

Ubiquitin 폴딩 intermediate의 열역학적 특성

박 순 호*

강릉대학교 치과대학 치의학과

(2003년 10월 15일 접수, 2004년 2월 7일 수리)

Ubiquitin 폴딩 반응의 초기에 나타나는 transient 폴딩 intermediate 상태의 열역학적인 특성을 연구하였다. 온도와 화학변성제의 농도를 바꾸어주면서 측정한 폴딩 kinetics의 결과로부터 unfolded 상태와 intermediate 상태의 평형상수 및 자유에너지를 quantitative kinetic modeling을 통하여서 구하였으며 또한 온도에 따른 자유에너지의 변화로부터 unfolded 상태에서 intermediate 상태로 전환될 때의 열역학적 함수인 ΔH , ΔS , ΔC_p 를 구하였다. Ubiquitin이 unfolded 상태에서 intermediate 상태가 될 때의 ΔC_p 는 unfolded 상태에서 native 상태로 되는 과정의 ΔC_p 의 약 80% 정도 되었다. 이것은 intermediate가 native 상태에 가까운 매우 조밀한 구조를 이루고 있는 ensemble state임을 나타낸다. 상온에서의 ΔH 는 양의 값을 보였다. 이는 ubiquitin의 unfolded 상태에서 소수성 잔기 주위에 위치한 물 분자의 규칙적인 구조가 intermediate 상태가 될 때 와해되기 때문이라고 여겨진다. 이러한 양의 enthalpy는 자유로워진 물 분자에 의한 전체 계의 entropy의 증가에 의하여서 보상되어 unfolded 상태에서 intermediate 상태로의 전환은 음의 자유에너지를 갖게 되며 폴딩 반응의 초기에 관찰되는 것으로 여겨진다.

Key words: 유비퀴틴, 폴딩 중간단계, 단백질 안정화 곡선, ΔC_p , 용액과 접촉하는 표면적

서 론

단백질이 수많은 heterogeneous conformation이 빠른 평형상태를 이루고 있는 random coil의 형태(unfolded 상태)에서 생물학적 기능을 지닌 유일한 native 구조가 되는 과정을 단백질의 폴딩이라 일컫는다. Anfinsen은 순수 정제되거나 화학적인 방법에 의하여 합성된 단백질의 폴딩이 *in vitro*에서 가역적으로 일어나는 것을 관찰하였고 따라서 단백질의 삼차구조 형성에 대한 정보는 각 단백질의 아미노산 서열에 저장되어 있음을 밝혔다.¹⁾ 단백질의 unfolded 상태가 갖는 구조적인 heterogeneity를 고려해 볼 때 단백질 폴딩 반응은 어떤 특정한 아미노산 서열이 random search 과정을 통하여서 유일한 native 상태가 되는데는 엄청나게 오랜 시간이 걸릴 것으로 사료된다.^{2,3)} 그런데 여러 작은(100 residue 미만) 구형 단백질(globular protein)의 폴딩 kinetics에 대한 연구에서 unfolded 상태에서 native 상태로의 전환은 수 초 안에 일어나는 것이 알려졌다. 즉 단백질은 매우 빠르고 효과적으로 native conformation을 형성한다고 할 수 있다. 단백질이 빠르고 효과적으로 native 삼차구조를 형성하는 것은 아미노산 서열에 특정 삼차구조에 대한 경향성(structural bias, structural preference)이 내재되어져 있다는 것을 의미한다. 단백질의 아미노산 서열에 내재되어진 특정 삼차구조에 대한 경향성은 이러한 경향이 어떻게 시간적 공간적으로 발현되는가를 밝혀봄으로써 얻어질 수 있으리라 생각된다. 즉 단백질 폴딩 반응의 중간단계(folding intermediate)의 구조를 밝히는 것이 중요하다고 할 수 있다.

단백질 폴딩은 매우 cooperative한 반응으로서 몇몇 크기가 크고 여러 domain으로 되어진 단백질을 제외한 하나의 domain으로 이루어진 작은 구형 단백질은 생리적인 조건에서 폴딩 중간단계가 평형 상태에서는 거의 관찰되지 않는다. 그러나 몇몇 작은 구형 단백질의 폴딩 kinetics 실험에서 반응의 초기 단계에(수 ms) 순간적으로 형성되는 중간단계(transient folding intermediate)가 관찰되었다.^{4,11)} 관찰되는 transient folding intermediate에 대한 해석은 이것이 native 상태로 되기 위하여 반드시 거쳐야 하는 중간단계(obligatory intermediate)라는 해석과 잘못 폴딩된 중간단계(misfolded intermediate)로서 native 상태로 되기 위하여서는 다시 unfolded 상태로 되어야 하는 중간단계(off-pathway intermediate)라는 해석이 있다.¹²⁾ 따라서 각 모델 단백질에서 관찰되는 중간 단계에 대한 세세한 연구가 필요하다 할 수 있다.

지금까지 단백질 폴딩 연구에 사용되어진 여러 모델 단백질 중 ubiquitin도 transient folding intermediate가 관찰되는 작은 구형 단백질이다.¹³⁾ Khorasanizadeh 등은 wild type ubiquitin과 hydrophobic core가 변이된 mutant ubiquitin의 폴딩 kinetics 실험을 통하여서 ubiquitin의 transient folding intermediate가 ubiquitin 단백질이 unfolded 상태에서 native 상태로 전환되는 과정에서 반드시 거쳐가는 obligatory folding intermediate임을 밝혔다.⁵⁾ 따라서 ubiquitin의 경우 transient folding intermediate의 구조에 대한 연구는 폴딩의 경로를 연구하는데 중요한 부분이 될 수 있다. 본 논문에서는 ubiquitin의 folding kinetics를 여러 온도에서 측정하여 transient folding intermediate의 열역학적인 특성을 탐구하였다.

*연락처

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

E-mail: spark9@kangnung.ac.kr

재료 및 방법

재료. Recombinant human ubiquitin은 Khorasanizadeh 등

이 기술한 방법에 Sephacryl S-100 column chromatography 과정을 더하여서 실시하였다.¹³⁾ 초순수 grade guanidine hydrochloride(GuHCl)는 ICN Biomedical Inc.(Costa Mesa, CA, USA)에서 구입하였다. GuHCl의 농도는 Reichert-Jung Mark II Abbe refractometer(Cambridge Instruments Inc., Buffalo, NY)를 이용하여 측정하였다. 그 외 시약들은 reagent grade이거나 그 보다 더 나은 grade를 사용하였다.

