

인체 SIP 단백질에 특이적인 단일클론 항체의 특성

¹한국생명공학연구원 세포생물학연구소, ²을지외과대학 병리학교실, ³을지외과대학 외과학교실

윤선영¹ · 주종혁¹ · 김주현² · 강호범¹ · 김진숙¹ · 이영희¹ · 권두한¹ · 김창남³
최인성¹ · 김재화¹

Characterization of a Monoclonal Antibody Specific to Human Siah-1 Interacting Protein

Sun Young Yoon¹, Joung Hyuck Joo¹, Joo Heon Kim², Ho Bum Kang¹, Jin Sook Kim¹, Younghee Lee¹, Do Hwan Kwon¹, Chang Nam Kim³, In Seong Choe¹ and Jae Wha Kim¹

¹Laboratory of Cell Biology, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), P.O. Box 115, Daejeon, Republic of Korea, ²Department of Pathology, Eulji University School of Medicine, Daejeon, Republic of Korea, ³Department of Surgery, Eulji University School of Medicine, Daejeon, Republic of Korea

ABSTRACT

Background: A human orthologue of mouse S100A6-binding protein (CacyBP), Siah-1-interacting protein (SIP) had been shown to be a component of novel ubiquitinylation pathway regulating β -catenin degradation. The role of the protein seems to be important in cell proliferation and cancer evolution but the expression pattern of SIP in actively dividing cancer tissues has not been known. For the elucidation of the role of SIP protein in carcinogenesis, it is essential to produce monoclonal antibodies specific to the protein. **Methods:** cDNA sequence coding for ORF region of human SIP gene was amplified and cloned into an expression vector to produce His-tag fusion protein. Recombinant SIP protein and monoclonal antibody to the protein were produced. The N-terminal specificity of anti-SIP monoclonal antibody was conformed by immunoblot analysis and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). To study the relation between SIP and colon carcinogenesis, the presence of SIP protein in colon carcinoma tissues was visualized by immunostaining using the monoclonal antibody produced in this study. **Results:** His-tag-SIP (NSIP) recombinant protein was produced and purified. A monoclonal antibody (Korea patent pending; #2003-45296) to the protein was produced and employed to analyze the expression pattern of SIP in colon carcinoma tissues. **Conclusion:** The data suggested that anti-SIP monoclonal antibody produced here was valuable for the diagnosis of colon carcinoma and elucidation of the mechanism of colon carcinogenesis. (**Immune Network 2004;4(1):23-30**)

Key Words: Siah-1 interacting protein (SIP), S100A6, monoclonal antibody, colorectal cancer

서 론

생쥐 S100A6 결합단백질(mouse S100A6-binding protein, CacyBP)의 인간 orthologue인 Siah-1-interacting protein (SIP)은 2001년 Reed 그룹에서 개체발생이나 암화기 전에 중요한 역할을 수행하는 β -catenin의 분해와 관련된 단백질인 Siah-1 ubiquitin ligase (mam-

책임저자 : 김재화, 한국생명공학연구원 세포생물학실
☎ 305-600, 대전광역시 어은동 52번지
Tel: 82-42-860-4180, Fax: 82-42-860-4593
E-mail: choerncbg@kribb.re.kr

본 연구는 2002년도 한국생명공학연구원 기관고유사업비 (KGS2-010212)에 의하여 이루어졌음.

malian homologue of *Drosophila Sina*)와 결합하는 단백질로서 처음 보고되었다(1). 이 단백질은 기존에 알려진 생쥐의 CacyBP 유전자와 약 93%에 달하는 염기서열의 동질성을 지니며 229개의 아미노산으로 구성되어 있고 아미노 말단 부분(aa1~80)은 β -catenin의 분해에 관여하는 Siah-1 ubiquitin ligase와 결합하는 부분이고, 아미노산 73~155번 부분은 β -catenin 분해과정 중에 생성되는 복합체의 일부인 Skp-1과 결합하는 부위로 그리고 카르복실 말단(aa125~229) 부분은 Ca^{2+} 결합단백질인 S100A6 단백질과 결합하는 부분으로 알려져 있다(2-5). 1996년에 최초로 생쥐에서 발견된 CacyBP는 상피세포 기원의 EAT (Ehlich ascites tumor) 세포에서 발현이 증가된 S100A6와 결합하는 새로운 유전자로 규명되었고(6), 약 30 kDa의 크기를 가지고 있으며 Ca^{2+} 의 농도에 따라 세포내에서 위치를 이동하는 단백질로 밝혀졌다(7). 2001년에 인체에서 발견된 CacyBP의 orthologue인 SIP는 Sina/Siah 단백질군과 SCF 복합체의 한 구성성분인 Skp-1 단백질의 연결단백질로서 cyclins, p27^{kip1}, p21^{waf-1}, E2F, IKB 그리고 β -catenin과 같은 세포 내 신호기전과 관련된 여러 단백질들의 분해에 중요한 역할을 수행하는 것으로 보고되었다(1). 이외에도 SIP 단백질은 erythropoietin receptor activation에 의해 활성이 증가하고 JAK2 활성화에 의해 유도되는 c-myc 또는 dpp-1과 같은 전사인자의 활성증가에 비례하여 그 발현이 증가됨이 보고되었다(8,9). SIP와 각종 암세포, 특히 상피세포 기원의 종양세포에서 발현량이 증가하는 S100A6가 직접 결합한다는 증거 또는 SIP가 Ca^{2+} 의 농도에 따라 신호 전달 기전이 조절되는 신경세포나 왕성한 분열이 이루어지는 상피세포 기원의 여러 암 세포에서 어떻게 발현이 조절되는지에 대한 연구결과는 아직까지 알려져 있지 않으나, 이 단백질과 93% 이상의 유사성을 지닌 생쥐 또는 쥐(rat)의 CacyBP에 대해서는 결합부위와 결정구조, 그리고 결합 및 해리상수 등에 관해서 심도 있는 연구결과가 보고되었다(10-12). SIP는 또 세포에 genotoxicity를 유도한 경우, p53 활성화에 따른 β -catenin 분해를 유도하여 cell cycle arrest에 관여하기도 하며 반대로 다른 세포에서는 세포의 분열과 증식 그리고 분화와 대사에 관여하는 S100 단백질군과의 결합을 통해 중요한 역할을 수행할 가능성이 있는 중요한 단백질(1)로 판단되나 지금까지 SIP 단백질의 기능을 연구하는 데 필수적인 이 단백질에 대한 단일클론 항체는 알려져 있지 않으며 β -catenin 분해와 관련된 기전 이외에는 이 단백질이 S100A6가 과발현되는 특정 종양세포 내에서의 역할과 발현형태에 관해서도 알려진 바가 없다.

