

Saccharomyces Cervisiae의 분비성 단백질의 합성 효율에 관여하는 이황이성질화 효소의 활성 도메인

김성환^{1*}, 김태윤¹, 강하라²
¹가톨릭대학교 의과대학 연구원
²인천대학교 생명과학부
*e-mail: lotto486@gmail.com

The a Domain of Protein Disulfide Isomerase is critical for synthesis of secretory proteins in *Saccharomyces Cervisiae*

Sunghwan Kim^{1*}, Tae-Yoon Kim¹, Hara Kang²
¹The Catholic University of Korea, Research Institute of Medical Science
²University of Incheon, Life Science department

요 약

효모 (*Saccharomyces Cervisiae*)는 단일 세포의 형태로 존재하는 진핵 세포로서 동물세포와 유사한 기작으로 분비성 단백질을 생성한다. 따라서 박테리아와 달리 효모를 이용하면 당단백질이나 이황결합을 포함하는 분비성 단백질을 경제적으로 대량 합성할 수 있다. 효모의 필수 단백질 중 하나인 단백질 이황이성질화 효소는 소포체에 위치하며 분비성 단백질에 구조적으로 안정한 이황결합을 제공하는 효소이다. 본 연구는 단백질 이황이성질화 효소 (protein disulfide isomerase)가 지니고 있는 두 개의 활성 도메인 중 분비성 단백질들의 합성 효율에 직접적으로 관여하는 부위를 찾는 연구이다. 효모 유전체로부터 단백질 이황이성질화 효소의 유전자 (PDI1)을 제거하고 효소의 변이 유전자를 주입한 후 효모의 성장 속도를 측정하였다. 또한 효모의 대표적 분비성 단백질을 각 변이 효소를 지니는 효모에 과발현시켜 합성 및 이황결합 형성 효율을 측정하였다. 단백질 이황이성질화 효소내 두 개의 활성 부위 중 아미노 말단쪽에 위치한 a 도메인에 있는 활성 부위가 분비성 단백질의 합성에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다. 이 결과는 이황결합이나 당을 포함하는 외래 단백질의 고효율 합성을 위한 새로운 효모종 개발에 중요한 정보를 제공할 것으로 기대 된다.

1. 서론

발효 효모 (*Saccharomyces Cervisiae*)는 단일 세포로 증식하는 진핵 세포이다. 가장 간단한 형태의 진핵세포라는 장점을 바탕으로 유전학, 세포생물학적 연구로 오랫동안 중요한 도구로 사용되어져 왔다. 또한 대량 배양과 유전적 변형이 용이한 장점을 바탕으로 외래 단백질의 합성에도 많이 이용되어지고 있다 (Romanos, Scorer and Clare, 1994). 특히 당단백질이나 이황결합을 포함하는 단백질의 경우 박테리아를 이용하여 합성하기가 힘들고, 동물세포나 곤충세포를 이용할 경우 경제적인 단점이 있다. 효모를 이용하면 경제적인 방법으로 이러한 단백질들을 대량 합성 할 수 있다.

세포 외부로 분비되거나, 소포체나 골지체내에 위치하거나, 혹은 막에 결합된 막단백질과 같은 분비성 단백질들은 진핵세포에의 분비 기작을 통해 합성된다. 분비성 단백질은 세포내에서 소포체에 결합된 라이보솜에서 합성된 후 소포체내로 주입된다. 소포체내에서는 여러 효소들의 작용으로 단백질의 접힘, 이황결합 형성, 그리고 당화와 같은 후발현 변형을 거쳐 안정한 구조를 형성한다. 이후 골지체로 운반되어 2차적인 당화 과정과 분해과정을 거친 후 세포 외부나 정해진 위치로 이동된다. 소포체내에서 당화나 이황결합이 제대로 이루어 지지 않으면 분비성 단백질은 세포 외부로 나가지 못하고 소포체내에 머물다가 프로테오솜으로 옮겨져 분해된다. 따라서 소포체내에서 분비성 단백질의 접힘과 변형과정에 대

한 이해는 외래의 분비성 단백질의 대량 생산에 중요한 정보를 제공한다.

단백질 이황이성질화 효소 (protein disulfide isomerase, PDI)는 소포체에 머물며 새로이 합성되어 소포체로 들어오는 분비성 단백질에 이황결합을 전달 시켜 준다. PDI에는 이황결합을 전달 시켜주는 활성 뿐 아니라 잘못 연결된 이황결합을 끊어서 구조적으로 안정한 이황결합으로 바꿔주는 이성질화 활성도 지니는 산화/환원 (oxidoreductase)이다. 효모에는 5개의 PDI-like 단백질을 지니고 있지만 PDI만이 필수 효소이다. 즉 PDI를 없애는 효모는 살지 못한다.

