

Inositol(1,4,5)triphosphate 3-Kinase의 유전자 재조합과 CCL39 Hamster Lung Fibroblasts에서 발현

김재웅 · 최관용*

유한전문대학 · 포항공과대학교*

Gene Construction of Inositol(1,4,5)triphosphate 3-Kinase and Expression in CCL39 Hamster Lung Fibroblasts

Jae Woong Kim, Kwan Yong Choi*

Yuhan Junior College, Bucheon 422-749, Korea, and POSTECH*, Pohang 790-784, Korea

Abstract

IP₃KcDNA gene(1.8 kbp) encoding rat brain IP₃K enzyme contained Not I restric site in open reading frame. The Not I sequence, GCGGCCGC, was converted to GCAGCCGC by site-directed mutagenesis. The mutated IP₃KcDNA was digested with EcoR I and ligated with EcoR I-restricted pSP72 · Not2 vector. The resulting pSP72 · Not2-IP₃KcDNA was digested with the Not I restriction enzyme and then subcloned into the Not I-digested pZIP · NeoSV(X) mammalian expression vector. The pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA was transfected into CCL39 hamster lung fibroblast cells. The efficiency of the expressed IP₃KcDNA gene was significantly higher than expected generally, not only a mean 5-fold increase in the amount of enzyme, but also 16-fold increase in enzyme activity from transfected CCL39 cells by the method of Western blot using anti-IP₃K antibodies. Both distribution of IP₃K in various rat tissues and biochemical properties were discussed.

Key words : IP₃KcDNA gene, site-directed mutagenesis, anti-IP₃K antibody, Western blot, CCL39 hamster lung fibroblasts.

서 론

세포막 표면에 존재하는 수용체가 agonists의 영향으로 흥분되면, phosphoinositide 특이성 phospholipase C(PLCs)는 G-protein을 거처서 활성화 되고, 이것은 세포막에 있는 phosphatidyl inositol(4,5)bisphosphate [PIP₂]를 inositol(1,4,5) triphosphate [Ins(1,4,5)P₃]와 diacylglycerol(DG)로 가수분해한다. 최근까지 여러 조직에서 알려진 PLCs에는 9종류 이상의 동질효소가 있으며 4개군(PLC- α , - β , - γ 및 - δ)으로 분류되고 Subtype도 존재한다.^{1,2)}

상피세포 성장인자(EGF)나 혈소판-유래 성장인자

(PDGF)의 수용체는 표적 단백질의 티로신 부위를 인산화하는 tyrosine kinase인데, *in vivo*와 *in vitro* 실험 결과들을 볼 때 대부분의 경우 이들 수용체는 EGF, PDGF의 영향을 받으면 짧은 시간내에 수용체는 PLC- γ 의 경우 Tyr 잔기를 직접 인산화시키기 때문에 G-protein을 거치지 않고도 효소의 활성화에 영향을 주게 되지만, PLC- β 나 PLC- δ 는 쉽게 인산화되지 않을 뿐 아니라 G-protein 의존성 효소로 추측하고 있다³⁾. 그러나 bradykinin, bombesin, angiotensin II를 처리했을 때 PLC- γ 는 인산화되지 않으면서도 PIP₂의 분해가 촉진되는데, 이와 같은 사실은 G-protein을 통하여 PLCs의 활성이 조절되기 때문으로 해석되고 있다⁴⁾.

Protein kinase C(PKC)는 EGF-수용체인 tyrosine kinase를 인산화 시킴으로써 PLC- γ 의 가수분해 작용을 되먹임으로 억제 조절하게 되고, PKC에 의하여 PLC- γ 와 PLC- δ 는 인산화 되지 않으나, PLC- β 인 경우에는 Ser 부위가 인산화되어 G-protein과의 상호 작용을 변화시킴으로써 활성을 억제하기 때문에 PIP₂로부터 Ins(1,4,5)P₃의 생성이 감소하게 된다³⁾. 또한 cAMP-의존성 protein kinase(PKA)에 의해서 PLC- β 와 PLC- δ 는 인산화되지 않으나, PLC- γ 의 Ser 잔기는 인산화 되어서 수용체 매개 PIP₂의 가수분해를 억제하는데, 세포내 cAMP의 농도를 증가시키는 물질들(cAMP analogs, theophylline, forskolin, 콜레라 독신, IBMX, 글루카곤, 및 PGE₂)은 혈소판, 호중구, 임파구, 신장세포, 췌장세포, 평활근세포, 사구체 및 신경종양 세포에서는 PIP₂의 가수분해를 억제하지만, 간세포와 Swiss 3T3 세포에서는 분해가 촉진된다는 것이다⁶⁾.

어쨌거나 PIP₂가 PLCs의 작용으로 분해, 생성된 Ins(1,4,5)P₃와 DG는 세포내에서 이차 전령으로 작용하는데, DG는 Ca²⁺와 포스파티딜 세린의 존재하에 PKC를 활성화 시키고, Ins(1,4,5)P₃는 세포내 Ca²⁺ 저장소의 수용체에 결합하여 세포질로 Ca²⁺을 방출시킨다는 사실은 잘 알려져 왔다⁷⁾.

PLCs-의존형 Ins(1,4,5)P₃가 대사되는 경로는 크게 두 가지로 나누어 생각해 볼 수 있다. 하나는 Ins(1,4,5)P₃가 탈인산되는 과정으로써 5-phosphatase에 의해서 Ins(1,4)P₂로 된 다음, 다른 phosphatases들에 의하여 점차로 인산기가 가수분해되어서 inositol이 되는 과정이 있고, 또 하나는 Ins(1,4,5)P₃가 3-히드록시기에 인산화되는 과정으로써 inositol(1,4,5)triphosphate 3-kinase [IP₃K]에 의하여 inositol(1,3,4,5)tetrakisphosphate [Ins(1,3,4,5)P₄]가 생성된 다음, InsP₅와 InsP₆로 합성대사되거나 아니면 Ins(1,3,4,5)P₄가 5-phosphatase의 작용을 받고 나서 연속적으로 분해되어 inositol로 되는 과정이 있는데, 5-phosphatase는 PKC에 의해서 인산화될 때 효소 활성이 나타나게 된다. 한편 재생된 inositol은 CDP-DG inositol transferase의 촉매로 phosphatidyl inositol(PI)이 합성되고, 각기 다른 kinases들에 의하여 순차적으로 PLCs들의 기질인 phosphat-

idyl inositol(4)phosphate (PIP), phosphatidyl inositol(4,5)bisphosphate(PIP₂)로 전환된다. 이러한 과정을 inositol phosphate 대사회전이라 하는데, 대사 중간산물들의 세포내 기능은 전혀 모르고 있는 실정이다.

IP₃K는 세포질에 존재하면서 ATP-의존성 인산화 반응으로 Ins(1,4,5)P₃를 Ins(1,3,4,5)P₄로 전환시키는 효소인데, 이것은 inositol phosphate 대사과정에서 중요한 탈인산화/인산화 반응의 분기점을 이루고, Ca²⁺-mobilizing 이차 전령인 Ins(1,4,5)P₃와 Ins(1,3,4,5)P₄의 농도를 조절하는 중심 위치에 있다. 알려진 기능 중에서 Ins(1,4,5)P₃는 소포체에 저장된 Ca²⁺을 세포질로 방출하는 기능이 있으나, Ins(1,3,4,5)P₄는 세포막에 작용하여 Ca²⁺-channel을 조절함으로써 세포밖의 Ca²⁺을 세포내로 유입토록 하여 Ca²⁺ 저장소의 Ca²⁺ 농도를 증가시키기도 하고, Ins(1,4,5)P₃-insensitive한 풀에서 -sensitive한 풀로 Ca²⁺을 이동시킨다는 가설이 있기 때문에⁷⁾, Ins(1,4,5)P₃와 Ins(1,3,4,5)P₄는 세포내 Ca²⁺ 농도의 항상성을 유지하게 되고, 세포의 다양한 활성조절에 깊이 관여할 것으로 믿어지고 있다.

IP₃K는 흰쥐의 뇌^{8, 9, 10)}, 소의 뇌¹¹⁾, 돼지의 대동맥 평활근¹²⁾으로부터 각각 분리되었는데 그들의 분자량도 여러 형태가 있음이 보고되었다. 또한 IP₃K를 암호화하는 IP₃KcDNA가 흰쥐^{13, 14)}와 사람의 뇌¹⁵⁾에서 클로닝되어 유전자의 염기 서열이 각각 결정되었다.

