

탄저 치사독소 처리에 의한 생쥐 대식세포의 단백질체 발현 양상 분석

정경화 · 서귀문 · 김성주 · 김지천 · 오선미 · 오광근¹ · 채영규*

한양대학교 과학기술대학 분자생명과학부, ¹바이오기능대학 바이오배양공정학과

탄저 치사독소는 생쥐 대식세포 (RAW 264.7)의 유전자 발현에 많은 변화를 초래한다. 이들 변화를 초래하는 치사독소의 역할은 아직 확실하게 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는, 치사독소가 처리된 생쥐 대식세포의 단백질체 프로파일을 이차원 전기영동으로 분석하였고, MALDI-TOF 질량분석기를 사용하여 해당 단백질의 질량을 측정하였다. 펩타이드 질량 분석 데이터는 ProFound 데이터베이스를 이용하여 동정하였다. 차별화되어 발현된 단백질 중에서 절단된 mitogen-activated protein kinase kinase (Mek1)와 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)가 치사독소 처리된 대식세포에서 각각 증가하였다. 치사독소를 처리하였을 경우, Mek1의 절단은 신호전달과정을 방해하고, 증가된 G6PD는 생성된 활성산소로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 보인다. 단백질체 분석 기술은 치사독소 처리에 의한 생쥐 대식세포의 세포사멸 관련 단백질을 동정하는데 도움을 주어, 치사독소의 잠정적인 기질을 찾는 데 유용할 것이다.

Key words □ Anthrax lethal toxin, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), mitogen-activated protein kinase kinase (Mek1), murine macrophages, proteomic techniques

탄저(anthrax)는 그람 양성 간균인 탄저균(*Bacillus anthracis*)에 의하여 발병하는 인수 공통 질병이다 (13). 탄저균의 독소는 세 개의 폴리펩타이드로 구성되어 있는데, 그 각각은 방어항원 (protective antigen), 부종요소(edema factor), 그리고 치사요소 (lethal factor)이다 (21). 탄저 치사독소(lethal toxin; LeTx)는 방어항원과 치사요소로 구성되며, 생쥐나 기니피그 등의 실험동물에 주입하였을 경우 치명적인 쇼크를 유발한다(20).

지금까지 알려진 탄저 독소의 기전으로는 방어항원이 세포에 존재하는 수용체에 먼저 결합함으로써 시작된다. 세포 수용체에 결합한 방어항원은 퓨린에 의해 N-말단 부위의 20 kDa 단편이 절단되어 63 kDa 부분의 방어항원만 남게 된다. 이들 63 kDa 방어항원들이 모여 heptamer를 형성 하고 (12), 형성된 heptamer에 부종요소 혹은 치사요소가 경쟁적으로 결합하게 되면 수용체 매개 endocytosis에 의하여 세포 내로 들어가 endosome을 형성 한다. 세포내의 endosome은 proton motive force에 의해 내부의 pH가 낮아지고 궁극적으로 heptamer의 구조가 변화하여, 부종요소와 치사요소는 endosome에서 세포질로 이동하게 된다(2, 10).

치사요소는 아연 결합 모티프인 HEXXH를 갖는 아연 의존성 단백질 가수분해효소이다(11). 현존하는 치사요소의 세포 내 기질은 mitogen-activated protein kinase kinases(Meks)로 Mek 5를 제외한 대개의 Meks (Mek 1~Mek 7)의 N-말단 부위를 절단한다(4, 24). 그러나 치사요소는 감수성 혹은 저항성을 갖고 있는 생쥐의 대식세포 대부분의 Meks의 N-말단 부위를 가수분해하기

때문에 Meks의 절단이 세포의 치사 작용에 직접적인 원인은 아닌 것으로 보인다(23).

최근 숙주와 병원균의 관계에 대한 연구와 독소의 세포 내 메커니즘을 이해하기 위해 단백질체 분석 기술이 도입되어 사용되고 있다. Molestina 등(14)은 이차원 전기영동 분석방법을 사용하여 *Chlamydia pneumoniae*에 감염된 Hep-2 세포에서 병원균 감염에 따라 변화하는 단백질들의 발현 양상을 분석하였다. Pizarro-Cerda 등(16)도 단백질체 분석 기술을 사용하여 *Listeria monocytogenes*가 감염된 사람 상피 세포주 LoVo 세포에서 phagosome 내의 단백질들의 발현 양상을 보고하였다. Seo 등 (17, 18)은 이차원 전기영동과 MALDI-TOF 질량분석 방법 혹은 SELDI-TOF 질량분석 방법을 사용하여 탄저균 아포에 감염된 사람 대식세포의 단백질체의 발현 변화를 분석하여 보고하였다. 또한, Chandra 등(4)이 이차원 전기영동과 MALDI-TOF 질량분석 방법을 사용하여 치사독소를 급사 수준으로 처리한 생쥐 대식세포 J774A.1의 단백질체 양상을 분석하였다.

