1998년도 산학협동 연구비 Korean Circulation J 2002;32(7):613-622

효모 이중-중합 시스템을 이용한 G Protein-Coupled Receptor Kinase 5 (GRK5)의 단백 상호작용 연구

경상대학교 의과대학 순환기내과학교실, 건강과학연구원[1], 신경생물학교실[2]
진병철[1] · 박태준[1] · 김은지[1] · 이지은[1,2] · 이정훈[1]
문인규[1] · 박정랑[1] · 최동주[1] · 서봉관[1]

Novel Protein Interactions of G Protein-Coupled Receptor Kinase 5 (GRK5) Searched with Yeast Two-Hybrid System

Byung-Cheol Jin, MD[1], Tae-Joon Park, MD[1], Eun-Ji Kim, MS[1],5
Ji-Eun Lee, BS[1,2], Jung-Hoon Lee, MD[1], In-Kyu Mun, MD[1],
Jeong-Rang Park, MD[1], Dong-Ju Choi, MD[1] and Bong-Gwan Seo, MD[1]
[1]Department of Interenal Medicine, Gyeongsang Institute of Health Science and [2]Neurobiology, College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

ABSTRACT

Background and Objectives: G protein-coupled receptors were considered to be the only natural substrates of G protein-coupled receptor kinases (GRKs). However, it was recently demonstrated that GRKs can also bind to other signal molecules. The purpose of this study was to investigate new molecules that might interact with the GRK5 using a yeast two-hybrid system to screen the cDNA library. **Materials and Methods**: For the yeast two-hybrid system, the "bait" was constructed to generate a LexA-GRK5 fusion protein in the EGY48 yeast strain. Rat library cDNA was inserted into the "prey". The first step in the library screening was performed by a galactose dependent leucine orthotrophism. For the second step screening, a β-galactosidase dependent discoloration of colonies was used. Sequencing and searching of the gene bank was undertaken to characterize the clones. **Results**: We screened a total of 1.3×10^6 clones from the cDNA library. On the first screening, 162 clones were identified by leucine orhotrophism. Another 54 clones were identified on the second screening by β-galactosidase activation. Seven clones were selected by PCR and restriction patterns. Sequencing of seven molecules revealed that four of the clones were emerin fragments, with 2 of the remaining 3 clones being: an ID2 protein and a mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II, with the last one remaining an unknown molecule. For the emerin fragments, their interactions with the GRK5 were confirmed by immunoprecipitation. **Conclusion**: We describe the novel protein-protein interactions of the GRK5, specifically, with three molecules. At first, these proteins may modulate the activation of the GRK5 through this specific protein-protein interaction desensitizing the beta-adrenergic receptors. Conversely, the localization of these molecules inside the cell indicates a potential new physiological role for the GRK5. **(Korean Circulation J 2002;32(7):613-622)**

KEY WORDS: GTP-binding proteins; GRK5; Yeasts; Two-hybrid system techniques; Rats; Heart.

논문접수일 : 2001년 10월 26일
수정논문접수일 : 2002년 4월 25일
심사완료일 : 2002년 6월 17일
교신저자 : 최동주, 660 - 280 경남 진주시 칠암동 92 경상대학교 의과대학 순환기내과학교실, 건강과학연구원
전화 : (055) 750 - 8055 · 전송 : (055) 758 - 9122 · E - mail : djchoi@nongae.gsnu.ac.kr

서 론

G protein-coupled receptor kinase(GRK)는 G 단백 연관수용체의 신호전달에 관여하는 효소들이다.[1] GRK들은 아고니스트가 결합한 수용체만을 선택적으로 구분하여 인산화시킨다. 수용체가 인산화되면 세포내의 arrestin이 인산화된 수용체에 결합하여 수용체와 G 단백 사이의 작용을 차단한다(" uncoupling "). 이러한 인산화는 수용체를 탈감작(desensitization)시킬 뿐 아니라 endocytosis를 통해 수용체를 세포막으로부터 세포질 내로 내화(internalization)시킨다. 세포내로 흡수된 수용체는 탈인산화되어 세포막으로 되돌아가거나 라이소솜에서 분해된다. 현재 7종류의 GRK 아형이 알려져 있는데 물질의 구조나 유사성에 따라 3부류로 분류된다. GRK1(rhodopsin kinase)와 GRK7 ; GRK2(일명 βARK1)와 GRK3(일명 βARK2) ; 그리고 GRK4, GRK5 및 GRK6로 구분된다. GRK들은 공통적인 물질 구조를 갖는데, 중간 270개 정도의 아미노산으로 구성되는 효소반응 구역(catalytic domain), 수용체와 상호작용을 하는 190개 아미노산으로 이루어진 N-terminal domain 및 105 233개의 아미노산으로 구성되어 세포막의 인지질과 반응하는 C-terminal domain으로 구성된다. 최근까지만 해도 GRK의 유일한 반응 기질은 G 단백 연관수용체(G protein-coupled receptor)로만 알려져 왔다. 그러나 최근 몇몇 연구들에 의하면 GRK는 세포 골격 단백인 tubulin이나 synuclin과 결합하여 이들을 인산화시킬 수 있음이 밝혀졌다. 이러한 사실들은 GRK가 지금까지 알려진 것보다는 더 많은 물질과 선택적으로 반응할 뿐 아니라 세포에서 더 넓은 범위의 신호 전달에 관여할 가능성을 시사한다.[2-4]

