

인산에 의한 토끼 혈장 Alkaline Phosphatase의 Phosphotyrosyl Phosphatase 활성 저해

이경태 · 서성훈 · 김동현
경희대학교 약학대학 약학과

Inorganic Phosphate Has the Inhibitory Effect on Phosphotyrosyl Phosphatase Activity of Alkaline Phosphatase in Rabbit Plasma

Kyung Tae Lee, Seong Hoon Seo, and Dong Hyun Kim

College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Inorganic phosphate (Pi) in rabbit plasma was found to block completely phosphotyrosine phosphatase (PTPase) activity without affecting the alkaline phosphatase (ALPase) activity. Our results provided that (1) PTPase activity and inhibitor are separated after G-25 gel-filtration. (2) This inhibitor is heat stable and trypsin-resistant and it can be removed by dialysis using 3 Kd cut-off tubing. (3) The elution pattern of the inhibitor is identical to that of Pi, and by performing a separate run with inorganic phosphate. (4) The PTPase activity was recovered following an incubation with CaCl₂ (10 mM). (Kor. J. Clin. Pharm. 1999; 9(1): 62-64)

□ Keywords - Alkaline phosphatase, Phosphotyrosyl phosphatase, Inorganic phosphatae, Inhibitor, Plasma, Rabbit

Alkaline phosphatase (ALPase)는 자연계에 널리 분포하는 효소로서, 최적 염기성에서 *p*-nitrophenylphosphate (*p*NPP)와 같은 간단한 합성 화합물 등에 작용하는 것으로 아직 정확한 생물학적 기능은 밝혀진 바 없다.¹⁾ 일반적인 ALPase는 대부분 효소 내부에 기본적으로 zinc가 존재하는 metalloenzyme이며, 포유류 세포에서는 ALPase의 carboxy-terminal기가 phosphatidylinositol을 통해 세포막의 지방층에 연결된 glycoprotein으로 알려져 있다.²⁾ Protein tyrosine phosphatase (PTPase)는 세포의 성장, 분화 및 발달에 중요한 역할을 하는 특이 효소로서 작용한다.³⁾

서로 다른 세 곳에서 (calf intestine, bovine liver, and *E. coli* ALPase)에서 분리한 ALPase를 사용하여 histone의 인산화된 tyrosine 및 serine기의 탈인산을 비교한 결과 tyrosine기의 탈 인산화가 serine기에 비해 5-10배 탈 인산화의 증가를 확인하였다.⁴⁾ Chernoff

(1983)의 연구⁵⁾는 bovine kidney ALPase가 IgG의 phosphotyrosyl를 탈 인산화 시키는 반면 phosphoserine phosphorylase의 탈 인산화를 시키지 못하는 결과를 보고하였다. Bovine intestinal ALPase는 phosphotyrosyl casein phosphatase 활성이 pH 7에서 상관성이 있는 phosphoserine casein phosphatase 활성에 비해 3450배 활성이 높음을 발표하였다.⁶⁾ ALPase와 PTPase 활성의 상관성을 보고하는 논문들이 많으나 그중 Sparks와 Brautigan(1985)는 세포질 PTPase와 세포막 결합 ALPase 사이에 기질 특이성이 존재하는 것을 발표 하였다.⁷⁾

비록 대부분의 PTPase 활성들이 phospho-tyrosine과 *para*-nitrophenylphosphate (*p*NPP)를 모두 가수분해 할 수 있으나, 이러한 성질들은 모든 포유류 동물들의 효소들에게 적용할 수는 없다. *p*NPP와 phosphotyrosine과의 구조적 유사성은 ALPase가 선택적으로 단백질의 tyrosine잔기를 선택적으로 탈 인산화시킬 수 있는 가능성을 높여주고 있으며 본 연구실에서는 토끼 혈장 PTPase는 완전히 tissue unspecific ALPase에서 기인되는 것으로 보고 하였다.⁸⁾

교신저자: 이 경 태

서울시 동대문구 회기동 1번지

경희대학교 약학대학

TEL. 02-961-0860, FAX. 02-966-3885

본 연구에서는 혈액에서 새로운 onco-developmental marker를 개발하기 위하여 토끼 혈장에서 PTPase 활성을 연구하였다.