본 연구에서는 SIP의 세포 내 역할을 분석하고 특

정 종양과의 관련성을 연구하기 위하여 SIP에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체를 생산하는 융합세포주를 만들고 이로부터 생산된 단일클론 항체를 이용하여 대장암(colorectal cancer, CC) 환자의 대장암 조직에서 SIP 단백질이 특이적으로 과발현되고 있음을 확인하였으며 또 본 연구에서 생산된 단일클론 항체의 활용가능성을 검증하였다.

재료 및 방법

재조합 단백질을 생산하는 발현벡터의 제조. 재조합 SIP 단백질은 인간 간암 세포주(HepG2, ATCC HB-8065)에서 추출한 mRNA를 역전사(reverse transcription)하여 얻은 cDNA를 주형으로 하여 생산하였다. 이 때 사용한 primer 쌍은 GenBank (accession number: NM-014412)에 발표된 염기서열을 기반으로 제작하였으며, 아미노 말단은 이 부위에 특이한 primer 쌍 (Forward; 5'-CGGGATCCATGGCTCAGAAGAGCTAC-AG-3', Reverse; 5'-CCGCTCGAGTCATGGTTTTTCA-TTATCAAGAAG-3')을 이용해, 카르복실 말단의 유전자 절편도 카르복실 말단에 특이적인 primer 쌍 (Forward, 5'-CGGGATCCCTTATATTGTGTAGAAA-GAAA-3', Reverse, 5'-CCGCTCGAGTCAAATTC-CGTGTCCTCTT-3')을 이용한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로 각각의 cDNA 절편을 증폭한 후, 이를 제한효소인 *Bam*H I과 *Xho* I으로 절단해 각각 180 bp와 240 bp 크기의 cDNA 절편을 분리, 정제하였다. 이들 절편을 역시 *Bam*H I과 *Xho* I으로 절단한 후 정제하여 미리 준비한 pET28a (Novagen) 발현벡터와 접합시켜 아미노 말단을 포함한 pET28a-NSIP와 카르복실 말단을 포함한 pET28a-CSIP, 두 종류의 plasmid 벡터를 제조하였다. 재조합 단백질에 6개의 히스티딘(histidine) 잔기를 붙일 수 있는 pET28a 벡터의 기능을 이용해 최종적으로 6개의 히스티딘 잔기가 포함된 His-tag-NSIP와 His-tag-CSIP, 2종의 단백질을 얻었다.

SIP 재조합 단백질들의 분리 및 정제. 발현벡터 pET28a-NSIP와 pET28a-CSIP로 대장균주, BL21 (λ DE3)을 형질전환시키고, 선별된 대장균 형질전환체로부터 NSIP와 CSIP 재조합 단백질의 생산을 유도하기 위하여 균체의 대수적 증식에 1 mM IPTG를 배양액에 첨가하였다. 생산된 재조합 단백질들은 12% SDS-PAGE로 분리한 후 이를 Coomassie Blue 염색법으로 확인하였다. 상기 배양액을 원심분리하여 대장균체를 회수한 후 세포 용해용액 (100 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Tris. HCl, 6 M Guanidine HCl, pH 8.0)으로 균체를 용해하고 다시 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 이 상등액을 히스티딘 잔기에 친화성이 있는

NTA agarose bead (Quiagen)로 만든 affinity column을 통과시켜 정제하였다. 히스티딘 잔기를 포함한 재조합 단백질들은 NTA agarose bead에 결합시킨 후 비특이적으로 결합된 단백질을 제거하기 위해 완충용액(100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 6.3)으로 2회 column을 세척하였다. Bead로부터 재조합 단백질을 회수하기 위해서는 용출용액 E1 (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M Urea, pH 4.5)과 E1 용액에 imidazole의 함유량을 점차적으로 증가시킨 E2 (200 μ M), E3 (400 μ M), E4 (600 μ M), E5 (800 μ M) 그리고 E6 (1 mM)를 사용해 순차적으로 재조합 단백질을 용출한 후 각 단계의 용출액을 12% SDS-PAGE 젤을 사용해 전기영동시켜 정제된 상태를 확인하였다. 12% SDS-PAGE를 이용해 분석한 결과 NSIP 단백질은 약 10 kDa, 그리고 CSIP 단백질은 약 1 kDa의 분자량을 가진 것으로 확인되었다. 상기의 재조합 단백질들은 NTA bead에 비특이적으로 결합한 다른 단백질들을 제거하기 위하여 전기영동 후의 젤을 25 mM CuCl₂ 용액으로 염색한 후 Cu²⁺ 이온과 결합하지 않은 각각의 재조합 단백질들을 전기영동법을 사용해 젤로부터 용출하였다. 용출된 재조합 단백질들은 PBS (phosphate-buffered saline)로 투석한 후 농축하고 Bradford method에 의해 측정된 최종 시료에서의 단백질의 농도는 1 mg/ml이었다.

