

ORD 및 CD 를 이용한 단백질 및 Polypeptide 의 형태 분석 (Conformational Analysis of Proteins and Polypeptides by ORD and CD)

김 영 하*

1. 서 론

비대칭(asymmetric) 유기물의 광학적 활성을 이용한 분석은 유기물의 구조분석에 널리 이용되고 있다. 고유회전(specific rotation)의 측정으로써 그 물질의 순도가 결정되고 ORD(Optical Rotatory Dispersion) 및 CD(Circular Dichroism)를 측정하여 유기화합물의 절대적배열(absolute configuration)을 결정할 수 있다¹. ORD는 화합물이 선형편광면(plane of polarized light)을 회전시키는 능력을 파장의 함수로써 측정한 것이고 CD는 화합물의 좌선성(left-) 및 우선성 원형편광(right circular polarized light)에 대한 상이한 흡수도를 측정한 것이다.

단백질의 구성요소인 아미노산($\text{NH}_2\text{-CHR}^*\text{-COOH}$)은 glycine($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$)을 제외하고 모두 적어도 한 개의 비대칭 탄소원자(L-또는 D-configuration)을 소유하고 있으나 그 광학적 활성 및 이에 따르는 ORD, CD 데이터는 상대적으로 작다. 이에 반하여 단백질은 peptide 단위의 비대칭적이고 주기적인 공간배열 즉 고유의 형태(conformation)를 가지므로 이에 따른 고유한 ORD 및 CD 분광도를 나타낸다. 근래의 X-선회절분석의 발달은 효소등의 단백질의 완전한 3차원 구조의 결정이 가능하게 되었고² 이 밖에 중성자 회절³, NMR⁴, IR⁵도 구조 분석에 응용되고 있다. ORD 및 CD는 위의 방법들에 비하여 정확한 구조 분석 능력을 소유하지 못하지만 민감하여 극소량의 시료로써 분석이 가능하고 신속하게 단백질의 형태에 관한 정보를 얻을 수 있는 장점이 있다. 따라서 ORD 및 CD

는 고유의 형태를 가지는 생물고분자들 특히 단백질 및 핵산등의 구조 분석의 중요한 수단인 하나이며 광학적 활성이 변화하는 모든 반응 즉 단백질의 변성(denaturation), polypeptide의 형태전위(conformation transition), 효소와 기질의 상호작용 또는 금속이온 및 염료와 단백질의 결합등의 분석에 응용될 수 있다.

대체로 1965년경까지는 기술적인 제한으로 파장 240nm 이상에서의 ORD 측정만이 가능하여 Drude 혹은 Moffitt 공식을 이용한 분석⁶ 만이 이용되었으나 그 후 측정기구의 발달로 말미암아 UV-범위를 포함한 190-600nm 전 파장범위에서의 측정이 가능하여지고 따라서 chromophore의 흡수 파장 범위에서의 직접 측정으로 보다 확실한 정보를 얻을 수 있게 되었고 특히 CD 측정기구의 월등한 발달을 보였다⁷. 다음에 ORD 및 CD의 기본원리와 측정 및 분석, 단백질 구조분석에의 응용을 요약하였다.

2. ORD 및 CD의 기초이론

비대칭 유기화합물의 광학적 활성과 ORD 및 CD 현상에 대해서 여러 단행본^{8~10}에 자세히 서술되어 있으며 다음에 이를 요약하였다.

선형편광(linearly polarized light)은 우선성(right-) 및 좌선성 원형편광(left-circularly polarized light)의 vector 합으로 볼 수 있다(Fig. 1).

선형편광이 광학적 활성의 유기화합물로 진입하면 다음 두가지 현상이 일어난다.

1) ORD(Optical Rotatory Dispersion)

$$v_l \approx v_r$$

비대칭 물질 안에서의 좌선성(v_l) 및 우선성 원형편광의 전파속도(v_r)가 다르므로 각 상(phase)의 차이가 생기고 vector 합을 할 때에 편

* KIST, 합성수지 연구실 (Young Ha Kim, Plastics Laboratory, KIST, Seoul, Korea)

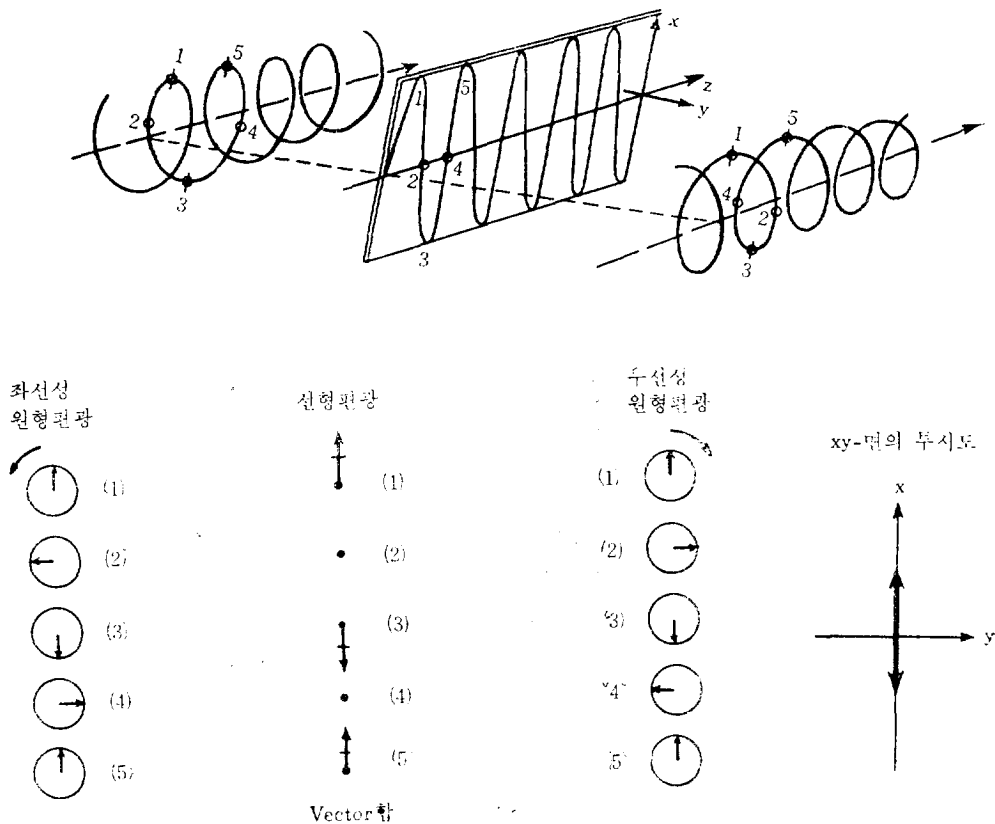


Figure 1. 선형편광과 원형편광

광면이 회전된다. (Fig. 2) 이것을 광회전 (optical rotation)라 하며 관용적으로 시계방향의 광회전을 +, 시계의 반대방향을 -로 명명하고 있다. ORD는 이 광회전을 파장, λ 에 대한 함수로써 측정된 것으로서 분자가 흡수하지 않는 파장범위에서는 ORD가 완만한 곡선 (plain curve)을 나타내지만 흡수범위에서는 ORD곡선이 한 방향으로 급증한 후 격감하여 0이 된 후 다시 반대방향으로 급증하는 이상곡선을 나타내는데 이러한 이상 효과를 Cotton-effect라 부른다 (Fig. 4 참조).

2) CD (Circular Dichroism)

$$\epsilon_l \neq \epsilon_r$$

Cotton-effect를 나타내는 파장범위에서는 광학적 활성물질의 좌선성 (ϵ_l) 및 우선성 원형편광에 대한 흡수계수 (ϵ_l , ϵ_r , extinction coefficient)가 같지 않다. 이러한 현상을 CD라 하며 결과적으로

로 vector 합성시에 타원형 편광 (elliptically polarized light)을 형성한다 (Fig. 3).

기계에 따라 흡수도의 차이 (differential dichroic absorbance $A_e - A_r$)가 직접 측정되거나 ellipticity, θ_λ 가 측정되는데 θ_λ 는 다음과 같이 정의된다.

$$\tan \theta_\lambda = \frac{\text{타원형 편광의 短軸}}{\text{타원형 편광의 長軸}}$$

따라서 θ_λ 는 $\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r$ 에 비례한다.

