

소의 뇌 Inositol triphosphate kinase와 Calmodulin— Affigel과의 친화도

영남대학교 의과대학 생화학교실

임승우 · 김정희

서 론

세포막의 정보전달경로는 외부에서 어떤 정보가 오면 이차 전령물질(second messenger)에 의해 세포내의 대사경로나 반응에 영향을 주어 세포성장, 대사, 흥분, 분비, 근육의 수축과 같은 세포반응이 일어나게 된다^{1,2)}.

최근에 알려지고 있는 이차전령물질중 phosphoinositide pathway는 여러 호르몬이나 growth factor등의 정보가 세포에 전달될 때 세포막의 수용체와 결합하면phosphatidyl inositol bisphosphate(PIP₂)를 분해시켜 diacylglycerol(DG)과 inositol triphosphate(IP₃)를 만들게 된다^{4,5)}.

생성된 두 물질이 이차 전령물질로서 세포내 변화를 일으키는 것으로 diacylglycerol은 protein kinase C(PKC)를 활성화시키며 세포내의 많은 단백질을 인산화 시킴으로서 세포성장과 분화를 조절하는 효소로 알려져 있다^{6,7)}.

IP₃는 다시 IP₃ kinase에 의해 inositol tetrakisphosphate(IP₄)로 바뀌며 IP₄는 새로운 이차전령물질로서 세포막의 Ca²⁺을 세포내로 들어오게 함으로서 세포내의 Ca²⁺ level을 유지하게 된다⁸⁻¹⁰⁾.

이러한 대사과정후 IP₄는 식물등에서는 IP₅, IP₆로 간다는 보고 등¹¹⁾도 있지만 아직까지 확

실히 증명되진 않았으며 1986년 Irvine등¹²⁾에 의하면 signal전달후의 IP₃나 IP₄는 5'phosphatase에 의해 탈인산화반응이 일어나 IP₂, IP, Inositol로 분해되어 다시 PI, PIP, PIP₂생성에 참여하게 된다는 사실이 밝혀졌다.

최근 동물세포에서 IP₄가 인산화되어 IP₅, IP₆가 존재한다는 보고가 있긴하나 IP₃ kinase에 의한 IP₄의 생성과 더불어 IP₃ kinase의 존재여부도 역시 새로운 대사과정으로 소개된 상황이라 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

한편 IP₃kinase는 Ca²⁺의 존재하에 calmodulin에 의해 활성화된다는 보고들¹³⁻¹⁵⁾이 있다.

Calmodulin은 Ca²⁺을 modulate시키는 작은 단백질로서 Ca²⁺과 결합을 하여 작용하게 되며 calmodulin에 Ca²⁺이 binding하는 부위는 4군데로 알려져 있다.

1987년 Biden등¹⁵⁾은 RIN 5F insulinoma cell에서, Yamaguchi등¹⁶⁾은 돼지의 aortic smooth muscle에서, Kimura등¹⁷⁾은 대식세포에서 IP₃kinase 존재여부를 확인하였고, Morris등¹⁸⁾은 turkey의 적혈구막에 결합한 IP₃kinase의 존재를 확인하였으며 이 효소의 작용을 위한 인산기는 ATP로 부터 공급되는 것으로 보고 되었다.

1987년 Ryu등¹³⁾이 소의 뇌로부터 IP₃kinase가 Ca²⁺과 calmodulin에 의해 활성화된다는 보고를 한후 Williamson(1988)등¹⁹⁾이 IP₃kinase를 쥐의

뇌조직으로부터 정제하였으며 역시 ATP에 의존적이며 calmodulin에 민감한 효소로 확인되었으나 그들은 정제한 것을 전기영동하여 겨우 silver staining으로 한 band를 확인하는데 그쳤다. 본 연구는 inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase의 특성을 알기위하여 소의 뇌로부터 calmodulin을 분리정제하고 이를 affigel과 결합시켜 IP₃kinase와의 친화도를 관찰하고 그 성질을 이용하여 IP₃kinase정제를 위한 calmodulin이 결합된 column을 만들고 그 결합능과 분리 정도를 관찰보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

Calmodulin 정제를 위하여 금방 도살한 신선한 소의 뇌를 사용하였으며 column resin으로 phenyl Sepharose CL-4B는 Pharmacia것을, Affigel 15는 Biorad제품이며, Green gel은 Amicon사 것이고, dithiothreitol(DTT), p-mercaptosulfonyl fluoride(PMSF), sodium dodecyl sulfate(SDS), 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid(MOPS), N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid(HEPES), adenosine triphosphate(ATP), coomassie brilliant blue(CBB), ethyleneglycol-bis-(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid(EGTA)등은 sigma사 제품을 사용하였고 IP₃kinase측정을 위한 inositol triphosphate(IP₃)와 ³²P-ATP는 Boehringer Mannheim사 제품을 사용하였으며, 그의 시약은 일반회사의 특급을 사용하였다.

