

## D-1

# 어류뇌로부터 폴리포스포이노시타이드 포스파타아제의 분리 및 특성

서정수 · 조장래 · 정준기  
부경대학교 수산생명의학과

## 서론

PtdIns(4)P와 PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>등과 같은 폴리포스포이노시타이드(Polyphosphoinositide)는 여러 가지 호르몬 및 성장인자들에 의한 세포의 신호전달기작에 있어서 중요한 역할을 한다. 이들은 세포내 여러효소 및 단백질의 활성을 조절하기도 하고, cofilin(1), destrin(2),  $\alpha$ -actinin(3), gCap39(4) 및 CapZ등과 같은 여러 actin binding protein들의 성질을 변화시키기도 한다. 또한 폴리포스포이노시타이드로부터 유래되는 여러종류의 수용성 및 지용성 분자들도 역시 세포내 신호전달기작에서 중요한 messenger로 작용한다. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>는 phospholipase C에 의해 가수분해되어 두 개의 중요한 세포내 second messenger인 Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>와 diacylglycerol(DAG)를 생성한다. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>는 세포내 유리칼슘농도를 증가시키며, DAG는 protein kinase C를 활성화시킨다. 이상의 사실들을 종합하여 보면 많은 polyphosphoinositide 분자들은 모두 생물학적 과정을 조절하는 잠재력을 가지고 있음을 알 수 있다. 따라서, 본 연구에서는 어류의 뇌조직에서 여러 종류의 phosphoinositide phosphatase의 활성을 확인하고 이들의 특성을 규명하였다.

## 재료 및 방법

시중에서 구입한 체중 1 kg의 넙치의 각종 장기를(뇌, 신장, 간 등)을 채집하여 각각 액체질소로 급속 동결 건조시킨 후, -70 °C에 저장하여 필요할 때 시료로 사용하였으며, 유용단백질의 추출은 일정량의 각종 넙치 장기를 homogenizing buffer(buffer A)에 녹여서 균질화 한 후, homogenate를 1,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 pellet은 버리고 상층액을 다시 100,000 × g 에서 1시간 동안 원심분리하여 침전물(pellet)은 membrane fraction으로 사용하고, 상층액(cytosol fraction)을 solid ammonium sulfate를 넣어 최종 포화 농도가 70%되게 하여 1시간 동안 교반한 후 5,000 × g 에서 20분 동안 원심분리하여 70% ammonium sulfate pellet을 얻어 -70°C에 보관

하였다. 침전물 및 상층액은 Phosphoinositide phosphatase의 분리정제를 위하여 각종 이온칼럼에서 분리 및 추출하였다. 각종 이온칼럼에서 분리정제한 fraction은 Phosphoinositide phosphatase활성 측정 및 Inositol polyphosphatase 활성 측정을 하였다. 그리고 순수정제된 단백질의 크기 및 purity를 측정하기 위하여 SDS-PAGE 상에서 분리시켜 silver staining 이나 혹은 Coomassie Brilliant R-250으로 염색 및 탈색시켜 band를 확인하였다. 그리고 분리된 단백질인 포유동물과 동일한 것인지를 확인하기 위하여 western blotting을 실시하였다.

## 결과 및 요약

### 1) Phosphoinositide phosphatase 분리 정제

넙치 뇌조직의 cytosol에서는 *Phosphoinositide phosphatase*활성을 지 fraction이 peak I(fraction 24-32), peak II(fraction 58-67), PeakIII(fraction 84-87) 3군데에서 관찰되었다.

### 2) Synaptojanin의 분리정제

Phenyl-5PW HPLC column으로 분리한 3개의 active peak중에서 peak IIA(fraction 8-14)를 Heparin-5PW HPLC column으로 분획하였을 때 1개의 active peak이 NaCl 농도 약 300 mM 근처에서 관찰되었으며, rat Synaptojanin polyclonal antibody로 immunoblotting 하였을 때 단백질 band들이 확인되었으며 이것은 activity profile과 잘 일치되었다.

### 3) 새로운 polyphosphoinositides 5-phosphatase의 분리정제 및 특성 규명

Phenyl-5PW HPLC column으로 얻은 peak IIB를 Mono S HPLC column으로 분획하였을 때 NaCl 농도 약 150 mM에서 1개의 active peak이 관찰되었고 이 active peak을 각각 gel filtration chromatography에 적용하였을 때 분자량이 약 158 kDa 정도에서 active peak이 관찰되었다.

### 4) Phenyl-5PW HPLC column의 peak IIC로부터 PLD억제 단백질의 분리 정제

Phenyl-5PW HPLC column으로부터 얻은 peak IIC를 Mono S HPLC column으로 분획하였을 때 NaCl 농도 약 400 mM 근처에서 1개의 active peak이 관찰되었고, 이 active peak을 각각 gel filtration chromatography에 적용하였을 때 분자량이 약 158 kDa 정도에서 active peak이 관찰되었다.

## 참고문헌

1. Majerus, P.W (1992) *Annu. Rev. Biochem.* 61, 225-250
2. Berridge, M.J. (1993) *Nature* 361, 315-325
3. Cullen, P.J., Hsuan, J. J., Truong, O., Letcher, A.J., Jackson, T.R., Dawson