

칼슘/칼모듈린-의존성 단백질 키나아제 I 키나아제에 의한 칼슘/칼모듈린-의존성 단백질 키나아제 Ia의 활성화에 따른 효소반응 특성의 변화

조 정 숙*

동국대학교 의과대학 의학과 약리학교실

(Received November 3, 1997)

Changes in Kinetic Properties of Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase Ia Activated by Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase I Kinase

Jung Sook Cho*

Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University,
Kyungju, Kyungbuk 780-714

Abstract—The activity of Ca^{2+} /calmodulin (CaM)-dependent protein kinase Ia (CaM kinase Ia) is shown to be regulated through direct phosphorylation by CaM kinase I kinase (CaMKIK). In the present study, three distinct CaMKIK peaks were separated from Q-Sepharose column chromatography of pig brain homogenate using a Waters 650 Protein Purification System. The purified CaMKIK from the major peak potently and rapidly enhanced CaM kinase Ia activity, reaching a maximal stimulation within 2 min at the concentrations of 12~15 nM. The activated state of CaM kinase Ia is characterized by a markedly enhanced V_{max} as well as significantly decreased K_m and K_a values toward peptide substrate and CaM, respectively. These observations suggest the activation process of CaM kinase Ia. The phosphorylation of CaM kinase Ia by CaMKIK may induce its conformational change responsible for the alterations in the kinetic properties, which ultimately leads to the rapid enzyme activation.

Keywords □ Ca^{2+} , calmodulin, phosphorylation, protein kinase, enzyme activation.

세포내에 존재하는 Ca^{2+} 은 호르몬의 분비와 신경전달물질의 유리, 근육의 수축, 대사, 유전자 발현 등과 같은 여러 가지 반응을 매개하는 중요한 2차 신호전달자로서 잘 알려져 있다.¹⁻³⁾ 이와 같이 세포내 Ca^{2+} 의 농도변화에 의해서 매개되는 다양한 작용들은 주로 세포내에서 일어나는 각종 단백질 인산화 반응에 의해 그 신호가 전달되며, 이 과정에 Ca^{2+} /calmodulin(CaM) 결합체에 의해 활성이 조절되는 것으로 알려진 Ca^{2+} /CaM-dependent protein kinases(CaM kinases)가

관여한다. 지금까지 알려진 CaM kinase로는 myosin light chain kinase를 비롯하여 phosphorylase kinase, CaM kinase I, II, III 및 IV 등이 있다.⁴⁻⁷⁾ 이들 중에서 특히 CaM kinase I, II 및 IV는 뇌에 주로 분포하는 효소로 알려져 있으며, 신경전달물질의 합성 및 유리, 시냅스 발달과 신호전달, 특정 유전자의 발현 등에 관여할 것으로 추정된다.^{4,6-8)}

CaM kinase I은 synaptic vesicle 결합 단백질 synapsin I의 N-단말쪽 첫 번째 인산화 부위(phosphorylation site 1)를 인산화시키는 효소로서 소의 뇌에서 처음 발견되었다.⁹⁾ 그 후, synapsin I의 phosphorylation site 1 주변의 아미노산 서열¹⁰⁾을 본따서

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0561-770-2419 (팩스) 0561-770-2003

만든 site 1 peptide(NYLRRRLSDSNF)를 기질로 이용하여, 소 뇌의 CaM kinase I⁹⁾과 기질 특이성 및 분자 크기 면에서 매우 유사한 특성을 지닌 43 kDa과 39 kDa의 두 효소가 흰쥐의 뇌에서 발견되어 정제되었으며, 각각 CaM kinase Ia 및 CaM kinase Ib로 명명되었다.¹¹⁾ 이들 두 효소의 활성은 인산화 및 탈인산화 반응에 의해 조절되며, 탈인산화 과정에는 protein phosphatase 2A가 관여한다고 한다.¹²⁾

이와 같이 CaM kinase Ia와 Ib는 몇 가지 유사한 성질을 지니고 있는 반면, 그 활성조절 과정에 있어서는 현저히 다른 양상을 보인다. 즉, CaM kinase Ib의 경우 Ca²⁺/CaM에 의해 효소가 활성화되지만, CaM kinase Ia는 Ca²⁺/CaM 이외에 CaM kinase Ia activator라는 특이한 조절인자가 존재할 경우에 한해서 그 효소활성을 발현함이 확인되었다.^{11, 13)} 이 조절인자를 정제하여 특성을 규명한 결과, SDS-PAGE에서 52.5 kDa 정도의 열에 약한 단백질로 확인되었으며,¹³⁾ 이는 CaM kinase Ia의 Thr 잔기에 인산화 반응을 촉매하는 또 하나의 인산화 효소임이 밝혀졌다.¹⁴⁾ 흰쥐에서 추출한 CaM kinase Ia 뿐만 아니라 cDNA cloning으로 얻은 사람의 CaM kinase I도 이 조절인자에 의해 Thr 잔기에 인산화가 일어나서 활성화됨이 확인되었으며,¹⁵⁾ 따라서 이 조절인자는 CaM kinase I kinase (CaMKIK)로 불리게 되었다.^{14, 15)}

