

Tryptic Digestion and Cytochalasin B Binding Assay of the Human HepG2-Type Glucose Transporter Expressed in *Spodoptera frugiperda* Clone 21-AE Cells

Chong-Kee Lee[†]

Department of Immunology, School of Medicine, Catholic University of Daegu, Daegu 705-718, Korea

The number of sites at which a protein can be readily cleaved by a proteolytic enzyme is greatly influenced by its three-dimensional structure. For native, properly-folded proteins both the rate of cleavage and number of sites at which cleavage takes place are usually much less than for the denatured protein. In order to compare the tertiary structure of recombinant HepG2 type glucose transporter with that of its native counterpart in the erythrocyte, the pattern of tryptic cleavage of the protein expressed in insect cell membranes was therefore examined. After 30 minutes digestion, a fragment of approximate Mr 19,000~21,000 was generated. In addition to this, there were two less intensely stained fragments of apparent Mr 28,000 and 17,000. The pattern of labelling was similar up to 2 hours of digestion. However, the fragments of Mr 19,000~21,000 and Mr 17,000 were no longer detectable after 4 hours digestion. The observation of a very similar pattern of fragments yielded by tryptic digestion of the HepG2 type transporter expressed in insect cells suggests that the recombinant protein exhibits a tertiary structure similar if not identical to that of its human counterpart. Also, the endogenous sugar transporter(s) present in Sf21 cells did not bind cytochalasin B, the potent transporter inhibitor. Therefore, the baculovirus/*Spodoptera frugiperda* (Sf) cell expression system could be very useful for production of large amounts of human glucose transporters, heterologously.

Key Words: Sugar transporter, Sf21, Cytochalasin B, Trypsin

서 론

최근 유전공학의 발달은 박테리아를 포함한 미생물과 포유동물들에 존재하는 당 수송체 (sugar transporter)들의 염기서열 (Mueckler et al., 1985)들을 밝혀주었고 또한, 이들 당 수송체들은 염기서열의 상동성을 가지는 커다란 당 수송체 집단을 구성하고 있음을 보여 주었다 (Baldwin et al., 1989; Baldwin, 1993; Wood and Trayhurn, 2003). 이는 이들 당 수송체들이 공동의 조상으로부터 진화하였음을 암시하고 있다. 또한 이들 집단 중 어느 한 수송체의 당 수송 기전이나, 삼차원적인 구조를 정확히 밝혀 낼 수 있다면 당의 세포내 영입을 주도하는 당 수송체에 관한 연구는 가속화 될 수 있어 당뇨병 치료 및 예방에 큰 도움이 될 수 있을 것이다.

포도당 (glucose)은 사람의 뇌와 적혈구 등을 포함하는 여러 중요 조직들에서 필수 대사 에너지원이며, 이들의 세포내 영입은 HepG2형 포도당 수송체 (glucose transporter, GT)에 의해 중재 된다 (Baldwin, 1993; Vannucci et al., 1997). HepG2형 GT는 생리적, 임상적으로 매우 중요한 물질이나 세포막 내에 적은 양으로 존재하고 있어 이들의 구조와 기능의 상관관계를 위한 유전공학적 연구, 삼차원적 구조 분석을 위한 결정화 (crystallization)와 같은 생물리학적 연구에 어려움이 되고 있다. 게다가, GT와 같은 당 수송체들은 nucleoside 수송체와 같은 물질들로 오염 (Jarvis and Young, 1981)되어 있어 순수한 당 수송체만을 분리, 정제하기가 쉽지 않다. 이러한 연유로 당 수송체를 유전 공학적 방법으로 많은 양을 생산하고자 하는 노력들이 꾸준히 진행되고 있었으며, 그 예로서 *Xenopus* oocytes (Gould and Lienhard, 1989; Keller et al., 1989), mammalian cells (Asano et al., 1989; Gould et al., 1989; Harrison et al., 1990), transgenic mice (Liu et al., 1992) 등이 있다. 그러나 막 단백질 (membrane proteins)들이 갖는 특성으로 인해 단지, 소량의 기능성 있는 단백질 발현만을 보여주었다.

*논문 접수: 2005년 2월 11일

수정재접수: 2005년 2월 24일

[†]교신저자: 이종기, (우) 705-718 대구광역시 남구 대명4동 3056-6.

