

전사활성 인자인 Sox4의 단백질 분해효소에 의한 표적 부위에 관한 연구

허은혜^{1,2} · 최주연^{1,3} · 장경희¹ · 김인경^{1,2} · 임향숙^{1*}

¹가톨릭대학교 의과대학 연구원 분자유전학연구소, ²가톨릭대학교 의과대학 생화학교실, ³상명대학교 생물학과

Sox4는 DNA 결합 도메인인 HMG-box와 전사 활성 도메인인 serine rich region (SRR)과 아직 그 기능이 알려져 있지 않은 glycine rich region (GRR) 등의 세 개의 기능 도메인을 가지는 전사인자이다. 전사인자인 Sox4는 생체 내 초기 분화 시 중요한 역할을 하는 유전자로 알려져 있으나 여전히 그 정확한 생리적 기능 및 세포 내에서 이 유전자 산물이 전사 활성화에 어떻게 관여하는 지 그 정확한 기전은 잘 밝혀져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 Sox4의 생리적 기능을 이해하고 세포 내에서 Sox4의 기능 연구에 유용하게 사용할 수 있는 항체를 제조하기 위해 Sox4를 대장균에서 발현, 정제하였다. 모든 기능 도메인을 다 포함하는 Sox4는 대장균에서 발현 시 대부분 절단되는 양상을 나타내었다. Sox4의 각 도메인을 대장균에서 GST-융합 단백질로 발현, 정제하여 그 발현 양상을 비교해 본 바 N-말단을 제거한 Sox4 (Δ HMG)의 경우 67 kDa 크기의 단백질이 생성되므로 이 단백질을 항원으로 이용하여 Sox4의 GRR에 특이적으로 반응하는 항체를 제조하였다. 또한, 67 kDa 크기의 단백질 외에 34 kDa 크기에서 GST-융합 단백질이 관찰되었다. 이 밴드는 Sox4 (GRR)를 발현, 정제시에도 관찰되는 동일한 크기의 밴드이며 thrombin과의 반응을 통해 7 kDa 크기로 절단되는 Sox4 밴드이다. 그러므로 이 들 결과로부터 GRR 내에 단백질 분해효소의 표적 부위가 존재함을 확인할 수 있었다. 본 연구결과는 아직 그 기능이 밝혀져 있는 않은 Sox4의 새로운 도메인인 GRR이 단백질 분해 효소의 표적 부위로 작용하여 Sox4의 안정성을 조절함으로써 Sox4의 활성화에 중요한 역할을 수행할 수 있다는 가능성을 제시하고 있다.

Key Words □ GRR, GST-Sox4, protease-sensitivity

Sox (SRV-HMG box) 유전자들은 성을 결정하는 유전자인 SRV의 high mobility group (HMG)-box 부위와 상당한 유사성을 지니는 도메인을 포함하고 있는데서 그 이름이 유래되었다(9, 22). HMG-box를 포함하는 단백질들은 $^A/T^A/TCAAAG$ motif에 높은 친화력을 가지는 것으로 알려져 있다(13,15,25). 이 AACAAAG motif는 T cell-specific enhancer의 최소 단위로 작용하는 것으로 알려져 있으나 lymphoid의 분화 조절에 관여하는 TCF-1과 LEF-1은 이 AACAAAG motif에 결합은 하나 전사 활성은 유도하지 않는 것으로 보고되어 있다(26). 많은 연구자들이 lymphocyte에서 특이적으로 발현되며 AACAAAG motif에 결합하여 전사를 활성화하는 제 3의 단백질을 발현하는 유전자를 찾고자하는 노력을 시도하였다. 이에 Goodfellow 실험실에서 사람의 Sox4 유전자를 최초로 클로닝 하게 되었고(7), Clevers 실험실에서 이 Sox4가 $^A/T^A/TCAAAG$ motif에 높은 친화력을 가지며 전사를 활성화하는 전자조절인자임을 밝혔다(27). 이 단백질은 DNA 결합 도메인인 HMG-box와 전사 활성 도메인인 serine rich region (SRR)과 아직 그 기능이 알려져 있지 않은 glycine rich region (GRR) 등의 세 개의 기능 도메인을 가지고 있다(27). 또한, Sox4는 T lymphocyte와 pre-B lymphocyte의 초기 분화 시 발현되며, Sox4 null mutants에서는 배아 14 일 경에 치사

를 유발하게 되므로 생명현상 유지에 있어 대단히 중요한 역할을 하는 유전자로 알려져 있다(19). 현재까지 밝혀진 Sox4의 기능으로는 중추 신경계와 심근 발생에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 여전히 그 정확한 생리적 기능은 잘 알려져 있지 않다(3,19).

대부분의 전사인자들은 키나제와 탈인산화효소의 작용에 의해 그 들 단백질의 인산화와 탈인산화를 통해 그 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다(14). 이러한 전사조절 인자 중 몇몇의 경우는 단백질이 생성된 후 단백질 분해 효소의 작용에 의해 분해됨으로써 그 기능을 조절하는 것이 알려지고 있다(1,5,11,20,24). 이와 같은 조절을 위해 진핵세포에서는 단백질의 생성 및 활성을 조절하는 하나의 기전으로 유비퀴틴-프로테아좀(ubiquitin-proteasome) 작용 기전을 사용하고 있다(1,5,11,20,24). 생성된 단백질이 온전한 형태를 이루지 못하거나 비정상적인 단백질이 만들어지면 대부분이 유비퀴틴과 반응하게 된다. 이들 단백질에 결합된 유비퀴틴이 프로테아좀의 표적부위로 작용하게 되므로, 결국 이 들 단백질들은 매우 다양한 길이의 작은 펩타이드로 분해되어 제거되게 된다(1,5,11,20,24). 진핵생물에서 세포 주기(cell cycle), 분화(differentiation), 24 시간 주기 리듬(circadian rhythm), 장기간의 기억(long-term memory), DNA 복구, 전사 휴지(transcriptional silencing), 항원 표시(antigen presentation)와 암과의 투쟁(combating cancer)이나 바이러스 감염(viral infection)등에서도 프로테아좀이 중요한 조절 역할을 수행하는 것으로 알려

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-590-2390, Fax: 02-532-0575
E-mail: hrhim@catholic.ac.kr

저 있다(8). 대다수의 원핵세포에도 단순한 형태의 프로테아좀은 있지만, 유비퀴틴이나 유비퀴틴의 결합에 관여하는 효소 시스템은 존재하지 않는 것으로 알려져 있다(8). 그러나 이들 세포 내에 존재하는 단백질 분해효소들의 작용에 의해 불안정하거나 세포에 유해한 단백질을 빠르게 분해시킴으로써 생명현상을 조절하는 것으로 알려져 있다(8). 대장균에서는 일반적으로 σ^{32} 에 의해 1~2 분내에 유해한 단백질들이 분해되어지는 것으로 알려져 있다(10).

