

## Expression and Purification of the Phosphatase-like Domain of a Voltage-Sensing Phosphatase, Ci-VSP

Sungjae Kim, Haemin Kim, Hoon Choi and Youngjun Kim\*

Department of Applied Biochemistry, Konkuk University, Chungju, 380-701, Korea

Received May 3, 2011 / Revised June 24, 2011 / Accepted June 28, 2011

Recently identified *Ciona intestinalis* voltage sensor-containing phosphatase (Ci-VSP) consists of an ion channel-like transmembrane domain (VSD) and a phosphatase-like domain. Ci-VSP senses the change of membrane potential by its VSD and works as a phosphoinositide phosphatase by its phosphatase domain. In this study, we present the construction of His-tagged phosphatase-like domain of Ci-VSP, its recombinant expression and purification, and its enzymatic activity behavior in order to examine the biochemical behavior of phosphatase domain of Ci-VSP without interference. We found that Ci-VSP(248-576)-His can be eluted with an elution buffer containing 25 mM NaCl and 100 mM imidazole during His-tag purification. In addition, we found the proper measurement condition for kinetics study of Ci-VSP(248-576)-His against p-nitrophenyl phosphate (pNPP). We measured the kinetic constant of Ci-VSP(248-576)-His at 37°C, pH 5.0 or 5.5, under 30 min of reaction time, and less than 2.0 µg of protein amount. With these conditions, we acquired that Ci-VSP(248-576)-His has  $K_m$  of  $354 \pm 0.143$  µM,  $V_{max}$  of  $0.0607 \pm 0.0137$  µmol/min/mg and  $k_{cat}$  of  $0.359 \pm 0.009751$  min<sup>-1</sup> for pNPP dephosphorylation. Therefore, we produced a pure form of Ci-VSP(248-576)-His, and this showed a higher activity against pNPP. This purified protein will provide the road to a structural investigation on an interesting protein, Ci-VSP.

**Key words** : *Ciona intestinalis* voltage sensor-containing phosphatase (Ci-VSP), phosphatidyl inositol phosphate, lipid phosphatase,  $K_m$ ,  $V_{max}$

### 서 론

세포 내의 인산화와 탈인산화 과정은 다양한 생명현상에 있어 중요한 역할을 수행함이 수 많은 연구를 통해 알려져 있다[2,14,15]. 특히 단백질 탈인산화 효소들에 대한 연구는 암이나 염증 발생 기작, 박테리아의 병리학적 기작 등의 다양한 생물학적 현상에 대한 이해의 단초를 제공한다. 한편 탈인산화 효소 중에 지질 탈인산화 효소 또한 여러 가지 생물학적 현상에 있어 중요한 역할을 하는 것이 잘 알려져 있다[2]. 이러한 지질 탈인산화 효소 중에 phosphatase and tensin homologue (PTEN)가 phosphatidyl inositol phosphate (PIP)들 중에 phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>)에 대해 탈인산화 활성을 보임이 여러 연구를 통해 밝혀져 있다[14]. PTEN은 종양 억제 유전자이며, PI(3,4,5)P<sub>3</sub>를 탈인산화시켜서 세포의 증식과 세포 자살 등의 신호 전달 과정에 관여되어 있음이 알려져 있다[14]. 이러한 PTEN의 탈인산화 활성이 암 발생 조절이나 줄기세포의 분화 등의 다양한 생리 과정에 관여하고 있다[14]. 이러한 연구 결과를 토대로 최근 PTEN 이외의 지질 탈인산화 효소들에 대한 연구가 광범위하게 이루어지

고 있다[14].

2005년에 일본의 국립자연과학연구소 신경분화연구부문의 연구팀에 의해 *Ciona intestinalis* voltage-sensor-containing phosphatase (Ci-VSP)라고 명명되는 새로운 막 단백질이 발견되었다[17]. Ci-VSP는 voltage 의존성 phosphatidylinositol 인산 가수분해 효소로써[17,28], 아미노 말단부터 239번째 아미노산까지는 칼륨 선택형 전위차 유도 이온 채널의 voltage-sensing domain (VSD)와 비슷하다. 그리고 그 이후부터 카르복실 말단까지는 PTEN으로 알려져 있는 종양 억제 효소와 높은 상동성을 공유하는 phosphatase-like domain (PD)을 가지고 있다[7,17,20,28]. 이 Ci-VSP의 PD는 protein tyrosine phosphatase와 phosphoinositide (PI) phosphatase의 효소 활성에 필수적인 HCXXGXXR signature motif를 가지고 있다[28,10]. Ci-VSP는 VSD를 통해 채널 유도 전류의 변화를 유도하고 이 변화는 Ci-VSP의 phosphatase-like domain을 통한 PIP들의 탈인산화를 유도하게 된다[6,20,22,28]. 전위차 유도 이온 채널은 일반적으로 2개 부분으로 이루어져 있다[17]. 카르복실 말단 쪽(S5~S6)이 이온 투과성의 세공으로 작용하는 동안 아미노 말단 쪽(S1~S4)은 전압 감지기로 작용한다[17]. Ci-VSP의 막전위 영역은 지금까지 알려진 전위차 유도 이온 채널의 VSD에서 중요한 서열의 상동성을 보여 주고 있다[10,16,28]. 그러나 Ci-VSP는 이온 채널에 존재하는 세공 도메

#### \*Corresponding author

Tel : +82-43-840-3569, Fax : +82-43-840-3929  
E-mail : ykim@kku.ac.kr

인을 포함하지 않는다[17]. 4번째 막 통과 부분(S4)에서 주기적으로 간격을 둔 염기성 아미노산은 전위차 유도 이온 채널에 있는 막 전위에 변화를 감지하기 위해 필수적인 것으로 알려졌다[17]. 이런 염기성 아미노산의 패턴은 또한 Ci-VSP의 S4에서도 보존되어 있다[1,10,12,26].

