

미꾸라지 간으로부터 포스포리파아제 C델타 단백질의 생화학적 특성

서정수* · 임상욱** · 김나영* · 이상환* · 오현석* · 이형호** · 정준기**

*부경대학교 수산생명의학과, **부경대학교 식품생명과학부

Biochemical Characterization of Phospholipase C δ from liver of Mud loach (*Misgurnus mizolepis*)

Jung Soo Seo*, Sang Uk Lim**, Na Young Kim*, Sang Hwan Lee*, Hyun Suk Oh*,
Hyung Ho Lee** and Joon Ki Chung**

*Department of Aquatic Life Medicine, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

**Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

Phosphoinositide-specific phospholipase C δ (PLC δ) plays an important role in many cellular responses and is involved in the production of second messenger. The present study was conducted to obtain the biochemical characteristics of the expressed recombinant PLC δ in *E. coli* cloned from *Misgurnus mizolepis* and partially purified PLC δ enzymes from liver tissues of *M. mizolepis* (wild ML-PLC δ). The ML-PLC δ gene was cloned and expressed under the previous report (Kim et al., 2004), and purified the recombinant protein by successive chromatography using Ni²⁺-NTA affinity column and gel filtration FPLC column. The wild ML-PLC δ protein was solubilized with 2 M KCl and purified by successive chromatography on open heparin-Sephagel and analytical TSKgel heparin-5PW. Both the recombinant and wild ML-PLC δ form of protein showed a concentration-dependent PLC activity to phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate (PIP₂) or phosphatidylinositol (PI). Its activity was absolutely Ca²⁺-dependant, which was similar to mammalian PLC δ isozymes. Maximal PI-hydrolytic activations of recombinant and wild ML-PLC δ was at pH 7.0 and pH 7.5, respectively. In addition, the enzymatic activities of recombinant and wild ML-PLC δ were increased in concentration-dependent manner by detergent, such as sodium deoxycholate (SDC), phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC). The activities decreased in contrast by a polyamine, such as spermine. Western blotting showed that several types of PLC δ isozymes exist in various organs. Taken together our results, it suggested that the biochemical characteristics of ML-PLC δ are similar with those of mammalian PLC δ 1 and δ 3 isozymes.

Key words : Phospholipase C δ , *Misgurnus mizolepis*, PIP₂ hydrolysis, Phospholipid

인지질가수분해효소 (phospholipase)는 주요한 lipolytic enzyme으로서 생체막을 구성하는 인지질 (phospholipid)을 가수분해하며, 여기서 생성된 2차 전달자는 생체신호전달과정에 있어서 세포대사, 성장, 분화 등의 조절에 관여 한다고 알려져 있다 (Kantan, 1988; Rhee, 2001). 이러한 인지질가수분해효소는 인지질을 가수분해하는 부

위에 따라 phospholipase A (PLA), phospholipase C (PLC), phospholipase D (PLD)가 있다고 알려져 있다. PLC는 인지질의 기본구조에서 sn-3 부분을 가수분해하는 효소이며 인지질에 대한 특이성에 따라 phosphatidylcholine (PC)에 특이성을 나타내는 PLC (PC-PLC)와 phosphatidylinositide (PI)에 특이성을 나타내는 PLC (PI-PLC)로

[†]Corresponding Author : Joon Ki Chung, Tel : 051-620-6142,
Fax : 051-628-7430, E-mail : jkchung@pknu.ac.kr

구분되어진다. PI-PLC는 성장요인 (growth factor), 호르몬 (hormone), 신경전달자 (neurotransmitter)에 의해 활성화되는 효소로서 phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate (PIP₂)에 특이적인 반응을 하여 2가지 종류의 강력한 이차전령인 디아실글리세롤과 inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃)의 생성을 촉매 한다고 알려져 있다. 이 이차 전령물질들 중 IP₃는 세포내 저장된 칼슘 (Ca^{2+})을 유리하고 디아실글리세롤은 PKC (protein kinase C)를 활성화 시킨다 (Lee and Rhee, 1996; Lee *et al.*, 1999).

PI-PLC는 포유동물에서 활성기작, 구조 및 조직 분포등에 따라 5종류, $\beta(1\text{-}4)$ -, $\gamma(1,2)$ -, $\delta(1\text{-}4)$ -, $\epsilon(1)$ -, $\zeta(1)$ -로 분류되며, 모든 PLC는 catalytic X, Y 도메인 (domain), C2 도메인, EF-hand 도메인, pleckstrin homology (PH) 도메인을 가지거나 몇몇 도메인을 가지지 않는다고 알려져 있다 (Rebecchi and Pentyala, 2000). PLC 효소류 (isozymes)의 아미노산 서열은 두 가지 잘 보존된 XY 도메인 영역을 제외하고는 비교적 다양하며, XY 도메인 영역은 촉매 부분으로 보인다고 알려져 있다. XY 도메인에서 아미노산 서열의 유사성은 포유동물 효소들 사이에서 비교적 높아 40~60% 정도이며, 이는 PLC가 다른 종에서도 매우 유사한 형태로 이루어져 있음을 알 수 있다. X와 Y 도메인사이에 서열은 β -와 δ -타입의 효소류에서는 짧고 (40-110 잔기), γ 타입에서는 SH2 도메인을 포함하여 길다 (-400 잔기). 대개 PLC isozymes들은 활성의 특정 메커니즘을 가지고 있다고 알려져 있다 (Irino *et al.*, 2004; Lopez *et al.*, 2001; Rebecchi and Pentyala, 2000; Rhee, 2001; Saunders *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2001; Williams, 1999).

PLC δ 효소류들은 현재 catalytic X, Y 도메인, EF-hand 도메인, pleckstrin homology (PH) 도메인, C2 도메인을 가지고 있는 효소로서 83에서 87 kDa의 분자량을 가진 multidomain 단백질이고 PLC δ isozymes 사이의 아미노산 서열 동질성은 45%에서 84%까지 다양하다고 보고 되어

진다 (Ghosh *et al.*, 1997; Rebecchi and Pentyala, 2000). 특징적으로 PLC δ isozymes들은 PLC- γ 에 있는 src homology region은 부족하고 따라서 티로신 키나아제 (tyrosine kinases)에 대한 기질로서 활성이 없다고 알려져 있다. 최근에 PLC- δ 4 isozymes와 대조적으로 PLC- δ 1과 PLC- δ 3 isozymes에서 가상적인 nuclear export sequence (NES)를 소유하고 있고, EF-hand 도메인의 한 부분으로 존재하고 있다고 보고되었다. PH 도메인은 120개 정도의 아미노산 잔기들로 구성되어 있고 PLC의 아마이드 (NH_2) 말단에 위치하고 있다. 이 도메인은 PIP₂ 가수분해 동안 막 표면에 효소들과 결합하는 역할을 수행한다고 알려져 있다 (Ferguson *et al.*, 1995; Yagisawa *et al.*, 1999). EF-hand 도메인은 칼슘 또는 마그네슘 이온들과 결합한다고 믿고 있지만 아직 확실한 역할에 대하여서는 확실하지 않다고 보고되고 있다 (Essen *et al.*, 1996; Pawelczyk and Matecki, 1997b). PLC- δ 효소의 중간에는 X와 Y 도메인이 있는데 이들 사이에는 산을 내는 아미노산이 풍부한 linker에 의해서 나누어져 있고, 카르복실 말단에는 120개 잔기를 가진 C2 도메인이 위치해있으며 이것은 칼슘 의존적이며 막 표면 촉매의 핵심으로 작용한다고 알려져 있다 (Essen *et al.*, 1996). PLC δ isozymes의 세포내 분포는 다양하게 보고되는데 PLC- δ 1 isozymes은 대부분 세포원형질 단백질에서 분리되나, PLC- δ 3 isozymes은 막 단편에서 검출되어진다고 보고되어지며 (Banno *et al.*, 1994), PLC- δ 4 isozymes은 세포 핵에서 현저하게 위치하고 있고, 그의 발현은 세포주기에 의존적이라고 보고된다 (Liu *et al.*, 1996). 그러나, PLC- δ 2 isozymes의 세포내 분포는 아직 보고되어지지 않고 있다. PLC- δ 의 활성은 칼슘, 인지질류 (phospholipids), polyamines와 다양한 단백질 (RhoAGAP)에 의해 조절된다고 알려져 있으며, 각각의 isotypes에 따라 다양한 활성의 변화가 있다고 보고되고 있다 (Haber *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2001).