Stopped-flow 장치를 이용한 단백질 folding 및 unfolding 측정. Ubiquitin 단백질의 refolding과 unfolding 반응의 kinetics는 SFM-4/QS stopped-flow 장치(Biologic, Claix, France)를 이용하여 측정하였다. 고농도의 GuHCl에 녹여 완전히 unfolding 된 유비퀴틴(40~60 μ M)을 stopped-flow 장치를 이용하여 8.5배 또는 11배의 완충용액에 빠르게 희석 시킨 다음 일어나는 intrinsic tryptophan fluorescence emission변화를 통하여서 refolding 반응의 kinetics를 측정하였고, unfolding kinetics는 buffer에 녹여진 단백질을 stopped-flow 장치를 이용하여 고농도의 GuHCl용액에 8.5 또는 11배 희석 시킨 다음 일어나는 intrinsic tryptophan fluorescence emission변화를 통하여서 측정하였다. Intrinsic tryptophan fluorescence emission은 tryptophan을 295 nm로 여기시킨 다음 나오는 fluorescence emission중 324 nm 이상 되는 것만 cutoff filter를 이용하여 선택하여 측정하였다. 희석 시키는 용액의 GuHCl의 농도를 적절히 조절하여 마지막 GuHCl농도가 0 M에서 6 M 사이의 다양한 값을 갖도록 하였다. Kinetic trace는 각 GuHCl 농도에서 적어도 5번 이상 측정하여 그 평균을 분석에 이용하였다. Refolding kinetic trace는 nonlinear least squares fitting을 이용하여 세 개의 exponential phase로 fitting하였고, unfolding kinetic traces는 하나의 exponential phase로 fitting 하였다. Stopped-flow 장치는 RCS-6D 순환수조(Brinkmann Instrument Co., Westbury, NY)를 이용하여 원하는 온도를 유지하였으며, 온도는 기기의 순환수 출구에 temperature probe를 설치하여 측정하였다. Stopped-flow 장치의 dead-time은 N-acetyltryptophanamide (NATA)의 fluorescence가 N-bromosuccinimide(NBS)에 의하여서 quenching되는 반응¹⁴⁾을 이용하여 구하였으며 3 ms로 관찰되었다. 따라서 모든 kinetic trace는 3 ms부터 얻을 수 있는 kinetic trace를 얻는다고 할 수 있다.

결과 및 고찰

1 M GuHCl 농도에서 유비퀴틴의 폴딩 kinetics. Fig. 1은 GuHCl의 최종 농도가 1 M일 때 유비퀴틴의 folding kinetic trace를 5개의 각기 다른 온도에서 측정된 결과를 보여준다. 각 folding kinetic trace는 세 개의 exponential phase로 fitting 되었으며 각 phase의 life-time은 2.3~50 ms, 20~330 ms, 1.6~100 s로 관찰되었다. 첫번째 phase는 GuHCl의 농도와 온도에 따라 amplitude가 변하였으며, 첫번째 phase이후에 관찰되는 두 phase의 amplitude는 전체 amplitude의 20% 정도였으며 비교적 온도와 GuHCl의 농도에 의존하지 않고 일정하였다. Ubiquitin은 3개의 proline residue를 가지고있으며(residue 위치 19, 37, 38) X-Pro 펩타이드의 cis/trans isomerization에 의하여서

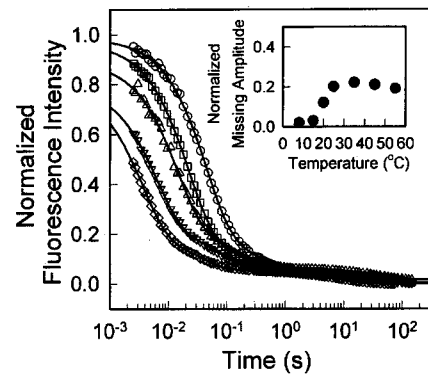


Fig. 1. Kinetic traces of ubiquitin folding reaction at pH 5.0 and 1 M final GuHCl concentration. Symbols represent the observed kinetic traces and the solid lines represent the non-linear least-squares fit of observed kinetic traces with three exponential phases. Circles, squares, triangles, reverse triangles, and diamonds represent the kinetic traces measured at 8, 15, 20, 25, and 35°C, respectively. Normalized missing amplitudes at each temperature are shown in the inset. Missing amplitudes were obtained by subtracting summed observable amplitudes from expected total amplitude and then normalized.

unfolded 상태에 각기 parallel folding pathway를 갖는 subspecies가 존재할 수 있다. 즉 나중에 관찰되는 두 개의 phase는 unfolded 상태에서 X-Pro peptide 결합의 cis/trans isomerization때문에 생기는 phase이며 관찰되는 속도는 단백질의 conformation이 변하는 것을 반영하는 것이 아니라 X-Pro peptide 결합의 cis/trans isomerization 속도를 반영한다고 할 수 있다.¹⁵⁾

Ubiquitin의 folding kinetic trace의 zero time에서의 fluorescence signal은 20°C 이상의 온도에서 unfolded ubiquitin의 fluorescence signal 보다 훨씬 낮게 관찰되었다. 이러한 현상을 burst phase현상이라 하며 적어도 하나 이상의 phase가 stopped-flow 장치의 dead-time 이전에 존재함을 의미한다. Burst phase의 amplitude는 stopped-flow 기기가 측정할 수 없으므로 missing amplitude라 지칭되며 기대되는 전체 amplitude에서 관찰되는 phase의 amplitude의 합을 빼주어서 얻는다. Khorasanizadeh등은 이러한 missing amplitude가 관찰되는 것은 ubiquitin의 폴딩 반응의 초기에 적어도 하나의 transient folding intermediate가 존재하고 있다고 가정하고 quantitative kinetic modeling을 통하여서 ubiquitin의 폴딩 반응은 transient folding intermediate를 거쳐서(obligatory intermediate) 진행된다고 해석하였다.⁵⁾

Fig. 1의 inset에 보여지듯이 35°C를 기준으로 하여 missing amplitude는 온도가 감소하거나 증가함에 따라 더 감소하는 양상을 보인다. 즉 stopped-flow 기기의 dead-time에서 나타나는 어떠한 species의 population이 약 35°C를 기준으로 하여 온도가 감소할 때도 감소하고 증가 할 때에도 감소하는 것을 나타낸다. 이러한 현상은 단백질이 삼차구조를 약하게 변성시킬 수 있는 용액에서 낮은 온도에서도 변성이 일어나며(cold denaturation) 또한 높은 온도에서도 변성이 일어나는(thermal unfolding) 현상과 유사한 점을 보인다. 이러한 관찰은 ubiquitin의 폴딩 kinetics 측정을 통하여서 transient folding

