

CTLA-4 항원의 세포막 도달 기작에서 친수성 N말단 아미노산 잔기의 역할

¹메텍스젠 생명공학연구소, ²한양대학교 의과대학 미생물학교실, ³대구대학교 자연자원대학 생명자원학부

한지웅¹ · 이혜자¹ · 김진미¹ · 최은영² · 정현주² · 임수빈² · 최장원³ · 정용훈²

Role of N-terminal Hydrophilic Amino Acids in Molecular Translocation of CTLA-4 to Cell Surface

Ji-Woong Han¹, Hye-Ja Lee¹, Jin-Mi Kim¹, Eun-Young Choi², Hyun-Joo Chung², Soo-Bin Lim², Jang-Won Choi³ and Yong-Hoon Chung²

¹Biomedical Research Institute of MedExGen Inc., Seoul, Korea, ²Department of Microbiology, College of Medicine, Hanyang University, Seoul, Korea, ³Division of Life Resources, College of Natural Resources, Taegu University, Gyeongsan, Korea

ABSTRACT

Background: This study was aimed to differentiate two forms of CTLA-4 (CD152) in activated peripheral blood lymphocyte and clarify the mechanism how cytoplasmic form of this molecule is targeted to cell surface. **Methods:** For this purpose we generated 2 different anti-human CD152 peptide antibodies and 5 different N'-terminal deletion mutant CTLA4Ig fusion proteins and carried out a series of Western blot and ELISA analyses. Antipeptide antibodies made in this study were anti-CTLA4pB and anti-CTLA4pN. The former recognized a region on extracellular single V-like domain and the latter recognized N'-terminal sequence of leader domain of human CD152. **Results:** In Western blot, the former antibody recognized recombinant human CTLA4Ig fusion protein as an antigen. And this recognition was completely blocked by preincubating antipeptide antibody with the peptide used for the antibody generation at the peptide concentration of 200 ug/ml. These antibodies were recognized human CD152 as a cytoplasmic sequestered- and a membrane bound- forms in phytohemagglutinin (PHA)-stimulated peripheral blood lymphocyte (PBL). These two forms of CD152 were further differentiated by using anti-CTLA4pN and anti-CTLA4pB antibodies such that former recognized cytosolic form only while latter recognized both cytoplasmic- and membrane-forms of this molecule. Furthermore, in a transfection expression study of 5 different N'-terminal deletion mutant CTLA4Ig, mutated proteins were secreted out from transfected cell surface only when more than 6 amino acids from N'-terminal were deleted. **Conclusion:** Our results implies that cytosolic form of CTLA-4 has leader sequence while membrane form of this molecule does not. And also suggested is that at least N'-terminal 6 amino acid residues of human CTLA-4 are required for regulation of targeting this molecule from cytosolic- to membrane- area of activated human peripheral blood T lymphocyte. (*Immune Network* 2002;2(2):102-108)

Key Words: CTLA-4, leader sequence, membrane translocation

서 론

CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CD152) 항원은 CD28 항원의 유사분자(homologue)로서 이 두 분자는 유전자 및 아미노산 구성상의 homology (1) 및 염색체상의 위치(2,3) 그리고 동일한 대응수용체 인

책임저자 : 정용훈, 한양대학교 의과대학 미생물학교실
☎ 133-791, 서울시 성동구 행당동 17
Tel: 02-2290-0644, Fax: 02-2281-8995
E-mail: chungyh@hanyang.ac.kr

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음
(KRF-1998-021-F00149).

식(4,5) 등의 매우 중요한 공통점을 갖고 있다. 그러나 CTLA-4는 CD28과는 달리 T세포가 활성화되어야만 발현되고(5), 대응수용체의 일부가 틀리며(6-8), 세포표면 발현이 CD28의 1/20 이하인 반면 CD80에 대한 결합력은 CD28보다 20배 가량 높으며(4), 또한 CTLA-4 분자는 비정상적으로 길며 수용성이 높은 N'-말단의 친수성이 높은 여유분(redundancy)을 갖는 매우 특이한 막 도달 서열(leader sequence)을 갖고 있다(1,2).

본 연구진은 현재까지 대개의 동종항원, mitogen, super-antigen, 및 T 림프구 표면항원에 대한 항체 등의 자극에 의하여 CTLA-4 항원의 발현이 유도되며, 이 항원은 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 림프구 모두에서 생성되지만 이 항원을 발현하는 주된 세포는 CD8⁺ T 림프구이며, CD4⁺ T 림프구의 helper 기능의 보조가 필요함을 보고한 바 있다. 또한 이 항원 분자는 활성화된 사람 말초혈액 T 림프구에서 세포막형과 세포질 내재형의 두 가지 형태로 존재하고, 이 분자의 대부분(93% 이상)은 일차적으로 세포질 내에 잠복상태로 존재하다가 세포표면으로 전환(translocation) 되고 세포질 내에서는 거대분자량의 단백 복합체를 형성하고 있음을 관찰하였다.

