

## ER Stress-Induced *Jpk* Expression and the Concomitant Cell Death

Hye Sun Kim, Hyunjoo Chung, Kyoung-Ah Kong, Sungdo Park and Myoung Hee Kim<sup>†</sup>

Department of Anatomy, Embryology Laboratory, Brain Korea 21 Project for Medical Science,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

A Jopock (*Jpk*), a *trans*-acting factor associating with the position-specific regulatory element of murine *Hoxa-7*, has shown to have a toxicity to both prokaryotic and eukaryotic cells when overexpressed. Since *Jpk* protein harbors a transmembrane domain and a putative endoplasmic reticulum (ER)-retention signal at the N-terminus, a subcellular localization of the protein was analyzed after fusing it into the green fluorescent protein (GFP): Both N-term (*Jpk*-EGFP) and C-term tagged-*Jpk* (EGFP-*Jpk*) showed to be localized in the ER when analyzed under the fluorescence microscopy after staining the cells with ER- and MitoTracker. Since ER stress triggers the ER-stress mediated apoptosis to eliminate the damaged cells, we analyzed the expression pattern of *Jpk* under ER-stress condition. When MCF7 cells were treated with the ER-stress inducer such as DTT and EGTA, the expression of *Jpk* was upregulated at the transcriptional level like that of Grp78, a molecular chaperone well known to be overexpressed under ER-stress condition. In the presence of high concentration of ER-stress inducer (10 mM), about 70 (DTT) to 95% (EGTA) of cells died strongly expressing (10~12 fold) *Jpk*. Whereas at the low concentration (0.001~1.0 mM) of the inducer, the expression of *Jpk* was increased about 2.5 (EGTA) to 5 fold (DTT), which is rather similar to those of ER chaperone protein Grp78. These results altogether indicate that the ER-stress upregulated the expression of *Jpk* and the excess stress induces the ER-stress induced apoptosis and the concomitant expression of *Jpk*.

**Key Words:** *Jpk*, Endoplasmic reticulum (ER)-stress, Cell death

### 서 론

Endoplasmic reticulum (ER)은 단백질 합성, 변형 그리고 동시에 분비단백질의 이동통로이며 또 지질 합성과 칼슘을 저장하고 방출하는 장소이다. 특히 분비단백질이나 막단백질의 경우, 핵에서 나온 mRNA가 ER에 부착되어 있는 리보솜 (ribosome)에 의해 단백질로 해독되면서 동시에 ER 내부로 translocon을 통해 들어가거나 막단백질의 경우 ER막에 존재하게 된다. ER 내부에서는 단백질들의 modification이 일어나는데 주로 glycosylation이나 disulfide bond의 형성, 여러 subunit 단백질들의 조합, 또는 proteolytic cleavage 등을 통하여 단백질이 변형되며 궁극적으로는 적절한 구조를 갖게 하여 단백질들이 목적하는 세포소기관으로 전달되어 적절한 기능을 하도록 한다 (Kaufman, 1999).

그러나 ER이 여러 종류의 세포내·외적 자극 (intracellular 혹은 extracellular stimuli)을 받게 되면 stress를 받게 되는데, ER은 이런 stress 상황 하에서도 생존할 수 있도록 자신을 보호하기 위한 반응, 즉 ER-stress response를 작동하게 된다 (Shen et al., 2004). Intracellular level에서의 ER-stress는 주로 lumen에서 생성된 단백질의 glycosylation이나 disulfide bond가 제대로 형성되지 않는 경우 유발되며 또 lumen에서 calcium이 고갈될 경우, 또는 Golgi로의 단백질 이동이 저해되거나 돌연변이에 의해 misfold/unfold된 단백질이 ER 내에 축적되면 stress가 유발된다 (Kadowaki et al., 2004; Schroder and Kaufman, 2005). 따라서 인위적으로 glycosylation inhibitor인 tunicamycin이나 ER-Golgi transport 저해제인 brefeldin, 혹은 disulfide bond 형성 저해제인 DTT 등을 세포에 처리하여 stress를 유도할 수도 있다.

