

초고열성 고세균 *Pyrococcus horikoshii* 유래 샤페로닌의 ATPase 활성 특성

최성석^{1†}, 김세원^{2†}, 서용배³, 김군도¹, 이해영⁴, 김연희^{2,5}, 전승종^{2,5}, 남수완^{2,5*}

¹부경대학교 미생물학과

²동의대학교 스마트바이오헬스학과

³씨비에스 바이오사이언스

⁴동의대학교 공과대학 바이오응용공학부 식품공학전공

⁵동의대학교 공과대학 바이오응용공학부 의생명공학전공

Received: November 12, 2019 / Revised: November 28, 2019 / Accepted: December 2, 2019

Characterization of ATPase Activity of Chaperonin from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus horikoshii*

Seong Seok Choi^{1†}, Se Won Kim^{2†}, Yong Bae Seo³, Gun-Do Kim¹, Hyeoung Lee⁴, Yeon-Hee Kim^{2,5}, Sung-Jong Jeon^{2,5}, and Soo-Wan Nam^{2,5*}

¹Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Pukyong National University, Busan 48513, Republic of Korea

²Department of Smart Bio-Health, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

³Cbs Bioscience Co., Ltd, Daejeon 34113, Republic of Korea

⁴Food Science & Technology Major, Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, ⁵Biomedical Engineering and Biotechnology Major, Division of Applied Bioengineering, College of Engineering, Dong-Eui University, Busan 47340, Republic of Korea

ATP drives the conformational change of the group II chaperonin from the open lid substrate-binding conformation to the closed lid conformation to encapsulate an unfolded protein in the central cavity. It is thought that the folding activity of group II chaperonin is strongly correlated with the ATP-dependent conformational change ability. In order to confirm the dependence of the reaction temperature and ATP concentration of PhCpn, the ATPase activities were measured under different reaction temperatures and ATP concentrations. The maximal ATPase activity of PhCpn was observed at 80°C and 3 mM ATP concentration. As a result of ATPase activity according to the type of salt ions, the highest activity was observed at 300 mM LiCl among the univalent cations and 5 mM MgCl₂ among the divalent cations, respectively. The values of K_m and V_{max} for ATP substrate were estimated as 2.17 mM and 833.3 μM/min, respectively. This results provide the enzymatic information of PhCpn when the prolonged and high activities of pharmaceutical and industrial proteins (or enzymes), by using chaperonin molecules, are required.

Keywords: ATPase activity, chaperonin, enzymatic parameters, *Pyrococcus horikoshii*

서론

단백질 1차 구조인 아미노산 서열은 단백질 접힘(folding)을 유도하는 정보를 포함하고 있다[1]. 하지만 높은 온도, 고

농도 거대 분자일 경우 단백질 접힘이 잘못 일어나 내부에 묻혀 있는 소수성 잔기가 외부로 노출되어 다른 단백질 표면의 소수성 잔기와 결합하여 집합체를 형성하게 된다. 세포 내에서 잘못된 단백질 접힘에 의한 회합을 차단하는 역할과 단백질의 입체적 구조를 갖도록 도와주는 역할을 하는 것이 샤페론이다. 분자 샤페론의 주요 기능은 세포 내에서 단백질의 정확한 접힘, 조립, 운반 및 분해에 중요한 역할을 담당한다. 분자 샤페론은 자신의 노출된 소수성 결합 부위를 통해 다른 단백질의 잘못된 접힘으로 인한 소수성 잔기가 노

*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2275, Fax: +82-51-505-182-6897

E-mail: swnam@deu.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

출된 표면에 결합하여 잘못된 접힘 및 응집을 막고 정확한 접힘이 일어날 수 있도록 유도한다[2].

분자 샤페론 중 하나의 구성원인 샤페로닌(Chaperonin)은 ATP 의존성 단백질로 접힘을 매개하며, mega-dalton 크기로 이중 링(ring) 구조를 하고 있다. 샤페로닌은 접힘 과정을 편집하기 위해 ATP를 이용하여 단백질 접힘에 도움을 주고 잘못 일어난 접힘을 되돌리는 역할을 수행한다[3-5].

분자 샤페론 중 유비퀴틴스 분류에 속하는 샤페로닌(HSP60)은 60 kDa의 서브 유닛의 이중 고리 복합체를 형성하고, 다양한 비 접힘 단백질을 포획하여 ATP 의존적인 방식으로 교정한다[6-9]. 단백질 서열과 구조적 특징에 기초하여, 샤페로닌은 I형과 II형 두 그룹으로 나뉜다[6, 9, 10]. I형 샤페로닌은 박테리아 및 진핵 세포 소기관(미토콘드리아 및 엽록체)에 존재하고 II형 샤페로닌은 고세균(Thermosome) 및 진핵 세포의 세포질(CCT1 또는 TRiC)에 존재한다[11].

