

The Alpha Subunit of Go Interacts with Promyelocytic Leukemia Zinc Finger Protein

Sung-Ho Ghil[†]

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

Heterotrimeric GTP binding proteins (G proteins) transduce signals of a variety of hormones and neurotransmitters. Go is one of the most abundant G proteins in the brain and classified as the Gi/Go family due to their sequence homology to Gi proteins. While the Gi proteins inhibit adenylyl cyclase and decrease the intracellular cAMP concentration, the functions of Go is not clearly understood despite their sequence homology to Gi. The promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF) is a DNA binding transcription factor and is expressed highly in central nervous system (CNS). Several studies reported that PLZF may be involved in regulation segmentation/differentiation during CNS development. Here, I report that the alpha subunit of Go (*Go α*) interacts with PLZF. The interaction between *Go α* and PLZF was verified by using GST pulldown assay and co-immunoprecipitation. Our findings indicate that *Go α* could modulate gene expression via interaction with PLZF during neuronal or brain development.

Key Words: G-proteins, PLZF, Yeast two hybrid

서 론

Heterotrimeric GTP 결합단백질 (G 단백질)은 외부에서 전달되어 오는 호르몬 또는 신경전달물질 등의 신호를 세포내로 매개하는 핵심적인 신호전달자이다 (Gilman, 1987; Neer and Clapham, 1988). G 단백질은 α , β , γ 라는 세 개의 소단위체로 구성되어 있으며, G 단백질의 특성을 결정짓는 α 소단위체는 현재까지 16종류가 존재한다고 알려져 있다 (Bimbaumer, 1992). G 단백질은 크게 Gs, Gi, 그리고 Gq 등 3개의 family로 분류되며, 본 연구의 주제가 되는 Go는 유전자의 서열상 Gi 단백질과 유사성이 높기 때문에 Gi family로 분류된다.

G 단백질은 GTP 또는 GDP의 결합여부에 따라서 활성화된 형태와 불활성화된 형태를 반복한다. 세포외부의 호르몬이나 신경전달물질이 그 수용체에 결합하게 되면, 수용체의 세포질부분에 결합되어 있던 G 단백질이 활성화된다. 이때, G 단백질내의 GDP가 GTP로 치환되고 α 소단위체로부터 $\beta\gamma$ 소단위체가 유리된다. 활성을 마친 G 단백질의 소단위체들은 다시 복합체를 이루고, α 소단위체에 결합되어

있는 GTP의 마지막 인산기가 분해되어 GDP가 되면서 G 단백질은 불활성화된 상태의 단백질 구조를 가지게 된다. 세포내의 G 단백질의 활성화 신호는 G-protein coupled receptor (GPCR)에 의해서 발생하며, adenylyl cyclase (AC), phospholipase C (PLC)와 이온채널 등의 매우 다양한 효과자에 영향을 미친다 (Liu and Anand, 2001). GPCR의 신호를 G 단백질이 매개함에 있어 Go를 제외한 다른 G 단백질들은 그 효과자가 비교적 명확히 알려져 있다. 그러나 Go의 효과자는 아직 명확하게 알려져 있지 않다. 그 이유는 현재까지의 연구가 Go와 Gi가 단백질 서열상 유사하다는 점에 착안하여 Go의 효과자를 검색하는데 있어서 AC만을 고려하여 그 활성을 중심으로만 조사하였기 때문이다. 그러나 Go가 결합된 생쥐는 정상생쥐와 비교하였을 때 $G\beta\gamma$ 에 의한 PLC의 활성화나 AC의 활성화에는 변화가 없음이 보고된 바 있다 (Jiang et al., 1998; Mende et al., 1998). 따라서 Go는 Gi, Gs와는 달리 AC를 효과자로 사용하지 않는다는 것을 알 수 있다. 또한 Go는 신경세포의 성장원추 (growth cone)의 막을 이루고 있는 단백질 중의 하나이며 (Strittmatte et al., 1990), 뇌조직 막성분의 약 0.5% 정도에 해당하는 높은 비율을 차지하고 있다 (Huff et al., 1985). 그리고 몇몇 연구들에서 Go가 신경세포의 분화과정에 중요한 역할을 수행할 것이라는 보고들이 있지만, 아직까지 뇌조직에서 Go의 기능에 대한 명확한 결론은 내려지지 못하고 있다.

Promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF)은 서열특이적인 전사조절인자이며, 총 673개의 아미노산으로 구성되

*논문 접수: 2004년 10월 13일

수정재접수: 2004년 11월 9일

[†]교신저자: 김성호, (우) 442-760 경기도 수원시 영통구 의의동, 경기대학교 생물학과

Tel: 031-249-9646, Fax: 031-249-9646

e-mail: shghil@kyonggi.ac.kr

어 있다. 단백질의 구조는 N-말단의 POZ (Pox virus and zinc finger) domain 또는 BTB (broad complex, tramtrack, bric-a-brac) domain, C-말단의 9개의 Kruppel-like C₂H₂ zinc finger domain, 그리고 두 개의 전사억제 domain (RD1과 RD2)으로 되어 있다 (Chen et al., 1993; Melnick and Licht, 1999). POZ/BTB domain은 N-CoR, SMRT, Sin3A, histone deacetylases 등의 corepressor와 함께 작용하여 표적유전자인 cyclin A2와 interleukin-3 receptor α chain 등의 유전자 발현을 억제한다고 알려져 있다 (Lin et al., 1998; Wong and Privalsky, 1998). 두 개의 전사억제 domain 중 두 번째 domain (RD2)은 POZ/BTB domain의 다음에 존재하며, ETO 단백질을 corepressor로 사용하여 표적유전자의 발현을 억제한다 (Melnick et al., 2000). PLZF의 전사억제의 기능과는 반대로 PLZF가 전사를 향상시킨다는 보고가 존재한다. 이 보고에 따르면, PLZF는 angiotensin II type 2 receptor (AT2R)의 C-말단과 결합하여 p85 α PI3K의 유전자의 전사를 촉진시켰으며 이는 p70^{S6} kinase의 세포내 발현을 증가시켰다 (Senbonmatsu et al., 2003). 이처럼 PLZF는 세포내에서 유전자의 발현을 증가 혹은 감소시키는 다양한 기능을 수행하리라 생각된다.

발생 중인 생쥐와 닭의 뇌에서 PLZF의 발현은 주로 rhombomere-특이적인 발현양상을 보이며, Hoxb2 등의 유전자의 발현을 조절하면서 중추신경계의 발생과 분화에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Wilkinson, 1993; Cook et al., 1995; Ivins et al., 2003). 이와 같이 PLZF의 발현은 생쥐의 태아시기의 뇌에서 높은 발현양상을 보인다. 따라서 뇌의 발생과정에 중요한 역할을 하리라 기대되지만 아직까지 몇몇 연구를 제외하고는 그와 관련된 많은 연구결과가 보고되지 못하였다.

본 연구는 뇌조직에서 Go α 의 기능을 찾고자 하는 연구의 일환으로 수행되었으며, 특히 지금까지 알려지지 않은 Go α 의 효과자를 탐색하는데 그 초점을 두었다. 이를 위하여 yeast two hybrid screening을 통해 인간 태아의 뇌조직에서 Go의 α 소단위체 (Go α)와 결합하는 단백질을 검색하였으며, 유전자 서열 분석결과 PLZF의 RD2 domain의 일부를 포함하는 단백질 부분이 Go α 와 결합하는 것으로 나타났다. 또한 GST pulldown assay 및 co-immunoprecipitation 방법을 사용하여 이들의 결합을 증명하였다. 이는 Go α 가 효과자로서 전사조절 인자인 PLZF를 사용할 수 있다는 것을 의미하며, 이들의 결합을 통해서 신경세포 및 뇌의 발생과 분화과정에 관여하는 다양한 유전자의 발현을 조절할 가능성을 시사한다.

재료 및 방법

1. 재료

Go α 의 야생형 (pRC/CMV-Go α^{wt}) (GenBank accession number: M17526)과 Go α 의 Q205L 돌연변이 (pRC/CMV-Go α^{Q205L})

플라스미드는 R. Iyengar (Mt. Sinai School of Medicine, USA)로부터, L40 효모세포주와 pHybTrp/Zeo 벡터는 배재대학교 채순기, 김은희 박사로부터, flag epitope이 tagging되어 있는 PLZF 발현벡터 (pRSV-Flag-PLZF) (GenBank accession number: NM_006006)는 고려대학교 김익영 박사로부터, 그리고 human fetal brain cDNA library는 연세대학교 정광철 박사로부터 제공받아 사용하였다. Yeast 성장배지 및 선택배지는 Bio101 (Vista, CA, USA), herring testis DNA는 Clontech (Palo Alto, CA, USA), TA cloning 벡터 (pGEMTeasy) system은 Promega (Madison, WI, USA), Go α monoclonal 및 polyclonal 항체는 Santacruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), glutathion sepharose 4B bead와 protein A sepharose CL-4B bead는 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden), 제한효소 및 modifying 효소는 Roche (Mannheim, Germany), 그리고 이외의 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

2. 벡터의 제작

pHybTrp/Zeo-Go α^{Q205L} 벡터는 pRC/CMV-Go α^{Q205L} 벡터에서 *EcoRI*과 *XbaI* 제한효소를 사용하여 절단하여, pcDNA3 벡터에 삽입한 후, 이를 다시 *EcoRI*과 *ApaI*으로 절단하여 pHybTrp/Zeo 벡터에 삽입하였다. GST-Go α 융합단백질을 제작하기 위한 발현벡터 (pGEX2T-Go α^{wt})는 pRC/CMV-Go α^{wt} 벡터를 주형으로 PCR을 수행하여 제작하였다. 이때 PCR primer는 5'-CAT GGG ATG TAC TCT GAG-3'과 5'-TCA GTA CAA GCC ACA GCC-3'이었으며, PCR 생산물을 pGEMTeasy 벡터에 삽입한 후, *EcoRI*으로 절단하여 pGEX2T 벡터에 최종적으로 삽입하였다.

