

# 인체 S100A6 단백질에 특이한 단일클론 항체

한국생명공학연구원 세포생물학실

김재화 · 윤선영 · 주종혁 · 강호범 · 이영희 · 최용경 · 최인성

## Characterization of the Monoclonal Antibody Specific to Human S100A6 Protein

Jae Wha Kim, Sun Young Yoon, Joung-Hyuck Joo, Ho Bum Kang, Younghee Lee, Yong-Kyung Choe and In Seong Choe

*Cell Biology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea*

### ABSTRACT

**Background:** S100A6 is a calcium-binding protein overexpressed in several tumor cell lines including melanoma with high metastatic activity and involved in various cellular processes such as cell division and differentiation. To detect S100A6 protein in patient's samples (ex, blood or tissue), it is essential to produce a monoclonal antibody specific to the protein. **Methods:** First, cDNA coding for ORF region of human S100A6 gene was amplified and cloned into the expression vector for GST fusion protein. We have produced recombinant S100A6 protein and subsequently, monoclonal antibodies to the protein. The specificity of anti-S100A6 monoclonal antibody was confirmed using recombinant S100A recombinant proteins of other S100A family (GST-S100A1, GST-S100A2 and GST-S100A4) and the cell lysates of several human cell lines. Also, to identify the specific recognition site of the monoclonal antibody, we have performed the immunoblot analysis with serially deleted S100A6 recombinant proteins. **Results:** GST-S100A6 recombinant protein was induced and purified. And then S100A6 protein excluding GST protein was obtained and monoclonal antibody to the protein was produced. Monoclonal antibody (K02C12-1; patent number, 330311) has no cross-reaction to several other S100 family proteins. It appears that anti-S100A6 monoclonal antibody reacts with the region containing the amino acid sequence from 46 to 61 of S100A6 protein. **Conclusion:** These data suggest that anti-S100A6 monoclonal antibody produced can be very useful in development of diagnostic system for S100A6 protein. (*Immune Network* 2002;2(3):175-181)

**Key Words:** S100A6, monoclonal antibody, epitope

### 서 론

현재까지 19 종류의 S100 단백질들이 보고되어 있고 이들 중 13 종류의 S100 유전자들은 인간 염색체 1q21의 지역에 위치하여 세포의 성장, 분화, 세포 내 대사조절, 암 발생 및 전이와 밀접한 관련을 가지고 있다(1-4). 그 중 S100A6은 혈청 성장 인자(serum growth factor)로 세포의 성장을 촉진시킬 때 그 발현이 증가하는 것으로 보고

가 되면서 세포 성장에 관련된 인자임이 보고되었고(5) 나아가 S100A6 발현이 여러 성장 인자들에 의해 조절된다고 보고되기도 하였다(3,6). 다른 S100 단백질과 유사하게 S100A6는 세포질과 핵 내에 존재하는 칼슘 결합 단백질로서 한 개의 분자에 2개의 칼슘 결합부위가 존재하며 세포 내부에서 칼슘이온의 항상성 유지와 칼슘관련 신호전달 및 세포의 성장, 분화와 관련(2)이 있으며 흑색종(melanoma)(7), 뇌종양(neuroblastoma)(8), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)(9)의 진단을 나타내는 표식자(marker)로도 알려져 있다. 이외에도 발암유전자 중 하나인 ras를 형질전환 시킨 fibroblasts 세포에서 S100A6 발현이 증가되었으며(10) 특히 전이 암의 경우 그 발현이 현저히 증가함은 암이 악성종양으로 분화될 때 이

책임저자 : 최인성, 한국생명공학연구원 세포생물학실  
☎ 305-600, 대전광역시 어은동 52번지  
Tel: 82-42-860-4180, Fax: 82-42-860-4593  
E-mail: choemcbg@mail.kribb.re.kr

본 연구는 2000년도 한국생명공학연구원 기관고유사업비에 의하여 이루어졌음(KG1512).

S100A6 단백질이 특정한 기능을 수행할 것으로 추정된다(11). 반면에 인체의 정상조직 중 fibroblasts와 외피성(epithelial) 세포들은 S100A6의 발현이 높고(12) 뇌세포와 평활근 세포에서도 그 발현을 확인할 수 있다(13). 세포 내 S100A6 단백질의 기능은 아직 잘 밝혀져 있지 않지만 최근에 기능을 밝히려는 노력으로 S100A6 단백질의 세포 내 결합단백질을 규명하는 실험이 진행되고 있다. 그 결과 in vitro상에서 S100A6 단백질은  $Ca^{2+}$  이온 농도에 따라 caldesmon 같은 actin 결합단백질(14), Tropomyosin(15) 그리고 calponin(16)들과 결합하는 것으로 보고되었고 annexin II, annexin VI(17) 그리고 annexin XI(18)과도 결합한다고 보고되었다. 특히 annexin XI는 세포 분열 시 핵으로 이동하여 기능을 수행하는 것으로 보아 S100A6 단백질이 세포성장을 조절하는 세포주기와 밀접한 연관이 있음을 확인하였다(19).