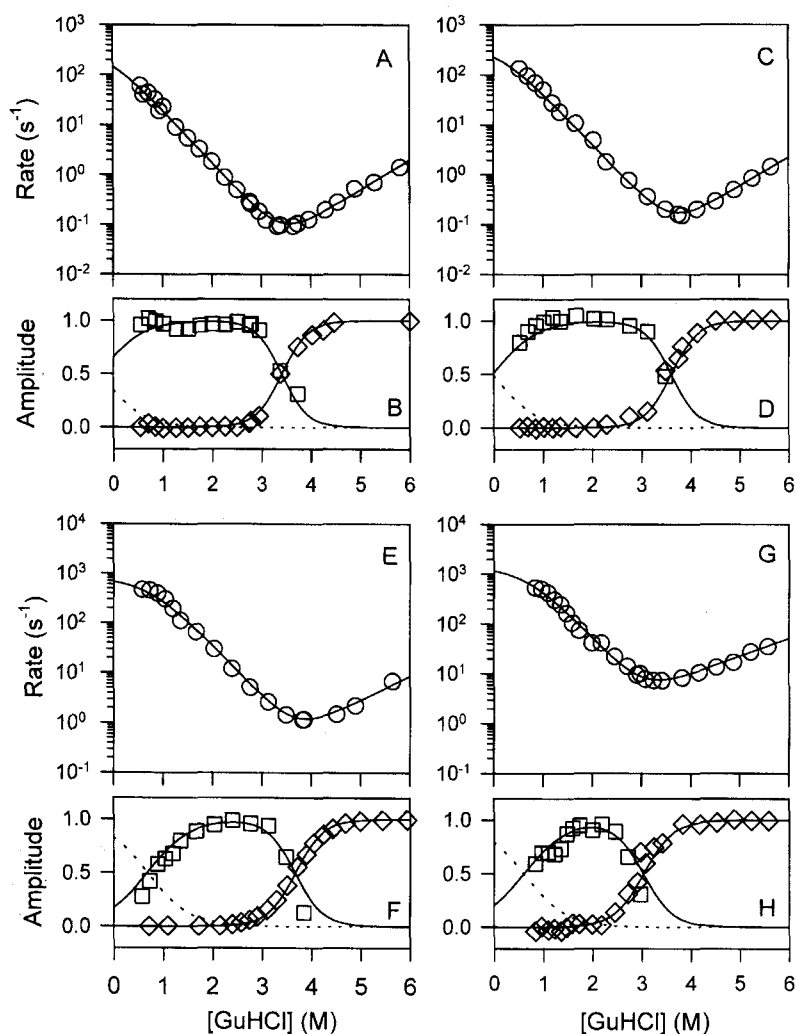


Fig. 2. Three-state kinetic analysis of ubiquitin folding kinetics at four representative temperatures. Symbols in each panel represent the observed rates and amplitudes as a function of GuHCl concentrations, which are obtained at 8°C (A and B), 15°C (C and D), 35°C (E and F), and 55°C (G and H), respectively. Panels A, C, E, and G represent GuHCl dependent rates (○) for major phase. Panels B, D, F, and H are normalized values for GuHCl dependent major phase amplitudes (□) and fluorescence at equilibrium (◇). Solid lines represent the calculated values of folding rates and amplitudes of major phase, and GuHCl dependent unfolding curve obtained by quantitative kinetic modeling. The dashed line represents the calculated values of missing amplitudes obtained by quantitative kinetic modeling.

intermediate의 열역학적인 특성을 알아볼 수 있음을 시사한다.

GuHCl 농도에 따른 Ubiquitin의 폴딩 kinetics. Ubiquitin 폴딩 반응의 transient folding intermediate의 열역학적 특성을 측정하기 위하여서 다양한 최종 GuHCl 농도에서의 folding, unfolding 반응의 kinetics를 여러 온도에서 측정하였다. 이러한 측정은 우선 transient folding intermediate는 평형상태에서는 그 population이 높지 않아서 측정이 불가능하여 오직 kinetics 측정으로만 관찰이 가능하며 또한 denaturant를 함유하지 않는 용액에서의 열역학적 특성을 알기 위하여서는 여러 최종농도의 denaturant 농도에서의 측정치로부터 외삽법(extrapolation)에 의하여서 구하여야 하기 때문이다.

Fig. 2는 대표되는 네 개의 온도에서 ubiquitin의 folding반응과 unfolding 반응의 관찰된 속도상수에 logarithm을 취한 값을 GuHCl 농도에 대하여 그린 rate profile과 amplitude 값을 GuHCl농도에 대하여 그린 amplitude profile을 보여준다. 여러 단백질의 폴딩 kinetics 측정을 통하여 rate profile은 V-자형은

피는 것으로 알려져 있으며 특히 폴딩 반응이 intermediate 상태가 발견되지 않는 two-state 단백질의 경우 V-자의 양 날개가 직선으로 나타나는 양상을 보인다고 알려져있다.¹⁶⁾ Fig. 2E와 2F에서 보듯이 35°C에서 측정한 rate profile은 GuHCl의 농도가 낮은 부분에서 곡선을 이루며(roll-over effect¹²⁾ 그에 상응한 amplitude profile에 missing amplitude(점선)가 현저하게 나타나는 것을 볼 수 있다. 이러한 관찰은 Khorasanizadeh 등이 관찰한 25°C에서의 ubiquitin의 folding, unfolding kinetics와 일치하며^{5,13)} stopped-flow 기기의 dead-time에 적어도 하나의 intermediate phase를 가지고있는 단백질의 폴딩 반응이 보여주는 전형적인 결과이다.^{6,7,9)} Missing amplitude와 roll-over effect는 55°C에서 측정한 폴딩 kinetics에서도 여전히 관찰되고 있다 (Fig. 2G와 2H). Fig. 2C와 2D는 15°C에서 측정한 폴딩 kinetics이며 rate profile은 V-자형의 양 날개가 직선을 띠고 있는 것처럼 보이나 여전히 GuHCl의 농도가 낮은 부분에서 missing amplitude가 보여지고 있다. 그런데 missing amplitude

