저선량 방사선에 의한 Ikaros-Autotaxin 상호작용 조절 효과

강한아[1] · 조성준[1] · 김성진[1] · 남선영[1] · 양광희[1,*]

[1]한국수력원자력(주) 방사선보건원 저선량연구팀

The Regulatory Effects of Low-Dose Ionizing Radiation on Ikaros-Autotaxin Interaction

Hana Kang[1], Seong-Jun Cho[1], Sung Jin Kim[1], Seon Young Nam[1] and Kwang Hee Yang[1,*]

[1]*KHNP Radiation Health Institute, Korea Hydro & Nuclear Power Co, Seoul, Korea*

Abstract - Ikaros, a transcription factor containing zinc-finger motif, has known as a critical regulator of hematopoiesis in immune system. Ikaros protein modulates the transcription of target genes via binding to the regulatory elements of the genes promoters. However the regulatory function of Ikaros in other organelle except nuclear remains to be determined. This study explored radiation-induced modulatory function of Ikaros in cytoplasm. The results showed that Ikaros protein lost its DNA binding ability after LDIR (low-dose ionizing radiation) exposure. Cell fractionation and Western blot analysis showed that Ikaros protein was translocated into cytoplasm from nuclear by LDIR. This was confirmed by immunofluorescence assay. We identified Autotaxin as a novel protein which potentially interacts with Ikaros through *in vitro* protein-binding screening. Co-immunoprecipitation assay revealed that Ikaros and Autotaxin are able to bind each other. Autotaxin is a crucial enzyme generating lysophosphatidic acid (LPA), a phospholipid mediator, which has potential regulatory effects on immune cell growth and motility. Our results indicate that LDIR potentially regulates immune system via protein-protein interaction of Ikaros and Autotaxin.

Key words : Low-dose ionizing radiation, Ikaros, Autotaxin, Lysophosphatidic acid, Immune system

서 론

일반적으로 인체가 많은 양의 방사선에 노출될 경우 세포의 손상이 유발되는 등 고선량 방사선이 인체에 유해하다는 것은 이전의 연구들을 통해 입증되었다. 이에 따라 방사선 방호적 측면에서는 선형-무역치(Linear No Threshold, LNT) 가설에 근거하여, 낮은 선량의 방사선 역시 인체에 유해하다고 인식되고 있다. 하지만 최근의 연구들은 기존의 LNT 모델과는 다르게 저선량 방사선이 오히려 인체에 긍정적인 효과를 줄 수 있다는 가능성을 제시하고 있다. 저선량 방사선에 의한 세포의 수명 연장, 암 발생 억제 효과 등이 보고되었고(Chun *et al*. 2012; Wang *et al*. 2014), 특히 방사선에 민감하다고 알려진 면역세포에서 저선량 방사선(0.025~0.1 Gy)에 의한 세포성장 증가가 보고된 바 있다(Liu *et al*. 1987). 이는 저선량 방사선에 의한 면역 기능 증진 가능성을 보여주는 것이고, 이러한 가능성은 *in vivo* 연구를 통해서도 입

* Corresponding author: Kwang Hee Yang, Tel. +82-2-3499-6665, Fax. +82-2-3499-6669, E-mail. kwangheey@khnp.co.kr

증되었다. 저선량 방사선이 조사된 C57BL/6 쥐의 비장세포(splenocyte)에서 세포사멸이 감소되었고, 이 효과는 특히 자연살해세포(natural killer cell, NK)와 수지상세포(dendritic cell, DC)에서 두드러지게 나타난다는 것이 보고되었다(Bogdάndi *et al*. 2010). 또한 최근에는 저선량 방사선에 대한 생물학적 영향을 현상학적으로만 평가하는 것에서 나아가, 그 기작과 신호전달 경로에 대한 연구 역시 활발히 진행되고 있다. 최근 보고된 연구에서는 하나의 기작으로서 저선량 방사선이 Ikaros라고 하는 전사 인자를 조절함으로써 면역 기능을 증진시킬 수 있음을 제시하였다(Cho *et al*. 2016). 0.05 Gy의 저선량 방사선이 쥐의 비장세포와 사람 B 림프구 세포주인 IM-9 세포의 증식을 촉진함을 확인하였고, 이는 저선량 방사선이 Ikaros를 통해 인체 면역세포의 활성을 조절할 수 있음을 간접적으로 시사한다.

