

# 제주산 왕노랑 초파리 (*Drosophila immigrans*)에서 Heat Shock Proteins (hsps)의 발현양상에 관한 연구

오 문 유 · 김 세 재

## Study on the Expression Patterns of Heat Shock Proteins (hsps) in *Drosophila immigrans*

*Moon-You Oh, and Se-Jae Kim*

### Summary

The expression patterns of heat shock proteins(hsps) were studied in the larval tissues and adults of *Drosophila immigrans*.

1. The synthesis of hsps in *Drosophila immigrans* was induced the most strongly in response to heat shock of 33°C.
2. The hsps induced by heat shock were divided largely into three groups, namely hsp83, hsp70, and small molecular weight group(hsp27, hsp26, hsp23, and hsp22) according to their molecular weights.
3. The induction of hsps was first detected at the heat shock during 10 min, was the most active at the heat shock during 30 min.
4. The patterns of hsps synthesis in various larval tissues were very similar to each other, especially hsp23 was synthesized during normal development without heat shock.
5. Since the expression patterns of small molecular weight hsps(hsp27, hsp26, hsp23, hsp22) were remarkably different according to aging process of adults, these hsps may be involved in aging process.

---

\* 본 연구는 1989年度 濟州大學校 自體學術研究費의 補助에 依하여 이루어진 것임.

## I. 서 론

생물체가 정상적인 발생 및 성장을 하기 위해서는 적합한 외부환경을 필요로 하는데, 온도는 발생에 영향을 미치는 대표적인 요인이다. 박테리아나 효모에서부터 고등생물의 곤충 및 사람에 이르기까지 모든 생명체는 온열처리를 받거나 외부자극을 받으면, 그 이전에는 불활성한 상태이거나 아주작은 활성도를 유지하던 일부 한정된 유전자들이 갑자기 강한 활성을 나타내는 현상을 볼 수 있다. 온열처리에 의한 유전자의 발현산물은 온열처리가 가해지는 동안 활발히 합성되어 축적됨으로서 결국 세포내 주요 구성분으로 나타나게 되는데, 이들을 heat shock proteins(hsps)이라 한다(Southgate *et al.*, 1985; Lindquest, 1980, 1986).

배양되는 노랑 초파리(*Drosophila melanogaster*)의 침샘(salivary gland)에 온열처리(37°C)를 하거나 dinitrophenol, sodium salicylate와 같은 화합물을 처리하였을 때 새로운 RNA 합성이 왕성한 puff가 유도되며(Ritossa, 1964a, 1964b), 이 부위에서 합성된 mRNA가 해독되어 heat shock proteins(hsps)이 합성된다(Tissieres *et al.*, 1974; Lewis *et al.*, 1975; McKenzie *et al.*, 1975; Spradring *et al.*, 1977).

*Drosophila melanogaster*의 hsp 유전자는 세 그룹으로 나누어진다. 첫째 그룹은 hsp70을 발현하는 다 유전자 족(multigene family)과 hsp68을 발현하는 유전자들로 구성되어 있다(Holmgren *et al.*, 1979;). 두번째 그

룹은 hsp27, hsp26, hsp23 및 hsp22를 만드는 4개의 작은 유전자들로, 서로 한 덩어리를 이루어서 존재한다(Petersen *et al.*, 1979; Corces *et al.*, 1980; Craig and McCarthy, 1980; Ingoria and Craig, 1981; Southgate *et al.*, 1983;). 세번째 그룹은 hsp83 유전자로 분자량이 가장 큰 hsp 83을 발현시킨다(Holmgren *et al.*, 1981; Hackett and Lis, 1983).

*Drosophila melanogaster*에서 hsps의 합성은 전사와 해독 수준 모두에서 조절된다(Storti *et al.*, 1980). Hsp 유전자들에 대한 활발한 연구에도 불구하고 이들의 기능은 확실히 알려져 있지 않다. Hsps는 온열처리에 의해 급속히 유도되고, anoxia나 산화적 과정을 저해하는 화합물에 의해서도 유도되기 때문에 항상성을 유지하는 기능, 즉 외부자극의 독성효과로부터 세포를 보호한다는 보고도 있다(Ashburner and Bonner, 1979).

