Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 24, No. 3, 290-298 (1996)

효모시스템에서 Human Transglutaminase C(TGase II)의 발현에 관한 연구: C-말단부위의 결손효과

우상규 · 정선미 · 이상기[1] · 안병윤[2] · 김희철*
(주) 녹십자 종합연구소, [1]한국과학기술 연구원 부설 생명공학 연구소 응용미생물 연구그룹,
[2]고려대학교 자연자원대학 유전공학과

Expression of Human Transglutaminase C (TGase II) in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An Effect of a Domain from Carboxyl Terminal Deletion of the Enzyme. Sang-Kyu Woo, Sun-Mi Jung, Sang-Ki Rhee[1], Byeong-Yoon Ahn[2] and Hee-Chul Kim*. *Central Research Institute, Korea Green Cross Corporation, 227, Kugal-Ri, Kiheung-Eup, Yongin, Kyungki-Do, 420-814, Korea, [1]Applied Microbiology Research Group, KRIBB, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejon 305-600, Korea, [2]Department of Genetic Engineering, College of Natural Resources, Korea University, #1, 5 Ka, Anam-Dong, Sungbuk-Ku, Seoul 410-869, Korea* — In an effort to understand the role of the conserved domain and of the heterologous one-third part of the carboxy terminal domain of transglutaminase C (TGase II), attempts were made to express TGase II cDNA of human origin in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as in a full-length form as well as in a form of C-terminal truncation. The 2μ-based expression plasmids which contained the TGase II cDNA under the gal inducible promoter were introduced into yeast and the maintenance of the full-length and truncated form of the TGase II gene plasmids were confirmed by Southern blot. The expression of the TGase II gene was analysed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and western blot analyses. As assayed by [1,4^{14}C]-putrescine incorporation into succinylated casein, the full-lenth as well as the truncated forms of recombinant TGase II showed some catalytic activity. These results indicate that the N-terminal homologous domain of human TGase II retains a catalytically active domain. The level of TGase II expressed in yeast, however, was far lower than satisfactory and other expression system should be sought further chracterization of the enzyme. The negative effect of TGase II on the growth of yeast is interesting with respect to the physiological effect of TGase II in cornification of epidermal keratinocytes.

단백의 교차결합은 조직의 안정화에 가담하는 중요한 생리적 과정의 하나이다. 여러종류의 조직에서 일어나는 교차결합의 예는 단백의 이황화 결합(1), 콜라겐과 탄력소의 알돌-알디민 축합반응(2), 수정란막의 Tyr-Tyr 결합(3), 인뇨의 N-ε(β-aspartyl)lysine 결합(4)등을 들 수 있다. 또한, transglutaminase(TGase)에 의한 N-ε(β-glutamyl)lysine 교차결합(5)도 이에 속하며 안정화된 fibrin 응고에서 처음으로 발견된 이래 생체계에서 가장 풍부하게 일어나는 현상이다. 이와 비슷한 교차결합은 porcupine quill medullar 단백질, guinea pig medullary 단백질등과 같은 표피 부속 부위에서도 발견된다. 단백질간에 형성된 N-ε(β-glutamyl)lysine 교차결합은 구조적 안정성과, 역학적인 탄력성, 그리고 단백분해제에 대한 저항성을 증가시키게 된다. 예로써, 교차결합이 형성된 fibrin은 그렇지 않은 fibrin 보다 훨씬 더 역학적인 안정성을 증가시키며 fibrin의 α-chain 사이의 교차결합정도에 따라서 분자탄력성이 증가한다.

Transglutaminase는 polypeptide chain간의 혹은 chain 내에서 isopeptide 형성을 유도하는 amine-γ-glutamyl 전이효소반응으로 불린다. TGase는 Ca^{++} 존재하에 글루타민 잔기의 γ-카르복사미드 그룹과 활성 부위의 시스테인이 반응하여 acyl-enzyme 중간체를 형성한 후 아민류의 1차아민 혹은 단백의 리신 잔기의 ε-NH_2 사이의 동종 펩타이드 교차결합 형성을 촉매함으로써 단백질을 변형시키는 효소(6)이며, 반응식은 다음과 같다.

$$\text{Protein}-(CH_2)_2-CO-NH_2+H_2N-R' \xrightarrow[Ca^{++}]{TG} \text{Protein}-(CH_2)_2-CO-NHR'+NH_3$$

TGase에 의해 변형된 단백은 상처치료시나, 지혈에서 생긴 fibrin 응고, 최종분화된 적혈구 세포막의 extracellular matrices, 표피의 cornified cell envelope등 체액 및 조직전반에 걸쳐 볼 수 있으며 생물학적 기능은 조직의 안정화 및 적혈구막의 견고화(7), receptor-mediated endocytosis(8)와 세포증식 및 분화의 조절(9, 10), 표피 keratinocyte에서의 각질화된 envelope 형성(11), 설치류에서 postejaculatory varginal plug의 형성(12), apoptosis등에 가담한다(13). 동물에서는 분명

*Corresponding author.
Key words: Transglutaminase C (TGase II), cross-linking

히 구분되는 여러종류의 TGase가 존재하는데, TGase II는 TGase C 또는 조직, 간 transglutaminase라고 불리며, 1966년 guinea pig의 간에서 처음으로 분리되었다(14). TGase II는 다양한 종류의 세포, 조직, 기관(11, 15)의 세포질에서 발견되며 분자량은 약 77 kDa이다(16). 표피와 같은 중층상피가 최종 분화하는 동안 TGase II와 함께 발현되는 TGase I(K)(14, 17)은 약 92 kDa으로 막에 결합한 형태로 존재하며, TGase III(E)(18-21)는 수용성 pro-enzyme으로 분자량은 약 77 kDa이다. 이 밖에 혈액응고에 관련된 혈장 단백 Factor XIIIa(18), TGase IV(P)(12)등이 존재한다. 각질화된 세포막의 형성과 관련한 TGase 간에 서로 담당하는 역할이나 표피에서 발현되는 위치의 차이점, 사용되는 기질의 종류나 특이성이 서로 다른 점 등은 세포 전반에 존재하는 TGase II의 기능과 역할이 상상보다 훨씬 다양할 것이라는 추측을 가능하게 한다. 현재까지 가장 잘 알려진 TGase는 FXIIIa이며, 본 연구의 주제인 TGase II는 나머지 TGase들에 비하여 그 기능이 잘 알려져 있지 않다. 지금껏 밝혀진 추정적인 TGase II의 역할은 extracellular matrice의 안정화에 가담하며, metamorphosis, embryonic morphogenesis, hormone induced tissue remodeling과 같은 apoptosis 과정에서 근본적인 역할을 수행하며 GTP 결합 성질에 따라 신호 전달에 관여할 것이라는 보고도 있다. 또한 TGase II의 pathogenecity와 관련된 예는 간경변이나 노인성 백내장과 같은 망막에서의 투명도 감소 등을 들 수 있다는 보고도 있다. TGase II에 대한 특이적 기질 단백질은 fibrin, fibronectin, vitronectin, nidogen/entactin, collagen type II, III와 같은 extracellular 단백질이 알려져 있으나 생체내에서 TGase II에 의해 교차 결합되는 기질 단백질이라는 확실한 증거는 없다. 지금까지 분리된 TGase 유전자들은 비교적 높은 상동성을 보인다. 이들의 아미노산 서열 분석 비교를 보면 N-말단 부위는 약 70%의 상동성을 갖고 있는데 비해 C-말단 부위의 상동성은 훨씬 낮은 것으로 알려져 있다. TGase I, TGase III의 N-말단 상동 부위는 효소의 역가를 나타내는데 필요하며, C-말단 비상동 부위는 효소의 기질 특이성에 관련있다고 알려져 있다(22). TGase의 진화적 계통을 보면 TGase II는 TGase III와 더 높은 상동성을 나타낸다. 몇몇 transglutaminase들은 그들의 활성에 단백질분해가 요구되는 zymogen으로 존재하는데 혈액에서 순환하고 있는 혈장 단백질 FXIII은 proenzyme이 thrombin에 의해 활성화된다. TGase III는 Ser-469 위치에서 trypsin, thrombin, proteinase K, dispase(20)에 의해 절단되어 이로 인한 구조적 변화로써 활성 부위의 thiol이 노출되어 활성화된다(21). 이에 비해 TGaseII는 완전한 촉매활성을 갖고 발현된다.

