

소의 뇌로부터 GTP 결합단백질의 분리

영남대학교 의과대학 생화학교실

김정희

서 론

호르몬에 의한 adenylyl cyclase의 자극 및 억제에는 두개의 조절 단백질 Gs와 Gi에 의해 기인되며, Gt는 망막의 조절 단백질로 cyclic GMP에 의한 phosphodiesterase를 자극함으로써 시황에 의한 빛을 전환시키는데 관여한다. 이러한 세종류의 단백질이 구조적으로 세포막과 관계되는 것이며 작용기전이 유사하다.^{1,2)} Go는 소의 뇌조직에서 분리된 새로운 GTP 결합 단백질로서 그 기능은 잘 모르나 역시 세포막 단백질로 알려져 있다.

세포막의 정보전달 기전에는 현재 두가지의 중요한 신경전달 경로가 알려져 있다. 즉 외부에서 호르몬이나 신경전달체가 세포막 수용체에 전달 되면 adenylyl cyclase가 활성화되어 세포내의 ATP를 c-AMP로 만들고 c-AMP가 이차전령물로 작용하는 경로와 phospholipase C가 활성화되어 세포막의 phosphatidylinositol bisphosphate를 분해하여 inositol triphosphate와 diacylglycerol을 생성함으로써 세포내로 정보를 전달하는 경로가 있다. 전자에서는 수용체에서 adenylyl cyclase가 활성화 되는데 GTP와 결합하는 GTP 결합단백질(G-단백질)이 관여한다는 몇몇 보고들이 있다.^{3,4)} 후자에서도 GTP 결합단백질의 참여 여부 등이 여러 연구자들에 의해 연구되고 있으며 GTP가 phospholipase C를 활성화시킨다는 보고가 이를 뒷받침하고 있으나 아직 논란이 되고 있다.^{5,6)}

GTP 결합단백질의 정제는 Sternweis와 Robishaw⁷⁾가 소의 뇌조직으로부터 Gs와 Gi 두 단백질을 분리하였으며 쥐의 뇌⁸⁾ 및 간,⁹⁾ 토끼의 neutrophil,¹⁰⁾ 사람의 혈소판막과 적혈구의 정제 등에서도 보고되었으며 α , β , γ subunit의 존재를 시사했다.^{11,12)} 소의 뇌조직의 GTP 결합단백질은 α subunit는 분자량 39,000, 41,000, 45,000 dalton들이 있으며 β subunit는 분자량 36,000, 35,000으로, γ subunit는 10,000, 11,000 dalton 등^{13,14)}이다. 아울러 GTP 결합 단백질은 $\alpha\beta\gamma$ complex로 있다가 GTP가 결합함으로써 활성화되며 이 때는 GTP가 α 와 결합하고 $\beta\gamma$ 는 떨어져 나가며 GTPase의 활성화로 GTP가 분해되어 GDP로 되면서 GTP 결합단백질은 다시 $\beta\gamma$ 와 결합하여 불활성화 된다.¹⁵⁾

최근 새로이 소개된 phosphoinositide의 대사경로와 관련하여 Go 단백질이 알려지고 GTP 결합단백질의 관여 여부 등도 논란이 되고 있다.^{16,19)}

본 연구는 소의 뇌조직으로부터 여러 column을 사용하여 GTP 결합 단백질을 분리 정제하여 분자량을 관찰하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 재료로 GTP 결합단백질의 분리하는 것 도살한 소의 신선한 뇌조직을 사용하였으며 column resin으로는 DEAE Sephacel 및

heptylamine-Sepharose는 Pharmacia사, Ultrogel AcA 34는 LKB사 제품을 사용하였고 dithiothreitol (DTT), sodium dodecyl sulfate(SDS), phenylmethylsulfonylfluoride(PMSF), ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)등은 Sigma사 제품이며 GTP γ S는 Boehringer Mannheim사이며 [35 S]GTP γ S는 Amersham사이고 그의 시약들은 일반회사의 특급 시약을 사용하였다. Standard GTP 결합단백질로 G α , G β 및 G γ 는 NIH/ NHLBL의 Dr. Rhee로부터 공급받았다.

