

## 디지토닌으로 투과성을 높인 Vero 76 세포의 포스포리파제 D 특성

고 은 희\*  
덕성여자대학교 화학과  
(2005. 7. 27 접수)

### Characterization of Phospholipase D Activity in Vero 76 Cells Permeabilized by Digitonin

Eun-Hie Koh\*  
Department of Chemistry, Duksung Woman's University, Seoul 132-714, Korea  
(Received July 27, 2005)

**요 약.** 포스포리파제 D의 활성은 세포막 교란을 포함한 다양한 세포신호전달 체계를 통해 조절되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에는 Vero 76 세포(원숭이 신장 상피세포)의 포스포리파제 D에 대한 디지토닌 영향을 검토하였다. Vero 76 세포의 포스포리파제 D는 디지토닌 농도가 30 µg/mL 조건에서 세포를 37°C에서 30분간 배양했을 때 그 활성이 약 9배 정도 증가하였다. 이 조건하에서 디지토닌에 의한 세포막의 투과성 증가는 형광 현미경으로 확인할 수 있었다. 디지토닌에 의해 유도된 포스포리파제 D의 활성은 EGTA에 의해 70% 이상 저해됨을 발견하였으며, 이와 함께 각종 단백질 키나제 저해물질들을 선처리 했을 때 PD98059와 Ro32-0432의 경우 디지토닌에 의해 야기된 포스포리파제 D의 활성이 크게 저해됨을 관찰할 수 있었다. 이들 저해물질의 결과는 단백질 키나제 C의 관여를 암시하며, 이는 PMA로 24시간 동안 처리한 세포에서 디지토닌의 영향이 상당 부분 막힌다는 것으로 재확인 할 수 있었다. 그 외 디지토닌 존재 하에서 Vero 76 세포의 생존능력을 조사했으며, 포스포리파제 D1과 D2를 Vero 76 세포에 발현시켜 그 포스포리파제 D에 대한 디지토닌의 영향을 검토하였다.

**주제어:** 포스포리파제 D, 디지토닌, Vero76 세포

**ABSTRACT.** Phospholipase D (PLD) activity is known to be modulated through cellular signaling pathways including membrane perturbation. In this study, we examined effect of digitonin on the PLD activity in monkey kidney epithelial Vero76 cells. At 30 µg/mL dosage of digitonin, the PLD activity was induced approximately 9 folds within 30 min at 37°C. Under the same condition the increased membrane permeability could be verified by fluorescence microscope. The digitonin-induced PLD activity was inhibited as much as 70% by EGTA and pretreatment with various protein kinase inhibitors such as PD98059 and Ro32-0432 significantly decreased the digitonin-induced PLD activity. The results of inhibitor studies suggest an involvement of protein kinase C. This finding was further verified by blocking digitonin effect by the pretreatment with PMA for 24 hours. Additionally we examined the viability of Vero76 cells under the digitonin influence and tested the digitonin effect on the Vero76 cells transiently transfected with PLD1 and PLD2 cDNAs.

**Keywords:** Phospholipase D, Digitonin, Vero76 cells

#### 서 론

세포를 둘러싸고있는 세포막은 주로 지질과 단백질로 구성된 달린 포대기같은 구조를 갖고 있다. 그러

나 지질은 유동적인 연속 이중막층을 이루고 있어 세포막의 동적성질을 가져오고 있다. 이들 세포막의 물리적성질의 변화는 세포에 포함된 단백질들에 영향을 미쳐 세포막 현상과 관련된 여러 생리에 영향을

미치는 것으로 알려져 있다. 즉 화학적이거나 물리적인 스트레스에 의한 세포막 교란은 각종 생화학적 현상을 유발시킨다는 실험적 증거들이 누적되고 있다. 예로써 세포막에 있는 지질 desaturase는 삼투압 변화에 의해 이 효소의 발현과 활성이 증가하여 세포막의 유동성이 증가되는 것으로 보고되었다.<sup>2</sup> 삼투압이나 UV에 노출된 HeLa세포는 성장요인이나 시토킨 수용체의 결집을 가져와 전사인자들의 유전자 발현을 촉진시키며 결과적으로 c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase를 활성화시킨다.<sup>3</sup>

