

포스포리파제 C-β4, 키메라(Chimera) 돌연변이 포스포리파제 C의 발현과 정제 및 특성 연구

박도준

서울대학교 의과대학 내과학교실

Expression and Purification of Phospholipase C-β4, and Chimeric Phospholipase C and Characterization of Them

Do Joon Park

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: Phospholipase C-β4 (PLC-β4) is known to be one of the most important signal transducing molecules; however, its biophysical and chemical characteristics are not well known due to the difficulty in purifying PLC-β4 from bovine retina. In the present study, we used the baculovirus expression system in order to express and purify large amounts of PLC-β4. With this system, we also tried to produce chimeric PLC-β3/β4 and PLC-β4/β3 protein in order to study the structure-activity relationship between N terminal and C terminal portion of PLC-βs.

Methods: I cloned PLC-β4 to the baculovirus expression system by the polymerase chain reaction method and infected the PLC-β4 to Sf9 cells. I purified recombinant PLC-β4 proteins using sequential high performance liquid chromatography (HPLC) by using the TSK phenyl-5PW column and the TSK heparin-5PW column. With this similar method, I was able to express chimeric PLC-β3/β4 and PLC-β4/β3 proteins.

Results: With the two step HPLC, I was able to purify PLC-β4 by 30-fold; this purified PLC-β4 contained PLC activity. I also expressed chimeric PLC-β3/β4 and PLC-β4/β3 using the baculovirus system, and their expression was confirmed by the immunoblot method. However, chimeric PLC-β4/β3 did not show PLC activity, while chimeric PLC-β3/β4 retained its PLC-activity.

Conclusion: Expression of chimeric PLC-β4 using the baculovirus system was an efficient method to obtain a large amount of protein. Moreover, this expression and purification method would be useful in studying the physical and chemical characteristics of this protein. In my study using chimeric PLC-β protein by swapping the N terminal and C terminal portions of PLC-β3 and β4, chimeric protein lost its activity completely in PLC-β4/β3 chimera. This result suggested a minute change in the tertiary structure of the protein, which may significantly affect its function. (*Endocrinol Metab* 27:282-288, 2012)

Key Words: Baculovirus, Chimera, Isolation and purification, Phospholipase C beta

서 론

포스포리파제(phospholipase C, PLC)는 phosphoinositide (PI)를 분해하여 두 가지의 신호전달 물질인 inositol trisphosphate와 diacylglycerol를 만드는 신호전달 단백질로, cAMP 체계를 활성화하는 adenylate cyclase와 함께 세포 내 신호전달에 가장 중요한 역할을

하는 대표적인 단백질 중의 하나이다. PLC에 의해 세포 내 신호전달이 일어나는 외부 자극의 종류는 100가지가 넘게 알려졌다, 그중에서도 호르몬 신호전달로는 갑상선자극호르몬 유리호르몬, 성선자극호르몬 유리호르몬, 부신피질자극호르몬, 갑상선자극호르몬, 성장호르몬, 바소프레신, 옥시토신, 붐베신, 가스트린, 세크레틴, 콜레시스토킨, 안지오텐신, 부갑상선호르몬 등이 대표적이며, 이 외에

Received: 3 August 2012, Accepted: 22 November 2012

Corresponding author: Do Joon Park

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine,
101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

Tel: +82-2-2072-3149, Fax: +82-2-762-9662, E-mail: djpark@snu.ac.kr

※ 본 논문은 서울대학교병원 연구지원(신진연구과제, 05-1999-0030)에 의해 작성되었음.

Copyright © 2012 Korean Endocrine Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

도 신경전달 물질, 성장인자, 사이토카인 등 여러 신호관련 물질들이 PLC에 의해 신호전달이 일어난다[1].

PLC는 현재 포유류에서 12종류가 클로닝되었고, 이들은 크게 β , γ , δ , ϵ 의 네 가지 군으로 나뉘며, 각각의 군은 4종류의 β type, 2종류의 γ type, 4종류의 δ type, 1종류의 ϵ type으로 나뉘는데, 각각의 활성화 기전과 조절 기전이 다르다[2-4]. 특히 PLC- β 는 PLC 중에서도 대부분의 호르몬 신호전달을 매개하여, 내분비적으로 매우 중요한 역할을 하는 효소이다.

PI 체계와 cAMP 체계는 세포 내 신호전달 체계에서 중요한 역할을 하는데, 현재 cAMP 체계 이상에 의한 내분비 질환은 여러 가지가 보고되었으나 PI 체계 이상에 의한 내분비 질환에 대한 보고는 상대적으로 적다. 혈액 응고 이상이 있는 가족에게서 PLC- β 2의 발현 감소가 있었다는 보고[5] 외에 질병과 직접 연관된 PLC에 관한 보고는 별로 없는 실정이다. 그렇지만 앞으로 PI system의 이상에 기인한 새로운 질환이 발견될 가능성은 많다고 예상된다.