따라서 본 연구에서는 거의 모든 세포에 산재하면서 그의 기능이 거의 알려져 있지 않은 TGaseII의 기능을 연구하기 위하여 인체의 TGase II를 효모 시스템에서 발현을 시도하였다. 또한 비교적 상동성이 낮은 C-말단 부위가 결손된 형태로도 발현하여 효소 역가를 자연형의 효소와 비교하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 벡터

본 연구에서 사용한 효모는 *Saccharomyces cerevisiae* 2805(*a: pep4:: H1S3 prbl-S can1 GAL2, his 3d, ura3-52*)이었으며 일반적인 DNA 조작과 plasmid 분리를 위하여 *E. coli* DH5α(*F-lacZΔM15 hsdR17(γ⁻m⁻)gyrA 36*)를 이용하였다.

TGase II 유전자는 *E. coli* DH5α에 형질전환된 plasmid(pBS-TGC)를 서울의대 생화학 교실의 김인규 교수로부터 분양받았다. 효모에서의 발현에 사용한 벡터는 *GAL10* promotor와 *GAL7* terminator를 포함하는 YPGα81 shuttle 벡터를 사용하였다.

사용배지

형질전환된 대장균은 ampicillin(Sigma, st. Lous, MO. A9518)이 100 μg/ml의 농도로 포함된 Luria-Bertani(이하 LB라 약칭) 액체 배지나 LB 한천 평판 배지를 사용하였다. 효모균주의 배양을 위하여 사용한 영양배지는 YPD(yeast extract 1%, bacto-peptone 2%, dextrose 2%) 배지와 YPD 한천(YPD broth, agar 2%) 배지이고, 선택표지와 외래유전자로 형질전환된 형질전환체의 배양을 위한 최소배지로서 YNB(Yeast nitrogen base w/o amino acid) 0.67%, dextrose 2%, casamino acid 0.55%의 조성을 가지는 배지와 YNB 한천(YNB broth, agar 2%)배지를 사용하였다. 형질전환된 효모에서의 TGase II 유전자의 발현을 위한 유도배지로는 YNB 0.67%, yeast extract 1%, bactopeptone 2%, galactose 2%의 조성을 가지는 배지를 사용하였다.

제한효소, 시약 및 TGase II 항체

DNA 재조합을 위해 사용한 제한 효소, T4-DNA ligase등은 Boehringer Mannheim사에서, 재조합 유전산물의 활성 측정을 위한 방사선 표지된 기질[1,4^{14}C putrescine]과 Southern hybridization용 labelling kit는 Amersham사에서, 중합 효소 연쇄 반응(PCR)을 위한 중합 효소는 Promega사에서, DNA 분리 정제용 kit는 Qiagen사에서, 역전사 반응-중합 효소 연쇄 증폭 반응(RT-PCR)을 위한 cDNA cycling kit는 Invitrogen사에서 각각 구입하여 사용하였으며, Western blot analysis용 rabbit anti-guinea pig liver transglutaminase II 항체는 서울의대 생화학 교실에서 분양받았다. Alkaline-phosphatase가 표지된 goat anti-rabbit IgG는 KPL사에서, 발색시약 NBT(ρ-nitroblue tetrazolium)와

BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)는 Sigma 사에서 구입하여 사용하였다.

대장균 및 효모의 형질전환

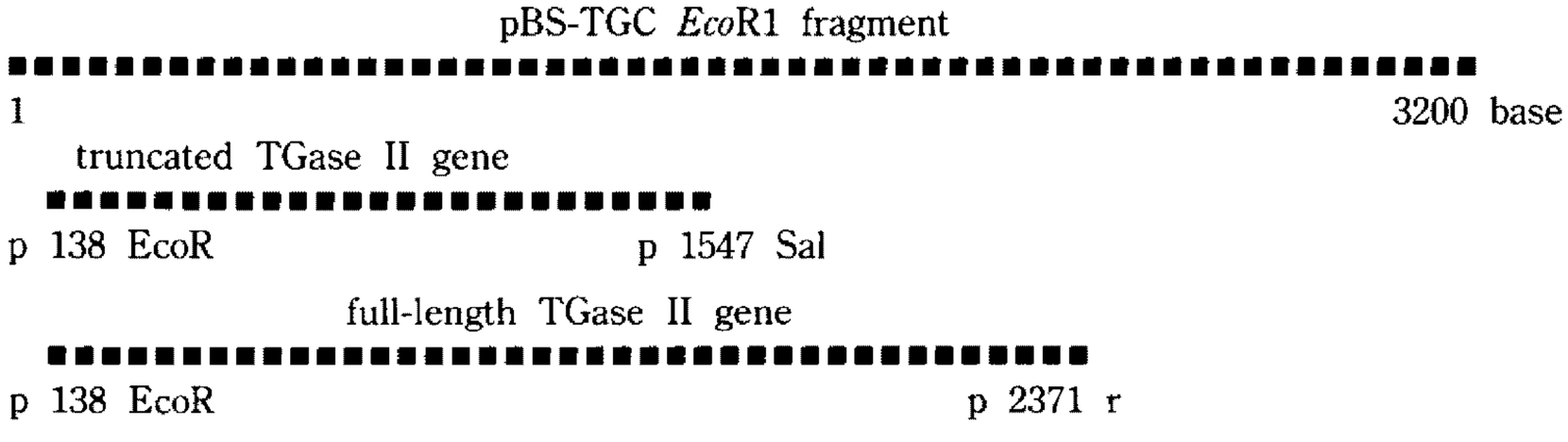
자연형 TGase II 유전자의 재조합을 위해 *E. coli* DH 5α 형질 전환체를 LB 액체 배지에서 37℃로 16시간 배양하였다. plasmid mini-preperation(23) 방법대로 pBS-TGC plasmid(6.4 kb)를 추출하여 제한 효소 *Eco*RI으로 처리한 후 QIAEX젤 추출 키트(Qiagen Inc. Catworth CA)를 이용, 분리 정제하였다. C-말단이 결손된 TGase II 유전자는 자연형 TGase II 유전자의 염기서열을 근거로하여 제작된 primer를 이용한 PCR 법에 의하여 제조하였다. Forward primer는 변역 개시 코돈 앞의 제한효소 *Eco*RI의 절단 부위를 포함하여 3′ 방향으로 21개 잔기(5′-GCCGAATTCAT GGCCGAG-GAG)를, reverse primer는 제한효소 *Sal*I 부위를 포함, 1547번째 핵산을 끝으로 하여 5′ 방향으로 28개(5′-GT-CGACCTATCATTATGTCTCCTCCTTC)의 상보 서열의 primer를 주문 제작하였으며(한국생공)(Table 1), 분리 정제된 자연형 TGase II 유전자 10 ng에 PCR 반응 혼합액(primer 각각 200 pmoles, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH 9.0, 0.1% Triton X-100, dNTP 0.2 mM, $MgCl_2$ 1 mM)이 최종 50 μl가 되도록 혼합한 후 Taq polymerase(Promega cat # M1861, Madison, WI) 2.5 U를 첨가하였다. PCR은 Thermal cycler 480(Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT)를 이용하여 94℃에서 5분간 predenaturation을 1회 실시한 후 94℃에서 denaturation 1분, 55℃에서 annealing 2분, 72℃에서 3분간 polymerization을 30 cycle 시행한 후 최종 extention을 72℃에서 7분간 더 진행하였다. 자연형 TGase II 유전자는 *Eco*RI으로 처리하여 YPG 81 벡터 *Eco*RI 부위에, PCR에 의해 증폭된 결손형 TGase II 유전자는 YPGα 벡터 *Eco*RI, *Sal*I 부위에 DNA ligation 하였다. 각각 ligation 된 DNA 1 μl와 *E. coli* DH5α competent cell 100 μl를 혼합하여 ampicillin 100 μg/ml이 포함된 LB 한천 평판 배지에 도말한 후 37℃에서 배양하였다. 형성된 집락을 각각 선택한 후 ampicillin이 포함된 LB 배지로 37℃에서 진탕배양한 후 위의 plasmid 분리 방법대로 분리하였으며, 자연형(YPG-TGC)의 경우 제한효소 *Eco*RI으로 처리하여 삽입된 유전자를 확인하고 제한효소 *Kpn*I 및 *Hind*III로 처리하여 벡터의 전사방향과 같은 방향으로 삽입된 것을 확인하였다. 결손형(YPG-ΔTGC)은 *Eco*RI, *Sal*I으로 처리하여 삽입된 유전자를 확인하였다. 확인된 각각의 plasmid DNA 50 ng과 운반체인 salmon-sperm DNA 5 μg을 효모 competent cell과 혼합하여 45℃에서 30분간 정치한 후 YNB-dextrose 한천 선택 배지 플레이트에 도말한 후 30℃에서 3일간 정치배양 하였다. 동시에 벡터만을 형질전환하여 대조군으로 사용하였다.

