Check for updates

JFMSE, 34(2), pp. 201~209, 2022.
수산해양교육연구, 제34권 제2호, 통권116호, 2022.
www.ksfme.or.kr
https://doi.org/10.13000/JFMSE.2022.4.34.2.201

대장균에서 발현된 넙치 PKCβ1의 활성도 조사

장민식 · 이형호†
부경대학교(학생) · †부경대학교(교수)

Activity Assay of Oliver Flounder PKCβ1 Recombinant Protein Expressed in *Escherichia coli*

Min Sik JANG · Hyung Ho LEE†
Pukyong National University(student) · †Pukyong National University(professor)

Abstract

Oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*) is the second most farmed fish species in Korea in 2020. Thus, oliver flounder was studied on aquaculture methods, pathogenic viruses and bacteria, and gene duplication of teleostei fish have been actively conducted. Protein kinase C (PKC) is an enzyme that phosphorylates serine/threonine residues of proteins. PKC is divided to several subfamilies (conventional, novel, atypical) depending on how it is activated. PKCβ is activated by Ca2+ and diacylglycerol (DAG) in the presence of phosphatidylserine. The recombinant protein of oliver flounder PKCβ1 (PoPKCβ1) was expressed and purified, and the activity was measured in several reaction conditions such as temperature, pH, and recombinant protein concentration. As a result, it exhibited a wide range of activity from 10 °C to 50 °C by reaction temperature, and sufficient activity from 5 to 10 by pH. And 50 ng/μl showed the highest activity in the recombinant protein concentration. Therefore this study suggests that PoPKCβ1 can perform phosphorylation of proteins under a wide range of conditions.

Key words : Oliver flounder, Protein kinase C recombinant protein, PoPKCβ1 gene cloning, Enzymatic activity assay

Ⅰ. 서 론

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 가자미목 넙치과에 속하는 종으로써 15~25 ℃의 온도에서 먹이 활동이 활발하며 생육에 적정하다. 한국 주변 해안에서 흔히 서식하며 가장 많이 양식되는 어종 중의 하나이다. 특히 2020년 총 양식어류 생산량의 2번째로 양식되는 어종이다(KOSIS, 2021). 이렇듯 양식을 통한 넙치의 생산량이 높기 때문에 높은 생산량을 위한 양식환경 및 양식방법에 대한 연구와 양식 과정 간 발생하는 바이러스 및 박테리아에 의한 질병에 의해 야기되는 집단폐사를 막기 위한 연구가 활발하였다(Kim and Jung, 2014; Nguyen et al., 2002; Kwon and Jung, 2012). 또한 진골어류의 Phospholipase C 유전자 중복 연구나 발현 분석에 사용되었다(Kim et al., 2008).

단백질 인산화효소 C(PKC)는 단백질의 세린/트레오닌 잔기를 인산화하는 효소이다(Newton, 1995). 그리고 지질 활성화 효소 계열로써 광범위한 세포 기능과 세포의 면역 기능을 조절하는 신

† Corresponding author : 051-629-5864, hyunghl@pknu.ac.kr
※ 이 논문은 부경대학교 자율창의학술연구비(2019년)에 의해 연구되었음.

호 전달 메커니즘과 관련된 역할을 가지고 있다 (Chen et al., 2001). PKC는 활성화되는 방식에 따라 아과(Subfamily) (conventional, novel, atypical)가 존재하는데 PKCβ가 속해있는 conventional의 가장 잘 알려진 메커니즘으로는 포스파티딜세린 (Phosphatidylserine)이 존재하고 있는 상태에서 Ca^{2+}와 diacylglycerol (DAG)에 의해 활성화되는 것이다(Hirai and Chida, 2003). PKCβ는 서열 중 Thr-500 (키나제 도메인의 활성화 루프), Thr-642 (턴 모티브) 및 Ser-661 (소수성 영역)가 인산화되어 활성화가 된다(Graff et al., 2005).

본 연구에서는 재조합 단백질의 정제를 비롯하여 재조합 단백질의 농도와 반응 온도, 반응 pH에 따른 활성의 차이를 비교함으로써 PoPKCβ1의 활성에 대한 기본 자료 제공의 목적으로 연구하고자 한다.