본 연구에서는 IP₃KcDNA 유전자의 재조합 과정을 통하여 형질전환주를 얻고, 이것을 CCL39 hamster lung fibroblasts 세포에 transfection하여 유전자를 발현시킨 다음 그 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

실험재료 및 방법

1. 실험재료

흰쥐의 IP₃KcDNA(Choi et al.), pSP72·Not2 vector(Promega Co.), pZIP·NeoSV(X) vector(Antonio, NIH), CCL39(ATCC), McCoy's medium(NIH), G₄₁₈, DH_{5 α} , DH_{5 α} F' 및 lipofectin(Gibco BRL Co.), restriction enzymes, T₄ DNA

polymerase, T₄ DNA ligase, T₄ polynucleotide kinase 및 DNA ladder(Gibco BRL Co. 또는 Pharmacia Co.), [³H]Ins(1,4,5)P₃(17 Ci/mmole, Dupont-New England Nuclear Co.), alkaline phosphatase conjugated with goat anti-mouse IgG, NBT 및 BCIP(KPI Co.) 등이 사용되었다.

2. 실험방법

1) IP₃KcDNA 유전자의 클로닝

IP₃KcDNA 유전자를 포함하는 세포의 배양, 플라즈미드 분리, restriction, ligation, transformation, site-directed mutagenesis 등 유전자 재조합 과정들은 Choi 등의 방법이 인용되었다^{13, 16}.

(1) Uracil 함유 ss-DNA 준비

흰쥐의 뇌로부터 클론된 EcoR I-inserted M13-IP₃KcDNA의 파지를 배양액 [2×YT medium 10 ml, uridine(0.25 mg/ml) 1 μl, M13-IP₃KcDNA 파지 10⁸ pfu, RZ1032(*dur*⁻ *ung*⁻, mid log phase) 0.5 ml]으로 37℃에서 5시간 진탕배양하여 site-directed mutagenesis의 주형으로 사용할 우라실 함유 ss-DNA가 만들어졌다.

(2) Site-directed mutagenesis

Oligo DNA 합성장치(Applied Biosystems model 30B DNA synthesizer)를 사용하여 IP₃KcDNA 유전자속의 GC↓GGCC↑GC 염기서열중 Not I 제한부위인 193번째 G를 A로 바꾸어 mutagenic 26mer nucleotide를 합성하였다. 합성된 oligo DNA 용액에 차가운 28% NH₄OH 1.5 ml를 가하고, 55℃에서 16시간 유지하여 벤조일과 보호족을 제거하고, 진공 건조하여 암모니아 가스를 제거한 후, TE 완충용액(10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)에 녹이고 물포화 부탄올로 3번 추출하였다. 7.5 M NH₄OAc로 최종농도가 0.3M 되도록 하고, 2.5배의 순수한 에탄올로 oligo DNA를 침전시키고, 70% 에탄올로 세척 후 다시 TE 완충용액에 녹였다. DNA는 A₂₆₀ nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다(A₂₆₀×30×D μg/ml).

자리-지정 돌연변이(G→A)된 IP₃KcDNA의 EcoR I 조각(1.8 kbp)을 얻기 위하여 kinasing mixture [2 μl(2 μg)의 26mer nucleotide, 10 μl의 T₄ kinase buffer, 2 μl의 10 mM ATP, 5 μl의 0.1 M DTT, 1 μl의 10 mM spermidine, 2 μl의 T₄ polynucleotide kinase 및 DW 78 μl] 100 μl를 37℃에서 1시간 항온처리하였다. Annealing mixture [1 μl의 kinased nucleotides, 2 μl의 ss-DNA(1 μg), 1.2 μl의 20× SSC, 16.8 μl의 DW] 21 μl를 65℃에서 10분간 항온처리한 후 서서히 실온으로 냉각하고 4시간 방치하였다. 이차 가닥 cDNA를 합성하기 위하여, 합성 mixture [21 μl의 annealed DNA, 2 μl의 1 M Hepes(pH 7.8), 2 μl의 0.1 M DTT, 1 μl의 1 M MgCl₂, 2 μl의 dNTPs(25 mM in each), 1 μl의 100 mM ATP, 2 μl의 T₄ DNA polymerase(10 u/μl), 1 μl의 T₄ DNA ligase 및 68 μl의 DW] 100 μl를 얼음속에 5분간 두었다가 실온에 5분간 방치하고 37℃의 수조에서 2시간 항온처리하였다. 결과적인 우라실 함유 ds-cDNA를 *E. coli*에 transformation 시키기 위하여, 70 μl의 DH_{5α}F'(*dur*⁺ *ung*⁺) competent cell에 위의 ds-cDNA 합성 mixture 100 μl 모두를 가하고 5초간 흔들어 섞고, 얼음속에 40분간 방치한 다음 42℃에서 45초간 열충격을 주고, 즉시 얼음위에서 2분간 식힌 후 0.6% YT top agar 용액[100 μl의 DH_{5α}F' lawn cell, 50 μl의 2% X-gal(in dimethylformamide), 10 μl의 200 mM IPTG(isopropylthiogalactoside) 포함] 3 ml에 가하여 잘 섞어서, YT 플레이트 위에 도말하고, 어느 정도 습기가 제거되면 뚜껑을 덮고 뒤집어서 37℃로 하룻밤 항온처리하였다. 3 ml의 2×YT medium에 같은 medium으로 5시간 배양한 DH_{5α}F' lawn cell 30 μl를 넣고, YT 플레이트 위에 생성된 무색의 mutagenic M13-IP₃KcDNA 파지 플라스크를 따서 inoculation 하고 37℃에서 5시간 진탕배양하였다. 배양액을 0℃에서 4,000×g로 20분간 원심분리하여 상층액은 ss-DNA 제조에 사용하고, 세포 침전물은 alkaline lysis법으로 처리하여 RF-DNA 제조에 사용하였다. 즉 상층액 1.5 ml 당 200 μl의 PEG 6000/NaCl (20%/2.5 M)을 가하여 잘 섞고 상온에 15분간 방치한 후, 4℃에서 20,000×g로 10분간 원심분리하는 조작을 반복하여 PEG를 제거하였다.

침전은 400 μ l의 TE 완충용액에 녹이고 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(10:10:1, v/v) 용액을 동량 섞은 후 15~20초간 세차게 vortexing 하였다. 상층액을 따서 새로운 미세원침관에 옮기고, 전체 체적의 0.1배 부피인 40 μ l의 3 M NaOAc(pH 6.0) 을 가하였다. 2배의 100% 에탄올(800 μ l)을 가하여 섞고 -20 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치하였다. 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 5분간 원심분리하여 생성된 침전을 70% 에탄올로 세척하고, 다시 원침한 다음 speed vac으로 건조하여 TE 완충용액에 녹이고 돌연변이된 ss-DNA 를 A₂₆₀ nm에서 정량하였다.

(3) IP₃KcDNA의 EcoR I 제한조각 준비

IP₃KcDNA 내부의 Not I 제한부위가 돌연변이된 M13-IP₃KcDNA 파지 플라크를 실험 2.1의 2)에서와 같은 방법으로, 50 ml의 2 \times YT medium에 배양하고 원심분리하여 얻은 세포 침전물에 2 ml의 Sol I 용액 [500 μ l의 1 M glucose, 200 μ l의 0.5 M EDTA, 250 μ l의 1 M Tris/HCl(pH 8.0), lysozyme 5 mg/ml]을 가하여 서서히 세포벽을 녹인 후, 새로 만든 4 ml의 Sol II 용액 (1 ml의 5 N NaOH, 25 ml의 10% SDS)을 가한 다음 55 $^{\circ}$ C에서 잠시 가열 처리하고 얼음 속에 방치하였다. 마지막으로 3 ml의 Sol III 용액 [30 ml의 5 M KOAc(pH 4.8), 5.75 ml의 gracial acetate, 14.25 ml의 DW]을 가하고 microfuge로 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 5분간 원심분리하였다. 상층액은 페놀/클로로포름 추출, 에탄올 침전, 세척 후 진공 건조하고, 400 μ l의 TE 완충용액에 녹인 다음, M13-IP₃KcDNA 플라스미드 0.5 μ g을 취하여 EcoR I으로 처리하였다. 즉 buffer mixture [10 \times buffer (Reaction ③) 3 μ l, RNase(10 mg/ml) 1.5 μ l, EcoR I 1.5 μ l] 6 μ l를 만들고, EcoR I-digest mixture [buffer mixture 2 μ l, M13-IP₃KcDNA 3 μ l (0.5 μ g), DW 5 μ l] 10 μ l를 37 $^{\circ}$ C의 수조에서 2시간 소화한 다음 1% agarose gel 상에서 전기이동하였다.

