

Heat shock protein의 기능과 면역 반응 (Function of heat shock protein and Immune response)

김 세 진

생명공학연구소 세포종양RU.

서 론

Heat shock protein (hsp)은 동·식물에서 박테리아에 이르기까지 모든 생명체에 존재하는 단백질로서, 온도변화에 의해서 특이적으로 빠르게 합성되는데 이러한 기전은 homeostatic mechanism으로 이런 현상을 heat shock response라 한다 (Morimoto, R.I. *et al.*, 1990; Morimoto, R.I. *et al.*, 1994). 이러한 현상은 단지 온도의 변화 뿐 아니라 환경적 자극, infection, normal physiological processes, gene transfer에 의해서 유발되어진다. 1978년도에 Neidhardt와 Yura group은 *E. coli*에서 temperature upshift 후에 단백질 합성율을 관찰하여 대부분 단백질은 온도 변화에 대하여 거의 변화가 없는 반면에(2배 이하) 일부 단백질의 합성율이 일시적으로 약 10~20배 증가하고 temperature downshift시 이들 hsp의 합성율이 약 20배 감소하게 됨을 보았다. 이와 같은 heat shock protein은 크게 몇 종류의 단백질 families로 분류되어진다 (Table 1). mammalian 세포에 특이적으로 존재하는 larger heat shock protein은 100-110 kDa으로

되어있고 hsp90 family는 분자량이 83-90 kDa이며 hsp70 family는 63-78 kDa이고 hsp60 family는 chaperonins이라 불리며 (Hemmingsen, S.M. *et al.*, 1988), 박테리아, mitochondria 그리고 chloroplast에서는 15-30 kDa의 다양한 group으로 되어 있으나 yeast와 human에서는 단일 종류로 되어 있는 반면에 higher plant에서는 약 30여 종류로 나누어진다 (Subjeck, J.R. *et al.*, 1983 ; Shyy, T.T. *et al.*, 1986). Heat shock protein은 stress가 없는 상태에서는 낮은 수준으로 존재하는 것으로 보아 필수적인 기능을 수행하는데 관여하는 것으로 보이며 발생 과정 또는 세포의 성장상태에 따라서 조절된다. 많은 경우에 있어서 chaperone과 heat shock proteases들은 동전의 양면성으로 표현되며 이들에 대한 현재의 관점은 세포내에서 hsp의 기능과 이들의 발현을 조절하는 기작, 질병과 autoimmune disease에 많은 관심이 집중되고 있다 (그림 1).

Molecular Chaperones

*E. coli*나 식물, 효모, 초파리, 사람 등에서 각각의 heat shock protein gene의 염기서열 비교한 결과와 antibody를 사용하여 각 종사이의 heat shock protein들의 구조적 유사성을 실험한 결과에 의하면 heat shock protein은 가장 높은 보존적 protein임을 알 수 있었다 (Bardwell, J.C.A. and Craig, E.A., 1984, 1987). 고도로 보존된 단백질들의 기능을 무엇일까? 이 질문에 대한 대답은 상당히 애매하다. 이러한 유전적 보존성은 heat shock response가 거의 모든 생물체에서 필수적임을 의미한다. hsp의 발현은 온도 이외의 알콜, viral infection, unfolded protein 등 다양한 요인에 의해서 야기되며 아울러 많은 hsp들은 정상적인 세포 성장에 필요하기 때문이다. 또한 다양한 heat shock protein에서 mutations은 DNA 복제와 단백질 및 RNA 합성, 세포 분열과 같은 세포 성장의 거의 모든 측면에 영향을 주는 것으로 보인다. 일부 hsp에서 기능에 대한 연구가 시작되어 hsp의 일반적인 기능은 세포에서 protein folding에 관여하는 것으로 나타났으며 많은 hsp는 molecular chaperones들로서 새롭게 합성되거나 부분적으로 fold 또는 unfold protein에 결합하여 aggregation이나 misfolding을 저해하여 folding 또는 refolding을 촉진한다. 또 다른 hsp들은 proteases로써 misfold 또는 abnormal protein을 분해시키는 기능을 갖는다. 일반적으로 진

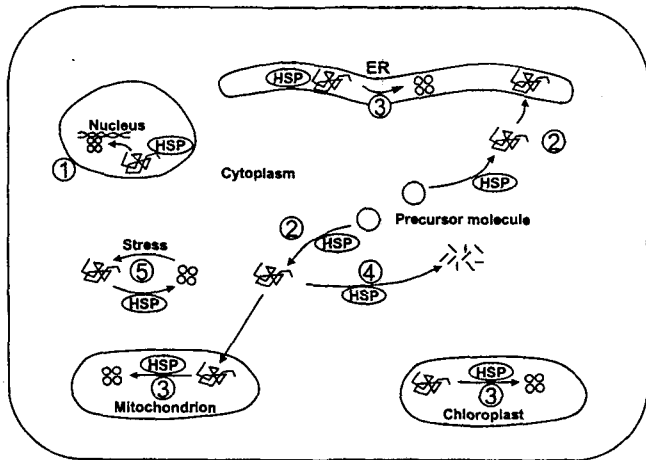


Fig. 1. Scheme illustrating the different function of HSPs in normal and stressed cells. (1) Prevention of steroid receptor binding to DNA by HSP; (2) unfolding of cytoplasmic proteins by HSP and subsequent translocation into the mitochondrion or endoplasmic reticulum (ER); (3) protein folding and assembly of oligomeric protein complexes; (4) degradation of unfolded proteins by HSP; (5) interference with protein unfolding caused by stress by HSP.

