

바이오칩을 위한 단백질의 2차원 결정화 기술

생물학적 거대분자의 2차원 결정화는 고해상도 전자현미경의 발전과 더불어 최근에 많이 연구되고 있다.^[1] 2차원 단위 면적당 분자 밀도를 임의로 조절할 수 있는 단백질 결정화 기술은 고기능의 바이오칩 및 바이오 센서를 구현하기 위한 필수 요소 기술이다.

단백질 2차원 결정화를 구현하기 위해 가장 이상적인 경우는 생체 내에서 결정화 된 단백질을 찾는 것이다. 잘 알려진 경우가 bacteriorhodopsin이다.^[2] 또다른 2차원 결정화 방법은 2차원 결정화를 유도하는 방법으로 단백질이 자연적으로 형성된 막 내에서 높은 농도로 발견될 때 일어난다. 그러한 경우 결정화는 (1) dimerization과 단분자들이 화학적으로 결합하도록 해주는 적은 양의 접착물질 첨가, (2) 막에서 지질의 양을 줄임을 통한 Phospholipase A2 처리 (3) 온도 전이를 통한 지질 상태의 전이는 결정화 유도 (4) detergents를 사용한 다른 membrane protein의 추출과 같은 방법으로 자발적으로 발생하거나 유도될 수 있다.^[3-6]

이외에도 용액 내에서의 재구성을 통한 결정화가 있는데 재구성을 통한 결정화는 현재까지 가장 많이 사용되고 있다. 실제로 대부분의 단백질들이 지질막에 대부분의 방법들이 detergent들을 첨가하여 정제되거나 발현될 수 있다. 그 중의 하나인 지질 단분자막 위에서의 결정화 방법에 대해서 알아보면, 이 방법은 최근에 막단백질을 결정화하는데 성공적으로 적용되었다.^[7] 이 방법은 결정화할 대상 단백질 수용액의 공기/물 계면에서 지질 막을 퍼뜨리는 방법이다. 이 방법에 대해서 좀 더 알아보도록 하자.

1. 지질막 상에서 단백질 결정화 방법

지질막은 희석되는 지질과 단백질과 결합하는 리간드 지질의 두 종류로 구성되어 있다. 리간드 지질과 단백질의 결합은 지질 아래에 단백질들이 즉각적으로 배열되도록 해준다. 높은 농도의 단백질은 리간드-단백질 복합체의 확산을 위해 2차원 결정화에서 매우 필요한 조건이다. 이 방법은 지질 표면을 파괴한다고 추측되는 detergent를 같이 첨가하기 때문에 수용성 단백질을 결정화할 시에만 사용된다. 그러나, 수용성 단백질을 위해 사용되는 전형적인 방법에 약간 수정을 가해서 막단백질도 결정화가 되도록 하였다. 그 방법은 막단백질과 재구성된 지질막과 detergent를 같이 녹여서 미리 형성된 기능성 단분자막 아래에 퍼뜨리는 것이다.

지질위에 막단백질 결정화 메커니즘은 1. 지질 표면상에 단백질 미셀 (micelle) 결

합 2. 지질막 위에 붙은 단백질 재구성 3. 2차원 결정화의 과정으로 구성된다.

(1) 지질 표면상에 단백질 미셀 결합

지질 표면상에 단백질 미셀이 결합되는 결합 단계에서 detergent의 존재 하에 단백질을 결정화시키기 위해 지질막을 개발하는 것이 주요 기술적 과제 중에 하나로 보고되고 있다.^[8] 이 단계에서 detergent는 단백질의 amphiphilicity를 유지시키기 위해 CMC (critical micelle concentration) 이상의 농도를 가져야 한다. 하지만 LB(Langmuir-Blodgett)를 이용하여 결합을 시킬 경우 detergent가 있는 계면 위에 지질막을 직접적으로 퍼지게 하면 표면 지질막이 즉각적으로 용해되기 때문에 어려운 것으로 증명되었다.^[9] 그러므로 detergent 없는 buffer용액의 방울 위에 표면 지질막이 먼저 형성되어야 한다. 그리고 그 다음에 미셀 형태의 단백질을 퍼뜨린다. 또한 단분자막 형성을 위해 10-20% 초과된 지질이 필요하다.

