

대장균에서의 human SOD1과 mutant SOD1 (G93A) 단백질의 발현과 HtrA2의 기질 여부 확인에 관한 연구

김구영^{1,2} · 김상수^{1,2} · 박효진^{2,3} · 임향숙^{1,2*}

¹가톨릭대학교 생명과학과, ²분자유전학연구소, ³고려대학교 생명과학대학 생명과학부

Received March 14, 2006 / Accepted April 11, 2006

Expression of Human SOD1 and Mutant SOD1 (G93A) in *E. coli* and Identification of SOD1 as a Substrate of HtrA2 Serine Protease. Goo-Young Kim^{1,2}, Sang-Soo Kim^{1,2}, Hyo-Jin Park^{2,3} and Hyangshuk Rhim^{1,2*}. ¹Department of Biomedical Sciences, ²Research Institute of Molecular Genetics, College of Medicine, the Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea, ³School of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea – Superoxide dismutase (SOD) is physiologically important in regulating cellular homeostasis and apoptotic cell death, and its mutations are the cause of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). Mitochondrial serine protease HtrA2 has a pro-apoptotic function and has known to be associated with neurodegenerative disorders. To investigate the relationship between genes associated with apoptotic cell death, such as HtrA2 and SOD1, we utilized the pGEX expression system to develop a simple and rapid method for purifying wild-type and ALS-associated mutant SOD1 proteins in a suitable form for biochemical studies. We purified SOD1 and SOD1 (G93A) proteins to approximately 90% purity with relatively high yields (3 mg per liter of culture). Consistent with the result in mammalian cells, SOD1 (G93A) was more insoluble than wild-type SOD1 in *E. coli*, indicating that research on the aggregate formation of SOD1 may be possible using this pGEX expression system in *E. coli*. We investigated the HtrA2 serine protease activity on SOD1 to assess the relationship between two proteins. Not only wild-type SOD1 but also ALS-associated mutant SOD1 (G93A) were cleaved by HtrA2, resulting in the production of the 19 kDa and 21 kDa fragments that were specific for anti-SOD1 antibody. Using protein gel electrophoresis and immunoblot assay, we compared the relative molecular masses of thrombin-cleaved GST-SOD1 and HtrA2-cleaved SOD1 fragments and can predict that the HtrA2-cleavage sites within SOD1 are the peptide bonds between leucine 9-lysine 10 (L9-K10) and glutamine 23-lysine 24 (Q23-K24). Our study indicates that SOD1 is one of the substrate for HtrA2, suggesting that both HtrA2 and SOD1 may be important for modulating the HtrA2-SOD1-mediated apoptotic cell death that is associated with the pathogenesis of neurodegenerative disorder.

Key words – HtrA2, SOD1, ALS mutant SOD1 (G93A), GST fusion system

서 론

생체 내에 존재하는 oxygen의 3-10% 정도는 조직에서 이 용된 후 superoxide radical과 같은 reactive oxygen species (ROS)로 전환된다. ROS는 protein, lipid와 같이 생체 내에서 중요한 역할을 하는 분자들을 산화 또는 분해시키고 DNA에도 손상을 준다[14]. 이러한 작용들은 세포와 조직의 기능을 손상시키고, 세포사멸을 유도할 뿐만 아니라 여러 가지 질병의 원인으로 작용하기도 한다[1,9,14,16]. Superoxide dismutase (SOD)는 이와 같은 superoxide radical을 hydrogen peroxide와 dioxygen으로의 변환을 촉진시켜서 superoxide radical의 작용을 저해할 수 있는 효소이다[1,9,14,16]. SOD는 결합하는 metal의 종류에 따라 Cu, Zn-SOD, Fe-SOD,

Mn-SOD, Ni-SOD와 같이 여러 가지 종류로 분류되는데, 이중 90%가 Cu, Zn-SOD (SOD1)이다[12]. 이와 같이 생체 내 편재해 있는 효소인 SOD1은 세포사멸과 항상성 유지에 생리적으로 중요한 역할을 한다.

퇴행성 뇌질환 중의 하나인 amyotrophic lateral sclerosis (ALS, 근위축성 측삭 경화증)는 유전적인 경우가 전체의 약 5-10%정도이며, 그 중에서 20-25% 정도가 SOD1의 mutation이 원인인 것으로 알려져 있다[19]. Gain of function인 이들 SOD1의 mutation은 mitochondria의 기능 저해와 cytochrome c의 방출을 통해서 세포사멸을 촉진한다고 알려져 있다[4,15,23]. Mutant SOD1에 의해 유도되는 세포사멸 경로와 발병기전은 아직 정확히 알려져 있지 않지만, mutant SOD1 (G93A)이 발현되는 transgenic (Tg) mice에서 motor neuron degeneration의 초기단계에서 발견되는 mitochondrial vacuolation이 관찰되고, outer mitochondrial membrane의 확장과 누출, intermembrane space의 확장에 의한 mitochondrial degeneration이 관찰 된다는 보고가 있다[5].

*Corresponding author

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

E-mail : hrhim@catholic.ac.kr

또 다른 연구에서의 Tg mice는 ALS의 임상적인 증상인 떨림과 함께 사지의 마비증상을 나타내며, 187일 정도 후에 치사한다는 보고도 있다[3]. ALS의 세포모델에서는 mutant SOD1이 주로 mitochondria에 위치한다고 알려져 있다[4]. Mitochondria에서의 이러한 mutant SOD1의 축적은 cytochrome c의 방출로 인한 caspase-9과 caspase-3의 활성화를 통하여 caspase-dependent neuronal cell death를 촉진한다고 알려져 있다[23].

