

Ric-8B Modulates the Function of Alpha Subunit of Go

Seung-Hyun Kim and Sung-Ho Ghil[†]

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

Heterotrimeric GTP binding proteins (G proteins) mediate signal generated by neurotransmitter and hormones. Among all G proteins, Go is the most abundant in brain but its role in brain is not clearly understood. To determine the function of the alpha subunit of Go (Go α), we search for the interacting partner of Go α in brain using yeast two-hybrid system. A resistant to inhibitor of cholinesterase (Ric-8B) was identified as a Go α interacting protein. We confirmed interaction between Go α and Ric-8b employing *in vitro* affinity binding assay and showed that the Ric-8b increased the function of Go α . Our findings indicate that Ric-8b is possible guanine nucleotide exchange factor for Go α .

Key Words: Yeast two hybrid, Affinity binding, Guanine nucleotide exchange factor, Brain

서 론

세포들 간의 정보 교환은 세포외부 신호전달물질이 특이적인 수용체에 의해 인식되어 야기되는 일련의 신호전달과정 (Signal transduction)을 통하여 세포 안으로 전달됨으로써 이루어진다. 이러한 신호전달과정은 유전자의 발현산물인 단백질들을 통해서 매개되며, 이들은 단순한 혼합물이 아닌 역동적 상호작용의 관계를 형성하여 신호전달과정을 수행하게 된다.

신호전달 네트워크에 있어서 세포막 수용체로 가장 큰 부분을 차지하고 있는 것이 G-protein-coupled receptor (GPCR)이다. GPCR은 Heterotrimeric GTP 결합단백질 (G 단백질)의 활성을 통해서 세포내 신호전달과정을 촉발하게 되는데, G 단백질은 guanine nucleotide 교환인자 (guanine nucleotide exchange factor, GEF)들에 의해 GTP와 결합이 유도됨으로써 활성화되고, 활성화된 G 단백질들은 세포내의 다양한 하위 신호전달효과자 (effector molecule)들의 활성을 유도함으로써 하위신호전달을 매개하게 된다 (Liu and Anand, 2001). 활성을 마친 G 단백질은 단백질 자체가 가지고 있는 GTPase 도메인에 의해 GTP의 마지막 인산기가 분해되어 GDP로 바뀌면 불활성화되며 다시 세포막의 GPCR과 결합하여 또 다른 외부의 신호를 기다리게 된다.

G 단백질은 α , β , γ 라는 세 종류의 소단위체로 구성되어

있으며 α 소단위체의 아미노산 서열의 차이에 따라 G_s, G_i, G_q, G₁₂ 등으로 분류된다. 그 중 Go는 아미노산 서열이 Gi와 유사하여 Gi family에 속해 있으며, 뇌조직 및 신경세포에서 그 발현량이 높다 (Huff et al., 1985). 또한, 신경세포의 성장원추 (growth cone)의 막을 구성하는 단백질 중의 하나로 알려져 있으며 (Strittmatter et al., 1990), 몇몇 연구들에서 Go가 신경세포의 분화과정에 있어서 중요한 역할을 할 것이라고 보고되어 있다 (Ghil et al., 2000; He et al., 2005; Jordan et al., 2005).

본 연구에서는 아직 밝혀져 있지 않은 Go α 의 상위신호전달자를 조사하기 위하여 Yeast two hybrid 스크리닝을 수행하였고, 그 결과 Ric-8B를 발굴하였다. 이전 보고에 의하면 Ric-8B는 일부 G 단백질의 α 소단위체와 상호작용하여 GEF로 작용할 가능성이 있다고 알려진 단백질이지만, Go의 α 소단위체 (Go α)와의 상호작용은 알려지지 않았다. 본 연구에서는 Go α ::Ric-8B의 상호작용을 GST-pull down assay를 수행하여 검증하였으며, co-immunoprecipitation을 통하여 재차 검증하였다. 또한, Ric-8B가 Go α 의 GEF로서의 기능을 수행하는지 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

Mouse brain cDNA library와 herring testis DNA는 Clontech (Palo Alto, CA, USA), Yeast 성장배지는 Bio101 (Vista, CA, USA), Go α 의 항체는 Santacruz (Santacruz, CA, USA), Flag의 항체, 3-amino-1, 2, 4-triazole, X-gal은 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA), TA cloning 벡터와 Luciferase assay system은 Promega (Madison, MI, USA), glutathione sepharose 4B bead, 그리

*논문 접수: 2007년 4월 2일

수정재접수: 2007년 6월 7일

[†]교신저자: 김성호, (우) 442-760 경기도 수원시 영통구 이의동, 경기대학교 생명과학과

Tel: 031-249-9646, Fax: 031-249-9646

e-mail: shghil@kyonggi.ac.kr

고 protein A sepharose CL-4B bead는 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 발현벡터의 제작

Yeast two hybrid 스크리닝에 사용된 bait 플라스미드는 phybTrp/Zeo-Goa^{Q205L}이며, 이전 보고에 언급되어 있다 (Park and Ghil., 2006). Ric-8B의 발현플라스미드인 pcFlag-Ric-8B는 cDNA library 플라스미드인 pACT2-Ric-8B를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 제작하였다. 이때 사용한 primer는 5'-CAT GGATGAAGAGCGCGCCC-3'와 5'-TGCTCGAGCAGGTGATGATG-3'이며, PCR 결과물을 pGEMT/easy 플라스미드에 삽입한 후, *EcoRI*과 *XhoI* 제한효소로 절단하여 pcFlag 플라스미드에 삽입하여 제작하였다. pcFlag-Ric-8B 플라스미드는 그 N-말단에 Flag epitope이 tagging되어 있어, 세포내에서 단백질로 발현하게 되면, Flag-Ric-8B가 융합된 형태로 발현하게 된다.

