

닭의 간과 적혈구의 핵 단백질의 비교연구

한 준 표

효성여자대학교 식품가공학과

A Comparison of Nuclei Proteins in Chicken Liver and Erythrocyte

Joon-Pyo Han

Dept. of Food Science and Technology, Hyosung Women's University, Kyungsan, 713-702, Korea

Abstract

Nuclei proteins were purified from chick liver to homogeneity by means of acid extraction, CM Sephadex C 25 column chromatography and Bio Rex 70 column chromatography. The molecular weights of liver Nuclei proteins 1 and 2, as estimated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel, are 29,000 and 27,000, respectively. These molecular weights are identical with those of Nuclei Proteins 1 and 2 isolated from chick erythrocyte. The liver and erythrocyte Nuclei Proteins also co-migrated in acetic acid-urea gel electrophoresis. Furthermore, the antisera, raised against liver Nuclei Proteins 1 and 2, cross-reacted with erythrocyte Nuclei Proteins 1 and 2, respectively. However, the amino acid compositions of liver Nuclei Proteins 1 and 2 were found to be different from those of corresponding erythrocyte Nuclei proteins; the contents of serine and proline in liver Nuclei proteins were higher than those in erythrocyte Nuclei proteins while the content of lysine in liver Nuclei proteins was lower than the erythrocyte Nuclei proteins. These results suggest that, in spite of similarities in many respects, the liver and erythrocyte Nuclei proteins in chicks are different proteins.

서 론

실험동물에 있어서 식이조건의 조절은 체내 효소활성에 중요한 영향을 미친다. 대부분의 체내 효소활성은 식이조건에 의존하거나 사료섭취에 의해 유도된다¹⁾. Barbiroli등²⁾은 사료섭취에 의해 RNA합성이 유도되고 이러한 RNA합성의 변동은 RNA polymerase의 활성과 주형인 RNA합성 개시부위의 활성증대에 의한다고 한다^{3,4)}. Oka와 Han은 부화직후의 병아리에게 사료를 섭취시키면 간RNA합성 및 간 염색체의 Nuclease에 의한 분해가 증가하고 동시에 세포핵내의 HMG단백질의 함량이 증가한다고 보고하고 간RNA 합성의

조절에 HMG단백질이 조절인자로 관여한다고 시사했다⁵⁾. High Mobility Group(HMG) non-histone 단백질은 염색체로부터 0.35M의 NaCl이나 0.2M의 H₂SO₄ 혹은 5%의 과염소산으로 유리되는 단백질중에서 전기영동 이동도가 높은 일군의 단백질이다⁶⁾. HMG단백질은 전사활성이 높은 염색체영역에 분포되어 있으며 전사활성이 높은 염색체의 구조 유지에 관여한다⁷⁾. 그러나 HMG 단백질의 구조와 기능에 대한 명확한 연구는 아직 찾아볼 수 없었다. 본 연구는 HMG 단백질의 기능을 검토하기 위하여 HMG 단백질을 닭의 간에서 분리, 정제한 후 적혈구 HMG 단백질과 아미노산 조성, 면역학적 성질 및 peptide map-

ping을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험동물은 도살 직후의 백색 leghorn종 닭의 간을 도축장으로 부터 구입하였으며 적혈구는 닭의 경부동맥으로 부터 채혈했다.

적혈구 HMG 단백질의 정제

닭 적혈구 HMG 단백질의 정제는 Mathew⁸⁾의 방법을 일부 변경했다. Mathew 등이 행한 CM-sephadex C25 column에 대해 분획된 HMG1과 HMG2 단백질은 소량의 불순물이 포함되어 있어서 각각의 HMG 단백질을 간 HMG 단백질 정제법과 같은 방법으로 Bio Rex 70 column에 의해 정제했다. 정제된 HMG 1과 HMG 2 단백질은 acetic acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis에서 단일의 물질로 확인되었다.

HMG 단백질의 아미노산 분석

간과 적혈구에서 정제한 HMG 단백질은 6N HCl로 110°C에서 24시간 가수분해한 후 그 분해물을 Hitachi H-835 아미노산 자동분석계로 분석했다.