더 직접적으로 세포막을 교란시킬 수 있는 계면활성제나 유기용매들은 세포막의 장력을 감소시키고 유사분열의 속도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이는 세포막의 변형이 주요한 세포생리에 조절자로 기능하고 있음을 추측케 한다. 세포를 연구하는 과정에서 세포막의 부과성을 증진시킬 필요성이 대두되며, 이 때 흔히 세포막 교란을 가져 올 가능성이 있는 디지토닌이나 필리핀 같은 계면활성제를 이용한다.<sup>4</sup> 디지토닌은 스테로이드그리코사이드로 대표적인 세포막 투과성물질로 알려져 있다. 디지토닌으로 처리된 세포는 ethidium bromide(EtBr)같은 작은 분자를 받아들이고 LDH를 포함 각종 세포내용물을 내놓는 것으로 알려져 있다.<sup>6</sup> 따라서 단순히 디지토닌을 세포막 부과성 증진물질로만 간주하는 것은 문제가 있다. 한 예로 디지토닌은 쥐 thymocytes의 phospholipase D(PLD)를 활성화시키고 있다.<sup>7</sup>

PLD는 여러 형태의 세포막 자극에 의해 활성화 되는 것으로 알려져 있다.<sup>8</sup> 가장 널리 알려진 활성화 경로는 G-protein과 연결된 수용체 티로신키나제가 있다. 두 번째 경로에 의한 PLD 활성화는 그 조절과정에 protein kinase C(PKC)와의 연계성을 시사하고 있다. 또 다른 조절과정은 phospholipase C(PLC)를 발현시켰을 때 생성된 diacylglycerol과 PKC가 함께 PLD활성을 증가시키고 있다. 최근에는 PLD의 활성이 PKC에 의한 인산화가 아니라 PKC와 PLD가 직접상호작용으로 가능하리라는 보고가 있다.<sup>9</sup>

이미 지적했듯이 디지토닌은 세포막을 교란시키므로써 여러 가지 세포생리현상에 영향을 미치고 있다. 본 연구에서는 X-ray에 의해 민감하게 PLD가 활성화되는 Vero76 세포주를 대상으로 디지토닌의 영향을 좀 더 체계적으로 접근하고자 한다. 실험방법으로 PLD 활성도측정은 방사성동위원소를 이용해 감도를 높였

고, 가능한 세포신호체계를 탐색하기 위해 각종 PKC 저해제를 검토하였다. 예측한대로 Vero76세포는 디지토닌에 의해 상당한 PLD활성을 보여주었으며 신호체계에는 PKC가 관여하는 것으로 추정되었다.

## 실 험

시약. [9,10-<sup>3</sup>H]palmitic acid (5mCi/mL)는 Dupont NEN (Wilmington, DEL)로부터 구입하였다. Phosphatidylbutanol(PBt)은 이미 보고된 실험과정에 따라 양배추 PLD를 이용하여 phosphatidylcholine으로부터 만들었다.<sup>10</sup> Digitonin, U731221-[6-((17β-3-methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione, PD98059와 SB203580은 Calbiochem (San Diego, CA)으로부터 구입했다. Bisindolylmaleimide (Ro32-0432), 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)와 genistein은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터, 그리고 Enhanced chemiluminescence (ECL) kit은 Amersham (Aylesbury, England)으로부터 구입했다. Cell culture mediums, DMEM, fetal bovine serum (FBS), Lipofect AMINE PLUS reagent, Dulbecco's phosphate-buffered saline은 Gibco BRL (Gaithersburg, MD)제품이다. Precoated silica gel TLC plate (Kieselgel 60 F254)는 Merck (Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용했다.

