

## 흰쥐 조직에 존재하는 Inositol(1,4,5) triphosphate 3-Kinase의 면역학적 특성

김재웅\* · 이서구

유한전문대학 식품영양과\*, 미국 NHLBI, NIH

### Immunological Characterization of Inositol(1,4,5) triphosphate 3-Kinase in Rat Tissues

Jae-Wong Kim\* and Sue-Goo Rhee

\* Dept. of Food and Nutrition, Yuhan Technical College, Bucheon 422-749, Korea

Dept. of NHLBI, NIH, U.S.A.

#### Abstract

Brain, heart, liver, lung, kidney and thymus etc. 12 organs were removed and homogenized from Dawley-Sprague rats after suffocation. After fractionation of the tissue cytosols, enzymatic activities of the key enzymes in metabolic inositol phosphates cycle, PLC, IP<sub>3</sub>K and Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 5-phosphatase, were measured respectively. Hybridoma monoclonal antibodies producing anti-IP<sub>3</sub>K murine monoclonal antibodies were obtained by the fusion of SP<sub>2</sub>/Ag 0-14 and spleen cells of mouse immunized with purified 53KDa IP<sub>3</sub>K, screening and cloning procedures. 18 cloned hybridoma cells were obtained, background due to nonspecific binding was very low with 10 clones. These Abs were purified from ascitic fluids by using affi-gel 15, and determined subtype of Abs. When immunoreactivities for rat tissues IP<sub>3</sub>K were exercised by adding the mixed Abs of IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>2b</sub>, they showed an overall similarity with noncompetitive inhibition. Brain tissue has high sensitivity for anti-IP<sub>3</sub>K Ab, whereas heart tissue has very low activity. In kinetic parameters Km value was 1.58mM and V<sub>max</sub> value was 5.41 μmol/min/ml, respectively. Only one form of 40 KDa IP<sub>3</sub>K was detected in heart tissues, however rat brain contains at least three immunologically distinct IP<sub>3</sub>K(53, 51 and 40 KDa) in western blot analysis. Of them 53 KDa protein was major enzyme in enzymatic activity. Northern blot analysis with <sup>32</sup>P-labeled cDNA probe which encodes 1.8 Kb IP<sub>3</sub>K gene was performed. These results suggest that IP<sub>3</sub>K are regulated at transcriptional level during rat tissue development.

Key words : Ins(1, 4, 5) P<sub>3</sub> 3-kinase

#### 서론

동식물의 정보전달 체계에서 phosphatidylinositol (PI) 대사회로의 역할은 생체내의 각종 생리작용을 조절하는 2nd messengers를 생성하기 때문에 중요하다. 먼저 phosphatide specific phospholipase C(PLC)가 trigger구실을 하는 agonists의 영향을 받은 후 세

포막에 있는 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)를 가수분해하여 diacylglycerol(DG)와 inositol(1,4,5)-triphosphate(InsP<sub>3</sub>)를 생성하게 되는데 이들은 모두 세포내에서 2nd messengers로 알려졌다<sup>1-6)</sup>. 즉, DG는 Ca<sup>2+</sup>, 인지질 및 oncogenes처럼 protein kinase C를 활성화시켜 생리작용에 관여하는 여러 가지 단백질의 인산화를 촉진토록 하여 생리활성을 조절하게 되며, InsP<sub>3</sub>는 칼슘 homeostasis의 potential modulator로서 소포체(ER)같은 vesicular nonmitochondrial intracellular organelle로부터 세포질로 칼

숨을 방출하여 metabolism(enzymes), secretion, contraction, neurotransmitters release, lymphocyte activation, sensory mechanism, DNA synthesis, visual function, bone formation, cell growth 및 division 등 다양하고 복잡한 signal event를 발생시킨다.

Inositol(1,4,5) triphosphate 3-kinase(IP<sub>3</sub>K)는 InsP<sub>3</sub>를 inositol(1,3,4,5) tetrakisphosphate(InsP<sub>4</sub>)로 3-phosphorylation을 일으키는 효소이다<sup>4-8)</sup>

InsP<sub>4</sub>와 InsP<sub>3</sub>는 3-phosphatase에 의하여 탈인산된 후 각기 다른 경로를 거쳐서 점차로 InsP<sub>2</sub>s, InsPs 및 inositol로 분해되고, inositol은 다시 PI의 합성원료가 되며, PI는 특정 kinase들에 의해 PIP(phosphatidylinositol-4-phosphate)를 거쳐 PIP<sub>2</sub>를 재생하여 PI cycle을 완성하게 된다.

그러나 PI회로의 중간산물인 inositol phosphates에 대한 생체내에서의 기능은 현재까지 거의 알려지지 않고 있다. 다만 InsP<sub>3</sub>는 ER에 저장되어 있는 Ca<sup>2+</sup>을 세포질로 신속 방출하여 각종 Ca<sup>2+</sup>의존성 대사를 조절하는 기능이 있으며, InsP<sub>4</sub>는 세포밖의 Ca<sup>2+</sup>이 membrane을 통해서 세포질로 직접 유입되도록 channel을 조절하는가 하면, InsP<sub>3</sub>에 insensitive한 Ca<sup>2+</sup> pool에서 sensitive한 pool로 칼슘을 이동시킨다는 가설도 있어 이들은 세포내에서 칼슘 flux를 duet으로 조절하는 2차 전달자일 것이라는 추정을 하고 있다<sup>9,10)</sup>.