Ⅱ. 연구 방법

1. 넙치 cDNA 합성

Total RNA를 얻기 위해서 넙치(*Paralichthys olivaceus*)의 12개 조직(뇌, 아가미, 식도, 위, 부록 유문, 장, 심장, 비장, 간, 신장, 근육, 고환)을 이용하였고, Hybrid-R™ (GeneAll)를 사용하여 제조사가 제공하는 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 품질을 확인하기 위해 nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 A260/A280 비율을 측정하였다. cDNA는 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TAKARA)에 의해 ologo dT primer와 random hexamer primer를 사용하여 제조사에서 제공한 방법으로 합성하였다. 이렇게 합성된 cDNA의 품질은 RNA와 동일한 방법으로 확인하였다.

2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

넙치 cDNA를 주형으로 하여 PoPKCβ1에 대한 PCR을 진행을 위해서 specific oligonucleotide primer set을 디자인하였다. Primer set은 NCBI에 제공되어 있는 PoPKCβ1의 mRNA 기존 서열 (XM_020101173.1) 중 ORF만을 참고하여 길이, melting temperature, GC 비율과 dimer 및 hairpin loop 생성 가능성을 고려하여 제작하였다. 프라이머 작성 시 PCR 후 ligation 과정에서 pET-28a(+)와의 연결을 용이하게 하기 위한 sticky end를 만들기 위해 forward 프라이머는 BamHI를, reverse 프라이머는 XhoI 제한효소 인식서열을 추가하였다<Table 1>. PCR에 사용한 중합효소는 nPfu-Forte (Enzynonmics)이었다. PCR 혼합물 구성요소는 nPfu-Forte 0.2 μl, 10x buffer 2 μl, dNTP 2 μl, forward primer 0.5 μl, reverse primer 0.5 μl, template 1 μl, 증류수 13.8 μl이었고 총 용량은 20 μl으로 반응을 진행하였다. PCR 조건은 초기 변성단계에서는 95 ℃, 2min, 변성단계에서는 95 ℃, 30sec, primer 결합단계에서는 59 ℃, 45sec, 신장단계에서는 72 ℃, 2min 1sec이었고 마지막으로 최종신장단계에서는 72 ℃, 5min이었다. PCR 산물은 1% 아가로즈 겔 전기영동을 통해서 결과를 확인하였다. 확인된 결과에 따라 목적 크기의 유전자에 맞게 겔을 잘라내어 FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen)를 이용하여 제공된 프로토콜을 통해 정제하였다.

<Table 1> Oligonucleotide primers used in PCR amplification of Protein Kinase C β1 gene of P. olivaceus (F, Forward; R, Reverse)

Name	Sequence
BamHI-PoPKCb-F	5'-CGC GGA TCC GAT GGC TGA CCC CAA CAG CGA
XhoI-PoPKCb1-R	5'-CCG CTC GAG TCA CTG GGT TGA GTG AGG GTA C

3. Ligation

Ligation 과정을 진행하기 전 정제한 sample과 ligation으로 사용될 vector인 pET-28a(+)를 제한효소를 통해 잘라주었다. pET-28a(+)는 multiple cloning site에 존재하는 제한효소 부위를 잘라내기 위해 사용된 제한효소는 BamHI (Enzynomics)과 XhoI (Enzynomics)이고 enzyme cutting 혼합물 구성요소는 정제한 PCR 산물 4 μl, BamHI 0.5 μl, XhoI 0.5 μl, 10x buffer 1 μl, D.W. 4 μl이었다. PCR 결과물과 vector 각각 5개의 튜브를 37 ℃, 3시간동안 반응을 진행하였다. 그 후, 반응된 산물만을 얻기 위해 FavorPrep™ GEL/PCR Purification Kit (Favorgen)를 이용하여 제공된 프로토콜을 통해 정제하였다. 정제가 완료된 plasmid와 목적 DNA를 T4 liagase (Promega)를 이용하여 ligation을 진행하였다. Ligation 혼합물 구성요소는 목적 DNA 3 μl, vector 2 μl, 2x buffer 5 μl, T4 ligase 1 μl, D.W. 4 μl이었다. Ligation 혼합물을 4 ℃에서 16시간 동안 반응시켰다.

