

세포내 소수성 물질 이동에서 막과 세포내 결합단백질의 역할 : 지방산 결합 단백질과 장쇄 지방산

김 혜 경

한서대학교 식품생물공학과

The Role of Membranes and Intracellular Binding Proteins in Cytoplasmic Transport of Hydrophobic Molecules : Fatty Acid Binding Proteins and Long Chain Fatty Acids

Kim, Hye-Kyung

Department of Food and Biotechnology, Hanseo University, Seosan, Chungnam, Korea

ABSTRACT

Path of a small hydrophobic molecule through the aqueous cytoplasm is not linear. Partition may favor membrane binding by several orders of magnitude ; thus significant membrane association will markedly decrease the cytosolic transport rate. The presence of high concentration of soluble binding proteins for these hydrophobic molecules would compete with membrane association and thereby increase transport rate. For long chain fatty acid molecules, a family of cytosolic binding proteins collectively known as the fatty acid binding proteins(FABP), are thought to act as intracellular transport proteins. This paper examines the mechanism of transfer of fluorescent anthroxyloxy-labeled fatty acids(AOFA) from purified FABPs to phospholipid membranes. With the exception of the liver FABP, AOFA is transferred from FABP by collisional interaction of the protein with an acceptor membrane. The rate of transfer increased markedly when membranes contain anionic phospholipids. This suggests that positively charged residues on the surface of the FABP may interact with the membranes. Neutralization of the surface lysine residues of adipocyte FABP decreased fatty acid transfer rate, and transfer was found to proceed via aqueous diffusion rather than collisional interaction. Site-specific mutagenesis has further shown that the helix-turn-helix domain of the FABP is critical for interaction with anionic acceptor membranes. Thus cytosolic FABP may function in intracellular transport of fatty acids to decrease their membranes association as well as to target fatty acids to specific subcellular sites of utilization. (*Korean J Nutrition* 30(6) : 658~668, 1997)

KEY WORDS : anionic phospholipids · fatty acid binding proteins · long chain fatty acids · fluorescent lipids · lipid transport · membranes.

서 론

세포내에서 작은 분자량을 가진 소수성 물질의 이동
채택일 : 1997년 5월 3일

은 한 세포 소기관에서 다른 곳으로 직선적인 이동을 할 것으로 생각하기 쉽다. 그러나 실제로는 이렇게 간단한 직선상의 움직임이 아니라 훨씬 더 멀고 복잡한 이동을 하게 된다. 소수성 물질의 경우는 막에 대한 친화도가 큰 영향을 미친다. 소수성 물질은 친수성인 cy-

toplasm 보다는 막에 대한 친화도가 훨씬 크기 때문에, 수용성 물질과 달리 소수성 물질의 이동에는 막과의 결합, 지질 이중막 내에서의 평면적인 diffusion 및 막에서의 분리등 여러요인이 영향을 미친다.

장쇄지방산의 경우 막에 대한 partition coefficient

가 수용성인 cytosol 보다 10^5 - 10^6 M 이 높기 때문에¹⁾ 이들이 세포내에서 이동하는 동안 훨씬 많은 시간을 막에 결합한 상태로 있게 된다(Fig. 1).

그러면 소수성 물질이 세포내에서 이동 할때 이들과 결합하는 결합 단백질(cytoplasmic binding protein)

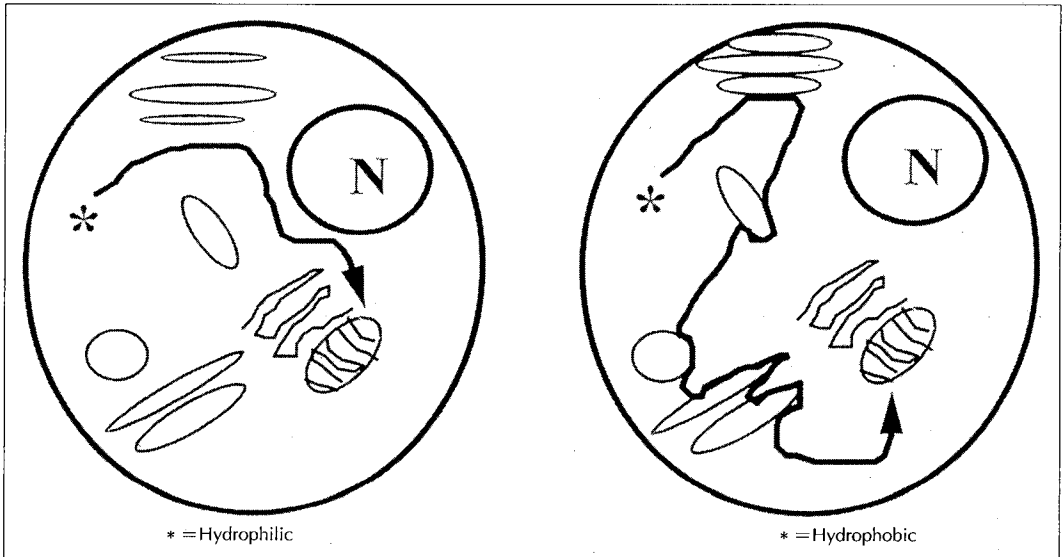


Fig. 1. Intracellular membranes and cytoplasmic transport of hydrophobic or hydrophilic molecule. (N : nucleus)

