

# Protein kinase와 Cell Cycle

유 일 재

한국산업보건연구원 산업독성연구실

## I. 서 론

Eukaryotic 세포의 cell cycle은 Gap phase 1 (G1), DNA replication을 하는 S phase, Gap phase 2 (G2), 두개의 딸 세포로 분리하는 M phase로 나눌 수 있다. Cell division cycle은 가장 중요한 세포의 현상으로 암 연구나 세포분화의 연구에 있어서 가장 기본적인 연구분야로 이런 현상의 실마리를 푸는데 매우 중요한 위치를 차지한다고 할 수 있다. 즉 다시 말하면 암은 cell cycle의 정확한 조절이 깨어진 것이라고 말할 수 있고, 세포의 분화성장은 세포가 cell division cycle을 멈춘 현상이라고 볼 수 있다. Eukaryotic cell cycle의 연구는 15년 전의 yeast의 연구부터 거슬러 올라갈 수 있다. Yeast 연구자들은 분열(fission)하는 *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*)에서 40여 종의 유전자가 세포분열에 필요한 것을 밝혀 내었다. 영국의 Paul Nurse의 그룹이 cdc2 유전자에 대한 관심을 두고 처음으로 연구를 하였다. 왜냐하면 cdc2는 cell cycle의 control point인 late G1과 G2의 필수적인 유전자로 밝혀졌기 때문이다. 그리고 ts(temperature sensitive) cell cycle mutant에서 cell cycle arrest하는 mutant가 cdc2가 활성화되면서 cell cycle이 진행되는 것을 관찰하였다(Nurse et al., 1976; Nurse & Thuriaux, 1980). 이런 현상들은 cdc2 유전자가 cell cycle을 진행하는데 rate-limiting step으로 작용하는 것을 보여 주었다. 1982년에는 출아 yeast인 *S. cerevisiae*에서도 cdc28이 발견되어 이것이 cdc2 mutant를 complement하는 것을 보았고, 이것이 cdc2와 유사한 것을 알게 되었다(Beach et al., 1982). 사람의 cdc 2를 가지고 있다. 이 cdc2 유전자의 기능은 1987년 Draetta 등에 의해 protein kinase로 밝혀지게 되었다. 그리고 p34cdc2 kinase로 명기한다.

p34cdc2 kinase의 regulatory subunit인 cyclin은 양서동물의 알에서 M phase를 촉진하는 단백질로 MPF(maturation promoting factor)로 알려지게 되었다(Smith & Ecker, 1969, 1971). 곧 MPF는 catalytic subunit인 p34cdc2와 regulatory subunit인 cyclin B의 heterodimer로 밝혀지게 되었다(Draetta et al., 1988, 1989). 사람의 cdc2는 p34cdc2의 인산화(phosphorylation)와 p34cdc2와 p62 cyclin B와의 결합에 의해 cell cycle에 따라서 조절되어 지고 있다(Pines & Hunter, 1989; Giordano et al., 1989). Cyclin은 3가지로 나누고 있는데 A-type cyclin, B-type cyclin, 그리고 *S. cerevisiae*의 CLN type이 알려지고 있다.

Eukaryotic protein kinase는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. Tyrosine kinase와 serine/threonine kinase로 나눌 수 있다. Tyrosine kinase는 receptor-like와 non receptor-like로 나눌 수 있는데 receptor-like tyrosine kinase는 transmembrane spanning region이 있고, 그 예로 ErbB나 Fms를 들 수 있다. Non receptor-like tyrosine kinase는 transmembrane spanning region이 없다. 그 예로 Src, Fps, Abl 등을 들 수 있다. Y-kinase는 주로 일차적인 signal transduction의 역할 즉 세포막에서 세포질로서의 signal transduction에 관계한다고 생각되어지고 있다. 그리고 2차적인 signal transduction에 관계한다고 생각되어 지는 serine/threonine kinase는 세포내에서 여러가지 반응, 즉 세포의 성장분화, 대사 등을 조절한다고 생각되어 지고 있다.

Protein kinase가 cell cycle에 관여하는 것은 p34cdc2가 protein kinase일 뿐만 아니라 그 자신도 다른 kinase의 인산화에 의해 조절되어 지고 있고 또 cell cycle에 관여하는 많은 kinase들이 oncogenic protein 즉 Myc, Fos, Jun, Myb, SV40 large T anti-

gen, RBb protein, adenovirus E1A 등을 인산화시키고 있는 것을 볼 수 있다. 그래서 이 총론에서는 cell cycle의 조절에 관계하는 p34cdc kinase의 특성과 기질 그리고 cell cycle에서의 역할을 살펴보고, 또 cell cycle에서와 여러가지 세포내의 현상에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 casein kinase II의 특성과 기질 그리고 cell cycle에서의 역할을 살펴보고자 한다. 그리고 이런 효소들을 연구하는 데 필수적인 방법이나 시약들로 소개하고자 한다.