Southern blot hybridization

한천 선택배지 플레이트에서 정치배양하여 얻어진 효모 집락을 각각 선택하여, 최소배지에서 배양하여 흡광도가 600 nm에서 7에 도달하면 유도배지에서 36시간 더 배양하여 같은 cell 농도로 조정한 후 0.4 μm glass bead를 이용 2회 phenol 처리를 하였다. 3M sodium acetate(pH 5.2)를 최종농도 0.3M 되게 가한 후 2배 부피의 ethanol로 −20℃에서 침전시켜 70% ethanol로 1회 세척하고 건조시킨 후 TE 완충액 50 μl로 부유하였다. 자연형 TGase II를 발현하는 *S. cerevisiae*의 추출된 DNA는 *Eco*RI으로만, 결손형 TGase II는 *Eco*RI 및 *Sal*I으로 처리하고, depurination, denaturation을 거쳐 nylon membrane(NYTRAN Schleicher & Schuell)에 0.025M Na_2HPO_4/NaH_2PO_4(pH 6.5)로 250 mA에서 3시간 옮기고 UV cross-linker(C2-1000 ultraviolet cross linker, UVP)를 이용 2분간 cross-linking

Table 1. Primer for the PCR amplification of the TGase II

primer	Complementary nucleotides	Enzyme site incoporated	Sequences
p138 EcoR	138 → 149	*Eco*RI	5′-GCCGAATTCATGGCCGAGGAG
p1547 Sal	1537 → 1547	*Sal*I	5′-GTCGACCTATCATTATGTCTCCTCCTTC
p2371r	2353 → 2371	None	5′-GCAGGAGGCTGAGATGG



하였다. Hybridization에 이용한 probe는 pBS-TGC plasmid에서 *Eco*RI 제한 효소로 처리한 fragment DNA 10 ng을 ECL kit(Amersham)의 nucleic acid labelling reagent와 혼합하고 30분간 37℃에서 glutaraldehyde 용액으로 고정시켰다. Hybridization oven(BT400100, ISS)에서 42℃로 prehybridization을 1시간 실시한 후 lable 된 DNA를 첨가하여 42℃에서 16시간 hybridization을 실시하였다. 1차 세척 용액(0.4% SDS, 0.5X SSC, urea 36%)으로 20분간 세척하고 10분간 2회 반복 세척하였다. 2차 세척 용액(2x SSC)으로 5분간 더 세척한 후 ECL kit의 detection reagent를 첨가하여 1분간 실온에서 방치하였으며, X-ray film(Kodak)을 장착한 후 2분간 노출하여 감광하였다.

Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

효모로 형질전환된 집락을 각각 선택하여 영양배지에서 36시간, 발현 유도용 배지에서 12시간, 24시간, 36시간 배양한 후 균농도를 각각 일정하게 조절하고, 원심분리하여 균체를 회수하였다. 10 m*l*의 sodium acetate 완충액(50 mM sodium acetate pH 6.0)에 현탁한 후 50 m*l*의 튜브에 옮겨 1/10 부피의 10% SDS와 1.2 부피의 prewarmed phenol(65℃)을 첨가하고, 65℃ 수조에서 매 30초마다 상온에서 잠깐 vortex 하면서 5분간 incubation 한 후 상온까지 빠르게 식혔다. 2500 g에서 10분간 원심분리 후 하층의 유기용매층을 제거하고 phenol 첨가를 반복 수행하고 chloropane(50% phenol, 50% chloroform) 동량을 첨가하여 2분간 vortex하고 액상층을 새튜브에 옮겨 같은 부피의 chloroform : isoamyl alcohol(24 : 1)로 추출하고 3M sodium acetate 1/10 부피와 3배 부피의 알코올을 첨가한 후 −20℃에서 수시간동안 RNA를 침전시켰다. 70% 알코올로 세척한 후 진공 건조하고 0.1% diethylpyrocarbonate(DEPC) 처리된 증류수에 10 μg/μ*l* 되도록 용해하였다. Invitrogen사의 cDNA cycle kit를 이용하여 분리된 전체 RNA 2 μg/μ*l*를 이용 설명서에 따라 cDNA를 합성한 후 PCR은 결손형의 경우 형질전환에 이용하였던 primer를 이용하였고, 자연형의 경우 결손형의 forward primer와, reverse primer 19 mer(5'CTCAGGTAGGCTGAGATGG)는 pBS-TGC *Eco*RI fragment의 종결 서열까지를 주문 제작하여 앞서 PCR의 방법대로 동일하게 시행하였다(Table 1).

재조합 Transglutaminase II 유전자 발현산물의 활성측정

변형된 TGase assay 방법(15)으로 효소활성을 측정하였다. 효소활성의 측정은 [1,4^{14}C] putrescine(Amersham)이 기질 succinylated casein에 혼입되는 양을 액체 scintillation β선 계수기(Beckman, Fulleton, CA)로 측정하였다. Succinylated casein은 Klotz(24)의 방법에 따라 준비하였다. 선택한천 배지에 형성된 자연형 및 결손형 TGase II 형질 전환체 각각의 colony를 최소배지 2 m*l*에 1일간 배양한 후 late-log phase에 도달하면 효모를 2500 g로 20분간 원심분리하여 회수하였다. 이를 phosphate buffered saline(PBS)으로 1회 세척하고, 유도배지 2 m*l*을 가해 36시간 배양하여 추출완충액(0.1M Tris acetate, pH 7.5, 10 mM EDTA, 2 mM Benzamidine-HCl, 1 mM PMSF, 1 μg/μ*l* leupeptin)으로 모두 흡광도를 600 nm에서 20으로 같게 조정하고, 동량부피의 0.45 μm glass bead를 첨가하여 세포파쇄기(MSK cell distruptor : B. Braun)에서 7분간 파쇄한 후 4℃에서 12.000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상청을 회수하여 시료로 사용하였다. 비유도시에는 영양배지에서만 36시간 배양하고 동일한 방법으로 파쇄하였다. 시료 100 μg/μ*l*에 반응 혼합액[(0.1M Tris-acetate pH 7.5) 1% succinylated casein, 1 mM EDTA, 10 mM $CaCl_2$, 0.5% lubrol PX, 5 mM dithiothreitol, 0.15M NaCl) 400 μg/μ*l*, 0.5 μCi [1,4^{14}C] putrescine (118 mCi/mmol)]을 가하여 37℃에서 1시간 정치후 20% trichloroacetic acid(TCA) 2 m*l*을 가하여 반응을 정지시킨 후 4℃에 30분간 방치하고, TCA-비용해침전물을 glass-fiber 여과지(Titer Tek, Lier, Norway)에 여과하여 5% TCA 20 m*l*로 세척한 후 침전에 결합된 방사선양을 액체 scintillation β-선 계수기로 측정하여 효소활성 값을 cpm/h로 나타내었다.