여기서 중요한 점은 IP<sub>3</sub>K가 InsP<sub>3</sub>와 InsP<sub>4</sub>의 농도비를 제어함으로써 PI대사경로에서 수많은 종류의 agonist-sensitive inositol phosphates들을 생성, 조절케 하는 핵심 branch point 효소이며, 이것은 protein kinase C, cAMP-dependent protein kinase, oncogenes, Ca<sup>2+</sup> 그리고 calmodulin 등 생체내의 중요한 물질들에 의해서 예민한 영향을 받고 있다는 것이다<sup>10-17)</sup>

본 연구에서는 흰쥐로부터 brain, heart, liver, lung, kidney, thymus, skeletal muscle, spleen, pancreas, stomach, testis 및 uterus 등 12종류의 기관을 계통별로 해부하여 각 조직속에 있는 IP<sub>3</sub>K의 분포를 immunoblotting법으로 검색한 후 중요한 장기 5종에 대한 생화학적 연구결과를 보고코자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

[<sup>3</sup>H] phosphatidylinositol(4,5) - bisphosphate와 [<sup>3</sup>H]Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>는 New England Nuclear에서, alkaline phosphatase conjugated with goat anti-mouse IgG(H+L), NBT(nitroblue tetrazolium), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate), milk solution, horseradish peroxidase conjugated system, 4-chloro-1-naphthol 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 KPI Inc로부터 구입하였다.

Complete and incomplete Freund's adjuvant, PEG 3000, hypoxanthine, aminopterin, thymine은 Gibco에서, RPMI 1640은 Hyclone Co. 제품이고 penicillin, streptomycin 및 trypsin solution은 NIH stock, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, calpain inhibitor I (N-acetyl-leucyl-norleucinal), II (N-acetyl-leucyl-leucyl-methional), endoproteinases, glu-C 및 lys-C는 Calbiochem Co. 제품이며 Affi-gel 15, molecular standard protein과 Dowex AG<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>(formate form, 100-200 mesh)는 Bio-Rad에서, EGTA(ethylene-glycolbis(β-aminoethylether)-N, N, N', N', tetraacetic acid), PMSF(phenylmethylsulfonylfluoride), DTT(dithiothreitol) 및 leupeptin은 Sigma Co.에서, 그리고 Sprague-Dawley rats와 Balb/c mice는 Taconic farm(German Town, NY)에서 공급받았다.

### 2. 실험방법

#### 1) Homogenates preparation

흰쥐를 전신마취 후 PBS로 perfusion하면서 각종 장기를 해부 적출하여 조직 1g당 2ml의 homogenization buffer(50mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.5mM PMSF, 1mM EGTA, 1mM DTT, 2μg/ml leupeptin and 4μg/ml calpain inhibitors)를 넣고 Brinkman polytron을 사용하여 얼음위에서 20초 간격으로 3번씩 조직을 파쇄하고 Beckmann TL-100 ultracentrifuge를 이용, 10<sup>5</sup>rpm으로 20분간 원심분리하여 cytosol을 분획하였다.

## 2) Enzyme activities

효소 activity는 조직들의 cytosol분획을 효소원으로 하고, PLC의 경우는 기질로 [ $^3\text{H}$ ] phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate를,  $\text{IP}_3\text{K}$ 와  $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$  5-phosphatase는 기질로 [ $^3\text{H}$ ]Ins(1,4,5) $\text{P}_3$ 를 사용하여 반응 후 liquid scintillation counter로 tritium의 cpm( $\times 10^{-3}$ )을 측정하였다<sup>15,18,19</sup>).  $\text{IP}_3\text{K}$ 에 대한 antibody의 저해 실험에서는 일정량의  $\text{IP}_3\text{K}$ 에 농도별로 Ab를 첨가하고 충분히 저어주면서 실온에서 한시간동안 immunoreaction시킨 후 기질을 가하여, 남은 효소의 활성은 생성된 [ $^3\text{H}$ ]Ins(1,3,4,5) $\text{P}_4$ 로 측정되었다.

## 3) Cell and media<sup>10</sup>

골수암 세포인 myeloma cells( $\text{SP}_2/\text{Ag}$  0-14)는 ATCC cell lines로 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100IU/ml penicillin과 100  $\mu\text{g}$ /ml streptomycin을 포함한 RPMI 1640 media로 humidified 5%  $\text{CO}_2$ , 37 $^\circ\text{C}$ 의 incubator에서 culture하였다. 그리고 hybridoma cell을 selection하기 위하여는 100 $\times$ HAT(Hypoxanthine,  $10^{-2}\text{M}$ , Aminopterin,  $4 \times 10^{-5}\text{M}$  and Thymine,  $1.6 \times 10^{-3}$ )를 정상배지에 1 $\times$  되도록 넣어 주었다.

## 4) Immunization

Suh 등의 방법<sup>20</sup>)을 변용하여, 흰쥐의 뇌로부터 정제한 53 KDa의  $\text{IP}_3\text{K}$ 를 동일체적의 complete Freund's adjuvant로 emulsification하고 Balb/c 마우스(7~8주)에 20~200  $\mu\text{g}$ /mouse을 intraperitoneally 면역시켰다. Boosting은 동량의  $\text{IP}_3\text{K}$ 를 incomplete Freund's adjuvant로 2주 간격으로 3번 시행하였다. 마지막 boosting을 하기 전에 마우스의 혈청을 뽑아서 antisera titer 또는 ELISA의 표준물질로 사용하였으며 hybridization을 하기 3일 전에는 PBS에 50  $\mu\text{g}$ 의  $\text{IP}_3\text{K}$ 를 녹여서 intravenous injection으로 한번 더 boosting을 실시하였다.

