

## The Alpha Subunit of Go Interacts with Brain Specific High Mobility Group Box Containing Protein

Jung-Sik Park and Sung-Ho Ghil<sup>†</sup>

Department of Biology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

Heterotrimeric GTP binding proteins (G proteins) mediate signal transduction generated by neurotransmitter and hormones. Among G-proteins, Go is classified as a member of the Go/Gi family and the most abundant heterotrimeric G protein in brain. Most of the mechanistic analyses on the activation of Go indicated its action to be mediated by the G $\beta\gamma$  dimer because downstream effectors for its  $\alpha$  subunit have not been clearly defined. To determine the downstream effectors of alpha subunits of Go (Go $\alpha$ ), we used yeast two-hybrid system to screen Go $\alpha$  interacting partners in cDNA library from the human brain. A brain specific high mobility group box containing protein (BHX), A possible transcription factor, was identified as a Go $\alpha$  interacting protein. We confirmed interaction between Go $\alpha$  and BHX employing *in vitro* affinity binding assay. Moreover, active form of Go $\alpha$  preferentially interacts with BHX than inactive form. Our findings indicate that Go $\alpha$  could modulate gene expression via interaction with BHX during neuronal or brain development.

**Key Words:** G-proteins, High mobility group (HMG), Yeast two hybrid, Affinity binding

### 서 론

세포 내에서의 신호전달은 많은 단백질들의 상호작용에 의해 연결된다. 그 중 세포막에서 상위신호전달자로서 신호전달의 기초가 되는 것이 Heterotrimeric GTP 결합단백질 (G-단백질)이다. G-단백질은  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 세 종류의 소단위체로 구성되어 있으며, GDP와 GTP가 교차로 결합하는 특성을 가지고 있다. GDP가 결합한 비활성화 상태에서는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 가 모두 결합한 상태로 G-protein-coupled receptor (GPCR)에 결합되어 있으며, GPCR에 신경전달물질 또는 호르몬 등의 리간드가 결합하게 되면 GDP가 GTP로 치환, 활성화되어  $\alpha$ -소단위체와  $\beta\gamma$ -소단위체가 서로 분리되어 각각의 하위신호전달효과자 (downstream effector molecules)에 그 신호를 전달하게 된다 (Liu and Anand, 2001). 효과자에 신호를 전달한 후에는 GTP의 마지막 인산기가 분해되어 GDP가 되면서 다시 원래의 불활성화 상태로 돌아가게 된다.

G-단백질은  $\alpha$ -소단위체의 단백질 서열의 차이에 따라 Gs, Gi, Gq, G<sub>12</sub> 등으로 분류되며, 세포 내에서의 그 기능 역시 각기 다른 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 사용된 Go의

$\alpha$ -소단위체 (Go $\alpha$ )의 경우 염기서열의 배열이 Gi의  $\alpha$ -소단위체 (Gi $\alpha$ )와 유사하여 Gi 단백질의 한 종류에 포함된다. Go를 제외한 다른 G-단백질의  $\alpha$ -소단위체는 그 하위신호전달효과자가 비교적 잘 알려진 것에 반해 Go는 그 하위신호전달효과자에 대해 잘 밝혀지지 않고 있다. 그 이유는 Go $\alpha$ 가 Gi $\alpha$ 와 단백질 서열이 유사하다는 것에 초점을 두어 Go $\alpha$ 의 효과자를 검색하는데 adenylyl cyclase (AC)만을 고려하여 그 활성을 중심으로만 조사하였기 때문이다. 그러나 Go $\alpha$ 가 phospholipase C (PLC)나 AC의 활성화에 영향을 미치지 않는다는 것이 Go $\alpha$ 가 결여된 생쥐와 정상생쥐의 비교를 통하여 보고된 바 있어 Go $\alpha$ 는 Gi $\alpha$ 나 Gs $\alpha$ 와 같이 AC를 하위신호전달효과자로 사용하지 않는다는 것을 알 수 있다 (Jiang et al., 1998; Mende et al., 1998).

이러한 Go $\alpha$ 의 기능을 알아보기 위하여 본 연구에서는 Yeast two hybrid 스크리닝을 수행하여, 뇌에서 특이적으로 발현되는 유전자인 brain specific high mobility group box containing protein (BHX)를 발굴하였다. 이 유전자는 내부에 HMG-box 도메인과 nuclear localization signal (NLS)를 가지고 있어 전형적인 전사조절인자 (transcription factor)의 성격을 갖는다. 본 연구에서는 Go $\alpha$ ::BHX의 상호작용을 GST-pulldown assay를 수행하여 재차 검증하였으며, Co-immunoprecipitation을 통하여 BHX가 Go $\alpha$ 의 하위신호전달효과자라는 것을 밝혔다.

