

S5

소포체 분자샤페론 ERp29의 기능연구 (Functional study of endoplasmic reticulum chaperone ERp29)

박수정, 유관희, 권오유*

충남대학교 자연대학 생물학과
충남대학교 의과대학 해부학교실

Abstract

ERp29는 ER chaperone의 한 종류이지만 아직까지 세포내에서 그 기능은 명확하지 않다. 배양 갑상선세포 (FRTL-5)에서 ERp29의 발현은 TSH (thyroid stimulating hormone) 의존적으로 조절되며, ERp29가 과발현된 세포에서는 ERp29-ER chaperone가 긴밀한 관계를 유지하여 분비단백질인 Thyroglobulin의 분비량이 약 30% 증가되었다.

서 론

세포의 전체 단백질에서 80%를 차지하는 분비단백질 (secretory protein)과 막단백질 (membrane protein)은 소포체 (ER ; Endoplasmic Reticulum)에서 전사후수식 과정 (post-translational modification) 통하여 생리적 활성을 가진 분비단백질로 생합성되게 혈관으로 분비되어 목적하는 기관으로 간다. 소포체내에는 단백질의 생합성/분비/분해를 조절하는 ER Quality Control 이라는 조절기능이 존재하며 이때에 참가하는 단백질군을 ER chaperone이라 한다, 지금까지 잘 알려진 것은 Bip, GRP94, PDI, ERp72, calnexin등이 있다. ER chaperone은, stress protein; heat shock protein 의 한 종류, 소포체내 존재하면서 단백질의 folding, assembly, degradation을 돕는다^{5,7,8,9}.

ERp29는 ER chaperone의 한 종류로 보고되었으며 cDNA의 크기는 약 1.1 Kbp이며 800bp의 ORF를 갖는다¹. Genomic DNA에서는 3개의 exon과 2개의 intron으

로 구성되고 총 길이는 약 9.3 kbp이며⁶, 260개의 아미노산을 인코딩하고 있는 단백질 ERp29의 분자량은 약 29 kDa 이다. ERp29 단백질은 소포체에 존재하는 단백질로서 N-말단 부근에 signal peptide를 가지며, C-말단부근에 ER retention의 전형적인 motif, KEEL가 있다.

ERp29의 세포내기능을 연구하기 위하여 ERp29 과발현 세포주를 만들어 소포체 내에서 ERp29가 분비단백질의 folding 및 secretion에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험에 사용된 고순도의 정제된 bovine TSH는 Sigma사 제품을 사용하였다. [α -³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol), [³⁵S]-methionine (1000 Ci/mmol)는 DuPont-New England Nuclear사로부터 구매하여 사용하였다. 열처리를 시행한 우혈청은 GIBCO-BRL사에서 구매하였으며, 그 외 기술하지 않은 모든 재료들은 Sigma사 제품을 사용하여 실험하였다.

2. 세포배양

Rat의 갑상선세포 (FRTL-5 cell, American Type Culture Collection, CRL #8305, Rockville)를 5% 우혈청과 4종류의 호르몬 (10^{-9} M TSH, 5 μ g/ml transferrin, 1 μ g/ml insulin, 10 nM hydrocortisone; 이하 4H라함)을 포함하고 있는 Coon's modified 배지 내에서 배양하였다. 배양기의 조건은 37°C, 5%이산화탄소, 그리고 충분히 습한 조건이다. 세포의 TSH에 의한 분열시간은 36 ± 6 시간이며, TSH가 없을 때는 분열하지 않는다. 실험에 사용된 세포는 5th~20th의 diploid이다. 신선한 배지를 2~3일 간격으로 교체하며 배양하였다.

3. 단백질 표지

Confluency가 약 95%인 FRTL-5 세포를 TSH가 함유되지 않은 3H 배지(-TSH)

에서 30분간 배양한 후, 80 uCi/ml 의 [³⁵S]-methionine를 함유한 4H 배지로 바꿔서 30분간 배양하였다. 여러 약품을 처리한 후에 찬 PBS으로 3번 세척하여 배지성분을 제거하고 1 ml의 lysis buffer (0.15 M Tris-HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, protease inhibitors로 lysis 하였다. 얼음에서 30분간 방치 후 10,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 회수하여 immunoprecipitation 에 이용하였다.

4. Western blot analysis

Western분석은 ERp29 항체를 이용하여 실시하였다. 충분히 자란 FRTL-5세포들을 여러 시약을 처리한 후 세포들은 긁어모은 후 SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 6%(w/v) SDS, 30% glycerol, 125 mM DTT, 0.03% (w/v) bromophenol blue)를 이용하여 용해시킨 뒤 biotinylated molecular weight standard marker와 함께 10% SDS-PAGE를 실시하였다. 단백질은 electrotransfer를 이용하여 2시간동안 nitrocellulose membrane으로 이동시켰다. 다시 membrane을 blocking buffer (1 x TBS, 0.1% Tween-20 with blocking reagent 5% milk) 속 에서 2시간 담근 후에 일차항체를 처리하고 4°C에서 18시간 반응시켰다. Blot을 1시간동안 HRP-linked anti-rabbit 이차항체를 재처리하고 ECL(Amersham)을 이용하여 발색시키고 X-ray film에 감광시켰다.