Ci-VSP는 VSD를 통해서 전위차 유도 이온 채널의 변화를 일으켜서 phosphatase domain을 통한 phospholinositides의 탈인산화를 하게 된다[5,9,11,13,24,25]. 이것을 실험적으로 확인을 하는 방법으로 형광 현미경 방법을 이용하여 세포 내 PIP 들의 변화를 확인하였다[13]. Ci-VSP는 PTEN 기질인 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>뿐만 아니라 phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PI(4,5)P<sub>2</sub>)도 탈인산화 한다고 알려져 있다[9]. 결국 Ci-VSP는 PI (3,4,5)P<sub>3</sub>를 탈인산화하는 것으로 보아 PTEN과 같은 기질 특이성을 공유한다고 보고되었다[9]. 한편 현재까지 나온 실험 결과를 보면 Ci-VSP는 탈분극 상태에서 phosphoinositide가 5-phosphate에서 활성을 보여 PI(4,5)P<sub>2</sub>에서 phosphatidylinositol 4-phosphate (PI(4)P)로 변하거나 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>에서 phosphatidylinositol-3, 4-bisphosphate (PI(3,4)P<sub>2</sub>)로 변한다는 결과도 있다[5]. 이러한 Ci-VSP에 의한 PIP 탈인산화는 세포의 신호체계에 대한 변화를 준다. Ci-VSP는 PIP의 탈인산화로 인하여 만들어지는 PIP의 농도 변화에 따라 세포막에 존재하는 여러 단백질들에게 영향을 끼쳐 그 단백질의 활성에 변화를 주는 것으로 알려져 있다[17]. 다시 말해 PIP들에 대한 Ci-VSP의 탈인산화 활성은 세포막에 존재하는 PIP들의 조성 변화를 발생시켜 세포막에 존재하는 각종 단백질의 활성화를 유도하게 된다[17]. 그런데 이와 같은 세포 내의 신호 체계 변화에 대한 Ci-VSP의 영향은 어느 정도 알려져 있으나 어느 PIP의 농도 변화에 기인하는 지에 대한 연구는 Ci-VSP의 PIP들에 대한 기질 특이성이 명확하게 설명되고 있지는 않은 상황이다. 한편 앞서 언급한 바와 같이 Ci-VSP의 PD와 PTEN의 PD는 높은 서열 상동성을 보이는데, 특히 이 단백질들의 활성 자리에는 거의 동일한 sequence가 존재한다[28]. 그러나 Ci-VSP의 365번째 아미노산으로 glycine이 존재하는데 PTEN에는 glycine 대신에 alanine이 있다. 이러한 차이 때문에 PTEN과 다르게 Ci-VSP는 PI(4,5)P<sub>2</sub>를 dephosphorylation 하는 것으로 생각되고 있다[9]. 두 단백질의 서열 정렬을 해보면 VSD와 Ci-VSP의 PD 사이에 위치한 16-아미노산 영역은 서열의 상이함을 볼 수 있으며 두 단백질의 카복실 말단의 서열도 다르다는 점을 발견할 수 있다[28].

Ci-VSP의 human 유사 단백질인 것으로 예상되는 Transmembrane Phosphatase with TEEnsin homology (TPTE)가 spermatocyte에 많이 발현되어 있음이 알려져 있다[17,19,21]. 이런 human testis specific 유전자로써 TPTE and PTEN homologous inositol lipid phosphatase (TPIP)도 있다[4,23,27]. 이 둘은 PTEN과도 매우 유사한 부분을 가지고 있으며 Ci-VSP와도 단백질 서열상 매우 유사하다[28]. 이러한 tes-

tis specific 유전자 단백질인 TPTE와 TPIP도 phosphatase domain, voltage sensing domain을 가지고 있다. 그리고 TPTE와 TPIP가 testis specific 유전자로 알려져 있는 것과 유사하게 Ci-VSP는 Ciona의 정자 꼬리 세포막에 많이 발현되어 있으며, 이는 이 단백질들이 정자의 운동과 관련된 생리적인 기능을 하지 않나 생각되고 있다[17,28]. TPTE와 TPIP의 생리학적 기능으로 정자의 운동성은 VSD의 전압 감지 활성화와 관련되어 있다고 생각되고 있다[28]. 이러한 실험상의 증거들은 이 단백질들에 대한 생화학적인 연구가 향후 남성 불임에 대한 치료제 개발의 기반을 제공할 것으로 예상된다.

