

대장균을 이용한 세포사멸 유도 단백질 caspase-9의 발현에 관한 연구

성영모² · 한철² · 최주연^{1,4} · 박효진² · 성근혜² · 남민경¹ · 김상수¹ · 김인경³ · 강성만² · 임함숙^{1*}

¹가톨릭대학교 의과대학 연구원 분자유전학연구소, ²고려대학교 생명공학원,

³가톨릭대학교 의과대학 생화학교실, ⁴상명대학교 생물학과

Caspase는 세포사멸 과정에서 중심적 역할을 하는 cysteine 단백질 분해 효소이다. 그 중 caspase-9은 활성이 없는 전장 단백질로 존재하지만 Apaf-1과 cytochrome *c*와 함께 apoptosome을 이루면 활성화된다. 활성화된 caspase-9은 다른 caspase들을 활성화 시키는 중요한 기능을 갖는다. 본 연구에서는 대장균에서 전장 caspase-9 단백질을 정제하고자 pGEX 발현 시스템을 이용하였다. 그러나 일반적 배양 및 유도조건에서 caspase-9을 발현시키면 과도한 단백질 분해로 인하여 전장 caspase-9 단백질이 매우 적게 발현되었다. 이를 극복하기 위해 배양조건과 유도인자의 농도를 변화시키자 caspase-9의 과도한 단백질 분해 현상이 감소되고 전장 caspase-9의 발현 정도도 상당량 향상되었다. 본 연구에서 확립된 배양조건으로 caspase-9을 발현, 정제하면 70% 이상의 순도를 가진 GST-caspase-9 단백질을 손쉽게 얻을 수 있다. 더불어 GST 융합 caspase-9이 대장균에서 발현될 때도 포유세포 내에서 절단되는 것과 동일한 위치인 Asp315에서 자가 단백질 분해 반응이 일어난다는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서는 caspase-9의 생화학적, 세포생물학적 기능연구에 필요한 전장 단백질을 다량으로 확보할 수 있는 간단하고 효과적인 정제방법을 제안한다.

Key words □ Caspase-9, pGEX 발현 시스템, 자가 단백질 분해, IPTG 유도인자, 배양온도, PEST 부위

Cysteine 단백질 분해 효소인 caspase-9은 활성이 없는 효소원 (zymogen)의 상태로 존재한다. 그러나 특정한 세포사멸 신호가 세포 안으로 전달되면 caspase-9은 Apaf-1 (apoptotic protease-activating factor-1)과 cytochrome *c*를 만나 함께 apoptosome을 형성하여 활성을 가진 효소가 된다(6). 이렇게 활성화된 caspase-9은 비활성 형태의 caspase-3와 7을 활성화시키고 이들은 여러 가지 단백질들을 분해 시켜 세포사멸 현상이 나타나도록 한다. 이러한 단계적인 caspase 단백질들의 활성화는 중추신경계의 발달 동안이나 치명적 세포손상에 따른 세포의 제거에 필요한 세포사멸의 중요한 경로가 된다(4, 5).

세포사멸 자극이 미토콘드리아로 전달되면 cytochrome *c*가 세포질로 빠져 나오고 Apaf-1과 함께 바퀴 형태의 올리고머를 만든다. 뒤이어 Apaf-1의 CARD (caspase recruitment domain) 도메인과 caspase-9의 CARD 도메인이 비공유 결합을 함으로써 완전한 apoptosome 복합체가 이루어진다(1, 8). 이 과정 중 전장 caspase-9은 이합체 이상의 올리고머 단백질의 형태가 되면서 활성을 가지게 된다(9, 14). 287번째 cysteine 아미노산 잔기를 활성화 위치로 하는 caspase-9이 활성화되면 가장 먼저 315번째 아미노산 잔기인 aspartic acid 뒤에서 자가분해 반응을 일으켜 큰 아단위 (subunit) p35와 작은 아단위 p12을 만든다(Fig. 1A)(15). 끝이어 활성화된 caspase-9은 caspase-3의 175과 176 번째 아미노산 사이의 펩티드 결합을 절단하여 caspase-3를 활성화시킨다. 역으로

caspase-3에 의한 caspase-9의 단백질 분해 현상도 존재한다. Apoptosome의 활성을 증폭하고자 하는 피드백 기작의 하나로서 caspase-3가 caspase-9의 330번째 아미노산 잔기를 자르면 결국엔 caspase-9이 보다 더 활성화되고 이 때 p10 아단위가 생성된다(Fig.

