

Characterization of ERp29 and ADP-Ribosylation Factor 5 Interaction

Kisang Kwon¹, Dae-Hyun Seog², Seung-Whan Kim³, Kweon Yu⁴ and O-Yu Kwon^{1*}¹Department of Anatomy, School of Medicine, Chungnam National University, Taejeon 301-747, Korea²Department of Biochemistry, College of Medicine, Inje University, Busan 614-735, Korea³Department of Emergency Medicine, Chungnam National University Hospital, Taejeon 301-721, Korea⁴Aging Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea.

Received March 28, 2011 / Accepted April 25, 2011

ERp29 is an endoplasmic reticulum (ER) luminal resident protein that shows sequence similarity to the protein disulfide isomerase family. Its biological function is thought to play a role in the processing of secretory proteins within the ER, possibly by participating in the folding of proteins in the ER. Although some data on ERp29 have been reported, its normal functions are still unclear. To gain insights into the function of ERp29, we identified ARF5 protein as a protein that interacts with ERp29 using yeast two-hybrid screening and GST pull-down assay. Interaction between ERp29 and ARF5 was detected under normal cell conditions but not under ER stress conditions. This result may provide a clue for understanding ERp29 biological functions.

Key words : Endoplasmic reticulum protein 29 (ERp29), binding protein, ADP-ribosylation factor 5 (ARF5)

서 론

세포에서 endoplasmic reticulum (ER)의 가장 중요한 기능 중의 하나는 ER내에서 정상적으로 신생분비단백질과 막구성 단백질이 folding/assembly할 수 있는 세포내 환경을 제공하는 것이다. 그러기 위하여 ER내에는 여러 종류의 특이 단백질이 존재하여 단백질의 최종 운명을 조절한다. 이들을 총칭하여 ER molecular chaperone이라고 한다. 1997년에 처음으로 Hubbard에 의해서 ERp29가 cloning되고 ER에 존재한다는 것이 보고되었으며(24.5 kDa soluble ER protein, pI 6.0), 분비단백질에 특이적인 역할을 한다는 것을 알았다[3]. 그러나 뚜렷한 기능연구의 실마리를 찾지 못할 때에 우리는 TSH에 의해서 ERp29 유전자 발현이 조절되는 것을 밝혔다[6,9]. 2001년에는 NMR을 사용하여 ERp29의 구조가 결정되고, 대표적인 분비단백질인 thyroglobulin의 folding에 관여하는 것과 genomic DNA의 구조가 결정되었으며 전체적으로 brain에서 높은 발현을 보이는 것이 알려 졌다[7,11]. 특히, 흥미로운 것은 ERp29가 세포에 침입하기 위한 polyomavirus와 결합하여 구조 변화를 유도하는 것이다[8]. 세포 내에서 ERp29는 단백질의 분비를 촉진시키며, 정자형성과정과 방사선 조사, 손상된 척수에서 특이적으로 발현한다[4,10]. 한편 ERp29가 connexin43 oligomerization과 apoptosis를 저해하고, 반대로 cytokeratin 19는 ERp29표현을 저해한다[1,2]. 그러나 앞에서 기술한 것과 같이 여러 종류의 연구결과가 있음에도 불구하고

아직까지 ERp29의 정확한 기능을 알지는 못하고 있다. ERp29의 기능연구를 심화하기 위하여서는 ERp29-결합단백질에 관한 연구가 필요 불가결 하다고 판단하여, 먼저 yeast two-hybrid 방법으로 탐색하여 얻은 후보군을 상대로 GST pull-down assay를 통하여 최종적으로 ERp29-결합단백질로서 ADP-ribosylation factor 5 (ARF5)을 발견하였다. ARF family는 기능상 class I (ARF1-3), class II (ARF4, ARF5), class III (ARF6)로 분류된다. 알려진 대표적인 기능으로는 vesicular trafficking에 관여하는 것과 phospholipase D의 activator로 작용하는 것이다[5]. 그러나 ARF5가 ER chaperone과 관련된 보고된 연구결과와는 없다. 당쇄가 붙어 있지 않은 ARF5 단백질과 ER에 존재하는 ERp29와 interaction하는 것은 ERp29의 기능 연구 측면에서 아주 흥미로운 일이다.