(4) 1% agarose gel 제조와 EcoR I-restricted IP₃KcDNA의 전기이동

Agarose 1.0g을 TBE 완충용액 [50mM Tris/H-

Cl, 50 mM boric acid, 1 mM EDTA(pH 8.0)] 100 ml에 가한 다음 100 $^{\circ}$ C로 가열하여 녹이고, 5 μ l의 EtBr(10 mg/ml)를 가하여 전기이동용 agarose gel 을 제조하였다. Gel 위에 실험 2.1의 3)으로부터 EcoR I-digested mixture를 주입한 다음 TBE 완충용액 속에서 25 volt(50 mA)로 5시간 전기이동하였다. EtBr가 결합된 IP₃KcDNA 띠를 잘라내서 투석막 속에 넣고 전기용출한 다음, 실험 2.1의 2) DNA 정제 과정으로 순도높은 EcoR I-restricted IP₃KcDNA를 얻고 TE 완충용액에 녹여 A₂₆₀ nm에서 정량하였다.

(5) EcoR I-restricted IP₃KcDNA의 클로닝

실험 1)의 (4)에서 얻은 EcoR I-restricted IP₃KcDNA를 pSP72·Not2의 운반체에 클로닝하기 위하여, pSP72·Not2 운반체의 EcoR I-digest mixture [pSP72·Not2 vector 15 μ l(3 μ g), 10 \times buffer(Reaction ③) 5 μ l, EcoR I 2.5 μ l, CIP 0.5 μ l, DW 27 μ l] 50 μ l를 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 소화하여 탈인산된 운반체(EcoR I site)를 얻은 다음 추출, 침전, 정량하였다. Ligation mixture [pSP72·Not2 vector(EcoR I-digested) 4 μ l(0.4 μ g), IP₃KcDNA 1 μ l(0.5 μ g), 5 \times ligation buffer 4 μ l, T₄ DNA ligase 1 μ l, DW 10 μ l] 20 μ l를 14 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 ligation 반응을 시켰다. Transformation을 시키기 위해서 폴리에틸렌 튜브(1 \times 7cm)에 70 μ l의 competent cell(DH_{5 α})을 넣은 다음, 여기에 위의 ligation mixture 1 μ l를 넣고, 얼음속에 30분간 방치하였다가, 42 $^{\circ}$ C에서 45초간 열충격을 가하고, 500 μ l의 SOC(BRL Co.)로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 진탕배양하였다. 원심분리하여 100 μ l만 남기고 나머지 상층액은 버린 다음, 마이크로 피펫으로 잘 섞어서 엠펠실린(100 μ g/ml)이 포함된 YT 플레이트 위에 얇게 펴고 잠시 방치한 후 37 $^{\circ}$ C로 하룻밤 항온처리하였다. 생성된 푸른색과 흰색을 각각 나타내는 형질 전환체 중에서 플라스미드 운반체 속에 외부 cDNA가 삽입된 흰색의 콜로니를 따서 엠펠실린(100 μ g/ml)이 포함된 3 ml의 TB medium으로 5시간 배양한 다음 플라스미드를 정제하고, ligation을 확인하기 위하여 EcoR I 처리용액 [pSP72·Not2IP₃KcDNA 6 μ l, 10 \times buffer(Reaction ③) 2 μ l, EcoR I 2 μ l, RNase(10

mg / ml in TE) 1 μ l, DW 9 μ l] 20 μ l를 37 $^{\circ}$ C에서 3 시간 소화하고 1.0% agarose gel로 전기이동하였다.

(6) Not I-restricted IP₃KcDNA의 서브클론

실험 2.1의 5)에서 얻은 pSP72 · Not2-IP₃KcDNA로부터 Not I 제한조각을 pZIP · NeoSV(X) 운반체로 옮기기 위하여, Not I-digest mixture [pSP72 · Not2-IP₃KcDNA 6 μ l, 10 \times buffer(Reaction ⑦) 2 μ l, Not I 2 μ l, RNase 1 μ l, DW 9 μ l] 20 μ l와 pZIP · NeoSV(X) 운반체의 digest mixture [vector DNA 1 μ l(1.4 μ g), Not I 1 μ l, 10 \times buffer(Reaction ⑦) 2 μ l, CIP 0.5 μ l, DW 15.5 μ l] 20 μ l를 37 $^{\circ}$ C에서 각각 3시간씩 소화하였다. 소화된 DNA들은 실험 2.1의 4)와 같이 전기이동하고 정량하였다. Not I-restricted IP₃KcDNA와 pZIP · NeoSV(X) 운반체의 ligation mixture [dephosphorylated pZIP · NeoSV(X) vector 1.5 μ l(0.5 μ g), IP₃KcDNA(Not I site) 10 μ l(0.6 μ g), 5 \times ligation buffer 4 μ l, T₄ DNA ligase 1 μ l, DW 3.5 μ l] 20 μ l를 14 $^{\circ}$ C에서 반응시키고 형질전환, 콜로니 생성, TB medium 배양과정은 실험 2.1의 5)와 같이 하였다.

2) IP₃KcDNA 유전자의 발현

(1) CCL39 hamster lung fibroblasts에 pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA의 transfection

BRL Co.의 manual에 따라서 lipofectin 법으로 pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA를 CCL39 세포에 transfection 시켰다. 즉 CCL39 세포를 10% bovine calf serum(BCS)이 포함된 McCoy's medium으로 10 cm 직경인 배양접시에 유지시키고, 세포가 50% 정도 confluent하게 자랐을 때 배양액을 제거한 후, 한번에 6 ml씩 serum free media (Opti-MEM[®] I, Gibco BRL Co.)를 가하여 세포들을 두번 세척하고 10 ml의 같은 배지를 넣어 주었다. 한편 lipofectin 50 μ g / 50 μ l DW를 폴리스틸렌 튜브에 취하고, 여기에 pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA 플라스미드 10 μ g / 50 μ l DW를 가하고 서서히 섞은 다음, 실온에 5분간 방치하였다가 CCL39 세포의 배양접시에 한 방울씩 첨가하였다. 이것을 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ / 95% air인 배양

기에서 24시간 배양한 후, 10% BCS가 포함된 정상 McCoy's medium으로 교환하고, 24~48시간 후에는 McCoy's medium에 G₄₁₈ (0.7 mg / ml)을 넣은 G₄₁₈ media로 3~4일에 한번씩 갈아주면서 스크린 배양하였다. pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA가 들어있는 세포가 바닥에서 자라는 것을 확인하고, 멸균된 바셀린으로 뚜껑을 만들고, 여기에 0.25% 트립신 / 0.25% EDTA를 처리한 즉시 세포용액을 24 well로 옮기고, G₄₁₈ media 1 ml 씩을 넣었다. 잘자라는 세포는 점차로 6 cm well, 10 cm well로 옮겨서 배양하였다.

(2) Immunoblot analysis

pZIP · NeoSV(X) 운반체와 pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA가 각각 transfect된 CCL39 세포는 실험 2.2의 1)에서와 같이 배양되었다. 10 cm 배양접시 바닥에 잘자란 세포들은 1 ml PBS로 두번 세척한 후 extraction buffer [20 mM Hepes(pH 7.2), 1% TritonX-100, 10% glycerol, 5 mM EGTA, 0.1 mM DTT 및 2 mM PMSF] 500 μ l를 가하고 세포를 긁어 모아서 미세원침관에 넣고 10초간 두번 초음파 처리한 다음에 4 $^{\circ}$ C에서 12,000 \times g로 5분간 원심분리하였다. 상층액의 단백질 150 μ g을 SDS-PAGE (12%) 하였다. 전기이동 후 단백질들은 transfer buffer(125 mM Tris, 635 mM glycine, 및 20% MeOH)를 넣은 blot chamber 속에서 4 $^{\circ}$ C에서 90 volt로 1시간 동안 nitrocellulose(NC) 필터에 이동시켰다. NC 필터는 3% BSA 용액(20 mM Tris / HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl)으로 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 항온처리하고 PBS로 10분간 충분히 세척한 다음, 모노클로날 anti-IP₃K antibody 용액으로 5시간 처리하여 antibody-IP₃K 복합체를 형성시켰다. PBS로 세척 후 KPI Co.의 manual에 따라서 alkaline phosphatase conjugated goat anti-mouse IgG (1:1000 ditute)를 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 처리한 다음 PBS로 세척하고, 기질용액(Tris / NBT / BICP, 10:1:1)을 가하여 발색시키고 증류수로 세척하였다.