세포막의 분리 및 GTP 결합단백질의 추출 : 소의 뇌조직 200g을 4배용량의 TS 완충액(10mM Tris/HCl, pH7.5, 10% sucrose)에서 분쇄하여 가제에 걸러 20,000 \times g(Beckman, rotor 21)에서 30분간 원심분리하였다. 침전물에 5배의 TS 완충액을 넣고 다시 분쇄 후 60분 원심하여 침전물을 동일 완충액으로 세척하였다. 분리해낸 세포막을 100 mM NaCl이 든 1200ml의 TED(30mM Tris/HCl, pH8.0, 1mM EDTA, 1mM DTT)에 녹여 원심하고 침전물을 다시 1% cholate가 든 TED용액 2L에 녹여 1시간 동안 혼합하였다. 35,000rpm(Sorvall OTD, rotor 375)에서 1시간 초원심한 상청액으로 chromatography를 시행하였으며 모든 과정은 4 $^{\circ}$ C에서 행하였다.

DEAE-Sephacel column(bed vol : 1 L)에 위의 상청액을 적용하였으며, 1% cholate가 함유된 TED용액으로 0-225mM의 NaCl로 직선 gradient를 2L 적용하여 chromatography 하였으며, 500mM의 NaCl이 든 용액으로 1L 더 흘러 보냈다. 흘러나온 각 분획은 23ml씩 받았고 GTP γ S와의 결합정도를 측정하여 결합 활성도 양성인 분획들을 모아 Amicon PM30의 농축기로 12배이상 농축하여 20ml로 만들었다.

다음 과정으로 1.2L의 column bed volume의 Ultrogel AcA 34 column chromatography를 시행하였다. 시료를 적용한 후 100mM NaCl 및 1% cholate가 든 TED용액으로 용출하였고 각 분획은 14.5 ml씩 회수하였다. 각 분획들은 GTP γ S 결합정도를 측정하여 활성분획을 모았다. 100ml bed volume의 heptylamine-Sepharose column에 상기 시료 용액

의 3배에 해당하는 TED-100mM NaCl 용액을 첨가한 시료를 적용하였고, 100ml의 TED-0.25% cholate-300mM NaCl로 씻은 후 NaCl 200mM에서 50mM되도록 역 gradient로 800ml의 용액을 적용하였다. 각 분획은 8ml씩 받아 GTP γ S 결합정도를 측정하였고 GTP 결합단백질은 Amicon PM30으로 1mg/ml되게 농축하였다.

GTP γ S 결합정도의 측정 : 시료는 10mM NaHepes, pH8.0-1mM EDTA-1mM DTT-0.1% (w/v) lubrol 12A9로 희석한 20 μ l의 시료에 20 μ l의 50mM NaHepes, pH8.0-40mM MgCl $_2$ -1mM EDTA-1mM DTT-200mM NaCl-2 μ M GTP γ S-100,000cpm [35 S] GTP γ S을 가하여 30 $^{\circ}$ C 에서 1시간 반응 후 1ml의 20mM Tris/HCl, pH8.0-100mM NaCl-25mM MgCl $_2$ 로 희석하여 BA85 nitrocellulose filter에 걸러서 같은 완충액을 2ml씩 4번 씻은 후 filter를 말려서 10ml의 liquid scintillation cocktail인 Aquasol II 용액에 녹여 GTP γ S와 결합한 GTP 결합단백질의 동위원소 활성도를 β -counter(LKB)로 측정하였다.

SDS-polyacrylamide gel 전기영동 : SDS가 든 polyacrylamide 8-25%의 gradient gel을 만들어 Weber 및 Osborn의 방법²⁰⁾으로 전기영동하였다. 시료에 2배의 sample loading buffer(0.12M Tris, pH7.2, 20% glycerol, 4% SDS, 10% mercaptoethanol)을 넣고 섞은 후 95 $^{\circ}$ C에서 2분간 방치하여, slab gel(16 \times 18 \times 0.5cm)에 시료적용 후 100V의 일정 전압을 유지시키며 5시간 전기영동하였다. 염색은 Coomassie brilliant blue 염색하여 methanol/acetic acid 혼합용액으로 탈색하여 단백질을 확인하였다.

실 험 성 적

소의 뇌로부터 GTP 결합단백질을 분리하기 위하여 뇌조직을 분쇄하여 세포막을 분리해내고, 1% cholate로 세포막 단백질을 용출하여 초원심한 상청액을 DEAE Sephacel chromatography를 시행하여 그 결과를 그림1에 나타내었다.