여러 종류의 PLC가 필요한 이유는 아직까지 잘 모르는 상태이다. PLC- β 가 G 단백질과 결합하여 활성화되는 것은 잘 알려져 있고, PLC- γ 는 티로신 인산화에 의해 활성화되며, PLC- δ 는 아직 그 활성화 기전이 명확치는 않으나 G 단백질의 일종인 G_{12} 단백질이 PLC- δ 1을 활성화할 수 있다는 보고가 있었고[6], 소분자량 G 단백질의 일종인 RhoA의 GTPase를 활성화하는 단백질인 RhoGAP가 정제된 PLC- δ 1을 활성화한다는 보고도 있다[7]. PLC- ϵ 는 Ras, Rho, Rap과 같은 small GTPase에 의하여 활성화된다[8]. 이렇게 각각의 PLC는 서로 다른 기전에 의해 활성화되는데 이러한 PLC를 활성화시키는 단백질들은 주로 PLC의 C 말단 부위에 결합하여 그 작용을 나타낸다. 반면에 PLC의 N 말단 부위는 PLC 활성화에 관계가 있는지, 또 PLC의 기능에 어떤 역할을 하는지는 잘 알려져 있지 못하다.

PLC와 같이 세포 내 신호전달 체계에 관련되는 단백질들의 성질을 연구하기 위해서는 여러 가지 접근 방법이 있겠으나 그 중 가장 기본적인 것은 정제된 단백질을 이용하여 그 물리화학적 성질을 규명하는 것이다. 그러나 신호전달 단백질들은 적은 양으로만 존재하기 때문에 일반적으로 정제가 매우 어렵다. PLC- β 2는 아직 조직에서 정제된 적이 없고, PLC- β 1, 3, 4가 조직에서 정제되었으나 그 정제 과정이 매우 어렵다. PLC- β 4의 경우 소의 망막에서 정제를 하여야 하기 때문에[9] 현실적으로 생화학적 실험에 이용할 수 있는 충분한 양의 단백을 얻기 어렵다. 이에 저자는 배콜로바이러스(baculovirus)를 이용하여 PLC- β 4 단백질을 발현, 정제하는 방법을 개발하고, 한편으로 배콜로바이러스를 이용한 발현 방법을 이용하여 PLC- β 3와 PLC- β 4의 N 말단 부위의 구조를 바꾸는 키메라(chimera) PLC를 만들어 PLC 활성화에 있어 N 말단 부위의 효소 활성화에 대한 의의를 밝히고자 연구를 진행하였다.

대상 및 방법

1. 재료

PLC- β 3의 부분 cDNA가 pTM1 벡터에 들어있는 PLC- β 4 cDNA 클론(p β 3/pTM1) 및 PLC- β 4의 cDNA 클론(PLC- β 4/pTM1)과 쥐 PLC- β 3 및 PLC- β 4에 대한 항체는 미국 National Institutes of Health (NIH)의 Dr. Sue Goo Rhee로부터 얻었다[10]. 소뇌로부터 정제된 PLC- β 3 단백질, 배콜로바이러스를 이용하여 정제한 PLC- β 1과 β 2 단백질 역시 미국 NIH의 Dr. Sue Goo Rhee로부터 얻었고 G_{α_q} 와 $G_{\beta\gamma}$ 단백질은 서울대학교 자연과학대학 생명공학부의 박동은 교수로부터 얻었다[11]. PLC 활성도 측정에 사용한 [3 H]phosphatidylinositol (PI)과 베타계수 측정용액(counting solution, Aquasol)은 New England Nuclear (Boston, MA, USA)에서 구입하였고 방사능 표지가 되지 않은 PI는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 단백질 정량을 위한 BCA 키트는 Pierce (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. 면역블롯(immunoblot) 때 사용한 2차 항체와 발색을 위한 알칼리인산분해효소(alkaline phosphatase)의 기질은 Kierkegaard (KPL, Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다.

단백질을 발현하기 위한 곤충세포인 Sf9 세포의 배양을 위하여 Grace's 곤충세포 배양액과 소태아혈청(fetal bovine serum), yeastolate, lactalbumin hydrolysate, pluronic, gentamicin, amphotericin B는 Life Technologies (Grand Island, NY, USA)에서 구입하여 사용하였고 배콜로바이러스 발현 시스템은 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)의 BaculoGold transfection kit (Cat. #21100K)와 Sf9 세포 (Cat. #21300L)를 구입하여 사용하였다.

PLC- β 4를 발현시키기 위하여 사용한 유전자 재조합 배콜로바이러스는 pVL1393 벡터에 PLC- β 3 유전자를 넣어 *Autographia californica* nuclear polyhedrosis virus particle과 cotransfection을 하여 제조한 것이고[12] 바이러스 감염을 시킨 Sf9 세포는 Biosciences에서 구입하였다.