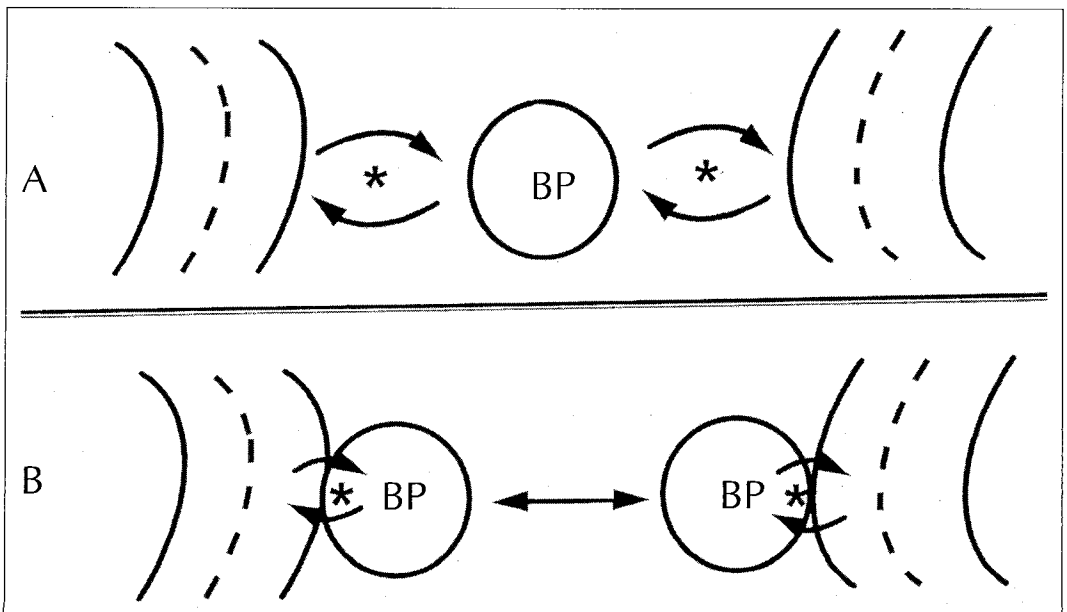


Fig. 2. Mechanism of binding protein(BP)-mediated ligand(*) transfer between membranes.

A : Aqueous diffusion where * dissociates from the donor membranes, associates with a BP during intracellular movement, and dissociates prior to associating with the acceptor membrane.

B : Collisional transfer, where * is transferred from the donor membrane to BP in the course of a collision. The BP-* complex then interacts with the acceptor membrane, and * leaves the BP and binds to the membrane.

의 역할은 무엇일까? 이들은 소수성 물질과 결합하는 친화도가 크기 때문에 막과 소수성 물질과의 결합을 억제할 수 있다. 예를 들면 인지질막과 간의 fatty acid binding protein(L-FABP) 사이에서 장쇄지방산의 친화도가 L-FABP에 대해 20배 이상 크기 때문에²³⁾ 이러한 세포내 결합 단백질의 존재는 지방산과 막과의 친화도를 크게 감소시킨다. 그러므로 지방산이 막과 결합하는 것 보다 이러한 결합 단백질에 붙어 수용성인 세포질내에 많은 농도로 녹아 있게 되고 결과적으로 지방산 이동속도가 빨라진다. FABP에 결합된 지방산의 경우 수용액 내에서의 확산이 이 막에 결합된 상태의 lateral diffusion 보다 100배 이상 빠른 것이 보고되었다⁴⁾.

세포내 결합단백질이 세포내의 막사이 - 예를 들어 원형질막에서 미토콘드리아 막 - 의 소수성 물질 이동에 관여 한다면 Fig. 2와 같은 2가지 방법이 가능하다.

A) 확산(diffusion)에 의한 방법, 즉 소수성 물질(*)이 원형질막에서 분리 되어 수용성인 세포질로 들어가 결합 단백질과 결합하여 확산에 의한 이동을 하고 다시 이 결합단백질에서 분리되어 미토콘드리아 막과 결합하거나

B) 충돌(collision)에 의한 방법으로 결합 단백질이 원형질막과 순간적인 충돌을 하여 ligand(소수성 물질, *)가 막에서 결합단백질로 이동되고 다시 이러한 충돌에 의해 ligand가 미토콘드리아 막으로 이동된다.

이 두가지 방법 모두가 어느 정도씩은 지방산 이동에 기여 할 것으로 추측된다. 만약 확산에 의한 방법에 의해 주로 일어난다면 지방산이 용해되어 있는 환경의 용해도에 지방산 이동 속도가 크게 영향을 받을 것이고, 충돌에 의한 방법이 지방산 이동의 주된 기전이면 막의 농도가 증가함에 따라 가능한 충돌횟수가 증가하므로 이동속도가 비례적으로 증가 할 것이다⁵⁾.

20여년전에 처음으로 발견된⁶⁷⁾ FABP는 짧은 지방산에는 결합하지 않고 장쇄 지방산에만 결합하며⁶⁸⁾ 14~15kDa의 비교적 작은 단백질로써 세포내 전체 단백질의 3~6%를 차지한다⁶⁹⁾. 이들은 세포내 지방산 이동에 관여 할 것으로 추측되지만 아직까지 정확한 역할이나 기전은 알려지지 않고 있다. 지금까지 알려진 간, 심장, 소장, 지방세포등의 FABP를 살펴보면 소장을 제외하고는 특유조직에 각기 특유의 FABP가 주로 존재한다. 즉 심장에는 heart FABP(H-FABP)만 존재하고 간에는 L-FABP, 지방세포에는 adipocyte FABP(A-FABP)가 주로 존재한다⁸⁹⁾. 그러나 소장에는 L-FABP와 intestinal FABP(I-FABP)가 거의 같은 양으로 존재한다. 또한 이들의 아미노산 sequence가 각 세포마다 차이가 있어 H-FABP와 A-FABP의 경우 가장 유사성이

높고(67%), H-FABP와 L-FABP의 경우 가장 유사성이 낮아(36%) 각 FABP 사이에 group 별 차이가 있음을 시사한다¹¹⁾. 특히 각 조직에서 지방산이 이용되는 기전이 다른 사실을 볼때(심장은 주로 산화에 이용되지만 지방세포는 주로 TG 합성에 이용) 이들 FABP가 공통적인 역할(지방산이동) 외에도 기능적으로 다른 역할을 할 수 있다는 것을 제시해 준다.

그러므로 본 연구는 세포내 결합 단백질, 특히 지금까지 많이 알려진 4종류의 FABP(간, 심장, 소장, 지방세포)들이 막사이에서 장쇄 지방산의 이동에 어떻게 관여하는가를 비교해 보고자, 각 FABP에서 인지질 model 막으로 형광성 지방산이 이동되는 기전 및 속도등을 조사하여 세포내 지방산 이동에서 각 FABP의 역할 및 차이를 비교 분석하였고 FABP와 인지질막과의 상호작용을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 사용시약

형광성의 Anthroyl-oxy 지방산 유도체(AOFA)인 2-(9-anthroyloxy) palmitic acid(2AP), 2-(9-anthroyloxy) stearic acid(2AS), 12-(9-anthroyloxy) stearic acid(12AS), 12-(9-anthroyloxy) oleic acid(12AO) 는 Molecular Probes, Inc.(Eugene, OR)에서 구입하였다. 인지질 model 막의 성분인 Egg phosphatidylcholine(EPC), NBD-Phosphatidyl ethanolamine(NBD-PE), brain phosphatidyl-serine(PS), phosphatidylinositol(PI), phosphatidylglycerol(PG), cardiolipin(CL), stearylamine(SA)은 Avanti Polar Lipids(Birmingham, AL)에서 구입하였다. 모든 지방은 질소 기체하, chloroform에서 -20°C에 보관하였다.

