

곤충세포 배지로부터 히스티딘이 융합된 Autotaxin(NPP-2)의 발현, 분비 및 정제

이종한 · 송재휘* · 이종훈 · 안영민** · 김수영 · 이석형 · 박원상 · 유남진 · 홍성렬* · 이정용 · 남석우#

가톨릭대학교 의과대학 병리학교실, *성균관대학교 자연과학대학 유전공학과

**경희대학교 의과대학 한의과대학

(Received November 5, 2003; Revised December 1, 2003)

Expression, Secretion and Purification of Histidine-Tagged Autotaxin (NPP2) from Insect Cells Media

Jong Han Lee, Jaehwi Song*, Jong Heun Lee, Young Min Ahn**, Su Young Kim, Sug Hyung Lee, Won Sang Park, Nam Jin Yoo, Sung Yeol Hong*, Jung Young Lee and Suk Woo Nam#

Department of Pathology, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea

*College of Life Science and Natural Resources, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

**Department of the Kidney System, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Seoul, Korea

Abstract — Autotaxin(ATX) was originally purified from conditioned media of A2058 human melanoma cells and shown to be a potent cell motility-stimulating factor, possessing a type II nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase (NPP2) activity. Recombinant ATX has recently demonstrated that human plasma lysophospholipase D is identical to ATX and uses lysophosphatidylcholine as a substrate to mediate various biological functions including tumor cell growth and motility through G-protein coupled receptor. However, despite pivotal roles of ATX on physiological or pathophysiological states, the production of ATX is solely depends on complicated purification method which employs multiple column steps, but resulted in very poor yield. This limited the use of ATX for extensive analysis. We, therefore, expressed six histidine-tagged recombinant human ATX(His-ATX) in High Five™ insect cells to improve the generation of ATX and to make simple the purification of ATX. The signal sequence of the human ATX gene was truncated and replaced with sequence of insect cell secretion signal within expression vector. In addition, codons for six histidines were added to the C-termini of 120kDa ATX cDNA construct. A simple purification scheme utilizing two-step affinity column chromatography was designed to purify His-ATX to homogeneity from the culture supernatant of transfected insect cells. Homogenous His-ATX was detected and isolated from the concentrated insect cell medium using concanavalin A agarose and nickel affinity chromatography. Purified His-ATX was in full length with ATX capacity. A combination of this expression system and purification scheme would be useful for production and purification of high-quality functional ATX for research and practical application of multiple functional motogen, ATX/NPP-2.

Keywords □ autotaxin, purification, insect cell

Autotaxin(ATX)은 Mr 125,000의 당단백질이며 아주 강력한 종양세포 이동성 촉진인자로서 인간 피부암세포종인 A2058 세포주의 조절배지로부터 처음으로 분리정제¹⁾ 되었으며, 세포바깥으로(exo or ecto) 분비되어 효소활성을 나타내는 type II nucleotide pyrophosphatase 및 phosphodiesterase(NPP-2) 효소군에 속하는 이동성 촉진인자(motogen)으로 알려져 있다.^{2,3)} 이러한 ATX는 피부암세포 이외에도 유방암세포, 전립선암세포 뿐

만 아니라 생쥐 상피세포, 인간 평활근세포주 및 내피세포와 같은 정상조직 세포를 나노몰에서 피코몰의 아주 적은 양으로도 그 이동성을 촉진시키는 강한 이동성 유발물질로 알려져 있다.^{1,4)} 또한 최근연구에 의하면 ras 유전자 도입으로 변형된 세포에 ATX를 과발현 시켰을 때, 세포침윤성(invasion), 이동성(motility)을 증가시키며, 세포종양성(tumorigenic potential) 및 전이능력(metastatic potential)을 향진시키며,⁵⁾ 생쥐를 이용한 Matrigel plug을 이용한 연구에서 혈관 신생화를 촉진하며, 종양세포의 신생혈관생성에 기여할 것이라고 보고 되고 있다.⁶⁾ 최근에는 ATX의 mRNA 발현이 생쥐의 골형성 및 연골형성 분화에 연관되어 있으며,⁷⁾ 희소돌기아교세포(oligodendrocyte)와 랫드의 active

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-590-1197 (팩스) 02-537-6586
(E-mail) swnam@catholic.ac.kr

myelination시 맥락막층 발달에서 발현되는 것으로 보고 되고 있다.⁸⁾ 따라서 ATX는 정상세포와 종양세포 모두 작용하면서, 종양세포의 침윤성 또는 악성화(aggressive phenotype)에 기여하는 것으로 사료된다. 이러한 복잡하고도 다양한 ATX의 생리활성 기전을 설명 할 수 있는 효소활성의 하나로 최근 ATX이 lysophospholipase D(lyso-PLD) 효소활성을 갖고 있다는 것이 밝혀졌으며,^{9,10)} 소 혈청 및 인간 혈장으로부터 분리된 lyso-PLD가 ATX와 동일한 것으로 보고 되었다. 또한 그 효소활성 산물인 lysophosphatidic acid(LPA)는 이미 오래전부터 많은 연구가 진행되어 왔으며, 세포성장, 세포 이동성, 신생혈관화 및 세포자멸사 반응 등과 같은 다양한 생리활성을 endothelial differentiation gene(Edg) 그룹의 G-단백수용체를 통해서 매개 하는 것으로 알려져 왔다.¹¹⁾ 따라서 ATX는 체내에서 종양세포의 이동성, 성장 그리고 분화를 조정하는 자기분비활성(autocrine) 동시에 주변 분비활성(paracrine)을 갖는 중요한 조절인자로서 역할을 하며, 암을 포함한 다양한 질병 치료에 대한 타겟(target)으로 제공될 수 있다. 이와 같이 ATX는 세포외 생리활성 인자로서 항암 또는 암전이 억제에 중요한 연구대상으로 주목받고 있다. 하지만, ATX의 생물학적 기전에 대한 다양한 역할의 기대에 불구하고 현재, ATX 생산은 복잡하고도 비효율적인 분리정제 과정을 거쳐야 하며, 또한 마이크로그램 이하의 아주 낮은 수득율(yield) 때문에 ATX를 이용한 연구에 절대적인 제한을 받고있는 것이 문제점으로 지적되고 있다.