하지만 이러한 조건하에서도 detergent가 CMC 이상에서 주입되었을 때 지질막이 점진적으로 용해가 일어나는 것으로 보인다. 그러나 단백질과 같이 detergent를 같이 주입하면 지질막은 매우 안정적이며 용해는 일어나지 않는다. 이는 계면에서 단백질 미셀이 높은 농도로 결합하는 것과 관련되어 있다고 본다.

계면 막위에 형성된 구조는 전자현미경으로 잘 관찰할 수 있게끔 변형시켜도 안정적이다. 관찰해보면 수 십 μm 정도로 얇은 평면 구조가 나타난다. 고배율에서는 단백질이 결합한 것으로 확실히 여겨지는 단백질과 같은 구조가 이 막에서 충분히 보였다. 만약 단백질이 보일 정도로 클 때 결합한 미셀은 뾰뾰히 결합된 것으로 보인다. 그리고 어떤 경우에는 hexagonal 형태로 매우 밀도 높게 쌓이는 경우도 있다. 그러나 배양시간이 길다고 하여 이러한 단백질 미셀의 결합을 결정상태로 만들어주지는 않는다.

Dodecylmaltoside, Triton x-100 또는 다른 polyethyleneglycol과 같은 낮은 CMC를 가진 detergent를 사용한 결합의 효율이 중요하다. Octylglucoside나 bile salt 유도체와 같은 높은 CMC를 가진 detergent는 지질막을 빠르게 용해시키기 때문에 실패했다. 높은 CMC를 가진 detergent로 정제된 막단백질을 사용하기 위해 이 단점은 극복되어야한다. 이는 (1) 높은 CMC를 가진 detergent를 적절한 크로마토그래피 column을 사용하여 낮은 CMC를 가진 detergent로 바꾸는것이다. (2) 단순히 주입 과정에서 낮은 CMC를 가진 detergent로 희석하기 또는 (3) fluorinated chain으로 만들어진 새로운 형태의 지질 사용을 통해 극복할 수 있다.

(2) 지질막 위에 붙은 단백질 재구성

지질막에 결합된 단백질 미셀의 2차원 결정화는 전혀 관찰되지 못했었다. 이는 아마도 미셀에 포함된 막단백질 사이에 친수성 접촉부분을 만드는 것이 어렵기 때문일 것으로 추측된다.

그래서, 단백질-단백질 상호작용을 원활히 하려면 detergent가 제거되어야하고 이를 위해 amphiphilicity를 유지시키기 위해 이미 단백질과 결합한 지질 이중막을 재구성할 수 있다. Detergent제거는 Bio-beads SM2를 지질막 밑의 용액에 첨가함으로써 가능하다.

지질 이중층의 재구성은 상의 아래에 초기 단백질 미셀 용액에 첨가된 지질의 양과 큰 관련이 있다. 지질이 주입되기 전 용해된 단백질 용액에 첨가될 때 큰 지질막이 재구성될 수 있다. 그리고 detergent가 제거되기 전까지는 응집된 구조만을 볼 수 있다.

(3) 2차원 결정화

지질-detergent-단백질 미셀의 결합과 detergent의 완벽한 제거 후에 단백질이 재구성된 막과 접촉하여 2차원 결정화를 이룬다. 단백질의 성질 말고도 성공적인 단백질 결정화를 이루기 위한 중요한 변수는 지질과 단백질의 비율과 지질의 성질이다. 지질과 단백질 비율이 높으면 표면에서 커다란 재구성된 막을 얻는데 도움이 된다. 부피 상에서의 재구성은 지질-detergent와 지질-단백질-detergent 미셀을 모두 포함하는 반면에 후자는 기능성 지질 표면에 붙고 재구성 단계에 참여한다. 다른 변수는 온도, 점도, buffer의 조합에 관련된 요소이다. 그렇게 해서 얻어진 2차원 결정화의 질과 관련해 통상적으로 이용되는 벌크 방법보다 지질막을 이용한 방법이 매우 큰 결정화 영역을 얻을 수 있다. 그러나 재구성된 결정영역에서 높게 응집된 부분이 고분해능으로 보기에 너무 작다. 이런 지질막을 이용하는 방법의 어려움은 생성되는 구조의 결정성을 바꿀 수 있는 계면 막의 전이이다. 작은 크기는 계면과 그 전이에 방해되는 요소는 아니다. 더욱 발전된 방법은 결정연구가 표면에서 형성되는 2차원 결정 단백질의 제한된 성장의 연구에 있다. 제한 요소는 단백질이 재구성된 막에서 리간드 지질과 결합하여 결정을 형성하는데 제한을 준다.

