

Yeast Prx의 스트레스의존 구조적 변화의 기작

강 지 선, 정 강 원^{1,2,*}

한국기초과학지원연구원 전자현미경부

¹경상대학교 응용생명과학부, ²경상대학교 국가핵심연구센터

Mechanism of Stress-dependent Structural Change of Yeast Prx

Ji-Seoun Kang and Gang-Won Cheong^{1,2,*}

Division of Electron Microscopy, Korea Basic Science Institute

¹Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University

²Environmental Biotechnology National Core Research Center

(Received October 11, 2005; Accepted November 18, 2005)

ABSTRACT

Peroxiredoxins (Prxs) are a superfamily of thiol specific antioxidant proteins present in all organism and involved in the hydroperoxide detoxification of the cell. To determine the structural organization of yeast Prx, electron microscopic analysis was performed. The average images of yeast Prxs revealed three different structure, i.e. spherical shaped structure, ring shaped structure and irregularly shaped small particles. In order to analyze the conformational change of yeast Prx by reduction and oxidation, Prxs were subjected to DTT and H₂O₂. In presence of DTT, yeast Prx showed a high tendency to form a decamer. However, they changed into dimeric or spherical structure in the oxidized state. Here we also show ionic interaction between dimeric subunits is primarily responsible for yeast Prx oligomerization.

Key words : Electron microscopy, Peroxiredoxins (Prxs), Thiol specific antioxidant protein

서 론

과산화수소 (H₂O₂), superoxide radical ($\cdot\text{O}_2^-$) 등과 같은 reactive oxygen species (ROS)는 호기성 대사과정에서나 세균의 침입 또는 외부 스트레스에 노출 되었을 때 생성 된다(Finkel, 2003; Georgiou & Masip, 2003). 이와같은 ROS는 스트레스 대응, 외부 침입에

대한 방어기전에 관여하는 유전자들을 활성화 시키는 second messenger로서의 중요한 역할을 수행한다. 하지만, 반응성이 매우 강한 superoxid radical, hydroxyl radical, singlet 상태의 산소를 포함하고 있기 때문에 세포내의 중요한 성분인 단백질, 지질, 핵산 등의 분해나 파괴를 유발할 뿐만 아니라, 여러 종류의 퇴행성질환을 유발시키는 원인이기도 하다 (Dempfle & Amabile-Cuevas, 1991; Neumann et al., 2003). 따라서 ROS는

This work was supported by the MOST/KOSEF to the Environmental Biotechnology National Core Research Center (R15-2003-012-01003-0)

* Correspondence should be addressed to Dr. Gang-Won Cheong, Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea. Ph.: (055) 751-5962; FAX: (055) 752-7062; E-mail: gwcheong@gsnu.ac.kr

외부 스트레스 등에 대한 저항성 신호전달 매체로서의 기능을 수행한 후 즉시 분해되거나 소멸되어야 한다. 최근 thiol-specific antioxidant protein인 peroxiredoxin (Prx)가 식물, 동물, yeast와 일부 박테리아에서 존재함이 보고된 바 있다 (Chae et al., 1995). 이 효소는 thioredoxin을 reducing agent로하는 최초로 확인된 peroxidase라는 점에서, thiol-dependent peroxiredoxin (티올 특이성 산화환원 단백질)이라 명명되어졌으며, 그 후 peroxiredoxin (Prx)라 불리어 지고 있다. Prx는 두 group 즉, N-과 C-terminal에 각각 cystein 잔기를 가지는 2-Cys peroxiredoxin (2-Cys Prx)과 N-terminal에만 cystein 잔기를 가지는 1-Cys peroxiredoxin (1-Cys Prx)으로 분류된다 (Wood et al., 2003). 또한 Prx는 peroxidase 활성($\text{ROOH} + 2e^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$)으로써 ROS을 감소시키는 역할을 수행한다 (Poole & Ellis, 1996; Bryk et al., 2000).