세포 배양과 방사성 동위원소 표지. 원숭이 신장 상피세포(Vero76)는 0.12 mg/mL penicillin G, 0.2 mg/mL streptomycin, 2 mg/mL sodium bicarbonate, 20 mM HEPES, pH7.3와 10% 열처리된 FBS를 추가한 DMEM 배양매체에서 길렀다. 세포는 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>와 95% 공기로 구성된 습기가 있는 대기에서 배양하였다. 방사성 동위원소 표지를 위해 Vero76 세포는 실험 하루전에 여섯개 웰이 있는 배양판에 옮겼으며, 한 웰에 0.3% BSA와 2 μCi/mL [<sup>3</sup>H]palmitic acid가 포함된 혈청 없는 매체를 넣고 37°C에서 3시간 동안 배양하여 표지 있는 phosphatidyl choline(PC)를 얻었다.

PLD 활성 측정. 방사성 동위원소로 표지된 Vero76 세포는 용액에 남아있는 [<sup>3</sup>H]palmitic acid를 제거하기 위해 DMEM 배양매체로 두번 씻어 사용했다. PLD 활성측정은 Lee 등이 기술한 방법에 따라 수행했다.<sup>11</sup> [<sup>3</sup>H]로 표지된 세포들은 DMEM(2 mg/mL sodium

bicarbonate, 20 mM HEPES, pH7.3)에 들어 있는 각종 아고니스크와 반응시켰다. 표준 배양조건은 37°C 30분으로 했으며, PLD 반응은 찬 1 mL methanol을 넣어 종결시켰다. 반응 지질은 2 mL의 chloroform과 0.8 mL의 0.1 N KCl를 넣고 격렬히 섞어서 추출했다. 지질을 포함한 아래쪽의 chloroform상은 조심스럽게 모아서 SpeedVac 진공원심분리기로 증발시켜 말렸다. 방사성 [<sup>3</sup>H]Phosphatidic butanol (PBt)를 검색하기 위해 따로 합성된 PBt를 추가로 넣고 마른 지질막을 chloroform으로 녹여냈다. 이들 지질들은 ethylacetate/isooctane/acetic acid/water (13:2:3:10:v/v) 혼합 전개용매를 이용하여 TLC판에서 분리하였다. 전개된 TLC 판은 요오드증기에 노출시켰으며 나타난 [<sup>3</sup>H]PBt 띠들(R<sub>f</sub> value: ~0.47)은 판에서 긁어냈다. 분리된 PBt는 ethanol/1 N HCl (100:1:v/v)로 용출시켜 그 방사성은 liquid scintillation counter로 읽었다. PLD 활성측정은 동시에 3번씩 했으며, 필요한 경우 이를 2번 또는 3번씩 반복했다.

**디지토닌으로 유도된 투과성 관찰.** Vero76 세포는 실험 하루전에 여섯개 웰 배양판에 준비했다. 이들 세포는 30 µg/mL digitonin 으로 37°C에서 30분간 처리한 후 10 µg EtBr를 넣고 형광 현미경 아래서 관찰하였다.

**세포 viability 검토(MTT 측정).** MTT 측정을 위해 Vero76 세포는 하루전에 96웰 배양판에 준비했다. 디지토닌 영향을 보기 위해 세포들은 37°C에서 일정시간 동안 일정량의 디지토닌을 처리하여 배양하였다. 정해진 배양시간 끝에 50 µL의 MTT(2 mg/mL) 용액을 각 웰에 넣고 배양판을 37°C에서 5시간동안 배양했다. 배양후 주사기와 주사바늘로 각웰의 매체를 제거했으며, 양극은 150 µL의 DMSO로 녹여냈다. 이 용액의 광학밀도는 분광광기기로 550 nm에서 읽었다.

