

벼 Small HSP의 발현에 의한 대장균의 고온 stress 하에서의 내성의 증가

이병현 · 이효신 · 원성혜 · 조진기

경북대학교 농과대학 동물공학과

Expression of Rice Small HSP Enhances Thermotolerance of *Escherichia coli* under Heat Stress

Byung-Hyun LEE · Hyo-Shin LEE · Sung-Hye WON · Jin-Ki JO

Dept. of Animal Science & Biotechnology, Kyungpook National University

Abstract

A cDNA encoding rice chloroplast small HSP, Oshsp21, was introduced into *Escherichia coli* using the pET expression vector to analyze the possible function of Oshsp21 under heat stress. We compared the viability of *E. coli* λ BL21 (DE3) cells transformed with recombinant plasmid containing Oshsp21 with the control *E. coli* cells transformed with pET28a vector under heat stress after IPTG induction. Upon heat treatment at 50°C, those cells that expressed Oshsp21 showed improved viability compared with control cells. When the cell lysates from *E. coli* transformants were heated at 55°C, the amounts of proteins denatured in the control and pEhsp21-transformed cells were about 60% and 35% of total cell proteins, respectively. These results indicate that rice chloroplast small HSP function as a molecular chaperone in cells.

Key words : chloroplast, molecular chaperone, overexpression, small HSP

서 론

모든 생물들은 고온 stress 하에서 heat shock protein (HSP)라 불리는 단백질을 합성한다 (Vierling, 1991; Waters, 1995). 이들은 분자량에 따라 크게 5 종류로 분류되어지는데, 주로 HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 및 분자량 15-30

kDa의 저분자량 HSP (small HSP)로 분류된다 (Lindquist and Craig, 1988). 식물의 small HSP의 하나인 엽록체 small HSP는, 고온 스트레스 하에서 세포내 단백질의 변성방지 및 단백질간의 응집 등을 방지하는 분자 chaperone으로서 기능한다는 것이 in vitro 실험의 결과로 그 기능이 추측되어져 왔다 (Lee et al., 1995; Lindquist and

Craig, 1988; Parsell and Lindquist, 1993; Waters et al., 1996). 그러나 *in vivo*에서의 직접적인 실험 결과는 아직 보고되지 않고 있다 (Park et al., 1996). 이러한 *in vivo*에서의 엽록체 small HSP의 기능을 밝히기 위해서는, 형질전환 식물체를 이용한 생화학적 해석 및 생리적인 해석이 필수적이거나 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 벼의 엽록체에 존재하는 small HSP의 기능을 *in vivo* 수준에서 밝히기 위하여 이 단백질을 발현하는 대장균계를 확립하여, 이 단백질의 발현에 따른 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 발현 vector의 구축 및 형질전환

벼의 엽록체 small HSP (Oshsp21)를 대장균에서 발현시키기 위하여, 벼로부터 분리한 cDNA 염기서열 중 N-terminal의 transit peptide부분을 제외한 coding region을 PCR로 증폭시켰다 (Lee et al., 1999). 증폭된 산물을 제한효소로 절단한 후, 발현 vector인 pET28a vector에 도입하여 발현 vector, pEhsp21를 작성하였다 (Fig. 1A). Plastocyanin (PC; Lee et al., 1997)을 발현시키기 위하여 mature PC 부분을 pET28a에 도입하여 발현 vector, pEpc를 작성한 후, 숙주균인 λ BL21(DE3)에 형질전환하였다 (Fig. 1B).

2. 단백질 발현유도, SDS-전기영동 및 immunoblot 분석

대장균을 Luria-Bertani (LB) 배지에 접종하여 600 nm에서의 흡광도가 0.5에 도달할 때까지 배양한 다음, isopropyl-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG)를 1 mM이 되도록 첨가하여 2시간 동안 발현을 유도하였다. 대장균을 원심분리하여 회

수한 후, 12% SDS-gel로 전기영동한 다음 (Laemmli, 1970), CBB 염색 또는 nitrocellulose membrane에 blotting하여 Oshsp21 항체로 immunoblot 분석을 하였다 (Lee et al., 1998; Lee et al., 1999).

3. 고온처리 및 생존율의 계산

단백질 발현을 유도한 대장균을 50°C에서 시간별로 처리한 후, 서로다른 배율로 희석하여 50 μ l를 kanamycin (50 μ g) 고체배지에 접종하여 배양한 다음, 성장한 colony 수를 계산하여 생존율을 산출하였다. 고온처리 후의 단백질의 가용성을 비교하기 위하여 단백질 발현을 유도시킨 대장균을 회수하여 PBS buffer에 현탁한 다음, 초음파로 파쇄한 후 300,000 g에서 원심분리하여 상층액을 회수한 다음, 55°C에서 30분간 처리한 후, 16,000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액 (가용성 단백질)과 침전물 (비가용성 단백질)을 분리하였다. 이들 분획을 Bradford법 (Bradford, 1976)으로 단백질 양을 정량하였다.

