

GST 융합 시스템에서 나타나는 macrophage migration inhibitory factor의 tautomerase 활성 저해에 관한 연구

김상수^{1,2} · 김경희^{1,2} · 박효진² · 허은혜² · 임향숙^{1,2*}

¹가톨릭대학교 생명과학과, ²분자유전학연구소

Received October 18, 2005 / Accepted December 6, 2005

Inhibitory Effect of the N-terminal GST on the Tautomerase Activity of Macrophage Migration Inhibitory Factor. Sang-Soo Kim^{1,2}, Kyung-Hee Kim^{1,2}, Hyo-Jin Park², Eun-Hye Hur² and Hyangshuk Rhim^{1,2}. ¹Department of Biomedical Sciences, ²Research Institute of Molecular Genetics, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea – Macrophage migration inhibitory factor (MIF), known as a cytokine, is a multifunctional protein that is ubiquitously expressed in a variety of cells and tissues; however, enzymatic function of MIF still remains elusive in cells. In this study, we assessed details of the tautomerase activity of MIF. We established rapid purification condition for MIF by using pGEX system and compared the L-dopachrome tautomerase activity of GST-MIF, tMIF, and MIF. The results show that GST (glutathione S-transferase)-epitope tag or N-terminal amino acids flanking the essential P² almost completely abrogated L-dopachrome tautomerase activity of MIF. Subsequently, to determine whether the N-terminal tags have effects on oligomerization of MIF, protein cross-linking products were analyzed on 15% SDS-PAGE. The result demonstrates that N-terminal tags are dispensable for the formation of MIF's homooligomers. Thus, the results imply that exposure of P² containing hydrophobic pocket in the active site is critical for L-dopachrome tautomerase activity of MIF. In addition, our study suggest that the MIF's tautomerase activity might be influenced by interacting with cellular partners.

Key words – Macrophage migration inhibitory factor, MIF, tautomerase, GST fusion system, cross-linking

인간 macrophage migration inhibitory factor (MIF)는 macrophage의 이동을 억제하는 cytokine으로 처음 알려졌다[6]. 여러 가지 면역학적 연구로 MIF가 세포 내에서 일어나는 다양한 활성을 통해서 세포사멸을 지연시키고, 세포의 성장과 분열을 촉진하는 생물학적 활성을 가지고 있다는 것이 보고되었다[3,13,15,18]. 또한 생화학적인 연구로 MIF가 2-carboxy-2,3-dihydroindole-5,6-quinone (dopamine)을 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA)로 전환시키는 tautomerization과 oxidoreduction 반응에 관여하는 효소적 활성을 지니고 있음이 확인되었다[2,17].

MIF의 X-ray crystallography와 NMR 연구들을 통하여 tautomerase 활성을 갖고 있는 D-dopachrome tautomerase와 MIF가 서로 구조적으로 매우 유사한 homotrimer를 형성하며, 각 단백질의 monomer마다 N-말단에 존재하는 proline (P²)을 중심으로 기질과 결합하는 hydrophobic pocket을 가지고 있다는 것이 확인되었다[14,16,20,21]. MIF의 다양한 돌연변이형을 이용한 생화학적 연구를 통하여 P²가 tautomerase 활성에 결정적인 catalytic base로 작용한다는 것이 밝혀졌다[4,22]. 이런 보고들은 MIF의 3차 구조와 N-말단의

P²가 MIF의 tautomerase 활성에 매우 중요하다는 것을 나타낸다. 이와 더불어 mouse MIF의 N-말단에 결합된 3개의 아미노산 잔기가 tautomerase 활성을 저해한다는 연구결과도 발표되었다[4].

이처럼 MIF의 tautomerase 활성은 3차 구조와 hydrophobic pocket을 형성하는 P² 주변의 아미노산 구성의 변화에 매우 민감한 것으로 보인다. 이에 따라 본 연구에서는 인간 MIF의 정제를 위하여 도입한 GST (glutathione S-transferase) 융합 시스템으로 얻어진 GST 융합 MIF (GST-MIF)를 이용하여 N-말단에 결합된 GST와 6개의 아미노산 잔기가 MIF의 tautomerase 활성에 어떤 영향을 주는지 조사하였다. 또한 MIF의 tautomerase 활성이 oligomer 형성과 어떤 관련이 있는지 확인하기 위하여 MIF와 6개의 아미노산 잔기를 갖는 MIF간의 단백질 cross-linking 연구를 수행하였다. 이를 통하여 GST와 6개의 아미노산들이 MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성을 완전히 저해하였지만, 이들 N-말단에 존재하는 tag이 MIF의 oligomer 형성에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다. 본 연구에서 확인한 결과들은 실제 세포 내에서 MIF와 다른 단백질간의 상호적인 결합과 MIF의 효소적 활성간의 연관성에 관한 연구에 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