Hsps는 정상적인 온도에서도 합성된다. Hsp83은 정상온도에서 배양되는 세포에서도 계속적으로 합성되며(Lindquest, 1980), hsp 70은 미소한 양으로 검출된다(Velazquez *et al.*, 1983). 그리고 분자량이 작은 hsps의 mRNA는 ecdysone에 의해 합성되는데 특히, hsp23는 3령 유충후기에 체내의 ecdysone 농도가 높아질 때 많은 양이 합성된다(Ireland and Berger, 1982; Cheney and Shearn, 1983). Hsps가 정상조건에서도 합성되기 때문에 이들은 온열처리 시에 기능을 하는 외에 정상발생에서도 실질적 기능

을 한다고 할 수 있다. Fleming *et al.* (1988)은 젊은 초파리와 늙은 초파리는 온열처리했을 때 합성되는 hsp의 양상이 서로 다르기 때문에 노화와도 관계가 있다고 하였다.

*Drosophila melanogaster*의 hsp에 대한 연구는 매우 활발히 진행되어 왔지만 *Drosophila* 속의 다른 종들에 대한 정보는 매우 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 제주도 자연집단에서 채집된 *Drosophila immigrans*(왕노랑 초파리)의 3령 유충의 조직들과 성체에서 hsp의 발현 양상을 연구하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1) 초파리 사육

본 연구에 이용된 제주도 왕노랑 초파리(*Drosophila immigrans*)는 제주도 자연집단에서 1988년 6월에 채집되었다. 초파리는 Lewis(1960)의 표준배지(5.5% dextrane, 2.5% sucrose, 8.3% cornmeal, 1.5% yeast, 0.06% propionic acid, and 0.04% agar)가 든 유리병에서 25°C와 70~80% 습도가 유지되는 항온실에서 배양하였다.

### 2) 조직의 절취

초파리의 3령유충을 buffered saline (0.01M MOPS, pH 7.0, 0.01M NaCl, 0.05M KCl, 0.00125M CaCl<sub>2</sub> and 0.0006M MgCl<sub>2</sub>)으로 여러번 씻은 후 해부 현미경 하에서 50 $\mu$ l의 buffered saline이 든 오목슬라

이드에서 침샘, 성체원기, 지방조직을 절취하여 microtube에 모았다.

### 3) 온열처리 및 조직 단백질의 [<sup>35</sup>S]-methionine 표지

유충의 각 조직의 온열처리는 조직이 들어있는 microtube를 처리될 온도로 미리 조정된 항온수조에 30분간 담가서 실시하였다. 온열처리가 끝난 조직은 25°C로 옮긴 후 [<sup>35</sup>S]-methionine(Amersham)이 0.2mCi/ml의 농도로 함유된 buffered saline 속에서 30분간 배양한 후 차가운 10% trichloroacetic acid를 20분간 처리해서 표지를 중지시키고 95% ethanol로 두번 씻은 후 진공 건조시켰다. 건조된 시료는 사용할 때까지 -20°C에 보관하였다.

성체의 온열처리는 intact 성체를 34°C로 유지된 항온기에서 40분간 배양한 후, 30분 동안 [<sup>35</sup>S]-methionine을 함유한 sucrose 용액으로 포화된 거름종이에 노출시켜 표지하였다.

### 4) 전기영동 및 단백질의 검출

일차원 전기영동(SDS-gradient polyacrylamide gel electrophoresis)은 Laemmli (1970)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 영하 20°C에 보관하였던 시료에 SDS sample buffer (0.0625M Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 10%(w/v) glycerol)를 넣고 5분간 가열한 후 2.5%가 되도록 2-mercaptoethanol을 첨가하였다. 단백질은 10~15% gradient SDS-polyacrylamide gel에서 분리하였고,

Laskey and Mills(1975)의 fluorography 방법으로 검출하였다.