대구가톨릭대학교 의과대학 면역학교실

Tel: 053-650-4477, Fax: 053-650-4477

e-mail: leeck@cu.ac.kr

이러한 어려움을 극복하기 위한 노력의 일환으로 최근에 baculovirus와 곤충세포를 이용한 GT의 유전자 발현이 보고되었다 (Yi et al., 1992; Lee, 2002). 그러나 발현된 단백질이 포도당을 수송할 수 있는 직접적인 증거는 이성질적인 발현을 허용한 곤충세포에 많이 존재하는 당 수송체의 활동으로 인하여 보여줄 수가 없었다. 그러므로 baculovirus와 곤충세포를 이용한 이성질적 발현 시스템의 효율적 활용을 위해서는 숙주세포에 내재하는, 알려진 바가 거의 없는 당 수송체의 특성과 곤충세포에 발현되는 이성질적 당 수송체의 생물학적 특성에 관한 보다 많은 연구가 필요한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 사람 HepG2 GT 단백질을 *Spodoptera frugiperda* 21-AE (Sf21) 세포에 발현시켜 제한된 트립신 분해 (tryptic digestion) 방법을 이용하여 발현된 단백질의 삼차원적 구조 (tertiary structure)에 관한 정보를 얻고자 하였다. 이는 당 수송체의 결정화에 따른 GT의 삼차원적 구조 분석이 어려운 현실임을 감안하면 GT의 생물리학적, 유전공학적 연구를 위해 반드시 필요한 GT의 대량생산을 위한 이성질적 발현체계 구축에 있어 매우 중요한 의미를 부여하게 된다. 아울러 Sf21 곤충세포에 발현된 당 수송체의 활성을 사람 당 수송체의 강력한 저해제 (inhibitor)인 Cytochalasin B를 이용한 결합 분석법 (binding assay)으로 조사하였다 (Zoccoli et al., 1978; Baldwin et al., 1982).

재료 및 방법

1. GT 유전자를 가지는 Recombinant baculovirus 생산

Summers와 Smith (1987)의 방법을 개조하여 pAcYM1-GT transfer vector (Lee, 2002)와 wild-type baculovirus인 AcNPV 바이러스 DNA를 이용하여 Sf21-AE 세포에 co-transfection 시킨 후 GT 유전자를 가지는 recombinant AcNPV-GT 바이러스를 생산하였다.

2. Sf21 세포의 배양, 감염 및 membrane fraction 준비

AcNPV 증식을 위해서 Sf21 세포를 TC-100 medium (Gibco)에 10% FCS를 첨가하여 이전에 발표된 방법에 따라 27~28°C에서 CO₂없이 배양하고 필요한 M.O.I에 따라 감염시켰다 (Lee, 2002). Membrane fraction은 세포 감염 후 4~5일 후 수거하여 세번 10 mM-sodium phosphate/150 mM-NaCl, pH 7.2로 씻었다. 그 후 proteinase 억제제들을 함유하는 10 mM-Tris/5 mM-MgCl₂, pH 7.4에서 0°C, 1분간 sonication하여 117,000 g로 1시간 동안 원심 분리하여 soluble fraction으로부터 분리해냈다.

3. Western blotting

10% SDS-polyacrylamide gel로 전기영동 (SDS/PAGE)한 후

표준화된 방법으로 nylon membrane에 blotting하였다. 항체는 HepG2형 GT 항체를 1차 항체로 이용하고 alkaline phosphatase 접합된 goat anti-rabbit IgG를 2차 항체로 사용하여 면역 반응을 측정하였다.

4. Tryptic digestion

트립신은 사람 HepG2형 당 수송체를 membrane의 cytoplasmic 표면에서만 자르는 것으로 알려져 있다 (Cairns et al., 1984; Lienhard et al., 1984; Cairns 등의 (1984) 방법에 따라서 25°C에서 50 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4의 반응 용액을 이용하여 제한적 트립신 분해를 실시하였다. 사용된 곤충세포 멤브레인에 있는 HepG2 GT와 트립신의 농도는 각각 143 µg/ml과 2.5 µg/ml이었다. 완전한 분해를 위해서는 신선한 트립신을 2시간 후에 다시 첨가하였고 다양한 시간대에 따라 시료를 채취하였다. 트립신 반응은 두 배 가량의 bovine lung aprotin을 첨가하여 중지시켰다.