실험방법

Calmodulin의 정제를 위하여 1.8kg의 소의 뇌를 2L의 buffer A(50mM Tris, pH 7.8, 3mM MgSO₄, 1mM EGTA, 0.5mM EDTA, 1mM DTT, 0.5mM PMSF)에 분쇄하여 10,000 rpm

(Beckman, rotor21)에서 1시간 원침한 상청액을 (NH₄)₂SO₄ 50%로 포화시키고 1시간 진탕하여 다시 10,000rpm에서 40분간 원침하였고 상청액을 1N H₂SO₄-50%(NH₄)₂SO₄용액으로 pH를 4.2로 맞추어 냉동고에 밤새 방치시켜, 생긴 침전물을 buffer A에 녹이고 80~82°C로 3분간 열처리하여 얻은 상청액을 phenyl-Sepharose CL-4B와 동량혼합하여 CaCl₂가 2mM되게하여 15분간 실온에서 결합시켰다.

Phenyl-Sepharose column에서의 Chromatography

시료가 붙은 phenyl-Sepharose CL-4B로 column을 만든후 buffer B(50mM Tris, 0.1mM CaCl₂, pH7.5)로 씻은 다음 0.5M NaCl을 첨가한 buffer B로 씻고 column chromatography를 시행하였다. Chromatography의 조건은 표1에 나타내었다. Column을 buffer B로 씻은후 buffer C(50mM Tris, 1.5mM EGTA, pH7.5)로 유출되었다. 흡광도 280nm에서 flow chart를 그리고 시료는 tube 당 10ml씩 받아서 단백질을 확인하였다. 단백질확인은 UV spectrophotometer로 scanning 하여 그래프로 확인하고 280nm에서의 흡광도 값을 얻어 단백질량 하였다. Calmodulin의 단백질량은 Biorad의 단백질측정 시약을 이용하여 Bradford 방법²⁰⁾으로 측정하였다.

Calmodulin을 확인하여 모은 tube는 Ultrafiltration 장치(Amicon)로 질소가스하에서 농축하여 사용하였다.

SDS-Polyacrylamide gel 전기영동은 SDS가 든 10~15% polyacrylamide gradient gel에 분자량 marker와 함께 점적하여 LKB의 전기영동 장치를 이용하여 120volt에서 5시간 영동후 CBB로 염색하였으며 methanol/acetic acid가 든 액에 배경염색을 제거하여 확인하였다.

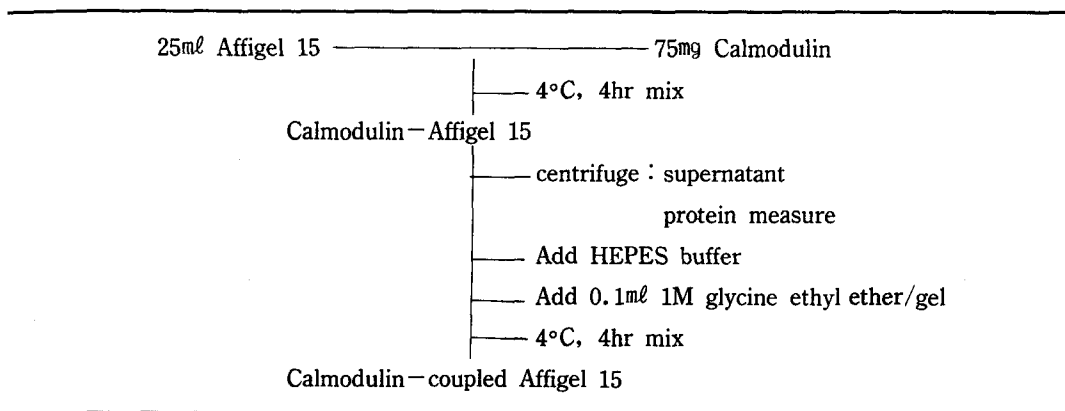
Calmodulin과 Affigel 15의 coupling

25mℓ의 affigel 15를 4°C의 증류수로 씻고 0.1M

Table 1. Optimal Condition of phenyl-Sepharose Column Chromatography.

Column	: phenyl-Sepharose CL-4B(2.6×15cm)
Flow rate	: 2ml/min
Absorbance range	: 0.5
Chart speed	: 0.5mm/min
Collection	: 10ml/5min/tube

Table 2. Coupling Procedure of Calmodulin and Affigel 15.



MOPS, pH7.5용액에 투석한 calmodulin 75mg과 1:1.5로 혼합하여 4°C에서 4시간동안 수직회전시킨후 원침하여 상청액에 남아있는 calmodulin을 측정하여 결합된 정도를 확인한 후 1M glycine ethyl ether(pH 8)을 ml gel당 0.1ml씩 넣고 4°C에서 4시간 수직회전후 HEPES buffer(10mM HEPES/Tris, pH 7.2, 1mM MgCl₂, 2mM DTT, 1mM CaCl₂)로 여러번 씻은 다음 사용하였다(표 2).

