

옥수수 유식물 조직에서 분리한 막 단백질과 Phosphatidylcholine의 재조합

吳承恩

(延世大學校 生物學科)

Reconstitution of Membrane Proteins from Corn Seedlings with Phosphatidylcholine

Oh, Seung-Eun

(Department of Biology, Yonsei University, Seoul)

ABSTRACT

Membrane proteins isolated from the coleoptile and mesocotyl tissues of corn seedlings were solubilized with Triton X100 and reconstituted with phosphatidylcholine at 20°C.

The proteoliposomes were incubated and proton uptake into the vesicles was measured with a spectrophotometer. Addition of ATP to the reaction mixture was found to result in an active accumulation of proton into the vesicles. These results indicate that the preparation contains tightly bound phosphatidylcholine vesicles with reconstituted H⁺-ATPase from the plant cell membranes.

서론

세포막에 위치하며, 방향성을 띄고 있는 이온 이동에 관여하는 단백질을 순화한 후에 그 기능을 유지한 상태로 인공적인 phospholipid vesicle로 재조합(reconstitution)할 수 있다(Wrigglesworth, 1985).

이 재조합된 system을 통해서 생화학적 방법으로 순화한 단백질이 이온을 이동시키는 지를 검증할 수 있다.

*Cucurbita pepo*의 세포막 vesicle에서 비이온계 detergent인 Triton X100을 사용해서 순화한 ATPase(Oh, 1990)들이 H⁺-pump 또는 Ca²⁺-pump인지를 확인하고, 그들의 조절기작을 연구하기 위해서 proteoliposome system을 만드는 방법의 개발이 필요하였다.

Triton X100으로 용해한 phosphatidylcholine을 초단파 처리함으로써 liposome을 형성시키고, *Zea mays*에서 획득한 proton-pump를 함유하고 있는 단백질을 첨가한 후 Bio-Beads SM-2로 Triton X100을 제거하므로서 proteoliposome으로 재조합 시켰다.

Lipophilic한 pH indicator인 neutral red(NR)를 사용해서 proteoliposome내로의 proton 이동을 측정하므로서 형성된 proteoliposome이 phospholipid에 의하여 온전하게

돌려 쌓여 있는 H⁺-ATPase의 재조합이라는 것을 확인하였다.

재료 및 방법

옥수수(*Zea mays* L. cv. "Inraplus", category 2a, Nuegesser KG, Darmstadt, FRG) 종자를 3-4시간 물에 담가둔 후, 물에 적신 cellulose가 놓여 있는 plastic 상자안에서 4 1/2일간(26°C, 습도 90%) 발아, 성장시켰다. 발아 후 성장하는 동안 이 유식물들에게 1일 2시간씩 적색광 처리를 하였다.

Phospholipid 준비. 편도칼로 40% L- α -phosphatidylcholine(Type IV-S, Sigma) 50 mg을 잘게 부순 다음, M eOH 3 ml로 용해하였다. 이 용액을 질소 gas로 건조시킨 후 0.5%(w/w) Triton X100이 함유된 25 mM MOPS-NaOH(pH 7.2) 6 ml로 용해한 뒤 -20°C에서 보관하였다.

사용직전 phospholipid 용액 2 ml에 2%(w/w) Triton X 100 2.5 ml를 첨가한 후 0°C에서 초단파 처리를 2.5분간 2회 실시하였다.