HMG 단백질의 면역학적 동정

HMG 단백질의 면역학적 동정은 Ouchterlony 법으로 했다. 환천상에 5mm의 간격을 두고 직경 4mm의 구멍을 뚫어 여기에 정제한 HMG 단백질과 제작된 HMG 단백질 항체를 넣었다. 이렇게 하여 실온에서 48시간 반응시킨 후 침강선을 관찰하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Acetic acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis는 Panyin과 Chalkley⁹⁾의 방법으로 pH 2.7에서 15%의 gel을 사용하였다. SDS polyacrylamide gel electrophoresis는 Laemmli¹⁰⁾의 방법으로 15%의 gel을 사용하였다. gel단백질의 염색은

0.1% Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였다.

단백질 정량

단백질은 bovine serum albumin을 표준물질로 Layne¹¹⁾의 비탁법으로 400nm에서 측정하였다.

Peptide mapping 제작

Staphylococcus aureus V8 효소를 사용해서 HMG단백질의 peptide를 절단하고 sterner¹¹⁾의 방법으로 2차원 전기영동을 행하여 peptide map을 작성했다.

결과 및 고찰

HMG 단백질의 추출

Seyedin과 Kistler의 방법¹²⁾으로 간에서 HMG 단백질을 추출했다. 200g의 간에 대해서 5배량의 0.25M의 sucrose, 50mM tris-HCl 완충액(pH 6.5), 25mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM phenylmethylsulfonfyl fluoride를 가하고 Potter-Elvehjem형 homogenizer로 마쇄했다. 마쇄액에 대해서 2M의 황산을 첨가하여 최종농도가 0.2M이 되도록 하여 4°C에서 12시간 HMG 단백질을 포함하는 분획을 추출하였다(Fig. 1). 황산추출분획을 10,000×g, 30분간 원심분리하고 그 상정액을 최종농도가 3%가 되도록 TCA를 가하여 다시 10,000×g, 30분간 원심분리하였다. 여기에 다시 최종농도가 25%가 되도록 TCA를 가하여 10,000×g, 30분간 원심분리하여 침전물을 아세톤으로 세척한 후 진공건조하여 300mg의 HMG 단백질 분획을 얻었다.

HMG 단백질의 정제

300mg의 HMG 단백질을 10ml의 7.5mM borate buffer(pH 8.8)에 용해하고 12시간 투석하였다. 투석한 sample을 7.5mM borate buffer(pH 8.8)로 평형화시킨 CM Sephadex C25(Pharmacia Co.) column(3.2×40cm)에 충전시킨 후 평형완충액으로 충분히 세척하고 흡착된 단백질을 0.15M의

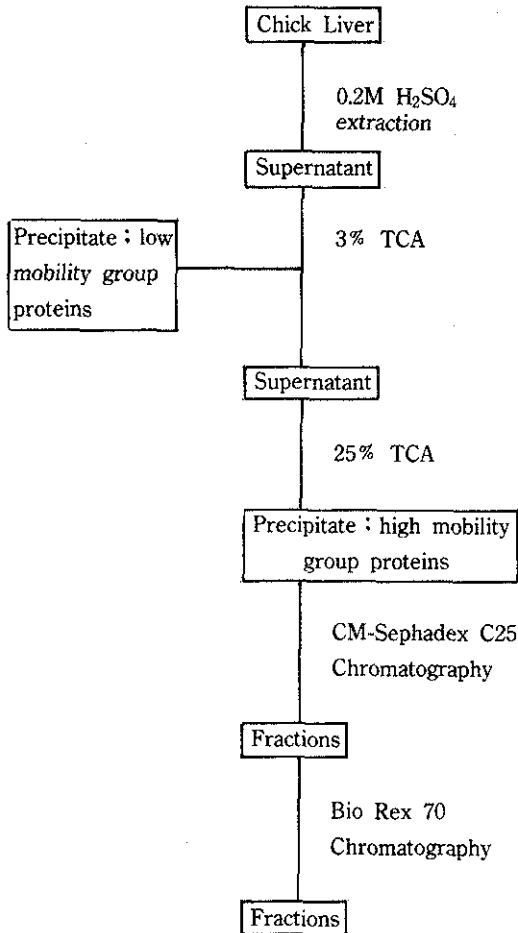


Fig. 1. Schematic diagram for the isolation of HMG proteins.