Ikaros는 면역세포의 발생과 분화, 성장의 조절에 있어서 중요한 역할을 수행한다고 알려진 전사 인자로서, 아미노말단(N-terminal)과 카르복실기말단(C-terminal)에 각각 4개와 2개의 아연-집게(zinc-finger) 구조를 가지고 있다. 아미노말단 쪽의 아연-집게 구조는 Ikaros 단백질이 표적유전자(target gene)의 프로모터(promoter)에 결합하여 표적유전자의 발현을 조절케 한다고 알려져 있다(Payne *et al*. 2003). 반면 카르복실기말단 쪽의 아연-집게 구조는 Ikaros가 동형단백질(isoform)이나 Ikaros 단백질 군(family protein)과 결합하여 단백질-단백질 간의 상호작용을 하는 데 중요한 역할을 할 수 있다고 알려져 있다(Sun *et al*. 1996). Ikaros 단백질은 표적유전자의 조절 부위에 직접 결합함으로써 유전자의 전사 활성을 조절하는데, Ikaros 단백질이 어떤 단백질과 결합하느냐에 따라 표적유전자의 활성과 비활성 조절이 결정된다. Ikaros 단백질은 histone deacetylase (HDAC)을 포함하는 복합체(NuRD, Sin3B)와 직접적으로 결합한다고 알려져 있는데, 이 복합체는 염색질 재편성(chromatin remodeling)을 통해서 전사 활성 억제자(repressor)로 작용한다(Kim *et al*. 1999; Koipally *et al*. 1999). Ikaos 단백질이 CtBP (C-terminal-binding protein)와 결합할 경우에는 HDAC 단백질과 상관없이 비의존적으로 표적유전자를 억제한다(Koipally and Georgopoulos 2000). 최근에는 Ikaros 단백질이 SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) 뉴클레오솜 재편성 복합체(nucleosome remodeling complex)의 catalytic subunit 전사 활성자(activator)와 결합한다는 것이 보고되었다. 표적유전자의 상위조절 부분에 결합한 Ikaros 단백질이 SWI/SNF 뉴클레오솜 재편성 복합체를 끌어옴으로써 표적유전자의 염색질 재편성과 전사 활성을 유도한다(Kim *et al*. 1999; O'Neill *et al*. 2000). 따라서 Ikaros 단백질은 어떤 단백질과 상호작용하는가에 따라 표적유전자의 전사를 억제하거나 활성화시킬 수 있다.

지금까지의 연구 보고는 Ikaros 단백질이 핵 내에서 다른 단백질과 상호작용함으로써 표적유전자의 전사 활성을 조절한다는 것에 국한되었고, 세포질에서 Ikaros 기능에 대한 것은 아직 밝혀진 바가 없다. 본 연구 그룹은 저선량 방사선에 의해 Ikaros 단백질이 세포질로 이동한다는 새로운 사실을 확인하였고, 세포질로 이동한 Ikaros 단백질이 다른 단백질과의 결합을 통해 새로운 기능을 수행할 수 있다는 가설을 세웠다. 이를 확인하기 위해, 저선량 방사선에 노출된 면역세포에서 Ikaros 단백질과 결합하는 새로운 표적단백질 후보자를 탐색하고 이 단백질과의 상호작용 효과에 대해 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

사람 B 림프구 세포인 IM-9 세포를 American Type Culture Collection (ATCC)에서 제공받았다. IM-9 세포는 10% 우태아혈청(FBS; Invitrogen), 페니실린(100 units ml^{-1})과 스트렙토마이신(100 units ml^{-1})이 포함된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 37°C에서 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

2. 감마선 조사

세포들은 상온에서 여러 선량별로 137Cs 감마선원(5.41 Gy min^{-1}; IBL 437 C type H, CIS Biointernational, France)을 이용하여 납차폐 후 10배 감쇄시켜 조사하였다. 대조군 세포는 방사선 조사를 제외하고 실험군 세포와 동일한 외부 자극을 주었다.

