

내염성 cyanobacteria로부터 *dnaK* heat shock protein 유전자의 cloning 및 특성 해명

원성혜¹ · 윤병욱¹ · 김학윤² · Teruhiro Takabe³ · 이병현*

*경상대학교 응용생명과학원 축산과학부

¹경북대학교 농과대학 동물공학과, ²농학과

³Meijo University, Nagoya 464-01, Japan

Cloning and Characterization of *dnaK* Heat Shock Protein Gene in a Halotolerant Cyanobacterium

Sung-Hye Won¹, Byung-Wook Yun¹, Hak-Yoon Kim², Teruhiro Takabe³ and Byung-Hyun Lee*

*Faculty of Animal Science, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

¹Department of Animal Science and Biotechnology, ²Department of Agronomy,

Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

³Meijo University, Nagoya 464-01, Japan

A gene, *dnaK2*, encoding a distinct member of the HSP70 family of molecular chaperones is isolated from the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. The *dnaK2* gene encodes a molecular weight of 68 kDa polypeptide with predicted 616 amino acid residues. The DnaK2 protein has a structural characteristic of bacterial DnaK homologues and shows high similarity to other HSP70/DnaK proteins. The *dnaK2* transcripts are hardly detectable at 28°C and strongly induced upon heat stress. It is also found that *dnaK2* transcript is increased by high-salinity stress even in the absence of heat stress. These results suggest that the DnaK2 protein plays an important role in protecting *A. halophytica* against damage caused by salt stress as well as heat stress.

Key words – cyanobacteria, heat shock protein, molecular chaperone, salt tolerance

서 론

생물계에 있어서 heat shock protein (HSP)은 세포 내 단백질들의 folding, assembly, degradation 등에 있어서 이들을 조절하는 molecular chaperone으로서 기능하는 필수적인 단백질 중의 하나이다[15]. 대부분의 HSP 유전자들은 높은 온도 또는 다양한 환경 스트레스에 의해 그 발현이

유도된다[13]. 이러한 HSP들 중에서도 HSP70/DnaK family가 모든 생물계에 가장 잘 보존되어 있는 것 중의 하나로 알려져 있고, 진핵생물의 경우 세포내의 각 소기관에 존재하는 10여 개의 HSP70 family로 구성되어 있으며, 원핵생물의 경우, 한 개의 HSP70 유전자를 가지는 것으로 알려져 있다[6]. 그러나 최근 원핵생물로부터 그 기능과 조절 기구가 서로 다른 복수의 HSP70 유전자가 보고되고 있는데, 이는 원핵생물이 다양한 환경 스트레스에 적응하기 위하여 다양한 molecular chaperone system을 분화시켜왔기 때문으로 추정된다 [5,9,12]. 광합성 cyanobacteria는 고등식

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : +82-55-751-5418, Fax : +82-55-751-5410

E-mail : hyun@nongae.gsnu.ac.kr

물의 염록체와 생리적, 기능적으로 아주 유사한 기구를 가지고 있어서 환경 스트레스에 대한 적응기작이 고등식물과 매우 유사할 것으로 추정된다. 따라서 광합성 cyanobacteria의 HSP70의 기능을 밝히면 고등식물에 있어서 염록체에 존재하는 HSP70의 기능을 추정할 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험은 *A. halophytica*에 있어서 HSP70 homolog인 *DnaK*의 기능을 밝히고자 genomic library로부터 유전자를 cloning하여 그 구조와 다양한 환경 스트레스에 대한 유전자의 발현양상 및 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

배양조건 및 스트레스 처리

*A. halophytica*는 Lee 등 [10]의 방법에 따라 18 mM의 NaNO₃와 Turk Island salt solution이 첨가된 BG11 배지 [8]로 28°C, 광조건하에서 배양하였다. 고온처리를 위하여 성장시킨 cyanobacteria를 각각의 온도로 설정된 waterbath에서 30분간 광조건하에서 처리하였다. 염 스트레스의 처리는 1주일간 0.5 M NaCl이 첨가된 배지에서 성장시킨 세포를 원심분리하여 모은 후, 각각의 농도로 NaCl이 첨가된 배지에서 3시간 처리하였다.

