

## Synaptobrevin (VAMP) 유전자의 대장균에서의 발현 및 *Clostridium botulinum* type B 독소에 의한 절단

정현호\* · 양기혁 · 이상달 · 양규환

\*선문대학교 자연과학대학 미생물학과, 한국과학기술원 생명과학과

## Expression of Mouse Synaptobrevin (VAMP) Gene in *E. coli* and its Cleavage by the *Clostridium botulinum* type B Toxin

Hyun Ho Jung\*, Gi-Hyeok Yang, Sang Dal Rhee and Kyu-Hwan Yang

\*Department of Microbiology, Sunmoon University, Asan 336-840, Korea  
Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of  
Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

(Received November 1, 1997)

(Accepted December 2, 1997)

**ABSTRACT** : Synaptobrevin is a kind of vesicle associated membrane proteins (VAMPs) which plays a secretory role in the neuronal synapse and was recently known as the biochemical target of botulinum neurotoxin type B. The structural gene of the synaptobrevin was cloned from mouse brain using RT-PCR technique and was sequenced. The deduced amino acid sequence showed that the synaptobrevin protein from mouse brain is exactly the same with that of the rat brain in the amino acid level. The synaptobrevin gene was subcloned into pET3a vector and expressed in *E. coli*. The molecular weight of the recombinant protein was 19 kDa as expected. Moreover, when the recombinant synaptobrevin protein was incubated with the native neurotoxin of *Clostridium botulinum* type B, it was cleaved by the toxin in a time dependent manner. This implies that the recombinant synaptobrevin protein and the native toxin are reacted in the same way as the native synaptobrevin did in the neuronal cells.

**Key Words** : Synaptobrevin, VAMP, RT-PCR, Botulinum toxin

### I. 서 론

*Clostridium botulinum*은 Gram 양성 간균형태의 세균으로서 혈청학적으로 서로 다른 7가지 종류의 단백질 독소를 만들어내며(A형부터 G형까지), 이들 독소들은 구조 및 기능 면에서 매우 유사한 것으로 알려졌다(Sugiyama, 1980). 이들 신경독소들은 처음엔 하나의 단백질 사슬로 만들어지나 바로 두 개의 하위 단위사슬로 나누어지며, 이들을 각각 H(heavy) chain(Mr 100 kDa)과 L(light) chain(Mr 50 kDa)이라고 한다. H chain은 신경세포에 결합하여 L chain을 세포 안으로 넣는 역할을 하며, L chain이 실제로 신경세포로부터 신경전달 물질의 분비를 막음으로써 신경마비를 유발하는 것으로 알려졌다(Smith 등, 1988).

한편, synaptobrevin은 synaptic vesicle 막표면에 존재하는 integral membrane protein으로서 외부의 자극에 따

라 신경전달물질을 싸고있는 synaptic vesicle을 신경접합부위로 이동시킴으로써 신경전달물질을 분비하는 과정에 관여한다고 알려졌다(McMahon 등, 1993). 최근 수년동안에 B형, D형, F 및 G형 botulinum 독소와 tetanus 독소의 표적 단백질이 synaptobrevin(VAMPs)으로 보고되었으며, 또 A형과 E형 botulinum 독소의 표적 단백질은 SNAP-25 (synaptosomal associated protein, 25 kDa)라는 단백질임이 밝혀졌다(Blassi 등, 1993; Binz 등, 1994; Schiavo 등, 1994; Yamasaki 등, 1993).

이전까지는 신경독소인 botulinum 독소의 독성 기작을 설명하는데 있어서 다음 3단계 기작이 광범위하게 받아들여져 왔다(Simpson 등, 1986). 1) botulinum 독소의 heavy chain이 neural membrane에 결합한 다음에 전체 독소가 세포 내부로 들어가는 endocytosis가 일어남, 2) 이후에 독소의 heavy chain과 신경 세포막과의 상호작용으로 membrane pore가 만들어짐, 3) 이 구멍을 통

해서 독소의 light chain만이 신경 세포의 세포질 내부로 들어가서 신경전달물질의 분비를 막음. 즉, 이제까지는 이런 과정을 통하여 botulinum 독소가 신경 마비를 유발시킬 것이라고 짐작했을 뿐, 그 자세한 기작에 대해서는 알지 못했었다. 따라서, 최근의 연구 결과로 B형 botulinum 독소의 light chain이 일종의 단백질 분해효소로 작용하여 synaptobrevin을 자르는 효소적 기능이 있음이 밝혀진 이상, synaptobrevin 단백질과 B형 botulinum 독소의 구조 및 그 작용기작간의 상관관계를 알기 위해서는 B형 botulinum 독소의 유전자와 함께 synaptobrevin 유전자의 클로닝이 필요하게 되었다.