\*논문 접수: 2006년 10월 12일

수정재 접수: 2006년 11월 25일

<sup>†</sup>교신저자: 김성호, (우)442-760 경기도 수원시 영통구 이의동, 경기대학교 생물학과

Tel: 031-249-9646, Fax: 031-249-9646

e-mail: shghil@kyonggi.ac.kr

## 재료 및 방법

### 1. 재료

BHX를 포함하는 cDNA 클론 (pBluescript-KIAA0737)은 Kazusa DNA Research Institute로부터 제공받아 사용하였다. Yeast 성장배지는 Bio101 (Vista, CA), herring testis DNA는 Clontech (Palo Alto, CA), Goa 항체와 HA 항체는 Santacruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Glutathione sepharose 4B bead와 Protein A sepharose CL-4B bead는 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden), TA 클로닝 벡터 (pGEMT/easy)는 Promega (Madison, WI) 제한효소와 T4 DNA 결합효소는 Roche (Mannheim, Germany), PVDF membrane은 Schleicher & Schuell Bioscience (Dassel, Germany), Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate는 Pierce (Rockford, IL). 이외의 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다.

### 2. 발현벡터의 제작

Yeast two hybrid 스크리닝에 사용한 bait 플라스미드인 pHybTrp/Zeo-Goa<sup>Q205L</sup>는 pRC/CMV-Goa<sup>Q205L</sup> 플라스미드에서 *EcoRI*과 *XbaI* 제한효소로 절단하여, pcDNA3 벡터에 삽입한 후, 다시 *EcoRI*과 *ApaI* 제한효소로 절단하여 pHybTrp/Zeo 벡터에 삽입하여 제작하였다. BHX의 발현플라스미드인 pcHA-BHX는 pBluescript-KIAA0737 플라스미드를 주형으로 하여 PCR을 수행하여 제작하였다. 이때 사용한 primer는 5'-ATGATCCATATGATGTTCCAGATTATGCTGCCATGGAG-TTTCCC-3'과 5'-CTATTTACAAACACCAC-3'이며, BHX의 N-말단에 HA 항원기를 첨가하였다. PCR 결과물을 pGEMT/easy 플라스미드에 삽입한 후, *EcoRI*과 *XhoI* 제한효소로 절단하여 pcDNA3.1 플라스미드에 삽입하였다.

### 3. Yeast two hybrid 스크리닝

Goa와 상호작용하는 단백질을 찾아내기 위하여 Yeast two hybrid 스크리닝을 수행하였다. L40 효모세포주에 lithium acetate 방법으로 bait 플라스미드 (pHybTrp/Zeo-Goa<sup>Q205L</sup>)를 형질전환시켜 트립토판이 결핍된 (-T) 고체성장배지에서 3일간 배양하였다. 배양된 콜로니를 (-T) 액체성장배지에서 16시간 추가 배양한 후, 원심분리 (100 ×g, 10분, 4°C)하여 세포를 수집하였다. 수집된 세포로 competent 세포를 제작하여 인간 배아의 뇌에서 유래한 cDNA library를 형질전환 시킨 후, 히스티딘, 류신, 트립토판이 결핍된 (-HLT) 고체성장배지에서 일주일간 배양하였다. 성장한 콜로니들로부터 false-positive 클론을 제거하기 위하여 각각 -HLT 고체성장배지에 3-AT (3-amino-1, 2, 4-triazole)가 첨가된 배지 (-HLT + 3-AT)와 루이신과 트립토판이 결여된 -LT 고체성장배지에 X-gal이 첨

가된 배지 (-LT + X-gal)에 접종, 배양하여 성장유무와 변색 유무를 각각 확인하였다. 또한 β-galactosidase (β-gal)의 활성의 정량적인 측정을 위해 콜로니들을 -HLT 액체성장배지에서 배양하여 β-gal 분석을 수행하였다. 선별된 콜로니들로부터 library 플라스미드 DNA를 추출하여 DH5α 박테리아 세포에 형질전환 시킨 후, 유전자 서열을 분석하였다. 분석된 유전자 서열은 NCBI의 Blast search 프로그램을 사용하여 동정하였다.

