

핵소체 단백질 B23과 세포질 단백질 p80의 유사성에 관한 연구

동아대학교 의과대학 약리학교실, 연세대학교 의과대학 약리학교실*

이혜정 · 윤상인 · 최용천 · 안영수*

= Abstract =

Study of an ER bound p80 Homologous to Nucleolar B23

Hye Jeong Lee, Sang In Yoon, Yong Chun Choi and Young Soo Ahn*

Department of Pharmacology, Dong-A University College of Medicine

**Department of Pharmacology, Yonsei University College of Medicine*

Protein B23 is one of the major nucleolar phosphoproteins associated with pre-ribosomal particles, and is localized in the granular region of the nucleolus. Recent studies suggest that protein B23 shuttles between nucleus and cytoplasm and also interacts with HIV Rev. These findings indicate that protein B23 is important in nucleocytoplasmic relationship and viral replication. However, the exact function of protein B23 is not clear yet.

In acute nucleolar hypertrophy of rat liver, treated with thioacetamide, there was observed an increase of not only protein B23 but also B23-like protein p45 when anti-B23 monoclonal antibody (MAb) was used for identification. On the basis of the large B23 specific epitope structure composed of 68 amino acids, a hypothesis was formulated to examine that p45 is the pre-B23 resulting from excessive production of B23. In an attempt to investigate the precursor of B23, we analyzed the subcellular fractions and microsomal subfractions. Subsequently, we analyzed the finger printings of B23-like proteins using the tryptic peptide mapping.

The results are summarized:

- 1) Using B23 MAb, we observed the presence of B23-like proteins in nucleolar fraction, nucleoplasmic fraction and microsomal fraction.
- 2) In the further microsomal subfractionation, we could partially purify B23-like protein in 2M layer of sucrose gradient.
- 3) When ion exchange chromatography was employed, there were protein species 80kDa(p80), 65kDa(p65) and 60kDa(p60).
- 4) Based on the tryptic map analysis of ¹²⁵I labeled proteins, the similarity between B23 and p80 was found only in 9 out of 14(B23) and 21(p80) peptides, and difference was found in the remaining peptides. p80 and p60 had 18 common peptides, and all the peptides of p60 were similar to those of p80.

From these results, it is proposed that p45 is an abnormal metabolite resulting from carcinogenesis by thioacetamide, and it is not the precursor of B23. In addition, we suggest that p80 may be a precursor of p45.

Key Words: Nucleolar protein B23, Thioacetamide, Nucleolar hypertrophy

서 론

핵소체는 모든 진핵 세포에 필수적으로 존재하는 소기관으로서 라이보솜을 생성하기 위하여 pre-rRNA를 합성하며 전라이보솜 입자(pre-ribosomal particles)를 조립(assembly)하고 가공(processing)하는 곳이다(Busch 및 Smetana, 1970). 세포질에서 합성된 라이보솜 단백질(ribosomal proteins)은 핵소체로 들어가 라이보솜 RNA와 전라이보솜 입자를 조립하게 되는데, 이 때 전라이보솜 입자의 가공 및 포장(packaging)에는 비라이보솜 핵소체 단백질(nonribosomal nucleolar proteins)을 필요로 한다(Prestayko등, 1974; Hugel등, 1985). 이러한 전라이보솜 입자는 세포질로 나가기 직전에 비라이보솜 단백질이 떨어져 나가게 되고 이로 인하여 기능을 가진 라이보솜 소단위로 성숙하게 된다(Hadjiolov, 1985; Warner, 1989).

핵소체 기능 연구의 대상은 rDNA, rRNA, 라이보솜 단백질, 비라이보솜 핵소체 단백질 등이 있는데, 비라이보솜 핵소체 단백질 중에서 중요시 되고 있는 것은 DNA 복사에 관여하는 RNA polymerase I, 유전자 활성화에 관여하는 topoisomerase I 등과 신호 변환(signal transduction)에 관여된다고 생각되는 핵소체 인산화 단백질 B23(MW/pI = 37kDa/5.1) (Prestayko등, 1974; Spector등, 1984; Chan등, 1988), C23(110kDa/5.1) (Mamrack등, 1979; Lapeyre등, 1987), p125(125kDa/7.4) (Ahn등, 1985; Meier 및 Blobel, 1992) 등이 있다. 이러한 비라이보솜 단백질은 라이보솜 생성 기전에 관여할 뿐만 아니라 핵소체 구조의 유지에도 관여되어 있는 것으로 알려져 있지만 그 기능은 아직 정확하게 규명되어 있지 않다. 이 단백질들의 특징은 핵소체 내에서 가장 많은 양을 차지하고 있는데 그 이유는 아직 모르고 있다. 현재까지 보고된 것들을 보면 C23 단백질은 다기능 단백질(multifunctional protein)으로서 염색체의 nucleolar organizing region(NOR) 부위에 결합하는 단백질로 rRNA 유전자 조절에 관여하며 또한

