

*E. coli*에서 발현된 human HtrA1 단백질의 정제와 HtrA1의 serine protease 활성 조건에 관한 연구

김경희^{1,2} · 김상수^{1,2} · 김구영^{1,2} · 임향숙^{1,2*}

¹가톨릭대학교 생명과학과, ²분자유전학연구소

Received August 22, 2006 / Accepted September 22, 2006

Purification of Human HtrA1 Expressed in *E. coli* and Characterization of Its Serine Protease Activity. Kyung-Hee Kim^{1,2}, Sang-Soo Kim^{1,2}, Goo-Young Kim^{1,2} 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. – Human HtrA1 (High temperature requirement protein A1) is a homologue of the *E. coli* periplasmic serine protease HtrA. A recent study has demonstrated that HtrA1 is a serine protease involved in processing of insulin like growth factor binding protein (IGFBP), indicating that it serves as an important regulator of IGF activity. Additionally, several lines of evidence suggest a striking correlation between proteolytic activity of HtrA1 serine protease and the pathogenesis of several diseases; however, physiological roles of HtrA1 remain to be elucidated. We used the pGEX bacterial expression system to develop a simple and rapid method for purifying HtrA1, and the recombinant HtrA1 protein was utilized to investigate the optimal conditions in executing its proteolytic activity. The proteolytically active HtrA1 was purified to approximately 85% purity, although the yield of the recombinant HtrA1 protein was slightly low (460 µg for 1 liter *E. coli* culture). Using in vitro endoproteolytic cleavage assay, we identified that the HtrA1 serine protease activity was dependent on the enzyme concentration and the incubation time and that the best reaction temperature was 42°C instead of 37°C. We arbitrary defined one unit of proteolytic activity of the HtrA1 serine protease as 200 nM of HtrA1 that cleaves half of 5 µM of β-casein during 3 hr incubation at 37°C. Our study provides a method for generating useful reagents to investigate the molecular mechanisms by which HtrA1 serine protease activity contributes in regulating its physiological function and to identify natural substrates of HtrA1.

Key words – HtrA1, GST fusion system, expression and purification conditions, serine protease activity

서 론

E. coli periplasm에서 작용하는 HtrA (High temperature requirement protein A)는 heat shock-induced serine protease로 알려져 있다[4,19]. HtrA null mutant *E. coli*는 생장 온도가 42°C가 되면 misfold 된 단백질을 분해하는 능력을 상실하게 되며, 결국에는 치사하게 되는데[19], 이 결과를 통하여 HtrA가 *E. coli*의 생존에 필수적인 protease로 작용함을 알 수 있다[4,18]. Human에서 bacterial HtrA의 homologue로 HtrA1 (L56, PRSS11), HtrA2 (Omi), HtrA3, HtrA4가 밝혀졌으며, 이 homologue들은 serine protease domain과 PDZ (post-synaptic density, discs large and zonular occludens) domain을 공통적으로 포함하는데, 이 domain들은 진화론적으로 잘 보존되어 있는 것을 알 수 있다[4]. HtrA homologue 중에서 연구가 가장 활발히 진행되고 있는 유전자는 programmed cell death pathway에 중요한 역할을 하는

것으로 알려진 HtrA2이다[4,17,18,21]. 이 HtrA2 serine protease의 substrate는 β-casein과 더불어 inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), HS1-associated protein X-1 (HAX1), PED/PEA-15, APP 등이 있다[12,16,20,22].

HtrA1은 SV40에 의해 형질이 전환된 fibroblast에서 down-regulation되어있는 유전자로 처음 알려졌으며[2], insulin like growth factor binding protein (IGFBP)을 분해하여 IGF의 작용을 조절할 수 있는 serine protease로 밝혀졌다[8]. 최근 HtrA1 serine protease 활성으로 인해 관절을 이루는 구성 물질이며 관절염질환과 상관관계가 있는 fibronectin이 분해되며[7,23], Alzheimer disease (AD)의 발병에 관여하는 amyloid beta (Aβ) 생성이 secretase 외에도 HtrA1 serine protease에 의해 조절된다는 사실이 밝혀졌다[6]. 이런 일련의 연구결과들은 HtrA1 serine protease의 활성이 특정 질환 발병 경로에 관여하는 단백질을 processing함으로써 질환의 발병을 조절할 수 있다는 가능성을 제시한다. 따라서 HtrA1의 생리적 기능 및 질환과의 연계성을 규명하기 위해 HtrA1의 natural substrate들을 찾는 연구가 필수적이다. 그러나 아직까지 HtrA1의 substrate를 탐색하고 HtrA1과 substrate의

*Corresponding author

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

E-mail : hrhim@catholic.ac.kr

상관관계에 대한 생화학적 연구를 위한 시스템이 잘 정립되어 있지 않은 실정이다. HtrA1 serine protease의 substrate를 탐색하기 위해서는 *in vitro*에서 용이하게 연구를 수행할 수 있는 시스템이 필요하다. 이를 위해 본 연구에서는 serine protease 활성을 지닌 HtrA1을 *E. coli*에서 다량 발현하고 정제하는 조건을 확립하였으며, 정제한 HtrA1을 이용하여 *in vitro* cleavage assay를 통해 HtrA1 serine protease 활성이 최적이 되는 반응 조건을 정립하였다.