### 4. 세포배양 및 transfection

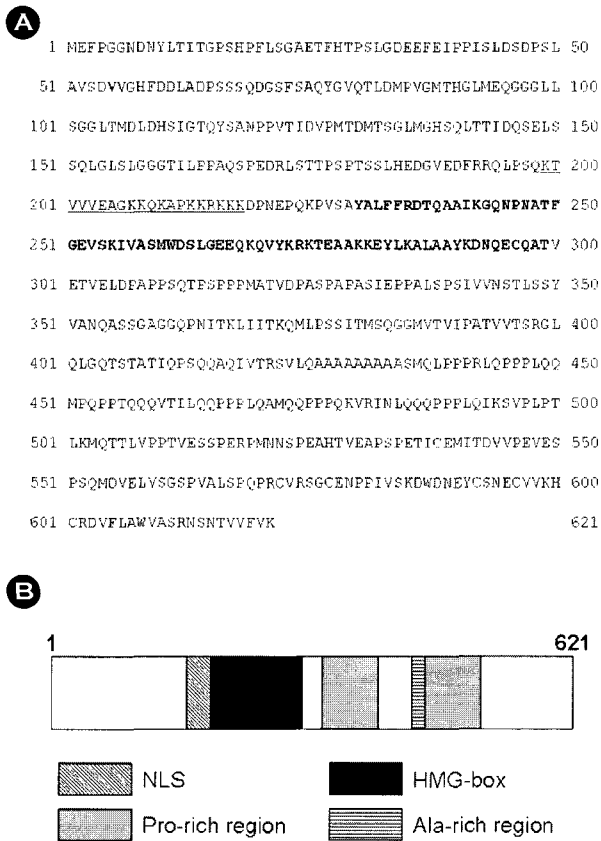
293T 세포는 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양배지 (DMEM, 10% FBS, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)를 이용하여 2, 3일간 배양한 후, 0.25% trypsin-EDTA 용액으로 세포를 수집하여 계대배양하였다. Transfection을 위해 하나의 100 mm 배양접시당 1.5×10<sup>6</sup>개의 세포수로 분주하였다. 24시간이 지난 후, calcium-phosphate 방법으로 DNA를 transfection하였다. 이를 간략히 설명하면, 각각의 발현 플라스미드들을 62 µl의 2 M CaCl<sub>2</sub>와 함께 혼합한 후, 동량의 2X HBS (50 mM Hepes pH 7.1, 280 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)를 첨가하였다. 이 혼합액을 상온에서 30분 정치하고 세포배양액에 분주하였다. Transfection을 수행하여 40시간 후에 세포를 수집하고, PBS (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl)로 수세한 후, GST-pulldown assay 및 co-immunoprecipitation 실험을 수행하였다.

### 5. GST-pulldown assay

GST 및 GST-Goa 융합단백질을 발현하는 유전자를 BL21 박테리아 세포주에 형질전환시켜 배양한 후, 0.5 mM IPTG를 배지에 첨가하여 4시간 동안 추가 배양하였다. 세포배양액을 원심분리 (3,000 rpm, 15분)하여 세포분쇄용액 (1% Triton X-100과 단백질분해효소 억제제가 첨가된 PBS)으로 무유한 후, 초음파분쇄기로 분쇄하였다. 재차 원심분리 (12,000 rpm, 10분, 4°C)하여 상등액을 Glutathione sepharose 4B beads와 4°C에서 1시간 반응시킨 후, 세포분쇄용액으로 beads를 5회 수세하였다. 이 beads에 293T 세포에 HA-BHX를 발현시킨 세포추출물을 4°C에서 1시간 반응시키고 세포분쇄용액으로 5회 수세하여 단백질 전기영동 후, HA 항체로 Western blot 분석을 실시하였다.

### 6. Co-immunoprecipitation

293T 동물 세포에 HA-BHX와 Goa의 야생형 (Goa<sup>wt</sup>) 또는 돌연변이형 (Goa<sup>Q205L</sup>) 플라스미드를 함께 발현시킨 후, 세포를 수집하여 세포분쇄용액으로 단백질을 추출하였다. HA-BHX와 Goa<sup>wt</sup>이 발현된 세포추출물을 사용한 경우에는 200 µM GDP와 100 µM GTPγS을 각각 처리하고 30°C에서



**Fig. 1.** Amino acid sequence and a schematical drawing of BHX. Amino acid sequence of BHX (A). The amino acids are numbered starting from the initiation codon. A putative NLS region is underlined. The putative HMG-box domain is indicated in bold type. A schematical illustration of the structure of BHX (B).

30분 반응시켰다. 세포추출물에 1  $\mu$ g의 HA 항체를 첨가하여 4°C에서 16시간 반응시킨 후, protein A sepharose CL-4B beads를 추가하여 4°C에서 4시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 세포분쇄용액으로 5회 수세하고 단백질 전기영동을 한 후, Goa 항체로 Western blot 분석하였다.

## 결 과

### 1. Yeast two hybrid 스크리닝을 통한 Goa와 상호작용하는 단백질의 탐색

Goa와 상호작용하는 단백질을 인간배아의 뇌에서 유래한 cDNA library에서 탐색하기 위해 yeast two hybrid 스크리닝을 수행하였다. 총  $1.2 \times 10^5$ 개의 독립적인 클론을 분석하여 5개의 clone에서 서로 유전자 서열이 동일한 유전자를 발견하였다. 이 유전자는 HMG (high mobility group)-box 도메인을 가지며, 그 기능이 아직 알려지지 않은 유전자이다. 이 유전자는 621개의 아미노산을 코딩하며 (Fig. 1A), 단백질로 번역되었을 때, nuclear localization signal (NLS), HMG-box,

proline-rich, alanine-rich 도메인 등을 갖는다 (Fig. 1B). 또한 본 cDNA를 제공한 Kazusa DNA Research Institute의 RT-PCR 실험자료에 의하면 이 유전자는 뇌에서만 특이적으로 발현되고 있다. 따라서 본 연구에서는 이 유전자를 brain specific HMG-box containing protein (BHx)로 명명하였다.