효모 이중-중합 시스템(yeast two-hybrid system : YTH)은 효모균이 동시에 여러 가지 플라스미드(plasmid)에 의해 변형(transformation)될 수 있으며, 유전자 조작에 의한 정상굴성(orthotropism)을 이용하여 성장을 통제할 수 있고, 표식자(reporter) 유전자를 제어하여 군락의 발색 반응을 유도할 수 있어 단백 발현 단계에서의 라이브러리 검색(library screening)에 효과적이다. 효모 이중-중합 시스템에는 기본적으로 세 가지 플라스미드가 필요하다. 첫째는 미끼(bait) 플라스미드로 pEG202가 사용된다. pEG202에는 ADH 프로모터에 의해 LexA 단백이 효모균 안에서 합성되는데, 플라스미드의 LexA 위치 바로 뒤에 multicloning site가 있어 연구하려는 물질의 cDNA를 프래임에 맞게 넣으면 LexA-융합 단백이 합성된다. LexA 단백은 효모균이나 표식자 유전자에 있는 LexA operator 위치에 결합할 수는 있으나 전사(transcription)를 일으키지는 못하는 결합 도메인(binding domain : BD)으로 작용한다. 두 번째 플라스미드는 포획(prey) 플라스미드 pJG4-5로 GAL1 프로모터 뒤에 전사 활성화 도메인(activating domain : AD)이 있어 LexA operator에 결합하면 효모균이나 표식자 유전자 단백의 전사를 활성화할 수 있다. pJG4-5의 AD 바로 뒤에도 multicloning site가 있는데 이곳에 원하는 cDNA 라이브러리를 삽입하여, 효모균 안에서 AD-융합 단백을 합성한다. 전사의 활성화를 위해서는 효모균 내에서 미끼와 포획이 결합하여 함께 LexA operator에 부착돼야 한다. 셋째는 표식자 플라스미드 pSH18-34로 GAL1 프로모터 부위에 LexA operator가 있어 BD과 AD이 함께 이곳에 결합되면 lacZ 유전자를 활성화하여 효모균 군락을 푸른색으로 변색시킨다(Fig. 1). 세 가지 플라스미드를 효모균에 변형시킨 후 일정한 조건으로 배양하면 라이브러리의 물질 중 미끼와 반응하는 단백을 함유한 효모군 군락은 표식자 유전자를 활성화시켜 다른 군락들과 구별할 수 있다. 양성반응을 보이는 군락 효모균에서 pJG4-5 플라스미드를 정제하면 새로운 반응 물질의 cDNA를 얻을 수 있다(Fig. 2).[5-8]

본 연구에서는 단백 반응 트랩(protein interaction trap)의 하나인 효모 이중-중합 시스템을 이용해 신생아 쥐의 심장 라이브러리를 검색하여 GRK5와 반응하는 새로운 물질을 찾아내어 GRK5의 새로운 작용을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재 료

본 연구의 효모 이중-중합 시스템에 사용된 플라스미드 벡터는 pEG202(" 미끼 " 플라스미드 : *HIS3*$^+$ for making LexA fusion), pJG4-5(" 포획 " 플라스미드 ; *HIS3*$^+$ for making AD fusion), pSH18-34(*URA3*$^+$, LexA 결합부위를 갖는 lacZ 표식자), JK101(*URA3*$^+$, 억제 반응을 위한 lacZ 표식자), RFHM1(*HIS3*$^+$ as, 전사능(transcription activity) 측정을 위한 음성 대조군)

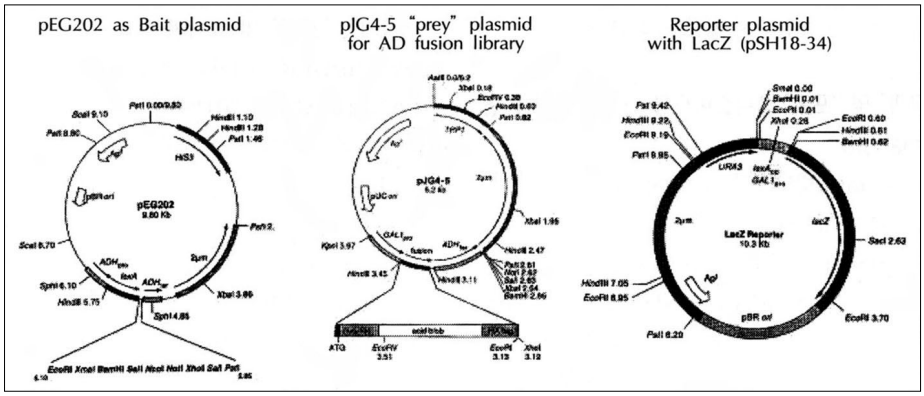

Fig. 1. Plasmids used in yeast two-hybrid system for library screening : pEG202 as "bait" plasmid ; pJG4-5 as "prey" plasmid ; pSH18-34 as reporter plasmid. AD : activation domain.

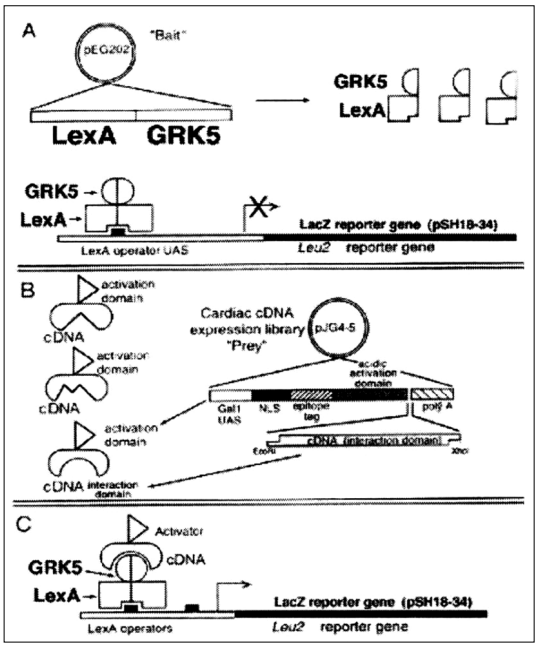

Fig. 2. "Bait" fusion protein (LexA-GRK5), which is generated in yeast, cannot bind to LexA operator site for transcription (A). Many library molecules fused with AD domain to make "prey" fusion protein (AD-library) were generated in yeast. Among them, only several "prey" fusion molecules which interact with GRK5 can bind to "bait" protein (B). After interaction of "bait" with "prey", LexA bind to operate site and AD domain can start transcription of reporter molecule (C). GRK5 : G protein-coupled receptor kinase 5.

