

인체 적혈구막 Band 4.5 단백질의 기능적인 분자구조

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

하 종 식

= Abstract =

Functional Molecular Structure of Band 4.5 Protein of Human Erythrocyte Membrane

Jong-Sik Hah

Department of physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

The functional molecular weight of band 4.5 polypeptide was measured by applying the classical target theory to radiation inactivation data of the cytochalasin B binding. Band 4.5 polypeptides purified from human erythrocyte membranes were irradiated at -45 to -50°C with an increasing dose of 1.5 MeV electron beam, and after thawing, cytochalasin B binding activities were assayed. Each activity measured was reduced as a simple exponential function of radiation dose. D_{37} dose appeared to be 6.7 mega rads, from which the target size (radiation sensitive mass) of band 4.5 polypeptide was calculated to be 95,500 daltons. This result with other informations available in literature suggests that band 4.5 polypeptide may exist as a dimer in human erythrocytes.

서 론

포도당운반체는 모든 동물세포의 형질막을 통하여 D-glucose의 이동을 촉진하는 내막단백질(integral membrane protein)로 알려져 있다(Wheeler and Hinkle, 1985). Kasahara 및 Hinkle(1977)은 최초로 Tx-100를 사용하여 인체 적혈구막으로부터 포도당운반체를 부분적으로 분리하여 포도당 이동능력과 포도당 이동의 가역적인 억제물질인 cytochalasin B의 결합능력을 측정하여 이를 확인하였고, 이들과 Baldwin 등(1982)은 포도당운반체가 SDS gel electrophoresis에서 분자량이 약 55,000 daltons에 해당되는 단백질이며, glucosamine, galactose 및 sialic acid 등의 탄수화물을 약 15% (w/w) 포함하고 있다고 보고하였다(Sogin and Hinkle, 1978; Baldwin et al., 1982).

Carter-Su 등(1982)과 Shanahan(1982, 1983)은 인체 적혈구막의 포도당운반체가 자외선조사(ultraviolet

photoirradiation)에 의해서 ^3H -cytochalasin B와 photoaffinity labeling이 일어남을 발견하였으며, ^3H cytochalain B는 분차량이 45,000~70,000 daltons 범위에 속하는 한개 혹은 그 이상의 단백질과 공유결합을 할 뿐 아니라 이 결합이 D-glucose에 의해서 억제됨을 관찰하고 포도당운반체의 분자량은 45,000~70,000 daltons에 해당된다고 보고하였다.

Gorga 등(1979) 및 Lienhard 등(1984)은 포도당운반체의 분자량이 45,000~70,000 daltons의 광범위한 분포를 보이는 것은 하나의 모단백질(parent polypeptide)에 glycosylation이 일어나는 정도가 다르기 때문에 이질적인 분자구조를 나타내는 것이며 endoglycosidase F를 처리하면 SDS gel electrophoresis에서 분자량이 약 46,000 daltons이 되는 예리한 band가 나타난다고 보고하고 분자량은 46,000 daltons이라고 하였다.

Wheeler 및 Hinkle(1985)의 review에 의하면 인체 적혈구막 뿐 아니라 여러 동물의 서로 다른 조직세포막에 있는 포도당운반체의 분자량도 약 45,000 daltons을

보임으로써 포도당운반체의 분자량은 45,000~50,000 daltons이 되는 것으로 짐작되나 이상의 실험결과는 SDS gel electrophoresis 상에서 얻은 성적이기 때문에 in situ한 상태에서의 포도당운반체의 구조와 일치한다고 볼 수는 없다. 특히 electrophoresis와 같은 물리화학적인 방법은 내막단백질의 종류와 분자량의 측정을 가능하게는 하지만 단백질의 quaternary structure에 관해서는 아무 정보도 제공하지 못한다. 따라서 단백질의 기능을 분자수준에서 이해하기 위해서는 반드시 in situ한 상태에서의 분자구조를 측정해야만 한다. 이 목적으로 도입된 학설이 "target theory"(Lea, 1946; pollard et al., 1955)이다.

본 실험은 이 이론에 의한 radiation-inactivation 방법으로 포도당운반체의 기능적인 분자구조를 측정하기 위하여 시행되었다.

실 험 방 법

1. Band 4.5의 분리

사람의 혈액으로부터 Dodge 등(1963)의 방법으로 헤모글로빈이 제거된 적혈구막의 부유액을 얻었다. 여기에 1mM EDTA를 가한후 PH 10.0으로 적정하고 얼음속에 20분간 세워 두어 막에 있는 peripheral proteins을 용해시키고 100,000×g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 0.1mM EDTA 용액에 재 부유시킨후 PH 12.0으로 적정하고 다시 20분간 얼음속에 방치하여 막에 남아있는 peripheral proteins을 가급적 완전히 용해시킨후 100,000×g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에는 band 3, 4.5 및 7등이 남아 있는데 이를 10mM Tris buffer(PH 7.4)로 한번 세척한후 하(1986)의 방법으로 DEAE column 크로마토그래피 방법으로 band 4.5를 선택적으로 분리하였다. 즉 peripheral proteins이 제거된 침전물을 0.5% Tx-100와 50mM Tris 용액(PH 7.4)에 부유시킨후 30분간 얼음속에서 흔들어 주면서 막내에 남아있는 integral proteins을 용해시키고 100,000×g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 불용성물질들을 완전히 제거하기 위하여 100,000×g에서 한번 더 원심분리하였다. 이 상층액에는 band 3, 4.5 및 7단백질들이 포함되어 있다. 여기에서 band 4.5를 선택적으로 분리하기 위하여 DEAE-52 column 크로마토그래피를 시행하고 band 4.5만 함유

