

## Heat Shock Protein 90 $\beta$ Inhibits Phospholipase C $\gamma$ -1 Activity *in vitro*

Sang-Min Cho, Sung-Kuk Kim and Jong-Soo Chang<sup>†</sup>

Department of Life Science, College of Natural Science, Daejin University, Kyeonggido 487-711, Korea

Phospholipase C- $\gamma$ 1 (PLC- $\gamma$ 1) is an important signaling molecule for cell proliferation and differentiation. PLC- $\gamma$ 1 contains two pleckstrin homology (PH) domains, which are responsible for protein-protein interaction and protein-lipid interaction. PLC- $\gamma$ 1 also has two Src homology (SH)2 domains and a SH3 domain, which are responsible for protein-protein interaction. To identify proteins that specifically binds to PH domain of PLC- $\gamma$ 1, we prepared and incubated the glutathione S-transferase(GST)-fused PH domains of PLC- $\gamma$ 1 with COS7 cell lysate. We found that 90 kDa protein specifically binds to PH domain of PLC- $\gamma$ 1. By matrix-assisted laser desorption ionization time of flight-mass spectrometry, the 90 kDa protein revealed to be heat shock protein (Hsp) 90 $\beta$ . Hsp 90 $\beta$  is a molecular chaperone that stabilizes and facilitates the folding of proteins that are involved in cell signaling, including receptors for steroids hormones and a variety of protein kinases. To know whether Hsp 90 $\beta$  affects on PLC- $\gamma$ 1 activity, we performed PIP<sub>2</sub> hydrolyzing activity of PLC- $\gamma$ 1 in the presence of purified Hsp 90 $\beta$  *in vitro*. Our results show that the Hsp 90 $\beta$  dose-dependently inhibits the enzymatic activity of PLC- $\gamma$ 1 and further suggest that Hsp 90 $\beta$  regulates cell growth and differentiation via regulation of PLC- $\gamma$ 1 activity.

**Key Words:** Phospholipase C- $\gamma$ 1, Heat shock protein 90 $\beta$ , GST pull down assay, PIP<sub>2</sub>-hydrolysis

### 서 론

Phospholipase C  $\gamma$ -1 (PLC- $\gamma$ 1)은 인지질 분해효소로서 인지질인 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)를 가수분해하여 2차 전령인 diacylglycerol (DG)과 inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)를 생성한다 (Berridge, 1993; Nishizuka, 1995). DG는 세포 내에서 protein kinase C (PKC)의 활성화자로 작용하고, IP<sub>3</sub>는 endoplasmic reticulum (ER)의 IP<sub>3</sub> receptor에 결합함으로써 ER 내의 Ca<sup>2+</sup>를 방출시켜서 세포질의 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 상승시키는 작용을 한다 (Kamat and Carpenter, 1997).

PLC- $\gamma$ 1은 1290개의 amino acid로 이루어진 단백질로서 몇 가지 특정 영역을 가지고 있다. 여기에는 catalytic 영역인 X와 Y 영역, 인산화된 수용체와 결합하는 SH 영역, 그리고 단백질이나 인지질이 결합하는 PH 영역으로 구성되어 있다 (Lemmon et al., 1996; Lemmon and Ferguson, 2000). PLC- $\gamma$ 1은 두 개의 PH 영역을 가지고 있는데 그 하나는 N-terminal 부위에 존재하고 또 다른 PH 영역은 SH 영역 (SH2-SH2-SH3)

에 의해 나뉘어져 있다 (Gibson et al., 1994; Chang et al., 2002). PH 영역은 세포 신호전달 단백질인 G 단백질의  $\beta\gamma$  소아단위체 (Touhara et al., 1994)와 특이적으로 결합하고 PKC (Yao et al., 1997), EF-1 $\alpha$  (Chang et al., 2002) 등과도 상호작용을 한다.

PLC- $\gamma$ 1을 매개로 하는 세포 내의 신호전달을 이해하기 위해서는 PLC- $\gamma$ 1에 결합하는 조절 단백질을 동정하고 나아가 이들의 상호작용이 구체적으로 세포의 신호흐름에 어떠한 영향을 미치는지를 밝혀내어야 한다. 우리는 이전의 연구에서 GST-융합 단백질계를 이용하여 PLC- $\gamma$ 1의 PH 영역에 결합하는  $\beta$ -tubulin (Chang et al., 2005)과 neurofilament light chain (NF-L) (Kim et al., 2006) 등을 동정한 바 있다. 본 연구에서는 PLC- $\gamma$ 1의 PH 영역에 heat shock protein (Hsp) 90 $\beta$ 가 결합한다는 사실을 밝히고 이 단백질이 PLC- $\gamma$ 1의 효소활성을 저해하고 있음을 확인하였다.