현재까지의 연구에 의하면 Ci-VSP의 phosphoinositides (PIs)에 대한 활성이 있음이 개괄적으로 알려져 있으나 그 구체적인 기질 특이성 연구는 부족한 상태이다. Ci-VSP는 최근에 새롭게 알려진 단백질로써 몇 가지의 중요한 사실들이 알려지기 시작하였으나, 기존 연구 방법의 제한성과 막 단백질로서의 접근 어려움에 기인한 몇 가지의 문제점 극복이 요구되고 있으며 그 해결책이 절실한 형편이다. 그 문제점을 정리해 보면, Ci-VSP는 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>와 PI(4,5)P<sub>2</sub>에 대해 활성이 있는 것으로 세포 내 실험을 통해 관찰되었으나[9] 기 보고된 활성 측정 조건에 몇 가지의 문제점을 내포하므로 정확한 기질 특이성(substrate specificity)을 관찰할 수 없다. 한편 일반적으로 Ci-VSP의 활성에 의한 PI(4,5)P<sub>2</sub>의 세포막에서 농도 변화가 이온 채널 등의 활성 변화에 미치는 영향에 대해 많이 알려져 있는 편이다. 그러므로 적정 조건하에서 Ci-VSP의 기질 특이성에 대한 연구가 PI phosphatase로써 다른 막 단백질에 대한 조절 기작을 밝히는데 기여할 것이다. 기 보고된 논문에는 Ci-VSP의 활성도를 보기 위하여 phosphatase-like domain만을 GST 융합된 형태로 발현시켜 PIP들을 기질로 하여 그 탈인산화 활성을 관찰하였다[9,17]. 그런데 이때 GST 융합된 Ci-VSP의 PD는 그 탈인산화 활성이 p-nitrophenyl phosphate (pNPP)를 기질로 이용한 경우에 전혀 활성이 없는 것으로 보고되었다[17]. 이는 GST의 강한 dimerization 경향 때문에 Ci-VSP 본연의 활성을 저해하여 그러한 결과를 얻은 것으로 판단된다. 그러므로 이 저해 효과를 극복하기 위한 새로운 접근 방법이 필요하다.

이 논문에서는 Ci-VSP의 기질 특이성과 그 활성화 기작에 대한 연구를 수행하기 위해 Ci-VSP에 존재하는 Phosphatase-like domain을 6x his-tagged 융합 재조합 단백질로 발현시킨 후 그 정제 과정을 최적화 하였고, SDS-PAGE를 통해 단백질의 순도를 확인하였고 pNPP를 기질로 이용하여 그 활성에 대해 동력학적으로 최적 조건을 탐색하였다. 이러한 연구 결과는 향후 그 PIP들에 대한 활성 확인과 세포막에서의 활성화 과정에 대한 기초적인 연구 자료로 활용할 수 있으며 현재 이 his-tagged Ci-VSP 단백질의 구조 결정 연구를 진행하고 있는 중이다.

## 재료 및 방법

### 실험 재료 및 유전자 준비

*E. coli*에서 Ci-VSP phosphatase-like domain의 재조합 단백질 발현을 위해 GST-Ci-VSP(248-576)으로부터[9] phosphatase-like domain(248-576)을 PCR로 증폭한 후(forward primer: 5'-TAACATATGATATCACAGAACGCG-3', reverse primer: 5'-AATCTCGAGAATGTCTTCAGCATC-3') *Nde* I, *Xho*I 제한 효소를 이용하여 pET21a(+) vector (Novagen)의 동일 제한 효소 부위에 삽입하여 Ci-VSP(248-576)-His DNA를 제작하였다. 이외의 실험 재료는 Sigma-Aldrich로부터 실험실 수준의 것을 사용하였다.

### Transformation

Micro tube에 Rosetta™ (DE3) singles competent cell (Novagen) 50  $\mu$ l와 Ci-VSP(248-576)-His DNA 1  $\mu$ l (100 ng)를 가지고 transformation 하였다. 이것을 50  $\mu$ g/ml ampicillin과 34  $\mu$ g/ml chloramphenicol을 항생제로 사용하여 선택하였다.

### IPTG induction

Culture tube에 LB media 5 ml를 넣고 final 농도가 50  $\mu$ g/ml ampicillin과 34  $\mu$ g/ml chloramphenicol을 넣어 주고 형질전환을 통해서 얻은 콜로니를 2~3개 정도를 접종하여 37°C shaking incubator에서 300 rpm으로 12~16시간 동안 배양하였다. 2X YT media 1 l에 앞의 seed culture를 넣어 주고 50  $\mu$ g/ml ampicillin과 34  $\mu$ g/ml chloramphenicol을 넣어 주었다. 37°C shaking incubator에서 300 rpm으로 2시간 30분간 배양하였다. 이후 UV-Vis spectrophotometer (Beckman Coulter)로 O.D. (600 nm)를 측정하여 O.D. 값이 0.2 이상 측정되면 50  $\mu$ g/ml ampicillin과 34  $\mu$ g/ml chloramphenicol을 한번 더 넣어 주고 37°C shaking incubator에서 300 rpm으로 1시간 배양하였다. 다시 O.D. 값을 측정하여 0.6~1.0 이 될 때까지 배양하였다. 이후 20분 동안 ice에 두어 안정화를 시킨 뒤에 micro tube에 500  $\mu$ l 정도 sampling 하고 0.4 mM의 Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), 50  $\mu$ g/ml ampicillin과 34  $\mu$ g/ml chloramphenicol을 추가로 넣어주고 shaking incubator에서 25°C, 300 rpm 조건으로 16시간 동안 배양하였다.

### Protein purification

배양액을 원심 분리하여 pellet을 따로 모은 후, 여기에 40 ml의 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.05 %  $\beta$ -mercaptoethanol (BME), protease inhibitor (benzamidine 1 mM, PMSF 1 mM, protein inhibitor cocktail 1  $\mu$ l/ml)로 구성된 lysis buffer를 넣어 잘 현탁시켰다. 이를 homogenizer를 이용하여 lysis 하였다. Lysis 된 현탁액을 원심분리기를 이용하여 16,000 $\times$  g 30 min으로 원심분리하였다.

