

Protein Phosphatase 2A의 활성화에 미치는 Lipid Bilayer Membrane의 저해 효과

남기열

명지대학교 공과대학 화학공학과

Inhibitory Effect of Lipid Bilayer Membrane on Protein Phosphatase 2A

Ki Youl Nam

Department of Chemical Engineering, Myong Ji University

ABSTRACT

Protein phosphatase 2A was obtained from a cytosolic fraction of bovine brain homogenate. The phosphatase activity using phosphorylated histone H1 as substrate was suppressed in the presence of liposomes composed of dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC) or the mixture of phosphatidylserine and DPPC. The binding of protein phosphatase to liposome was indicated by the facts that the phosphatase activity of the supernatant of protein phosphatase/multilayer vesicle mixture was decreased with increasing amount of liposome, and that [125 I]-labeled protein phosphatase was coeluted with liposome. However, the affinity of the protein for phospholipid membrane was not so high. On the other hand, okadaic acid and liposome reduced the phosphatase activity synergistically, which means that okadaic acid binds neither to lipid membrane nor to the membrane-associated phosphatase. The inhibitory effect of liposome was, therefore, ascribed to association of the protein phosphatase 2A with the lipid bilayer membrane.

서론

Okadaic acid는 조개속에 함유되어 있어서 섭취하면 설사의 원인이 되는 해양독물이며, 검은 해면으로부터 분리 추출되었다[1]. 최근 이 화학 물질은 mouse 피부에서의 2단계 발암 실험에서 강력한 tumor promoter임이 밝혀졌다[2]. Okadaic acid (Fig. 1)는 TPA type tumor promoter 수용체인 protein kinase C에 결합하지 않으므로 non-TPA-type tumor promoter로 분류되었다[2].

Suganuma등 [3]은 mouse 피부의 세포질 frac-

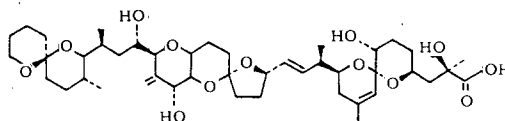


Fig. 1. Molecular structure of okadaic acid.

tion에서 [3 H]okadaic acid와 특이적으로 결합하는 단백질인 protein phosphatase 2A를 분리하였다. Okadaic acid는 protein phosphatase-1, -2A활성의 강력한 저해제이다. 특히 protein phosphatase

2A는 암을 일으키는 메카니즘에 관여하는 사실이 보고되어 있다[4-8]. 그러므로 이 효소 활성의 메카니즘을 구명하므로써 암의 예방과 항암제를 개발할 수 있다. 그리고 okadaic acid류에 속하는 calyculin A는 과립 fraction에서 [³H] okadaic acid의 특이적 결합을 감소시키는 현상이 검출되었다. 이들의 결과는 okadaic acid류의 tumor promoter경로가 protein phosphatase의 활성을 억제하므로 이들 기질 단백질의 인산화를 촉진시키는 것과 관계있음을 시사한다[9].

세포막을 통한 정보전달 메카니즘은 단백질의 인산화 과정과 탈인산 과정의 여러단계로 구성되고 정보전달의 흐름은 흔히 세포막과 결합 효소에 의하여 이루어진다. 예를들면 protein kinase C와 protein phosphatase 2B는 세포막과 회합하여 활성화된다. 이것은 단백질과 lipid membrane과의 상호작용이 효소의 활성에 중요한 영향을 미치고 있음을 의미한다[10-12].

이 논문은 protein phosphatase 2A와 lipid membrane과의 상호작용이 탈인산화 과정에 중요한 역할을 할 것으로 생각하여 이들의 상호작용을 검토하여 phosphatase의 활성을 lipid membrane과 okadaic acid와의 존재하에서 조사하여 평가한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

재료

Okadaic acid는 이전에 보고된 대로 black sponge, Halichondria okadai로부터 추출하였다[2, 3, 13]. [³²P]Adenosine-5'-triphosphate([³²P]ATP)는 Amersham Corp., 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA)는 LC Services Inc., histone H1은 Boeringer Mannheim, DEAE-52 cellulose는 whatman에서 egg yolk phosphatidylcholine, phosphatidylserine(PS)과 dipalmitoyl phosphatidylcholine(DPPC)는 Sigma Chemical Co., 그리고 Sephadex G-200, Sephacryl S-300과 Sephacryl S-400은 Pharmacia Fine Chemicals로부터 구입하였다. 그외의 이 실험에 사용된 시약은 최고급 순도의 것을 사용하였다.