된 effluents를 SM-2 column을 통과시켜 Tx-100를 제거한후 100,000×g에서 60분간 원심침전시켜 band 4.5를 얻었다. 한편 0.5% Tx-100대신 46mM octylglucoside와 2mM dithiothreitol이 함유된 용액으로 peripheral proteins이 제거된 침전물을 용해시키고 DEAE-52 column을 통하여 얻은 effluents를 50mM Tris-HCl(PH 7.4)에 3시간 동안 투석시키고 즉시 3배로 희석시킨후 100,000×g에서 60분간 원심분리하여 침전물인 band 4.5를 얻었다.

2. Target theory에 의한 분자량 측정

1) 이론적인 배경 :

Lea(1946)의 target theory에 의하면 생체막에 존재하는 효소나 운반체 단백질을 분리하지 않고서도 분자량을 측정할 수가 있다. 이는 생체막에 방사선을 조사하면 방사능에 비례하여 생물학적인 활성도가 감소함에 그 원리를 두고 있다. 즉 단백질이 방사선에 노출되면 단백질의 분자구조가 파괴되기 때문에 그 활성도를 잃게 된다는 것인데 최적조건하에서 분자가 방사선에 "hit"될 확률은 그 분자의 크기에 비례한다는 것이다(여기서 hit된 분자는 생물학적으로 불활성화된 분자를 뜻함). 만약 방사선의 에너지가 매우 크다면 한번의 "hit"로 분자의 기능을 완전히 파괴 시켜버릴 수도 있다. 방사선에 조사된후 남아있는 생물학적인 활성도(A)란 Poisson 공식으로부터 방사선량(radiation dose, D)의 지수함수 관계에 있게 되는데

$$A = A_0 e^{-KD} \dots\dots\dots (1)$$

여기서 A₀는 조사 받기전의 활성도를 나타내며 K는 상수다. Lyophilized시킨 단백질을 0°C의 진공속에서 조사 했을때 K의 값은 경험적으로 그 단백질의 target molecule에 비례함을 보이고 있다. Kepner 및 Macey(1968)는 primary ionization을 일으키는데 필요한 에너지의 양이 실험적으로 66eV임을 계산하고 이 값과 단백질의 밀도를 공식(1)에 대입하여 새로운 관계식을 정립하였는데

$$Mr = 640,000/D_{37} (M \text{ rad}) \dots\dots\dots (2)$$

여기서 Mr은 단백질의 분자량을 나타내고, D₃₇은 단백질이 조사 받기전 가지고 있던 생물학적 활성도를 37%로 감소시키는 방사선량을 나타내고 있다. 따라서 어

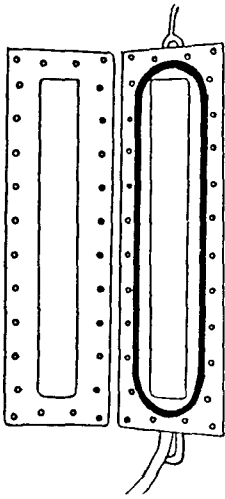


Fig. 1. The target chamber consisting of a base and a cover, both made of aluminum. The base is a 6×22 inch block with a 0.25 inch deep gasket encircling a sample channel which accomodates sample trays. An aluminum foil window (0.005 inch thick) is sealed to the cover providing an airtight unit when in place over the gasket and bolted along the perimeter of the base.

면 효소나 단백질의 활성도를 측정하고 일정량의 방사선을 조사한 후 본래의 활성도를 37%로 감소시키는 방사선량을 mega rads 단위로 측정하면 공식(2)에서 그 효소나 단백질의 분자량을 계산할 수 있다.

2) Radiation-inactivation 실험절차 :

가로, 세로 및 깊이가 각각 80 mm, 10 mm 및 3 mm 인 얇은 aluminum 용기에 분리된 band 4.5 단백질을 1 ml씩 얇게 깔고 액체질소내에 담그어 냉동시킨후 radiation chamber (Fig. 1) 속에 넣고 Van de Graaff electron accelerator에서 발생시킨 1.5 MeV의 electron beam 하에서 방사선량의 크기에 따라 노출시간을 달리하면서 방사선을 조사시켰다. Radiation chamber 는 Jung 등(1980) 및 Hah 등(1985)의 방법으로 액체질소를 계속 흘려 보내면서 시료의 온도를 -45°~ -50°C의 냉동상태를 유지토록 하였으며 이때 방사선량을 측정하기 위해서 청색의 cellophane지를 시료와 함께 조사시킨후 transmittance 변화를 chemical dosimeter에서 측정하여 정확한 방사선량을 계산하였다(Fricke and Hart,

1966). 방사선 조사후 시료는 실온에서 녹히고 cytochalasin B 결합시험에 사용하였다.

