

전사인자 저해제 통한 미백제 탐색용 단백질 칩 제작

한 정 선·곽 은 영·이 향 복·신 정 현*·백 승 학**·정 봉 현**·김 은 기[†]

인하대학교 공과대학 생명화학공학과 생물공학과, *인하대학교 의과대학 피부과, **한국생명공학연구원 바이오나노센터

Manufacturing Protein-DNA Chip for Depigmenting Agent Screening

Jung-Sun Han, Eun-Young Kwak, Hyang-Bok Lee, Jung-Hyun Shin*, Seung-Hak Baek**,
Bong-Hyun Chung**, and Eun-Ki Kim[†]

Department of Biological Engineering, Inha University, 253, Younghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea

*Department of Dermatology, College of Medicine, Inha University

**Bionanotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

요약: MITF는 미백관련 유전자의 대표적인 조절 인자 단백질로서 미백관련 유전자의 E-box와의 결합정도를 단백질 칩을 이용하여 측정하였다. 융합 단백질 형태의 MITF를 유리 칩에 고정시켰고 E-box를 포함하는 DNA oligomer가 결합하는 것을 확인하였다. 형광법, SPR (surface plasmon resonance), SPRi (surface plasmon resonance imaging) 방법 중 형광법이 가장 효과적이었으며, DNA 저해제를 사용시 결합이 감소하는 것을 확인하였다. 이 결과 MITF를 이용한 미백원료의 고속스크리닝(HTS)의 가능성을 보여주었다.

Abstract: An attempt was made to develop a proteinchip for screening of MITF (microphthalmia transcription factor) inhibitor. Binding of MITF to E-box causes transcription of several pigmenting genes including tyrosinase gene. We investigated binding of MITF and its DNA binding site (E-box) using a protein-DNA chip with various detection methods including fluorescence (Cyt3), SPR (surface plasmon resonance) and SPRi (surface plasmon resonance imaging). A fusion protein (MITF-Maltose Binding Protein) was attached on the glass plate by chemical modification. An inhibitory synthetic DNA oligomer, artificially designed based on the E-box sequence, inhibited the binding of MITF and E-box. These results showed the potentials of fluorescence-based MITF protein chip as a microarray for high throughput screening (HTS) system of depigmenting agents.

Keywords: MITF (microphthalmia transcription factor), E-box, β -CD, microarray, fluorescence-based detection

1. 서 론

피부 색소 침착은 melanocyte의 tyrosine이 tyrosinase, Tyrp1 (tyrosinase related protein 1), Tyrp2 (tyrosinase related protein 2), DCT (dopachrom tautomerase), DHICA oxidase 등과 같은 효소에 의해 산화과정을 거쳐 생성된 멜라닌에 의해서 조절된다[1]. 멜라닌 세포의 표면에는 melanocortin-1 receptor (MC1R), Frizzled, endothelin receptor 등의 수용체들이 존재하며[2], 이들이 자극되면 세포내로 신호가 전달되어 결국 MITF (microphthalmia transcription factor)가 발현되어 멜라닌 색소를 형성하는 주

요 효소들이 만들어지고 결국 이들에 의해 멜라닌 합성이 이루어지게 된다. 따라서 MITF는 신호전달의 목표 중에 색소형성에 관여하는 주요 효소의 발현을 조절하는 주요 전사자이다. 색소 침착의 핵심 조절인자로 알려진 MITF는 basic-helix-loop-helix-leucine zipper 구조로 알려져 있으며 이는 결합 DNA sequence에 특이적으로 결합한다[3]. 한편 멜라닌 생성에 핵심 효소인 tyrosinase, Tyrp1, DCT의 발현 유전자의 promoter에 E-box (CATGTG)가 존재하며 이는 MITF의 염기성 부분과 특이적으로 결합하여 효소 발현을 유도하게 되고 피부 색소 침착을 조절하게 되며 이러한 결합의 저해제로 알려진 MITF-DN, PIAS3은 색소 침착을 저해한다고 보고된 바 있다[4].