2. FABP 분리 및 정제

H-FABP, L-FABP, I-FABP 및 A-FABP는 Recombinant plasmid를 이용한 system에서 각기 분리 정제되었다.

Ampicilin(50 µg/ml)이 포함된 YT media에서 *Escherichia coli*(*E. coli*)를 하루밤 배양 후 1/125이 되도록 새 media로 희석하고 4시간 후 0.4mm isopropyl-β-D-thiogalactoside(IPTG)로 induction한다. 3시간 후 cell을 수집하여 sonication으로 단백질을 용출시킨다. 각기의 FABP는 sephadex G-50와 DE52에 의한 gel filtration을 거쳐 Lidex-1000 column을 사용하여 delipidation 시킨다¹²⁾.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)¹³⁾에 의해 분리된 FABP의 순수도를 측정하였고 단백질 농도는 Lowry법¹⁴⁾에 의해 구하였다.

3. H-FABP의 acetylation

H-FABP에서 (+)전하를 가진 lysine기를 중화시키기 위하여 acetic anhydride와의 반응을 이용하였다. 분리된 FABP용액을 0.2N NaOH를 사용하여 pH9.0으로 적정하고 lysine의 50배 농도에 해당하는 acetic anhydride 2μl씩 10번에 나누어 15~30분에 걸쳐 첨가하였다. Acetic anhydride 첨가후 NH₂OH-HCl을 최종농도 1N이 되도록 첨가하고 5N NaOH로 pH10.0으로 높인다. 상온에서 60~90분 배양시킨 후 10mM HEPES, pH7.5에서 하룻밤 dialyze시켜 cent-tricon 10 microconcentrator(Amicon)으로 농축시켰다.

4. 인지질 model 막

인지질로 구성된 model 막은 일반적으로 90mol% EPC와 10mol% NBD-PE(형광 quencher)로 구성되었고 sonication과 ultracentrifugation에 의해 small unilamellar vesicle(SUV)을 만들어 이용하였다¹⁵⁾.

(-)전하를 가진 membrane은 65mol% EPC, 25mol% PS(또는 PI, CL) 및 10mol% NBD-PE로 구성되었다. (+)전하를 가진 membrane은 65mol%

EPC, 25mol% SA 및 10mol% NBD-PE로 구성되었다.

각 구성분이 들어 있는 인지질들을 TBS buffer (40mM Tris, 100mM NaCl, pH7.4)에 녹여 45분간 sonication하고 40,000g로 4°C에서 45분간 원심분리하여 상층액에 있는 SUV만을 사용하였다.

5. 지방산 이동 속도 측정

형광성의 anthroyloxy기를 가진 지방산(AOFA)이 FABP에서 인지질 model 막으로 이동되는 속도를 측정하기 위해 Fluorescence Resonance Energy Transfer(FRET) assay를 이용하였다¹⁶⁾. Fig. 3에 나타난 바와 같이 한쪽 Syringe에는 1μM AOFA 유도체 (2AP, 2AS, 12AO, 12AS)가 들어 있는 15μM의 FABP용액을 넣고 다른 쪽 Syringe에는 각 해당 농도의 인지질 막을 넣어 stopped-flow spectrofluorimeter(Applied Photophysics, UK)를 사용하였다. 같은 volume의 두 syringe 용액이 섞이면 FABP에 결합되어 있던 형광 지방산이 FABP에서 떨어져 나와 형광 quencher(NBD-PE)가 들어있는 인지질 막으로 이동하게 되고 이에 따라 AOFA의 형광성이 감소된다. 이것을 시간과 형광도에 대해 plot하여 지방산 이동 속도를 측정하였다.

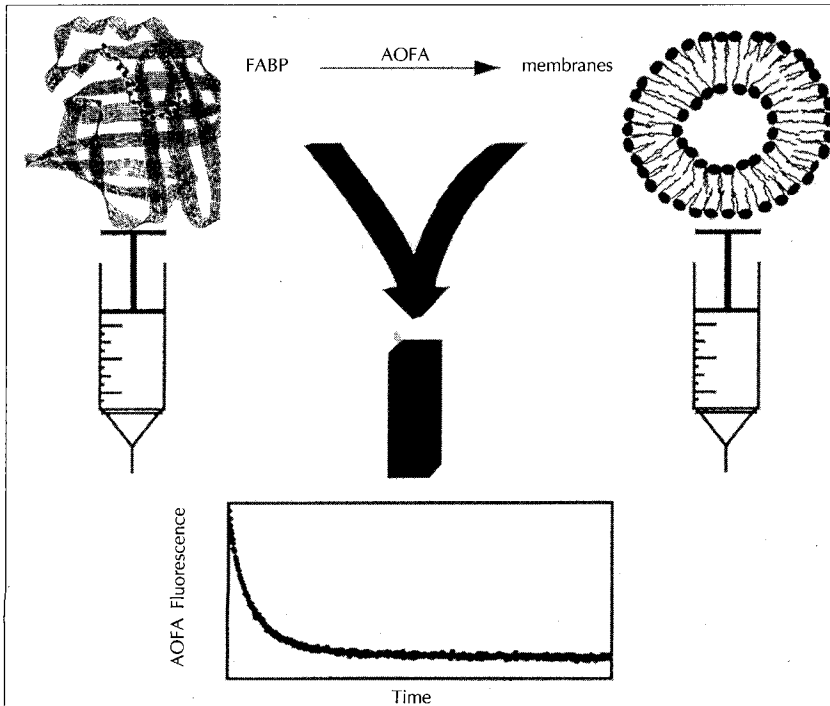


Fig. 3. The fluorescence resonance energy transfer(FRET).

6. H-FABP의 Mutation

H-FABP의 point mutation은 phosphothiorate screening protocol(Amersham, Inc)을 사용하였고, cDNA의 mutation은 di-deoxy sequence analysis 로 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 각 FABP에서의 지방산 이동 속도

4가지 FABP에서 EPC 모델 막으로의 지방산 이동 속도는 Table 1과 같다.