결과 및 고찰

벼에 있어서 엽록체 small HSP의 *in vivo*에서의 기능을 밝히기 위하여, Oshsp21의 mature protein의 coding region만을 발현 vector에 도입하였다 (Fig. 1A). 대조구 단백질 발현을 위해 *Silene pratensis*의 PC (Lee et al., 1997)를 발현 vector에 도입하여 사용하였다 (Fig. 1B). 이들 발현 vector를 대장균에 도입하여 단백질 발현을 IPTG를 첨가하여 유도하였다 (Fig. 2). 벼의 mature Oshsp21을 대장균에서 발현시킨 결과 분자량 21 kDa의 단백질이 발현되었다 (Fig. 2A, lane 2). 이 단백질이 벼의 엽록체 small HSP인지를 알아보기 위하여 Oshsp21 항체를 이용하

여 immunoblot 분석을 해 본 결과, 21 kDa의 band만이 반응하였다 (Fig. 2B). 또한 PC도 대장균에서 분자량 약 15 kDa의 band로 관찰되어 이들 단백질들이 예상 분자량과 일치함을 확인하였다.

한편 벼로부터 분리한 Oshsp21이 숙주균인

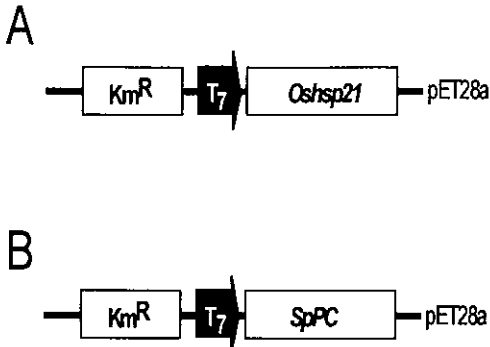


Fig. 1. Construction of expression vectors. cDNAs for rice chloroplast small HSP (A) and *Silene pratensis* plastocyanin (B) were ligated into the pET28a vector and transformed into *E. coli* λ BL21(DE3) cells.

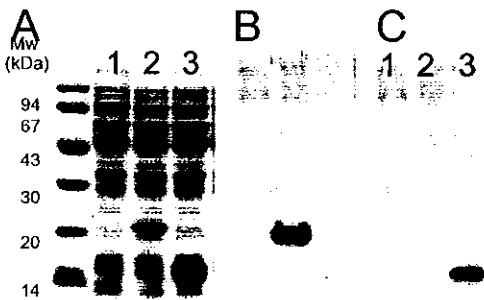


Fig. 2. Expression of chloroplast small HSP and plastocyanin in *E. coli* cells. After SDS-PAGE, gels were stained with CBB (A) or subjected to immunoblot analysis using antibody for Oshsp21 (B) or silene plastocyanin (C).

대장균의 고온내성을 증가시키는지 조사하였다. Oshsp21 또는 PC로 형질전환된 대장균을 배양하여 각각의 단백질의 발현을 유도한 다음, 50°C에서 시간별로 처리한 후, 처리 시간별 생존율을 조사한 결과 Fig. 3과 같았다. 발현 vector인 pET28a로만 형질전환된 대조군주와 pEpc로 형질전환된 대장균의 경우, 50°C에서의 처리시간이 증가할수록 생존율이 약 30%까지 감소하였다 (Fig. 3). 반면, pEhsp21로 형질전환된 대장균의 경우, 50°C에서 30분간의 열처리에서 약 80%까지 생존하였으며, 1시간 처리에서도 70% 이상의 생존율을 나타내었다. 이러한 결과는 식물에 있어서 광합성 전자전달계 단백질인 PC의 경우 대장균에 고온내성을 부여할 수 없으나, 벼의 엽록체 small HSP는 대장균 내에서도 세포를 보호하는 기능을 담당하여 고온내성을 부여할 수 있음을 나타낸다. 이와 유사한 결과가 *Castanea sativa*로부터 분리한 세포질에 존재하는 small HSP의 대장균으로의 도입에서도 최근 보고된 바 있다 (Soto et al., 1999).

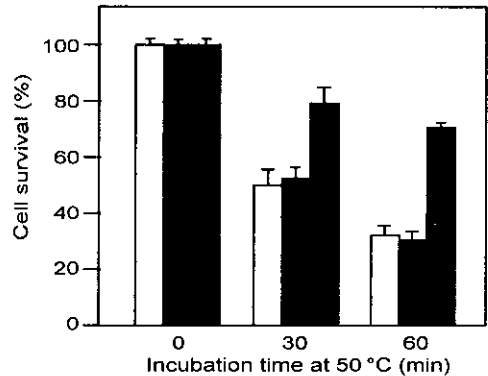


Fig. 3. Survival of *E. coli* cells at 50°C. Each transformant was cultured as described and subjected to 50°C treatment for up to 60 min. Survival (%) of pET cells (□), pEpc cells (▨), and pEhsp21 cells (■) were shown.