IP₃kinase의 분리

소의 뇌 1kg으로부터 2배의 homogenizing buffer(50mM Tris, 3mM MgSO₄, 1mM DTT, 0.5 mM PMSF)에서 분쇄하여 15,000rpm에서 1시간 원침후 상청액을 10% polyethylene glycol이 되게 넣어 1시간 진탕후 그 침전물을 buffer에 녹여

다시 45,000rpm에서 1시간 초원심 침전(Sorvall OTD 15)하여 상청액을 DEAE cellulose chromatography를 하였고 IP₃kinase 분획은 다시 농축하여 Green gel matrix에서 chromatography하여 IP₃kinase를 분리해 내었다.

IP₃kinase의 측정

효소반응을 위하여 substrate로는 20μM inositol triphosphate(IP₃), 100μM ATP가 든 50mM HEPES buffer에 0.1mM DTT, 100mM KCl, 20 mM MgCl₂를 첨가하고 ³²P-ATP를 300,000 cpm/tube되게 준비하였고 assay당 20μl substrate와 시료 20μl되게 하여 37°C에서 20분간 반응후 10μl의 1N H₃PO₄와 10μl의 1N KOH을 넣은후 원침한 상청액은 Thin layer chromatography(TLC)에 20μl씩 점적하여 분리하였으며 용

매로는 1M KPO₄(pH3.4)을 사용하였다. 분리가 끝난 TLC판은 말려서 X-ray film에 부착하여 약 1시간 이상 autoradiography를 시행하였으며 IP₃분획은 잘라서 10ml의 aquasol에 담구어 liquid scintillation counter(LKB)로 측정하였다¹³⁾.

Calmodulin-Affigel에 inositol triphosphate kinase의 결합능 실험

두개의 column(0.5×5cm)에 1ml의 calmodulin-affigel을 채우고 한 column은 1mM Ca²⁺이 든 50mM tris buffer로, 다른 한 column은 2mM EGTA가 든 동일 buffer로 씻은후 분리한 IP₃kinase 시료를 3ml씩 4번 적용하였다. 각각의 buffer로 씻은 다음 전자의 column은 EGTA가 든 buffer로, 후자의 column은 Ca²⁺이 든 buffer로 1ml씩 4번 유출시켜 각각을 받아 E1, E2, E3로

Table 3. Binding and Elution test of inositol triphosphate kinase on Calmodulin-Affigel 15 Column.

Group	IP ₃ kinase activity (pM/min/mg of protein)	
	Ca ⁺⁺ equilibrium buffer	EGTA equilibrium buffer
Sample loading	3ml×4	3ml×4
S1	3.00	3.00
S2	2.22	2.46
S3	0.30	1.84
S4	0.65	2.51
Washing	1ml×2	1ml×2
Elution	EGTA buffer (1ml×3)	Ca ⁺⁺ buffer (1ml×3)
E1	0.85	ND
E2	1.48	ND
E3	2.43	ND
Washing	Ca ⁺⁺ buffer (1ml×2)	Ca ⁺⁺ buffer (1ml×2)
Elution	Ca ⁺⁺ / CaM buffer (1ml×4)	Ca ⁺⁺ CaM buffer (1ml×4)
CE1	10.36	ND
CE2	12.76	ND
CE3	7.04	ND
CE4	7.70	ND

IP₃ : inositol triphosphate, ND : no detectable

CaM : calmodulin

S1, S2, S3 : collected tube number after sample was applied 3ml each.

E1, E2, E3 : eluted tube number with elution buffer 1ml each

CE1~CE4 : eluted tube number with Ca²⁺/ CaM buffer 1ml each

하였고 두 column모두 Ca^{2+} 이 든 buffer로 씻은 후 1mM Ca^{2+} 과 100 μ M calmodulin이 든 buffer로 1ml씩 4번 유출시켜 CE1~CE4로 정하였으며 받은 각 tube들의 일부를 IP_3 kinase를 측정하였다.

그외에도 동일 column에 유출액을 변화시켜 IP_3 kinase의 유출정도를 관찰하였으며 0.2% chaps buffer를 사용하였다.

성 적

소의 뇌로부터 calmodulin을 정제하기 위하여 phenyl-Sephrose column chromatography를 시행하였으며 시행조건은 표·1에 도시하였으며 chromatography의 결과를 도·1에 나타내었다. 흡광도 280nm에서 50mM Tris/HCl, pH 7.5 0.1mM $CaCl_2$ 으로 안정될 때까지 씻은후 1.5mM EGTA가 든 상기 완충액으로 calmodulin을 분리해 내었다.

Recorder에서 흡광도가 그려진 각 tube의 곡선부위를 spectrophotometer로 확인하여 흡광도 값 0.3 이상의 값인 42~47번까지 분획을 모아 농축하였다.

모은 분획을 단백정량하여 본 결과 소 brain 900g당 9mg의 calmodulin을 정제하였으며 정제 단계를 10~20%의 SDS-polyacrylamide gradient gel에 전기영동하여 도·2에 나타내었다.

