

## 동물 조직세포로부터 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase의 분리 및 성격규명

연세대학교 보건과학대학 임상병리학과

김태우<sup>†</sup> · 정동주 · 김윤석

**국문초록:** Mitogen-activated protein (MAP) kinase는 여러 세포증식 촉진인자들에 의하여 자신이 인산화됨으로써 활성화되어 다른 protein kinase를 인산화시키는 역할을 하는 세포내 신호전달의 중요한 효소이다. 본 연구에서는 P388 murine leukemia 세포 파쇄액에서 SP sephadex C-50, phenyl superose, Mono Q column을 통하여 MAP kinase를 분리한 결과, 44 kD와 66kD의 isoform을 확인할 수 있었다. 면역 T 세포의 p56<sup>lck</sup>의 N-terminal로 부터 유전자 재조합 방법을 통하여 glutathion-s-transferase(GST) fusion protein을 얻은 후 분리한 MAP kinase의 기질로 사용하여 본 결과, wild type과 mutant 간에 인산화 정도의 차이를 확인할 수 있어 MAP kinase의 또다른 기질로 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다.

### 서 론

진핵 세포(eukaryotic cell)의 성장과 분화는 그 세포의 외부로부터 전달된 신호들(signals)에 의하여 이루어진다. 이때 세포의 표면에서 이들 신호들의 감지는 세포막에 붙어있는 receptor protein들에 의하여 이루어지며, cytoplasm을 통하여 nucleus에 이 신호들이 전달된다. Mitogen-Activated Protein(MAP) Kinase는 세포 외부로부터의 성장인자, cytokine, hormone등에 의해 유발된 신호를 세포질을 통해 핵내로 전달하는 신호 전달(signal transduction) 과정의 매개체로서 밝혀졌으며<sup>1,2,3</sup> 세포의 성장, 분화 및 자극에 대한 반응을 조절하는 기능을 갖고있다<sup>4</sup>. MAP kinase의 활성화는 세포 표면의 많은 수용체(receptor)로부터 유발된 신호가 G 단백질, Ras등으로부터 여러 효소를 거쳐 MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK)인 c-raf<sup>5</sup>, Mos<sup>6</sup>, Ste II<sup>7</sup>등에 전달되고 이 효소들은 MAP Kinase Kinase(MAPKK)의 ser-

ine과 threonine 부위를 인산화 시킴으로써 활성화 시킨다. 활성화된 MAP Kinase Kinase는 MAP Kinase의 tyrosine과 threonine 부위를 인산화 시킴으로써 MAP Kinase 자체의 자가인산화 (autophosphorylation)와 함께 완전한 MAP Kinase의 활성이 이루어지도록 한다<sup>8,9</sup>. MAP Kinase의 인산화 부위인 Tyr과 Thr은 특별한 순서없이 각기 독립적으로 인산화가 이루어지며<sup>9</sup> 활성화된 MAP Kinase는 S6 Kinase II 등을 인산화 하거나<sup>10</sup>, 핵 내로 이동하여 c-Jun, c-Fos, c-Myc등과 같은 transcription factor를 인산화함으로써 신호를 전달하고<sup>10</sup> 신호를 전달한 후에 MAP Kinase는 탈인산화되어 비활성화 상태로 되돌아가는 것으로 알려졌다<sup>11</sup>. 현재까지 밝혀진 MAP Kinase의 종류는 EGF나 Insulin으로 처리한 포유동물에서 MAP2 Kinase로 알려진 p42<sup>mapk</sup>와 p44<sup>mapk</sup>가 분리되었고 cycloheximide로 처리한 쥐의 간에서 활성화되는 p54 MAP Kinase<sup>12</sup> 그리고 성숙 중인 sea star의 난모세포에서 germinal vesicle이 깨지기 시작할 때 활성화되는 p44<sup>mapk</sup><sup>13</sup> 등이 밝혀졌다. MAP Kinase에 대한 조절인자로서 작용하는 물질로는 우선 MAP Kinase의 활성화를 유발하는 MAPKK를 들 수 있고, 이와 반대로 활성화된 MAP Kinase의 인산기를 제거함으로써 불활성화시키는 phosphatase를 들 수 있다. MAP Kinase를

\*논문접수 1996년 3월 6일, 수정재접수 1996년 5월 1일.

\*이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모 과제 연구비에 의하여 연구되었음.