이상의 자극에 대한 self-protective mechanism을 ER-stress response라고 하는데, 크게 3가지로 나눌 수 있다. 첫 번째 기작은 translational attenuation으로서, 전반적인 단백질의 해독을 저해시켜 misfold/unfold된 단백질들이 세포내에 축적되는 것을 막는다. 두 번째로는 ER 내부에 존재하는 chaperone 단백질들의 발현을 전사수준에서 유도하는 것인데 (Lee, 2005)

\*논문 접수: 2005년 4월 20일

수정재접수: 2005년 5월 21일

<sup>†</sup>교신저자: 김명희, (우) 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 해부학교실  
Tel: 02-2228-1647, Fax: 02-365-0700  
e-mail: mhkim1@yumc.yonsei.ac.kr

이렇게 증가된 chaperone 단백질들은 ER 내에서 단백질의 folding과 assembly를 돕게 된다. 그리고 세 번째 기작은 단백질을 분해하는 ERAD (ER-associated degradation) pathway를 활성화시켜 misfold/unfold된 단백질의 분해를 유도하여 궁극적으로 ER 내의 misfold/unfold된 단백질들을 제거한다 (Hampton, 2000; Cudna and Dickson, 2002; Kadowaki et al., 2004; Shen et al., 2004). 그러나 더 강한 stress로 인해 self-protective mechanism의 용량이 초과되면 apoptosis가 유발되고 이를 ER-stress induced apoptosis라고 한다 (Ferri and Kroemer, 2001; Oyadomari and Mori, 2004; Srinivasan et al., 2005).

Jpk (Jopock) 유전자는 생쥐 (mouse)의 형태 형성에 관여하는 Hox 유전자 (Gehring et al., 1985; Akam et al., 1989)의 발현을 조절하는 인자로 분리되었으나 (Cho et al., 1997; Kim et al., 2002) 세포 내에서 과 발현되었을 경우 prokaryotic cell (Park et al., 2002)과 eukaryotic cell (Kong et al., 2003; Kong et al., 2005) 모두에서 cell death를 유발한다. 특히 F9 embryonic teratocarcinoma cell에서는 mitochondrial transmembrane potential을 낮추고 ROS 생성을 증대시키며 Bax와 Bad의 발현을 증가시켜 궁극적으로는 apoptosis를 유도한다고 알려져 있다 (Kong et al., 2003).

Jpk 단백질은 흥미롭게도 N 말단으로 1개의 trans-membrane domain을 그리고 1개의 ER retention signal을 함유하고 있는 것으로 분석되었으므로 (Park et al., 2002), 본 연구에서는 EGFP fusion을 통해 우선 Jpk 단백질이 발현하는 세포내 소기관을 분석하고, ER-stress를 유발시킨 다음 Jpk의 발현을 분석하고자 하였다. 또 과도한 ER-stress가 apoptosis를 유발한다고 알려져 있으므로 본 연구에서는 인위적으로 ER-stress induced apoptosis를 유발시키고 이때 Jpk 발현과의 상호 연관성을 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포 배양 및 cell viability

COS7 (Monkey kidney cell line)과 MCF7 (human breast cancer cell line) 세포는 10% fetal bovine serum, 100 µg/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 5% CO<sub>2</sub> 분압조건과 37°C에서 배양하였다. ER stress 유발을 위해 MCF7 cells을 6 well plates에 6×10<sup>6</sup> cells/well로 깔아준 다음 dish상에서 90~95% 이상 채워졌을 때 serum과 antibiotics가 배제된 DMEM 배지로 갈아주어 세포들을 약 24시간 동안 굶겼다. 그리고 serum이 없는 DMEM에 dithiothreitol (DTT)과 ethylene glycol-bis (beta-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)의 농도를 0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 그리고 10 mM로 각각 달리하여 처리한 후 24시간 동안 배양한 다음 1% trypsin을 처리하여 세포를

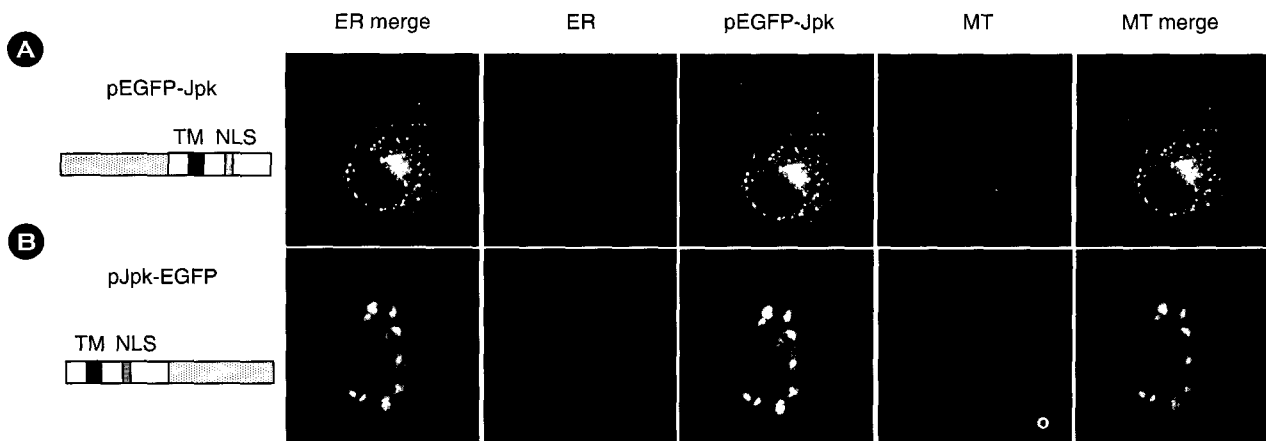
회수하였다. Cell viability는 trypan blue 염색으로 측정하였다. 회수한 세포 현탁액 100 µl에 0.4% trypan blue 100 µl를 첨가한 다음 hemocytometer로 흰색 (살아 있는) 세포와 파란색 (죽은) 세포로 나누어 세포 수를 측정하였다.