핵소체 내 45S pre-rRNA가 존재하는 섬유성 성분(fibrillar component)에 위치하고 있는 것으로 보아 rRNA 가공의 초기에 관여할 것으로 보고하였다(Lischwe등, 1981; Sommerville, 1986). B23 단백질은 핵소체 내 과립성 성분(granular component)에 위치하고 있으며 이러한 소견은 B23 단백질이 전라이보솜 입자와 결합하여 rRNP 가공에 관여하며 라이보솜 구조의 성숙(maturation)에 연관되어 있음을 시사한다고 하였다(Spector등, 1984; Sommerville, 1986). 또한 B23 단백질의 분포는 성장 세포나 암 세포에서 정상 세포보다 약 20배 가량 더 많은 것으로 보고되었다(Spector등, 1984; Feuerstein등, 1988; Chan등, 1989). 최근 연구에서 B23 단백질이 특수한 조건 즉, 핵소체 위축을 일으키는 경우에 있어 전위(translocation)될 수 있다는 것이 제시되었으며(Chan등, 1985; Yung등, 1985a,b; Chan, 1992), 이러한 "B23 단백질 전위"는 핵소체의 통합(integrity)과 RNP 수송 등에 관계된다고 추측하고 있다. 또한, Borer등(1989)은 서로 다른 종(species) 간의 세포융합 실험을 통하여 B23 단백질이 핵과 세포질을 오가는 이동 단백질(shuttling protein)임을 제시하면서 라이보솜 구성성분의 수송에 관여할지도 모른다고 암시하였다. Fankhauser등(1991)은 human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)의 조절 단백질인 Rev 단백질의 조절 기전을 연구하기 위하여 Rev-결합 단백질을 생화학적으로 조사한 결과, 주 HIV Rev-결합 단백질이 B23임을 증명하였다. 그러므로, B23은 핵소체의 구성성분일 뿐만 아니라 RNP 대사, 핵과 세포질 간의 연관관계, 바이러스 복제 등과 관계가 있는 것을 볼 때에 기능이 대단히 복잡하다는 것을 알 수 있다.

본 연구에서는 B23의 기능을 밝혀나갈 목적으로 발암제인 thioacetamide를 투여하여 핵소체 비대를 초래한 후(Mironescu등, 1968) 핵소체 내 단백질의 변화를 관찰하고, 그 변화에 따른 핵소체 단백질의 구조와 생물학적 성질을 규명하고자 하였다. Thioacetamide는 약한 발암제로서 장기간 투

여시 간장의 종양을 초래하게 되며 투여 첫 주에 간세포의 핵소체 비대를 유발하고 라이보솜 RNA 합성을 증가시킨다(Steele 및 Busch, 1966). 이 두가지 특징은 많은 다른 종양에서도 나타나는 소견이므로 thioacetamide 투여시 핵소체 내 단백질의 연구는 발암과정(carcinogenesis)의 연구에도 도움이 되리라 생각된다. 본 연구의 예비실험에서 thioacetamide를 투여한 후 핵소체 단백을 B23 단일클론 항체로 면역염색하여 보면 정상상태의 B23 단백질보다 더 진하게 염색될 뿐만 아니라 정상상태에서는 보이지 않던 분자량 45kDa의 단백질(이하 p45라고 칭함)이 염색되는 것을 발견하였다. 본 연구자는 p45 단백질이 핵소체 비대시 B23의 급격한 증가와 함께 출현되는 것으로 보아 B23의 과잉대사시 완전히 B23로 가공되지 못한 B23의 전구체일지도 모른다는 가정을 하게 되었다. 그러므로 본 연구에서는 p45와 B23의 관련성을 규명하기 위하여 마이크로솜 분획에서의 p45 단백질의 존재 여부를 확인하고 그 구조의 유사성 여부를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

1) 재료

(1) 실험 동물: 실험 동물로는 1주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 200~250g 정도의 암컷 흰쥐(Sprague Dawley계)를 사용하였으며, 식수는 사료와 같이 자유로이 먹을 수 있게 공급하였다.

(2) Thioacetamide 투여: 0.9% 생리 식염수에 thioacetamide (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)의 농도를 1%로 만들어 50mg/kg 씩 매일 복강 내로 7일간 투여하였다(Mironescu 등, 1968).

2) 방법

(1) 핵과 핵소체의 분리: 쥐의 간에서 핵과 핵소체를 분리하는 방법으로 sucrose method를 사용하였다(Busch 및 Smetana, 1970). 이때 분리하는 각 단계마다 단백질의 파괴를 방지하기 위하여

단백분해효소 억제제인 phenylmethylsulphonyl fluoride(PMSF)(0.5mM), aprotinin (5 µg/ml) 및 leupeptin (5 µg/ml)을 사용하였다.

(2) 조직화학 및 형광면역조직화학: 생리 식염수로 관류한 간장을 떼어낸 후, B5 고정액으로 고정하여 hematoxylin-eosin 염색을 시행하였다. 면역형광염색을 위하여 간장의 동결 조직절편을 만든 후, B23 단일클론 항체를 작용시켰으며 fluorescein-labeled goat anti-mouse IgG(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 형광현미경으로 관찰하였다(Spector 등, 1984).