두 그룹 사이의 구조적 차이는 샤페로닌 cavity의 lid 역할에서 차이가 있다. I형 샤페로닌 경우 분리형 lid (*Escherichia coli*의 경우 GroES-GroEL complex)가 cavity을 닫는 역할을 한다[6, 9, 12]. II형 샤페로닌은 도메인의 끝부분에 확장된 나선형 돌출부가 구성(built-in lid)되어 샤페로닌 cavity를 닫는 역할을 한다[13-15]. 또 다른 중요한 차이점은 I형 샤페로닌과 II형 샤페로닌에 존재하는 두 개의 고리가 상호 작용하는 방식이며, 이는 두 샤페로닌 그룹에 대해 상이한 intra-ring과 inter-ring 신호 메커니즘을 시사한다. 샤페로닌의 개방 상태와 폐쇄 상태 사이의 전이는 ATP 결합 및 가수 분해에 의해 유도되며, 이는 복잡한 intra-ring 및 inter-ring의 구조 변화를 유발한다[16, 17].

20년 동안 I형 샤페로닌은 구조적 및 기능적인 연구가 지속되고 있지만, 더 복잡한 II형의 경우에는 지속적인 연구가 이루어지지 않았다. II형 샤페로닌은 최근에 샤페로닌으로 기능을 할 때 겪는 구조적 재배열에 대해 밝혀졌으며[18-20], II형 샤페로닌의 형태 변화에 대한 ATP 가수 분해의 요건에 대한 연구가 보고되었다[21, 22]. CCT에서의 ATP에 의한 구조의 형태 변화 및 CCT와 GroEL의 유사성에 대한 구조적 데이터는 CCT의 기능이 ATP 결합에 의존적이라는 것을 시사한다[22].

이전 연구에서는 고세균 *Pyrococcus horikoshii* OT3에서 유래한 II형 샤페로닌 PhCpn 유전자를 대장균에서 과발현시켜 정제하였으며, porcine pancreas procarboxypeptidase B와 공발현을 성공적으로 시킨 바 있다[23]. 본 연구에서는 정제된 재조합 PhCpn의 ATPase 효소학적 특성을 규명하기 위해서 ATP 농도, 활성 온도, 염의 종류 및 농도에 따른 ATPase 활성을 분석하는 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

균주, 플라스미드 및 시료 준비

이 연구에서 클로닝은 pGEM T-easy vector (Promega, USA)와 *E. coli* DH5 α 를 이용하였으며, 샤페로닌 발현을 위한 재조합 DNA 구축은 pET21 플라스미드 및 *E. coli* Codonplus (DE3) 균주를 이용하였다. *E. coli* 균주들은 LB 배지(1% Tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, and 1% NaCl)에서 배양하였다. 실험에 사용한 제한 효소와 ExTaq DNA polymerase는 Takara (Japan)에서 구입하였으며, 효소 반응을 위해 사용한 ATP 및 염은 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다.

단백질 발현을 위한 재조합 DNA 구축

대장균에서 PhCpn 단백질을 생합성하기 위해 pET21 vector를 이용한 재조합 DNA를 구축하였다. 고세균인 *Pyrococcus horikoshii* OT3로부터 genomic DNA를 추출한 후, PhCpn 유전자를 *Nde*I 및 *Bam*HI 제한 효소 부위를 포함하는 primer set (forward primer : 5'-CATATGGCACAGTTAGCAGGTCACCAATT-3', reverse primer 5'-GGATCCGTCTAGGTCGCTACTACCGCTGAA-3')를 이용하여 PCR 하고 TA 클로닝을 하였다. 회수한 플라스미드를 *Nde*I 및 *Bam*HI 제한 효소로 처리하고, 같은 제한 효소로 처리하여 회수한 pET21 vector에 삽입하였다. 완성된 pET21a-PhCpn 플라스미드는 단백질 발현을 위해 *E. coli* Codonplus (DE3) 세포에 형질전환하여 재조합 단백질 PhCpn 샤페로닌을 생합성 하였다[23].

재조합 PhCpn의 발현 및 정제

pET21a-PhCpn로 형질전환된 *E. coli* Codonplus (DE3) 세포를 50 μ g/ml의 ampicillin을 포함하는 10 ml LB에서 배양하고, 1 mM IPTG를 처리하였다. IPTG를 처리하고 6시간 동안 배양한 후, 세포를 원심분리 하였다. 원심분리 후 pellet을 회수하여 완충 용액 A (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM MgCl₂, 5% glycerol (v/v), 1 mM DTT)에 재현탁하였다. 초음파 파쇄기로 세포를 파쇄하고, 4°C에서 10분 동안 9,800 \times g에서 원심 분리하여 상층액을 회수하였다.