현재 미백 메커니즘의 활발한 연구로 melanocyte 성장

[†] 주 저자 (e-mail: ekkim@inha.ac.kr)

과 분화에 중요한 요소인 endothelin-1 (ET-1), 멜라노솜의 전달에 중요한 요소인 PAR-2, 멜라닌 형성을 유도하는 hormon α -MSH나 POMC (proopiomelanocortin), 색소 침착 효소의 발현을 유도하는 MITF에 대한 연구가 진행 중이나, MITF를 목표물로 한 화장품 소재의 개발은 미미한 실정이며 세포 내 탐색에 국한적으로 이용되어지고 있어 새로운 탐색 시스템 구축이 미흡한 상황이다.

기존 화장품소재로 이용되는 미백성분들은 피부 흑화의 최종 단계인 멜라닌 합성에 관여하는 효소를 억제하는 것으로 재발 및 부작용 등으로 인하여 미백 효과가 크지 않은 실정이다. 화장품소재의 해외 의존도가 큰 실정에서 미백제의 개발은 피부생리 메커니즘에 근거한 새로운 특이적 목표물의 선정과 함께 기존의 효소 중심의 탐색방법에서 벗어나 원료로부터 미백유효성분을 대량검색할 수 있는 탐색방법 구축이 절실하다고 사료된다.

따라서 본 논문은 피부 메커니즘에 근거한 새로운 목표물인 MITF의 저해제의 탐색을 위한 고속탐색 시스템 구축을 목표로 하여 새로운 단백질 칩의 개발로 microarray와 형광 표지법을 이용하였다.

2. 실험

2.1. 시약

3-Glycidoxyl-trimethoxysilane, 11-mercapto-1-undecanol, 2-(2-aminoethoxy)-ethanol, α -cyclodextrin, epichlorohydrin, tetrathylene glycol, dextran은 Sigma사에서 구입하였으며 bovine serum albumine은 Qbiogene사에서 구입하였다. Microarray는 proteogene (CM-100)을 사용하였으며 scanner는 Genfix 4.1 프로그램을 이용하여 확인하였다. SPR은 Autolab사의 제품을 이용하였으며 SPRi는 한국생명공학연구원 바이오 나노 센터에서 사용하였다.

2.2. 플라스미드 제작

Glutathione-S-transferase (GST)-MITF 융합 단백질 발현 벡터는 Kitamura로부터 받았으며 본 실험에서는 MBPek-MITF 벡터로 재구성하였다. PCR primer: NMBP-*nde* I: 5'-CAA AAA CAT ATG AAA ATC GAA GGT AAA CTG GTA, CMBP-*Sma* I: 5'-GTG CAC GAA TTC AGT CTG CGC GTC TTT CAG GGC TT, MITF-*Eco*RI (F): 5'-GGC GAA TTC ATG CTG GAA ATG CTA GAG TAC AGT C, MITF-*Sal* I(R): 5'-GGC GTC GAC CTA ACA TGC ATG CTC CGT TTC TG PCR 후에 pET 벡터의 *Eco*RI, *Sal*I 부위에 MBPek-MITF를 삽입하였다.

2.3. 재조합 융합 단백질 발현 및 분리

pETMBPek-MITF 벡터는 *Escherichia coli* BL21 (DE3)

를 이용하여 발현시켰다. 흡광도 600 nm에서 0.6일 때 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 최종농도 1 mM로 처리하여 단백질 발현을 유도하였다. 세포 배양액을 수거하여 6000 rpm에서 10 min간 원심분리하여 세포를 수집하고 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0의 완충액을 이용하여 세포를 현탁하여 부유시킨 후 초음파를 이용하여 5 s 간격으로 5 min간 세포 파쇄를 수행하였다. 파쇄된 세포는 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.9의 완충용액을 이용하여 soluble 분획을 수집하고 SDS-PAGE로 확인하였다. MBPek-MITF 단백질의 분리(주)바이오프로젠에 의뢰하여 수행하였다.