(3) 세포 분획(Subcellular fractionation): 흰쥐의 간을 분리하여 0.25M sucrose, 50mM Tris-HCl, pH 7.6 용액에서 균질화한 후 600xg에서 10분간 원심분리하여 세포질과 핵으로 분리하였다. 세포질을 15,000xg에서 10분간 원심분리하여 미토콘드리아 분획을 얻었고, 상층액을 176,000xg로 70분간 원심분리하여 마이크로솜 분획을 얻었으며, 이 때 남은 상층액을 cytosol로 정하였다(De Duve, 1975). 방법 (1)에서 분리한 핵을 sonication한 후 540xg에서 10분 동안 원심분리하여 펠렛은 핵소체, 상층액은 핵질로 구분하여 모두 다섯 가지의 세포 분획을 얻었다.

(4) 마이크로솜 분획의 세분화(Microsomal subfractionation): 세포분획에서 얻어진 마이크로솜 분획을 0.15M sucrose/ 25mM KCl/ 10mM MgCl₂/ 35mM Tris-HCl, pH 7.8 용액으로 유리 homogenizer를 사용하여 균질화한 후 마이크로솜 현탁액(microsomal suspension)을 만들었다. 이 현탁액에 1% desoxycholate를 첨가한 후 2.0M sucrose로 underlay하여 176,000xg에서 16시간 원심분리하여 펠렛, 2M sucrose 층, 0.15M sucrose 층 및 그 위에 존재하는 우유빛의 지질용해층을 얻었다(Storrie 및 Madden, 1990).

(5) 단백질 추출 및 순수 분리: 각 분획에서 분리한 펠렛은 sodium dodecyl sulfate(SDS) 완충액(0.125 Tris HCl, pH 6.8/4% SDS/10% sucrose/5% 2-mercaptoethanol)에 녹여 단백을 추출하였고, 상층액은 ethanol + 2% potassium

acetate 용액으로 단백을 침전시킨 후 SDS 완충액으로 단백을 추출하였다. 단백의 순수 분리가 필요한 분획은 침전된 단백을 4M urea/3M LiCl 용액으로 균질화한 후 16시간동안 단백을 추출하였고, 27,000xg에서 20분간 원심분리 후 상층액을 20mM Tris-maleate buffer, pH 5.5/4M urea/1mM dithiothreitol(DTT)/1mM EDTA에서 48시간 투석하였다(Michalik 등, 1981). 단백의 순수 분리는 이온 교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography)방법을 이용하였는데, 음이온 교환 수지로 DEAE-cellulose(Whatman, Maidstone, Kent., England), 양이온 교환 수지로 phosphocellulose (Whatman, Maidstone, Kent., England)를 사용하였다. 분리된 분획들은 Bradford 방법(1976)으로 단백의 양을 정량하였다.

(6) SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE): 7.5% polyacrylamide gel(0.38M Tris HCl, pH 8.8)위에 4.5% polyacrylamide gel(0.13M Tris HCl, pH 6.8)이 얹혀지는 불연속 gel을 만들어, 추출한 각 단백을 95~98°C에서 10분간 가열한 후, 10,000rpm에서 10분 원심분리하여 상층액을 20~30 μ l(100~150 μ g)씩 부하하였다. 이것을 Tris-glycine buffer(0.025M Tris-HCl, pH 8.3/0.192M glycine/0.1% SDS)를 사용하여 17.5mA에서 6시간동안 전기영동을 시행하였다(Laemmli, 1970).

(7) Western blotting: SDS-PAGE에 의하여 분리된 단백들을 nitrocellulose막 (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA)에 전기적 전이(electrotransfer)를 시행한 후 2단계 간접 항체 방법(2-step indirect antibody method)을 사용하여(ProtoBlot, 1985) immunoblotting을 시행하였다.

(8) Tryptic peptide mapping: 방법 (7)에서 시행한 젤(gel)을 0.05% Coomassie brilliant blue로 염색하여 원하는 부분의 단백을 잘라내어 Elder 및 Zweig 방법을 이용하여(Elder 등, 1977; Zweig, 1981) tryptic mapping을 시행하였다.

결 과

1) 핵소체 비대와 p45 검출

(1) 조직화학 및 형광면역조직화학: Thioacetamide를 7일간 복강내 투여시 간세포에서 핵소체가 급격히 비대해짐을 관찰할 수 있었다. Thioacetamide를 투여한 간세포의 핵과 핵소체는 정상 상태보다 약 3~4배 커져 있었으며 핵소체가 진하게 염색되어 있는 것을 알 수 있었다. B23 단일클론 항체로 면역형광염색한 사진에서 thioacetamide를 투여한 간세포에서 핵소체의 형광능이 훨씬 증가되어 있음을 관찰할 수 있었다(Fig. 1).