상층액을 85°C에서 20분 동안 가열하고, 9,800 \times g, 4°C의 조건에서 10분간 원심분리하여 변성된 단백질을 제거하였다. 동일한 완충액에서 0-500 mM의 NaCl로 농도를 선형 구배하여 단백질을 분리하였다. PhCpn을 함유하는 분획을 수집하고 한외 여과법으로 농축시켰다(Centriprep YM-10, USA). 농축한 단백질은 겔 여과 컬럼(HiLoad 26/60 Superdex 200)을 이용하여 150 mM NaCl을 함유하는 완충액 A를 이

동상 용매로 사용하여 재정제 하였다. 이어서, PhCpn을 함유하는 분획을 완충액 A로 평형화시키고 NaCl의 선형 구배로 용출시킨 음이온 교환 컬럼(HiTrap Qcolumn, Amersham Biosciences)을 이용하여 최종적으로 PhCpn을 정제하였다 [23]. PhCpn의 순도는 Silver Staining (Power Stain™ Protein Silver Stain Kit, M-biotech, Korea)으로 확인하였다. 총 세포 용해물의 단백질 농도 및 가용성 및 불용성 분획 내 단백질 농도는 Pierce™ Modified Lowry Protein Assay Kit (Thermofisher, USA)을 이용하여 측정하였다.

온도에 따른 PhCpn의 ATPase 활성 측정

재조합 PhCpn의 ATPase 활성에 미치는 반응 온도의 영향을 알아보기 위해 정제된 PhCpn (10 µg/ml)을 함유하는 200 µl 표준 반응 완충액(30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1.5 mM ATP) 을 제조하였다. 이를 각각 37, 50, 60, 70, 80 및 85°C에서 10분 동안 반응시킨 후 ATPase 활성을 분석하였다.

ATP 농도에 따른 PhCpn의 ATPase 활성 측정

재조합 PhCpn 단백질의 ATPase 활성은 malachite green assay 분석법을 이용하여 방출된 phosphate (Released Pi)를 비색 정량하여 측정하였다[24]. 표준 반응 완충액(30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 10 µg/ml PhCpn)에 최종농도가 1.5, 3, 5, 7, 10 mM이 되도록 ATP를 넣고 최종 부피 1,000 µl가 되도록 제조하였다. PhCpn의 ATPase의 반응 온도를 확인하기 위해, 37°C에서 85°C 사이의 온도에서 각각 10분 동안 반응시켰다. 반응 후, 샘플을 얼음에서 냉각하고, spindown 하였다. 800 µl의 malachite green 시약 및 100 µl의 34% (v/w) trisodium citrate를 첨가하고, 실온에서 5분 동안 반응시켰다. 반응 혼합물은 UV-vis 분광 광도계(Shimadzu Co., Japan)로 660 nm에서 흡광도를 측정하여, 방출된 Pi 양을 측정하였다. ATPase 활성은 µM/min/mg-PhCpn으로 표시하였다.

1가 및 2가 양이온 종류와 농도에 따른 PhCpn의 ATPase 활성 측정

재조합 PhCpn의 ATPase 활성에 미치는 1가 및 2가 양이온의 영향을 알아보기 위해 사용한 1가 양이온 염은 KCl, NaCl, LiCl, NH₄Cl이었으며, 표준 반응 완충액에 1가 염의 최종농도가 100 mM, 200 mM, 300 mM이 되도록 첨가한 후, 10분간 반응시켜 ATPase의 활성을 측정하였다. 2가 양이온의 영향을 알아보기 위해 사용한 염은 MgCl₂, MgSO₄, MnCl₂, MnSO₄, CoSO₄, ZnCl₂, NiCl₂, CaCl₂, BaCl₂ 등이었으며 1 mM 농도에서의 PhCpn의 ATPase 활성을 분석하였다. Mg²⁺ 이온의 영향을 좀더 알아보기 위해 MgCl₂ 농도

를 1–20 mM로 변화시키면서 ATPase 활성을 측정하였다.

결 과

온도에 따른 PhCpn의 ATPase 활성 분석

재조합 단백질 PhCpn의 ATPase 활성을 분석하기 위해서 정제된 PhCpn (10 µg/ml)을 함유하는 200 µl 반응 완충액을 제조하였다. 이를 각각 37, 50, 60, 70, 80 및 85°C에서 10분 동안 반응시킨 후 분석하였다. PhCpn의 ATPase 활성은 37°C에서 134.63 ± 4.72로 가장 낮은 값을 보였으며, 80°C에서는 299.78 ± 7.63 µM/min/mg으로 측정되어 약 2.2배 증가하였음을 알 수 있었다. 또한, 85°C에서는 활성 값이 265.01 ± 11.35%로 최적 온도 80°C 대비 ATPase 활성이 88% 수준에 달하였다(Fig. 1). 이 결과에서 PhCpn의 ATPase의 활성은 80°C까지 온도 의존적 증가하며, 최적 활성 온도 80°C 이상에서는 활성이 감소하는 것을 확인하였다.

