

RBL-2H3 세포에서 IgE-dependent Histamine-releasing Factor의 탈인산화 효소에 관한 연구

황선옥 · 이경림*
이화여자대학교 약학대학

Identification of Calcium/Calmodulin-Dependent Phosphatase as the Dephosphorylating Enzyme of IgE-Dependent Histamine-Releasing Factor in RBL-2H3. Hwang, Sun-Ok and Kyunglim Lee*. *College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea* – IgE-dependent histamine-releasing factor(HRF) was initially described as a secretagogue for secretion of histamine from IgE+ basophils from a subset of allergic donors. Previously, we identified that S98 residue of HRF was phosphorylated using anti-HRFpS98 antibody which specifically recognizes the phosphorylated serine residue of HRF and HRFS98A mutant construct. In vitro kinase assay, only wild type HRF was phosphorylated by PKC, and S98A HRF was not affected by PKC. In this study, we attempted to characterize the phosphatase which specifically dephosphorylates HRF by immunoprecipitation and pull-down assay. In RBL-2H3 cells, HRF interacted only with calcineurin (also called as PP2B, calcium/calmodulin-dependent phosphatase) but not with PP1 or PP2A. The results suggest that HRF is most likely dephosphorylated by calcineurin.

Key words: HRF, phosphatase, PKC, (Na,K)ATPase

IgE-dependent histamine releasing factor(HRF)는 1986년 알레르겐 자극시 배출되는 분비액에서 처음 확인된 이후, 1995년 MacDonald 등에 의해 아토피 환자의 림프세포와 알레르기 환자의 생체액에서 분리, 정제되었다. 또한 HRF는 성장관련 단백질로 알려진 translationally controlled tumor protein과 동일한 단백질임이 밝혀졌다[2, 4]. HRF는 1980년대까지 암특이적 단백질로 그 합성이 암세포 증식과 관련되어 나타난다고 생각되었으나[3, 12] 이후 신장 또는 신장세포암(renal cell carcinoma)을 제외한 모든 정상 세포에서도 발현될 뿐 아니라 포유류, 고등식물, 효모 등에서도 발견되었으며 거의 모든 종에 있어 높은 상동성(homology)을 보이므로[12] 세포 내에서는 없어서는 안 될 house keeping gene으로 중요한 역할을 하리라 추측되었으나 그 정확한 기능은 알려지지 않은 상태였다[6].

한편, Sanchez 등 (1997)은 erythrocytes, liver, non-differentiated keratinocytes, melanoma, hepatoblastoma, glioma 세포에 대한 monoclonal anti-HRF 항체를 이용한 immunoblotting을 실시하여 HRF가 3개의 isoform으로 나타나는 것을 확인하였는데, 이 세 isoform이 비슷한 분자량을 가지고 있으면서도 각기 다른 isoelectric point를 보이는 사실에 대해 HRF의 인산화 가능성을 제시하였다[7]. Macrophage에서

도 PKC를 자극시키는 phorbol myristate acetate(PMA)를 처리했을 때 HRF의 인산화가 증가했다는 보고[10]가 있었다.

본 연구실에서는 yeast two hybrid assay를 통해 Na,K ATPase의 결합단백질로 HRF를 동정한 바 있고, 특히 Na,K ATPase의 3번째 세포질 루프와 상호작용하여 Na, K ATPase의 효소활성을 감소시킨다는 것을 밝혔다[3]. 한편 HRF의 98-100번 아미노산 잔기에는 인산화가 될 수 있는 SIK이 존재하며 Ser-98이 인산화되는 자리임을 anti-HRFpS98 antibody와 HRF S98A mutant를 이용한 실험으로 확인하였다. 또한 ⁸⁶Rb⁺-uptake assay 실험에서 HRF의 serine 98 잔기의 탈인산화는 Na, K-ATPase의 활성화에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. HRF와 Na,K ATPase의 상호작용에는 여러 기전이 가능하겠지만, 그 중에서도 특히 HRF의 인산화와 탈인산화 조절이 Na,K ATPase와의 상호작용에 관여할 것이라 생각하였다[1, 7, 8, 11]. 따라서 본 연구에서는 HRF를 탈인산화시키는 효소를 동정하기 위해서 HRF에 결합하는 protein phosphatase를 immunoprecipitation과 pull down assay로 확인하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 extract 분리

RBL(Rat Basophil Leukemia)-2H3 mast cell은 ATCC에서 구입하였다. RBL-2H3 cell을 배양액(20% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin을