PDI는 4개의 thioredoxin (Trx) 도메인을 지니고 있다. 그 중 아미노말단과 카르복실기 말단쪽의 두 도메인에는 활성을 지닌 CXXC 모티프가 있다. 이 CXXC 모티프에 있는 두 개의 Cysteine 잔기는 이황결합을 형성할 수 있고, 기질로 이들의 이황결합을 전달 할 수 있다. 환원 형태의 CXXC 모티프는 기질내의 잘못된 이황결합을 환원시키고 자신은 산화된다. 기질로 이황결합을 전달 한 후 환원된 활성 모티프는 또 다른 소포내 필수 효소인 Ero1으로부터 새로운 이황결합을 전달 받는다 (Vitu, Kim, ... 2010). 다시 말해 Ero1은 소포체내에서 새로운 이황결합을 생산하는 역할을 하고 PDI는 Ero1으로부터 이황결합을 받아서 기질로 정확히 전달하는 역할을 한다. 이 두 효소의 기밀한 조절 기작에 의해 소포체는 단백질 산화에 필요한 적절한 환경을 유지하며, 소포체의 산화적 스트레스를 최소화 한다 (Kim, Sideris, and Kaiser, 2012). 이 두 단백질중 하나라도 정상적으로 작동하지 않으면, 기질들은 소포체를 벗어나 골지체나 세포 외부로 분비되지 못하고 분해 되어 진다. 따라서 이 두 단백질의 활성 정도에 따라 분비성 단백질의 합성 효율이 달라진다고 말할 수 있다.

이전의 연구는 효모에서는 PDI의 두 활성 도메인 중 첫 번째 도메인인 a 도메인이 Ero1으로부터 새로운 이황결합을 주로 전달 받는다고 보여 주었다. 하지만 두 활성 도메인 중 어떤 것이 실제로 기질의 폴딩과 이황결합에 중요하게 작용하는지는, 혹은 두 도메인이 어떤 협동적인 역할이 존재하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않는다. 이 연구에서는 두 활성 도메인 중 아미노말단 부위에 있는 도메인이 분비성 단백질의 합성에 더 중요한 역할을 한다고 보여 준다. 하지만 두 도메인이 둘 다 지니고 있을때

보다는 활성이 낮다. 따라서 두 도메인의 결합 효과 혹은 협동 효과가 있을것으로 기대 된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 효모 배양

실험에 사용된 발효 효모(*Sacchromyces cerevisiae*)는 Leucine이나 Uracil 이 배제된 SMM-Glucose 혹은 SMM-Galactose 배지를 이용하여 30도에서 배양 되었다. 크로모솜에서 PDI1 유전자를 없앤 효모에 wild type PDI1이나 변이 유전자를 포함하는 플라스미드가 주입된 효모는 이전 연구를 통해 만들어 졌다 (Vitu, Kim,..., 2010).

2.2. 플라스미드

wild type의 PDI1이나 변이 PDI1의 유전자는 pRS315에 일반적인 클로닝 방법을 통해 만들어 졌다 (Vitu, Kim,...2010). 이황결합을 포함하는 대표적 효모의 분비성 단백질인 Bg12과 컨트롤로 사용된 세포질 단백질인 FRD1은 PCR을 통해 증폭 한 후 pRS316에 주입되었다. 과발현을 위해 Galactose 1 프로모터를 이용하였다. 플라스미드들을 효모에 transformation 한 후 Leucine이나 Uracil이 첨가되지 않은 SMM 배지에서 선택되어 졌다.

2.3 효모 성장 실험

특정 플라스미드를 포함하는 효모들을 액상 배지에 초기 배양후 새로운 액상 배지에 0.1 혹은 0.2의 OD600에서 배양을 시작하였다. 그리고 성장 곡선을 만들기 위해 매 90분 혹은 120분 마다 OD600을 측정 하였다 (n=3). 분비성 단백질의 과발현을 위해서는 Galactose를 포함하는 SMM 배지에서 배양 되어 졌다.

2.4 분비성 단백질의 측정

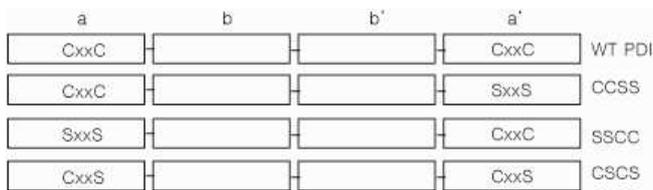
배양된 효모들을 배지 성분으로부터 분리 한 후 더 이상의 이황결합 형성이나 환원이 이루어 지지 않도록 10% TCA상에서 작은 유리구슬을 이용하여 세포를 분쇄하였다. 분쇄후 침전된 세포 유래 단백질은 차가운 acetone으로 씻은후 말렸다. 말려진 단백질 침전물은 100mM NEM을 포함하는 SDS-loading 버퍼로 녹여졌다. NEM은 환원형태의 cysteine 잔기에 결합하