3. 단백질 정량

단백질의 정량은 근본적으로 Lowry 등(1951)의 방법에 의하였다. 단지 band 4.5 preparation은 boundary lipids를 많이 함유하고 있고 이중 인지질(phospholipids)은 비색제에서 optical density를 측정할 때에 교란을 일으키므로 측정하고자 하는 sample에 1% sodium lauryl sulfate를 가하여 불용성인자들을 완전히 용해시킨후 일반적인 절차에 따라 측정하였다. 즉 (1) 0.2 ml의 sample에 10 μ l의 20% sodium lauryl sulfate를 가하고 (2) 2 ml의 reagent C를 가한후 10분간 끓는 물속에서 가열하고 (3) 0.2 ml의 phenol reagent를 가하고 30분후에 파장 750 nm에서 optical density를 측정하였다. 이때 단백질의 표준곡선은 소의 혈청알부민과 소의 혈청감마글로부린을 표준단백질로 사용하여 작성하였다. 왜냐하면 소의 혈청알부민은 그양이 75 μ g 이상에서는 농도에 따른 optical density의 직선적인 관계를 볼 수 없고 반면에 소의 혈청감마글로부린은 25 μ g 이하에서는 감수성이 약하나 그 이상에서는 optical density의 직선적인 관계를 보이므로 두 표준단백질로 그런 표준곡선의 평균값을 취하여 새로운 표준곡선을 그렸다.

4. Cytochalasin B 결합실험

Jung 및 Rampal(1977)의 방법으로 band 4.5 단백질의 포도당 이동능력을 측정하는 대신 cytochalasin B의 결합능력을 측정하였다. 실험방법은 원심분리용 시험관에 방사능이 0.02 μ c/ml이 되는 3 H-labeled cytochalasin B와 전체 cytochalasin B의 농도가 각각 1.33×10^{-9} M, 10^{-7} M, 3×10^{-7} M, 10^{-6} M, 3×10^{-6} M 및 10^{-5} M이 되는 용액을 준비하고 band 4.5 단백질을 1/15 Dodge 용액으로 20 μ g/ml되게 희석하여 각 시험관에 1 ml씩 가한후 이 혼합용액을 vortex로 1분간 잘 섞고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이 반응물을 Beckman 초원심분리기로 100,000×g에서 30분간 원심분리하고 상층액과 침전물에 분포되어 있는 3 H-cytochalasin B의 방사능을 Packard(Model 3320) Liquid Scintillation Counter로 측정하여 Scatchard(1949) 방법으로 결합양상을 분석하였다.

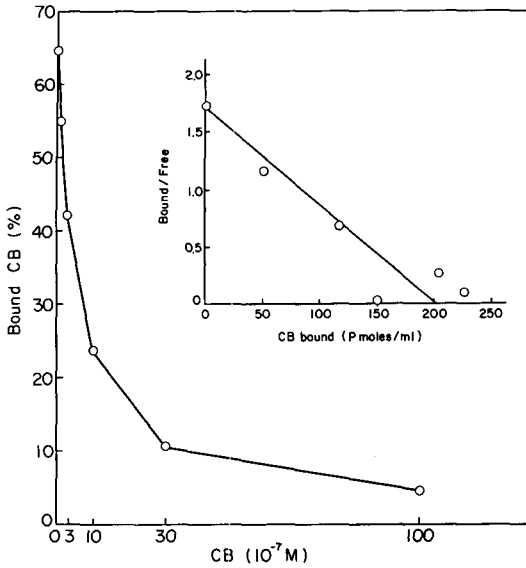


Fig. 2. Equilibrium binding of cytochalasin B by the band 4.5 protein purified from human erythrocyte membrane. Scatchard analysis of data is shown in set. The line represents the linear regression analysis of the data with $r=0.90$.

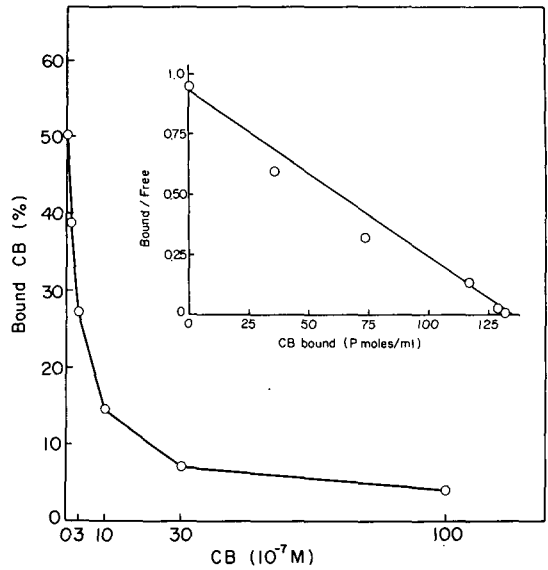


Fig. 3. Equilibrium binding of cytochalasin B by the band 4.5 protein irradiated with 2.03 mega rads under a Van de Graaff generated 1.5 MeV electron beam. Scatchard analysis of data is shown in set. The line represents the linear regression analysis of the data with $r=0.89$.

