

## Glut4와 Cytoskeletal Protein의 상호작용에 관한 연구

김미영 · 이경림\*

이화여자대학교 약학대학

### Studies on the Interaction of Glut4 and Cytoskeletal Protein

Miyoung KIM and Kyunglim LEE\*

College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

(Received October 27, 1996; accepted December 10, 1996)

**Abstract** – The glucose transporters found in the plasma membrane of all animal cells are known to have 12 putative transmembrane domains. Among 7 cytoplasmic loops, the fourth loop is the largest one. Since previous studies showed that cofilin, an actin-modulating protein, was found to interact with the largest cytoplasmic loop of (Na,K)ATPase, we tested if cofilin interacts with the largest cytoplasmic loop of Glut4. We demonstrated by the two-hybrid system that the largest cytoplasmic loop of Glut4 did not show any interaction with cofilin, suggesting that cofilin is not required for the membrane targeting process of other membrane proteins but only for a P-type ATPase.

**Keywords** □ Glut4, cofilin, two-hybrid, membrane targeting.

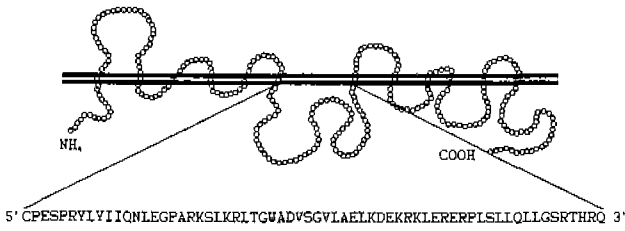
포유동물의 생존에 절대적으로 필요한 영양소인 glucose는 glucose transporter라는 세포막 단백질을 통해 세포 내로 이동한다. Glucose transporter는 10여년 전부터 cloning되기 시작했고 여러 isoform들도 발견되었다(Fukumoto 등, 1989). 이들 isoform들을 종거리 비교해 보면 유전자들의 homology가 상당히 높고 또한 조직 특이적으로 발현됨을 알 수 있다(Kahn, 1992).

여러 isoform들 중에서 Glut4는 insulin에 의한 glucose의 세포내 이동을 매개하는 단백질로 골격근, 심장, 비만세포에서만 발현된다(Gould와 Holman, 1993). Insulin은 insulin 수용체에 붙음으로써 세포내 신호 전달 체계를 활성화하고 그로 인해 세포내에 vesicle상태로 있던 glucose transporter가 세포막으로 이동하게 된다고 한다. 즉 insulin이 세포막에 있는 glucose transporter의 수를 증가시킴으로써 당뇨병을 치료한다는 것인데 이것은 insulin의 신호 전달 체계와 세포골격, glucose transporter의 전달과정 사이에 상관 관계가 있음을 강하게 암시하고 있다(Suzuki와 Kono, 1980). 또한 Theodoros Tsakiridis 등(1994)은 분화된 흰 쥐 근육세포에서 glucose transporter가 insulin에 의해 수송될 때 세포 골격의 구성 성분인 actin filament가 관여함을 시사한바 있다.

세포골격은 세포내의 수송, 세포내이입, 배출작용에 관련됨이 암시되어 왔으며 그 중 actin filament가 주된 역할을 할 것으로 생각되어 왔다. 세포골격 단백질중의 하나인 cofilin은 actin과 결합하여 depolymerization을 시키는 단백질로서 세포막 단백질인 (Na,K)ATPase의 가장 큰 H4-H5 loop와 상호작용함이 발견된 바 있다(이경림과 Guidotti, submitted). (Na,K)ATPase와 단백질-단백질 상호작용하는 cofilin은 아마도 actin에 결합함으로써 세포골격의 network를 영성하게 만들고 그 결과 세포막단백질이 ER에서부터 세포막으로 이동하도록 도와주는 역할을 한다고 여겨진다.