## II. Protein kinase와 cell cycle

### 1. Protein kinase의 특이성

최근에 단백질화학과 분자생물학의 발달로 protein kinase는 어떤 특이한 아미노산 구조의 serine/threonine이나 tyrosine을 기질로 한다는 것을 밝혀 내었다. Table 1에서 보는 바와 같이 알려진 protein kinase들은 각각의 독특한 아미노산의 sequence motif를 가지고 있다. cAMP-dependent protein kinase (PKA)는 basic peptide sequence에서도 특히 arginine이나 lysine에 가깝게 위치한 serine이나 threonine을 인산화하고 있다. 이 아미노산 서열을 이용하여 Kemp (1976)는 kemptide leu-arg-ara-ser-leu-gly라는 peptide를 합성하여 이 효소의 활성을 측정하는데 이용하였다. 이 후로 특정 효소의 인산화 motif가 알려지면 이 서열을 이용하여 peptide를 합성하여 효소의 활성을 특정하거나 inhibitor로 사용되어 지고 있다. PKA, PKG, phosphorylase kinase, myosine light chain kinase, histone kinase, S6 kinase 등은 PKA와 비슷하게 arginine이나 lysine이 있는 basic peptide에서 각각의 효소의 특성에 맞는 sequence motif를 가지고 있다. 그리고 tyrosine kinase는 C-terminal쪽으로 basic보다는 acidic에 위치한 tyrosine kinase는 인산화 한다. 그리고 casein kinase II (CKII)는 N-terminal이나 C-terminal쪽으로 강한 acidic peptide에 위치한 serine이나 threonine을 인산화 한다. p34cdc2는 serine이나 threonine을 인산화하는데 이 아미노산은 proline을 C-terminal쪽으로 두고 있으며, 그 proline 옆에는 basic 아미노산을 두고 있다. Table 1. 명기한 reference는 peptide를 합성하여 kinase의 기질로 사용한 것을 나타내고 있고 또 많은 것들이 상용화

되어지고 있다.

### 2. p34cdc2 kinase의 기질

Table 2에서는 p34cdc2의 기질들과 인산화에 따르는 생리적인 기능을 보여주고 있다. 아직 많은 기질들이 *in vitro*인지 *in vivo*의 phosphorylation site 여부는 몇가지 기질을 제외하고는 명확치 않고, 또 그 인산화에 따르는 세포내에서의 기능도 아직도 명확히 밝혀지지 않고 있다. Lamin, vimentin, histone H1 등의 인산화는 G2/M 전환에 따른 필수적인 현상들이라 설명할 수 있으나 viral과 cellular oncogene의 단백질이나 tumor suppressor gene의 단백질도 기질로 하는 것을 보면 p34cdc2의 phosphorylation은 cell cycle 진행 외에도 다른 기능이 있지 않을까 생각된다.

### 3. CKII의 기질

CKII는 casein이 생리화학적 기질은 아니다. DEAE column을 이용하여 CKII를 정제하는 과정에서 casein을 기질로 이용하여 활성도를 측정하였는데, 제일 먼저 elute해서 활성도의 peak를 보여주는 효소를 casein kinase I (CKI)이라 하였고, 두 번째 peak를 보여주는 효소를 CKII라 부르게 된 것에서 연유하는 것이다. 이 효소도 p34cdc2와 같이 다양한 기질을 가지고 있는데 Table 3에 나타나고 있다. CKII의 기질도 cdc2와 같이 다양하게 효소, cytoskeletal protein, transcriptional factor, oncoprotein 등을 가지고 있다. 특히 nuclear oncoprotein들 E1A, LTA<sub>g</sub>, Fos, Myc 등을 기질로 하고 있는 것을 보면 CKII의 phosphorylation은 암유발이나 세포의 성장에 중요한 역할을 할 것이라 생각된다. 그리고 또 CKII는 p34cdc2 kinase의 기질이지만 CKII도 p34cdc2 kinase를 기질로 가지고 있는 것을 보면 두 효소의 상호 인산 작용이 cell cycle에 중요한 역할을 하리라 생각된다.

### 4. Localization of p34cdc2 kinase and CKII

p34cdc2 kinase는 핵에 존재하는 단백질로서 항체를 microinjection하게 되면 세포를 G2에 arrest한다고 한다. 그리고 p34cdc2는 M phase에는 centrosome과 밀접하게 관계하여 위치한다(riabowol, 1989).

CKII의 세포내의 위치에 대해서는 아직 여러가지 이론이 있다. Yu (1991) 등은 interphase에서  $\alpha$  &  $\beta$  subunit은 대부분이 세포질에  $\alpha'$  subunit은 세포