Genomic DNA library의 구축 및 screening

*A. halophytica*로부터의 genomic DNA는 Williams [19]의 방법에 따라 분리하였다. 분리한 genomic DNA를 부분 분해한 다음 lambda FIX II vector에 도입하여 gnomonic library를 구축하였다. Library screening을 위한 probe는 genomic DNA로부터 *dnaK* 유전자 단편을 PCR로 증폭하여 사용하였다. PCR 반응을 위한 primer로는 지금까지 보고된 원핵생물 유래의 HSP70 유전자들의 염기서열을 기초로 하여 oligonucleotides, hsp5N (5'-GG(G/T)ATCGACCT(C/G)GGTACTACCA-3')과 hsp3C (5'-GC(T/A)GCGGTGGG(C/T)TCGTT(G/A)AT-3')를 각각 forward 및 reverse primer로 사용하였다. 증폭된 0.5 kb의 PCR산물의 염기서열을 확인한 후, 이를 ³²P로 labelling하여 library screening을 위한 probe로 사용하였다.

Subcloning 및 염기서열의 결정 분석

선발된 positive phage clone으로부터 phage DNA를 조

제하여 제한효소 지도를 작성한 후, *dnaK* 유전자를 포함하는 최소 단편을 pBluescript SK- vector에 subcloning 하였다. 염기서열을 결정하기 위하여 분리한 plasmid DNA의 양방향의 염기서열을 dideoxy chain termination 법으로 ALFexpress Auto Cycle Sequencing Kit를 사용하여 ALFexpress DNA sequencer (Pharmacia, Uppsala)로 결정하였다. 염기서열 및 아미노산 배열의 분석은 Genetyx software (SDC Software Development, Tokyo)를 사용하여 분석하였다.

Southern 및 Northern blot 분석

Genomic DNA (5 µg)를 각각의 제한효소로 절단한 후 0.8% agarose gel로 전기영동한 다음 nylon membrane에 blotting 하였다. Probe DNA는 다른 *dnaK*와의 homology가 낮은 영역인 C-terminal의 *EcoRI* 단편(Fig. 1, nucleotide 1213-1975)을 ³²P로 labelling하여 *dnaK*-specific probe로 사용하였다. Membrane을 *dnaK*-specific probe로 hybridization 시킨 후 65°C에서 0.2×SSC로 30분간 2회 washing 하여 X-ray film에 노출시켰다.

Total RNA는 Lee 등 [10]의 방법에 따라 분리하였으며, 10 µg의 RNA를 1% agarose gel로 전기영동하여 nylon membrane에 blotting한 후 *dnaK*-specific probe와 hybridization 시켰다.

결과 및 고찰

내염성 cyanobacteria인 *A. halophytica*의 HSP70 homolog인 *dnaK* 유전자의 기능을 밝히기 위하여 genomic library로부터 *dnaK* 유전자를 screening 하였다. 분리한 positive clone들의 insert DNA를 제한효소 분석을 실시한 결과 두 개의 그룹으로 분류되었다. 그중 하나는 Lee 등 [10]이 보고한 유전자와 동일한 제한효소 절단부위를 나타내었으며, 다른 하나는 이와는 구별되는 다른 구조를 나타내었다. 이 유전자의 염기서열을 결정하여 본 결과, 1975개의 염기로 구성되어 있었으며 89번 염기로부터 1939번 염기까지의 한 개의 완전한 open reading frame (orf)을 나타내었고 이를 orf2로 명명하였다. 이 orf2는 616개의 번역된 아미노산으로 구성되어 있었으며 추정되는 분자량은 68 kDa 이었다 (Fig. 1). 또한 아미노산 서열을 BLAST software로 상동성

