

누에 배양세포(Bm5)로부터 분리한 새로운 전사제어인자 ATFC의 특성분석

구태원¹ · 윤은영¹ · 김성완¹ · 최광호¹ · 황재삼¹ · 박수정² · 권오유² · 강석우^{1*}

¹농촌진흥청 농업과학기술원

²충남대학교 의과대학

Isolation and Characterization of a Novel Transcription Factor ATFC Activated by ER Stress from *Bombyx mori* Bm5 Cell Lines

Tae Won Goo¹, Eun Young Yun¹, Sung Wan Kim¹, Kwang Ho Choi¹, Jae Sam Hwang¹,
Soo Jung Park², O-Yu Kwon² and Seok Woo Kang^{1*}

¹Department of Sericulture and Entomology, the National Institute of Agriculture Science and Technology, R.D.A., Suwon 441-100, Korea

²Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-131, Korea

Abstract

Cells respond to an accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER) by increasing transcription of genes encoding molecular chaperones and folding enzymes. The information is transmitted from the ER lumen to the nucleus by intracellular signaling pathway, called the unfolded protein response (UPR). To obtain genes related to UPR from *B. mori*, the cDNA library was constructed with mRNA isolated from Bm5 cell lines in which N-glycosylation was inhibited by tunicamycin treatment. From the cDNA library, we selected 40 clones that differentially expressed when cells were treated with tunicamycin. Among these clones, we have isolated ATFC gene showing similarity with Hac1p, encoding a bZIP transcription factor of *S. cerevisiae*. Basic-leucine zipper (bZIP) domain in amino acid sequences of ATFC shared homology with yeast Hac1p. Also, ATFC is up-regulated by accumulation of unfolded proteins in the ER through the treatment of ER stress drugs. Therefore we suggest that ATFC represents a major component of the putative transcription factor responsible for the UPR leading to the induction of ER-localized stress proteins.

Key words – ATFC, Bm5, *Bombyx mori*, bZIP, ER, Hac1p, molecular chaperone, UPR

서 론

소포체(endoplasmic reticulum; ER)의 가장 중요한 생물학적 기능 중의 하나는 번역 후 변형과정 (post-translation

modification)에서 새롭게 합성되는 분비단백질과 세포막 단백질의 정확한 접힘과 조립 (folding & assembly)을 위한 적절한 환경을 제공하는 것이다[11,6]. 이를 위하여 소포체는 여러 종류의 거주 단백질인 ER chaperone, ER foldase, ER degradase 등을 가지고 있다[4,5]. 결국 이들은 비정상적인 단백질의 생산을 막는 품질관리(quality control)를 통하여 정확하게 접히고 조립된 단백질만을 세포

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 031-290-8545, Fax : 031-290-8439

E-mail : Kangsw@rda.go.kr

내외의 적당한 위치에 분비 또는 수송하여 주어진 기능을 수행하도록 한다[8,15]. 반면에 정확하게 접혀지지 않았거나(unfolded 또는 misfolded) 조립되지 못한 폴리펩타이드(polypeptide)에 대하여 세포는 분자샤페론과 folding enzyme의 전사를 증가시킴으로써 소포체 내에 존재하는 비정상적인 구조를 가지는 단백질의 정상화를 촉진한다[18, 17]. 따라서 소포체의 단백질 고차구조 형성 능력은 필요에 의해서 조절된다. 만약, 세포가 heat shock, 중금속 오염, 산소결핍, Ca^{2+} 이온의 항상성 파괴, 단백질 glycosylation 및 disulfide bond 형성 저해 등의 각종 스트레스를 받아 소포체 내강(ER lumen) 내에 이상한 구조를 가지는 단백질이 과다 발생하면, 세포는 소포체 내에 존재하는 분자샤페론과 folding enzyme의 능력만으로 정상적 단백질로 복구가 불가능하므로 분자샤페론과 folding enzyme의 전사를 증가시키기 위하여 intracellular signaling pathway 즉, unfolded protein response (UPR)라는 신호를 핵(nucleus)으로 보낸다[1]. 이 UPR signaling pathway에 관해서는 이미 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 대부분이 해명되었는데, 3개의 유전자 산물 즉, Ire1p, Reg1p 및 Hac1p가 효모의 UPR에서 필수적인 역할을 수행한다[14,20,31,27]. 일단 소포체 내에 비정상구조의 단백질이 발생하면 transmembrane kinase인 Ire1p가 비정상 구조의 단백질을 인지하고 신호를 소포체나 핵 내막으로 전달한다. Ire1p는 growth factor receptor와 매우 유사하게 oligomerization과 autophosphorylation에 의해서 활성화되어 HAC1 precursor mRNA를 특이적으로 절단하며, 절단된 5' 엑손과 3' 엑손이 Rlg1p (tRNA ligase)에 의해서 연결됨으로써 성숙한 형태의 HAC1 mRNA가 된다. 성숙 HAC1 mRNA에 의해서 basic-leucine zipper (bZIP) type의 전사제어인자(transcription factor)인 Hac1p가 생성되어, 분자샤페론이나 folding enzyme의 프로모터 상류에 위치하고 있는 UPRE (unfolded protein response element)에 결합함으로써 분자샤페론의 전사를 증가시킨다[2,21,22]. 이렇게 전사제어인자 Hac1p에 의해서 전사가 증가된 분자 샤페론들이 정확하게 접혀지지 않았거나 조립되지 못한 폴리펩타이드에 결합함으로써 적절하게 접혀지고 조립되게 하여 정확한 구조를 가지는 단백질로 재생된다.