4. Transformation

반응이 끝난 ligation 샘플을 *E. coli* BL21(DE3)에 형질전환(Transformation)하였다. 총 15 μl인 ligation 샘플을 *E. coli* BL21(DE3) 100 μl에 첨가하고 얼음에서 30분간 안정화를 진행하였다. 안정화가 진행된 후 42 ℃ waterbath에서 30초간 heatshock를 진행한 후 2분간 다시 얼음에서 안정화를 진행하였다. 마지막 안정화를 거친 후 LB배지 1 ml를 추가하고 37 ℃ 1시간 동안 배양하였다. 배양이 다 끝난 *E. coli* BL21(DE3)을 100 ug/ml kanamycin이 첨가된 LB plate에 도말 한 후 다시 37 ℃에서 16시간 동안 배양하였다.

5. Plasmid extraction & Sequencing

E. coli BL21(DE3)에 형질전환된 plasmid 서열을 확인하기 위해 FavorPrep™ Plasmid DNA Extraction Mini Kit (favorgen)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 plasmid의 추출을 진행하였다. 서열 확인을 위해 T7 terminator primer와 T7 primer를 서열 확인용 primer로 사용하였다. 그 후 plasmid를 sanger method를 통해 재조합 단백질이 될 서열을 확인하였다.

6. Purification

pET-28a(+) vector에 구축한 ORF서열이 만들어낸 아미노산 서열과 기존 PoPKCβ1의 아미노산 서열 간의 차이가 없음을 sanger method를 통해 확인이 된 형질전환 E. coli를 100 ug/ml kanamycin을 포함한 1 L LB배지에 배양시켰다. 사전배양된 10 ml의 형질전환된 E. coli를 배지에 첨가하였고, O.D600값이 0.6에 도달할 때까지 37℃ 배양기에서 배양시켰다. 배양된 세포는 초음파 처리를 진행하였고, 재조합 단백질은 Ni-NTA His•Bind® Resins (Novagen)를 이용하여 제공된 제작사의 실험 과정에 따라 친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 300 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate 와 10 mM imidazole으로 이루어진 binding buffer를 초음파 처리된 샘플과 혼합하여 컬럼에 통과시켰다. Resin에 부착되지 않은 단백질들은 300 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate, and 20 mM imidazole로 구성된 washing buffer를 통해서 제거해준 뒤 재조합 단백질은 300 mM NaCl, 50 mM sodium phosphate, and 250 mM imidazole로 구성된 elution buffer로 용출하였다. 용출단계는 초기 용출단계, 본 용출단계, 후기 용출단계로 나누어서 진행을 하였다. 초기 용출단계는 분당 1.0 ml 속도로 10분 동안 진행을 하였다. 다음 본 용출단계는 분당 0.7 ml 속도로 1분간 14단계로 나누어 용출을 진행을 하였다. 후기 용출단계는 분당 1.0 ml 속도로 10분 동안 진행을 하였다.

7. SDS-PAGE & Western-blot

PoPKCβ1의 재조합 단백질을 정제 시, 시간별 14단계 중 표적 단백질이 어느 단위에서 정제되어있는지 확인하기 위해서 SDS-PAGE과정을 진행하였다. 먼저 60 mM Tris (pH 6.8), 25% glycerol, 2% SDS, 14.4 mM 2- mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue로 구성된 시약을 정제된 단백질과 혼합하여 100 ℃에서 5분간 반응시킨 후 다시 4 ℃에서 5분간 안정화를 진행하였다. 5% stacking gel과 10% separating gel을 이용하여 단백질을 분리시켰다. 정제된 단백질의 확인을 위해서 coomassie brilliant blue R-250 (BYLABS)을 사용하여 전기영동이 끝난 separating gel을 염색시켰다. 예측한 크기에 부합하는 단백질이 염색한 separating gel을 통해 확인이 되면 western-blotting 진행을 하였다. Hoefer transblotting system (Pharmacia)을 이용하여 acrylamide gel을 통해 분리된 정제한 단백질을 Polyvinylidene Flouride transfer membrane (GVS)에 옮겼다. Membrane에 옮겨진 정제된 단백질을 고정시키기 위해 1x TBS-T (Tris-buffered saline -Tween)에 1% BSA (Bovine Serum Albumin)을 섞은 blocking buffer를 이용했다. Rabbit anti-6-His tag antibody (1:2000, Bentyl)과 goat anti-Rabbit lgG antibody (1:1000, Bentyl)를 1차 항체와 2차 항체로 사용을 하였고, BCIP (5-Bromo- 4-chloro-3-indolylphosphate) (Sigma)를 통해 염색하였다.