이차원 전기영동은 O'Farrell(1975)의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 단백질은 일차로 등전점 전기영동으로 분리하였고, 이차로 12.5%의 SDS-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리하였다. 등전점 전기영동은 4% polyacrylamide, 9.8M urea, 2% Nonidet P-40 및 2% Ampholine(LKB)로 구성된 gel이 들어있는 15cm×3mm의 원통 유리관에서 실시하였다. Ampholine은 pH 5-7과 pH 3.5-10을 4:1로 혼합하여 대략 pH 5에서 7의 구배를 갖도록 하였다. 등전점 전기영동이 끝난 gel은 equilibrium buffer (2.3% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.0625M Tris-HCl, pH 6.8)에 2시간 동안 평형화시킨 후 곧 바로 이차원 전기영동을 실시하거나 -70°C에 보관하였다. 이차원 전기영동이 끝난 gel의 fluorography는 Laskey and Mills(1975)의 방법으로 수행하였다. 필요에 따라서 단백질은 Oakley *et al.* (1980)의 방법으로 silver staining하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 온도별에 따른 단백질 합성변화

왕노랑 초파리(*Drosophila immigrans*)의 침샘조직을 여러 온도에서 [<sup>35</sup>S]methionine으로 표지했을 때 합성된 단백질 양상은 다

양하였다(Fig. 1A). 정상 온도 조건(25°C)에서는 methionine이 많은 세포성 단백질에 표지되지만, 온도가 상승함에 따라 특징적인 heat shock proteins(hsps)의 합성은 왕성한 반면 기존의 세포성 단백질의 합성은 현저히 감소되었다. 분자량이 83,000인 hsp83은 28°C 조건에서 합성이 가장 왕성하게 진행되지만 정상온도 조건에서부터 36°C까지 이르는 광범위한 온도 범위에서 꾸준히 합성되었다. 분자량이 작은 그룹인 hsps는 좁은 온도범위에서 합성되는 양상을 보였다. 특히 hsp27과 hsp23은 28°C와 30°C에서 가장 왕성하게 합성되었고 36°C에서는 오히려 이들의 합성이 감소되었다. hsp70은 가장 많은 양으로 합성되는 단백질로서 33°C에서 가장 왕성한 합성 양상을 보였다. 만일에 Fig. 1의 fluorogram을 더 오래동안 노출시키면 소수의 다른 hsps가 검출됨을 볼 수 있다. 따라서 온열처리에 반응해서 합성되는 hsps의 정확한 수는 결정하지 않았다(Lindquist, 1980). 또한 40°C 조건에서는 methionine이 단백질에 표지되지 않기 때문에 이 조건에서는 세포들이 치사되는 것으로 사료된다.

노랑 초파리(*Drosophila melanogaster*)의 경우 hsps의 합성은 37°C 조건에서 왕성히 유도된다(Fig. 1B). 반면에 왕노랑 초파리의 침샘에서는 33°C의 온도조건에서 가장 왕성하게 hsps가 유도되었다. 이런 사실로 보아 왕노랑 초파리가 노랑 초파리보다 온도에 더 민감한 것으로 사료되었다. *Drosophila*에 대한 hsps연구에 의하면 종내 혹은 종간에서 hsps들은 사소한 분자량과 등전점의 차