## 5) 세포융합 및 hybrids의 클로닝<sup>10,19,20</sup>

Myeloma cells( $5 \times 10^7$ )과 면역된 mouse의 spleen으로부터 얻은 형질 cell( $10^8$ )을 PEG 3000을 사용하여 세포융합시켰다. 융합시킨 즉시 96-well plate에 evenly 분포시킨 다음 37 $^\circ\text{C}$ 에서 5%  $\text{CO}_2$ , 수증기가 포

함된 95% 공기중에서 하룻밤 incubation하였다. 24 hr 후에 0.1 ml의 HAT medium을 각 well에 가하고 2,3, 5일째는 각 well로부터 medium의 절반씩을 뺐아내고 서서히 신선한 HAT medium을 추가하여 완전 교체하였다. 2주간 매 3~4일 마다 신선한 HAT medium으로 culture하는 과정에서 정상적인 myeloma cell과 spleen cell은 사멸시켰으며, HAT screening 후 잘 자라는 hybridoma cell에 대해서는 Ab의 생성을 확인하고 24 well plate(costar)로 옮겨 2ml씩 HAT medium을 넣어주었다. Cell이 거의 confluent하게 자랄 때 supernatant도 Ab activity를 갖는지 ELISA법으로 검색해 보고 잘 자란 positive cell line들은 cloning을 하기 위해서 저장용 medium mixture(cryoprotective medium 2ml, FBS 1ml 및 HT medium 1ml)에 녹이고 그 1ml 씩을 vial에 넣어 -70 $^\circ\text{C}$ 에서 2일간 두었다가 질소 탱크에 보관하였다. 이 방법에서 몇 종류의 hybridoma들이 monoclonal로부터 유도되었는지를 확인하기 위해서는 BMB(Boehringer Mannheim Biochemical) kit를 사용하여 mouse immunoglobulin subtype을 결정하였다. ELISA는 horseradish peroxidase conjugated system으로 수행되었고 효소 반응은 50  $\mu\text{l}$ 의 기질 용액을 넣고 30분간 37 $^\circ\text{C}$ 에서 incubation하였다. 기질의 color변화는 405nm에서 UV로 monitoring되었다.

## 6) Ascitic fluid의 생산

Ascitic fluid를 잘 생성시키기 위하여 마우스 당 500  $\mu\text{l}$ 의 priming agent인 pristane(Sigma Co.)을 Balb/c 마우스에 injection 한 후, hybridoma clone을 inoculation하고 10~20일 동안 ascitic fluid를 생성시켰다.

## 7) Anti- $\text{IP}_3\text{K}$ murine monoclonal Ab의 정제

Culture supernatant 또는 ascitic fluid로부터 얻은 anti- $\text{IP}_3\text{K}$  antibody를 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 침전시키고 최소체적의 0.1M Mops, pH 7.5, buffer에 녹인 다음 동일 buffer로 2일간 투석시켰다. 투석물은 20배의 deionized 냉수로 세척한 affi-gel 15에 Ab의 protein량이 gel 1ml 당 20mg 포함되도록 조절한 후 4 $^\circ\text{C}$ 에서 4hr(실온 1hr)동안 서서히 교반하면서 충분히 coupling시킨 다음 컬럼위에 걸고 동일 buffer로 280nm에

서 흡광도가 없을 때까지 세척하였다. Bound IgG는 용출 buffer(1M NaCl을 포함하는 3M의 urea용액)를 사용하여 0.5 ml/min 속도로 1ml씩 받았다. IgG를 포함하는 fraction을 모두 모아서 0.01 M Na-phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.2로 투석시켰다.

### 8) SDS-PAGE 및 Immunoblotting<sup>19)</sup>

실험과정에서 모든 protein은 Bradford법<sup>21)</sup>으로 595 nm에서 정량하였고 SDS-PAGE(12% separation gel 및 6% stacking gel)는 Laemmli법<sup>22)</sup>으로 시행하였다. 전기영동 후 protein들은 electroblot system을 사용하여 90 volt에서 1hr동안 nitrocellulose(Schleicher & Schuell Co.)membrane에 transfer시켰다.

남아 있는 protein binding site를 block하기 위하여 electroblots을 20mM Tris /HCl, 0.15 M NaCl, pH 7.4, 3% BSA(Sigma Co.) 또는 milk solution으로 37°C에서 2hr incubation시켰다. 그 NC membrane은 goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase로 37°C에서 2hr incubation하고 기질용액 NBT /BICP로 color develop하여 complex를 형성시킨 후 증류수로 즉시 세척하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Enzyme activities

계통별로 중요 장기인 brain, heart, liver, lung 및 kidney를 흰쥐로부터 적출하여 각 조직의 homogenates를 만들고 즉시 cytosol을 분획한 후, 이것을 효소원으로 하여 PI 대사 cycle에서 핵심효소들이라 생각되는 PLC, IP<sub>3</sub>K 그리고 InsP<sub>3</sub> 5-phosphatase의 activity를 비교 측정하였다. 그 결과는 Fig. 1 및

Table 1과 같다.

IP<sub>3</sub>K의 활성도는 brain, liver, lung, heart 및 kidney 조직 순서로 감소하였으나 lung과 liver에서는 서로 비슷한 활성도를 나타내었다. PLC는 brain, kidney, lung, heart 및 liver순서로 활성도가 감소하였다.

이 결과는 bovine brain에서의 PLC것과도 일치하고 있다<sup>20)</sup>. IP<sub>3</sub>K와 PLC의 효소활성이 모두 brain에서 높았으며, 5-phosphatase는 lung과 heart에서, kidney에서는 PLC의 활성이 다른 것에 비하여 다소 높았다.

이러한 결과는 정보전달 체계에서 중요한 PLC와 IP<sub>3</sub>K가 다른 조직보다는 brain의 cytosol에 상대적으로 많이 존재함을 알 수 있으며, agonist-sensitive inositol phosphate의 대사가 brain에서 가장 활발하다는 것으로 생각된다.