NaCl로 용출하였다(Fig. 2). Peak I은 HMG1 단백질과 HMG2 단백질이 주된 성분이고 peak II는 HMG2 단백질이 주된 성분이었다. peak I과 peak II의 분획을 합하여 농축하고 증류수로 투석한 후 동결건조 하였다. 동결건조 한 단백질을 2ml의 4% GuCl을 함유하는 50mM phosphate buffer(pH 6.5)에 용해하고 같은 용액에 투석하였다. 투석한 HMG단백질을 4% GuCl을 함유하는 50 mM phosphate buffer(pH 6.5)로 평형화시킨 Bio-Rex 70(Bio-Rad Co.) column에 충전시킨 후 평형 완충액으로 충분히 세척 후 흡착된 단백질을 4~8 % GuCl linear gradient로 13.8ml/h의 유속으로

분획당 3ml되게 용출시켰다(Fig. 3). peak I에는 HMG2 단백질이 용출되었고 peak II에는 HMG1 단백질이 용출되었다. 200g의 간에서 0.43mg의 HMG1 단백질과 0.87mg의 HMG2 단백질이 얻어졌다. 본 연구에 있어서 닭 간 HMG1과 HMG2 단백질의 최종 정제 단계는 Seyedin등¹²⁾이 송아지 흉선 HMG 단백질 및 흰쥐 고환 HMG 단백질의 정제에 사용한 Bio-Rex 70 column chromatography를 사용하였다. 송아지 흉선 및 흰쥐 고환 HMG 단백질의 경우에는 GuCl linear gradient에 의해 HMG1 단백질이 먼저 용출되고 HMG2 단백질이 용출되었다. 그러나 닭 간 HMG 단백질의 경우는 HMG2 단백질이 HMG1 단백질 보다 먼저 용출되었으며 적혈구 HMG 단백질도 간 HMG 단백질과 같은 순서로 같은 위치에 용출되었다. 이와같이 Bio-Rex column 상의 HMG 단백질의

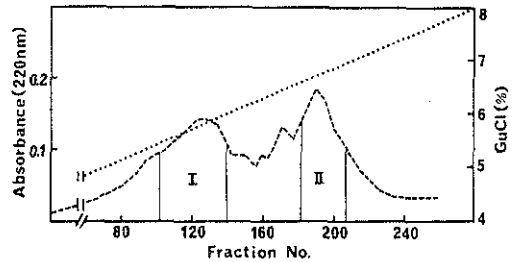


Fig. 2. Bio Rex 70 chromatography of HMG proteins.

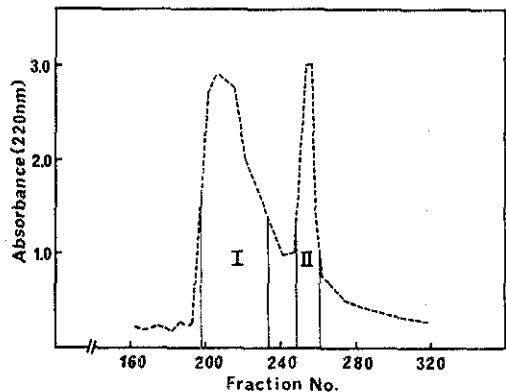


Fig. 3. CM Sephadex C25 ion exchange chromatography of HMG proteins from chick liver.

거동이 닭이라고 하는 종의 독특한 것인지는 금후의 연구과제로 기대된다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

정제된 HMG 단백질을 Panyin법⁹⁾에 따라 acetic acid-urea polyacrylamide gel로써 전기영동을 행하여 본 결과 Fig. 4와 같이 단일밴드가 확인되었다. 또한 간 HMG 단백질의 전기영동 이동도는 적혈구 HMG 단백질과 일치하였다. 한편 HMG 단백질의 subunit를 조사하기 위하여 2차원 전기영동 결과 간 HMG1 단백질 및 간 HMG2 단백질 모두 단일의 점만으로 확인되어 subunit는 없었다 (Fig. 5).