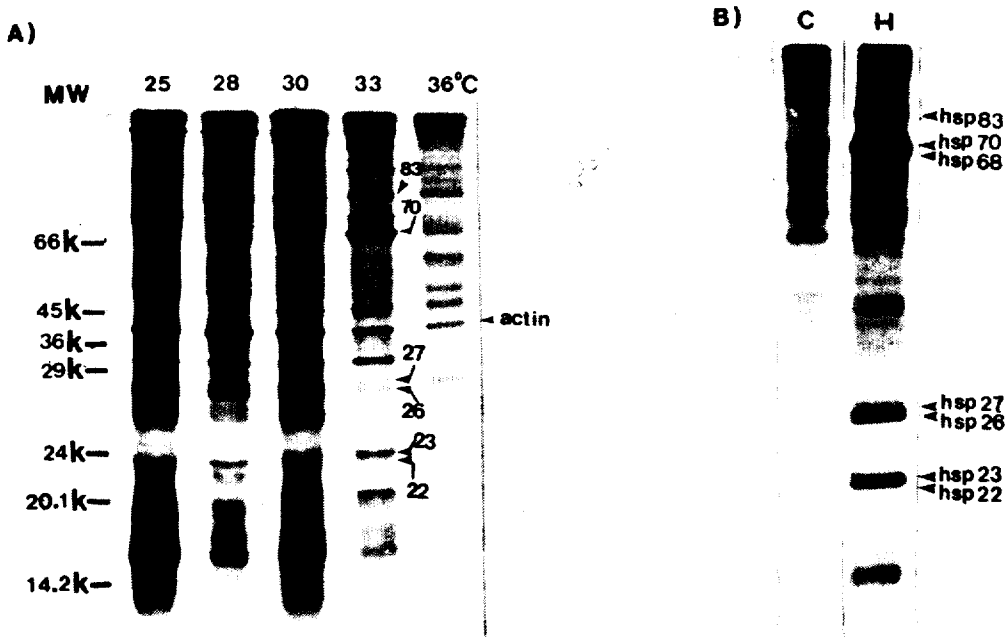


Fig. 1. (A) Distribution of *Drosophila immigrans* proteins labeled with [<sup>35</sup>S]methionine at various temperatures. The salivary glands (5 pairs) were dissected from the late third-instar larvae, heat shocked at the indicated temperatures for 30 min, and then labeled with [<sup>35</sup>S]methionine for 40 min. TCA-precipitable proteins were separated on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Labeled proteins indicated visualized by fluorography. The apparent molecular weight of the heat shock proteins (hsps) are indicated by arrows. (B) Fluorography of SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of heat shock proteins (hsps) of *Drosophila melanogaster*. The imaginal wing discs were dissected from the third-instar larvae, heat shocked for 30 min at 37°C, and then labeled with [<sup>35</sup>S]methionine. (C) control, (H) heat shocked.

이가 존재한다(Buzin and Patersen, 1982; Sinibaldi and Storti, 1982). 왕노랑 초파리의 hsp를 노랑 초파리의 hsp와 비교할 때 이러한 차이점은 있지만 크게 3개의 hsp 그룹으로 나누어진다는 점에서 매우 유사하였다.

### 온열처리 시간에 따른 단백질 합성변화

온열처리 시간경과에 따라서 유도되는 heat shock proteins(hsps)의 합성양상을 조사하기 위해서 34°C 조건에서 침샘조직을 배양하면서 10분 간격으로 [<sup>35</sup>S]methionine 으로 pulse labelling하였다(Fig. 2). 모든 hsp, 즉 hsp83, hsp70, hsp68, hsp27, hsp26, hsp23, 그리고 hsp22는 10분 동안의 온열처리에서 합성이 유도되기 시작하였고, 30분 동안의 온열처리에서 모든 hsp들이 가장 왕성하게 합성되었다. Hsps들의 합성의 유도는 30분부터 60분까지 정상상태(steady state)를 보였다. 본 결과는 노랑 초파리의 cell lines에서 보고된 Lindquist(1980)의 연구와 잘 일치하고 있다.

### 유충조직별에 따른 hsp 합성

3령유충에서 분리된 침샘조직(salivary glands), 성체원기(imaginal discs), 그리고 지방조직(fat bodies)에서 온열처리에 따른 hsp의 발현양상을 2차원 전기영동법으로 분석하였다(Fig. 3). 각 조직에 특이한 많은 세포성 단백질의 질적인 차이에도 불구하고 조직간의 hsp의 발현의 차이는 없었다. 그

러나 hsp83과 hsp70의 합성은 모든조직에서 동일한 양으로 합성되지만, 분자량이 작은 hsp 그룹, 즉 hsp27, hsp26, hsp23, 그리고 hsp22의 합성 양상에서 조직간에 양적인 차이를 보였다. 특히 성체원기에서는 hsp23이 정상조건에서도 합성되었다. 이것은 3령 유충말기에 체내의 ecdysone농도가 높아지는 현상과 관계가 있는 것으로 사료된다. 노랑 초파리의 3령 유충의 성체날개원기는 정상 발생단계에서도 hsp23을 합성한다(Cheaney and Shearn, 1983; Ireland and Berger, 1982).