현재 어류에서 PLC는 다양한 생리적 조절에

관여할 것이라고 보고되고 있으며 특히, 어류의 난 수정 (egg fertilization) 및 활성화 (activation)에서 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다 (Asano-Miyoshi *et al.*, 2000; Borski *et al.*, 2002; Burlando *et al.*, 2003; Cadiou and molle, 2003; Yasuoka *et al.*, 2004). 또한, 어류에서 다양한 약물을 통한 PLC의 활성을 측정하므로서 PLC의 역할에 대하여 조사하였는데, 이 중 imipramine은 PLC를 통해서 olfactory InsP3-gated 채널을 활성화시키고, neomycin은 효소의 기질로서 PdtIns(4,5)P₂에 결합하여 잠재적 PLC 억제제로 작용한다고 보고되었다 (Slivka and Insel 1988). 그러나, 현재 어류에서 PLC에 대한 단백질의 특성, 기능 및 유전자 서열은 잘 보고 되고 있지 않으나, 메기 (catfish)로부터 부분적으로 PLC가 크로닝 되어져 보고되었다 (Abogadie *et al.*, 1995).

따라서, 본 연구에서는 이전에 미꾸라지로부터 PLC δ 유전자를 클로닝하였다 (Kim *et al.*, 2004). 이것을 형질 전환된 대장균에서 과발현 시킴과 동시에 미꾸라지로부터 PLC δ 를 정제하여 두 단백질의 생화학적 특성을 비교하고자 하였다. 이러한 결과들은 어류에서 PLC δ 를 통한 생체신호가 어떠한 역할을 할 것인지에 대한 기초적인 자료를 제공해 줄 것이라 사료된다.

재료 및 방법

재료

전기영동 관련시약들은 BIO-RAD 사로부터 구입하였으며, PLC 활성 측정 시 사용된 [³H]phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate (PIP₂) 또는 [³H]phosphatidylinositol (PI) 기질들은 NEN Life Science Products (미국)로부터 구입하였다. AP conjugation kit은 BIO-RAD 사로부터 구입하였고, 그 외 다른 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

재조합(recombinant) ML-PLC δ 의 클로닝 및 발현

벡터 삽입

미꾸라지 (mud loach) 간으로부터 제조한 cDNA library에 PLC δ 유전자를 클로닝 및 발현 벡터 (pET28a, Novagen) 삽입은 이전에 보고된 Kim *et al* (2004)의 방법으로 수행하였다.

재조합 (recombinant) ML-PLC δ 의 분리 및 발현

미꾸라지 간으로부터 제조한 cDNA library에 PLC δ 유전자를 클로닝하여 이를 pET28a vector (Novagen)에 재조합시킨 후, 이를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환시켰으며, 삽입된 pET-PLC δ 은 아미노기-터미널 쪽에 6 × His fragment로 융합단백질로서 PLC δ 의 발현에 이용되어졌다 (Kim *et al.*, 2004). 형질전환된 대장균은 LB broth에 접종하여 O.D = 0.6 (A₆₀₀)까지 배양한 후 isopropyl-1- β -D-galactopyranoside (IPTG)를 최종 농도가 0.4 mM이 되도록 배양액에 첨가하였다. 그 후 20 °C 배양기에서 3시간 동안 진탕배양하였다. 과발현된 미꾸라지 PLC δ (ML-PLC δ)의 정제를 위하여 His-bind purification kit (Novagen)를 이용하여 수행하였다. 간단히 설명하면 모여진 세포들은 차가운 1 × binding buffer에서 재부유시켜서 초음파 분쇄기를 이용하여 파쇄한 후, 4 °C에서 20분 동안 20,000 × g로 원심분리하였다. 원심분리한 후, 상층액 부분은 즉시 Ni²⁺-NTA 칼럼에 적용하였으며, 펠렛부분은 항체제작을 위하여 따로 보관하였다. Ni²⁺-NTA 칼럼 정제과정은 상기의 kit 매뉴얼에 따라 수행하였으며, 분출된 용액은 효소활성을 측정하기 위하여 PI- 또는 PIP₂ 가수분해 활성을 측정하였다. Ni²⁺-NTA 칼럼으로부터 정제된 재조합 PLC δ 은 Amicon Centriprep-10 농축기 (Amicon, 미국)를 사용하여 농축하였으며, 농축된 샘플은 다시 eluted buffer로 미리 평형화된 gel filtration 칼럼에 바로 적용시켰다. 효소 활성은 PI-가수분해 활성으로 확인하였고, Amicon Centriprep-10 농축기를 이용하여 활성부분을 농축시켰다. 농축시킨 단백질의 정량은 BIO-RAD 단백질 분석 kit를 사용하였다.

미꾸라지 각종 조직으로부터 PLC δ 의 확인 및 분리

MS-222로 마취한 어류의 간을 절취하여 미리 액체 질소로 저장해 둔 간 조직을 간조직의 10 배 volume의 균질화 용액 (10 mM Tris/pH7.4, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, leupeptin (1 μ g/ml), aprotinin (1 μ g/ml)) 50 ml에 넣어서 motor-driven Teflon pestle로 유리 균질기에서 균질화하였다. 균질화된 샘플을 1,000 \times g로 10분간 원심분리 하였다. 상층액은 KCl를 첨가시켜 2 M이 되도록 보정시키고 4 °C에서 2 시간 동안 교반시킨 후, 30분 동안 35,000 \times g로 원심분리시켰다. 여기서 상층액을 다시 균질화 용액 4 리터에 밤새 투석시키고 다시 원심분리 하였다. 상층액을 heparin-Sepharose CL-6B 칼럼 (Amersham Phamacia, 미국)에 적용시켜서 1 mM EGTA과 1 mM DTT를 포함한 20 mM HEPES/pH 7.0로 평형화시켰다. 결합된 단백질은 1.2 M NaCl를 포함한 평형 완충용액으로 linear gradient 방법으로 분당 4 ml 유속으로 용출시켰으며, 16 ml의 양을 PLC assay를 이용하여 얻을 수 있었다. 얻어진 PLC 활성은 여섯 개 분획에서 얻어졌으며, 이것을 모아서 YM 30 막으로 stirred ultrafiltration cell (Amicon, 미국)을 이용하여 농축하였다. NaCl 농도를 50 mM로 최종적으로 조정하여 농축 된 것을 10분 동안 100,000 \times g로 원심분리 하였다. 상층액으로부터 얻어진 단백질은 다시 평형화 된 TSKgel heparin-5PW HPLC 칼럼 (7.5 \times 75 mm; TOSHOHAS, 일본)에 주입하였고, 60 분간 0.4 M NaCl을 linear gradient를 이용하여 분획당 1 ml의 용출시켜, 소량 (10 μ l)으로 PI-PLC 활성을 측정하였다.