고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)용 TSKgel phenyl-5PW column과 TSKgel heparin-5PW column은 Pharmacia LKB (Uppsala, Sweden)의 제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 키메라 PLC 유전자의 제조

PLC- β 4 단백질을 발현하기 위해서는 배콜로바이러스에 PLC- β 4 유전자를 클로닝하여야 하는데, 이를 위해 사용한 유전자는 이전에 저자들이 PLC- β 3를 클로닝을 위해 제작한 것을 사용하였으며[12], 이전과 같은 방법으로 배콜로바이러스용 pVL1393 vector의 NcoI과 PstI 제한효소 위치에 PLC- β 4 유전자를 클로닝하였다.

PLC- β 3와 PLC- β 4의 키메라 유전자의 클로닝을 위해서는 poly-

PLC-β3 : SRYLGGEENGILPL

PLC-β4 : CRYLMSDENAPVFL

PLC-β3/β4 : SRYLGGEENAPVFL

PLC-β4/β3 : CRYLMSDENGILPL

Fig. 1. Sequences of chimeric phospholipase C (PLC)-β3/β4 and PLC-β4/β3. Each alphabet letter represents single amino acid. Underlined letters mean swapped amino acids between PLC-β3 and PLC-β4.

merase chain reaction (PCR)을 이용하여 돌연변이를 유도하였다. PLC-β3/β4 키메라는 PLC-β3의 1-283번째 아미노산과 PLC-β4의 299-1176번째 아미노산을 연결하였으며, PLC-β4/β3 키메라는 PLC-β4의 1-298번째 아미노산과 PLC-β3의 284-1217번째 아미노산을 연결하였다(Fig. 1). 이를 위하여 PLC-β3과 PLC-β4의 치환이 일어나는 부위의 아미노산 서열을 포함하는 primer를 만들었고 이를 이용하여 각각 PCR을 시행한 후 클로닝을 하여 키메라 PLC-β를 만들었다.

2) Sf9 세포의 배양

Sf9 세포의 배양은 이전 연구와 동일하게 하였다[12]. 간단하게 요약하면 27°C 배양기 안에서 배양하였고 CO₂를 따로 공급하지 않았다. 사용한 배양액은 Grace's 곤충세포 배양액으로 10% 소태아혈청과 3.33 g/L의 yeastolate, 3.33 g/L의 lactalbumin hydrolysate, 2.92 g/L의 L-glutamine, 0.1% pluronic, 10 mg/L의 gentamicin, 2.5 mg/L의 amphotericin B를 섞어 사용하였다.

단백질 대량 발현을 위해서는 3 L 크기의 회전 배양기를 이용하여 부유 상태로 Sf9 세포를 유지하였다. 3 L 배양기에 750 mL의 배양액을 넣고 여기에 농도가 5 × 10⁵ cells/mL이 되도록 적당한 개수의 Sf9 세포를 넣어주어 배양하였으며 회전 막대는 분당 60회 회전하도록 하였다. 세포의 농도가 2 × 10⁶ cells/mL에 다다르게 되면 농도가 5 × 10⁵ cells/mL이 되도록 새로운 배양기에 분주하여 유지하였다.

3) 유전자 재조합 배콜로바이러스의 제작

유전자 재조합 배콜로바이러스의 제작은 이전 연구와 동일하게 하였다[12]. 방법을 요약하면, Sf9 세포를 6 cm의 세포 배양 접시에 분주하여 키운 후 0.5 μg의 선형화된 배콜로바이러스 입자(linearized baculoviral particle)와 2 μg의 DNA를 섞어 형질도입(transfection)한 후 5일간 27°C에서 배양하였다. 형질도입을 할 때에는 야생형(wild type)의 배콜로바이러스를 똑같은 조건으로 Sf9 세포에 감염시켜 양성 대조군으로, 배콜로바이러스를 넣지 않은 배양 접시는

음성 대조군으로 삼았다.

감염된 Sf9 세포를 증폭하여 키운 후 2,000 rpm에서 원심분리하여 상층액은 바이러스 증폭을 위하여 -80°C에 보관하였고 침전된 세포를 가지고 PLC 활성도 측정과 PLC-β4에 대한 면역블롯을 시행하였다.

4) 바이러스의 증폭 및 단백질의 발현

형질도입 후 1차 증폭한 바이러스를 이용하여 2차 증폭을 하였다. 2 × 10⁷개의 Sf9 세포를 15 cm 세포 배양 접시에 넣어 잘 부착시킨 후 여기에 50 μL의 1차 증폭한 바이러스를 넣어주고 3일간 배양하였다. 3일 후 세포 배양액을 무균 상태의 50 mL 원심분리관에 넣어 2,000 g에서 5분간 원심분리하고 이 중 상층액을 취하여 -20°C에서 보관하였다. 회전 배양기에서 부유 상태의 Sf9 세포가 1 × 10⁶ cells/mL의 농도가 되면 750 mL의 세포 배양액당 2차 증폭한 바이러스 40 mL를 넣고 현미경으로 감염 상태를 관찰하며 2-3일간 배양하였다. 충분히 감염이 된 후 세포 배양액을 250 mL 원심분리 용기에 넣고 2,000 g으로 5분간 원심분리하였다. 원심분리하여 상층액은 버리고 침전된 세포를 수거하여 단백질 정제에 이용하였다.