### 노화에 따른 hsp 합성

왕노랑 초파리 성체의 노화과정에 따른 hsp의 발현양상의 변화를 2차원 전기영동법으로 분석하였다(Fig. 4). 노화에 따라서 많은 세포성 단백질 합성양상이 변화할 뿐만 아니라 hsp의 발현의 차이도 관찰되었다. 특히 분자량이 작은 그룹의 hsp합성 양상에 현격한 차이가 있었다. 이는 Fleming *et al.*, (1988)의 노랑 초파리에서 보고한 결과와 부합된다. 비록 노화 과정 자체는 잘 이해가 되지 않는 복잡한 과정이지만 이 과정은 유전자 발현에서의 상당한 질적인 변화를 동반한다는 것을 말해준다.

왕노랑 초파리는 노랑 초파리와 분류학적으로 관계가 먼 그룹에 속하지만, 온열처리에 반응해서 합성되는 hsp의 그룹은 여러 면에서 서로 매우 유사하였다. Hsp에 대한 광범위한 연구에도 불구하고 이들의 기능에 대해서는 확실히 알려져 있지 않다. 하지만

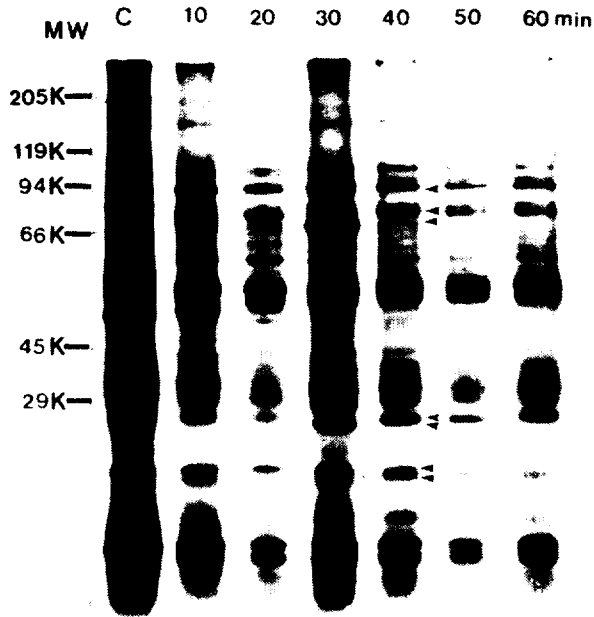


Fig. 2. Induction of heat shock proteins (hsps). The salivary glands were shifted to 34°C. Proteins were monitored by the addition of [<sup>35</sup>S]methionine to individual aliquots in 10-min consecutive intervals. The first lane (donated C) were labeled at 25°C and served as a control for the pattern of protein synthesis at normal condition.

