

초고온 archaeon인 *Thermococcus profundus*에서 P93 복합체의 분리 및 구조적 특성

이미홍, 김숙경, 윤영근, 박성철, 박정동, 정강원*
경상대학교 자연과학대학 생명과학부 생화학과

Purification and Structural Characterization of P93 Complex from Hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus profundus*

Mi-Hong Lee, Suk Kyoung Kim, Young-Gun Yun,
Seong-Cheol Park, Jeong-Dong Bahk and Gang-Won Cheong*
Department of Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju, 660-701, Korea
(Received April 8, 2000)

ABSTRACT

An unusually large protein complex was found in the cytosol of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*. The purified protein was shown to be a homomultimer of 93 kDa subunit (P93 complex). The complex is extremely heat stable. During 12 hrs incubation with SDS (final concentration 1%) at 85°C, no changed structure could be observed. Electron image analysis of negatively stained showed that the complex has a single, stable characteristic view and a well-preserved core with threefold rotational symmetry. The periphery of the assembly is composed of a nebulous, possibly flexible, component. Based on the projected structure suggest the P93 complex from *T. profundus* is composed 24 homomultimer.

Key words: Electron Microscopy, Heat Stable, Hyperthermophilic Archaeon, Image Processing, *Thermococcus*

서 론

최근 생명과학분야에서 가장 중요하게 인식되고 있는 문제중 하나인 단백질 열안정성, 특히 높은 온도(80~100°C)에서 안정성을 결정하는 메커니즘을 이해하기 위해 세계 여러 곳에서 경쟁적으로 연구를 수

행하고 있다(Jaenicke, 1991). 단백질은 50°C 이상에서 peptide 결합의 분해, disulfide 결합의 파괴 등으로 변성되지만, 내열성 단백질은 이보다 높은 온도(110°C)에서조차 안정한 형태를 유지하고 있다(최근 review: Admas, 1993). 이와 같은 내열성 단백질은 최근 10여년간 초고온 생물체(hyperthermophile)가 분리되면서 발전되기 시작하였다. 100°C 이상에서 성장하는 생물

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 연구비(KRF-98-015-D00242) 지원에 의하여 연구되었음.

* Correspondence should be addressed to Dr. Gang-Won Cheong, Department of Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea. Ph.: (0591) 751-5962, FAX: (0591) 752-7062, E-mail: gwcheong@nongae.gsnu.ac.kr

Copyright 2000 Korean Society of Electron Microscopy

체 (hyperthermophile)가 고온에서 안정한 효소들을 생성하는 것은 자연스러운 현상이고, 이와 같은 내열성 단백질은 내열지작을 이해하는 하나의 model system으로써 연구의 대상으로 되어오고 있다. 그 첫 번째로 (hyper)thermophile과 mesophile 생물체에서 분리된 동일종류의 효소를 서로 비교하므로써 열안정성 mechanism을 이해하는 방법이다. 그 예로 malate dehydrogenase (Kelly et al., 1993), DNA poly-merase (Korolev et al., 1995)와 citrate synthase (Russel et al., 1994)등의 비교로 ion pair가 많을수록 열에 안정하다는 가설을 제시하고 있다. 하지만, site-directed mutagenesis 실험 (Tomschy et al., 1994)과 glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase에 대한 연구로 (Korn-dorfer et al., 1995) 단백질의 내열성은 ion pair 뿐만 아니라 기질과의 특이성을 고려해야됨을 보여준다. 단백질의 내열기작에 대한 다른 관점은 cavity의 volume의 감소 (Russel et al., 1994), high order oligomer를 형성하는 경향 (Hecht et al., 1990), 실온에서 flexibility 감소 (Matthews, 1993), 전기적과 소수성 상호작용 (Spasov et al., 1995)등이 제안되고 있다. 최근 glutamate dehydrogenase (GluDH)의 비교로 ion pair의 증가와 protein core에서 hydrophobic interaction의 증가가 열에 안정하게 하는 요소로 제안되고 있다 (Knapp et al., 1997). 그 두 번째의 접근 방법으로, 다른 종류의 내열성 단백질을 서로 비교하여 homology를 찾아 새로운 model을 찾는 방법이다 (Voorhorst et al., 1997). 이와 같이 내열성 단백질에 대해 많은 연구를 수행하고 있지만, 아직도 그의 기작에 대해 많은 부분을 이해하지 못하고 있다. 즉, 단백질이 고온에 대한 안정한 현상을 하나의 기작으로 설명될 수 없음을 보여주며 (Jaenicke, 1996), 기질과의 특이성, 단백질 내부에서 hydrophobic interaction등 복합적인 요소로 결정되는 구조적 특징이 규명되지 못하기 때문이다 (Knapp et al., 1997).