실 험 성 적

1. Band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합능력

방사선을 조사받지 않은 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합양상은 포화적(saturable)이고 직선적(linear)인 양면성을 보이고 있다(Fig. 2). 이론적으로 직선적인 결합량은 band 4.5 vesicles을 구성하고 있

는 지질이나 단백질에 비 특이적(non-specific)으로 결합된 것 이거나 물과 함께 trapped된 것으로 볼 수 있으므로 이 부분을 제거하고 포화적인 결합 부분을 Scatchard 방법으로 분석하면 Table 1과 Fig. 2의 Set 내의 적은 그림과 같다. 즉 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합능력은 10 nmoles/mg protein이고 K_D 는 0.12 μ M임을 보이고 있다.

Table 1. Analytical data of the cytochalasin B binding by the band 4.5 protein without radiation for the Scatchard plot

[CB]	% bound	Fraction bound (calibrated)*	Fraction free	Fb/Ff	CB bound (moles)
1.33×10^{-9} M	64.5	0.614	0.355	1.720	1.07×10^{-9}
10^{-7}	54.8	0.517	0.452	1.140	51.7
3×10^{-7}	42.0	0.389	0.580	0.670	116.7
10^{-6}	23.5	0.204	0.765	0.260	204
3×10^{-6}	10.6	0.075	0.894	0.083	225
10^{-5}	4.6	0.015	0.954	0.020	150

*전체 결합량에서 비 특이적인 결합량을 제거한 것임.

Table 2. Analytical data of the cytochalasin B binding by the band 4.5 protein irradiated with 2.03 mega rads for the Scatchard plot

[CB]	% bound	Fraction bound (calibrated)*	Fraction free	Fb/Ff	CB bound (moles)
$1.33 \times 10^{-9} M$	50.1	0.473	0.499	0.947	0.83×10^{-9}
10^{-7}	38.7	0.359	0.613	0.585	35.9
3×10^{-7}	27.1	0.243	0.729	0.333	72.9
10^{-6}	14.5	0.117	0.855	0.136	117
3×10^{-6}	7.1	0.043	0.929	0.046	129
10^{-5}	4.1	0.013	0.959	0.013	130

*전체 결합량에서 비 특이적인 결합량을 제거한 것임.

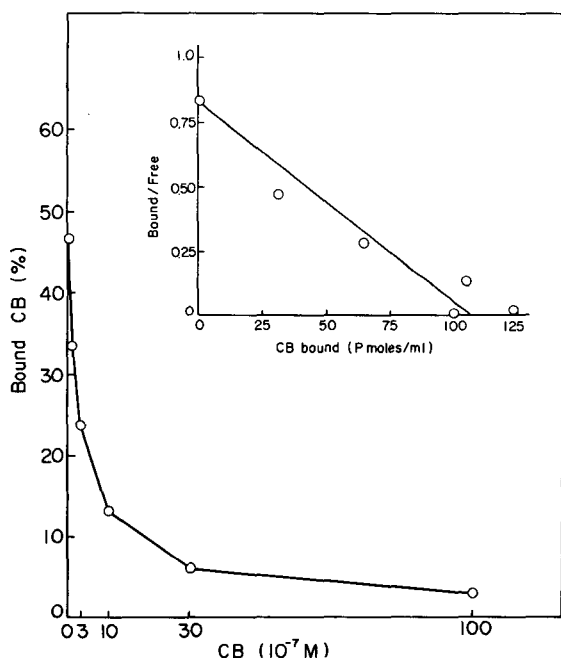


Fig. 4. Equilibrium binding of cytochalasin B by the band 4.5 protein irradiated with 3.74 mega rads. Scatchard analysis of data is shown in set. The line represents the linear regression analysis of the data with $r=0.93$.

2. 2.03 mega rads로 조사시킨 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합능력

Band 4.5 단백질을 2.03 mega rads로 조사시킨후 cytochalasin B 결합양상은 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 포화적이고 직선적인 양면성은 방사선을 조사받지 않았을 때와 동일하고, 전과 같이 직선적인 결합량을 제거하고 포화적인 결합 부분을 Scatchard 방법으로 분석하면

Table 2와 Fig. 3의 Set 내의 그림과 같다. Cytochalasin B의 결합능력은 6.75 nmoles/mg protein으로 대조군 값의 67.5%로 감소하였고 K_D 는 $0.14 \mu M$ 로 거의 변화가 없었다.