세포막 단백질이지만 (Na,K)ATPase와는 달리 ATPase기능이 없는 glucose transporter 또한 membrane targeting과정을 거치게 되는데 이때도 cofilin을 요구하는지는 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 glucose transporter의 membrane targeting에 cofilin이 관여하는지를 알아 보고자 하였다. 만일 세포골격과 그를 조절하는 단백질과 상호작용한다면 이는 세포 안쪽으로 노출된 loop지역일 것이다. Glucose transporter는 12개의 transmembrane을 가지고 있으며 세포 안쪽으로는 7개의 loop를 지니고 있다(Hresko 등, 1994). 그 중에서 제일 큰 cytoplasmic loop이 4번째 loop인데 (Na,K)ATPase의 경우처럼 바로 이 부위가 세포 골격과 작용할 수 있는 기능성이 가장 높은 부위로 여겨진

\* To whom correspondence should be addressed.



**Fig. 1.** Putative topology of glucose transporter and amino acid sequences of the cytoplasmic loop4. The glucose transporters are known to have 12 putative transmembrane segments. The largest cytoplasmic loop4 coding sequences are amplified by PCR using oligonucleotide primers. The PCR fragments encoding residue 223-287 of Glut4 were cloned into a LexA fusion plasmid, pEG202.

다(Fig. 1). 이를 위하여 본 연구에서는 yeast two-hybrid system을 이용하여 actin 조절 단백질인 cofilin이 Glut4의 제일 큰 cytoplasmic loop과 상호작용하는지를 알아보고자 하였다.

**실험방법**

**Construction of LexA Fusion Protein**

Dr. Roger Brent(Massachusetts General Hospital, Boston, MA)께서 yeast two-hybrid system(Gyuris 등, 1993; Zervos 등, 1993)에 쓰이는 vector들을 제공하여 주셨다. Human Glut4의 cDNA는 정준기 박사(서울대학교 병원)께서 제공하여 주셨다. pEG202 expression vector에 subclone하기 위해 다음과 같은 primer-들을 만들어 Glut4의 가장 큰 cytoplasmic loop인 loop4 부분을 PCR로 증폭하였다.

Primer 1(25 mer):

GGAATTC(EcoR I)TGTCCTCCGAGAGCCCCCGC

Primer 2(27 mer):

CGGGATCCA(BamH I)GGGCTGCCGGTGGGTACG

PCR primer-들에 직접 제한효소 자리인 EcoR I과 BamH I 자리를 도입했으므로 이는 PCR하는 과정에서 각 단편들의 끝에 놓인다. 증폭된 PCR 단편들을 1% agarose gel에 걸어서 예상되는 크기를 확인한 후 EcoR I과 BamH I으로 끊었다. 이 insert를 pEG202 EcoR I-BamH I에 연결한후 내부의 제한효소 자리들을 확인함으로써 원하는 construct를 찾아 내었다. 이 과정을 통해 Glut4의 large cytoplasmic loop4 부분은 ADH promoter하에서 LexA의 binding domain과 fusion되었다.

**Western Blotting**

위의 construct가 reading frame에 들어 있는지를 보기 위해 western blotting을 했다. Selective media 7 ml에 있는 yeast cell을 OD<sub>600</sub> 0.8~1.0까지 키운 후 3,000×g에서 5분간 원심분리했다. 이를 1 ml yeast lysis buffer(YLB)(50

mM Tris, pH8.0, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM NaF, 0.5 mM PMSF, 5 μg/ml aprotinin, 1 μg/ml leupeptidin, 1 mM benzamidine)에 현탁시킨 후 다시 원심분리했다. 그 후 100 μl YLB와 100 μl glass beads에 다시 현탁시킨 후 4℃에서 30초간, 6번씩 vortex했다. Bradford법으로 단백질을 정량한 후 약 50 μg의 yeast extract를 western blotting에 사용했다(이경림과 Guidotti, 1994). Glut4의 large cytoplasmic loop4가 LexA와 fusion되어 있으므로 LexA antibody (Harvard University, Marc Ptashne께서 제공)로 감지했다.