2.4. 이중 나선 DNA (E-box: CATGTG)의 제조

이중 나선 oligonucleotide는 MC1R promoter sequence 중 CATGTG 부분을 이용하였으며 (5'-CTCACGCCCCCGG CATGTGGCCGCC-3') Cy3로 표지하였다. 경쟁제로는 CATGTG 부분을 변형시켜 사용하였으며 (5'-CTCACGCCCCGGCTT GAGGCC-3')을 사용하였다. Cy3의 표지는 Bioneer (Korea)에서 수행하였다[3,5].

2.5. 유리 및 골드 기판의 수식화

단백질 칩 제작을 위하여 유리 및 골드 기판 위에 재조합된 융합 단백질을 고정화하기 위하여 기판 수식(modification)화를 하였다. 유리기판을 epoxy silanization을 위해 Baylor College of Medicine Microarray Core Facility의 방법으로 수행하였다. Epoxy silanization 된 유리기판은 0.1 M NaOH와 β -CD 70 mg/mL 용액 처리를 하여 40°C에서 20 h 후 1 M ethanolamine으로 37°C에서 3~4 h 처리하여 사용하였다. 골드 기판의 제조는 참고문헌의 방법을 이용하여 제조하였다[3,6].

2.6. Microarray

MBPek-MITF과 완충액(50 mM Tris, 20% (v/v) glycerol 혹은 ethylene glycerol, pH 8.0)을 혼합한 후 microarrayer를 이용하여 β -CD chip에 점적하였다. 사용된 단백질 핀과 microarrayer는 Proteogen (Korea)사의 제품을 사용하였으며 점적의 지름은 335 μ m가 되도록 하였다. 이 때의 습도는 70~80%이며 상온에서 수행되었으며 약 30 min간 MBPek-MITF를 결합 반응시킨 후 세척 완충액(20 mM Tris-buffer, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)과 증류수로 세척하였다.

Microarray 후 결합된 MBPek-MITF에 coverwell perfusion chamber를 이용하여 단백질-DNA 결합 반응을 유도하였으며, 이는 6 mM HEPES, pH 7.8, 40 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 6% glycerol, 0.25 mg/mL poly-dI-dC, 2% milk와 1 pmol의 DNA (E-box)를 혼합하여 처리하였다. 또한 경쟁제 역시 1 pmol 처리하여 확인하였다. 결

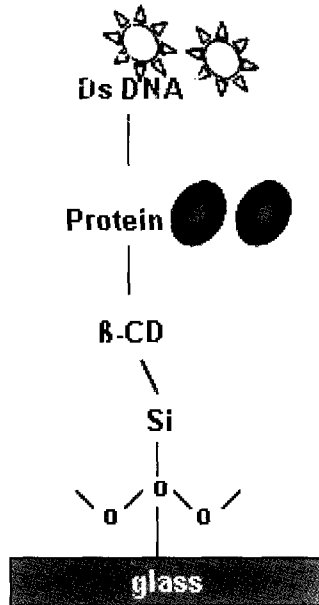


Figure 1. Schematic representation showing MBPek-MITF fusion protein binding to double stranded DNA on epoxy coated glass slide.

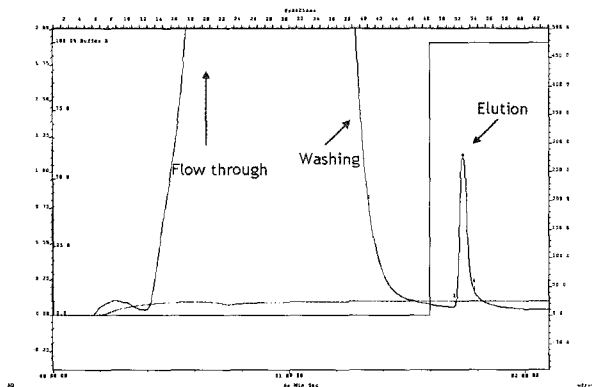


Figure 2. Chromatogram of affinity column chromatography packed with MBP excellose. (Bioprogene, Korea) Binding buffer: 20 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, elution buffer: 10 mM maltose in binding buffer, flow rate: 4 mL/min.