3. Yeast two hybrid 스크리닝

Yeast two hybrid 스크리닝은 이전 보고와 같은 방법으로 수행되었다 (Park and Ghil, 2006). 이를 간략히 설명하면, L40 효모세포주에 bait 플라스미드를 형질전환 시킨 후, 트립토판이 결여된 (-T) 고체성장배지에서 3일간 배양하였다. 배양된 콜로니를 -T 액체성장배지에서 16시간 배양한 후, 세포를 수집하여 competent 세포로 제작하였다. 제작된 competent 세포에 cDNA library를 형질전환 시킨 후, 히스티딘, 류신, 트립토판이 결여된 (-HLT) 고체성장배지에서 일주일간 배양하였다. 성장한 콜로니들을 -HLT 고체성장배지에 3-AT (3 amino-1, 2, 4-triazole)가 첨가된 배지 (-HLT + 3-AT)와 류신, 트립토판이 결여된 (-LT) 고체성장배지에 X-gal이 첨가된 배지 (-LT + X-gal)에 접종하여 콜로니 성장여부와 변색유무를 각각 확인함으로써 false-positive 클론을 제거하였다. 선별된 콜로니들에서 library 플라스미드 DNA만을 추출하기 위해 류신 결여된 (-L) 액체성장배지로 1:400으로 희석하여 24시간 배양한 후, 다시 1:1000으로 희석하여 -L 고체성장배지에서 배양하였다. 성장한 콜로니들로부터 DNA를 추출하여 DH5 α 박테리아 세포에 형질전환 시킨 후, 유전자 서열을 분석한 후, NCBI의 Blast search 프로그램을 사용하여 분석된 유전자 서열을 동정하였다.

4. 세포배양 및 transfection

293T 세포는 10% fetal bovine serum과 1% penicillin, 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양하였으며, 2, 3일에 한번씩 HBSS로 씻어낸 후 0.25% trypsin-EDTA 용액을 사용하여 세포를 배양용기의 바닥으로부터 분리시킨 다음 계대배양하였다. Transfection은 배양용

기 (100 mm)당 1.5 \times 10⁶개의 세포를 18~24시간 배양한 후, calcium-phosphate방법을 사용하여 DNA를 transfection하였다. Calcium-phosphate방법은 적당량의 발현플라스미드를 62 μ l의 2 M CaCl₂와 함께 혼합한 후, 동량의 2X HBS (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na₂HPO₄)를 섞어주었다. 이 DNA 혼합용액을 30분간 상온에 정치한 후, 세포배양액에 혼합하여 반응시켰다. Transfection한 다음 40시간 후에 세포를 PBS (10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)로 2회 씻어준 후, 다음 실험에 사용하였다.

5. GST-pulldown assay

BL21 박테리아 세포주에 GST와 GST-Goa 융합단백질을 발현하는 유전자를 형질전환시켜 배양하였다. 단백질의 과발현을 유도하기 위해 배양한 세포주에 0.5 mM IPTG를 첨가하여 4시간 동안 추가 배양한 후, 세포를 수집하였다. 세포를 PBTX 용액 (1% Triton X-100과 단백질분해효소 억제제가 첨가된 PBS)으로 부유시킨 후, 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄한 세포를 원심분리 (12,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액을 glutathione sepharose 4B beads와 4°C에서 1시간 30분 반응시킨 다음 PBTX로 3회 수세하였다. Beads를 293T 세포에 pcFlag-Ric-8B 발현플라스미드를 과발현시킨 세포 추출물과 37°C에서 2시간 30분 반응시키고 PBTX로 5회 수세하였다. 수세 후, 침전된 beads에 1XSDS loading dye를 첨가하여 SDS-PAGE를 실시하고 Flag 항체를 사용하여 Western blot 분석을 수행하였다.

6. Co-immunoprecipitation

293T 세포를 100 mm 배양용기에 1.5 \times 10⁶ 세포수 만큼 24시간 배양한 후, pcFlag-Ric-8B (10 μ g)과 Goa (10 μ g) 발현 플라스미드들을 함께 발현시켰다. 48시간 후, 세포들을 PBS로 2회 수세해 주고, 500 μ l의 PBTX로 세포를 수집하고 추출액을 분리한 후 20 μ l의 Protein A-Sepharose CL-4B beads (10% slurry)을 혼합하여 preclearing (1시간, 4°C)을 하였다. Preclearing이 끝난 세포 추출액에 1 μ g의 Goa 항체를 혼합하여 37°C에서 4시간 반응시킨 후, beads (40 μ l)를 첨가하여 상온에서 2시간 동안 추가로 반응시켰다. 반응이 끝난 후, PBTX로 5회 수세하고 침전된 beads에 1XSDS loading dye를 첨가하여 SDS-PAGE를 실시하고 Flag 항체를 사용하여 Western blot 분석을 수행하였다.

