

아메바(*Amoeba proteus*)의 열충격 대응에 관한 분자생물학적 연구: I. 열충격 대응 단백질의 탐색

홍혜경 · 최지영 · 안태인

서울대학교 생물교육과

세균이 세포내 공생하는 xD strain과 모 세포주인 tD strain *Amoeba proteus*의 열충격 대응의 차이를 알아 보기 위하여 방사선 동위원소로 표지된 아미노산을 Ca^{2+} -less Chalkley's 용액에서 음작용 경로를 통하여 90분 동안 흡수하게 하고, 저온 및 고온 스트레스에 대하여 새로 합성되는 스트레스 대응 단백질의 양상을 1, 2차원 전기영동 및 자기 방사 사진법에 의해서 비교하였다. 저온($10^{\circ}C$) 충격에 대응하여 아메바는 두 strain 모두 56.0 kDa, pI 6.0 단백질을 강하게 발현하였으며, xD strain에서는 tD strain과 달리 저온 충격 초기에 66.0 kDa, pI 5.5 단백질의 발현이 중단되었다. 한편 고온($33^{\circ}C$) 열충격에 대하여 두 strain 아메바에서 모두 10여종의 단백질이 새합성되는 것으로 확인되었으며, tD 아메바에는 이들 단백질의 새합성이 완만하게 이루어지는데 비하여 xD 아메바에서는 그중 66.0 kDa 단백질이 고온 대응 단백질로서 신속하게 새합성되는 것으로 나타났다. 이외에도 2차원 전기 영동 분석을 통하여 열충격에 의해서 발현이 촉진되는 다수의 단백질들을 탐지하였다. 탐지된 아메바의 열충격 단백질은 분자량에 따라 hsp100군 2종, hsp90군, 3종, hsp70군 및 hsp60군 각 1종, 그리고 small hsp군 4종으로 분류해 볼 수 있었다. 두 분석의 결과를 종합해 보면 tD 아메바에는 저온 및 고온 충격에 대하여 열충격 단백질의 합성이 완만하게 상승하는 데 비하여 xD strain에서는 신속하게 이루어졌다. 이상의 결과로 보아 아메바의 세포내 공생 세균은 숙주의 열충격 대응기작에 변화를 야기한 것으로 판단된다.

KEY WORDS: Heat-shock Proteins, *Amoeba*, Symbiosis

생물체는 세포 수준에서 열충격을 비롯한 많은 생리적 역조건(스트레스)에 대하여 신속하고 격렬한 반응을 보이며 열충격 유전자라는 소수의 특이 유전자의 일시적인 발현을 가속화한다. 이로 인하여 정상상태에는 소량으로 존재하던 이들 유전자 산물(일반적으로 열충격 단백질 또는 스트레스 단백질)이 증가되며 경우에 따라서는 이들 단백질이 고농도에 이를 만큼 세포내에 축적되기도 한다(Morimoto *et al.*, 1990). 많은 상황적 증거들에 의하면 이들 단백질은 스트레스로 인한 부작용으로부터 세포를 회복시키고, 보

호하는 기능을 한다고 알려져 있다.

스트레스하에서는 열충격 유전자가 활성화될 뿐만 아니라 대부분의 다른 유전자의 발현이 억제된다. 따라서 열충격 또는 스트레스는 비정상적인 유전자 발현을 초래하고, 이 현상이 지속될 경우 세포의 생존에 치명적인 결과를 초래하기도 한다. 초파리의 배양세포에 정상온도 보다 $12^{\circ}C$ 높은 $37^{\circ}C$ 의 짧은 열충격을 주었을 때 대부분의 전사작용이 감소하고 특히 리보솜 유전자의 전사가 격감된다(Arrigo, 1980). 또한 열충격은 RNA processing(Yost and Lindquist, 1986), mRNA 안정성 및 해독과정(Lindquist, 1980), 전사 종결 등에도 변화를 야기하며 세포 분열 및 DNA 합성을 중단시킨다고 알려져 있

**본 연구는 한국과학재단의 목적기초(1989) 연구 지원에 의하여 수행되었음.

다. 열충격에 의한 핵의 형태적 기능적 변화로는 핵의 필라멘트성 액틴이 영향을 받고, 과립성의 리보핵산단백질을 비롯하여 인이 순간적으로 손상을 받게되며 핵으로 부터 리보솜의 조립 및 방출이 중단된다(Pelham, 1984; Welch and Suhan, 1985). 또한 배양된 식물 조직세포에서 열충격시에 가시적인 변화로 핵에서 인이 뭉쳐지며, 이는 열충격으로 pre-rRNA가 축적되어 생기는 현상으로 설명되고 있다(Nover *et al.*, 1983). 이밖에도 세포의 구조 및 형태적 변화로 세포질에 열충격 단백질로 이루어진 과립이 형성되고, 세포질에 있던 특정 단백질이 핵으로 이동하는 현상이 관찰된 바 있으며, 이와 같은 구조형성 및 단백질의 이동은 열충격에 대한 자기조절 기능과 관계가 있는 것으로 보고되고 있다(Baler *et al.*, 1991).

Amoeba proteus xD strain은 tD strain에 *Lesionella* 유사한 그람음성의 세균이 감염하여 형성된 세포주이다(Ahn *et al.*, 1991). 이 세균은 감염초기에는 기생체의 특성을 보였으나 감염 1년후 부터는 유해성이 감소되면서 숙주에게 있어서 필수적인 공생체로 발전하였다(Jeon and Lorch, 1967). 공생주인 xD 아메바는 모세포주인 tD strain과 비교하여 열충격 대응에 있어서 다음과 같은 몇가지의 현상적인 차이를 보인다. 아메바의 정상 배양온도는 20 - 24°C이며 tD strain의 경우는 30°C에서도 배양이 가능하다. 그러나 공생아메바는 27°C 이상의 온도에서 배양하면, 먼저 공생세균이 감소하며 1주일 이상이 되면 공생세균이 제거되고 이후에 숙주도 사멸되는 고온 감수성을 나타낸다(Jeon and Ahn, 1978). 또한 xD아메바는 고온 배양시에 박테리아의 소멸과 관련하여 핵내의 인이 비정형으로 뭉쳐지는 이상이 나타나며 이와 같은 형태적 비정형은 공생세균을 미세 주입하였을 경우에는 회복된다(Lorch and Jeon, 1982). 이와같은 사실로부터 xD strain 아메바는 세균의 세포내 공생으로 인하여 모세포주(tD strain)가 가지고 있던 열충격 대응 체계에 변화가 유도된 것으로 보인다.