(2) 면역염색: 정상 상태의 핵소체 단백질과

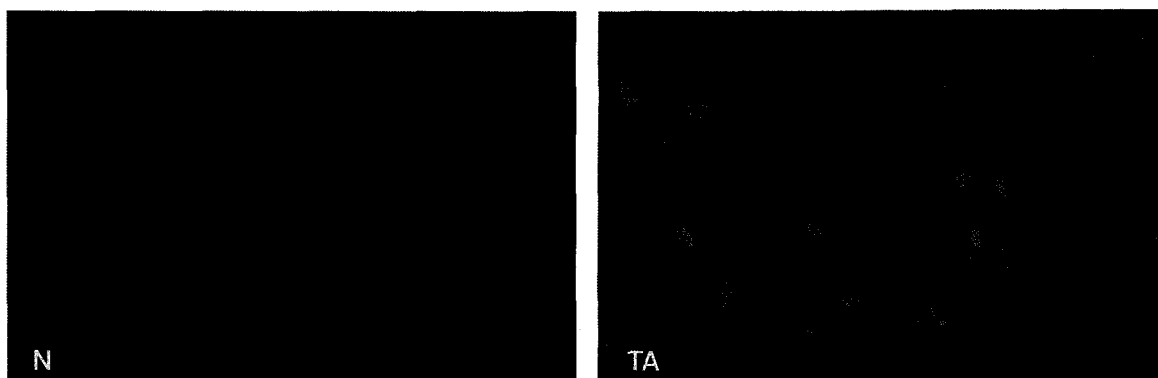


Fig. 1. Immunofluorescence analysis of nucleoli of rat livers using B23 monoclonal antibody. N: Normal liver, TA: Thioacetamide treated liver.

thioacetamide를 투여한 핵소체 단백을 추출하여 SDS-PAGE, western blot을 시행한 결과, thioacetamide를 투여한 핵소체에서 B23 단백질의 양이 정상 상태보다 증가되어 있으며, 정상 핵소체에서는 보이지 않던 단백질이 검출되었다(Fig. 2). 이 단백질의 분자량은 45 kDa(p45) 정도되며 그 양은 B23 단백질의 1/10 정도이었다.

2) 세포 분획

세포를 파쇄하여 differential centrifugation 방법으로 세포질과 핵으로 분리하였고, 세포질을 다시 원심분리하여 미토콘드리아, 마이크로솜, cytosol 분획으로 구분하였으며, 핵은 sonication 방법으로 핵소체와 핵질로 분획하였다. 이렇게 분획한 각 성분들을 SDS-PAGE, western blot으로 분

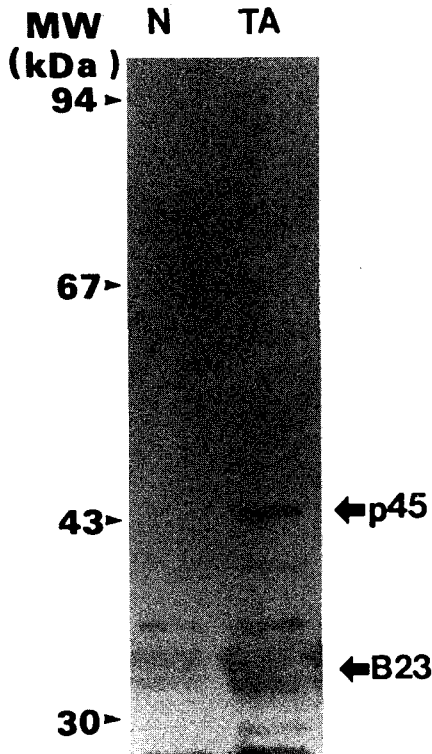


Fig. 2. Identification of nucleolar p45. N: Normal liver, TA: Thioacetamide treated liver.

석한 결과, B23 단일클론 항체에 의하여 검출되는 즉, B23와 같은 항체인식부위(epitope)를 가진 단백질이 있는 분획은 핵소체와 핵질 그리고 마이크로솜 분획에 존재하였다.

3) 핵소체 단백질 B23의 순수분리

핵소체를 분리하여 4M urea/3M LiCl 용액으로 단백을 추출하였다. 추출한 단백을 DEAE-cellulose column에 통과시킨 후 0~0.5M 농도 경사의 NaCl 용액으로 크로마토그래피한 결과 B23은 0.2 M NaCl 용액에서 분리되었다.

4) 마이크로솜 분획의 세분화

마이크로솜 분획을 1% sodium desoxycholate로 용해시킨 후, discontinuous gradient로 17,600xg로 원심분리하여 폴리솜(polysomes) 펠렛, 2M sucrose층, 0.15M sucrose층 및 지질 용해층으로 분획하였다. 펠렛을 제외한 세 가지 분획의 단백은 알코올 침전법으로 추출하고, 펠렛의 단백은 SDS 완충액으로 추출하였다. 세분화된 각 층의 단백을 SDS-PAGE, western blot한 결과 2M sucrose층에 B23 epitope을 가진 단백질의 농도가 가장 높고, 펠렛에서 약간 검출되었다.

5) 마이크로솜 분획 중 2M sucrose층의 단백질 분석

2M sucrose층에서 침전된 단백을 4M urea/3M LiCl 용액으로 균질화하여 48시간 투석한 후 양이온 교환수지인 phosphocellulose column을 사용하였다. 0~0.5M 농도 경사의 NaCl로 elution한 결과, 3개의 peak가 관찰되었고(Fig. 3a), western blot에 의하여 B23 epitope을 가진 단백질은 첫째 peak에 존재하였으며, 이들의 분자량은 80kDa(p80), 65kDa(p65), 60kDa(p60) 등이었다(Fig. 3b).

