

핵 내에서 분리한 Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase의 Transcription Factor에 대한 인산화

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

김윤석 · 김소영 · 김태우[†]

국문초록: 모든 진핵세포에 존재하며 세포의 성장 및 분화에 주로 관계되는 신호전달물질의 하나인 Mitogen-activated protein(MAP) kinase의 mitogen에 의한 핵내 활성화와 기질 인산화에 대해 알아보기 위해 본 실험을 수행하였다. P388 세포를 10% fetal bovine serum이 첨가된 DMEM 배지에 배양한 후, 혈청이 들어있지 않은 배지에서 24시간 더 배양하고 serum 및 PMA를 농도별로 처리하여 세포성장을 위한 최적농도를 확인한 결과 serum은 5-20% 농도에서 세포성장을 촉진시켰고 PMA는 실험한 모든 농도에서 세포성장을 거의 촉진시키지 못하는 경향을 확인하였다. 이어 P388 세포를 serum 및 PMA로 10 분간 활성화하여 파쇄한 후 세포질분획과 핵분획으로 분리하여 각 분획을 10% gel상에서 전기영동 하여 nitrocellulose paper에 옮긴 후 anti-ERK1 antibody를 이용해 확인해본 결과 serum, PMA로 처리된 세포 모두에서 MAP kinase의 핵내 이동이 관찰되었으며 특히 세포질 내에 주로 존재하는 42, 44 Kd의 MAP kinase isoform중 42 Kd의 isoform이 주로 핵내로 이동되는 것이 관찰되었다. MAP kinase의 기질인산화실험을 위해 serum으로 활성화시킨 세포를 파쇄하여 SP-sephadex C-50, Phenyl superose, Mono Q column의 순서로 chromatography를 시행하여 MAP kinase를 부분분리하였다. 이와 같이 얻은 MAP kinase를 가지고 면역 T 세포에 존재하는 tyrosine kinase인 p56^{lck}의 N-terminal peptide로 구성된 GST-fusion protein에 대한 인산화를 확인하였다. 또한 세포에서 분리한 MAP kinase를 가지고 transcription factor의 하나인 c-Jun protein에 대한 인산화실험을 실시한 결과 MAP kinase에 의해 인산화 됨이 확인되었다. 이상의 결과를 통해 P388 세포는 (1)세포 성장시 외부 신호를 G-protein-coupled receptor/protein kinase C/MAP kinase의 경로보다는 주로 tyrosine kinase receptor protein/Ras/MAP kinase의 경로를 이용하여 핵으로 전달하는 것으로 추측되며 (2) mitogen의 처리로 활성화된 MAP kinase중 주로 42 Kd isoform이 핵내로 이동하고, 분리한 MAP kinase가 GST-fusion protein과 transcription factor인 c-Jun을 모두 인산화 시키는 결과로 보아 MAP kinase의 isoform에 따라 표적 compartment가 다르고 결과적으로 표적 기질에 차이가 있을지 모른다고 간접적으로 추론할 수 있다.

서 론

Mitogen-Activated Protein(MAP) Kinase는 세포가 cytokine⁹⁾, growth factor, hormone^{19,33,39)}, mitogen 등 외부 신호전달물질의 자극으로 성장, 분화되

는 과정에 관련된²⁵⁾ 세포내 신호전달체계의 중간 매개체로^{15,30)} ERK(extracellular-signal regulated kinase)로 명명되기도 하는⁷⁾ protein kinase이다. MAP kinase는 모든 진핵세포에 존재하는 것으로 알려져 있으며 진화의 측면에서 볼 때 그 보존성이 매우 높은 것으로 보아 세포생명 유지에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있다. 보고에 의하면 MAP kinase가 심장에 존재하는 cardiocyte를 mechanical stress로 자극할 경우 활성화되고²²⁾ mouse oocyte에서 germinal vesicle breakdown 유발 시에도 활성화되며¹²⁾ bovine tracheal

* 논문접수 1996년 9월 12일, 수정재접수 1996년 11월 8일.

* 이 논문은 1995년도 연세대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어졌음.

[†] 별책요청 저자

myocyte가 과산화수소에 의해 자극될 때 활성화되고²⁾ B16 melanoma 세포의 melanin합성에도 관여¹⁶⁾ 하는 등 세포의 성장 및 분화 이외에도 세포의 종류에 따라 다양한 세포내 활동에 관여하는 것으로 알려져 있다. MAP Kinase는 각각의 종(species)에 따라 여러 종류의 isoform이 보고되었는데 그중 42 Kd(ERK2), 44 Kd(ERK1), 54 Kd, 62-3 Kd(ERK3)등의 isoform이 잘 알려져 있다. 이러한 각각의 isoform들이 활성화 시에 이동하는 compartment가 다르다는 사실이 일부 보고되어지고 있는데 COS-7 세포에서 serum처리시 MAP kinase의 40 Kd, 41 Kd의 isoform이 핵내로 이동되며 그중 41 Kd의 isoform만이 핵 이외에도 세포의 ruffling membrane으로 이동된다는 사실이 알려져 있다¹⁸⁾. MAP Kinase의 활성도를 조절하는 인자는 MAP kinase를 인산화시키는 상위 기전의 MAP kinase kinase와 같은 protein kinase들과 인산화된 MAP kinase를 탈 인산화 시키는 CL100(Thr/Tyr) MAP kinase phosphatase(human homologue of mouse MKP1)⁸⁾, HVH2 phosphatase²⁰⁾, PAC1 phosphatase³⁰⁾등과 같은 phosphatase들로 구성되는데 이 두 인자의 조화된 조절에 의해 MAP kinase의 활성도가 조절되며 그 결과 다양한 세포반응이 일어난다. MAP Kinase의 상위, 하위 기전에 대한 연구가 계속적으로 이루어져 왔는데^{6,9,42)} G protein-coupled receptor, tyrosine kinase receptor가 p21 Ras, protein kinase C, 또는 PI3-kinase⁴¹⁾, STE 11 protein kinase등을 인산화 시키고 이것이 Raf1/MAP kinase kinase kinase, c-Mos³¹⁾를 인산화 시키고 다시 Raf1/ MAP kinase kinase kinase가 MAP kinase kinase를 인산화 시킨 후²³⁾, 이 MAP kinase kinase가 MAP kinase의 tyrosine기와 threonine기를 인산화 시킴으로써²⁸⁾, MAP kinase의 자가 인산화(autophosphorylation)와^{21,36)} 함께 MAP kinase가 활성화 되는 것으로 보고되어 있다. 이와 같이 활성화된 MAP kinase는 ribosomal S6 kinase(p90 RSK)³⁸⁾, MAP kinase-activated protein kinase 2 (MAP-KAP2)등의 다른 protein kinase, epidermal growth factor등의 receptor protein, neurofilament와 같은 structural protein, c-Jun³²⁾, c-Fos^{10,29)}, c-Myc³⁷⁾등과 같은 transcriptional factor^{5,17,27)}등을 인산화 시키는 것으로 알려져 있어, MAP kinase의 기질이 세포의 여러 compartment에 다양하게 분포되어 있는 것을 알 수 있다. 이중 transcriptional factor의 인산화는 early gene expression

