

흰쥐 뇌에서 발현되는 16 kDa Vacuolar (H⁺)-ATPase의 유전자 클로닝

[†]Department of Anatomy & Neurobiology, University of Maryland School of Medicine,
Baltimore, Maryland, 21201, USA, ¹계명대학교 기초과학부 생물학전공

신 송 우[†] · 유 민¹

국문초록: Vacuolar (H⁺)-ATPase (V-ATPase)는 multi-subunit로 구성된 단백질로서, proton pumping을 통해 세포내 산성화반응에 관여를 한다. 최근에 이 단백질이 synaptic vesicle에서도 발견된 것으로 보아 뇌 신경전달에 중요한 역할을 수행할 것으로 추정하고 있다. 우리는 흰쥐 뇌에서 분리한 mRNA를 주형으로 한 PCR 반응에서 16 kDa subunit의 V-ATPase cDNA를 클로닝할 수 있었고, 이의 염기서열 또한 결정하였다. 분리된 뇌 16 kDa V-ATPase의 coding sequence는 전체 468 bp로서 간에서 보고되었던 것과 동일한 크기였다. 단지 3' 말단의 염기 하나가 A에서 C로 바뀌어 있었는데 모두 alanine (GCA, GCC)을 지정하기 때문에 단백질의 일차구조에는 변화가 없는 것으로 확인되었다. 한편 rat brain cDNA library에서도 동일한 clone이 분리되었는데 역시 같은 부분에서 polymorphism이 발견되었고, RNA splicing 등 더 이상의 조직특이적 변화는 없었다. 본 연구는 16 kDa V-ATPase의 뇌에서의 기능과 신경말단에서의 neurotransmission 및 synaptic vesicle의 재순환 기전을 이해하는데 유용한 정보가 될 것이다.

서 론

세포내의 이온 농도를 일정하게 유지하는 것은 생명 유지를 위하여 대단히 중요한 일이다. 이 기능은 ion-pumping ATPase라는 단백질들이 담당하고 있는데 위치에 따라 세가지로 나뉘어진다. P-ATPase는 세포막에, F-ATPase는 미토콘드리아와 엽록체 등에, 그리고 V-ATPase는 리소좀 및 골지체와 같은 세포내 막성분에 각각 위치한다⁹. 이 중에서 F-ATPase와 V-ATPase는 상호 밀접한 관계에 있는데 F-ATPase가 ATP를 합성하는 반면 V-ATPase는 ATP를 분해해준다³. 즉 V-ATPase가 ATP를 분해하여 얻은 에너지는 vacuole 내부의 단백질을 바깥으로 배출하는데 이용이 되고, 결국 세포내 pH를 일정하게 유지해주는 산성화반응이 일어나게 된다. 최근에는 V-ATPase가 신경말단의 synaptic vesicle에서도 발견되었기 때문에 neurotransmission과 synaptic vesicle이 재순환되는 과정에서 중요한 역할을 담당

할 것으로 추정되고 있다¹⁰.

V-ATPase는 multi-subunit로 된 복합단백질이다. 각각의 subunit는 크기별로 115, 72, 57, 41, 39, 34, 33, 20, 그리고 16 kDa 등의 9 종류인데⁴, 일부는 종별, 조직별 그리고 발생단계별로 여러가지 isoform이 존재한다고 보고되어 있다^{2,8,11,14,15}.

기능상 특히 중요시 되는 것은 가장 작은 크기인 16 kDa V-ATPase이다. 그만큼 연구도 활발해서 소의 chromaffin granule⁷, 사람의 HeLa cell과 cystic epithelium⁵, 흰쥐의 간¹⁰, 생쥐의 osteoclast⁶ 등으로부터 cDNA가 연속적으로 분리되었다. 최근의 보고에 의하면 16 kDa ATPase가 뇌에서도 발현되고 있다는 것이 northern 및 western blotting을 통해 확인되었는데^{10,12} 아직 왜 이 단백질이 뇌에서 발현되는지 그 기능을 정확히 모를 뿐만 아니라 mRNA도 분리하지 못한 실정이다. 우리는 이러한 이유로 16 kDa V-ATPase cDNA를 흰쥐 뇌에서 직접 클로닝하여 조직특이적 변화가 있는지를 보려 하였고 염기서열 또한 결정하였다. 본 연구는 16 kDa V-ATPase의 뇌에서의 기능과 신경말단에서의 neurotransmission 및 synaptic vesicle의 재순환 기전을 이해하는데 유용한 정보가 될 것으로 기대된다.