Hsp 90 $\beta$ 는 단백질의 3차원 구조 형성 과정에서 단백질의 정확한 folding이 이루어지도록 유도하는 분자 샤페론 (molecular chaperone)의 일종이다 (Buchner, 1999). 이 단백질은 또한 세포 분열, 성장, 전사 조절 및 발생에 관여하는 중요한 단백질들과 결합하기도 한다 (Whitesell et al., 1994; Stancato et al., 1997; Sato et al., 2000). 또한 세포 신호전달과 조절을 담당하는 다양한 종류의 kinase와도 서로 상호작용을 이루고 스테로이드 호르몬 수용체와 결합하여 그 기능적 역

\*논문 접수: 2006년 9월 25일

수정재접수: 2006년 11월 1일

<sup>†</sup>교신저자: 장종수, (우) 487-711, 경기도 포천시 선단동

대진대학교 자연과학대학 생명과학과

Tel: 031-539-1853, Fax: 031-539-1850

e-mail: jchang@daejin.ac.kr

활을 하기도 한다 (Luo and Benovic, 2003). 건강한 세포와 비교하여 여러 암세포들은 Hsp 90 $\beta$ 의 수치가 증가되어 있으며, Hsp 90 $\beta$ 가 차단될 경우, 암세포를 성장시키는 단백질의 수치가 감소한다는 사실이 보고된 바 있다 (Vilenchik et al., 2004).

## 재료 및 방법

### 1. Materials

본 실험에 사용된 Hsp 90 $\beta$  cDNA는 American type culture collection (ATCC)에서 구입하였다. GST fusion protein에 사용된 GST vector는 Amersham Pharmacia Biotech에서 구입하였다. 그리고 anti-FLAG antibody와 pFLAG-CMV2 vector는 Sigma사에서 구입하였다. Nitrocellulose membrane은 Bio-Rad사에서 구입하였고, glutathione sepharose 4B (GSH)와 ECL solution은 Amersham Pharmacia Biotech에서 구입하였다. FLAG-M2 agarose bead 및 3X FLAG peptide는 Sigma사에서 구입하였고  $[^3\text{H}]$ -PIP<sub>2</sub>는 Perkin Elmer Life Sciences (Boston, USA)에서 구입하였다.

### 2. Cell culture and expression of pFLAG-Hsp 90 $\beta$

원숭이 신장 세포인 COS7 cell은 ATCC에서 구입하였다. 세포는 37 $^{\circ}\text{C}$ , 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 항생제 (100 units/ml penicillin 및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin)와 10%의 소의 태아 혈청이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양하였다.

Hsp 90 $\beta$ 를 코딩하는 cDNA를 PCR하여 증폭시킨 후 EcoRV과 SalI의 제한효소를 사용하여 pFLAG-CMV2 vector (Sigma)에 삽입하였다. 이렇게 제작된 재조합 DNA (pFLAG-Hsp 90 $\beta$ ) 5  $\mu\text{g}$ 을 lipofectamine (Invitrogen) 10  $\mu\text{l}$ 와 혼합한 후 이를 COS7 cell에 transfection 하였다. 48시간이 지난 후 COS7 cell을 회수하여 FLAG epitope이 융합된 Hsp 90 $\beta$ 를 정제하였다. 그 방법은 다음과 같다. COS7 cell에서 pFLAG-Hsp 90 $\beta$ 를 과잉발현 시킨 후 Igepal buffer (20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1% Igepal CA-630, 300 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF) and 1 mM sodium orthovanadate) 1 ml에 용해시켰다. 추출된 COS7 cell lysate를 FLAG-M2 agarose bead와 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 반응시켰다. 이 bead를 TBS buffer (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl)로 수세하였다. 3X FLAG peptide를 첨가하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응시켜 bead로부터 FLAG-Hsp 90 $\beta$  fusion protein을 분리시킨 후 원심 분리하여 FLAG-Hsp 90 $\beta$  fusion protein을 순수 분리하였다 (Welch and Feramisco, 1982). 단백질의 정량은 BSA를 대조구로 하는 BCA kit (Pierce Co.)를 사용하였다.