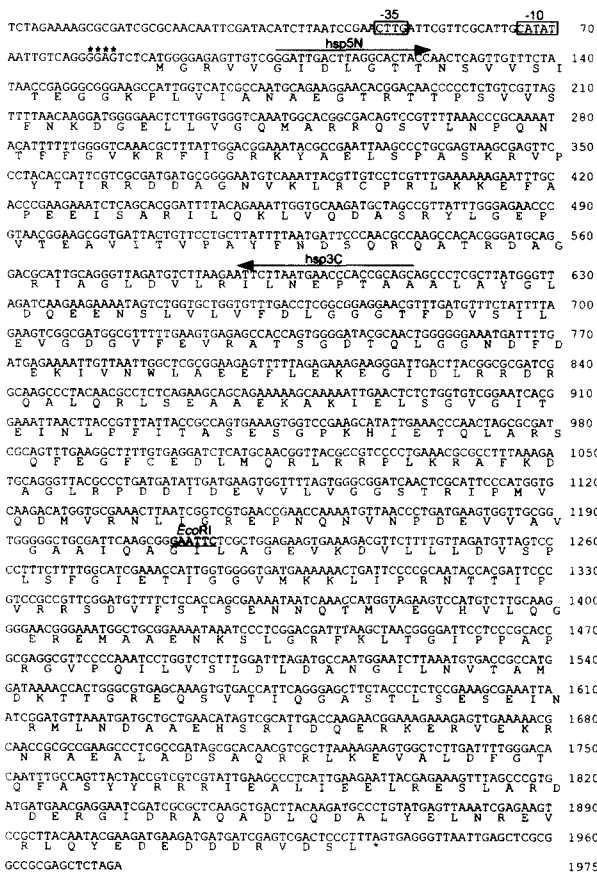


Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of *A. halophytica dnaK2*.

Regions with homology to -35 and -10 heat-shock promoters are boxed. Possible ribosome-binding sites (*) are indicated above the sequence. Arrows indicate the positions and orientations of primers used for PCR.

검색을 실시한 결과 지금까지 보고된 HSP70/DnaK 단백질들과의 높은 상동성을 나타내었으며, 이 유전자를 *dnaK2* 로, 그 단백질을 DnaK2로 각각 명명하였다. DnaK2는 광합성 cyanobacteria 유래의 DnaK 단백질들과의 높은 상동

성을 나타내어 *Synechococcus* PCC7942의 DnaK와 가장 높은 57%의 identity를, *Synechocystis* PCC6803의 DnaK와 55%의 identity를 나타내었다(Table 1). 한편 *A. halophytica*의 DnaK1과는 49%의 identity를 나타내어 같은 생물내의 DnaK homolog임에도 불구하고 비교적 낮은 상동성을 나타내어 기능적으로 분화된 서로 다른 기능을 담당할 가능성을 나타내었다. 대부분의 HSP70 family는 구조적으로 두 부분으로 나누어지는데 그의 N-terminal 영역에 45 kDa 정도의 잘 보존된 영역인 ATPase domain을 가지며 C-terminal 영역에 보존정도는 낮으나 약 18 kDa 정도의 peptide-binding domain을 가지는 것으로 알려져 있는데 [7], 이러한 특성은 DnaK2에도 잘 보존되어 있었다. 따라서 DnaK2 단백질은 *A. halophytica*가 가지는 또 하나의 HSP70 homolog인 것으로 추정되었다.

한편 *E. coli*를 비롯한 다른 원핵생물에 있어서 heat stress에 따른 유전자 발현의 조절은 특정한 조절 단백질인 자(sigma-32)가 RNA polymerase로 하여금 특정 promoter 서열을 인식하도록 함으로서 이루어진다[5]. 이러한 promoter 서열은 대부분의 원핵생물에서 잘 보존되어있는 -35 영역 (CTTG)과 -10 영역 (CAT-T)으로 *dnaK2* 유전자에서는 번역개시 codon으로부터 39 bp와 20 bp 상류에서 각각 발견되었다(Fig. 1). 이 결과는 고온처리에 의해 유도되는 것으로 보고된 *Synechococcus* PCC7942의 *groESL* operone [17] 또는 *Synechocystis* PCC6803의 *dnaK* [3] 등의 promoter 서열과의 높은 상동성을 나타내어 이들 cyanobacteria에서와 같이 alternative sigma-32 인자에 의해 스트레스 조건 하에서의 *dnaK2* 유전자의 발현이 조절됨을 의미한다.