3. Yeast two hybrid screening

Yeast two hybrid screening은 제작사의 manual (Clontech laboratories, CA, USA)을 토대로 수행하였다. 간단히 설명하면, L40 효모세포주를 사용하여 competent cell을 먼저 제작하고, pHyb-Trp/Zeo-Go α^{Q205L} 벡터와 herring testis DNA를 혼합한 후, 42°C에서 15분간 heat shock을 가하여, 트립토판 아미노산이 결합되어 있는 성장배지 (-T plate)에서 3일간 배양하여 bait 벡터가 형질전환된 colony를 선별하였다. 성장한 colony를 획득하여 20 μ g의 human fetal brain cDNA library를 같은 방법으로 형질전환 시킨 후, 히스티딘, 류신, 그리고 트립토판 아미노산이 결합된 성장배지 (-HLT plate)에서 5, 6일간 selection 하였다. 성장한 colony를 획득하여 false-positive를 제거하기 위해 다음과 같은 선별과정들을 수행하였다. 1) 5 mM 3-AT (3-amino-1, 2, 4-triazole)가 첨가된 -HLT plate에 colony를 옮겨주고 성장유무를 관찰하였다. 2) X-gal이 함유되어 있는 -LT plate에 colony 옮겨주고 변색유무를 관찰하였다. 3) filter paper를 이용하여 replica를 제작하고 freezing and thawing 방법으로

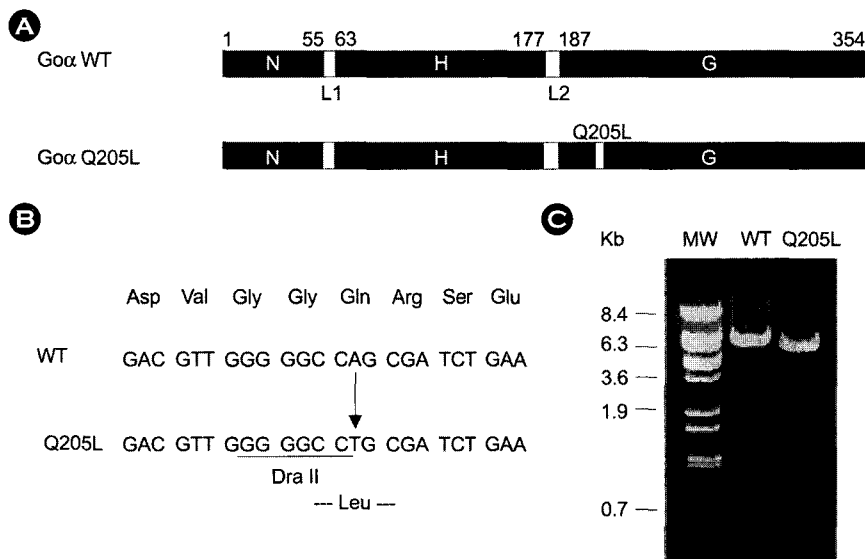


Fig. 1. Schematic diagram of bait construct and comparison of Goa^{wt} and Goa^{Q205L}. Schematic diagram of Goa^{wt} and Goa^{Q205L} (A). Comparison of Goa^{wt} and Goa^{Q205L}. Substitution of A to T introduced a novel *DraII* restriction enzyme site, resulting in conversion of glutamine to leucine in the mutant (B). Confirmation of a *DraII* restriction enzyme site in the mutant by agarose gel electrophoresis (C). WT, Goa^{wt}; Q205L, Goa^{Q205L}.

효모세포의 물질투과성을 증가시킨 후, X-gal이 포함되어 있는 용액에 반응시켜 colony의 변색유무를 관찰하였다. 이와 같은 선별과정에서 양성반응을 보이는 colony를 획득하여 플라스미드를 추출하고, DH5α 박테리아 세포주에 형질전환시킨 후, 유전자 서열을 분석하였다. 분석된 유전자 서열은 BLAST search 프로그램을 사용하여 동정하였다.

