

# 인간 퓨린수용체 P2X<sub>4</sub>를 발현시킬 때 나타나는 대장균 독성의 원인분석

유연주 · 정윤아 · 임동빈\*

송실대학교 자연과학대학 의생명시스템학부

## Analysis of Toxicity in *Escherichia coli* from the Expression of Human Purinergic Receptor P2X<sub>4</sub>

Yonjoo Yu, Yuna Jung, and Dongbin Lim\*

School of Biomedical Systems, Soongsil University, Seoul 156-743, Republic of Korea

(Received March 3, 2011 / Accepted March 28, 2011)

**In general, expression of membrane protein in *Escherichia coli* is very toxic to the host organism, but the mechanism for the toxicity is not clear yet. Expression of human purinergic receptor P2X<sub>4</sub> was found to be extremely toxic to the host *E. coli*. We examined this toxicity by isolation and analysis of less toxic mutant proteins. We could isolate 30 less toxic mutants of P2X<sub>4</sub> after hydroxylamine mutagenesis. Western blot showed that all of them produced proteins smaller than the wild type P2X<sub>4</sub>. DNA sequencing of two largest mutant proteins showed that they were lost its second transmembrane domain. Localization analysis of these mutant proteins showed that they are not in cytoplasmic membrane, but in inclusion bodies. These data showed that inactive truncated P2X<sub>4</sub> is not toxic to *E. coli* and membrane integration and functionality of P2X<sub>4</sub> may be needed to show host toxicity.**

**Keywords:** membrane protein, overexpression toxicity, protein expression and purification, purinergic receptor P2X

막단백질은 생물체 단백질의 약 25-30% 정도를 차지하며, 호흡이나 광합성 같은 기초적인 에너지 대사부터, 세포와 세포간 커뮤니케이션, 외부 환경의 인지, 물질 수송, 지질 대사 등 광범위한 생리 작용에 관여하는 단백질 군이다. 이처럼 중요한 생리 작용에 관여하기 때문에 막단백질은 오래 전부터 약제 개발의 표적이 되어 왔다. 시중에서 판매되는 작은 분자 약제의 약 50% 정도가 막단백질의 일종인 G-단백질 연결 수용체(G-protein coupled receptor, GPCR)를 작용점으로 한다고 보고되어 있으며(6), 시중에서 가장 많이 팔리는 약제 100개 중의 1/4 정도는 GPCR이 작용점이라는 보고도 있다(4).

막단백질이 경제적으로나 학문적으로 매우 중요한 단백질 군임에도 불구하고 막단백질에 대한 연구는 수용성 단백질에 대한 연구와는 비교할 수 없을 정도로 뒤쳐져 있다. 막단백질 연구가 이처럼 뒤쳐진 가장 큰 이유는 수용성 단백질과 달리 막단백질, 특히 여러 번 막을 가로지르는 다관통막단백질(multipass transmembrane)은 재조합 DNA 기술을 이용한 발

현과 정제가 매우 힘들기 때문이다(7).

문헌에 보고된 고등생물 막단백질의 대장균내 발현 사례는 매우 드물며, 설사 발현에 성공한 경우라 할지라도 발현량이 매우 적다(2, 8). 특별히 성공적인 경우라 할 수 있는 뉴로텐신 수용체(neurotensin receptor)의 경우를 보면 맥아당 결합 단백질(maltose binding protein)의 융합 형태로 발현시켜 대장균 세포 100 g 당 약 3 mg 정도의 단백질을 얻을 수 있다고 보고한 바 있다(13).

대장균을 이용한 외래 막단백질의 발현이 어려운 이유는 수용성 단백질과 달리 막단백질은 목적 단백질의 발현이 충분히 이루어지기 전에 막단백질의 발현으로 인한 독성 때문에 발현속도가 사멸해 버리기 때문이다. 이 문제를 해결하기 위하여 Walker 그룹은 막단백질의 발현을 유도해도 잘 죽지 않는 돌연변이 균주 *E. coli* C41과 C43를 유도한 바 있다(9). 최근에 이루어진 C41/C43 균주에 대한 연구에 따르면 이들 균주는 T7 RNA polymerase의 UV5 프로모터 부분에 변이가 일어났고, 그 결과 T7 RNA polymerase가 모균주보다 더 천천히 그리고 적은 양으로 만들어지며, 따라서 T7 프로모터에

\* For correspondence. E-mail: dblim@ssu.ac.kr; Tel: +82-2-820-0452; Fax: +82-2-824-4383

의하여 조절 받는 목적 단백질의 발현 속도가 모균주 보다 낮아진다는 사실을 알게 되었다(12). 그 결과 배양액 부피당 목적단백질의 절대 양은 늘어나지만 총 단백질 중 목적단백질이 차지하는 비율은 모균주와 비슷하다는 결론을 얻었다. 결국 C41(DE3)나 C43(DE3) 균주가 모균주 BL21(DE3)보다 목적 단백질을 많이 생산하는 이유는 목적단백질의 유도후에도 숙주 세포가 어느 정도 더 자라기 때문이라고 결론지었다(12).