HMG 단백질의 분자량

정제한 HMG 단백질을 Laemmli의 방법¹⁰⁾으로

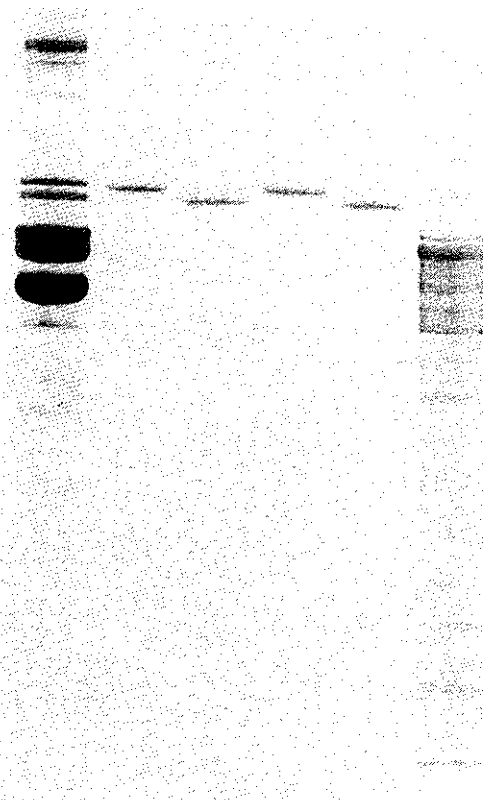


Fig. 4. Acetic acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis of chick liver and erythrocyte HMG proteins.

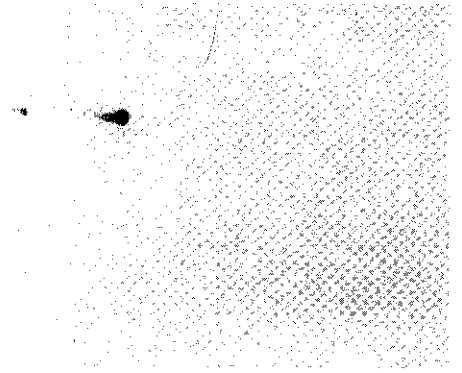


Fig. 5A. Two-dimensional electrophoresis of chick liver HMG1.

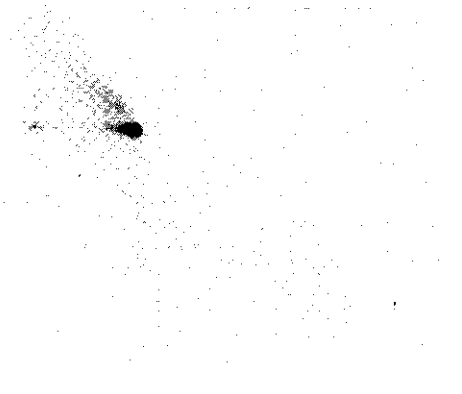


Fig. 5B. Two-dimensional electrophoresis of chick liver HMG2.

SDS polyacrylamide gel로 전기영동을 행한 결과 단일의 밴드가 확인되었으며 분자량은 HMG1 단백질이 29,000 HMG2 단백질이 27,000으로 적혈구 HMG1 단백질 및 HMG2 단백질과 각각 일치하였다.

HMG 단백질의 면역학적 성질

간 HMG1 단백질 및 HMG2 단백질을 토끼에게 피하주사한 후 항체를 작성하고 혈청에 대한 간 HMG 단백질 및 적혈구 HMG 단백질의 면역학적 특이성을 검토했다. Fig. 6은 Ouchterlony 법에 의한 침강선을 나타내는데 HMG1 혈청과 간 HMG1 단백질 및 적혈구 HMG1 단백질 사이에는 하

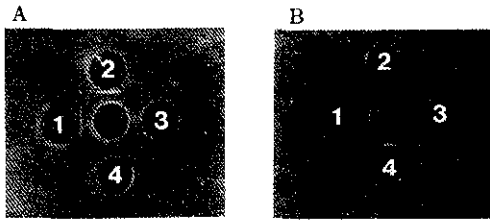


Fig. 6. Immunological cross-reaction between HMG protein.

demonstrated by immunodiffusion.