인체 S100 단백질들 중 S100A4, S100A6, S100A7 그리고 S100B 단백질들은 여러 종류의 암세포에서 그 발현이 증가하여 RNA, 단백질수준에서 진단 표식자로서 활용을 하고 있거나 그 가능성을 지닌다(20-22). 임상적으로 이러한 질병의 존재 여부나 진행단계를 확인하는 방법은 환자들의 외과적 증상 외에도 혈청·뇨·변 검사와 조직학적 병리검사 등 여러 단계에서 확인이 가능하다. S100 단백질은 악성 흑색종의 경우 환자의 혈청에서 검출된 보고가 있다(23). 특히 암이 악성화될수록 검출되는 횟수가 80% 이상으로 확인되어 혈청을 이용한 진단체계의 확립은 암 관련 질병의 정확한 진단에 필요한 연구이다. 본 연구에서는 환자의 혈청에 존재하는 S100A6 단백질을 소량으로도 검출할 수 있는 sandwich ELISA 방법에 사용되는 특정 epitope을 인식하는 항체 및 인체의 각종 조직에서 어느 정도로 발현되며 또 어떻게 분포되어 있는가를 명확히 측정하여 임상적으로 보다 정확한 병변의 확인에 따른 체계적인 연구의 기초를 제공할 수 있는 항체를 제공하고자 하였다. 이에 관한 연구는 실용적인 면에서도 암을 진단하기 위한 정확하고 유용한 표식자로 활용할 수 있어 인체 S100A6 단백질에 대해 특이적으로 반응하는 단일클론 항체와 이 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주의 제작은 높은 활용가치가 있다.

따라서 본 연구에서는 우선 인체 S100A6 유전자를 이용하여 S100A6 재조합 단백질을 생산한 후 이 단백질에 대한 단일클론 항체를 분비하는 융합세포주(Hybridoma)를 제조하고 생산된 단일클론 항체의 S100A6 단백질에 대한 특이성을 재조합단백질의 절단체(deletion mutants)들을 이용한 epitope 결정으로 증명하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**실험동물 및 세포주.** 융합세포주의 제작에 필요한 면역화된 생쥐를 얻기 위하여 생후 6~8주가 된 Balb/c 백서를 사용하였고 이들 실험 동물들은 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology) 내의 실험동물센터로부터 분양 받아 항온항습실에서 사육하면서 실험하였다. 세포 융합 시 모세포(parent cell)로 사용되는 Sp2/0·Ag14 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland)으로부터 분양받아 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco-BRL, Grand Island, NY)을 함유하는 RPMI1640 (Gibco-BRL, Grand Island, NY) 배지에서 배양하였다. 본 실험실에서 제조한 단일클론 항체의 세포 내 S100A6 단백질에 대한 반응성을 확인하고자 인체 정상 간과 간암 세포주인 Chang liver, HepG2, Hep3B 그리고 대장암 세포주인 KM12, Colo205, HT29, SW620, HCT116들을 ATCC로부터 분양받아 10% FBS를 포함하는 DMEM (Gibco-BRL)과 RPMI1640 배지에서 배양하였다.

**인체 S100A6 재조합 단백질을 생산하는 발현벡터의 제조.** 인체 S100A6 유전자(GenBank accession number, M18981)의 open reading frame (ORF) 전체 염기서열을 얻기 위해 인간 태아 간 cDNA library를 주형으로 하여 primer 5'-CGGGATCCATGGCATGCCCTGGATCAGG-3'과 5'-CGGAATTCTCAGCCCTTGA GGGCTTCAT-3' 사용하여 PCR로 증폭시킨 후, 이를 제한효소인 BamHI과 EcoRI으로 절단하여 pGEX2T (Amersham Pharmacia Biotech) vector와 ligation시켜 GST-S100A6 발현벡터를 DH5α 대장균에 형질전환시켰다. 또한 제조한 단일클론 항체의 epitope 결정을 확인하기 위하여 S100A6 재조합 단백질의 여러 C-terminal 절단체를 제조하였다. 우선 전체 90개의 아미노산으로 이루어진 C-terminal로부터 특정수의 아미노산 잔기를 절단한 변이체들을 각각 GST-S100A6 deletion mutant 1 (GST-SD1), GST-SD2, GST-SD3, GST-SD4와 GST-SD5라고 명명하였으며 이들 S100A6 절단변이체들의 primer들은 Table I에서 제시하였다. 증폭한 산물들을 제한효소 BamHI과 EcoRI으로 절단하여 각각 pGEX4T-1 발현벡터(Amersham Pharmacia Biotech)에 접합시켜 모두 대장균에 형질전환시켰다.