(3) IP₃K의 활성화 측정.

효소의 활성화는 실험 2.2의 1)에서 얻은 세포 추출물을 효소원으로 하여 측정하였다. 효소 반응액 200 μ l

[50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 200 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 10 mM ATP, 2 mM EGTA, 50 mM 2, 3-bisphosphoglycerate, 1 mM dithiothreitol, 20, 000cpm [³H]Ins(1,4,5)P₃ 및 1 μM Ins(1,4,5)P₃]에 효소용액 20 μl를 가하여 37°C에서 2분간 반응시킨 후 1 N H₃PO₄ 50 μl와 1 N NaOH 50 μl를 차례로 가하여 효소반응을 중지시켰다. Inositol phosphates는 0.7 ml의 Dowex AG 1-X2(formate form) 컬럼을 사용하여 분리하였다. 각 컬럼은 0.1 M HCOOH가 함유된 0.55 M HCOONH₄ 용액 2 ml로 6번 세척하여 미반응 Ins(1,4,5)P₃를 제거하였다. [³H]Ins(1,3,4,5)P₄는 0.1 M HCOOH가 포함된 1.5 M HCOONH₄ 용액 2.5 ml로 용출하여 liquid scintillation counter로 [³H]의 cpm(×10³)을 측정하였다.

(4) 단백질의 정량

단백질의 정량은 Pierce Co.의 BCA법으로 수행하였다. Reagent A 50 part와 Reagent B 1 part를 혼합하여 발색용액을 만들고, 실험 2.2의 2)에서 얻은 원심분리 상층액 5~10 μl에 DW 95~90 μl를 넣어서 단백질의 측정범위를 결정한 후 발색용액 2 ml씩 가하여 55~60°C에서 30분간 발색시키고 562 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 BSA(2 mg/ml)을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. IP₃KcDNA 유전자의 클로닝

IP₃KcDNA는 M13mp18 박테리오파지 운반체의 EcoR I 절단부위속에 읽는구조 전체를 포함하는 약 1.8 kbp의 크기로 삽입되어 있으며, 이 플라스미드 DNA는 포항공대 최관용 박사로부터 제공받았다.

최 등¹³⁾은 흰쥐의 뇌로부터 총 RNA를 분리하고, oligo(dT) 셀룰로오스 크로마토그래피를 시행하여 poly(A)⁺-rich mRNA를 정제하고 그로부터 역전사효소를 사용하여 일차 및 이차 cDNA를 합성하였다. cDNA속에 존재하는 EcoR I 절단부위를 EcoR I methylase로 메틸화하고, 이 cDNA 양끝에 T₄ DNA ligase로 EcoR I 연결자를 무딘말단으로 연결시키고, EcoR I 처리하여 부착성 말단을 만들었다. EcoR I으

로 처리하고 5'-말단을 탈인산화 시킨 EcoR I 부착성 말단을 가진 λgt 11 파지 DNA 운반체에 메틸화된 cDNA를 연결시키고, phage extract(Amersham Corp.)로 packaging 시킨 후 cDNA 문고를 만들었다. 한편 순수하게 분리정제된 흰쥐 뇌의 IP₃K (53kDa)에 의해 Balb/c 마우스에서 만들어진 단세포 균 anti-IP₃K antibody를 이용하여 IP₃K를 암호화하는 IP₃KcDNA 유전자 클론을 선별하고 염기서열을 결정하였다.

본 연구에서 IP₃KcDNA 유전자의 클로닝에 사용된 pSP72·Not2의 구조는 Fig. 1과 같다. 이 운반체의 특징은 2.4 kbp 크기의 플라스미드로서 엠피실린 마크가 있고, 다중 클로닝 부위의 Pvu II와 EcoR V 부위가 각각 Not I 제한 부위로 변경 디자인되어 있고, 그 사이에 EcoR I 부위가 들어있다. Agarose gel 상에서 확인된 IP₃KcDNA 유전자의 재조합 특성은 Fig. 2A, 2B와 같다. 흰쥐의 뇌로부터 IP₃K를 암호화하는 IP₃KcDNA는 1.8 kbp의 크기였으며(Fig. 2A, lane 2), EcoR I-inserted pSP72·Not2-IP₃Kc-

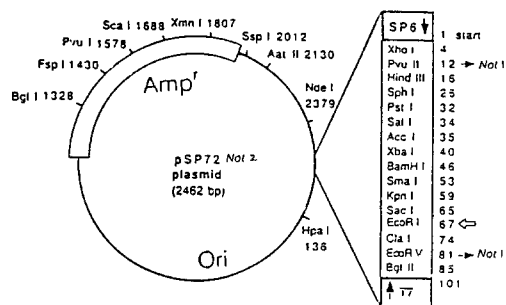


Fig. 1. Structure of pSP72·Not2 vector system.

pSP72·Not2 plasmid(2,462bp) contained both SP6 and T7 transcription promoter sequences, diametrically opposed and separated by the multiple cloning site, respectively. In multiple cloning site, both the Pvu II site at SP6 promoter and EcoR V site at T7 promoter were converted to Not I restriction sites. One EcoR I site is present between two created Not I sites. DNA fragments cloned in pSP72·Not2 can be transcribed with SP6 RNA polymerase or with T7 RNA polymerase.

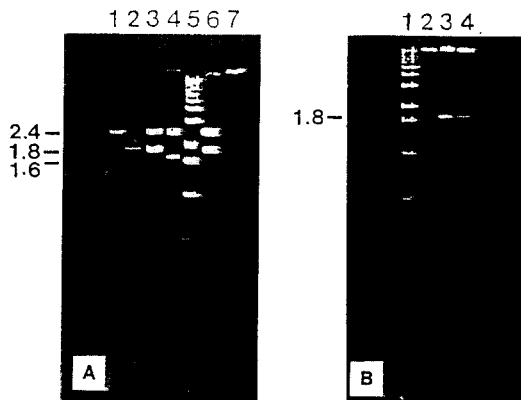


Fig. 2. Agarose gel(1%) electrophoresis of re-stricted-DNA fragments.

- A) Lane 1, pSP72·Not2 plasmid(2.4 kbp).**
Lane 2, IP₃KcDNA(1.8 kbp) cloned from rat brain.
Lane 3, pSP72·Not2-IP₃KcDNA digested with EcoR I.
Lane 4, pSP72·Not2-IP₃KcDNA digested with Not I.
Internal Not I site was cleaved from IP₃KcDNA.
Lane 5, DNA molecular size marker(BRL Co.).
Lane 6, pSP72·Not2-IP₃KcDNA digested with Not I.
Internal Not I site of IP₃KcDNA was destructed.
Lane 7, pZIP·NeoSV(X) vector.
- B) Lane 1, DNA ladder(BRL Co.).**
Lane 2, pZIP·NeoSV(X) vector.
Lane 3, pZIP·NeoSV(X)-IP₃KcDNA digest- ed with Not I.

DNA 플라스미드를 Not I으로 처리한 결과, IP₃KcDNA 내부에는 유전자의 0.2 kbp 근방에 Not I 부위가 존재하는 것이 전기이동법으로 확인되었다(Fig. 2A, lane 4). Dideoxynucleotide chain termination 분석법으로 서열을 찾은 결과, 이 IP₃KcDNA 유전자의 EcoR I 단편속에는 193번째와 197번째 염기 서열 사이에서 Not I 제한부위(GCGGCCGC)가 확인되었다. 따라서 Not I 부위를 제거하기 위하여, IP₃KcDNA의 193번째 염기 G→A 로 디자인하고,

DNA 합성장치로 26 mer의 올리고 DNA를 합성한 다음, 이것을 시발체로하여 우라실이 함유되도록 준비한 M13mp18-IP₃KcDNA의 ss-DNA 주형에 annealing 하고, T₄ DNA polymerase 와 T₄ DNA ligase를 이용하여 이차가닥 cDNA를 합성하였다. *E. coli* DH_{5α} F'에서 형질전환하고, YT 고체배지에서 변이주를 얻은 다음, RF-IP₃KcDNA를 분리하여, 이것을 p-SP72·Not2 플라스미드의 EcoR I 제한부위에 클로닝한 다음, DH5α competent 세포에 형질전환하고 엠펜실린(100 μg/ml)이 함유된 2× YT로 배양하였다.

pSP72·Not2-IP₃KcDNA 플라스미드를 분리하여 Not I으로 처리하고 agarose gel 전기이동한 결과, IP₃KcDNA 내부의 Not I 부위인 GCGGCCGC가 GCAGCCGC로 site-directed mutagenesis가 된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2A, lane 6). 그러나 점 돌연변이된 IP₃KcDNA는 효소활성에 전혀 영향을 주지 않았는데 이와 같은 사실은 이 부위가 효소활성의 조절부위가 아님을 알 수 있었다. 이 IP₃KcDNA를 Not I-digested pZIP·NeoSV(X) 운반체에 서브클론한 결과는 Fig. 2B와 같다. pZIP·NeoSV(X)는 포유동물의 유전자 발현 운반체로 알려져 있으며, 구조와 특징은 Fig. 3과 같다¹⁷⁾.