### 2. 총 RNA의 분리

총 RNA는 ZolB (TEL-TEST, Inc)를 이용하여 회사에서 제시하는 방법대로 회수하였다. 우선 회수된 세포들을 1,500 rpm으로 원심 분리하여 세포들만을 얻은 후 ZolB 500 µl를 첨가한 다음 pipet을 이용하여 잘 혼합하였다. 다시 chloroform-isoamylalcohol (49:1) 50 µl를 넣고 가볍게 위아래로 흔들어서 섞어준 다음 15분 동안 3분마다 섞어주면서 상온에 보관하였다. 15분 후 얼음에 5분 정도 보관하였다가 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 상층 액만 다른 tube로 옮기고 동량의 isopropanol을 첨가하여 혼합한 다음 -20°C에서 하루 동안 보관하였다. 다음날 12,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리하여 RNA를 침전시키고 75% ethanol로 세척한 후 건조 시켰다. 침전된 RNA는 DEPC를 처리한 증류수에 녹여 UV-spectrophotometer (Amersham Biosciences, UK)를 이용하여 정량하였다.

### 3. RT-PCR

정량된 RNA 2 µg을 PCR tube에 넣고 oligo-dT (100 pmole/µl) 1 µl와 DEPC-H<sub>2</sub>O 10 µl를 첨가한 다음 70°C에서 5분간 RNA를 변성시킨 후 4°C에서 5× reverse transcriptase buffer 5 µl, 2.5 mM dNTP 5 µl, RNase inhibitor (40 U/µl) 0.5 µl 그리고 M-MLV reverse transcriptase (200 U/µl, Promega, Madison, WI, USA) 0.5 µl를 더 첨가하여 전체 양이 25 µl가 되도록 하였다. 그리고 37°C에서 60분간 annealing하여 cDNA를 만들었다. cDNA 중 2 µl를 취하여, TOP-Taq polymerase (5 unit/µl) 0.1 µl, 10× PCR buffer 2.5 µl, 2.5 mM dNTP 2 µl, 50% glycerol 2.5 µl, DMSO 2.5 µl, forward와 reverse primer를 각각 10 pmole씩 그리고 DW로 전체 양을 25 µl가 되도록 하여 함께 섞어 준 후 thermal cycler (Perkin Elmer, Wellwley, MQ, USA)를 이용하여 PCR 반응을 시행하였다. PCR은 95°C에서 5분간 반응한 뒤 95°C에서 denaturation time을 1분, 각 primer에 맞는 annealing time을 1분, 72°C에서 extension time을 1분으로 하여 25 cycle 수행한 후 72°C에서 final extension 반응을 10분간 수행하였다. 여기서 사용된 Jpk, Grp78 그리고 β-actin primer는 다음과 같다: Jpk forward primer, 5'-CAT GGA ACG CCA AGA GGA G-3'; Jpk reverse primer, 5'-ACA AAC CCC ATC AAC TGT CC-3'; Grp78 forward primer, 5'-CTC GAA TTC CAA AGA TTC AG-3'; Grp78 reverse primer, 5'-TAC CAA GTG TAA GGG GAC AC-3'; β-actin forward primer, 5'-CAT GTT TGA GAC CTT CAA CAC-3'; β-actin reverse primer, 5'-GCC



**Fig. 1.** Subcellular localization of the EGFP tagged-Jpk. COS7 (monkey) cells were transiently transfected with each plasmid pEGFP-Jpk (A) and pJpk-EGFP (B), and cultured for 20 hours. The cells were treated with 50 nM MitoTracker and 200 nM ER-Tracker to stain mitochondria and endoplasmic reticulum, respectively. The photographs were taken under the fluorescence microscope. The transmembrane domain (TM) and a putative nuclear localization signal (NLS) were indicated along the plasmid construct, and the EGFP was indicated as a dot box.