포유동물에도 효모의 UPR에서 필수적인 역할을 수행하는 Ire1p, Reg1p 및 Hac1p와 유사한 counterpart를 찾기

위하여 많은 연구를 수행하였다. 그 결과로써, 포유동물 세포는 IRE1 α 와 IRE1 β 라 불리는 두 개의 Ire1p homolog를 발현한다는 것을 발견하였다. IRE1 α 와 IRE1 β 는 cytoplasmic region에 protein kinase와 endoribonuclease domain을 가지고 있는 소포체 내에 존재하는 type I transmembrane protein으로[30,32,25,13], 효모의 Ire1p와 동일하게 HAC1 precursor mRNA를 같은 위치에서 절단한다는 것을 발견하였다[30,25]. 따라서 포유동물의 경우에도 UPR 생성시 Ire1p homolog가 존재함으로써 이후 Hac1p-like-transcription factor를 찾기 위한 많은 연구가 수행되었다[33,28]. 그 결과, 포유동물에서도 UPR에 의해서 조절되는 bZIP 도메인을 가지고 있는 전사제어인자인 ATF6 α , ATF6 β 및 XBP1이 발견되었지만, 이들 전사제어인자가 IRE1 α 및 IRE1 β 에 의해서 직접적으로 조절되는지에 관해서는 아직까지 어떠한 증거도 밝혀지지 않았다[9,10,34,35].

따라서 본 연구는 곤충에서 처음으로 각종 물리·화학적 스트레스에 의해서 소포체 내에 비정상 구조를 가지는 단백질들이 발생될 때 정상구조를 가지는 단백질로 재생하는 분자샤페론이나 folding enzyme의 전사를 증가시키는 효모의 Hac1p와 유사한 기능을 하는 전사제어인자를 코딩하는 유전자를 선별하기 위하여, 누에 배양세포주(Bm5)에 tunicamycin을 처리하여 UPR을 유도하고 이로부터 cDNA 유전자은행을 제작하였다[7]. 또한 정상 세포주와 tunicamycin이 처리된 세포주로부터 각각 분리한 poly(A)⁺ RNA를 이용하여 합성한 1st-strand cDNA를 탐침으로써 차별화 선별[12]을 하고, 이로부터 발현량이 증가하는 40개의 차별화 발현 cDNA 클론에 대하여 부분 염기서열을 분석하고, 이 중 기존에 밝혀진 전사제어인자와 1차 아미노산의 구조적 유사성을 나타내는 클론에 대하여 유전자의 구조와 발현 특성을 분석하였다. 이는 곤충에서 UPR pathway에 관련한 전사제어인자의 최초의 보고이다.

재료 및 방법

공시 배양세포주 및 N-glycosylation 억제

본 연구에 사용된 곤충 배양세포주는 누에(*Bombyx mori*: Silkworm) 난소(ovary) 조직에서 수립된 Bm5 세포주이었다. N-glycosylation 억제를 위해 배양세포에 tunicamycin을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리하여 25°C에서 5시간 배양하였다[3].

Total RNA 및 poly(A)+ RNA 분리

Tunicamycin이 처리된 배양세포를 5시간 후에 PBS (phosphate buffered saline)로 2회 세척한 다음 이로부터 total RNA 분리는 Promega (Madison, WI, USA)의 RNAGents Total RNA Isolation System을 사용하여 분리하였다. 분리한 total RNA는 전기영동으로 양상을 확인하고, 파장 260 nm에서 UV 분광광도계로 정량하여 poly(A)+ RNA 분리에 사용하였다. Poly(A)+ RNA의 정제는 Stratagene (La Jolla, CA, USA)의 Poly(A) Quik mRNA Purification Kit를 사용하여 정제한 후 cDNA 유전자은행을 제작하는데 이용하였다.