위에서 정제한 단백질들이 His-tag-NSIP와 His-tag-CSIP의 재조합 단백질임을 확인하기 위하여, His-tag 재조합 단백질들을 특이적으로 인식하는 항체(T7-tag IgG-HRP conjugate 항체; Novagen)를 사용하여 Western blot 분석을 수행하였다. 우선 12% SDS-PAGE상에서 분리된 단백질들을 막 필터(membrane filter)로 옮긴 후 막 필터의 비특이적인 반응을 차단하기 위하여 소의 혈청알부민(bovine serum albumin) 용액으로 2시간 동안 막을 처리하였다. 여기에 항T7-tag IgG-HRP 결합항체를 첨가하고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 막 필터를 0.5% Tween 20이 포함된 PBS로 세척한 후 ECL (enhanced chemiluminescence) 용액(Amersham Biosciences)로 형광 발색시킨 다음 X-ray 필름(Kodak)에 감광시켜 확인하였다.

생쥐의 면역. 항체생산을 위한 면역화된 생쥐를 얻기 위하여, 위에서 정제한 NSIP 재조합 단백질을 20 μ g/100 μ l의 농도로 희석한 후 동일한 부피의 FCA (Freund's complete adjuvant) 용액을 가하고 유상화될 때까지 잘 혼합하여 생후 6 내지 8주령의 Balb/c 생쥐(한국생명공학연구원 실험동물실)의 복강 내에 주사하였다. 10 일 후, 동일한 양의 NSIP 단백질을 동량의 FIA (Freund's incomplete adjuvant)와 혼합한 후 생쥐의 복강에 다시 주사하였다. 그로부터 4 내지 5일이 경과한

후 생쥐의 눈 부위 혈관에서 소량의 피를 뽑아내어 (eye bleeding) 항체의 역가를 ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) 방법으로 확인하였고, 세포융합 실험을 실시하기 3 내지 4일 전에 다시 0.85%의 생리 식염수에 녹인 20 μ g의 NSIP 단백질을 생쥐의 복강에 주사하여 생쥐의 면역성을 배가시켜 세포융합에 사용될 생쥐를 준비하였다.

세포 융합. 면역화된 생쥐를 에테르(ether)로 마취시킨 후 비장(spleen)을 적출하여 조직균질기(tissue homogenizer)로 곱게 파쇄한 다음 RPMI 1640 배지를 이용하여 현탁액을 만들고 비장세포를 15 ml 원심분리관 내에서 원심분리하였으며 충분한 세척을 위해 이 과정을 2회 반복하였다. 세포융합의 모세포(parent cell)로는 NS-1 골수종 세포 유래의 FOXP-NY 세포주(ATCC, CRL-1732)를 5 \times 10⁵/ml 정도의 농도를 유지하며 10%의 FBS (fetal bovine serum, 소 태아혈청)를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 배양하였으며 모세포도 RPMI 1640 배지를 이용하여 두 차례 세척하였다.

비장세포와 모세포를 각각 10 ml의 RPMI 1640 배지에 현탁시킨 후 세포의 농도를 결정하고 최종적으로 비장세포는 10⁸개, 모세포는 10⁷개가 되도록 두 현탁액을 50 ml의 원심분리관 내에서 섞은 다음 다시 원심분리하여 침전시켰다. 침전된 세포들을 손가락으로 가볍게 두드려서 분산시키고, 37°C에서 1분간 정지 후 45% PEG (polyethylene glycol)와 5% DMSO (dimethyl sulfoxide)를 함유한 1 ml의 PBS를 1분간에 걸쳐서 천천히 가한 다음 약 1분간 가볍게 흔들어 주었다. 그 후 배양용 배지(RPMI 1640) 9 ml를 3분간에 걸쳐 천천히 첨가하고, 다시 가볍게 흔들어 주면서 서서히 배양용 배지(RPMI 1640)를 첨가하여 현탁액의 용적이 50 ml가 되도록 조정하였다. 이 현탁액을 다시 원심분리한 후 세포 침전물을 10% FBS를 포함한 분리용 배지(HAT 배지)를 이용해 세포농도가 12 \times 10⁵/ml가 되도록 다시 현탁시키고, 96-well microtiter-plate에 0.2 ml씩 분주한 후 37°C로 유지된 가슴 이산화탄소 세포배양기에서 배양하였다.

단일클론 항체를 생산하는 융합세포의 선별. NSIP 재조합 단백질 항원에만 특이적으로 반응하는 융합 세포들을 선정하기 위해 정제된 NSIP 단백질을 항원으로 이용한 ELISA 방법으로 선별하였다.

Microtiter-plate상에서 얻은 SIP의 NSIP 단백질을 PBS에 용해시킨 다음 각 well에 50 μ l (1 μ g/ml)씩 가하여 세포를 plate 표면에 부착시킨 후 반응하지 않은 항원은 PBS-Tween 20 용액으로 세척하여 제거하였다. 이 plate에 융합세포의 배양액을 각well당 50 μ l씩 가하고 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-Tween 20 용액으로 충분히 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거

하고 여기에 염소에서 얻는 생쥐 IgG를 인식하는 항체와 HRP (horseradish peroxidase, Sigma)의 복합체를 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 다음 PBS-Tween 20 용액으로 충분히 세척하였다. 세척이 끝난 각각의 well에 HRP의 기질용액(*o*-phenylenediamine, OPD)을 넣어 반응시킨 후 반응정도를 ELISA 판독기를 사용해 파장 492 nm에서의 흡광도를 측정해 결정하였다.

위에서 선별된 융합세포주를 배양한 후 상등액을 이용하여 ELISA 방법으로 항체의 역가를 측정하고 ImmunoType™ Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Sigma-Aldrich)로 단일클론 항체들의 면역글로블린의 아형을 결정하였다. 최종적으로 선정된 SIP의 아미노 말단에 특이적인 항체를 생산하는 융합세포주는 SIP 1G3으로 명명되었다.