재료 및 방법

Matchmaker LexA two-hybrid system (Clontech)을 사용하여 ERp29-binding protein screening을 위한 yeast two-hybrid assay 실시하였다. ERp29 cDNA를 pLexA vector의 DNA-BD region에 fusion시켜서 yeast strain EGY48 strain에 형질전환하였다. EGY48 strain은 total rat thyroid cDNA로 transformation되어서 ERp29 bait plasmid를 가지고 있는 것이다. 이들의 배양은 histidine, tryptophan, uracil이 결여되고 glucose를 포함하는 synthetic dextrose (SD) plate에서 행하였다. large scale 결과 약 350개 colony를 X-gal에 다시 옮겨 확인한 결과, 62개는 white였으므로 총 288개 colony를 다음 단계의 실험에 사용하였다. 그 결과 48개의 colony를 선별해서 yeast

*Corresponding author

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

E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

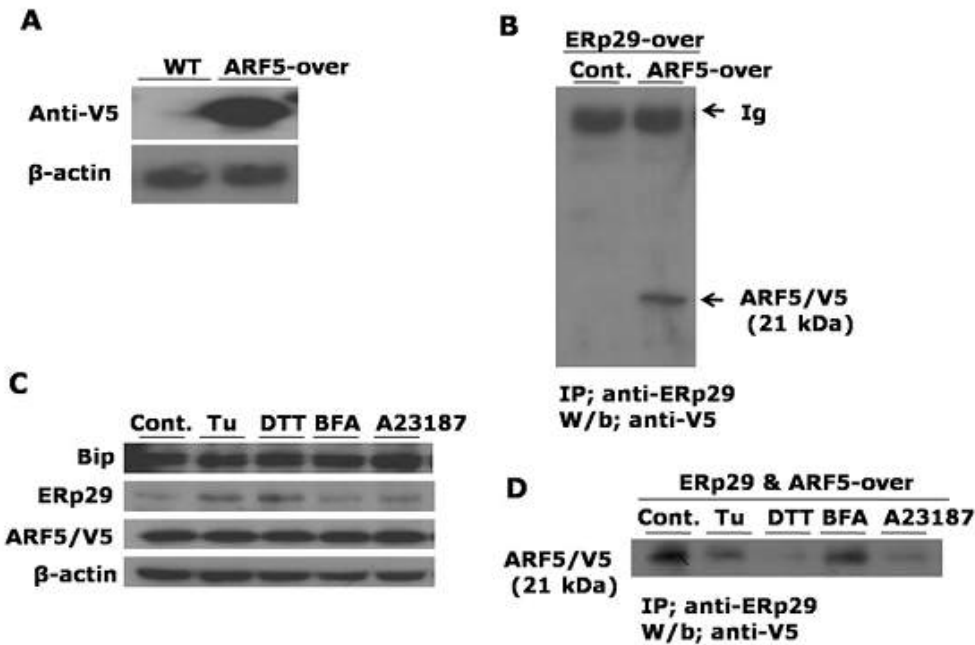


Fig. 1. Interaction of ERp29 with ADP-ribosylation factor 5 (ARF5). (A) Construction of cell line in which ARF5 is over-expressing. Explain the process here. (B) Interaction between ERp29 and ARF5 under normal cell conditions. The ERp29 complex was immunoprecipitated using anti-ERp29 antibody from normal and ARF5-overexpressing cells and blotting with anti-V5 antibody. The 21 kDa ARF5 is indicated by an arrow. (C) Expression of ARF5 under ER stress conditions. Tu; (Tunicamycin, N-glycosylation inhibition, 10 ug/ml-3 hr), DTT (Dithiothreitol, strong reducing agent, 3 mM-3 hr); BFA (Bafilomycin A, H⁺-ATPase inhibition, 10 ug/ml-3 hr) A23187 (Ionophore A23187, divalent cation ionophore, 2 mM-3 hr). (D) Dissociation of ERp29 and ARF5 under ER stress conditions. The conditions of IP and W/b are same with Fig. 1B.