우리는 막단백질 발현 시스템 개발 프로젝트의 일환으로 G protein-coupled receptor (GPCR), 이온채널, 막수송체, 막효소 등 다양한 막단백질의 대장균내 발현을 시도하고 있다. 최근 우리는 박테리오파지의 막단백질을 아미노말단 융합파트너로 사용할 경우 막단백질의 발현이 잘 일어남을 발견하였다. 특히 시스토바이러스속 박테리오파지 phi6의 주외막단백질 (major envelope protein) P9을 융합파트너로 사용할 경우 발현을 시도한 막단백질의 70% 이상이 발현됨을 확인하였다 (Jung and Lim, in preparation). 이 과정 중에 우리는 막단백질 유전자를 발현벡터에 클로닝하면 숙주 세포에 독성을 보이는 현상을 발견하였는데, 특히 퓨린 수용체의 일종인 P2X<sub>4</sub>의 경우 그 독성이 대단히 심하였다.

퓨린수용체 P2X는 세포 바깥에 존재하는 ATP 등 퓨린의 결합에 의하여 통로가 열리는 이온채널로 7개의 서브타입이 알려져 있다(10). P2X<sub>4</sub>는 ATP의 결합에 의하여 열리는 칼슘채널(1)인데, 다른 이온 채널과는 달리 막통과 도메인이 두 개 밖에 없는 특이한 구조를 가진다(5). 아미노 말단과 카이복시 말단은 모두 세포질 쪽에 위치하며 세 개의 서브유닛이 모여 이온 채널을 형성한다고 알려져 있다(3).

본 연구는 과발현시 심한 독성을 나타내는 인간 퓨린 수용체 P2X<sub>4</sub>를 이용하여 막단백질이 과발현될 때 나타나는 독성의 원인을 탐구하고자 하였다. P2X가 발현될 경우 독성이 왜 나타나는지를 알아보기 위해 P2X<sub>4</sub> 유전자를 돌연변이 시킨 후 과발현 되어도 독성을 나타내지 않는 변이체를 얻은 다음, 이들의 일차구조와 세포내 위치를 분석함으로써 막단백질의 발현과 독성과의 관계를 알아보하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 유전자, 플라스미드 및 균주

인간 퓨린수용체 P2X<sub>4</sub>의 cDNA 클론(Accession no. BC033826)은 21C Frontier Human Gene Bank로부터 구입하였으며, 단백질 코딩부분만을 PCR로 증폭하여 t-vector에 클로닝한 후 발현 벡터에 옮겼다. P2X<sub>4</sub>의 발현에 사용한 플라스미드 pRphi69-P2X는 Invitrogen의 pRSETa vector 유도체로, 목적 단백질이 *Pseudomonas virus phi6*의 P9 단백질의 융합 단백질 형태로 발현되도록 제작되었다(Fig. 1). 유전자의 클로닝에는 Epicentre Biotechnologies의 *E. coli* EPI300 균주를, 단백질 발현에는 BL21(DE3) 균주를 사용하였다.

### Hydroxylamine mutagenesis

*In vitro*에서 플라스미드 DNA를 무작위 돌연변이 시키기

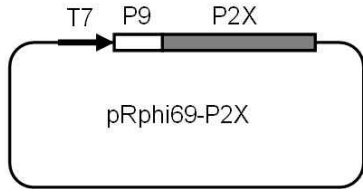
위해 hydroxylamine mutagenesis를 사용하였다. Hydroxylamine 용액은 0.17 g hydroxylamine hydrochloride과 22  $\mu$ l 5 M NaOH을 2.27 ml의 증류수에 섞어 녹인 후, 1 M NaPO<sub>4</sub>(pH 6.8)을 사용하여 용액의 pH가 6.7이 되도록 맞추었다. 준비한 플라스미드 DNA 2  $\mu$ g을 100  $\mu$ l hydroxylamine 용액에 첨가한 후 37°C에서 20시간 동안 반응시킨 후 spin column을 이용하여 DNA를 정제하였다. 이 DNA를 EPI300 균주에 형질 전환하여 수많은 콜로니가 형성되도록 한 후, 이 콜로니를 모두 함께 수거해 플라스미드를 정제함으로써 돌연변이 라이브러리를 얻었다. 돌연변이 라이브러리를 BL21(DE3)에 형질 전환 시키면 P2X 유전자의 독성 정도에 따라 다양한 크기의 콜로니를 형성하는데, 이로부터 콜로니 크기가 확연히 구별되는 30개의 큰 콜로니를 골라서 분석하였다.

