

추백리가 감염된 닭의 간에서 발현이 증가하는 APOA1 단백질의 확인

정기철¹ · 이유주¹ · 유성란¹ · 이준현¹ · 장병귀² · 구용범³ · 소현경⁴ · 최강덕^{4,†}

¹충남대학교 동물자원학부, ²농촌진흥청 축산연구소, ³인제대학교 생명공학부, ⁴한경대학교 생물정보통신대학원

Identification of Upregulated APOA1 Protein of Chicken Liver in Pullorum Disease

K. C. Jung¹, Y. J. Lee¹, S. L. Yu¹, J. H. Lee¹, B. K. Jang², Y. B. Koo³, H. K. So⁴ and K. D. Choi^{4,†}

¹Division of Animal Science and Resources, Chungnam National University, ²National Livestock Research Institute, R.D.A.,

³School of Biotechnology and Biomedical Science, Inje University,

⁴The Graduate School of Bio & Information Technology, Hankyong National University

ABSTRACT The aim of this study was to investigate differentially expressed proteins between normal chicken liver and chicken liver infected by *Salmonella pullorum*. 2-dimensional electrophoresis (2DE) and mass spectrometry (MS) were used to identify the proteins. More than 300 protein spots were detected on silver stained 2DE gels using pH 3~10 gradients. The most outstanding protein spot was further analyzed by MALDI-TOF MS and protein database using the Mascot search engine. The protein was finally identified as APOAI (Apolipoprotein AI). Based on the known function of the APOA1, this gene acts protective action against the accumulation of platelet thrombin at the site of vascular damage for the pullorum disease. Therefore APOA1 protein, identified in this study, can be a valuable biomarker in relation to the pullorum disease in chicken.

(Key words : chicken, liver, APOA1, MALDI-TOF, 2DE, pullorum disease)

서 론

프로테오믹스(Proteome)이란 비교적 최근에 생긴 신생어로서 일반적으로 하나의 세포내 유전자들로부터 만들어지는 모든 단백질을 총칭하여 말한다. 다세포 생물에서 모든 세포가 같은 유전자를 가지지만 단백질의 발현은 주위 환경의 변화에 따라 다른 양상을 볼 수 있다. 따라서 프로테오믹스(Proteomics)란 유전자에 의해 발현된 단백질들을 2차원 전기영동(2 dimensional electrophoresis, 2DE)을 이용하여 총체적으로 밝혀내고 여기서 발현되는 단백질들의 발현 정도와 변형 및 단백질들간의 상호작용을 연구하는 학문을 말한다(Pandey and Mann, 2000). 바꾸어 말하면 유전자의 염기서열과 생체기능을 이어주는 중요한 연결고리가 바로 프로테오믹스라고 할 수 있다.

이 프로테오믹스의 연구는 각 단백질을 분리하는 기술인 2차원 전기영동의 개발로 1970년대 후반부터 시작이 되었으

나 각 단백질을 정확히 분리, 동정하는데 문제점이 있어 보완화 되지 못하였다. 그러나 최근에 MALDI-TOF(matrix-assisted laser desorption ionization time of flight)를 비롯한 단백질분자구조분석기술의 발달과 인간을 비롯한 동물의 유전체정보의 증가로 활발한 연구가 이루어지고 있다. 2DE는 단백질의 pH 측, 등전점 pI값에 따라 1차 분석을 한 후, 분자량에 따라 2차분석을 하여 이미지화하는 기술이며 MALDI 분석은 2DE gel에서 분리된 단백질을 trypsin으로 가수분해하여 펩타이드를 분석하는 방법이다. 이 MALDI 분석에는 질소레이저(337 nm)를 이용하며, 분석물질의 비행시간을 측정하여 질량을 추정하는 TOF형이 많이 이용이 되고 있어서 MALDI-TOF라는 용어가 일반적으로 사용이 되고 있다.

