

돼지의 흉선조직에서 ubiquitin 활성화 효소들의 분리와 특성

이송재

고신대학교 의과대학 생화학교실

Purification and characterization of ubiquitin activating enzymes from porcine thymus

Song Jae Lee

Department of Biochemistry, Kosin University college of Medicine

Abstract

Backgrounds : The continuous synthesis and degradation of proteins in the cell are responsible for essential cellular functions such as the modulation of the levels of key enzymes and regulatory proteins and removal of abnormal proteins that arise by biosynthetic errors or postsynthetic damages. Intracellular protein degradation are largely occurred in lysosome and cytoplasm. Nonselective protein degradation appears to be largely occurred in lysosome. However, short-lived proteins or damaged and abnormal proteins are degraded in the cytoplasm. These kind of protein degradation in the cytoplasm (ubiquitin mediated protein degradation) require energy (ATP), ubiquitin and ubiquitin activating enzymes such as E1 (ubiquitin activating enzyme), E2 (ubiquitin carrier protein) and E3 (ubiquitin-protein ligase). To better understand the degradation mechanism in the cytoplasm, ubiquitin activating enzymes (such as E1 and E2 enzymes) was purified from cytosol fraction of porcine thymus and tested their conjugation activity with iodinated ubiquitin. **Materials and Methods** : The cytosol fraction prepared from porcine thymus tissue were used as a enzyme source. The DEAE-cellulose column chromatography, ammonium sulfate precipitation and ubiquitin-sepharose affinity column and/or gel filtration column chromatography were adapted to purify the E1 and E2 enzymes from thymus tissue. The conjugation activity of purified E1 and E2 enzymes were tested in the presence of 125I-ubiquitin. **Results** : The E1 and E2 enzymes of cytosol fraction from porcine thymus tissue was purified from 30-80% ammonium sulfate precipitant of DEAE-cellulose eluate fraction. Following ubiquitin-sepharose column and gel filtration column chromatography, the E1 enzyme showed homogeneous form (judged by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis). The various kinds of well known E2 isoforms and putative new kind of E2 isoform (M.W 37 Kda) were found in cytosol fraction. When purified E1 and E2 enzyme or both were incubated in the presence of 125I-ubiquitin, these enzymes were conjugated with ubiquitin. **Conclusion** : Ubiquitin-activating enzymes were purified from cytosol fraction of porcine thymus tissue. The homogeneous form of E1 enzyme and E2 isoforms showed strong conjugation activity with 125I-ubiquitin. These results might be useful for elucidation of selective protein degradation in the cytoplasm.

Key words : Cytoplasm, Ubiquitin activating enzyme, Protein degradation

서론

생명체의 기본단위인 세포에서 일어나는 단백질들의 연속적인 합성과 분해는 세포내 중요 효소들과 조절 과정에 관여하는 단백질들의 양적 조절 및 세포의 항상성 (homeostasis) 유지에 필수적이다.¹⁾ 세포에서 일어나는 단백질들의 분해는 세포내외의 주위환경과 다른 인자들에 의하여 영향을 받는데 진핵 세포에서 일어나는 단백질들의 분해는 주로 세포질과 라이조솜

교신저자 : 이 송 재
주소: 602-703, 부산광역시 서구 암남동 34번지
고신대학교 의과대학
TEL. 051-990-6417 FAX. 051-241-0145
E-mail: sjlee430@ns.kosinmed.or.kr

· 본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비 일부 지원에 의해 이루어짐

에서 일어나며 에너지가 필요하다.²⁾ 세포내 단백질 분해는 세포의 특이성과 생리적 상태의 변화에 따라 다르다. 즉, 세포내의 영양상태나 호르몬이 고갈된 경우에는 라이조솜에서의 단백질 분해가 크게 증가하며 라이조솜에서 일어나는 단백질 분해는 대부분이 비선택적으로 일어난다.³⁾ 세포질에서 일어나는 단백질들의 분해는 박테리아에서 일어나는 ATP 의존성 단백질 분해효소에 의한 단백질 분해⁴⁾와 ubiquitin을 매개로 하는 단백질 분해경로(ubiquitin-mediated protein degradation pathway)가 알려져 있으며,^{5,6)} 이들은 단백질들의 선택적 분해와 밀접한 관련이 있다. 세포질에서 일어나는 단백질들의 선택적 분해에는 ubiquitin이 매우 중요한 역할을 함이 밝혀졌다. ATP 의존성 단백질 분해효소가 활성을 나타내기 위해서는 ubiquitin이 분해될 기질 단백질과의 결합이 필수적이며 ubiquitin과 결합한 기질 단백질을 단백질 분해효소가 선택적으로 분해함이 밝혀졌다.^{7,8)} Ubiquitin이 매개하는 단백질 분해기작은 비교적 복잡한 과정을 거쳐서 이루어지는데 크게 3단계로 구분할 수 있다.⁹⁻¹²⁾ 첫 번째 단계에서 E1 효소가 활성화되면 ubiquitin의 carboxyl end의 glycine 잔기와 ATP에서 PPi가 분리된 AMP와 결합하고 곧 이어 ubiquitin에서 AMP가 유리되고 ubiquitin은 E1 효소의 thiol site와 결합한다. 다음 단계에서는 E1과 결합하고 있던 ubiquitin이 ubiquitin 운반 단백질로 명명된 E2 효소와 결합하고 E1은 유리된다. 세 번째 단계에서는 E3 라고 명명된 ubiquitin protein ligase에 의하여 ubiquitin과 기질 단백질이 결합한다. 이때 ubiquitin의 C-terminal의 glycine은 기질 단백질의 lysine 잔기의 ϵ -amino group과 isopeptide 결합을 형성한다. Ubiquitin과 결합한 기질 단백질은 ATP 의존성 단백질 분해효소 복합체인 26S proteasome (분자량 약 2000 kDa)에 인지되어 분해되는데 26S proteasome은 20S의 catalytic 부위와 19S의 조절부위로 구성되어 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 세포질에서 일어나는 단백질 분해에서 ubiquitin들은 monomer로 존재하거나 또는 polyubiquitin 형태로 존재하며 polyubiquitin들도 분해될 단백질과 결합하면 proteasome과 쉽게 결합하여 곧바로 단백질 분해가 일어난다. 세포에서 ubiquitin은 단백질 분해 외에도 역할이 매우 다양함이 알려졌다.¹⁷⁾ 즉, 세포질에서

일어나는 reticulocyte의 maturation¹⁸⁾, 단백질의 기능 변화¹⁹⁻²⁰⁾와 단백질의 endocytosis²¹⁾에도 관여함이 밝혀졌다. 세포질에서 일어나는 ubiquitin을 매개로 하는 단백질 분해와 관련된 E1, E2, E3 효소들은 주로 토끼의 reticulocyte와 사람의 erythrocyte, yeast 및 식물 등의 세포질 분획에서 분리되거나 존재하고 있음이 확인되었다.