### Dot blot과 western blot

Hydroxylamine mutagenesis로부터 선별한 콜로니를 50  $\mu$ g/ml의 앰피실린에 첨가된 10 ml LB에 각각 접종하여 OD<sub>600</sub>의 값이 0.4가 될 때까지 배양한 후, 최종 농도가 0.2 mM이 되도록 IPTG를 넣어 P2X의 발현을 유도하였고, 유도 후 4시간을 더 배양하였다. 이 때 배양 온도는 20°C를 유지하였다. Western blot은 배양액 6 ml, Dot blot은 배양액 2 ml에서 세포를 수거하여 실험하였다. 수확한 세포에 20 mM Tris-Cl (pH 6.8) 용액을 가하여 OD<sub>600</sub>값이 1.85가 되도록 모두 맞춰준 후 적당량의 5× SDS loading buffer를 가하여 1× SDS loading buffer가 되도록 하였다. 이를 8분 동안 끓여 시료 준비를 완성하였다. Dot blot은 각 시료를 원액, 1/3 희석액, 1/9 희석액으로 만든 후 1  $\mu$ l씩 nitrocellulose 종이에 찍어 실시하였다. 항체는 우리 실험실에서 제조하여 사용중인 융합파트너 P9에 대한 항체(mouse anti-P9 polyclonal antibody)를 이용하였으며, P9-P2X 융합 단백질을 chemiluminescence 방법으로 검출하였다. Western blot은 배양액 6 ml에서 수거한 세포에 300  $\mu$ l의 PBS buffer를 첨가한 후 초음파 파쇄하여 사용하였다. 5× SDS loading buffer 75  $\mu$ l를 넣어 잘 섞은 후 끓이는 과정 없이 12% 아크릴아마이드 겔에 SDS-PAGE를 수행하였다. 단백질을 nitrocellulose membrane에 electrotransfer한 후 dot blot과 같은 방법으로 P9-P2X 융합 단백질을 검출하였다.

### 단백질 위치 결정

pRphi69-P2X-mt24 플라스미드와 대조군 플라스미드인 pRphi69 플라스미드를 각각 BL21(DE3) 숙주에 형질전환시킨 후 항생제를 포함하는 LB 11 ml에 접종 후 20°C에 배양했다. OD<sub>600</sub>값이 0.5일 때 1 ml를 다른 튜브에 옮기고, 남은 10 ml에는 IPTG를 넣어 0.2 mM 되게 한 후 4시간 동안 배양한다. 원심분리하여 세포를 수거한 후 0.5 ml의 sonication buffer (20 mM Tris-HCl; pH 8.0), 0.3 N NaCl, 10% glycerol)에 세포를 녹인 후 초음파 분쇄하였다. 시료를 16,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물은 1× SDS loading buffer에 녹여 보관하고, 상등액은 100,000×g로 1시간 동안 초고속원



**Fig. 1.** Structure of expression vector pRphi69-P2X. Plasmid pRphi69-P2X is a derivative of pRSETa and P9-P2X fusion protein was produced by T7 promoter.

심분리하였다. 초고속원심분리 침전물은 1× SDS loading buffer에 녹이고, 상등액은 5× SDS loading를 첨가하여 1× 농도로 만들었다. 이 과정에서 얻은 모든 시료를 12% SDS PAGE에 건 후 western blot으로 P9단백질과 P9-P2X 융합단백질을 검출하였다.

**DNA 서열분석**

EPI300 숙주에서 pRphi69-P2X-24와 pRphi69-P2X-214 플라스미드를 정제한 후 T7프로모터와 T7 터미네이터에 해당하는 프라이머를 이용하여 앞 뒤 DNA 서열 결정을 수행하여 전체 P9-P2X 융합단백질의 서열을 알아내었다.

**결과 및 고찰**

**P2X의 대장균 독성과 실험 설계**

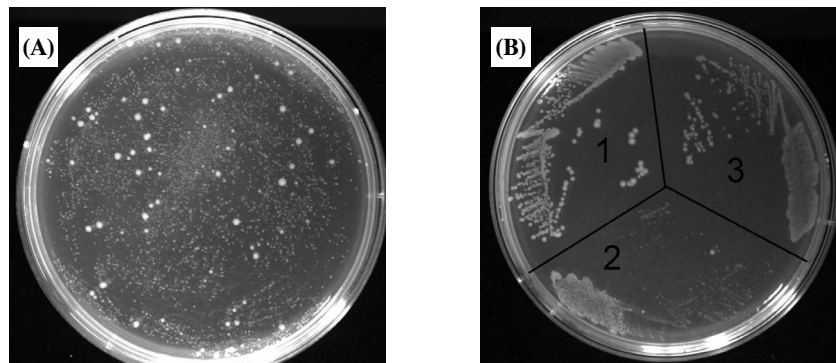
퓨린수용체의 일종인 P2X<sub>4</sub>는 388개의 아미노산으로 이루어진 ligand-gated ion channel이며 두 개의 막통과(transmembrane) 도메인을 가진다. 이 단백질을 발현시킬 목적으로 단백질 코딩 부분만을 증폭하여 T7 프로모터와 *Pseudomonas phage phi6*의 P9 단백질을 가지고 있는 발현벡터 pRphi69에 삽입하여 pRphi69-P2X를 제조하였다(Fig. 1). 이렇게 제조한 플라스미드 pRphi69-P2X는 T7 프로모터에 의하여 P9-P2X 융합단백질을 생산한다.