3. 핵 추출 및 EMSA (Electrophoric Mobility Shift Assay)

Biotin 3′ End DNA Labeling Kit를 이용하여 Ikaros 단백질이 강하게 결합하는 부분을 포함한 IK-BS2 (5′-GTACAC TCTCCTTTGGGAACAGTTATG-3′) 올리고뉴클레오티드 탐침을 합성하였다. IM-9 세포를 방사선 조사 후 수확하여 NE-PER kit (Pierce)를 이용해 핵 추출물을 순수 분리하였다. 순수 분리된 핵 추출물을 IK-BS2 탐침과 결합 반응시키고 이에 대한 경쟁 반응으로 100배의 표지되지 않은 DNA 올리고뉴클레오티드를 이용하였다. Ikaros 단백질과 IK-BS2 탐침의 결합은 ECL법으로 확인하였다.

4. 세포분획법

세포를 수확하여 PBS로 세척하였다. 그 다음 NE-PER kit를 이용하여 공급자가 제공하는 방법에 따라 세포질과 핵 추출물을 순수 분리하였다. 순수 분리된 각 추출물들을

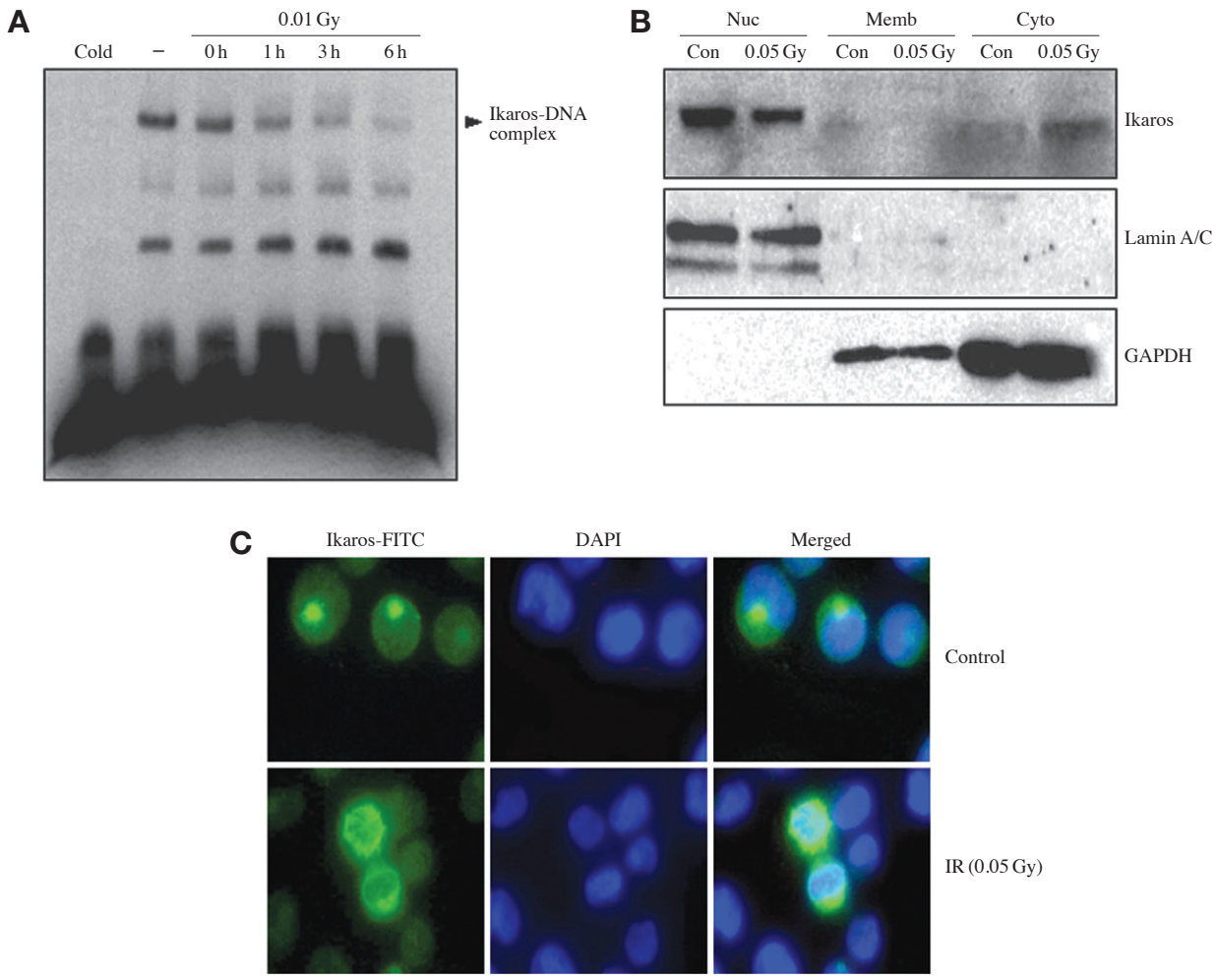

Fig. 1. Loss of DNA binding activity of Ikaros and its translocation after LDIR exposure. (A) DNA-binding activity of Ikaros was determined by EMSA in LDIR (0.01 Gy)-treated IM-9 B lymphocytes. Cells were harvested after IR treatment as indicated time. The arrow indicates the location of the Ikaros-DNA complex. (B) IM-9 B cells were exposed to LDIR (0.05 Gy) and further incubated for 2 hours. Cells were fractionated with nuclear and cytosolic components. The level of Ikaros, Lamin A/C and GAPDH were determined by Western blot analysis. (C) IM-9 