등이 사용되었으며, 효소는 EGY48(MAT α, *his3, trp1, ura3-25, leu2 : pLEU2-LexAop6*)가 사용되었다. 항 LexA 항체는 Clontech에서 구매하였다. Agarose A, ECL등은 Pharmacia에서, 항 GRK5 폴리클론 항체는 Santa Cruz에서 구매하여 사용했다.

"미끼" 플라스미드(bait LexA fusion plasmid) 제작

효모 이중-중합 시스템의 "미끼"로 사용될 LexA-GRK5 융합 플라스미드를 제작하기 위해, pRK5-GRK5를 EcoRI과 SalI 제한효소로 절단하여 GRK5의 전체 cDNA(1.78 kb)를 얻어 pEG202의 multiclonig site에 pEG202-GRK5-EcoRI/SalI으로 접합하여 GRK5의 단백질 전사 배열순이 pE202의 LexA 단백에 연이어 순차적이 되게 하였다(Fig. 1).

"포획" (prey) 융합 플라스미드 제작(심장세포 cDNA library)

라이브러리 검색을 위하여 신생아 쥐의 심근세포의 pJG4-5 activation domain(AD) 융합 플라스미드를 제작하였다. 신생아 쥐 좌심실세포에서 total RNA로부터 poly(A) RNA를 추출하여 Moloney virus의 역전사 효소와 oligo(dT)를 사용하여 일차 전사 cDNA 가닥(strand)를 합성하고 XhoI 반응 위치를 첨가하였다. 2차 cDNA 가닥을 합성한 후 5 말단에 EcoRI adaptor를 붙인 후 pJG4-5에 넣었다(Fig. 1). 그 결과 천삼백만개 가량의 서로 다른 클론을 얻었으며, 라이브러리의 cDNA 클론의 92%는 500 bp에서 2 Kb, 평균 1.0 Kb의 크기였다. 이렇게 제작된 플라스미드는 galactose-inducible GAL1 프로모터에 의해 단백 발현이 조절되었다. 라이브러리를 갖는 효모를 2% galactose와 1% raffinose(Gal/Raf)가 포함된 배지에서 키우면 "포획" 융합 단백이 발현되나, 2% glucose(Glu)가 있는 배지

에서는 발현되지 않도록 하였다.

표식자, "미끼" 및 "포획" 플라스미드를 이용한 효모 변형(transformation)

Lithium acetate 방법으로 두 가지(pEG202 - LexA/GRK5와 pJG4 - 5 - AD/prey) 플라스미드와 표식자 플라스미드인 pSH18 - 34를 효모에 넣은 후 단일 균주를 선별하였다. 20 mL 선별 배지(YDP media)에 단일 집락을 취하여 30에 600 nm에서 OD 0.6에서 0.8되도록 배양했다. 배양 후 원심분리하여 침강물을 증류수로 세척한 후, 새로 만든 TE 버퍼(10 nM Tris - Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 녹인 lithium acetate 용액 1.5 mL에 2.5 μg 플라스미드 DNA와 100 μg의 끓인 salmon sperm DNA를 넣은 후 200 μL의 효모 혼탁액을 첨가한다. 혼합 용액을 30에서 30분간 흔들고 1.2 mL의 PEG - 400을 첨가한 후 다시 30분 더 배양한다. 혼합 용액을 42℃에서 15분간 열처리(heat shock)한 후 원심침전 후 선택배지 플래이트에서 48시간 효모를 배양한다. 선택배지 플래이트는 "미끼" 플라스미드와 LacZ 표식자 플라스미드를 구별하기 위한 uracil(URA^-)과 histidine(HIS^-)가 없는 배지에 "포획" 플라스미드를 위한 tryptophan(Trp^-)가 빠진 배지로 만든 플래이트를 사용했다.

"미끼" 단백 발현 확인

효모에 넣어진 "미끼" 플라스미드로부터 "미끼" 단백이 발현되어 안정하게 존재하는지를 알기위해 효모로부터 단백을 추출하여 확인한다. 분쇄 버퍼(8 M urea, 5% SDS, 40 mM Tri - HCl(pH 6.8), 0.1 mM EDTA, 0.4 mg/mL bromophenol blue)를 60에서 데운 후, 효모균을 OD_{600}에서 7.5 unit이 되도록 하여, 80 μL glass bead와 1.5 mL 튜브에서 10분 동안 70℃에서 가열한다. 원심분리 후 100에서 3분 가열한 후 Western blot으로 확인했다.

cDNA 라이브러리 선별(screening)

pJG4 - 5와 발현되는 라이브러리 단백들 중 GRK5와 반응하는 물질을 높은 특이성으로 선별하기 위해 galactose - 유도 LacZ 표식자로 양성 군락을 구별하는 일차 선별 후, galactose - 유도 leucine orthotrophism으로 양성을 구별하는 2차 선별을 거쳐 GRK5 반응 단백을 찾아냈다.

"미끼", "포획" 및 표식자 플라스미드로 변형된 효모균을 Glu/Ura(-) His(-) Trp(-)인 24×24 cm 플래이트에 도말하여 30℃에서 3일 동안 배양한다. 자라난 효모균 군락들을 긁어내어 20 mL의 65% glycerol, 10 mM Tris - Cl(pH 7.5), 10 mM $MgCl_2$에 혼합한 후 1 mL씩 분주하여 - 80℃ 냉동고에 보관한다. 이들 galactose - 생존 효모균 군락들 중 leucine - orthotrophism을 선별하기 위해, galactose 유도 후 4개의 Gal/Raf Ura(-), His(-), Trp(-) Leu(-)에 도말한 후 30℃에서 4일 간 배양하여 군락이 출현하기 시작하면 한 군락씩 취하여 Glu/Ura(-) His(-) Trp(-) 마스터 플래이트에 도말하여 2차 선별을 시작한다. 일차선별에서 얻은 효모균들을 Glu/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-), Glu/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Lue(-), Gal/Raf/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-), Gal/Raf/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Lue(-) 등 4종류 플래이트에 도말하여 4일 이상 배양하여 차례로 효모균 군락을 취하여 마스터 플래이트에 도말했다. 이때 자란 효모균들은 galactose 유도로 leucine 없이 성장할 수 있을 뿐 아니라, galactose 유도에 의해 X - gal 배지에서 푸른색을 나타낸다. 이들 이차 양성 군락들을 얻어 DNA를 분리한다.