에 영향을 주어 세포 주기중 G₀ phase에 정체(arresting)되어 있던 세포를 G₁ phase로 이동시킴으로써 세포분열을 야기시키고, 결과적으로 세포의 성장 및 분화에 영향을 주며 이를 위해서는 MAP kinase가 어느 정도 지속적으로 활성화상태로 유지되어야 한다는 것이 알려져^{6,24)} 그에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. serum과 같이 MAP kinase를 지속적으로 활성화시켜 세포분열을 야기하는 mitogen들이 많이 연구되는데 그 중 하나인 PMA에 대해서는 각기 다른 결과가 보고되어지고 있다. 어떤 보고에서는 PMA가 hamster fibroblast의 MAP kinase를 지속적으로 활성화시키지 못해 G₀ phase에서 G₁ phase로의 세포주기 이동을 유발할 수 없다고 보고하고 있는 반면²⁴⁾ 다른 보고에서는 PMA가 serum과 마찬가지로 HeLa세포의 MAP kinase를 지속적으로 활성화시켜 세포분열을 유발한다고 보고되어지고 있다¹¹⁾. MAP kinase는 외부의 자극이 없는 상태에서 세포종류에 따라 세포질과 핵에 모두 존재하는 경우와^{11,37)} 세포질에만 존재하는 경우가⁸⁾ 각기 보고되고 있는데 growth factor, mitogen등의 외부 신호전달물질의 자극에 의해 어느 세포나 MAP kinase가 세포질에서 활성화 되어 핵으로 이동(translocation)^{6,11,18,39)}하며 그 이동은 MAP kinase의 활성화에 의존하는 것으로 MAP kinase의 kinase activity유무에는 영향을 받지 않는 사실이 보고되고 있으며¹⁸⁾ 일정시간 경과 후 탈 인산화 되어 세포질로 다시 이동되는 것으로 알려져 있다. 또한 MAP kinase의 활성도를 조절하는 인자중의 하나인 phosphatase가 주로 핵내에 존재하며 MAP kinase의 탈인산화 작용범위가 핵내로 한정되어 있다는 사실이 알려져지고 있다²⁰⁾. 또한 MAP kinase의 활성화 정도와 기간에 따라 그 작용결과가 다르다는 사실이 보고되고 있는데 PC12 세포에서 nerve growth factor에 의해 MAP kinase가 지속적 활성화 시에는 세포의 성장을, epidermal growth factor에 의해 일시적으로 짧은 활성화 시에는 세포의 분화를, insulin에 의해 일시적으로 짧은 활성화 시에는 glucose나 lipid 대사반응을 유발한다는 사실이 보고된 바도 있다^{14,40)} 위의 보고된 바를 종합해볼때 MAP kinase의 작용기전에서 isoform에 따른 그 표적 compartment가 다르고 결과적으로 표적기질이 다를지도 모른다는 추론과 MAP kinase의 다양한 세포내 역할을 설명하기 위해서는 세포내 존재하는 각각의 isoform과

활성 시에 특정 compartment로 이동되는 MAP kinase의 활성화 양상을 알아보고 궁극적으로 각각의 isoform을 각각 분리하여 그 기질 특이도에 대해서 연구하는 것이 바람직한 것으로 생각된다. 본 실험에서는 P388 세포성장제에 대한 serum과 PMA의 작용을 확인하고 serum 및 PMA 처리로 활성화된 P388 murine leukemia 세포에서 세포질과 핵을 분리하여 세포질에서 핵으로의 MAP kinase 이동여부를 확인하였다. 세포질에 주로 존재하는 isoform과 핵으로 이동되는 isoform을 관찰함으로써 isoform에 따른 이동 compartment차이가 있는지 확인하기 위하여 세포에 존재하는 MAP kinase를 chromatography로 부분 분리하여 핵내에 존재하는 transcription factor의 하나인 c-Jun protein과 면역 T세포의 tyrosine kinase인 p56^{lck} N-terminal peptide로 구성된 GST-fusion protein에 대한 인산화를 연구함으로써 MAP kinase가 세포내 각기 다른 compartment에 존재하는 다양한 기질을 인산화하는 것을 확인할 수 있었다.

재료 및 방법

1. 세포배양 및 mitogen처리

Murine leukemia cell인 P388 cell을 10% 혈청이 포함된 DMEM 배지를 사용해 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양했으며 mitogen을 처리하기 전에 혈청이 포함되지 않은 DMEM 배지에 24시간동안 배양한 후 serum은 10%, PMA는 100 ng/ml의 농도로 각각 10분간 처리하여 활성화 시켰다.