*논문 접수: 2000년 9월 10일

수정재접수: 2000년 9월 30일

[†]별책 요청 저자: sshin003@umaryland.edu

Table 1. Primers used for PCR amplifications

Name	Direction	Sequence
16KDV-1	Sense	ATGGCTGACATCAAGAACAACC
16KDV-2	Antisense	CTACTTTGTGGAGAGGATTAGG
β actin-1	Sense	GCCGGCTTCGCGGGCGACGATGC
β actin-2	Antisense	GCCAGCCAGGTCCAGACGCAGGATG

재료 및 방법

1. 재료

성숙한 숫 흰쥐는 효창사이언스 (Taegu, Korea)에서 구입하였고, polymerase chain reaction에 사용할 oligonucleotide들은 Biopolymer lab (Baltimore, USA)에 주문 합성하였다. Lambda ZAP II rat brain cDNA library는 Stratagene (USA)에서, MMLV reverse transcriptase는 Gibco BRL (USA)에서, RNAqueous kit은 Ambicon (USA)에서 각각 구입하였다. PCR 기기는 Perkin Elmer Cetus (USA)의 DNA Thermal Cycler를, DNA sequencing 기기는 ABI 373 Stretch (Applied Biosystems, USA)를 사용하였다.

2. Rat brain total RNA 분리

흰쥐에게 sodium pentobarbital (25 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시켰다. 0.9% saline 200 ml을 좌심실에 주사하고 우심방으로 나오도록 관류하여 혈액을 완전히 제거한 다음 신속하게 뇌조직을 적출하였다. Total RNA는 RNAqueous kit을 구입하여 제조사의 추천 방법에 따라 분리하였다.

3. Reverse transcription (RT)

Total RNA 1 μ g을 DEPC-treated water 13.5 μ l에 현탁하였고, 여기에 6 μ l의 5X MMLV RT buffer, 3 μ l의 0.1 M DTT, 3 μ l의 BSA (1 mg/ml), 1 μ l의 oligo (dT) (100 pmoles/ μ l), 2 μ l의 10 mM dNTP, 0.5 μ l의 RNase inhibitor (40 U/ μ l), 1 μ l의 MMLV reverse transcriptase (200 U/ μ l)를 혼합한 다음 37°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다.

4. Phage DNA 분리

Rat brain cDNA library로부터의 recombinant phage DNA 분리는 Sambrook 등이¹³⁾ 제시한 방법에 따라 실시하였다.

M 1 2 3 4 5

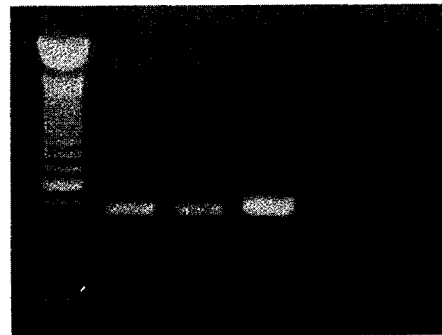


Fig. 1. Results of PCR reactions followed by electrophoresis. Lanes 1, 2 represent the amplified DNA products (468 bp) using reverse-transcribed cDNA (lane 1) or phage DNA (lanes 2) as templates. Lane 3 shows the PCR reaction with β -actin primers as a positive control. Lanes 4 and 5 represent the negative controls without primers or template DNA, respectively. Lane M represents the 100 bp ladder DNA as size marker.

5. Polymerization Chain Reaction (PCR)

Template DNA는 RT product 2 μ l 또는 phage DNA 100~500 ng을 사용하였으며, 여기에 2 μ l의 10X Taq buffer, 2 μ l의 primer 조합 (10 pmoles/ μ l), 1 μ l의 10 mM dNTP, 0.2 μ l의 Taq DNA polymerase (5 U/ μ l)를 첨가하였고, 전체 부피가 20 μ l 되게 멸균수를 첨가한 다음 혼합하였다. 본 실험에 사용한 primer는 Nezu 등에¹⁰⁾ 의해 보고된 흰쥐 간 16 kDa V-ATPase cDNA 염기서열을 참고하여 고안하였고, 대조군으로서 β -actin primer 조합을 사용하였다 (Table 1). PCR 반응은 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초로 하여 전체 35 cycle 수행하였다. 반응이 끝난 PCR product는 0.5 μ g/ml의 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에 전기영동한 다음 UV transilluminator 위에서 확인하였다.