*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-3024, Fax: 82-2-3277-2851

E-mail: klyoon@ewha.ac.kr

첨가한 DMEM)을 이용하여 CO₂ 5%, 37°C incubator에서 키우며 2일에 한번씩 10⁶ cells/ml로 분주해 주었다. 각 cell이 80% 정도 culture dish에 자라면 PBS로 2회 세척하고 lysis buffer (50 mM Tris-HCL, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P40, 0.5% sodium deoxy-cholate, 1 tablet CompleteTM protein inhibitor cocktail/50 ml, 0.7 µg/ml Pepstatin)를 가한 후, 1시간 동안 4°C에 방치했다. 세포 현탁액을 새로운 microfuge tube에 옮겨 10,680 rpm에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 분리하였다. Rat brain extract의 경우는 뇌를 적출하여 잘게 조각낸 후 lysis buffer 1 ml를 가하여 유리 분쇄기로 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻었다.

Immunoprecipitation과 Western blotting 분석

RBL-2H3 세포 extract에 각 샘플당 monoclonal anti-PP1 antibody(Santa Cruze Biotechnology Inc.), polyclonal anti-PP2A antibody(Santa Cruze Biotechnology Inc.), polyclonal anti-PP2B antibody(CHEMICON International, Inc.) 3 µl 혹은 HRF monoclonal antibody(hybridoma culture supernatant) 400 µl 정도를 가한 후 4°C, rocking platform에서 하룻밤 방치했다. 여기에, protein A-혹은 G-agarose suspension(Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 sample당 50 µl씩 가한 후 4°C, rocking platform에서 5-6시간 동안 방치한 다음 10,680 rpm에서 6분간 원심분리하여 complex를 수거하였다. Lysis buffer로 2회, PBS로 2회 세척한 다음, agarose pellet에 2×SDS sample buffer 50 µl로 resuspension시킨 후 100°C에서 5분간 끓이고, 다시 상온에서 30초간 스핀하여 protein A-혹은 G-agarose를 제거하였다. 최종적으로 얻어진 상등액을 SDS-PAGE 분석에 사용하였다. Blot은 nitrocellulose(NC) membrane(Scheicher & Schuell, Dassel, Germany)에 옮긴 후, NC membrane을 1시간 동안 blocking solution(3% gelatin in TBS)로 처리하고 TTBS(0.05% tween 20 in TBS)로 10분씩 3회 세척한 후, 1차 항체인 Rabbit polyclonal anti-HRF antibody 혹은 PP1, 2A, 2B antibody를 2시간 처리하였다. TTBS로 10분씩 3회 세척한 다음 2차 항체인 horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG, HRP-linked anti-mouse IgG, HRP-linked anti-goat IgG(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)로 1시간 30분간 처리하였다. 다시 TTBS로 10분씩 2회, TBS로 1회 세척한 후 chemiluminescence reagent (ECL, Amersham International Inc., Buckinghamshire, U.K.)를 처리하여 LAS-1000 (Fujifilm, Japan)으로 촬영하였다.

Affinity chromatography를 이용한 HRF와 상호작용하는 protein의 분리

pRSET A/HRF의 cDNA를 *BL21(λDE3)pLysS* supercompetent cell에 transformation하는 방법은 다음과 같다. *BL21(λDE3)pLysS* 균주는 T7 RNA polymerase의 저해제로 작용

하는 T7 lysozyme을 낮은 농도로 발현시키는 plasmid를 전달하는 세포이며 pRSET vector system의 균주로 용이하였다.

