

흰쥐 말초 림프구의 분자량 22 kDa 인산화 단백질의 특성

아주대학교 의과대학 약리학교실 및 *연세대학교 의과대학 약리학교실

주 일 로 · 권 혁 춘 · 안 영 수*

The Characteristics of 22 kDa Phosphoprotein Obtained from Rat Peripheral Blood Lymphocytes

Ilo Jou, Hyeckchoon Kwon and Youngsoo Ahn*

Department of Pharmacology, Ajou University, School of Meicine, Suwon, Korea

*Department of Pharmacology, School of Medicine, Yonsei University, Seoul, Korea

Lymphocytes were found to possess all of the enzymatic machinery needed to phosphorylate and dephosphorylate proteins. At least four groups of protein kinases participate in T cell activation and interact with each other in a complex and as yet unknown manner. Increased phosphorylation in lymphocytes following stimulation with mitogens or interleukin-2, and the pivotal role of protein kinase C(PKC) in the initial biochemical reaction have been reported. But the exact role of PKC in T cell activation and the substrate of PKC are not well known.

This study was attempted to clarify the characteristics of 22 KDa phosphoprotein obtained from rat peripheral blood lymphocytes(rPBL) stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA), using various kinase inhibitors as well as kinase activators. The lymphocytes were incubated with ^{32}P orthophosphate before PMA stimulation. The migration pattern of the phosphorylated proteins of PMA-treated rPBL in the two dimensional electrophoretic fields were analyzed after autoradiography. And the phosphorylation sites of 22 kDa protein were analyzed by high performance liquid chromatography(HPLC) and scintillation counting.

The results are as follows:

- 1) Increased phosphorylation of 22 kDa protein was observed with PMA.
- 2) Forskolin, an activator of adenylyl cyclase, causes no significant change of phosphorylation of 22 kDa.
- 3) A 23187, a Ca^{2+} ionophore, has no noticed effect on the phosphorylation of 22 kDa protein.
- 4) Staurosporine, a potent PKC inhibitor, showed inhibitory action on PMA-stimulated phosphorylation of 22 kDa.
- 5) Calphostin C, specific PKC inhibitor inhibited the PMA-stimulated phosphorylation of 22 kDa.
- 6) Among tryptic peptide fractions of 22 kDa by HPLC, one ^{32}P phosphopeptide peak was observed at about 20% acetonitrile.

From the above results, it could be suggested that the 22 kDa phosphoprotein of rat peripheral blood lymphocytes would be a substrate of PKC, and has one phosphorylation on serine residue.

Key Words: T-lymphocyte, Phosphoprotein, Protein kinase C(PKC)

*본 연구는 1993학년도 아주대학교 정착연구비 지원에 의해 수행된 것임.

저자연락처: 주일로, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 아주대학교병원 약리학교실, Tel (0331) 219-5061

서 론

단백의 인산화는 진핵세포에서 세포기능을 조절하는 중요한 반응의 하나이다¹. 이러한 단백질의 인산화는 10여가지에 달하는 protein kinase에 의해 매개되며² 이중 상당수는 세포 외부로부터 전달된 자극에 대한 세포내 반응을 매개하는 중요한 역할을 한다. 일부 성장인자는 수용체의 한부분이 protein kinase 활성을 가짐으로써 단백질이 성장인자에 의해 직접 인산화되기도 하나 대개의 경우 제2전령체를 매개로 하여 또는 단계적 인산화 반응에 의해 단백질이 인산화됨으로써 활성화된다³.

단백의 인산화반응은 protein kinase와 phosphoprotein phosphatase에 의해 조절되는 가역적 반응이며 kinase와 phosphatase의 반응은 인산기의 공여자인 adenosine triphosphate(ATP)로부터 γ -phosphoryl 분자를 단백질 내 인산수용기를 가진 특정 아미노산에 결합시키거나 이와 역의 반응이므로 매우 빠른 생물학적 반응이다. 이러한 인산화, 탈인산화의 반응은 세포 내에서 서로 수평적 및 수직적인 상호 연관관계(crosstalk)를 이루므로 한 신호변환체계에 의해 유입된 정보는 다른 신호변환체계에 의해 그 정보가 양적, 질적인 변형을 가져오므로 다양한 생체반응을 나타내게 된다. 특히 glycogen대사, 유전인자의 전사조절이나 세포주기의 조절 등에서 보이는 바와 같이 세포 밖으로부터 전달된 정보는 단계적 인산화 반응에 의해 증폭되어 많은 세포 기능을 담당하게 된다.

림프구는 단백질의 인산화/탈인산화에 필요한 효소계를 모두 가지고 있으며⁴⁻⁶, T 림프구의 활성화에는 적어도 4종류 이상의 protein kinase 즉, Ca^{2+} /phospholipid-dependent protein kinase(PKC), cAMP-dependent protein kinase(PKA), protein-tyrosine kinase(TPK)와 Ca^{2+} /CaM-dependent kinase(CaM kinase)가 참여하며 이들이 서로 복합적으로 연계되어 반응을 유발한다고 하나 그 자세한 반응기구는 알려져 있지 않다.