여 이후 여타 화학반응이 일어나지 않도록 하기 위해 첨가 되어 졌다. 추출된 단백질은 단백질 말단에 tag 으로 첨가된 flag이나 HA 에 대한 항체를 이용하여 western analysis를 통해 확인하였다. Bgl2의 경우 세포벽에 발현된 양을 확인하기 위해 immunostaining기법을 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 PDI1 변이종

PDI의 양 말단부위의 a domain 과 a' domain에는 CxxC 모티브를 지니고 있고, 이 CxxC의 두 cysteine 아미노산은 이황결합을 형성 할 수 있다 (그림 1). 이 활성 부위의 이황결합은 기질로 전달되어 진다. 두 개의 활성 부위의 Cysteien을 Serine으로 변화 시켜 활성을 제거 시킬수 있다. a 와 a' 도메인을 둘 다 없애면 효모는 죽는다. 따라서 두 도메인의 CxxC 모티브내의 두 번째 cysteine만 serine으로 바꾸어 CSCS를 최저의 활성을 지니는 변이체로 이용하였다 (그림 1).

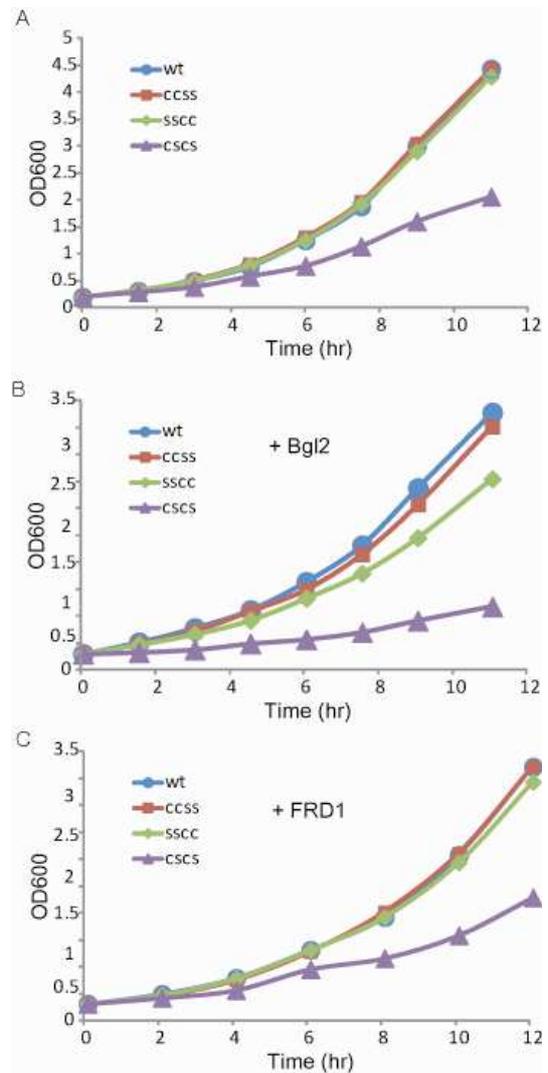


[그림 1] PDI의 도메인 구조 및 변이체

3.2 PDI1 변이에 따른 성장률의 차이

PDI의 각 활성 도메인의 활성을 없앤 변이를 발현하는 효모를 액상 배지에 키워서 성장 곡선을 측정을 하였다. 그림 3-A에서 보는 것과 같이 정상적인 배양 조건에서는 wild type과 하나의 도메인의 활성을 없앤 CCSS와 SSCC는 성장에 큰 차이를 보이지 않았다. 두 도메인의 활성을 모두 줄인 CSCS의 경우에만 성장이 급격히 둔화 되었다. 하지만, 이황결합을 포함하는 분비성 단백질을 Bgl2을 과발현 시켰을 때 wild type과 CCSS는 유사한 성장을 보이지만, SSCC의 경우 이들 보다 둔한 성장을 보였다. 이 결과는 아미노말단 부위에 있는 a 도메인이 이 Bgl2의 발현에 더 큰 영향을 주고 있다는 사실을 알 수 있다. 컨트롤로 세포질 단백질인 Frd1(그림 3-C)을 과발현 시켰을 때는 일반적인 성장 곡선과 유사한 패턴을 보였다. 이러한 결과는 Bgl2 이외의 다른 분비성 단백질을 과발현 했을때에도 유사한 결과를 보였다 (data not shown).

