

Platelet Activating Factor Acetylhydrolase의 대량 생산법 개발

영남대학교 의과대학 미생물학교실, 영남대학교 약학대학¹

정영화 · 장현욱¹ · 이태윤*

Development of a Mass Production Method of Platelet Activating Factor Acetylhydrolase

Yong-Hwa Jong, Hyeun-Wook Chang¹ and Tae-Yoon Lee*

Department of Microbiology, College of Medicine, Yeungnam University, 317-1 Daemyung-5-dong, Nam-gu, Daegu 705-035, Korea and College of Pharmacy¹, Yeungnam University, Gyongsan 712-749, Korea

Received : November 10, 2006

Accepted : December 13, 2006

Platelet activating factor (PAF; 1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) is a potent lipid mediator in a variety of physiological events. PAF is also involved in various pathological events including allergy and inflammation. PAF-acetylhydrolase (PAF-AH) hydrolyzes PAF to produce inactive lyso-PAF. Thus, overproduction of PAF-AH will be useful for the therapeutic valuation of the enzyme. In this study, we established an overproduction method of bovine PAF-AH in *Escherichia coli* system. We used bovine mammary gland for cDNA cloning. The cDNA had two mismatches of amino acid sequences (Thr-247 to Met and Ile-431 to Thr) compared with the previously reported PAF-AH cDNA (bovine spleen, NM_174578). The recombinant PAF-AH of 43 kDa in molecular size reacted with human PAF-AH polyclonal antibody and showed a strong PAF-AH enzyme activity in an *in vitro* assay system. The recombinant PAF-AH produced by this study can be applied for various experiments including *in vivo* models to test its protective activity against PAF-related diseases.

Key Words: PAF-AH, Anti-inflammatory protein, Mass production

서 론

천식 (asthma), 만성 폐쇄성 호흡기질환 (chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염, 염증성 대장질환 등의 공통점은 만성 혹은 재발성 급성 염증이 존재한다는 것이다. 염증과 관련된 국소적 조직손상에 반응하는 세포들은 복잡한 분비성 매개체들에 의해 활성화된다. 이들 매개체 중 하나인 혈소판 활성화 인자 (platelet activating factor, PAF)는 [1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine]의 구조를

가지는 인지질 (phospholipid)로서 chemoattractant로 작용할 수 있으며 백혈구를 활성화시키는 성질이 있어 PAF의 존재는 다양한 염증반응과 연관되어 있다 (10,11,17,18,19,21).

PAF은 다양한 세포에서 생성되며 세포표면 PAF 수용체에 작용하여 세포 기능에 영향을 준다 (12,27). 염증반응에서 중요한 과정 중의 하나는 백혈구, 단핵구, 혹은 혈소판이 혈류로부터 빠져나와 조직으로 이동하는 것이다. 이 과정은 여러 단계를 거치며, 다양한 분자들의 발현 및 상호작용이 관여하는데, 예를 들어 백혈구의 경우 혈관 내피세포에 부착하는 것이 필수적인 첫 단계이다. 급성 염증반응의 경우 이 부착에는 P-selectin이 관여한다. 즉, 적절한 자극에 의하여 내피 세포 내에 저장되어 있던 P-selectin이 빠르게 세포표면으로 이동하며, 그 결과 평소에는 매끈하고 부착성이 없던 혈관 내피벽이 부착성을 띄게 된다. P-selectin은 백혈구 표면의 counterpart인 P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1)과 결합

*교신저자: 이태윤. 705-035, 대구광역시 남구 대명5동 317-1, 영남대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: 053-620-4362, Fax: 053-653-6628,
e-mail: doxr7p@yumail.ac.kr

**본 연구는 2004년도 재단법인 천마의학연구재단 지원에 의하여 이루어진 것임.

하여 활성화된 내피세포에 백혈구가 단단히 부착하게 된다. 다음 단계는 내피세포가 PAF를 표면에 발현하고, 내피세포에 부착된 백혈구는 PAF 수용체를 발현하여 PAF과 PAF 수용체간의 결합에 의한 신호를 받은 백혈구가 beta-integrin 유도성 migration를 통해 조직으로 이동하게 된다. 이와 같이 염증과정에서 PAF의 역할 중의 하나는 내피세포에 발현된 특정 부착분자를 통해 혈관 벽에 부착되어 있는 백혈구를 활성화시켜 염증부위로 이동시키는 것이다.

