

레몬산합성효소에 대한 S.so-HSP20단백질의 분자보호활성

리동철, 이정금

원핵생물과 진핵생물계에 광범히 존재하는 많은 종류의 저분자열충격단백질(sHSP)은 모두 스트레스조건하에서 단백질의 응집을 억제함으로써 분자보호활성을 나타낸다.

sHSP는 각종 온도에서 모두 분자보호활성을 나타내지만[1, 3-5] 열스트레스에 의하여 복합체를 형성한 다음의 기능은 지난 시기 고세균에서 광범히 연구되었으나 *Sulfolobus solfataricus* P2의 저분자열충격단백질 S.so-HSP20분자보호기능에 대한 연구는 아직까지 밝혀지지 않았다.

논문에서는 정제된 S.so-HSP20단백질의 활성을 시험관내에서 분석하여 레몬산합성효소에 대한 분자보호활성을 조사한 결과를 논의하였다.

재료와 방법

재료로는 대장균 *E. coli* BL21(DE3)과 발현운반체 pET-28a(+)(《Novagen》)를 리용하였다.

시약으로는 레몬산합성효소(Citrate synthase, CS, 《Sigma》, 150U/mg의 8.8mg/mL 저장용액) IPTG, SDS-PAGE시약, LB배지, Km, 단백질정제시약(Ni-NTA, 《Qiagen》), 실험기구로는 자외선분광광도계(《Beckman PV 70》), 온도조절미생물배양장치, 단백질전기영동장치(《AE-6450》), 온도조절수욕조를 비롯한 기타 장치를 리용하였다.

실험은 선행방법[2]에 기초하여 진행하였다.

레몬산합성효소용액을 40mmol/L의 HEPES(pH 7.5)완충액에 현탁시킨다. 정제된 S.so-HSP20단백질을 최종농도 150, 300nmol/L되게 첨가하고 레몬산합성효소의 최종농도는 150nmol/L로 정한다.

자외선분광광도계를 리용하여 43℃의 항온조건에서 1h동안 5min 간격으로 360nm에서 흡광도를 측정하여 기록한다. 한편 45℃에서 1h동안 10min 간격으로 320nm에서 흡광도를 측정하여 기록한다. 동시에 공백대조구와 150nmol/L의 BSA(소혈청알부민)를 첨가한 시험구의 흡광도를 측정한다.

결과 및 논의

1) S.so-HSP20유전자발현산물의 Ni탑에 의한 정제

대장균 *E. coli*(pET-28a(+)-S.so-HSP20)의 배양액에 0.5mmol/L의 IPTG를 첨가하고 20℃에서 6h동안 유도발현시킨 후 Ni수지탑을 리용하여 정제한 다음 SDS-PAGE한 결과는 그림 1과 같다.

더 많은 가용성산물을 얻기 위하여 낮은 온도(20℃)에서 유도발현시켜 정제한 결과 크

기가 20kDa인 단일단백질비가 99.9%의 순도로 얻어졌다.

이 결과는 목적인 가용성단백질을 앞으로의 분자보호활성분석실험에 리용할수 있다는것을 보여주고있다.

2) S.so-HSP20의 분자보호활성

43℃의 열처리조건에서 S.so-HSP20의 분자보호활성 43℃의 열처리조건에서 레몬산합성 효소에 대한 정제된 S.so-HSP 20단백질의 분자보호활성을 측정 한 결과는 그림 2와 같다.

43℃에서 150nmol/L 레몬산합성 효소(150U/mg의 8.8mg/mL 저장용액)의 열변성을 억제하는 정제된 S.so-HSP20단백질의 영향은 혼탁도변화로 보여 주었다.

그림 2에서 보는바와 같이 43℃ 열변성 60min에서 S.so-HSP20단백질은 레몬산합성 효소의 열변성을 각각 48.2, 70.4% 억제함으로써 분자보호제로서의 기능을 가지고있다는 것을 보여준다.

45℃의 열처리조건에서 S.so-HSP20의 분자보호활성 45℃의 열처리조건에서 레몬산합성 효소에 대한 정제된 S.so-HSP20단백질의 분자보호활성을 측정한 결과는 그림 3과 같다.