Tris 완충액에 NaCl 농도가 0-225mM 되게 증

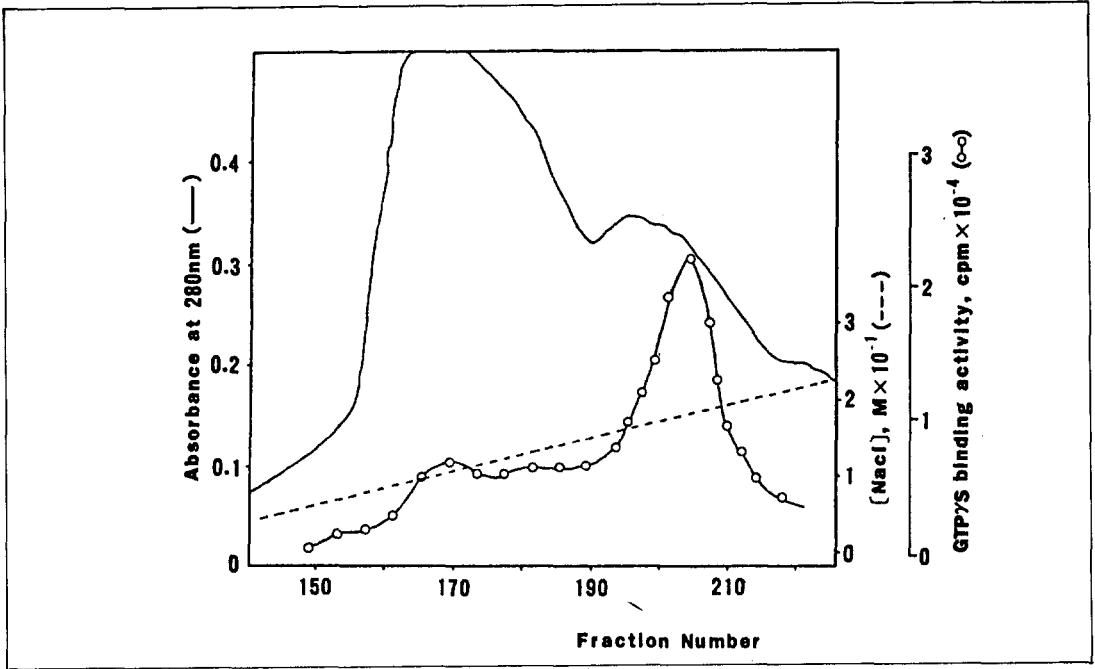


Fig. 1. DEAE Sephacel chromatography. The extracted membrane by 1% cholate from bovine brain was applied to DEAE-Sephacel column. The chromatography was performed with a linear gradient of NaCl from zero to 225 mM.

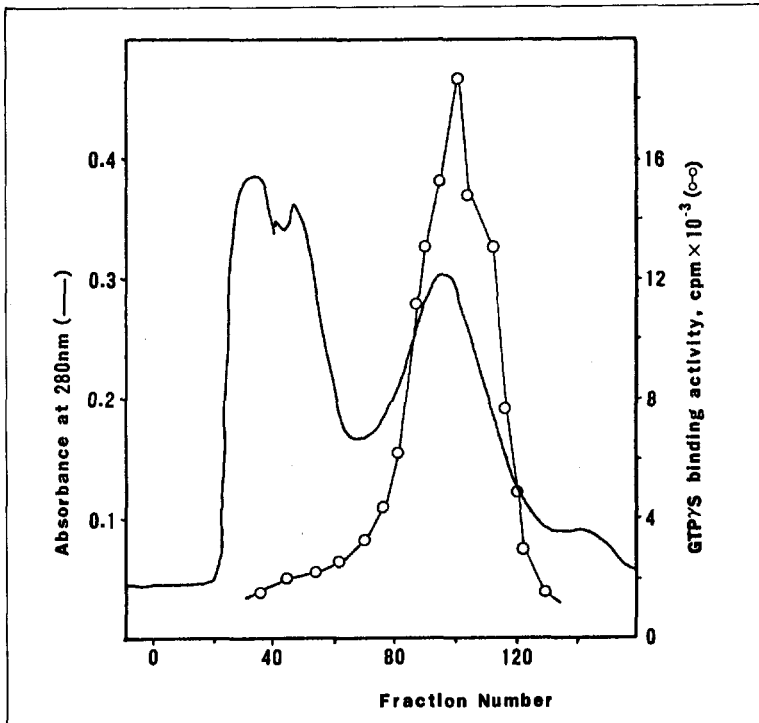


Fig. 2. Ultrogel AcA 34 chromatography. The pooled fraction eluted from DEAE Sephacel was applied to Ultrogel AcA 34 column. The elution buffer was used with TED-1% cholate-100 mM NaCl.