**PLD 유전자 발현.** Vero76 세포에 PLD isoform cDNAs의 발현은 LipofectAMINE PLUS reagent 생산자의 프로토콜에 따라 행하였다. 간단히 요약하면 100 mm 배양접시에 70% 정도 채워진 세포를 4 µg의 DNA, 30 µL의 LipofectAMINE PLUS reagent, 그리고 20 µL의 PLUS reagent를 포함하고 혈청과 항생제 없는 6.5 mL의 DMEM 배양매체에서 4시간 동안 배양했다. 그런

이후 이 매체를 진공으로 빨아버리고 세포를 10% FBS를 포함하는 항생제 없는 DMEM 매체에서 다시 48시간 키웠다. 잠상적으로 PLD가 발현된 세포들은 DMEM 매체로 두번 씻어준 후 PLD 활성실험 등을 행했다.

## 결과 및 고찰

**디지토닌에 의한 PLD 활성.** Vero76 세포에서의 디지토닌영향을 보기 위해 [<sup>3</sup>H]palmitic acid로 표지된 세포를 0.3% n-butanol 존재하에서 디지토닌 양과 시간을 변화 시키면서 배양하였다. PLD 활성은 transphosphatidylation에 의해 형성된 [<sup>3</sup>H]PBt를 측정하여 결정하였다(Fig. 1). 디지토닌 첨가로 생성된 [<sup>3</sup>H]PBt는 30분 배양조건에서 디지토닌 양에 의존적이었으며 디

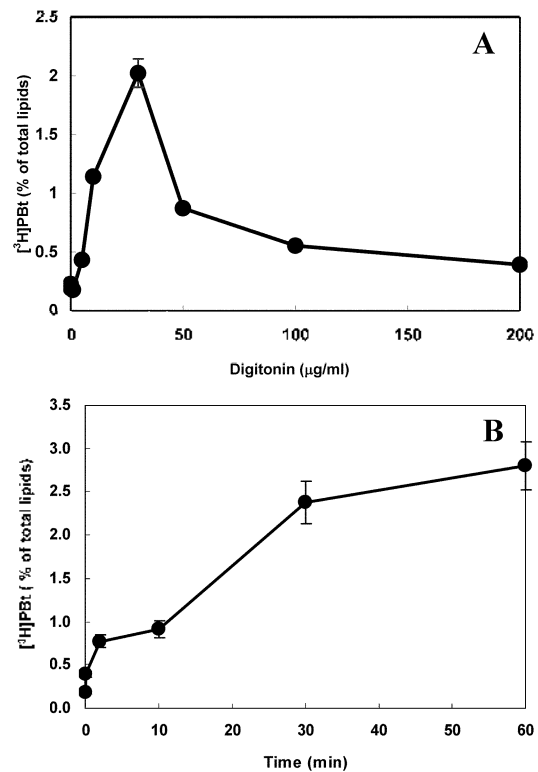


Fig. 1. Dose- and time-dependence of digitonin stimulated PLD activity in Vero76 cells. (A) The [<sup>3</sup>H]palmitic acid labeled Vero76 cells were treated with indicated dose of digitonin and incubated for 30 min in the presence of 0.3% of n-butanol; (B) cells treated with 30 µg/mL digitonin were incubated for indicated time.

