

Yeast Two Hybrid Assay를 이용한 Lipocortin-1 결합 단백질 유전자의 분리

이경화, 김정우
배재대학교 생화학과

Isolation of the Gene for Lipocortin-1 Binding Protein Using Yeast Two Hybrid Assay

Kyoung Hoa Lee, Jung Woo Kim
Department of Biochemistry, Pai-Chai University

Glucocorticoid에 의한 항염증 작용의 second messenger로 생각되어지는 annexin superfamily중 하나인 37 kDa의 단백질, lipocortin-1의 작용기작을 이해할 목적으로 in vivo에서 protein-protein interaction을 인식 하는 yeast-based genetic assay인 yeast two hybrid assay를 통하여 lipocortin-1과 결합하는 단백질 유전자를 분리하여 조사하였다. 이 방법으로 실험을 수행한 결과 분리된 유전자가 human serine proteinase 유전자와 homology가 있는 것으로 밝혀졌다.

To study the mechanism of lipocortin-1, the 37 kDa protein, one of the annexin superfamily thought to be a second messenger during the glucocorticoid dependent anti-inflammatory action, the gene for lipocortin-1 binding protein was isolated using the yeast two hybrid assay, the yeast based genetic assay recognizing the protein-protein interaction. The results showed that this gene has a weak homology to the gene for the human serine proteinase.

Key words : Yeast two hybrid assay, Lipocortin-1, Binding protein, Protein-protein interaction, Serine proteinase

서론

Lipocortin-1은 Ca^{2+} 에 의존적인 phospholipid-binding protein 으로서 glucocorticoid에 의해 조절되는 항염증 인자로 작용하며 생체 내에서 glucocorticoid에 의해서 phospholipase A2 (PLA2) inhibitor의 합성과 방출에 관여하고, primary

monocytes에서 lipocortin-1 mRNA를 유도한다. 그리고 lipocortin-1은 원칙적으로 steroid-inducible phospholipase A2 inhibitor로서 정의되고 arachidonic acid production을 제한하여 항염증작용을 하고 있다고 생각되고 있다(Cirino *et al.*, 1993; Wallener *et al.*, 1986). 또한 annexin superfamily member중 하나이며 분자량이 37 kDa인 lipocortin-1은 glucocorticoids에 의해 anti-inflammatory action을 하는 "second messenger"

로서 흥미를 유발시키고 있다(Arcone *et al.*, 1993; Goulding and Guyre, 1993). 그 외에도 세포 성장의 조절과 분화, neutrophils의 migration, cytokine에 대한 CNS responses, neuroendocrine secretion, neurodegeneration system 등에 중요한 작용을 하고 있다고 알려지고 있다(Flower and Rothwell, 1994; Kovacic *et al.*, 1991). Human lipocortin-1 gene은 chromosome 9에 위치하고 있으며 18.5 kb길이의 13 exon을 가지고 있고 promotor region에 TATA box와 glucocorticoid recognition elements(GRE)를 포함하고 있다(Browning *et al.*, 1990). Lipocortin-1의 구조는 독특한 N-terminus와 Ca²⁺ 존재시 negatively charged phospholipid에 결합하는 4개의 반복구조로 되어있다. 43개의 아미노산으로 되어있는 N-terminus 부분에는 tyrosine과 serine잔기를 가지고 있으며 이 부분이 세포내의 signal transduction시 작용하는 매개체로 생각되어 지고 있다. 최근에 이 단백질의 3차 구조까지 밝혀졌으며, glucocorticoid에 의해서 lipocortin-1이 조절된다고 생각되어 지고 있다.

세포의 유전자 발현을 조절하는 생물학적 효과를 나타내는 glucocorticoid의 항염증 작용의 second messenger로 작용하는 lipocortin-1의 작용 기작을 알아보기 위한 한 방법으로 본 실험에서는 yeast two hybrid assay를 통해 조사하였다. yeast two hybrid assay는 protein-protein의 약한 결합이나 transient interaction도 잘 detection할 수 있는 매우 sensitive 한 assay로서 특정 단백질에 결합하는 단백질의 유전자를 찾는 system이다(Chien *et al.*, 1991; Bartel *et al.*, 1991; Fields and Song, 1989; Guarente, 1993). 이와 같은 방법으로 분리된 유전자로부터 생성되는 단백질의 성질을 조사하면 이 lipocortin-1 단백질의 작용기작을 아는데 도움이 되리라 생각되어 실험을 진행하였다.

