

인슐린 B사슬에 대한 고세균 *Sulfolobus solfataricus* P2 저분자열충격단백질 HSP20의 분자사페론류사활성기능

리동철, 림래근

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《모든 과학자, 기술자들이 과학기술발전의 추세에 맞게 첨단과학과 기초과학발전에 힘을 넣어 나라의 과학기술을 세계적수준에 올려세우도록 하여야 합니다.》(《김정일선집》 증보판 제20권 62페이지)

원핵생물과 진핵생물계에 광범히 존재하는 많은 종류의 저분자열충격단백질은 모두 스트레스조건하에서 단백질의 응집을 억제함으로써 생물학적활성을 유지하는 기능을 가진다.

일반적으로 열충격단백질은 단백질의 응집을 억제하는 등 여러가지 기능을 가지고있[1, 3, 4]지만 *Sulfolobus solfataricus* P2의 저분자열충격단백질 HSP20의 열유도응집을 억제하는 분자사페론류사활성기능에 대한 연구는 아직까지 밝혀지지 않았다.

우리는 정제된 HSP20단백질의 활성을 *in vitro*에서 분석하여 인슐린 B사슬에 대한 분자사페론류사활성기능을 분석하였다.

재료와 방법

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

시약으로는 인슐린 B사슬(Insulin B, 《Sigma》), IPTG, SDS-PAGE시약, LB배지, 카나미친(Km), 단백질정제시약(Ni-NTA, 《Qiagen》), 실험기구로는 자외선분광광도계, 온도조절미생물배양장치, 《AE-6450》형단백질전기영동장치, 온도조절수욕조를 비롯한 기타 장치를 리용하였다.

실험은 선행연구[2]에 기초하여 진행하였다.

인슐린 B사슬을 완충액(50mmol/L Tris-HCl, 0.15mol/L NaCl, pH 7.4)에 풀고 40℃에서 25min동안 DTT유도로 응집될 때 첨가된 정제후의 HSP20단백질이 발현되는 활성을 측정한다.

동시에 HSP20단백질을 첨가하지 않는 대조구의 활성을 측정한다. DTT의 최종농도는 20mmol/L로 한다. 《Beckman PV70》형분광광도계를 리용하여 360nm에서 4min 간격으로 인슐린 B사슬의 탁도를 측정한다.

HSP20과 인슐린의 비는 2 : 1로 하였다.

결과 및 해석

1) HSP20유전자발현산물의 존재방식의 결정

37°C에서 4h 유도발현후 초음파마쇄하여 상청액과 침전물의 HSP20유전자발현산물을 SDS-PAGE전기영동분석한 결과는 그림 1과 같다.

연구결과는 37°C 유도 4h후의 HSP20유전자발현산물은 95%이상이 비가용성형태 즉 봉입체형태로 존재하며 적은 량의 발현산물만이 가용성형태로 세포질에 존재한다는것을 보여주고있다. 이로부터 IPTG유도조건에서 재조합*E. coli*(pET-28a-HSP20)발현계는 봉입체형태로 HSP20을 대량적으로 발현시킬수 있다는것을 알수 있다. 때문에 생물학적활성을 가진 가용성산물을 대량 얻어내야 한다.

2) Ni타입에 의한 HSP20유전자발현산물의 정제

더 많은 가용성산물을 얻기 위하여 *E. coli*(pET-28a(+)-HSP20)의 배양액에 0.5mmol/L의 IPTG를 첨가하고 20°C에서 6h동안 유도발현시킨 후 Ni수지타입을 리용하여 정제한 다음 SDS-PAGE전기영동한 결과는 그림 2와 같다.