합 시간은 1 h으로 4°C에서 수행하였으며 결합 후 PBS와 PBST (1% Tween-20), PBS/Triton X-100을 이용하여 2번씩 수세하였다. 건조된 chip을 형광 scanner, SPR, SPRi를 이용하여 단백질과 DNA의 특이적 결합을 확인하였다.

2.7. Microarray 데이터 분석

Stealth pin (Model SMP-10, TeleChem)이 장착된 mi-

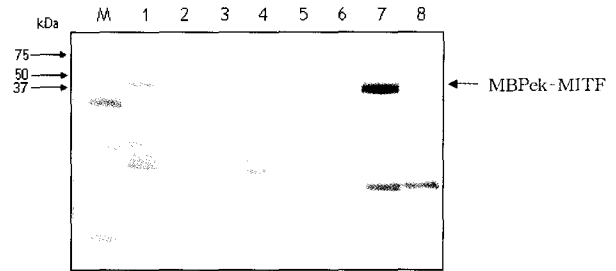


Figure 3. SDS-PAGE analyses of partially purified MBPek-MITF fusion protein: lane M, protein marker; lane 1, total fraction; lane 2, insoluble; lane 3, soluble fraction; lane 3, loading sample (in soluble fraction); lane 5, washing fraction; lane 6~7, elution fraction; lane 8, MBPek-MITF after ultrafiltration.

croarrayer (Proteogen, Korea)로 지름 335 μm로 점적하였다[6].

2.8. Surface Plasmon Resonance (SPR) 및 SPR 데이터 분석

SPR (Autolab Esprit, ecochemie, Netherlands)에 골드 기판을 올린 프리즘을 장치하고, 세척 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20)을 흘려주어 골드 기판 표면이 안정화된 후 실험을 수행하였다[6].

2.9. Surface Plasmon Resonance Image (SPRi) 및 SPRi 데이터 분석

150-W Quartz tungsten-halogen lamp (Schott, Germany), narrow interference filter (647.1 nm, Δλ = 1 nm; Oriel Instruments)가 장착된 SPRi 시스템 내의 프리즘 위에 실험이 완성된 골드 기판을 놓은 후, 1/2 inch charge coupled device(CCD) camera (Sony, Japan)에 의해 반사된 이미지를 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3. 1. MBPek-MITF의 발현 및 분리

본 연구에서는 기존의 GST-MITF를 β-CD chip을 적용하기 위해 MBP를 MITF에 융합시켰다. SDS-PAGE 결과 대부분의 MBPek-MITF는 용액 형태로 발현되는 것을 확인하였다(Figure 3). MBPek-MITF 단백질은 MBP excellose (Bioprogen, Korea)를 충진제로 하여 1.1 cm × 30 cm (Millipore, USA) 컬럼을 이용하였으며 완충액은 20 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4로 하고 이에 10 mM maltose를 포함한 것을 용출 완충액으로 이용하여 4 mL/min의 용출속도로 하여 분리하였다(Figure 2). 분리된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 확

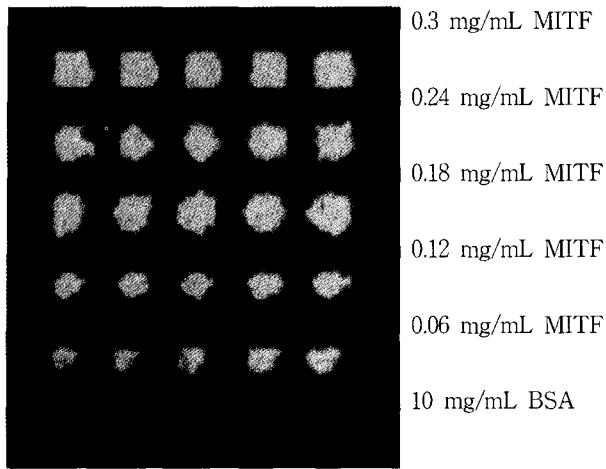


Figure 4. Fluorescence images analyses of MBPek-MITF fusion protein at different concentrations with target double stranded DNA to the array.

