

## Small GTP-binding Proteins

許奎晶

(이화여자대학교 생물학과)

## Small GTP-binding Proteins

Hur, Kyu-Chung

(Ewha Womans Univ. Biology Dept. Seoul)

### ABSTRACT

There is a family of homologous proteins known to small GTP-binding proteins which have a GTP binding domains and GTPase activity with molecular weight of about 20000 in mammalian tissues. Recently at least 20 different small GTP-binding proteins including three ras proto-oncogene, smg25, rho, and ral gene products were identified. These proteins play a central role in cellular proliferation, neoplasia, signal transduction, terminal differentiation, and secretory process of the cells. In this review, I have briefly compiled current information on the different areas of research in the small GTP-binding proteins in an attempt to convey an overall view of the fundamental role that this family of protein in normal cellular processes. Moreover, future goals of research in the small GTP-binding proteins as well as the possible existence of this family of proteins in plant cells were discussed.

### 서론

유핵세포에서 signal transduction, 세포의 증식, 분화 및 neoplasia 등에 관여하는 여러 가지 GTP-binding protein 이 알려져 있다.

여러 가지 GTP-binding protein 중에서 포유류 세포막에서 발견되는 hormone receptor 와 작용하여 세포막의 signal 을 세포내 messenger 로 전환시키는데 관여하는 transducer molecule 을 이루는 일련의 GTP-binding protein 은  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  subunit 로 구성되어 있다(Gilman, 1987). Transducer G protein 으로 adenylate cyclase 활성을 조절하는  $G_s$ ,  $G_i$  가 있으며 retina rod cell 에서 cyclic GMP phosphodiesterase 와 rhodopsin 을 연결해주는 transducin 이 있다(Kuhn, 1980). 그리고 최근에 와서는 아직 명확한 기능이 밝혀져 있지 않지만 뇌조직에 많이 있는  $G_o$ . 도 이러한 단백질에 속한다는 것이 알려졌다(Itoh *et al.*, 1986). 유사성이 있는 일련의 이러한 단백질은 각 단백질마다  $\alpha$ -subunit 는 차이가 나지만 같은  $\beta$ ,  $\gamma$  subunit 를 가지고 있는데,  $\alpha$ -subunit 는 GTP binding domain 과

GTPase activity 를 가지고 있으며 분자량이 39000-52000 정도이다(Gilman, 1987).

Transducer molecule 외의 또 한 종류의 GTP-binding protein 으로 분자량이 20-30kD 정도되는 GTP-binding domain 과 GTPase activity 를 가지고 있는 일련의 단백질을 small GTP-binding protein(Matsui *et al.*, 1988) 또는 noble GTP-binding protein(Kawata *et al.*, 1988)이라 부른다. 이러한 단백질로는 ras proto-oncogene 및 20 여 가지 gene product 가 알려져 있다(Barbacid, 1987). 이 계열에 속하는 단백질들의 기능은 거의 대부분 밝혀져 있지 않지만 모든 동물조직에 분포해 있는 것으로 보아 signal transduction, organelle 의 이동 등에 세포내 여러 가지 중요한 기능과 연관되어 있으리라 추측되며 최근에는 몇 가지 이러한 단백질의 기능이 밝혀지고 있다.

본 글은 최근에 많이 연구되어지고 있는 이러한 여러 종류의 small GTP-binding protein 의 특징, 기능 및 조절을 소개하고 앞으로의 연구방향과 아울러 이러한 단백질의 식물세포내 존재가능성을 검토하는데 목적이 있다.