가 시키면서 각 tube 당 23ml씩 취하였고, 흡광도 280nm에서 단백질곡선을 그려 각각의 분획을 GTP γ S와 결합시켜 결합정도를 측정하였으며, 곡선에서와 같이 191-214번의 GTP γ S 결합곡선 부분을 모았다.

모은 시료를 12배 정도 농축하여 Ultrogel AcA 34(bed volume 1.2L) column chromatography를 하여 그림2에 도시하였다. 100mM NaCl 및 1% cholate가 함유된 Tris완충액으로 용출하였고 분획은 14.5ml씩 모아 GTP γ S 결합정도를 측정한 결과 분획 90번에서 최고치가 나왔으며 곡선부분인 83-120번의 분획을 회수하였다.

회수한 시료는 3배로 희석하여 heptylamine-Sepharose column(bed volume : 100ml)에 적용하여 그려진 chromatogram을 그림3에 나타내었다. 시료를 적용한 column에 NaCl 농도를 200-50mM이 되도록 역 gradient를 적용하였고, 각 분획은 8ml씩

받아 GTP γ S 결합정도를 측정하였으며 34번 분획에서 최고치가 나왔다.

곡선을 중심으로 각 분획의 단백확인을 위하여 SDS polyacrylamide gel 전기영동하여 그림4에 나타내었다. GTP γ S와 결합하는 정도가 높은 GTP 결합단백질은 분획 32-42번으로 Go α 표준 band와 일치하는 위치에서 Go α band를 확인할 수 있었으며 분자량은 39KD(dalton)이었다. G β 는 활성도가 낮은 분획 44-48번에서 표준 G β 와 일치하는 band가 나왔으며 분자량은 36KD이었다. Go α 는 32번 분획에서 잘 분리되었으나 G β 는 다른 여러 band가 겹쳤다.

Heptylamine-Sepharose column을 통과한 Go α 와 G β 를 한번 더 DEAE Sephacel에 적용하여 얻은 분획을 전기영동하여 그림5에 나타내었다. 더욱 정제된 Go α 와 G β 를 관찰할 수 있었다.

