

생쥐 Wee1 인산화효소들의 각 도메인의 역할에 관한 연구

한 승 진*

인제대학교 생명공학부

Received December 26, 2007 / Accepted January 17, 2008

The Roles of Amino and Carboxyl Domains in the Mouse Wee1 Kinases. Seung Jin Han*. *School of Biotechnology and Biomedical Science, Inje University, Gimhae, Korea 621-749.* The molecular machinery controlling cell cycle is centered around the regulation of the activity of maturation-promoting factor (MPF), a complex composed of a catalytic Cdc2 and the cyclinB regulatory subunit. Cdc2 kinase is inactivated by phosphorylation of inhibitory kinase, Wee1. It has been known that there are three different Wee1 kinases in the mammalian cell, Wee1A, Wee1B and Myt1. To investigate the regulatory mechanism of Wee1 kinases, the phosphorylation and degradation of Wee1A and Wee1B were checked in the *Xenopus* oocyte cell cycle. When Wee1 kinases were injected into frog oocyte, Wee1B was more stable than Wee1A. Wee1A and Wee1B kinase were phosphorylated by many kinases such as PKA and Akt. The roles of amino or carboxyl terminal in mouse Wee1A or Wee1B kinase were investigated using chimeric constructs. The degree of protein phosphorylation, degradation and cell cycle progression were different between chimeric constructs. The amino domain of Wee1A was implicated in the protein phosphorylation and degradation while amino domain of Wee1B and carboxyl domain of Wee1A were involved in the activity regulation. These results suggested that the domains of Wee1 kinase have different and significant roles in regulating the Wee1 kinases in the cell cycle progression.

Key words : Wee1A, Wee1B, Myt1, chimeric construct, protein phosphorylation

서 론

Maturation-promoting factor (MPF)로도 불리는 cell division cycle 2 kinase (cdc2)/cyclinB 복합체는 체세포 분열과 감수 분열의 핵심 조절자로서, 여러 세포주기 조절 신호들을 취합하여, 다양한 단백질을 인산화시킴으로써 세포주기를 조절한다[1]. MPF의 활성은 활성촉진단백질인 cyclin의 결합, 활성억제단백질인 p27^{kip}, p21^{cip} 등의 결합에 의해 조절되어 지거나 [8], 여러 효소에 의한 인산화, 탈인산화 기작으로 조절되어진다. CDK activating kinase (CAK)는 MPF를 인산화하여 활성을 촉진하는 반면[5], Wee1, Myt1, Mik 인산화효소는 활성을 억제하고, 반대로 Cdc25 탈인산화효소는 MPF를 활성화시킨다[2]. Wee1 인산화효소는 cdc2/cyclinB 복합체의 아미노산 서열 중 중간에 잘 보존되어 있는 Tyr15번을 인산화하고, Myt1은 Thr14와 Tyr15를 인산화함으로써 효소 활성을 억제시킨다. 이로 인해 세포는 G2에서 M 주기로의 세포 주기 이행이 정지된다[7,10,13,17]. 발톱개구리(*Xenopus laevis*)의 난자에는 모계 유래의 maternal *Xenopus* Wee1 (XeWee1A)가 존재하지만, 수정 후에는 접합체 유래의 zygotic Wee1B (XeWee1B)가 존재하여 세포주기를 조절한다고 알려져 있다[12]. 이러한 두 개의 인산화효소는 발생단계 특이적, 조직 특이적 발현 양상을 보이는데, Wee1A는 난자의 제2감수분열 중기(MII)에서 발현되

