

미백제 스크리닝용 단백질칩의 개발

곽은영·한정선·이향복·신정현*·김은기†

인하대학교 공과대학 생명화학공학과 생물공학과, *인하대학교 의과대학 피부과
(2005년 2월 22일 접수, 2005년 3월 4일 채택)

Developing a Protein-chip for Depigmenting Agents Screening

Eun-Young Kwak, Jung-Sun Han, Hyang-Bok Lee, Jung-Hyun Shin*, and Eun-Ki Kim†

Department of Biological Engineering, Inha University, 253, Younghyun-dong, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea

*Department of Dermatology, College of Medicine, Inha University

(Received February 22, 2005; Accepted March 4, 2005)

요약: 미백 물질 탐색 방법으로, MC1R 발현 인자인 Mitf (microphthalmia transcription factor)를 이용한 protein chip을 적용하였다. MC1R promoter와 Mitf 결합의 저해 인자로서, DNA 상의 결합 부위인 E-box (CATGTG)와 유사한 서열을 가진 oligomer를 사용하였고, E-box 내외부의 서열 변화에 따른 저해율 또한 측정하였다. 그 결과 DNA-Mitf 결합 저해율이 있어서, E-box 서열 내 변화를 준 oligonucleotide 경쟁자는, E-box 이외의 서열 변화를 준 경쟁자보다 낮은 수치를 보였다.

Abstract: For the high-throughput-screening system (HTS) of depigmenting agents using a protein chip, effects of oligonucleotide-inhibitor sequence on the binding of Mitf protein to E box of MC1R was investigated. The sequence of oligonucleotide-inhibitor affected the binding of the target DNA to Mitf, depending on the location of the sequence variation in the inhibitor nucleotide. The oligonucleotide-inhibitor that changed the CATGTG sequence didn't show enough inhibition of the target DNA to Mitf, whereas significant inhibition was observed when the sequence outside the CATGTG was changed. This result indicated that CATGTG is crucial sequence for the binding of Mitf to E-box which initiates the transcription of pigmentation genes.

Keywords: Mitf (microphthalmia transcription factor), E-box, β -CD, microarray

1. 서 론

피부 색소 침착은 melanocyte의 tyrosine이 tyrosinase, Tyrp 1, Tyrp 2 등과 같은 효소에 의해 산화 과정을 거쳐 생성된 멜라닌에 의해서 발생한다[1]. Melanocyte 세포막 표면에는 melanocortin-1 receptor (MC1R), frizzled, endothelin receptor 등의 수용체들이 존재하며[2], 이들이 자극받으면 세포 내 신호에 의해 생성된 Mitf (microphthalmia transcription factor)가 멜라닌 합성에 관여하는 주요 효소들을 생성하여 색소 침착을 초래하게 된다. 따라서 Mitf는 신호 전달 기작의 매개체 중에 색소 형성에 관여하는 주요 효소 발현의 조절인자이다. 색소 침착의 핵심 조절 인자로 알려진 Mitf는 basic-helix-loop-

helix-leucin zipper 구조로 밝혀져 있으며 이는 DNA 결합 부위 sequence와 특이적으로 결합한다[1]. 한편, 멜라닌 생성에 핵심 효소인 tyrosinase, Tyrp1, DCT의 발현 유전자의 promoter에 존재하는 E-box (CATGTG)는 Mitf의 염기 부분과 특이적으로 결합하여 발현을 유도함으로써 피부 색소 침착을 조절하게 된다. α -MSH의 receptor인 MC1R promoter내에 존재하는 E-box 또한 Mitf와 특이적 결합을 통해 발현을 조절하는 가능성이 알려져 있다[5].