본 연구에서는 세포질에서 일어나는 단백질의 선택적 분해기작을 규명하기 위한 연구의 일환으로 돼지 흉선 조직에서 세포질 분획을 효소원으로 사용하여 anion exchange column과 affinity column 및 gel filtration column chromatography를 시행하여 ubiquitin 활성화 효소인 E1과 E2를 분리 정제하고 전기영동을 행하여 이들 효소들의 순수분리와 E2 효소의 isoform을 확인하고자 하였으며 방사능으로 표지된 ¹²⁵I-ubiquitin을 제조하여 이들 효소들과 반응시킨 후 autoradiography를 행하여 ubiquitin과의 결합여부를 확인하였다.

연구재료 및 방법

돼지의 흉선 조직에서 세포질 분획의 분리

Ubiquitin 활성화 효소들인 E1, E2 효소의 분리와 정제는 Ciechanover 등²²⁾, Pickart 등²³⁾, Hass 등²⁴⁾의 분리 방법의 장점들을 변형하고 조합하여 사용하였다. 세포질 분획의 분리는 4°C 이하에서 수행하였고 E1, E2 효소들의 분리과정은 상온에서 시행하였다.

세포질 분획의 분리

세포질 분획의 분리는 Jeohn 등²⁵⁾과 Urade 등²⁶⁾의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 생후 10개월 미만의 어린 돼지(체중 100 kg 이하)의 신선한 흉선 조직을 도살장에서 도살 직후 구입하여 지방과 혈액 및 근육조직 등의 불순물을 제거한 다음 무게를 측정하고 가위로 작은 절편을 만들고 10mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.0)으로 반복 세척하였다. 여기에 3배량의 10% glycerol과 10mM DTT, 1mM EDTA, 1 mM PMSF 및 10 μ M의 leupeptin이 함유된 10mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.0)을 가하여 파쇄기로 조직을 파쇄하고 4겹의 수술용 거즈로 여과하여 불순물과 침전물을

제거하였다. 파쇄된 균질액을 500 xg에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 제거하고 다시 20,000 xg에서 20분간 2회 반복 원심 분리하여 침전물을 버리고 상층액을 모았다. 상층액을 105,000 xg에서 2시간 동안 초 원심 분리하여 cytosol 분획을 분리하였다.

DEAE-cellulose column chromatography

적당량의 Whatman DE-52 cellulose resin에 약 3배 부피의 1mM DTT가 함유된 10mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충용액에 부유시켜 완전히 평형에 이르게 한 후 DE-52 cellulose 부피와 세포질 분획의 부피의 비율이 약 1.5 : 1이 되게 세포질 분획을 가하고 4°C에서 2시간 동안 교반기를 사용하여 교반하였다. 교반 후 4°C에서 일정시간 방치하고 상층액을 제거한 다음 단백질이 결합된 DEAE-cellulose resin을 column (2.5 x 25cm)에 packing 하고 1mM DTT가 함유된 10mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충용액으로 씻은 후 1mM DTT와 20mM KCl이 함유된 10mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충용액으로 280nm에서 단백질의 흡광도가 0이 될 때까지 씻어서 DEAE cellulose resin에 약하게 결합하고 있는 단백질들을 완전히 제거하였다. 여기에 1mM DTT와 0.5M KCl이 함유된 20mM Tris-Cl (pH 7.0) 완충용액으로 용출시키며 LKB fraction collector를 사용하여 30ml/hr의 속도로 흡광도가 0이 될 때까지 0.5M KCl 분획을 받았다.

Ammonium sulfate 침전과 Fraction II 제조

위에서 얻은 DEAE-cellulose 분획에 30%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 분말을 가하여 하룻밤 방치하고 14000 xg에서 10분간 원심 분리하여 상층액과 침전된 단백질 분획을 분리하였다. 상층액에 다시 80%에 해당되는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심 분리하여 침전된 단백질 분획을 모았다(30-80% ammonium sulfate fraction). 30-80%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 분획을 소량의 0.2mM DTT가 함유된 20mM Tris-Cl 완충용액 (pH 7.2)에 녹인 후 분자량이 3500 이하만을 제거하는 투석 bag에 넣어서 동일한 완충용액으로 수회 반복 투석하였다. 투석 후 투석 bag 안에 있는 단백질 분획을 14,000 xg에서 10분간 원심 분리하여 침전물을

제거하고 부피를 측정한 후 여기에 0.1M DTT와 ATP를 가하여 이들의 최종농도가 각 0.5mM과 1mM이 되게 조정하였다(Fraction II).

Ubiquitin-sepharose affinity column chromatography

활성화된 CH sepharose gr당 약 10mg의 ubiquitin이 결합된 ubiquitin-sepharose를 제조 하여 column (1.5 x 4 cm)에 packing 한 다음 2mM MgCl_2 와 2mM ATP가 함유된 50mM Tris-Cl 완충용액 (pH 7.2)으로 평형에 이르게 하였다. Fraction II 용액에 100mM의 ATP와 MgCl_2 및 phosphocreatine을 가하여 이들의 최종농도가 각 2mM ATP, 2mM MgCl_2 , 5mM phosphocreatine이 되게 조정하고 여기에 1U/ml creatine kinase와 0.38U/ml의 inorganic pyrophosphatase를 가하고 상온에서 10분간 반응시켰다. Ubiquitin-Sepharose column에 Fraction II 분획을 loading하고 10배 부피의 50mM Tris-Cl 완충용액 (pH 7.2)으로 280nm에서 흡광도가 0이 될 때까지 column을 씻은 다음 0.5 M KCl이 함유된 50mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.2)으로 용출시키고 다시 10배 부피의 50mM Tris-Cl 완충용액 (pH 7.2)으로 용출시켜 column에 남아있는 KCl 용액을 완전히 제거하였다. 여기에 2mM AMP와 2mM sodium pyrophosphate가 함유된 50mM Tris-Cl 완충용액 (pH 7.2)으로 용출시키고 LKB fraction collector를 사용하여 30 ml/hr의 속도로 약 50ml의 분획을 모았다(AMP-PPi 용출액). 이 column을 다시 10배 부피의 50mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.2)으로 용출시켜서 column에 함유된 AMP와 PPi 용액을 제거하고 10mM DTT와 0.1mM EDTA가 포함된 50mM Tris-Cl 완충용액 (pH 9.0)으로 30ml/hr의 속도로 용출시키면서 약 60ml의 용출액을 받았다(DTT 용출액). AMP-PPi 용출액은 용출 후 즉시 4mg의 albumin을 가하고 100mM DTT를 가하여 DTT의 최종농도가 10mM이 되게 하였다. 또한 DTT 용출액도 용출 즉시 효소의 활성도 저하를 방지하기 위하여 pH 7.5로 조정하고 여기에 4mg의 albumin을 가하였다.

Gel filtration column chromatography

AcA 34 gel matrix를 3배 부피의 Tris-Cl 완충용액(pH 7.2)에 부유시킨 후 column (1.6 x 30cm)에 packing하고

동일한 완충용액으로 완전히 평형에 이르게 하였다. 여기에 Ubiquitin-Sepharose column을 시행하여 분리한 세포질의 E1 분획을 loading하고 0.17M NaCl이 함유된 50mM Tris-Cl 완충용액 (pH 7.2)으로 용출시키고 LKB fraction collector를 사용하여 30 ml/hr의 속도로 각 분획을 모았다.