어 초기 발생단계에 관여하고, Wee1B는 gastrulation 이후의 시기에서부터 발현되어 체세포 분열에 관여한다. 반면에 Myt1 인산화효소는 세포의 발달 과정과 상관없이 발생초기부터 계속적으로 발현된다[12]. Wee1 인산화효소는 또한 Crk와의 결합을 통하여 apoptosis에도 관여한다고 알려져 있다[14]. 포유동물에서는 Wee1A가 모든 조직에서 발현됨이 확인되었고, 최근에 발견된 인간 Wee1B, 생쥐 Wee1B는 주로 난자에서 발현되는 것으로 보아[3,11] 발톱개구리의 Wee1A의 ortholog로 생각되어진다. 이러한 여러 결과들은 Wee1 인산화효소들이 서로 다른 기작에 의해 조절될 것이라는 사실을 암시한다. 특히 Wee1A와 Wee1B는 효소 활성을 나타내는 kinase 도메인은 높은 서열상동성을 갖지만 아미노 도메인과 카르복실 도메인은 상동성이 떨어진다. 이러한 사실은 Wee1 인산화효소의 아미노, 카르복실 도메인에 의한 조절이 두 Wee1 인산화효소의 특징을 결정한다는 추측을 가능케 한다. 그러므로 본 연구에서는 생쥐 Wee1A와 Wee1B의 난자 세포주기 조절 능력을 조사하고, PKA와 Akt 인산화효소에 의한 Wee1의 인산화 유무를 측정하였으며, 각각의 아미노, 카르복실 도메인을 치환한 chimera 단백질을 제조하여 각 도메인이 효소의 인산화, 효소 단백질 안정성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

*Corresponding author

Tel : +82-55-320-3787, Fax : +82-55-320-7706

E-mail : hansjin@inje.ac.kr

재료

[γ -³²P]ATP는 New England Nuclear Science Inc. (Boston,

MA)에서, ECL Western blot detection kit는 GE Healthcare (Piscataway, NJ)에서, DMEM 과 fetal bovine serum은 Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)에서 구입하였다. mMessage mMachine™ 은 Ambion Inc. (Austin, TX) 에서 구입하여 사용하였고, 특별한 언급이 없는 한 모든 시약은 Sigma-Aldrich Chemicals (St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다.

개구리 난자에 mRNA의 미세주사

PMSG를 주사한 발톱개구리의 난소를 채취한 후, collagenase (2.5 mg/ml)를 처리하여 Stage VI 의 난자를 얻은 후, mMessage mMachine을 이용하여 합성한 일정량의 mRNA를 IM300 micromanipulator (Narishige USA Inc., Long Island, NY)를 이용하여 미세주사 하였다. 12 또는 16시간 후 난자에 500 nM의 progesterone을 처리하여 세포주기를 재개 시켰다. 세포주기의 재개는 동물극 쪽의 백색 반점의 생성유무로 확인하였다. 각 난자 당 5 µl의 Tris buffer (250 mM sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.01% NP40, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM EGTA, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 10 mM sodium pyrophosphate, 5 mM β-mercaptoethanol, 1 µM microcystin, 4 µg/ml aprotinin, 0.7 µg/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF, and 0.5 µg/ml leupeptin)를 처리하여 파쇄한 후 원심 분리하여 중간층을 SDS PAGE에 사용하였다.

세포내에서의 Wee1 단백질의 위치 관찰

Hek293 세포에 Wee1A, Wee1B 또는 Myt1을 형질전환한 후 16시간 배양하였다. 세포는 미토콘드리아의 염색을 위해 Mito-Tracker로 1시간 처리하였고, 4% paraformaldehyde를 이용하여 고정시켰다. 핵 부위는 1 µl의 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 용액(1 mg/ml, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA)으로 염색하였다. V5 항체(Invitrogen Corp. Carlsbad, CA)를 1/1,000로 희석하여 상온에서 2시간 반응시키고, 다시 FITC가 결합된 2차 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA)를 1:1,000 비율로 희석하여 1 시간 반응시킨 후, 형광 현미경 Axio Vision 3.1 (Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

Chimeric construct의 제조

Wee1A의 1번에서 289번 아미노산과 Wee1B의 1번에서 199번 아미노산을 아미노 도메인으로 명명하고 아미노산이 바뀌지 않도록 redundant codon을 이용하여 PCR 방법으로 *NheI* 자리를 생성하여 연결하였다. 사용한 primer는 Wee1A: ctgaaagcaacatggctagccgggtatacaactgaatttc, ctaatatggctagccgctatgaaaagaat, Wee1B: attcttttcatagcggctagccatattag, ctaatatggctagccgctatgaaaagaat이다. 카르복실 쪽은 Wee1A의 569, Wee1B의 482 아미노산 이후를 *BfrI* 자리를 이용하여 연결하였다. 사용한 primer는 Wee1A: caggatgaatcatgaccttaagcaact

gtgtcac, gtagacagagttgcttaaggtcatgattcatctg, Wee1B: ttatgtctacttaagaatgatccaccc, gtggatcattcttaagtagaccataaaag이다.