본 연구에서는 고온(최적온도: 80°C)에서 혐기적으로 성장하는 초고온 생물체중 *Thermococcus profundus* (Kobayashi et al., 1994)에서 거대분자 복합체를 분리하여 그의 구조를 규명하므로써 내열기작을 이해하고자 한다.

재료 및 방법

1. *Thermococcus profundus*의 배양

Thermococcus profundus (DT5432)은 Kobayashi et al. (1994)의 방법에 따라 혐기적으로 80°C에서 배양하였다. 배양된 균은 원심분리로 농축후 -70°C에서 보관하였다.

2. P93 complex의 분리

*T. profundus*를 50 mM Tris/HCl 완충용액 (pH 7.5)으로 두 번 씻은 후 (1,000 × g, 30 min), DNaseII (Sigma, 1 mg/100 ml 완충용액)을 첨가후 실온에서 10분간 항온시켰다. Sonification을 이용하여 균을 분쇄시켰으며, 원심분리를 이용하여 부서지지 않은 균을 분리시켰다. 상등액을 4°C에서 천천히 (4시간) ammonium sulfate를 60%까지 포화시킨 후, 원심분리 (1,000 × g, 40분)을 이용하여 분리한 후, 50 mM Tris/HCl 완충용액 (pH 7.5)으로 8시간 투석시켰다. Centricon (YM-30, millipore)을 이용하여 용액을 농축시킨 후, 50 mM Tris/HCl 완충용액 (pH 7.5)으로 평행된 High Q Sepharose column (pharmacia, Germany)에 통과시킨 후, NaCl linear gradient (0-1 M NaCl)로 분리하였다. P93 complex는 300-400 mM NaCl농도에서 나타났으며, 농축후 Sephacryl 400 (pharmacia, Gennany)으로 gel filtration을 하였다. 순수 분리한 P93 complex는 50 mM Tris/HCl 완충용액 (pH 7.5, 400 mM NaCl)로 혼탁시킨 후 전자현미경과 생화학실험을 진행시켰다. P93 complex의 분리과정은 전자현미경관찰과 SDS전기영동으로 각각 확인하며 진행하였다.

3. 전자현미경

순수 분리한 P93 complex는 Cheong 등 (1993)의 방법에 따라 염색하였다. 간단히 요약하면, 탄소막을 입힌 grid에 3분동안 흡착시킨 후 여과지로 조심스럽게 상등액을 제거후 증류수로 2-3회 씻은 다음 2% uranyl acetate로 착색시켰다. Philips사 Tecnai 12 전자현미경으로 120 kV에서 42,000 ×의 배율로 Low-Dose-System을 이용하여 촬영하였으며, Kodak 4489 Film에 기록하였다. Optical diffractometer를 이용하여 인화된 전자현미경사진에 나타난 astigmatism (난시현

상)과 drift현상 등을 관찰하였으며 image analysis와 processing을 위해 적절한 사진을 선택하였다.