본 연구에서는 전사인자인 Sox4를 대장균에서 발현 시 단백질 분해효소의 작용에 민감한 지를 조사하고 Sox4의 생리적 기능 분석을 위한 시료들을 확보하기 위해 Sox4의 각 도메인을 GST-융합 단백질로 대장균에서 발현, 정제하는 실험 방법을 정립하였다. 대장균에서 GST-융합 단백질로 분리 정제 중 Sox4의 GRR 부위에 대장균 내에 존재하는 단백질 분해 효소에 민감한 부위가 존재함을 관찰할 수 있었다. 이 연구에서 사용한 정제 방법은 원하는 목표 유전자 산물을 다량으로 발현, 정제하여 그 단백질의 분자생물학적, 생화학적 기능을 연구하는 데 사용할 수 있으며 대장균에서 단백질의 분해효소에 민감한 부위를 찾는 데 사용할 수 있는 좋은 방법으로 사료된다.

재료 및 방법

플라스미드 제조

대장균에서 Sox4를 GST (glutathione S-transferase) 융합 단백질로 발현하기 위해 Sox4의 각 도메인을 pGEX-4T 발현 벡터 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA)에 클로닝 하였다(Fig. 1). HMG-box를 포함하는 Sox4 (aa 1-173) 부위는 pcDM7-Sox4 (27)를 주형으로 하여 5 Sox4 primer (GCG CGA ATT CGG ATC CGC CAT G; bold체는 *EcoRI* 제한 효소 부위),

3 Sox4 primer (GCG CGT CGA CTC AGG TAC CCC CGC CGC C; bold체는 *SalI* 제한 효소 부위)와 *pfu* DNA 중합효소 (Stratagene, La Jolla, USA)를 이용하여 중합반응으로 증폭하였다. 증폭된 cDNA를 *EcoRI*과 *XhoI* 제한 효소로 잘라 전기영동을 통해 정제한 후 pGEX4T-1에 클로닝 하였다. 나머지 클론들은 Sox4의 각 도메인을 포함하는 부위에 존재하는 적당한 제한 효소 절단 부위들을 이용하여 pGEX-4T에 클로닝 하였다. pGEX-Sox4 플라스미드들은 GST와 Sox4 부위 사이에 thrombin 절단부위를 가지고 있어 GST와 Sox4 단백질 사이를 절단하여 Sox4만 정제하는데 이용된다. 클로닝한 모든 플라스미드들은 염기서열법과 면역블로팅법을 통해 염기서열의 정확성과 발현을 확인하였다.

GST-Sox4 단백질들의 발현과 정제

GST-Sox4 플라스미드는 특정 단백질 분해 효소를 가지고 있지 않는 BL21 ($F^-ompT hsdS_B(r_B^-m_B^-) gal dcm$) 균주에 삽입하여 단백질 발현에 이용한다(4,16,18). pGEX-Sox4 플라스미드를 함유하고 있는 대장균을 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 ampicilin을 포함하는 LB 배지 10 ml에서 16 시간 동안 배양한 후 90 ml의 LB 배지로 희석하여 2 시간 더 37°C에서 배양한다. GST-Sox4 단백질의 발현을 유도하기 위해 0.5 mM IPTG (isopropyl-1-thio-D-galactopyranoside; Amresco)를 넣고 3 시간 더 키운 후 4°C에서 8,000 $\times g$ 으로 25 분간 원심 분리하여 대장균을 침전시킨다. 이렇게 모아진 대장균들은 7 mM DTT, 100 $\mu\text{g/ml}$ lysozyme, 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 10 $\mu\text{g/ml}$ leupeptin을 포함하는 EBC 완충 용액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40) 1 ml에 용해 시켜 15 분간 얼음에 놓아둔 뒤 초음파로 대장균을 용해시킨다. 세포 찌꺼기는 4°C에서 10,000 $\times g$ 으로 10 분간 원심 분리하여 제거하고 상층액을 1.5 ml 새 튜브로 옮긴다. 미리 EBC 완충

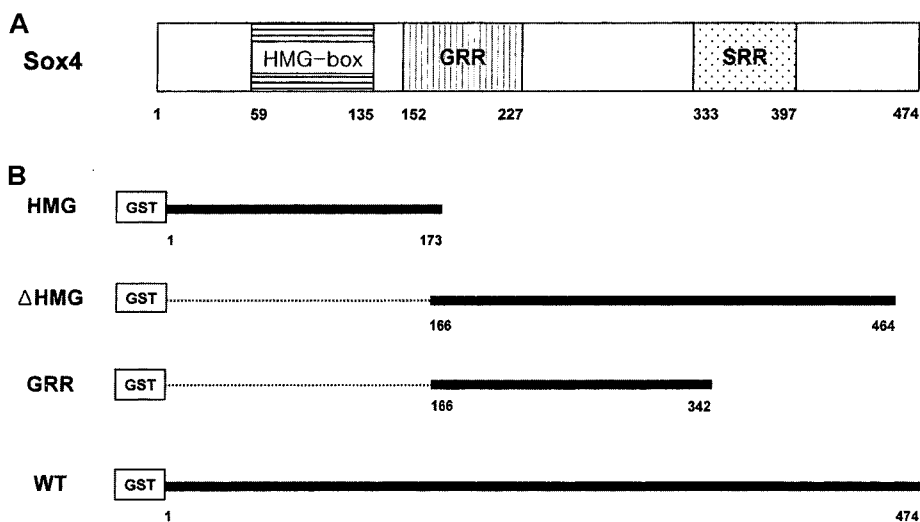


Fig. 1. Constructs expressed as GST-Sox4 fusion proteins in *E. coli* A. The box represents a full-length Sox4 protein with its functional domains: an HMG (high mobility group) box, GRR (glycine rich region) and SRR (serine rich region). B. All GST-Sox4 constructs analysed in this study. Amino acid residues at the junction of the truncation site are indicated under the box. The sequence integrity of all constructs was verified by DNA sequencing and expression in *E. coli*.

용액으로 2번 씻어둔 50% glutathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech) 50 μ 에 준비해둔 상층액을 넣고 잘 섞어준다. 상온에서 30분 동안 rotator에서 반응시킨 후, 10,000 \times g에서 1분간 원심 분리하여 glutathione bead에 붙은 GST-Sox4 융합 단백질을 침전시킨다. 0.05% SDS를 포함하는 NETN 완충용액(1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl)으로 3번 세척하고 GST 절단을 위한 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM KCl)으로 6번 세척한 후, 원심분리에 의해 남은 용액을 완전히 제거한다. 침전된 bead에 1 mM DTT를 포함하는 cleavage 완충용액 100 μ 를 넣고 human thrombin (Amersham Pharmacia Biotech) 4 units를 넣어 준 뒤 상온에서 1시간동안 360 회전하여 반응시킨다. 절단된 Sox4 단백질을 GST-bound Sepharose bead로부터 떼어낸 뒤 15% SDS-polyacrylamide gel에서 130 V로 2시간 동안 전기영동한다. Coomassie 염색용액(0.1% Brilliant blue R (Sigma, St. Louis, USA), 45% methanol, 10% acetic acid)에 30분간 염색시킨 후, 탈색 용액(10% methanol, 10% acetic acid)에 담가 발현된 단백질 밴드를 확인한다.

