

지질의 물리화학적 성상이 적혈구막 Band 4.5 단백질의 재조립 (Reconstitution)에 미치는 영향

이화여자대학교 의과대학 생리학교실

하 중 식

= ABSTRACT =

The Effects of Physical States of Phospholipids on the Incorporation and CB Binding Activity of Band 4.5 Protein of human Erythrocyte Membrane in Reconstituted Vesicles

Jong - Sik Hah, Ph.D.

Department of Physiology, College of Medicine, Ewha Womans University

Proteoliposomes were prepared by reconstitution of a solubilized band 4.5 protein of human erythrocyte membrane with a mixture of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) of varying ratios. The incorporation of the band 4.5 protein into the reconstituted vesicles was dependent on the stability of the bilayer of lipid added exogeneously when mixed soybean PE and egg PC were used for reconstitution.

The protein/phospholipid ratio was maximal at 25% PC and 75% PE, the composition which give maximal bilayer instability. The specific activity of the cytochalasin B binding of the reconstituted band 4.5 protein increased monotonically as PC content increased in egg PC/soybean PE mixture. These coincide with the results of proteoliposomes reconstituted using crude protein extracts containing band 4.5 protein.

Band 4.5 protein, however, changed significantly the phase of the lipid in reconstituted vesicles instead of that protein crude extract modified slightly the phase of the lipid. No lipidic particles (LIP, seen by freeze-fracture electron microscopy) were seen in all lipid mixtures studied.

From above findings the fact that pre-existing defects in lipid bilayer promote protein incorporation into the bilayer during reconstitution is confirmed and band 4.5 protein somewhat seems to favor the bilayer structure.

서 론

일반적으로 생체막은 그 기초가 지질의 이중층막(lipid bilayer)으로써 단백질이 peripheral proteins 형태로 막 주위에 결합되어 있거나 혹은 integral proteins으로써 막내에 존재함으로써 지질분자와 특수한 결합을 하고 있는 것으로 알려져 있다^{1,2)}.

생체막에서 운반체(transporter)로 알려져 있는 단백질은 대부분이 막을 관통하는 integral proteins으로써 이들 단백질의 기능은 인접하고 있는 주위지질에 의하여 영향을 받게 되리라는 것이 쉽게 유추된다. 따라서 최근에는 생체막으로부터 단백질을 분리해낸 후에 이를 지질의 종류와 물리적 성상이 다른 인공막에 재조립시킨 후 단백질의 기능을 측정하므로써 그 작용기전을 규명하려는 시도가 이루어지고 있다. Wickner³⁾는 M-13 단백질을 Model 막에 재조립(reconstitution)코자 할 때 단백질이 삽입되는 정도는 막을 구성하고 있는 지질의 phase transition 온도에 영향을 받는다고 하였고, 혈청의 apolipoproteins 과 lecithins의 complex형성⁴⁾과 glucagon과 lecithins의 complex형성⁵⁾등도 지질의 phase상태에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. Marsh 등⁶⁾은 phase transition 온도에서 지질막에 단백질이 많이 삽입되는 이유는 phase transition이 일어날 때 지질의 이중층막에 구조적인 결합이 많이 생기게 되어 단백질의 삽입이 용이해지기 때문이라고 주장하였다.

한편 지질의 구성과 물리적인 성상은 재조립된 단백질의 기능에도 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Kagawa 등⁷⁾은 mitochondrial ATPase를 liposome 에 삽입시킬 때 어떤 특수한 지질로 구성된 liposome 에서 활성도가 가장 컸고 이때 지질의 구성은 bilayer instability를 가장 크게 나타내는 지질의 구성과 일치함을 보였으며⁸⁾, 적혈구막에서 단백질을 분리해낸 후 liposome 에 재조립시킬 때에도 liposome을 만들때에 사용한 지질의 종류에 따라서 단백질의 기능이 변화함을 보고하였다^{9,10)}.

저자는 지난번 실험에서 적혈구막으로부터 부분적으로 분리된 포도당 운반체를 적혈구막의 주 phospholipids인 phosphatidylcholine과 phosphatidylethanolamine 혼합지질속에 재조립시킬 때에 혼합지질의 조성에 따라 단백질의 삽입(incorporation)과 cytochalasin B의 결합능력이 변함을 보고 한 적이 있다¹¹⁾. 그동안 적혈구막의 포도당운반체는 band 4.5에 해당하는 polypeptide로 알려지게 되었고^{12~15)} 비교적 최근에는 이 단백질의 순수한 분리가 가능하게 됨으로써 단백질과 지질의 상호작용을 이해하기 위해서는 순수한 band

4.5의 재조립시험이 필요하게 되었다.

따라서 본 실험에서는 적혈구막으로부터 band 4.5 단백질을 분리 정제한 후 이를 phase diagram과 lipid structure를 알고 있는 phosphatidylcholine 과 phosphatidylethanolamine의 혼합지질과 세포막을 재조립할 때에 lipid bilayer의 구조적 결합이 단백질의 막에 대한 결합 및 cytochalasin B의 결합능력에 어떤 영향을 미치는지를 관찰함으로써 단백질과 지질의 상호작용을 보다 정확히 이해하려고 시도하였다.

재료 및 방법

1) 실험재료

Egg phosphatidylcholine과 soybean phosphatidylethanolamine은 Avanti Polar-lipids Inc. (Birmingham, Alabama, U. S. A.)에서 구입하였고 Tx-100는 J. T. Baker Co. (Phillipsberg, New Jersey, U. S. A.)에서 구입하였다. Bio Beads (SM-2)는 Bio-Rad Laboratories (Richmond, California, U. S. A.)에서, cytochalasin B는 Sigma chemical Co. (Saint Louis, Missouri, U. S. A.)에서, ³H-labelled cytochalasin B는 New England Nuclear Co. (Boston, Massachusetts, U. S. A.)에서, DE-52 Sepharose는 Whatman Co. (England)에서 구입하였고, Octyl glucoside는 일부는 Sigma chemical Co.에서 구입하고 주로 실험실에서 합성하여 사용하였다. 그의 모든 시약은 가급적 가장 질이 좋은 것들을 쓰도록 노력하였다.