현재 미백 기작의 활발한 연구로 melanocyte 성장, 분화에 중요한 요소인 endothelin-1 (ET-1), 멜라노솜의 전달에 중요한 요소인 PAR-2, 멜라닌 형성을 유도하는 호르몬인 α -MSH나 POMC (proopiomelanocortin), 색소 침착 효소의 발현을 유도하는 Mitf에 대한 연구가 진행 중이나, Mitf를 목표물로 한 화장품 소재의 개발은 미비한

† 주 저자 (e-mail: ekkim@inha.ac.kr)

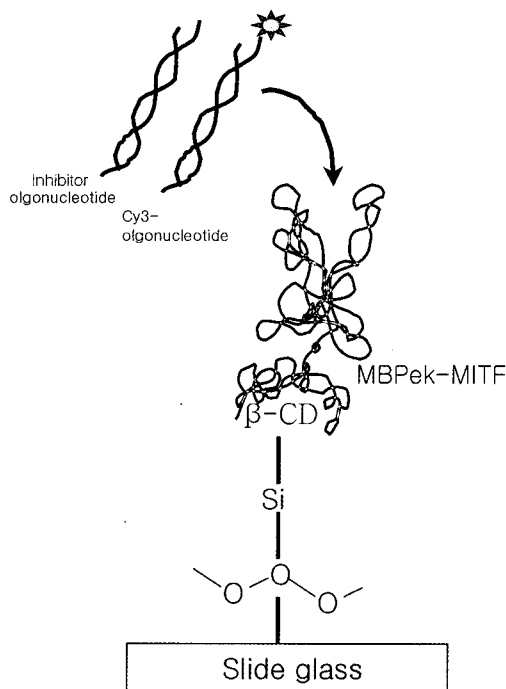


Figure 1. Schematic representation showing MBPek-MITF fusion protein binding to double stranded DNA on epoxide group coated glass slide.

실정이며 세포 내 탐색에 국한적으로 이용되어지고 있어 세포 외적인 새로운 탐색 시스템 구축이 미흡한 상황이다.

기존 화장품 소재로 이용되는 미백 성분들은 피부 흑화의 최종 단계인 멜라닌 합성에 관여하는 효소를 억제하는 것으로 재발 및 부작용 등으로 인하여 미백 효과가 크지 않은 실정이다. 화장품 소재의 해외 의존도가 큰 실정에서 미백제의 개발은 피부 생리 메커니즘에 근거한 새로운 특이적 목표물의 선정과 함께 기존의 효소 중심의 탐색 방법에서 벗어나 원료로부터 미백 유효 성분을 대량 검색할 수 있는 탐색 방법 구축이 절실하다고 사료된다.

따라서, 본 논문은 MC1R과 Mitf에 관한 피부 메커니즘에 근거하여, 새로운 목표물인 Mitf의 저해제의 탐색을 위한 고속 탐색 시스템 구축을 목표로 하여 새로운 단백질 칩 개발과 함께 저해제로써의 가능성을 보이는 저해물질로써 결합 부위 유사 서열 oligonucleotide를 이용하여 저해율을 확인해보았다.

2. 실험

2.1. 시약

3-Glycidoxypropyltrimethoxysilane, β -cyclodextrin, tetra

(ethyleneglycol), bovine serum albumine, ethanolamine을 Sigma사에서 구매하였다.

Microarrayer는 Proteogene (CM-1000)을 사용하였으며, scanner는 Axon 4100를 사용하여 GenePix program 4.1으로 이미지 분석하였다.

Protein chip의 주재료인 MBPek-Mitf는 대장균에서 발현, 분리하여 사용하였다[6].

2.2. 이중 나선 DNA의 제조

Mitf와 결합성을 확인하기 위한 결합 부위인 이중 나선 oligonucleotide는, MC1R promoter sequence 중 E-box (CATGTG)가 포함된 부분을 이용하였으며, 5'-CTCACG GCCCCGGCATGTGGCCGCCC-3', 5' 끝부분에 Cy3 형광물질로 표지하였다.