Oleic acid 형광유도체인 12AO의 이동 속도는 각 FABP마다 큰 차이를 보여 1000배까지의 차이가 있었다. 지방산의 이동 속도는 크게 2유형으로 나눌 수 있는데 heart 와 adipocyte와 같이 빠른 경우와 liver와 intestine의 훨씬 느린 경우이다. Heart와 adipocyte 형은 FABP member 중에서 가장 유사하고(67% 아미노산 Sequence homology), Matarese 등¹⁷⁾에 의하면 이 두 FABP는 2억 4천 만년 전에 같은 gene에서 갈라졌으나 간과 소장 FABP는 진화에서 다른 branch에 속한다고 보고 되었다. 그러므로 FABP에 의한 지방산 이동 속도는 그들의 진화 유사성과 관계 있을 수 있다. 또한 H-FABP와 L-FABP는 구조적 차이가 있어서 L-FABP의 지방산 결합 부위는 H-FABP 결합 부위보다 훨씬 더 소수성의 성질을 가지고 지방산과의 결합력이 강하다(논문 준비중). 그러므로 지방산이 FABP에서 떨어져 나와 인지질 막으로 이동될 때 H-FABP가 L-FABP보다 빠를 것으로 사료된다.

2. 심장 및 지방세포 FABP에서의 지방산 이동 기전

1) 지방산의 용해도의 영향

각기 다른 FABP에서 지방산 이동 속도가 크게 차이

Table 1. Transfer of oleic acid from FABP to phospholipid model membranes at pH 7.4, 24C and 1 : 10 molar ratio of FABP : phospholipid

FABP	Oleic acid transfer rate, sec ⁻¹
A-FABP	33.5
H-FABP	10.1
I-FABP	0.5
L-FABP	0.035

Table 2. Effect of fatty acid structure on fatty acid transfer from H-and A-FABP

Fatty acid(AOFA)	H-FABP	A-FABP
2AS(18 : 0)	1.78 ± 0.18	15.5 ± 1.0
2AP(16 : 0)	1.11 ± 0.18	9.6 ± 0.1
12AS(18 : 0)	16.9 ± 2.7	24.5 ± 1.0
12AO(18 : 1)	15.2 ± 2.1	25.1 ± 0.8

나는 외에 이동 방법에서도 차이가 있는지를 비교해 보았다. 지방산 이동이 주로 확산에 의한 것이라면, 지방산의 길이를 짧게 하거나 이중결합을 첨가시켜 지방산의 용해도를 증가시키면 이동속도가 영향을 받을 것이다. 그러나 만약 FABP와 막 사이의 충돌에 의한 이동이 주된 기전이면, FABP 농도는 고정시키고 막의 농도를 증가 시켰을때 충돌 가능 횟수가 증가되고 이동속도 또한 이에 비례하여 증가될 것이다. Table 2에 나타낸 바와 같이 유사성이 높은 H-FABP와 A-FABP 모두 지방산의 용해도가 높은 palmitic acid(2AP, C16 : 0)의 이동속도가 stearic acid(2AS, C18 : 0)보다 늦어서 지방산의 용해도와 이동속도가 비례하지 않았고, 용해도가 높은 oleic acid와 용해도가 낮은 stearic acid의 이동속도에도 차이가 없었다. 또한 용액내에 NaCl 을 첨가하여 지방산의 용해도를 감소시켰을 때 A-FABP에서 지방산 이동은 영향을 받지 않았고 H-FABP에서의 지방산 이동 속도는 오히려 증가하였다(Fig. 4). 이상의 결과에서 H-와 A-FABP에서의 지방산 이동은 용해도와 관계없이 일어나 확산에 의한 방법이 아님을 증명한다. 또한 H-FABP와 A-FABP는 결합부위 내에서 L-FABP보다 결합력이 약하고 많은 부분이 주변의 수용성 용액과 접해 있기 때문에 지방산의 용해도에 영향을 주는 조건들이 지방산의 이동에 큰 영향을 주지 않을 수 있는 가능성도 있을 것이다. 또 다른 가능한 설명은 NaCl을 첨가하여 ionic strength를 증가시키면 인지질막 유동상(fluid phase)에 물리적 상태를 변화시킨다¹⁸⁾. 이때 FABP에서의 지방산 이동이 충돌에 의한 방법일 경우 이러한 인지질막의 물리적 변화가 이동 속도에 영향을 줄 것이다.

2) 충돌 가능 회수에 의한 영향

이들 FABP 에서의 지방산 이동이 FABP와 인지질

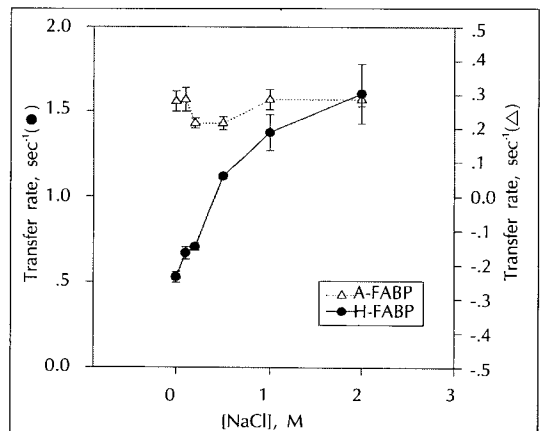


Fig. 4. Effect of NaCl on palmitic acid transfer from H-or A-FABP.

막 사이의 충돌에 의한 것인지를 알아보기 위하여 FABP : 막의 비율을 증가시켰다. 인지질막의 농도가 높아지면 FABP와 막의 충돌 가능회수가 증가하고 이에 비례하여 지방산 이동 속도도 영향을 받을 것이다. Fig. 5에 나타낸바와 같이 H-와 A-FABP 모두 막의 농도가 증가함에 비례하여 지방산 이동 속도가 증가되었다. 이 결과는 지방산이 이들 FABP에서 막으로 이동될 때 충돌에 의한 것임을 다시 한번 확인해 준다.

3) 인지질 막의 전하의 영향

A- 및 H-FABP에서 지방산 이동이 FABP 단백질

과 막 사이의 충돌에 의한 것이면 FABP와 인지질막 사이의 전하의 영향을 받을 것이다. 그러므로 모델 막을 만들때 인지질의 구성을 중성의 성질을 가지는 Phosphatidylcholine(PC)에서(-)전하를 가진 phosphatidyl serine(PS), cardiolipin(CL), phosphatidyl inositol(PI)으로 또는(+전하를 가진 인지질인 stearylamine(SA)으로 변화시켜 보았다.