### 3. Expression and purification of GST fusion proteins

PLC- $\gamma$ 1 cDNA (Suh et al., 1988)를 주형으로 하여 특정 영역 부위를 PCR하였다. 5' 부위에는 EcoRI 제한효소를 인식하는 primer를, 3' 부위에는 XhoI 제한효소를 인식하는 primer를 사용하였다. 제한효소를 이용하여 PCR로 증폭된 PLC- $\gamma$ 1의 다양한 영역들을 pGEX 5X-1 vector에 삽입하였다. PLC- $\gamma$ 1의 각 영역에 해당하는 GST fusion protein들의 아미노산 위치는 다음과 같다. PH<sub>1</sub>: 25~145, nPH<sub>2</sub>: 477~547, SH2N: 550~667, SH2C: 668~735, SH3: 791~836, cPH<sub>2</sub>: 850~979 아미노산에 해당한다 (Chang et al., 2002). 재조합 DNA를 *E. coli* DH5 $\alpha$ 에 형질전환 하여 GST fusion protein을 발현하였다. 형질전환된 *E. coli* DH5 $\alpha$ 를 3 ml LB배지에 하룻밤 배양한 후 이를 다시 30 ml 새로운 LB배지에 옮겨 3시간 더 배양하여 0.1 mM isoprophylthio- $\beta$ -galactosidase (IPTG)를 처리하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 동안 GST fusion protein이 합성되도록 유도하였다. 대장균을 8,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 집균하고 phosphate buffer saline (PBS) 2 ml 넣어 현탁하였다. Ultrasonicator를 이용하여 cell을 lysis하고 triton X-100을 최종 1% 되게 처리한 후 10분간 원심 분리하여 그 상층액을 glutathione sepharose 4B (GSH) bead와 2시간 동안 반응한 후 수세하여 GST 융합 단백질을 순수 분리 하였다.

### 4. *In vitro* binding assay with GST fusion protein

GSH bead에 결합된 GST fusion protein을 각각 3  $\mu\text{g}$ 로 정량한 후, 여기에 COS7 cell lysates를 1 ml (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )씩 첨가하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 반응하였다. 이를 Igepal buffer로 3회 수세한 후 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 하였다. Coomassie brilliant blue (CBB)로 30분간 염색한 뒤 탈색하여 단백질 밴드를 확인하였다.

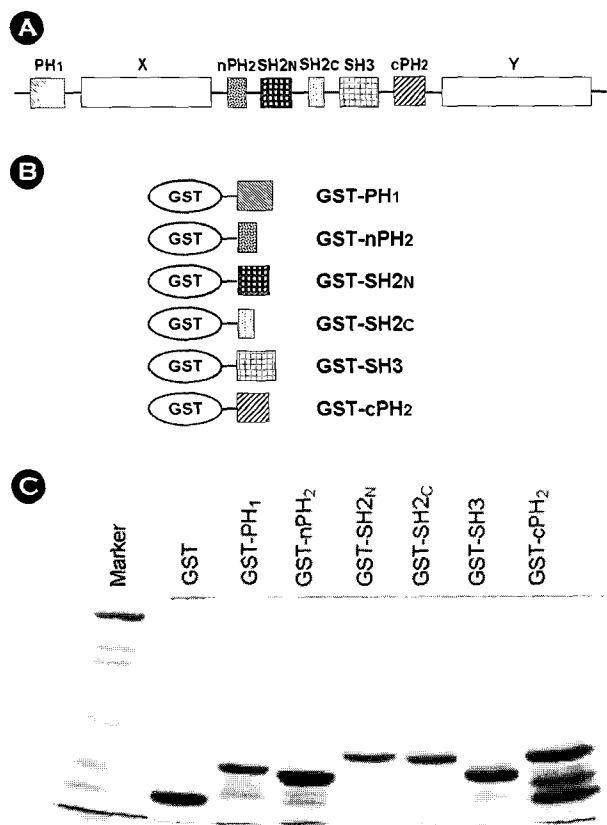
### 5. Immunoprecipitation and immunoblotting

면역침전은 다음과 같이 수행하였다. FLAG-Hsp 90 $\beta$ 를 과잉발현시킨 COS7 cell을 PBS로 2회 수세한 후 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) 완충액 (20 mM Tris-Cl, pH 7.2, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 1 mM PMSF and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin)에 lysis하였다. Lysates를 Pan-sorbin (Calbiochem, La Jolla, CA)에 결합한 항-FLAG 항체와 혼합하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 약 2시간 가량 면역반응을 실시하였다. 이를 원심 분리하여 ice-cold RIPA buffer로 3회 수세한 후 10% SDS-PAGE하였다. Gel에 존재하는 단백질을 200 mA로 4시간 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. Membrane에 결합된 단백질은 항 FLAG 항체로 1시간 반응한 다음 horseradish peroxidase (HRP)가 conjugation된 항 mouse 항체를

2차 항체로 사용하였다. ECL detection system (Amersham Biosciences)을 이용하여 target protein (FLAG-Hsp 90 $\beta$ )의 존재 여부를 확인하였다.