Fig. 4는 흡수, ORD, CD를 종합적으로 도시하였다. ORD 및 CD는 같은 분자 내 전자 배열에서 출발된 광학 현상이므로 서로 상관되어 있고 Kronig-Kramer식에 의하여 서로 이론적으로 산출할 수 있다^{8a}. CD는 ORD에 비하여 Cotton-effect의 부호를 직접 나타내어 주고 흡수밴드가 단일하며 그 peak의 넓이가 한정되어 분석이 용이하므로 근래에는 CD가 주로 사용되

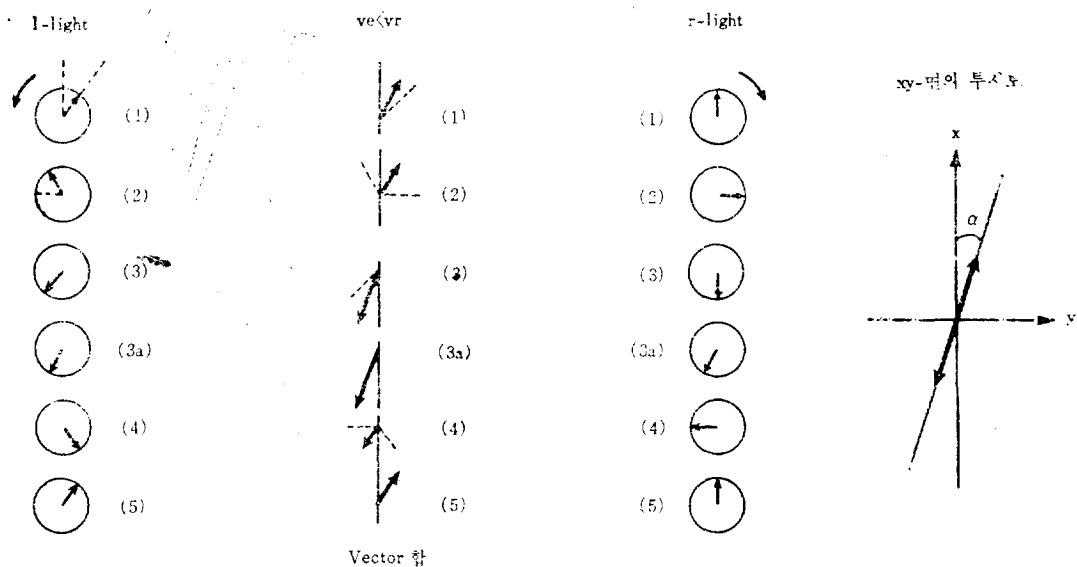


Figure 2. 광회전 (Optical rotation)

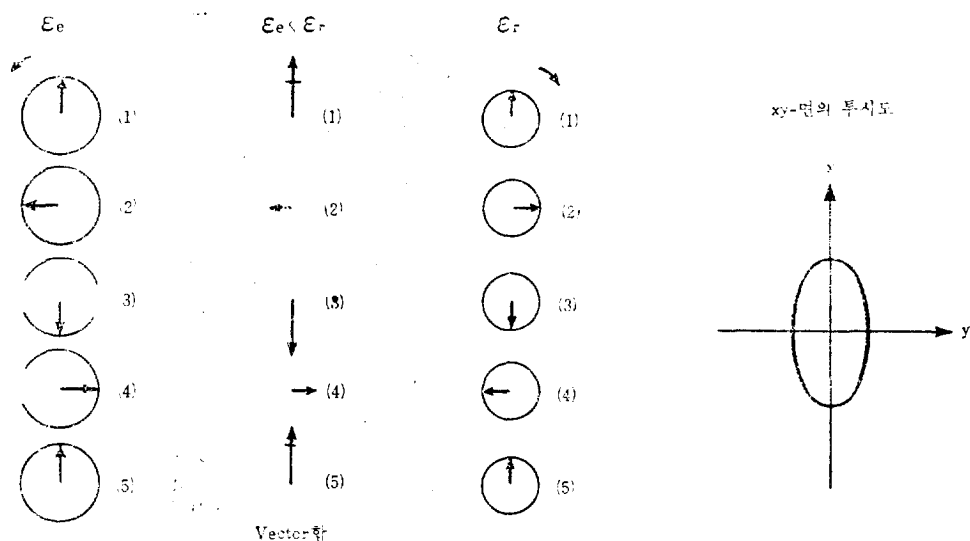


Figure 3. CD 현상

며 ORD는 이에 보완적으로 쓰이고 있다.

3. 실제 측정법

ORD 및 CD의 실질적인 측정에 관하여 여러
폴리머 제3권 제2호 1979년 3월

곳에 상세히 기술되어 있으므로^{6,7,11,12} 여기에서
는 그 요점만 요약하겠다.

시료는 보통 水溶液을 사용하나 필름도 이용
할 수 있다. 光源으로 Xe-아크등을 쓰는데 측정

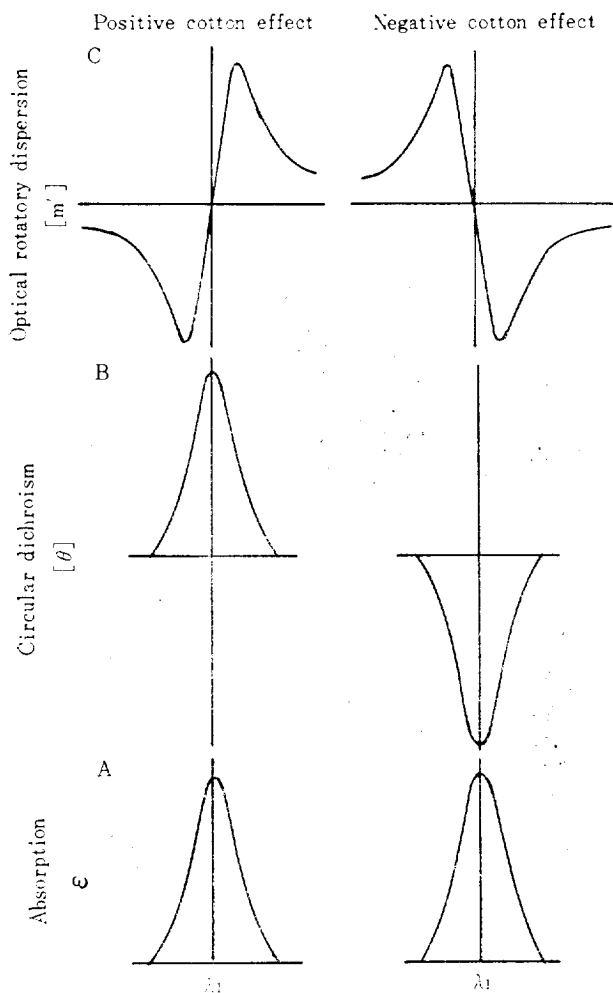


Figure 4. 흡수(A), CD(B), ORD(C)의 상관 관계

에 가장 중요한 것은 충분한 빛의 통과량이다. 특히 短파장 범위에서는 빛의 강도가 약화되고 측정기구 및 용매에 의한 흡수가 증가하므로 주의해야 하며 산소의 광흡수를 막기 위하여 질소를 流通시켜야 한다. 용매로는 물 이외에 trifluoroethanol, hexafluoroisopropanol, methane sulfonic acid, trimethylphosphate 등이 가능하며 유기용매는 흡수 범위에 따라 사용할 수 있는 파장범위가 한정된다. 또한 불화염(fluoride) 및 과염소산염을 제외한 일반 염용액은 短파장범위의 빛을 흡수하므로 주의할 요한다. 시료의 농도는 185~240nm에서의 측정에서는 0.01~0.1%로서 0.1~1mm cell을 이용하지만 240nm 이상에서는

보다 높은 농도나 긴 cell을 필요로 한다. 보통 단백질이나 polypeptide는 진공건조후에도 상당량의 물을 포함하고 있으므로 정확한 농도의 측정을 위해서는 Nessler micro-Kjeldahl 분석¹³이나 biuret¹⁴, Lowry¹⁵ 또는 ninhydrin¹⁶ 발색분석(colorimetry)에 의하여 결정하여야 한다.