대장균의 endoprotease HtrA (high-temperature requirement A)와 상동적인 human HtrA2는 mitochondrial serine protease이다. HtrA2는 50 kDa의 전구체로 합성되고, cleavage가 일어나면 36 kDa의 mature protein이 생성된다[24]. Mitochondria에서 maturation된 HtrA2는 세포사멸 동안에 mitochondria에서 cytoplasm으로 방출되어 caspase-dependent와 caspase-independent programmed cell-death에 관여한다는 결과들이 보고되고 있다[22,25]. Cytoplasm으로 방출된 mature HtrA2의 inhibitor of apoptosis protein (IAP) binding motif (IBM)는 cytosolic IAP protein과 결합하여 이들 단백질의 기능을 상쇄시키는 역할을 하여 caspase cascade의 활성화를 통해 caspase-dependent cell-death를 촉진한다[20,25].

HtrA2의 또 다른 기능은 자체적인 serine protease의 catalytic activity에 의해 세포 내 apoptosis 관련 단백질들의 기능을 조절하여 caspase-independent cell death를 유도하는 것으로 알려지고 있다[2,18,20]. 최근 보고들에 의하면 mitochondria내의 anti-apoptotic 단백질로 알려진 Hs1-associated protein X-1 (HAX-1)은 *in vitro*와 *in vivo*에서 HtrA2의 protease 활성에 의해 절단 된다고 알려져 있다[2]. 또한, apoptotic 단백질과의 결합과 proteasomal degradation의 촉진을 통하여 세포사멸 경로에서 중요한 역할을 하는 조절 단백질로 알려진 apollon도 HtrA2의 protease 활성에 의해 절단된다는 연구 결과가 발표 되었다[18]. 비록, HtrA2의 세포내에서의 기능은 아직 정확히 밝혀져 있지 않지만, HtrA2는 여러 가지 cellular stress의 조건에서 세포사멸을 조절할 수 있는 필수적인 조절인자로 알려지고 있다[20,24,25]. 이러한 HtrA2의 세포사멸 기전을 알기 위해서는 HtrA2 serine protease의 기질의 탐색과 molecule간의 상호작용을 규명하는 연구가 반드시 필요하다.

더욱이 motor neuron degeneration 2 (*mnd2*) mice는 근육의 약화, thymus와 spleen의 퇴화와 neurodegeneration, 발육단계에서의 치사 등을 나타내는데, linkage analysis와 mutation screening을 통해 *mnd2* mice HtrA2의 serine protease domain에 존재하는 serine 276이 cysteine으로 변경된 것이 확인되었다[6]. 또한, HtrA2 knockout (KO) mice의 경우 *mnd2* mouse와 매우 유사한 표현형을 나타내며 striatal neuron의 감소와 함께 발육단계에서 치사하는 것으로 알려져 있다[11]. 이러한 결과들은 HtrA2의 serine protease의 기

능이 세포내 항상성 조절과 함께 ALS와 같은 퇴행성 뇌질환과도 높은 관련성이 있음을 시사한다.

최근에 SOD1 Tg animal 모델에 cerebral ischemia를 주었을 때, SOD1이 HtrA2의 signaling pathway를 조절한다는 보고가 있다[17]. 이는 SOD1과 HtrA2가 세포사멸기전에서 밀접한 상관관계가 있음을 말해준다. 이를 증명하기 위한 방법의 하나로서 두 단백질간의 상관관계를 분석하기 위해 HtrA2의 serine protease로서의 효소 활성을 이용하여 *in vitro* cleavage 실험을 한 결과, HtrA2가 protease activity를 통하여 antioxidant enzyme인 SOD1과 ALS 발병의 원인 중 하나인 mutant SOD1 (G93A)을 절단하는 것을 증명하였다. 이는 HtrA2가 세포의 사멸조절뿐만 아니라 퇴행성 뇌질환의 발병기전에도 중요한 단백질로서 작용할 것이라는 가능성을 제시하고 있다.

재료 및 방법

Plasmid의 제조

대장균에서 SOD1을 GST (glutathione S-transferase) fusion 단백질로 발현하기 위해 선행연구에서 제작한 C-terminus에 FLAG epitope tag를 지닌 pGST-FLAG에 cloning을 하였다 [20,21]. Human SOD1 (GenBank accession number BT006676)은 human brain cDNA library를 주형으로 하여 5' SOD1 primer (5'-GCGCGAATTCATGGCGACGAAGGCCGTGTGC-3': bold체는 *EcoR* I restriction enzyme site), 3' SOD1 primer (5'-GCGCGGTACCTTGGGCGA TCCCAATTACACCA-3': bold체는 *Kpn* I restriction enzyme site), *pfu* DNA polymerase (Stratagene, La Jolla, USA)를 이용하여 nucleotide 1~ 462 까지를 PCR로 증폭하였다. 증폭한 full-length SOD1을 *EcoR* I과 *Kpn* I restriction enzyme으로 절단하여 동일한 restriction enzyme들로 절단한 pGST-FLAG에 삽입하여 pGST-SOD1-FLAG plasmid를 제작 하고, 이를 pGST-SOD1이라고 명명하였다. DNA 염기서열 분석법(ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystem)을 이용하여 cloning한 pGST-SOD1의 염기서열의 정확성을 확인하였다.