SDS-PAGE and Western blot analysis

Laemmli(23)의 방법을 변형하여 시행하였다. 전기영동할 효모의 재조합 발현 단백질은 유도배양 및 비유도배양 배지에서 36시간 배양한 후 효모를 2500 g로 20분간 원심분리하고 위의 방법대로 추출하였다. 이를 아가로스젤에서 전기영동을 실시, nylon membrane으로 옮기고 5% 탈지유로 1시간 blocking을 실시한 후, rabbit anti-guinea pig liver transglutaminase II로 1시간, goat anti-rabbit IgG로 1시간 반응을 각각 실시하였다. 이를 NBT와 BCIP로 발색하였다.

형질 전환된 효모의 성장 속도 측정

자연형 및 결손형 TGase II 형질 전환체 및 벡터만의 형질 전환체를 각각 최소 배지에서 late-log(흡광도 7) 상태까지 배양한 후 2500 g, 10분간 원심하여 PBS로 세척한 후 발현유도배지에서 60시간 동안 배양하면서 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

자연형 TGase II 및 결손형 TGase II 유전자의 클로닝 및 *E. coli* 형질전환

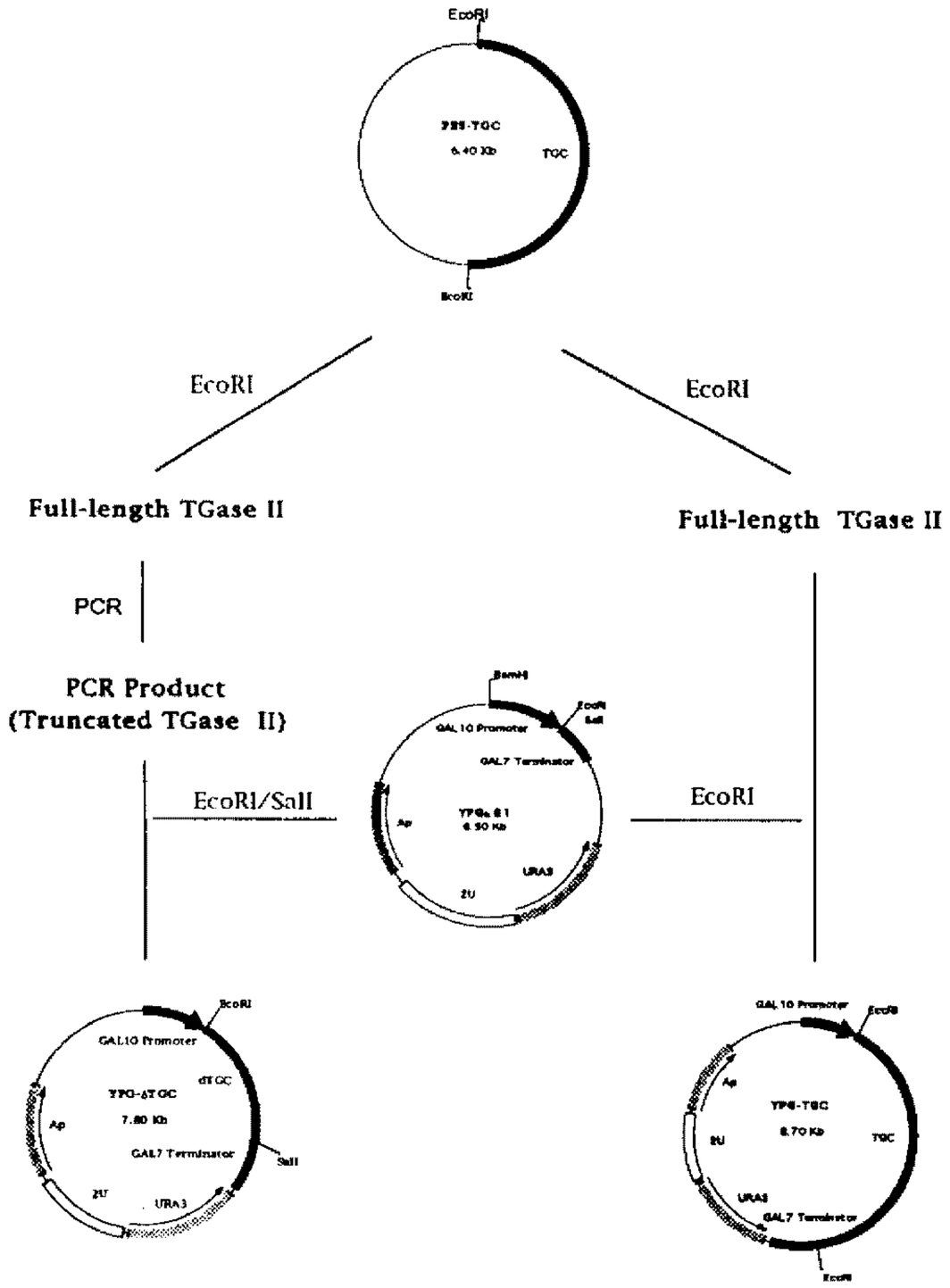


Fig. 1. Construction of the plasmids for the expression of recombination full-length and truncated TGase II in yeast.

TGase II 유전자를 함유한 plasmid pBS-TGC를 *Eco*RI 제한효소로 절단하여 3.2 kb의 자연형 TGase II 유전자를 0.8% 아가로스 젤에서 확인 분리한 후 *Eco*RI으로 처리한 YPGα81 shuttle vector 내부로 삽입하였다. 결손형 TGase II 유전자는 forward primer(p 138 Eco)와 reverse primer(P 1547 Sal)를 사용하여 (Table 1) 젤에서 분리한 TGase II 유전자를 주형으로 138번째 핵산에서 1547번째 핵산까지를 증폭하여 벡터와 같이 *Eco*RI, *Sal*I으로 처리한 후 ligation 하고 *E. coli* DH5α로 형질전환 하였다. 집락이 형성된 형질전환체에서 플라스미드를 분리하여 각각의 클로닝부위에 제한 효소로 처리하여 삽입 절편 3.2 kb와 1.4 kb를 확인하였으며 각각의 경우 벡터와 같은 전사 방향을 갖고 있음을 확인하였고, 자연형의 경우 YPG-TGC, 결손형의 경우 YPG-TGC로 명명하였다(Fig. 1, 2).

효모의 형질전환

효모의 형질전환 여부를 확인하기 위해서 YPG-TGC와 YPG-TGC 각각에 의해 형질전환된 집락과 벡터만에 의해 형질전환된 집락을 각각 한개씩 취해 최소배지에서 24시간 배양한 후 유도배지에서 36시간 배양하여 얻은 배양액을 2500 g로 20분간 원심분리 하