본 연구에서는 B형 botulinum 독소의 효소적 기질로 알려진 synaptobrevin의 구조 유전자를 마우스 뇌조직으로부터 분리하여 *E. coli*에서 발현시키고, 이를 이용하여 B형 botulinum 독소와의 상관관계를 살펴보고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 배지 및 시약

대장균을 키우기 위한 배지로는 LB배지(bactotryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 1 g per 1 Liter)와 Super Broth(bactotryptone 125 g, yeast extract 150 g, NaCl 50 g per 1 Liter)를 용도에 따라서 사용하였으며, 제한효소들 및 T4 DNA ligase는 Promega(USA)사에서, Taq polymerase는 NEB(USA)사에서 구입하였다. 한편, RT-PCR은 GIBCO BRL(USA)사의 SuperScript Preamplification System을 구입하여 사용하였다. Agarose는 FMC(USA) 제품을 사용하였고, 그 외 전기영동에 필요한 시약들은 Sigma(USA)사의 제품을 사용하였다. Blotting용 nitrocellulose membrane은 Hoeffler(USA)사의 제품을 사용하였고, anti-synaptobrevin 항체는 NIH(USA)에 계시는 진혜민 박사님으로부터 제공받았다. 그 외 alkaline phosphatase가 결합된 anti-rabbit 항체 및 Western blotting에 필요한 시약들은 Sigma(USA)사의 제품들을 구입하여 사용하였다.

### 2. total RNA의 분리 및 RT-PCR

Synaptobrevin 유전자를 클로닝 하기 위한 RT-PCR을 위해서 마우스(Balb/c)의 뇌조직을 외과적으로 추출한 다음에, Chomczynsky 방법을 응용하여 total RNA를 분리하였다(Chomczynsky, 1987). PCR에 사용될 primer로서는 이미 알려져있는 rat과 human synaptobrevin의 염기서열로부터 homology가 가장 높은 부

위를 선택하여 한국생공으로부터 합성하였다. 이때, 합성될 DNA 조각의 5'쪽과 3'쪽 각각에 제한효소 NdeI과 BamHI site를 집어넣어서, 차후 발현벡터로의 클로닝을 용이하게 하였다. 다음은 RT-PCR에 이용되었던 primer들의 염기 서열이다.

RSVS1 : 5'-CATATGTCGGCTACCGCTGCCACC-3'

RSVAS1 : 5'-GGATCCTTAAGTGCTGAAGTAAAC-3'

### 3. 균주 및 plasmid

Transformation 및 subcloning을 위한 대장균 균주로는 DH5 $\alpha$ 를 사용하였고 발현용 대장균 균주로는 BL21( $\lambda$ DE3)을 사용하였다. 한편, synaptobrevin 단백질을 발현하기 위한 벡터로는 박테리오파지 T7 프로모터를 가진 pET-3a plasmid를 사용함으로써, 클로닝된 synaptobrevin 단백질이 원래의 아미노산 서열과 똑같이 발현되도록 하였다.

### 4. synaptobrevin 재조합 단백질 발현용 벡터의 제조 및 DNA sequencing

유전자의 클로닝을 위한 DNA 재조합 기술과 재조합 단백질의 발현기술은 Sambrook등이 저술한 Molecular Cloning(1989)에 근거하여 사용하였다. 먼저, RT-PCR에 의하여 증폭된 synaptobrevin 유전자를 포함한 DNA 절편을 agarose 겔에서 분리한 후에 BamHI 과 NdeI으로 처리하여 cohesive ends를 만들고, 이를 순수 분리하였다. 발현벡터로 이용한 pET-3a plasmid도 제한효소 BamHI 과 NdeI으로 처리한 후, agarose 겔에서 전기영동하고 다시 순수분리 하였다. 이들 순수 분리된 두 DNA 절편을 T4 DNA ligase로 결합시킨 뒤에 BL21( $\lambda$ DE3)균주에 형질전환시키고, 형질전환된 대장균 균주를 ampicillin이 들어간 선택배지에서 분리하였다. 마지막으로 synaptobrevin 구조 유전자가 들어간 클론을 제한효소 BamHI 과 NdeI으로 잘라보고, synaptobrevin 유전자가 들어간 것으로 확인된 클론으로부터 정확한 염기배열을 확인하기 위해서, dideoxy termination 방법을 사용하여 염기서열을 결정하였다.