재료 및 방법

Plasmid의 제조

Mature form의 HtrA1을 얻기 위하여 full-length HtrA1을 발현하는 pcDNA3-T7-PRSS11 plasmid와 serine protease 활성을 저해시킨 pcDNA3-T7-PRSS11 S328A plasmid를 이용하였다[1]. 이 plasmid들을 pBluescript II KS+에 cloning하여, pBS-HtrA1 (WT)과 pBS-HtrA1 (S328A)라고 명명하였다. HtrA1의 C-terminus에 FLAG epitope tag을 하기 위하여 5' HtrA1 primer (GCGCGGATCCGATATCATGATCACA: bold체는 *EcoRV* restriction enzyme site), 3' HtrA1 primer (GCGCGGTACCTGGGTCAATTCCTC: bold체는 *Kpn I* restriction enzyme site)를 제작하여 pBS-HtrA1 (WT) plasmid를 주형으로 PCR을 수행하였다. 증폭된 HtrA1 cDNA fragment는 BamH I 과 *Kpn I*으로 절단한 뒤 동일한 restriction enzyme으로 절단한 pcDNA-HA-FLAG plasmid에 cloning하여 pcDNA-HA-HtrA1 (aa 468-480)-FLAG으로 명명하였다. 각 각의 pcDNA-HA-HtrA1 (aa 468-480)-FLAG과 pBS-HtrA1 (WT), pBS-HtrA1 (S328A) plasmid를 동일한 restriction enzyme인 BamH I 과 *EcoRV*로 절단한 후 cloning하여 pHA-HtrA1-FLAG (WT), pHA-HtrA1-FLAG (S328A) plasmid를 제작하였다.

HtrA1 (GeneBank accession number NM_002775)의 450 번째 nucleotide (aa 150)위치에 존재하는 unique Pst I restriction enzyme site를 이용하여 mature HtrA1 (HtrA1 Δ 149, aa 150-480)을 발현하는 plasmid를 제조하였다. 먼저 이 cloning을 위하여 pHA-HtrA1-FLAG (WT), pHA-HtrA1-FLAG (S328A) plasmid를 Pst I 과 Xba I으로 절단하여 pBluescript II KS+ 벡터에 cloning하였다. 이를 pBS-HtrA1-FLAG Δ 149 (WT), pBS-HtrA1-FLAG Δ 149 (S328A)로 명명하였다. Mature form HtrA1을 GST (glutathione S-transferase) fusion 단백질로 *E. coli*에서 발현시키기 위해 pBS-HtrA1-FLAG Δ 149 (WT), pBS-HtrA1-FLAG Δ 149 (S328A) plasmid 각각을 *EcoR I* 과 *Xho I*으로 절단하여 pGEX 4T-1 expression vector (Amersham)에 cloning하였다. GST-HtrA1을 발현하는 plasmid를 p Δ 149-FLAG (WT), p Δ 149-FLAG (S328A)로 명명하였다. DNA 염기서열 분석법(ABI Prism

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystem)을 이용하여 cloning한 모든 HtrA1 plasmid의 염기서열을 확인하였다.

GST-HtrA1 fusion 단백질의 발현과 정제

GST-HtrA1 fusion 단백질 Δ 149 (WT)와 Δ 149 (S328A)의 발현과 정제는 선행 연구 방법을 참고하였다[15,17]. p Δ 149-FLAG (WT)와 p Δ 149-FLAG (S328A) plasmid를 특정 protease를 가지고 있지 않은 BL21 [*F ompT hsdSB(r_Bm_B) gal dcm*]균주에 삽입하였다. Ampicillin (50 μ g/ml)을 포함하는 LB 배지 20 ml에서 18 시간 배양한 후, 180 ml의 LB 배지로 희석하여 37°C에서 90 분간 더 배양하였다. GST-HtrA1 fusion 단백질 발현을 유도하기 위하여 0.1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, Amresco)를 넣고 90 분을 키운 후, 4°C에서 2,500 rpm으로 15 분간 원심 분리하여 배양한 *E. coli*를 침전시켰다. 이렇게 모은 *E. coli*들은 7 mM DTT, 100 μ g/ml lysozyme, 10 μ g/ μ l aprotinin, 10 μ g/ μ l leupeptin이 포함된 EBC buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40)로 용해시킨 후 초음파 파쇄기로 다시 용해시켰다. 원심 분리를 통하여 세포 찌꺼기를 제거하고 얻은 상층액에 glutathione Sepharose 4B beads (Amersham) 20 μ l를 넣고 상온에서 30 분간 반응시킨 후, 원심 분리하여 glutathione Sepharose 4B bead에 결합되어 있는 GST-HtrA1 fusion 단백질을 침전시켰다. 각 단계별로 얻은 단백질들은 15% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하고 Coomassie staining solution [0.1% Brilliant blue R (Sigma), 45% methanol, 10% acetic acid]로 20 분간 염색시킨 후, destaining solution (10% methanol, 10% acetic acid)으로 씻어내어 단백질 밴드를 확인하였다.

Recombinant HtrA1 단백질을 정제하기 위하여 glutathione Sepharose 4B beads에 결합되어 있는 GST-HtrA1에 5 mM reduced glutathione을 첨가하고 37°C에서 30 분 반응시켰다. 원심 분리를 통하여 bead를 제거한 free 상태의 GST-HtrA1을 Δ 149*라고 명명하였다[10]. 정제한 단백질들은 이미 농도를 알고 있는 BSA (bovine serum albumin)와 비교 정량하여 단백질의 양을 결정하였다.

In vitro endoproteolytic cleavage assay

Glutathione Sepharose 4B beads에 결합되어 있는 GST-HtrA1 단백질과 reduced glutathione과 반응시켜 정제한 free GST-HtrA1 단백질의 serine protease 활성을 확인하기 위해 serine protease의 일반적인 substrate로 알려진 β -casein을 사용하여 *in vitro* endoproteolytic cleavage assay를 실시하였다[17]. 각 각 200 nM (620 ng)의 GST-HtrA1 단백질에 5 μ M (8 μ g)의 β -casein final 50 μ l reaction volume으로 혼합하여 37°C에서 3 시간 반응시켰다. 전체 반응용액