2) 포도당운반체 (band 4.5)의 분리

수혈기간은 지났으나 비교적 신선한 혈액을 사용하여 Dodge 등¹⁶⁾의 방법으로 ghost를 만들었다. 먼저 cytoskeleton 등 peripheral proteins을 제거하기 위해서 Steck과 Yu¹⁷⁾의 방법으로 EDTA를 처치하였다. 즉 ghost를 1mM EDTA 용액에서 PH 10.0으로 적정후에 얼음속에 20분간 세워두었다가 100,000 × g에서 30분간 원심분리하였다. 침전물을 0.1mM EDTA 용액에 재부유시킨 후 PH 12.0으로 적정하고 20분간 얼음속에 세워두었다가 100,000 × g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에는 band 3, 4.5, 7등이 남아 있다. 이를 10mM Tris buffer (pH 7.4)로 한번 세척한 후 Kasahara와 Hinkle¹²⁾방법 및 Baldwin 등¹⁵⁾의 방법으로 band 4.5를 선택적으로 분리하였다. 즉 Kasahara와 Hinkle의 방법으로는 위에서 얻은 침전물을 0.5% Tx-100와 50mM Tris (PH 7.4)가 있는 용액에서 30분간 용해(solubilization) 시키고 100,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이를 같은

원심력하에서 한번더 원심분리후 상층액을 미리 준비한 DE-52 column에 옮겨 effluents를 얻고 이를 직접 연결된 SM-2 column을 통하여 Tx-100를 제거하였다. 이 여과액을 100,000 × g에서 60분간 원심분리하여 침전물인 band 4.5를 얻었다.

Baldwin 등의 방법으로는 EDTA로 추출하여 얻은 침전물을 46mM octylglucoside와 50mM Tris-HCl (pH 7.4) 및 2mM dithiothreitol이 함유된 용액에서 30분간 용해시키고 100,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이를 같은 원심력하에서 한번더 원심분리한 후 상층액을 미리 34mM octylglucoside와 50mM Tris-HCl 및 2mM dithiothreitol로 세척한 DEAE-52 cellulose column을 통해 effluents를 얻고 detergent를 제거하기 위해서 50mM Tris-HCl 용액에서 3시간동안 투석(dialysis)시키고 즉시 3배로 희석(dilution)시킨 후 100,000 × g에서 60분간 원심분리하여 침전물인 band 4.5를 얻었다.

3) 재조립 (reconstitution) 방법

(1) Tx-100로 추출한 band 4.5의 재조립: 5mg의 egg PC와 soybean PE의 혼합지질을 PC의 농도가 0, 15, 25, 50 및 75%가 되도록 준비한후 rotary vacuum evaporator를 사용하여 용매인 chloroform을 완전히 제거함과 동시에 시험관 내면에 얇은 지질의 막을 만들었다. 각 농도의 지질막에 DEAE-52 column의 effluents 20ml(0.5% Tx-100 함유)씩 넣고 여기에 Tx-100를 0.8%가 되도록 첨가한후 1분간 세계진탕(vortex)하고, 30분간 흔들어주면서 incubation한후 Tx-100를 제거하기 위하여 batch방법 혹은 chromatography 방법으로 SM-2를 제거하였다. Batch 방법은 용액 1ml당 0.1g씩 젖은 SM-2를 직접 가하고 2시간 흔들어 준 후에 glass wool를 사용하여 여과하였고 여과액을 2회 반복 같은 조작으로 더 처리한 후에 마지막 여과액을 100,000 × g에서 60분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이를 1/10 BSS 용액에 부유시킨 후 사용할때까지 -70°C에 보관하였다. Column chromatography 방법은 각 용액의 Tx-100를 SM-2 column (1.2cm × 30cm)을 통하여 제거하는 방법으로서 flow rate는 40ml/hour로 하였다. 이 여과액을 100,000 × g에서 60분간 원심분리하여 침전물을 얻었고 이 침전물을 1/10 BSS 용액에 부유시킨 후 사용할때까지 -70°C에 보관하였다.

(2) Octylglucoside로 추출한 band 4.5의 재조립:

전과 같은 방법으로 혼합지질의 얇은 막을 제조한후 DEAE-52 column의 effluents 20ml (34mM octylglucoside 함유)를 가한후 1분동안 진탕(vortex)하

고 4°C에서 30분간 흔들면서 incubation하였다. 막을 재조립하기 위해서 detergent-protein-phospholipid 혼합액을 50mM Tris-HCl (pH 7.4) 용액에서 3시간 투석시킨후 다시 3배로 희석하여 100,000 × g에서 60분간 원심분리 하였다. 침전물을 1/10 BSS 용액에 다시 부유시킨 후 사용할때까지 -70°C에 보관하였다.

4) 지질의 분석

재조립된 세포막(reconstituted membranes)의 지질의 구성성분을 측정하기 위해서 0.2ml의 세포막 부유액으로부터 지질을 추출한 후 thin-layer chromatography로 각 지질을 분리 하였다¹⁸⁾. 세포막의 주 구성 성분인 PC와 PE는 TLC plate를 황산과 에칠알콜(1:1) 혼합액으로 분무한후 180°C에서 10분간 태움으로써 구분하였고, PC와 PE 각 spot를 긁어 모은 후이 속에 있는 무기인산(phosphate)을 Bartlett¹⁹⁾의 방법으로 측정한후 각 지질량을 계산하였다.

5) 단백질의 분석

재조립된 세포막에서의 단백질의 종류와 상대적인 양을 알기위해서 세포막 부유액을 Fairbanks 등²⁰⁾의 방법으로 disc gel electrophoresis를 하였고 각 band의 coomasie blue 염색정도를 densitometer(Gilford Co)로 측정하였다. 총 단백질의 양은 Lowry 등²¹⁾의 방법으로 측정하되 sample의 성질상 약간의 수정을 가하였다. 즉 본 실험에서 사용되는 인지질들은 용액속에서 혼탁하여 분광계에서 optical density를 측정할 때에 교란(interference)을 야기하므로 이를 배제하기 위하여 다음과 같이 처리하였다.

