

IL-1/Toll-like Receptor Superfamily 신호전달에 관여하는 TRAF6 결합 Motif의 규명

임 미 정[#]

숙명여자대학교 약학대학

(Received May 20, 2003; Revised June 3, 2003)

Identification of TRAF6-Binding Motif in IL-1/Toll-like Receptor Superfamily-Mediated Signal Transduction

Mijung Yim[#]

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract — Crystal structure of TRAF6 in complex with TRAF6-binding sites from CD40 was previously determined. The structure revealed a distinct TRAF6-binding groove of CD40, the key structural determinant of interaction. The structural information leads to a proposed TRAF6-binding motif. This allows the identification of TRAF6-binding sequences in the hIRAK protein, whose functional requirement in IL-1/Toll-like receptor superfamily-mediated signal transduction is further demonstrated using site-directed mutagenesis. The mutational effects of hIRAK on the down-stream NF- κ B signaling shows the importance of the TRAF6 interface for signaling by IL-1/Toll-like receptor superfamilies.

Keywords □ TRAF6-binding motif, hIRAK, IL-1/Toll-like receptor superfamilies, NF- κ B

인체의 뼈는 신체지지의 골격을 제공하고, 각종 면역세포의 발달과 성숙의 장소를 제공하며 Ca^{++} 과 같은 무기질의 저장소 역할을 하는 중추적 기관이다.¹⁾ 뼈의 재형성(bone remodeling)이란 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 작용에 의해 뼈가 지속적으로 형성과 파괴의 과정을 거치는 것을 일컬으며,²⁾ 골다공증, 만성 관절 류머티즘 등의 대사성 뼈 질환은 파골세포에 의한 뼈 흡수가 이상 활성화되어 나타난 결과라고 할 수 있다.³⁾

파골세포는, 체내 면역기능을 담당하는 수지상세포(dendritic cell), 대식세포(macrophage)와 공통의 전구세포로부터 분화한다.⁴⁾ 더욱이 감염 및 염증 반응 결과 공통적으로 수반되는 뼈의 손실(bone loss)은 면역계와 파골세포간의 밀접한 관계를 시사한다고 할 수 있다.⁵⁾

실제로 파골세포의 활성화에는 면역세포가 분비하는 사이토카인을 비롯한 많은 신호전달 분자가 관여하는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ 그중 IL-1/Toll-like receptor superfamily는 신호전달 물질인 MyD88, IRAK, TRAF6의 순차적 결합을 유도하여, 그 결과

IL-1/Toll-like receptor superfamily



Fig. 1 – Signal transduction via IL-1/Toll-like receptor superfamilies in osteoclast

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-710-9572 (팩스) 02-715-9498
(E-mail) myim@sookmyung.ac.kr

NF-κB의 활성화를 통해 반응을 매개하는 것으로 인식되어 왔다 (Fig. 1)⁷⁾ 특히 TRAF6는 IL-1/Toll-like receptor superfamily뿐 아니라 3 cell의 CD40로부터의 반응도 매개하는 것으로 밝혀져, 주목을 끌고 있다.⁸⁾ 최근 H. Ye 등은 이러한 TRAF6의 작용 메커니즘을 이해하고 그 생물학적 반응을 조절하기 위해 TRAF6와 CD40의 결합 구조를 분석한 바 있다.⁹⁾

본 연구에서는 결합구조 분석에서 보여진 TRAF6의 결합 motif가 IRAK에도 존재하며, 이것이 기능적으로도 중요하다는 것을 명확히 하기 위해 IRAK의 돌연변이체를 제작하여 NF-κB의 활성을 조사하였기에 이에 보고하는 바이다.

실험방법

hIRAK 돌연변이체의 제작

pcDNA3.1 vector에 cloning된 hIRAK의 결손 돌연변이체는 Stratagene의 Ex-Site method에 의해, 94°C 2분, 50°C 1분, 72°C 30초를 1 cycle, 94°C 1분, 56°C 2분, 68°C 2분을 8 cycle, 68°C 30초를 1 cycle의 반응으로 제작하였다. 한편 염기 치환 돌연변이체는 QuickChange method(Stratagene, La Jolla, CA)에 의해, 94°C 2분 처리 후 94°C 1분, 56°C 1분, 68°C 12분을 12 cycle, 68°C 5분을 1 cycle의 반응으로 제작하였다. 제작된 모든 돌연변이체는 DNA 서열을 읽어 확인하였다.