실험 방법

시약 및 실험 재료

pNPP, benzamidine, 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptane hydrochloride (TLCK), 1-1-p-tosylamino-2-phenylethyl chloromethyl ketone (TPCK)와 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)들은 Sigma (미국)에서 Tris, Na₃PO₄와 2-(ethylamino)ethanol은 Aldrich (미국)에서 구입하였다. G-25는 Pharmacia (미국)에서 phospho-reduction carboxamidomethylation lysozyme (RCM-lysozyme)은 Cayla 등의 방법⁹⁾에 따라 준비하였다.

혈장의 분리

혈장은 채취한 혈액과 동량의 150 mM NaCl, 10 U/ml heparin과 여러 protease 저해제들(0.5 mM benzamidine, 0.1 mM TLCK, 0.1 mM TPCK and 0.3 mM PMSF)을 포함한 20 mM Tris pH 7.4 완충액을 혼합한 후 즉시 원심 분리(4,000g × 10 min)하여 상등액을 취하여 혈장으로 사용하였다.

PTPase 효소 활성측정

PTPase 활성은 Cayla 등의 방법⁹⁾에 따랐으며 짧게 정리 하면 다음과 같다. ³²P로 표지된 1 μM RCM-lysozyme, 20 mM Tris pH 7.4 및 1 mg/ml bovine serum albumin가 포함된 기질 혼합물 30 μl에서 유리되는 ³²P에 준하여 측정하였다. 1 unit의 phosphatase 활성은 1분당 1 nmol 기질을 탈 인산화 시키는 것으로 나타내었다.

ALPase 효소 활성 분석

ALPase 활성은 시료 200 μl를 pH 10.3으로 10 mM pNPP와 0.5 mM MgCl₂와 1 M 2-(ethylamino)ethanol을 포함한 반응용매 200 μl와 37°C에서 20분간 배양한 후 20% TCA 200 μl를 가하여 반응을 중지시키고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 450 μl에 1M-Na₂CO₃ 330 μl씩 넣어 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 위의 조건에서 p-nitrophenol의 extinction coefficient는 1.75 × 10⁴ M⁻¹ cm⁻¹이며 1 unit는 1분당 pNPP 1 nmol을 전환시키는 것으로 나타내었다.¹⁾

Pi 분석

유리 phosphate는 Fiske-SubbaRow 법¹⁰⁾에 따라 정량 하였다. Unit는 standard calibration curve를 사용하여 μM로서 표시하였다.

G-25 gel filtration

준비한 혈장 1 ml을 10분간 10,000 × g로 원심 분리한 후 0.15 M NaCl을 함유한 완충액(20 mM Tris-HCl at pH 7.4, 0.5 mM MgCl₂)으로 세척한 G-25 gel filtration 컬럼(1 × 65 cm)에 loading한 후 20 ml/h 속도로 용출시켰다. 1 ml 분획들을 모은 후 ALPase, PTPase와 inorganic phosphate의 활성을 각각 측정하였다.

실험 결과 및 고찰

혈액중 ALPase는 효소 활성과 전기영동 실험에 따라 수년 동안 여러 질병의 진단 특히 뼈의 이상, 간질환 그리고 여러 종류의 암 진단 등에 사용되어 왔다. 비록 동질 효소의 형태는 생화학적 그리고 면역학적 방법에 따라 결정하고 있으나 조직에 존재하는 효소들은 일반적인 효소의 성질과 항원적인 성질이 매우 유사하기 때문에 조직에 존재하며 그곳에서 유리되는 효소와 혈액에 존재하는 효소가 어느 정도 일치하는 것은 정확하지 않다. 본 연구자들은 토끼 혈장중 pNPP를 기질로 사용하여 매우 높은 ALPase 활성을 확인하였으나¹¹⁾ RCM-lysozyme을 기질로 사용하여 PTPase 활성을 측정한 결과 토끼 혈장에서 직접적인 활성은 전혀 확인되지 않았으나 gel filtration을 통과한 후 뚜렷한 활성이 다시 나타났다(Fig. 1). 이는 분자량이 적은 저해제의 분리에 의한 것으로 추정되었으며 총 ALPase 활성은 gel filtration 전과 후에서 변화가 없었

