

## 대장균과 포유류 세포 내에서 parkin의 발현 양상에 관한 연구

남민경<sup>1,2</sup> · 박혜민<sup>3</sup> · 최주연<sup>2</sup> · 박효진<sup>2,3</sup> · 정광철<sup>4</sup> · 강성민<sup>3</sup> · 임향숙<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>가톨릭대학교 생명과학과, <sup>2</sup>분자유전학연구소, <sup>3</sup>고려대학교 생명과학대학 생명과학부, <sup>4</sup>연세대학교 이과대학 생물학과

Received October 13, 2005 / Accepted November 29, 2005

**The Expression Patterns of Human Parkin in *E. coli* and Mammalian Cells.** Min-Kyung Nam<sup>1,2</sup>, Hye-Min Park<sup>3</sup>, Ju-Youn Choi<sup>2</sup>, Hyo-Jin Park<sup>2,3</sup>, Kwang Chul Chung<sup>4</sup>, Seongman Kang<sup>3</sup> and Hyangshuk Rhim<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Department of Biomedical Sciences, <sup>2</sup>Research Institute of Molecular Genetics, the Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea, <sup>3</sup>School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, <sup>4</sup>Department of Biology, College of Sciences, Yonsei University, Shinchon-dong 134, Seodaemun-gu, Seoul 120-749, Korea – Parkin, known as an E3 ubiquitin ligase, has essential role in protein quality control, and its severe dysfunction leads to neurodegenerative disorders. Human Parkin was excessively degraded when expressed in *Escherichia coli* under the conventional induction condition (37°C culture condition with 0.5 mM IPTG). To optimize the induction and culture conditions for recombinant human Parkin and develop a rapid method for the Parkin purification, we expressed Parkin by using pGEX system at the different culture temperatures and IPTG concentrations. The intact Parkin protein was purified to approximately 90% purity with suitable amounts of protein under the optimal culture condition (25°C with 0.01 mM IPTG). Additionally, we constructed various parkin plasmids with different tagging systems and investigated their expression patterns in HEK293 cells. We found that the proteolytically sensitive site is localized within a ubiquitin-like domain of Parkin. This study develops a method for generating useful reagents to investigate biochemical properties of Parkin.

**Key words** – Parkin, pGEX 발현 시스템, Protein quality control, PEST sequence

Protein quality control은 chaperone과 protease들의 작용으로 세포내 단백질들의 활성이나 운명을 조절하는 역할에 의해 이루어지고 있다. Chaperone은 새로 만들어지는 단백질들의 정확한 구조형성을 돕는 역할을 하는 반면, protease들은 여러 과정들의 오차로 생겨난 비정상적인 단백질을 제거하는 역할을 한다[1-6]. 단백질 분해 과정 중 다단계로 이루어지는 ubiquitination은 E1, E2, E3 효소들의 복합적인 상호관계를 거쳐 분해하고자 하는 단백질에 4개 이상의 ubiquitin들을 결합시키는 과정으로, ubiquitin이 결합된 단백질들은 궁극적으로 proteasome에서 제거된다[3,4].

Protein quality control의 비정상적 작동이 퇴행성 뇌질환의 주원인들 중의 하나로 간주된다. 특히 E3 ligase들의 이상이나 ubiquitin proteasome system (UPS)의 비활성화로 인해 단백질의 aggregate들이 축적되어 신경세포의 손상을 일으킴으로써 퇴행성 뇌질환이 유발되기도 한다[1,7]. 하나의 E3 ligase인 Parkin은 파킨슨병의 주요 원인 유전자로 알려져 있는 동시에 polyQ 이상 질환에서 세포를 보호하는 역할을 한다는 보고가 있다[8-11]. Parkin은 465개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 분자량이 52 kDa인 단백질이다. Parkin의 N-말단에 1~76 아미노산의 ubiquitin-like domain (ULD)이 있

고, 현재까지 그 기능이 잘 알려지지 않은 central domain (145-232 아미노산)과 C-말단에 두 개의 RING finger domain (237-449 아미노산)이 존재한다[12].

퇴행성 뇌질환의 발병기전을 분자생물학적 측면에서 이해하기 위해 Parkin에 의해 ubiquitination 되는 기질 및 Parkin과 상호작용하는 단백질들을 탐색하는 연구들이 진행되고 있다[13-18]. 그러나 Parkin과 상호작용하는 단백질이나 Parkin의 기질에 대한 생화학적, 생리학적 측면에서의 기능 연구는 아직까지 상당 부분 수행되지 않은 상태이다. Parkin과 상호작용하는 단백질들과 기질에 대한 연구가 생화학적, 분자생물학적 측면에서 이루어진다면 퇴행성 뇌질환의 발병기전을 분자 수준에서 밝혀나갈 수 있을 것이다.

Parkin과 상호작용하는 단백질들과 Parkin과의 관계를 in vitro에서 연구하기 위해서는 Parkin을 다량으로 발현, 정제할 수 있는 시스템이 필요하다. 또한, 포유류 세포에서 Parkin의 발현양상과 기능을 연구하기 위해서 Parkin을 발현할 수 있는 시스템을 구축할 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 pGEX vector를 이용하여 대장균 내에서 Parkin을 overexpression 하고 affinity column method로 정제하여 순도 높은 Parkin 단백질을 다량 얻을 수 있는 적정 조건을 확립하였다. 또한 Parkin의 발현을 용이하게 확인할 수 있도록 HA나 Myc tagging 시스템을 이용한 vector들을 제작하여 HEK293 세포에서 Parkin의 발현양상을 비교 분석하였다.