3. 3.74 mega rads로 조사시킨 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합능력

Band 4.5 단백질을 3.74 mega rads로 조사시킨후 cytochalasin B의 결합양상은 Fig. 4와 같다. 전과 같이 Scatchard 방법으로 분석하면 Table 3과 Fig. 4의 Set 내의 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 K_D 는 $0.13 \mu M$ 로 거의 변화없고 cytochalasin B 결합능력은 5.35 nmoles/mg protein으로 대조군 값의 53.5%로 감소하였다.

4. 6.12 mega rads로 조사시킨 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합능력

Band 4.5 단백질을 6.12 mega rads로 조사시킨후 cytochalasin B의 결합양상은 Fig. 5와 같다. 같은 방법으로 cytochalasin B 결합능력과 K_D 의 변화를 분석하면 Table 4와 Fig. 5의 Set 내 그림에서 볼 수 있는 바와 같이 band 4.5 단백질의 활성도는 3.7 nmoles/mg protein으로 대조군 값의 37%로 감소하였으나 K_D 는 약 $0.14 \mu M$ 로 변화가 없었다.

5. 8.30 mega rads로 조사시킨 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합능력

Band 4.5 단백질을 8.3 mega rads로 조사시킨후 cytochalasin B의 결합능력을 측정하면 Fig. 6과 Table 5에서 보는 바와 같이 K_D 는 $0.14 \mu M$ 로 변화없고 band

Table 3. Analytical data of the cytochalasin B binding by the band 4.5 protein irradiated with 3.74 mega rads for the Scatchard plot

[CB]	% bound	Fraction bound (calibrated)*	Fraction free	Fb/Ff	CB bound (moles)
$1.33 \times 10^{-9}M$	46.6	0.445	0.534	0.833	0.77×10^{-9}
10^{-7}	33.3	0.312	0.667	0.467	31.2
3×10^{-7}	23.7	0.216	0.763	0.283	64.8
10^{-6}	13.1	0.110	0.869	0.126	110
3×10^{-6}	6.1	0.041	0.939	0.043	123
10^{-5}	3.1	0.010	0.969	0.010	100

*전체 결합량에서 비 특이적인 결합량을 제거한 것임.

Table 4. Analytical data of the cytochalasin B binding by the band 4.5 protein irradiated with 6.12 mega rads for the Scatchard plot

[CB]	% bound	Fraction bound (calibrated)*	Fraction free	Fb/Ff	CB bound (moles)
$1.33 \times 10^{-9}M$	35.8	0.334	0.642	0.520	0.58×10^{-9}
10^{-7}	24.4	0.220	0.756	0.291	22
3×10^{-7}	15.4	0.130	0.846	0.153	39
10^{-6}	9.1	0.067	0.909	0.073	67
3×10^{-6}	5.2	0.028	0.948	0.029	84
10^{-5}	3.1	0.007	0.969	0.007	70

*전체 결합량에서 비 특이적인 결합량을 제거한 것임.

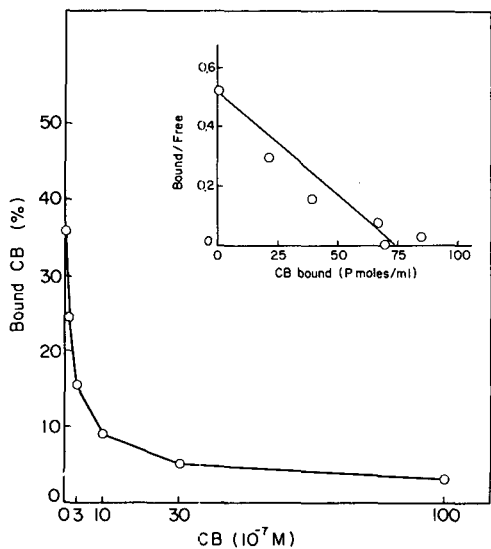


Fig. 5. Equilibrium binding of cytochalasin B by the band 4.5 protein irradiated with 6.12 mega rads. Scatchard analysis of data is shown in set. The line represents the linear regression analysis of the data with $r=0.91$.

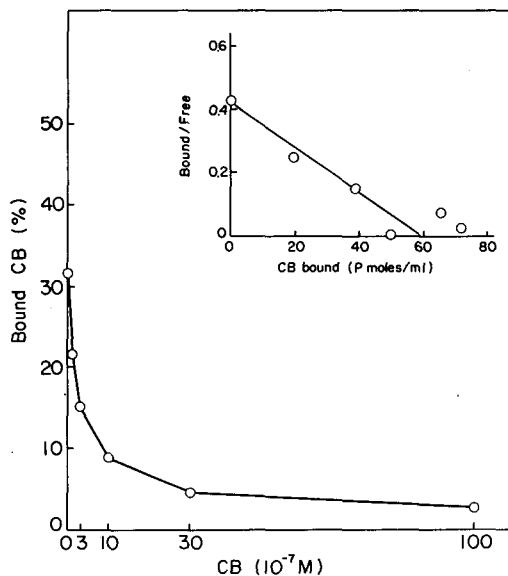


Fig. 6. Equilibrium binding of cytochalasin B by the band 4.5 protein irradiated with 8.30 mega rads. Scatchard analysis of data is shown in set. The line represents the linear regression analysis of the data with $r=0.87$.

