

## 방사선에 의한 세포사멸에서 E3 Ubiquitin Ligase RFP2에 의한 AKT의 조절 연구

주해미 · 김지영\* · 정재분 · 성기문 · 남선영 · 양광희 · 김치순 · 김희선 · 정미선 · 안성관<sup>1</sup> · 진영우  
한국수력원자력(주) 방사선보건연구원 · 건국대학교 유전단백체기능제어연구센터<sup>1</sup>  
E-mail: jykim@khnp.co.kr

중심어 (keyword) : Ret Finger Protein (RFP) 2, 세포사멸, Ubiquitination, E3 ubiquitin ligase, AKT

### 서 론

RFP2 (Ret Finger Protein 2)라는 유전자는 B-CLL (B-cell chronic lymphocytic leukemia) 환자의 50%정도에서 13q14가 삭제된 것을 볼 수 있는데 이 위치에 존재하는 유전자들을 찾는 과정에서 발견된 것으로, 세 개의 도메인 구조를 갖는 RBCC (RING finger, B-box, coiled-coil) 단백질군 중 하나이다. RBCC 단백질은 세포 사멸, 세포 증식, 세포 분화 및 전사조절과 같은 세포내 다양한 과정에 관여하는 것으로 알려져 있으며 [1], 최근에는 RFP2의 Ring finger domain 구조가 E3 ubiquitin ligase 활성을 갖는 것으로 보고되었다 [2]. 그러나 아직까지 RFP2에 대한 생물학적 기능은 많이 밝혀지지 않았다. Protein kinase B (PKB)라고도 알려져 있는 세포신호전달물질인 AKT는 세포 증식, 세포 성장 및 사멸, 대사과정에서 세포 기능을 조절하는 단백질로 알려져 있다 [3].

본 연구에서는 E3 ubiquitin ligase 활성을 갖는 RFP2가 ligase의 새로운 타겟 기질 (substrate)로서 세포생존에 관여하는 AKT와 결합 이들의 발현을 조절하는지를 살펴보고자 하였다.

### 재료 및 방법

**세포배양** : 293T 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 분양받아 10% FBS, 1 %

penicillin-streptomycin이 첨가된 DMEM 배양액에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건의 배양기에서 배양하였다.

**방사선 조사** : 감마선 발생장치 (<sup>137</sup>Cs, 0.8 Gy/min, IBL 437N)를 이용하여 다양한 선량을 각 실험군에 조사하였다.

**세포생존율과 세포사멸 측정** : 방사선 조사 72시간 후 MTT assay로 세포생존율을 확인하였으며, Titer TACS TUNEL assay (R&D systems)로 세포사멸을 측정하였다.

**In vivo ubiquitination 측정** : 293T 세포에 RFP2와 his-Ub를 과발현 시킨 후 Ni-NTA column을 이용하여 ubiquitination된 단백질을 관찰하였다.

**AKT kinase 측정** : 세포 용해물과 AKT 항체를 IP (Immunoprecipitation, 면역침강법)한 후, GSK-3 α/β fusion protein (cell signaling)과 반응시키고 anti-phospho-GSK-3 α/β antibody (Cell signaling)로 Western blot을 시행하였다.

### 결과 및 고찰

#### 1. RFP2의 발현이 세포사멸에 미치는 영향 관찰

E3 ubiquitin ligase 활성을 갖는 RFP2가 방사선에 의한 세포사멸에서 어떠한 영향을 미치는지 살펴보기 위하여 293T 세포에 wild-type과 mutant-type의 RFP2를 과발현 시킨 후 방사선 조사 후 72시간에 세포 생존과 사멸을 각각 측정한 결과 고선량으로 갈수록 세포사멸이 증가하였으며, wild-type RFP2를 과발현 시킨 293T 세포에서 세포사멸이 더욱 더 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig. 1). 반면 E3 ubiquitin ligase 활성

을 갖는데 중요한 역할을 하는 Ring finger domain의 cystein잔기를 alanine기로 치환한 mutant-type RFP2에서는 empty vector와 비슷한 결과 (Fig. 1)를 나타내는 것으로 보아 RFP2에 의한 세포사멸은 E3 ubiquitin ligase 활성화에 의존적임을 알 수 있었다.