PI 및 PIP₂-hydrolyzing PLC activity 측정

PI의 가수분해활성은 5 μ M PI, 및 1 μ Ci/ml PI를 포함하는 인지질 인공막 (phospholipid micell)을 사용하여 측정하였으며, PIP₂의 가수분해활성은 120 μ M phosphatidylethanolamine (PE), 30 μ M PIP₂, 및 1 μ Ci/ml PIP₂를 포함하는 인지질

인공막으로서 측정하였다. 각각의 클로로포름총에 녹아 있는 지질은 질소가스로 건조시켰고, 0.08 % sodium deoxycholate, 1 mM ethylene glycol-bis (β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 10 mM NaCl, 100 μ M CaCl₂과 적정량의 PLC를 50 mM HEPES/pH 7.0에 첨가하여 총 부피가 200 μ l가 되도록 하였다. PLC의 반응은 30 °C에서 15분간 진행시켰고, 1 ml chloroform/methanol/HCl (100:100:0.6, v/v/v)의 첨가로 PLC의 반응을 종결시켰으며, 계속해서 1 N HCl에 녹아있는 5 mM EGTA를 0.3 ml 첨가하였다. 준비된 시료는 30 초 동안 강하게 섞은 후 유기 용매층과 물 층을 분리하기 위해 21,000 \times g로 5분 동안 원심분리를 하였다. 분리된 수층 (0.5 ml)은 다시 모아, 5 ml의 액체 형광용액에 녹였으며 Liquid Scintillation Counter (Packard, 미국)로 활성을 측정하였다.

재조합 ML-PLC δ 에 대한 다클론 항체 준비

ML-PLC δ 에 대한 다클론 항체는 재조합된 대장균에서 발현된 재조합 단백질을 이용하였다. 먼저 대장균에서 발현된 ML-PLC δ 의 침전 분획물 (pellet fraction)을 8 M urea, 5 mM imidazole, 0.5 M NaCl을 포함하는 20 mM Tris/pH 7.9에 녹인 후, 단백질의 완전 용해를 위해 1시간 동안 차가운 상태 (ice)에서 보관하였다. 그리고 Endogenous *E. coli* 단백질을 제거하기 위해 실온에서 16,000 \times g에서 30분간 원심분리 하였다. 원심분리한 침전물은 다시 한번 생리식염수로 세척 한 후, 0.5% SDS, 5% glycerol, 3.6 mM β -mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue가 포함된 15 mM Tris/pH 6.8에 녹였으며, SDS-PAGE (7.5%)로 분리하였다. 0.1% Coomassie Brilliant Blue를 이용하여 2시간동안 염색 후 ML-PLC δ 를 확인하였다. ML-PLC δ 의 단백질 band에 해당하는 겔 (gel) 부분은 잘라서, 파쇄 후 3회 물로 추출하였으며, 1,000 \times g에서 5분 동안 원심분리한 후 상층액은 모아 일정하게 혼합하여 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 상층액은 다시 모

아서 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 농축하였다. 이 상층액 50 μl 와 Freund's complete adjuvant와 혼합한 후 토끼에 주사하였으며, 이후 4번의 booster injection은 Freund's incomplete adjuvant를 이용하여 2주 간격으로 주사하였다. 마지막 booster후에 얻어진 항혈청의 적정 농도는 Western blotting을 위한 1: 200,000 이상이었다.

ML-PLC δ 의 조직내 분포 및 전기영동

MS-222로 마취한 어류를 각종 장기 (0.5- 1 g; 간, 위, 장, 두신, 비장)을 절취하여 상기의 균질용액에 넣어서 유리 균질기로 균질화하였다. 균질화된 샘플은 1,000 \times g로 30분간 원심분리하였으며, 상층액은 최종적으로 2 M이 되도록 KCl을 넣은 후, 4 °C에서 2시간 동안 교반시켰으며, 12,000 \times g로 30분 동안 다시 원심분리하였다. 상층액을 균질 완충액 1 리터에 12시간 동안 투석 후, 단백질 양을 측정하여 전기영동을 실시하였다. 전기영동은 Laemmli (1970)의 방법에 따라 수행하였다. 전기 영동한 겔은 0.1% Coomassie Brilliant Blue 염색을 하거나 Western blotting을 실시하였다.

Western blotting

상기의 방법으로 전기 영동한 샘플은 nitrocellulose 막으로 단백질들을 옮겼다. 옮겨진 nitrocellulose 막은 washing buffer (TTBS: tween 20를 포함한 Tris buffer saline/pH 7.6)로 세척 후에 다시 실온에서 1시간 동안 3% BSA를 포함한 TTBS로 blocking하였으며, 다양한 항체 [polyclonal anti-PLC delta antibody (TTBS, dilution of 1: 1,000), monoclonal anti-his taq antibody]를 4 °C에서 12시간 동안 배양하였으며 다시 TTBS를 사용하여 세척하였다. 이 막은 phosphatase-labeled goat anti-rabbit IgG나 혹은 goat anti-mouse IgG (1: 1,000)로 실온에서 2시간 동안 배양하였고, 다시 TTBS로 세 번 세척하였다. 발색은 AP conjugation kit (Bio-Rad, 미국)을 이용하였다.

단백질 농도 분석

단백질 농도측정은 Bradford 방법을 변형한 Bio-Rad protein assay kit를 사용하여 분석하였으며, 표준물질로 bovine serum albumin를 사용하였다.

결 과

미꾸라지로부터 재조합 및 wild PLC δ 의 발현, 분리 및 정제

재조합 ML-PLC δ 를 만들기 위해서 pET28a 벡터를 이용하여 *E. coli*에서 배양하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 과발현 된 ML-PLC δ 는 His-taq 칼럼 및 gel filtration 칼럼등을 이용하여 분리정제 하였으며, 각각의 yield 및 활성 값은 Table 1에서 나타내었다. 대장균으로부터 얻어진 ML-PLC δ 는 단일 항체인 His taq 항체를 이용하여 Western blotting의 방법으로서 확인할 수 있었다. 이와 같이 얻어진 재조합 ML-PLC δ 는 대조구에 비해서 큰 활성을 나타내었으며, PIP₂-가수분해 활성에 있어서 농도의존적인 활성을 나타냄을 알 수 있었다 (Fig. 2). Table 1의 정제 과정 등을 거치면서 대략 PI-가수분해 활성에 있어서 대략 16.871 nmol/min/mg의 specific activity를 나타내었다. 이 분획물들은 각각 100 μl 씩 분주하여 -75 °C에 보관하면서 재조합 ML-PLC δ 의 활성 분획물로 이용하였다.