이와 같이 세포내의 Ca²⁺ 신호가 연속적으로 전달되는 경로에서 upstream kinase에 의해 인산화됨으로서 효소가 활성을 발현하는 조절기전을 갖는 CaM kinase로는 CaM kinase I 및 Ia외에 CaM kinase IV가 알려져 있다. Cerebellar granule cell에서 처음 발견되어 CaM kinase Gr로도 불리는 CaM kinase IV는 분자량이 SDS-PAGE에서 약 63 kDa 정도이며, 아미노산 서열 비교에서 CaM kinase II와 약 40%의 유사성을 지닌다.¹⁶⁾ 이 효소의 활성은 CaM kinase II¹⁷⁾에서와 같이 Ca²⁺/CaM-의존성 autophosphorylation에 의해 조절되는 것으로 보고되었으나,¹⁸⁾ 그 후 *E. coli*에 발현시킨 불활성 상태의 CaM kinase IV가 쥐의 뇌에서 얻은 추출물에 의해 활성화됨을 관찰함으로써, CaM kinase IV의 활성조절인자의 존재가 제시되었다.¹⁹⁾ 인산화된 CaM kinase II와 CaM kinase IV는 Ca²⁺/CaM-의존성을 상실하여 Ca²⁺/CaM이 없는 경우에도 부분 활성을 지니는 특성이 있으나,⁶⁻⁸⁾ CaMKIK에 의해 인산화된 쥐의 CaM kinase Ia와 사람의 CaM ki-

nase I은 활성화된 후에도 계속 Ca²⁺/CaM 의존성을 나타낸다.^{13, 15)}

본 연구에서는 Waters 650 Protein Purification System을 사용하여 실시한 Q-Sepharose column 크로마토그래피를 통해, 돼지의 뇌에 CaM kinase Ia의 활성을 증가시킬 수 있는 CaMKIK peak이 여러 개 존재함을 관찰하였고, 그 중 주요 peak으로부터 거의 균질한 상태까지 정제한 CaMKIK를 이용하여 농도별 및 시간별 CaM kinase Ia의 활성변화를 측정하였으며, 비활성 및 활성 상태에서 CaM kinase Ia의 기질 친화력과 최대 반응속도(V_{max})를 측정, 비교하여 효소의 활성화에 따른 kinetic parameter의 변화를 연구하였다.

실험방법

시약

CaM, Sephacryl S-100 HR, Sephacryl S-300 HR, phenyl-Sepharose, CaM-Sepharose, heparin-Sepharose는 Pharmacia LKB Biotechnology Inc.에서 구입하였고, poly-L-lysine agarose, Q-Sepharose(fast flow), DEAE-Sepharose CL-6B, PMSF, Tris, EGTA, EDTA, ATP, bovine serum albumin (BSA)은 Sigma Chemical Company에서, [γ -³²P]ATP는 DuPont/NEN에서, dithiothreitol (DTT), hydroxylapatite, Tween-20는 Bio-Rad에서 구입하였으며, DEAE-cellulose(DE-52)와 phosphocellulose paper(P-81)는 Whatman에서 구입하였다. Site 1 peptide는 University of Michigan, Biomedical Research Core Facilities에서 합성하여 HPLC로 정제한 것을 사용하였다. 기타 일반 시약은 특급품을 사용하였다.

Site 1 peptide kinase 활성측정

CaM kinase Ia의 활성은 DeRemer^등¹¹⁾의 방법에 의해 site 1 peptide에 유입된 [³²P]의 양으로 측정하였다. 즉, 50 mM Tris, pH 7.6, 0.5 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM [γ -³²P]ATP(200~500 cpm/pmol), 0.5 mg BSA/ml, 1.0 mM CaCl₂, 1 μ M CaM, 50~100 μ M site 1 peptide와 직경양의 CaM kinase Ia를 함유하는 38 μ l의 반응액을 30°C에서 반응시켰다. 일정시간 경과 후 각각 15 μ l씩 2회

취하여 P-81에 점적하고 75 mM H_3PO_4 용액으로 10분씩 3회 세척하고 건조시킨 후 liquid scintillation counting으로 기질에 유입된 동위원소량을 측정하였다.

CaMKIK 활성측정

CaMKIK의 활성은 CaM kinase Ia의 활성을 증가시키는 능력으로 정의되며, Lee와 Edelman¹³⁾의 방법에 의해 측정되었다. 즉, CaMKIK를 제거한 상태의 CaM kinase Ia의 활성과 이에 CaMKIK를 가했을 때의 활성을 상기 방법에 따라 site 1 peptide를 기질로 하여 측정한 후, 후자에서 전자를 빼 준 값으로 CaMKIK의 활성이 계산되었다.

CaM kinase Ia의 정제

CaM kinase Ia는 DEAE-Sepharose CL-6B, hydroxylapatite, Sephacryl S-100 HR, CaM-Sepharose, heparin-Sepharose 크로마토그래피를 차례로 이용하여 균질화한 흰쥐 뇌에서 Lee와 Edelman¹³⁾의 방법에 의해 CaMKIK가 제거된 상태로 정제하였다. 각 단계에서 얻은 분획중의 CaM kinase Ia는 site 1 peptide kinase 활성측정과 [^{125}I]CaM blotting을 이용하여 추적하였다. 최종 정제된 CaM kinase Ia의 기본 활성은 CaMKIK에 의해 최대로 활성화되었을 때 활성의 2~4%를 나타내었다.