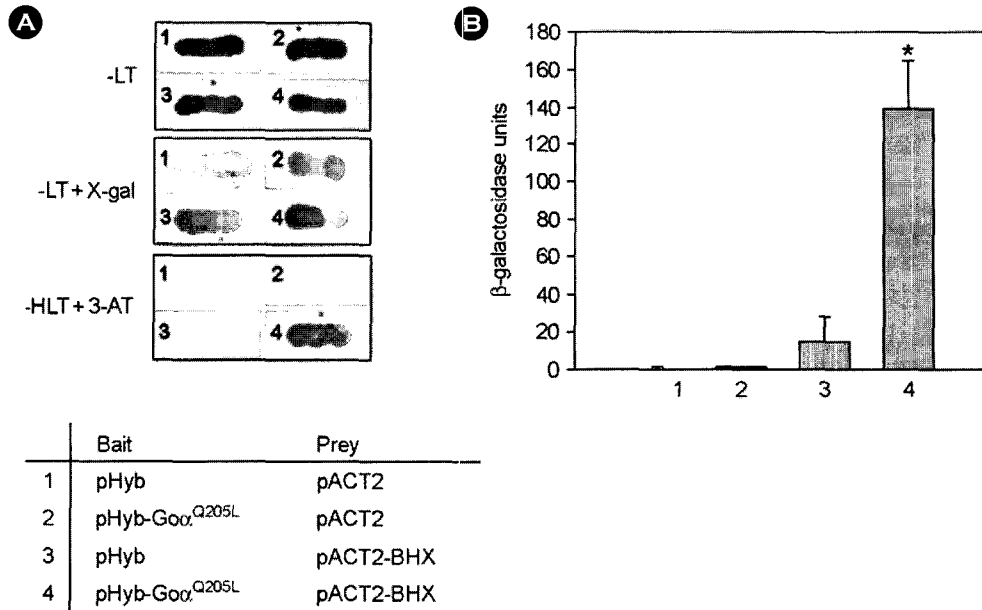
BHx와 Goa의 상호작용을 Yeast two hybrid system을 통하여 확인하기 위해, L40 효모세포주에 pHybTrp/Zeo 플라스미드와 pHybTrp/Zeo-Goa<sup>Q205L</sup> 플라스미드를 각각 형질전환시킨 후, 추가로 pACT2와 pACT2-BHx를 각각 형질전환하였다. 형질전환된 세포를 -LT, -LT + X-gal, -HLT + 3-AT에 접종, 배양하여 성장유무 및 변색유무를 관찰하였다 (Fig. 2A). 그 결과, -LT 성장배지에서는 모든 세포가 성장하였고, -LT + X-gal 성장배지에서는 pHybTrp/Zeo-Goa<sup>Q205L</sup> 플라스미드와 pACT2-BHx 플라스미드가 함께 형질전환된 세포에서 X-gal에 의한 양성 변색반응이 일어났다. 또한 -HLT + 3-AT 배지에서는 pHybTrp/Zeo-Goa<sup>Q205L</sup> 플라스미드와 pACT2-BHx 플라스미드가 함께 형질전환된 세포에서만 성장하였다. 각각의 플라스미드가 형질전환된 세포에서 보이는 정상적인  $\beta$ -gal의 발현양을 분석하기 위해, 형질전환된 세포를 수거하여, 분쇄한 후,  $\beta$ -gal 분석을 실시하였다 (Fig. 2B). 그 결과, pHybTrp/Zeo-Goa<sup>Q205L</sup> 플라스미드와 pACT2-BHx 플라스미드가 함께 형질전환된 세포에서 가장 높은  $\beta$ -gal의 활성을 보였다. 이와 같은 결과는 Goa와 BHx는 서로 상호작용함을 의미한다.

### 2. BHx와 Goa의 상호작용 증명

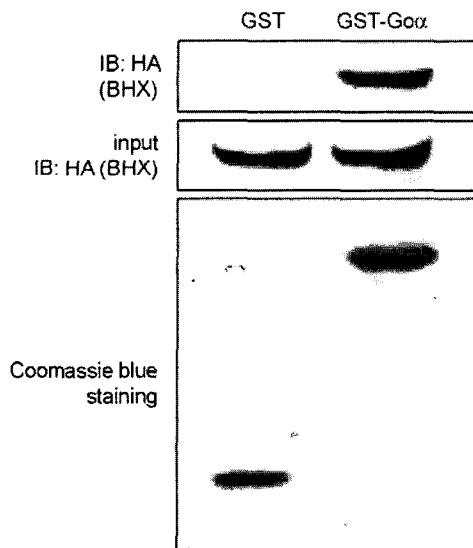
Yeast two hybrid 스크리닝 결과에서 보이는 Goa::BHx의 상호작용을 재차 검증하기 위해서 GST-pulldown assay를 수행하였다. 이를 위해 GST와 GST-Goa 융합단백질을 각각 BL21 박테리아 세포주에 발현시켜 얻은 추출물을 glutathione sepharose beads와 반응시켰다. 또한 293T 세포에 HA-BHx 단백질을 발현시켜 얻은 추출물을 추가로 beads에 반응시킨 후, 단백질 전기영동을 수행하고 HA 항체를 이용하여 Western 분석하였다. 그 결과 GST와 BHx를 반응시킨 대조군에서는 BHx의 band가 나타나지 않았으나, GST-Goa와 BHx를 반응시킨 실험군에서는 BHx의 band가 확인되었다 (Fig. 3). 따라서 Goa와 BHx는 *in vitro*에서 서로 상호작용을 하고 있음을 알 수 있었다.