cDNA 유전자은행 제작

N-glycosylation이 억제된 곤충 배양세포주의 cDNA 유전자은행의 제작은 Stratagene사(CA, USA)의 Uni-ZAP XR Vector Kit와 Gigapack Packaging Extract를 사용하여 제작하였다. 즉, poly(A)+ RNA로부터 *Xho*I linker primer와 역전사효소를 이용하여 cDNA 말단을 평활말단으로 만들었다. 그리고 *Eco*RI adapter를 부착시킨 후, 제한효소인 *Xho*I로 절단하고 size fractionation을 거쳐 500 bp 이상 크기의 단편만을 취하였다. 이러한 cDNA를 Uni ZAP XR 벡터에 결합시켜 삽입한 후 완전한 bacteriophage 상태가 되도록 coat protein으로 packaging하여 cDNA 유전자 은행을 제작하고 기주세포(XL1-Blue MRF' strain)내에 감염시킨 후 cDNA 농도를 적정하고 이를 적당한 농도로 증폭하여 시험에 사용하였다.

정상 및 N-glycosylation이 억제된 곤충 배양세포주의 차별화 선별

Tunicamycin을 처리하여 제작된 cDNA 유전자은행으로부터 *in vivo* excision에 의해 무작위로 768개의 클론을 선별하여 플라스미드를 분리하였다. 분리한 플라스미드를 95°C에서 10분간 가온하여 변성시킨 후 두 장의 나일론 막에 각각 동일한 0.5 µg의 플라스미드 DNA를 blotting 하였다. 두 장의 막을 각각 정상세포에서 분리한 poly(A)+ RNA와 N-glycosylation이 억제된 곤충 배양세포에서 분리한 poly(A)+ RNA를 M-MLV 역전사효소로 합성한 1st-strand cDNA를 탐침으로 사용하였다.

cDNA 탐침제조는 1.5 ml 튜브에 1 µg poly(A)+ RNA,

1 µg oligo(dT) primer (1 µg/µl), 20 units RNase inhibitor, 5 µl 5× reverse transcriptase buffer, dGTP, dCPT, dTTP (20 mM/each), 120 µM dATP, 10 µl [α -³²P] dATP (3000 Ci/mmol)와 20 units M-MLV 역전사효소를 넣고 1시간 동안 역전사하였다. 여기에 2 units RNaseH를 첨가하고 37°C에서 15분간 반응하여 poly(A)+ RNA만을 선택적으로 제거시킨 후 동위원소가 표지된 단선 cDNA를 G-50 Sephadex 칼럼을 이용하여 회수하였다.

Northern blot 분석

선발한 차별화 클론에 대하여 전사체 검정을 위하여 정상 배양세포주와 각종 스트레스 유도제 처리에 의해서 세포체 내 비정상 단백질이 생성된 배양세포주로부터 각각 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA는 1.2% formaldehyde agarose 겔에 각각 동일한 5 µg의 RNA를 전기영동하고 나일론 막에 전이시킨 후, Stratagene (La Jolla, CA, USA)의 Prime-It II Random Primer Labelling Kit를 이용하여 [α -³²P] dATP로 표지한 cDNA를 탐침으로 Northern blot 분석을 수행하였다.

염기서열 분석 및 데이터베이스 검색

차별화 발현되는 클론의 부분 염기서열 분석은 Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA)의 자동염기서열 분석장치 (ABI377)를 이용하여 제조회사의 방법에 따라 수행하였다. 각 염기의 표지는 Applied Biosystems (Foster, CA, USA)의 Bigdye Ready Reaction Kit를 이용하여 반응액을 조제하고 PCR을 수행한 후, 반응산물을 정제하여 4.5% 아크릴 아마이드겔에 전개하였다. 아크릴아마이드겔의 예비통전은 30 W로 20~30분간하였으며, 시료주입은 정제한 PCR 산물에 formamide 5 µl와 50 mM EDTA 1 µl를 넣어 100°C에 2분간 변성하고 급냉한 후 각 well에 2 µl씩 점적 (loading)하였으며, 염기서열은 Perkin Elmer (Wellesley, MA, USA)의 DNA Sequencing Analysis Software에 의해서 분석하였다. 그 후 얻어진 염기서열은 GenBank 데이터베이스를 통하여 상동성을 분석하고 GenBank 및 DDBJ 국제 유전자은행에 등록하였다.

5'-RACE-PCR

차별화 선별된 클론의 전체 염기서열을 결정하기 위하

여 Clontech (East Meadow Circle Palo Alto, CA, USA)의 Marathon cDNA Amplification Kit를 사용하여 5'-Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) PCR을 실시하였다. Tunicamycin이 처리된 누에 배양세포(Bm5)로부터 분리한 poly(A)⁺ RNA를 사용하여 1st 및 2nd cDNA를 합성하고, Marathon cDNA Adaptor (5'-CTAATACGACTCACTATA-GGGCTCGAGCGGCCCGCCGGCAGGT-3')를 ligation 한 후 유전자내의 gene specific primer (GSP1: 5'-GATTT-ACTTGATTAGACCCTTCGCCTTGAAAAGATC-3')와 adaptor primer (AP1: 5'-CCATCCTAATACGACTCACT-ATAGGGC-3')를 사용하여 touch down PCR을 수행하였다. 증폭된 5'-RACE (GSP1/AP1) PCR 산물은 1.2% 아가로스겔에 전기영동하여 증폭된 단편의 크기를 확인한 후, Promega (Madison, WI, USA)의 pGEM-T 벡터에 클로닝하고 염기서열을 확인하여 전체 염기서열을 결정하였다.