재조합에 사용한 단백질. 20g의 옥수수 자엽초나 중 배육 조직 1g당 10%(w/w) sucrose를 함유하고 있는 25

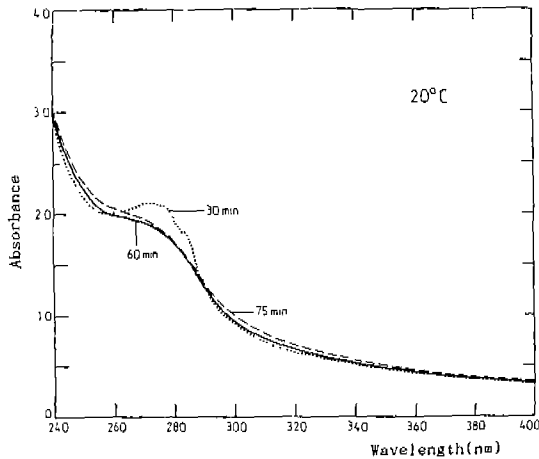


Fig. 1. Kinetics of adsorption of Triton X100 on Bio-Beads SM-2. The ratio of proteins, ultrasonicated phospholipid and Triton X100 was 1 : 10 : 32 (1.5 mg : 15 mg : 47.7 mg). Bio-Beads SM-2 3.8 g was added to 3.915 ml of solution and the mixture was incubated at 20°C. At 30, 60 and 75 min, the absorbance was measured.

mM MOPS-NaOH (pH 7.2) 1 ml를 첨가한 후 면도날로 잘게 부셨다. 이 homogenate를 nylon 형겅(ϕ 100 μ m)에 통과시킨 후 10,000 \times g에서 10분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 상등액(제 1 상등액)을 다시 96,000 \times g에서 30분간 원심분리한 후 제 2 상등액을 제거하고 제 2 침전물을 0.5% Triton X100을 함유하고 있는 25 mM MOPS-NaOH (pH 7.2) 12 ml로 헹궈낸 후 다시 96,000 \times g에서 30분간 원심분리 후 제 3 상등액을 획득하고 Sephadex G25를 사용해서 13배 농축하였다. 단백질 정량은 Krystal *et al.* (1985)의 방법을 사용하였다.

Proton 유입측정. Proteoliposome내로 H⁺의 유입은 Hager *et al.* (1980)의 방법에 의해 흡광도(465-430 nm) 측정으로 하였다. 170 μ l의 (40 μ M NR, 5 mM MgCl₂와 1 mM EGTA를 함유하고 있는) MOPS-NaOH 완충용액을 재조합된 liposome을 함유하고 있는 MOPS-NaOH (pH 7.2) 800 μ l 용액에 혼합한 후 100 mM ATP 용액 30 μ l를 첨가함으로써 반응을 시작하였다.

Program이 가능한 HP 8450 spectrophotometer로 반응 kinetics를 측정하였다.

결 과

Triton X100 흡착에 대한 kinetics. 농축된 제 3 상등액 540 μ l와 3.375 ml phospholipid 용액을 Eppendorf 반응용기 안에서 혼합하였다. 단백질, phospholipid와 Triton X100의 혼합비율은 1 : 10 : 32(1.5 mg : 15 mg : 47.7 mg)이었다.