이전의 연구 결과는 Ero1이 두 도메인 중에 a 도메인에 이황결합을 더 잘 전달한다고 보여 주었다. 이것은 a 도메인이 기질에 이황결합을 잘 전달할 뿐 아니라 Ero1으로부터 이황결합을 잘 받는 도메인이라고 할 수 있다. PDI가 이황결합을 전달하고, 잘못된 이황결합을 끊어 주는 역할까지 한다는 것을 고려 했을 때, PDI의 두 활성 도메인이 어느 정도 나뉜 활성을 지니고 있을 가능성이 있다. 즉 a 도메인은 Ero1으로부터 이황결합을 받아서 기질에 전달하고, a' 도메인은 잘못된 이황결합을 끊어주는 역할을 할 가능성이 있다.



[그림 2] PDI 변이와 Bgl2와 FRD1의 과발현시 성장률 차이. Bgl2와 Frd1의 유전자는 Galactose 프로모터의 영향을 받기 때문에 과발현을 위해 효모는 3% Galactose를 포함하는 배지에서 배양 되었다.

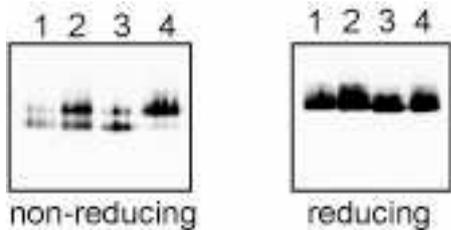
3.3 PDI1 변이에 따른 Bgl2의 발현차이

PDI의 각 활성 도메인 변이를 지니는 효모에서 발현되는 Bgl2의 이황결합과 세포내 발현정도를 확인해 보았

4. 결론

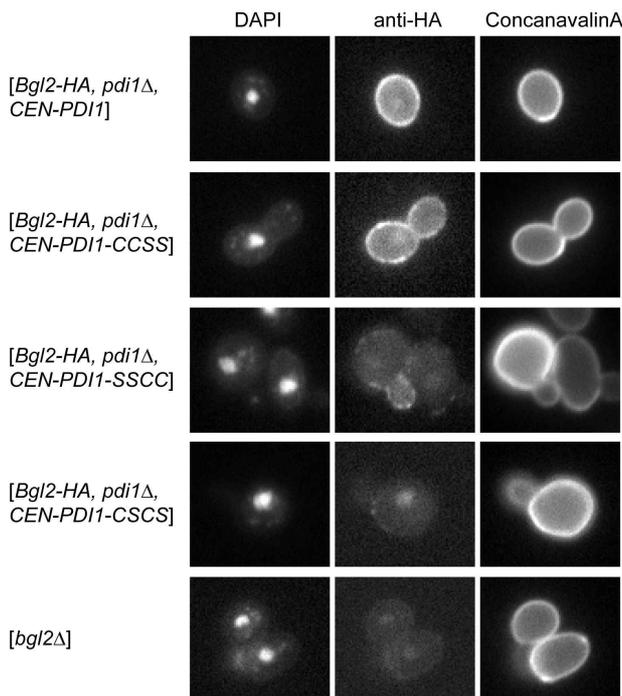
다. 먼저 세포내에 있는 Bgl2의 이황결합의 유무는 non-reducing SDS-PAGE에서의 이동차이를 통해 확인할 수 있었다 (그림 3). CCSS나 wild type에 비해 SSCC의 경우 reduced형태의 Bgl2의 비율이 높았다. 두 도메인의 활성이 모두 적어진 변이인 CSCS에서는 거의 모든 Bgl2가 환원된 상태로 존재 했다.

분비성 단백질을 과발현 했을 때 이황결합 형성 효소인 PDI의 역할을 고찰 하였고, 그에 더해 PDI가 지니는 두 개의 활성 도메인중 분비성 단백질 발현 양에 더 큰 영향을 주는 도메인을 찾았다. 결과 아미노 말단에 위치한 a 도메인이 분비성 단백질인 Bgl2의 이황결합에 중요한 역할을 한다.



[그림 3] PDI 변이와 Bgl2의 이황결합. Lane 1 - wild type PDI, Lane 2- SSCC, Lane 3- CCSS, Lane 4 - CSCS. non-reducing SDS-PAGE와 reducing SDS-PAGE에서 비교 되었다. non-reducing SDS-PAGE에서 위에 있는 band는 이황결합을 포함하지 않는 Bgl2를 나타내고, 아래에 있는 band는 이황결합을 포함하는 Bgl2를 나타낸다.

PDI의 변이에 따른 Bgl2의 발현을 세포상에서 확인을 해보면 SSCC와 CSCS는 wild type과 CCSS에 비해 세포벽에 Bgl2의 발현이 적다는 것을 확인할 수 있었다. (그림 4).



[그림 4] Bgl2의 세포벽 발현. 현광현미경을 통해 Bgl2의 세포벽 발현을 확인하였다. DAPI는 핵을 Concanavalin A는 세포벽을 나타내 준다.