실험 방법

protein phosphatase 2A의 정제

protein phosphatase 2A는 Suganuma와 Mackenzie의 방법에 따라 bovine brain homogenate에서 분리하였다[3, 14]. Bovine brain은 완충액 A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EGTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF), 0.25 M sucrose)중에서 Polytron(Kinematica)을 사용하여 homogenization하였다. Homogenate의 상등액은 DEAE-52 column에 첨가하고 완충액 B(Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, 2 mM 2-mercaptoethanol, 10% glycerol)과 0.1 M NaCl을 함유한 완충액 B로 column를 씻었다. 그후에 0.2 M NaCl을 함유한 완충액 B로 단백질을 용출시켜서 각 fraction에 대해서 phosphatase 활성을 측정하였다. Phosphatase의 활성이 있는 fraction을 모아서 PM-30 filter가 장착된 Amicon ultrafiltration을 이용하여 20ml로 농축시켰다. Phosphatase를 더욱 정제하기 위하여 Sephacryl S-300과 Sephadex G-200 column(2.5×90cm)에 첨가하여 완충액 B로 용출시켰다.

phosphatase 활성의 측정

phosphatase 활성은 30°C에서 [³²P]-histone H1의 방사능이 감소하는 양을 측정하여 평가하였다[15]. Histone H1은 protein kinase C의 활성을 이용하여 [³²P]로 표식하였다[16]. 측정 용액은 protein(0.2μg 최종농도), [³²P]-histone H1(1μg, 20,000-22,000 cpm/μg) 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% 2-mercaptoethanol) 2 mM MnCl과 10% glycerol로 구성 되어있다.

Lipid membrane의 조제

Chloroform에 분산시킨 DPPC 혹은 PS/DPPC 용액은 N₂ 기류하에서 chloroform을 증발시키고 용기벽에 형성된 지질 박막을 진공하에서 완전히 건조시켰다. 이 지질 박막에 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1 M NaCl)을 가하여 DPPC의 상 전이온도 이상에서 분산시켰다. 얻어진 다중층 지질막은 probe형 초음파로 처리하여 이중층 지질막을 얻었다.

phosphatase의 Liposome에의 분배

정제된 phosphatase는 New England Newclear (NEZ-151)에서 구입한 방사성 요오드 화계를 이용하여 lacto peroxidase법으로 [125 I]표식을 하였다. 목적물은 Sephadex G-200 column(1×50cm)에 의하여 유리 [125 I]를 제거하고 얻었다. 요오드로 표식한 단백질의 수율은 7100cpm/ μ g이었다.

[125 I]로 표식한 단백질 [0.24(μ g)]은 DPPC 이중층 지질막에 첨가하여 30°C에서 10분간 incubation하였다. 그리고 혼합물은 완충액(Tris-HCl, pH 7.0, 1 mM EDTA, 0.1% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol)으로 Sephacryl S-400 column을 통하여 용출시켰다. 용출물의 방사능 측정은 JD-751 Auto Well system(Aloka)으로 행하였다. 또한 protein phosphatase의 lipid membrane에의 분배는 lipid membrane과 결합하지 않는 phosphatase의 양을 측정하여 평가하였다. 즉, 단백질과 DPPC 이중층 지질막의 혼합물은 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% 2-mercaptoethanol, 0.15 M NaCl, 10% glycerol) 중에서 30°C로 10분간 incubation하였다. 그후 15,000g로 10분간 원심 분리하고 상등액 중의 phosphatase 활성을 측정하여 phosphatase의 lipid membrane에의 분배를 결정하였다. protein phosphatase 2A를 얻기 위하여서는 다음과 같은 방법을 이용하였다. 즉 protein phosphatase 2A는 DEAE

column을 이용하여 0.2 M NaCl을 함유한 완충액으로 용출시켰다[3, 14]. 그후에 gel-chromatography로 정제하였다[14]. 정제된 단백질의 특성을 Table 1에 나타내었다.