Anti-Sox4 polyclonal 항체 제조

Sox4에 대한 polyclonal 항체를 만들기 위해 GRR과 SRR을 포함하는 GST-Sox4 (Δ HMG) 단백질을 앞서 설명한 방법을 이용하여 발현시킨 후 glutathione bead와 반응시킨다. 0.05% SDS를 포함하는 NETN 완충 용액으로 6번 세척하고 50 mM Tris-HCl, pH 8.0로 10번 세척한다. 5 mM glutathione (Amresco), 50 mM Tris-Hcl, pH 8.0 용액 100 μ 를 넣어 37°C에서 3분 동안

반응한 후 12,000 rpm에서 원심 분리하여 상층액을 모은다. 이 과정을 세 번 반복하여 GST-Sox4 (Δ HMG) 단백질을 glutathione bead로부터 떼어낸다. 정제한 단백질을 장기 보관하기 위해서는 단백질을 포함하고 있는 용액에 최종 20%의 농도가 되게 글리세롤과 7 mM의 농도가 되게 DTT를 첨가하여 -70°C에서 보관한다. 이런 방법을 통해 정제된 2 mg의 단백질을 PBS로 투석한 후에 토끼에 주사하여 Sox4 항원에 대한 polyclonal 항체를 제조한 후 protein G affinity chromatography를 이용하여 polyclonal 항체를 정제하여 본 연구에 이용한다(Koma Biotech, Seoul, Korea).

면역블로팅법

대장균에서 발현, 정제한 Sox4 단백질들을 Protein Assay Solution (Bio-Rad, Richmond, USA)을 이용하여 각각의 단백질 농도를 측정하여 10 ng의 단백질을 15% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose 막에 옮겨 면역블로팅법을 시행한다. 1차 항체는 GST 단일항체 (Santa Cruz), Sox4 polyclonal 항체 등으로 바꾸어 반응시키고 2차 항체로 항원-항체 복합체와 반응시킨 후 ECL (Amersham Pharmacia Biotech) 방법으로 확인한다

결 과

대장균에서 Sox4 단백질의 발현과 Sox4 항체의 제조 및 항원 특이성

Sox4의 생리적 기능을 연구하기 위한 시료들을 확보하기 위해 모든 기능 도메인을 다 포함하는 Sox4 단백질을 대장균에서

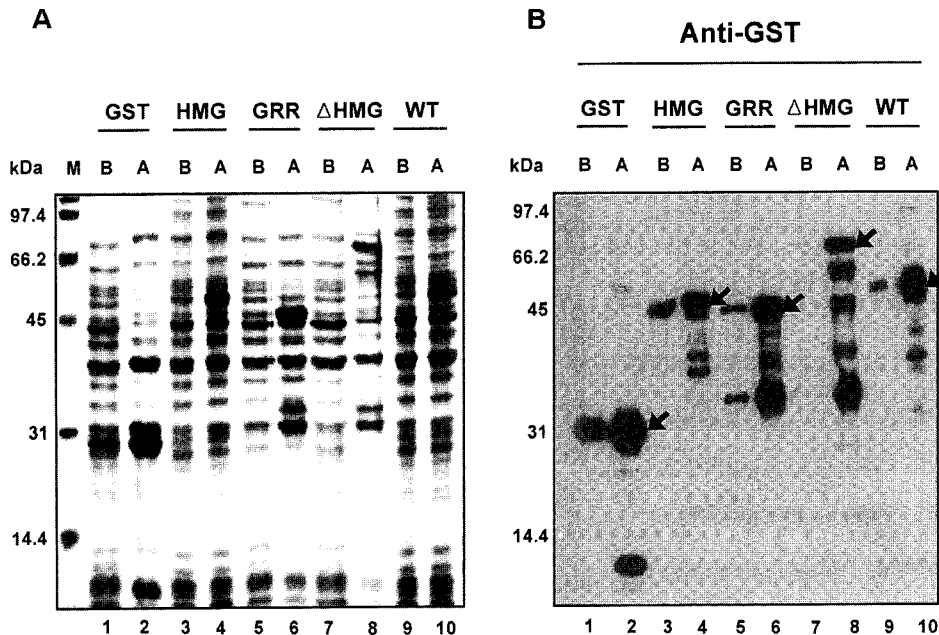


Fig. 2. Expression of full-length or truncate Sox4 proteins as GST- fusion proteins in *E. coli* . A. Expression of the GST-Sox4 fusion proteins. The indicated Sox4 proteins were expressed in *E. coli* strain BL21. Proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue. Lane M, molecular weight standard. "B" and "A" represent total cell extracts of *E. coli* cultures before and after IPTG induction, respectively. B. Immunoblot analysis of the GST-Sox4 fusion proteins, following 15% SDS-PAGE shown in Figure 2A, with the GST-antibody. The GST-fusion proteins are indicated by arrows.