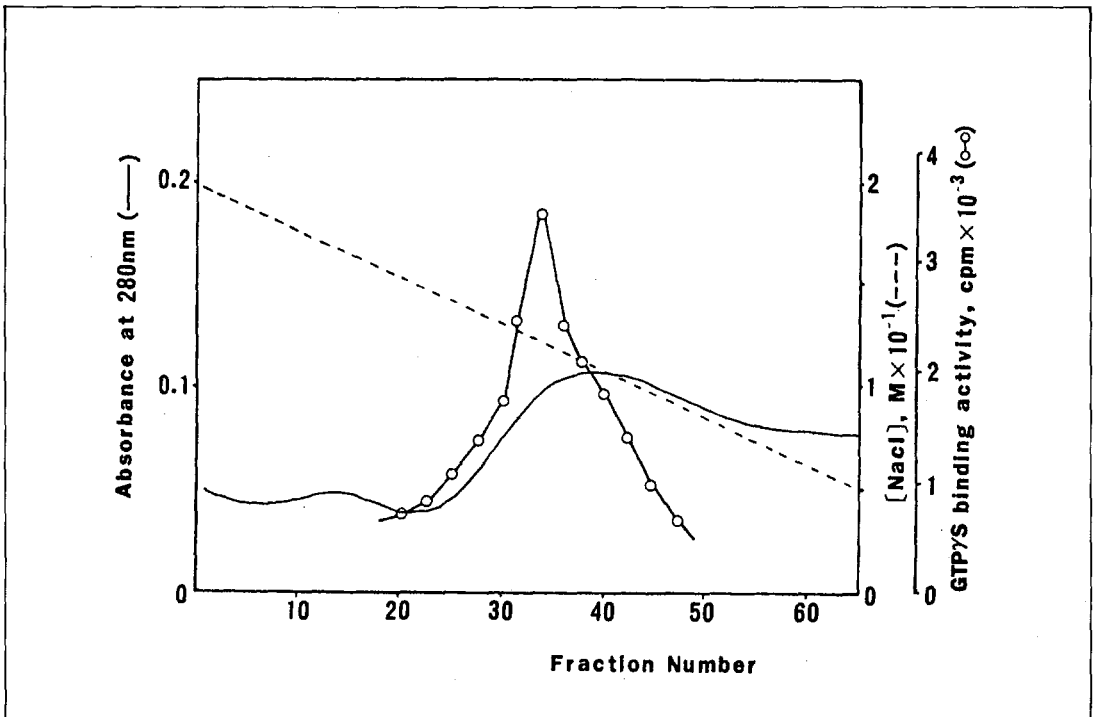


Fig. 3. Heptylamine-Sepharose chromatography. The pooled G protein from Ultrogel AcA 34 was applied to heptylamine-Sepharose column and eluted with a reverse linear gradient of NaCl from 200 to 50 mM.

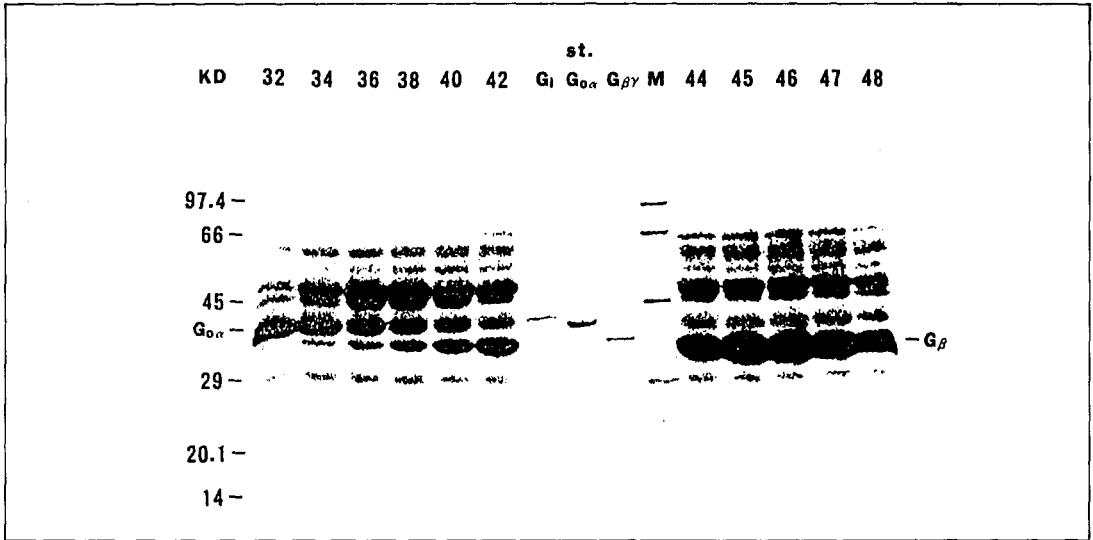


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of fractions of G protein from heptylamine-Sepharose column. The standard(st.) of Gi(41KD), Goα(39KD) and Gβ(36KD) was applied on central three lanes.

