

Antibody 제작을 위한 human serine palmitoyltransferase 유전자의 발현

김 희 숙*

경성대학교 식품공학과

Received November 26, 2003 / Accepted February 21, 2004

Expression of Human Serine Palmitoyltransferase Genes for Antibody Development. Hee Sook Kim*. Dept. of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea – For antibody development of human serine palmitoyltransferase (SPT, EC 2.3.1.50), SPTLC1 and SPTLC2 genes were subcloned in pRset vector and expressed in *E. coli* BL21 (DE3)pLys cells. Eucaryotic SPT is a membrane-bound heterodimer enzyme, while all other members are soluble homodimer enzymes. cDNA library were obtained from total RNA from human embryo kidney cell line, HEK293, using RT-PCR and PCR with specific primers was carried out for preparing SPTLC1 and SPTLC2 genes. pRset vector which can express hexahistidine-tag fusion protein was used and the DNA sequences of pRsetB/SPTLC1 and pRsetA/SPTLC2 were confirmed. Recombinant BL21 cells with SPTLC subunits were selected with LB plate containing ampicillin and chloramphenicol. SPTLC1 and SPTLC2 proteins were induced with 1 mM IPTG and separated on 10% SDS-PAGE gel. Expressed proteins were confirmed by western blotting with His-tag antibody.

Key words – Serine palmitoyltransferase, antibody development, expression

Sphingolipid들은 구조골격으로 long-chain base인 sphingoid base (sphingosine 및 sphinganine 등)를 가지는 지질로서 sphingomyelin 및 ganglioside 등은 진핵세포들과 몇몇 원핵세포의 막지질 구성성분이며 ceramide는 사람의 피부에서 중요한 경계면기능이 있는 각질층 지질성분의 40% 이상을 차지하고 있어 수분의 증발을 막아준다고 하였다(10,16,19). Johann L. W. Thudichum이 100여 년 전 뇌에 생리활성물질인 “sphingosine”이라고 불리는 aliphatic alkaloid가 존재한다고 보고한 이래, sphingolipid의 구조, 분포 및 대사에 대한 연구가 많이 이루어졌다(3,9). 지난 10년간, sphingolipid 대사산물인 sphingosine, sphinganine 및 sphingosine 1-phosphate 등은 세포증식, 분화 및 apoptosis 등 다양한 세포반응을 주관하고 있음이 밝혀졌다(15,22).

Sphingolipid에 관련된 연구로서는 lysosome 내의 glycosylsphingolipid 가수분해효소들의 유전자 결함 등에 의하여 대사이상을 일으키는 Niemann-Pick disease, Farber disease, Tay-Sachs disease 등 10여 종의 유전병들이 알려져 있으며(12,21), Merrill 등은 sphingomyelin, glycosylceramide, ganglioside 등이 1,2-dimethyl hydrazine (DMH)로 유도된 CF1 생쥐의 대장암발생을 억제한다고 하였고(17,20), Hannun 등은 ceramide 및 sphingosine 등이 세포의 apoptosis에 관여한다고 하였다(11,14).

Serine palmitoyltransferase (SPT)[EC 2.3.1.50]는 sphingolipid들의 생합성과정에서 첫 단계인 serine과 palmitoyl CoA