Table 1. Conserved stress proteins with known function.

Family	Alternate designations		Functions
	Eukaryotes	Prokaryotes	
Hsp90	Hsp83, 87	HtpG (C62.5)	Bind to specific polypeptides, and either silence their function (e.g. Glucocorticoid receptor). and/or escort them to their proper cellular compartment (e.g., pp60 ^{src})
Hsp70 (DnaK)	Hsp68, 72, 73; clathrin uncoating ATPase;BiP; grp75, 78, 80; hsc70;KAR2; SSA1, 2, 3, 4; SSB1, 2;SSC1; SSD1	DnaK	Dissociate some protein aggregates; Maintain some polypeptides in unfolded state, thus facilitating their translocation across membranes, and/or accelerating proper folding and oligomerization;bind to specific polypeptides (e.g., p53)
Hsp60 (GroEL)	Hsp58;RuBisCo- subunit binding protein;MIF-4	GroEL (MopB)	Maintain some polypeptides in unfolded state, thus facilitating their translocation across membranes, and/or accelerating proper folding and assembly. (by preventing misfolding?)
DnaJ	SEC63 (NPL) ^a , SIS ^b	DnaJ	Bind to specific polypeptides (e.g., RepA protein of phage P1);accelerates the release of some of the polypeptides bound to DnaK(?);interacts with DnaK and GrpE.
GrpE	antigenically related protein is present	GrpE	interacts with DnaK and DnaJ;accelerates the release of some of the polypeptides bound to DnaK (?).
Small hsp ^{sc}	hsp17.5, 22.23, 26;GENE 3	HtrC (?) ^d	Eukaryotec fuction is largely ynknown; homology to α -crystallin family; HtrC may be necessary for septum formation in prokaryotes (?) ^d
Ubiquitin	UBI1, 2, 3, 4	None	Conjugation to and "tags"unfolded polypeptides destined to be destroyed

a. The homology to DnaJ is confined only to a 70-amino-acid stretch;region that mediates interaction with hsp70 protein (?).

b. The homology to DnaJ is extensive and is found almost throughout the protein. SIS1 was isolated as multicopy, extragenic suppressor of mutations in SIT4, a gene encoding a putative cellcycle-dependent phosphatase.

c. A diverse family of proteins of 15-30 Kd, with tendency to aggregate.

d. The *htrC* gene is under σ^{32} -transcriptional Tegelation. The HtrC protein is needed for growth only at high temperatures and shares homology with the small hsp's at its carboxyl end.

핵생물은 많은 heat shock gene을 최소 2개 이상 가지고 있고 하나는 heat shock regulation시에 작용하고 다른 하나는 constitutive control에 관여한다. 예로 효모의 경우 hsp70 family은 최소 9종류의 유전자로 구성되어 있으며 사람의 genome에도 유사하게 존재한다. 그러나 원핵생물은 각 heat shock gene에 대하여 단일 copy만 존재한다. 이러한 사실은 대부분의 원핵생물의 heat shock 유전자들은 지속적으로 발현되며 필수적인 기능과 관련되어 있다. 실제, 원핵생물의 주요 hsp들은 단일 유전자에 의해서 지속적으로 발현된다. hsp는 단백질의 합성, 전달, fold에 필수적인 작용을 하므로 molecular chaperones이라고도 불리우며 (Gething, M.-J. and Sambrook, J., 1992) 단백질 folding에 대한 초기의 연구는 denaturation후에 *in vitro*에서 polypeptides의 refolding을 수행하였다. Anfinsen은 RNase renaturation에 대한 연구 결과 folding에 필요한 정보는 단백질의 primary sequence에 내재되어 있어 energy의 유입이나 어떤 외재적인 요인도 folding에 필요하지 않음을 보였다. 여러 종류의 단백질 refolding을 연구한 결과 단백질은 self-assembly할 수 있다는 일반적 원리가 가능하게 되었다. 초기에는 *in vivo*에서 단백질이 folding되는데 보조적인 요인이 필요하지 않다고 생각하였으나 단백질들의 빠른 folding이 molecular chaperone들과 transient interaction을 한다는 것이 밝혀졌으며 이러한 interaction은 다양한 effector에 의해서 빠르게 분리된 후 다른 단백질의 folding에 관여하게 된다. *in vitro* folding연구는 희석된 상태에서 수행하는 반면에 *in vivo*상태에서는 매우 농축된 상태에서 일어난다. 이러한 조건에서 nonproductive interaction이 증가하게 되어 단백질 folding 반응이 비가역적이거나 매우 느리게 일어나게 된다. 따라서 chaperone은 많은 양의 단백질이 정확하게 fold되기 위해서 필수적이다. hsp의 또 다른 groups은 protease로서의 기능을 갖는다. 지금까지 σ^{32} 의 regulon에 의한 모든 protease는 ATP dependent하다. 이들 protease들은 conformational change 또는 어떤 peptide bond cleavage가 필요한 부수적인 과정을 ATP로부터 energy를 제공받게 된다.