### 3. Goa의 하위신호전달효과자 (downstream effector molecules)로서의 BHx

G-단백질의 소단위체는 세포외부의 신호를 세포내부로 전달하는 핵심적인 신호전달자로서 세포막의 GPCR의 신호를 전달받아 활성화되면 다양한 하위신호전달효과자로 그 신호를 전달한다. 따라서 본 연구에서 Goa::BHx의 상호작용이



**Fig. 2.** Interaction between Goa and BHX. Yeast clone co-expressed Goa and BHX represented blue colony in X-gal containing media (-LT + X-gal) and were grown in 5 mM 3-AT containing media (-HLT + 3AT) (A).  $\beta$ -galactosidase assay represented showing interaction between Goa and BHX. Data are shown as the average  $\pm$  S.E. of at least three independent experiments. \*,  $P < 0.001$  compared to control (B). -LT, Leucin and Tryptophan drop out medium; -HLT, Histidin, Leucin, and Tryptophan drop out medium; and 3-AT, 3-amino-1,2,4-triazole.



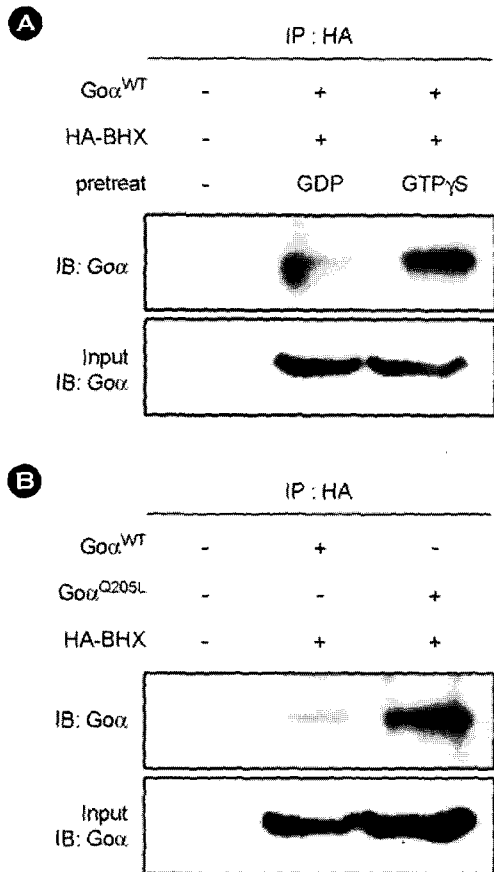
**Fig. 3.** GST pull-down results showing that Goa interacts with BHX. Beads charged with bacterially expressed GST alone and GST-Goa were incubated with 293T cell extracts expressing 10  $\mu$ g of HA-BHX plasmid. Bound proteins were immunoblotted with antibodies against HA. Input was loaded with 10% of 293T cell extracts used for the GST pull-down assay. Coomassie blue staining revealed the levels of GST and GST-Goa fusion proteins.

이러한 신호전달기작에 의해서 서로 상호작용하는지를 확인하기 위해서, Goa의 활성화상태에 따른 BHX의 상호작용 여부를 조사하였다. 먼저 293T 세포에 Goa와 BHX를 함께 발현

시킨 후, 세포추출물을 얻어 GDP 및 세포 내에서 쉽게 분해가 되지 않는 GTP인 GTP $\gamma$ S를 처리하여 HA 항체로 immunoprecipitation하였다. 그 후, immunocomplex에 Goa의 존재 여부를 확인하기 위해 Goa 항체로 Western blot 분석을 실시하였다 (Fig. 4A). 그 결과, GTP가 결합된 활성화된 Goa가 불활성화된 형태보다 BHX에 대한 강력한 결합력을 보였다. 또한 293T 세포에 HA-BHX와 Goa의 야생형 (Goa<sup>wt</sup>) 및 활성화된 형태의 돌연변이 (Goa<sup>Q205L</sup>) 플라스미드를 발현시키고, 세포추출물을 얻어 HA 항체로 immunoprecipitation하고 Goa 항체로 Western blot 분석을 실시한 실험에서도 Goa의 활성화된 형태가 BHX와 더 강력한 결합력을 보였다 (Fig. 4B). 이상의 결과를 토대로 BHX는 Goa의 활성화된 형태와 더 잘 결합함을 알 수 있으며, 이는 BHX가 Goa의 하위신호전달효과자임을 시사한다.