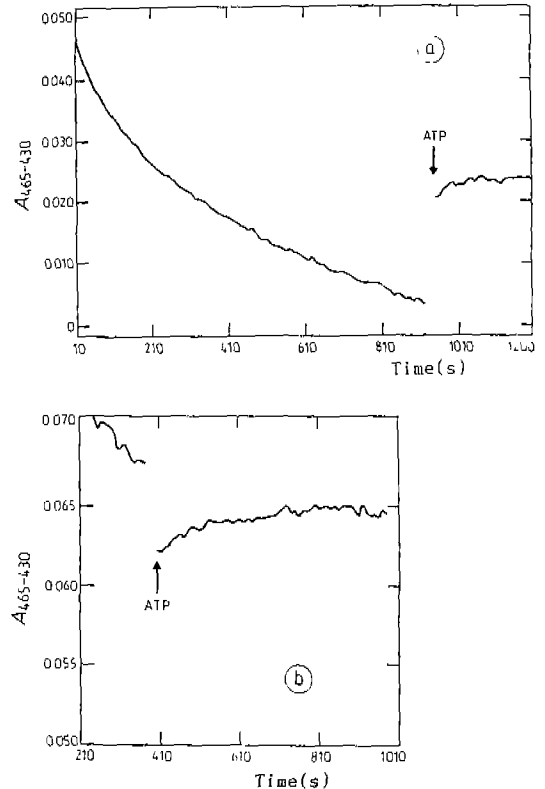


Fig. 2. Kinetics of proton uptake in reconstituted vesicles. Reconstituted vesicles 800 μ l were added to 170 μ l neutralred (NR) test solution (40 μ M NR, 5 mM MgCl₂ and 1 mM EGTA in 25 mM MOPS-NaOH pH 7.2). The reaction was started by adding 30 μ l of 100 mM ATP to the reaction mixture at appropriated times as indicated by the arrows. (a) ATP was added in a later stage of incubation. (b) ATP was added in an early stage of incubation.

혼합용액의 Triton X100을 제거하기 위해서 Bio-Beads SM-2(Bio-Rad) 3.8 g(80 mg/mg Triton X100)을 첨가한 후 mini shaker를 사용하여 반응용기를 흔들어서주었다.

20°C에서 30, 60, 75분 후에 혼합용액의 275 nm에서 흡광도를 측정하였다(Fig. 1). Bio-Beads SM-2에 의한 Triton X100의 흡착율은 온도에 따라 현격한 차이를 나타내었다. 0°C에서는 60분 후에도 흡광도의 변화가 거의 없었다(결과는 제시하지 않음). 20°C에서 60분 후에는 Triton X100의 흡착이 최고에 도달하였다.

재조합된 liposome 내부로의 proton 이동에 대한 kinetics. 20°C에서 60분간 Triton X100을 흡착시킨 후 유리섬유를 이용해서 Bio-Beads SM-2를 제거한 후에 NR를 이용해서 proton 이동을 측정하였다. 흡광도 변화가 감소한 뒤 ATP를 첨가하였다(Fig. 2a). ATP를 첨가하기전 465-430

nm의 흡광도는 -1.5 mE/min 이었으나 ATP를 첨가한 후 100초간 $+2.3 \text{ mE/min}$ 에 도달하였다. ATP를 incubation 초기단계 즉 흡광도 측정 400초 후에 첨가할 경우(Fig. 2b) -1.4 mE/min 에서 300초간 흡광도가 $+0.53 \text{ mE/min}$ 까지 상승하였다. ATP를 첨가한 후 465-430 nm 흡광도의 증가는 재조합된 proteoliposome에 proton-pump가 결합되어 있고 phospholipid에 의해서 둘러싸여 있음을 보여준다.

고찰

옥수수의 자엽초나 중배축의 세포막들에 결합되어 있는 proton-pump들을 세포, 세포파편(debris), 전분, 핵 등을 제거한 후 순화과정 없이 detergent로 용해한 후 재조합에 이용하였다.

Triton X100은 낮은 cmc(critical micelle concentration) 값을 갖기 때문에 micelle의 크기가 상대적으로 크므로 낮은 온도에서도 가능한 투석법을 사용할 수 없다.

사용한 방법은 20°C의 비교적 높은 온도에서 효과적이므로 불안정한 단백질을 재조합할 때 활성의 감소를 가져올 것이나, 재조합 후에는 단백질이 순화과정에서 사용된 detergent보다는 적절한 삼차원적 구조를 형성할 수 있을 것이다.

Unilamella 구조를 가진 liposome이 형성되기 위해서는 적당한 양의 detergent와 phospholipid가 사용되어야 한다. Detergent의 농도가 낮은 경우 일부 phospholipid는 multilamella 구조를 갖는 aggregate를 형성하게 되므로(Mimms *et al.*, 1981) phospholipid를 Triton X100에 녹인 후 초단파 처리로 가능한 unilamella 구조를 형성하도록 한 후 사용하였다.