이와 같은 현상적인 열충격 대응의 차이를 분

자적 수준에서 해명하기 위한 일단계로서, 본 연구에서는 아메바 두 세포주에서 열충격 단백질의 차이점을 조사하였다. 이를 위하여 아메바에서 스트레스 대응 새합성 단백질을 조기에 탐지할 수 있는 방법을 개발하고, 열충격에 대응하여 발현되는 단백질을 1, 2차원 전기영동법 및 자기 방사 사진법으로 분석하여 아메바에서 탐지한 몇종의 고온 및 저온 열충격 대응 단백질과 두 아메바 세포주간에 열충격 대응의 차이점을 탐색한 결과에 대하여 보고한다.

재료 및 방법

아메바 배양: *Amoeba proteus* tD 및 xD strain은 Ahn(1983)의 방법에 따라서 *Colpidium sp.*을 먹이로하여 20°C에서 저장배양 하고, 무균배양한 *Tetrahymena pyriformis*를 먹이로하여 24°C에서 대량 배양하였으며 Chalkley's 배양액은 먹이와 함께 주 6회 갈아주었다.

새 합성 단백질의 표지: 스트레스에 대응하여 새로 합성된 단백질을 탐지하기 위하여 Chalkley's 배양액의 조성중(Choi *et al.*, 1991a) 아메바의 음작용을 저해하는 Ca^{2+} 를 배제하고(Ca^{2+} -less Chalkley's) 새합성 단백질의 전구물질로 Tran ^{35}S -methionine(약 70% L-methionine [S^{35}], 1000 Ci/m mol; ICN Biochemicals, Costa Mesa, Ca)을 첨가하였다. 배양액에서 Ca^{2+} 을 배제한 것으로 인한 아메바 배양 상태의 이상 여부를 확인하기 위하여 위축운동, 먹이의 섭취상태, cytolysis 여부 등을 1주간 대량배양 상태에서 점검하였으며, 세포분열은 single cell culture(Jeon and Ahn, 1978)를 통하여 확인하였다. 이 배양액으로 부터 전구물질의 흡수 정도 및 새로 합성된 단백질에 S^{35} -methionine이 결합되는 정도는 liquid scintillation counting, SDS polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) 및 자기 방사 사진법으로 조사하였다. 표지된 전구물질을 흡수한 아메바에서 동위원소의 양은 원심분리로 3회 세척한

일정 수의 아메바를 직경 2 cm의 glass filter (Gelman, Ann Arbor, Mich) 위에 옮겨 건조시킨 다음 scintillation tube에 담고, 7 ml의 Scintiverse(Fisher, Pittsburg, PA)에 혼합시켜 30분 동안 정치시킨 후 방사선량으로 측정하였다. 새로 합성된 단백질에 결합된 동위원소의 양은 glass filter 위에 부착시킨 아메바를 4°C 10% TCA로 고정 및 3회 세척한 다음, 공기중에서 건조시키고 위와 같은 방법으로 측정하였다.

열충격의 적용: 24°C에서 대량 배양하면서 2일간 굵긴 아메바를 Chalkley's 용액으로 2회 씻어준 후 최종적으로 열충격 온도의 Chalkley's 용액으로 채운 다음 해당 항온기에 넣어 열충격을 주었다. 저온 충격은 정상배양 온도(24°C)보다 14°C 낮은 10 ± 1°C에서 고온 충격은 9°C 높은 33 ± 1°C에서 시행하였다. 직경 10 cm 사알레에 담은 아메바를 Chalkley's 배양액에서 30분 - 7시간 동안 저온 또는 고온에서 전처리한 후 동일한 열충격 온도의 Ca²⁺-less Chalkley's 용액에서 Tran ³⁵S-methionine을 90분간 투여하고, 다시 동일 온도의 정상 배양액에서 2-3시간 추적하였다. 열충격에 대응하여 새로 합성된 단백질은 SDS PAGE 및 2-D PAGE 자기방사 사진법으로 확인하였다.

열충격 대응 단백질 분석: 열충격을 가한 아메바는 4°C Chalkley's 배양액으로 3회 씻어준 후 원심분리(200g, 1분)하여 모으고, 5회 냉동-녹임을 되풀이하여 균질 파괴하였다. 이를 4°C, 12000g 에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 단백질을 정량하였으며(Lowery *et al.*, 1951), Laemmli(1970)의 방법을 따라 SDS PAGE를 시행하였다. 2차원 전기영동은 변형된 O' Farrell의 방법(Ahn and Choi, 1985)에 따라 수행하였으며, 약 10,000 V.hr가 되도록 등전 초점분리하고 8-12% acrylamide 농도 구배의 SDS-PAGE 겔에서 150 V로 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 겔은 0.05% Coomassie brilliant blue(BCB), 50% methanol, 10% 초산용액에 3-12시간 염색한 후 50% methanol, 10% 초산용액으로 탈색하여, 10%

methanol, 5% 초산용액에 보관하였다. 아메바의 총 단백질의 조성은 BCB 염색을 통하여 비교하였고 스트레스 반응으로 새로 합성된 단백질은 이 겔을 건조시킨 후 자기방사 사진법(Ahn and Jeon, 1982)에 의하여 탐지하였다. 2차원 전기 영동한 단백질들의 등전점은 Ahn and Jeon(1989)의 방법에 따라 결정하였다.

결과 및 고찰

아메바는 섬모충류를 먹이 생물로 사용하여 배양하기 때문에 새합성 단백질의 선구물질의 투여가 용이하지 않다. 단시간 동안 가한 열충격에 대응하여 합성된 단백질을 탐지하기 위해서는 일시적인 선구물질의 투여 방법과 새합성 단백질을 초기에 탐지할 수 있는 방법이 강구되어야 한다. 이를 위하여 아메바의 생명활동을 정상적으로 유지시키면서 방사성 동위원소로 표지된 아미노산을 투여하는 방법으로 Ca²⁺-less Chalkley 배양액을 사용하였다. Chalkley's 액에 첨가된 1가 양이온은 아메바의 음작용을 활발하게 촉진시키는 반면, 첨가된 Ca²⁺은 음작용을 저해한다(Chapman-Andresen, 1973). 이에 착안하여 아메바의 배양액에는 0.61 mM 정도의 1가 양이온이 있으므로 Chalkley's 용액 조성중 Ca²⁺을 제외하여 완전한 음작용 유도를 실험하였다(Choi *et al.*, 1991a). 이 Ca²⁺-less Chalkley's 용액에서 아메바는 수일 동안 먹이 섭취, 세포분열 등이 정상적이었으며 배양액에 직접 투여한 Tran S³⁵-methionine을 Fig. 1에 보인 바와 같이 흡수하였다. 아메바는 Ca²⁺-less Chalkley 배양액에서 90분간이면 최대량의 Tran S³⁵-methionine의 흡수를 보였으며 이후에는 크게 증가되지 않았다. Ca²⁺-less Chalkley에서 최대한 uptake가 이루어지는 시간을 90분으로 하여 Tran S³⁵-methionine 농도를 달리 하였을 때 uptake 및 TCA insoluble fraction에 방사선 동위원소 잔여량은 Fig. 2에 보인 바와 같았다.

