화학적 Chaperone을 이용한 돌연변이 Vasopressin V2 수용체의 기능적 구출

서울대학교 의과대학 어린이병원 소아과

정해일 · 최현진 · 조희연 · 강주형 · 하일수 · 최 용

목 적 : 성염색체 열성 유전 신성 요붕증 (nephrogenic diabetes insipidus, NDI)은 vasopressin V2 수용체 (V2 receptor, V2R)를 encoding 하는 AVPR2 유전자 이상에 기인한다. 현재까지 보고된 AVPR2 돌연변이의 상당 부분은 missense 점 돌연변이이고, 그 상당수는 단백의 misfolding에 의한 세포내 운반 장애를 초래한다. 최근 화학적 chaperone이 돌연변이 misfolded 단백의 refolding을 유도하여 세포내 운반장애를 극복할 수 있음이 알려졌다.

방 법 : 임상에서 NDI로 진단 받은 환자들에서 AVPR2 유전자 검색을 시행하였으며, 그 결과 발견된 돌연변이 중 3종의 missense 점 돌연변이를 (A98P, R113W, L274P) 선택하여 다음 연구를 진행하였다. 정상 신조직에서 wild-type (WT) AVPR2 cDNA를 cloning하고 3종의 돌연변이에 해당하는 site-directed mutagenesis를 시행하였다. WT 및 3종의 돌연변이 cDNA를 각각 두 종류의 포유류 세포 발현 vector에 다시 cloning 하여 COS-7 세포를 transfection 시켰다. 이 vector들은 각각 AVPR2 유전자의 시작 codon (methionine) 바로 다음에 myc-단백 및 green fluorescent protein (GFP)이 삽입되게 제작하였다. 세포내 단백 발현은 anti-myc 항체 및 GFP 자체 형광으로 확인하였다. 일부 실험에서는 화학적 chaperone으로 trimethylamine N-oxide (TMAO), DMSO 및 glycerol을 첨가하거나 26℃ 저온 노출 후 세포내 단백 위치의 변화를 관찰하였다.

결 과 : 전체 16명의 NDI 환자 중에서 15명에서 14종의 AVPR2 유전자 돌연변이를 확인하였고, 그 중 8종은 missense 점 돌연변이였다. 한편 나머지 1명에서는 AQP2 유전자 내 2종의 돌연변이가 발견되었다. A98P 및 L274P 돌연변이 V2R는 COS-7세포에서 생성된 후 세포막으로의 정상적 이동을 못하고 세포질 내에 갇혀있었고, R113W V2R는 일부가 세포막에서 발현하였다. TMAO 또는 DMSO의 첨가로 돌연변이 V2R를 세포막으로 구출할 수 있었다. 저온 노출도 같은 효과를 나타냈지만, glycerol은 아무 효과가 없었다.

결 론 : 화학적 chaperone을 이용하여 A98P 및 L274P 돌연변이 V2R에 대한 기능적 구출은 성공적이었다. 향후 화학적 chaperone을 이용한 NDI의 새로운 치료전략이 가능하리라 사료된다.