E1과 E2 효소의 125 I-ubiquitin과의 결합력 측정

정제된 E1과 E2 효소의 일정량에 50mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.5)과 최종농도가 각 5mM $MgCl_2$, 2mM ATP, 2uM 125 I-ubiquitin을 가하여 최종부피가 20 μ l 되게 조정하고 37°C에서 3분간 반응시켰다. 또한 같은 부피의 E1과 E2 효소액을 동시에 반응액에 가한 후 30분간 반응시킨 후 반응액에 5 μ l의 sample buffer를 가하여 반응을 정지시키고 12.5 % acrylamide gel에 loading하여 전기영동을 행하였다. 전기영동이 끝난 gel은 고정과 염색 및 탈 염색처리하고 3H-Enhancer 용액에 담가서 방사능을 활성화시킨 후 증류수로 씻은 다음 gel dryer를 사용하여 gel을 건조시키고 X-OMAT imaging film에 넣어 deep freezer에 일정시간 방치하고 autoradiography를 하였다.

단백질의 정량

단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 이용하여 Bradford 방법²⁷⁾을 사용하여 정량 하였다.

연구결과

DEAE-cellulose column chromatography

돼지의 흉선 조직에서 분리한 세포질 분획을 DEAE-cellulose resin과 교반하여 column에 packing하고 1mM DTT와 20mM KCl이 함유된 10mM Tris-Cl(pH 7.0) 완충용액으로 용출시켜 DEAE-cellulose resin에 약하게 결합하고 있는 단백질들을 완전히 제거하였다. 이 column을 1mM DTT와 0.5M KCl이 함유된 20mM Tris-Cl(pH 7.0) 완충용액으로 용출시켰을 때 단일 peak를 나타냈다 (Fig.1).

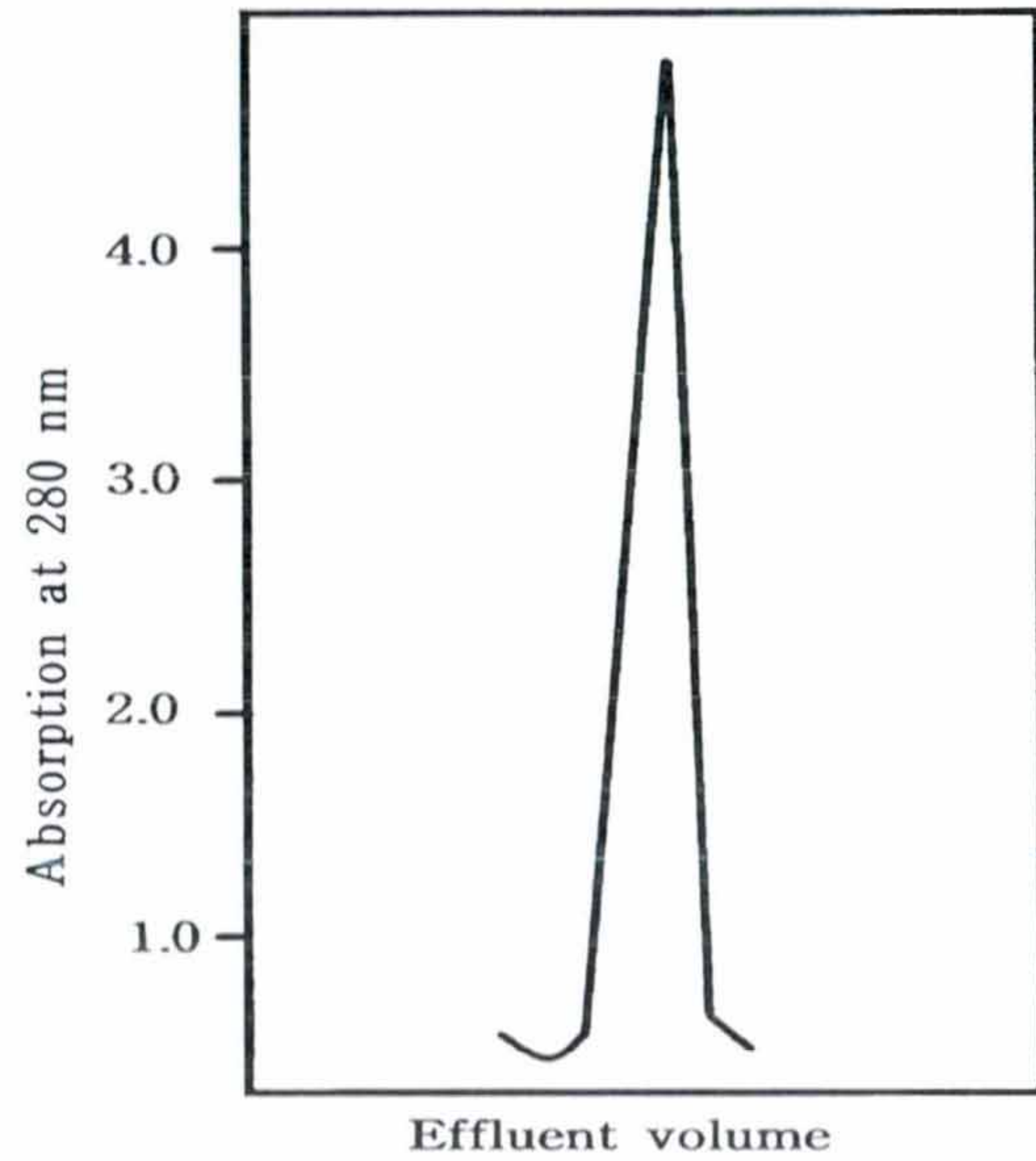


Fig. 1. DEAE-cellulose column chromatography of cytosol fraction of porcine thymus tissue. The mixed cytosol fraction and DEAE-cellulose resin was packed into column (2.5 x 25cm) and washed with 20mM KCl and then eluted with 0.5M KCl. The eluate from the DEAE-cellulose column was precipitated with 30-80% ammonium sulfate and prepared Fraction II flowered by dialysis.

DEAE-cellulose의 용출액에 $(NH_4)_2SO_4$ 를 가하여 침전시켰을 때 30-80% $(NH_4)_2SO_4$ 침전분획에서 ubiquitin 활성화 효소들인 E1과 E2 효소들이 포함되어 있음이 전기영동의 결과에서 관찰되었다(Fig. 4).