**Interaction trap**

Yeast cell EGY48/pSH18-34/267은 reporter gene LexAop-LacZ와 rat cofilin을 전사하는 expression vector를 가지고 있는데 여기에 Glut4의 loop4가 들어 있는 pEG202 construct를 주입시켜 transformation했다. Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>Leu<sup>-</sup> glu/gal plates에서의 galactose 의존적 Leu<sup>+</sup> colony와 Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>X-Gal glu/gal plate에서의 galactose 의존적 blue colony를 나타내는지 관찰했다. 이 두개의 plate에서 양성 반응을 보이면 이는 cofilin과 상호작용하는 것으로 간주되어 진다(Gyuris 등, 1993; Zervos 등, 1993). 또한 glucose Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>와 galactose Ura<sup>-</sup>His<sup>-</sup>Trp<sup>-</sup>의 liquid culture시 자란 cells의 LacZ reporter gene 활성 정도를 측정하기 위해 ONPG(o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranoside)를 기질로 사용해 β-Gal assay를 해 보았다(Himmelfarb 등, 1990). 대조 실험치보다 유의성 있게 높은 β-Gal unit를 나타내면 역시 cofilin과 상호작용하는 것으로 간주하였다.

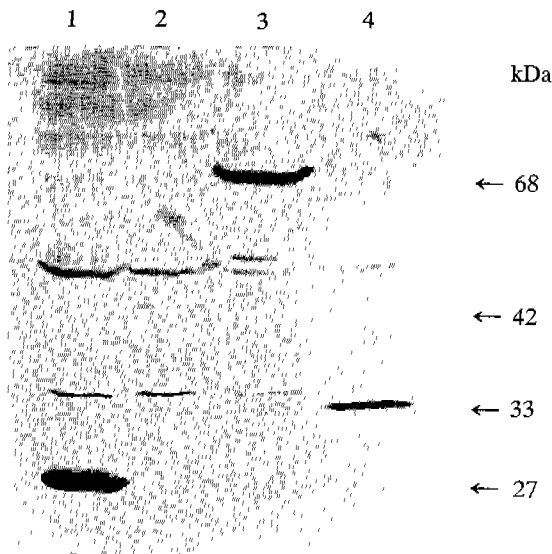
**실험결과**

**LexA Fusion Protein**

증폭된 PCR 단편들을 1% agarose gel에 걸어서 Glut4의 large cytoplasmic loop4의 206bp를 확인한 후 EcoRI과 BamH I으로 끊었다. 이 insert를 pEG202 EcoR I-BamH I에 연결한후 EcoR I-BamH I과 내부의 제한효소 자리들을 확인함으로써 원하는 construct를 찾아 내었다(data not shown). 또한 pEG202/Glut4Loop4로 transformation한 후 yeast extract를 만들어서 western blotting함으로써 약 33kDa의 LexA에 fusion된 Glut4Loop4를 확인할 수 있었다(Fig. 2, lane 4). Control로 사용한 pEG202(Fig. 2, lane 1), Drosophila bicoid fragment인 pRFHM(Fig. 2, lane 2), (Na,K)ATPase α 2Loop3(Fig. 2, lane 3)는 각각 약 27 kDa, 42 kDa, 68 kDa에 나타났다.

**Interaction of Glut 4 and cofilin**

EGY48/pSH18-34/267(cofilin construct)에 control로서 pEG 202, pRFHM(bicoid cytosolic protein), (Na,K)ATPase의 H4-H5 loop와 Glut4Loop4를 bait로 transformation한 후 yeast cell



**Fig. 2.** Expression of LexA fusion protein. Extract were obtained from yeast cells EGY48/pSH18-34/267 that had been transformed with one of the following plasmids in selective media: pEG202(lane 1), pEG202/pRFHM(lane 2), pEG202/ $\alpha$ 2L3(lane 3), pEG202/Glut4L4(lane 4). After Western blotting, blots were incubated with the rabbit polyclonal LexA antibody, followed by horseradish peroxidase-linked goat anti-rabbit IgG. The antibody binding was detected with chemiluminescence reagent(ECL, Amersham).