이러한 방식으로 백혈구의 보충과 활성화가 혈관 내피세포에서 PAF의 합성에 의해 이루어진다. PAF이 매개하는 염증반응은 PAF의 합성과 분해에 의하여 엄밀히 그리고 빠르게 조절되는데, PAF의 분해에 관여하는 것이 혈소판 활성화 인자 분해효소 (PAF-acetylhydrolase, PAF-AH)이다. PAF-AH는 PAF의 sn-2 위치하는 acetyl 또는 산화 acyl기를 가수분해하여 활성을 상실한 lyso-PAF (1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine)으로 변환시킨다 (2). PAF-AH는 하나의 분비성 (혹은 혈장형, plasma type), 그리고 최소 4가지의 세포 내에 존재하는 세포질성 (cytoplasmic) isoenzyme들로 구성된 효소 군이다. 세포 내 PAF-AH들은 혈장형 PAF-AH와 기본적으로는 동일한 반응을 촉진시키지만 세포질 내 다양한 부위에 존재하고 기질 특이성도 비교적 넓다. 한편 혈장형 PAF-AH는 순환과정 및 세포의 표면에서 작용한다. 이와 같이 PAF-AH 활성은 여러 isoenzyme들에 의하여 그 위치와 isoform 유형에 따라 생리적, 병리적으로 다양한 영향을 미칠 수 있다. 세포 내 PAF-AH에는 Ia, Ib, II 및 적혈구형 (erythrocyte form) 등 적어도 4 가지의 다른 isoform이 보고되어 있다 (3,6,7,13,22).

혈장형 PAF-AH는 상기한 염증반응 시 혈관 내피세포에 발현된 PAF를 분해하는 역할을 수행함으로써 과도한 염증반응을 억제한다. 이는 45 kDa의 monomer 단백질로서 대부분 그 효소활성이 혈청 내 lipoprotein과 연관되어 있다 (20). PAF이 관여하는 다양한 염증성 질환을 조절하려는 노력으로 재조합 PAF-AH 단백질을 사용한 항 염증작용의 연구가 다양한 염증 및 알레르기 모델에서 시도되고 있다. 재조합 PAF-AH를 미리 처리한 경우 PAF이 유도하는 급성염증이 저지됨이 보고 되었으며 (25), 생쥐 모델에서 알레르겐에 의해 유도된 천식에서 후기 호흡기 염증을 억제하였고 (8), anaphylactic shock 모델에서 재조합 PAF-AH가 사망률을 저하시킴이 보고 된 바 있다 (4).

최근 소의 초유가 높은 혈장형 PAF-AH 활성을 함유하고 있으며, 이 PAF-AH 활성은 갓 태어난 송아지에서 괴사성 장염 (necrotizing enterocolitis)을 억제함이 보고 되었다 (장현욱, personal communication). 사람의 초유에도 동일한 활성이 있을 것으로 추정되나 시료 채취 등의 어려움이 있으

로, 본 연구에서는 소의 유선조직으로부터 혈장형 PAF-AH cDNA를 클로닝하고 PAF-AH 단백질을 발현시키는 실험을 수행하였다.

본 연구에서 분리된 재조합 PAF-AH 단백질은 43 kDa의 monomer로서 PAF를 강력하게 분해하는 것으로 나타났다. 본 연구의 결과는 소의 유선조직 내에 혈장형 PAF-AH 활성이 존재함을 의미하며 본 연구에서 분리된 PAF-AH는 PAF에 의한 질병 모델 등 다양한 실험에 사용될 수 있을 것이다.