CTLA-4 항원은 크게 두 가지의 특징을 갖고 있는데, 그 첫 번째는 면역학적 특징으로 상기에서 언급한 대로 매우 광범위에 생체 내의 면역반응에 상당한 영향을 미친다는 점이고, 두 번째는 세포생물학적 특징으로 이 항원의 막 표면 발현이 단백 합성 후 즉시 이루어지지 않고 세포질에 잠복하고 있다가 또 다른 후속 자극이 가해져야만 세포표면으로 나가게 된다는 점이다(9). 이 단백 항원의 어느 부위에 cytoplasmic sequestration signal이 존재하는 지는 아직 모른다. 통상 대부분의 막표면 단백질이나 분비형 단백질은 그 N-말단에 소수성이 높은 20~24개의 아미노산으로 구성되는 막 도달 서열을 갖는다. 그러나 본 CTLA-4 분자는 16개의 친수성이 높은 N-말단의 16개의 아미노산과 소수성이 높은 전형적인 막영역에 해당되는 21개의 아미노산 등 도합 37개의 아미노산으로 구성되고 있다. 그래서 기존의 연구 실험들에서는 본 CTLA4Ig 융합단백을 제조할 때에 본 분자의 막 도달 서열을 oncostain M (4) 혹은 IL-6 (10)의 막 도달 서열로 전부 교체하여 발현하고 있다.

이 연구에서는 이러한 결과에 토대하여 사람 활성 T 세포 표면 항원 CTLA-4가 세포질에서 세포막으로 도달하는 특성 기전을 규명하고자 이 분자의 leader sequence 및 세포외역에 대한 2종의 상이한 항-펩타이드 항체를 제조하였다. 이 항체들을 사용하여 이 분자의 세포표면 및 세포질 내 발현 양상의 차이를 조사하는 한편 다양한 막 도달 서열 중 N-말단 결손 변이 CTLA4Ig 융합 유전자를 사용하여 이 분자의 막도달 기전을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

세포배양. 건강한 성인에서 채취한 혈액을 RPMI-1640 배지로 1 : 1로 희석한 후 Ficoll-Hypaque (FH)에 중첩하여 2,000×g로 20분간 밀도구배 원심침전하였고 이를 세척하여 사용하였다. 10% 우태아 혈청 함유 RPMI-1640 배지(FBS-RPMI)로 림프구 농도를 5×10^5 /ml로 조절하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. CTLA-4 발현을 유도하기 위하여 phytohemagglutinin-L (PHA-L, Sigma) 3~10 g/ml를 첨가 배양하였다. CHO-k1 세포는 DMEM배지에 10% FBS를 첨가하여 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다.

항펩타이드 항체 제조. 사람 CTLA-4 분자의 신호펩타이드역과 세포외역에 해당하는 아미노산 서열 중에서 N'-M₁ACLGFRHKAQLNLA₁₆C-C'서열을 갖는 17 mer의 펩타이드 N (CTLA4pN)과 N'-C₁₀₃TGTSSGNQV₁₁₂-C'서열을 갖는 10 mer의 CTLA-4 펩타이드 B (CTLA4pB) 두 가지를 peptide synthesizer를 사용하여 제조한 다음 운반단백질인 keyhole limpet hemocyanin (KLH, Calbiochem, U.S.A.)에 결합하여 면역에 사용하였으며, coupling 반응에는 m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS, Pierce)를 사용하였다. MBS를 dimethyl formamide (DMF)에 녹인 다음, 50 mM sodium phosphate buffer에 녹아 있는 5 mg의 KLH 용액에 1 : 40의 비율로 가한 다음 실온에서 30분간 반응하였고 Sephadex G-25 column을 통과시켜서 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5)로 투석한 후, 준비된 펩타이드 2 mg을 가하여 실온에서 5 시간 탁반한 다음 하룻밤 투석하여 반응되지 않은 펩타이드를 제거하여 면역에 사용하였다.

매 회 상기의 제조된 펩타이드-KLH를 펩타이드 기준 200 ug씩 2주 간격으로 New Zealand White 토끼(수컷, 약 2.0 kg 내외)에 근육 및 피하 경로로 4회 면역한 후 마지막 면역일로부터 2주 후 전체혈하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청에 KLH를 점적하여 KLH에 반응하는 항체를 제거하고 다시 protein G 또는 protein A column (Pierce, U.S.A.)을 통과시켜 부착된 항체를 0.05 M glycine완충용액(pH 2.7)으로 용출하여 PBS로 투석한 후 다음 실험에 사용하였다. 이렇게 제조된 항체는 각각 상기의 서술된 펩타이드순으로 anti-CTLA4pN 및 anti-CTLA4pB로 명명하여 사용하였다.

유전자 재조합 CTLA4Ig 융합 단백 제조. 본 연구에서 개발한 항-펩타이드 항체의 항원 인식여부 및 특이성 검증의 항원으로 사용하기 위하여 CTLA-4 세포외역과 사람 IgG의 hinge region 이하 상쇄부위를 클로닝하였다. 이 융합 유전자를 chinese hamster ovary 세포인 CHO-k1 세포에 transfection하여 배양여액으로 분비되는 유전자 재조합 CTLA4Ig 융합 단백을 protein-A column으로 정제하여 항원으로 사용하였다.

즉 상기의 PHA를 첨가하여 배양된 2×10^6 개의 세포로부터 RNAzolTM를 가한 후 RNA를 용해하였고 이를 template로 하였다(11). 여기에 사용된 forward primer와 reverse primer는 아래와 같다.