**인체 S100A6 재조합단백질의 분리 및 정제.** GST-S100A6 재조합단백질과 절단변이체들의 발현vector들을 대장균 내에서 37°C로 배양한 후 1 mM IPTG로 각각의 재조합 단백질을 유도하였다. 우선 단일클론 항체를 제조하기 위한 항원으로 사용될 S100A6 단백질은 대량의 GST-S100A6 재조합 단백질을 유도시킨 배양액을 원심 분리하여 균체를 회수한 후 초음파로 파쇄하여 세포조액(cell lysates)의 상등액에 존재하는 GST-S100A6 재조

**Table I.** The sequences of deletion mutants of S100A6

Deletion mutants	The sequences of primers
S100A6 deletion mutant 1 (SD1)	Sense primer, 5'-CGGGATCCATGGCATGCCCCCTGGAT-3' Antisense primer, 5'-CGGAATTCTGAAGATGGCACGAGGAG-3'
SD2	Sense primer, 5'-CGGGATCCATGGCATGCCCCCTGGAT-3' Antisense primer, 5'-CGGAATTCCCTTGCTCAGGGTGTGCTT-3'
SD3	Sense primer, 5'-CGGGATCCATGGCATGCCCCCTGGAT-3' Antisense primer, 5'-CGGAATTCCGAGCCAATGGTCAGCTC-3'
SD4	Sense primer, 5'-CGGGATCCATGGCATGCCCCCTGGAT-3' Antisense primer, 5'-CGGAATTCTGTCCTCAAGTCTTCCATCAG-3'
SD5	Sense primer, 5'-CGGGATCCATGGCATGCCCCCTGGAT-3' Antisense primer, 5'-CGGAATTCTGAAGGTGACATACTCTCTG-3'

합 단백질을 GST affinity column (Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 제품사의 지시사항에 따라 분리·정제하였다. 정제된 GST-S100A6 재조합 단백질은 thrombin (Sigma)으로 재조합된 GST 단백질을 절단하여 S100A6 단백질만 gel elution 방법으로 다시 분리하여 농축하였다. 최종 농축된 단백질의 양은 Bradford법으로 측정된 결과 100µg/ml이었다. 분리·정제된 단백질들은 15% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동하여 확인하였다. 반면에 S100A6 절단변이체들은 위와 동일한 방법을 사용하여 1mM IPTG로 각각의 재조합 단백질의 생산을 유도하였고 각각의 세포조액을 12% SDS-PAGE로 분리하여 coomassie blue 염색과 GST 항체를 이용한 immunoblotting으로 생산된 절단변이체들을 확인하였다.

**인체 S100A6 재조합 단백질에 대한 단일클론 항체의 제조.** 융합세포주(hybridoma)의 제작에 필요한 면역화된 백서를 얻기 위하여 Harlow와 Lane(24)이 제시된 방법에 따라 PBS 용액에 용해된 인체 S100A6 재조합 단백질(10 µg/100µl)을 보조항원(adjuvant, Sigma)과 함께 섞어 생후 6주된 백서의 복강 내에 3~4차례 주사하였다. 면역화가 일어난 백서의 혈액을 소량 채취하여 96 well microtiter plate (Falcon)에 well당 1µg의 재조합 단백질을 부착시켜 ELISA 방법으로 항체의 역가를 확인하고 융합 세포주를 제조하는 단계로 진행하였다. 단일클론 항체를 분비하는 융합세포주를 제조하는데 거치는 세포융합(cell fusion), 융합세포의 선별과정, 단일클론 항체의 대량생산방법은 특허(등록번호, 330311) 내용에 따라 실시하였다. 또한 생산된 단일클론항체의 immunoglobulin의 아형은 immunodiffusion 방법(25)에 따라 확인하였다.

**단일클론 항체와 S100A6 재조합 단백질의 항원-항체 반응.** 분리·정제된 단일클론 항체의 인체 S100A6 재조합 단백질에 대한 특이성은 immunoblotting과 ELISA 방법으로 확인하였다. 우선 immunoblotting 방법을 이용한 경우, 항원을 준비하는 과정의 GST-S100A6 재조합 단백질과 GST를 절단시킨 S100A6 단백질을 15% SDS-PAGE에

분리하여 PVDF 막(Millipore)에 단백질을 옮긴 후 5% skim milk로 막을 차단하고 1차 항체로 준비된 단일클론 항체(1µg/µl)를 1,000배 희석하여 상온에서 2시간 결합시켰다. 이후 PVDF 막을 PBST 용액으로 3회 세척하고 2차 항체로 anti-mouse IgM-HRP (Sigma)을 상온에서 30분간 반응시켰다. 항원-항체반응을 나타내는 발색과정은 HRP (Horse radish peroxidase)의 기질로 사용되는 0.018% chloro-1-naphtol (Sigma)와 0.045% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 사용하여 반응시켰다. 단일클론 항체의 epitope 결정을 확인하기 위하여 절단변이체들을 단일클론 항체와 반응시키는 방법은 위의 과정과 동일하다.