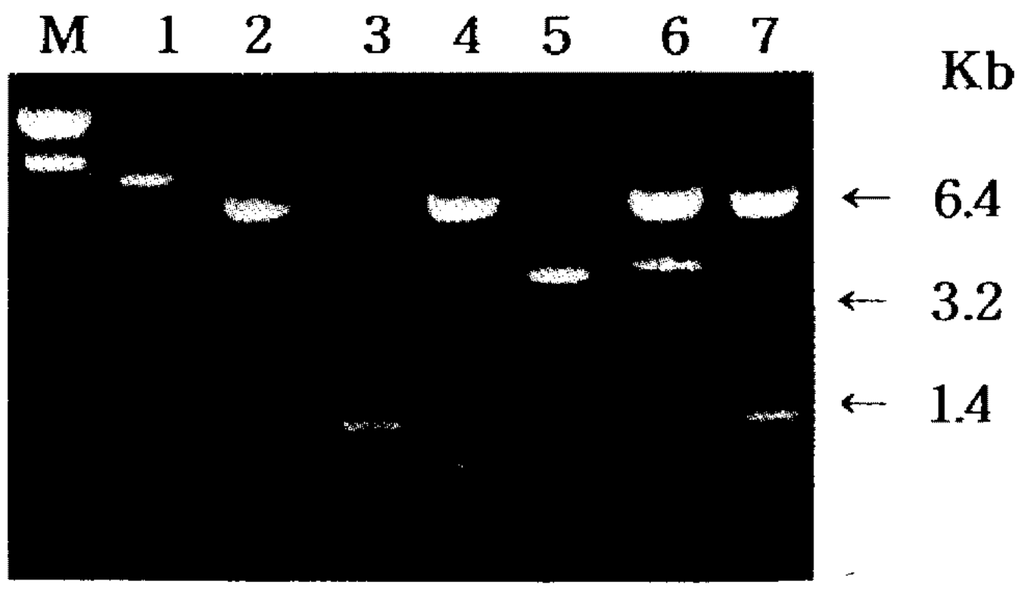


Fig. 2. Restriction pattern of the plasmids.
DNA from plasmid minipreparation was digested with restriction enzyme and analysed by electrophoresis on 0.8% agarose. Separated DNA was visualized by EtBr staining.
M: DNA size marker (λ *Hind*III)
1: YPG 81 plasmid (uncut)
2: YPG 81 plasmid (*Eco*RI/*Sal*I)
3: Truncated TGase II PCR product
4: YPG 81 plasmid (*Eco*RI)
5: Full-length TGase II (pBS-TGC *Eco*RI fragment)
6: YPG-TGC (*Eco*RI)
7: YPG-ΔTGC (*Eco*RI/*Sal*I)

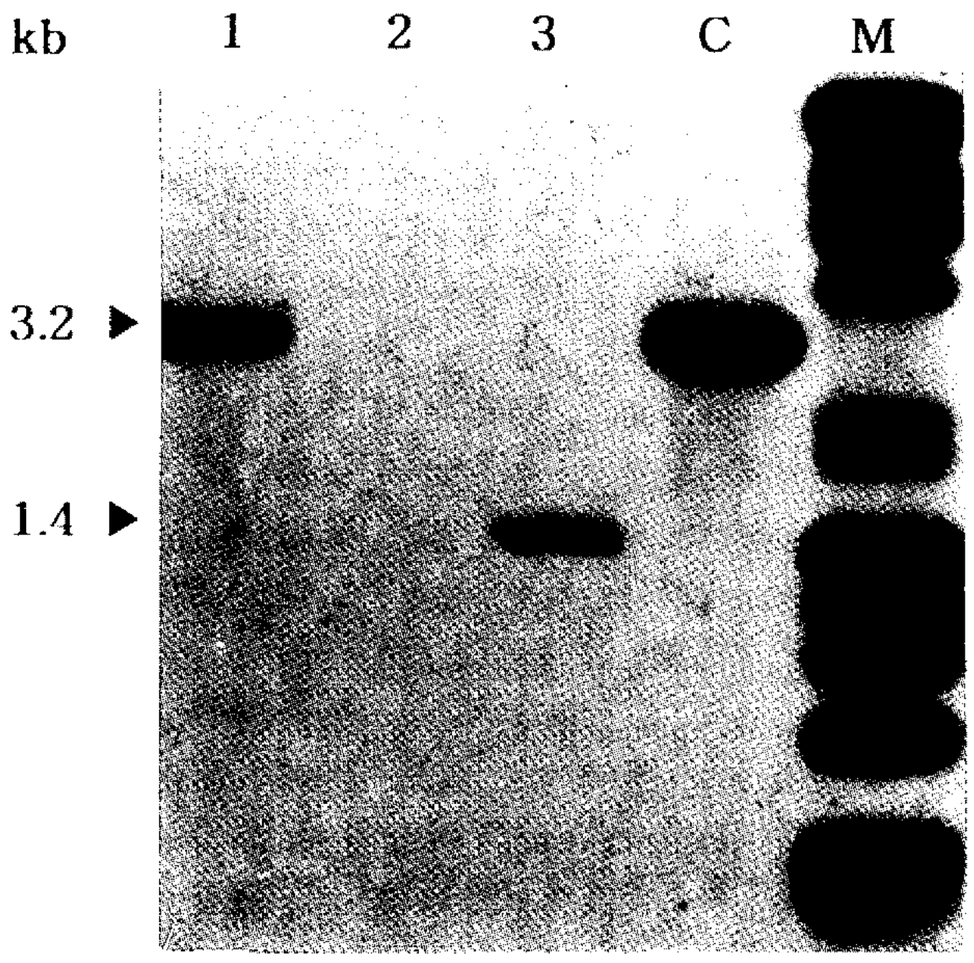


Fig. 3. Southern blot hybridization of plasmid DNA prepared from transformed yeast.
DNAs isolated from transformed yeast were digested with *Eco*RI or *Eco*RI/*Sal*I. Digested DNAs were separated by agarose gel electrophoresis and blotted onto nylon membrane filters and hybridized with TGase II probe DNA. Hybridized membrane was treated as described in Material and Method.
An autoradiogram is shown.
Lane 1: DNA from yeast transformed with YPG-TGC (digested with *Eco*RI)
Lane 2: wild type yeast
Lane 3: DNA from yeast transformed with YPG-ΔTGC (digested with *Eco*RI/*Sal*I
C: pBS-TGC digested with *Eco*RI
M: DNA size marker (λ *Hind*III, φX 174 *Hae*III)

였다. 같은 cell 농도로 조정하여 DNA를 추출하였으며, pBS-TGC *Eco*RI fragment를 probe로 사용하여 southern hybridization을 실시한 결과 벡터만에 의해 형질전환된 집락에서는 어떠한 삽입 절편도 확인되지 않았으며, YPG-TGC는 3.2 kb, YPG-TGC는 1.4 kb의 유전자가 확인되어 집락을 형성한 형질전환체는 삽입된 유전자를 갖고 있음을 확인하였다(Fig. 3).

형질전환체로부터 mRNA의 합성 확인

각각의 형질전환체에서 외래 유전자의 발현에 요구되는 TGase II mRNA의 합성여부를 발현유도배양 시간별로 관찰하였다. 최소한천배지에서 생성된 각각의 집락을 최소배지에서 24시간 배양한 후 영양배지에서 36시간, 유도배지에서 12시간, 24시간, 36시간 별로 배양하여 같은 cell 농도로 조정하여 전체 RNA를 추출하여 northern blot을 실시하였으나 mRNA의 양이 매우 적어 검출되지 않았으므로 Invitrogen사의 cDNA cycle kit를 이용하여 reverse transcription을 수행하였다. Table 1에 나타낸 각각의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 유도 배양하기 전에는 삽입 유전자의 전사가 일어나지 않았던 것을 알 수 있었으며, 유도배양의 경우 배양 초기부터 자연형 · 및 결손형에서 각각 mRNA가 합성되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 결손형에 비해 자연형에서 band의 강도가 높은 것은 1차 PCR 산물을 주형으로 재차 PCR을 수행하였기 때문이었다.

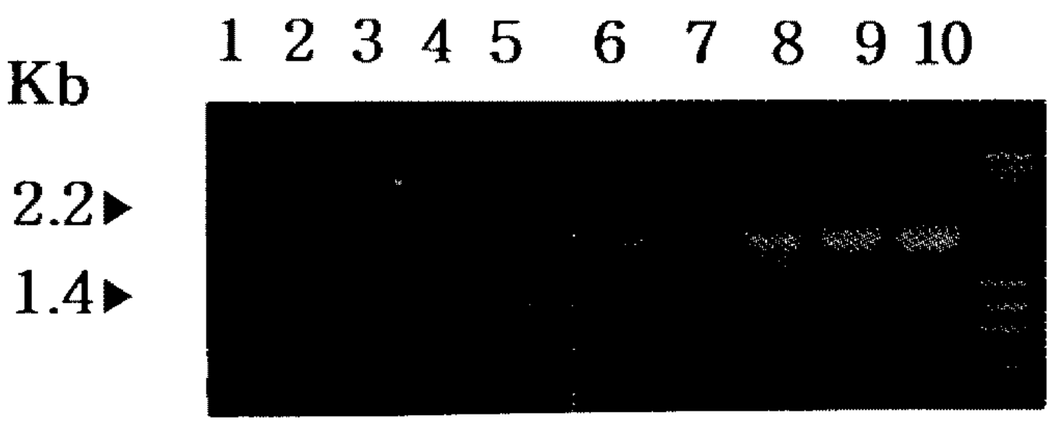


Fig. 4. RT-PCR amplification of mRNA from transformed yeast according to induction time.
Total RNA extracts from each transformant at various induction time. A reverse transcription reaction was carried out by at 42℃ with random primer and reverse transcriptase. PCR was carried as descrived Material and Method. PCR products were separated on 0.8% agarose gel and stained with EtBr.
*forward primer p138 EcoR; reverse primer p1547 Sal → Truncated TGase II PCR product
lane 1: non-induction
lane 2: 12 hr post-induction
lane 3: 24 hr post-induction
lane 4: 36 hr post-induction
lane 5: PCR product of truncated TGase II DNA template from yeast transformed with YPG-ΔTGC
*forward primer p138 EcoR; reverse primer p2371r → Full-length TGase II fragment PCR product
lane 6: PCR product of *Eco*RI fragment TGase II from pBS-TGC
lane 7: non-induction
lane 8: 12 hr post-induction
lane 9: 24 hr post-induction
lane 10: 36 hr post-induction