Table 5. Analytical data of the cytochalasin B binding by the band 4.5 protein irradiated with 8.30 mega rads for the Scatchard plot

[CB]	% bound	Fraction bound (calibrated)*	Fraction free	Fb/Ff	CB bound (moles)
$1.33 \times 10^{-9} M$	31.4	0.291	0.686	0.424	0.51×10^{-9}
10^{-7}	21.6	0.193	0.784	0.246	19.3
3×10^{-7}	15.1	0.128	0.849	0.150	38.4
10^{-6}	8.9	0.066	0.911	0.072	66
3×10^{-6}	4.7	0.024	0.953	0.025	72
10^{-5}	2.8	0.005	0.972	0.005	50

*전체 결합량에서 비 특이적인 결합량을 제거한 것임.

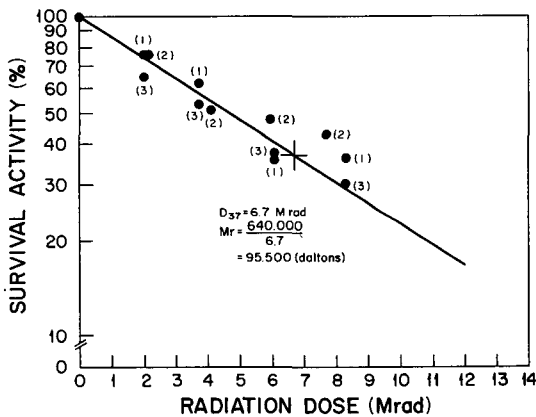


Fig. 7. Semilog plot of survival activities of cytochalasin B binding by the band 4.5 proteins as a function of radiation dose. The line represents the least squares linear regression analysis of the data with $r=0.90$. Data are from three independent sets of irradiation experiments.

4.5 단백질의 활성도만 3.0 nmoles/mg protein으로 대조군 값의 30%로 감소하였다.

6. Band 4.5 단백질의 기능적인 분자량

Target theory에 의하여 방사선 조사량과 남아있는 활성도를 반대수표(semilog paper)에 표시하면 Fig. 7의 (1)과 같다.

한편, 방사선량을 일정하게 조절할 수 없는 실험상의 문제로 각 방사선 조사량에 따른 활성도의 변화를 통계 처리할 수 없기 때문에 독립적으로 3회 같은 실험을 시행하고 방사선 조사량과 남아있는 활성도를 각각 Fig. 7의 (2)와 (3)으로 표시하였다. 각 점들을 대표하는 linear

regression line 상에서 D_{37} dose는 6.7 mega rads로써 이를 실험방법의 공식(2)에 대입하면 band 4.5 단백질의 기능적인 분자량은 약 95,500 daltons임을 알 수 있다.

고찰

고 에너지의 radiation-inactivation 방법에 의한 target size의 측정에는 electrophoresis 등의 보편적인 물리화학적 방법에 비하여 많은 장점을 제공하고 있다 (Lea, 1946; Pollard et al., 1955). 이 방법은 측정하고자 하는 단백질을 용해시키거나 분리할 필요가 없고 단백질의 생물화학적 활성도를 측정하는 것이기 때문에 이 방법으로 측정된 분자량은 바로 단백질의 기능적인 분자의 크기를 대변할 뿐 아니라, 만약 subunits의 크기를 알면 in situ 상태에서의 단백질의 association에 관한 정보도 얻을 수 있다 (Hah et al., 1985). 또한 이 방법은 sample의 극히 적은 양만 있으면 측정이 가능하기 때문에 경제적이라고도 할 수 있다.

인체 적혈구막에 존재하는 포도당운반체는 막내단백질(integral membrane protein)으로서 SDS 'gel electrophoresis에서 band 4.5 단백질로 분자량이 약 45,000~50,000 daltons인 것으로 알려져 있다 (Kasahara and Hinkle, 1977; Baldwin et al., 1982). 이 값은 band 4.5 단백질 하나의 분자량을 말해 줄 뿐이고 기능적인 분자구조에 관해서는 알려진 바가 없다.

따라서 본 실험은 target theory에 의한 radiation-inactivation 방법으로 band 4.5 단백질의 기능적인 분자량을 측정하기 위하여 시행되었다. 실험결과는 방사선 조사에 의하여 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합 양상은 K_D 의 변화없이 전체 결합량의 감소만 보임으로

써 band 4.5 단백질의 결합능력 감소가 방사선조사에 의한 cytochalasin B 결합부위의 구조적인 변화에 기인된 것이 아니고, 방사선조사의 실무를 (all or none)의 법칙에 따라 hit를 받은 단백질은 활성도를 잃어버리고 hit를 받지 않은 단백질은 활성도를 유지한다는 Pollard 등 (1955)의 target theory에 잘 일치함을 보이는 것이다. 그러므로 Kepner 및 Macey(1968)의 방법에 의하여 방사선조사량과 남아있는 cytochalasin B 결합능력의 백분율을 Fig. 7에서 볼 수 있는 바와 같이 반 대수표에 그리고 D_{37} dose를 구하면 약 6.7 mega rads로써 target size는 약 95,500 daltons이 됨을 알 수 있다.

