

HeLa 세포에서 IgE-dependent Histamine-Releasing Factor와 Triosephosphate Isomerase의 상호작용 규명

문지애 · 김화정 · 이경림*
이화여자대학교 약학대학

Interaction between IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor and Triosephosphate Isomerase in HeLa Cells. Moon, Ji-Ae, Hwa-Jung Kim, and Kyunglim Lee*. College of Pharmacy, Ewha Woman's University, Seoul 120-750, Korea – IgE-dependent histamine-releasing factor (HRF) is found extracellularly to regulate the degranulation process of histamine in mast cells and basophils and known to play a predominant role in the pathogenesis of chronic allergic disease. HRF has been also identified in the intracellular region of the cell. Previously, we reported that HRF interacts with the 3rd cytoplasmic domain of the alpha subunit of Na,K-ATPase. To understand the molecular mechanism of the regulation of Na,K-ATPase activity by HRF, we investigated the interaction between HRF and TPI since TPI was obtained as HRF-interacting protein in HeLa cDNA library, using yeast two hybrid screening. Domain mapping study of the interaction between HRF and TPI revealed that the C-terminal region of the residue 156-249 of TPI is involved in the interaction with HRF. The interaction between HRF and TPI was confirmed by immunoprecipitation from HeLa cell extracts. Our results suggest that TPI is a HRF-binding protein and the interaction between HRF and TPI may thus affect Na,K-ATPase activity.

Key words: HRF, TPI, yeast two hybrid, Na,K-ATPase

IgE-dependent histamine releasing factor(HRF)는 1986년 알레르겐 자극시 배출되는 분비액에서 처음 확인된 이후, 1995년 MacDonald 등에 의해 아토피 환자의 림프세포와 알레르기 환자의 생체액에서 분리, 정제되었다. 또한 HRF는 성장관련 단백질로 알려진 P23와 동일한 단백질임이 밝혀졌다[4, 8]. HRF는 1980년대까지 암특이적 단백질로 그 합성이 암세포 증식과 관련되어 나타난다고 생각되었으나[6, 16] 이후 신장 또는 신장세포암(renal cell carcinoma)을 제외한 모든 정상 세포에서도 발견될 뿐 아니라 포유류, 고등식물, 효모 등에서도 발견되었으며 거의 모든 종에 있어 높은 상동성(homology)을 보이므로[16] 세포 내에서는 없어서는 안 될 house keeping gene으로 중요한 역할을 하리라 추측되었으나 그 정확한 기능은 알려지지 않은 상태였다[11].

본 연구실에서는 yeast two hybrid assay를 통해 Na,K-ATPase의 결합단백질로 HRF를 동정한 바 있고, 특히 Na,K-ATPase의 3번째 세포질 루프와 상호작용하여 Na,K-ATPase의 효소활성을 감소시킨다는 것을 밝혔다[10]. 한편 HRF의 98-100번 아미노산 잔기에는 인산화가 될 수 있는 SIK이 존재하며 본 연구실에서는 HRF가 PKC에 의해 인산화되며, Ser-98이 인산화되는 자리임을 확인하였다. HRF와 Na,K-

ATPase의 상호작용에는 여러 기전이 가능하겠지만, 그 중에서도 특히 HRF의 결합단백질, 즉 kinase에 의한 조절이 Na,K-ATPase와의 상호작용에 관여할 수 있다고 생각하였다[2, 13-15]. 따라서 그 조절단백질을 알아보기 위해 HRF를 bait로 yeast two hybrid assay를 실행한 결과 해당과정에 관여하는 TPI (triosephosphate isomerase) 효소를 발견하였다. TPI는 중간 상동성이 높고, 주로 해당과정에서 Dihydroxyacetone phosphate(DHAP)와 Glyceraldehyde-3-phosphate를 서로 전환시켜주는 효소로서, 그 기능과 결핍증에 관해 많이 연구되어 있다[1, 3, 5, 7, 9, 12]. 본 실험에서는 HRF와 TPI의 결합여부를 immunoprecipitation을 통해서 확인하였고 그 결합도메인을 동정하였다.