**Table 1.** Kinases and sequence specificities.

Kinase	Substrate	Sequence	Ref.
PKA	Kemptide	L-R-R-A-S-L-G	Kemp (1976)
	liver pyruvate kinase	R-R-X-S-X	
	phosphorylase kinase	L-R-X-X-S-X	
	phosphatase inhibitor-1	R-R-L-S-S-L-R-A	
	ribosomal protein S6	R-R-S-S-S-L-R-A	
PKG	histone H2B	R-K-R-S-R-K-E	Pelech (1986)
PKC	synthetic	R-R-L-S-S-L-R-A	House (1977)
Ga/CaM	glycoen synthase	P-L-S-R-T-L-S-V-S-S(S(T)	Pearson (1985)
MLCK	smoth muscle MLC	K-K-R-P-Q-A-T-S-N-V-T-A	
	skeletal muscle MLC	P-K-K-A-K-R-R-A-A-E-G-S-S-N	
Phosphory lase kinase	glycogen synthase	K-K-S-R-T-L-S-V-S-X-L-P-G	
	phosphorylase	L-S-Y-R-R-Y-S-L	
Tyrosine kinase	pp60 (src), p90	K-L-I-E-D-N-E-Y-T-A-R	Ahn (1991)
	pp60 (src)	K-R-L-I-E-D-N-E-Y-T-A-R-Q-G	
	EGF stimulated	L-I-E-D-A-E-Y-T-A	
CK I	glycogen syntease	P-L-S-R-T-L-S-V-S-S-L-P-G	Kuenzel (1985)
CK II	synthetid	E-E-E-T-E-E-E	
	troponin	AC-S-S-N-E-E-V-E-H-V-E-E-E	
	glycogen synthase	P-H-Q-S-E-D-E-E-E-P-T-D-D-G	
p34cdc2 kinase	nucleolar protein	A-P-A-S-E-D-E-E-D-D-D-D	Marshak (1991)
		X-X-S(T)-P-X-X	

PKA=cAMP dependent protein kinase

PKG=cGMP dependent protein kinase

Ca/Ca. = calcium/calmodulin dependent protein kinase

MLCK=myosin light chain kinase

EGF=epidermal growth factocelr

A=alanine, D=aspartate, E=glutamate, G=glycine, H=histidine, I=isoleucine, K=lysine, L=leucine, M=methionine, N=asparagine, P=proline, Q=glutamine, R=arginine, S=serine, T=threonine, V=valine, : = tyrosine, X=any amino acid, AC=acidic amino acid

The underlines indicate sites for phosphorylation.

질에 존재하며, S phase에서는  $\alpha$ 와  $\beta$ 가 세포질에 존재하며  $\alpha'$ 도 핵에서 이동하여 세포질에 존재하며, M phase에서는 모두가 세포질에 존재하며 특히  $\alpha$  subunit은 microtubule과 결합하여 존재한다고 하였다. 그러나 Krek 등(1992)은 CKII는 모두가 핵에 존재하며 세포질로 이동(translocation)하지 않는다고 발표하였다. 그리고 Lorenz 등(1993)은 CKII  $\beta$  subunit은 대부분이 핵에 존재하며, 휴지기(quiet-cent)의 세포에서 분열기의 세포로 갈때 CKII  $\beta$ 는

핵으로 이동한다고 보고하였다. CKII  $\alpha$ 나  $\alpha'$  subunit의 아미노산 서열을 살펴보면 74-86 사이에 nuclear localization sequence (NLS)가 있다. 이 서열은 주로 basic 아미노산 서열 (KKKKIKIREIKILE)로서 핵으로 이동할 때 핵 이동 단백질과 결합하여 핵 이동을 증가시킨다고 한다(Dong & Lee, 1989). 그러나  $\beta$  subunit은 NLS를 가지고 있지 않다. 그래서  $\beta$ 의 이동은  $\alpha$ 나  $\alpha'$  subunit과의 결합때만 가능하지 않을까 생각된다. CKII의 인산화의 역할 중의 하나

**Table 2.** Substrates for p34cdc2 kinase

Substrate	Phosphorylation site	Function
histone H1	KS/TPK	chromosome condensation
histone H1	KS/TPXK	
Polymerase II CTD	SPTSPSY	transcription inhibition
SV40 T antigen	HSTPPKK	DNA replication
p105Rb	QRSPRK	unknown
p105Rb	LRSFYK	
p60src	QTPNK	cytoskeletal rearrangement
p53	SSSPQK	unknown
nucleolin	TPXKK	nucleolar reorganization
C-Ab1	APDTPEL	unknown
C-Ab1	PAVSPLL	
Human lamin A	TPLSPTRI	nuclear lamina disassembly
Human lamin A	RLSPSPTS	
Chicken lamin B2	GTPLSPTR	
Casein kinase II	SNFKSPVK	unknown

Sources: Nobury, C., and Nurse, P., 1992. *Annu. Rev. Biochem.* 61: 441-70, Draetta, G., 1990. *TIBS* 15: 378-383.

로 NLS를 가진 많은 oncogenic protein (e.g. SV 40 large T antigen)들이 NLS의 downstream sequence (약 10-20 아미노산)에 CKII 인산화 서열이 있는 것을 볼 수 있는데 CKII의 인산화가 이런 단백질들의 핵 이동을 증가시킨다고 한다(Rihs et al., 1991).

위의 Table에서도 보았지만 CKII의 많은 기질들이 세포질과 세포핵에 존재하는데 어떤 형태의 CKII가 세포질 형태이고 핵 형태인지는 좀 더 많은 연구가 되어야 할 것 같다. 또 아직  $\alpha'$ 에 대한 항체가 전혀 개발되지 않아서 연구를 어렵게 하고 있다. 최근에 우리가 개발한  $\alpha'$  특이 항체를 이용한 실험 결과는 CKII의 localization이나 compartmentalization이 결코 쉬운 과제는 아니라는 것을 제시하고 있다.