도·2에서 a줄은 homogenize이며 b줄은 ammonium sulfate precipitate이고 c줄은 b의 침전후 남은 상청액이며, d줄은 pH 4.2 에서 침전된 시료, e줄은 열처리한 시료, f줄은 phenyl-Sephrose에 결합시키기 전 시료, g줄은 정제한 calmodulin을 나타낸다. 맨 뒷줄은 marker로 calmodulin의 분자량이 17,000dalton으로 비교 측정되었다. 정제한 calmodulin과 Affigel의 coupling 과정은 표·2에서 나타내어주며 calmodulin-coupled Affigel column을 이용하여 inositol triphosphate(IP_3) kinase 시료를 적용하였다.

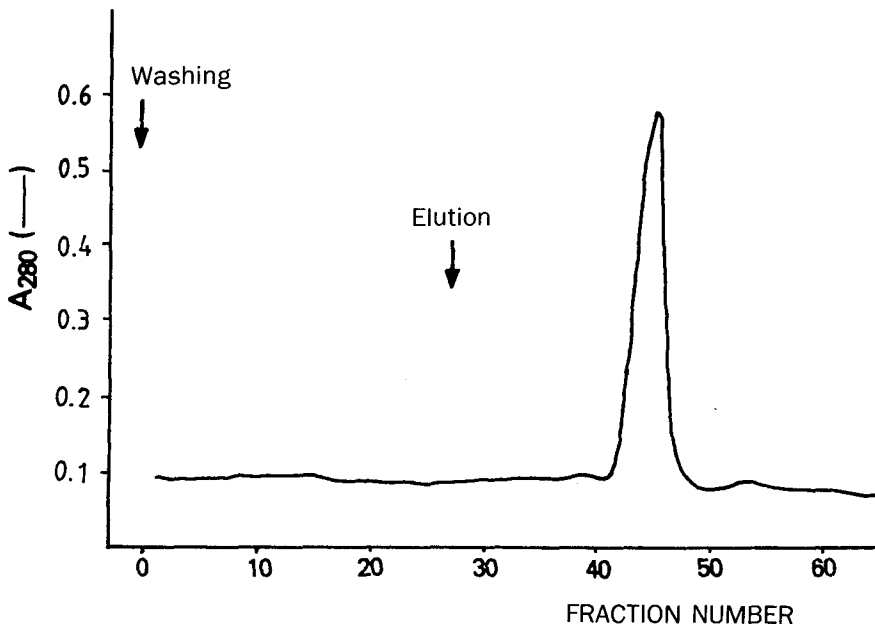


Fig. 1. Calmodulin purification on phenyl-Sephrose column. Washing solution contained 0.1mM $CaCl_2$ and eluting solution contained 1.5mM EGTA in 50mM Tris/HCl, pH 7.5 each other.

Column을 흘러나온 시료의 일부를 IP_3 kinase 측정용 하였고 측정시의 결과를 autoradiography한 그림을 도·3에 나타내었으며 1번 줄은 효소가 없는 대조군으로 ^{32}P -ATP가 그대로 나타나며 2번줄은 IP_3 kinase에 의해 인산화되어 IP_4 가 생성된 것을 관찰하였다.

시료를 column에 적용하여 결합되고 분리되는 각 시료에 대해 TLC판에서 활성도를 측정하여 표·3과 4에 도시하였다. IP_3 kinase효소의 활성도는 1분당 생성된 IP_4 의량을 계산하여 단백질 mg당으로 환산한 농도를 나타내었다.

표·3에서 Ca^{2+} 이 든 Tris buffer와 EGTA가 든 Tris buffer 각각의 column에 시료를 3ml씩 4번 적용한 것의 IP_3 kinase의 활성도는 Ca^{2+} 이 든 쪽이 잘 결합되어 S3, S4에선 거의 나오지

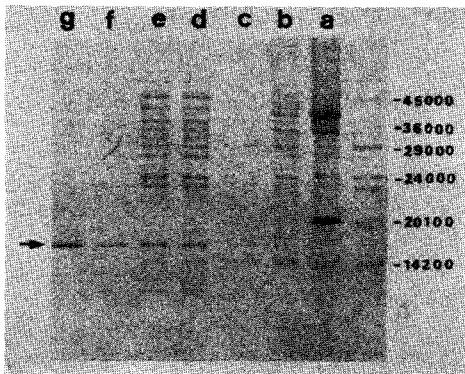


Fig. 2. 10~20% SDS-polyacrylamide gradient gel electrophoresis with purified calmodulin.

- a lane ; homogenized sample from bovine brain
- b lane ; soluble protein from homogenate
- c lane ; supernatant expected by 50% ammonium sulfate
- d lane ; precipitate in pH 4.2
- e lane ; supernatant after heat treatment
- f lane ; sample before binding with phenyl-Sepharose
- g lane ; purified calmodulin (MW 17,000)