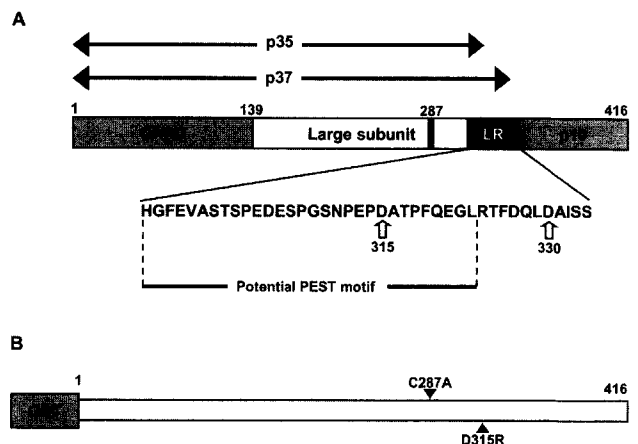


Fig. 1. Constructs expressed as GST-caspase-9 fusion proteins in *E. coli*. A. Schematic diagram of full-length procaspase-9. The positions of autocatalytic cleavage site (D315) and caspase-3 cleavage site (D330) within the linker region (LR) between the large subunit and small subunit marked as p10. p35 and p37 are two alternatively processed products. The CARD is indicated. B. The GST-caspase-9 constructs were analysed in this study. Amino acid residues at the cleavage sites are indicated by arrows.

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

IA)(3, 12, 15). 이러한 단백분해 과정 중 생겨난 p12와 p10 아단위는 caspase-9의 활성을 억제하는 조절단백질인 IAP (inhibitor apoptosis protein)와의 결합에 꼭 필요한 절편이다(18).

이처럼 caspase-9의 활성화와 조절에 관여하는 단백분해 기작은 다양하고 이 과정 중 caspase-9은 효소로서뿐만 아니라 기질로서도 작용한다. 따라서 효소와 기질로서 작용하는 caspase-9의 생화학적, 세포생물학적 연구가 계속적으로 필요하며 이를 위해서는 다량의 잘 정제된 단백질이 필요하다. 본 연구에서는 pGEX 벡터 시스템을 이용하여 대장균에서 순도 높은 caspase-9 단백질을 다량으로 얻을 수 있는 간단하고 효과적인 발현, 정제 시스템을 확립하였다.

재료 및 방법

플라스미드 제조

대장균에서 caspase-9을 GST(glutathione S-transferase) 융합 단백질로 발현시키기 위해 caspase-9 유전자를 pGEX-4T-1 발현 벡터(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA)에 클로닝 하였다(Fig. 1). GeneBank™ accession number BC006463에 근거한 caspase-9 cDNA를 Mammalian Gene Collection (MGC, clone ID 3542075)으로부터 구입하였다. 이 cDNA를 주형으로 하여 5' caspase-9 primer(GCG CGG ATC CAC CAT GGA CGA AGC GGA T; bold체는 *Bam*HI 제한 효소 부위)과 3' caspase-9 primer(GCG CCT CGA GTC TCC AGA TCT A; bold체는 *Xho*I 제한 효소 부위)으로 뉴클레오티드 1부터 196까지의 절편을 증폭하였다. 이 중합반응에는 pfu DNA 중합효소(Stratagene, LaJolla, USA)를 이용하였다. 증폭된 절편을 *Bam*HI과 *Xho*I 제한 효소로 잘라 전기영동을 통해 정제하였다. 뉴클레오티드 191부터 1251까지의 절편은 cDNA 클론(MGC, clone ID 3542075)을 *Xho*I 과 *Not*I으로 잘라 얻었다. 이렇게 준비된 두 절편의 cDNA를 *Bam*HI과 *Not*I으로 자른 pGEX 4T-1 벡터에 삽입시켜 완전한 길이의 caspase-9 유전자를 클로닝 하였다. 클로닝한 모든 플라스미드들은 염기서열을 직접 읽어서 염기서열의 정확성을 확인하였다.

돌연변이 유발

QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene Inc.)을 이용하여 돌연변이 caspase-9 유전자를 만들었다. 자연형 caspase-9 유전자를 포함하는 pGEX 플라스미드를 주형으로 하고 점돌연변이를 유도할 primer 쌍을 이용해 중합반응을 시킨다. 그 다음 *Dpn*I (New England Biolabs, Beverly, USA) 효소를 37°C에서 2 시간 동안 처리하여 자연형의 주형 플라스미드를 제거한 후, 대장균으로 형질전환 시켜 돌연변이 클론의 colony를 얻는다. DNA 염기서열 분석법(ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystem, Foster city, USA)을 이용하여 이 중 변이된 플라스미드를 포함하는 클론을 선별한다.