라이브러리 플라스미드의 분류

라이브러리 스크리닝에서 양성 반응을 보인 효모 clone에서 플라스미드를 추출하여, pJG4 - 5만을 선택적으로 얻기 위해 KC8 대장균에 변형(transformation)시켜 Trp(-) ampicillin 플래이트에서 배양했다. Trp(-) ampicillin 배지에서 자란 균은 pJG4 - 5 플라스미드를 갖는 균으로 이들로부터 플라스미드를 추출하여, pJG4 - 5 플라스미드에 있는 융합 물질을 구별했다. 이러한 라이브러리 플라스미드의 구분은 EcoRI과 XhoI 제한 효소에 의한 절단 양상과 PCR 후 HaeIII 혹은 AluI 절단 양상을 비교하여 라이브러리에서 얻은 물질을 구분했다. pJG4 - 5에 삽입된 라이브러리 DNA를 구분하기 위한 PCR을 위한 5 - primer는 EcoRI 위치의 앞쪽 염기서열(5 '- CCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATG)을 사용했고, 3 - primer는 XhoI 위치 아래쪽(5 - GACAAGCCGACAACCTTGATTGGAG)를 사용했다. PCR 조건은 92℃에서 30초 denaturation시킨 후 65℃에서 2

분간 annealing하고 75°C에서 30초 extension시켰다. PCR 생성 DNA는 HaeIII와 AluI으로 절단한 후 1.0% Tris - borate gel에서 관찰하였다. 이들 가운데 서로 다른 DNA들만을 골라 염기 서열을 분석하여 물질을 확인한다.

결 과

미끼 단백 발현과 효모 이중 - 중합 시스템의 확인

GRK5와 반응하는 새로운 물질을 찾기 위해 일반적인 물질 전사(transcription) 단계에 의한 단백 - 단백 상호작용을 찾는 효모 이중 - 중합 시스템을 사용하였다. 이 단백 상호 반응 트랩(interaction trap)은 효모균 내에서 단백 - 단백 상호 반응을 전사 단계에서 찾아내기 위해 개발된 시스템이다. 효모 이중 - 중합 시스템을 구축하기 위해서는 다음 세 가지 요소가 필요하다. 첫째는 LexA DNA - binding domain을 포함하는 중합 단백으로 다른 물질 전사에 영향을 미치지 않아야 하며(" 미끼 " 단백), 두 번째는 표식자(reporter) 유전자로서 기본적 전사능이 없어야 하고, 세 번째는 라이브러리에서 발현된 융합 단백 물질로 아미노 말단에 activation domain을 갖는다.

본 연구의 첫 단계로 " 미끼 " 단백 플라스미드를 제작하여 효모균에 변형시킨 후 LexA - GRK5 " 미끼 " 융합 단백이 EGY48 효모균에서 정상적으로 발현되는지를 확인하였다. EGY48을 Gal/Raf Ura(-) His(-) 배지에서 24시간 배양한 후 단백을 추출하여 시행한 Western blot으로, monoclonal anti - LexA 항체를 일차 항체로 사용하여 105 kDa 크기의 LexA - GRK5 융합 단백이 잘 발현됨을 보여 주고 있다(Fig. 3). 융합 단백의 크기는 GRK5 79 kDa와 LexA 26 kDa의 합으로 둘 단백의 융합체임을 보여준다. 첫 번째 열에서 세 번째 열까지는 전기 영동한 단백량을 각각 15 μg, 10 μg, 5 μg으로 낮게 했으며, 마지막 열의 대조 단백은 EGY48 효모균을 pRFHM1 플라스미드로 변형한 후 추출한 단백을 사용하였다. 두 균주 모두 유사한 성장을 보였는데, " 미끼 " 단백이 EGY48 효모균에 유해하지 않음을 나타낸다.

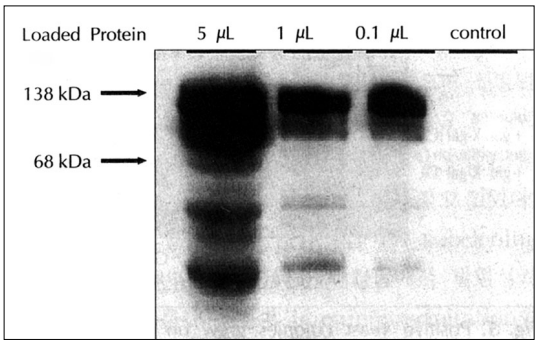

Fig. 3. After yeast, EGY48, was transformed by "bait" plasmid, protein was purified from it and Western blot was performed with anti-LexA antibody as primary antibody. LexA-GRK5 fusion protein (138 kDa) was well expressed in EGY48.