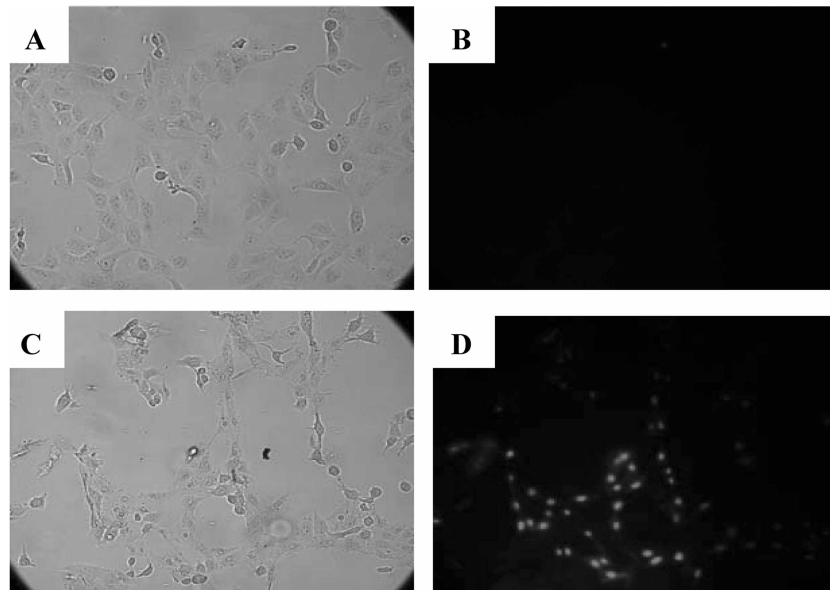


Fig. 2. Effect of digitonin on the morphology of Vero76 cells. The cells were visualized under the normal or fluorescence microscope with 10  $\mu\text{g}$  EtBr. (A) and (B), controlled Vero76 cells; (C) and (D) treated cells with 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  digitonin for 30 min at 37°C (B) and (D), the fluorescence visualization.

지토닌양이 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 일 때 거의 최고의 값을 보여주고 있다(Fig. 1A). 이 조건에서 지토닌에 의해 활성화된 PLD활성은 원래 Vero76세포에 있던 PLD 활성화보다 거의 9배 증가한 것이다. 이에 따라 시간변화에 대한 실험은 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 지토닌 농도에서 실행하였다. 시간에 따라 PLD활성은 60분까지 증가 하는 것으로 보였으나 30분 이후해서 증가폭이 줄어들어 가는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 이들 결과를 감안 하여 지토닌에 의한 PLD활성실험은 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  지토닌 농도 조건에서 30분간 배양하여 수행하였다.

**지토닌 유도 세포막투과성.** 지토닌에 의한 세포막 투과성을 관찰하기 위해 EtBr를 이용해 Vero76세포의 흡수여부를 검토하였다. 실험은 지토닌에 의해 PLD가 최고로 활성화되는 조건에서 Vero76세포의 모양을 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 2). 계면활성제 지토닌의 존재하에서 세포막의 투과성이 증가한 결과 세포내 EtBr에 의한 형광이 선명하게 나타났다(Fig. 2D). 이 조건에서 대부분의 세포에 EtBr이 부과 된 것으로 보여진다. 따라서 지토닌이 Vero76세포의 투과성을 높이는 과정에서 Vero76세포의 PLD가 활성화 된다고 사료된다.

**PLD활성화와 세포막 칼슘.** 칼슘은 여러 종류의 세포주에서 PLD활성을 좌우하는 주요한 조절인자로 알려져 있다.<sup>12</sup> 따라서 본 실험에서도 지토닌에 의한 PLD활성과  $\text{Ca}^{2+}$  사이의 관계를 검토하였다(Fig. 3). 지토닌 효과는 2 mM EGTA로 세포막  $\text{Ca}^{2+}$ 를 제거하면 PLD활성화가 현저하게 줄어들었다. 이 결과는 세포막 칼슘이 지토닌에 의한 PLD 활성화에 주요

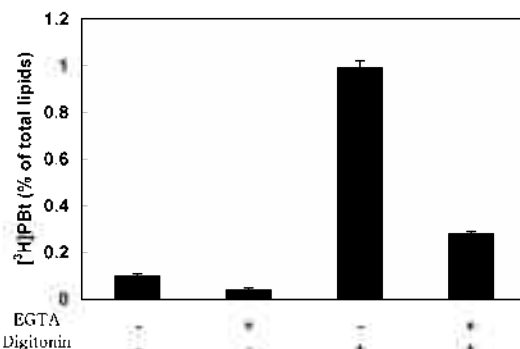


Fig. 3. Effect of extracellular calcium on the PLD activity by digitonin. The [<sup>3</sup>H]palmitic acid labeled Vero76 cells were preincubated with EGTA (2 mM) and then incubated for 30 min in the presence of 0.3% n-butanol after digitonin treatment.