### 2. SDS-PAGE

Fig. 2는 12% polyacrylamide slab gel에서 SDS-PAGE한 결과이다. Lane 2는 흰쥐의 뇌로부터 분리 정제된 fresh한 IP<sub>3</sub>K의 주 band인데 분자량이 53 KDa임을 알 수 있다. Lane 8은 IP<sub>3</sub>K에 대한 monoclonal antibody의 band이다. Heavy chain은 50 KDa임을 알 수 있고, prestained high molecular STD protein과 견주어 보아 21~25 KDa 근방에는 light chain이라고 생각되는 밀착된 두 band가 보인다.

이 Ab는 affi-gel 15로 완전히 정제한 후 BMB kit를 사용하여 IgG subtype을 결정한 결과 이들은 각각 IgG<sub>1</sub>과 IgG<sub>2b</sub>로 판명되었다. Lane당 100 μg의 조직 protein을 취하여 slab 전기영동한 후 Coomassi Brilliant Blue로 단백질을 염색했을 때 lane 3의 brain

**Table 1. Enzyme activities in the rat tissues**

Tissues	Enzyme activity (cpm/40 μg protein)		
	Ins(1,4,5) P <sub>3</sub> 3-kinase	RLC	Ins(1,4,5) P <sub>3</sub> 5-phosphatase
Brain	7384 ± 62	4275 ± 89	931 ± 53
Heart	1341 ± 193	887 ± 43	4232 ± 18
Liver	3155 ± 27	700 ± 68	1662 ± 50
Lung	3067 ± 287	1872 ± 64	4953 ± 385
Kidney	837 ± 163	2813 ± 43	1788 ± 28

All values were expressed as mean ± SD \* p < 0.05

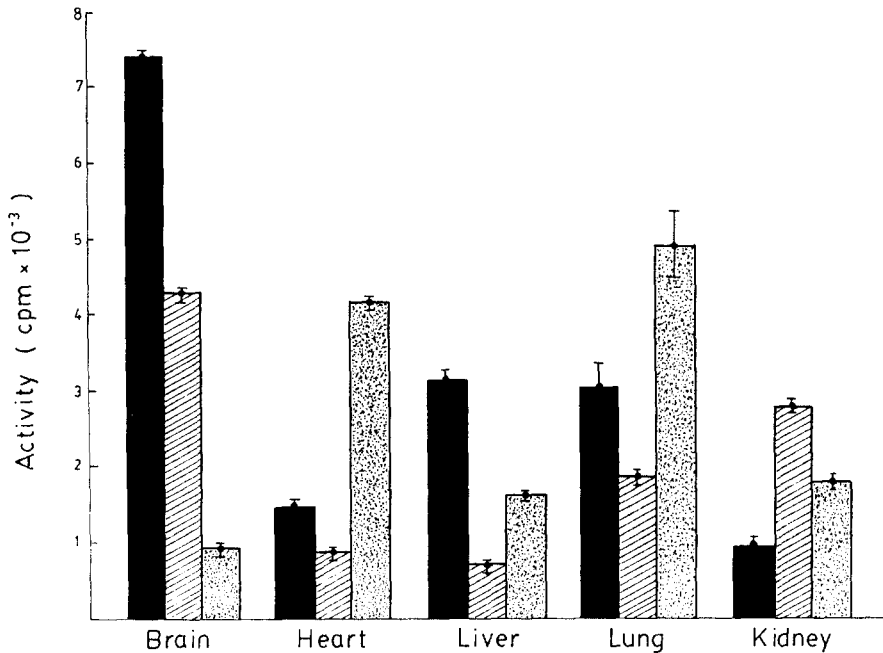


Fig. 1. Activities of IP<sub>3</sub>K, PLC and Ins(1,4,5) P<sub>3</sub> 5-phosphatase in rat tissues.

■ : IP<sub>3</sub> activity, ▨ : PLC activity, ▩ : Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 5-phosphatase activity

을 제외한 어느 조직에서도 53KDa에 해당하는 IP<sub>3</sub>K의 band는 뚜렷이 확인되지 않고 smear하다.

그러나 40KDa에 해당하는 protein band들은 어느 조직에서나 쉽게 확인되는데 특히 heart조직인 lane 4에서는 강하게 관찰되었다. 이 사실은 53KDa의 IP<sub>3</sub>K는 조직에 아주 적은 양으로 존재하는 것을 나타내는 것이며, 어느 정도 일반 protein과 겹치기는 하겠지만 heart속에는 40KDa의 IP<sub>3</sub>K가 다른 조직에서보다는 비교적 풍부하리라 짐작된다.

### 3. Immunization, fusion, hybridoma clone and anti-IP<sub>3</sub>K murine monoclonal Ab

원위의 뇌로부터 추출 분리 정제된 53KDa의 IP<sub>3</sub>K를 Balb/c 마우스에 immunization후, 비장 세포를 절제하여 암세포인 SP<sub>2</sub>/Ag<sub>0-14</sub>와의 cell fusion, screen 및 cloning과정을 통하여 anti-IP<sub>3</sub>K murine monoclonal antibody(Ab)를 생산하였다.

이 방법에서 IP<sub>3</sub>K에 대한 18개의 hybridoma clone을 얻었으며 그 중 10개만이 nonspecific binding에 기인되는 background가 낮았다. 각 조직에 존재하는 IP<sub>3</sub>K에 대한 이 항체들의 immuno반응을 검증하기 위하여 정제된 IgG<sub>1</sub>과 IgG<sub>2b</sub>의 혼합(1/1) mAb(Fig. 2, lane 8)를 inhibitor로 사용하여 각 조직별로 효소활성 저해실험을 하였다.

이 결과는 Fig. 3과 Table 2에 보였다. 활성억제 실험에 사용된 각 조직들의 protein량은 모두 40μg으로 동일하였고, 첨가된 혼합 mAb의 양은 각각 0.04 μg, 0.4 μg, 4 μg, 80 μg 및 200 μg이었다.