A, center well, anti-liver-HMG 1 ;

B, center well, anti-liver-HMG 2 ;

2, liver HMG 1 ; 2, erythrocyte HMG 1 ;

3, liver HMG 2 ; 4, erythrocyte HMG 2.

나의 침강선이 관찰되고 융합되어 있다. 한편 HMG2 단백질과는 침강선이 관찰되어 있지 않다 (Fig. 6A). 또한 HMG2 혈청과 간HMG2단백질 및 적혈구 HMG2 단백질 사이에는 하나의 침강선이 관찰되고 융합되어 있으나 HMG1 단백질과의 사이에는 침강선이 관찰되어 있지 않다 (Fig. 6B).

이러한 결과는 간HMG단백질과 적혈구HMG 단백질은 동일한 항원성을 가진다고 사료된다.

HMG단백질의 아미노산 조성

간 및 적혈구 HMG 단백질을 비교하면 (Table 1) 간HMG1 및 HMG2단백질은 매우 유사하며 proline을 약 7%, 산성 아미노산을 약 25%, 염기성 아미노산을 약 17% 함유하고 있다. 간HMG 단백질과 적혈구HMG단백질을 비교하면 적혈구 HMG단백질의 Lys함량은 간HMG단백질 보다 많고 한편 Ser과 Pro함량은 간HMG단백질이 많은 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 간HMG단백질과 적혈구HMG단백질은 전기영동에서 동일한 이동도를 나타내고 분자량도 같으며 더우기 면역학적으로 동일한 항원성을 가지고 있으나 아미노산 조성에서 Ser, Pro, Lys의 함량이 다른 점에서 서로 상이한 단백질로 사료된다.

HMG단백질의 peptide map 작성

HMG단백질의 아미노산 조성의 차이를 상세히 조사하기 위하여 2차원 전기영동을 이용해서 pep-

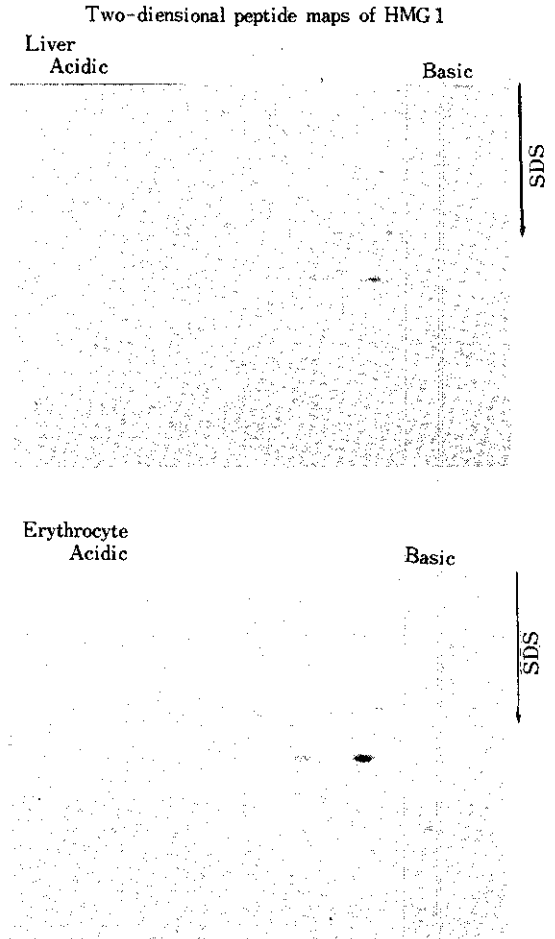


Fig. 7. Two-dimensional peptide maps of HMG 1.

tid mapping을 행하였다 (Fig. 7, Fig. 8). 간 HMG1단백질과 적혈구 HMG1단백질은 상당히 유사하지만 (Fig. 7) 적혈구 HMG1단백질에서는 염기성쪽에 3개의 spot가 관찰되고 간HMG1단백질에는 산성쪽에 1개의 spot가 관찰되었다. 또한 간HMG2단백질과 적혈구HMG2단백질을 비교하면 (Fig. 8) 역시 유사하지만 적혈구HMG2단백질에는 염기성쪽에 3개의 spot와 산성쪽에 2개의 spot가 관찰되고 간HMG단백질에는 산성쪽에 몇 개의 spot가 관찰되었다.