5. Cytochalasin B binding assay

Cytochalasin B는 강력한 사람 HepG2형 GT 저해제이다. Zoccoli 등의 방법에 따라 (1978) 평형투석 (equilibrium dialysis) 방법을 이용하여 농도 40 nM의 [4-³H] cytochalasin B를 사용하여 400 mM D-glucose 또는 L-glucose를 첨가하여 측정하거나 또는 D-glucose나 L-glucose 없이 측정하였다.

결 과

1. 사람 HepG2 GT 유전자의 Sf21 세포에서의 발현

사람 HepG2 GT 유전자의 곤충세포 Sf21에서의 발현은 HepG2 GT의 C-terminus 항체와 alkaline-phosphatase 연계된 2차 항체를 사용하여 Western blot 방법으로 확인하였다. HepG2 GT 유전자를 가지는 유전자 재조합된 baculovirus (AcNPV-GT)로 감염시킨 곤충세포에서만 HepG2 GT 특이 항체에 반응하는 당 수송체 (M_r 45,000)의 발현을 확인할 수 있었고 야생주 바이러스로 감염된 세포에서나 감염시키지 않은 대조군에서는 당 수송체가 발현되지 않았다 (Fig. 1). 발현된 GT는 Sf21의 membrane fraction 시료에서만 존재하였고 soluble fraction의 시료에서는 존재하지 않았다.

2. 곤충세포에 발현된 HepG2 GT의 Tryptic digestion

트립신은 사람 HepG2형 GT를 수송 기질 (substrates)이나 억제제 (inhibitors)들이 없는 상황에서 membrane의 cytoplasmic 표면 쪽에서만 당 수송체를 절단할 수 있어 사람 GT의 알려진 트립신 분해 양상과 비교한다면 발현된 GT 단백질의 삼차원적 구조 folding을 예측할 수 있는 방법이기도 하다.

따라서 유전자 재조합된 AcNPV-GT baculovirus로 감염시키고 4일 후 Sf 세포의 membrane을 준비하였다. 트립신으로 25°C에서 처리된 시료는 SDS/PAGE 후 완전한 HepG2 항체와 peroxidase 접합된 donkey anti-rabbit IgG 2차 항체를 이용하여 Western blotting하였다. Fig. 2는 약 4시간에 걸친 제한된 트립신 분해 과정에서 생성된 Sf21에 발현된 HepG2 GT의 트립신 분해 패턴을 보여주고 있다. 트립신 처리를 하지 않은 Lane A에서는 M_r 45,000의 완전히 발현된 하나의 GT band만 볼 수 있었고, 트립신 분해 30분 후부터는 약 M_r 19,000~21,000의 조각 band 하나와 staining 정도가 조금 연한 M_r 28,000과 17,000의 두개의 band가 생성되었다. Labeling 양상은 분해 두 시간까지는 유사하였다 (Lanes B-D). 그러나 분해 4시간 후부터는 M_r 19,000~21,000와 M_r 17,000

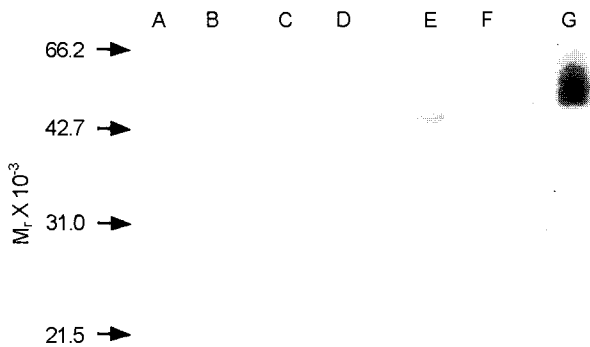


Fig. 1. Western blot analysis of HepG2 GT expression in insect cells. Sf21 cells were grown in the absence of virus (lanes A and B), infected with wild-type AcNPV (C and D) or with AcNPV-GT (E and F). After 4 days they were harvested, sonicated and then separated into membranous (A, C and E) and soluble (B, D and F) fractions. Samples derived from equal numbers of cells (2.1×10^6) were then electrophoresed on a 10% SDS/polyacrylamide gel and subjected to Western blotting using affinity-purified antibodies against the C-terminus of HepG2 GT, and alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG. G = human erythrocyte membrane control. The positions of proteins used as Mr markers are indicated.