7. Luciferase Assay

293T 세포를 6 well 배양용기에 3 \times 10⁵/well이 되게 분주한 다음 24시간 배양한 후, calcium phosphate방법으로 Luciferase reporter gene (IL3R α -tk-luc) (0.3 μ g)과 pcFlag-Ric-8B (1 μ g), pcFlag-PLZF (1 μ g), pRC/CMV-Goa (1 μ g)의 발현플라스미드

들을 함께 발현시켰다. Transfection 효율을 normalization해 주기 위해 β -galactosidase (β -gal) 발현플라스미드인 pCMV- β -gal (0.3 μ g)을 모든 조건에 함께 발현시켰다. Transfection 24 시간 후에 세포배양액을 0.5% FBS가 포함된 배지로 교환해 주고 16시간 후에 Luciferase Assay system을 사용하여 Luciferase의 활성 정도를 측정하였다.

결 과

1. Yeast two hybrid 스크리닝을 통한 Ric-8B의 발굴

Goa와 상호작용하는 단백질들을 탐색하기 위하여 생쥐의 뇌에서 유래한 cDNA library를 사용하여 yeast two hybrid 스

크리닝을 수행하였다. 스크리닝 결과 총 2.8×10^6 개의 클론을 분석하였으며, 그 중 3개의 Ric-8B 유전자를 발견하였다. 최근 보고에 의하면, Ric-8B는 G 단백질의 일부 α 소단위체 (G α 및 G β)와 상호작용하는 것으로 알려졌으나 (Gregory et al., 2003), Goa에 대한 언급은 없었다. 그러나, 본 연구에서는 Goa와도 상호작용하였다. Ric-8B의 유전자는 560개의 아미노산을 코딩하며 (Fig. 1), 기존에 알려진 Ric-8A/synembryn과 단백질 서열상 40%의 상동관계를 가지고 있다. Ric-8B의 유전자 구조는 10개의 exon 지역과 9개의 intron 지역으로 구성되어 있고, 이 중 exon 9 지역은 Ric-8B가 후각신경계-특이적 G단백질인 Golf α 와 상호작용하는데 있어 중요한 지역으로 보고되어 있다 (Dannecker et al., 2005).

1	ATG GAT GAA GAG CGC GCC CTC TAC ATC GTC CGG GCC GGC GAG GCG GGG GCT ATC GAG CGG GTC CTG	56
	M D E E R A L Y I V R A G E A G A I E R V L	
67	AGG GAT TAC AGC GAC AAG CAT AGG GCT ACT TTC AAA TTT GAA TCA GCA GAT GAA GAT AAA AGA AAG	132
	R D Y S D K H R A T F K F E S A D E D K R K	
133	AAA CTC TGT GAA GGC ATA TTT AAG GTC CTT GTC AAG GAG GTC CCA ACG ACA TGC CAA GTG TCC TGC	198
	K L C E G I F K V L V K E V P T T C Q V S C	
199	CTG GAA GTA CTC CGC ATT CTC TCC AGA GAC AAA AAG ATC TTA GTT CCT GTA ACA ACT AAG GAA AAT	264
	L E V L R I L S R D K K I L V P V T T K E N	
265	ATG CAA ATA CTG CTG AGA CTA GCC AAG CTC CAC GAG TCA GAC GAT TCT TTG GAG AAG GTG TCA GAG	330
	M Q I L L R L A K L H E S D D S L E K V S E	
331	TTC CCA GTT ATT GTG GAA TCA ITG AAG TGT CTG TGT AAC ATC GTG TTC AAC AGT CAG ATG GCA CAG	396
	F P V I V E S L K C L C N I V F N S Q M A Q	
397	CAG CTT AGC CTG GAA CTG AAT CTC GCT GCA AAG CTC TGT AAC CTC CTA AGG AAG TGC AAG GAC CGA	462
	Q L S L E L N L A A K L C N L L R K C K D P	
463	AAA TTT ATC AAT GAC ATA AAG TGC TTT GAC TTG CGC TTG CTC TTC GTC TTG TCA CTT TTG CAC ACT	528
	K F I N D I K C F D L R L F V L S L L H T	
529	GAC ATC AGG TCA CAA TTG CGC TAT GAG CTC CAC GGA CTC CCG CTG CTA ACC CAG ATC TTG GAA AGT	594
	D I R S Q L R Y E L Q G L P L L T Q I L E S	
595	GCC TTT AGC ATC AAG TGG ACC GAT GAG TAT GAG TCG GCC ATA GAC CAT AAT GGA CCT CCT CTC TCA	660
	A F S I K W T D E Y E S A I D H N G P P L S	
661	CCT CAG GAG ACA GAC TGT GCC ATT GAG GCC CTC AAA GCT CTG TTC AAT GTG ACG GTA GAC AGT TGG	726
	P Q E T D C A I E A L K A L F N V T V D S W	
727	AAG GTG CAT AAA GAG AGC GAT TCT CAT CAG TTT CGT GTC ATG GCA GCT GTC CTT CGC CAT TGT TTA	792
	K V H K E S D S H Q F R V M A A V L R H C L	
793	CTA ATT GTA GGT CCA ACT GAA GAC AAA ACC GAA GAG CTG CAC AGT AAT GCC GTC AAC CTT TTA AGC	858
	L I V G P T E D K T E E L H S N A V N L L S	
859	AAT GTT CCA GTC TCT TGT TGT GAT GTT CTC ATT TGT OCA TTA ACC CAT GAA GAA ACA GCC CAA GAG	924
	N V P V S C L D V L I C P L T H E E T A Q E	
925	GCA GCA ACT CTA GAT GAA CTG CCC AGT GAT AAA ACA ACG GAG AAA GAC ACA GCT TTG AAA AAC AGT	990
	A A T L D E L P S D K T T E K D T A L K N S	
991	ACC ATG GTA TAC AAT GGC ATG AAT ATG GAG GCC ATT CAC GTT TTA CTC AAT TTT ATG GAG AAG AGA	1056
	T M V Y N G M N M E A I H V L L N F M E K R	
1057	ATT GAT AAG GGA AGC AGC TAT AGA GAG GGT CTA ACT CCA GTT CTC AGC TTA TTA ACA GAA TGT TCC	1122
	I D K G S S Y R E G L T P V L S L L T E C S	
1123	CGA GCC CAT CGG AAC ATC CGA AAA TTT CTC AAA GAT CAG GTT TTA CCG CCT TTG AGA GAT GTG ACA	1188
	R A H R N I R K F L K D Q V L P P L R D V T	
1189	AAT OGA CCA GAA GTC GGC TCA ACC GTG AGA AAT AAG CTG GTT CGT GTC ATG ACA CAT GTT GAC CTC	1254
	N R P E V G S T V R N K L V R L C M T H V D L	
1255	GGA GTC AAG CAG ATT GCT GCT GAG TTC CTT TTT GTC CTT TGC AAA GAG AGA GTG GAT AGC CTG CTG	1320
	G V K Q I A A E F L F V L C K E R V D S L L	
1321	AAA TAC ACT GGC TAT GGG AAC GCT GCA GGA CTC TTG GCG GCC AGG GGC CTC TTG GCT GGA GGA AGA	1386
	K Y T G Y G N A A G L L A A R G L L A G G R	
1387	GGA GAT AAT TGG TAC TCA GAG GAC GAG GAC ACG GAC ACT GAA GAA TAC AAA AAC GCA AAA CCA AAC	1452
	G D N W Y S E D E D T D T E E Y K N A K P N	
1453	ATT AAT CTT ATC ACT GGT CAT TTA GAG GAA CCA ATG CCA AAC CCT ATA GAT GAA ATG ACA GAA GAA	1518
	I N L I T G H L E E P M P N P I D E M T E E	
1519	CAA AAA GAA TAT GAA GCC ATG AAA CTT GTC AAC ATG CTT GAT AAA CTT TCC AGA GAG GAG TTG CTT	1584
	Q K E Y E A M K L V N M L D K L S R E E L L	
1585	AAA CCA ATG GGA CTA AAA CCT GAC GGG ACA ATA ACG CCT TTG GAG GAA GCA CTC AGC CAG TAT TCT	1650
	K P M G L K P D G T I T P L E E A L S Q Y S	
1651	GTC ATC GAA GAG ACC AGC TCG GAC ACA GAC TGA	1683
	V I E E T S S D T D	