4. GST pulldown assay

Goa와 PLZF의 결합여부를 확인하기 위해서 pGEX2T-Goa^{wt}백터를 BL21 대장균에 형질전환시킨 후, 0.5 mM의 IPTG가 첨가된 액체배지에서 induction하였다. 세포를 수집하기 위해 원심분리 (3000 rpm, 15분, 4°C)하고, 그 pellet에 lysis buffer (1% TritonX-100과 단백질분해효소 억제제가 첨가된 PBS)를 처리한 후, 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 이후, 재차 원심분리하여 (12000 rpm, 10분, 4°C) 얻은 상층액을 glutathion sepharose 4B bead와 4°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, bead를 lysis buffer로 5회 수세하고, 293T 세포에 PLZF를 발현시켜 얻은 단백질 추출물과 4°C에서 1시간 반응시켰다. 반응종류 후, lysis buffer로 5회 수세하고 SDS loading dye를 첨가하여 전기영동한 후, anti-flag항체를 사용하여 Western 분석하였다.

5. Co-immunoprecipitation

Goa와 PLZF의 발현 백터를 함께 293T 세포에서 발현시킨 후, lysis buffer를 사용하여 단백질을 추출하였다. 이 단백질추출액에 1 μg의 anti-Goa polyclonal 항체를 혼합하여 4°C

에서 16시간 반응시킨 후, protein A sepharose CL-4B bead를 첨가하여 4°C에서 4시간 반응시켰다. 반응이 끝난 immunocomplex를 lysis buffer로 5회 수세하고 SDS loading dye를 첨가하여 전기영동한 후, anti-flag 항체와 anti-Goa monoclonal 항체를 사용하여 Western 분석하였다.

결 과

1. Yeast two hybrid screening을 위한 bait 발현백터의 제작

Goa는 총 354개의 아미노산으로 이루어져 있고, 3개의 domain 즉, N-말단 (N), helical (H), 그리고 GTPase domain (G)으로 구성되어 있다. 그리고 각각의 domain들은 두 개의 linker domain (L1과 L2)에 의해서 서로 연결되어 있다 (Fig. 1A). Yeast two hybrid screening을 위해 사용된 bait 백터는 Goa의 205번째 아미노산인 글루타민 아미노산이 류신 아미노산으로 치환된 형태의 돌연변이 단백질을 coding하는 백터이며 (Fig. 1A), 이 과정에서 205번째 아미노산에 해당되는 DNA 염기서열이 5'-CAG-3'에서 5'-CTG-3'로 치환되면서 Goa의 야생형의 DNA에는 존재하지 않았던 *DraII* 제한효소의 인식부위가 생성되었다 (Fig. 1B). 이 돌연변이 단백질은 G 단백질 고유의 기능인 GTPase의 활성이 소실되기 때문에 Gβγ와 결합하지 못하는 돌연변이로 알려져 있으며, Goa의 constitutively active한 형태이다 (kroll et al., 1992). Goa 유전자의 야생형과 돌연변이형을 확인하기 위하여 각각의 DNA를 *DraII* 제한효소로 절단하고 agarose gel에 전기영동한 결과 약 700 bp 정

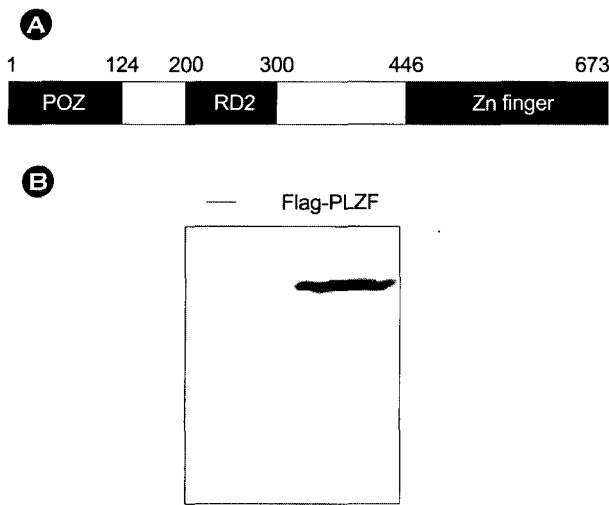


Fig. 2. Domain structure and expression of PLZF. Schematic representation of the PLZF domain structure (A). The subdomain of PLZF are labeled as follows: POZ, poxvirus and zinc finger; RD2, repression domain 2; zinc finger; zinc finger domain. Expression of PLZF was confirmed by Western blot analysis using anti-flag antibody (B).

도의 $Go\alpha$ 야생형에는 보이지 않는 band가 나타나는 것을 확인하였다 (Fig. 1C). 이와 같이 $Go\alpha$ 의 돌연변이 단백질을 bait로 사용하는 이유는 이미 $Go\alpha$ 와의 결합이 보고되어 있는 $G\beta\gamma$ 를 yeast two hybrid screening에서 배제하기 위함이다.