##### 5. p34cdc2 kinase와 casein kinase II의 구성과 cell cycle에 따른 활성

###### A. p34cdc2 kinase

Heterodimer로서 p34와 p62 cyclin B로 구성되어 있다. p34는 catalytic subunit이고, p62는 regulatory subunit이다. p34cdc2 kinase의 활성도는 cell cycle에 따라 조절되는데 G1에서 활성도가 가장 낮고,

S phase에서는 증가하기 시작하여 G2/M phase에서 최대치를 보여 준다. 이런 활성도의 조절은 p34cdc2의 인산화와 cyclin B와의 결합에 의해 조절되어 지고 있다. Cyclin B의 역할은 두가지 모델이 있는데 가장 타당하다고 여겨지는 이론은 충분한 양의 불활성 형태의 p34cdc2/cyclin B의 heterodimer가 cell cycle 초기에 만들어져서 G2/M의 전환기에 극적으로 활성화된다는 이론이다(Nurse, 1990; Solomon et al., 1990; Cyert, M., 1988; Gautier, 1991). Table 4는 cell cycle에 따른 p34cdc2의 인산화 상태를 보여주고 있다. 그리고 이 활성은 인산화와 탈인산화에 의해 이루어진다고 생각된다. G1 초기에 p34cdc2는 파괴된 cyclin B와 분리가 되고 T14, Y15, T161이 dephosphorylation된 불활성화 형태로 있다가 G1 말기에 T161이 phosphorylation이 된다(Norbury et al., 1991). T161의 인산화는 cyclin B와 결합을 유도하고 S기에 T14, Y15의 인산화가 되게 한다(Krek & Nigg, 1991; Norbury et al., 1991). ATP-binding site인 T14, TY15의 인산화는 ATP가 결합하지 않게 하여 p34cdc2를 불활성한 상태가 되게 한다. G2기에 DNA replication이 끝난 후 p54-80cdc25에 의해 T14, Y15의 dephosphorylation이

되면서 p34cdc2의 활성화가 되면서 ATP-binding site에 ATP가 결합할 수 있게 한다(Kumagai & Dunphy, 1991; Strausfeld et al., 1991). M 말기에서 G1 초기에 T161의 dephosphorylation이 일어나고 cyclin B가 파괴된다. 또 새로이 밝혀진 serine 39은 CKII에 의해 G1 cell cycle에 인산화가 되는데 아직 p34cdc2의 CKII에 의한 인산화의 생리적 기능은 아직 잘 모르지만 p34cdc2가 cyclin A나 B와의 결합에 관여하는지(Russo et al., 1992), 아니면 nuclear localization sequence부근의 CKII site를 인산화하여 p34cdc2가 핵에 위치하게 하는데 작용하지 않나 생각된다.

### B. CKII

CKII는 serine/threonine kinase로서 모든 핵이 있는 eukaryotic 세포에서 존재한다. CKII는 2 subunit으로 구성되어 있는데 사람의  $\alpha$ 는 45 kd  $\beta$ 는 28 kd를 가지고 있으며  $\alpha\alpha\beta\beta$  형태를 가지고 있다.  $\alpha$  subunit은 catalytic subunit이고  $\beta$ 는 regulatory subunit이다. 그리고 또 다른형태의 catalytic subunit으로  $\alpha'$ 이 있는데 이것의 분자량은 42 kd 정도이다. 이  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ 는 각기 다른 유전자에서 만들어 지는데 세포내에서는  $\alpha\alpha\beta\beta$ ,  $\alpha\alpha'\beta\beta$ ,  $\alpha'\alpha'\beta\beta$ 의 형태를 가지고 있으리라 생각된다. CKII의 생물학적 중요성은 성장호르몬에 의해 CKII의 활성화 조절된다는 것이다. CKII는 serum, growth factor(EGF, Insulin) 등에 의해 활성도가 유도되고, 또 세포의 분화에서도 활성도가 증가한다고 한다(Carroll & Marshak, 1989; Sommercorn et al., 1989; Klarlund & Czech, 1987; Ackerman & Osheroff, 1989; Sommercorn & Krebs, 1987). 이때 CKII의 양은 증가하지 않으면서 활성도가 높아지는 것은 인산화와 같은 covalent modification이나 아니면 활성을 증가시켜 주는 촉진물질 등이 작용할 것이라고 추측되고 있다. 사실 CKII의  $\beta$  subunit은 2개의 인산화 장소가 있는데 N-terminal에는 CKII의 autophosphorylation site가 있고 C-terminus 쪽에는 p34cdc2 kinase의 phosphorylation site가 있다(Yu et al., unpublished; Litchfield et al. 1991). 이런 인산화도 cell cycle에 따라 조절되고 있는데, autophosphorylation site인 N-terminal site인 p34cdc2 kinase site인 C-terminal site와 비교하여 주로 G1에 인산화가 많이 되고 N-terminal site는 주로 p34cdc2 kinase 활성도가 높