*Corresponding author

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

E-mail : hrhim@catholic.ac.kr

재료 및 방법

Plasmid 제조

대장균에서 MIF를 GST 융합 단백질로 발현하기 위하여, 선행연구에서 제작한 C-말단에 FLAG epitope tag를 갖고 있는 pGEX-4T-1 expression vector를 이용하였다[19]. 인간 MIF complementary DNA (cDNA, GenBank accession number AF469046)는 인간 brain cDNA library를 주형으로 하여 5' MIF primer (5'-GCGCGAATTCGCCATGCCGATGTTTCATCGTA-3')와 3' MIF primer (5'-GCGCAGATCTGTTACCGCGAAGGTGGAGTT-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 이 PCR에는 *pfu* DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, USA)를 이용하였다. 증폭된 full-length MIF의 cDNA를 *EcoRI*과 *KpnI* 제한효소로 잘라 pGEX-4T-1 plasmid에 삽입시켜 pGST-MIF-FLAG plasmid를 제조하였다. DNA sequencing으로 cloning된 MIF의 염기서열의 정확성을 확인하였다. pET11b-MIF는 R. Bucala로부터 제공 받았다[11].

MIF 단백질들의 발현 및 정제

MIF 단백질은 특정 protease를 가지고 있지 않은 BL21 (DE3) [*F ompT hsdS_B(r_Bm_B) gal dcm*] 균주에서 1 mM isopropyl-1-thio-β-D-galactoside (IPTG, AMRESCO, Solon, USA) 조건 하에서 발현을 유도하였다. pET11b-MIF plasmid를 함유하고 있는 대장균을 50 µg/ml 농도의 ampicillin을 포함하는 LB 배지 20 ml에서 12 시간 동안 배양한 후 180 ml의 LB 배지로 희석하여 600 nm 파장에서 흡광도가 0.48이 될 때까지 37°C에서 더 배양하였다. MIF 단백질의 발현을 유도하기 위하여 1 mM IPTG를 넣은 다음 3 시간 30 분 동안 더 키운 후, 2,500 rpm으로 25 분간 원심 분리하여 대장균을 수거하였다. 이렇게 모아진 대장균은 1 µg/ml의 aprotinin과 leupeptin을 포함하고 있는 buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM NaCl) 4 ml에 용해시킨 후 5 분 동안 vortexing하고 5 분 동안 얼음에 놓아두었다. 이 과정을 한 번 더 반복한 후 초음파로 용해하였다. 세포 찌꺼기는 4°C에서 12,000 rpm으로 10 분 동안 원심 분리하여 제거하고 상층액은 1.5 ml 새 튜브로 옮긴 후 -70°C에서 보관하였다.

GST-MIF 단백질의 발현은 선행연구를 따라 BL21 균주에서 0.1 mM IPTG 조건하에 유도하고 정제하였다[19]. 발현이 유도된 GST-MIF 단백질은 glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 상층액으로부터 정제하였다. 정제된 GST-MIF는 5 mM glutathione을 이용하여 bead를 제거하여 free GST-MIF라고 명하고, 5 U의 thrombin으로 GST 부위를 제거하여 tMIF라고 명하였다. 정제된 MIF 단백질들은 15% 또는 18% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다(SDS-PAGE). Coomassie 염색용액[0.1% Brilliant blue R (Sigma), 45% methanol and 10% acetic acid]에 20 분간 염색시킨 후, de-

staining solution (10% methanol and 10% acetic acid)으로 씻어내어 단백질 밴드를 확인하였다.

L-dopachrome tautomerase 활성 측정

L-dopachrome tautomerase 활성을 측정하기 위하여, 먼저 기질로서 L-dopachrome을 제조하였다[8]. 이를 위해 sodium phosphate buffer (10 mM sodium phosphate, pH 6.2, 1 mM EDTA) 700 µl에 10 mM L-3, 4-dihydroxy phenylalanine (L-dopa, Sigma, St. Louis, USA) 45 µl와 20 mM sodium m-periodate (Sigma) 30 µl를 넣고 섞어 주었다. 제조된 L-dopachrome은 빛을 차단한 상태로 얼음에서 보관하였고, 활성 측정 시 마다 새로 만들어서 이용하였다. L-dopachrome tautomerase 활성 측정은 상온에서 96-well plate에 1 well 당 190 µl의 L-dopachrome을 넣은 다음 다양한 농도의 MIF 단백질을 첨가하여 수행하였다. MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성은 Spectra Max 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 10 분 동안 측정하였다.

FPLC 시스템에 의한 단백질 정제

MIF 단백질의 정제는 선행연구를 참고하여 FPLC 시스템을 이용한 anion-exchange chromatography로 수행하였다[5]. MIF 단백질은 pET11b-MIF의 plasmid를 갖고 있는 대장균에서 발현을 유도하였다. 이를 통해 얻어진 상층액 2 ml을 상온에서 buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 15 mM NaCl)로 평형상태를 조절한 anion-column (Uno Q1 column, Bio-Rad, Hercules, USA)에 loading하였다. Buffer A 10 ml로 column을 세척한 후, buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 50 mM NaCl)로 15 ml을 추출한 후 18% SDS-PAGE로 분석하여 MIF가 가장 높은 수준으로 정제된 추출액 5 ml을 수득하였다. 정제된 MIF 단백질은 L-dopachrome tautomerase 활성을 측정한 후 -70°C에서 보관하였다.

