

넙치 (*Paralichthys olivaceus*) 뇌로부터 phospholipase D 활성 억제 단백질의 정제 및 특성 규명

서정수 · 김은희 · 황은영 · 김남득* · 김동선** · 이형호*** · 정준기+
부경대학교 수산생명의학과, *부산대학교 약학과, **경북대학교 의과대학 해부학교실
***부경대학교 식품생명공학부

Purification and Characterization of Proteins Inhibiting Phospholipase D Activity from Flounder (*Paralichthys olivaceus*) Brain

Jung-Soo SEO, Eun-Hi KIM, Eun-Young HWANG, Nam Deuk KIM*
Dong Sun KIM**, Hyung-Ho LEE*** and Joon-Ki CHUNG+

Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Pharmacy, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

**Department of Anatomy, School of Medicine, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

***Faculty of Food Science and Biotechnology, Biotechnology and Bioengineering major,
Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Flounder brain cytosol contains protein inhibitors that markedly inhibit the activity of partially purified brain membrane phospholipase D (PLD) which is dependent on phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) but insensitive to ADP-ribosylation factor (ARF). The PLD inhibitors have been enriched through several chromatographic steps and characterized with respect to size and mechanism of inhibition. Sequential chromatography of the brain cytosol yielded six inhibitor fractions. Two (IIA and IIB) of six inhibitor fractions showed the PIP₂-phosphatase activities. IIA was identified as synaptojanin, a nerve terminal protein that has known to be a member of the inositolpolyphosphate 5-phosphatase family, by immunoblot analysis. IIB showed an apparent molecular mass of 158 kDa by Superose 12 gel filtration chromatography and was immunologically distinct from synaptojanin. IIB hydrolyzed PIP₂, yielding only phosphatidylinositol phosphate (PIP) as product, suggesting that IIB hydrolyzes only one phosphate from either the 4- or 5-position of PI (4,5)P₂. These studies demonstrate that the existence of multiple PIP₂-phosphatases have been implicated in the negative regulation of PIP₂-dependent PLD activity within flounder brain.

Key words: *Paralichthys olivaceus*, Phospholipase D (PLD), Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) phosphatase, Flounder brain, Synaptojanin, PLD inhibitors

서 론

인지질가수분해효소 (phospholipase)들은 모든 생명체의 세포막의 구성성분인 인지질 (phospholipid)의 생합성 및 분해와 같은 세포내에서 대사과정 뿐만 아니라 세포외부인자들에 대한 세포내의 신호전달에 연관된 다양한 이차전달자 (second messenger)들을 생성하는데 중요한 역할을 한다 (Serhan et al., 1982; Downes and Mitchell, 1982; Grzeskowiak et al., 1985). 인지질가수분해효소 D (phospholipase D, PLD)는 세포막의 인지질 중 주된 성분인 포스파티딜콜린 (phosphatidylcholine, PC)의 포스포디에스테르 (phosphodiester) 결합을 가수분해시켜 수용액상에서는 phosphatidic acid (PA) 및 콜린 (choline)을 생성하며, 일차 알코올 (primary alcohol) 존재하에서는 우선적으로 phosphatidyl 부분을 알코올로 전이시켜 포스파티딜알콜 (phosphatidylalcohol)을 생성하는 특유의 transphosphatidylatation 반응을 촉매하는 포스포디에스테라제 (phosphodiesterase)이다 (Bocckino et al., 1987; Pai et al., 1988;

Yang et al., 1967). PLD의 작용에 의해 생성된 PC의 대사산물은 세포내에서 중요한 생리적 역할을 담당한다. PA는 그 자체가 이차 전달자로 직접작용하여 fusogenic ability를 나타내며 (Simmonds and Halsey, 1985), c-fos 및 c-myc 전사 자극 (Kanuss et al., 1990), 단백질인산화효소 (protein kinase)의 활성화 (Ha and Exton, 1993; Limatola et al., 1994), 인지질가수분해효소 C γ (phospholipase C γ) 활성화 (Jones and Carpenter, 1993), respiratory burst 자극 (Perry et al., 1992), 식세포작용 (Fallman et al., 1992), membrane trafficking 및 소포전달 (vesicle transport) (Cockroft et al., 1994; Ktistakis et al., 1996) 등에 관여하고, 섬유아세포 (fibroblast)에서 DNA 합성 및 세포증식을 촉진한다 (Moolenaar et al., 1986; Cuadrado et al., 1993). 또한 PA는 PA phosphohydrolase에 의하여 신속히 단백질인산화효소 C (protein kinase C, PKC)을 활성화시키는 디아실글리세롤 (DAG)로 전환되거나 혹은 lysophosphatidic acid (LPA)의 전구체로서 작용한다 (Nishizuka, 1986; Kanoh et al., 1991). 그리고 콜린은 신속히 포스포콜린 (phosphocholine)이나 아세틸콜린 (acetylcholine)으로 전환되어 세포증식에 관여하거나 신경전달물질로 작용한다

+ Corresponding author: jkchung@mail.pknu.ac.kr

(Cuadrado et al., 1993). PLD 활성은 진핵생물 및 원핵생물체 전반에 걸쳐 광범위하게 나타나며, 특히 포유류 조직에서는 다양한 형태의 PLD 활성이 다양하고 복잡한 기작에 의하여 조절된다. 포유류의 PLD는 PKC, 칼슘이온, 티로신 인산화효소 (tyrosine kinases), GTP결합 단백질 (G-protein), phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), 지방산 (fatty acid), 및 Arf, Cdc42, Rho A 와 같은 저분자 GTP결합 단백질 (small G-protein)에 의해서 활성화된다 (Cockcroft, 1992; Brown et al., 1993; Exton, 1994; Massenbourg et al., 1994; Pertile et al., 1995; Siddiqi et al., 1995; Singer et al., 1995). 또한, 포유류의 PLD 활성은 생체내 여러 단백질들에 의하여 억제되어지는데 여기에 속하는 것으로서는 synaptojanin, AP-3, amphiphysin, fordrin 및 기타 30 kDa의 인자들이 보고되고 있다 (Han et al., 1996; Kim et al., 1996; Lukoski et al., 1996; Chung et al., 1997; Lee et al., 1997; Jenco et al., 1998; Lee et al., 2000).