서열 변화 저해제로써, i) 결합 부위 자체로 구성된 oligonucleotide (5'-CTCACG GCCCCGGCATGTGGCCGCCC-3'), ii) E-box 부분을 변형시킨 oligonucleotide (5'-CTCACG GCCCCGGCTTGAGCCGCCC-3'), iii) E-box 외부를 변형시킨 oligonucleotide (5'-CTCTCG GCCCCGGCATGTGGCCGCCC-3')를 사용하였다[2].

2.3. 유리 기판의 수식화

단백질 칩 제작을 위하여 유리 기판 위에 제조된 융합 단백질을 고정화하기 위하여 기판 수식화(modification)를 하였다. 유리 기판의 epoxy silanization을 위해 "baylor college of medicine microarray core facility"의 방법으로 수행하였다. Epoxy silanization된 유리 기판은 0.1 N NaOH와 β -cyclodextrin 70 mg/mL 용액 처리하여 40°C에서 20 h 후 1 M ethanolamine으로 37°C에서 3~4 h 처리하여 사용하였다[3].

2.4. Microarray

MBPek-Mitf와 완충액(50 mM Tris, 25%(v/v) tetra (ethyleneglycol, pH 8.0)을 혼합한 후 microarrayer를 이용하여 β -cyclodextrin 칩에 점적하였다. 사용된 microarrayer는 proteogen (Korea)사의 제품을 사용하였으며, 단백질 핀은 Telechem사(SMP10)의 제품을 사용하였다. 점적의 지름은 320 μ m가 되도록 하였고, 습도는 60~70%로 유지하였으며 상온에서 수행하였다. 점적을 마친 후, 약 1 h 동안 microarrayer 안에서 결합 반응을 시켰으며 세척 완충액(20 mM Tris-buffer, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)과 증류수로 세척하였다. Mitf의 농도별 점적과 함께 DNA의 다른 단백질에 대한 비특이적 결합성 여부를 확인하기 위해 1% BSA 점적도 함께 수행하였다.

점적을 마친 후 결합된 MBPek-Mitf에 coverwell perfusion chamber (Sigma)를 이용하여 단백질-DNA 결합 반응을 유도하였으며, 결합 완충용액(6 mM HEPES (pH

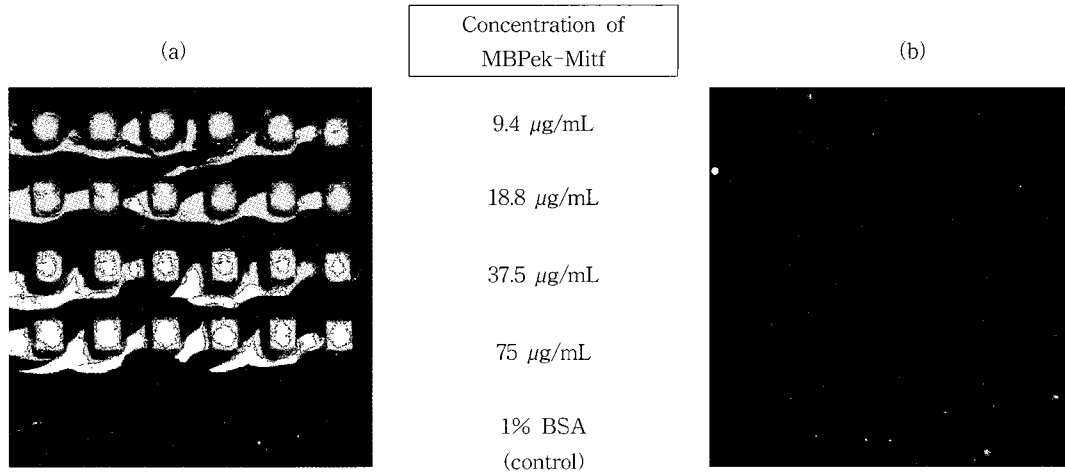


Figure 2. Binding of Mitf on the surface-modified glass plate, (a) Cy3 labelled MBPek-Mitf, (b) no labelled MBPek-Mitf.