2. CCL39 hamster lung fibroblasts에서 IP₃KcDNA 유전자의 발현.

Lipofectin 법으로 pZIP·NeoSV(X)-IP₃KcDNA를 transfect 시킨 CCL39(ATCC) 세포는 10% BCS를 함유한 McCoy's 배지에 유지하고, 세포의 선별은 G₄₁₈을 포함한 배지로 수행되었다. G₄₁₈은 상호로 geneticin이라고 하며, aminoglycoside계 항생제인 gentamycin의 성분으로, 분자생물학 연구에서 selective agent로 사용되는데 이것은 세균, 효모, 고등 동식물의 세포, protozoans 및 helminths 등에 아주 유해하다고 알려졌다. 따라서 antibiotic-resistant 세포를 선별하기 위하여 culture media에 첨가하여 사용하게 된다¹⁸⁾. G₄₁₈으로 변이 세포를 선별하였을 때 antibiotic-resistant 클론은 2~3주 후에 나타났으며, IP₃K의 발현 효율은 임무노블랏팅과 효소활성의 측정으로 확인되었다. 대조세포로는 IP₃KcDNA가 없는

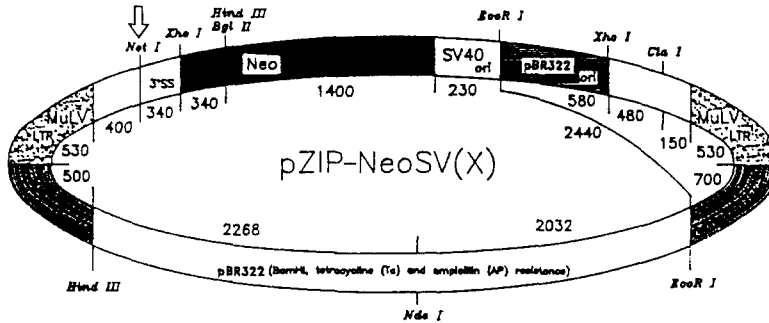


Fig. 3. Structure and component parts of pZIP · NeoSV(X) vector system. pZIP · NeoSV(X) is mammalian expression vector under the control of long terminal repeats(LTR) of moloney murine leukemia virus(MuLV), and this vector contained pBR(Bam HI derivative from Hind III to EcoR I), left LTR to Not I site(originally Bam HI), 3'SS(3' splice site of MuLV from pZIP), Neo(TN₅ gene from pBR · Neo), SV40 ori(EcoR I to Hind III fragment of SV40), pBR ori, and Xho I to the end of the right LTR.

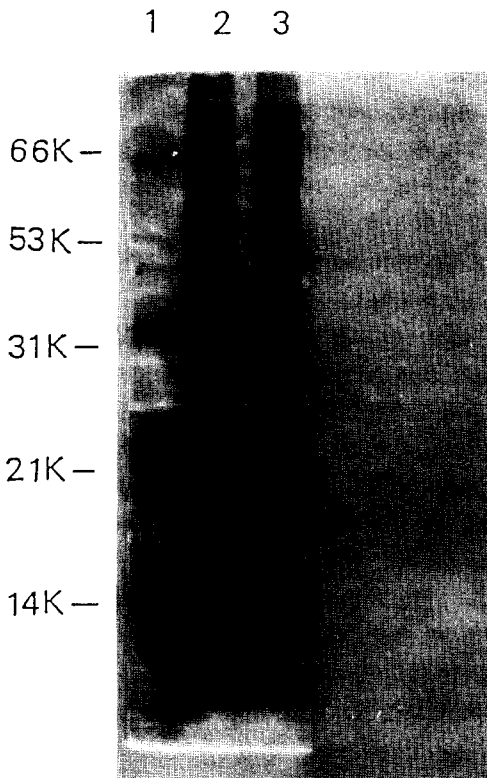


Fig. 4. SDS/PAGE electrophoresis of CCL39 hamster lung fibroblast cells transfected with pZIP · NeoSV(X) vector and pZIP · NeoSV(X) -IP₃KcDNA, respectively.
 Line 1, marker protein (BRL Co.).
 Line 2, pZIP · NeoSV(X).
 Line 3, pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA.

pZIP · NeoSV(X) 운반체가 transfect된 것을 사용하였다.

Fig. 4는 유전자 재조합 IP₃KcDNA가 CCL39 세포내에서 발현되는 수율을 조사하기 위하여, pZIP · NeoSV(X)와 pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA가 각각 transfect된 CCL39 세포의 세포질 분획을 SDS-PAGE한 결과이다. Coomassie brilliant blue의 염색으로 IP₃KcDNA가 삽입된 단백질 띠를 어느정도는 구별이 가능하지만 뚜렷치는 않았다. 이러한 사실은 숙주세포의 단백질 띠와 같은 전장에서 위치이동하기 때문인 것으로 추측된다. 그러나 anti-IP₃K antibody를 사용하여 Western blot한 결과(Fig. 5), CCL39 세포에서 IP₃K는 transcriptional 수준으로 발현이 조절되는 것으로 확인되었고, IP₃KcDNA가 transfect된 모든 클론에서 분자량이 53과 51kDa 보다 약간 큰 띠가 발현 과정에서 관찰되고 있다. 이러한 서로

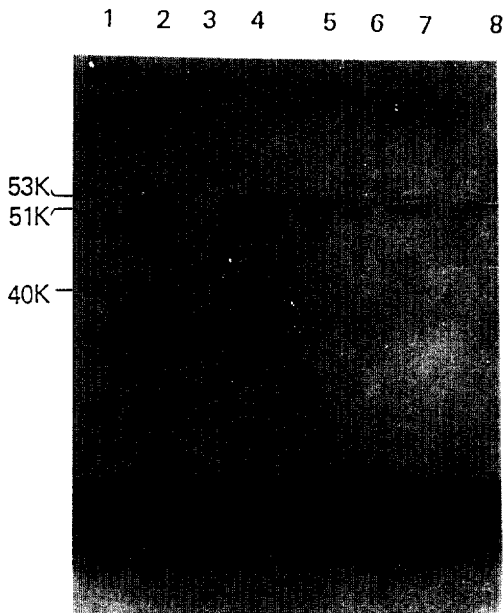


Fig. 5. Immunoblot analysis for expression in CCL39 hamster lung fibroblast cells transfected with pZIP · NeoSV(X) vector and pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA, respectively.
Lane 1, marker protein(BRL Co.).
Lane 2, IP₃K purified from rat brain.
Lane 3, CCL39 cells transfected with pZIP · NeoSV(X).
Lane 4, CCL39 cells transfected with pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA.
Lane 5, 6, 7, 8, post-transcriptional levels during expression in CCL39 cells transfected with pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA.

다른 크기의 띠가 관찰되는 이유는 hamster에서 IP₃K 단백질이 발현될 때 크기에서 차이가 생길 수 있거나, endogeneous 효소의 선택적인 단백질 절단작용으로 전사 후 변형이 다르게 일어나기 때문인 것으로 생각되었다. 효소의 양과 활성도를 대조세포와 비교 측정해 본 결과, CCL39 세포에서 발현된 IP₃K 효소의 양은 대조세포에 비하여 5배 이상 많았고, 효소의 활성도는 무려 16배로서 일반적으로 기대하였던 것

보다 훨씬 발현 효율이 높았다.