이와 같이 PLD가 인지질 가수분해효소로서 세균에서 동물에 이르기까지 광범위한 생물체에 분포하여 각 생물체의 세포내 다양한 생리적 반응에 매우 밀접하게 관여한다는 사실이 밝혀짐에 따라 이 효소의 분리정제, 세포내에서 생리적 기능, 조절기작 등에 관한 많은 연구들이 활발히 진행되고 있다. 그러나 연구의 대부분이 포유류에 대하여 이루어지고 있으며 수계생물체에 대한 연구는 거의 전무한 실정이다. 본 연구에서는 넙치 뇌 조직에서 PLD 활성의 특성 규명 및 이 활성을 억제하는 단백질을 분리 정제하여 그 특성을 규명하였다.

실험 재료 및 방법

1. 시 약

본 실험에 사용한 주요한 시약들은 다음과 같다. Bovine brain phosphatidylcholine (PC) 및 phosphatidylethanolamine (PE)는 Avanti Polar Lipid사로부터 구입하였고, GTP γ S 및 phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) 및 phosphatidylinositol 4-phosphate (PIP)는 Boehringer Mannheim으로부터 구입하였고, [*Choline-methyl*-³H]dipalmitoylphosphatidylcholine (50 Ci/mmol), [*2-palmitoyl-9,10*-³H]dipalmitoylphosphatidylcholine (89 Ci/mmol), [*inositol-2*-³H]PI(4,5)P₂(7 Ci/mmol), [*2*-³H]inositol 1,4,5 triphosphate (21 Ci/mmol), [*2*-³H]inositol 1,3,4 triphosphate (21 Ci/mmol) 및 [γ -³²P]ATP은 DuPont NEN으로부터 구입하였고, *n*-octyl- β -D-glucopyranoside는 Calbiochem으로부터 구입하였다. Phosphatidylinositol 4,[³²P]5-bisphosphate (PI(4,[³²P]5)P₂)는 PI(4)P, PIP 5-kinase 및 [γ -³²P]ATP 를 반응시켜 만들었다. PIP 5-kinase는 미국 NIH의 Lab. of Cell Signaling에 근무하는 Dr. Sue Goo Rhee로부터 얻었다.

2. 시료 채집

시중에서 구입한 체중 1 kg 넙치의 각종 장기 (뇌, 신장, 간 등)를 적출하여 각각 액체질소로 급속 동결시킨 후 -70°C에 저장하여

필요할 때 시료로 사용하였다.

3. 넙치 뇌로부터 단백질 추출

일정량의 각종 넙치 장기를 20 mM HEPES (pH 7.0), 1 mM EGTA, 0.1 mM dithiothreitol (DTT), 1.5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), leupeptin 및 aprotinin (각각 1.5 μ g/mL)을 함유한 homogenizing buffer (buffer A)에 녹여서 균질화한 후, 이것을 1,000 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 침전물은 버리고 상층액을 다시 100,000 \times g에서 1시간 동안 초고속 원심분리하였다. 초고속 원심분리하여 얻은 상층액 (cytosol fraction)은 PLD 활성 조절인자를 탐색하는데 사용하기 위하여 solid ammonium sulfate를 넣어 최종 포화농도가 70% 되게 하여 1시간 동안 교반한 후, 5,000 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 70% ammonium sulfate 침전물을 얻어 -70°C에 보관하였다. 또한, 초고속 원심분리하여 얻은 침전물은 막 분획물 (membrane fraction)로 사용하였다. 막 분획물은 1% Triton X-100 및 0.3 M NaCl이 함유된 homogenizing buffer로 1시간 동안 교반한 후 용해시켜 100,000 \times g에서 1시간 동안 원심분리하여 용해된 막 단백질 (상층액)을 얻었다.

4. 인지질가수분해효소 D (PLD) 활성 측정

PLD 활성은 Chung et al. (1997)의 방법에 따라 포스파티딜콜린 (PC)을 분해하는 능력으로 결정하였다. PLD의 PC 가수분해능력은 16:1:4:1의 molar 비율의 phosphatidylethanol (PE), phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂), phosphatidylcholine (PC)에 분석당 200,000 cpm을 나타내도록 *choline-methyl*-³H (pam)₂PC가 첨가된 인공 인지질막을 기질로 사용하여 다음과 같이 측정하였다. 기질 25 μ L를 PLD source, 50 mM HEPES (pH 7.5), 3 mM EGTA, 80 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂를 함유한 혼합액 125 μ L에 첨가하고 37°C에서 30분 배양한 후 stop solution A (CHCl₃, CH₃OH, conc HCl=50:50:0.3, v/v) 1.0 mL과 stop solution B (1 M HCl in 5 mM EGTA) 0.35 mL를 넣어 반응을 종결시켰다. 반응액을 원심분리한 후 수용층액을 0.5 mL 취하여 이 속에 함유된 [³H] choline을 liquid scintillation spectrometry로 측정하였다. PLD 활성 억제 단백질의 활성은 위에서 언급한 PLD 활성 측정 조건하에서 측정된 PLD 활성을 억제하는 능력으로 판단하였다.

5. 넙치 뇌로부터 인지질가수분해효소 D (PLD)의 부분 정제 용해된 막 단백질을 0.3 M NaCl이 함유된 buffer B[20 mM HEPES (pH 7.0), 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT, 0.1% Triton X-100]로 평형화된 Heparin-Sepharose CL-6B 칼럼에 주입한 후 칼럼을 완충액으로 세척하고 결합된 단백질은 NaCl 농도가 0.3~2.0 M 되게 하여 linear gradient로 1분당 5.0 mL 속도로 용출하였다. 활성을 나타내는 분획물을 모두 모아 buffer B로 4배 희석한 후, buffer B로 미리 평형화되어 있는 TSK gel CM-5PW 양이온 교환 칼럼 (7.5 \times 75 mm, Toso-Haas)에 주입하였다. 단백질은 buffer C[20 mM HEPES (pH 7.0), 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT, 0.7% *n*-octyl- β -D-glucopyranoside]로 NaCl 농도 0~1.0 M 범위

에서 1.0 mL/min 속도로 linear gradient로 용출하였다. 활성을 나타내는 분획물을 buffer D[20 mM HEPES (pH 7.4), 1 mM EGTA, 0.1 mM DTT and 0.7% n-octyl- β -D-glucopyranoside]로 평형화된 Heparin-5PW 칼럼 (7.5×75 mm)에 주입, 세척한 후, 단백질은 1.0 mL/min 속도로 60분 동안 NaCl 농도 0~1.0 M 범위에서 linear gradient로 용출하였다. 얻어진 활성이 있는 분획물을 PLD 원료로 사용하기 위하여 50 μ L씩 분주하여 -70°C에 보관하였다.