5) PLC 활성 측정

침전된 Sf9 세포(10 cm 배양 접시에서 모은 것)에 250 μL의 homogenation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.0, 1 mM ethylene glycol tetraacetic acid [EGTA], 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 5 μg/mL leupeptin, 5 μg/mL aprotinin)를 넣고 sonicator로 10초간 3회 분쇄시켰다. 여기서 5 μL를 취하여 PLC 활성을 측정하였다. 5 mL짜리 유리 시험관에 150 μL의 기질(50 mM Hepes, pH 7.0, 20,000 cpm의 ³H-PI, 300 μM cold PI, 1 mM free Ca²⁺, 2 mM EGTA, 1 mg/mL sodium deoxycholate)과 45 μL의 물을 섞어 총 반응 양을 200 μL로 하였다. 반응은 37°C에서 10분간 하였고 stop solution (chloroform:methanol:conc-HCl, 100:100:1)을 1 mL 넣어 반응을 중지시켰다. 여기에 second stop solution (1 M HCl, 5 mM EGTA) 0.3 mL 넣어 잘 섞어준 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 반응물이 두 층으로 나뉘면 이 중 수용액 층인 위쪽에서 500 μL를 취하여 counting vial에 넣고 여기에 10 mL의 counting solution을 넣어 1분간 β 카운터(Hewlett-Packard)로 방사능 양을 측정하였다.

6) PLC-β4의 정제

PLC-β4의 정제는 이전의 방법[12]을 이용하였다. 요약하면 침전된 세포를 40 mL의 phosphate-buffered saline로 잘 풀어준 후 2,000 g으로 5분간 원심분리하고 이 과정을 한 번 더 반복하여 세포를 잘 씻어준 후 30 mL의 분쇄 완충액(homogenation buffer) (20 mM Hepes pH 7.0, 1 mM PMSF, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol, 5 μg/mL

leupeptin, 5 μ g/mL aprotinin, 1 \times calpain inhibitor I, 1 \times calpain inhibitor II)을 넣은 후 sonicator를 사용하여 세포를 분쇄하였다. 얼음을 채운 실험 용기를 사용하여 20초간 부수고 30초간 얼음에 식히는 과정을 4-5회 반복하여 세포를 부순 후 여기에 KCl 6.71 g을 넣어 최종 KCl 농도가 3 M이 되도록 하였다. 이것을 밤 동안 4°C에서 rocker를 사용하여 계속 섞어주어 세포막으로부터 단백질이 유리되도록 한 후 23,000 g에서 60분간 원심분리하여 상층액을 취하고 이를 다시 100,000 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다.

TSKgel phenyl-5PW column (21.5 \times 150 mm)을 이용한 HPLC로 PLC- β 3를 1차 정제한 후 PLC 활성도 측정을 하여 활성도가 높은 분액 3개(총 15 mL)를 모아 단백질을 정량한 후 여기에 15 mL의 heparin column용 평형 완충액(equilibration buffer) (20 mM Hepes pH 7.0, 1 mM EGTA) 15 mL를 넣어 centriprep 100을 사용하여 10,000 g에서 원심분리하여 약 6 mL로 농축. 여기에 다시 24 mL의 heparin column의 평형 완충액을 넣고 다시 6 mL로 농축하고 여기에 4 mL의 heparin column용 평형 완충액을 넣어 10 mL를 만들었다. TSKgel heparin-5PW column (7.5 \times 75 mm)을 이용하여 2차 정제에서는 1분씩 받은 1 mL의 분액 중 2 μ L씩을 취하여 PLC 활성 측정을 하였다.

7) Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 및 면역블롯

세포를 분쇄한 뒤 단백질을 정량한 후 면역블롯을 위하여 20 μ g씩의 단백질을 6%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기 영동하였고 이후 gel에서 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 전이하고 PLC- β 3의 N 말단부와 C 말단부 혹은 PLC- β 4의 N 말단부와 C 말단부에 대한 항체를 1차 항체로 사용하고 알칼리인산분해효소가 결합된 goat anti-rabbit IgG antibody를 2차 항체로 사용하여 PLC- β 3, 혹은 PLC- β 4 단백을 확인하였다.

