

## 소포체 스트레스가 Ajuba 발현유도

박상미 · 권기상 · 윤은영<sup>1</sup> · 구태원<sup>1</sup> · 권오유\*

충남대학교 의과대학 해부학교실, <sup>1</sup>농업과학기술원 농업생물부

Received May 18, 2007 / Accepted June 8, 2007

**Expression of Ajuba, a Novel LIM Protein, is Regulated by Endoplasmic Reticulum Stress.** Sang Mi Park, Ki sang Kwon, Eun Young Yun<sup>1</sup>, Tae Won Goo<sup>1</sup> and O Yu Kwon\*. *Department of Anatomy, College of medicine, Chungnam National University, Taejon 301-747, Korea. <sup>1</sup>Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agriculture Science and Technology, R.D.A., Suwon 441-100, Korea* – Ajuba is a number of proteins containing cytosolic LIM domain. Its function may provide a new pathway whereby cell-cell adhesive events are transmitted to the nucleus to regulate cell proliferation and differentiation decisions. Here, Ajuba gene expression was investigated its molecular properties associated with endoplasmic reticulum (ER) stresses (tunicamycin, DIT, A23187 and BFA) which induced remarkable expression of Ajuba mRNA. The mRNA half life of Ajuba was also determined, its half life of Ajuba mRNA in FRTL-5 cells was approximately 2 hr after the initial translation. Although the obvious biological function of Ajuba is not clear, on the base of the results, Ajuba gene expression is deeply associated with ER stresses.

**Key words** – Endoplasmic reticulum (ER) stress, Ajuba, mRNA half life

### 서 론

소포체 (endoplasmic reticulum; ER)는 세포분비물, 세포막, 골지체와 lysosome이 유기적으로 연관된 단백질의 합성과 폴딩 (folding)에 중요 세포내소기관이다. 소포체는 신생 단백질의 당화 (glycosylation), 이화황화결합 (disulfide bond formation), 폴딩, 조립 (assembly), 분해와 같은 중요한 기능을 한다. 단백질은 소포체에서 적절한 입체 형태로 폴딩 및 posttranslational modification이 일어나야 한다. 폴딩이 안되거나 잘못 폴딩된 단백질은 골지체로 운반될 수 없다. 소포체내 비정상적인 단백질의 축적은 소포체기능을 방해하고, 세포생존을 위협할 수 있다[6]. 이와 같은 소포체 기능에 직접적으로 관여하는 소포체 단백질무리를 소포체 분자샤페론 (ER molecular chaperone)이라고 한다. 지금까지 보고된 대표적인 것으로는 Bip, GRP94, Erp72, PDI, calnexin, calreticulin, Erp29 등이 있다[4].

소포체 막에는 3개의 소포체 스트레스를 감지하는 kinase 감지기 (Ire1, ATF6, PERK)가 있다[2]. 스트레스가 없는 상태에서는 소포체 샤페론 BiP은 3개 감지기의 소포체 내강의 도메인에 결합되어 있다. 폴딩되지 않거나 잘못 폴딩된 단백질 (unfolded / misfolded protein)이 소포체 내에 축적되면, 소포체스트레스 감지기에서부터 BiP이 분리되어 비정상적인 단백질에 결합한다. BiP의 해리는 소포체스트레스 감지기의 활성화를 유도한다. Ire1과 PERK는 dimer형성에 의해 활성

화된 후 자가인산화 (autophosphorylation)된다. 비활성형 ATF6 (p90ATF6)은 골지체로 운반된 후 Site-1 protease (S1P)와 Site-2 protease (S2P)에 의해 2단계 절단 (cleavage)에 의해 활성화되면서 활성형 ATF6 (p50 ATF6)으로 바뀐다. p50 ATF6 활성형은 핵 속으로 운반되어 ER stress 관련 유전자들의 전사 활성인자로서 작용한다[9].

소포체 스트레스 반응단계는 4가지로 나누어 설명한다. 첫 번째 단계는 활성화된 PERK가 eIF-2 $\alpha$  ( $\alpha$  subunit of eukaryotic initiation factor 2)의 인산화를 통해 단백질합성을 감소시켜서 전체적인 단백질 합성을 감소시키는 과정이다 [3]. 두 번째 단계는 소포에 내에 단백질 폴딩 활동을 증강시키기 위해 BiP와 같은 소포체 샤페론을 유도하는 것이다. 세 번째 단계는 세포질 내 ubiquitin-proteasome system을 통한 소포체내 폴딩되지 않거나 잘못 폴딩된 단백질을 분해하는 과정이다. 이는 ER stress 관련 분해 (ER stress-associated degradation; ERAD)라고 불린다. 마지막으로 소포체 스트레스 유도성 스트레스가 너무 심하여 소포체 기능을 회복할 수 없을 때에는 세포사멸 (apoptosis) 경로가 활성화되어 손상된 세포를 제거한다. ER stress 상태에서는 이들 4가지 반응 단계가 시간 의존적으로 이행된다[10].