원심분리된 상층액을 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) resin 1 ml이 담긴 튜브에 옮긴 뒤 약 1 시간 45 분간 섞어 주었다. 5,000 $\times$  g으로 10분 동안 원심분리를 하여 resin을 다운시키고 상층액을 버린 후 lysis buffer 12.5 ml씩 넣어 주고 5분 동안 4°C에서 rocking을 해준 뒤에 5,000 $\times$  g에서 다시 원심분리시켜 resin을 다운 시키는 방법으로 4회 washing을 행하였다. Resin을 micro tube로 옮겨 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM NaCl, 100 mM imidazole, 0.05 % BME로 구성된 elution buffer 1 ml를 넣어 주고 10분 동안 4°C에서 inverting을 해준 뒤에 1,000 $\times$  g에서 원심분리를 행하였다. 이 방식대로 3회 시행해 주고 모아둔 상층액을 조심스럽게 centrifugal filter units에 넣은 뒤에 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM NaCl, 5 mM DTT, 0.05% BME의 filter buffer 6 ml 넣고 5,000 $\times$  g에서 5~10분간 원심분리를 5번 시행하였다. 농축액을 얻은 다음 Bradford assay [3]로 단백질 농도를 정량한 후에 부피의 20% 정도로 글리세롤을 첨가한 뒤 -70°C에 보관하였다.

### SDS-PAGE

5 $\times$  SDS-PAGE loading buffer 4  $\mu$ l를 첨가한 모든 시료들을 95~100°C에서 5분간 처리한 후 8,000 $\times$  g에서 1분간 원심분리를 행하였다. 시료들을 약 10  $\mu$ l씩을 준비된 gel에 loading 하였다. 이후 150 V, 120 mA에서 100분간 전기영동을 행하였다. 전기 영동을 마치면 gel을 분리시켜 2시간 동안 Coomassie staining solution으로 염색을 한 후에 destaining solution으로 탈색하였다. 탈색이 다 되면 drying kit에서 건조시킨 후 단백질을 확인하였다.

### pNPP assay와 kinetic constant calculation

총 assay량을 20  $\mu$ l로 잡고 최종 농도가 1 $\times$  pNPP assay buffer (100 mM sodium acetate, 50 mM Bis-Tris, 50 mM Tris), 50 mM pNPP를 넣어 주고 준비된 단백질을 조건에 맞춰서 넣어 주었다. 조건은 상황에 맞게 온도와 반응 시간 또는 pH등을 바꿔서 측정하였다. 반응이 끝나면 0.25 N NaOH 80  $\mu$ l를 첨가하여서 반응을 중지시켰다. 그 후에 410 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

이렇게 측정된 흡광도에 흡광계수로 17,800 l/mol $\cdot$ cm을 이용하여 반응한 농도를 계산하였다. 이를 통해 pNPP에 대한 kinetic 상수 결정을 위해 참고 문헌 29번에 제시된 curve fitting 방법으로 계산하였다. 모든 실험은 독립적으로 3회 이상 반복적으로 이루어졌으며 각 실험에서 얻어진 결과는 평균 $\pm$  표준편차로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

### 단백질 발현과 정제

GST-Ci-VSP로부터 Ci-VSP(248-576) 단백을 증폭하고 pET21a(+) 벡터의 *Nde*I과 *Xho*I의 자리에 삽입한 뒤 그 서열을

확인하였다. 그 결과 Gene Bank AB183035.1의 서열 중 우리가 원했던 Ci-VSP PD의 서열과 일치함을 확인하였다. 이 결과에 따르면 우리가 클로닝한 Ci-VSP(248-576)-His의 단백질 분자량은 대략적으로 38 kDa에 상당하는 것으로 판단되었다. 이렇게 만들어진 DNA를 Rosetta™(DE3) singles competent cell에 transformation한 후에 그 발현 여부를 확인하였다. 0.4 mM IPTG에 의해 Ci-VSP(248-576)-His가 발현 유도됨을 확인하였다(Fig. 1). 이어서 이렇게 유도된 E. Coli를 가지고 Ni-NTA resin을 이용하여 단백질을 정제하였다. 이 과정에서 우리는 몇 가지의 Ci-VSP-His 정제 조건의 특이성을 몇 가지 발견하였다. 이를 서술하면 일반적인 his-tag 정제 조건에서는 salt 농도가 약 300 mM NaCl 정도를 요구하나 이 조건으로 Ci-VSP-His를 정제하면 대부분의 단백질이 침전되는 현상이 발견되어 이에 대한 보완책으로 단백질 정제 용액의 salt의 농도를 낮추어 진행하는 것이 필요하다는 점을 발견하였다. 그리고 Ci-VSP-His를 Ni-NTA resin에서 용출하는데 필요한 용액의 조성에서도 그 salt의 농도가 25 mM 정도가 적당하며 imidazole의 농도 또한 100 mM 정도가 적당하다는 점을 발견하였다. 이러한 실험을 통해 Ci-VSP-His의 Ni-NTA 정제 조건을 최적화하여 보고하게 되었다. 이러한 최적화된 정제의 조건을 통해 *E. coli* 세포 1 l의 배양을 통해 분자량 38 kDa정도에 해당하는 Ci-VSP-His를 순도 90% 이상(Fig. 1)으로 대략 1-2 mg 정도를 얻을 수 있게 되었다.