4. Image analysis와 Processing

전자현미경사진을 Leafscan (LS45, USA)을 사용하여 1024 × 1024 pixel을 20 μm pixel 크기 (실제 object에 대해 0.48 nm)로 계수화(digitalize)시켰다. Image analysis와 processing은 EM (Hergel, 1996)과 SEMPER (Saxton et al., 1979) 등의 software package를 이용하였다. 계수화된 전자현미경 image를 64 × 64 pixel의 크기로 각각의 입자(P93 complex)를 자른후 Kim et al. (1999)의 방법에 따라 translation과 rotation시킨 후 alignment시켰다. 임의로 선택된 image를 reference로 사용하여 correlation average (Phipps et al., 1991)를 구하였다. 이 결과로 얻은 average를 다음 cycle의 reference로 사용하여 average를 구하였다. 또 multivariate statistical 분석법 (Frank, 1996) 즉, 모든 image를 각각 비교하여 얻은 eigenvector와 eigenvalue값을 이용하여 유사한 형태로 분류(classification)하였다. 이와 같은 방법으로 얻은 class의 average와 모든 입자의 average는 angular correlation coefficients (Dürr, 1991)에 기초로 symmetry를 결정하였다.

결과 및 고찰

1. P93 complex의 분리

*T. profundus*의 cytosolic total protein에서 anion-exchange chromatography를 이용하여 분리하였다. Fig. 1에서 보는데와 같이 93 kDa protein은 total protein에서 major band로 보여주지 않고 있다. Anion-exchange chromatography를 통과시킨 후 300-400 mM NaCl 농도에서 나타난 peak의 모든 fraction을 SDS-전기영동으로 확인 후 fraction을 선별하였다(data not shown). 선별한 fraction은 Fig. 1의 lane 2와 같이 93 kDa의 band가 강하게 보이며, 저분자량의 band는 약하게 나타나고 있다. 저분자량의 band를 제거하기 위해 gel-filtration을 한 후 SDS-전기영동(Fig. 1. lane 3)에서는 93 kDa protein만 보여주고 있다. 또한 전자현미경으로 확인한 결과 P93 complex만 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과로 complex의 monomer는 93 kDa

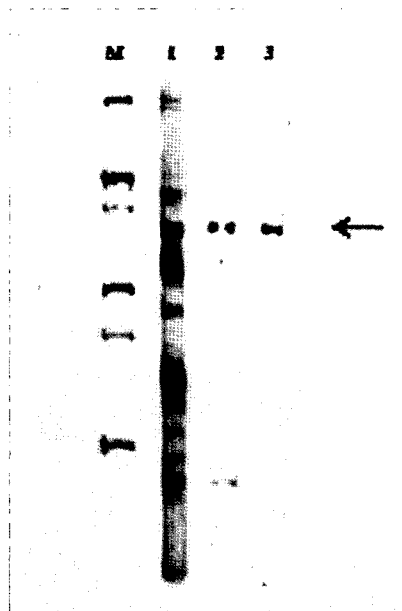


Fig. 1. SDS-PAGE (10% acrylamide) of purified the 93 kDa protein complex from *Thermococcus profundus*. Lane 1: total cytosolic proteins. In this lane the 93 kDa protein appears as one of a minor proteins. Lane 2: pooled p93 complex-containing fractions from high Q anion-exchange column. Lane 3: pooled fractions from Sephacryl 400. The arrow indicated the position of P93 protein. Lane M: contains size marks (from top to bottom): myosine (210 kDa), β-galactosidase (116 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), bovin serum albumin (66.2 kDa), catalase (57.4 kDa), ovalbumin (40 kDa). Gel was stained with Coomassie blue R-250.

protein임을 알 수 있다. 순수 분리한 P93 complex는 NaCl의 농도에 영향을 받음을 알 수 있었다. 저 농도 (50 mM NaCl)에서는 불안정한 형태를 보여주는 반면, 높은 농도 (500 mM NaCl)에서는 complex의 구조와 열에 가장 안정한 상태를 보여 주고 있다 (data not shown).