단일클론 항체와 SIP 단백질의 항원-항체 반응 확인. 융합세포주 SIP60 1G3가 생산하는 단일클론 항체의 SIP에 대한 특이적 반응성을 측정하기 위하여 아래와 같이 Western blot 분석을 수행하였다. 먼저 인간의 간에서 유래한 세포주들인 Chang (ATCC, CCL-13), HepG2 (ATCC, HB-8065) 및 Hep3B (ATCC, HB-8064)를 10% FBS를 포함한 DMEM (Gibco/BRL) 세포 배양액에서 배양한 후 원심분리 방법으로 회수하였다. 각 세포주들의 세포조액을 얻기 위하여 파쇄 완충액(lysis buffer; 50 mM Tris · HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1 mM aprotinin, 1 mM PMSF)에 세포들을 현탁시킨 후 4°C에서 1시간 동안 방치한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 상등액에서 단백질을 회수하였다. 각각의 상등액을 Bradford 시약으로 정량한 후 동일한 양의 단백질을 갖는 세포조액을 12% SDS-PAGE법으로 전기영동한 후 막 필터에 단백질을 옮겼다. 막 필터는 비특이적인 반응을 줄이기 위해 3% BSA 용액으로 1시간 동안 처리하였다. 1차 항체로는 본 연구에서 얻은 단일클론 항체를 첨가한 후 상온에서 2시간 동안 반응시켰으며 상기 막 필터를 0.5%의 BSA가 포함된 PBS로 3회 세척한 후 2차 항체로 HRP가 결합된 염소의 항-마우스 면역글로블린 G (goat anti-mouse-IgG-HRP, ICN)를 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 막 필터를 다시 0.5% Tween 20이 포함된 PBS로 세척한 후 ECL 용액을 이용하여 발색을 유도하였다.

단일클론 항체의 대장암 조직에서의 면역조직화학 염색. SIP 단백질의 발현 양상을 보기 위한 면역조직화학 염색은 모세관 현상의 원리를 적용한 MicroProbe detection system (Fisher Co.)을 이용하여 avidin-biotin-immunoperoxidase complex (ABC) 법으로 염색하였다. 을지의과대학교의 외과 수술팀과 병리학교실에서

2000년도부터 현재까지 종양환자로부터 적출 후 확보한 상피세포 기원의 인체 대장암 환자 29명의 정상 조직과 암 조직을 면역조직화학 염색을 위하여 10% 중성 포르말린 완충용액으로 24시간 동안 고정된 후 파라핀 포매를 하였다. 각각의 대장암조직 파라핀 블록을 4µm 두께로 박절한 후 poly-L-lysine으로 피복된 유리슬라이드 위에 부착시킨 후 xylene/histoclear 혼합액과 알코올로 각각 탈파라핀과 함수과정을 거쳤다. 상기 절편을 pH 7.6 Tris 완충액으로 세척한 후 3% 과산화수소에 3분간 작용시켜 내인성 페록시다제의 작용을 차단시킨 후, Tris 완충액으로 수세 및 정상 염소혈청으로 5분간 작용시켜 비특이적 단백질결합을 차단하였다. 일차 항체로는 1% 염소혈청알부민이 들어 있는 pH 7.4의 일차항체 희석액에 1 : 200 비율로 희석한 SIP에 대한 단일클론 항체를 사용하여 40°C에서 20분 동안 반응시켰다. 다시 pH 7.6 Tris 완충액으로 수세한 후 biotin이 결합된 이차항체를 40°C에서 10분간 부치시킨 후 Tris 완충액으로 세척하고 streptavidin-HRP용액(Immunotech Co.)을 40°C에서 10분 동안 처리하였다. Tirs 완충액으로 세척하고 HRP의 기질용액인 3-amino-9-ethyl carbazole (AEC)로 발색시킨 후 10% Meyer's hematoxylin으로 대조염색하고 수세한 후 슬라이드를 봉합한 뒤 광학 현미경으로 확인하였다. 음성대조군으로 일차항체 대신 anti-mouse IgG 및 일차항체 희석액으로 이용하였다.

결 과

SIP 재조합 단백질의 발현 및 정제. SIP 단백질을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체 및 그를 생산하는 융합세포주를 제조하기 위하여, 우선 SIP 유전자를 확보하였다. SIP 유전자는 공지의 아미노산 서열을 이용하여 합성하거나 유전공학적인 방법에 의해 재조합 단백질로 생산이 가능한데 본 실험에서는 Gen-Bank에 등재된 SIP (등록번호, NM-014412)의 유전자 서열을 이용하여 재조합 단백질을 생산하였다. 생산된 재조합 단백질은 용이한 분리 및 정제를 위해 히스티딘 표지가 결합된 His-tag-SIP의 형태로 발현시켜 His-tag에 대한 친화성 크로마토그래피(NTA-agarose, Quiagen)를 이용하여 용이하게 정제할 수 있도록 설계하였다. 대장균 형질전환 균주로부터 생산된 His-tag-SIP는 전기영동을 한 후 Coomassie blue 염색으로 확인한 결과, SIP의 아미노 말단 부위의 1~60번까지의 아미노산을 포함하는 His-tag-NSIP는 약 10 kDa의 분자량을, 카르복실 말단의 151~228번 아미노산을 포함하는 His-tag-CSIP는 약 16 kDa의 분자량을 가지고 있음을 확인하였다(Fig. 1).

