

Thyroglobulin의 소포체내 dimerization

신기선¹ · 권오유*

충남대학교 의과대학 해부학교실
¹한국생명공학원

Dimerization of Thyroglobulin in the Endoplasmic Reticulum

Kee-Sun Shin¹ and O-Yu Kwon*

Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-747, Korea
¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-600, Korea

Abstract

The kinetics of dimerization of a newly synthesized thyroglobulin (Tg), the precursor protein in the manufacture of thyroid hormone, was investigated in the endoplasmic reticulum of thyrocytes FRTL-5 cell line. The folded monomeric Tg was first detectable in a conformationally unstable form, from the examination of lysates of pulse labeled cultured thyrocytes by denaturing and nondenaturing gel electrophoresis by 15 min after biosynthesis. The first dimeric Tg was formed by 30 min after; the monomer declined and the dimer progressively increased, and 40 min after remarkable dimeric Tg form was found. Finally, dimerization was complete at 60 min after.

Key words – thyroglobulin (Tg), endoplasmic reticulum (ER), two-dimensional electrophoresis (2-DE)

서 론

신생분비단백질의 정확한 folding 및 assembly는 분비 단백질의 세포내 이동과 생물활성의 기능에 아주 중요하다[6]. 많은 종류의 진핵세포에서 분비단백질의 세포내 이동이란 관점에서 보면 소포체(ER)에서 Golgi complex로의 이동이 rate-limiting 단계이다[10]. 그래서 분비단백질들의 각각 다른 folding 및 assembly시간은 결국 각각 다른 시간에 걸쳐서 ER에서 Golgi complex에 도달하는 것을 의미한다. 최근에 많은 종류의 ER-molecular chaperone들이 분

비단백질의 ER내의 folding 및 assembly에 직접 관여하는 것이 알려져 있다[5].

갑상선배양세포(FRTL-5 cell)에서 분비되는 분비단백질의 약 80% 정도가 갑상선호르몬의 전구물질인 thyroglobulin (Tg)이다. 활성을 가진 Tg의 생합성은 ER내에서 posttranslational 단계를 거쳐서 완성된다[3]. 즉, ER내에서 Tg-mRNA로부터 신생된 Tg-peptide가 unfolded monomer-Tg로 만들어져 일정시간이 경과하면서 ER-molecular chaperone의 도움을 받아서 folded monomer-Tg (약 330 kDa)가 만들어져 ER에서 Golgi complex로 이동하기 직전에 homodimerization이 일어나 생체활성을 가진 약 600 kDa의 분비당단백질이 된다[7]. Tg dimerization에 칼슘이 요구되는 것과 dityrosine bridge형성이 중요한 것으로 알려져 있지만

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 042-580-8206, Fax : 042-586-4800
E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

Tg가 ER내에서 unfolded monomer, folded monomer, homodimer과정을 거치는 것에 관한 보고는 없다[2,4]. Tg는 분자량이 아주 크면서 60여개 이상의 disulfide 밴드를 형성하기 때문에 posttranslation과정이 다른 분비단백질에 비해서 아주 천천히 진행됨으로 인하여 ER내에서 일어나는 분비단백질의 folding 및 assembly의 연구를 위하여 귀중한 실마리를 제공할 수 있는 잇점이 있다. 특히, 갑상선 기능저하증(hypothyroidism)의 원인중의 하나로 알려진 것이 ER에서 Tg의 misfolding 혹은 unfolding에 의한 Tg의 세포외 분비불량이다[9]. 이런 관점에서, 본 연구에서는 ER내에서 unfolded-Tg에서 homodimer-Tg가 만들어지는 반응속도를 결정하였다. 이는 각종 갑상선질환의 진단과 치료에 중요한 의미를 가질 수 있다.

