

돼지의 흉선조직에서 Cysteine 단백질 분해효소의 분리와 특성

이송재

고신대학교 의과대학 생화학 교실

Purification and characterization of Cysteine Protease from porcine thymus

Song Jae Lee

Department of Biochemistry, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background : The endoplasmic reticulum (ER) plays an important role in quality control of newly synthesized proteins. Proper folded, assembled subunits and modified proteins are allowed to enter transport vesicles en route to the Golgi. Many misfolded, overexpressed and unassembled subunit proteins are retained and rapidly degraded in the ER (or near the ER) without reaching the cis Golgi. To better understand the possible role of protease which may be related to proteolytic processing or degradation in the ER (or near the ER), calpain like cysteine protease was partially purified from microsomal fractions of porcine thymus and tested enzyme activities in the presence of inhibitors such as N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) and N-acetyl-leucyl-leucyl-methioninal (ALLM). **Materials and Methods :** The microsomal fraction of porcine thymus prepared by sucrose density gradient centrifugation was used as an enzyme source. The calpain like cysteine protease was purified from microsomal fractions using successively DEAE-cellulose column and phenyl-sepharose CL-4B column chromatography and tested enzyme activities in the presence of inhibitors. **Results:** The cysteine like protease activity of microsomal fraction from porcine thymus was increased dose dependently and decreased in the presence of inhibitors. The cysteine like proteases of microsomal fraction such as calpain I and II activities were found in 0.1 M and 0.25 M NaCl eluate fraction of DEAE-cellulose column chromatography, respectively. When 0.25 M of NaCl eluate fraction from DEAE-cellulose column was loaded with phenyl-sepharose column, calpain II activity was contained in the unbound fraction of phenyl-sepharose column. The enzyme activity was significantly inhibited by the presence of cysteine protease inhibitors, N-acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) and N-acetyl-leucyl-leucyl-methioninal (ALLM). Though calpain II isolated by phenyl-sepharose chromatography was not homogeneous form, enzymatic assay in vitro and other biochemical properties were identical to calpains. **Conclusion:** Calpain I and II are well known calcium dependent cysteine proteases and found mostly in cytosol fraction of various organs (ex. liver, kidney etc). The existence of calpain like cysteine protease in the microsomal fraction of thymus tissue confirmed present work might be useful for the elucidation of rapid and selective degradation of newly synthesized proteins in the cells.

Key words : Microsomal fraction, Cysteine protease

서론

교신저자 : 이 송 재
Tel : 051-990-6417
E-mail : sjlee 430@ kosinmed.or.kr

* 본 연구는 고신대학교 의과대학 연구비(2001년) 일부 지원에 의하여 이루어진 것임

세포내 가장 중요한 소 기관의 하나인 소포체
(endoplasmic reticulum: ER)에서는 미토콘드리아나 엽록

체의 단백질을 제외한 모든 단백질들의 생합성이 일어난다.¹⁾ 새로 합성된 단백질들은 조면 소포체(rough endoplasmic reticulum)에서 합성된 직후 소포체의 관강(lumen)으로 전이(translocation)된 다음 소포체로의 이동을 지시하는 signal peptide²⁾가 제거되고 새로 합성된 단백질들의 수정과정이 일어난다. 즉, 소포체의 관강에서는 적절한 접힘(proper folding)과정, 당 단백질들의 glycosylation, multisubunit 로 구성된 복합 단백질들의 복합체 형성³⁻⁶⁾과 sulfhydryl group을 포함한 단백질들의 경우에는 단백질 내부 또는 다른 peptide subunit와의 올바른 disulfide bond 형성이 이루어진다.⁷⁻¹⁰⁾ 이러한 수정과정을 거친 단백질들은 golgi로 수송되고 medial golgi에서 또 다른 수정과정을 거친 후 기능을 갖는 단백질로 변형되어 최종 분류되고 정돈되어 그들의 예정된 최종 목적지(예, 세포표면, 분비 단백질 등)로 vesicular transport된 다음 그들의 고유한 역할을 나타내게 된다. 그러나 소포체에서 잘못 접혀진 단백질(misfolded protein)이나 과량 생성된 단백질 및 복합체 형성에 관여하지 못하는 각각의 구성 단백질들과 올바른 disulfide bond를 형성하지 못한 단백질들은 golgi로 수송되지 못하고 lysosome이 아닌 소포체 또는 소포체근처에서 급격히 분해되어 제거된다.¹¹⁻¹³⁾ 이와 같은 과정들은 단백질들이 합성된 직후의 post-translational level에서 일어나며, 세포의 항상성(homeostatis) 유지와 새로 합성되는 단백질들의 질적 및 양적 조절에 필수적이다. 진핵세포에서 일어나는 단백질들의 분해는 주로 라이조솜과 세포질에서 일어나는데 라이조솜에서는 비 선택적인 단백질 분해가 일어나며 세포질에서는 새로 합성된 단백질들 가운데 잘못 접혀진 단백질이나 과량 생성된 단백질들을 선택적으로 분해하여 제거한다. 이와 관련된 가장 잘 알려진 예는 T 세포 항원 α, β 수용체(T cell antigen α, β receptor : TCR)¹⁴⁻¹⁸⁾, HMG Co A reductase¹⁹⁾, asialoglycoprotein receptor^{20,21)} 등이 알려져 있다.