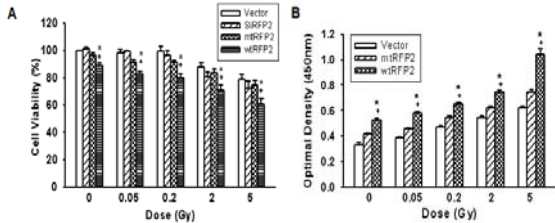


Fig. 1. Effects of RFP2 on ionizing radiation-induced apoptosis.

## 2. RFP2 과발현이 p53과 AKT 단백질 발현에 미치는 영향 관찰

위의 결과에서 과발현된 wild-type의 RFP2가 세포사멸을 증가시켰기 때문에 세포사멸에 대표인자인 p53의 발현과 세포생존에 관여하는 것으로 알려진 AKT의 발현을 살펴본 결과 p53의 발현은 증가하고 AKT의 단백질 발현은 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 2).

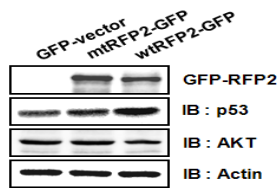


Fig. 2. Expression change of p53 and AKT protein induced by RFP2 overexpression.

## 3. RFP2에 의한 AKT의 degradation 관찰

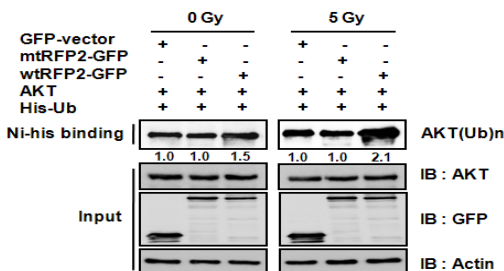


Fig 3. The ubiquitination of AKT induced by RFP2.

RFP2의 과발현은 세포생존 조절인자인 AKT의 단백질 발현을 감소시켰기 때문에 AKT가 E3 ubiquitin ligase 활성을 갖는 RFP2의 새로운 타겟 기질로 작용하여 ubiquitination에 의해 분해됨으로서 이러한 결과

를 가져오는지 살펴보기 위하여 in vivo ubiquitination assay를 실시해 본 결과 AKT는 wild-type RFP2에 의해서 ubiquitination이 증가하였으며, 방사선 조사에 의해 더욱 더 AKT의 ubiquitination이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

## 4. RFP2에 의한 AKT kinase 활성변화 관찰

Ubiquitination을 통해 AKT 단백질의 발현량을 감소시킨 RFP2가 AKT kinase 활성화에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 RFP2를 과발현 시킨 293T 세포에서 AKT kinase assay를 수행한 결과 AKT의 단백질 발현량이 감소했던 결과와 마찬가지로 kinase activity도 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4).

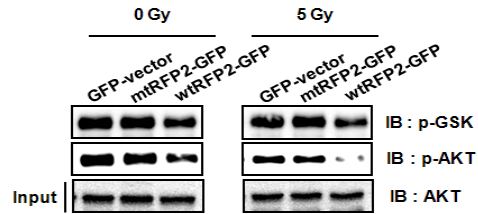


Fig. 4. The reduction of AKT kinase activity induced by RFP2.

## 결론

이상의 연구결과를 통하여 고선량 방사선에 의한 세포사멸에서 E3 ubiquitin ligase 활성을 갖는 RFP2는 세포생존을 조절하는 AKT와 결합 ubiquitination 시킴으로서 단백질 분해 및 kinase 활성을 억제하여 세포사멸을 증가시키는 것으로 사료된다.

## 참고 문헌

- Baranova A. et al., Distinct organization of the candidate tumor suppressor gene RFP2 in human and mouse: multiple mRNA isoforms in both species- and human-specific antisense transcript RFP2OS. *Gene*, 321:103-112, 2003.
- Lerner M. et al., The RBCC gene RFP2 (Leu5) encodes a novel transmembrane E3 ubiquitin ligase involved in ERAD. *Mol Biol Cell*, 18:1670-1682, 2007.
- Rane M.J. et al., Regulation of neutrophil apoptosis by modulation of PKB/AKT activation. *Front Biosci*, 14:2400-2412, 2009.