즉 (1) 0.2ml의 sample에 1%의 sodium lauryl sulfate를 가하였다. (2) 여기에 2 ml의 reagent C를 가하고 끓는 물속에서 10분간 가열하였다. (3) 0.2 ml의 phenol reagent를 가하고 잘 섞은후 파장 750mm에서 optical density를 측정하였다. 이와 같은 처리로써 phosphatidylcholine에 의해서 생기는 interference를 100배까지 줄일 수 있다. 만약 이와같은 방법으로도 여전히 혼탁하여 측정이 용이하지 않을 경우에는 또 다음과 같이 시도하였다. 즉, (1) 0.2ml의 sample에 0.015%의 deoxycholate를 넣고 진탕한후 10분간 세워둔다. (2) 여기에 7.2% trichloroacetic acid를 가하고 3,000 × g에서 30분간 원심 침전시켰다. (3) 침전물을 0.015%의 deoxycholate와 7.2%의 trichloroacetic acid가 들어있는 3ml의 수용액에 재 부유시킨후 10분간 세워 두었다. (4) 이를 다시 같은 조건으로 원심 침전시키고 (3)과 (4)의 과정을 한번 더 반복한 후 일반적인 Lowry 등의 방법으로 단백질을 정량하였다. 이때 단백질의 표준곡선은 소의 혈청알부민(BSA)와 소의혈청

r -글로부린 (γ globulin)을 표준단백질로 사용하여 작성하였으며, 소의 혈청알부민은 그 양이 $75 \mu\text{g}$ 이상에서는 농도에 따른 optical density의 직선적인 관계를 볼 수 없고 반면에 소의 혈청 r -globulin은 $25 \mu\text{g}$ 이하에서는 감수성이 약하기 때문에 두 단백질로 그린 표준곡선의 평균값으로 표준곡선을 그렸다.

6) Cytochalasin B의 결합실험

포도당운반체가 재조립된 세포막을 1/10 BSS 용액에 재부유시킨후 4°C 에서 초자 homogenizer로 균질액을 만들었다. 원심분리용 시험관에 $0.02 \mu\text{c/ml}$ 의 ^3H -labelled cytochalasin B를 함유하고 전체 cytochalasin B의 농도가 $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-5}\text{M}$ 되는 용액을 준비한후 각 시험관에 위의 세포막 균질액을 1ml씩 가하였다. 이 혼합용액을 vortex로 1분간 잘 섞은후 실온에 30분간 세워 두었다가 $100,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하고 supernatant와 pellet에 있는 ^3H -CB의 방사능을 Tm Analytic Liquid Scintillation Counter로 측정하여 Scatchard의 방법²²⁾으로 결합양상을 조사하였다.

7) 전자현미경 사진촬영

재조립된 proteoliposomes의 막의 형태를 관찰하기 위하여 $0.1 \mu\text{l}$ 의 specimen을 두겹의 얇은 구리판속에 스며들게 하고 이를 빠른 속도로 액화 propane속으로 밀어넣음으로써 얼렸다. 얼어있는 specimen을 Polarion C-7500 Unit속에서 fracture시켰으며 백금/탄소로 evaporate시킨후 replicas를 IN 질산에 띄우고 hypochloric acid로 세척한 후 Siemen 101 전자현미경으로 관찰하고 사진을 찍었다.

실험 결과

1) PC와 PE의 혼합지질이 band 4.5 proteoliposome 막의 총지질 재조합에 미치는 영향 :

Table III-1. Total phospholipid recovered from reconstituted band 4.5 protein

PC/PE ratio of exogenous lipid	Total phospholipid ($\mu\text{g/ml}$)
No exogenous lipid	146.3 ± 19.6
0 / 100	556.1 ± 37.2
15 / 85	565.5 ± 17.1
25 / 75	566.0 ± 10.3
50 / 50	505.9 ± 48.4
75 / 25	532.5 ± 73.2

Band 4.5 단백질과 5mg의 egg PC와 soybean PE의 혼합지질로 proteoliposomes을 만들었을때 총지질의 재조합은 지질의 구성에 관계없이 거의 일정하였다 (Table III-1).

재조합된 세포막의 PC/PE에 대한 비율은 proteoliposome을 만들때 가한 PC/PE 비율에 직선적으로 비례하였으나 PC의 막에 대한 결합이 PE에 비해서 약간 증가하는 경향을 보였다 (Fig. III-1).

Band 4.5를 분리했을때 단백질이 가지고 있는 고유의 PC와 PE의 양은 일정하였다. 한편 외부에 가한 PC와 PE의 비율에 따른 band 4.5 단백질의 재조합된 양은 PC의 전체 지질에 대한 비율이 25%일때 가장 많았고 PC의 비율이 이보다 낮거나 높으면 점점 감소하는 경향을 보였으며 (Fig. III-2) 어떤 비율에서도 대조군 보다는 높은 값을 보였다.

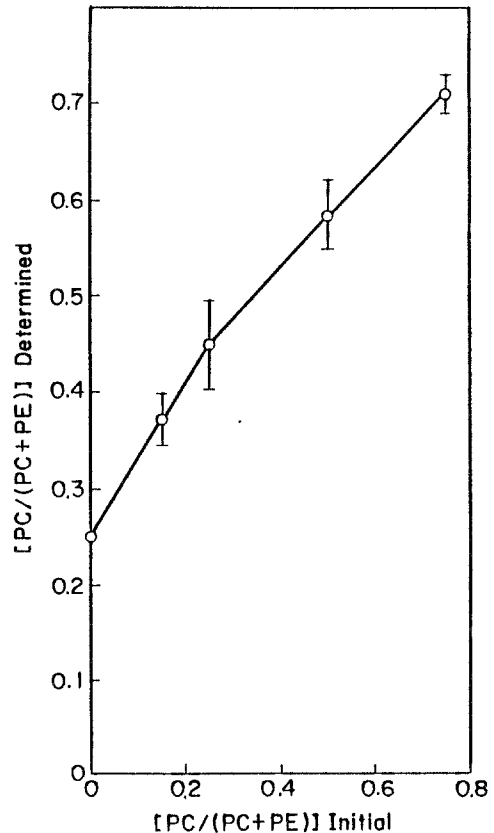


Fig. III-1. The ratio of PC/PC+PE in reconstituted band 4.5 proteoliposomes as function of that in exogenously added lipid. Each point represents a mean value and bars represent standard errors.

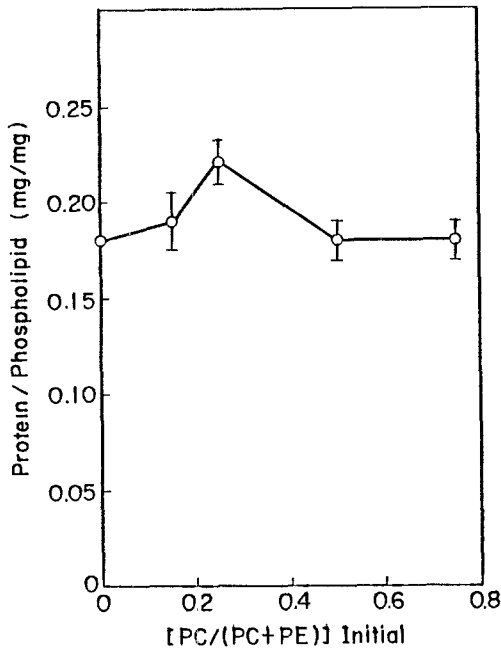


Fig. III-2. The ratio of protein to phospholipid in reconstituted band 4.5 protein as function of PC/PC+PE ratio of exogenous lipids. Each point represents a mean value and bars represent standard errors.