## 고찰

본 연구에서는 뇌조직에서 그 발현량이 높음에도 불구하고, 아직까지 그 기능이 알려지지 않은 Goa의 기능을 밝히기 위한 연구로서, 뇌조직에서 Goa와 상호작용하는 단백질을 발굴하고자 하였다. 이를 위해서 인간배아 뇌조직에서 유래한 cDNA library를 사용하여 Goa와 상호작용하는 단백질을 동정하였다. 지금껏 그 상호작용이 알려진 단백질을 포함하여 많은 수의 단백질이 Goa와 상호작용하였으며, 그 중에



**Fig. 4.** BHX preferentially bind the active form of Go $\alpha$ . Extracts of 293T cell mock-transfected or co-transfected with expression plasmids for wild type of Go $\alpha$  (5  $\mu$ g) and HA-BHX (10  $\mu$ g) were pretreated GDP (200  $\mu$ M) or GTP $\gamma$ S (100  $\mu$ M) at 30 $^{\circ}$ C for 30 min, and immunoprecipitated with HA antibody. Immunoprecipitates were immunoblotted with antibody against Go $\alpha$  (A). Extracts of 293T cells mock-transfected or transfected with expression plasmids for wild-type (Go $\alpha^{WT}$ , 5  $\mu$ g) or active mutant (Go $\alpha^{Q205L}$ , 3  $\mu$ g) of Go $\alpha$  together with HA-BHX (10  $\mu$ g) were immunoprecipitated with the anti-HA antibody. Immunoprecipitates were immunoblotted with antibody against Go $\alpha$  (B). Input was loaded with 10% of 293T cell extracts used for immunoprecipitation.

서 HMG-box 도메인을 갖는 전형적인 전사조절인자 (transcription factor)의 기능을 할 것으로 추정되는 BHX를 동정하였다. 특히 BHX는 다른 조직에 비해 뇌조직에서 그 발현량이 매우 높았으며, 이는 Go $\alpha$ 의 생체 내 발현부위와 일치한다. 지금까지 수행되어온 Go $\alpha$ 에 관한 연구에서 Go $\alpha$ 는 뇌조직의 발생 및 분화에 많은 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, Go는 신경세포의 성장원추 (growth cone)를 구성하는 막 단백질의 주성분이며 (Strittmatter et al., 1990), 뇌조직의 막 성분의 약 0.5%를 차지하고 있다 (Huff et al., 1985). Go는 신경세포의 길이성장에 관련되어 있는데, Go/Gi의 활성화제인 mastroparan을 처리하였을 때, 닭의 배아에서 유래한 신경세포의 성장원추의 붕괴를 초래하였으며, 이러한 반응은

Go/Gi의 억제제인 pertussis toxin (PTX)에 의해 억제되었다. 또한 GPCR에 반응하는 신경전달물질의 리간드의 처리에 의해서 몇몇 신경세포에서 길이성장이 억제되었다 (Haydon et al., 1984; Lankford et al., 1988; Rodrigues and Dowling, 1990). 이와는 반대로, Go $\alpha$ 의 활성화된 돌연변이 단백질의 발현에 의해서 PC12 세포에서는 신경돌기 (neurites)의 개수가 증가하는 양상을 보였다 (Strittmatter et al., 1994). F11 신경모세포종에 Go $\alpha$ 를 인위적으로 발현시켰을때에도 신경돌기의 길이 성장에 영향을 미쳤다 (Ghil et al., 2000). 또한 Go/Gi와 결합되어 있는 GPCR의 일종인 cannabinoid 수용체의 리간드를 처리했을 때에도 neuro2a 세포의 신경돌기의 길이성장이 유도되었다 (Jordan et al., 2005; He et al., 2005). 이와 같은 결과는 Go $\alpha$ 는 뇌에서 신경세포의 분화 및 발생에 강력한 역할을 수행함을 암시한다. 따라서, Go $\alpha$ 와 BHX가 뇌에서 그 발현량이 높다는 것은 이들의 상호작용이 신경세포의 분화 및 발생에 관련되어 있을 가능성이 높다는 것을 시사한다.

세포외부로부터 신경전달물질 혹은 호르몬의 신호를 세포 내부로 전달하는데 핵심적인 역할을 수행하는 단백질인 G-단백질은 하위신호전달효과자의 활성을 조절한다. 특히 Go를 제외한 다른 G-단백질의 경우, 그 하위 신호전달 효과자들이 매우 잘 알려져 있다. 그 중에서 Gs와 Gi는 AC의 활성을 직접조절하며, Gq는 PLC의 활성을 조절한다. 그러나 Go의 하위신호전달효과자에 대해서는 분명하지 않다. 그러나 최근 몇몇 보고에서 Go의 하위신호전달효과자에 대한 보고가 존재하며, 이를 토대로 Go의 기능을 분석 중에 있다 (Jordan et al., 1999; Ghil, 2004). 본 연구에서 BHX는 Go $\alpha$ 의 하위신호전달효과자로서의 역할을 할 가능성이 있다. 그 이유는 활성화된 형태의 Go $\alpha$ 와 BHX의 결합이 불활성화된 형태에 비해 강력한 결합력을 보이기 때문이다 (Fig. 4). 따라서 이어지는 연구들에서 BHX의 기능을 밝힌다면, 이제껏 알려지지 않은 Go $\alpha$ 의 새로운 기능을 추가할 수 있을 것이다.