Wild ML-PLC δ 를 정제하기 위해서 미꾸라지의 간을 가지고 정제과정을 거쳤다. 먼저 대부분의 PLC는 heparin 칼럼에 대하여 친화성을 가지므로 우선적으로 open heparin 칼럼을 통과시켰다 (Fig 3A). Open heparin 칼럼을 통하여 용출된 PLC 활성을 가진 분획물들은 다시 모아서 투석한 후, 분석용 heparin 칼럼으로 한번 더 정제하였다 (Fig. 3B). 그림에서 보는 바와 같이 분석용 heparin 칼럼으로 용출되어진 PLC 활성 분획들은 ML-PLC δ 에 대한 다클론 항체에 대하여 면역반응을 일으키는 분획들이 대략 20

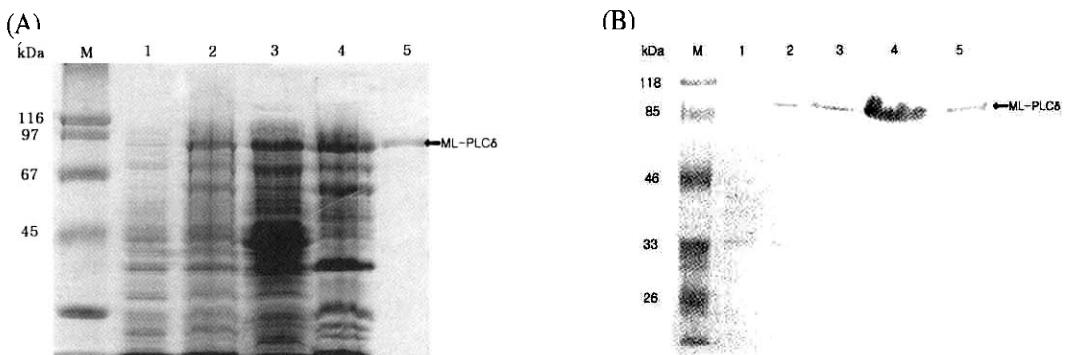


Fig. 1. Expression and purification of recombinant ML-PLC δ . (A) Protein samples were separated by SDS-PAGE (10%) and visualized by Coomassie R-250 blue staining. (B) Western blotting analysis using anti-His tag monoclonal antibody. Antisera were used in dilutions of 1: 1,000. lane M: standard size marker; lane 1, whole cell lysate (20 μ g of protein) of *E. coli* with expression vector (pET-Self) only. lanes 2-5, ML-PLC δ -expressing *E. coli* induced with 0.4 mM IPTG for 3 h at 18 $^{\circ}$ C: lane 2, whole cell lysate (25 μ g of protein) lane 3, supernatant fraction (30 μ g of protein) lane 4, pellet fraction (26 μ g of protein) lane 5, His-bind column purified fraction (3 μ g of protein). The positions of standard size markers are shown on the left. The position of ML-PLC δ is shown.

Table 1. Purification of recombinant ML-PLC δ .

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/min/mg)	Fold purification	Yield (%)
Crude extract	54	7.641	0.1415	1	100
Ni ²⁺ -NTA	0.48	4.951	10.871	73	64
Gel filtration	0.24	4.015	16.871	119	52

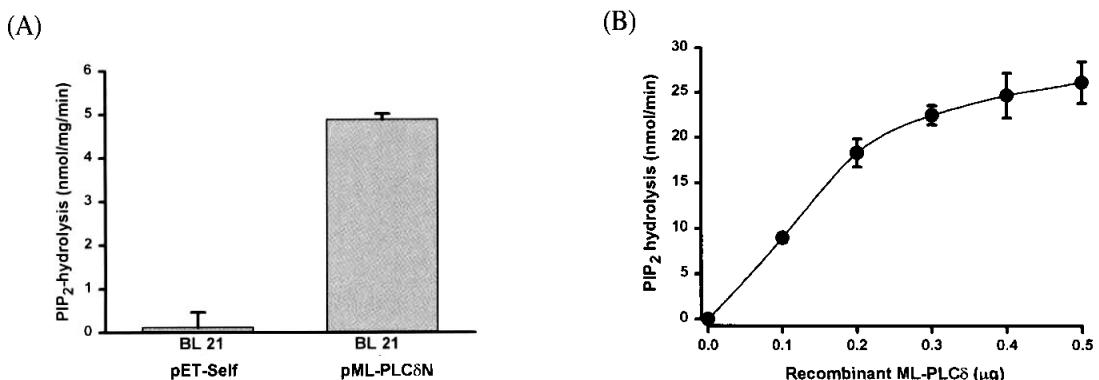


Fig. 2. PIP₂ hydrolyzing activity of ML-PLC δ . (A) The *E. coli* BL 21 cells were transformed with a control plasmid (BL21 + pET-Self) or the ML-PLC δ -expressing plasmid, pML-PLC δ N (BL21 + pML-PLC δ N). The cell lysates (30 μ g of protein) were acquired from a control and expressing plasmid, respectively, and PIP₂ hydrolyzing activity was assayed in the presence of 0.3 mM Ca²⁺. (B) Concentration-dependent PIP₂ hydrolyzing activity of purified recombinant ML-PLC δ . PIP₂ hydrolyzing activity was assayed in the presence of 0.3 mM Ca²⁺. Error bars represent standard errors of triplicates.

Table 2. Purification of wild ML-PLC δ .

Purification Step	Total protein (mg)	Total activity (nmol/min)	Specific activity (nmol/min/mg)	Fold purification	Yield (%)
Crude extract	117	14.67	0.13	1	100
Open Heparin	24	13.32	5.43	41	88
Heparin-5PW	0.6	11.07	18.45	148	75

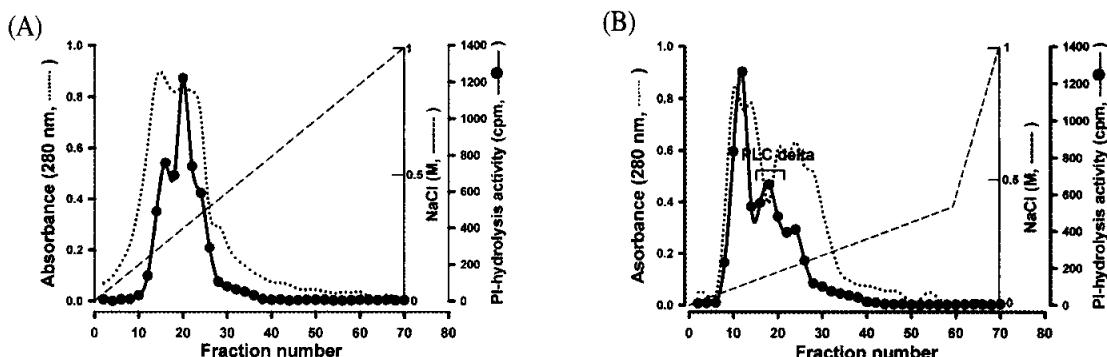
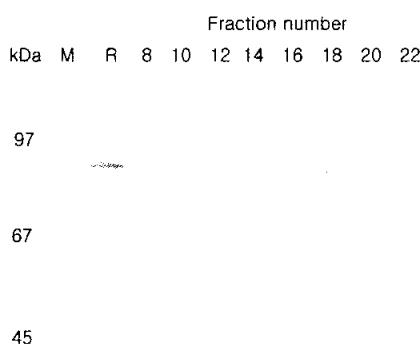


Fig. 3. Chromatography of PLC activity through an open heparin sephacryl column (A) and analytical heparin 5-PW column (B).