2. P93 protein의 열안정성

순수 분리한 93 kDa protein의 열안정성을 확인하기 위해서 SDS와 혼합후 (최종농도 1%), 85°C에서 12시간 항은 시킨 후 SDS-전기영동을 하였다. 열처리 (Fig. 2. lane 2)와 열처리하지 않은 93 kDa protein (Fig. 2, lane 1)의 band는 전혀 변화가 없음을 보여주고 있

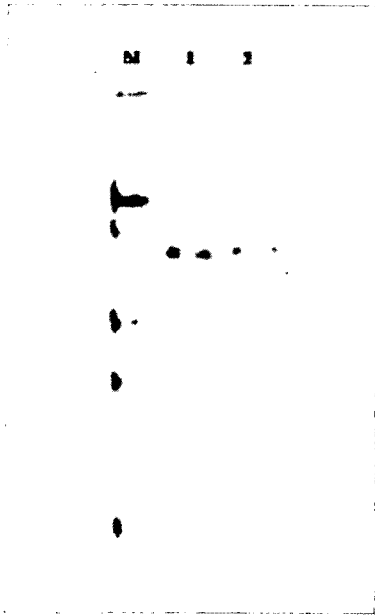


Fig. 2. Heat stable of P93 protein complex. Lane 1: purified P93 protein no treated with SDS and heat. Lane 2: purified P93 protein incubated at 85°C with SDS (final 1%) in 12 hrs.

다. 또한 전자현미경으로, 구조적 변화를 관찰할 수 없었다(data not show). 이와 같은 결과로부터 P93 complex는 열에 매우 안정할 뿐만 아니라 detergent에도 대단히 안정한 단백질 복합체이다. 이는 초고온 생명체에서 분리된 여러 종류의 효소보다 열에 안정함을 보여주고 있다. 그 예로, *Thermotoga meapolitana*에서 분리된 α -galactosidase의 경우 80°C에서 4시간 항온 후 활성이 75%로 떨어짐이 보고된 바 있다(King et al., 1998).

단백질의 내열성을 ion pair의 증가(Russel et al., 1994)와 protein core에서 hydrophobic interaction의 증가가 열에 안정하게 하는 요소로 제안(Knapp et al., 1997)되고 있다. P93 complex는 hole을 가지는 팔면체의 구조(P93 complex의 구조 참조)로 SDS와 열 처리에도 안정한 형태를 유지한다. 이것은 monomer 간의 interaction에서 단백질 내부의 hydrophobic core가 오철과 같이 형성되고 그 주위를 다른 아미노산들이 감싸고 있는 형태로 생각할 수 있다. 그러므로써 내부에서는 hydrophobic interaction과 표면의 ionic

interaction의 증가로 내열성을 증가시키는 것으로 추정할 수 있다. P93 complex 내열성의 정확한 이해는 구조적으로 유사한 초고온 생명체에서 분리한 phosphoenolpyruvate synthase (Harauz et al., 1996)와 mesophile에서 분리한 효소와의 구조적 비교와 아미노산잔기의 치환법(Korolev et al., 1995), 기질과의 특이성 등 복합적인 요소가 요구된다.