2. 세포 성장을 측정

96 well microplate에 serum 및 PMA를 DMEM 배지로 two-fold dilution하여 50 ul씩 넣고 농도를 1×10⁵ cells/ml로 맞춘 세포부유액을 각 well에 50 ul씩 첨가하여 48시간동안 37°C, 5% CO₂ 항온항습기에 배양한 후 각 well에 20 ul의 MTS/PMS 용액을 첨가하여 1시간 동안 배양 후 490 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

3. 세포 파쇄액 준비 및 핵분리

Crude extract를 얻기 위해 mitogen처리로 활성화된 세포를 350×g, 10분 원심분리 후 배지를 제거하고 STE용액(150 mM NaCl, 1mM EDTA, 50 mM Tris/Cl, pH 7.2)으로 2회 세척한 후 extraction 완충액(20 mM Tris/Cl pH 7.5, 5 mM

EGTA, 0.5% tritonX-100, 50 mM β-glycerophosphate, 1 mM PMSF, 6 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate)을 세포 5×10⁶당 1ml씩 첨가하여 얼음에 30분 방치한 뒤 12,000×g, 15분 원심분리하여 상층액을 모았다. 핵분리는 다음과 같이 실시하였다. 반응을 정지시킨 세포를 350×g, 10분 원심분리 후 배지를 제거하고 STE 용액으로 2회 세척한 후 세포 5×10⁶당 500 ul의 hypotonic lysis solution I(1 mM EGTA, 1 mM EDTA, 10 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, 40 ug PMSF per ml, and 10 ug of both pepstatin and leupeptin per ml, pH 7.2)를 첨가하여 얼음 위에서 30분 방치 후 dounce-homogenizer로 파쇄하였다. 파쇄한 세포액을 1 M sucrose를 첨가한 hypotonic lysis solution I 1 ml에 loading하여 1,600×g, 10분 원심분리하여 상층액 400 ul을 취하여 이것을 12,000×g, 15분 원심분리하여 상층액을 취해 세포질분획으로 사용했고, 나머지 상층액을 제거한 후 pellet을 다시 1 M sucrose가 첨가된 hypotonic lysis solution I 1 ml로 재부유 시킨 후 1,600×g, 10분 원심분리하여 상층액을 제거하고 pellet에 hypotonic lysis solution II (hypotonic lysis solution I + 0.5% Igepal CA-630, 0.1% deoxycholate, 0.1% Brij-35) 300 ul을 첨가하여 얼음 위에서 30분 방치 후 이것을 12,000×g, 30분 원심분리하여 상층액을 취해 핵분획을 얻었다. 모든 과정은 4°C로 진행하였으며 핵의 분리도는 세포질내 효소인 LDH를 측정함으로써 확인하였다.

4. western blotting

4.1 colorimetric substrate를 이용한 방법

전기영동이 끝난 gel을 transfer 완충액 (25 mM Tris/Cl, 192 mM glycine, 20% methanol)에 넣어 30분간 방치하여 평형을 이룬 후 transfer 완충액 내에서 500 mA로 1시간 30분 동안 진행시켜 nitrocellulose paper에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 nitrocellulose paper는 TBST (10 mM Tris/Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.15% Tween-20)로 10분간 3회 세척하고 blocking 용액 (TBST + 2% BSA)으로 37°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBST로 10분간 3회 세척하고 blocking용액으로 1:1,000 배로 희석한 anti-ERK1 항체를 첨가한 후 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이것을 TBST용액

으로 10분간 3회 세척하고 biotin이 부착된 anti-rabbit IgG 항체를 1:10,000의 농도가 되게 blocking용액으로 희석한 후 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 TBST로 5분간 3회 세척하고 alkaline phosphatase가 결합된 streptoavidin을 blocking 용액으로 1:10,000 희석하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 기질로 NBT와 BCIP를 사용하여 10분간 빛을 차단하여 반응시켰다.

4.2 Chemiluminescent substrate를 이용한 방법

전기영동한 gel의 단백질을 colorimetric substrate를 이용한 앞의 방법과 동일하게 nitrocellulose paper에 옮긴 후 TBST로 5분간 3회 세척하고 blocking용액으로 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 blocking용액으로 anti-phosphoserine 단일항체와 anti-phosphothreonine 단일항체를 1:500으로 희석하여 첨가한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이것을 TBST로 5분간 3회 세척하여 biotin이 부착된 anti-IgG항체를 1:10,000의 농도가 되게 blocking용액으로 희석한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 TBST용액에 5분간 3회 세척하고 alkaline phosphatase가 부착된 streptoavidin을 blocking용액으로 1:10,000 희석하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 nitrocellulose paper는 TBST용액으로 5분간 3회 세척하고 이어 assay용액 (0.1 M diethanolamine, 1 mM MgCl₂)로 5분간 2회 세척한 후 chemiluminescence기질액인 CSPD로 10분간 반응시켰다. 반응 후에 nitrocellulose paper를 X-ray film에 1시간 동안 노출시킨 후 암실에서 현상하였다.

5. 인산화 측정.

5.1 c-Jun protein을 기질로한 인산화 측정

c-Jun protein(Promega) 5 µl에 kinase reaction 완충액 (25 mM Tris/Cl pH 7.4, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 40 µM ATP, 0.5 mM EGTA) 10 µl를 혼합하고 여기에 chromatography¹⁾로 분리한 MAP kinase 10µl를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응시켰다. 반응의 종료는 sample loading완충액을 넣어 실시하였고 곧이어 전기영동과 western blotting을 실시한 후 anti-phosphoserine 단일항체를 이용하여 인산화를 확인하였다.