Fig. 1. Gene and amino acid sequence of the Ric-8B. The Ric-8B is 1683 bp long and encodes a protein of 560 amino acids.

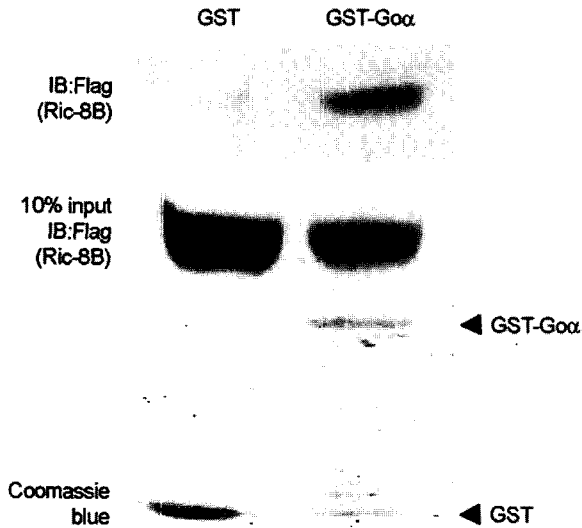


Fig. 2. *Goa* interacts with Ric-8B by GST-pull-down assay. Glutathion beads charged with GST alone and GST-*Goa* were incubated with 500 μ g of 293T extracts transfected with Ric-8B. Bound proteins were subjected to Western analysis using anti-Flag antibody. Input was loaded with 10% of the extract used for pull-down. Coomassie staining represents the amount of bacterially expressed GST alone and GST-*Goa*.

2. *Goa*와 Ric-8B의 상호작용 검증

Yeast two hybrid screening에서 나타난 *Goa*와 Ric-8B의 상호작용을 확증하기 위해 GST-pull-down assay를 수행하였다. BL21 박테리아 세포주에 GST와 GST-*Goa* 융합단백질을 각각 과발현시켜 얻은 추출물을 glutathione sepharose 4B bead에 반응시키고, 293T 세포에 pcFlag-Ric-8B를 발현시켜 획득한 세포 추출물을 혼합시킨 후, 단백질 전기영동을 실시하여 Flag 항체로 Western 분석을 실시하였다 (Fig. 2). 그 결과, GST-*Goa*와 Flag-Ric-8B는 서로 결합하였으나, GST 단독으로는 Flag-Ric-8B와 결합하지 않았다. GST-pull down assay에 사용된 Ric-8B의 발현양은 모두 동일하였으며, GST 및 GST-*Goa*의 융합단백질의 발현양은 역시 동일하였다.