재료 및 방법

Rat의 갑상선세포유래인 FRTL-5 cell를 Coon's 배지(GIBCO)에서 배양하였다. 이 배지에는 insulin (10 mg/ml), thyroid-stimulating hormone (0.5 U/mg), transferrin (50 mg/ml), 10 nM hydrocortisone과 함께 열 처리에 의해서 비활성화된 5%의 calf serum이 포함되어 있다. 세포 배양은 37°C에서 충분한 습도가 유지되며 5%의 CO₂를 유지하였다. 신선한 세포를 실험에 사용하기 위하여 2일마다 배지를 갈아주며, 세포가 culture plate에서 confluent상태를 이룬 다음에 2주가 지난 다음에는 splitting하여 새로운 culture plate에 배양하였다[1].

FRTL-5 cell이 confluent상태가 되었을 때 각종 호르몬이 들어있지 않은 Coon's배지로 30분간 starvation하였다. Tg를 ³⁵S-Met (DuPont-New England Nuclear Expre^{SS})으로 5분동안 labeling한 다음에 대량의 Cys/Met이 포함된 37°C chase 배지(cysteine-free 배지)에서 0, 15, 20, 30, 40, 60분동안 각각 chase한 후에 모은 배지를 SDS와 DTT가 들어있지 않는 lysis buffer (0.1 M NaCl, 25 mM Tris, pH 6.8, 5 mM EDTA, 0.1% Triton X-100)에 녹인 다음에 5%의 native gel에 전기영동 한다. 전기영동이 끝나면 gel 상에서 Tg를 포함하고 있는 band를 면도칼로 cut off하여 lysis buffer에 4% SDS 와 50 mM DTT가 들어있는 4% gel을 사용하여 2D SDS-PAGE를 실시한다. Gel을 건조시켜서 X-ray 필름 사이에 끼워서 -80°C에서 하룻밤 지낸 뒤에

developing하여 나타난 spot를 각각 unfolded-monomer Tg, folded-monomer Tg, homodimer Tg로 구분한다. 이들 Tg spot를 scanning densitometry (Heofer GS-350)를 사용하여 정량화한 다음에 그래프를 작성한다. 명시하지 않은 시약은 모두 Sigma회사의 제품을 사용하였다.

결과 및 고찰

갑상선배양세포(FRTL-5 cell)를 정상조건하에서 배양할 때에 Tg는 1시간 이내에는 세포외로 분비되지 않는다. 즉, 신생 Tg가 mRNA에서 번역되어 ER내에서 posttranslational step과 Golgi complex를 거치는 시간이 적어도 1시간정도 필요하며 그 동안에는 완전하게 만들어진 Tg-dimer가 만들어지지 않았다는 것을 의미한다. Tg가 ER내의 dimerization의 kinetics에 관한 보고는 전무한 상태이다. 갑상선 호르몬의 전구체인 Tg의 생합성과정을 분명하게 규명하는 것은 갑상선질환연구의 가장 기본적이고 유익한 정보를 제공할 것이다. 그런 이유로, 본 실험에서는 갑상선세포가 거의 100%정도의 confluent상태를 보일 때에 30분동안 starvation후에 5분동안 ³⁵S-Met으로 신생 Tg를 labeling한다. 다량의 Cys/Met은 포함되었지만 TSH는 포함되지 않은 배지로 충분히 씻는다. 37°C에서 정해진 시간동안(0, 15, 20, 30, 40, 60분) 다량의 Cys/Met이 포함된 배지로 chase하여 collection한 Tg (세포외분비)를 SDS와 DTT가 들어있지 않는 lysis buffer에 녹인다. Native gel (5%)에 전기영동후에 4% SDS 와 50 mM DTT가 들어있는 2D SDS-PAGE를 실시하였다. 필름 상에서 확인된 세포외로 분비된 Tg spot는 결국 정상적으로 ER내에서 unfolded monomer, folded monomer 그리고 homodimer과정을 거쳤다는 것을 의미한다.