는 35°C에서 관찰된 것보다 비교적 GuHCl의 농도가 낮은 구간에서 관찰되며 그 값도 그리 크지 않았다. 이는 낮은 온도에서 폴딩 intermediate의 GuHCl에 대한 안정성이 비교적 낮아졌음을 의미한다. Fig. 2A와 2B는 8°C에서 얻은 폴딩 kinetics 결과로서 two-state 단백질이 보이는 전형적인 결과와 일치한다. 즉 10°C 이하의 온도에서 ubiquitin folding intermediate의 안정성이 현저히 감소하여 더 이상 관찰되지 않고 따라서 ubiquitin의 folding 반응은 외견상 two-state를 띠는 것처럼 관찰되는 것이다. 이러한 해석은 hydrophobic core가 변이된 mutant ubiquitin의 폴딩 kinetics 측정과 일치한다.⁵⁾ Hydrophobic core residue인 26번째 위치의 valine이 alanine으로 치환된 변이 ubiquitin의 상온에서의 folding kinetics는 WT ubiquitin의 8°C에서의 folding kinetics와 마찬가지로 rate profile의 V-자형의 양 날개가 직선이고 missing amplitude는 관찰되지 않았으나 단백질을 안정시키는 조건인 0.4 M Na₂SO₄가 존재하는 용액에서 rate profile이 GuHCl의 농도가 낮은 조건에서 roll-over effect를 보이며 또한 stopped-flow 기기의 dead-time에서 missing amplitude가 관찰되었다.^{5,13)} Khorasanizadeh 등은 이러한 관찰이 ubiquitin의 폴딩 메커니즘이 달라진 것이 아니라 폴딩 intermediate의 안정성이 떨어져서 외견상으로 관찰되지 않는다고 해석하였다.⁵⁾ Fig. 2에서 보여지듯이 ubiquitin 단백질이 낮은 온도에서 외견상 two-state 폴딩 메커니즘을 따르는 것처럼 보이는 이유도 transient folding intermediate의 안정성이 낮은 온도에서 떨어졌기 때문이라고 해석할 수 있다 (cold denaturation).

Stopped-flow kinetics 측정 결과의 three-state 폴딩 메커니즘에 입각한 분석. 여러 온도에서 측정된 ubiquitin 폴딩 반응의 kinetics 결과를 통하여서 ubiquitin의 폴딩 반응 과정에서 나타나는 intermediate state의 열역학적인 특성을 알아보기 위하여 GuHCl의 농도에 따른 폴딩 kinetics 측정의 결과를 obligatory intermediate를 거치는 minimal three-state 폴딩 메커니즘(Scheme 1)에 fitting 하였다(quantitative kinetic modeling).⁵⁾



Scheme 1은 U ↔ I, I ↔ N 두개의 elementary reaction으로 구성되어 있으며 그 각 elementary 반응의 속도 상수는 k_p로 표현된다. 여기에서 U, I, N은 각각 unfolded state, intermediate state, native state를 지칭한다. Two-state 폴딩 반응의 속도상수에 logarithm을 취한 값은 GuHCl의 농도에 대하여 직선의 관계가 성립되므로 (수식 1)¹⁶⁾ 각 GuHCl농도에서의 elementary 반응의 속도상수를 구할 수 있다.

$$\ln k_p = \ln k_p^0 + (m_p^\ddagger/RT) C \quad (1)$$

수식 1에서 k_p⁰, m_p[‡], R, T, C는 각각 0 M GuHCl에서의 속도상수, 속도상수의 GuHCl 농도에 대한 의존도, gas constant, 절대온도, GuHCl의 농도를 나타낸다. Fig. 1에서 보여주는 것과 같은 kinetic trace를 fitting하여 얻어지는 외견상으로 관찰되는 속도 상수(λ)와 amplitude는 Scheme 1을 구성하고 있

는 각 elementary 반응의 속도 상수(k_p)로 이루어진 rate matrix를 통하여서 구할 수 있다.^{17,18)} 그런데, Fig. 1에서도 보여지듯이, burst phase의 kinetics는 stopped-flow 기기로 측정이 가능하지 않은 빠른 반응으로 U ↔ I transition의 microscopic 속도 상수는 얻을 수 없다. 그러나 Scheme 1을 따르는 반응에서 관찰되는 속도상수(apparent rate constant, λ)는 U ↔ I transition이 I ↔ N transition보다 훨씬 빠른 상황에서 다음과 같은 간략한 수식으로 표현된다.

$$\lambda_1 = k_{UI} + k_{IU} \quad (2)$$

$$\lambda_2 = f_I \cdot k_{IN} + k_{NI} \quad (3)$$

여기서 λ₁은 burst phase의 외견상 관찰되는 속도 상수이고 λ₂는 Fig. 1의 kinetic trace에서 외견상으로 관찰되어지는 가장 빠른 phase의 속도 상수이며 intermediate 상태의 안정도에 비례한다. 즉 f_I는 intermediate의 fractional population을 반영하며 다음과 같은 수식으로 표현된다.

$$f_I = k_{UI}/(k_{UI} + k_{IU}) = K_{UI}/(1 + K_{UI}) \quad (4)$$

수식 4에서 K_{UI}는 U ↔ I elementary 반응의 평형 상수이다. 따라서 ubiquitin의 folding kinetics 결과와 위 수식에서 U ↔ I elementary 반응의 microscopic 속도상수는 구할 수 없지만 그 microscopic 속도 상수의 비로 표현되는 평형상수(K_{UI}= [I]/[U])와 I ↔ N elementary reaction의 microscopic 속도 상수인 k_{IN}과 k_{NI}는 각 GuHCl 농도에서 측정된 kinetics 결과를 수식 1, 3, 4에 fitting 하여 얻을 수 있다. Fig. 1에서 관찰된 두 개의 느린 phase는 conformational 변화가 아닌 X-Pro peptide 결합의 cis/trans isomerization에 기인한 parallel 폴딩 pathway를 따르는 unfolded state의 subpopulation으로 생각되어지므로 quantitative kinetic modeling에서는 제외하였다.⁵⁾

