

유지방구막의 주요 성분인 PAS-4 당단백질의 구조 해석

황보 식

상지대학교 생체기능과학 연구소

Structural Analysis of PAS-4 Glycoprotein from Milk Fat Globule Membrane

Sik Hwangbo

Bioscience Research Center, Sangji University

ABSTRACT

Most lipids in milk are dispensed as the form of fat globules. Apical portion of plasma membrane is coated with fat globules, which are synthesized from mammary epithelial cells and then secreted into the lumen. The unique phenomenon in separation of the plasma membrane from the cell is observed only in mammary system. It has been suggested that milk fat globule membrane (MFGM) is formed from endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, secretory granule to plasma membrane. For this reason MFGM is important for understanding the structure and function of biological membrane. Because MFGM also plays an important role in inhibition of lipase action, stimulation of nutrient digestion and absorption, emulsion or function as natural liposome, study of the major components in MFGM will provide the opportunity for more broad industrial uses of MFGM in the future.

I. 서 론

생체를 구성하고 있는 단백질의 많은 부분은 당 단백질로 되어 있다. 당쇄를 갖고 있지 않은 단백질은, 유전자의 염기배열에 의해 아미노산이 결정되며, 균일한 분자로서 만들어진다. 그러나 당단백질은, 아미노산 배열이 유전자의 염기배열에 의해 결정되어지는 것이 아니고, 당쇄의 결합이 그 분자구조에 다양성을 부여하고 있다. 단백질에 당

쇄가 결합됨으로써, 그 단백질의 기능은 큰 영향을 받는다. 포유동물 세포의 세포막을 구성하고 있는 당단백질은 세포인식, 세포접착, 면역인식, 또는 virus나 호르몬의 수용체 등의 장소로서 중요한 역할을 담당하고 있다.

당단백질은 유즙에도 많이 함유되어 있다. 특히 막 획득을 구성하고 있는 성분중에는 당단백질이 많이 포함되어 있다. 분비된 우유의 지질의 대부분은 지방구로써 분산되어, 안전한 emulsion의 형태를 유지하고 있는 것은 유선의 세포막 유래의

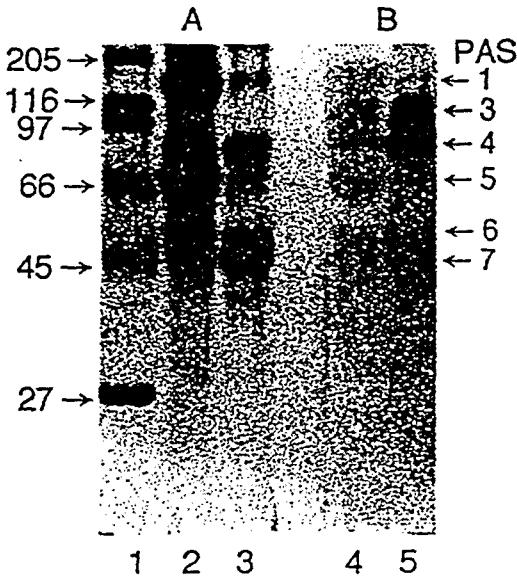


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of MFGM proteins.

MFGM was separated by SDS-PAGE(10%) under reducing conditions. Lanes 1, protein markers; 2 and 4, MFGM; 3 and 5 Triton X-114 soluble fraction from Fig. 1-2. A was stained with coomassie brilliant blue R-250 (CB) and glycoprotein(B) with periodic acid-Schiff reagent(PAS).

양친매성의 막물질, 유지방구막(milk fat globule membrane, 이하 MFGM)에 의해 피복되어 있기 때문이다. MFGM은 CB염색에 의해 주로 16개의 peptide로 구성되어 있으며, PAS염색에 의해 7개의 성분이 검출되고 있으며, PAS에 의해 염색되는 당단백질을 분자량 순으로 PAS-1에서 PAS-7까지 명명하고 있다(Fig. 1).

MFGM의 주요 구성 성분의 하나인 PAS-4는, 분자량 78,000의 성분으로써 막과 강하게 결합되어 있는 소수성 당단백질인 것이 알려져 있다. 또한 CB염색한 MFGM의 겔을 이용하여 그 함량을 측정된 결과 약 3%를 차지하고 있는 것이 확인되었다.

