

Transmembrane Protein과 T 세포항원 수용체 α , β 사슬의 소포체에서의 정체와 분해에 관련된 기작

고신대학교 의학부 생화학교실
이 송 재

Mechanism of endoplasmic reticulum retention and degradation of transmembrane proteins and T cell antigen receptor α , β chains.

Song Jae Lee

*Department of Biochemistry
Kosin Medical College, Pusan, Korea*

= Abstract =

Right after synthesis in the rough ER, secretory and cell surface expression proteins are initially modified in the lumen of the ER, followed by further modifications in the golgi and vesicular transport to their predestined place, e.g. cell surface or secretion. In contrast, ER resident proteins, both ER luminal and transmembrane proteins, escape from the vesicular transport by using specific retention signals. CD4, a cell surface marker of helper T cells, is a glycoprotein composed of extracellular domains, a single transmembrane region, and a 38 amino acid long cytoplasmic region. The mutant of CD4, in which the cytoplasmic C-terminal 13 amino acids were truncated, was not expressed on the cell surface but was retained in the ER. The C-terminal amino acids (-Lys-Lys-X-X) of this mutant may have the sequence information for ER retention and possibly all transmembrane proteins. This retention motif functions only in the presence of a transmembrane region. By contrast, the -Lys-Lys-Glu-Leu motif, which targets ER luminal proteins, does not function in the presence of a transmembrane region. These results suggest that two distinct mechanisms are involved in ER retention or ER resident proteins.

The T cell antigen receptor-CD3(TCR/CD3) complex which is known to be composed of at least seven polypeptides is a key molecule in immune recognition and regulation. Cell surface expression of this complex (and degradation of excessively synthesized TCR chains) is strictly regulated in the ER. Both TCR α and β chains are rapidly degraded in the ER unless they are

transported to the cell surface after formation of such big complex in the ER. In the present work, mechanism for ER degradation of TCR chains is proposed. ER degradation of unassembled TCR α chain is caused by exposure of hydrophobic transmembrane region to the polar environment of the ER lumen. Based on this observation, we hypothesize that any misfolded or denatured proteins would be subjected to ER degradation by exposing their hydrophobic regions to the degradation systems. This hypothesis can be supported by the observation of TCR β chain degradation in the ER.

Key words : Endoplasmic reticulum(ER), Retention signal, T cell antigen receptor

m-RNA와 ribosome에서 합성되는 단백질들은 분류되고 정돈되어 그들의 고유한 기능을 나타내는 세포내 소기관(핵, 소포체, mitochondria, lysosome, peroxisome 등)으로 수송되는데, 새로 합성되는 단백질내에는 이들의 행로를 결정해 주는 특이한 target sequence가 존재하며 이러한 signal sequence는 엄격한 조절을 받는다(1-3). 세포내 가장 중요한 소기관의 하나인 소포체는 진핵세포의 경우는 대부분이 ribosome과 결합되어(조면 소포체)있으며 소포체의 membrane은 전체 cell membrane의 약 1/2을 차지하고 있다. 소포체에서는 mitochondria나 엽록체내의 단백질을 제외한 모든 단백질 즉, 세포막을 구성하는 membrane protein과 지질합성, 세포 밖으로 분비되는 분비 단백질 및 lysosomal protein 등의 생합성이 일어나며 steroid hormone 생합성 및 해독작용에 관여하는 많은 효소들이 포함되어 있다. 또한 소포체에서는 새로 합성된 단백질들이 적절한 구조를 이룰 때는 이들이 소포체에서 수정되어 예정된 행로를 따라서 그들의 목적지로 수송되거나 역할이 끝난 단백질과 misfold된 단백질들 및 mutichain receptor protein들의 경우에서와 같이 복합체 형성에 관여하지 못하는 각각의 구성 단백질들이 소포체에서 분해된다. 이러한 특성을 지닌 소포체에 관하여는 많은 연구자들의 관심의 대상이 되어 왔으나 순수

분리의 어려움 등으로 인하여 다른 세포내 소기관에 비하여 연구가 미진한 실정이며 특히 소포체에 존재하는 단백질들의 역할과 구조적 특성(retention signal) 및 소포체에서 일어나는 단백질들의 분해과정(ER degradation)에 관한 연구는 최근에 이르러 조금씩 밝혀지고 있다. 본 논문에서는 소포체에 존재하는 단백질들의 특성과 분해기작에 관하여 CD 4 protein과 TCR α , β chain들을 이용한 본인등의 연구결과와 다른 연구자들의 결과를 비교 설명하고자 한다.

ER retention signal of ER resident proteins

조면소포체(rough endoplasmic reticulum : RER)에서 합성되는 분비 단백질(secretory protein)과 세포 표면단백질(cell surface expression protein) 및 lysosomal protein들은 합성된 후 그들 자신에 함유된 signal sequence에 의하여 소포체로 인도된 다음 소포체의 관강(ER lumen)에서 일차 수정되고 golgi(cis-, medial-, trans golgi)에서 또 다른 수정과정을 거쳐서 그들의 예정된 장소인 세포표면 또는 세포 밖으로 vesicular transport 된다(4, 5). 이러한 단백질들을 "default pathway"를 통하여 수송되거나(6) 소포체에 존재하는 단백질들(ER luminal and transmembrane protein)은 위의 vesicular transport를 따르지 않고 소포

체에 정체되는 특이한 retention signal을 갖고 있음이 밝혀졌다. 즉, 소포체의 관강에 존재하는 수용성 단백질들의 C-terminal end에 -Lys-Asp-Glu-Leu (-KDEL)의 아미노산 결합순서를 갖고 있는 단백질들 (heavy chain binding protein, disulfide isomerase 등)은 세포 밖으로 분비되거나 세포 표면에 expression되지 않고 예외없이 소포체에 정체된다(7, 8). 그러나 이러한 -KDEL retention signal sequence는 소포체의 관강에 존재하는 단백질에 제한되며 transmembrane region을 갖고 있는 transmembrane protein들의 경우는 해당되지 않는다. 그러므로 transmembrane protein들의 ER retention signal을 알아보려고 전형적인 single transmembrane protein으로 알려진 CD 4 protein을 standard molecule로 선택하였다. CD4 protein은 4개의 domain으로 구성된 extracellular domain과 20개의 소수성 아미노산으로 이루어진 transmembrane region 및 38개의 아미노산으로 구성된 cytoplasmic domain으로 이루어져 있으며 소포체에 정체되지 않고 세포 표면에 expression되는 아주 전형적인 single transmembrane protein이다. 또한 extracellular domain 1에는 AIDS virus 같은 HIV virus들의 binding site가 존재하고 있다. 이러한 특성을 지닌 CD4 protein의 cytoplasmic domain의 중간 위치에 존재하는 glutamine을 stop codon으로 치환시켜 C-terminal end가 -Lys-Lys-X-X(-KKXX, X: any amino acid)의 아미노산 결합순서를 갖는 CD4 mutant(CD4.Q421 stop)를 중심으로 하여 여러가지 형태의 mutant를 제조하여 이들 CD4 mutants cDNA를 HeLa cell에 transfection시켜서 expression되는 CD4 protein들의 행로를 cell staining 및 immunoprecipitation 방법으로 조사한 결과 오직 CD4.Q421 stop mutant만이 소포체에 정체됨이 관찰되었다(Fig. 1).