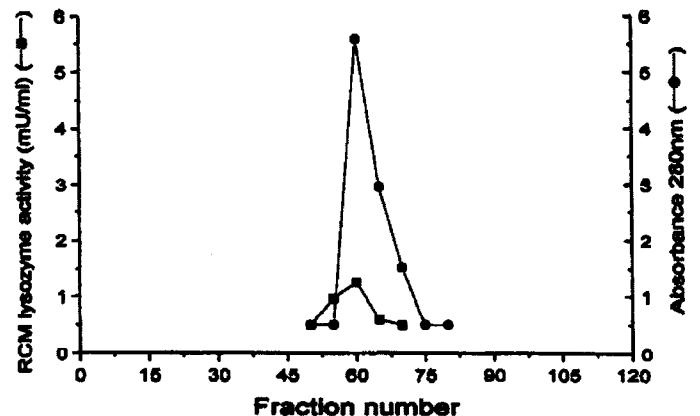


Fig. 1. Rabbit serum or plasma PTPase activity (B) after G-25 gel filtration. Absorbance was measured at 280 nm (A).

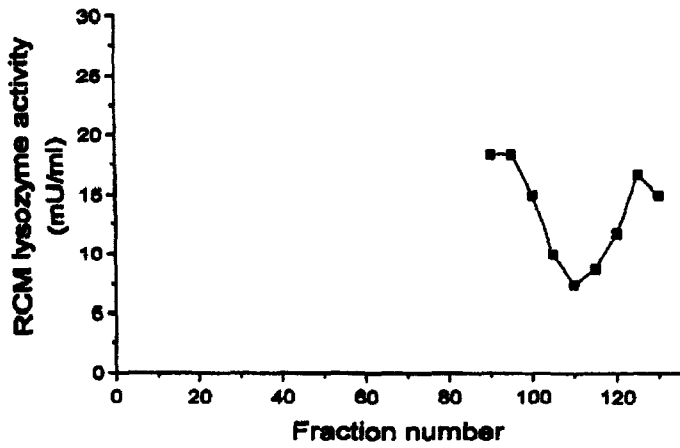


Fig. 2. The inhibition of the PTPase activity through G-25 gel filtration

다. 이러한 결과는 gel filtration 후 저해제의 분리에 의한 것으로 추정하고 있다.

저해제 확인

저해제는 gel filtration 후 아래와 같은 방법으로 확인한 결과 컬럼 분획 후 말단에 존재하는 것으로 분자량이 매우 적음을 확인 할 수 있었다(Fig. 2). Gel filtration 후 나타나는 주 PTPase 활성을 가진 분획과 그 외 분획을 합하여(recombined activity assay) PTPase 활성을 측정하여 PTPase 활성이 감소되는 분획을 확인하였다. 저해제들이 분리되는 위치는 유리 인산의 측정과 단독으로 inorganic phosphate (1 ml of 2 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)를 컬럼에 loading하여 분리 측정한 결과(Fig. 3,4)와 일치함을 확인하였다. Pi를 컬럼 분석 후 PTPase 활성을 가진 분획에 Pi를 첨가한 경우 혈장에서의 저해제와 유사한 효과를 보였으며 *in vitro*에서 저해에 요구되는 농도($\text{IC}_{50}=5 \mu\text{M}$)는 *in vivo*에서 생리적으로 존재하는 Pi의 농도(1.5-2 mM)