<sup>†</sup>별책요청 저자

불활성화 시키는 phosphatase로는 다소 비특이적인 PP2A로부터 in vitro상에서 특이적으로 MAP Kinase의 인산기를 제거하는 phosphatase를 각각 coding하고 있는 3Hc134<sup>14</sup>, erp<sup>15</sup>, PAC-1<sup>16</sup> 등이 있다. 그리고 활성화된 MAP Kinase에 의해 MAP kinase kinase kinase인 raf-1과 MAP kinase kinase가 과도하게 인산화됨으로써 본래의 Kinase활성도가 떨어지게 되는 역 조절(feedback) 기능도 보고되었다<sup>17</sup>. MAP Kinase가 인산화 시키는 기질에서는 공통적으로 Pro-Xaa-Ser/Thr-Pro 또는 Xaa-Xaa-Ser/Thr-Pro의 아미노산 배열이 있다고 보고되었는데<sup>18</sup> 세포내의 몇 개의 단백질에서 이러한 아미노산 배열이 보여지며, 특히 transcription factor 등에서도 이러한 아미노산 배열을 갖고 있는 것들이 밝혀졌고 이들을 MAP kinase가 인산화 시키는 것으로 보고되었다<sup>10,19</sup>. 그리고 MAP kinase는 세포의 주기와도 밀접한 관련을 맺으며 그 작용을 하는 것으로 여러 실험결과 나타났는데, MAP kinase가 세포의 주기 중 관련되어지는 시기로는, 포유동물의 G<sub>0</sub> 시기의 세포를 분열촉진인자로 처리시 특히 p42<sup>mapk</sup>와 p44<sup>mapk</sup> 등이 짧은 시간 내에 활성화 되어졌고, p44<sup>mapk</sup>은 분열촉진인자로 처리시 5~10분 정도에 최고의 활성도를 보인 뒤 50% 정도 활성이 감소된 채로 2시간 정도 유지되는 것으로 보아 G<sub>1</sub>시기의 끝부분 부터 DNA 합성 전의 S시기 초까지의 기간동안 분열촉진인자에 대한 세포의 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. 포유동물의 체세포에서의 역할과 비슷하게 sea star에서는 p44<sup>mapk</sup>가 그리고 *X.laevis*에서는 p42<sup>mapk</sup>가 hormone에 반응하여 G<sub>2</sub> 시기와 M 시기 사이에 머물러 있던 수정란의 성숙을 다시 유발시키는데 역할을 한다고 보고되었다<sup>20</sup>. 즉 MAP kinase는 세포의 주기가 변하기 위해서 필요로 하는 반응을 일으키는 과정에 관여함으로써 다음 stage로 넘어가도록 해주는 역할을 하리라는 것을 알 수 있다. 이와 같은 정상적인 세포의 주기 외에도 세포가 암으로 진행하는데 MAP kinase는 어떤 영향을 미칠 수 있는가에 대한 연구가 진행되고 있는데, 최근에는 MAP kinase kinase의 N-terminal 아미노산 32번 부터 51번까지를 제거하고 218번째 serine과 222번째 serine을 glutamic acid와 aspartic acid로 각각 바꿈으로써 정상적인 MAPKK의 활성보다 약 410배 정도 높은 활성도를 갖는 MAPKK를 만들어서 NIH/3T3 세포에 감염시켜 세포의 비정상적인 증식 형태가 나타나

는 것을 관찰함으로써 지속적이고 높은 MAPKK의 활성은 세포의 형질 전환과 관계가 있다고 한다<sup>20</sup>. 이와같이 신호 전달 체계에서 MAP Kinase의 역할은 정상적인 상태에서나 또는 세포가 암세포로 진행해가는 과정에서 그 역할이 매우 중요하다고 볼 수 있다. 그래서 암의 생성과 관련된 proto-oncogene들의 역할과 그 조절에 관한 이해를 위해서는 MAP Kinase에 대한 연구가 도움이 되리라 판단되므로, 진핵세포로부터 MAP kinase를 분리하고자 본 실험에서는 P388 murine leukemia 세포주로 부터 3 단계의 chromatography를 거쳐 MAP Kinase를 분리해내어 특징을 살펴보고 미생물에서 발현시킨 glutathion-s-transferase(GST) fusion protein에 분리한 MAP kinase를 처리하여 인산화 정도를 알아봄으로써 기질로서의 가능성을 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양 및 mitogen 처리

P388 murine leukemia 세포를 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 항온 항습기에서 5% fetal bovine serum이 첨가된 DMEM배지로 충분히 자라게 한 후, 혈청이 들어 있지 않은 DMEM배지에서 24시간 자라게 하고 여기에 mitogen으로 10% serum을 첨가하여 10분 배양하여 세포분열을 촉진시켰다.

### 2. 세포 파쇄액 준비

세포분열을 촉진시킨 세포를 1,500 rpm, 10 min, 4℃로 원심분리하여 상층액을 제거하고 STE 완충액 (150mM NaCl, 50mM Tris/Cl, 1mM EDTA)으로 2회 원심 분리로 세척한 다음, extraction 완충액 (20 mM Tris/Cl pH 7.5, 5mM EGTA, 0.5% triton X-100, 50mM β-glycerophosphate, 1mM PMSF, 6mM DTT, 1mM sodium orthovanadate)을 첨가하여 얼음에 30분 방치후 15,000 rpm, 15 min, 4℃로 원심분리하여 상층액만을 모아 세포 파쇄액으로 사용하였다. 전 과정은 얼음 위에서 실시하였다.

### 3. Column chromatography

#### 3-1. SP-sephadex C-50 column

세포 파쇄액을 완충액 A (20 mM Tris/Cl pH 7.4, 2 mM EGTA, 25 mM β-glycerophosphate, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate)로

평형시킨 SP-sephadex C-50 column (0.5×10cm)에 0.12 ml/min의 속도로 loading한 후, 0 M에서 1 M의 NaCl 농도구배로 용출시켰다. 용출액중 MAP kinase가 존재하는 분획을 anti-ERK1 antibody를 사용하여 확인한 후 그 분획만을 모아 완충액 B (20 mM Tris/Cl pH 7.4, 2 mM EGTA, 12.5 mM β-glycerophosphate, 1 mM PMSF, 2 mM DTT, 1 mM sodium orthovanadate, 0.5 M ammonium sulfate)로 평형시킨 후 농축하여 다음 column의 loading sample로 사용하였다.