결과 및 고찰

정제한 protein phosphatase 2A의 특성

정제한 protein phosphatase 2A는 protein kinase C에 의하여 인산화 된 histon H1으로 부터 효과적으로 탈인산화 하였다. Table 1로 부터 phosphatase의 활성으로 인한 탈인산 효과는 protein phosphatase 2A의 활성을 특이적으로 증가시키는 Mn^{2+} 첨가에 의하여 증대 되었으나 Ca^{2+} Mg^{2+} 의 첨가효과는 관측되지 않았다. 한편 protein phosphatase 2A의 활성은 okadaic acid에 의해서도 저해를 받는 것으로 알려져 있으며, histone H1은 이 효소에 대하여 좋은 기질로 알려져 있다[15]. 그러므로 추출한 단백질은 protein phosphatase 2A인 것이 확인되었다.

protein phosphatase 2A의 liposome에의 분배

protein phosphatase 2A는 T-lymphoblast의 세포질과 plasma membrane의 양쪽에서 분리되었다. 그러나 membrane에 결합한 phosphatase의 양은

Table 1. The effect of divalent cations and okadaic acid on the phosphatase activity. The numerical values represent the remained [32 P] histone H1 in the presence for the protein phosphatase under various conditions.¹⁾

| Substance | without divalent cations | Mn^{2+} | Ca^{2+} | Mg^{2+} |
|----------------------|--------------------------|-----------|------------|------------|
| without okadaic acid | 8550 ± 1 | 260 ± 35 | 8820 ± 421 | 7930 ± 76 |
| with okadaic acid | (100) ²⁾ | (363) | (106) | (114) |
| without okadaic acid | | 1010 ± 71 | 9110 ± 469 | 8560 ± 108 |
| with okadaic acid | | (339) | (76) | (93) |

¹⁾ [32 P]histone H1 (11430 ± 1570 cpm) was incubated with the protein (200ng) at 30°C for 10 min in the presence of absence of okadaic acid (0.1 mM) and/or divalent cations (2 mM).

²⁾ The number in parenthesis represents the relative phosphatase activity, the activity in the absence of okadaic acid and divalent cations being taken as 100%.

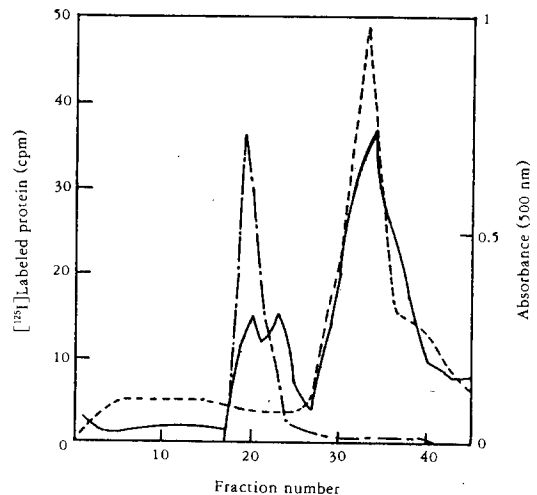


Fig. 2. Elution profiles of [125 I]labeled protein incubated without (---) or with (—) DPPC small unilamellar vesicles through Sephacryl S-400. The elution profile of DPPC small unilamellar vesicles (— · —) is also indicated.

세포질에서의 결합 양 보다도 적었다[17]. [125 I]로 표식한 phosphatase 2A의 DPPC 이중층 지질막에서의 결합을 검토하였다. 표식된 phosphatase 2A와 DPPC 이중층 지질막의 혼합물이 같이 용출되는 모양을 Fig. 2에 나타내었다. Fraction 20 부근에서 [125 I]protein과 lipid membrane을 incubation하여 용출시킨 peak가 함께 관측되어 phosphatase 2A와 lipid membrane이 결합한 것을 알 수 있었다. 또한 이들의 결합을 확인하기 위하여 DPPC 다중층 지질막을 이용하여 조사하였다. phosphatase 2A를 DPPC 다중층 지질막과 incubation하였다. 그 후 membrane과 결합한 phosphatase 2A를 원심 처리하여 침전시키고 상등액 중의 phosphatase 2A의 활성을 측정하였다. 상등액 중의 phosphatase 2A의 활성은 다중층 지질막의 양이 증가함에 따라 감소되는 것이 관측되었다(Fig. 3). phosphatase 2A의 활성이 감소함에 따라서 탈인산 작용이 감소하여 histone H1으로 부터 탈인산화 양이 감소하는 것을 알 수 있다. 이로부터 protein phosphatase 2A가 lipid membrane에 결합하는 것이 확인되었다. protein phosphatase 2B는 PS 혹은 phosphatidylglycerol과 특이적으로 결합한다. 그러나 PC와는 특이적으로 결합하지 않는다[12]. 이 연구에서 protein phosphatase 2A의 PS를 포함한 membrane에서의 결합의 현저한 증가는 관측되지