따라서 본 연구에서는 유전자 조작을 통하여 ATX에 히스티딘(histidine)이 융합된 His-ATX을 대량생산하기 위하여 곤충세포에 특이적인 발현벡터를 이용하였으며, 히스티딘 잔기에 대한 친화성을 이용하여 Ni-agarose affinity column chromatography를 통한 단순 정제를 시도하여 ATX 생산을 쉽고 간단하게 하였으며, 곤충세포 배지로부터 분리되어 분리정제 된 His-ATX와 wild-type의 ATX와 효소 활성 및 세포이동성 촉진 능력 등을 비교하였다.

실험방법

실험재료 및 세포배양

곤충세포는 대량 세포배양을 위한 세포배양 교반기에서 배양 가능한 High-Five 곤충세포를, 배지는 Ultimate Insect serum-free media, 그리고 곤충세포 발현 벡터는 pMIB/V5-His Insect Select 벡터를 Invitrogen사에서 구입하였다. 클로닝을 위한 제한 효소, ligase, DNA polymerase 그리고 그 밖의 시약은 각각 New England Biolabs, Stratagene, Qiagen, Promega 또는 Gibco-BRL에서 구입하였다. Agarose에 결합된 concanavalin A(ConA)는 Vector Laboratory사에서, Ethylene glycol은 Fisher Scientific사에서 구입하였다. 인간 흑색종양 세포인 A2058 세

포와 생쥐 섬유모세포인 NIH3T3 세포는 2 mM glutamine, penicillin/streptomycin 그리고 10% heat-inactivated fetal bovine serum이 함유된 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다.

Phosphodiesterase 효소활성 측정

ATX의 대표적인 효소활성중의 하나인 phosphodiesterase (PDE) 활성도는 다음과 같은 방법을 사용하여 측정하였다. DMEM/0.1% BSA에 포함된 20 μ l의 시료를 1 mM MgCl₂, 1 mM Tris-HCl, 그리고 0.5 mM p-nitrophenyl-TMP와 같이 30 분간 반응(전체 100 μ l)한 후 0.1 N NaOH 900 μ l를 가한 다음 410 nm에서 흡광도를 조사하여 활성을 측정하였다.

Western blot 분석

단백질 정량을 통한 동일한 양의 시료를 전기영동 한 다음 Western blot 분석을 위해서 PVDF 막으로 transfer 하였다. ATX에 특이적인 면역블릿을 위해서 anti-ATX 100 펩티드를 1 차 항체로 사용하였으며, HRP-conjugated 항토끼 염소 면역글로브린을 제 2차 항체로 사용하였다. 발색을 위해서는 블릿을 ECL(Amersham Life Science) 시약을 이용하여 반응한 다음 Hyperfilm에 발색하여 밴드의 강도를 측정하여 분석하였다.

세포이동성 분석 방법(Cell Motility Assay)

ATX에 의한 세포이동성은 48-well microchemotaxis Boyden chamber를 이용하여 37°C에서 4시간 배양하는 방법¹²⁾으로 분석하였다. 간략하게 기술하면, 약 80~90% 정도 세포배양된 A2058 세포 또는 NIH3T3 세포를 Trypsin/EDTA를 처치 후 세포를 수확한 다음 최소한 1시간 이상 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 배양하여 손상된 세포를 회복시킨 후 1 mg/ml의 BSA를 함유한 배지에 세포수가 2×10^6 /ml의 수가 되도록 조정한다. 세포 이동성 측정을 위해서 gelatin이 코팅된 PVP free polycarbonate membrane(25 \times 80 mm, 8 μ m pore)을 Boyden chamber에 고정하여 사용하였다. Wild-type ATX(pATX) 또는 히스티딘이 융합된 ATX(His-ATX)를 세포이동성 촉진물질(chemoattractant)로 사용하여 약 4시간 배양한 후 Diff-Quik 시약을 사용하여 membrane을 고정, 염색 한 다음 세포이동성의 정도를 densitometer를 사용하여 측정하거나, 현미경으로 membrane을 통해서 이동한 세포수를 계산하여 분석하였다.¹²⁾

Human ATX와 ATXpMIB-V5/His vector의 재조합 및 클로닝 방법

간단하고 신속한 분리정제 과정을 이루기 위하여 ATX발현 벡터로 3' 말단에 6개의 히스티딘이 발현하는 곤충세포 발현벡터인 pMIB-V5/His plasmid를 선택하여 Invitrogen사에서 구입하였다. C-말단부위에 6개의 히스티딘이 융합된 인간 ATX cDNA