2) PC와 PE의 혼합비율이 band 4.5 proteoliposome 막의 cytochalasin B 결합능력에 미치는 영향 :

Egg PC와 soybean PE의 혼합비율로 재조합된 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합양상은 포화적 (saturable) 이고 직선적 (linear) 인 양면성을 보였으며 (Fig. III-3) 직선적인 부분은 proteoliposome 의 PC함량이 증가함에 따라 증가하였다. 이론적으로 직선적인 결합에 해당되는 것은 proteoliposome의 지질이나 단백질에 비특이적 (non-specific) 으로 결합된 것이거나 물과 함께 trap된 것으로 볼 수 있으므로 이부분을 결합곡선에서 뺀후 포화적인 결합부분만 Scatchard 방법에 의해서 분석하였다니 직선을 나타내었다 (Fig. III-3 내의 inset). 이는 band 4.5 proteoliposome에서의 cytochalasin B의 결합부위는 하나뿐임을 보이는 것이다. 이때 외전상 해리상수 (KD)는 약 $0.14 \mu\text{M}$ 이었고 이는 proteoliposome의 PC함량이 증가함에 따라 약간 증가하는 경향을 보였다 (Fig. III-4). Cytochalasin B의 총 결합능력 (BT) 도 proteoliposome의 PC 함량이 증가함에 따라 약간 증가하는 경향을 보였으며 (Fig.

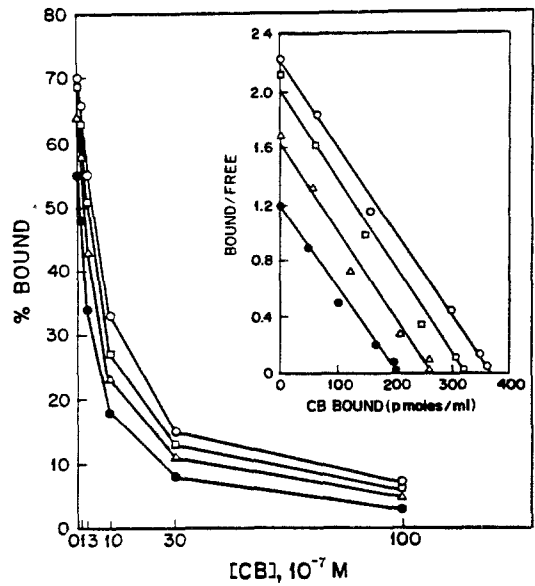


Fig. III-3. Equilibrium binding of cytochalasin B to proteoliposomes reconstituted from fixed amounts of band 4.5 protein and lipid mixture of varying ratio egg PC/soy PE. The PC/PC+PE ratio in liposomes used are 15/85 (○), 25/75 (△), 50/50 (□), and 75/25 (○), respectively. Scatchard analysis of data are shown in inset.

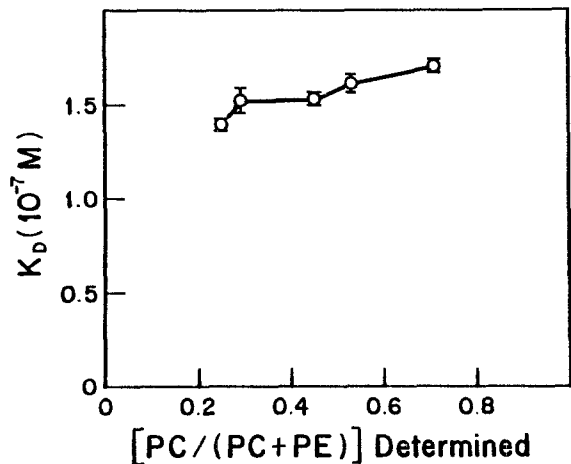


Fig. III-4. Dissociation constant (KD) of cytochalasin B binding to proteoliposomes reconstituted from band 4.5 protein and exogenous lipid mixture of PC and PE of varying ratios. Each point represents a mean value and bars represent standard errors.

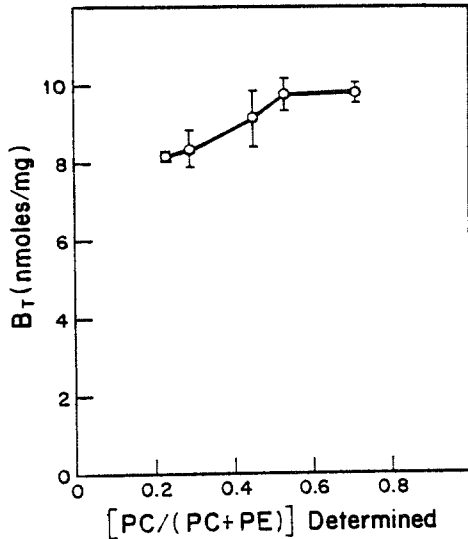


Fig. 3-5. Total binding capacities (BT) of cytochalasin B to proteoliposomes reconstituted from band 4.5 protein and exogenous lipids of different PC/PC+PE ratio. Each point represents a mean value and bars represent standard errors.

III-5), 측정된 PC함량이 71%일때 총 결합능력은 외부 지질을 가하지 않은 대조군에 비하여 약 17배 증가되었다.

3) Band 4.5 단백질이 재조립된 proteoliposomes 막의 지질구조에 미치는 영향:

지질이 단백질의 재조립에 영향을 주는 반면에 band 4.5 단백질은 재조립된 proteoliposomes 막의 지질구조를 변화시켰다.

PC/PE의 혼합조성에 관계없이 band 4.5 단백질과 재조립시키면 재조립된 proteoliposomes의 막은 bilayer 구조로 변화하였다(Fig. 3-6). 즉 PC의 PE에 대한 백분율이 15%~25% 일때 그 혼합지질이 나타내던 non-bilayer 구조 까지도 bilayer 형태로 변화하였다.