hsp70 (DnaK) chaperone machine

1970년대에 일명 stress protein이라는 70 kDa heat shock protein 계열의 구성원이 처음 발견되었다. 1974년에 Tissières 등은 초파리 세포 단백질의 합성 수준이 heat shock에 의해서 급격히 증가됨을 관찰하였다 (Tissières, A., *et al.*, 1974). 또한 이 시기에 bacteriophage λ 를 42 °C에서 배양시 bacteriophage replication이 일어나지 않고 temperature-sensitivity를 나타내는 돌연변이 대장균을 얻게 되었다. 이 돌연변이 유전자는 DnaK 단백질로 규명되었고 균주는 dnaK756으로 알려졌다 (Georgopoulos, C.P. *et al.*, 1979). 그후 1984년도에 대장균의 DnaK 단백질의 아미노산 서열이 초파리의 70 kDa heat shock protein과 유사함을 알게 되었다 (Bardwell, J.C.A and Craig, E.A., 1984). 진핵생물에서 hsp70 유전자의 높은 염기서열 보

존성을 이용하여 다른 hsp70 단백질들의 cDNA cloning에 초파리 유전자를 hybridization probe로 사용할 수 있었다 (Hunt, C.R. and Morimoto, R.I., 1985; Munro, S. and Pelham, H.R., 1986). hsp70 단백질은 세포내에 소량이 존재하더라도 ATP에 강하게 결합하는 특성을 이용하여, ATP-agarose를 사용하면 비교적 쉽게 정제할 수 있어 다수의 hsp70 계통이 발견

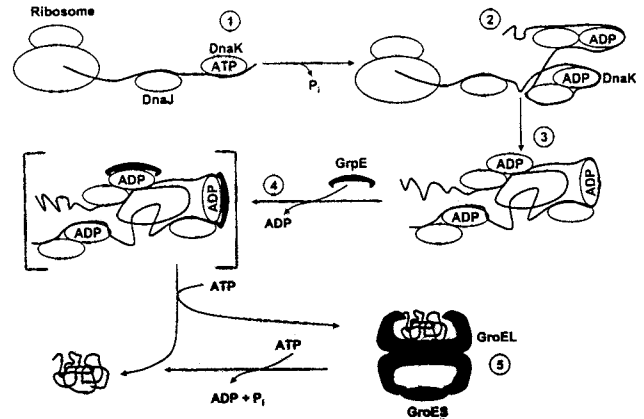


Fig. 2. Model for the pathway of chaperone-mediated protein folding in the cytosol of bacteria. (1) DnaK and DnaJ associate with the polypeptide chain as it emerges from the ribosome; (2) interaction of DnaJ with DnaK stabilizes DnaK in its ADP state; (3) a tight ternary complex of DnaJ, DnaK, and unfolded polypeptide is formed; (4) GrpE dissociates ADP from DnaK; (5) ATP binding to DnaK releases the unfolded protein, permitting its transfer to GroEL for folding to the native state.

하게 되었고 이들이 stress에 제한되지 않고 정상적인 조건하에서도 존재하는 것으로 밝혀졌다. Rothman 등은 단백질의 cellular trafficking의 연구에서 ATP dependent 반응에서 coated vesicles의 clathrin을 분리하는 clathrin uncoating ATPase를 *in vitro*에서 찾았으며 이 효소가 지속적으로 발현되는 hsp70의 구성원임이 밝혀졌다 (Chappel, T.G. *et al.*, 1986). 그후 이 단백질이 세포질에서 mitochondria와 endoplasmic reticulum으로 단백질을 transmembrane targeting하는데 관여하는 것으로 밝혔다 (Chirico, W.J. *et al.*, 1988; Murakami, H. *et al.*, 1988). 따라서 hsp70계통은 λ 복제의 initiation, clathrin의 분리, translation, transmembrane translocation, protein (re)folding, heat shock후에 손상된 단백질의 repair등 다양한 활성화에 관여하는 것으로 보인다. 이 종류의 chaperone은 이전에 규명된 두 종류와 비교하여 유전적, 생화학적, 구조적인 연구에서 더욱 진보된 것으로 major chaperone인 hsp70 (DnaK)과 두 종류의 DnaJ (hsp40)와 GrpE로 구성되어 있다 (그림 2). DnaK와 DnaJ 구성원은 실질적인 chaperone으로서 DnaK는 stretched conformation이 존재할 때 unfolded polypeptide와 결합을 선호하며 DnaJ는 다소 compact한 중간체 즉 molten globule상태에 결합

하는 특성이 있다 (Landry, S.J. *et al.*, 1992; Langer, T. *et al.*, 1992). 어떤 경우에는 DnaK/DnaJ proteins은 unfolded polypeptide substrate에 synergistic하게 결합하여 최종 maturation을 위한 GroEL (hsp60)구성원으로 전달해 주는 역할을 한다. 최근 연구에서 DnaJ protein은 DnaK가 polypeptide substrate와 결합하는 것을 촉진하는 것으로 보이며 DnaJ와 GrpE가 공조하여 DnaK의 ATPase 활성을 dramatic하게 조절하는데 특히 DnaJ는 DnaK-bound ATP의 hydrolysis을 가속화하며 GrpE는 DnaK-bound nucleotide release의 원인이 되는 ADP/ATP exchange를 촉진한다 (Liberek, K. *et al.*, 1991). hsp70 (DnaK)의 중요한 생물학적 기능중의 하나는 heat shock gene transcription에 관련된 heat shock factor의 기능과 관련된 negative autoregulation에 있다. 세포내에서 unfolded 또는 aggregated protein의 양은 heat shock gene expression의 정도에 따라 조절되며 특히 DnaK chaperone machine에 의해서 조절된다 (Craig, E.A. and Gross, C.A., 1991; Yura, T. *et al.*, 1993).