6) Tryptic peptide map의 분석

핵소체 단백질 B23과 마이크로솜 분획에 존재하는 p80, p65, p60을 분리하여 이들 단백질의 tyro-

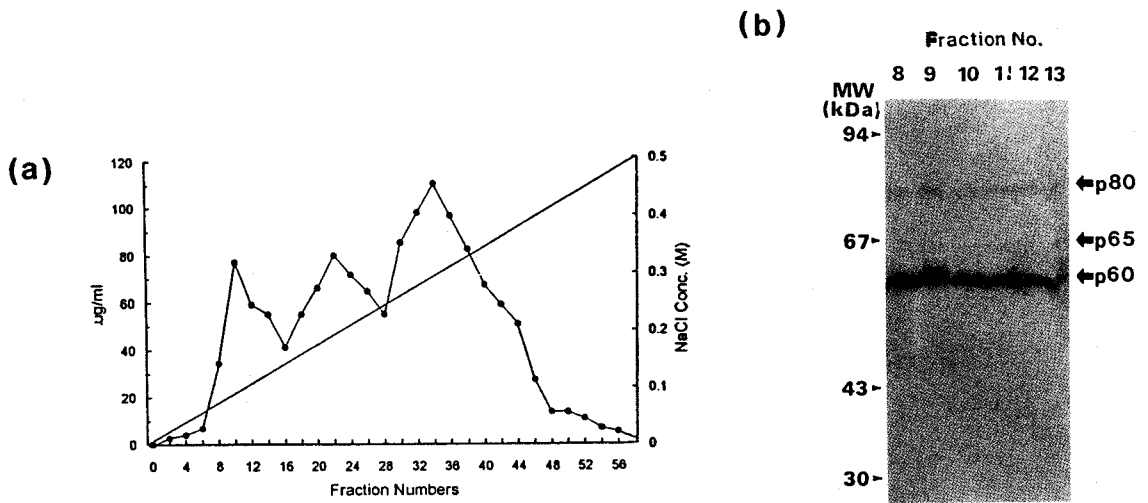


Fig. 3. (a) Profiles of fractionations of phosphocellulose chromatography in 2M sucrose layer. (b) Immunoblot analysis of microsomal proteins fractionated by phosphocellulose chromatography.

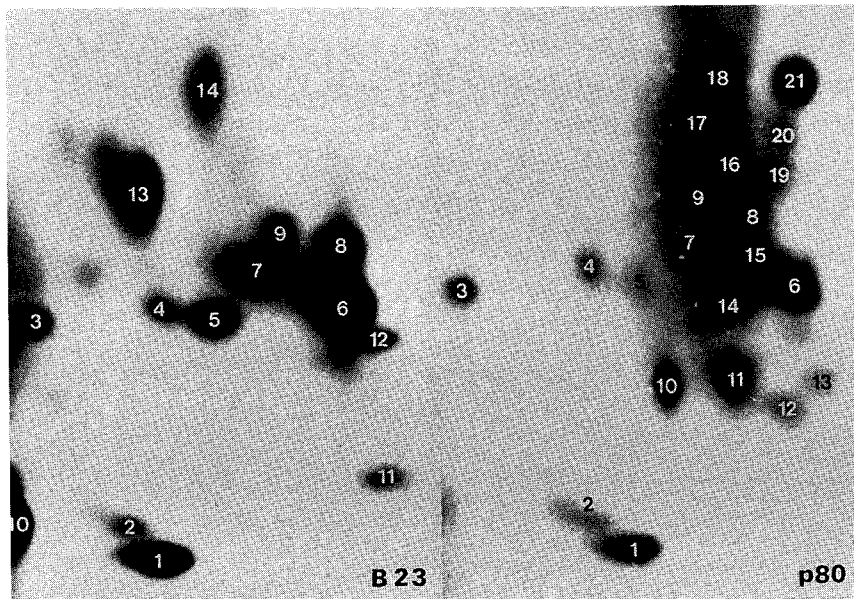


Fig. 4. Comparisons of tryptic maps of B23 and P80. Both of the proteins were ^{125}I -labeled and subsequently trypsinized for two dimensional fractionation.

sine에 ^{125}I 를 label하여 trypsin으로 분해한 후 2차원으로 분석한 결과를 보면, 각각의 펩타이드 수는 B23이 14개, p80이 21개, p65가 15개, p60이

19개로 관찰되었다(Fig. 4). 혼합 실험에서 p60의 19개 펩타이드는 모두 p80에 포함되는 것을 알 수 있었고, B23과 p80은 9개의 펩타이드를 공유

