

Subcellular Location of *Spodoptera* Cell-expressed Human HepG2-type Glucose Transport Protein

Chong-Kee Lee[†]

Department of Immunology, School of Medicine Catholic University of Daegu Daegu 705-718, Korea

The baculovirus/insect cell expression system is of great value for the large-scale production of normal and mutant mammalian passive glucose-transport proteins heterologously for structural and functional studies. In most mammalian cells that express HepG2, this transporter isoform is predominantly located at the cell surface. However, it had been reported that heterologous expression of other membrane proteins using the baculovirus system induced highly vacuolated cytoplasmic membranes. Therefore, how a cell responds to the synthesis of large amounts of a glycoprotein could be an interesting area for investigation. In order to examine the subcellular location of the human HepG2 transport proteins when expressed in insect cells, immunofluorescence studies were carried out. Insect cells were infected with the recombinant baculovirus AcNPVHIS-GT or with wild-type virus at a MOI of 5, or were not exposed to viral infection. A high level of fluorescence displayed in cells infected with the recombinant virus indicated that transporters are expressed abundantly and present on the surface of infected Sf21 cells. The evidence for the specificity of the immunostaining was strengthened by the negative results shown in the negative controls. Distribution of the transporter protein expressed in insect cells was further revealed by making a series of optical sections through an AcNPVHIS-GT-infected cell using a confocal microscope, which permits optical sectioning of cell sample. These sections displayed intense cytoplasmic immunofluorescence surrounding the region occupied by the enlarged nucleus, indicating that the expressed protein was present not only at the cell surface but also throughout the cytoplasmic membranous structures.

Key Words: Baculovirus, Glycoprotein, Confocal microscopy

포유동물 세포의 주요 대사 에너지원은 포도당이며, 이 당의 세포 내 영입은 passive glucose transport 단백질에 의해 이루어진다 (Wood and Trayhurn, 2003). 염기서열 비교분석 결과에 따르면 박테리아를 포함한 미생물들의 당 수송체와 포유동물 당 수송체 사이에는 염기서열의 상동성이 존재하며, 또한 이들은 커다란 당 수송체 집단 (sugar transporter family)을 이루고 있음을 보여주었다 [(Mueckler et al., 1985; Wheeler and Hinkle, 1985; James et al., 1989; Seatter and Gould, 1999; Joost and Thorens, 2001; Wood and Trayhurn, 2003)]. 이러한 사실들은 당 수송체들

이 공동의 조상으로부터 진화되었음을 암시하고 있어 이들 집단 중 어느 한 수송 단백질의 당 수송 기전이나, 삼차원적인 구조를 정확히 밝혀 낼 수 있다면 이는 당뇨병 예방 및 치료약물 개발에도 크게 이바지 할 수 있을 것이다.

단백질의 구조와 기능의 상관관계를 위한 유전공학적 연구와 3차원적 구조 분석을 위한 결정화 (crystallization) 와 같은 생물리학적 연구에는 비교적 많은 양의 단백질이 필요하다. 하지만 사람의 뇌, 적혈구 등에서의 포도당 수송을 담당하는 적혈구형 또는 HepG2형 포도당 수송체 (Bell et al., 1993; Vannucci et al., 1997)가 세포막 내에는 위와 같은 연구에 충분치 않은 양으로 존재하고 있으며, 또한 nucleoside 수송체와 같은 물질들로 오염 (Jarvis and Young, 1981)되기 쉬워 순수한 HepG2형 수송체만을 분리, 정제하기가 쉽지 않다. 이러한 연유로 당 수송체들을 유전공학적 방법을 이용하여 많은 양 생산하고자 하

*Received: 17 November, 2011 / Revised: 3 June, 2012
Accepted: 4 June, 2012

[†]Corresponding author: Chong-Kee Lee. Department of Immunology, School of Medicine Catholic University of Daegu 3056-6 Daemyung 4-dong, Namgu Daegu, 705-718, Korea.
Tel: +82-53-650-4477, Fax: +82-53-650-4477
e-mail: leeck@cu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