한 역할을 한다는 것을 보여주고 있다.

**단백질 키나제 저해제들의 영향.** 디지토닌에 의한 PLD활성화가 어떤 세포신호전달체제와 관련 있는가를 알기위해 Vero76 세포를 각종 단백질 키나제 저해제로 처리하였다. Fig. 4에서 보여주듯이, PD98059 (MEK 저해제), SB203059 (MAPK 저해제)과, Ro32-0432 (PKC 저해제)은 상당한 저해 효과를 보여주었으나, wortmannin(P13-kinase저해제)과 genistein(protein tyrosine kinase저해제)은 별 효과가 없는 것으로 나타났다. 이 키나제저해제의 효과 중 특히 PKC저해제인 Ro32-0432가 가장 효과적이었으며, 이는 PKC가 PLD활성과 직접적인 관계가 있다는 보고와 일치하고 있다.<sup>13</sup> 한편 더 자세한 연구에서는 PLD가 PKC에 의해 serine/threonine 잔기가 인산화 된다는 것을 보여주고 있다.<sup>14</sup> 그 외 MEK와 MAPK 저해제의 영향으로 보아 디지토닌에 의해 유도된 PLD의 활성화는 여러 종류의 세포신호전달체제가 연관되어 있을 가능성을 배제할 수 없다.

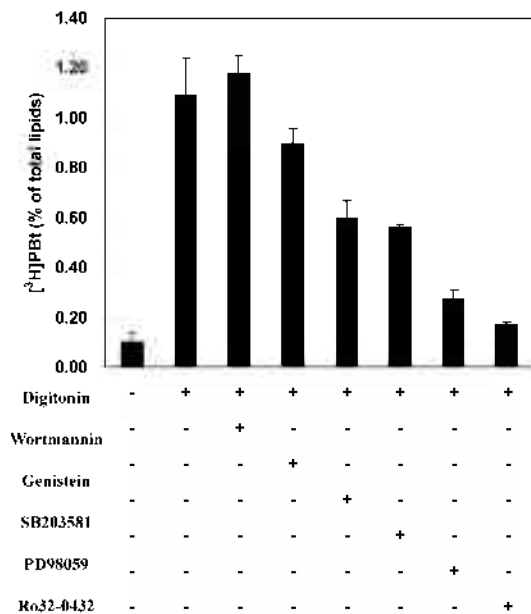


Fig. 4. Effect of kinase inhibitors on the digitonin-stimulated PLD activity in Vero76 cells. The [<sup>3</sup>H]palmitic acid labeled cells were preincubated with PD98059 (25 μM), SB 203581 (10 μM) for 1 h in the presence of 0.3% of n-butanol after 30 μg/ml, digitonin treatment. The preincubation time for Wortmannin (10 μM), Ro32-0432 (10 μM), Genistein (100 μM), U73122 (10 μM) were 30 min.

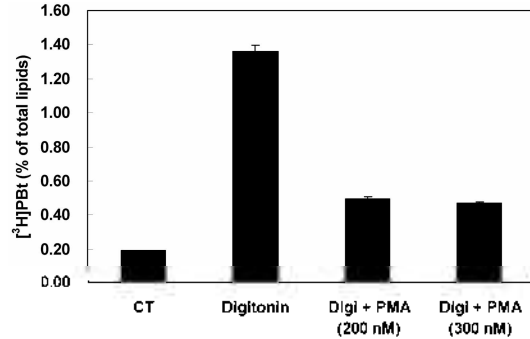


Fig. 5. Effect of PKC down regulation with PMA on digitonin-stimulated PLD activity in Vero76 cells. The [<sup>3</sup>H]palmitic acid labeled cells were preincubated with PMA for 24 h and then incubated for 30 min in the presence of 0.3% n-butanol after digitonin stimulation (30 μg/ml).