이상의 결과로부터 간HMG1 및 간HMG2단백질은 적혈구HMG1 및 HMG2단백질과 매우 유사하면서도 각각 다른 단백질로 해석된다. 그러나

Table 1. Amino acid composition(mole %) of HMG proteins from chick liver and erythrocyte

	Chick liver HMG 1	Chick liver HMG 2	Chick erythrocyte HMG 1	Chick erythrocyte HMG 2
Asp	10.52	10.65	11.86	12.93
Thr	3.64	3.66	2.94	2.59
Ser	10.77	9.42	8.01	6.76
Glu	14.53	13.85	13.63	14.60
Gly	9.94	9.52	9.65	7.56
Ala	8.55	8.71	8.60	9.17
Cys	1.20	1.66	1.56	0.90
Val	3.27	3.64	4.17	3.69
Met	1.47	1.30	2.06	0.71
Ile	2.08	2.13	2.10	1.59
Leu	3.50	3.25	3.36	2.47
Tyr	2.22	2.16	2.64	2.80
Phe	3.84	3.86	4.74	5.46
Lys	12.51	13.14	16.68	18.78
His	2.18	1.96	2.46	0.97
Arg	3.85	3.92	2.36	3.12
Pro	6.45	7.18	4.32	5.95
Lys+Arg	16.36	17.06	18.14	21.90
Asp+Glu	24.85	24.50	25.49	27.53

HMG단백질의 조직특이성에 대해서 Rabbani등¹³⁾은 송아지 흉선, 비장, 간장, 신장등의 4개의 조직에서 HMG1 및 HMG2의 아미노산 조성은 동일하고, Mathew등⁸⁾은 닭 적혈구와 흉선의 HMG2단백질의 아미노산 조성은 차이가 없다고 보고했다. 지금까지 HMG단백질의 조직특이성에 대한 보고는 아직없고 본 보고가 최초의 보고이다. 닭 적혈구와 흉선의 HMG단백질이 동일하다고 하는 Mathew등⁸⁾의 보고가 옳다고 한다면 간HMG단백질만이 다른 조직과 비교해서 특이성이 있는지 아니면 다른 장기에도 특이성이 있는지는 금후로 남아있는 흥미있는 문제로 사료된다. 본 연구에서 작성한 간HMG1 및 HMG2 단백질에 대한 항혈청을 이용한 면역학적 검토 결과 적혈구HMG1 및 HMG2단백질은 간HMG1 및 HMG2 단백질과 동일한 항원성을 나타냈다. 유전자발현에 있어서 HMG단백질의 역할에는

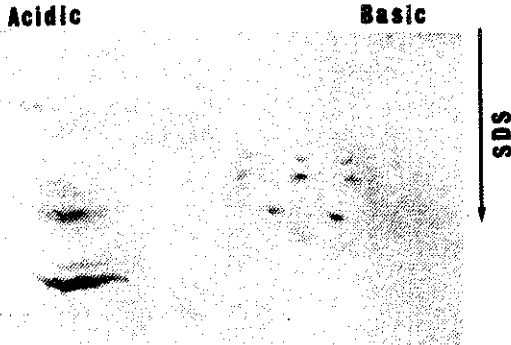
불명확한점이 많지만 여기에서 작성한 HMG단백질의 항체가 HMG단백질의 기능을 해명하는데 유력한 수단이 될 것으로 기대된다.