25mol%의 PS, CL, PI 등이 함유된 막으로의 이동은 PC에 비해 20배 까지 증가되고(Fig. 6), (+전하를 가진 인지질인 stearylamine이 함유된 막으로의 이동은 함유량에 비례하여 감소되었다(Fig. 7).

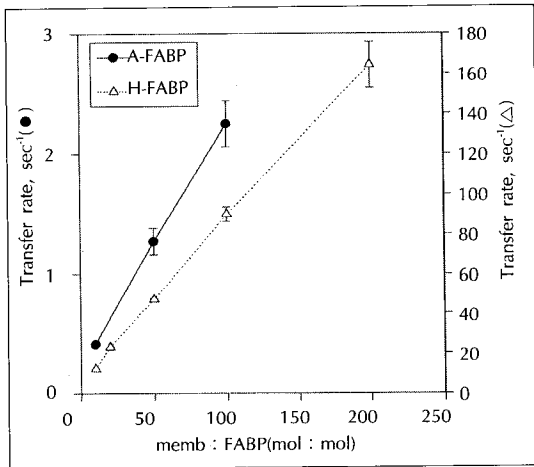


Fig. 5. Effect of membrane concentration on fatty acid transfer from H- and A-FABP.

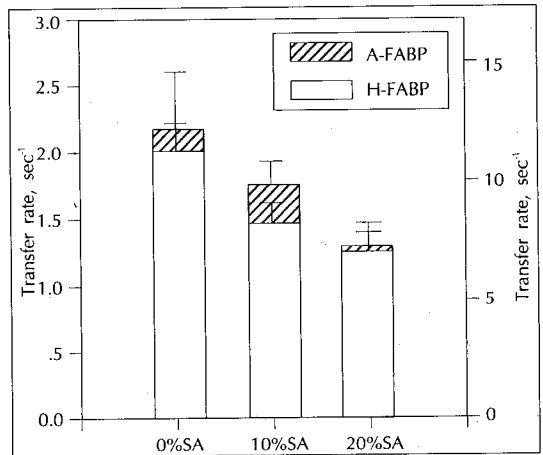


Fig. 7. Fatty acid transfer from FABP to membrane with a net positive charge.

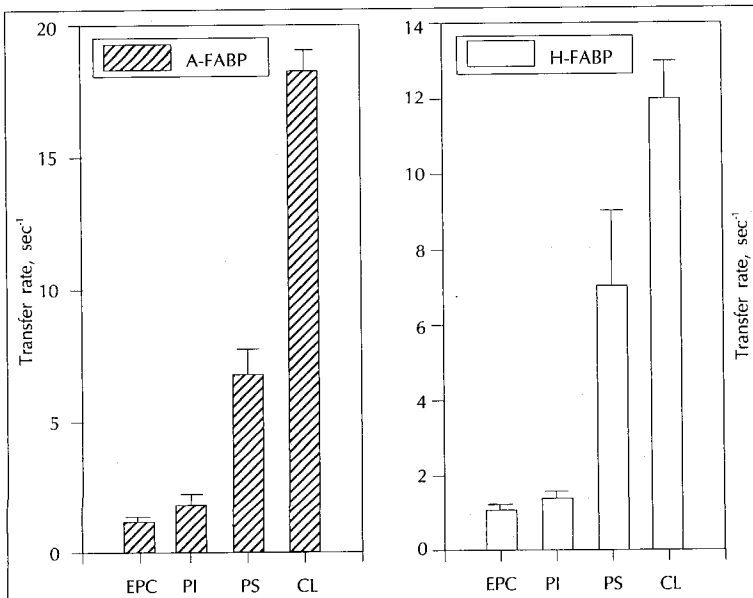


Fig. 6. Fatty acid transfer from FABP to membrane with a net negative charge.

그러므로 지방산이 세포내에서 이동될 때 이동되는 막의 구성에 크게 영향을 받는 것을 알 수 있고 또한 이동되는 막이 (+) 전하를 가질 때 속도가 감소되고 (-) 전하를 가질 때 속도가 증가되는 것은 FABP 표면에 존재하는 (+) 전하를 가진 아미노산들이 FABP와 막과의 충돌에 중요한 역할을 할 수 있음을 시사해 준다.

3. 간 및 소장 FABP에서의 지방산 이동 기전

Table 1에서 나타낸 바와 같이 L-과 I-FABP는 지방산 이동 속도가 H- 나 A-FABP에 비해 훨씬 느리다. 또한 다른 조직과 달리 소장에는 L- 및 I-FABP 모두 많은 양이 존재한다. 그러면 이들 FABP가 같은 조

직에 존재하며 같은 기능을 가지는 것인지 아니면 어떤 기능적 차이를 나타내는지를 알아보기 위하여 같은 조직에 존재하지만 다른 FABP인 L-과 I-FABP를 비교하여 보았다. Fig. 8에 나타낸 바와 같이 L-FABP에서의 지방산 이동은 FABP와 막 사이의 충돌에 의한 것이 아니다. 즉 FABP : 인지질막의 비율이 증가하여 충돌 가능횟수가 증가되어도 L-FABP에서의 oleic acid 이동속도는 영향을 받지 않았다. 그러나 I-FABP에서의 oleic acid 이동 속도는 A-나 H-FABP에서와 같이 막의 농도가 증가함에 비례하여 증가하였다. 더욱이 인지질 막의 성분을 변화시켰을 때 L-FABP에서의 지방산 이동은 영향을 받지 않았으나 I-FABP의 경우는 (-) 전하를 가진 인지질 막의 이동 속도가 크게 증가하였다 (Fig. 9).