GST-caspase-9 단백질들의 발현과 정제

pGEX-caspase-9 플라스미드는 특정 단백질 분해 효소를 가지

고 있지 않는 BL21 (F *ompT hsdSB(r_Bm_B) gal dcm*) 균주에 삽입하여 단백질 발현에 이용한다(2, 10, 11). pGEX-caspase-9 플라스미드를 함유하고 있는 대장균을 25 µg/ml 농도의 ampicillin을 포함하는 LB 배지 10 ml에서 16시간 동안 배양한 후 90 ml의 LB 배지로 희석하여 90분 더 37°C에서 배양한다. GST-caspase-9 단백질의 발현을 유도하기 위해 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside; Amresco)를 넣고 90분 더 키운 후 4°C에서 1,000 × g으로 25 분간 원심 분리하여 대장균을 침전시킨다. 이렇게 모아진 대장균들은 7 mM DTT, 100 µg/ml lysozyme, 10 µg/µl aprotinin, 10 µg/µl leupeptin을 포함하는 EBC 완충용액 (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 120 mM NaCl, 0.5 % Nonidet P-40) 1 ml에 용해시켜 15분간 얼음에 놓이둔 뒤 초음파로 대장균을 용해시킨다. 세포 찌꺼기는 4°C에서 14,400 × g으로 10분간 원심 분리하여 제거하고 상층액을 1.5 ml 새 튜브로 옮긴다. 미리 EBC 완충용액으로 2번 씻어둔 50% glutathione Sepharose beads (Amersham) 50 µl에 준비해 둔 상층액을 넣고 잘 섞어준다. 상온에서 30분 동안 반응시킨 후, 14,400 × g에서 1 분간 원심 분리하여 glutathione bead에 붙은 GST-caspase-9 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 5번 세척하고 계면 활성제를 포함하지 않는 완충용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM KCl)으로 2번 세척한 후, 15% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 한다. Coomassie 염색 용액(0.1% Brilliant blue R (Sigma), 45% methanol and 10% acetic acid)에 20분간 염색시킨 후, 탈색 용액(10% methanol and 10% acetic acid)으로 씻어내어 단백질 밴드를 확인한다.

면역블로팅법

대장균에서 발현, 정제한 caspase-9 단백질들을 Protein Assay Solution(Bio-Rad)을 이용하여 각각의 단백질 농도를 측정하여 20 ng의 단백질을 15% SDS-PAGE로 분리한 후 nitrocellulose 막에 옮겨 면역블로팅법을 시행한다. 1차 항체는 GST 단일항체 (Santa Cruz), caspase-9 (BD Pharmingen) polyclonal 항체 등으로 바꾸어 반응시키고 2차 항체로 항원-항체 복합체와 반응시킨 후 ECL (Amersham Pharmacia Biotech.) 방법으로 확인한다

결 과

대장균에서 caspase-9 단백질의 발현과 정제를 위한 적정 조건

모든 기능 도메인을 다 포함하는 전장 procaspase-9을 대장균에서 GST-융합단백질로 발현, 정제하고자 pGEX 시스템을 이용하였다(Fig. 1)(11). Procaspase-9 cDNA를 pGEX-4T 벡터에 클로닝 하여 특정 단백질 분해효소가 결핍된 균주인 BL21에 삽입하였다. 일반적으로 이용되는 배양조건하에서(37°C, 0.5 mM IPTG) caspase-9을 포함하고 있는 대장균을 배양하여 0.5 mM IPTG로 GST-caspase-9의 발현을 유도하였다(Fig. 2). ExPASy Molecular Biology Server Program (http://us.expasy.org/tools/pi_tool.html)을 이용하여 GST-caspase-9 융합단백질의 분자량이 약 73 kDa임을

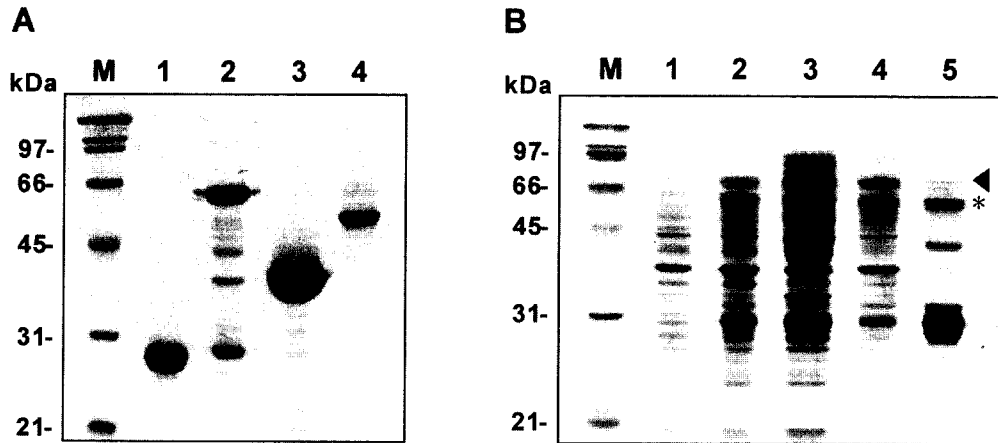


Fig. 2. Expression of GST-fusion proteins in *E. coli*. A, Expression of various proteins as GST fusions. The indicated proteins were expressed in *E. coli* strain BL21 under conventional induction condition (0.5 mM IPTG at 37°C), and GST-fusion proteins were purified by glutathione beads. The proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. Lane 1, GST; lane 2, GST-Omi¹⁵⁶⁻⁴⁵⁸; a truncated Omi/HtrA2 at amino acid residue 156; lane 3, GST-Omi³⁵⁰⁻⁴⁵⁸; a truncated Omi/HtrA2 at amino acid residue 350; and lane 4, GST-GFP: green fluorescence protein fused to GST. B, Expression of caspase-9 as GST fusion under conventional induction condition. Lane M, molecular weight standard; lane 1, total cell extracts of *E. coli* cultures before IPTG induction; lane 2, total cell extracts of *E. coli* cultures after IPTG induction; lane 3, total soluble lysates; lane 4, precipitation fraction and lanes 5, Caspase-9 protein selectively bound to glutathione Sepharose beads. Full-length caspase-9 protein is indicated by arrowhead, and the cleaved caspase-9 is indicated by asterisk.