재료 및 방법

1. RNA 분리 및 reverse transcriptase (RT)-PCR

Liquid nitrogen에 냉동 보관한 소의 유선조직 1 g에 10 ml의 TRIzol™ (Life Technologies, Inc.)을 첨가해 homogenizer로 균질화 시켰다. 2 ml의 chloroform을 넣어 15초간 잘 섞어준 후 4℃, 12,000 ×g로 15분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 RNA를 포함하는 수용액 층을 새 tube에 옮겨 0.5 ml의 isopropyl alcohol을 넣고 -20℃에서 30분간 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA를 12,000 ×g에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 제거하고, ice-cold 75% ethanol로 세척한 후 다시 7,500 ×g로 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 RNA가 함유된 침전물을 10분간 건조시켰다. RNase free water에 용해시켜 RNA의 농도를 측정 한 후 -70℃에 보관하며 사용하였다. RT-PCR을 위하여 RNA 1 µg을 25 mM MgCl₂, 10× RNA PCR buffer, RNase free water, 2.5 mM dNTP mixture, 40 U/µl RNase inhibitor, 5 U/µl AMV-reverse transcriptase (TaKaRa), 2.5 pmol/µl oligo dT-primer를 포함하는 용액에 잘 혼합시켰다. 이 반응 혼합물을 thermocycler (Perkin Elmer)로 30℃에서 10분, 42℃에서 30분, 99℃에서 5분간 반응시켜 first strand cDNA를 합성하였다. PCR을 위한 primer는 이미 알려져 있는 소 혈장형 PAF-AH의 염기서열을 토대로 바이오닉스에 의뢰하여 합성하였으며, 그 염기서열은 다음과 같다.

Forward; 5'-ACGGTACCCAGCTCAGCTTCGGAGATG-3'

Reverse ; 5'-GCAGATCTGCTCTTTTAATCTAAATTTGGTC-3'

PCR tube에 멸균 증류수 40.5 µl, 10× buffer 5 µl, 2.5 mM dNTP 3 µl, 5 U/µl Ex-Taq (TaKaRa) 0.5 µl, cDNA 2 µl와 합성한 100 pmole의 각 primer 0.5 µl를 첨가해 총 50 µl의 반응 혼합물을 만들었다. PCR 반응조건은 94℃에서 5분간 pre-denaturation하고, 94℃에서 1분간 denaturation, 58℃에서 1분간 annealing, 72℃에서 2분간 extension을 총 30회 실시하여 증폭하였다. 마지막으로 72℃에서 10분간 post-elongation시켰다.

2. 염기서열 결정

PCR product를 1% agarose gel에서 전기영동한 후 extraction kit (Qiagen)를 이용해 원하는 1.3 kb의 band를 분리한 후 pCR3.1 vector에 클로닝 하였다. PAF-AH cDNA의 클로닝을 확인하기 위하여 mini-prep kit (Promega)로 높은 순도의 DNA를 준비하여 Big dye terminator cycle sequencing kit를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 4 µl의 terminator ready reaction mix template, 1.6 pmole의 sequencing용 primer, 200 ng의 DNA를 혼합한 후 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 2분간, 총 25회 PCR을 수행하였다. PCR이 끝난 후 멸균 증류수, 3 M sodium acetate (pH 4.6), 95% ethanol을 첨가해 얼음에서 10분간 방치하고 실온 14,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 70% ethanol로 세척하고, 다시 8분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet을 건조한 다음 3 µl의 loading buffer X (5:1 deionized formamide to 25 mM EDTA, 50 mg/ml Blue dextran)에 재 부유시켰다. 4.8%의 sequencing gel에서 전기영동하고 염기서열 분석 프로그램을 이용하여 자료를 분석하였다.

3. PAF-AH 단백질의 대량 생산

PAF-AH를 *E. coli*에서 대량 발현 시키기 위해 강력한 T7 promoter와 분리에 용이한 His·Tag을 가진 pET30a vector (Novagen)로 cloning하였다. 이를 위해 PAF-AH가 클로닝 되어 있는 pCR3.1을 제한효소 *KpnI*과 *XhoI*으로 절단하여 원하는 1.4 kb의 PAF-AH cDNA 단편을 분리하고 pET-30a에 ligation 시켜 PAF-AH 유전자를 pET30a에 클로닝 하였다.

