

Yeast내에서 MEK1 융합 단백질 발현 및 Lethal Factor 활성 검증

황혜현¹ · 김정목¹ · 최경재¹ · 박해철¹ · 한성환¹ · 정희일¹ · 구본성² · 박준식³ · 윤문영^{1,*}

¹한양대학교 화학과, ²농업생명공학 연구원 미생물 기능팀, ³전자부품 연구원

Anthrax lethal toxin은 탄저병의 치사원인이 되는 독소이며, Lethal toxin은 두 종류의 단백질 PA (Protective antigen)과 LF (lethal factor)로 구성되어 있다. PA는 세포 표면의 수용체와 결합하여 LF를 세포질 안으로 이동시켜 주는 역할을 한다. LF는 금속 이온(Zn^{2+}) 의존적 단백질 가수분해 효소로써 MKKs [MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinases] 집단 단백질의 아미노 말단 부분을 절단하여 대상 세포를 죽음으로 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 LF에 대한 특성 분석 및 억제제 개발에 관한 연구를 위해 cell-based high-throughput screens 개발에 선행되어야 하는 기초 자료를 마련하는데 그 목적이 있다. 이를 위하여 LF의 절단 대상이 되는 기질인 MEK1을 yeast내에서 동시 발현시켜 LF의 활성을 검증하였다. 먼저 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 숙주로 하여 LF의 기질인 MEK1 발현 vector를 구축하였고 구축된 발현 system을 기본으로 LF 활성을 검증 하고자 yeast에 형질전환하여 plasmid의 안정성 및 MEK1 유전자의 발현 및 LF에 의한 MEK1 아미노말단의 절단 부위를 확인하였다. 본 연구는 세포내 검증 system 도입의 기초적 자료를 제공하였으며, yeast내의 MEK1 발현은 탄저병의 저해제 선별 및, 활성 측정 검증을 생체에서 고효율적이며, 안정적으로 할 수 있다는 가능성을 나타냈다.

Keywords □ *Bacillus anthracis*, cell-based assay system, lethal factor, yeast expression system.

LF는 그람 양성균인 *Bacillus anthracis* 균주에 의해 분비되어 지는 3가지 독소 단백질(protective antigen, PA 83 kDa; lethal factor, LF 90 kDa; edema factor, EF 89 kDa) 가운데 하나로써 탄저 독소의 가장 중요한 요소로 알려져 있다(15, 16, 18). LeTx는 공유 결합을 하고 있지 않은 LF와 PA 두 개의 factor로 구성된다. PA가 세포 표면의 수용체 즉, "anthrax toxin receptor (ATR)"와 결합하면 furin 계열의 단백질 가수분해 효소에 의해 아미노 말단 20 kDa (PA20)이 절단된 63 kDa (PA63)은 heptamer를 이루게 된 뒤 LF가 결합하게 된다(4, 6, 13, 14, 17). 이렇게 조합된 독소 중합체들은 세포내로 들어가게 되고 그 즉시 endosome 형태로써 LF를 세포질 안으로 이동 시키는 것으로 알려져 있다. LF는 금속이온(Zn^{2+}) 의존적 단백질 가수분해 효소로써 mitogen-activated protein kinase kinases (MKKs) 집단의 특이 기질로 알려져 있다(2, 7, 9, 10, 15, 21). MKKs는 인산화에 관련되어 MAPKs를 특이적으로 활성화 시키는데 MKKs는 병원성 물질에 반응하여 신호 전달의 조절 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다(16). MEK1과 MEK2는 ERK1과 ERK2 MAPKs의 표적이며, MKK3와 MKK6는 p38 MAP kinases의 표적이고, MKK4와 MKK7은 MAP kinases의 하위인 JNK (c-Jun N-terminal kinase)의 표적이 된다. LF에 의한 절단 부위는 MKK 단백질과 그들의 동종 단백질인 MAPK와 상호 작용되어 붙을 수 있는 D-site (MAPK-docking site) 주변임이 밝혀져 있다. 이들 docking sites는 MKK 중간 단계인 MAPK의 인산화를 촉진