반면에 서로 유사한 구조를 지니는 인체 S100 family 중 S100A1, S100A2, S100A4 단백질들과 단일클론 항체와의 반응성을 확인하여 인체 S100A6 단백질에 대한 특이성을 검증하였다. 이 과정은 GST-S100A1, GST-S100A2, GST-S100A4와 GST-S100A6 재조합 단백질을 96 well microtiter plate에 well당 각각 1µg씩 부착시킨 후 anti-S100A4와 anti-S100A6 항체를 각각 10<sup>3</sup>과 10<sup>4</sup>으로 희석하여 1시간 반응시키고 PBST 용액으로 충분히 세척한 후 anti-mouse IgG-HRP (Sigma)와 anti-mouse IgM-HRP를 가하여 1시간 반응시킨 다음 PBST 용액으로 충분히 세척하였다. 세척이 끝난 각각의 well에 HRP의 기질인 OPD (Sigma)를 넣어 반응시킨 후 ELISA reader로 파장 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

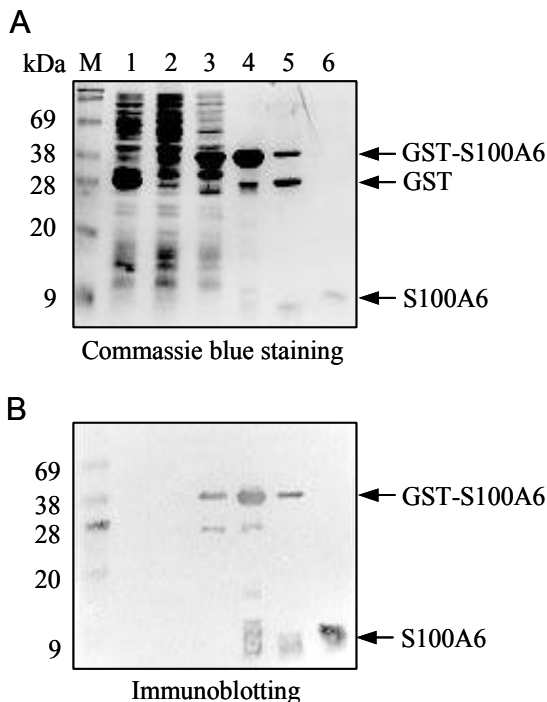
**인체 S100A6 재조합 단백질의 발현 및 정제.** 인간 태아 간 cDNA로부터 얻은 인체 S100A6 유전자의 전체 ORF 지역을 포함하는 pGEX4T-1-S100A6 발현벡터를 형질전환시킨 대장균을 1 mM IPTG로 S100A6 재조합 단백질을 유도시킨 후 15% SDS-PAGE로 확인해 본 결과, 분자량이 약 38 kDa에 해당하는 GST-S100A6 단백질이 전체 단백질의 30% 정도로 과발현되었다(Fig. 1A, lane 3). 과발현된 GST-S100A6 단백질의 가용성을 확인하기 위하여

여 재조합 단백질의 생산을 유도시킨 균체를 PBS용액에서 초음파로 파쇄하여 세포조액의 상등액을 SDS-PAGE로 분리하여 본 결과 과발현된 재조합 단백질의 90% 이상이 가용성 단백질로 확인되었고 이를 affinity column으로 분리한 단백질을 gel상에서 확인하였다(Fig. 1A, lane 4). S100A6 단백질에 특이적인 항체를 생산하기 위하여는 GST-S100A6 재조합 단백질의 GST 부분을 제거하여 S100A6 단백질을 항원으로 사용하는 것이 좋은 결과를 유도할 수 있으므로 thrombin 효소의 인식부위를 지니는 재조합 단백질을 효소와 반응시켜 그 반응정도를 확인해 본 결과 50% 정도만이 GST-S100A6 단백질에서 GST (약 28 kDa)와 S100A6 (약 10 kDa)로 절단되었다(Fig. 1A, lane 5). 절단된 S100A6 단백질을 SDS-PAGE

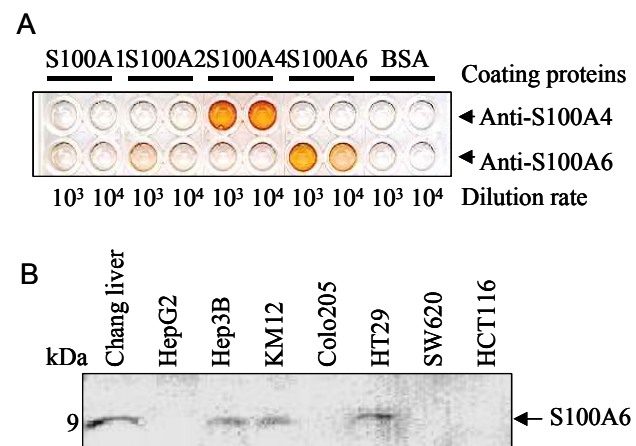
상에서 전기적인 방법으로 추출하여 농축한 것도 동일한 gel상에서 확인하였다(Fig. 1A, lane 6).