pJG4-5의 신생아 쥐 심실 라이브러리 선별 검사

선별 검사에 사용된 EGY48 효모균을 pJG4 - 5 " 포획 " 플라스미드, pEG202 - LexA - GRK5 " 미끼 " 플라스미드 및 pSH18 - 34 표식자 플라스미드로 변형시킨 후 YPD 플래이트에 72시간 배양하여, 효모균 군락들을 수집하여 글리세롤과 영하 80°C에 보관하였다. 이 중 1.3×10^6 효모균 군락을 계산하여 galactose 유도 후 10개의 Gal/Raf Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-) 10 cm 플래이트에 도말 배양했다. 둘째 날에서 일곱째 날 사이에 새로 직경 1 mm자라는 효모균 군락을 각각 순서대로 수집하였다. 일차 선별 검사에서 수집한 군락 수는 총 162개로 Glu/ Ura(-) His(-) Trp(-) 마스터 플래이트에 도말하여 제 2 차 선별 검사를 준비했다. 제 2 차 선별 검사는 leucine orthotrophism을 이용한 1차 선별 검사에서의 위양성 군락을 제거하기 위한 단계이다. 이론적으로는 " 미끼 "와 " 포획 " 플라스미드를 함께 갖는 효모균만이 leucine이 포함되지 않은 배지에서 자랄 수 있으나, 많은 수의 위양성 군락이 생성된다. 이를 재확인하기 위해 162군락의 효모균을 각각 Glu/ Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-), Glu/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-), Gal/Raf/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-), Gal/Raf/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-) 네 가지 플래이트 위에 도말하여 배양했다. 이들 중 Gal/Raf/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-) 플래이트에서 자라나 Glu/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-) 플래이트에서는 자라지 않고, Gal/Raf/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-) 플래이트에서는 푸른색 군락으로 변색되나 Glu/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-) 플래이트에서는 변색되지 않는 54군락을 수집하였다.

선별된 라이브러리 플라스미드의 분류

이차 라이브러리 선별 검사 후 수집한 54개 군락의 EGY48 효모균으로부터 플라스미드를 추출했다. 추출한 플라스미드 중 pJG4-5 "포획" 플라스미드만을 얻기 위해 KC8 대장균을 EGY48에서 얻은 플라스미드(세 가지 플라스미드 존재)로 변형시켜 Trp(-) ampicillin 플래이트에 배양한 후 다시 플라스미드를 분리했다(pJG4-5만 존재). 분리한 54가지의 플라스미드를 PCR한후 HaeIII와 AluI제한 효소로 절단하여 전기 영동하였다(Fig. 4). 잘린 DNA 크기와 양상을 비교하여 플라스미드 DNA 7개가 서로 다른 군락에서 나온 것임을 알았다.

최종적으로 선별된 7가지의 pJG4-5의 위 양성 여부를 시험하기 위해 pSH18-34와 pEG202-LexA-GRK5를 갖고 있는 EGY48을 7가지 pJG4-5로 변형시킨 후 Glu/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-), Glu/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-), Gal/Raf/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-), Gal/Raf/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-) 4 가지 플래이트에 도말 배양하여, 성장 양상과 변색 여부를 관찰한 후 모두 양성 군락임을 재차 확인하였다(Fig. 5).

또한 pEG202-LexA-GRK5 대신 대조군으로 pFM-H1 혹은 pEG202-LexA-FKBP로 함께 EGY48을 변형시킨 후 Glu/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-), Glu/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-), Gal/Raf/Xgal/CM Ura(-) His(-) Trp(-), Gal/Raf/CM Ura(-) His(-) Trp(-) Leu(-) 4가지 플래이트에 도말 배양하여, 7개 모든 군락이 FKBP나 pRFMH1에 의해 전사에 영향을 받지 않고 galactose-의존성 전사에 의한 선별이었음을 보였다(Fig. 6, 7).

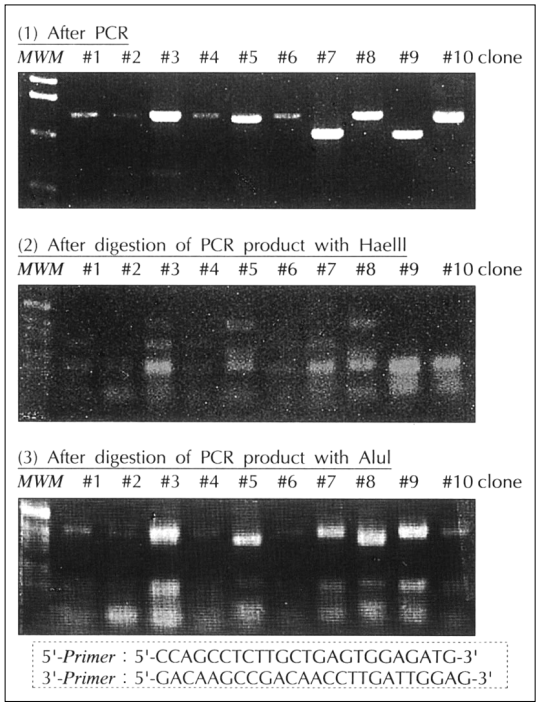

Fig. 4. Positive clones from library screening were subjected to classification by PCR and restriction pattern. Discrimination by size after PCR (1). Restriction by HaeIII and (2) AluI (3).

새로운 GRK5 반응 단백의 확인

각 7개 군락으로부터 얻은 pJG4-5에 삽입된 물질을 알아보기 위해 DNA 염기서열을 결정한 후(automatic sequencer 사용, Perkin-Elmer, ABI PRISM 377 DNA sequencer : ACO1 and BCO1 as primer) 유전자 Gene bank를 검색하였다. 7 roclone 중 4개가 서로 다른 길이의 같은 판독 순열(reading frame)을 갖는 단백물질로, 34 Kda의 serine이 풍부하게 함유된 emerin이라는 물질이었다(NCBI Entrez NID : g4557552, accession : NM_000117.1). 선별된 Emerin의 DNA 염기 서열은 2개가 12번째 codon에서 시작되었으며(emerin$_{12-783}$), 하나는 279번째 codon에서(emerin$_{279-783}$), 다른 하나는 297번째에서(emerin$_{297-783}$) 시작되었다.

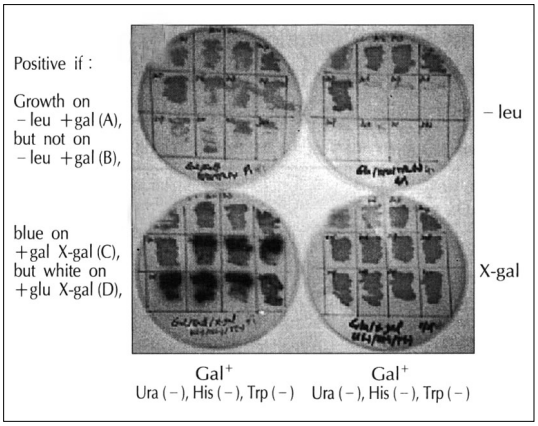

Fig. 5. Positive yeast colonies grew on galactose media without leucine (A) but not on glucose media without leucine (B), and were discolorated to blue on galactose media with X-gal (C) but not on glucose media with X-gal (D). Leu : leucine, Gal : galactose, Ura : uracil, His : histidine, Trp : tryptophan, Glu : glucose.