Fig. 4. Identification through immuno blotting of wild ML-PLC δ . Protein samples were separated by SDS-PAGE (10%) and then transferred to nitrocellulose membrane. Lane R: recombinant ML-PLC δ . 1Ab: anti-recombinant ML-PLC δ polyclonal antibody. Antisera were used in dilutions of 1:1,000.

번 주위에서 나타났다 (Fig. 4). 이 분획물들은 각각 100 μ l 씩 분주하여 -75 °C에 보관하면서 wild ML-PLC δ 의 활성분획물로 이용하였다.

재조합 및 wild ML-PLC δ 의 생화학적 특성 비교

본 실험에서 PIP₂-가수분해 활성에 있어서의 재조합 및 wild ML-PLC δ 활성은 3 × 10⁴ M 칼슘 농도하에서 가장 큰 활성을 나타내나 (Fig. 5A), PI-가수분해 활성에 있어서는 10⁴ M에서 wild 및 재조합 ML-PLC δ 활성이 가장 큰 활성을 나타냄을 알 수 있었다 (Fig. 5B).

PI-PLC는 활성에 있어서 대부분 중성 pH에서 최적의 PLC 활성을 가진다고 알려져 있는데, 어류로부터 얻은 재조합 및 wild ML-PLC δ 가 어떠한 적정 pH하에서 가장 큰 활성을 나타내는지를 PI-가수분해 활성을 통하여 측정하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 wild ML-PLC δ 는 pH 7.5

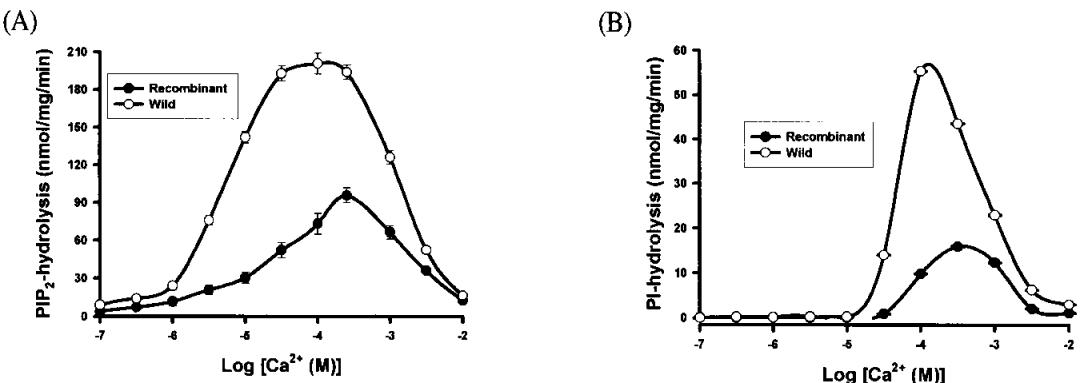


Fig. 5. Ca^{2+} dependence of the activity of recombinant and wild ML-PLC δ . The active fractions ($0.2 \mu\text{g}$ of ML-PLC δ) of recombinant and wild ML-PLC δ from purification process were incubated with phospholipid substrate vesicles under various conditions as indicated. The activity was determined by measuring the generation of [^3H] products from [^3H]phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate (A) or [^3H]pam:PI (B) as described under "Material and Methods." Results are given as the mean \pm S.E.

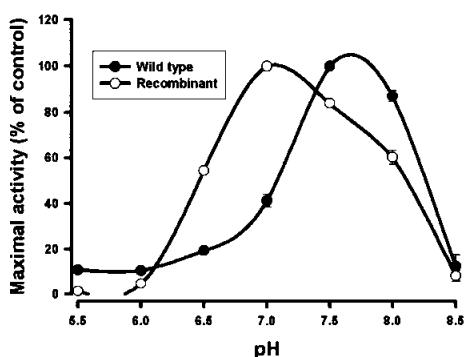


Fig. 6. pH dependence of the activity of recombinant and wild ML-PLC δ . The active fractions ($0.2 \mu\text{g}$ of ML-PLC δ) of recombinant and wild ML-PLC δ from purification process were incubated with phospholipid substrate vesicles under various conditions as indicated. The activity was determined by measuring the generation of [^3H]-labeled inositol from [^3H]pam:PI as described under "Material and Methods." The maximal activities are shown as % of the activity at 7.0 (recombinant ML-PLC δ), pH 7.5 (wild ML-PLC δ), respectively. Effect of pH was examined with MES buffer (pH 5.5–6.5) and Tris/HCl buffer (pH 7–8.5). Results are given as the mean \pm S.E. of triplicate determination from one of four-independent experiments.

에서 가장 큰 활성을 나타내었으나, 재조합 ML-PLC δ 는 pH 7.0에서 가장 큰 활성을 나타내었다.

지질류의 PLC 활성에 있어서의 영향을 조사

하였을 시에 phosphatidylethanolamine (PE)의 농도에 대하여 PIP₂-가수분해 활성을 농도 의존적으로 활성을 나타내었으며, PE가 없을 때에는 활성을 나타내지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 7). 또한, PC의 농도가 증가함에 따라 PIP₂-가수분해 활성이 증가됨을 알 수 있었다.

재조합 및 wild ML-PLC δ 의 PI- 나 PIP₂-가수분해시에 SDC의 양에 따른 활성의 변화를 조사하였다. Fig. 8에서 보는 바와 같이 0.08%의 SDC 양의 존재 하에서 ML-PLC δ 의 활성이 가장 크게 나타난다는 사실을 알 수 있었다.

현재 포유류 PI-PLC δ 는 basic protein과 polyamine류 등에 의해서 조절된다고 알려져 있는 데 (Banno *et al.*, 1994; Pawelczyk and Matecki, 1998) 본 실험에서 얻어진 재조합 및 wild ML-PLC δ 를 가지고서 spermine에 대한 PI-가수분해 활성을 측정하였다 (Fig. 9). 그림에서 보는 바와 같이 spermine의 농도가 증가할수록 재조합 및 wild ML-PLC δ 의 PI-가수분해 활성이 감소되어짐을 알 수 있었다. 그러나 lysozyme이나 혹은 thrombin의 존재 하에서 재조합 및 wild ML-PLC δ 의 PI-가수분해 활성은 아무런 영향을 받지 않음을 알 수 있었다 (data not shown).

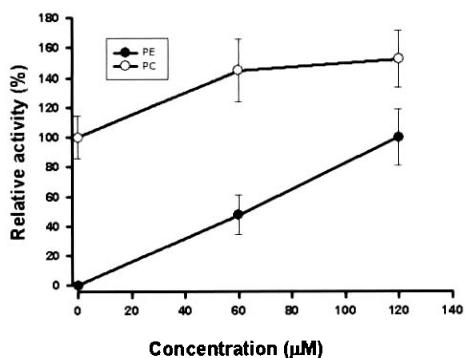


Fig. 7. Effect of phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylcholine (PC) on the activity of mud loach recombinant (A) and wild ML-PLC δ (B). The activity was determined by measuring the generation of [3 H]-labeled phosphatidylinositol from [3 H]phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate as described under "Material and Methods." Error bars represent standard errors of triplicates.