T 림프구를 분열유발물질이나 interleukin-2등으로 자극하면 인산화가 증가하며^{7,8}, 이의 초기 생화학적 반응은 주로 phospholipase C(PLC)의 매개에 의한 세포막 인지질(phosphoinositides)의 가수분해로 생성된 diacylglycerol(DAG)과 inositol 1,4,5-trisphosphate(IP₃)에 의해 매개됨이 알려져 있다³. 특히 림프구의 G₁ stage돌입에 따른 세포내 초기 변화, 즉 PKC 활성화에 따른 보고가 활발하며⁹, 이 효소가 세포분열의 초기 단계에서 조절물질로 중요하게 작용한다는 것이 밝혀졌다. phorbol 12-myris-

tate 13-acetate(PMA)는 PKC의 내인성 활성물질인 DAG와 구조적으로 매우 유사한 PKC 활성제로 본인이 시행했던 실험¹⁰에 의하면 PMA에 의하여 인산화의 변동을 보이는 단백질은 몇개의 군으로 나눌 수 있는데 그중 특히 반응 초기에 강한 인산화증가를 보이면서 10분 이상 지속적인 인산화를 보이는 인산화 단백질은 kinase 억제제인 W-7이나 H-7 처치에 의하여 인산화 양상의 변동이 적었다. 이 단백질은 12% polyacrylamide gel에서의 이동거리로 보아 그 분자량이 대략 22 kDa로 추정되었으며 non-equilibrium pH gradient electrophoresis(NEPHGE)상 그 등전점이 대략 5.4로 추정되어 이후 22/5.4로 약하기로 한다.

본 실험에서는 림프구의 G₁ stage 돌입에 따른 림프구에서의 초기 신호변환단계에 대하여 알아보하고자 이때 주요 조절물질로 작용하는 PKC의 기질단백의 가능성을 가지는 22/5.4 단백질의 인산화 기전 및 인산화부위등을 추정하였다.

재료 및 방법

1. 림프구 분리

200 g 안팎의 숫컷 흰쥐(Sprague-Dawley)의 복대동맥으로부터 전혈을 채취하여 Histopaque(Sigma, St. Louis, MO) 위에 상층을 만든 후 원심분리하여 림프구를 얻는다. 얻은 림프구를 nylon wool(Robbins Scineific, Sunnyvale, CA) column을 통과시켜 T 림프구만을 분리하여 사용한다.

2. 림프구 단백질의 인산화

1에서 얻은 림프구 pellet을 2×10^7 cells/ml이 되도록 phosphate free media(Gibco, Chagrin Falls, OH)로 세포부유액을 만든 후 0.2 mCi/ml의 carrier free orthophosphate(³²P, Amersham, Buckinghamshire, England)를 가한 다음 37°C에서 3시간 배양하여 세포 내 ATP pool을 표지시켰다. 그후에 PMA를 가하여 단백질의 인산화의 변동을 관찰하였다. 즉 Eppendorf tube에 980 μ l의 ³²P로 표지된 세포를 넣은 후 PMA 100 ng/ml로 10분간 자극 후 원심분리하여 상층액을 제거하고 lysis buffer(9M urea, 2% ampholyte, 5% 2-mercaptoethanol, 2% nonidet P-40)를 가하여 세포를 파괴하고 균질화시켰다. 그후 Bradford¹¹의 방법을 이용하여 단백질량을 측정하였다.

3. 전기영동 및 인산화 단백질의 확인실험

Lysis buffer로 용액화시킨 단백질 시료를 O'Farrell¹²

의 방법에 의한 non-equilibrium pH gradient gel electrophoresis(NEPHGE)와 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)의 이차원 전기영동을 시행하였다. 분리된 단백질의 등전점 추정을 위해서는 2-dimensional gel electrophoresis marker(Bio-Rad, Richmond, CA)를 이용하였다. 완성된 전기영동 gel을 -70°C에 X-ray film(Kodak XAR-2, Rochester, NY)에 감광시켜 자가방사법(autoradiography)을 이용하여 ³²P가 결합된 인산화 단백질을 관찰하였다.

4. Protein kinase활성 및 억제에 따른 인산화 변동 실험

Adenylyl cyclase 활성제인 forskolin(Calbiochem, La Jolla, CA)과 칼슘 ionophore인 A23187(Calbiochem, La Jolla, CA)을 림프구 분획에 각각 10⁻⁶ M, 10⁻⁵ M이 되도록 가해 10분간 반응시킨 후 인산화의 변동을 살펴 보았다. 같은 방법으로 PKC 억제제인 staurosporine(Sigma, St. Louis, MO)을 20 nM, 40 nM, 100 nM과 calphostin C(Calbiochem, La Jolla, CA) 10⁻⁶ M, 10⁻⁵M을 림프구 분획에 가해 10분간 반응시킨 후 PMA 100 ng/ml로 10분간 자극 후 인산화의 변동을 보았다.

5. 인산화자리의 추정 실험

이차원 전기영동후 gel 상에서 원하는 단백질 분획을 잘라낸 후 10% methanol로 세척 후 동결건조하였다. 여기에 trypsin 50 mg/ml을 함유한 50 mM의 ammonium bicarbonate(pH 7.4) 용액을 tube당 1 ml씩 넣고 37°C에서 overnight incubation후 상층액을 떠서 다른 siliconized tube에 옮긴 후 동결 건조하였다. 이 sample을 0.1% trifluoroacetic acid(TFA, Sigma, St. Louis, MO)를 함유한 증류수로 녹인 후 0.1% TFA를 함유한 acetonitrile(Burdick & Jackson, Muskegin, MI) 0~50% gradient(flow rate 0.7 ml/분)로 230 nm에서 reverse phase C18 column (Verspack, Altech, Deerfield, IL)을 사용하여 HPLC (Spectra-Physics, Fremont, CA)로 분석하였다¹³. HPLC로 분리된 분획을 fraction collector(Bio-Rad, Richmond, USA)로 30초 간격으로 분획을 채취한 후 scintillation counter(Pharmacia, Uppsala, Sweden)로 각 분획의 방사능을 측정하였다.