결과 및 고찰

차별화 선별법에 의한 차별화 발현 클론 선별

누에 배양세포(Bm5)의 소포체 내에 비정상 구조를 가지는 단백질들이 발생될 때, 정상구조를 가지는 단백질로 재생하는 분자샤페론이나 folding enzyme의 전사를 증가시키는 효모의 Hac1p와 유사한 기능을 하는 전사제어인자를 코딩하는 유전자를 선별하기 위하여, 누에 배양세포에 N-glycosylation 형성 저해제인 tunicamycin (5 μ g/ml)을 처리하여 cDNA 유전자은행을 제작하였다[3,29]. cDNA 유전자은행으로부터 cDNA 파아지 클론들을 *in vivo* excision 방법을 이용하여 플라스미드로 전환하여 무작위로 768개의 cDNA 클론을 선별한 후 hybri-dot manifold system (BRL Co., USA)을 이용하여 2장의 나일론 막에 동일하게 blotting하였다. 이때 사용한 cDNA 탐침은 정상 세포주와 tunicamycin이 처리된 배양세포로부터 각각 분리한 poly(A)⁺ RNA를 이용하여 합성한 1st-strand cDNA를 사용하였다. 그 결과, 정상 세포주에 비해 tunicamycin이 처리된 배양세포주에서 분리한 poly(A)⁺ RNA를 이용하여 합성한 1st-strand cDNA를 탐침으로 한 나일론 막에서 더 강한 반응을 나타내는 40개의 차별화 발현 클론에 대하여 부분 염기서열 분석 데이터베이스 검색을 통하여 발현 유전자 꼬리표(Expressed Sequence Tags ; ESTs)를 작성한 후 DDBJ

국제 유전자은행에 등록하였다[7].

본 연구에서는 선별한 40개의 차별화 발현 클론 중에서 기존에 밝혀진 효모의 전사제어인자 Hac1p (Homology to ATF and CREB)와 1차 아미노산 구조가 유사한 TmInc329 클론을 선별하여 전체 염기서열 분석 및 유전자의 특성을 분석하였다[26]. 이는 전사제어인자의 경우, 효모에서 연구가 선행된 이후 포유동물 등에서 많은 연구가 보고된 반면에 곤충에서는 전무한 실정이며[9,10,34,35], 또한 현재 곤충 세포주에서 재조합단백질 발현시 재조합단백질의 고차 구조 형성 및 번역 후 변형과정(post-translational modification)에서의 문제점이 제기됨으로 이를 해결하기 위한 누에 배양세포주로부터 분리한 분자 샤페론이나 folding enzyme의 전사를 조절하는 전사제어인자의 연구 가치가 충분하다고 사료되었기 때문이다.

TmInc329 클론의 전체 염기서열 결정

TmInc329 클론의 전체 염기서열 분석 결과, 822 bp의 염기로 구성되어 있었으며 이 cDNA로부터 105개의 아미노산을 번역할 수 있었다. 또한 316번째 염기 위치에서 번역종결 코돈인 TAA를 확인할 수 있었으며 774번째 염기 위치에서 잠정 전사종결신호인 'AATAAA'를 확인할 수 있었고 795번째 염기 위치에서 poly(A) tail을 확인할 수 있었다[7]. 그러나 cDNA 클론은 5' 쪽의 번역 개시코돈인 ATG를 포함하고 있지 않아, TmInc329 클론의 전체 염기서열 결정 및 유전자를 확보하기 위하여 Clontech 사의 Marathon cDNA Amplification Kit를 사용하여 5'-Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) PCR을 실시하였다. 그 결과 TmInc329 클론은 1,386 bp의 염기로 구성되어 있었으며 172번째 염기에서 개시되어 882번째 염기 위치에서 종결되는 open reading frame (ORF)을 가지고 있었다. 이 cDNA의 ORF로부터 236개의 아미노산을 번역할 수 있었으며, 이 번역 아미노산으로부터 추정되는 단백질의 분자량은 26.1 kDa이었다(Fig. 1). 전체 염기서열이 결정된 TmInc329 클론을 ATFC (Activating Transcription Factor of Chaperone)로 명명하고 국제 유전자은행에 등록하였다 (GenBank acc. No. AF325210).