열충격에 의해서 일시적으로 발현되는 단백질

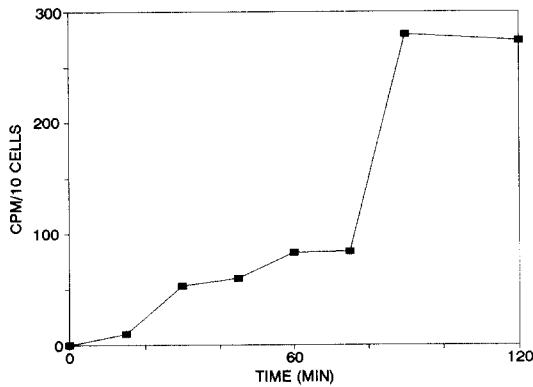


Fig. 1. Uptake of Tran ³⁵S-methionine by amoebae incubated in Ca²⁺-less Chalkley's solution containing 5 μCi/ml of Tran ³⁵S-methionine.

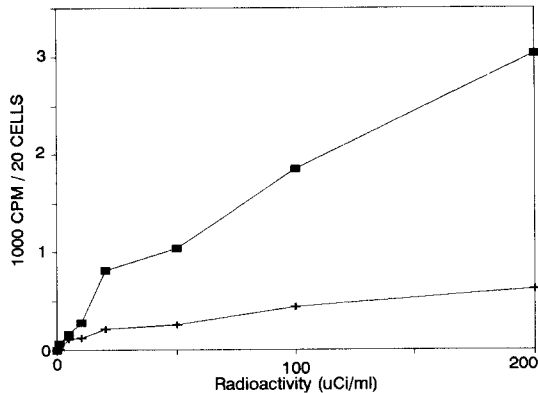


Fig. 2. Kinetics of Tran ³⁵S-methionine uptake (solid square symbols) and incorporation into TCA precipitable fraction (cross symbols) of amoebae. Amoebae were incubated for 90 min in Ca²⁺-less Chalkley's solution containing various concentrations (0-200 μCi/ml) of Tran ³⁵S-methionine.

을 탐지하기 위해서는 표지 시간을 길게할 수가 없기 때문에 전구물질을 uptake한 이후의 추적 시간을 2시간으로 하였다. SDS PAGE gel의 자기 방사 사진법으로 새합성 단백질을 분석하기 위하여 필요한 동위원소의 양을 결정하고자 여러 농도로 실험하였다. 그 결과 100 μCi/ml 이상의 농도에서 uptake 시키면 자기 방사 사진에서 새로 합성된 단백질을 탐지 및 비교할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3). XD 아메바를 10°C

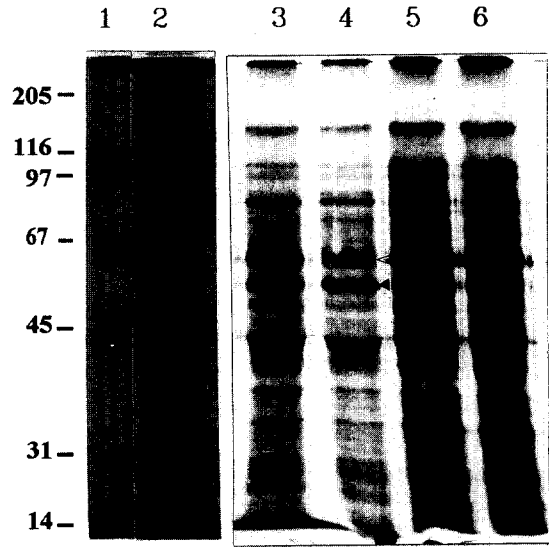


Fig. 3. Autoradiogram of SDS PAGE of total protein extracted from temperature stressed xD amoeba analyzed by SDS PAGE. Amoebae were pretreated for 30 min. at each stress temperature, incubated for 90 min in Ca²⁺-less Chalkley's solution containing 100 μCi/ml of Tran ³⁵S-methionine, then chased for 1-3 hr in normal Chalkley's solution at the same temperature. Lane 1: Molecular weight standards, Lane 2, 3: BCB staining and corresponding autoradiogram of amoebae processed at 23°C, chased for 2 hr. as control, Lane 4: 10°C, chased for 3 hr, Lane 5, 6: 33°C, chased for 1 and 2 hr, respectively. By shifting the temperature, expression of 66 kDa (open arrowhead) and 56 kDa (solid arrowhead) protein was significantly changed. Molecular weight markers on the left of the figure are in kDa. The same markers were used for all SDS gels in this study.

로 30분간 전처리한 후 90분 동안 Tran ³⁵S-methionine을 흡수시키고, 3시간 동안 추적하여 새로 합성된 단백질을 대조군(23°C, 2시간 표지)의 단백질과 비교하여 본 결과 56 kDa 단백질의 발현은 다른 단백질에 비하여 강화된 데 비하여 66 kDa 단백질의 합성은 현저하게 감소하였으며, 33°C 고온충격시에는 1, 2시간 추적하였을 때 66 kDa 단백질의 합성이 다소 증가하는 것으로 나타나 열충격 효과를 단백질 수준에서 탐지할 수 있었다(Fig. 3). 이에 따라서 이후의 실험에서는 Tran S³⁵-label을 고온 충격에서는 100 μCi/ml, 저온 충격에서는 대사가 감소하므로 150 μCi/ml 농도로 적용하여 각

각의 스트레스에 대응하여 새합성되는 단백질을 분석하였으며 필요한 경우 추적 시간을 조절하였다.