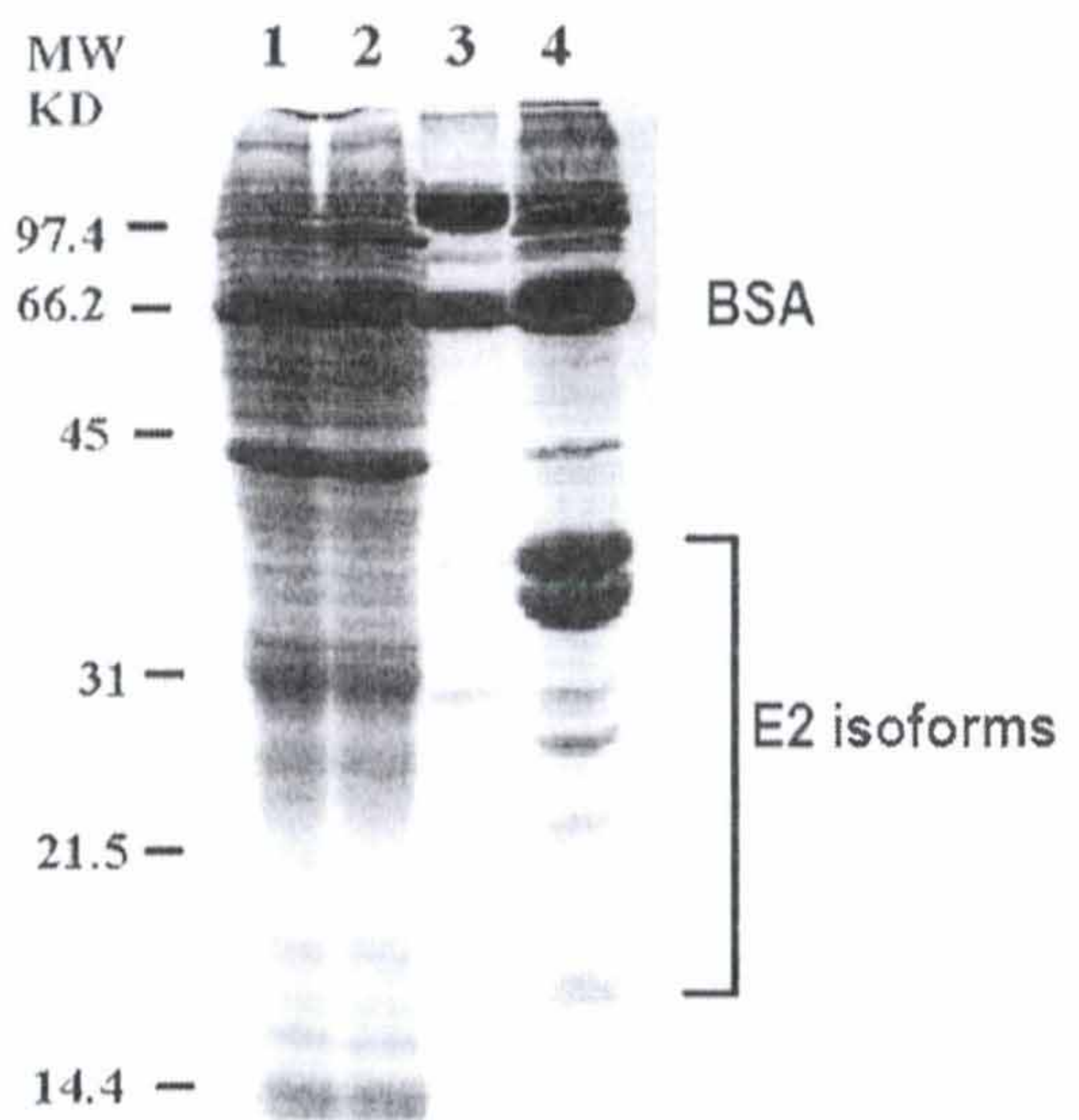


Fig. 4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of E1 and E2 enzyme preparations from cytosol fraction of porcine thymus tissue. The Fraction II of cytosol fraction from porcine thymus was loaded to Ub-sepharose (10mg/gr of sepharose) column. The concentrated eluates were run on the 12.5% acrylamide gel and stained with Coomassie Blue. The marker proteins were: phosphorylase B (97.4 Kda), bovine serum albumin (BSA; 66.2 Kda), ovalbumin (45 Kda), carbonic anhydrase (31 Kda), trypsin inhibitor (21.5 Kda), lysozyme (14.4 Kda). Molecular weights were estimated from those of proteins run on the same gel (not shown). Lane 1, porcine thymus fraction II (60 μ g of protein); lane 2; flow-through of Ub-sepharose column (60 μ g), lane 3; concentrated AMP and PPi eluate (E1 enzyme) from the Ub-sepharose column (50 μ g), lane 4; concentrated DTT (pH 9.0) eluate (E2 enzyme eluate) from the Ub-sepharose column (50 μ g).

30-80%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전분획에 함유된 효소원의 활성 저하를 방지하기 위하여 ATP와 DTT를 가하여 이들의 최종농도가 각 0.5mM과 1mM이 되게 조정하였다. 이때 투석액의 최종 부피는 시작단계의 약 1/5에 해당되었고 단백질농도는 약 40-50mg/ml 이었으며 편의상 Fraction II로 명명하였다.

Ubiquitin-sepharose affinity column chromatography

Ubiquitin-sepharose column에 Fraction II 분획을 loading하고 0.5 M KCl이 함유된 50mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.2)으로 용출시켰을 때 ubiquitin-sepharose column에 결합하지 않은 단백질들의 작은 peak가 관찰되었고(Fig. 2),

