

용액상의 단백질 구조 분석을 위한 PLS 4C1빔라인의 성능 테스트

유청중‡ · 김제한‡ · 김광우 · 김경화 · 이흥수 · 이문호* · 김경진†

포항 가속기 연구소 빔라인부, 포항공과대학교, 포항, 790-784, 한국

*화학과, 포항공과대학교, 포항, 790-784, 한국

(논문접수일 : 2005년 6월 20일)

Performance Test of 4C1 Beamline for Protein Solution Scattering at the PLS

Chung-Jong Yu‡, Jehan Kim‡, Kwang-WooKim, Ghyung-Hwa Kim,
Heung-Soo Lee, Moonhor Ree*, Kyung-Jin Kim†

Beamline Division, Pohang Accelerator Laboratory, Pohang University of Science and Technology, Pohang, 790-784, Korea

*Department of Chemistry, Pohang University of Science and Technology, Pohang, 790-784, Korea

(Received June 20, 2005)

요 약

액상 x-선 소각산란법을 이용하여 단백질의 구조를 분석하였다. 사용한 단백질은 구조가 이미 알려진 Lysozyme과 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop) 그리고 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop)에 자유롭게 움직이는 고리를 가진 Bcl-XL(Δ TM)이다. Lysozyme와 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop)에 대한 소각산란결과는 단백질 결정학으로부터 알려진 분자구조에서 얻은 이론적인 결과와 농도에 의한 차이정도를 제외하고는 잘 일치하였다. Bcl-XL(Δ TM)의 경우는 단백질 결정산란 신호에서 볼 때 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop)와 차이가 없는 것으로 알려져 있으나, 소각산란에서는 뚜렷한 차이를 나타내는 결과를 얻어 loop와 같이 쉽게 움직이는 부분을 가진 단백질을 연구하는 경우 소각산란의 장점을 확인할 수 있었다. 위 실험을 통하여 포항 가속기 연구소 4C1 빔라인의 성능은 적어도 해상도 ~2.2 nm까지 용액상의 단백질 구조를 분석할 수 있다는 것을 확인하였다.

주제어 : Small Angle X-ray Scattering, Protein Structure, Protein Solution

Abstract

We tested performance of the 4C1 beamline for analyzing structures of proteins in solution using small angle X-ray scattering (SAXS) at the Pohang Light Source(PLS). Structurally well-known proteins such as lysozyme and Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop) were used for the study. Low resolution solution structures of lysozyme and Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop) were obtained at a resolution of at least 2.2 nm, and the structures were basically same as those calculated from the crystal structures of the proteins. We also used Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop) with a long flexible loop attached [Bcl-XL(TM)] and obtained significantly different data from Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop), although the electron density map of the loop is known to be invisible from the crystal structure of Bcl-XL(Δ TM). We confirm that SAXS experiment is a powerful tool for the structural study of proteins in solution and the 4C1 beamline at the PLS is well-equipped and suitable for the protein solution SAXS experiment.

Key Words : Small Angle X-ray Scattering, Protein Structure, Protein Solution

† E-mail : kkj@postech.ac.kr

‡ equally contributed

1. 서 론

현대생물학의 중요한 한 가지 주제는 단백질의 구조분석과 각 구조에 따른 역할을 규명하는 것이다. 이들 가운데 크기가 작은 단백질은 결정성장이 다소 용이하여 단백질 결정학 혹은 x-선 회절이 (diffraction)로 해석하는데 큰 문제는 없었다. 그러나 우리가 더욱 관심을 가지고 있는 생명체내의 중요한 기능을 담당하는 많은 단백질들이 거대 분자량을 가진 복합 단백질이기 때문에 결정성장이 용이하지 않아 단백질 결정학으로 해석할 수 없고 [1], 다른 대표적인 단백질 분석 도구인 핵자기 공명으로도 거대 복합 단백질에서 나타나는 신호에 대해 분해능이나 민감도가 충분하지 않으므로 [2], 위 단백질들의 구조분석에는 대체할 수 있는 분석 도구가 요구된다.

단백질결정성장이 용이하지 않을 경우, 쉽게 생각할 수 있는 한가지 방법은 각 단백질 분자를 서로에게서 충분히 멀리 있게 하여 각각의 입자들로부터 상호간섭하지 않는 신호를 증폭하여 얻는 것이다. 이 방법은 결정분석과는 달리 단백질 분자들의 밀도가 충분하지 않으므로 신호가 약하여 일반적으로 높은 세기의 x-선을 선호한다. 이러한 실험의 대표적인 예가 용액상의 단백질을 방사광 x-선 소각산란으로 분석하는 것이다. 소각산란은 극히 제한된 영역에서 나오는 신호를 받는 도구로서 복합 단백질의 자세한 구조는 볼 수 없지만 전체적인 모양에 대한 정보를 제공한다 [3,4]. 소각산란은 특히 용액 속에 있는 단백질의 구조를 분석할 수 있기 때문에 단백질 결정학과는 달리 단백질이 놓여 있는 환경에 따른 구조변화, 단백질의 결정화과정, 다른 단백질과의 상호작용등에 대한 밀그림을 제공할 수 있는 유용한 도구가 된다.