를 축합하여 3-ketodihydrosphingosine(KDS)를 생산하는 반응을 촉매하는 효소로 포유동물의 경우 2개의 subunit인 SPTLC1 (53 kDa) 및 SPTLC2 (63 kDa)로 구성되어 있는 heterodimer이며 효모로부터 발견된 SPT의 LCB1과 LCB2에 해당된다. SPT는 cofactor로서 pyridoxal 5'-phosphate (PLP)를 요구하는 PLP-dependent enzyme superfamily에 속하는 효소로서 SPTLC2 subunit에 PLP가 결합되어 있다(4,5). Endoplasmic reticulum의 막에 결합한 진핵세포의 SPT와는 달리 박테리아인 *Sphingomonas paucimobilis*는 homodimer (45 kDa subunit)로서 soluble SPT를 생성하며 LCB1과 LCB2 모두에 대하여 아미노산 서열의 30% 정도 identity를 가지고 있다(13). Nagiec 등(18) 및 Gable 등(8)은 *Saccharomyces cerevisiae*에서 SPT의 활성이 나타나는데는 LCB1과 LCB2가 다 요구된다고 하였으며, Weiss와 Stoffel (23)은 human embryo kidney cell인 HEK293 세포에서 SPTLC2만 발현시켜도 SPT활성이 증가한 것으로 보아 SPTLC1이 요구되지 않는다고 하였다. Yasuda (24)등은 hamster ovary cell (CHO)을 이용하여 LCB1이 결핍된 변이주에서 LCB1 DNA를 넣어 주었을 때 LCB2 mRNA 양이 정상세포와 같은 수준으로 증가하였으며 이 결과는 LCB2의 유지가 LCB1에 의존한다는 것을 보여주는 것이라고 하였다. 이와 같이 SPT는 세포내의 sphingolipid 수준을 조절하는 효소로서 그 역할이 중요할 것이라고는 짐작하고 있으나 단백질의 분리·정제 및 항체제작 등이 이루어지지 않아 제대로 연구되지 못하는 실정이다.

본 연구에서는, 사람의 SPT 효소에 대한 항체를 얻기 위하여 먼저 HEK293 cell로부터 SPTLC1과 SPTLC2의 cDNA를 얻어 *E. coli* 발현 vector인 pRset vector에 유전자 재조합하고 SPTLC1과 SPTLC2 단백질을 발현시켜 보았다.

***Corresponding author**

Tel : +82-51-620-4713, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : hskim@star.ks.ac.kr

재료 및 방법

HEK293 cell의 RNA 정제 및 cDNA library 제작

Human embryo kidney cell인 HEK293 cell을 10% FBS가 함유된 DMEM 배지에 70% confluent하게 배양하고 trypsin으로 세포를 부유시킨 후 RNA 정제 kit(Boeringer Menheim사)를 이용 total RNA를 얻었다. Total RNA를 template로 하고 oligo dT를 primer로 하여 reverse transcriptase로 RT-PCR을 행하므로써 primary strand cDNA library를 얻었다.

PCR을 통한 SPTLC1과 SPTLC2 gene의 증폭 및 cloning

제조한 cDNA library로부터 SPTLC1과 SPTLC2을 증폭시키기 위하여 PCR을 사용하였다. SPTLC1의 primer로는 5SPT1F (BglIII) : 5' - ccgagatctatggcgaccgccagcgagca - 3' 및 3SPT1R (BglIII) : 5' - ccgagatctctagagcaggcggcctgggcta - 3' 를 사용하였으며 SPTLC2의 primer로는 5SPT2F (XhoI) : 5' - ccgctcgagatcgggccggagcccggag - 3' 및 3SPT2R (XhoI) : 5' - ccgctcgagtcagtcttctgtttctcatagc - 3' 를 사용하였다. 먼저 SPTLC1 및 SPTLC2는 Promega사(USA)의 pGEM-T easy vector에 PCR product 들을 삽입하여 E. coli DH5a (recA endA) competent cell에 형질전환 시켰다. E. coli 발현 vector로는 (His₆)-tag과 Xpress epitope을 발현시킬 수 있는 pRset series (Invitrogen 사)를 사용하였다. pGEM-T/SPTLC1은 BglIII로 가수분해하여 약 1.5 kb DNA 조각을 pRset B vector에, pGEM-T/SPTLC2는 XhoI으로 가수분해하여 약 1.7 kb DNA 조각을 pRset A vector에 삽입시키고 DH5a에 형질전환시켰다. 재조합 plasmid들을 여러 종류의 제한효소로 가수분해하여 agarose gel 전기영동을 행하고 DNA sequencing으로 염기서열을 확인하였다.