발현 산물의 활성측정

약 3000여개의 형질전환체중 각각 20개를 선발하여 재료및 방법에서 기술한 것처럼 15 m*l* 시험관에서 2 m*l*의 최소배지에서 24시간 배양한 후 유도배지에서 36시간 더 배양하여 효모를 회수하고 파쇄기로 효모를 파쇄하여 상청에서 효소활성을 측정하였다. 발현을 유도하지 않은 효모 추출물의 경우 250 μg의 총단백질에 의해 750 cpm/h 이하의 역가를 보인데 비하여 발현을 유도한 경우는 40개 검체 모두 적어도 3,000 cpm/h 이상 최고 10,600 cpm/h까지의 역가를 보였다. 그러나 이러한 발현의 정도는 동일 assay 조건에서 FXIII을 대조군으로 사용하여 얻어진 역가에 비해서는 무척 저조한 것으로 평가된다. 동일한 방법으로 측정했을 경우 정상인 혈장 속의 FXIII 1 μg(혈장 약 50 μ*l*에 해당됨)의 transglutaminase activity 값은 약 160,000 cpm/h으로 나타나는 것에 비해 매우 저조하였다. 각각의 형질 전환체

Table 2. Activities of the recombinant full-length and truncated TGaseII

Cell No.	Activity (cpm×10^2 /H)			
	Full-lenth TGase C		Truncated TGase C	
	induction	non-induction	induction	non-induction
1	34.1	5.1	32.1	5.2
2	41.2	4.6	31.2	5.3
3	70.5	4.5	74.3	4.8
4	106.1	5.0	68.5	4.6
5	65.2	7.2	83.6	4.5
6	69.4	7.1	43.7	4.8
7	45.2	5.2	30.5	5.6
8	52.3	5.1	49.3	6.5
9	38.6	5.3	48.2	6.2
10	50.2	4.8	77.1	7.1
11	52.5	4.7	32.4	7.4
12	65.4	4.6	49.7	7.2
13	34.3	4.5	63.2	6.1
14	72.2	5.6	31.1	4.9
15	40.1	7.1	74.2	4.6
16	56.7	6.8	36.5	4.5
17	72.6	7.5	75.6	6.2
18	62.9	5.2	64.4	5.2
19	88.3	4.6	55.2	6.4
20	60.5	5.6	80.1	6.1
Mean Value	58.5		55.1	

*All data are mean value of three independent measurements.

Table 3. Effect of induction time on the activities of full-lenth and truncated TGase II.

Cell No.		Full-lenth			Truncated		
Time (Hr)		4	17	19	5	10	20
Activity (cpm × 10^2 /H)	12	40	32	35	44	35	46
	24	55	31	36	42	45	45
	36	87	59	62	67	53	59
	48	80	50	48	55	52	44

*All data are mean value of three independent measurements.

에서 자연형의 경우 평균 5800 cpm/h인데 비하여 결손형은 5500 cpm/h로 거의 동등한 수준이었다(Table 2). 따라서 N-말단의 상동 부위가 효소 역가를 나타내는데 충분한 부위임을 알았다. 이는 β-casein과 Fibrin의 아민 수용체 부위에 대한 혈액 응고 인자 Factor XIII의 C-말단의 기질 특이성 연구(27)에서 처럼 TGase II의 C-말단 부위도 다른 세포에서의 TGase처럼 기질 특이성에 관여하는 것으로 추정된다. 형질전환체 간의 편차가 큰 것은 집락간의 plasmid의 안정성 때문일 수도 있으며, 소량이나마 TGase II의 발현이 세포의 성장에 저해적인 효과를 나타내는 것으로 사료된다. RT-PCR에서 유도 배양초기부터 mRNA의 발현이 일어남에 따라 어떤 시점에서 효소 활성이 가장 높은가를 관찰하기 위해 효소 활성이 높은 집락 세개씩을 선택하여 배양한 후 유도 배양시간 별로 48시간까지 12시간 간격으로 활성치를 비교하였다. 대체로 36시간 배양에서 높은 활성을 나타내었으며, 그 이후는 오히려 감소하는 경향을 보였다(Table 3).

Western blot 분석

형질전환체의 경우 낮은 수준이지만 TGase II의 역가가 관찰되었으므로, TGase II 단백질의 발현 정도를 조사하기 위하여 자연형 및 결손형 형질 전환체를 36시간 유도배양 하고, SDS-PAGE로 전기영동 하여 분석하였다. 분리된 단백질을 Coomassie blue로 염색한 결과 자연형이나 결손형 모두 예상되는 크기의(77 kDa 및 56 kDa) 단백질을 관찰할 수 없었다. 보다 예민한 측정을 위하여 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 rabbit anti-guinea pig TGase II polyclonal antibody로 immunoblotting한 결과, 이 경우에서도 발현 단백질을 구별하기 어려웠다. 그러나 TGase II 유전자가 도입된 형질전환체에서는 숙주 세포내의 기질과 혹은 효소 자신끼리의 polymerization 때문으로 추정되는 거대한 단백질 중합체가 관찰되었다. 자연형의 경우 그러한 중합체의 양이 결손형에 비하여 상당히 많았다(Fig. 5). 한편 유도발현된 효모 추출물로부터 자연형 및 결손형 TGase II의 음이온 교환 크로마토 그