또한 침전물이나 불순물에 의한 빛의 산란을 막기 위하여 시료의 여과가 필수적이며 측정시마다 순수한 용매에 의한 측정치(blank test)를 용액의 측정치로부터 감해야 한다.

정확한 측정을 위하여서는 위에 적은 시료의 농도, 용매의 선택, 측정 cell의 길이등을 조절함이 필요하며 225nm 이하의 UV 범위에서의 측정 및 방향성 결가지(side chain)를 가진 물질에 대해서는 특히 중요하다.

현재 널리 쓰이고 있는 분광편광계(spectropolarimeter)로는 Cary(Varian 회사), Jasco(Japan Spec 회사)와 Jouan(불란서 Jouan 회사)이 대표적이며 ORD 및 CD를 겸용할 수 있는 형이 보통이다. 측정 cell은 원통형의 석영제품으로서 일정한 온도 유지를 위한 순환수 jacket이 원칙적으로 부착되어야 한다. 분광편광계의 보정(calibration)물질로는 ORD의 경우 0.25% N. B. S. Sucrose 용액¹⁷으로서 충분하나 CD는 0.1% α -10-camphorsulfuric acid의 290nm에서의 ellipticity를 사용하지만 이 물질의 순도에 문제가 있어 정확한 ORD 측정을 바탕으로 $[\theta]_{290}/[M]_{306}=1.76$ 과 $[\theta]_{290}/[M]_{270}=-1.37$ 의 계산치¹⁸를 사용하기도 한다.

4. 측정치의 계산

유기화합물의 광학적 활성에는 다음 몇가지 정의가 사용된다.

ORD : 광회전의 측정치가 도(degree)로 표시된다.

1) 고유회전(Specific Rotation), $[\alpha]_T^T$

$$[\alpha]_T^T = \frac{\alpha_{\text{obs}} \times 100}{d \cdot c}$$

T : 온도

λ : 파장

α_{obs} : 관측된 광회전, 도(degree), (용액

의 측정치—순수용매의 측정치)

d : 측정 cell의 빛의 통과거리 즉 cell의 두께, dm

c : 농도, gr/100ml. 필름의 경우는 $c = \text{gr}/\text{cm}^2$, d 는 불필요하다.

이 고유회전은 시료의 純度 측정, Drude식의 이용에 쓰인다.

2) 분자회전 (Molar Rotation), $[M]_\lambda$

$$[M]_\lambda = \frac{M\omega}{100} \cdot [\alpha]_\lambda = \frac{\alpha_{\text{obs}} \times 10}{c' \cdot d}$$

M_ω : 분자량

c' : 몰농도, mol/l

3) 단위회전 (Residue Rotation), $[m]_\lambda$

고분자량의 단백질이나 polypeptide에 대해서

는 통상의 M_ω 대신에 그 구성단위 $-\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{C}}}-\text{CHR}$ —N—의 분자량 $M_{R\omega}$ 을 사용한다. 이때에 아미노산의 조성이 알려져 있으면 $M_{R\omega}$ 의 산출이 가능하고 그렇지 않으면 아미노산 분자량의 평균치인 115를 이용한다.

$$[m]_\lambda = \frac{M_{R\omega} \cdot [\alpha]_\lambda}{100} = \frac{\alpha_{\text{obs}} \times 10}{c' \cdot d}$$

$M_{R\omega}$: 평균단위 분자량 (mean residue weight)

4) Reduced Molar and Residue rotation, $[m']_\lambda$

광회전 능력은 물질의 굴절율의 함수이므로 서로 다른 용액 중에서의 광회전을 비교할 때에는 진공에서의 값으로 환산하여야 하며 이에선 Lorentz 환산식, $3/(n^2+2)$ 을 사용한다. n 은 파장 λ 에서의 굴절율이며 여러 용매 및 염용액의 n 은 도표¹¹에서 찾을 수 있고 또한 Sellmeier 식, $n^2 = 1 + \frac{a\lambda^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2}$ 을 이용하여 두 파장에서의 측정을 통하여 a 및 λ_0 를 결정하고 이를 이용하면 n 을 근사적으로 계산할 수 있다.

$$[m']_\lambda = [m]_\lambda \cdot \frac{3}{n^2+2}$$

CD: 기체에 따라 흡수도의 차이가 직접 측정되거나 ellipticity, θ 로 측정된다.

1) Molar 또는 Residue ellipticity, $[\theta]_\lambda$

$$[\theta]_\lambda = \frac{\theta_{\text{obs}} \times M_\omega (M_{R\omega})}{c' \cdot d \cdot 100} = \frac{\theta_{\text{obs}} \times 10}{c' \cdot d}$$

θ_{obs} : 측정된 ellipticity, 도 (degree)

c' : 농도, g/ml

d : 측정, cell의 두께, dm

c' : 몰농도, mol/l

$[\theta]_\lambda$ 의 단위는 $\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{decimol}$ 이다.

2) Reduced Molar 또는 Residue Ellipticity, $[\theta']_\lambda$

보통 CD에 있어서는 ORD처럼 Lorentz의 환산치를 사용하지 않지만 다른 용액에서의 관측치를 비교할 때에는 유용하다.

$$[\theta']_\lambda = [\theta]_\lambda \times \frac{3}{n^2+2}$$

3) 흡수도의 차이 $A_l - A_r$ 이 직접 측정될 때 $A = \epsilon \cdot c' \cdot l$ 이므로

$$\Delta\epsilon = \epsilon_l - \epsilon_r = \frac{A_l - A_r}{c' \cdot l}$$

l : cell의 두께, cm

$[\theta] = 3300(\epsilon_l - \epsilon_r)$ 의 관계가 성립되고 $\theta_{\text{obs}} = 33(A_l - A_r)$ 이 성립된다.

5. 단백질의 형태 (Conformation)와

ORD 및 CD

단백질은 고유한 아미노산의 조성 (composition)과 배열 (sequence) (1차구조, primary structure라 부름)을 가지며 peptide 단위 ($-\text{CO}-\text{NH}-$)는 分子內 수소결합을 통하여 주기적인 α -helix 구조 또는 分子間 수소결합을 통한 β -구조 (β -pleated sheet) 및 proline-helix 등의 규칙적인 소위 2차구조 (secondary st.)를 형성한다. 이러한 2차구조의 단위들이 공간적으로 배열되어 고유의 섬유상 (fibrous) 또는 球形 (globular) 단백질을 형성하며 (3차구조, tertiary st.) 이들의 집합체로서 고유의 기능을 소유하는 Virus, 효소등을 4차구조 (quaternary st.)라 칭한다. 단백질의 2차 및 3차구조를 합하여 형태로 정의되는데 이 형태는 아미노산의 조성 및 배열에 따라 결정되며 peptide 단위 ($-\text{CO}-\text{NH}-$)의 평면 trans의 입체적 특성에 imino 산 (proline) 및 결가지 ($-\text{CO}-\text{CHR}-\text{NH}-$ 의 R)의 영향과 수소결합, 이온간의 상호작용, 소수 (hydrophobic) 및 극성상호작용에 의한 영향이

근본적인 요소로서 형태는 외부조건 즉 pH, 온도, 상대 이온의 종류 및 농도, 유기용매등의 영향을 받는다.

위와 같이 단백질의 3 차구조는 2 차구조들 (α , β , 부정형, prolin helix)의 집합체로서 그 구성 아미노산의 조성 및 배열에 따라 2 차구조들의 구성비가 상이한데 반하여 아미노산의 homopolymer 인 poly- α -amino acid 및 공중합체인 polypeptide는 아미노산의 종류에 따라 일정한 2 차구조를 나타낼 뿐이고 3 차구조를 형성치 않으므로 여러 연구에 단백질의 표본물질로 이용되고 있다¹⁹. 특히 아미노산 N-carboxyanhydride(NCA)의 중합으로 얻어지는 poly- α -amino acid의 형태는 아미노산 종류에 따라 α -helix 및 β -구조를 형성하며²⁰ 외부조건 즉 온도나 pH 등의 변화로 이러한 규칙적 구조가 파괴되어 부정형(random, unordered structure)을 이룬다. 따

라서 이러한 2 차구조의 poly- α -amino acid를 ORD 및 CD에 적용한 이후 측정 분석에 커다란 발전을 가져 왔으며 단백질의 변성화(denaturation)를 형태전위(conformation transition)로 설명하게 되었고 기타 여러가지 분석에 응용할 수 있게 되었다. 다음에 ORD 및 CD를 이용한 2 차구조 분석을 예시하겠다.