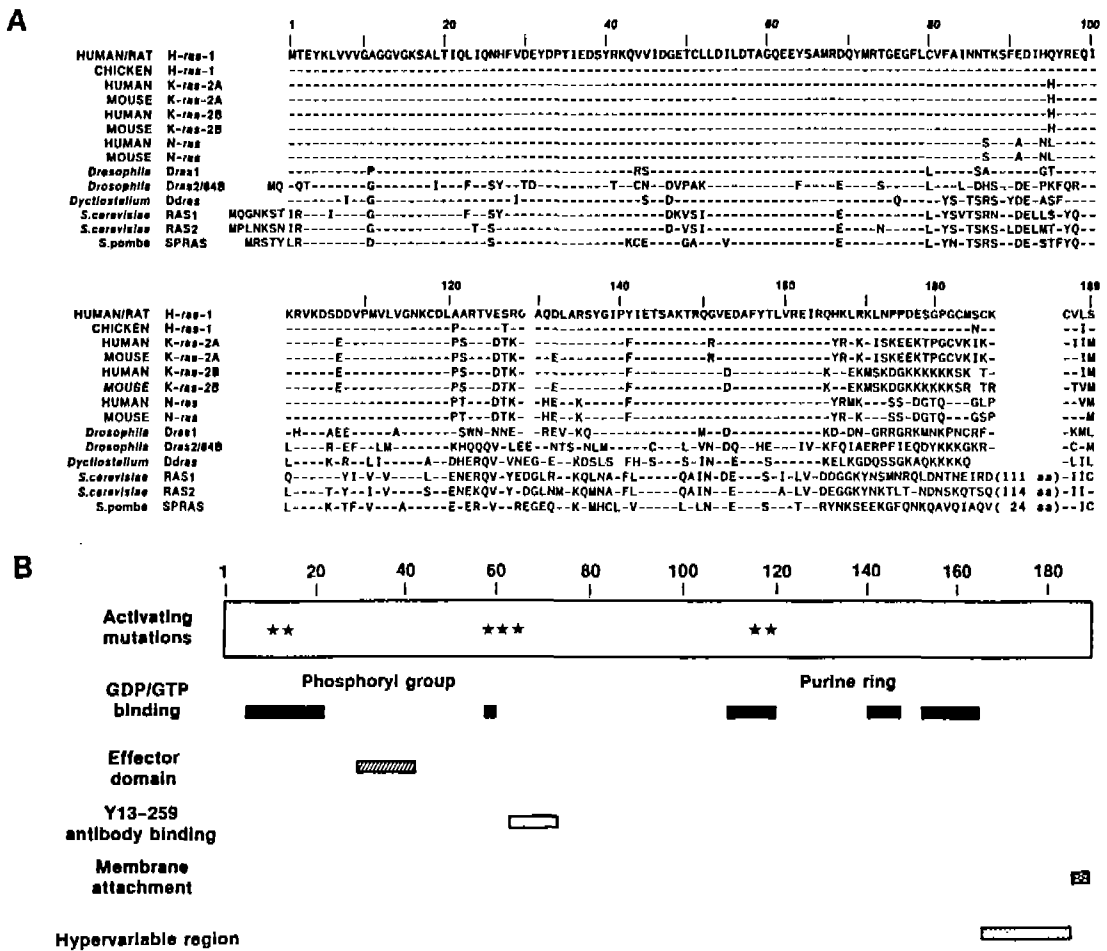


Fig. 1. A. Comparative amino acid sequence of *ras* proteins. Residues identical to the human H-*ras*-1 gene product are designated by a dash. B. Schematic representation of the structural and functional domains defined within mammalian p21 *ras* proteins. (Barbacid, 1987).

### Small GTP-binding protein 의 특성

Small GTP-binding protein 은 transducer molecule 의  $\alpha$ -subunit 와는 달리 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 한 다음 nitrocellulose paper 로 옮겼을 때 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]GTP 와 결합한다(Lapetina Reep, 1987). 이러한 특성을 이용하여 거의 모든 포유류 조직에서 여러 종류의 small GTP-binding protein 이 세포질과 세포막에 같이 있음을 밝혔다. 최근에 와서 분리한 단백질의 동정 및 cDNA clone 에 의해 많은 종류의 서로 유사성이 있는 small GTP-binding protein 이 규명되었는데 가장 많은 연구가 된 것이 ras 계열의 단백질이다.