### 5. synaptobrevin 재조합 단백질의 발현 및 Western blotting

Synaptobrevin 재조합 단백질 유전자를 가지고 있는 대장균 균주를 ampicillin과 chloramphenicol이 들어있는 LB배지에 접종하여 하룻밤 동안 37°C에서 키우고,

새로운 super broth배지에 1:100으로 희석하여 접종한 다음, 600 nm 파장에서 흡광도가 0.4에 이를 때까지 배양한 후, 1 mM의 IPTG를 첨가하여 synaptobrevin 단백질의 생산을 유도하였다. 생산된 단백질의 분석은 13% SDS-polyacrylamide 젤 전기영동(SDS-PAGE)과 Western blotting법을 이용하였다(Towbin 등, 1979).

**6. Botulinum 독소에 의한 재조합 synaptobrevin 단백질의 절단효과 분석**

Synaptobrevin 발현 plasmid를 가지고 있는 대장균 균주에 IPTG를 처리한 후, 90분이 지나서 전체 대장균 세포를 원심분리하여 수확하였다. 수확된 대장균 세포는 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.2) 용액에 풀어서 육안으로 투명성이 증가할 때까지 sonication을 수행하였다. 이후 충분히 파쇄된 대장균 용액 20 µl을 따라서 0.1 µg의 botulinum 독소와 섞어준 다음에 37°C에서 반응을 시킨 후, 2X sample buffer를 넣어서 반응을 정지 시켰다.

**III. 결과 및 고찰**

**1. 마우스 뇌조직으로부터 분리한 total RNA로부터 synaptobrevin 유전자의 클로닝 및 DNA 염기서열 분석**

분리된 마우스 뇌조직의 total RNA로부터 RSVS1, RSVAS1 두 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였으

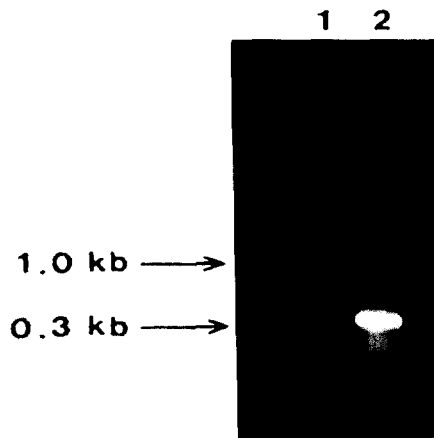


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR product. Total RNAs derived from mouse brain was used as a template. Primers derived from the synaptobrevin sequences of the rat brain were used after reverse transcription. Lane 1; Molecular weight marker, Lane 2; Product after RT-PCR of mouse synaptobrevin(10 ul was loaded).