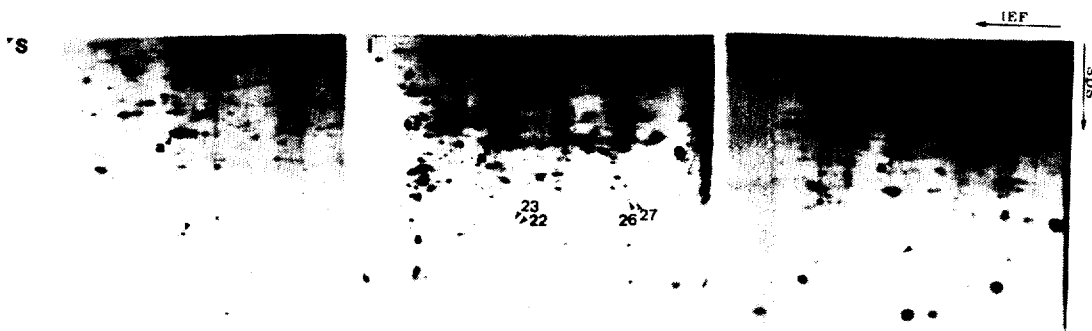


Fig. 3. Proteins synthesised by *Drosophila immigrans* under heat-shocked condition. The tissues were labeled with 20  $\mu$ Ci [ $^{35}$ S]methionine for 40 min at 25°C. Samples were solubilized and proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis, followed by fluorography. (S) Salivary glands, (I) Imaginal discs (F) Fat body. Arrow A, actin(Mr 41,000; pI 5.3); arrow heads indicate the low molecular weight heat shock polypeptides that are expressed in each tissues.