포유류에서 ras gene 은 암을 일으키는 retrovirus 에서 oncogene 으로 처음 알려졌는데(Harvy, 1964) 사람과 설

치류의 많은 종양세포에서 변이가 일어난 이 유전자가 관찰되었다(Perucho *et al.*, 1981 ; Balmain & Pragnell, 1983). 그리고 암세포나 retrovirus 에서 발견되는 ras gene 은 세포자체의 proto-oncogen 의 변이임이 알려졌다(Eva and Aaronson, 1983). ras gene 은 yeast 나 곰팡이에서부터 포유류에 이르기까지 광범위하게 나타나는데, 여러 종류에서 발견되는 ras gene 의 염기서열 및 염기서열로부터 추정 한 amino 산 서열은 높은 유사성을 보이고 있으며 이러한 사실은 ras 단백질이 세포의 증식에서 기본적인 역할을 할 것임을 암시해준다(Barbacid, 1987) (Fig. 1A). 포유류에서는 세 가지 ras gene 이 밝혀져 있는데 이 gene 들을 H-ras, K-ras, N-ras 로 불리고 있다. 이 세 가지 ras gene 은 유사성이 매우 높은 21 kD (P21<sup>ras</sup>) 단백질을 만들며, Fig. 1A 에서 보는 바와 같이 여러 종류의 ras 단백질의

amino 산 서열을 비교해보면 거의 변화가 없는(처음 85 amino 산) 부분과 그 다음 80% 정도 유사성이 있는 부위와 C-terminal의 4개의 amino 산을 제외하고는 변화가 많은 부위로 구성되어 있다. C-terminal 4개의 amino 산은 cys-A-A-X-(OOH) (A: aliphatic amino 산)로 모든 ras 단백질에서 볼 수 있고 ras 단백질이 세포막에 붙는데 관여한다. 포유류의 P21<sup>ras</sup>와 초파리, 곰팡이, yeast 등의 ras 단백질을 비교해보면 포유류의 다른 ras 단백질들은 N-terminal 부위에 몇개의 amino 산이 더 있으며, 첫번째 부위의 amino 산 서열은 84% 정도 유사성을 보이나 두번째 세번째 부위는 유사성이 낮다. 그러나 척추동물의 ras gene을 ras1<sup>-1</sup>ras2<sup>-1</sup> yeast에 적당한 promoter에 붙여 넣어주면 yeast ras gene의 chimera를 mouse NIH3T3 세포에 넣으면 세포를 transformation시키는 것으로 보아 (DeFeo-Jones *et al.*, 1985) gene 자체는 차이가 나도 같은 기능을 수행할 수 있도록 진화과정에서 잘 보존되어 있음을 말해준다. 포유류 ras gene에 대한 deletion mutant와 ras protein monoclonal antibody를 이용한 집중적인 연구결과 ras gene의 다섯 부위(amino 산 5-63, 77-92, 109-123, 139-165 및 carboxylterminal cys-A-A-X-(OOH)가 ras 기능에서 절대적인 부위임을 밝혔다. Fig. 1B에서와 같이 대부분의 부위는 GTP-binding에 다른 부위는 effector 식별에 관여한다. C-terminal 부위는 ras 단백질이 세포막의 안쪽에 들어가는데 필요한 부위이다. ras 단백질은 세포질에서 합성되어 세포막 안쪽의 fatty acid (palmitic acid)에 acylation 되어 붙는데 이 때 acylation 되는 부위는 cys<sup>186</sup>의 -SH group이다. cys<sup>186</sup>이 없는 mutant ras는 세포질에 남아 있으며 제거능을 발휘하지 못한다 (Willumsen *et al.*, 1984).

ras 계열의 단백질외에 최근에 밝혀지고 있는 또 한 종류의 small GTP-binding protein은 분자량이 25kD 정도인데, 이 종류의 단백질은 분리한 단백질의 amino 산 서열을 이용하여 synthetic DNA probe를 만들어 소뇌 cDNA library로부터 3가지 cDNA clone을 얻었는데 smg25A, smg25B, smg25C라 명명했다 (Matsui *et al.*, 1988). 이 세 가지 단백질의 amino 산 서열을 cDNA 염기서열로부터 추정하여 비교한 결과 77-85% 정도의 유사성을 보이며 GTP binding 부위와 GTPase domain을 가지고 있다. 그러나 이 단백질은 ras 단백질과는 28% 정도의 유사성을 보이며 C-terminal amino 산 서열도 다르다.