5.2 GST-fusion protein을 기질로한 인산화 측정 이전의 방법²⁾으로 발현된 GST-fusion protein 40

µl를 취해 kinase reaction 완충액 10 µl를 첨가하여 25℃에서 10분간 반응시켰다. 반응의 종료는 sample loading 완충액을 넣어 실시하였고 곧이어 전기영동과 western blotting을 실시한 후 anti-phosphoserine 단일 항체를 이용하여 p56^{lck} N-terminal의 인산화를 확인하였다.

결 과

Mitogen 처리 농도에 따른 세포 성장률

Mitogen인 serum과 PMA의 처리 농도에 따른 세포 성장률을 측정하여 차후 세포 활성화를 위한 최적 mitogen 처리농도를 알아보기 위하여 실시하였다. 96 well plate에 serum은 40% 부터, PMA는 100 ng/ml, 1,000 pg/ml의 농도로부터 two-fold dilution을 실시하여 방법에서와 같이 진행 후 CellTiter 96TM Aquasol Non-Radioactive proliferation assay kit를 이용하여 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다(figure 1).

그림에서 보는 바와 같이 P388 세포는 serum은 5-20%의 농도에서 높은 성장률을 보였으며 40% 농도에서는 오히려 성장률이 떨어지는 것을 확인하였다. 반면 PMA는 실험에 사용한 어느 농도에서도 세포성장을 야기시키지 못하는 경향을 확인하였다.

핵분리 및 mitogen처리에 따른 MAP kinase의 핵내이동

Mitogen처리 후 MAP kinase의 핵내이동의 관찰을 위해 serum 및 PMA를 10분간 처리하여 활성화된 세포를 STE 완충액으로 세척하고 hypotonic lysis solution I에 방치한 후 dounce-homogenizer로 파쇄하여 1 M sucrose가 포함된 hypotonic lysis solution I의 상층액을 세포질 분획으로 사용하고 pellet을 hypotonic lysis solution II에 방치한 후 원심분리하여 그 상층액을 핵분획으로 사용하였다. 분획의 순수도를 확인하기 위하여 세포질내 효소인 LDH의 활성도를 측정하여 핵분획에서 측정된 효소활성도가 세포질분획에서 측정된 효소 활성도의 35%이하인 분획만 다음 실험에 사용하였다. 위와같이 분리된 각 분획을 nitrocellulose paper에 이동시킨 후 MAPkinase에 대해 특이도가 있는 anti-ERK1 antibody를 사용하여 MAP kinase의 핵내이동을 관찰해본 결과 figure 2에서 나타나듯이 serum과 PMA로 처리된

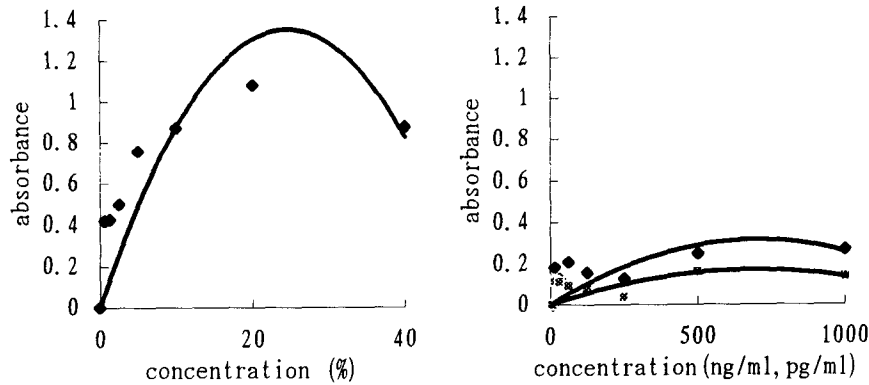
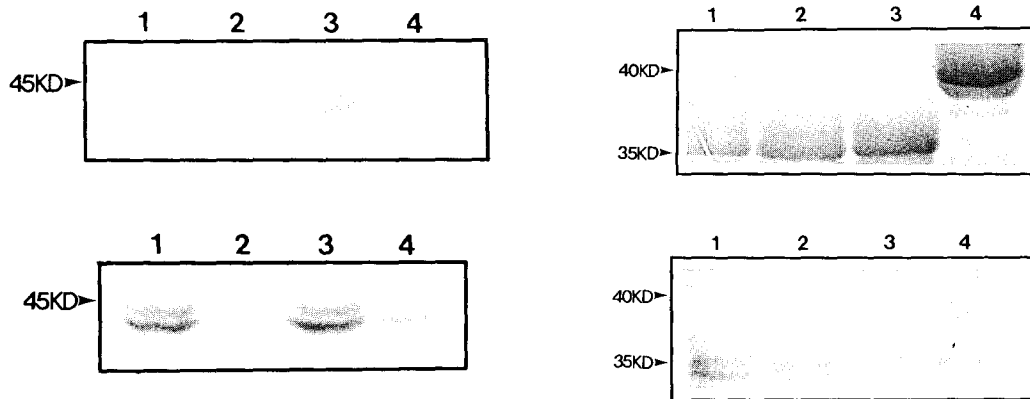


Fig. 1. Proliferation rates of P388 cells in response to various concentration of serum and PMA. Left: proliferation rates of P388 cells in response to 0-40% concentration of serum Right: proliferation rates of P388 cells in response to 0-1000ng/ml(◆), 0-1000pg/ml(■) concentration of PMA.



lane 1 : cytosol fraction
lane 2 : nuclear fraction
lane 3 : cytosol fraction
lane 4 : nuclear fraction

Fig. 2. Immunoblot analysis of MAP kinase treated with serum or PMA in cytosol and nuclear fraction, Top: serum free(1,2 lane) or serum treatment (3,4 lane), Bottom: PMA free (1,2 lane) or PMA treatment (3,4 lane)