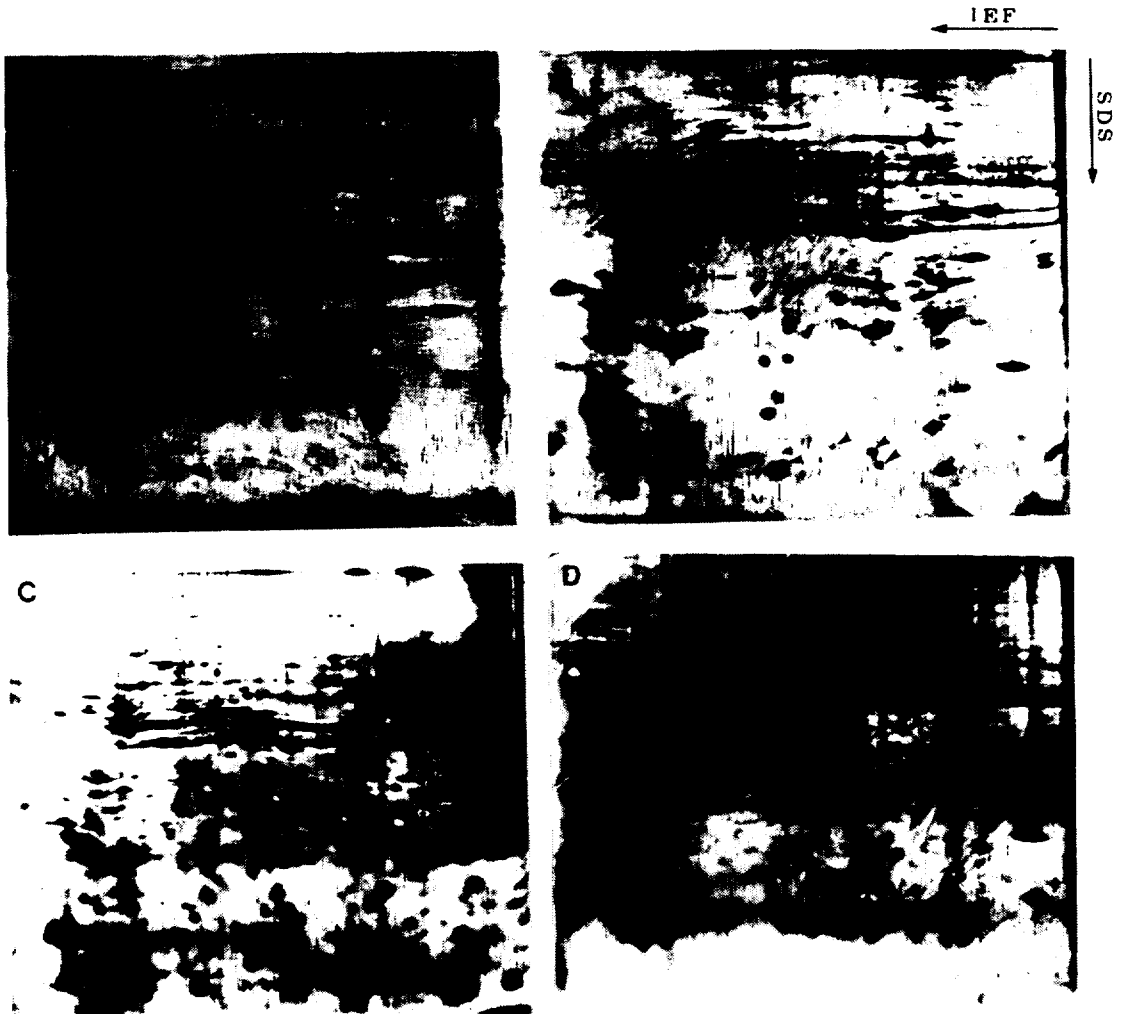


Fig. 4. Proteins synthesized by adult *Drosophila immigrans* under heat-shocked condition. Intact adult flies were heat shocked at 34°C for 30 min, solubilized and proteins were separated by two-dimensional gel electrophoresis, followed by silver staining. (A) 1-day-old flies, (B) 7-day-old flies, (C) 14-day-old flies, (D) 23-day-old flies. Arrow heads indicate the heat shock proteins (hsps) that are expressed in each age groups.

hsps는 외부 stress에 세포가 생존할 수 있는 저항성을 부여해 주는 것은 타당한 것 같다 (Lindquest, 1986; Berger and Woodward, 1983). 특히 노화과정에 따라서 분자량이 작은 hsps들의 발현양상에 차이가 있는 점으로 보아 이들이 직·간접적으로 어떤 기능을 담당할 것으로 사료된다. 이를 위해서는 왕노랑 초파리의 hsps발현에 대한 더 진전된 분자 생물학적 연구가 요구된다.

#### IV. 적 요

제주산 왕노랑 초파리(*Drosophila immigrans*)의 유충조직과 성체에서 heat shock proteins(hsps)의 발현양상을 연구하였다.

1. 왕노랑 초파리에서 hsps의 합성은 33°C

의 온열처리로 가장 왕성하게 유도되었다.

2. 온열처리로 유도된 hsps는 크게 3개의 그룹, 즉 hsp80, hsp70, 그리고 분자량이 작은 hsps 그룹(hsp27, hsp26, hsp23, hsp22) 등이 검출되었다.

3. Hsps의 합성은 10분간의 온열처리로 유도되기 시작하여, 30분 동안의 온열처리에서 가장 왕성하였다.

4. 유충의 각 조직에서의 hsps의 합성양상은 매우 유사하였고, 특히 hsp23은 온열처리를 하지 않은 정상발생조건에서도 합성되었다.

5. 분자량이 작은 그룹의 hsps는 성체의 노화과정에 따라서 다른 발현 양상을 보이므로 이들은 직·간접적으로 노화과정과 연관이 있을 것으로 추정된다.

## V. 참고문헌

- Ashbuner, M. and J.J. Bonner, 1979. The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17 : 241-254.
- Berger, E.M. and M.P. Woodward, 1983. Small heat shock proteins in *Drosophila* may confer thermal tolerance. *Exp. Cell Res.* 147 : 437-442.
- Buzin, C.H. and N.S. Petersen, 1982. A Comparison of the multiple *Drosophila* heat shock proteins in cell lines and larval salivary glands by two-dimensional gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 158 : 181-201.
- Cheney, C.C. and A. Shearn, 1983. Developmental regulation of *Drosophila* disc proteins : Synthesis of a heat shock protein under non-heat shock condition. *Dev. Biol.* 95 : 325-330.
- Corces, V., R. Holmgren, R. Freund, R. Morimoto, and M. Meselson, 1980. Four heat shock proteins of *Drosophila melanogaster* coded within a 12 kilobases region in chromosome subdivision 67B. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 77 : 5390-5393.
- Craig, E.A. and B.J. McCarthy, 1980. Four *Drosophila* heat shock genes at 67B : Characterization of recombinant plasmids. *Nucleic Acids Res.* 9 : 1627-1642.
- Fleming, J.E., J.K. Walton, R. Dubitsky, and K.G. Bensch, 1988. Aging results in a unusual expression of *Drosophila* heat shock proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 4099-4103.
- Hackett, R.W. and J.T. Lis, 1983. Localization of the hsp83 transcript within a 3292 nucleotide sequence from the 63B heat shock locus of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 11 : 7011-7030.
- Holmgren, R., V. Corces, R. Morimoto, R. Blackman, and M. Meselson, 1981. Sequence homologies in the 5' regions of four *Drosophila* heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 : 3775-3778.
- Holmgren, R.K., Livak, R. Morimoto, R. Freund, and M. Meselson, 1979. Studies of cloned sequences from four *Drosophila* heat shock loci. *Cell* 18 : 1359-1370.
- Ingolia, T.B. and E.A. Craig, 1981. Primary sequence of the 5' flanking