이상의 ras 및 smg25 계열의 단백질외에도 여러 유핵세포에서 이러한 단백질과 어느 정도 유사성이 있는 gene들이 밝혀지고 있다. ras protein과 30-40% 정도 유사성이 있는 rho (Madaule and Axel, 1985), R-ras (Lowe *et al.*, 1987), ral (Chardin and Tavitaïn, 1986) 및 ypt1 (Gallwitz *et al.*, 1983) 등 다수가 알려져 있는데 이러한 일련의 단백질을 ras-like protein이라 부른다.

### Small GTP-binding protein의 기능 및 조절

여러 가지 small GTP-binding protein이 찾아지고 많은 연구가 행하여지고 있지만 이러한 단백질의 명확한 기능 및 작용기작은 알려져 있는 것이 거의 없다. 대부분의 기능에 대한 연구는 이러한 단백질의 유전인자를 변형시키거나 inducible promoter에 붙여서 세포내 주입시켰을 때 일어나는 변화를 추적하여 얻어진 결과를 분석한 것이다.

여러 small GTP-binding protein 중에서 작용에 대한 연구가 가장 많이 된 것이 ras 단백질이다. ras 단백질은 세포의 증식, transformation, signal transduction 및 terminal differentiation에 작용하는 것으로 알려져 있다. 세포의 증식 및 transformation은 ras gene의 변이체인 oncogene을 가지고 있는 retrovirus가 감염될 경우 세포가 transformation이 일어나는 것과 사람과 설치류에서 발견되는 여러 종양세포가 ras gene의 변이 때문이라는 것을 찾았으므로 세포의 증식과 neoplasia에 관여한다는 것이 알려졌다 (Barbacid, 1987). 종양세포에서 발견되는 대부분의 ras protein은 GTPase activity를 잃어버렸거나 감소된 것을 관찰할 수 있다. 이러한 사실은 ras protein이 세포의 증식에 관여하는 데는 GTP와 결합이 필요하며 GTP가 GDP로 분해되는 과정에서 조절이 일어나는데 oncogene의 경우 이러한 조절기능을 잃어버렸기 때문에 세포의 증식이 조절되지 않음을 말해주고 있다 (Trahey and McCormick, 1987). 더 나아가서 모든 ras 단백질을 인식하는 monoclonal Ab를 NIH3T3 세포에 주입시키면 G<sub>0</sub>에서 S기로 들어가는 것이 저지되며 S기에 있는 세포는 영향을 받지 않는다. 그러나 mutant ras gene으로 transformation된 NIH3T3 세포는 이 Ab의 영향을 받지 않았다 (Bar-Sagi and Feramisco, 1986). 이는 ras protein이 G<sub>0</sub>에서 S로 들어가는 과정에 관여함을 말해준다. 뿐만 아니라 세포막에 있는 growth factor receptor와 유사한 oncogene으로 transformation시킨 NIH3T3 세포에 이 Ab를 주입시키면 세포는 S phase로 들어가지 못한다 (Smith *et al.*, 1986). 이는 ras protein이 receptor나 세포막에 있는 단백질과 작용하여 signal transduction에 영향을 미치는 것을 보여준다. Inducible N-ras proto-oncogene을 주입시킨 NIH3T3 세포에 bradykinin을 처리했을 때 phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)와 1,2-diacylglycerol (DAG), inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>)량이 2-3배 증가했다 (Wakelam *et al.*, 1986). 이는 ras protein이 PIP<sub>2</sub>를 분해하여 DAG와 IP<sub>3</sub>를 만드는 phospholipase C를 활성화시키는 G<sub>β</sub>와 동일한 단백질일 가능성을 시사해준다.