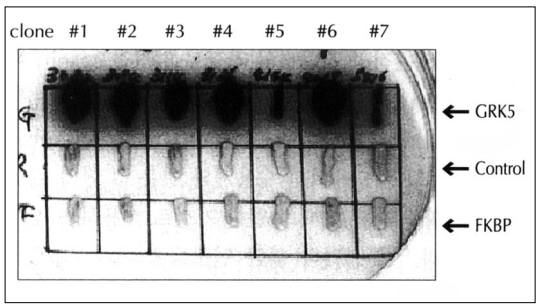

Fig. 6. To exclude the probability of false positive, non-specific control molecule, FKBP, was fused to LexA instead of GRK5, and cotrol plasmid, RFHM1, was expressed with pJG4-5 of positive clones in yeast together. Only yeast colonies possessing GRK5 turned to blue on galactose media with X-gal.

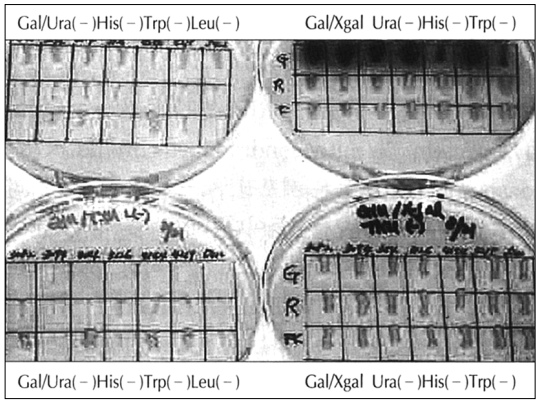

Fig. 7. Test false positive : yeast colonies with pEG202-GRK5 only showed leucine orthotrophism and discloration by X-gal.

다섯 번째 군락에서 추출된 물질은 ID2 protein으로 (g434790, accession : D_10863), 선별된 ID2 protein은 48번째 codon부터 시작되었으며, 여섯번째 군락의 물질은 mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II(NCBI Entrez NID : NCBI Entrez NID : g343181, accession : M_27315)이었으며 선별된 subunit II는 3,100번째 codon에서 시작하여 3,783번째 codon에서 끝났다. 나머지 한 개의 군락에서 추출된 물질은 아직 알려지지 않은 DNA염기 서열을 갖고 있었다.

이들 물질 중 emerin을 pGEX4T - 1에 subcloning 하여 GST - emerin 융합단백을 대장균에서 발현시켜 anti - GST 항체를 사용하여 immunoprecipitation한 후 전기영동하여 anti - GRK5 항체로 western blot하여 GRK5와 emerin이 서로 반응함을 재차 확인하였다 (Fig. 8).

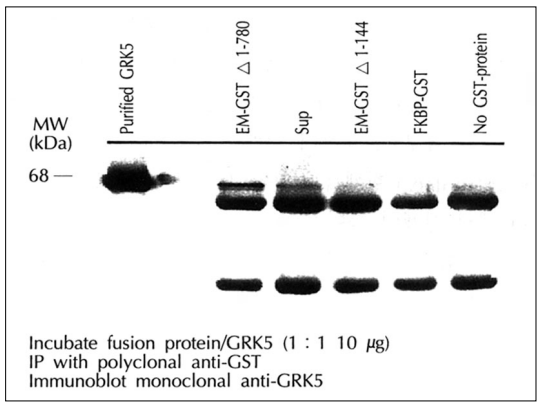

Fig. 8. pGEX-GST-emerin fusion construct was transformed to E. col and its extract was immunoprecititated with anti-GST antibody and Western blot was performed anti-GRK5 as primary anti-body. Emerin was interact with GRK5 specifically.

고 찰

본 연구 결과에 의하면 효모 이중 - 중합 시스템을 이용하여 GRK5와 반응하는 네 가지 단백 물질을 새로이 발견하였다. 이들 중 한가지는 그 염기 서열이 보고된 바 없는 새로운 물질이다. 네 개의 클론에서 서로 다른 크기와 open reading frame으로 발견된 emerin은 이들 중 GRK5와 가장 반응성이 강하고 특이적인 물질로 핵막에 존재하여 선천적으로 이상이 있으면 Emerie - Dreiffus muscular dystrophy라는 심근병증을 동반하는 근이양증을 일으킨다.[9)10)]

GRK5와 반응하는 새로운 물질을 찾기 위해 효모 이중 - 중합 시스템을 구축하였는데 이 시스템에 의한 새로운 물질 탐색은 단백 상호 작용 단계에서 특정한 라이브러리를 검색하여 DNA를 클론할 수 있다. 효모 이중 - 중합 시스템은 전사 활성 물질들이 하나의 모듈처럼 작용하는 특성을 이용한 것으로 효모균 내에서 단백 - 단백 반응을 전사 단계에서 찾아낸다. 이 시스템의 구축을 위해서는 기본적인 세 가지 요소들의 설정이 요구된다. " 미끼 "라고 불리는 스스로의 전사능이 없는 LexA DNA - binding domain 융합 단백과 " 미끼 "와 결합하는 표식자 유전자, 그리고 activation domain의 아미노 말단에 융합되어 라이브러리 물질들을 발현시킬 수 있는 카이메라 물질의 발현이 필요하다(Fig. 1). 효모 이중 - 중합 시스템의 단점은 위양성 반응을 보이는 클론을 찾아낼 수 있다는 것이다.[5)8)] 본 연구에서도 위양성