세계적인 소각산란 빔라인들은 최근까지 이 분야에 많은 발전을 이루어 왔고, 현재 이 빔라인들의 빔타입은 단백질구조 분석으로 50%정도를 할애하고 있다. 포항 방사광 가속기(PLS)는 건설 후 10년의 기간을 거치면서 상당히 안정된 방사광원을 공급하고 있으며 국제적으로 인정받는 다수의 논문을 발표하는데 기여해 왔다. 그러나 PLS의 소각산란 빔라인에서는 아직 용액상의 단백질분석에 대해

극히 제한된 시도만을 하여 세계적인 추세를 따르는데 미진한 부분이 있었다. 본 고에서는 포항 가속기 연구소 4C1 빔라인에서 위 실험들에 대한 가장 기본적인 단계인 용액상의 단백질분석을 성공적으로 수행함으로써, 국내에서도 방사광X-선 소각산란을 이용한 저분해능 단백질 구조분석이 가능하다는 것을 알리고자 한다.

실험 중에 사용한 시료는 박테리아 세포벽을 파괴하는 Lysozyme 과 세포사멸에 관계하는 Bcl-XL 관련 분자들이다. Lysozyme은 타원체와 흡사한 모양으로 온도나 습도 등의 외부 조건에 거의 영향을 받지 않아 표준 시료로 많이 쓰이고 알려진 자료들이 많이 있기 때문에 선택하였다. Bcl-XL는 대체로 타원체의 단단한 부위, 타원체에 양끝을 붙이고 자유롭게 움직일 수 있는 고리부분 (loop), 그리고 타원형에서 막대기처럼 튀어나온 hydrophobic 한 transmembrane(TM) 부분으로 나뉘어져 있다. TM 부분은 Bcl-XL를 물에 용해 시키기 위하여 제거하고 이 경우를 Δ TM이라고 부른다. Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop)는 Bcl-XL에서 TM과 loop를 제거한 단단한 타원체 부분을 의미하고 단백질 결정학으로 원자 단위까지 구조가 완전히 풀린 상태이다 [5].

Bcl-XL는 세포의 미토콘드리아 표면에 hydrophobic 한 부분(TM)이 결합되어 있으며 세포사멸이 일어나기 전에 세포사멸을 직접하는 (pro-apoptotic) 분자들을 붙들어 세포사멸을 억제하고(anti-apoptotic) 있다가 세포사멸 신호를 받으면 세포사멸을 직접하는 분자들을 놓아주는 기작을 가지고 있다. Bcl-XL에 대한 기초적 연구는 단백질 결정학에서 밝힐 수 없는 loop의 역할을 규명하고 세포사멸을 직접하는 분자들과의 결합연구에 많은 도움을 줄 것으로 기대한다. 본 고에서는 loop의 역할연구 시도로서 Bcl-XL(Δ TM)에 대한 소각산란결과를 보일 것이다.

2. 실험 방법

액상 소각 산란 실험에 사용한 x-선은 포항 방사광 가속기의 4C1 SAXS 빔라인으로부터 얻었으며, 그림 1에 개략도가 있다.

당 빔라인은 광학 장치로 에너지의 단색화를 위

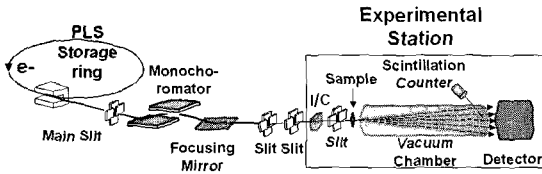


그림 1. 4C1 빔라인 장치 개략도

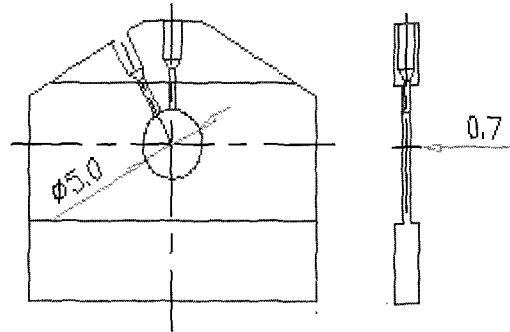


그림 2. 시료함의 개략도

표 1. : 4C1 빔라인 CCD검출기 성능

Model	MarCCD 165
Dynamic Range	16 bit
Spatial Resolution	80 μ m/pixel
Detector Diameter	165 mm
Efficiency	6e-/x-ray at 12keV
Readout Rate	3.5 sec
Dark Current	0.005 e-/pixel/sec

한 이중 다층 분광기(Monochromator)와 집속거울(Focusing Mirror) 그리고 3개소의 슬릿(Slit)으로 구성되어 있다. 소각 산란 실험 장치는 빔강도 측정 장치와 진공 챔버 그리고 이차원 x선 CCD (Charged Coupled Detector) 검출기로 구성되어 있으며, 표 1에 당 검출기의 성능을 보였다. 빔 강도 측정은 이온 챔버와 신틸레이션 계수기를 사용하였다.