ATFC 유전자의 번역 아미노산 구조분석

ATFC의 번역 아미노산 서열 중에서 분자 샤페론이나

```

1 ACTAGTGATTAACGAATGCGACCTATCGTCGCTATCACGCTCTGGCCAGTCTCCACCG 60
61 CATTCTAGAACGTAGCAGCGCTCTCCATTCCGTCGGTGGAGCTGATTTGGCCACGTACGCT 120
***
121 ACATAGTCTAACGAATCCGCATCTCCGCCGAGGCAACGATACCCCTGGGCATGTCGTGT 180
M S C
181 CGTGCTATGGTGTCCGCCCTCCAGAACCCTGGCCAGGTGGGTTCTAGCTTCAAGT 240
R A M V S P P S R T A R A G A V L A S S
241 CCTTTTGTGACCTCGCAGCCACTGAAGAAGTCTGCGGAATTCGAAACGGTTTATGGT 300
P F V T S Q P T E E L L R E F E T V Y G
301 GGTGTCGAGTTAACGCATTTAACACCGCCGAGAGTCCGCCGGACCCGGACTCAGTTG 360
A V E L T H L T P P Q S P P G P A T Q L
361 CTCTGAGTTACGCTCAACAAGCACAATGCACAGCACTAGCACCTCCAGCTCCCTGGCA 420
L L S Y A Q Q A Q C T A L A P P A P L A
421 CCGCCGCAAGAAGCGTGGCAGATTGTGGCACTGTTCCGGTTAACAGCTGCCGGAAGT 480
P P Q E A W Q I V A P V P V N Q L P E G
481 TACGAGTGTGACTTGGACCGCTCGAGGAAGTGGTCCGTCACGAGCCTCTCAACTGGCA 540
Y E C D L D A V E E L V R H R A S Q L A
541 TCTCCGCAACATCCAGTAGTAGTCTAATGCCTCTCCAGCTTCTTACCACCACCATCG 600
S P Q H S S S S A N A S P R S S P P P S
601 CCGCGTCTCATCGACCGCAGGAGTGGTCCGACCGTCAAGTTTGAAGACGGTCTCT 660
P R S S S T D E D W S A P S R L K
661 GTAGATGACCGTCTTCAACGAAAGAGGCAAAATAAAATGCTGCTACTGTTACCGT 720
V D D R R S R K K E D N K N A A T R Y R
721 CAGAAGAAAAAGCGGAAGTGGAGTCTCTCAAGGAGGAGCAGACCTCGCCGACGCT 780
H K K K A E V E V L L K E E Q T L R Q R
781 CACACCGAACTCCGGGAGAAGTGTCTGACCTCCAAAGAGAGATCGCTACCTAAAGGCT 840
H T E L G E K C S D L Q R E I R Y L K A
***
841 CTGATGCGTGATCTTTCAAGGCGAAGGCTCTAATCAAGTAAATCAATCAACAACGCCG 900
L M R D L F K A K G L I K
901 CTCCAGAGAAATAAATCAATATGCAAAAACGCATAAAGCGATTGATCTGTTGATCATCG 960
961 GAAGTTAAGGGAGTCTTTAATTTGGATGATTTTTATTTTACGATAAAAATAATTTAACTC 1020
1021 TGTCTATGTTTGCATCTAAGTGAGCAGATCAGATGTCACATTATCGAGCAGCATAAGCTA 1080
1081 CGTCATCATCAGAGGATACTAATAACACCTTGTAAAGTGGCGCATTCTTCATCATCA 1140
1141 TTCATTCATTAATTCATTAATTCATTTAGACGATAGGTCGATTCGTTATTGTAAGATA 1200
1201 TGTATACTTATAGGATCAACAACATCTTACTCCTGTTTGGTTAAATCACTATTTTCGG 1260
1261 TATATATATACATACTGTTATTGAGAATTTTATCAACTGACATGAAATCTTTGATTATT 1320
1321 TTTTAAATTTCTTACATAAATGGAATGGGATGGCGAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAA 1380
1381 AAAAAA 1386

```

Fig. 1. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *Bombyx mori* ATFC complementary deoxyribonucleic acid (cDNA). The cDNA sequence of this ATFC gene was submitted to GenBank under accession number AF325210. The predicted amino acid sequence (single-letter abbreviation) is shown below the nucleotide sequence within the open reading frame. The basic region is indicated by shaded areas, and the leucine zipper is indicated in bold. The translation start and stop codons are indicated by asterisks. The underlined nucleotide sequences indicate the putative polyadenylation signal and poly (A) tail. respectively.

folding enzyme의 프로모터 상류에 존재하는 cis-acting element인 UPRE (Unfolded Protein Response Element)와 결합할 것으로 추정되는 bZIP (basic-leucine zipper) 도메인 영역[23,16,33,28]을 기존에 밝혀진 효모 Hac1p의 bZIP 도메인 영역에 대하여 CLUSTAL W program을 통하여 상