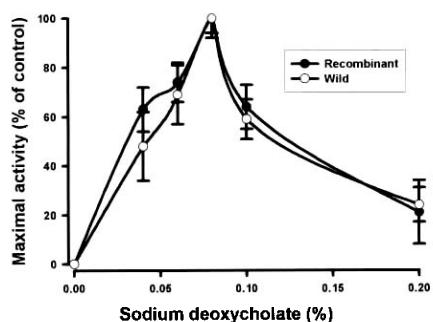


Fig. 8. Effect of sodium deoxycholate (SDC) on the activity of mudloach recombinant and wild ML-PLC δ . The activity was determined by measuring the generation of [3 H]-labeled phosphatidylinositol from [3 H]phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate as described under "Material and Methods." Error bars represent standard errors of triplicates.

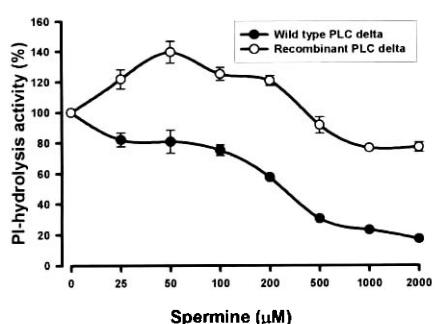


Fig. 9. Effect of spermine on the activity of mud loach recombinant and wild ML-PLC δ . The activity was determined by measuring the generation of [3 H]-labeled inositol from [3 H]phosphatidylinositol as described under "Material and Methods."

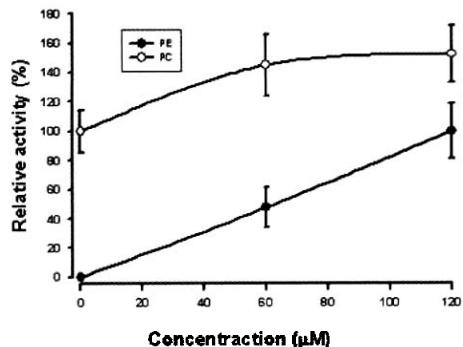


Fig. 10. Tissue distribution of ML-PLC δ . Lane M: standard size marker; lane 1, Recombinant ML-PLC δ (2 μ g of protein); lane 2, Wild purification ML-PLC δ (10 μ g of protein); lane 3, Brain (50 μ g of protein); lane 4, Gill (50 μ g of protein); lane 5, Muscle (50 μ g of protein); lane 6, Heart (50 μ g of protein); lane 7, Liver (50 μ g of protein); lane 8, Spleen (50 μ g of protein); lane 9, Intestine (50 μ g of protein); lane 10, Egg (50 μ g of protein). The positions of standard size markers are shown on the left.

미꾸라지 각 기관별 ML-PLC δ 의 조직 분포

포유류 PLC δ 는 대개 진핵 세포에서 발현될시 다양한 형태의 크기로서 발현되어진다고 알려져 있다. 따라서, 미꾸라지의 간에서 클로닝 되어진 ML-PLC δ 가 미꾸라지 각 기관에서의 발현 정도 및 발현 크기를 Western blotting으로 확인하고자 하였다. Fig. 10에서 보는 바와 같이 발현 양이 상대적으로 간, 아가미, 근육 등에서 적게

나타나나, 대신에 뇌, 알, 심장 등에서는 발현이 많이 됨을 알 수 있었다.

고 찰

본 논문은 어류에서 $\text{PLC}\delta$ 를 통한 생체신호가 어떠한 역할을 할 것인지에 대한 기초적인 자료를 얻기 위하여 미꾸라지, *M. mizolepis*로부터 재조합 및 wild ML- $\text{PLC}\delta$ 를 분리하여 생화학적 특성에 대해서 알아보았다.

현재 포유류 등에서 $\text{PLC}\delta$ isozymes에 대한 생화학적 특성에 관한 연구는 많이 이루어지고 있다. *In vitro* 상태에서 모든 진핵세포의 PLC 효소들은 활성에 대하여 칼슘이온을 필요로 한다고 알려져 있다 (Lee & Rhee, 1996). $\text{PLC}\delta$ 효소들은 칼슘이온에 가장 민감한데 $\text{PLC}\delta 1$ 뿐만 아니라 $\text{PLC}\delta 3, 4$ isozymes은 $1\text{-}10 \mu\text{M}$ 의 농도 칼슘에 의해서 전제적으로 활성을 가진다고 알려져 있다 (Cheng *et al.*, 1995; Ghosh *et al.*, 1997; Lee and Rhee, 1996; Pawelczyk and Lowenstein, 1992; Pawelczyk and Matecki, 1998). 재조합 ML- $\text{PLC}\delta$ 의 칼슘이온에 있어서의 최대 활성은 $3 \times 10^{-4}\text{M Ca}^{2+}$, half-maximal 활성은 $3 \times 10^{-5}\text{M Ca}^{2+}$ 로 나타났는데, 이것은 rat $\text{PLC}\delta 1$ isotype의 적정 칼슘양인 $3\text{-}5 \times 10^{-5}\text{M Ca}^{2+}$ 보다도 많은 양을 필요로 한다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 이유는 재조합 ML- $\text{PLC}\delta$ 의 효소활성이 장시간의 투석과 imidazole의 오염 때문이 아닌가 추정되어 진다.

본 논문에서 재조합 및 wild ML- $\text{PLC}\delta$ 의 효소 활성의 특성을 규명하기 위하여 각 효소는 단백질 정제 과정 등을 통하여 정제하였는데, *In vitro*에서 PIP_2 -가수분해 활성이 차이가 나타났었다. 이는 이전에 Pawelczyk and Matecki (1997a) 등이 사람 재조합 및 wild $\text{PLC}\delta 3$ 의 PIP_2 가수분해 활성이 같게 나타난다는 결과는 다르게 나타났다. 이와 같은 차이점은 아마도 재조합 ML- $\text{PLC}\delta$ 가 대장균에서 과발현시 단백질의 3차 구조가 wild 형태와는 다른 형태가 생성되는 것이 아닌가 추

정되어진다.

포유류 등에서 PI- $\text{PLC}\delta$ isozyme의 효소활성 조절에 대한 연구는 주로 *in vitro* 및 *in vivo* 분석 하에 $\text{PLC}\delta$ isozyme의 효소활성의 변화 등을 조사하므로서 이루어지고 있다. 본 실험에서는 *in vitro* 방법을 통하여 재조합 및 wild ML- $\text{PLC}\delta$ 의 효소활성의 변화를 조사하였는데, sodium deoxycholate (SDC) 및 phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC)와 같은 지질류에 대하여 PLC 활성을 농도의존적인 활성을 나타내나, spermine과 같은 polyamine류의 존재하에서는 농도 의존적으로 활성이 감소됨을 알 수 있었다. 이것은 이전에 포유류 등에서 보고되어진 결과와는 다른 결과를 도출하였다. 이전의 보고들에 따르면, PI-PLC의 PIP_2 -가수분해 활성에 있어서 $\text{PLC}\delta 1$ isozyme은 PE, PC, sphingosine, thrombin 및 spermine 등이 활성인자로 작용하나, $\text{PLC}\delta 3$ isozyme에 있어서는 spermine, cAMP 및 PE등은 억제제로 작용한다고 알려져 있다 (Matecki and Pawelczyk, 1997b; Pawelczyk and Lowenstein, 1992; Pawelczyk and Matecki, 1998, 1999). 이러한 차이는 아마도 포유류 $\text{PLC}\delta$ isozyme과 ML- $\text{PLC}\delta$ isozyme의 아미노산 서열의 차이에서 비롯된 단백질 구조의 차이 때문이 아닌가 추정되어진다.