재료 및 방법

Yeast two-hybrid screening assay

Bait construct로 효모 형질전환 : LexAop-LacZ reporter를 가지고 있는 pSH18-34 plasmid가 들어있는 yeast(EGY48/pSH18-34) cell을 glucose Ura⁻ 액체 배지 5 ml에 접종한 후 30°C, 220 rpm에서 24시간 동안 배양하였다. 이 중 20 µl를 취해 glucose Ura⁻ 액체 배지 17 ml에 다시 접종하여, 30°C, 220 rpm에서 OD₆₀₀=0.3~0.5가 될 때까지 배양하다가 총 부피 100 ml로 희석하여 OD₆₀₀=0.33까지 배양하였다. 2×10⁶ cells/ml까지 배양된 세포는, 실온에서 5,000 rpm으로

*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-3024, Fax: 82-2-3277-2851
E-mail: klyoon@ewha.ac.kr

5분 동안 원심분리하였다. 세포 펠릿을 멸균수 10 ml로 세척한 후 같은 조건으로 다시 원심분리하고, 멸균수 1 ml로 현탁시켜 원심분리기용 튜브에 옮김 다음 5~10초간 원심분리하였다. 세포 펠릿을 1X TE-LiAc(1 volume 10X TE pH 7.5, 1 volume 10X LiAc, 8 volume dH₂O) 용액 3 ml에 현탁시켜 다시 원심분리한 후, 1X TE-LiAc 용액에 2×10^9 cells/ml이 되도록 현탁하였다. Carrier DNA(끓임과 식힘을 각각 10분씩 3회 반복한 salmon sperm DNA) 50 μ g과 이미 만들어진 pEG202/HRF 1 μ g을 준비된 yeast competent cell(EGY48/pSH18-34) 50 μ l에 잘 섞어 넣어준 후, PEG 용액(1 volume 10X TE pH 7.5, 1 volume 10X LiAc, 8 volume 50% PEG3350) 300 μ l를 가하여 30°C에서 30분간 진탕배양하였다. 42°C에서 15분간 heat shock을 가하고 실온에서 잠시 원심분리한 후, 1X TE pH 7.5 용액에 pellet을 현탁시켜 glucose Ura⁻His⁻ agar 배지 위에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다.

라이브러리 효모 형질전환 : Glucose Ura⁻His⁻ agar 배지에서 선택된 단일 콜로니를 같은 액체 배지 5 ml에 접종시켜 30°C에서 1 L에 희석하여 OD₆₀₀=0.3~0.5이 될 때까지 진탕배양 한 후, 총 5 L에 OD₆₀₀=0.33이 될 때까지 다시 진탕배양 하였다. 배양된 세포를 가지고 scale-up하여 위와 동일한 방법으로 HeLa library DNA를 형질전환한 뒤, glucose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지 위에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다.

Interactor hunting : Glucose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar에서 자란 세포들을 긁을 때 사용하는 용액(65% glycerol, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂)으로 긁어 모아 총 40 ml이 되도록 현탁 시켰다. 현탁액 중 10 μ l를 취해 2% galactose YP 배지 5 ml에 30°C에서 5시간 동안 진탕배양한 후, 약 10초간 원심분리하여 얻은 pellet을 1X TE 1 ml에 3회 세척하여 glucose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar와 galactose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지 위에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다. galactose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지 위에서 자란 세포들이 2×10^7 cells/ml 이상 되는지 확인한 후, 단일 콜로니를 선택하여 galactose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지에서 30°C에서 3일간 배양하였다. Leu⁺ 콜로니를 선택하여 glucose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻와 galactose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지, X-Gal glucose Ura⁻His⁻Trp⁻와 X-Gal galactose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지 위에 스트리킹하여 30°C에서 3일간 배양하였다. Glucose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지 위에서는 자라지 않고 galactose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지 위에서만 자람과 동시에 X-Gal glucose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지에서는 파란색을 나타내지 않으나 X-Gal galactose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지에서는 파란색을 나타내는 콜로니를 선별하였다.