LB/chloramphenicol plate상에 있는 *BL21(λDE3)pLysS*의 single colony를 취해서 LB/chloramphenicol(34 µg/ml) 5 ml이 담긴 시험관에 접종하고 37°C에서 진탕배양 시킨 후 OD₆₀₀가 0.2-0.8이 되면 그 중 2 ml을 취해 동일 조성의 배지 10 ml이 담긴 250 ml flask로 옮긴 후, OD₆₀₀가 0.5-0.9가 될 때까지 37°C에서 진탕 배양하였다. 여기에 LB/chloramphenicol을 50 ml이 될 때까지 가하고 다시 진탕 배양 시켜서 OD₆₀₀가 0.6이 되면 즉시 얼음에서 식힌 후 4,200 rpm에서 4°C를 유지하면서 15분간 원심분리 하여 cell pellet을 얻었다. 이를 10 ml의 cold TB I buffer(30 mM KOAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 100 mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15% glycerol)로 현탁시킨 다음 다시 4°C 4,200 rpm에서 15분간 원심분리 해서 얻은 cell pellet을 2 ml의 cold TBII(10 mM Na-MOPS, pH 7.0 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% glycerol)로 현탁시켰다. Competency유지를 위해 -70°C에 보관하였다. -70°C에 보관한 *BL21(λDE3)pLysS* supercompetent cell 200 µl을 얼음에서 서서히 녹인 후 pRSET A/HRF clone의 cDNA 5 ng을 가하고 잘 혼합한 후 얼음에 30분간 방치하였다. 42°C에서 2분간 heat pulse를 가한 후, 얼음에 1분간 방치하였다. 여기에 LB배지 0.8 ml를 가하고 200-250 rpm으로 진탕하면서 37°C에서 1시간 배양한 후 미리 준비된 ampicillin(50 µg/ml)과 chloramphenicol (34 µg/ml)이 포함된 LB-agar plate에 spreading 한 후, 37°C에서 16시간 배양하였다.

Fusion protein발현 및 affinity chromatography를 이용한 분리하는 방법은 다음과 같다. pRSET A/HRF cDNA를 *BL21(λDE3)pLysS* supercompetent cell에 transformation시켜 50 µg/ml의 ampicillin과 34 µg/ml chloramphenicol을 포함하는 LB 배지 5 ml에 접종하고 37°C에서 16시간 배양한 후, 이를 50배 희석하여 OD₆₀₀가 0.6이 되었을 때, T7 RNA polymerase의 합성을 유도하여 isopropylthiogalactoside (IPTG)를 최종 농도가 1.0 mM이 되도록 첨가한 후 37°C에서 3시간 동안 진탕배양하여 재조합 단백질의 합성을 유도하였다. 그 후 박테리아를 6,500 rpm에서 4°C를 유지하면서 5분 동안 원심분리 하여 cell pellet을 수거한 후 -70°C에 보관하였다. Cell pellet에 binding buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8.0 500 mM NaCl, 5 mM imidazole)를 2-5 ml/g wet weight가 되도록 가하여 세포를 현탁시킨 후 얼음에서 방치하였다. 그 후, 얼음에서 10초 동안 6-7회 200-300 W로 sonication하였다. Cell lysate를 4°C에서 15,000rpm에서 25분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 His·Bind Resin(Novagen, Milwaukee, WI, USA)에 13 ml의 charge buffer(50 mM NiSO₄)를 흘려 보내 packing한 column에 loading한 후, binding buffer 15 ml를 가하여 column에 His-tagged HRF를 결합시킨 후 RBL-2H3 cell extract를 흘려 보내주었다. 비특이적 결합단

백질을 제거하기 위해 15 ml의 binding buffer와 washing buffer(60 mM Tris-HCl, pH 8.0 500 mM NaCl, 60 mM imidazole)로 세척하였다. Ni과 결합한 단백질을 elution buffer(20 mM Tris-HCl, pH 8.0 500 mM NaCl, 60 mM imidazole) 0.5 ml로 용출시켜 수거하였다. 대조군으로는 Ni²⁺ column에 RBL cell extract만을 동일 양 흘려보내주어 같은 방법으로 세척한 후 얻은 단백질을 준비하였다. 단백질을 정량한 후 대조군 20 µg과 샘플 단백질 20 µg 그리고 rat brain에서 얻은 단백질 4 µg을 각각 13% SDS-PAGE gel에 loading하여 monoclonal anti-PP1 antibody, polyclonal anti-PP2A antibody, polyclonal anti-PP2B antibody로 Western blot을 실시하였다.

결과 및 고찰

Immunoprecipitation을 이용한 HRF와 protein phosphatase 2B의 상호작용

RBL-2H3 세포에서 HRF의 탈인산화에 관여하는 phosphatase를 동정해 보았다. RBL-2H3 cell lysates에 anti-protein phosphatase(PP) 1, 2A, 2B 항체를 첨가한 후, protein G-agarose와 반응시켜 immunoprecipitation을 실시하였다. Polyclonal anti-HRF 항체로 western blot을 실시한 결과 PP2B를 가해준 샘플에서만 HRF를 23 kDa으로 확인하였다(Fig. 1). 역으로 monoclonal anti-HRF 항체를 가한 후, protein A-agarose와 반응시키고 anti-PP1, 2A, 2B 항체로 western blot을 해본 결과 PP1, 2A는 검출되지 않았으나 PP2B의 경우는 regulatory subunit(19 kDa), catalytic subunit(60 kDa) 모두 확인할 수 있었다(Fig. 2). 본 연구에서는 Immunoprecipitation과 affinity chromatography를 통해 PP2B가 HRF의 탈인산화에 관여함을 확인하였다. 단, HRF가 결합된 column을 통과한 eluate에서 검출된 calcineurin의 경우, positive control로 사용한 brain extract나 RBL cell extract에서 보다 전체적으로 upshift된 위치에서 검출되었는데 이는 사용 buffer(각각 elution buffer, lysis buffer)내 염의 농도 차이에서 기인한 것으로 추정된다.