Heat shock 유전자 발현의 조절

1975년에 Cooper와 Ruettinger는 hsp인 GroE의 합성에 영향을 주는 nonsense mutation (Tsn-K165)를 추출하여 *groE* structural gene에서 돌연변이가 일어났으리라 추측하였다. 그러나 추가적인 분석결과 이 돌연변이를 갖는 세포는 high temperature shift후에 많은 hsp들의 합성율이 일시적인 증가를 나타내지 않음으로서 heat shock response의 전체적인 조절에 영향을 주는 것으로 나타났다. 이 regulator의 sequence는 σ^{70} 과 homology가 매우 높으며 대장균에 규명된 첫 번째 alternative sigma factor임이 알려졌다. 이 regulatory locus는 초기에 *hspR* 또는 *hin*이라 명칭하였으나 후에 *rpoH*로 재명명되었다. *rpoH*는 32-kDa의 sigma factor (σ^{32})를 encode하며 대장균에서 대부분

$E\sigma^{70}$ 에 의해서 인식되는 것과는 상당히 다르게 core RNA polymerase와 promoter에 직접 작용한다(그림 3). $E\sigma^{32}$ promoter가 $E\sigma^{70}$ 에 의해서 인식되는 직접적인 증거가 없다. heat shock promoter들은 $E\sigma^{32}$ 에 의해서 인지되며 대부분의 cellular protein과는 구별된다. 알려진 $E\sigma^{32}$ promoters를 종합하면 그림 4와 같다. 대장균에서 major heat shock response pathway는 σ^{32} factor의 transcriptional control되고 minor pathway은 다른 factor에 의해서 transcripton이 조절된다. σ^{32} factor는 RNA polymerase (RNAP) core (E)와 complex를 이루어 σ^{32} dependent promoter를 전사하는 $E\sigma^{32}$ holoenzyme을 구성한다. 대장균에서 heat shock response의 조절은 3단계로 조절된다. 첫째, *rpoH* (*hspR*) mRNA (encoding the σ^{32} factor)의 posttranslational control로써 저온에서 억제되고 고온에서 급격히 유발된다. 두 번째로는 σ^{32} 의 매우 불안정한 life-time으로 조절된다. 대장균에서 heat shock gene의 발현은 세포내 σ^{32} 양과 매우 연관되어 있다. σ^{32} polypeptide의 극단적으로 짧은 half-life 때문에 σ^{32} 의 세포내 수준은 σ^{32} 의 생성과 안정성 조절이 즉각적으로 반영된다. σ^{32} -induced protein의 대부분은 protease 또는 protease 활성을 조절하는 구성물들로서 heat shock response를 negative하게 autoregulation한다. 세 번째 전략은 translational repression, σ^{32} half-life modulation, RNAP core에서 σ^{32} factor의 sequestration, σ^{32} holoenzyme에 의한 open-complex formation의 억제 같은 다양한 방법으로 DnaK/DnaJ/GrpE chaperone machine