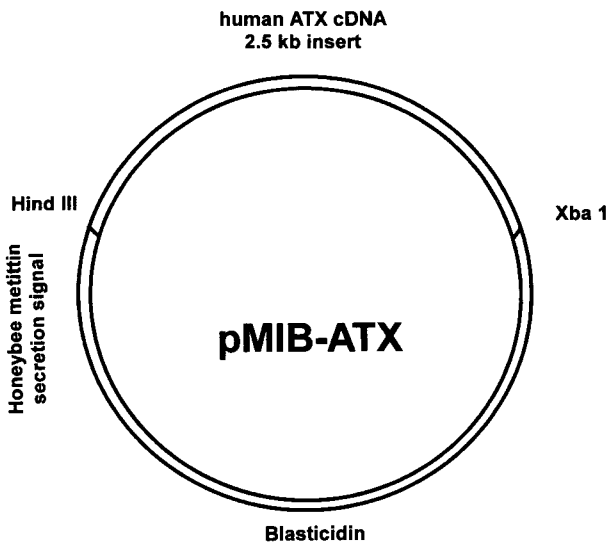


Fig. 1 – Schematic diagram of the pMIB-ATX vector. The cDNA of human ATX was amplified using oligonucleotides which created *Hind*III and *Xba*I sites, respectively. This ATX cDNA was missing of 31 amino acids from its N-terminus which is transmembrane domain of ATX. The cDNA was inserted into pMIB-V5/His plasmid in order to create the pMIB-ATX expression vector. This plasmid was designed for the secretion from insect cell of the recombinant human ATX protein with six multiple additional histidine amino acid.

를 구성하기 위하여 다음의 각각 올리고를 이용하여 중합효소연쇄반응을 시행하였다. pMIB plasmid와 ATX cDNA의 제한효소의 공동 부분을 갖고 있는 각각 ATX1S(5'-ATGCATGCAAG-CTTGATTAAGAGAGCAGAAGGATGG-3') ATX1A(5'-ATGC-ATGCTCTAGAAATCTCGCTCTCATATGTATG-3') 올리고를 중합효소 연쇄반응에 사용하였다. MDA-435 유방암 세포의 ATX cDNA를 pcDNA3.1 벡터에 클로닝한 pcDNA-ATX 벡터를 기질로 사용하였다(Fig. 1).

His-ATX의 발현 및 정제 방법

히스티딘이 융합된 ATX 단백질은 pMIB/V5-His 벡터에 ATX의 N-말단 부위에 포함되어있는 세포내 도메인과 세포막 도메인이 제거되고, 그 대신 꿀벌의 분비 신호전달인 honeybee metittin 시스템을 포함함과 동시에 V5 epitope과 6개의 히스티딘이 C-말단에 융합되도록 plasmid를 조작하였으며, His-ATX가 지속적으로 과발현 되는 안정한 곤충세포주로 확립하기 위하여 다음과 같은 방법을 시행 하였다. 먼저 ATX cDNA 벡터를 pMIB/V5-His 벡터와 같은 방향으로 제한하는 효소를 선택하여 각각을 ligation 한 다음 DH- α 세포에 transformation 한 다음, pMIB/V5-His 벡터에 같은 방향으로 들어간 ATX를 ATX specific primer를 이용한 PCR 방법과, 제한 효소를 사용하는 방법으로 inserts 유무를 확인 한 다음, ATX cDNA가 insert로 포함되어

있는 pMIB/V5-His-ATX 벡터를 확보하였다. 그 다음, 이 pMIB/V5-His-ATX 벡터를 lipofectamine을 이용하여 High-Five 세포에 transfection 하였다. transfection한 High-Five 세포는 Ultimate insect cell 배지를 이용하여 배양하며, 안정화된 세포주를 확보하기 위하여 50 μ g/ml 농도의 blasticidin을 이용하여 항생제에 저항성이 있는 세포주 만 선택적으로 selection을 하였다. 충분한 항생제 계대배양을 통한 안정화된 세포주가 확보된 다음, His-ATX 발현 High-Five 세포는 10 mg/ml의 blasticidin이 포함된 Ultimate insect cell 배지로 유지하였다. pMIB/V5-His 벡터의 분비 시그날에 의해 과잉 발현된 His-ATX를 포함하는 배양액을 대량으로 얻기 위하여 High-Five 세포를 플라스크 배양에서 swing-bottle culture 시스템으로 확장하였다. 1000 ml의 His-ATX 과발현 배지를 먼저 0.45 μ m filter를 사용하여 이물질 또는 세포 불순물 등을 제거한 다음, 분자량 30,000 cut-off 막을 이용한 Amicon ultra-filtration 장치를 이용하여 농축하였다. 약 500 ml의 농축된 배지를 ConA agarose affinity column에 통과하기 전에 60% ammonium sulfate 포화 침전법으로 단백질을 농축 한 다음, 침전된 단백질 펠렛을 ConA buffer A(1 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 20% Ethylene glycol)에 다시 녹인 다음, 침전단백질에 포함되어 있는 과잉의 ammonium sulfate를 제거하기 위하여 투석법을 시행하였다. 우선 시료는 분자량 10,000 kDa 이하를 투과할수 있는 Slide-A-Lyzer 10 K(PIERCE)에 주입한 다음 ConA buffer A 약 2~3 liter의 투과용액에 12~18시간 동안 투석한다. ammonium sulfate가 제거된 농축 시료를 제 1단계 affinity chromatography에 적용하여 분리 및 정제 하기 위하여 시료 모두를 ConA agarose affinity column에 통과 하였다. 시료가 agarose column에 충분히 결합하기 위하여 column 통과 시료를 모아 다시 ConA agarose affinity column에 통과하는 방법을 2번 반복한 다음, 과잉의 시료와 column에 결합하지 않은 시료를 세척하기 위하여 ConA buffer A로 50 ml 통과 하였다. ConA agarose affinity column에 결합한 당단백질만을 column으로부터 분리하기 위하여 ConA buffer B(50 mM Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M CaCl₂, 0.15 M methylmannoside, 20% Ethylene glycol) 50 ml를 통과 하였다. 통과한 ConA buffer B는 1 ml씩 시험관에 모아서, 통과한 ConA buffer B에 His-ATX가 분리되어 나오는지 확인하기 위하여 각각 PDE 활성도 측정을 시행 하였다. PDE 활성도를 나타내는 시험관시료를 모두 모아 Ni-NTA-His bind affinity column(Novagen)에 통과 하였다. Ni-NTA-His bind affinity column를 시행하기 위해서 다음의 조작을 시행 하였다. 1 ml의 Ni-NTA-His 슬러리를 시료와 함께 4°C에서 약 60분간 반응 시킨다. 반응한 시료와 Ni-NTA-His 슬러리를 column에 넣은 후, wash buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)를 4 ml씩 모두 3번 반복해서 세척 하였다. 그 다음 elution buffer 4 ml로 결합한 His-ATX를 분리