*A. halophytica*의 genome에 다른 *dnaK* homolog들이 존재하는지를 조사하기 위하여 Southern blot 분석을 실시하였다(Fig. 2). DnaK2 polypeptide 중에서 비교적 상동성이

Table 1. Similarities (identity) among HSP70 homologue proteins from different organisms

Organisms	<i>Synechococcus</i> sp. PCC7942 DnaK	<i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 DnaK	<i>Bacillus subtilis</i> DnaK	<i>E. coli</i> DnaK	Pea, Chloroplast HSP70	<i>A. halophytica</i> DnaK1	Yeast Cytosol SSA1
<i>A. halophytica</i> <i>DnaK2</i>	70(57)	68(55)	67(53)	67(49)	64(49)	63(49)	58(43)

Sources are: *Synechocystis* sp. PCC6803, DnaK [9]; *Synechococcus* sp. PCC7942, DnaK [12]; *B. subtilis*, DnaK [18]; *E. coli*, DnaK [1]; Pea, chloroplast, HSP70 (L03299); *A. halophytica* DnaK1 [10]; Yeast cytosol, SSA1 [14]

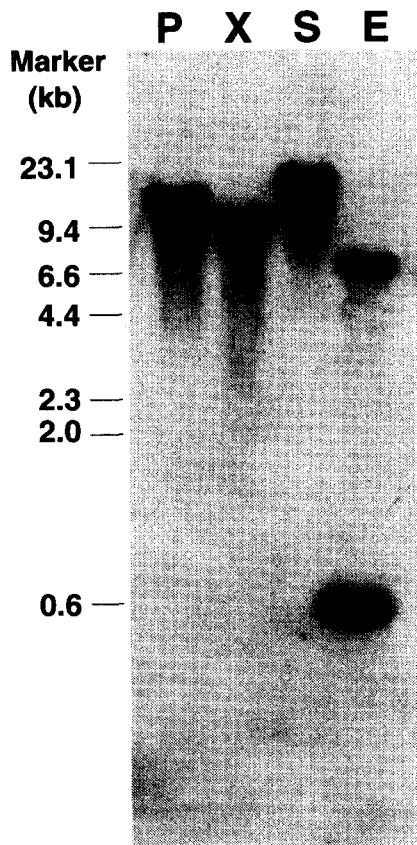


Fig. 2. Southern blot analysis of genomic DNA of *A. halophytica*. Genomic DNA was digested with *Pst*I (P), *Xho*I (X), *Sal*I (S) or *Eco*RI (E), and separated on 0.8% agarose gel.

낮은 영역인 C-terminal의 *Eco*RI 단편을 specific probe로 하여 분석한 결과, *dnaK2* 유전자내에 절단부위를 갖는 *Eco*RI 외에는 모든 제한효소 절단에서 한 개씩의 hybridization band만이 검출되어 *dnaK2* 유전자는 하나만이 존재하는 것으로 추측되었다. 그러나 full-length의 *dnaK2* 유전자를 probe로 하여 분석한 결과 모든 제한효소 절단에서 2 또는 3개씩의 band가 각각 검출되었다(결과 미제시). 따라서 *A. halophytica* 내에는 *dnaK* homolog가 2 또는 3 copies로 존재함을 의미하며, 이러한 결과는 library의 screening에서 서로 다른 제한효소 절단 양식을 나타내었던 결과와 일치하는 것이다. Cyanobacteria에 있어서 *dnaK* 유전자가 복수로 존재하는 것은 *Synechocystis* [3]와 *Synechococcus* [9,12]에서 보고된 바 있으나 그들 각각의 기능에 대해서는 아직 자세히 밝혀져 있지 않다.

한편 *dnaK1*과는 다른 구조를 하고있는 *dnaK2*의 기능을 추측하기 위하여 *A. halophytica*를 heat stress 처리를 실시한 후, 각각의 처리온도에 따른 유전자의 발현을 *dnaK2*-specific probe를 사용하여 Northern blot으로 분석하였다. 그 결과 Fig. 3A에 나타낸바와 같이 *dnaK2* 유전자는 최적 성장온도인 28°C에서 크기가 약 2.1 kb인 transcript가 적은 양으로 축적되었으며, 42°C까지 온도가 증가할수록 발현량이 급격히 증가하다가 47°C에서는 약간 감소하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 *dnaK2*가 독립적으로 발현됨을 의미하여 *grpE-dnaK1* operon이 동시에 발현되는 *dnaK1* 유전자와는 다른 발현양상을 나타내는 것이며, heat stress에 의해 유전자의 발현이 조절됨을 의미한다. 또한 염농도의 변화가 *dnaK2*의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위하여