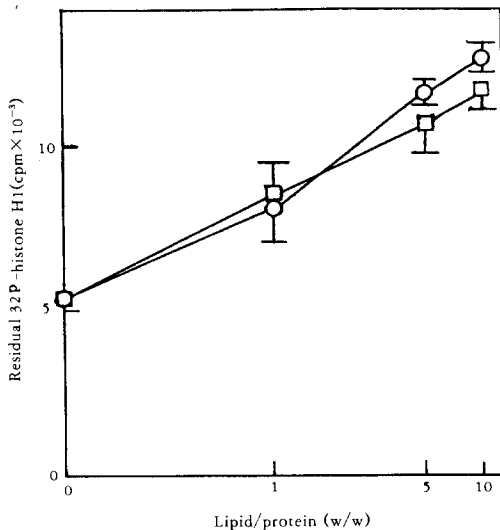


Fig. 3. Association of protein phosphatase with DPPC multilayer vesicles (○) and PS/DPPC (2/8 w/w) multilayer vesicles (□).

않았다(Fig. 3). 전체 protein phosphatase 2A가 lipid membrane에 결합할 때는 다량의 lipid가 필요하므로 protein phosphatase 2B가 lipid membrane에 결합하는 것보다 약한 친화력을 갖는 것으로 생각된다. 이 결과는 T-lymphoblast의 plasma membrane에서 분리한 protein phosphatase 2A의 양이 세포질에서 분리한 양보다 적은 실험 결과와도 일치한다[17].

Membrane과 결합한 protein phosphatase 2A의 활성 거동

protein phosphatase 2A의 활성을 DPPC lipid membrane의 존재하에서 측정하였다. phosphatase 2A의 활성은 lipid의 농도가 증가함에 따라서 감소하는 것이 관측 되었다(Fig. 4). Fig. 4로 부터 lipid의 농도가 같은 때는 이중층 지질막에 의한 phosphatase 2A의 활성 저해효과는 다중층 지질막보다 이중층 지질막 쪽이 현저히 컸다. 이 결과는 phosphatase 2A가 이중층 지질막에 결합 할 수 있는 면적이 다중층 지질막보다도 넓기 때문이라고 생각된다. phosphatase 2A의 활성에 미치는 lipid membrane의 효과에 기질과 membrane의 상호작용이 미치는 영향을 검토하기 위하여 기질인 [32 P]histone H1의 lipid membrane에의 결합을 조사하였다(Fig. 5). [32 P]histone H1의 방사능활성은 DPPC 다중층 지질막 혹은 PS/DPPC 다중층 지질막과 함께 incubation한 후 원심 처리하여 상등액 중 기질의 양을 측정하여 평가하였다. 그 결과 다중층 지질

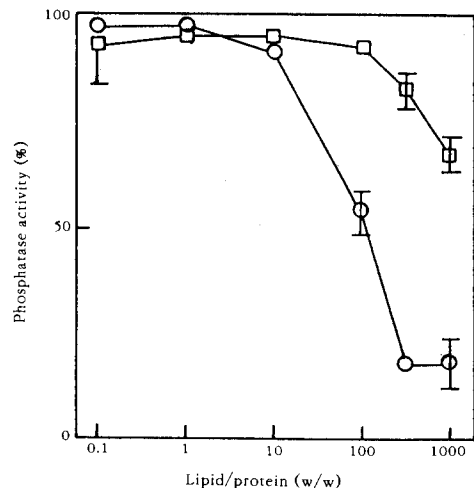


Fig. 4. Inhibitory effect of DPPC small unilamellar vesicles (○) and DPPC multilayer vesicles (□).

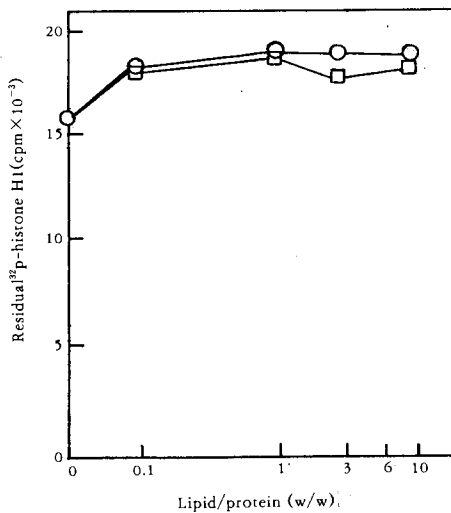


Fig. 5. Association of phosphorylated histone H1 with DPPC multilayer vesicles (○) and PS/DPPC (2/8 w/w) multilayer vesicles (□).