Fig. 1 (A, B)에서 보는 것과 같이, chase 15분에서부터 folded monomer가 관찰되기 시작하여서 chase 20분부터는 분명하게 folded monomer가 관찰되는 것과 동시에 dimer가 만들어지기 시작하였다. 반면에 unfolded monomer는 줄어들기 시작하였다. 결국 갑상선세포에서 Tg의 folding 및 assembly는 신생 Tg가 만들어지기 시작한지 15-20분에 동시에 일어나는 것을 알 수 있다. Chase 30분부터는 본격적으로 unfolded monomer가 folded monomer를 거쳐서 dimer로 바뀌면서 unfolded monomer가 현저

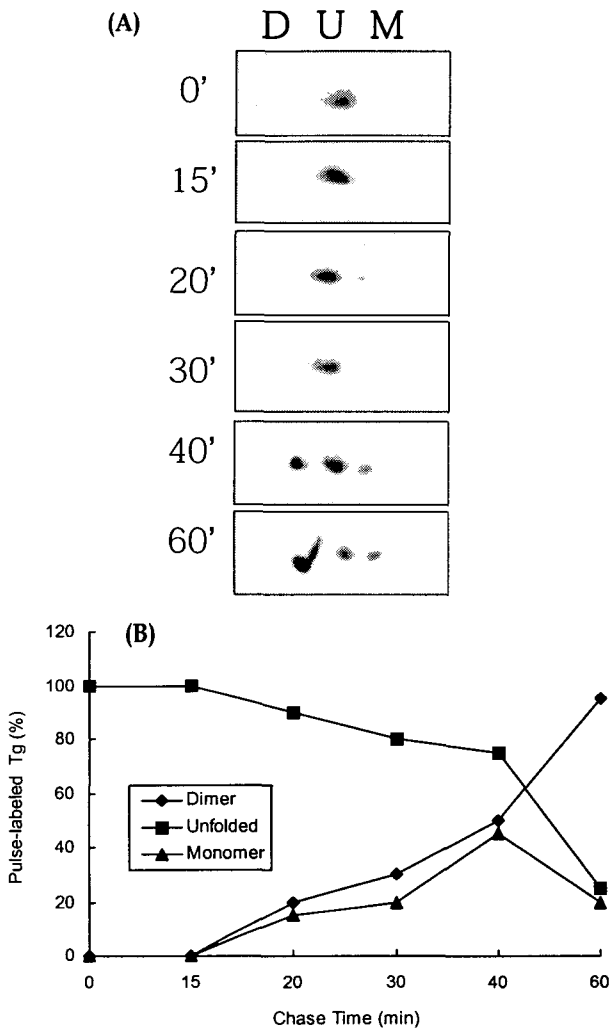


Fig. 1. Kinetics of Tg dimerization by 2-D gel analysis and quantitation of Tg dimerization.

A) Culture cells FRTL-5 were pulse-labeled with [³⁵S]-Met for 5 min at 37°C for the indicated times, chased and lysed, and analyzed by 2-D PAGE. B) Tg bands in panel A were quantitated by scanning densitometry. The sum of the density in Tg bands at each chase time was assigned 100%. U, unfolded monomer; M, folded monomer; D, dimer.

하게 줄어드는 것과는 반대로 monomer와 dimer가 전체 신생Tg에서 차지하는 비율이 높아지기 시작하였다. Chase 40분에서는 거의 동일한 비율의 unfolded monomer, folded monomer, dimer가 관찰되었다. 갑상선세포가 세포외로 Tg를 분비하기 시작하는 시간인 60분 chase에서는 완성된 dimer가 전체 신생Tg의 비율 중에서 거의 대부분을 차지하고 unfolded monomer와 folded monomer는 급격하

게 줄었다. 위의 결과를 요약하면, 갑상선세포에서 Tg의 세포외분비는 Tg-mRNA에서 신생Tg가 ER내에서 만들어지는 것은 translation이 시작하는 것과 거의 동시에 일어나며 20분부터 folded monomer가 만들어지는 것과 거의 동시에 dimer가 만들어져 30분부터 본격적으로 dimer가 만들어져 60분부터 Tg가 세포외로 분비되기 시작한다.