CaMKIK의 정제

CaMKIK는 DE-52 batch 크로마토그래피와 65% ammonium sulfate 침전, Q-Sepharose, heparin-Sepharose, phenyl-Sepharose, poly-L-lysine agarose, CaM-Sepharose, Sephacryl S-300 HR 크로마토그래피를 차례로 거쳐, 최종 단계로 sucrose density gradient centrifugation을 이용하여 균질화한 돼지 뇌로부터 Lee와 Edelman¹³⁾의 방법에 의해 정제하되, 초기 단계에 사용한 Q-Sepharose 크로마토그래피는 Waters 650 Protein Purification System을 이용하여 500 psi에서 실시하였다. 각 크로마토그래피에서 얻은 분획중의 CaMKIK의 활성은 정제한 CaM kinase Ia 일정량을 가했을 때의 활성증가 및 SDS-PAGE와 silver staining을 이용하여 추적하였다. 정제한 CaMKIK 자체의 site 1 peptide kinase 활성은 거의 없는 것으로 나타났다.

CaMKIK의 농도결정

CaMKIK는 앞서 기술한 바와 같이 여러 단계를 거쳐 정제되어, 최종적으로 얻어지는 양은 일반적인 단백질 정량법^{20, 21)}에 의해 그 농도를 결정할 수 없었다. 따라서, 정제된 CaMKIK의 농도는 Moeremans²²⁾의 방법을 변형한 Lee와 Edelman¹³⁾의 방법에 의해 colloidal gold staining으로 측정하였다. 여러 농도의 BSA 표준액 및 정제한 CaMKIK를 10% SDS-PAGE로 전개시켜 nitrocellulose 막에 전이시킨 후, 이 막을 0.3% Tween 20를 함유하는 phosphate buffered saline에 밤새 담갔다가 다음 날 탈이온수로 세정하고 colloidal gold 시약(AuroDye forte)과 상온에서 약 2~4시간동안 반응시켰다. 다시 탈이온수로 세정한 후 1일간 건조시켜 색깔이 발현되면 densitometric scanning에 의해 정량화한 BSA 표준곡선을 이용하여 CaMKIK의 농도를 결정하였다.

비활성 상태와 활성 상태에서 CaM kinase Ia의 kinetic parameter 측정

비활성 및 활성 상태에서 peptide 기질, ATP 및 CaM에 대한 CaM kinase Ia의 친화력(K_m) 및 최대 반응속도 (V_{max})를 다음과 같이 측정하였다. Peptide 기질에 대한 kinetic parameter를 측정하기 위해서는 CaM kinase Ia를 CaMKIK 없이 또는 CaMKIK와 함께 10 mM $MgCl_2$, 100 μM ATP, 1 mM $CaCl_2$, 1 μM CaM을 함유하는 반응액에서 30°C에서 10분간 각각 예비 반응시킨 후, [γ - ^{32}P]ATP 및 활성 측정에 필요한 각종 요소를 재조정하고, 2.5~100 μM site 1 peptide 또는 syntide 2를 사용하여 kinase 활성을 측정하였다. ATP에 대한 kinetic parameter를 측정하기 위해서는, CaM kinase Ia를 CaMKIK 없이 또는 CaMKIK와 함께 10 mM $MgCl_2$, 50 μM ATP, 1 mM $CaCl_2$, 1 μM CaM을 함유하는 반응액에서 각각 예비 반응시킨 후, 100 μM site 1 peptide와 10~505 μM ATP를 사용하여 상기 방법에 준하여 site 1 peptide kinase 활성을 측정하였다. CaM에 대한 kinetic parameter를 측정하기 위해서는, CaM kinase Ia를 CaMKIK 없이 또는 CaMKIK와 함께 10 mM $MgCl_2$, 100 μM ATP, 1 mM $CaCl_2$, 20 nM CaM을 함유하는 반응액에서 각각 예비 반응시킨 후, 100 μM site 1 peptide, 200 μM ATP, 2.5 nM~1 μM CaM을 사용하여 상기 방법에 준하여 site 1 peptide ki-

nase 활성을 측정하였다.

Kinetic parameters (K_m 및 V_{max})는 Enzfitter (BioSoft)를 이용한 non-linear regression에 의해 결정하였으며, 각 parameter는 duplicate로 실시한 3회의 반복 실험에서 얻은 평균 \pm S.E. 값이다.

실험결과 및 고찰

DeRemer 등¹¹⁾은 흰쥐 뇌에서 얻은 균질액에서 CaM kinase Ia를 정제하던 중, CaM-Sepharose 크로마토그래피로부터 얻은 분획에서 Ca^{2+} /CaM-의존성 site 1 peptide kinase 활성이 현저히 상실됨을 관찰하였다. 이 분획에 CaM-Sepharose 크로마토그래피의 wash fraction을 일정량 가해 주면 CaM kinase Ia의 활성은 상당히 증가되었으며, 이 결과를 근거로 CaM kinase Ia의 활성화에 관여하는 요소가 존재함을 제시하였고,¹¹⁾ 이는 후에 CaM kinase Ia를 직접 인산화시키는 효소로 규명됨에 따라 CaMKIK로 명명되었다.^{14, 15)} 본 저자는 CaMKIK가 최대한 제거된 상태의 CaM kinase Ia를 정제하던 중, 최종 단계로 사용한 heparin-Sepharose 크로마토그래피 과정에서 CaMKIK가 CaM kinase Ia