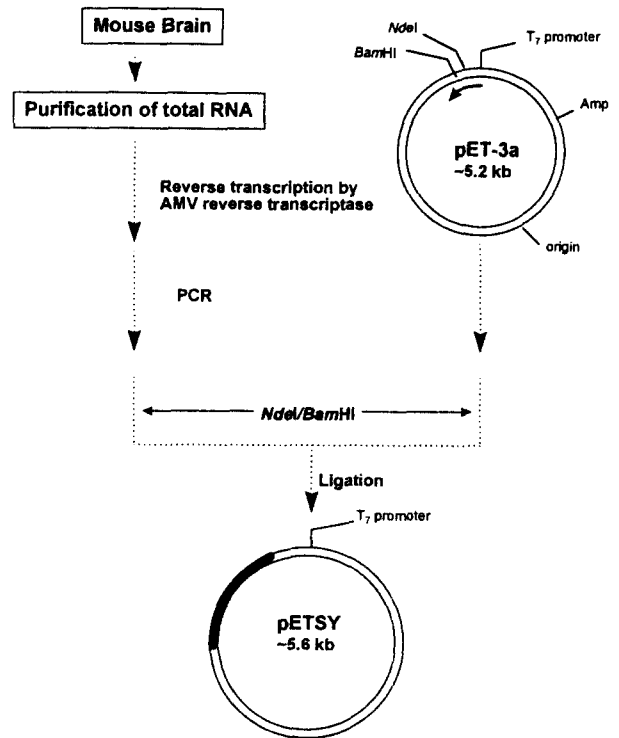


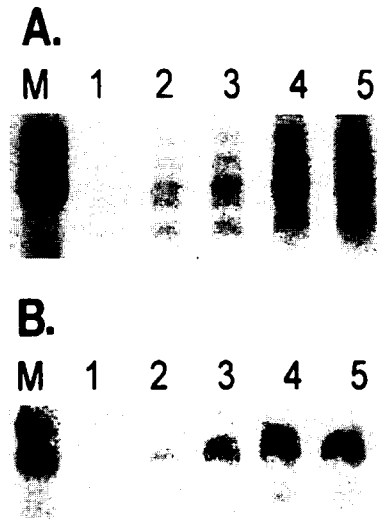
Fig. 2. Construction scheme for an expression plasmid pETSY to produce synaptobrevin recombinant protein under the control of T7 promoter using pET-3a plasmid in *E. coli*

며(Taq polymerase를 뺀 PCR 반응 용액을 95°C에서 5분 동안 반응시킨 후에 Taq polymerase를 넣고 55°C 2분, 72°C 2분, 93°C 2분, 30회 반복), 그 결과 Fig. 1에서 보이는 것처럼 예상된 밴드를 확인할 수 있었다(약 350 bp). PCR 산물을 agarose 젤에서 전기영동한 후, 분리 정제를 하고, pET3a 발현벡터에 subcloning 하여 재조합 plasmid pETSY를 만들었다(Fig. 2).

한편, 클로닝된 synaptobrevin 구조 유전자의 염기서열을 분석한 결과(염기서열 비교결과는 보여지지 않음), 기존에 알려진 백서의 뇌에서 유래된 synaptobrevin과 우리가 RT-PCR 방법으로 분리한 마우스의 synaptobrevin은 DNA 염기서열에 있어서 모두 세부위에서 차이가 났지만, 이것을 다시 아미노산 서열로 해독해보았을 때는 전혀 차이가 없었다. 이것은 뇌에서 신경전달에 중요한 역할을 하는 단백질인 synaptobrevin이 같은과에 속하는 백서와 마우스에서 잘 보존되어 있음을 시사한다.

**2. Synaptobrevin 재조합 단백질의 발현 및 botulinum 독소에 의한 절단효과 검색**

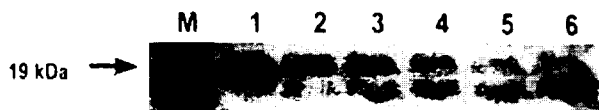
pETSY plasmid가 들어있는 BL21(λDE3) 균주를 1



**Fig. 3.** Expression of synaptobrevin protein in *E. coli*. (A); SDS-PAGE. (B); Western Blotting. Lane 1; *E. coli* containing pET-3a, uninduced, Lane 2-Lane 5; *E. coli* containing pETSY induced with IPTG(1mM) for 20, 40, 60, 80 min. respectively.

mM IPTG가 들어있는 Super Broth에서 배양한 후에 수확하여 SDS-polyacrylamide 젤 전기영동 및 Western-blotting한 결과는 Fig. 3에 나타냈다. 먼저 SDS-polyacrylamide 젤상에서는 IPTG로 induction한 후 약 60여분 후부터 synaptobrevin 단백질 예상 위치(Mr, 19 kDa)에서 진한 밴드가 보여지고 있다(A). 이것을 anti-synaptobrevin 항체를 가지고 확인한 Western-blotting 결과에서도 IPTG 처리 후에 SDS-PAGE에서 진행되는 밴드가 확실한 synaptobrevin 단백질임을 보여주고 있다(B).