본 연구의 주된 대상인 Ajuba는 세포질 LIM domain에 포함되는 단백질 family의 일원으로 세포의 표면부착과 밀접한 관계가 있다. Actin cytoskeleton의 표면 수용체로서의 기능을 맡게 된다[1]. 세포와 세포 사이의 접근되어 있는 상태에서 세포질 내에서의 퍼트려나가는 확산을 조절하는 기능을 가진 인자로서, 기능적 leucine이 풍부한 NES (nuclear export signal)와 세포표면으로부터 세포질에서 핵까지 순환

#### \*Corresponding author

Tel : +82-42-580-8206, Fax : +82-42-586-4800

E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

을 한다[5,7]. 또한 세포 간 응착을 제공하는 경로로서의 기능은 핵으로의 신호를 전달함으로써 세포의 증식 및 분화를 결정하는 중요 조절의 인자이다[8].

본 실험에 사용되는 갑상선 배양세포인 FRTL-5 (Fisher rat thyroid cells)는 5% 우혈청을 포함한 Coon's modified media에서 배양한다. 배양조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95%이상의 적당한 습도를 유지한다. 신선한 배지를 2일 간격으로 교체하며 배양하였으며, 1주일에 한 번씩 계대 배양하였다. 실험에 쓰이는 세포는 70~90%의 충실도를 보이는 세포를 사용하였고 전 처리 후 pre-warmed PBS (phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후, ER stress 유도하는 시약 [DTT (3 mM/ml), tunicamycin (20 µg/ml), Ca<sup>2+</sup> ionopore A23187 (1 µl/ml), BFA (1 µl/ml)]을 처리한다. Total RNA를 얻기 위하여 easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit를 사용한다. RT-PCR은 total RNA (3 µg/ml)에서 cDNA의 합성 후 94°C에서 2분간 반응시켜 Reverse Transcriptase를 inactivation시킨 후 DEPC-H<sub>2</sub>O로 최종 100 µl를 만들었다. cDNA를 증폭하기 위해 mouse Ajuba (NM\_010590) primer (20-mer sense primer 5'-AGTCTCCTGGTCCCTTCGTT-3', 20-mer antisense primer 5'-TCACCCCTACAATGTCCTCA-3')와 dNTP와 taq polymerase 및 taq buffer가 혼합된 2×Dyemix (Biostream)가 하여 총 반응액이 20 µl가 되도록 하여 PCR을 시행하였다. Ajuba의 증폭조건은 처음 94°C에서 5분간 predenaturation시킨 후 94°C에서 30초간 denaturation, 57.5°C에서 30초 anealing, 72°C에서 50초간 extension을 29회 반복한 후 마지막으로 72°C에서 5분간 final extension 시간을 가진 후 4°C를 유지하도록 하였다.

ER stress를 유도하는 신생단백질의 당쇄부가 (N-glycosylation)를 방해하여 단백질 접힘을 방해하는 tunicamycin, 강력한 환원제로서 신생단백질의 각 thiol기 (-SH)가 이황화 결합 (-S-S-)으로 형성되는 것을 방해하는 DTT, 소포체 내의 칼슘을 교란시켜서 단백질의 정상적인 접힘을 방해하는 Ca<sup>2+</sup> ionopore A23187, 소포체에서 Golgi complex로 신생분비단백질의 이동을 차단하는 brefeldin A (BFA)으로 스트레스를 유도한 결과 대조군과 비교하여 tunicamycin과 DTT로 인하여 Ajuba mRNA의 발현량이 증가하였다. Ca<sup>2+</sup> ionopore A23187 과 BFA에서도 스트레스 증가로 인한 mRNA의 발현이 증가하였으나 상대적으로 괄목할 만한 발현은 아니었다 (Fig. 1). 같은 조건에서 ER stress maker인 Bip mRNA level이 같은 패턴으로 발현하는 것을 관찰할 수 있다. 앞의 실험결과에서 tunicamycin과 DTT의 스트레스 유도 시간에 따라 각각 0시간, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간의 경과에 따른 mRNA의 발현양상에 대해 관찰하였다. Tunicamycin의 스트레스 유도 후 대조군에 비하여 2시간 이후부터 강한 발현을 보이기 시작하여 차츰 시간이 지날수록 발현이 커졌으며 DTT는 스트레스 처리 4시간이후부터 강한 발현의 증가를