또한 CD4.Q421 stop mutant에서 C-ter-

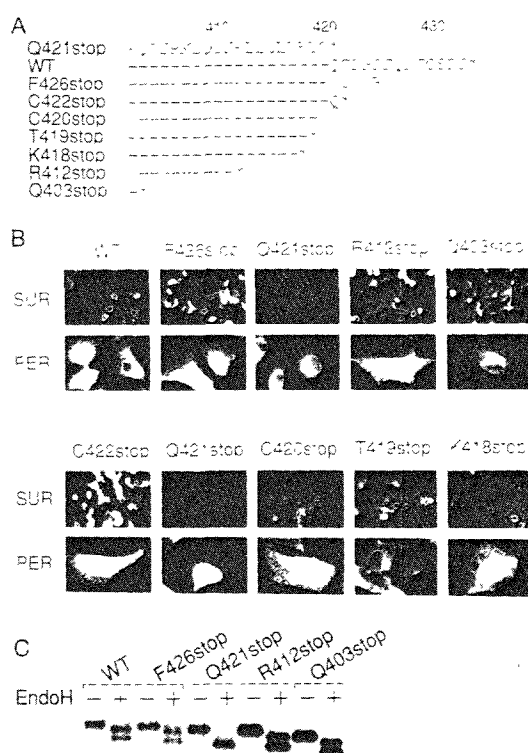


Fig. 1. ER retention of truncation mutants of CD4. Specific localization of CD4 wild type(WT) and the mutants was examined by cell surface, permeabilized cell staining, and endo H digestion of immunoprecipitates. (A) Amino acid sequences of cytoplasmic region from Arg-402. Identity of amino acids to the reference sequence is indicated by a dash and stop codons are indicated(*). (B) Cell surface (rows SUR) and permeabilized cell (row PER) staining patterns are shown.(x20 and x110, respectively) (C) Immunoprecipitates were incubated with (+) or without(-) endo H for 12 hr and analyzed by SDS/PAGE using 10% gels.

minal end의 아미노산 결합순서를 -Arg-Lys-X-X와 Lys-X-Lys-X-X로 치환시킨 mutants도 소포체에 정체됨이 확인되었다(Fig. 2).

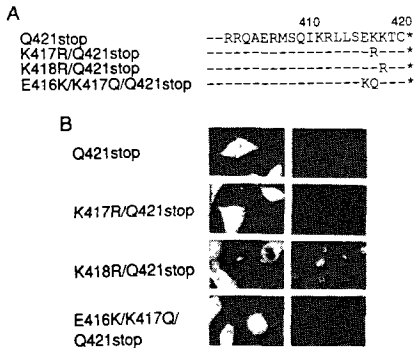


Fig. 2. Alteration of the positively charged amino acids and their position in the ER retention motif of CD4. Q421 stop(A). Each mutant was tested for its ER retention by immunofluorescence of the cell surface(on the right) and permeabilized cell(on the left) staining.(B).

이러한 결과들은 C-terminal end에 존재하는 KKXX, RKXX 및 KXXXX의 아미노산 결합순서가 transmembrane protein들을 소포체에 정체시키는 retention signal임을 입증하고 있다. 다음은 수용성 단백질들의 retention signal인 -KDEL과 본인등이 발견한 transmembrane protein들의 retention signal인 -KKXX의 특성을 비교 조사하였다. 즉, CD4 protein의 transmembrane region과 cytoplasmic domain을 제거한 수용성 CD4 mutant의 C-terminal end에 각각 -KDEL과 -KKXX를 접합시킨 mutant와 이와는 반대로 transmembrane region이 존재하는 CD4 protein의 cytoplasmic domain에 -KDEL과 -KKXX retention signal을 접합시킨 CD4 mutants를 제조하여

이들의 행로를 조사하였을 때 ER luminal protein들의 retention signal인 -KDEL은 transmembrane region이 없는 경우에만 retention signal로서 작용하며 -KKXX retention signal은 transmembrane region이 존재하는 경우에만 retention signal로서 역할을 할 수 있음이 관찰되었다(Fig. 3).

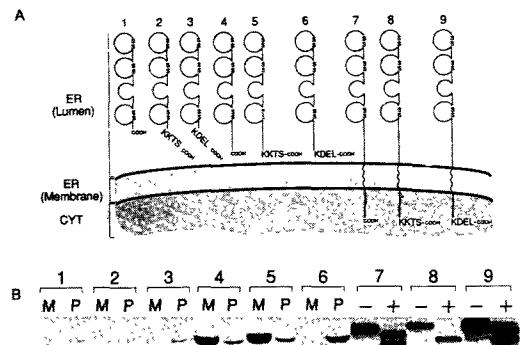


Fig. 3. Effect of transmembrane regions on the ER retention motifs -KDEL and -KKXX. (A) Introduction of the motifs at Gly-351 (lanes 1-3), Trp-365(lanes 4-6), or Gln-403(lanes 7-9). As the result of different restriction sites used for constructions, the sequences added to Ser-350 were -VKDEL or -VEKKTS, to Thr-364 were -WSKDEL or -WSEKKTS, and to Arg-402 were -LVKDEL or -LSEKKTS. CYT, cytoplasm. (B) ER retention of soluble proteins was measured by secretion into the medium after a 15-min pulse labeling and a 4-hr chase [lanes 1-6, immunoprecipitates of medium (M) or cell pellet lysate(P)]. Endo H sensitivity was used for transmembrane proteins[lanes 7-9, with (+) or without(-) endo H digestion].

이러한 결과들은 이들 두 종류의 retention signal들이 전혀 다른 mechanism을 통하여 소포체에 존재하는 단백질들을 정제시키고 있음을 의미한다.