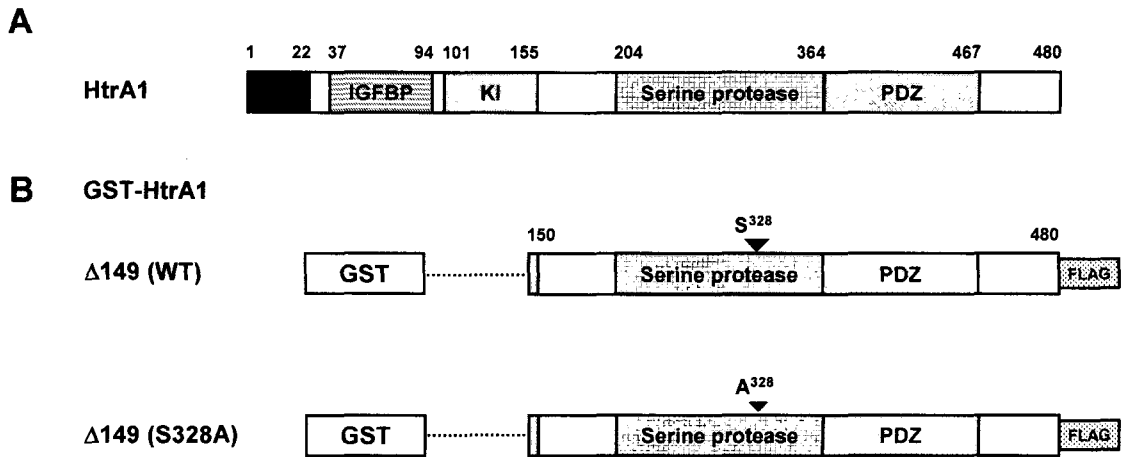


Fig. 1. Constructs expressed as GST-HtrA1 fusion proteins in *E. coli*. (A) Schematic diagram of full-length HtrA1. HtrA1 consists of five functional domains: SP, signal peptide; IGFBP, insulin like growth factor binding protein domain; KI, Kazal type trypsin inhibitor motif; serine protease domain; and PDZ domain. (B) Schematic representation of GST-HtrA1 constructs. Δ149 indicates a mature form of HtrA1 encompassing aa 150-480. Δ149 (S328A) is the catalytically inactive mutant by replacing the catalytic serine 328 residue with alanine.

을 glutathione Sepharose 4B bead층과 상층액으로 분리한 후 15% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 β-casein의 절단양상을 분석하였다. Multi Gauge V3.0 프로그램을 사용하여 절단되지 않은 β-casein 밴드의 농도를 정량한 후, SigmaPlot 9.0 프로그램을 이용하여 그래프로 나타내었다.

결 과

Mature form의 HtrA1 단백질의 발현과 정제

Human HtrA1 serine protease 단백질은 signal peptide, IGFBP domain, kazal like trypsin inhibitor motif (KI), serine protease domain, PDZ (post-synaptic density, discs large and zonular occludens) domain으로 구성되어있다 (Fig. 1A). Full-length HtrA1을 *E. coli*에서 발현시키면 자신의 serine protease 활성화에 의하여 47, 44, 42 kDa의 fragment가 생성되는데 (data not shown), 기존의 연구결과를 바탕으로 42 kDa의 fragment가 mature form의 HtrA1임을 추론할 수 있었다[2]. 따라서 mature HtrA1의 생화학적 특징을 연구하기 위해 pGEX 시스템을 이용하여 mature form의 recombinant HtrA1을 발현할 수 있는 plasmid를 제조하였다 (Fig. 1B). 이를 위하여 450번째 nucleotide (HtrA1의 150번째 amino acid residue 부위)에 존재하는 unique restriction enzyme인 *Pst* I을 이용하여 mature HtrA1 cDNA fragment를 pGEX 4T-1에 cloning한 후 GST-HtrA1을 발현하는 plasmid (pΔ149라 명명)를 얻었다(Fig. 1B).

Lon protease와 *OmpT* protease가 결핍된 균주인 BL21 [F' *ompT hsdSB(r_B m_B) gal dcm*]에 제조한 plasmid를 삽입하여 일반적인 배양 조건(37°C, 0.1 mM IPTG)하에서 GST-

HtrA1 fusion 단백질(Δ149 (WT)와 Δ149 (S328A))의 발현을 유도한 후, 15% SDS-polyacrylamide gel에서 분리하여 발현 양상을 비교 분석하였다(Fig. 2). ExPASy Molecular Biology Server Program (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)을 이용하여 Δ149 (WT)와 Δ149 (S328A) 단백질의 분자량을 이론적으로 계산하면 62,133Da이다. IPTG로 단백질의 발현을 유도하기 전에는 Δ149 (WT), Δ149 (S328A) 단백질을 관찰하기 어려웠으나 발현 유도 후에 약 64 kDa 크기에서

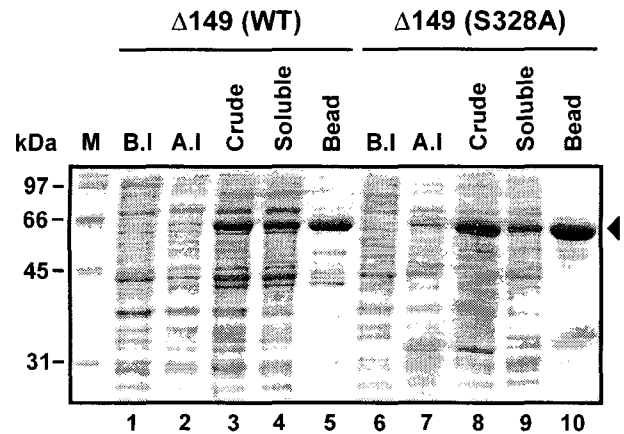


Fig. 2. Expression and purification of GST-HtrA1 fusion proteins. Expression of the GST-HtrA1. Lane M, molecular weight standard; lanes B.I, cell lysates of *E. coli* cultures before IPTG induction; lanes A.I, cell lysates of *E. coli* cultures after IPTG induction; lanes Crude, crude cell extract after sonication; lanes soluble: soluble fraction from crude cell extract; and lanes Bead, HtrA1 protein selectively bound to glutathione Sepharose beads. Arrowhead indicates the GST-HtrA1 fusion proteins, Δ149 (WT) and Δ149 (S328A).