1) ORD

초기에 ORD 측정은 可視 및 近자외선 파장범위(visible and near UV)에 국한되어 Cotton-effect를 직접 관측할 수 없었고 plain curve를 Drude 식²¹ 및 Moffit 식²²을 이용하여 분석이 가능하였었다.

$$\text{Drude 식} : [\alpha]_{\lambda} = \frac{k}{\lambda^2 - \lambda_c^2}$$

k : 상수

λ_c : 광학적 활성의 전자전위가 일어나는 평균파장

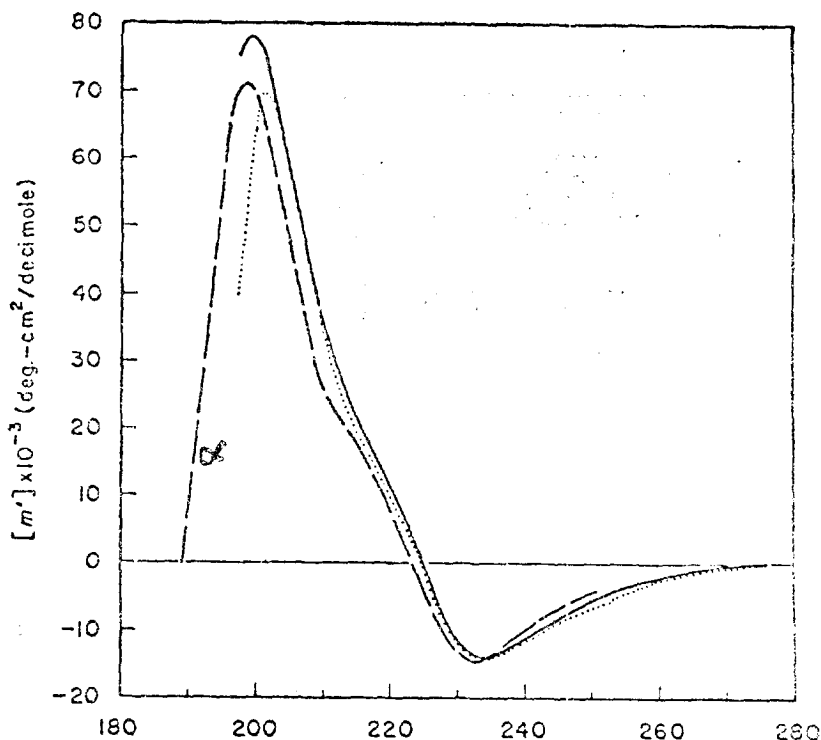


Figure 5 : The optical rotatory dispersion of the α -helix in various polypeptides: Poly-L-glutamic acid in water:dioxane, 1 : 1, — [from E. Iizuka and J. T. Yang, *Biochemistry* **4**, 1249 (1965)]. Poly-L-lysine in water, pH 11.0, [from N. J. Greenfield, B. Davidson, and G. D. Fasman, *Biochemistry* **6**, 1630 (1967)]. Poly-[N^5 -(2-hydroxyethyl)-L-glutamine] in methanol: water, 8:2, [from A. J. Adler, R. Hoving, J. Potter, M. Wells, and G. D. Fasman, *J. Amer. Chem. Soc.* **90**, 4736 (1968)].

이 식은 적은 helix%의 단백질이나 polypeptide에 일치하며 λ_c 는 약 40%의 helix%까지는 helix%에 비례하는 것으로 알려져 있다²³.

$$\text{Moffitt 식 : } [m']_{\lambda} = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2}$$

a_0 , b_0 , λ_0 는 상수이다. λ_0 는 polypeptide의 흡수밴드의 위치로서 통상 212nm를 취하고 있다. a_0 가 polypeptide의 결가치 및 용매의 함수인데 반하여 b_0 는 이에 무관하며 polypeptide의 helix%에 비례한다. 많은 우선성 α -helix 구조의 polypeptide의 $b_0 = -630$ 이며 부정형에 대해서는 $b_0 = 0$ 이므로 $b_0 / -630 = \alpha$ -helix%로 나타낼 수 있다. 이 b_0 를 Moffitt-Yang parameter라 부르며 $[m']_{\lambda} \cdot (\lambda^2 - \lambda_0^2)$ 을 $1/(\lambda^2 - \lambda_0^2)$ 에 대하여 그 라프 도시(plot)한 기울기(slope)로부터 얻을 수 있다. 이 Moffitt 식을 이용한 분석법은 실제와 근사하여 좋은 결과를 얻을 수 있으나 단점은 β -구조를 무시한 데에 있고 이에 따른 오차를

피할 수 없다.

측정기구의 발달로 UV 파장범위 즉 polypeptide의 흡수범위에서의 Cotton-effect를 직접 측정할 수 있게 되었다. 아래의 각 형태의 여러 polypeptide의 ORD를 도식하였다. Fig. 5에 나타난 α -helix의 ORD는 polypeptide의 종류에 따라 약간의 차이가 있으나 전체적으로 233nm에서 골(trough)을 200nm 근처에서 강한 정상(peak)을 나타낸다. Fig. 6에 나타난 β -구조의 경우는 차이가 더욱 크며 poly-L-lysine의 경우 230nm와 205nm에서 각각 골과 정상을 나타낸다. Fig. 7에 나타난 부정형 polypeptide의 ORD는 밴드의 강도의 차이가 있지만 205nm의 골의 위치는 거의 동일하다. 따라서 관측된 ORD카브의 형상 및 밴드의 위치로부터 polypeptide의 2차구조를 결정할 수 있고 한 파장에서의 $[m']$, 보통 $[m']_{233}$ 을 반응조건의 함수로써 추적하면 형태의 전위, helix%를 결정할 수 있는

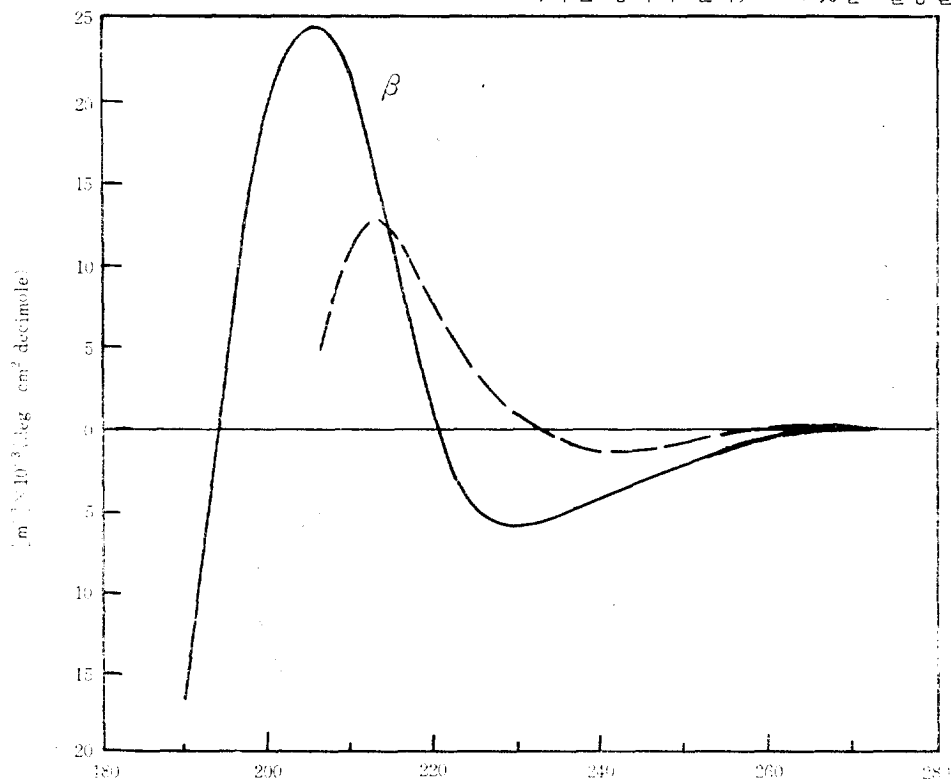


Figure 6. The optical rotatory dispersion of the β form of various polypeptides: Poly-L-lysine in water, pH 11, — [from N. J. Greenfield, B. Davidson, and G. D. Fasman, *Biochemistry* 6, 1630 (1967)]. Poly-S-carboxymethyl-L-cysteine in water, pH 4.25, [from S. Ikeda and G. D. Fasman, *J. Mol. Biol.* 30, 491 (1967)].