대장균 BL21에 SPTLC1 및 SPTLC2의 overexpression

Overexpression용 E. coli 숙주세포로는 BL21 (DE3)pLysS을 사용하였다. Electroporation 용 competent cell (1×10⁹ cell)을 만들어 0.1 cm cuvette에 40 µl씩 넣은 다음, pRSET B/SPTLC1 및 pRSET A/SPTLC2 DNA를 1 µl과 섞어 1.8 kV에서 5 msec의 전류를 흘렸다(MicroPulser Electroporation Apparatus, Bio-Rad, USA). 형질전환된 BL21 균을 35 µg/ml 농도의 chloramphenicol과 50 µg/ml 농도의 ampicillin이 함유된 LB plate에서 선별하였다. 선별된 pRSET B/SPTLC1 및 pRSET A/SPTLC2을 재조합한 BL21균을 chloramphenicol과 ampicillin이 들어있는 LB 액체배지에 배양하여 최종농도가 1 mM IPTG가 되도록 첨가함으로써 단백질을 발현시켰다. 10% acrylamide gel상에서 SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리한 다음, nitrocellulose 종이에 전기적으로 단백질을 이동시키고 western blot을 행하였다. Ponceau 액

으로 단백질들의 band를 확인한 다음 5% skim milk로 blocking하고 1차 항체는 (His₆)-tag에 대한 polyclonal antibody (sc-803, Santa Cruz Biotechnology Inc., USA)를 사용하였으며 2차 항체는 horse radish peroxidase가 부착된 anti-rabbit antibody(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA)를 사용하였다. 기질로는 Amersham 사의 ECL kit를 사용하였고, ECL용 hyperfilm에 감광시켜 발현된 SPTLC1 및 SPTLC2 단백질을 확인하였다.

결 과

pRset 발현 vector에 SPTLC1 및 SPTLC2 유전자의 재조합

Human embryo kidney cell인 HEK293로부터 사람의 SPT 유전자인 SPTLC1 및 SPTLC2를 얻어 대장균 발현 vector인 pRset vector에 재조합시킨 과정은 Fig. 1과 같았다. pGEM-T/SPTLC1 및 pRset B/SPTLC1는 BglIII로, pGEM-T/SPTLC2 및 pRSET A/SPTLC2는 XhoI으로 가수분해하여

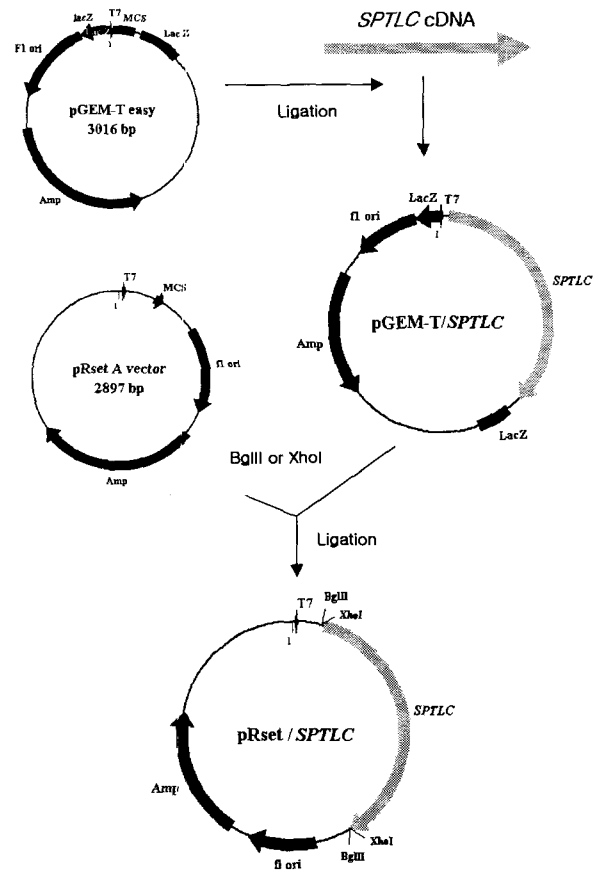


Fig. 1. Construction of human SPTLC recombinant DNA in E. coli expression vector. SPTLC1 and SPTLC2 cDNA were obtained by RT-PCR from total RNA of HEK293 cell. SPTLC1 and SPTLC2 were inserted in pRset B and pRset A vector, respectively.