ATP 농도에 따른 PhCpn의 ATPase 활성

PhCpn에서 ATP 농도에 따른 ATPase 활성을 확인하기 위해, 표준 반응혼합액에 ATP를 각각 1.5, 3, 5, 7, 10 mM 넣고 80°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 방출된 Pi의 농도를 측정하여 ATPase 활성을 분석한 결과, ATP 농도 의존적으로 ATPase 활성이 증가하는 양상을 보였으며, 10 mM에서 최대치에 달하였다. ATP의 농도가 1.5, 3, 5, 7, 10 mM로 증가할 때, 1 mM ATP당 방출된 Pi의 농도가 3 mM ATP에서 가장 높고 이후 점차 감소하는 것으로 분석되었다. 따라서, PhCpn이 최적 ATPase 활성을 보이는 ATP 농도는 3 mM로 결정되었다(Fig. 2). 그렇지만 1.5 mM에서도 상당히 높은 ATPase 활성을 보였고, ATP 기질의 비용을 감안하여 이후 실험에서는 1.5 mM ATP 농도를 주로 사용하였다.

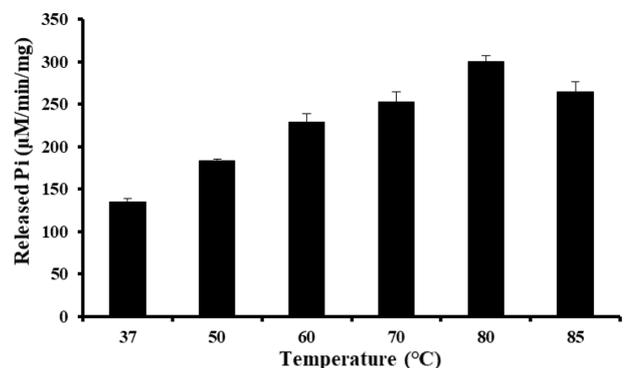


Fig. 1. Effect of reaction temperature on the ATPase activity of the recombinant PhCpn. The purified 10 µg/ml PhCpn was reacted in the standard reaction buffer mixture (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 1.5 mM ATP) under different temperatures (37–85 °C).

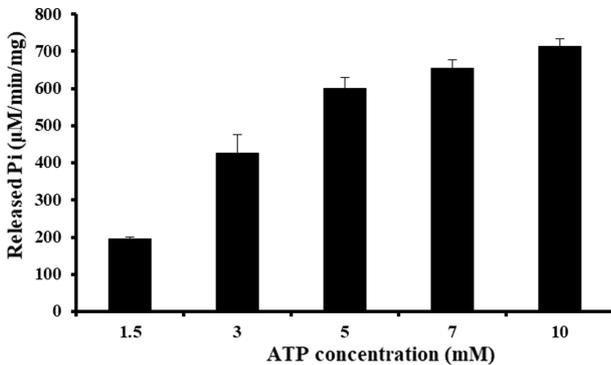


Fig. 2. Effect of ATP concentration on the ATPase activity of the recombinant PhCpn at 80 °C. The purified 10 µg/ml PhCpn was reacted in the standard reaction buffer mixture (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl) with different ATP concentrations (1.5–10 mM).

1가 양이온 첨가에 따른 PhCpn의 ATPase 활성

염의 종류에 따른 PhCpn의 ATPase 활성을 확인하기 위해, 다양한 1가 양이온 염 농도에서 PhCpn의 ATPase 활성을 분석하였다. 사용한 1가 양이온 염은 KCl, NaCl, LiCl, NH₄Cl이었으며, 표준 반응 혼합물에 최종 염의 농도가 100 mM, 200 mM, 300 mM이 되도록 첨가한 후, 10분간 반응시켜 ATPase의 활성을 측정하였다. 염을 전혀 첨가하지 않은 대조군(control)과 비교하여, NaCl을 제외하고는, 염농도 의존적으로 ATPase의 활성이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 3).