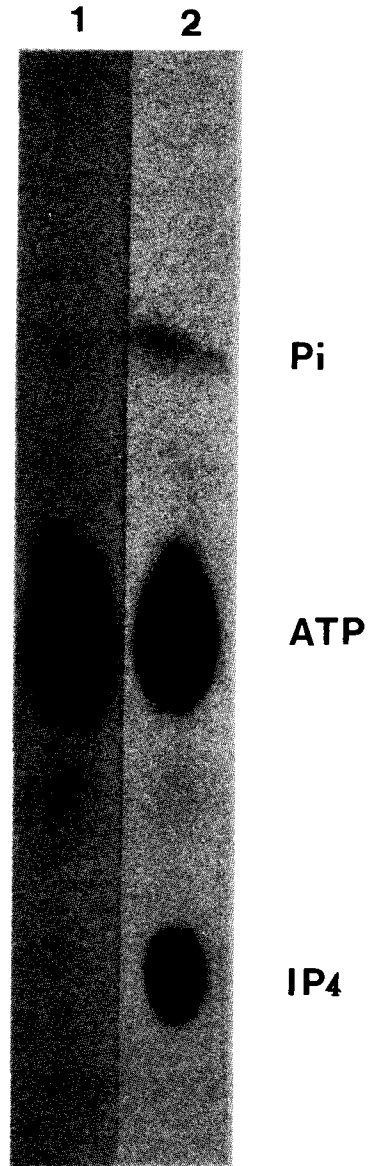


Fig. 3. Separation of $[\gamma\text{-}^{32}P]$ ins-1,3,4,5- P_4 on polyethyleneimine cellulose TLC plate and its autoradiograph.

않았으며 EGTA buffer로 유출시 Ca^{2+} equilibrium buffer group에서만 E2, E3에서 1.48, 2.43 pM/min/mg of protein으로 유출되었다.

다시 Ca^{2+} 과 calmodulin이 든 용액으로 유출시는 CE1, CE2에서 10.36, 12.76pM/min/mg

of protein의 활성도를 나타내었으나 EGTA equilibrium group에선 유출이 없었다.

그러나 calmodulin에 의한 IP₃kinase의 활성도가 상승되는 것을 유출과 비교하여 표·4에 도시하였다. EGTA buffer에서 유출에 의한 IP₃kinase활성도에서보다 Chaps buffer에서는 E2에서 23.19, E3에서 8.05pM/min/mg of protein의 많은 IP₃kinase의 유출과 집중된 활성도를 관찰할 수 있었다.

고 찰

Phosphoinositide가 세포내의 Ca²⁺의 증가와 관계가 있고 phospholipase C가 관여한다는 것이 70년대 후반에 와서야 알려지고 1980년 Mitchell등이 phospholipase C (PLC)에 의해 Ino(1, 4, 5) P₃가 생겨 Ca²⁺level을 증가시킨다는 것이 밝혀짐으로서 많은 사람들이 이 방면의 연구를 하게 되었다. 더우기 1981년 Nishizuka⁶⁾는 protein kinase C를 확인하였고 이 효소는 diacylglycerol과 phosphatidyl serine에 의해 활성화되며 protein kinase C가 세포정보전달에 밀접한 관계가 있다는 것을 확인하게 되었다^{20,21)}. 세포막의 정보전달에 대한 새로운 경로로 phosphoinositide system의 정보전달기전은 growth factor나 Ca²⁺ antagonist에 의해 전달받아 세포막의 phosphatidylinositide bisphosphate(PIP₂)는 Inositol

triphosphate(IP₃)로 되고 IP₃는 이차전령 물질로 작용하고서 IP₃kinase에 의해 Ins P₄로 인산화되거나 5-phosphatase에 의해 탈인산화되어 Ins (1, 4)P₂로 되고, Ins-1-P, Inositol로 분해되는 경로를 거친다. IP₃는 세포내의 Ca²⁺을 상승시키는 역할을 하고 IP₄는 Ca²⁺을 세포막에서 세포내로 들어오도록 함으로서 세포내 Ca²⁺level을 조절한다¹⁶⁾고 한다.

IP₃kinase는 ATP에 의해 인산화되며 calmodulin에 의해 활성화 된다는 보고들¹³⁻¹⁵⁾이 있으며 calmodulin은 Ca²⁺을 modulate하는 단백질로 알려져 있다.

IP₃kinase는 최근 연구자들이 정제를 시도하였으며 쥐의 뇌¹⁹⁾, 돼지의 aortic smooth muscle¹⁷⁾에서 일부정제한 것이 보고 되었다.

그러나 이러한 효소의 순수분리를 위하여 calmodulin의 친화성을 이용하여 분리하는 방법등이 알려지게 되었다.

본 논문은 이러한 IP₃kinase의 분리를 위한 전 단계로 calmodulin을 정제하였으며 calmodulin과 결합한 친화성 column인 affigel을 이용하여 calmodulin과 IP₃kinase의 정제를 위한 유출시료를 비교관찰하였다.

Calmodulin 정제는 소의 뇌에서 얻었으며 분자량 17,000의 한 band를 전기영동상에서 분리하여 확인하였다.

정제과정에서 calmodulin이 Ca²⁺과 결합하는

Table 4. Inositol triphosphate kinase elution by EGTA buffer and Chaps buffer on Calmodulin-Affigel 15 Column.