pET30a에 클로닝 된 PAF-AH 유전자를 가진 *E. coli*에서 PAF-AH가 발현되는지 알아보기 위해 transformant를 5 ml의 LB/Kan 배지에 접종하여 37°C에서 밤새 키웠다. 배양액 2 ml을 100 ml의 LB/Kan 배지에 희석해 다시 37°C 진탕배양기에서 600 nm에서의 흡광도가 0.7~0.8 사이가 될 때까지 키웠다. IPTG를 최종농도 1 mM로 첨가해 2시간 동안 단백질 발현을 유도한 후 5,000 ×g, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 얼음 위에서 30 sec pulses-30sec gap으로 sonication 하고 다시 12,000 ×g, 4°C에서 20분간 원심분리 하였다. 상층액을 새 시험관에 옮겨 -20°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

4. PAF-AH 활성 분석

활성 측정을 위해 [³H-acetyl] PAF (DuPont-New England Nuclear) 약 100,000 dpm을 유리 시험관에 넣고, N₂ gas로 ethanol을 휘발시켜 얻은 PAF lipid film에 Tris-tyrode를 첨가해 sonication하여 이를 PAF-AH의 기질로 사용하였다. Lysate

에서 얻은 효소를 10 µl 넣고 0.5 M Tris-Cl (pH 7.4) 12.5 µl와 0.1 M EDTA 12.5 µl, 50 mM 2-mercaptoethanol 25 µl를 넣고 37°C에서 30분간 배양한 후 정지 용액과 증류수 250 µl로 반응을 중지시켰다. Multi-vortex에서 격렬하게 교반시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 600 µl를 vial에 옮겨 3 ml의 cocktail solution (Triton-toluen)을 첨가해 유리된 [³H] acetic acid를 liquid scintillation counter (Beckman LS 6500)로 측정하였다.

5. Western Blot

단백질 sample을 BSA와 BCA protein assay reagent로 정량한 후 SDS sample buffer (100 mM Tris-Cl, pH 6.8, 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.2% bromophenol blue, 20% glycerol)와 섞어 95°C에 5분간 방치한 후 12% SDS polyacrylamide gel에 lane당 30 µg이 되게 넣어 전기영동 하였다. Semi-dry transfer system (Bio-Red)을 이용하여 nitrocellulose membrane에 전이시킨 후 5% skim milk (50 mM Tris (pH 7.4), 150 mM NaCl, and 0.1% Tween 20)로 blocking하였다. 사람 항 PAF-AH 항체 (1:500 희석, Cayman Chemical Co., Ann Arbor, USA)로 4°C에서 부드럽게 진탕하면서 밤새동안 배양하고, TBST로 세척한 후 horseradish peroxidase가 conjugate된 goat anti-rabbit IgG로 1시간 더 배양한 후 chemiluminescence detection system (Amersham Biosciences, Piscataway, USA)을 이용해 X-ray film에 감광시켜 단백질을 관찰하였다.

결 과

1. 소 유선조직에서 PAF-AH cDNA 클로닝

PCR 결과 예상되는 약 1.4 kb의 cDNA가 관찰되었으며 이를 pCR3.1 벡터에 클로닝 하였다. 총 2개의 클론의 염기서열을 결정한 결과 1,332 bp의 open reading frame에 444개의 아미노산이 예측되는 염기서열이 발견되었고 이는 약 43 kDa의 분자량에 해당되었다. 기존에 보고 되어 있는 소의 비장 PAF-AH cDNA 염기서열 (NM_174578)과 비교한 결과, 다음과 같은 차이를 관찰할 수 있었다; ACG (247-Thr) → ATG (Met), ATT (431-Ile) → ACT(Thr).

2. PAF-AH의 과다발현 및 활성 측정

pCR3.1에 클로닝 되어 있는 PAF-AH를 *E. coli*에서 대량 발현 시키기 위해 pET30a vector의 *KpnI*과 *XhoI* 부위에 subcloning하였다. 숙주세포인 *E. coli* BL21에 형질전환 시켜 IPTG로 단백질 발현을 유도하였다. 세포 lysates를 분리하여 PAF-AH 활성을 측정한 결과, 사용한 배지 및 숙주세포인 BL21에서는 효소활성이 나타나지 않았으나 PAF-AH로 형