4) "Freezing - thawing" 이 band 4.5 proteoliposome 막의 cytochalasin B 결합능력에 미치는 영향:

막을 재조립시킬때에 "얼렸다 · 녹였다." 하는 과정을 반복하면 leaky vesicle을 막아주고 vesicle의 융합을 촉진하는 것으로 알려져 있다²³⁾²⁴⁾. 또한 이때에 sonication을 잠깐하면 liposome속으로 단백질이 삽입되는 것이 촉진될 뿐만 아니라 단백질의 활성도도 증가되는 것으로 알려져 있다¹²⁾²⁵⁾. 본 실험에서도 재조합 실험과정중 proteoliposome을 액화질소에 담그어 얼리고 다시 실온에서 녹이는 과정을 6회까지 반복하면서 cy-

tochalasin B 결합능력을 측정, 비교하였다. Band 4.5 proteoliposome의 단백질삽입은 이과정의 반복에 의해서 증가하였고 cytochalasin B 결합능력도 증가하였다(Fig. 3-7). Specific activities는 얼렸다 · 녹히는 과정을 1회, 2회, 3회 했을때와 전혀 하지 않았을때 각각 8.5, 10.2, 8.7 및 7n moles/mg으로서 2회 반복했을때 단백질의 활성도가 가장 높았고 sonication을 하면 단백질의 활성도가 오히려 감소하였다.

고 찰

몇몇 연구자들¹²⁾¹⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾이 포도당 운반체를 분리한 후 재조립코져 시도하였으나 이들은 detergents에 의하여 용해된 단백질의 활성도를 유지하려는 의도였으며 지질의 구조에 따른 단백질의 기능을 연구한 실험 보고는 아직 없다.

일찌기 Kahlenberg 및 Banjo²⁸⁾는 적혈구막으로부터 분리한 ghosts 세포막을 phospholipase A₂로 처리하여 β-지방산을 제거하면 포도당의 결합능력이 75%까지 현저히 줄어드는 것을 관찰하였으며, 반면 phospholipase C나 D로 처리하여 막지질의 phosphodiester linkage를 각각 64%와 46% 가수분해시켜도 막의 포도당 결합능력은 별로 영향을 받지 않는 것으로 보고하였다. 이는 세포막을 구성하고 있는 인지질의 친수성(hydrophilic)인 머리부분과 배수성(hydrophobic)인 꼬리부분중 배수성 부분이 포도당의 결합에 더 영향을 주고 있음을 나타낸다.

Melchior와 Czech²⁹⁾는 지방세포에서 부분적으로 분리한 포도당 운반체를 지질낭에 재조합시킬때에 온도를 변화시키면 재조합된 세포막에서 포도당의 이동속도가 변화하는 것을 관찰하였으며 지질이 gel상태로 있을때에 이동속도가 감소됨을 보고 하였다. 이와 비슷한 실험으로써 Baldassare와 Silbert³⁰⁾는 LM 세포에서 sterol을 추출하였더니 gel상태의 지질구조를 형성하였고, 포도당의 이동이 감소됨을 보고하였다.

이상의 실험결과들은 모두 세포막을 구성하고 있는 지질의 배수성 부분인 지방산의 물리적인 상태가 인접해 있는 단백질의 기능에 결정적인 영향을 미칠수 있음을 보이고 있다. 따라서 저자는 지난번 실험¹¹⁾에서 적혈구 막으로부터 부분적으로 추출한 비교적 덜 순수한 포도당 운반체를 PC와 PE의 조성을 변화시킴으로써 막의 물리적 성상이 각각 다른 지질낭속에 재조립시킬때에 포도당 운반체의 cytochalasin B의 결합능력은 PC의 농도에 비례 함을 보였으며, 이는 지질을 구성하고 있는 배수성 부분인 지방산의 포화도가 클 때에 단백질의 기능이 증가함을 보이는 것이며, egg PC인 경우 농도가 증가할 수록 bilayer를 형성하는 경향이 증가하므로³¹⁾