ATC TCC TGC TCG AAG TCT-3'.

#### 4. 유전자 발현 양상 분석

PCR 반응물은 각각 1.7% agarose gel에서 120 V로 전기영동하여 분리한 다음 Dolphin Gel Doc (Weltec. Co., GA, USA)을 이용하여 상대적인 양을 비교 분석 하였다. PCR 반응물 band를 확인하고 TINA 2.0 (Raytest, Strubenhart, Germany) program을 이용하여 band의 density를 측정 한 다음  $\beta$ -actin band 값으로 보정하였다.

#### 5. 형광현미경 관찰

Jpk의 세포내 발현위치를 확인하기 위하여 Jpk를 GFP에 융합하여 발현하였다. Jpk 유전자를 포함하는 *EcoRI* fragment를 C171 (Cho et al., 1997)로부터 얻어 pGEM-7zf의 *EcoRI* site에 클론하여 pGEM-Jpk를 얻었다. 다시 pGEM-Jpk로부터 *Sall*과 *KpnI*을 처리하여 얻은 Jpk fragment를 pEGFP-N1의 *XhoI*과 *KpnI* site에 삽입하여 pJpk-EGFP를 만들었으며 C-말단에 fusion된 pEGFP-Jpk는 Kim 등의 것을 사용하였다 (Kim et al., 2002). 각각의 plasmid는 0.5% gelatin이 coating된 glass slide에 붙어 있는 상태의 COS7 세포에 lipofectamine을 이용하여 transfection 시켰다. 20시간 배양 후 ER tracker (Molecular Probe, Inc) 200 nM와 Mito tracker (Molecular Probe, Inc) 50 nM를 이용하여 염색한 다음 형광현미경 (Olympus Co.)을 이용하여 관찰하였고 MetaMorph Image Program으로 분석하였다.

## 결 과

### 1. Subcellular localization of Jpk

Jpk 단백질의 세포내 위치를 수월하게 분석하기 위하여 enhanced green fluorescent protein (EGFP)에 융합되어 발현하도록 제작하였다. GFP 단백질의 N-말단과 C-말단에 각각 융합되도록 제작된 플라스미드 pJpk-EGFP와 pEGFP-Jpk를 COS7 세포에 주입하고 20시간 동안 발현 시킨 다음 초록색 형광을 띤 단백질의 위치를 형광현미경을 이용하여 추적하였다. 이때 소포체와 미토콘드리아를 특이적으로 염색하는 시약인 ER-tracker와 Mito-tracker를 처리하여 함께 분석하였다. Fig. 1에서와 같이 EGFP의 N-말단과 C-말단에 융합된 Jpk는 모두 다 ER에 위치하는 것으로 관찰되었다. 또 Jpk의 경우 N-terminal half에 1개의 transmembrane domain을 갖고 있는 단백질로 분석되었으므로 (Park et al., 2002) ER의 lumen 보다는 membrane에 위치할 것으로 유추된다. 그러나 흥미롭게도 EGFP-Jpk와 Jpk-EGFP는 발현 양상에서 약간의 다른 점이 관찰되었다. EGFP의 N-말단에 융합된 Jpk (Jpk-EGFP)의 경우 EGFP-Jpk의 경우와는 달리 매우 큰 vesicle에 축적되어 있는 양상으로 관찰되었다 (Fig. 1B).

### 2. Effect of DTT on Jpk expression

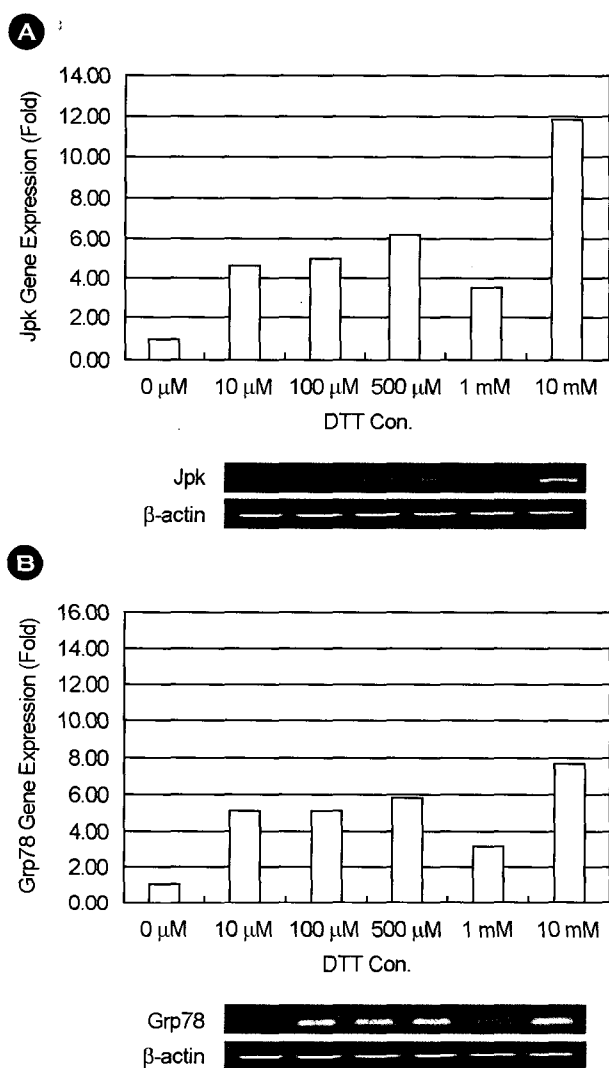
Jpk가 세포 내의 ER에 존재하고 있는 것으로 나타났으므로 본 연구에서는 ER stress 유발시 Jpk의 발현을 보고자 하였다. 세포에 DTT를 처리하여 ER stress 유발한 다음 Jpk의 발현 양상을 분석하였다. DTT는 ER 내에서 합성 중인 단백질의 disulfide bond 형성을 저해함으로써 단백질의 folding을