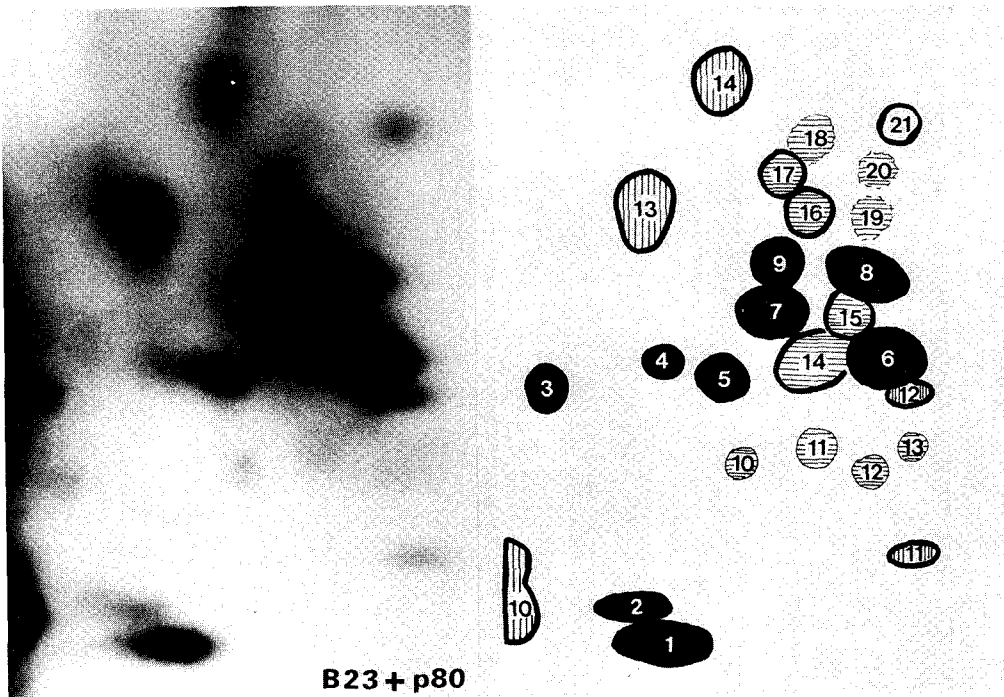


Fig. 5. Tryptic map of the B23/p80 mixture for determination of their identity. ● : Common peptides observed between B23 and p80, ⊖ : B23 specific peptides, ⊕ : p80 specific peptides

하고 있음을 관찰하였다(Fig. 5).

고 찰

현재까지 핵소체 단백 B23은 정상상태에는 핵소체에만 존재하는 것으로 알려져 있으며, 세포질에서 합성된 B23 단백질은 핵소체로 들어가기 전에 인산화, 아미드화(amidation)등 해독후 변형 (post-translational modification)등과 같은 과정을 거친 후 핵소체 내에 위치하게 된다. B23은 특수한 상황에서 즉, 혈청결핍시(Chan등, 1985), actinomycin D, toyocamycin, 고용량의 α -amanitin처리시(Yung등, 1985b), luzopeptin (Yung등, 1986), doxorubicin (Chan등, 1987), camptothecin (Chan, 1992) 처리시 핵질로 이동하는 것으로 알려져 있다. 이러한 B23의 핵질 이동의 의미는 세포 성장을 억제하거나 RNA 합성을 저지시켜 핵소체의 위축을 초래하게 되면 핵소체와 핵질 사이

의 B23 단백질의 균형이 깨어져 B23이 핵소체로 들어가지 못하고 핵질에 남아있게 되는 것이라고 암시하였다(Yung등, 1985a).

반면에 발암제인 thioacetamide는 장기간 지속적으로 투여하면 간경화 및 담도계의 간종양을 초래하게 되는 것으로 알려져 있다(Gupta, 1955; Jackson 및 Dessau, 1961). 간장의 기능적인 변화는 초기 8시간 내에 변화를 발견할 수 있으며 10~24시간 사이에는 쉽게 인지할 수 있다. Thioacetamide에 의한 핵과 핵소체의 변화는 초기 8시간 내에는 전해질 및 물의 이동 때문에 핵의 크기가 커지게 되고, 16시간이 지나게 되면 RNA 합성이 증가되고 RNA 수송이 감소되어 핵과 함께 핵소체의 크기가 뚜렷이 증가됨을 보고하였다(Olason 및 Smuckler, 1976). 또한, 24시간이 지나게 되면 핵소체에 존재하는 RNA polymerase I의 양이 3~4배 정도 증가하는 것을 보고하였으며(Leonard 및 Jacob, 1977), 이는 핵소

체 내 rRNA 합성이 증가되어 있음을 의미하는 것이다.

본 연구에서는 thioacetamide 투여 후 핵소체 내 단백질의 분획을 시행하여 핵소체 단백질 양의 변화를 관찰한 결과 그 양이 증가되어 있었고 B23 단일클론 항체로써 면역염색한 결과 B23 단백질 양의 증가와 분자량 45kDa의 단백질(p45)이 존재함을 알게 되었다. 본 연구에서는 검출된 p45 단백을 B23의 전구체라고 가정하게 되었는데 그 이유는 첫째, thioacetamide에 의해 급격한 핵소체 비대가 초래되었을 때 핵소체 내 단백질의 양이 증가하고 특히 B23의 양이 10배 가량 증가를 보이므로 이러한 핵소체 내 과잉 대사가 초래되면 아직 B23 단백질로 변화되지 못한 B23 단백질의 전구물질이 존재할 수 있다고 가정할 수 있으며 둘째, B23의 항체인식부위(epitope)는 68개의 아미노산으로 구성되어 있음이 알려져 있는데(Chan 등, 1986), 이는 일반적인 항체인식부위의 크기보다 훨씬 큰 것으로 B23 단일클론 항체에서 검출된 p45는 구조적으로 볼 때 B23 단백질의 전구체일 수 있다고 가정하게 되었다. 이렇게 B23의 전구체가 존재한다면 세포 분획 상에서도 B23 단일클론 항체에 검출되는 단백질이 존재할 것이라 가정하고 세포 분획을 시행하였다. 그 결과 마이크로솜 분획에서 B23 항체에 면역염색되는 단백질이 검출되었으며 이러한 B23 유사단백은 p80, p65, p60으로 나타났다. 이로 인하여 B23 유사단백이 B23의 전구체인가에 대한 가능성 여부를 시험하였다. 구체적으로 기술하면 ① DNA 공법을 사용하여 위 단백질의 cDNA와 genomic DNA를 분리하여 염기서열을 비교하였고, ② 단백질구조학적 방법인 tryptic mapping을 이용하여 위 단백질의 유사성을 직접 비교하였다. 본 논문에서는 후자의 방법을 주로 사용하였으며 이차적으로 cDNA library를 screen하여 염기서열을 비교하였다(미발표). B23, p80, p65, p60 단백질들은 tryptic mapping을 시행하였으나, p45는 핵소체 내의 양이 매우 적고 cross contamination이 많아서 시행하지 못하였다. p80, p65, p60의 tryptic mapping에서는 펩타이드들의