Transfection 및 NF-κB의 활성 측정

0.1 μg의 각각의 돌연변이체를 75 ng의 NF-κB-luciferase reporter plasmid, transfection의 효율을 측정하기 위한 25 ng의 β-galactosidase plasmid와 함께, 6-well plate에서 배양한 293T 세포에 transfection 하였다. Transfection 하는 전 DNA의 양은 empty pcDNA3.1 vector를 더하여 항상 1 μg이 되도록 유지하였다. 세포는 24시간 배양 후 수집하여, 보고된 방법¹⁰⁾에 따라 luciferase와 β-galactosidase assay에 사용하였다. 측정된 luciferase의 활성치는 β-galactosidase 값에 의해 표준화되었다.

통계처리

그러프의 모든 수치는 각 실험횟수에 대한 평균과 표준 오차로 나타내었다.

실험결과

최근 H. Ye 등은 CD40에 의한 신호전달은 CD40의 231-QEPQVEINF-238 배열이 TRAF6의 TRAF-C domain과 결합함으로써 이루어짐을 밝히고, 이에 기초한 TRAF6 결합 motif로 XXPXEdd(F/Y/E/D)를 제안하였다.⁹⁾

한편, hIRAK 또한 TRAF6와의 결합을 통해 IL-1/Toll-like

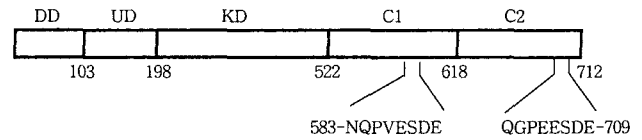


Fig. 2 – Domains of hIRAK. DD, death domain; UD, domain of unknown function; KD, kinase domain; Cn, C-terminal domain n. The putative TRAF6-binding sequences in C1 and C2 are indicated.

receptor superfamily의 신호전달에 관여하는 분자로 CD40와 동일하게 TRAF-C domain과 결합하는 것으로 알려졌다.¹¹⁾ 이러한 사실로 볼 때 XXPXEdd(F/Y/E/D)의 TRAF6 결합 motif가 hIRAK에도 존재할 가능성은 높다고 하겠다.

hIRAK은 N-말단에 존재하는 DD(아미노산 번호 : 1-103)를 시작으로 UD(104-198), KD(199-522), C1(523-618), C2(619-712) 등의 복수 domain을 가지며 그중 C1과 C2가 TRAF6를 매개한 IL-1/Toll-like receptor superfamily의 신호전달에 관여하고 있다 (Fig. 2).¹²⁾ 이러한 지견을 바탕으로 C1과 C2 domain의 아미노산 서열을 조사한 결과, 2곳의 아미노산 서열 부위 583-NQPVESDE-590(C1)과 702-QGPEESDE-709(C2)가 TRAF6의 결합에 관여하여 생물학적 활성을 나타낼 것이라고 생각되었다. 이러한 가설을 증명하기 위해 C1 domain 결손체(dC1)와 그의 Q702A, P704Q, E706A, D708A, E709A 돌연변이체, C2 domain 결손체(dC2)와 그의 N583A, P585Q, E587A, D589A, E590A 그리고 E587A/E706A의 돌연변이체를 제작하여 NF-κB 활성을 조사하였다.

Fig. 3A에서 보여지는 것과 같이 dC1과 dC1/Q702A는 NF-κB 유도 활성을 지니는 반면 dC1/P704Q, dC1/E70dC1/D708A, dC1/E709A는 그 활성이 현저히 감소하였다. 이와 마찬가지로 dC2의 돌연변이체 역시 dC2와 dC2/N583A를 제외한 dC2/P585Q, dC2/E587A, dC2/D589A, dC2/E590A는 감소된 활성을 보였다(Fig. 3B). dC1과 dC2가 NF-κB 유도 활성을 유지하고 있는 것으로부터 hIRAK의 TRAF6 결합에는 C1과 C2 domain이 상호 보완적으로 작용하고 있음을 유추할 수 있다. 또한 C1과 C2에 대한 이중 돌연변이체의 활성 감소는, 예상했던 바와 같이 C1과 C2 각각의 583-NQPVESDE-590과 702-QGPEESDE-709 배열이 TRAF6 결합 부위로 작용함을 명백히 하였다. 그러나 E587A/E706A의 경우, 미약하나 NF-κB 유도 활성을 지니는 것으로 보아 제 3의 TRAF6 결합 부위가 존재할 가능성도 배제할 수 없다고 하겠다.