Mutagenesis

QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene Inc.)을 이용하여 mutant SOD1 (G93A, 93번 glycine을 alanine으로 변경) construct를 제조하였다. pGST-SOD1 plasmid를 template로 하고 single point mutation (278번째 nucleotide G를 C로 변경)을 포함하는 primer 쌍을 이용해 PCR을 실시하였다. PCR로 증폭한 product에 *DpnI* (New England Biolabs) 효소를 37°C에서 2 시간 동안 처리하여 wild type의 template를 제거한 후, 대장균에 transformation 하였다. DNA 염기서열 분석을 통하여 G93A mutation을 포

합하는 clone을 선별하여 pGST-G93A라고 명명하였다.

GST-fusion 단백질의 발현과 정제

GST-SOD1과 GST-G93A의 발현과 정제는 선행연구의 방법에 따라서, 특정 단백질 분해 효소를 가지고 있지 않는 BL21 (F ompT hsdSB(r_Bm_B) gal dcm) 균주에 삽입하여 단백질 발현에 이용하였다[7,13]. Ampicillin (50 µg/ml)을 포함하는 LB 배지 10 ml에서 16 시간 동안 배양한 후 90 ml의 LB 배지로 희석하여 90 분 더 37°C에서 배양하였다. 단백질의 발현을 유도하기 위해 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside, Amresco)를 넣고 90 분 더 키운 후 4°C에서 1,000 xg 으로 20 분간 원심 분리하여 대장균을 침전시켰다. 이렇게 모아진 대장균들은 7 mM DTT, 100 µg/ml lysozyme, 10 µg/µl aprotinin, 10 µg/µl leupeptin을 포함하는 EBC buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) 1 ml에서 초음파로 용해시켰다. 초음파로 용해한 시료 중 40 µl 를 새로운 tube에 옮겨서 원심 분리하여 상층액의 수용성 세포 추출물을 제거하고 total insoluble precipitate을 얻었다. 원심 분리를 통해 세포 찌꺼기를 제거하고 얻은 상층액을 glutathione Sepharose 4B beads (Amersham) 50 µl에 넣고 상온에서 25 분 동안 반응시킨 후, 원심 분리하여 glutathione bead에 결합되어 있는 단백질을 침전시켰다. 각 단계별로 얻은 단백질들은 15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 Coomassie staining solution (0.1% Brilliant blue R (Sigma), 45% methanol and 10% acetic acid)에 20 분간 염색시킨 후, destaining solution (10% methanol and 10% acetic acid)으로 씻어내어 단백질 밴드를 확인하였다. HtrA2 (aa 134-458)과 HtrA2 (S306A, aa 134-458)는 각각 GST-HtrA2와 GST-S306A 라고 명명하고 선행 연구와 동일한 방법으로 발현, 정제하여 사용하였다[20,21]. 정제한 단백질들은 알고 있는 농도의 BSA (bovine serum albumin)와 비교 정량하여 단백질의 양을 결정하였다.

Recombinant SOD1 단백질을 정제하기 위하여, glutathione Sepharose 4B bead에 결합되어 있는 GST-SOD1을 5 U의 human thrombin (Amersham Pharmacia Biotech.)을 첨가하여 상온에서 2 시간동안 반응시켰다. 원심분리를 통하여 thrombin에 의해 절단된 SOD1 단백질은 bead에 결합되어 있는 GST로부터 정제하여 Th-SOD1이라 명명하였다.

In vitro cleavage test

정제한 GST-SOD1 단백질이 HtrA2 단백질에 의해 절단되는 지 확인하기 위하여, cleavage buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM KCl, 1 mM DTT)에 재부유한 GST-SOD1이나 GST-G93A 단백질 2.5 µM에 GST-HtrA2 이나 GST-S306A 단백질 0.62 µM을 각각 혼합하였다. 이를 37°C에서 16 시간 반응한 후, 상층액과 bead층을 분리하여 각각을 15% SDS-

polyacrylamide gel에서 전기영동 하였다. Coomassie staining solution에 20 분간 염색시킨 후, destaining solution으로 씻어내어 단백질 밴드를 확인하였다.

Immunoblot analysis

In vitro cleavage test에서 분리한 상층액과 bead층을 15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동한 후 nitrocellulose membrane에 옮겨 immunoblotting을 시행하였다. Primary Ab는 SOD1 polyclonal Ab (Santa Cruz), FLAG monoclonal Ab (Sigma)로 반응시키고 secondary Ab로 antibody-antigen 반응을 시킨 후 ECL (Amersham Pharmacia Biotech.) 방법으로 밴드를 확인하였다.

SOD1 wild-type (wt)과 ALS-linked mutant (G93A) 단백질의 발현과 정제

Wild-type (wt) SOD1과 ALS 환자에서 발견되는 mutant SOD1 (G93A)의 생화학적 특성을 연구하기 위해서는 다량의 recombinant SOD1 단백질이 필요하다. SOD1을 대장균에서 발현시켜 순수한 단백질로 정제하고자 pGEX 시스템을 이용하였다(Fig. 1). 일반적으로 이용되는 배양조건(ampicillin을