위의 결과를 종합하여 보면 L-FABP에서의 지방산 이동은 확산에 의한 것인데 반하여 I-FABP는 막과의 충돌에 의해 지방산 이동이 일어난다는 것을 알 수 있다. 또한 I-FABP에서의 지방산 이동 속도는 유사성이 높은 L-FABP와 비슷 하지만 (Table 1) 지방산 이동 기전은 A- 나 H-FABP와 같다. 그러므로 소장 세포내에 같이 존재하는 I-과 L-FABP가 기능적으로 다른 역할을 할 수 있음을 시사한다. 예를들어 L-FABP의 경우 세포질 내에서 지방산과 결합하여 유리지방산이나 막에 결합되어 있는 지방산 농도를 낮추는 역할을 하는데 반하여 I-FABP의 경우 각기 막의 아미노산 조성등의 영향을 받아 지방산을 각기 이용되는 세포내 소기관들

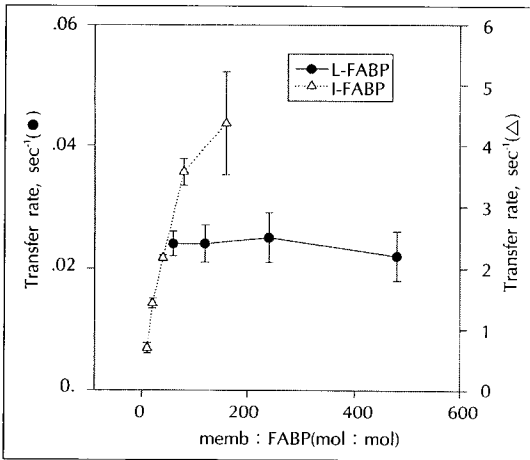


Fig. 8. Effect of membrane concentration on fatty acid transfer from L-or I-FABP.

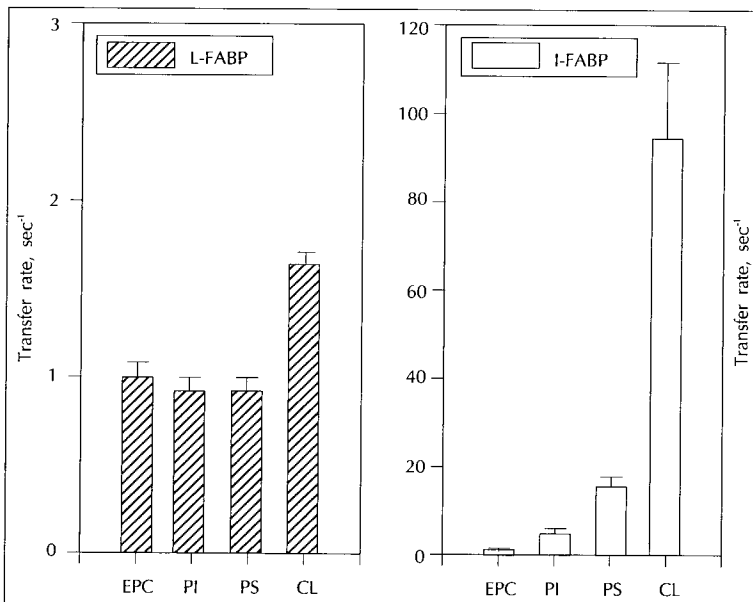


Fig. 9. Effect acid transfer from FABP to membrane with a net negative charge.

로의 targeting에 관여할 수 있다.

4. FABP와 막의 지방산 이동에서 FABP의(+전하) 아미노산 잔기의 역할

1) Acetylation에 의한 영향

Fig. 6 및 9의 결과와 같이(-)전하를 가진 막으로 지방산 이동 속도가 크게 증가하는 것은 A-, H- 및 I-

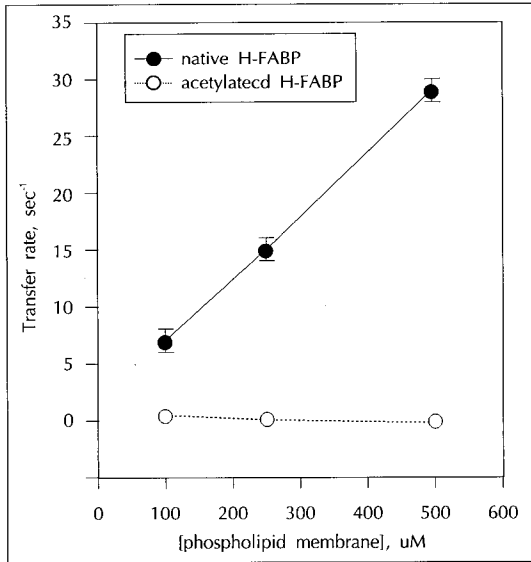


Fig. 10. Palmitic acid (2AP) transfer from native and acetylated H-FABP.

FABP 표면에 존재하는(+전하)를 가진 잔기들이 막과의 충돌시에 관여하는 것을 시사한다. 그러므로 H-FABP 표면의(+전하)를 가진 Lysine 잔기를 acetylation 시켜 중성화 시켰다. Circular dichroic spectra 결과 acetylation 반응은 FABP 단백질 구조 변화가 없음을 확인되었고 또한 acetylation으로 변형된 FABP와 지방산의 결합 affinity에도 차이가 없음을 보고되었다¹¹⁾ Fig. 10의 결과는 Palmitic acid 형광 유도체인 2AP 이동 속도는 원래의 H-FABP에 비교하여 acetyl화된 H-FABP가 30배 이상 느리고 더욱이 H-FABP의(+전하)를 가진 Lysine 잔기를 중성화시키면 막의 농도를 증가시켜도 지방산 이동 속도가 증가하지 않아 지방산 이동 기전이 충돌에 의한 방법이 아닌 확산에 의한 방법으로 변화된 것임을 예시한다. A-FABP 경우에도 비슷한 결과를 나타내었다. 그러므로 위의 결과는 H-FABP 에서 충돌에 의한 지방산 이동은 FABP 표면에 존재하는(+전하)를 가진 Lysine 잔기가 중요한 역할을 하는 것을 제시하여 A-, H- 및 I-FABP와 인지질 막 사이의 ionic interaction이 세포내 지방산 이동에 중요한 역할을 하는 것을 알수있다.