6. PLD활성 억제 단백질의 분리 정제

70% ammonium sulfate로 포화된 넙치 장기의 세포질 분획물을 buffer E[20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, leupeptin 및 aprotinin (각각 1 μ g/mL)]에 현탁하여 같은 조성의 buffer에 하루 동안 투석한 후 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻어진 상층액을 미리 buffer E로 평형화되어 있는 DEAE-5PW HPLC 칼럼 (21.5×150 mm)에 주입하고, 칼럼에 부착된 단백질은 처음 70분 동안은 buffer E에 NaCl의 농도가 0~0.3 M 범위로 되게 하여 linear gradient로 5 mL/min 속도로 용출하고, 그 이후에는 100분까지 NaCl 농도가 0.3~1.0 M 되게 하여 용출하였다. 이 과정에서 3개의 활성 분획 [peak I (fraction 24~32), peak II (fraction 58~67), peak III (fraction 84~87)]을 얻었다.

DEAE-5PW HPLC 칼럼으로부터 얻어진 3개의 활성 분획물 중 활성이 가장 큰 peak II (fraction 58~67)를 0.8 M ammonium sulfate 포화용액으로 만들어 0.8 M ammonium sulfate를 함유한 buffer E로 미리 평형화된 TSK-gel Phenyl-5PW 칼럼에 주입하였다. 단백질은 1.0 mL/min 속도로, 첫 번째는 20분 동안 ammonium sulfate 농도가 0.8 M에서 용출하며 20분부터 85분까지는 ammonium sulfate 농도가 0.8~0 M 범위내에서 linear gradient로 용출하고 마지막으로 100분까지는 ammonium sulfate 농도 0 M에서 용출하였다. 이 과정에서도 다시 peak IIA (fraction 8~14), peak IIB (fraction 39~43), peak IIC (fraction 54~58) 3개의 PLD 활성억제 분획물이 관찰되었다 (Fig. 7B).

Phenyl chromatography로부터 얻은 peak IIA (fraction 8~14)을 모아서 buffer E로 하루 동안 투석한 후 원심분리하여 상층액을 얻고, 얻어진 상층액을 미리 buffer E로 평형화된 TSK-gel Heparin-5PW 칼럼에 주입하고 단백질은 1.0 mL/min 속도로 NaCl 농도가 0~1.0 M 되게 60분 동안 linear gradient로 용출하였다. Phenyl chromatography로부터 얻은 peak IIB (fraction 39~43)는 buffer E로 하루동안 투석한 후 원심분리하여 상층액을 얻고, 얻어진 상층액을 Microcon-30 (Amicon)을 사용하여 30 μ L로 농축하여 Pharmacia-LKB SMART System에 장착된 Mono SPC 1.6/5에 주입한 후 단백질은 100 μ L/min 속도로 처음 23분 동안은 NaCl농도가 0에서 0.5 M 되게 60분 동안 linear gradient로 용출하고 나머지는 30분까지 0.5 M NaCl 농도하에서 용출하였다. 그리고 phenyl chromatography로부터 얻은 peak IIC (fraction 54~58)는 buffer E로 하루동안 투석한 후 원심분리하여 상층액을 얻고, 얻어진 상층액을 Microcon-30 (Amicon)을 사용하여 30 μ L로 농축하여 Pharmacia-LKB SMART System에 장착된 Mono Q PC

1.6/5에 주입한 후 단백질은 100 μ L/min 속도로 처음 23분 동안은 NaCl농도가 0에서 0.5 M 되게 60분 동안 linear gradient로 용출하고 나머지는 30분까지 0.5 M NaCl 농도하에서 용출하였다.

Mono S 및 Mono Q 칼럼으로부터 얻은 각각의 PLD 억제 분획물들은 Microcon-30을 사용하여 30 μ L로 농축하여 Pharmacia-LKB SMART System에 장착된 Superose 12 PC 3.2/30 칼럼 (3.2×30 mm, Pharmacia)에 주입한 후 NaCl 150 mM을 함유한 20 mM Tris (pH 7.5) buffer로 40 μ L/min 속도로 단백질을 용출하였다. 얻어진 분획물은 PLD-inhibiting activity assay, SDS-PAGE 등을 사용하여 분석하였다.

7. PI (4,5)P₂ 5-Phosphatase Assay

Chung et al. (1997)의 방법에 따라 16:14:1의 molar 비율의 PE, PI (4,5)P₂ 및 PC에 분석당 20,000 cpm을 나타내도록 [*inositol*-2-³H]PI (4,5)P₂를 첨가한 인지질 인공막을 기질로 사용하였다. 반응은 3 mM Mg²⁺을 함유한 PLD assay buffer 120 μ L에 부분 정제된 PLD 억제 분획물 25 μ L와 기질 25 μ L를 첨가한 후 37°C에서 10분간 배양하고 PLD 분석에 사용한 반응액에 stop solution A 1 mL과 stop solution B 0.35 mL 및 PI (4,5)P₂/PI (4)P/PI 혼합액을 시험관 당 각각의 양이 10 μ g이 되게 넣고 반응을 종결시켰다. 반응액을 원심분리한 후 지질을 추출하여 chloroform/methanol/conc. HCl (200/100/1)용액에 용해시키고 n-propanol/ammonium hydroxide/water (65/20/15, v/v)의 전개용매를 사용하여 TLC 상에 전개하고 생성된 ³H-labeled 생성물들을 autoradiography를 이용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 인지질가수분해효소의 분리정제

넙치의 각종 장기 (뇌, 신장, 간, 근육 등)로부터 얻은 추출물을 가지고 PLD 활성을 조사한 예비실험 결과 신장, 간, 뇌 등의 조직에서 PLD 활성이 관찰되었으며, 그 중에서도 뇌 조직에서 가장 현저한 PLD 활성이 관찰되었다. 따라서, 본 실험에서는 향후 실험에서 PLD 원료로 사용하기 위하여 넙치의 뇌 조직으로부터 PLD를 부분 정제하였다. 넙치 뇌 조직으로부터 얻은 막 분획물과 세포질 분획물을 Heparin-Sepharose CL-4B conventional 칼럼에 적용한 결과, 세포질 분획물에서는 포스파티딜콜린 (PC) 가수분해작용이 전혀 관찰되지 않았고 막 분획물에서는 NaCl 500 mM 근처에서 한 개의 활성이 있는 부위가 관찰되었다 (data not shown). 이 활성이 있는 막 분획물들을 Heparin-5PW HPLC 칼럼에 적용하였을 때 분획물 38~42사이 (NaCl 농도: 약 700 mM 근처)에서 한 개의 활성이 관찰되었다. 이 활성은 GTP γ S 및 small G protein인 Arf에 의해 영향을 받지 않았다 (Fig. 1). 그런데, PC는 PLD 뿐만 아니라 인지질가수분해효소 C (PLC)에 의해서도 가수분해 될 수 있다 (Pai et al., 1988; Billah et al., 1989; Massenburt et al., 1994). 그러므로, 본 실험에서 얻은 넙치 뇌 조직의 PC 가수분해 작용이 순수한 PLD에 의한 작용인지 알아보기 위