ras protein은 세포의 증식 및 signal transduction 외에도 terminal differentiation에 관여한다. Rat pheochromocytoma cell line인 PC12 세포는 Nerve growth Factor (NGF)나 cAMP를 처리하면 neurite를 형성하며 분화가 일어나는데 이 세포에 ras oncogene을 넣어주면 같은 효과가 나타나며 (Noda *et al.*, 1985) 또 PC12 세포에 P21<sup>ras</sup> Ab를 주입시키고 NGF를 처리하면 분화가 일어나

지 않았다(Hagag *et al.*, 1986). 이 결과는 ras protein이 신경세포의 terminal differentiation에 관여하는데 NGF signal transduction과 연계되어 있음을 말하고 있다.

ras protein의 이러한 여러 가지 작용기작은 이 단백질의 정상적인 기능수행을 위해서 조절이 필요하다. ras protein의 조절기작으로는 GTPase activity의 조절과 세포질에서 세포막으로 들어가는 과정이 알려져 있다. GTPase activity에 의한 조절은 분리한 ras 단백질을 *in vitro*에서 GTPase activity를 측정할 때보다 *in vivo*에서 높은 활성이 있는 것을 발견하고 추적한 결과 세포질내에 GTPase-activating protein(GAP)을 찾음으로 밝혀졌다. GAP는 110kD 단백질로 C-terminal 부위의 40kD이 ras protein과 결합하여 GTP 분해를 도와준다(Marshall, 1989). 정상적인 H-ras gene으로 transformation시킨 NIH3T3 세포에 GAP gene을 넣어주면 이 세포는 정상적인 형태를 회복한다. 그러나 ras oncogene으로 transformation을 시킨 세포는 영향을 받지 않는다(Zhang *et al.*, 1990). 그리고 tumor promoter인 phobol ester를 처리하면 GTP가 붙어있는 ras 단백질이 증가하는데 이는 protein kinase C가 GAP를 phosphorylation시켜서 GAP 작용을 저해하는 것으로 밝혀졌다(Downward *et al.*, 1990). 이 두 실험결과는 ras 단백질의 기능이 GTPase activity에 의해서 조절되는 것을 명백하게 말해준다. 또 다른 하나의 ras 단백질의 조절기작으로 세포질에서 세포막으로 들어가는 과정을 들 수 있는데 ras 단백질의 C-terminal(cys-A-A-X-(OOH)) amino산에서 cys<sup>166</sup>이 다른 amino산으로 바뀐 mutant gene의 산물은 세포질에 남아 있으며 세포를 transformation시키지 못한다는 사실이 이를 뒷받침해주고 있다(Willumsen *et al.*, 1984). 아울러 세포내 cAMP 량을 증가시키면 ras 계열의 단백질에 phosphorylation이 일어나며 세포질에서 이러한 단백질이 더 많이 발견된다는 사실(Lapetina *et al.*, 1989)이 세포막과 세포질 사이의 이동과정에서 이 단백질의 작용조절에 중요하다는 것을 말해준다.

ras 단백질외에 그 기능이 밝혀진 small GTP-binding protein으로는 YPT1 및 SEC4 gene product이다. Yeast의 YPY1 단백질은 23kD로 golgi에 주로 있으며 YPT1 mutant 세포는 세포질내에 vesicle이 축적되며 invertase의 분비가 감소된다(Bourne, 1988). 이는 YPT1 단백질이 golgi에 있으며 golgi를 통한 단백질의 이동에 관여함을 말해준다. SEC4 gene은 23.5kD 단백질을 만들며 이 단백질의 85%가 golgi와 세포막의 세포질에 분포하며, golgi와 세포막 사이의 분비과정에 관여한다(Salminen and Novick, 1987).