는 노력들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 그 예로서 *E. coli* (Sarkar et al., 1988; Thorens et al., 1988), *Xenopus* oocytes (Gould and Lienhard, 1989; Keller et al., 1989), mammalian cells (Asano et al., 1989; Gould et al., 1989; Harrison et al., 1990), transgenic mice (Liu et al., 1992) 등을 이용한 이성질적 발현 노력들이 있었다. 그러나 아쉽게도 막 단백질 (membrane proteins)들이 갖는 특성으로 인해 단지, 소량의 기능성 있는 단백질 발현만을 보여주었을 뿐이다. 이러한 어려움을 극복하기 위한 노력의 일환으로 최근 baculovirus와 곤충세포를 이용한 사람 당 수송체의 이성질적 발현 노력이 있었으며 (Cope et al., 1994; Lee, 2010) 고무적인 결과를 보여주었다. 그러나 단백질 발현 양과 그 활성에는 차이가 있었으며, 이 시스템의 효율적 활용을 위해서는 당 수송체와 같은 glycoprotein의 다량 생산 시 발현 패턴, 발현 수송체의 직접적 당 수송능력 입증 등과 같은 보다 많은 연구를 필요로 하고 있다.

HepG2를 발현하는 대부분의 포유동물 세포에서는 HepG2형 당 단백질 (glycoprotein)들은 세포 표면 (cell

surface)에서 현저히 발현된다 (Bell et al., 1993). 그러나 recombinant baculovirus를 이용한 곤충세포에서의 이성질적 당 단백질 발현은, 그 당 단백질의 높은 수준 생산으로 인해 폭넓은 세포질 공포형성 (cytoplasmic vacuolation)을 초래한다고 보고되었다 (Matsuura et al., 1987). 뿐만 아니라 사람 다약제 내성 수송체와 같은 당 단백질이 발현된 곤충세포에서는 정상 발현 부위가 아닌 곳에서의 발현을 보고하기도 하였다 (Germann et al., 2000). 그러므로 본 연구에서는 사람 포도당 수송체와 같은 glycoprotein의 곤충세포 발현 시 발현 단백질의 subcellular location을 면역형광법과 immunoblotting 방법을 이용하여 조사해 보았다.

간략히 방법을 소개하면, 사람 HepG2 당 수송체 유전자를 포함하고 있는 recombinant baculovirus인 AcNPVHIS-GT (Lee, 2010) 또는 야생주 바이러스를 이용하여 Sf21 세포를 5 MOI로 감염시킨 후 28°C에서 배양시킨 후 이틀 뒤에 세포를 수확하여 TC100 배양액에 (밀도 4×10^4 cells/ml) 다시 부양시켰다 (Summers and Smith, 1987). 그 후에 세포액 25 μ l를 multispot microscope slides에 옮겨