본 연구에서 사용한 CD4 protein과 TCR α , β chain들의 extracellular domain에는 각 2, 5, 3개의 N-glycosylation site(Asn-X-Ser, Asn-X-Thr)가 존재하는데 단백질들이 합성된 후 소포체의 관강에서 이들 site에 당(mannose)이 결합하는 glycosylation이 일어난 다음 이들은 다시 golgi로 수송되어 또 다른 수정과정(thilation)을 거쳐서 그들의 최종목적지로 수송된다. 그러므로 이들 단백질들이 소포체에 정제되어 있다면 이들은 endoglycosidase H(Endo H)에 의하여 당이 제거되어 전기영동 시 단일 band를 나타내나 이들이 golgi에 수송되어 또 다른 수정과정을 거친다면 이들은 더이상 Endo H에 의하여 분해되지 않으며(9, 10) 전기영동시 두가지 band(Endo H sensitive from과 resistant from)를 나타낸다. 그러므로 Endo H는 소포체에 존재하는 단백질들의 중요한 maker enzyme으로 사용될 수 있다.

Intracellular fates of the TCR α , β chains

T 세포 항원 수용체(T cell antigen receptor : TCR)는 두개의 서로 다른 chain들이 disulfide 결합으로 이루어진 heterodimer(α β 또는 γ δ)이며 이들은 세포 표면에서 적어도 다섯 가지의 non-polymorphic polypeptide로 구성된 CD3분자(γ , δ , ϵ , ζ , η)와 복합체를 형성하고 있다(11). 이러한 TCR/CD3 복합체 형성과정과 조립된 복합체(assembled complex)의 세포 표면으로의 수송기작에 관하여는 최근에 이르러 조금씩 밝혀지고 있다. 즉, TCR/CD3 복합체는 이 복합체를 구성하는 각각의 peptide들이 조면 소포체에서 합성된 후 소포체에서 조립되고 golgi에서 더욱 더 수정된 다음 세포표면으로 수송되어 면역학적인 기능을 나타낸다. 그러나 TCR/CD3 복합체의 형성에 관여하지

못한 각 구성성분(TCR α , β chains 등)과 미완성된 불완전한 TCR/CD3 복합체는 소포체에 정제되거나 소포체에서 급격히 분해되며 일부는 lysosome에서 분해된다고 알려져 있으나(12) 이들 각각의 구성성분들이 어떠한 degradation mechanism을 통하여 분해되는지에 관하여는 알려져 있지 않다. 그러므로 본 논문에서는 TCR α , β chain들의 구조적 특성과 소포체에서의 정제 및 분해 기작에 관하여 논하고자 한다.

TCR α chain은 228개의 아미노산으로 구성된 extracellular domain과 20개의 아미노산으로 이루어진 transmembrane region 및 5개의 매우 적은 아미노산으로 이루어진 cytoplasmic tail을 갖는 transmembrane protein으로 알려져 있다. 또한 TCR β chain은 256개의 아미노산으로 이루어진 extracellular domain과 28개의 주로 소수성 아미노산으로 구성된 transmembrane 부위 및 6개의 작은 아미노산들이 cytoplasmic tail을 구성하고 있는 single transmembrane protein으로서 C-terminal end에는 특이하게 다른 TCR chain에는 존재하지 않는 ER transmembrane protein의 retention motif인 -Lys-Arg-Lys-Asp-Phe(-KX-KXX)가 존재하고 있다. 이러한 특성을 갖는 human TCR α , β chain의 cDNA를 HeLa cell에 transfection 시킨 후 expression된 단백질의 행로를 조사한 결과 이들은 모두 소포체에 정제되고 분해되었다(Fig. 4 A, B).

또한 TCR α , β chain들의 분해 장소를 정확히 알아보고자 TCR β chain을 encoding하는 cDNA를 HeLa cell에 transfection시킬 때 expression되는 단백질의 lysosome에서의 분해를 방지하기 위하여 세포 내의 pH를 증가시킬 수 있는 50mM NH_4Cl 을 첨가하였으나 NH_4Cl 의 존재 또는 비존재하에서의 분해 양상이 유사하였다(Fig. 4 C).

이러한 결과들은 CD3 구성 성분들과 복합체를 형성하지 못하는 TCR α , β chain

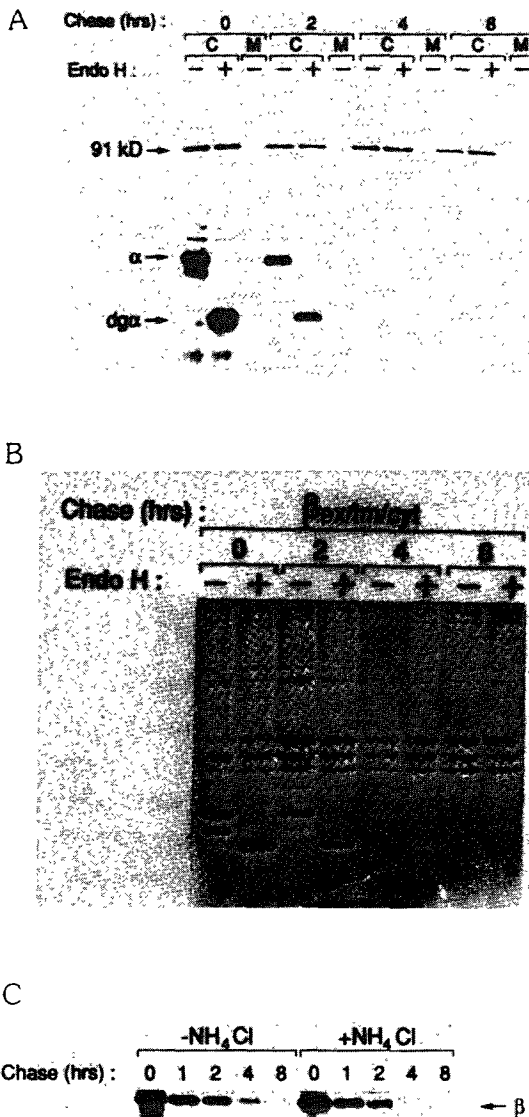


Fig. 4. Intracellular fates of TCR α , β chains. (A) ER degradation of TCR α chain (dg α , deglycosylated form). (B) ER degradation of TCR β chain. (C) ER degradation of TCR β chain treated with or without NH_4Cl . Immunoprecipitates of encoding TCR α , β transfected and pulse-labeled cell lysates (C) and culture medium (M) are presented (numbers at the top in-

icate hours after chase). Molecular size standards are shown at the left in kilodaltons.