본 연구에서는 치사독소 처리에 의한 생쥐 대식세포에서 일어나는 단백질체의 발현 양상을 이차원 전기영동과 MALDI-TOF 질량분석 방법을 이용하여 분석하였다.

실험대상

Dulbecco's Modified Eagle's Media (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 GibcoTM에서, ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction 키트는 Calbiochem에서 구매하여 사용하였다.

Urea, 1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenylformazolium bromide (MTT), thiourea, 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-pro-

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 031-400-5513, Fax: 031-406-6316
E-mail: ygchai@hanyang.ac.kr

panesulfonate (CHAPS), dithiothreitol (DTT), benzamidine, Bradford solution, acrylamide, iodoacetamide, bis-acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS), acetonitrile, trifluoroacetic acid, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, modified porcine trypsin (sequencing grade)은 Sigma-Aldrich (ACS reagents, Ultrapure)제품을 사용하였다. Pharmalyte (pH 3.5-10)은 Amersham Biosciences에서 구매하였고, immobilized pH gradient (IPG) DryStrips (pH 4-10 NL, 24 cm)은 제노마인 제품을 사용하였다. Anti-Mek 1 (C-18) 항체와 anti-Mek 2 (N-20) 항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구매하였으며, horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG는 Pierce에서 구매하여 사용하였다. Enhanced chemiluminescent (ECL) advance Western blotting detection 키트는 Amersham Biosciences 제품을 사용하였다.

세포 배양과 탄저 치사독소 처리

생쥐 대식세포(RAW 264.7)는 10% FBS, 100 IU/ml penicillin과 10 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 37°C와 5% 이산화탄소 농도 조건에서 배양하였다. 세포는 6×10^6 세포/100-mm 플레이트의 밀도가 되도록 폴리스틸렌 배양 접시에 분주하였고, 12시간 동안 배양한 후 새로운 배지로 교환해 주면서 실험군은 100 ng/ml 방어항원과 100 ng/ml 치사요소를 처리하였고, 대조군은 100 ng/ml 방어항원만을 처리하였다.

세포 생존율 분석

세포 생존율 분석은 미토콘드리아의 dehydrogenase와 반응하여 세포 생존율을 측정하는 MTT 분석 방법으로 수행하였다. 즉, 생쥐의 대식세포(RAW 264.7)는 96-웰 플레이트에 각각 6×10^4 개로 분주하여 37°C, 100 IU/ml penicillin과 100 μ g/ml streptomycin이 포함된 DMEM에서 37°C와 5% 이산화탄소 농도 조건에서 배양하였다. 방어항원 농도를 100 ng/ml로 고정하고, 치사요소를 농도(4, 8, 16, 32, 및 100 ng/ml)별로 각각의 웰에 처리하였다. 시간 (10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 및 240분)별로 25 μ l의 MTT(5 mg/ml in phosphate buffered saline)를 가한 후, 37°C, 5% 이산화탄소 배양기에서 4시간 배양하였다. 배양이 끝난 플레이트에 정지용액 (20% SDS, 50% dimethyl formamide, pH 4.7)을 100 μ l 가하고 상온에서 천천히 30분 동안 교반한 후 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

단백질체 분리

실험군과 대조군의 대식세포는 각 시간 별(30분, 60분, 90분, 및 180분)로 배지를 제거하고, 세포를 PBS로 2번 세척하였다. 세척된 세포에 ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction 키트의 추출완충액 1(protease inhibitor cocktail 첨가)을 넣고 잘 섞어서 4°C에서 10분간 반응시켰다. 녹지 않는 물질을 제거하기 위해 원심분리한 후 얻어진 상층액을 Bradford 분석법(3)을 이용하여 정량한 다음 이차원 전기영동과 Western blotting에 사용하였다.

이차원 전기영동

IPG 스트립은 2% CHAPS, 1% DTT, 1% pharmalyte가 포함된 7 M urea, 2 M thiourea에 각각의 단백질 200 μ g을 섞은 후 16시간 동안 rehydration하였다. Isoelectric focusing (IEF)은 Multiphor II 전기영동 키트와 EPS 3500 XL 전원 공급장치 (Amersham Biosciences)를 이용하여 20°C에서 다음과 같이 수행하였다. 첫 번째 단계로 전압을 150 V에서 3,500 V로 3시간 동안 증가시켜 단백질들이 젤 내로 들어가게 하였으며, 두 번째 단계로 전압을 3,500 V로 유지하며, 96 kVh가 될 때까지 단백질을 완전히 focusing하였다. 이차원 전기영동을 하기 전에, 스트립은 1% DTT가 포함된 equilibration buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)에서 10분간 반응시켰고, 2.5% iodoacetamide가 포함된 equilibration buffer에서 10분간 반응시켰다. Equilibration이 끝난 스트립은 SDS-PAGE 젤 (20-24 cm, 10-16%)의 윗부분에 넣고 Hoefer DALT 이차원 전기영동 시스템(Amersham Biosciences)을 이용하여 전기영동을 수행하였다. 이차원 전기영동한 젤은 고정(fixation)과 sensitization 단계를 제외한 은 염색(silver staining) 방법을 이용하여 염색하였다(15). 이차원 전기영동은 각 시간별 시료를 4번 반복하여 수행하였다. 얻어진 이미지를 정량적으로 분석하기 위해 PDQuest 소프트웨어(버전 7.0, BioRad)를 사용하여 각 스팟 세기(intensity)를 정량화하였으며, 차별화 발현된 스팟의 단백질을 동정하기 위하여 MALDI-TOF를 수행하였다.