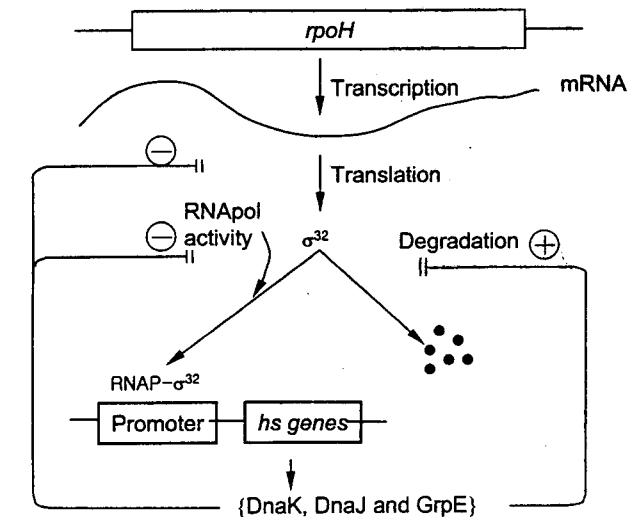


Fig. 3. Model for the role of DnaK, DnaJ, and GrpE in controlling σ^{32} .

```

groE  cagAatTTTTTtctTTTTccacCTTGAAgggggcga...agccteatCCCCATTctctggctAccag
dnaKp1  acaAaaatTTTTgcatctccccCTTGAAgcgtgg...TTTAgcCCCCATTAgtagtCAaccg
dnaKp2  ctgcAAAaaatgaaattgggagCTTGAAccagac...gtttgcCCCCATTacagactCAaac
hspGp1  gagAgcaggatcaacctgctctgCTTGAAatatttc...tcccttCCCCATTctcccaCActctg
hspGp2  atCAcctgctctgctgtgaaatbATTctcccttCTG...cccatctctCCCCATcctctTTTaaac
rpoD    gtcgtacaAaatagtctgccaecCTTGAAaactgt...cgatgtgggaCGATaTagcagatAagaat
lon     ttaATtttctctctattctcgggCTTGAgtgggg...gaaacatCCCCATTaTactgacgtacaatg
grpE    ttgAtgcaatgtgagtgctctccCTTGAAccctga...aactgatCCCCATAaTaagcgaAggttag
cipB    ttCAattatctgtgtcaaaacCTTGAcaattga...gggatCCCCATTaatctcCActgagc
cipP    cgtAacaacaagaatgtttatCTTGAAatattgt...gatgcgtCCCCATTaacacaggaactct
hspX    tggtagacttaagcaactaccagaCTTGAAatagtc...ggctaaCCCCATTacagtggtggtAtctg
hspY    cagtggggcagtgctcaegatctCTTGAAggagtag...tCCCGgtTccggtatChagc
ibpA    caaAaaagtcocgctgaTaaggCTTGAAggttca...tttCoagaCCCCATTtcaactCGagcc
hzm    tcacatgcaaaaccaacaatcccgCTTGAAggactag...ctaaaCCCCACAcTAgTtTggtgcaat
hslV   ctgcatcggctcgcgcggggCTTGAAccctca...aaateccCCCCATTaTaatCGaatat
ftsJ    tegtatttttcttactggtgggCTTGAAcgggt...cattctacCCCCATTcccatATATcacc
rtnB    cagAaaatattttaaattctctCTTGAAgggcgg...aaataactCCCCATTaatgcccaccActg
gapA    atCAcatttttatcgttaattgCTTGAAatctgg...ggcgcgaCCCCATTgTgctcaaaGccc
consensus  -GAa--at--t--t--t--c--CTTGA--g--ggcgcgaCCCCATTgTgctcaaaGccc

```

Fig. 4. Consensus sequence for $E\sigma^{32}$ promoters. Published $E\sigma^{32}$ promoters were aligned by eye to maximize alignment in the -10 and -35 regions of the promoter. Capitalized bold letters represent positions with 11/18 match; small bold letters represent positions with 9/18 matches; Capitalized italic bold letters are start sites for transcription. Note that previous versions of the consensus sequence, based on a smaller number of the major heat shock promoters, also included several conserved C's upstream of the -35 region. It is possible that these C's are important for very strong heat shock promoters. *groE* is the *groEL-groES* operon; *dnaK* is the *dnaK-dnaJ* operon; *ibpA* is the *ibpA-ibpB* operon; *ftsJ* is the *ftsJ-hfIB* operon; *gapA* is the promoter for a D-glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase. Model for the role of DnaK, DnaJ, and GrpE in controlling σ^{32} .

을 negative하게 autoregulation된다. DnaK와 DnaJ chaperone proteins은 ATP의 존재시에 단독 또는 공존하여 σ^{32} factor와 complex를 이룬다. 대장균에서 heat shock response는 alternative sigma factor σ^{32} 에 의해서 positive하게 regulate되고 DnaK, DnaJ, GrpE 유전자의 산물에 의해서 negative regulate된다. 많은 eubacteria에서 heat shock response는 대장균과는 다른 조절 기작을 보인다. heat shock gene transcription을 촉진을 위한 σ^{32} -like transcription factor의 사용이 보편적이지 않고 특히 모든 Gram-negative bacteria에서는 작용하지 않는다. 지난 수년 동안 여러 연구실에서 수행된 연구 결과에 의하면 Gram-positive bacteria는 DnaK와 GroEL 유전자에 의한 heat shock regulation이 이루어짐이 보였다. 비록 많은 heat shock gene이 clone되고 sequence되었으나 이에 대한 특정한 promoter sequence가 존재한다는 증거가 거의 없으며 연구된 모든 경우에서 heat-inducible transcriptional start site가 저온의 site와 일치된다. 이러한 heat shock gene induction의 유일한 결과는 9개의 nucleotide에 의해서 분리된 nine-nucleotide inverted repeat의 존재와 이들이 transcriptional start site와 structural gene의 시작부위 사이에 존재한다는 것이다 (Wetzstein, M. et al., 1992)(그림 4). 이것은 DNA 또는 RNA 수준에서 기능적인 repressor molecule이 이 inverted repeat element에 결합하여 heat shock gene expression을 제한할 가능성이 있다. 이 putative repressor는 heat에 대하여 sensor로서 작용하여 transcription 또는 translation을 높게 나타내도록 한다. 동일한 nine-nucleotide inverted repeat structure는 σ^{32} -promoted response가 결여된 Gram-negative bacterium인 *Agrobacterium tumefaciens*의 *groE* operon의 upstream에서 볼 수 있다. 대장균과는 대조적으로 *Bacillus subtilis*는 3종류의 heat shock gene을 가지고 있으며 mild heat stress에 의해서 발현된다. Class I heat shock gene인 *dnaK*와 *groE* operon은 vegetative promoter P_A 에서 발현되며 이들의 발현은 CIRCE라고 하는 cis-active inverted repeat와 관련된다 (Zuver, U. and Schumann, W., 1994). Class I heat shock genes은 CIRCE element와 상호작용하는 repressor에 의해서 negative regulate된다. Class II는 약 40개의 다른 유전자로 구성되며 (Schulz, A. and Schumann, W., 1996) 이들 유전자는 alternate sigma factor σ^B 에 의해서 조절된다. Class III heat shock gene은 vegetative promoter P_A 로부터 발현되며 additional element는 아직 밝혀지지 않았다. *lon* (Riethdort, S. et al., 1994), *clpC* (Krüger, E. et al., 1994)와 *fitH* (Deuring, E. et al., 1995) 유전자가 class III gene의 구성원임을 밝혀졌다.