이와같이 아메바의 음작용 경로를 통한 새합성 단백질의 조기확인 방법은 종전에 사용해오던 방법이 가지고 있는 다음의 몇가지 난점들을 해소하였다. 아메바에서 지금까지 보편적으로 사용되어 온 동위 원소로 표지된 먹이(*Tetrahymena*)를 이용하여 새합성 단백질을 분석하는 방법은 (Kim and Jeon, 1986), 먹이가 완전히 소화되기까지 기다린 후 어떤 처치를 해야 한다. 그러나 이런 경우 먹이의 완전 소화에 소요되는 시간(2일 이상)의 정확한 추정이 어렵고, 포식 직후부터 일부 소화물로 부터 오는 표지된 전구 물질이 아메바의 세포 대사에 활용되므로 열충격 전후에 합성된 단백질들간의 구분이 불가능하다. 또한 polylysine을 이용하고 0.01 M sodium phosphate buffer에 50 mM NaCl을 첨가하여 과도하게 음작용을 유도하는 방법(Sanders and Bell, 1970)은 단시간(10분) 내에 다량의 전구물질을 투여할 수 있는 장점이 있으나 음작

용이 15분 이상 지속되면 아메바가 cytolysis로 죽게된다. 그러므로 이 방법은 과다한 음작용으로 인하여 아메바에 삼투적 충격이 일어날 가능성이 있어서 열충격 효과를 실험하는 데에 적절하지 못하다.

두 strain 아메바간에 열충격 온도 및 열충격 지속 시간에 대한 반응의 차이를 비교해 보기 위하여 저온 전처리 시간을 0, 2, 5, 7 시간, 고온 전처리 시간을 1, 3, 5시간으로 하여 비교해본 결과는 Fig. 4와 같았다. 이 결과에서 tD strain은 저온 충격 전처리 7시간 까지 66, 43, 5, 41.0, 27.5 및 25.1 kDa 단백질의 합성이 완만하게 증가하였다(Fig. 4A, lanes 1-4). 이에 비하여 xD strain은 저온 처리 2시간 부터 66.0 kDa 단백질의 발현이 중단되고, 전처리 5 시간에는 97.1 kDa, 56.0 kDa 및 20.0 kDa

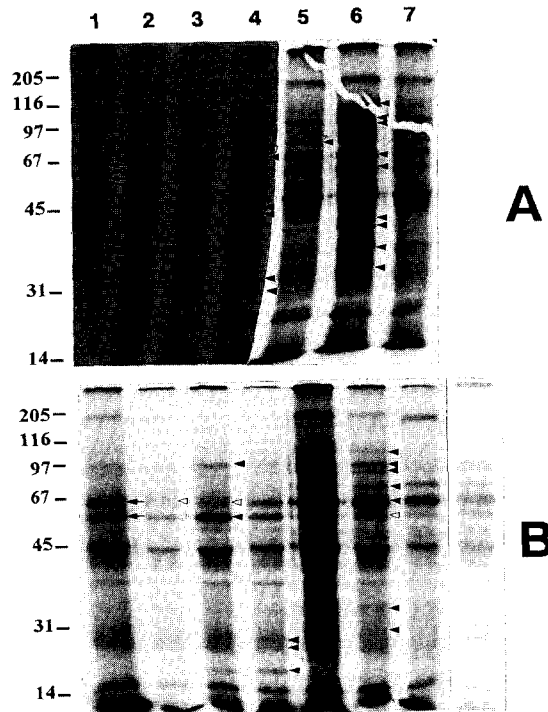


Fig. 4. Detection of heat shock proteins in autoradiogram of SDS PAGE of tD(A) and xD(B) strain of *A. proteus* being pre-treated for variable duration with temperature stress. Amoebae stressed with high temperature (33°C) were labeled for 2 hr with 100 μ Ci/ml of Tran 35 S-methionine. Low temperature (10°C) stressed amoebae were labeled for 3 hr with 150 μ Ci/ml of Tran 35 S-methionine.

Lane 1: At 23°C, 2hr for control, Lane 2, 3, and 4: Pre-treated for 2 hr, 5 hr, and 7 hr at 10°C, respectively, Lane 5, 6, and 7: Pre-treated for 1 hr, 3 hr, and 5 hr at 33°C, respectively, Lane 8 of B: Shorter exposure of lane 5.

For comparisons, untreated control level expression of 66.0 and 56.0 kDa bands in lane 1 are marked with arrows. Solid and open arrowheads indicate the stress inducible and repressible protein bands, respectively. Calculated molecular weight(kDa) of the marked bands are (top to bottom in order);

In A: Lane 4; 66.0, 43.5, 41.0, 27.5, and 25.1, Lane 5; 88.3, Lane 6; 107.6, 96.6, 91.0, 66.0, 56.0, 39.1, 37.5, 33.6, and 30.0

In B: Lane 3; 97.1, 66.0, and 56.0, Lane 4; 27.5, 25.1, and 20.0, Lane 6; 107.6, 96.6, 91.0, 88.3, 66.0, 56.0, 33.6, and 30.0

At 10°C, expression of 43.5 and 41.0 kDa proteins are unique to tD strain. Synthesis of 56.0 kDa band strongly enhanced in xD amoebae pre-treated for 2 hr (B, lane 3). On prolonged incubation, the effect of temperature shift diminished (cf. lanes 1 and 4 in B) except 20.0 kDa band that is unique to xD amoeba on cold shock. At 33°C, expression of 66 kDa protein enhanced (cf. lanes 1 and 6 in B), but that of 56.0 kDa decreased. Note changes in the profile of arrowheaded bands.

단백질의 합성이 증가하였다. 그리고 전처리 7시간에 이르렀을 때에는 97.1 kDa 및 56.0 kDa 단백질 합성이 열충격 전 수준으로 원상회복되는데 비하여 20 kDa 단백질은 계속 증가하였다.

고온 열충격에 대해서도 tD strain은 새합성되는 단백질은 있으나 대응 단백질의 변화 양상이 완만하였다. XD strain과 비교하여 특기할만 한 것은 전처리 3시간에 이르러 107.6, 96.6 및 33.6 kDa 단백질의 발현이 명확하였으나 5시간 후에는 이들 단백질의 새합성이 현저히 감소하였으며 이들 이외의 단백질은 전처리 시간에 따라 별 차이가 없는 것으로 나타났다. 이같은 차이는 tD strain 아메바는 보통 30°C 까지도 정상 배양이 되는 것으로 알려져 있으므로 (Bovee and Jahn, 1973) 33°C는 그다지 큰 열충격이 되지 못하기 때문에 나타난 결과라고 생각된다. 그러나 27°C 이상에서는 세포균 형성이 불가능한 xD strain에서는 33°C에서 상당한 변화가 나타났다. 33°C 고온 충격 1시간 부터 66 kDa 단백질의 합성이 증가하였으며 (Fig. 4B, lane 8), 이와는 대조적으로 56 kDa 단백질의 발현은 5시간 이상 전처리 시에 완전히 중단되었다. 그리고 107.6, 96.6 kDa 단백질의 발현도 tD strain에 비하여 약하며 33.6 kDa 단백질의 경우는 발현이 유도되지 않았다.