로부터 더 효율적으로 분리됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이 과정은 본래 CaM kinase Ib가 Ia와는 달리 heparin-Sepharose에 잘 결합하는 특성이 있어, 이를 이용하여 정제 과정에서 미량이나마 존재할 수 있는 CaM kinase Ib를 제거하기 위한 목적으로 사용되었는데,¹¹⁾ 이 과정에서 CaMKIK도 CaM kinase Ia로부터 효과적으로 제거됨을 알 수 있었다. Fig. 1에서 heparin-Sepharose 크로마토그래피에서 얻은 flow through (분획 1) 및 wash fraction(분획 2-20)에서의 CaM kinase Ia 자체의 site 1 peptide kinase 활성은 매우 낮으나, 이들 분획에 CaMKIK 초기 정제과정 중의 Q-Sepharose 크로마토그래피 분획(이 경우, Fig. 2의 분획 34) 일정량을 가해 주면, 특정 분획에서 site 1 peptide kinase 활성이 급격히 증가함을 볼 수 있다. Flow through 및 wash fraction 중의 내인성 CaM kinase Ia의 활성이 낮아 이 결과만으로는 CaM kinase Ia가 함유된 분획을 구별하기 어려우므로, Fig. 1에서 볼 수 있는 바와 같이 각 분획에 CaMKIK를 가한 후 증가한 활

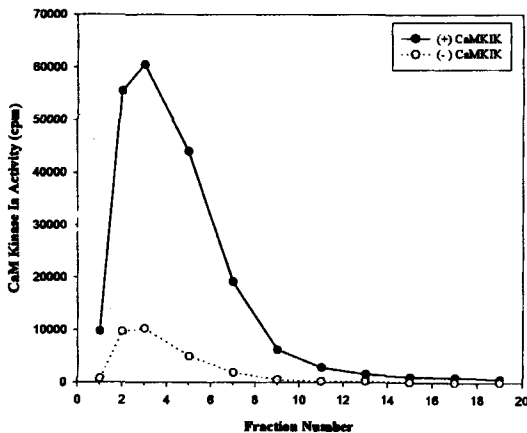


Fig. 1—Heparin-Sepharose column chromatography during CaM kinase Ia purification. In the final step of CaM kinase Ia purification, the sample was loaded onto a heparin-Sepharose column and the flow-through (fraction No. 1) and wash fractions (fraction No.'s 2~20) were collected. CaM kinase Ia activity in the fractions was assayed in the absence (O) or the presence (●) of the partially purified CaMKIK (fraction No. 34 in Fig. 2). A typical activity profile is shown.

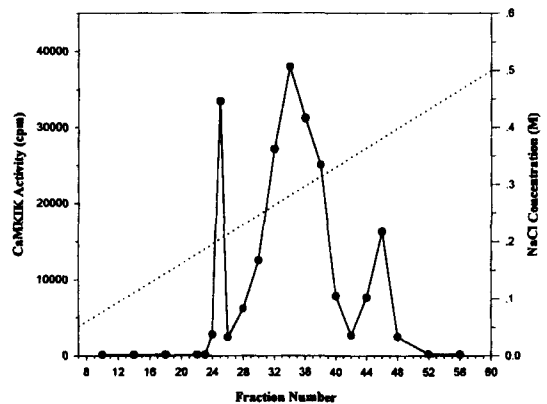


Fig. 2—Evidence for multiple forms of CaMKIK activity resolvable by Q-Sepharose chromatography using a Waters 650 Protein Purification System (FPLC). CaMKIK activity was eluted from the Q-Sepharose column with a linear gradient of 0~0.5 M NaCl in the equilibration buffer. Fractions were assayed in the absence or the presence of the added CaM kinase Ia. The contribution to total activity of the added CaM kinase Ia has been subtracted. In addition, the activity in the absence of CaM kinase Ia in the fractions was also subtracted from the activity in the presence of the added CaM kinase Ia to represent CaMKIK activity. A representative Q-Sepharose profile of CaMKIK activity from 6 separate preparations is shown.

성을 다시 측정하거나, [125 I]CaM blotting에 의해 각 분획에서 CaM kinase Ia를 나타내는 band의 크기를 확인함으로써 CaM kinase Ia가 함유된 분획(Fig. 1의 경우, 분획 1-8)을 합하여 최종 정제 물질을 얻을 수 있었다. 정제된 CaM kinase Ia는 전기영동 후 silver staining 및 [125 I]CaM blotting에서 43 kDa 위치에 한 개의 band로 확인되었다(data not shown). CaMKIK를 가하기 전 CaM kinase Ia의 자체 활성이 낮을수록, 가한 후의 활성 증가가 클수록 정제과정에서 CaMKIK가 효과적으로 제거되었음을 의미하며, 이러한 특성을 가지는 CaM kinase Ia가 CaMKIK에 의한 활성화 연구에 사용되었다.