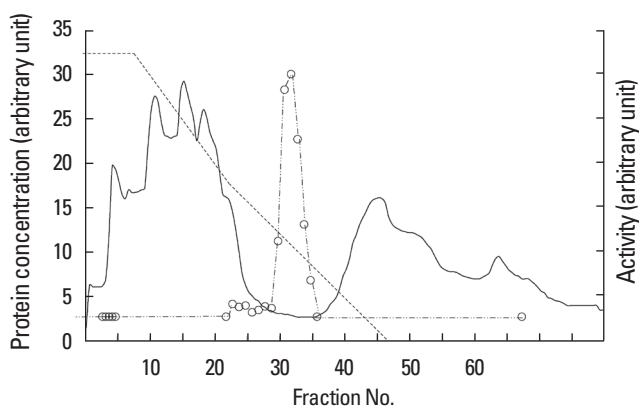


Fig. 2. Purification of phospholipase C (PLC)- β 4 on TSK phenyl-5PW column. Solid line shows the absorbance at 280 nm which represents the concentration of the eluted protein. Open circles represent the activity of PLC- β 3 as cpm, and the dotted line shows the KCl gradient.

결 과

1. PLC- β 4의 발현 및 정제

TSKgel phenyl-5PW column을 이용한 크로마토그래피에서 용출된 단백질을 260 nm에서 본 양상과 이들 각 분획에서의 PLC 활성도는 Fig. 2와 같다. PLC 활성도 측정 결과, 31, 32, 33번째 분액의 활성도가 높아 이들을 따로 모았다. 이렇게 함께 모은 3 mL의 분액의 salt를 제거하고 heparin column에 적용하였다. 수차례에 걸쳐 Centricon (Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용하여 완충액을 바꾸어 주고 염(salt)의 농도는 처음 용출되었을 때에 비해 약 1/10 이하로 줄일 수 있었다. 두 번째 column인 heparin chromatography에서는 56, 57, 58번째 분액에서 활성도가 가장 높았고(Fig. 3) 이 분액은 이전 PLC- β 4가 용출되는 위치와 일치하였다[9].

2. PLC- β 3/ β 4 및 PLC- β 4/ β 3 키메라 발현 및 활성도 측정

배큘로바이러스를 이용한 키메라 PLC- β 4/ β 3 발현을 확인하기 위하여 각각을 PLC- β 3의 N 말단부, 혹은 C 말단부를 인식하는 항체와 PLC- β 4의 N 말단부 혹은 C 말단부를 인식하는 항체를 이용하여 미리 정제된 PLC- β 3 및 β 4 단백질과 같이 면역블롯을 시행하였다.

PLC- β 3/ β 4 키메라의 경우 PLC- β 3의 N 말단부에 대한 항체와 PLC- β 4의 C 말단부에 대한 항체에 반응하여 절편이 나타났고(Fig. 4A, D), PLC- β 4/ β 3 키메라의 경우는 PLC- β 4의 N 말단부에 대한 항체와 PLC- β 3의 C 말단부에 대한 항체에 반응하여 절편을 나타내어 키메라 단백질이 발현이 되었음을 알 수 있었다(Fig. 4B, C). 그러나 PLC의 활성도를 측정하였을 때 PLC- β 3/ β 4 키메라는 PLC의 활성이 있었으나 PLC- β 4/ β 3 키메라는 PLC 활성도를 전혀 나타내지 않았다.

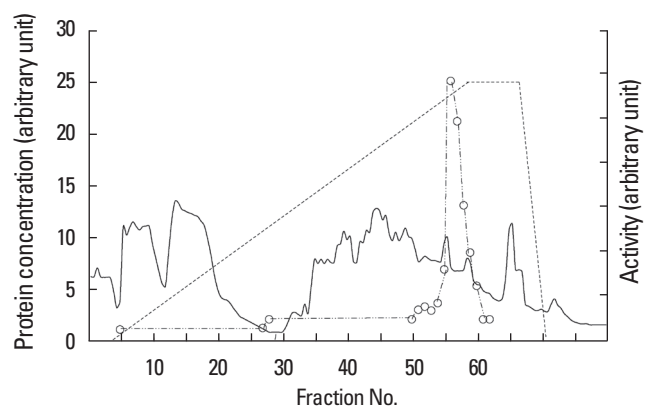


Fig. 3. Purification of phospholipase C (PLC)- β 4 on TSK heparin-5PW column. Solid line shows the absorbance at 280 nm which represents the concentration of the eluted protein. Open circles represent the activity of PLC- β 3 as cpm, and the dotted line shows the NaCl gradient.