Fig. 2에 그려진 실선과 점선은 stopped-flow 기기를 통하여 관찰된 폴딩 kinetics의 결과를 three-state 폴딩 모델로 fitting한 결과를 보여주며 Table 1은 fitting에 의하여 얻어진 kinetic parameter를 나열한 것이다. Fig. 2의 선들은 기호로 표시된 실제 측정된 속도상수, amplitude 결과와 잘 일치하는 것을 볼 수 있다. Table 1에 나열된 parameter 중 m_{UI}와 m_{UN}는 m-value라 한다.¹⁹⁾ 단백질이 compact native 상태에서 unfolded 상태로 전환될 때 용액과 접촉하는 표면적이 증가하며 m-value는 폴딩 반응의 진행과정에서 용액에 노출된 표면적을 반영한다고 알려져 있다.²⁰⁾ 즉 m_{UI}와 m_{UN}은 pre-equilibrium transition(U ↔ I)과 overall folding transition(U ↔ N)에서 단백질의 표면이 용액과 접촉하는 표면적의 변화를 반영하며, 마찬가지로 m[‡]-value는 단백질 폴딩 반응의 ground state(native state, unfolded state, intermediate state)와 transition state에서의 용액에 노출되는 표면적의 변화를 반영한다고 생각할 수 있다.²¹⁾ Table 1에서 보듯이 U ↔ I transition의 m-value인 m_{UI}는 overall transition의 m-value인 m_{UN}의 약 65%이다. 이는 unfolded 상태에서 용액에 노출된 표면의 65%가 intermediate 상태에서는 용액과 접촉하고 있지 않음을 나타낸다. 즉 intermediate 상태는 unfolded 상태와 비교하여 더 조밀한 상태(compact state)가 되었음을 나타낸다.

Table 1. Kinetic parameters obtained from the analysis based on the sequential three-state folding mechanism

Temperature (°C)	K_{UI}°	m_{UI}	k_{IN}°	k_{NI}°	m_{NI}^{\ddagger}	m_{UN}
8	0.6	1.37	400	5.0×10^{-4}	0.77	2.14
15	1.1	1.37	450	7.0×10^{-4}	0.77	2.14
20	5.0	1.50	350	1.2×10^{-3}	0.75	2.25
25	6.7	1.47	450	3.5×10^{-3}	0.70	2.17
35	5.6	1.47	800	1.1×10^{-2}	0.68	2.15
45	6.7	1.53	950	4.9×10^{-2}	0.62	2.15
55	5.3	1.50	1100	2.3×10^{-1}	0.60	2.10

K_{UI}° , k_{IN}° , and k_{NI}° represent equilibrium constant of $U \leftrightarrow I$ transition, microscopic rate constant of $I \rightarrow N$, and $N \rightarrow I$ processes in the absence of denaturant, respectively. m_{UI} and m_{NU} are equivalent to the m -values obtained from linear extrapolation of the equilibrium unfolding measurements, and represent m -values for pre-equilibrium transition ($U \leftrightarrow I$), and overall equilibrium unfolding transition ($U \leftrightarrow N$), respectively. m_{NI}^{\ddagger} represent kinetic m -value for $N \rightarrow I$ process as shown in Equation 1. m_{NI}^{\ddagger} was assumed to be 0. m_{NU} was obtained by summation of m_{UI} and m_{NI}^{\ddagger} .

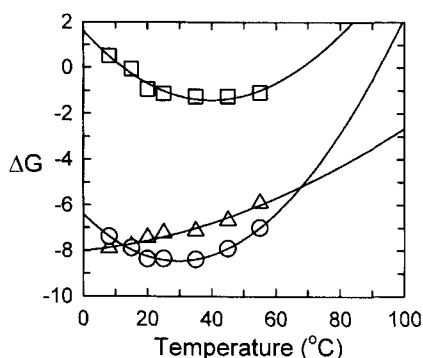


Fig. 3. Protein stability curves of elementary reactions in ubiquitin folding. Squares, triangles, and circles represent the free energies of $U \leftrightarrow I$, $I \leftrightarrow N$, and $U \leftrightarrow N$ transitions, respectively. Solid lines represent the best fit of temperature dependent free energy to protein stability equation.

Ubiquitin folding intermediate의 열역학적 성질. Stopped-flow kinetics 측정 결과의 three-state 폴딩 메커니즘에 입각한 분석을 통하여서 얻어진 ubiquitin folding elementary reaction의 평형상수로부터 안정화 free energy를 다음과 같은 관계로부터 얻을 수 있다.

$$\Delta G_{UI}^{\circ} = -RT \ln K_{UI}^{\circ} \quad (5)$$

$$\Delta G_{IN}^{\circ} = -RT \ln (k_{IN}^{\circ}/k_{NI}^{\circ}) \quad (6)$$

$$\Delta G_{UN}^{\circ} = \Delta G_{UI}^{\circ} + \Delta G_{IN}^{\circ} \quad (7)$$

Fig. 3의 네모와 세모는 $U \leftrightarrow I$, $I \leftrightarrow N$ 반응의 단백질 안정화 free energy의 온도에 대한 변화를 수식 5~7로부터 얻어서 그린 protein stability curve이다.^{22,23} Unfolded 상태에서 intermediate 상태로 되는 반응($U \leftrightarrow I$)은 단백질 삼차구조의 안정성이 가장 높은 온도가 약 40°C이며 이 온도를 기준으로 하여 안정성이 낮아지는 것을 보여준다. 특히 $U \leftrightarrow I$ 반응의 경우 10°C 이하에서 unfolded state의 population이 native state의 population보다 더 많은 cold denaturation의 양상을 띠는 것을 확연하게 보여준다. 반면에 $I \leftrightarrow N$ 반응은 온도에 대한 안정화 에너지의 변화가 완만하게 이루어지고 있음을 보여준다. Fig. 3의 원은 unfolded ubiquitin이 intermediate를 거쳐서 native state가 되는 overall 반응의 stability curve를 나타내는 것으로

native ubiquitin은 약 30°C에서 온도에 대하여서 가장 높은 안정성을 보이는 것으로 보인다.

단백질이 변성될 때 native 상태에서 단백질의 내부에 위치하는 소수성 아미노산의 side-chain이 수용액에 노출되며 이러한 소수성 아미노산의 side-chain 주위를 물 분자가 둘러싸고 있는 견고한 구조가 형성되어 unfolded 상태의 단백질이 native 상태의 단백질에 비하여서 일정한 압력에서의 비열(heat capacity)이 높다.^{22,23} 일정한 압력에서 unfolded state와 native state 사이의 비열의 차는 ΔC_p 로 표현된다. 이렇듯 unfolded state와 native state 사이의 비열의 차(ΔC_p)는 단백질의 온도에 대한 삼차구조 변환의 enthalpy와 entropy에 영향을 준다(수식 8, 9). 단백질의 온도에 대한 안정성을 나타내어 주는 protein stability curve(ΔG vs. T curve)는 단백질 denaturation 반응의 enthalpy와 entropy의 ΔC_p 에 대한 의존도를 가미한 수식 10(protein stability equation)으로 표현되며 Fig. 3과 같이 곡선을 그리게 된다.^{22,23} 또한 ΔC_p 의 온도에 대한 의존도는 실험의 오차범위에 들 정도로 작아서 무시되어 단백질 삼차구조 변환의 비열은 일정한 값을 갖는다고 알려져 있다.²⁴

$$\Delta H = \Delta H_0 + \Delta C_p (T - T_0) \quad (8)$$

$$\Delta S = \Delta S_0 + \Delta C_p \ln(T/T_0) \quad (9)$$

$$\Delta G = \Delta H_0 - T\Delta S_0 + \Delta C_p \{(T - T_0) - T \ln (T/T_0)\} \quad (10)$$

위 수식에서 T_0 , ΔH_0 , ΔS_0 는 절대온도로 표현되는 기준 온도(reference temperature), 기준 온도에서의 enthalpy와 entropy를 각각 나타낸다. 이 실험에서는 상온(25°C, 298K)을 기준온도로 삼았다.