세균성 질병인 추백리는 어린 병아리에 백색 설사를 하며 패혈증으로 폐사하는 급성 전염병으로 사망률과 폐사율이 높아 국내에서는 제2종 법정전염병으로 분류되어 있다. 원인균은 *Salmonella pullorum*으로 일령, 계절에 관계없이 발

[†] To whom correspondence should be addressed : kchoi04@hknu.ac.kr

병이나 부화 후 3주령 정도의 병아리가 가장 감수성이 크다. 추백리균은 배설물을 통하여 다른 병아리의 소화기나 호흡기를 통하여 감염되기도 하며 부화기 내에서 난각을 통하여 계태아에 침입하여 감염이 된다. 그러나 추백리에 감염된 병아리가 폐사되지 않을 경우 보균계가 되며, 이의 대표적인 증상으로 난소에 병변이 생기며 산란이 저하되며 보균란을 낳는다. 그리고 보균란을 부화하면 부화율이 저하되어 사육란이 된다(정선부 등, 2003).

따라서 본 연구는 감염되지 않은 건강한 닭에 인위적으로 *Salmonella pullorum*을 감염시켜 추백리를 유발시킨 후 간에서 특이하게 발현하는 단백질을 동정함으로써 추백리 질병의 방역 및 질병치료의 연구에 도움을 주기 위해 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 이용된 재료는 인위적으로 추백리 질병에 감염된 닭의 간이 사용되었다. 13주령 재래닭 10수를 0.1 mL의 *Salmonella pullorum*(7.3×10^6 cell)로 근육 주사하였으며, 5일 후 2~3 마리의 폐사가 관찰된 후 나머지를 도살하였다. 감염 및 조직 채취는 국립수의과학검역원 조류질병과에서 실시하였다. 대조군은 동일조건에서 감염이 되지 않은 닭을 사용하였다. 각 시료는 도살 즉시 액체질소에 넣어 동결하였으며 사용전까지 -70°C 에 보관하였다.

2. 시료준비

닭의 간 1 g을 막자사발에 넣어 액체질소를 첨가하면서 분쇄하였으며 이 과정에서 단백질의 변성을 막기 위해 protease inhibitor인 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride, Roche)를 1 mM 첨가하였다. 그리고 sample buffer I[0.3% SDS(sodium dodecyl sulfate, USB, Amersham Pharmacia), 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), 200 mM DTT(dithiothreitol, Bio-Rad)]와 반응시킨 후 10분간 100°C 에서 끓였다. 이 혼합액을 얼음에 옮긴 후 sample buffer II[DNase I, RNase A, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0), MgCl_2]과 함께 10분간 반응시켰다. 반응 후 15,000 rpm으로 15분동안 4°C 에서 원심분리하고 상층액을 50% TCA(trichloroacetic acid, Sigma) 용액과 함께 얼음에서 1시간동안 정치시켰다. 원심분리 후 얻어진 단백질의 pellet들은 ice-cold acetone으로 5번 washing한 후, speed vacume을 이용하여 건조시켜 바로 실험에 사용하거나 -20

$^{\circ}\text{C}$ 에 저장하였다. 건조된 pellet들은 rehydration buffer[8 M urea, 2% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate, Amersham Pharmacia), 0.01% bromophenol blue, 60 mM DTT, 0.5% IPG buffer(Amersham Biosciences)에 녹여 농도를 측정하였다. 농도 측정은 bovine serum albumin(BSA)과 protein assay system(Bio-Rad, USA)을 이용하였으며 정확한 농도 측정을 위하여 0 μg , 2 μg , 5 μg , 10 μg 의 BSA로 standard curve를 만든 후 시료의 농도를 측정하였다.

3. 2-Dimentional Electrophoresis(DE)

등전점 전기영동(IEF, isoelectric focusing)을 실시하기 위해 건조된 pellet은 rehydration buffer[8 M urea, 2% CHAPS, 0.01% bromophenol blue, 60 mM DTT, 0.5% IPG buffer (Amersham Biosciences)]에 녹였다. 닭의 간 단백질(250 μg)이 포함된 이 용액은 18 cm immobilized pH gradient strip (Amersham Biosciences, 3-10 NL)에 12시간 rehydration시킨 후 등전점 전기영동을 실시하였다. 등전점 전기영동은 IPG-phore system(Amersham Biosciences, Sweden)을 사용하였으며 200V에서 1시간, 500V에서 1시간, 1,000V에서 1시간 실행하였으며 순차적으로 8,000V까지 상승시켜 80,000 Vhr까지 전압을 높였다. 등전점 전기영동 후, 12% polyacrylamide SDS gel을 Ethan dalt electrophoresis kit(Amersham Biosciences, USA)를 이용하여 전개하였다.