lymphocytes were treated 0.05 Gy of LDIR. After 2 hours, cells were fixed, permeabilized, and immunostained with anti-Ikaros antibody and FITC-conjugated secondary antibody (Green), Nuclei were visualized with DAPI (blue).

Western blot 분석에 이용하였다.

5. 단백질 면역침강법 (Immunoprecipitation, IP)과 Western blot 분석법

IM-9 세포를 수확하여 IP 용해 버퍼 (50 mM Tris-cl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 1% NP-40, protease inhibitor cocktail)를 이용하여 용해시킨 후, 초음파를 이용하여 분쇄하였다. 상층액을 수집하여 4°C에서 30분간 비드로 먼저 결합 반응시킨 후, 비드와 결합하지 않은 상층액을 다시 수집하여 Ikaros 단백질에 대한 항체 (H-100; SantaCruz)로 4°C에서 2시간 동안 결합 반응시켰다. 그 후 protein A 비드를 더해 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 반응물을 원심 분리하여 침전물만 로딩 버퍼로 용해시킨 후에 이를 SDS-폴리아크릴아마이드 (SDS-polyacrylamide) 겔을 이용하여 polyvinylidenefluoride (PVDF) membrane (Millipore)에 이동시켰다. Ikaros 단백질과 이와 결합된 Autotaxin 단백질의 양은 각각에 대한 항체 (Ikaros H-100, Autotaxin H-180; SantaCruz)를 이용하여 Western blot 분석법으로 확인하였다. Ikaros 단백질은 면역침강법의 양성대조군으로 확인하였다. Western blot 분석법에서 단백질의 검출은 ECL-PLUS (enhanced chemiluminescence, Amersham Biosciences)를 이용하여 확인하였다.