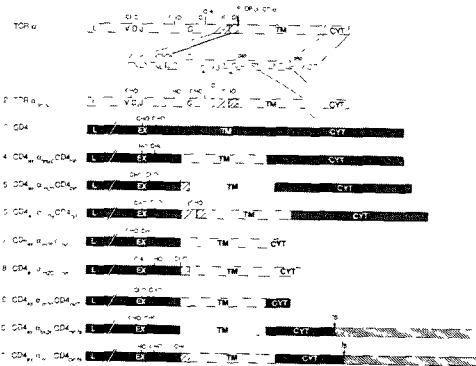
들이 golgi 또는 lysosome으로 수송되지 않고 소포체에 정체되고 소포체에서 분해됨을 의미하며 golgi에서 lysosome으로의 vesicular transport를 교란시키는 monensin이나 brefeldin A를 사용하였을 경우에도 이와 유사하였다(13, 14, 15).

ER retention motif of TCR α chain

TCR/CD3 복합체가 세포표면에 expression되어 면역학적인 기능을 나타내기 위하여 필요한 TCR 각 chain들과 CD3 구성성분들의 적절한 접힘(proper folding)과 조립과정은 엄격한 조절작용을 받으며 TCR 각 chain과 CD3 구성성분들이 세포내 어느 한 소기관으로 부터 다른 소기관으로 분류되고 정돈(sorting and trafficking)되기 위해서는 각 구성 peptides들에 존재하는 molecular information이 중요한 역할을 한다. Klausner 등의 연구자들은 TCR α 및 β subunit의 transmembrane region에는 ER retention과 degradation에 관하여는 정보를 지닌 signal이 존재하며 특히 transmembrane region에 존재하는 하전된 아미노산들이 TCR α 와 β chain의 ER retention과 degradation 및 이들 chain들이 CD3 구성성분과 복합체를 이룰 때 중요한 역할을 한다고 제안하였다(16-19). 이들 연구자들은 Tac antigen(interleukin receptor α chain)의 transmembrane 부위를 TCR α chain의 transmembrane 부위로 치환시킨 chimeric form의 cDNA를 Cos cell에 transfection시켰을 때 experssion되는 chimeric molecule이 소포체에서 정체되고 분해되며(16), CD3 구성성분의 하나인 δ subunit와 결합함을 발견하였으며(18), 양으로 하전된 아미노산을 소수성 아미노산으로 치환시킨 cDNA를 TCR α chain이 결여된 cell line인

REX, Clone 20A등에 transfection시켰을 때 TCR/CD3 복합체가 형성되지 못함을 관찰하였다(19). 본 연구에서도 TCR α chain의 소포체에서의 retention signal을 알아보기 위하여 TCR α chain의 transmembrane region과 cytoplasmic tail을 truncation 시킨 soluble from TCR α chain mutant(Fig. 5 A)를 제조하여 HeLa cell에 transfection 시킨 결과 expression 된 단백질이 소포체에 정체되었으며 Endo H에 의하여 분해됨으로 보아 이 soluble TCR α chain mutant는 go-gli로 수송되지 않고 소포체에 정체되어 있음을 의미한다(Fig. 5 B).

A



B

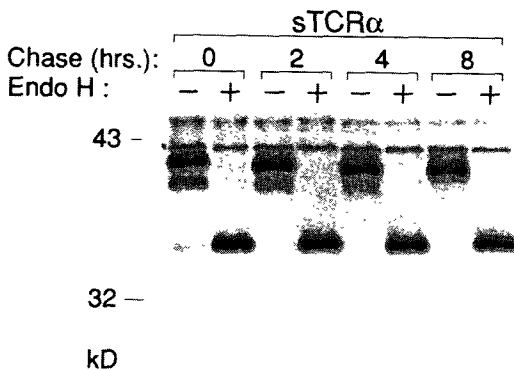


Fig. 5. Intracellular fates of TCR α chain, truncated TCR α chain, and CD4_{ex} α _{tm} CD4_{cyt} (A) Diagrammatic illustration of TCR α (light), CD4 (dark), and chimeric molecules composed of parts of TCR α and CD4. The TM region of TCR α is presented with the one-letter amino acid code. L, leader sequence. CHO, carbohydrate residue. V, D, J, and C, TCR α gene segments(20); plus (+) signs indicates positively charged residues. (B) Immunoprecipitation of cell lysates shows that a TCR α without its TM and CYT region is not degraded rapidly. TCR α found in immunoprecipitate was all Endo H sensitive.

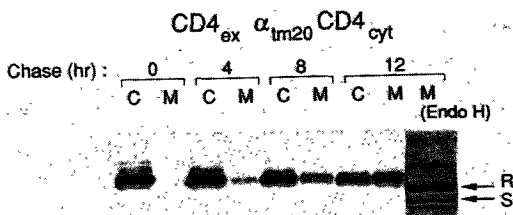
이러한 결과는 TCR α chain의 ER retention이 transmembrane region에 존재하는 두개의 양으로 하전된 아미노산 보다는 extracellular domain에 의하여 일어남을 알 수 있다.

Translocation of TCR α chain into ER lumen

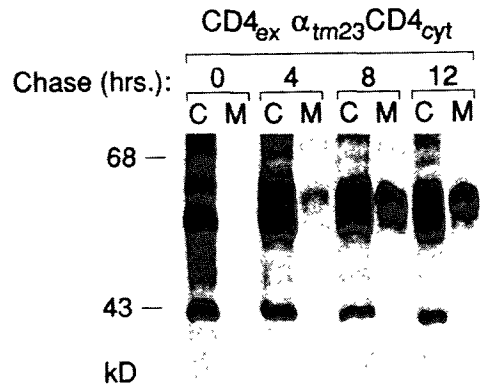
일반적으로 transmembrane protein의 transmembrane 부위는 20개 내외의 주로 소수성 아미노산으로 이루어져 있으므로 이들 단백질들의 transmembrane 부위가 membrane의 lipid bilayer를 통과하지 못하고 membrane에 anchor되어 있다. 또한 이들 부위는 lipid bilayer에서 α -helix를 이루고 있는데 이러한 α -helix를 형성하기 위하여는 적어도 11개 이상의 소수성 아미노산들이 연속적으로 존재해야 한다. 그러나 20개의 아미노산으로 이루어진 TCR α chain의 transmembrane region은 특이하게 극성 아미노산과 양으로 하전된 아미노산(Arg, Lys.