플라스미드 pRphi69-P2X로부터 P9-P2X 융합단백질의 발

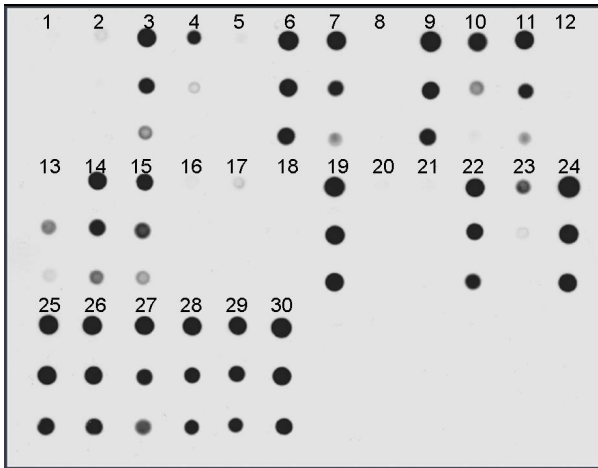
현을 보고자 발현용 숙주인 *E. coli* BL21(DE3)에 pRphi69-P2X를 도입하였더니 형질전환체는 LB-Amp 배지에서 아주 작은 콜로니를 형성하였다(Fig. 2 참조). 이 콜로니를 액체배지에 접종해보니 24시간 후에도 성장이 관찰되지 않았다. 이러한 결과는 LB 배지에서 유도체(inducer) 첨가 없이 만들어지는 P9-P2X만으로도 세포의 성장이 저해됨을 보여준다. 동일한 벡터를 이용하여 발현을 시도한 15개의 막단백질 중에서 P2X가 가장 강한 독성을 보여주었다. P2X의 리간드인 ATP는 항상 대장균이나 배지에 존재하기 때문에 만일 P2X가 발현된다면 P2X의 채널은 열리게 될 것이고, 이 활성화된 이온 채널을 통하여 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 등의 양이온이 유입 혹은 유출이 일어날 것으로 유추할 수 있다. 따라서 우리가 관찰한 P2X의 특별한 독성은 막단백질 발현시 일반적으로 나타나는 독성보다도 양이온의 투과로 인한 막전위 교란 때문일 것이라는 가설도 가능하다. 이 가설에 따르면 세포독성은 P2X가 이온채널로서의 기능을 할 때만 나타나며, 기능을 잃어버린 P2X는 대량 발현된다 할지라도 세포 독성이 없거나 작을 것이라 기대된다. 우리는 P9-P2X의 돌연변이를 분리하고 이를 분석함으로써 이 가설을 테스트하고자 하였다. 즉 독성을 잃은 P9-P2X 돌연변이 단백질을 제조하고 이 변이 단백질과 야생형 단백질의 발현과 독성, 일차구조를 분석하면 P2X의 독성과 세포내 기능에 대한 정보를 얻을 수 있을 것이라 판단하였다.

**독성이 줄어든 P2X 돌연변이체의 분리**

Figure 1에 보여 주듯이 우리가 사용한 퓨린 수용체 P2X는 2개의 막 통과 도메인을 가지는 단백질로 아미노 말단과 카복시 말단이 세포내에, 리간드 결합 도메인은 세포 밖에 있는 구조를 가지는 것으로 판단된다(3). 그러나 우리가 연구하는 P2X<sub>4</sub> isotype의 기능적 도메인에 대한 구체적 정보가 없다. 따라서 우리는 P2X<sub>4</sub>가 보이는 대장균 독성을 분석하기 위해서 선택자리 돌연변이(site-directed mutagenesis) 보다는 무작위 돌연변이 방법을 취하였다. 정제된 pRphi69-P2X plasmid를 hydroxylamine 용액에 20시간 담가 DNA 변이를 유도한 후 T7 RNA polymerase를 생산하지 않는 대장균 EPI300 균



**Fig. 2.** Isolation of mutants with reduced toxicity. (A) isolation of mutants. (B) growth comparison of BL21(DE3) harboring (1) vector pRphi69, (2) wild type pRphi69-P2X, or (3) mutant pRphi69-P2X-Mt4. In A, various sizes of colonies were observed and in B, mutant strain produces colonies bigger than wild type, but smaller than vector only.

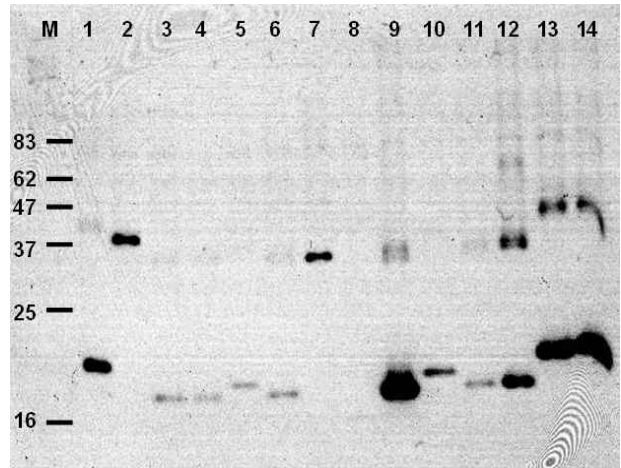


**Fig. 3.** Dot blot of 30 mutants with reduced toxicity. Mutants were grown, sonicated and then normalized to have the same concentration of proteins. Samples were diluted to 1/3 and 1/9 and spotted onto nitrocellulose membrane. P9-P2X protein was detected by anti-P9 antibody. The first line, no dilution; The second line, 1/3 dilution; The third line, 1/9 dilution.