Top : SDS-PAGE of the expressed GST-fusion protein
Bottom : Immunoblot using anti-phosphoserine antibody

lane 1 : wild type 1-77 peptide of p56^{lck} N-terminal
lane 2 : mutant(S42A) 1-77 peptide of p56^{lck} N-terminal
lane 3 : mutant(S59A) 1-77 peptide of p56^{lck} N-terminal
lane 4 : mutant(S42A) 1-123 peptide of p56^{lck} N-terminal

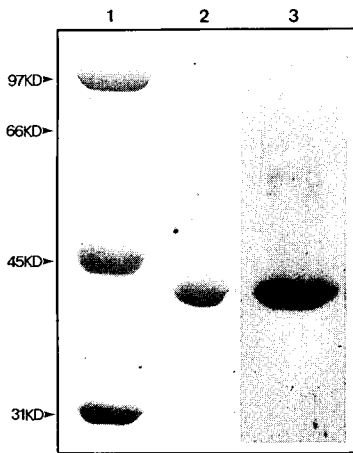
Fig. 3. Immunoblot analysis of phosphorylated GST-fusion protein using anti-phosphoserine antibody.

세포모두에서 핵내로의 MAP kinase 이동이 관찰되었다. 또한 세포질에서 주로 관찰된 isoform이 42 Kd, 44 Kd의 것인데 비하여 핵내로 이동된 것은 주로 42 Kd의 isoform이 주된 것이 관찰되었다.

GST-fusion protein의 인산화 측정

GST-fusion protein을 coding하는 DNA를 집어넣은 pGEX-3Xb plasmid vector가 형질전환된 E. coli DH5a를 배양해 IPTG로 단백질 발현을 유도한 후 세균을 깨뜨려 원심분리하여 그 상층액을 취해

glutathione sepharose 4B로 GST-fusion protein만을 분리해 그 발현을 확인하였다(figure 3). 확인된 GST-fusion protein을 kinase reaction 완충액과 chromatography로 부분 분리한 MAP kinase를 가지고 incubation시킨 후 nitrocellulose paper로 옮겨 인산화된 serine에 특이도가 있는 anti-phosphoserine antibody로 확인해 본 결과 figure 3에서 나타나는 것과 같이 인산화가 된 것이 확인되었다.



lane 1 : standard marker
 lane 2 : c-Jun protein stained with coomassie blue R-250
 lane 3 : c-Jun protein immunoblotted with anti-phosphoserine Ab

Fig. 4. Immunoblot analysis of phosphorylated c-Jun using anti-phosphoserine antibody.

c-Jun protein의 인산화

c-Jun 용액에 kinase reaction 완충액, 분리한 MAP kinase를 첨가하여 반응시킨 후 nitrocellulose paper에 옮겨 anti-phosphoserine 단일 항체를 이용하여 그 인산화를 확인해 본 결과 figure 4에서 나타나듯이 MAP kinase에 의해서 c-Jun protein이 인산화 되는 것을 확인하였다. c-Jun protein이 제대로 인산화되었는지 확인하기 위해 표준으로 c-Jun protein을 같이 전기영동해 염색하여 그 위치를 비교해본 결과 인산화된 것이 c-Jun protein인 것을 확인하였다.

고 찰

MAP kinase는 cytokine⁹⁾, growth factor, hormone^{19,33,39)}, mitogen 등의 외부인자가 receptor에 결합해 발생하는 신호를 핵을 포함한 여러 compartment로 전달하는 신호전달체계의 중간물질로^{15,30)} 본 실험에서는 세포의 성장 및 분화를 촉진시키는 것으로 보고되고 있는 serum과 PMA의 처리에 따른 MAP kinase의 활성화 및 기질 인산화에 대해 연구하였다. 보고에 의하면 MAP kinase는 일정시간 충분히 활성화된 상태에서만 세포가 G₀ phase를 벗어나 G₁ phase로 이동해 성장 및 분화하도록 작용하는 것으로 알려져 있는데^{6,24)}, serum은 모든 세포의 MAP kinase를 지속적으로

충분한 시간 활성화를 시킬 수 있다고 알려져 있으나 PMA는 세포의 종류에 따라 어떤 세포에서는 MAP kinase를 지속적으로 일정시간 활성화시킬 수 없어 MAP kinase의 활성화가 세포의 G₀ phase에서 G₁ phase로의 이동을 야기시킬 수 없다는 것이²⁹⁾ 보고되고 있다. 따라서 본 실험에서는 먼저 serum과 PMA가 P388 세포의 성장 및 분화에 충분하게 MAP kinase를 활성화시키는지를 확인하기 위하여 농도에 따른 성장률을 먼저 확인하였다. 그 결과 serum은 5-20% 농도에서 세포의 성장을 왕성히 촉진시켰으나 PMA는 실험에 사용한 어느 농도(0-1,000 ng/ml)에서도 세포의 성장을 촉진시키지 못하는 경향을 확인하였다. 세포가 mitogen의 자극에 의해 MAP kinase를 경유하여 신호가 핵에 도달함으로써 세포의 분열을 유발하는 경로는 크게 세종류로 알려져 있다. 첫째는 G protein-coupled receptor에 mitogen이 결합하여 protein kinase C를 경유하여 MAP kinase가 활성화되는 경로이고 두번째는 tyrosine kinase receptor protein에 mitogen이 결합하여 Ras를 경유하여 MAP kinase를 활성화하는 경로이고 세번째는 제3의 receptor에 mitogen이 결합하여 세포질에 있는 tyrosine kinase를 활성화하고 이 tyrosine kinase가 Ras를 경유하여 MAP kinase를 활성화하여 세포분열을 촉진시키는 경우이다. 본 실험에서 사용한 PMA는 protein kinase C의 antagonist로 밝혀져 있으므로 P388 세포가 세포의 성장 및 분화를 위해 주로 사용하는 신호전달경로는 G protein-coupled receptor에서 protein kinase C로 이어지는 경로보다는 tyrosine kinase receptor, 세포질의 tyrosine kinase에서 Ras로 이어지는 경로를 통해 주로 이루어지는 것으로 추측된다. 이러한 결과는 먼저 보고된 hamster fibroblast에서 PMA가 MAP kinase를 지속적으로 활성화하지 못해 세포분열을 유발하지 못한다는 사실과²⁴⁾ 일치한다. 그러나 본 실험에서 mitogen의 처리에 따른 MAP kinase의 핵내 이동에서는 serum과 PMA 모두에서 그 이동이 관찰되었다. 또한 보고에 의하면 serum을 처리한 세포의 MAP kinase가 G₁ phase기간, 대략 6시간 정도는 그 활성도가 지속적으로 유지되는 것으로 알려져 있다²⁹⁾. 위의 내용을 종합해 볼때 MAP kinase의 핵내 이동은 그 활성화 기간에 의존하기보다는 활성화 자체에 의존하는 것으로 생각되며 세포성장을 유발시킬 수 있는지 유발시킬 수 없는