*Goa*와 Ric-8B의 상호작용이 동물세포의 세포내 환경에서도 가능한가를 확인하기 위해서 co-immunoprecipitation을 수행하였다. 293T 동물세포주에 *Goa*와 Ric-8B를 함께 발현시켜 얻은 세포 추출물에 *Goa* 항체를 첨가한 후, protein A sepharose CL-4B beads를 혼합하여 immunocomplex를 형성시켰다. 형성된 immunocomplex에 Ric-8B의 존재여부를 확인하기 위하여 Flag 항체를 사용하여 Western 분석을 실시하였다 (Fig. 3). 그 결과 *Goa*와 Ric-8B는 동물세포의 세포내 환경에서도 서로 상호작용함을 확인하였다.

3. *Goa*와 Ric-8B의 상호작용이 갖는 생리학적 의의

지금까지 보고된 Ric-8B의 세포내 기능 중 하나는 후각

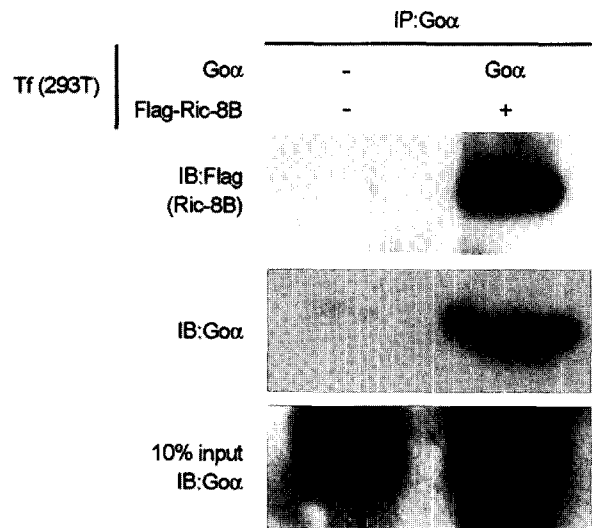


Fig. 3. *Goa* associates with Ric-8B in mammalian cellular context. Cells of 293T were transfected with *Goa* (10 μ g) and Ric-8B (10 μ g). One milligram of detergent extracts were immunoprecipitated with anti-*Goa* antibody and blotted with anti-Flag antibody or anti-*Goa* antibody. Input contain 10% of extract used for immunoprecipitation.

신경계의 특이적 G 단백질인 *Golfa*의 활성을 조절함으로써 세포내 cAMP의 양을 증가시키는 것이다 (Danecker et al., 2005). 이는 Ric-8B가 *Golfa*의 GEF로 작용할 가능성이 있음을 의미한다. Ric-8B와 그 아미노산 서열이 유사한 Ric-8A/synembryn 역시 많은 보고를 통해 *Ga*의 GEF라는 것이 밝혀졌기 때문에 (Gregory et al., 2003), Ric-8B 역시 G 단백질의 GEF로서 활동할 수 있는 가능성이 충분하다. 이를 조사하기 위해, 본 연구에서는 *Goa*에 의해 활성화가 유도되는 PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger)의 활성이 Ric-8B에 의해 배가되는지 여부를 분석하였다 (Won and Ghil, 2006). PLZF는 acute promyelocytic leukemia (APL)의 원인단백질로써 염색체내의 PLZF 유전자와 retinoic acid receptor- α (RAR α) 유전자가 translocation되어 PLZF-RAR α 단백질 또는 RAR α -PLZF 단백질이 발현되면 APL을 일으킬 수 있다 (Mistry et al., 2003). 이런 PLZF는 interleukin-3-receptor의 α chain (IL-3R α)의 프로모토에 결합하여 전사를 억제하는데 이때, *Goa*가 발현되면 전사억제능력이 증가한다. 293T 세포에 *Goa*, PLZF, Ric-8B의 발현플라스미드 그리고 reporter constructs (IL-3R α -Luc) 등을 발현시키고 그 추출액을 얻어 Luciferase의 활성을 측정하였다 (Fig. 4). *Goa*의 발현은 PLZF의 활성을 증가시켰으며, Ric-8B가 함께 발현되었을 때, PLZF의 전사억제활성은 더욱 증가함을 볼 수 있다. 이와 같은 결과는 Ric-8B가 *Goa*의 GEF로써 작용할 가능성을 강력히 시사한다.