Prx oligomer의 특성에 대한 연구는 인간 적혈구에서 분리된 torin에 대한 전자현미경적 고찰과 박테리아, yeast Prx에 대한 연구가 보고되고 있다 (Harris et al., 2001; Wood et al., 2003). 또한 Schröder et al. (1998)은 돼지의 적혈구에서 분리된 natural-killer-enhancing factor B (NKEF-B)을 HPLC gel filtration chromatography 이용으로 4종류의 다른 형태의 oligomer가 혼합되어 있으며, DTT 처리로 완전히 환원된 상태에서는 한 종류의 oligomer 형태로만 존재함을 제안하였다. 이것은 dimer간의 disulfide 결합으로 oligomer를 형성하지 않음을 보여주며 또한, NKEF-B은 Ca^{2+} 의존 cystein protease인 calpain의 active site를 masking하르로서 가수분해 기작을 방해함을 보고하였다. Kristensen et al. (1999)은 thiol-specific antioxidant protein (TAS; 23 kDa)이 urea의 농도를 변화(0~2.8M)에 따른 oligomer의 변화 즉 고농도에서 dimer 크기만 존재하다 urea의 농도가 감소될수록 분자량이 증가되며, 0M urea 농도에서는 300 kDa 이상의 크기를 가지는 oligomer만 존재함을 HPLC gel filtration chromatography을 이용하여 보고하였다. 이와 같은 결과로 dimer간에 nonionic interaction이나 공유결합(disulfide bridge)이 아닌 다른 어떤 힘에 의해 oligomer가 형성됨을 추측하게 한다. 또 다른 실험실에서 여러 종류의 peroxiredoxin에 대한 연구 즉, alkyl

hydroperoxide의 reductase인 C22, human NKEF, calpromotin 등의 결과와 유사함을 보여준다 (Shau et al., 1990; Plishker et al., 1992). 이와같이 티올 특이성 산화환원 단백질이 환원상태에서 oligomer로 존재함을 단지 gel filtration의 결과만으로 추정하고 있을 뿐, 산화 상태에서 환원 상태로 어떻게 또 왜 구조적 변화를 보이는지에 대한 연구는 전무한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 전자현미경과 image processing을 이용하여 yeast Prx의 구조와 산화/환원 상태에 따른 구조적 변화, oligomerzation의 기작을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

1. Yeast Prx의 순수 분리 및 전자현미경

Yeast Prx는 Cheong et al. (1999)의 방법에 따라 pGEX expression vector을 이용하여 대장균 (*E. coli*, BL21)에서 발현시켰으며, size exclusion chromatography 등을 이용하여 순수분리 하였다. 순수 분리한 Yeast Prx는 Cheong et al. (1993)의 방법에 따라 염색하였다. 간단히 요약하면, 탄소 막을 입힌 grid에 3분 동안 흡착시킨 후 여과지로 조심스럽게 상등 액을 제거 후 중류수로 2~3회 씻은 다음 2% uranyl acetate로 착색시켰다. Technai 12 전자현미경으로 120 kV에서 $51,600\times$ 의 배율로 (nominal magnification: $52,000\times$) Low-Dose System을 이용하여 촬영하였으며, Kodak 4489 Film에 기록하였다. Optical diffractometer를 이용하여 인화된 전자현미경 사진에 나타난 astigmatism (난시현상)과 drift 현상들을 관찰하였으며 image analysis와 processing을 위해 적절한 사진을 선택하였다.