선택된 콜로니에서 라이브러리 plasmid 분리 : 선별된 콜로니를 galactose Ura⁻His⁻Trp⁻ 액체 배지 5 ml에 접종하여 OD₆₀₀=0.8~1.0이 될 때까지 30°C에서 진탕배양하였다. 10초간 원

심분리하여 세포 펠릿으로 만든 후, 다시 남은 배지액으로 vortexing하여 현탁시켰다. 현탁액에 breaking 용액(10 mM KPO₄ pH 7.2, 10 mM EDTA, 100 mM β -mercaptoethanol, 100 μ g/ml zymolyase) 200 μ l를 가한 후, 37°C에서 1시간동안 배양하였다. 배양액에 TES 용액(0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 25 mM EDTA, 2.5% SDS) 100 μ l를 가하고 다시 5 M KOAc 100 μ l를 가하여 얼음에 10분간 방치하였다. 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액만 취해 100% 에탄올 700 μ l를 가해 -70°C에서 24시간동안 방치하였다. 4°C, 10,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후, pellet을 다시 70% 에탄올 100 μ l로 세척하여 4°C, 10,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상온에서 에탄올을 완전히 제거한 후, 멸균수 40 μ l에 녹였다.

라이브러리 plasmid로 KC8 세포의 형질전환 : KC8 단일 콜로니를 LB 액체 배지 5 ml에 접종하여 12~14시간 동안 배양한 후, 1 ml만 취해 LB 액체 배지 600 ml에 희석하여 OD₆₀₀=0.5~0.8이 될 때까지 진탕배양하였다. 30분간 얼음에 방치한 후, 4°C, 5,500 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 다시 같은 조건으로 600 ml의 차가운 멸균수로 세포 펠릿을 세척한 후 원심분리 하는 것을 2회 반복한 뒤, 차가운 10% 글리세롤 용액 2 ml에 세척한 후 원심분리하였다. 다시 세포 펠릿을 차가운 10% glycerol 용액 1.2 ml에 현탁시킨 후, 현탁액 40 μ l와 효모 미지 plasmid DNA 0.4 μ g 미만을 잘 혼합하여 10분간 얼음에 방치하였다. 혼합 현탁액을 electroporation cuvette(0.1 cm)에 옮긴 후, 1.8 kV, 25 μ F, 150 Ω 의 pulse를 가하는 즉시 SOC 용액(2% bactotrypton, 0.5% yeast extract, 25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucose, 10 mM NaCl)에 현탁시켰다. 37°C, 225 rpm으로 1시간동안 진탕배양시킨 후, 40초간 원심분리하여 Trp⁻ minimal agar 배지 위에 도말하여 37°C에서 2일간 배양하였다.

라이브러리 plasmid의 확인 : Trp⁻ minimal agar 배지 위에서 자란 KC8 단일 콜로니를 150 μ g/ml ampicillin LB 배지 5 ml에 접종한 후, 37°C에서 12~14시간 동안 진탕배양하였다. 4°C, 10,000 rpm에서 원심분리한 후, Wizard Plus SV minipreps DNA purification kit을 이용하여 미지 plasmid DNA를 정제하였다. 정제된 construct pJG4-5/unknown 1 μ g, pEG202/HRF 1 μ g, carrier DNA 50 μ g을 yeast competent cell(EGY48/pSH18-34) 50 μ l와 함께 잘 혼합하여 위와 같은 방법으로 형질전환시킨 뒤, glucose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지 위에 도말하여 30°C에서 3일간 배양하였다.

라이브러리 plasmid의 염기서열 결정 : KC8에서 정제된 plasmid DNA와 pJG4-5 vector용 sequencing primer를 이용하여 대 세포신호전달 센터(CCSR: Center for Cell Signaling Research)에 의뢰하여 염기서열을 결정 하였다.

Deletion mutants를 통한 HRF와 TP의 결합도메인 추정
pJG4-5 library vector에 TPI(triosephosphate isomerase)