5. Immunoprecipitation

세포 충실도 80-90%를 보이는 FRTL-5 세포를 methionine free medium으로 교환하고 이후 [³⁵S]-methionine (1000 Ci/mmol)으로 표지한다. 차가운 RIPA buffer로 세포를 용해시키고 이를 얻어 원침 (4°C, 3,000 rpm, 15 min)하여 상청액 15 ml와 rabbit IgG-agarose conjugate과 반응시킨 후 다시 원침 (1,500 rpm, 4°C, 5 min)한다. 1 ml의 extract를 항체와 반응시켜 immunoprecipitate를 얻고 SDS-PAGE 한다.

결과 및 고찰

1. Thyroglobulin의 분비

FRTL-5의 주요한 분비단백질인 thyroglobulin (Tg)분비를 확인해 보기 위하여 신생단백질을 [³⁵S]-methionine로 표지 한 후 일정 시간 pulse chase하여 Tg의 분비를 확인하였다. Tg는 세포내에서 생성하여 분비될 때까지 약 1시간의 시간이 소요된다^{2,3,10}. 소포체에서 골지체로 이동하며 monomer가 homodimer로 되어 세포 외부로 분비된다. 또한 Tg는 post-translational modification이 매우 많이 일어나는 단백질이다. 일반적인 세포를 배양하면서 tunicamycin (N-linked glycosylation inhibitor)을 처리하면 Tg의 post-translational modification이 일어나지 못하여 소포체내에 쌓여 있게 된다. 그 배지를 SDS-PAGE 하면 세포외로 분비되는 Tg의 양이 매우 감소한다. 이에 정상세포와 ERp29를 과발현한 세포를 배양한 뒤 약 90%의 confluency에서 TSH가 배제된 배지로 옮겨서 starvation 하였다. 30분 뒤에 [³⁵S]-methionine이 함유된 4H 배지를 이용하여 30분간 단백질을 표지하였다. 그리고 방사성동위원소가 함유된 배지를 제거하고 다시 4H 배지로 교환 후, 시간대 별로 chase하여 배지를 SDS-PAGE 하여 분비된 Tg를 보았다. ERp29를 과발현한 세포에서 일반세포에 비하여 비교적 빠른 시간대부터 Tg의 분비를 관찰할 수 있었다. 일반 FRTL-5 세포에서는 chase 후 2시간부터 세포외로 배출되는 Tg를 식별할 수 있었으나 ERp29를 과발현한 세포에서는 chase 후 1시간부터 Tg의 분비를 관찰할 수 있었다 (Fig.1). ERp29가 주로 분비조직에서 발현하고 분비단백질의 분비에 관여한다는 사실을 알 수 있었다.

2. ERp29 과잉발현에 의한 분자샤페론들의 발현증가

ERp29가 과발현한 세포에서 ERp29가 Tg를 더 빠르고 많이 생성하는데 착안하여 일반세포와 ERp29 과잉발현세포에서 다른 ER chaperone의 발현량의 변화가 있는지를 알기 위하여 일반세포와 ERp29 과발현세포에서 다른 ER chaperone의 발현을 Western blotting하였다. ER chaperone들은 스트레스를 받지 않은 상태에서도

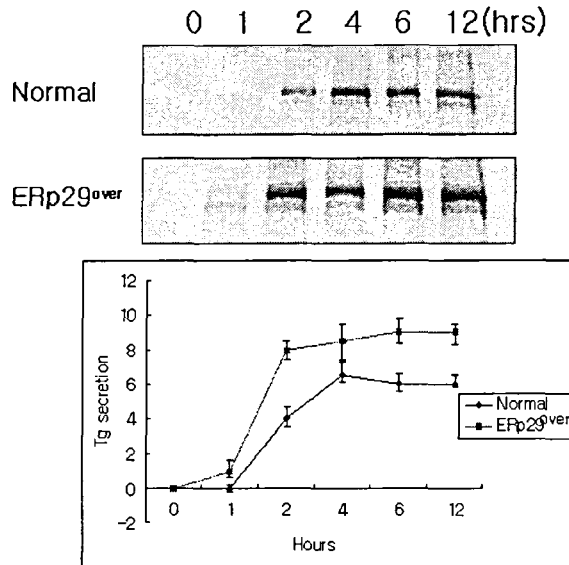


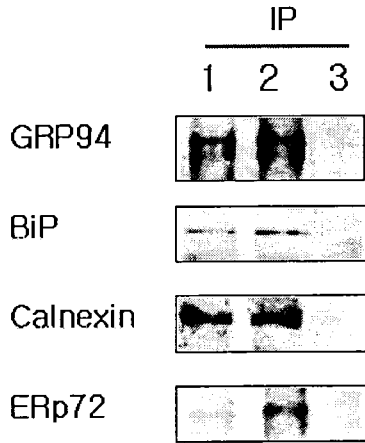
Fig. 1. Secretion of Thyroglobulin (Tg) from FRTL-5 cells of normal and ERp29 overexpressed cells.