최 등에 따르면¹⁶⁾ pZIP · NeoSV(X)-IP₃KcDNA가 transfect된 CCL39 세포에서 thrombin, PDGF, bombesin 등의 agonist로 자극을 받는 동안에 Ins(1,4,5)P₃의 수준이 점차로 감소하면서 Ins(1,4,5)P₃가 Ins(1,3,4,5)P₄로 전환되었으며, 세포질의 Ca²⁺ 농도와 Ca²⁺ · influx 응답이 모두 감소하였다는 것이다. 또한 세포내 Ins(1,3,4,5)P₄ 수준이 Ca²⁺-mobilization, Ca²⁺-entry, Ca²⁺-sequestration을 촉진시킨다는 명확한 증거도 없었다고 하였다. 이러한 결과는 CCL39 세포에서 Ins(1,4,5)P₃는 agonist-induced Ca²⁺-mobilization의 주요한 결정요소가 될지라도, Ins(1,3,4,5)P₄는 Ca²⁺ 대사과정에 크게 기여하지 못하며, IP₃K는 Ca²⁺ -phosphoinositide 신호전달 반응기구에서 negative 조절자로 작용할 가능성이 있다고 하였으며, Ins(1,4,5)P₃와 Ins(1,3,4,5)P₄가 협동적으로 세포내의 Ca²⁺-signal 생성을 조절한다는 종래의 가설과는 다른 결과가 되므로, Ins(1,3,4,5)P₄의 기능에 대한 앞으로의 연구방향이 주목되고 있다.

흰쥐 뇌의 cDNA 문고로부터 IP₃K를 암호화하는 IP₃KcDNA를 선별하고, 결정된 염기서열을 근거로 하여 449개의 아미노산으로 이루어진 단백질(Mw = 49,853)의 이차구조를 컴퓨터로 예측해 본 결과^{13, 14)}, IP₃K는 100% α-helix 구조를 갖을 것으로 판단하였으며, IP₃KcDNA의 일차 아미노산 서열 상에는 여러 염기성 아미노산과 소수성 아미노산들이 일정한 간격을 두고 존재하는데, 이들이 α-helix 형 이차구조를 형성할 때 α-helix의 한쪽에는 염기성 아미노산들이 서로 folding하게 됨으로써 양으로 하전된 영역을 이루고, α-helix의 반대쪽에는 소수성 아미노산들이 모이게 되면 이곳이 calmodulin(CaM)을 인식하는 motif가 되기 때문에 IP₃K가 CaM-binding site에 강하게 결합할 수 있고, 그러므로 IP₃K는 Ca²⁺ /CaM 복합체에 예민하게 되어 효소활성이 증가된다는 것이며, 또한 IP₃KcDNA 유전자에는 Pro, Glu /Asp, Ser /Thr이 많은 소위 “PEST”라는 서열부분을 가지고 있는데, 이 서열에는 주로 Glu /Asp에 의한 음전기가 많고, Ser /Thr은 수소결합을 할 수 있는 아미노산들이며, 인산화 가능성도 많은 부위이므로 “PEST” 서열에는 세포내 Ca²⁺이 쉽게 결합할 수 있어서 부분

적으로 Ca^{2+} 농도를 증가시키고, "PEST" 서열을 가진 대부분의 단백질들은 CaM과 결합하게 되고, 그 결과 Ca^{2+} -의존성 proteases를 활성화시킴으로써 proteases로부터 쉽게 공격을 받을 수 있게 된다는 것이다¹³⁾.

원위의 뇌가 세포분열 및 분화과정을 거쳐서 fetal로부터 adult로 성장하는 동안에 IP_3K 의 활성이 14배나 증가하였고, IP_3K 에 특이성을 갖는 단세포균 항체를 이용한 Western blot 법과 1.8 kbp의 읽는구조 전체를 암호화하는 ^{32}P -labeled IP_3K cDNA를 탐침으로 하여 Northern blot 법으로 mRNA와 단백질의 양을 정량한 결과 이들은 모두 성장단계에서 transcriptional 수준으로 IP_3K 효소가 조절받고 있음이 밝혀졌다^{19, 20)}.

이와 같이 IP_3K cDNA의 분자 클로닝은 아미노산의 서열결정뿐 아니라, 촉매작용에 필요한 영역의 구조, Ca^{2+} /CaM-조절대사 등 생리적인 특이성을 연구하는데 중요한 실마리를 제공하게 되었다.

3. IP_3K 효소의 생화학적 특성

원위의 조직별 IP_3K 의 분포를 조사하기 위하여, 원위를 전신마취시킨 후 PBS를 살포하면서 각종 조직을 해부학적으로 적출하고, 조직 1 g당 2 ml의 homogenization buffer(50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.5 mM PMSF, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 2 μ g/ml leupeptin, and 4 μ g/ml calpain inhibitors)를 넣고, Brinkman polytron을 사용하여 얼음위에서 20초간격으로 조직을 3번 파쇄하고, Beckmann TL-100 초원심분리기로 10⁵ rpm에서 20분간 원심분리하여 시토솔을 분획하였다²⁰⁾.

Lane 당 조직 단백질의 양은 150 μ g으로 통일하여 Laemmli 법으로 slab SDS-PAGE(12% 분리겔 및 6% stacking gel)을 시행하고, 실험 2.2의 2)에서와 같이 임무노블랏팅한 결과는 Fig. 6A, 6B와 같다.

Fig. 6A 중 cerebellum(lane 7)에서는 면역학적으로 서로 다른 3종류의 IP_3K (53, 51 및 40kDa) 단백질 띠가 뚜렷하게 관찰되는데, 40kDa의 띠는 진하게 나타나 있지만, 53kDa의 단백질이 가장 큰 효소활성을 갖는 것으로 밝혀졌다²⁰⁾. Pancrease(lane 6)에서는 58kDa의 smear한 띠만이 관찰되었고, testis(lane

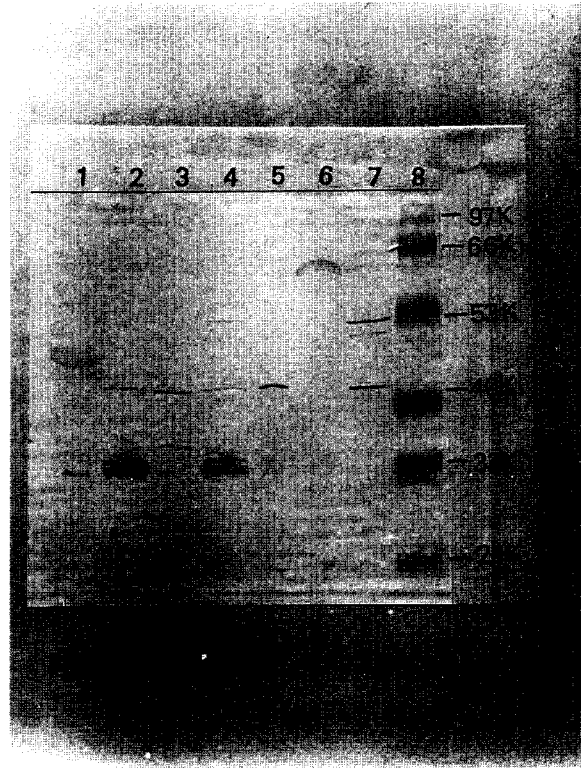


Fig. 6A. IP_3K distribution by the method of immunoblot with monoclonal anti- IP_3K antibody in rat tissues.

Lane 1, skeletal muscle.

Lane 2, uterus.

Lane 3, stomach.

Lane 4, thymus.

Lane 5, testis.

Lane 6, pancreas.

Lane 7, cerebellum.

Lane 8, marker protein(BRL Co.).

5)에서는 유일하게 40kDa의 띠만 보이며, thymus(lane 4)에서는 53과 40kDa의 약한 띠, 33 및 32kDa의 진한 띠가 나타나 있다. Stomach(lane 3)에서는 진하게 관찰되는 40kDa의 띠와, 35kDa의 약한 띠도 보인다. Uterus(lane 2)에서는 40kDa 외에 33 및 32kDa의 진한 띠가 겹쳐 있다. Skeletal muscle(lane 1)에서는 smear한 45kDa의 띠와 32kDa의 띠가 관찰되었다.