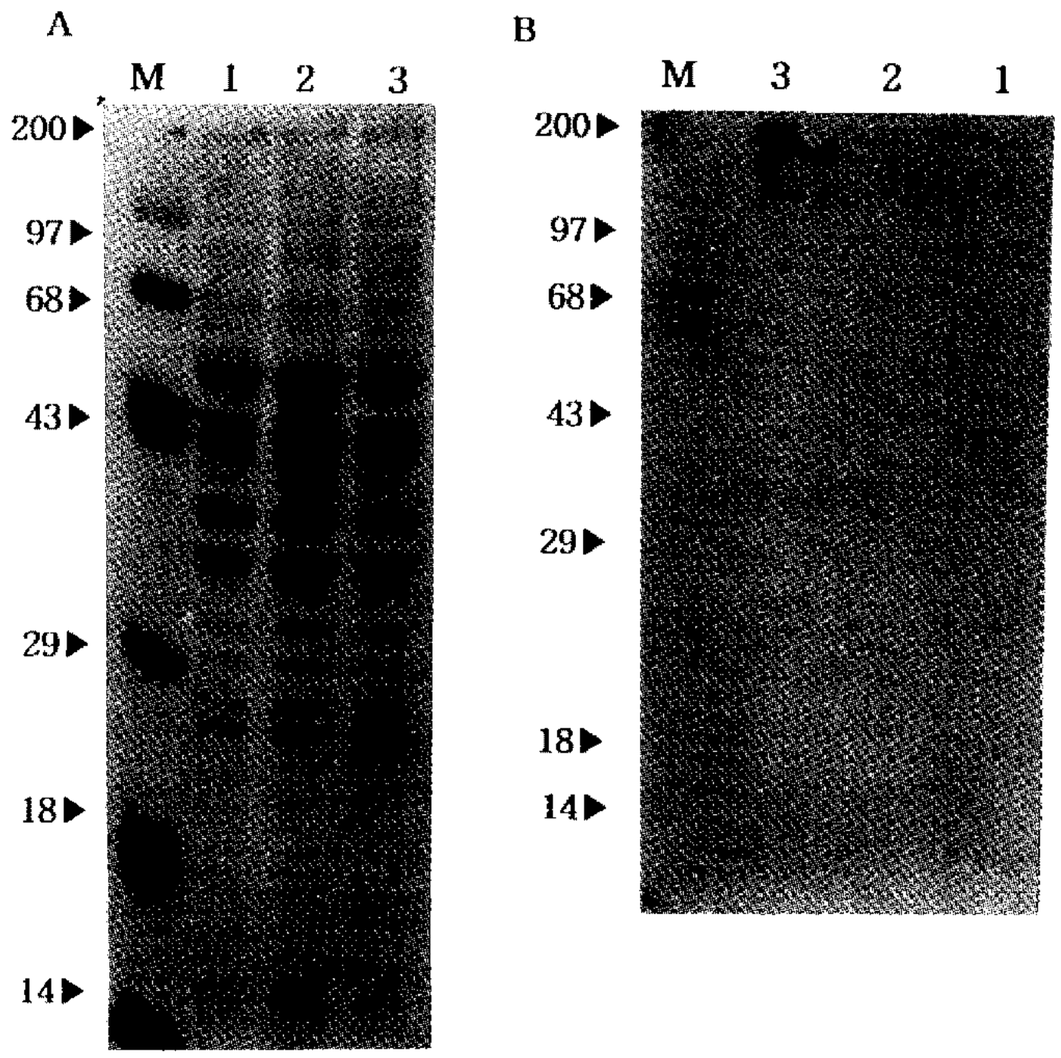


Fig. 5. SDS-PAGE and Western blot analysis of the recombinant full-length and truncated TGase II gene product.
Protein in crude extracts from each transformant were separated by 12% SDS-PAGE. A: Coomassie blue staining; B: Western blot with rabbit anti-guinea pig TGase II antibody.
M: molecular size marker (200, 97, 68, 43, 29, 18, 14 kDa)
lane 1: Yeast transformed by vector alone
lane 2: Yeast transformed by truncated TGase II gene
lane 3: Yeast transformed by full-length TGase II gene

래피를 이용한 부분정제의 시도에서 Kim등(1990)의 연구결과와 일치하지 않는 분리 특성을 보이는 점으로 미루어(Data not shown) 세포내에서 합성된 후 아직 규명되지 않은 기전에 의하여 효소자신 혹은 효소와 세포내의 기질단백질들과 중합체를 형성하는 것으로 추정되며, 이는 Western blot 분석에서 예상되는 분자량보다 훨씬 큰 형태의 단백질이 검출된 결과와 부합된다. 즉 자체적으로 TGase II를 발현하지 못하는 세포에서 형질전환에 의해 유도발현된 TGase II는 부적절한 조절방식에 의한 cross-linking이 발생되어 나타나는 결과로 추정된다.

TGase II 유전자의 발현이 효모 성장에 미치는 영향

YPG-TGC, YPG-ΔTGC 및 벡터로만 형질전환된 형질전환체를 최소배지에서 24시간 배양하고 발현유도배지에서 60시간까지 배양하면서 성장속도를 600 nm에서 흡광도로 측정하였다. Fig. 6에서처럼 각각의 TGase II 형질전환체는 벡터만으로 형질전환된 형질전환체에 비해 유도발현 36시간 이후부터 성장이 감소하는 현상을 보임으로 미루어 보아 미량이나마 발현된 산물이 세포에 작용하여 cell death를 유도하는 것으로 추정된다.

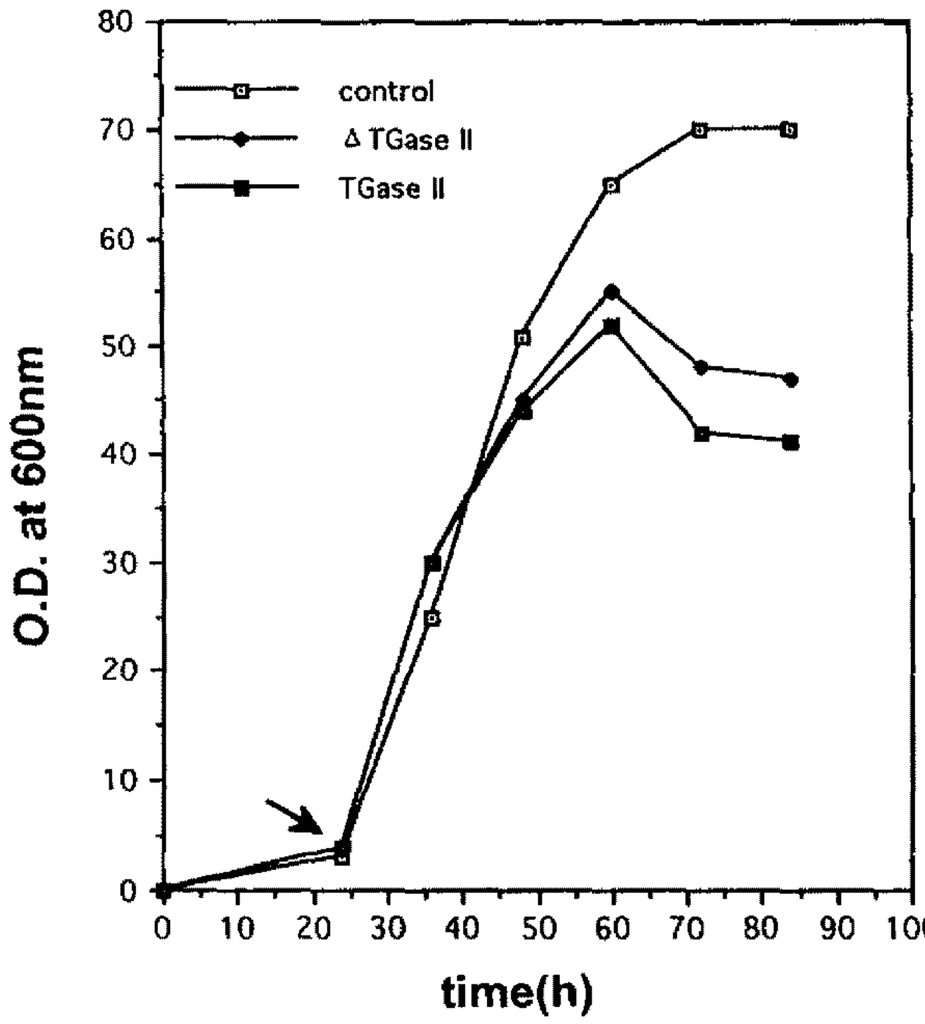


Fig. 6. Growth pattern of full-length and truncated TGase II transformants.
*Each transformants were cultured at minimal media for 24 hrs and then, induced with 2% galactose. Cell concentration was measured by optical density at 600 nm.
(→: induction point; O.D.: optical density; ΔTGase II: truncated TGase II; TGase II: full-length TGase II; control: yeast transformed by vector alone)

TGase II를 intrinsic 하게 발현하는 세포에서는 retinoic acid와 같은 유도화합물로 유도발현시켜 다량합성된 TGase II가 세포내에서 특이할만한 변화를 일으키지 않는 반면, 자체적으로 TGase II를 발현하지 못하는 세포에서 유도발현된 TGase II는 세포질의 응축, 세포질의 fragmentation, chromatin의 fragmentation, 핵농축과 같은 뚜렷한 세포내의 변화를 유발 한다는 결과가 보고되고 있다. 이러한 현상은 mammalin epidermis의 cornification에 있어서 TGase II가 keratinocyte의 death와 무관하지 않을 것으로 추정되는 것과 연관성이 있을지도 모른다. 차후에 강력한 발현 시스템에서의 cell death를 관찰 함으로써 이러한 현상이 더욱 연구될 수 있을 것으로 사료된다.