#### 6. PLC- $\gamma$ 1 activity assay

순수 분리한 재조합 PLC- $\gamma$ 1 (Bae et al., 2000) 0.1  $\mu$ g과 COS7 세포에서 순수 분리한 Hsp 90 $\beta$ 를 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1의 물 비율이 되게 혼합한 후 총 부피가 30  $\mu$ l가 되도록 만들었다. 이 시료를 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응하여 단백질-단백질 상호작용을 유도한 후 기질 [75 mM PIP<sub>2</sub> vesicle, 75 mM [<sup>3</sup>H]-PIP<sub>2</sub> (9,000~10,000 cpm/assay, Perkin Elmer Life Sciences), 30 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 750 mM PE]을 첨가하였다. 이 반응액을 30 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응한 후, chloroform/methanol/HCl (50:50:0.3) 1 ml을 첨가함으로써 반응을 종결하였다. 이것을 교반기로 혼합한 뒤 2,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액 300  $\mu$ l를 scintillation counting을 하였다 (Hepler et al., 1993; Bae et al., 2000).



**Fig. 1.** Construction scheme of the PLC- $\gamma$ 1 and GST fusion protein. **A**, PLC- $\gamma$ 1 has two PH domains (PH1 and split PH2) in addition to the SH2N, SH2C, SH3 domains and catalytic X, Y domains. **B**, Each domain of PLC- $\gamma$ 1 was fused with GST for bacterial expressions. **C**, GST fusion proteins were expressed and resolved on a 10% SDS-PAGE. Marker represents 203, 119, 100, 51, 37 kDa respectively.

## 결 과

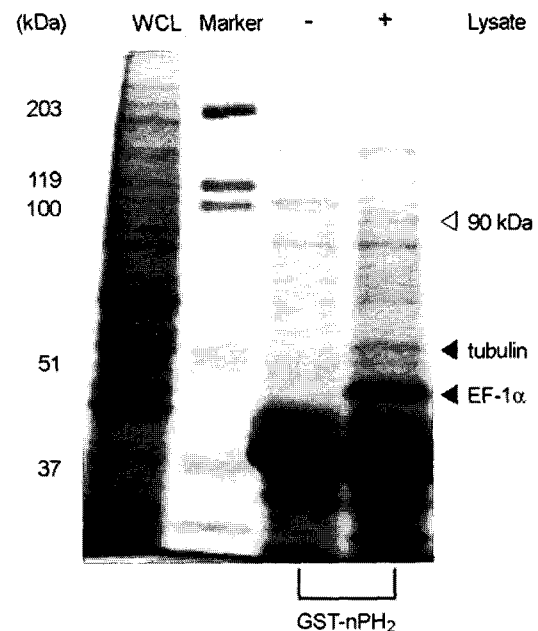
### 1. GST-융합 단백질의 발현 및 정제

PLC- $\gamma$ 1은 다른 단백질들과 결합할 수 있는 여러 가지 영역을 가지고 있다 (Rhee, 2001; Chang et al., 2005; Varnai et al., 2005). 이들 영역은 Fig. 1A에서 나타난 바와 같이 PH<sub>1</sub>, nPH<sub>2</sub>, SH2N, SH2C, SH3, cPH<sub>2</sub> 등의 순서로 존재하고 있다. 우리는 PLC- $\gamma$ 1의 이들 영역과 결합하는 미지의 단백질을 동정하기 위하여 이들 영역만을 암호화하는 유전자 부위를 증폭시킨 후 이를 GST와 결합시킨 융합 단백질을 코딩하는 재조합 DNA를 제작하고 이를 대장균에서 발현하였다 (Fig. 1B 및 C).

GST fusion protein의 합성은 IPTG를 사용하여 유도하였다. 합성된 융합 단백질을 GSH bead에 결합시킨 후 Igepal 완충액으로 수세하여 순수하게 분리할 수 있었다. 각 GST fusion protein들은 SDS-PAGE 상에서 그 분자량 및 발현 양을 확인할 수 있었다 (Fig. 1C).

### 2. PLC- $\gamma$ 1과 결합하는 Hsp 90 $\beta$

우리는 이전의 연구에서 PLC- $\gamma$ 1의 PH 영역과 특이적으로 결합하는 EF-1 $\alpha$  (Chang et al., 2002), NF-L (Kim et al., 2006)



**Fig. 2.** The PH domain of PLC- $\gamma$ 1 specifically binds to Hsp 90 $\beta$ . Purified GST-PH domain fusion proteins were incubated with (+) or without (-) COS7 cell lysate. The bound proteins were separated by GST pull-down and subjected to 10% SDS-PAGE. A noticeable protein with 90 kDa (open arrow) was detected from GST-PH fusion protein.