지의 여부는 핵내로 이동한 MAP kinase가 하위 기전의 기질, 특히 transcriptional factor를 인산화하는 시간정도에 의존하는 것으로 추측할 수 있다. 또한 figure 2에서 보듯이 세포질분획에서 관찰된 MAP kinase는 주로 42 Kd, 44 Kd의 isoform인데 반해서 핵으로 이동한 MAP kinase는 주로 42 Kd isoform인 것으로 관찰되었다. 보고에 의하면 MAP kinase가 다양한 세포내 생명활동에 관련되어 있다는 사실을 각 isoform이 이동하는 표적 compartment가 다르고 결과적으로 표적 기질이 다르기 때문일 것으로 설명하고 있으며 어떤 보고에서는 그 활성화 정도와 기간의 차이에^{14,40)} 의해서 조절될지도 모른다고 알려져 있다. 일례로 COS-7세포에서 serum처리시 MAP kinase의 40 Kd, 41 Kd isoform이 핵내로 주로 이동되며 그 중 41 Kd isoform은 핵내로의 이동뿐 아니라 세포의 ruffling membrane으로 이동된다는 사실이 밝혀져 있고¹⁸⁾ PC12 세포에서는 외부신호물질에 따라 MAP kinase의 활성화 기간이 달라 각기 다른 세포반응을 유발한다는 사실이 보고되어지고 있다. 또한 MAP kinase가 isoform에 따라 세포분열을 유발시키는 주된 역할 이외에도 각종 세포 반응에 관계되어^{2,12,16,22)} 있다는 사실이 계속 보고되어지고 있다. 따라서 위의 사실들을 토대로 mitogen에 의한 P388 세포의 성장촉진은 MAP kinase의 여러 isoform중에 주로 42 Kd isoform이 관여하는 것으로 추측되어지며 세포질에 주로 남아있는 44 Kd isoform은 세포분열촉진 이외에도 다른 주된 기능을 가지고 있을 것이라 추측되어 진다. 이전의 보고를 보면 MAP kinase의 존재위치가 세포의 종류에 따라 어떤 세포에는 핵과 세포질에 모두 존재하는 것으로 보고되어지고^{11,37)} 있고 어떤 세포에는 세포질에만 존재하다가 그 활성화에 의해서 핵내로 이동된다고 보고되어지고⁸⁾ 있다. 본 실험결과에서는 P388 세포의 MAP kinase가 세포질과 핵에 모두 존재하는 것으로 관찰되었는데 핵의 분리과정에 있어 그 분리가 완전하지 못했으므로 figure 2의 결과만으로는 세포질내의 MAP kinase가 핵분획으로 오염되었을 가능성을 완전히 배제하지 못했다. 단지 단백질정량을 거쳐 동일한 농도의 sample을 전기영동해서 MAP kinase의 이동정도를 상대적으로 확인할 수단 있었다. 앞으로 MAP kinase의 isoform에 따른 표적 compartment와 기질 특이도 차이를 연구하기 위해서 세포소기관, 특

히 핵의 순수분리에 좀더 중점을 두어야할 필요가 있는 것으로 생각된다. 보고에 의하면 c-Jun protein은 AP-1 transcription factor를 구성하는 subunit로 mitogen의 처리에 의해 활성화된 MAP kinase에 의해 N terminal의 A1 transactivation domain이 인산화되는 것으로 알려져 있는데³⁾ 본 실험에서 mitogen인 serum을 처리한 P388 세포에서 부분 분리한 MAP kinase가 c-Jun protein을 인산화시키는 것을 확인하였다. 따라서 MAP kinase, 주로 42 Kd isoform이 핵내로 이동한다는 위의 결과와 종합해볼때 mitogen인 serum을 처리한 P388 세포에서 활성화된 MAP kinase가 핵내로 이동하여 핵내의 transcription factor인 AP-1의 c-Jun subunit를 인산화시켜 세포성장을 위한 gene expression을 야기하며, 이에 관련된 MAP kinase는 주로 42 Kd isoform일지도 모른다고 추측할 수 있다. 또한 분리한 MAP kinase 분획으로 면역 T세포의 세포막 근처에 존재하는 tyrosine kinase인 p56^{lck}의 N-terminal peptide로 구성된 GST fusion protein이 인산화되는 것을 확인하였다. 비록 GST-fusion protein이 P388 세포내에 존재하는 단백질은 아니지만 주요 세포단백질간의 진화상 보존성이 큰 것을 감안해본다면 위의 결과로 P388 세포내에 존재하는 MAP kinase의 isoform중에는 세포질 및 세포막을 그 표적 compartment로 또한 그 compartment에 존재하는 특정 단백질을 표적기질로 가지고 있는 isoform이 존재할 가능성을 추측해 볼 수 있다. 보고에 의하면 MAP kinase는 GST-fusion protein의 59번째 serine을 인산화시키고 42번째 serine은 인산화시키지 못하는 것으로 알려져 있는데¹³⁾ 본 실험의 GST-fusion protein 인산화측정에서 59번째 serine을 변이시킨 protein도 미세하게 인산화된 것이 관찰되었다. 이것은 3개의 chromatography를 통한 MAP kinase의 순수분리가 완전하게 이루어지지 않아 제3의 protein kinase에 의해 42번째 serine이 인산화 된것으로 추측되며 앞으로 GST-fusion protein을 MAP kinase의 완전분리를 검증하는 기질로서 사용할 수 있는 가능성을 제시해 준다. 특히 최근에 protein분리에 가장 흔하게 사용하는 affinity chromatography에서 용출된 MAP kinase의 순수도 확인에는 아주 적절한 기질로서 사용할 수 있으리라 생각한다. 위의 실험결과를 토대로 P388세포의 주된 MAP kinase인 42 Kd, 44 Kd isoform을 따로 분리하여, 또는 mitogen으