Affinity chromatography를 이용한 HRF와 PP2B의 상호작용

HRF와 PP2B의 상호작용을 Ni²⁺ column을 이용하여 다시 한번 확인하였다. 우선 pRSET A/HRF cDNA를 *BL21* (λ DE3)*pLysS* supercompetent cell에 transformation시켜 E.coli 배양액에서 얻은 protein extract을 Ni²⁺ column에 흘려 보내주어 column에 His-tagged HRF를 결합시킨 후, 여기에 RBL-2H3 cell extract를 흘려 보내주었다. 대조군으로는 Ni²⁺ column에 RBL-2H3 cell extract만을 동일 양 흘려 보내 주고 같은 방법으로 세척한 후 수거한 protein을 사용하였다. 모든 buffer에 1mM CaCl₂를 첨가하여 준 경우와 그렇지 않은 경우의 차이를 아울러 관찰하였다. 단백질을 정

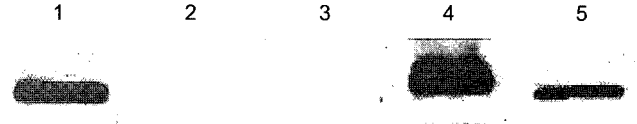


Fig. 1. Interaction of HRF and protein phosphatase 2B (calcineurin). Western blotting HRF binding proteins from RBL-2H3 cells with polyclonal anti-HRF Ab. Lane 1, RBL extracts 45 µg; lane 2, immunoprecipitates of RBL-2H3 cells with monoclonal anti-PP1 Ab; lane 3, immunoprecipitates of RBL-2H3 cells with polyclonal anti-PP2A Ab; lane 4, immunoprecipitates of RBL-2H3 cells with polyclonal anti-PP2B Ab; lane 5, rat brain extracts 4 µg.

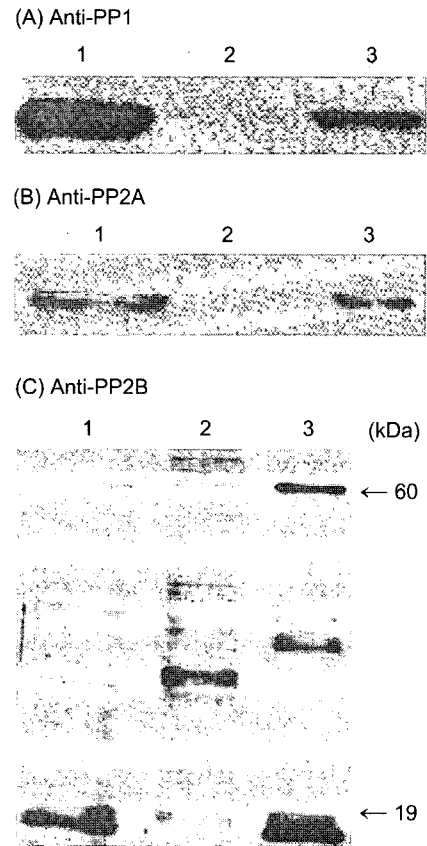


Fig. 2. Interaction of HRF and protein phosphatase(PP) 2B confirmed by co-immunoprecipitation. Western blotting of HRF binding proteins from RBL-2H3 cells. (A) IB: monoclonal anti-PP1 Ab (B) IB: polyclonal anti-PP2A Ab (C) IB: polyclonal anti-PP2B Ab. Lane 1, RBL-2H3 cell extracts 45 mg; lane 2, Immunoprecipitates with monoclonal anti-HRF Ab; lane 3, Rat brain extracts 4 mg. Both catalytic subunit (60 kDa) and regulatory subunit (19 kDa) were detected in crude extracts and immunoprecipitates.