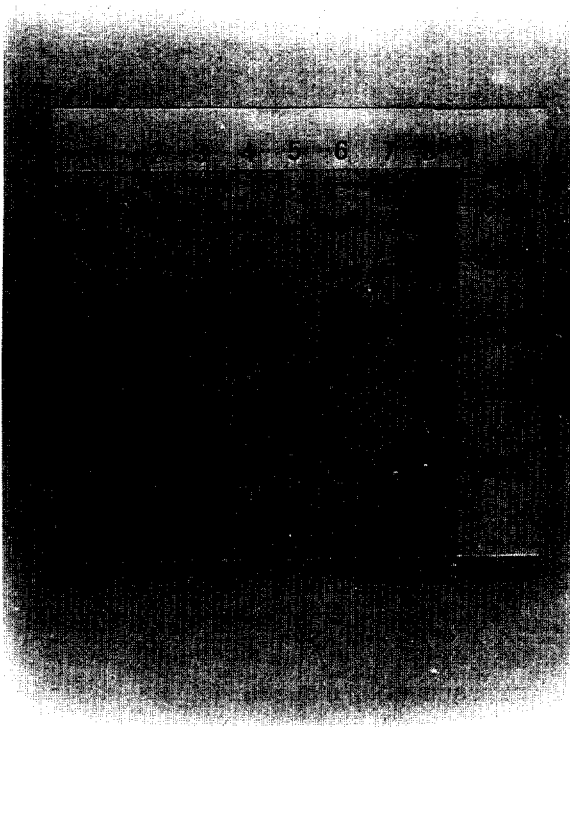


Fig. 6B. IP₃K distribution by the method of immunoblot with monoclonal anti-IP₃K antibody in rat tissues.

Lane 1, spleen.

Lane 2, drosophila.

Lane 3, xenopus oocyte.

Lane 4, heart.

Lane 5, lung.

Lane 6, kidney.

Lane 7, liver.

Lane 8, marker protein(BRL Co.).

Fig. 6B 중 liver(lane 7)에서는 53kDa의 띠 외에도 93kDa과 희미한 58kDa의 띠가 관찰되고 있으며, kidney(lane 6)에서는 53과 40kDa의 띠 외에 93kDa과 58kDa의 띠도 나타나 있으며, lung(lane 5)에서는 판별키 어려운 51kDa의 띠와 32kDa의 진한 띠가 보이고, heart(lane 4)에서는 주된 효소로서 진하고 강한 40kDa의 띠가 다량으로 검출되었으며, 32와 58kDa의 띠도 관찰되었다. Spleen(lane 1)에서는

33kDa의 띠만이 나타나 있고, lacrimal gland에서는 약한 51kDa의 띠와 40kDa의 진한 띠가 관찰되었으며 (not shown data), drosophila(lane 2)에서는 150 μg의 조직 단백질량으로서는 IP₃K가 전혀 확인되지 않았으며, xenopus oocyte (line 3)에서는 42, 45kDa의 띠 외에 93kDa의 띠가 선명하게 관찰되었다.

흰쥐 조직의 특이한 점은 cerebellum에서는 53, 51 및 40kDa의 띠가 주된 효소이고, liver(lane 7)와 kidney(lane 6)에서는 53kDa의 띠 외에도 93kDa의 비 특이적인 단백질 띠가 관찰되었고, skeletal muscle, spleen 및 pancreas에서는 IP₃K에 유의성이 그리 많지 않았으며, 소화기관인 stomach와 생식기관인 testis, uterus에서는 공통적으로 40kDa의 띠가 관찰되는데, 특히 심장조직에서는 53kDa의 효소는 없었고 40kDa의 효소가 다량으로 존재하였다. 아직까지 이들 조직에서 IP₃K의 기능이 무엇인지 전혀 알려진 것이 없는 실정이다.

Lee 등은¹⁰⁾ 흰쥐의 뇌로부터 Matrex green gel, CaM-agarose, TSK gel HA-1000(hydroxyapatite), 및 Mono-S 컬럼의 HPLC를 사용하여 calpain inhibitors의 존재하에서 53kDa의 IP₃K 효소를 16, 100배로 정제하였다. 분리 정제된 53kDa의 IP₃K를 calpain으로 처리하였을 때 생성되는 42~45kDa 범위와 35kDa의 약한 띠들은 53kDa의 것으로부터 유래된 것이라 하였고, 51, 40, 33 및 32kDa의 IP₃K도 효소 활성을 지니지만 CaM은 35kDa보다 큰 단백질에만 결합하고, 33과 32kDa에는 결합되지 않았다는 것이다.

Johanson 등⁸⁾은 흰쥐의 뇌로부터 100,000×g 원심 분리, phosphocellulose, orange-A, CaM-agarose 및 hydroxyapatite를 이용하여 IP₃K를 2,700배 정제하였는데, SDS/PAGE 결과 53kDa의 분자량을 가지며, size exclusion 크로마토그래피 하면 70kDa의 monomeric 분자량을 갖는데, 1.0 μM의 Ca²⁺와 CaM을 가한 후에 size exclusion하면 150~160kDa의 분자량을 갖게 되며, 이것은 IP₃K와 CaM이 이량체의 구조를 형성하기 때문이며, Km 값은 0.21±0.08 μM이고, 적정 pH는 8.5이며, CaM을 가하면 Vmax가 약 2배로 증가하고, Ca²⁺/CaM에 의하여 Ins(1,4,5)P₃에 대한 친화력이 커진다는 것이다.

비슷한 결과로서 Yamaguchi 등은¹²⁾ 돼지의 동맥 평활근에서 분리한 IP₃K를 SDS /PAGE하면 분자량이 93kDa에서 단일 띠가 얻어지고, TSK gel G3000 SW로 g.p.c하면 IP₃K는 84kDa의 monomeric 효소로서 Km값이 0.4 μM, 최적 pH는 5.8~7.7이며, CaM과 1:1로 결합하여 최대의 활성을 나타낸다고 하였다.

Takazawa 등은¹¹⁾ 소의 뇌로부터 CaM-sepharose로 친화성 크로마토그래피하여 IP₃K를 분리 정제하였다. Ca²⁺ /CaM에 의하여 IP₃K의 최대 활성도는 6~7배 이상 높았고, f.p.l.c gel 여과법으로 측정된 분자량은 44kDa이며, SDS /PAGE 하였을 때 분자량이 52, 38 및 35kDa인 단백질이 분리되었으며, 모두 IP₃K의 활성을 지닌다고 하였다.

또한 흰쥐의 뇌로부터 IP₃K의 C-말단을 암호하는 IP₃KcDNA가 클론되었고¹⁴⁾, 임무노스크린하여 분리한 양성 클론을 *E. coli* 속에서 발현시킨 것을 전기이동한 결과, 50kDa의 단백질 띠를 가지고 있으며, 트립신으로 처리하였을 때는 44와 36kDa으로 분해되었는데, 모두 IP₃K의 활성도를 가지며 Ca²⁺ /CaM에 민감하였다고 하였다. 흰쥐 뇌의 IP₃KcDNA로 hybridization 법을 이용하여 사람 뇌의 cDNA 문고도 스크린 되었는데¹⁵⁾, 염기서열중 93% 이상이 흰쥐의 것과 유사하였고, *E. coli*에 발현시킨 것을 SDS /PAGE 하면 분자량이 58~64kDa, 45~50kDa, 37~39kDa인 IP₃K 활성 분획이 얻어진다는 것이다.

여러 조직으로부터 현재까지 연구된 IP₃K의 생화학적 특성을 살펴보면, IP₃K는 Mg²⁺과 ATP-의존적으로 Ins(1,4,5)P₃를 인산화하여 Ins(1,3,4,5)P₄로 전환시키는 cytosolic 효소인데, 두 기질 ATP와 Ins(1,4,5)P₃에 대하여 단순한 Michaelis-Menten 식을 따르며, IP₃K의 유일한 기질은 Ins(1,4,5)P₃이고, cIns(1:2,4,5)P₃는 인산화시키지 못하며, Ins(4,5)P₂와 glycerophosphoinositol-4, 5-bisphosphate의 인산화 속도는 매우 늦다는 것이며, 또한 CTP, GTP, γ-thioATP는 ATP만큼 인산기가 전환되지 않는다고 알려졌다⁹⁾. IP₃K는 Ins(1,4,5)P₃에 대하여 0.2~1.5 μM 범위의 낮은 Km 값을 가지며, 이것은 Ins(1,4,5)P₃로부터 5-phosphatase와는 경쟁적으로 작용하게 되는데, IP₃K에 비하여 5-phosphatase는 7~25 μM