본 연구에서 야생형 hIRAK에 대한 dC2 돌연변이체들의 활성 감소가 dC1 돌연변이체들에 비해 미비한 반면, E587A/E706A는 큰폭의 활성 감소를 보인 것은 흥미로운 사실이라 할 수 있다. 최근 TRAF6에 결합하여 NF-κB 유도를 억제하는 단백질이 새롭게 발견된 사실로¹³⁾ 미루어, C2 domain에 결합하는 억제성 단

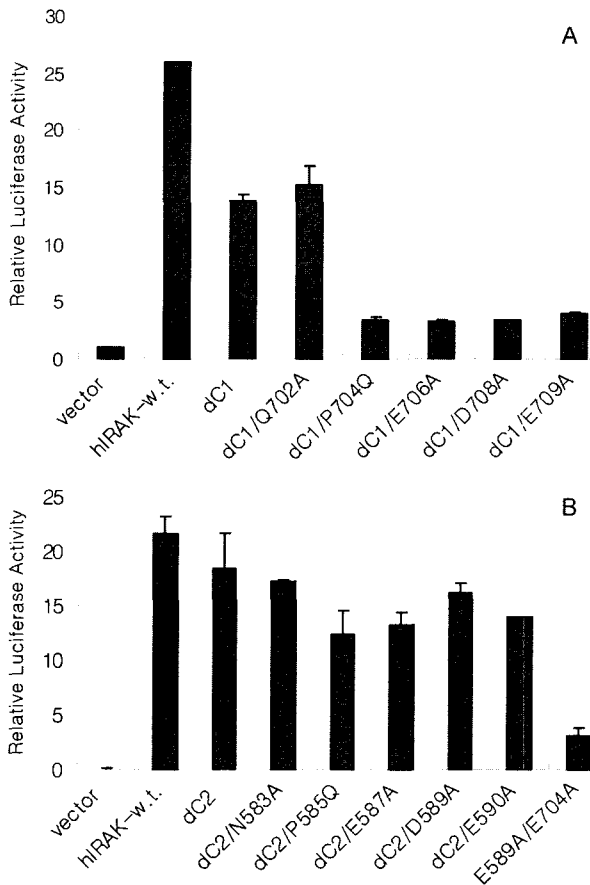


Fig. 3 – Functional significance of structurally observed TRAF6 and hIRAK interface residues. A. hIRAK dC1 or mutants was co-transfected with an NF- κ B-responsive luciferase reporter plasmid and β -galactosidase. Relative luciferase activity was normalized for β -galactosidase activity. Representative results of three independent transfections are shown. B. hIRAK dC2 or mutants was transfected as in A.

질의 존재가 제기될 수 있다. 앞으로 Yeast two-hybrid 등의 실험 방법을 사용하여 이러한 억제성 단백질의 존재를 추적하는 것은 의미있는 실험이 될 것이다.

고찰 및 결론

최근 인구가 지속적으로 증가하고 고령화가 심화됨에 따라 뼈 질환에 관한 국민적 관심이 높아지고 있다. 관절염과 골다공증과 같은 질병은 생명에 치명적인 손상을 불러오지는 않지만 여성 및 노령 인구에 빈발하는 질환으로 삶의 질을 급격히 떨어뜨림으로써 사회·문화적으로 파급효과가 큰 질환이라 할 수 있다.¹⁴⁾ 그럼에도 불구하고 파골세포의 분화 및 뼈 파괴 기전은 아직 밝혀지지 않았고, 그로 인해 예방 및 치료법에 대한 명확한 지침이 확립되지 못한 것이 현실이다.