### \*Corresponding author

Tel : +82-2-590-2390, Fax : +82-2-532-0575

E-mail : hrhim@catholic.ac.kr

## 재료 및 방법

### Plasmid 제조

대장균에서 GST에 fuse된 Parkin을 발현하기 위해 pGEX4T-1 (Amersham Pharmacia Biotech.) (GenBank account number U13853) 시스템을 이용하였다. pcDNA3.1(+)-Myc-parkin [11]을 *Bam*HI과 *Sac*I으로 절단하여 아미노산 1~301을 포함하는 parkin cDNA를 얻어 pBluescriptII KS+ (*Bam*HI과 *Sac*I으로 절단)에 cloning하여 pBS-Parkin (1-301)이라고 명명하였다. pcDNA3.1(+)-Myc-parkin을 template로 하여 parkin-294F primer (GCGCGAATTCGCCATGCCCAACTCCTGATT)와 parkin-465R primer (GCGCGTCGACCTACACGTCGAACCAGTGGTC)를 이용하여 아미노산 294~465를 포함하는 parkin cDNA를 PCR로 증폭하였다. 증폭한 parkin fragment를 *Eco*RI과 *Sal*I으로 절단하여 pBluescriptII KS+ (*Eco*RI과 *Sal*I으로 절단)에 cloning하여 pBS-Parkin (294-465)를 얻었다. pBS-Parkin (1-301)을 *Eco*RI과 *Sac*I으로 절단한 fragment와 pBS-Parkin (294-465)를 *Sac*I과 *Sal*I으로 절단한 fragment를 동시에 pBluescriptII KS+ (*Eco*RI과 *Sal*I으로 절단)에 cloning하여 pBS-Parkin (1-465)를 제작하였다. pBS-Parkin (1-465)를 *Eco*RI과 *Sal*I으로 절단하여 아미노산 1~465를 포함하는 parkin cDNA를 얻어 pGEX4T-1 (*Eco*RI과 *Sal*I으로 절단)에 삽입하여 pGST-Parkin을 제작하였다.

포유류 세포에서 Parkin을 발현시키기 위해 CMV promoter가 존재하는 expression vector인 pcDNA 3.0 (Invitrogen)을 변형하여 이용하였다. C-말단에 HA를 tagging한 Parkin-HA (C-HA로 표기), N-말단에 myc을 tagging한 Myc-Parkin (N-Myc로 표기), 양쪽 N-말단과 C-말단에 HA로 tagging한 Parkin (HA-HA 표기), N-말단은 Myc, C-말단은 HA로 tagging한 Parkin (Myc-HA로 표기)을 제작하였다. N-Myc은 pcDNA3.1(+)-Myc-parkin [11]을 사용하였고, Myc-HA는 Myc-Parkin-FLAG에서 *Xho*I과 *Xba*I으로 절단함으로써 Parkin-FLAG이 없어진 pcDNA-Myc vector에 pBS-Parkin-HA (*Xho*I과 *Xba*I로 절단)에서 나온 Parkin-HA fragment를 cloning하여 제작하였다. HA-HA는 pcDNA-HA 4T-1 (*Bam*HI과 *Xba*I로 절단) expression vector에 Parkin-HA fragment를 cloning하여 제작하였다.

### GST-Parkin 단백질 발현 및 정제

GST-Parkin fusion 단백질을 대장균에서 발현하기 위해 pGST-Parkin을 protease deficient strain인 *Escherichia coli* BL21에 transformation하였다. 대장균을 37°C 또는 25°C에서 16 시간 배양한 후, ampicillin을 포함하는 LB 배지에 10%로 접종한 후 90 분 더 배양하였다. 최종 농도가 0.01, 0.1, 0.5 mM 되게 isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG)를 첨가하여 GST-Parkin 단백질의 발현을 유도하였다. 수확한

대장균 세포들은 EBC lysis buffer (0.5% NP-40, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 120 mM NaCl)에 suspension한 후 sonication으로 세포를 파쇄 하였다. 세포파쇄 용액을 4°C에서 14,400  $\times$ g로 15 분간 원심 분리하여 불용성의 세포 찌꺼기를 침전시켰다. 분리된 상층액은 EBC lysis buffer로 2번 씻은 Glutathione Sepharose 4B bead (Amersham Pharmacia Biotech)와 함께 혼합하였다. 혼합물은 상온에서 20 분간 반응시킨 후 14,400  $\times$ g에서 1 분간 침전시켰다. NETN buffer (1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.05% SDS)로 4번 씻어주고 SDS-lysis buffer를 첨가해 준 후 3 분간 끓인다. 이를 15% SDS-polyacrylamide gel에 걸어서 전기영동을 하고 Coomassie staining solution (0.1% Brilliant blue R, Sigma, 45% methanol, 10% acetic acid)으로 20 분간 염색시킨 후 destaining solution (10% methanol, 10% acetic acid)으로 씻어내어 단백질 밴드를 확인하였다.