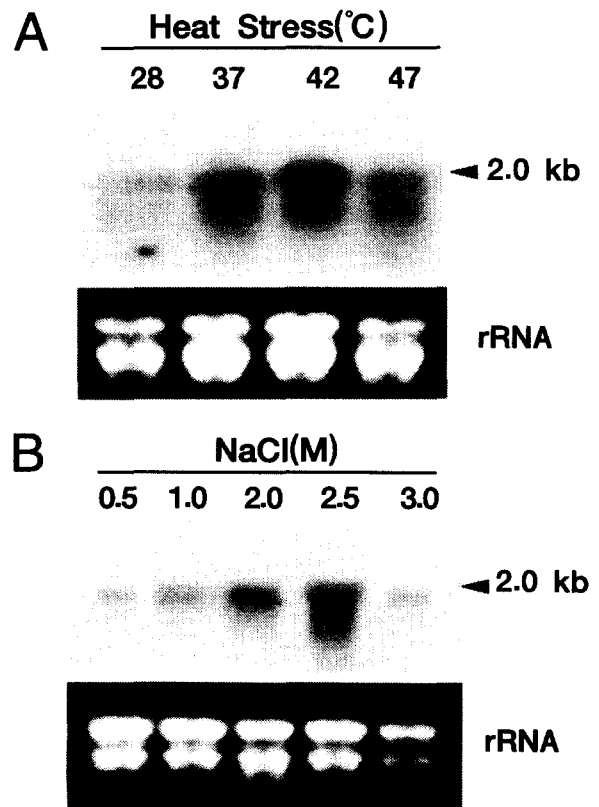


Fig. 3. Expression of the *dnaK2* gene under heat and salt stresses.

A. Temperature dependence. *A. halophytica* cells were cultured at 28°C and treated for 30 min at designated temperature. B. Effect of hyperosmotic stress. *A. halophytica* cells were grown in the presence of 0.5 M NaCl at 28°C, transferred to the same medium containing designated concentrations of NaCl.

세포를 NaCl 0.5 M에서 3 M까지 3시간 처리한 후 total RNA를 분리하여 그 발현양상을 조사하였다(Fig. 3B). 배지 내의 NaCl 농도가 1 M 일 때에는 생장적정 NaCl 농도인 0.5 M에서와 거의 같은 수준의 발현량을 보였으나 2.5 M에서는 그 발현량이 급격히 증가하였으며, 그 이상의 농도에서는 오히려 발현량이 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 *dnaK2* 유전자의 발현이 heat stress 뿐만 아니라, 높은 염 스트레스에 의해서도 발현이 유도됨을 의미한다. 지금까지 몇몇 원핵생물에 있어서 염 스트레스에 의해서 HSP의 발현이 유도된다는 보고는 있었으나[2,4,11,16], 그 발현을 조절하는 promoter에 있어서의 공통서열은 아직 밝혀져 있지 않다. 대부분의 생물은 염 농도의 증가에 따른 스트레스에 적응하기 위하여 세포 내에 다양한 compatible solute를 축적한다. *A. halophytica*의 경우 높은 염 스트레스 하에서 세포 내에 glycine-betaine을 약 1 M까지 축적함으로써 단백질들의 변성방지 또는 세포의 구조를 유지시키는 것으로 알려져 있다[8]. 이러한 고농도의 compatible solute를 축적함에도 불구하고 높은 염농도에서 *dnaK2* 유전자의 발현이 유도된다는 것은 DnaK2 단백질이 compatible-solute와 더불어 상호보완적으로 기능함으로써 염 스트레스로부터 세포를 보호하기 위해 중요한 역할을 담당할 것으로 추측된다.