하였다. elution buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole)는 0.5 ml 간격으로 각 각 시험관에 모은 다음 His-ATX 분리정제를 확인하기 위하여, SDS-PAGE를 시행하여 단일 단백질로 정제 되었는지 확인 하였다.

실험결과

His-ATX 발현 벡터 조작 및 원리

ATX를 대량 생산하기 위해선, 곤충세포에 발현하는 것이 더 효율적이라고 사료되어 High-Five insect cell에 ATX plasmid를 transfection 하였으며, 따라서 곤충세포에 선택적인 발현 벡터인 pMIB expression vector(Invitrogen)를 선정하였다. ATX는 약 120 kDa 크기의 당단백질이기에 때문에 일반적으로 대장균(*E. coli*)에 과발현 하여 분리정제 하는 방법은 적절치 못하다, 따라서 pMIB는 포유동물 세포 발현 세포인 pcDNA에 재조합 되어 있는 pcDNA-ATX와 같은 방향성으로 제한효소를 사용할 수 있으며, 벡터내 honeybee metittin 분비신호 서열이 있어 pcDNA-ATX 내에 있는 세포외 분비 신호서열을 제거하고, 동시에 ATX의 C-terminal 에 6개의 histidine이 융합할 수 있도록 프레임에 맞도록 조작한 다음, 실험 방법에서와 같이 pMIB/His-ATX plasmid를 제작하였다. 특히 pMIB 벡터는 blasticidin 항생제 저항 유전자를 포함하고 있어, 곤충세포에 transfection한 다음 안정화 세포주로 확립하기에 매우 강력한 항생제로서 단시간 내 His-ATX를 다량 분비하는 곤충세포주를 확립하는데 유용하였다(Fig. 1).

High-Five 곤충세포로부터 히스티딘 융합 ATX의 발현 및 등정

High-Five 곤충세포는 배양용기 바닥과 배양액 자체에서 모두 잘 자라는 특성을 갖고 있다. 따라서 transfection 초기에 ATX만을 분비하는 곤충세포를 selection하기위한 colony 형성을 이루기 위하여, transfection 한 다음 항생제로 selection하는 2~3주 기간 동안은 배양용기 바닥에 배양하였다. 그 후 단일 colony 세포를 확장하기위하여, 그리고 대량 배양하기 위하여 swing-bottle culture 시스템으로 확장하였으며, 이때 배양액으로부터 발현되는 ATX를 확인하기위하여 Western blot 조사방법을 시행하였다. Fig. 2에서 처럼, 각 각 확립된 Mock transfectant 2개 세포주와 pMIB/His-ATX를 transfection한 5개 세포주의 배양액을 불순물을 제거하기 위하여 0.45 µm 크기의 막으로 투과 한 후 Ultrafrel-15 centrifugal device(Millipore)를 이용하여 500~1000 배정도 농축한 배양액을 8~16% Tris-Glycine gel에 전기영동하여 분리한 다음, anti-ATX 항체와 anti-His 항체를 1차 항체로 사용하여 곤충세포로 분비되는 ATX가 히스티딘융합되어 있는지를 확인 하고자 하였다. 실험결과 Fig. 2(a)에서 처럼 Mock transfectant에서는 ATX는 검색되지 않아 전혀 발현되지 않은 것으로 사료되었으며, pMIB/His-ATX transfectant에서 얻은 시료