### 세포 배양 및 immunoblot assay

HEK293 세포는 10% (v/v) fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin과 50  $\mu$ g/ml streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle minimum essential medium (DMEM) (Invitrogen)에 5% CO<sub>2</sub> 상태로 37°C에서 배양하였다.

포유류 세포에서 발현되는 plasmid는 LipofectAMINE reagent (Invitrogen)를 사용하여 HEK293 세포에 transfection하였다. 세포에 DNA를 transfection하여 24 시간 경과한 후 세포를 harvest하여 배지를 제거하고 RIPA buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate)로 30 분간 얼음에 놓아서 세포를 용해시킨 후 14,400  $\times$ g에서 30 분간 원심분리 하여 세포 찌꺼기를 제거하였다. 상층액은 새 튜브에 옮긴 후 Protein assay solution (BioRad)을 이용해서 단백질 농도를 측정하고 15  $\mu$ g의 단백질을 15% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 옮겨 immunoblotting을 실시하였다. HA (Santa Cruz), Myc (Santa Cruz), polyclonal Parkin (Cell Signaling Technology) antibody와 반응시킨 다음 secondary antibody로 antigen-antibody complex와 반응시킨 후 ECL (Amersham Pharmacia Biotech.)로 밴드를 확인하였다.

## 결 과

### GST-Parkin을 발현하는 plasmid 제조와 대장균에서의 발현

단백질들의 기능을 in vitro에서 생화학적인 방법으로 연구하기 위해서는 특정 단백질을 대장균에서 다량으로 발현, 정제할 수 있는 시스템이 필요하다. 대장균에서 Parkin을 다량으로 발현, 정제하기 위해 human parkin cDNA를 pGEX4T-1

expression vector에 cloning하여 *Escherichia coli* BL21 strain에서 GST-Parkin fusion 단백질을 발현하였다(Fig. 1). ExPASy (Expert Protein Analysis System, [http://ca.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html))에서 이론적으로 계산한 Parkin의 분자량은 약 51,651 Da이며, glutathione S-transferase (GST)의 분자량은 27,898 Da이므로 pGEX-Parkin으로부터 약 79,500 Da 크기의 GST-Parkin 단백질의 발현을 예상할 수 있다. 배양온도 37°C에서 0.5 mM IPTG (일반적인 배양조건)로 단백질의 발현을 유도한 후, Gultathione Sepharose 4B bead를 이용하여 친수성의 대장균 lysate로부터 GST-Parkin 단백질을 정제하여 발현양상을 비교 분석하였다(Fig. 1). pGEX 시스템을 이용하여 37°C 배양온도에서 0.5 mM IPTG로 단백질의 발현을 유도하면, 대장균에서 안정성이 높은 단백질들은 1 리터 대장균 배양액 당 10 mg 이상의 GST-fusion 단백질로 순수하게 회수할 수 있다[19]. 그러나 GST-Parkin의 경우 79 kDa 외에도 30 kDa과 45 kDa 사이에서 여러 밴드들이 나타났으며, 79 kDa의 GST-Parkin 단백질보다는 38 kDa 크기의 단백질 fragment가 더 많은 양 관찰되었다(Fig. 1B, lane 5).

**대장균 내에서 GST-Parkin 발현을 위한 적정 조건 정립**

상기의 결과로 일반적으로 사용되는 배양 및 단백질 유도 조건(37°C 배양온도와 0.5 mM IPTG)에서는 GST-Parkin이 쉽게 분해되어 완전한 크기의 단백질로 정제하는 것이 용이

하지 않음을 알 수 있다. 대장균 시스템에서 분해되지 않고 순도 높은 Parkin 단백질을 얻기 위해 단백질의 발현 유도를 위한 적정조건을 정립할 필요가 있다. 이를 위해 여러 배양 온도와 IPTG 농도에서 GST-Parkin 단백질을 발현하여 정제하였다(Fig. 2). 일반적으로 사용되는 조건인 37°C에서 90 분간 배양하고 37°C에서 90 분간 여러 농도의 IPTG (0.01, 0.1, 0.5 mM)로 GST-Parkin 단백질의 발현을 유도하였다(Fig. 2A). Glutathione Sepharose 4B bead로 단백질을 정제하여 GST-Parkin 단백질의 양을 15% SDS-PAGE로 비교하였다. 그 결과 0.01 mM의 IPTG 농도에서는 1 ml 대장균 배양액 당 250 ng의 GST-Parkin (79 kDa)을 확인할 수 있었으나, 0.1 mM과 0.5 mM의 IPTG 농도에서는 5배 더 적은 50 ng을 관찰할 수 있었다. 또한, 이 조건에서 72 kDa 외에도 29, 30, 38, 40, 43, 45 kDa 크기의 6개 밴드가 더 나타났다. 특히, 38-kDa fragment는 1 ml 대장균 배양액 당 500 ng으로 72 kDa 크기의 GST-Parkin보다 10배 더 많은 양을 gel 상에서 확인할 수 있었다.