MIF 단백질의 cross-linking

Thrombin을 이용하여 GST를 제거한 1.5 µg의 tMIF와 10 µg의 MIF 각 단백질을 sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.8)에 넣은 다음 0.1% glutaraldehyde (Sigma)를 첨가하여 단백질 cross-linking 반응을 상온에서 15 분간 수행하였다. Tris-HCl buffer (20 mM, pH 7.5)를 이용하여 단백질 cross-linking 반응을 정지시킨 후, 결합단백질들을 15% SDS-PAGE로 밴드를 확인하였다.

결 과

재조합 인간 MIF 단백질의 발현 및 정제

인간 MIF의 생화학적 특성을 연구하기 위하여, pET와 pGEX 발현 시스템을 이용하여 재조합 MIF 단백질을 발현하

는 plasmid를 제조하였다(Fig. 1A). 먼저 어떤 종류의 epitope tag도 가지고 있지 않은 pET vector 시스템을 이용하여 MIF의 발현을 유도하였다(Fig. 1B). ExPASy (Expert Protein Analysis System, http://ca.expasy.org/tools/pi_tool.html)에서 아미노산 서열을 기준으로 하여 이론적으로 계산한 MIF 단백질의 분자량은 약 12,476 Da이며, 18% SDS-PAGE 분석 결과도 유사한 크기인 12.5 kDa에서 밴드가 확인되었다. IPTG로 단백질의 발현을 유도하면 1 리터 대장균 배양액 당 약 31 mg 이상의 MIF가 발현되는데, 이는 전체 수용성 세포 단백질의 22%를 차지한다(Fig. 1B, lane 1).

많은 경우 재조합 단백질을 단일과정으로 다량 정제하기 위해 pGEX 시스템을 사용 한다[9]. 이 연구에서도 pGEX 시스템을 이용하여 GST-MIF 융합 단백질을 대장균에서 발현하여 glutathione-Sepharose 4B bead로 정제하였다(Fig. 1B, lane 2). 전기영동을 한 결과 40 kDa 크기의 분자량 위치에서 GST-MIF가 확인되었으며, 이 시스템을 이용하면 1 리터 대장균 배양액 당 20 mg 이상의 GST-MIF를 정제할 수 있다(Fig. 1B, lane 2). 다음으로 90 µg의 GST-MIF를 glutathione

으로 반응 시킨 후 bead로부터 분리하면 약 51%의 회수율인 46 µg의 free GST-MIF를 얻을 수 있다(Fig. 1B, lane 3). MIF로부터 N-말단 GST를 제거하기 위해 30 µg의 GST-MIF를 thrombin으로 반응한 후 bead로부터 GST가 절단된 MIF (tMIF, 14.5 kDa) 12 µg을 회수하였다 (Fig. 1B, lane 4). tMIF의 경우 GST 부분이 절단되었지만, pGEX-4T-1 plasmid의 thrombin 절단 부위 위치상 MIF의 N-말단 methionine (M¹) 앞에 6개의 아미노산 (Gly-Ser-Pro-Glu-Phe-Ala, G-S-P-E-F-A)이 남아있다.

세포 추출물을 이용한 MIF의 tautomerase 활성 측정 방법의 정립

Epitope tag이 붙지 않은 단백질을 정제하기 위해서는 일반적으로 여러 가지 생화학적 정제 방법이 쓰인다. 그러나 pET 시스템을 이용하면 대장균에서 발현되는 전체 수용성 단백질의 약 1/4 정도가 MIF이다. 또한 MIF의 경우 진핵세포 내에서 glycosylation이 일어나지 않는 것으로 보고되었다[5]. 즉, 대장균에서의 MIF 발현이 MIF의 활성에 큰 영향