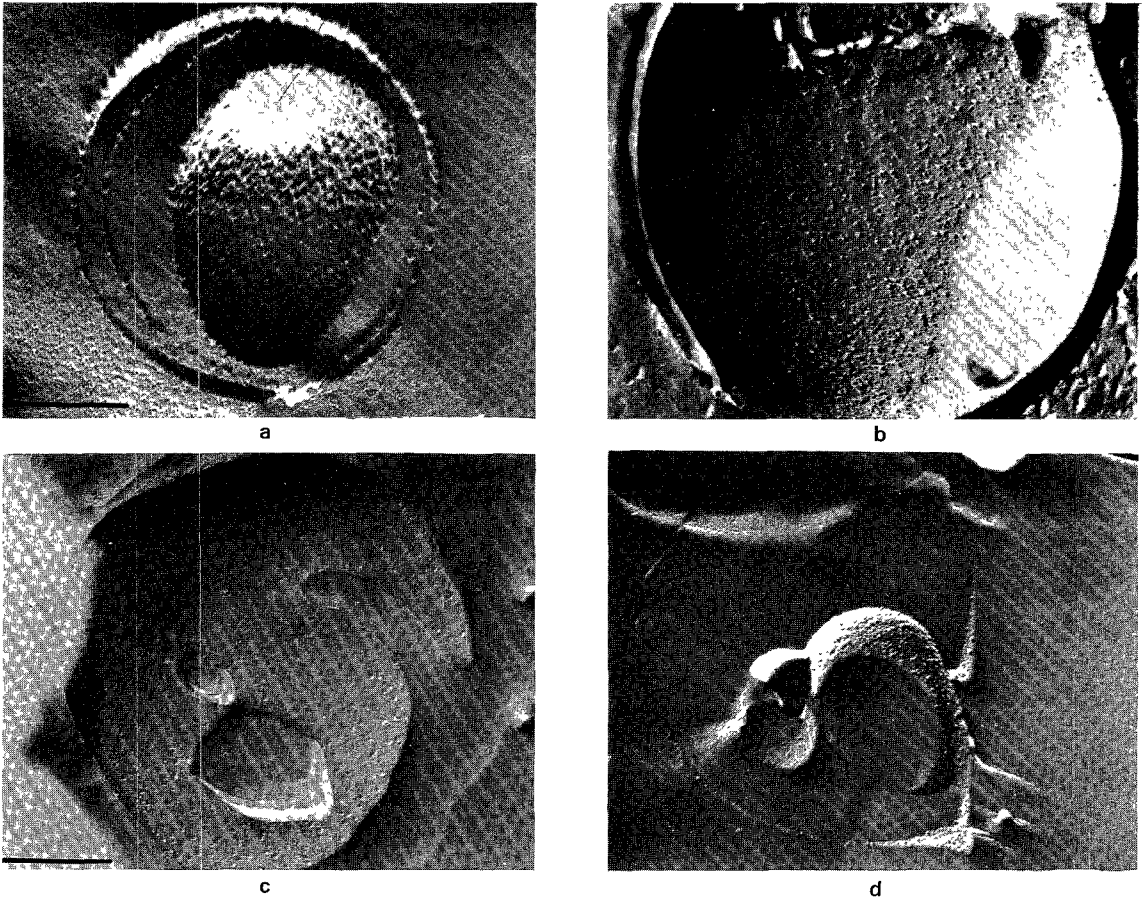


Fig. III-6. Freeze-- fractured electron micrographs of band 45 proteins. (a) control, (b) 15% egg PC/85% Soy PE, (c) 50% egg PC/50% Soy PE, and (d) 75% egg PC/25% Soy PE.

막의 bilayer를 형성하는 정도와 단백질의 기능이 밀접한 관계가 있음을 보이는 것이다. 그러나 추출된 포도당 운반체는 gel electrophoresis 결과 포도당 운반체로 알려진 band 4.5 외에도 band 3, band 5, band 7 등이 함께 섞여 있어 순수한 band 4.5 만의 재조립에 따른 결과로 보기에는 약간의 문제가 있다. 왜냐하면 지질낭속으로 단백질의 삽입(incorporation)이 일어날 때에 순전히 지질과 단백질의 상호작용 외에도 단백질과 단백질 상호작용을 배제할 수가 없으므로 급급적 순수하게 분리한 band 4.5 만을 사용하여 지질의 물리적인 상태에 따른 단백질의 기능을 측정해야 할 필요가 있기 때문이다. 그동안 Kasahara와 Hinkle¹²⁾ 및 Baldwin¹³⁾의 방법을 토대로하여 band 4.5 단백질만을 순수하게 분리하려고 시도한 결과 활성도에는 아직도 논란이 있지만 gel electrophoresis 결과 순도(purity)에서는 거의 순수하게 분리할 수 있었다 (Fig. IV-1).

따라서 이렇게 분리된 단백질을 이용하여 PC와 PE의 상대적인 조성이 PC가 0%, 15%, 25%, 50% 및 75% 되는 지질막속에 재조립하고 단백질의 기능 및 단백질의 삽입되는 양을 비교하였다.

Fig. III-2에서 보는 바와 같이 지질의 물리적인 상태에 따른 band 4.5 단백질의 삽입되는 양은 25% PC군에서 가장 많았고, 재조립된 band 4.5의 cytochalasin B 결합능력은 Fig. III-5에서 보는 바와 같이 막에 재조립된 PC의 양에 비례하여 증가함을 보였으며, 최고 결합능력이 지질을 가하지 않은 대조군에 비하여 약 1.7배 정도 증가하였다. 이들 결과는 전번 실험결과와 잘 일치하는 것이었다.

그러나 Kagawa 등⁷⁾은 25% PC와 75% PE의 혼합 지질을 사용했을 경우 vesicle의 ATP 교환활성도가 가장 높았다고 보고하였고 Jensen과 Schultzbach 등³²⁾은 mannosyltransferase II의 활성도가 non-bilayer구

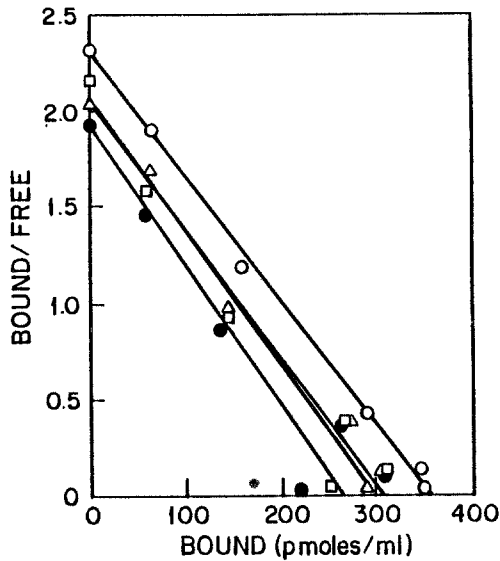


Fig. III-7. Effect of freezing-and-thawing on cytochalasin B binding activity to band 4.5 protein. Symbols used are once (Δ), twice (\circ), six times (\square), and without freezing-and-thawing.

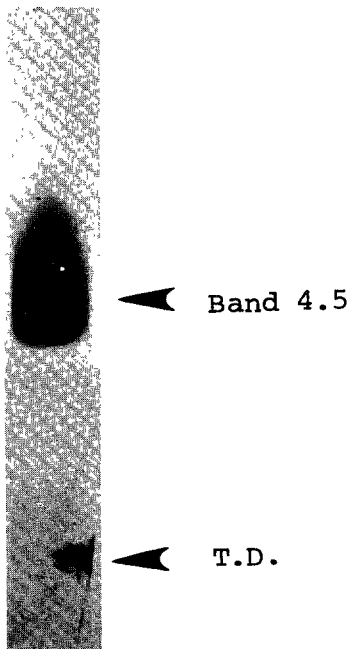


Fig. IV-1. Gel electrophoresis picture of band 4.5 protein. T.D. represents tracking dye.