배양온도 37°C에서 90 분간 키워 충분한 양의 대장균을 확보한 뒤, 단백질의 안정성을 높이기 위해 온도를 25°C로 낮추어 여러 농도의 IPTG로 GST-fusion 단백질의 발현을 유도하였다(Fig. 2B). 그 결과 72 kDa 크기의 GST-Parkin은 IPTG의 농도에 대해 큰 영향 없-1 ml 대장균 배양액 당 250 ng의 단백질을 정제할 수 있었으나, 0.1 mM과 0.5 mM 농도

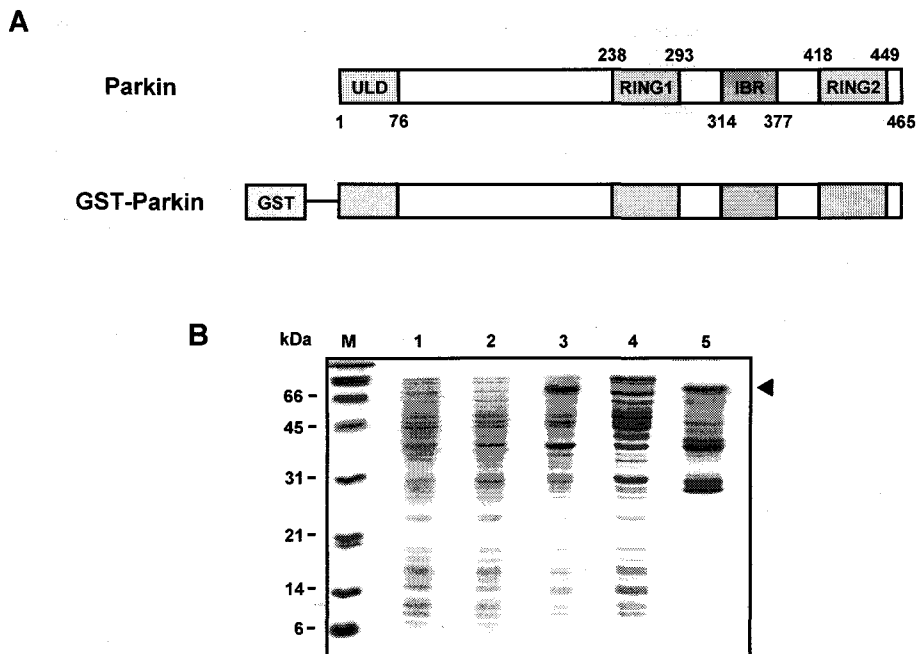


Fig. 1. Expression of GST-fusion proteins in *E. coli*. **A.** Schematic diagram of human Parkin. Parkin consists of functional domains: ULD, ubiquitin like domain, RING1, really interesting new gene, IBR, in-between RING, and RING2. **B.** Expression of GST-Parkin under general induction condition. Lane M, molecular weight standard marker; total cell lysates of *E. coli* before (lane 1) or after (lane 2) IPTG induction; lane 3, total soluble lysates; lane 4, precipitation fraction; and lane 5, GST-Parkin bound to Glutathione Sepharose 4B bead. Arrowhead indicates GST-Parkin.

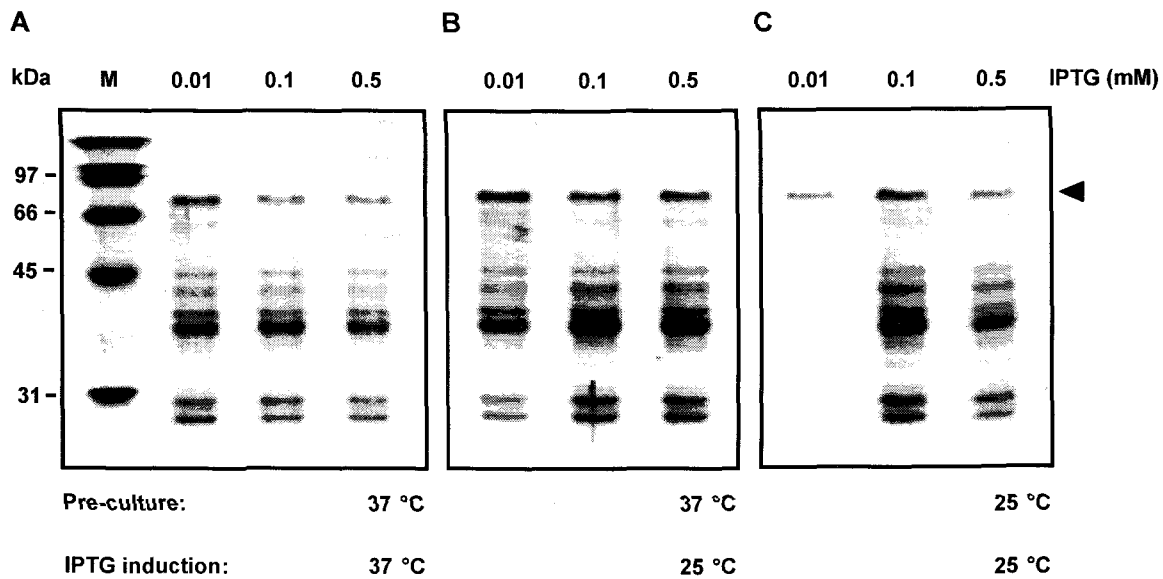


Fig. 2. An optimal condition for Parkin expression in *E. coli*. Bacteria harboring the GST-Parkin plasmid were cultured for 90 min at the indicated temperatures and then induced by various concentrations of IPTG for 90 min at different temperatures. GST-Parkin purified by Glutathione Sepharose 4B bead was resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue. Lane M, molecular weight standards.