정도의 높은 Km 값을 갖는다¹⁾. 이와 같이 Ins(1,4,5)P₃가 인산화 또는 탈인산화되는 과정은 세포질내의 Ca²⁺농도에 따라 조절되는데, Ca²⁺농도가 생리적인 농도(0.1 μM)로 낮은 경우에는 5-phosphatase와 IP₃K의 효소 활성이 서로 비슷하지만, 세포가 자극을 받아서 Ca²⁺ 농도가 상승되면 phosphatase보다 IP₃K의 활성이 몇 배나 높아지기 때문에, Ins(1,4,5)P₃에서 Ins(1,3,4,5)P₄를 생성하는 쪽으로 반응이 진행된다는 것이다. 그러나 Ca²⁺ 농도가 생리적인 조건의 범위를 넘으면 IP₃K의 활성은 40%정도로 감소한다는 것이다⁹⁾. 뇌 조직으로부터 분리한 대부분의 IP₃K는 SDS /PAGE하면 32~53kDa 범위의 분자량을 가지며, calpain에 민감한 효소로서, CaM 존재하에 Ca²⁺의 농도가 0.2~1.0 μM 농도에서 활성화되는 Ca²⁺ /CaM-민감성 효소이고, IP₃K는 cAMP-의존성 protein kinase(PKA), Ca²⁺ /phospholipid-의존성 protein kinase(PKC), oncogene의 대사 산물, CaM-의존성 protein kinase에 의해서 인산화되면 효소활성이 영향을 받게 된다^{1, 21)}.

c-src 단백질은 세포의 형질막 내면에 유착 분포된 6.0kDa의 인산단백질(pp60)로서 N-말단기는 형질막의 지방산과 결합되어 있으나, 형질전환된 v-src pp60의 N-말단기는 돌연변이에 의하여 지방산과의 결합이 불가능하다. 따라서 변이성 src 단백질은 그 자체에 인산지방질-kinase의 활성을 가지고 있어서 PI→PIP→PIP₂ 경로를 활성화 하고, 결과적으로 세포분열을 향진시킬 수 있다고 하는데, 실제로 v-src 형질전환된 rat-1 세포에서 v-src oncogene에 의해서 발현되는 tyrosin kinase pp60^{v-src}는 IP₃K를 인산화시키므로써 Ins(1,3,4,5)P₄의 양이 5~7배 증가하였고, 효소활성도 6~8배 증가되었다는 것이다²²⁾.

간장세포에서는 IP₃K가 PKA와 PKC에 의해서 효소활성이 증가되는 반면에, 분리 정제된 IP₃K는 *in vitro* 실험에서 PKA에 의해서 인산화되면 효소활성이 1.8배 증가되지만, PKC에 의해서는 효소활성이 1/4로 억제 조절된다는 것이다²³⁾. 또한 PKA에 의한 IP₃K의 인산화 부위는 Ser 109이고, PKC에 의한 인산화 부위는 Ser 109와 Ser 175를 포함해서 여러 부위에 인산화될 수 있다는 것이다. PKC의 활성제인 TPA나 cAMP는 간장세포, intact 혈소판, 인슐린-분비 RIN

m5F 세포, T-세포에서 IP₃K를 활성화시키는데, IP₃K에 의해서 생성된 Ins(1,3,4,5)P₄는 Ins(1,4,5)P₃의 Ca²⁺-mobilizing 기능을 촉진하고, Ins(1,4,5)P₃의 탈인산화를 억제함으로써 Ca²⁺-signal 생성을 증진시키는 등, 세포내 Ca²⁺ 항상성을 조절하기 위해서는 Ins(1,4,5)P₃와 Ins(1,3,4,5)P₄가 협동적으로 작용한다는 것이다^{7, 21)}. 그러나 pZIP·NeoSV(X)-IP₃KcDNA가 transfect된 CCL39 hamster lung fibroblasts 세포에서는 Ins(1,3,4,5)P₄가 세포내 Ca²⁺-signal 생성에 아무런 기여를 하지 못한다는 결과가 발표됨으로써¹⁶⁾ 이에 대한 새로운 연구방향이 설정되는 계기가 될지도 모른다.

요 약

흰쥐의 뇌로부터 읽는구조 전체를 포함하는 1.8 kbp 크기인 IP₃K를 암호화 하는 IP₃KcDNA 유전자 속의 Not I 부위 GCGGCCGC를 GCAGCCGC로 site-directed mutagenesis 하여 얻은 변이 IP₃KcDNA를 pSP72·Not2 운반체의 EcoR I 부위에 클로닝하여 증폭시키고, 유전자 재조합 과정을 거쳐서 포유동물의 발현 운반체인 pZIP·NeoSV(X)의 Not I 부위에 IP₃KcDNA를 서브클론하였다. 이것을 CCL39 hamster lung fibroblasts 세포에 transfection 하여 발현시키고, anti-IP₃K antibody를 사용하여 Western blot 법으로 효소량과 활성도를 각각 측정 한 결과, 효소량은 5배, 효소의 활성도는 부려 16배로서 기대하였던 것보다 훨씬 발현효율이 높았다. 또한 흰쥐의 각 조직속에 IP₃K의 분포와 생화학적 특성이 논의되었다.

참고문헌

1. Majerus, P. W. : Inositol phosphate biochemistry, *Ann. Rev. Biochem.* **61**, 225(1992).
2. Rhee, S. G., Suh, P. G., Ryu, S. H., and Lee, S. Y. : Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C, *Science*, **244**, 540(1989).
3. Meisenhelder, J., Suh, P. G., Rhee, S. G.

- and Hunter, T. : Phospholipase C- γ is a substrate for the PDGF and EGF receptor protein-tyrosine kinases *in vivo* and *in vitro*, *Cell*, **57**, 1109(1989).
4. Cockcroft, S. and Stutchfield, J. : G-protein-, the inositol lipid signalling pathway, and secretion, *Phil. Trans. Roy. Soc. (Lond.) B* **320**, 247(1988).
5. Kim, U-H., Kim, J. W., and Rhee, S. G. : phosphorylation of phospholipase C- γ by cAMP-dependent protein kinase, *J. Biol. Chem.* **264**, 20167(1989).
6. Ryu, S. H., Kim, U-H., Wahl, M. I., Brown, A. B., Carpenter, G., Huang, K-P., and Rhee, S. G. : Feedback regulation of phospholipase C- β by protein kinase C, *J. Biol. Chem.* **265**, 17941(1990).
7. Berridge, M. J., and Irvine, R. F. : Inositol phosphates and cell signalling, *Nature*, **341**, 197(1989).
8. 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).
9. Moris, A. J., Murray, K. J., England, P. J., Downes, C. P., and Michell, R. H., : Partial purification and some properties of rat brain inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase, *Biochem. J.* **251**, 157(1988).
10. 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).
11. Takazawa, K., Passareiro, H., Dumont, J. E., and Erneux, C. : Purification of bovine brain inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase, *Biochem. J.* **261**, 483(1989).
12. Yamaguchi, K., Hirata, M., and Kuriyama, M. : Purification and characterization of in-

- ositol 1, 4, 5-triphosphate 3-kinase from pig aortic smooth muscle, *Biochem. J.* **251**, 129 (1988).
13. Choi, K. Y., Kim, H. K., Lee, S. Y., Moon, K. H., 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).
 14. Takazawa, K., Vandekerckhove, J., Dumont, J. E., Erneux, C. : Cloning and expression in *Escherichia coli* of a rat brain cDNA encoding a Ca^{2+} /calmodulin-sensitive inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase, *Biochem. J.* **272**, 107 (1990).
 15. 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).
 16. Balla, T., Sim, S. S., Iida, T., Choi, K. Y., Catt, K. J., and Rhee, S. G. : Agonist-induced calcium signalling is impaired in fibroblasts overproducing inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate, *J. Biol. Chem.* **266**, 24719(1991).
 17. Cepko, C. L., Roberts, B. E., and Mulligan, R. C. : Construction and applications of a highly transmissible murine retrovirus shuttle vector, *Cell*, **37**, 1053(1984).
 18. Southern, P. J., and Berg, P. : Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter, *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 327(1982).
 19. Kim, J. W., Choi, K. Y., and Rhee, S. G. : Developmental changes of $Ins(1,4,5)P_3$ 3-kinase and mRNA in rat brain, *Kor. Biochem. J.* **24**, 472(1991).
 20. Kim, J. W., and Rhee, S. G. : Immunological characterization of inositol(1,4,5) triphosphate 3-kinase in rat tissues, *Kor. J. Food & Nutr.* **6**, 37(1993).
 21. Shears, S. B. : Metabolism of the inositol phosphates produced upon receptor activation, *Biochem. J.* **260**, 313(1989).
 22. Johnson, R. M., Wasilenko, W. J., Mattingly, R. R., Weber, M. J., and Garrison, J. C. : Fibroblasts transformed with v-src show enhanced formation of an inositol tetrakisphosphate, *Science*, **246**, 121(1989).
 23. 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).
-
- (1996년 5월 8일 수리)