이와 같이 CaMKIK가 제거된 상태로 정제한 CaM kinase Ia를 기질로 사용하여, 실험방법에 기술한 바와 같이 여러 가지 크로마토그래피를 차례로 이용하여 CaMKIK를 정제하였다. 정제 후의 순도를 높이기 위해서는 많은 단계를 거쳐야 했기 때문에 충분한 양의 시료 확보를 위해 흰쥐 뇌대신 돼지 뇌를 사용하였다.¹³⁾ 균질액을 DE-52에 흡수시켜 0.5 M NaCl을 함유한 용액으로 유출하고, 65% ammonium sulfate로 침전시킨 후 투석하여 얻은 용액을 Waters 650 Protein Purification System을 이용한 Q-Sepharose column에 적용하여 NaCl gradient로 유출한 분획에 대한 CaMKIK 활성이 Fig. 2에 나타나 있다. CaMKIK 활성은 site 1 peptide에 대한 CaM kinase Ia의 활성을 증가시키는 능력으로 정의되며, 각 분획에 일정량의 정제된 CaM kinase Ia를 가했을 때의 활성에서 가해준 CaM kinase Ia 자체의 활성을 뺀 값으로 측정하였다. 정제 초기 단계에서는 site 1 peptide를 기질로 이용하는 인산화 효소들이 미처 분리되기 전이므로 분획 자체의 내인성 효소 활성이 비교적 크며, Fig. 2에는 이 값을 뺀 후 순수한 CaMKIK 활성만으로 표시하였다. 이 크로마토그래피 과정에서 CaMKIK는 분획 34 주변의 major peak과 분획 25 및 46으로 구성된 2개의 minor peak으로 분리됨을 관찰할 수 있었다. 이 결과는 CaM kinase Ia를 활성화시킬 수 있는 CaMKIK가 여러 가지 형태로 존재할 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 세 peak 중에서 가장 큰 부분을 차지하는 약 0.3 M NaCl 용액으로 유출된 peak인 분획 28~40을 합하여 실험방법에 기술한 바와 같이 CaMKIK를 정제하였다. Fig. 3은 최종 단계로 사용한 sucrose density gradient centrifugation으로부터 얻

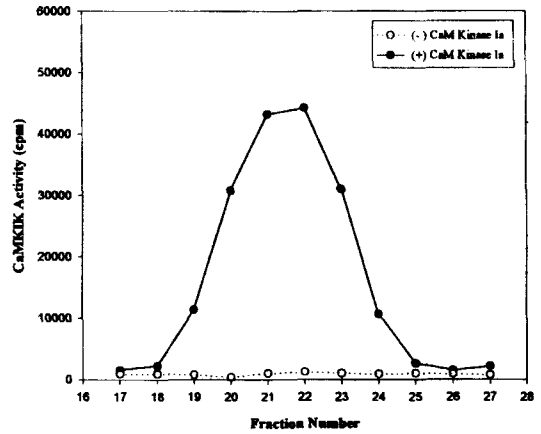


Fig. 3—CaMKIK activity in the fractions from sucrose density gradient centrifugation. Fractions from the final CaMKIK purification step, centrifugation on the 5~20% sucrose density gradients, were assayed for CaMKIK activity in the absence (○) or the presence (●) of the added CaM kinase Ia. For the latter, the activity of the added CaM kinase Ia in the absence of the CaMKIK has been subtracted. A representative profile from 6 separate preparations is shown.

은 분획에서 CaMKIK 활성을 측정한 결과이다. Q-Sepharose(Fig. 2)에서와는 달리 이 분획에는 site 1 peptide를 기질로 이용하는 내인성 효소 활성은 거의 없었다(Fig. 3). 이는 정제과정이 진행됨에 따라 CaM kinase Ia 및 Ib와 같은 site 1 peptide를 기질로 이용하는 효소가 제거된 때문인 것으로 보인다. 각 분획에 CaM kinase Ia를 가했을 때 증가한 활성을 기준으로 하여 분획 19~24를 합한 후 전기영동하여 silver staining한 결과, Lee and Edelman^{13,14)}이 보고한 CaM kinase Ia activator와 유사한 특성을 가진 CaMKIK가 관찰되었다. 최종 정제된 CaMKIK는 52.5 kDa의 major protein과 약 50 kDa 정도의 minor protein으로 구성되어 있었으며, 정제과정 중 CaMKIK 활성과 일치하는 분획에서 이 두 band가 함께 유출되는 점으로 보아 minor band는 major band의 breakdown product로 추정된다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, Lee and Edelman¹³⁾에 의해 저압에서 실시되었던 Q-Sepharose 크로마토그래피에 의해서는 본 연구에서 관찰된 바와 같은 여러 개의 CaMKIK peak(Fig. 2)이 효과적으로 분리되지 않았음을 짐작할 수 있다. 이후 5회에 걸친 반복실험에서도 Fig. 2에서