### 앞으로의 연구방향 및 식물세포에서 small GTP-binding protein의 존재 가능성

여러 종류의 small GTP-binding protein이 밝혀지고 또

cDNA cloning이 되어 단백질의 특성이 규명되었지만 그 기능이 명확하게 밝혀지지 않았다. 앞으로는 지금까지 밝혀진 이러한 여러 종류의 단백질이 어떻게 작용하며 왜 ras protein과 같은 경우 세 가지(H-ras, K-ras, N-ras) 다른 gene product로 이루어져 있으며 이 각 gene product들이 어떻게 세포내에서 각기 다른 기능을 수행하는가가 밝혀져야 할 과제이다. 그리고 지금까지 알려진 대부분의 기능들은 mutant 세포를 이용하거나 또는 gene을 주입시켜서 나타나는 생리적 현상을 추적한 결과분석에 의해 밝혀진 것인데 이러한 단백질들이 어떻게 effector molecule과 작용하는가를 molecular level에서 추적하여야 할 것이다. 또 이러한 G-protein의 표현은 어떻게 조절이 되며 발생과 어떻게 연관되어지는가도 밝혀야할 문제이다.

지금까지 밝혀진 거의 모든 small GTP-binding protein과 그 기능은 동물세포와 yeast를 재료로 한 것이다. 세포의 증식과 세포내 signal transduction에 관여하는 ras protein의 경우 식물에도(양파) 동물세포의 ras와 결합하는 단백질이 있다는 것(Barcid, 1987)외에는 아직 발표된 논문은 없다. 식물세포에서도 IP<sub>3</sub> cascade가 있음이 밝혀졌고(Zbell and Walter, 1987) 이 과정에서 small GTP-binding protein이 관여할 가능성이 있다. 뿐만 아니라 식물에서도 동물세포나 yeast에서처럼 golgi에서 세포막으로 이어지는 secretory pathway에서 YPT1 및 SEC4 단백질이 존재할 가능성은 충분히 있다. 본인의 실험실에서 최근 옥수수과 콩을 가지고 실험한 결과 27kD, 23kD 및 21kD 단백질이 GTP-binding을 한다는 것을 찾았다. 이러한 단백질들의 동물에서 밝혀진 ras 단백질이나 다른 small GTP-binding protein과 어느 정도 유사성이 있으며, 그러한 단백질과 같은 기능을 수행하는가를 앞으로 추적할 예정이다(미발표). 그리고 식물세포에서 이러한 단백질의 존재와 식물세포에서 작용기작에 대한 활발한 연구결과를 기대해 본다.

### 참 고 문 헌

- Balmain, A. and I.B. Pragnell. 1983. Mouse skin carcinomas induced *in vivo* by chemical carcinogens have a transforming Harvey-ras oncogenes. *Nature* **303**: 72-74.
- Barbacid, M. 1987. Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 779-827.
- Bar-Sagi, D. and J.R. Feramisco. 1986. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblast by ras proteins. *Science* **233**: 1061-1068.
- Bourne, H.R. 1988. Do GTPase direct membrane traffic in secretion? *Cell* **53**: 669-671.
- Chardin, P. and A. Tavitian. 1986. The ral gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe. *EMBO J.* **5**: 2203-2208.
- DeFeo-Jones, D., K. Tatchell, C.L. Robinson, I.S. Sigal and W.C. Vass. 1985. Mammalian and yeast ras gene pro-