plasmid miniprep 실시하여 대장균 KC8 strain에 옮겨서 insert을 확인하고 400 bp 이하 insert을 제외하고 재형질전환 실험 결과 총 21개 blue colony 얻었다. 이중 아주 강한 blue와 강한 blue의 DNA sequence결과 10개의 ERp29-결합단백질 후보군을 얻었다. HEK293 (human embryonal kidney) cell 은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지 내에서 37°C, 5% CO₂, 충분히 습한 조건으로 배양하였다. pcDNA3.1-hERp29/GST 와 pcDNA3.1-hARF5/V5을 HEK293 cell에 각각 transfection 한 36시간 후에 발현을 확인하였다. pcDNA3.1-hERp29/GST 을 확인한 다음에 pcDNA3.1- hARF5/V5를 transfection 하였다. 36시간이 지난 후에 실험에 사용하였다. pcDNA3.1-hERp29/GST을 HEK293 cell에 transfection 한 후 24시간 후에 다시 pcDNA3.1- hARF5/V5를 transfection 하였다. 36시간 이 지난 후에 실험에 사용하였다. Immunoprecipitation (IP)에 사용할 cell을 차가운 PBS로 2회 씻어 준 다음 RIPA로 lysis 하였다. Cell extract를 정량하여 1 mg 으로 양을 맞춘 후 ERp29 antibody 4 ul를 넣고 에서 4시간 동안 head-over-tail swinging 시켰다. Protein A/G PLUS agarose를 40 ul를 새 tube에 옮기고 PBS로 2회 rinse 한 후 각각의 sample에 첨가하여 4°C에서 12시간 동안 head-over-tail swinging 시켰다. Ripa

buffer 1 ml씩 4회 씻어준 후 2× SDS-PAGE sample buffer 40 ul 넣고 5분간 boiling 하여 elution 하였다. IP 한 sample 을 12% SDS-PAGE gel 에 loading 하여 anti-V5 로 Western blotting 하였다.

결과 및 고찰

Yeast two-hybrid assay 결과 얻은 10개의 ERp29-binding protein candidate는 아래와 같다. NM_001025271.1; Sfpq, BC127508.1; HP1 gamma homolog, NM_022191.1; Syt6, NM_130829.1; Palm, NM_001106797.1; Cbx5, XM_216529.4; Smap11, XM_215570.4; Schip1, NM_001014080.1; Uba1, NM_024149.1; Arf5, NM_001014014.1; Nip30. 이들을 각각 ERp29가 overexpression하는 세포주에 transfection하여, Fig. 1A와 같이 ARF-5가 지속적으로 overexpression하는 세포주를 screen하였다. ERp29와 ARF5의 세포내 결합을 확인하기 위하여 먼저 anti-ERp29 antibody를 사용하여 IP한 다음에 anti-V5을 사용하여 ARF5을 확인하였다. Control에서는 ARF5가 확인되지 않았지만 ARF5가 transfection된 세포에서는 ERp29와 ARF5가 결합하는 것이 Fig. 1B의 결과와 같이 증명되었다. 이들의 발현이 ER stress 상태에서는 어떤 양상으로

변하는지를 실험하였다(Fig. 1C). ERp29는 ER stress inducible 단백질임으로 예상과 같이 control에 비하여 tunicamycin과 DTT처리에서 발현이 증가하였다. 그러나 ARF5는 ER stress inducible drug 처리에서도 변화가 없었다. 이번에는 ER stress 상태에서 ERp29와 ARF5의 세포 내 결합을 확인하기 위하여 ER stress 유도 후에 Fig. 1B와 동일하게 실험하였다(Fig. 1D). 그 결과는 의외로 ER stress 상태에서 이들의 결합은 control에 비하여 약하였다. 이 결과는 ERp29와 ARF5의 결합은 세포가 정상적인 상태일 때에 어떤 기능을 발휘하기 위하여 결합하며, 세포생리에 불리한 ER stress를 받으면 이들의 결합은 떨어지는 것으로 생각된다. 이는 일반적인 ER chaperone의 기능과 반대되는 현상이다. 일반적으로 ER chaperone은 ER stress를 받으면 세포를 보호하기 위하여 발현이 증가한다. 물론 이들 중 많은 ER chaperone은 비정상적인 단백질과 직접 결합하여 이들의 변형을 막거나, folding을 도와준다. 지금으로서는 정상적인 세포생리상태에서 이들의 결합체 기능을 알 수 없으나, 이 실험 결과는 ER chaperone의 기능연구에 새로운 해답을 찾을 수 있는 실마리를 제공한다.