주에 형질전환하여 돌연변이 라이브러리를 제조하였다. 이 라이브러리를 T7 RNA Polymerase를 생산하는 대장균 BL21 (DE3)에 형질전환시킨 후 LB-Amp 배지에 도말하였다. 이 때 형성되는 콜로니들은 야생형과 같이 아주 작은 것부터, 벡터만 함유하는 세포가 만드는 보통 크기의 콜로니까지 아주 다양하게 나타났다(Fig. 2). 콜로니의 크기는 각 형질전환체가 만드는 P2X의 독성과 관련이 있을 것이기 때문에, 독성이 강할수록 작은 콜로니를 만들 것으로 판단하였다. 따라서 야생형 pRphi69-P2X의 콜로니와 확연히 구별되는 커다란 크기의 콜로니 30개를 선별하여 이들이 생성하는 P9-P2X 단백질의 발현 양과 발현된 단백질의 성질을 알아보았다.

**Dot blot을 이용한 P9-P2X 발현 정도 조사**

Figure 2에서 크기가 큰 콜로니는 이 콜로니의 세포가 가지고 있는 플라스미드 pRphi69-P2X로 인한 독성이 야생형보다 적다는 것을 의미한다. 그러나 이러한 독성의 감소가 돌연변이에 따른 P2X의 기능 변화로 인한 것인지, 또는 단순히 P9-P2X 단백질의 발현양 감소 때문인지를 알 수 없다. 예를 들어 P2X 유전자는 야생형과 동일하나 pRphi69-P2X의 T7 프로모터 부분에 변이가 일어나거나 플라스미드의 카피 수가 줄어드는 변이가 일어나도 콜로니 크기가 커지는 표현형을 보일 것이다. 따라서 앞서 선별한 30개의 클론들이 생성하는 P9-P2X 단백질의 양을 P9에 대한 항체를 이용하여 dot blot 방법으로 알아 보았다. 30개의 클론을 재료와 방법에서 기술한 바와 같이 배양 후 상대적인 발현 정도를 비교할 수 있도록 OD<sub>600</sub>값을 이용하여 표준화하였다. 시료의 원액, 3배 희석액, 9배 희석액을 만들고 이로부터 1 µl를 nitrocellulose 종이에 떨어뜨린 후 anti-P9 antibody를 이용하여 각각의 변이체가



**Fig. 4.** Western blot of mutants with reduced toxicity. Cells were grown, induced to produce P9-P2X fusion protein and applied to SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose and fusion proteins were detected by anti-P9 antibody. M, size marker. Lanes: 1, Mt3; 2, Mt4; 3, Mt7; 4, Mt9; 5, Mt10; 6, Mt11; 7, Mt14; 8, Mt15; 9, Mt19; 10, Mt22; 11, Mt24; 12, Mt25; 13, Mt26; 14, Mt27.

만드는 P9-P2X 융합단백질을 검출하였다(Fig. 3). 그 결과 우리가 선별한 총 30개의 클론은 3개의 그룹으로 나뉘어졌다. 즉 10개의 클론에서는 P9-P2X 단백질이 검출되지 않았으며 (변이체 Mt1, Mt2, Mt5, Mt8, Mt12, Mt16, Mt17, Mt18, Mt20, Mt21), 다른 10개의 클론에서는 많은 양의 목적 단백질이 검출되었고(Mt6, Mt9, Mt19, Mt22, Mt24, Mt25, Mt26, Mt28, Mt29, Mt30), 나머지 10개의 클론 중에서는 중간 정도의 P9-P2X 단백질이 검출되었다. 첫 번째 그룹 즉 P9-P2X 단백질이 전혀 검출되지 않는 클론들은 목적 단백질의 발현에 문제가 있는 클론으로 발현에 따른 독성 분석이라는 우리 목적에 맞지 않는다. 따라서 두 번째 그룹과 세 번째 그룹에서 14개의 클론을 선별하여 연구를 진행하였다.

**Western blot을 이용한 단백질 크기 비교**

Figure 3의 dot blot은 대체로 각 돌연변이체가 생산하는 P9-P2X의 상대적인 양을 보여주지만, 생산되는 단백질이 어떤 상태인지에 대한 정보는 제공하지 않는다. 만일 P2X 유전자의 앞부분에서 종결코돈으로 변화했다면, 이러한 돌연변이체는 P2X가 없는 P9 단백질만을 생산할 것인데, 검출에 사용한 항체가 P9에 대한 것이기 때문에 dot blot에서는 진하게 나올 것이다. 이런 변이 단백질은 발현 양이 많다 할지라도 P2X 기능에 따른 독성은 나타나지 않을 것이다. 이러한 변이체는 우리가 원하는 P2X 독성에 대한 최소한의 정보를 제공한다. 대신에 단백질의 크기가 정상이고 발현양도 늘었으나 독성이 관찰되지 않는 단백질을 야생형과 비교·분석하면 독성 메커니즘에 대한 많은 정보를 얻을 것이다. 따라서 각 돌연변이체가 생산하는 단백질의 크기를 Western blot으로 알아보고 하였다. 많은 양의 목적 단백질을 발현하는 변이체 6개

(Mt9, Mt19, Mt22, Mt24, Mt25, Mt26)와 중간 정도의 발현을 보이는 변이체 8개(Mt3, Mt4, Mt7, Mt10, Mt11, Mt14, Mt15, Mt27)를 선택하여 western blot을 수행하였다(Fig. 4).