BHX는 그 단백질의 서열구조로 보아, 전형적인 전사조절 인자의 성격을 갖는다. 지금까지 Go $\alpha$ 의 하위신호전달효과자로서 전사조절인자가 그 역할을 수행한다는 보고는 그리 많이 존재하지 않는다. 그러나 본 연구자들의 선행연구에서 Go $\alpha$ 는 promyelocytic leukemia zinc finger protein (PLZF)라는 전사조절인자와 상호작용함을 yeast two hybrid 스크리닝을 통해 동정하였고, 다양한 생화학적 실험을 통해 이들의 상호작용을 재차 검증하였다 (Ghil, 2004). 따라서 Go는 전사조절 인자와도 결합할 수 있는 가능성을 충분히 갖는 단백질이다.

BHX 유전자는 내부에 잘 알려져 있는 DNA 결합 도메인인 HMG-box 도메인을 포함하고 있으며, NLS를 가지고 있어 세포 핵 내로의 이동이 가능하다. 이러한 HMG-box 도메인을 가지고 있는 단백질들은 TCF-1 (T cell Ffactor-1), SRY (the sex determining region Y)와 같이 유전자 서열-특이적 결

합단백질들과 HMGB1, UBF (the upstream binding factor) 등의 유전자 서열-비특이적 결합단백질들로 나누어진다 (Burriss et al., 1996; Ikeda et al., 1996; Parker and Schimmer, 1997). 유전자 서열-특이적 결합단백질들은 일반적으로 하나의 HMG-box 도메인을 가지고 있으며 비특이적 결합단백질의 경우 두 개 이상의 HMG-box 도메인을 가지는 것으로 알려져 있다. BHX는 하나의 HMG-box 도메인을 가지고 있어 유전자 서열-특이적 결합단백질일 것으로 사료된다.

HMG-box 도메인은 효모에서부터 진핵세포에 이르기까지 넓게 분포하고 있으며 (Grosschedl et al., 1994; Thomas and Travers, 2001), 몇몇의 HMG-box 도메인을 갖는 단백질들은 생체 내에서 중요한 생리적인 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 그 중 UBP는 rRNA 전사조절인자로 역할을 하고 (Bell et al., 1988; Jantzen et al., 1990), SRY는 성 결정에 있어 근본적인 단백질로 알려져 있다 (Sinclair et al., 1990; Gubbay et al., 1990). 또한, LEF1 (lymphocyte enhancementfactor-1), TCF-1 (T-cell factor-1), Sox4 (SRY-box containing protein 4) 등은 림프구의 발생과정에 중요한 역할을 하기도 한다 (Kuo and Leiden, 1999). LEF-1과 TCF-1은 T세포의 발생에 방해를 일으키는 등, T cell 분화 조절자로서 역할을 한다 (Schilham and Clevers, 1998; Staal and Clevers, 2000). SOX4의 경우 생쥐에서 pro-B 세포의 확장을 방해하고, thymocyte의 발생에 영향을 미치는 것으로 알려지고 있다 (Schilham et al., 1996). 이러한 정황들로 미루어 볼 때, LEF1, TCF1, Sox4 등의 HMG-box를 갖는 단백질들은 생체 내에서 특이 유전자의 전사를 조절하여 발생에 영향을 주는 것으로 사료된다. 최근 그 기능이 알려진 또 다른 HMG-box 도메인을 갖는 단백질인 GCX-1 (granulosa cell HMG-box protein-1)의 경우 세포 내에서 전사인자로서 작용하며, 내부에 NLS와 HMG-box 도메인을 C-말단에 pro-rich region을 가지고 있고 조직특이적인 발현양상을 보이고 있어 (Kajitani et al., 2004), BHX와 유사한 점이 많은 단백질이다. GCX-1 역시 난소에서 여포 발생과정에 전사를 조절하는 단백질로서 역할을 수행하기 때문에, BHX 역시 뇌의 발생과정에 필요한 유전자의 전사를 담당할 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때,  $Go\alpha$ 는 전사조절인자의 기능을 수행할 것으로 예상되는 단백질인 BHX와 상호작용하였으며, 특히 BHX는  $Go\alpha$ 의 하위 신호전달 효과자로서의 역할을 수행할 것으로 판단된다. 따라서 BHX의 세포 내 기능 및 역할을 이어지는 연구에서 추가적으로 분석한다면,  $Go\alpha$ 의 세포 내 기능을 이해하는데 많은 도움이 되리라 기대된다.