시켜, MKK-MAPK가 강하게 결합되도록 한다(19-22). LF의 절단은 현재까지 세포 내 성장, 분화, 사멸 등의 다양한 신호 전달을 조절하는 MKKs 집단 단백질들의 아미노 말단 부위를 절단하여 하위 단백질 MAPK의 활성화를 억제함으로써 대상 세포의 죽음을 유도하는 것으로 추정된다. 이들 아미노 말단 부위의 절단은 하위 조절 인자의 활성화를 억제함으로써 신호 전달계의 교란이 세포 사멸과 관련되는 것으로 알려져 있다(3, 10). 탄저에 대한 대응 방법에는 신속한 조기 진단에 따른 치료제 투여와 감염 역학 조사에 대한 사전예방 요법 등이 사용될 수 있으나 테러에 의한 탄저 포자 흡입의 경우 잠복기가 2~60일로 길어 조기 진단이 매우 어렵고, 증세가 나타났을 때는 이미 치료 효력이 없어 높은 치사율을 가진다(11). 따라서, 본 연구는 LF의 기질로 잘 알려진 MEK1을 효모 내에서 LF와 동시발현 시킴으로써 단백질 가수분해 효소의 세포 내 활성 검증 system 개발의 기초 자료를 마련하였으며, 본 실험 결과를 통해 효모 내에서 발현될 수 있는 기질과 가수분해 효소 간의 검증이 쉽고 빠르게 수행될 수 있다는 가능성을 제시 하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

발현 숙주 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 AH109 (MATa, *trp1-901*, *leu2-3*, 112, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, LYS2, GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-His3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ)를 사용하였고, 효모의 완전 배지로는 YPDA (Difco peptone, yeast extract, dextrose, 0.2%

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 02-2220-0946, Fax: 02-2299-0762
E-mail: myyoon@hanyang.ac.kr

adenine hemisulfate. Clontech Co., USA) 배지, 선택 배지로는 SD (yeast nitrogen base without amino acids)를 사용하였다. 효모는 30°C에서 200rpm 으로 OD₆₀₀ = 0.7-0.8까지 배양했으며, plasmid DNA의 증폭에는 대장균 균주인 DH5 α 를 이용하였다. DH5 α 의 완전 배지로는 Luria-Bertani (Bacto-tryptone, Bacto-yeast extract, NaCl) 배지를 사용했고 진탕 배양기(Hanbaek Scientific Co., Korea)에서 37°C에서 180 rpm 으로 OD₆₀₀ = 0.7-0.8까지 배양하였다.

효모 발현 vector의 구축 (pGADT7-MEK1)

효모 내에서 단백질 발현을 위하여 yeast two-hybrid에 사용되는 MATCHMAKER vector (Clontech Co., USA)인 pGADT7 (8.0 kb) vector를 이용했으며, MEK1 유전자 절편(1.2 kb)을 얻기 위하여 pGEX-2T에 이미 MEK1 유전자로 클로닝 된 vector를 이용하여 클로닝을 용이하게 하고자 primer 5'-말단 각각에 제한 효소 인식 자리인 *Nde*I과 *Sal*I의 염기서열을 부착하였다. 이를 위하여 primer (UP-MEK1) 5'-AA C ATA TGA TGC CCA AGA AGA AGC CGA CG -3' 과 primer (DN-MEK1) 5'- AA G TCG ACG ACG CCA GCA GCA TGG GTT GG -3' 를 합성하였다. 5% DMSO (Dimethyl Sulfoxide)가 함유된 반응 용액에서 pre-denaturation 95°C 2분, denaturation 95°C 45초, annealing 55°C 1분, extension 68°C 3분을 한 회전으로 하여 28회전으로 PCR하였다. MEK1 PCR 생성물을 정제한 후 클로닝 vector인 pGEM-T vector (Promega Co., USA)를 이용하여 클로닝 한 MEK1의 유전자 절편을 미리 *Nde*I과 *Bam*HI 제한효소로 자른 후 정제한 pGADT7 vector와 1:3 molar ratio로 섞은 후 접합하여 DH5 α *E. coli*에 형질전환 하였다. 형질전환 시킨 DH5 α 를 증식시켜 plasmid를 추출하고 *Hind*III, *Nco*I, *Nde*I/*Sal*I 제한효소 처리 후 나타나는 유전자 절편 분석 및 유전자 염기 서열을 통해 확인하였다.