본 연구에서는 조면 소포체에서 합성된 직후 일어나는 단백질들의 선택적인 분해기작을 규명하기 위한 연구의 일환으로 소포체에 존재할 것으로 예상되는 단백질 분해효소들의 존재 유무를 확인하고 그들의 특성을 알아보고자 하였다. 즉, 돼지의 흉선 조직에서 초원심분리와 sucrose density gradient centrifugation 방법을 사용하여

microsomal 분획(crude 소포체 분획)을 분리한 후 효소원으로 하고 여러 단계의 column chromatography를 시행하여 단백질 분해 효소를 분리하고 이들의 특성을 연구하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 시약

본 실험에 사용한 leucyl-norleucinal(ALLN), N,N-dimethylated casein, Iodoacetic acid(sodium salt), leupeptin, imidazole, sodium deoxycholate, PMSF, EDTA, EGTA, dithiothreitol 등은 Sigma사(USA), Phenyl-sepharose CL-4B는 Pharmacia Co.사, DEAE-cellulose (DE52)는 Whatman사 (England), Folin-Ciocalteu 시약은 Hayashi사(Japan), Bradford 시약은 Bio-Rad 회사 제품(USA)을, 기타 용매와 일반 시약은 Junsei(Japan) 사 제품의 특급 시약을 사용하였다.

2. 돼지의 흉선 조직에서 microsomal 분획의 분리

돼지의 흉선 조직에서 단백질 분해효소의 분리와 정제는 다음과 같은 과정을 거쳐서 분리하였으며 모든 과정은 4°C 이하에서 수행하였다.

1) Crude microsomal 분획의 제조

돼지의 흉선조직에서 microsomal 분획의 분리는 Jeohn등²²⁾과 Urade등²³⁾의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 생후 10개월 미만의 어린 돼지(체중 100Kg 이하)의 신선한 흉선 조직을 도살장에서 도살 직후 구입하여 지방과 혈액 등의 불순물을 제거한 다음 무게를 측정하였다. 300 gr의 흉선 조직에 4배 량의 0.27 M의 sucrose가 포함된 10 mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.5)으로 3회 반복 세척한 후 4배 량의 0.27 M의 sucrose, 1 mM EDTA와 1 mM PMSF 및 10 μ M의 leupeptin이 함유된 10 mM Tris-Cl 완충 용액(pH 7.5)을 가하여 파쇄기로 조직을 파쇄하고 4겹의 수술용 거즈로 여과하여 불순물을 제거하였다. 파쇄된 균질액을 500xg에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 제거하

고 다시 20,000xg에서 20분간 2회 반복 원심분리하여 침전물(vesicle fraction)을 버리고 상층액을 모았다. 상층액을 105,000xg 에서 1시간 동안 초 원심분리하여 상층액 (cytosol 분획)과 침전물 분획(crude microsomal fraction)을 얻었다.

2) Microsomal 분획의 제조

위의 1)항에서 얻은 침전물 분획을 0.27 M sucrose 와 1 mM PMSF 및 10 μ M의 leupeptin이 함유된 10 mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.5) 4.5 ml에 부유시킨 후 2.1 M의 sucrose가 함유된 10 mM Tris-Cl 완충용액 (pH 7.5)을 가하여 sucrose의 최종농도를 1.2 M로 조정하고 총 부피가 10 ml 되게 하였다. 초원심 분리용 튜브에 Tris-Cl(pH 7.5)에 용해시킨 2 ml의 2.0 M sucrose, 1.7 M sucrose(4 ml), 1.45 M sucrose(4 ml), 1.2 M 시료(10 ml), 0.8 M sucrose(6 ml), 0.27 M sucrose(6 ml)를 차례로 가하고 105,000xg에서 36시간 초원심분리하였다. 초 원심분리 후 0.12 M sucrose 분획의 하층에서 비교적 순수한 microsomal 분획을 채취 하였다. 1.5 ml의 microsomal 분획에 1% sodium deoxycholate가 함유된 20 mM Tris-Cl 완충용액(pH 7.5) 10 ml를 가하여 부유시킨 후 magnetic stirrer를 사용하여 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 동안 용해시켰다. 용해된 소포체 분획을 0.25% sodium deoxycholate와 25 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA가 함유된 20 mM Tris-Cl(pH 7.5) 완충용액(Buffer A)으로 2회 반복하여 하룻밤 투석하고 105,000xg에서 1시간 동안 초원심분리하여 침전물을 버리고 상층액을 모아 단백질 분해 효소의 분리를 위한 효소원으로 사용하였다.

3. Microsomal 분획에서 단백질 분해효소의 분리

Microsomal 분획에서 cystein 단백질 분해효소의 분리와 정제는 Yoshimura 등²⁴⁾과 Gopalakrishna와 Barasky²⁵⁾ 및 Gopalakrishna 와 Head²⁶⁾의 분리방법을 변형하여 사용하였다.