Figure 4는 14개의 독성 감소 돌연변이체 단백질에 대한 Western blot 결과이다. 우선 Anti-P9 antibody에 의하여 검출되는 단백질이 몇몇 클론에서는 두 개의 밴드로 보인다는 점이 눈에 띈다(lanes 12, 13, 14). 각 밴드에 해당하는 단백질의 크기, 또 SDS PAGE 할 때 시료를 끊이지 않았다는 점을 고려할 때, 두 개의 밴드는 각 단백질의 monomer와 dimer 밴드로 여겨진다. 일반적으로 막단백질의 경우 SDS-PAGE시 시료를 끊이면 막단백질은 자기들끼리 서로 엉겨 붙어 분리되지 않고 젤의 상단에 남기 때문에 막단백질의 SDS-PAGE 시에는 시료를 끊이지 않는다. Figure 4에서 30 kDa 이상 크기의 단백질이 검출된 Mt4와 Mt14는 dimer를 형성하지 않는 것처럼 보이며, 단백질의 크기가 작을수록 dimer 현상이 뚜렷한 것처럼 보인다. 야생형 P2X가 만드는 채널은 trimer로 구성된다는 사실과(5), P9 단백질이 dimer를 형성함을 고려할 때(Fig. 6 참조) Fig. 4의 dimer 형성은 P2X 보다는 P9 단백질의 성질일 것으로 판단된다.

Figure 3과 Fig. 4를 비교해보면 dot blot에서 목적 단백질이 많이 검출됐던 돌연변이 중 일부는 Western에서는 소량의 단백질만 검출된 점을 발견할 수 있다. 즉 dot blot에서 많은 양의 단백질이 검출됐던 시료 6개를 western 분석에 이용하였는데 Mt19와 Mt26은 western에서도 많은 양의 단백질이 검출됐으나 Mt9, Mt22, Mt24의 경우 dot blot과 달리 western에서는 소량만이 검출되었다. 두 시료의 차이점은 dot blot의 경우 분석 전에 1× SDS loading buffer 존재 하에서 시료를 8분간 끓여 세포를 파쇄했으나, western blot의 경우 시료를 초음파 파쇄로 세포를 분쇄하였다는 점이다. 검출되는 단백질의 양이 이러한 시료처리의 차이로 인한 nitrocellulose 종이에의 흡착 정도가 달라지기 때문인지 아니면 다른 이유가 있는지는 현재로서는 확실치 않다.

Figure 4의 결과에서 중요한 점은 P9-P2X 융합 단백질의 온전한 크기(55 kDa)에 해당하는 단백질을 생성하는 돌연변이체가 발견되지 않고, 모두 크기가 훨씬 작은 단백질을 생성한다는 사실이다. 이는 우리가 분석한 14개의 돌연변이체는 모두 끝이 잘린(truncated) 돌연변이체임을 알려준다. 우리가 사용한 hydroxylamine이 주로 염기삭제(base deletion)나 염기삽입(base insertion)보다는 치환(substitution) 돌연변이를 유도함을 상기할 때, 단일 아미노산의 치환에 의하여 P2X의 독성 감소를 일으키는 것이 매우 힘들다는 점을 시사한다. 어쨌든 Fig. 4를 보면 Mt4가 생산하는 단백질의 크기가 제일 크고, Mt14이 생산하는 단백질의 크기가 그 다음인데, 이들은 대략 크기가 35 kDa 정도로 계산된다. 이들 두 단백질의 일차구조를 알아보기 위해 DNA 서열분석을 수행하였다.

**독성감소 돌연변이 단백질과 야생형 단백질의 일차구조 비교**

돌연변이 Mt4와 Mt14로부터 플라스미드를 정제하여 T7 promotor와 T7 terminator 서열을 primer하여 DNA 서열분석

을 수행하였다. 이들의 염기서열을 야생형과 비교하여 본 결과 Mt4에서는 개시코돈 ATG로부터 777번째 염기 G가 A로 변이되었음을 알았는데, 이 변이로 인하여 259번째의 아미노산 Trp 코돈 TGG가 종결코돈 TGA로 변하였다. 따라서 Mt4는 야생형보다 130개의 아미노산이 적은 258개의 아미노산으로 이루어진 P2X 변이체 단백질을 생산한다. Mt14의 경우 582번 위치의 G가 A로 변함으로써 194번째 Trp 코돈 TGG가 종결코돈 TAA로 바뀌어 193개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 변하였다. 이처럼 Mt4와 Mt14 단백질은 카복시 말단의 상당부분이 잘려진 형태의 단백질을 만들기 때문에 야생형 단백질의 기능인 ligand-gated ion channel로서의 기능은 잃었을 것으로 판단된다. 이러한 DNA 서열분석 결과를 P2X의 기능적 도메인에 표시한 것이 Fig. 5이다.