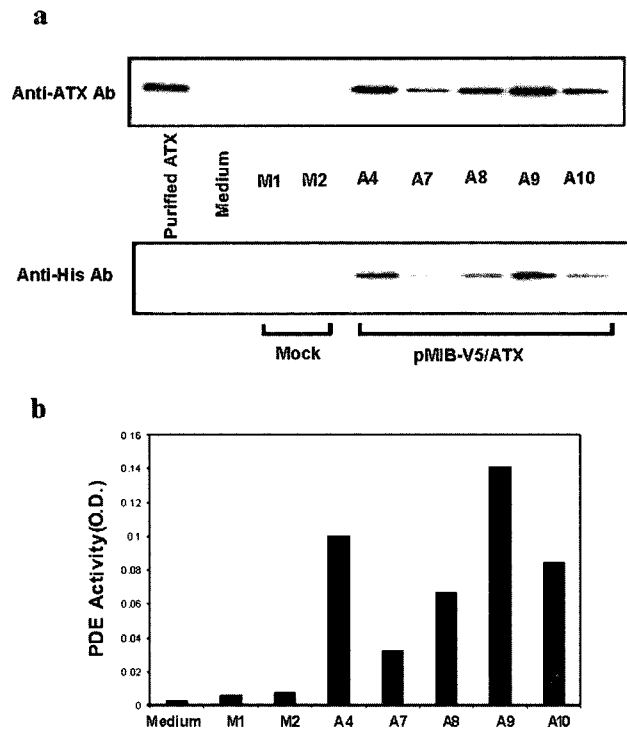


Fig. 2 – Expression of His-ATX in High-Five insect cells. Western blot was performed to see whether pMIB-ATX vector transfectant High-Five insect cells express and secrete histidine-tagged ATX into medium (a). In addition, phosphodiesterase activity (PDE) was assessed to confirm that His-ATX has intact activity as much as wild-type ATX by, at least, *in vitro* enzyme assay (b).

에서만 ATX 항체 특이 반응을 볼 수 있었으므로 pMIB/His-ATX transfectant에서 ATX이 발현되는 것을 확인하였다. 한편 단백질 발현이 확인된 ATX이 히스티딘이 융합되어 있는지 조사하기 위하여 동일 시료를 anti-His 항체로 시행 하였을 때 그림에서 처럼, 히스티딘 융합말단을 포함하지 않는 wild-type ATX의 경우 anti-His 항체에 대하여 특이성이 없는 반면 곤충세포에 pMIB/His-ATX에 의해 발현되는 모든 세포주들은 히스티딘 융합말단을 포함하고 있는 것으로 확인되었다. 한편, 곤충세포주에서 발현되는 His-ATX가 분리 정제된 wild-type ATX와 같은 활성을 갖고 있는지 확인하기위하여 각 각의 시료에 대한 PDE 활성도를 측정하였다[Fig. 2(a)]. Fig. 2(b)에서와 같이 pMIB/His-ATX transfectant 세포주에서 분리, 농축된 시료에서만 PDE 활성도를 확인할 수 있었으며, 활성도는 Western blot 분석결과와 일치한 정도를 나타내었다. 이 결과로서 pMIB/His-ATX transfection된 곤충세포에서 히스티딘이 융합된 ATX가 발현되며, 이는 분리 정제된 wild-type ATX와 같은 활성을 갖는 것으로 사료되었다.

His-ATX의 정제 및 분리 등정

Western blot 분석과 PDE assay로 곤충세포로부터 과 발현되

는 ATX는 히스티딘 잔기를 갖고 있으며, 또한 wild-type ATX과 같은 활성을 갖고 있는 것으로 확인되었으며, 따라서 다량의 ATX 과발현 곤충세포 배양액으로부터 His-ATX의 분리 및 정제를 시행하였다. 곤충세포 배양액 약 500 ml을 Ultra-filtration device를 이용하여 약 150~200 ml 정도로 농축 한 다음, 농축배양액을 ConA agarose column에 적용할 수 있도록 60% ammonium sulfate 포화 침전법으로 농축하였다. 침전 펠렛의 과잉의 염을 제거하기 위해 ConA buffer A를 사용하여 투석법을 시행하였다. Ammonium sulfate가 제거된 농축 시료를 ConA agarose affinity column에 통과 시키며, 이때 시료가 agarose column에 충분히 결합하기 위하여 column 통과시료를 모아 다시 ConA agarose affinity column에 다시 통과하는 방법을 2번 반복한 다음, 과잉의 시료와 column에 결합하지 않은 시료를 세척하기 위하여 ConA buffer A로 50 ml 통과 하였다. ConA agarose에 결합된 당단백질만 분리하기 위하여 ConA buffer B로 elution 하였다. Fig. 3(a)에서와 같이 곤충세포배양 농축액과 ConA column 통과 시료를 SDS-PAGE로 분리된 시료의 순수도를 비교하여 볼 때 곤충세포 배양액에 비해서 많은 단백질들이 ConA column chromatography에 의해 제거 되었지만, 여전히 상당히 많은 다른 단백질들이 정제되어있지 않기 때문에 Ni-NTA affinity chromatography를 시행하였다. ConA agarose column에 의해 부분 정제된 시료를 1 ml의 Ni-NTA-His 슬러리와 함께 4°C에서 약 60분간 반응