3. P93 Complex의 구조

순수 분리한 P93 complex의 구조를 규명하기 위하여 투과전자현미경과 image processing을 이용하였다. P93 complex를 2% uranyl acetate로 착색하여 관찰한 전자현미경사진을 Fig. 3에 나타내었다. 음착색된 complex는 한 종류의 형태로만 보여주고 있으며, 20 nm의 일정한 크기를 보여준다. complex입자들은 중앙에 stain이 채워져 있는 hole(또는 core)을 가지고 있음을 알 수 있다. 잘 착색된 1431개의 입자들을 선별하여 translation과 rotation시킨 후 alignment시켰다. 1431개 입자들의 data set에서 얻은 eigenvector/eigenvalue의 기초로 분석 및 correlation average를 구하였다. 가장 많은 information을 포함한 10개의 eigenvector를 이용하여 유사한 형태별로 구분(classification) 즉 3개의 class로 나누었다(Fig. 4). Symmetry를 시키지 않은 각 class average들에서 3-fold symmetry를 뚜렷이 가지고 있음을 보여주고 있다. 또한 class간의 구조적 차이가 크게 없음을 보여주고 있다. Class 1(813개의 complex 포함)과 class 2(424개의 complex)는 삼각형의 형태를 보여주는 반면 class 3(194개 complex)의 경우 구의 형태에 가까운 삼각형의 형태를 보여주고 있다. 각 class의 average에서 complex의 가장자리부분이 뚜렷한 형태를 보여주지 않고 있다. 모든 class average의 구조적 특징은 두 개의 monomer가 하나의 group으로써 hole 중심에 3대칭(p3 symmetry)으로 이루고 있다. Class 3는 전체의 약 13%로 적은 입자수를 포함하고 있다. 이와 같은 결과로 class간의 형태적 차이는 소위 stain effect(Fuller, 1981)에 기인된 것으로 생각할 수 있다.

Fig. 5에서 전체 1431개의 particle에 대한 average를 나타내었다. P93 complex는 가운데 stain으로 채워져 hole을(약 5 nm) 가지고 있으며, 이를 중심으로 단백

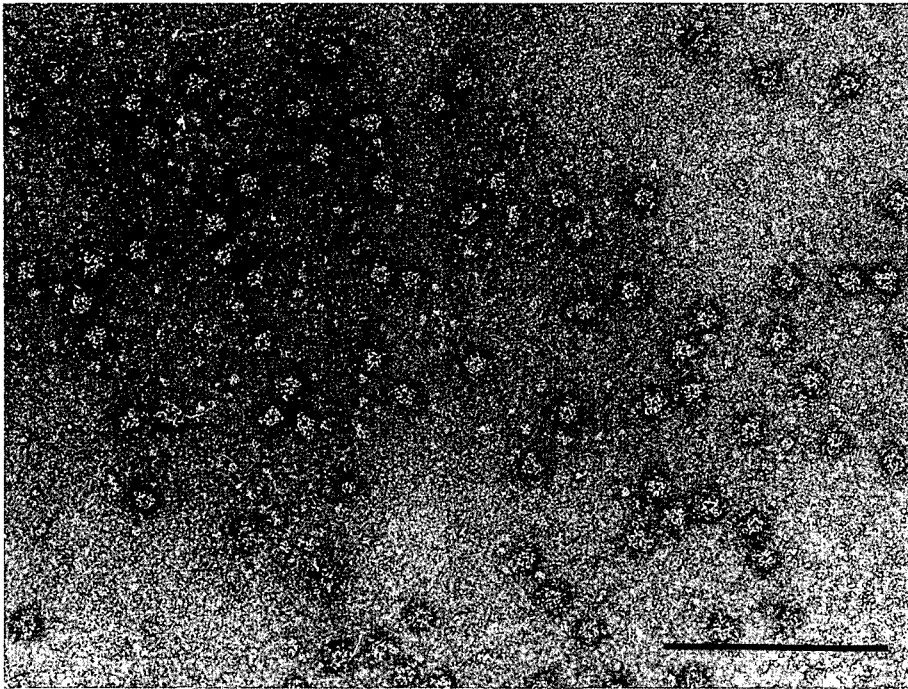


Fig. 3. Electron micrograph of purified multimeric complex of the 93 kDa protein negatively stained with 2% uranyl acetate. Scal bare, 200 nm.