막의 양을 증가시켜서 첨가하여도 상등액 중의 기질의 방사능 활성은 변하지 않는 것이 관측되었다. 이것은 membrane의 첨가에 의해서 인산화된 기질에서 자발적으로 탈인산 과정이 일어나지 않는 것을 의미한다. 또한 유리 인(phosphates)도 lipid membrane에 결합하지 않는 것이 확인되었다. 이들 결과로부터 protein phosphatase 2A로 인한 [³²P]histone H1에서의 탈인산 효과는 phosphatase 2A와 lipid membrane의 결합에 의한 것임을 알 수 있다.

Okadaic acid에 의한 phosphatase 2A의 활성 저해효과

Okadaic acid는 phosphatase 2A 활성의 강력한 저해제로 알려져 있다[4-8]. Okadaic acid의 첨가에 의한 protein phosphatase 2A의 활성에 미치는 효과는 DPPC 이중층 지질막의 존재하에서 조사 검토하였다 (Fig. 6). Okadaic acid와 lipid membrane은 협동적으로 phosphatase 2A의 활성을 저해하는 것이 관측되었다. 완충액중에 protein phosphatase 2A만 존재할 때의 활성은 0.5 nM okadaic acid를 첨가하면 본래 효소 활성의 1/2 까지 감소한다. 한편, 이제에 lipid membrane이 존재하면 okadaic acid만을 첨가하였을 때보다도 phosphatase 2A의 활성은 더욱 감소하는 것이 관측되었다. 이것은 okadaic acid가 lipid membrane과 lipid membrane

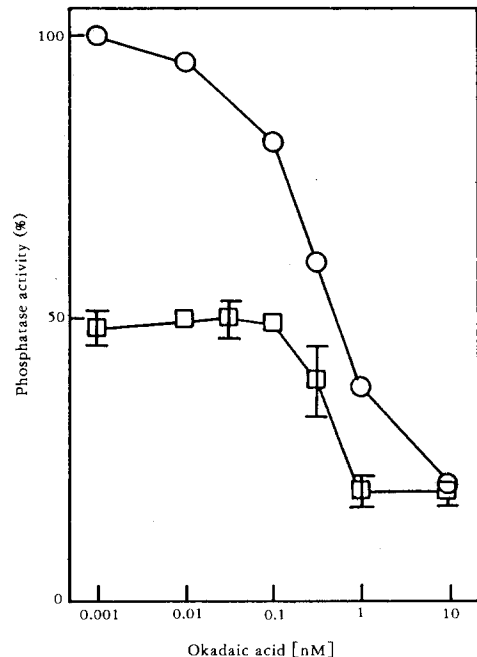


Fig. 6. Effect of okadaic acid on phosphatase activity in the absence (○) or presence (□) of DPPC small unilamellar vesicles.

에 결합한 phosphatase 2A에는 결합하지 않는 것을 시사한다. 그리고 이 결과는 okadaic acid가 lipid membrane에 대하여 낮은 친화력을 가지고 있다는 이전의 실험 결과와도 일치한다[18]. protein phosphatase 2A의 활성을 조절하는 몇가지 메커니즘이 보고 되어있다[19]. protein phosphatase 2A는 세포 중에서 미 활성화된 상태로 존재한다. protein phosphatase 2A의 활성 저해 메커니즘은 별로 알려져 있지 않다. 이 연구에서 protein phosphatase 2A의 활성저해는 phosphatase 2A가 okadaic acid와 lipid membrane에 결합하므로써 일어나는 것이 밝혀졌다. 이것은 protein phosphatase 2A가 이들 물질과 결합하여 conformation 변화를 일으키기 때문이라고 생각한다. 세포내 정보전달 기구에 관여하는 phosphatase의 또 하나의 메커니즘은 membrane과 결합하므로써 생길 수 있다. 또한 이 실험 결과로부터 세포막에 결합한 protein phosphatase 2B에 okadaic acid가 특이적으로 결합하지 않는 사실에 대하여서도 설명될 수 있을 것이다.