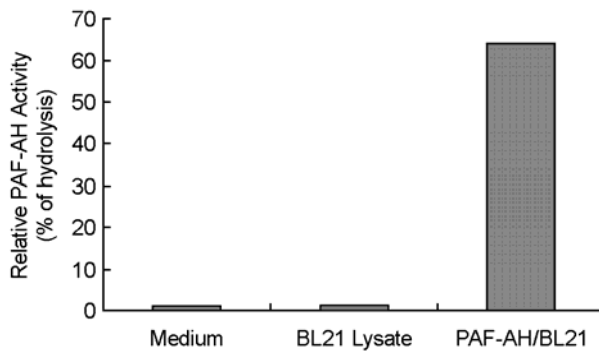


Figure 1. PAF-AH activity from the lysates of *E. coli* BL21 cells. The PAF-AH activity in culture medium, lysates of BL21 cells, lysates of BL21 cells transformed with bovine PAF-AH gene on an expression vector pET30a were analyzed as described in Materials and Methods.

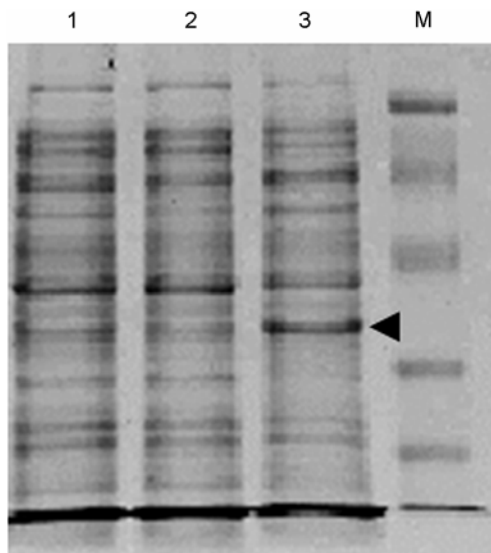


Figure 2. SDS-PAGE profiles of cell lysates of *E. coli* BL21 transformed with pET30a (1), BL21 transformed with bovine PAF-AH-pET30a (2), and BL21 transformed with bovine PAF-AH-pET30a induced by IPTG (3). Induced expression of PAF-AH protein (43 kDa) is indicated by an arrow. M, protein size marker (104, 80, 46.9, 33.5, and 28.3 kDa from top to bottom).

질 전환된 BL21 세포에서만 PAF-AH 효소활성이 관찰되었다 (Fig. 1).

3. PAF-AH Western blotting

E. coli lysate를 SDS-PAGE 한 결과 cDNA로부터 예상되는 크기인 43 kDa의 단백질이 PAF-AH/BL21 세포에서 과 발현되는 것을 알 수 있었고 (Fig. 2), 사람 PAH-AH 항체로 Western blot 한 결과 43 kDa 단백질이 반응함을 알 수 있었다 (Fig. 3). 이상의 결과로 보아 본 연구에서 소 유선조직의

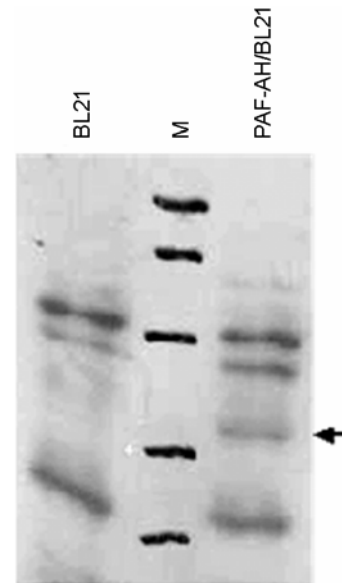


Figure 3. Western blot of recombinant PAF-AH expressed in cell lysates of *E. coli* BL21 transformed with bovine PAF-AH gene cloned on pET30a. PAF-AH protein (43 kDa) was detected using anti-human PAF-AH polyclonal antibody. M, prestained protein size marker (104, 80, 46.9, 33.5, and 28.3 kDa from top to bottom).

PAF-AH 유전자가 성공적으로 클로닝 되고 발현됨을 확인하였다.