조를 가진 vesicle에서 높다고 하는 결과와는 약간 상이하다. 즉 본 실험에서는 25% PC 혼합지질을 사용했을 경우처럼 non-bilayer 구조를 형성하는 상태에서 단백질의 재조립이 가장 많이 일어나므로 전체적인 활성도를 따진다면 다른 지질의 조성에 비하여 단연 높다고 할 수 있으나 특이적 활성도 (specific activity)는 PC의 양에 비례하여 증가됨을 볼 수 있다. 이는 Gerritsen 등⁹⁾이 적혈구 막에서 분리한 단백질을 지질의 종류를 달리하여 재조립시킬 때에 PC를 가한 군에서 vesicle에 IMP 분포가 증가하였고 vesicle의 이온 이동 능력은 IMP 숫자와 비례하였다는 결과와 일치하였다. 재조립된 막의 지질구조는 단백질의 종류에 따라 영향을 받기도 하는데 Fig. III-6에서 보는 바와같이 band 4.5 단백질은 지질의 상태를 의의있게 변화시켰다. 즉 PC의 농도에 관계없이 band 4.5가 삽입된 지질낭에서는 LIP를 발견할 수 없었다. 이는 지질의 종류에 따라서 지질이 가지는 고유의 물리적인 성상이 가한 단백질에 의해서 변화됨을 나타내고 있다. 아직 정확한 기전은 알 수 없지만 PC의 양에 관계없이 band 4.5와 재조립된 막은 모두 bilayer 구조를 보이고 있으므로 band 4.5 단백질은 bilayer 구조를 선호한다고 볼 수 있는데 이는 몇몇 연구가^{33)~36)}들에 의한, 가한 단백질이 bilayer 구조를 안정시킨다는 보고와 일치된다. 이는 band 4.5 단백질이 integral protein으로써 지질의 이중층을 관통하고 있다고 생각할 때에 인접한 지질에 의해서 단백질의 배열 (orientation)이 영향을 받아 cytochalasin B의 결합부위가 노출되는 정도가 달라지기 때문에 결합 능력이 영향을 받게 될 것으로 생각되고, non-bilayer 구조보다는 bilayer 구조에서 단백질의 배열이 더욱 정상에 가깝도록 이루어질 수 있으므로 단백질의 활성도가 intact cell에 가깝게 증가되는 것이 아닌가 생각된다.

재조립된 band 4.5 단백질에서 D-glucose sensitive한 cytochalasin B 결합능력이 75% PC군에서 약 10n moles/mg protein (Fig. III-5)으로 가장 높은 값을 보였다. 이 값은 band 4.5가 100% 순수하게 추출되었다고 생각하면 활성도가 약 반에 해당되는 값으로 그 이유가 detergent에 의한 불활성화 (inactivation)에 의한 것인지 혹은 포도당의 이동과 cytochalasin B의 이동 역제의 stoichiometry가 1:1이 아니기 때문인지 현재로서는 불명이므로 더 추구해 보아야 할 과제로 남는다.

한편 재조립 방법중 "열렸다·녹혔다" 하는 과정을 반복함에 따라 cytochalasin B의 결합능력을 증가시킬 수 있었다 (Fig. III-7). 이는 다른 연구자들⁹⁾¹⁰⁾³⁷⁾³⁸⁾이 이 과정을 반복함으로써 직경이 큰 vesicle을 얻었다

는 보고와 관련이 있는 것 같다. 즉 제조법 방법중 detergents를 사용할 경우 detergents 제거후 단백질은 추출할 때에 남아있는 최소한의 "boundary lipid" 혹은 내인성지질(endogeneous lipid)과 형성된 작은 vesicle에 존재하고, 외부에서 가한 지질은 비교적 큰 vesicle을 형성하여 서로 분리된 상태로 있다가 얼렸다·녹히는 과정중에 작은 vesicle과 큰 vesicle의 융합이 일어나 단백질의 재배열이 갖추어짐으로 단백질의 활성도가 증가된다고 볼 수 있다. 융합의 기전으로써는 얼리는 과정중에 생긴 얼음 결정이 vesicles을 다른 얼음 결정과 얼음 결정 사이로 밀게되며 그 힘에 의해서 막을 구성하고 있던 지질의 이중층이 부서지게 되고 물이 얼음 결정으로 변하면 상대적으로 탈수현상(dehydration)이 일어나 vesicle과 vesicle이 서로 접촉하는 기회가 증가됨으로 이때 단백질이 균열이 생긴 막 속으로 침투할 수 있다고 설명할 수 있다. 이 과정은 polyethyleneglycol과 같은 화학적인 fusogens과는 작용기전을 달리하며 단백질의 종류나 지질의 종류에 따른 선호도 없으며 단순한 혼합과정이라고 볼 수 있다.

결 론

지질의 물리화학적 성상이 적혈구막으로 부터 추출한 band 4.5 단백질의 제조법시 단백질의 삼입 및 cytochalasin B 결합능력에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) Band 4.5 단백질과 PC/PE 혼합지질로 세포막을 제조할 때에 25%의 PC와 75% PE의 혼합지질에서 단백질의 삼입이 최고로 증가하였다.

2) 제조된 막에서 band 4.5 단백질의 cytochalasin B 결합능력은 막에 제조된 PC의 양이 증가할 수록 거의 비례적으로 증가하였다.

3) Band 4.5 단백질은 지질의 phase transition에 영향을 주었다. 지질막의 전자현미경소견상 혼합지질만이 있을때 보이던 lipidic particles(LIP)가 소실되었으며 모든 혼합지질은 band 4.5 단백질에 의하여 bilayer 형태로 전환되었다.

4) 제조법 시험중 "얼렸다·녹혔다"(freezing and thawing) 하는 과정은 band 4.5 단백질의 외부에서 가한 lipid vesicles속으로의 삼입을 조장하였다.

이상의 실험결과는 제조법 시험중 지질의 bilayer에 결합이 존재할 때에 단백질의 삼입이 용이함을 보이는 것이며 제조법세포막에서의 band 4.5 단백질의 기능은 지질이 bilayer를 형성하는 정도와 비례함을 보이고 있다. 그 기전은 확실히 알 수 없으나 이는 아마도 band 4.5 단백질의 세포막에서의 reorientation과 이에 따르

는 활성부위(active sites)의 노출과 관련이 있는 것으로 사료된다.

REFERENCES

- 1) Singer SJ, Nicolson GI : *The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.* *Science*, 1972, 175: 720-731
- 2) Lodish HF, Rothman, JE : *The assembly of cell membranes.* *Sci Amer* 1979, 240(1): 48-63
- 3) Wickner W : *Role of hydrophobic forces in membrane protein asymmetry.* *Biochemistry* 1977, 16: 254-258
- 4) Pownall HJ, Massey JB, Kusserow SK, Gotto AMJr : *Kinetics of lipid-protein interactions: Effect of cholesterol on the association of human plasma high-density apolipoprotein A-1 with dimyristoylphosphatidylcholine.* *Biochemistry* 1979, 18: 574-579
- 5) Epand RM, Epand RF, Stewart TP, Hui SW : *The condensing effect of glucagon on phospholipid bilayer.* *Biochim Biophys Acta* 1981, 649: 608-615
- 6) Marsh D, Watts A, Knowles PF : *Evidence for phase boundary. Permeability of Temp-Choline into DMPC vesicles at the phase transition.* *Biochemistry* 1976, 15: 3570-3578
- 7) Kagawa Y, Kandrach A, Racker E : *Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: Specificity of phospholipids required for energy transfer reaction.* *J Biol Chem* 1973, 248: 676-684
- 8) Hui SW, Stewart TP, Boni LT, Yeagle PL : *Membrane fusion through point defects in bilayers.* *Science* 1981, 212: 921-923
- 9) Gerritsen WJ, Verkleij AJ, van Deenen LLM : *The lateral distribution of intramembrane particles in the erythrocyte membrane and recombining vesicles.* *Biochim Biophys Acta* 1979, 555: 26-41
- 10) Wolosin JM : *A Procedure for membrane-protein reconstitution and the functional reconstitution of the anion transport system of the human erythrocyte membrane.* *Biochem J* 1980, 189: 35-44