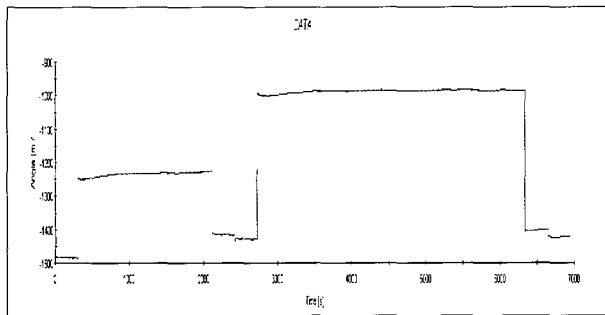


Figure 5. SPR analysis of real-time association rates for MBPek-MITF-DNA interactions.

인하였다(Figure 3).

3.2. 형광 표지 방법을 이용한 MBPek-MITF와 이중나선 DNA (E-box)의 특이적 결합

단백질 칩의 제작을 위하여 유리 기판 상에 MBPek-MITF 단백질의 고정화를 확인하였다. 단백질 및 대조구 (BSA, bovine serum albumine)를 각각 Cy3로 표지하여 확인한 결과, β -CD 기판 표면에 MBPek-MITF 이외의 BSA는 결합되지 않는 것을 확인하였다(data not shown).

단백질과 DNA와의 특이적 결합을 확인하기 위하여 MITFek-MITF를 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 mg/mL의 농도로 하여 기판 위에 고정화시키고 이에 이중나선 DNA (E-box)가 혼합된 용액을 처리한 결과 Figure 4에서와 같이 결합된 MBPek-MITF가 농도 의존적으로 목적 DNA와 결합함을 확인하였다. 총 6줄에 5개씩 점적하였으며 마지막 줄은 대조구로서 10 mg/mL의 BSA를 점적한 대조구에는 형광이 보이지 않는 것으로 보아 MBPek-

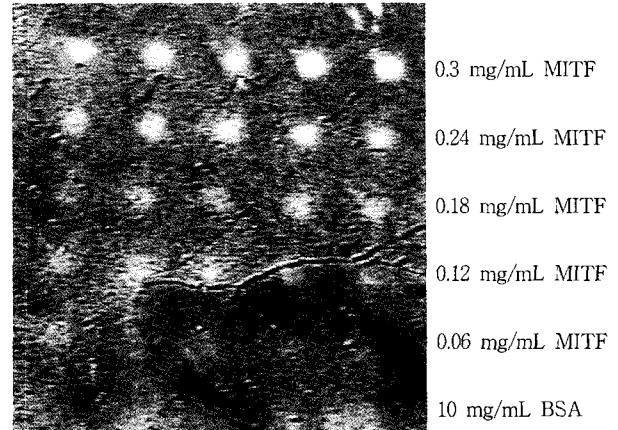


Figure 6. SPR imaging analyses of MBPek-MITF and target double stranded DNA.

MITF와 목적 DNA가 특이적으로 결합함을 확인하였다.

이는 DNA chip에서 필요로 하는 고순도의 단백질 정제가 필요하지 않으며 DNA-Chip에서 결합된 단백질을 확인하기 위해 항체를 사용하는 단점을 개선한 방법으로 적용 가능성을 확인하였다.