2. Image processing

전자현미경사진을 Leafscan (LS45, USA)을 사용하여 1024×1024 pixel을 $20\ \mu\text{m}$ pixel 크기 (실제 object에 대해 0.38 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 pixel

의 크기로 각각의 입자를 자른 후 Kang et al. (2003)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 multivariation statistical 분석법 (Kim et al., 2000) 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. Yeast Prx의 구조

순수 분리한 Yeast Prx의 구조를 규명하기 위하여 투과전자현미경과 image processing을 이용하였다. 순수 분리한 Yeast Prx를 2% uranyl acetate로 착색하여 관찰한 전자현미경 사진은 네 가지의 다른 형태 즉 구형태의 구조, 반지모양(ring-shaped)의 구조(end-on view), 아령(double-dot)과 같은 모양(side-on view)과 비 규칙적인 적은 입자를 보여주고 있다(Fig. 1a). 이것은 Yeast Prx가 여러 다른 형태의 구조를 가지며, 또한 grid위에 놓여진 상태에 따라 end-on view와 side-on view의 형태를 보여주고 있는 것으로 추정할 수 있다. 보다 정확한 구조를 분석하기 위하여, 같은 형태의 구조를 가지는 입자별로 선별하여 translation과 rotation시킨 후 alignment시켰다. 선별한 입자들의 data set에서 얻은 eigenvector/eigenvalue의 기초로 분석 및 correlation average를 구하였다. 또한, eigenvector를 이용하여 유사한 형태별로 구분(classification)하였다. 먼저, 구 형태의 구조를 가지는 입자(Fig. 1b)는 다른 크기(22~28 nm)를 가지고 있으며, 이것은 각 입자에 다른 수의 Prx에 기인된 것으로 생각할 수 있다. 링 형태(end-on view)의 Prx의 전자현미경 사진에서도 뚜렷하게 5개의 subunit으로 이루어져 있으며, 중앙에 stain이 채워진 hole이 있음을 알 수 있다. Top-on view의 image processing을 위해 409

개의 입자들을 선별하여 translation과 rotation시킨 후 alignment시킨 data set에서 얻은 eigenvector/eigenvalue의 기초로 분석 및 correlation average를 구하였다. 가장 많은 information을 포함한 3개의 eigenvector를 이용하여 유사한 형태별로 구분(classification) 즉 3개의 class로 나누었다. Symmetry를 시키지 않은 각 class average들에서 5-fold symmetry를 뚜렷이 가지고 있음을 보여주고 있다. 또한 class간의 구조적 차이가 크게 없음을 보여주고 있다(data not shown). 이와 같은 결과는 Human Prx의 구조와 매우 일치하며 (Harris et al., 2001), dimer로 구성된 5개의 subunit이 모여진 decamer임을 확인 할 수 있었다. Yeast Prx는 중심 hole을(약 5 nm) 중심으로 단백질이 모여 링모양을 이루며, 전체적인 크기는 14 nm이다(Fig. 1c). Side-on view의 image processing을 위해 218개의 입자들을 선별하여 역시 translation과 rotation시킨 후 alignment시켰다. Correlation average는 double-dot 모양을 보여주며, 크기는 링 형태의 구조와 일치됨을 보여 주고 있다(Fig. 1d). 비 규칙적인 적은 입자는 Prx의 구조를 이루는 기본 단위인 dimer 또는 tetramer로 추정할 수 있다.

2. 산화, 환원에 따른 구조 변화

Yeast Prx 효소는 hydrogen peroxide (H_2O_2)를 환원시키기 위해 두 redox-active cysteine을 가지고 있으며, 두 가지의 oligomer 형태 즉, dimer와 decamer의 ring형태가 알려져 있다(Wood et al., 2003). Yeast Prx의 산화, 환원에 따른 구조의 변화를 고찰하기 위해, DTT와 H_2O_2 을 처리하여 전자현미경으로 관찰하였다. Dimer 형태의 Yeast Prx(Fig. 2a)에 10 mM DTT를 처리(overweight)할 경우, monomer간의 S-S 결합(disulfide bond)은 환원상태(SH)로 변화될 것이며, 이때 Prx는 dimer 형태에서 다른 어떤 oligomer 형태로 바뀔 것이다. DTT처리 후 전자현미경 사진(Fig. 2b)에서 dimer 형태의 oligomer는 적은 비율(약 30% 미만)로 관찰할 수 있는 반면, 규칙적인 ring 형태의 oligomer 즉, decamer 형태는 70% 이상 관찰할 수 있었다. Prx의 산화 상태에서의 구조의 변화를 관찰하기 위해, DTT를 처리한 시료에 15 mM H_2O_2 을 한 시간 처리한