전기영동한 결과는 Fig. 2와 같았다. pGEM-T easy vector 및 pRset vector의 크기는 각각 3016 bp 및 2897 kb이며 SPTLC1 및 SPTLC2는 각각 1422 bp 및 1689 bp이다. DNA ladder와 비교했을 때 SPTLC1은 1.5 kb보다 약간 아래, SPTLC2는 1.5 kb보다 약간 위에 보이므로 확인할 수 있었다. 제대로 삽입되었다고 생각되는 clone들을 선택하여 DNA를 정제하고 DNA sequencing을 행하므로써 염기서열을 확인하였다. 염기서열로부터 유추한 아미노산 서열을 확인한 결과 (His)₆-tag, Xpress epitope, SPTLC1 및 SPTLC1가 fusion된 단백질로 발현될 수 있게 재조합되어 있음을 확인할 수 있었다.

재조합 SPTLC1 및 SPTLC2의 발현

pRset B/SPTLC1과 pRset A/SPTLC2가 들어있는 재조합 BL21 균을 LB 액체배지에 배양하고 1 mM IPTG를 첨가하므로써 SPTLC1 및 SPTLC2를 발현시켰다. SDS가 함유된 10% acrylamide gel 상에서 전기영동을 행하여 단백질을 분리한 뒤 western blotting을 행한 결과는 Fig. 3과 같았다. 62 kDa의 72 kDa의 크기를 가진 (His)₆-tag fusion SPTLC1 및 SPTLC2를 확인할 수 있었으며 SPTLC1의 경우 62 kDa보다 작은 크기의 band도 있었으며 IPTG로 유도하지 않았을 때에는 발현되지 않았으나 SPTLC2의 경우에는 IPTG로 유도하지 않아도 약간의 발현을 보였다.

고 찰

Serine palmitoyltransferase (SPT)는 sphingolipid생합성의 첫 단계 조절효소로서 sphingolipid 대사에 중요한 역할을 한다고 보고되어 있으며 SPT 활성저해제를 사용하여 그

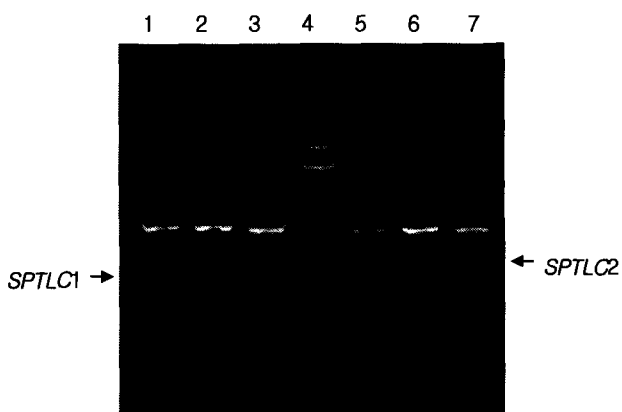


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of SPTLC recombinant DNA fragments after restriction enzyme digestion. lane 1 : BglIII digestion of pGEM-T easy/SPTLC1, lane 2 : BglIII digestion of pRsetB vector, lane 3 : BglIII digestion of pRsetB/SPTLC1, lane 4. DNA ladder of lambda HindIII plus, lane 5 : XhoI digestion of pGEM-T easy/SPTLC2, lane 6 : XhoI digestion of pRset A vector, lane 7 : XhoI digestion of pRset A/SPTLC2.