의 IPTG에서 38 kDa과 40 kDa의 단백질 fragment들은 0.01 mM 농도에서 보다 10배 더 많은 2.5 µg의 단백질 양을 확인할 수 있었다. 상기의 조건에서 단백질 분해가 증가되므로 배양조건도 25°C로 낮추어 발현한 결과 0.01 mM IPTG 유도 조건에서는 분해된 fragment 없이 순수한 79 kDa의 GST-Parkin만을 1 ml 대장균 배양액 당 50 ng을 얻을 수 있었다(Fig. 2C, lane 1). 따라서 고온의 배양온도와 고농도의 IPTG가 Parkin 단백질의 안정성에 크게 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

**HEK293 세포 내에서 Parkin의 발현양상 분석**

정상적인 folding 과정과 posttranslational modification이 특정 단백질의 생리적 기능에 결정적인 역할을 할 경우, 이 특정 단백질을 포유류 세포에서 발현시켜 기능을 분석할 수 있는 시스템 구축이 필요하다. 그러나 현재까지는 Northern blot과 RT-PCR 또는 immunohistochemistry를 통해 mouse, rat, human 뇌에서 parkin mRNA나 단백질의 발현양상을 비교하는 연구들이 진행되고 있을 뿐[20,21,22], 포유류 세포 내에서 Parkin의 발현과 기능을 분자 수준에서 규명할 수 있는 시스템은 거의 확립이 되어있지 않은 실정이다.

대장균에서 발현되는 human Parkin은 매우 불안정하여 50% 이상 분해되는 것을 관찰할 수 있는데, 이런 분해현상이 포유류 세포에서도 나타나는 지를 조사하기 위해 HEK293 세포에서 Parkin의 발현양상을 비교분석하였다. 먼저 HEK293 세포에서 발현되는 Parkin을 쉽게 확인하고자 N-말단과 C-말단에 Myc이나 HA를 tagging한 Parkin을 발현할 수 있는

각종 expression plasmid들을 제작하였다(Fig. 3). 각 plasmid를 HEK293 세포에 transfection한 후 HA, Myc, 또는 Parkin antibody로 Parkin의 발현을 확인하였다(Fig. 4). HA antibody로 immunoblot을 한 결과 N-말단 또는 C-말단을 HA로 tagging한 Parkin에서 58 kDa 크기의 밴드가 주로 확인되었다. 대장균에서처럼 여러 fragment들이 관찰되지는 않았지만, 58 kDa 밴드 외에 48 kDa 위치에서 또 다른 fragment를 확인할 수 있었다(Fig. 4A, lanes 2-4, 위). Parkin의 N-말단에 존재하는 Myc tag를 인지하는 Myc antibody로 immunoblot을 한 결과 58 kDa의 Parkin 밴드만 나타나고 48 kDa의 밴드는 관찰되지 않았다(Fig. 4A, lanes 1과2, 아래).

상기에서 관찰되는 48-kDa fragment가 Parkin 인지 확인하기 위해 Parkin의 400 번째 아미노산 주변 부위를 인지하는 Parkin antibody를 이용하여 immunoblot을 실시하였다(Fig. 4B). 그 결과 HA antibody로 immunoblot을 했을 때와 동일하게 58 kDa과 48 kDa의 두 밴드를 확인할 수 있었다. 이들 immunoblot 결과를 바탕으로 48-kDa fragment는 Parkin의 N-말단 Myc-tag부분이 절단되고 C-말단의 HA-tag를 포함하는 Parkin임을 알 수 있었다(Fig. 4A, lane 2). 따라서 Parkin의 N-말단으로부터 약 10 kDa정도 위치에 세포 내 protease에 민감한 절단 부위가 존재하는 것을 알 수 있다.

**고 찰**

본 연구에서는 생화학적 연구에 Parkin을 이용하기 위한 시스템 구축의 일환으로 대장균 내에서 높은 순도로 Parkin

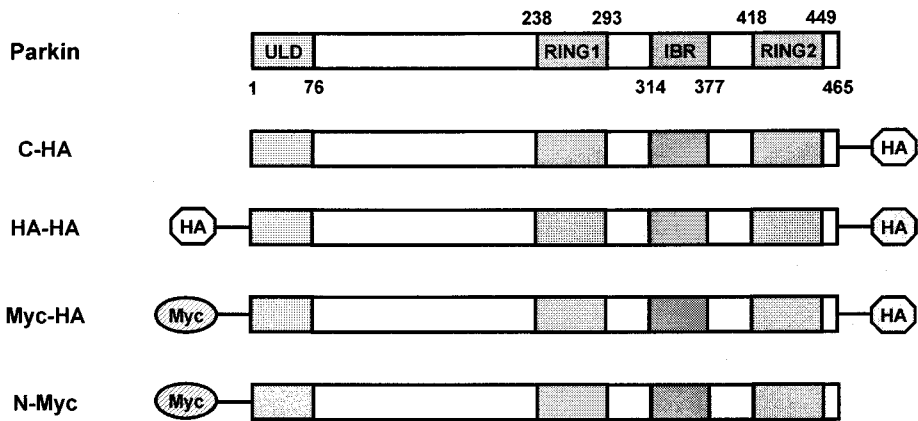


Fig. 3. Schematic diagram of the Parkin constructs fused to various tags for a mammalian expression system.