한 후 column에 장착한 다음, wash buffer로 세척하고, elution buffer로 결합한 His-ATX를 분리하였다. SDS-PAGE를 시행한 결과 Fig. 3(a)에서와 같이 His-ATX는 단일 단백질로 분리 정제 되었음이 확인 되었다. 단일 단백질로 정제된 His-ATX를 다시 Silver staining의 확인한 결과 wild-type ATX(pATX)과 같이 순수한 단일 단백질로 분리 정제되었음을 알 수 있었다. 한편 His-ATX의 융합된 히스티딘 잔기를 확인하기 위하여, 앞서 시행한 anti-ATX, anti-His antibody로 각각 Western blot 분석방법으로 재차 시행한 결과, 역시 기대한대로 순수 분리 정제된 His-ATX의 히스티딘 융합 잔기를 확인할 수 있었다. 곤충세포 배양액으로부터 순수 분리된 His-ATX의 전체 분리 정제 과정에 대한 내용을 Table I에 요약하였다. 60% ammonium sulfate 침전에서부터 Ni-NTA affinity column chromatography까지 과정에서 수득율은 약 9.8%이었으며, 약 2,693배 정도 순수하게 분리 정제 되었다. 특히, 약 500 ml의 곤충세포 배양액으로부터 약 15 µg의 His-ATX를 분리정제 할 수 있는 것은, 기존의 viral infected medium 약 20,000 ml로부터 평균 5 µg 정도 분리 정제 할 수밖에 없는 수득율과 비교하면, ATX의 분리정제의 효율성이 상당히 개선되었다고 사료된다.

His-ATX의 세포이동성 촉진

지금까지 알려진 ATX의 가장 강력한 생리활성중의 하나는 세

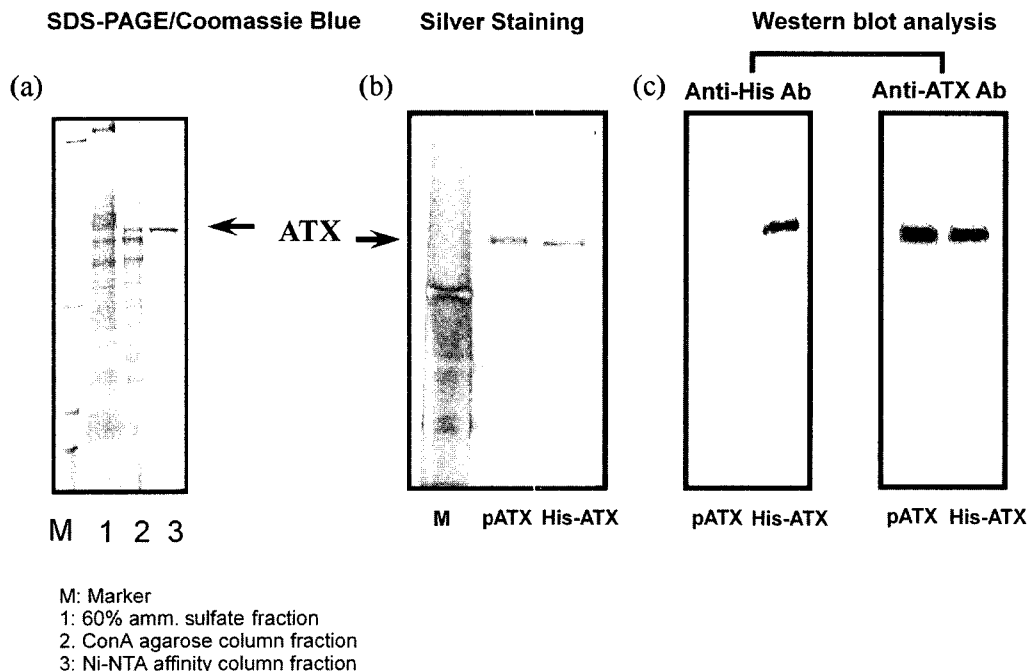


Fig. 3 – Purification and identification of His-ATX. Ten microliters of samples from each eluted fraction, concentrated medium of High-Fi v cells, ConA agarose fraction and Ni-NTA agarose fraction, was used to measure the protein concentration and protein profiling by Coomassie blue (a) staining. Silver staining of proteins eluted from Ni-NTA agarose fraction was shown to a homeogenous purified His-ATX compared to wild-type ATX (b). Histidine tagged ATX was proves to test by Western blot assay using anti-His antibody and anti-ATX antibody, respectively (c).

Table I – Purification of His-tagged recombinant human autotaxin

Step	Total protein (mg)	Total activity ^a (Unit)	Specific activity (Unit/mg)	Yield (%)	Purification fold
60% Amm.ppt./Dialysis	424.2	713	1.68	100	1
ConA-agarose	20.0	625	31.35	87.5	19
Ni-NTA	0.0155	70.25	4532	9.8	2693

^aOne unit of PDE activity correspond to 64 nmol of p-nitrophenol consumed per 20 min at 37°C as substrate.