동성 및 1차 아미노산 구조 분석을 실시하였다. 그 결과, Hac1p와의 연역 아미노산 상동성이 19%로 매우 낮았으며 (Fig. 2A), 또한 Hac1p의 bZIP 도메인이 아미노 말단(N-terminal) 쪽에 존재하는데 반하여 ATFC의 bZIP 도메인은 카르복실 말단(C-terminal)에 존재하는 차이점을 나타내었다(Fig. 2B). 그러나 ATFC는 효모의 Hac1p와 구조적으로 매우 유사하게 α -helix 상의 7개 아미노산 잔기마다 leucine이 7회 반복하여 출현하는 leucine zipper 모티프가 존재하고 있었으며, leucine zipper 바로 앞쪽에는 분자 샤페론이나 folding enzyme의 프로모터 부위에 존재하는 UPRE에 결합할 것으로 추정되는 염기성 아미노산이 풍부한 basic region이 존재하고 있었다(Fig. 2B) [2,21,24]. 따라서 ATFC 유전자는 효모의 Hac1p와 유사하게 분자샤페론 및 folding enzyme의 프로모터 부위에 존재하는 특정 염기서열(UPRE)에 결합하여 분자샤페론 및 folding enzyme의 전사를 촉진시키는 전사제어인자(transcription factor, transacting factor)의 기능을 할 것으로 추정할 수 있었다.

ATFC 유전자의 발현특성 분석

기존에 밝혀진 효모의 Hac1p와 유사한 기능을 수행할 것으로 추정되는 ATFC 유전자에 대하여 분자샤페론 및 folding enzyme의 전사 촉진 기능을 해석하기 위하여, 누에 배양세포주 (Bm5)에 각종 스트레스 유도제를 처리하여 세포내 비정상 구조를 가지는 단백질을 유도하였다. 사용된 스트레스 유도제로는 단백질의 N-glycosylation 형성 저해제인 tunicamycin, 단백질의 disulfide bond 형성 저해제인 DTT (dithiothreitol), 칼슘이온의 항상성 저해제인 Ca^{2+} ionophore A23187, ATP 저해제인 antimycin A, 소포체에서 골지체로의 단백질 이동 저해제인 monencin 및 산화 스트레스제인 H_2O_2 를 사용하였다[19]. Tunicamycin, DTT, Ca^{2+} ionophore A23187, antimycin A, monencin 및 H_2O_2 는 각각 5 μ g/ml, 3 mM, 10 μ M, 8 μ M, 100 μ M 및 100 μ M의 농도로 누에 배양세포주 (Bm5)에 처리하여 5시간 배양 후, 이로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석에 의해서 ATFC 유전자의 발현양상을 전사 수준에서 분석하였다. 그 결과, 정상 세포주에서는 발현이 되지 않았으나 스트레스 유도제가 처리된 세포주에서는 전사체가 강하게 발현됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 따라서 ATFC 유전자는 소포체 내의 정확하게 접혀지지 않았거나 조립

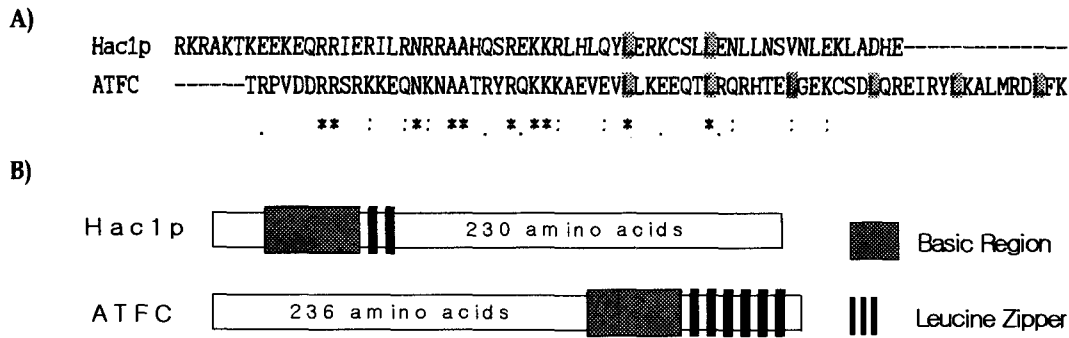


Fig. 2. Comparison of amino acid sequences of conserved region, basic region and leucine zipper (bZIP) between *S. cerevisiae* Hac1p and *B. mori* ATFC protein. Each amino sequence is represented by standard single letter code and leucine zipper forming residues are shaded. Identical residues (*), conserved substitutions (:), and semi-conserved substitutions (.) between 2 sequences are indicated below the sequences (A). Schematic drawing below are to depict the relative location of these motifs (B).