알 수 있다. IPTG로 단백질의 발현을 유도하면 유도 전에는 보이지 않던 30kDa 크기의 단백질이 발현되었다(Fig. 2B, lanes 1, 2). 그러나 전체 세포 추출물에서 73kDa 크기의 과발현된 단백질을 관찰하기가 용이하지 않아 glutathione bead로 GST-융합 단백질을 정제하였다(Fig. 2B, lane 5). 대부분의 단백질들은 상기의 배양 조건에서 아미노산잔기들로부터 계산되는 분자량과 크기가 유사한 단백질들을 glutathione bead로 정제할 수 있다(Fig. 2A). 그러나 이와는 대조적으로 glutathione bead를 이용하여 GST-caspase-9를 정제하여 15% SDS-PAGE로 분석한 결과, 73 kDa 크기의 희미한 밴드와 61, 43, 30kDa 크기의 밴드들이 나타났다(Fig. 2B, lane 5).

상기의 실험결과로부터 일반적으로 사용되는 일반적인 단백질의 발현 유도조건에서는 전장 caspase-9이 쉽게 분해 되므로 전장 caspase-9을 발현, 정제하는 것이 용이하지 않다. Caspase-9의 생화학 및 생리적기능을 연구하기 위한 시료를 확보하기 위해 대장균에서 순도가 높은 전장 caspase-9을 다량으로 확보할 수 있는 발현 유도 조건의 정립이 필요하다. 이를 위해 배양온도와 유도인자로 작용하는 IPTG의 농도를 변경하여 이 요소들이 대장균에서 caspase-9의 발현에 어떤 영향을 주는 지 관찰하였다(Fig. 3). 먼저, 37°C의 배양온도에서 IPTG 농도를 달리하여 caspase-9을 발현시킨 후 glutathione bead로 정제하였다(Fig. 3A). 이 배양온도에서는 고농도의 IPTG에 비해 0.01 mM 농도에서 전장 caspase-9(72kDa)의 발현이 2배 정도 감소되나 30kDa과 43 kDa 크기의 밴드가 현저히 줄어들었다. 특히 30kDa 크기의 밴드는 30배 이상 감소되었다(Fig. 3A). 배양온도 37°C에서 90분 배양 후 0.01, 0.1, 0.5 mM의 IPTG를 첨가하고 25°C의 온도에서 90분 배양하여 caspase-9의 발현을 유도하였다(Fig. 3B). Fig. 3A의

조건에서 발현, 정제한 단백질들의 발현양상과는 달리 30kDa 크기의 단백질들이 거의 확인되지 않았다. 또한, 73kDa 크기의 전장 caspase-9의 발현이 Fig. 3A에서 사용한 배양조건에서보다 약 10배 정도 증가하였다. Fig. 3B에서 사용한 배양조건에서는 caspase-9이 쉽게 자가분해 되지 않으므로 1 liter의 대장균으로부터 순도 70% 이상인 GST-caspase-9 단백질을 약 600 µg 정도 정제할 수 있었다. 배양온도를 25°C로 유지하고 IPTG의 농도를 달리한 후 caspase-9의 발현양상을 비교한 결과 0.01 mM IPTG에서는 caspase-9이 거의 분해되지 않았으나 전장 caspase-9의 발현이 20배 이상 감소하였다(Fig. 3C). 배양온도 37°C에서 90분간 배양하고 0.01mM IPTG를 첨가한 후 25°C에서 90분간 배양하는 조건에서는 자가분해도 적게 되고 전장 caspase-9이 많이 발현되므로 다음에서 진행되는 실험들은 이 조건을 사용하였다.

대장균에서 발현되는 caspase-9의 자가분해 절단부위 동정

Caspase-9을 대장균에서 발현, 정제시 항상 관찰되는 61kDa 크기의 밴드는 glutathione bead에 의해 정제되며 C-말단의 caspase-9의 자가분해 부위가 제거되고 남은 GST-융합단백질의 크기와 유사하다. 이 단백질이 caspase-9의 자가분해에 의해 생성되는 단백질의 절편인지를 확인하기 위해 caspase-9의 돌연변이체를 제조하였다(Fig. 1B). Caspase-9의 cysteine protease 활성 위치인 287번째 아미노산잔기 cysteine을 alanine으로 바꾸어 caspase-9의 단백질 분해 활성을 제거하였다(17). 이 단백질활성 위치 돌연변이 유전자(C²⁸⁷A)를 포함하는 대장균을 37°C에서 배양한 후, 25°C에서 0.01 mM IPTG로 발현을 유도하면 자연형 caspase-9 단백질의 발현, 정제시 항상 관찰되던 약 61kDa 크기의 밴드가 사라지는 것을 확인할 수 있다(Fig. 4A). 이 결과로부