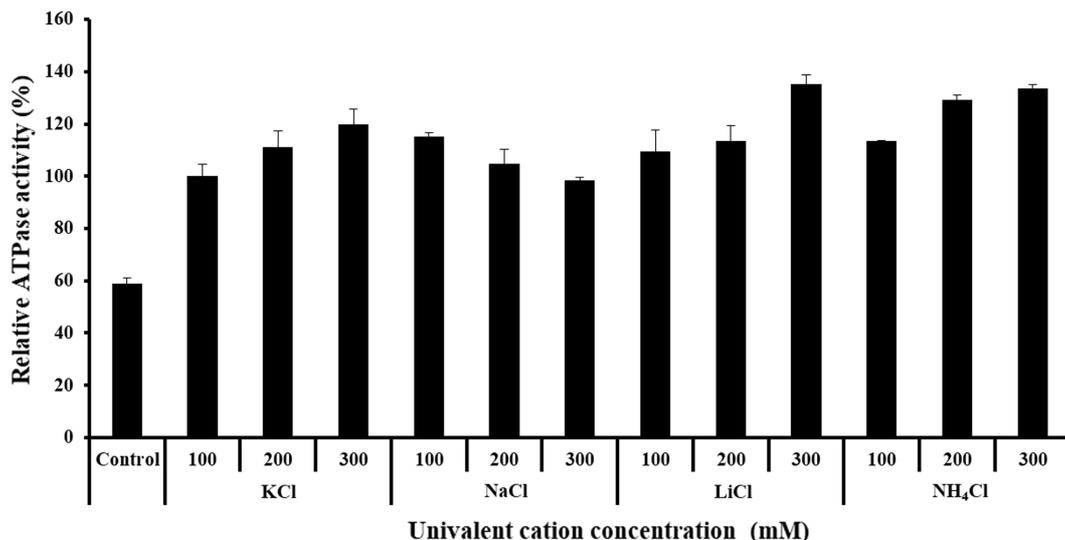


Fig. 3. Effects of univalent cations on the ATPase activity of the recombinant PhCpn. The purified 10 µg/ml PhCpn was reacted in the standard reaction buffer mixture (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 1.5 mM ATP) with different univalent cations and its concentrations. Control (C) means the reaction with 0 mM univalent cation. When 100 mM KCl was used, the relative ATPase activity was calculated as 100%.

Fig. 3에서 보는 바와 같이, 100 mM KCl일 때의 ATPase 활성을 100%로 했을 때, K⁺와 NH₄⁺ 및 Li⁺의 농도가 증가할수록 ATPase 활성이 증가하는 것을 확인하였다. K⁺의 경우, 300 mM일 때 120.00 ± 5.75%, Li⁺의 경우 300 mM일 때 135.33 ± 3.34%로 증가하였다. NH₄⁺를 첨가한 경우에도 300 mM에서 ATPase의 활성이 133.73 ± 1.45%로 증가하는 것을 확인하였다. 이와는 반대로 Na⁺를 첨가한 경우에는 100 mM에서 ATPase 활성이 가장 높았고, 300 mM에서 ATPase의 활성이 98.53 ± 1.20%로 나타나, Na⁺의 농도가 증가할수록 ATPase의 활성이 감소하였다(Fig. 3). PhCpn의 ATPase 활성에 최적인 1가 양이온과 농도는 LiCl 300 mM로 분석되었다.

2가 양이온 첨가에 따른 PhCpn의 ATPase 활성

2가 양이온의 종류에 따른 PhCpn의 ATPase 활성을 확인하기 위해, MgCl₂, MgSO₄, MnCl₂, MnSO₄, CoSO₄, ZnCl₂, NiCl₂, CaCl₂, BaCl₂ 등 다양한 2가 양이온을 포함하는 염 1 mM 농도에서의 PhCpn의 ATPase 활성을 분석하였다. 염을 전혀 첨가하지 않은 대조군(control)과 비교하여 2가 염을 첨가하면 ATPase 활성은 대체로 증가되었다(Fig. 4). 1 mM MgCl₂을 첨가했을 때 ATPase 활성을 100%로 했을 때, Mn²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ 등은 ATPase 활성 증가를 보였고, Ni²⁺, Ca²⁺, Ba²⁺ 등은 활성 감소를 보였다.

PhCpn의 ATPase 활성은 Mg²⁺에 크게 영향을 받는 것으로 확인되었으며, Mg²⁺의 농도(1–20 mM)에 따른 PhCpn의 ATPase 활성을 측정하였다(Fig. 5). MgCl₂를 전혀 첨가하지

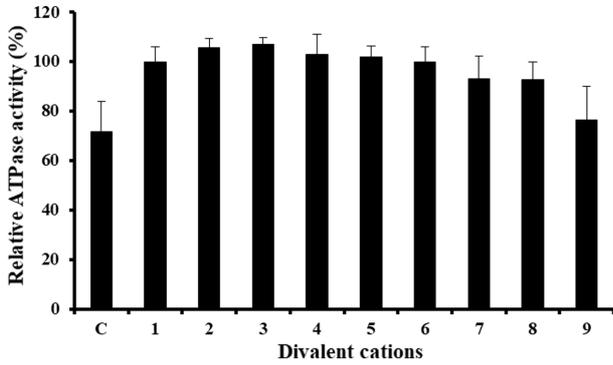


Fig. 4. Effects of divalent cations on the ATPase activity of the recombinant PhCpn. The purified soluble 10 µg/ml PhCpn was reacted in the standard reaction buffer mixture (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 1.5 mM ATP) with 1 mM divalent cations. (C) No divalent cation, (1) MgCl₂, (2) MgSO₄, (3) MnCl₂, (4) MnSO₄, (5) CoSO₄, (6) ZnCl₂, (7) NiCl₂, (8) CaCl₂, (9) BaCl₂. When 1 mM MgCl₂ was used, the relative ATPase activity was calculated as 100%.