1) DEAE-cellulose column chromatography

Whatman DE-52 cellulose 적당량을 완충용액 A(20

mM Tris-Cl, pH7.5, 1 mM EDTA, 25 mM 2-mercaptoethanol)에 부유시킨 후 기포를 제거하고 chromatography column(2.2 x 20 cm)에 packing 한 다음 충분량의 완충용액 A로 용출시켜 DEAE- cellulose를 평형에 이르게 하였다. 평형화된 DEAE-cellulose에 상기 2.2항에서 얻은 소포체 분획을 loading하고 완충용액 A로 280 nm에서 단백질의 흡광도가 0이 될 때까지 씻어 준 후 0.1 M NaCl이 함유된 완충용액 A로 용출시키며 LKB fraction collector를 사용하여 30 ml/hr의 속도로 흡광도가 0이 될 때까지 0.1 M NaCl 분획을 받았다. DEAE-cellulose column에 다시 0.25 M의 NaCl이 함유된 완충용액 A를 가하여 위와 같은 방법으로 용출시킨 후 cysteine 단백질 분해효소 활성을 갖는 분획을 모아 다음 실험에 사용하였다.

2) Phenyl-sepharose CL-4B column chromatography

위의 1)항에서 분리한 0.25 M NaCl 분획을 완충용액 A로 미리 평형화시킨 phenyl-sepharose CL-4B column(1.2 x 8 cm)에 loading 한 다음 완충용액 A로 용출 시켰다. 완충용액 A로 용출시 phenyl-sepharose CL-4B에 결합하지 않고 용출되는 단백질 분획을 모아서 amicorn concentrator를 사용하여 농축시킨 후 부피를 측정하고 여기에 100 mM CaCl₂와 1 mM leupeptin을 가하여 이들의 최종농도가 각 1 mM과 20 μ M이 되게 조정하였다.

3). Calcium dependent phenyl-sepharose CL-4B column chromatography

위의 2) 항에서 분리한 용출액을 완충용액 B(20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM CaCl₂, 25 mM 2-mercaptoethanol, 20 μ M leupeptin)로 평형화 시킨 20 ml의 phenyl-sepharose CL-4B와 혼합하였다. 이 혼합액을 rotator를 사용하여 30분간 조심스럽게 흔들어 용출된 단백질들을 column에 결합시킨 후 직경이 2 cm 인 column에 packing (2 x 8 cm)하고 완충용액 B로 280 nm에서 흡광도가 0이 될 때까지 용출시켜 결합하지 않은 단백질들을 column 으로부터 완전히 씻어낸 다음 leupeptin이 포함되어 않은 완충용액 B로 용출시켜서 leupeptin을 제거하고 다시 5 mM EDTA가 함유된 buffer B로 용출시키고 LKB

fraction collector를 사용하여 30 ml/hr의 속도로 용출액을 받았다. 각 분획에서 일정량을 취하여 단백질 분해효소의 효소원으로 사용하여 효소의 활성도를 측정하였다.

4. 효소의 활성도 측정과 단백질 정량

효소의 활성도는 casein을 기질로 사용한 Yoshimura 등²⁴⁾의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉, 시료 (0.1-0.3 ml)에 4 mg casein이 함유된 20 mM imidazole-Cl 완충용액(pH7.5), 2 mM dithiothreitol, 0.05 mM CaCl₂(calpain I), 또는 1 mM CaCl₂, (calpain II)가 포함된 반응 혼합액의 최종부피가 1 ml 되게 한 다음 25 °C에서 30 분간 반응시킨 후 1 ml의 5% trichloroacetic acid 를 가하여 반응을 정지시키고 4000xg에서 5분간 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 0.4 ml의 상층액에 0.01 N NaOH 용액에 용해시킨 0.375 M Na₂CO₃ 0.2 ml와, 2 N iodoacetic acid 0.1 ml를 가하고 30분간 반응시켜 sulfhydryl 화합물들을 blocking 하였다²⁷⁾. 여기에 2.5 ml의 알칼리성 구리시약을 가하고 10분간 상온에서 방치한 후 다시 0.25 ml의 Folin-Ciocalteu 시약을 가하고 30분간 반응시켜 발색시킨 다음 750 nm 에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 효소 활성도 측정시 blank는 반응액에 기질을 첨가하지 않은 군과 반응액에 CaCl₂ 대신에 1 mM EGTA를 첨가한 군을 blank로 하였다. 효소의 활성도는 효소-기질 반응 후 750 nm에서 흡광도 측정시 1 흡광도 단위가 증가시키는데 필요한 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Cysteine 단백질 분해효소의 활성도 측정시 억제물질에 의한 효소활성도 변화 측정도 위와 같은 반응 조건하에서 효소 반응 혼합액에 억제물질을 농도별로 가하여 조사하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin을 표준물질로 이용하여 Bradford 방법²⁸⁾을 사용하였다.

결 과

돼지의 흉선조직의 소포체 분획에 존재하는 cysteine 단백질 분해효소의 분리와 특성을 조사하고자 여러

종류의 column chromatography를 시행하고 각 단계마다 효소의 활성도를 측정하였다.

Microsomal 분획의 cysteine 단백질 분해효소 활성도 측정

돼지의 흉선조직을 파쇄한 후 초원심분리와 sucrose density gradient centrifugation 방법을 행하여 얻은 정제된 소포체 분획의 일부분을 취하여 완충용액 C(Tris-Cl, pH7.5, 5 mM 2-mercaptoethanol)로 4°C에서 하룻밤 투석시킨 후 투석막 안의 용액을 효소원으로 하여 단백질 분해효소의 활성도를 측정하였다. 효소의 활성도는 효소-기질반응 시 첨가한 효소원(50, 100, 200 μ l)의 양에 비례하여 활성도가 증가함을 관찰하였고 (Fig. 1), cysteine protease의 하나로 알려진 calpain I과 calpain II의 억제제인 ALLN과 ALLM을 첨가하였을 때 효소의 활성도가 약 40 % 감소하였음을 관찰하였다(Fig. 2). 이러한 실험결과는 흉선 조직의 microsomal 분획에는 cysteine protease family인 calpain I과 calpain II가 존재함을 의미하며 이와 같은 실험결과를 기초로 하여 소포체 분획에서 calpain I 과 II의 분리를 시도하였으며 본 연구에서는 주로 calpain II의 분리에 중점을 두고 연구를 수행하였다.