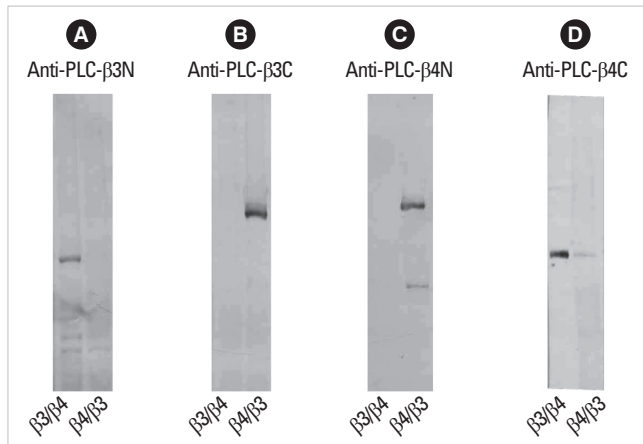


Fig. 4. Immunoblot of chimeric phospholipase C (PLC)-β3/β4 and PLC-β4/β3 with antibodies against C terminal of PLC-β3, β4, N terminal of PLC-β3 or β4. Sf9 cells infected with recombinant chimeric PLC-β3/β4 or PLC-β4/β3 were disrupted with sonicator, and 20 μg protein of each homogenate was separated on 6% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. (A) Panel A was probed with antibodies against N terminal PLC-β3. (B) Panel B was probed with antibodies against C terminal PLC-β3. (C) Panel C was probed with antibodies against N terminal PLC-β4. (D) Panel D was probed with antibodies against C terminal PLC-β4. The molecular weight of chimeric PLC-β3/β4 is lower than chimeric PLC-β4/β3, and its cognate bands were revealed by antibodies against N terminal PLC-β3 and antibodies against C terminal PLC-β4 (A, D). Chimeric PLC-β4/β3 bands were revealed by antibodies against C terminal PLC-β3 and antibodies against N terminal PLC-β4 (B, C).

고 찰

본 연구는 망막에서 정제하여야 하기 때문에 그 정제가 매우 어려운 PLC-β4를 배콜로바이러스 발현 시스템을 이용하여 쉽게 정제하는 방법을 확립하였다. 그리고 이 시스템을 이용하여 비슷한 구조를 가진 PLC-β3와 PLC-β4의 N 말단부와 C 말단부를 서로 바꾼 키메라 PLC-β를 제조하여 PLC 구조와 활성도와의 관계를 관찰하였으며, PLC-β3/β4 키메라는 활성도를 가지고 있었으나 PLC-β4/β3는 활성도를 잃어 비슷한 펩타이드 서열을 가진 단백질이라고 하더라도 2차 구조, 3차 구조의 변화에 따라 활성도가 달라짐을 확인할 수 있었다.

최근 단백질의 특성을 연구하기 위한 방법으로는 유전자를 과발현이나 발현 억제제를 시켜 세포 내에서 특정 단백질의 발현을 조절하거나, 점 돌연변이를 유도한 단백질을 발현시켜, 이를 통해 단백질의 특성을 분석하는 방법을 많이 사용한다. 이와 같은 분자생물학적 방법은 생화학적 방법을 통하여 단백질을 순수 정제하는 것보다 상대적으로 쉬우며, 단백질, 특히 효소 단백질의 성질과 다른 단백질과의 상호작용을 이해하는 데 효과적인 방법이다. 그러나 효소의 기본적인 물리화학적 성질인 K_m 이나 V_{max} 와 같은 수치를 구하는 것은 불가능하며, X선 결정학(crystallography)을 통한 단백질의 3차 구조의 규명이나, 더 나아가 이를 통해 단백질의 작용을 조절하는 약제

의 개발에 이용될 수는 없다. 따라서 분자생물학적인 방법이 편리하고 효율적인 방법이라는 하나 단백질의 성질을 완전히 규명하기 위해서는 많은 양의 순수 단백질의 정제가 필수적이다.

일반적으로 단백질의 정제 과정은 어려운 여러 단계를 거쳐야 하고 특히 효소와 같은 단백질의 경우는 여러 정제 단계를 거치는 도중 그 활성을 잃어버리는 경우가 많아 일반 단백질에 비해 그 정제가 더욱 어렵다. PLC의 정제도 마찬가지로 기존의 방법들은 소의 뇌 48개로부터, 혹은 쥐의 뇌 1,000개로부터 소량의 PLC만을 정제할 수 있었으며 일반 크로마토그래피 단계와 HPLC 단계를 합쳐 보통 6-7단계의 크로마토그래피를 시행하여야 한다. PLC-β4의 경우는 더욱 어려워 4,000개의 소 망막을 한꺼번에 사용하여야만 정제가 가능하였다[9]. 따라서 현실적으로 PLC-β4의 물리, 화학적 성질에 대한 적절한 연구는 어려운 상황이다. 배콜로바이러스를 이용한 단백질의 발현은 곤충세포를 이용한 발현이기 때문에 *Escherichia coli*를 이용한 단백질 발현에서의 문제점인 전사 후 변형(posttranslational modification)이 일어나지 않는 점이나, 이에 따른 2차 구조 및 3차 구조의 적절한 형성이 이루어지지 않아 정상 기능을 가진 단백질을 발현할 수 없는 단점을 해결할 수 있다[13,14].