A: ATGGCTGACATCAAGAACAACCCCGAATATTCTTCGTTTTTCGGTGTCATGGGCGCCTCG 60bp
 B: ATGGCTGACATCAAGAACAACCCCGAATATTCTTCGTTTTTCGGTGTCATGGGCGCCTCG

A: TCCGCCATGGTCTTCAGCGCCATGGGAGCTGCCTATGGCACAGCCAAGAGTGGCACTGGC 120bp
 B: TCCGCCATGGTCTTCAGCGCCATGGGAGCTGCCTATGGCACAGCCAAGAGTGGCACTGGC

A: TCCGCCATGGTCTTCAGCGCCATGGGAGCTGCCTATGGCACAGCCAAGAGTGGCACTGGC 180bp
 B: TCCGCCATGGTCTTCAGCGCCATGGGAGCTGCCTATGGCACAGCCAAGAGTGGCACTGGC

A: ATGGCTGGGATCATCGCCATCTACGGCCTGGTGGTTGCAGTACTTATCGCTAACTCCCTG 240bp
 B: ATGGCTGGGATCATCGCCATCTACGGCCTGGTGGTTGCAGTACTTATCGCTAACTCCCTG

A: ACTGATGGCATCACCTCTACAGGAGTTTTCTTCAACTGGGTGCTGGCCTGAGTGTGGGG 300bp
 B: ACTGATGGCATCACCTCTACAGGAGTTTTCTTCAACTGGGTGCTGGCCTGAGTGTGGGG

Ala
GCC
GCA
Ala

A: CTGAGTGGCCTGGCTGCTGGCTTT GCC ATTGGCATTGTCGGAGATGCTGGTGTCCGGGGC 360bp
 B: CTGAGTGGCCTGGCTGCTGGCTTT GCA ATTGGCATTGTCGGAGATGCTGGTGTCCGGGGC

A: ACTGCCAGCAGCCTCGACTGTTTCGTGGGCATGATCCTGATCCTCATCTTTGCGGAGGTG 420bp
 B: ACTGCCAGCAGCCTCGACTGTTTCGTGGGCATGATCCTGATCCTCATCTTTGCGGAGGTG

A: CTTGGCCTCTACGGTCTCATCGTGGCCCTAATCCTCTCCACAAAGTAG 468bp
 B: CTTGGCCTCTACGGTCTCATCGTGGCCCTAATCCTCTCCACAAAGTAG

Fig. 2. Comparison of the nucleotide sequences of the rat brain form (A) and the previously reported rat liver form (B) of the 16 kDa V-ATPase. The polymorphic change and corresponding amino acid (Ala) are represented in the box. Positions for PCR primers are underlined. The initiation codon (ATG) and stop codon (TAG) are indicated as (***)

6. Cloning 및 DNA sequencing

Agarose gel로부터 PCR product를 추출한 다음 pT7Blue T-vector에 ligation하여 대장균주 NovaBlue에 transformation시켰다. Transformant들은 X-gal (40 µg/ml), IPTG (5 mM), 그리고 ampicillin (50 µg/ml)이 포함된 LB plate 위에 도말한 다음 37°C에서 하룻밤을 배양하였다. Insert가 클로닝된 것으로 확인되면

DNA sequencing을 위해 plasmid DNA를 분리하였고, 자동화 DNA sequencer로 염기서열을 결정하였다.