1-155 amino acid(468 bp)를 subcloning하였고, 이외에 domain mapping 분석에 사용된 pJG4-5/TPI(34-249 a.a), pJG4-5/TPI(55-249 a.a), pJG4-5/TPI(74-249 a.a), pJG4-5/TPI(91-249 a.a), pJG4-5/TPI(123-249 a.a), pJG4-5/TPI(156-249 a.a), pJG4-5/TPI(1-122 a.a)는 이미 연구실에서 만들어진 것을 이용하였다. LexAop-LacZ reporter를 가지고 있는 pSH18-34 plasmid가 들어있는 yeast(EGY48/pSH18-34) competent cell에 pEG202/HRF와 pJG4-5/deleted TPI를 co-transformation한 뒤, glucose Ura⁻His⁻Trp⁻ plate에 스트리킹하여 30°C에서 3일간 배양하였다. pEG202/HRF와 pJG4-5/deleted TPI가 reading frame에 맞게 들어가 효모 세포내에서 알맞은 크기의 융합단백질이 발현되었는지 확인하기 위해 western blotting을 시행했다. pEG202/HRF와 pJG4-5/deleted TPI를 co-transformation시킨 효모 세포 EGY48/pSH18-34를 glucose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻, galactose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ plate에 각각 스트리킹하여 galactose 의존적 Leu⁺ 콜로니를 나타내는지 관찰하였다. 이들 plate에서 양성 반응을 보이면 상호작용하는 것으로 간주하였다. 이때 positive control로는 이미 상호작용한다고 알려진 pEG202/ α 2D3와 pJG4-5/cofilin을 사용했고, negative control로는 빈 vector들을 사용했다. Glucose Ura⁻His⁻Trp⁻와 galactose Ura⁻His⁻Trp⁻의 액체배지에 배양시켜 자란 효모 세포의 LacZ reporter gene 활성정도를 측정하기 위해 ONPG (O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside)를 기질로 사용해 β -gal assay를 실시하였다. 대조실험군으로 positive control과 negative control도 함께 실험하여 이와 비교시 유의성 있게 높은 β -gal unit를 나타내면 두 단백질이 상호작용 하는 것으로 간주하였다.

Immunoprecipitation을 이용한 HRF와 TPI간의 상호작용 확인

HeLa 세포를 10% fetal bovine serum(FBS), 100 units/ml penicillin, 100 units/ml streptomycin을 첨가한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 키우며 2-3일에 한번씩 1×10⁶ cells/ml로 분주해 주었다. HeLa 세포에 차가운 lysis buffer를 넣어 생성된 세포 추출액에 토끼 anti-TPI polyclonal 항체를 가하여 침전시킨 다음, 토끼 anti-HRF polyclonal 항체를 가하여 침전시켰다. 반대로 침전시에는 토끼 anti-HRF polyclonal 항체를 가하였고 immunoblotting 시에는 토끼 anti-TPI polyclonal 항체를 반응시켰다.

결과 및 고찰

Yeast two hybrid 결과

HRF는 어떤 단백질과 상호작용하는지 알아보기 위해 HRF를 bait로 HeLa library에서 yeast two hybrid assay를 수행하였다. 본 실험에 이용하는 yeast two-hybrid system에서

reporter gene의 전사는 LexA DNA 결합 도메인이 융합된 hybrid(pEG202 construct)와 B42 전사 활성 도메인이 융합된 hybrid(pJG4-5 construct)의 짝에 의해 활성화 된다(Fig. 1). Galactose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지위에서 자란 Leu⁺ 콜로니를 1차 선별하여 약 2000여개의 콜로니를 얻었다. 선별된 콜로니를 다시 galactose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지와 glucose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지, X-Gal galactose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지와 X-Gal glucose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지위에 스트리킹하여 Leu⁺ 콜로니와 파란색을 띠는 콜로니를 2차 선별한 결과 최종 48개를 얻을 수 있었다. 최종 선택된 48개의 콜로니를 재현성이 있는지 재확인한 후, DNA sequencing을 통하여 인간 TPI는 17개, 기타 31개의 단백질이 rat HRF와 상호작용한다는 것을 알았다(결과 제시 안함).

Deletion mutants를 통한 HRF와 TPI의 결합도메인 추정

Yeast cell EGY48/pSH18-34에 pEG202/HRF와 pJG4-5/deleted TPI를 co-transformation한 후, LexA 항체로 western blotting하여 pEG202/HRF가 발현됨을 확인하였으며(data not shown), 마우스 anti-HA monoclonal 항체로 western blotting하여 pJG4-5/deleted TPI가 발현됨을 확인하였다(Fig. 2). 앞서 설명한 방법으로 co-transformation한 후, galactose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지와 glucose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지에 스트리킹하였다(Fig. 3). Galactose Ura⁻His⁻Trp⁻Leu⁻ agar 배지에서 negative control에서는 콜로니가 생기지 않았으며 positive control에서는 Leu⁺ 콜로니가 생겼다. Deleted TPI중 1-122 아미노산과 1-155 아미노산은 Leu⁺ 콜로니가 보이지 않으므로 최소한 156-249 아미노산이 결합에 필요한