Yeast 배양배지 및 형질전환

모든 배지는 Burke et al. (5)에서 제공하는 방법을 이용하였으며, yeast 형질 전환은 lithium acetate 방법에 따라 수행하였다 (12).

MEK1 단백질 발현 및 LF 활성검증

SD/-Leu, SD/-Trp-Leu 배지에서 키운 형질 전환된 효모 pellet 을 -70°C에서 하루 동안 놔둔 후 37°C에서 cracking buffer (8 M Urea, 5% SDS, 40 mM Tris-HCl; pH 6.8, 5 mM BME, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF)에 넣어 용해시킨다. 여기에 glass bead 80 μ l 넣고 vortex를 2분간 두 번 실시한다. 70°C에서 10분간 놔둔 후 1,000 \times g에서 원심 분리를 15분간 실시한 후 상층액을 1.5 ml tube에 옮긴다. 5 \times SDS sample buffer에 넣고 100°C에서 5분간 처리 후 단백질 추출물 일정량을 분획하여 12% SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, Mini-Protein II electrophoresis, gel thickness 1.5 mm, Bio-Rad, USA) 140 V로 전기영동 하였고, 전기영동이 끝난 gel

의 단백질을 NC (nitrocellulose) membrane으로 blotting (Mini Trans-Blot Transfer Cell, Bio-Rad, USA)을 30 V로 12시간 이동하였다. 2% BSA로 1시간 동안 blocking 했으며, 첫 번째 MEK1 (anti-MEK1 antibody) 항체를 1시간 동안 상온에서 붙였고, 두 번째 항체인 anti-rabbit IgG (HRP conjugate)를 1시간 동안 반응시켰다. NC membrane에 부착된 MEK1 단백질과 LF에 의해 잘린 MEK1의 절단반응을 보기 위해 ECL-plus reagent (Amersham Bioscience, USA)로 반응, X-ray film (Agfa, Belgium)에 20분간 노출하여 관찰하였다.

결과 및 고찰

Yeast 내 cell-based assay system의 도입을 위한 MEK1 발현 vector의 구축 (pGADT7-MEK1)

출아효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 중심으로 protein-protein interaction에 관한 여러 연구가 yeast two-hybrid system의 도입으로 시행되어 오고 있으나 단백질 가수분해 효소의 억제제 개발에 필요한 cell-based assay system의 도입에 있어서는 많은 종류의 선행 연구가 되어 있지 않은 상태이다. 탄저병 억제제 개발을 위해서는 기존의 개발된 수많은 후보 물질들을 배제해서는 안되며, 치료제 개발의 고효율과 다양성을 위해서는 다량의 후보 물질들을 선별하는데 있어서 최적화된 system의 도입이 시급한 실정이다. 본 연구에서는 탄저병의 치사 독소인 LF의 기질로 잘 알려져 있는 MEK1을 yeast에 발현시켜 cell based assay system의 도입을 용이하게 하고자 pGADT7 vector를 이용하였다. pGADT7 vector는 *in vivo* protein interaction 실험에서 주로 사