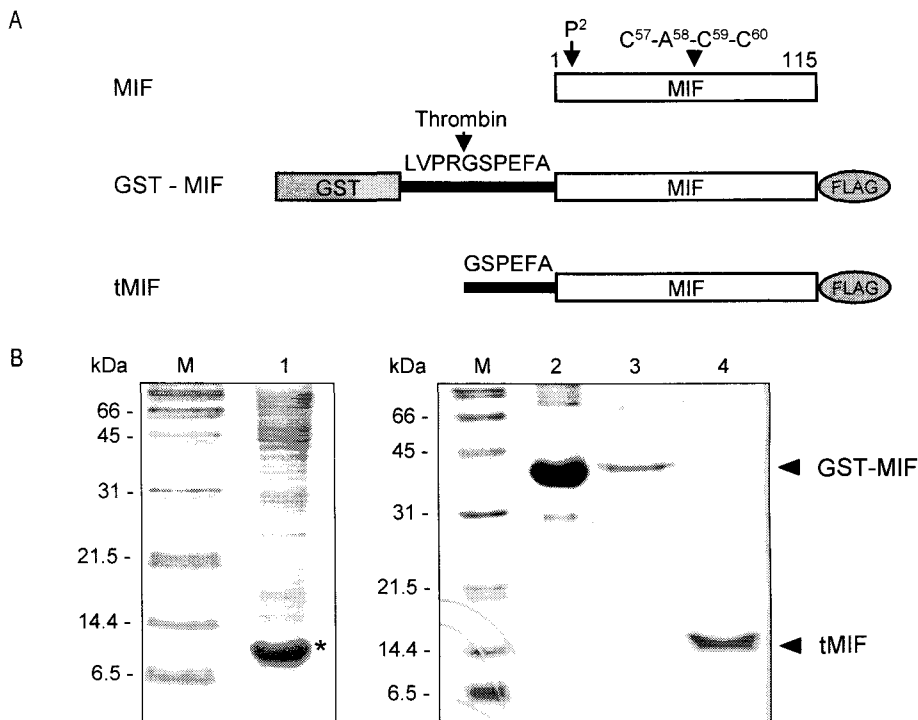


Fig. 1. Expression of various forms of recombinant MIF proteins. (A). Schematic diagrams of human recombinant MIF proteins. MIF consists of 115 amino acids and has critical two enzymatic portion, the tautomerase active site (P²) and the oxidoreductase motif (C⁵⁷-A⁵⁸-L⁵⁹-C⁶⁰). (B). Expression of the MIF proteins. Using the pET-MIF plasmid, MIF was expressed as an untagged protein in *E. coli*, resolved by 18% SDS-PAGE, and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye (left). Lanes M and 1 indicate protein size marker and total bacterial soluble lysates, respectively. MIF is indicated by asterisk. The purified recombinant MIF proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye (right). Lane 2 shows the GST-MIF protein selectively bound to glutathione-Sepharose 4B beads. GST-MIF (40 kDa) was eluted from glutathione-Sepharose 4B beads by incubation with reduced glutathione (lane 3), and tMIF (14.5 kDa) was eluted from bead-bound GST after thrombin cleavage of GST-MIF (lane 4).

을 주지 않는 것으로 여겨진다. 이에 따라 본 연구에서는 대장균에서 발현하여 정제하지 않은 수용성 세포 추출물 상태로 MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성 여부를 직접 측정하였다(Fig. 2). 농도를 알고 있는 BSA를 기준으로 하여 세포 추출물에 존재하는 MIF의 농도를 결정하였다. MIF의 활성은 10 분 동안 475 nm의 파장에서 약 1~5 nM 농도 범주의 MIF 단백질을 포함하는 반응시료의 흡광도 변화로 측정하였다(Fig. 2). MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성을 통하여 오렌지색의 L-dopachrome이 무색의 DHICA로 전환

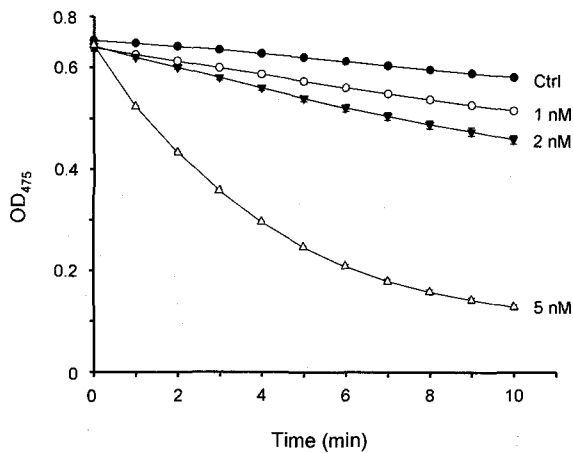


Fig. 2. Tautomerase activity of MIF. The untagged MIF protein (1~5 nM) was incubated with L-dopachrome for 10 min at room temperature, and the decrease in absorbance at 475 nm was measured as an index of the MIF tautomerase activity. Equal amounts of total bacterial soluble lysates derived from cells harboring the pET plasmid were used as a control assay (Ctrl).

되므로 475 nm에서 흡광도의 감소는 MIF의 효소활성이 증가하는 것을 의미한다. MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성은 MIF 단백질의 농도에 따라 증가하고 있으며, 5 nM에서 활성이 가장 높은 것으로 나타났다. L-dopachrome tautomerase 활성이 MIF에 의해 특이적으로 나타나는 것 인지를 확인하기 위해 대조군으로 pET plasmid만을 가지고 있는 세포의 추출물을 이용한 결과 흡광도의 변화를 관찰할 수 없었다. 상기의 실험을 통하여 생화학적 정제 방법을 이용하지 않고도 세포 추출물 상태에서 MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성을 측정할 수 있으며, 이 MIF의 효소 활성은 대장균 내재성 단백질들의 영향을 받지 않음을 알 수 있다. 따라서 본 연구에서는 pET-MIF 시스템을 이용하여 tag이 없는 MIF를 대량으로 발현 시켜 L-dopachrome tautomerase 활성을 보다 간편하고 신속하게 측정할 수 있는 방법을 확립하였다.

N-말단 GST가 MIF의 tautomerase 활성을 저해

Serine protease인 HtrA2의 경우 GST-HtrA2의 융합단백질에서나 GST-HtrA2를 thrombin으로 절단하여 GST를 제거한 HtrA2에서도 동일한 효소활성을 나타내는 것을 관찰할 수 있다[19]. 또한, 대장균에서 발현된 GST-융합 단백질은 glutathione-Sepharose 4B bead 정제법으로 고순도의 단백질을 대량으로 회수할 수 있으므로 MIF도 pGEX 시스템을 이용하여 GST-MIF 융합단백질로 발현하여 affinity column 법으로 정제 하였다(Fig. 1B).