### 3-2. phenyl superose column

SP-sephadex C-50 column으로부터 얻은 sample은 완충액 B로 미리 평형시킨 phenyl superose HR 5/5 column에 0.5 ml/min의 속도로 loading한 후, 0.5M에서 0M의 ammonium sulfate 농도구배로 용출시켰다. 위에서와 같은 방법으로 MAP kinase를 확인한 후 그 분획만을 모아 완충액 C (12.5 mM Tris/Cl pH 7.4, 12.5 mM β-glycerophosphate, 0.5 mM EGTA, 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 mM NaF, 2 mM DTT)로 평형시키고 농축하여 다음 column의 loading sample로 사용하였다.

### 3-3. Mono Q column

Phenyl superose column으로부터 얻은 sample은 완충액 C로 미리 평형시킨 Mono Q column에 1.0 ml/min의 속도로 loading한 후, 0 M에서 0.8 M NaCl 농도구배로 용출시켰다. 위에서와 같은 방법으로 MAP kinase를 확인한 후 그 분획만을 모아 농축하여 MAP kinase의 특성을 관찰하는데 사용하였다. MAP kinase의 활성화 정도는 분리별 각 분획에서 anti-phospho-specific MAP kinase antibody (NEB)를 사용하여 아래의 chemiluminescent 방법을 이용하여 확인하였다.

## 4. Western blotting

### 4-1. chemiluminescent substrate를 이용한 방법

각 단계에서 분리한 sample 18μl에 10 % gel 상에서 14 mA로 1시간 30분동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel을 transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol)에 30분간 방치한후 transfer buffer내에서 220 mA로 1시간 30분 진행시켜 nitrocellulose paper에 옮겼다. 이를 TBST용액 (10 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20)으로 5분간 3회 세척하고 blocking용액 (TBST+2% BSA)으로 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 TBST용액으로 5분간

3회 세척하고 blocking용액으로 인산화 된 MAP kinase에 대한 항체인 anti-phospho MAP kinase 항체를 1:1,000배로 희석하여 첨가한후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이것을 TBST용액으로 5분간 3회 세척하고 biotin이 부착된 anti-rabbit IgG항체를 1:10,000의 농도가 되게 blocking용액으로 희석한 후 첨가하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 TBST용액에 5분간 3회 세척하고 alkaline phosphatase가 결합된 streptavidin을 blocking용액으로 1:10,000 희석하여 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 nitrocellulose paper는 TBST용액으로 5분간 3회 세척하고 이어 assay buffer (0.1 M diethanolamine, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)로 5분간 2회 세척한후 chemiluminescence 기질액인 CSPD로 10분간 반응시켰다. 반응후에 nitrocellulose paper를 X-ray film에 1시간 노출시킨후 암실에서 현상하였다.

### 4-2. colorimetric substrate를 이용한 방법

세포 성장의 촉진 인자중 하나인 serum으로 시간별(0분, 10분, 1시간, 4시간, 12시간, 24시간)로 활성화시킨 세포 파쇄액을 SP-sephadex C-50, Phenyl superose fraction으로 분리한 후 anti-ERK1 항체로 확인하였다. 전기영동 및 Western blot은 위의 반응과 같이 진행시키고 anti-ERK1 항체로 반응이 끝난 nitrocellulose paper를 TBST용액으로 5 분간 3회 세척하고 alkaline phosphatase conjugation 용액 (100mM Tris/Cl pH 8.0, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>)에 NBT와 BCIP를 용해하여 빛을 차단한 후 10 분간 반응시켰다.

## 5. GST fusion protein의 subcloning 및 인산화 측정

MAP kinase의 기질로써 GST-fusion protein을 사용하고자 Winkler 등(1993)<sup>21)</sup>의 방법을 이용하여 실험하였다. pGEX-3Xb plasmid vector에 p56<sup>lck</sup>의 N-terminal 아미노산 77개를 coding하고 있는 DNA를 각각 wild type, 42번째 serine을 alanine으로 변이 시킨 것(S42A), 59번째 serine을 alanine으로 변이 시킨 것(S59A)을 집어넣은 것을 분양받아 *E.coli* DH5a 균주에 CaCl<sub>2</sub>를 이용하여 competent *E.coli*로 만든 뒤 42℃ heat shock을 가하여 형질전환(transformation)시켰다. 감염 후 plasmid가 제대로 삽입 되었는지를 확인하기 위해 50 μg/ml의 ampicillin이 첨가된 1% LB 한천배지(10 g trypton, 5 g yeast extract, 10 g NaCl, 1 ml 1 N