재조합 단백질을 생산하는 형질전환 대장균체를 1

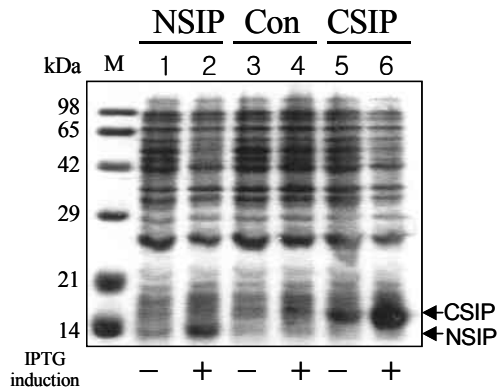


Figure 1. Production of SIP recombinant proteins. cDNA fragments of N-terminal (amino acid 1-60) and C-terminal (amino acid 151~228) of SIP were subcloned into pET28a plasmid vector and named as pET28a-NSIP for a vector containing N-terminal sequence and pET28a-CSIP for the one containing C-terminal. Each vector was transformed into *E. coli* (BL21, λ DE3) and transformed cells were treated with 1 mM IPTG to induce the production of the recombinant proteins. Cell lysates of the treated cells were loaded onto 12% SDS-PAGE gel, runned and stained with Coomassie blue. Lane 1 and 2 were lysates of pET28a-NSIP transformants, lane 3 and 4 were lysates of control pET28a transformants, and lane 5 and 6 were lysates of pET28a-CSIP transformants. Lane 2, 4, and 6 were the lysates of transformed cells treated with 1 mM IPTG for 3 h. Location of NSIP and CSIP were marked by arrows. Lane M was size markers.

mM IPTG로 과발현을 유도한 세포조액을 NTA-agarose를 이용한 affinity column으로 정제하는 과정에서는 여러 농도 구배의 imidazole이 함유된 회수용액(E1-E6)을 순차적으로 사용하였고, 각 단계의 회수율은 SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 2A). 결과적으로 NSIP 단백질은 E2 회수용액에, 그리고 CSIP 단백질은 E3-E5의 회수용액에 효율적으로 용출되었음을 알 수 있었다. Electro-elution 방법으로 농축된 NSIP와 CSIP의 순도는 SDS-PAGE로 확인하였다(Fig. 2B).

SIP 단백질에 대한 단일클론 항체의 제조 및 반응 특이성. 본 실험에서 생산, 정제된 NSIP 단백질을 생쥐의 면역화와 단일클론 항체를 생산하는 융합세포주를 선별하고 분석하기 위한 간접 ELISA 방법의 항원으로 사용하였다. 생쥐의 면역성을 높이기 위한 부스터 주사(booster injection)는 NSIP와 불완전 보조항원, FIA를 동량으로 섞어 생쥐의 복강에 3회에 걸쳐 주사하였다.

NSIP로 면역화된 생쥐로부터 혈청을 채취하여 항체의 역가를 측정하였으며 항체 형성이 확인된 생쥐의 비장세포와 세포융합 모세포를 세포 수를 기준으로 10 : 1의 비율로 혼합하고 세포융합을 시킨 다음 배양용 배지, RPMI 1640을 가하여 희석시켰다. 융합된 세포들은 선별용 HAT 배지에 옮겨 배양한 후 융합세포군들의 성장이 명확히 확인되는 시점에 배양

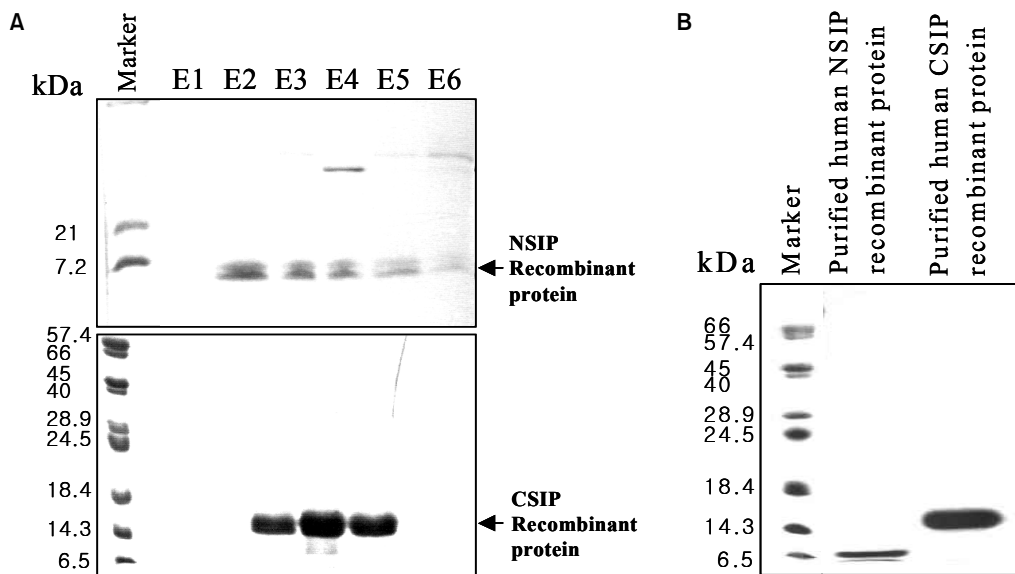


Figure 2. Purification of SIP recombinant proteins. His-tag-SIP recombinant proteins were purified by NTA-agarose affinity column and analyzed by 12% SDS-PAGE gel. pET28a-NSIP or pET28a-CSIP transformed cells were treated with 1 mM IPTG for 3 h and recombinant proteins were purified using the NTA- Agarose affinity column. The proteins were eluted stepwise from the column by buffers containing various concentrations of imidazole (E1-E6). Each elution product was loaded and separated on PAGE gel (A). Locations of purified recombinant NSIP, upper panel, and CSIP, lower panel, were marked by arrows. The proteins were eluted and concentrated by electro-elution method and loaded on 12% SDS-PAGE again to confirm the purity (B). Lane M was size markers.