각 조직들의 효소활성은 대체로 비슷한 저해를 받았으나 brain의 IP<sub>3</sub>K는 0.4 μg의 mAb에서도 20%, 4 μg에서는 50%이상의 강력한 저해를 받았다. 그러나 kidney, liver 및 lung은 4 μg의 mAb에서 25~30% 범위로 저해되었으며, heart를 제외한 모든 조직이 80 μg의 mAb로 80%내외의 저해를 받았지만 200 μg에서도 완

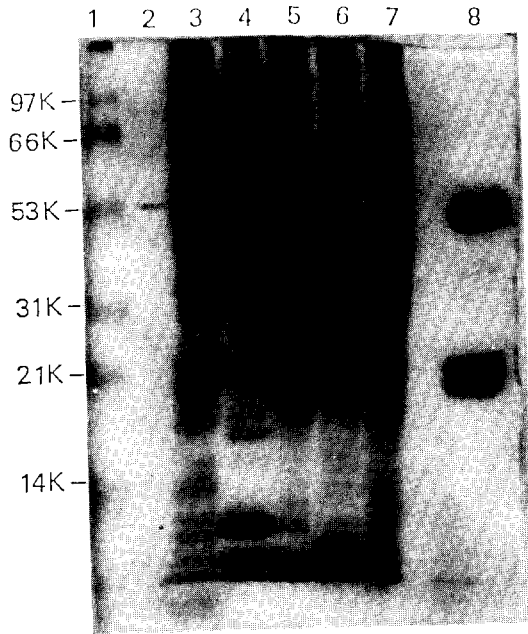


Fig. 2. SDS-PAGE

Lane 1 : Standard proteins  
 Lane 2 : Fresh IP<sub>3</sub>K purified from rat brain  
 Lane 3 : Rat brain      Lane 4 : Rat heart  
 Lane 5 : Rat liver      Lane 6 : Rat lung  
 Lane 7 : Rat kidney  
 Lane 8 : Murine monoclonal antibody(IgG<sub>1</sub>, and IgG<sub>2b</sub>) for IP<sub>3</sub>K

전히 저해되지는 않았다. 특이한 것은 heart의 IP<sub>3</sub>K로서 첨가한 mAb의 농도가 묽을 때(0.4 μg 이하)는 오히

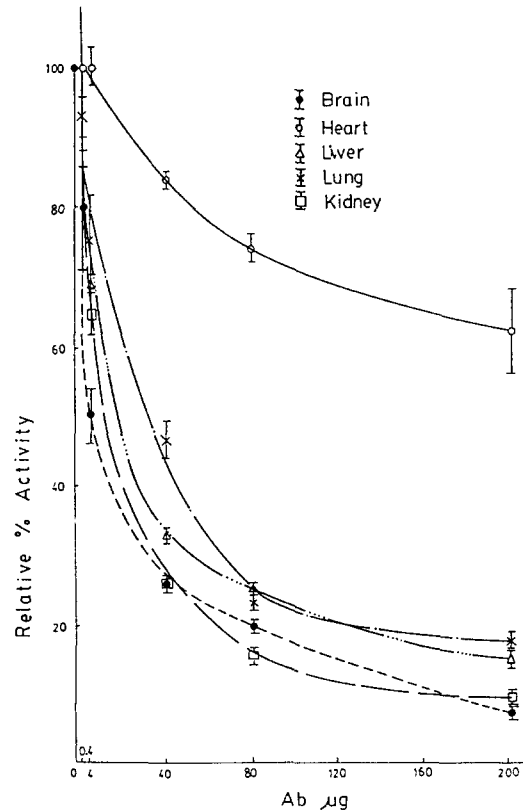


Fig. 3. Inhibition effect of rat tissues IP<sub>3</sub>K murine monoclonal Ab

려 활성도가 증가하기도 하고, 과량(200 μg)의 mAb 첨가에도 불구하고 저해효소과는 40%로서 효소활성에

Table 2. Effect of monoclonal antibody on the IP<sub>3</sub> 3-kinase in the rat tissues

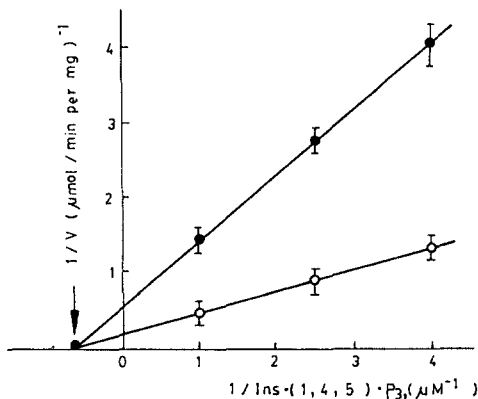
Tissues	Ins(1,4,5)P <sub>3</sub> 3-kinase activity (cpm / 40 μg protein)						
	Control	Concentration of monoclonal Ab					
		0.04 μg	0.4 μg	4 μg	40 μg	80 μg	200 μg
Brain	7384 ± 62		5752 ± 658	3710 ± 294	1716 ± 14	1472.5 ± 12.5	542.4 ± 4.5
Heart	1341 ± 193		1683 ± 73	1381 ± 57	1128.5 ± 14.5	993.5 ± 24.5	889 ± 26
Liver	3155 ± 27		3207 ± 3	2190 ± 30	1031 ± 9.5	792.5 ± 67.5	485.5 ± 0.5
Lung	3067 ± 287	3001 ± 121	2880 ± 118	2271 ± 285	1478 ± 138	743 ± 69	551.5 ± 51.5
Kidney	837 ± 163	630 ± 74	581 ± 73	552 ± 44	212 ± 27	131.5 ± 16.5	86 ± 11

All values were expressed as mean ± SD. \*p < 0.05

많은 영향을 미치지 못하였다. 또한 western blot (Fig. 5)을 하였을 때도 53과 51 KDa의 protein은 거의 볼 수 없고 40 KDa에서만 진한 protein band를 볼 수 있는 것이 다른 조직의 것과는 다른 점이다.