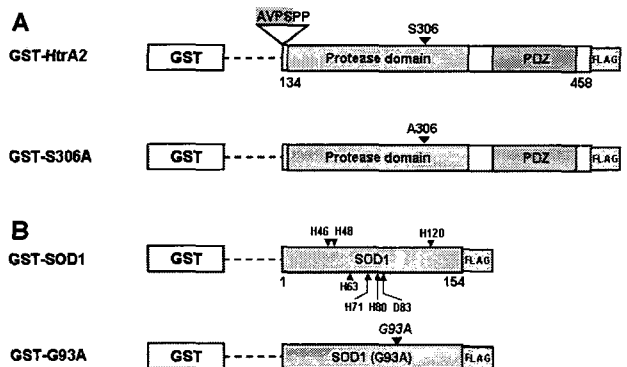


Fig. 1. Schematic diagrams of the GST-HtrA2 and GST-SOD1 constructs. (A) GST-HtrA2 contains distinct functional domains: an inhibitor of apoptosis protein (IAP) binding motif (IBM) (AVPS, aa 134-137), a serine protease domain (aa 150-343), a post-synaptic density, discs large and zonula occludens domain (PDZ, aa 364-445). GST-S306A indicates the catalytically inactive mutant generated by replacing the catalytic serine 306 residue with alanine. (B) The metal-binding region of SOD1 consists of one copper- and one zinc-binding site close enough in proximity to share an imidazole ligand His63. The copper ion ligand (His46, His48, and His120) and zinc ion ligand (His71, His80, and Asp83) are involved in the formation of a hydrogen bonding network in the functionally important regions of SOD1. GST-G93A indicates the gain of function mutation by replacing the glycine 93 residue with alanine.

포함하는 LB 배양배지, 37°C배양, 0.1 mM IPTG)하에서 GST-SOD1과 GST-G93A 단백질의 발현을 유도하여 단백질의 발현양상을 15% SDS-polyacrylamid gel에서 분리하여 분석하였다(Fig. 2). ExPASy Molecular Biology Server Program (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)을 이용하여 이론적으로 계산한 GST-SOD1 fusion 단백질의 분자량은 43,834 Da이다. IPTG로 단백질의 발현을 유도하기 전에는 GST-SOD1 fusion 단백질을 확인하기 어려웠으나(lanes 1), IPTG로 단백질의 발현을 유도하면 45 kDa 크기에서 많은 양의 단백질이 발현되는 것을 관찰할 수 있다(lanes 2). 수용성 세포 추출물에서 glutathione Sepharose 4B bead에 GST-fusion 단백질을 선택적으로 결합시켜 정제한 후 분석하면, 이 45 kDa 크기의 band가 GST-SOD1과 GST-G93A 단백질을 보다 명확하게 확인할 수 있다(lanes 4). Ampicillin을 포함하는 LB배지 100 ml에 대장균을 배양하고 glutathione Sepharose 4B bead를 이용하여 GST-SOD1은 약 325 μ g, GST-G93A는 250 μ g의 양을 정제할 수 있었다. 이 시스템을 이용하여 전체 대장균 단백질로부터 순도 90%의 GST-SOD1 fusion 단백질을 15%의 yield로 정제할 수 있다.

ALS 환자에서 발견되는 mutant SOD1 (G93A, SOD1의 93번째 amino acid residue의 glycine을 alanine으로 치환)의 경우는 세포내에서 aggregate를 형성하고 mitochondria의 apoptosis 조절 단백질인 Bcl-2와 결합한다고 알려져 있다 [4,15]. 이러한 G93A mutation을 SOD1에 도입하여 대장균에서 발현하게 될 경우, mammalian cell에서 발견되는 것과 유사하게 G93A가 wt SOD 보다 더 잘 aggregate를 형성하는 지 관찰하기 위해 total insoluble precipitate를 비교분석 하였다(lanes 3). Ampicillin을 포함하는 LB 배지 100 ml에 배양

하면 GST-SOD1은 약 75 μ g, GST-G93A는 150 μ g의 insoluble 단백질이 확인되었다. 이러한 결과를 통해 대장균 시스템에서도 G93A가 wt SOD1 보다 더 insoluble 하다는 것을 알 수 있으며, 이는 mammalian cell에서 관찰된 결과와 유사한 것을 알 수 있다. 이 정제 시스템을 이용하면 1 liter의 대장균 배양액으로부터 90% 이상의 순도를 지니는 GST-SOD1, GST-G93A 단백질을 약 3 mg 정도 회수할 수 있으므로, SOD1이 HtrA2의 기질인지를 여부를 확인하는 *in vitro* cleavage test와 같은 생화학적 연구를 용이하게 수행할 수 있다.