조각 밴드들은 더 이상 탐색되지 않았다 (Lane E).

3. Ligand cytochalasin B binding assay

Cytochalasin B binding은 평형투석 (equilibrium dialysis) 방법 (Zoccoli et al., 1978)을 이용하여 농도 40 nM의 cytocha-

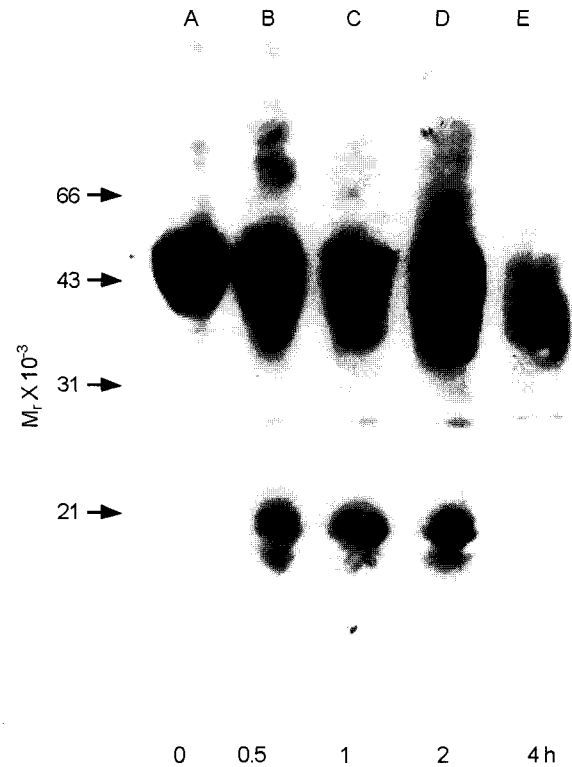


Fig. 2. Proteolytic fragmentation pattern of human HepG2 GT expressed in insect cells. Samples ($10 \mu\text{g}$) of insect cell membranes digested with trypsin ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$) for the times indicated were electrophoresed on a 12% SDS/polyacrylamide gel and subjected to Western blotting using affinity-purified antibodies against intact HepG2 GT. The bound primary antibody was detected with alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG. The positions of proteins used as Mr markers are indicated.

Table 1. Assay of cytochalasin B binding to insect cells infected with baculoviruses

Sample (1 mg/ml)	Cytochalasin B (B/F)		
	(-) D-Glucose	(+) D-Glucose	*Specific B/F
Sf21-AE cells infected with:			
- No virus	0.053	0.052 (0.051)	0.001
- Wild-type virus	0.054	0.053 (0.053)	0.001
- Recombinant virus (AcNPV-GT)	1.098	0.161 (1.051)	0.937

Sf cells were harvested 4 days after infection and membranes prepared as described in the Materials and Methods. The assay for cytochalasin B binding activity of membrane samples was performed by equilibrium dialysis using 40 nM - $[^3\text{H}]$ cytochalasin B, in the absence (-) or presence (+) of 400 mM D-glucose, as described in Zoccoli et al (1978). Cytochalasin B binding activity (*) was calculated as described previously (Baldwin et al., 1982). The values shown in parenthesis were obtained by performing the binding experiments in the presence of 400 mM L-glucose. $B/F = [\text{bound cytochalasin B}] / [\text{free cytochalasin B}]$

lasin B를 사용하여 3번씩 측정 하였다. 멤브레인 시료는 야생주 바이러스 또는 AcNPV-GT 바이러스를 이용하여 숙주 세포를 감염시켜 4일 후에 분리 준비하였다. Bound cytochalasin B에 대한 Free cytochalasin B의 비율 (B/F)은 기능성 있는 당 수송체 농도 측정에 좋은 척도가 된다 (Zoccoli et al., 1978). Table 1에 요약된 바와 같이 곤충세포에 대한 cytochalasin B 결합 활성은 바이러스 감염되지 않은 세포와 야생주로 감염시킨 세포에서는 1 mg/ml시료 당 모두 0.001이었고 AcNPV-GT 감염된 Sf21-AE 세포에서는 0.937이었다. 또한 바이러스 감염되지 않은 세포나 야생주 바이러스로 감염시킨 Sf21 세포에서는 D-glucose로 저해 가능한 결합이 거의 또는 전혀 없었고 반면에 D-glucose로만 저해 가능하며 L-glucose로는 저해시킬 수 없는 특이한 결합은 AcNPV-GT 바이러스로 감염시킨 세포에서만 나타났다 (Table 1).