아지는 M phase에 인산화가 많이된다. 그러나 이런 인산화는 CKII의 활성화도에는 양서류의 CKII의 활성화도에 영향을 준다는 보고가 있으나(Mulner-Lorillon, 1990), 직접적으로 영향을 주지 않고 세포내의 localization이나 다른 inactive pool에서 active pool로 전환하거나 또는 활성 촉진제나 억제제와의 작용하리라 생각된다(Yu et al., unpublished, Litchfield et al., 1991). CKII의 활성화는 cell cycle에서 p34cdc2와 반대되는 현상을 보여준다. CKII의 활성화는 G1에서 가장 높고, S, M기로 가면서 낮아진다. 그래서 CKII는 G1기에 p34cdc2의 serine을 인산화시키는데 이 인산화는 p34cdc2가 cyclin B와 결합하는데 영향을 주리라 생각된다. 그리고 p34cdc2 kinase는 G2/M기에서 CKII의  $\beta$  subunit의 C-terminal의 threonine을 인산화시킨다. 이 두가지 효소의 상호작용이 cell cycle에 미치는 좀더 연구가 되어야 할 것이다.

### III. p34cdc2 kinase와 CKII의 cell cycle 적인 연구방법

여기에서는 cell cycle에서의 p34cdc2 kinase와 CKII 연구에 필수적인 몇가지 kinase assay방법과 항체, 또 세포를 원하는 cell cycle에 arrest하는 방법을 이야기하고자 한다.

#### 1. 합성된 특이 peptide기질을 이용한 Casein kinase II 측정방법

Casein kinase II 특이 RRREEETEEE (Kuenzel & Krebs, 1985) peptide를 이용하여 세포추출액에서 측정한다. CKII 활성 측정은 32P가 이 peptide에 주입되는 것을 잴다. 세포추출액 5  $\mu$ 를 20 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M  $[\gamma$ -ATP] (1,000-3,000 cpm/pmol)과 5 mM peptide가 있는 용액에 넣어 final volume이 30  $\mu$ 되게 한다. 그리고 37  $^{\circ}$ C에 30분간 둔다. 반응은 PCA (trichloroacetic acid)를 final concentration 10% 되게하여 더한 후 4 $^{\circ}$ C에 30분간 놓아두어서 충분히 침전하게 한다. 12,000 rpm으로 microfuge한 후 상등액의 일정한 양을 P81 종이에 흡착하게 한 후 충분히 phosphoric acid에 씻은 후 말려서 beta-counter에서 P32를 측정한다(Carroll & Marshak, 1989; Yu et al., 1991).

#### 2. 합성된 특이 peptide 기질을 이용한 p34cdc2

**Table 3.** Selected Substrates of CKII

Enzymes	DNA topoisomerase II (Ackerman et al., 1985) RNA polymerase I and II (Stetler and Rose, 1982) Glycogen synthase (Picton et al., 1982) DNA polymerase $\alpha$ (Podust et al., 1990) Ornithine decarboxylase (Peng and Richards, 1988) p34cdc2 kinase (Mulner-Lorillon et al., 1990; Litchfield et al., 1991; Yu unpublished)
Cytoskeletal proteins	Tubulin (Serrano et al., 1987; Diaz-Nido et al., 1990) Brain myosine heavy chain (Murakami et al., 1990) MAP-1A, MAP-1B (Diaz-Nido et al., 1988) Clathrin (Cantournet et al., 1987)
Transcription factors	serum response factor (Manak et al., 1990)
Oncoproteins	Myc and Myb (Luscher et al., 1989, 1990) SV 40 large T antigen (Gasser et al., 1988)
Other	Nucleolin (Schneider and Issinger, 1988) cAMP-regulated phosphoprotein (Girault et al., 1989)

Sources: Yu et al., 1991.

### kinase 측정방법

p34cdc2 특히 ADAQHATPPKKKRKVEDPKDF (Marshak et al., 1991)을 이용한다. 이 peptide는 SV 40 large T antigen의 서열을 이용하여 합성한 것이다. 이 방법도 역시 위와 유사한 방법으로 세포 추출액 5  $\mu$ l를 p34cdc2 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 1 mM EGTA)에 5  $\mu$ l ATP( $[\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP, 500-1,000 cpm/mol)를 더한 후 모두 30  $\mu$ l이 되게한 후 30°C에서 10분가 놓아둔다. 그리고 위에서 말한 바와 같이 P81 종이에 흡착하고 세척하고 나서 건조하여 활성도를 잰다(Marshak et al., 1991).