< CTLA4 extracellular domain cloning용 PCR primer >

1. CT4L1': 5'-ATG GCT TGC CTT GGA TTT CAG-3' (CTLA-4 L1 forward primer)
2. CT4L2': 5'-ATG CGG CAC AAG GCT CAG CTG AAC-3' (CTLA-4 L2 forward primer)
3. CT4L3': 5'-ATG CAG CTG AAC CTG GCT GCC AGG-3' (CTLA-4 L3 forward primer)
4. CT4L4': 5'-ATG AGG ACC TGG CCC TGC ACT CTC-3' (CTLA-4 L4 forward primer)
5. CT4L5': 5'-ATG CTC CTG TTT TTT CTT CTC TTC-3' (CTLA-4 L5 forward primer)
6. CT4c': 5'-CTC TGC AGA ATC TGG GCA CGG TTC AGG ATC-3' (CTLA-4 reverse primer)

두 oligonucleotide를 가한 다음 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 6 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Triton X-100, 100µg/ml BSA 1 mM poly (dNTPs), RNasin (Biotec) 200 U, Moloney murine leukemia virus, reverse transcriptase (Gibco-BRL) 20 U, forward primer 500 ng, reverse primer 500 ng, RNA template 10 ng, 그리고 *Pfu* DNA polymerase (Stratagene) 또는 *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer Cetus) 2.5 U를 혼합하였다. 이 혼합 반응물 50µl를 만들고 멸균된 mineral oil을 상첨한 후 42°C에서 10분 반응시킨 다음, 94°C 3분, 58°C 1분, 74°C 1분 30초씩 2회, 그리고 94°C 1분, 58°C 1분, 74°C 1분 30초씩 30회의 연속 반응시킨 후 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus)를 사용하여 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)을(12) 실시하여 extracellular CTLA-4 domain cDNA를 얻었다.

융합용 IgG1의 hinge-CH2-CH3 domain cloning은 사람 말초혈액을 배양 없이 바로 사용하였으며 이의 PCR 용 primer는 forward primer, 5'-A TCT GCA GAG CCC AAA TCT TGT GAC-3와 reverse primer, 5'-TT CTC GAG TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA-3' 두 oligonucleotide를 사용했으며 이하의 과정은 상기와 동일하였다. 이 두 cDNA를 eukaryotic expression vector인 pCR-3 (Invitrogen, U.S.A.)에 클로닝하고 융합하였다(13). 이를 dideoxy chain termination법으로(14) 아래의 primer들을 사용하여 유전자의 염기서열을 확인하였고 이를 발현에 사용하였다.

< Sequencing용 primer >

1. T7. 5'-AGT GCT GTG GAA GTC TGT-3' (T7 pro-

moter sequence primer)

2. SP6. 5'-AGT GCT GTG GAA GTC TGT-3' (SP6 promoter sequence primer)
3. T3. 5'-AGT GCT GTG GAA GTC TGT-3' (T3 promoter sequence primer)
4. IgCH2. 5'-GGC GTG GAG GTG CAT AAT GC-3' (IgG1 CH2 domain 중간 primer)

이상의 과정을 통하여 확인된 plasmid들을 large-prep 하여 15µg을 5×10^6 /ml의 CHO-k1 세포와 혼합한 다음 electroporater (BTX T820)에 cuvette을 넣고 480 V, 99 µsec, 2 cycle 조건에서 electroporation을 실시하였다. 세포들을 geneticin G418 (Gibco, 1,500µg/ml) 함유 무혈청 배지인 CHO-SFM (GIBCO, USA)에 배양하여(15) 배양여액을 수거하고 이를 다시 Protein-A sepharose (Pharmacia, Sweden) column을 이용하여 순수정제된 CTLA4Ig 융합 단백을 얻었다.

Western blot. 전기영동은 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE)을 사용하였다. 각 전기영동 시 한 lane에 가하는 시료는 세포수 1×10^6 으로부터 추출된 양이 되게 조절하였다. 전기영동 후 젤은 pore 크기 0.2µm 혹은 0.45µm의 nitrocellulose membrane (Scheicher and Schell, U.S.A.)으로 전기적으로 막전이하였다. 이 때 25 mM Tris-192 mM glycine (pH 8.3)-20% methanol을 완충용액으로 사용하였다. 막 전이 후 2~3% 탈지분유 (skim milk) 및 0.1% Tween20 함유 10 mM Tris (pH 7.6, blocking buffer, 이하 BF)로 blocking한 후 동일 BF에 일차 항체를 넣고 하룻밤 반응시켰다. 이 때 사용된 일차 항체는 아래의 본 연구에서 제조된 항-펩타이드 항체와 intracellular CD152 protein complex를 면역하여 얻은 항체 및 Pharmingen에서 시판 중인 항체(anti-human CD152, U.S.A.) 등을 사용하였다. 일차 항체반응 후 BF로 3회 세척한 다음 anti-rabbit goat IgG-peroxidase 및 anti-mouse goat IgG-peroxidase 등을 1 : 2,000으로 희석하여 2시간 반응시켰다. 반응 후 이를 다시 BF로 3회 세척한 다음 이차 증류수로 1회 최종 세척하였다. 세척된 nitrocellulose membrane을 25 mg diaminobenzidine 함유 10 mM Tris (pH 7.6) 50 ml에 담그고 33% H₂O₂ 100 µl를 첨가하여 실온에서 10~15분간 진탕반응시켰다. 이 때 발색 반응은 수돗물 세척으로 중단시켰다.