고 찰

최근 cDNA cloning 연구에 의하면 박테리아와 같은 원핵 세포와 사람을 포함하는 진핵세포들에 존재하는 당 수송체들은 염기서열의 상동성을 가지는 커다란 당 수송체 집단 (sugar transporter family)을 구성하고 있음을 보여 주고 있다 (Baldwin and Henderson, 1989). 이는 이들 수송체 집단의 비록 어느 한 멤버의 구조나 특성에 관한 정보라 할지라도 매우 유용하게 활용 되어질 수 있음을 나타내고 있다. 그러므로 단백질의 삼차원적 구조를 알아내기 위한 단백질 결정화와 같은 생물리화학적 방법이 GT와 같은 막 단백질에는 아직은 사용될 수 없는 현실에서 단백질분해효소 트립신을 이용한 곤충세포에 발현된 HepG2형 당 수송체의 삼차원적 구조 분석에 관한 정보는 당 수송체의 이성질적 발현체계 구축에 있어 매우 의미 있는 자료이다.

어떤 단백질이 단백질분해 효소에 의해 쉽게 절단되어 질 수 있는 부위의 수는 그 단백질의 삼차원적 구조에 의해 크게 영향을 받는다. 다시 말하면 적절하게 접어 포개진 원래의 단백질들 (native proteins)은 절단이 일어나는 절단속도에서도, 절단이 일어나는 부위의 수에 있어서도 변형된 단백질들 (denatured proteins)보다는 훨씬 적다 (Branden and Tooze, 1991). 그러므로 곤충세포에 발현된 HepG2 GT의 3차적 구조를 사람 HepG2형 GT의 3차적 구조와 비교하기 위하여 곤충세포에 발현된 HepG2형 GT를 제한된 트립신 분해 방법을 이용하여 트립신 절단 패턴을 조사하였다. 트립신은 사람 HepG2형 GT를 membrane의 cytoplasmic 표면 쪽에서만 당 수송체를 절단할 수 있다고 알려져 있으며 (Lienhard et al., 1984; Cairns et al., 1984), 절단은 Arg₂₁₂와 Arg₂₆₉ 사이에 있는 sequence의 친수성 중앙 고리 부위와 Lys₄₅₆ 다음의 C-terminal 부위의 여러 곳에서 일어난다 (Cairns et al., 1987).

따라서 HepG2형 GT는 짧은 기간의 트립신 분해 후에는 두 개의 큰, membrane 결합된 조각으로 잘리게 된다. HepG2형 GT의 N-terminal 절반 부위 (residues 1~212)는 이중의 glycosylation 때문에 SDS/PAGE 전기영동 시에 M_r 23,000~42,000 크기의 하나의 넓으나 염색이 잘되지 않는 밴드로서 이동한다 (Cairns et al., 1987). 이 부위는 항 수송체 (anti-transporter) 항체에 의해 인식되어지는 어떠한 epitope들도 포함하고 있지 않다. 따라서 항 수송체 항체를 사용한 본 실험에서도 이 부위는 역시 검출되지 않았다. 그러나 HepG2형 GT의 C-terminal 절반 부위에서 유래된 트립신 조각들은 사용된 항 수송체 항체에 의해 인식되었다. 매우 짧은 트립신 분해 후에는 우선적으로 당 수송체는 M_r 25,000의 C-terminal 유래의 조각을 생산한다. 비록 절단이 일어나는 순서가 필수적이지는 않으나 이 트립신 조각은 곧 이어 M_r 23,000의 조각을 경유하여 안정된 형태의 M_r 18,000 조각으로 바뀌게 된다 (Cairns et al., 1984; Davies et al., 1987). 현재의 실험에서 무엇보다 중요한 것은 M_r 18,000 조각 (residues 270~456)이 원래의 membrane-bound 단백질에서 숨어 존재하는 많은 트립신 절단의 잠재적인 위치들을 포함하고 있다는 사실이다. 아울러 곤충세포에 발현된 GT의 트립신 분해 조각 양상은 원래의 HepG2 GT의 트립신 분해에 따른 조각들 양상과 매우 유사한 패턴을 보여 주었다. 따라서 이러한 결과는 발현된 GT 단백질의 3차적 구조 (tertiary structure)가 본래의 당 수송 단백질이 갖는 3차적 구조와 매우 유사하거나 아니면 같은 3차적 구조를 가지고 있음을 암시하고 있다. 또한 Sf21 곤충세포에 내재하는 당 수송체는 사람 HepG2 GT의 강력한 저해제인 cytochalasin B와 결합하지 않아 발현된 GT의 생물학적 활성 측정에 cytochalasin B를 사용할 수 있으므로 baculovirus와 곤충세포를 이용한 당 수송체의 이성질적인 발현 체계는 단백질 결정화와 같은 생물리화학적 방법이나, 유전 공학을 응용한 단백질의 구조와 기능 분석을 위한 매우 유용한 발현수단이 될 수 있음을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 2004년도 대구가톨릭대학교 의과연구소 연구비 지원으로 이루어 졌음을 감사드립니다.