이 값은 대략 band 4.5 단백질 두 분자에 해당되는 크기로써 band 4.5 단백질의 기능적인 단위는 dimer임을 암시하고 있다.

Kasahara 및 Hinkle(1977)은 Tx-100를 사용하여 적혈구막으로부터 순수하게 분리한 band 4.5 단백질의 활성도가 약 8~11 nmoles/mg protein이라고 하였고, Hah (1985)는 Tx-100 및 octylglucoside를 사용하여 적혈구막으로부터 분리한 band 4.5 단백질의 활성도가 약 10 nmoles/mg protein이라고 하였으므로 band 4.5 단백질의 분자량을 45,000~50,000 daltons이라고 볼 때 10 nmoles/mg protein은 0.5 분자의 cytochalasin B 분자가 band 4.5 분자 하나에 결합하는 0.5 stoichiometry를 보이므로(Klingenberg, 1981) 이는 위의 실험결과와 잘 일치하고 있다.

한편, Sogin과 Telford(1978) 및 Sase 등(1982)은 재조립시킨 band 4.5 vesicles의 전자현미경 사진에서 단백질 입자의 밀도와 단백질과 지질의 비율로부터 단백질 입자의 분자량을 계산하였더니 110,000 daltons (Sogin and Telford)와 120,000 daltons (Sase et al.) 이었다고 보고 하였는데 이것도 본 실험성과 일치한다.

최근에 Wu 등(1983)은 band 4.5 단백질이 nucleoside의 운반체로써의 기능이 있음을 발견하였고, Jarvis 등(1984)은 radiation-inactivation 방법으로 이 단백질의 target size를 측정하였더니 122,000 daltons이라고 보고하였다.

이상의 각 연구자들의 보고와 본 실험성적으로 미루어 보아 적혈구막에서의 in situ한 포도당운반체의 구조는 기능적으로 두 분자로 구성되어 포도당 이동의 관문을 이루고 있으며, cytochalasin B 한 분자는 이 두 분자의 band 4.5 단백질에 동시에 결합함으로써 포도당 이동을

억제하는 것으로 생각할 수 있다.

생체막에 존재하는 운반체단백질(carrier proteins)중에는 band 4.5 단백질 외에도 (Na^+ , K^+)-ATPase (Hah et al., 1985), anion carrier (Cuppoletti et al., 1985; Hsu and Morrison, 1985) 및 Ca^{++} -ATPase (Hymel et al., 1985)등도 dimerization을 이루고 있는 것으로 알려져 있는데 이러한 운반체단백질은 왜 dimer 상태로 존재하는지 그 정확한 의의에 관해서는 현재로서는 확실히 알 수 없다. 그러나 앞으로 운반체단백질들의 제1차, 2차, 3차 및 4차적인 구조가 모두 밝혀지면 열력학적으로 그 설명이 가능해질 것으로 본다.

결 론

인체 적혈구막의 포도당운반체는 SDS gel electrophoresis에서 band 4.5에 해당되는 단백질로써 분자량이 약 45,000~50,000 daltons 정도 되는 것으로 알려져 있다. 그러나 in situ한 상태에서 band 4.5 단백질이 어떤 구조를 이루고 있는지는 알려져 있지 않음으로 radiation-inactivation 방법으로 target size를 측정하고자 본 실험에 착수하였고 다음과 같은 결론을 얻었다.

즉 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합능력은 방사선조사에 의하여 단일 지수함수적(single exponential)으로 감소하였으며, D_{37} dose는 약 6.7 mega rads로써 Kepner와 Macey(1968)의 공식, $\text{Mr} = 640,000 \text{ daltons} / D_{37} (\text{M rad})$, 에 대입하면 분자량이 약 95,500 daltons으로 계산되었다. 이는 band 4.5 단백질의 두 분자에 해당되는 크기로써 in situ한 band 4.5 단백질의 분자구조가 dimer임을 암시하는 것이다

참 고 문 헌

Baldwin, S.A., Baldwin, J.M. and G.E. Lienhard: *Mono-saccharide transporter of the human erythrocyte. Characterization of an improved preparation. Biochemistry, 21:*3836, 1982.

Carter-Su, C., Pessin, J. E., Mora, R., Gitomer, W. and M. P. Czech: *Photoaffinity labeling of the human erythrocyte D-glucose transporter. J. Biol. Chem., 257:* 5419, 1982.

Cuppoletti, J., Goldinger, J., Kang, B.S., Jo, I.H., Berenski, C. and C.Y. Jung: *Anion carrier in the human erythrocyte exists as a dimer. J. Biol. Chem., 260:* 15714, 1985.