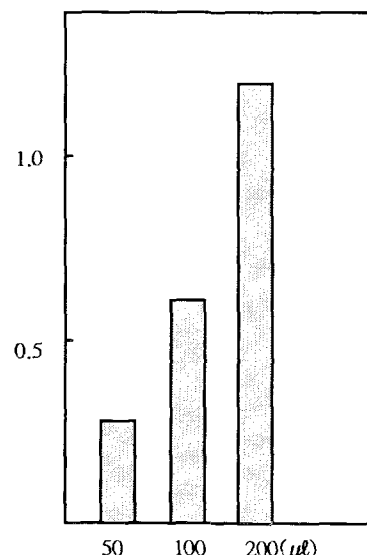


Fig. 1. Cysteine protease activity of purified microsomal fraction from porcine thymus. Calpain like cysteine protease activity of microsomal fraction (6.8 mg protein/ml) was determined as described in Materials and Method. One unit

of enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to give an increase of one absorption unit at 720 nm.

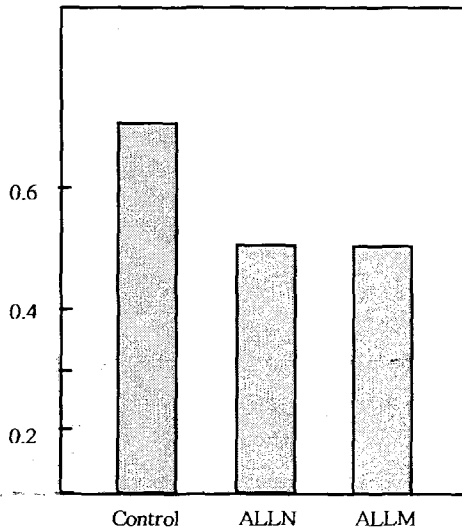


Fig. 2. Effect of ALLIN and ALLM on cysteine protease activity of ER fraction. Enzyme activities were assayed in the presence of ALLN(20 μ g) and ALLM(10 μ g).

DEAE-cellulose column 분획의 단백질 분해효소 활성도 측정

Microsomal 분획을 DEAE-cellulose column에 loading 한 후 0.1 M NaCl과 0.25 M NaCl이 함유된 완충용액 B로 단계적으로 용출시켰을 때 단일 peak를 나타냈으며(Fig. 3) 각 분획에서 소량을 취하여 완충용액 C로 하룻밤 투석하고 calpain의 활성도를 측정한 결과 0.1 M NaCl 분획에는 calpain I이 확인되었으며, 효소원액 100 μ l를 취하여 calpain의 억제물질인 ALLN(5 μ g/ml)을 가하여 반응시켰을 경우에는 효소의 활성도가 약 45%이상 현저히 감소되었다(Fig. 4). 또한 0.25 M NaCl 분획에는 calpain II가 함유되어 있으며(Fig. 5), 효소-기질 반응 시 효소원액 100 μ l를 취하여 calpain의 억제물질인 ALLM을 농도별로 첨가하였을 때 ALLM에 의하여 효소의 활성도가 현저히 감소됨을 관찰하였다(Fig. 6).

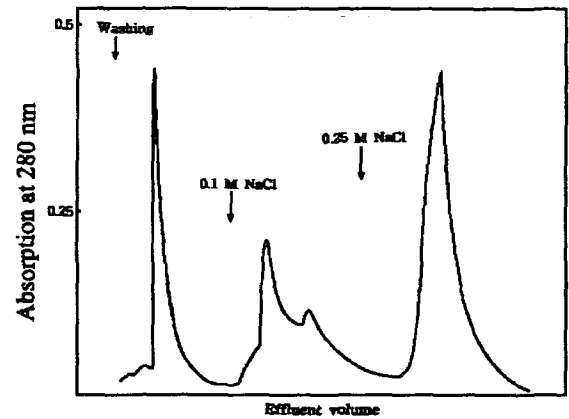


Fig. 3. DEAE-cellulose column chromatography of microsomal fraction from porcine thymus.