실험재료 및 방법

1. LexA-lipocortin-1 fusion plasmid의 구축

Yeast two hybrid system은 "interaction trap"이라 불려 지기도 하며 다음과 같은 세 개의 요소로 구성 되어 있다. 즉, 하나의 hybrid protein은 DNA-binding domain과 protein X를 가지고 있고

다른 hybrid protein은 transcription activation domain과 protein Y를 가지고 있으며 reporter genes이 fused된 protein들인 X, Y가 결합하면 transcription이 유도되도록 되어있다.

Human lipocortin-1과 interaction하는 단백질의 유전자를 screening하기 위해 먼저 LexA의 DNA binding domain의 유전자와 lipocortin-1의 N-말단 쪽의 단백질을 code하는 유전자가 fusion되어 있는 plasmid를 구축하였다. 이 N-말단부분은 43개의 아미노산으로 구성된 tyrosine과 serine 잔기를 가지는 unique N-terminus와 4개의 repeating subunit중 첫 번째 subunit(69 아미노산으로 구성) 그리고 connector I(10 아미노산으로 구성)으로 구성되어 있다.

Human lipocortin-1의 cDNA는 전부 346개의 아미노산을 encoding 하도록 되어있고 그중 N-말단 부분은 113개의 아미노산을 encoding하는 DNA 단편으로 구성되어있다. 이 단편은 다음의 primer를 사용한 PCR을 통해서 분리하였다.

* P 1 : TGG TGT CGA ATT CTC ATG

* P 2 : TTT TAG CTC TGC TAA AAT GAC
TGC AGA

이처럼 증폭된 PCR product를 EcoR I와 BamH I site를 이용하여 yeast two hybrid assay용 plasmid인 pEG 202에 ligation시켰다. 이 plasmid를 modified된 lithium acetate method에 의해서 yeast strain EGY48 [*MATa, his3, trp1, ura3-52, leu2*: pLeu-LexAop6/pSH18-34(LexAop-lacZ reporter)]안으로 transformation한다.

이 transformants를 yeast synthetic media (Ura- and His-)에서 selection하고 selection한 transformants를 가지고 LexA protein에 대한 polyclonal rabbit antibody가 나타나는 immunoblotting에 의해서 hybrid protein이 합성되었는지를 조사하였다.

2. Human cDNA library를 이용한 lipocortin-1 결합 단백질 유전자 검색

LexA-lipocortin hybrid 단백질이 포함되어 있는 yeast strain EGY48 을 2% glucose가 첨가된 yeast synthetic medium (Ura-, His-)에서 키운 후, pJG4-5에 *EcoRI*과 *xhoI* site를 이용하여 cloning되어있는 B42 fusion 단백질을 발현할 수 있는 Hela cDNA library를 사용하여 screening하

였다. 또한 이 fusion 단백질의 expression은 galactose 존재 하에서만 유도되도록 고안되어져 있어서 특이성을 조사하는데 이용된다. Library cDNA를 competent yeast strain 안으로 introduction 하고 transformants들을 2% glucose가 포함된 syntetic medium (Ura⁻, His⁻, Trp⁻)에서 tryptophan prototrophy (plasmid marker)로 selection하였다. 모든 transformants들을 모아서 pool을 만들고 다시 2% galactose가 포함된 syntetic medium (Ura⁻, His⁻, Trp⁻, Leu⁻)에 respread 하여 introduction된 cDNA의 발현을 유도하였다. 선택 배지에서 자란 yeast들을 galactose 존재 하에서 그들의 성장 의존도를 보기 위해 2% galactose (inducing condition) 혹은 2% glucose (non inducing condition)이 포함된 syntetic medium (Ura⁻, His⁻, Trp⁻, Leu⁻)에서 다시 retest하여 galactose를 포함하는 배지에서만 성장하는 yeast들을 선별하였다. 여기에서 선별된 yeast들을 β-galactosidase activity test 를 위해 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside (X-gal)가 들어 있고 2% galactose 혹은 2% glucose가 포함된 syntetic medium (Ura⁻, His⁻, Trp⁻)에 접종 한 후, galactose 존재 하에서만 효소의 활성이 나타나서 푸른색을 띠는 yeast들을 선택하여 plasmids를 분리하였다. 분리한 plasmid를 *E. coli* strain DH5α [*supE44*, Δ*lacu169*(*ϕ*80 *lacZ*Δ*M15*), *hsdR67*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *relA1*]에 transformation하고 transformants들을 ampicillin이 들어간 LB 배지에서 선별한다. 선별된 *E. coli* cells로부터 plasmid를 isolation하여 다시 yeast에 넣어서 재현성을 확인한 후, 그 cDNA의 염기배열을 조사하였다.