되지 못한 단백질을 정확하게 접혀지게 하고 조립되게 하여 정상구조를 가지는 단백질로 재생하는 분자샤페론이나 folding enzyme의 전사를 촉진시키는 효모 Hac1p와 매우 유사한 기능을 수행할 것으로 추정할 수 있었다. 그러나 ATFC 유전자가 과연 Hac1p와 동일하게 분자샤페론 및 folding enzyme의 cis-acting element인 UPRE에 직접 결

합하여 전사를 촉진시키는지 또는 Ire1p에 의해서 직접적으로 조절되는지에 관한 연구가 보완되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

누에배양세포주(Bm5)에 N-glycosylation 저해제인 tunicamycin를 처리하여 인위적으로 UPR를 유도하고 이로부터 cDNA 유전자은행을 제작한 후, 정상세포주에 비하여 발현량이 증가하는 40개의 차별화 발현 cDNA 클론을 선발하였다. 차별화발현 클론 중에서 기존에 밝혀진 전사제어인자와 1차 아미노산의 구조적 유사성을 나타내는 클론(ATFC)에 대하여 유전자의 구조와 발현특성을 분석한 결과는 다음과 같다. 유전자의 구조분석 결과, ATFC는 효모의 전사제어인자 Hac1p와 구조적으로 매우 유사하게 α -helix 상의 7개 아미노산 잔기 마다 leucine이 7회 반복하여 출현하는 leucine zipper 모티프가 존재하고 있었으며, leucine zipper 바로 앞쪽에는 분자 샤페론이나 folding enzyme의 프로모터 부위에 존재하는 UPRE에 결합할 것으로 추정되는 염기성 아미노산이 풍부한 basic region이 존재하고 있었다. 또한, ATFC 유전자에 대하여 분자샤페론 및 folding enzyme의 전사 촉진 기능을 해석하기 위하여 누에 배양세포주(Bm5)에 각종 스트레스 유도제를 처리한 후 ATFC의 발현특성을 분석한 결과, 정상 세포주에서는 발현이 되지 않았으나 스트레스 유도제가 처리된 세포

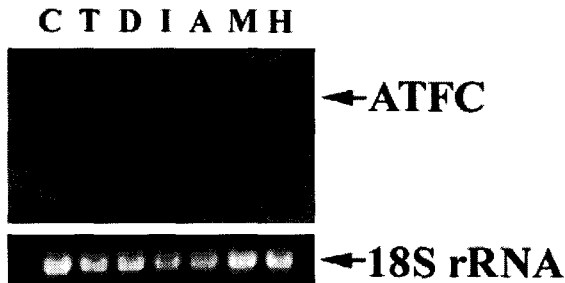


Fig. 3. Effects of various ER-stresses on *B. mori* ATFC mRNA expression. Bm5 culture cells were treated for 5 h with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tunicamycin (T), 3 mM DTT (D), 10 mM calcium inophore A23187 (I), 8 mM antimycin A (A), 100 mM monensin (M) and 100 mM H_2O_2 (H), respectively, and C indicates the control without treatment of ER stress drugs. Total RNA was isolated as described in the *materials and methods* and was subjected to Northern blotting. An arrow indicated ATFC (upper panel) and an ethidium bromide staining of the 18S ribosomal RNA (lower panel) was used to indicated the equivalence of the on the gel.

주에서는 ATF6의 전사체가 강하게 발현됨을 확인 할 수 있었다. 따라서 ATF6 유전자는 소포체 내의 정확하게 접혀지지 않았거나 조립되지 못한 단백질을 정확하게 접혀지게 하고 조립되게 하여 정상구조를 가지는 단백질로 재생하는 분자샤페론이나 folding enzyme의 전사를 촉진시키는 효모 Hac1p와 매우 유사한 기능을 수행할 것으로 추정할 수 있었다. 이상의 결과는, 효모를 제외한 모든 생물종에서 UPR pathway에 관련한 전사제어인자의 최초의 보고이다.

감사의 글

이 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업의 연구비에 의해서 연구되었다.