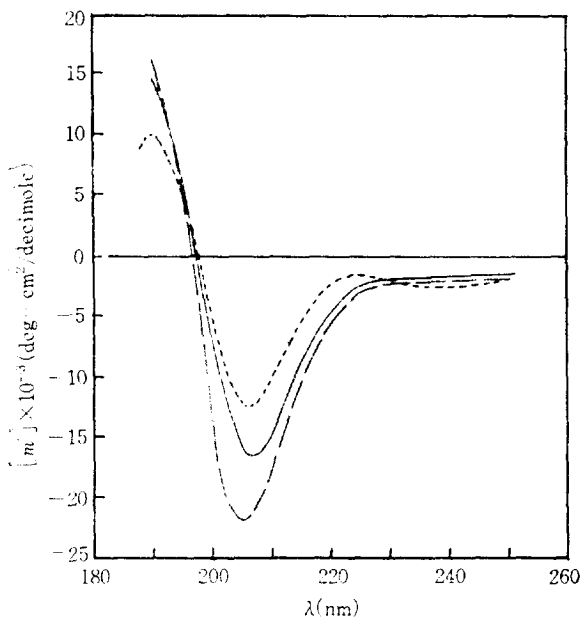


Figure 7. The optical rotatory dispersion of the random coil form of various polypeptides: Poly-L-glutamic acid in water, pH 7.3, — [from E. Iizuka and J. T. Yang, *Biochemistry* 4, 1249 (1965)]. Poly-L-lysine in water, pH 4.7–5.0, [from N. J. Greenfield, B. Davidson, and G. D. Fasman, *Biochemistry* 6, 1630 (1967)]. Poly-[N⁵-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine] in water, [from A. J. Adler, R. Hoving, J. Potter, M. Wells, and G. D. Fasman, *J. Amer. Chem. Soc.* 90, 4736 (1968)].

테 Fig. 8에 예를 실었다.

$$\text{helix \%} = \frac{[m']_{233, \text{obs}} - [m']_{233, r}}{[m']_{233, h} - [m']_{233, r}}$$

여기에서 $[m']_{233, r}$, $[m']_{233, h}$ 는 각각 부정형 및 helix 형태의 $[m']_{233}$ 값이다.

2) CD

CD의 ORD에 대한 장점은 앞에 서술한 바와 같이 그 밴드의 분석이 보다 용이하므로 현금은 UV 범위에서의 CD 측정이 추가 되고 있으며 UV 범위에서 광흡수가 큰 시료 및 용액에 대하여 長파장에서의 ORD를 보완적으로 쓰고 있는 형편이다. ORD에서와 마찬가지로 여러가지 2차구조의 CD 카브의 모양은 서로 다르며 Fig. 9에 α -helix 구조의 polypeptide의 CD를 도시

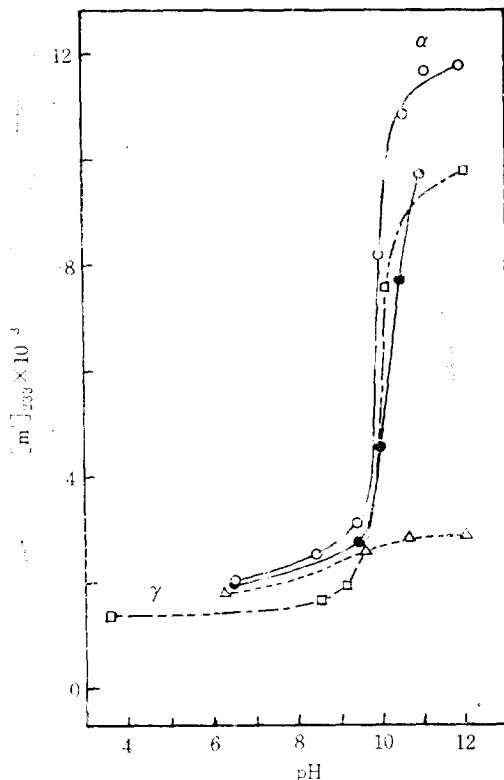


Figure 8. pH dependence of $[m']_{233}$ of poly- α -amino acids in aqueous solutions: $\circ$, poly-L-lysine (160); $\bullet$, poly-L-lysine (46); $\square$, poly-L-ornithine (190); $\triangle$, poly(L- α , γ -diaminobutyric acid) (110). [from M. Hatano and M. Yoneyama, *J. Am Chem. Soc.*, 92, 1392(1970)].

하였다. 약간의 차이가 있으나 222nm와 208nm에 전형적인 二重골(double minima)이 위치하고 190nm 근처에 강한 정점을 나타낸다. 190nm 근처의 밴드는 peptide 단위의 $\pi-\pi^*$ 전자전위에 해당하며 산소, 용액 및 염의 광흡수로 측정시 관측되지 못하는 경우가 있으며 208nm, 222nm의 밴드는 $n-\pi^*$ 전위로부터 기인한다. CD 측정이 가능한 수용성 β -구조의 polypeptide 획득은 CD 발전의 중요한 계기가 되었는데 poly-L-lysine의 알칼리 수용액을 가열하여 비로써 얻을 수 있었다^{25~28}. poly-L-lysine은 계면활성제(Sodium dodecyl sulfate)의 용액에서도 β -구조를 이루지만 그 밴드의 강도(intensity)가 보다 작다. β -구조의 CD는 ORD에서와 마찬가지로

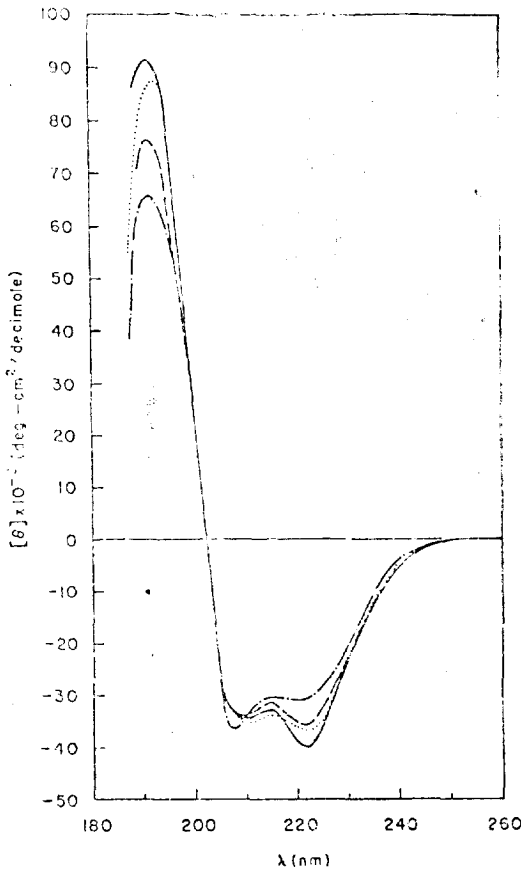


Figure 9. The circular dichroism of the α -helix in various polypeptides: Poly-L-glutamic acid in water, pH 4.4 — [from G. M. Holzwarth and P. Doty, *J. Amer. Chem. Soc.*, **87**, 218 (1965)]. Poly-L-lysine in water, pH 11.0, [from R. Townsend, T. F. Kumosinski, S. N. Timasheff, G. D. Fasman, and B. Davidson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 163 (1966)]. Poly-[N⁵-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine] in methanol: water, 8:2, (G. D. Fasman, unpublished data). Poly-L-alanine in trifluoroethanol:trifluoroacetic acid, 98: 5:1.5, - - - - - [from F. Quadrioglio and D. W. Urry, *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 2755 (1968)].