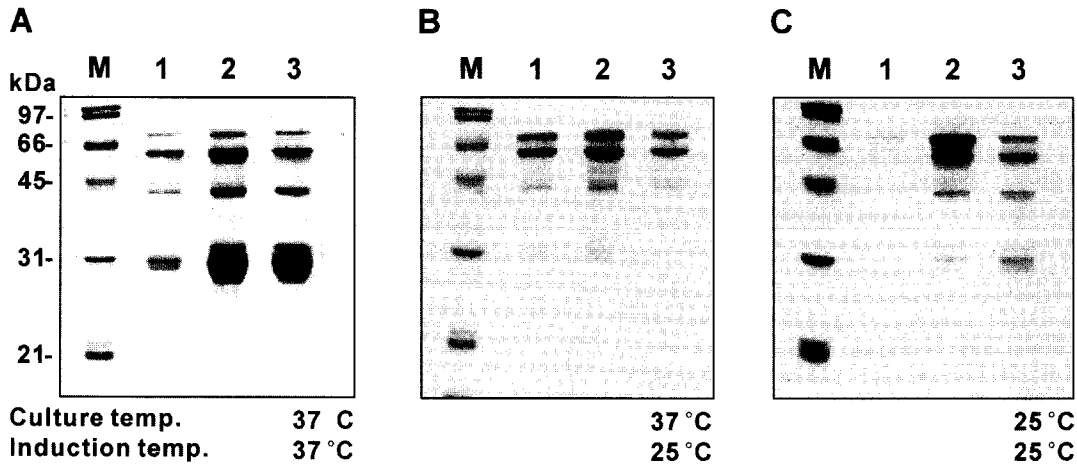


Fig. 3. Expression patterns of the GST-procaspase-9 protein under various conditions. Bacteria harboring wild-type GST-caspase-9 were cultured for 90 min at the indicated temperature (A and B, 37°C or C, 25°C) and then induced with various concentrations of IPTG for 90 min at the indicated temperature (A, 37°C or B and C, 25°C). The GST-caspase-9 was selectively bound to glutathione Sepharose beads. The proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. Lanes M, molecular weight standards; lanes 1, 0.01 mM IPTG; lanes 2, 0.1 mM IPTG; and lanes 3, 0.5 mM IPTG.

터 61 kDa의 밴드는 caspase-9의 단백분해 활성화에 의해 생성되는 것임을 알 수 있다. 또한, 배양온도 37°C에서 90분 배양 후 0.01 mM IPTG를 첨가하고 25°C의 온도에서 90분간 단백질의 발현을 유도하는 조건에서 이 단백질활성 위치 돌연변이 caspase-9(C²⁸⁷A) 단백질은 발현양상이나 발현 양에 있어서 IPTG의 농도에 거의 영향을 받지 않았다(Fig. 4A). 이 발현 유도 조건에서 대장균 1 liter로부터 효소 활성을 상실한 전장 caspase-9을 약 1.2 mg 정도 정제할 수 있다(순도 70% 이상).

포유세포 내에서 caspase-9의 자가분해의 활성화는 315번째 아미노산인 aspartic acid를 인지하여 315번째와 316번째 아미노산의 펩타이드 결합을 절단하는 것으로 알려져 있다(15,17). Caspase-9을 대장균에서 발현, 정제하는 동안 생성되는 61kDa의 분해산물

이 포유세포 내에서 일어나는 자연적인 자가분해와 동일한 위치에서 절단되는지를 조사하기 위해 315번째의 산성 아미노산 잔기 aspartic acid을 염기성 아미노산 잔기 arginine으로 치환시킨 돌연변이 유전자를 제조하였다. 절단인지 부위 돌연변이체(D³¹⁵R)를 대장균에서 발현, 정제하여 자연형의 단백질과 비교한 결과 61kDa 크기의 밴드가 사라지고 73kDa 크기의 전장 caspase-9이 주로 발현되었다(Fig. 4B). 이 결과는 caspase-9이 대장균에서 발현될 때도 세포에서 절단되는 것과 동일한 위치에서 자가 단백질분해 반응이 일어난다는 것을 보여준다. 또한, 배양온도 37°C에서 90분 배양 후 0.01 mM IPTG를 첨가하고 25°C의 온도에서 90분간 단백질의 발현을 유도하는 조건에서 자가분해되지 않는 73kDa 크기의 전장 caspase-9을 얻을 수 있다. 대장