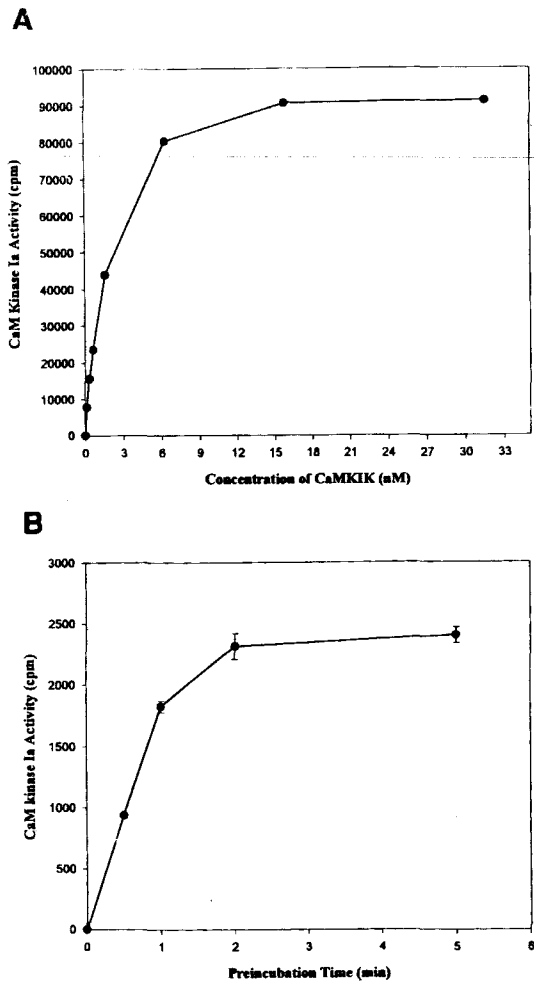


Fig. 4—Concentration- and time-dependence of CaM kinase Ia activity upon CaMKIK. A. The activity of CaM kinase Ia was measured at 30°C for 10 min by the standard assay procedures in the presence of various concentrations of purified CaMKIK. CaMKIK concentrations were calculated assuming a Mr of 52,500. The activity measured in the absence of CaMKIK was 3.4% of the maximally stimulated activity. A representative experiment using two independent preparations of purified CaMKIK is shown. B. CaM kinase Ia was preincubated with CaMKIK (15 nM) in the presence of 10 mM MgCl₂, 0.2 mM ATP, 1 mM CaCl₂ and 1 μM CaM at 30°C for the indicated periods of time. After preincubation, [³²P]ATP and other components required to readjust to standard assay conditions were added and site 1 peptide kinase activity measured for 1 min. Activity in the absence of preincubation (zero time point) has been subtracted. Each point represents the mean ± S.E. of 3 determinations.

와 같이 여러 개의 peak으로 분리된 CaMKIK를 관찰할 수 있었으며, 각 peak에 함유된 CaMKIK의 특성은 각각을 정제한 후 major peak에서 정제한 CaMKIK와의 비교 및 분석을 통해 규명되어야 할 것이다.

CaMKIK가 제거된 상태로 정제한 CaM kinase Ia 자체의 site 1 peptide에 대한 활성은 매우 낮았으나 상기 방법에 따라 정제한 CaMKIK에 의해 통상적으로 약 30~50배 증가하였다. CaMKIK의 농도에 따른 CaM kinase Ia의 활성화 정도를 측정된 결과 CaMKIK는 매우 강력한 활성화 인자였으며, 12~15 nM 정도의 낮은 농도에서 CaM kinase Ia를 최대로 활성화 시킬 수 있었다(Fig. 4A). CaMKIK에 의한 CaM kinase Ia의 시간별 활성화 정도를 측정하기 위하여, 최대 활성화시킬 수 있는 농도인 15 nM CaMKIK와 CaM kinase Ia를 Ca²⁺/CaM과 MgATP 존재 하에서 원하는 시간동안 예비 반응시킨 후 site 1 peptide kinase 활성을 측정된 결과, CaM kinase Ia는 매우 빠른 속도로 활성화되었으며 2분 이내에 최대에 도달함을 관찰하였다(Fig. 4B).

다음에는 peptide 기질, ATP 및 CaM에 대한 CaM kinase Ia의 비활성 및 활성 상태에서의 kinetic parameter를 측정함으로써 CaMKIK에 의한 활성화 기전을 연구하였다(Table I). 비활성 상태의 CaM kinase Ia는 정제한 그대로를, 활성화 상태의 CaM kinase Ia는 15 nM CaMKIK와 Ca²⁺/CaM, MgATP 존재 하에서 30°C에서 10분간 예비 반응시켜 얻은 것을 사용하였다. Site 1 peptide에 대한 apparent K_m 값은 비활성 상태와 활성 상태에서 각각 358 μM과 30.4 μM로 측정되었으며, 효소의 활성화와 더불어 이 기질에 대한 친화력이 11.8배 증가함을 알 수 있었다. V_{max} 값은 각각 8.7 μmol/min/mg과 59.0 μmol/min/mg으로, 효소의 활성화에 의해 약 7배의 증가를 보였다. Glycogen synthase에서 인산화되는 부위의 아미노산 잔기 서열¹⁷⁾로 구성된 syntide 2 (PLARTLSVAGLPGKK)는 본래 CaM kinase II⁶⁾ 및 CaM kinase IV¹⁸⁾의 기질로 잘 알려져 있으나, CaM kinase Ia에 의해서도 인산화된다.^{11, 13)} 이 기질을 이용한 kinetic parameter 측정에 있어서도 site 1 peptide의 경우와 유사한 정도의 친화력 및 최대 속도 증가를 관찰하였다. ATP에 대한 apparent K_m 값은 비활성 상태와 활성 상태에서 각각 128 μM과 78.7 μM로 나타나 친화력이 약간 증가하는 것으로 보이지만

Table I— Kinetic parameters of CaM kinase Ia in its non-activated and activated states

State of enzyme	Site 1 peptide		ATP		CaM	
	K_m (μM)	V_{max}^a	K_m (μM)	V_{max}^a	K_a (nM)	V_{max}^a
Nonactivated state	358 \pm 32	8.7 \pm 0.9	128 \pm 57b	3.6 \pm 0.9	25.6 \pm 2.6	1.9 \pm 0.2
Activated state	30.4 \pm 0.8	59.0 \pm 1.1	78.7 \pm 5.4b	88.2 \pm 3.3	10.8 \pm 1.2	68.7 \pm 5.3

Each value represents the mean \pm S.E. of three independent experiments. Each experiment consisted of five different concentrations of site 1 peptide, ATP, or CaM, and two determinations at each concentration.