참고 문헌

- Chapman, R., C. Sidrauski and P. Walter. 1998. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **14**, 459-485.
- Cox, J. S. and P. Walter. 1996. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell.* **87**, 391-404.
- Elbein, A. D. 1981. The tunicamycins-useful tools for studies on glycoproteins. *Trends Biochem. Sci.* **6**, 219-221.
- Ellis, R. J. 1987. Proteins as molecular chaperones. *Nature.* **328**, 378-379.
- Ellis, R. J. 1993. The general concept of molecular chaperones. *Phil. Trans Roy. Soc. Lond. B.* **339**, 257-261.
- Gething, M. J. and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* **355**, 33-45.
- Goo, T. W., E. Y. Yun, J. S. Hwang, S. W., Kang, K. S. Lee and O. Y. Kwon. 2001. Isolation and characterization of a gene encoding a protein disulfide isomerase from *Bombyx mori* Bm5 cell line. *Kor. J. Genetics.* **23**, 295-305.
- Hammond, C. and A. Helenius. 1994. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* **126**, 41-52.
- Haze, K., T. Okada, H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi and K. Mori. 2001. Identification of the G13 (cAMP-response-element-binding protein-related protein) gene product related to activating transcription factor 6 as a transcriptional activator of the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* **355**, 19-28.
- Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori. 1999. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol. Biol. Cell.* **10**, 3787-3799.
- Hurtley S. M. and A. Helenius. 1989. Protein oligomerization in the ER. *Ann. Res. Cell Biol.* **5**, 277-307.
- HÖÖg. 1991. Isolation of a large number of novel mammalian genes by a differential cDNA library screening strategy. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6123-6127.
- Iwawaki, T., A. Hosoda, T. Okuda, Y. Kamigori, C. Nomura-Furuwatari, Y. Kimata, A. Tsuru and K. Kohno. 2001. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat. Cell Biol.* **3**, 158-164.
- Kaufman, R. J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**, 1211-1233.
- Knittler, M. R., S. Dirks and I. G. Haas. 1995. Molecular chaperones involved in protein degradation in the endoplasmic reticulum: quantitative interaction of the heat shock cognate protein BiP with partially folded immunoglobulin light chains that are degraded in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 1764-1768.
- Kohno, K., K. Normington, J. F. Sambrook, M. J. Gething and K. Mori. 1993. The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 877-890.
- Lee, A. S. 1987. Mammalian stress response: induction of the glucose-regulated protein family. *Curr. Opinion in Cell Biol.* **4**, 267-273.
- Marquardt, T. and A. Helenius. 1992. Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **117**, 505-513.
- Mkrtchian, S., C. Fang, U. Hellman and M. Ingelman-Sundberg. 1998. A stress-inducible rat liver endoplasmic reticulum protein, ERp29. *Eur. J. Biochem.*

- 251, 304-313.
20. Mori, K. 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*. **101**, 451-454.
 21. Mori, K., T. Kawahara, H. Yoshida, H. Yanagi and T. Yura. 1996. Signaling from endoplasmic reticulum to the nucleus : transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells*. **1**, 803-817.
 22. Mori, K., N. Ogawa, T. Kawahara, H. Yanagi and T. Yura. 1998. Palindrome with spacer of one nucleotide is characteristic of the cis-acting unfolded protein response element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **273**, 9912-9920.
 23. Mori, K., A. Sant., K. Kohno, K. Normington, M. J. Gething. and J. F. Sambrook. 1992. A 22bp cis-acting element is necessary and sufficient for the induction of yeast KAR2 (BiP) gene by unfolded proteins. *EMBO J.* **11**, 2583-2593.
 24. Nikawa, J., M. Akiyoshi, S. Hirata and T. Fukuda. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression. *Nucleic Acids Res.* **24**, 4222-4226.
 25. Niwa, M., C. Sidrauski, R. J. Kaufman and P. Walter. 1999. A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. *Cell*. **99**, 691-702.
 26. Nojima, H., S. H. Leem, H. Araki, A. Sakai, N. Nakashima, Y. Kanaoka and Y. Ono. 1994. Hac1 : A novel yeast bZIP protein binding to the CRE motif is a multicopy suppressor for *cdc10* mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **22**, 5279-5288.
 27. Patil, C. and P. Walter. 2001. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 349-356.
 28. Roy, B. and A. S. Lee. 1999. The mammalian endoplasmic reticulum stress response element consists of an evolutionarily conserved tripartite structure and interacts with a novel stress inducible complex. *Nucleic Acids Res.* **27**, 1437-1443.
 29. Shamu, C. E., J. S. Cox and P. Walter. 1994. The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends Cell Biol.* **4**, 56-60.
 30. Tirasophon, W., A. A. Welihinda and R. J. Kaufman. 1998. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* **12**, 1812-1824
 31. Urano, F., A. Bertolotti and D. Ron. 2000. IRE1 and efferent signaling from the endoplasmic reticulum. *J. Cell Sci.* **21**, 3697-3702.
 32. Wang, X.-Z., H. P. Harding, Y. Zhang, E. M. Jolicoeur, M. Kuroda and D. Ron. 1998. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* **17**, 5708-5717.
 33. Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori. 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins; involvement of basic-leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 741-33749.
 34. Yoshida, H., T. Masui, Yamamoto A., Okada T. and K. Mori. 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. **107**, 881-891.
 35. Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori. 2000. ATF6 activated by proteolysis directly binds in the presence of NF-Y (CBF) to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6755-6767.

(Received June 30, 2003; Accepted September 29, 2003)