Heat shock proteins과 질병

bacteria, viruses, protozoa에서 helminths (Young, D.B. et al., 1990)에 이르는 광범위한 infectious agent에 대한 주요 antigen으로서 heat shock protein이 관련된다는 많은 문헌들이 발표되고 있다. 이러한 관찰은 손상되었거나 감염된 세포의 immune

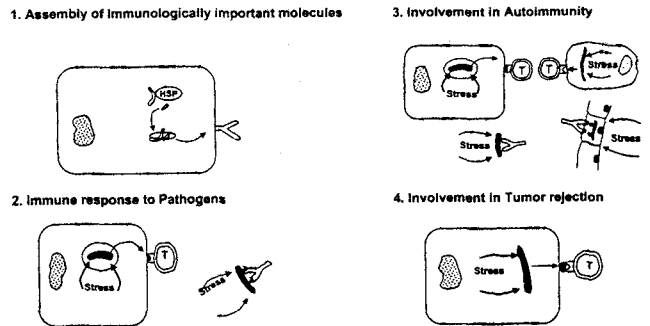


Fig. 5. Scheme showing major involvements of HSPs in the immune response.

surveillance에서 pathogen의 heat shock protein에 대한 dominant antigenicity에 의한 autoimmunity등, 수많은 추측이 제시되고 있다. pathogen에 의한 heat shock protein의 발현은 host cell에서 phagocytosis시 stress response에 관련하여 survival할 수 있게 하고 host cell에서 heat shock protein의 elevated chronic 발현은 specific T-cell population에 의한 epitope을 pathogen과 host가 공유하여 anti-heat-shock-protein immune surveillance system에 민감하게 된다. pathogen에 의한 heat shock protein의 주요 antigenic peptide와 host heat shock protein의 sequence가 구별되는 것으로 보아 pathogen에 의한 heat shock protein의 antigenicity와 autoimmune disease사이에는 직접적인 연관은 없는 것 같다. MHC 분자에서 얻어진 peptide의 identity는 heat shock protein peptide가 MHC class I, II분자와 연관되어 있다(Newcomb, J.R. and Cresswell, P., 1993). 이 data는 self heat-shock-protein peptide가 T cell에 의해서 인지됨을 의미한다. 또 다른 발견은 *M. tuberculosis* 또는 *E. coli*의 GroEL (Hsp60)이나 DnaK (Hsp70) heat shock protein은 이들과 conjugate된 peptide나 oligosaccharide에 대한 antigenicity가 급격히 증가된다. 따라서 이들 heat shock protein을 이용하면 infection에 대한 보다 나은 vaccine의 설계에 도움이 될 것이다 (그림 5).

환경적 자극과 virulence의 조절.

Starvation, acidic pH, heat shock 같은 자극은 어떤 virulence gene의 발현을 조절한다는 증거가 많이 보고되었다(그림 5-1). *PhoP-PhoQ* 조절 체계는 macrophage에서 *S. typhimurium*의 생존에 필요한 유전자의 발현을 조절한다. 이러한 조절 체계는 acidic pH에서처럼 carbon과 nitrogen starvation에 반응하여 일어나며 *PhoPQ*는 phagolysosomes내에서 환경적 조건에 반응하여 나타난다. *PhoPQ* mutant는 *PhoP*-역제 유전자의 발현이나 balanced regulation에 의해서 독성이 약하게 된 것이다. *Listeria monocytogenes*의 세포내 독성에 관련된 단백질인 listeriolysin의 발현은 heat shock과 oxidative stress에 의해서 유도된다. 이와 유사하게 *S. typhimurium*은 진핵세포에 invasion됨으로서 heat

shock protein을 발현한다. 면역학적 자료와 더불어 이러한 결과들은 stress response가 많은 bacterial infection의 한 구성원임을 추정케 한다. 실제로 heat shock response의 induction은 *ToxR* virulence regulator의 발현이 감소되어진다. 이러한 반응은 infection cycle에서 초기 단계에 관련된 것으로 acidic pH, anoxia, starvation시 생존하는 것이 virulence determinant의 발현보다 더욱 중요하기 때문이다.

Immunobiology and stress response

Bacteria와 parasitic pathogen에 의한 감염이 되면 infectious agent stress protein에 대하여 특이한 antibody가 다량 발현되어진다 (그림 5-2). mycobacteria의 주요 antigen은 bacterial GroEL protein과 관련된 65 kDa protein과 DanK homolog인 70-71 kDa antigen이 잠재적인 T-cell immunogen으로서 작용한다 (Young, D. *et al.*, 1988). 이러한 관측은 vaccine의 candidate로써 이들 immunodominant stress protein이 사용될 가능성을 제시한다. host에서 밀접하게 관련된 homologous antigen을 사용한 chronic stimulation은 유해한 결과와 autoimmune disease를 야기할 수 있다는 점을 생각하여야 한다. Stress protein은 CD4⁺와 CD8⁺ T cell과 B cell에 대한 major immunogen으로 (Ottenhoff, T.H. *et al.*, 1988), 최근에 antigenic recognition의 이러한 형태는 세포 표면에 CD4⁺ 또는 CD8⁺ molecule을 발현하지 않는 $\gamma\delta$ T cell에서도 진행되었다. stress protein이 잠재적인 antigen이라는 추정은 이들이 매우 풍부하고 infection에 의해서 stress protein의 합성이 증가되기 때문이다. 이러한 관찰의 의미는 확실하지 않지만 immune system은 pathogen-infect와 damaged cell을 인식하는 T cell의 다양한 종류가 관계될 것이며 면역반응에서 stress protein이 관련된다는 또 다른 증거는 hsp70 gene이 human chromosome의 6, 14, 21에 위치한다는 chromosomal mapping연구를 통해서 얻을 수 있다. 아울러 Sargent *et al.* (1989)등은 human hsp70 gene이 HLA의 class III region인 TNF- α 와 - β 유전자와 complement 유전자 사이에 위치한다는 것을 밝혔다. 이와 유사한 결과를 rat hsp70 gene에서도 얻었다. stress protein과 infection 반응 사이에 다른 가능한 연관은 neoplasia가 human hsp70 gene과 tumor necrosis factor (TNF) α 와 β 유전자와 근연관계에 있다는 점이다. cytokine의 일종인 TNF는 inflammation과 immunity와 cell injury에 관여하여 광범위한 반응을 일으킨다. TNF와 IL-1은 febrile response에서 hypothalamic thermoregulation에 관련된다.