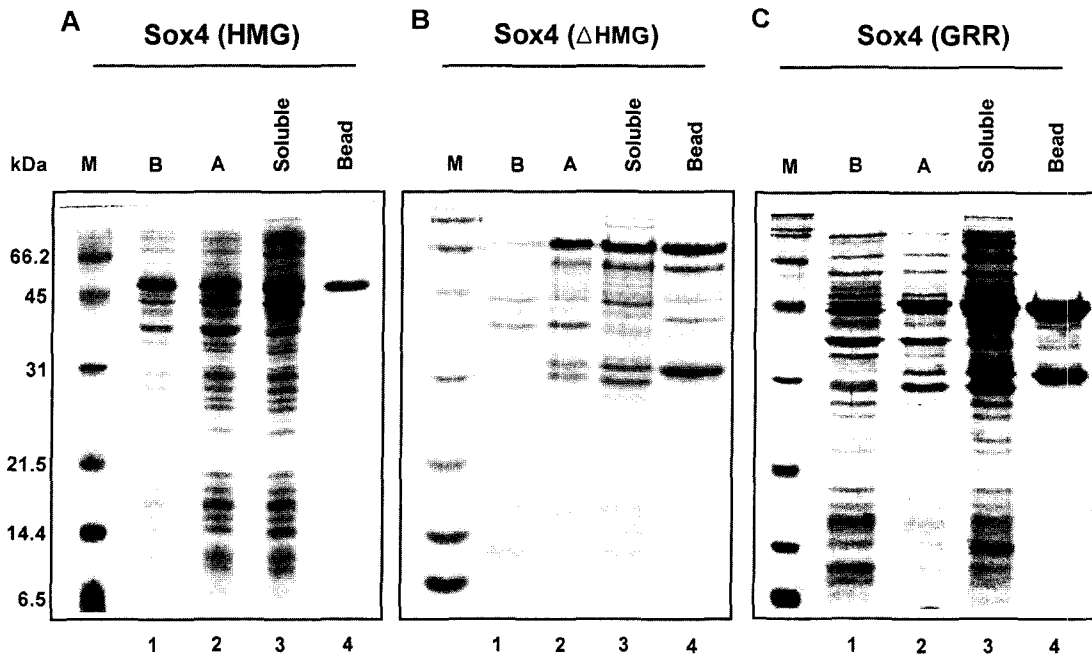


Fig. 3 Expression and purification of the truncate Sox4 proteins.

A. Expression of GST-Sox4 (HMG). B. Expression of GST-Sox4 (Δ HMG). C. Expression of GST-Sox4 (GRR). Lanes M, molecular weight standard; lanes 1, total cell extracts of *E. coli* cultures before IPTG induction; lanes 2, total cell extracts of *E. coli* cultures after IPTG induction; lanes 3, total soluble lysates and lanes 4, GST-Sox4 proteins selectively bound to glutathione Sepharose beads. The GST-Sox4 proteins are indicated by arrows.

GST-융합 단백질로 발현, 정제하고자 pGEX 시스템을 이용하였다(18). Sox4 cDNA를 pGEX-4T 벡터에 클로닝하여 특정 단백질 분해효소가 결핍된 균주인 BL21에 삽입하였다. IPTG를 처리하여 GST-Sox4 융합 단백질의 발현을 유도한 후 15% SDS-PAGE에서 전기영동으로 분리하였다(Fig. 2A). Coomassie 염색법으로 Sox4의 발현을 조사하였으나 73.1 kDa 크기의 GST-Sox4 융합 단백질의 발현을 확인할 수 없었다(Fig. 2A, lane 10; Table 1). Coomassie 염색법으로 확인되지 않는 소량의 단백질의 발현을 확인하기 위해 면역블로팅 방법으로 GST-Sox4의 발현을 조사한 바 73.1 kDa 크기의 단백질은 확인되지 않았으나 48.2 kDa 정도에서 GST 항체와 특이적으로 반응하는 밴드를 확인할 수 있었다(Fig 2B, lane 10, Table 1). 그러나 포유류 세포주에서는 Sox4 단백질을 발현 시 완전한 크기인 52 kDa의 Sox4 단백질이 면역블로팅법에 의해 확인된다(data not shown). 이는 대장

균에서 사람의 Sox4 단백질의 발현 및 안전성에 영향을 끼치는 시스템이 존재함을 시사한다.

항체를 만들기 위한 항원은 대장균에서 대량으로 발현, 정제를 해야 하므로 대장균에서 원하지 않는 크기에서 절단된 산물로 관찰되는 full-length Sox4는 이 실험 목적에 타당하지 않다. HMG-box 부위를 포함하는 Sox4의 N-말단 부위는 항원으로 사용할 수 있을 정도로 충분한 양이 대장균에서 발현되고 80% 이상의 순도로 정제 가능하나 이 부위는 포유세포주의 핵에서 DNA에 결합하는 부위이며 HMG-box를 포함하는 단백질과 아미노산 잔기들의 유사성이 높으며, Sox11의 HMG-box부위와는 94%의 유사성을 나타내므로 HMG-box 부위를 항원으로 사용하지 않았다(Fig. 3A) (12, www.expasy.com). HMG-box를 포함하는 N-말단 부위를 제거한 Sox4 (Δ HMG)는 Sox4의 전사 활성도메인인 SRR 부위와 아직은 그 기능이 알려져 있지 않은 GRR 부위를 포함하며 다른 단백질들과도 아미노산 잔기들의 유사성이 적으므로 이 부분을 대장균에서 발현, 정제하여 항체 제조를 위한 항원으로 사용하고자 하였다(Fig. 1). 이 HMG 부위를 GST-융합 단백질로 대장균에서 발현한 결과 일부가 대장균에서 절단되기는 하나 67.5 kDa 크기의 GST-Sox4 (Δ HMG) 단백질이 발현되며, 그 발현 양과 정제 후의 순도면에서도 Sox4 항체를 만들 수 있는 항원으로 적합하여 대장균에서 대량 발현한 후, 수용성 Sox4 단백질을 친화성 컬럼의 일종인 glutathione Sepharose 4B를 이용하여 한 단계로 정제하여 Sox4 polyclonal 항체 제조에 사용하였다(Fig. 3B).

Table 1. Sox4 protein expressed as GST-fusion

GST-Sox4 fusion protein	Calculated molecular mass (Da)/ Theoretical pI	Estimated molecular mass By SDS-PAGE (Da)
GST	27,000	28,500
HMG	45,284 / 9.65	47,400
Δ HMG	55,283 / 5.33	67,500
GRR	42,748 / 9.48	45,000
WT	73,130 / 6.87	48,200

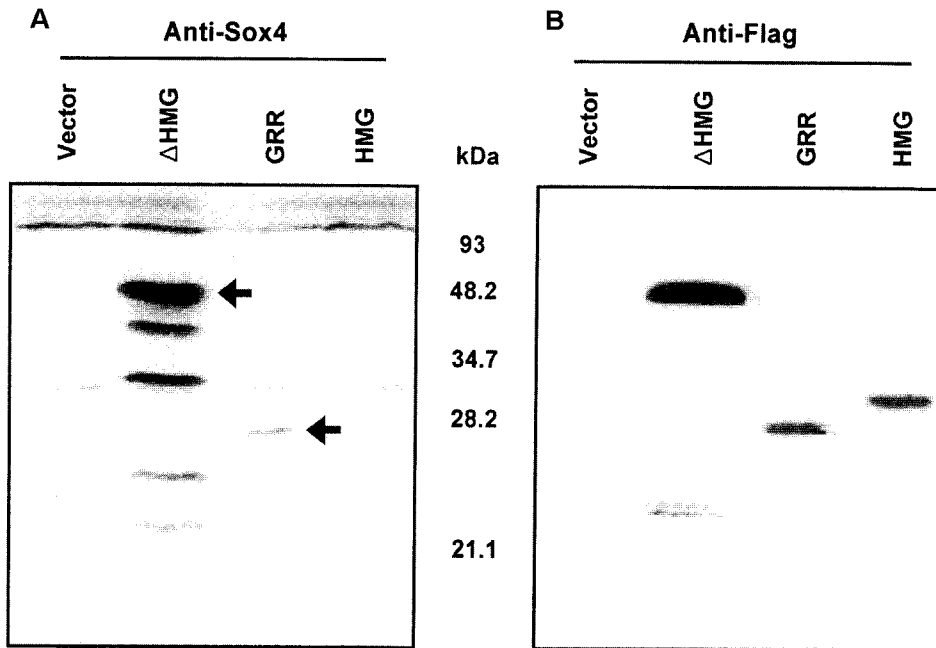


Fig. 4. Specificity of the polyclonal Sox4 antibody.