단백질 in-gel digestion과 MALDI-TOF

선택된 단백질 스팟은 Shevchenko 등 (19)의 방법에 따라 트립신을 사용하여 in-gel digestion을 수행하였다. 얻어진 젤 조각은 SDS, 염 및 염색약을 제거하기 위해 50% acetonitrile로 씻어 내고, 유기용매를 제거하기 위해 건조시켰다. 건조된 젤 조각에 트립신 (8-10 ng/ μ l)을 첨가하여 hydration 시키고 37°C에서 8-10 시간 동안 반응시켰다. 반응은 trifluoroacetic acid (0.5%)를 5 μ l 첨가하여 멈추었으며, 50% aqueous acetonitrile로 여러 번 추출하여 트립신에 의해 잘려진 펩타이드를 수층 (aqueous layer)으로 옮겼다. 이 펩타이드는 C18ZipTips (Millipore)을 이용하여 염을 제거한 후, acetonitrile 1-5 μ l로 추출하였다. 추출한 펩타이드에 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid를 첨가한 후 1 μ l를 target plate에 올려놓고, Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences)을 이용하여 질량을 측정하였다.

데이터베이스 조사

각 스펙트럼은 평균 300 레이저 샷으로 얻었으며, 얻은 질량은 Rockefeller 대학에서 개발한 ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe?FORM=1) 데이터베이스에서 조사하여 단백질을 동정하였다.

Western blotting

얻어진 단백질의 발현 변화를 확증하기 위하여 세포질의 단백질을 ProteoExtract[®] Subcellular Proteome Extraction 키트를 이

용하여 분리한 후 immunoblotting을 수행하였다. 단백질 20 μ g을 SDS-PAGE 시료용액(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol)에 넣고 5분간 끓인 후, 12% polyacrylamide-gel에 로딩하여 전기영동을 수행하였다. 그 후 젤 내의 단백질을 20% 메탄올 용액에서 80 V로 60분 동안 polyvinylidene fluoride (PVDF) 막으로 이송시켰다. 단백질이 이송된 PVDF 막은 5% nonfat-dry milk가 포함된 TBS-T 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20)에 넣고 교반기에서 1시간 동안 반응하여 blocking하였다. Blocking이 끝난 PVDF 막은 anti-Mek1 (C-18) 항체와 anti-Mek2 (N-20) (200 μ g/ml)항체를 1:5000배 희석하여 첨가한 TBS-T 완충액에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 PVDF 막은 TBS-T로 15분간 3회 씻은 후 HRP-conjugated anti-rabbit IgG (1:1000 dilution)을 넣고 1시간 반응시켰다. 다시 PVDF 막을 TBS-T 완충액으로 15분간 3회 씻은 후, ECL advanced 키트를 이용하여 반응시키고 필름에 감광하였다.

결과 및 고찰

생쥐 대식세포 (RAW 264.7)에 100 ng/ml 농도의 방어항원과 4, 8, 16, 32, 및 100 ng/ml 농도의 치사요소를 처리한 후 시간별(10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 및 240분)로 MTT 분석을 수행하여 세포생존율을 조사하였다. MTT 분석 결과 방어항원만 처리하거나, 치사요소 1, 2, 및 4 ng/ml를 처리하였을 때는 세포 사멸이 일어나지 않음을 확인하였다. 치사요소의 농도가 8 ng/ml 이상이 되면 90분을 기준으로 세포 사멸이 일어났다(Fig. 1).