#### 감사의 글

본 연구는 2006년 과학기술부 뇌신경 생물학 사업단과

2006년 경기대학교 특성화사업 지원에 의해 수행되었음.

## REFERENCES

- Bell SP, Learned RM, Jantzen HM, Tjian R. Functional cooperativity between transcription factors UBF1 and SL1 mediates human ribosomal RNA synthesis. *Science* 1988. 241: 1192-1197.
- Burriss TP, Guo W, McCabe ERB. The gene responsible for adrenal hypoplasia congenita, DAX-1, encodes a nuclear hormone receptor that defines a new class within the superfamily. *Recent Prog Horm Res.* 1996. 51: 241-260.
- Ghil SH, Kim BJ, Lee YD, Suh-Kim H. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. *J Neurochem.* 2000. 74: 151-158.
- Ghil SH. The alpha subunit of Go interacts with promyelocytic leukemia zinc finger protein. *J. Exp. Biomed. Sci.* 2004. 10: 407-413.
- Grosschedl R, Giese K, Pagel J. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet.* 1994. 10: 94-100.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sexdetermining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990. 346: 245-250.
- Haydon PG, McCobb DP, Kater SB. Serotonin selectively inhibits growth cone motility and synaptogenesis of specific identified neurons. *Science* 1984. 226: 561-564.
- He JC, Gomes I, Nguyen T, Jayaram G, Ram PT, Devi LA, Iyengar R. The G alpha(o/i)-coupled cannabinoid receptor-mediated neurite outgrowth involves Rap regulation of Src and Stat3. *J Biol Chem.* 2005. 280: 33426-33434.
- Huff RM, Axton JM, Neer EJ. Physical and immunological characterization of a guanine nucleotide-binding protein purified from bovine cerebral cortex. *J Biol Chem.* 1985. 260: 10864-10871.
- Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai KT, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol.* 1996. 10: 1261-1272.
- Jantzen HM, Admon A, Bell SP, Tjian R. Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology toHMGproteins. *Nature* 1990. 344: 830-836.

- Jiang M, Gold MS, Boulay G, Spicher K, Peyton M, Brabet P, Srinivasan Y, Rudolph U, Ellison G, Birnbaumer L. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95: 3269-3274.
- Jordan JD, Carey KD, Stork PJ, Iyengar R. Modulation of rap activity by direct interaction of G $\alpha$ (o) with Rap1 GTPase-activating protein. *J Biol Chem*. 1999. 274: 21507-21510.
- Jordan JD, He JC, Eungdamrong NJ, Gomes I, Ali W, Nguyen T, Bivona TG, Philips MR, Devi LA, Iyengar R. Cannabinoid receptor-induced neurite outgrowth is mediated by Rap1 activation through G $\alpha$ (o)/i-triggered proteasomal degradation of Rap1GAPII. *J Biol Chem*. 2005. 280: 11413-11421.
- Kajitani T, Mizutani T, Yamada K, Yazawa T, Sekiguchi T, Yoshino M, Kawata H, Miyamoto K. Cloning and characterization of granulosa cell high-mobility group (HMG)-box protein-1, a novel HMG-box transcriptional regulator strongly expressed in rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 2004. 145: 2307-2318.
- Kuo CT, Leiden JM. Transcriptional regulation of T lymphocyte development and function. *Annu Rev Immunol*. 1999. 17: 149-187.
- Lankford KL, DeMello FG, Klein WL. D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988. 85: 2839-2843.
- Liu JG, Anand KJ. Protein kinases modulate the cellular adaptations associated with opioid tolerance and dependence. *Brain Res Brain Res Rev*. 2001. 38: 1-19.
- Mende U, Zagrovic B, Cohen A, Li Y, Valenzuela D, Fishman MC, Neer EJ. Effect of deletion of the major brain G-protein alpha subunit ( $\alpha$ (o)) on coordination of G-protein subunits and on adenylyl cyclase activity. *J Neurosci Res*. 1998. 54: 263-272.
- Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev*. 1997. 18: 361-377.
- Rodrigues Pdos S, Dowling JE. Dopamine induces neurite retraction in retinal horizontal cells via diacylglycerol and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990. 87: 9693-9697.
- Schilham MW, Oosterwegel MA, Moerer P, Ya J, de Boer PA, van de Wetering M, Verbeek S, Lamers WH, Kruisbeek AM, Cumano A, Clevers H. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 1996. 380: 711-714.
- Schilham MW, Clevers H. HMG box containing transcription factors in lymphocyte differentiation. *Semin Immunol*. 1998. 10: 127-132.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990. 346: 240-244.
- Staal FJ, Clevers H. Tcf/Lef transcription factors during T-cell development: unique and overlapping functions. *Hematol J*. 2000. 1: 3-6.
- Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC. G0 is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 1990. 344: 836-841.
- Strittmatter SM, Fishman MC, Zhu XP. Activated mutants of the alpha subunit of G(o) promote an increased number of neurites per cell. *J Neurosci*. 1994. 14: 2327-2338.
- Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. 2001. 26: 163-174.