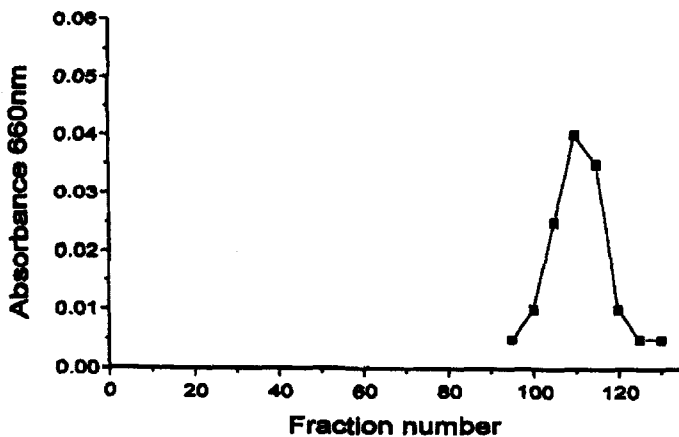


Fig. 3. Measurement of free phosphate after G-25 gel filtration

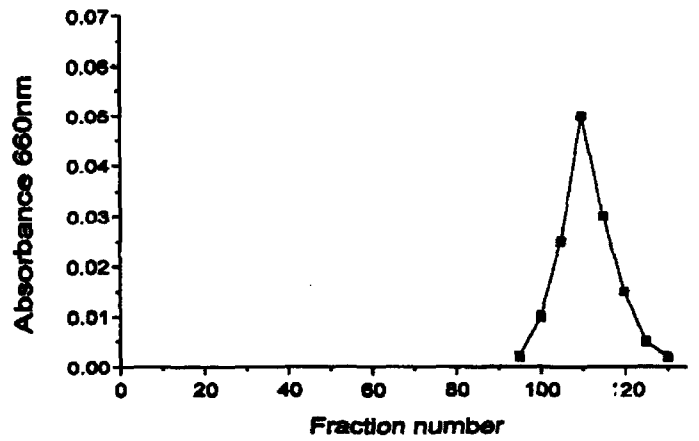


Fig. 4. Elution position of a prepared free phosphate solution (2 mM $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) after gel filtration

와 일치함을 보여주고 있다.

Inorganic phosphate를 침전시킬 수 있는 100 mM CaCl_2 를 혈장과 배양한 후 원심분리하여 상등액의 PTPase 활성을 측정한 결과 PTPase 활성을 다시 확인할 수 있었으나, gel filtration 후의 PTPase activity에 CaCl_2 처리 후에는 PTPase 활성에 아무런 영향을 미치지 않았다.

저해제의 성질

혈장에서 분리된 저해제는 100°C에서 30분간 배양 및 trypsin 처리 후에도 PTPase 활성 저해를 보였으며 3 KD cut-off 투석막에 의해 저해제가 빠져나가는 것으로 보아 분자량이 3 KD 이하로 매우 적음을 확인하였다. 이상의 실험 결과에서 저해제는 열에 안정성이 있으며 protease에 대한 저항성과 분자량이 적은 것으로 밝혀졌다.

이러한 실험 결과들에서 혈장에서는 분자량이 적으며, 열에 안정성이 있고 trypsin에 저항성이 있는 물질이 존재하며 이것이 ALPase의 PTPase 활성을 조절한다.

이상의 모든 결과에서 혈장에 존재하는 생리적 inorganic phosphate에 의해 기본적인 PTPase와 ALPase 활성의 측정에 있어 ALPase 활성에는 영향을 미치지 않으나 PTPase 활성은 완전히 저해되고 있음을 보여주고 있다.

문 헌

1. Lee KT, Kwon CH, Waelkens E, et al. Substrate specificity of alkaline phosphatase. *Yakhak Hoeji* 1993; 37: 571-6
2. Low MG, Ferguson MAJ, Feuterman AH, et al.

- Covalently attached phosphatidylinositol as a hydrophobic anchor for membrane proteins. Trends Biochem. Sci. 1986; 11: 212-45
3. Zongchao J. Protein phosphatase: structure and implications. Biochem Cell Biol 1997; 75: 17-26
 4. Swarup G, Cohen S, Garbers DL. Selective dephosphorylation of proteins containing phosphotyrosine by alkaline phosphatase. J Biol Chem 1981; 256: 8197-201
 5. Chernoff J, Li H-C. Multiforms of phosphotyrosyl and phosphoserine protein phosphatase from cardiac muscle. Biochem Biophys 1983; 226: 517-30
 6. Foulkes JG, Erikson E, Erikson RL. Separation of multiple phosphotyrosyl and phosphoserine protein phosphatase from chicken brain. J Biol Chem 1983; 258: 431-8
 7. Sparks JW, Brautigan DL. Specificity of protein phosphotyrosine phosphatases. Comparison with mammalian alkaline phosphatase using polypeptide substrate. J Biol Chem 1985; 260: 2042-5
 8. Lee KT, Waelkens E, Merlevede W. Plasma phosphotyrosine phosphatase from healthy rabbits can be totally ascribed to the tissue-unspecific alkaline phosphatase. Arch Int Pharmacodynamic Ther 1991; 311: 189-90
 9. Cayla X, Goris J, Hermann J, et al. Isolation and characterization of a tyrosyl phosphatase activating factor from rabbit skeletal muscle and Xenopus laevis oocyte. Biochemistry 1990; 29: 658-67
 10. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 1925; 66: 375-9
 11. Lee KT, Waelkens E, Merlevede W. Purification of an alkaline phosphatase present in rabbit serum. Clin Chem Enzym Comms 1990; 3: 151-65