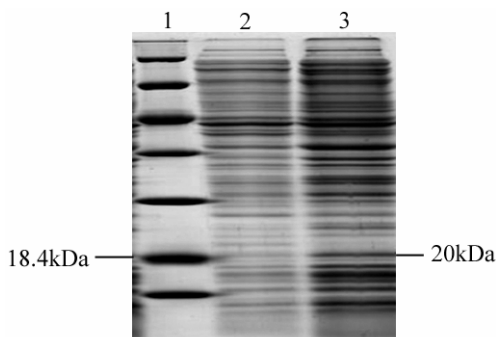


그림 1. 상청액과 침전물의 HSP20유전자 발현산물의 SDS-PAGE전기영동상
1-단백질분자량표식자, 2-상청액, 3-침전물(봉입체)

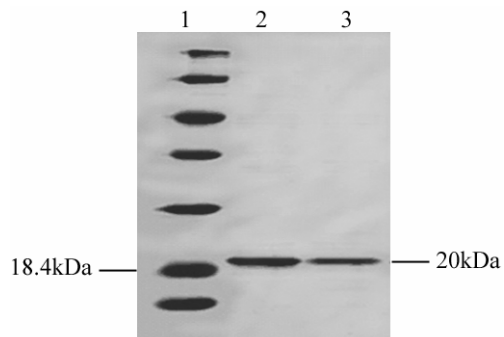


그림 2. Ni수지타입을 리용하여 정제한 HSP20유전자발현산물의 SDS-PAGE 전기영동상(가용성산물)
1-단백질분자량표식자, 2, 3-HSP20단백질

일반적으로 재조합단백질이 *in vitro*에서 대량발현될 때 생물학적활성이 없는 봉입체상태로 얻어진다. 따라서 온도를 낮추어 천천히 발현시키거나 투석 등을 진행하여 생물학적활성을 가진 가용성산물을 얻어야 한다.

더 많은 가용성산물을 얻기 위하여 낮은 온도(20°C)에서 유도발현시켜 정제한 결과 그림 2에서 보는바와 같이 크기가 20kDa인 단일단백질띠가 얻어졌다.

이 결과는 목적인 가용성단백질을 앞으로의 분자사패론활성분석실험에 리용할수 있다는것을 보여주고있다.

3) HSP20단백질의 분자사패론류사활성기능

40°C의 열자극유도조건에서 인슐린 B사슬에 대한 정제된 HSP20단백질의 응집억제기능을 측정한 결과는 그림 3과 같다.

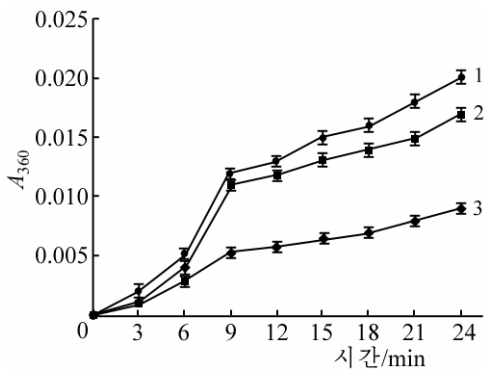


그림 3. HSP20의 분자샤페론류사활성기능
1-인슐린 B사슬(0.2mg/mL)+BSA(0.2mg/mL),
2-인슐린 B사슬(0.2mg/mL), 3-인슐린 B사슬
(0.2mg/mL)+HSP200(1mg/mL)

그림 3에서 보는바와 같이 40°C 열변성 24min 후 HSP20단백질은 인슐린 B사슬의 열변성된 탁도를 47% 낮추었다. 결과는 HSP20단백질이 인슐린 B사슬의 열변성을 억제하여 *in vitro*에서 생물학적활성을 유지하게 한다는것을 보여준다.

맺 는 말

호열산성고세균 *Sulfolobus solfataricus* P2의 정제된 HSP20단백질은 40°C 열스트레스조건에서 인슐린 B사슬의 열유도응집을 *in vitro*에서 억제함으로써 생물학적활성을 유지하는 분자샤페론류사활성기능을 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.

주체104(2015)년 12월 5일 원고접수

The Molecular Chaperone-Like Function of HSP20 Protein of *Sulfolobus solfataricus* P2 on the Insulin B Chain

Ri Tong Chol, Rim Thae Gun

At 40°C thermal stress condition, the purified HSP20 protein from hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P2 protect against heat-induced aggregation of insulin B chain *in vitro* and possess molecular chaperone-like functions that maintain biological activity.

Key words: HSP20, insulin B chain