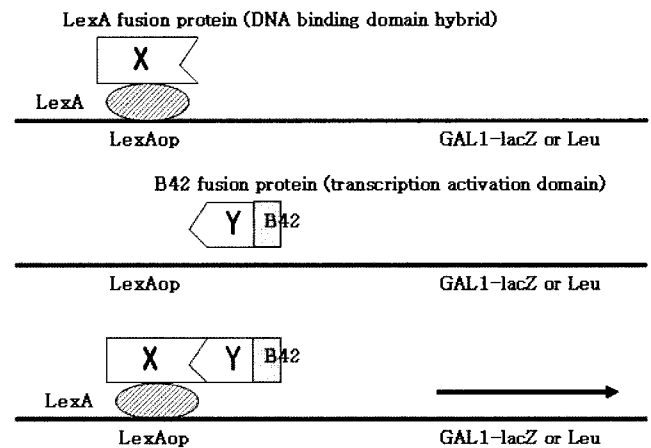


Fig. 1. Strategy to detect interacting proteins using the yeast two hybrid system. Plasmid encoding two hybrid proteins, one consisting of the LexA DNA binding domain fused to protein X and the other consisting of the B42 activating domain fused to protein Y, are constructed and introduced into yeast. Interaction between protein X and Y leads to the transcriptional activation of a reporter gene containing a binding site for LexA.

것으로 생각된다. 또한 X-Gal galactose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지와 X-Gal glucose Ura⁻His⁻Trp⁻ agar 배지위에 스트리킹 하였을 때도 마찬가지로 negative control에는 흰색의 콜로니를 보였고 positive control에서는 파란색의 콜로니를 보인 반면, 1-122 아미노산과 1-155 아미노산에는 파란색이 나타나지 않았다(data not shown).

LacZ reporter gene의 활성정도를 측정하기 위해 ONPG (O-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)를 기질로 사용하여

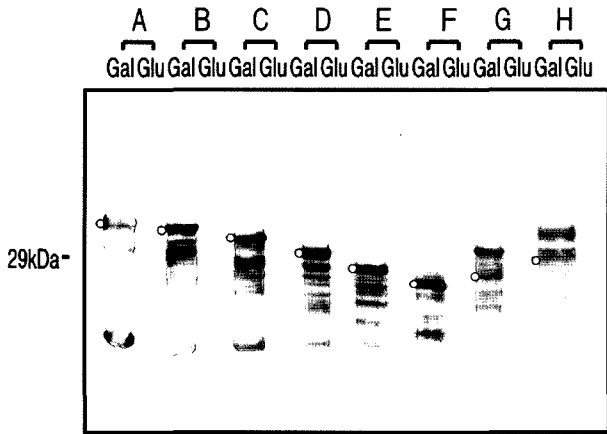


Fig. 2. Expression of rat TPI and its deleted constructs. Cell extracts were obtained from yeast cell EGY48/pSH18-34 that had been transformed with one of following plasmid : pJG4-5/TPI (34-249 a.a) A, pJG4-5/TPI (55-249 a.a) B, pJG4-5/TPI (74-249 a.a) C, pJG4-5/TPI (91-249 a.a) D, pJG4-5/TPI (1-122 a.a) E, pJG4-5/TPI (123-249 a.a) F, pJG4-5/TPI (1-155 a.a) G, pJG4-5/TPI (156-249 a.a) H. The extracts were separated by 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose, analyzed with ECL (Amersham) using 12CA5 monoclonal antibody.



Fig. 3. Interaction of the deleted polypeptides with the bait pEG202/HRF. The yeast cells EGY48/pSH18-34 were transformed with one of the following plasmids : pEG202α2D3/pJG4-5cofilin (positive control) (1), pEG202/pJG4-5 (negative control) (2), pEG202HRF/pJG4-5TPI (34-249 a.a) (3), pEG202HRF/pJG4-5TPI (55-249 a.a) (4), pEG202HRF/pJG4-5TPI (74-249 a.a) (5), pEG202HRF /pJG4-5TPI (91-249 a.a) (6), pEG202HRF/pJG4-5TPI (1-122 a.a) (7), pEG202HRF/pJG4-5TPI (123-249 a.a) (8), pEG202HRF/pJG4-5TPI (1-155 a.a) (9), pEG202HRF/pJG4-5TPI (156-249 a.a) (10). The transformants were streaked onto galactose Ura⁻ His⁻ Trp⁻ Leu⁻ (A) and glucose Ura⁻ His⁻ Trp⁻ Leu⁻ (B) to test Leu2 expression.