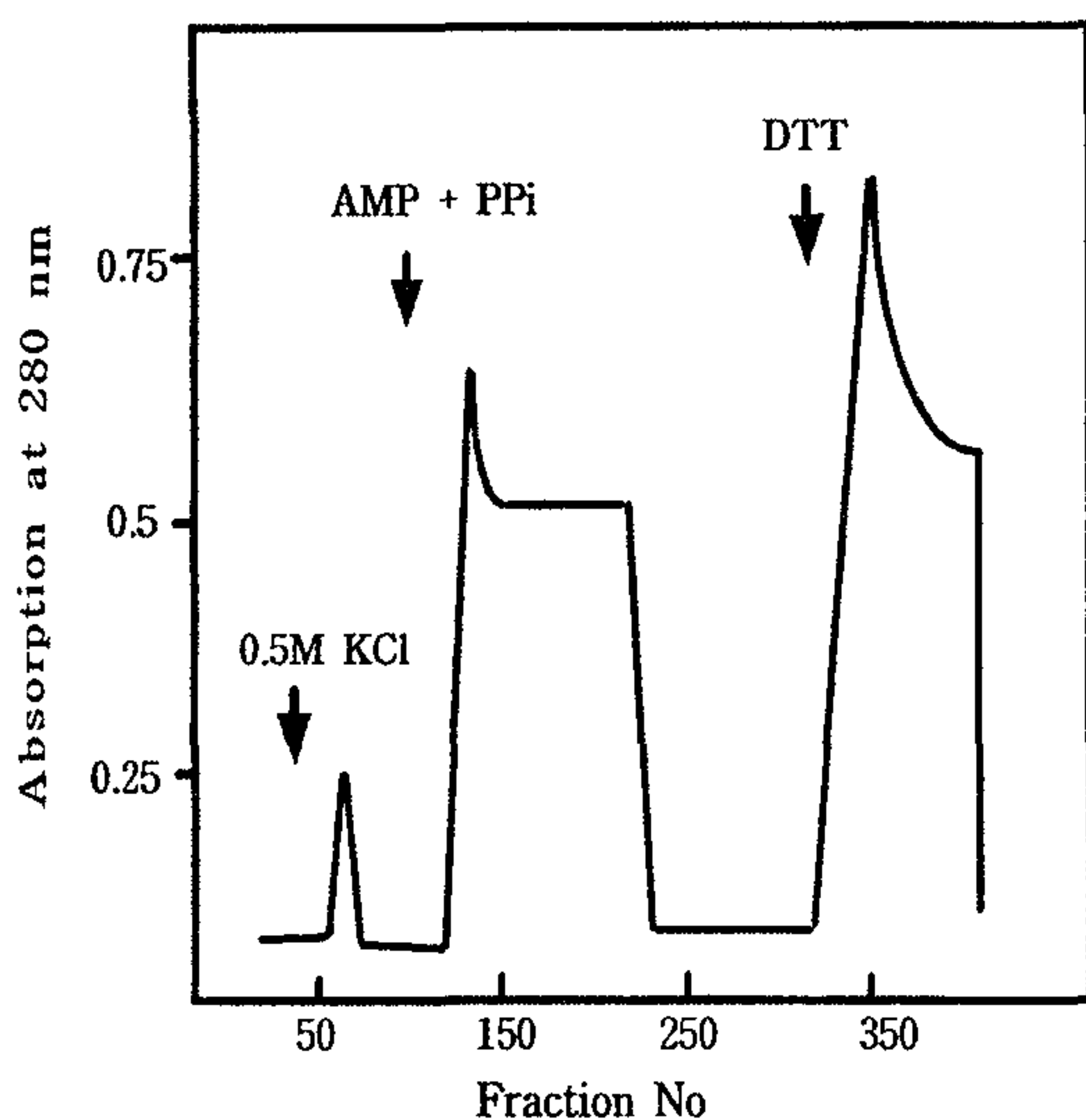


Fig. 2. Elution profiles of cytosol fraction from ubiquitin-sepharose column chromatography. The fraction II of cytosol fraction was loaded to Ub-sepharose (10mg of Ub/gr of sepharose) column and washed with equilibrium buffer. The column was eluted with 0.5M KCl, flowered by washing with 50mM Tris buffer (pH 7.5) and then eluted with 50mM Tris-Cl buffer (pH 7.5) containing 2mM AMP, 2mM pyrophosphate and 10mM DTT (pH 9.0), respectively. The eluates from the column were concentrated with YM 10 membrane filter under the nitrogen gas stream.

2mM AMP와 2mM sodium pyrophosphate가 함유된 50mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.2)으로 용출시킨 용출액을 YM 10 membrane filter를 사용하여 질소가스로 농축시켜 전기영동을 하였을 때 E1 (분자량은 약 106 KDa)가 용출되었고 미량의 E2 효소의 isoform들이 함께 용출됨이 전기영동결과에서 관찰되었다(Fig.4 lane 3).

Ubiquitin-sepharose column을 다시 10mM DTT와 0.1mM EDTA가 포함된 Tris-Cl 완충용액(pH 9.0)으로 용출시켜 농축하고 전기영동을 하였을 때 37 kDa의 E2 isoform을 포함한 여러 형태의 E2 isoform들이 관찰되었다 (Fig. 4 lane 4).

Gel filtration chromatography

Ubiquitin-sepharose column을 시행하여 분리한 E1 효소분획에 함유된 소량의 E2 isoform 및 불순 단백질을 제거하고자 gel filtration column chromatography를 시행하고 용출형태를 조사하였을 때 E1 효소의 단일 peak와 안정제로 첨가한 albumin의 peak가 관찰되었다 (Fig. 3).

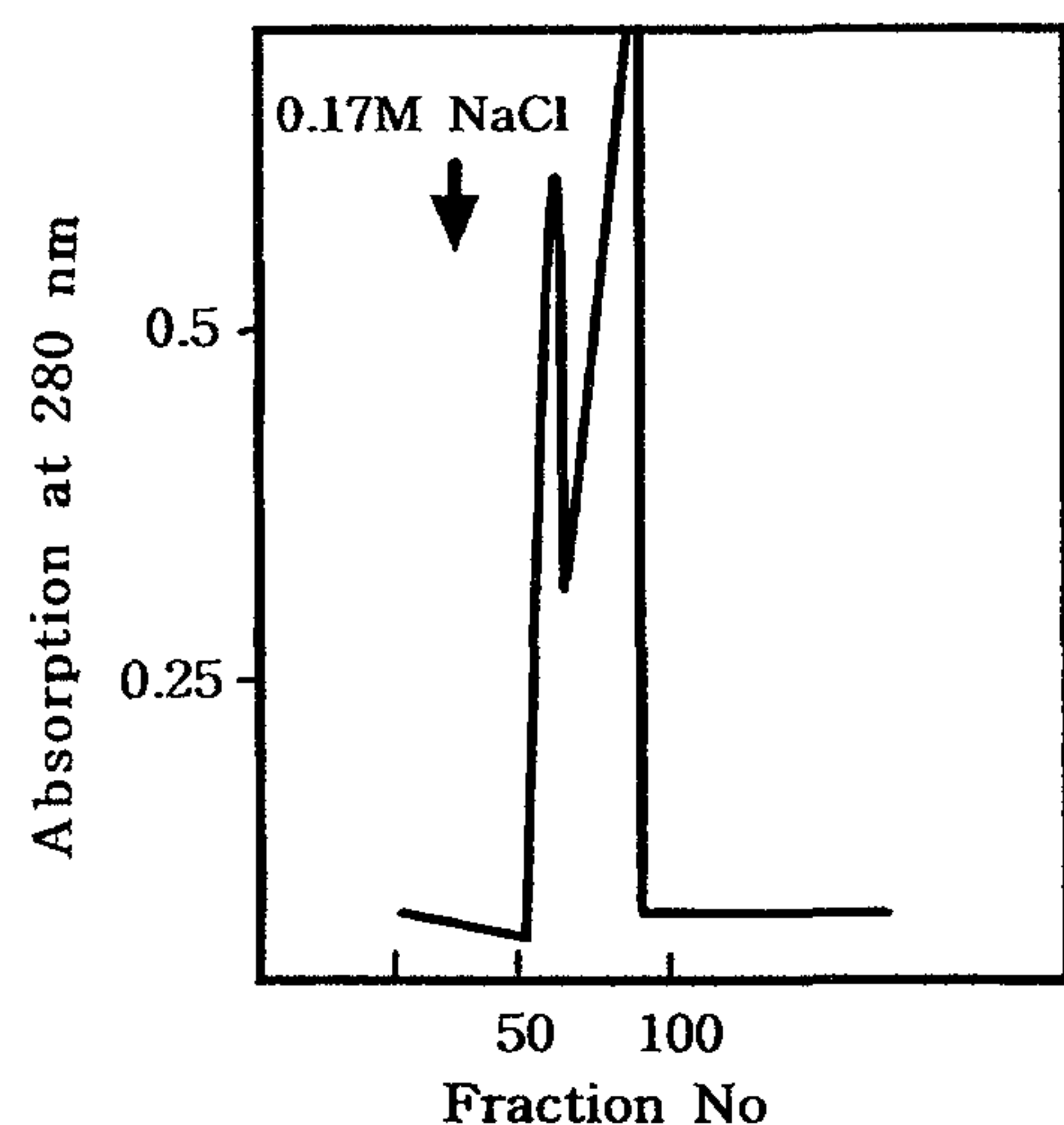


Fig. 3. AcA 34 gel filtration column chromatography of cytosol E1 enzyme from ubiquitin-sepharose column. The concentrated cytosol E1 enzyme fraction eluted from ubiquitin-sepharose column was loaded to AcA 34 gel filtration column and eluted as described in "Materials and Methods".

또한 E1 효소가 포함된 용출액을 질소가스 하에서 농축하여 전기영동을 행하였을 때 정제된 E1 효소의 단일 band를 확인하였다(Fig.5).