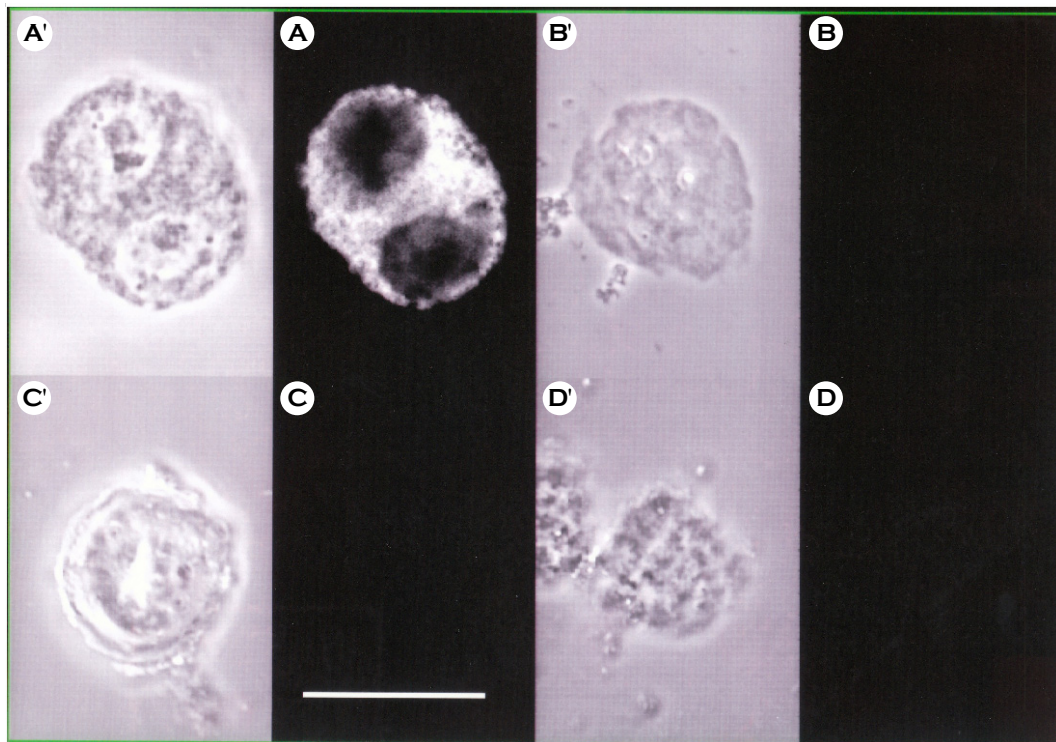


Fig. 1. Images of confocal and phage-contrast microscopy of non-infected and baculovirus-infected Sf21 cells. Two-days post-infection cells were collected, fixed and incubated first with affinity-purified anti-HepG2 transporter antibody (50 μ g/ml) and then a fluorescein conjugate of goat anti-rabbit IgG, before examination using a confocal laser scanning microscope. The panels show immunofluorescent images of cells infected with (A) recombinant AcNPVHIS-GT, (B) wild-type AcNPV (C) no virus or (D) cells infected with recombinant AcNPVHIS-GT and stained as for the other panels except with omission of the primary antibody. The corresponding phage-contrast images are shown in panels A' - D'. Scale bar 50 μ m.

Table 1. Assay of cytochalasin B binding to Sf21 cells with D-glucose

Sample (1 mg/ml)	Cytochalasin B Binding (B/F)		
	(-) D-glucose	(+) D-glucose	*Specific B/F
Sf21 cells infected with			
- no virus	0.051	0.050	0.001
- wild-type virus	0.053	0.052	0.001
- recombinant virus (AcNPVHIS-GT) [☆]	1.495	0.142	1.353

The assay for cytochalasin B binding activity of membrane samples was performed by equilibrium dialysis using 40 nM-[³H]cytochalasin B, in the absence (-) or presence (+) of 400 mM D-glucose, as described in Zoccoli et al. (1978). Cytochalasin B binding activity (*) was calculated as described previously (Gorga and Lienhard, 1981). B/F = [bound cytochalasin B] / [free cytochalasin B]. ☆: preparation from the Sf21 cells infected with AcNPVHIS-GT virus containing the entire human HepG2 gene.

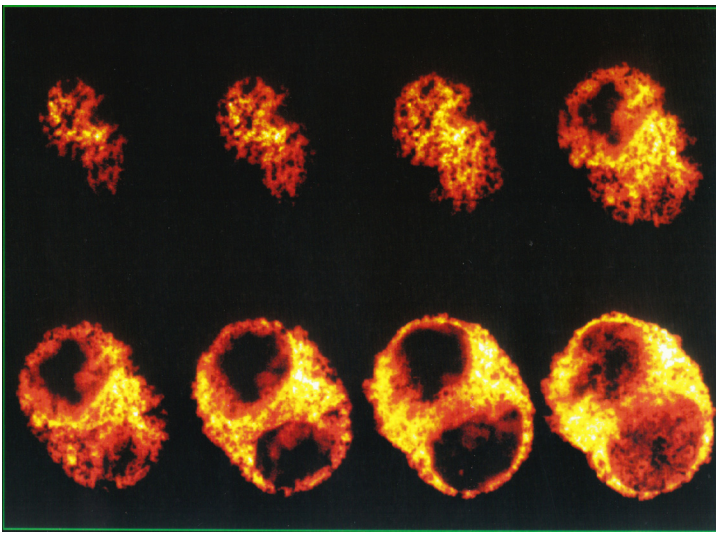


Fig. 2. Sequential display of confocal optical sections through AcNPVHIS-GT-infected Sf21 cells. Sf21 cells were infected with the recombinant virus. At 2 days after infection, the cells were collected, fixed and then fluorescently-labelled, as described before. A series of optical images were obtained at section planes spaced regularly (0.6 μm) through the fluorescently-labelled, AcNPVHIS-GT-infected cells, using a confocal laser scanning microscope. Some of these images were then recalled individually from an image file.