요 약

내염성 광합성 cyanobacteria인 *Aphanothece halophytica*로부터 molecular chaperone으로 기능하는 HSP70 homolog인 *dnaK2* 유전자를 cloning 하였다. 이 *dnaK2* 유전자는 616 개의 아미노산으로 구성되어 있었으며 추정되는 분자량 68 kDa의 단백질을 code하고 있었다. 아미노산 서열로부터 추정되는 DnaK2 단백질의 구조를 분석하여 본 결과, 다른 원핵생물의 DnaK 단백질들이 공통적으로 갖는 특성인 N-terminal ATPase domain과 C-terminal의 peptide-binding domain이 잘 보존되어 있었으며, 다른 HSP70/DnaK 단백질들과의 높은 상동성을 나타내었다. 한편 *dnaK2* 유전자는 생장온도인 28°C에서 낮은 수준으로 구성적으로 발현하였으며 heat stress에 의해 그 발현량이 급격히 증가하였다. 또한 *A. halophytica*를 고농도의 염 스트레스로 처리한 결과, heat stress가 없음에도 불구하고 그 발현량이 급격히

증가하였다. 이러한 결과들은 DnaK 단백질이 고온 또는 염 스트레스에 따른 세포의 손상을 보호하기 위하여 중요한 기능을 담당하고 있기 때문으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Bardwell, J. C. A. and E. A. Craig. 1984. Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 848-852.
2. Bhagwat, A. A. and S. K. Apte. 1989. Comparative analysis of proteins induced by heat shock, salinity, and osmotic stress in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain L-31. *J. Bacteriol.* **171**, 5187-5189.
3. Chitnis, P. R. and N. Nelson. 1991. Molecular cloning of the genes encoding two chaperone proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biol. Chem.* **266**, 58-65.
4. Csonka, L. N. and W. Epstein. 1996. Osmoregulation, p. 1210, In Neihardt, F. C. (ed.), *Escherichia and Salmonella: Cellular and Molecular Biochemistry*, American Society for Microbiology, Washington, DC.
5. Gross, C. A. 1996. Function and regulation of the heat shock proteins, p. 1382, In Neihardt, F. C. (ed.), *Escherichia and Salmonella: Cellular and Molecular Biochemistry*, American Society for Microbiology, Washington, DC.
6. Gupta, R. S. and G. B. Goldberg. 1993. Evolution of Hsp70 gene and its implications regarding relationships between archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. *J. Mol. Evol.* **37**, 573-582.
7. Hartl, F. -U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580.
8. Hibino, T., B. -H. Lee, A. K. Rai, H. Ishikawa, H. Kojima, M. Tawada, H. Shimoyama and T. Takabe. 1995. Salt enhances photosystem I content and cyclic electron flow via NAD(P)H dehydrogenase in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Aust. J. Plant Physiol.* **23**, 321-330.
9. Kaneko, T., A. Tanaka, S. Sato, H. Kotani, T. Sazuka, N. Miyajima, M. Sugiura and S. Tabata. 1995. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *DNA Res.* **2**, 153-166.

10. Lee, B. -H., T. Hibino, J. Jo, A. M. Vial and T. Takabe. 1997. Isolation and characterization of a *dnaK* genomic locus in a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*. *Plant Mol. Biol.* **35**, 763-775.
11. Meuty, I. and M. Kohiyama. 1991. Role of heat shock protein DnaK in osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **173**, 4404-4410.
12. Nimura, K., H. Yoshikawa and H. Takahashi. 1994. Identification of *dnaK* multigene family in *Synechococcus* sp. PCC7942. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 466-471.
13. Parsell, D. A. and S. Lindquist. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. *Annu. Rev. Genet.* **27**, 437-496.
14. Slater, M. R. and E. A. Craig. 1989. The SSA1 and SSA2 genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **17**, 805-806.
15. Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42**, 579-620.
16. Volker, U., H. Mach, R. Schmid and M. Hecker. 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2125-2135.
17. Webb, R. and L. Sherman. 1994. The Cyanobacterial Heat-Shock Response and the Molecular Chaperones, p. 751, In Bryant, D. A. (ed.), *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.
18. Wetzstein, M., U. Volker, J. Dedio, S. Lobau, U. Ztuber, M. S. Schiesswohl, C. Herget, M. Hecker and W. Schumann. 1992. Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3300-3310.
19. Williams, J. G. K. 1988. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in *Synechocystis* 6803. *Meth. Enzymol.* **167**, 766-778.

(Received July 9, 2001; Accepted August 23, 2001)