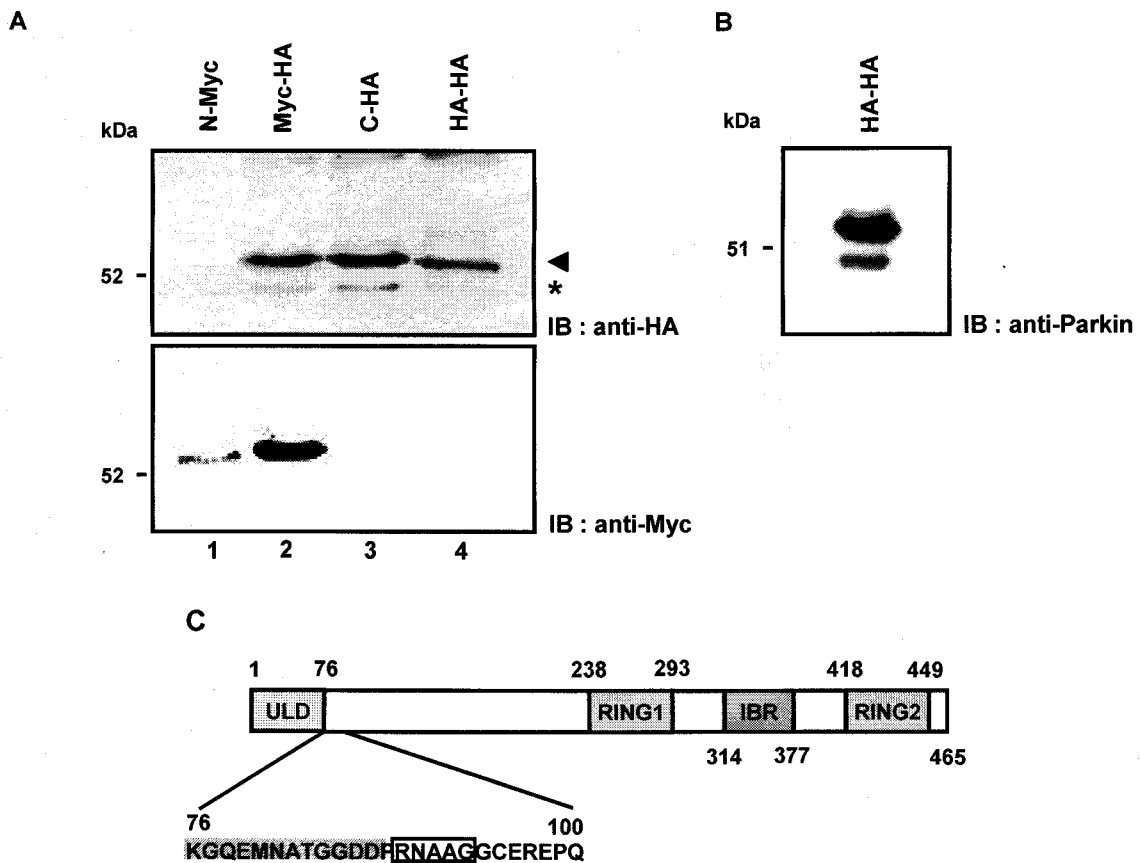


Fig. 4. Expression patterns of Parkin in mammalian cells. **A.** The indicated plasmids were transfected into HEK293 cells. The samples were resolved by 15% SDS-PAGE, followed by IB analysis with anti-HA (upper panel) or anti-Myc (lower panel) Abs. Full-length and N-terminally truncated Parkin are indicated by arrowhead and asterisk, respectively. **B.** The HA-HA plasmid was transfected into HEK293 cells. The Parkin proteins were detected by anti-Parkin Ab that recognizes Parkin's C-terminus (corresponding to residues surrounding amino acid 400 of human Parkin). **C.** Schematic representation of the putative PEST region in the N-terminus of Parkin. Shadow box and open box indicate the poor PEST sequence and predicted cleavage residues, respectively.

을 정제할 수 있는 적정 조건과 시스템을 확립하였다. 또한 포유류 세포인 HEK293 세포에서 Parkin의 발현양상을 분석

하기 위해 여러 epitope tag를 이용한 vector 시스템을 제작하여 Parkin의 발현 특성을 확인하였다.