2. Yeast two hybrid screening

Bait 및 library의 발현벡터에는 각각 트립토판 아미노산의 유전자 또는 류신 아미노산 유전자가 존재하고 이들이 효모 세포주에 형질전환되면 각각의 아미노산들이 세포내에 발현된다. Bait단백질과 library단백질이 세포내에서 서로 결합하였을 때에는 L40 효모세포주의 유전자내에 존재하는 히스티딘 아미노산의 발현과 함께 β -galactosidase의 발현이 유도된다.

$Go\alpha$ 와 결합하는 단백질을 human fetal brain cDNA library에서 검색하기 위하여 bait와 library-유전자를 함께 효모세포주에 형질전환 시킨 후, 트립토판, 류신, 그리고 히스티딘 아미노산을 제거한 효모성장배지에서 성장하는 colony만을 선별하고 false-positive를 제거하는 과정을 거쳤다. 총 1.2×10^5 개의 독립적인 clone을 분석하여 10개의 clone을 최종적으로 획득하였다. 유전자서열분석결과 이들 중 2개의 clone이 PLZF와 높은 상동성을 갖는 유전자로 동정되었다. Fig. 2A는 PLZF의 단백질구조를 나타낸다. PLZF는 단백질간의 상호작용을 위한 부위와 전사조절 부위를 가지고 있으며, 그 중에서 $Go\alpha$ 와의 결합부위는 PLZF의 Gly²³³에서 Gln⁴²¹ 사이였다. $Go\alpha$ 와 PLZF의 상호작용에 대한 좀 더 자세한 연구를 위해서 PLZF에 flag epitope이 tagging되어 있는 벡터 (pRSV-

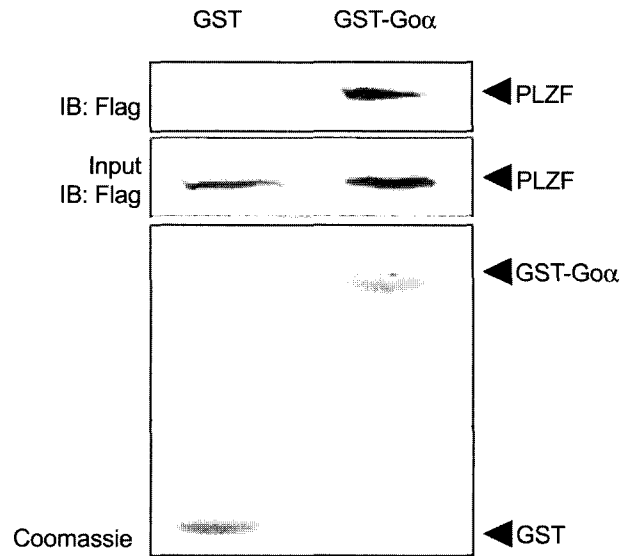


Fig. 3. GST- $Go\alpha$ interacts with PLZF. Glutathion beads charged with GST alone or GST- $Go\alpha$ were incubated with 500 μ g of 293T extracts transfected with PLZF. Bound proteins were subjected to Western analysis using anti-flag antibody. Input was loaded with 10% of the extract used for pulldown. Coomassie staining represents the amount of bacterially expressed GST alone and GST- $Go\alpha$.

flag-PLZF)를 공여받아 293T 세포에 일시적으로 발현시킨 후, anti-flag 항체를 사용하여 Western 분석하였다. 그 결과 약 74 kDa 정도의 위치에 flag-PLZF 단백질이 발현되고 있음을 확인하였다 (Fig. 2B).

3. $Go\alpha$ -PLZF 상호작용의 증명

Yeast two hybrid screening에 의해서 나타난 결과를 확증하기 위해 GST pull-down assay를 수행하였다. Glutathion sepharose bead에 GST 또는 GST- $Go\alpha$ 융합단백질을 박테리아에서 induction 한 후 얻은 추출물을 반응시키고, 다시 pRSV-flag-PLZF 벡터가 발현된 293T 세포의 추출물을 반응시켜 전기영동한 후, anti-flag 항체를 사용하여 Western 분석을 실시하였다 (Fig. 3). 그 결과 PLZF는 GST에는 결합하지 않지만, GST- $Go\alpha$ 융합단백질에는 결합하는 것으로 나타났다. 이때 사용된 293T 세포의 추출물 중 PLZF의 양은 서로 동일하였고 (input), 박테리아에서의 GST 및 GST- $Go\alpha$ 융합단백질의 발현양에서도 차이를 보이지 않았다.