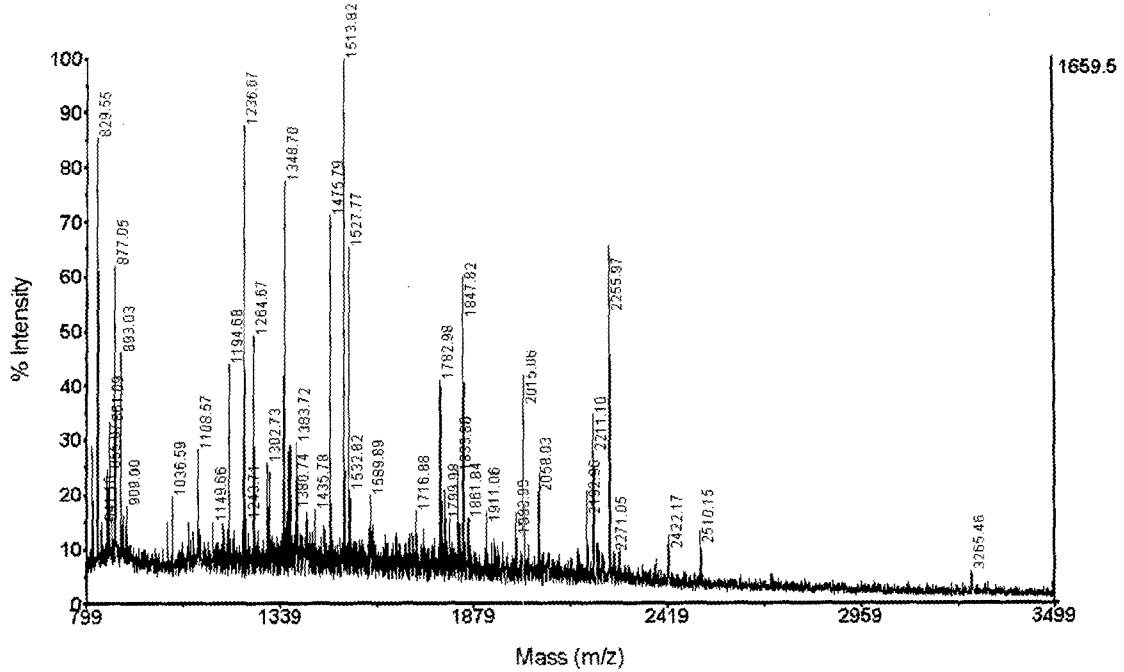


Fig. 3. MALDI-TOF mass spectrometric analysis of tryptic peptides from the unidentified 90 kDa protein.

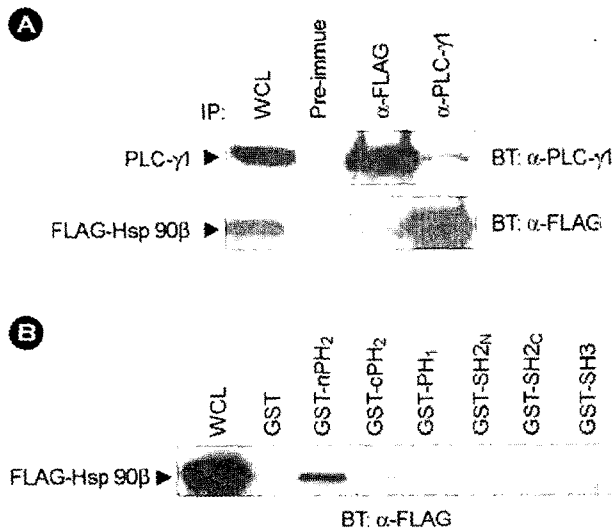


Fig. 4. Immunoprecipitation analysis reveals that PLC-γ1 associates with Hsp 90β in COS7 cells. **A**, PLC-γ1 co-immunoprecipitates with Hsp 90β and vice versa. **B**, PH domain of PLC-γ1 specifically binds to Hsp 90β. WCL represents whole cell lysate of COS7 cells.