polypeptide에 따라 차이가 많은데 이것은 가능한 β -구조의 다양성 즉 분자간 수소결합에 의한 parallel 및 antiparallel β -구조 및 분자내 수소결합에 의한 antiparallel cross β -구조들이 가능하기 때문으로 풀이되고 있으며 아직 이 3가지

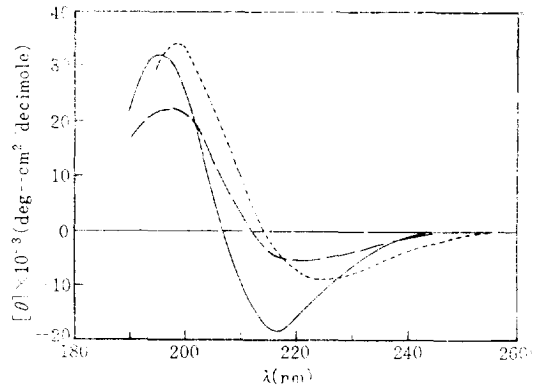


Figure 10. The circular dichroism of the β form of various polypeptides: Poly-L-lysine in water, pH 11, — [from N. J. Greenfield and G. D. Fasman, *Biochemistry* **8**, 4108 (1969)]. Poly-L-Serine in water, [from F. Quadrioglio and D. W. Urry, *J. Amer. Chem. Soc.* **90**, 2760 (1968)]. Poly-S-carboxymethyl-L-cysteine in water, pH 4.3, - - - - - (G. D. Fasman, unpublished data).

β -구조에 대한 ORD 및 CD의 구별은 성공되지 않고 있다. β -구조의 CD는 217-223nm에 골이 위치하고 200nm 근처에 정점이 위치한다. (Fig. 10 Fig. 11)에 표시된 부정형의 polypeptide의 CD는 현재에도 미해결된 문제로서 여기에 두가지 상반된 의견이 대립되고 있다. 즉 전하를 띄고 있는 결가지의 polypeptide 등에서 얻어지는 카브A는 218nm 근처에서 약한 정점을 200nm에서 강한 골을 가리키며 초기에는 이 카브가 부정형 polypeptide에 해당하는 것으로 생각하였으나²⁹ 그 후 Tiffany와 Krimm은 이에 반론을 제기하고 부정형이 아닌 전개된 helix (extended helix)로 규정하고 부정형의 polypeptide는 진한 염용액에서 얻을 수 있다고 주장하였다.

이 CD는 단지 200nm 근처에서 골을 나타낸다. (카브B) 그 후 수많은 논문이 이 문제 즉 부정형-전개된 helix를 각각도로 취급하였으나 결론을 짓지 못하고 있다. 좌선성 3_1 -helix의 polyproline II-helix 및 poly-Ala-Gly-Gly의 CD가 카브A를 나타내는 점과 변성화된 단백질(따라서 부정형으로 간주됨)이 카브B를 나타내는 점³⁰이 이론적 뒷받침³¹과 함께 전개된 helix를 지지하고 있으나 실제 이러한 규칙적인 구조

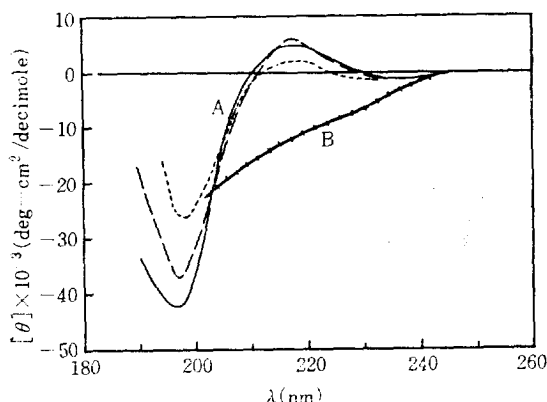


Figure 11. The circular dichroism of the random coil from of various polypeptides: Poly-L-glutamic acid in water pH 7.5, — [from A. J. Adler, R. Hoving, J. Potter, M. Wells, and G. D. Fasman, *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 4736 (1968)]. Poly-L-lysine in water, pH 5.7, [from N. J. Greenfield and G. D. Fasman, *Biochemistry* **8**, 4108 (1969)]. Poly-[N⁵-(2-hydroxyethyl)-L-glutamine in water, [from A. J. Adler, R. Hoving, J. Potter, M. Wells, and G. D. Fasman, *J. Amer. Chem. Soc.*, **90**, 4736 (1968)]. Poly-L-lysine in 4M CaCl₂ [from M. L. Tiffany and S. Krimm, *Biopolymers* **8**, 347 (1969)].

(long-range ordered structure)의 존재는 광분산, 초음파 흡수 등 여러 분석법으로도 증명되지 못하였고 단지 Raman 스펙트럼의 선명한 아마이드 III 밴드만이 그 존재를 시사하고 있다³². 여러 가지의 반대되는 증거가 존재하지만 Tiffany와 Krimm의 전개된 belix가 보다 많은 지지를 받고 있고³³ 다른 면에서 생각하면 이론적인 계산에 의하면 여러 가지 다른 형태도 유사한 CD 카브를 나타낼 수 있음이 알려지고 있다³⁴.

이러한 문제점에도 불구하고 polypeptide의 2차구조 분석에의 CD 효용은 크며 CD 카브의 모양으로부터 2차구조를 판별할 수 있고 한 파장에서의 측정치, 보통 $[\theta]_{222}$ 를 추적하면 반응에 따르는 형태전위 및 helix%를 쉽게 인지할 수 있는데 Fig. 12에 한 예를 나타내었다. $[\theta]_{222,r}$ 및 $[\theta]_{222,h}$ 는 부정형 및 helix 구조의 $[\theta]_{222}$ 를

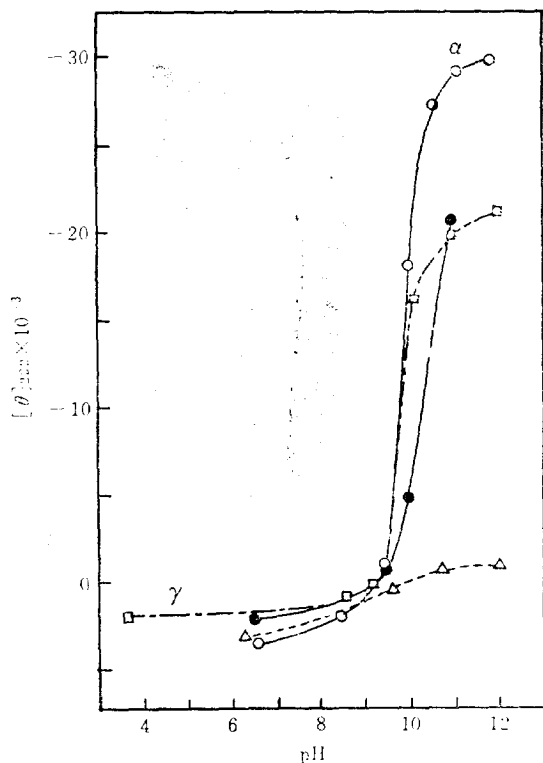


Figure 12. pH dependence of $[\theta]_{222}$ of poly- α -amino acids in aqueous solutions: ○, poly-L-lysine (160); ●, poly-L-lysine (46); □, poly-L-ornithine (190); △, poly(L- α , γ -diaminobutyric acid) (110). [from M. Hatano and M. Yoneyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 1392 (1970)].

가리킨다.

$$\text{helix \%} = \frac{[\theta]_{222, \text{obs}} - [\theta]_{222, r}}{[\theta]_{222, h} - [\theta]_{222, r}}$$

6. 球形 단백질의 ORD 및 CD

상기의 합성 polypeptide의 2차구조에 대한 ORD 및 CD 분석의 결과를 확대 응용하여 고유한 3차구조를 가지는 여러 가지 球形 단백질(globular protein)의 구조분석 즉 α , β , 부정형의 구성비율을 손쉽게 얻으려는 노력이 부단히 전개되었다. 물론 근래의 X-ray 회절법의 발달로써 정확한 3차원구조의 해독이 가능하나 이는 간단치 않으므로 신속한 ORD 및 CD로써 이에 접근하려는 시도이다. 최초의 시도는 ORD

를 이용하여 다음 式에 의한 것이다³⁵.

$$[m']_{\lambda} = [m']_{\alpha} \cdot f_{\alpha} + [m']_{\beta} \cdot f_{\beta} + [m']_r \cdot f_r$$

$f_{\alpha, \beta, r}$ 은 X-ray로 부터 얻어진 α , β , 부정형 구조의 구성이며 $f_{\alpha} + f_{\beta} + f_r = 100\%$ 가 된다.