유사성이 대단히 많아 p80가 전구체라고 결론을 내렸다. p80와 B23의 tryptic mapping에서는 유사한 펩타이드가 9개로 한정되어 있어서 p80-B23 관계는 precursor-product relationship이 존재하지 않는다고 판명하였다. 이를 뒷받침해주는 증거로써 현재 본 실험실에서 진행중인 cDNA cloning 및 염기서열결정 실험에서 B23의 cDNA는 253개의 아미노산을 encode하고 있는 점으로 보아 B23의 전구체는 존재하지 않음을 시사하였다.

본 논문에서는 B23 단백질과 B23 유사단백의 구조와 기능의 관계는 명백하게 밝히지 못하였으나 본 논문의 의의는 B23의 epitope protein이 라이보솜을 형성하는 핵소체에만 존재하는 것이 아니라 단백을 합성하는 endoplasmic reticulum에도 존재함을 알게 되어 중요한 기능이 있음을 시사하는 것이다. 현재 본 실험실에서는 E. Coli의 단백질에서 B23 단백질과 유사성을 가지는 단백을 발견하였는데 이 단백질의 구조 및 기능에 관하여서는 계속 연구중에 있지만 아마도 이 단백질은 B23 단백질의 선조체(ancestor molecule)일지도 모른다는 가정을 하고 있다. 앞으로 더 많은 연구를 통하여 B23 단백질의 생물학적 기능 및 구조, 그리고 그 전구체 뿐만 아니라 superfamily가 규명되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

발암제인 thioacetamide를 흰쥐의 복강 내에 투여하면 간세포의 핵소체가 급격히 커지는 현상을 관찰할 수 있다. 비대된 핵소체 단백을 B23 단일클론 항체로 분석하여보니 B23 단백질의 양이 증가될 뿐만 아니라 B23와 유사성을 가진 p45 단백을 발견하였다. 이 p45 단백질이 B23 단백질의 전구체일지도 모른다는 가정하에 세포질에서의 존재 여부를 관찰하여 본 결과 마이크로솜 분획에 B23 유사단백이 존재함을 알게 되었다. 마이크로솜을 desoxycholate에 처리하여 sucrose density gradient로 세분하여 분석한 결과, 2M sucrose층에 존재함이 관찰되었다. 이 단백을 phosphocellulose

이온 교환 크로마토그래피를 시행하여 western blot한 결과 B23 단일클론 항체에 반응하는 단백질은 p80, p65, p60이었다. 구조적 특성을 규명하기 위하여 B23 단백질과 마이크로솜에서 분리한 p80, p65, p60 단백질의 tryptic peptide mapping을 시행한 결과, B23과 p80은 9개의 공통 펩타이드를 소유하고 있는 구조적 유사성을 알게 되었고, p60은 p80에서 파생되었음을 알게 되었다. 그러므로 p45는 ① B23의 전구체가 아니라, thioacetamide의 암유발작용으로 인하여 초래된 이상산물이 핵소체에 존재하게 된 것으로 생각하며, ② 오히려 p45의 전구체가 세포질에 존재하는 p80일지도 모른다고 암시된다.