질들이 모여있는 구조로 약 19 nm의 크기를 가진다. 중앙의 hole을 중심으로 인접된 두 개의 monomer가 1개의 group으로써, p3 symmetry를 형성하고 있다. 이것은 Harauz et al. (1996)이 *Staphylotherus marinus*에서 분리한 phosphoenolpyrovate (PEP) synthase (20 nm의 크기로 hole을 중심으로 p3 symmetry를 이루는 구조)와 유사한 형태를 보여주고 있다. P93 complex는 또한 *E. coli*에서 분리한 PEP synthase (93.7 kDa)와 유사한 분자량을 가지고 있다 (Niersbach et al., 1992). *E. coli* PEP synthase의 경우 dimer 또는 tetramer로 추정하는 반면, P93 complex의 경우 multimer (아래 참조)이다. P93 complex의 경우 protein core에서 hydrophobic interaction의 증가로 high multimer를 형성함으로써 내열성을 보이는 것으로 추정할 수 있다.

High multimeric complex의 배열 및 packing의 구조적 연구는 DeRosier et al. (1971)에 의해 처음으로 시작되었다. DeRosier et al. (1971)은 24-homomultimeric complex인 dihydrolipoly transsuccinylase에 대

한 전자현미경적 고찰로 팔면체의 형태로 이루어져 있음을 보고하였다. 그 후 Massover et al. (1993)은 ferritin complex가 또한 팔면체임을 보여주었고 최근 Cicicopol et al. (1999)은 팔면체의 각 모서리에 4개의 monomer로 이루어진 24-multimer를 설명하고 있다. 이 경우 projection 구조는 두 monomer가 1개 group으로 모여 p3 symmetry 구조를 보여주고 있다. P93 complex의 경우 gel filtration에서 2,000 kDa 이상의 multimer임을 보여준다 (data not shown). 이는 P93 complex가 최소 21개 이상의 monomer로 구성되어 있음을 의미한다. P93 complex가 21면체 또는 22면체로 구성되어 있다면, projection 구조에서는 적은 hole을 많이 포함하는 구의 형태를 관찰해야만 할 것이다. P93 complex 구조는 중앙에 위치한 hole을 중심으로 단백질이 모여 있음을 보여주고 있다. 여기서 각 monomer가 팔면체의 각 모서리에 위치해 있는 경우 즉, 팔면체의 각 모서리에 4개의 monomer가 위치해 있는 경우로 가정하면, projection 구조 (전자현미경 사

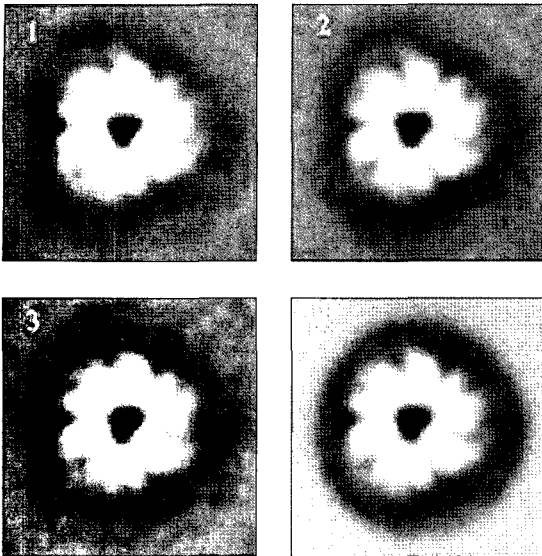


Fig. 4. Class averages of negatively stained P93 complex. The non-symmetrized class average were derived from the negatively stained P93 complex. The 1431 particles were subjected to rotational and translationl alignment, classified into three group based on eigenvector/eigenvalue data analysis (1, 2 and 3), and projected in average (4). Class averages (1 to 3) included 813, 424 and 194 images, respectively.