**인체 S100A6 단백질에 대한 단일클론 항체의 제조 및 특성.** 앞에서 확인한 정제된 10 kDa의 S100A6 단백질을 항원으로 생후 6주된 3마리의 백서를 면역화시킨 후 이미 보고한 방법(특허 등록번호, 330311)에 따라 단일클론 항체를 분비하는 융합세포주를 선별하여 한국생명공학연구원 유전자원센터에 기탁하였다(기탁번호, KCTC 0447BP). 이 융합세포주에서 분비되는 단일클론 항체의 항원 특이성을 확인하기 위하여 GST만 유도시킨 세포조액과 GST-S100A6, 정제된 GST-S100A6, gel 상에서 추출된 S100A6 단백질에 단일클론 항체를 이용하여 immunoblotting을 수행한 결과 GST 만을 유도한 세포조액과 GST-S100A6를 유도시키지 않은 세포조액에서는 항체의 반응이 일어나지 않았으며 GST-S100A6과 순수 S100A6 단백질에는 모두 항원-항체 반응이 일어났음을 확인하였다(Fig. 1B). 단일클론 항체의 아형의 종류는 immunodiffusion 방법으로 확인한 결과 IgM 종류임을 확인하였다(결과를 제시하지 않음).

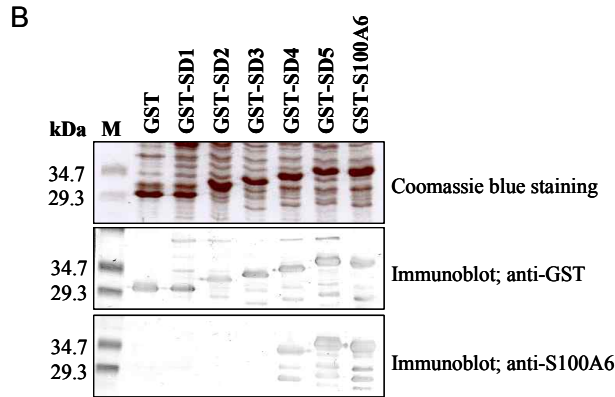
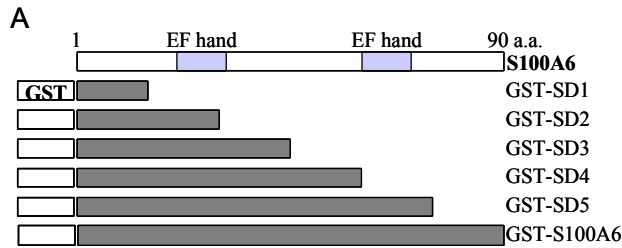
**인체 S100A6 단백질에 대한 단일클론 항체의 특이성 검색.** S100A6 재조합 단백질을 항원으로 하여 생산된 단일클론 항체는 인체 S100A6 단백질을 특이적으로 인식하는가를 검증하는 한 방법으로 S100A6 단백질과 유사한 구조를 지니는 S100 family 중에서 S100A1,



**Figure 1.** Expression of GST-S100A6 fusion protein and immunoblot analysis with anti-S100A6 monoclonal antibody. (A) GST and GST-S100A6 recombinant protein with approximate molecular weight of 28 kDa (lane 1) and 38 kDa (lane 3) respectively were induced by 1 mM IPTG and purified using the glutathione-sepharose 4B affinity chromatography (lane 4). And then the purified recombinant protein was cut by thrombin (lane 5). To purify the S100A6 cleaved from GST, only the S100A6 protein was extracted from SDS-PAGE using electroelution method (lane 6). (B) Purified monoclonal antibody was tested to confirm the binding to recombinant S100A6 proteins. The protein from each step for the purification of recombinant S100A6 was separated on PVDF membrane and the membrane was incubated with anti-S100A6 monoclonal antibody. The monoclonal antibody was specifically interacted with recombinant S100A6 protein, while it was not reacted with GST (lane 1) and cell lysates of uninduced pGEX2T-S100A6 transformed cells (lane 2). M, Prestained protein marker.