heat shock response와 autoimmune disease

autoimmune disease의 발생에 있어서 hsp의 일반적인 기능에 대해서는 아직까지 해결되지 않았다. 실험동물과 환자에서 연구된 증거들은 hsp가 autoimmunity에 작용할 것으로 추정하고 있다. 여러 autoimmune disease에서 hsp에 관련된 anti-

body의 증가가 관찰되었다. 즉 rheumatoid arthritis에서 hsp65에 대한 antibody, ankylosing spondylitis에서 hsp90, systemic lupus erythematosus에서 ubiquitin, hsp70과 hsp90의 증가됨이 관찰되었다. 이러한 결과에도 불구하고 이들에 대해서 아직도 완전히 이해되지 않고 있다. hsp는 intracellular compartment에 내재되어 있으며 이들이 자극을 받았을 때 이들의 surface에 hsp를 발현하는 것으로 추정된다. 이러한 stressed cells이 anti-HSP antibody의 target이 되며 다른 autoimmune reaction을 trigger하는 것으로 생각된다 (그림 5-3). synthetic peptide를 사용한 연구 결과에서 T-cell이 mycobacteria와 human hsp65의 공통된 epitope을 인식하여 반응하는 것으로 보인다. 이는 T cell에 정상적인 개체에서 hsp65의 self epitope을 제공하는 것으로 보인다. 한편 Koga *et al.*에 의한 연구는 stressed host cell이 hsp65에 대한 T cell의 target으로서 작용한다는 증거를 제시하였다. 이 연구에서 CD8⁺ T cells은 mycobacterial hsp65 peptide에 대해서 생성되며 이들 T cell은 hsp65 peptide로 자극된 macrophage 뿐 아니라 exogenous peptide가 없이 stressed macrophage를 용해한다. 비록 이들 T cell에 의해서 인지되는 epitope이 규명되지 않았지만 이들은 bacterial 과 murine hsp65에 의해서 공유될 것이다. 따라서 self-hsp는 MHC class I molecules의 내용물로 나타나게 된다. 최근에 CD4⁺ T cell이 intracellular bacteria에 의해서 활성화가 되며 CD8⁺ T cell서도 hsp70과 crossreactivity를 갖는다고 알려졌다. hsp의 intracytoplasmic location은 class II보다 class I에 더욱 영향을 받기 쉽게 된다. 이러한 발견을 근거로 autoimmunity에 대해 hsp의 작용에 대한 일반적인 개념은 1) bacterial 과 human hsp에 대한 공유된 epitope을 가지는 일부 T cell과 antibody들은 tolerance mechanism을 갖게 된다. 2) 이들 T cell과 antibody들은 microbial infection시에 microbial hsp와 접촉하여 활성화 된다. 3) hsp의 self epitope이 stress 조건에 의해서 host cell로부터 발현된다. 4) 공유된 epitope에 대한 특이성을 갖는 T cell과 antibody에 의해서 이들 stressed host cell을 인식하여 autoimmune response가 일어난다.

hsp가 기능과 구조에서 보편적이고 매우 보존적이라는 사실은 생물학에서는 이미 일반적인 사실이다. 따라서 이들 hsp가 molecular chaperone으로서 단백질의 folding에 관여할 뿐 아니라 면역계에 관련된다는 것은 그리 놀라운 일은 아니며 실제로 pathogen과 host가 서로에 대하여 자신을 보호하기 위해서 유사한 기작을 사용하며 이는 hsp 기능의 광범위한 영역에 잘 적용되어 이루어진 것이다. 면역학적 측면에서 pathogenesis에 관련된 epitope과 protection의 epitope이 단일 분자에 제공된다는 사실은 infectious, neoplastic 그리고 autoimmune disease에 대한 우리의 이해를 새로운 국면에 접근하도록 할 것이다.