- ducts: biological function in their heterologous systems. *Science* **228**: 179-184.
- Downward, J., J.D. Graves, P.H. Warne, S. Rayter and D.A. Cantrell. 1990. Stimulation of p21<sup>ras</sup> upon T-cell activation. *Nature* **346**: 719-702.
- Eva, A. and S.A. Aaronson. 1983. Frequent activation of c-kis as a transforming gene in fibrosarcomas induced by methylcholanthrene. *Science* **220**: 955-956.
- Gallwitz, D., C. Donath and C. Sander. 1983. A yeast gene encoding a protein homologous to the human c-has/bas proto-oncogene product. *Nature* **306**: 704-707.
- Gilman, A.G. 1987. G proteins: transducer of receptor-generated signals. *Ann. Rev. Biochem.* **56**: 615-649.
- Harvey, J.J. 1964. An unidentified virus which causes the rapid production of tumor in mice. *Nature* **204**: 1104-1105.
- Itoh, H., T. Kozasa, S. Nagata, S. Nakamura and T. Katada. 1986. Tissue tropism of a leukemogenic murine retrovirus is determined by sequences outside of the long terminal repeats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 3776-3780.
- Kataoka, T., S. Powers, S. Cameron, O. Fasano, M. Goldfarb, J. Broach and M. Wigler. 1985. Functional homology of mammalian and yeast RAS genes. *Cell* **40**: 19-26.
- Kawata, M., Y. Matui, J. Kondo, T. Hishida, Y. Teranish and Y. Takai. 1988. A novel small putative effector domain as the ras proteins in bovine brain membranes. *J. Biol. Chem.* **263**: 18965-18971.
- Kuhn, H. 1980. Light and GTP-regulated interaction of GTPase and other proteins with bovine photoreceptor. *Nature*, **283**: 587-589.
- Lapetina, E.G. and B.R. Reep. 1987. Specific binding of [<sup>32</sup>P]GTP to cytosolic and membrane-bound proteins of human platelets correlates with the activation of phospholipase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 2261-2265.
- Lapetina, E.G., J.A. Lical, B.R. Reep and L.M. Vedia. 1989. A ras-related protein is phosphorylated and trans located by agonist that increase cAMP levels in human platelets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **8**: 3131-3134.
- Lowe, D.G., D.J. Capon, E. Delwart, A.Y. Sakaguchi, S.L. Naylor and D.V. Goeddel. 1987. Structure of the human and murine R-ras' genes, novel genes closely related to ras proto-oncogenes. *Cell* **48**: 137-146.
- Madaule, P. and R. Axel. 1985. A novel ras-related gene family. *Cell* **41**: 31-40.
- Marshall, M.S., W.S. Hill, A.S. Ng, U.S. Vogel, M.D. Schaber, E.M. Scolnick, R.A.F. Dixon, I.S. Sigal and J.B. Gibbs. 1989. A C-terminal of GAP is sufficient to stimulate ras p. 21 GTPase activity. *EMBO J.* **8**: 1105-1110.
- Matui, Y., A. Kikuchi, J. Kondo, T. Hishida, Y. Teranishi and Y. Takai. 1988. Nucleotide and deduced amino acid sequences of a GTP-binding protein family with molecular weight of 25,000 from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **263**: 11071-11074.
- Nada, M., M. Ko, A. Ogura, D.G. Liu and T. Amano. 1985. Sarcoma viruses carrying ras oncogenes induce differentiation-associated properties in a neuronal cell line. *Nature* **318**: 73-75.
- Perucho, M., M. Goldfarb, K. Shimizu, C. Lama, J. Fagh and M. Wigler. 1981. Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell* **27**: 467-476.
- Salminen, A. and P.J. Novick. 1987. A ras-like protein is required for a post-golgi event in yeast secretion. *Cell* **49**: 527-538.
- Smith, M.R., S.J. DeGudicibus and D.W. Stace. 1986. Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. *Nature* **320**: 540-543.
- Trahey, M. and F. McCormick. 1987. A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science* **238**: 542-545.
- Willumsen, B., A. Christensen, N. Hubbert, A. papageorge and D. Lowry. 1984. The p21<sup>ras</sup> C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310**: 583-586.
- Zbell, B. and C. 1987. About the search for the molecular action of high affinity auxin-binding sites on membrane-localized rapid phosphoinositide metabolism in plant cells. NATO ASI series Vol H10, Plant Hormone Receptors (Edited by D. Klambt), Springer-Verlag.
- Zhang, K., J.E. DeClue, W.C. Vass, A.G. Papageorge, F. McCormick and D.L. Lowy. 1990. Suppression of c-ras transformation by GTPase-activating protein. *Nature* **346**: 754-756.