#### Steady state kinetics 조건 최적화

앞의 정제를 통해 얻은 Ci-VSP-His를 가지고 그 탈인산화 활성에 대한 확인과 pNPP에 대한 탈인산화 특성을 확인하고자 pNPP에 대한 kinetics의 steady state 조건 확립을 위한 최적화 실험을 수행하였다. 이를 위해 정제된 단백질을 이용하여 pNPP 반응의 온도, pH, 반응 시간, 단백질 양에 대한 그 경향성을 확인하였다(Fig. 2). 먼저 Ci-VSP-His의 pNPP에 대한 탈인산화의 반응 시간에 대한 경향성(Fig. 2A)을 5분 간격

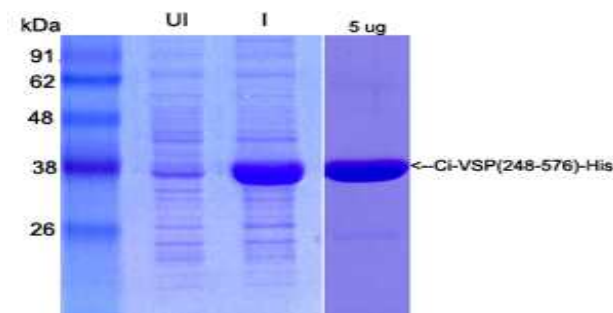


Fig. 1. The expression and purification of Ci-VSP(248-576)-His. A. The induction result of Ci-VSP(248-576)-His, UI: uninduced, I: induced, 5 ug: the purity of Ci-VSP(248-576)-His, 5  $\mu$ g loading. This figure is representative one of 3 independent experimental results.

으로 하여 50분까지 살펴보았는데, 약 30분까지는 그 반응이 steady state에 있음을 확인하였다. 한편 반응 온도의 경우에는 25°C, 30°C, 37°C, 42°C에서 측정된 결과 37°C에서 그 활성이 최대값을 가짐을 확인하였다(Fig. 2B). 그리고 반응 pH의 경우에는 4.5에서 8.5까지 0.5 간격으로 측정된 결과, 약 5.0 내지 5.5에서 최대값(Fig. 2C)을 나타냄을 확인하였다. 한편 pNPP 탈인산화에 대한 단백질 양의 경향성은 3  $\mu$ g까지 0.5  $\mu$ g 간격으로 측정된 결과 약 2  $\mu$ g까지 그 반응이 steady state에 있음을 확인하였다(Fig. 2D). 한편 실험 결과들의 표준 편차가 약 10% 이내인 점으로 보아 각 측정 결과들이 유의한 범위에서 얻어졌다고 판단하였다. 이러한 최적화 실험을 통해 얻어진 Ci-VSP-His 단백질의 pNPP 탈인산화에 대한 steady-state kinetic 측정 조건은 온도 37°C, pH 5.0 내지 5.5, 반응 시간 30분 이내, 반응 단백질 양 2.0  $\mu$ g 이내가 적합하다는 점을 알게 되었다.

#### Ci-VSP의 pNPP kinetics

앞서의 최적화 실험을 통해 얻게 된 pNPP 측정 조건으로 pNPP 농도에 따른 반응성을 확인하여 Ci-VSP-His의 pNPP의 반응에 대한 kinetic 상수들(Fig. 3)을 얻었다. 이를 통해 얻게 된 Ci-VSP-His의 pNPP의 탈인산화에 대한 반응성을 specific activity ( $\mu$ mol/min/mg)로 전환하여 그래프로 표시하였다(Fig. 4A). 이렇게 얻어진 그래프를 가지고 curve-fitting 방법으로 Ci-VSP-His의  $K_m$ 과  $V_{max}$  값을 계산하였다(Fig. 3B). 이렇게 얻어진  $K_m$  값은 대략 350  $\mu$ M 정도이며  $V_{max}$ 는 0.0607  $\mu$ mol/min/mg 정도인 것으로 확인하였다. 이를 통해 얻을 수 있는 Ci-VSP-His의  $k_{cat}$  값은 2.359  $\text{min}^{-1}$ 로 확인되었다. 이를 통해 Ci-VSP-His의 half-maximal pNPP 결합 농도가 대략 400  $\mu$ M이며 반응의 turn-over rate이 1분에 대해 대략 2.4 번 정도임을 확인할 수 있다. 이렇게 얻어진 값을 다른 탈인산화 효소와 비교하여 보면[29] 저자가 이전에 구조 연구를 수행하였던 Small CTD phosphatase 1 (SCP1)의  $K_m$  값에 비해 10배 정도 적은 값을 보였으며,  $k_{cat}$  값은 약 110배 정도 적게 나타났다. 이러한 결과는 pNPP에 대한 활성이 거의 없는 것으로 보고된 PTEN이나 GST-Ci-VSP(248-576)-His[17]의 경우에 비해 높은 값으로 나타났다고 볼 수 있다. 이러한 비교를 통해 판단하기에 위 측정 값은 적절한 수준의 활성을 보인 것으로 판단된다. 그리고 이러한 측정 값의 결과는 본 연구를 통해 정제된 Ci-VSP(248-576)-His의 구조적 integrity가 보존되고 있다고 볼 수 있다. 그러므로 본 연구에서 제작한 Ci-VSP(248-576)-His는 활성을 가진 단백질로써 향후 그 구조 연구와 기질 특이성 연구를 수행함이 가능하리라 예상한다.