6. 인산화 아미노산 분석

이차원 전기영동 후 gel상에서 해당 인산화 단백질을 잘라내어 6 N 염산으로 산분해(110°C, 2시간)후 pyridine-acetic acid(pH: 3.5) 완충용액으로 cellulose plate(Sigma, St. Louis, MO)상에서 전기영동(1000V, 45분) 후

0.1% ninhydrin을 산포하여 인산화 아미노산의 전개 상태를 관찰하였다.

결 과

1. 이차원 전기영동 상에서의 림프구 단백질의 분획상 및 인산화 양상

림프구분획(2×10⁷ cells/ml)을 이차원 전기영동하여 얻은 단백질분획을 Coomassie brilliant blue로 염색하여 탈색시킨 gel 상에서는 주로 분자량 31 kDa-100 kDa 사이에 많은 단백질 분획이 나타났으며 대부분이 등전점 5와 7사이에 위치하였다(Fig. 1A). 방사성 동위원소 ³²P로 표지시킨 림프구 분획을 이차원 전기영동하여 얻은 단백질 분획을 자가방사 기록법을 이용하여 X-ray film에 감광시킨 결과 Coomassie brilliant blue 염색으로 확인되었던 단백질 분획과는 다른 양상을 보였다. 분자량 22 kDa의 단백질은 gel상에서 소량의 단백질로 나타났으나 자가 방사상에서도 미약한 인산화를 보였다(Fig. 1A & 1B).

2. PMA 자극에 의한 인산화의 변동

림프구분획을 PMA 100 ng/ml로 10분간 자극 반응 후 이를 이차원 전기영동하여 자가방사기록 사진 상에서 보면 대조군에서 희미하게 나타났던 22 kDa 인산화 단백질은 PMA자극에 의해 현저한 인산화의 증가를 나타내었다(Fig. 2A & 2B).

3. Protein kinase 활성화에 의한 22 kDa단백의 인산화 변동

³²P로 표지시킨 림프구 배양액에 protein kinase를 활성화 시키는 adenylyl-cyclase 활성화 물질, 또는 칼슘 ionophore를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 이들이 22 kDa 단백질의 인산화에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 PMA 100 ng/ml 자극에 의해 현저한 증가를 보였던 22 kDa 단백질의 인산화는 adenylyl cyclase를 활성화시키는 forskolin 10⁻⁶ M 또는 10⁻⁵ M 처치에 의해서는 별 영향을 받지 않았다(Fig. 2C). 또한 세포내 칼슘을 증가시키는 A23187 10⁻⁶ M 또는 10⁻⁵ M 처치에 의해서도 22 kDa 단백질의 인산화는 큰 변동을 보이지 않았다(Fig. 2D).

4. Protein kinase 억제제 전처치가 PMA-유발 22 kDa 단백질의 인산화 증가에 미치는 영향

1) Staurosporine 전처치에 의한 인산화 변동 양상:

³²P로 표지시킨 림프구 배양액에 여러가지 protein

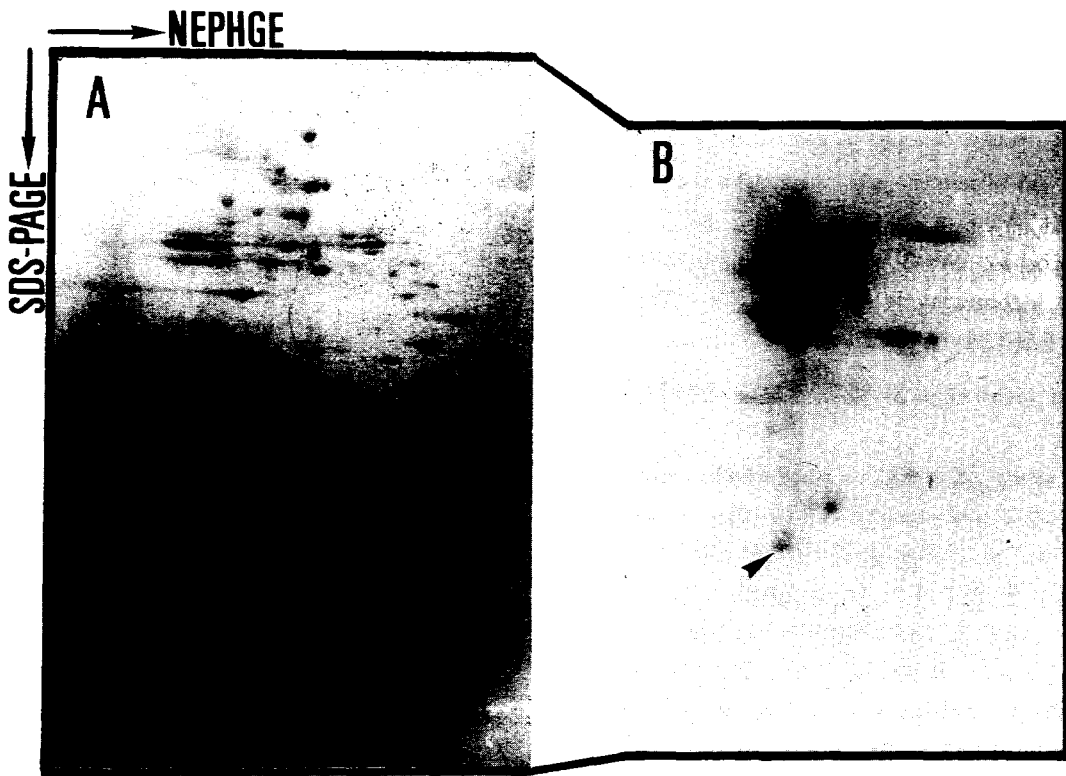


Fig. 1. 2-dimensional electrophoresis and autoradiograph of rat phosphoproteins of tained from peripheral blood lymphocytes
A: Coomassie brilliant blue stain
B: Autoradiograph of phosphoproteins
NEPHGE: non-equilibrium pH gradient electrophoresis
SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
22 kDa protein was appeared as small spot on the gel and autoradiograph.