Fig. 2의 SDS-PAGE나 immunoreaction에서 알 수 있듯이, *in vivo* 상태에서의 각종 생리 실험을 위해서 heart속의 IP<sub>3</sub>K를 labeling이나 immunoprecipitation하려면 clone된 IgG<sub>1</sub>과 IgG<sub>2b</sub>의 혼합 mAb로는 다소 힘들 것이라고 생각된다. 또한 heart이외의 조직에서도 효소활성이 완전히 저해되지 않았던 이유는 각 조직에 40 KDa의 IP<sub>3</sub>K가 상당량 포함되어 있기 때문이 아닌가 생각된다. 따라서 40 KDa의 gene을 분자수준에서 이해하기 위하여 cloning하려면 해당 IP<sub>3</sub>K로 polyclonal 또는 monoclonal Ab를 다시 생산하던가 다른 subclass의 Ab로 검색하는 것이 효과가 더 있을지 모른다. 그러나 53 KDa에 해당되는 주 IP<sub>3</sub>K의 gene은 이 monoclonal Ab로 완전히 sequencing이 되었다<sup>10)</sup>.

#### 4. Enzyme kinetics



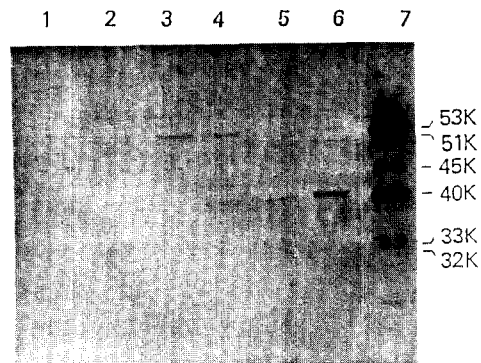
**Fig. 4. Effect of rat brain IP<sub>3</sub>K by monoclonal Ab on the Lineweaver-Burk double reciprocal plots.**

IP<sub>3</sub>K (5 μg) was incubated with substrates in the absence (○) and presence (●) of monoclonal Ab. After 30 min at 30°C, IP<sub>3</sub>K activity was measured as described.

IP<sub>3</sub>K의 함량이 다른 조직보다는 비교적 많다고 판단된 흰쥐의 brain에서 affinity resin인 matrex green gel, calmodulin-agarose, TSK gel HA-1000 (hydroxyapatite), 그리고 Mono-S column의 HPLC를 이용하여 16,100배로 IP<sub>3</sub>K가 Lee et al.에 의해서 분리 정제되었다<sup>16)</sup>. 이것을 사용하여 기질 [<sup>3</sup>H] Ins(1,4,5) P<sub>3</sub>로부터 Km값을 얻은 결과는 Fig. 4와 같다. Km 값은 1.58 mM, 최대 반응 속도 V<sub>max</sub> 값은 5.41 μmol / min / ml이었다. 혼합 IgGs의 저해효과 실험 (●)에서는 Ab가 지나는 different epitope들 때문에 아마도 비경쟁적으로 저해를 받는 것으로 생각된다.

#### 5. Western blot

Fig. 5는 IP<sub>3</sub>K에 대한 mAb를 사용하여 western blot한 결과이다. Immunoblotting을 위해서 slab SDS-PAGE에 loading한 각 조직의 단백질량은 lane 당 150 μg씩으로 통일하였다. Brain (lane 6)에서는 면역학적으로 서로 다른 3가지의 IP<sub>3</sub>K인 53, 51 및 40 KDa의 band가 분명히 관찰되는데, 실험결과 53 KDa의 protein이 활성도가 가장 큰 주된 효소라 추정되었다. Heart (lane 5)에서는 강한 40 KDa과 그 분해 산물이라 추정되는 흔적량의 32 KDa, kidney (lane 4)에



**Fig. 5. Western blot by the use of monoclonal Ab to IP<sub>3</sub>K in rat tissues**

Lane 1 : Rat thymus      Lane 2 : Rat lung  
Lane 3 : Rat liver      Lane 4 : Rat kidney  
Lane 5 : Rat heart      Lane 6 : Rat brain  
Lane 7 : Purified IP<sub>3</sub>K (pre-existing state, 3 weeks at 4°C) from rat brain

서는 53과 40 KDa, liver(lane 3)에서는 53 KDa 그리고 lung(lane 2)에서는 51과 33 KDa의 희미한 분해산물이 나타나 있다. Thymus(lane 1)에서도 53과 51 KDa의 band가 날카롭게 관찰되고 있다.

그밖에 skeletal muscle, spleen 및 pancreas에서는 IP<sub>3</sub>K에 유의성이 그리 많지 않았으며 소화기관인 stomach와 생식기관인 testis, uterus에서도 40 KDa의 band는 관찰되었지만 53 KDa의 효소는 거의 나타나지 않았다(not shown data.)

어쨌건 IP<sub>3</sub>K는 정보 전달체계에서 중요한 효소임이 틀림 없으나 immunoblots나 SDS-PAGE상에서 관찰할 때 양적으로는 동물의 조직속에 극미량으로 분포, 존재하며 또한 불안정하여서 쉽게 분해하므로 정제하여 그 특성을 연구하는데 아주 까다로운 효소임을 알 수 있었다. 성장중에 있는 흰쥐의 뇌에서 각 단계별로 IP<sub>3</sub>K를 분자 생물학적 수준으로 검색해 본 결과 fetus로부터 생후 일주일 사이에는 40 KDa의 protein이 점차로 증가, 생성되다가 일주일 이후 8일째는 53 KDa과 51 KDa의 protein이 갑자기 생성되는 것이 관찰되며, 이들은 모두 IP<sub>3</sub>K의 효소 활성을 지니는 것으로 확인되었다.