그러나 유선 상피세포에서의 PAS-4의 상세한 구조 및 기능에 대해서는 아직 알려져 있지 않다. 따라서 PAS-4를 정제하여 그 생화학적 특성을 1995년도 한국낙농학회에 보고한 바 있다. 이번에

는 PAS-4의 유전자 구조 해석에 대해 보고하기로 하겠다.

1970년대 초에 유전자 공학이 탄생한 이래 20여년이 경과되었으며, 그 동안 많은 새로운 기술이 개발되었다. 목적의 유전자 산물, 즉 단백질을 정제하여 아미노산 배열을 조사한 후, 이것을 기준으로 하여 합성한 oligonucleotide를 probe로 하여 hybridization에 의해 목적의 cDNA clone를 찾는 방법이 일반적이었다.

최근 cDNA bank를 대장균에 발현시켜, 발현된 단백질을 항체와 결합시키거나, 특정의 염기배열과 결합시킴으로써 목적의 cDNA를 동정하는 것이 가능해졌다. 이러한 유전자 공학적 기법들을 이용하여 PAS-4의 유전자구조 및 그 기능을 밝히기 위한 연구를 보고하기로 하겠다.

II. PAS-4의 cDNA cloning

유선으로부터 total RNA를 AGPE법으로 정제한 후, oligo(dT)칼럼을 이용하여 mRNA를 분리시켰다. 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성시킨 후 이것을 template로 하여 PCR을 실시하였다. Primer로써는 N-말단 분석 및 부분아미노산 배열 분석을 하여 얻은 정보를 이용하여 oligonucleotides를 합성하여 사용하였다. 그 결과 전장 555bp의 PAS-4의 부분 cDNA의 염기배열을 해독하였다. 이것을 가지고 5'- 및 3'-Race PCR을 실시하여 전장 1,882 bp의 PAS-4 cDNA를 cloning할 수 있었다(Fig. 2). 5'- 과 3'-Race PCR에 의해 cloning된 산물의 증폭된 부분의 염기배열은 일치하는 것이 확인되었다.