Asn, Thr등)들이 약 5개의 아미노산 주기로 위치하고 있다(Fig. 5 A). 또한 2개의 양으로 하전된 아미노산은 α -helix상에서 서로 반대 방향(약 140°)으로 위치하고 있으며 lipid bilayer에서 α -helix 형태를 유지하기 위하여는 극성 아미노산들을 소수성 아미노산인 alanine으로 치환하였을 때보다 약 17.2 Kcal의 더 많은 energy가 소요된다. 그러므로 이러한 특징을 갖는 TCR α chain의 transmembrane 부위가 lipid bilayer에서 α -helix를 형성하여 존재할 수 있는지 의문시 된다. 이러한 의문점을 조사하기 위하여 현재까지 TCR α chain의 transmembrane 부위로 알려진 TCR α chain transmembrane 부위를 CD4 protein의 transmembrane 부위와 치환시킨 chimeric cDNA(CD4_{ex} α _{tm}CD4_{cyt})와 TCR α chain의 transmembrane 부위에서 N-terminal쪽의 extracellular domain에 위치하는 3개의 아미노산(Asn-Leu-Ser)을 첨가한 CD4_{ex} α _{tm23}CD4_{cyt} 및 9개의 아미노산(Thr-asn-Leu-Asn-Phe-Gln-Asn-Leu-Ser)을 더 첨가한 CD4_{ex} α _{tm29}CD4_{cyt} chimeric molecule을 제조하여 HeLa cell에 transfection시킨 후 첫째 expression되는 chimeric molecule이 세포 밖으로 분비되는지와 만일 세포 밖으로 분비된다면 Endo H에 의하여 분해되는지의 여부를 조사하였다. 이 chimeric molecule은 조사기간 동안에 cell에서 culture media로 분비되었으며 분비된 chimeric molecule의 약 절반은 Endo H에 의하여 분해되지 않았다(Fig. 6 A, B, C).

A



B



C

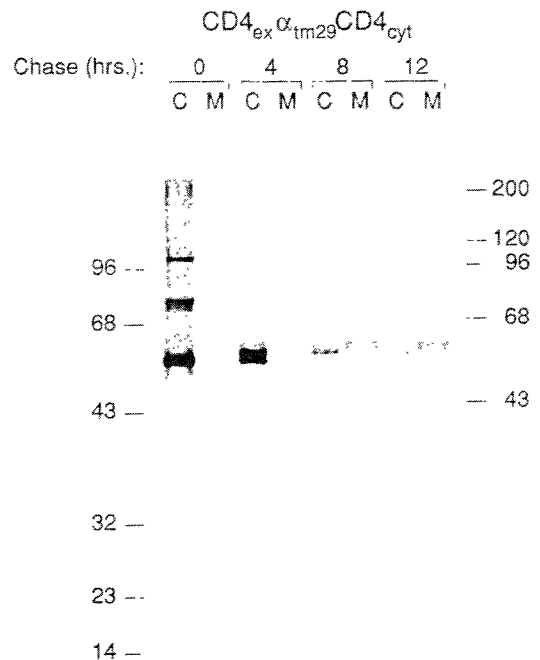


Fig. 6 Secretion of CD4_{ex} α _{tm}CD4_{cyt} chimeric molecules.

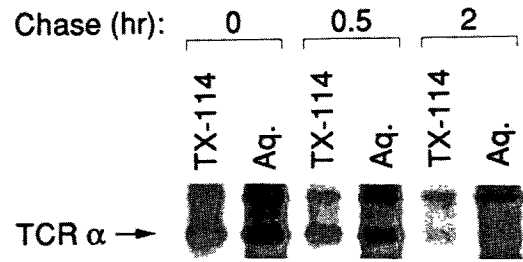
(A) Immunoprecipitation of the CD4_{ex} α _{tm20}CD4_{cyt} from cell lysate (C) or from the medium(M). Endo H-resistant(R) and Endo H-sensitive(S) forms of the secreted CD4_{ex} α _{tm20}CD4_{cyt} are marked. (B)

Immunoprecipitation of the $CD4_{ex} \alpha_{tm23} CD4_{oyt}$ from cell lysate (C) or from the medium (M). (C) Immunoprecipitation of the $CD4_{ex} \alpha_{tm29} CD4_{oyt}$ from cell lysate (C) or from the medium (M)

이러한 실험결과는 expression된 chimeric molecule들이 소포체의 membrane에 anchor되어 있는 것이 아니라 membrane을 통과하여 소포체의 관강에서 일차 수정되고 golgi에서 더욱 더 수정된 다음 세포밖으로 분비됨을 의미한다. 또한 지금까지 알려진 TCR α chain의 transmembrane region에 존재하는 두개의 양으로 하전된 아미노산들이 TCR α chain의 ER retention 또는 degradation signal로서 중요한 역할을 한다면 TCR α chain의 transmembrane region을 포함하는 $CD4_{ex} \alpha_{tm} CD4_{oyt}$ chimeric molecule들은 세포 밖으로 분비되지 않고 소포체에 정제되거나 소포체에서 급격히 분해되어야 한다. 그러나 TCR α chain의 transmembrane region을 포함하는 chimeric molecule들이 예외없이 세포 밖으로 분비됨으로 보아 이들 양으로 하전된 아미노산들이 TCR α chain의 ER retention 또는 degradation signal로서 역할을 하지 않음을 알 수 있다. 이러한 연구결과를 토대로 하여 실제로 intact TCR α chain과 $CD4_{ex} \alpha_{tm} CD4_{oyt}$ chimeric molecule들이 합성된 직후 소포체의 membrane을 통과하여 소포체의 관강에 존재하는지를 다음과 같은 2가지 실험을 통하여 조사하였다. 즉, TCR α chain을 HeLa cell에 transfection한 후 cell을 lysis한 다음 소포체 분획을 분리하였다. 이 분획에 Triton X 114를 처리하였을 때 대부분의 TCR α chain이 aqueous phase에서 검출되는 것으로 보아 (Fig. 7 A)

TCR α chain은 소포체의 관강에 존재함을 알 수 있다. Triton X 114를 단백질 용액에 처리하면 membrane protein들은 detergent

A



B

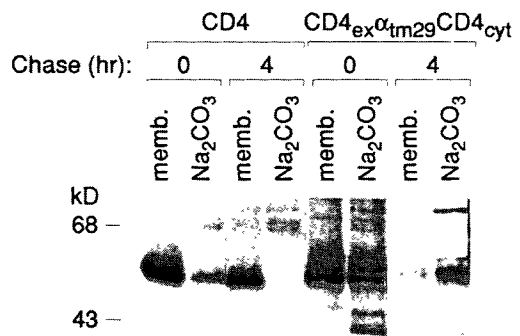


Fig. 7. Translocation of TCR α chain and $CD4_{ex} \alpha_{tm29} CD4_{oyt}$ chimeric molecules. (A) Triton X 114 phase separation of TCR α chain. (B) Na_2CO_3 (pH 11.3) extraction of CD4 and $CD4_{ex} \alpha_{tm29} CD4_{oyt}$