In vitro kinase assay와 Western blot

Hek 293 세포를 10% FBS를 포함하는 DMEM (Invitrogen Corp.)에서 70%가 되도록 배양한 후 Lipofectamine 2000™ (Invitrogen Corp.)을 이용하여 Wee1A와 Wee1B를 형질전환하였다. 24시간 후 세포를 Tris-NP40 lysis buffered solution (50 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1% NP40, 4 µg/ml aprotinin, 0.7 µg/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF, 0.5 µg/ml leupeptin, 1 µM microcystin-LR, 1 mM NaVO₄, and 1 mM NaF)에서 파쇄한 후, 원심분리로 상층액을 분리 하였다. 1 µg의 anti-V5 항체를 이용하여 면역침전한 후 면역침전체를 phosphorylation buffered solution (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 4 µg/ml aprotinin, 0.7 µg/ml pepstatin, 0.2 mM PMSF, 0.5 µg/ml leupeptin, and 500 µCi/ml [³²P]ATP (3,000 Ci/mmol, New England Nuclear Science Inc., Boston, MA)에서 PKA catalytic subunit (Promega Corp., Madison, WI)을 첨가하여 30분간 반응시켰다. 반응물을 8% SDS-PAGE을 이용하여 분리한 후 필름에 노출시켜 인산화 정도를 측정하였다. Western blot을 위해서는 면역침전물을 SDS-PAGE후 membrane에 옮겨 V5 항체나 anti-phospho Akt substrate 항체 (Cell Signaling, Danvers, MA)를 2시간 동안 처리하고, 1:5,000 비율로 horseradish peroxidase가 붙은 2차 항체(GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 1시간 처리한 후, ECL 방법으로 단백질을 확인하였다.

결과 및 고찰

지금 까지 포유동물에는 Wee1A, Wee1B 그리고 Myt1, 3 가지 종류의 Wee1 kinase가 존재한다고 알려져 있다. 생쥐의 Wee1A 단백질과 Wee1B 단백질은 26%의 아미노 도메인 상동성을 갖고, 38%의 카르복실 도메인, kinase 활성을 갖는 중간 도메인은 매우 높은 73%의 상동성을 갖는다. 그러나 Myt1 인산화효소는 kinase 도메인을 제외하고는 다른 Wee1 kinase들과 거의 상동성을 나타내지 않는다(Fig. 1). V5가 달린 Wee1A, B 그리고 Myt1 kinase를 Hek293 세포에 형질전환 시킨 후 세포내의 위치를 관찰하였을 때, Wee1A와 Wee1B는 핵 내에 주로 존재하는 반면에 Myt1 kinase는 주로 핵 외부의 ER부위에 존재하였다(Fig. 2). 이는 Wee1A와 Wee1B에만 nuclear localization signal (NLS)로 추정되는 아미노산 서열이 존재하고 Myt1에는 존재하지 않는다는 사실과 일치한다. 그러므로 본 연구에서는 주로 Wee1A와 Wee1B를 비교하여 그들의 차이점을 규명하고자 하였다.

Wee1A와 Wee1B의 차이점을 규명하고자 각각의 유전자

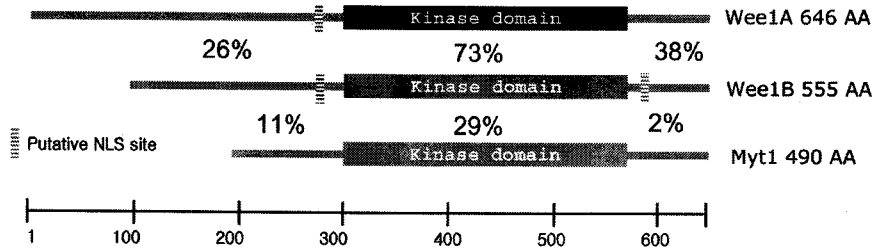


Fig. 1. Comparison of domain organization in mouse Wee1A, Wee1B and Myt1 proteins. The Wee1A and Wee1B share highly conserved kinase domain (73%) and have weak homology at the N (26%) and C terminal (38%) regions. However Myt1 is poorly conserved in all domains. The putative NLSs (nuclear localization signals) are indicated by shaded boxes.