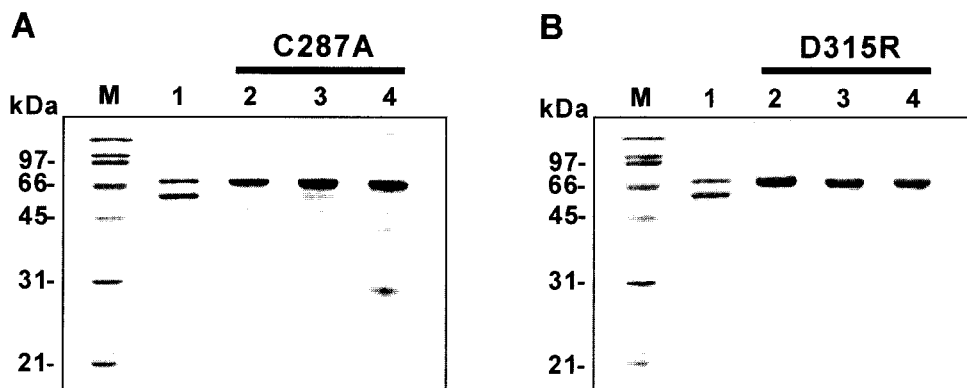


Fig. 4. Expression and purification of the autocatalytically inactive caspase-9 proteins. Bacteria harboring wild-type or autocatalytically inactive mutants (A, an active site mutant, C²⁸⁷A and B, an autocatalytic cleavage site mutant, D³¹⁵R) were cultured for 90 min at 37°C and then induced with the indicated concentrations of IPTG for 90 min at 25°C. GST-caspase-9 proteins were purified by selectively binding to Glutathione Sepharose beads. The proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie brilliant blue dye. Lanes M, molecular weight standards; lanes 1, wild-type; lanes 2, 0.01 mM IPTG; lanes 3, 0.1 mM IPTG; and lanes 4, 0.5 mM IPTG.

균 1 liter로부터 순도 70% 이상의 GST-caspase-9 단백질을 약 1.2mg 정도 정제할 수 있다.

Glutathione bead로 정제한 단백질들이 caspase-9 단백질이라는 것을 재확인하기 위해 면역블로팅 분석법을 실시하였다(Fig. 5). Caspase-9의 N-말단에 융합시킨 GST에 대해 특이적으로 반응하는 GST 항체와 반응한 결과, 자연형의 caspase-9에서는 73kDa 과 61kDa 크기의 밴드를 확인할 수 있었으며, 돌연변이형 단백질들(C^{287A}과 D^{315R})에서는 73kDa 크기의 밴드만을 확인하였다. Caspase-9 항체로 면역반응을 실시한 결과 73kDa과 61kDa의 단백질들이 caspase-9 항체와도 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로부터 73kDa의 밴드는 전장 caspase-9이며 61kDa의 밴드는 caspase-9의 자가분해에 의해 생성되는 단백질 분해 절편임을 알 수 있다. 따라서 대장균에서 발현, 정제 시 관찰되는 caspase-9의 자가분해도 포유세포 내에서 관찰되는 caspase-9의 자가분해 위치와 동일한 아미노산 잔기인 aspartic acid에서 일어나는 것을 확인하였다.

고 찰

본 연구에서는 세포사멸에서 중요한 역할을 하는 단백질 분해 효소인 caspase-9을 대장균에서 발현, 정제할 수 있는 적정 유도 조건과 시스템을 확립하였다. 일반적 배양 및 유도조건에서 caspase-9을 발현시키면 단백질 분해로 작은 절편들이 많이 생성되고 전장 caspase-9 단백질이 매우 적게 발현되는 문제점이 야기된다. 이를 극복하기 위해 각종 배양조건과 유도인자의 농도에서

caspase-9의 발현을 비교 분석하였다. 대장균을 적당량 확보하고자 37°C에서 배양하다가 단백질 발현 유도는 25°C로 배양온도를 낮추고 유도인자인 IPTG의 농도도 0.01mM로 낮추었다니 caspase-9의 과다한 단백질 분해 현상이 감소되는 반면 전장 caspase-9의 발현정도도 상당량 향상되었다. 본 연구에서 확립된 배양 조건에서 caspase-9을 발현한 후, glutathione bead를 이용한 단일 스텝의 정제방법으로 70%이상의 순도를 가진 GST-caspase-9 단백질을 손쉽게 얻을 수 있었다. 그러므로 본 연구에서 구축된 배양 및 유도조건과 pGEX 시스템을 이용한 caspase-9의 정제방법은 생화학적, 세포생물학적 연구에 이용할 수 있는 각종 caspase-9 단백질들을 다량으로 확보하는 데 응용할 수 있는 좋은 방법임을 알 수 있다.

종전의 연구에서는 대장균 발현시스템에서 His로 표지된 자연형의 caspase-9은 자가분해에 의해 p35와 p12로 완전히 절단되므로 전장 caspase-9 단백질을 확보하기 위해서는 활성 위치나 절단 위치를 다른 아미노산으로 치환하여야만 했다(16, 17). 그러나 본 연구에서 개발된 배양 조건을 이용하면 caspase-9 돌연변이 유전자의 제조 없이도 다량의 자연형 전장 caspase-9 단백질을 얻을 수 있다. 돌연변이를 포함하고 있지 않은 자연형의 전장 caspase-9를 다량으로 확보함으로써 이 시료를 단백질의 구조 연구 및 단백질 분해 효소로서의 활성 연구에 사용할 수 있다. 또한, 이 시료는 caspase-9의 자가 단백질 분해 활성 외에 자연형 전장 caspase-9이 다른 단백질 분해 효소의 기질로 작용하는 지를 동정하는 실험에도 유용하게 이용될 수 있다.