**Table I.**  $\beta$ -Gal assay

Bait	Selective medium			
	Ura <sup>-</sup> His <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup> glu	Ura <sup>-</sup> His <sup>-</sup> Trp <sup>-</sup>	gal	
pEG202/267	65.8 × 10 <sup>3</sup>	204.8 × 10 <sup>3</sup>		
pEG202/pRFHM/267	22.0 × 10 <sup>3</sup>	75.1 × 10 <sup>3</sup>		
pEG202/ $\alpha$ 2L3/267	38.9 × 10 <sup>3</sup>	6776 × 10 <sup>3</sup>		
pEG202/Glut4L4/267	21.1 × 10 <sup>3</sup>	90.8 × 10 <sup>3</sup>		

※  $\beta$ -Gal unit=O.D.<sub>420</sub> × 1000/t (min) × vol. of extract (ml) × protein ( $\mu$ g/ml).

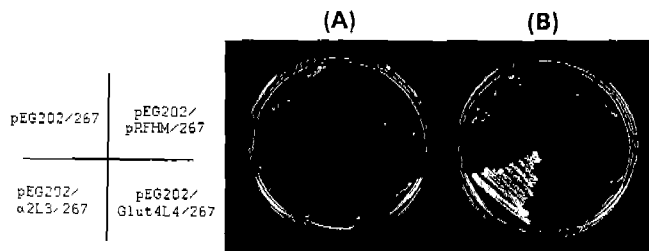
타나지 않았고(data not shown)  $\beta$ -Gal assay에서도 대조실 험치와 비슷한 정도의 LacZ-reporter gene 활성을 나타내었다(Table I). 이상의 결과들은 Glut4Loop4가 (Na,K)ATPase의 제일 큰 cytoplasmic loop과는 달리 actin 조절 단백질인 cofilin과 상호작용하지 않음을 암시한다.

**고찰**

(Na,K)ATPase의 H4-H5 loop와 상호작용하는 것(이경림과 Guidotti, submitted)으로 생각되는 cofilin은 21kDa 단백질로 actin에 결합해 depolymerization시킴으로써 actin filament를 엉성하게 한다는 보고가 있다(Nishida 등, 1984). 또한 dephosphorylation된 cofilin만이 actin과 결합할 수 있으며 tropomyosin과 상경적으로 결합한다는 보고도 있다(Ohta 등, 1989; Morgan 등, 1993).

Yeast two-hybrid system을 이용한 본 연구에서는 Glut4Loop4가 cofilin과 상호작용하지 않음을 보여 주며 이는 Glut4의 membrane targeting이 (Na,K)ATPase와는 다르다는 사실을 암시한다. 근육세포와 비만세포에 주로 있는 Glut4가 ER에서 vesicle로 떨어져 나온 후 insulin 신호가 올 때까지 세포질내에 머무르고 있다는 사실은 이 가능성을 지지해 준다. 하지만 cofilin이 Glut4Loop4가 아닌 다른 loop과 상호작용함으로써 targeting에 관여할 가능성은 배제할 수 없다. 또한 본 연구에서 쓴 cDNA가 human Glut4와 rat cofilin이었으므로 만일 rat Glut4를 사용하면 다른 결과가 나올 가능성도 있다. 그러나 rat과 human의 Glut4Loop4 지역을 비교해 볼 때 64개의 아미노산 중 3개만이 다르므로 그 가능성은 비교적 낮게 생각된다.