이상의 결과에서 저온 적응 단백질로 xD strain에서는 97.1, 56.0, 20.0 kDa 단백질이, tD strain에서는 43.5, 41.0 kDa 단백질이 특이한 것으로 탐지되었으며, 27.5, 25.1 kDa 단백질은 공통적인 것으로 나타났다. 고온 스트레스에 대해서는 xD strain에서 66.0 kDa 단백질 합성 증가가 특이하였으며, tD strain에서는 39.1, 37.5 kDa 단백질의 발현이 특이적이었다. 그리고 두 strain 아메바 모두에서 발현량에는 차이가 있지만 공통적으로 107.6, 96.6, 91.0, 33.6, 30.0 kDa 단백질이 고온 충격 대응 단백질로 나타났다. 이와 같이 SDS PAGE 및 자기 방사 사진법을 이용하여 두 strain 아메바에서 저온 및 고온 열충격에 대해 분명하게 발현량에서 차이를 보이는 66.0 kDa, 55.0 kDa 단백질을 비롯한 열충격 단백질을 탐

지하였으며, tD 및 xD strain 간에 저온 및 고온 충격에 대응하여 새합성 또는 합성이 중단되는 단백질에 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

XD strain 아메바에서 열충격 대응 단백질의 발현이 tD strain보다 뚜렷하므로 아메바의 열충격 반응을 보다 자세히 알아보기 위하여, 2차원 전기영동 및 자기 방사 사진법을 시행하였다. 먼저 열충격 단백질을 판정하는 기준으로 정상 배양 온도(24°C)에서 2시간 Tran ³⁵S-methionine으로 표지된 단백질의 양상을 Fig. 5에 제시하였으며 열충격 없이도 비교적 강하게 표지되는 각 단백질을 "a" - "n"으로 표시하였

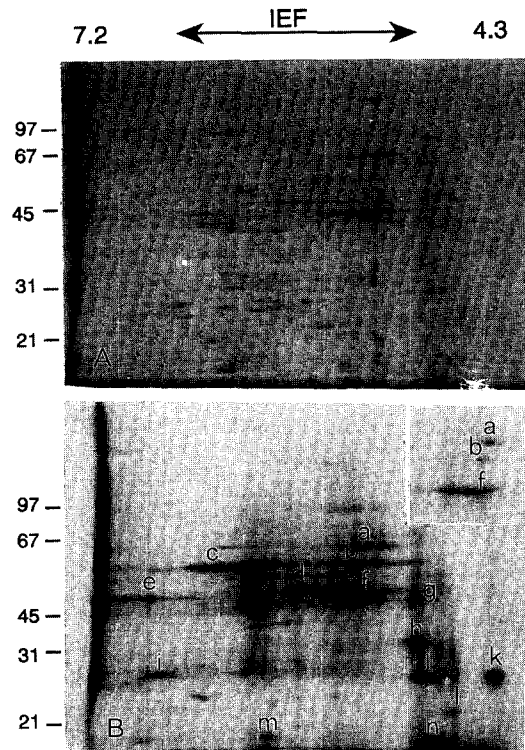


Fig. 5. BCB staining(A) and corresponding autoradiogram(B) of 2 dimensional PAGE gel of proteins from xD amoebae. Amoebae were labeled for 2 hr with 100 μCi/ml of Tran ³⁵S-methionine in Ca²⁺-less Chalkley's solution at 24°C. For detection of heat shock proteins in following figures, ³⁵S-labeled major proteins are marked with alphabet "a - n". The inset picture in "B" is a part of autoradiogram of tD strain for comparison.

다. TD 및 xD strain 아메바간에는 24°C에서 표지된 단백질의 전체적인 양상은 비슷하였으며 tD strain의 경우 "a" 단백질(66kDa, pI 5.5)이, xD strain의 경우 "b" 단백질(56kDa, pI 5.5)과 동일 분자량의 "c" 단백질(pI 6.0)이 다소 강하게 표지되는 특징이 있었다.

XD 아메바는 3시간 동안 10°C 저온에서 전처리 하였을 때 2차원 전기 영동한 gel의 자기 방사 사진(Fig. 6)에서 "c" 단백질이 다른 단백질 보다 강하게 표지되었으며, "e", "h", "i",

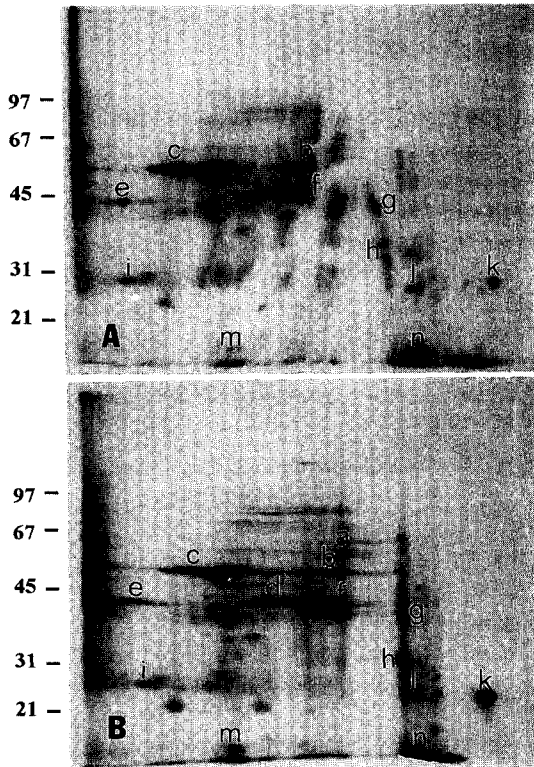


Fig. 6. Cold shock inducible proteins shown in autoradiogram of 2 dimensional PAGE of xD amoebae. Amoebae were pretreated for 5h(A) or 7 hr(B) at 10°C, labeled and chased same as in Fig. 4.

Cold shock induced the expression of 'b' and 'c' proteins (cf. Fig. 5) that correspond to 56 kDa band in Fig. 4. The synthesis of 'c' protein decreased on prolonged cold stress. On the other hand, the synthesis of 'h' and 'k' protein that corresponds to 27.5 kDa and 25.1 kDa band, respectively in Fig. 4 increased after 7 hr cold stress. However, 20 kDa protein shown in Fig. 4B, lane 4 could not be resolved in the autoradiogram.