III. PAS-4의 분자구조

염기배열에서 추정된 아미노산의 1차 배열을 중심으로 PAS-4의 소수성도를 Kyte-Doolittle지수를 이용하여 측정하였다. 그 결과 N-말단 및 C-말단쪽에 매우 소수성이 강한 단편이 확인되었다.

```

tcagtgtaattcgttgcctccaaccagcattctgaaagtgcgttgacactggtggtccttgc 63
actttttcatcggactccaactgaaccagacctcttggcaacactttcatcagaccgggag 126
ttggaagaagcaggtgctgaacctcagtttttccctaggacaagaaaaATGGGGTGCATCGA 189
ACTGTGGGCTCATGCTGGTGTCTCATTGGTGCAGTCCTGGCTGTGTTTGGAGGGATTCTA 262
N C G L L A G A V I G A V L A V F G G I L
ATGCCAGTTGGAGACATCCTTATTGAGAAGCAATTAAGAAGAAAGTTGCTTGAAGAAGCC 325
M P V G D H L I E K T I K K E V V L E E G
ACAATTGCTTTAAAAAATGGGTTAAAACAGGCACAGATGTTTACAGACAGTTTTGGATATT 388
T I A F K N W V K T G T D V Y R O F W I F
GATGTGCAGAAATCCAGATGAAGTGACAGTTAACAGCAGCAAAATTAAGTTAAGCAAAGAGGT 451
D V Q N P D E V T V N S S K I K V K Q R G
CCTTACACATACAGAGTTGTTATCTAGCCAAGGAAAATATAACCCAGGACCCTGAGACCAAC 514
P Y T Y R V R Y L A K E N I T Q D P E T N
ACGGTCTCTTCTGCAGCCCAATGGGGCCATCTTTGAACCCCTGCTATCAGTTGGAAGCTGAG 577
T V S F L Q P N G A I F E P L L S V G T E I
GATGACAAGTTCACCATCTCAACCTGGCTGTAGCAGCTGCACCACAGCTGATCCAAATACA 640
D D K F T I L N L A V A A A P Q L Y P T R
TTTATGCAAGGAATACTCAATTCATTTATCAAAAAGTCCAAATCTTCTATGTTCAAACAGA 703
F M Q G I L N S F I K K S K S S M F Q N R
ACTTTGAAAGAACTATTGGGGGCTATACCGATCCATCTTGAATTTGGTTCATATCCTATT 766
T L K E L L W G Y T D P F L N L V P Y P I
ACTACTACAAATGGTGTGTTTATCCTTACAATAACTGCGGATGGAATTTAGAAAAGTTTTC 849
T T T I G V F Y P Y N N T A D G I Y K F I
AATGGAAGGACGACATAGCAAAGTTGCTATAATTGACACATATAAAGGCAGAAAGATCTC 912
N G K D D I S K V A I I D T Y K G R K N L
TCCTATTGGTCAAGTATTGTGACCTGATTATGGTACAGATGCAGCCTCATTCCACCTTGT 975
S Y W S S Y C D L I N G T D A A S F P P L
GTTGAGAAGCAAGGATTTGCAATTTTCTCCTCTGATATTGCAAGTCCATCTATGCTGTG 1038
V E K T R V L Q F F S S D I C R S I Y A V
TTTGAGCTGAAATAAATCTGAAAGGAATCCCTGTGTATAGATTGTTCTTCCATCCTTTGCT 1101
F G A E I N L K G I P V Y R F V L P S F A
TTTGCATCTCCATTTGAAAATCCAGACAACCACGTGTTTCTGCACAGAAAATCATCTCAAAA 1164
F A S P F E N P D N H C F C T E K I I S K
AATTGTACCTTATATGGTGTGCTAGACATTGGCAAATGCAAAGAAGGAAAACCTGTGTACATT 1227
N C T L Y G V L D I G K C K E G K P V Y I
TCATCTCCTCATTTTCTACATGGAAGTCTGAACTTGCAAGACCTATTGAAGGCTTAAAGTCCA 1290
S L P H F L H G ' S P E L A E P I E G L S P
AATGAAGAAGAACATAGCACGTACTTAGATGTTGAACCTATAACTGGATTACTTTACGGTTT 1353
N E E E H S T Y L D F E P I T G F T L R F
GCAAAACGGCTGCAGGTCAACACTGGTCAAGCCAGGCAAAAAAAAAAATGAAGCATGAAGAAT 1416
A K R L Q V N T G Q A R Q K K I E A L K N
CTGAAGCACAACTATATTGTCCTTCTTTGGCTTAATGAGACTGGTACCATTTGGGTGATGAG 1479
L K H N Y I V P I L W L N E T G T I G D E
AAGCGGAAATGTTCAAAAATCAAGTGACTGGGAAAATAAACCTCCTGGGCTGGTAGAAATC 1542
K A E M F R N Q V T G K I N L L G L V E I
GCTTGTGCTAGTGTGGTGTGATGTTTATTGCTTTCATGATTCATATTGATGTCATACAGA 1605
V L L S V G V M F I A F M I S Y C A Y R
TCAAAGAGAGTAAATTAAGgagtaaaadagctctctacatttatgaaccagctatgtcaggacc 1668
S K T I K
tttcttaatatcaccttcaaaaagtcaagatttcatgctttatattttcaaacacaccttacc 1731
ttacagttcaagaactggtgacactcctccacctgccccataagcagcagcacattttcaaaag 1794
gattattaagacatcaataaattccacacttcgaacgaaaaccagcacttttaaaaattcga 1857
catgttcacaatggaatgacttcag-3' 1882

```

Fig. 2. cDNA cloning of PAS-4 by 3'- and 5'-RACE PCR.

Nucleotides are numbered at the right side of each line. Lower lines were indicated amino acid from nucleotides.

따라서 이 부위가 막통관 부위인 것으로 추정되었다. 아미노산 배열에서 추정된 8개의 N-결합 당쇄 부위는 모두 친수성 부위에 위치하고 있었다. 아미노산의 1차 구조를 이용한 소수성도를 계산한 결과, 1,226cal/residues인 것이 확인되어 매우 소수성이 강한, 내재성 당단백질인 것이 입증되었다. 또한 PAS-4의 정제 과정에서 MFGM으로부터 용이하게 추출되지 않았던 결과와 일치하였다.

이러한 소수성도를 바탕으로 막과의 결합형태를 추정하였다. 그 결과, N- 및 C-말단의 2개 부위를 막통관영역으로 가지고 있었으며, 그밖에 4개

의 부위가 소수성 아미노산이 밀집되어 있어, 막과 결합 또는 막속에 위치하고 있는 구조가 예측되었다.