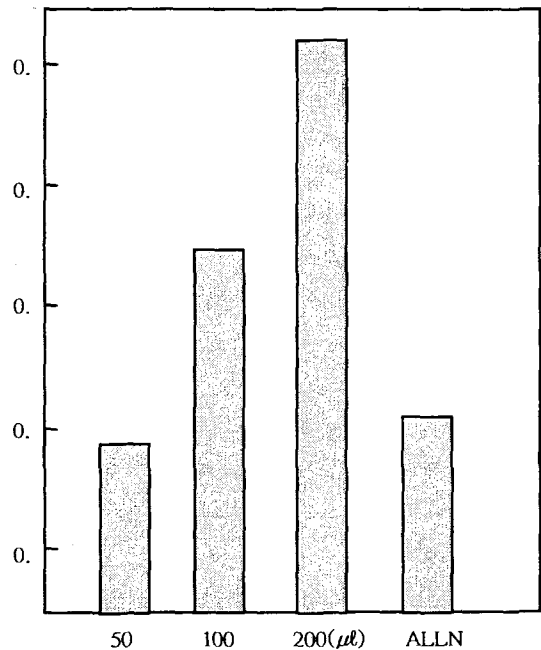


Fig. 4. Calpain I activity of 0.1 M NaCl eluate fraction from DEAE-cellulose column chromatography. Enzyme eluted from DEAE-cellulose by 0.1 M NaCl (1.5 mg protein/ml) was assayed for calpain I activity at concentration of 50 μ M CaCl₂ and ALLN (20 μ g). Phenyl-sepharose CL-4B hydrophobic column chromatography

DEAE-cellulose column의 0.25 M NaCl 용출액을 phenyl-sepharose 4B column에 loading 하고 완충용액 B로 용출시켰을 때 column에 결합하지 않고 용출된 용출액의 일부를 완충용액 C로 투석한 후 calpain II의 활성도를 측정하였을 때 투석막 안의 용출액에서 calpain II의

활성도가 관찰되었다(Fig. 7).

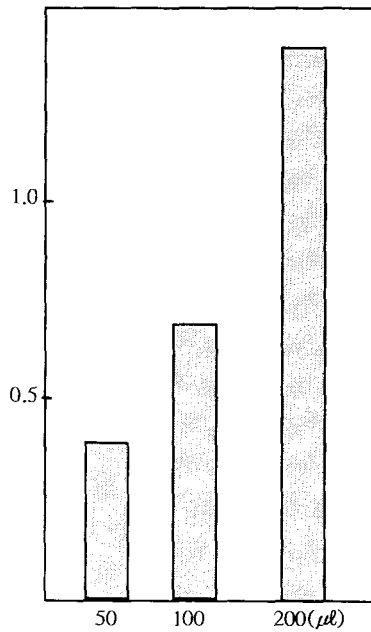


Fig. 5. Calpain II activity of DEAE-cellulose column chromatography. Enzyme eluted from DEAE-cellulose by 0.25 M NaCl (1.3 mg protein/ml) was pulled and assayed for calpain II activity in the presence of 1 mM CaCl_2 .

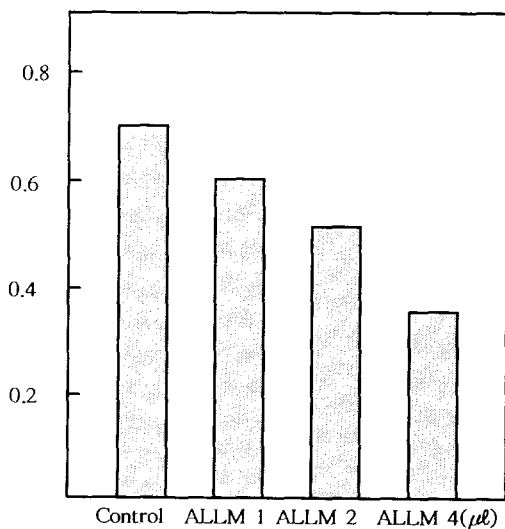


Fig. 6. Effect of ALLM on calpain II activity of 0.25 M NaCl eluate fraction from DEAE-cellulose column chromatography. Enzyme eluted from phenyl-Sepharose 4B column by 5 mM EGTA (5.6 μg protein/ml) was pulled and assayed for calpain II activity in the presence of ALLM.

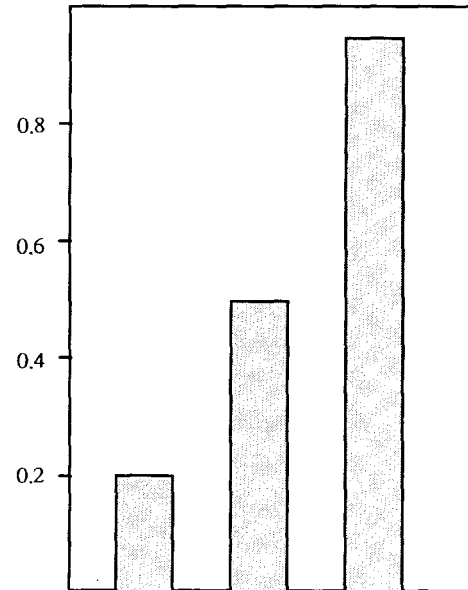


Fig. 7. Calpain II activity of Phenyl-sepharose 4B hydrophobic interaction column chromatography. The unbound fraction from the column was pooled and assayed for calpain II activity.