재조합된 소수성 단백질은 multilamella 구조가 unilamella 구조로 전환되도록 하나(Kagawa *et al.*, 1973) 재조합 후 proteoliposome 생성에 관여하지 않은 phospholipid는 multilamella 구조로, Bio-Beads에 흡착되지 않은 Triton X100은 free form 형태나 mixed micelle form으로 존재할 수 있다.

사용한 phospholipid와 단백질 비율은 문헌의 결과를 참고로 결정하였으며(Bennett and Spanswick, 1983; Kasamo, 1987) detergent와 phospholipid의 비율은 실험을 통해서 결정하였다.

재조합 후 ATP를 첨가하기전까지 pH indicator의 465-430 nm 흡광도가 계속 감소하는 현상을 보였다. NR을 사용해서 vesicle 내부로의 proton 유입을 측정할 경우 시간이 경과함에 따라 흡광도가 감소하는 현상은 이미 알려져 있으며(Hager *et al.*, 1980) 이는 vesicle내부에 음전하를 띄고 있는 단백질과 같은 특정부분과 NRH⁺ 결합이 부분적인 염료농도의 증가로 aggregate를 형성하며 이 aggregate가 NRH⁺-최대흡광도의 metachromatic-shift를 일으키기 때문이라고 생각한다. 이 proteoliposome system에서 ATP 첨가전 즉 H⁺이 결합되지 않은 NR 상태에서 NR 최대 흡광도의 변화로 이런 현상이 일어나는 지는 확실하지 않

다.

순화된 단백질과 gel-filtration이나 원심분리를 통한 균일한 liposome 집단을 사용하여 형성된 proteoliposome을 순화하고 전자현미경을 통한 구조의 확인 후 model-system으로서 특성규명이 가능하며, 정확한 이온 이동에 대한 kinetics 분석이 가능하여질 것이다.

적요

옥수수 유식물의 자엽초와 중배축에서 분리한 막 단백질을 Triton X100로 용해시켜 20°C에서 phosphatidylcholine과 재조합된 proteoliposome을 얻었다. 이 proteoliposome을 incubate하여 용액의 수소이온이 ATP 첨가로 인하여 vesicle 안으로 축적되는 사실을 확인하였다.

이러한 결과는 이 proteoliposome이 phospholipid막으로 온전하게 둘러싸였다는 것과 세포막에 존재하는 H⁺-ATPase의 기능을 유지하는 재조합을 얻었다는 것을 의미한다.

참고문헌

- Bennett, A.B. and R.M. Spanswick. 1983. Solubilization and reconstitution of an anion-sensitive H⁺-ATPase from corn roots. *J. Membrane Biol.* 75: 21-31.
- Hager, A., R. Frenzel and D. Laible. 1980. ATP-dependent proton transport into vesicles of microsomal membranes of *Zea mays* coleoptiles. *Z. Naturforsch.* 35C: 783-793.
- Kagawa, Y., A. Kandrach and E. Racker. 1973. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 248: 676-684.
- Kasamo, K. 1987. Reconstitution and characterization of H⁺-translocating ATPases from the plasma membrane of *Phaseolus mungo* L. roots. *Plant Cell Physiol.* 28: 19-28.
- Krystal, G., C. MacDonald, B. Munt and S. Ashwell. 1985. A method for quantitating nanogram amounts of soluble protein using the principle of silver binding. *Anal. Biochem.* 148: 451-460.
- Mimms, L.T., G.Z. Zampighi, Y. Nozaki, C. Tanford and J.A. Reynolda. 1981. Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry* 20: 833-840.
- Oh, S.-E. 1990. Purification and characterization of ATPases and phosphatase of light membrane vesicles isolated from *Cucurbita pepo*. *Korean J. Bot.* 33:
- Wrigglesworth, J.M. 1984. Reconstituted membrane system. *In*, Membrane Processes. Part I, Structural and function relationships in cell membranes. G. Benga *et al.* (eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 3-26.