## 결론

Ci-VSP는 신경전달 및 다양한 생명현상에 영향을 미치는

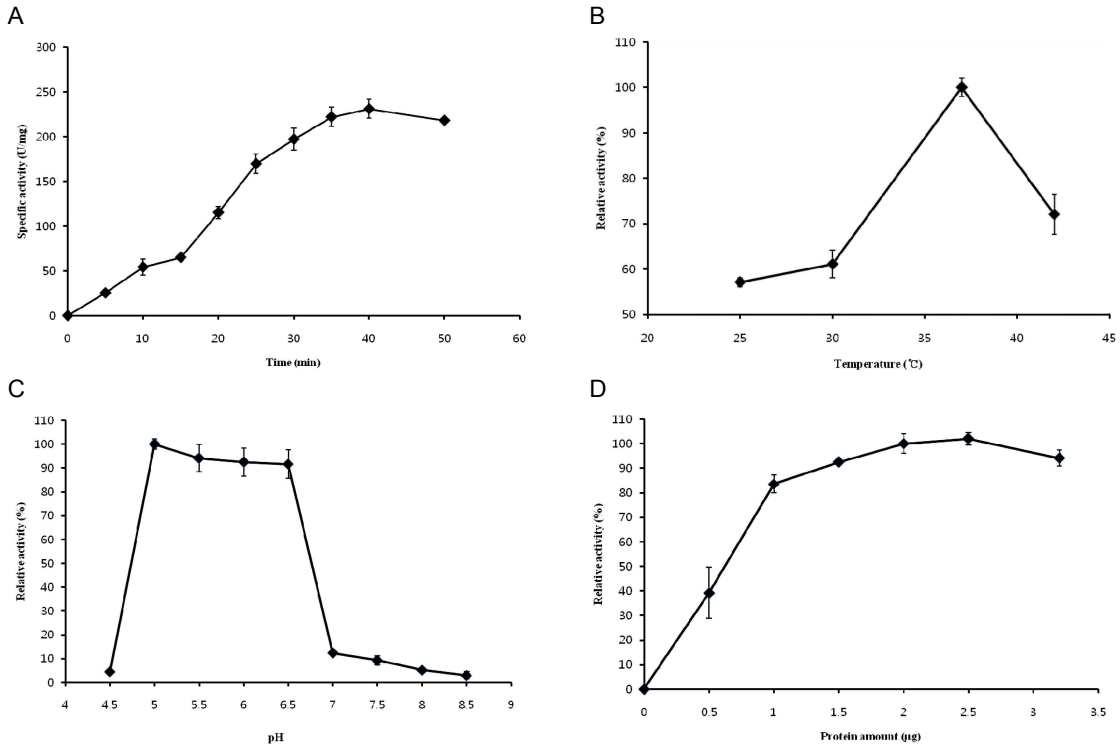


Fig. 2. The optimization of pNPP assay condition for the steady-state kinetics of purified Ci-VSP(248-576)-His. A; Time dependency with 1.82 µg of protein at 37°C and pH 5.5, U means µmol, B; Temperature dependency with 1.82 µg of protein at pH 5.5 for 10 min, The measured temperatures were 25°C, 30°C, 37°C and 42°C, C; pH dependency with 1.82 µg of protein at 37°C for 10 min, D; Protein concentration dependency of Ci-VSP-His of pNPP dephosphorylation at 37°C and pH 5.5 for 10 min. Values are mean±SD, n=3.

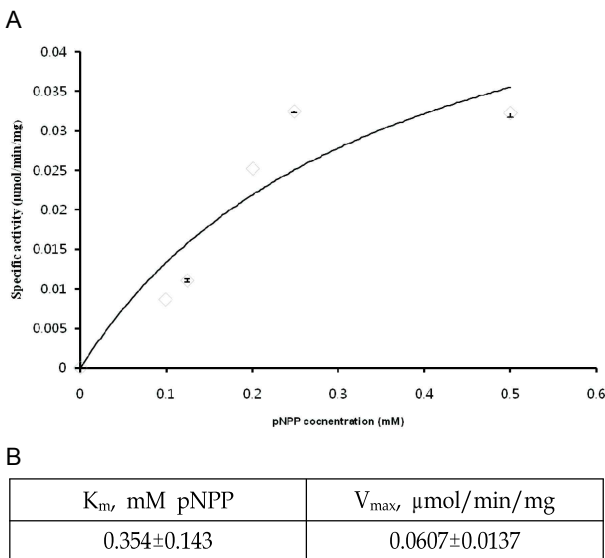


Fig. 3. The kinetic constant of purified Ci-VSP(248-576)-His. A; The curve-fitting graph of purified Ci-VSP (248-576)-His for the dephosphorylation of pNPP with 1.092 µg of protein at 37°C and pH 5.5 for 10 min. B; Apparent Michaelis-Menten constant values. Values are mean±SD, n=3.

전위차의 변화를 감지하여서 phosphoinositide의 인산기를 제거하는 탈인산화 효소 활성을 보여준다. 이러한 과정을 살펴보면 전위를 감지하는 구간인 S1-S4 부분으로 인하여 PD로 전달하는 메커니즘을 가짐으로써 Ci-VSP가 phosphatase로써 PIP들을 탈인산화하여 세포막에서의 PIP의 조성 변화가 일어나고 이로 인해 세포막에 있는 다른 단백질의 활성을 유도한다. Ci-VSP는 이런 과정에서 주로 PI(3,4,5)P<sub>3</sub>와 PI(4,5)P<sub>2</sub> 등을 탈인산화한다고 알려져 있다.

본 연구는 이러한 특성을 가지고 있는 단백질 구조 연구와 생화학적인 연구 수행을 위해 적합한 형태의 발현 시스템 구축과 이의 정제 과정에 대한 검토와 그 효소 활성에 대한 검토를 수행한 내용을 정리한 것이다. 앞서의 실험적 결과를 통해 얻을 수 있는 의미는 다음과 정리할 수 있으리라 본다. 앞서 연구된 논문[17]에는 Ci-VSP를 GST 버전으로 정제하여 pNPP에 대해 그 활성이 거의 없기에 그 kinetic constant가 보고되지 못하였으나 본 연구를 통해 Ci-VSP-His로 정제하여 pNPP에 대한 탈인산화 활성의  $K_m$  값이  $0.354 \pm 0.143$  mM 인 점과  $k_{cat}$  값이  $2.359 \pm 0.009751 \text{ min}^{-1}$  인 점을 보고하였다. 한편 Ci-VSP 유사 단백질인 PTEN의 경우에도 pNPP에 대한 kinetic constant가 보고된 바가 없기에 Ci-VSP 유사 단백질들 중에서 본

연구를 통해 Ci-VSP의 pNPP에 대한 kinetic 상수를 처음으로 보고한다는 의미를 가질 수 있다고 본다. 그리고 이러한 활성을 가진 단백질을 가지고 그 기질 특이성과 활성화 기작 연구와 같은 생화학적 연구의 기반을 마련하였다는 의미를 가지는 것으로 생각한다.