대장균 내에서 일반적인 조건으로 발현시킨 경우 Parkin 단백질이 분해되어 순도 높은 Parkin 단백질을 얻을 수 없는 문제점이 발생하였다. 이를 해결하기 위해 여러 배양 및 유도 온도와 IPTG 농도에서 Parkin을 발현, 정제한 후 Parkin의 발현 양상을 비교 분석하였다. 그 결과 25°C의 배양 및 유도 온도와 0.01 mM의 IPTG 조건에서 Parkin의 분해가 가장 적게 일어나고 단백질의 회수율이 0.2% (1 ml 대장균 배양액 당 50 ng/25 µg, 정제된 GST-Parkin/전체 세포 추출물) 정도로 대장균 1 리터로부터 순도 90% 이상의 GST-Parkin 단백질을 50 µg 정도 정제 할 수 있었다. 비록 양은 적지만 순도 높은 Parkin을 정제하는 방법을 확립 하였으므로, 이 방법을 이용하여 생화학적 연구에 적용할 수 있는 Parkin 단백질을 다량 정제할 수 있다.

N-말단이나 C-말단 tag를 인지하는 antibody로 HEK293 세포에서 발현되는 Parkin을 immunoblot 한 후, 단백질의 크기를 비교 분석한 결과 48-kDa fragment는 N-말단이 절단된 Parkin 단백질임을 알 수 있었다. 이는 Parkin의 N-말단으로부터 10 kDa 떨어진 ULD에 존재하는 아미노산 부위에서 절단된 fragment임을 알 수 있다. 또한 대장균에서도 Parkin을 발현하여 Glutathione 4B bead로 결합시킨 후 전기영동을 한 결과 여러 fragment 중 38 kDa 크기의 밴드가 많은 양 관찰된다. 따라서 이 38-kDa fragment는 GST의 C-말단에 Parkin의 N-말단의 10-kDa fragment가 결합되어 생성된 것이라는 것을 추론할 수 있다. 이는 대장균에서나 포유류 세포에서 Parkin의 ULD가 protease의 공격에 민감하게 반응할 수 있다는 것을 시사한다.

PEST 부위(proline (P), glutamate (E), serine (S), threonine (T))를 많이 가진 단백질들은 proteolysis signal을 전달하는데[23], Parkin의 경우도 이런 부위로 인해 절단될 가능성이 높다. 이를 알아보기 위해 PEST find program (<https://emb1.bcc.univie.ac.at/toolbox/pestfind/pestfind-analysis-webtool.htm>)을 이용하여 Parkin 아미노산 서열을 분석하였다. 그 결과 Parkin 단백질 내에 7군데의 poor PEST sequence가 존재하는데, Parkin의 N-말단(76~89 아미노산 잔기)에 위치하는 PEST sequence가 protease에 의해 공격을 받으면 약 10 kDa 크기의 fragment가 생성될 가능성이 있다 (Fig. 4C).

또한 대장균 내에서 Parkin을 발현 시키는 경우 온도 변화에 따른 38-kDa fragment의 양적 변화는 PEST 부위가 온도에 민감하게 작용할 수 있다는 가능성을 제시한다. 대장균 내 여러 protease 중 50%가 세포질에 존재하고 있는데[24], 세포질 내에서 발현되는 Parkin은 이러한 효소에 쉽게 노출되어 일반 효소활성 온도인 37°C에서 poor PEST 부위가 공격을 받아 쉽게 분해될 수 있다. 이를 증명하기 위해 분해 가능성 있는 부위의 아미노산의 돌연변이를 통해 Parkin의 절단부위와 protease와의 상관관계를 규명하는 연구가 필요하다.

다. 최근 Parkin의 1에서 6의 아미노산 잔기가 Parkin 유전자의 발현에 중요한 역할을 하고, ULD가 없는 경우 E3 ligase 기능에는 영향을 미치지 않지만 ULD가 있는 경우보다 발현 양이 증가한다는 보고가 있다[26]. 따라서 외부 자극에 의해 Parkin에 존재하는 PEST sequence 부위가 절단되는 현상은 세포 내 Parkin의 발현과 기능을 조절하는 또 다른 기전으로 작용할 수 있는 가능성을 제시한다[25].

## 요 약

E3 ligase로 알려진 Parkin은 protein quality control에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라, 이런 quality control system의 이상으로 나타나는 퇴행성 뇌질환에도 밀접한 연관성이 있다. 이와 같이 생체의 필수적인 업무를 담당하는 Parkin의 기능을 생화학적 측면에서 연구하기 위해서는 고 순도의 단백질을 다량 정제할 수 있는 시스템이 필요하나, 아직까지 Parkin의 발현 양상과 정제법에 관한 연구가 미흡한 상태이다. 본 연구에서는 pGEX system을 이용하여 Parkin을 대장균에서 overexpression시켜 단일 스텝으로 정제할 수 있는 방법을 정립하였다. 저온의 배양조건에서 0.01 mM의 IPTG로 발현을 유도한 결과 90% 이상의 순도를 가지는 완전한 크기의 Parkin을 정제할 수 있었다. 또한, 여러 tag를 갖는 Parkin plasmid를 제작하였을 뿐만 아니라, 이들을 HEK293 세포에 transfection하여 Parkin의 발현 양상을 비교 분석하였다. 그 결과 Parkin의 N-말단에 protease에 민감한 절단 부위가 존재한다는 사실을 확인하였다. 본 연구에서 정립한 Parkin 정제법과 포유류 세포에서 Parkin의 발현 양상에 대한 결과는 Parkin의 기질을 탐색하고, 그들이 Parkin의 효소 활성 및 기능에 미치는 영향을 조사하기 위한 다양한 연구에 활용될 수 있을 것이다.