고 찰

PAF은 매우 엄밀히 조절되는 인지질로서 다양한 생리학적 기능을 가지고 있으나, 이 조절체계에 이상이 생기면 염증 및 알레르기 등의 질병과정에서 중요한 역할을 수행한다. 천식, 만성 폐쇄성 호흡기질환, 류마티스성 관절염, 염증성 대장질환 등이 그 예가 될 수 있다. 이들 질병의 경우 대부분 PAF의 증가가 연관되어 있으므로 PAF을 감소시키거나 그 작용을 억제하는 것이 PAF 연관 질병의 조절에 중요할 것이다. PAF은 세포표면의 수용체를 통해 작용하므로 PAF 수용체 길항제를 사용한 연구들이 진행되어 왔다 (9,15,16). 그러나, 대부분 PAF 길항제의 경우 대부분 부작용의 문제로 임상실험에서 좋은 성적을 거두지는 못하고 있다 (28). 반면에 재조합 혈장형 PAF-AH는 천식이나 패혈증 등에서 만족할 만한 성과가 보고 되어 있다 (22,25).

혈장형 PAF-AH의 활성은 정상 성인 내에서 5배 정도의 차이가 나며 많은 경우 혈장 내 LDL cholesterol (LDL-C)의 수준과 관련이 있다고 알려져 있다. 정상인들 간에 PAF-AH 활성에 차이가 나는 것을 보면, 혈장형 PAF-AH가 건강을 결정하는 주요인자인지, 선천적으로 혈장형 PAF-AH가 낮으

면 특정질병에 잘 걸리는 것인지, PAF-AH의 발현이 높으면 이들 특정질병에 잘 걸리지 않을 것인지 등의 의문을 가질 수 있다. 실제 임신, 혈관계 질환, 허혈성발작 (ischemic stroke), 당뇨병, 신우신염, 류마티스성 혹은 비류마티스 성 관절염 등과 같은 염증과 관련된 다양한 질병의 초기 단계에서 PAF-AH의 증가가 보고 되어 있다 (10,11,17,18,21). 반대로, 정상보다 낮은 PAF-AH 활성을 나타내는 질병으로는 천식, 전신성 홍반성 낭창 (systemic lupus erythematosus, SLE), 급성 심근 경색, 폐혈증, 크론씨 병 등이 있다 (5). 그러나, 이와 같은 질병에서 관찰되는 효소의 감소가 이들 질병에 의한 것인지 아니면 이들 효소의 수치가 낮기 때문에 유발되었는지는 알기 어렵다. 혈장 내 LDL 농도는 혈장형 PAF-AH 활성을 결정하는 주요인자이다. 예를 들어, SLE 환자의 낮은 PAF-AH의 활성은 감소된 LDL과 관련성이 있다. 이와 같이 PAF-AH 활성은 혈장 내 LDL과 연관되어 다양한 질병상태에서 상승하거나 감소할 수 있다 (23).

816명의 건강한 일본 성인 중 32명에서 혈장형 PAF-AH의 활성이 관찰되지 않았다고 보고하였으며, 일본 소아 211명 중 8명에서도 비슷한 비율로 PAF-AH의 활성 상실이 있음을 보고하였다. 10개 가족에서 유전적인 상관성을 분석한 결과 PAF-AH의 결손은 상염색체 열성 유형 (autosomal recessive fashion)으로 유전된다고 보고하였다. 보다 흥미로운 것은 PAF-AH의 결손 빈도가 천식을 앓고 있는 아이들에서 높았으며, 이는 낮은 PAF-AH 활성과 염증질환과의 관련성을 가장 명확히 보여주는 예라고 할 수 있다 (26).

선천적인 PAF-AH의 결손 때문에 발생하는 염증관련 질병의 또 다른 예는 미성숙 신생아이다. 체중 1,500g 이하의 약 11%에 해당하는 신생아에서 괴사성 장염 (necrotizing enterocolitis, NEC)이 나타난다. NEC의 요인들 중 PAF가 주요 요소의 하나인 것으로 생각되고 있다. Rat에 PAF, LPS 및 TNF를 혈관 내에 주사하거나 hypoxia를 유발하면 NEC와 유사한 ischemic bowel necrosis가 유발되며, 이와 같은 현상은 PAF antagonist를 사전에 처리하면 예방된다는 보고가 있다. 또한 PAF 길항제를 이 질병을 앓고 있는 신생아 쥐에 투여하면 NEC로의 진행을 막을 수 있다. PAF-AH 효소활성은 성인에 비해 신생아에서 낮다. 흥미로운 것은 모유에는 PAF-AH가 존재하며, 이는 NEC의 발생을 감소시킬 수 있다. 따라서 염증반응에 위험률이 높은 선천적인 결손을 보이는 신생아에게 PAF-AH를 공급하면 위험률을 감소시킬 수 있을 것으로 생각되고 있다 (25).