결 론

Lipocortin-1은 346 amino acid 로 구성되어 있고 그 중 N-terminal과 subunit 1부분이 다른 protein과 interaction하는 것으로 추정되어 113개의 아미노산을 LexA 단백질의 C-말단 쪽에 fusion 시켜 본 실험에 사용할 pLexA-LC plasmid를 구축하였다(Fig 1). 이처럼 만들어진 plasmid는 yeast EGY48에서 발현시켰고, 이 hybrid 단백질이 잘 발현되는 가를 보기 위해 LexA에 대한 rabbit polyclonal antibody로 immunoblotting을 통해 확인하였다(data not shown).

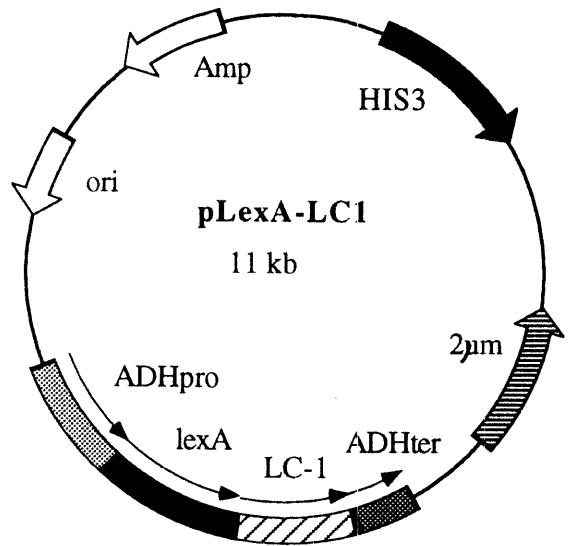


Fig. 1. Construction of the plasmid pLexA-LC1.

Transcription activator인 B42의 gene이 fusion 되어 있는 human Hela cDNA library를 LexA/LC1 hybrid 단백질이 발현되고 있는 yeast cell로 introduction하여, 대략 6×10^5 개의 독립된 transformants를 수확하였고, 그들을 cDNA 유래의 단백질 발현을 유도하는 2% galactose가 포함된 selection media (Ura⁻, His⁻, Trp⁻, Leu⁻)에 재접종 하였다. Selection 배지에서 자라는 colony 40개를 얻어 이중 최종적으로 galactose에 의존적인 X-gal 배지 상에서 푸른색을 띠는 15개의 colony들을 얻었다. 그중 한 균주(#25)를 선택하여 다음 실험을 진행하였다. 선택된 yeast cell로부터 plasmid를 분리하기 위해 Trp-배지에서 개대 배양후 glass bead를 사용하여 yeast를 분쇄하고 phenol을 사용하여 plasmid를 추출하였다 이 plasmid를 *E. coli* DH5α에 transformation하여 ampicillin 포함 배지에서 성장하는 균으로부터 plasmid를 분리하였고, 이 25번 plasmid의 재현성을 확인하기 위해 LexA/LC1(N말단 lipocortin-1 포함 plasmid)이 포함된 yeast와 LexA/LC1(C말단 lipocortin-1 포함 plasmid)에 다시 transformation하여 N말단 lipocortin-1에만 특이적으로 반응하고 있음을 확인하였다. 즉 Table1과 Table2에서 처럼 이 25번 plasmid는 단지 LexA/LC1과만 반응하여 reporter gene (*LEU 2*와 *lac Z*)을 유도시킴으로 각각의 phenotype을 나타냈다. 이

25 : 18 GAGTTGGTGGAGAAGACAGCACCTGCCGTGGTCTATATCGA 58
 || ||||| || ||||| |||||
 serine : 568 GACGTGGTGGAGAAGATCGCCCCTGCCGTGGTTCATATCGA 608
 proteinase

Fig. 3. Comparison of the nucleotide sequences between the gene #25 for the lipocortin-1 binding protein and the gene for the hu-man serine proteinase

25번 plasmid의 염기서열중 일부를 조사한 결과를 Fig. 2에 표시하였으며, 이 염기서열을 사용하여 기존 유전자의 염기서열과 같은 것이 존재하는지를 알기 위해 homology가 있는 유전자들을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 조사한 결과 얻어진 유전자의 염기서열은 serine proteinase와 일부 homology가 있는 것으로 나타났다.