본 연구에서는 탄저 치사독소(PA=100 ng/ml, LF=100 ng/ml)를 60분과 90분 동안 처리한 생쥐의 대식세포 세포질 단백질 변화를 이차원 전기영동(pH 3.5-10)을 이용하여 조사하였다. 세포질 단백질 200 μ g을 pH 3.5-10의 IPG 스트립에서 분리한 후 이차원 전기영동 하였다(Fig. 2). 알칼리 은 염색(alkaline silver

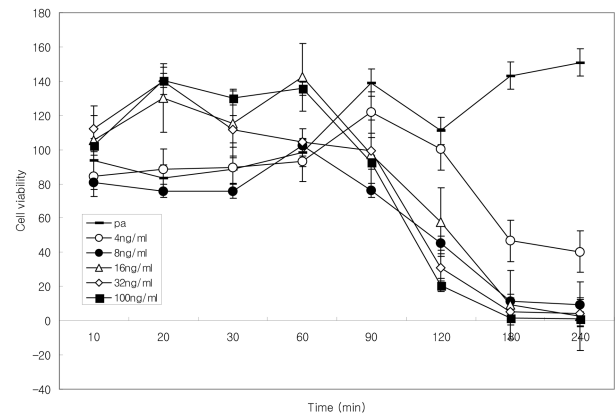


Fig. 1. Cell viability for murine macrophages (RAW 264.7) treated with anthrax lethal toxin (LeTx : 100 ng/ml of PA and various concentration of LF).

staining)을 하여 젤 당 약 1800 \pm 200 스팟을 얻었으며, 이는 Seo 등 (17)이 탄저균 아포를 사람 대식세포에 감염시켜 이차원 전기영동 수행한 결과인 젤 당 1600 \pm 200의 스팟을 얻은 경우와 유사하다. 이차원 전기영동한 젤 이미지는 PDQuest 7.0 이미지 소프트웨어로 분석하여, 치사독소를 60분과 90분 동안 처리한 생쥐 대식세포(RAW 264.7) 세포질에서 증가/감소하는 단백질 19종을 선택하였다. Fig. 2에서는 선택된 일부 단백질의 60분과 90분에서의 발현 패턴을 나타내었다.

탄저 치사독소 작용에 의하여 발현의 차이가 나는 단백질을 동정하기 위하여 선택된 스팟을 트립신 in-gel digestion한 후 MALDI-TOF를 이용하여 질량을 얻었다. 얻어진 질량은 ProFound 데이터베이스에서 이론적인 질량과 비교 분석하여 단백질을 동정하였다. 발현 패턴이 다른 단백질 19종은 ras-GTPase-activating protein SH 3-domain binding protein, protein phosphatase 1, leukotriene A4 hydrolase, 6-phosphogluconate dehydrogenase,

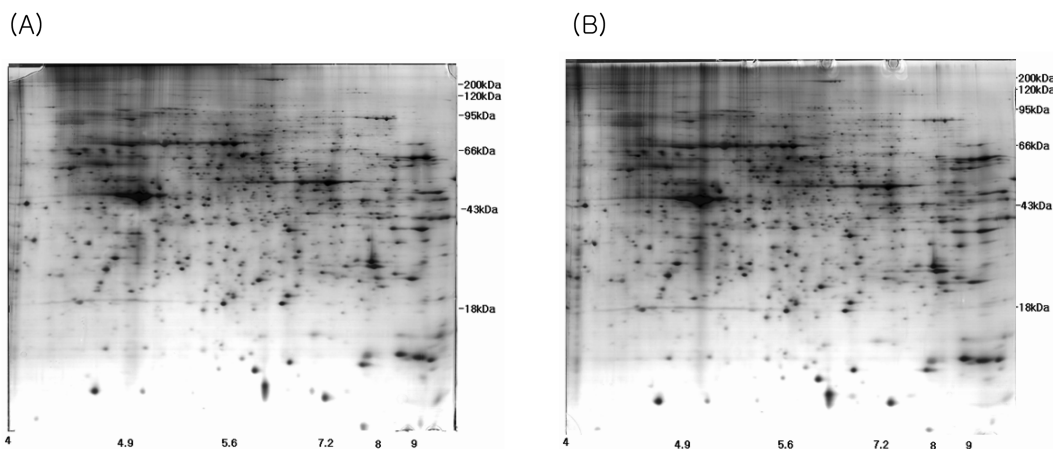


Fig. 2. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis images of cytosolic proteins from the murine macrophages treated with protective antigen (A) and LeTx (B) for 60 min. The figure displays sectors of interest of pH 3.5-10 and molecular weights. Differentially expressed proteins were identified using MALDI-TOF/MS.

Table 1. The list of differentially expressed proteins that were found to be altered at 60 min and 90 min in LeTx-intoxicated macrophages.

Spot number	Proteins	60 min	90 min
4505	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain binding protein	Up	Down
5324	Adenosine kinase short isoform	Up	Up
6221	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha	Down	Down
6522	Leukotriene A4 hydrolase	Up	No change
7101	Translin-associated factor X	Up	No change
7221	Tissue specific transplantation antigen P35B	Up	Up
7320	Unnamed protein product	Down	Down
7522	Unnamed protein product	No	UP
8127	RIKEN cDNA 2310005E10	Up	Up
8407	Unnamed protein product	Down	UP
8409	Unnamed protein product	Down	UP
8601	Msn protein	Down	UP
8618	Vesicle-fusing ATPase	Down	Not detected
9302	6-Phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Up	Up
6302	Mitogen activated protein kinase kinase 1	Up	Up
6315	Unnamed protein product	Up	Up
7011	DbpA42(Y889f)	Up	Up
7313	Mitogen activated protein kinase kinase 1	Down	Down
7410	Glucose-6-phosphate dehydrogenase X-linked	Up	Up

mitogen activated protein kinase kinase 1 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase 등이다(Table 1).