본 연구에서는 소의 초유에서 혈장형 PAF-AH 활성이 최근 알려짐에 따라 소의 유선조직으로부터 PAF-AH cDNA를 클로닝 하여 재조합 단백질을 생산하였다. 본 재조합 단백질은 혈장형 PAF-AH cDNA로부터 예상되는 크기를 가지고

있었으며 강력한 PAF-AH 활성을 보였다. 염기서열 분석 결과 소의 혈장형 PAF-AH cDNA는 1332 bp의 open reading frame에 444개의 아미노산이 예측되는 염기서열로서 사람에 비하여 3개의 아미노산이 더 많았으며, 분비에 필요한 신호 펩티드 (Met-1~Ala17)를 가지고 있었다. Lipase나 esterase의 공통 효소활성 부위인 GXSG motif를 가지고 있었으며 (272-GHFSG-276) 사람 혈장형 PAF-AH의 catalytic triad (24)로 알려진 Ser-273, Asp-296, His-351도 모두 존재하였다 (Ser-274, Asp-297, His-352). Western blot 결과 몇 개의 비특이 밴드가 관찰되었으나 이는 숙주세포인 *E. coli* BL21의 단백질들로 생각되며, polyclonal 항체를 사용한 때문인 것으로 생각되었다. PAF-AH 단백질은 N-glycosylation 되는 것이 특징이며 이 부위들 중에는 Asn-423 및 Asn-433이 포함되는데 (1) 이들 역시 소의 PAF-AH 염기서열에서도 잘 보존되어 있었다. N-glycosylation이 PAF-AH 효소활성에 영향을 미칠 수 있다는 보고 (14)도 있으나, *E. coli* system에서 분리한 PAF-AH 단백질이 활성을 가지는 것으로 보아 PAF를 분해하는 능력에는 관여하지 않는 것으로 생각되었다.

PAF은 염증을 포함한 다양한 병리과정에서 중요한 역할을 하며 혈장형 PAF-AH에 의해 조절되므로, 본 연구 결과는 *in vitro* 혹은 *in vivo* PAF 모델에서 PAF 연관 질병들의 예방 및 조절에 있어 PAF-AH의 역할에 관한 연구에 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

- 1) Akiyama M, Sugatani J, Suzuki T, Suzuki Y, Miwa M: Identification of a major PAF acetylhydrolase in human serum/plasma as a 43 kDa glycoprotein containing about 9 kDa asparagine-conjugated sugar chain(s). *J Biochem* (Tokyo) **123**: 786-789, 1998.
- 2) Bazan NG: A signal terminator. *Nature* (London) **374**: 501-502, 1995.
- 3) Chen CH: Platelet-activating factor acetylhydrolase: is it good or bad for you? *Curr Opin Lipidol* **15**: 337-341, 2004.
- 4) Fukuda Y, Kawashima H, Saito K, Inomata N, Matsui M, Nakanishi T: Effect of human plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase in two anaphylactic shock models. *Eur J Pharmacol* **390**: 203-207, 2000.
- 5) Graham RM, Stephens CJ, Silvester W, Leong LL, Sturm MJ, Taylor RR: Plasma degradation of platelet-activating factor in severely ill patients with clinical sepsis. *Crit Care Med* **22**: 204-212, 1994.
- 6) Hattori M, Arai H, Inoue K: Purification and characteriza-