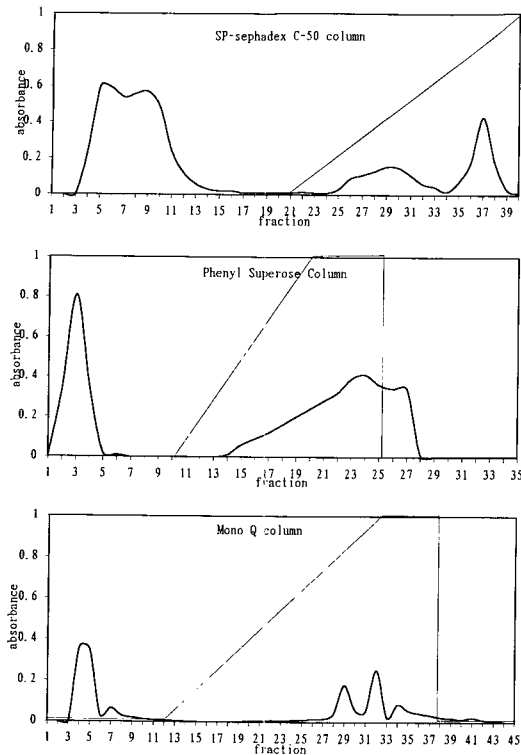


Fig. 1. Elution profiles of mitogen activated lysate from P388 murine leukemia cells by SP-sephadex C-50, Phenyl superose and Mono Q column.

NaOH, 10 g agar, pH 7.5 /L) 상에서 배양하여 자라는 집락만을 선택하여 LB broth에서 키운 뒤 miniprep을 실시하여 plasmid DNA만을 분리하였다. 분리되어진 plasmid DNA는 *EcoR* I, *EcoR* V endonuclease로 37°C에서 1시간씩 처리한 뒤 0.5 g/ml의 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel 상에서 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 254 nm파장의 transilluminator상에서 사진을 찍고 Polaroid film으로 현상하였다. 위와 같이 plasmid가 형질전환된 것이 확인된 대장균을 LB broth 100ml에 late-log 시기까지 자라게 한 뒤(595 nm에서 흡광도 0.6~0.8) IPTG가 최종농도 0.1 mM이 되도록 배지에 첨가한 뒤 2시간 가량 더 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 세균만을 모은 뒤 세균 g당 3 ml의 lysis 완충액(50mM Tris/Cl pH8.0, 1mM EDTA, 100mM NaCl)을 넣고 세균 덩어리들이 완전히 풀어지도록 흔든 뒤 세균 g당 50 mM의 PMSF 8µl, 10 mg/ml의 lysozyme 80 µl와 deoxycholic acid 4 mg을 넣고 37°C에서 10

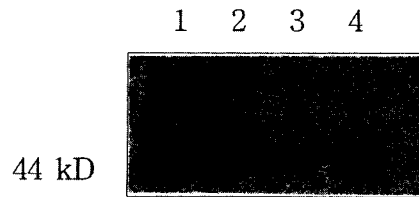


Fig. 2. Western blotting analysis of the fractionated samples from crude extract to Mono Q column by anti-ERK1 antibody using chemiluminescent substrate. lane 1: crude extract, lane 2: SP-sephadex C-50, lane 3: phenyl superose, lane 4: Mono Q.

분간 흔들며 섞는다. 3회 열렸다 녹임으로써 세균을 파쇄시키고 25,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 모았다. 상층액중의 GST fusion 단백질은 GST와 결합력이 있는 glutathione sepharose 4B를 첨가하여 실온에서 흔들어주면서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 원심분리하여 상층액을 버리고 남아있는 glutathione sepharose 4B를 PBS로 2번 씻어준 뒤 kinase 완충액 20µl와 분리된 MAP kinase fraction과 함께 30°C에서 10분간 반응시켰다. 반응의 종료는 sample 완충액을 넣어 실시하였고 끝이어서 전기영동과 western blotting을 실시한 후 anti-phospho-serine 단일항체를 이용하여 p56<sup>lck</sup> N-terminal의 인산화를 확인하였다.

## 결 과

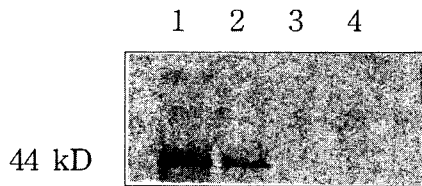
### MAP kinase의 분리 및 확인

SP-sephadex C-50 chromatography 결과 그림 1의 상단에서와 같이 waste에서 하나의 peak, gradient에서 두개의 peak를 얻어 각각을 농축하여 anti-ERK1 항체를 이용하여 MAP kinase 존재를 확인한 결과 waste에서 얻은 peak에서 MAP kinase가 확인되어 이것을 완충액 B로 평형시키고 phenyl superose에 loading하고 이어서 0.5M에서 0M의 ammonium sulfate 농도구배로 용출한 결과 그림 1의 중간에서와 같이 waste에서 하나의 peak, gradient에서 하나의 peak를 얻어 각각 농축하여 MAP kinase 존재를 확인한 결과 waste에서 얻은 peak에서 MAP kinase가 확인되었다. 이 peak 분획을 완충액 C로 평형시키고 Mono Q에 loading하고 이어서 0M에서 0.8M의 NaCl 농도구배로 용출한 결과, 그림 1의 하단에서와 같이 waste에서 얻은 peak에서 MAP kinase가 확인되었다. 그림 2에서는 분리 단계별로 얻은 분획에 대

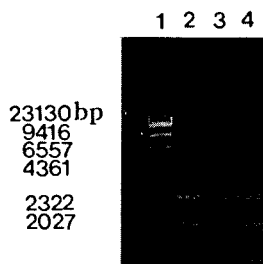
한 MAP kinase의 존재를 anti-ERK1 항체를 이용하여 관찰한 것으로, 이 때 44 kD의 band를 주로 확인하였으며 3-4 개의 교차 반응을 보인 분획들이 관찰되었다.