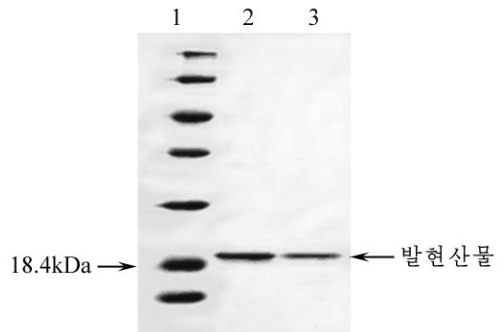


그림 1. Ni수지탑을 리용하여 정제한 S.so-HSP20유전자발현산물 (가용성산물)의 SDS-PAGE상
1-단백질분자량표식자, 2, 3은 S.so-HSP20단백질

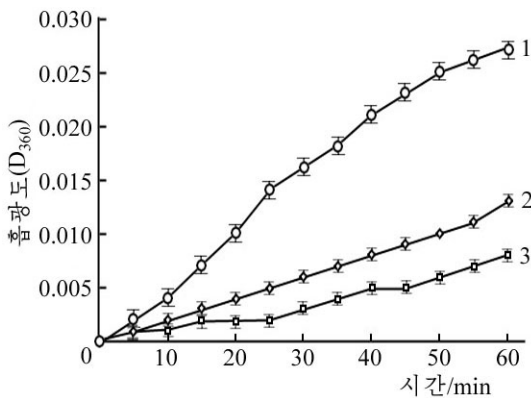


그림 2. 43℃의 열처리조건에서 레몬산합성 효소의 열변성억제에 미치는

S.so-HSP20의 영향

1-0nmol/L S.so-HSP20(S.so-HSP20을 첨가하지 않은 대조구), 2-150nmol/L S.so-HSP20, 3-300nmol/L S.so-HSP20

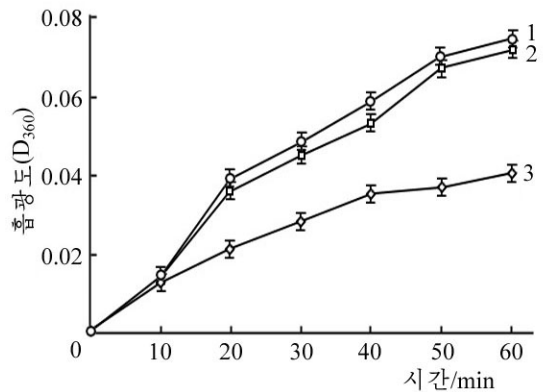


그림 3. 45℃의 열처리조건에서 레몬산합성 효소의 열변성억제에 미치는

S.so-HSP20의 영향

1-0nmol/L S.so-HSP20, 150nmol/L BSA, 2-0nmol/L S.so-HSP20, 3-150nmol/L S.so-HSP20

그림 3에서 보는바와 같이 45℃ 열변성 60min후 S.so-HSP20단백질은 레몬산합성 효소의 열변성을 38.3% 억제하였다. 결과는 S.so-HSP20이 레몬산합성 효소의 열변성을 억제하며 시험관내에서 분자보호활성을 가지고있다는것을 보여준다.

맺 는 말

열 및 산줄김성고세균 *Sulfolobus solfataricus* P2로부터 정제한 S.so-HSP20단백질은 43, 45°C 열스트레스조건에서 레몬산합성효소의 열유도응집을 보호함으로써 시험관내에서 분자보호활성을 가진다.

참 고 문 헌

- [1] D. A. Parsell et al.; Annu. Rev. Genet., 27, 437, 1993.
- [2] X. Ding et al.; Cell Stress and Chaperones, 13, 239, 2008.
- [3] 徐迅 等; 生物技术, 20, 1, 9, 2010.
- [4] 葛亚东 等; 生物学杂志, 27, 59, 2010.
- [5] 杨官品 等; 中国海洋大学学报, 39, 965, 2009.

주체103(2014)년 7월 5일 원고접수

**The Molecular Chaperone Activity of S.so-HSP20 Protein
on the Citrate Synthase(CS)**

Ri Tong Chol, Ri Jong Gum

At 43, 45°C thermal stress condition the purified S.so-HSP20 protein from hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P2 protect against heat-induced aggregation of citrate synthase *in vitro* and possesses molecular chaperone activity.

Key words; S.so-HSP20, citrate synthase