Proline(P), glutamic acid(E), serine(S), threonine(T)와 같은 아

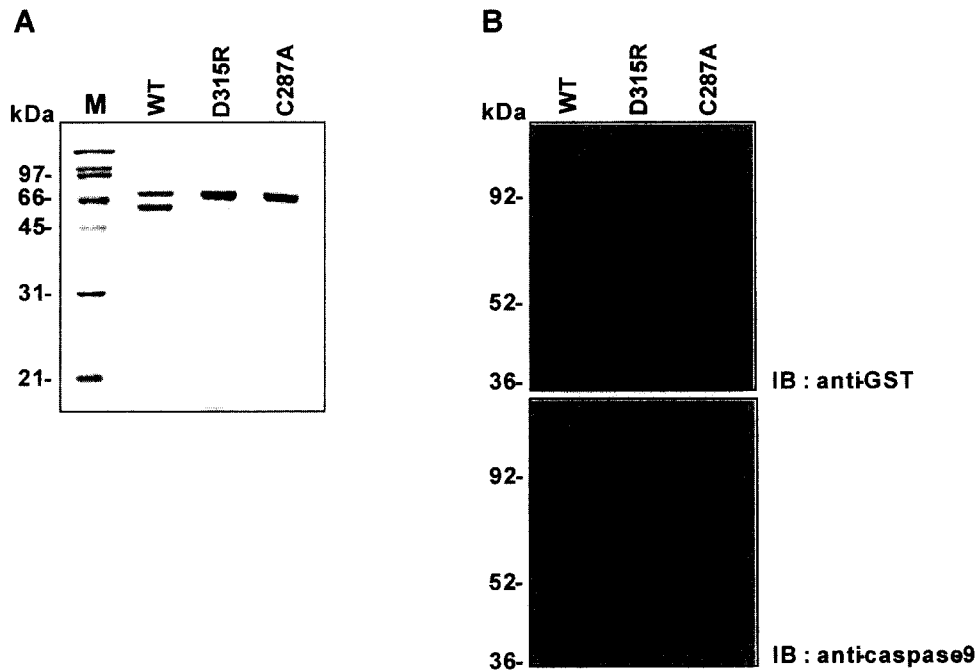


Fig. 5. GST-caspase-9 is autocatalytically processed at aspartic acid 315 during expression in *E. coli* and purification. A, Wild type or autocatalytically inactive forms of GST-caspase-9 were expressed in *E. coli* and selectively purified with Glutathione Sepharose beads. The purified proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and visualized by staining with Coomassie Brilliant Blue dye. B, The purified proteins were analyzed by immunoblot analysis with anti-GST or anti-caspase-9 antibodies.

미노산잔기가 많은 단백질들은 세포 내에서 쉽게 분해하는 데, 이는 PEST 부위가 단백질분해에 대한 표적으로 작용하기 때문이라는 결과들이 보고 되고 있다(7,13). 다른 단백질들과는 달리 일반적인 발현 조건에서 caspase-9이 쉽게 분해되는 경향이 있으므로 caspase-9 내에 단백질분해 효소에 의해 쉽게 공격을 받을 수 있는 PEST 부위를 가지고 있을 가능성이 있다. 이를 확인하기 위해 PEST find 프로그램(<http://emb1.bcc.univie.ac.at/embnet/tools/bio/PESTfind/>)을 이용하여 caspase-9의 아미노산잔기들을 분석하였다. LR 부위에 존재하는 294에서 323사이의 아미노산잔기들이 PEST 부위로 작용할 수 있는 가능성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 1). 본 연구에서 배양 및 단백질 발현유도 조건을 조정함으로써 전장 caspase-9을 정제할 수 있었던 결과는 caspase-9의 PEST 부위의 존재와 세포내 단백질분해 시스템과 서로 상관관계 있다는 사실을 시사한다. 저온에서는 세포내에 존재하는 PEST 부위를 공격할 수 있는 단백질분해 시스템의 활성이 저하되어 표적단백질의 분해가 감소되는 것으로 생각되나 보다 더 정밀한 연구가 필요하다. 이 상관관계를 규명하기 위해서는 PEST 부위를 제거한 caspase-9을 제조하여 대장균에서 발현양상이 어떻게 변하는지 조사하는 연구 등이 필요하다.

본 연구에서 적정 배양 및 단백질 발현유도 조건을 이용하여 대장균에서 발현한 caspase-9이 자가 단백질분해 활성을 가지고 있음을 면역블로팅 분석법과 돌연변이 제조로 확인할 수 있었다. 또한, 전장 단백질을 다량 발현할 수 있는 장점과 정제 방법의 용이성을 이용하여 caspase-9의 자가 절단 위치도 확인할 수 있었다. 이는 자가 분해 되는 다른 단백질들의 절단위치를 동정하는 데도 용이하게 활용될 수 있는 방법이다.