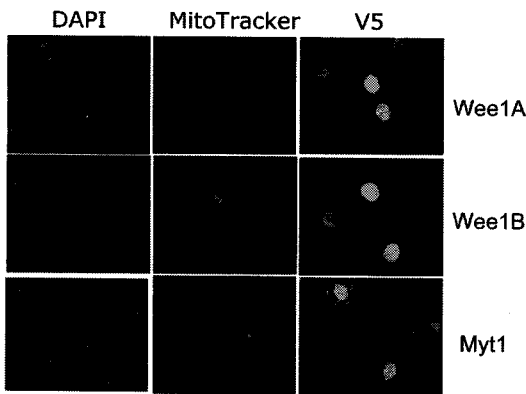


Fig. 2. Localization of Wee1 kinases in the Hek293 cell. Hek293 cell were transfected with Wee1A, Wee1B and Myt1 and incubated for 16 hr. After incubation with Mito-Tracker for 1hr, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and mounted with DAPI containing mounting solution. The cells were observed under the microscope with X100. The transfected proteins were detected with V5 antibody with FITC-conjugated secondary antibody. The mitochondria was stained with Mito-Tracker to show cytosol and nuclear was stained with DAPI. Wee1A and Wee1B are expressed in the nuclear, but Myt1 is exclusively resident on the outside of nuclear, ER.

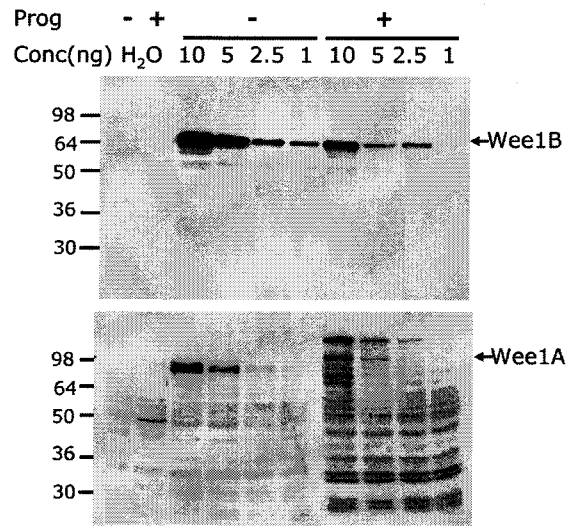


Fig. 3. The regulation of mouse Wee1A and Wee1B in the *Xenopus* oocytes meiotic cell cycle progression. Indicated amounts (Conc, ng) of *in vitro* synthesized Wee1 kinases (upper panel: Wee1B, lower panel: Wee1A) mRNA or H₂O were injected into the stage IV *Xenopus* oocytes. After 16 hr incubation, the injected oocytes were treated with 500 nM Progesterone (Prog) to induce oocyte maturation. The expression of the Wee1 proteins were checked by Western blot analysis using V5 antibody.

를 *in vitro*에서 mMessage mMachine™을 이용하여 mRNA로 전사한 후, 일정량의 mRNA를 발톱개구리의 stage IV 난자에 미세 주사하였다. 개구리의 난자는 세포주기가 G2의 마지막 상태에 정지 되어있는데, 분리된 난자에 progesterone, insulin 또는 insulin like growth factor (IGF)를 처리하면 세포주기가 재개된다. 개구리 난자의 세포주기 재개는 동물극 쪽에 생성되는 백색 반점의 유무로 관찰할 수 있다. 각각 다양한 양의 Wee1A 또는 Wee1B mRNA를 주사한 후 단백질이 합성되고 축적될 수 있도록 16시간을 배양하였다. 그 후 각각의 난자에 500 ng의 progesterone을 처리하고, 8시간 후 난자를 채집하여 단백질의 양을 Western blot을 이용하여 분석하였다(Fig. 3). Wee1 인산화효소는 세포주기 억제 효소이므로, Wee1A나 Wee1B를 주사한 경우 progesterone에 의