REFERENCES

- Asano T, Shibasaki Y, Ohno S, Taira H, Lin JL, Kasuga M, Kanazawa Y, Akanuma Y, Takaku F, Oka Y. Rabbit brain glucose transporter responds to insulin when expressed in insulin-sensitive Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989. 264: 3416-3420.
- Baldwin SA. Mammalian passive glucose transporters: members

- of an ubiquitous family of active and passive transport proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1993. 1154: 17-49.
- Baldwin SA, Baldwin JM, Lienhard GE. Monosaccharide transporter of the human erythrocyte: Characterization of an improved preparation. *Biochemistry*. 1982. 21: 3836-3842.
- Baldwin SA, Henderson PJF. Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu Rev Physiol*. 1989. 51: 459-471.
- Branden C, Tooze J. Introduction to protein structure. 1991. Garland Publishing, Inc. NY, USA.
- Cairns MT, Elliot DA, Scudder PR, Baldwin SA. Proteolytic and chemical dissection of the human erythrocyte glucose transporter. *Biochem J*. 1984. 28: 9447-9452.
- Cairns MT, Alvarez J, Panico M, Gibbs AF, Morris HR, Chapman D, Baldwin SA. Investigation of the structure and function of the human erythrocyte glucose transporter by proteolytic dissection. *Biochim Biophys Acta*. 1987. 905: 295-310.
- Davies A, Meeran K, Cairns MT, Baldwin SA. Peptide-specific antibodies as probes of the orientation of the glucose transporter in the human erythrocyte membrane. *J Biol Chem*. 1987. 262: 9347-9352.
- Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjiman K, Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE, Mueckler M. Insulin-stimulated translocation of the HepG2/erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem*. 1989. 264: 2180-2184.
- Gould GW, Lienhard GE. Expression of a functional glucose transporter in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry*. 1989. 28: 9447-9452.
- Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Insulin regulation of hexose transport in mouse 3T3-L1 cells expressing the human HepG2 glucose transporter. *J Biol Chem*. 1990. 265: 20106-20116.
- James DE, Strobe M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature*. 1989. 338: 83-87.
- Jarvis SM, Young JD. Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J*. 1981. 194: 331-339.
- Keller K, Strube M, Mueckler M. Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*. 1989. 32: 18884-18889.
- Lee CK. Photoaffinity labelling of the human erythrocyte glucose transporters expressed in *Spodoptera frugiperda* clone 9 cells. *J Biomed Lab Sci*. 2002. 8: 211-215.
- Lienhard GE, Crabb JH, Ransome KJ. Endoglycosidase f cleaves the oligosaccharides from the glucose transporter of the human erythrocyte. *Biochem Biophys Acta*. 1984. 769: 404-410.
- Liu ML, Olson AL, Moye-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1992. 267: 11673-11676.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 1985. 229: 941-945.
- Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex Agric Exp Stn Bull*. 1987. No. 1555.
- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr*. 2003. 89: 3-9.
- Yi CK, Charalambous BM, Emery VC, Baldwin SA. Characterization of functional human erythrocyte-type glucose transporter expressed in insect cells using a recombinant baculovirus. *Biochem J*. 1992. 283: 643-646.
- Zoccoli MA, Baldwin SA, Lienhard GE. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J Biol Chem*. 1978. 253: 6923-6930.