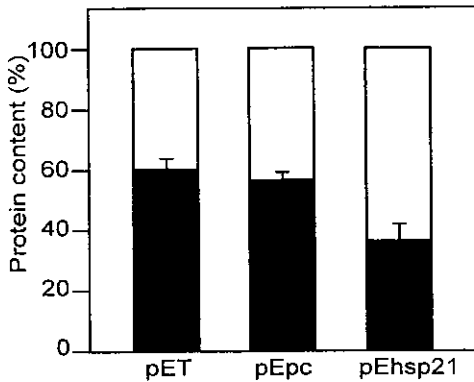


Fig. 4. Thermostabilization of proteins prepared from cell lysate of each transformant.

After 2 h IPTG induction, cell lysates were prepared and heated at 55°C for 30 min and subjected to centrifugation. The amount of protein in pellet (hatched bars) and supernatant (open bars) was quantified and expressed as percentage.

대부분의 HSP들은 분자 chaperone 기능을 가지고 있어서 각종 스트레스 하에서 세포내의 단백질의 변성방지 또는 가용성을 증가시켜 단백질의 기능을 유지시켜 주는 것으로 알려져 있다 (Lindquist and Craig, 1988). 따라서 Oshsp21에 의한 대장균의 고온 스트레스 하에서의 내성부여 기능이 분자 chaperone 기능에 의한 것인지 여부를 조사하기 위하여, 대장균의 총 단백질의 가용성의 변화를 조사하였다 (Fig. 4). 단백질의 발현을 유도시킨 대장균을 파쇄하여 얻은 총 단백질을 55°C에서 30분간 열처리한 후, 단백질을 가용성과 비가용성 단백질로 분류한 후 각각의 비율을 조사하였다. 그 결과 대조균주의 경우 총 단백질의 약 60%가 비가용성 단백질로 변성되었으나, Oshsp21을 발현시킨 대장균의 경우 총 단백질의 약 35%만이 비가용성 단백질로 나타났다. 이러한 결과는 Oshsp21 단백질이 대장균내에서도 분자 chaperone으로 기

능하여 고온 스트레스 하에서의 단백질들의 변성을 방지하였기 때문으로 추측된다.

따라서 벼의 엽록체에 존재하는 small HSP는 고온 스트레스 조건 하에서 세포기관을 보호하기 위하여 다른 단백질들의 고온에 의한 변성 방지 및 가용성을 증가시킴으로서 고온내성을 증가시키는 것으로 추측된다.

적 요

벼의 엽록체 small HSP의 고온 스트레스 하에서의 기능을 밝히기 위하여 Oshsp21 cDNA를 pET 발현 vector에 도입하였다. 형질전환된 대장균 배양액에 IPTG를 첨가하여 단백질 발현을 유도시킨 다음 고온 stress 하에서의 생존율을 대조균과 비교하였다. 그 결과 대조균주의 경우 50°C에서의 생존율이 크게 감소하였으나 Oshsp21이 발현된 대장균의 경우 70% 이상의 생존율을 나타내었다. 또한 대장균 단백질을 55°C에서 30분간 열처리한 후, 대장균 단백질을 가용성과 비가용성 단백질로 분류한 다음, 각각의 비율을 조사한 결과, 대조균주의 경우 총 단백질의 약 60%가 비가용성 단백질로 변성되었으나, Oshsp21을 발현시킨 대장균의 경우 총 단백질의 약 35%만이 비가용성 단백질로 나타났다. 이러한 결과는 벼의 엽록체 small HSP는 세포내에서 분자 chaperone으로 기능하여 고온내성을 부여할 수 있음을 나타낸다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 경북대학교 Post-Doc. 연구수지에 의하여 연구되었음

참 고 문 헌

1. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
2. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
3. Lee, B.-H., T. Hibino, J. Jo, A. M. Viale, T. Takabe. 1997. Isolation and characterization of a *dnaK* genomic locus in a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Plant Mol. Biol.* 35: 763-775.
4. Lee, B. -H., Y. Tanaka, T. Iwasaki, N. Yamamoto, T. Kayano, M. Miyao. 1998. Evolutionary origin of two genes for chloroplast small heat shock protein of tobacco. *Plant Mol. Biol.* 37: 1035-1043.
5. Lee, B. -H., S. -H. Won, H. -S. Lee, M. Miyao, W. I. Jung, I. J. Kim, J. Jo (1999) Expression of the chloroplast-localized small heat shock protein by oxidative stress in rice. *Gene* 241: in press.
6. Lee, G. J., N. Pokala, E. Vierling. 1995. Structure and in vitro molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *J. Biol. Chem.* 270: 10432-10438.
7. Lindquist, S., E. A. Craig. 1988. The heat shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.
8. Park, S., R. Shivaji, J. V. Krans, D. S. Luthe. 1996. Heat-shock response in heat-tolerant and nontolerant variants of *Agrostis palustris* Huds. *Plant Physiol.* 111: 515-524.
9. Parsell, D. A., S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. *Annu. Rev. Genet.* 27: 437-496.
10. Soto, A., A. Isabel, C. Collada, M. A. Guevara, C. Rosa, R. C. Emilio, G. Luis. 1999. Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *E. coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiol.* 120: 521-528.
11. Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579-620.
12. Waters, E. R. 1995. The molecular evolution of the small heat-shock proteins in plants. *Genetics* 141: 785-795.
13. Waters, E. R., G. J. Lee, E. Vierling. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* 47: 325-338.