최근에 포유류 $\text{PLC}\delta$ isozymes은 다양한 동물 조직에서 검출되며 발현양이 차이가 난다고 보고되고 있다. 쥐 $\text{PLC}\delta 1$ 은 골격근, 비장, 정소, 폐와 뇌등에서 발견되며 (Cheng *et al.*, 1995), $\text{PLC}\delta 2$ 는 주로 장의 metaplasia와 adenocarcinoma에서 중요하게 발현된다고 보고되나 근육, 소화기, 조혈세포 및 임파 조직등에서는 발현되지 않는다고 보고되었다 (Banno *et al.*, 1994). 게다가, 쥐 $\text{PLC}\delta 3$ 와 4 isozymes는 신장, 심근, 동맥, 비장, 간, 정소 및 뇌등에서 검출된다고 보고하였다 (Banno *et al.*, 1994; Lee and Rhee, 1995; Pawelczyk and Matecki, 1998). ML- $\text{PLC}\delta$ 를 미꾸라지 조직에서의 발현 양을 Western blotting으로 비교하여 보았을 시에 미꾸라지의 각 장기에서 다양

한 형태 및 발현 양을 보임을 알 수 있었다. 비록, PLC δ 가 몇 개의 형태로 구성되어져 있는지는 알 수 없었으나, 아마도 2개 이상의 PLC δ 가 존재하지 않는가 추정되어졌다. 이와 같은 결과들로 미루어서, ML-PLC δ 의 생화학적 특성은 이전에 알려진 포유류 PLC δ isozyme의 생화학적 특성과는 다른 생화학적 특성을 가짐을 추정할 수 있었다.

현재 어류에서 PLC에 대한 생화학적 특성 및 기능에 대한 연구는 별로 이루어져 있지 않으나, 몇몇 종을 대상으로 하여 어류의 난 수정(egg fertilization)을 촉진시킨다고 보고되고 있다 (Asano-Miyoshi *et al.*, 2000; Borski *et al.*, 2002; Burlando *et al.*, 2003; Cadiou and molle, 2003; Yasuoka *et al.*, 2004). 그러나, 아직까지 어류에서의 PLC를 통한 다양한 생리적 기능에 대한 연구는 별로 이루어지지 않고 있다. 따라서, 향후 수계환경에서의 어류내의 PLC의 생리적 기능 등에 대한 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

미꾸라지 (mud loach, *Misgurnus mizolepis*)의 간으로부터 클로닝한 phosphoinositide-specific phospholipase C δ (ML-PLC δ)를 대장균 (*E. coli*)에서 과발현시켜 만든 재조합 ML-PLC δ 와 미꾸라지 간 조직으로부터 직접 정제한 ML-PLC δ 의 생화학적 특성을 비교분석하였다. 우선, pET28a vector (Novagen)를 이용하여 *E. coli* BL21(DE3)에서 과발현된 재조합 ML-PLC δ 은 Ni²⁺-NTA affinity 크로마토그래피 및 gel filtration 칼럼에 의해서 정제되었다. 미꾸라지 간 조직으로 ML-PLC δ 는 open heparin 칼럼 및 분석용 heparin 칼럼등을 통하여 부분 정제하였다. 두개의 재조합 및 wild ML-PLC δ 는 phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate (PIP₂)에 대한 농도 의존적 PLC 활성을 보여주었고, 그 활성은 포유류 PLC δ 효소와 유사하게 칼슘 농도에 의존적인 활성을 나타내

었다. 재조합 및 wild ML-PLC δ 는 각각 pH 7.0 및 7.5에서 가장 큰 PI-가수분해 활성을 나타낸다는 사실을 알 수 있었다. 게다가, 재조합 및 wild ML-PLC δ 는 sodium doecylcholate (SDC) 및 phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC)와 같은 지질류에 대하여 농도의존적인 활성을 나타내나, spermine과 같은 polyamine류의 존재하에서는 농도 의존적으로 PLC 활성이 감소됨을 알 수 있었다. 미꾸라지 각 기관들의 ML-PLC δ 의 발현양상 및 양 등을 측정하여 보았을 때 ML-PLC δ 는 포유류 PLC δ 와 마찬가지로 다양한 형태의 PLC δ 가 존재함을 알 수 있었다. 이와 같은 결과들로 미루어서 미꾸라지로부터 얻은 ML-PLC δ 는 포유류의 PLC δ isozymes과 유사한 형태의 생화학적 특성을 가지고, 포유류 PLC δ 1과 PLC δ 3 isozyme의 생화학적 특성을 함께 가짐을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 부경대학교 발전기금재단의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구 결과의 일부임을 밝힙니다.

참 고 문 헌

- Abogadie, F.C., Bruch, R.C., Wurzburger, R., Margolis, F. L. and Farman A. I.: Molecular cloning of a phosphoinositide-specific phospholipase C from catfish olfactory rosettes. Brain Res. Mol. Brain Res., 31: 10-16, 1995.
- Asano-Miyoshi, M., Abe, K. and Emori, Y.: Co-expression of calcium signaling component in vertebrate taste bud cells. Neuro. Sci., 283: 61-64, 2000.
- Banno, Y., Okano, Y. and Nozawa, Y.: Thrombin-mediated phosphoinositide hydrolysis in chinese hamster ovary cells overexpressing phospholipase C- δ 1. J. Biol. Chem., 269:

- 15846-15852, 1994.
- Borski, R. J., Hyde, G. N. and Fruchtman, S.: Signal transduction mechanisms mediating rapid, nongenomic effects of cortisol on prolactin release. *Steroids*, 67: 539-548, 2002.
- Burlando, B., Bonomo, M., Fabbri, E., Dondero, F. and Viarengo, A.: Hg²⁺signaling in trout hepatoma (RTH-149) cells: involvement of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release. *Cell Calcium.*, 34: 285-293, 2003.
- Cadiou, J. and Molle, G.: Adenophostin A and imipramine are two activators of the olfactory inositol 1,4,5-trisphosphate-gated channel in fish olfactory cilia. *Eur. Biophys. J.*, 32: 106-112, 2003.
- Cheng, H. F., Jiang, M. F., Chen, C. L., Liu, S. M., Wong, L. P., Lomasney, J. W. and King, K.: Cloning and identification of amino acid residues of human phospholipase C delta 1 essential for catalysis. *J. Biol. Chem.*, 270: 5494-505, 1995.
- Coward, K., Champos-Mendoza, A., Larman, M., Hibbitt, O., McAndrew, B., Bromage, N. and Parrington, J.: Teleost fish spermatozoa contain a cytosolic protein factor that induces calcium release in sea urchin egg homogenates and triggers calcium oscillations when injected into mouse oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 305: 299-304, 2003.
- Essen, L. O., Perusic, O., Cheung, R., Katan, M. and Williams, R. L.: Crystal structure of a mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C δ . *Nature*, 380: 595-602, 1996.
- Feng, J-E., Rhee, S. G. and Im, M-J.: Evidence that phospholipase C δ 1 is the effector in the Gh (transglutaminase II)-mediated signalling. *J. Biol. Chem.*, 271: 16451-16454, 1996.
- Ferguson, K. M., Lemmon, M. A., Schlessinger, J. and Sligler, P. B.: Structure of the high affinity complex of inositol triphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell*, 83: 1037-1046, 1995.
- Gasa, R., Trinh, K. Y., Yu, K., Wilkie, T. M. and Newgard, C. B.: Overexpression of G11 α and isoforms of phospholipase C in islet β -cells reveals a lack of correlation between inositol phosphate accumulation and insulin secretion. *Diabetes*, 48: 1035-1044, 1999.
- Ghosh, S., Pawelczyk, T. and Lowenstein, J. M.: Phospholipase C δ 1 and δ 3 from human fibroblast. High-yield expression in *Escherichia coli*, simple purification, and properties. *Pro. Exp. Purif.*, 9: 262-278, 1997.
- Haber, M. T., Fukui, T., Lebowiz, M. S. and Lowenstein, J. M.: Activation of phosphoinositide-specific phospholipase C δ 1 requires that Ca²⁺ bind to the catalytic domain but not the C2 domain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 288: 243-249, 1991.
- Hodson, E.A.M., Ashley, C.C., Hughes, A.D. and Lymn, J.S.: Regulation of phospholipase C-delta by GTP-binding proteins-rhoA as an inhibitory modulator. *Biochim. Biophys. Acta*, 1403: 97-101, 1998.
- Homma, Y. and Emori, Y.: A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C- δ stimulating activities. *EMBO J.*, 14: 286-291, 1995.
- Irino, Y., Cho, H., Nakamura, Y., Nakahara, M., Furutani, M., Suh, P.-G., Takenawa, T. and Fukami, K.: Phospholipase C δ -type consists of three isozymes bovine PLC δ 2 is a homologue of human/mouse PLC δ 4. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 320: 537-543, 2004.
- Kantan, M.: Families of phosphoinositide-specific