않은 대조군(control)에서 생산된 Pi의 농도가 76.9 ± 7.7 µM/min/mg인 것과 비교하여, MgCl₂의 농도가 1, 2, 5 mM로 증가할수록 생성된 Pi의 농도가 141.2 ± 3.4, 233.9 ± 15.6, 378.8 ± 14.9 µM/min/mg으로 각각 1.8, 3.0, 4.9배로 증가하였다. MgCl₂의 농도가 7.5 mM일 경우 생성된 Pi의 농도가 273.1 ± 12.9 µM/min/mg으로, MgCl₂의 농도가 5 mM의 농도에서보다 생성된 Pi의 양이 감소하였다. 결론적으로, MgCl₂의 농도가 5 mM까지 농도 의존적으로 ATPase 활성이 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 오히려 활성이 감소하는 것으로 분석되었다.

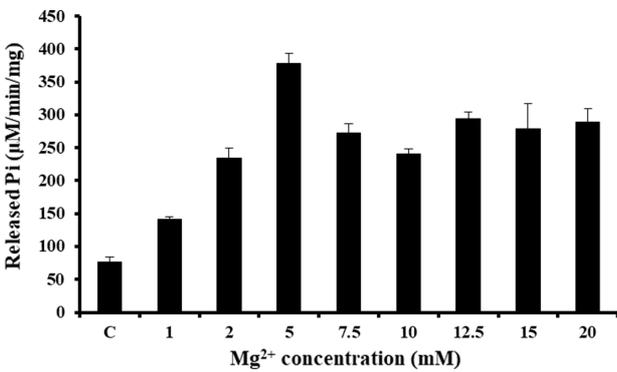


Fig. 5. Effects of Mg²⁺ concentration on the ATPase activity of the recombinant PhCpn. The purified soluble 10 µg/ml PhCpn was reacted in the standard reaction buffer mixture (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 1.5 mM ATP) with different MgCl₂ concentrations (1–20 mM). Control (C) means the reaction with 0 mM MgCl₂.

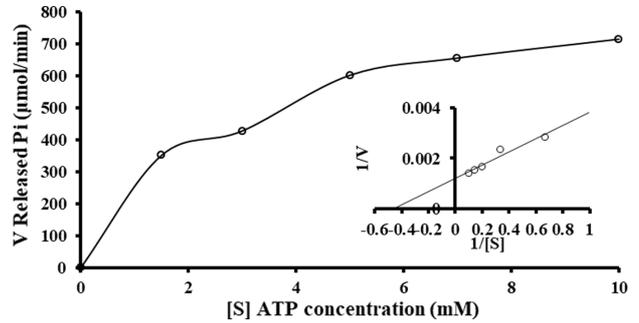


Fig. 6. Michaelis-Menten kinetics for the ATPase activity of PhCpn. The purified soluble 10 µg/ml PhCpn was reacted in the standard reaction buffer mixture (30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl) with different concentrations (1.5–10 mM) of ATP at 80 °C for 10 min.

효소 반응 속도를 이용한 PhCpn의 ATPase 활성 분석

PhCpn의 효소 반응 속도를 확인하기 위해 Pi 생성 속도를 이용하여 Michaelis-Menten 식의 이중역수도표식, $1/V = K_m/V_{max} \cdot 1/[S] + 1/V_{max}$ 을 사용하였으며, 여기서 V는 초기 Pi 생성속도를, [S]는 ATP 농도를 나타낸다. 효소 반응 속도 분석을 사용하여 기질 ATP에 대한 PhCpn의 K_m 및 V_{max}를 결정하였다. ATP 농도에 따른 ATPase 활성을 분석하기 위해 ATP의 농도를 1.5, 3, 5, 7, 10 mM이 되도록 첨가하여 반응시킨 후, 생성된 Pi의 농도를 측정하여 초기반응 속도를 계산한 결과, 각각 350.7803, 427.0935, 600.9631, 654.8051, 713.8196 µM/min으로 확인되었다. 이중역수도표를 통해(Fig. 6) 계산된, K_m 값은 2.17 mM, V_{max} 값은 833.3 µM/min였다.

고 찰

샤페로닌은 분자 샤페론 패밀리의 구성 단백질로 단백질의 정확한 폴딩, 조립, 운반 등에 중요한 역할을 수행한다. PhCpn은 고세균에서 분리된 II형 샤페로닌으로 ATP를 이용하여 단백질의 정확한 폴딩을 유도하고, 잘못된 폴딩을 교정하는 역할을 담당한다. 본 연구진은 *Pyrococcus horikoshii* OT3에 존재하는 PhCpn의 활성을 ATPase에 의해 생성되는 Pi를 이용하여 분석하였다.

Okochi 등 [25]은 PhCpn의 ATPase 최대 활성 온도를 90°C라고 보고하였으나 본 연구진의 실험결과에서는 80°C에서 가장 높은 것으로 나타났으며, 최대 활성 온도까지 온도에 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 샤페로닌 PhCpn이 분리된 원균주 *Pyrococcus horikoshii*의 최적배양 온도와 유사하다[25].