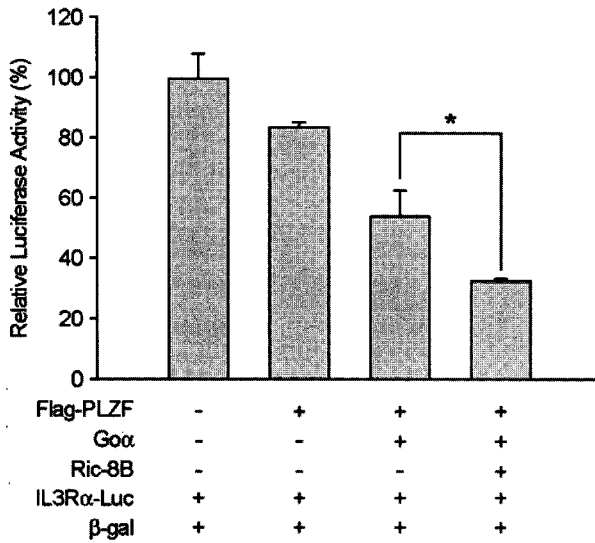


Fig. 4. Ric-8B increases the function of Goa Cells of 293T were transfected with the expression plasmids for Goa (1 μ g), Flag-PLZF (1 μ g) and Ric-8B (1 μ g), IL3R α -tk-Luc (0.3 μ g), and β -gal (0.3 μ g). Then the extracts were subjected to the luciferase reporter gene assay. The transfection efficiency was adjusted with β -galactosidase activity. Data are shown as the average \pm S.E. of at least three independent experiments. *, $P < 0.05$.

고찰

Heterotrimeric G 단백질은 세포막의 7개 transmembrane domain을 가지는 GPCR (G protein coupled receptor)과 결합되어 있으면서 세포외부 신호를 세포내부로 전달하는 역할을 수행한다. 그에 반해 small G 단백질인 Ras, Rho, Rab, Arf 등은 세포질 내에서 다양한 신호전달과정에서 작용한다 (Takai et al., 2001). G 단백질들은 GDP 결합 형태로 불활성화 되어 존재하다가 GEF의 신호를 받아 GDP가 GTP로 치환되면서 활성화 되어 다양한 효과자들의 활성화에 관여함으로써 신호를 전달하게 된다 (Bornancin et al., 1989; Coleman et al., 1994). G 단백질의 활성을 조절하는 GEF 중 가장 잘 알려진 단백질이 GPCR이다 (Coleman et al., 1994). GPCR에 세포외부의 호르몬이나 신경전달물질 등이 결합하게 되면, 하위신호전달자인 G 단백질의 α 소단위체의 GDP를 GTP로 치환해 줌으로써 G 단백질을 활성화시킨다. GPCR의 GEF 기능을 갖는 단백질로는 Ric-8A/synembryn가 보고되어 있다. Ric-8A/synembryn의 경우 Gq α , Gi1 α 그리고 Goa의 GEF로 작용하지만, Gs α 의 활성화에는 무관하다고 보고되어 있다 (Greggory et al., 2003).

Heterotrimeric G 단백질 뿐만 아니라 small G 단백질인 Ras, Rho, Rab, Arf 등 역시 GEF에 의해서 활성이 조절된다. Ras의 GEF로 알려진 Cell division control protein 25 (CDC25)와 상동관계인 *Saccharomyces cerevisiae* division control protein

25 (SDC25)의 경우 세포막에 존재하면서 Ras를 활성화시켜 adenylate cyclase를 조절함으로써 세포분열에 관여한다 (Emmanuelle et al., 1996). 최근에 알려진 Rho의 GEF인 Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 11 (ARHGEF11)은 인슐린의 분비와 활동에 관여한다고 알려져 있다 (Sabra et al., 2007).

본 연구에서 발굴한 Ric-8B 역시 후각신경계의 특이적 G-단백질인 Golf α 의 GEF로 활동하면서 cAMP양을 증가시키는 것으로 알려졌다. 또한, 이때 Ric-8B의 9번째 Exon 부분이 Golf α 와 상호작용하는 중요 지역으로 보고되고 있다 (Dannecker et al., 2005). 다양한 냄새를 인지하는 수용체인 odorant receptors (ORs)들은 후각신경계의 섬모에서 발현하면서 각각 선택적으로 냄새의 정보를 받아 들이게 된다 (Buck et al., 1991). 이런 ORs의 유전자는 사람에게에는 388개, 쥐에서는 1,200개가 있다고 알려져 있다 (Ache et al., 2005). 하지만, 지금까지 30개 정도 만이 각각의 특이적 냄새를 구별할 수 있다고 보고되고 있다 (Malnic et al., 1999; Mombaerts et al., 2004; Saito et al., 2004; Shirokova et al., 2005). ORs가 많이 밝혀지지 않은 이유는 후각신경계가 아닌 이종조식체계에서 ORs의 발현 불가능 문제와 많은 수의 ORs와 냄새를 적용하는 것의 어려움 때문이다. 그러나, 최근 이종조식체계에서 ORs의 발현을 증가시키는 방법들이 사용되어 OR의 표적을 찾는데 도움을 주고 있다. 예를 들면, ORs의 세포막 발현을 촉진시키는 지역인 N-말단에 로돕신 또는 세로토닌 수용체의 N-말단에 위치한 20개의 아미노산을 융합함으로써 발현을 증가시키는 방법과 후각 특이적 수용체를 운반하는 단백질 (Olfactory-specific receptor transporting proteins; RTPs)을 같이 발현시키는 방법 등이다 (Kajiya et al., 2001; Krautwust et al., 1998; Wetzal et al., 1999; Saito et al., 2004). 최근 보고에 의하면, Ric-8B 역시 Golf α 그리고 ORs를 같이 발현시킬 경우 ORs의 발현을 증가시켜 특이적 리간드를 찾는 연구에 중요한 단백질로 보고되어 있다 (Dannecker et al., 2006). 이 연구에 의하면 Ric-8B는 Golf α 의 세포막 발현을 유도하며, 이를 통해 ORs의 기능적 발현을 유도한다고 보고하였다. 따라서 Ric-8B는 G 단백질의 활성을 조절하는 중요한 단백질임을 알 수 있다.