GST-fusion 단백질을 확인할 수 있었다(Fig. 2, lanes 2, 7). 단백질의 solubility를 측정하기 위하여 sonication 후 crude extract에 포함되어 있는 $\Delta 149$ (Fig. 2, lanes 3, 8)의 양과 cell debris와 precipitation되는 단백질을 제거한 수용액층에 포함되어 있는 $\Delta 149$ (Fig. 2, lanes 4, 9)의 양을 Multi Gauge V3.0 프로그램을 이용하여 정량한 후 비율을 백분율로 환산하였다. Crude extract에 존재하는 $\Delta 149$ 는 200 ml 배양액 당 약 400 μg 이며, 수용액 층(soluble fraction)에는 200 ml 배양액 당 320 μg 의 $\Delta 149$ 가 포함되어 있으므로 $\Delta 149$ 단백질의 solubility는 80% 정도임을 알 수 있다(% solubility = total amount of $\Delta 149$ in the soluble fraction/total amount of $\Delta 149$ in the crude extract \times 100). Soluble fraction에 glutathione Sepharose 4B beads를 넣고 incubation하면 bead에 선택적으로 결합한 $\Delta 149$ 단백질을 200 ml 배양액 당 약 80 μg 의 양으로 정제할 수 있다[8,10] (Fig. 2, lanes 5, 10). 따라서 GST 시스템을 이용한 단일 정제법으로 20% yield로 $\Delta 149$ 단백질을 회수할 수 있다(Table 1). 정제한 $\Delta 149$ 를 15% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동을 하면 64 kDa의 $\Delta 149$ 외에도 약 50, 45, 42 kDa의 fragment들을 확인할 수 있는데, 이는 $\Delta 149$ (WT)의 serine protease 활성으로 인하여 $\Delta 149$ (WT)의 약 170번째 amino acid와 210번째 amino acid에서 autoprocessing되어 생성되는 것으로 예상할 수 있다(Fig. 2). Multi Gauge V3.0을 이용하여 각 단백질 band들의 intensity를 측정하고 이 합을 1이라고 정하였을 때 64 kDa의 $\Delta 149$ 단백질은 약 0.85정도의 intensity를 나타내었다. 이 GST 시스템을 이용하여 85%의 순도를 지닌 $\Delta 149$ 단백질을 얻을 수 있다(Fig. 2). 이 실험에서 사용한 발현 및 정제조건을 이용하면 1 liter 배양 시 정제된 $\Delta 149$ (WT)와 $\Delta 149$ (S328A)를 약 400 μg 와 520 μg 을 얻을 수 있다. $\Delta 149$ (S328A)의 경우 $\Delta 149$ (WT) 보다 약 1.3배를 더 회수할 수 있는데, 이는 wild-type

Table 1. Purification and serine protease activity of GST-HtrA1.

	Culture volume (ml)	Total amount of GST-HtrA1 protein (μg)	Yield ^c (%)	Total activity ^d (U)
Crude extract	200	400	100	645
Soluble fraction	200	320	80	516
Affinity column ^a	200	80	20	129
Elution ^b	200	32	8	96

One unit (U) of the GST-HtrA1 serine protease activity was arbitrarily defined as the amount of enzyme that cleaves 50% of 8 mg β -casein in 3 hr at 37 °C. ^aAffinity column: GST-HtrA1 by selectively bound to glutathione Sepharose 4B, ^bElution of GST-HtrA1 by incubating with reduced glutathione, ^cTotal amount of GST-HtrA1 in each fraction/total amount of GST-HtrA1 in crude extract \times 100, ^dU/620 ng \times total amount of GST-HtrA1

HtrA1의 autoproteolytic activity로 인하여 단백질의 일부가 소실되기 때문인 것으로 판단할 수 있다.

HtrA1의 serine protease 활성에 GST가 미치는 영향

GST-fusion 단백질의 정제 시 사용한 glutathione Sepharose 4B bead가 HtrA1 serine protease 활성에 영향을 주는 지 확인하기 위하여 glutathione Sepharose 4B bead와 $\Delta 149$ 를 분리하고자 하였다. Glutathione 4B beads를 이용하여 정제한 $\Delta 149$ 단백질들을 reduced glutathione과 혼합하여 37°C에서 30 분간 반응시킨 후, 반응 용액을 원심 분리하여 glutathione Sepharose 4B bead로부터 $\Delta 149$ 를 분리하여 free 상태의 GST-HtrA1 ($\Delta 149^*$) 단백질을 얻었다(Fig. 3A). $\Delta 149$ 를 다량 회수하기 위하여 glutathione Sepharose 4B bead에 수용성 cell extract를 2 시간 반응시킨 후, reduced glutathione을 처리하면 $\Delta 149$ 를 bead로부터 elution할 수 있어 200 ml 배양액 당 32 μg 를 회수할 수 있었다(Fig. 3A).

먼저 glutathione Sepharose 4B bead로 정제한 $\Delta 149$ 단백질들의 serine protease 활성을 측정하기 위하여 β -casein을 substrate로 하여 in vitro cleavage assay를 실시한 결과, catalytic site mutant인 $\Delta 149$ (S328A)는 β -casein을 절단하지 못했지만, $\Delta 149$ (WT)는 β -casein을 약 30% 절단하는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B). $\Delta 149$ 단백질과 $\Delta 149^*$ 단백질을 각각 β -casein과 혼합하여 37°C에서 3시간 반응한 후, 반응 상층액을 15% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 β -casein의 절단양상을 비교 분석한 결과, $\Delta 149$ (S328A)와 $\Delta 149^*$ (S328A)는 β -casein을 절단하지 못했지만, $\Delta 149$ (WT)와 $\Delta 149^*$ (WT)는 β -casein을 절단하는 것을 알 수 있다(Fig. 3B). Glutathione Sepharose 4B bead에 결합해 있는 $\Delta 149$ (WT)와 bead로부터 free한 $\Delta 149^*$ (WT)의 serine protease 활성을 비교하기 위해 β -casein의 절단을 분석한 결과, 동일한 반응조건에서 β -casein의 약 65%가 $\Delta 149^*$ (WT)에 의하여 절단되며 $\Delta 149$ (WT)에 의해서는 약 37%가 절단되는 것을 알 수 있다(Fig. 3C, Table 1).