8. Activity Assay

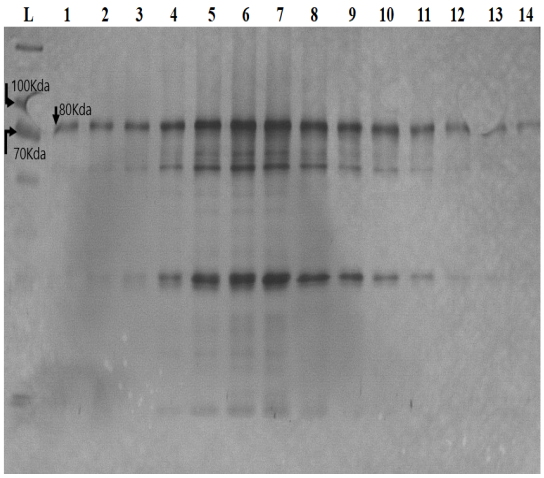
PoPKCβ1의 효소 활성을 측정하기 위해서 PKC Kinase Activity Kit (Enzo)를 이용하여 제조사에서 제공한 실험 과정에 따라 진행하였다. 효소 활성 측정은 반응 온도별, pH별, 재조합 단백질 농도별로 측정하였다. 먼저 온도는 10 ℃, 20 ℃, 30 ℃, 40 ℃, 50 ℃ 별로 효소 활성을 측정하였다. 반응 온도별 효소 활성 측정시에 pH는 PKC Kinase Activity Kit 내에 있는 buffer의 pH인 7.0을 기준으로 하였고, 재조합 단백질 농도는 20 ng으로 첨가하여 진행하였다. 반응 온도별 결과에 따라 최적 온도를 기준으로 pH별, 재조합 단백질 농도별로 실험을 진행했다. 또한, pH별 실험결과에 따라 최적 pH를 기준으로 재조합 단백질 농도별 실험을 진행했다. EPOCH2 microplate reader(BioTek)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도 값을 토대로 반응 온도별과 재조합 단백질 농도별은 ANOVA test를 진행하여 유의수준을 검정하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. PoPKCβ1 expression vector의 구축

먼저 His-tag을 가진 PoPKCβ1 재조합 단백질의 확보를 위해 대장균에서 발현시킬 PoPKCβ1 발현 벡터를 구축하고자, 넙치에서의 cDNA합성 및 PCR을 통해 얻은 유전자 단편을 pET-28a(+)의 muti cloning site에 존재하는 BamH1과 Xho1 인식 서열사이에 삽입시켜 발현벡터를 구축하였다. T7 terminator primer와 T7 primer를 이용하여 합성한 PoPKCβ1의 서열과 보고된 기존 PoPKCβ1과의 서열 차이를 분석하였다. 이 염기서열 분석을 통해 PoPKCβ1의 coding sequence의 서열이 PCR 과정상의 오류나 ligation 과정상의 오류로 인한 재조합 단백질의 아미노산 서열의 변화를 찾을 수 있다. 서열분석 결과 본 연구에 사용되어진 넙치 개체의 단일 염기 변화가 발견되었으나 PoPKCβ1의 아미노산 서열의 변화는 일으키지 않았다. 따라서 실험 수행 간 발생할 수 있는 오류는 본 실험 과정 간에서는 발생하지 않았다. 그리고 PoPKCβ1의 coding sequence 서열뿐만 아니라 PoPKCβ1의 종결코돈 삭제가 올바르게 이뤄졌다. 또한, 종결 코돈 삭제 후에도 3‘ 방향의 His-tag 서열의 frame shift가 발생하지 않았다. 이 결과를 통해 재조합 단백질 생산을 위한 PoPKCβ1의 서열을 확정 지었다.