그러나 40 KDa의 효소는 53 KDa의 것보다 활성도가 낮았다. 생후 일주일 이후에는 IP<sub>3</sub>K의 활성도가 현저히 증가되며 어른이 되었을 때는 14배로 되는데, 태아 또는 어린 단계에서 효소활성이 낮은 이유중의 하나가 생후 일주일 이전에는 뇌속에 40 KDa의 IP<sub>3</sub>K만이 존재하고 53 KDa은 생성되지 않았기 때문이 아닌가 하며, 1.8Kb의 전체 IP<sub>3</sub>K gene을 encoding하는 <sup>32</sup>P-labeled cDNA를 probe로 만들어 northern blot으로 IP<sub>3</sub>K의 mRNA를 정량한 결과 성장 단계별로 이들 효소가 모두 transcriptional 수준으로 조절받고 있음을 전보에서도 확인하였다<sup>18,19</sup>.

또한 흰쥐의 뇌로부터 분리된 53 KDa의 IP<sub>3</sub>K는 아주 불안정하여서 약 3주간의 pre-exiting(4°C) 또는 -20°C 상태에서도 쉽게 degradation되는 것이 관찰되는데, 정제 후 일정시간이 경과된 다음 immunoblotting할 때 45, 33, 32 및 ~20 KDa외에도 몇가지 fragmentation pattern을 볼 수 있다. Trypsin, chymotrypsin, glu-C, lys-C, subtilisin 및 calpain 등 여러 가지 proteases로 처리한 후의 digestion pattern을

보면 proteases 모두에 susceptible 하지만 특히 subtilisin과 calpain에는 autoproteolysis와 비슷한 영향을 많이 받는다. 따라서 calpain inhibitor I 과 II를 함께 사용하면 IP<sub>3</sub>K의 정제과정이나 실험을 위한 보존중에도 proteolysis를 어느 정도 막을 수 있다는 사실을 확인할 수 있었으나 생체내에서 calpain과 그 inhibitor가 IP<sub>3</sub>K에 어떤 영향을 줌으로써 inositol phosphates 대사에 기대할 만한 modulator가 될 수 있는지는 아직 알 수 없다<sup>19</sup>.

이 문제는 생체내에서 inositol phosphates 대사 산물의 역할과 관련하여 앞으로도 더욱 연구되어야 할 과제이다. IP<sub>3</sub>K는 cAMP-dependent kinase나 protein kinase C에 의하여 인산화되면 효소활성이 modulate 될 수 있다는 것이 알려졌고<sup>17</sup>, PLC에서와 마찬가지로 <sup>23</sup>Ca<sup>2+</sup> 존재하에 calmodulin에 의해서도 53 KDa과 40 KDa의 IP<sub>3</sub>K는 효소활성이 2배로 증가된다는 사실이 확인되었으며<sup>16</sup>, 암을 유발하는 oncogene의 하나인 virus의 src gene에 의해서도 IP<sub>3</sub>K가 영향을 받아서 6~8배로 활성이 증가된다는 보고<sup>24</sup>들이 있는 점으로 미루어 IP<sub>3</sub>K가 세포내의 각종 생리활성을 조절하는 중요한 물질임은 틀림없다고 생각된다.

최근에는 IP<sub>3</sub>K가 정보 전달체계에서 어떠한 역할을 하는지 분자수준에서의 메카니즘을 이해하기 위한 연구들이 도처에서 진행되고 있으며<sup>25,26</sup>, 심지어는 사람의 뇌세포에서도 IP<sub>3</sub>K의 유전자를 분리하였다는 보고가 있다<sup>27,28</sup>. 따라서 생명 현상을 올바로 이해하기 위한 수단으로써 signal transduction에 대한 생화학적인 연구들이 앞으로도 활발이 이루어질 것으로 전망된다.

## 요 약

흰쥐로부터 뇌, 심장, 간장, 폐, 신장 및 흉선 등 12종류의 기관을 계통별로 해부하여 homogenates를 만들고 cytosol을 분획한 다음, 이것을 효소원으로 하여 inositol phosphates 대사회로에서 핵심효소인 PLC, IP<sub>3</sub>K 및 Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> 5-phosphatase의 활성도를 조직별로 비교 측정하였다. 흰쥐의 뇌에서 분리 정제된 53 KDa의 IP<sub>3</sub>K를 Balb/c 마우스에 면역 후 비장 세포를 얻어서 골수암세포인 myeloma cells (SP<sub>2</sub>/Ag 0-14)에 세포융합, 스크리닝 및 클로닝과정을 거쳐서 anti-



IP<sub>3</sub>K murine monoclonal antibodies를 만들었다. 이 과정에서 18개의 hybridoma clone이 얻어졌고 그 중 10개의 clone만이 nonspecific binding에 기인되는 background가 낮았다.

Ascitic fluid를 생산시킨 후 그 Ab를 Affi-gel 15로 정제하여 IgG의 subtype을 결정하였다. 이 항체들 중에서 IgG<sub>1</sub>과 IgG<sub>2b</sub>를 함께 사용하여 조직의 IP<sub>3</sub>K에 대한 immuno반응성을 검증한 결과 대체로 비슷한 비경쟁적 저해를 보였으며 뇌조직의 IP<sub>3</sub>K가 예민한 반응을 나타내었고, 심장조직에서는 현저히 activity가 낮았다. 흰쥐의 뇌로부터 16,100배로 정제된 IP<sub>3</sub>K효소를 사용하여 얻어진 Km값은 1.58 mM, 최대반응속도 V<sub>max</sub> 값은 5.41 μmol/min/ml이었다. Western blot 결과 심장조직에서는 40 KDa의 IP<sub>3</sub>K만이 관찰되었으며, 뇌속에는 면역학적으로 서로 다른 3가지의 IP<sub>3</sub>K (53, 51 및 40 KDa)가 존재하였다. 그 중 53 KDa의 단백질이 활성이 큰 주 효소이며, 1.8 Kb의 IP<sub>3</sub>K gene을 완전히 encoding하는 <sup>32</sup>P-labeled cDNA를 probe로 만들어 Northern blot법으로 IP<sub>3</sub>K의 mRNA를 정량한 결과 성장단계별로 이들은 모두 transcriptional 수준으로 조절받고 있음을 밝혔다.