### 3. 전기영동과 immunoprecipitation, western blotting과 autoradiography를 이용한 측정방법

특이 기질이 없을 경우에는 특이성은 특이 기질 peptide이 비해 훨씬 떨어지지만 dephosphorylated casein (sigma, CKII의 기질)이나 histone H1(Sigma, p34cdc2 kinase의 기질)을 사용할 수 있다. 이런 기질과 효소, <sup>32</sup>P-ATP를 같이 섞은 후 일정시간이 지난 후 전기영동으로 분리하여 gel을 건조시킨 다음 X-ray film에 autoradiography해서 활성도를 측정하는 방법이 있다(Marshak et al., 1991). 효소의 활성도를 침전시킬 수 있는 항체를 이용하여 immu-

noprecipitation한 다음 다시 위에 언급한 기질과 ATP를 섞은 후 일정 시간이 지난 후 전기영동을 하고 gel을 건조시킨 다음 autoradiography를 한다 (Russo et al., 1992). 그리고 세포추출액에서 효소의 양을 잰 때는 western blotting을 이용하는데 먼저 세포추출액을 전기 영동한 후, nitrocellulose 종이에 transfer한 후 여러가지 labeling 방법으로 측정할 수 있다(Yu et al., 1991).

### 4. p34cdc2 kinase를 연구하는데 사용할 수 있는 시약과 항체

p34cdc2에 대한 항체나 시약들은 상품화되어 Oncogene Science내 또 다른 몇개 회사에서 구할 수 있다.

Anti-PONA (proliferation cell nuclear antigen): 36 kd의 핵의 polymerase  $\delta$ 의 항체, 주로 분열하는 세포를 염색 관찰하는데 이용한다.

Anti-bromodeoxyuridine (BrdUr): DNA 합성을 하는 세포에서 thymidine의 유사체인 BrdUr을 유입시켜 항체로서 DNA를 합성하는 세포를 판정하는데 이용한다.

Anti-PSTAIRE: p34cdc2 kinase의 family가 가지고 있는 공통의 아미노산 서열 (PSTAIRE)에 대한 항체

**Table 4.** Regulation of p34cdc2 kinase by phosphorylation and binding to cyclin B

	p34cdc2				cyclin B
	S39	T14	Y15	T161	
G1 early	+(a)	-(b)	-	-	-(c)
G1 late				+	-
S	-	+	-	+	+(d)
G2	-	+	+	+	+
M	-	-	-	+	+

T14; threonine 14, Y15; tyrosine 15, S39; serine 49, T161; threonine 161

a; + indicates phosphorylated status

b; - indicates dephosphorylated status

c; - indicates cyclin B is not bound to p34cdc2

d; + indicated cyclin B is bound to p34cdc2

G6: p34cdc2의 C-terminal sequence (292-297)에 대한 항체로서 immunoprecipitation이나 western blotting에 이용.

Anti-cyclin A, Anti cyclin B: cyclin A나 B에 대한 항체

Anti-p13suc1 or p13suc1 agarose: p34cdc2 binding protein인 p13suc1에 대한 항체. Immunoprecipitation이나 p13suc1 agarose로 침전시키면 p34cdc2를 함께 얻을 수 있다.

### 5. CKII에 대한 항체

아직 상품화 되진 않았음. CKII의 특성 즉 모든 동물 세포에는 아미노산 서열이 유사한 CKII를 가지고 있어서 항체를 만들기 어려운 점이 있으므로 많은 CKII에 대한 항체는 anti-peptide항체임 (Yu et al., 1991).

Ab245:  $\alpha$  subunit에 대한 항체, N-terminal에 대한 항체

Ab276:  $\alpha$ 와  $\alpha'$ 에 대한 항체, C-terminal sequence에 대한 항체

Ab247:  $\alpha$ 와  $\alpha'$ 에 대한 항체, nuclear localization sequence 주변의 항체

Ab78:  $\beta$  subunit에 대한 항체

Ab377:  $\alpha'$ 에 대한 항체, C-terminal에 대한 항체

### 6. Cell cycle arrest 방법

Cell cycle arrest는 cell cycle 연구에 가장 기본적으로 요구되는 방법으로 asynchronous 세포를 synchronous G1, S, G1/M 세포로 고정시킴으로 cell

cycle에 관계된 여러가지 연구를 효율적으로 하게 한다. 이 방법으로는 elutriation centrifugation과 cell cycle arrest drug을 사용하는 방법이 있다.

#### A. Elutriation

세포를 원심분리 elutriation으로 분리하는 방법인데, 지수적으로 자라고 있는 세포를 모아서 일정한 속도로 원심분리하면서 이 원심분리관에 pump 속도를 조절하여 cell cycle별로 세포를 분리하는 방법이다. 간단히 설명하면 세포( $1 \times 10^9$ )를 모아서 다시 차가운 elutriation buffer(phosphate buffered saline (PBS), 1% fetal calf serum, 0.1% glucose, 0.3 mM EDTA)로 씻은 다음, 50 ml로 다시 만든 다음 Beckman JE-10X elutriation rotor에 buffer flow rate 약 65 ml/min로 1550 rpm으로 4°C에서 원심분리를 한다. 그러면서 200 ml fraction으로 모으면서 flow rate를 75에서 190 ml/min가 되도록 매 fraction마다 증가시키면 G1, S, G2/M의 세포들을 차례로 얻어낼 수 있다(Buchkovich et al., 1989). 그리고 이 세포들의 일부를 ethanol에 고정시켜 propidium iodide로 염색하여 flow cytometry에서 DNA 양을 제어 cell cycle을 측정하게 한다. 대개 G1의 DNA양은 2N, S는 3N, G2/M은 4N으로 표시한다.