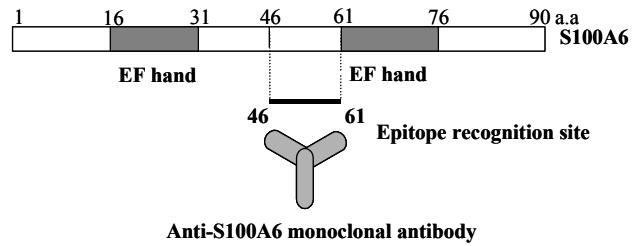


**Figure 2.** Specificity of monoclonal antibody to S100A6 recombinant and intact S100A6 proteins. (A) Cross reactivity of anti-S100A6 monoclonal antibody was tested with ELISA method. Each S100A recombinant protein (1 µg/well) was coated in a microtiter plate and then coated proteins were reacted with diluted anti-S100A6 antibodies. This result shows that anti-S100A6 monoclonal antibody specifically reacted to S100A6 protein. (B) Detection of endogenously expressed S100A6 protein using monoclonal antibody was confirmed in several human cancer cell lines by immunoblot analysis. Endogenous S100A6 protein was detected in Chang liver, Hep3B, KM12 and HT29 cells at the predicted position.



**Figure 3.** Epitope mapping of S100A6 protein responding the anti-S100A6 monoclonal antibody. (A) This diagram is a schematic design for deletion mutants of GST-S100A6 recombinant protein. Five of deletion mutants were made by a unit of 15 amino acids from N-terminal of S100A6 protein added in sequence. (B) All of the deletion mutants of GST-S100A6 recombinant protein were induced by 1mM IPTG and separated with 10% SDS-PAGE. Induced recombinant proteins were confirmed by coomassie blue staining (upper panel) and immunoblot analysis with anti-GST antibody (middle panel). Actually, monoclonal antibody was reacted with the GST-SD4, GST-SD5 and GST S100A6 (low panel).

S100A2, S100A4 재조합 단백질을 발현시켜 확보한 후 단일클론 항체가 S100A6 단백질에만 항원-항체 반응을 나타내는지 ELISA 방법으로 확인하였다. 그 결과 S100A1, S100A2, S100A4 그리고 대조군으로 bovine serum albumin (BSA)가 부착된 microtiter plate의 well들은 anti-S100A6 단일클론 항체에 반응하지 않았고 비교실험으로 본 연구실에서 제조한 anti-S100A4 단일클론 항체는 S100A4 재조합 단백질에만 그 특이성을 나타내고 있다(Fig. 2A). 그리고 이 단일클론 항체가 세포 내 존재하는 S100A6 단백질을 인지하는가를 인체 여러 암 조직에서 유래한 세포주의 세포조액을 6~15% gradient SDS-PAGE로 분리한 후 immunoblotting 방법으로 확인하였다. 그 결과, 약 9 kDa 크기의 S100A6 단백질들이 인체 간암 세포 유래의 세포주인 Hep3B와 인체 대장암 세포 유래의 세포주인 KM12와 HT29에서 확인되었다(Fig. 2B). 위의 결과로 보면 본 연구실에서 제조한 S100A6에 대한 단일클론 항체는 여러 유사한 S100 family 중에서 S100A6에 특이성을 지님을 알 수 있었다.



**Figure 4.** The diagram of epitope, the site on S100A6 protein recognized by monoclonal antibody. As shown in Fig. 3, anti-S100A6 monoclonal antibody reacts with the residue containing the sequence from 46 to 61 amino acid of S100A6 protein.

**인체 S100A6 단백질에 대한 단일클론 항체의 특정 epitope 결정.** 본 연구실에서 생산한 단일클론 항체가 S100A6 단백질의 어느 특정 부위를 인식하는가를 규명하는 일은 기존에 보고된 항체와의 차별을 확인할 수 있으며 전체 단백질의 부위별 인식을 요하는 실험에 도움을 주는 기반이 된다고 판단하여 GST-S100A6 전체 재조합 단백질의 카르복시기 말단부분을 특정 수 정도 절단한 5 종류의 변이체를 제작하여(Fig. 3A) GST-S100A6 재조합 단백질을 생산할 때와 동일한 조건으로 각각을 과발현시켰다(Fig. 3B, upper panel). 과발현된 재조합 단백질들은 예상되는 크기의 단백질로 발현됨을 확인할 수 있었으나 GST-SD5 재조합 단백질의 크기가 전체 S100A6를 포함하는 GST-S100A6 재조합 단백질보다 크게 확인되었다. 이는 앞서 ‘재료 및 방법’에서 언급하였듯이 GST-SD5 재조합 단백질은 pGEX 4T-1 vector와, GST-S100A6는 pGEX 2T vector에 cloning된 것으로 이로부터 생성된 재조합 단백질의 크기가 약간 차이가 나는 것으로 판단된다. 과발현된 GST 재조합 단백질의 절단 변이체들은 anti-GST 항체로 그 발현정도와 크기를 재차 확인하였다(Fig. 3B, middle panel). 확인된 절단 변이체들을 포함한 세포조액을 S100A6 단백질에 대한 단일클론 항체로 반응성을 확인해 본 결과 GST-SD4 변이체부터 항원-항체 반응이 이루어짐을 확인할 수 있었다(Fig. 3B, lower panel). 이러한 결과로 미루어 보아 Fig. 4에서 보여주는 모식도에서 같이 본 실험에 사용한 단일클론 항체는 S100A6 단백질의 47번 아미노산 서열부터 61번 아미노산 서열 사이의 특정 아미노산 서열을 인식함을 나타낸다.