Calcium dependent phenyl-sepharose CL-4B column chromatography

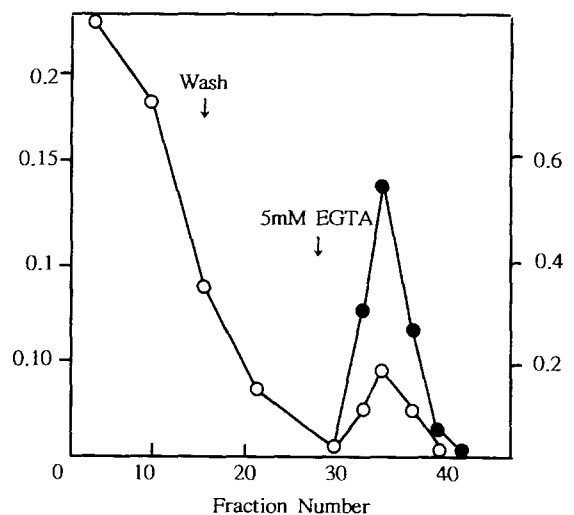


Fig. 8. Calcium-dependent phenyl-Sepharose 4B column chromatography of calpain II. Enzyme eluted from DEAE-cellulose by 0.25 M NaCl was applied to phenyl-Sepharose column in the absence of Ca^{++} . The unbound material from this column was adjusted to 3 mM

CaCl₂, 20 μ M leupeptin and mixed for 30 min with phenyl-Sepharose and then packed into column. After washing to remove unbound material and leupeptin, the bound enzyme was eluted with EGTA. Samples were assayed for calpain activity in the presence of 1 mM CaCl₂.

Phenyl-sepharose CL-4B column chromatography 시 column에 결합하지 않고 용출된 용출액을 1 mM CaCl₂가 함유된 phenyl-sepharose CL-4B와 혼합하여 조심스럽게 반응시킨 후 column에 packing하고 완충 용액 B로 용출시켜 column에 결합하지 않은 단백질 분획을 제거하였다. 여기에 다시 5 mM EDTA가 함유된 완충용액 B로 용출시키면 작은 peak가 관찰되었다. 이 peak의 각 분획을 효소원으로 사용하여 calpain II 활성도를 측정 한 결과 5 mM EGTA가 함유된 완충 용액 B 분획에서 효소의 활성이 발견되었으며 column에 결합하지 않은 단백질 분획에서는 효소의 활성도가 관찰되지 않았다(Fig. 8).

고 찰

생명체의 기본단위인 세포에서 일어나는 단백질들의 연속적인 합성과 분해는 세포내 중요 조절과정에 관여하는 단백질들의 양적 및 질적 조절과 세포의 항상성 유지에 필수적이다. 세포에서 일어나는 단백질들의 분해는 세포내외의 주위환경과 단백질 분해 효소 및 다른 인자들에 의하여 영향을 받으며 진핵 세포에서 일어나는 단백질들의 분해는 주로 세포질과 lysosome에서 일어난다.^{29,30)}

본 연구에서는 세포질에서 일어나는 단백질들의 선택적인 분해과정에 관여하는 단백질 분해효소의 특성을 조사하기 위한 연구의 일환으로 어린 돼지의 흉선 조직에서 microsomal 분획을 분리하여 cysteine 단백질 분해효소의 존재 유무를 알아보고자 하였다. Microsomal 분획을 효소원으로 하고 casein을 기질로 하여 cysteine 단백질 분해효소의 활성도를 측정하였을 때 효소의 활성도가 첨가한 효소원의 농도(50 μ l, 100 μ l, 200 μ l)에 비례하여 증가하였고 억제제(ALLIN, ALLM)를 첨가하면 효소의 활성도가 40 % 이상 현저히 억제됨을 확인하였다(Fig. 1, 2). 이러한 연구결과

들은 흉선조직의 microsomal 분획에는 cysteine protease 속하는 calpain I과 calpain II가 함유되어 있음을 의미한다. 그러므로 microsomal 분획을 효소원으로 하여 cysteine 단백질 분해효소인 calpain I과 calpain II를 여러 형태의 column chromatography를 이용하여 분리하고자 하였다. Microsomal 분획을 DEAE-cellulose column chromatography 시 0.1M NaCl 용출액에는 calpain I이, 0.25M NaCl 분획에는 calpain II가 함유되어 있음을 효소의 활성도 측정과 이들 효소에 특이한 억제제를 첨가한 연구에서 관찰하였다(Fig. 4, 5, 6). 또한 DEAE-cellulose column chromatography 시 0.25 M NaCl 분획의 단백질 분해효소 specific activity를 측정한 결과 약 10배 증가하였다. 그러나 0.1 M NaCl 분획에는 calpain I 이외에 calpain I의 억제제인 calpastatin이 동시에 용출되므로²⁴⁻²⁶⁾ 이 과정에서의 specific activity 측정은 생략하였다. DEAE-cellulose column의 0.25 M NaCl 용출 분획을 phenyl-sepharose 4B column에 loading 하고 완충용액 A로 용출시켜 calpain II의 효소 활성도를 측정하였을 때 calpain II의 활성도가 column에 결합하지 않고 용출되는 용출액에서 발견되었다(Fig. 7). 이러한 연구결과는 Calpain II의 분리, 정제를 위한 column chromatography 시 용출시킬 완충용액에 Ca²⁺이 포함되지 않거나 낮은 농도에서는 Calpain II가 phenyl-sepharose 4B와 결합하지 않으며, Ca²⁺이 Calpain II의 소수성 부위를 노출시켜 Calpain II와 phenyl-sepharose 4B의 결합을 용이하게 한다는 연구보고와 일치하였다.^{25,26)} 그러므로 Phenyl-sepharose 4B에 결합하지 않은 용출액에서 calpain II를 정제하기 위하여 phenyl-sepharose 4B를 1 mM CaCl₂가 함유된 완충용액 B로 평형화시키고 용출액을 혼합하여 단백질을 결합시킨 후 column에 packing하고 1 mM CaCl₂ 대신에 5 mM EGTA가 함유된 완충용액 B로 용출시켰을 때(Fig.8) calpain II의 활성도가 5 mM EGTA 분획에서 확인되었다(유사결과 생략). 이러한 연구결과는 calcium ion들이 calpain II 단백질의 소수성 부위를 노출시켜 calpain II가 phenyl-sepharose 4B와의 결합을 용이하게 하며, calpain II가 calcium ion의 존재하에서 활성을 나타낼 수 있는 calcium 의존형 효소임을 의미한다.