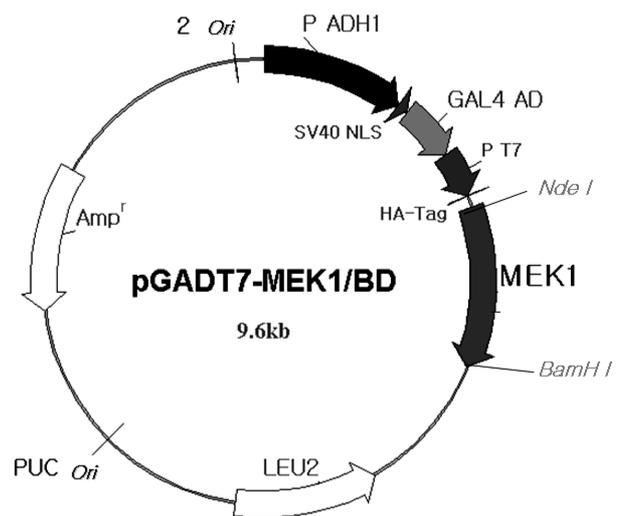


Fig. 1. Schematic diagram for MEK1 expression vector (pGADT7-MEK1). Rat full-length MEK1 cDNA was inserted into pGADT7-MEK1 at *Nde*I and *Bam*HI site. This plasmid has two replication origins, and selection markers for *E. coli* (pUC ori. Kan^r) and yeast (2 μ ori. Trp1), respectively. The constructed plasmid produces MEK1 as a N-terminal HA-tag fusion protein, of which expected molecular weight is about 80 kDa.

용되는 yeast two-hybrid system의 효모발현 vector로써 목적 단백질의 아미노 말단 부위에 GAL4 DNA activation domain (GAL4 AD)의 융합 형태로 생산된다(1). MEK1 유전자(1.2 kb)

는 pGEX-2T vector에서 이미 확보된 DNA를 추출하여 PCR을 통하여 확보한 뒤 *NdeI* 및 *SalI* 자리에 삽입하였다(pGADT7-MEK1, Fig. 1). 유전자 염기서열은 DNA 염기서열 분석을 통하여 확인했으며, 예상되는 유전자 절편의 크기를 *HindIII*, *NcoI*, *NdeI/SalI*의 제한효소 처리를 통해 확인했고 DNA 염기서열 분석을 통해 재확인 하였다(data not shown).

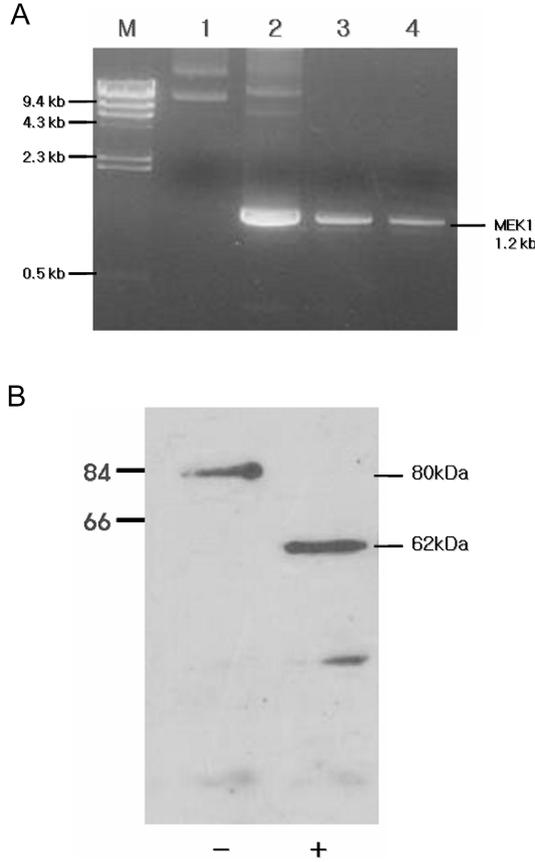


Fig. 2. Confirmation of stable yeast cell line expressing MEK1 & cleavage by LF. The plasmid encoding (pGADT7-MEK1) was transformed into both yeast cell (AH109) and the cells pre-transformed with pGBKT7ΔBD-LF (AH109 expressing LF), as described in Materials and Methods. Cells were grown in the selection media, SD/-Leu and SD/-Trp-Leu (Synthetic Dropout medium supplemented with essential amino acids in the absence of leucine and tryptophan) at 30°C for 2 days. (A) The plasmid was purified from the cells to confirm whether the plasmid (pGADT7-MEK1) was stably maintained in the transformed yeast cell line. The purified plasmid (Lane 1, the cloning vector pGADT7 without MEK1 gene as a negative control; Lane 2, the plasmid (pGADT7-MEK1) containing MEK1 gene as a positive control, Lane 3-4, purified plasmids isolated from two independent yeast clones transformed with (pGADT7-MEK1) were used as a template for PCR using a MEK1 specific primer set. PCR products were resolved on 1% agarose gel-electrophoresis and stained with Et-Br. (B) Each cells were lysed in the cracking buffer containing 8 M urea and 5% SDS. Cell extracts were resolved on 12% SDS/PAGE and transferred into NC (Nitrocellulose) membrane. Expression(+, cell extracts from AH109 transformed with pGADT7-MEK1) and cleavage (+, cell extracts from AH109 transformed with both pGBKT7ΔBD-LF and pGADT7-MEK1) of MEK1 were determined by immunoblotting using anti-MEK1 (C-terminus, 200 ng/ml) antibody.

Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, AH109) 내 MEK1의 발현 및 LF에 의한 활성 검증

Clontech사의 standard protocol에 따른 형질전환 방법을 통하여 클로닝 된 pGADT7-MEK1 vector를 yeast (AH109)에 형질전환 시킨 후, 형질 전환 된 yeast를 확인하기 위해 선택 배지인 SD/-Leu 배지에서 yeast 균체들을 획득했으며, LF에 의한 절단 반응을 확인하기 위해 이미 pGBKT7DBD-LF vector로 형질 전환 된 yeast (1)에 다시 pGADT7-MEK1 vector를 형질전환 했고, SD/-Trp-Leu 배지에서 획득 된 균체에서는 MEK1의 발현 확인과 LF에 의한 활성을 검증하기 위해 형질전환 yeast를 배양하여 PCR 및 western blot을 통해 확인했다. Yeast의 유전자를 추출하여 클로닝에 사용된 MEK1의 primer를 이용해 PCR한 결과 MEK1의 유전자를 확인했다(Fig. 2A). 또한 LF 단백질이 효모 내에서 MEK1과 특이적으로 활성을 가져 MEK1의 아미노 말단을 절단하는지 확인하기 위해 형질전환 된 yeast의 전체 단백질을 분리한 뒤, 분리된 단백질을 전기영동하고 항원항체 반응을 이용한 western blot 방법을 이용해 확인 한 결과 activation domain과 융합된 MEK1 단백질(80 kDa)의 아미노 말단이 LF에 의해 절단 된 사실을 단백질 절편의 크기(62 kDa)를 통해 확인할 수 있었다(Fig. 2B).

LF를 저해할 수 있는 치료제 개발이 우선시 되어야 하는 현실에서 LF 치료제 high-throughput screens 개념을 도입하여, 후보 물질들의 고처리량 cell-based assay system 활성 검증방법 등이 개발되어서 새로운 치료제 검증 및 안정성 확보가 필요하기에 이번 연구에서는 LF의 활성 검증 방법이 효모 내에서 개발될 수 있다는 가능성을 제시하였으므로, 효모 내에서 저해제 검증 방법을 개발할 수 있는 기초 자료를 제공 하였다고 판단되어진다.

감사의 말

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 2005041034632)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. 황혜현, 김정목, 최경재, 정희일, 한성환, 구본성, 윤문영. 2005. Yeast 내에서 탄저병 원인균인 *Bacillus anthracis*의 치사독소인 Lethal Factor 단백질 발현. 미생물학회지 41, 275-280.
2. Agrawal, A., J. Lingappa, S.H. Leppla, S. Agrawal, A. Jabbar, C.