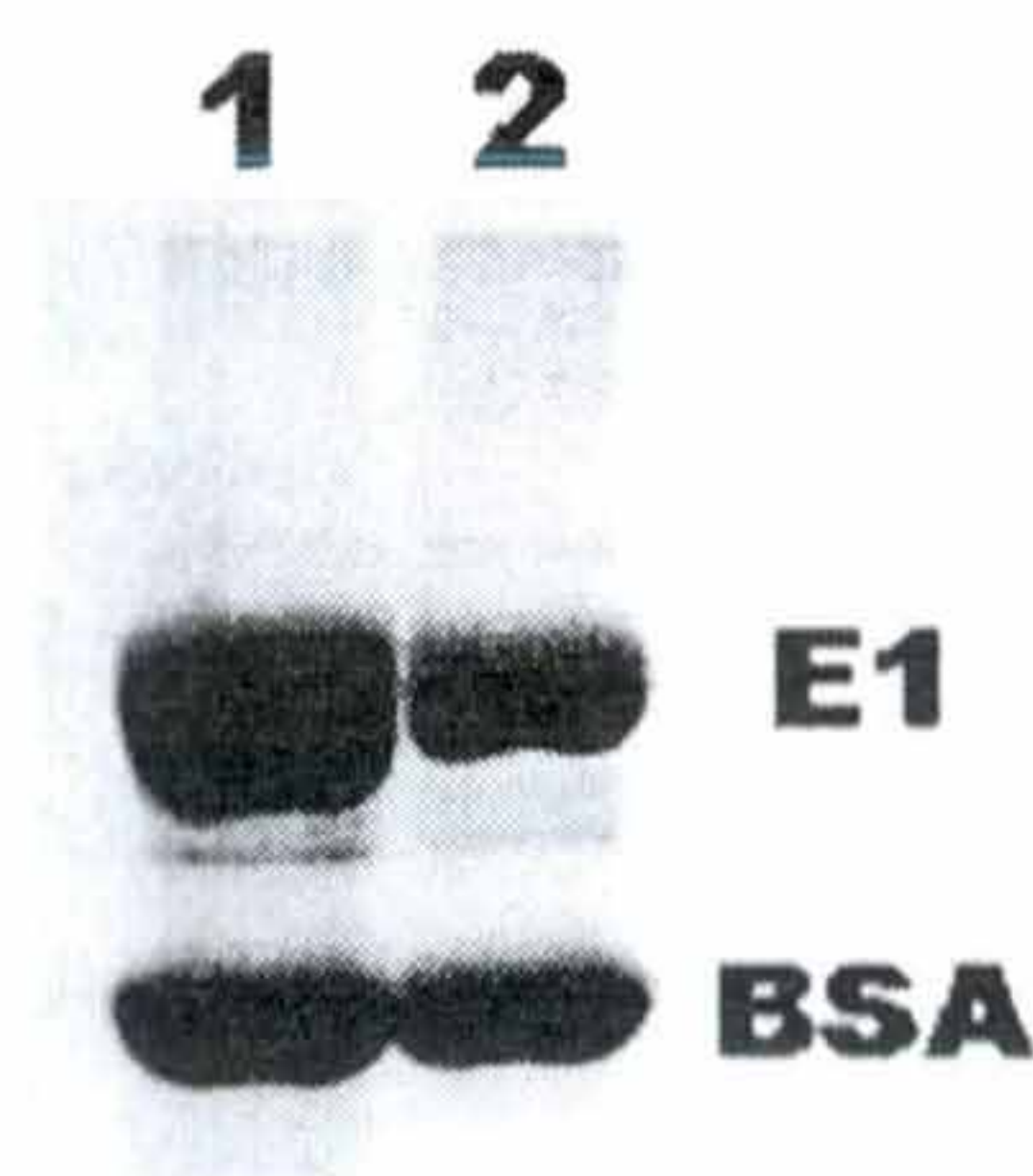


Fig. 5. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of purified E1 enzyme.

The concentrated eluates of ubiquitin-sepharose column from cytosol fraction was loaded to AcA34 gel filtration column. The concentrated eluates were run on the 10% acrylamide and stained with Coomassie Blue. Lane 1; concentrated eluate from ubiquitin-sepharose column, Lane 2; concentrated eluate from AcA 34 gel filtration column.

정제된 E1과 E2 효소들의 ubiquitin과의 결합능력 측정

세포질에서 분리한 E1과 E2 효소를 125 I로 표지된 ubiquitin과 반응시킨 후 전기영동을 하여 autoradiography를 하였을 때 세포질의 E1 과 E2 효소 모두가 ubiquitin과 결합하였으며 polyacrylamide gel상에서 관찰

되지 않았던 미확인된 단백질들이 관찰되었다. (Fig. 6).