HtrA2의 serine protease activity에 의한 GST-SOD1 와 GST-G93A의 절단 양상 확인

최근 HtrA2는 세포사멸 경로뿐만 아니라 세포내의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다는 결과들이 발표되고 있다 [2,18,20,22,25]. 이러한 HtrA2가 세포내 ROS를 조절하는 SOD1과 ALS의 원인 단백질인 SOD1 G93A와 어떤 상관관계가 있는 지를 조사하기 위해 SOD1이 HtrA2의 serine protease의 기질로 작용하는 지 여부를 *in vitro* cleavage test로 확인하였다(Fig. 3). Serine protease 활성부위를 포함하는 약 65 kDa GST-HtrA2와 active site의 serine을 alanine으로 point mutation시켜 serine protease 활성을 제거한 GST-S306A도 GST-SOD1 발현 유도와 동일한 방법으로 정제하여 *in vitro* cleavage test에 이용하였다. 절단된 SOD1 fragment를 보다 신속하게 확인하기 위해 GST-HtrA2 단백질과 GST-SOD1 단백질이 glutathione bead에 결합되어 있는 상태로 37°C에서 16 시간 반응하였다. HtrA2에 의해 절단되어 bead로부터 해리되어 나오는 SOD1 fragment들의 존재를 확인하기 위하여 반응 상층액을 GST 단백질 부분과 결합되어 있는 상태의 bead층과 분리하여 15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 하여 분석하였다(Fig. 3B, Sup). HtrA2에 의하여 절단된 상태에서 glutathione bead에 결합되어 있는 GST-SOD1 fragment들은 bead를 precipitate 시킨 후 전기영동을 통해 절단 양상을 비교 분석하였다(Fig. 3B, Ppt). GST-HtrA2나 GST-SOD1만을 반응시켰을 때는 나타나지 않던 밴드들이 GST-SOD1과 serine protease 효소활성을 지닌 GST-HtrA2를 함께 반응시켰을 경우 약 14~21 kDa사이에서 4개정도의 단백질 fragment들이 상층액에서 확인되었다 (Fig. 3B. Sup, lane 2). 이와는 대조적으로 GST-S306A와 GST-SOD1을 반응시키면 wt HtrA2와의 반응에서 관찰되는 단백질 fragment들이 전혀 확인 되지 않았다 (Fig. 3B. Sup, lanes 3). 이는 GST-HtrA2의 serine protease activity에 의해 GST-SOD1의 특정부위가 절단된 것임을 알 수 있다. GST-G93A에서도 wt SOD1과 유사한 절단양상을 관찰할 수 있는데(Fig. 3B. Sup. lanes 6, 7), 이는 GST-HtrA2의 serine protease activity에 의해서 GST-G93A도 절단된다는 것을 보여준다.

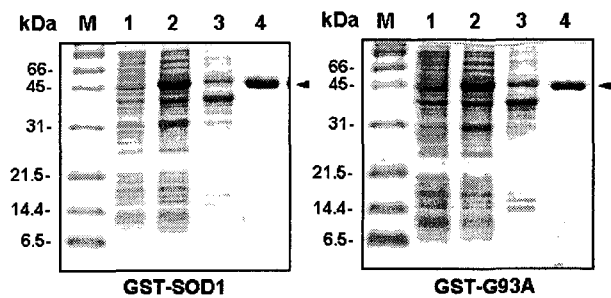


Fig. 2. Expression of the GST-SOD1 and GST-G93A proteins in *E. coli*. The GST-SOD1 and GST-G93A proteins expressed in *E. coli* were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. Lanes M, molecular weight standard; total cell extracts of *E. coli* cultures before IPTG induction (lanes 1) and after IPTG induction (lanes 2); lanes 3, total insoluble precipitation fraction; and lanes 4, GST-SOD1 proteins selectively bound to Glutathione Sepharose 4B beads. Arrowhead indicates the GST-SOD1 proteins.

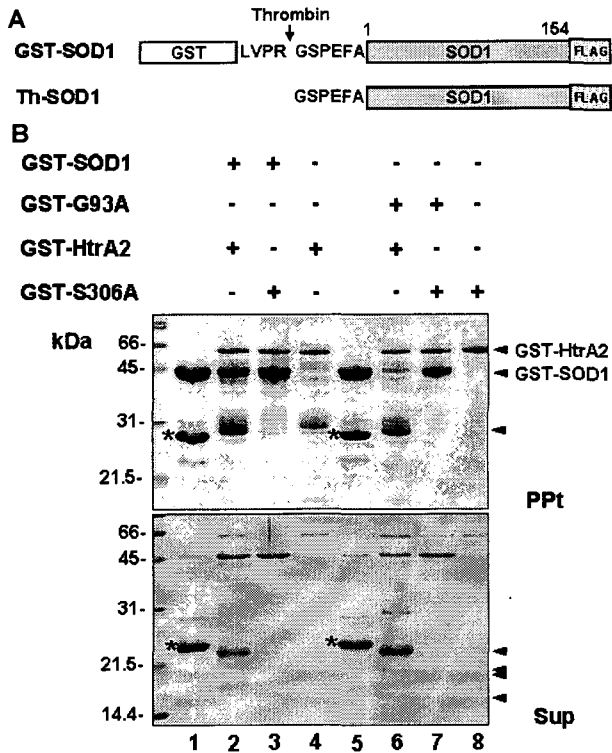


Fig. 3. HtrA2-cleavage patterns of the GST-SOD1 and GST-G93A proteins. (A) Amino acid residues of junction between GST and SOD1. A thrombin-cleavage site is indicated by arrow. (B) The HtrA2-cleavage pattern of SOD1. The SOD proteins purified by selective binding to Glutathione Sepharose 4B beads were incubated with proteolytically active or inactive HtrA2. The reaction mixtures separated into the GST proteins bound to beads (precipitate, PPT) and supernatant (Sup) were resolved by 15% SDS-PAGE, and proteins were visualized by staining with Coomassie brilliant blue. The GST-SOD1 proteins cleaved by thrombin indicate asterisks. Arrowheads indicate the fragments cleaved by HtrA2.