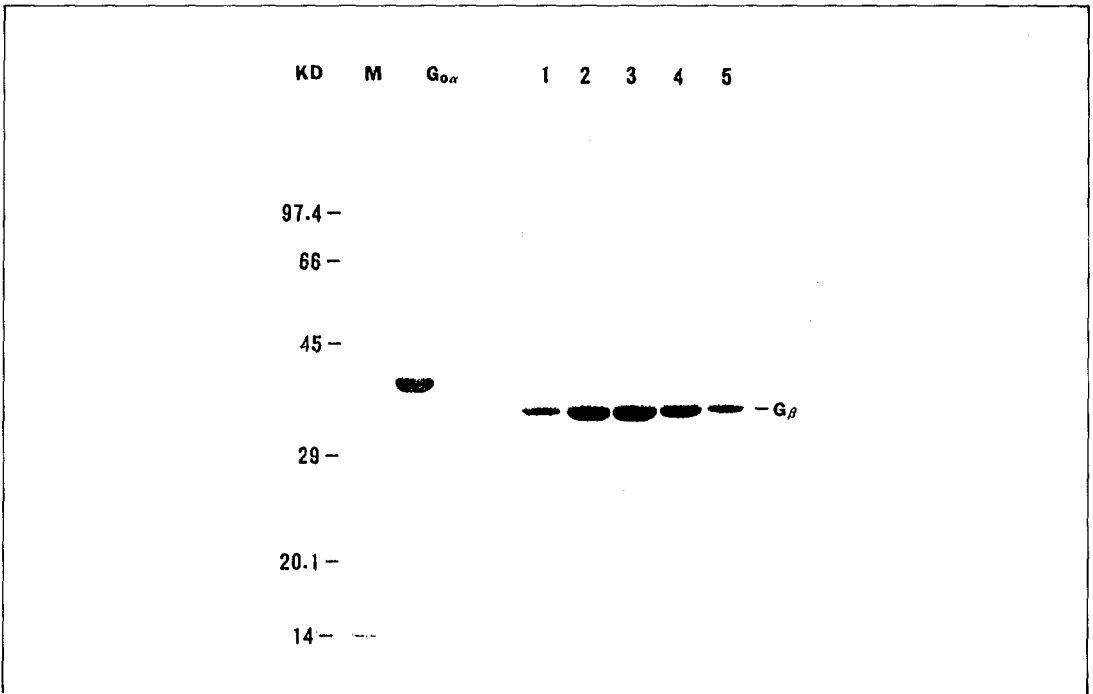


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Each Goα and Gβ sample from heptylamine-Sepharose was performed the second DEAE-Sephacel chromatography. Goα was revealed as 39KD and lanes 1-5 were expressed Gβ(36KD).

고 찰

Acetylcholine이나 norepinephrine같은 신경전달체는 세포막의 수용체와 결합하고 수용체-GTP 결합단백질과 복합체가 되어 adeny cyclase를 활성화시키고 세포질의 ATP를 c-AMP로 전환시킴으로 c-AMP는 이차전령물질로서 세포내의 중요 전달물질로 작용한다.^{3,14)} GTP 결합단백질은 세포막과 관련된 단백질로 막의 정보전달시 GTP와의 결합을 조절하므로써 정보전달의 조절단백질로 알려져 있으며 그 기능에 따라 Gs, Gi, Go, Gt 등이 존재한다. 이들의 각 종류에 대한 정확한 작용기전은 아직 확실하지 않으나 정보전달의 자극효과를 가진 Gs와 억제효과를 가진 Gi, 눈의 망막에 존재하는 transducin인 Gt와 최근 알려진 Go가 있으며 각기 그 subunit로 α , β 및 γ 가 있다.^{6,21)}

GTP 결합단백질의 정제로 Sternweis¹³⁾는 hydroxyapatite column을 이용한 chromatography로 소의 뇌로부터 Gs를 분리하였다. Gi와 Go의 α 및 $\beta\gamma$ subunit는 heptylamine-Sepharose로 분리하였으며 Al^{3+} 와 Mg^{2+} 및 F(AMF)의 존재시 정제되었다. 즉 Gi와 Go는 AMF에 의해 활성도가 증가한다고 할 수 있다. Neer 등¹⁴⁾은 역시 소의 뇌실질로부터 sucrose가든 tris 완충액과 benzamide를 이용하여 분리해내고 DEAE-Sephacel I-Sepharose 6B를 거쳐 DEAE-Sephacel II 및 heptylamine-Sepharose를 이용한 α_i 및 β 를, $\alpha_i + \beta$ 를 분리하고 Ultrogel AcA 44로 α_i 및 β 의 다른 polypeptide를 분리해 내어 α 는 분자량 41KD, 39KD이고 β 는 36KD임을 보고하였다. Gs는 콜레라균 독소에 의한 ADP-ribosylation을 가져왔다. 그러나 Go는 콜레라균 독소 없이도 ADP-ribosylation을 가져왔고 muscarine수용체와 상호작용한다고 하였다.^{8,22)}

본 연구에는 GTP 결합단백질의 분리는 cholate존재 하에서 세포막으로부터 단백질을 용출하였다. GTP 결합단백질은 detergent가 있는 상태에서 안정하다고 하였다. 정제 단계로 DEAE Sephacel chromatography를 하여 GTP와 결합하는

단백질 분획을 얻은 후 Ultrogel AcA 34를 거친 후 heptylamine-Sepharose를 통과시킴으로써 단백질 분획을 관찰하였다. Heptylamine-Sepharose chromatography는 NaCl을 역 gradient로 사용하였으며 단백질 분획을 280nm의 UV spectrophotometer로 확인하였다.