- Dodge, J.T., Mitchell, C. and D.J. Hanahan: *The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 100:119, 1963.
- Fricke, H. and E.J. Hart: In 'Radiation Dosimetry (Attix, F.H. and W.C. Roesch eds.) Vol. 11, pp. 167-239, Acad. Press, N.Y., 1966.
- Gorga, F.R. Baldwin, S.A. and G.E. Lienhard: *The monosaccharide transporter from human erythrocytes is heterogeneously glycosylated*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 91:955, 1979.
- Hah, J.S.: *The effects of physical states of phospholipids on the incorporation and CB binding activity of human erythrocyte membrane proteins in reconstituted vesicles*. Ph.D.Thesis, SUNY at Buffalo, N.Y., U.S.A., 1985.
- Hah, J.S.: *The effects of physical states of phospholipids on the incorporation and CB binding activity of band 4.5 protein of human erythrocyte membrane in reconstituted vesicles*. *Ewha Med. J.*, 9:163, 1986.
- Hah, J.S., Goldinger, J.M. and C.Y. Jung: *In situ assembly states of (Na⁺, K⁺)-pump ATPase in human erythrocytes. Radiation target size analysis*. *J. Biol. Chem.*, 260:14016, 1985.
- Hsu, L. and M. Morrison: *A new variant of the anion transport protein in human erythrocytes*. *Biochemistry*, 24:3086, 1985.
- Hymel, L., Nielsen, M. and K. Gietzen: *Target sizes of human erythrocyte membrane Ca⁺⁺-ATPase and Mg⁺⁺-ATPase activities in the presence and absence of calmodulin*. *Biochim. Biophys. Acta*, 815:461, 1985.
- Jarvis, S.M., Fincham, D.A., Ellory, J.C., Paterson, R.P. and J.D. Young: *Nucleotide transport in human erythrocytes. Nitrobenzylthioinosine binding and uridine transport activities have similar radiation target sizes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 772:227, 1984.
- Jung, C.Y., Hsu, T.L., Hah, J.S., Cha, C.J. and M.N. Haas: *Glucose transport carrier of human erythrocytes. Radiation-target size of glucose-sensitive cytochalasin B binding protein*. *J. Biol. Chem.*, 255:361, 1980.
- Jung, C.Y. and A.L. Rampal: *Cytochalasin B binding sites and glucose transport carrier in human erythrocyte ghosts*. *J. Biol. Chem.*, 252:5456, 1977.
- Kasahara, M. and P.C. Hinkle: *Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes*. *J. Biol. Chem.*, 252:7384, 1977.
- Kepner, G.R. and R.I. Macey: *Membrane enzyme systems. Molecular size determinations by radiation inactivation*. *Biochim. Biophys. Acta*, 163:188, 1968.
- Klingenberg, M.: *Membrane protein oligomeric structure and transport function*. *Nature (London)*, 290:449, 1981.
- Lea, D.E.: *Action of Radiation on Living Cells*, Cambridge University Press, London and New York, 1944.
- Lienhard, G.E., Crabb, J.H. and K.J. Ransome: *Endoglycosidase F cleaves the oligosaccharides from the glucose transporter of the human erythrocyte*. *Biochim. biophys. Acta*, 769:404, 1984.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and R.J. Randall: *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J. Biol. Chem.*, 193:265, 1951.
- Pollard, E.C., Guild, W.R., Hutchinson, F. and R.B. Setlow: *The direct action of ionizing radiation on enzymes and antigens*. *Prog. Biophys. Chem.*, 5:72, 1955.
- Sase, S., Takata, K., Hirano, H. and M. Kasahara: *Characterization and identification of the glucose transporter of human erythrocytes*. *Biochim. Biophys. Acta*, 693:253, 1982.
- Scatchard, G.: *The attractions of proteins for small molecules and ions*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51:660, 1949.
- Shanahan, M.F.: *Cytochalasin B. A natural photoaffinity ligand for labeling the human erythrocyte glucose transporter*. *J. Biol. Chem.*, 257:7290, 1982.
- Shanahan, M.F.: *Characterization of cytochalasin B photoincorporation into human erythrocyte D-glucose transporter and F-actin*. *Biochemistry*, 22:2750, 1983.
- Sogin, D.C. and P.C. Hinkle: *Characterization of the glucose transporter from human erythrocytes*. *J. Supramol. Struct.*, 8:447, 1978.
- Sogin, D.C. and T.N. Telford: *Partial purification of the glucose transporter from human erythrocytes*. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 37:1567, 1978.
- Wheeler, T.J. and P.C. Hinkle: *The glucose transporter of mammalian cells*. *Ann. Rev. Physiol.*, 47:503, 1985.
- Wu, J.R., Kwong, F.Y.P., Jarvis, S.M. and J.D. Young: *Identification of the erythrocyte nucleoside transporter as a band 4.5 polypeptide: Photoaffinity labeling studies using nitrobenzylthioinosine*. *J. Biol. Chem.*, 258:13745, 1983.