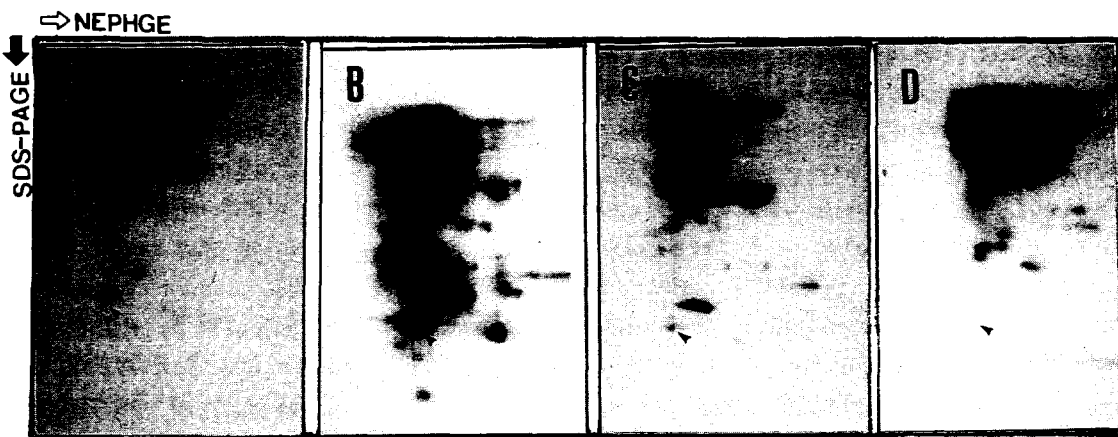


Fig. 2. The effect of PMA, forskolin and A23187 on the protein phosphorylation obtained from rat blood T-lymphocytes.
A: control
B: PMA 100 ng/ml treatment
C: forskolin treatment
D: A23187 treatment
22 kDa protein was phosphorylated by PMA, but showed no significant changes by forskolin, adenylyl cycalse activator or A23187 calcium ionophore.

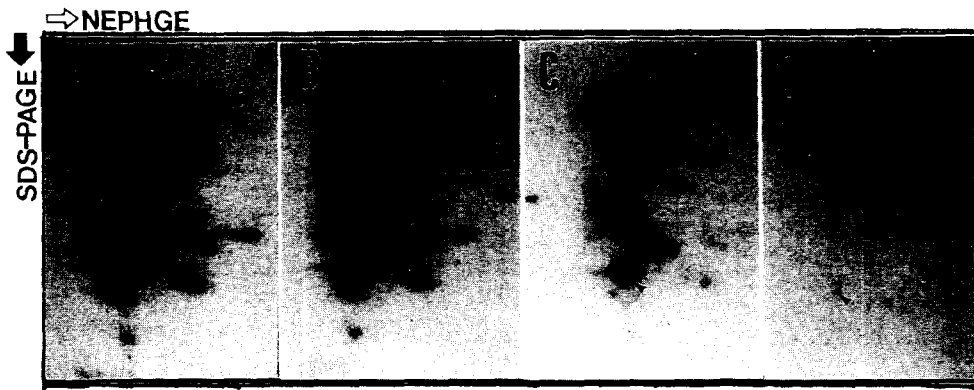


Fig. 3. The effect of staurosporine pretreatment on PMA- stimulated phosphorylation of 22 kDa protein.
 A: phosphoproteins of PMA stimulated lymphocyte
 B: staurosporine 20 nM pretreatment
 C: staurosporine 40 nM pretreatment
 D: staurosporine 100 nM pretreatment
 PMA-stimulated 22 kDa protein phosphorylation was inhibited by staurosporine pretreatment.

kinase 억제제를 전처리하여 이들이 PMA-유발 인산화 증가에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 protein kinase A와 protein kinase C 모두를 억제하는 staurosporine은 20 nM에서는 인산화의 억제 작용을 나타내지 않았으며(Fig. 3B) 40 nM에서는 전반적인 인산화 억제를 볼 수 있었으나 22 kDa 단백질은 별 영향을 받지 않았다(Fig. 3C). 그러나 staurosporine의 농도를 100 nM로 농도를 높여 투여한 경우 22 kDa 단백질의 인산화 억제를 볼 수 있었다(Fig. 3D). 즉 staurosporine 100 nM 전처리로 22 kDa의 단백질은 현저한 인산화의 억제를 나타내었다.

2) Calphostin C 전처리에 의한 인산화 변동 양상: PMA로 인한 22 kDa 단백질의 인산화 증가 현상은 새로운 PKC 억제제인 Calphostin C 10^{-5} M 전처리에 의해 특이적인 억제양상을 보였다(Fig. 4).