몇몇 보고들에 의해서 Go가 신경계 형성과정에서 중요한 역할을 담당하고 있음을 암시하는 결과가 보고되었다. 신경세포에 Go/Gi의 활성화제인 mastoparan을 처리하였을 때, 성장원추의 붕괴가 촉진되었고, 이러한 작용은 Go/Gi의 억제제인 pertussis toxin (PTX)에 의해서 다시 억제되었다 (Igarashi et al., 1993). 도파민은 성장원추의 운동성과 신경돌기의 성장을 감소시켰다 (Lankford et al., 1998; Rodrigues et al., 1990). 트롬빈은 G 단백질과 연결된 수용체에 작용하여 신경모세포종의 신경돌기의 성장을 억제하였다 (Suidan et al., 1992). Go의 GTPase 활성을 증가시키는 GAP-43는 PC12세포에서 신

경성장인자에 의해서 유도된 신경돌기의 성장을 증가시켰으며 (Yankner et al., 1990), GAP-43을 특이적으로 인식할 수 있는 항체를 세포내부에 삽입시켰을 때, 신경모세포종 (neuroblastoma)에서 신경돌기의 형성을 억제하였다 (Shea et al., 1995). Pheochromocytoma 세포인 PC12 세포에 활성을 지닌 Go 돌연변이 백터를 발현시켰을 경우, 신경돌기의 평균적인 길이의 증감은 없이 신경돌기들의 숫자가 증가하였다 (Strittmatter et al., 1994). PC12 세포에서 신경돌기의 형성은 신경영양인자 (neurotrophic factor)보다 NCAM (neural cell adhesion molecule)과 N-cadherin에 의해 더 빨리 유도되는데 이 현상은 PTX에 의해서 억제되었다 (Doherty et al., 1991). 발생중인 닭의 뇌 추출물이나 쥐 중추신경계의 수초단백질 혹은 Go, Gi의 활성을 증가시키는 mastoparan을 각각 닭의 신경세포에 처리하면 성장원추가 소실되었다 (Higashijima et al., 1990). Goa가 결여된 생쥐는 동물행동학적으로 운동능력, 냄새를 감지하는 능력, 시각의 형성, 성적 행동 유발 등에 상당한 저하를 보였다 (Jiang et al., 1998; Tanaka et al., 1999; Luo et al., 2002). F11 신경모세포종에 Goa를 인위적으로 발현하였을 경우, 신경돌기의 성장을 유발하였다 (Ghil et al., 2000). Go-연결된 GPCR인 cannabinoid 수용체의 agonist의 처리는 Goa의 활성을 증가시켰으며, 이는 neuro2a 세포의 신경분화를 유도하였다 (He et al., 2005; Jordan et al., 2000).

본 연구를 통해 Goa와 Ric-8B가 상호작용하는 것을 알 수 있었으며, Goa와 Ric-8B가 세포내에 같이 존재할 때, PLZF의 전사억제기능이 향상되는 것을 확인함으로써 Ric-8B가 Goa의 GEF로 활동할 가능성을 제시하였다. 하지만, 아직 Ric-8B의 어느 지역이 Goa와 상호작용 하는 중요지역 인지 와 Goa에 결합하는 부분 역시 확인하지 못 하였다. 이것은 앞으로의 연구를 통해서 확인 할 것이다.

이상의 결과들을 통해 Goa의 신호전달에 있어서 Ric-8B가 상위신호전달로서의 역할을 수행하고 있는 것을 알 수 있었으며, 두 단백질 모두 뇌의 신경계에서 중요한 역할을 수행하고 있는 것으로 보고되어 있는 만큼 앞으로 Goa의 기능을 분석하는데 있어서 이 두 단백질의 관계는 중요한 자료가 될 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2006년 과학기술부 뇌신경 생물학 사업단의 지원에 의해 수행되었음.

REFERENCES

- Ache BW, Young JM. Olfaction: diverse species, conserved principles. *Neuron* 2005. 48: 417-430.
- Bornancin F, Pfister C, Chabre M. The transitory complex between photoexcited rhodopsin and transducin. Reciprocal interaction between the retinal site in rhodopsin and the nucleotide site in transducin. *Eur J Biochem.* 1989. 184: 687-698.
- Boy-Marcotte E, Ikonomi P, Jacquet M. SDC25, a dispensable Ras guanine nucleotide exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae* differs from CDC25 by its regulation. *Mol Biol Cell.* 1996. 7: 529-539.
- Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 1991. 65: 175-187.
- Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR. Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis. *Science* 1994. 265: 1405-1412.
- Damak F, Boy-Marcotte E, Le-Roscouet D, Guilbaud R, Jacquet M. SDC25, a CDC25-like gene which contains a RAS-activating domain and is a dispensable gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1991. 11: 202-212.
- Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS. Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels. *Cell* 1991. 67: 21-33.
- Fu M, Sabra MM, Damcott C, Pollin TI, Ma L, Ott S, Shelton JC, Shi X, Reinhart L, O'connell J, Mitchell BD, Baier LJ, Shuldiner AR. Evidence that Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor 11 (ARHGEF11) on 1q21 is a type 2 diabetes susceptibility gene in the Old Order Amish. *Diabetes* 2007.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. *J Neurochem.* 2000. 74: 151-158.
- Gregory G, Tall, Andrejs M, Krumins, Alfred G, Gilman. Mammalian Ric-8A (Synembryn) Is a Heterotrimeric Gα Protein Guanine Nucleotide Exchange Factor. *J Biol Chem.* 2003. 10: 8356-8362.
- He JC, Gomes I, Nguyen T, Jayaram G, Ram PT, Devi LA, Iyengar R. The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem.* 2005. 280: 33426-33434.
- Higashijima T, Burnier J, Ross EM. Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. *J Biol Chem.* 1990. 265: 14176-14186.
- Hoatlin ME, Zhi Y, Ball H, Silvey K, Melnick A, Stone S, Arai S, Hawe N, Owen G, Zelent A, Licht JD. A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi

- anemia group C protein and PLZF. *Blood* 1999. 94: 3737-3747.
- Huff RM, Axton JM, Neer EJ. Physical and immunological characterization of a guanine nucleotide-binding protein purified from bovine cerebral cortex. *J Biol Chem.* 260: 10864-10871.
- Igarashi M, Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC. Mediation by G proteins of signals that cause collapse of growth cones. *Science* 1993. 259: 77-79.
- Jiang M, Gold MS, Boulay G, Spicher K, Peyton M, Brabet P, Srinivasan Y, Rudolph U, Ellison G, Birnbaumer L. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998. 95: 3269-3274.
- Jordan JD, He JC, Eungdamrong NJ, Gomes I, Ali W, Nguyen T, Bivona TG, Philips MR, Devi LA, Iyengar R. Cannabinoid receptor-induced neurite outgrowth is mediated by Rap1 activation through G(alpha)o/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAP1. *J Biol Chem.* 2005. 280: 11413-11421.
- Kajiya K, Inaki K, Tanaka M, Haga T, Kataoka H, Touhara K. Molecular bases of odor discrimination: Reconstitution of olfactory receptors that recognize overlapping sets of odorants. *J Neurosci.* 2001. 21: 6018-6025.
- Krautwurst D, Yau KW, Reed RR. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell* 1998. 95: 917-926.
- Lankford KL, DeMello FG, Klein WL. D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988. 85: 2839-2843.
- Luiz Eduardo C. Von Dannecker, Adriana F. Mercadante, Bettina Malnic. Ric-8B, an Olfactory Putative GTP Exchange Factor, Amplifies Signal Transduction through the Olfactory-Specific G-Protein G α olf. *J Neurosci.* 2005. 25: 3793-3800.
- Luo AH, Cannon EH, Wekesa KS, Lyman RF, Vandenbergh JG, Anholt RR. Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). *Brain Res.* 2002. 941: 62-71.
- Malnic B, Hirono J, Sato T, Buck LB. Combinatorial receptor codes for odors. *Cell* 1999. 96: 713-723.
- Mombaerts P. Genes and ligands for odorant, vomeronasal and taste receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2004. 5: 263-278.
- Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev.* 2003. 17: 71-97.
- Park JS, Ghil SH. The alpha subunit of Go interacts with brain specific high mobility group box containing protein. *J. Exp. Biomed. Sic.* 2006. 10: 407-413.
- Rodrigues Pdos S, Dowling JE. Dopamine induces neurite retraction in retinal horizontal cells via diacylglycerol and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990. 87: 9693-9697.
- Saito H, Kubota M, Roberts RW, Chi Q, Matsunami H. RTP family members induce functional expression of mammalian odorant receptors. *Cell* 2004. 119: 679-691.
- Shea TB. Inhibition of neuronal surface proteases decreases the requirement for GAP-43 in neurite outgrowth. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995. 87: 87-90.
- Shirokova E, Schmiedeberg K, Bedner P, Niessen H, Willecke K, Raguse JD, Meyerhof W, Krautwurst D. Identification of specific ligands for orphan olfactory receptors. G protein-dependent agonism and antagonism of odorants. *J Biol Chem.* 2005. 280: 11807-11815.
- Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC. G0 is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 1990. 344: 836-841.
- Strittmatter SM, Fishman MC, Zhu XP. Activated mutants of the alpha subunit of G(o) promote an increased number of neurites per cell. *J Neurosci.* 1994. 14: 2327-2338.
- Suidan HS, Stone SR, Hemmings BA, Monard D. Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron* 1992. 8: 363-375.
- Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* 2001. 81: 153-208.
- Tanaka M, Treloar H, Kalb RG, Greer CA, Strittmatter SM. G(o) protein-dependent survival of primary accessory olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. 96: 14106-14111.
- Wetzel CH, Oles M, Wellerdieck C, Kuczkowiak M, Gisselmann G, Hatt H. Specificity and sensitivity of a human olfactory receptor functionally expressed in human embryonic kidney 293 cells and *Xenopus Laevis* oocytes. *J Neurosci.* 1999. 19: 7426-7433.
- Won JH, Ghil SH. The effect of alpha subunit of Go on cell growth. 2006. *J. Exp. Biomed. Sic.* 12: 385-391.
- Yankner BA, Benowitz LJ, Villa-Komaroff L, Neve RL. Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: effects on neurite outgrowth and regeneration. *Brain Res Mol Brain Res.* 1990. 7: 39-44.