결 과

PCR 반응에 사용된 primer들은 16 kDa V-ATPase cDNA에 특이적인 것들로서 (Table 1), Nezu 등이¹⁰⁾ 보고한 흰쥐 간의 16 kDa V-ATPase cDNA 염기서열

을 참고하였다. 여기에는 coding sequence 전체가 증폭될 수 있도록 개시코돈과 종말코돈을 포함시켰다. PCR 반응물을 전기영동으로 확인한 결과 468 bp에 해당하는 DNA band가 증폭되었다 (lane 1, Fig. 1). 이는 이미 보고된 간의 16 kDa V-ATPase mRNA의 coding sequence와 일치하는 크기였다. PCR 반응의 양성대조군으로는 β -actin primer를 사용하였고, 음성대조군은 primer 또는 template DNA를 넣지 않고 수행한 PCR 반응들이었다 (lanes 4 and 5, Fig. 1). 양성대조군에서 증폭된 DNA band는 β -actin에서 예상했던 크기 그대로였고 (lane 3, Fig. 1), 음성대조군에서는 각각 아무런 DNA도 증폭되지 않았다 (lanes 4 and 5, Fig. 1). 한편 rat brain cDNA library에서 분리한 recombinant phage DNA를 주형으로 하여 동일한 PCR 반응을 수행하였는데 역시 증폭된 크기가 mRNA를 직접 RT-PCR 했을 때와 같은 것으로 확인되었다 (lane 2, Fig. 1).

이렇게 증폭된 16 kDa V-ATPase cDNA 절편들의 염기서열을 결정된 결과 RT 반응물을 주형으로 했을 때나 phage DNA를 주형으로 사용했을 때 모두 동일한 염기서열을 나타내었다 (Fig. 2). BLAST 프로그램으로 database를 추적한 결과 흰쥐 간의 것과는 99%, 생쥐의 osteoclast와는 98%, 사람의 HeLa cell 및 cystic epithelium과는 87%, 그리고 소의 chromaffin granule과는 85%의 유사성을 나타내었다. 유사성 99%를 나타낸 흰쥐 간의 것과 염기서열을 세밀히 비교한 결과 3' 말단 부근에 위치한 염기 하나가 A에서 C로 바뀌어 있는 것이 최종 확인되었다.

고 찰

PCR 반응으로 흰쥐 뇌에서 16 kDa V-ATPase를 직접 클로닝할 수 있었다. 전체적인 크기는 간의 것과 동일하였는데 3' 말단의 염기 하나가 A에서 C로 바뀌어 있었다 (Fig. 2). 하지만 codon에 따라 유도되는 아미노산은 변함없이 alanine (GCA, GCC)을 지정하고 있었기에 단백질의 1차구조에는 변화가 없을 것으로 확인되었다. 이 염기 변화는 뇌에서 추출한 mRNA를 직접 RT-PCR 했을 때나 library에서 분리한 recombinant phage DNA를 주형으로 사용했을 때 모두에서 동일하게 나타났기 때문에 Taq DNA polymerase에 의한 artifact일 가능성은 희박한 것으로 판단되었고 오히려 polymorphism의 가능성이 높은 것으로 추정되었다. 한편 Nezu 등이¹⁰⁾ 한때 genomic Southern blot analysis를 통하여 16 kDa

V-ATPase의 isoform이 최소한 3개 정도 존재할 것이라고 보고한 적도 있었지만 본 실험에서는 기타 팔목할 만큼 형태가 다른 clone은 발견되지 않았다. 본 연구에서 발견된 polymorphism이 어떠한 의미를 지니고 있는지에 관한 연구가 향후 지속적으로 이루어져야 할 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Arai H, Berne M, Terres G, Terres H, Puopolo K and Forgac M (1987): Subunit composition and ATP site labeling of the coated vesicle proton-translocating adenosine triphosphatase. *Biochemistry*, **26**: 6632-6638.
- 2) Chatterjee D, Chakraborty M, Leit M, Neff L, Jamsa-Kellokumpu S, Fuchs R, Bartkiewicz M, Hernando N and Baron R (1992): The osteoclast proton pump differs in its pharmacology and catalytic subunits from other vacuolar H⁽⁻⁾-ATPases. *J Exp Biol*, **172**: 193-204.
- 3) Fillingame RH (1996): Membrane sectors of F- and V-type (H⁽⁺⁾)-transporting ATPases. *Curr Opin Struct Biol*, **6**: 491-498.
- 4) Forgac M (1992): Structure, function and regulation of the coated vesicle V-ATPase. *J Exp Biol*, **172**: 155-169.
- 5) Gillespie GA, Somlo S, Germino GG, Weinstat-Saslow D and Reeders ST (1991): CpG island in the region of an autosomal dominant polycystic kidney disease locus defines the 5' end of a gene encoding a putative proton channel. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 4289-4293.
- 6) Laitala-Leinonen T, Howell ML, Dean GE and Vaananen HK (1996): Resorption-cycle-dependent polarization of mRNAs for different subunits of V-ATPase in bone-resorbing osteoclasts. *Mol Biol Cell*, **7**: 129-142.
- 7) Mandel MA, Moriyama Y, Hulmes JD, Pan Y-CE, Nelson H and Nelson N (1988): cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of (H⁽⁺⁾)-ATPases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**: 5521-5524.
- 8) Mattsson JP, Li X, Peng SB, Nilsson F, Andersen P, Lundberg LG, Stone DK and Keeling DJ (2000):