다음으로는 Ci-VSP의 phosphatase-like domain의 구조적 연구를 위한 첫 단계로서 His-tag 이 단백질 구조 연구에 영향을 미칠 수 있는 약점을 가지고 있기는 하지만, His-tag 버전의 단백질 발현과 정제에 대한 조건 확립에 그 의미를 부여할 수 있으리라 본다. 다시 말해 지금까지 보고된 GST-tag 버전의 경우에는 구조적 연구에 있어 그 한계가 있기에 이를 극복하는 His-tag 버전의 Ci-VSP phosphatase-like domain의 *E. coli* 발현의 조건과 그 정제 조건의 확립을 통해 약 90 % 이상의 순도의 구조적 연구를 위한 단백질 생산이 가능하게 되었다는 점이 가장 큰 의미가 되리라 본다. 현재 이 정제된 단백질을 가지고 X-ray crystallography를 통한 구조 연구를 진행 중에 있으며 일차적으로 Ci-VSP(248-576)-His의 결정을 얻어 그 구조 연구를 수행하여 4 Å 정도의 회절 패턴을 구하였으나 더 좋은 해상도의 회절 패턴을 구하고자 추가적인 연구를 진행하고 있는 중이다.

이런 Ci-VSP(248-576)-His에 대해서 실행한 단백질 발현 및 정량 실험과 활성 실험을 통해서 기본적으로 Ci-VSP의 정제와 활성 측정에 필요한 여러 조건들을 성립할 수 있었으며 앞으로 Ci-VSP 단백질에 대한 구조 연구 등과 같은 생화학적인 실험들에 대한 발판이 될 것으로 예상되며 더 나아가서는 human의 TPTE 단백질과의 상관성을 찾아내서 정자의 편모 운동을 더 활발하게 만들어 주는 약을 개발하여 불임문제를 해결할 수 있도록 연구가 이루어 질 것으로 기대된다.

### 감사의 글

이 논문은 2008년 정부(교육과학기술부) 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구의 결과(KRF-2008-331-E00031)이며 이에 감사드립니다.

### References

- Alabi, A. A., M. I. Bahamonde, H. J. Jung, J. I. Kim, and K. J. Swartz. 2007. Portability of paddle motif function and pharmacology in voltage sensors. *Nature* **450**, 370-375.
- Alonso, A., J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, and T. Mustelin. 2004. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **117**, 699-711.
- Bradford, M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248-254.
- Chen, H., C. Rossier, M. A. Morris, H. S. Scott, A. Gos, A. Bairoch, and S. E. Antonarakis. 1999. A testis-specific gene, TPTE, encodes a putative transmembrane tyrosine phosphatase and maps to the pericentromeric region of human chromosomes 21 and 13, and to chromosomes 15, 22, and Y. *Hum. Genet.* **105**, 399-409.
- Halaszovich, C. R., D. N. Schreiber, and D. Oliver. 2009. Ci-VSP is a depolarization-activated phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5'-phosphatase. *J. Biol. Chem.* **284**, 2106-21013.
- Hessa, T., S. H. White, and G. von Heijne. 2005. Membrane insertion of a potassium-channel voltage sensor. *Science* **307**, 1427.
- Horn, R. 2005. Electrifying phosphatases. *Sci. STKE* **2005**, pe50.
- Hossain, M. I., H. Iwasaki, Y. Okochi, M. Chahine, S. Higashijima, K. Nagayama, and Y. Okamura. 2008. Enzyme domain affects the movement of the voltage sensor in ascidian and zebrafish voltage-sensing phosphatases. *J. Biol. Chem.* **283**, 18248-18259.
- Iwasaki, H., Y. Murata, Y. Kim, M. I. Hossain, C. A. Worby, J. E. Dixon, T. McCormack, T. Sasaki, and Y. Okamura. 2008. A voltage-sensing phosphatase, Ci-VSP, which shares sequence identity with PTEN, dephosphorylates phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 7970-7975.
- Kohout, S. C., M. H. Ulbrich, S. C. Bell, and E. Y. Isacoff. 2008. Subunit organization and functional transitions in Ci-VSP. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 106-108.
- Kohout, S. C., S. C. Bell, L. Liu, Q. Xu, D. L. Jr Minor, and E. Y. Isacoff. 2010. Electrochemical coupling in the voltage-dependent phosphatase Ci-VSP. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 369-375.
- Lundby, A, H. Mutoh, D. Dimitrov, W. Akemann, and T. Knöpfel. 2008. Engineering of a genetically encodable fluorescent voltage sensor exploiting fast Ci-VSP voltage-sensing movements. *PLoS One* **3**, 2514.
- Lundby, A, W. Akemann, and T. Knöpfel. 2010. Biophysical characterization of the fluorescent protein voltage probe VSFP2.3 based on the voltage-sensing domain of Ci-VSP. *Eur. Biophys. J.* **39**, 1625-1635.
- Maehama, T., G. S. Taylor, and J. E. Dixon. PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. 2001. *Annu. Rev. Biochem* **70**, 247-279.
- Mourey, R. J. and J. E. Dixon. 1994. Protein tyrosine phosphatases: characterization of extracellular and intracellular domains. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 31-39.
- Murata, Y. and Y. Okamura. 2007. Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP2. *J. Physiol.* **583**, 875-889.
- Murata, Y., H. Iwasaki, M. Sasaki, K. Inaba, and Y. Okamura. 2005. Phosphoinositide phosphatase activity coupled to an intrinsic voltage sensor. *Nature* **435**, 1239-1243.
- Mutoh, H., A. Perron, D. Dimitrov, Y. Iwamoto, W. Akemann, D. M. Chudakov, and T. Knöpfel. 2009. Spectrally-resolved response properties of the three most