및 β-tubulin (Chang et al., 2005)을 동정한 바 있다. 본 연구에서는 PLC-γ1의 PH 영역에 결합하는 단백질로서 이전의 실험에서 확인하지 못했던 90 kDa 단백질을 동정하고자 하였다. 이 단백질은 원숭이 세포인 COS7 cell lysate에서 결합되어 나온 단백질로서 PLC-γ1의 PH 영역에 결합하고 있음을 볼 수 있다 (Fig. 2). 이 단백질을 동정하기 위하여 밴드

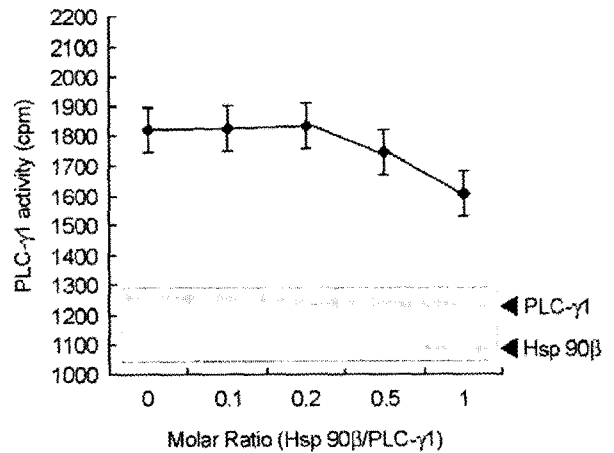


Fig. 5. Hsp 90β inhibits PLC-γ1 activity *in vitro*. The PIP<sub>2</sub> hydrolyzing activity of PLC-γ1 was measured in the presence of purified FLAG-Hsp 90β. PLC-γ1 activity is expressed as the radioactivity of [<sup>3</sup>H]-IP<sub>3</sub>. The data represent the average of duplicate determinations (mean ± range) from three experiments with similar results.

를 gel에서 오려낸 후 이를 matrix-assisted laser-desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)로 분석하였다 (Fig. 3). Trypsin에 의해 생성된 여러 가지 폴리펩티드들을 NCBI data base에서 검색해 본 결과 90 kDa의 단백질은 Hsp 90β임을 알 수 있었다.

이에, 두 단백질이 세포 내에서도 서로 상호작용하고 있는지를 확인해 보기 위하여 면역침전을 실시하였다. FLAG epitope이 tagging된 pFLAG-Hsp 90β가 발현된 COS7 cell

lysate을 각각 항 FLAG 항체 및 항 PLC- $\gamma$ 1 항체를 사용하여 면역침전한 후 이를 위 두 항체로서 웨스턴 브롯팅한 결과, Fig. 4에서와 같이 두 단백질이 서로 공역침전됨을 확인할 수 있었다. 이 사실은 PLC- $\gamma$ 1과 Hsp 90 $\beta$ 이 세포 내에서 서로 결합하고 있음을 의미한다. 또한 우리는 Hsp 90 $\beta$ 와 PLC- $\gamma$ 1의 상호작용이 PH 영역에만 특이적으로 결합하는지 아니면 다른 영역에도 결합하는지를 확인하기 위하여 GST-pull down assay를 실시하였다. 이 결과, Hsp 90 $\beta$ 는 PLC- $\gamma$ 1의 nPH<sub>2</sub> 영역에만 특이적으로 결합한다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 4B).

### 3. Hsp 90 $\beta$ 에 의한 PLC- $\gamma$ 1의 효소활성 저해

Hsp 90 $\beta$ 와 PLC- $\gamma$ 1이 세포 내에서 서로 결합한다는 것은 Hsp 90 $\beta$ 가 PLC- $\gamma$ 1의 효소활성에 어떤 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 이에, 우리는 Hsp 90 $\beta$ 가 효소활성에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 *in vitro* enzyme activity assay를 수행하였다. 항 FLAG 항체를 이용하여 COS7 세포에서 친화성크로마토그래피로 분리한 Hsp 90 $\beta$ 를 PLC- $\gamma$ 1과 섞어준 후 PLC- $\gamma$ 1이 그 기질인 PIP<sub>2</sub>를 분해하는 정도를 확인하였다. 즉, 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1의 몰 비율 (Hsp 90 $\beta$ /PLC- $\gamma$ 1)로 두 단백질을 섞어준 후, 시험관에서 생성되는 [<sup>3</sup>H]-IP<sub>3</sub>의 양을 scintillation counter로 측정함으로써 PLC- $\gamma$ 1의 활성을 검정하였다. 그 결과, Hsp 90 $\beta$ 의 농도에 비례하여 PLC- $\gamma$ 1의 활성이 감소함을 확인할 수 있었다 (Fig. 5). 이 결과는 Hsp 90 $\beta$ 가 PLC- $\gamma$ 1의 nPH<sub>2</sub> 영역에 결합하여 PLC- $\gamma$ 1의 효소활성을 저해하고 있음을 보여준다.