GST-MIF의 경우 약 27 kDa 크기의 GST 단백질이 N-말단에 존재하므로 정제를 위해 도입한 이 GST가 인간 MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성에 영향을 미치는 지를 조사하였다(Fig. 3). Glutathione-Sepharose 4B bead를 이용하

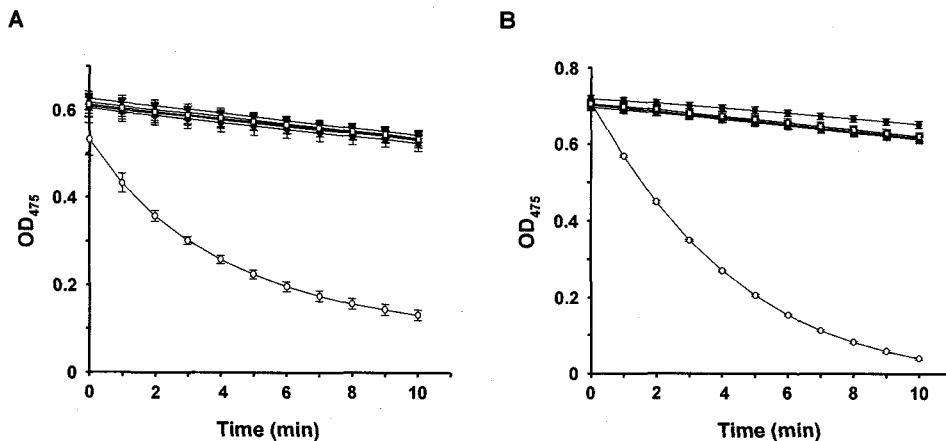


Fig. 3. Effect of the N-terminal GST on MIF tautomerase activity. GST-MIF selectively bound to glutathione-Sepharose 4B beads (A) and GST-MIF eluted from glutathione-Sepharose 4B beads (B) were incubated with L-dopachrome for 10 min at room temperature. The MIF tautomerase activity was assayed at a final concentration of 5 nM of the indicated proteins and measured by the absorbance of the reaction samples at 475 nm. ●, Control; ○, 5 nM MIF; ▼, 5 nM GST-MIF; ▲, 10 nM GST-MIF; ■, 20 nM GST-MIF; □, 50 nM GST-MIF

여 정제한 GST-MIF는 bead에 결합되어 있는 상태로 L-dopachrome tautomerase 활성을 측정하였다. 약 5 nM의 MIF가 포함된 세포 추출물의 경우 L-dopachrome tautomerase 활성에 따른 흡광도의 감소를 확인할 수 있었으나, GST-MIF는 5 nM에서 뿐만 아니라 50 nM 농도에서조차 흡광도의 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3A). HtrA2의 경우 bead에서 해리시킨 상태에서 serine protease의 효소활성이 3배 정도 더 높은 것으로 나타나는 것을 관찰할 수 있다[19]. 그러므로 glutathione으로 GST-MIF를 bead로부터 해리하여 자유로운 상태의 GST-MIF로 L-dopachrome tautomerase 활성을 측정하였다(Fig. 3B). Bead에 결합되어 있는 GST-MIF의 경우와 마찬가지로 free GST-MIF의 경우 어떤 농도에서도 흡광도의 감소를 관찰할 수 없었다. 그러므로 GST-MIF의 tautomerase 활성 저해는 반응용액에서 단백질의 자유도와는 전혀 상관이 없으며, N-말단에 존재하는 GST 단백질이 MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성을 저해할 것이라는 가능성을 제시한다.

MIF의 N-말단에 결합되어 있는 6개 아미노산들에 의한 MIF의 L-dopachrome tautomerase 활성 저해

인간 MIF의 경우 GST로 인해 L-dopachrome tautomerase 활성이 억제 되는 것을 관찰하였다(Fig. 3). 이는 GST의 분자량(27 kDa)이 MIF의 분자량(12.5 kDa) 보다 2배 이상 크므로 MIF의 구조적인 변화에 큰 영향을 미칠 수 있다는 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 인간 MIF도 mouse MIF 처럼 N-말단의 소수 아미노산 잔기에 의해 tautomerase 활성이 저해되는지를 보하고자 GST-MIF를 정제하여 thrombin으로 GST를 제거한 tMIF를 사용하였다. GST-MIF의 효소활성 반응 실험과 동일한 조건에서 반응을 수행하였으나 50 nM 농도의 tMIF를 포함하는 반응시료에서도 흡광도의 변화는 거의 관찰할 수 없었다(Fig. 4).