감사의 글

이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2008-314-C00320).

References

- Bambang, I. F., D. Lu, H. Li, L. L. Chiu, Q. C. Lau, E. Koay, and D. Zhang. 2009. Cytokeratin 19 regulates endoplasmic reticulum stress and inhibits ERp29 expression via p38 MAPK/XBP-1 signaling in breast cancer cells. *Exp. Cell Res.* **315**, 1964-1974.
- Das, S., T. D. Smith, J. D. Sarma, J. D. Ritzenthaler, J. Maza, B. E. Kaplan, L. A. Cunningham, L. Suaud, M. J. Hubbard, R. C. Rubenstein, and M. Koval. 2009. ERp29 restricts Connexin43 oligomerization in the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* **20**, 2593-2604.
- Demmer, J., C. Zhou, and M. J. Hubbard. 1997. Molecular cloning of ERp29, a novel and widely expressed resident of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **402**, 145-150.
- Guo, W., F. Qu, L. Xia, Q. Guo, X. Ying, and Z. Ding. 2007. Identification and characterization of ERp29 in rat spermatozoa during epididymal transit. *Reproduction* **133**, 575-584.
- Kahn, R. A., L. Volpicelli-Daley, B. Bowzard, P. Shrivastava-Ranjan, Y. Li, C. Zhou, and L. Cunningham. 2005. Arf family GTPases: roles in membrane traffic and microtubule dynamics. *Biochem Soc. Trans.* **33**, 1269-1272.
- 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.
- Liepinsh, E., M. Baryshev, A. Sharipo, M. Ingelman-Sundberg, G. Otting, and S. Mkrtchian. 2001. Thioredoxin fold as homodimerization module in the putative chaperone ERp29: NMR structures of the domains and experimental model of the 51 kDa dimer. *Structure* **9**, 457-471.
- Magnuson, B., E. K. Rainey, T. Benjamin, M. Baryshev, S. Mkrtchian, and B. Tsai. 2005. ERp29 triggers a conformational change in polyomavirus to stimulate membrane binding. *Mol. Cell* **20**, 289-300.
- Park, S., K. H. You, M. Shong, T. W. Goo, E. Y. Yun, S. W. Kang, and O. Y. Kwon. 2005. Overexpression of ERp29 in the thyrocytes of FRTL-5 cells. *Mol. Biol. Rep.* **32**, 7-13.
- Park, S., H. M. Hwang, Y. H. Lee, K. H. You, K. S. Shin, and O. Y. Kwon. 2003. Expression of endoplasmic reticulum chaperone ERp29 in the injured spinal cord. *Korean J. Biol. Sci.* **7**, 265-269.
- Sargsyan, E., M. Baryshev, L. Szekely, A. Sharipo, and S. Mkrtchian. 2002. Identification of ERp29, an endoplasmic reticulum luminal protein, as a new member of the thyroglobulin folding complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 17009-17015.

초록 : ERp29와 ADP-ribosylation factor 5의 결합특성

권기상¹ · 석대현² · 김승환³ · 유권⁴ · 권오유^{1*}

(¹충남대학교 의학전문대학원 해부학교실, ²인제대학교 의과대학 생화학교실, ³충남대학교병원 응급의학과, ⁴한국생명공학연구원 장수연구센터)

ERp29는 endoplasmic reticulum (ER) lumen에 존재하는 단백질로 protein disulfide isomerase (PDI) family에 속한다. 비록 관련 연구 결과는 조금 있지만 정확한 생물학적인 기능은 아직 분명하지 않지만, 분비단백질과정과 단백질 folding에 관여하는 것으로 알려 지고 있다. ERp29의 기능 연구를 위하여 yeast two-hybrid screening/GST pull-down assay 방법을 사용하여 ERp29-결합단백질인 ADP-ribosylation factor 5 (ARF5)를 동정하였다. 이들의 결합은 정상적인 세포생리상태에서는 결합하지만 ER stress 상태에서는 떨어졌다. 이 결과는 ERp29의 기능 연구를 위하여 하나의 실마리를 제공할 것이다.