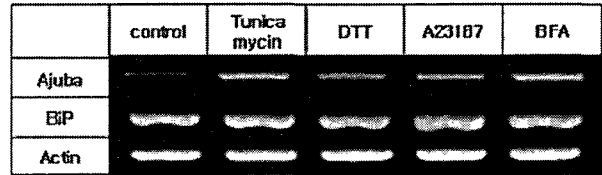


Fig. 1. The expression of Ajuba against ER stress inducible drugs in FRTL-5 cells. Total RNA was extracted from each sample, which was performed RT-PCR using primers (20-mer sense primer 5'-AGTCTCCTGGTCCCTTCGTT-3', 20-mer antisense primer 5'-TCACCCCTACAATGTCCTCA-3'). Thermal cycling was performed 94°C for 5 min (predenaturation), 94°C for 30 sec (denaturation), 57.5°C for 30 sec (anealing), 29 cycles of 72°C for 50 sec (extension), 72°C for 5 min (final extension). In order to normalize for the Ajuba mRNA level, the mRNA of the mouse actin gene was used as a marker. Following RT-PCR conditions are same with described in Fig. 1.

보여 증가하는 추세를 보였다. 앞의 두 가지 스트레스 유도 모두 시간이 경과함에 따라 점점 발현이 증가하는 양상을 보였다 (Fig. 2). ERp29의 발현은 TSH 의존적으로 조절되며, thyroglobulin의 분비량이 약 30% 증가한다[4]. Ajuba mRNA 발현의 TSH 의존성을 조사하였다. 갑상선 세포에서 TSH에 대하여 Ajuba mRNA의 발현은 비의존적임을 확인하였다 (Fig. 3). 즉, Ajuba 유전자에서는 TSH의 유무와 상관관계를 보이지 않았다. 정상상태에서와 ER stress 상태에서의 Ajuba mRNA의 세포내 반감기를 측정하였다. DRB처리 전의 발현 정도를 100%로 하여 시간에 따른 발현 정도를 도표로 표시할 때, 세포내 반감기는 약 2시간임을 알 수 있었다. Tunicamycin을 같이 처리하여 DRB처리를 한 결과 도표에

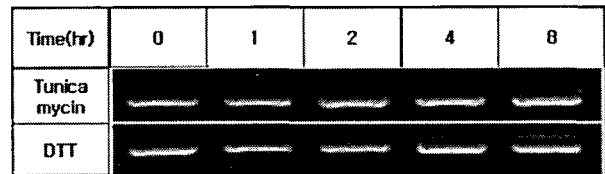


Fig. 2. Ajuba expression by ER stress of tunicamycin and DTT in FRTL-5 cells. Confluent FRTL-5 cells were treated with N-glycosylation inhibitor of tunicamycin (the upper) and DTT (the lower) during indicated times, respectively.

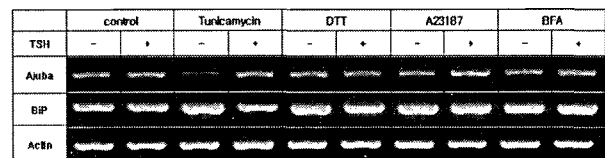


Fig. 3. Effect of Ajuba expression by TSH. +; with TSH, -; without TSH.

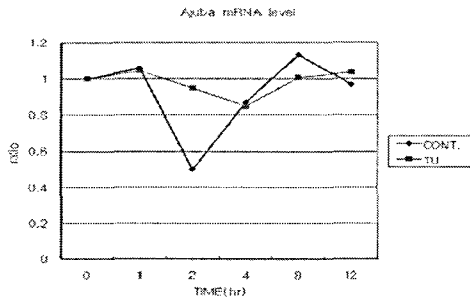
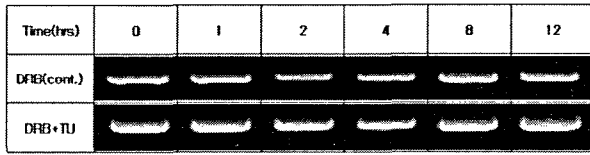


Fig. 4. Estimation of Ajuba mRNA half life in a FRTL-5 cell. Confluent FRTL-5 cells were treated with DRB (5,6-dichloro-β-D-ribofuranosylbenzimidazole) which is a specific inhibitor of RNA polymerase II. Total RNA isolated after indicated times. The DRB treatment prevents new mRNA synthesis and permits the monitoring of intracellular residue mRNAs.