면역효소검사항법. Rabbit anti-human IgG를 carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6)로 희석하여 100 µg/ml 농도로 각 well에 50 µl씩 가한 후 4도에서 하룻밤 동안 부착한 후 washing buffer (PBS, pH 7.4, 0.05% Tween 20~1% Bovien serum albumin) 100 µl씩 점적하여 실온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이 반응을 억제하였다. 0.1% BSA와 0.05% Tween 20이 함유된 PBS로 상기의 CHO세포

배양여액을 단계별로 희석 50 μ l씩 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 peroxidase labelled rabbit anti-human IgG (KPL, USA)를 PBS-0.1%BSA-0.05%Tween20로 4,000배 희석한 후 50 μ l마이크로 가하여 실온에서 30분간 반응시키고 substrate로 OPD (o-Phenylenediamine-Dihydrochloride, Sigma, MO, USA)를 well당 100 μ l씩 넣어 어두운 곳에서 30분 동안 발색시킨 다음 3 M sulfuric acid을 50 μ l씩 넣어 반응을 정지시켰다. 이 과정 후 plate는 automated ELISA plate reader (Flow Lab., Lugano, Switzerland)에 넣어 450~492 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조 시료는 mok plasmid를 transfection시킨 CHO세포 배양여액을 사용하였다.

결 과

제조 anti-peptide antibody의 항원인식 특이성 검증. 전술한 바와 같이 이 연구에서는 3 종류의 사람 CD152 항원에 대한 항-펩타이드 항체를 개발하였고, 이들의 항원인식 여부 및 그 특이성을 검증하였다.

이 실험에 사용된 항원은 전술한 방법으로 제조 및 정제된 human CTLA4Ig 융합 단백질로 분자량은 monomer 상태에서 50 kD이고 dimer 상태에서는 100 kD였다. 이를 전술된 사람 CD152의 세포외역 부위를 인식할 수 있는 anti-human CTLA4pN와 anti-human CTLA4pB 두 항체로 Western blot을 실시한 결과 이들 모두 유전자 재조합 human CTLA4Ig 융합 단백질의 monomer 혹은 homodimer를 항원으로 인식하였다(Fig. 1). 이 항-펩타이드 항체의

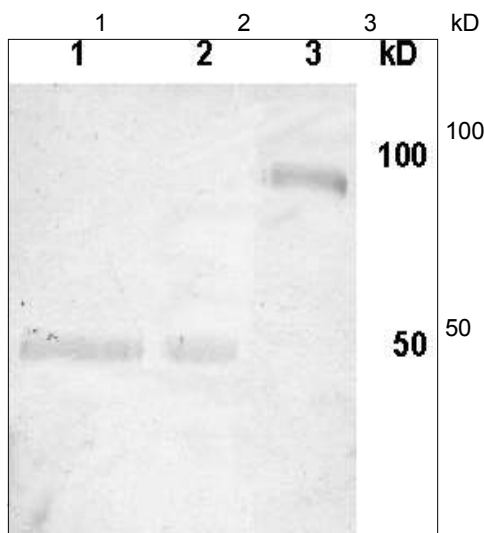


Figure 1. Recognition of recombinant CTLA4Ig fusion protein by anti-human CD152 antibodies. Lanes 1, 2 & 3, Western blot with anti-CTLA4pN, anti-CTLA4pB & anti-CTLA4pB antibodies respectively. Lanes 1~2, lysate treated in reducing condition; 3, lysate treated in non-reducing condition.

항원 인식능이 특이성이 있는지를 확인하기 위하여 anti-human CTLA4pB antibody를 대상으로 하여 이 항체를 제조할 때 항원으로 사용된 human CTLA4pB 펩타이드가 이 항체의 유전자 재조합 human CTLA4Ig 인식을 저지하는지를 알아보았다(Fig. 2). Fig. 2에서 보이는 바와 같이 펩타이드 농도에 비례하여 Western blot상에서 이 항체의 human CTLA4Ig이 억제되며, 200 μ g/ml의 농도에서 완벽하게 항원인식을 저지하였다.

CD152 분자의 세포막형 및 세포내재형 두 유형의 발현 특성. 상기의 과정으로 항원 인식능 및 특이성이 확인된 항-펩타이드 항체를 사용하여 상기의 배양 방법으로 활성화시킨 사람 말초혈액 림프구의 세포액 및 세포막 분획에서 CD152 분자의 발현을 Western blot으로 확인한 결과 선행 연구에서와 동일하게 세포액 분획에서는 34 kD 항원을 세포막 분획에서는 30 kD의 항원을 인식하여 이 분자가 세포질 내와 세포표면에서의 상이한 두 가지 유형으로 발현되었다(Fig. 3A). 이 두 유형의 구조적 차이를 확인하기 위하여 전술된 사람 CD152 단백질의 leader sequence를 인식하는 anti-CTLA4pN antibody와 이 단백질의 세포외역을 인식하는 anti-CTLA4pB antibody를 사용하여 세포액 분획 및 세포막 분획을 Western blot한 결과 세포액 분획의 34 kD 항원은 두 항체 모두에 의하여 인식되나, 세포막 분획의 30 kD 항원은 오직 세