A. Immunoblot analysis with the Sox4 antibody. A plasmid encoding the N- or C-terminal FLAG-tagged Sox4 truncate mutant was transfected into HEK293 cells. Expression of the truncated Sox4 protein was detected by immunoblot analysis with polyclonal Sox4 antibody. B. Immunoblot analysis with the FLAG antibody. The FLAG-Sox4 proteins are indicated by arrows.

본 연구에서 제조한 Sox4 항체의 항원에 대한 반응 특이성을 조사하기 위해 Sox4가 발현되지 않는 HEK293 세포에 N-말단 또는 C-말단에 FLAG로 표지한 각 종 Sox4 도메인을 발현하는 플라스미드를 세포 내에 주입한 후 면역블로팅법을 통해 발현양상을 조사하였다(Fig. 4). 먼저 세포로부터 단백질을 추출하여 Sox4 항체로 면역블로팅 한 결과 벡터만을 세포 내에 주입한 HEK293 세포에서는 Sox4의 발현이 확인되지 않는 데 반해 Sox4의 GRR 부위를 포함하는 단백질인 Sox4 (Δ HMG), Sox4 (GRR)은 그 발현이 확인되었다. 이와는 달리 Sox4 (Δ HMG)의 경우는 이 항체와는 반응성을 나타내지 않는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 동일한 blot에서 Sox4 항체를 제거한 후 FLAG 항체로 면역블로팅을 실시한 결과 각 Sox4의 도메인들이 예상되는 크기의 밴드로 확인되었다(Fig. 4B). 그러므로 이 연구에서 사용한 Sox4 항체가 Sox4의 GRR 부위를 특이적으로 인지하는 것을 알 수 있다.

이 Sox4 polyclonal 항체는 GST-Sox4 (Δ HMG)를 항원으로 이용하여 제조한 항체이므로 GST에 대한 항체도 포함하고 있어 그림 2B에서 보는 것과 같이 GST뿐만 아니라 GST-Sox4 (HMG) 융합 단백질의 GST 부분과도 반응하므로 면역블로팅에서 밴드로 확인이 된다. 그러나 Fig. 4A에서 보는 바와 같이 포유류 세포주에서는 GST에 대한 밴드가 확인되지 않으므로 이들 세포주에서 Sox4의 발현을 확인하기 위해 사용할 때는 전혀 실험적으로 문제가 없는 항체임을 알 수 있다.

대장균에서 Sox4 기능 도메인의 발현 양상의 비교 분석

상기의 결과를 바탕으로 대장균에서 Sox4의 발현 양상을 연구

하기 위해 Sox4의 각 종 도메인을 pGEX-4T 벡터에 클로닝 하여(Fig. 1) Sox4 단백질들의 발현을 비교 분석하였다(Fig. 2). Sox4의 HMG-box 부위를 포함하는 N-말단 부위(아미노산 잔기 1-173)를 GST-융합 단백질로 발현 시 47.4 kDa 크기의 단백질 밴드를 확인할 수 있다(Fig. 2A, B, lanes 4; Fig. 3A). HMG-box 부위를 포함하는 N-말단을 제거한 Sox4 (Δ HMG)를 GST-융합 단백질로 대장균에서 발현한 결과 67.5 kDa 크기의 GST-Sox4 (Δ HMG) 단백질뿐만 아니라 34 kDa 크기에서 GST-융합 단백질 밴드를 관찰할 수 있었다(Fig. 2A, B, lanes 8; Fig. 3B). GST-Sox4 (GRR) 단백질도 대장균에서 발현 시 45 kDa 크기의 단백질뿐만 아니라 GST-Sox4 (Δ HMG) 발현 시 관찰되는 것과 동일한 34 kDa 위치에서 밴드를 관찰할 수 있다(Fig. 3C).

인간으로부터 유래된 단백질들을 대장균에서 발현하면 Sox4 단백질에서 관찰되는 절단 현상과 유사한 현상이 나타나는 지를 조사하기 위해 파킨슨병의 원인 유전자로 알려진 인간 α -synuclein을 GST-융합 단백질로 발현시켜 분리 정제하였다(Fig. 5A) (4). 그러나 Sox4와는 달리 α -synuclein은 단백질 분해효소의 작용에 전혀 반응성을 나타내지 않으며 약 43 kDa 크기에서 GST-synuclein 단백질 밴드가 관찰되었다. 이 GST-synuclein 단백질을 thrombin과 반응시키면 17.5 kDa 크기의 α -synuclein 단백질로 절단된다(Fig. 5A) (4). 그러므로 Fig. 3에서 관찰되는 Sox4의 절단된 밴드는 Sox4의 아미노산 잔기가 대장균 내에 존재하는 단백질 분해효소에 대해 특이적으로 반응하므로 생성되는 산물임을 시사하고 있다.

Sox4의 어느 부위가 단백질 분해효소에 대한 표적 부위인지를 좀 더 자세히 분석하기 위해서 정제된 GST-Sox4 (Δ HMG) 단

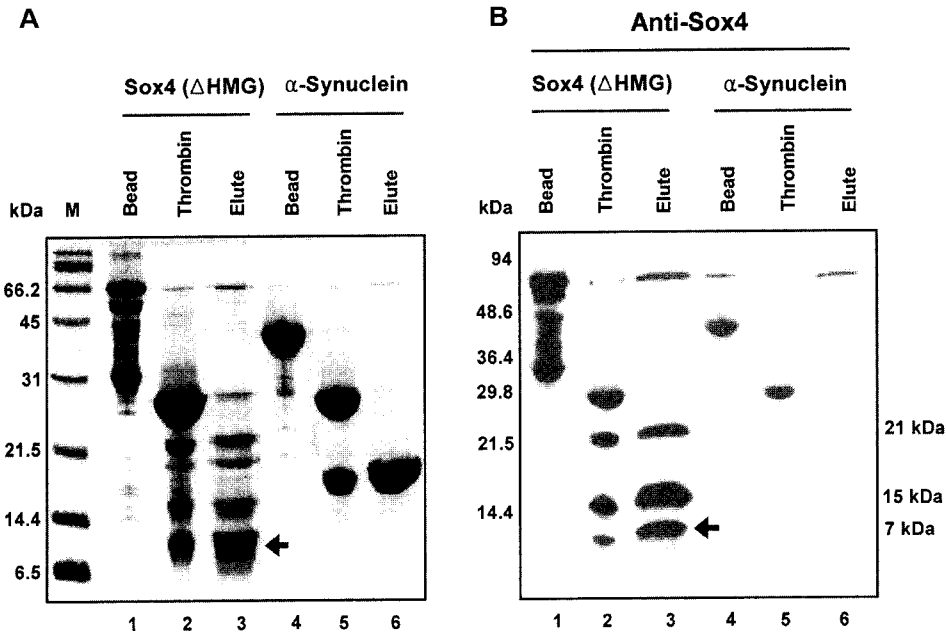


Fig. 5. Protease-sensitivity of Sox4 (ΔHMG).