Confluent FRTL-5 cells were incubated in 3H (without TSH) medium for 30 min. and labelled with [³⁵S]-methionine and chased for 0 to 12 hours. The medium was subjected to SDS-PAGE.

적정량의 발현은 있다. 그러나 ERp29를 과발현한 세포에서는 스트레스를 받지 않은 상태에서도 정상세포에 비하여 많이 발현하는 것을 알 수 있었다. 실험결과 ERp29가 과잉발현 된 세포에서 GRP94, Calnexin, ERp72, Bip등의 ER chaperone의 발현이 증가한 양상을 보였다. Bip/GRP78 과 ERp72의 경우는 다른 ER chaperone에 비하여 매우 많은 발현을 보였다. 그러나 PDI의 경우는 유의성이 없게 나타났다. 이 사실은 ERp29가 Tg의 분비와 생성을 촉진하는 기능 이외에 molecular chaperone으로서 다른 chaperone의 작용에도 직접적이거나 간접적으로 작용을 함을 의미한다.

3. ERp29 와 분자샤페론간의 상호작용

위의 실험결과를 볼 때 ERp29가 과발현된 세포에서 다른 ER chaperone들의 발



IP: ERp29 1. Normal 2. ERp29^{over} 3. serum

Fig. 2. Interaction of ERp29 and molecular chaperones.

Confluent normal FRTL-5 cells and ERp29 transfected cells were harvested and lysed by immunoprecipitation buffer, and sonicated. 1000 μ g Supernatant of each samples was immunoprecipitated using anti-ERp29-antibody. Immunoprecipitants was used for Western blotting using specific antibodies.

현양이 증가함을 보고 ERp29와 다른 ER chaperone들과의 세포내 상호작용을 immunoprecipitation을 통하여 실험하였다. 이전 보고된 문헌에 의하면 ERp29와 Bip/GRP78의 상호작용이 보고되었을 뿐이었다. 그러나 본 실험에서는 ERp29는 Bip/GRP78를 포함한 다른 ER chaperone들과 상호작용을 함을 알 수 있었고, 특히 ERp29를 과발현한 세포에서는 더 많은 상호작용을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2). 주로 molecular chaperone들이 세포내에서 단백질 folding을 도우면서 molecular chaperone간의 상호작용이 있다는 사실에 미루어, ERp29가 ER chaperone으로서 소포체내에서 기능을 하는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Demmer, J., C. M. Zhou, M. J. Hubbard, 1997. Molecular cloning of ERp29, a

- novel and widely expressed resident of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* 402 : 145-150.
2. Deshpande, V., S. G. Venkatesh, 1999. Thyroglobulin, the prothyroid hormone: chemistry, synthesis and degradation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1430: 157-178.
 3. Di Jeso, B., S. Formisano, L. Ulianich, 1997. Perturbation of cellular calcium delays the secretion and alters the glycosylation of thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 : 133-136.
 4. Kwon, O. Y., S. Park, W. Lee, K. H. You, H. Kim, 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.
 5. Plemper, R. K., D. H. Wolf, 1999. Retrograde protein translocation: ERADication of secretory proteins in health and disease. *Trends Biochem. Sci.* 24 : 266-270.
 6. Sargsyan, E., M. Baryshev, M. Backlund, A. Sharipo, S. Mkrtchian, 2002. Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding a putative endoplasmic reticulum chaperone, ERp29. *Gene* 285 : 127-139.
 7. Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman, P. Walter, 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 10 : 249-258.
 8. Brodsky, J. L., E. D. Werner, M. E. Dubas, J. L. Goeckeler, K. B. Kruse, A. A. McCracken, 1999. The requirement for molecular chaperones during endoplasmic reticulum-associated protein degradation demonstrates that protein export and import are mechanistically distinct. *J. Biol. Chem.* 74: 3453-3460.
 9. Friedlander, R., E. Jarosch, J. Urban, C. Volkwein, T. Sommer, 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat. Cell. Biol.* 2 : 379-384.
 10. Kim, P. S., O. Kwon, P. Arvan. 1996. An endoplasmic reticulum storage disease causing congenital goiter with hypothyroidism. *J. Cell. Biol.* 133 : 517-527.