## 고 찰

PLC- $\gamma$ 1은 세포 외부의 자극에 반응하여 세포 내 신호전달을 매개하는 단백질이다. 따라서 PLC- $\gamma$ 1에 결합하는 단백질을 동정해 내는 것은 세포 내의 신호전달 과정을 이해하는 좋은 방법 중의 하나이다. 본 연구에서는 이에 근거하여 PLC- $\gamma$ 1에 결합하는 미지의 단백질을 동정하고자 하였으며 그 결과 Hsp 90 $\beta$ 가 PLC- $\gamma$ 1의 PH 영역에 특이적으로 결합하고 있음을 확인하였다. 또한 시험관 내에서 Hsp 90 $\beta$ 가 PLC- $\gamma$ 1의 효소활성을 억제함을 밝혔다.

PLC- $\gamma$ 1의 PH 영역은 세포막 부위의 phosphoinositide를 인식하고 여기에 결합하는 기능 (Falasca et al., 1998)을 가지고 있어서 단백질-단백질의 상호작용 및 단백질-인지질의 상호작용이 보고된 바 있다 (Rhee, 2001; Chang et al., 2002; Varnai et al., 2005).

이번 연구에서 밝혀진 Hsp는 열 충격, 아미노산 유도제, 중금속 및 oxidative stress 등과 같은 단백질변성 스트레스 자극에 의해 발현이 증가하는 단백질로 샤페론 단백질의 일종

이다 (Buchner, 1999). 단백질의 기능과 관련하여 중요한 문제 중 하나는 생성된 단백질이 활성을 나타내기 위해 적절한 형태로 접힘 (folding)을 하여야 하는데, 이때 중요한 역할을 하는 것이 샤페론 단백질이다. 즉, 샤페론은 단백질의 소수성 부분에 결합하여 단백질의 접힘을 도와 비정상적인 접힘 (misfolding)이나 응집 (aggregation)을 막아줄 뿐만 아니라 단백질의 세포 내 소기관으로의 이동, 변성된 단백질의 분해를 도움으로써 세포의 성장, 분화 및 생존과정에서 중요한 작용을 한다 (Whitesell et al., 1994; Stancato et al., 1997).

세포 신호전달에서 있어서 PLC- $\gamma$ 1의 역할과 관련하여 이번 연구에서 동정된 Hsp 90 $\beta$ 는 세포 내에서 PLC- $\gamma$ 1의 효소활성을 조절하는 단백질임을 시사한다. 원래, PLC- $\gamma$ 1은 불활성화 상태로 세포질에 존재하다가 epidermal growth factor나 platelet derived growth factor와 같은 성장인자의 자극이 있을 경우 세포막으로 이동하여 PIP<sub>2</sub>를 분해함으로써 이차전령인 DG나 IP<sub>3</sub>를 생성한다 (Rhee, 2001; Lee et al., 1999; Ruwhof et al., 2001; Wang et al., 2001; Bai et al., 2002; Evdonin et al., 2004). 따라서, 외부의 자극이 없는 상태에서 PLC- $\gamma$ 1이 세포질에서 불활성화 상태로 존재한다는 것은 이 효소에 어떤 조절물질이 결합해 있음을 시사한다. 이런 맥락을 고려할 때, 본 연구에서 동정된 Hsp 90 $\beta$ 는 PLC- $\gamma$ 1의 불활성화를 유도하는 단백질 중의 하나가 될 수 있음을 암시한다. 따라서 Hsp 90 $\beta$ 는 이차전령의 생성을 조절함으로써 세포의 분화와 성장을 조절할 수 있음을 시사한다.

## REFERENCES

- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signaling. *Nature* 1993. 361: 315-325.
- Buchner J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci.* 1999. 24: 136-141.
- Bae SS, Perry, DK, Oh YS, Choi JH, Galadari, SH, Ghayur T, Ryu SH, Hannun YA, Suh PG. Proteolytic cleavage of phospholipase C-gamma1 during apoptosis in Molt-4 cells. *FASEB J.* 2000. 14: 1083-1092.
- Bai XC, Liu AL, Deng F, Zou ZP, Bai J, Ji QS, Luo SQ. Phospholipase C-gamma1 is required for survival in heat stress: involvement of protein kinase C-dependent Bcl-2 phosphorylation. *J Biochem.* 2002. 131: 207-212.
- Chang JS, Seok H, Kwon TK, Min DS, Ahn BH, Lee YH, Suh JW, Kim JW, Iwashita S, Omori A, Ichinose S, Numata O, Oh JK, Suh PG. Interaction of elongation factor-1alpha and pleckstrin homology domain of phospholipase C-gamma1 with activating its activity. *J Biol Chem.* 2002. 277: 19697-19702.