### 참고문헌

- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. : Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, **312**, 315 (1984)
- Majerus, P.W., Connolly, T.M., Deckmyn, H., Ross, T.S., Bross, T.E., Ishii, H., Bansal, V.S. and Wilson, D.B. : The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science*, **234**, 1519(1986)
- Nishizukia, Y. : Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, **233**, 305(1986)
- Berridge, M.J. and Irvine, R.F. : Inositol phosphate and cell signalling. *Nature*, **341**, 197 (1989)
- Shears, S.B. : Metabolism of the inositol phosphates produced upon receptor activation. *Biochem. J.*, **260**, 313(1989)
- Berridge, M.J., Downes, C.P., Hanley, M.R. : Neural and developmental actions of lithium. *Cell*, **59**, 411(1989)
- Irvine, R.F., Letcher, A.J., Heslop, J.P. and Berridge, M.J. : The inositol tris/tetrakis phosphate pathway-demonstration of Ins(1,4,5) P<sub>3</sub> 3-kinase activity in animal tissues. *Nature*, **320**, 631(1986)
- Storey, D.J., Shears, S.B., Kirk, C.J. and Michell, R.H. : Stepwise enzymatic dephosphorylation of inositol 1,4,5-triphosphate to inositol in liver. *Nature*, **312**, 374(1984)
- Hansem, C.A., Mah, S. and Williamson, J.R. : Formation and metabolism of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in liver. *J. Biol. Chem.* **261**, 8100(1986)
- Choi, K.Y., Kim, H.K., Lee, S.Y., Moon, K. H., Sim, S.S., Kim, J.W., Chung, H.K. and Rhee, S.G. : The complete primary structure of inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase. *Science*, **248**, 64(1990)
- Biden, T.J., Comte, M., Cox, J. A. and Wollheim, C.B. : Calcium-Calmodulin stimulates inositol 1,4,5-triphosphate kinase activity from insulin-secreting RINm5F Cells. *J. Biol. Chem.* **262**, 9437(1987)
- Morris, A.J., Downes, C.P., Harden, T.K. and Michell, R.H. : Turkey erythrocytes possess a membrane-associated inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase that is activated by Ca<sup>2+</sup> in the presence of calmodulin. *Biochem. J.* **248**, 489(1987)
- Johanson, R.A., Hansen, C.A. and Williamson, J.R. : Purification of D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **263**, 7465(1988)
- Takazawa, K., Passareiro, H., Dumont, J.E. and Erneux, C. : Purification of bovine brain inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase. *J. Biol.*

- Chem.* **261**, 483(1989)
15. Moon, K.H., Lee, S.Y. and Rhee, S.G. : Developmental changes in the activities of phospholipase C, 3-kinase, and 5-phosphatase in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **164**, 370(1989)
  16. Lee, S.Y., Sim, S.S., Kim, J.W., Moon, K. H., Kim, J.H. and Rhee, S.G. : Purification and properties of D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **265**, 9434(1990)
  17. Sim, S.S., Kim, J.W. and Rhee, S.G. : Regulation of D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase by cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **265**, 10367(1990)
  18. Kim, J.W., Choi, K.Y., Suh, P.G. and Rhee, S.G. : Developmental changes in phospholipase C, ins(1,4,5) P<sub>3</sub> 3-kinase, and ins(1,4,5) P<sub>3</sub> 5-phosphatase in rat brain. ASBMB / AAI, p.20, New Orleans, Louisiana, U.S.A. (1990)
  19. Kim, J.W., Choi, K.Y. and Rhee, S.G. : Developmental changes of ins(1,4,5) P<sub>3</sub>-kinase and mRNA in rat brain. *Kor. Biochem. J.* **24**, 472(1991)
  20. Suh, P.G., Ryu, S.H., Choi, W.C., Lee, K.Y. and Rhee, S.G. : Monoclonal antibodies to three phospholipase C isozymes from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **263**, 14497(1988)
  21. Bradford, M.M. : *Anal. Chem.* **72**, 248(1976)
  22. Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, **227**, 680(1970)
  23. Ryu, S.H., Lee, K.Y., and Rhee, S.G. : *FASEB. J.* **1**, 388(1987)
  24. Johanson, R.M., Wasilenko, W.J., Mattingly, R.R., Weber, M.J. and Garrison, J.C. : *Science*, **246**, 121(1988)
  25. Hirata, M., Watanabe, Y., Ishimatsu, T., Ikebe, T. Kimura, Y., Yamaguchi, K., Ozaki, S. and Koga, T. : Synthetic inositol triphosphate analogs and their effects on phosphatase, kinase, and the release of Ca<sup>2+</sup>. *J. Biol. Chem.* **264**, 20303(1989)
  26. Prestwich, G.D. et al. *JACS*, **113**, 1822(1991)
  27. Takazawa, K., Vandekerhove, J., Dumont, J. E. and Erneux, C. : Cloning and expression in *Escherichia coli* of a rat brain cDNA encoding a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-sensitive inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase. *Biochem. J.* **272**, 107 (1990)
  28. Takazawa, K., Perret, J., Dumont, J.E. and Erneux, C. : Molecular cloning and expression of a human brain inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 529(1991)

---

(1993년 3월 5일 수리)