- 11) Hah JS, Hui SW, Jung CY : *Effects of physical states of phospholipids on the incorporation and cytochalasin B binding activity of human erythrocyte membrane proteins in reconstituted vesicles*. *Biochemistry* 1983, 22 : 4763–4769
- 12) Kasahara M, Hinkle P: *Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocyte*. *J Biol Chem* 1977, 252 : 7384– 7390
- 13) Phutrakul S, Jones MN: *The permeability of bilayer lipid membrane on the incorporation of erythrocyte membrane extracts and the identification of the monosaccharide transport*. *Biochim Biophys Acta* 1979, 550: 188–200
- 14) Froman G, Lundahl P, Acevedo F : *Partial purification of the D-glucose transport protein from human erythrocyte membranes by affinity chromatography on wheat germ lectin-sepharose*. *FEBS Lett* 1981, 129: 100–104
- 15) Baldwin SA, Baldwin JM, Lienhard GE : *Monosaccharide transporter of the human erythrocyte. Characterization of an improved preparation*. *Biochemistry* 1982, 21: 3836–3842
- 16) Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ : *The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes*. *Arch Biochem Biophys* 1963, 100:119–130
- 17) Steck TL, Yu J: *Selective solubilization of proteins from red blood cell membranes by protein perturbants*. *J Supramol Struct* 1973, 1 : 220–232
- 18) Zoccoli MA, Baldwin SA, Lienhard GE : *The monosaccharide transport system of the human erythrocyte*. *J Biol Chem* 1978, 253: 6923–6930
- 19) Bartlett GR : *Phosphorus assay in column chromatography*. *J Biol Chem* 1959, 234: 466–468
- 20) Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH : *Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane*. *Biochemistry* 1971, 10 : 2606– 2616
- 21) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ : *Protein measurement with the folin phenol reagent*. *J Biol Chem* 1951, 193 : 265–275
- 22) Scatchard G : *The attractions of proteins for small molecules and ions*. *Ann NY Acad Sci* 1949, 51 : 660–672
- 23) Pick U : *Liposomes with a large trapping capacity prepared by freezing and thawing of sonicated phospholipid mixtures*. *Arch Biochem Biophys* 1981, 212: 186–194
- 24) Anholt R, Fredkin DR, Deerinck T, Ellisman M, Montal M, Lindstrom J : *Incorporation of acetylcholine receptors into liposomes*. *J Biol Chem* 1982, 257: 7122–7134
- 25) Ochoa ELM, Dalziel AW, McNamee MG : *Reconstitution of acetylcholine receptor function in lipid vesicles of defined composition*. *Biochim Biophys Acta* 1983, 727: 151–162
- 26) Kahlenberg A, Zala CA : *Reconstitution of D-glucose transport in vesicles composed of lipids and intrinsic protein (Zone 4.5) of the human erythrocyte membrane*. *J Supramol Struct* 1977, 7: 287–300
- 27) Shanahan MF, Czech MP : *Purification and reconstitution of the adipocyte plasma D-glucose transport system*. *J Biol Chem* 1977, 252 : 8341–8343
- 28) Kahlenberg A, Banjo B : *Involvement of phospholipids in the D-glucose uptake activity of human erythrocyte membranes*. *J Biol Chem* 1972, 247: 1156–1160
- 29) Melchior DL, Czech MP : *Sensitivity of the adipocyte D-glucose transport system to membrane fluidity in reconstituted vesicles*. *J Biol Chem* 1979, 254: 8744– 8747
- 30) Baldassare JJ, Silbert DF : *Membrane phospholipid metabolism in response to sterol depletion*. *J Biol Chem* 1979, 254 : 10078–10083
- 31) Hui SW, Stewart TP, Yeagle PL, Albert AD : *Bilayer to non-bilayer transitions in mixtures of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine : Implications for membrane properties*. *Arch Biochem Biophys* 1981, 207: 227–240
- 32) Jensen JW, Schultzbach JS : *Activation of mannosyltransferase II by non-bilayer phospholipids*. *Biochemistry* 1984, 23 : 1115–1119
- 33) deGrip WJ, Drenthe EHS, vanEchteld CJA, deKruiff B, verkleij AJ : *A possible role of*

- rhodopsin in maintaining bilayer structure in the photoreceptor membrane. Biochim Biophys Acta* 1979, 553: 330-337
- 34) Goormaghtigh E, Vandenbranden M, Ruyschaert JM, dekruijff D: *Adriamycin inhibits the formation of non-bilayer lipid structures in cardiolipin-containing model membranes. Biochim Biophys Acta* 1982, 685: 137-143
- 35) Taraschi TF, van der Steen ATM, dekruijff B, Tellier C, Verkleij AJ: *Lectin - receptor interactions in liposomes: Evidence that binding of wheat germ agglutinin to glycoprotein-phosphatidylethanolamine vesicles induces non-bilayer structures. Biochemistry* 1982, 21: 5756-5764
- 36) Killian JA, deKruijff B, vanEchteld CJA, Verkleij AJ, Leunissen-Bijvelt, DeGier J: *Mixtures of gramicidin and lysophosphatidylcholine form lamellar structure. Biochim Biophys Acta* 1983, 728: 141-144
- 37) Yu J, Branton D: *Reconstitution of intramembrane particles in recombinants of erythrocyte protein band 3 and lipid: Effects of spectrin-actin association. Proc Natl Acad Sci* 1976, 73: 3891-3895
- 38) Wheeler T, Hinkle, PC: *Kinetic properties of the reconstituted glucose transporter from human erythrocytes. J Biol Chem* 1981, 256: 8907-8914
-