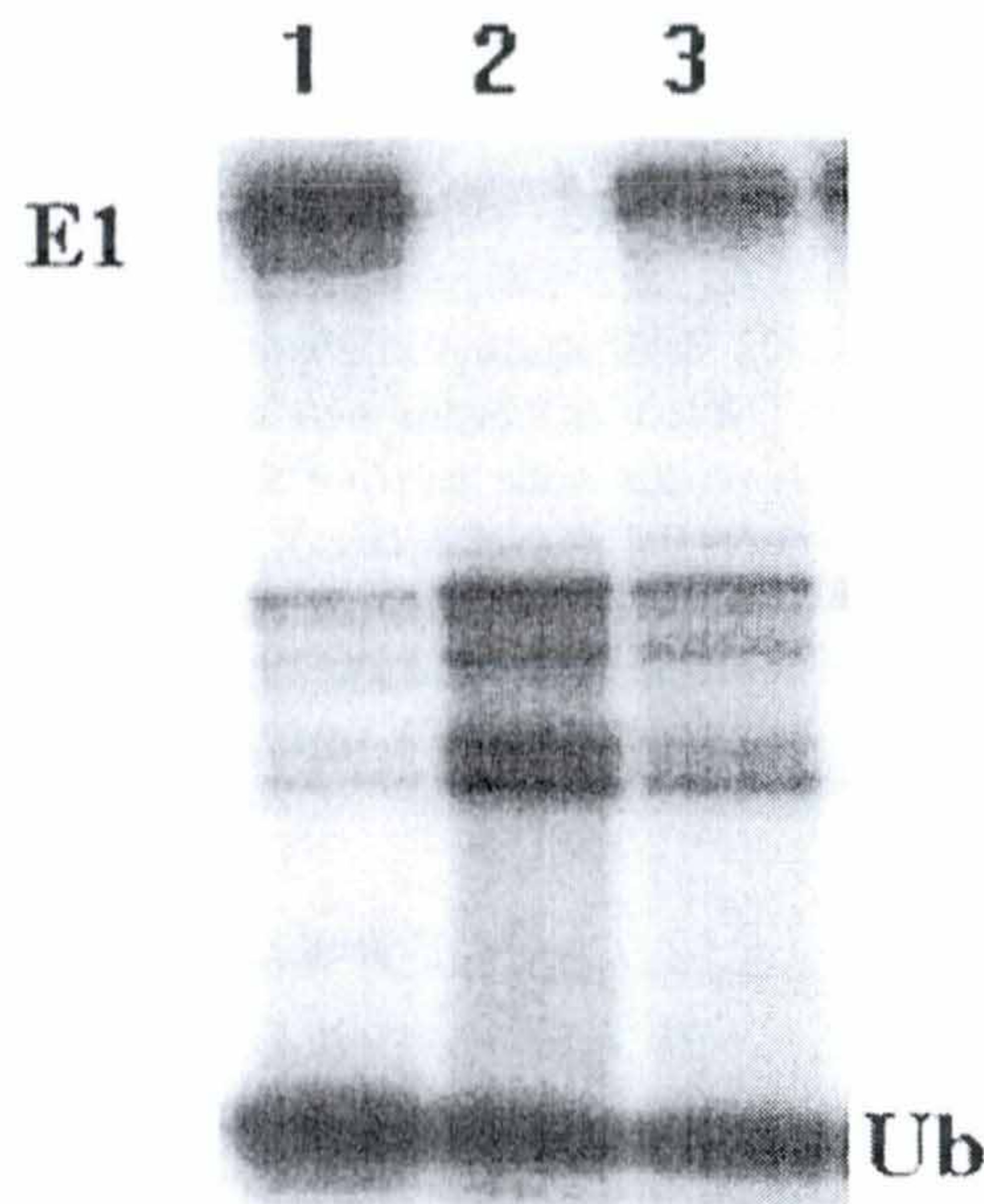


Fig. 6 . Autoradiograph of 125 I-ubiquitin conjugation with E1 and E2 enzymes.

The conjugation assay of E1 and E2 enzymes with 125 I-ubiquitin were carried out as described in "Materials and Methods". The reaction mixtures were quenched with sample buffer and heated to 100°C for 1 min prior to 12.5% acrylamide gel electrophoresis. Following electrophoresis, the gel were stained, dried and autoradiographed at -600°C. Lane 1, E1 enzyme ; Lane 2, E2 enzyme; Lane 3, equal volume of E1 and E2 enzyme

고 찰

세포내 단백질의 주요 분해장소의 하나인 lysosome에서는 비 선택적인 단백질들의 분해가 일어난다.

그러나 세포질에서 일어나는 단백질 분해는 매우 선택적이며 에너지(ATP)가 필요하고 ubiquitin이 매개하며 여러 효소가 관여하고 비교적 복잡한 과정을 통하여 단백질 분해가 선택적으로 일어난다.

세포질에서는 반감기가 짧은 단백질과 합성 후 수정 과정에서 발생하는 잘못 접혀진 단백질 (misfolded protein)이나 과량 생성된 단백질 등을 인지하여 선택적으로 제거하는데 이는 정상 세포의 질적 조절 및 항상성을 유지에 매우 중요하다.²⁸⁾

세포질분획을 각 DEAE-cellulose resin과 혼합하여

반응시키면 ubiquitin 활성화 효소들인 E1, E2, 및 E3 효소들은 DEAE-cellulose에 결합하나 ubiquitin은 결합하지 않는다.²⁹⁾ DEAE-cellulose column 용출액의 일부를 취하여 전기영동을 행하였을 때 용출액에는 ubiquitin 활성화 효소 등을 포함한 수많은 종류의 단백질들이 관찰되었다(data 생략). 용출액의 부피를 줄이고 불필요한 단백질들을 제거하고자 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 가하여 침전시켰을 때 30-80%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 분획에서 E1과 E2 효소들이 존재함이 확인되었다. 30%의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 분획에는 분자량이 크고 기질 단백질과의 결합이 매우 특이한 E3 효소가 존재하며, DEAE-cellulose 용출액의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 침전물에 존재하는 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도가 10mM 이상일 경우에는 ubiquitin-sepharose column chromatography시 ubiquitin과 ubiquitin 활성화 효소들의 thiol ester 결합을 방해한다고 알려져 있다.²³⁾ 그러므로 ubiquitin-sepharose column chromatography에서 E1과 E2 효소들의 분리능을 향상시키고 효소들의 활성을 유지하기 위하여 투석막 안의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 농도가 1mM 이하가 될 수 있도록 대량의 투석 용액을 바꿔가면서 투석을 수차례 반복하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 농도를 1mM 이하로 제거하였다. Fraction II의 부피는 초기 부피의 약 1/10 이었으며 단백질의 농도는 30-40mg/ml 이었다. Fraction II에 함유된 E1과 E2 효소들은 sepharose와 결합된 ubiquitin과 thiol ester 결합을 하고 있으나 그 외의 단백질들은 약한 소수성 상호 작용에 의하여 ubiquitin-sepharose gel에 존재하고 있다. 그러므로 ubiquitin-sepharose column에서 Fraction II에 함유된 E1과 E2 효소들을 제외한 나머지 단백질들을 고농도의 염인 0.5M의 KCl이 포함된 완충용액으로 용출시켜 제거하였다. Ubiquitin-sepharose에 결합된 E1 효소를 AMP와 PPi가 함유된 완충용액으로 용출시키면 ubiquitin과 결합된 E1 효소는 AMP와 치환되어 용출되나 E2 효소들은 용출되지 않는다. 용출된 E1 효소 용출액을 질소가스 하에서 농축하여 전기영동을 하였을 때 분자량이 106 KDa의 근처에서 단일 band의 E1 효소가 확인되었으며 소량의 E2 효소들이 같이 용출됨이 확인되었다. 그러므로 E1 효소 분획에 존재하는 E2 효소를 제거하기 위하여 gel filtration을 행하여 전기영동을 시행한 결과 정제된 E1 효소를 얻을 수

있었다. E1 효소를 용출시킨 ubiquitin-sepharose column을 Tris 완충용액(pH 7.5)으로 충분히 씻어서 AMP와 PPi를 제거한 후 10mM DTT가 함유된 Tris 완충용액(pH 9.0)으로 용출시키고 농축하여 전기영동 하였을 때 E2_{37K}를 포함한 분자량의 크기가 다양한 여러 형태의 E2 효소의 isoform들이 관찰 되었다. E2 효소들의 isoform들은 현재까지 약 7개의 E2 isoform (E2_{14K}, E2_{17K}, E2_{20K}, E2_{25K}, E2_{32K}, E2_{35K}, E2_{230K} 등) 들이 알려지고 있으며 본연구에서 사용한 돼지의 흉선조직 에서는 6종류의 E2 효소들의 isoform들 관찰되었다. E2 isoform들은 기능이 매우 다양하며 ubiquitin과의 결합은 E1 효소의 의존형과 독립형이 알려져 있다^{18,23,30,31)}. 즉, 반감기가 비교적 짧은 단백질과 비정상적인 단백질 및 stress 단백질들의 ubiquitination과 Papilloma virus의 P53 단백질의 ubiquitination에는 Ubc4와 Ubc5가 관여함이 밝혀졌으며³²⁻³³⁾ DNA repair에 관여하는 효소와 매우 유사함이 밝혀졌다.³⁴⁾ 이들 E2 isoform들의 공통적인 역할은 단백질의 ubiquitination에 관여하나 단백질의 ubiquitination에 관여하는 E2 효소의 isoform들이 매우 protein specific 하다고 알려졌다. 세포질의 E1과 E2 효소들의 ubiquitin과의 결합능력을 조사하기 위하여 방사능으로 표지된 ¹²⁵I-ubiquitin을 기질로 사용하여 gel filtration chromatography를 행하여 얻은 정제된 E1 효소와 E2 효소를 반응시키고 autoradiography를 행하였다. E1과 E2 효소들 모두가 ubiquitin과의 강한 결합력을 나타냈으며 E2 효소의 경우는 polyacrylamide gel에서 나타난 여러 종류의 isoform들이 모두 관찰되었다. 또한 E1과 E2 효소를 혼합하여 ¹²⁵I-ubiquitin과 반응시켰을때 E1 효소에 결합한 ubiquitin들이 E2 효소로 이동됨이 확인되었다. 이러한 결과들은 E1과 E2 효소들이 분리와 정제과정 중에서 변성되지 않고 활성도를 유지하고 있으며 acrylamide gel에서 관찰된 E2 효소의 isoform들의 band가 다른 단백질에서 기인된 것이 아니라 E2 효소에서 기인된 isoform 임을 입증한다.