#### MAP kinase 인산화

Chromatography 결과로 MAP kinase가 확인된 분획을 가지고 anti-phospho MAP kinase 항체를 이용하여 MAP kinase의 인산화 결과를 확인한 결과 그림 3 에서 보듯이 그 활성화가 SP-sephadex C-50에서 얻은 분획까지 유지되고 phenyl superose 이후로 얻은 분획은 활성화가 유지 되지 않고 일정 시간이 지난 후 탈인산화가 된 것이 관찰되었다. Serum을 시간별로 처리하여 MAP kinase의 농도를 비교해 본 결과, 그림 4에서와 같이 10 분 후부터 44 kD의 MAP kinase의 농도가 증가하기 시작하여 세포 분열 시기인 24 시간 까지 세포내 존재하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 66 kD의 isoform이 P388 세포에서



**Fig. 3.** Western blotting analysis of the fractionated samples from crude extract to Mono Q column by anti phospho-specific MAP kinase antibody using chemiluminescent substrate. lane 1: crude extract, lane 2: SP-sephadex C-50, lane 3: phenyl superose, lane 4: Mono Q.

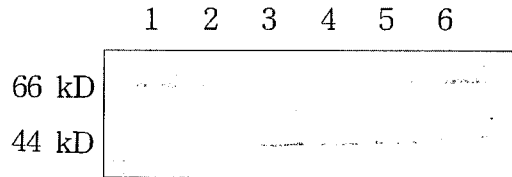


(A)

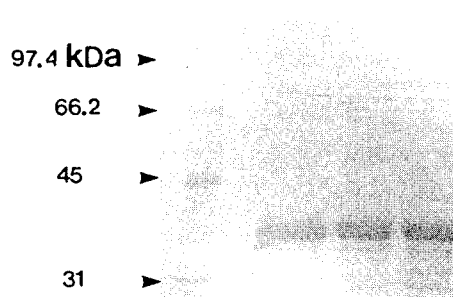
관찰되었는데, 농도 변화는 관찰할 수 없었다.

#### GST-fusion protein 발현 및 인산화

p56<sup>lck</sup>의 N-terminal 중 77개의 아미노산들을 coding하고 있는 DNA가 cloning되어있는 pGEX-3Xb plasmid vector를 형질전환 시킨 *E.coli*를 키워서 miniprep을 통해 plasmid 만을 추출하였다. 추출한 뒤 *EcoR* I 과 *EcoR* V endonuclease를 각각 1시간씩 처리하여 agrose gel상에서 전기영동한 결과 77개의 아미노산을 coding하고 있는 plasmid를 확인하여 N-terminal이 제대로 삽입되었는지를 확인하였다(그림 5.A). 또한 그림 5.B에서 보는바와 같이 p56<sup>lck</sup>의 N-terminal 중 77개의 아미노산들을 coding하고 있는 DNA가 IPTG induction을 통해 발현된 것을 확인하였다. 발현된 단백질은 26 kD의 GST와 결합된 상태로 발현되므로 77개의 아미노산을 coding하고 있는 DNA가 발현되면 분자량 약 35 kD 정도의 단백질이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이들 wild type 및 mutant들에 대한 MAP kinase의 인산화 정도는 그림 6 에서와 같이 wild type과 mutant(S42A)에

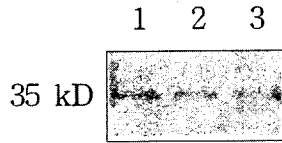


**Fig. 4.** Immunoblotting analysis of phenyl superose fraction by anti- ERK1 antibody using colorimetric substrate with mitogen activated time course. lane 1-6 : control, 10 min, 1 hr, 4 hr, 12 hr, 24 hr, respectively.



(B)

**Fig. 5.** Agarose gel electrophoresis of recombinant pGEX-3Xb plasmid treated with *EcoR* I and *EcoR* V restriction endonuclease(A) and SDS-PAGE of GST-fusion proteins that affinity purified by glutathion sepharose 4B(B). lane 1: Lambda DNA/*Hind* III digest(A) and low protein marker(B) lane 2: wild type 77 amino acid of p56<sup>lck</sup> N-terminal lane 3: mutant 77 amino acid of p56<sup>lck</sup> N-terminal(S42A) lane 4: mutant 77 amino acid of p56<sup>lck</sup> N-terminal(S59A).



**Fig. 6.** Phosphorylation of GST-fusion proteins by MAP kinase, purified from Mono Q column, using chemiluminescent substrate. lane 1: GST-77 wild type, lane 2: GST-77 mutant(S42A) lane 3: GST-77 mutant(S59A).