요 약

protein phosphatase 2A는 bovine brain homogenate의 세포질 fraction에서 얻어졌다. 기질로서 인산화된 histone H1을 이용하여 측정된 phosphatase의 활성은 dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC) 혹은 phosphatidylserine/DPPC의 혼합물로 구성된 liposome의 존재하에서 저해되었다. Protein phosphatase 2A의 lipid membrane에의 결합은 다중층 지질막의 혼합물 계에서 liposome의 양이 증가함에 따라서 상등액 중의 phosphatase의 활성이 감소하는 것으로 확인할 수 있었다. 또한 [¹²⁵I]protein phosphatase 2A가 liposome과 동시에 용출되는 것으로도 확인되었다. 그러나 liposome에 대한 protein phosphatase의 친화력은 높지 않았다. 한편, okadaic acid와 liposome은 협동으로 phosphatase의 활성을 감소시켰다. 이것은 okadaic acid가 lipid membrane이나 membrane에 결합한 phosphatase에는 결합하지 않는다는 것을 의미한다. 그러므로 lipid membrane에 의한 protein phosphatase 2A의 활성 저해 효과는 phosphatase 2A와 lipid membrane과의 결합에 의한 것이라고 설명될 수 있다.

감사의 글

이 연구는 1985년부터 1990년까지 교토 대학 공학부 고분자화학교실 Imanishi 연구실에서 수행되었다. 연구수행 중에 지도하여 주신 Yukio Imanishi 교수와 Shunsaku Kimura 박사에게 감사드린다. 그리고 일본 국립 암 센터 연구소 예방 연구부에서 체재 연구중 호의를 베풀어 주신 Hirota Fujiki 부장과 Massami Suganuma 박사에게도 감사드린다.

참고문헌

1. M. Murata, M. Shimatani, M. Sugitani, Y. Oshima and T. Yamamoto (1982) Bull. Japan Soc. Scient. Fish., **48**, 549.
2. M. Suganuma, H. Fujiki, H. Suguri, S. Yoshizawa, M. Hirota, M. Nakayasu, M. Ojika, K. Wakamatsu, K. Yamada and T. Sugimura (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 1768.
3. M. Suganuma, M. Suttajit, H. Suguri, M. Ojika, K. Yamada and H. Fujiki (1989) FEBS Lett., **250**, 615.
4. C. Bialojan and A. Takai (1988) Biochem. J., **256**, 283.
5. T. A. J. Haystead, A. T. R. Sim, D. Carling, R. C. Honnor, Y. Tsukitani, P. Cohen and D. G. Hardie (1988) Nature, **337**, 78.
6. S. Klumpp, P. Cohen and J. E. Schultz (1990) EMBO J., **9**, 685.
7. M. A. Felix, P. Cohen and E. Karsenti (1990) EMBO J., **9**, 675.
8. P. Cohen, S. Klumpp and D. L. Schelling (1989) FEBS Lett., **250**, 596.
9. H. Fujiki, M. Suganuma and T. Sugimura (1989) Envir. Carcino. Revs., **C7**, 1.
10. Y. Nishizuka (1984) Nature, **308**, 693.
11. M. D. Bazzi and G. L. Nelsestuen (1987) Biochemistry, **26**, 115.
12. M. Politino and M. M. King (1987) J. Biol. Chem., **262**, 10109.
13. T. Tachibana, P. J. Scheuer, Y. Tsukitani, H. Kikuchi, D. Van Engen, F. Clardy, Y. Gopichard and F. J. Schumitz (1981) J. Am. Chem. Soc., **103**, 2471.
14. C. W. Mackenzie, G. J. Bulbulian and J. S. Bishop (1980) Biochim. Biophys. Acta, **614**, 413.
15. S. Jakes and K. K. Schlender (1988) Biochim. Biophys. Acta, **967**, 11.
16. H. Fujiki, Y. Tanaka, R. Miyake, U. Kikkawa, Y. Nishizuka and T. Sugimura (1984) Biochem. Biophys. Res. Commun., **120**, 339.
17. D. R. Alexander, J. M. Hexham and M. J. Crumpton (1988) Biochem. J., **256**, 885.
18. K. Y. Nam, M. Hiro, S. Kimura, H. Fujiki and Y. Imanishi (1990) Carcinogenesis, **11**, 1171.
19. P. Cohen (1989) Ann. Rev. Biochem., **58**, 453.