[Fig 1.] Full nucleotide sequence and its deduced amino acid sequences of PoPKC β1



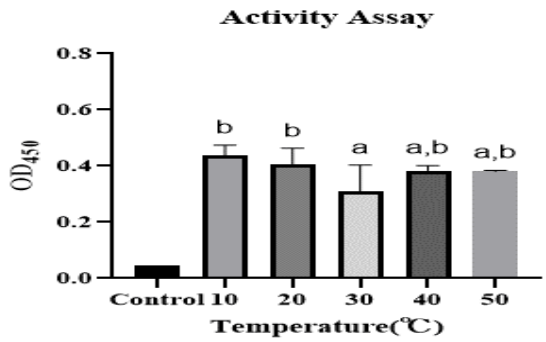
[Fig 2] Western blotting of recombinant protein synthesized in *E. coli* with PoPKCβ1 expression vector

2. Western blotting

PoPKCβ1의 재조합 단백질 정제 후 western blotting를 통해서 결과를 확인하였다[Fig 2]. 그 결과 PoPKCβ1의 분자량인 약 80kDa에서 항체에 의한 밴드를 확인할 수 있었다. 하지만 PoPKCβ1의 재조합 단백질만이 발견되어지지 않고 다른 크기의 단백질 밴드도 같이 발견되었다. 이는 His-tag을 이용하여 정제를 진행하였고, His-tag에 특이적인 1차 항체를 이용하여 실험을 수행하였다. His-tag은 일반 단백질에서도 흔히 발견될 수 있는 아미노산 서열이며 그에 특이적으로 사용하는 1차 항체는 목적 단백질 분해효소에 의한 목적 단백질의 분해 조각과 대장균 고유의 단백질에도 반응을 할 수 있다고 볼 수 있다. 그 결과 PoPKCβ1의 재조합 단백질의 밴드만이 아닌 다른 크기의 밴드 또한 발견되었다. 따라서 효소 활성 측정을 수행하기 위해서 비목적 단백질의농도가 낮고, PoPKCβ1의 재조합 단백질의 농도가 높은 정제 용출단계에서 시간별로 분획한 14단계 중 3단계의 샘플을 선택하였다.

3. Activity Assay

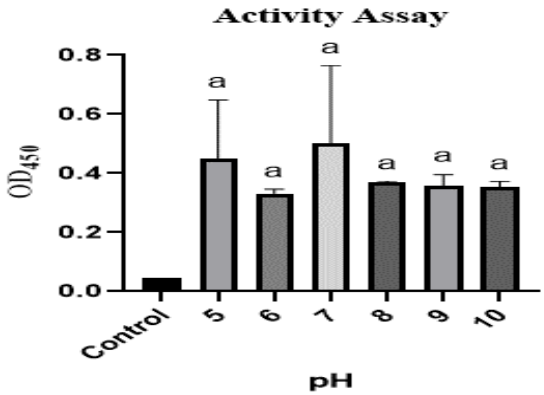
정제한 PoPKCβ1의 재조합 단백질의 효소 활성 측정은 반응 온도별, pH별, 재조합 단백질 농도별로 측정하였다[Fig 3]. 먼저 반응 온도별로 OD_{450}에서 흡광도를 측정한 결과 10 ℃에서의 평균값이 0.4363이었고, 20 ℃에서는 0.4063이었고, 30 ℃에서는 0.3087이었고, 40 ℃에서는 0.3837이었다. 마지막으로 50 ℃에서의 평균값은 0.3800으로 측정되었다. 가장 높은 평균값이 나온 온도는 10 ℃이었고, 가장 낮은 평균값이 나온 온도는 30 ℃이었다. 측정한 결과값의 유의수준을 판단하기 위해 ANOVA test를 진행한 결과 10 ℃와 20 ℃가 하나의 그룹으로 형성이 되었고, 30 ℃만이 하나의 그룹으로 형성이 되었고, 40 ℃와 50 ℃가 또 다른 그룹으로 형성이 되었다. 10 ℃와 20 ℃의 그룹은 30 ℃와는 완전히 다른 그룹으로 형성이 되었고, 40 ℃와 50 ℃는 10 ℃와 20 ℃의 그룹과 30 ℃의 연관성이 존재한다는 값이 도출되었다.



[Fig 3] Activity assay graph for each reaction temperature of *PoPKC*β1. The reaction temperature was set to 10 °C, 20 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, and absorbance was measured at OD450 after the reaction. As a result of performing an ANOVA test using the measured absorbance values, groups a and b were formed between temperatures with similar levels of activity.