"j", "k" 단백질은 약하게 발현되었다(cf. Fig. 5B). 그러나 5 시간 전처리하였을 경우에는 3시간 전처리와 비교하여 "a" 단백질의 발현이 증가하였고, "c"보다 "b" 단백질의 표지 강도가 높게 나타났으며 "h", "k" 단백질의 발현은 원상회복되는 양상을 보였다. "b", "c" 두 단백질의 분자량은 차이가 없으며 SDS PAGE 상에서(Fig. 4B, lane 4, 5) 확인한 56kDa 단백질에 해당한다. 이로 보아 xD 아메바에는 저온 충격에 대하여 "b", "c" 단백질간에 일종의 전환이 이루어지는 것으로 보인다. 이는 동일한 기능을 가진 다른 단백질로서 isotype일 가능성도 있으며, 동일한 단백질이 탈 인산화 등에 의하여 등전점이 달라지는 것일 수도 있을 것이다.

XD strain은 33°C 열충격에 대해서는(Fig. 7) 전처리 1시간 후에 "a" - "n" 단백질 중 "a" 단백질의 합성이 현저히 증가하였으며(cf. Fig. 7A and Fig. 5B), 단백질 "a"의 이런 증가된 발현은 전처리 3시간까지 같은 수준으로 유지되는 데 비하여 초기에 증가하였던(Fig. 7B) "b", "c" 단백질의 합성은 감소되었다. 이 "a" 단백질은 2차원 자기 방사 사진에서 동일 분자량의 다른 단백질이 없는 것으로 보아 Fig. 4에서 보인 xD 아메바가 33°C에서 특이하게 발현하는 66 kDa 단백질에 해당한다. 이외에도 "g" (분자량 50kDa, pI 4.5), "l" (분자량 20kDa, pI 4.3) 단백질의 발현이 증가하였으며 반대로 "d" (분자량 45 kDa, pI 5.9), "i" (분자량 25 kDa, pI 6.5) 및 "j" (분자량, 25 kDa, pI 4.5) 단백질의 발현은 감소하였다(Fig. 7B, 7C). 33°C에서 5 시간 전처리한 경우 전체적으로 표지된 단백질의 숫자가 감소하였으며 tD 아메바와 같은 원상회복(적응)은 이루어지지 않았다. 분자량은 비슷하지만 "g", "l" 단백질이 Fig. 4B, lane 6의 어느 특정 단백질과 일치하는지는 확정하지 못하였다.

이외에도 고온에서 전처리한 시간에 따라서 합성이 감소하는 단백질들을 Fig. 7에서 open arrowhead로 표시하고 번호(1 - 8)를 부여 하였으며, 증가하는 단백질들은 solid arrowhead로 표시하고 A - F로 표시하여 비교하였다. 이들 단백질에서도 보는 바와 같이 고온 충격에 대

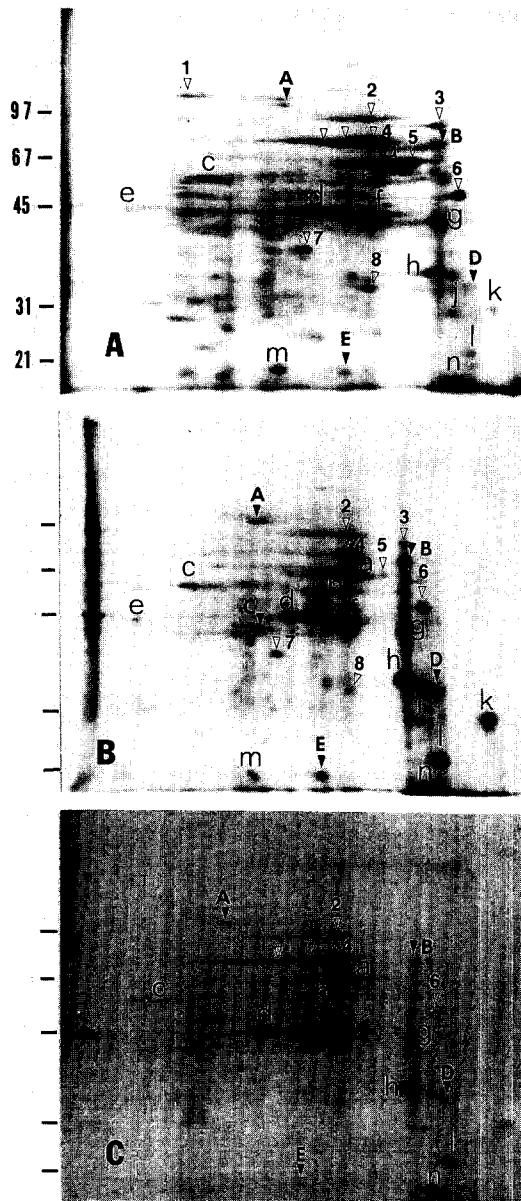


Fig. 7. High temperature stress proteins shown in autoradiogram of 2 dimensional PAGE gel of xD strain of *Amoeba proteus*. Amoebae were pretreated for 1 hr (A), 3 hr(B), or 5 hr(C) at 33°C and labeled as in Fig. 4. High temperature induced synthesis of 'a', 'g', 'h', 'k' 'l' proteins and those proteins marked with open arrowheads (cf. Fig. 5) and repressed the synthesis of 'c' and 'j' proteins. Transiently increasing minor proteins are marked with solid arrowhead. Open arrowhead indicates the protein whose synthesis decreased on prolonged incubation at 33°C. Also note that 'b' and 'c' proteins whose expression enhanced at cold were decreased at high temperature. The molecular weights of a, b, c, g, h, and k proteins are 66.0, 56.0, 56.0, 50.0, 27.5 and 25.1 kDa, respectively (cf. Fig. 4). The size markers in "B" and "C" are the same as in A

어 추가되었다(Parsell and Lindquest, 1994). 원생생물에서 밝혀진 열충격 단백질로는 *Leishmania spp.*의 hsp54, 74, 88, 70, 83, 22-26, 68, *Trypanosoma cruzi*의 hsp55, 60, 70, 83, *Tetrahymena pyriformis*의 hsp25-29, 70-75, *Tetrahymena thermophila*의 hsp80, 91, 30, 73, 80, 58 등이 탐지 및 보고된 바 있다(Watson, 1990).