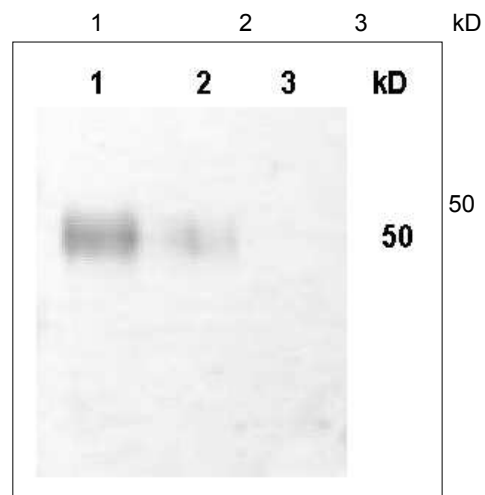


Figure 2. Inhibition of antibody binding by soluble peptide. Recognition of recombinant CTLA4Ig fusion protein by anti-CTLA4pB was blocked with soluble CTLA4pB. Lane 1, membrane transferred CTLA4Ig onto were incubated with anti-CTLA4pB (1 : 100) antibody only. Lane 2, same concentration of antibody were preincubated with CTLA4pB peptide at 50 μ g/ml of concentration at 37°C for 1 hr and then incubated with the CTLA4Ig-transferred membrane. Lane 3, same concentration of antibody were preincubated with CTLA4pB peptide at 200 μ g/ml of concentration at 37°C for 1 hr and then incubated with the CTLA4Ig-transferred membrane.

포외역을 인식할 수 있는 anti-CTLA4pB antibody에 의해 서만 인식되었다(Fig. 3B).

CHO 세포에서 CTLA4 leader 서열 결손에 따른 세포 외 발현 조사. 외래 유전자를 포함하지 않는 pCI-neo vector만을 transfection하여 얻은 Mock transfectant의 배양 여액에서는 면역효소법 검사에서 항원 발현이 전혀 검출되지 않았다. CTLA4/L₁-IgG₁ 융합 유전자를 함유한 pCI-neo vector를 transfection하여 얻은 CHO-k1 세포주를 동일한 방법으로 검색한 결과 항 사람 CTLA-4 항체로 본 항원의 세포표면 발현이 매우 약하게 검출되었다(Fig. 4). CTLA4/L₂-IgG₁부터 CTLA4/L₅-IgG₁까지의 융합

유전자를 transfection하여 얻은 세포주의 배양여액에서는 매우 높은 양의 융합단백이 배양여액으로 분비되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 이들 중에서 CTLA4/L₃-IgG₁이 가장 세포외 분비율이 높았고 그 다음으로 CTLA4/L₂-IgG₁였으며, CTLA4/L₄-IgG₁ CTLA4/L₅-IgG₁순으로 발현율이 높게 나타났다.

고 찰

이 연구에서는 CTLA-4 분자의 막 도달 서열 및 세포 외역(extracellular domain)에 대한 2종의 상이한 항-펩타이드 항체를 제조하여 이 분자의 사람 말초 혈액 림프구에서 이 분자가 어떤 기전으로 세포질 내에서 세포막 영역으로 도달할 수 있는지를 이해 규명하고자 하였다.

먼저 이 연구에서 제조된 2종의 사람 CTLA-4 항원에 대한 항-펩타이드 항체의 항원인식 여부 및 그 특이성의 검정을 위해 CTLA4Ig 융합 단백을 제조하였다. 이 실험에서 CTLA4pB 펩타이드는 농도에 비례하여 Western blot상에서 이 항체의 human CTLA4Ig 인식을 특이적으로 억제하였으며, 200 ug/ml의 농도에서 완벽하게 항원 인식을 저지함이 확인되었고 이는 제조된 항-펩타이드 항체가 human CTLA-4를 항원으로 특이성 있게 인식하고 있음을 증명하는 것으로 생각된다. 이러한 항원 특이성이 확인된 항-펩타이드 항체는 세포액 분획에서는 34 kD 항원을 세포막 분획에서는 30 kD의 항원을 인식하여 이 분자가 세포질 내와 세포표면에서의 상이한 두 가지 유형으로 발현됨을 알 수 있었다. 이 두 유형간의 분자량 차이 4 kD는 정확하게 CTLA-4의 막 도달 서열로 추정되는 36개의 N-말단 아미노산의 분자량과 일치되고 있다. 즉 CTLA-4의 세포막형은 이 막 도달 서열을 갖고 있지 않음을 증명하기 위하여 전술한 방법으로 사람 CTLA-4 단백질의 leader sequence를 인식하는 anti-CTLA4pN