그리고 이런 centrifugal elutriation 기구가 없든지, 또는 조직 배양에서 실험하고자 할 때는 cell cycle arrest drug을 사용한다.

#### B. Drugs for cell cycle arrest

Hydroxyurea: 세포를 50-70%의 confluency로 키운 다음 1-1.5 mM의 hydroxyurea (final)를 배양액에 첨가한 후 약 14시간이 되면(HeLa cell의 경우) 세포는 G1/S transition에 멈추게 된다. 이때 hydroxyurea의 배양액을 없애고 다시 새 배양액을 넣으면 세포는 동일시(synchronous) 하게 cell cycle을 진행하는데, 4시간 후에는 S기에 머물게 되고, 또 4시간 후에는 G2/M기에 머물게 되고, 다시 4시간 후에는 early G1기로 진행하게 된다(Yu et al., 1991; Russo et al., 1992).

Nocodazol: Asynchronous하게 자라고 있는 세포( $5 \times 10^5$ )에 1  $\mu$ g/ml (final) 농도로 nocodazole(microtubule disassembling agent) 더하면 4시간 후에는 대부분의 세포는 G2/M phase에 머물게 된다. 그리고 다시 nocodazole을 없애면 세포는 cell cycle을

진행하게 된다(Brizuela et al., 1989).

#### IV. 결 론

Protein kinase는 cell cycle에서 매우 중요한 역할을 차지하고 있다. 그 중에서 p34cdc2 kinase는 G1/S와 G2/M 전환에 필수적이고 또 M phase에 최고 활성도를 보여주고 있다. 그리고 cell cycle에 따른 CKII 활성도의 변화도 cell cycle 조절에 중요한 역할을 하리라 생각된다. 그래서 이 두 kinase의 상호작용은 cell cycle 조절에 기여하리라 생각된다. CKII는 G1 cell cycle에서 최고의 활성도를 보여주는데 이때 p34cdc2의 serine 39를 인산화하여 p34cdc2가에서 다음 단계를 넘어갈 때 필요한 cyclin과의 결합을 용이하게 하든지 p34cdc2의 핵의 이동을 쉽게 하는 역할을 하리라 생각한다. 그리고 p34cdc2는 M phase에 그 활성이 최대가 되는데 이때 CKII의 regulatory subunit인  $\beta$  subunit을 인산화하여 CKII의 활성도에 영향을 미치거나 세포내의 재분배에 작용을 하리라 생각한다. 그리고 이 총론에서는 이 kinase들의 상호작용을 주로 언급했지만 이 kinase들이 동시에 가지고 있는 기질들(예, SV40 large T antigen, p53, lamine 등)의 cell cycle에서의 인산화 장소의 다름에 따라 생기는 단백질의 기능과 다른 기질과의 상호작용도 cell cycle의 유지에 중요한 역할을 하리라 생각한다. 그리고 이 총론에서 언급은 하지 않았으나 dephosphorylation 또한 cell cycle 조절에 중요한 역할을 하리라 생각한다.

#### 참고문헌

- Ackerman, P., Glover, C.V.V., and Osheroff, N., 1985, PNAS **82**: 3164-68.
- Ackerman, P.C., Glover, C.V.C., and Osheroff, N., 1990. PNAS USA **87**: 821-825.
- Ahn, N.G., Seger, R., 1991. JBC **266**: 4220-7.
- Brizuela, L., Draetta, G., Beach, D., 1989, PNAS USA **86**: 4362-4366.
- Buchkovich, K., Duffy, L.A., and Harlow, E., 1989. Cell **58**: 1097-1105.
- B. Kemp, 1976. Fed. Proc. **35**: 1384.
- B. Kemp, 1977. JBC **258**: 4888.
- Carroll, D., Marshak, D.R., 1989. JBC. **262**: 3839-3843.
- Cantournet, B., Creuzet, C., Komano, O., and Loeb, J., 1987. FEBS Lett. **220**: 143-148.
- Cyert, M., Korschner, M. 1988. Cell **53**: 185-95.
- Dagn, C.F., and Lee, W.M.F., 1989. JBC **264**: 18109-18203.
- Diaz-Nido, J., Serrano, L., and Avila, J., 1988. Mol. Cell. Biochem., **79**: 73-79.
- Diaz-Nido, J., Serrano, L., Lopez-Otin, C., Vandekerckhove, J., and Avila, J., 1990. JBC **265**: 13949-13954.
- Diaz-Mido, J., Serrano, L., Mendez, E., Avila, J., 1990. J. Cell Biol., **106** 2057-2065.
- Draetta, G., Brizuela, L., Potashkin, J., and Beach D., 1987. Cell **50**: 319-325.
- Draetta, G., Beach, D., 1988. Cell **54**: 17-26.
- Draetta, G. Luca, F., Westendorf, J., Brizuela, L., Ruderman, J. and Beach D., 1989. Cell **56**: 829-38.
- Draetta, G., 1990. TIBS **15**: 378-383.
- Giordano, A., Whyte, P., Harlow, E., Franza, B., Beach, D., and Dretta, G., 1989. Cell **58**: 981-990.
- Gautier, J., Maller, J.L. 1991. EMBO, J. **10**: 177-82.
- Girault, J., Hemmings, H.C., Williams, K.R., Nairn, A.C., and Greengard, P., 1989. JBC **262**: 31748021759.
- Glass, D.B., and Krebs, E.G., 1979. JBC **254**: 9728.
- Grasser, F.A., Scheidtmann, K.H., Tuazon, P. T., Traugh, J.A., and Walter, G., 1988. Virology **165**: 13-22.
- House, C. and Kemp, B.E., 1987. Science **238**: 1726.
- Klarlund, JI K., and Czech, M.P., 1988. JBC **263**: 15872-15875.
- Krek, W., and Nigg, E.A. 1991. EMBO J. **10**: 305-16.
- Kuenzel, E.A., and Krebs, E.G., 1985. PNAS **82**: 737.
- Kulmagai, Q., and Duphy, W.G., 1991. Cell **64**: 903-14.
- Lee, M and Nurse, P., 1987. Nature **327**: 31-35.