Table 2에는 Fig. 3에 보여진 온도에 따른 단백질의 안정화 free energy의 변화를 수식 10의 Protein stability equation에 fitting하여 얻어진 ΔH_0 , ΔS_0 , ΔC_p 가 나열되어 있다. 얻어진 parameter들은 fitting의 초기 값(initial guess)에 상관없이 언제나 일정한 값으로 수렴하였으므로 전체적인 극소값(global minimum)에 도달하였다고 여겨졌다. Ubiquitin 단백질의 $U \leftrightarrow N$ overall transition의 ΔC_p 는 -1.39 kcal/mol/K 였으며 이 값은 ubiquitin 단백질의 differential scanning calorimetric 실험에 의하여 구하여진 ΔC_p 값(-1.32 kcal/mol/K)과 유사하였다.²⁵ Preequilibrium반응인 $U \leftrightarrow I$ elementary 반응의 ΔC_p 는 -1.14

Table 2. Thermodynamic parameters of each elementary reaction in the three-state folding of ubiquitin at 25°C

Thermodynamic parameters	U↔I	I↔N	U↔N
ΔH_o	15.5	-17.8	-2.31
ΔS_o	55.3	-34.8	20.4
ΔC_p	-1.14	-0.24	-1.39

The units for ΔH , ΔS , and ΔC_p are kcal/mol, cal/mol/T, and kcal/mol/T, respectively. T is temperature in the absolute scale.

kcal/mol/K로서 overall transition의 ΔC_p 값의 약 80%로 나타났다. 이 결과는 unfolded 상태에서 용액에 노출된 소수성 표면이 intermediate 상태에는 80% 정도 단백질의 내부에 위치하여 용액과 접촉하고있지 않다는 사실을 반영한다. 상온에서의 U↔I elementary 반응의 enthalpy는 양의 값을 띠었다. 즉 unfolded 상태에서 intermediate 상태가 될 때 많은 열이 필요하다는 것을 의미한다. 이는 unfolded 상태에서 intermediate 상태로 될 때 unfolded 상태의 소수성 잔기 주위에 형성되는 물 분자의 견고한 결합을 외해시키기 위하여 필요한 열이라고 할 수 있다. 이러한 양의 enthalpy는 물 분자의 유리에 의한 전체 계의 entropy 증가에 의하여서 보상되고 있음을 U↔I elementary 반응이 양의 entropy(55.3 cal/mol/K)값을 갖는 점으로부터 알 수 있다. Table 2에서 보듯이 I↔N elementary 반응의 경우에는 entropy의 변화가 음의 값을 갖는 것을 볼 수 있다. 이는 I↔N elementary 반응이 아미노산의 side-chain이 단백질 내부에 고정되어지는 과정으로 side-chain의 자유도가 감소하기 때문이라고 생각할 수 있으며 이 과정에서 여러 noncovalent 결합의 생성으로 인하여 enthalpy도 음의 값을 갖게 되며 이 음의 enthalpy가 음의 entropy를 보상하여 I↔N elementary 반응이 정방향으로 진행되게 한다고 여겨진다. 이러한 각 elementary 반응에서의 enthalpy, entropy의 보상관계를 통하여서 ubiquitin의 overall 폴딩 반응은 음의 free energy를 갖게 되고 상온에서는 열역학적으로 안정한 native 상태가 우세한 상태를 유지하게 되는 것으로 여겨진다.

폴딩 반응 속도의 온도에 따른 변화. Fig. 4은 절대 온도의 역수에 속도상수에 logarithm을 취한 값을 그린 Arrhenius Plot ($\log k_{ij}$ vs. $1/T$)이다. Fig. 4A는 I↔N elementary reaction의 microscopic rate constant의 온도에 대한 변화를 나타내고 있으며 Fig. 4B는 수식 3에서 보여진 unfolded state에서 native state로의 transition의 외견상 관찰되는 속도인 λ_2 의 온도에 대한 변화를 보여준다. 먼저 특기할 만한 점은 λ_2 의 온도에 대한 변화는 Arrhenius 함수를 따르는 불룩한 곡선으로 나타나고 있다. 반면에 I↔N elementary reaction의 microscopic rate constant인 k_{IN} 과 k_{NI} 는 거의 직선에 가까웠다. Protein stability curve와 마찬가지로 microscopic rate constant도 ground state와 transition state 사이의 용액에 노출된 소수성 표면적의 변화에 의존하며 따라서 단백질 폴딩 반응의 ground state와 transition state도 비열의 차(ΔC_p^\ddagger)가 있게 된다. 이러한 ΔC_p^\ddagger 의 영향으로 protein stability curve가 곡선을 띠는 것과 마찬가지로 Arrhenius plot($\log k_{ij}$ vs. $1/T$)도 곡선을 띠고 있는 것이 chymotrypsin

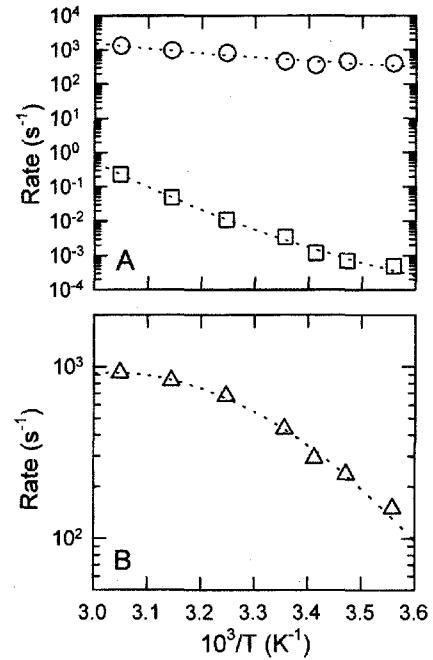


Fig. 4. Temperature dependent folding and unfolding rates. Panel A represent the temperature dependent rates for I→N (○) and N→I (□) transitions, respectively. Panel B represent the temperature dependent apparent folding rates (△) as a function of temperature. Dotted lines are drawn for visual aid.