량한 후, RBL -2H3 cell extract 40 µg, 대조군 20 µg와 샘플 단백질 20 µg, 그리고 rat brain에서 얻은 protein 4 µg을 각각 13% SDS-PAGE gel에 loading하여 polyclonal anti-PP2B 항체로 western blot을 실시하였다. 그 결과 19 kDa의 PP2B regulatory subunit과 60 kDa의 catalytic subunit을 모두 확인

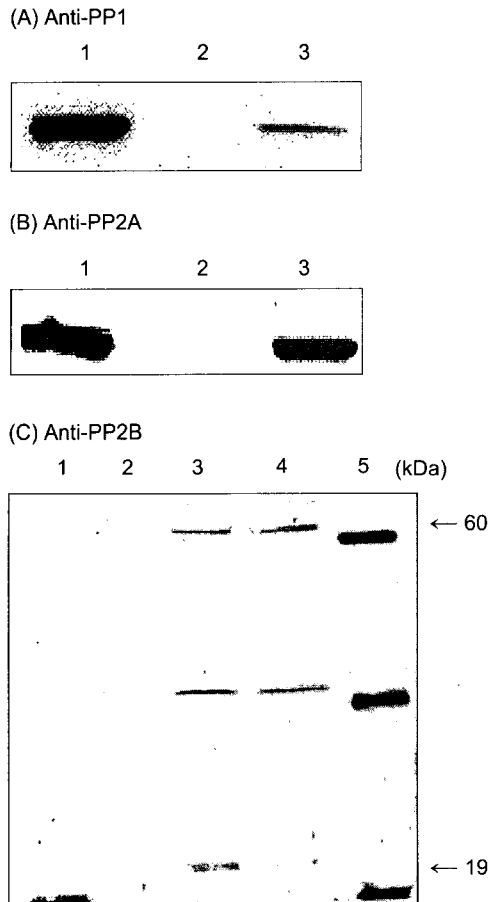


Fig. 3. Identification of HRF binding to PP2B from RBL-2H3 cell extract. (A), (B) Western blotting of HRF binding proteins from RBL-2H3 cells were eluted from the His-tagged HRF or His⁶Bind Resin. Lane 1, RBL-2H3 cell extracts 40 µg; Lane 2 protein from the immobilized HRF column with buffers without 1 mM CaCl₂ (20 µg); Lane 3, rat brain extract (4 µg). The used antibodies are monoclonal anti-PP1 antibody(A) and polyclonal anti-PP2A antibody(B). PP1 (39 kDa), PP2A (36 kDa) were detected in crude extracts. (C) Western blotting of HRF binding proteins from RBL-2H3 cells were eluted from the His-tagged HRF on His·Binc Resin. The used antibody is polyclonal anti-PP2B antibody. Lane 1 RBL-2H3 cell extracts 40 µg; Lane 2, protein from column with RBL-2H3 cell extracts (20 µg); Lane 3, protein from the immobilized HRF column with buffers without 1 mM CaCl₂ (20 µg); Lane 4, protein from the immobilized HRF column with buffers contained 1 mM CaCl₂ (20 µg); Lane 5, rat brain extract (4 µg).

할 수 있었지만, 외부 Ca²⁺이온 첨가 여부에 따른 차이는 관찰할 수 없었다.

또한, elution buffer로 용출한 샘플과 positive control로 사용한 cell-extract간 band size차이는 buffer 조성의 차이에서 기인하는 것이다. Ca²⁺이온을 첨가하지 않은 환경에서 수거한 샘플을 monoclonal anti-PP1 항체와 polyclonal anti-PP2A 항체로 western blot을 실시한 결과 PP1와 2A는 검출되지 않았다(Fig. 3).

RBL-2H3 세포에서는 buffer내 1 mM CaCl₂ 첨가 여부에

따른 차이가 관찰되지 않았다. RBL-2H3 cell extracts를 만들 때, 5 mM EDTA를 첨가해줌으로써 Ca²⁺이 배제된 환경을 만들어 주었는데, EDTA 농도를 더 높여주는 등 외부 환경을 달리해 줌으로써 catalytic subunit의 검출 여부가 달라지는지는 다시 확인할 필요가 있겠다. 또한, crude extracts에 인위적으로 metal을 첨가해 주지 않았음에도 calcineurin이 높은 활성을 보이는 것은 crude enzyme이 natural cofactor를 보유하고 있음을 시사하는 것이다.