참 고 문 헌

- Ahn YS, Choi YC, Goldknopf IL and Busch H: *Isolation and characterization a 125-kilodalton rapidly labeled nucleolar phosphoprotein. Biochemistry* 24: 7296-7302, 1985
- Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM and Nigg EA: *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. Cell* 56: 379-390, 1989
- Bradford MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- Busch H and Smetana K: *Introduction. In Busch H, Smetana K, eds. The nucleolus. New York and London, Academic Press, 1970, pp 2-49*
- Chan PK: *Characterization and cellular localization of nucleophosmin/B23 in HeLa cells treated with selected cytotoxic agents (Studies of B23-translocation mechanism). Exp cell Res* 203: 174-181, 1992
- Chan PK, Aldrich M and Busch H: *Alterations in immunolocalization of the phosphoprotein B23 in HeLa cells during serum starvation. Exp Cell Res* 161: 101-110, 1985
- Chan PK, Chan WY, Yung BY-M and Busch H: *Amino acid sequence of a specific antigen peptide of protein B23. J Biol Chem* 261: 14225-14341, 1986
- Chan PK, Yung BY-M and Aldrich MB: *Structural and functional studies of protein B23. Progress in Non-Histone Protein Research III: 11-38, 1988*
- Chan WY, Liu QR, Borjigin J, Busch H, Rennert OM, Tease LA and Chan PK: *Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. Biochemistry*, 28: 1033-1039, 1989
- De Duve C: *Exploring cells with a centrifuge. Science* 189: 186-194, 1975
- Elder JH, Pickett II RA, Hampton J and Lerner RA: *Radioiodination of proteins in single polyacrylamide gel slices. J Biol Chem* 252: 6510-6515, 1977
- Fankhauser C, Izaurralde E, Adachi Y, Wingfield P and Laemmli UK: *Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: Dissociation by the rev response element. Mol Cell Biol* 11: 2567-2575, 1991
- Feuerstein N, Chan PK and Mond JJ: *Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals. J Biol Chem* 263: 10608-10612, 1988
- Gupta DN: *Production of cancer of the bile ducts with thioacetamide. Nature* 175: 257-262, 1955
- Hadjiolov AA: *Maturation of Preribosomes. In Hadjiolov AA, eds. The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. Wien and New York, Springer-Verlag, 1985, pp87-109*
- Hugle B, Scheer U and Franke WW: *Ribocharin: A nuclear MW 40,000 protein specific to precursor particles of the large ribosomal subunit. Cell* 41: 615-627, 1985
- Jackson B and Dessau FI: *Liver tumors in rats fed acetamide. Lab Invest* 10: 909-923, 1961
- Laemmli UK: *Cleavage of Structural Proteins*

- During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature* 227: 680-685, 1970
- Lapeyre B, Bourbon H and Amalric F: *Nucleolin, the major nucleolar protein of growing eukaryotic cells. Proc Natl Acad sci* 84: 1427-1476, 1987
- Leonard TB and Jacob ST: *Alterations in DNA-dependent RNA polymerases I and II from rat liver by thioacetamide: Preferential increase in the level of chromatin-associated nucleolar RNA polymerase IB. Biochemistry* 16: 4538-4544, 1977
- Lischwe MA, Richards RL, Busch RK and Busch H: *Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to nucleolar organizer regions. Exp cell Res* 136: 101-109, 1981
- Mamrack MD, Olson MOJ and Busch H: *Amino acid sequence and sites of phosphorylation in a highly acidic region of nucleolar nonhistone protein C23. Biochemistry* 18: 3381-3386, 1979
- Meier UT and Blobel G: *Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm. Cell* 70: 127-138, 1992
- Michalik J, Yeoman LC and Busch H: *Nucleolar localization of protein B23 by immunocytochemical techniques. Life Sci* 28: 1371-1379, 1981
- Mironescu IM, Encut I, Mironescu K and Liciu F: *Nucleolar behavior in regenerating liver of rats receiving intraabdominal injections of azo dyes and thioacetamide. J Natl Cancer Inst* 40: 917-933, 1968
- Olason D and Smuckler EA: *Changes in hepatic nuclei induced by acetamide and thioacetamide. Arch Pathol Lab Med* 100: 415-418, 1976
- Prestayko AW, Klomp GR, Schmoll DJ and Busch H: *Comparison of proteins of ribosomal subunits and nucleolar preribosomal particles from Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry* 13: 1945-1951, 1974
- ProtoBlot Immunoscreening System: *Technical manual of promega biotec*, 1985
- Sommerville J: *Nucleolar structure and ribosome biogenesis. Trend in Biochem Sci* 11: 438-442, 1986
- Spector DL, Ochs RL and Busch H: *Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectromicroscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. Chromosoma* 90: 139-148, 1984
- Steele WJ and Busch H: *Increased content of high molecular weight RNA fractions in nuclei and nucleoli of livers of thioacetamide-treated rats. Biochim Biophys Acta* 119:501-509, 1966
- Storrie B and Madden EA: *Isolation of subcellular organelles. In Deutscher MP, eds. Method in Enzymology* 182: 203-235, 1990
- Warner JR: *Synthesis of ribosomes in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol Rev* 53: 256-271, 1989
- Yung BY-M, Busch RK, Busch H, Mauger AB and Chan PK: *Effects of actinomycin D analogs on nucleolar phosphoprotein B23(37kDa/pI5.1). Biochem Pharmacol* 34: 4059-4063, 1985a
- Yung BY-M, Busch H and Chan PK: *Translocation of nucleolar phosphoprotein B23(37kDa/pI5.1) induced by selective inhibitors of ribosome synthesis. Biochim Biophys Acta* 826: 167-173, 1985b
- Yung BY-M, Busch H and Chan PK: *Effects of luzopeptins on protein B23 translocation and ribosomal RNA synthesis in HeLa cells. Cancer Res* 46: 922-925, 1986
- Zweig SE: *The muscle specificity and structure of two closely related fast-twitch white muscle myosin heavy chain isozymes. J Biol Chem* 256: 11847-11853, 1981