방해하고 궁극적으로 ER 내에 이런 misfold된 단백질을 축적시킴으로서 ER stress를 유발한다고 알려져 있다. 본 실험에서는 사람의 유방암 세포의 일종인 MCF7 cell line을 이용하여 DTT를 여러 농도 (0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0, 10 mM)로 처리하고 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 전체 RNA를 분리하였으며 RT-PCR을 통하여 Jpk의 발현 양상을 분석하였다. DTT의 처리와 함께 Jpk의 발현이 증가 하였으며 매우 적은 농도 (0.01 mM)에서도 Jpk의 발현이 약 5배 정도 up regulation됨을 알 수 있었다. 고농도 (10 mM)의 DTT 존재 하에서는 DTT가 없는 control에 비해 약 12배 정도 Jpk의 발현이 증가하였다 (Fig. 2A). 이런 DTT 농도에 따른 발현 증가

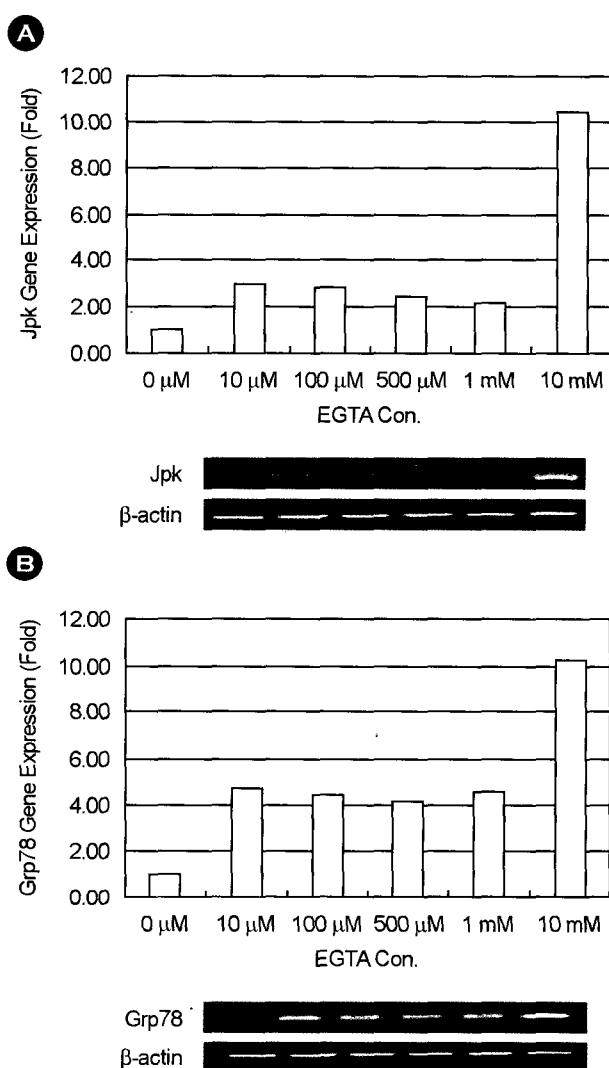
양상은 control로 사용한 ER chaperone 단백질 중 하나인 Grp78/Bip의 발현 양상과 유사하였다. Grp78 역시 0.01 mM 농도에서는 약 5배 정도의 증가가 관찰되었고 고농도에서는 약 8배 정도의 발현 증가가 관찰되었다 (Fig. 2B).