inhibitor 2(CI2), cold shock protein B(CspB), T4 lysozyme의 온도에 따른 폴딩 kinetics 측정에서 관찰되었다.^{21,26,27} Protein stability curve의 fitting에서 보여 지듯이 이미 80% 이상의 소수성 표면이 단백질 내부에 위치한(U↔I elementary 반응) 이후에 일어나는 I↔N transition은 용액과 접촉하는 소수성 표면적의 변화가 작기 때문에(~20%) ΔC_p^\ddagger 의 절대값도 작을 것으로 여겨지며 k_{IN} 과 k_{NI} 의 Arrhenius plot은 거의 직선에 가까운 양상을 보인다고 할 수 있다. 불행히도 U↔I elementary 반응의 microscopic 속도 상수는 stopped-flow 기기의 한계 때문에 측정할 수 없었고 Fig. 4B에서 보듯이 unfolded 상태에서 intermediate 상태를 거쳐서 native 상태가 되는 overall 폴딩 반응에서 관찰되는 외견상의 속도 상수인 λ_2 의 경우 overall folding 반응의 주된 transition state(rate-limiting step)가 intermediate state 다음에 나타나므로 ΔC_p^\ddagger 의 절대값이 U↔I transition의 ΔC_p^\ddagger 의 절대값인 1.14 kcal/mol/K 이상의 값을 가질 것으로 기대되며 Fig. 4B에서 보듯이 λ_2 에 대한 Arrhenius plot이 k_{IN} , k_{NI} 의 Arrhenius plot보다 더 곡선을 띠게 되는 것으로 생각되어진다.

Ubiquitin 폴딩 intermediate의 구조적 특성. 비록 단백질 폴딩 kinetics 실험과 열역학적인 실험 결과를 통하여서 단백질의 삼차구조를 직접 밝힐 수는 없지만 폴딩 반응의 진행 경로에서 나타나는 intermediate가 갖는 구조적인 특성은 unfolded 상태와 native 상태 사이의 비열의 차이(ΔC_p), m-value 등을 통하여서 알아볼 수 있다. Ubiquitin 폴딩 반응의 중간 단계인 transient intermediate의 용액에 노출된 표면을 반영하는 ΔC_p , m_{UI} 값은 각각 unfolded 상태에 비하여 80%, 65% 정도 감소

한 것으로 나타났다. Thermal unfolding 실험으로 얻은 값(80%)과 kinetics 실험을 통하여 얻은 값(65%)이 차이를 보이는 것은 각 실험이 내포하고 있는 오차에 의한 것 뿐만 아니라 thermal unfolding 실험에서 얻은 값은 unfolded 상태와 native 상태의 hydrophobic surface의 변화를 반영한다고 할 수 있는 반면 kinetics 실험에 의하여 얻은 값은 hydrophobic surface와 hydrophilic surface를 모두 포함한 용액에 노출될 수 있는 모든 표면을 반영하기 때문에 나타난 차이로 생각된다. 어쨌든 unfolded 상태에서 intermediate 상태가 될 때 용액과 접촉하는 표면이 상당히 많이 감소한다는 점은 일치하고 있다. Unfolded 상태에서 intermediate 상태로 될 때 용액과 접촉하는 표면적이 상당히 줄어들었다는 점은 intermediate 상태가 native 상태에 매우 근접하여 용액에 노출된 표면(average exposed surface)이 매우 감소한 compact ensemble intermediate 상태를 이루고 있다는 것을 나타낸다. Ubiquitin 폴딩 반응의 초기에 형성되는 수소결합의 경향에 대하여 알아보기 위하여 Briggs와 Roder가 quenched-flow 수소교환실험을 실시한 결과가 있다.¹⁵⁾ 이 실험의 결과는 native 상태에서 수소결합을 이루고 있는 ubiquitin의 hydrophobic core residue의 amide proton들이 수소결합을 이루는 time constant(8 ms)는 본 stopped-flow 실험에서 관찰되는 첫번째 폴딩 phase의 time constant(5 ms)와 매우 유사한 값을 보였다. 따라서 주 폴딩 phase에서 native 수소결합이 일어나고 있음을 알 수 있다. 그런데 특이하게도 quenched-flow 수소교환실험에서는 stopped-flow 실험에서 관찰된 것과 같은 missing amplitude는 관찰되지 않았다. 이러한 관찰은 stopped-flow 기기의 dead-time(3 ms)에서 나타나는 조밀한(compact) 구조는 ubiquitin의 native 상태와 유사하나 backbone/backbone 또는 side-chain/backbone의 수소결합은 형성되어 있지 않거나 또는 약하게 형성되어 있어 쉽게 unfolding되는 구조로 생각할 수 있다. 즉 ubiquitin의 transient 폴딩 intermediate 상태의 내부는 hydrophobic group끼리 서로 접촉하고 있는 조밀한 상태이나 native 상태보다는 용액의 침투(solvent penetration)가 용이하여 수소교환이 빠르게 일어나는 것으로 생각되며 따라서 quenched-flow 기기의 dead-time에는 amide proton이 protection되지 않는다고 여겨진다. 이러한 구조는 Ptsin이 주장한 바 있는 dry molten globule과 유사한 상태로 여겨진다.²⁸⁾

결 론

Ubiquitin 폴딩 반응의 초기에 나타나는 transient 폴딩 intermediate의 열역학적인 특성을 여러 온도에서 폴딩 kinetics 측정을 통하여서 탐색하여 보았다. Ubiquitin 폴딩 반응의 transient intermediate는 unfolded 상태에서 용액과 접촉하고 있는 표면의 3분의 2 이상이 단백질의 내부에 위치하는 조밀한 구조를(compact ensemble intermediate) 이루고 있으며 이러한 점으로 보아 transient intermediate는 native 상태와 유사한 구조를 이루고 있을 것으로 사료되나 quenched-flow hydrogen exchange 실험의 결과와 비교하여 볼 때 backbone amide의 수소결합은 확고하게 형성되어 있지않은 loosely folded 상태인 것

으로 보인다. 본 실험에서 관찰되는 폴딩 intermediate는 stopped-flow 기기의 dead-time인 3 ms 이전에 형성되는 것으로서 이러한 관찰은 단백질이 매우 heterogeneous한 구조들이 매우 빠른 평형상태를 이루고 있는 random coil상태에서 유일한 native 상태로 되는 초기 단계에 거의 native 구조에 가까운 ensemble intermediate 형태가 형성된다는 것을 의미한다. 단백질의 삼차구조형성에 대한 정보가 단백질의 아미노산 서열인 일차구조에 저장되어있음은 이미 오래 전에 알려져 있다.¹⁾ 이 실험에서와 같이 폴딩 반응의 초기 단계에 native 구조에 가까운 형태가 형성된다는 것은 단백질의 아미노산 서열에 native 구조 형성에 대한 bias가 효과적으로 내재되어 있다는 것을 나타내어 준다.