## 고찰

본 연구에서는 인체의 치명적인 질병의 하나인 암과 밀접한 관련이 있는 S100A6 단백질의 특정 부위를 인식하는 단일클론 항체를 제조하는 융합세포주와 그 항체를 생산하여 인체에 발생하는 수종의 암 조직에서 특이적으로 과발현하는 인체 S100A6 단백질을 인식하여 정

상세포로부터 암세포를 식별할 수 있는 표식자로서의 활용가능성을 지닌 항체를 제시함을 목적으로 하였다. 실제 인체 S100A6는 흑색종양의 진전을 나타내는 표식자(7)로 알려져 있지만 전이성이 높은 세포주에서 그 발현정도가 더 높은 것으로 미루어보아 암세포의 전이과정에도 관련성이 있을 것으로 추정된다(11). 1997년 Henze 외 여러 연구자들은 흑색종 환자들의 혈액에서 S100 단백질을 검출하였고 악성화된 환자일수록 더 용이하였다(23). 이 연구에서는 전체 S100 family 단백질 중 어떤 종류인지 확인되지 않은 상태이며 혈액에서 검출 방법에 사용한 항체 또한 정확한 규명이 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 현재까지 인체 수종의 암 분화 및 조절에 관련이 있는 S100A6 단백질을 관련 암 환자의 혈액이나 조직에서 이 단백질에 특이적인 반응을 가지는 항체로 검증하여 진단 표식자로서 활용가능성을 제시한다면 그 이용가치가 높다고 판단된다. 이 때 혈액에서 sandwich ELISA 방법에 사용할 수 있는 항체는 동일한 하나의 항원에 대해 각각 다른 인식 부위를 가지는 두 가지 항체가 필요하게 된다. 본 연구실에서 제조한 인체 S100A6 단백질에 대한 단일클론 항체는 현재 보급되고 있는 Sigma사의 anti-S100A6 항체(clone CACY-100)와는 항체 아형의 종류와 S100A6 단백질을 인식하는 인식부위가 다른 항체이다. 본 연구실에서 제조한 단일클론 항체는 인체 S100A6 단백질의 46번 아미노산 서열부터 61번 아미노산 서열 사이를 인식하는 반면에 Sigma사의 항체는 31번부터 46번 사이의 아미노산 서열을 인지하는 특성을 지닌다(특허 등록번호, 330311). 따라서 인체 S100A6 단백질을 특이적으로 인식하며 각각 다른 인식 부위를 나타내는 항체를 확보함으로써 환자들의 혈액에서의 sandwich ELISA 체계를 구축할 수 있다. 기존에 사용하고 있는 암 세포를 진단하는 표식자들은 carcinoembryonic antigen (CEA), epithelial membrane antigen (EMA), 여러 가지 cytokeratin 종류들(26,27)이 있는데 실제 단 한 가지만의 표식자로 정확한 진단을 한다는 것은 모순된 생각이다. 따라서 가능한 한 많은 진단 표식자를 확보하여 활용한다면 임상적으로 정확한 병변의 확인에 따른 체계적인 연구를 수행하는 기초를 제공할 것이다.

현재까지 인체 S100A6의 세포 내 기능은  $Ca^{2+}$  이온의 항상성 유지와  $Ca^{2+}$  관련 신호전달 및 세포의 성장과 분화와 밀접한 관련이 있을 것으로 추정하나 그 정확한 기능이 밝혀져 있지 않다. 앞으로 본 연구에서 제시한 단일클론 항체가 실용적인 면에서 암을 진단하기 위한 유용한 표식자로서 활용할 수 있을 뿐만 아니라 아직까지 밝혀지지 않은 세포 내 기전을 연구하는 데 기초를 제공할 것으로 생각한다.