참고논문

1. Anfinsen, C.B., and H.A. Scheraga, 1975. Experimental

- and theoretical aspects of protein folding. *Adv. Protein Chem.* 29: 205-300.
2. Bardwell, J.C.A., and E.A. Craig, 1984. Major heat shock gene of *Drosophila* and *Escherichia coli* heat inducible *danK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 848-852.
 3. Bardwell, J.C.A., and E.A. Craig, 1987. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 5177-5181.
 4. Chappel, T.G., Welch, W.J., Schlossman, D.M., Palter, K.B., Schlesinger, M.J., and J.E. Rothman, 1986. Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* 45: 3-13.
 5. Chirico, W.J., Waters, M.G., and G. Blobel, 1988. 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* 332: 805-810.
 6. Cooper, S., and T. Ruettinger, 1975. A temperature sensitive nonsense mutation affecting the synthesis of a major protein of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* 139: 167-176.
 7. Craig, E.A., and C.A. Gross, 1991. Is hsp70 the cellular thermometer? *Trends Biochem. Sci.* 16: 135-140.
 8. Deuring, E., Paeslack, B., and W. Schumann, 1995. The *fisH* gene of *Bacillus subtilis* is transiently induced after osmotic and temperature upshock. *J. Bacteriol.* 177: 4105-4112.
 9. Georgopoulos, C.P., Lam, B., Lundquist-Heil, A., Rudolph, C.F., Yochem, J., and M. Feiss, 1979. Identification of the *E. coli* dnaK (groPC756) gene product. *Mol. Gen. Genet.* 172: 143-149.
 10. Gething, M.-J., and J. Sambrook, 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355:33-45.
 11. Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., and R.J. Ellis, 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 33: 330-334.
 12. Hunt, C.R., and R.I. Morimoto, 1985. Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 6455-6459.
 13. Krüger, E., Völker, U., and M. Hecker, 1994. Stress induction of *clpC* in *Bacillus subtilis* and its involvement in stress tolerance. *J. Bacteriol.* 176: 3360-3367.
 14. Landry, S.J., Jordan, R., McMacken, R., and L.M. Gierasch, 1992. Different conformations of the same polypeptide bound to chaperone DnaK and GroEL. *Nature* 355:455-457.
 15. Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M.K., and F.-U. Hartl, 1992. Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature* 356: 683-689.
 16. Liberek, K., Marszałek, J., Ang, D., Georgopoulos, C., and M. Zylicz, 1991. The *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate DnaK's ATPase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 2874-2878.
 17. Morimoto, R.I., Tissières, A., and C. Georgopoulos, 1990. Stress proteins in biology and medicine. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 18. Morimoto, R.I., Tissières, A., and C. Georgopoulos, 1994. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 19. Munro, S., and H.R. Pelham, 1986. An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78kDa glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 46: 291-300.
 20. Murakami, H., Pain, D., and G. Blobel, 1988. 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J. Cell. Biol.* 107: 2051-2057.
 21. Neidhardt, F.C., VanBogelen, R.A., and V. Vaughn, 1984. The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 18: 295-329.
 22. Newcomb, J.R. and P. Cresswell, 1993. Characterization of endogenous peptide bound to purified HLA-DR molecules and their absence from invariant chain-associated α/β dimer. *J. Immunol.* 150: 499-507.
 23. Ottenhoff, T.H., Kale, A.B., Van Embden, J.D.A., Thole, J.E.R., and R. Kiessling, 1988. The recombinant 65-kd heat shock protein of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Geurin/ *M. tuberculosis* is a target molecule for CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes that lyse human monocytes. *J. Exp. Med.* 168: 1947-1952.
 24. Riethdort, S., Völker, U., Gerth, U., Winkler, A., Engelmann, S., and M. Hecker, 1994. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis* *lon* gene. *J. Bacteriol.* 176: 6518-6527.
 25. Sargent, C.A., Dunhan, I., Trowsdale, J., and R.D. Campbell, 1989. Human major histocompatibility complex contains genes for the major heat shock protein HSP70. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74: 5463-5467.

26. Schulz, A., and W. Schumann, 1996. *hrcA*, the first gene of *Bacillus subtilis* *dnaK* operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J. Bacteriol.* 178: 1088-1093.
27. Shyy, T.T., Subject, J.R., Heinaman, R., and G. Anderson, 1986. Effect of growth state and heat shock on nucleolar localization of the 110,000-Da heat shock protein in mouse embryo fibroblasts. *Cancer Res.* 46: 4738-4745.
28. Subject, J.R., Shyy, T., Shenand, J., and R. Johnson, 1983. Association between the mammalian 110,000 dalton heat shock protein and nucleoli. *J. Cell Biol.* 97: 1389-1395.
29. Tissières, A., Mitchell, H.K., and U.M. Tracy, 1974. Protein synthesis in salivary glands *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84: 389-398.
30. Wetzstein, M., Volker, U., Dedio, J., Lobau, S., Zuber, U., Schiesswohl, M., herget, C., Hecker, M., and W. Schumann, 1992. Cloning, sequencing and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 3300-3310.
31. Young, D., Lathigra, R., Hendrix, R., Sweetser, D., and R.A. Young, 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4267-4270.
32. Young, D.B., Mehlert, A., and D.F. Smith, 1990. Stress proteins and infectious diseases. In stress proteins in biology and medicine (ed. R.I. Morimoto, et al.), pp. 131-166. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
33. Yura, T., Nagai, H., and H. Mori, 1993. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 321-350.
34. Zuber, U., and W. Schumann, 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 1359-1363.



김 세 진

1985년 성균관대학교 생물학과 학사
 1987년 성균관대학교 생물학과 석사
 1998년 성균관대학교 생물학과 박사
 1998-현재 생명공학연구소 세포종양RU.
 Post Doc.