$[m']_{\alpha, \beta, r}$ 은 한 파장에서의 세가지 기본형태의 $[m']$ 인데 따라서 각 형태의 표본물질 선정은 중요한 출발점이 된다. 이 연구에서는 poly-L-lysine의 3가지 형태를 표본으로 하였으며 분석 결과 단백질의 종류에 따라 오차의 범위가 상이하였다. 그 후 CD의 발달로 카브의 모양이 ORD보다 간단하여 분석하기 쉬운 장점을 이용하여 이러한 구형 단백질의 구조분석이 활발하여 졌는데 ORD에서와 같은 원리로 다음 式을 이용한다.

$$[\theta] = [\theta]_{\alpha} f_{\alpha} + [\theta]_{\beta} f_{\beta} + [\theta]_r f_r$$

$[\theta]_{\alpha, \beta, r}$ 은 각 기본 구조의 한 파장에서의 ellipticity이며 여기에서도 어떤 물질을 기본 형태로 선정하느냐는 문제가 출발점이다. Fig. 9, 10, 11에 나타난 바와 같이 각 polypeptide의 α -helix의 CD는 차이가 경미하지만 β -구조 및 부정형은 차이가 많으므로 표본 선정이 어렵다.

최초로 Greenfield와 Fasman에 의하여 역시 poly-L-lysine의 3가지 기본형태가 표본으로 선정되었다²⁹. 그러나 앞에서 이야기한 바와 같이 Tiffany-Krimm의 주장으로 부정형-전개된 helix 문제가 제기된 후 Rosenkranz와 Scholtan은 poly-L-serine의 β 구조 및 염용액에서의 부정형을 표본으로 채택하였다³⁶. 그 후 Saxena와 Wetlaufer³⁷, 또한 Chen 등³⁸은 알려진 단백질 및 polypeptide의 X-ray 및 CD 데이터를 기본으로 이론적인 계산에 의하여 β 및 부정형의 표본 CD를 결정하였다. Fig. 13에 사용된 표본들의 β 및 부정형에 대한 표준 CD를 종합적으로 도시하였다. 그러나 이러한 방법은 기본적인 3가지 형태 즉 α , β , 부정형 이외에 실제로 단백질이 소유하는 polyproline- II helix 등의 구조를 무시하였고 방향성 결가지 및 디설파이드(-S-S-)가 교결합의 CD에의 영향을 아직 분석할 수 없는 취약점을 지니고 있다. Fig. 14 및 Fig. 15에 이러한 방법에 의한 구형 단백질 구조분석의 예를 비교 도시하였다³⁹. 실제의 CD 카브와 계산된 CD 카브의 다소간의 차이점을 볼 수 있으나 α -helix

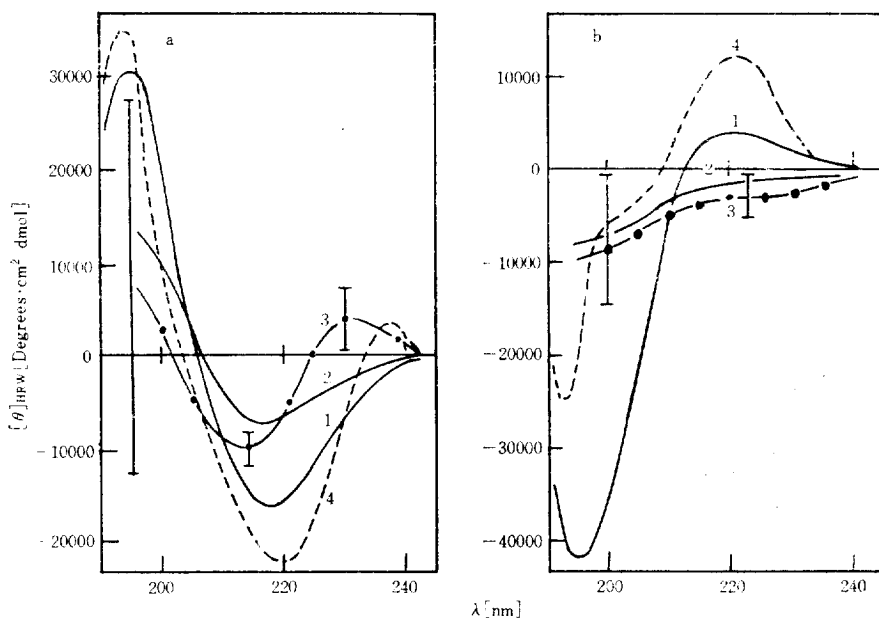


Figure 13, CD spectra of model substances for the β -structure (Fig. 1a) and for the nonperiodic or irregular structure (Fig. 1b) of globular proteins according to
1. Greenfield & Fasman, 2. Rosenkranz & Scholtan, 3. Chen et al. (vertical bars = standard deviations) and 4. Saxena & Wetlaufer.

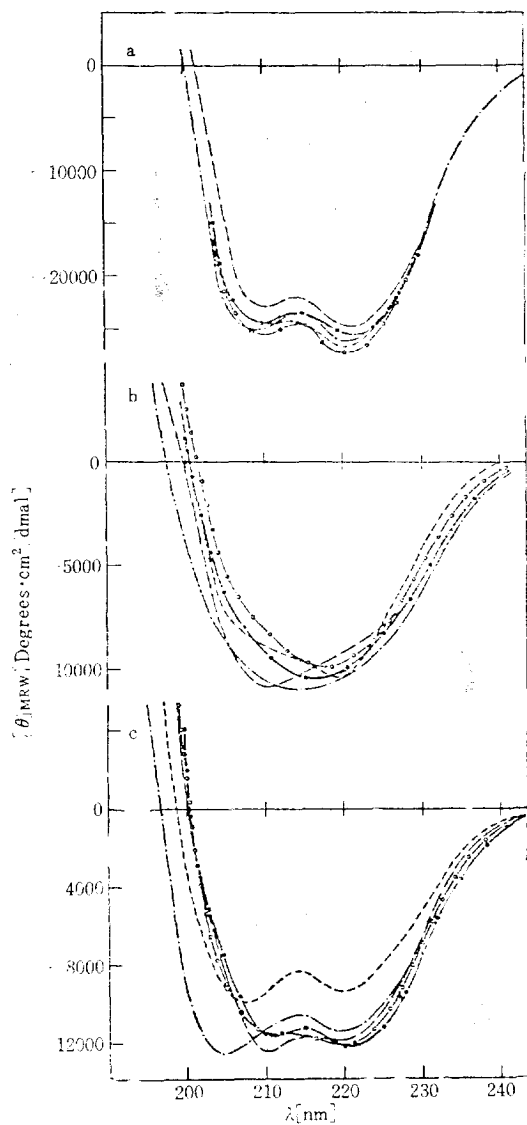


Figure 14. Experimentally observed (—•—) and calculated CD spectra for
a) myoglobin (77% α , 0% β , 23% ρ)
b) ribonuclease (19% α , 38% β , 43% ρ)
and
c) lactate dehydrogenase (29% α , 20% β , 51% ρ).
(The calculation was carried out using the various reference spectra (--- Greenfield & Fasman, Saxena & Wettlaufer, --- Chen et al., o—o Rosenkranz & Scholtan as well as the conformation amounts).