- tion of bovine brain platelet-activating factor acetylhydrolase. *J Biol Chem* **268**: 18748-18753, 1993.
- 7) **Hattori K, Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K**: Purification and Characterization of platelet-activating factor acetylhydrolase II from bovine liver Cytosol. *J Biol Chem* **270**: 22308-22313, 1995.
 - 8) **Henderson WR Jr, Lu J, Poole KM, Dietsch GN, Chi EY**: Recombinant human platelet-activating factor-acetylhydrolase inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. *J Immunol* **164**: 3360-3367, 2000.
 - 9) **Imaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA**: Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med* **238**: 520, 1995.
 - 10) **Ishii S, Nagase T, Tashiro F, Ikuta K, Sato S, Waga I, Kume K, Miyazaki J, Shimizu T**: Bronchial hyperreactivity, increased endotoxin lethality and melanocytic tumorigenesis in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. *EMBO J* **16**: 133-142, 1997.
 - 11) **Ishii S, Kuwaki T, Nagase T, Maki K, Tashiro F, Sunaga S, Cao WH, Kume K, Fukuchi Y, Ikuta K, Miyazaki J, Kumada M, Shimizu T**: Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* **187**: 1779-1788, 1998.
 - 12) **Izumi T, Shimizu T**: Platelet-activating factor receptor: gene expression and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* **1259**: 317-333, 1995.
 - 13) **Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M**: Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). *Prog Lipid Res* **42**: 93-114, 2003.
 - 14) **Karasawa K, Kuge O, Kawasaki K, Nishijima M, Nakano Y, Tomita M, Yokoyama K, Setaka M, Nojima S**: Cloning, expression and characterization of plasma platelet-activating factor-acetylhydrolase from guinea pig. *J Biochem (Tokyo)* **120**: 838-844, 1996.
 - 15) **Murakami K, Okajima K, Uchiba M, Johno M, Okabe H, Takatsuki K**: A novel platelet activating factor antagonist, SM-12502, attenuates endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation and acute pulmonary vascular injury by inhibiting TNF production in rats. *Thromb Haemost* **75**: 965-970, 1996.
 - 16) **Nagase T, Ishii S, Katayama H, Fukuchi Y, Ouchi Y, Shimizu T, Tashiro F, Ikuta K, Sato S, Waga I, Kume K, Miyazaki J, Kuwaki T, Maki K, Sunaga S, Cao WH, Kumada M**: Airway responsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. Roles of thromboxanes and leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* **156**: 1621-1627, 1997.
 - 17) **Nagase T, Ishii S, Kume K, Uozumi N, Izumi T, Ouchi Y, Shimizu T**: Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice *J Clin Invest* **104**: 1071-1076, 1999.
 - 18) **Peplow PV**: Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **61**: 6582, 1999.
 - 19) **Pinckard RN, Farr RS, Hanahan DJ**: Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J Immunol* **123**: 1847-1857, 1979.
 - 20) **Satoh K, Yoshida H, Imaizumi T, Takamatsu S, Mizuno S**: Platelet-activating factor acetylhydrolase in plasma lipoproteins from patients with ischemic stroke. *Stroke* **23**: 1090-1092, 1992.
 - 21) **Snyder F**: Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim Biophys Acta* **1254**: 231-249, 1995.
 - 22) **Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM**: Platelet-activating factor acetylhydrolases. *J Biol Chem* **272**: 17895-17898, 1997.
 - 23) **Tew DG, Southan C, Rice SQ, Lawrence MP, Li H, Boyd HF, Moores K, Gloger IS, Macphee CH**: Purification, properties, sequencing, and cloning of a lipoprotein-associated, serine-dependent phospholipase involved in the oxidative modification of low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**: 591-599, 1996.
 - 24) **Tjoelker LW, Eberhardt C, Unger J, Trong HL, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW**: Plasma Platelet-activating Factor Acetylhydrolase is a secreted phospholipase A2 with a catalytic triad. *J Biol Chem* **270**: 25481-25487, 1995.
 - 25) **Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, Zimmerman GA, McIntyre TM, Stafforini DM, Prescott SM, Gray PW**: Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature (London)* **374**: 549-553, 1995.

- 26) **Tsukioka K, Matsuzaki M, Nakamata M, Kayahara H, Nakagawa T:** Increased plasma level of platelet-activating factor (PAF) and decreased serum PAF acetylhydrolase (PAFAH) activity in adults with bronchial asthma. *J Invest Allergol Clin Immunol* **6**: 22-29, 1996.
- 27) **Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM:** Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res* **34**: 691-702, 1993.
- 28) **Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM:** Platelet-activating factor: antagonists, terminators, molecular mimics, and microbial opportunism. *J Intern Med* **239**: 463-466, 1996.
-