^a V_{max} is given as $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$.

^bThe means are not significantly different.

통계적 유의성은 없는 것으로 분석되었고, V_{max} 값은 각각 3.6 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 과 88.2 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 효소의 활성화에 의해 약 25배의 증가를 보였다. CaM에 대한 apparent K_a 값은 비활성 상태와 활성 상태에서 각각 25.6 nM과 10.8 nM로서 효소의 친화력이 통계적으로 유의성 있게($p < 0.05$) 증가하였으며, V_{max} 값은 각각 1.9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 과 68.7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 으로 36배의 증가를 보였다. 따라서 CaMKIK에 의해 CaM kinase Ia가 활성화되면 peptide 기질과 CaM에 대한 결합 친화력이 증가하고, 이에 의해 peptide 기질을 인산화시키는 최대 반응속도가 현저히 증가하여 빠른 속도로 활성화됨을 이 결과로부터 알 수 있었다.

한편, Table I에 제시된 비활성 상태에서의 kinetic parameter를 살펴보면, 기질이 포화 상태로 존재하는 조건에서는 CaMKIK에 의해 활성화된 상태가 아니라 하더라도 인산화가 서서히 일어날 수 있음을 시사한다. 이에 관한 명확한 해답은 본 연구에서 정제하여 사용한 CaM kinase Ia에 미량이나마 CaMKIK가 전혀 포함되어 있지 않다는 증거가 없는 한 쉽게 내려질 수 없을 것이다. 그럼에도 불구하고, 효소가 활성화됨에 따라 기질에 대한 apparent K_m 값이 감소한다는 사실은 생리적으로 중요한 의미를 지닐 수도 있다. 왜냐하면, CaM kinase Ia가 기저 상태일 경우, 즉 CaMKIK에 의해 활성화되기 이전의 상태에서는 이 효소에 의해 인산화될 수 없었던 단백질이라 해도, CaMKIK에 의해 활성화된 상태에서는 본 연구 결과에서 볼 수 있는 바와 같이 기질 친화력 및 최고 반응속도의 현저한 증가와 더불어 인산화될 수도 있기 때문이다. 이 가능성은 CaM kinase Ia가 활성화됨으로서 세포내의 새로운 기질을 "recruit"하여 생리적으로 중요한 역할을 수행할 수도 있음을 시사한다.

비활성 상태의 효소에 의한 인산화 반응은 baculovirus²³⁾에 발현시켜 정제한 CaM kinase IV에서도

관찰되었다. 이 효소는 1~2시간에 걸쳐 서서히 autophosphorylation이 일어나 활성이 약 2배 가량 증가하는 것으로 보고되었으나, 위에서 논의한 CaM kinase Ia의 경우와 마찬가지로 생리적 중요성은 없을 것으로 추정된다. 이 효소에 쥐의 뇌에서 추출한 68 kDa의 CaM kinase IV kinase(CaMKIVK)를 가하면 활성이 증가하며, 이러한 기전에 의해 CaM kinase IV가 활성화되어 그 생리적 기능을 수행할 것으로 생각된다.^{23, 24)} CaMKIVK에 의한 CaM kinase IV의 활성 증가폭(10배²³⁾)은 CaMKIK에 의한 쥐 CaM kinase Ia의 증가폭(30~50배¹³⁾)이나 사람 CaM kinase I의 증가폭(25배¹⁵⁾)보다 작은 것으로 나타났다. 그 이유는 활성화된 CaM kinase IV의 경우, syntide 2에 대한 K_m 값이 비활성 상태보다 약 10배 감소할 뿐 V_{max} 에는 변화가 없었고, ATP에 대해서는 K_m 과 V_{max} 값에 거의 영향을 주지 않은 반면,²³⁾ CaM kinase Ia의 경우에는 peptide 기질과 CaM에 대한 친화력을 증가시킬 뿐 아니라 V_{max} 값도 크게 증가시키는 때문이라 생각된다.

이상에서 관찰한 바와 같이 빠르고 효율적인 CaM kinase Ia의 활성화 과정을 볼 때 CaMKIK는 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 과 더불어 CaM kinase Ia의 생리적 활성 발현에 있어서 거의 절대적으로 필요한 요소임을 알 수 있다. CaM kinase Ia는 CaMKIK에 의해 인산화되어 conformational change를 일으키고, 그로 인해 효소와 기질간의 상호작용 및 반응속도가 증가함으로써 결국 효소가 활성화될 것으로 추정된다.