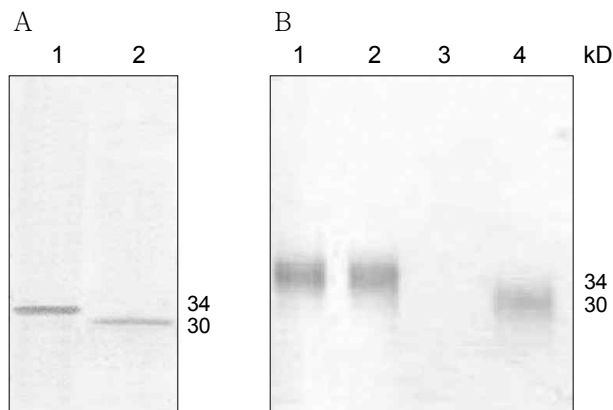


Figure 3. A. Presence of two different forms of CD152 protein in cytosolic and membrane fractions of PHA-activated human peripheral blood lymphocyte (PBL). Lanes 1 and 2, aqueous and detergent phase of PHA-stimulated PBL lysate blotted with anti-CTLA4pB antibody. B. Differential recognition of cytosolic and membrane forms of CD152 by anti-CTLA4pN antibody. Lanes 1 & 2, aqueous fraction, lanes 3 & 4 membrane fraction of PBL. Lanes 1 & 3, Western blotting with anti-CTLA4pN antibody; 2 & 4, Western blotting with anti-CTLA4pB antibody.

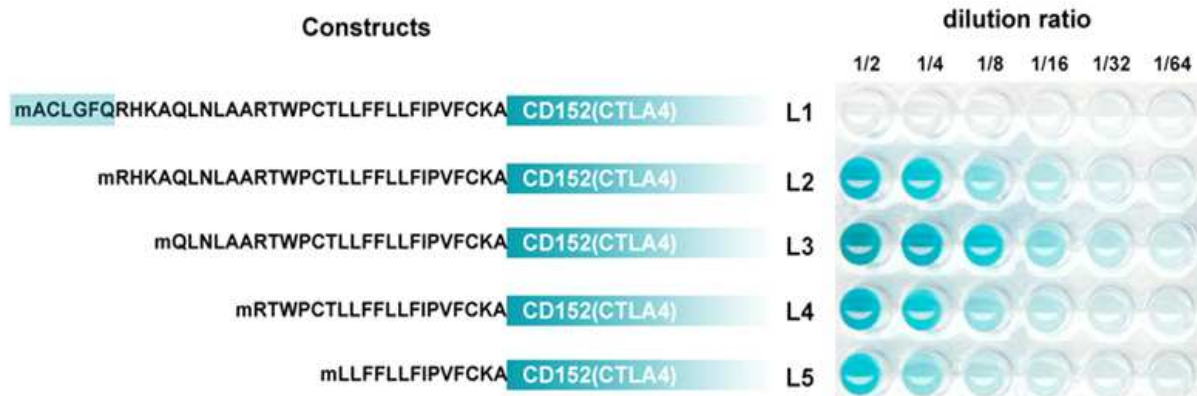


Figure 4. Extracellular secretion of 5 different N-terminal deletion mutant CTLA4Ig. L1, 2, 3, 4 & 5 gene constructs with variable N-terminal leader sequence were transfected into SP-2/0 cells by electroporation. Proteins were collected from culture supernatant of each transformants and then quantified by ELISA with anti-human CTLA4 monoclonal antibody and anti-human IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP).

antibody와 CTLA-4 단백질의 세포외역을 인식하는 anti-CTLA4pB antibody를 사용하여 Western blot한 결과는 세포질 내재형 CTLA-4는 leader sequence를 갖고 있으며 세포표면 발현형 CTLA-4는 leader sequence가 제거된 단백질임을 알 수 있었다.

이상의 실험 결과로부터 시사되는 CTLA-4의 특성은 면역계의 경우 ICAM-1이 유사한 발현양상을 보이지만 이 항원과는 뚜렷한 차이가 있다(16). 그러나 세포막 단백질로서 세포표면에 직접적으로 발현되지 않는 예는 최근 들어서 많이 보고되고 있다. 일단 단백질 합성 후 그의 발현은 그 단백질의 도달결정기(targeting motif, TM)에 의하여 결정되게 되는데 이는 그 단백질의 아미노말단에 있을 수도 있고, 카르복시말단에 있을 수도 있으며, 그 중간 부위에 있을 수도 있다. 단백질의 중간부위에 TM를 갖는 단백질은 대개 세포질에서 만들어진 후 핵내로 이동하여 발현되고 기능을 하는 유전자 전사조절 단백질자(transcription factor)가 대표적인 예로서 이들의 TM를 nuclear localization signal (NLS)라 부르고 이를 인식하여 결합하는 또 다른 종류의 세포액성 인자들(NLS-binding proteins)의 도움을 받아서 핵내로 도달할 수 있게 된다(17). 카르복시말단에 TM를 갖는 단백질은 대개 lysosome에 도달하여 발현되거나 세포밖으로 유리되는 물질들이다. 이의 예로는 lysosome의 막구성단백인 LAMP-1과(18) lysosomal membrane glycoprotein 120 (19) 그리고 살해 T 세포의 표적세포 DNA fragmentation을 유발하는 것으로 알려졌으며 polyadenylate binding protein의 일종인 TIA-1 (20) 등이다. 이들은 그 카르복시말단에 AGYXT의 공통 TM를 갖고 있고 이 motif가 이 단백질들의 lysosome도달을 결정하는 것으로 알려져 있다. 이와는 달리 대개 세포표면에 발현되는 단백질은 그 아미노말단에 TM 혹은 그 유사기능을 보유하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 밝혀진 CTLA-4 분자의 세포표면 발현특성과 비교적 유사한 양상을 갖는 예가 보고된 바가 있는데 insulin 의존형 glucose의 세포 내 유입을 주도하는 glucose transporter인 GLUT-4 (21)가 그 예이다. 근육 및 지방조직에서 glucose의 세포 내 이동을 주도하는 대표적인 transporter로 GLUT-1과 GLUT-4가 알려져 있다. 전자의 경우는 세포내의 ribosome에서 이 단백질이 합성된 즉시 세포표면에 발현되는 반면 후자는 ribosome에서 합성된 후에 세포내부에 존재하다가 insulin자극이 그 세포에 가해졌을 때 막표면에 발현되는 특징을 갖고 있다. 즉 후자의 경우는 그 단백질의 세포표면 도달이 또 다른 유도성 신호(targeting induction signal)에 의하여 조절되는 것이며 Piper 등의 연구(21)에 의하면 이러한 단백질의 막 도달결정기(membrane targeting motif)는 이 단백질의 아미노 말단에 존재하는 것이 명백해졌다. 이 두 단백질의 아미노 말단의 구조를 비교하여 보면 유도적으로 막 도달이 결정되는