2차원 결정에서 단백질의 조직화와 관련하여 모든 2차원 결정은 같은 방향으로 정렬된 지질막 방법을 쓴다. 그런 특이성은 단백질과 리간드 지질과의 특이적 결합으로 인해 일어난다. FhuA의 경우가 그 예이다.

이렇게 한 번 단백질이 리간드 지질과 결합하면 detergent는 단백질이 막 안으로 재구성될 수 있도록 제거된다. Detergent를 제거하기 위해 polystyrene beads, 희석, 투석 등의 방법이 사용된다.

2. 사용되는 조건

지금까지 지질막에서의 결정화 방법에 대해서 알아보았다. 결정화에 중요한 변수에 대해 알아보면 다음과 같다.

(1) 단백질

단백질은 그 자체로 정제와 정량에 있어서 중요한 제한 변수이다. 좋은 결정을 만들기 위해 잘 정제된 단백질이 필요하다.

높은 과포화 농도로 단백질을 빠르게 결정화시킬 수 있다. 불활성화는 단백질이 한가지 형태로 고정화되는 것을 방해할 수 있는데, 이것은 단백질에 대한 특정 저해제를 사용하면 해결된다. 응집과 관련하여 응집이 결정화를 도울 수 있다는 생각이 있는데 예를 들어 용액이 한가지 형태의 응집형태를 나타낸다면 이 응집형태는 온도와 같은 요소에 영향을 받아 결정으로 성장할 수 있다는 것이다.

(2) Detergent

detergent는 단백질 정제시 단백질이 삽입된 자연적인 지질막의 용해에 중요하다. detergent의 선택은 단백질 2차원 결정화에 중요하다. 두가지 detergent의 사용과 그 두가지의 비율은 2차원 결정화에 있어서 중요한 요소이다. 그 두가지로는 단백질에 효과적인 detergent와 지질에 효과적인 detergent를 동시에 사용하는 것을 생각해 볼 수 있다. 이것은 재구성 과정에서 단백질 주위의 지질에 대한 detergent의 대체 속도, 거대 구조 재구성과정에서 결정화에 도움이 되거나 방해가 될 수 있는 detergent의 성질, 결정화 과정에서 지질의 느린 추출 과정에 영향을 준다. 많은 연구에서 CMC가 큰 것과 작은 detergent를 혼합해서 사용했다. 두가지 detergent를 사용하는 것은 좋은 결정을 성장시키는데 있어서 좋다. 이는 두가지 작용을 한다 : 한 detergent는 지질에 작용을 하고 (추출과 확산) 그리고 다른 하나는 단백질의 보호와 그들의 상호작용을 돕는 것이다. 그리고 한가지 detergent보다 두가지를 혼합하여 사용하는 것이 좋다는 보고가 많이 있다.

두가지 detergent의 사용에 있어서의 초점은 단백질의 안정성과 혼합된 미셀의 확산에 영향을 있다. 단백질의 안정성을 위해서는 긴 acyl chain과 큰 머리부분을 가진 비이온성 detergent를 사용하는 것이 바람직하다. 그러나 긴 acyl chain과 큰 머리부분을 가진 detergent는 단백질이 재구성된 막과 상호작용 하는 것을 방해할 가능성이 크다. 그래서 확산과 성장을 위해서는 짧은 acyl chain과 작은 머리 부분을 가진 detergent가 적합하다.

그래서 최소 두가지 종류의 detergent를 사용하여 막 단백질의 구조적 안정성을 높여서 미셀이 재구성된 막으로 잘 확산되도록 해준다.