- Chang JS, Kim SK, Kwon TK, Bae SS, Min DS, Lee YH, Kim SO, Seo JK, Choi JH, Suh PG. Pleckstrin homology domains of phospholipase C-gamma1 directly interact with beta-tubulin for activation of phospholipase C-gamma1 and reciprocal modulation of beta-tubulin function in microtubule assembly. *J Biol Chem*. 2005. 280: 6897-6905.
- Evdonin AL, Guzhova IV, Margulis BA, Medvedeva ND. Phospholipase C inhibitor, U73122, stimulates release of hsp 70 stress protein from A431 human carcinoma cells. *Cancer Cell Int*. 2004. 4: 2.
- Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J. Activation of phospholipase C-gamma1 by PI 3-kinase induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J*. 1998. 17: 414-422.
- Gibson TJ, Hyvonen M, Musacchio A, Saraste M, Birney E. PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci*. 1994. 19: 349-353.
- Hepler JR, Kozasa T, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, Gilman AG. Purification from sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11 alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. *J Biol Chem*. 1993. 268: 14367-14375.
- Kamat A, Carpenter G. Phospholipase C-gamma1: regulation of enzyme function and role in growth factor-dependent signal transduction. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997. 8: 109-117.
- Kim SK, Choi JH, Suh PG, Chang JS. Pleckstrin homology domain of phospholipase C-gamma1 directly binds to 68-kDa neurofilament light chain. *Exp Mol Med*. 2006. 38: 265-272.
- Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 1996. 85: 621-624.
- Lee YH, Kim S, Kim J, Young Kim K, Kim MJ, Ryu SH, Suh P. Overexpression of phospholipase C-gamma1 suppresses UVC induced apoptosis through inhibition of c-fos accumulation and c-Jun N-terminal kinase activation in PC12 cells. *Biochem Biophys Acta*. 1999. 1440: 235-243.
- Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J*. 2000. 15: 1-18.
- Luo J, Benovic JL. G protein-coupled receptor kinase interaction with Hsp 90 mediates kinase maturation. *J Biol Chem*. 2003. 278: 50908-50914.
- Nishizuka Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J*. 1995. 9: 484-496.
- Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*. 2001. 70: 281-312.
- Ruwhof C, Van Wamel JT, Noordzij LA, Aydin S, Harper JC, Van Der Laarse A. Mechanical stress stimulates phospholipase C activity and intracellular calcium ion levels in neonatal rat cardiomyocytes. *Cell Calcium* 2001. 29: 73-83.
- Stancato LF, Silverstein AM, Owens-Grillo JK, Chow YH, Jove R, Pratt WB. The hsp 90-binding antibiotic geldanamycin decreases raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of raf kinase. *J Biol Chem*. 1997. 272: 4013-4020.
- Suh PG, Ryu SH, Moon KH, Suh HW, Rhee SG. Inositol phospholipid-specific phospholipase C: complete cDNA and protein sequence and sequence homology to tyrosine kinase-related oncogene products. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988. 85: 5419-5423.
- Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp 90. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. 97: 10832-10837.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2001. Chapter 15.14-15.19. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ. Binding of G protein beta gamma-subunits to pleckstrin homology domains. *J Biol Chem*. 1994. 269: 10217-10220.
- Vilenchik M, Solit D, Basso A, Huezio H, Lucas B, He H, Rosen N, Spampinato C, Modrich P, Chiosis G. Targeting wide-range oncogenic transformation via PU24FCl, a specific inhibitor of tumor Hsp 90. *Chem Biol*. 2004. 11: 787-797.
- Varnai P, Bondeva T, Tamas P, Toth B, Buday L, Hunyady L, Balla T. Selective cellular effects of overexpressed pleckstrin homology domains that recognize PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> suggest their interaction with protein binding partners. *J Cell Sci*. 2005. 118: 4879-4888.
- Welch WJ, Feramisco JR. Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J Biol Chem*. 1982. 257: 14949-14959.
- Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. Inhibition of heat shock protein HSP 90-pp60<sup>v-src</sup> heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994. 91: 8324-8328.
- Wang XT, Mcgulloch KD, Wang XJ, Carpenter G, Holbrook NJ. Oxidative stress-induced phospholipase C-gamma1 activation enhances cell survival. *J Biol Chem*. 2001. 276: 28364-28371.
- Yao L, Suzuki H, Ozawa K, Deng J, Lehe C, Fukamachi H,

Anderson WG, Kawakami Y, Kawakami T. Interactions between protein kinase C and pleckstrin homology domains. Inhibition by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phor-

bol 12-myristate 13-acetate. *J Biol Chem.* 1997. 272: 13033-13039.

---