CaM kinase IV의 경우와 유사한 이러한 활성화 기전은 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 존재하에서 autophosphorylation에 의해 활성화되는 CaM kinase II¹⁷⁾나 CaM kinase V²⁵⁾와는 전혀 다른 특이한 기전이다. 그러나, 박테리아에 발현하여 정제한 37 kDa의 쥐 CaM kinase I은 CaM kinase II와 유사한 성질을 보여 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 존재시 Thr-177 잔기에 autophosphorylation이 일어나는 것으로

보고되었는데,²⁶⁾ 이 효소와 CaM kinase Ia, CaM kinase Ib와의 관계는 앞으로 규명되어야 할 과제중의 하나이다. CaM kinase II와 더불어 CaM kinase I 및 CaM kinase IV는 뇌에서 신경전달물질의 유리 및 시냅스 신호전달 등에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 추정되나, 세포 내의 Ca²⁺ 신호전달체계에서 이들 효소의 활성을 조절하는 인자인 CaMKIK 및 CaMKIVK의 활성을 조절하는 세포의 자극이나 upstream regulators에 관해서는 전혀 보고된 바가 없다. 뿐만 아니라, 본 연구에서 관찰된 여러 가지 형태의 CaMKIK의 구조적 특성, 생리적 의미, CaMKIVK와의 연관성 등에 대해서도 앞으로 더 활발한 연구가 필요한 상태이다.

문 헌

- 1) Campbell, A. K. : *Intracellular Calcium: Its Universal Role as Regulator* John Wiley & Sons, New York (1983).
- 2) Tsien, R. W. and Tsien, R. Y. : Calcium channels, stores, and oscillations *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 715 (1990).
- 3) Davis, T. N. : What's new with calcium? *Cell* **71**, 557 (1992).
- 4) Nairn, A. C., Hemmings, H. C., Jr. and Greengard, P. : Protein kinases in the brain *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 931 (1985).
- 5) Edelman, A. M., Blumenthal, D. K. and Krebs, E. G. : Protein serine/threonine kinases *Annu. Rev. Biochem.* **56**, 567 (1987).
- 6) Colbran, R. J., Schworer, C. M., Hashimoto, Y., Fong, Y.-L., Rich, D. P., Smith, M. K. and Soderling, T. R. : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II *Biochem. J.* **258**, 313 (1989).
- 7) Waalas, S. I. and Greengard, P. : Protein phosphorylation and neuronal function *Pharmacol. Rev.* **43**, 299 (1991).
- 8) Hanson, P. I. and Schulman, H. : Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases *Annu. Rev. Biochem.* **61**, 559 (1992).
- 9) Nairn, A. C. and Greengard, P. : Purification and characterization of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase I from bovine brain *J. Biol. Chem.* **262**, 7273 (1987).
- 10) Czernik, A. J., Pang, D. T. and Greengard, P. : Amino acid sequences surrounding the cAMP-dependent and calcium-calmodulin-dependent phosphorylation sites in rat and bovine synapsin I *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7518 (1987).
- 11) DeRemer, M. F., Saeli, R. J. and Edelman A. M. : Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases Ia and Ib from rat brain. I. Identification, purification, and structural comparisons *J. Biol. Chem.* **267**, 13460 (1992).
- 12) DeRemer, M. F., Saeli, R. J., Brautigan, D. L. and Edelman A. M. : Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinases Ia and Ib from rat brain. II. Enzymatic characteristics and regulation of activities by phosphorylation and dephosphorylation *J. Biol. Chem.* **267**, 13466 (1992).
- 13) Lee, J. C. and Edelman, A. M. : A protein activator of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase Ia *J. Biol. Chem.* **269**, 2158 (1994).
- 14) Lee, J. C. and Edelman, A. M. : Activation of Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase Ia is due to direct phosphorylation by its activator *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **210**, 631 (1995).
- 15) Haribabu, B., Hook, S. S., Selbert, M. A., Goldstein, E. G., Tomhave, E. D., Edelman, A. M., Snyderman, R. and Means A. R. : Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase *EMBO J.* **14**, 3679 (1995).
- 16) Ohmstede, C.-A., Bland, M. M., Merrill, B. M. and Sahyoun, N. : Relationships of genes encoding Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase Gr and caldesmon: A gene within a gene *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 5784 (1991).
- 17) Schworer, C. M., Colbran, R. J. and Soderling, T. T. : Reversible generation of a Ca²⁺-independent form of Ca²⁺(calmodulin)-dependent protein kinase II by an autophosphorylation mechanism *J. Biol. Chem.* **261**, 8581 (1986).
- 18) Frangakis, M. V., Ohmstede, C.-A. and Sahyoun, N. : A brain specific Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase Gr) is regulated by autophosphorylation *J. Biol. Chem.* **266**, 11309 (1991).

- 19) Okuno, S. and Fujisawa, H. : Requirement of brain extract for the activity of brain calmodulin-dependent protein kinase IV expressed in *Escherichia coli* *J. Biochem.* **114**, 167 (1993).
- 20) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 21) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 22) Moeremans, M., Daneels, G. and De Mey, J. : Sensitive colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes *Anal. Biochem.* **145**, 315 (1985).
- 23) Tokumitsu, H., Brickey, D. A., Glod, J., Hidaka, H., Sikela, J. and Soderling, T. R. : Activation mechanisms for Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV: Identification of a brain CaM-kinase IV kinase *J. Biol. Chem.* **269**, 28640 (1994).
- 24) Okuno, S., Kitani, T. and Fujisawa, H. : Purification and characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV kinase from rat brain *J. Biochem.* **116**, 923 (1994).
- 25) Mochizuki, H., Ito, T. and Hidaka, H. : Purification and characterization of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase V from rat cerebrum *J. Biol. Chem.* **268**, 9143 (1993).
- 26) Picciotto, M. R., Czernik, A. J. and Nairn, A. C. : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I: cDNA cloning and identification of autophosphorylation sites *J. Biol. Chem.* **268**, 26512 (1993).