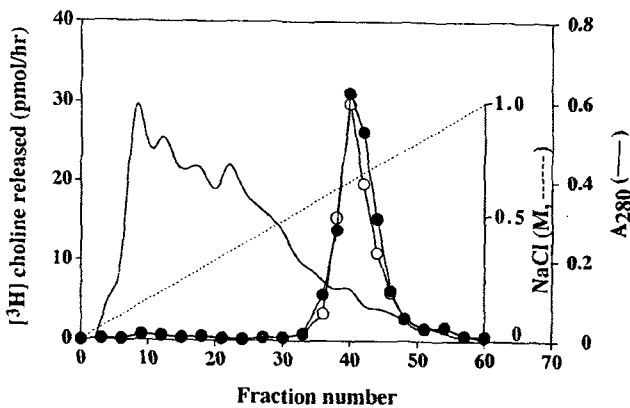


Fig. 1. Chromatography of PLD activity through a preparative Heparin-5PW HPLC column. Membranes from flounder brains were prepared, extracted, and processed as described under "Experimental Procedures" Eluted fractions (5 mL) were assayed for protein (-) and PLD activity in the presence of GTP γ S and Arf (●) or in the absence of GTP γ S and Arf (○).

하여 PLD 특유의 반응인 일차 알코올 존재 하에서 포스파티딜에탄올 (phosphatidylethanol, PEtOH) 생성반응 (Kobayashi and Kanfer, 1987; Billah et al., 1989)을 조사하였다. 일차 알코올이 존재하지 않은 lane 2에서는 phosphatidic acid (PA)만 생성되었고, 일차 알코올이 존재하는 lane 3에서는 PEtOH가 주된 생성물이었다 (Fig. 2). 이 결과는 넙치 뇌 조직의 PC 가수분해 작용이 전적으로 PLD 활성에 의하여 일어난다는 증거를 제시하고 있다. 한편, 현재까지 연구결과에 의하면 포유류에서 PLD 활성은 생화학적으로 phosphoinositide-dependent PLD activity와 fatty acid-dependent PLD activity로 크게 2개의 군으로 분류되고, phosphoinositide-dependent PLD activity는 저분자 GTP결합 단백질 (RhoA, Arf, Rac 및 Cdc42 등)에 의하여 활성화되는 반면에, fatty acid-dependent PLD activity는 저분자 GTP결합 단백질에 의하여 영향을 받지 않는다고 알려져 있다 (Massenburg et al., 1994; Rose et al., 1995; Waksman et al., 1996; Ella et al., 1996). 그러나, 본 실험에서 얻은 넙치 뇌 조직의 PLD 활성은 phosphoinositide-dependent PLD activity임에도 불구하고 Arf에 의하여 영향을 받지 않았다 (Fig. 1). 그러므로, 넙치 뇌 조직에는 아마도 포유류와는 다른 PLD isoform이 존재할 것으로 사료된다.

2. 인지질가수분해효소 D (PLD) 활성 억제 단백질의 분리정제 및 특성

70% ammonium sulfate로 침전시켜 얻은 넙치 뇌 조직의 세포질 단백질 (cytosolic protein)들을 DEAE-5PW HPLC 칼럼으로 용출하여 각각의 분획물들의 PLD 활성 억제 효과를 조사한 결과, PLD 활성 억제는 peak I (fraction 24~32), peak II (fraction 58~67), Peak III (fraction 84~87) 3군데에서 관찰되었다 (Fig. 3A). 이 중에서 PLD 활성 억제가 가장 큰 peak II (fraction 58~

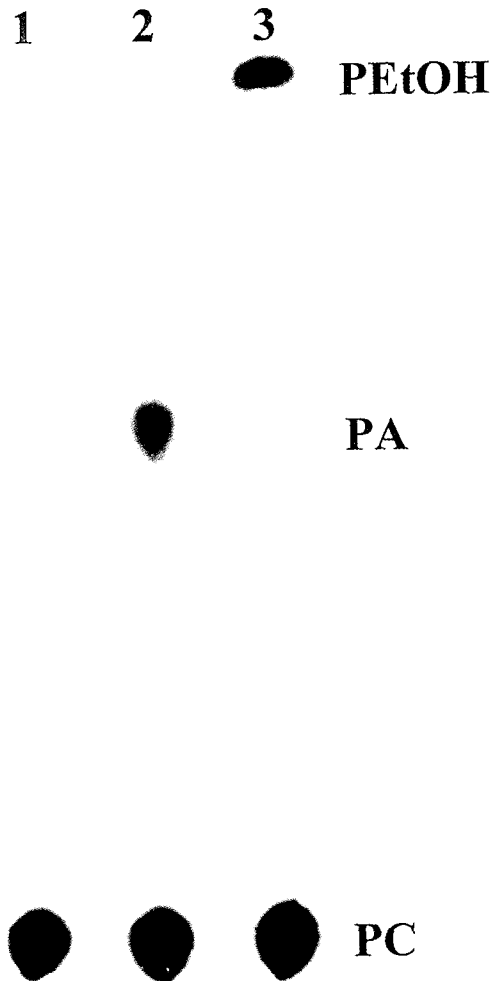


Fig. 2. Reaction products formed from hydrolysis of PC. The active fraction from a preparative heparin-5PW HPLC column was incubated with phospholipid substrate vesicles in reaction mixture without (lane 2) and with (lane 3) 0.67% (v/v) ethanol. The substrate vesicles comprised PE, PIP₂, and PC in a molar ratio of 16:1.4:1 with [2-palmitoyl-9,10-³H]dipalmitoyl PC to yield 200,000 cpm per assay. After incubation for 1 h at 37°C, the lipid products were analyzed by TLC and visualized by autoradiography. The positions of PC, PA, and PEtOH are indicated. Lane 1 represents control (substrate alone).