본 연구에서 얻은 결과들을 통해 cofilin이 membrane targeting 과정에 필요한 일반적 factor가 아니라 (Na,K)ATPase와 같은 P-type ATPase들의 targeting에 국한된 factor일 가능성을 생각해 볼 수 있다. Cofilin이 관여된 membrane targeting과정을 이해하기 위해서는 좀 더 많은 실험이 필요할 것으로 생각되나 이를 통해 membrane targeting 과정의 일부를 파악하는데 기여할 것이고 특히 glucose transporter vesicle의 조절 기능을 이해하는데 기여하리라 사료된다.



**Fig. 3.** The yeast cells EGY48/pSH18-34/267 that had been transformed with one of following plasmids were cultured in glucose Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> plate: pEG202, pEG202/pRFHM, pEG202/ $\alpha$ 2L3, pEG202/Glut4L4. Each one of individual clones was streaked onto a glucose Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> plate(A) and galactose Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> plate(B).

을 glucose Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> plate와 galactose Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> plate에 streaking을 하였다. Galactose Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> plate에서 negative control인 pEG202, pRFHM에서는 colony가 생기지 않았으며 positive control인 (Na,K)ATPase의 경우는 colony가 생겼다. 하지만 (Na,K)ATPase의 construct와는 달리 Glut4Loop4의 construct에서는 colony가 생기지 않았다(Fig. 3B). 마찬가지로 galactose Ura<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> X-gal plate에서도 pEG202, pRFHM인 경우 colony가 흰색을 보여주고 (Na,K)ATPase인 경우는 파란색을 보여주는 반면 Glut4Loop4인 경우는 파란색이 나

## 감사의 말씀

본 연구는 1996년도 교육부 유전공학학술연구조성비와 이화여자대학교 교내 연구비에 의하여 연구되었기에 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Fukumoto, H., Kayano, T., Buse, J. B., Edwards, Y., Pilch, P. F., Bell, G. I. and Seino, S. (1989). Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem.* **264**, 7776-7779.
- Goldin, S. M. (1977). Active transport of sodium and potassium ions by the sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from renal medulla. Reconstitution of the purified enzyme into a well defined *in vitro* transport system. *J. Biol. Chem.* **252**, 5630-5642.
- Gottlieb, T. A., Ivanov, I. E., Adensik, M. and Sabatini, D. (1993). Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **120**, 695-710.
- Gould, G. W. and Holman, G. D. (1993). The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* **295**, 329-341.
- Gyuris, J., Golemis, E., Chertkov, H. and Brent, R. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**, 791-803.
- Himmelfarb, H. J., Pearlberg, J., Last, D. H., and Ptashne, M. (1990). GAL11P: a yeast mutation that potentiates the effect of weak GAL4-derived activators. *Cell* **63**, 1299-1309.
- Kahn, B. B. (1992). Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J. Clin. Invest.* **89**, 1367-1374.
- Morgan, T. E., Lockerbie, R. O., Minamide, L. S., Browning, M. D. and Bamburg, J. R. (1993). Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor. *J. Cell Biol.* **122**, 623-633.
- Nishida, E., Maekawas, S. and Sakai, H. (1984). Cofilin, a protein porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin. *Biochemistry* **23**, 5307-5313.
- Ohta, Y., Nishida, E., Sakai, H. and Miyamoto, E. (1989). Dephosphorylation of cofilin accompanies heat shock-induced nuclear accumulation of cofilin. *J. Biol. Chem.* **264**, 16143-16148.
- Suzuki, K. and Kono, T. (1980). Evidence that insulin causes translocation of glucose transporter activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 2542-2545.
- Tsakiridis, T., Vranic, M. and Klip, A. (1994). Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **269**, 29934-29942.
- Yoon, K. L. and Guidotti, G. (1994). Studies on the membrane topology of the (Na,K)ATPase. *J. Biol. Chem.* **269**, 28249-28258.
- Yoon, K. L. and Guidotti, G. (submitted). The alpha subunit of (Na,K)ATPase interacts with cofilin.
- Zervos, A., Gyuris, J. and Brent, R. (1993). Mx11, a protein that specifically interacts with Max to bind Myc-Max recognition sites. *Cell* **72**, 223-232.