서 뚜렷이 볼 수 있었고 다른 mutant(S59A)에서는 비교적 약한 band를 확인 할 수 있어 MAP kinase의 specific substrate로써 활용 할 수 있는 가능성을 제시하였다.

## 고 찰

MAP kinase 분리 과정 중의 chromatography는 Gotoh등<sup>22)</sup>의 방법을 응용하여 실시하였다. Gotoh등의 연구에 따르면 두개의 chromatography를 이용한 two-step 분리 과정으로도 MAP kinase를 분리할 수 있으나, 다른 kinase들에 의한 오염이 완전히 제거되지 않는다고 보고하고 다른 부가적인 column의 사용을 권장하고 있다. 그래서 본 실험에서는 첫 째로 cation exchanger인 SP sephadex C-50를 사용하여 양전하를 띠고 있는 단백질만을 분리하여 농축하고, hydrophobic interaction으로 단백질을 분리하는 phenyl superose column을 이용하였다. 이어서 Mono Q column을 써서 3단계의 chromatography를 통하여 최종적으로 모아진 분획은 세포 파쇄 상층액을 anti-ERK1 항체로 western blot을 실시했을 때 보여지던 3~4개의 isoform band들이 제거가 되고 2개의 band가 나타나므로 chromatography를 통하여 44kD와 66kD의 MAP kinase가 분리되어진 것으로 판단되어 2 개의 isoenzyme의 존재를 확인할 수 있었다. 현재까지 알려진 MAP kinase의 isoform으로는 몇몇의 동물세포에서 42, 44, 54kDa의 분자량을 갖는 kinase들이 보고되었으며<sup>12,13)</sup> 이들은 모두 기질의 serine과 threonine 아미노산을 인산화 시키는 serine/threonine kinase family에 속한다<sup>2)</sup>. 이러한 kinase들의 in vitro상에서의 기질로는 MBP나 MAP2에 가장 인산화를 잘 시키는 것으로 보고되었다<sup>23)</sup>. 또한 MAP kinase는 자기 자신의 tyrosine과 threonine 부위에 자가 인산화 및 MAP kinase kinase로부터 인산화 되어야

활성을 나타내는 특성을 갖고 있고<sup>1)</sup> 하위과정의 단백질에 신호를 전달한 뒤는 곧바로 탈인산화 되어 활성이 떨어진다. 본 연구에서는 44 kD, 66 kD의 serine/threonine kinase가 분리되어져 P388 세포에서 또다른 MAP kinase의 isoform들을 확인할 수 있었다. 분리 과정중 인산화 정도를 확인 하기 위해서는 anti phospho-specific MAP kinase 단일 항체를 이용하여 western blot을 통해 확인 하였다. Western blot 후 최종 발색 과정에서는 chemiluminescence 방법을 이용하여 x-ray film에 2시간 정도 노출시켰다. 이 방법은 민감도가 뛰어나 gel shifting등을 관찰하고자 할 때 효과적이라고 보고되었으나<sup>24)</sup>, 배경이 깨끗하지 못한 단점도 나타내었다. 그림 4 에서와 같이 분리 과정중 점차로 탈 인산화되어 phenyl superose column 과정에서 부터는 인산화 정도를 관찰할 수 없어 분리 과정에서의 시간을 최소화 할 필요성을 나타내었다. MAP kinase의 기질로 사용될 수 있는 단백질을 이해하는 것이 여러 성장인자, cytokine, hormone등으로 부터 유발된 신호에 의한 신호전달 체계에서 MAP kinase의 역할을 이해하는데 도움이 되리라 생각된다. 활성화된 MAP kinase에 의해 인산화 되는 세포 내의 물질로는 MAP kinase를 인산화 시키는 MAP kinase kinase와 MAP kinase kinase kinase등의 다른 protein kinase<sup>17)</sup>들과 핵 내의 c-Myc, c-Jun, c-Fos등이 transcription factor등을 들 수가 있고<sup>10,25)</sup> 또한 cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>나 세포 표면의 수용체<sup>19)</sup>, tyrosine hydroxylase<sup>26)</sup>등을 들 수 있다. 즉 MAP kinase는 세포 외부로 부터의 물질과 결합하여 처음 신호를 생성해내는 수용체와 그것을 받아 하위 과정으로 전달해주는 여러 protein kinase들 그리고 최종적으로 핵내의 유전자에서 전사과정을 일으키는 transcription factor등을 인산화하는 세포내 신호전달 과정의 중요한 매개체이다. In vitro상에서의 MAP kinase의 기질로 선택되고 있는 것으로는 myelin basic protein (MBP)을 들 수 있는데, bovine MBP의 sequence중 Thr-Pro-Arg-Thr<sup>77)</sup>-Pro-Pro-Pro과 같은 triproline loop에 존재하는 97번째 threonine을 MAP kinase가 주로 인산화하는 것으로 보고되었다<sup>27)</sup>.