ACGAGGCGCT TCATCGCGAG TTGGTGGAGA AGACAGCACC
 TGCCGTGGTC TATATCGAGA TCCTGGACCG GCACCCTTTC
 TTGGGCCGCG AGTCCTATCT C

Table 1. Galactose-inducible promoter test for the isolated plasmid #25

	X	LexA/LC1N	LexA/LC1C
Y			
Plasmid #25	UHWL-/Glc ^a	no growth	no growth
	UHWL-/Gal ^b	growth	no growth

- X : fused to DNA-binding domain
- Y : fused to transcription activation domain
- a : CM Ura-, His-, Trp-, Leu-/1% Raffinose + 2% glucose
- b : CM Ura-, His-, Trp-, Leu-/1% Raffinose + 2% galactose

Table 2. β-galactosidase activity test for the isolated plasmid #25.

	X	LexA/LC1N	LexA/LC1C
Y			
Plasmid #25	UHW-/Glc ^a	white	white
	UHW-/Gal ^b	blue	white

- X : fused to DNA-binding domain
- Y : fused to transcription activation domain
- a : CM Ura-, His-, Trp-/2% glucose + X-gal
- b : CM Ura-, His-, Trp-/2% galactose + X-gal

Fig. 2. Nucleotide sequence of the isolated gene #25 for the lipocortin-1 binding protein

고찰

Lipocortin-1 단백질은 glucocorticoid에 의해 유도되는 인자로서 target세포의 gene expression을 변경시킬 수 있는 second messenger로서 작용하므로 이를 이용하면 anti-inflammatory drug을 만들 수 있으므로 이 단백질에 대한 연구는 매우 중요하다고 보고되고 있다. 이러한 lipocortin-1은 signal sequence를 가지고 있지 않으나 세포 외로 분비되기도 하고, neutrophil처럼 세포 표면에 high affinity binding site가 존재하고 있으나 이 binding site는 아직까지 알려지지 않고 있는 등 그 작용기작이 아직 명확치 않은 상태이다.

Lipocortin-1은 또한 세포의 분화, 세포의 성장과도 관련이 되다고 알려져 있다. 이러한 여러 가지 기능을 갖고 있는 lipocortin-1의 작용 기작을 이해하기 위해 yeast two hybrid assay를 통한 실험을 진행해서 선별된 유전자의 염기서열을 조사해 본 결과 human serine proteinase와 homology가 있는 새로운 유전자인 것으로 밝혀졌다. 이 유전자에서 생성된 단백질이 proteinase라면 lipocortin-1의 특정부위를 절단하여 그의 기능을 조절하는 작용이 존재할 가능성도 있으리라 여겨진다.

감사의 말씀

본 논문은 1996년도 배재대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행된 것임.

참고문헌

- Arcone, R., Arpaia, G., Ruoppolo, A., Malorni, A., Pucci, P., Marino, G., Ialenti A., Di Rosa and Ciliberto G., 1993, Structural characterization of a biologically active human lipocortin 1 expressed in *Escherichia Coli*. *Eur. J. Biochem.*, 211: 347-355.
- Bartel, P.L., Chien, C.T., Sternglanz, R. and Field, S., 1991, The two-hybrid systems a method to identify and clone genes for pro-tein that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88: 9578-9582.
- Browning, J.L., Ward, M.P., Wallner, B.P. and Pepinsky, R.B., 1990, Studies on the structural properties of lipocortin 1 and the regulation of its synthesis by steroids. In: *Cytokines and Lipocortins in Inflammation and Differentiation.* Wiley-Liss, Inc., New York. pp. 27-45.
- Chien, C.T., Bartel, P.L., Sternglanz, R. and Field, S., 1991, Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques.*, 14: 920-924.
- Cirino, G., Cicala C., Sorrentino, L., Ciliberto, G., Arpaia, G., Perretti, M., and Flower, R.J., 1993, Anti-inflammatory actions of an N-terminal peptide from human lipocortin 1. *Br. J. Pharmacol.*, 108: 573-574.
- Fields, S. and Song, O., 1989, A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-247.
- Flower, R.J., and Rothwell, N.J., 1994, Lipocortin-1 : cellular mechanisms and clinical relevance. *TIPS.*, 15: 71-76.
- Goulding, N.J. and Guyre, P.M., 1993, Glucocorticoids, lipocortins and the immune response., *Current Opinion in Immunology*, 5: 108-113.
- Guarente, L., 1993, Strategies for the identification of interacting protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 1639-1641.
- Kovacic, R.T., Tizard, R., Cate, R.L., Frey, A.Z. and Wallner, B.P., 1991, Correlation of gene and protein structure of rat and human lipocortin 1. *Biochemistry*, 30: 9015-9021.
- Wallener, B.P., Mattaliano, R.J. Hession, C., Cate, R.L., Tizard, R., Sinclair, L.K., Foeller, C., Chow, E.P., and Browning, J.L., 1986, Cloning and expression of human lipocortin, a phospholipase A2 inhibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature*, 320: 77-81.
-