Chandra 등(5)은 생쥐 대식세포 J774A.1에 급사 수준(lethal dose; PA=1 µg/ml, LF=1 µg/ml)으로 치사독소를 처리하고 세포의 총 단백질을 대상으로 하여 발현에 변화가 있는 41개의 단백질을 얻었으며, 이 중에서 phosphoglycerate kinase I, enolase I, ATP synthase (β subunit)와 같은 대사과정과 연관이 있는 단백질과 tubulin β-2, γ-actin과 같은 구조 단백질, 그리고 Hsp 70, 14-3-3 zeta protein, ERP29, GRP78 등과 같은 스트레스 관련 단백질 등의 발현이 변화하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 동정한 단백질 중 Chandra 등(5)이 보고한 단백질과 일치하는 단백질은 없었다. 이는 Chandra 등(5)의 실험에서는 치사독소를 급사 수준으로 처리하여 90% 이상의 세포가 죽는 105분에 총 단백질을 얻고 IPG 스트립 pH 4-7에서 분리하여 이차원 전기영동 하였으나, 본 연구에서는 치사독소를 처리하여 세포가 죽기 시작하는 60분과 90분에서 얻은 세포막과 미토콘드리아, 핵 등 세포내 소기관을 제외한 세포질 단백질을 사용하여 IPG 스트립 pH 3.5-10에서 분리하여 이차원 전기영동 하였기 때문에 추정된다.

Seo 등(17)의 실험에서는 탄저 아포를 감염시켜 이차원 전기영동한 결과 proteasome 26S, P21-activated protein kinase 2 (PAK2) 그리고 RAB GDP-dissociation inhibitor beta (RabGDI-beta) 등의 단백질 변화가 있음을 보고하였다. 탄저 치사독소를 처리한 본 연구에서는 동일한 단백질의 변화는 관찰할 수 없었다. 이는 탄저 아포 감염 시에는 치사독소 외에도 탄저균에서 발현되는 단백질이나 다른 병원성 인자들이 대식세포의 사멸에 영향을 주는 것으로 추정된다.

이차원 전기영동 결과에서 얻은 스팟 6302은 분자량 47.44

kDa, pI 6.0의 단백질이며, 스팟 7313은 분자량 48.19 kDa, pI 7.16의 단백질을 확인하였다. 이들 단백질을 MALDI-TOF 질량분석기로 분석한 결과 스팟 6302와 스팟 7313은 동일한 Mek 1으로 확인되었다. 이들 두 단백질의 크로마토그램은 Fig. 3에 나타내었다. 스팟 6302은 60분과 90분에 증가하는 반면, 스팟 7313은 60분과 90분에 감소하는 패턴을 보였다(Fig. 2A와 B). 이들 결과를 종합으로 볼 때 스팟 6302의 Mek 1 단백질 N-말단 부위가 치사독소에 의해 절단된 것이 스팟 7313인 것으로 확인되었다. 본 결과는 치사독소가 기질인 Mek의 N-말단 부위를 절단한다(4)는 사실을 이차원 전기영동 상에서 확인하였다.

Guidi-Rontani 등(7)이 치사독소를 세포에 처리하였을 경우 치사독소가 15분 내에 세포질에서 발견이 되고 60분에는 세포질에서 사라짐을 보고하였다. 이러한 현상은 Mek의 N-말단 부위와 C-말단 부분을 각각 인식하는 단일클론성 항체를 사용한 western blotting 결과에서 유사한 결과를 얻었다. 즉, Mek의 C-말단 부위를 감지한 밴드는 변화가 없으나, Mek의 N-말단 부위를 감지한 밴드는 30분부터 감소하며, 180분에서는 검출이 불가능하였다(Fig. 4). 이는 세포질 내로 들어간 치사독소는 30분 정도에 N-말단 부위를 절단하기 시작하고, 180분에 대부분의 Mek의 N-말단 부위가 절단되었다. 따라서 N-말단 부위가 제거된 Mek는 세포내 신호 전달에 중요한 역할을 하는 MAP kinase pathway를 불활성화시켜 downstream component (p38, ERK, JNK)의 인산화를 억제한다. 이들 신호전달 과정의 저해는 숙주세포를 사멸하는 기전에는 직접적으로 관여하는 것으로 보이지만, 궁극적으로 세포사멸에 다양한 영향을 미치는 것으로 보인다(1).