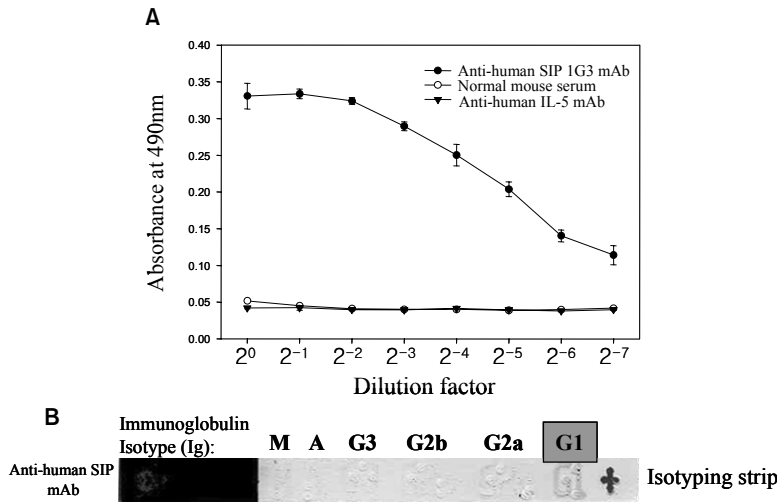


Figure 3. Characterization of monoclonal antibody (mAb) specific to SIP recombinant protein. Titration curve of anti-SIP mAb was determined by ELISA method. Each micro-titer plate well was coated with recombinant SIP and reacted with diluted anti-SIP antibody, Anti-human IL-5 antibody, and normal mouse serum were used as controls (A). The isotype of the monoclonal antibody produced by SIP60 IG3 hybridoma cells was IgG₁ (B).

용 배지를 HT 배지로 바꾸어 세포의 증식을 촉진하였다.

HT 배지에서 성장하는 융합세포군들 중에서 NSIP에만 특이적으로 반응하는 융합세포군을 간접ELISA 분석방법을 사용해 선별하였다. ELISA 판독기(ELISA reader)로 흡광도를 측정하여 정제된 인간 NSIP와 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 융합세포주를 선별하고(Fig. 3A), 선별된 세포가 단일클론이 되도록 제한 희석법(limiting dilution)을 사용해 융합세포를 희석한 후 하나의 세포로부터 증식한 세포들로 이루어진 세포주를 확립하였다. 이와 같이 선별된 융합세포주는 'SIP60 1G3'로 명명하여 한국생명공학연구원의 유전자은행(KCTC)에 2003년 3월, 수탁번호 KCTC 10443BP호(Korea patent #2003-45296)로 기탁하였다. SIP60 1G3가 생산하는 항체의 아형은 IgG₁ type으로 판명되었다(Fig. 3B).

융합세포주 SIP60 1 G3가 생산하는 단일클론 항체의 NSIP 아미노산 서열에 대한 반응특이성을 측정하기 위하여 다른 His-tag 재조합 단백질들에 대한 교차 반응성을 간접 ELISA와 Western blot 방법으로 수행하였으며, 이 항체는 SIP 단백질의 아미노 말단 부분에 특이적으로 반응하는 항체임을 확인하였다(Fig. 4, 5A). 또한 인체에서 얻은 세포 내에서 발현되는 약 30 kDa 크기의 SIP와 SIP60 1G3가 생산하는 단일클론 항체가 특이적으로 반응함을 확인하였다(Fig. 5B).

SIP 항체와 인체 대장암 조직의 면역조직화학염색 반응특이성. SIP는 S100A6 단백질과 결합하는 단백질로 알려져 있으며, 상피세포 기원의 종양세포에서 S100A6의 mRNA나 단백질의 발현이 현저히 증가한다는 사실이 보고되어 있다(13-19). 그러나 종양세포 내에서 SIP와 S100A6의 발현이 서로 어떠한 상관관

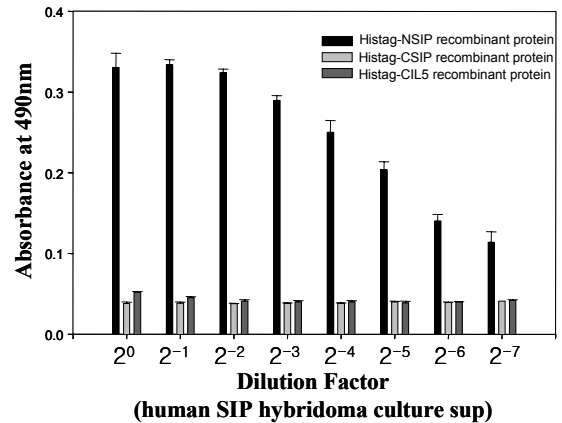


Figure 4. Binding specificity of the anti-SIP mAb. The anti-SIP mAb did not show any reactivity with His-tag-CSIP and His-tag-IL-5 proteins. It only reacted with His-tag-NSIP recombinant protein containing N-terminal region of SIP. Each micro-titer plate well was coated with a relevant recombinant protein and reacted with diluted culture supernatant of SIP60 IG3 hybridoma cells.