5. 인산화자리의 추정실험

22 kDa의 단백을 trypsin 처리 후 0.1% TFA를 함유한 0~50% acetonitrile gradient상에서 HPLC로 분리하여 fraction collector로 30초 간격으로 peptide 분획을 모은 후 scintillation counter로 각 분획의 방사능을 측정한다. 결과 PMA 자극 전에는 각 분획에서 방사능이 거의 측정되지 않았으나 PMA 자극 후에는 34~36번 분획이 높은 방사능(>200 CPM)을 나타내었으며 이때의 aceto-

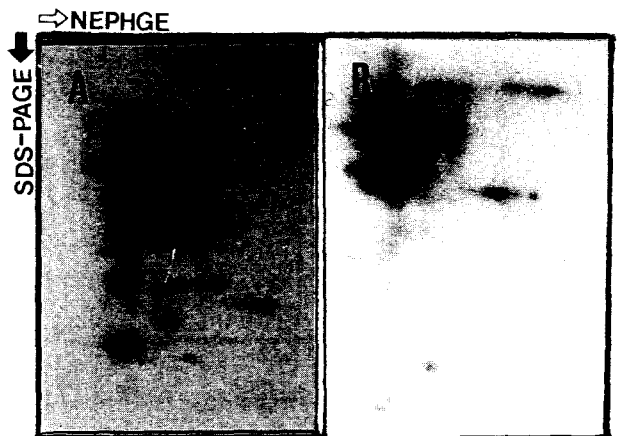


Fig. 4. The effect of calphostin C on PMA-stimulated phosphorylation of 22 kDa protein obtained from rat blood T-lymphocyte
 A: phosphoproteins of PMA-stimulated lymphocytes
 B: calphostin C 10^{-5} M+PMA 100 ng/ml treatment

nitrile은 약 20%였다(Fig. 5).

6. 인산화 아미노산 분석

이차원 전기영동 gel에서 22 kDa 단백을 잘라내어 산분해후 cellulose plate상에서 전기영동을 시행후 ninhydrin을 산포하여 발색시켜 본 결과 plate상에서는 발색

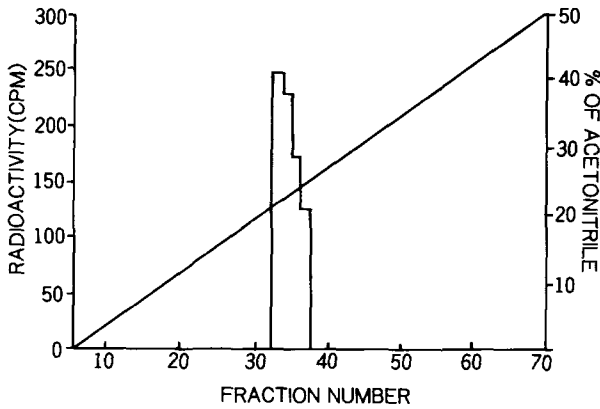


Fig. 5. Phosphorylation site determination of tryptic peptide fraction of 22 kDa protein
 22 kDa phosphoprotein was tryptic digested, then fractionated every 30 second by HPLC. High radioactivity was detected between 34th and 36th fraction.

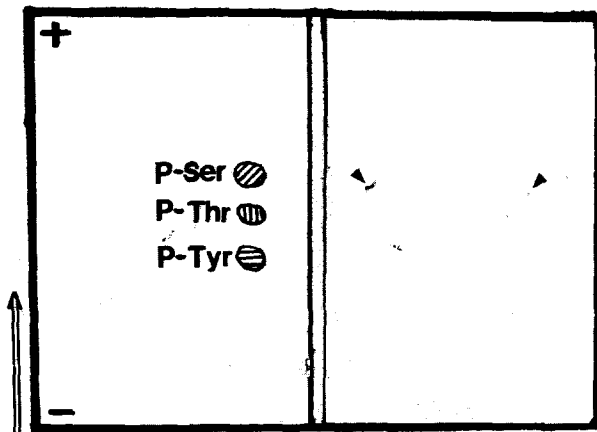


Fig. 6. Phosphoamino acid analysis of 22 kDa protein. 22 kDa protein was acid hydrolyzed and electrophoresed at pH 3.5, then, autoradiographed. Radioactivity was detected at phosphoserine residue.

반응이 거의 나타나지 않았으나 이의 자가방사 사진상에서는 인산화세린 자리에 방사상을 보였다(Fig. 6).

고 찰

대부분의 항원에 대한 면역반응에서 가장 중요한 사건은 항원 특이성을 가진 T림프구의 클론확장이다. T림프구의 클론확장은 두 단계의 과정 즉, T세포의 활성화(activation) 및 증식(proliferation)의 단계를 거친다. T세

포의 활성화단계에서는 PKC가 중요한 역할을 하며 T세포의 증식과정에는 interleukin-2(IL-2)가 필수적이며 이는 T세포의 활성화체계와는 다른 신호전달체계를 사용하는 것으로 알려져 있다^{14,15}. 즉, T세포를 항원이나 분열유발 물질로 자극하면 30초 이내의 매우 빠른 시간에 세포막의 phosphoinositide-specific phospholipase C(PLC)의 활성이 증가되어 phosphoinositide의 가수분해가 일어나 두가지의 주요한 제 2 전령체 즉, inositol-1,4,5trisphosphate(IP₃)와 1,2-diacylglycerol(DAG)이 생성된다. IP₃는 세포내 칼슘 저장소로부터 칼슘을 유리시켜 세포내 칼슘 농도를 증가시키며¹⁶ DAG는 PKC를 직접 활성화시키게 된다¹⁷. 이와 같이 세포내의 유리 칼슘의 농도와 PKC의 활성도가 T세포의 활성화 초기의 주요한 조절기전으로 작용하리라는 보고^{17,18,19}가 지배적이나 수용체의 활성화에 따른 세포막 PLC의 활성화에 대하여는 그 기전이 분명치 않다. 많은 연구자들이 수용체 활성화에 따른 PLC의 활성의 조절기전으로 다른 신호전달 체계에서 흔히 이용되는 GTP-의존성 조절단백(G 단백질)의 적용을 추구하고 보았으나 입증하지 못하였다.