2) Site directed mutagenesis

H-FABP의 lysine(Lys) 잔기를 모두 중성화 시켰을 때 이동속도 뿐 아니라 이동 기전도 충돌에 의한 방법에서 확산으로 되었으므로 충돌에 의한 지방산 이동에

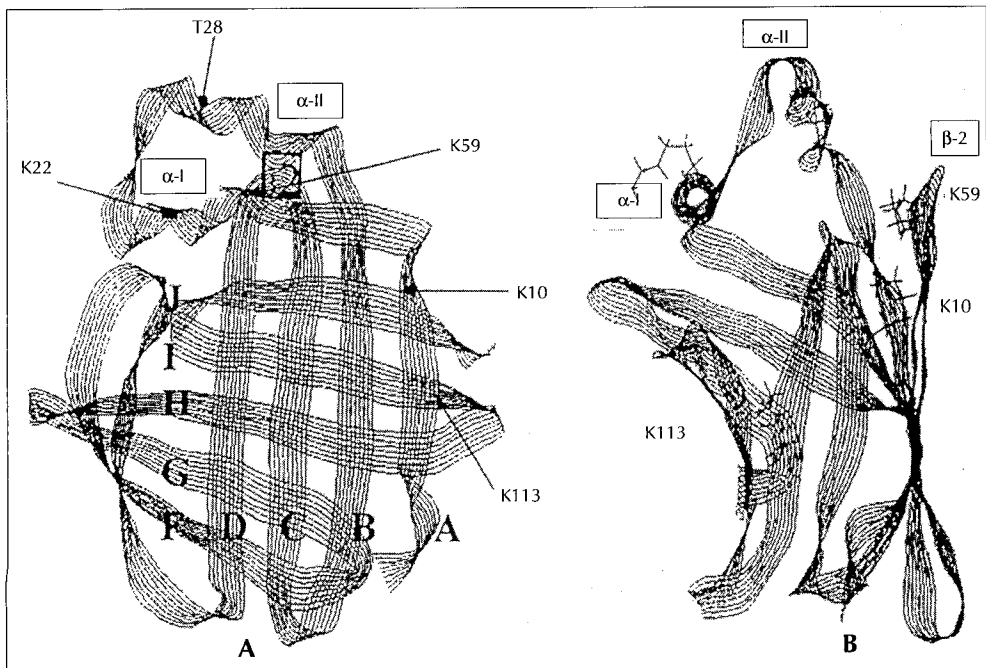


Fig. 11. The portal domain of H-FABP.

FABP에 존재하는(+)전하를 가진 아미노산인 Lys 중에서도 특히 어떤(Lys) 잔기가 관여하는지를 site directed mutagenesis를 이용하여 살펴보았다. Fig. 11에서 보는 바와 같이 Lys 22(K22)는 H-FABP의 α -I helix region에 있으며 지방산이 FABP에 결합할 때 결합 부위에 속한다. Lys22를 isoleucine이나(K22I) glutamic acid(K22E)로 변형시켜(+)전하를 중성이나(-)전하로 변화시키면 palmitic acid 이동속도가 2~3배 감소되었다(Fig. 12). 또한 지방산 결합 부위로 추정되는 Lys 59(C와 D β -strand를 연결하는 β -

2turn에 존재한다)(Fig. 11)를 중성인 isoleucine으로 대체하면(K59I) 이동속도는 2배로 증가되었다(Fig. 12). K22와 K59를 모두 변화시킨 mutant(K59, 22I)는 wild type과 비슷하였다(Fig. 12). K59I 변형시의 이동속도 2배 증가와 K22I 변형시의 2~3배 감소결과가 상쇄되어 원래 FABP와 비슷한 이동속도를 나타낸 것으로 풀이된다.

β -strand I의 Lys 113 잔기와 β -strand A의 Lys 10 잔기를 isoleucine으로 중성화시킨 결과는 원래의 H-FABP와 비슷한 결과를 나타내었다.

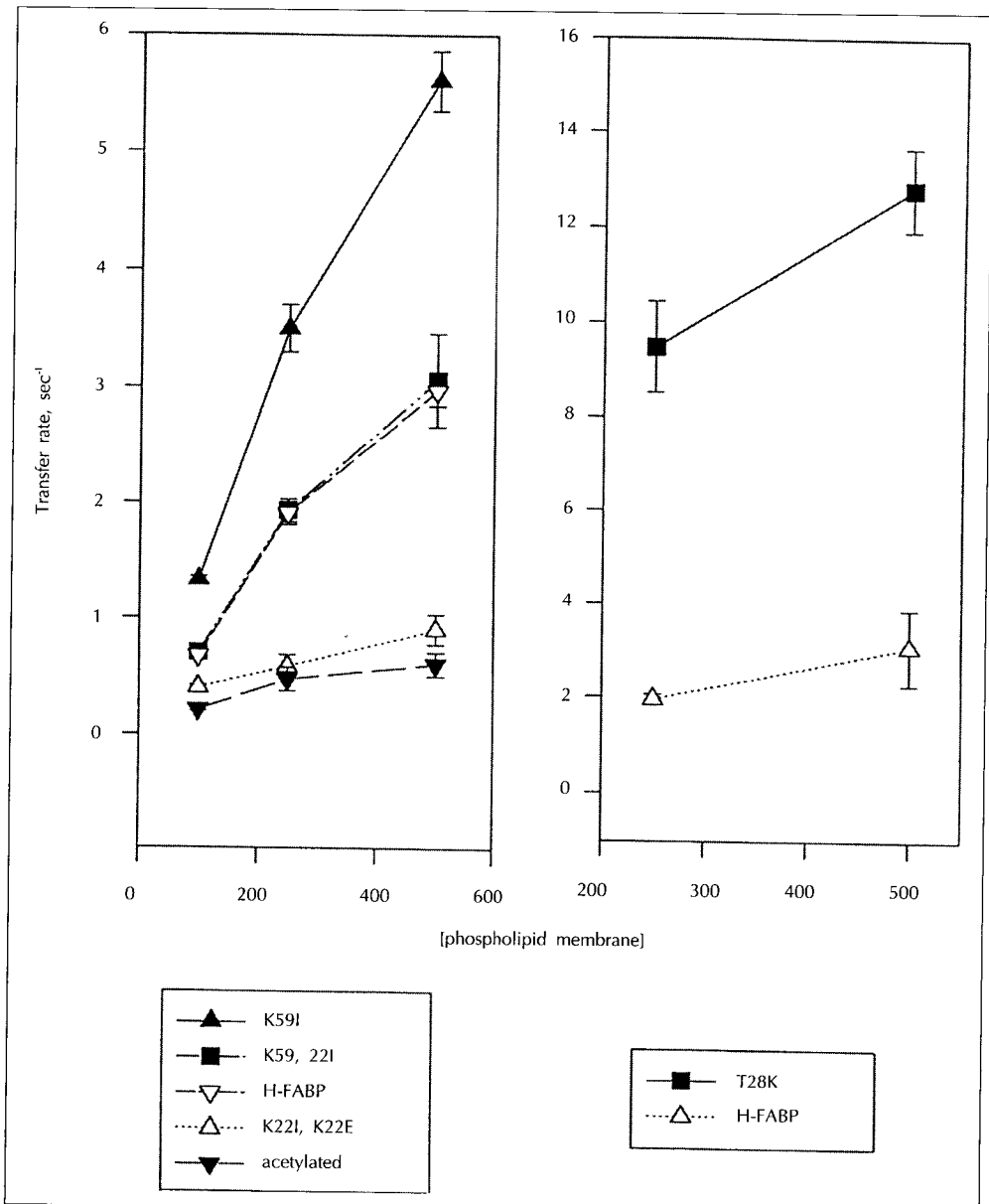


Fig. 12. Effect of FABP mutation on fatty acid transfer.