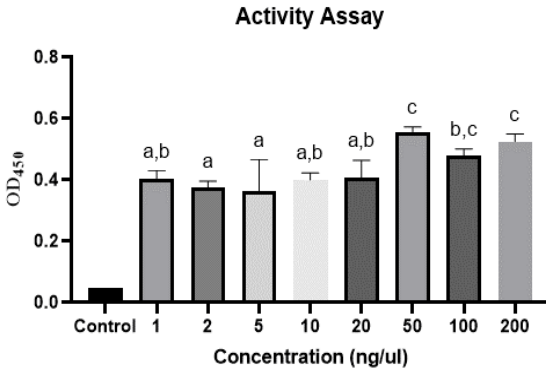
하지만 각 반응 온도별간의 p value가 모두 유의수준 0.05이하를 만족하지 못하였다. 따라서 반응 온도별 PoPKCβ1의 차이는 유의하지 못하다고 판단이 되었다. 이 실험결과에 따라 PoPKCβ1은 넓은 폭의 온도에서도 충분한 활성을 띈다고 판단이 된다. 포유류의 경우, 최적 활성 온도가 37 ℃으로 알려져있으며, 37 ℃를 전후로 감소하는 경향이 나타난다(Busto, Raul, et al., 1994; Micol et al., 1999). 특히, 최적 온도가 아닌 경우, 적은 온도 변화로도 큰 활성의 감소가 나타났다. 하지만 PoPKCβ1의 경우, 30 ℃에서 낮아지지만 온도에 따른 효소의 활성이 차이가 나지 않는다. 이러한 차이가 나타나는 이유로는 포유류와 어류의 체온조절 방식 때문으로 생각된다. 포유류는 혈액을 이용하여 체온의 급격한 변화를 막는 특징을 가지고 있지만 어류의 경우에는 해당 방법으로 체온의 조절이 불가하다. 이에 어류에서는 포유류보다 더 넓은 온도 범위에서 활성의 변화가 일어나지 않아야 PKC에 의한 신호전달이 원활하게 이루어질 수 있을 것이다. 특히, PKC가 생체 내에서 세포자살, 분화, 염증반응 등과 같은 세포 필수적인 기능을 수행한다는 점도 넙치에서 넓은 범위의 PKC 활성을 나타내는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다 (Chen et al., 2001; Kawakami et al., 2002; Newton, 1995; Wightman and Raetz, 1984). 따라서 다양한 온도 조건에서 활용이 가능할 것으로 판단된다.

다음으로 정제한 PoPKCβ1의 재조합 단백질의 효소 활성 측정을 pH별로 실행하였다([Fig 4]). 반응 온도별 결과에서 유의미한 값을 가지는 온도가 측정되지 않았기 때문에 넙치의 적정 생육 온도가 20 ℃ 내외이기 때문에 20 ℃에서 pH별 반응을 진행하였다. pH별 OD_{450}에서 흡광도를 측정한 결과 pH5에서의 평균값은 0.4507이었고, pH6에서의 평균값은 0.3317이었고, pH7에서의 평균값은 0.5003이었고, pH8에서의 평균값은 0.3713이었고, pH9에서의 평균값은 0.3587이었다. 마지막으로 pH10의 평균값은 0.3530이었다. 가장 높은 평균값이 나온 pH는 7이었고, 가장 낮은 평균값이 나온 pH는 6이었다. 측정한 결과값의 유의수준을 판단하기 위해 ANOVA test를 진행한 결과 모든 pH에서 유의수준을 만족하지 못하였다. 따라서 PoPKCβ1의 차이는 유의하지 않았으며 pH의 영향에 따라 효소 활성의 감소나 증가가 크게 나타나지 않는다고 판단이 되었다. 다만, 기존 20 ℃에서 진행하였던 효소 활성 측정 결과에서 평균값으로 0.4063였던 것에 비해 pH5와 pH7에서 0.4507과 0.5003으로 증가하였다. 따라서 활성을 위한 최적의 pH로 pH7을 결정하였다. 소의 PKC는 약 pH7에서 최고의 활성을 가지고 pH6과 pH7.5에서 활성이 그보다는 약한 것으로 알려져 있다(Caohuy et al., 2001). PoPKCβ1의 경우에도 비슷한 경향을 보이는 것으로 나타났다. 하지만 소에서는 그러한 차이가 통계적으로 유의미하게 나타났지만 PoPKCβ1에서는 유의미하지 않았다. 이러한 차이가 나타나는 이유도 온도와 유사하게 어류에서는 포유류에 비해 항상성을 유지하기 상대적으로 어렵기 때문으로 추측할 수 있다.