GST-HtrA1의 endoproteolytic 활성 조건 확립

HtrA1 serine protease 활성이 enzyme 농도와 어떤 상관관계가 있는지 조사하기 위하여 일반적인 serine protease의 substrate인 β -casein을 이용하여 in vitro cleavage assay를 실시하였다(Fig. 4). 각 종 농도의 $\Delta 149$ (WT) 단백질(0~500 nM)을 5 μM 의 β -casein을 포함하고 있는 반응용액에 첨가하여 37°C에서 3 시간 반응시켰다. 반응 후 상층액을 15% SDS-polyacrylamide gel에 전기영동하여 $\Delta 149$ 에 의하여 절단되지 않은 β -casein의 양을 Multi Gauge V3.0 프로그램을 이용하여 측정된 결과 $\Delta 149$ (WT) 단백질의 농도가 50 nM일 경우 약 83%의 β -casein이 절단되지 않고 남아 있는 것을 확인할 수 있었다. $\Delta 149$ (WT) 단백질의 농도가 200 nM 일 경우

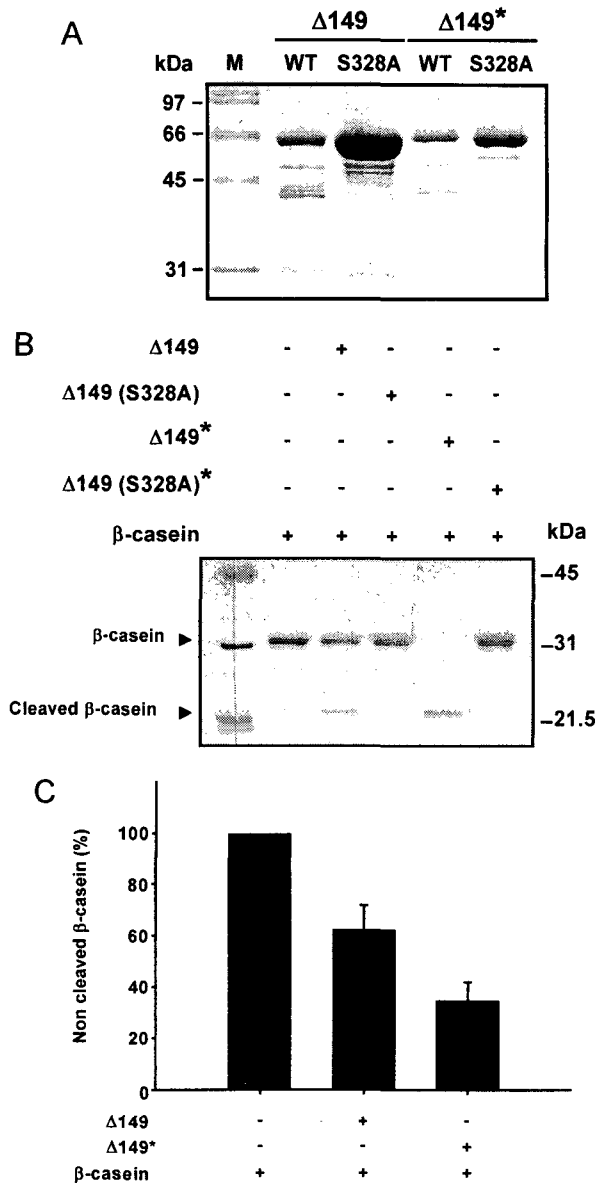


Fig. 3. GST has no discernible effect on the HtrA1 serine protease activity. (A) Purification of the GST-HtrA1 proteins. $\Delta 149^*$ indicates GST-HtrA1 proteins eluted from glutathione Sepharose beads by incubating with reduced glutathione. (B) Endoproteolytic activity of the GST-HtrA1 proteins. The 200 nM of GST-HtrA1 fusion proteins were incubated with 5 μ M of β -casein as an exogenous substrate for 3 hours at 37 $^{\circ}$ C. The reaction mixture were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. (C) Graphic representation of endoproteolytic cleavage of GST-HtrA1 shown in Fig. 3B. Non-cleaved β -casein bands were quantified by using Multi Gauge V3.0 software. Error bars represent the standard error of the mean.

약 48%의 β -casein이 절단되지 않고 남아 있고, 500 nM의 $\Delta 149$ (WT)단백질을 이용하여 cleavage assay를 실시한 결

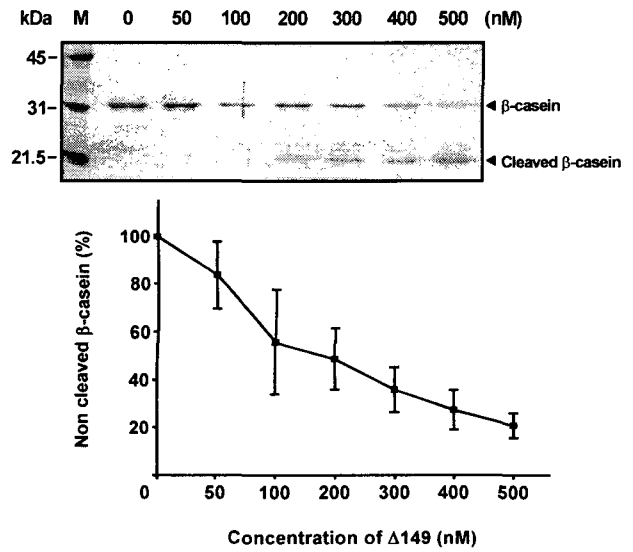


Fig. 4. HtrA1 catalyzes cleavage of β -casein in a concentration-dependent manner. Various concentration of GST-HtrA1 (0-500 nM) were incubated with 5 μ M of β -casein as an exogenous substrate for 3 hours at 37 $^{\circ}$ C. The reaction mixture were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. Non-cleaved β -casein bands were quantified by using Multi Gauge V3.0 software. Error bars represent the standard error of the mean.