(3) 지질

대부분의 결정화는 자연적인 지질 내에서 더욱 쉽게 이루어진다. 그러나 더욱 효율적인 결과를 얻으려면 결정화에 효과적인 하나 또는 두개의 지질을 찾아서 batch 반응을 하는 것이 좋다. LPR (lipid to protein ratio)은 일반적으로 0.2와 1 (w:w)가 많이 사용된다. 결정화를 위해 요구되는 LPR에 영향을 주는 요소는 단백질의 소수성/친수성 비율이다. 예를 들어 높은 소수성/친수성 비율을 가진 단백질은 tube형태보다 sheet형태로 자라기 위해 더 큰 LPR비율이 요구된다. 초기 시작 LPR 농도를 낮추는 데는 detergent나 phospholipase A2를 자연 지질막내에 첨가하는 것이 좋다. 결정에서 발견되는 LPR은 초기 시작 값보다 낮다. 이는 두가지의 detergent 또는 phospholipase A2를 사용하였기 때문에 지질이 추출된 경우가 원인인 것이 많다.

또 다른 원인은 결정이 형성되고 성장하는 초기물질이나 응집물 또는 vesicle, sheet에서 sheet내에서의 단백질의 움직임 확보하고 재구성 되도록 하기 위해서 유동성이 필요하기 때문이다. 한 번 성장핵이 형성되면 단백질의 확산이 결정 성장에 좋게 도움이 된다. 과잉 지질은 detergent가 쉽게 제거할 수 있도록 바깥영역으로 밀려난다. 이 단계에서 단백질이 결정화가 잘되게 하도록 제거가 국지적으로 쉽게 일어난다.

(4) 완충용액

완충용액은 단백질의 용해도를 높이기 위해 직접적으로 반응한다. 이는 비록 다른 요소가 이상적이라고 할지라도 단백질이 각각의 완충용액마다 다르게 반응한다는 것을 의미한다.

PH와 관련하여 다음과 같은 사항을 기억해야한다. 1. pH의 변화는 무엇이든 단백질의 net charge를 변화시킨다. 2. pH가 용해도에 끼치는 영향은 낮은 이온 결합보다도 강하다. 3. 단백질의 pI에서는 그 net charge가 이온 결합 강도에 독립적이다.

(5) 온도

온도는 그렇게 중요한 변수로 여겨지지는 않는다. 그러나 크고 좋은 결정화를 이루기 위해 대부분 온도를 최적화 시켜 사용하고 있다.

지금까지 단백질의 결정화 방법과 조건에 대해서 알아보았다. 지질막을 이용한 단백질 결정화 방법은 최근 많이 연구가 되고 있으며 비단 LB막에서 뿐 만 아니라

자기 조립된 생체막을 통해서도 연구가 되고 있다.

현재 많은 연구실에서 단백질의 2차원 결정화에 대해서 연구하고 있다. 각 연구실에서 나온 많은 결과들을 서로 공유한다면 더 좋은 결정화 방법을 모색할 수 있을 것이다.

참고 문헌

1. Kimura, Y., Vassilyev, D.G., Miyazawa, a., Kidera, A., Matsushinma, M., Mitsuoka, K., Murata, K., Hirai, t., Fujiyoshi, Y., 1997. Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* 389, 206-211.
2. Mosser, G., 2001. Two-dimensional crystallogenesi s of transmembrane proteins. *Micron* 32, 517-540.
3. Buhle, E.L., Knox, B., Serpersu, E., Aebi, U., 1983. The structure of the Ca^{2+} -ATPase revealed y electron microscopy and image processing of ordered arrays. *Journal of Ultrastructure Reaserch* 85, 186-203.
4. Manella, C.A., 1984. Phospholipase-induced crystallization of channels in mitochondrial outer membranes. *Science* 224, 165-166.
5. Brisson, A., Unwin, P.N.T., 1984. Tubular crystals of acetlcholine receptor. *Journal of Cell Biology* 99, 1202-1211.
6. Zampighi, G., Unwin, P.N.T., 1979. Two forms of isolated gap junctions. *Journal of Molecular Biology* 135, 451-464.
7. Levy, D., Mosser, G., Lambert, O., Moeck, G.S., Bald, D., Rigaud, J.L., 1999. Two-Dimensional crystallization on Lipid Layer : A successful approach for membrane proteins. *Journal of Structural Biology* 127, 44-52.
8. Ringler, P., Muller, W., Ringsdorf, h., Brisson, A., 1997. Functionalized lipid tubules as tools for helical crystallization of proteins. *chemical European Journal* 3, 620-625.
9. Levy, D., Chami, M., Riguad, J.L. 2001. Two-dimensional crystallization of membrane proteins: the lipid layer strategy. *FEBS Letters* 504, 187-193.