A. Comparison of protease sensitivity between the purified Sox4 (ΔHMG) and α-synuclein. GST-Sox4 (ΔHMG) and GST-synuclein prepared by single-step purification were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by Coomassie brilliant staining. Lane M, molecular weight standard; lanes 1 and 4, the GST-Sox4 (ΔHMG) and GST-synuclein protein selectively bound to glutathione Sepharose beads, respectively; lanes 2 and 5, thrombin proteolytic digestion of GST-fusion proteins bound to beads; lanes 3 and 6, eluate of the Sox4 (ΔHMG) and α-synuclein protein released from GST bound glutathione Sepharose beads, respectively. B. Immunoblot analysis of the cleaved Sox4 (ΔHMG) proteins, following 15% SDS-PAGE shown in Figure 5A, with the Sox4-antibody. The arrow indicates the cleaved Sox4 (ΔHMG) protein that is derived from 34 kDa of GST-fusion protein shown in lane 1.

백질을 thrombin으로 절단하여 생기는 산물들의 크기와 Sox4 항체와의 반응성을 조사하였다(Fig. 5). Fig. 5A에서 보는 바와 같이 GST-Sox4 (ΔHMG)를 glutathione bead로 정제한 후 thrombin으로 반응을 시키면 GST외에 세 개의 절단된 주 밴드들이 관찰된다. 이 세 밴드가 Sox4 (ΔHMG)에서 유래된 밴드인지를 확인하기 위해 Sox4 항체로 면역블로팅을 실시하였다(Fig. 5B). Thrombin과 반응시킨 후 glutathione bead로부터 절단된 단백질을 유리해 내면 GST는 여전히 glutathione bead에 붙어있으므로 확인되지 않으나 나머지 세 밴드는 Sox4 항체와 특이적으로 반응하는 것으로 보아 21, 15, 7 kDa 크기의 세 밴드들은 Sox4 (ΔHMG)로부터 유래되는 것임을 알 수 있다(Fig. 5B, lane 3). 이 결과로부터 HMG 내에 대장균 내에 존재하는 단백질 분해효소의 작용에 민감하게 반응하는 부위가 존재함을 알 수 있다(Fig. 5B).

Fig. 3의 B와 C에서 관찰되는 34 kDa 크기의 단백질들은 glutathione bead에 결합되는 것이므로 약 27 kDa 정도인 GST 부분을 제거하고 생각하면 HMG와 GRR의 공통부분인 GRR의 N-말단 부위에서부터 약 7 kDa 정도의 위치에 존재하는 아미노산 잔기가 대장균 내에 존재하는 단백질 분해효소에 의한 표적 부위로 작용함을 시사하고 있다(Fig. 1). Sox4의 GRR 도메인 내에 단백질 분해효소에 대한 표적 부위가 존재하는지를 증명하기 위해 GST-Sox4 (GRR)를 발현한 후 glutathione bead로 정제하여 thrombin으로 반응 시켜 생성되는 산물의 크기와 Sox4 항

체와의 반응성을 조사하였다(Fig. 6). Glutathione bead로 정제한 후 결과를 보면 단백질 분해효소에 의해 절단되지 않은 45 kDa 크기의 Sox4 (GRR) 단백질과 GRR 부위에서 공격을 받아 만들어진 단백질 밴드가 3:2의 비율로 생성됨을 관찰할 수 있다(Fig. 6A, lane 4). Glutathione bead로 정제한 단백질을 thrombin으로 반응시킨 후 bead로부터 Sox4 단백질을 유리해 내면 16.2 kDa와 7 kDa 크기의 두 밴드가 주로 관찰되며 이 밴드들은 Sox4 항체와 특이적으로 반응한다(Fig. 6B). Fig. 5와 6에서 thrombin 반응 시 우리가 예상하는 바와 같이 7 kDa 크기의 밴드가 관찰되는 데 이는 34 kDa 크기의 GST-융합 단백질로부터 유래된 것으로 약 27 kDa 정도인 GST 부분이 제거되고 남은 Sox4의 GRR의 N-말단 부위에서부터 약 7 kDa 정도의 위치에 존재하는 아미노산 잔기에서 절단되어 생성된 것임을 알 수 있다. 그러므로 Sox4의 GRR 도메인 내에 대장균의 단백질 분해효소에 민감한 표적 부위가 존재함을 알 수 있다.

고찰

본 연구에서 전사인자인 full-length Sox4를 대장균에서 발현 시 단백질 분해효소에 의해 절단되는 것을 관찰하였다(Fig. 2A). 이러한 절단이 Sox4의 어느 부위에서 일어나는 지 조사하기 위해 Sox4를 각 도메인별로 나누어 GST-융합 단백질로 대장균에서 발현 시켰다. Sox4 (ΔHMG)는 대장균에서 발현 시 67.5

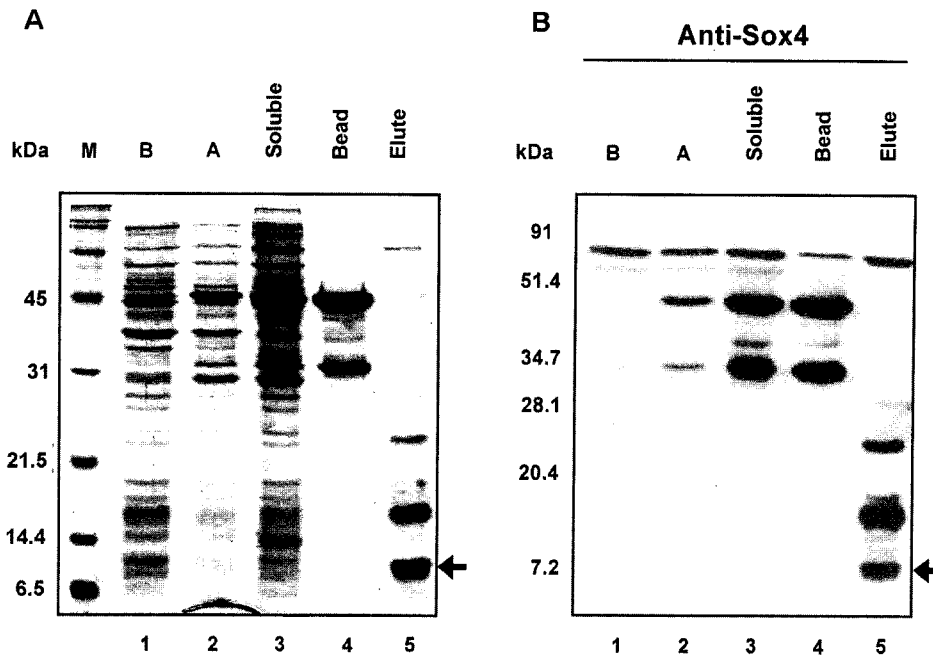


Fig. 6. A protease-sensitive site exists within GRR of Sox4.