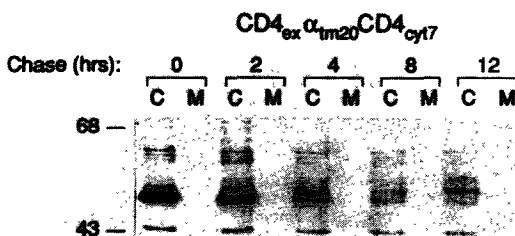
phase에서 soluble protein들은 aqueous phase에서 검출되는데 TCR α chain은 aqueous phase에서 검출되며 chase 2 시간 후에는 detergent phase나 aqueous phase에서 아주 미량의 TCR α chain이 확인되는데 이것은 TCR α chain이 소포체에서 급격히 분해됨을 의미한다. 또한 $CD4_{ex} \alpha_{tm29} CD4_{oyt}$ chimeric molecule의 ER fraction을 sodium carbonate(pH 11.3)으로 처리하였을 때 chase time이 경과함에 따라서 이 chimeric molecule이 membrane fraction으로부터 sodium carbonate(pH 11.3) 용액에 추출되는 양이 증가하는 반면에 전형적인 transmembrane protein으로 알려진 CD4

protein은 chase time에 관계없이 membrane fraction에 존재함으로(Fig. 7 B) 보아 이들 chimeric molecule이 실제로 ER membrane을 통과하여 ER lumen에서 수정되고 golgi를 거쳐서 세포 밖으로 분비됨을 알 수 있다. 이러한 연구결과들은 지금까지 알려진 TCR α chain의 transmembrane 부위가 적절하지 않으며 TCR β chain 및 CD3 구성 성분들과 복합체를 형성하지 못하는 과량 생성되거나 misfold된 TCR α chain이 소포체의 membrane에 anchor되어 있는 것이 아니라 ER lumen으로 translocation되어 소포체의 관강에서 급격히 분해됨을 의미한다.

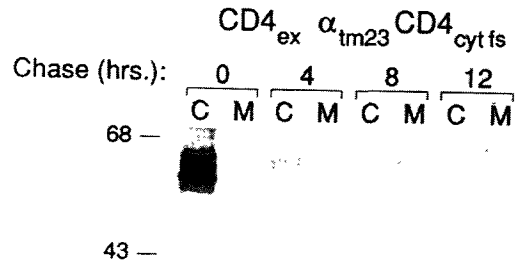
ER degradation of TCR α chain

TCR α chain의 소포체에서의 분해기작을 알아보려고 아래와 같은 실험을 수행하였다. 즉, 세포 밖으로 분비되는 chimeric molecule ($CD4_{ex} \alpha_{tm} CD4_{oyt}$)의 38개의 아미노산으로 이루어진 chimeric molecule의 cytoplasmic domain의 길이를 intact TCR α chain의 cytoplasmic tail의 길이와 유사하게 7개의 아미노산으로 줄이거나 반대로 60개의 아미노산으로 연장한 chimeric mutants($CD4_{ex} \alpha_{tm} CD4_{oyt7}$, $CD4_{ex} \alpha_{tm} CD4_{oytfs}$)를 제조하여 HeLa cell에 transfection 시킨 결과 이들 chimeric molecule이 세포 밖으로 분비되거나 소포체에 정체되지 않고 소포체에서 급격히 분해됨을 관찰하였다(Fig. 8 A, B). 또한 $CD4_{ex} \alpha_{tm} \alpha_{cyt}$ chimeric molecule의 경우도 소포체에서 급격히 분해되었다(Fig. 8 C).

A



B



C

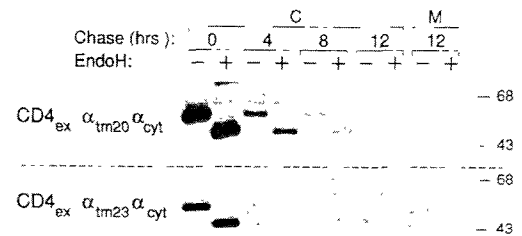


Fig. 8. ER degradation of chimeric proteins with short and frame-shift mutants. Rapid ER degradation and Endo H sensitivity of the (A) $CD4_{ex} \alpha_{tm20} CD4_{oyt7}$, (B) $CD4_{ex} \alpha_{tm23} CD4_{oytfs}$ (C) $CD4_{ex} \alpha_{tm20} CD4_{oyt}$ (upper), $CD4_{ex} \alpha_{tm23} \alpha_{cyt}$ (lower). Molecular size markers are indicated as kilodaltons.

이러한 결과들은 TCR α chain의 transmembrane region을 포함하고 있는 chimeric molecule들의 행로가 이들의 합성된 후의 접혀진 상태에 의존됨을 의미한다. 즉, 이들 chimeric molecule이 조면 소포체에서 합성된 후 접혀질 때 주로 소수성 아미노산으로 구성된 transmembrane 부위가 단백질의 안쪽에 위치하면 이 molecule은 소포체에서 분해되지 않고 세포 밖으로 분비되나(Fig. 6 A, B, C) transmembrane 부위가 단백질의 바깥쪽에 위치하여 친수성인 주위상태(ER lumen)에 노출되면 소포체의 관강에 존재하는 분해 물질에 의하여 급격히 분해됨을

강력히 의미한다.

ER retention and degradation of TCR β chain

TCR β chain의 cDNA를 HeLa cell에 transfection시키면 expression되는 TCR β chain molecule이 소포체에서 정체와 급격한 분해가 일어난다(Fig. 2). 그러므로 TCR β chain내의 ER retention과 관련된 부위(extracellular domain, transmembrane region 또는 cytoplasmic tail)를 알아보고자 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 TCR β chain cDNA의 transmembrane region과 cytoplasmic tail을 truncation시킨 soluble form의 TCR β chain mutant를 제조하여 HeLa에 transfection시킨 결과 이들은 soluble TCR α chain(Fig. 5)과는 달리 소포체에서 급격히 분해되었다(Fig. 9).