### 3. Effect of EGTA on Jpk expression

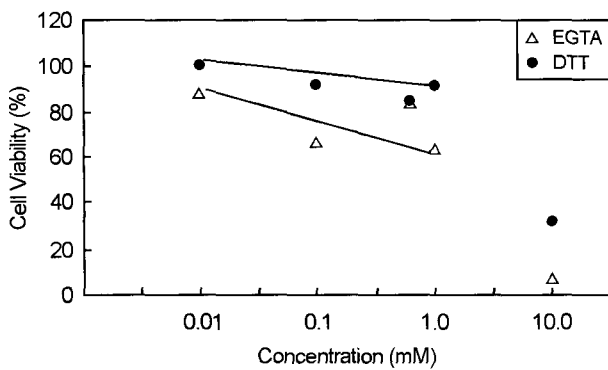
위의 실험에서 Jpk가 ER에 존재하고 ER chaperone 단백질 중 하나인 Grp78과 유사하게 ER stress시 발현이 증가되는 것을 알았으므로 이번엔 calcium chelator를 이용하여 Jpk의 발현을 분석하였다. ER은 calcium의 저장고로 알려져 있으므로 calcium의 결핍을 유도하는 시약으로 알려진 EGTA를 세



**Fig. 2.** Effect of DTT on Jpk expression. MCF7 cells were treated with serum-free DMEM containing different concentrations (0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 and 10 mM) of DTT for 24h. RT-PCR was performed with total RNA isolated from each sample. The relative expression level of Jpk (A) and control Grp78 (B) were shown after normalizing the intensity of the PCR band with that of  $\beta$ -actin.



**Fig. 3.** Effect of EGTA on Jpk expression. MCF7 cells were treated with serum-free DMEM containing different concentrations (0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 and 10 mM) of EGTA for 24h. RT-PCR was performed with total RNA isolated from each sample. The relative expression level of Jpk (A) and control Grp78 (B) were shown after normalizing the intensity of the PCR band with that of  $\beta$ -actin.



**Fig. 4.** Effect of DTT and EGTA on cell viability. MCF7 cells were treated with serum-free DMEM containing different concentrations (0, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 and 10 mM) of EGTA or DTT for 24 h, and then the cell viability was measured with trypan blue exclusion analysis.

포에 처리하여 Jpk의 발현 증감을 분석하였다. 본 실험에서는 DTT처리하는 방식과 같은 방법으로 수행하였다. MCF7 세포를 EGTA가 농도별로 첨가된 배지에서 24시간 동안 배양한 다음 총 RNA를 분리하였고 RT-PCR 방법으로 Jpk의 발현 양상을 분석한 결과 DTT 처리시와 마찬가지로 매우 적은 농도 (0.01 mM)의 EGTA 존재하에서도 Jpk의 발현이 증가하였으며 고농도 (10 mM)에서는 그 발현이 현격히 증가하였다 (Fig. 3A). 그리고 이런 발현 양상은 Grp78의 경우도 매우 유사한 것으로 확인되었다 (Fig. 3B).

#### 4. Cell viability

DTT와 EGTA가 세포의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 본 실험에 사용한 농도에서 재료 및 방법에서와 같은 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. Fig. 4에서와 같이 DTT의 경우 1 mM까지는 거의 90% 이상의 생존율을 보였으나 고농도인 10 mM에서는 약 30%의 세포만 생존하였다. 이에 반해 EGTA의 경우 좀 더 낮은 생존율을 나타내었는데 EGTA 농도에 따라 비례하여 생존율이 저하되었으며 1 mM에서는 약 65%만 생존하였고, 고농도인 10 mM에서는 거의 대부분의 세포에서 사멸이 관찰되었다.

## 고 찰

ER은 핵에서 나온 mRNA를 단백질로 번역시켜 그 단백질이 적절한 위치에서 적절한 기능을 할 수 있도록 변형시키는 기능을 갖고 있으며 또 smooth ER은 calcium의 저장고로서 세포 내의 calcium 항상성 유지에 관여한다고 알려져 있다. 이런 기능을 하는 ER에 인위적으로 자극을 가하며 세포들은 이런 stress 상태 하에서도 살아남기 위해 ER stress response라고 불리는 스스로를 보호하는 기구를 활성화 시킨

다. ER stress response에는 3개의 다른 메커니즘이 있는데, translational attenuation과 ER-resident chaperones 유전자의 전사 활성화 그리고 ER-associated degradation (ERAD)을 통한 단백질 분해가 그것이다. 그러나 stress가 너무 강하면 세포들은 이를 견디지 못하고 자신을 스스로 파괴시키기 위해 CHOP, caspase-12, Bax/Bak, IRE1, MAP kinase cascades같은 단백질을 이용하여 세포사멸 (apoptosis)을 유도한다 (Kadowaki et al., 2004; Oyadomari and Mori, 2004).