결 과

1. 저선량 방사선에 의한 Ikaros 단백질의 표적유전자 결합력 조절과 세포 내 이동 효과

최근의 연구에서 저선량 방사선이 Ikaros를 통해 면역

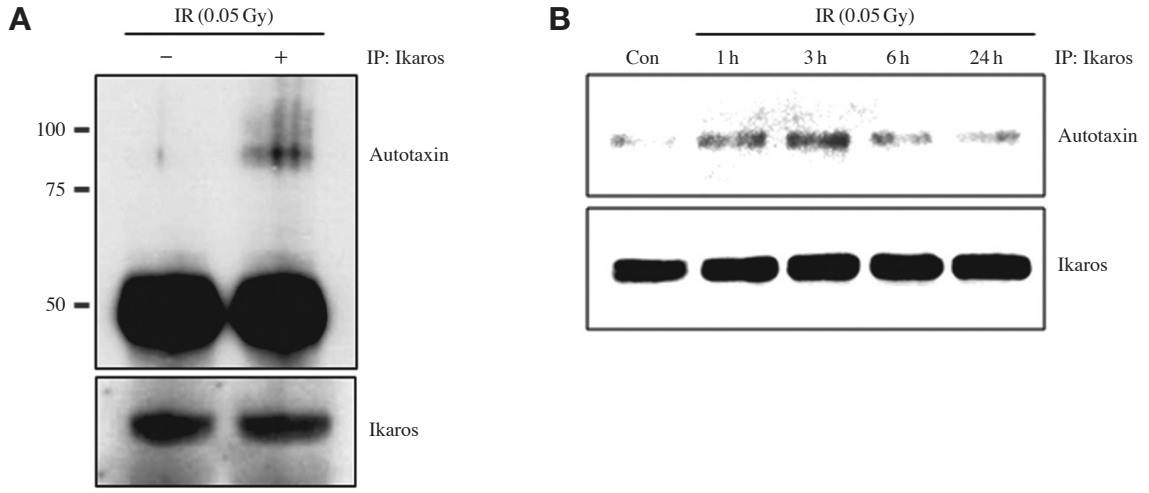

Fig. 2. Ikaros-Autotaxin interaction in cytoplasm induced by LDIR. (A) IM-9 cells were exposed to LDIR (0.05 Gy) and cell lysates were immunoprecipitated with anti-Ikaros antibody. Autotaxin was detected with anti-Autotaxin and anti-Ikaros antibody used as a control. (B) IM-9 cells were irradiated (0.05 Gy) and further incubated as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with Ikaros antibody and subjected to Western blot analysis with anti-Autotaxin antibody. Anti-Ikaros was used as a immunoprecipitation control.

기능을 증진시킬 수 있음이 보고되었다(Cho *et al*. 2016). Ikaros는 표적유전자의 조절 부위에 서열-특이적인 방식으로 결합함으로써 표적유전자의 발현을 조절하는 전사 인자이다. 즉 Ikaros가 기능을 수행하는 데 있어서 DNA에 결합 유무는 중요한 과정이므로, 먼저 저선량 방사선이 Ikaros의 DNA 결합능력에 어떠한 영향을 주는지 확인하였다. IM-9 세포주에 0.01 Gy의 저선량 방사선을 조사한 후, 시간별로 수확하여 Ikaros 단백질과 DNA의 결합을 EMSA 방법으로 확인하였다. 그 결과, 저선량 방사선을 조사하였을 때 Ikaros 단백질이 DNA에 결합하는 능력이 현저히 감소함을 확인하였고, 이러한 감소효과는 6시간까지 일시적으로 유지됨을 확인하였다(Fig. 1A). 다음으로 저선량 방사선에 의한 Ikaros 단백질의 DNA 결합능력 감소가 결과적으로 Ikaros 단백질의 세포 내 위치 이동에도 영향을 주는지 확인하였다. IM-9 세포주에 0.05 Gy의 저선량 방사선을 조사하고, 2시간 후 세포를 수확하여 세포분획법을 통해 핵, 핵막, 세포질 부위로 나누어 Western blot 분석법으로 Ikaros 단백질 양을 확인하였다. 그 결과 0.05 Gy의 저선량 방사선을 조사하였을 때, 대조군에 비해 핵에 존재하는 Ikaros 단백질 양이 약간 감소하였고, 세포질에서는 이와 반대로 증가하였다(Fig. 1B). 이는 핵에 존재하는 Ikaros 단백질이 저선량 방사선에 의해 세포질로 이동했음을 뜻한다. 앞선 결과를 재확인하기 위해 0.05 Gy의 방사선을 조사한 IM-9 세포주를 Ikaros 단백질에 대한 형광항체로 표지한 후, 세포 내에서 Ikaros 단백질의 발현 위치를 형광현미경으로 확인하였다. 그 결과 저선량 방사선을 조사하였을 경우, 대조군에 비해 Ikaros 단백질이 세포질에 더 많이 위치하고 있는 것이 관찰되었다(Fig. 1C).