로 활성화시킨 세포내 소기관을 따로 분리해 그 안으로 이동된 MAP kinase를 분리하여 c-Jun과 같은 핵내 기질과 GST-fusion protein과 같은 세포질 기질 등을 각기 인산화시켜 비교 분석해 봄으로써 isoform에 따른 기질 특이도, 그 인산화능 차이 및 표적 compartment 차이를 확인하는 것이 앞으로 수행해야 할 연구과제로 남겨져 있다.

참 고 문 헌

1. 김태우, 정동주, 김윤석 (1996): 동물 조직세포로부터 Mitogen-activated protein (MAP) kinase의 분리 및 성격규명. 대한의생명과학회지, **2**: 21-30.
2. Abe MK, Chao TS, Solway J, Rosner MR and Hersenson MB (1994): Hydrogen peroxide stimulates mitogen-activated protein kinase in bovine tracheal myocytes: implications for human airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **11**: 577-85.
3. Bernd JP, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E and Woodgett JR (1991): Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature*, **353**: 670-674.
4. Bird TA, Sleath PS, deRoos PC, Dower SK and Virca GD (1991): Interleukin-1 represents a new modality for the activation of extracellular signal-regulated kinases/microtubule-associated protein kinases. *J Biol Chem*, **266**: 22661-22670.
5. Bohmann D (1990): Transcription factor phosphorylation: a link between signal transduction and the regulation of gene expression. *Cancer cell*, **2**: 337-344.
6. Bouliskas T. (1995): Phosphorylation of transcription factors and control of the cell cycle. *Crit Rev Eukarot Exp*, **5**: 1-77.
7. Boulton TG, Nye SH, Robbins DJ, Ip Y, Radziejewska E, Morgenbesser SD, Depinho RA, Panayotatos N, Cobb MH and Yancopoulos GD (1991): ERKs: A family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*, **65**: 663-676.
8. Brondello JM, McKenzie FR, Sun H, Tonks NK and Pouyssegur J (1995): Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G1 specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts. *Oncogene*, **10**: 1895-1904.
9. Brunet AJ, Brondello M, L'Allemain G, Lenormand P, McKenzie F, Pages G and Pouyssegur J (1995): MAP kinase module: role in the control of cell proliferation. *C R Seances Soc Biol Fil*, **189**: 43-57.
10. Chen RH, Abate C and Blenis J (1993): Phosphorylation of the c-Fos transrepression domain by mitogen-activated protein kinase and 90-kDa ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 10952-10956.
11. Chen RH, Sarnecki C and Blenis J (1992): Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*, **12**: 915-927.
12. Chesnel F and Eppig JJ (1995): Induction of precocious germinal vesicle breakdown (GVB) by GVB-incompetent mouse oocytes possible role of mitogen-activated protein kinases rather than p34cdc2 kinase. *Biol Reprod*, **52**: 895-902.
13. David GW, Park I, Kim TU, Payne NS, Walsh CT, Strominger JL and Shin J (1993): Phosphorylation of Ser-42 and Ser-59 in the N-terminal region of the tyrosine kinase p56^{lck}. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 5176-5180.
14. Dikic I, Schlessinger J and Lax I (1994): PC12 cells overexpressing the insulin receptor undergo insulin-dependent neuronal differentiation. *Curr Biol* **4**: 702-708.
15. Edwards DR (1994): Cell signaling and the control of gene transcription. *Trends Pharmacol Sci*, **15**: 239-244.
16. Englaro W, Rezzonico R, Durand-Clement M, Lallemand D, Ortonne JP and Ballotti R (1995): Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J Biol Chem*, **270**: 24315-24320.
17. Gille H, Sharrocks AD and Shaw PE (1992): Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex for-