HtrA2에 의해 새롭게 생성되는 단백질의 fragment들이 GST 단백질과 SOD1 단백질 중 어느 부위로부터 유래한 것 인지를 동정하기 위해 GST-SOD1을 thrombin으로 절단한 후 전기영동으로 단백질의 크기를 분석하였다(Fig. 3, lanes 1, 5). Thrombin으로 절단 시 생성되는 SOD1 fragment에는 SOD1의 1번 methionine (M) 앞쪽으로 6개의 amino acid가 더 존재하며, FLAG tagging에 의해 C-terminus 뒤에 restriction enzyme site를 포함해서 10개의 amino acid가 더 존재한다. 이를 ExPASy Molecular Biology Server Program을 이용하여 이론적으로 계산하면 17,705 Da 이지만, 실제로 15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 후 size marker들의 relative mobility에 따라 분자량을 계산하면 약 23,000 Da 이다. 정제된 GST와 Th-SOD1 단백질을 size standard로 하여 HtrA2에 의해 절단된 SOD1 fragment들과 비교 분석해

보았다. Th-SOD1 보다 size가 작은 14~21 kDa fragment들은 상층액에서만 확인할 수 있었고(Fig. 3B. Sup, lanes 1, 2, 5, 6), 27 kDa 크기의 GST 단백질 보다 큰 size인 28~31 kDa의 단백질 fragment들은 PPT에서 확인할 수 있었다(Fig. 3B. PPT, lanes 1, 2, 5, 6). 이들 fragment들의 size를 기준으로 하여 이론적으로 추론해 보면 HtrA2의 serine protease 활성에 의해 SOD1의 N-terminal 부분이 절단된다는 것을 알 수 있다. 생성된 4개의 fragment중 21 kDa fragment가 가장 많은 양이 확인되는데, 이는 HtrA2가 SOD1을 절단할 때 주로 인식하는 부위를 포함한다고 생각할 수 있다.

Immunoblot assay로 HtrA2에 의해 절단되는 SOD1 fragment들의 검증

In vitro cleavage test에서 확인한 fragment들이 HtrA2에 의한 SOD1의 절단에 의한 것임을 재확인하기 위해 immunoblot 분석법을 실시하였다(Fig. 4). Cleavage test의 상층액을 전기영동하여 단백질을 membrane에 옮긴 후 membrane을 FLAG 항체와 반응한 결과, Coomassie staining에서 관찰되었던 15, 17, 19, 21 kDa 크기의 band 중 19 kDa과 21 kDa 두 개의 밴드만을 확인할 수 있었다(Fig. 4, lanes 2, 6). SOD1 항체로 면역반응을 실시한 결과에서도 FLAG항체 실험과 동일하게 이 두 fragment들만이 SOD1항체와 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 SOD1의 N-terminal amino acid의 일부만이 HtrA2에 의해 절단되고 C-terminal 부분을 포함하는 SOD1의 거의 대부분이 남아 있는 상태임을 알 수 있다.

고 찰

본 연구에서는 wt SOD1과 mutant SOD1 (G93A)이 HtrA2 serine protease의 기질임을 *in vitro*에서 확인 하였다. 또한

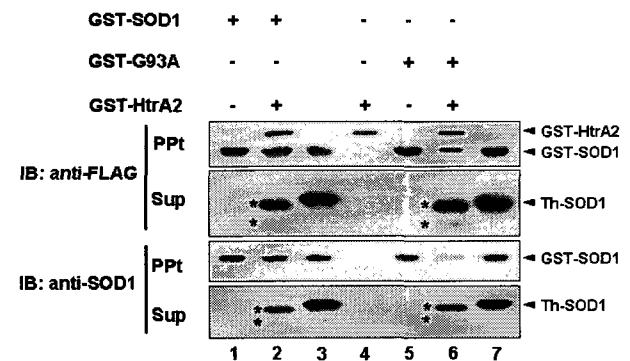


Fig. 4. Cleavage of wild-type and ALS-linked mutant SOD1 (G93A) proteins by proteolytically active HtrA2. *In vitro* cleavage assay samples (Fig. 3) were resolved by 15% SDS-PAGE, followed by immunoblot assays with anti-FLAG or anti-SOD1 antibodies. Asterisks indicate the SOD1 fragments cleaved by HtrA2.

antioxidant enzyme 기능을 하는 wt SOD1과 mutation에 의해 ALS를 유발하는 것으로 알려져 있는 SOD1 (G93A) 단백질을 대장균 내에서 높은 순도로 정제할 수 있는 적정 조건과 시스템을 확립하였다. 발현을 유도하기 전에는 확인하기 어려웠던 45 kDa 크기의 GST-SOD와 GST-G93A 단백질을 IPTG로 GST-fusion 단백질의 발현을 유도하면 적은양의 배지에 배양하여도 많은 양의 soluble form SOD1과 mutant SOD1 (G93A) 단백질을 회수할 수 있었다. 이렇게 pGEX system을 이용하여 단일정제 방법으로 간단하게 다량의 SOD1 단백질을 얻을 수 있어, 다양한 생화학적 실험 연구에 이용할 수 있는 reagent를 용이하게 확보할 수 있다.

HtrA2 단백질 고유의 기능인 serine protease activity를 이용한 *in vitro* cleavage test로 14~21 kDa사이에서 4개의 단백질 fragment가 확인 되었고, 이 중 19 kDa과 21 kDa fragment들은 FLAG antibody를 이용한 Western blot analysis로 확인할 수 있었다. 따라서 SDS-PAGE system과 Western blot analysis를 이용하여 Th-SOD1과 19, 21 kDa fragment들의 크기를 비교한 결과, HtrA2가 주로 SOD1의 N-terminus에 존재하는 amino acid residue를 절단하여 단백질 fragment를 생성한다는 것을 알 수 있다. 또 다른 두 개의 밴드는 GST 항체, FLAG 항체, SOD1 항체들과는 반응하지 않으므로 C-terminal FLAG tag과 SOD1 항체가 인지하는 부위가 HtrA2에 의해 제거된 fragment임을 알 수 있다. Thrombin에 의해 절단되어 생성되는 SOD1의 N-terminus 앞쪽의 flanking amino acid와 C-terminal FLAG을 포함하여 170개의 amino acid로 이루어져 있는 Th-SOD1의 분자량 23 kDa을 기준으로 하여, SOD1의 어느 amino acid가 HtrA2에 의해 절단되어 19 kDa 과 21 kDa fragment들이 생성되는 지 그 cleavage site를 추론할 수 있다(Fig. 5). 이 중 major band인 21 kDa은 SOD1의 N-terminus로부터 9번째 leucine (L)과 10번째 lysine (K) 사이의 peptide bond가 HtrA2에 의해 절단되어 생성되는 fragment일 것이라 예상할 수 있다. 또 다른 minor cleavage site는