본 연구에서는 파골세포의 활성화에 관여하는 IL-1/Toll-like

receptor superfamily의 신호 전달 경로를 조절하고자 hIRAK의 TRAF6 결합 부위를 조사하였다. hIRAK은 C1과 C2 domain에 TRAF6 결합 motif가 존재하며, 각각의 domain이 상호 보완적으로 작용함을 확인할 수 있었다.

현재 파골세포 관련 분자의 펩타이드 유사체를 사용하여 뼈 질환을 치료하고자 하는 시도가 많이 이루어지고 있다.¹⁵⁾ 본 연구 결과 또한 펩타이드 유사체를 이용하여 IL-1/Toll-like receptor superfamily에 의한 파골세포 활성화 반응을 조절할 수 있는 가능성을 제시하고 있으며, 이는 차후 뼈 질환의 치료 등의 의학적 응용에 매우 유용할 것이라 사료된다.

참고문헌

- Jacobs, J. J., Roebuck, K. A., Archibeck, M., Hallab, N. J. and Glant, T. T. : Osteolysis: basic science. *Clin. Orthop.* **393**, 71 (2001).
- Masi, L. and Brandi, M. L. : Physiopathological basis of bone turnover. *Q. J. Nucl. Med.* **45**, 2 (2001).
- Duong, L. T. and Rodan, G. A. : Regulation of osteoclast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2**, 95 (2001).
- Miyamoto, T., Ohneda, O., Arai, F., Iwamoto, K., Okada, S., Takagi, K., Anderson, D. M. and Suda, T. : Bifurcation of osteoclasts and dendritic cells from common progenitors. *Blood.* **98**, 2544 (2001).
- Lane, N. E. and Rehman, Q. : Osteoporosis in the rheumatic disease patient. *Lupus.* **11**, 675 (2002).
- Grcevic, D., Katavic, V., Lukic, I. K., Kovacic, N., Lorenzo, J. A. and Marusic, A. : Cellular and molecular interactions between immune system and bone. *Croat. Med. J.* **42**, 384 (2001).
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. and Goeddel, D. V. : TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature.* **383**, 443 (1996).
- Pullen, S. S., Labadia, M. E., Ingraham, R. H., McWhirter, S. M., Everdeen, D. S., Alber, T., Crute, J. J. and Kehry, M. R. : High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry.* **38**, 10168 (1999).
- Ye, H., Arron, J. R., Lamothe, B., Cirilli, M., Kobayashi, T., Shevde, N. K., Segal, D., Dziveno, O. K., Vologodskaja, M., Yim, M., Du, K., Singh, S., Pike, J. W., Darnay, B. G., Choi, Y. and Wu, H. : Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature.* **418**, 443 (2002).
- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Vologodskaja, M., Steinman, R. M. and Choi, Y. : The TRAF family of signal transducers mediates NF- κ B activation by the TRANCE receptor. *J. Biol. Chem.* **273**, 28355 (1998).

- 11) Kobayashi, N., Kadono, Y., Naito, A., Matsumoto, K., Yamamoto, T., Tanaka, S. and Inoue, J. : Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.* **20**, 1271 (2001).
- 12) Li, X., Commane, M., Jiang, Z. and Stark, G. R. : IL-1-induced NF- κ B and c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation diverge at IL-1 receptor-associated kinase (IRAK). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4461 (2001).
- 13) Shin J. N., Kim, I., Lee, J. S., Koh, G. Y., Lee, Z. H. and Kim, H. H. : A novel zinc finger protein that inhibits osteoclastogenesis and the function of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *J. Biol. Chem.* **277**, 8346 (2002).
- 14) Srivastava, M. and Deal, C. : Osteoporosis in elderly: prevention and treatment. *Clin. Geriatr. Med.* **18**, 529 (2002).
- 15) Body, J. J., Greipp, P., Coleman, R. E., Facon, T., Geurs, F., Feraud, J. P., Harousseau, J. L., Lipton, A., Mariette, X., Williams, C. D., Nakanishi, A., Holloway, D., Martin, S. W., Dunstan, C. R. and Bekker, P. J. : A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer.* **97**, 887 (2003).