- Quinn, and B. Pulendran. 2003. Impairment of dendritic cells and adaptive immunity by anthrax lethal toxin. *Nature* 424, 329-334.
3. Bardwell, A.J., L.J. Flatauer, K. Matsukuma, J. Thorner, and L. Bardwell. 2001. A conserved docking site in MEKs mediates high-affinity binding to MAP kinases and cooperates with a scaffold protein to enhance signal transmission. *J. Biol. Chem.* 276, 10374-10386.
 4. Beauregard, K.E., R.J. Collier, and J.A. Swanson. 2000. Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cell Microbiol.* 2, 251-258.
 5. Burke, D., D. Dawson, and T. Stearns. 2000. Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 6. Collier, R.J. and J.A. Young. 2003. Anthrax toxin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 45-70.
 7. Dixon, T.C., M. Meselson, J. Guillemin, and P.C. Hanna. 1999. Anthrax. *Engl. J. Med.* 341, 815-826.
 8. Dong, C., R.J. Kavis, and R.A. Flavell. 2002. MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 55-72.
 9. Drum, C.L., S.Z. Yan, J. Bard, Y.Q. Shen, D. Lu, S. Soelaiman, Z. Grabarek, A. Bohm, and W.J. Tang. 2002. Structural basis for the activation of anthrax adenyl cyclase exotoxin by calmodulin. *Nature* 415, 396-402.
 10. Duesery, N.S., C.P. Webb, S.H. Leppla, V.M. Gordon, K.R. Klimpel, T.D. Copeland, N.G. Ahn, M.K. Oskarsson, K. Fukasawa, K.D. Paull, and C.F. Bande Woude. 1998. Proteolytic inactivation of MAP-Kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science* 280, 734-737.
 11. Ezzell, J.W. and T.G. Abshire. 1988. Immunological analysis of cell associated antigens of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 56, 349-356.
 12. Gietz, D., A.St. Jean, T.A. Woods, and T.H. Schiestl. 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res.* 20, 1425.
 13. Grossier, F. and M. Mock. 2001. Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon.* 39, 1747-1755.
 14. Klimpel, K.R., S.S. Molloy, G. Thomas, and S.H. Leppla. 1992. Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89, 10277-10281.
 15. Leppla, S.H. 1988. Production and purification of anthrax toxin, in: *Methods in Enzymology.* Academic press. 165, 103-116.
 16. Mock, M. and A. Fouet. 2001. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 647-671.
 17. Mogridge, J., K. Cunningham, and R.J. Collier. 2002. Stoichiometry of anthrax toxin complexes. *Biochemistry.* 41, 1079-1082.
 18. Morton, N. and M.D. Swartz. 2001. *New Engl. J. Med.* 345, 1621-1626.
 19. Pellizzari, R., C. Guidi-Rontani, G Vitale, M. Mock, and C. Montecucco. 1999. Anthrax lethal factor cleaves MKK3 in macrophages and inhibit the LPS/IFN γ - induced release of NO and TNF α . *FEBS Lett.* 462, 199-204.
 20. Vitale, G., L. Bernardi, G. Napolitani, M. Mock, and C. Montecucco. 2000. Susceptibility of mitogen-activated protein kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochem. J.* 352, 739-745.
 21. Vitale, G., R. Pellizzari, C. Recchi, G. Napolitani, M. Mock, and C. Montecucco. 1998. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 706-711.
 22. Xu, B., S. Stippec, F.L. Rovinson, and M.H. Cobb. 2001. Hydrophobic as well as charged residues in both MEK1 and ERK2 are important for their proper docking. *J. Biol. Chem.* 276, 26509-26515.

(Received June 10, 2006/September 14, 2006)

ABSTRACT : Expression of MEK1 Fusion Protein in Yeast for Developing Cell Based Assay System, a Major Substrate of LeTx

Hyehyun Hwang¹, Joungmok Kim¹, Kyoung-Jae Choi¹, Haechul Park¹, Hoeil Chung¹, Sung-Hwan Han¹, Bon-sung Koo², Joon-Shik Park³, and Moon-Young Yoon^{1,*} (¹Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea, ²Microbial Function Team, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea, ³NANO Mechatronics Research Center, Korea Electronics Technology Institute, Gyeonggi-do, 463-816, Korea)

Lethal toxin is a critical virulence factor of anthrax. It is composed two protein: protective antigen (PA) and lethal factor (LF). PA binds to specific cell surface receptors and, forms a membrane channel that mediates entry of LF into the cell. LF is a zinc-dependent metalloprotease, which cleaves MKKs [MAPK (mitogen-activated protein kinase) kinases] at peptide bonds very close to their N-termini. In this study, we suggest application of cell-based assays in the early phase of drug discovery, with a particular focus on the use of yeast cells. We constructed MEK1 expression system in yeast to determine LF activity and approached cell-based assay system to screen inhibitors, in which the results covering the construction of LF-substrate in yeast expression vector, expression, and LF-mediated proteolysis of substrate were described. These results could provided the basic steps in design of cell-based assay system with the high efficiency, rapidly and easy way to screening of inhibitors.