감사의 말

본 연구는 과학재단 (1999-2-210-002-5)에 의해 지원되었음

참고문헌

1. Acehan, D., X. Jiang, D.G. Morgan, J.E. Heuser, X. Wang, and C. W. Akey. 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol. Cell* 9, 423-32.
2. 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 alpha-synuclein proteins: C-terminal truncation promotes the conversion of alpha-synuclein into a protease-sensitive form in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36, :33-40.
3. Fujita, E., J. Egashira, K. Urase, K. Kuida, and T. Momoi. 2001. Caspase-9 processing by caspase-3 via a feedback amplification loop *in vivo*. *Cell Death Differ.* 8, 335-44.
4. Hakem, R., A. Hakem, G.S. Duncan, J.T. Henderson, M. Woo, M. S. Soengas, A. Elia, J.L. de la Pompa, D.Kagi, W. Khoo, J. Potter, R. Yoshida, S.A. Kaufman, S.W. Lowe, J.M. Penninger, and T.W. Mak. 1998. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways *in vivo*. *Cell* 94, 339-52.
5. Kuida, K., T.F. Haydar, C.Y. Kuan, Y. Gu, C. Taya, H. Karasuyama, M.S. Su, P. Rakic, and R.A. Flavell. 1998. Reduced apoptosis and cytochrome *c*-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 94, 325-37.
6. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-89.
7. Loetscher, P., G. Pratt, and M. Rechsteiner. 1991. The C terminus of mouse ornithine decarboxylase confers rapid degradation on dihydrofolate reductase. Support for the pest hypothesis. *J. Biol. Chem.* 266, 11213-20.
8. Qin, H., S.M. Srinivasula, G. Wu, T. Fernandes-Alnemri, E.S. Alnemri, and Y. Shi. 1999. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature* 399, 549-57.
9. Renatus, M., H.R. Stennicke, F.L. Scott, R.C. Liddington, and G. S. Salvesen. 2001. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14250-5.
10. Rhim, H., F. Chan, C.O. Echetebe, and A.P. Rice. 1993. Rapid purification of monomer HIV-2 Tat protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* 4, 24-31.
11. 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, 1110-21.
12. Rodriguez, J., and Y. Lazebnik. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 13:3179-84.
13. Rogers, S., R. Wells, and M. Rechsteiner. 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364-8.
14. Shiozaki, E.N., J. Chai, and Y. Shi. 2002. Oligomerization and activation of caspase-9, induced by Apaf-1 CARD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 4197-202.
15. Srinivasula, S.M., M. Ahmad, T. Fernandes-Alnemri, and E.S. Alnemri. 1998. Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell* 1, 949-57.
16. Srinivasula, S.M., R. Hegde, A. Saleh, P. Datta, E. Shiozaki, J. Chai, R.A. Lee, P.D. Robbins, T. Fernandes-Alnemri, Y. Shi, and E.S. Alnemri. 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-6.
17. Stennicke, H.R., Q.L. Deveraux, E.W. Humke, J.C. Reed, V.M. Dixit, and G.S. Salvesen. 1999. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem.* 274, 8359-62.
18. Zou, H., R. Yang, J. Hao, J. Wang, C. Sun, S.W. Fesik, J.C. Wu, K. J. Tomaselli, and R.C. Armstrong. 2003. Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J. Biol. Chem.* 278, 8091-8.

(Received September 29, 2003/ Accepted November 14, 2003)

ABSTRACT : High-level Expression of Human Procasase-9 in *Escherichia coli* and Purification of its GST-tagged Recombinant Protein

Young-Mo Seong², Chul Han², Ju-Youn Choi^{1,4}, Hyo-Jin Park², Geun-Hye Seong², Min Kyung Nam¹, Sang-Soo Kim¹, In-Kyung Kim³, Seongman Kang², and Hyangshuk Rhim^{1*}
(¹Research Institute of Molecular Genetics, Catholic Research Institutes of Medical Sciences, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea, ²Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, ³Biochemistry, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea, ⁴Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea)

Human caspase-9, an essential apoptosis initiator protease, was excessively degraded when expressed in *Escherichia coli* under the conventional induction condition. To optimize the conditions for induction and develop a rapid purification method for obtaining significant amounts of wild-type procaspase-9, we expressed procaspase-9 as GST fusion in *E. coli*. The addition of 0.01 mM IPTG as an inducer to the bacterial culture and decreasing the culture temperature to 25°C improved the production of procaspase-9 protein by circumventing proteolytic degradation in *E. coli*. The wild-type procaspase-9 was purified to approximately 70% purity with relatively high yields using the method developed in this study. In addition, we found that GST-caspase-9 is autocatalytically cleaved after aspartic acid 315, which is the same site for processing in mammalian cells, during expression in *E. coli*.