한편 MAP kinase에 의해서 인산화가 일어나는 것으로 보고되어진 p56<sup>lck</sup>의 N-terminal은 prokaryotic expression vector인 pGEX-3Xb plasmid에 삽입하였다. Plasmid가 제대로 형질 전환 되었는지

는 ampicilin이 첨가된 LB broth상에서 키운 균주를 모아 miniprep을 통해 plasmid만을 분리하고 *EcoR* I, *EcoR* V endonuclease를 각각 1시간씩 처리하여 agarose gel상에서 band pattern을 관찰함으로써 확인할 수 있었다. 형질 전환이 확인되어진 균주를 지수증식기 후반부까지 키운 뒤 IPTG로 induction시키고 glutathione sepharose 4B를 이용하여 GST-fusion 단백만을 분리할 수 있었다. 분리되어진 단백질은 분자량 26kDa의 GST와 결합되어 생성되므로 77개의 아미노산은 약 35kD 임을 전기영동을 통해 확인하였다. 또한 분리 시간을 최소로 단축하여 최종 분리단계인 Mono Q column에서 얻은 분획을 GST-fusion protein에 처리하여 인산화되는 정도를 분석한 결과, wild type 과 mutant(S42A)에서 비교적 뚜렷이 나타났으며 mutant(S59A)에서는 비교적 약한 band를 확인할 수 있어 이들 GST-fusion protein 들이 MAP kinase의 specific substrate로써의 가능성을 제시할 수 있었으며 in vitro 상에서 유일하게 기질로 선택되는 MBP<sup>27)</sup>가 비교적 여러개의 band를 나타내는것에 비해 단일한 band 형태로 구별하기가 쉬운 장점도 제시할 수 있었다. 최근에는 MAP kinase kinase의 N-terminal 일부를 제거하고 인산화되는 두 곳의 serine을 변이시켜 약 410배 정도의 증가된 활성을 갖는 효소를 발현할 수 있는 DNA가 삽입된 vector를 NIH/3T3 세포에 transfection하면 세포의 형태가 transformation되는 실험이 보고된 바 있다<sup>20)</sup>. 즉 계속적으로 증가된 활성을 갖는 MAP kinase의 신호 전달 과정은 세포가 암세포로 진행하는데 영향을 줄 수 있다는 사실을 나타내주고 있다. 현재까지 MAP kinase를 경유한 신호 전달 체계에 대한 조절 과정은 phosphatase등에 의한 탈 인산화 과정으로 kinase 활성이 감소되는 것과 MAP kinase에 의한 raf-1과 MAP kinase kinase의 과도한 인산화가 raf-1과 MAP kinase kinase의 활성을 떨어뜨리는 것으로 보고되어 MAP kinase가 MAP kinase kinase kinase나 MAP kinase kinase보다 신호전달 과정의 하위에 존재할 뿐만 아니라 feedback 조절작용을 통해 이들을 조절할 수 있는 것으로 보고되었다<sup>17)</sup>. 본 실험에서 발현시킨 p56<sup>lck</sup>도 T 임파구의 CD4의 세포질내 부분과 반응하여 CD4로부터 신호를 전달받는 세포질내 효소로 알려져 있는데, 이러한 효소도 in vitro상에서 MAP kinase에 의한 인산화가 일어나는 것이 보고되었으므로<sup>21)</sup>

MAP kinase를 통한 신호전달 과정은 복잡한 기전을 갖고 있다고 볼 수 있다.

앞으로의 실험은 MAP kinase가 세포내의 어느 위치의 단백질들을 인산화 시키며, 인산화된 단백질들은 결국 어떤 작용을 일으키는가와 MAP kinase가 비교적 빠른 시간내에 탈 인산화되어 활성이 떨어지게 되는 요인에 대한 분석을 시도하는 것이 필요하다고 본다.

## 참 고 문 헌

1. Ray LB and Sturgill TW (1988): Characterization of Insulin-stimulated Microtubule-associated Protein Kinase. *J Biol Chem*, **266**: 12721-12727.
2. Pelech SL and Sanghera JS (1992): Mitogen-activated protein kinases : versatile transducers for cell signaling. *TIBS*, **17**: 233-238.
3. Bird TA, Sleath PS, deRoos PC, Dower SK and Virca GD (1991): Interleukin-1 represents a new modality for the activation of extracellular signal-regulated kinases/microtubule-associated protein kinases. *J Biol Chem*, **266**: 22661-22670.
4. Levin DE and Errede B (1993): A Multitude of MAP Kinase activation pathways. *J NIH Research*, **5**: 49-52.
5. Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR and Avruch J (1992): Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, **358**: 417-421.
6. Posada JNY, Ahn N, vandeWoude GF and Cooper JA (1993): Mos stimulates MAP kinase in *Xenopus* oocytes and activates a MAP kinase kinase in vitro. *Mol Cell Biol*, **13**: 2546-2553.
7. Lange-carter CA, Pleiman CM, Gardner AM, Blumer KJ and Jonson GL (1993): A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf *Science*, **260**: 315-319.
8. Posada J and Cooper JA (1991): Requirement for Phosphorylation of MAP Kinase during Meiosis in *Xenopus* Oocytes. *Science*, **255**: 212-215.