67)를 Phenyl-5PW HPLC 칼럼으로 용출하였을 때 또다시 3개의 활성 부위 (peak IIA, fraction 8~14; peak IIB, fraction 39~43; peak IIC, fraction 54~58)가 관찰되었다 (Fig. 3B). 이 중에서 PLD 활성 억제 능력이 가장 큰 peak IIA (fraction 8~14)는 Heparin-5PW HPLC 칼럼으로, peak IIB와 peak IIC는 각각 Mono-S와 Mono-Q HPLC 칼럼으로 다시 부분 정제하였다. Peak IIA (fraction 8~14)를 Heparin-5PW HPLC 칼럼으로 용출하였을 때 1개의 활성 지점이 NaCl 농도 약 300 mM 근처에서 관찰되었다

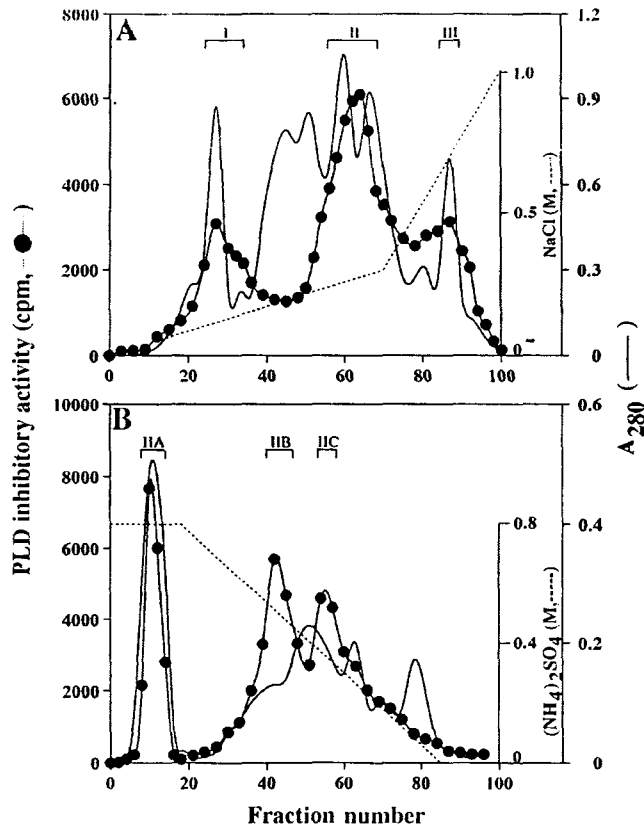


Fig. 3. Purification of PLD-inhibiting proteins from flounder brain cytosol.

The 70% ammonium sulfate precipitate from cytosol of flounder brains was subjected to sequential chromatography on a preparative HPLC DEAE-5PW column (A), and HPLC phenyl-5PW column (B). Bars above the elution profiles indicate subjected to inhibitor fractions that were pooled for subsequent purification or characterization. Fractions thus pooled are hereafter collectively referred to as a "peak fraction." Peak fractions I, II, and III of A refer respectively to fractions 24~32, 58~67, and 84~87. Peak fractions IIA, IIB, and IIC of B refer respectively to fractions 8~14, 39~43, and 54~58.

(Fig. 4A). 이 활성 지점의 분리조건은 쥐 (rat) 뇌 세포질에서 Arf-dependent PLD 활성을 억제하는 분자량 150 kDa의 단백질의 분리조건 (Han et al., 1996)과 일치하였다. 쥐 뇌세포질에서 얻은 150 kDa의 PLD 활성 억제 단백질은 나중에 Chung et al. (1997)에 의해 synaptic vesicle의 세포내 섭취 (endocytosis)에 관여하는 신경말단단백질인 synaptojanin으로 밝혀졌다. 또한, synaptojanin은 5-phosphatase activity를 가지고 있기 때문에 PI (4,5)P₂를 가수분해함으로써 PLD 활성을 억제한다고 알려져 있다 (Chung et al., 1997). 따라서, 본 실험에서는 Fig. 3B의 peak IIA가 synaptojanin과 관련이 있는지를 확인하기 위하여 peak IIA (fraction 8~14)를 Heparin-5PW HPLC 칼럼으로 용출하여 얻은 분획물에 대하여 rat-synaptojanin 다클론항체로 면역화학적분석을 실시하였

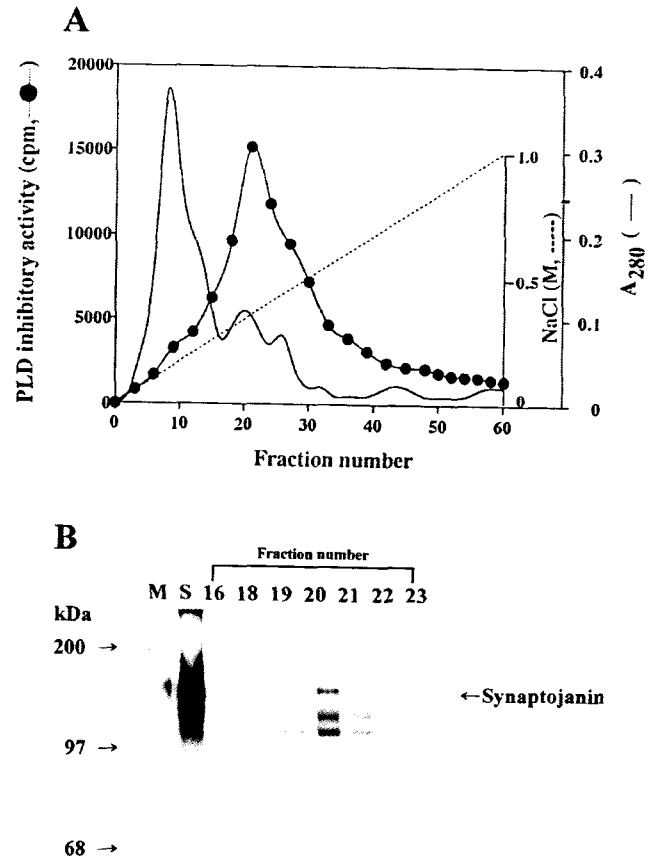


Fig. 4. Partial purification of synaptojanin from PLD inhibitor IIA.

PLD inhibitor IIA partially purified from phenyl-5PW HPLC column was further subjected to chromatography on heparin-5PW HPLC column (A). The fractions were subjected to SDS-PAGE on 10% gels and subsequent immunoblot analysis with polyclonal antibody to rat synaptojanin (B). M, molecular marker; S, rat synaptojanin.

다. Fig. 4B에서 나타난 바와 같이 분획물 19~21에서 synaptojanin 단백질 band가 확인되었으며 이것은 Fig. 4A의 PLD 활성 억제 능력과 잘 일치하였다.