3.3. SPR 시스템을 이용한 MBPek-MITF와 이중나선 DNA (E-box)의 특이적 결합

골드 기판 위에 β -CD를 처리하고 MBPek-MITF 단백질의 고정화시킨 후 목적 DNA와의 특이적 결합을 SPR 시스템을 이용하여 확인하였다. SPR 시스템에서 MBPek-MITF 결합과 목표 DNA 결합 확인 결과 처음 baseline 보다 MBPek-MITF 처리 후 높아진 baseline으로 약 2 mg/mL의 MBPek-MITF의 결합을 확인하였다, 또한 목표 DNA가 약 1 pmol 결합된 것을 확인하였다. 또한 형광 방법을 이용한 실험 결과와 상응하게 SPR 시스템에서 약 10 mg/mL의 BSA를 처리하였으나 결합하지 못하는 것을 확인하였다. 이는 β -CD에 다른 단백질과 DNA의 비특이적 결합이 없음을 확인한 것이다(Figure 5).

본 SPR 시스템은 형광방법과는 달리 시료를 Cy3로 표지할 필요가 없고 단백질과 DNA 결합을 실시간으로 분석이 가능하나 동시다발적인 시료 분석이 불가능하다는 단점이 있다.

3.4. SPRi 시스템을 이용한 MBPek-MITF와 이중나선 DNA (E-box)의 특이적 결합

골드처리된 유리기판 위에 β -CD를 처리하고 MBPek-MITF 단백질을 고정화시킨 후 목적 DNA와의 특이적 결합을 SPRi 시스템을 이용하여 확인하였다.

측정 시료 수가 제한적이라는 SPR의 단점을 보완하고자 SPR에서의 결합을 이미지로 얻을 수 있는 SPRi 방법

을 이용하여 확인 결과 MBPek-MITF와 이중 나선 DNA의 결합을 확인하였다. 본 연구에서는 DNA를 Cy3로 표지하여 탐지 강도를 높여 농도 의존적으로 이중 나선 DNA의 결합을 확인하였다(Figure 6). 이는 SPRi 시스템은 microarray 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하지만 본 시스템에서는 골드 기판에 고정된 단백질이 0.3 mg/mL에서도 탐지 강도가 낮고 단백질과 결합하는 DNA 또한 탐지 강도가 낮아 이를 보완하기 위한 방법이 요구되기 때문이다.

4. 결 론

β -CD chip 표면을 이용한 유리 chip에서 MBPek-MITF와 특이적 결합을 형광 측정 방법을 이용하여 확인하였으며 대조구로 사용한 BSA 확인 결과 다른 단백질의 비특이적 결합을 하지 않는 것으로 확인하였다. 본 실험의 결과 단백질 칩에서 분리 정제를 거치지 않는 목표 단백질의 결합 적용 가능성을 확인하였으며 또한 Cy3로 표지된 DNA의 특이적 결합과 경쟁제의 84% 저해를 확인하였으며 SPR, SPRi로 실험한 결과 EMSA assay 방법 적용과 저해제 탐색에 HTS 시스템의 적용 가능성을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. T. Ellenberger, D. Fass, M. Arnaud, and S. C. Harrison, Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer, *Genes. Dev.*, **8**, 970 (1994).
2. H. Aoki and O. Moro, Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MCL1), *Life Sci.*, **71**, 2171 (2002).
3. J. M. Jung, Y. B. Shin, M. G. Kim, H. S. Ro, H. T. Jung, and B. H. Chung, A fusion protein expression analysis using surface plasmon resonance imaging, *Anal. Biochem.*, **330**, 251 (2004).
4. C. Levy, H. Nechushtan, and E. Razin, A new role for the STAT3 inhibitor, PIAS3: a repressor of microphthalmia transcription factor, *J. Biol. Chem.*, **277**, 1962 (2002).
5. M. L. Bulyk, X. Huang, Y. Choo, and G. M. Church, Exploring the DNA-binding specificities of zinc fingers with DNA microarrays, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 7158 (2001).
6. S. H. Baek, Y. B. Shin, M. G. Kim, H. S. Ro, E. K. Kim, and B. H. Chung, Surface plasmon resonance imaging analysis of hexahistidine-tagged protein on the gold thin film coated with a calix crown derivative, *Biotechnol. Biopro. Eng.*, **9**(2), 143-146 (2004).
7. 특허: MBP chip을 이용한 MITF 전사인자 저해제의 고속탐색방법 개발(특허출원중).