- Properties of three isoforms of the 116-kDa subunit of vacuolar (H⁺)-ATPase from a single vertebrate species. Cloning, gene expression and protein characterization of functionally distinct isoforms in *Gallus gallus*. *Eur J Biochem*, **267**: 4115-4126.
- 9) Nelson N (1989): Structure, molecular genetics, and evolution of vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Bioenerg Biomembr*, **21**: 553-571.
 - 10) Nezu J, Motojima K, Tamura H and Ohkuma S (1992): Molecular cloning of a rat liver cDNA encoding the 16 kDa subunit of vacuolar H⁺-ATPases: organellar and tissue distribution of 16 kDa proteolipids. *J Biochem*, **112**: 212-219.
 - 11) Nishi T and Forgacs M (2000): Molecular cloning and expression of three isoforms of the 100-kDa a subunit of the mouse vacuolar proton-translocating ATPase. *J Biol Chem*, **275**: 6824-6830.
 - 12) Numata M, Ohkuma S and Iseki S (1995): Expression and localization of mRNA encoding 16 kDa subunit of vacuolar H⁺-ATPase in rat brain. *Cell Biol Int*, **19**: 1-7.
 - 13) Sambrook J, Maniatis T and Fritsch EF (1989): *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - 14) Toyomura T, Oka T, Yamaguchi C, Wada Y and Futai M (2000): Three subunit a isoforms of mouse vacuolar H⁺-ATPase. Preferential expression of the a3 isoform during osteoclast differentiation. *J Biol Chem*, **275**: 8760-8765.
 - 15) Van-Hille B, Richener H, Evans DB, Green JR and Bilbe G (1993): Identification of two subunit A isoforms of the vacuolar H⁺-ATPase in human osteoclastoma. *J Biol Chem*, **268**: 7075-7080.
 - 16) Wang Y and Floor E (1998): Hydrogen peroxide inhibits the vacuolar (H⁺)-ATPase in brain synaptic vesicles at micromolar concentrations. *J Neurochem*, **70**: 646-652.

=Abstract=

**Molecular Cloning of the cDNA Encoding the 16 kDa Subunit of
V-ATPase in Rat Brain**

Song-Woo Shin[†] and Min Yoo¹

[†]Department of Anatomy & Neurobiology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, 21201, USA, ¹Department of Biology, Keimyung University, Taegu, 704-701, Korea

Vacuolar (H⁺)-ATPase (V-ATPase) is an intracellular protein which consists of multiple subunits. It carries out acidification by pumping protons in the cell. This enzyme has also been found in the synaptic vesicles and may play an important role in the neurotransmission. We cloned cDNA fragments encoding the 16 kDa subunit of V-ATPase from the rat brain by RT-PCR and PCR using total RNA or recombinant phage DNA as templates. They contained the full coding sequences (468 bp) and one nucleotide at 3' region turned out to be different (A to C) when compared to the liver counterpart. However, this polymorphic difference did not cause any significant change in the primary structure of the protein because both GCA and GCC code for alanine. Our study would contribute to the understanding of the function of 16 kDa V-ATPase in the brain and of the mechanisms of neurotransmission.

Key Words: V-ATPase, 16 kDa subunit, Rat brain, Polymorphism, Neurotransmission

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(3): 165-170, September, 2000]

[†]Corresponding author