β-galactosidase assay를 실시한 결과, 앞의 결과와 마찬가지로 deleted TPI중에 1-122 a.a와 1-155 a.a에서 보여진 활성도가 다른 결실형 TPI보다 낮은 수치를 나타내었다. 따라서 TPI의 N 말단보다 C 말단에 해당하는 염기서열이 HRF와의 결합에 더 중요한 역할을 하리라는 것을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Quantitative assay of β-galactosidase activity from the LacZ reporter constructs. The yeast cell EGY48/pSH18-34 that has been transformed with one of the indicated plasmids (pJG4-5/TPI (34-249 a.a) A, pJG4-5/TPI (55-249 a.a) B, pJG4-5/TPI (74-249 a.a) C, pJG4-5/TPI (91-249 a.a) D, pJG4-5/TPI (1-122 a.a) E, pJG4-5/TPI (123-249 a.a) F, pJG4-5/TPI (1-155 a.a) G, pJG4-5/TPI (156-249 a.a) H) were cultures to stationary phase in glucose Ura⁻ His⁻ Trp⁻ and galactose Ura⁻ His⁻ Trp⁻ liquid media. β-galactosidase activity was determined as described.

Constructs	Selective media	
	Glucose Ura ⁻ His ⁻ Trp ⁻	Galactose Ura ⁻ His ⁻ Trp ⁻
Positive control	<1	1028
Negative control	<1	11
pJG4-5TPI (A)	<1	839
pJG4-5TPI (B)	<1	929
pJG4-5TPI (C)	<1	1710
pJG4-5TPI (D)	<1	699
pJG4-5TPI (E)	<1	54
pJG4-5TPI (F)	<1	318
pJG4-5TPI (G)	<1	46
pJG4-5TPI (H)	<1	272

* β-gal unit = O.D₄₂₀ × 1000 / (t (min) × vol. of extract (mL) × protein (μg/mL))



Fig. 4. Interaction of HRF and TPI confirmed by immunoprecipitation in HeLa cells. HeLa cell extracts were immunoprecipitated with anti-TPI antibody and immunoblotted with anti-HRF antibody after 15% SDS-PAGE (A). HeLa cell extracts were immunoprecipitated with anti-HRF antibody and immunoblotted with anti-TPI antibody after 15% SDS-PAGE (B).

Immunoprecipitation을 통한 HRF와 TPI의 상호작용 확인

In vivo에서 HRF와 TPI의 상호작용을 확인하기 위해 HeLa 세포에 내재한 HRF와 TPI를 이용하여 immunoprecipitation 하였다. 먼저 polyclonal anti-TPI 항체로 침전시키고 protein A agarose와 반응시킨 후 polyclonal anti-HRF 항체로 western blotting한 결과 23 kDa 위치에서 negative control 과 mock에서는 보이지 않는 밴드가 보였다(Fig. 4A). 위의 방법과 마찬가지로 HeLa 세포에 내재한 HRF와 TPI를 대상으로 polyclonal anti-HRF 항체로 침전시키고 polyclonal anti-TPI 항체로 붙여 본 결과 27 kDa 위치에서 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 4B).

요 약

본 실험에서는 HRF의 조절단백질을 알아보기 위해 HRF를 bait로 한 yeast two hybrid assay를 실행한 결과 해당과정에 관여하는 TPI(triosephosphate isomerase)라는 효소를 발견하였으며, 가장 많이 중복되어 있었다. In vitro에서 HRF는 TPI의 C 말단 잔기 부근(아미노산 156-249)이 상호작용에 주로 관여하는 부위임을 알 수 있었다. 또한, HeLa 세포에서 immunoprecipitation을 이용하여 HRF와 TPI의 상호작용이 실제 in vivo에서도 일어나는 현상이라는 것을 밝혔다. 결과적으로 HRF와 TPI의 상호작용은 세포내 일정량이 존재하며 여러가지 신호전달에 의해 동시에 Na,K-ATPase와도 상호작용하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 이화여자대학교 약학대학 약학연구소 연구비의 지원을 받았음.