아메바에서 본 연구로 밝혀진 열충격 단백질은 분자량 107.6 kDa에서 20.0 kDa에 이르며 SDS PAGE에서 탐지한 것 만으로도 13종에 달한다. 이들 단백질이 지금까지 밝혀진 열 충격 단백질의 어느 군에 속하는 지는 추후의 연구에서 밝혀질 것이다. 그러나 이들 단백질의 분자량으로 예측해 볼 때, 107.6 kDa 및 96.6 kDa 단백질은 hsp100군에 속할 가능성이 있으며, 91.0, 91.0, 88.3 kDa 단백질은 hsp90군에, 66.0 kDa 단백질은 hsp70군, 56.0 kDa 단백질은 hsp60군, 그리고 나머지 43.5 - 20.0 kDa에 이르는 단백질들은 아직까지는 그 기능들이 잘 규명되지 못한 다수의 저 분자량 단백질을 포함하는 small hsp에 속하는 것으로 생각된다.

열충격 단백질 중에는 세균의 감염 및 공생의 경우에 숙주와 기생 혹은 공생세균에서 다량으로 발현되는 종류들도 있다. 공생세균이 숙주 세포 내에 공생할 때 대장균의 GroEL과 상동 단백질이 다량 합성된다는 사실은 콩과식물의 뿌리혹 박테리아(Choi *et al.*, 1991b), 진드기의 공생

하여 단백질 합성의 변화는 고온 전처리 3시간 전후에 가장 많이 이루어짐을 알 수 있다.

진핵 생물의 열충격 단백질은 크게 분자량 83-90 kDa에 이르는 HSP90군, 66-78 kDa의 HSP70군, 세균, 미토콘드리아, 엽록체 등에서 charperonin으로 알려진 HSP60군과, 분자량 15-30 kDa에 이르는 small HSP군으로 분류해 왔으며, 최근에 이르러 HSP100군이 발견되

세균에서 이미 밝혀져 있으며(Hightower, 1991; Ohkada *et al.*, 1992), xD 아메바의 공생 세균에서도 동일한 단백질이 다량 발현됨이 단세포균 항체를 이용한 western blotting 및 면역 형광 현미경법에 의해서 확인된 바 있다(Choi *et al.*, 1991b). 아메바 공생 세균의 경우 *groE* 유전자는 열충격 프로모터 이외에 열충격 요소와는 다른 전사요소에 의해서 발현이 조절되는 특이 프로모터를 가지고 있다(Ahn *et al.*, 1991, 1994). 이와 같은 보고들은 공생 세균이나 기생 감염하는 세균에는 고온 충격 없이도 세포내 감염 및 공생시에 열충격 단백질을 대량으로 발현시키는 특이한 유전자 발현 조절 체계를 가지고 있으며, 이때 세포내에 기생 또는 공생하는 것 자체가 숙주와 기생체, 혹은 공생체에게 생리적 역조건으로 작용함을 의미한다. 세포내 공생에 기원하였을 것으로 보는 미토콘드리아나 엽록체에도 동일한 단백질(charperonin)이 다량 있다는 사실들은 열충격 대응 단백질이 세포내 기생 및 공생에서도 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다. 열충격 단백질은 세균 감염에 대한 숙주의 반응으로도 발현되기 때문에 열충격에 대한 연구는 병리학, 병원미생물학 및 면역학에서도 주요 연구주제 중의 하나가 되고 있다(Morimoto *et al.*, 1990). 이같은 보고들과 관련하여 생각해 보면 xD 아메바에는 공생세균이 세포내에 상존함으로써 야기되는 스트레스가 있기 때문에 열충격에 대한 대응이 모세포주인 tD 아메바에 비하여 차이가 날 수도 있다.

즉 본 연구의 결과 밝혀진 세균 공생 아메바(xD strain)와 그 모세포주인 비공생 아메바(tD strain)간에 56kDa, 66kDa 단백질을 비롯한 열충격 단백질들의 발현에서 나타난 차이는 xD 아메바의 세포내에 공생하는 공생세균에 기인한 것으로 보인다. 이런 발현 차이는 앞에서 언급하였던 바와 같이 xD 아메바에 있어서 세균의 세포내 공생이 하나의 생리적 역조건으로 작용하기 때문이거나 세균에 의하여 숙주핵에 야기된 어떤 유전적 변화에 의해서 생성된 차이일 가능성도 있다.

공생아메바가 보이는 열충격 대응상의 특성이

공생 세균에 의한 숙주 핵의 유전적 변이와 관련성이 있을 것이라는 가정은 다음과 같은 사실에 연유한다. 아메바의 핵이식 실험결과에 의하면 xD 아메바의 핵은 핵-세포질 상존성에 있어서 tD 아메바의 핵과는 차이가 나며(Lorch and Jeon, 1982), xD 아메바의 핵은 tD 아메바의 핵에 치사효과가 있다(Jeon and Lorch, 1973). 그리고 이와 같은 숙주의 핵 특성의 변화는 실험적으로 감염시킨 tD 아메바에서 감염 4주만이면 유도된다. 이들 일련의 실험적 증거들은 xD 아메바의 핵에 공생세균에 의하여 유전적으로 어떤 변화가 야기되었음을 의미한다. 최근 이 아메바에서 결손된 45 kDa 단항체를 이용하여 그 cDNA를 클로닝 및 분석한 결과 S-adenosyl methionine synthetase임을 확인하였다(Choi and Ahn, in preparation). 이와같은 결과에 비추어 xD 아메바에는 열충격 대응 유전자 및 그 조절 유전자에서도 일종의 유사한 유전적 변화가 생성된 것으로 예측되며, 이로 인하여 모세포주와는 다른 열충격 대응을 보일 가능성이 있는 것으로 본다.

앞에서 논의한 이들 가능성의 규명 및 세균 공생아메바의 열충격 대응 단백질들의 역할을 명확히 규명하기 위하여서는 본 연구에서 탐지한 아메바의 열충격 단백질들의 순수 분리 및 기능 분석이 이루어져야 할 것이다. 그러나 대부분 열충격 단백질이 소량 단백질이며 일시적으로 합성되므로 순수분리가 용이하지 못한 경우가 대부분이다. 본 연구 결과에 기초하여 이들 일부 단백질에 대한 단항체를 생산하였으며(Lee *et al.*, in preparation) 이들 단항체를 이용하면 보다 용이하게 열충격 단백질을 순수 분리할 수 있을 것이며, 또는 단항체를 지표로 열충격 단백질에 대한 cDNA가 클로닝 및 분석되면 이들 단백질의 특성이 규명될 수 있을 것으로 기대한다.