Calcium 의존형 단백질 분해효소는 cysteine 단백질 분해효소로서 Murachi등이 calpain으로 명명하였으며³¹⁾ 두 가지 형태의 isozyme 즉, calpain I과 calpain II가 알려져 있다. 이들 두가지 isozyme은 모두 calcium ion의 존재 하에서만 효소의 활성을 나타낼 수 있으나 calpain I의 경우에는 micromole의 calcium ion이 calpain II의 경우에는 milimole의 calcium ion이 이들 calpain의 활성화에 필요하다고 알려져 있다³¹⁻³⁴⁾. Calpain은 쥐의 신장²⁷⁾의 cytosol 분획에서 Gopalakrishna와 Barasky²⁸⁾는 쥐의 간, 신장, 비장, 뇌, 심장, 근육조직, 폐, 적혈구의 cytosol 분획에서 Gopalakrishna 와 Head²⁹⁾는 송아지의 뇌와 토끼의 근육조직의 cytosol 분획에서 발견하였으나 흉선조직 특히 소포체 분획에서는 그 존재 여부가 현재까지 보고된 바 없다. Calpain의 세포내에서의 생화학적 및 생리적 역할은 적혈구에서 막 단백질들의 분해를 촉진하여 세포-세포사이의 융합을 촉매하고, 세포막에 결합된 protein kinase C를 활성화시킴 등이 알려져 있으나 가장 중요한 역할은 lysosome이 아닌 세포질에서 일어나는 단백질들의 분해에 관련한다고 제안하였다.³⁵⁾

세포질에서 일어나는 잘못 접혀진 단백질 및 과량 생성된 단백질 등의 선택적 분해에는 ubiquitin을 매개로하는 단백질 분해효소들이 잘 알려져 있다. 그러나 본 연구에서 확인된 cystein 단백질 분해효소가 세포질이외의 microsomal 분획에서 관찰된 것은 세포에서 일어나는 단백질들의 선택적인 분해기작 규명에 활용될 수 있는 매우 의미있는 연구결과로 생각된다.

결 론

돼지의 흉선조직에서 microsomal 분획을 효소원으로 하고 여러 단계의 column chromatography를 시행하여 cysteine 단백질 분해효소를 분리하고 그 생화학적 특성을 조사하여 다음과 같은 실험결과를 확인하였다.

1. 돼지의 흉선 조직에서 소포체 분획을 sucrose density gradient centrifugation 방법 사용하여 분리하고

casein을 기질로 하여 cysteine 단백질 분해효소의 활성도를 효소-기질 반응과 억제제를 첨가한 효소-기질 반응을 통하여 관찰하였다.

2. 소포체 분획의 DEAE-cellulose column chromatography 시 0.1 M NaCl 분획에서는 calpain I이 0.25 M NaCl 분획에서는 calpain II가 확인되었다.

3. DEAE-cellulose column chromatography에서 얻은 0.25 M NaCl 분획을 phenyl-sepharose 4B column chromatography에 loading하고 CaCl₂가 함유되지 않은 완충용액으로 용출시켰을 때 calpain II의 활성도가 column에 결합하지 않은 용출액에서 발견되었다.

4. Phenyl-sepharose 4B column chromatography시 column에 결합하지 않고 용출되는 용출액을 1 mM CaCl₂가 함유된 완충용액으로 평형화 시킨 phenyl-sepharose 4B column loading하고 용출시켰을 때 calpain II의 활성도가 5mM EGTA가 함유된 완충용액으로 용출시킨 용출액에서 발견되었다.

이상의 연구결과들은 돼지의 흉선조직의 microsomal 분획에는 cysteine 단백질 분해효소인 calpain I 과 calpain II가 존재하고 calpain II는 효소의 활성화에 calcium 이온을 필요로하는 calcium 의존형 효소임을 의미하며 이들 cysteine 단백질 분해효소들이 세포에서 일어나는 단백질들의 선택적 분해에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Alarcon B, Berkhout B, Breitmeyer J, Terhorst C: Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3- γ , δ , ϵ core and single T cell receptor α β chains: J Biol Chem 263: 2953-2961, 1988
2. Miller JD, Wilhelm H, Gierasch L, Gilmore R, Walter P: GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation: Nature 366: 351-354, 1993
3. Rothman JE: Polypeptide chain binding proteins: catalysts of protein folding and related processes in cells: Cell 59: 591-601, 1989
4. Gething MJ, Sambrook J: Protein folding in the cell: Nature 355: 33-45, 1992
5. Rose JK, Doms RW: Regulation of protein export from the