PhCpn의 ATPase 활성은 ATP 농도 의존적으로 증가하였

으며, 1 mM ATP당 방출된 Pi의 농도로 계산했을 때는 3 mM ATP에서 가장 높은 ATPase 활성을 보였고 이후 점차 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 ATP 농도 의존적인 group II chaperonin의 활성은 green fluorescent protein의 재접힘 반응에서도 관찰된 바 있다[25].

염의 종류와 농도에 따른 활성을 분석한 결과, 1가 양이온으로는 K⁺가 존재할 경우 ATPase 활성 증가하는 것을 확인하였다. PhCpn은 1가 양이온인 K⁺와 Li⁺에 의해서 활성이 크게 증가되었으며, 2가 양이온으로는 Mg²⁺, Mn²⁺ 등이 존재할 경우 ATPase 활성 또한 크게 증가하는 것을 확인하였다. Mg²⁺의 농도에 따른 활성을 분석하였을 때, 5 mM의 농도까지 Mg²⁺의 농도에 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인하였다. PhCpn의 활성에 있어서 1가 또는 2가의 금속 이온을 필요로 하며, 특히 2가 양이온 중 Mg²⁺이 PhCpn의 활성에 큰 영향을 미친다는 것을 확인하였다. 대장균 GroEL의 ATPase 활성은 K⁺ 이온에 크게 의존이지만[26], 모든 샤페로닌이 ATPase 활성에 K⁺ 이온에 대한 의존성을 가지고 있지 않다[27, 28]. 그러나, 본 연구의 PhCpn의 ATPase 활성이 K⁺와 Mg²⁺에 크게 의존적인 것은 *Pyrococcus furiosus* 유래 chaperonin과 유사하였으며[29], 특히 PhCpn은 Li⁺ 이온에 의해서 가장 ATPase 활성이 크게 나타났다. 이러한 양이온들의 ATPase 활성 증대 이유는 이들 양이온이 존재할 때 PhCpn과 ATP 간의 결합이 촉진되는 것으로 사료된다.

5 mM Mg²⁺ 이온을 첨가하고 ATP 농도에 따른 효소반응 후 생성된 Pi 농도(초기 Pi 생성속도)로부터 이중역속도표하여 Km 및 Vmax 값을 2.17 mM, 833.3 μM/min으로 계산할 수 있었다. 현재까지 샤페로닌 중에서 DnaK [30], Hsc66 [31] 등에서 샤페로닌의 활성에 관한 연구가 보고되었다. *E. coli*에 존재하는 샤페로닌인 DnaK에서 DnaK 1nM의 농도에서 Km이 19 nM인 것으로 보고된 바 있으며, Hsc66은 1 μM의 농도에서 Km이 12.7 1 μM로 보고된 바 있다[30]. 이들 연구와 비교하여 PhCpn의 경우는 비교적 높은 Km, Vmax 값을 가지는 것으로 판단된다.

이러한 결과는 PhCpn 샤페로닌이, 고열로 불활성화되는 단백질의 폴딩과 활성을 유지 및 보존하는데 필수적인 ATPase로 작용함을 알 수 있고, 특히, 의약학용 및 바이오 산업용 단백질(효소)의 장기간 활성유지에 PhCpn을 이용할 경우에 본 연구 결과가 귀중한 기초 자료를 제공할 것이다.

요 약

Group II형 샤페로닌은 단백질의 캡슐화를 유도하기 위해 열린 기질 결합 형태에서 닫힌 형태로 형태를 변화시키며, 이 때 ATP를 필요로 한다. 샤페로닌의 폴딩 유도는 ATP에 의한 샤페로닌의 구조 변화와 관련이 있는 것으로 보여진

다. 본 연구에서는 *Pyrococcus horikoshii* OT3의 group II형 샤페로닌인 PhCpn의 ATPase 활성을 다양한 조건에서 측정하였다. PhCpn의 반응온도(37–85°C)와 ATP 농도(1.5–10 mM) 의존성을 확인한 결과, 반응 온도는 80°C에서, ATP 농도는 3 mM에서 최적 활성을 보였다. 염의 종류에 따른 ATPase의 활성을 분석한 결과, 1가 양이온은 300 mM LiCl, 2가 양이온은 5 mM MgCl₂에서 최적 활성을 나타내었다. ATP 기질에 대한 Km 값은 2.17 mM, Vmax 값은 833.3 μM/min으로 계산되었다. 이러한 결과는 의약학용 및 바이오 산업용 단백질(효소)을 장기간 활성유지하는데 PhCpn을 이용할 경우에 귀중한 기초 자료를 제공할 것이다.

Acknowledgments

This work was supported by Dong-Eui University Grant (201902210001).