N-말단에 6개의 아미노산이 결합되어 있는 MIF의 oligomerization

생리적 조건에서 MIF가 homotrimer를 형성한다는 것은 X-ray crystallography 와 NMR study를 통하여 알려져 있다 [14,16,21]. 이와 더불어 단백질 cross-linking법으로 MIF가 수용액 상태에서 trimer 뿐만 아니라 monomer와 dimer 상태로 존재한다는 것이 알려졌다, MIF의 oligomerization이 생리적 기능과 어떤 연관성이 있는지는 아직 명확하지 않다 [12]. 따라서 N-말단에 결합된 GST나 6개의 아미노산으로 인한 L-dopachrome tautomerase 활성 저해가 MIF의 oligomer 형성과 서로 연관이 있는지 확인하기 위하여 단백질 cross-linking법을 이용하였다. Cross-linking 반응에는 효소활성이 저해된 tMIF와 대조군으로 tag을 갖고 있지 않는 MIF를 사용하였다(Fig. 5). 그러나 본 연구에서 사용한 세포 추출물을 단

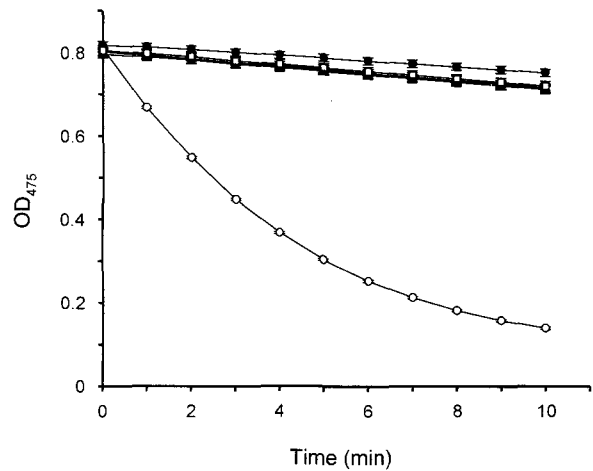


Fig. 4. Effect of the N-terminal amino acids flanking the essential P² on MIF tautomerase activity. Thrombin-cleaved MIF, so called tMIF, was incubated with L-dopachrome for 10 min at room temperature. The MIF tautomerase activity was assayed at a final concentration of 5 nM of the indicated proteins and measured by the absorbance at 475 nm. —●—, Control; —○—, 5 nM MIF; —▼—, 5 nM tMIF; —△—, 10 nM tMIF; —■—, 20 nM tMIF; —□—, 50 nM tMIF

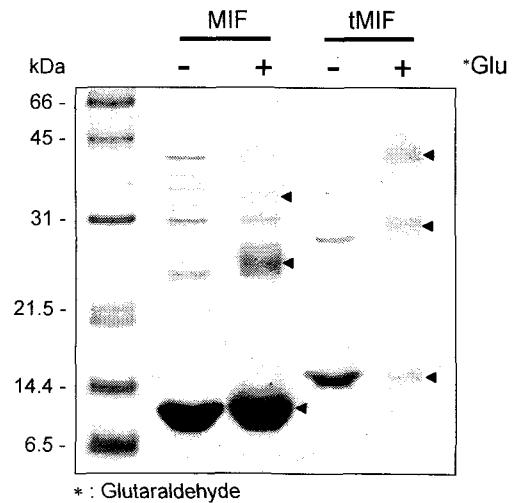


Fig. 5. Effect of the N-terminally flanked amino acids on trimeric assembly of MIF. MIF (10 µg) and tMIF (1.5 µg) were reacted with 0.1% glutaraldehyde for 15 min at room temperature. The cross-linking reaction mixture was resolved by 15% SDS-PAGE, and three different forms of MIF were visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. Arrowheads indicate three different forms of MIF or tMIF.

백질의 cross-linking 반응하였을 경우, 대장균 내재성 단백질들로 인해 나타나는 비특이적 밴드들 때문에 분석에 방해가 되었다(data not shown). 이를 극복하기 위하여, anion-exchange chromatography를 이용하여 좀 더 순수한 MIF를 정

제하였다(data not shown). 단백질 cross-linking 후 SDS-PAGE 분석에 의해 MIF는 약 12.5, 25, 37.5 kDa에서 cross-linking을 수행하지 않은 MIF와는 양상이 다른 특이적인 밴드들이 나타나는 것을 확인하였다. tMIF의 경우도 약 14.5, 29, 43.5 kDa에서 cross-linking을 수행하지 않은 tMIF에서 나타나지 않았던 특이적인 밴드들을 확인하였다. 각각의 특이적인 밴드들의 분자량은 tMIF의 oligomer와 서로 부합하므로 tMIF도 수용액 상태에서 oligomerization이 일어났다는 것을 보여준다. 이는 6개의 아미노산 잔기가 MIF의 N-말단에 존재하여도 MIF oligomerization에는 전혀 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 즉 MIF의 tautomerase 효소활성에 결정적인 역할을 하는 P²와 기질간의 결합을 막거나 P²의 catalytic base로서의 역할을 방해함으로써 MIF의 tautomerase 활성이 저해되는 것으로 보여 진다.

고 찰

MIF가 cytokine으로 처음 알려진 이후 여러 연구를 통하여 MIF가 지니고 있는 많은 기능들이 밝혀지고 있다[3,13,15,18]. MIF의 기능에 관한 흥미로운 점은 분자량이 매우 작은 단백질임에도 불구하고 다양한 생물학적 활성과 효소적 활성을 동시에 지니고 있다는 것이다. 특히 류마티즘과 같은 자가면역질환, 암 발달 과정, 염증반응에 있어서 MIF가 매우 중요한 역할을 하고 있다는 가능성들이 제시되고 있다[7,18,23]. 그러나 생화학적 연구를 통하여 밝혀진 MIF의 효소적 활성이 실제 세포내에서 어떤 역할을 하는지와 생물학적 활성과 어떤 연관이 있는지 아직까지는 자세하게 밝혀지지 않았다.