한편, Phenyl-5PW HPLC 칼럼으로 얻은 peak IIB와 peak IIC를 각각 mono S와 mono Q HPLC 칼럼으로 용출하였을 때 NaCl 농도 약 150 mM와 약 400 mM 근처에서 각각 1개씩의 PLD 활성 억제 부위가 관찰되었고 (Fig. 5A와 6A), 이들 지점을 각각 gel filtration chromatography로 용출하였을 때 분자량이 약 158 kDa 정도에서 PLD 활성 억제 지점이 관찰되었다 (Fig. 5B와 6B). Fig. 5B와 6B에서 얻은 각각의 PLD 활성 억제 분획물들은 rat-synaptojanin 다클론성 항체에 대하여 면역학적 반응을 나타내지 않았다 (data not shown). 그러므로, peak IIB와 IIC에서 얻은 PLD 활성 억제 단백질들은 synaptojanin과는 다른 종류일 것으로 사

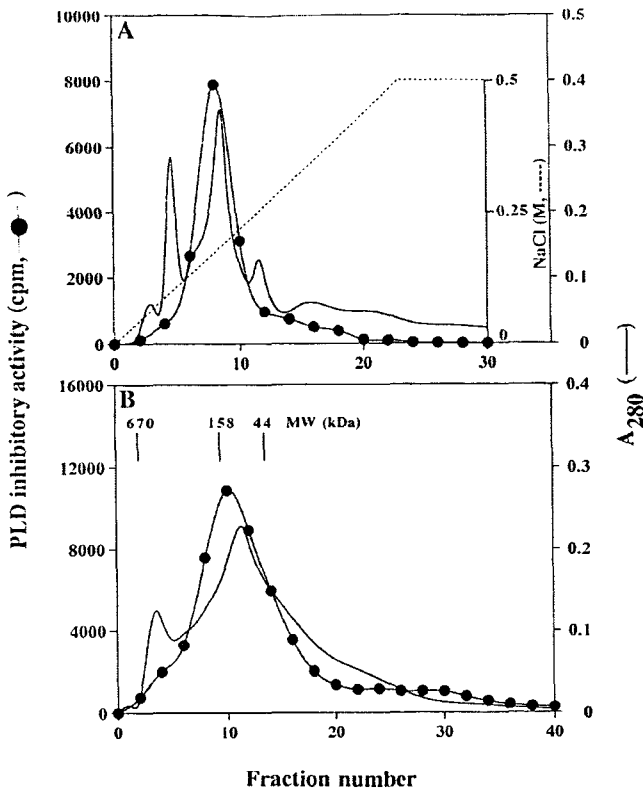


Fig. 5. Partial purification of PLD inhibitor IIB. PLD inhibitor IIB obtained from phenyl-5PW HPLC column was further subjected to chromatography on Mono SPC 1.6/5 HPLC column (A) and a Superose 12 PC 3.2/30 gel filtration column (B). The elution positions of molecular size standards (thyroglobulin, 670 kDa; bovine γ -globulin, 158 kDa; chicken ovalbumin, 44 kDa) are indicated in B.

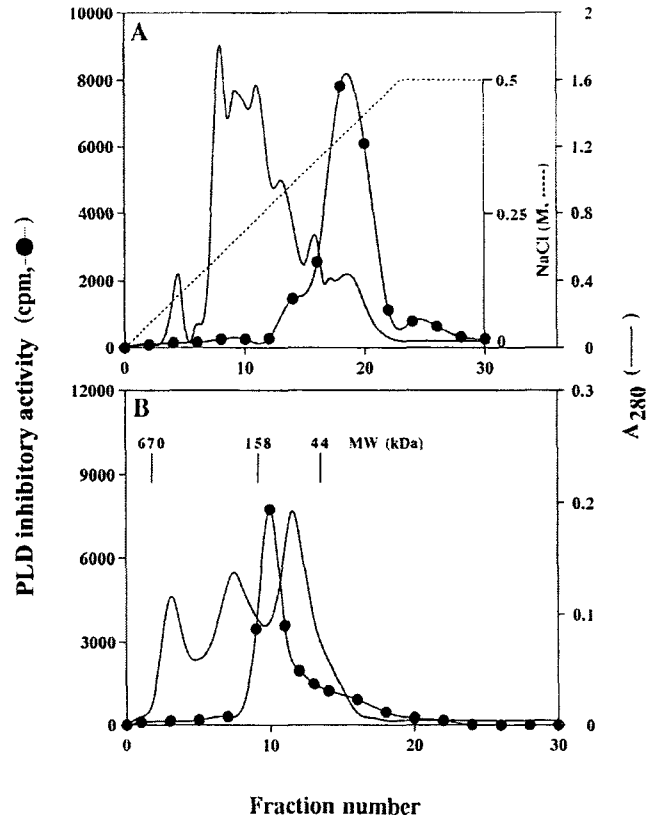


Fig. 6. Partial purification of PLD inhibitor IIC. PLD inhibitor IIC obtained from phenyl-5PW HPLC column was further subjected to chromatography on Mono Q PC 1.6/5 HPLC column (A) and a Superose 12 PC 3.2/30 gel filtration column (B). The elution positions of molecular size standards (thyroglobulin, 670 kDa; bovine γ -globulin, 158 kDa; chicken ovalbumin, 44 kDa) are indicated in B.

료되었다. 이들 PLD 활성 억제 단백질들도 포스파타아제 활성 (phosphatase activity)을 가지고 있는지 알아보기 위하여 PI (4,5) P₂에 대한 포스파타아제 활성을 조사한 결과, Peak IIC로부터 얻은 PLD 활성 억제 단백질은 포스파타아제 활성을 나타내지 않았으나 (data not shown), Peak IIB에서 얻은 단백질은 PI (4,5)P₂에 대하여 포스파타아제 활성을 나타내어 대사산물로서 phosphatidylinositol phosphate (PIP)만을 생성하였으며 포스파티딜이노시톨 (phosphatidylinositol, PI)은 생성하지 않았다 (Fig. 7). 이러한 결과는 peak IIB에서 얻은 단백질이 정확한 위치는 알 수 없으나 PI (4,5)P₂의 4 혹은 5 위치의 인산 (phosphate) 중 어느 하나를 선택적으로 가수분해시킨다는 것을 암시하였다. 한편 synaptojanin은 IP₃에 대해서는 5-phosphatase activity를 나타내나 PIP₂에 대하여서는 4와 5 위치의 인산염 모두 분해시켜 최종 생성물로서 PI를 생성한다고 알려져 있다 (Chung et al., 1997). 그러므로, 본 실험의 peak IIB으로부터 부분 정제된 PLD 활성 억제 단백질은 peak IIA에서 얻은 synaptojanin과는 다른 새로운 polyphosphoinositide phosphatase 중의 하나라고 추정된다.