- mation at c-fos promoter. *Nature*, **358**: 414-417.
18. Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS and Davis RJ (1993): Serum-induced translation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J Cell Biol*, **122**: 1089-101.
 19. Gronowski AM and Rotwein P (1994): Rapid changes in nuclear protein tyrosine phosphorylation after growth hormone treatment in vivo. Identification of phosphorylation of phosphorylated mitogen-activated protein kinase and STAT91. *J Biol Chem*, **269**: 7874-7878.
 20. Guan KL and Butch E (1995): Isolation and characterization of a novel dual specific phosphatase, HVH2, which selectively dephosphorylates the mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **270**: 7197-7203.
 21. Her JH, Lakhani S, Zu K, Vila J, Dent P, Sturgill TW and Weber MJ (1993): Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein(MAP) kinase activation. *Biochem J*, **296**: 25-31.
 22. Komuro I, Yamazaki T, Katoh Y, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R and Yazaki Y (1995): Protein kinase cascade activated by mechanical stress in cardiocytes: possible involvement of angiotensin II. *Eur Heart J*, **16**: 8-11.
 23. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR and Avruch J (1992): Raf-1 activates MAP kinase kinase. *Nature*, **358**: 417-421.
 24. Lenormand P, Sardet C, Pages G, L'Allemain G, Brunet A and Pouyssegur J (1993): Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinase(p42 mapk) and p44 mapk) but not of their activator MAP kinase kinase(p45 mapk) in fibroblasts. *J Cell Biol*, **122**: 1079-1088.
 25. Levin DE and Errede B (1993): A Multitude of MAP kinase activation pathways. *J NIH Research*, **5**: 49-52.
 26. Lewis TL, Groom A, Sneddon AA, Smythe C and Keyse SM (1995): XCL100, an inducible nuclear MAP kinase phosphatase from *Xenopus laevis*: its role in MAP kinase inactivation in differentiated cells and its expression during early development. *J Cell Sci*, **108**: 2885-2896.
 27. Makajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T and Akira S (1993): Phosphorylation at threonine 235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 2207-2211.
 28. Mordet G (1993): MAP kinase kinase: a node connecting multiple pathway. *Biol Cell* **79**: 193-207.
 29. Okazaki K and Sagata N (1995): The Mos/MAP kinase pathway stabilize c-Fos by phosphorylation and augments its transforming activity in NIH 3T3 cells. *EMBO J*, **14**: 5048-5059.
 30. Pelech SL and Sanghera JS (1992): Mitogen-activated protein kinases: versatile transducers for cell signaling. *TIBS*, **17**: 233-238.
 31. Posada J, Yew N, Ahn N, vandeWoude GF and Cooper JA (1993): Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocyte and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol*, **13**: 2546-2553.
 32. Pulverer B, Kyriakis JM, Avruch J, Nikolakaki E and Woodgett JR (1991): Phosphorylation of c-Jun mediated by MAP kinases. *Nature*, **353**: 670-674.
 33. Ray LB and Sturgill TW (1988): Characterization of Insulin-stimulated Microtubule-associated Protein Kinase. *J Biol Chem*, **263**: 12721-12727.
 34. Rohan PJ, Davis P, Moskaluk CA, Kearns M, Krutzsch H, Siebenlist U and Kelly K(1993): PAC-1: A mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science*, **259**: 1763-1766.
 35. Sanghera JS, Peter M, Nigg EA and Pelech SL (1992): Immunological characterization of avian MAP kinases: evidence for nuclear localization. *Mol Biol Cell*, **3**: 775-787.
 36. Seger R, Ahn NG, Boulton TG, Yancopoulos GD, Panayotatos N, Radziejewska E, Ericsson L, Bratlien RL, Cobb MH and Krebs EG (1991): Microtubule-associated protein 2 kinases, ERK1 and ERK2, undergo au-

- tosphorylation on both tyrosine and threonine residues: Implications for their mechanism of activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 6142-6146.
37. Seth A, Gonzalez FA, Gupta S, Raden DL and Davis RJ (1992): Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **267**: 24796-24804.
38. Sturgill TW, Ray LB, Erikson E and Maller JL (1988): Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates r ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, **334**: 715-718.
39. Tobe K, Kadowaki T, Hara K, Gotoh Y, Kosako H, Matsuda S, Tamemoto H, Ueki K, Akanuma Y, Nishida E and Yazaki Y (1992): Sequential activation of MAP kinase activator, MAP kinases, and S6 peptide kinase in intact rat liver following insulin injection. *J Biol Chem*, **267**: 21089-21097.
40. Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P and Ullrich A (1994): EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol*, **4**: 694-701.
41. Urich M, Shemerly MY, Besser D, Nagamine Y and Ballmer-Hofer K (1995): Activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases by polyomavirus middle-T or serum depend on phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, **270**: 29286-29292.
42. Williams NG, Paradis H, Agarwal S, Charest DL, Pelech SL and Roberts TM (1993): Raf-1 and p21v-ras cooperate in the activation of mitogen-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. **90**: 5772-5776.

=Abstract=

Phosphorylation of Transcriptional Factor by Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase Purified from Nucleus

Yoon-Suk Kim, So-Young Kim and Tae-Ue Kim[†]

*Department of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University,
Wonju 222-701, Korea*

The mitogen-activated protein(MAP) kinase signal transduction pathway represents an important mechanism by which mitogen, such as serum and PMA, regulate cell proliferation and differentiation. Target substrates of the MAP kinase are located within several compartments containing plasma membranes and nucleus. We now report that serum addition induces proliferation of the P388 murine leukemia cell, but PMA does not, while both serum and PMA treatment cause translocation of the MAP kinase, mainly p42^{mapk} isoform, from cytosol into the nucleus, which was monitored by immunoblot analysis using polyclonal anti-ERK1 antibodies. We investigated whether the MAP kinase was capable of phosphorylating c-Jun protein and GST-fusion proteins, the P56^{lck}N-terminal peptides (1-77 or 1-123 domain) of the T cell tyrosine kinase, using the partially purified MAP kinase by SP-sephadex C-50, phenyl superose and Mono Q column chromatography. We found that the partially purified MAP kinase was able to phosphorylate c-Jun protein and the GST-fusion protein expressed using *E.coli* DH5 α which is transformed with pGEX-3Xb plasmid vector carrying of p56^{lck} N-terminal peptide-encoding DNA. These results imply that tyrosine kinase receptor/Ras/Raf/MAP kinase pathway is a major mechanism for mitogen-induced cell proliferation in P388 murine leukemia cell and that the various MAP kinase isoforms may have their own target substrates located in distinct subcellular compartments.

Key Words: mitogen-activated protein (MAP) kinase, cell proliferation, phosphorylation, c-Jun protein.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(2): 175-185, December 1996]

[†]Corresponding author