$Go\alpha$ 와 PLZF의 결합이 mammalian cellular context에서도 가능한지를 확인하기 위해 293T 세포에 $Go\alpha$ 와 PLZF의 발현벡터를 함께 발현시켰다. 세포의 추출물을 얻어 anti- $Go\alpha$ polyclonal 항체 또는 preimmun serum (PI)을 사용하여 immunoprecipitation한 후, bead와 결합한 각각의 immunocomplex를 anti-flag 항체와 anti- $Go\alpha$ monoclonal 항체를 사용하여 Western 분석하였다 (Fig. 4). 그 결과 $Go\alpha$ 의 immunocomplex에 $Go\alpha$ 와

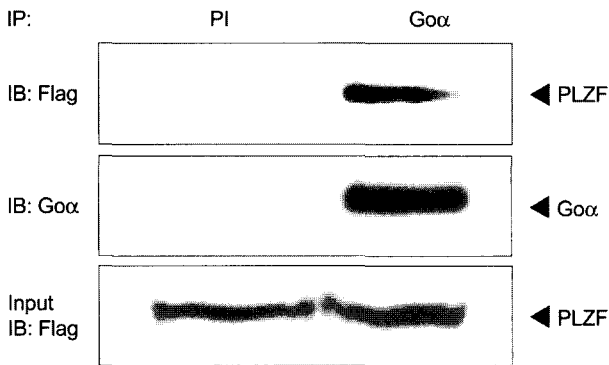


Fig. 4. Go α associates with PLZF in mammalian cellular context. Co-immunoprecipitation of Go α and PLZF from 293T cells. 293T cells were transfected with Go α (10 μ g) and PLZF (10 μ g). one milligrams of detergent extracts were immunoprecipitated with preimmun serum (PI) or anti-Go α polyclonal antibody (IP) and blotted with anti-flag or anti-Go α monoclonal antibody. Input contains 10% of extract used for immunoprecipitation.

PLZF가 함께 존재했으며, PI의 immunocomplex에는 Go α 또는 PLZF가 전혀 검출되지 않았다. 또한 이때 사용된 293T 세포추출물에서의 PLZF의 양은 서로 동일하였다 (input). 따라서 GST-pulldown assay와 co-immunoprecipitation 방법을 통해 yeast two hybrid screening에서의 결과를 확증할 수 있었으며, Go α 와 PLZF의 단백질 상호간의 상호작용은 세포내의 환경에서도 가능한 것을 알 수 있었다.

고 찰

Go는 뇌조직 막성분의 단백질 중 약 0.5%나 차지할 정도로 뇌에 가장 풍부한 G 단백질이며, 특히 신경돌기 (neurite)의 성장원추 (growth cone)에 많이 존재한다 (Huff et al., 1985). 본 연구자 및 몇몇 타 연구자들에 의해서 Go가 신경계 형성과정에서 중요한 역할을 담당하고 있음을 암시하는 결과가 다음과 같이 보고되었다. 1) 신경모세포종 (neuroblastoma)에서 Go α 는 신경돌기의 신장을 조절하였으며, 이는 PKA와 CREB의 신호전달기작을 조절함으로써 가능하였다 (Ghil et al., 2000). 2) 신경세포에 Gi/Go의 활성화제인 mastoparan을 처리하였을 때, 성장원추의 붕괴가 촉진되었고, 이러한 작용은 Gi/Go의 억제제인 pertussis toxin (PTX)에 의해서 다시 억제되었다 (Igarashi et al., 1993). 3) Gi/Go와 연결되어있는 신경전달물질의 수용체인 serotonin은 성장원추의 운동활성을 억제하였고 (Haydon et al., 1984), 도파민은 성장원추의 운동성과 신경돌기의 신장을 감소시켰다 (Lankford et al., 1988; Rodrigues et al., 1990). 4) 트롬빈은 GPCR에 작용하여 신경모세포종의 신경돌기의 성장을 억제하였다 (suidan et al., 1992). 5) Go의 GTPase 활성을 증가시키는 GAP-43는 PC12 세포에서 신경성장인자에 의해서 유도된 신경돌기의 성장을 증가시

켰으며 (Yankner et al., 1990), GAP-43을 특이적으로 인식할 수 있는 항체를 세포내부에 주입하였을 때, 신경모세포종에서 신경돌기의 형성이 억제되었다 (Shea et al., 1995). 6) PC12 세포에 Go α^{Q205L} 의 발현백터를 발현시켰을 경우, 신경돌기의 평균적인 길이의 증감은 없이 신경돌기들의 숫자가 증가하였다 (Strittmatter et al., 1994). 7) PC12 세포에서 신경돌기의 형성은 신경성장인자보다 NCAM과 N-cadherin에 의해 더 빨리 유도되는데 이 현상은 PTX에 의해서 억제되었다 (Doherty et al., 1991). 8) 발생 중인 닭의 뇌 추출물이나 생쥐 중추신경계의 수초단백질 혹은 Go, Gi의 활성을 증가시키는 mastoparan을 각각 닭의 신경세포에 처리하면 성장원추가 소실되었다 (Higashijima et al., 1990). 9) Go α 가 결여된 생쥐는 동물행동학적으로 운동능력, 냄새를 감지하는 능력, 시각의 형성, 성적 행동 유발 등에 상당한 저하를 보였다 (Jiang et al., 1998; Tanaka et al., 1999; Luo et al., 2002). 이상과 같은 보고에서 Go는 신경세포 및 뇌의 발생 및 분화에 핵심적인 역할을 수행한다는 것을 알 수 있다.