요 약

RBL-2H3 cell lysates에 anti-protein phosphatase(PP) 1, 2A, 2B 항체를 첨가한 후 immunoprecipitation을 실시한 결과 PP2B를 가해준 샘플에서만 HRF를 확인하였다. 역으로 monoclonal anti-HRF 항체를 가한 후 immunoprecipitation을 실시한 결과 PP1, 2A는 검출되지 않았으나 PP2B의 경우는 regulatory subunit(19 kDa), catalytic subunit(60 kDa) 모두 확인할 수 있었다. Affinity chromatography를 통해서도 PP2B가 HRF의 탈인산화에 관여함을 확인하였다. 즉 19 kDa의 PP2B regulatory subunit과 60 kDa의 catalytic subunit 모두가 확인되었으며 외부 Ca²⁺이온 첨가 여부에 따른 차이는 관찰할 수 없었다. 결론적으로 RBL-2H3 cell에서 PP2B는 PP1이나 PP2A에 비해 상대적으로 그 존재량은 적으나 HRF와 상호작용하는 phosphatase로서 검출된 반면 PP1이나 PP2A는 검출되지 않았다.

감사의 글

본 논문은 이화여자대학교 약학대학 약학연구소 연구비의 지원을 받았음.

참고문헌

1. Bieka, H., R. Benndorf, and I. Junghahn. 1998. Growth related changes in protein synthesis and a 25 kDa protein of Ehlich ascites tumor cells. *Biomed. Biochem. Acta.* **47**: 557-563.
2. Hultsch, T., P. Brand, S. Lohmann, J. Saloga, R. L. Kincaid, and J. Knop. 1998. Direct evidence that FK506 inhibition of Fcepsilon RI-mediated exocytosis from RBL mast cells involves calcineurin. *Arch. Dermatol. Res.* **290**: 258-263.
3. Jung, J., M. Kim, M. Kim, M. J. Kim, J. Moon, J. Lim, J. S. Kim, M. Kim, and K. Lee. 2004. Translationally Controlled Tumor Protein Interacts with the 3rd Cytoplasmic Domain of Na,K-ATPase α -subunit and Inhibits the Pump Activity in HeLa Cells, *J. Biol. Chem.* **279**: 49868-49875.
4. Ludowyke, R. I., K. Warton, and L. L. Scurr. 1998. Inhibition of antigen and calcium ionophore induced secretion from RBL-2H3. *Cell. Biol. Int.* **22**: 855-865.

5. MacDonald, S. M., T. Rafnar, J. Langdon, and L. M. Lichtenstein. 1995. Molecular identification of an IgE-dependent histamine releasing factor. *Science* **269**: 688-690.
6. Ozawa, K., Z. Szallasi, M. G. Kanaietz, P. M. Blumberg, H. Mischak, F. J. Mushinski, and M. A. Beaven. 1993. Ca-dependent and Ca-independent isozymes of protein kinase C mediate exocytosis in antigen-stimulated rat basophilic RBL-2H3 cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 1749-1756.
7. Sanchez, C. J., D. Schaller, F. Ravier, D. Golaz, S. Jaccoud, M. Belet, R. M. Wilkins, J. Richard, J. Deshusses, and D. Hochstrasser. 1997. Translationally controlled tumor protein : protein identified in several nontumoral cells including erthrocytes. *Electrophoresis* **18**: 150-155.
8. Schroeder, J. T., L. M. Lichtenstein, and S. M. MacDonald. 1996. An Immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor Induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J. Exp. Med.* **183**: 1265-1270.
9. Schroeder, J. T., L. M. Lichtenstein, and S. M. MacDonald. 1997. Recombinant histamine-releasing factor enhances IgE-dependent IL-4 and IL-13 secretion by human basophils. *J. Immunol.* **169**: 447-452.
10. Walsh, B. J., A. A. Gooley, K. L. Williams, and S. N. Briet. 1995. Identification of macrophage activation associated proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *J. Leukoc. Biol.* **57**: 507-512.
11. Walsh, M. P., A. Horowitz, O. Clement-Chomiene, J. E. Andrea, B. G. Allen, and K. G. Morgan. 1996. Protein kinase C mediation of Ca-independent contractions of vascular smooth muscle. *Biochem. Cell Biol.* **74**: 485-502.
12. Warner, J. A., M. M. Pienkowski, M. Plaut, P. S. Norman, and L. M. Lichtenstein. 1986. Identification of histamine releasing factors in the late phase of cutaneous IgE-mediated reactions. *J. immunol.* **136**: 2583-2587.

(Received Aug. 5, 2005/Accepted Sep. 7, 2005)