이 전 실험에서 Jpk 단백질이 과 발현되었을 경우 apoptosis가 유도되었으므로 (Kong et al., 2003, 2005) 본 실험에서는 세포에 인위적으로 DTT와 EGTA를 처리하여 stress를 유발한 다음 Jpk의 발현을 관찰하였다. 저농도의 DTT와 EGTA (0.01 mM)는 세포 안에 있는 단백질의 folding을 방해하거나 calcium을 고갈시킴으로서 약한 강도의 ER stress를 유발할 것으로 생각되며, 이때 세포는 자신이 처한 환경에서 살아남기 위해 ER stress response 메커니즘을 작동시켜 Grp78과 같은 chaperon들을 활성화 시킬 것으로 예상되며 GRP78의 활성화는 ATF6와 XBP-1 등의 단백질들이 ERSE (ER stress response element) 또는 UPRE (unfolded protein response element)에 특정 transcription factor들과 함께 결합하여 ER stress 적응에 필요한 chaperon 단백질들의 전사를 촉진시킬 것으로 예상된다 (Lee, 2005). 실험 결과에서 볼 수 있듯이 약한 농도 (0.01 mM)의 DTT나 EGTA를 처리했을 때 Grp78의 발현이 RNA 수준에서 대조군에 대해 약 5배 정도 증가하였으며 흥미롭게도 Jpk의 발현 양상이 Grp78과 매우 유사하게 나타났다. 이는 Jpk의 promoter부분에 ERSE가 있기 때문에 GRP78의 활성화에 의해 핵으로 이동한 ATF6나 XBP-1에 의해 Jpk의 전사가 증가되었기 때문으로 생각된다 (Gao et al., 2004). DTT와 EGTA의 농도를 1 mM까지 증가시켜도 GRP78의 RNA level은 저농도 (0.01 mM)일 때와 거의 차이가 없는 것으로 관찰되었으므로 1 mM까지는 아직도 세포가 cell survival을 위하여 chaperone의 발현을 증가시킨 것으로 생각된다.

그러나 고농도 (10 mM)로 DTT와 EGTA를 처리한 경우 cell viability가 급속히 저하되었으며 EGTA의 경우는 거의 모든 세포들이 사멸하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 고농도의 자극에 의해 ER-stress induced apoptosis가 유발된 것으로 유추된다 (Fig. 4). 또한 RNA 수준에서 GRP78의 발현이 7배 (DTT 10mM 처리 했을 때)에서 10배 (EGTA 10 mM 처리했을 때)까지 차이 난 것으로 보아 많은 GRP78이 활성을 갖으면서 ATF6나 XBP1을 활성화 시켜 GRP78의 발현을 전사수준에서의 증가시킨 것으로 여겨진다 (Fig. 2 and 3). Jpk의 경우에도 DTT를 처리한 경우 약 12배가 증가하였으며 EGTA를 처리한 경우에는 약 10.5배 증가한 것을 볼 수 있었다. 이것 역시 GRP78과 매우 유사한 발현 양상을 보이지만

DTT의 경우 낮은 농도로 처리된 세포에서의 Jpk 발현 증가가 GRP78의 발현 증가율과 비슷하였지만 고농도에서는 Jpk의 발현이 GRP78에 비하여 더 많이 증가하였다.

이상의 결과는 어느 정도까지의 ER stress에 대한 기능은 Jpk와 GRP78 모두 유사하게 작용하면서도 고도의 stress시 죽음을 선택할 때에는 GRP78과는 다른 기능으로 세포죽음을 유도할 수도 있다는 가능성을 제시한다. 이전 실험에 의하면 Jpk를 bacterial cells과 mammalian cells에서 과 발현시켰을 때 세포사멸을 유도한 것으로 미루어 볼 때 약한 자극에서 Jpk는 세포를 보호하기 위하여 GRP78과 유사하게 발현하지만 강한 자극에서는 발현 양을 증가시켜 세포를 사멸하도록 유도했을 수도 있다. 더욱이 EGTA를 처리했을 때 Jpk의 RNA 수준에서의 발현은 GRP78에 비하여 적은 양이 발현하다가 세포사멸이 유도될 정도의 고농도의 EGTA를 처리한 경우에 적은 농도에서의 발현 때에 비하여 발현 증가 폭이 GRP78에 비하여 상당히 넓은 것을 볼 수 있다. 이런 결과는 Jpk의 기능이 GRP78과 유사한 기능을 하기 보다는 오히려 CHOP처럼 세포가 사멸을 선택하는데 관여되는 단백질일 수도 있다는 점을 제시한다 (Kadowaki et al., 2004).