과, 약 20%의 β -casein이 절단되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 $\Delta 149$ (WT)단백질의 농도가 증가할수록 β -casein의 절단이 더 많이 일어나는 것을 알 수 있다 (Fig. 4). 따라서 HtrA1 serine protease의 활성은 enzyme의 농도에 dependent하게 나타나는 것을 확인하였다.

HtrA1 serine protease의 활성이 반응시간에 따라 어떻게 변화하는지 확인하기 위하여 200 nM $\Delta 149$ (WT)단백질과 5 μ M의 β -casein을 혼합하여 반응시간을 증가시키면서 β -casein의 절단양상을 분석하였다(Fig. 5). $\Delta 149$ (WT)와 β -casein을 1 시간 반응시키면 β -casein이 약 30% 정도 절단되고 나머지 70%는 절단되지 않고 남아있지만, 반응시간을 3 시간으로 증가시키면 약 50%의 β -casein이 절단되는 것을 관찰할 수 있다. 반응시간을 5 시간으로 증가시키면 약 80%의 β -casein이 절단되며, 8 시간 반응시키면 약 84%의 β -casein이 절단되었다(Fig. 5). $\Delta 149$ (WT)의 β -casein을 절단하는 효소활성은 5 시간까지는 반응시간에 비례하여 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이 결과를 바탕으로 $\Delta 149$ (WT)의 serine protease 활성에 의하여 β -casein이 50% 절단되는 3 시간을 적절한 반응시간으로 선택하여 다음 실험을 진행하였다.

HtrA1 serine protease의 활성이 반응온도에 의해 어떻게 변화하는지를 확인하기 위해 β -casein을 substrate로 하여 각종 온도에서 in vitro cleavage assay를 실시하였다(Fig. 6). $\Delta 149$ (WT)와 β -casein을 혼합한 후, 온도조건을 달리하여 3

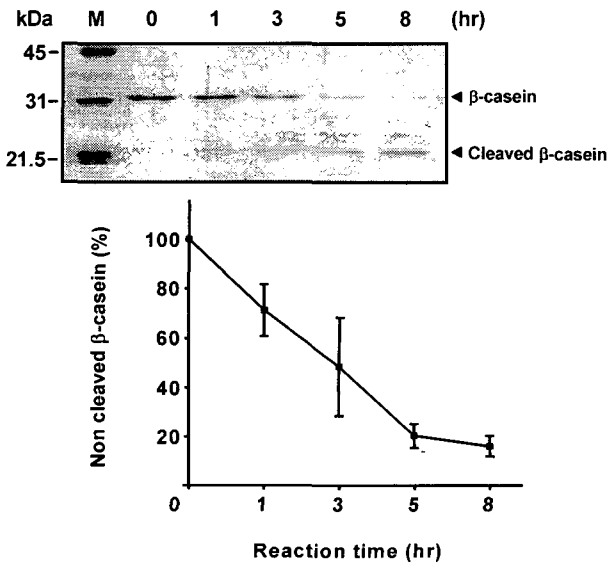


Fig. 5. HtrA1 catalyzes cleavage of β -casein in a time-dependent manner. The 200 nM of GST-HtrA1 was incubated with 5 μ M of β -casein as an exogenous substrate at 37 $^{\circ}$ C for various reaction times (0-8 hours). The reaction mixture were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. Non cleaved β -casein bands were quantified by using Multi Gauge V3.0 software. Error bars represent the standard error of the mean.

시간 반응시킨 결과, 4 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 β -casein은 절단을 거의 확인할 수 없었으나 37 $^{\circ}$ C에서는 약 49%의 β -casein이 절단되었다. 반응온도를 점점 높이면 β -casein의 절단 양상을 관찰한 결과 42 $^{\circ}$ C에서 약 71%의 β -casein이 절단되었으나, 온도를 56 $^{\circ}$ C로 높이면 약 16%로 β -casein의 절단이 감소되는 것을 확인할 수 있다. Δ 149 (WT)와 β -casein을 80 $^{\circ}$ C에서 반응시키면 4 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 것과 마찬가지로 β -casein이 거의 절단 되지 않은 것을 확인할 수 있다(Fig. 6). 이를 통하여 42 $^{\circ}$ C에서 Δ 149 (WT)의 serine protease 활성이 가장 높은 것을 알 수 있다.

고 찰

본 연구에서는 HtrA1의 natural substrate 탐색에 관한 연구에 필요한 active HtrA1을 얻기 위해 glutathione Sepharose 4B bead를 이용한 단일 step 정제법으로 약 460 μ g/liter culture의 serine protease 활성을 지닌 GST-HtrA1을 회수할 수 있는 정제조건을 정립하였다. 또한 HtrA1 serine protease의 활성은 protease의 농도와 substrate와의 반응시간에 dependent하고, 42 $^{\circ}$ C의 반응온도에서 최적의 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

*E. coli*에서 mature HtrA1의 발현과 정제를 쉽게 하기 위하여 사용한 GST와의 fusion이 HtrA1의 serine protease 활