2. 저선량 방사선에 의한 특이적인 Ikaros-Autotaxin 결합 증가 확인

Ikaros 단백질은 핵 내에서 다른 단백질과의 상호작용을 통해 DNA 결합이 조절되고, 표적유전자의 전사 활성을 조절한다고 알려졌다. 그러나 세포질에서 Ikaros 단백질의 기능에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없고, 저선량 방사선에 의해 세포질로 이동한 Ikaros는 새로운 단백질과의 결합을 통해 그동안 보고된 바 없는 기능을 수행할 가능성이 있다. 이에 착안하여 생물정보학적 DB와 *in vitro* 결합단백질 탐색을 통해, Ikaros와 결합 가능한 후보 단백질로서 Autotaxin, PFKM, NOMO2 등 일곱 개의 인자를 도출하였다. 그중에서도 Autotaxin은 면역 활성에 밀접하게 관련하는 인자로 Ikaros와 상호작용할 가능성이 가장 높은 후보로 예측하였다. 실제로 이 두 단백질이 결합하는지 확인하기 위해 IM-9 세포주에 0.05 Gy의 방사선을 조사한 후, Ikaros 항체와 결합하는 단백질들을 단백질 면역침강법과 Western blot 분석법을 이용하여 확인하였다. 그 결과 0.05 Gy의 저선량 방사선을 조사하였을 때, Ikaros 단백질과 Autotaxin 단백질이 서로 결합한다는 것을 새롭게 확인하였다(Fig. 2A).

다음으로 저선량 방사선에 의한 Ikaros와 Autotaxin의 단백질-단백질 결합이 방사선 조사 후 얼마나 유지되는지 확인하기 위해, IM-9 세포주에 저선량 방사선을 조사한 후 시간별로 수확하여 확인하였다. Ikaros 단백질과 Autotaxin 단백질의 결합은 방사선 조사 후, 비교적 짧은 시간인 1시간 뒤부터 높게 나타났고, 3시간 뒤에 가장 높아졌다가 그 뒤로 감소하는 경향을 보였다(Fig. 2B). 이는 저선량 방사선에 의해 세포질로 이동한 Ikaros 단백질이 세포질에서 Autotaxin

과 일시적으로 결합하는 것을 검증한 결과이다.

고 찰

Ikaros는 핵에서 표적유전자의 발현 조절 부위에 결합하여 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자로서, 개체의 항상성 유지를 위해 표적유전자의 기능에 따라 유전자의 발현을 억제하거나 또는 활성화시키기도 한다. 따라서 Ikaros 단백질이 표적유전자의 조절에 결합하지 않는 상황에서는 어떠한 역할을 하는지 알아보고자 본 연구를 수행하였다.

논문 결과에 의하면, 저선량 방사선이 Ikaros 단백질의 DNA 결합능력을 감소시키고, 이에 따라 Ikaros 단백질이 핵에서 세포질로 이동함을 확인하였다. 이는 저선량 방사선에 의해 세포질로 이동한 Ikaros 단백질이 새로운 다른 기능을 수행할 가능성이 있음을 보여준 것이다.

따라서 저자는 세포질 내에서 Ikaros 단백질과 결합 가능한 새로운 단백질 후보군을 탐색하였으며, 그 결과 가장 가능성이 높은 후보로서 Autotaxin을 발굴하였고, 실제로 저선량방사선에 의해 Ikaros와 Autotaxin 단백질이 일시적으로 결합하고 있음을 확인하였다. Autotaxin은 체액에 광범위하게 분포하는 분비단백질로서, 전구체인 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidylcholine)으로부터 LPA (lysophosphatidic acid)라고 하는 인산지질(phospholipid)을 만들어내는 중요한 효소이다. LPA는 거의 모든 종류의 세포에서 G-단백질 결합 수용체(G-protein coupled receptor)를 통해 성장인자(growth factor)처럼 작용하여 세포의 성장과 이동, 활성화를 조절한다는 것이 알려졌다. 또한 최근에는 LPA가 림프구와 수지상세포의 이동과 활성을 유도함으로써 면역반응 조절에 있어서도 중요한 역할을 수행한다는 것이 밝혀졌다 (Knowlden S and Georas SN 2014). 이는 저선량 방사선이 Ikaros 단백질의 DNA 결합능력을 조절하여, 세포질에서 일시적인 Ikaros와 Autotaxin의 단백질 상호작용을 유도함에 따라 결과적으로 생체 내 면역체계의 활성을 조절할 가능성이 있음을 시사한다. 따라서 이러한 주장을 검증하기 위해서는 저선량 방사선에 의한 Ikaros와 Autotaxin의 결합이 Autotaxin의 효소 활성을 증가시키는지에 대해 추후 연구가 더 필요할 것이다.