A. Expression of Sox4 (GRR). Proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue. Lane M, molecular weight standard, lane 1, total cell extracts of *E. coli* cultures before IPTG induction; lane 2, total cell extracts after IPTG induction; lane 3, total soluble lysates; lane 4, the GST-Sox4 (GRR) selectively bound to glutathione Sepharose beads and lane 5, eluate of the Sox4 (GRR) after thrombin proteolytic digestion of GST-Sox4 (GRR). B. Immunoblot analysis of the cleaved GST-Sox4 (GRR), following 15% SDS-PAGE shown in Figure 6A, with the Sox4-antibody. The cleaved 7 kDa Sox4 protein is indicated by arrow.

kDa 크기의 단백질이 확인될 뿐만아니라 34 kDa 크기의 단백질이 관찰되었다. 동일한 크기의 34 kDa 단백질은 GST-Sox4 (GRR)의 경우 더 뚜렷하게 관찰할 수 있었다(Fig. 6). 이 34 kDa의 밴드는 thrombin과 반응 시 27 kDa 크기의 GST와 7 kDa 정도의 밴드로 절단되게 되는 데, 이 밴드는 Sox4 항체와 특이적으로 반응을 한다. 그러므로 Sox4 (GRR)과 Sox4 (Δ HMG)의 공통적인 부분인 GRR 내에 단백질 분해효소에 민감한 아미노산 잔기가 존재함을 보여주고 있다.

이와 유사한 예로 조절인자인 Sp1의 O-glycosylation이 감소되면 단백질 분해효소에 대한 반응성이 증가하게 된다는 보고가 있다(23). 이는 Sp1의 N-말단 54 아미노산 부위가 Sp1의 분해를 유도하는 표적 부위로 작용함으로써 나타나는 현상임이 밝혀져 있다(23). 반면, 포유류 세포주에서 Sox4를 발현하면 대장균에서 관찰되는 절단 현상을 관찰할 수 없다(data not shown). 그러나 Fig. 6에서 관찰되는 밴드들은 무작위로 절단된 것이 아니라 특정 부위에 분해효소가 특이적으로 작용하여 생성되는 것임을 알 수 있다. 그러므로 절단된 단백질의 크기를 계산하여 나온 결과로부터 단백질 분해효소가 GRR 내의 glycine (aa 210)과 valine (aa 211)을 특이적으로 인지하여 절단하는 것으로 추정할 수 있다. 또한, 정확한 절단 부위는 절단된 단백질을 정제하여 단백질의 N-말단의 아미노산 잔기의 서열을 분석함으로써 알 수 있다. 그러므로 이 연구에서 관찰되는 Sox4의 절단 과정이 대장균에서 방어기전으로 나타나는 현상일 수도 있으나 포유류 세포주에서는 면역블로팅법 외에 보다 더 민감한 동위원소를 이용한 pulse-

chase법으로 발현되는 Sox4 단백질의 안정성을 조사하는 등의 실험을 수반함으로써 포유류 세포주에서 Sox4의 발현 및 분해 양상을 관찰할 수 있을 것으로 사료된다(21).

대개의 경우 SDS-PAGE에서 단백질의 밴드들은 계산된 분자량과 비슷한 크기에서 확인되나 산성 아미노산 기를 많이 포함하는 경우는 다른 단백질 보다 음전하량이 더 많아 음전하를 띠는 SDS와의 반발력이 증가하므로 다른 단백질에 비해 SDS와의 결합력이 저하되게 된다. 그러므로 전기영동 시 이동 속도가 다른 단백질보다 늦어지게 되어 예상하는 것 보다 더 큰 크기에서 밴드가 관찰되게 된다. HMG도 전기영동 시 예상되는 밴드인 55.3 kDa 보다 더 큰 67.5 kDa에서 관찰되는 데 ExPASy (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)를 이용하여 pI값을 구해 본 바 산성 아미노산 잔기를 많이 포함하고 있으므로 이런 결과가 관찰됨을 알 수 있다(Table 1).

이 연구의 결과는 Sox4가 전사 활성을 수행한 후 GRR 도메인이 특수한 환경에서 단백질 분해효소의 표적으로 작용하여 Sox4가 절단됨으로써 생체 내에서 그 기능을 조절할 수 있을 것이라는 가능성을 제시하고 있다. Full-length Sox4는 대장균에서 단백질 분해효소에 민감한 형태로 존재하나 단백질 분해효소에 민감한 부위를 제거함으로써 단백질의 분해 효소에 저항성이 높은 단백질을 발현할 수 있다. 이와 같이 Sox4의 분해 현상을 관찰할 수 있는 클론들을 제조하고 이들을 이용하여 Sox4 항체를 제조함으로써 Sox4 유전자의 생리적 기능을 밝힐 수 있는 시료들을 확보할 수 있으므로 이 연구의 의의가

크다고 할 수 있다

또한, 이 연구에서 사용한 glutathione 친화성 컬럼 방법은 질여과와 이온 교환 컬럼 등의 전형적인 컬럼들을 이용하여 단백질을 정제하던 종래의 전통적인 방법과는 달리 한 종류의 친화성 컬럼만으로 한 번에 순도가 아주 높은 Sox4 단백질을 정제할 수 있는 빠르고 간편한 방법임을 확인하였다(17). 또한, GST-Sox4의 접합부위를 thrombin으로 절단하여 Sox4만을 GST로부터 분리 정제할 수 있으며 동시에 대장균에서 절단된 단백질도 분리 정제할 수 있으므로 절단 부위를 아미노산 서열 방법을 이용하여 확인할 수 있는 좋은 시스템을 시사한다. 이 연구에서 사용한 정제 방법은 생화적, 세포생물학적 연구에 이용할 수 있는 각종 Sox4 단백질을 다량으로 확보하는 데 응용할 수 있는 좋은 방법으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 학술진흥재단(KRF-99-041-D0003444)에 의해 지원되었음