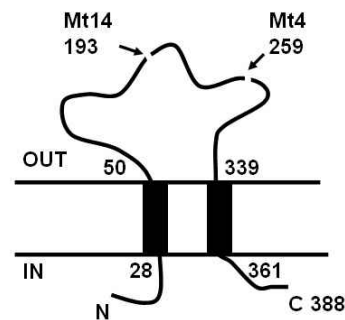
**돌연변이 단백질의 대장균 세포내 위치**

막토폴로지 예측 프로그램은 야생형 P2X<sub>4</sub> 단백질이 28-50 번째 아미노산 지역과 339-361 번째 아미노산 지역이 막 통과 도메인인 Fig. 5와 같은 구조를 가질 것으로 예측한다(11). 따라서 258개의 아미노산으로 이루어진 Mt4 단백질은 아미노 말단 쪽의 막통과 도메인만을 가지고 있게 된다. 이 돌연변이 Mt4 단백질이 대장균에서 발현시 세포막에 삽입되어 존재하는지의 여부를 알아보기 위하여 단백질을 여러 분획으로 나누고 Western blot을 수행하였다.

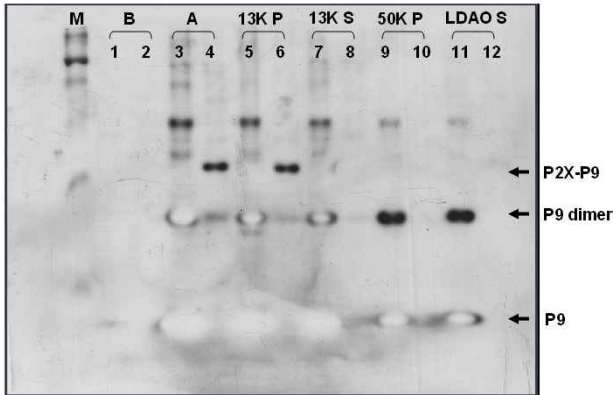
초음파로 세포를 파쇄할 경우 대장균의 세포막은 작은 소포(vesicle)를 형성하기 때문에 보통의 원심분리 후에는 대부

```

MAGCCAALAA FLFEYDTPRI VLIRSRKVGL MNRAVQLLLI
AYVIGWVFWV EKG YQETDSV VSSVTTKVKV GVAVTNTSKLG
FRIWDVADYV IPAQEENSLF VMTNVILTMN QTQGLCPEIP
DATTVCKSDA SCTAGSAGTH SNGVSTGRVCV AFNGSVKTCE
VAAWCPVEDD THVPQPAFLK AAENFTLLVK NNIWYPKFNF
SKRNILPNIT TTYLKSCIYD AKTDPFCPIF RLKIVENAG
HGFQDMAVEG GIMGIQVNW D C NLDRAASLC LPRYSFRRLD
TRDVEHNVP GYNFRFAKY Y RDLAGNEQRT LIKAYGIRFD
IIVFGKAGKF DIIPTMINIG SGLALLGMAT VLCDIIVLYC
MKKRLYYREK KYKYVEDYEQ GLASELDQ
    
```



**Fig. 5.** The amino sequence of human P2X<sub>4</sub> and locations of stop codons in the Mt4 and Mt14. In the left panel, the locations of tryptophan (W) whose codon was mutated into termination codon in Mt4 and Mt14 were underlined. In the right, the positions of termination codons were indicated in the topology model of P2X<sub>4</sub> (11).



**Fig. 6.** Cellular localization of P9-P2X derivative from Mt4. Cellular location of mutant protein was examined using wild type P9 as a control. M, prestained marker (NEB); Lanes with odd number were samples of *E. coli* BL21(DE3/pRphi69) producing wild type P9; Lanes with even number were samples of strain Mt4 producing mutant form of P9-P2X; B, total protein before induction; A, total protein after induction; 13K P, pellet from 16,000×g (13,000 rpm); 13K S, supernatant from 16,000×g; 50K P, pellet from ultracentrifugation (100,000×g); LDAO S, supernatant from ultracentrifugation of LDAO-resuspended pellet. Positions of P9, P9 dimer and P9-P2X from Mt4 were indicated by arrows.

분 상등액에 존재한다. 이 상등액을 초고속 원심분리하면 (100,000×g 한 시간 이상) 세포막 유래 소포(vesicle)들은 침전물로 된다. 소포의 막에 박혀있는 막단백질은 초고속원심분리 침전물에 LDAO나 Triton X-100과 같은 순한 세제(mild detergent)를 처리하면 녹아 나와 용액으로 회수된다. 이런 원리를 이용하여 Mt4가 생산하는 P2X 유도체의 세포내 위치(localization)을 분석하였다. Figure 6을 보면 대조군으로 사용한 P9 단백질의 경우 16,000×g (13,000 rpm) 원심분리 후 절반 이상의 단백질이 상등액에 남고(lane 8), 이 상등액을 초고속원심분리하면 모두 침전물로 된다(lane 10). 이 침전물에 순한 세제 LDAO를 가하여 현탁시킨 후 재차 초고속 원심분리하면 이번에는 모두 상등액으로 나오므로써(lane 12) 이들이 대장균의 세포막에 존재함을 알 수 있다. 그러나 Mt4는 세포 파쇄 후 16,000×g 원심분리하면 발현된 P-P2X 단백질은 모두 침전물에 존재함을 보게 된다(lane 7과 lane 9 비교). 이는 대장균에서 과발현된 단백질이 응집체(inclusion body)를 형성할 경우 관찰되는 현상이다. 따라서 Mt4가 발현하는 258개 남은 truncated P-P2X 단백질은 대장균에서 응집체를 형성한다고 할 수 있다.