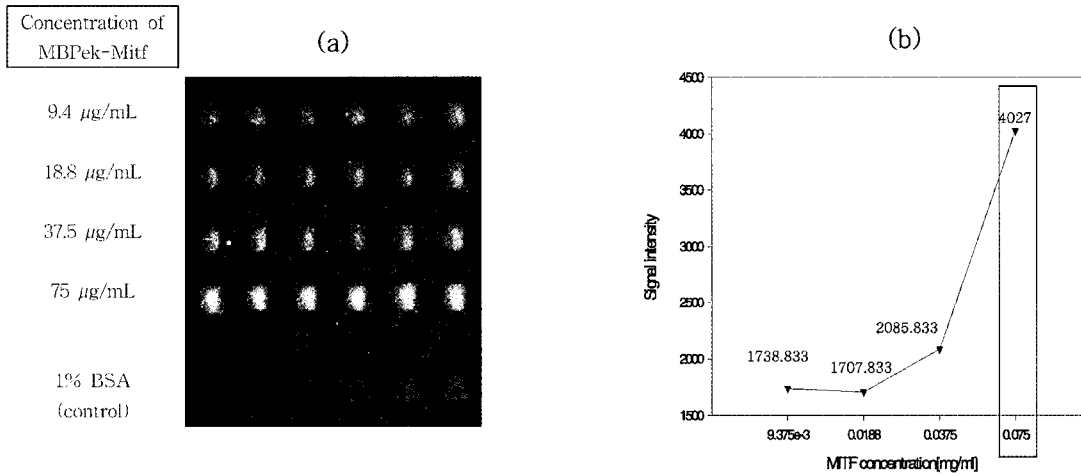


Figure 3. Effect of Mitf concentration on the intensity of signal, (a) fluorescence image, (b) intensity of fluorescence.

7.8), 40 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 6% glycerol, 0.25 mg/mL poly (dIdC-dIdC), 2% skimmilk)과 최종 농도 1 µM의 DNA가 되도록 혼합하여 처리하였다[4]. 또한 경쟁제 역시 같은 농도인 1 µM이 되도록 처리하여 확인하였다. 결합은 4°C에서 1 h 반응시킨 후, 세척은 PBST (0.05% Tween-20)와 PBS/TrintonX-100, PBS를 이용하여 각각 5 min 동안 3번씩 수행하였다. 원심분리로 건조시켰다.

2.5. Microarray 데이터 분석

완성된 단백질 칩을 형광 스캐너의 Cy3 형광 물질의 감지 파장인 532 nm 범위에서 PMT500 설정 후, 단백질과 DNA의 특이적 결합을 signal intensity 수치화를 통해 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. β-Cyclodextrin Chip 상에 고정된 Mitf 확인

DNA 결합 반응에 사용된 MBPek-Mitf 자체와, Cy3를 붙인 MBPek-Mitf를 β-cyclodextrin 처리한 유리 기판 위에 점적 후 형광성을 확인하였다(Figure 2).

그 결과, 농도별로 점적한 Mitf의 형광 신호를 확인하였고, 이는 Mitf의 고정화가 잘 이루어졌다는 것으로 판단할 수 있다. 또한, 형광 물질을 붙이지 않은 Mitf의 경우 그 자체에는 형광성이 없는 것이 확인되었고, 이 논문의 형광성 신호는 DNA-Mitf 간의 결합을 통한 결과임을 알 수 있다.