[Fig 4.] Activity assay graph for each reaction pH of *PoPKCβ1*. The reaction pH was set to 5, 6, 7, 8, 9, 10 and absorbance was measured at OD450 after the reaction. As a result of performing an ANOVA test using the measured absorbance values, groups a and b were formed between temperatures with similar levels of activity.

마지막으로 재조합 단백질 농도별로 정제한 PoPKCβ1의 재조합 단백질의 효소 활성 측정을 실행하였다 [Fig 5]. 반응 온도는 20 ℃, pH는 7에서 반응을 진행하였다. 재조합 단백질 농도별 OD450에서 흡광도를 측정한 결과 1 ng/μl에서의 평균값은 0.4023이었고, 2 ng/μl에서의 평균값은 0.3737이었고, 5ng/μl에서의 평균값은 0.3640이었고, 10 ng/μl에서의 평균값은 0.4000이었고, 20 ng/μl에서의 평균값은 0.4063이었고, 50 ng/μl에서의 평균값은 0.5573이었고 100 ng/μl에서의 평균값은 0.4800이었다. 마지막으로 200 ng/μl에서의 OD450 흡광도를 측정한 결과값의 평균은 0.5253이었다. 50 ng/μl에서 가장 높은 흡광도 평균값이 측정되었고, 5 ng/μl에서 가장 낮은 흡광도 평균값이 측정되었다. 측정한 결과값의 유의수준을 판단하기 위해 ANOVA test를 진행한 결과 50 ng/μl에서의 p value는 해당 농도보다 낮은 1 ng/μl, 2 ng/μl, 5 ng/μl, 10 ng/μl에서 유의수준 0.05를 만족하였다. 하지만 50 ng/μl보다 높은 100 ng/μl, 200 ng/μl에서는 유의미한 값을 나타내지 않았다. 그림 5에 따른 그래프를 보았을 때 50 ng/μl 이상의 농도에서의 그룹과 50 ng/μl 미만의 농도에서의 그룹이 확연하게 차이가 나타남을 판단할 수 있었다. 따라서 50 ng/μl에서 가장 높은 활성을 가졌고 이보다 적은 농도에서는 활성수준이 부족하다고 판단이 되어진다. 또한, 이전 최적 조건이었던 20 ℃와 pH7에서의 0.5003의 값을 나타내었지만 50 ng/μl 이상의 재조합 단백질 농도에서는 이보다 높은 값을 가졌다는 사실도 이를 뒷받침한다. 다만, 50 ng/μl이상 농도 간의 유의미한 p value가 나타나지 않은 것은 50 ng/μl 이상으로 농도가 높아지더라도 기질의 고갈 등의 이유로 농도의 영향이 적다고 판단이 되었다.



[Fig 5.] Activity assay graph for each concentration of *PoPKC*β1. The concentration was set to 1 ng/μl, 2 ng/μl, 5 ng/μl, 10 ng/μl, 20 ng/μl, 50 ng/μl, 100 ng/μl, 200 ng/μl, and absorbance was measured at OD450 after the reaction. As a result of performing an ANOVA test using the measured absorbance values, groups a and b were formed between temperatures with similar levels of activity.

Ⅳ. 결 론

PoPKCβ1 발현 벡터를 대장균에서 발현시켜조합 단백질을 합성하고 이의 활성도를 조사하였다. 이 재조합 단백질은 넙치의 적정 생육 온도인 15~25 ℃에서 비교적 높은 활성을 보였으나, 전제적으로 광범위한 온도와 pH 영역에서 충분한 활성도를 가진다는 것을 알 수 있었다. 이러한 경향은 포유류와 같은 항온동물과는 달리 어류에서는 상대적으로 온도나 pH와 같은 것이 환경에 영향을 많이 받기 때문에 광범위한 조건에서도 활성의 차이가 없는 것이 PKC에 의한 신호전달 체계에 유리하다고 판단된다. 따라서 본 연구를 통해 밝혀진 PoPKCβ1 단백질의 활성도에 대한 정보가 앞으로 진행될 PKC 단백질 관련 연구에 기초자료로써 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