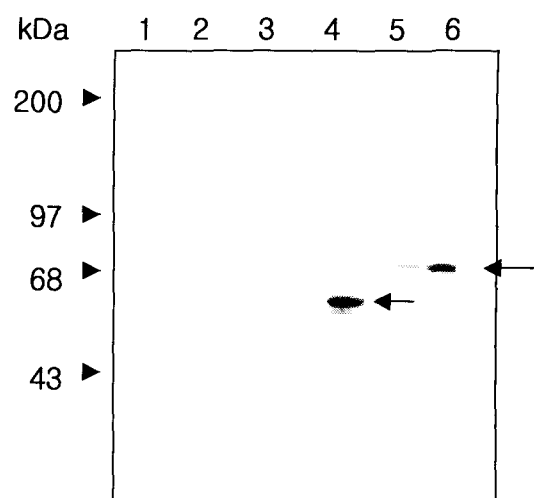


Fig. 3. Western blot analysis of recombinant human SPTLC1-His and SPTLC2-His fusion protein expression in *E. coli* BL21(DE3) cells transformed with pRset vector (1 and 2), pRsetB/SPTLC1 (3 and 4) and pRsetA/SPTLC2 (5 and 6). Lane 1, 3 and 5; without induction, lane 2, 4 and 6; induction with 1 mM IPTG.

역할들을 구명하는 연구들은 많이 보고되어 왔다. Sphingolipid의 대사산물인 sphingoid base나 ceramide 등이 세포에 많은 영향을 준다는 증거들이 보고되면서 SPT 효소단백질의 변이는 임상적인 질병을 일으킬 것이라고 예측되어 왔으나 SPT 단백질의 정제 및 SPT의 항체가 제대로 개발되어 있지 않아 세포내 분자수준의 SPT에 대한 연구들은 제대로 이루어지지 않았다고 생각된다. 최근에 human genome project가 완성되면서 하지감각 및 자율신경의 퇴행을 포함한 우성적 유전병인 hereditary sensory neuropathy type I (HSN1)의 gene variant가 보고되었으며(2,6) HSN1 locus는 염색체 지도 9q22.1-22.3에 위치하고 SPTLC1 유전자 역시 같은 곳에 위치하는 것이 밝혀졌다(1). 또한 HSN1 family 실험군 50%의 유전적 결함은 SPTLC1 유전자에 missense mutation이 일어난 것으로 그 결과 SPTLC1 subunit의 Cys¹³³ 또는 Val¹⁴⁴ 등 아미노산이 돌연변이 되었다고 하였으며 나머지 50%의 HSN1 family의 유전적 결함은 SPTLC2에 기인하지 않을까 의심하고 있다고 하였다(6). HSN1 변이는 처음에는 SPT 활성을 높이는 것으로 알려졌는데, 이는 radioactive serine으로 metabolic labeling을 하였을 때 건강한 사람보다 HSN1 환자의 lymphoblast에서 glucosylceramide의 합성이 1.8배나 높은 것으로 나타났기 때문이다. 그러나, 최근 Bejaoui 등(1)은 HSN1 mutation은 SPT에 HSN1 family lymphoblast에서 LCB1과 LCB2 subunit의 steady-state level은 정상인데 반하여 SPT activity와 sphingolipid의 생합성 속도는 사실상 감소한다고 하였으며 이와 같은 결과들의 모순된 이유는 아직 밝혀지지 않았다. SPT 활성 및 sphingolipid의 생합성에 있어서 HSN1 mutation의 negative effect는 CHO cell에서도