강력한 종양촉진제(tumor promotor)로 알려진 phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)는 PKC를 직접 활성화시킨다^{20,21}. PMA는 PKC의 내인성 활성 물질인 DAG와 구조적으로 매우 유사하며 ligand binding study에 의하면 phorbol ester와 DAG는 PKC에서의 결합부위가 같다고 알려져 있다²². DAG가 PKC의 칼슘에 대한 친화력을 증가시키듯이 PMA 역시 PKC의 칼슘에 대한 친화력을 증가시켜 10⁻⁷ M의 칼슘 범위 내에서는 칼슘의 유입없이도 이 효소를 완전히 활성화시킨다²³.

흰쥐 말초 혈액의 22 kDa 단백질은 PMA자극으로 그 인산화가 증가되었으나 칼슘 ionophore인 A23187의 처리로 인산화의 증가를 보이지 않았다. T림프구의 증식에는 IL-2 생성이 필수적이며 PMA나 칼슘 ionophore, 둘 중 하나의 단독 처리로는 림프구 증식이 일어나지 않으며 이 둘을 동시에 투여하면 IL-2를 생성시켜 림프구의 증식을 유발한다¹⁹. 이 사실로 보아 22 kDa 인산화단백은 T림프구 수용체 활성화에 따른 신호전달 체계에 관여하는 하나의 기질단백이며 특히, PKC의 기질단백임을 배제할 수 없다. 즉 분열 유발물질이나 항 CD3 수용체 항체로 T림프구를 자극하면 세포내 칼슘 농도의 증가가 일어나나 칼슘 단독으로는 이들과 같은 효과를 일으킬 수 없으며 칼슘외에 제 2의 신호가 필요하다²⁴. [³H]-Thymidine 섭취를 이용한 림프구 증식능 측정 실험에서 본 바와 같이 PMA 100 ng/ml로 T림프구를 자극하면 대조군에 비해 림프구 증식능이 증가됨을

알 수 있다. 그러나 PMA 자극이 IL-2의 성장 촉진 효과를 대치하지는 못하므로^{14,15} 분열유발물질로 자극 시 만큼 충분한 증식능을 보이지는 못하였다. 또한 분열유발물질로 림프구를 자극하면 안정시의 100 nM의 칼슘 농도에 비해 5배 이상 칼슘의 농도가 증가하여¹⁶, 상승 효과를 나타내게 된다. 그러나 자극이 없는 상태에서는, 부가적인 신호가 없는 칼슘농도의 증가는 오히려 내성을 유발하여²⁵ T림프구가 정상적으로 림프구 활성화 신호에 반응하는 것을 방해하며 이 상태에서는 IP³의 생성이 현저히 감소한다³.

이상의 결과로 22 kDa단백이 PKC의 기질단백일 가능성을 배제할 수 없으나 이의 확인과 동시에 22 kDa 단백질의 성질을 규명하기 위하여 우선 kinase억제제인 staurosporine을 사용하였다. PKC 억제제인 staurosporine을 전처리하면 이 단백질의 PMA에 의한 인산화 증가가 용량 비례적으로 억제됨을 알 수 있었다. 그러나 staurosporine은 PKC, PKA 및 PKG에 대한 억제작용 뿐 아니라 일부 tyrosine kinase에 대해서도 억제작용을 나타내므로²⁶⁻²⁸ 이의 확인이 필요하였다. 특히 최근 알려진 바에 의하면 T림프구 활성화 후 10초 이내에 일어나며 T림프구 활성화에 따른 PLC의 활성화에 tyrosine kinase 억제제가 영향을 미친다는 보고가 있다²⁹. 따라서 staurosporine에 의한 22 kDa 단백질의 인산화 억제가 staurosporine의 PKC 억제 효과가 아니라 tyrosine kinase 억제 효과에 의한 가능성을 배제할 수 없다. 그러나 비교적 PKC에 특이적으로 작용하는 calphostin C를 처리한 결과 PMA-유발 인산화 증가를 억제함을 알 수 있었다. Calphostin C는 *Cladosporium cladosporioides*의 배양액으로부터 추출한 물질로 PKC에 대한 억제작용이 강하며(IC₅₀: 중간억제농도=0.05 mM) PKA(IC₅₀>50 mM)나 tyrosine kinase(IC₅₀>50 mM)에 대한 억제효과는 매우 약한 물질이다³⁰. 특히 calphostin C는 다른 kinase 억제제와는 달리 PKC의 촉매소단위는 억제하지 않으며 [³H]Phorbol dibutyrate 결합을 억제하므로 PKC의 DAG 결합 부위에 경쟁적으로 작용해 억제효과를 나타냄을 알 수 있다. 이상의 실험결과에서 보여주듯이 22 kDa 단백질은 PKC에 의해 인산화 되는 기질 단백질이며 PMA에 의한 림프구 활성화에서 중요한 역할을 하는 인단백임을 알 수 있었다.

다음으로 22 kDa인단백의 PKC 신호전달체계에서의 작용기작을 알아보기 위한 첫단계로 22 kDa인단백의 인산화자리를 알아보기 위한 실험을 시행하였다. 즉 tryptic phosphopeptide의 각 분획을 받아 방사능을 측정 한 결과 acetonitrile gradient 20% 전후에서 하나의 ³²P

phosphopeptide가 분리되었으며 이 분획의 인산화 아미노산 분석 결과 22 kDa 인단백의 인산화 자리는 serine임을 알 수 있었다.