계를 가지고 있는지 또는 이들의 발현이 암화기전과 관련이 있는지 등에 대해서는 보고된 것이 없다. 본 연구에서는 29명의 대장암 환자에서 수집한 정상 조직과 암조직으로부터 mRNA를 추출한 후 SIP 유전자의 ORF (open reading frame)에 해당하는 부분을 RT-PCR로 증폭하여 비교 분석하였다(Fig. 6). 대장암 환자의 경우 정상조직에 비해 암조직에서 SIP mRNA의 발현이 높은 것을 확인할 수 있었고, 본 연구에서 제작한 단일클론 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 하여 관찰한 결과, 대장암조직이 특히 강하게 갈색으로 염색되었다(Fig. 7). 위의 결과에서 본 연구에서 생산된 단일클론 항체는 환자의 세포내 SIP 단백질 항

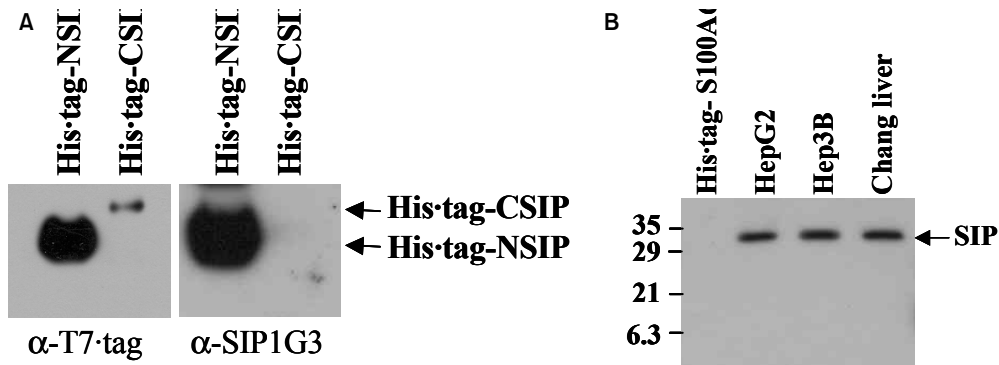


Figure 5. Binding specificity of the anti-SIP mAb determined by Western blot analysis. Recombinant NSIP and CSIP were detected by T7-tag antibody (Novagen) which could recognize proteins marked by His-tag but only NSIP was detected by the antibody produced by SIP60 IG3 hybridoma (A). The reactivity of the antibody to SIP native protein of 30 kDa produced in the cells of HepG2, Hep3B and Chang was also confirmed (B). His-tag-S100A6 was used as negative control.

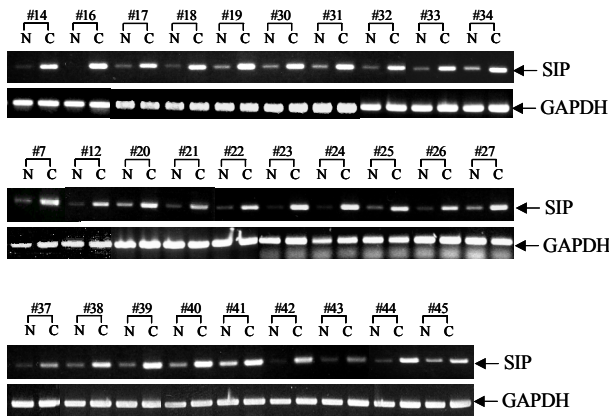


Figure 6. Expression of SIP in human colon carcinoma tissues. RT-PCR method was employed to reveal the comparative expression levels of SIP mRNA in 29 normal and colorectal carcinoma tissue samples. The expression level of reference gene (GAPDH) was also determined to compensate the variation in the amount of loaded RNAs from each sample. N; normal tissue, C; colon carcinoma tissue, numeric; patient number.

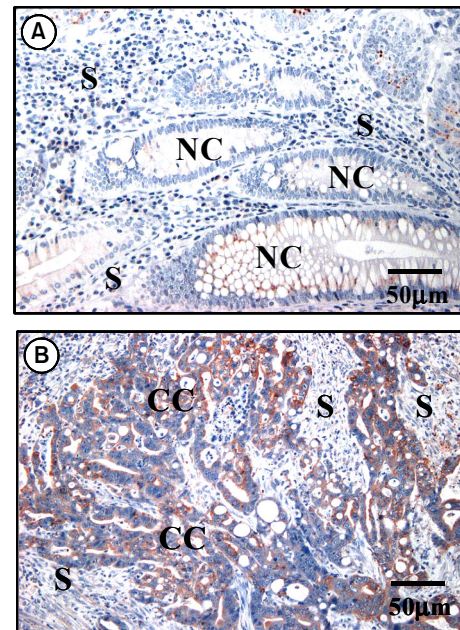


Figure 7. Expression of SIP in human colon carcinoma immunohistochemical staining using monoclonal antibody to SIP produced in this study. The positive immunoreactivity of SIP was revealed in the cytoplasm of cancer when compared to adjacent normal cells. NC; normal colon, S; stroma, CC; colon cancer.

원의 발현량 분석뿐 아니라 발암 관련성과 관련된 연구에도 유용하게 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다

고 찰

본 연구는 인체의 특정 종양조직과 종양세포에서 과발현되는 칼슘결합 단백질 S100A6 (2,3)과 결합하는 단백질이며, 세포의 발생(development)과 암화(oncogenesis)에 중요한 역할을 담당하는 β -catenin의 분해에 관여하는 Siah 복합체의 한 인자로 알려진 Siah-1 interaction protein (SIP; 1, 4, 11)을 특이적으로 인식하는 단일클론 항체의 제작과 이를 생산하는 융합세포주의 선별에 관한 것이다. 본 실험에서 제작한

융합세포주, SIP60 1G3가 생산하는 단일클론 항체는 SIP의 아미노 말단의 특정서열을 인식하는 항체로 대장암 환자의 조직에서 발현이 증가하는 SIP를 특이적으로 인식하는 능력을 가지고 있음을 확인하였다.