- region of the *Drosophila* heat shock genes in chromosome subdivision 67B. *Nucleic Acids Res.* 9 : 1627-1642.
- Ireland, R.C. and E.M. Berger, 1982. Synthesis of low molecular weight heat shock peptides stimulated ecdysterone in a cultured *Drosophila* cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 : 2079-2083.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227 : 680-685.
- Laskey, R.A. and A.D. Mills, 1975. Quantitative film detection of <sup>3</sup>H and <sup>14</sup>C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* 56 : 375-381.
- Lindquest, S., 1986. The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55 : 1151-1191.
- Lewis, E.B., 1960. A new standard food medium. *Dros. Inf. Ser.* 34 : 117-118.
- Lewis, M.J., P. Helmsing, and A. Ashbuner, 1975. Parallel changes in puffing activity and patterns of protein synthesis in salivary glands of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 : 3604-3608.
- Lindquest, S., 1980. Varying pattern of protein synthesis in *Drosophila* during heat shock : Implication for regulation. *Dev. Biol.* 77 : 463-479.
- McKenzie, S.L., S. Henikoff, and M. Meselson, 1975. Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 : 1117-1121.
- Mirault, M-E., M. Goldshmidt-Clermont, E. Moran, P.A. Arrigo, and A. Tissieres, 1978. The effect of heat shock on gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Cold Spring Harbor Sym. Quant. Biol.* 43 : 819-827.
- Oakley, B.R., D.R. Kirsh, and N.R. Morris, 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detection proteins in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 105 : 361-363.
- O'Farrell, P.H., 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250 : 4007-4021.
- Ritossa, F.M., 1964a. Experimental activation of specific loci in polytene chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 35 : 601-607.

- Ritossa, F.M., 1964b. Behavior of RNA and DNA synthesis at the puff level in salivary gland chromosomes of *Drosophila*. *Exp. Cell Res.* 36 : 515-523.
- Sinibaldi, R.M. and R.V. Storti, 1982. One- and two-dimensional polyacrylamide gel analysis of the heat shock protein of the *virilis* group of *Drosophila*. *Biochem. Genet.* 20 : 791-807.
- Southgate, R., A. Ayme, and R. Voellmy, 1983. Nucleotide sequence analysis of the *Drosophila* small heat shock gene cluster at locus 67B. *J. Mol. Biol.* 165 : 35-37.
- Southgate, R., M-E. Mirault, A. Ayme, and A. Tissieres, 1985. Organization and induction of heat shock genes. In: *Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress* (B.G. Atkinson and D. Walden, eds). Academic Press, New York, pp. 3-33.
- Spredling, A., M.L. Pardue, and S. Pennam, 1977. Messenger RNA in heat-shocked *Drosophila* cells. *J. Mol. Biol.* 109 : 559-587.
- Tissieres, A., H.K. Mitchell, and U.M. Trecy, 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84 : 389-398.
- Velazquez, J.M.S. Sonoda, G. Bugaisky, and S. Lindquest, 1983. Is the major *Drosophila* heat shock protein present in cell that have not been heat shocked? *J. Cell Biol.* 96 : 286-290.