스팟 7410은 60분에 방어항원만 처리한 대식세포보다 치사독소를 처리한 세포에서 소량 증가하고, 90분에는 2배 이상 증가하였다(Fig. 2C). 스팟 9302는 발현이 되지 않다가 60분과 90분

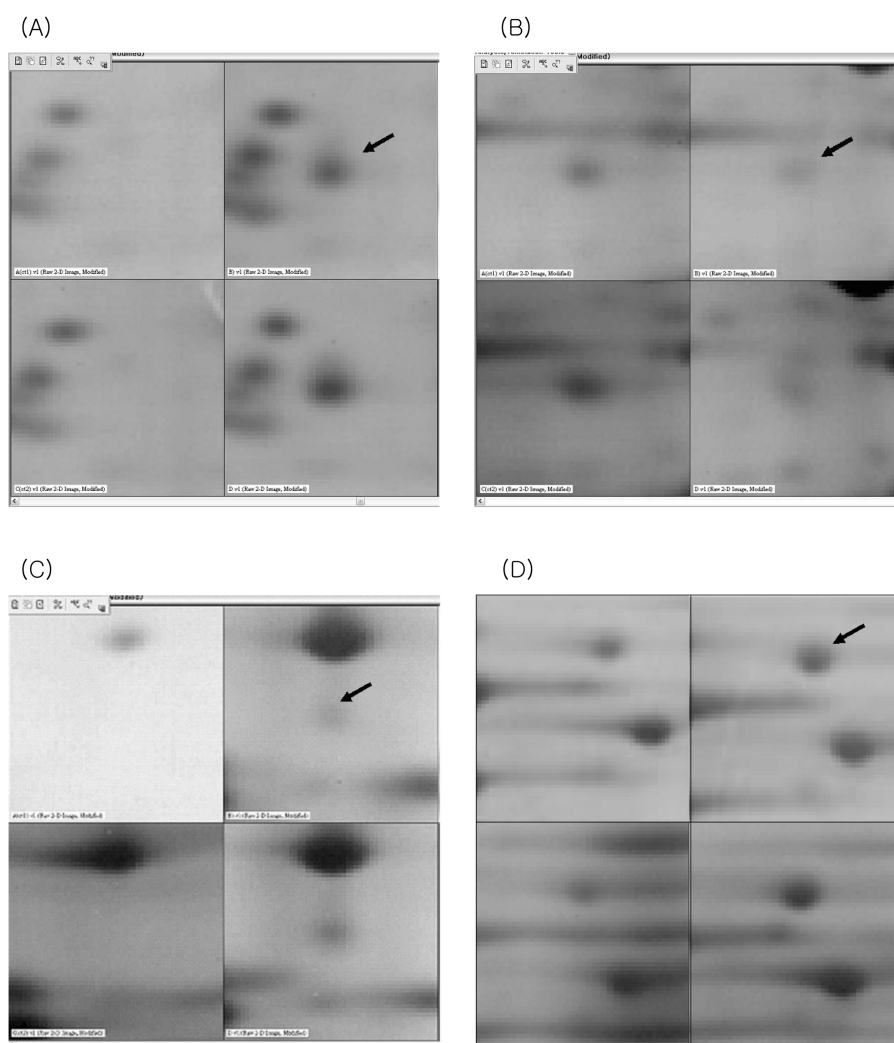
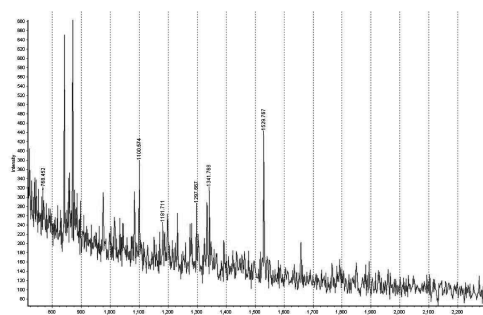


Fig. 3. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis images of the cytosolic protein spots from murine macrophages treated with protective antigen (left panels) and LeTx (right panels) for 60 min (upper panels) and 90 min (lower panels), respectively. (A) mitogen-activated protein kinase kinase (Mek) 1 (spot 6302), (B) cleaved Mek1 (spot 7313), (C) glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) (spot 9302), (D) 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) (spot 7410)

(A) 6302



(B) 7313

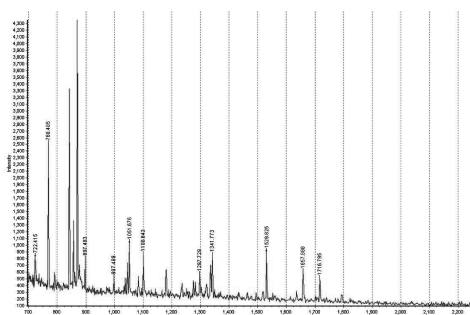


Fig. 4. MALDI-TOF/MS spectra of trypsin-treated proteins. The spot 6302 (A) and spot 7313 (B) were identified by Mek1 and cleaved Mek1.