결 론

돼지의 흉선 조직에서 세포질 분획을 효소원으로 사용하여 anion exchange column과 affinity column 및 gel

filtration column chromatography를 시행하여 ubiquitin 활성화 효소인 E1과 E2를 분리하고 정제하였다. 각 분획에서 분리한 E1 효소의 순수도와 E2 isoform의 여러 형태를 전기영동을 행하여 비교 확인하였고 방사능으로 표지된 ubiquitin을 기질로 사용하여 이를 각 효소들의 ubiquitin과의 결합능력을 autoradiography를 행하여 관찰하고 다음과 같은 실험결과를 얻었다.

1. 효소원으로 사용한 세포질분획의 30-80% ammonium sulfate 분획에서 ubiquitin 활성화 효소인 E1과 E2 효소가 존재함이 확인되었다.
2. Ubiquitin-sepharose column chromatography에서 부분 정제된 E1 효소는 AcA 34 gel filtration column chromatography를 행하여 순수한 형태의 E1 효소를 분리하였다.
4. Ubiquitin-sepharose column을 10mM DTT가 포함된 pH 9의 완충용액으로 용출시켜 E2 효소를 분리하였으며 6종류의 E2 isoform이 확인되었다.
5. ¹²⁵I로 표지된 ubiquitin을 기질로 사용하여 반응시킨 반응액을 전기영동하고 autoradiography를 하였을 때 E1 과 E2 효소 모두가 ubiquitin과의 강한 결합력을 나타냈다.

참고문헌

1. Clausen T, Southan C, Ehrmann M : The HtrA family of proteases : Implications for protein composition and cell fate. Mol Cell 10: 443-455, 2002
2. Bond JS, Butler PE: Intracellular proteases. Ann Rev Biochem 56: 333-364, 1987
3. Hershko A : Ubiquitin-mediated protein degradation. J Biol Chem 263: 15237-15240, 1988
4. Katayama FY, Gottesman S, Maurizi MR: A multiple-component, ATP-dependent protease from Escherichia coli. J Biol Chem 262: 4477-4485, 1987
5. Hershko A: Lessons from the discovery of ubiquitin system. Trend Biochem Sci 21:445-449, 1996
6. Varshavsky A: The ubiquitin system. Trend Biochem Sci 22:383-387, 1997
7. Hass AL, Introduction : Involving roles for ubiquitin in cellular regulation. The FASEB J 11:1053-1054, 1997
8. Pagano M: Cell cycle regulation by ubiquitin pathway. The FASEB J 11:1067-1075, 1997
9. Hass AL, Siepmann TJ: Pathways of ubiquitin conjugation. The FASEB J 11:1257-1268, 1997
10. Hochstrasser M: Ubiquitin dependent protein degradation.

Ann Rev Genetics 30: 405-439, 1996

11. Rechsteiner M, Rogers WS: PEST sequences and regulation by proteolysis. Trend Biochem Sci 21: 267-271, 1996
12. Wilkinson KD: Regulation of ubiquitin dependent processes by deubiquitinating enzymes. The FASEB J 11:1245-1256, 1997
13. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL: Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Ann Rev Biochem 65: 801-847, 1996
14. Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C. Transferring substrates to the 26S proteasome. Trend Biochem Sci 28: 26-31, 2003
15. Pickart CM: Targeting of substrates to the 26S proteasome. The FASEB J 11:1055-1066, 1997
16. Voges D: The 26S proteasome: A molecular machine for controlled proteolysis. Ann Rev Biochem 68: 1015-1068, 1999
17. Hochstrasser M: Protein degradation or regulation: Ub the judge. Cell 84: 813 - 815, 1996
18. Pickart CM, Vella AT: Levels of active ubiquitin carrier proteins decline during erythroid maturation. J Biol Chem 263: 12028-12035, 1988
19. Chen Z, Parent L, Maniatis T: Site-specific phosphorylation of I κ B α by a novel ubiquitin-dependent protein kinase activity. Cell 84: 853-862, 1996
20. Tanos T and Maniatis T: NF- κ B ; a lesson in family values. Cell 10: 529-532, 1995
21. Hicke L, Riezman H: Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated proteolysis. Cell 10: 84, 277-287, 1996
22. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Hershko A: "Covalent affinity" purification of ubiquitin-activating enzymes. J Biol Chem 257: 2537-2542, 1982
23. Pickart CM, Rose IR: Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. J Biol Chem 260: 1573-1581, 1985
24. Hass AL, Bright PM: The resolution and characterization of putative ubiquitin carrier proteins isozymes from rabbit reticulocytes. J Biol Chem 263: 13258-13267, 1988
25. Jeohn GH, Serizawa S, Iwamatsu A, Takahashi K: Isolation and characterization of gastric trypsin from the microsomal fraction of porcine gastric antral mucosa. J Biol Chem 270: 14748-14755, 1995
26. Urade R, Nasu M, Moriyama T, Wada K, Kito M: protein degradation by the phosphoinositide-specific phospholipase C- α family from rat liver endoplasmic reticulum. J Biol Chem 267: 15152-15159, 1992
27. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 72: 248-254, 1973
28. Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S: Posttranslational quality control: Folding, refolding and degrading proteins. Science 286: 1888-1893, 1999
29. Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A: Components of

- ubiquitin-protein ligase systems. J Biol Chem 258: 8206-8214, 1983
30. Chen Z, Pickart CM: A 25-Kda ubiquitin carrier protein(E2) catalyzes multiubiquitin chain synthesis via lysine 48 of ubiquitin. J Biol Chem 265: 21835-21842, 1990
31. Hass AL, Bright PM, Jackson VE: Functional diversity among putative E2 isozymes in the mechanism of ubiquitin-histone ligation. J Biol Chem 263: 13268-13275, 1988
32. Seufert W, Jentsch S: Ubiquitin-conjugating enzymes Ubc4 and Ubc5 mediate selective degradation of short-lived and abnormal proteins. EMBO J 9: 543-550, 1990
33. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM: The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-ligase in the ubiquitination of P53. Cell 75: 495-505, 1993
34. Dohmen RJ, Madura K, Bartel B, Varshavsky: The N-end rule is mediated by the UBC2(RAD6) ubiquitin-conjugating enzyme. Proc Natl Acad Sci 88: 7351-7355, 1991