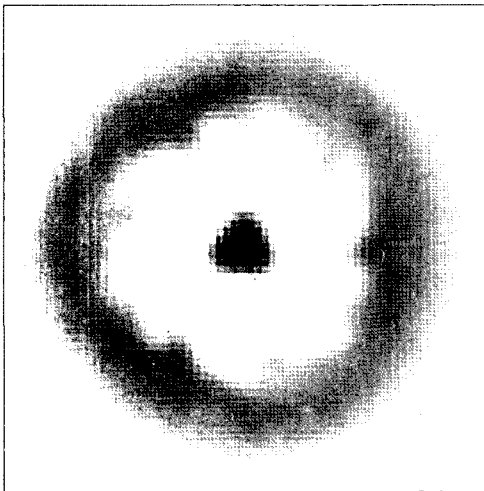


Fig. 5. Correlation average of P93 oligomer. Correlation average of 1431 images after three-fold rotational symmetrization. The diameter of complex and the central cavity are approximately 19 and 5 nm, respectively.

진)는 2개의 monomer가 1개의 group으로 이루어진 p3 symmetry의 형태를 관찰할 수 있을 것이다. 이것은 P93 complex 구조와 (Fig. 5) 잘 일치됨을 보여준다. 그러므로 gel-filtration과 2차원 구조를 기초로 우리가 P93 complex가 24-multimer임을 강하게 주장할 수 있으며, 내부의 구조와 기질과의 결합 등을 알기 위해서는 cryo-tomography적 고찰이 필요할 것이다.

감사의 글

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 연구비 (KRF-98-015-D00242) 지원에 의하여 연구되었음.

참고 문헌

- Adams MWW: Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100°C. *Annu Rev Microbiol* 47 : 627-658, 1993.
- Cheong G-W, Guckenberger R, Fuchs K-H, Gross H, Baumeister W: The structure of the surface layer of *Methanoplanus limicola* obtained by a combined electron microscopy and scanning tunneling microscopy approach. *J Struct Biol* 111 : 125-134, 1993.
- Cicicopol C, Peter J, Lupas A, Cejka Z, Muler SA, Golbik R, Pfeifer G, Lilie H, Engel A, Baumeister W: Novel Molecular Architecture of the Multimeric Archaeal PEP-synthase Homologue (MAPS) from *Staphylothermus marinus*. *J Mol Biol* 290 : 347-361, 1999.
- DeRosier D, Oliver RM, Reed LJ: Crystallization and preliminary structural analysis of dihydrolipoyl transsuccinylase, the core of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 68 : 1135-1137, 1971.
- Dürr R: Displacement field analysis: calculation of distortion measures from displacement maps. *Ultramicroscopy* 38 : 135-141, 1991.
- Frank J: Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies, Academic Press, Inc. 126-181, 1996.
- Fuller SD: Three-dimensional reconstruction of membrand protein crystals. *Meth Cell Biol* 22 : 251-296, 1981.
- Harauz G, Cicicopol C, Hegerl R, Cejka Z, Goldie K, Santarius U, Engel A, Baumeister W: Structural Studies on the