PLZF는 acute promyelocytic leukemia (APL)의 원인 단백질이라는 보고들이 많이 존재한다. 즉 염색체내의 PLZF 유전자와 retinoic acid receptor- α (RAR α) 유전자가 translocation되어 PLZF-RAR α 단백질 또는 RAR α -PLZF의 단백질이 발현되어 APL을 일으킬 수 있다는 것이다 (Mistry et al., 2003). 그러나 뇌에서 PLZF의 기능은 많이 알려지지 않고 있다. 몇몇 연구자들은 rhombomere-특이적인 발현양상을 보이는 PLZF의 발현이 중추신경계의 발생에 중요한 역할을 할 수 있다고 보고 하였다 (Wilkinson, 1993; Cook et al., 1995; Ivins et al., 2003). 최근에 yeast two hybrid screening을 통해서 PLZF와 GPCR의 일종인 angiotensinII type2 receptor (AT2R)의 C-말단이 결합할 가능성이 제시되었다 (Senbonmatsu et al., 2003). 이 보고에 의하면 angiotensin II의 자극에 의해서 AT2R이 internalization 되고, PLZF는 핵으로 전위되는 것을 관찰하였다. 또한 핵내에서는 p85 α PI3K의 유전자의 발현을 증가시켰으며, 이는 downstream에 존재하는 여러 단백질의 합성을 증가시켰다. 특히 PLZF와 AT2R의 결합은 PTX에 의해서 억제되었으며, 이는 PLZF와 AT2R 사이의 결합에 Gi 혹은 Go가 관여할 가능성을 제시해 주고 있다. 그러나 이들의 결합에 Gi 또는 Go가 직접적으로 관여하는지에 대한 연구는 진행되지 못하였다. 본 연구의 결과에서 Go는 PLZF와 결합하였으며, 이는 GPCR의 신호를 전사조절자인 PLZF로 중계하는 역할을 Go가 담당할 가능성을 강력히 시사한다.

Go α 와 PLZF의 결합에 있어서 PLZF의 Gly²³³에서 Gln⁴²¹ 사이의 단백질 부분이 Go α 와 결합하는 것으로 나타났다. 이 부위는 PLZF의 RD2 domain과 중첩되는 부위로서, ETO 등의 단백질 결합이 이루어지는 부위이다 (Melnick et al., 2000). 따라서 Go α 는 PLZF의 RD2 domain과의 상호작용을 통해 GPCR

의 신호를 증계할 것이며, 이는 결국 PLZF의 전사활성에 영향을 주어 다양한 유전자의 발현을 조절하게 할 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 통해서 Go α 는 PLZF의 RD2 domain의 일부를 포함하는 단백질부분과 결합함을 알 수 있었으며, 두 종류의 단백질 모두 뇌 및 신경의 발생에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려진 만큼 본 연구의 결과들은 Go α 의 기능을 뇌에서 분석하고 Go α 의 효과자를 탐색하는데 기초연구로서 큰 가치를 가진다고 할 수 있다. 또한 본 연구의 결과를 바탕으로 PLZF와 GPCR의 관련성을 풀어낼 수 있는 밑거름을 제공할 수 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2003학년도 경기대학교 학술연구비 (신진연구과제)지원에 의하여 수행되었음.