30. Litchfield, D., Lozeman, F.J., Cicirelli, M.F., Harrylock, M., Ericson, L.H., Piening, C.J., and Krebs, E.G., *JBC*, **266**: 20308-20389.
31. Lorenz, P., Pepperkok, R., Ansorg, W., and Pyrin, Y., 1993. *JBC* **268**: 2733-2739.
32. Luscher, B.E., Kuenzel, E.A., and Krebs, E.G., 1989. *EMBO J.* **8**: 1111-1119.
33. Manak, J.R., Biosschoop, N., Kris, R.M., Prywes, R., 1990. *Genes and Dev.* **4**: 955-967.
34. Marskak, D.R., Vandenerg, M.T., Bae, Y.S., and Yu, I.J., 1991. *J. Cell Biochem.*, **45**: 391-400.
35. Minshull, J., Golsteyn, R., Hill, C.S., Hunt, T. 1990. *EMBO J.*, **9**: 2865-75.
36. Mulner-Lorillon, O., Cormier, P, Labbe, J., Doree, M. Poulhe, R., Osborne, H., and Belle, R., 1990. *Eur. J. Biochem.*, **193**: 529-534.
37. Murakami, N., Healy-Louie, G., and Elzinga, M., 1990. *JBC* **265**: 1041-1047.
38. Norbury C., Blow, J., Nurse, P., 1991. *EMBO J.* **10**: 3321-29.
39. Norbury, C., and Nurse, P., 1992. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 441-70.
40. Nurse, P., Thuriaux, P. and Nasmyth, K. 1976. *Mol. Gen. Genet.* **146**: 167-178.
41. Nurse, P. and Thuriaux, P., 1980. *Genetics* **96**: 627-637.
42. Nurse, P. 1990. *Nature* **344**: 503-8.
43. Pearson, R.B., 1985. *JBC* **260**: 14471.
44. Pelech, S.L., 1986. *PNAS* **83**: 5968.
45. Peng, R., and Richards, J.F., 1988. *BBRC* **153**: 135-141.
46. Picton, C., Woodgett, J., Hemmings, G., and Cohen, P., 1982. *FEBS Lett.* **150**: 191-196.
47. Pines, J and Hunter, T. 1989. *Cell* **58**: 833-846.
48. Podust, V.G., and Bialek, G., Sternbach, H., and Grosse, F., 1990. *Eur. J. Biochem.*, **193**: 189-193.
49. Rihs, H.P., Jans, D.A., Hua, F., and Peters, R. 1991. *EMBO* **10**: 633-639.
50. Russo, G.L., Vandenberg, M.T., Bae, Y.S., Franz, Jr., G.R., and Marshak, D.R., *JBC* **237**: 20317-20325.
51. Schneider, H.R., Issinger, O., 1988. *BBRC* **156**: 1390-1397.
52. Serrano, L.M., Diaz-Nido, J., Wandosell, F., and Avila, J., 1987. *J. Cell Biol.*, **105**: 1731-1739.
53. Sommercorn, J., and E.G. Krebs, 1987. *JBC.* **262**: 3839-3843.
54. Sommercorn, J., Mulligan, J.A., Lozeman, F.J., and Krebs, E.G., 1987. *PNAS USA* **84**: 88 34-8838.
55. Solomon, M.J., Glotzer, M., Lee, T.H., Phillippe, M., Kirschner, M. W., 1990. *Cell* **56**: 829-38.
56. Steler, D.A., and Rose, K.M., 1982. *Biochemistry* **21**: 3721-3728.
57. Strausfeld, U., Labbe, J.C., Fesquet, D., Cavadore, J.C., Picard, A. 1991. *Nature* **351**: 242-25.
58. Yu, I.J., Spector, D.L., Bae, Y.S., and Marshak, D.R. 1991. *J. Cell Biol.*, **114**: 1217-1232.