갑상선기능저하증의 원인중의 하나가 misfolded/unfolded-Tg가 ER내에서 ER-molecular chaperone에 의해서 retention되어서 정상 조직에서 보다가 분비량이 불량하다는 것이 알려져 있다[6]. 이 문제를 해결하기 위하여 먼저 생각할 수 있는 것은, 어떻게 생체활성을 가진 Tg가 ER내에서 순차적으로 posttranslation step을 거쳐 세포외로 분비되는지를 결정하는 것이 전제조건이 될 것이다. 결국, 이는 ER내의 정상적인 Tg 생합성과 갑상선기능저하증에서 보이는 Tg 생합성의 차이를 분자수준에서 확인할 수 있다. 이를 바탕으로 Tg 생합성의 각 단계에 관여하는 특이인자를 분리할 수 있는 기회가 제공되며 이를 적극적으로 진단과 치료에 활용할 수 있을 것이다. 특히, 갑상선기능저하증과 같이 비정상적인 folding/assembly된 Tg가 ER내에 축적됨으로 인하여 유발되는 질병이 많이 알려져 있으며, 이를 통칭하여 ERSD (endoplasmic reticulum storage disease)라 한다. ERSD연구를 위하여 갑상선세포의 Tg는 아주 적절한 분비단백질이다[9]. 그 이유는, Tg는 600 kDa이상의 큰 분자량을 가지고 있어서 최종적으로 활성을 가진 Tg가 만들어지기 위하여서는 ER내에서 60여개 이상의 disulfide 밴드를 형성할 시간이 길어서 실험적으로 측정할 수 있는 충분한 시간이 요구되기 때문이다. 그리고, Tg의 posttranslation step에 관여하는 ER molecular chaperone과의 interaction 등이 잘 연구되어있기 때문이다[8].

요 약

갑상선호르몬의 전구체인 thyroglobulin (Tg)이 어떻게 dimerization이 일어나는지를 조사하였다. 변성 혹은 비변성전기영동법으로 관찰한 결과 새롭게 만들어지기 시작한 Tg는 15분에 처음으로 구조적으로 불안정하지만 folded monomer가 관찰되었다. 그 이후에 monomer가 dimer로 바뀌어 결국 30분에 dimer Tg가 만들어지기 시작하여 40분에는 dimer Tg가 관찰되었다. 최종적으로 60분에 완전

하게 dimerization된 Tg가 만들어졌다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의해서 이루어졌음.

참고 문헌

1. Arvan, P. and J. Lee. 1991. Regulated and constitutive protein targeting can be distinguished by secretory polarity in thyroid epithelial cells. *J. Cell Biol.* **112**, 365-376.
2. Baudry, N., P. J. Lejeune., P. Niccoli., L. Vinet., P. Carayon and B. Mallet. 1996. Dityrosine bridge formation and thyroid hormone synthesis are tightly linked and are both dependent on N-glycans. *FEBS Lett.* **396**, 223-226.
3. Deshpande, V. and S. G. Venkatesh. 1999. Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1430**, 157-178.
4. Di Jeso, B., R. Pereira., E. Consiglio., S. Formisano., J. Satrustegui and I. V. Sandoval. 1998. Demonstration of a Ca^{2+} requirement for thyroglobulin dimerization and export to the golgi complex. *Eur. J. Biochem.* **252**, 583-590.
5. Fewell, S. W., K. J. Travers., J. S. Weissman and J. L. Brodsky. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. 2001. *Ann. Rev. Genet.* **35**, 149-191.
6. Freudl, R., M. Klose and U. Henning. 1990. Export and sorting of the Escherichia coli outer membrane protein OmpA. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 441-449.
7. Kim, P. S. and P. Arvan. 1991. Folding and assembly of newly synthesized thyroglobulin occurs in a pre-Golgi compartment. *J. Biol. Chem.* **266**, 12412-12418.
8. Kim, P. S., D. Bole and P. Arvan. 1992. Transient aggregation of nascent thyroglobulin in the endoplasmic reticulum: relationship to the molecular chaperone, BiP. *J. Cell Biol.* **118**, 541-549.
9. Kim, P. S., O. Y. Kwon and P. Arvan. 1996. An endoplasmic reticulum storage disease causing congenital goiter with hypothyroidism. *J. Cell Biol.* **133**, 517-527.
10. Petaja-Repo, U. E., M. Hogue., A. Laperriere., P. Walker and M. Bouvier. 2000. Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 13727-13736.

(Received January 22, 2003; Accepted May 13, 2003)