에 발현이 증가하였다(Fig. 2D). MALDI-TOF 질량분석의 결과에서 스팟 7410은 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)

단백질이며, 스팟 9302는 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) 단백질로 확인되었다. G6PD는 pentose phosphate

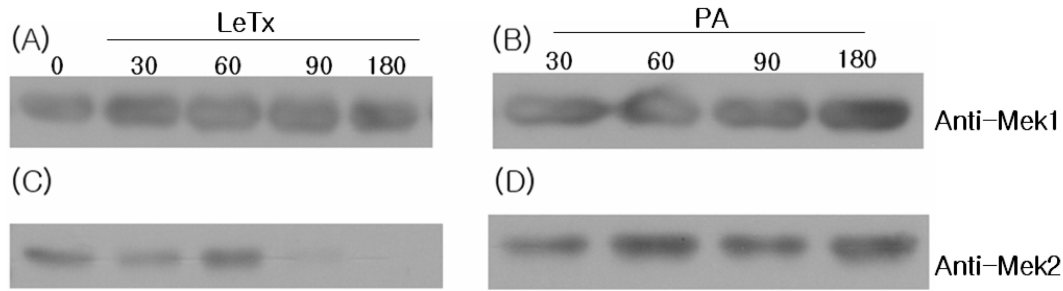


Fig. 5. Western blotting images of Mek1 and Mek2 in murine macrophages treated with PA and LeTx, respectively. (A) Immunoblot result of anti-Mek1 (C-18) antibody against the cytosolic protein of LeTx treated-macrophages for 0, 30, 60, 90, and 180 min. (B) anti-Mek1 (C-18) antibody from protective antigen treated-macrophages for 30, 60, 90 and 180. (C) anti-Mek2 (N-20) antibody from LeTx treated-macrophages for 0, 30, 60, 90, and 180. (D) anti-Mek2 (N-20) antibody from PA treated-macrophages for 30, 60, 90, and 180. Mek1 was decreased but N-terminal cleaved Mek2 was increased in the LeTx treated macrophages but the PA treated macrophage.

pathway (PPP)의 속도 결정 효소(rate limiting enzyme)로 PPP 효소를 거쳐 포도당 대사를 조절하는 NADPH의 양을 조절한다. 치사독소가 처리된 대식세포는 활성산소를 생성하고 이에 따라 G6PD가 증가하게 된다. G6PD의 증가는 redox-stress에 의해 유도되는 세포사멸 현상으로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 보인다(6, 22).

Hanna 그룹(8, 9)은 급사 농도의 치사독소를 처리하는 경우, 세포는 쇼크 매개물질을 생성하고, 대식세포를 죽이는 활성 산소가 대량으로 생성되는 현상을 보고하였다(8). 대식세포에 중간 급사 수준의 치사독소를 처리하면, 그 결과로서 활성산소가 생성되고, 이로부터 대식세포를 보호하기 위해서 G6PD와 그 downstream에 존재하는 6PGDH가 증가되는 것으로 보인다.

치사독소에 민감한 세포주나 치사독소에 저항성이 있는 세포주에서도 Mek1의 N-말단 부위 절단 현상이 보고된 바 있어(23), 치사독소에 의한 Mek1의 N-말단 부위의 절단이 세포사멸에 직접적인 영향을 주지 않는 것으로 추정된다. 또한 아급사 수준의 치사독소 처리 결과는 치사독소에 의해 생성되는 활성산소로부터 세포를 보호하는 단백질들을 발현시켜 세포사멸을 보호하는 기전을 일으키는 것으로 보인다. 결국, 치사독소의 세포사멸 기전을 완벽하게 이해하기 위해서는 치사독소가 처리된 대식세포내의 단백질에 대한 프로테오믹스 분석 기술뿐만 아니라, 세포내의 다른 소기관 즉, 미토콘드리아나 세포막 등의 단백질 변화를 연구해야 할 필요성이 있으며, 이들 소기관에서 차별화 발현되는 단백질들에 대한 분석을 수행하고 있는 중이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원으로 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Agrawal, A., and B. Pulendran. 2004. Anthrax lethal toxin: a weapon of multisystem destruction. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2859-2865.
- 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.
- Bradford, M.M. 1976. 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.
- Chopra, A.P., S.A. Boone, X. Liang, and N.S. Duesbery. 2003. Anthrax lethal factor proteolysis and inactivation of MAPK kinase. *J. Biol. Chem.* 278, 9402-9406.
- Chandra, H., P.K. Gupta, K. Sharma, A.R. Mattoo, S.K. Garg, W.N. Gade, R. Sirdeshmukh, K. Maithal, and Y. Singh. 2005. Proteome analysis of mouse macrophages treated with anthrax lethal toxin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1747, 151-159.
- Fico, A., F. Paglialunga, L. Cigliano, P. Abrescia, P. Verde, G. Martini, I. Iaccarino, and S. Filosa. 2004. Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 11, 823-831.
- Guidi-Rontani, C., M. Weber-Levy, M. Mock, and V. Cabiliaux. 2000. Translocation of *Bacillus anthracis* lethal and edema factors across endosome membranes. *Cell. Microbiol.* 2, 259-264.
- Hanna, P.C. 1999. Lethal toxin actions and their consequences. *J. Appl. Microbiol.* 87, 285-287.
- Hanna, P.C., B. Kruskal, R. Ezekowitz, B. Bloom, and R.J. Collier. 1994. Role of macrophages oxidative burst in the action of anthrax lethal toxin. *Mol. Med.* 1, 7-18.
- Krantz, B.A., R.A. Melnyk, S. Zhang, S.J. Juris, D.B. Lacy, Z. Wu, A. Finkelstein, and R.J. Collier. 2005. A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science* 309, 777-781.
- Klimpel, K.R., N. Arora, and S.H. Leppla. 1994. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. *Mol. Microbiol.* 13, 1093-1100.
- Milne, J.C., D. Furlong, P.C. Hanna, and R.J. Collier. 1994. Anthrax protective antigen forms oligomers during intoxication of mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 269, 20607-20612.
- Mock M., and A. Fouet. 2001. Anthrax. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 647-671.
- Molestina, R.E., J.B. Klein, R.D. Miller, W.H. Pierce, J.A. Ramirez, and J.T. Summersgill. 2002. Proteomic analysis of dif-

- ferentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of Hep-2 cells. *Infect. Immun.* 6, 2976-2981.
15. Oakley, B.R., D.R. Kirsch, and N.R. Morris. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 105, 361-363.
 16. Pizarro-Cerda, J., R. Jonquieres, E. Gouin, J. Vandekerckhove, J. Garin, and P. Cossart. 2002. Distinct protein patterns associated with *Listeria monocytogenes* InIA- or InIB-phagosomes. *Cell. Microbiol.* 4, 101-115.
 17. Seo, G.M., S.J. Kim, J.C. Kim, D.H. Nam, M.Y. Yoon, B.S. Koo, and Y.G. Chai. 2004. Targeting of *Bacillus anthracis* interaction factors for human macrophages using two-dimensional gel electrophoresis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 854-859.
 18. Seo, G.M., S.J. Kim, and Y.G. Chai. 2004. Rapid profiling of the infection of *Bacillus anthracis* on human macrophages using SELDI-TOF mass spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 1236-1239.
 19. Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858.
 20. Smith, H. 2000. Discovery of the anthrax toxin: the beginning of in vivo studies on pathogenic bacteria. *Trends Microbiol.* 8, 199-200.
 21. Smith, H. and H.B. Stoner. 1967. Anthrax toxic complex. *Fed. Proc.* 26, 1554-1557.
 22. Tian, W.N., L.D. Braunstein, K. Apse, J. Pang, M. Rose, X. Tian, and R.C. Stanton. 1999. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am. J. Physiol.* 276, C1121-C1131.
 23. Tonello, F., P. Ascenzi, and C. Montecucco. 2003. The metalloproteolytic activity of the anthrax lethal factor is substrate-inhibited. *J. Biol. Chem.* 274, 40075-40078.
 24. 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.

(Received October 11, 2005/Accepted November 4, 2005)

ABSTRACT : Proteome Profiling of Murine Macrophages Treated with the Anthrax Lethal Toxin
Kyoung-Hwa Jung, Giw-Moon Seo, Sung-Joo Kim, Ji-Chon Kim, Seon-Mi Oh, Kwang-Geun Oh¹, and Young-Gyu Chai* (Dept. of Biochemistry, Hanyang University, Ansan, Gyeonggi-do 426-791, Korea, ¹Dept. of Bioprocess Technol., Biopolytech College, Nonsan, Chungnam 320-9051, Korea)

Intoxication of murine macrophages (RAW 264.7) with the anthrax lethal toxin (LeTx 100 ng/ml) results in profound alterations in the host cell gene expression. The role of LeTx in mediating these effects is unknown, largely due to the difficulty in identifying and assigning function to individual proteins. In this study, we have used two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis to analyze the protein profile of murine macrophages treated with the LeTx, and have coupled this to protein identification using MALDI-TOF mass spectrometry. Interpretation of the peptide mass fingerprint data has relied primarily on the ProFound database. Among the differentially expressed spots, cleaved mitogen-activated protein kinase kinase (Mek1) and glucose-6-phosphate dehydrogenase were increased in the LeTx treated macrophages. Mek1 acts as a negative element in the signal transduction pathway, and G6PD plays the role for the protection of the cells from the hyper-production of active oxygen. Our results suggest that this proteomic approach is a useful tool to study protein expression in intoxicated macrophages and will contribute to the identification of a putative substrate for LeTx.