해 유도되는 난자세포주기의 재개가 주사한 mRNA의 농도에 비례하여 지연됨을 확인 할 수 있었다(data not shown). 비록 동일량의 mRNA를 주사하였지만 단백질의 발현 정도에는 차이가 있었다. 동일한 vector에 동일한 promotor, 그리고 동일한 3' untranslated region을 이용하여 클로닝을 하였으므로, 이러한 효과는 발현의 차이보다는 발현된 후 단백질의 안정성의 문제라고 사료되었다. 특히 Wee1A의 경우 progesterone 처리 후(세포주기가 재개된 후) 대부분의 단백질이 분해되었고, 일부 단백질은 SDS-PAGE 상에서 이동도가 감소하여 더 커다란 크기로 나타나는 것을 볼 수 있다. 이러한 단백질의 SDS-PAGE상에서의 이동도의 감소 현상은 주로 단백질의 인산화 또는 단백질 분해를 위한 ubiquitina-

tion에 의해 일어난다. 단백질의 인산화 정도를 측정하기 위해 각각의 단백질을 과발현한 후 V5 항체를 이용하여 면역침전법을 수행하였다. 그 후 세포주기 조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 PKA와 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 를 이용하여 PKA에 의한 인산화 정도를 측정하였다(Fig. 4A). 기존에 Wee1B는 PKA에 의해 인산화된다는 보고가 있었으므로[3] PKA에 의한 Wee1A의 인산화를 관찰하였다. Wee1 인산화 효소는 자기인산화활성(autophosphorylation activity)을 가지고 있으므로, PKA를 첨가 하지 않은 경우에도 Wee1A가 인산화가 됨을 볼 수 있었으나(Fig. 4A, 5,6,8 lane), PKA를 첨가한 경우 인산화가 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 4A, 7 lane). 이러한 인산화는 잘 알려져 있는 PKA의 억제제인 H89를 처리하면 관찰할 수 없었으므로(Fig. 4A, 8 lane), Wee1A의 인산화는 PKA에 특이적임을 알 수 있다. 이를 확인하기 위하여 *in vitro* 전사, 해독을 통하여 S³⁵-Methionine이 함유된 단백질을 합성하고 여기에 PKA를 첨가하여 인산화

반응을 시켰을 경우, SDS-PAGE상에서 Wee1A와 Wee1B 단백질의 이동도가 감소함을 관찰 할 수 있었다(data not shown). 이러한 결과는 PKA에 의해 Wee1A와 Wee1B가 인산화될 수 있음을 증명하는 것이다. 그러나 Wee1A의 PKA에 의한 인산화정도가 미비하므로 다른 인산화 효소가 작용하는지를 관찰하였다.

Wee1A의 경우 세포주기 조절에 관여한다고 알려진 polo like kinase (plk)에 의하여 인산화된다는 것이 보고된 바 있으며[15], 또한 음성되먹임작용(negative feedback)에 의하여 Wee1A의 기질인 Cdc2/cyclinB 복합체에 의해 인산화된다는 것이 알려져 있다[4]. 이에 본 연구에서는 세포 주기, 세포 증식에 관여한다고 알려진 Akt와 AuroraA 인산화효소[6, 9]에 의한 Wee1의 인산화를 측정하였다. 이를 위하여 Wee1A와 Wee1B를 Hek293 세포에 형질전환하고 Akt 유전자를 동시형질전환한 후, 면역침전법을 수행하였다. 분리된 면역침전물을 SDS-PAGE상에서 분리한 후, Akt substrate specific 항체를 이용하여 인산화 정도를 측정하였다. 그림 3B에서 보이는 것처럼 Akt는 Wee1A를 인산화시키고 Wee1B는 인산화시키지 못하였다. 이러한 결과는 Wee1A와 Wee1B의 인산화에 의한 조절 기작이 상이함을 나타낸다. 그러나 Aurora A kinase는 Wee1A, Wee1B 모두를 인산화시키지 않았다(data not shown).