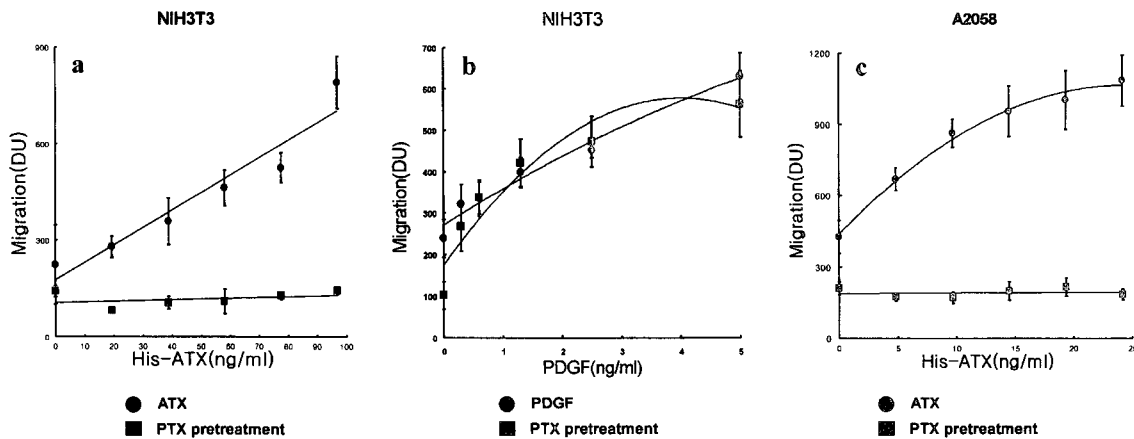


Fig. 4 – His-ATX stimulates NIH3T3 cells migration as well as human A2058 melanoma cells. His-ATX displays a potent activity on the stimulation of mouse fibroblast NIH3T3 cells and human melanoma cells, A2058 (a, c). As indicated, the ability of the stimulation of migration was abolished by the pre-treatment of pertussis toxin, but not in stimulated by PDGF in NIH3T3 cells.

포이동성을 촉진하는 것이다. 이 ATX에 의한 세포이동성 촉진은 pertussis toxin의 전처치에 의하여 선택적으로 억제되는 특성이 있으며, 이는 ATX에 의한 세포이동성의 기전이 세포막의 G-단백질 형태의 수용체에 의하여 매개된다고 추측할 수 있다. 따라서 히스티딘이 융합된 His-ATX 역시 wild-type ATX와 같은 생리활성을 매개하고 또한 그 기전이 같은 G-단백질 수용체를 경유하는지 고찰하기 위하여 각 각 NIH3T3 세포와 A2058 human melanoma 세포의 이동성을 시험하였다. Fig. 4에서와 같이 His-ATX는 각 각 NIH3T3 세포와 A2058 human melanoma 세포의 이동성을 농도 의존적으로 항진시키는 것으로 나타났으며, 또한 이러한 효과는 pertussis toxin의 전 처치에 의하여 선택적으로 억제되는 것으로 관찰된바 His-ATX 역시 wild-type의 ATX와 동일한 생리활성을 매개 하는 것으로 사료되었다. 특히 ATX와 다른 기전으로 세포이동성을 촉진시키는 PDGF의 경우 pertussis toxin에 의해 세포 이동성이 억제 되지 않는 것으로 보아, His-ATX 역시 PDGF와 별개의 기전으로 세포이동성을 촉진 하며, 이는 ATX의 작용과 동일 한 것으로 관찰 되었다.

고찰 및 결론

본 연구에서는 ATX의 단순 분리정제를 위하여 ATX의 C-말단에 6개의 히스티딘 잔기를 도입함으로써 Ni-agarose affinity column chromatography를 이용하여, ATX의 단순 정제를 가능

하게 하였다. 또한 상대적으로 적은 세포 배양액에 ATX 발현 세포를 많이 증식시킬 수 있는 곤충세포를 이용하였으며, 곤충세포에 특이적이며 분비단백질 발현 벡터에 ATX plasmid를 재조합 함으로서, ATX 과 발현 세포주 확립과 대량의 ATX 함유 세포배양액 확보를 용이하게 하였다. 연구 결과를 종합하면, 간단하게 3단계의 분리정제 과정으로 약 2,693배 순수 정제된 His-ATX를 얻을 수 있었으며, 수득율 또한 약 10% 정도로서 대부분 세포이동성 촉진인자의 분리정제 과정이 복잡하고 수득율이 극히 저조한 사실에 비교할 때 앞으로 ATX를 이용한 세포이동성 촉진에 대한 기전뿐만 아니라, 종양세포의 이동과 침윤 그리고 암의 전이과정을 고찰하는 매우 중요한 수단으로 제공될 것으로 사료된다.

ATX는 human melanoma 세포주에서 처음으로 분리정제 된 후, 그 동안 연구 보고에 의하여 일부 정상 세포를 포함한 대부분의 종양세포의 이동성을 강력히 촉진하며,¹²⁾ 생쥐를 이용한 Matrigel plug 실험에서 혈관 생성을 촉진시키는 것으로 알려져 왔다.⁶⁾ 그 동안 이러한 ATX이 생리활성 매개 기전은 세포막의 G-단백수용체를 경유할 것으로 추측 되어왔으며 그 이유는 ATX의 모든 생리활성이 pertussis toxin에 전 처치에 의해 선택적으로 억제 된다는 사실에 근거하였다.¹³⁾ 그러나 이러한 ATX의 생리활성 기전의 파라다임은 최근 연속적으로 연구 발표된 논문^{9,10)}에 의하여 새로운 전환점을 찾게 되었다. 즉 ATX는 lysophosphatidyl choline(LPC)을 기질로 하여 LPA를 생성하는 lyso-PLD