기류식 무균실험대 (laminar flow cabinet) 공기를 이용하여 건조시키고, -20℃ 아세톤으로 2분간 고정시킨 후 기류식 무균실험대에서 짧게 건조시켰다. 이 과정을 통해 세포고정을 시키고 아울러 세포 내부에 항체 접근을 허용케 하는 세포막 침투성을 높였다. Affinity-purified anti-HepG2 수송체 항체 C-terminus 특이 항체 25 μl (50 μg/ml)를 이용하여 37℃에서 1시간 staining 시켰다. 그 후 세포를 10분간 세 차례에 걸쳐 PBS 용액으로 magnetic stirrer를 이용하여 가볍게 움직이며 세척한 후, 80배 희석시킨 fluorescein 접합된 goat anti-rabbit IgG (Pierce, USA) 25 μl로 37℃에서 1시간 배양하여 immunolabelling 시켰다. 그 후 confocal laser scanning 현미경을 사용하여 조사하였다. 결과는 Fig. 1에서 보듯이 recombinant AcNPVHIS-GT로 감염시킨 세포에서만 밝은 형광이 나타났고 (panel A) 야생 주 AcNPV 바이러스로 감염시킨 세포에서는 (panel B) 형광 염색이 측정되지 않았다. 또한 negative

대조군인 감염시키지 않은 세포에서는 형광이 관찰되지 않았다 (panel C). Immunostaining의 특이성은 recombinant 바이러스 (AcNPVHIS-GT)로 감염시킨 세포의 다른 시료에서 1차 항체를 의도적으로 제외하고 염색시켜 봄으로써 입증하였다 (panel D). 또한 panel D'에서는 recombinant 바이러스의 성공적 감염을 입증하는 좋은 단서인 viral occlusion body 즉 Polyhedrin의 발현이 관찰되었다 (panel D'). 이러한 관찰 결과로 미루어 볼 때 곤충세포가 사람 당 수송체를 사람세포처럼 합성하고 처리하여, 단백질을 올바르게 plasma membrane에 이송, 삽입하고 있음을 나타내고 있다. 또한 강력 억제제인 cytochalasin B binding assay (Gorga and Lienhard, 1981)를 통해 발현 단백질의 생물학적 활성도 검증되었다 (Table 1).

공 초점 현미경 (Confocal microscope)은 세포나 두꺼운 조직을 광학적으로 절단할 수 있는 능력을 가지는데 Fig. 2는 이 특성을 활용하여 곤충세포에 발현된 사람 당 수