- 2.25-MDa Homomultimeric Phosphoenolpyruvate Synthase from *Staphylothermus marinus*. *J. Struct Biol* 116 : 290-301, 1996.
- Hecht K, Wrba A, Jaenike R: Catalytic properties of thermophilic LDH and halophilic MDH at high temperature and low water activity. *Eur J Biochem* 183 : 69-74, 1990.
- Hergel R: The EM program package: a platform for image processing in biological electron microscopy. *J Struct Biol* 116 : 30-34, 1996.
- Jaenicke R: Protein stability and molecular adaptation to extreme conditions. *Eur J Biochem* 202 : 715-728, 1991.
- Jaenicke R: Stability and folding of ultrastable proteins-eye lens crystallins and enzymes from thermophiles. *FASEB J* 10 : 84-92, 1996.
- Kelley CA, Nishiyama M, Ohnishi Y, Beppu T, Birktoft JJ: Determinants of protein stability in the 1.9Å crystal structure of malate dehydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermus silvatus*. *Biochemistry* 32 : 3913-3922, 1993.
- Kim KI, Park S-C, Kang SH, Cheong G-W, Chung CH: Selective Degradation of Unfolded Proteins by the Self-compartmentalizing HtrA Protease, a Periplasmic Heat Shock Protein in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 294 : 1363-1374, 1999.
- King MR, Yernool D, Eveleigh DE, Chassy BM: Thermotable α -galactosidase from *Thermotoga neapolitana*: cloning, sequencing and expression. *FEMS Microbiology Letters* 163 : 37-42, 1998.
- Knapp S, de Vos WM, Rice D, Ladenstein R: Crystal structure of glutamate dehydrogenase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima* at 3.0Å resolution. *J Mol Biol* 267 : 916-932, 1997.
- Kobayashi T, Kwack YS, Akiba T, Kundo T, Horikoshi K: *Thermococcus profundus* sp. nov., A new Hyperthermophilic Archaeon Isolated from a Deep-sea Hydrothermal Vent. *System Appl Microbiol* 17 : 232-236, 1994.
- Korndorfer I, Steipe B, Huber R, Tomschy A, Jaenicke R: Crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5Å resolution. *J Mol Biol* 246 : 511-521, 1995.
- Korolev S, Nayal M, Barnes WM, di Cera E, Waksman G: Crystal structure of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I at 2.5Å resolution: structural basis for thermostability. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 9264-9268, 1995.
- Matthews BW: Structural and genetic analysis of protein stability. *Annu Rev Biochem* 62 : 139-160, 1993.
- Niersbach M, Kreuzaler F, Geerse RH, Postma PW, Hirsh HJ: Cloning and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K-12 ppsA gene, encoding PEP synthase. *Mol Gen Genet* 231 : 332-336, 1992.
- Phipps BM, Hoffmann A, Stetter KO, Baumeister W: A novel ATPase complex selectively accumulated upon heat shock is a major cellular component of thermophilic archaeobacteria. *EMBO J* 10 : 1711-1722, 1991.
- Russell RJM, Hough DW, Danson MJ, Garry LT: The crystal structure of citrate synthase from the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Structure* 2 : 1157-1167, 1994.
- Saxton WO, Pitt TJ, Horner M: Digital image processing: the semper system. *Ultramicroscopy* 4 : 343-354, 1979.
- Spassov VZ, Karshikoff AD, Ladenstein R: The optimization of protein-solvent interactions : thermostability and the role of hydrophobic interactions. *Protein Sci* 4 : 1516-1527, 1995.
- Tomschy A, Bohm G, Jaenicke R: The effect of ion pairs on the thermal stability of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Protein Eng* 7 : 1471-1478, 1994.

< 국문 초록 >

초고온 archaeon인 *Thermococcus profundus*에서 매우 거대한 단백질 복합체를 분리 및 구조를 규명하였다. 거대 복합체는 93 kDa 단백질 (P93 complex)로 구성된 homomultimer이며, 강한 내열성을 보여주고 있다. 순수 분리한 P93 complex를 SDS (최종 농도 : 1%)와 85°C에서 12시간 항온시킨 후, SDS-PAGE와 전자현미경에서 구조적 변화를 관찰할 수 없었다. 음착색된 P93 complex의 전자현미경 사진에서 하나의 형태만을 보여주고 있으며, 구조의 규명을 위해 image processing을 하였다. 이의 구조는 3대칭 중심에 core (혹은 hole)이 뚜렷이 존재하며 이를 중심으로 단백질이 모여 있는 형태를 보여 주고 있다. 또한 P93 complex는 가장자리에서 뚜렷한 형태를 보여주지 않은 부분, 즉 flexible 부분을 포함하고 있다. Gel filtration과 2차원 구조를 기초로 P93 complex는 24 homomultimer로 되어 있음을 추정하였다.