반응을 방지하기 위해 여러 단계의 확인 과정을 거쳤다. 처음 LexA 융합 단백을 효모균에서 발현시키는 과정에서 생성된 단백질이 올바른 LexA - GRK5 융합 단백인지는 효모균으로부터 단백을 분리하여 anti - LexA와 anti - GRK5 항체를 사용하여 각각의 western blot 결과에서 항체에 특이적으로 반응하며 그 크기가 105 kDa로 GRK5 크기 79 kDa와 LexA의 크기 26 kDa의 합과 일치함을 보여주었다(Fig. 3). 다음 단계의 확인 과정은 전사 단계의 비특이성 문제이다. EGY48 효모균을 LexA - GRK5 융합체를 갖는 " 미끼 " 플라스미드와 pSH18 - 34 표식자 플라스미드로 함께 변형시킨 후, 대조군으로 pRFHM1 플라스미드와 pSH18 - 34 플라스미드로 변형시킨 EGY48 효모균을 비교 배양하여 두 군의 효모균 군락이 모두 변색되지 않고 같은 성장 속도로 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 LexA - GRK5 융합 " 미끼 "가 효모균에 대하여 비특이적 자가 전사능이 없음을 보여주는 동시에, 효모균에 대하여 독성이 없음을 나타낸다.

다음으로 검정되어야 할 조건은 LexA - GRK5 융합 단백이 핵 안으로 들어가 유전자와 결합해야 된다. Galactose 배지에서 배양될 경우 자동적으로 β - galactosidase 활동성을 갖는 pJK101 플라스미드와 " 미끼 " 플라스미드로 함께 EGY48을 변형시켜 galactose 배지에서 배양하여 β - galactosidase 활동성을 측정했다. Galactose만을 함유한 배지에서 pJK101 플라스미드를 갖는 효모균을 배양하면 효모균이 GAL4를 생성하여 pJK101의 USA GAL에 붙어 β - galactosidase 활동성을 나타낸다. 그러나 LexA 융합 단백이 LexA operator 염기 서열에 부착되면 USA GAL의 활성을 차단한다. 미끼 플라스미드와 pJK101 플라스미드로 함께 변형된 효모균은 β - galactosidase 활동성을 억제하여 LexA - GRK5 융합 단백이 핵 안으로 들어가 유전자와 결합함을 나타냈다. 다음 단계는 라이브러리에서 선별된 GRK5와 반응하는 물질의 위양성 여부의 검증이다. 라이브러리 검색에 의해 선별된 pJG4 - 5의 " 포획 " 플라스미드를 LexA - GRK5(" 미끼 ") 혹은 LexA 혹은 대조 플라스미드인 LexA - FKBP 융합 플라스미드와 함께 각각 EGY48을 변형시킨 후 배양하여 비교하였는데(Fig. 6), 이는 " 미끼 "와 반응했던 물질들은 위양성이 아니었음을 나타낸다. 이상의 결과들은 GRK5는 emerin, ID2 protein 및 mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II와 특이적으로 반응함을 보여준다.

GRK는 일반적인 키나제의 기질로 알려진 casein 혹은 phosvitin 등도 인산화 시키지 않는 점으로 매우 특성화된 키나제로 알려져 왔으며, GRK5의 기질(substrate)은 베타 아드레너직 수용체와 같은 G 단백 결합 수용체가 활성화 됐을 때 유일한 기질로 작용하는 것으로 알려졌다.[11)12)] 그러나 최근 연구들에 의해 GRK의 작용은 더욱 광범위하며 다른 물질들과도 반응하는 것으로 밝혀지고 있다.[13)] 최근 연구에 의하면 GRK는 세포골격 단백인 tubulin과 synuclein을 인산화 시킬 수 있으며, 이러한 인산화는 베타 아드레너직 수용체 활성화에 의해 시작하는 것으로 알려져 있다.[14)15)] 그 외에도 GRK6는 Na^+/H^+ exchanger regulatory factor를 인산화하는데 PDZ domain 반응에 의한 특이적 결합을 형성한다.[16)] 본 연구에서 신생아 쥐 심장의 라이브러리 검색에서 발견한 GRK5 연관 물질인 emerin, ID2 protein 및 mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II 등은 세포질, 핵막 혹은 미토콘드리아에 널리 분포하는 물질들이다. 이들 중 특히 emerin이 가장 GRK5와 특이적으로 반응하여, 서로 다른 네 개의 클론이 반응했다(Fig. 7). Emerin은 핵의 내막의 lamine에 붙어 존재하는 물질로 전기영동하면 34 kDa 단백으로 나타난다.[17)] 사람에서 선천적으로 emerin 유전자에 이상이 생기면 Emery - Dreifuss Muscular Dystrophy라는 근이형성증이 발생하는데, 전도장애를 동반한 심근병증을 동반한다. 그러나 아직 emerin의 핵막에서의 역할이나 심근병증을 유발하는 기전 등은 잘 밝혀져 있지 않아 향후 더 많은 연구가 필요하다.

본 연구에서 지금까지 알려진 GRK5의 베타 아드레너직 수용체를 비롯한 G - 단백 연관 수용체의 조절 작용 외에도, GRK5가 세포내부나 핵막에 대해 새로운 기능을 가질 가능성을 제시해주고 있다. GRK5는 심근 수축력을 조절할 뿐 아니라 심부전이나 심근 비후 등 심장의 병적 상태에 발현이 변하는데, 이는 GRK5의 기능이 심장에서 수용체의 조절기능에 국한되어 있지 않음을 시사한다. 실제로 G - 단백 연관 수용체 외에 기존에 GRK5와 반응하는 것으로 알려진 세포내의 물질들과 함께, 본 연구에서 클로닝된 emerin, ID2 단백 등과의 기능적 관계와 역할에 대해서는 더 많은 연구가 필요하다.