GTP와 결합하는 활성도가 최고치의 분획에서 SDS-polyacrylamide gel 전기영동상의 분자량 39KD의 $Go\alpha$ 표준 단백질과 일치하는 분획이 관찰되었다. $G\beta$ 분획은 곡선이 하향하는 분획 44-48에서 관찰되었고 band역시 $G\beta$ 의 표준 단백질과 일치하는 분자량 36KD에서 관찰되었다. 이는 GTP 결합 단백질의 $\alpha\beta$ complex 중 GTP의 결합은 $Go\alpha$ 와 결합하며 $G\beta\gamma$ 는 떨어져 나가므로 $Go\alpha$ 곡선과 GTP 결합 정도가 일치하는 양상을 뒷받침해주는 결과라고 할 수 있다. 그러나 분리된 전기영동상의 단백질 분획을 관찰할 때 여러 다른 분획들이 함께 나와서 DEAE Sephacel chromatography를 한번 더 통과 시켜 거의 α 및 β subunit만 분리할 수 있었다.

Gamma subunit는 분자량 10,000, 11,000 dalton 정도의 크기로서 대개 β 분획과 거의 함께 따라다니며 분자량이 적은 관계로 단순 전기영동상에서는 잘 나타나지 않으며 immunoblot으로 확인가능할 것이다.^{7,19)} 따라서 본 연구는 정보전달 기전연구의 단편으로 GTP 결합단백질의 각 subunit를 분리 정제하여 단백질을 얻음으로서 각 subunit의 성질이나 분자량들을 알고 정보전달 경로에서의 역할 등의 연구에 잘 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

세포막 정보전달 경로에서 수용체에 전달된 정보를 세포내로 전달하는데 조절 단백질로 알려진 GTP 결합단백질을 소의 뇌조직으로부터 정제하고 그 분자량등을 관찰하였다.

분쇄한 소의 뇌조직으로부터 세포막을 분리해내고 1% cholate를 이용하여 세포막 단백질을 얻

었으며 DEAE-Sephacel column chromatography를 시행하였다. 여기서 얻은 GTP 결합단백질은 다시 Ultrogel AcA 34 column chromatography, heptylamine-Sepharose column chromatography 순으로 실시하여 GTP γ S와 결합하는 단백질 분획을 모았고 활성도와 일치하는 분획을 얻었다. 전기영동으로 관찰한 결과 Go α 가 분자량 39,000 dalton, G β 가 36,000 dalton인 band를 확인하였고 나머지 다른 단백질도 함께 관찰되어 heptylamine-Sepharose 분획을 다시 DEAE-Sephacel column에 적용하여 순수한 band를 구하였다. GTP 결합단백질의 활성화는 GTP가 결합될 때 α 부분과 결합하고 $\beta\gamma$ 는 떨어져 나간다. 그러므로 heptylamine-Sepharose column분획의 활성도에서 Go α 의 band 분획과 곡선의 활성도가 일치하고 β 는 곡선이 하향하는 분획에서 전기영동상에 관찰되었다.