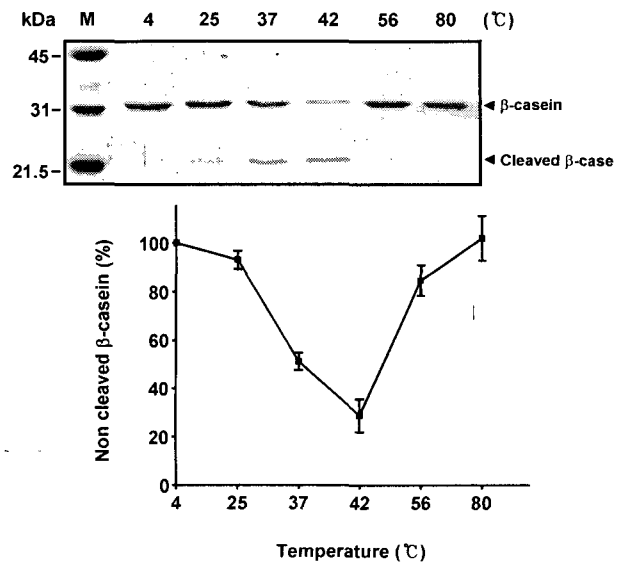


Fig. 6. The effect of temperatures on the endoproteolytic activity. The 200 nM of GST-HtrA1 was incubated 5 μ M of β -casein as an exogenous substrate for 3 hours at various temperatures (4-80 $^{\circ}$ C). The reaction mixture were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. Non cleaved β -casein bands were quantified by using Multi Gauge V3.0 software. Error bars represent the standard error of the mean.

성에 영향을 주는지 조사하기 위하여 정제된 Δ 149에 human thrombin을 처리하였다. 그 결과 HtrA1의 152번째와 282번째 그리고 269번째 amino acid residue가 thrombin에 의하여 절단되어 약 38 kDa의 mature HtrA1과 약 26 kDa의 GST외에 약 8.5, 9, 11.5, 14, 16, 18, 26 kDa의 HtrA1 fragment들이 생성되는 것을 확인할 수 있었다(data not shown). GST가 HtrA1의 serine protease 활성에 미치는 영향을 비교 측정하기 위해서는 GST가 존재하는 Δ 149와 GST를 제거한 HtrA1을 이용하는 것이 가장 좋으나, HtrA1이 thrombin에 의하여 절단되므로 이 방법을 사용할 수가 없었다.

HtrA human homologue인 HtrA2의 경우, GST가 HtrA2의 serine protease 활성에 전혀 영향을 주지 않기 때문에[16], GST-HtrA1으로 enzyme활성을 비교한 결과 Δ 149가 Δ 149*에 비하여 1.85배 정도 낮다. 이는 GST fusion이 HtrA1의 serine protease 활성에 영향을 주는 것이 아니라, free 상태의 Δ 149*가 bead에 결합되어 있는 Δ 149에 비하여 상대적으로 자유로워 β -casein과의 반응할 기회가 많기 때문인 것으로 예상할 수 있다. Δ 149의 단위 활성 능력은 Δ 149*에 비하여 1.85배 낮지만, total enzyme 활성 능력은 Δ 149가 Δ 149*에 비해 1.34배 더 좋으므로(Table 1), reduced glutathione으로 incubation하는 step을 줄일 수 있어 Δ 149를 이용하여 HtrA1 serine protease의 최적 활성조건을 정립하였다.

Enzyme의 작용은 enzyme의 농도, 반응온도, 반응용액의

pH, 반응시간 등에 영향을 받으므로[5], 이에 따른 HtrA1의 enzyme 활성 정도를 측정 한 후, HtrA1 serine protease가 β -casein을 50% 정도 절단하는 반응조건(enzyme, 200 nM GST-HtrA1; substrate, 5 μ M β -casein; 반응온도, 37°C; 반응시간, 3 시간)에서 사용한 HtrA1의 양을 단위 unit으로 정하였다. Enzyme 활성은 온도에 따른 특이성을 갖기 때문에[5, 14], HtrA1 serine protease도 활성 온도의 특이성을 지니고 있는지 여부를 조사한 결과 42°C에서 serine protease 활성이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 bacterial HtrA와 human HtrA2에서도 비슷한 경향을 나타내는데[19,24], 이는 진화론적으로 잘 보존되어 있는 serine protease domain의 영향 때문인 것으로 예상할 수 있으며, HtrA1과 HtrA2 serine protease가 동일한 substrate를 절단할 가능성이 있다는 것을 시사한다. 최근 amyloid precursor protein (APP)의 processing에 HtrA1이 직접 관여한다는 결과가 보고되었을 뿐만 아니라[6], 본 연구실에서 HtrA1 homologue인 HtrA2가 APP를 직접 절단한다는 결과를 발표하였다[12]. 따라서 candidate substrate를 *E. coli*에서 발현하거나 in vitro transcription-translation 방법을 이용하여 제조한 후 본 연구에서 확립한 HtrA1 정제 시스템과 in vitro cleavage assay를 이용하여 candidate 단백질이 HtrA1 serine protease에 의해 절단되는 지 여부를 SDS-polyacrylamide gel 상에서 보다 용이하게 확인할 수 있을 것이다. 또한, diagonal gel electrophoresis system을 이용하여 새로운 HtrA1 substrate를 탐색하는데도 본 연구에서 확립한 방법으로 정제한 active HtrA1을 활용할 수 있다.

요 약

E. coli HtrA (High temperature requirement protein A)의 human homologue 중 하나인 HtrA1은 IGFBP를 절단하여 IGF의 활동을 조절하는 serine protease으로 알려졌다. HtrA1의 serine protease 활성이 여러 질병의 발병 mechanism과 연관성을 가진 것으로 예상되고 있지만, 이런 상관관계를 밝히기 위해서 기본적으로 필요한 다량의 HtrA1 단백질의 발현 및 정제조건과 HtrA1 serine protease의 최적 활성조건이 확립되어 있지 않은 상황이다. 따라서 본 연구에서는 pGEX 시스템을 이용하여 *E. coli*에서 mature HtrA1인 Δ 149 (WT)와 catalytic site mutant인 Δ 149 (S328A)를 85%의 순도로 1 liter 배양 시, 정제된 단백질을 각각 400 μ g, 520 μ g 얻을 수 있는 발현조건을 정립하였다. 또한 HtrA1 serine protease 활성은 protease의 농도와 substrate와의 반응시간에 dependent하며, substrate와의 반응온도가 42°C일 때 최적의 serine protease 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 특히 200 nM의 HtrA1 serine protease를 37°C에서 3 시간 반응시켰을 때, substrate로 사용한 β -casein의 약 50%가 절단되

는 것을 관찰하였다. 따라서 이 반응조건에 사용한 HtrA1의 양을 1 unit으로 하여 HtrA1의 serine protease 활성을 여러 조건에서 비교 분석할 수 있다. 본 연구에서 정립한 mature HtrA1을 다량으로 얻을 수 있는 발현 및 정제조건과 serine protease 최적 활성조건은 HtrA1의 serine protease 활성과 생물학적 기능의 상관관계를 이해하는데 활용될 수 있을 것이다.