따라서 N-말단 및 C-말단 쪽의 cys잔기를 포함하는 짧은 배열은 세포질 쪽으로 향하고 있으며, 8개의 N-결합당쇄 부위를 가진 대부분의 아미노산 영역을 lumen쪽으로 향하고 있는 구조가 예측되어 졌다(Fig. 3)

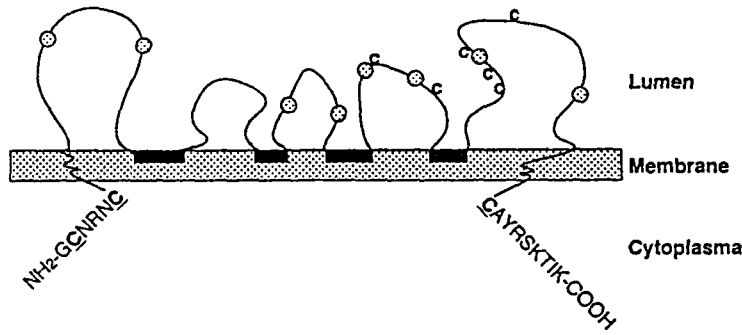


Fig. 3. Cartoon depicting the main features of PAS 4 glycoprotein.

The dotted box illustrates the membrane. C, cystein residues, Circles represent oligosaccharide chains attached to the potential glycosylation sites. The black boxes show strong hydrophobic region.

IV. Northern and Southern Blotting

유선에서의 PAS-4의 발현량을 Northern blotting에 의해 측정하였다. 그 결과, 약 2.9kb의 크기로 PAS-4가 다량 발현되고 있는 것이 확인되었다. 또한 다른 조직에서 PAS-4 또는 이와 유사한 성분의 발현을 조사한 결과, 간, 심장, 신장, 폐 그리고 지라에서도 발현되고 있는 것이 확인되었다. 각 조직에서 그 발현량을 비교한 결과, HEL세포에서는 유선조직과 거의 같은 양이었으나, 간 및 신장은 약 1/3, 그리고 폐나 심장, 지라는 1/10 정도의 양에 불과하였다. cDNA염기 배열에서 PAS-4는 CD36과 약 94%의 유의성을 나타내고 있음이 확인되었으므로, 유선 이외의 조직에서 발현되고 있는 성분은 CD36으로써 발현되고 있음을 시사하고 있다.

간으로부터 조제한 Genomic DNA를 제한효소로 절단한 후, PAS-4 cDNA clone를 probe로 이용하여 Southern blotting을 실시하였다. 그 결과 Pst I, Hind III, BamHI 등으로 절단시켰을 때, 몇 개의 signal이 검출되었으나, 그 감도가 매우 낮아 한 개의 유전자에서 유래하는지의 여부는 불확실하였다. 그러나, PAS-4를 code하는 DNA의 copy수는 매우 적은 것이 확인되었다.

V. PAS-4 당단백질의 변동

PAS-4에 대한 단클론항체를 생산하여, ELISA에 의해 PAS-4의 변동을 조사하였다. 그 결과, 분만후 시간의 경과와 함께 PAS-4의 발현량이 감소하는 것이 확인되었다.

Rat의 유선을 이용하여, 유선발달과 함께 PAS-4의 발현량을 RT-PCR을 통하여 조사하였다. 비 임신기, 임신초기, 임신말기 그리고 비유중의 Rat로부터 RNA를 정제하여 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과, 임신말기가 될수록 PAS-4의 발현량이 증가하였으며, 분만직후의 발현량이 최대가 되는 것이 확인되었다. 또한 조직염색을 실시한 결과 PAS-4는 정단세포의 lumen쪽이 강하게 염색되는 것이 확인되어 PAS-4와 유의성이 매우 높은 CD36과 차이가 있음이 밝혀졌다. 즉, PAS-4는 분비기구에 관여하며, CD36과 또 다른 기능을 가지고 있을 가능성이 높은 것이 확인되었으며, 유선세포에서의 PAS-4의 기능을 밝히기 위해 연구를 수행중에 있다.

VI. 결론

우유의 대부분의 지질은 지방구의 형태로써 분

산되어 있다. 유선 상피세포에서 합성된 지질은 지방방울로써 정단세포 막에 피복되어 lumen으로 분비된다. 특히 세포막아 세포밖으로 이출되는 현상은 생물계에서는 유선에서만 볼 수 있는 현상이다.