4. Staining

Gel의 염색은 silver staining으로 실시하였으며 Heukeshoven과 Dernick(1985)에 기초한 Silver Staining Kit Protein (Amersham Biosciences, USA)을 사용하여 단백질을 염색하였다.

5. Image Analysis

Silver staining된 gel들은 Powerlook III image scanner (UMAX data system, Taiwan)를 이용하여 gel image를 얻었으며, 이미지의 분석은 2D Image Master(Amersham Biosciences)를 이용하여 발현량의 차이가 나는 단백질을 확인하였다. 닭 간에서 발현되는 단백질중 정상보다 월등히 발현되는 단백질을 중심으로 분석하였다.

6. In-Gel Digestion

이미지 분석후 확인된 차등발현 단백질들은 gel에서 분리한 후 trypsin(Promega, USA)으로 37°C 에서 12시간 반응시켰다. 그 후 10 mM ammonium bicarbonate와 50% acetonitrile

로 세척한 후, gel 조각들을 digestion buffer(50 mM ammonium bicarbonate, 5 mM CaCl₂, 12.5 ng/μl trypsin)와 37°C에서 12시간동안 반응시켰다. 반응후 얻어진 peptide들은 50 mM ammonium bicarbonate와 100% acetonitrile을 이용하여 회수하였으며 speed vacume을 이용하여 건조시켰다.

7. MALDI-TOF MS를 이용한 Peptide Mass Fingerprinting

건조된 sample들은 0.5% TFA(trifluoroacetic acid)에 녹였다. MALDI-TOF 전에 Zip-tip C18(Millipore, USA)로 정제하였으며 결정화를 시키기 위해 같은 양의 peptide와 matrix용액을 섞은 후 Voyager-DE STR MALDI-TOF mass spectrometer(PerSeptive Biosystems, USA)를 이용하여 peptide mass fingerprinting을 분석하였다.

8. 단백질 발현양상 분석 및 Database 검색

질량분석 후의 결과를 matrixscience(<http://www.matrix-science.com>)server의 Mascot program을 이용하여 조사하였다(Perkins et al., 1999). Mascot Search는 각각의 MS spectrum과 일치하는 peptide sequence를 조사한 후 이들 peptide들이 어떤 단백질과 일치하는지 조사하였다.

결과 및 고찰

추백리 질병에 인위적으로 감염된 닭의 간에서 *Salmonella pullorum*이 어떠한 영향을 미치는지 분석하기 위하여 마리당 *Salmonella pullorum* 7.3×10⁶ 세포를 근육주사하여 5일간 감염시켰다. 닭의 간에서 추출된 단백질들은 immobilized pH gradient strip을 이용하여 1차 등전점 전기영동 후 acrylamide gel에서 2차 전기영동을 실시하고 silver staining 방법으로 acrylamide gel을 염색한 후 2D Image Master software를 이용하여 분석하였다. 대부분의 단백질들은 대략 pH 5~9, 분자량 20~100 kDa에서 주로 분리되었으며 확인된 전체 단백질의 수는 약 300여개였다(Fig 1). 분석 결과 정상개체의 간에서만 특이적으로 나타난 spot은 9개였고 추백리증의 개체 특이 spot은 8개가 나타났다. 또한 추백리증의 개체에서는 9개의 spot이 정상개체의 간보다 up-regulation되었으며 13개의 spot은 down-regulation되었다.

이중 발현 차이를 가장 크게 보이는 한 개의 단백질 spot은 정상보다 8.6배 up-regulation되었는데(Fig. 1), MALDI-TOF MS를 거쳐 peptide map을 확인한 후 기존에 보고된 단

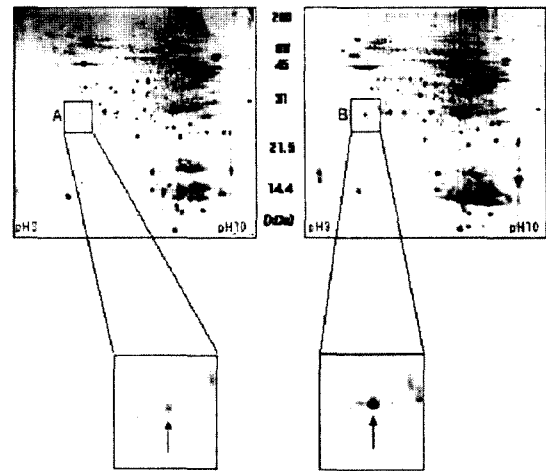


Fig. 1. 2DE gel images of the chicken liver proteins.