GLUT-4의 경우 친수성(hydrophilicity)이 강한 아미노말단의 여유기가 존재함을 알 수 있다. 이러한 아미노말단의 차이는 이 연구의 대상인 CD28과 CTLA-4 분자 간에도 정확히 적용될 수 있다. 그러나 CTLA-4와 GLUT-4의 친수성 아미노말단 잔여기 간의 유사한 서열이나 결정기를 공유하지 않고 있어 막 도달 기전은 두 분자가 다를 것으로 생각된다. 막 단백질이 세포표면에 즉시 발현되지 않고 세포내부에 존재하는 경우 몇 가지의 가능성 있는 기전들을 제시할 수 있는데 첫 번째로 그 막 단백질의 능동적 세포유입(active endocytosis)을 생각할 수 있다. 여기에 해당되는 예로는 저밀도 지단백(low density lipoprotein) (22), ASGP receptor (23), transferrin receptor (24) 등이 있으며 이 경우 tyrosine 잔여기가(25) endocytosis를 결정하는 데에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. GLUT-4의 경우에서 이 단백질의 아미노말단이 이 단백질을 직접 clathrin-coated pits로 도달시키는 역할을 할 수 있다는(26) 연구결과가 보고되었고 CTLA-4의 경우는 Chuang 등(27)은 이 분자의 세포내역(cytoplasmic domain)이 이와 유사한 역할을 한다고 보고하였다. 또한 Lee 등(28)은 이 분자의 세포내역이 세포 내 신호전달에 관여하는 것으로 보고하였다. 두 번째로는 endoplasmic reticulum 내에 존재하는 단백질에서의 KDEL motif (29)와 기능적으로 유사한 단백질의 아미노말단에 TM이 존재할 가능성도 생각할 수 있다. CTLA-4도 이러한 경우들에 해당될 가능성이 있으며, 이 단백질분자가 세포질 내에서 다른 단백질과 결합하고 있다가 또 다른 신호가 전달될 때 이로부터 유리되어 세포막 표면으로 도달될 수도 있을 것으로 추정된다. 이외에도 활발하게 성장하는 신경세포막에 발현되는 것으로 알려진 neuromodulin GAP-43의 경우는 아미노말단의 3번째와 4번째의 cysteine에 이 단백질의 posttranslational modification에 일종인 지방산화(fatty acylation)에 의하여 prenyl- 혹은 palmitoyl-기가 결합됨으로써 막 도달이 이루어지는 것으로 알려져 있다(30). 활성화된 대식세포에서 발현되는 것으로 알려진 protein kinase C의 기질인 MARCKS의(31) 경우는 단백질 합성 후 아미노말단에 myristoyl기가 결합되었을 때 막 도달이 가능한 것으로 보고되었다.

이상의 CD152분자에 적용 가능성 있는 단백질 분자들의 예를 검토하여 보았으나 그 유사한 예를 찾기 어려운 매우 독특한 성격을 갖고 있다. 따라서 이 연구의 성격은 면역학뿐만 아니라 분자 및 세포 생물학 분야에서도 의미 있는 새로운 현상을 규명하는 데에 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

1. Harper K, Balzano C, Rouvier E, Mattei MG, Luciani MF, Golstein P: CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte

- molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location. *J Immunol* 147;1037-1044, 1991
2. Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, P Golstein: A new member of the immunoglobulin superfamily, CTLA-4. *Nature* 328;267-270, 1987
 3. Lafage-Pochitaloff M, Costello R, Couez D, Simonetti J, Mannoni P, Mawas C, Olive D: Human CD28 and CTLA-4 Ig superfamily genes are located on chromosome 2 at bands q33-q34. *Immunogenetics* 31;198-201, 1990
 4. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Darnle, Ledbetter JA: CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174;561-569, 1991.
 5. Linsley PS, Greene JL, Tan P, Bradshaw J, Ledbetter JA, Damle NK: Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes. *J Exp Med* 176;1595-1604, 1992
 6. Lenschow DJ, Su GHT, Zuckerman LA, Nabavi N, Jellis CL, Gray GS, Miller J, Bluestone JA: Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;11054-11058, 1993
 7. Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Daley J, Gray G, Nadler LM: Activated human B lymphocytes express three CTLA-4 counterreceptors that costimulate T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;11059-11063, 1993
 8. Razi-Wolf Z, Galvin F, Gray G, Reiser H: Evidence for an additional ligand, distinct from B7, for the CTLA-4 receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90;11182-11186, 1993
 9. Linsley PS, Bradshaw J, Greene J, Peach R, Bennett KL, Mittler RS: Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4;535-543, 1996
 10. Yamada A, Nurakami M, Ijima K, Yagita H, Okumura K, Komatsu S, Uede T: Long-term acceptance of major histocompatibility complex-mismatched cardiac allograft induced by a low dose of CTLA4IgM plus FK506. *Microbiol Immunol* 40;513-518, 1996
 11. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: Molecular cloning, p1.25-1.31, p1.63-1.69, p7.26-7.29. USA New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
 12. Wang RF, Cao WW, Johnson MG: A simplified single tube, single buffer system for RNA-PCR. *Biotechniques* 12;702-704, 1992
 13. Hanahan D: Techniques for transformation of E. coli. In Glover DM ed: DNA cloning a practical approach. p109-135, England Oxford IRL Press, 1985
 14. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74; 5463-5467, 1977
 15. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, eds: Current protocols in molecular biology. p9.1-9.9, USA John Wiley and Sons Inc, 1987
 16. Diamond MS, Stauton DE, Marlin SD, Springer TA: Binding of the integrin Mac-1 to the third Ig-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65;961-971, 1991
 17. Moore MS, Blobel G: The two steps of nuclear import, targeting to the nuclear envelope and translocation through the nuclear pore, require different cytosolic factors. *Cell* 69;939-950, 1992
 18. Chen JW, Cha Y, Yuksel KU, Gracy RW, August JT: Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding lysosomal membrane glycoprotein mouse LAMP-1. *J Biol Chem* 263;8754-8758, 1988
 19. Howe CL, Granger BL, Hull M, Green SA, Gabel CA, Helenius A, Mellman I: Derived protein sequence, oligosaccharides, and membrane insertion of the 120-kD lysosomal membrane glycoprotein (lgp120): identification of a highly conserved family of lysosomal membrane glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 85;7577-7581, 1988.
 20. Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossman SF, Anderson P: A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell* 67;629-639, 1991
 21. Piper RC, Tai C, Slot JW, Hahn CS, Rice CM, Huang H, James DE: The efficient intracellular sequestration of the insulin-regulatable glucose transporter (GLUT-4) is conferred by the NH₂ terminus. *J Cell Biol* 117;729-743, 1992
 22. Davis CG, van Driel IR, Brown MS, Goldstein JL: The low density lipoprotein receptor. identification of amino acids in cytoplasmic domain required for rapid endocytosis. *J Biol Chem* 262;4075-4082, 1987
 23. Fuhrer C, Geffen I, Spiess M: Endocytosis of the ASGP receptor H1 is reduced by mutation of tyrosine-5 but still occurs via coated pits. *J Cell Biol* 114;423-431, 1991
 24. Jing S, Spencer T, Miller K, Hopkins C, Trowbridge IS: Role of the human transferrin receptor cytoplasmic domain in endocytosis: localization of a specific sequence for internalization. *J Cell Biol* 110;283-294, 1990
 25. Kistakis NT, Thomas D, Roth MG: Characteristics of the tyrosine recognition signal for internalization of transmembrane surface glycoprotein. *J Cell Biol* 111;1393-1407, 1990
 26. Robinson L, Pang S, Harris DS, Heuser J, James DE: Translocation of the glucose transporter (GLUT4) to the cell surface in permeabilized 3T3-L1 adipocytes: effects of ATP, insulin and GTPγS and localization of GLUT4 to clathrin lattices. *J Cell Biol* 117;1181-1196, 1992
 27. Chuang E, Alegre ML, Duckett CS, Noel PJ, Vander Heiden MG, Thompson CB: Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression. *J Immunol* 159;144-151, 1997
 28. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA: Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science* 282;2263-2266, 1998
 29. Pelham HRB: Control of protein exit from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* 5;1-23, 1989
 30. Skene JHP, Jacobson RD, Snipes GJ, Macguire CB, Norden JJ, Freeman JA: A protein induced during nerve growth (GAP-43) is a major component of growth-cone membranes. *Science* 233;783-786, 1986
 31. Arnold TP, Standaert ML, Hernandez H, Watson J, Mischak H, Kazanietz MG, Zhao L, Cooper DR, Farese R: Effects of insulin and phorbol esters on MARCKS (myristoylated alanine-rich C-kinase substrate) phosphorylation (and other parameters of protein kinase c activation) in rat adipocytes, rat soleus muscle and BCH3H-1 myocytes. *Biochem J* 295;155-164, 1993