이상의 결과들을 종합하여 보면 넙치의 뇌 조직에 존재하는

PLD는 포유류의 PLD와는 다른 형태일 가능성이 높은 것으로 사료되며, 또한 이 효소의 활성조절에 여러 종류의 polyphosphoinositide phosphatase들이 관여하는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 넙치, *Paralichthys olivaceus* 뇌 조직에서 인지질가수분해효소 D (phospholipase D, PLD) 활성의 특정 규명 및 이 활성을 억제하는 단백질을 분리 정제하여 그 특성을 규명하였다. 넙치 뇌 조직에서 PLD 활성이 관찰되었으며, 이 활성은 포스파티딜 이노시톨 비스인산염 (phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate, PIP₂)에 대해서 의존성을 나타내었으나, ADP-rebosylation factor (ARF)에 의해서는 영향을 받지 않았다. PLD 억제물은 넙치 뇌 조직의 세포질 분획물을 사용하여 여러 종류의 칼럼을 통하여 분리 정제하였고, 그 억제물의 분자크기 및 기작의 특성을 규명하였다. 마지막 chromatography을 통하여 여섯 개의 억제물 나타내는 분획물을 얻었으며, 이 중 두 개의 분획물인 IA, IB는

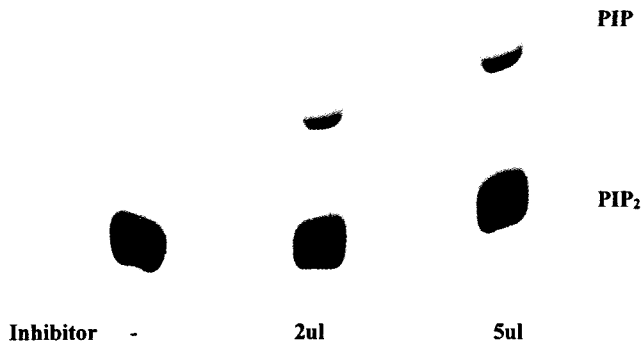


Fig. 7. Dephosphorylation of PI (4,5)P₂ by the partially purified PLD inhibitor IIB.

Lipid vesicles containing PE, [inositol-2-³H]PI (4,5)P₂, and PC were incubated for 10 min at 37°C with the partially purified fractions through heparin-5PW HPLC column and a Superose 12 PC 3.2/30 gel filtration column from PLD inhibitor IIB. The reaction was stopped, and lipids were extracted, separated by TLC and visualized by autoradiography.

PIP₂-phosphatase activities를 나타내었다. 이 중 IIA 분획물은 면역화학적 분석을 통하여 inositolpolyphosphate 5-phosphatase family로 알려져 있는 신경말단 단백질인 synaptojanin으로 동정되었다. 그리고 IIB fraction은 Superose 12 gel filtration chromatography를 통하여 158-kDa의 크기로 확인되었으며, 이것은 면역화학적 분석을 통하여 synaptojanin과는 별개의 단백질로 판명되었다. 또한, IIB 분획물은 PIP₂ phosphatase activity 확인 실험에서 대사산물로서 phosphatidylinositol phosphate (PIP)만을 생성하였다. 이 결과는 IIB 분획물이 PIP₂의 4 혹은 5 위치의 인산(phosphate) 중 어느 하나만을 선택적으로 가수분해시킨다는 것을 암시한다. 이상의 연구 결과들을 종합하여 보면, 넓치 뇌 조직에는 다양한 형태의 PIP₂-phosphatases가 존재하며, 이들은 PIP₂-의존적인 PLD 활성의 억제조절과정에서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음을 감사드리며 (KRF-1997-623-H00043), 1997년도 부경대학교 교내연구비에 의해 수행된 결과로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

Billah, M.M., S. Eckel, T.J. Mullmann, R.W. Egan and M.I. Siegel. 1989. Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. Involvement of phosphatidate phosphohydrolase in signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 264, 17069~17077.

- Bocckino, S.B., P.B. Wilson and J.H. Exton. 1987. Ca²⁺-mobilizing hormones elicit phosphatidylethanol accumulation via phospholipase D activation. *FEBS Lett.*, 225, 201~204.
- Brown, H.A., S. Gutowski, C.R. Moomaw, C. Slaughter and P.C. Sternweis. 1993. ADP-ribosylation factor, a small GTP-dependent regulatory protein, stimulates phospholipase D activity. *Cell*, 75, 1137~1144.
- Chung, J.-K., F. Sekiya, H.-S. Kang, C. Lee, J.-S. Han, S.R. Kim, Y.S. Bae, A.J. Morris and S.G. Rhee. 1997. Synaptojanin inhibition of phospholipase D activity by hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Biol. Chem.*, 272, 15980~15985.
- Cockcroft, S. 1992. G-protein-regulated phospholipases C, D and A2-mediated signalling in neutrophils. *Biochim. Biochem. Acta*, 1113, 135~160.
- Cockcroft, S., G.M.H. Thomas, A. Fensome, B. Geny, E. Cunningham, I. Gout, I. Hiles, N.F. Totty, O. Truong and J.J. Hsuan. 1994. Phospholipase D: a downstream effector of ARF in granulocytes. *Science*, 263, 523~526.
- Cuadrado, A., A. Carnero, F. Dolfi, B. Jimenez and J.C. Lacal. 1993. Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. *Oncogene*, 8, 2959~2968.
- Downes, P. and R.H. Michell. 1982. Phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate: lipids in search of a function. *Cell Calcium*, 3, 467~502.
- Exton, J.H. 1994. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochem. Biophys. Acta*, 1212, 26~42.
- Ella, K., J.W. Dolan, Q.I. Chen and K.E. Meier. 1996. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* deficient in expression of phospholipase D. *Biochem. J.*, 314, 15~19.
- Fallman, M., M. Gullberg, C. Hellberg and T. Andersson. 1992. Complement receptor-mediated phagocytosis is associated with accumulation of phosphatidylcholine-derived diglyceride in human neutrophils. Involvement of phospholipase D and direct evidence for a positive feedback signal of protein kinase. *J. Biol. Chem.*, 267, 2656~2663.
- Grzeskowiak, M., V. Della Bianca, P. De Togni, E. Papini and F. Rossi. 1985. Independence with respect to Ca²⁺ changes of the neutrophil respiratory and secretory response to exogenous phospholipase C and possible involvement of diacylglycerol and protein kinase C. *Biochim. Biophys. Acta*, 844, 81~90.
- Ha, K.-S. and J.H. Exton. 1993. Differential translocation of protein kinase C isozymes by thrombin and platelet-derived growth factor. A possible function for phosphatidylcholine-derived diacylglycerol. *J. Biol. Chem.*, 268, 10534~10539.
- Han, J.-S., J.-K. Chung, H.-S. Kang, J. Donaldson, Y.S. Bae and S.G. Rhee. 1996. Multiple forms of phospholipase D inhibitor from rat brain cytosol. *J. Biol. Chem.*, 271, 11163~11169.
- Jenco, J.M., A. Rawlingson, B. Daniels and A.J. Morris. 1998. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*, 37, 4901~4909.
- Jones, G.H. and G. Carpenter. 1993. The regulation of phospholipase C-gamma 1 by phosphatidic acid. Assessment of kinetic parameters. *J. Biol. Chem.*, 268, 20845~20850.
- Kanoh, H., Y. Kanaho and N. Nozawa. 1991. Activation and solubilization by Triton X-100 of membrane-bound phospholipase D of rat brain. *Lipids*, 26, 426~430.