23번째 glutamine (Q)과 24번째 lysine (K) 사이의 peptide bond일 것으로 예상할 수 있다. 정확한 cleavage site를 알기 위해서는 이 fragment들을 정제하여 N-terminal amino acid sequencing을 수행할 필요가 있을 것으로 생각한다. HtrA2 serine protease가 인지하는 특정 amino acid sequence는 아직 정확하게 알려져 있지 않지만, peptide libraries를 기질로 이용하여 확인한 실험 결과에 의하면 HtrA2는 주로 aliphatic residue와 small non-polar residues 사이를 자른다고 보고되어 있다[10]. 그러나 HtrA2가 기질을 선택할 때 protein-protein interaction을 증재하는 PDZ domain이 중요한 역할을 할 수 있으므로, HtrA2에 의한 기질단백질의 cleavage site 결정은 amino acids sequence는 물론, 단백질의 conformation도 중요한 역할을 할 것이다[8,10].

최근 연구들을 살펴보면 HtrA2 serine protease에 의해 apoptosis 조절 단백질로 알려진 HS1-associated protein X-1 (HAX-1), apollon, XIAP등이 절단된다는 보고들이 있다 [2,18]. HtrA2에 의해 SOD1이 절단된다는 본 연구결과를 바탕으로 ROS 관련 세포사멸자극에 의해 HtrA2가 cytosol로 release 되면서 superoxide radical을 제거하는 SOD1의 기능 조절에 관여할 수 있다는 가능성을 제시한다. 또한, 정상적인 상태에서는 mitochondria의 intermembrane에 존재하는 HtrA2 단백질이 mitochondria에 위치하는 mutant SOD1 (G93A)을 절단하여 제거할 수 있지만, *mnd2* mouse에서처럼 HtrA2의 protease domain의 mutation에 의해 inactive HtrA2로 존재하게 되면 mutant SOD1 (G93A)의 제거가 정상적으로 이루어 지지 않아 보다 더 많은 aggregate를 형성하게 되어 mitochondria의 dysfunction을 야기할 수 있다.

ALS 환자에서 발견되는 mutant SOD1 (G93A)의 경우는 세포내에서 형성되어 mitochondria의 apoptosis 조절 단백질들과 binding한다고 알려져 있는데[4,15], GST-G93A가 wt GST-SOD1 보다 더 insoluble하다는 결과는 mammalian cell에서 확인된 결과와 유사하며 대장균에서도 mutant SOD1 (G93A)이 쉽게 aggregate를 형성 할 수 있다는 것을 나타낸다. 이는 mutant SOD1의 aggregate형성과 퇴행성 뇌질환의 발병기전과의 상관관계를 연구하는 데 있어서 대장균을 이용한 단백질 발현 시스템의 이용이 가능하다는 것을 말해준다.

본 실험의 결과와 여러 연구결과들을 바탕으로 HtrA2의 serine protease는 caspase-independent 세포사멸 이외에도 SOD1과 같이 세포 내에서 중요한 역할을 하는 여러 단백질의 기능을 조절할 뿐만 아니라 disease의 발병에도 중요한 역할을 담당하는 필수적인 조절인자로 작용할 수 있다는 가능성을 제시한다.

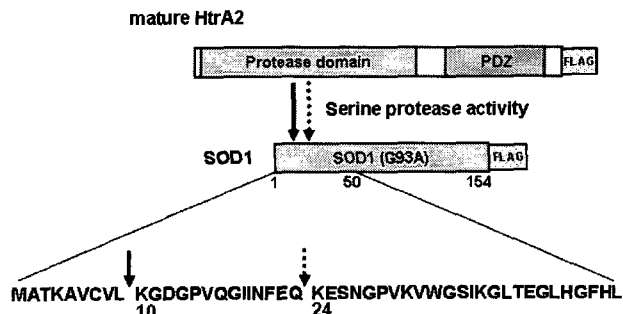


Fig. 5. Prediction of the amino acid residues at the HtrA2-cleavage sites of SOD1. The cleavage sites were predicted based upon molecular masses of the HtrA2-cleavage fragments of SOD1 observed in Fig. 3. Arrows indicate the major (solid) and minor (dotted) cleavage sites on SOD1.

감사의 글

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

본 연구에서 사용한 pGST-SOD1은 최주연이 제공해 주었음.