본 연구에서는 약 60 mL의 배콜로바이러스가 감염된 Sf9 세포를 이용하여 PLC-β4를 발현할 경우 2단계의 HPLC 정제를 거칠 경우 약 8% 정도의 수율로 30배 이상의 정제를 할 수 있음을 보였다. 이러한 방법은 향후 정제된 단백질을 얻기가 매우 어려운 PLC-β4의 물리, 화학적 성질을 연구하는 데 유용한 방법이 될 것이다.

또한 본 연구에서는 위의 단백질 발현 시스템을 이용하여 PLC의 N 말단부와 C 말단부의 구조적 차이와 단백질 발현 및 활성도에 미치는 영향을 관찰하였다.

PLC는 그 구조에 있어 공통적인 부위와 서로 다른 부위가 있고, 이에 의해 서로 다른 기전에 의해 활성화된다. 현재까지 알려진 PLC의 구조와 기능과의 관계를 보면 우선 PLC에는 X와 Y 구역(domain)이라고 명명된 두 부위가 있는데[2], 이 부위는 PLC의 효소 작용을 나타내는 부위로 PLC 간에 40-60%의 아미노산 서열의 상동성을 보인다. X 구역은 약 170개의 아미노산으로 구성되었고 Y 구역은 약 260개의 아미노산으로 구성되어 있으며 포유류뿐 아니라 하등 생물에서 발견되는 PLC에서도 부분적으로 이 구조는 발견되어 PLC의 효소 작용에 가장 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 실제로 X 구역이나 Y 구역에 돌연변이를 유도할 경우 PLC의 활성이 없어지는 것으로 보아[15] PLC의 작용의 가장 중요한 부위이다. 모든 포유류 PLC에 공통적으로 존재하는 또 다른 구역은 아미노산 100개 정도로 구성되는 pleckstrin homology (PH) 구역이라고 불리는 부위로 이 부위는 PLC뿐 아니라 여러 신호전달에 관여하는 단백질에서 같이 발견되는 부위이다[16]. PH 구역은 PIP₂와 결합하여 PLC가 세포막과의 작용을 하는 데 필요한 것으로 알려졌다.

각각의 PLC는 공통적인 X, Y, PH 구역 외에는 그 구조가 전혀 다

르다. PLC- δ 가 가장 간단하고 짧은 구조를 갖고 있으나 PLC- β 는 Y 구역 뒤쪽으로 긴 C 말단부 부위가 존재하며 PLC- γ 는 X와 Y 구역 사이가 길다. 특히 PLC- β 는 G 단백질과 결합하여 활성화되는 것이 잘 알려져 있고, 따라서 많은 호르몬 작용과 연관이 된다. 따라서 PLC- β 의 활성화 기전에 대한 이해는 내분비 기관의 조절 및 질환 발생의 기전을 연구하는 데 중요하다. PLC- β 3와 PLC- β 4는 각각 서로 다른 G 단백질에 의해 활성화되는데, 어떻게 하여 각각 다르게 조절 받는지에 대한 기전은 알려져 있지 않다. 단백질의 구조가 영향을 줄 것으로 알려져 있으나, 이의 기전에 대한 연구는 많지 않다. 본 연구에서는 PLC 안에서 비교적 구조가 비슷한 PLC- β 3와 PLC- β 4의 X, Y 구역 앞쪽을 기준으로 하여 N 말단부와 C 말단부를 각각 바꾼 키메라 PLC- β 를 만들었을 때 그 활성도가 어떻게 달라지는지를 관찰하였다. 원래 기대하였던 것은 키메라를 만들었을 때 G 단백질과 결합하는 C 말단부 부위에 달라지면 G 단백질과의 결합도 그에 따라 달라질 것으로 생각하고, 이의 재현 활성도를 관찰하려 하였다. 그러나 키메라 PLC- β 의 경우 PLC- β 3/ β 4는 PLC의 활성도가 있었으나 PLC- β 4/ β 3는 전혀 PLC 활성도를 나타내지 못하여 키메라를 만들 경우 단백질의 3차 구조가 바뀌면서 PLC의 활성도 자체가 달라짐을 알 수 있었다. 실제로 펩타이드 서열도 비슷하고, 구조도 비슷한 것으로 예상되는 PLC- β 3와 β 4 단백질임에도 불구하고 서로의 N 말단부 부위와 C 말단부 부위를 바꾸었을 때 활성도를 완전히 잃는 경우가 발생하는 것을 볼 때에 단백질의 기능에 있어 3차 구조의 미세한 차이가 기능에 큰 영향을 줄 수 있음을 확인하였다.

요 약

배경: 세포 내 신호전달에 중요한 단백질인 포스포리파제 C- β 4 (phospholipase C- β 4, PLC- β 4)의 물리화학적 성질을 연구하기 위해서는 다량의 정제된 단백질이 필요하나 기존의 망막 조직을 이용한 정제 방법은 그 방법이 매우 어려워 충분한 양의 단백질을 정제하는 것이 거의 불가능하다. 따라서 이를 쉽게 정제하기 위하여 배콜로바이러스(baculovirus)를 이용한 발현 및 정제 방법을 개발할 필요가 있다. 또한 배콜로바이러스를 이용한 정제 방법이 확립된 경우 이를 이용하여 키메라 단백질의 발현도 쉽게 할 수 있어 단백질의 성질 연구에 매우 유용하다. 따라서 배콜로바이러스 발현 시스템을 이용한 PLC- β 4의 발현 방법을 개발하고, 이를 이용하여 PLC- β 3/ β 4 및 PLC- β 4/ β 3 키메라 단백질을 제조하였다.