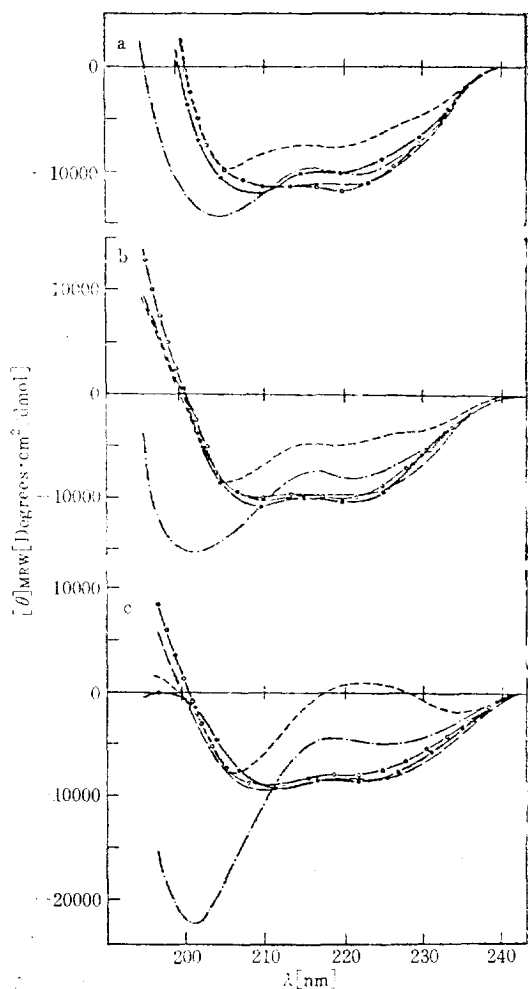


Figure 15. Experimentally observed (—•—) and calculated CD spectra for
a) lysozyme (29% α , 16% β , 55% ρ)
b) nuclease* (24% α , 15% β , 61% ρ) and
c) papain (21% α , 5% β , 74% ρ)
(The calculation was carried out using the various reference spectra (--- Greenfield & Fasman, Saxena & Wettlaufer, --- Chen et al., o—o Rosenkranz & Scholtan, * experimentally observed CD spectrum according to Chen et al.

및 β -구조를 합한 구성비가 부정형%보다 월등히 많을 때에는 대체로 일치하며 반대의 경우에는 오차가 커진다. 특히 Greenfield & Fasman 방법과 Saxena & Wetlaufer 방법을 적용할 경우에는 다른 두 방법보다 차이가 일반적으로 큼을 알 수 있다.

결론적으로 CD 를 통한 구형 단백질의 구조분석은 다음 몇 가지의 한계성을 나타낸다고 할 수 있다.

1) 결정성 고체 단백질의 구조가 용액에서의 구조와 동일하여야 한다. 이것은 실험적인 분석을 통하여 쉽게 확인 할 수 있다.

2) 이러한 방법은 α -helix, antiparallel β -구조 또는 부정형이외의 다른 구조를 포함하지 않는 구형 단백질에 한하여 적용이 가능하다.

3) 방향성 결가지를 가진 아미노산 및 디설파이드 가교 결합이 CD 에 끼치는 영향이 적은 단백질에 한한다.

4) 단백질의 CD 가 α -helix 의 전형적인 二重골(208nm 와 222nm)이나 β -구조의 골(217nm)을 나타낼 때에 결과가 좋으며 α -helix 및 β -구조를 포함하지 않는 단백질에는 적용할 수 없다.

Reference

1. E. L. Eliel, Stereochemistry of Carbon Compounds, McGraw-Hill, New York (1962).
2. R. E. Dickerson & I. Geis, The Structure and Action of Proteins, Harper, New York, (1969).
3. B. P. Schoenborn, *Nature (London)*, **224**, 143 (1969).
4. G. C. K. Roberts & O. Jardetzky, *Advanc. Protein., Chem.* **24**, 448(1970).
5. H. Susi, Methods in Enzymology vol. 26, Enzyme Structure Part D, Ed. C. H. W. Hirs & S. N. Timasheff, [22], p. 445, New York, Academic Press. (1972).
6. G. D. Fasman, Methods in Enzymology, vol. 6, [126], p. 928, New York, Academic Press. (1963).

7. A. J. Adler et al. Methods in Enzymology, vol. 27, p. 675, New York, Academic Press. (1973).
8. C. Djerassi, Optical Rotatory Dispersion, McGraw-Hill, New York (1960); (a) chapter by A. Moscovitz, p. 150
9. L. Velluz, M. Legrand & M. Grossjean, Optical Circular Dichroism, Academic Press., New York (1965).
10. N. G. Greenfield and G. D. Fasman, Encyclopedia of Polymer Science and Technology, vol. 15, p. 410, Wiley, New York (1971).
11. A. J. Adler & G. D. Fasman, Methods in Enzymology, vol. 12B, p. 268.
12. W. F. H. M. Mommaerts, Methods in Enzymology, vol. 12B, p. 302.
13. C. A. Lang, *Anal. Chem.*, **30**, 1692(1958).
14. S. Zamenhof, Methods in Enzymology, vol. 12B, p. 268.
15. O. H. Lowry et al. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951).
16. S. Moore and W. H. Stein, *J. Biol. Chem.*, **211**, 893(1954).
17. E. Brand et al. *J. Amer. Chem. Soc.*, **76**, 3037(1954).
18. J. Y. Cassim & J. T. Yang, *Biochemistry*, **8**, 1947(1969).
19. M. A. Stahman, Polyaminoacids, Polypeptides and Proteins, Wisconsin(1962). : G. D. Fasman, poly- α -Aminoacids New York (1967).
20. E. R. Blout et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 3787(1960); A. G. Walton & J. B. Blackwell, Biopolymers, Academic Press, New York (1973), chap. 9.
21. P. Drude, Lehrbuch der Optik 2nd ed., Hirzel, Leipzig (1906).
22. W. Mofitt, *J. Chem. Phys.* **25**, 467(1956); Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. **42**, 736(1956).
23. J. T. Yang & P. Doty, *J. Amer. Chem. Soc.*, **79**, 761 (1957).

24. W. Moffitt & J. T. Yang, *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.* **42**, 596(1956).
25. B. Davidson et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 156(1966).
26. R. Townend et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **23**, 163(1966).
27. P. Sarkar & P. Doty, *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.* **55**, 981(1966).
28. B. Davidson & G. D. Fasman, *Biochemistry*, **6**, 1616(1967).
29. N. J. Greenfield & G. D. Fasman, *Biochemistry*, **8**, 4108(1969).
30. M. L. Tiffany & S. Krimm, *Biopolymers*, **6**, 1379(1968); *Biopolymers*, **8**, 347(1969).
31. S. Krimm & J. E. Mark, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **60**, 1122(1968).
32. P. C. Painter & J. L. Koenig, *Biopolymers*, **15**, 229(1976).
33. A. J. Hopfinger, in *Conformational Properties of Macromolecules*, p.172, New York (1973).
34. D. Balasubramanian, *Biopolymers*, **13**, 407 (1974).
35. N. J. Greenfield et al. *Biochemistry*, **6**, 1630 (1967).
36. H. Rosenkranz & W. Scholtan, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 896(1971).
37. V. P. Saxena & D. B. Wetlaufer, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **68**, 969(1971).
38. Y. H. Chen et al., *Biochemistry*, **11**, 4120 (1972).
39. H. Rosenkranz, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, **12**(9), 415(1974).

—폴리머 기술 뉴스—

(p. 88에서 계속)

Accurel은 여러가지 形態로 市販될 豫定인데 濾過를 爲한 필름, 흡착을 위한 플록, 나아가서는 튜브의 形態로 까지 캐스트할 豫定이라고 말하고 있다. 또 Armark 社가 現在 開發을 推進하고 있는 큰 分野는 controlled release 分野인데, 香料, 惡臭除去劑, 殺虫劑, 나아가서 製藥分野에 對한 應用까지 침투할 생각을 하고 있다. 70%의 void volume을 갖는 1g의 Accurel은 約 3g의 活性藥品을 充填시킬 수 있다는 것이다. 活性藥品의 放出速度는 細孔의 크기를 조절함으로써 그 조절이 可能하다는 것이며 또 어떤 境遇는 活性藥品自體를 溶媒로 使用할 수도 있다는 것이다. 예를 들어 고양이를 쫓는 藥品인 methyl nonyl ketone은 polyolefin系 重合體에 利用함으로써 直接 重合體속에 充填할 수 있다는 것이다.

溶媒의 選擇이 얼마나 重要하며 機械的 强度등이 어떠한지 등, 아직도 모르는 點이 많이 있으나 製造法이 比較的 簡單하며 또 應用이 豊富할 것이 期待된다. (義)

[Chem. and Eng. News, Dec. 11, (1978)]