A

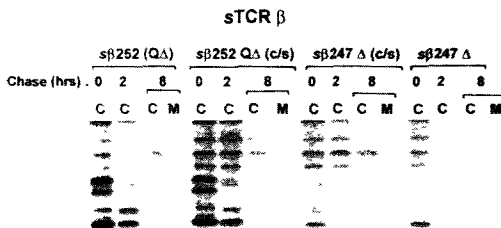
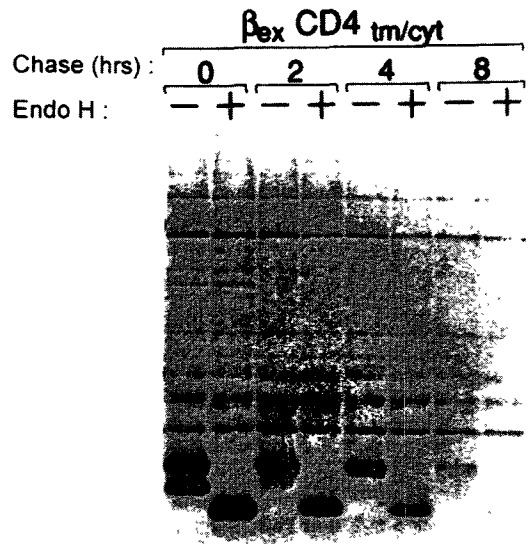


Fig. 9. Intracellular fates of soluble TCR β chain mutant.

또한 TCR β chain의 transmembrane region 또는 cytoplasmic tail의 한 부위를 CD4 cDNA 상대 부위와 치환시킨 chimeric cDNA(β_{ex} CD4 $_{tm}$ CD4 $_{cyt}$, CD4 $_{ex}$ β_{tm} β_{cyt})를 제조하여 HeLa cell에 transfection시킨 후 expression되는 chimeric molecule들도 예외 없이 소포체에서 정체되고 분해되었다(Fig. 10).

A



B

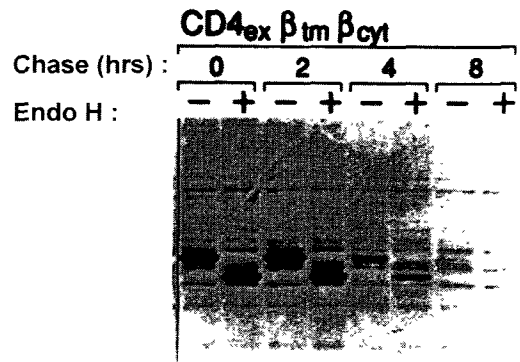


Fig. 10. ER degradation of β_{ex} CD4 $_{tm}$ CD4 $_{cyt}$ and CD4 $_{ex}$ β_{tm} β_{cyt} chimeric molecules.

이러한 결과들은 TCR β chain의 소포체에서의 retention이 extracellular domain 또는 transmembrane cytoplasmic domain에 기인됨을 의미한다. 다음은 TCR β chain의 소포체에서의 분해와 관련된 기작을

알아보고자 TCR β chain의 분해와 관련된 molecular information을 포함하고 있을 것으로 예상되는 아미노산들을 치환시킨 수십 종류의 mutants를 제조하여 이들의 행로를 조사한 결과 이들 모두 예외없이 TCR β chain과 유사하게 소포체에서 급격히 분해되었다(실험결과 생략). 이러한 결과들은 TCR β chain의 소포체에서의 급격한 분해는 특이한 degradation signal이 존재하기 보다는 이들의 합성된 후의 접혀진 상태에 기인함을 의미한다. 즉, TCR β chain의 합성된 직후의 접혀진 구조가 TCR α chain에 비하여 매우 불안정하며 소포체에서의 분해는 불안정하게 접혀진 TCR β chain의 extracellular domain 또는 주로 소수성 아미노산으로 구성된 transmembrane region이 친수성인 소포체의 관강에 노출되어 관강에 존재하는 degradation system에 의하여 급격히 분해된다고 생각한다. 또한 chimeric molecule의 (β_{ex} CD4_{tm} CD4_{cyt} CD4_{ex} β_{tm} β_{cyt}) degradation rate를 조사하여 본 결과 이들 chimeric molecule의 ER degradation rate가 TCR β chain에 비하여 두배이상 감소되었다. 이러한 사실은 TCR β chain의 소포체에서의 분해가 이들 단백질들의 접혀진 상태에 의존됨을 의미한다.

Conclusion

세포내 가장 중요한 소기관의 하나인 소포체에서 일어나는 단백질들의 정체와 분해 기작에 관하여는 현재까지 뚜렷하게 밝혀져 있지 않다. 그러므로 본 논문에서 언급한 CD4 mutant protein들의 retention signals들은 소포체에 존재하는 단백질들의 특성을 이해하는데 기여하리라고 생각된다. ER lumenal protein들의 C-terminal end에 존재하는 Lys-Asp-Glu-Leu 아미노산 결합순서는 transmembrane region이 없는 soluble protein의 경우에만 retention signal로서 역할을 하며 transmembrane protein들의 경우에는 C-terminal end에 -Lys-Lys-X-X(-

Arg-Lys-X-X, -Lys-X-Lys-X-X 포함) 아미노산 결합순서 외에 transmembrane region이 존재해야만 retention signal로서 역할을 한다. 이러한 결과들은 이들 두종류의 retention signal들이 전혀 다른 기작에 의하여 소포체에서 단백질을 정체시키고 있음을 의미한다.

TCR α , β chain들의 합성된 후의 행로는 크게 두가지로 구분할 수 있다. 첫째로 이들 TCR chain들이 CD3 구성 성분들과 소포체에서 TCR/CD3 복합체를 형성한 다음 세포 표면으로 수송되어 중요한 면역학적 기능을 나타내거나 둘째로 CD3 구성성분들과 복합체를 형성하지 못하는 TCR chain들과 불완전한 TCR/CD3 복합체는 소포체 또는 소포체 부근에서 급격하게 분해된다. 그러나 TCR α , β chain들의 소포체에서의 분해기작은 거의 알려져 있지 않다.