Elution group (1ml×3)	IP ₃ kinase Activity (pM/min/mg of protein)	
	EGTA buffer	Chaps buffer
E1	0.85	0.75
E2	1.48	23.19
E3	2.43	8.05

IP₃: inositol triphosphate

성질을 이용하여 Ca^{2+} 의 존재하에서 calmodulin과 phenyl-Sephrose CL-4B resin를 결합시켰고 column chromatography를 하여 Sephrose에 결합된 calmodulin은 EGTA가 든 buffer를 흘려보냄으로서 Ca^{2+} 과 EGTA가 결합하는 성질을 이용하여 calmodulin을 유출시킨다. 이때 EGTA는 chelating agent로 특히 Ca^{2+} 과 강하게 결합하는 성질이 있다. 정제한 calmodulin은 뇌 조직 9당 0.1mg의 량을 얻었으며, calmodulin과 affigel 15의 결합을 실시하였다.

그러나 affinity gel로 많이 사용하는 CNBr-activated Sepharose 4B등도 시도하였으나 calmodulin의 결합정도는 affigel보다 훨씬 더 강하였으나 Sepharose로부터 calmodulin을 분리시키기가 어려웠고 affigel 15이 IP_3 kinase 분리에 더 적절하였다. 만들어진 calmodulin-affigel 15 column에 IP_3 kinase를 적용시 Ca^{2+} 이 있는 상태에서 calmodulin과 결합이 강하였고 EGTA buffer group에선 결합정도가 낮았다.

IP_3 kinase의 유출의 관찰에서도 EGTA buffer로 유출시 일부 흘러나왔으나 유출정도가 낮았으므로 Ca^{2+} 과 calmodulin을 buffer에 넣어 유출시 10.36, 12.76pM/min/mg of protein의 강한 유출을 볼 수 있었다. 그러나 calmodulin(CaM)에 의한 유출과 동시에 Ca^{2+} /CaM에 의해 IP_3 kinase의 활성도가 증가된 것도 감안할 수 있다. 이는 Ryu등¹³⁾과 Takazawa등¹⁴⁾의 연구에서 IP_3 kinase는 Ca^{2+} /Calmodulin에 아주 예민하여 활성도가 증가된다는 보고등이 뒷받침해 주고 있다. Calmodulin에 의한 효소의 활성도가 높고 유출정도가 많으나 효소의 정제면에서 볼 때 이는 정제후 다시 calmodulin과 분리해야하는 단점과 calmodulin/ Ca^{2+} 등이 이 효소의 활성화를 증가시켜 활성도가 높아진 것도 감안하여 여러 다른 detergent를 사용하였다. 사용한 detergent로 chaps, tween 20, deoxycholate, cholic acid등으로 유출해 보았으나 chaps가 가장 효과적이었다.

표·4에서 EGTA와 Chaps 0.2%를 적용하여 유출한 것을 비교하였으며 Chaps buffer는 E2에서 23.19, E3에서 8.05pM/min/mg of protein의 아주 강한 유출을 관찰할 수 있었다. 그래서 Chaps buffer가 EGTA보다는 유용한 것으로 관찰되었다.

세포막 정보전달(Signal transduction)의 경로 중 phosphoinositide system에 phospholipase C (PLC)와 IP_3 -kinase가 중요역을 한다고 할 수 있다. PLC효소는 Ryu(1988)등²³⁾에 의해 소의 뇌로부터 분리한 isozyme의 단백질이나 DNA sequencing까지 이루어져 그 중 PLC-r type은 oncogene와 동일한 유전자가 보고되었고 그 분포도도 r-type만 모든 조직, 세포 등에 고루 분포되어 있다는 것이 증명되었다²⁴⁻²⁶⁾. 그의 erb B gene이나 ras gene 등이 PLC활성화에 연관이 있고, diacylglycerol유사물인 phobol ester는 protein kinase C를 지속적으로 활성화시켜 암세포를 변화하는 유도물이라는 것이 알려져 있으며 암의 기전과 세포막 정보전달의 조절기전과는 상당히 밀접한 관계가 있다는 것은 알려진 사실이다²⁷⁻³⁰⁾.

Ino. P_3 -3 kinase 효소 역시 signal pathway의 이차반응으로 IP_3 생성에 중요한 효소로 생각되거나 몇몇장기에서 확인하고 아직 확실히 밝혀져 있지 않았다³¹⁻³³⁾.

Morris등¹⁶⁾이 IP_3 -kinase가 Ca^{2+} 과 calmodulin에 의해 활성화된다는 보고와 Yamaguchi등¹⁷⁾이 돼지의 aortic smooth muscle에서 정제하여 분자량 93,000의 IP_3 kinase를 분리 보고하였으나 아직 정제에 대한 방법도 정확히 정립되지 않고 있다. 앞으로 IP_3 kinase가 정제되고 그 성질을 밝혀지게 되면 Ca^{2+} 이나 calmodulin에 의한 세포내 대사의 변화등에 대한 새로운 경로를 밝힐 수 있을 것이며 정보전달과 세포성장 조절기전을 밝힘으로서 Ca^{2+} 과 관계된 질병들과의 관계등도 좀 더 자세히 알 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

세포막의 정보전달기전중 phosphoinositide system은 정보가 전달될때 phospholipase C 효소의 작용으로 phosphatidyl inositol bisphosphate로부터 inositol triphosphate(IP₃)와 diacylglycerol이 생성되며 IP₃는 다시 IP₃kinase에 의해 inositol tetrakisphosphate(IP₄)로 되어 이차전령물로서 작용한다.