한편, 이렇게 만들어진 재조합 synaptobrevin 단백질이 botulinum 독소의 기질로 이용됨으로써 생화학적으로도 동일한 단백질인가를 확인하기 위해서 botulinum 독소에 의한 절단 효과를 확인하였다(Fig. 4). 같은 양의 대장균 파쇄액에(20  $\mu$ l) botulinum 독소를 처리한 후, SDS-PAGE 전기영동 후에 0.5% Coomassie brilliant blue 염색용액으로 확인하였을 때는 gel상에서 뚜렷한 밴드의 변화를 확인 할 수가 없었다. 하지만 같은



**Fig. 4.** Immunodetection of the cleavage of the synaptobrevin protein by Western blotting. For each lane, 20  $\mu$ l of the whole cell lysate after IPTG induction was incubated with 0.1  $\mu$ g of the native toxin. After the incubation, reactions were stopped by adding sample buffer. The samples were resolved by SDS-PAGE and immunoblotted with antibodies against synaptobrevin. Lane 1; without the botulinum toxin, Lane 2-Lane 6; incubated with the botulinum toxin for 20, 40, 60, 80, 100 min., respectively.

gel을 Western blotting하여 확인하였을 때는 Fig. 4에서 보이는 것처럼 시간이 지남에 따라 synaptobrevin 밴드가 변동되고 있음을 보여주고 있다.

이상의 연구 결과로부터 우리가 발견시킨 마우스 뇌 조직 유래의 synaptobrevin 단백질은 비록 DNA 염기배열이 세균대에서 다르긴 하지만, 이미 알려진 백서 뇌 조직에서 유래된 synaptobrevin 단백질과 아미노산 수준에서는 동일한 단백질이며, 따라서 B형 botulinum 독소의 기질로서 사용될 수 있음을 알 수 있다. 이 결과로 보아 B형 botulinum 독소 외에 tetanus 독소, D, F, G형 botulinum 독소들도 pETSY로부터 나오는 synaptobrevin을 절단할 수 있으리라 기대된다. 또, 본 연구팀은 이미 B형 botulinum 독소를 클로닝하여 유전자를 확보하고있기 때문에(Jung 등, 1992) 마우스 뇌조직 유래의 synaptobrevin 유전자의 클로닝 및 발현 결과는 앞으로 B형 botulinum 독소와 synaptobrevin과의 상관관계를 구체적으로 살펴볼 수 있는 수단을 제공할 뿐만 아니라, 지금까지의 in vivo assay를 대체하는 in vitro botulinum toxin assay 개발에도 기여하게 될 것이다.

## 감사의 말씀

이 논문은 1995년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

## REFRENECES

- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Sudhof, T.C., Jahn, R. and Niemann, H., (1994): Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins, *J. Biol. Chem.*, **269**, 1617-1620.
- Blasi, J., Chapman, E.R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., Camilli, P.D., Sudhof, T.C., Niemann, H. and Jahn, R. (1993): Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25, *Nature*, **365**, 160-163.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987): Purification of RNA, *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159
- Jung, H. H., Rhee, S. D., and Yang, K. H (1992): Cloning of a Clostridium botulinum type B toxin gene fragment encoding the N-terminus of the heavy chain, *FEMS Microbiol. Lett.*, **91**, 69-72.
- McMahon, H.T., Ushkaryov, Y.A., Eelmann, L., Link, E., Binz, T., Niemann, H., Jahn, R. and Sudhof, T. C. (1993): Cellubrevin is a ubiquitous tetanus toxin substrate homologues to a putative synaptic vesicle fusion protein, *Nature*, **364**, 346-349.

- Sambrook, J., Fritsh, E.F., Maniatis, T. (1889): Molecular Cloning, 2nd. Ed., Cold Spring Harbor, Laboratory Press, New York, USA.
- Schiavo G., Benfenati F., Poulain B., Rossetto O., Laureto P.P., DasGupta B. R. and Montecucco C. (1992): Tetanus and botulinum-B neurotoxin block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin, *Nature*, **359**, 832-835.
- Schiavo G., Maligio, C., Trimble, W.S., Laureto P.P., Milan, G., Sugiyama, H., Johnson, E.A. and Montecucco C. (1994): Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond, *J. Biol. Chem.*, **269**, 20213-20216.
- Simpson, L.L. (1986): Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **26**, 427-453.
- Smith, L.D.S. and Sugiyama, H. (1988): Botulism: The Organism, Its toxin, The Disease. 2nd edn., Charles C. Thomas, Springfield, USA.
- Sugiyama, H. (1980): Microbial Toxins, *Microbiol. Rev.*, **44**, 419-448.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and application. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4353.
- Yamasaki, S., Baumeister, A., binz, T., Blasi, J., Link, E., Cornille, F., Roques, B., Fykse, E.M., Sudhof, T.C., Jahn, R. and Niemann, H. (1993): Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulin neurotoxins and tetanus toxin, *J. Biol. Chem.*, **269**, 12764-12772.