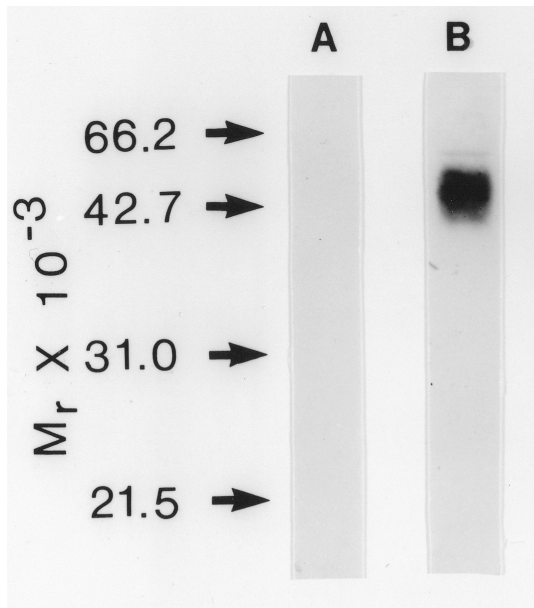


Fig. 3. Immunoblotting analysis of HepG2 expression in soluble and membranous fractions of the Sf21 cells infected with a recombinant baculovirus. Insect cells were grown as described before (Summers and Smith, 1987). Sf21 cells were infected with the recombinant virus AcNPVHIS-GT. At 2 days after infection, they were harvested, sonicated and then separated into soluble (A) and membranous (B) fractions. Samples derived from equal numbers of cells (2×10^6 cells) were then electrophoresed on a 10% SDS/polyacrylamide gel and subjected to Western blotting using affinity-purified antibodies against the C-terminus of HepG2, and alkaline phosphatase conjugated goat anti-rabbit IgG. The positions of proteins used as M_r markers are indicated.

총 단백질의 subcellular 분포를 보여주고 있다. Sf 세포를 $0.6 \mu\text{m}$ 두께로 sectioning한 절단면에서는 발현된 HepG2 수용체가 실제 plasma membrane에 발현되고 있음을 나타내는 cell surface에서의 많은 형광이 관찰되었다. 뿐만 아니라 바이러스 감염으로 인해 커진 세포의 핵 (nucleus) 이 차지하는 부분을 제외한 세포질 (cytoplasm) 전반에서도 강한 형광 표지가 탐지되었다. 그러므로 이것은 사람 당 수송체가 세포 표면뿐만 아니라 세포질 전반에 걸친 세포소기관 (organelles)에도 많은 양 발현되고 있음을 보여주고 있다. Fig. 3은 세포질 전반에 걸쳐 보이는 형광, 즉 발현 단백질들이 cytosol이 아닌 세포질의 막 구조물 (membranous structures)에만 존재한다는 사실을 확실히 보여주고 있다. 따라서 곤충세포에서의 과도한 단백질 합성은 대부분 포유동물들 세포에서는 세포 표면에서 발현되는 HepG2형 당 단백을 세포막뿐만 아니라 세포소기관 막 구조물 전반에 걸쳐 발현을 초래한 것으로 보인다. 그러나 본 연구에서는 당 단백질의 다량 발현으로 인

해 초래될 수도 있다는 폭넓은 세포질 vacuolation 현상 (Matsuura et al., 1987)은 관찰되지 않았다.

Baculovirus와 곤충세포를 이용한 발현 체계에서의 유전자 발현율은 다른 이성질적 발현법에 비해 높은 것으로 알려지고 있다. 비록 일부 non-membrane 단백질에서 polyhedrin에 맞는 총 세포 단백질의 35~50%에 해당하는 수위까지도 발현된 적이 있다고 보고된 바 있으나 (O'Reilly et al., 1993), 외부 유전자가 실제 얼마나 효율적으로 baculovirus 시스템에서 발현될 것인지를 일반화하는 것은 어려운 일이다. 왜냐하면 baculovirus를 이용한 발현 시스템에서 외부 유전자의 발현 수위를 결정하는 요소들이 아직까지도 완전히 알려져 있지 않기 때문이다 (O'Reilly et al., 1993). 따라서 실제 발현 단백질의 합성 수준은 오로지 실험관찰을 통해서만 결정되어질 수 있다. 그렇지만 대부분의 경우에는 잘 구축된 세포주들에서 발현율은 vector 구축 시의 세부사항과 외부 유전자 발현 단백질의 고유 특성에 큰 영향을 받게 되며 또한 숙주세포가 발현 단백질을 얼마나 잘 수용할 수 있는가 하는 점 등에 깊은 영향을 받게 된다 (O'Reilly et al., 1993). 그러므로 어떤 세포가 높은 수위의 glycoprotein 합성에 어떻게 반응할 것인지는 좀 더 많은 연구를 필요로 하고 있다.