**PMA로 처리한 Vero76세포의 디지토닌 영향.** 세포전달체제에서의 PKC참여 여부는 phobol ester(PMA)로 장시간 처리한 세포에서의 PKC변화를 살펴봄으로써 가능하다고 알려져 있다.<sup>15</sup> 디지토닌 처리로 야기된 PLD신호체제에 PKC의 관여를 확인하고자 PMA를 가지고 PKC 하향조정을 시도 하였다(Fig. 5). 기대했던대로 PMA로 처리한 Vero76세포의 디지토닌으로 유도된 PLD의 활성화는 60%이상 줄어들었다. 이 결과는 디지토닌으로 활성화된 PLD의 신호전달과정에 PKC가 포함된다고 볼 수 있으나, 그 감소 정도보다 다른 신호전달과정도 무시할 수 없는 것으로 보인다.

**세포 생존능력과 디지토닌.** 디지토닌에 의한 PLD 활성화실험 중에서 디지토닌에 의해 세포의 투과성이 증가하므로 그 세포의 생존능력을 확인 할 필요성이 있다. 이를 위해 MTT를 이용한 세포생존능력 (viability)을 검토하였다. Fig. 6에 나타났듯이 30분 배양시 30 μg/ml 디지토닌 농도에서 약 54%의 생존능력을 보여주고 있다. 그리고 50 μg/ml 디지토닌 농도에서는 30분 이내에 70%가량의 세포가 생존하지 못하는 것으로 나타났다. Fig. 1과 비교해 볼 때 30 μg/ml 디지토닌 농도가 훨씬 많은 PLD활성을 보여주는 것으로 보아 생존하지 못한 세포는 PLD활성화에 기여하지 못하는 것으로 판단된다.

**발현된 PLD의 디지토닌 영향.** 디지토닌에 의한 PLD활성화 효과가 세포에 내재한 PLD에만 국한된

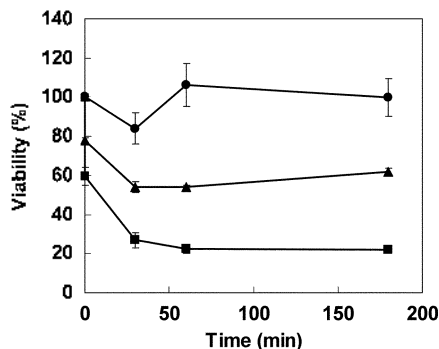


Fig. 6. Identification of cell viability through the MTT assay. Results are expressed as percentage of control. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of at least three experiments. Concentrations of digitonin were (●) 0, (▲) 30, (■) 50  $\mu$ g/ml.

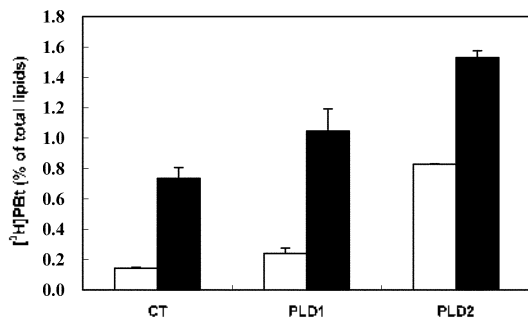


Fig. 7. Effect of digitonin on the PLD activity of Vero76 cells expressing PLD isoforms. The transient transfection of 4  $\mu$ g PLD1, PLD2 cDNAs was conducted by using LipofectAMINE PLUS reagents into Vero76 cells. Labeled cells were stimulated by 30  $\mu$ g/mL digitonin for 30 min at 37°C. PLD activity was measured by determining the formation of [ $^3$ H]Pbt from the cells labeled with [ $^3$ H]palmitic acid in the presence of 0.3% n-butanol. □ Digitonin (0  $\mu$ g/ml), ■ Digitonin (30  $\mu$ g/ml).