본 연구는 IP₃kinase효소가 Ca²⁺와 calmodulin에 의해 활성화되는 성질을 이용하여 calmodulin을 정제하고 IP₃kinase효소와의 친화도를 비교 관찰하였다.

Calmodulin정제는 phenyl-Sepharose resin을 이용하여 column chromatography를 시행하여 정제확인하였으며 분자량이 17,000임을 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 확인하였다. 정제된 calmodulin을 affigel column에 결합시킨 gel에 소의 뇌로부터 분리한 IP₃kinase효소가 담긴 시료를 calmodulin-affigel column에 적용하여 결합 및 유출정도를 비교하였으며 Ca²⁺이 든 buffer에서 친화도가 가장 컸으며 유출은 EGTA용액에서 일부 유출되었으며 calmodulin/Ca²⁺이 든 buffer에선 강한 유출정도를 관찰하였다. 그러나 calmodulin/Ca²⁺는 IP₃kinase효소의 활성을 증가시키며 calmodulin이 단백질이어서 정제면에서 효소와의 분리가 쉽지않아 여러 다른 detergent를 적용하였으나 0.2% chaps buffer에서 집중된 유출을 관찰하였다.

참 고 문 헌

1. Irvine, R.F. : The metabolism and function of inositol phosphates. *Biochem. Society Transduction*, 15 : 122~123, 1987.
2. Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. : Inositol phospholipid turnover and protein kinase C in stimulus-response coupling. *Biochem. Society Transduction*, 15 : 124~125, 1987.
3. Berridge, M. : Signal transduction : The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Sci. Am.* (October), 124~129, 1985.
4. Hawthorne, J.N. : Does receptor-linked phosphoinositide metabolism provide messengers mobilizing calcium in nervous tissues? *J. Biol. Chem.*, 261 : 631~637, 1986.
5. Lirosh, I. and Fain, J.N. : Regulation of phosphoinositide breakdown by guanine nucleotides. *Life Sciences*, 39 : 187~194, 1986.
6. Nishizuka, Y. : The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature*, 308 : 693~698, 1984.
7. Bocchino, S.B., Blackmore, and Exton, J.H. : Stimulation of 1,2-diacylglycerol accumulation in hepatocytes by vasopressin, epinephrine, and angiotensin II. *J. Biol. Chem.*, 260 : 14201~14207, 1985.
8. Mayr, G.W. : Inositol phosphates : Structural components, regulators and signal transducers of the cell-a review. *Topics in Biochem.*, 1~18, Boehringer.
9. Berridge, M.J. and Irvine, R.F. : Inositol triphosphate, a novel messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312 : 315~320, 1984.
10. Irvine, R.F., Anggard, E.E., Letcher, A.J. and Downes, C.P. : Metabolism of inositol 1,4,5-triphosphate and inositol 1,3,4-triphosphate in rat parotid gland. *Biochem. J.*, 229 : 505~511, 1985.
11. Hansen, C.A. Mah, S., and Williamson, J.

- R. : Formation and metabolism of inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate in liver. *J. Biol. Chem.*, 261 : 8100~8103, 1986.
12. Irvine, R.F., Letcher, A.J., Heslop, J. P., and Berridge, M.J. : The inositol tris/tetrakisphosphate pathway-demonstration of Ins(1,4,5)P₃-kinase activity in animal tissues. *Nature*, 320 : 631~634, 1986.
 13. Ryu, S.H., Lee, S.Y., Lee, K.Y., and Rhee S.G. : Catalytic properties of inositol triphosphate kinase : activation by Ca⁺⁺ and calmodulin. *FASEB*, 388~393, 1987.
 14. Takazawa, K., Passarero, H., Dumont, J.E., and Erneux, C. : Ca²⁺/calmodulin sensitive inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase in rat and bovine brain tissues. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 153 : 632~641, 1988.
 15. Biden, T.J., Comte, M., Cox J.A. and Wollheim, C.B. : Calcium-calmodulin stimulates inositol 1,4,5-triphosphate kinase activity from insulin secreting RINm5F cells. *J. Biol. Chem.*, 262 : 1~4, 1987.
 16. Yamaguchi, K., Girata, M., and Kuriyama, H. : Purification and characterization of inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase from pig aortic smooth muscle. *Biochem. J.*, 251 : 129~134, 1988.
 17. Kimura, Y., Hirata, M., Yamaguchi, K. and Koga, T. : A soluble Ins P₃ 3-kinase was shown to phosphorylate Ins P₃ to Ins P₄ in macrophage. *Arch. Biochem. Biophys.*, 257 : 363~369, 1987.
 18. Morris, A.J., Downes, P., Harden, K. and Michell, R.H. : Turkey erythrocytes possess a membrane-associated inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase that is activated by Ca⁺⁺ in the presence of calmodulin. *Biochem. J.*, 248 : 489~493, 1987.
 19. Johanson, R.A., Hansen, C.A. and Williamson, J.R. : Purification of D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase from rat brain. *J. Biol. Chem.*, 263 : 7465~7471, 1988.
 20. Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 49 : 248~254, 1976.
 21. Berridge, M.J. : Oncogenes, inositol lipids and cellular proliferation. *Biotechnology*, 541~546, 1984.
 22. Bennett, C.F. and Crooke, S.T. : Purification and characterization of a PI-specific phospholipase C from guinea pig uterus. *J. Biol. Chem.*, 262 : 13789~13797, 1987.
 23. Suh, P.G., Ryu, S.H., Choi, W. C., Lee, K.Y., and Rhee, S. G. : Monoclonal antibodies to three phospholipase C isozymes from bovine brain. *J. Biol. Chem.*, 263 : 14497~14504, 1988.
 24. Fukui, T., Lutz, R.J. and Lowenstein, J.M. : Purification of a phospholipase C from rat liver cytosol that acts on phosphatidyl-inositol 4,5-bisphosphate and phosphatidyl inositol 4-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 263 : 17730~17737, 1988.
 25. Ryu, S.H., Cho, K.S., Lee, K.Y., Suh, P.G. and Rhee, S.G. : Two forms of PI-specific PLC from bovine brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 141 : 137~144, 1986.
 26. Suh, P.G., Ryu, S.H., Moon, K.H., Suh, H.W. and Rhee, S.G. : Cloning and sequence of multiple forms of phospholipase