3.2. DNA-Mitf 저해율 확인을 위한 Mitf 농도 선정

농도별 Mitf 점적 후 형광 물질 처리된 DNA 만의 결

Table 1. Effect of Sequence Variation on the Mitf-E Box Binding

Oligonucleotide	Signal Intensity	Inhibitory Ratio
Cy3-5'CTCACGGCCCCCGGCATGTGGCCGCCC3'	4027	-
Cy3-5'CTCACGGCCCCCGGCATGTGGCCGCCC3'	807.1667	80%
i) Inhibitor 5'CTCACGGCCCCCGGCATGTGGCCGCCC3'		
Cy3-5'CTCACGGCCCCCGGCATGTGGCCGCCC3'	1047.02	74%
ii) Inhibitor 5'CTCTCGGCCCCCGGCATGTGGCCGCCC3'		
Cy3-5'CTCACGGCCCCCGGCATGTGGCCGCCC3'	1490	63%
iii) Inhibitor 5'CTCACGGCCCCCGGCTTGAGGCCGCCC3'		

합성을 형광성 신호로 확인해 본 결과, 농도 순차적인 결과를 보인 부분은 점적의 최고 농도인 [75 $\mu\text{g}/\text{mL}$]이었으며 저해 oligonucleotide 사용 시 보인 저해율 확인 농도로 적용하였다(Figure 3).

3.3. 저해제로 사용된 Oligonucleotide 별 저해율 측정

저해 oligonucleotide는, i) 결합 부위 자체, ii) E-box 내의 두 개 서열 변화시킨 것, iii) E-box 이외의 한 개 서열 변화시킨 것을 사용하였다.

저해제로 적용한 oligonucleotide들의 종류별 DNA-Mitf 결합 저해율을 확인한 결과에 나타난 바와 같이 결합 부위 자체 서열을 가진 i) oligonucleotide 저해제가 가장 효과적인 저해율을 보였고, E-box내의 염기 서열을 변화시킨 ii) oligonucleotide 저해제가 가장 약한 저해율을 나타냈다(Table 1).

이는 E-box 서열이 보존된 형태를 가진 저해제가 DNA-Mitf 결합을 가장 크게 방해하는 것임을 알 수 있고, 이들 DNA-Mitf 결합에 있어서 E-box 서열이 중요한 부분임을 알 수 있는 결과이다.

4. 결 론

β -cyclodextrin chip 표면을 이용한 유리 chip에서 MBPek-Mitf와 특이적 결합을 형광 측정 방법을 이용하여 확인하였다. 서열을 변화시킨 종류별 저해 oligonucleotide 처리를 함으로써 도출된 저해율을 통해, E-box 서열을 보존하고 있는 oligonucleotide 저해제(i, ii)의 저해율이 큰 수치인 80%(i), 74%(ii)였고, E-box 내 서열 변화를 준 저해제는 63%(iii)로 그에 비해 낮은 저해율을

보였다. 이 결과에 보아, DNA-Mitf 결합에 있어서 E-box (CATGTG) 부분이 중요한 핵심 결합 부위라는 것을 예측할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. T. Ellenberger, D. Fass, M. Arnaud, and S. C. Harrison, Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer, *Genes. Dev.*, **8**, 970 (1994).
2. H. Aoki and O. Moro, Involvement of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in expression of human melanocortin-1 receptor (MC1R), *Life Sci.*, **71**, 2171 (2002).
3. J. M. Jung, Y. B. Shin, M. G. Kim, H. S. Ro, H. T. Jung, and B. H. Chung, A fusion protein expression analysis using surface plasmon resonance imaging, *Anal. Biochem.*, **330**, 251 (2004).
4. J. Linnell, R. Mott, S. Field, and I. A. Udalova, Quantitative high-throughput analysis of transcription factor binding specificities, *Nucleic Acids Res.*, **32**(4), e44 (2004).
5. O. Moro, R. Ideta, and O. Ifuku, Characterization of the promoter region of the human melanocortin-1 receptor (MC1R) gene, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **262**, 452 (1999).
6. 한정선, 곽은영, 김은기, 전사인자 저해제 통한 미백제 탐색용 단백질 칩 제작, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **30**(4), 480 (2004).