Wee1A와 Wee1B는 거의 동일한 효소 활성 도메인을 가졌음에도 불구하고, 인산화 과정과 분해 과정이 다르게 진행되므로, 각각의 효소의 어느 부위가 이러한 조절 기작에 관여하는지를 관찰하고자, 각각의 아미노 도메인과 카르복실 도메인을 상호 치환한 키메라(chimera) 단백질을 제조하고(Fig. 5), 이를 Hek293 세포에 형질전환한 후 그 발현을 확인하였다. 발현이 확인된 각각의 construct를 이용하여 mRNA를 합성하고, 각각을 발톱개구리의 난자에 주입한 후 progesterone을 처리하여 이동도 감소에 의한 인산화 정도, 그리고 단백질 양의 감소 정도를 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 Wee1A의 아미노 도메인이 존재하는 경우 SDS-PAGE상에서 많은 이동도 감소를 관찰할 수 있었고, 또한 대부분의 단백질이 분해되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한 결과는 Wee1A의 아미노 도메인이 단백질의 인산화와 안정성 조절에 관여한다는 사실을 제시한다. 단백질의 조절은 여러 가지 기작에 의해 일어나지만 최근의 연구 결과들은 단백질의 활성 조절 기작으로 기존에 주로 연구되어 오던 인산화와 탈인산화에 의한 조절이외에, 단백질의 ubiquitination등을 통한 분해 정도에 많은 관심은 쏟고 있다[16]. 이러한 단백질의 안정성의 조절에는 많은 신호전달체계가 동시에 작용한다. 단백질에 ubiquitin을 연결하는 ubiquitin ligase (E3)는 주로 특이한 아미노산 서열을 인식하는데, 특히 보존된 아미노산 서열의 인산화된 형태를 인식하는 경우가 많다[16]. Fig. 2에서 보듯 Wee1A는 세포주기가 진행됨에 따라 SDS-PAGE 상에서

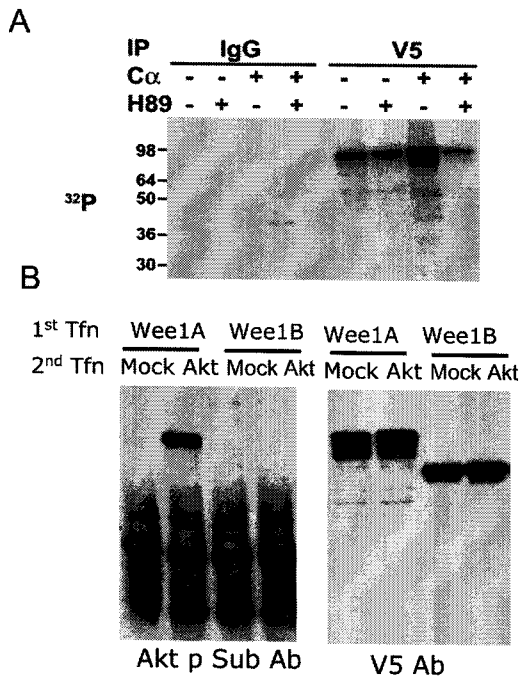


Fig. 4. Phosphorylation of Wee1 by PKA and Akt. A. Wild type Wee1A was transfected into Hek293 cells and cell lysate was used for immunoprecipitation with control IgG or anti V5 tag antibody (V5). The immune complex was incubated with or without PKA catalytic subunit (C α) and 10mM of H89 in 5 $\mu\text{Ci/ml}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ containing kinase buffer and separated on 8% SDS-PAGE. B. Wee1A or Wee1B transfected cells were co-transfected with Akt construct. Immunoprecipitates were subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis using anti-phospho Akt substrate antibodies (left panel). The expression of Wee1 kinases was confirmed by Western blot using anti-V5 antibodies (right panel).