- phospholipase C structure and function. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1436: 5-17, 1988.
- Kim, M. S., Seo, J. S., Choi, G. E., Lim, S. U., Chung, J. K. and Lee, H. H.: Molecular cloning and expression analysis of phospholipase C δ from mud loach, *Misgurnus mizolepis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 139B: 681-693, 2004.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- Lee, S.B. and Rhee, S.G.: Molecular cloning, splice variants, expression, and purification of phospholipase C- δ 4. *J. Biol. Chem.*, 271: 25-31, 1996.
- Lee, W. K., Kim, J. K., Seo, M. S., Cha, J. H., Lee, K. J., Rha, H. K., Min, D. S., Jo, Y. H. and Lee, K. H.: Molecular cloning and expression analysis of a mouse phospholipase C-delta1. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 261: 393-399, 1999.
- Liu, N., Fukami, K., Yu, H. and Takenawa, T.: A new phospholipase C delta 4 is induced at S-phase of the cell cycle and appears in the nucleus. *J. Biol. Chem.*, 271: 355-360, 1996.
- Lopez, I., Mak, E. C., Ding, J., Hamm, H. E. and Lomasney, J. W.: A novel bifunctional phospholipase C that is regulated by G α 12 and stimulates the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.*, 276: 2758-2765, 2001.
- Lomasney, J. W., Cheng, H-F., Rofflers, S. R., and King, K.: Activation of phospholipase C δ 1 through C2 domain by a Ca $^{2+}$ -enzyme-phosphatidylserine ternary complex. *J. Biol. Chem.*, 274: 21995-22001, 1999.
- Meldrum, E., Katan, M. and Parker, P.: A novel inositol-phospholipid-specific phospholipase C. Rapid purification and characterization. *Eur. J. Biochen.*, 182: 673-677, 1989.
- Nakamura, Y., Fukami, K., Yu, H., Takenawa, K., Kataoka, K., Shirakata, Y., Nishikawa, S-I., Hashimoto, K., Yoshida, N. and Takenawa, T.: Phospholipase C δ 1 is required for skin stem cell lineage commitment. *EMBO. J.*, 22: 2281-2291, 2003.
- Pawelczyk, T. and Lowenstein, J. M.: Regulation of phospholipase C δ activity by sphingomyelin and sphingosine. *Arch. Biochem. Biophys.*, 297: 328-333, 1992.
- Pawelczyk, T. and Lowenstein, J. M.: The effect of different molecular species of sphingomyelin on phospholipase C δ 1 activity. *Biochemie.*, 79: 741-748, 1997.
- Pawelczyk, T. and Matecki, A.: Expression, Purification and kinetic properties of human recombinant phospholipase C δ 3. *Acta Biochim. Polon.*, 44: 221-230, 1997a.
- Pawelczyk, T. and Matecki, A.: Structure requirements of phospholipase C δ 1 for regulation by spermine, sphingosine and sphingomyelin. *Eur. J. Biochem.*, 248: 459-465, 1997b.
- Pawelczyk, T. and Matecki, A.: Localization of phospholipase C δ 3 in the cell and regulation of its activity by phospholipids and calcium. *Eur. J. Biochem.*, 257: 169-177, 1998.
- Pawelczyk, T. and Matecki, A.: Phospholipase C δ 3 binds with high specificity to phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and phosphatidic acid in bilayer membranes. *Eur. J. Biochem.*, 262: 291-298, 1999.
- Rebecchi, M. J. and Pentyala, S. N.: Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Rev.*, 80: 1291-1335, 2000.
- Rhee, S. G.: Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.*,

- 70: 281-312, 2001.
- Saunders, C. M., Larman, M. G., Parrinton, J., Cox, L. J., Royse, J., Blayney, L. M., Swann, K. and Lai, F. A.: PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca $^{2+}$ oscillations in eggs and embryo development. *Develop.*, 129: 3533-3544, 2002.
- Simoes, A. P., Reed, J., Schnabel, P., Schnabel, M., Camps, P. and Gierschik, T.: Characterization of putative polyphosphoinositide binding motifs from phospholipase C δ -2. *Biochem.*, 214: 5113-5119, 1995.
- Slivka, S. R. and Insel, P. A.: Phorbol ester and neomycin dissociate bradykinin receptor-mediated arachidonic acid release and polyphosphoinositide hydrolysis in madin-darby canine kidney cells. Evidence that bradykinin mediates noninterdependent activation of phospholipases A2 and C. *J. Biol. Chem.*, 263: 14640-14647, 1988.
- Song, C., Hu, C-D., Masago, M., Kariya, K-I., Yamawaki-Kataoka, Y., Shibatohge, M., Wu, D., Satoh, T. and Kataoka, T.: Regulation of a novel human phospholipase C, PLC ϵ , through membrane targeting by Ras. *J. Biol. Chem.*, 276: 2752-2757, 2001.
- Takenawa, T., Homma, Y., and Emori, Y.: Properties of phospholipase C isozymes. *Methods Enzymol.*, 197: 551-518, 1991.
- Towbin, H. and Gordon, J.: Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. *J. Immunol. Methods.*, 72: 313, 1984.
- Williams, R. L.: Mammalian phosphoinositide-specific phospholipase C. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1441: 255-267, 1999.
- Yagisawa, H., Fujiik, M. and Hirata, M.: Phospholipase C- δ and related molecules. *Biochem. Soc. Transactions*, 27: 652-657, 1994.
- Yasuoka, A., Aihara, Y., Matsumoto, I. and Abe, K.: Phospholipase C-beta 2 as a mammalian taste signaling marker is expressed in the multiple gustatory tissues of medaka fish, *Oryzias latipes*. *mech. Dev.*, 121: 985-989, 2004.

Manuscript Received : March 03, 2005

Revision Accepted : April 01, 2005

Responsible Editorial Member : Kwan-Ha Park
(Kunsan Univ.)