REFERENCES

- Balendiran, K., Y. Tan, R. K. Sharma, and K. H. Murthy. 1995. Preliminary crystallization studies of calmodulin-dependent protein phosphatase from bovine brain. *Mol. Cell. Biochem.* **149**: 127-130.
- Bieka, H., R. Benndorf, and I. Junghahn. 1998. Growth related changes in protein synthesis and a 25 kDa protein of Ehrlich ascites tumor cells. *Biomed. Biochem. Acta* **47**: 557-563.
- Chitpatima, S. T., S. Makrides, R. Bandyopadhyay, and G. Brawerman. 1988. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucl. Acid Res.* **16**: 2350.
- Hultsch T., P. Brand, S. Lohmann, J. Saloga, R. L. Kincaid, and J. Knop. 1998. Direct evidence that FK506 inhibition of Fcepsilon RI-mediated exocytosis from RBL mast cells involves calcineurin. *Arch. Dermatol. Res.* **290**: 258-263.
- Kuchtey, J. and C. Fewtrell. 1999. Protein kinase C activator PMA reduces the Ca²⁺ response to antigen stimulation of adherent RBL-2H3 mucosal mast cells by inhibiting depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *J. Cell Physiol.* **181**: 113-123.
- Jung, J., M. Kim, M. Kim, M. J. Kim, J. Moon, J. Lim, J. S. Kim, M. Kim, and K. Lee. 2004. Translationally Controlled Tumor Protein Interacts with the 3rd Cytoplasmic Domain of Na,K-ATPase γ -subunit and Inhibits the Pump Activity in HeLa Cells, *J. Biol. Chem.* **279**: 49868-49875.
- Ludowyke, R. I., K. Kawasugi, and P. W. French. 1994. PMA and calcium ionophore induce myosin and F-actin rearrangement during histamine recretion from RBL-2H3 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **29**: 354-365.
- Ludowyke, R. I., K. Warton, and L. L. Scurr. 1998. Inhibition of antigen and calcium ionophore induced secretion from RBL-2H3. *Cell. Biol. Int.* **22**: 855-865.
- Ludowyke, R. I., J. Holst, L. M. Mudge, and A. T. Sim. 2000. Transient translocation and activation of protein phosphatase 2A during mast cell secretion. *J. Biol. Chem.* **275**: 6144-6152.
- MacDonald S. M., T. Rafnar, J. Langdon, and L. M. Lichtenstein. 1995. Molecular identification of an IgE-dependent histamine releasing factor. *Science* **269**: 688-690.
- Ozawa, K., Z. Szallasi, M. G. Kanaietz, P. M. Blumberg, H. Mischak, F. J. Mushinski, and M. A. Beaven. 1993. Ca-dependent and Ca-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 1749-1756.
- Raufman J., R. Malhotra, and R. D. Raffaniello. 1997. Regulation of calcium-induced exocytosis from gastric chief cells by protein phosphatase 2B. *Biochim. Biophys. Acta* **1357**: 73-80.
- Sanchez, C. J., D. Schaller, F. Ravier, D. Golaz, S. Jaccoud, M. Belet, R. M. Wilkins, J. Richard, J. Deshusses, and D. Hochstrasser. 1997. Translationally controlled tumor protein : protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis* **18**: 150-155.
- Schroeder J. T., L. M. Lichtenstein, and S. M. MacDonald. 1996. An Immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor Induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J. Exp. Med.* **183**: 1265-1270.
- Walsh, M. P., A. Horowitz, O. Clement-Chomiene, J. E. Andrea, B. G. Allen, and K. G. Morgan. 1996. Protein kinase C mediation of Ca-independent contractions of vascular smooth muscle. *Biochem. Cell Biol.* **74**: 485-502.
- Warner J. A., M. M. Pienkowski, M. Plaut, P. S. Norman, and L. M. Lichtenstein. 1986. Identification of histamine releasing factors in the late phase of cutaneous IgE-mediated reactions. *J. Immunol.* **136**: 2583-2587.

(Received Aug. 5, 2005/Accepted Oct. 12, 2005)