(a) Total chicken liver proteins from a normal bird.

(b) Total chicken liver proteins from a bird infected by *S. pullorum*. Arrows indicated the most outstanding protein spot between the two samples.

백질(gi/227016)과의 유사성을 확인하였다(sequence coverage: 35%). 그 결과 이 spot은 분자량이 28,790 Da이고, pH는 5.45인 apolipoprotein AI(APOA1)과 가장 높은 상동성을 보이는 것으로 밝혀졌다. Fig. 2는 단백질 spot이 APOA1임을 알아내기 위해 MALDI-TOF MS후 database search를 거쳐 상동성이 있는 단백질을 찾아내는 일련의 과정을 보여주고 있다.

APOA1은 HDL(high density lipoprotein)중 주요한 apoprotein의 하나로서 약 1.0~1.5 mg/mL의 농도로 주로 혈장 단백질에 많이 존재한다. 이 APOA1은 single polypeptide chain으로 구성되어 있으며 총 243개의 아미노산 잔기를 가지고 있다(Brewer et al., 1978). APOA1의 주요 생성장소는 간과 소장으로 알려져 있으며 LCAT(Lecithin cholesterol acyltransferase)의 보조인자로 plasma에서 cholesteryl esters의 형성에 주로 반응하며 세포로부터 cholesterol의 유출을 촉진시키는 역할을 한다. 이밖에 APOA1은 Prostaglandin(PG)₂를 안정화시키는 역할을 하는데 PG₂는 혈관 내피세포층과 평활근에서 합성되며 혈관을 확장시키고 혈소판의 응고를 막는 기능을 한다. 따라서 HDL(high density lipoprotein)과 APOA1에 의한 PG₂의 안정화는 손상된 혈관 부위에 응혈작용을 하는 thrombin을 축적하는 중요한 방어 작용을 한다(Yui et al., 1988). 결론적으로 추백리가 감염된 닭의 간에서 APOA1 단백질의 증가는 손상된 혈관의 재생과 밀접한 관계가 있다.

프로테오믹스(Proteomics)에 관한 연구는 최근에 급격한 성장을 보이고 있으며 human과 mouse의 경우 이미 간, 적

(a) Apolipoprotein A1

RSFWQHDEPQTPLDRIRDMVDVYLETVKASGKDAIAQFESSAVGKQLDLKLDNLDLTSAAAALREDMAPYYK⁷EVREMWLKDEAL
 RAELTKDLEEVKEKIRPFLDQFSAK⁸WTEELEQYR⁶QRLTPVAQELKELTKQKVELMQAKLTPVAEEEAR¹DRLRGHVEELRK⁴NLAPYSDEL⁴
 QKLSQKLEEIREKGIPQASEYQAKVMEQLSNIREK⁹MTPLVQEFR³ERLTPYAENLK²NRLISFLDELQK⁵SVA

(b)

	Observed	Peptide
1	985.55	LTPVAEEAR
2	1048.60	LTPYAENLK
3	1120.60	MTPLVQEFR
4	1177.61	NLAPYSDEL ^R
5	1205.70	LISFLDELQK
6	1253.61	WTEELEQYR
7	1285.66	LREDMAPYYK
8	1321.75	IRPFLDQFSAK
9	1346.73	VMEQLSNIREK