감사의 글

본 연구는 대구가톨릭대학교 2011년도 교내연구비 (20115007) 지원 사업에 의해 부분 지원되었음에 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Asano T, Shibasaki Y, Ohno S, Taira H, Lin JL, Kasuga M, Kanazawa Y, Akanuma Y, Takaku F, Oka Y. Rabbit brain glucose transporter responds to insulin when expressed in insulin-sensitive Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1989. 264: 3416-3420.
- Bell GI, Burant CF, Takeda J, Gould GW. Structure and function of mammalian facilitative sugar transporters. *J Biol Chem.* 1993. 268: 19161-19164.
- Cope DL, Holman GD, Baldwin SA, Wolstenholme AJ. Domain assembly of the GLUT1 glucose transporter. *Biochem J.* 1994. 300: 291-294.
- Germann UA, Willingham MC, Pastan I, Gottesman MM. Expression of the human multidrug transporter in insect cells

- by a recombinant baculovirus. *Biochemistry* 2000. 29: 2295-2303
- Gorga FR, Lienhard GE. Equilibria and kinetics of ligand binding to the human erythrocyte glucose transporter. Evidence for an alternating conformation model for transport. *Biochemistry* 1981. 20: 5108-5113.
- Gould GW, Derechin V, James DE, Tordjiman K., Ahern S, Gibbs EM, Lienhard GE, Mueckler M. Insulin-stimulated translocation of the HepG2/erythrocyte-type glucose transporter expressed in 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 1989. 264: 2180-2184.
- Gould GW, Lienhard GE. Expression of a functional glucose transporter in *Xenopus* oocytes. *Biochemistry* 1989. 28: 9447-9452.
- Harrison SA, Buxton JM, Clancy BM, Czech MP. Insulin regulation of hexose transport in mouse 3T3-L1 cells expressing the human HepG2 glucose transporter. *J Biol Chem.* 1990. 265: 20106-20116.
- James DE, Strobe M, Mueckler M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature (London)*. 1989. 338: 83-87.
- Jarvis SM, Young JD. Extraction and partial purification of the nucleoside-transport system from human erythrocytes based on the assay of nitrobenzylthioinosine-binding activity. *Biochem J.* 1981. 194: 331-339.
- Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol.* 2001. 18: 247-256.
- Keller K, Strube M, Mueckler M. Functional expression of the human HepG2 and rat adipocyte glucose transporters in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 1989. 32: 18884-18889.
- Lee CK. Expression of polyhistidine-containing fusion human HepG2 type glucose transport protein in *Spodoptera* cells and its purification using a metal affinity chromatography. *J Exp Biomed Sci.* 2010. 16: 201-206.
- Liu ML, Olson AL, Moye-Rowley WS, Buse JB, Bell GI, Pessin JE. Expression and regulation of the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter gene in transgenic mice. *J Biol Chem.* 1992. 267: 11673-11676.
- Matsuura Y, Possee RD, Overton HA, Bishop DHL. Baculovirus expression vectors: the requirement for high level expression of proteins. *J Gen Virol.* 1987. 68: 1233-1250.
- Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, Allard WJ, Lienhard GE, Lodish HF. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 1985. 229: 941-945.
- O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. 1993. Freeman and Company
- Sarker HK, Thorens B, Lodish HF, Kaback HR. Expression of the human erythrocyte glucose transporter in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988. 85: 5463-5467.
- Seatter MJ, Gould GW. The mammalian facilitative glucose transporter (GLUT) family. *Pharm Biotechnol.* 1999. 12: 201-228.
- Summers MD, Smith GE. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Tex Agric Exp Stn Bull.* 1987. No. 1555.
- Thorens B, Sarker HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and β -pancreatic islet cells. *Cell* 1988. 55: 281-290.
- Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia.* 1997. 21: 2-21.
- Wheeler TJ, Hinkle PC. The glucose transporter of mammalian cells. *Annu Rev Physiol.* 1985. 47: 503-517.
- Wood IS, Trayhurn P. Glucose transporters (GLUT and SGLT): Expanded families of sugar transport proteins. *Br J Nutr.* 2003. 89: 3-9.
- Zoccoli MA, Baldwin SA, Lienhard GE. The monosaccharide transport system of the human erythrocyte. Solubilization and characterization on the basis of cytochalasin B binding. *J Biol Chem.* 1978. 253: 6923-6930.