참 고 문 헌

- Andersen J. K. 2004. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med.* **10**, Suppl:518-25.
- Cilenti L., M. M. Soundarapandian, G. A. Kyriazis, V. Stratico, S. Singh, S. Gupta, J. V. Bonventre, E. S. Alnemri, A. S. Zervos. 2004. Regulation of HAX-1 anti-apoptotic protein by Omi/HtrA2 protease during cell death. *J Biol Chem.* **279**, 50295-301.
- Dal Canto M. C., M. E. Gurney . 1995. Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). *Brain Res.* **676**, 25-40.
- Dawson V. L. 2004. Maiming mitochondria in familial ALS. *Nat Med.* **10**, 905-6.
- Higgins C. M., C. Jung, Z. Xu. 2003. ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. *BMC Neurosci.* **4**, 16
- Jones J. M., P. Datta, S. M. Srinivasula, W. Ji, S. Gupta, Z. Zhang, E. Davies, G. Hajnoczky, T. L. Saunders, M. L. Van Keuren, T. Fernandes-Alnemri, M. H. Meisler, E. S. Alnemri. 2003. Loss of Omi mitochondrial protease activity causes the neuromuscular disorder of mnd2 mutant mice. *Nature.* **425**, 721-7.
- Kim S. S., K. H. Kim, H. J. Park, E. H. Hur, H. Rhim. 2005. Inhibitory effect of the N-terminal GST on the Tautomerase activity of macrophage migration inhibitory factor. *J. Life Science.* **15**, 961-967.
- Li W, S. M. Srinivasula, J. Chai, P. Li, J. W. Wu, Z. Zhang, E. S. Alnemri, Y. Shi. 2002. Structural insights into the pro-apoptotic function of mitochondrial serine protease HtrA2/Omi. *Nat Struct Biol.* **9**, 436-41.
- Maier C. M., P. H. Chan. 2002. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist.* **8**, 323-34.
- Martins L. M., B. E. Turk, V. Cowling, A. Borg, E. T. Jarrell, L. C. Cantley, J. Downward. 2003. Binding specificity and regulation of the serine protease and PDZ domains of HtrA2/Omi. *J Biol Chem.* **278**, 49417-27.
- Martins L. M., A. Morrison, K. Klupsch, V. Fedele, N. Moiso, P. Teismann, A. Abuin, E. Grau, M. Geppert, G. P. Livi, C. L. Creasy, A. Martin, I. Hargreaves, S. J. Heales, H. Okada, S. Brandner, J. B. Schulz, T. Mak, J. Downward. 2004. Neuroprotective role of the Reaper-related serine protease HtrA2/Omi revealed by targeted deletion in mice. *Mol Cell Biol.* **24**, 9848-62.
- Miller A. F. 2004. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol.* **8**, 162-8.
- Nam M. K., H. M. Park, J. Y. Choi, H. J. Park, K. C. Chung, S. Kang, H. Rhim, 2005. The expression patterns of Human parkin in *E. coli* and mammalian cells. *J. Life Science.* **15**, 916-922.
- Noor R., S. Mittal, J. Iqbal. 2002. Superoxide dismutase-applications and relevance to human diseases. *Med Sci Monit.* **8**, 210-5.
- Pasinelli P., M. E. Belford, N. Lennon, B. J. Bacskai, B. T. Hyman, D. Trotti, R. H. Jr. Brown. 2004. Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron.* **43**, 19-30.
- Potter S. Z., J. S. Valentine. 2003. The perplexing role of copper-zinc superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis (Lou Gehrig's disease). *J Biol Inorg Chem.* **8**, 373-80.
- Saito A., T. Hayashi, S. Okuno, T. Nishi, P. H. Chan. 2004. Modulation of the Omi/HtrA2 signaling pathway after transient focal cerebral ischemia in mouse brains that overexpress SOD1. *Brain Res Mol Brain Res.* **127**, 89-95.
- Sekine K, Y. Hao, Y. Suzuki, R. Takahashi, T. Tsuruo, M. Naito. 2005. HtrA2 cleaves Apollon and induces cell death by IAP-binding motif in Apollon-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **330**, 279-85.
- Silverstone Valentine J., P. A. Doucette, S. Zittin Potter. 2005. Copper-zinc superoxide dismutase and amyotrophic lateral sclerosis. *Annu Rev Biochem.* **74**, 563-93.
- Seong Y. M., J. Y. Choi, H. J. Park, K. J. Kim, S. G. Ahn, G. H. Seong, I. K. Kim, S. Kang, H. Rhim. 2004. Autocatalytic processing of HtrA2/Omi is essential for induction of caspase-dependent cell death through antagonizing XIAP. *J Biol Chem.* **279**, 37588-96.
- Seong Y. M., H. J. Park, G. H. Seong, J. Y. Choi, S. J. Yoon, B. R. Min, S. Kang, 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**, 200-8.
- Suzuki Y., Y. Imai, H. Nakayama, K. Takahashi, K. Takio, R. Takahashi. 2001. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell.* **8**, 613-21.
- Takeuchi H, Y. Kobayashi, S. Ishigaki, M. Doyu, G. Sobue. 2002. Mitochondrial localization of mutant superoxide dismutase 1 triggers caspase-dependent cell death in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Biol Chem.* **277**, 50966-72.
- van Gurp M., N. Festjens, G. van Loo, X. Saelens, P. Vandenabeele. 2003. Mitochondrial intermembrane proteins in cell death. *Biochem Biophys Res Commun.* **304**, 487-97.
- Verhagen A. M., J. Silke, P. G. Ekert, M. Pakusch, H. Kaufmann, L. M. Connolly, C. L. Day, A. Tikoo, R. Burke, C. Wrobel, R. L. Moritz, R. J. Simpson, D. L. Vaux. 2002. HtrA2 promotes cell death through its serine protease activity and its ability to antagonize inhibitor of apoptosis proteins. *J Biol Chem.* **277**, 445-54.