참고 문헌

- Gilman AG : G protein : Transducers of receptor controlled adenylate cyclase system. *Science* 225 : 1350-1356, 1984.
- Berridge MJ : The molecular basis of communication within the cell. *Sci Am* 253(4) : 142-152, 1985.
- Newell PC, Europe-Finner GN, Small NV, Liu G : Inositol phosphates, G proteins and ras genes involved in chemotactic signal transduction of dictyoteliium. *J Cell Sci* 89 : 123-127, 1988.
- Northup JK, Sternweis PC, Gilman AG : The subunit of the stimulatory regulatory component of adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 259 : 3568-3577, 1984.
- Berridge M : Signal transduction : the metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Sci Am* (October) : 124-129, 1985.
- Aub DL, Frey EA, Sekura RD, Cote TE : Coupling of the thyrotropin releasing hormone receptor to PLC by a GTP-binding protein distinct from the inhibitory or stimulatory GTP-binding protein. *J Biol Chem* 261 : 9333-9340, 1986.
- Sternweis PC, Robinsshaw JD : Isolation of two proteins with high affinity for GNT from membranes of bovine brain. *J Biol Chem* 259 : 13806-13813, 1984.
- Katada T, Oinuma M, Ui M : Two guanine nucleotide-binding proteins in rat brain serving as the specific substrate of islet-activating protein, pertussis toxin. *J Biol Chem* 261 : 8182-8191, 1986.
- Northup JK, Sternweis PC, Smigel MD, Schleifer LS, Ross EM, Gilman AG : Purification of G protein from rabbit liver. *Proc Natl Acad Sci* 77 : 6516-6520, 1980.
- Dickey BF, Pyun HY, Williamson KC, Navarro J : Identification and purification of a novel G protein from neutrophils. *FEBS letters* 219 : 289-292, 1987.
- Banno Y, Nagao S, Katada T, Nagata K, Ui, Michio, Nozawa Y : Stimulation by GTP-binding proteins (Gi, Go) of partially purified phospholipase C activity from human platelet membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 146(2) : 861-869, 1987
- Hildebranolt JD, Codina J, Risinger R, Birnbaumer L : Isolation of subunit of guanine nucleotide regulatory protein from human erythrocyte. *J Biol Chem* 259 : 2039-2042, 1984.
- Sternweis PC : The purified α subunits of Go and Gi from bovine brain require $\beta\gamma$ for association with phospholipid vesicles. *J Biol Chem* 261 : 631-637, 1986.
- Neer EJ, Lok JM, Wolf LG : Purification and properties of inhibitory guanine nucleotide regulatory unit of brain adenylyl cyclase. *J Biol Chem* 259 : 14222-14229, 1984.

15. Stryer L : Hormone action : cyclic AMP activates a protein kinase by releasing its regulatory subunits. *Biochemistry* 3rd edition : 975-988, 1988.
16. Bojanic D, Wallace MA, Wojcikiewicz RJH, Fain JN : Guanine nucleotide and pyrophosphate activate exogenous phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in rat liver plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 147(3) : 1088-1094, 1987.
17. Wang P, Toyoshima S, Osawa T : Physical and functional association of cytosolic inositol phospholipid-specific phospholipase C of calf thymocytes with a GTP-binding protein. *J Biochem* 102 : 1275-1287, 1987.
18. Blachier F, Malaisse WJ : Phospholipase C activation via a GTP-binding protein in tumoral islet cells stimulated by carbamylcholine. *Experientia* 43 : 601-602, 1987.
19. Roof DJ, Applebury ML, Sternweis PC : Relationships within the family of GTP-binding proteins isolated from bovine central nervous system. *J Biol Chem* 260(30) : 16242-16249, 1985.
20. Weber K, Osborn M : The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem* 244 : 4406-4412, 1969.
21. Florio VA, Sternweis PC : Reconstitution of resolved muscarinic cholinergic receptors with purified GTP-binding proteins. *J Biol Chem* 260(6) : 3477-3483, 1985.
22. Higashijima T, Ferguson KM, Sternweis PC, Smigel MD : Effects of Mg^{2+} and the $\beta\gamma$ -subunit complex on the interactions of guanine nucleotides with G Proteins. *J Biol Chem* 262(2) : 766, 1987.

- Abstract -

Isolation of GTP Binding Protein from Bovine Brain

Jung Hye Kim

*Department of Biochemistry**College of Medicine, Yeungnam University**Taegu, Korea*

GTP binding protein (G-protein) associated with membrane and involved in signal transduction was isolated from bovine brain, and molecular weight of G protein was observed.

As the results, cell membranes were homogenized from bovine brain tissues and proteins of membrane were gained using 1% cholate, and progressed the chromatography.

The purification process was performed by step, DEAE-Sephacel, Ultrogel AcA 34 and heptylamine-Sepharose column chromatography.

The chromatographic fractions were confirmed by GTP binding assay and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Molecular weight of $G\alpha$ was revealed 39,000 dalton and $G\beta$ 36,000 dalton. One more step of heptylamine-Sepharose was enforced to purify the GTP binding protein.

Finally I gained the GTP binding protein isolated subtype of $G\alpha$ and $G\beta$.

Key Words : G protein, $G\alpha$, $G\beta\gamma$, DEAE Sephacel, Ultrogel AcA 34