Fig. 4. Plot of $\ln(K/K_0)$ vs. number of exposed histidines in case of the addition of Cu(II)IDA-PEG5,000 (○) or Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 (●) ligand at pH=8.0 and Cu(II) ion concentration of 8×10^{-4} M.

값을 보여주었다. 실제로 histidine 이외에도 cysteine, thiol sulfur, accessible N-terminus 등 다른 functional group들도 금속 이온과 친화성이 있으나 Suh and Frances식에서는 이러한 변수들의 영향이 포함되어 있지 않다. 따라서 이러한 functional group들을 포함하고 있는 단백질들은 금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 예상보다 높은 분배계수를 나타낼 수 있다. 또한, 이 식은 금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 단백질 분배계수의 예측은 물론 금속 이온과 금속 친화성이 있는 단백질과의 stability constant를 구하는 모델식으로도 매우 유용하게 사용될 수 있다. Cu(II)IDA-PEG5,000과 단백질 표면 histidine과의 stability constant는 PEG phase에서는 $2.2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$, dextran phase에서는 $4.5 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ 로 보고된 바 있다 (3). 그러나 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 리간드의 경우 Cu(II)IDA-PEG5,000와는 달리 한 개의 리간드에 2개의 금속 이온을 갖고 있어 Suh와 Frances식은 적용할 수가 없다. 따라서, Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000을 단백질 분리에 사용할 경우에는 분배계수를 예측할 수 있는 새로운 모델식의 개발이 요구된다고 할 수 있다.

결론적으로 기존의 금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 사용되어 온 Cu(II)IDA-PEG5,000보다 분배계수가 높은 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000 리간드를 사용할 경우 표면에 histidine을 갖고 있는 단백질들의 분배를

향상시킬 수 있었다. 본 연구에서는 정제된 단백질들을 모델 시스템으로 하여 단백질 분배 실험을 하였지만 실제로 발효 배지로부터 contaminant 단백질들을 갖고 있는 시스템에서 본 단백질 분리방법의 적용을 위한 연구가 수행되어야 할 것이다.

요 약

금속 친화성 액 이상분계 시스템에서 단백질 분배는 pH, 단백질 표면에 존재하는 histidine수, metallated PEG 리간드의 농도 및 분배계수에 의해 영향을 받는다. 금속 친화성이 있는 단백질 분배를 향상시키기 위하여, 기존의 금속 친화성 리간드로 사용되어 온 Cu(II)IDA-PEG5,000보다 분배계수가 높은 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000을 합성하여 PEG/dextran 이상분계 시스템에서 새로운 금속 친화성 리간드로 사용하였다. 단백질 분배 실험은 horse cytochrome c, *S. cerevisiae* cytochrome c, horse myoglobin, sheep myoglobin을 모델 시스템으로 하여 수행하였으며, 실험 결과 Cu(II)IDA-PEG5,000보다 Cu(II)₂IDA₂-PEG20,000을 사용하였을 경우에 향상된 단백질 분배계수를 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Wuenschell, G.E., E. Naranjo and F.H. Arnold. 1990. Aqueous two-phase metal affinity extraction of heme proteins. *Bioprocess Eng.* 5: 199-202.
2. Plunkett, S. and F.H. Arnold. 1990. Metal affinity extraction of human hemoglobin in an aqueous polyethylene glycol-sodium sulfate two-phase system. *Biotechnol. Techniq.* 4: 45-48.
3. Suh, S.S., M.E. Van Dam, G.E. Wuenschell, S. Plunkett and F.H. Arnold. 1990. Novel metal-affinity protein separations. *ACS Symp. Ser.* 427: 139-149.
4. Suh, S.S. and F.H. Arnold. 1990. A mathematical model for metal affinity protein partitioning. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 682-690.
5. Suh, S.S., B.L. Haymore and F.H. Arnold. 1991. Characterization of his-X₃-his sites in α -helices of synthetic metal-binding bovine somatotropin. *Protein Eng.* 4: 301-305.
6. Todd, R., M. Van Dam, D. Casimiro, B.L. Haymore and F.H. Arnold. 1990. Cu(II)-binding properties of a cytochrome c with a synthetic metal-binding site: his-X₃-his in an α -helix. *Proteins* 10:

- 156-161.
7. Chung, B.H. and F.H. Arnold. 1991. Metal-affinity partitioning of phosphoproteins in PEG/dextran two-phase systems. *Biotechnol. Letts.* **13**: 615-620.
 8. Buckmann, A.F., M. Michael and K. Maria-Regina. 1987. Preparation of technical grade polyethylene glycol(PEG)(Mr 20,000)-N⁶-(2-aminoethyl)-NADH by a procedure adaptable to large-scale synthesis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **9**: 258-268.
 9. Van Dam, M.E., G.E. Wuenschell and F.H. Arnold. 1989. Metal affinity precipitation of proteins. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **11**: 492-502.
 10. Herlich, K. 1990. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, p717. The Association of Official Analytical Chemists, Inc., VA.
 11. Flanagan, S.D. and S. H. Barondes. 1975. *Affinity partitioning*. *J. Biol. Chem.* **250**: 1484-1489.

(Received April 10, 1993)