- C. Cell, 54 : 161~169, 1988.
27. Katan, M., Kriz, R.W., Totty, N., Philip, R., Meldrum, E., Aldape, R.A., Knoopf, J.L. and Parker, P.J. : Determination of the primary structure of PLC-154 demonstrates diversity of phosphoinositide-specific phospholipase C activity. Cell, 54 : 171~177, 1988.
 28. Moolenaar, W.H., Tertoolen, L.G.J. and de Laat, S.W. : Phobol ester and diacylglycerol mimic growth factors in raising cytoplasmic pH. Nature, 312 : 371~374, 1984.
 29. Williams, L.T. : Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. Science, 243 : 1564~1570, 1989.
 30. Fleischman, L.F., Chaheala, S.B. and Cantley, L. : Ras-transformed cells : Altered levels of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and catabolites. Science, 231 : 407~410, 1986.
 31. Hallcher, L.M., and Sherman, W.R. : The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. J.Biol.Chem., 255 : 10896~10901, 1980.
 32. Taylor, M.V., Metcalfe, J.C., Hesdeth, T.R., Smith, G.A., and Moore, J.P. : Mitogens increase phosphoinositides in thymocytes. Nature, 312 : 462~465, 1984.
 33. Balla, T., Guillemette, G., Baukal, A.J., and Catt, K.J. : Metabolism of inositol 1, 3, 4-triphosphate to a new tetrakisphosphate isomer in Angiotensin-stimulated adrenal glomerulosa cells. J.Biol.Chem., 262 : 9952~9955, 1987.

- Abstract -

THE AFFINITY OF CALMODULIN-AFFIGEL FOR INOSITOL TRIPHOSPHATE KINASE FROM BOVINE BRAIN

Sung Woo Lim, Jung Hye Kim

*Department of Biochemistry
College of Medicine, Yeungnam University
Taegu, Korea*

The one event on signalling mechanism is the cleavage by adenylyl cyclase of ATP into second messenger, cyclic AMP. The other transfer system of inositol metabolism, it is widely recognized that hydrolysis of the minor membrane lipid phosphoinositide bisphosphate(PIP_2) initiated by occupation of certain receptors and catalyzed by phospholipase C, lead to the generation of the two intracellular messengers, inositol triphosphate(IP_3) and diacylglycerol(DG). IP_3 is converted to inositol tetrakisphosphate(IP_4) by IP_3 kinase.

In the present study, it is that purification of calmodulin is used by phenyl-Sepharose CL-4B chromatography, its molecular weight, 17,000 in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. In order to observe the affinity between calmodulin(CaM)-Affigel 15 and IP_3 kinase, and isolated IP_3 kinase, was applied in CaM-Affigel with Ca^{2+} equilibrium buffer and EGTA equilibrium buffer.

We compared with binding and elution effect of IP_3 kinase in several condition of buffer. In affinity of binding, Ca^{2+} equilibrium buffer was in the most proper condition, and elution, CaM/ Ca^{2+} buffer(CE 1 10.36, CE2 12.76pM/min/mg of protein) was effected much more than EGTA buffer(E2 1.48, E3 2.43pM/min/mg of protein), but CaM/ Ca^{2+} stimulate the activity of IP_3 kinase.

And then, several detergents such as sodium deoxycholate, tween 20, cholic acid, polyethylene glycol, chaps were applied.

The 0.2% chaps buffer(E2 23.19, E3 8.05pM/min/mg of protein) was the most effective in elution of IP_3 kinase.