실험에 사용한 x선 빔 사이즈는 1.0 mm (Horizontal) \times 0.8 mm (Vertical)로 조정하였고, 카메라 길이(Camera length)는 1 m로 하여 하였다. 산란 벡터 교정 (Scattering vector calibration)은 장주기 거리가 5.8376 nm로 알려진 표준 시료(Silver Behennate)를 사용하여 CCD 픽셀의 상대적인 위치에 따라 행하였다.

시료함(sample cell)은 시료가 균일 두께(0.7 mm)를 갖도록 10 μ m 두께의 mica 원도우를 사용하여 제작하였고, 시료의 양이 50 μ l가 되도록 원도우 크기를 결정하였다. 시료함의 개략도는 그림 2에 있다.

Lysozyme 은 물을 용매로 사용하였고, Bcl-XL (Δ TM/ Δ loop)와 Bcl-XL(Δ TM)은 30 mM TrisHCl, pH 8.0을 용매로 사용하였다. 결과 및 고찰에 보이는 자료들은 단백질이 있는 경우와 없는 경우를 각

각 측정하여 용매만의 산란신호는 제거한 상태이다. 데이터는 에너지 7.8keV, 시료-CCD간 길이 1 m setup에서 0.28 \AA^{-1} 까지 얻을 수 있었고 이것은 분해능이 ~ 2.2 nm($= 2\pi/2.8$ nm)임을 의미한다.

3. 결과 및 고찰

그림 3에 10 mg/ml Lysozyme에 대한 산란 세기 vs. q의 결과를 보였다. 여기서 q는 $4\pi/\lambda \sin\theta$, λ 는 x-선의 파장, θ 는 입사 x-선의 방향에서 산란되는 각도의 반이다. 소각산란 결과 (\square)에 겹쳐져 있는 실선은 SASHA fitting [6] 결과이다. 데이터 위의 점선은 Lysozyme의 결정구조를 이용하여 CRYSOLO 프로그램[6]으로 계산한 결과이다. q 구간 0.05~0.2 \AA^{-1} 의 데이터가 우리의 실험데이터보다 더 빨리 떨어지는 이유는 결정내의 Lysozyme의 분자구조와 용액 속에서의 분자구조가 정확히 일치하지는 않는다는 것을 의미한다. 이 두 가지 경우는 또한 용액상의 단백질 농도가 다른 경우로도 해석할 수 있고 농도가 다른 경우 소각산란 데이터가 일치하지 않는 것은 흔히 관측되는 현상이다 [7].

SASHA의 기본원리는 다음과 같다. 용액상의 단백질 형태는 구형적으로 평균 된 모습을 가지게 되기 때문에, spherical harmonics의 completeness에 의하여 서로 독립된 spherical harmonics의 선형결합으로 나타낼 수 있다. 그런데 SAXS데이터는 제한된 정보만을 제공하기 때문에 (자유도 = 단백질 크기 \times ($q_{\max} - q_{\min}$)/ π), 자유도 개수정도의 spherical harmonics를 결정할 수 있게 된다. Lysozyme의 경우 그 결과를 그림 3안에 PDB 데이터에서 제공하

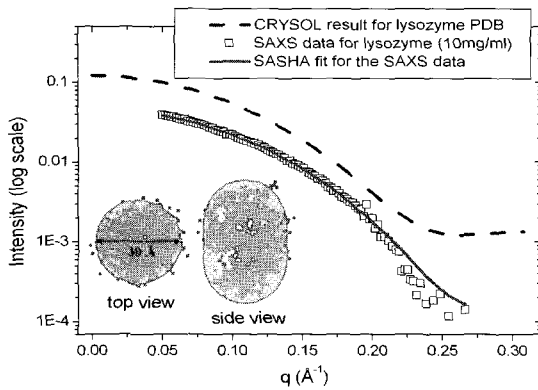


그림 3. Lysozyme (10 mg/ml) 에 대한 소각산란 결과 (□)와 SASHA를 이용한 최적 fitting 결과 (—). (---) 곡선은 Lysozyme의 PDB로부터 CRYSOLOG계산한 결과 (보기 쉬운 비교를 위하여 소각산란 결과(□)에서 위로 이동 하였다.) 소각산란 결과(□)의 아래 두개의 그림은 SASHA결과와 PDB자료를 겹쳐 보여 주고 있다. (자세한 내용은 본문 참고)

는 구조와 함께 나타내었다. 그림에서 쉽게 알 수 있듯이 SASHA의 결과는 상당히 비슷하게 원래 구조를 나타낸다고 볼 수 있다.

Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop)와 Bcl-XL(Δ TM)에 대한 소각산란 결과는 그림 4에 보였다. 단백질 결정학 으로는 자유롭게 움직일 수 있는 고리의 존재여부 는 데이터에 차이를 주지 않는다. 그러나 소각산란 결과는 그 차이를 뚜렷이 보이고 있다. 고리부분의 생물학적 역할이 정확히 규명되지 않은 상태이기 때문에 고리의 역할을 연구하고자 한다면 소각산란 은 아주 유용한 도구가 될 것이다.

그림 4내의 작은 그래프는 거리(r)에 따른 pair correlation function($P(r)$)을 보이고 있다. $P(r)$ 은 동일한 두개의 분자를 r 만큼 떨어뜨린 상태에서 겹 치는 부분의 전자밀도를 곱한 양과 비례한다. 그리고 $r=0$ 지점에 $P(r)$ 이 0이 되도록 하였다. 즉 $P(r)$ 은 (—)와 같은 형태가 일반적으로 나타나게 되는 것을 쉽게 이해할 수 있는데, 이 모양이 완전히 좌 우대칭 이라면 단백질이 구형인 것을 의미한다. 그리고 $r > r_0$ 일 때 $P(r)$ 이 0이 되는 것은 단백질의 전체 크기가 r_0 인 것을 의미한다. 이제 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop)와 Bcl-XL(Δ TM)의 $P(r)$ 을 비교하여 보면 Bcl-XL(Δ TM)은 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop)보다 2 nm정도 더

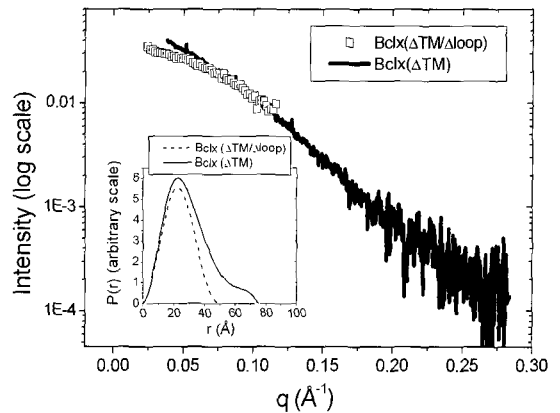


그림 4. Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop) (5 mg/ml)와 Bcl-XL(Δ TM) (5 mg/ml)에 대한 소각산란 결과: (□)는 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop)에 해당하고, (—)는 Bcl-XL(Δ TM)에 해당한다. 작은 그래프는 각각에 해당하는 $P(r)$ 을 나타낸다. ($P(r)$ 에 관한 내용은 본문 참조: (---)는 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop), (—)는 Bcl-XL(Δ TM)에 해당한다.

큰 것을 알 수 있고 이것은 자유롭게 움직일 수 있는 고리의 영향일 것이다.

4. 결 론

본 연구에서는 Lysozyme과 Bcl-XL(Δ TM/ Δ loop) 그리고 Bcl-XL(Δ TM) 단백질을 사용하여 PLS 4C1 빔라인에서 2.2 nm분해능으로 액상의 단백질 구조 를 분석할 수 있고, 단백질 고리(Loop) 같이 쉽게 움직이는 부분을 가진 단백질을 연구하는 경우, 소 각산란 법은 절대적인 필요성이 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과는 액상 단백질 연구에 대한 PAL 4C1 빔라인의 성능이 우수하다는 것을 보인다.

후 기

본 연구 수행에 필요한 단백질 정제를 도와준 권 수영과 최윤주에게 고마움을 전합니다.

참 고 문 헌

[1] D. I. Svergun, Biophys. J. **76**, 2879 (1999).
 [2] G. Wider, IEEE Trans. Appl. Supercon. **12**,

- 740 (2002).
- [3] R. Kato et al., *J. Mol. Biol.* **309**, 227 (2001). [6] M. H. J. Koch, P. Vachette, and D. I. Svergun, *Q. Rev. Biophys.* **36**, 147 (2003).
- [4] A. S. Meyer et al., *Cell* **113**, 369 (2003).
- [5] J. T. Opferman and S. J. Korsmeyer, *Nat. Immunol.* **4**, 410 (2003).
- [7] P. Vachette and D. Durand, unpublished.