참고문헌

- Baumeister, W., J. Walz, F. Zuhl, and E. Seemuller. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 6, 367-380.
- Berta, P., J.R. Hawkins, A.H. Sinclair, A. Taylor, B.L. Griffiths, P.N. Goodfellow, and M. Fellous. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 29, 448-450.
- Cheung, M., M. Abu-Elmagd, H. Clevers, and P.J. Scotting. 2000. Roles of Sox4 in central nervous system development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 23, 180-191.
- Choi, J.Y., Y.M. Sung, H.J. Park, E.H. Hur, S.J. Lee, C. Hahn, B.R. Min, I.K. Kim, S. Kang, and H. Rhim. 2002. Rapid purification and analysis of α -synuclein proteins: C-terminal truncation promotes the conversion of α -synuclein to a protease-sensitive form in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 35, 1-7
- Ciechanover, A. 1994. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 7, 13-21.
- Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.* 15, 7151-7160.
- Farr, C.J., D.J. Easty, J. Ragoussis, J. Collignon, R. Lovell-Badge, and P.N. Goodfellow. 1993. Characterization and mapping of the human SOX4 gene. *Mamm. Genome.* 4, 577-584.
- Glickman, M.H. 2000. Getting in and out of the proteasome. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11, 149-158.
- Gubbay, J., J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Munsterberg, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 19, 245-250.
- Herman, C., D. Thevenet, R. D'Ari, and P. Bouloc. 1995. Degradation of sigma 32, the heat shock regulator in *Escherichia coli*, is governed by HflB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 11, 3516-3520.
- Hershko, A. and A. Ciechanover. 1998. The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
- Jay, P., C. Goze, C. Marsollier, S. Taviaux, J.P. Hardelin, P. Koopman, and P. Berta. 1995. The human SOX11 gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. *Genomics.* 20, 541-545.
- Nasrin, N., C. Buggs, X.F. Kong, J. Carnazza, M. Goebel, and M. Alexander-Bridges. 1991. DNA-binding properties of the product of the testis-determining gene and a related protein. *Nature* 28, 317-320.
- Nishinaka, T., Y.H. Fu, L.I. Chen, K. Yokoyama, and R. Chiu. 1997. A unique cathepsin-like protease isolated from CV-1 cells is involved in rapid degradation of retinoblastoma susceptibility gene product, RB and transcription factor SP1. *Biochim. Biophys. Acta.* 10, 274-286.
- Oosterwegel, M.A., M.L. van de Wetering, F.C. Holstege, H.M. Prosser, M.J. Owen, and H.C. Clevers. 1991. TCF-1, a T cell-specific transcription factor of the HMG box family, interacts with sequence motifs in the TCR beta and TCR delta enhancers. *Int. Immunol.* 3, 1189-1192.
- Rhim, H., F. Chan, C.O. Echeteu, and A.P. Rice. 1993. Rapid purification of monomer HIV-2 Tat protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 4, 24-31.
- Rhim, H., C.O. Echeteu, C.H. Herrmann, and A.P. Rice. 1994. Wild-type and mutant HIV-1 and HIV-2 Tat proteins expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 7, 1116-1121.
- Rhim, H. and A.P. Rice. 1993. TAR RNA binding properties and relative transactivation activities of human immunodeficiency virus type 1 and 2 Tat proteins. *J. Virol.* 67, 1110-1121.
- Schilham, M.W., M.A. Oosterwegel, P. Moerer, J. Ya, P.A. de Boer, M. van de Wetering, S. Verbeek, W.H. Lamers, A.M. Kruisbeek, A. Cumano, and H. Clevers. 1996. Defects in cardiac outflow tract formation and pro-B-lymphocyte expansion in mice lacking Sox-4. *Nature* 25, 711-714.
- Schwartz, A.L. and A. Ciechanover. 1999. The ubiquitin-proteasome pathway and pathogenesis of human diseases. *Annu. Rev. Med.* 50, 57-74.
- Seong, I.S., J.Y. Oh, S.J. Yoo, J.H. Seol, and C.H. Chung. 1999. ATP-dependent degradation of SulA, a cell division inhibitor, by the HslVU protease in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 30, 211-214.
- Sinclair, A.H., P. Berta, M.S. Palmer, J.R. Hawkins, B.L. Griffiths, M.J. Smith, J.W. Foster, A.M. Frischauf, R. Lovell-Badge, and P.N. Goodfellow. 1990. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 19, 240-244.
- Su, K., M.D. Roos, X. Yang, I. Han, A.J. Paterson, and J.E. Kudlow. 1999. An N-terminal region of Sp1 targets its proteasome-dependent degradation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 21, 15194-15202.
- Tanaka, K., T. Suzuki, and T. Chiba. 1998. The ligation systems for ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Mol. Cells.* 31, 503-512.
- Travis, A., A. Amsterdam, C. Belanger, and R. Grosschedl. 1991. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function. *Genes. Dev.* 5, 880-894.
- van de Wetering, M., M. Oosterwegel, D. Dooijes, and H. Clevers. 1991. Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box. *EMBO J.* 10, 123-132.
- van de Wetering, M., M. Oosterwegel, K. van Norren, and H. Clevers. 1993. Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *EMBO J.* 12, 3847-3854.

(Received May 28, 2002/Accepted September 11, 2002)

ABSTRACT: A Novel Glycine-Rich Region in Sox4 is a Target for the Proteolytic Cleavage in *E. coli*
Eun-Hye Hur^{1,2}, Ju-Youn Choi^{1,3}, Kyung-Hee Jang¹, In-Kyung Kim^{1,2}, and Hyangshuk Rhim^{1*} (¹Research Institute of Molecular Genetics, Catholic Research Institutes of Medical Science, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea, ²Biochemistry, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea, ³Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea)

Sox4, a transcription factor, consists of three functional domains: an HMG-box domain as a DNA binding domain, serine rich region as a transactivation domain and glycine rich region (GRR), an unknown functional domain. Although Sox4 is known to be functionally involved in heart, B-cell and reproductive system development, its physiological function remains to be elucidated. We used pGEX expression system to develop a simple and rapid method for purifying Sox4 protein in suitable forms for biochemical studies of their functions. Unexpectedly, we observed that full-length Sox4 appears to be protease-sensitive during expression and purification in *E. coli*. To map the protease-sensitive site in Sox4, we generated various constructs with each of functional domains of Sox4 and purified as the GST-Sox4 fusion proteins using glutathione beads. We found that the specific cleavage site for the proteolytic enzyme, which exists in *E. coli*, is localized within the novel GRR of Sox4. Our study suggest that the GRR of Sox4 may a target for the cellular protease action and this cleavage in the GRR may be involved in regulating physiological function of Sox4. Additionally, our study may provide a useful method for investigating the proteolytic cleavage of the target molecule in *E. coli*.