## 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(20050401-034-658-135-03-0)의 지원에 의해 이루어진 것임

## 문 헌

1. Ardley H. C., C. C. Hung, and P. A. Robinson. 2005. The aggravating role of the ubiquitin-proteasome system in neurodegeneration. *FEBS Lett.* **579**, 571-576.
2. Cyr D. M., J. Hohfeld, and C. Patterson. 2002. Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci.* **27**, 368-375.
3. Tanaka K. and T. Chiba. 1998. The proteasome: a protein-destroying machine. *Genes Cells.* **3**, 499-510.
4. Hershko A. and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* **67**, 425-479.

5. Frydman J. 2001. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annu Rev Biochem.* **70**, 603-647.
6. McClellan A. J., S. Tam, D. Kaganovich and J. Frydman. 2005. Protein quality control: chaperones culling corrupt conformations. *Nat Cell Biol.* **7**, 736-741.
7. Korhonen L. and D. Lindholm. 2004. The ubiquitin proteasome system in synaptic and axonal degeneration: a new twist to an old cycle. *J Cell Biol.* **165**, 27-30.
8. Gandhi S. and N. W. Wood. 2005. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet.* **14**, 2749-2755.
9. Mizuno Y., N. Hattori, H. Mori, T. Suzuki and K. Tanaka. 2001. Parkin and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol.* **14**, 477-482.
10. Tsai Y. C., P. S. Fishman, N. V. Thakor and G. A. Oyler. 2003. Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem.* **278**, 22044-22055.
11. Shimura H., N. Hattori, S. Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka and T. Suzuki. 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet.* **25**, 302-305.
12. Morett E. and P. Bork P. 1999. A novel transactivation domain in parkin. *Trends Biochem Sci.* **24**, 229-231.
13. Lim K. L., K. C. Chew, J. M. Tan, C. Wang, K. K. Chung, Y. Zhang, Y. Tanaka, W. Smith, S. Engelender, C. A. Ross, V. L. Dawson and T. M. Dawson. 2005. Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1: implications for Lewy body formation. *J Neurosci.* **25**, 2002-2009.
14. Choi P., H. Snyder, L. Petrucelli, C. Theisler, M. Chong, Y. Zhang, K. Lim, K. K. Chung, K. Kehoe, L. D'Adamo, J. M. Lee, E. Cochran, R. Bowser, T. M. Dawson and B. Wolozin. 2003. SEPT5\_v2 is a parkin-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res.* **117**, 179-189.
15. Corti O., C. Hampe, H. Koutnikova, F. Darios, S. Jacquier, A. Prigent, J. C. Robinson, L. Pradier, M. Ruberg, M. Mirande, E. Hirsch, T. Rooney, A. Fournier and A. Brice. 2003. The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet.* **12**, 1427-1437.
16. Huynh D. P., D. R. Scoles, D. Nguyen, S. M. Pulst. 2003. The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet.* **12**, 2587-2597.
17. Ren Y., J. Zhao, J. Feng. 2003. Parkin binds to alpha/beta tubulin and increases their ubiquitination and degradation. *J Neurosci.* **23**, 3316-3324.
18. Zhang Y., J. Gao, K. K. Chung, H. Huang, V. L. Dawson, T. M. Dawson. 2000. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin-protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**, 13354-13359.
19. Seong Y. M., H. J. Park, G. H. Seong, J. Y. Choi, S. J. Yoon, B. R. Min, S. Kang and H. Rhim. 2004. N-terminal truncation circumvents proteolytic degradation of the human HtrA2/Omi serine protease in Escherichia coli: rapid purification of a proteolytically active HtrA2/Omi. *Protein Expr Purif.* **33**, 200-208.
20. Huynh D. P., M. Dy, D. Nguyen, T. R. Kiehl, S. M. Pulst. 2001. Differential expression and tissue distribution of parkin isoforms during mouse development. *Brain Res Dev Brain Res.* **130**, 173-181.
21. Kuhn K., X. R. Zhu, H. Lubbert and C. C. Stichel. 2004. Parkin expression in the developing mouse. *Brain Res Dev Brain Res.* **149**, 131-142.
22. Dagata V. and C. Sebastiano. 2004. Parkin transcript variants in rat and human brain. *Neurochemical Research.* **29**, 1715-1724.
23. Rechsteiner M. and S. W. Rogers. 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci.* **21**, 267-271.
24. Murby M., M. Uhlen M and S. Stahl. 1996. Upstream strategies to minimize proteolytic degradation upon recombinant production in Escherichia coli. *Protein Expr Purif.* **7**, 129-136.
25. Kim H. S., J. S. Yoo, Y. G. Kim, C. H. Chung and Y. L. Choi. 1999. Cloning and Expression of Serratia marcescens Coenzyme A (CoA) Transferase Gene in E. coli. *J. Life Science.* **9**, 54-57.
26. Finney N., F. Walther, P. Y. Mantel, D. Stauffer, G. Rovelli and K. K. Dev. 2003. The cellular protein level of parkin is regulated by its ubiquitin-like domain. *J Biol Chem.* **278**, 16054-1608.