보이는 것처럼 2시간째의 반감기보다 mRNA의 발현이 증가하였으며 약 4시간에서 가장 적은 발현을 보였으며 tunicamycin으로 스트레스를 유도한 실험의 결과가 꾸준히 Ajuba mRNA의 발현이 증가하였음을 알 수 있었다 (Fig. 4).

본 논문에서 처음으로 Ajuba mRNA의 발현이 ER stress에 의해서 조절된다는 것을 알았다. 그러나 FRTL-5 세포임에도 불구하고 TSH에 의한 발현의 변화는 없었다. Ajuba mRNA의 세포내 반감기는 약 2시간으로 측정되었다. 특히, 소포체 스트레스 유도 약물 중에서 신생단백질의 당쇄부가 형성을 특이적으로 억제하는 tunicamycin에 대해 가장 강한 발현을 보인 것은 당단백질이 소포체 내에서 정확한 구조를 가지기 위해서는 단백질에 추가되는 당쇄가 필수적이라는 것을 알 수 있다. 소포체 내에서 정상적인 단백질 폴딩이 일어나지 않으면 이들이 지속적으로 축적되는 악순환으로 더욱 강한 ER 샤페론의 발현이 유도됨을 의미한다. ER내에서 스트레스로 인한 비정상적 단백질의 축적으로 Ajuba의 발현량이 증가함으로써 세포간의 연결 및 핵과의 순환의 순조롭지 못한 세포 안에서 더 큰 스트레스를 유발하여 복구시스템을 위한 메커니즘이 활성화를 유도할 것이다. 이와 같은 세포내에서의 대사 장애는 손상기전으로 나타날 수 있으며 세포의 손상 및 손실을 가져올 수 있음에 초점을 맞추어 앞으로 세포의 스트레스의 최소화와 원천적인 ER stress을 억제하여 최적의 품질관리화된 단백질을 생산, 기능을 조절할

수 있는 방법을 연구하는 것은 앞으로의 몫이다.

### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 2007-0401034024)의 지원에 의해 이루어진 것임.

### 참고 문헌

1. Crawford, A. W. and M. C. Beckerle. 1991. Purification and characterization of zyxin, an 82,000-dalton component of adherens junctions. *J. Biol. Chem.* **266**(9), 5847-5853.
2. Credle, J. J., J. S. Finer-Moore, F. R. Papa, R. M. Stround and P. Walter. 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 18773-18784.
3. Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertolotti, H. Zeng and D. Ron. 2000. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**, 897-904.
4. Kwon, O. Y., S. Park, W. Lee, K. H. You, H. Kim and M. Shong. 2000. TSH regulates a gene expression encoding ERp29, an endoplasmic reticulum stress protein, in the thyrocytes of FRTL-5 cells. *FEBS Lett.* **475**, 27-30.
5. Nix, D. A. and M. C. Beckerle. 1997. Nuclear-cytoplasmic shuttling of the focal contact protein, zyxin: a potential mechanism for communication between sites of cell adhesion and the nucleus. *J. Cell Biol.* **138**, 1139-1147.
6. Oyadomari, S., E. Araki and M. Mori. 2002. Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in pancreatic-cells. *Apoptosis* **7**, 335-345.
7. Petit, M. M., J. Fradelizi, R. M. Golsteyn, T. A. Ayoubi, B. Menichi, D. Louvard, W. J. Van de Ven and E. Friederich. 2000. LPP, an actin cytoskeleton protein related to zyxin, harbors a nuclear export signal and transcriptional activation capacity. *Mol. Biol. Cell* **11**, 117-129.
8. Sanchez-Garcia, I. and T. H. Rabbitts. 1993. LIM domain proteins in leukaemia and development. *Semin. Cancer Biol.* **4**, 349-358.
9. Yoshida, H., K. Haze, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori. 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 33741-33749.
10. Yoshida, H., T. Matsui, N. Hosokawa, R. J. Kaufman, K. Nagata and K. Mori. 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell.* **4**, 265-271.