감사의 글

“본 연구에 사용한 pcDNA3-T7-PRSS11과 pcDNA3-T7-PRSS11 S328A는 Dr. A. Baldi (Second University of Naples, Italy)가 제공해 주었음”

참 고 문 헌

- Baldi A, A. De Luca, M. Morini, T. Battista, A. Felsani, F. Baldi, C. Catricala, A. Amantea, D. M. Noonan, A. Albin, P. G. Natali, D. Lombardi, M. G. Paggi. 2002. The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells. *Oncogene* **21**, 6684-6688.
- Chien J, J. Staub, Si. Hu, M. R. Erickson-Johnson, F. J. Crouch, D. I. Smith, R. M. Crowl, S. H. Kaufmann, V. Shridhar. 2004. A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer. *Oncogene* **23**, 1636-1644.
- 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**, 50295-50301.
- Clausen T, C. Southan, M. Ehrmann. 2002. The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* **10**, 443-455.
- David L. Nelson and Michael M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. pp. 243-269, 3rd eds., Worth Publishers. 41 Madison Avenue, New York.
- Grau S, A. Baldi, R. Bussani, X. Tian, R. Stefanescu, M. Przybylski, P. Richards, S. A. Jones, V. Shridhar, T. Clausen, M. Ehrmann. 2005. Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **102**, 6021-6026.
- Grau S, P. J. Richards, C. Hughes, B. Caterson, A. S. Williams, U. Junker, S. A. Jones, T. Clausen, M. Ehrmann. 2006. The role of human HtrA1 in arthritic disease. *J. Biol. Chem* **281**, 6124-6129
- Hu Si, M. Carozza, M. Klein, P. Nantermet, D. Luk, R. M. Crowl. 1998. Human HtrA, an evolutionarily conserved serine protease identified as a differentially expressed gene product in osteoarthritic cartilage. *J. Biol. Chem.* **273**, 34406-34412.
- Kim G. Y., S. S. Kim, H. J. Park. and H. Rhim. 2005. Expression of human SOD1 and mutant SOD1 (G93A) in

- E. coli* and identification of SOD1 as a substrate of HtrA2 serine protease. *Journal of Life Science* **16**, 716-722.
10. Kim S. S., K. H. Kim, H. J. Park, E. H. Hur and H. Rhim. 2005. Inhibitory Effect of the N-terminal GST on the Tautomerase Activity of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Journal of Life Science* **6**, 961-967.
 11. Nam M. K., H. M. Park, J. Y. Choi, H. J. Park, K. C. Chung, S. Kang and H. Rhim. 2005. The Expression Patterns of Human Parkin in *E. coli* and Mammalian Cells. *Journal of Life Science* **6**, 916-922.
 12. Park H. J., S. S. Kim, Y. M. Seong, K. H. Kim, H. G. Goo, E. J. Yoon, D. S. Min, S. Kang, H. Rhim. 2006. Beta-amyloid precursor protein is a direct cleavage target of HtrA2 serine protease: Implications for the physiological function of HtrA2 in the mitochondria. *J. Biol. Chem.* **281**, 34277-34287.
 13. Park H. J., Y. M. Seong, J. Y. Choi, S. Kang, H. Rhim. 2004. Alzheimer's disease-associated amyloid beta interacts with the human serine protease HtrA2/Omi. *Neurosci. Lett.* **357**, 63-67.
 14. S. C. Cary, T. Shank, J. Stein. 1998. Worms bask in the extreme temperatures. *Nature* **391**, 545-546.
 15. Seong Y. M., C. Han, J. Y. Choi, H. J. Park, G. H. Seong, M. K. Nam, S. S. Kim, I. K. Kim, S. Kang, Rhim H. 2003. High-level Expression of Human Procaspase-9 in *Escherichia coli* and Purification of its GST-tagged Recombinant Protein. *Kor. J. Microbiol.* **39**, 216-222.
 16. 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**, 279-285.
 17. 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**, 200-208.
 18. 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**, 37588-37596.
 19. Spiess C, A. Beil, M. Ehrmann. 1999. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in widely conserved heat shock protein. *Cell* **37**, 339-347.
 20. Srinivasula S. M., S. Gupta, P. Datta, Z. Zhang, R. Hegde, N. Cheong, T. Fernandes-Alnemri, E. S. Alnemri. 2003. Inhibitor of Apoptosis Proteins Are Substrates for the Mitochondrial Serine Protease Omi/HtrA2. *J. Biol. Chem.* **278**, 31469-31472.
 21. 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**, 613-621.
 22. Trencia. A., F. Fiory, M. A. Maitan, P. Vito, A. P. M. Barbagallo, A. Perfetti, C. Miele, P. Ungaro, F. Oriente, L. Cilenti, A. S. Zervos, P. Formisano, F. Beguinot. 2004. Omi/HtrA2 Promotes Cell Death by Binding and Degrading the Anti-apoptotic Protein ped/pea-15. *J. Biol. Chem.* **279**, 46566-46572.
 23. Tushiya A, M. Yano, J. Tocharus, H. Kojima, M. Fukumoto, M. Kawaichi, C. Oka. 2005. Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis. *Bone* **37**, 323-336.
 24. Zhang X, Z. Chang. 2004. Temperature dependent protease activity and structural properties of human HtrA2 protease. *Biochemistry (Mosc)* **69**, 687-692.