- Kanuss, T.C., F.E. Jaffer and H.E. Abboud. 1990. Phosphatidic acid modulates DNA synthesis, phospholipase C, and platelet-derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 265, 14457~14463.
- Kim, J.H., Y.J. Suh, T.G. Lee, Y. Kim, S.S. Bae, M.J. Kim, J.D. Lambeth, P.-G. Suh and S.H. Ryu. 1996. Inhibition of phospholipase D by a protein factor from bovine brain cytosol. Partial purification and characterization of the inhibition mechanism. *J. Biol. Chem.*, 271, 25213~25219.
- Kobayashi, M. and J.N. Kanfer. 1987. Phosphatidylethanol formation via transphosphatidylation by rat brain synaptosomal phospholipase DJ. *Neurochem.*, 45, 1597~1603.
- Ktistakis, N.T., H.A. Brown, M.G. Waters, P.C. Sternweis and M.G. Roth. 1996. Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J. Cell Biol.*, 134, 295~306.
- Lee, C., H.-S. Kang, J.-K. Chung, F. Sekiya, J.-R. Kim, J.-S., Han, S.R. Kim, Y.S. Bae, A.J. Morris and S.G. Rhee. 1997. Inhibition of phospholipase D by clathrin assembly protein 3 (AP3). *J. Biol. Chem.*, 272, 15986~15992.
- Lee, C., S.R. Kim, J.-K. Chung, M.A. Frohman, M.W. Kilimann and S.G. Rhee. 2000. Inhibition of Phospholipase D by amphiphysins. *J. Biol. Chem.*, 275, 18751~18758.
- Limatola, C., D. Schapp, W.H. Moolenaar and W.J. van Blitterswijk. 1994. Phosphatidic acid activation of protein kinase C-zeta overexpressed in COS cells: comparison with other protein kinase C isotypes and other acidic lipids. *Biochem. J.*, 304, 1001~1008.
- Liscovitch, M., V. Chalifa, P. Pertile, C.-S. Chen and L.C. Cantley. 1994. Novel function of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate as a cofactor for brain membrane phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, 269, 21403~21406.
- Lukoski, S., M.-C. Lecomte, J.-P. Mira, P. Marin, H. Gautero, F. Russo-Marie and B. Geny. 1996. Inhibition of phospholipase D activity by fodrin. An active role for the cytoskeleton. *J. Biol. Chem.*, 271, 24164~24171.
- Massenburg, D., J.S. Han, M. Liyanage, W.A. Patton, S.G. Rhee, J. Moss and M. Vaughan. 1994. Activation of rat brain phospholipase D by ADP-ribosylation factors 1,5, and 6: separation of ADP-ribosylation factor-dependent and oleate-dependent enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91, 11718~22.
- Moolenaar, W.H., W. Kruijer, B.C. Tilly, I. Verlaan, A.J. Bierman and S.W. de Laat. 1986. Growth factor-like action of phosphatidic acid. *Nature*, 323, 171~173.
- Nishizuka, Y. 1986. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233, 305~312.
- Pai, J.-K., M.I. Siegel, R.W. Egan and M.M. Billah. 1988. Activation of phospholipase D by chemotactic peptide in HL-60 granulocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150, 355~364.
- Pertile, P., M. Liscovitch, V. Chalifa and L.C. Cantley. 1995. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis is required for activation of phospholipase D in U937 cells. *J. Biol. Chem.*, 270, 5130~5135.
- Perry, D.K., W.L. Hand, D.E. Edmondson and J.D. Lambeth. 1992. Role of phospholipase D-derived diradylglycerol in the activation of the human neutrophil respiratory burst oxidase. Inhibition by phosphatidic acid phosphohydrolase inhibitors. *J. Immunol.*, 149, 2749~2758.
- Rose, K., S.A. Rudge M.A. Frohman, A.J. Morris and J. Engebrecht. 1995. Phospholipase D signaling is essential for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 12151~12155.
- Serhan, C.N., M.J. Broekman, H.M. Korchak, A.J. Marcus and G. Wiessman. 1982. Endogenous phospholipid metabolism in stimulated neutrophils differential activation by FMLP and PMA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 107, 951~958.
- Siddiqi, A.R., J.L. Smith, A.H. Ross, R.G. Qiu, M. Symons and J.H. Exton. 1995. Regulation of phospholipase D in HL60 cells. Evidence for a cytosolic phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, 270, 8466~8473.
- Singer, W.D., H.A. Brown, G.M. Bokoch and P.C. Sternweis. 1995. Resolved phospholipase D activity is modulated by cytosolic factors other than Arf. *J. Biol. Chem.*, 270, 14944~14950.
- Simmonds, A.C. and M.J. Halsey. 1985. General and local anaesthetics perturb the fusion of phospholipid vesicles. *Biochem. Biophys. Acta*, 813, 331~337.
- Waksman, M., Y. Eli, M. Liscovitch and J.E. Gerst. 1996. Identification and characterization of a gene encoding phospholipase D activity in yeast. *J. Biol. Chem.*, 271, 2361~2364.
- Yang, S.F., S. Freer and A.A. Benson. 1967. Transphosphatidylation by phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, 242, 477~484.

2001년 4월 27일 접수

2001년 6월 30일 수리