라는 효소이며, 이 효소 작용에 의해 생성된 LPA의 지금까지 알려진 생리활성 작용은 ATX의 그것과 매우 유사하다는 사실로 더욱 흥미로운 관심을 갖도록 하였다. 또한 최근 Clair¹⁴⁾ 및 공동연구자들에 의해 연구 보고 된 사실에 의하면, ATX는 lyso-PLD 효소활성으로서 LPC 이외에 sphingosylphosphorylcholine를 기질로 이용할 수 있으며, 이로 인해 생성된 sphingosine-1-phosphate는 LPA에 의한 세포이동성을 억제 할 수 있으며, 그 기전은 pertussis toxin에 민감한 G-단백수용체 기전과는 다른 기전을 경유한다고 하였다. 이렇듯 ATX는 매우 다양한 기질에 대한 선택성을 갖고 있으며, lyso-PLD 활성 이외에도 PDE 활성 ATPase 활성, Phosphorylase 활성 등 다기능적 효소하고 할 수 있다. 하지만 아직까지 lyso-PLD의 효소활성에 대한 몇몇 기질에 대한 특이성과 그 산물에 대한 생리기작이 알려져 있을 뿐 ATX가 갖고 있는 다른 대부분의 효소활성에 의해 매개되는 기전에 대해서는 연구되어야 할 과제로 남아있다. 따라서 앞으로 ATX를 이용한 연구가 활발하게 진행될 것으로 기대되며, 당연히 ATX에 대한 생산성이 효율적이며 쉽게 얻을 수 있는 시스템이 연구의 필수적인 여건으로 사료된다. 그러므로 본 연구 결과에 의해서 ATX의 간단하고 단순한 정제 시스템에 의한 대량 생산이 가능하게 되었다고 사료되며, 이는 앞으로 lyso-PLD에 대한 생리활성 연구뿐만 아니라 나아가 lyso-glycerophospholipid 및 phosphosphingolipid의 생화학 및 생리활성 연구에 많은 기여를 할 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 2003년도 학술진흥재단 신진교수 연구과제 지원에 의거하여 연구되었음(KRF-2003-003-C00141).

문 헌

- 1) Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E. and Liotta, L. A. : Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *J. Biol. Chem.* **267**(4), 2524 (1992).
- 2) Murata, J., Lee, H. Y., Clair, T., Krutzsch, H. C., Arestad, A. A., Sobel, M. E., Liotta, L. A. and Stracke, M. L. : cDNA cloning of the human tumor motility-stimulating protein, autotaxin, reveals a homology with phosphodiesterases. *J. Biol. Chem.* **269**(48), 30479 (1994).
- 3) Clair, T., Lee, H. Y., Liotta, L. A. and Stracke, M. L. : Autotaxin is an exoenzyme possessing 5'-nucleotide phosphodiesterase/ATP pyrophosphatase and ATPase activities. *J. Biol. Chem.* **272**(2), 996 (1997).
- 4) Mulvaney, P. T., Stracke, M. L., Nam, S. W., Woodhouse, E., O'Keefe, M., Clair, T., Liotta, L. A., Khaddurah-Daouk, R. and Schiffmann, E. : Cyclocreatine inhibits stimulated motility in tumor cells possessing creatine kinase. *Int. J. Cancer.* **78**(1), 46 (1998).
- 5) Nam, S. W., Clair, T., Campo, C. K., Lee, H. Y., Liotta, L. A. and Stracke, M. L. : Autotaxin (ATX), a potent tumor motogen, augments invasive and metastatic potential of ras-transformed cells. *Oncogene* **19**, 241 (2000).
- 6) Nam, S. W., Clair, T., Kim, Y. S., McMarlin, A., Schiffmann, E., Liotta, L. A. and Stracke, M. L. : Autotaxin (NPP-2), a metastasis-enhancing motogen, is an angiogenic factor. *Cancer Res.* **61**, 6938 (2001).
- 7) Bachner, D., Ahrens, M., Betat, N., Schroder, D. and Gross, G. : Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech. Dev.*, **84**, 121 (1999).
- 8) Fuss, B., Baba, H., Phan, T., Tuohy, V. K. and Macklin, W. B. : Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J. Neurosci.* **17**, 9095 (1997).
- 9) Umez-Goto, M., Kishi, Y., Taira, A., Hama, K., Dohmae, N., Takio, K., Yamori, T., Mills, G. B., Inoue, K., Aoki, J. and Arai, H. : Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J. Cell Biol.* **158**, 227 (2002).
- 10) Tokumura, A., Majima, E., Kariya, Y., Tominaga, K., Kogure, K., Yasuda, K. and Fukuzawa, K. : Identification of human plasma lysophospholipase D, a lysophosphatidic acid-producing enzyme, as autotaxin, a multifunctional phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* **277**, 39436 (2002).
- 11) Mills, G. B. and Moolenaar, W. H. : The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**(8), 582 (2003).
- 12) Nam, S. W., Clair, T., Schiffmann, E., Liotta, L. A. and Stracke, M. L. : A sensitive screening assay for secreted motility-stimulating factors. *Cell Motil. Cytoskelet.* **46**, 279 (2000).
- 13) Stracke, M. L., Clair, T. and Liotta, L. A. : Autotaxin, tumor motility-stimulating exophosphodiesterase. *Adv. Enzyme Regul.* **37**, 135 (1997).
- 14) Clair, T., Aoki, J., Koh, E., Bandle, R. W., Nam, S. W., Ptaszynska, M. M., Mills, G. B., Schiffmann, E., Liotta, L. A. and Stracke, M. L. : Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res.* **63**(17), 5446 (2003).