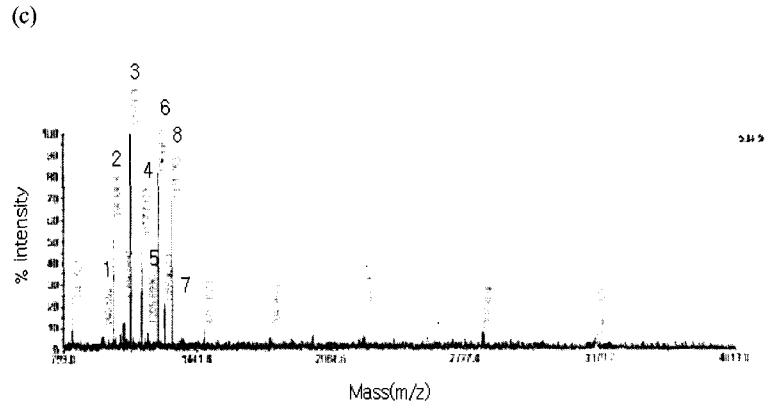


Fig. 2. MALDI-TOF MS peptide map of APOA1 spot.

- (a) Amino acid sequence of APOA1.
- (b) Observed peak data.
- (c) Peptides identified by peptide mass fingerprinting.

혈구세포, 신장 등에서 발현되는 단백질들이 database화 되어 있다(<http://us.expasy.org>). 그러나 가축에 있어서 아직 시작단계이기 때문에 2DE나 질량 분석을 통해서 축종별 각 조직의 단백질에 대한 database 구축이 절실히 필요하다. 최근에 이런 중요성이 인식되어 소의 근육, 간, 신장, 혈장, 적혈구 세포에 관한 자세한 2DE map이 발표되었으며(Talamo et al., 2003), 가금의 경우 가슴 근육에 관한 2DE map이 최근에 발표되었다(Doherty et al., 2004). 가금에서 이러한 proteomics 관련 연구는 지난 3월 미국에서 공개한 chicken genome sequencing의 결과와 더불어 앞으로 급격한 성장을 가져올 것으로 사료된다(Personal communication: Angenmap discussion group). 이 논문에서 proteomics를 이용하여 추백리가 감염된 개체의 간에서 APOA1 단백질의 발현 증가는 APOA1이 추백리의 감염 여부를 나타내주는 Bio-marker로서의 역할을 할 것으로 기대가 되며 앞으로 더 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

적 요

가금 추백리와 밀접한 관계가 있는 단백질을 동정하기 위하여 인위적으로 추백리를 유도한 개체와 정상인 개체의 간

에서 단백질을 추출하였으며, 2차원 전기영동(2DE)과 mass spectrometry(MS)를 이용하여 차등 발현되는 단백질을 조사하였다. 총 300여개의 단백질 spot들이 관찰되었으며, 이중 발현양에 현저한 차이를 보이는 spot을 MALDI-TOF MS와 protein database search를 통해 분석한 결과, 가금 APOA1 (Apolipoprotein A1)으로 확인되었다. 추백리가 감염된 닭의 간에서 APOA1 단백질의 증가는 손상된 혈관의 재생과 밀접한 관계가 있으며 추백리의 감염 여부를 나타내 주는 Bio-marker로서 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업의 지원에 의해 이루어진 연구결과와 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

인용문헌

Brewer HB, Fairwell T, LaRue A, Ronan R, Houser A, Bronzert TJ 1978 The amino acid sequence of human apoA-I, an apolipoprotein isolated from high density

- lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 80:623-630.
- Doherty MK, McLean L, Hayter JR, Pratt JM, Robertson DH, El-Shafei A, Gaskell SJ, Beynon RJ 2004 The proteome of chicken skeletal muscle: Changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics* 4:2082-2093.
- Heukeshoven J, Dernick R 1985 Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6:103-112.
- Pandey A, Mann M 2000 Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405:837-846.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS 1999 Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-3567.
- Talamo F, D'Ambrosio C, Arena S, Del Vecchio P, Ledda L, Zehender G, Ferrara L, Scaloni A 2003 Proteins from bovine tissues and biological fluids: defining a reference electrophoresis map for liver, kidney, muscle, plasma and red blood cells. *Proteomics* 3:440-460.
- Yui Y, Aoyama T, Morishita H, Takahashi M, Takatsu Y, Kawai C 1988 Serum prostacyclin stabilizing factor is identical to apolipoprotein A-I (Apo A-I). *J Clin Invest* 82:803-807.
- 정선부 2003 가금생산학. 선진문화사 pp. 460-462.