것인지 확인하기 위하여 PLD cDNA를 Vero76세포에 발현시켜 디지토닌 효과를 검토하였다. 발현시킨 PLD 1은 사람의 것이고 PLD 2는 생쥐 것으로 Lipofect AMINE PLUS reagent를 이용하여 발현시켰다. 발현된 정도는 Western blotting으로 검토하였으며, 외부 PLD가 발현된 이들 세포의 디지토닌에 의한 PLD활성화는 Fig. 7에 나타났다. PLD 2가 발현된 Vero76세포에서는 약 4배의 활성화가 나타났으며 PLD 1의 경우에는 약 1.4배의 활성화가 나타났다. 이들 결과는 발현된 PLD도 활성화됨을 보여 주고 있으나 그 활성화 정도는 내재한 PLD보다 적은 것으로 판단된다. 그

리고 이 실험 결과로는 어떤 PLD동위효소가 더 디지토닌에 민감한가라는 질문에 해답을 주지 못하고 있다.

본 실험은 Vero76 세포의 PLD가 세포막의 부과성을 증진시키는 디지토닌에 의해 크게 증가함을 보여 주고 있다. 이 활성화된 PLD의 특성은 세포막 칼슘에 의존적이며 세포 신호전달체계에서 PKC와 연계되어있는 것으로 추정된다. 그리고 다량의 디지토닌 처리는 세포의 생존능력을 감소시키며 이 또한 PLD 활성화를 감소시키는 것으로 나타났다. 세포막교란에 의한 PLD 활성화와 이와 연관 맺은 것으로 추정되는 세포신호전달 과정은 좀 더 철저한 연구가 필요하다. 이들 Vero76세포의 디지토닌 결과들은 흔히 디지토닌을 세포막투과성 증진의 목적으로 사용하는 것에 대한 경중으로 받아들여져야 된다.

본 연구는 2004년도 덕성여자대학교 자연과학연구소 연구지원비에 의하여 이루어졌으며, 방사성 동위원소를 이용한 실험은 서울대학교 대학원 화학부 생화학 실험실 권혜영의 도움을 받았다.

## 인용문헌

1. Singer, S.J.; Nicolson, G.L. *Science*. **1972**, *175*, 720.
2. Los, D. A.; Murata, N. *Science's stke*. **2000**, *62*, 1.
3. Rosette, C.; Karin, M. *Science*. **1996**, *274*, 1194.
4. Raucher, D.; Sheetz, M. P. *J. Cell Biol.* **1999**, *154*, 535.
5. Park, H.; Go, Y. M.; St. John, P. L.; Maland, M. C.; Lisanti, M. P.; Abrahamson, D. R.; Jo, H. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32304.
6. Vitale, M. L.; Castillo, R. D.; Trifaro, J.-M. *J. Neurochem.* **1992**, *59*, 1717.
7. Lee, Y. K. M.S. dissertation, Department of Chemistry, Seoul National University. **1998**.
8. Exton, J. H. *Biochim Biophys Acta*. **1994**, *1212*, 26.
9. Exton, J. H. *FEBS Letters*. **2002**, *531*, 58.
10. Jung, K.; Koh, E.; Choi, M-U. *Bull. Korean. Chem. Soc.* **1989**, *10*, 585.
11. Lee, S.Y.; Park, N.G.; Choi, M-U. *FEBS Lett.* **1998**, *432*, 50.
12. Exton, J. H. *Physiol. Rev.* **1997**, *77*, 303.
13. Min, D. S.; Kim, E. G.; and Exton, J. H. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 29986.
14. Kim, Y.; Han, J.M.; Han, B. R.; Lee, K. A.; Kim, J. H.; Lee, B. D.; Jang, I. H.; Suh, P. G.; Ryu, S. H. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 13621.