MIF의 tautomerase 활성 부위에 존재하는 결정적인 아미노산(P²)의 돌연변이형(S²)이 MIF의 생물학적 활성에는 거의 영향을 미치지 않는다는 보고가 있다[10]. 더불어 세포내에서 MIF의 tautomerase 활성과 관련된 특이적인 기질의 존재가 불분명하므로 많은 연구자들이 MIF의 생물학적 기능에 초점을 두고 연구를 진행하고 있는 실정이다. 최근 MIF의 tautomerase 활성을 저해시키는 inhibitor가 MIF의 생물학적 활성 또한 저하시킨다는 연구가 보고되었다[1]. 이 결과는 MIF의 tautomerase 활성이 MIF의 생물학적 활성과 밀접한 연관이 있을 수 있다는 것을 가리킨다.

본 연구에서는 MIF 재조합 단백질들의 tautomerase 활성 비교를 통하여 N-말단의 GST와 6개 아미노산 잔기가 MIF의 tautomerase 활성을 완전히 저해한다는 사실을 확인하였다. 또한 단백질 cross-linking 연구에서 tMIF가 정상적으로 oligomer를 형성하는 것을 발견하였다. 비록 본 연구에서 대조군으로 사용한 MIF의 정제 순도가 매우 높은 편은 아니어서 15% SDS-PAGE 분석에서 나타난 밴드들이 명확하지는 않았지만, 본 연구에서 cross-linking법으로 확인한 MIF의 oligomer 밴

드들은 MIF의 oligomerization에 관한 선행연구의 결과들과 일치한다는 것을 알 수 있다[12]. 상기 결과들은 N-말단의 tag는 MIF의 oligomerization에는 전혀 영향을 끼치지 않고 MIF의 tautomerase 활성만을 저해한다는 것을 가리킨다. 이는 P²를 중심으로 형성되는 소수성 활성부위가 기질 쪽으로 완전히 노출되어만 MIF에 의한 기질의 tautomerization이 일어날 수 있다는 것을 말해준다. 더 나아가 세포내에서 MIF가 특정 단백질과의 결합에 의해서도 충분히 MIF의 tautomerase 활성이 저해될 수 있음을 시사한다. 현재 이 가능성을 바탕으로 세포내에서 MIF와 상관관계가 있을 것으로 보이는 단백질에 관한 다양한 연구들을 진행하고 있다.

본 연구에서는 MIF의 tautomerase 활성 연구를 빠르게 진행 할 수 있는 방법과 GST-MIF 정제 방법을 확립하였다. 비록 GST-MIF의 경우 tautomerase 활성이 완전히 저해되지만, 다른 연구진에 의한 선행 연구 결과에서 MIF의 또 다른 효소적 활성인 oxidoreductase 활성은 정상적으로 존재한다는 것을 보여주었다[8]. 따라서 본 연구에서 확립한 tautomerase 활성 측정과 GST-MIF의 정제 방법은 MIF의 효소활성에 관한 후속 연구에도 많은 도움을 줄 수 있을 것이다.

요 약

Cytokine으로 처음 밝혀진 macrophage migration inhibitory factor (MIF)는 다양한 생물학적 활성 및 효소적 활성을 지닌 단백질로 알려지고 있다. 아직까지 MIF의 서로 다른 활성간의 연관성 및 효소적 기능이 세포내에서 어떤 역할을 하는지는 명확하게 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 MIF가 지닌 효소적 활성 중 tautomerase 활성에 대하여 좀 더 자세하게 연구 하였다. 먼저, GST 융합 시스템을 이용하여 MIF의 정제 조건을 확립하였다. 이를 통해서 얻어진 GST (glutathione S-transferase)-MIF와 MIF 간의 활성을 비교하여 N-말단의 GST에 의하여 MIF의 tautomerase 활성이 완전히 저해되는 것을 확인하였다. 다음으로, GST대신 N-말단에 존재하는 매우 짧은 아미노산 잔기가 MIF의 tautomerase 활성을 저해하는 지를 조사하고자, GST-MIF의 GST를 thrombin으로 제거한 tMIF를 사용하였다. 그 결과 tMIF도 GST-MIF와 마찬가지로 tautomerase 활성이 완전히 저해된다는 사실을 확인할 수 있었다. 추가로 N-말단 tag에 의한 MIF의 효소적 활성 저해가 단백질의 구조적인 변환에 의한 것인지를 조사하기 위하여 단백질 cross-linking 연구를 수행하였다. 단백질 cross-linking 결과 tMIF도 MIF와 같이 정상적으로 oligomer를 형성하는 것을 확인하였다. 이들 결과는 MIF의 N-말단 P²를 중심으로 하는 소수성 활성부위의 노출이 tautomerase 활성에 결정적인 역할을 한다는 것을 시사한다. 또한 본 연구결과는 세포내에서 MIF가 다른 단백질과의 상호결합에 의해서도 충분히 tautomerase 활성이 저해될 수 있

을 것이라는 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구에서 사용한 GST-MIF clone은 남민경이 제공해주었음.