REFERENCES

- Birnbaumer L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: Roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell*. 1992. 71: 1069-1072.
- Chen Z, Brand NJ, Chen A, Chen SJ, Tong JH, Wang ZY, Waxman S, Zelent A. Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t (11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J*. 1993. 12: 1161-1167.
- Cook M, Gould A, Brand N, Davies J, Strutt P, Shakhovich R, Licht J, Waxman S, Chen Z, Gluecksohn-Waelsch S. Expression of the zinc-finger gene PLZF at rhombomere boundaries in the vertebrate hindbrain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995. 92: 2249-2253.
- Doherty P, Ashton SV, Moore SE, Walsh FS. Morphoregulatory activities of NCAM and N-cadherin can be accounted for by G protein-dependent activation of L- and N-type neuronal Ca²⁺ channels. *Cell*. 1991. 67: 21-33.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. *J Neurochem*. 2000. 74: 151-158.
- Gilman AG. G proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*. 1987. 56: 615-649.
- Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science*. 1984. 226: 561-564.
- Higashijima T, Burnier J, Ross EM. Regulation of Gi and Go by mastoparan, related amphiphilic peptides, and hydrophobic amines. Mechanism and structural determinants of activity. *J Biol Chem*. 1990. 265: 14176-14186.
- Huff RM, Axton JM, Neer EJ. Physical and immunological characterization of a guanine nucleotide-binding protein purified from bovine cerebral cortex. *J Biol Chem*. 1985. 260: 10864-10867.
- Igarashi M, Strittmatter SM, Vartanian T, Fishman MC. Mediation by G proteins of signals that cause collapse of growth cones. *Science*. 1993. 259: 77-79.
- Ivins S, Pemberton K, Guidez F, Howell L, Krumlauf R, Zelent A. Regulation of Hoxb2 by APL-associated PLZF protein. *Oncogene*. 2003. 22: 3685-3697.
- Jiang M, Gold MS, Boulay G, Spicher K, Peyton M, Brabet P, Srivivasan Y, Rudolph U, Ellison G, Birnbaumer L. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998. 95: 3269-3274.
- Kroll SD, Chen J, De Vivo M, Carty DJ, Buku A, Premont RT, Iyengar R. The Q205LGo-alpha subunit expressed in NIH-3T3 cells induces transformation. *J Biol Chem*. 1992. 267: 23183-23188.
- Lankford KL, DeMello FG, Klein WL. D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: Evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988. 85: 2839-2843.
- Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH JR, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*. 1998. 391: 811-814.
- Liu JG, Anand KJ. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001. 38: 1-19.
- Luo A, Cannon E, Wekesa K, Lyman R, Vandenberg J, Anhol R. Impaired olfactory behavior in mice deficient in the a subunit of Go. *Brain Res*. 2002. 941: 62-71.
- Melnick A, Licht JD. Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999. 93: 3167-3215.
- Melnick AM, Westendorf JJ, Polinger A, Carlile GW, Arai S, Ball HJ, Lutterbach B, Hiebert SW, Licht JD. The ETO protein disrupted in t (8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol Cell Biol*. 2000. 20: 2075-2086.
- Mende U, Zagrovic B, Cohen A, Li Y, Valenzuela D, Fishman MC, Neer EJ. Effect of deletion of the major brain G-protein alpha subunit (alpha(o)) on coordination of G-protein sub-

- nits and on adenylyl cyclase activity. *J Neurosci Res.* 1998. 54: 263-272.
- Mistry AR, Pedersen EW, Solomon E, Grimwade D. The molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia: Implications for the clinical management of the disease. *Blood Rev.* 2003. 17: 71-97.
- Neer EJ, Clapham DE. Roles of G protein subunits in transmembrane signalling. *Nature.* 1988. 333: 129-134.
- Rodrigues P dos S, Dowling J. Dopamine induces neurite retraction in retinal horizontal cells via diacylglycerol and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990. 87: 9693-9697.
- Senbonmatsu T, Saito T, Landon EJ, Watanabe O, Price E JR, Roberts RL, Imboden H, Fitzgerald TG, Gaffney FA, Inagami T. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: Possible role in cardiac hypertrophy. *EMBO J.* 2003. 22: 6471-6482.
- Shea TB, Benowitz LI. Inhibition of neurite outgrowth following intracellular delivery of anti-GAP-43 antibodies depends upon culture conditions and method of neurite induction. *Neurosci Res.* 1995. 41: 347-354.
- Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC. Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature.* 1990. 344: 836-841.
- Strittmatter SM, Fishman MC, Zhu XP. Activated mutants of the alpha subunit of G(o) promote an increased number of neurites per cell. *J Neurosci.* 1994. 14: 2327-2338.
- Suidan HS, Stone SR, Hemmings BA, Monard D. Thrombin causes neurite retraction in neuronal cells through activation of cell surface receptors. *Neuron.* 1992. 8: 363-375.
- Tanaka M, Treloar H, Kalb R, Greer C, Strittmatter S. Go protein-dependent survival of primary accessory olfactory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. 96: 14106-14111.
- Wilkinson DG. Molecular mechanisms of segmental patterning in the vertebrate hindbrain and neural crest. *Bioessays.* 1993. 15: 499-505.
- Wong CW, Privalsky ML. Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J Biol Chem.* 1998. 273: 27695-27702.
- Yankner BA, Benowitz LI, Villa-Komaroff L, Neve RL. Transfection of PC12 cells with the human GAP-43 gene: Effects on neurite outgrowth and regeneration. *Brain Res Mol Brain Res.* 1990. 7: 39-44.