## 참 고 문 헌

1. Forus A, Berner JM, Mera-Zepeda LA, Saeter G, Mischke D, Fodstad O, Myklebost O: Molecular characterization of a novel amplicon at 1q21-q22 frequently observed in human sarcomas. *Br J Cancer* 78;495-503, 1998
2. Donato R: Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450;191-231, 1999
3. Barraclough R: Calcium-binding protein S100A4 in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1448;190-199, 1998
4. Schafer BW, Heizmann CW: The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21;134-140, 1996
5. Calabretta B, Battini R, Kaczmarek L, de Riel JK, Baserga R: Molecular cloning of the cDNA for a growth factor-inducible gene with strong homology to S-100, a calcium-binding protein. *J Biol Chem* 261;12628-12632, 1986
6. Leonard DG, Ziff EB, Greene LA: Identification and characterization of mRNAs regulated by nerve growth factor in PC 12 cells. *Mol Cell Biol* 7;3156-3167, 1987
7. Drier JK, Swanson PE, Chervitz DL, Wick MR: S100 protein immunoreactivity in poorly differentiated carcinomas. Immunohistochemical comparison with malignant melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 111;447-452, 1987
8. Tonini GP, Fabretti G, Kuznicki J, Massimo L, Scaruffi P, Brisigotti M, Mazzocco K: Gene expression and localization of calyculin, a calcium-binding protein of the S100 family in fresh neuroblastomas. *Eur J Cancer* 31A; 499-504, 1995
9. Calabretta B, Kaczmarek L, Mars W, Ochoa D, Gibson CW, Hirschhorn RR, Baserga R: Cell-cycle specific genes differentially expressed in human leukemias. *Proc Natl Acad Sci* 82;4463-4467, 1985
10. Guo XJ, Chambers AF, Parfett CL, Waterhouse P, Murphy LC, Reid RE, Craig AM, Edwards DR, Denhardt DT: Identification of a serum-inducible messenger RNA (5B10) as the mouse homologue of calyculin: tissue distribution and expression in metastatic, ras-transformed NIH 3T3 cells. *Cell Growth Differ* 1; 333-338, 1990
11. Wettersman, MAJ, Stoopen GM, van Muijen GNP, Kuznicki J, Ruiter DJ, Bloemers HPJ: Expression of calyculin in human melanoma cell lines correlates with metastatic behavior in nude mice. *Cancer Res* 52;1291-1296, 1992
12. Kuznicki J, Kordowska J, Puzianowska M, Wozniak BM: Calyculin as a marker of human epithelial cells and fibroblasts. *Exp Cell Res* 200;425-430, 1993
13. Yamashita N, Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW, Kosaka T: Distribution of a specific calcium-binding protein of the S100 family, S100A6 (calyculin), in subpopulation of neurons and glial cells of the adult rat nervous system. *J Comp Neurol* 404;235-257, 1999
14. Mani RS, Kay CM: Effect of calyculin on caldesmon-actin interaction. *J Biol Chem* 270;6658-6663, 1995
15. Golitsina NL, Kordowska J, Wang CL, Lehrer SS:  $Ca^{2+}$ -dependent binding of calyculin to muscle tropomyosin. *Biochem Biophys Res Commun* 220;360-365, 1996
16. Wills FL, McCubbin WD, Gimona M, Strasser P, Kay CM: Two domains of interaction with calcium binding proteins can be mapped using fragments of calponin. *Protein Sci* 3;2311-2321, 1994
17. Zeng FY, Gerke V, Gabius HJ: Identification of annexin



- II, annexin VI and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as calyculin-binding proteins in bovine heart. *Int J Biochem* 25;1019-1027, 1993
  18. Sudo T, Hidaka H: Regulation of calyculin (S100A6) binding by alternative splicing in the N-terminal regulatory domain of annexin XI isoforms. *J Biol Chem* 273;6351-6357, 1998
  19. Mizutani A, Usuda N, Tokumitsu H, Minami H, Yasui K, Kobayashi R, Hidaka H: CAP-50, a newly identified annexin, localizes in nuclei of cultured fibroblast 3Y1 cells. *J Biol Chem* 267;13498-13504, 1992
  20. Ilg EC, Schafer BW, Heizmann CW: Expression pattern of S100 calcium-binding proteins in human tumors. *Int J Cancer* 68;325-332, 1996
  21. Maelandsmo GM, Florenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O: Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer* 74;464-469, 1997
  22. Moog-Lutz C, Bouillet P, Regnier CH, Tomasetto C, Mattei MG, Chenard MP, Anglard P, Rio MC, Basset P: Comparative expression of the psoriasin (S100A7) and S100C genes in breast carcinoma and co-localization to human chromosome 1q21-q22. *Int J Cancer* 63;297-303, 1995
  23. Henze G, Dummer R, Joller-Jemelka HI, Boni R, Burg G: Serum S100-a marker for disease monitoring in metastatic melanoma. *Dermatology* 194;208-212, 1997
  24. Harlow ED, Lane D: Antibodies: a laboratory manual. In: *Monoclonal Antibodies*, p132-312, In Cold Spring Harbor Press, 1988
  25. Rochu D, Crespeau H, Fine A, Fine JM: A sensitive double-diffusion microassay suitable for the detection of idiotype-antiidiotype precipitates. *J Immunol Methods* 118;67-71, 1989
  26. Gold P, Freedman SO: Tests for carcinoembryonic antigen. Role in diagnosis and management of cancer. *JAMA* 234;109-192, 1975
  27. Tsuji M, Kashiwara T, Terada N, Mori H: An immunohistochemical study of hepatic atypical adenomatous hyperplasia, hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma with  $\alpha$ -fetoprotein, carcinoembryonic antigen, CA19-9, epithelial membrane antigen, and cytokeratin 18 and 19. *Pathol Int* 49;310-317, 1999
-