9. Her JH, Lakhani S, Zu K, Vila J, Dent P, Sturgill TW and Weber MJ (1993): Dual phosphorylation and autophosphorylation in mitogen-activated protein(MAP) kinase activation. *Biochem J*, **296**: 25-31.
10. Chem RH, Sarnecki C and Blenis J (1992): Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Mol Cell Biol*, **12**: 916-927.
11. Sturgnill TW, Ray LB, Erikson E and Maller JL (1988): Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. *Nature*, **334**: 715-718.
12. Kyriakis JM, Brautigan DL, Ingebritsen TS and Avruch J (1991): pp54 Microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity *J Biol Chem*, **266**: 10043-10046.
13. Sanghera JS, Paddon HB, Bader SA and Pelech SL (1990): Purification and characterization of a maturation-activated myelin basic protein kinases from sea star oocytes. *J Biol Chem*, **265**: 52-57.
14. Charles CH, Sun H, Lau LF and Tonks NK (1993): The growth factor-inducible immediate-early gene 3CH134 encodes a protein-tyrosine-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 5292-5296.
15. Noguchi T, Metz R, Chen L, Mattei MG, Carrasco D and Bravo R (1993): Structure, mapping, and expression of *erp*, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of *erp* on cell growth. *Mol Cell Biol*, **13**: 5195-5205.
16. Rohan PJ, Davis P, Moskaluk CA, Kearns M, Krutzsch H, Siebenlist U, Kelly K (1993): PAC-1 : A mitogen-induced nuclear protein tyrosine phosphatase. *Science*, **259**: 1763-1766.
17. Ueki K, Matsuda S, Tobe K, Gotoh Y, Tamemoto H, Yach M, Akanuma Y, Yazaki Y, Nishida E and Kadowaki T (1994): Feedback regulation of mitogen-activated protein kinase kinase activity of *c-raf-1* by insulin and phorbol ester stimulation. *J Biol Chem*, **269**: 15756-15761.
18. Davis RJ (1993): The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, **268**: 14553-14556.
19. Makajima T, Kinoshita S, Sasagawa T, Sasaki K, Naruto M, Kishimoto T and Akira S (1993): Phosphorylation at threonine 235 by a *ras*-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 2207-2211.
20. Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Cundia JM, Rong S, Fukasawa K, vandeWoude GF and Ahn NG (1994): Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science*, **265**: 966-969.
21. Winkler DG, Park ID, Kim TU, Payne NS, Walsh CT, Strominger JL and Shin JK (1993): Phosphorylation of Ser-42 and Ser-59 in the N-terminal region of the tyrosine kinase p56<sup>lck</sup>. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 5176-5180.
22. Gotoh Y, Nishida E, Yamashita T, Hoshi M, Kawakami M and Sakai H (1990): Microtubule-associated-protein(MAP) kinase activated by nerve growth factor and epidermal growth factor in PC12 cells. *Biochem J*, **193**: 661-669.
23. Tobe K, Kadowaki T, Tamemoto H, Ueki K, Hara K, Koshino O, Momomura K, Gotoh Y, Nishida E, Akanuma Y, Yazaki Y and Kasuga M (1991). Insulin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate activation of two immunologically distinct myelin basic protein/Microtubule-associated protein 2 (MBP/MAP2) kinases via de novo phosphorylation of threonine and tyrosine residues. *J Biol Chem*, **266**: 24793-24803.
24. Gillespie PG and Hudspeth AJ (1991): Chemiluminescence detection of protein from single cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 2563-2567.
25. Seth A, Gonzalez FA, Guptu S, Raden DL and Davis RJ (1992): Signal transduction within the nucleus by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **34**: 24796-24804.
26. Haycock JW, Ahn NG, Cobb MH and Krebs EG (1992): ERK1 and ERK2 two microtubule-associated protein 2 kinases mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**: 2365-



- 2369.
27. Erickson AK, Payne DM, Martino PA, Rosomando AJ, Shabanowitz J, Weber MJ, Hunt DF and Sturgill TW (1990): Identification by mass spectrometry of threonine 97 in bovine myelin basic protein as a specific phosphorylation site for mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, **265**: 19728-19735.

**=Abstract=**

**Purification and Characterization of Mitogen -Activated Protein (MAP) Kinase  
from Mammalian Tissue Cells**

**Tae-Ue Kim<sup>†</sup>, Dong-Ju Jung and Yoon-Suk Kim**

*Dept. of Medical Technology, College of Health Science, Yonsei University,  
Wonju 222-701, Korea*

MAP kinases are a family of serine/threonine specific protein kinases becoming activated in response to different proliferative stimuli by phosphorylation at both threonine and tyrosine residue. Present study shows that MAP kinase was purified from P388 murine leukemia cells by SP sephadex C-50, phenyl superose and Mono Q column chromatography and identified with anti-ERK1 antibody by western blotting. Immunoblotting analysis to the crude extract of P388 cell lysate shows 44 kD and other minor bands but partial purified fraction eluted from phenyl superose column have 44kD and 66 kD isoform. Subcloned GST-fusion protein from N-terminal of p56<sup>lck</sup> was tested as a substrate for MAP kinase phosphorylation. It was showed that the wild type and mutant forms(S42A) were fully phosphorylated by purified MAP kinase fraction as compare with the other mutant form(S59A). This finding suggest that those GST-fusion proteins may be used as substrate for the in vitro test of MAP kinase.

**Key Word:** MAP kinase, Purification, GST-fusion protein.

[Korean J. Biomed. Lab. Sci. 2(1): 21-30, June 1996]

---

<sup>†</sup>Corresponding author