일반적으로 membrane protein들의 transmembrane region들은 소수성 아미노산들로 구성되어 있으므로 lipid bilayer를 통과하지 못하고 lipid bilayer에 anchor되어 α -helix를 형성하여 존재한다. 그러나 TCR α chain의 transmembrane region은 다른 membrane protein들의 transmembrane region과는 달리 매우 특이한 구조적 특성을 지니고 있다. 그러므로 TCR α chain의 transmembrane region이 lipid bilayer에서 안정하게 존재할 수 있는지를 알아보기 위하여 TCR α chain의 transmembrane region을 전형적인 transmembrane protein으로 알려진 CD4 protein의 transmembrane region과 치환시킨 chimeric mutant를 제조하여 이들의 행로를 조사한 결과 매우 흥미롭게도 이들이 소포체에서 정체되거나 분해되지 않고 세포 밖으로 분비되었다. 또한 현재까지 알려진 TCR α chain의 transmembrane region으로 부터 extracellular domain 방향으로 3개 또는 9개의 아미노산을 더 첨가한 chimeric molecule도 세포 밖으로 분비되었다. 이러한 연구 결과들은 i) 지금까지 알려진

TCR α chain의 transmembrane region이 적절하지 않으며 ii) 적어도 TCR α chain 단독으로는 이들이 소포체의 membrane에 anchor되어 있는 것이 아니라 소포체의 관강에 존재하며 iii) TCR α chain의 transmembrane region에 존재하는 두개의 양으로 하전된 아미노산들에 의하여 이들이 소포체에 정체되고 분해된다는 다른 연구자들의 설명이 적절하지 않음을 알 수 있다. 이러한 연구결과는 TCR α chain과 세포 밖으로 분비되는 chimeric molecule의 cDNA를 transfection시킨 HeLa cell의 소포체 분획을 분리하여 Triton X 114와 sodium carbonate (pH 11.3)처리를 하였을 때 이들이 실제로 소포체의 막을 통과하여 관강에 존재하고 있음을 확인함으로써 재차 입증되었다. CD3 구성 성분들과 복합체를 이루지 못하는 TCR α chain은 소포체에서 급격히 분해되므로 그 자신을 이용하여 TCR α chain의 소포체에서의 정체 및 분해기작을 알아보는 것은 쉽지가 않다. 그러므로 TCR α chain의 소포체에서의 정체와 분해에 있어서 각 domain의 역할을 알아보기 위하여 soluble TCR α chain mutant를 제조하여 이들의 행로를 조사한 결과 이들은 소포체에서 분해되거나 세포 밖으로 분비되지 않고 소포체에 정체되었다. 이 결과는 TCR α chain의 소포체에서의 정체신호가 extracellular domain에 존재함을 의미하며 지금까지 retention과 degradation signal로서 알려진 transmembrane region내에 존재하는 두개의 양으로 하전된 아미노산들이 포함되어 있지 않음에도 불구하고 이들이 소포체에 정체됨으로 볼 때 두개의 하전된 아미노산들은 retention과 degradation signal로서 적절하지 않음을 증명한다 TCR α chain의 degradation mechanism을 연구하기 위하여 세포밖으로 분비되는 chimeric molecule의 cytoplasmic domain의 길이를 줄이거나 연장시킨 chimeric mutants와 extracellular domain은 CD4로 구성되며 transmembrane region과

cytoplasmic tail은 TCR α chain으로 구성된 chimeric mutant를 제조하여 행로를 조사하였을 때 이들 chimeric mutants들은 예외없이 소포체에서 급격히 분해되었다. 이러한 연구결과들은 단백질들의 합성 후의 접혀진 상태가 소포체에서의 급격한 분해와 밀접한 관련이 있음을 의미한다. 즉, 주로 소수성 아미노산으로 구성된 transmembrane region이 protein folding시 안쪽에 위치하게 되면 이들은 소포체에서 분해되지 않고 세포 밖으로 분비되나 만일 이들 부위가 바깥쪽에 위치하여 친수성인 주위환경(소포체의 관강)에 노출되면 이들 단백질들은 소포체의 관강에 존재하는 degradation system에 의하여 급격히 분해된다. 이러한 연구결과들을 토대로 하여 단백질들의 소포체에서의 분해는 단백질들 내에 특이한 degradation signal이 존재하기 보다는 이들의 접혀진 구조에 의하여 결정된다는 가설을 제안하였다. 이러한 가설은 TCR β chain의 소포체에서의 분해기작에서 뚜렷하게 입증된다.

본 논문에서 제시한 transmembrane protein들의 ER retention signal 및 TCR α , β chain의 연구결과는 TCR α , β chain 뿐만 아니라 일반적인 transmembrane protein들의 소포체에서의 정체와 분해기작 및 그들의 행로를 설명할 수 있는 model system으로 인용될 수 있다고 생각한다.

* 본 논문에 인용된 연구결과는 본인등이 Science(259, 1901-1904, 1993)와 PNAS(88, 1918-1992, 1991)에 게재한 내용 및 현재 진행중인 실험결과를 요약 정리한 것임을 밝혀 드립니다.

REFERENCES

1. Baranski, T.J., Faust, P.L., and Kornfeld, S. (1990) Cell 63, 281-291
2. Dang, C.V., and Lee, W.M.F. (1989) J. Biol. Chem. 264, 18019-18023
3. Van Etten, R.A., Jackson, P., and Balti-

- more, D., (1989) *Cell* 58, 669–678
 4. Lodish, H.F., (1988) *J.Biol. Chem.* 263, 2107–2110
 5. Pfeffer, S.R., and Rothman, J.E. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 829–852
 6. Weiland, F.T., Gleason, M.L., Serafini, T.A., and Rothman, J.E. (1987) *Cell* 50, 289–300
 7. Munro, S., and Pelham, H.R.B. (1987) *Cell* 48, 899–907
 8. Pelham, H.R.B., (1988) *EMBO J.* 7, 913–918
 9. Hirschberg, C.B., and Snider, M.D. (1987) *Ann. Rev. Biochem.* 56, 63–87
 10. Tarentino, A.L., and Maley, F. (1974) *J.Biol.* 249, 811–816
 11. Clevers, H., Alarcon, B., Wileman, T., and Terhorst, C. (1988) *ANN.Rev. Immunol* 6, 629–662
 12. Alarcon, B., Berkhout, B., Breitmeyer, J., and Terhorst, C. (1989) *J.Biol. Chem.* 263, 2953–2961
 13. Poole, B., and Okuma, S. (1981) *J. Cell.Biol.* 90, 665–669
 14. Tartakoff, A.M. (1983) *Cell* 32, 1026–1028
 15. Lippincott-Schwartz, J., Donaldson, J. G., Schweizer, A., Berger, E.G., Hauri, H.P. Yuan, L.C., and Klausner, R.D. (1990) *Cell* 80, 821–836
 16. Bonifacino, J.S., Cosson, P., and Klausner, R.D. (1990) *Cell* 63, 503–513
 17. Bonifacino, J.S., Suzuki, C.K., and Klausner, R.D. (1990) *Science* 247, 79–82
 18. Manolios, N., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. (1990) *Science* 249, 274–277
 19. Blumberg, R.S., Alarcon, B., Sancho, J., Mcdemott, F.V., Lopez, P., Breitmeyer, J., and Terhorst, C., (1990) *J.Biol. Chem.* 265, 14036–14043
 20. Leiden, J.M., Fraser, J.D., and Strominger, J.L. (1986) *Immunogenetics* 24, 17–23
-