PKC의 기질단백을 찾으려는 많은 연구자들의 노력으로 fibroblast에서의 PKC의 기질단백인 80 kDa인단백에 대한 보고가 많으며³¹⁻³³, 사람 말초혈액 T림프구에서는 분자량 80 kDa와 분자량 19 kDa 단백질이 내인성 기질단백으로 보고되었다³⁴⁻³⁷. 이중 80 kDa의 기질단백은 fibroblast의 80 kDa 기질단백과 동일한 생화학적 특징을 보이므로 이 두 단백질은 유사하거나 동일한 단백질로 생각되며^{31,34,37} 19 kDa의 단백질은 새로운 단백질로 생각된다.

사람의 T림프구에서의 19K 단백질³⁸과 유사한 단백질이 여러 T림프구의 암세포주에서 발견되었다. 즉, 급성 림프구성 백혈병에서의 oncoprotein 18³⁹, Jurkat 세포주에서의 pp21과 pp23단백, HL-60 세포주에서의 prosolin등⁴⁰ 인산화 상태와 발견되는 세포주에 따라 분자량과 등전점에 있어서 약간의 차이를 보이나 유사한 단백질로 생각된다.

본 실험에서 나타난 22 kDa의 단백질은 등전점 5.4의 단백질로 사람의 백혈병 T 세포주인 Jurkat에서 나타났던 pp21이나 pp23과 등전점과 PMA에 대한 인산화 양상등에 유사성을 보이며⁴¹ HL-60 세포주에서 나타났던 등전점 5.5, 분자량 17~20 kDa의 단백질과도 분자량, 등전점과 인산화 자리에서 매우 유사함을 보인다. 그러나 본 실험에서 나타난 22 kDa의 단백질이 이들 인산화 단백질과 유사하거나 동일한 단백질인가의 확인을 위해서는 좀 더 연구가 필요하겠다. 또한 T림프구의 활성화에 tyrosine kinase 역시 초기 단계에서 중요 역할을 함이 밝혀졌으므로 tyrosine kinase와 PKC가 서로 어떻게 상관관계를 가지며 이 과정에 22 kDa 단백질의 관여 여부를 밝히기 위해서는 좀더 실험이 필요하겠다.

결 론

흰쥐의 말초 혈액으로부터 얻은 T 림프구에서 PMA (100 ng/ml)로 자극시 지속적인 인산화를 보였던 분자량 22 kDa/5.4단백에 대하여 protein kinase 활성화 물질 및 억제물질의 처리로 인한 인산화 변동을 관찰하여 인산화 기전을 추구하고 이 단백질의 인산화 부위등을 검색하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 22 kDa단백은 PKC 활성화제인 PMA 처리에 의하여 인산화가 증가하였다.

2) Adenylyl cyclase 활성화제인 forskolin은 22 kDa단백

의 인산화에 아무 영향을 주지 못하였다.

3) 칼슘 ionophore인 A23187의 처리로 22 kDa단백의 인산화 증가가 나타나지 않았다.

4) 22 kDa단백의 인산화 증가는 PKC의 억제제인 staurosporine과 calphostin C 전처치에 의해 억제효과를 보였다.

5) HPLC에 의한 22 kDa 단백질의 tryptic peptide fractionation은 33~36번 분획에서 대조군에 비해 인산화가 크게 증가되었다.

6) 22 kDa단백의 인산화 아미노산 분석 결과 인산화 세린 잔기에 인산화가 일어났다.

이상의 실험 결과로 보아 흰쥐 말초 혈액 T 림프구에서 PMA처치에 의해 현저한 인산화의 증가를 보이는 분자량 22 kDa의 단백질은 protein kinase C에 의해서만 인산화되는 기질단백이라고 생각되며, 22 kDa의 tryptic peptide중 PKC에 의하여 인산화되는 부위는 한 곳을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Greengard P: Phosphorylated proteins as physiological effector protein phosphorylation may be final common pathway or many biological regulatory agents. *Science* 199: 146-152, 1990
- Hunter T: A Thousand and one Protein Kinases. *Cell* 50: 823-829, 1987
- Altman A, Coggeshall KM and Mustelin T: Molecular events mediating T cell activation. *Adv Immunol* 48: 227-360, 1990
- Johnson EM, Karn J and Alfrey UG: Early nuclear events in the induction of lymphocyte proliferation by mitogens. Effects of concanavalin A on the phosphorylation and distribution of non-histone chromatin proteins. *J Biol Chem* 249: 4990-4999, 1974
- Horenstein A, Piras MM, Mordoh J and Piras R: Protein phosphokinases activities of resting and proliferation human lymphocytes. *Exp Cell Res* 101: 260-266, 1976
- Chaplin DD, Wedner HJ and Parker CW: Protein phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes: subcellular distribution and partial characterization of adenosine 3'5'-monophosphate-dependent protein kinases. *Biochem J* 182: 525-536, 1979
- Wedner JH and Parker CW: Protein phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes stimulation by phytohemagglutinin and N6-monobutyryl cyclic AMP. *biochem Biophys Res Commun* 62: 808-821, 1975
- Chaplin DD, Wedner HJ and Parker CW: Protein phosphorylation in human peripheral blood lymphocytes: Mitogen-induced increases in protein phosphorylation in -28-intact lymphocytes. *J Immunol* 124: 2390-2398, 1980
- Nishizuka Y: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308: 693-698, 1984
- Jou I, Ko SS and Ahn YS: Phosphorylated proteins of mitogen stimulated-rat peripheral blood lymphocytes. *Kor J Pharmacol* 29: 121-130, 1993
- Badford MM: A rapid and sensitive method of the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- O'Farrell PZ, Goodman HM and O'Farrell PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cel* 12: 1133-1142, 1977
- Mahoney WC and Hermodson MA: Separation of large denatured peptides by reverse phase high performance liquid chromatography. *J Biol Chem* 255: 11199-11203, 1980
- Albert F, Hua C, Truneh A, Pierres M and Schmitt-Verhulst AM: Distinction between antigen receptor and IL2 receptor triggering events in the activation of alloreactive T cell clones with calcium ionophore and phorbol ester. *J Immunol* 134: 3649-3655, 1985
- Isakov N and Altman A: Tumor promoters in conjunction with calcium ionophores mimic antigenic stimulation by reactivation of alloantigen-primed murine T lymphocytes. *J Immunol* 135: 3674-3680, 1985
- Imboden JB and Stobo JD: Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J Exp Med* 161: 446-456, 1985
- Castagna M, Takai Y, Kakai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U and Nishizuka Y: Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinases by tumor-promoting phorbol ester. *J Biol Chem* 257: 7847-7851, 1982
- Hasegawa-Sasaki H and Sasaki T: Rapid breakdown of PtdIns accompanied by accumulation of phosphatidic acid and diacylglycerol in rat lymphocytes. *J biochem* 91: 463-468, 1982
- Truneh A, Albert F, Goldstein P and Schmitt-Verhulst AM: Early steps of lymphocyte activation bypassed by synergy between calcium ionophores and phorbol ester. *Nature(London)* 313: 318-320, 1985
- Kikkawa U, Takai Y, Tanaka Y, Miyake R and Nishizuka Y: Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 258: 11442-11445, 1983
- Nieel JE, Kuhn LJ and Vandenbark GR: Phorbol ester receptor copurifies with protein kinase C. *J Biol Chem* 80: 36-40, 1983
- Sharkey NA, Leach KL and Blumberg PM: Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 607-610, 1984
- Yamanishi: Synergistic function of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 112: 778-786, 1983
- Hesketh TR, Smith GA, Houslay MD, Warren GB and Metcalfe JC: Is an early calcium flux necessary to stimulate lymphocytes. *Nature(London)* 267: 490-494, 1977
- Jenkins MK, Pardoll DM, Mizuguchi J, Chused TM and Schwartz RH: Molecular events in the induction of non-responsive state in interleukin 2-producing helper T lymphocytes.