요 약

배경 및 목적 :

GRK의 유일한 반응 기질은 G 단백 연관수용체(G protein - coupled receptor)로만 알려져 왔다. 그러나 최근 GRK는 세포 골격 단백 및 세포전달 물질과도 결합할 수 있음이 밝혀져, GRK가 지금까지 알려진 것보다 더 많은 물질과 선택적으로 반응할 것으로 기대되고 있다. 본 연구의 목적은 효모 이중 - 중합 시스템을 이용하여 GRK5와 반응하는 새로운 물질을 찾아보는데 있다.

방 법 :

본 연구에 사용된 효모 이중 - 중합 시스템은 EGY48 효모균 내에 LexA - GRK5 융합단백을 발현시키기 위해 pEG202 - GRK5 - EcoRI/SalI을 " 미끼 " 플라스미드로 사용하였다. 쥐 심장 cDNA 라이브러리를 " 포획 " 플라스미드인 pJG4 - 5에 삽입하여 효모균 내에서 AD (Activating Domain) - 융합 단백으로 발현되게 하였다. 효모 이중 - 중합 시스템의 첫 단계는 galactose에 의한 leucine의 orthotrophism을 이용한 라이브러리 검색이며, 두 번째 단계는 β - galactosidase에 의한 효모 군락의 발색 반응으로 양성 클론을 구별한다. 이 단계에서 표식자 플라스미드로 pSH18 - 34로 효모균을 변형시켜 사용하였다. 라이브러리 검색을 통해 얻은 양성 클론들의 분류는 PCR에 의한 크기와 AluI과 HaeII 제한효소에 의한 절편 양상에 따라 하였다. 최종적으로 얻어진 클론들은 염기서열을 분석하여 유전자은행의 정보를 이용하여 어떤 물질인가를 확인하였다.

결 과 :

효모 이중 - 중합 시스템을 이용하여 cDNA 라이브러리에서 130만개의 클론을 검색하였다. Leucine이 결핍된 배지에서 7일 동안 1차 검색 결과 162개의 양성 군락을 얻었다. 2차 검색에서는 β - galactosidase를 활성화시켜 푸른색으로 발색된 54개의 클론을 선별하였다. 이들을 PCR 산물의 크기와 제한 효소에 의한 절단 양상으로 분류하여 7개의 서로 다른 클론을 찾았다. 염기서열 분석 결과 4개의 클론은 서로 다른 조각의 emerin이었으며, 나머지는 각각 ID2 protein, mitochondrial cytochrome c oxidase subunit II 및 미지의 물질 한가지였다. 이들 중 emerin은 34 kDa 크기의 serine - rich 단백물질로, pGEX - 4T - 1을 사용하여 GST - emerin 결합 단백질을 합성하여 GRK5와 반응함을 면역침강법으로 확인하였다.

결 론 :

본 연구를 통하여 GRK5가 새로운 세 가지 물질들과 결합 - 반응함을 파악하였다. 이는 GRK5가 기존에 알려지지 않은 신호 전달 기능이 있을 가능성을 시사한다. 이는 두 가지 의미를 내포하는데, 하나는 이들 물질과 GRK5의 새로운 단백 반응에 의해 베타 아드레너직 수용체의 탈감작 반응을 조절할 수 있음을 시사하며, 다른 하나는 GRK5의 작용이 세포막의 수용체에 국한되지 않고 세포내 핵막 등에서 다양한 기능을 가질 수 있음을 나타낸다.

중심 단어 : G protein - coupled receptor kinase5 (GRK5) ; 효모 이중 - 중합 ; 백서 ; 심장.

본 연구는 1998년도 대한순환기학회 산학협동 연구비와 한국과학재단 목적기초연구(1999 - 2 - 207 - 001 - 5) 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

1) Strader CD, Fong TM, Granziano MP, Tota MR. *The family of G protein-coupled receptors. FASEB J 1995;9: 745-54.*
2) Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. FASEB J 1990;4:2881-9.*
3) Krupnick JG, Benovic JL. *The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1998;38:289-319.*
4) Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. *Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. FASEB J 1995;9:175-82.*
5) Roder KH, Wolf SS, Schweizer M. *Refinement of vectors for use in the yeast two-hybrid system. Anal Biochem 1996; 241:260-2.*
6) Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S. *The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:9578-82.*
7) Hughes SR, Goyal S, Sun JE, Gonzalez-DeWhitt P, Fortes MA, Riedel NG, Sahasrabudhe SR. *Two-hybrid system as a model to study the interaction of beta-amyloid peptide monomers. Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:2065-70.*
8) Gyuris J, Golemis E, Chertkov H, Brent R. *Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates Cdk2. Cell 1993;75:791-803.*
9) Nagano A, Koga R, Ogawa M, Kurano Y, Kawada J, Okada R, Hayashi YK, Tsukahara T, Arahata K. *Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with emery-dreifuss muscular dystrophy. Nat Genet 1996;12:254-9.*
10) Manilal S, Nguyen TM, Sewry CA, Morris GE. *The emery-dreiffus muscular dystrophy protein, emerin, is a nuclear membrane protein. Hum Mol Genet 1996;5:801-8.*

11) Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. Science 1992;257:1264-7.*
12) Loudon RP, Benovic JL. *Altered activity of palmitoylation-deficient and isoprenylated forms of the G protein-coupled receptor kinase GRK6. J Biol Chem 1997;272: 27422-7.*
13) Freeman JL, de la Cruz EM, Pollard TD, Lefkowitz RJ, Pitcher JA. *Regulation of G protein-coupled receptor kinase 5 (GRK5) by actin. J Biol Chem 1998;273:20653-7.*
14) Carman CV, Som T, Kim CM, Benovic JL. *Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled rceptor kinases. J Biol Chem 1998;273:20308-16.*
15) Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, Benovic JL. *Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. J Biol Chem 2000;275:26515-22.*
16) Hall RA, Spurney RF, Premont RT, Rahman N, Blitzer JT, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. *G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na (+)/H (+) exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction. J Biol Chem 1999;274:24328-34.*
17) Small K, Wagener M, Warren ST. *Isolation and characterization of the complete mouse emerin gene. Mamm Genome 1997;8:337-41.*