요 약

닭 간 HMG단백질을 산추출 CM Sephadex C25, Bio Rex 70을 이용하여 분리 정제하였으며 분자량은 HMG1단백질이 29,000 HMG2단백질이 27,000이었다. 이것은 적혈구 HMG단백질의 분자량과 동일하였으며 전기영동에서도 동일한 이동도로 나타났고 면역학적 검토에서도 동일한 항원성을 가지는 단백질로 판명되었다. 그러나 아미노산 분석과 peptide map의 결과 간HMG단백질과 적혈구HMG단백질은 아미노산 조성면에서 약간의 차이를 보였다. 이 결과 간HMG단백질과 적혈구HMG단백질은 성질이 유사하면서도 각각

Two-dimensional peptide maps of HMG2

Liver



Erythrocyte

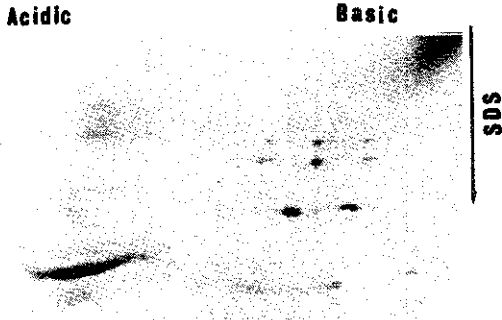


Fig. 8. Two-dimensional peptide maps of HMG 2.

다른 단백질로 판명되었다.

(본 연구는 1989년도 문교부 학술연구 조성비 지원에 의하여 이루어졌으며 당국에 감사를 드립니다.)

문헌

1. Potter, V. R., Baril, E. F., Watanabe, M. & Whittle, E. D. : Systematic oscillations in metabolic functions in liver from rats adapted to controlled feeding schedules. *Fed. Proc.* 27. 1238 (1968)
2. Hopkins, H. A., Bonney, R. J., Walker, P. R., Yager, J. D. & Potter, V. R. : Food and light separate entrainment signals for rat liver enz-

- ymes. *Adv. Enzyme Regul.*, 11, 169(1973)
3. Barbiroli, B., Moruzzi, M. S., Monti, M. G. & Tadolini, B. : Regulation of RNA synthesis in the liver of rats maintained under controlled feeding schedules. *FEBS Lett.*, 37, 159 (1973)
4. Barbiroli, B., Tadolini, B., Moruzzi, M. S. & Monti, M. G. : Modification of the template capacity of liver chromatin for form-B ribonucleic acid polymerase by food intake in rats under controlled feeding schedules. *J. Biochem.*, 146, 687(1975)
5. Oka, T., Han, J. P., Natori, Y., Hasegawa, H., Kanai, M. & Watari, N. : Enhancement of RNA synthesis in chick liver by food intake : Possible role of high mobility group nonhistone proteins. *J. Nutr.*, 115, 1504(1985)
6. Goodwin, G. H. & Mathew, C. G. P. : Role in gene structure and function. The HMG chromosomal proteins (Johns, E. W., editor), Academic Press, London, 193 (1982)
7. Brown, E. & Goodwin, G. H. : Comparison of th high mobility group chromosomal proteins in rainbow-trout (*Salmo gairdnerii*) liver and testis. *J. Biochem.*, 215, 531(1983)
8. Mathew, C. G. P., Goodwin, G. H., Gooderham, K., Walker, J. M. & Johns, E. W. : A comparison of the high mobility group nonhistone chromatin protein HMG2 in chicken thymus and erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 87, 1243(1979)
9. Panyin, S. & Chalkley, R. : High resolution acrylamide gel electrophoresis of histone. *Arch. Biochem. Biophys.*, 130, 337(1969)
10. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680(1970)
11. Sterner, R., Boffa, L. C. and Vidali, G. : Comparative structural analysis of high mobility group proteins from a variety of sources. *J. Biol. Chem.*, 253(11), 3830(1978)
12. Seyedin, S. M. & Kistler, W. S. : Levels of chromosomal protein high mobility group 2 parallel the proliferative activity of testis, skeletal muscle and other organs. *J. Biol. Chem.*, 254, 11264(1979)
13. Rabbani, A., Goodwin, G. H. & Johns, E. W. : Studies on the tissue specificity of the high mobility group nonhistone chromosomal proteins from calf. *J. Biochem.*, 173, 497(1978)

(1990년 4월 30일 접수)