- advanced FRET based fluorescent protein voltage probes. *PLoS One* **4**, 4555.
19. Ogasawara, M., M. Sasaki, N. Nakazawa, A. Nishino, and Y. Okamura. 2011. Gene expression profile of Ci-VSP in juveniles and adult blood cells of ascidian. *Gene Expr. Patterns* **11**, 233-238.
  20. Ramsey, I. S., M. M. Moran, J. A. Chong, and D. E. Clapham. 2006. A voltage-gated proton-selective channel lacking the pore domain. *Nature* **440**, 1213-1216.
  21. Sakata, S., M. I. Hossain, and Y. Okamura. 2011. Coupling of the phosphatase activity of Ci-VSP to its voltage sensor activity over the entire range of voltage sensitivity. *J. Physiol.* Apr. 4 [Epub ahead of print].
  22. Sasaki, M., M. Takagi, and Y. Okamura. 2006. A voltage sensor domain protein is a voltage-gated proton channel. *Science* **312**, 589-592.
  23. Tapparel, C., A. Reymond, C. Girardet, L. Guillou, R. Lyle, C. Lamon, P. Hutter, and S. E. Antonarakis. 2003. The TPTE gene family: cellular expression, subcellular localization and alternative splicing. *Gene* **323**, 189-199.
  24. Villalba-Galea, C. A., F. Miceli, M. Tagliatela, and F. Bezanilla. 2009. Coupling between the voltage-sensing and phosphatase domains of Ci-VSP. *J. Gen. Physiol.* **134**, 5-14.
  25. Villalba-Galea, C. A., W. Sandtner, D. Dimitrov, H. Mutoh, T. Knöpfel, and F. Bezanilla. 2009. Charge movement of a voltage-sensitive fluorescent protein. *Biophys. J.* **96**, 19-21.
  26. Villalba-Galea, C. A., W. Sandtner, D. M. Starace, and F. Bezanilla. 2008. S4-based voltage sensors have three major conformations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 17600-17607.
  27. Walker, S. M., C. P. Downes, and N. R. Leslie. 2001. TPIP: a novel phosphoinositide 3-phosphatase. *Biochem. J.* **360**, 277-283.
  28. Worby, C. A. and J. E. Dixon. 2005. Phosphoinositide phosphatases: emerging roles as voltage sensors? *Mol. Interv.* **5**, 274-277.
  29. Zhang, Y., Y. Kim, N. Genoud, J. Gao, J. W. Kelly, S. L. Pfaff, G. N. Gill, J. E. Dixon, and J. P. Noel. 2006. Determinants for dephosphorylation of the RNA polymerase II C-terminal domain by Scp1. *Mol. Cell.* **24**, 759-770.

---

#### 초록 : 막 전위 감지 탈인산화 효소, Ci-VSP의 유사 탈인산화 효소 도메인의 발현과 정제

김성재 · 김혜민 · 최훈 · 김영준\*  
(건국대학교 응용생화학학과)

최근에 *Ciona intestinalis*에서 확인된 막 전위 감지 탈인산화 효소는 이온 채널과 유사한 막 통과 도메인과 유사 탈인산화 효소 도메인으로 이루어져 있다. 이 Ci-VSP는 그 막 통과 도메인에 의해 막 전위 변화를 감지하고 유사 탈인산화 효소에 의해 인산화된 이노시틸 인지질들에 대한 탈인산화 활성을 보이는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 6개의 히스티딘이 융합된 Ci-VSP의 유사 탈인산화 효소 도메인의 발현 시스템 구축을 추구하였다. 그래서 본 논문은 그 시스템의 구축과 발현 그리고 정제 조건 확립, 마지막으로 그 효소 동력학적인 활성을 pNPP에 대한 검토한 결과를 보고한다. 본 연구 결과에 따르면 Ci-VSP(248-576)-His 단백질 발현 및 정제시에 다른 단백질들의 정제 조건과 다르게 25 mM NaCl과 100 mM 정도의 이미다졸이 필요함을 확인하였다. 정제된 단백질을 가지고 탈인산화 효소의 대표적인 기질인 pNPP를 이용하여 그 동력학적인 상수 측정을 시도한 결과 정상 상태 동력학 측정 조건으로 온도 37°C, pH 5.0 내지 5.5, 반응 시간 30분 이내, 반응 단백질 양 2.0 µg 이내가 적합하다는 점을 알게 되었다. 이러한 확립된 조건을 토대로 pNPP에 대한 동력학적 상수를 측정한 결과  $K_m$  값은  $354 \pm 0.143 \mu\text{M}$ 이며  $V_{max}$ 는  $0.0607 \pm 0.0137 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ 이며  $k_{cat}$  값은  $2.359 \pm 0.009751 \text{ min}^{-1}$ 인 것으로 확인되었다. 이를 통해 본 연구는 Ci-VSP(248-576)-His의 순도 높은 정제 결과와 pNPP에 대한 높은 활성 보임을 제시하였다. 이러한 연구 결과를 통해 향후 Ci-VSP에 대한 구조적인 연구 등을 포함하는 다양한 생화학적인 연구가 수행되리라 본다.