MFGM의 형성 과정은, “소포체→골지체→분비소포→세포막→MFGM”이라는 막의 흐름이 제창되어 있다. 따라서 MFGM은 생체막 연구에 귀중한 자원이며, 이를 연구함으로써, 생체막의 dynamic한 구조 및 그 기능을 연구하는 것이 가능하리라 생각된다. 특히 최근에 lipase에 대한 저해작용, 각종 영양소의 소화 흡수 촉진작용, 유화기능, 또는 천연 liposome로써의 기능들이 연구되어지면서 새로운 연구분야로서 주시되어 지기 시작하고 있다. 따라서, MFGM의 주요구성성분들의 연구는 MFGM에 대한 보다 폭넓은 이용가치를 부여해 주리라 생각되어진다.

Ⅶ. 인용문헌

- Greenwalt, D. E., V. G. Johnson and I. H. Mather. 1985. Specific antibodies to PAS IV, a glycoprotein of bovine milk fat globule membrane, bind to a similar protein in cardiac endothelial cells and epithelial cells of lung bronchioles. *Biochem. J.*, 228:233.
- Greenwalt, D. E., K. W. K. Watt, T. Hasler, R. J. Howard and S. Patel. 1990. Structural, functional, and antigenic differences between bovine heart endothelial CD36 and human platelet CD36. *J. Biologi. Chem.* 265:16296.
- Greenwalt, D. E., K. W. K. Watt, O. Y. So and N. Jiwani. 1990. PAS-4, an integral membrane protein of mammary epithelial cells, is related to platelet and endothelial cell CD36(GP IV). *Biochemistry*, 29:7054.
- Greenwalt, D. E., R. H. Lipsky, C. F. Ockenhouse, H. Ikeda, N. N. Tandon and G. A. Jamieson. 1992. Membrane glyco-
- protein CD36 a review of its roles in adherence, signal transduction, ad transfusion medicine. *Blood*, 80:1105.
- Imamura, N., H. Ota, K. Abe and A. Kuramoto. 1994. Expression of the thrombospondin receptor (CD36) on the cell surface in megakaryoblastic and promegakaryocytic leukemias: Increment of the receptor by megakaryocyte differentiation *in vitro*. *Amer. J. Hemato.*, 45:181.
- Johnson, V. G. and I. H. Mather. 1985. Monoclonal antibodies prepared against PAS-1, Butyrophilin and GP-55 from guinea pig milk-fat-globule membrane bind specifically to the apical pole of secretory-epithelial cells in lactating mammary tissue. *Exp. Cell Res.*, 158:144.
- Kanno, C., S. Hwangbo and N. Azuma. 1995. Rapid and simple procedure for purifying PAS 4 glycoprotein from bovine milk fat globule membrane. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59:848.
- Keenan, T. W., D. J. Morre and C. M. Huang. 1974. In *Lactation*, vol. 2. (Larson, B. L., Smithed, V. R.) Academic Press, New York and London. 191.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157:105.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265.
- Mather, I. H. and L. J. W. Jack. 1993. A review of the molecular and cellular biology of butyrophilin, the major protein of

- bovine milk fat globule membrane. J. Dairy Sci., 76:3832.
13. Mather, I. H., L. R. Banghart and W. S. Lane. 1993. The major fat-globule membrane proteins, bovine components 15/16 and guinea-pig GP 55, are homologous to MFG E8, a murine glycoprotein containing epidermal growth factor-like and factor V/VIII-like sequences. Bioch. Mol. Biol. Int., 29:545.
 14. McPherson, A. V. and B. J. Kitchen. 1983. Reviews of the progress of dairy science: The bovine milk fat globule membrane its formation, composition, structure and behavior in milk and dairy products, J. Dairy Res., 50:107.
 15. Ockenhouse, C. F., C. Magowan and J. D. Chulay. 1989. Activation of monocytes and platelets by monoclonal antibodies or malaria infected erythrocytes binding to the CD36 surface receptor *in vitro*. J. Clin. Invest., 84:468.
 16. Oquendo, P., E. Hundt, J. Lawler and B. Seed. 1989. CD36 directly mediates cytoadherence of plasmodium falciparum parasitized erythrocytes. Cell, 58:95.
 17. Peterson, G. L., 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal. Biochem., 83:346.
 18. Woodruff, J. and B. M. Gesner. 1969. The effect of neuraminidase on the fate of transfused lymphocytes. J. Exp. Med., 129:551.