인용문헌

- Ahn, T.I., 1983. The fate of the strain-specific protein in xD strain of *Amoeba proteus*. *Korean J. Zool.* **26**: 181-192

- Ahn, T.I. and E.Y. Choi, 1985. Loss of a strain-specific protein by bacterial infection in *Amoeba proteus*. *Korean J. Zool.* **28**: 21-30.
- Ahn, T.I. and K.W. Jeon, 1982. Structural and biochemical characteristics of the plasmalemma and vacuole membranes in amoebae. *Exp. cell Res.* **137**: 253-268.
- Ahn, T.I. and K.W. Jeon, 1989. Antigenic reactivity of a monoclonal antibody against *Amoeba proteus* actin. *J. Protozool.* **36**: 560-562.
- Ahn, T.I., H.K. Leeu, I.H. Kwak and K.W. Jeon, 1991. Nucleotide sequence and temperature dependent expression of *xgroEL* gene isolated from symbiotic *Amoeba proteus*. *Endocyt. Cell Res.* **8**: 33-44.
- Ahn, T.I., S.T. Lim, H.K. Leeu, J.E. Lee and K.W. Jeon, 1994. A novel strong promoter of the *groEx* operon of symbiotic bacteria in *Amoeba proteus*. *Gene* in press.
- Arrigo, A.P., 1980. Investigation of the function of the heat shock proteins in *Drosophila melanogaster* tissue culture cells. *Mol. Gen. Genet.* **178**: 517-524.
- Baler, R., W.J. Welch and R. Voellmy, 1991. Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor. *J. Cell. Biol.* **117**: 1151-1159.
- Bovee, E.C. and T.L. Jahn, 1973. Taxonomy and phylogeny. In: *The biology of amoeba* (Jeon, K.W. ed.). Academic Press. pp37-82.
- Chapman-Andresen, C., 1973. Endocytic processes, In: *The biology of amoeba* (Jeon, K.W. ed). Academic Press. pp319-348.
- Choi, B.S., Y.S. Zoo and T.I. Ahn, 1991a. Effect of exogenous ATP and ionic concentration on the activity of contractile vacuoles in *Amoeba proteus*. *Korean J. Zool.* **34**: 452-459.
- Choi, E.Y., G.S. Ahn and K.W. Jeon, 1991b. Elevated levels of stress proteins associated with bacterial symbiosis in *Amoeba proteus* and soybean root nodule cells. *Biosystems* **25**: 205-212.
- Hightower, L.C., 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxicity. *Cell* **66**: 191-197.
- Jeon, K.W. and I.J. Lorch, 1967. Unusual intracellular bacterial infection in large free-living amoebae. *Exp. Cell Res.* **46**: 615-619.
- Jeon, K.W. and I.I. Lorch, 1973. Strain specificity in *Amoeba proteus*. In: *The biology amoeba* (Jeon, K. W. ed). Academic press, New York. pp 549-67.
- Jeon, K.W. and T.I. Ahn, 1978. Temperature sensitivity: A cell character determined by obligate endosymbionts in amoebae. *Science* **202**: 635-637
- Kim, H.B. and K.W. Jeon, 1986. Protein synthesis by bacterial endosymbionts in amoebae. *Endocyt. Cell Res.* **3**: 299-309.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T₄. *Nature* **227**: 680-685.
- Lindquist, S., 1980. Translational efficiency of heat induced messages in *Drosophila melanogaster* cells. *J. Mol. Biol.* **137**: 151-158.
- Lorch, I.J., and K.W. Jeon, 1982. Nuclear lethal effect and the nucleocytoplasmic incompatibility induced by endosymbionts in *Amoeba proteus*. *J. Protozool.* **29**: 468-70.
- Lowry, O.L., N.J. Rosenberg, A.L. Farr and R.T. Randall. 1951. Proteins measurement with phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Morimoto, R.I., A. Tissieres and C. Georgopoulos, 1990. The stress response, function of proteins and perspectives. In: *Stress proteins in biology and medicine* (Morimoto, R.I., A. Tisseieres and C. Georgopoulos eds.). Cold Spring Harbor Lab. Press pp.1-36.
- Nover, L., K.D. Scharf and D. Neumann, 1983, Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 1648-1655.
- Ohtaka, C., H. Nakamura and H. Ishikawa. 1992. Structure of chaperonins from an intracellular symbiont and their functional expression in *E.coli groE* mutant. *J. Bac.* **174**: 1869-1874.
- Parsell, D.A. and S. Lindquist, 1994. Heat shock proteins and stress tolerance. In: *The biology of heat shock proteins and molecular charperones* (Morimoto, R.I., A. Tissieres, and C. Georgopoulos eds.). Cold Spring Harbor Lab. Press. pp.457-494.
- Pelham, H.B.R., 1984. Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *EMBO J.* **3**: 3095-3100.
- Watson, K. 1990. Microbial stress proteins. *Adv. Micro. Physiol.* **31**: 183-233.
- Welch, W.J. and J.P. Suhan, 1985. Morphological study of the mammalian stress response: Characterization of changes in cytoplasmic organelles, cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intracellular actin filaments in rat fibroblasts after heat shock treatment. *J. Cell. Biol.* **101**: 1198-1211.
- Yost, H.J. and S. Lindquist, 1986. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell* **45**: 185-193.

(Accepted September 6, 1994)

**Molecular Biological Studies on Heat-Shock Responses in *Amoeba proteus*: I.
Detection of Heat-shock Proteins**

Hae Kyung Hong, Ji Young Choi and Tae In Ahn (Department of Biology Education, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

In order to detect the differences in heat shock response between the bacterial symbiont containing xD strain and the non-symbiotic mother strain (tD strain) of *Amoeba proteus*, cells were preloaded with labeled amino acids through pinocytotic pathway by incubating for 90 min in Ca^{2+} -less Chalkley's solution. The profile of labeled proteins synthesized on response to low or high temperature stress was analyzed by SDS PAGE, 2 dimensional gel electrophoresis and autoradiography. Both amoebae strongly expressed 56.0 kDa, pI 6.0 protein on cold shock (10°C). Somehow the synthesis of 66.0 kDa, pI 5.5 protein was repressed in xD strain, but that was not repressed in tD strain. On heat shock (33°C), more than 10 different proteins were newly synthesized from both strains of amoeba. In tD strain, synthesis of these proteins gradually increased. On the other hand, xD strain synthesized 66.0 kDa protein very rapid. In 2 dimensional gel electrophoresis, more heat shock inducible proteins were detected. On classifying these heat shock proteins on the bases of molecular weight, there were 2 in hsp100, 3 in hsp90, 1 each in hsp70 and hsp60, and 4 in small hsp group. In summary, heat shock response in tD strain was slow, and gradually increase the synthesis of heat shock proteins, but it was fast in xD strain. Thus the symbiotic bacteria apparently modified the heat shock response of the host.