- phocyte clone. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5409-5413, 1987
26. Tamaoki T, Nomoto H, Takahashi I, Kato Y, Morimoto M and Tomita F: Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{2+} dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 135: 397-402, 1986
 27. Nakano H, Kobayashi E, Takashi I, Tamaoki T, Kuzun Y and Iba H: Staurosporine inhibits tyrosine-specific protein kinase activity of Rous sarcoma virus transforming protein p60. *J Antibiot* 40: 706-708, 1987
 28. Fujita-Yamaguchi Y and Kathuria S: characterization of receptor tyrosine-specific protein kinases by the use of inhibitors. Staurosporine is a 100-times more potent inhibitor of insulin receptor than IGF-1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 955-962, 1988
 29. Abraham RT, Karmitz LM, Seicrist JP and Leibson PJ: Signal transduction through the T-cell antigen receptor. *Trans Biol Chem* 17: 434-438, 1992
 30. Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M and Tamaoki T: New protein kinase C inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 159: 548-556, 1989
 31. Blackshear PJ, Wen L, Glynn BP and Witters LA: Protein kinase C stimulated phosphorylation in vitro of a Mr. 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factors in intact fibroblasts. Distinction from protein kinase C in brain. *J Biol Chem* 261: 1459-1472, 1986
 32. Rozengurt E, Rodriguez-Pena M and Smith KA: Phorbol esters, phospholipase C and growth factors rapidly stimulated the phosphorylation of a Mr. 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 7244-7263, 1983
 33. Rodriguez-Pena A and Rozengurt E: Phosphorylation of an acidic mol. wt. 80,000 cellular protein in a cell free system and intact Swiss 3T3 cells: a specific marker for protein kinase C activation. *EMBO J* 5: 77-85, 1986
 34. Friedrich B, Noreus K, Cantrell DA and Gullberg M: Activation dependent phosphorylation of endogenous protein kinase C substrates in quiescent human T lymphocytes. *Immunobiology* 176: 465-478, 1988
 35. Friedrich B and Bullberg M: The role of protein kinase C in early activation versus growth of T lymphocytes. *Eur J Immunol* 18: 489-492, 1988
 36. Brattsand G, Friedrich B and Gullberg M: A rapid separation procedure to analyse phosphorylation of two putative protein kinase C substrate in intact lymphocytes. *Scand J Immunol* 30: 233-240, 1989
 37. Friedrich B, Cantrell DA and Gullberg M: Evidence for protein kinase D activation by stimulation of either the CD2 or CD3 antigen. *Eur J Immunol* 19: 17-23, 1989
 38. Gullberg M, Noreus K, Brattsand G, Friedrich B and Shingler V: Purification and characterization of a 19-kilodalton intracellular protein. *J Biol Chem* 265: 17499-17505, 1990
 39. Hailat N, Strahler J, Melhem R, Zhu XX, Brodeur G, Seeger RC, Reynolds CP and Hanas S: N-myc gene amplification in neuroblastoma is associated with altered phosphorylation of a proliferation related polypeptide(Op 18). *Oncogene* 5: 1615-1618, 1990
 40. Braverman R, Bhattacharya B, Feuerstein N and Cooper L: Identification and characterization of the nonphosphorylated precursor of pp17, a phosphoprotein associated with phorbol ester induction of growth arrest and monocytic differentiation in HL-60 promyelocytic leukemic cells. *J Biol Chem* 261: 14342-14348, 1986
 41. Peyron JF, Aussel C, Ferrua B, Haring H and Fehlmann M: Phosphorylation of two cytosolic proteins. *Biochem J* 258: 505-510, 1989
-