PR-I-15. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 세포치사 팽창 독소의 재조합 단백질 B 의 정제와 구조 복원

전용선*, 김형섭
전북대학교 치과대학 치주과학교실

Background

구강 내에 존재하는 세균중 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*는 유일하게 Cytolethal distending toxin (CDT)를 생산하는 것으로 밝혀졌으며 localized aggressive periodontitis (LAP)의 원인균으로 알려져있다. CDT는 세포 주기에 관여하여 세포증식을 억제하며, 치사, 팽창을 유발하는 세균 단백 독소의 일종이다. CDT는 CdtA, CdtB 와 CdtC 로 구성된 독소로 이중 CdtB는 효소활성에 있어 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한, CdtB는 인체내의 DNaseI 과 구조적인 유사성이 있는 것으로 보인다. CdtB 에서 연구된 형태적 유사성은 효소 촉매 작용이나, DNA의 결합 그리고 금속 이온 결합과정 에서 연구된 특이한 DNase I residue 들과 연관성이 있는 것으로 조사되었다. 이들 중 금속이온 결합 부위와 Glu66, Asp189, Asp263은 DNase 활성에서 중요한 조절인자로 여겨지고 있다. Kunitz의 연구에서 활성에 필요한 마그네슘 이온의 농도는 DNA 농도와 비례한다고 하였으며, 다른 연구에서 칼슘 이온이 첨가 되었을 때 DNase의 활성도가 증가한다고 하였다.

Material and methods

*A. actinomycetemcomitans*의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 통해 *cdtB*를 증폭시키고 증폭된 *cdtB*유전자를 T-벡터 내로 클로닝 하였다. 클로닝된 *cdtB*를 pET28 발현 벡터내로 서브-클로닝하고 BL21(DE3) 발현 균주를 pET28-cdtB로 형질 전환시켜 CdtB 단백질 발현을 유도하였다. 클로닝된 *cdtB*를 pET28 발현 벡터 내로 서브-클로닝하였다. pET28-*cdtB*로 형질 전환된 BL21(DE3)에서 발현된 *CdtB* 단백질을 정제하고 구조를 복원하였다. 구조 복원된 Cdt B를 기능적으로 재구성하기 위해 다양한 조건을 설계하였다. 칼슘이온과 마그네슘 이온을 CdtB에 첨가시켜 DNase 활성에 금속 이온의 역할을 평가하였다.

Results

금속이온 즉, 칼슘이온과 마그네슘 이온이 A. actinomycetemcomitansCdtB subunit을 재구성하고, E. coli에서 발현시킨 후 구조복원 체계를 이용하여 기능적인 재발현 CdtB subunit을 제작하였다. 더 나아가 DNaseI 과 연관된 CdtB residue에 있어서 plasmid 함입에 의한 금속이온 효과의 중요성을 평가하였다.