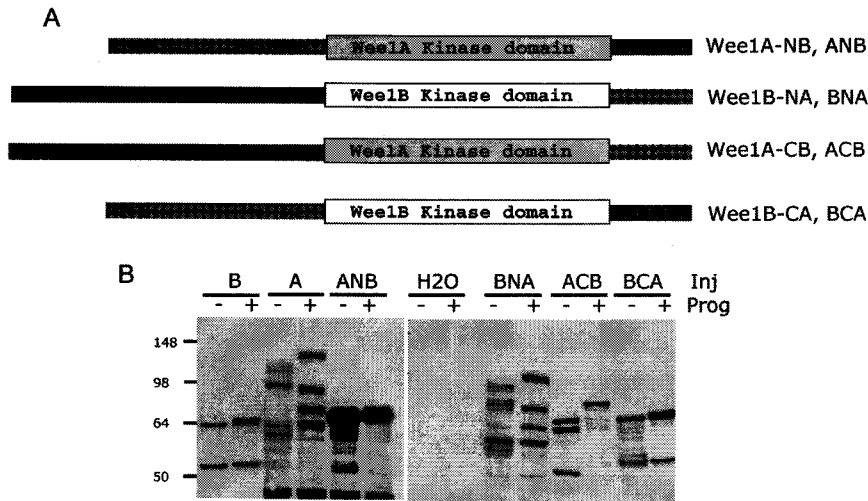


Fig. 5. The regulation of amino and carboxyl domains of Wee1 kinases during cell cycle progression A. Diagram of the chimeric constructs of Wee1 kinases used in this study. B. 5 ng of mRNA coding for generated chimeric construct was injected into *Xenopus* oocytes. Twelve hours later, oocytes were treated with 500 nM of progesterone and the protein expression of injected mRNAs was detected by Western blot with V5 antibody.

크기가 증가하고, 또한 양이 줄어드는 것으로 보아 인산화와 ubiquitination 과정을 거쳐 분해가 되는 것으로 생각되어진다. 최근의 연구 결과 체세포 분열에서는 인간의 Wee1A가 SCF β -TrCP에 의해 ubiquitination 되는 것으로 알려져 있다[15]. 반면, Wee1B의 아미노 도메인을 포함하는 대부분의 키메라 단백질은 단백질의 인산화에 관여하였으나 적은 이동도 변화를 보였고, 대부분의 단백질이 분해되지 않은 채 남아있었다. 이러한 사실은 Wee1B의 아미노산 도메인이 다른 인산화 효소에 의해 인산화되나, 이 부위가 단백질의 안정화와 분해 과정에는 관여하지 않는다는 것을 암시한다.

키메라 단백질의 활성 측정을 위하여 각각의 키메라의 mRNA를 합성 후 발톱개구리 난자에 주입하고 progesterone 처리 후 세포주기의 재개 정도를 측정하였다(Fig. 6).

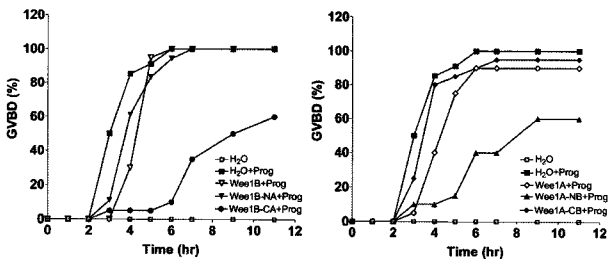


Fig. 6. The involvement of Wee1B amino domain and Wee1A carboxyl domain in the activity regulation. The mRNA of generated chimeric construct was injected into *Xenopus* oocytes (1ng/oocyte). After 16 hr incubation, oocytes were treated with 500 nM Progesterone to induce maturation. The number of oocytes displaying a white spot on the animal pole was scored at different times after progesterone addition.

Wee1 인산화효소는 Cdc2/cyclinB를 인산화하여 그 활성을 억제하므로, Wee1 인산화효소의 활성이 클수록 세포주기의 재개가 억제된다. 동일한 양의 mRNA를 주사한 결과 Wee1B의 아미노 도메인과 Wee1A의 카르복실 도메인을 갖는 두 개의 키메라 (Wee1B-CA (BCA), Wee1A-NB (ANB))가 가장 잘 세포주기를 억제하는 것으로 보아 Wee1B의 아미노 도메인과 Wee1A의 카르복실 도메인이 활성화를 조절하거나, 반대로 Wee1B의 카르복실 도메인과 Wee1A의 아미노 도메인의 인산화효소의 활성화를 억제하는 역할을 하는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 세포 주기를 조절하는 단백질인 Wee1 인산화효소들의 특성을 다양한 키메라 단백질을 유전자 재조합 방법을 이용하여 제조하여 비교 분석하였다. 결과적으로 두 Wee1 인산화효소의 각각 아미노, 카르복실 도메인의 역할을 규명하였고, 인산화와 효소의 활성에 관여하는 여러 연관 인산화효소의 작용기작을 밝히는 기초를 마련하였다. 이러한 결과들은 두 개의 Wee1 인산화효소가 각각 다른 조직과 다른 종류의 세포에 존재하고, 각각 체세포 분열과 감수 분열에서 특이적인 역할을 하는 이유를 잘 설명해준다. 각각의 Wee1 kinase를 인산화시키는 효소와 그에 의한 활성의 변화, 그리고 단백질의 안정성 변화에 미치는 영향 등은 추후에 자세히 연구되어야 할 것이다.