Conflict of interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Anfinsen CB. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-230.
2. Gething MJ, Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45.
3. Horwich AL, Fenton WA, Chapman E, Farr GW. 2007. Two families of chaperonin: physiology and mechanism. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**: 115-145.
4. Hartl FU. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571-579.
5. Ranson NA, White HE, Saibil HR. 1998. Chaperonins. *J. Biochem.* **33**: 233-242.
6. Bukau B, Horwich AL. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**: 351-366.
7. Ellis RH, Hartl FU. 1996. Protein folding in the cell: Competing models of chaperonin function. *FASEB J.* **10**: 20-26.
8. Hartl FU, Hayer-Hartl M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858.
9. Hartl FU, Hayer-Hartl M. 2009. Converging concepts of protein folding *in vitro* and *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 574-581.
10. Gutsche I, Essen LO, Baumeister W. 1999. Group II chaperonins: new TRIC(k)s and turns of a protein folding machine. *J. Mol. Biol.* **293**: 295-312.
11. Reissmann S, Joachimiak LA, Chen B, Meyer AS, Nguyen A, Frydman J. 2012. A gradient of ATP affinities generates an asymmetric power stroke driving the chaperonin TRIC/CCT folding cycle. *Cell Rep.* **2**: 866-877.

12. Taro K, Ryo I, Kazunobu T, Kosuke M, Rie M, Muhamad S, *et al.* 2008. Sequential action of ATP-dependent subunit conformational change and interaction between helical protrusions in the closure of the built-in lid of group II chaperonins. *J. Biol. Chem.* **50**: 34773-34784.
13. Ditzel L, Löwe J, Stock D, Stetter KO, Huber H, Huber R, Steinbacher S. 1998. Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* **93**: 125-138.
14. Shomura Y, Yoshida T, Iizuka R, Maruyama T, Yohda M, Miki K. 2004. Crystal structures of the group II chaperonin from *Thermococcus* strain KS-1: steric hindrance by the substituted amino acid, and inter-subunit rearrangement between two crystal forms. *J. Mol. Biol.* **335**: 1265-1278.
15. Xu Z, Horwich AL, Sigler PB. 1997. The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* **388**: 741-750.
16. Horovitz A, Willison KR. 2005. Allosteric regulation of chaperonins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**: 646-651.
17. Yébenes H, Mesa P, Muñoz IG, Montoya G, Valpuesta JM. 2011. Chaperonins: two rings for folding. *Trends Biochem. Sci.* **36**: 424-432.
18. Cong Y, Baker ML, Jakana J, Woolford D, Miller EJ, Reissmann S, *et al.* 2010. 4.0-Å resolution cryo-EM structure of the mammalian chaperonin TRiC/CCT reveals its unique subunit arrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 4967-4972.
19. Huo Y, Hu Z, Zhang K, Wang L, Zhai Y, Zhou Q, *et al.* 2010. Crystal structure of group II chaperonin in the open state. *Structure* **18**: 1270-1279.
20. Lopez T, Dalton K, Frydman J. 2015. The Mechanism and Function of Group II Chaperonins. *J. Mol. Biol.* **427**: 2919-2930.
21. Meyer AS, Gillespie JR, Walther D, Millet IS, Doniach S, Frydman J. 2003. Closing the folding chamber of the eukaryotic chaperonin requires the transition state of ATP hydrolysis. *Cell* **113**: 369-381.
22. Galit K, Keith RW, Amnon H. 2001. Nested allosteric interactions in the cytoplasmic chaperonin containing TCP-1. *Prot. Sci.* **10**: 445-449.
23. Kim JH, Shin EJ, Jeon SJ, Kim YH, Kim P, Lee CH, Nam SW. 2009. Overexpression, purification, and functional characterization of the group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **14**: 551-558.
24. Geladopoulos TP, Sotiroudis TG, Evangelopoulos AE. 1991. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal. Biochem.* **192**: 112-116.
25. Okochi M, Matsuzaki H, Nomura T, Ishii N, Yohda M. 2005. Molecular characterization of the group II chaperonin from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus horikoshii* OT3. *Extremophiles* **9**: 127-134.
26. Viitanen PV, Lubben TH, Reed J, Goloubinoff P, O'Keefe DP, Lorimer GH. 1990. Chaperonin-facilitated refolding of ribulose biphosphate carboxylase and ATP hydrolysis by chaperonin 60 (groEL) are potassium dependent. *Biochemistry* **29**: 5665-5671.
27. Guagliardi A, Cerchia L, Bartolucci S, Rossi M. 1994. The chaperonin from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* promotes correct refolding and prevents thermal denaturation *in vitro*. *Protein Sci.* **3**: 1436-1443.
28. Gutsche I, Mihalache O, Baumeister W. 2000. ATPase cycle of an archaeal chaperonin. *J. Mol. Biol.* **300**: 187-196.
29. Chen HY, Tan XL, Lu J, Zhang CX, Zhang Y, Yang SL. 2009. Characterization of ATPase activity of class II chaperonin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol. Lett.* **31**: 1753-1758.
30. Russell R, Jordan R, McMacken R. 1998. Kinetic characterization of the ATPase cycle of the DnaK molecular chaperone. *Biochemistry* **37**: 596-607.
31. Silberg JJ, Vickery LE. 2000. Kinetic characterization of the ATPase cycle of the molecular chaperone Hsc66 from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 7779-7786.