재현되었으며(1), HSN1 mutation을 가진 LCB1 mutant를 발현시킨 yeast cell에서 SPT 활성 및 sphingolipid 합성이 저해되는 것으로 나타났다(7). 본 실험실에서도 사람의 대장암 세포인 HT29 cell로부터 얻은 SPTLC2의 염기서열을 확인한 결과 여러 곳에서 돌연변이를 발견하였으며 pcDNA vector에 삽입하여 HT29 cell에 발현시켰을 때 SPTLC2만으로도 SPT 활성이 증가함을 관찰할 수 있었으나 SPTLC2의 아미노산 변이에 의한 SPT 활성증가인지는 확인할 수 없었다(data not shown). 세포내 sphingolipid 대사산물의 역할이 중요하다고 생각되며 이들을 연구하기 위하여 변이가 일어나지 않은 SPTLC1 및 SPTLC2 유전자를 HEK293 cell로부터 얻어 발현 vector에 subcloning을 진행하고 있다. Fusion 단백질을 발현시킬 수 있는 vector들이 많이 개발되어 있어 외부유전자를 발현시킨 세포에서(His)₆-tag 및 GST-tag 등의 항체를 이용하여 발현된 단백질을 연구할 수 있게 되었다. 그러나 세포내에 원래 발현되어 있는 수준의 단백질에 대한 연구를 위해서는 그 단백질의 항체를 필요로 한다. 이 연구에서 *E. coli*에 발현시킨 사람의 SPTLC1 및 SPTLC2 단백질을 이용하여 항체를 얻게 되면 외부 유전자를 발현시키지 않은 본래의 세포에서의 SPT 효소에 대한 연구를 더욱 깊이 행할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2003학년도 경성대학교 학술지원연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

요 약

사람의 serine palmitoyltransferase(SPT, EC 2.3.1.50)에 대한 항체를 제작하기 위하여 *E. coli* 발현 vector인 pRset vector에 SPTLC1 및 SPTLC2 유전자를 subcloning하고 BL21 (DE3)pLys cell에 발현시켰다. 포유동물의 SPT는 원핵세포의 SPT homodimer와는 달리 SPTLC1 및 SPTLC2 2개의 sub-unit로 된 heterodimer이다. Human embryo kidney cell인 HEK293 cell의 total RNA로부터 RT-PCR을 행하여 cDNA library를 얻은 다음 SPTLC1 및 SPTLC2의 특이적인 primer들을 이용하여 PCR을 행하였다. SPTLC1 및 SPTLC2 DNA를 hexahistidine fusion 단백질을 발현시킬 수 있는 pRset vector에 cloning하여 pRsetB/SPTLC1 및 pRsetA/SPTLC2를 얻고 염기서열을 확인하였다. 재조합 plasmid를 발현세포인 BL21 cell에 형질전환시킨 다음 ampicillin 및 chloramphenicol 배지에서 선별하여 재조합세포를 얻었다. 1 mM IPTG로서 발현을 유도하였으며 세포 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 다음 His-tag antibody로 western blotting을 행하여 SPTLC 및 SPTLC2가 발현되었음을 확인하였다.