요 약

Wee1 인산화효소는 세포주기 조절의 핵심 단백질인 cdc2/cyclinB 복합체를 인산화하여 활성을 억제, 조절하는 주요한 효소이다. 지금까지 포유동물에서는 Wee1A, Wee1B

그리고 Myt1의 세 가지 효소가 발견되었다. Wee1 인산화효소의 조절기작을 연구하기 위하여 생쥐의 Wee1A와 Wee1B를 발톱개구리의 난자에 주사한 후 단백질의 변형을 관찰하였다. 이 세포주기 과정에서 두 효소는 모두 인산화되었으며, Wee1A 단백질은 분해되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 세포의 인산화 방법을 통하여 Wee1A가 PKA와 Akt에 의해 인산화됨을 확인하였다. 이러한 Wee1 인산화효소의 인산화와 단백질 안정성에 영향을 미치는 단백질 내의 부위를 살펴보고자, Wee1A와 Wee1B의 아미노 도메인과 카르복실 도메인을 서로 치환한 단백질을 제조하여 개구리 난자에 주사하고 인산화 정도와 단백질의 안정성을 조사하였을 때, Wee1A의 아미노 도메인이 단백질의 인산화와 안정화에 중요한 영향을 미친다는 것을 규명하였다. 그리고 Wee1B의 아미노 도메인과 Wee1A의 카르복실 도메인은 효소의 활성을 조절하는 역할을 한다.

감사의 글

이 논문은 인제대학교 2007년 신입교수 정착금 지원에 의한 것임.

References

1. Choi, Y. H. and H. H. Choi. 2001. Significance of Cell Cycle and Checkpoint Control. *J. life science*. **11**, 362-370.
2. Fattaey, A. and R. N. Booher. 1997. Myt1: a Wee1-type kinase that phosphorylates Cdc2 on residue Thr14. *Prog. Cell Cycle Res.* **3**, 233-240.
3. Han, S. J., R. Chen, M. P. Paronetto and M. Conti. 2005. Wee1B Is an Oocyte-Specific Kinase Involved in the Control of Meiotic Arrest in the Mouse. *Curr. Biol.* **15**, 1670-1676.
4. Harvey, S. L., A. Charlet, W. Haas, S. P. Gygi and D. R. Kellogg. 2005. Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1. *Cell* **122**, 407-420.
5. Aldis, P., A. A. Russo, H. S. Chou, N. P. Pavletich and M. J. Solomon. 1998. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2545-2560.
6. Keen, N. and S. Taylor. 2004. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 927-936.
7. Leise, W. and P. R. Mueller. 2002. Multiple Cdk1 inhibitory kinases regulate the cell cycle during development. *Dev. Biol.* **249**, 156-173.
8. Morgan, D. O. 1995. Principles of CDK regulation. *Nature* **374**, 131-134.
9. Okumura, E. et al. 2002. Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat. Cell Biol.* **4**, 111-116.
10. Mueller, P. R., T. R. Coleman, A. Kumagai and W. Dunphy. 1995. Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270**, 86-90.
11. Nakanishi, M. et al. 2000. Identification and characterization of human Wee1B, a new member of the Wee1 family of Cdk-inhibitory kinases. *Genes Cells* **5**, 839-847.
12. Okamoto, K., N. Nakajo and N. Sagata. 2002. The existence of two distinct Wee1 isoforms in Xenopus: implications for the developmental regulation of the cell cycle. *EMBO J.* **21**, 2472-2484.
13. Parker, L. L. and H. Piwnicka-Worms. 1992. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257**, 1955-1957.
14. Smith, J. J. et al. 2002. Apoptotic regulation by the Crk adapter protein mediated by interactions with Wee1 and Crm1/exportin. *Mol. Cell Biol.* **22**, 1412-1423.
15. Watanabe, N. et al. 2004. M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4419-4424.
16. Welchman R. L., C. Gordon and R. J. Mayer. 2005, Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 599-609.
17. Wells, N. J. et al. 1999. The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G (2)/M progression. *J. Cell Sci.* **112**, 3361-3371.