- endoplasmic reticulum: *Ann Rev Cell Biol* 4: 257-288,1988
6. Hurtley S, Helenius A: Protein oligomerization in the endoplasmic reticulum: *Ann Rev Cell Biol* 5: 277-307,1989
7. Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF: Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum: *Science* 257: 1496-1502,1992
8. Braakman I, Helenius J, Helenius A: Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum: *EMBO J* 11: 1717-1722,1992
9. Braakman I, Helenius J, Helenius A: Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum: *Nature* 356: 260-262, 1992
10. De Silva A, Braakman I, Helenius A: Posttranslational folding of vesicular stomatitis virus G protein in the ER: involvement of noncovalent and covalent complexes: *J Cell Biol* 120: 647-655,1993
11. Lippincott-Schwartz J, Bonifacino JS, Yuan LC, Klausner RD: Degradation from the endoplasmic reticulum: disposing of newly synthesized proteins: *Cell* 54: 209 -220,1988
12. Amara JF, Lederkremer G, Lodish HF: Intracellular degradation of unassembled asialoglycoprotein receptor subunits: a preGolgi non-lysosomal endoproteolytic cleavage: *J Cell Biol* 109: 3315-3324,1989
13. Klausner RD, Sitia R: Protein degradation in the endoplasmic reticulum: *Cell* 62: 611-614,1990
14. Carson G, Kuestner RE, Ahmed A, Pettey CL, Concino MF: Six chains of the human T-cell antigen receptor-CD3 complex are necessary and sufficient for processing the receptor heterodimer to the cell surface: *J Biol Chem* 266: 7883-7887,1991
15. Alarcon B, Berkhout B, Breitmeyer J, Terhorst C: Assembly of the human T cell receptor-CD3 complex takes place in the endoplasmic reticulum and involves intermediary complexes between the CD3- γ , δ , ϵ core and single T cell receptor α β chains: *J Biol Chem* 263: 2953-2961, 1988
16. Wileman T, Carson GR, Concino M, Ahmed A, Terhorst C: The γ and ϵ subunits of the CD3 complex inhibit pre-golgi degradation of newly synthesized T cell antigen receptors: *J Cell Biol* 10: 973-986,1990
17. Bonifacino JS, Suzuki CK, Lippincott-Schwartz J, Weissman AM, Klausner RD: Pre-Golgi degradation of newly synthesized T cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly: *J Cell Biol* 109: 73-83, 1989
18. Chen C, Bonifacino JS, Yuan L, Klausner RD: Selective degradation of T-cell antigen receptor chains retained in a pre-Golgi compartment: *J Cell Biol* 107: 2149-2161, 1988
19. Inoue S, Bar-Nun S, Roitelman J, Simon R: Inhibition of degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase in vivo by cysteine protease inhibitors: *J Biol Chem* 266: 13311-13317,1991
20. Wikstrom L, Lodish HF: Nonlysosomal,pre-golgi degradation of unassembled asialoglycoprotein receptor subunits: A TLCK and TPCK-sensitive cleavage within the ER: *J Cell Biol* 113: 997-1007,1991
21. Yuk MH, Lodish: Two pathways for the degradation of the H2 subunit of the asialoglycoprotein receptor in the endoplasmic reticulum: *J Cell Biol* 113: 1735- 1749,1993
22. 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
23. Urade R, Nasu M, Moriyama T, Wada K, Kito M: protein degradatoion by the phosphoinositide-specific phospholipase C- α family from rat liver endoplasmic reticulum: *J Biol Chem* 267: 15152-15159,1992.
24. Yoshimura N, Kikuchi T, Sasaki T, Kitahara A, Hatanaka M, Murachi T: Two distinct Ca²⁺ proteases (calpain I and calpain II) purified concurrently by the same method from rat kidney: *J Biol Chem* 258: 8883-8889,1983
25. Gopalakrishna R, Barasky SH: Quantitation of tissue calpain activity after isolation by hydrophobic chromatography: *Anal Biochem*: 148, 413-423, 1985
26. Gopalakrishna R, Head JF: Rapid purification of calcium-activated protease by calcium-dependent hydrophobic-interaction chromatography: *FEBS Letters*: 186, 246-250,1985
27. Ross L, Schatz G: Assay of protein in the presence of high concentrations of sulfhydryl compounds: *Anal Biochem*: 54, 304-306, 1973
28. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding: *Anal Biochem*: 72, 248-254, 1973
29. Bond JS, Butler PE: Intracellular proteases: *Annu Rev Biochem* 56: 333-364,1987
30. Rechsteiner M: Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis: *Ann Rev Cell Biol* 3: 1-30,1987
31. Murachi T, Tanaka K, Hatanaka M, Murakami T: Intracellular Ca²⁺-dependent protease (calpain) and its high molecular weight endogeneous inhibitor (calpastatin): *Adv Enzymol Regul*: 19,407-424,1981.
32. Pontremoli S, Melloni E: Extralysosomal protein degradation. *Ann Rev Biochem*: 55, 455-481,1986
33. Goll DE, Edmunds T, Kleese WC, Sathe SK, Shannon JD : Some properties of the Ca²⁺-dependent proteinase: *Prog Clin Biol Res*:19, 407-424,1981
34. Suzuki K: Calcium activated neutral protease: domain structure and activity regulation: *Trends Biochem Sci*: 12,103-1-5, 1987
35. Mellgren RL: Calcium-dependent proteases: an enzyme system active at cellular membranes? *FASEB J*: 1,110-115,1987