세포가 적응할 수 있는 한계를 넘어서는 stress를 받으면 세포는 스스로 사멸을 유도하는데, CHOP는 스트레스를 받지 않았을 때 낮게 발현 되다가 스트레스를 받으면 전사 과정에서 과 발현되고 cell-cycle arrest와 세포사멸을 유도한다고 알려져 있다. CHOP은 Bcl-2 유전자의 발현을 억제시키며, 세포내 glutathione의 양을 감소시킴으로써 reactive oxygen species (ROS)를 유발시키는 것으로 보고 되었는데, Jpk 역시 과 발현시 세포내 ROS의 증가를 초래하여 apoptosis가 유도되었다 (Kong et al, 2003, 2005). 또 Jpk에 의해 Bcl-2 family에 속하는 Bax와 Bad의 발현이 증가된 반면 (Kong et al, 2003) Grp78이나 CHOP의 발현 증가는 관찰되지 않았다 (data not shown). 세포내 pro-apoptotic 그리고 anti-apoptotic한 Bcl-2 family간 상대적인 양이 apoptosis를 결정한다고도 보고되어 있으므로 Jpk에 의한 pro-apoptotic gene 즉, Bax와 Bad의 증가가 cell death를 유도했을 것으로 본다. 반면 anti-apoptotic한 Bcl-2 및 Bcl-XL의 발현에는 별 차이가 없는 것으로 미루어 stress-induced cell death에는 CHOP-mediated cell death와는 다른 Jpk-mediated cell death pathway가 있을 가능성을 제시한다.

#### 감사의 글

본 연구는 2004년도 학술진흥재단의 기초과학 연구지원사업 연구비 (KRF-2004-015-E00012)의 지원에 의해 이루어졌으며 김혜선, 박성도 학생은 BK21 장학금 수혜자로 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- Akam M. Hox and HOM: homologous gene clusters in invertebrates and vertebrates. *Cell* 1989. 57: 347-349.
- Cho MS, Shin C, Min W, Kim MH. Rapid analysis for the isolation of novel genes encoding putative effectors to the position-specific regulatory element of murine *Hoxa-7*. *Mol Cells*. 1997. 2: 220-225.
- Cudna RE, Dickson AJ. Endoplasmic reticulum signaling as a determinant of recombinant protein expression. *Biotechnol Bioeng*. 2003. 81: 56-65.
- Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol*. 2001. 3: 255-263.
- Gao Y, Feng HC, Walder K, Bolton K, Sunderland T, Bishara N, Quick M, Kantham L, Collier GR. Regulation of the selenoprotein SelS by glucose deprivation and endoplasmic reticulum stress -SelS is a novel glucose-regulated protein. *FEBS Letters*. 2004. 563: 185-190.
- Gehring WJ. The homeobox: a key to the understanding of development? *Cell* 1985. 40: 3-5.
- Hampton RY. ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr Biol*. 2000. 10: R518-521.
- Kadowaki H, Nishitoh H, Ichijo H. Survival and apoptosis signals in ER stress: the role of protein kinases. *J Chem Neuroanat*. 2004. 28: 93-100.
- Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*. 1999. 13: 1211-1233.
- Kim H, Park S, Park HW, Kim MH. Isolation and characterization of novel gene, jpk from murine embryonic matchmaker cDNA library. *Korean J Genet*. 2002. 24: 197-203.
- Kong KA, Kim HS, Park HW, Kim MH. Membraneous localization of Jpk is not essential to exert cytotoxicity in F9 teratocarcinoma cells. *J Exp Zool*. 2005. 303A: 422-429.
- Kong KA, Park SD, Park HW, Kim MH. A novel gene, Jpk, induces apoptosis in F9 murine teratocarcinoma cell through ROS generation. *Ann N Y Acad Sci*. 2003. 1010: 4333-4336.
- Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods*. 2005. 35: 373-381.
- Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004. 11: 381-389.
- Park SD, Park HW, Kim MH. A novel factor associating with the upstream regulatory element of murine *Hoxa-7* induces bac-

- terial cell death. *Mol Bio Rep.* 2002. 29: 363-368.
- Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 2005. 569: 29-63.
- Shen X, Zhang K, Kaufman RJ. The unfolded protein response-a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat.* 2004. 28: 79-92.
- Srinivasan S, Ohsugi M, Liu Z, Fatrai S, Bernal-Mizrachi E, Permutt MA. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3{beta} in mouse insulinoma cells. *Diabetes.* 2005. 54: 968-975.
-