이들 모두의 mutation에서 지방산 이동기전은 막의 농도가 증가함에 비례하여 이동속도가 증가하여 충돌에 의한 것이므로 이들 mutation이 이동속도에는 영향을 주나 이동기전에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다. α - II strand의 threonine을 lysine으로 대체시켜 (+)전하를 더 첨가했을 때(T28K) 지방산 이동 속도는 4배 이상 증가되었다. 그러므로 Fig. 11에서 보면 K22, K59, T28 region의 mutation이 이동 속도에 크게 영향을 미치므로 H-FABP의 helical "cap" 부위가 결합 단백질과 막 사이의 ionic interaction에 중요한 역할을 한다고 할 수 있겠다.

결론

지방산 결합 단백질은 일반적으로 세포내 지방산 이동 및 대사에 중요한 역할을 할 것으로 추측되어 왔다. 그러나 지방산 이동 속도 및 기전에는 각기 다른 FABP 마다 큰차이가 있다. 지방산 이동속도는 이들 단백질의 진화상의 유사성과 관련이 있으며 L-FABP는 확산에 의해서 지방산이 이동되지만 H- A- 및 I-FABP는 지방산이 막으로 이동할 때 이 단백질과 이중 지질막 사이의 충돌에 의한 이동을 한다. 이러한 FABP와 막 사이의 직접적인 상호작용을 조사해 보았다. FABP 표면의 Lysine 잔기가 FABP- 막의 충돌 complex 생성에 큰 역할을 함이 추측된다. 또한 FABP와 막이 충돌함에 따라 지방산 이동이 일어난다는 것은 FABP가 지방산을 세포내에서 이동할 때 무조건적인 이동이 아니라 특수한 site로 표적 이동할 수 있다는 것을 시사한다. 세포내 결합 단백질은 장쇄지방산 이동에 매우 중요한 역할을 한다. 만약 FABP가 없다면 지방산은 막으로 partition 되어 세포질보다 막에 더 많이 결합되어 있으므로 막 평면에서 lateral diffusion에 의해 주로 이동되고 이 결과 지방산 이동 속도는 크게 늦어질 것이다. 세포내 높은 농도로 존재하는 FABP의 존재는 지방산의 세포질내 용해도를 높이고 이에따라 지방산 이동속도를 빠르게 한다. 더욱이 만약 FABP가 지방산을 막과의 충돌에 의한 방법으로 이동한다면 이동속도는 더욱 빨라진다. 또한 FABP와 막사이의 충돌에 의한 지방산 이동이(-)전하를 가진 산성 인지질 막이나 막에 존재하는 산성 peptide 부위로 향하면 지방산 이동속도만 더 빨라지는 것이 아니라 어떤 특정한 site로의 표적 이동이 될 수 있다. 이것은 결과적으로 세포내에서 지방산이 필요한 세포기관으로 이동될 때 효과적인 표적으로 세포내 지방산 이동의 조절 기전이 될 수 있다.

Literature cited

- 1) Pjura WJ, Kleinfeld AM, Karnovsky MJ. Partition of fatty acids and fluorescent fatty acids into membranes. *Biochem* 23 : 2039-2043, 1984
- 2) Cistola DP, Walsh MT, Corey RP, Hamilton JA, Brecher P. Interactions of oleic acid with liver fatty acid binding protein : A carbon 13 NMR study. *Biochem* 27 : 711-717, 1988 and correction *Biochem* 28 : 3628, 1989
- 3) Zilversmit DB. lipid transfer proteins. *J Lipid Res* 25 : 1563-1569, 1984
- 4) Cantor CR, Schimmel PR. In : Techniques for the study of biological structure and function, pp.343-846, W.H. Freeman and Co. New York, 1980
- 5) Roseman MA, Thomson TI. Mechanism of the spontaneous transfer of phospholipids between bilayers. *Biochem* 19 : 439-444, 1980
- 6) Ockner RK, Manning JA, Poppenhausen RD, Ho WKL. A binding protein for fatty acids in cytosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissues. *Science* 177 : 56-58, 1972
- 7) Mishkin S, Stein L, Gatmaitan Z, Arias IM. The binding of fatty acid to cytoplasmic proteins : Binding to Z protein in liver and other tissues of the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 47 : 997-1003, 1972
- 8) Bass NM. The cellular fatty acid binding proteins : aspects of structure, regulation and function. *Intl Rev Cytol* 3 : 143-184, 1988
- 9) Kaikus RM, Bass NM, Ockner RK. Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia* 46 : 617-630, 1990
- 10) Sweester DA, Henckerth RO, Gordon JI. The metabolic significance of mammalian fatty acid binding proteins. *Ann Rev Nutr* 7 : 337-359, 1987
- 11) Sacchettini JC, Said B, Schulz H, Gordon JI. Rat heart fatty acid binding protein is homologous to the murine adipocyte 422 protein and the P2 protein of peripheral nerve myelin. *J Biol Chem* 261 : 8218-8223, 1986
- 12) Glatz JFC, Veerkamp JH. A radiochemical procedure for the assay of fatty acid binding proteins. *Anal Biochem* 132 : 89-95, 1983
- 13) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970
- 14) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
- 15) Huang C, Thompson TE. Preparation of homogenous single walled phosphatidylcholine vesicles. *Methods Enzymol* 32 : 485-489, 1974

- 16) Storch J, Kleinfeld AM. Transfer of long chain fluorescent fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochem* 25 : 1717-1726, 1986
- 17) Matarese V, Stone RL, Waggoner DW, Bernlohr DA. Intracellular fatty acid trafficking and the role of cytosolic lipid binding proteins. *Prog Lip Res* 28 : 245-272, 1989
- 18) Storch J, Kleinfeld AM. Transfer of long chain fluorescent free fatty acids between unilamellar vesicles. *Biochem* 25 : 1717-1726, 1986