감사의 글

본 논문은 부분적으로 과학재단 지역대학우수과학자지원사업(R05-2003-000-12064-0 (2003))의 연구비로 이루어진 것으로 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-229.
2. Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* **85**, 44-45.
3. Zwanzig, R., Szabo, A. and Bagchi, B. (1992) Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 20-22.
4. Elöve, G. A., Chaffotte, A. F., Roder, H. and Goldberg, M. E. (1992) Early steps in cytochrome c folding probed by time-resolved circular dichroism and fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* **31**, 6876-6883.
5. Khorasanizadeh, S., Peters, I. D. and Roder, H. (1996) Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nat. Struct. Biol.* **3**, 193-205.
6. Sauder, J. M., MacKenzie, N. E. and Roder, H. (1996) Kinetic mechanism of folding and unfolding of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome *c*₂. *Biochemistry* **35**, 16852-16862.
7. Park, S.-H., O'Neil, K. T. and Roder, H. (1997) An early intermediate in the folding reaction of the B1 domain of protein G contains a native-like core. *Biochemistry* **36**, 14277-14283.
8. Raschke, T. M. and Marqusee, S. (1997) The kinetic folding intermediate of ribonuclease H resembles the acid molten globule and partially unfolded molecules detected under native conditions. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 298-304.
9. Kern, G., Handel, T. and Marqusee, S. (1998) Characterization of a folding intermediate from HIV-1 ribonuclease H. *Protein Sci.* **7**, 2164-2174.
10. Kuwata, K., Shastry, R., Cheng, H., Hoshino, M., Batt, C. A., Goto, Y. and Roder, H. (2001) Structural and kinetic characterization of early folding events in beta-lactoglobulin. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 151-155.
11. Capaldi, A. P., Shastry, M. C., Kleantous, C., Roder, H. and

- Radford, S. E. (2001) Ultrarapid mixing experiments reveal that Im7 folds via an on-pathway intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 68-72.
12. Baldwin, R. L. (1996) On-pathway versus off-pathway folding intermediates. *Folding Des.* **1**, R1-R8.
13. Khorasanizadeh, S., Peters, I. D., Butt, T. R. and Roder, H. (1993) Stability and folding of a tryptophan-containing mutant of ubiquitin. *Biochemistry* **32**, 7054-7063.
14. Peterman, B. F. (1979) Measurement of the dead time of a fluorescence stopped-flow instrument. *Anal. Biochem.* **93**, 442-444.
15. Briggs, M. S. and Roder, H. (1992) Early hydrogen-bonding events in the folding reaction of ubiquitin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2017-2021.
16. Tanford, C. (1970) Protein denaturation. Part C. Theoretical models for the mechanism of denaturation. *Adv. Protein Chem.* **24**, 1-95.
17. Berberan-Santos, M. N. and Martinho, J. M. G. (1990) The integration of kinetic rate equations by matrix methods. *J. Chem. Edu.* **67**, 375-379.
18. Pogliani, L. and Terenzi, M. (1992) Matrix formulation of chemical reaction rates. *J. Chem. Edu.* **69**, 278-280.
19. Pace, C. N. (1975) The stability of globular proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **2**, 1-43.
20. Myers, J. K., Pace, C. N. and Scholtz, J. M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci.* **4**, 2138-2148.
21. Schindler, T. and Schmid, F. X. (1996) Thermodynamic properties of an extremely rapid protein folding reaction. *Biochemistry* **35**, 16833-16842.
22. Becktel, W. J. and Schellman, J. A. (1987) Protein stability curves. *Biopolymers* **26**, 1859-1877.
23. Schellman, J. A. (1987) The thermodynamic stability of proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **16**, 115-137.
24. Privalov, P. L. and Khechinashvili, N. N. (1974) A thermodynamic approach to the problem of stabilization of globular protein structure: a calorimetric study. *J. Mol. Biol.* **86**, 665-684.
25. Wintrode, P. L., Makhatazde, G. I. and Privalov, P. L. (1994) Thermodynamics of ubiquitin unfolding. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **18**, 246-253.
26. Chen, B., Baase, W. A. and Schellman, J. A. (1989) Low-temperature unfolding of a mutant of phage T4 lysozyme. 2. Kinetic investigations. *Biochemistry* **28**, 691-699.
27. Jackson, S. E. and Fersht, A. R. (1991) Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 2. Influence of proline isomerization on the folding kinetics and thermodynamic characterization of the transition state of folding. *Biochemistry* **30**, 10436-10443.
28. Ptitsyn, O. B. (1995) Molten globule and protein folding. *Adv. Protein Chem.* **47**, 83-229.

Thermodynamic Properties of Ubiquitin Folding Intermediate

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

Abstract: Thermodynamic properties of ubiquitin transient folding intermediate were studied by measuring folding kinetics in varying temperatures and denaturant concentrations. Through quantitative kinetic modeling, the equilibrium constant, hence folding free energy, between unfolded state and intermediate state in several different temperatures were calculated. Using these values, the thermodynamic parameters were estimated. The heat capacity change (ΔC_p) upon formation of folding intermediate from unfolded state were estimated to be around 80% of the overall folding reaction, indicating that ubiquitin folding intermediate is highly compact. At room temperature, the changes of enthalpy and entropy upon formation of the intermediate state were observed to be positive. The positive enthalpy change suggests that the breaking up of the highly ordered solvent structure surrounding hydrophobic side-chain upon formation of intermediate state. This positive enthalpy was compensated for by the positive entropy change of whole system so that formation of transient intermediate has negative free energy.

Key words: ubiquitin, folding intermediate, protein stability curve, ΔC_p , solvent accessible surface area

*Corresponding author