이러한 사실 등을 통해 TGase II를 정상적으로 발현하는 세포는 compartmentalization을 포함하는 적절한 조절 mechanism에 의해 조절된다는 것을 알 수 있으며, 이는 고등세포에서 재조합 transglutaminase를 발현하는 것이 용이하지 않다는 것을 의미한다. 이러한 문제를 극복하고 TGase II를 다량 발현시키는 방법으로 plasma protein Factor XIII의 경우와 같이 N-말단의 Arg-37까지의 염기 서열을 합성연결하여 활성을 갖고 있지 않은 zymogen의 형태로 발현을 유도한 후 *in vitro*에서 활성을 나타나게 고안하는 방법을 강구할 수 있으며, 세포외부로 secretion 될 수 있는 시스템을 고안하는 연구가 필요하다.

요 약

Transglutaminase(TGase)는 펩타이드-결합 글루타민 잔기와 펩타이드-결합 라이신잔기 및 1차 아민류를 포함하는 다양한 화합물과의 교차결합에 의하여 단백질의 변형을 촉매하는 효소이다. 동물세포에는 구별가능한 5종류의 TGase가 존재한다[TGase I(또는 K), II(C), III (E), IV(P)와 혈장단백 XIIIa]. 그들은 아미노산 서열에서 N-말단에 약 70%의 상동성을 갖고 있으며, C-말단의 경우에는 거의 상동성이 존재하지 않는다. 본 연구에서는 TGase II의 상동성 부위(N-말단 2/3)와 비상동성 부위(C-말단 1/3 부위)의 역할을 알아보기 위해 전체효소 또는 C-말단이 결손된 형태의 효소를 *Saccharomyces cerevisiae*에서 발현 하고자 하였다. Southern blot, 역전사 중합 연쇄 반응, Western blot등을 통해 전체효소 및 C-말단 결손형 효소가 형질전환된 효모에서 발현되는 것을 확인하였다. Succinylated casein에 [1,4-^{14}C]-putrescine이 통합되는 반응을 이용한 활성 측정에서 C-말단이 결손된 TGase II는 같은 세포 농도에서 전체 TGase II 효소와 비교하여 유사한 수준의 활성을 나타내었다. 이러한 결과들은 사람 TGase II의 경우 N-말단의 높은 상동성부위가 효소의 역가결정에 중요하다는 것을 나타내 준다. 효모시스템에서 발현한 결과 효소의 역가가 나타났으나 높지 않았으며 발현된 양이 극히 낮아서 단백질의 정제나 특성연구를 위하여 발현벡터의 개량을 포함한 방법의 개선이 필요하다고 사료된다. 흥미롭게도 TGase II의 발현이 효모의 성장을 저해하는 것으로 나타나 이러한 현상이 표피세포의 각질화에 수반된 세포의 죽음과 유관한지의 가능성에 대한 보다 자세한 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Anfinsen, L.B. 1973. Principle that govern the folding of protein chains. *Science* **1811**: 223-230.
2. Tanger, M.L. 1976. In Biochemistry of collagen (eds. Ramanchandran, G.N., and Reddi, A.H.).
3. Gross, A.J. and I.W. Sizer. 1959. Oxidation of tryamine, tyrosine, and related compounds by peroxidase. *J. Biol. Chem.* **234**: 1611-1614.
4. Lou, M.F. 1975. Isolation and identification of L-aspartyl-L-lysine and L-ε-glutamyl-L-ornithine from normal human urine. *Biochemistry* **14**: 3503-3508.
5. Pisamo, J.J., J.S. Finlayson, and M.P. Peytron. 1968. Cross-link in fibrin polymerized by factor XIII ε-(γ-glutamyl)lysine. *Science* **160**: 892-893.
6. Folk, J.E. and J.S. Finlayson. 1977. The ε-(γ-glutamyl) lysine cross-link and the catalytic role of transglutaminases. *Adv. Prot. Chem.* **31**: 1-133.
7. Lorand, L.W. and L.B. Epel. 1976. Role of intrinsic

TGase in Ca^{++} mediated cross-linking of erythrocyte proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**: 4479-4481.
8. Davies, P.J.A., D.R. Davies, A. Levitski, F.R. Maxfield, P. Milhand, M.C. Willingham, and I.H. Pastan. 1980. Transglutaminase is essential in receptor mediated endocytosis of α2-macroglobulin and polypeptide hormons. *Nature* **238**: 162-167.
9. Brickbichler, P.J., G.R. Orr, E. Conway, and M.K. Patterson. 1977. Transglutaminase activity in normal and tansformed cells. *Cancer res.* **37**: 1340-1344.
10. Fesus, L., E.F. Szucs, K.E. Barrett, D.D. Metcalfe, and J.E. Folk. 1983. Activation of transglutaminase and production of protein-bound γ-glutamylhistamine in stimulated mouse mast cell. *J. Biol. chem.* **260**: 13771.
11. Rice, R.H. and H. Green. 1978. Relation protein synthesis and transglutaminase activity to formation the cross-linked envelope during terminal differentiation of the cultured human epidermal keratinocyte. *J. Cell. Biol.* **76**: 705-711.
12. William, H.G. 1984. Role of transglutaminase in rodent prostrate. *Mol. Cell. Biol.* **58**: 51-61.
13. Alessandra. A., L. Giovanna, O. Seratina, V. Colizzi, and Piacentini, M. 1994. HIV-1 gp120-dependent induction of apoptosis in antigen specific human T-cell clones is characterized by 'tissue' transglutaminase expression and prevented by cyclosporin A. *FEBS Letters* **339**: 258-264.
14. Folk, J.E. and P.W. Cole. 1966. Mechanism of action of guinea pig liver transglutaminase 1: Purification and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **241**: 5578.
15. Chung, S.I. and J.E. Folk. 1972a. Transglutaminase from hair follicle of guinea pig. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 303-308.
16. Ikura, K., T. Nasu, H. Yokoda, Y. Tsusia, R. Sasaki, and H. Chiba. 1988. Amino acid sequence of guinea pig liver transglutaminase from its cDNA sequence. *Biochemistry* **27**: 2898-2905.
17. Thacher, S.M. and R.H. Rice. 1985. Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: Relatio to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* **40**: 685-695.
18. Folk, J.E. and S.I. Chung. 1973. Molecular and catalytic properties of transglutaminase. *Adv. Enzymol.* **38**: 109-191.
19. Negi, M., M.C. Colbert, and L.A. Goldsmith. 1985. High molecular weight epidermal transglutaminase. *J. Invest. Dermatol.* **85**: 75-78.
20. Kim, H.C., M.S. Lewis, J.J. Gorman, S.C. Park, J.E. Girad, J.E. Folk, and S.I. Chung. 1990. Protransglutaminase E from guinea pig skin. *J. Biol. Chem.* **265**: 21971-21978.
21. Kim, I.G., J.J. Gorman, S.C. Park, S.I. Chung, and M.S. Peter. 1993. The deduced sequence of the noble protransglutaminase E (TGase 3) of human and mouse. *J. Biol. Chem.* **268**: 12682-12690.
22. Kim, S.Y., S.I. Chung, and M.S. Peter. 1995. Highly active soluble processed forms of the transglutaminase I enzyme in epidermal keratinocytes. *J. Biol. Chem.* **270**: 18026-18035.
23. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, A laboratory mannual, 2nd eds, Cold Spring Harvor Laboratory Press, Cold Spring Hrbor, NY, USA.
24. Klotz. 1959. Succinylation in method in enzymoloy. 70, Academic press, New York.
25. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assemble of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.
26. Huber, M., I. Rettler, K. Bernascon, and E. Frenk. 1995. Mutations of keratinocyte transglutaminase in lamellar Ichthyosis. *Science* **267**: 525-527.
27. Gorman, J.J. and J.E. Folk. 1981. Structural features of glutamin substrates for transglutaminases: Specificities of human plasma factor XIIIa and the guinea pig liver enzyme toward synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* **256**: 2712-2715.

(Received 20 January 1996)