결 론

본 연구에 따르면, 0.05 Gy 정도의 저선량 방사선에 노출된 면역세포에서 Ikaros 단백질은 DNA 결합능력을 상실하고 이후 세포질로 이동한 Ikaros 단백질이 Autotaxin이라고 하는 세포막 분비단백질과 서로 결합함을 확인하였다. 이는 Autotaxin 단백질이 면역세포의 성장과 이동, 활성을 조절하기 위해 LPA를 생산하는 주요 효소임을 감안할 때 (Knowlden and Georas 2014), 결국 저선량 방사선이 생체 내 면역체계 활성 조절에 관여할 수 있다는 새로운 가능성을 간접적으로 시사한다.

사 사

본 연구는 산업부 주관 원자력융합원천기술개발사업의 일환으로 수행되었습니다(#20131610101840).

참 고 문 헌

Bogdándi EN, Balogh A, Felgyinszki N, Szatmári T, Persa E, Hildebrandt G, Sáfrány G and Lumniczky K. 2010. Effects of low-dose radiation on the immune system of mice after total-body irradiation. *Radiat. Res.* **174**(4):480-489.

Cho SJ, Kang H, Kim MY, Lee JE, Kim SJ, Nam SY, Kim JY, Kim HS, Pyo S and Yang KH. 2016. Site-specific phosphorylation of Ikaros induced by low-dose ionizing radiation regulates cell cycleprogression of B lymphoblast through CK2 and AKT activation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **94**(5):1207-1218.

Chun SH, Park GY, Han YK, Kim SD, Kim JS, Lee CG and Yang K. 2012. Effect of low dose radiation on differentiation of bone marrow cells into dendritic cells. *Dose Response* **11**(3):12-41.

Kim J, Sif S, Jones B, Jackson A, Koipally J, Heller E, Winandy S, Viel A, Sawyer A, Ikeda T, Kingston R and Georgopoulos K. 1999. Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity* **10**(3):345-355.

Knowlden S and Georas SN. 2014. The autotaxin-LPA axis emerges as a novel regulator of lymphocyte homing and inflammation. *J. Immunol.* **192**(3):851-857.

Koipally J, Renold A, Kim J and Georgopoulos K. 1999. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J.* **18**(11):3090-3100.

Koipally J and Georgopoulos K. 2000. Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J. Biol. Chem.* **275**(26):19594-19602.

Liu SZ, Liu WH and Sun JB. 1987. Radiation hormesis: its expression in the immune system. *Health Phys.* **52**(5):579-583.

O'Neill DW, Schoetz SS, Lopez RA, Castle M, Rabinowitz R, Shor E, Krawchuk D, Goll MG, Renz M, Seelig HP, Han

S, Seong RH, Park SD, Agalioti T, Munshi N, Thanos D, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Bank A. 2000. An ikaros-containing chromatin-remodeling complex in adult-type erythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* **20**(20):7572-7582.

Payne KJ, Huang G, Sahakian E, Zhu JY, Barteneva NS, Barsky LW, Payne MA and Crooks GM. 2003. Ikaros isoform x is selectively expressed in myeloid differentiation. *J. Immunol.* **170**(6):3091-3098.

Sun L, Liu A and Georgopoulos K. 1996. Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *Embo J.* **15**(19):5358-5369.

Wang B, Li B, Dai Z, Ren S, Bai M, Wang Z, LI Z, Lin S, Wang Z, Huang N, Yang P, Liu M, Min W and Ma H. 2014. Low-dose splenic radiation inhibits lover tumor development of rats through functional changes in CD4+CD25+ Treg cells. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **55**:98-108.

Received: 19 February 2016
Revised: 19 March 2016
Revision accepted: 23 March 2016