참고 문헌

1. Bejaoui, K., C. Wu, M. D. Scheffler, G. Hann, P. Ashby, L. Wu, P. de Jong and R. H. Brown, Jr. 2001. SPTLC1 is mutated in hereditary sensory neuropathy, type I. *Nat. Genet.* **27**, 261-262.
2. Bejaoui, K., Y. Uchida, S. Yasuda, M. Ho, M. Nishijima, R. H. Brown, Jr., W. M. Holleran and K. Hanada. 2002. Hereditary sensory neuropathy type I mutation confer dominant-negative effects on serine palmitoyltransferase, critical for sphingolipid synthesis. *J. Clin. Invest.* **110**, 1301-1308.
3. Bell, R. M., Y. A. Hannun, and A. H. Merrill, Jr. 1993. In *Advances in Lipid Research, Sphingolipid and their metabolite*, **25**, Academic Press, San Diego.
4. Braun, P. E. and E. E. Snell. 1967. The biosynthesis of dihydrosphingosine in cell-free preparation of *Hansenula cifferri*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 298-303.
5. Braun, P. E., P. Morell and N. S. Radin. 1970. Synthesis of C18- and C20- dihydrosphingosines, ketodihydrosphingosines and ceramides by microsomal preparation from mouse brain. *J. Biol. Chem.* **245**, 335-341.
6. Dawkins, J. L., D. J. Hulme, S. B. Brahmabhatt, M. Auergrumbach and G. A. Nicholson. 2001. Mutation in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I. *Nat. Genet.* **27**, 309-312.
7. Gable, K., G. Han, E. Monaghan, D. Bacikova, M. Natarajan, R. Williams and T. M. Dunn. 2002. Mutations in the yeast LCB1 and LCB2 gene, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **277**, 10194-19200.
8. Gable, K., D. Slife, D. Bacikova, E. Monaghan and T. M. Dunn. 2000. Tsc3p is an 80-amino acid protein associated with serine palmitoyltransferase and required for optimal enzyme activity. *J. Biol. Chem.* **275**, 7597-7603.
9. Hakomori, S. 1983. Chemistry of glycosphingolipids, in J. N. Kanfer and S. Hakomori(Eds.), *Sphingolipid Biochemistry*, Plenum, New York, pp 1-164.
10. Hakomori, S. 1991. Bifunctional role of glycosphingolipids : modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J. Biol. Chem.* **265**, 18713-18716.
11. Hannun, Y. A. and C. Luberto. 2000. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol.* **10**, 73-80.
12. Kolter, T. and K. Sandhoff. 1999. Sphingolipid - Their metabolic pathway and the pathobiochemistry of neurodegenerative disease. *Angew. Chem. Int. Ed.* **38**, 1532-1568.
13. Ikushiro, H., H. Hayashi and H. Kagamiyama. 2001. A water-soluble homodimeric serine palmitoyltransferase from *Sphingomonas paucimobilis* EY2395T strain. *J. Biol. Chem.* **276**, 18249-18256.
14. Luberto, C. and Y. A. Hannun. 1999. Sphingolipid metabolism in the regulation of bioactive molecules. *Lipids* **34**, Suppl. S5-11.
15. Mathias, S., L. A. Pena, and R. N. Kolesnick. 1998. Signal

- transduction of stress via ceramide. *Biochem. J.* **335**, 465-480.
16. Merrill, A. H. Jr., E. M. Schmelz, D. L. Dillehay, S. Spiegel, J. A. Shayman, J. J. Schroeder, R. T. Riley, K. A. Voss and E. Wang. 1997. Sphingolipids - the enigmatic lipid class : Biochemistry, physiology and pathophysiology, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **142**, 208-225.
 17. Merrill, A. H. Jr., E. M. Schmelz,, E. W. Schroeder, D. L. Dillehay and R. T. Reley. 1995. Role of dietary sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism in cancer and other diseases. *J. Nutr.* **125**, 1677S-1682S.
 18. Nagiec, M. M., J. A. Baltisberer, G. B. Wells, R. I. Lester and R. C. Dickson. 1994. The LCB2 gene of *Saccharomyces* and the related LCB1 gene encode subunits of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7899-7902.
 19. Norlén, L. 2001. Skin barrier structure and function : the single gel phase model, *J. Invest. Dermatol.* **117**, 830-836.
 20. Schmelz, E. M., M. C. Sullard, D. L. Dillahay and A. H. Merrill, Jr. 2002. Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1,2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice. *J. Nutr.*, **130**, 522-527.
 21. Schuchman, E. H. 1995. Two new mutations in the acid sphingomyelinase gene causing type a Niemann-pick disease: N389T and R441X. *Hum. Mutat.* **6**, 352-354.
 22. Spiegel, S. and A. H. Merrill, Jr. 1996. Sphingolipid metabolism and cell growth regulation. *FASEB J*, **10**, 1388-1397.
 23. Weiss, B. and W. Stoffel. 1997. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase - cloning, expression and characterization of the key enzyme in sphingolipid synthesis. *Eur. J. Biochem.* **249**, 239-247.
 24. Yasuda, S., M. Nishijima and K. Hanada. 2003. Localization, topology and function of the LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 4176-4183.