S100A6 단백질의 세포 내 기능은 Ca^{2+} 이온의 항상성 유지와 Ca^{2+} 관련 신호전달 및 세포의 성장과 분화에 밀접한 관련이 있을 것으로 추정되며 특히 암을 위시한 여러 가지 질병의 진전에 관련성이 높을

것으로 추정되나 정확한 생리작용의 기전은 아직 밝혀져 있지 않다(2,3). 따라서 많은 연구자들이 S100A6와 결합하는 단백질들의 생리적 역할의 분석을 통하여 S100A6의 기능을 밝히려 시도하고 있으며, 그 결과로 S100A6가 tropomyosin, annexin II, annexin XI, G3PDH (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase) 그리고 caldesmon 등의 단백질들과 상호작용을 함이 발견되었다(2). 최근에는 S100A6가 SIP와 결합하는 것이 밝혀지면서 두 단백질의 상호작용이 암화 기전에 중요한 역할을 담당하고 있을 가능성이 발표되었다(1,4,11). 본 실험에서 선별된 융합세포주, SIP60 IG3와 이 세포주가 생산하는 단일클론 항체는 SIP의 세포내 기능연구는 물론 세포내에 존재하는 SIP 항원을 특이적으로 검출하는 능력이 있어 암의 진행에 대한 임상적 진단에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예측된다.

SIP에 대한 단일클론 항체는 아직까지 국내외에서 시판되지 않고 있으며 본 연구를 통해 개발된 단일클론 항체는 최근에 관심을 끌고 있는 SIP의 세포내 기능에 관한 연구에 유용한 수단으로 활용할 수 있다 또한 이 항체는 대장암 환자의 종양세포에서 SIP 항원을 민감하게 특이적으로 진단할 수 있는 능력이 밝혀짐으로써 Western blot이나 면역조직화학염색에 이용해 실제 임상적 진단 및 실험에 적용할 수 있고 대장암 등 상피세포 기원의 암세포를 진단하기 위한 진단용 키트의 제작에도 활용이 가능할 것이다.

참 고 문 헌

- Matsuzawa SI, Reed JC: Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell* 7;915-926, 2001
- Donato R: Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochim Biophys Acta* 1450; 191-231, 1999
- Donato R: S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33;637-668, 2001
- Jastrzebska B, Filipek A, Nowicka D, Kaczmarek L, Kuznicki J: Calcyclin (S100A6) binding protein (CacyBP) is highly expressed in brain neurons. *J Histochem Cytochem* 48;1195-1202, 2000
- Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W: The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37;417-429, 1995
- Filipek A, Wojda U: p30, a novel protein target of mouse calcyclin (S100A6). *Biochem J* 320 (Pt 2);585-587, 1996
- Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, Kwiatkowska K, Hetman M, Surmacz L, Wyroba E, Kuznicki J: Ca²⁺-dependent translocation of the calcyclin-binding protein in neurons and neuroblastoma NB-2a cells. *J Biol Chem* 277;21103-21109, 2002
- Xia ZB, Dai MS, Magoulas C, Broxmeyer HE, Lu L: Differentially expressed genes during in vitro differentiation of murine embryonic stem cells transduced with a human erythropoietin receptor cDNA. *J Hematother Stem Cell Res* 9;651-658, 2000
- Pircher TJ, Geiger JN, Zhang D, Miller CP, Gaines P, Wojchowski DM: Integrative signaling by minimal erythropoietin receptor forms and c-Kit. *J Biol Chem* 276;8995-9002, 2001
- Nowotny M, Bhattacharya S, Filipek A, Krezel AM, Chazin W, Kuznicki J: Characterization of the interaction of calcyclin (S100A6) and calcyclin-binding protein. *J Biol Chem* 275; 31178-31182, 2000
- Filipek A, Jastrzebska B, Nowotny M, Kuznicki J: CacyBP/ SIP, a calcyclin and Siah-1-interacting protein, binds EF-hand proteins of the S100 family. *J Biol Chem*, 277;28848-28852, 2002
- Matsuzawa S, Li C, Ni CZ, Takayama S, Reed JC, Ely KR: Structural analysis of Siah1 and its interactions with Siah-interacting protein (SIP). *J Biol Chem* 278;1837-1840, 2003
- Boni R, Heizmann CW, Doguoglu A, Ilg EC, Schafer BW, Dummer R, Burg G: Ca²⁺-binding proteins S100A6 and S100B in primary cutaneous melanoma. *J Cutan Pathol* 24; 76-80, 1997
- Breen EC, Tang K: Calcyclin (S100A6) regulates pulmonary fibroblast proliferation, morphology, and cytoskeletal organization in vitro. *J Cell Biochem* 88;848-854, 2003
- Maelandsmo GM, Florenes VA, Mellingsaeter T, Hovig E, Kerbel RS, Fodstad O: Differential expression patterns of S100A2, S100A4 and S100A6 during progression of human malignant melanoma. *Int J Cancer* 74;464-469, 1997
- Yang Q, O'Hanlon D, Heizmann CW, Marks A: Demonstration of heterodimer formation between S100B and S100A6 in the yeast two-hybrid system and human melanoma. *Exp Cell Res* 246;501-509, 1999
- Komatsu K, Murata K, Kameyama M, Ayaki M, Mukai M, Ishiguro S, Miyoshi J, Tatsuta M, Inoue M, Nakamura H: Expression of S100A6 and S100A4 in matched samples of human colorectal mucosa, primary colorectal adenocarcinomas and liver metastases. *Oncology* 63;192-200, 2002
- Komatsu K, Kobune-Fujiwara Y, Andoh A, Ishiguro S, Hunai H, Suzuki N, Kameyama M, Murata K, Miyoshi J, Akedo H, Tatsuta M, Nakamura H: Increased expression of S100A6 at the invading fronts of the primary lesion and liver metastasis in patients with colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 83;769-774, 2000
- Komatsu K, Andoh A, Ishiguro S, Suzuki N, Hunai H, Kobune-Fujiwara Y, Kameyama M, Miyoshi J, Akedo H, Nakamura H: Increased expression of S100A6 (Calcyclin), a calcium-binding protein of the S100 family, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 6;172-177, 2000