참고 문헌

- Al-Abed, Y., D. Dabideen, B. Aljabari, A. Valster, D. Messmer, M. Ochani, M. Tanovic, K. Ochani, M. Bacher, F. Nicoletti, C. N. Metz, V. A. Pavlov, E. J. Miller and K. J. Tracey. 2005. ISO-1 binding to the tautomerase active site of MIF inhibits its pro-inflammatory activity and increases survival in severe sepsis. *J Biol Chem*.
- Baugh, J. A. and R. Bucala. 2002. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* **30**, S27-S35.
- Baumann, R., C. Casaulta, D. Simon, S. Conus, S. Yousefi and H. U. Simon. 2003. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *Faseb J* **17**, 2221-2230.
- Bendrat, K., Y. Al-Abed, D. J. Callaway, T. Peng, T. Calandra, C. N. Metz and R. Bucala. 1997. Biochemical and mutational investigations of the enzymatic activity of macrophage migration inhibitory factor. *Biochemistry* **36**, 15356-15362.
- Bernhagen, J., R. A. Mitchell, T. Calandra, W. Voelter, A. Cerami and R. Bucala. 1994. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* **33**, 14144-14155.
- Bloom, B. R. and B. Bennett. 1966. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* **153**, 80-82.
- Calandra, T., J. Bernhagen, C. N. Metz, L. A. Spiegel, M. Bacher, T. Donnelly, A. Cerami and R. Bucala. 1995. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* **377**, 68-71.
- Jung, H., T. Kim, H. Z. Chae, K. T. Kim and H. Ha. 2001. Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction. *J Biol Chem* **276**, 15504-15510.
- Kim, E. J., I. C. Jeong, S. H. Oh and M. Y. Cho. 1999. Induction of Leptin cDNA Expression in Escherichia coli Cells. *J. Life Science* **9**, 253-261.
- Kleemann, R., H. Rorsman, E. Rosengren, R. Mischke, N. T. Mai and J. Bernhagen. 2000. Dissection of the enzymatic and immunologic functions of macrophage migration inhibitory factor. Full immunologic activity of N-terminally truncated mutants. *Eur J Biochem* **267**, 7183-7193.
- Lubetsky, J. B., A. Dios, J. Han, B. Aljabari, B. Ruzsicska, R. Mitchell, E. Lolis and Y. Al-Abed. 2002. The tautomerase active site of macrophage migration inhibitory factor is a potential target for discovery of novel anti-inflammatory agents. *J Biol Chem* **277**, 24976-24982.
- Mischke, R., R. Kleemann, H. Brunner and J. Bernhagen. 1998. Cross-linking and mutational analysis of the oligomerization state of the cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF). *FEBS Lett* **427**, 85-90.
- Mitchell, R. A., H. Liao, J. Chesney, G. Fingerle-Rowson, J. Baugh, J. David and R. Bucala. 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 345-350.
- Muhlhahn, P., J. Bernhagen, M. Czisch, J. Georgescu, C. Renner, A. Ross, R. Bucala and T. A. Holak. 1996. NMR characterization of structure, backbone dynamics, and glutathione binding of the human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Protein Sci* **5**, 2095-2103.
- Nguyen, M. T., H. Lue, R. Kleemann, M. Thiele, G. Tolle, D. Finkelmeier, E. Wagner, A. Braun and J. Bernhagen. 2003. The cytokine macrophage migration inhibitory factor reduces pro-oxidative stress-induced apoptosis. *J Immunol* **170**, 3337-3347.
- Philo, J. S., T. H. Yang and M. LaBarre. 2004. Re-examining the oligomerization state of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in solution. *Biophys Chem* **108**, 77-87.
- Rosengren, E., R. Bucala, P. Aman, L. Jacobsson, G. Odh, C. N. Metz and H. Rorsman. 1996. The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med* **2**, 143-149.
- Santos, L. L., D. Lacey, Y. Yang, M. Leech and E. F. Morand. 2004. Activation of synovial cell p38 MAP kinase by macrophage migration inhibitory factor. *J Rheumatol* **31**, 1038-1043.
- 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.
- Sugimoto, H., M. Taniguchi, A. Nakagawa, I. Tanaka, M. Suzuki and J. Nishihira. 1999. Crystal structure of human D-dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution. *Biochemistry* **38**, 3268-3279.
- Sun, H. W., J. Bernhagen, R. Bucala and E. Lolis. 1996. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5191-5196.
- Swope, M., H. W. Sun, P. R. Blake and E. Lolis. 1998. Direct link between cytokine activity and a catalytic site for macrophage migration inhibitory factor. *Embo J* **17**, 3534-3541.
- Talos, F., P. Mena, G. Fingerle-Rowson, U. Moll and O. Petrenko. 2005. MIF loss impairs Myc-induced lymphomagenesis. *Cell Death Differ* **12**, 1319-1328.