방법: Polymerase chain reaction 방법으로 PLC- β 4를 배콜로바이러스 발현 벡터에 클로닝한 후 Sf9 세포에 감염시켜 PLC- β 4 단백질을 발현시켰다. 이를 TSK phenyl-5PW column과 TSK heparin-5PW column을 이용한 순차적 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용하여 정제하였다. 동일한 방법을 이용하여 PLC- β 3/ β 4 및 PLC- β 4/ β 3 키메라 단백질을 발현하였다.

결과: 2차례의 HPLC 정제를 통하여 PLC- β 4를 30배 이상으로 정제할 수 있었으며, 이렇게 정제한 단백질은 PLC의 활성도를 가지고 있었다. 배콜로바이러스를 이용한 PLC- β 3/ β 4 및 PLC- β 4/ β 3 키메라 단백질 발현은 항체를 이용한 면역블롯법으로 단백질이 발현됨은 확인하였으나 PLC- β 3/ β 4 키메라 단백질은 PLC의 활성도를 가지고 있었으나 PLC- β 4/ β 3 키메라 단백질은 PLC 활성도를 보이지 않았다.

결론: 배콜로바이러스를 이용한 단백질의 발현 방법은 PLC- β 4 단백질을 효과적으로 발현할 수 있었으며, 이 방법을 이용하여 다량의 순수한 PLC- β 4 단백질을 HPLC 방법을 통하여 정제할 수 있었고, 이는 향후 PLC- β 4의 물리화학적 성질을 연구하는 데 유용하게 이용될 것이다. 키메라 단백질을 이용한 PLC- β 3와 PLC- β 4의 구조와 활성도의 관계 연구에서는 서로의 N 말단부 부위와 C 말단부 부위를 바꾸었을 때 활성도를 완전히 잃는 경우가 발생하는 것을 볼 때에 단백질의 기능에 있어 3차 구조의 미세한 차이가 기능에 큰 영향을 줄 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. Noh DY, Shin SH, Rhee SG: Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling. *Biochim Biophys Acta* 1242:99-113, 1995
2. Rhee SG, Choi KD: Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 267:12393-12396, 1992
3. Rhee SG: Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70:281-312, 2001
4. Harden TK, Sondek J: Regulation of phospholipase C isozymes by ras superfamily GTPases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:355-379, 2006
5. Lee SB, Rhee SG: Significance of PIP2 hydrolysis and regulation of phospholipase C isozymes. *Curr Opin Cell Biol* 7:183-189, 1995
6. Feng JF, Rhee SG, Im MJ: Evidence that phospholipase delta1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signaling. *J Biol Chem* 271:16451-16454, 1996
7. Homma Y, Emori Y: A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J* 14:286-291, 1995
8. Zhang L, Malik S, Kelley GG, Kapiloff MS, Smrcka AV: Phospholipase C epsilon scaffolds to muscle-specific A kinase anchoring protein (mAKAP-beta) and integrates multiple hypertrophic stimuli in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 286:23012-23021, 2011
9. Lee CW, Park DJ, Lee KH, Kim CG, Rhee SG: Purification, molecular cloning, and sequencing of phospholipase C-beta 4. *J Biol Chem* 268:21318-21327, 1993
10. Jhon DY, Lee HH, Park D, Lee CW, Lee KH, Yoo OJ, Rhee SG: Cloning, sequencing, purification, and Gq-dependent activation of phospholipase C-beta 3. *J Biol Chem* 268:6654-6661, 1993
11. Park D, Jhon DY, Lee CW, Lee KH, Rhee SG: Activation of phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem* 268:4573-4576, 1993
12. Park DJ: Expression of phospholipase C-B3 using recombinant baculovirus expression system. *J Korean Soc Endocrinol* 12:283-294, 1997

13. Gruenwald S, Heitz J: Baculovirus expression vector system: procedures and methods manual. 2nd ed. pp5, San Diego, PharMingen, 1993
14. O'Reilly DR, Miller L, Luckow VA: Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. New York, W. H. Freeman, 1992
15. Smith MR, Liu YL, Kim H, Rhee SG, Kung HF: Inhibition of serum- and ras-stimulated DNA synthesis by antibodies to phospholipase C. *Science* 247:1074-1077, 1990
16. Mayer BJ, Ren R, Clark KL, Baltimore D: A putative modular domain present in diverse signaling proteins. *Cell* 73:629-630, 1993