일반적으로 막단백질의 발현으로 인한 숙주 세포의 사멸은 (1) 목표 막단백질의 신속한 대량합성이 일어나면서 숙주세포의 막단백질 발현시스템이 포화되기 때문에 숙주 막단백질을 생산할 수 없어 나타나는 숙주 필수막단백질의 결핍(2), 세포막에 특정의 막단백질을 대량 삽입함으로써 야기되는 세포막의 기능 저해 등이 원인일 것으로 추정해 왔다. 그러나 지금까

지 이러한 가설이 사실임으로 보여주는 실험 데이터는 없다. 우리는 P2X 발현시 나타나는 독성을 분석하여 막단백질 발현시 나타나는 독성의 기작을 이해하고자 독성이 약화된 P2X의 돌연변이체를 분리하고, 이들의 생화학적 특성을 분석하여 독성 상실의 원인을 추론하고자 하였다. 그러나 우리가 분리한 P2X 독성약화 돌연변이체는 모두 P2X 단백질 카복시 말단의 상당부분을 잃어버린 돌연변이들로 P2X의 기능을 잃어버린 돌연변이체였다. 따라서 이번 결과가 P2X 발현에 따른 숙주 독성의 원인을 보여주지는 못하였지만, 적어도 P2X의 경우 기능적으로 완전한 단백질의 발현이 독성을 나타내는데 중요하다는 사실을 확인할 수 있었다.

## 적요

일반적으로 대장균을 숙주로 이용하여 고등생물 유래 막단백질을 발현시킬 경우 발현된 막단백질은 숙주 세포에 치명적인 독성을 보인다. 우리가 발현을 시도한 15개의 인간 막단백질 중에서 특히 퓨린수용체 P2X<sub>4</sub> 발현은 대장균에 강한 독성을 보였다. 이러한 독성의 원인을 알아보기 위해 hydroxylamine을 사용하여 하여 인간 P2X<sub>4</sub> 유전자를 돌연변이 시키고 독성이 약해진 돌연변이체를 선별하였다. 돌연변이체 단백질을 면역블랏으로 분석한 결과 야생형에 비해 모두 단백질의 크기가 작았다. 크기가 제법 큰 돌연변이 두 개를 골라 DNA 서열분석을 해보니 130번째, 또는 194번째 Trp 코돈이 종결 코돈으로 바뀌므로써 두 번째 막통과 도메인이 사라진 truncated protein이라는 사실을 알았다. 이들 돌연변이체의 세포내 위치를 추적해보니 둘 다 세포막에 삽입되어 있지는 않았다. 이런 결과를 종합해 볼 때 P2X<sub>4</sub>의 발현이 대장균에 독성을 보이기 위해서는 전체 단백질의 올바른 세포막 삽입이 중요함을 시사한다.

## 참고문헌

- Egan, T.M. and B.S. Khakh. 2004. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *J. Neurosci.* 31, 3413-3420.
- Grisshammer, R., R. Duckworth and R. Henderson. 1993. Expression of a rat neurotensin receptor in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 295, 571-576.
- Khakh, B.S. and R.A North. 2006. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442, 527-532.
- Klabunde, T. and G. Hessler. 2002. Drug design strategies for targeting G-protein-coupled receptors. *Chem. Bio. Chem.* 3, 928-944.
- Li, M., T.H. Chang, S.D. Silberberg, and K.J. Swartz. 2008. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nature Neuroscience* 11, 883-887.
- Lundstrom, K. 2005. The future of G protein-coupled receptors as targets in drug discovery. *IDrugs.* 8, 909-913.
- Mancia, F. and W.A. Hendrickson. 2007. Expression of recombinant G-protein coupled receptors for structural biology. *Mol. BioSyst.* 3, 723-734.
- Marullo, S., C. Delavier-Klutchko, Y. Eshdat, A.D. Strosberg, and L. Emorine. 1988. Human beta 2-adrenergic receptors

- expressed in *Escherichia coli* membranes retain their pharmacological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7551-7555.
9. Miroux, B. and J.E. Walker. 1996. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J. Mol. Biol.* 260, 289-298.
  10. Ralevic, V. and G. Burnstock. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* 50, 413-492.
  11. Silberberg, S.D., T.H. Chang, and K.J. Swartz. 2005. Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X receptor channels. *J. Gen. Physiol.* 125, 347-359.
  12. Wagner, S., M.M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Hogbom, K.J. van Wijk, D.J. Slotboom, J.O. Persson, and J.W. de Gier. 2008. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14371-14376.
  13. White, L.B. and T.J. Shiloach. 2004. Automated large-scale purification of a G protein-coupled receptor for neurotensin. *FEBS Lett.* 564, 289-293.