References

Busto R, Globus MYT, Neary JT and Ginsberg M D(1994). Regional alterations of protein kinase C activity following transient cerebral ischemia:

effects of intraischemic brain temperature modulation. Journal of neurochemistry, 63(3), 1095~1103.
https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63031095.x

Caohuy H and Pollard HB(2001). Activation of Annexin 7 by Protein Kinase C in Vitroand in Vivo. Journal of Biological Chemistry, 276(16), 12813~12821.
https://doi.org/10.1074/jbc.M008482200

Chen L, Haider K, Ponda M, Cariappa A, Rowitch D and Pillai S(2001). *Protein Kinase C-associated Kinase (PKK), a Novel Membrane-associated, Ankyrin Repeat-containing Protein Kinase*. Journal of Biological Chemistry, 276(24), 21737~21744.
https://doi.org/10.1074/jbc.M008069200

Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, Konicek BW, Lynch RL, Bailey SN, Banks C, Capen A, Goode R, Lewis JE, Sams L, Huss KL, Campbell RM, Iversen PW, Neubauer BL, Brown TJ, Musib L, Geeganage S and Thornton D(2005). *The protein kinase Cβ-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts*. Cancer Research, 65(16), 7462~7469.
https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0071

Hirai T and Chida K(2003). *Protein kinase Cζ (PKC ζ): Activation mechanisms and cellular functions*. In Journal of Biochemistry Vol. 133, Issue 1, 1~7.
https://doi.org/10.1093/jb/mvg017

Kawakami T, Kawakami Y and Kitaura J(2002). Protein kinase Cβ (PKCβ): Nomal functions and dieases. The Journal of Biochemistry, 132(5), 677~682.
https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003273

Kim MS, Seo JS, Ahn SJ, Kim NY, Je JE, Sung JH, Lee HH, and Chung JK(2008). *Duplication of phospholipase C-δ gene family in fish genomes*. Genomics, 92(5), 366~371.
https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.07.012

Kim JU and Jung SJ(2014). *cDNA microarray analysis of viral hemorrhagic septicemia infected olive flounder, Paralichthys olivaceus: immune gene expression at different water temperature*. Journal of Fish Pathology, 27(1), 1~9.
https://doi.org/10.7847/jfp.2014.27.1.001

KOSIS(2021) *The current fish culture area by city & province, ward &county, by culture type, by species*.
https://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=101&tblId=DT_1EZ0008&vw_cd=MT_ZTITLE&list_id=K2_4&seqNo=&lang_mode=ko&language=kor&obj_var_id=&itm_id=&conn_path=MT_ZTITLE

Kwon MG and Jung SH(2012). *Comparative Study of Pathogenicity Following Single or Coinfection with Edwardsiella tarda and Streptococcus iniae in Oliver flounder, Paralichthys olivaceus*, Journal of Fisheries and Marine Sciences Education, 24(4), 591~601
https://doi.org/10.13000/JFMSE.2012.24.4.591

Lim Pek Siew, Christopher Ray, and Sudha Rao. (2015). *Protein Kinase C in the Immune System : From Signalling to Chromatin Regulation*. Immunology 146(4):508~522.
https://doi.org/10.1111/imm.12510

Micol V, Sánchez-Piñera P, Villalaín J, de Godos A and Gómez-Fernández JC(1999). Correlation between protein kinase C α activity and membrane phase behavior. Biophysical journal, 76(2), 916~927.
https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77255-3

Newton Alexandra C(1995). *Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation*. The Journal of Biological Chemistry 270(48):28495~98.
https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28495

Nguyen HT, Kanai K, and Yoshikoshi K(2002). *Ecological investigation of Streptococcus iniae in cultured Japanese flounder (Paralichthys olivaceus) using selective isolation procedures*. Aquaculture, 205, 7~17
https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00667-6

Wightman PD and Raetz CR(1984). The activation of protein kinase C by biologically active lipid moieties of lipopolysaccharide. Journal of Biological Chemistry, 259(16), 10048-10052.
https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)90925-7

• Received : 21 January, 2022
• Revised : 21 February, 2022
• Accepted : 25 February, 2022