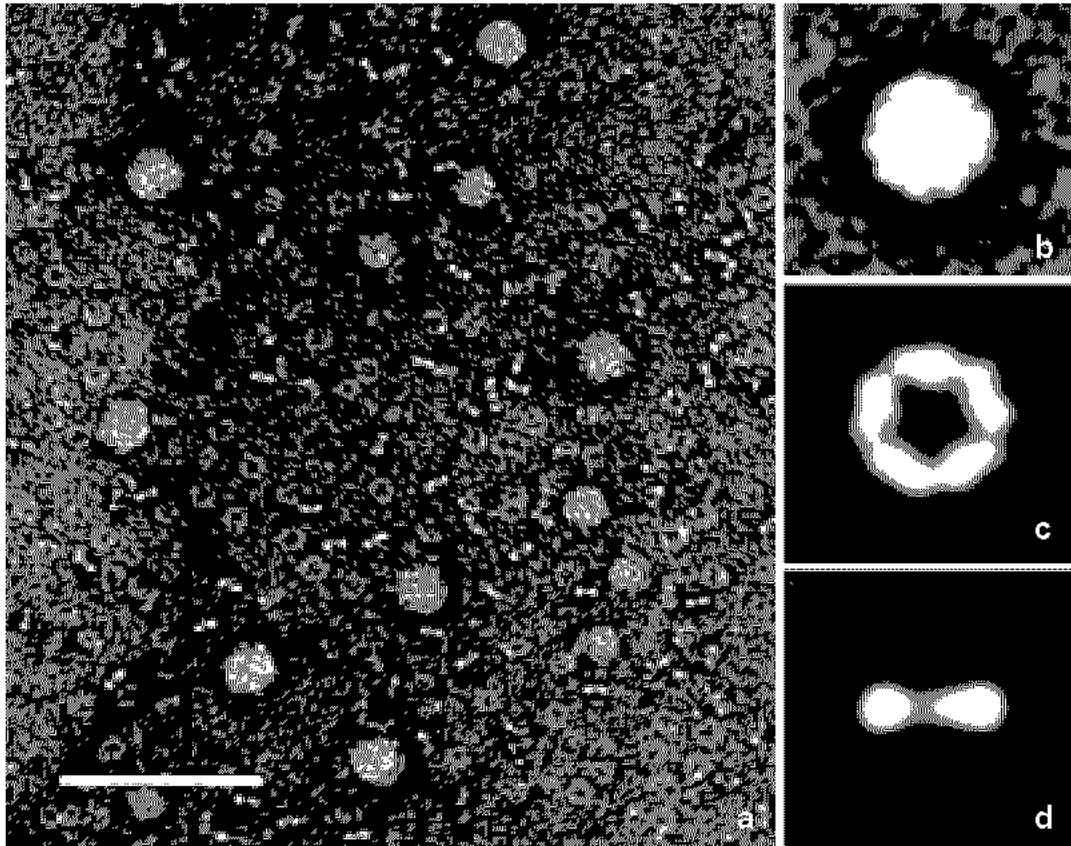


Fig. 1. Diverse structure of yeast-Prx complexes. a : Electron micrographs of purified yeast-Prx complexes were obtained by negatively staining with 2% uranyl acetate. Scale bar represents 100 nm. b~d : Correlation averages of yeast-Prx complexes obtained after rotational and translational alignment. The spherical shaped structure have different diameters ranging from 22 to 28 nm (b). The ring-shaped structure with an end-on orientation (c) and double-dot structure with a side-on orientation (d). The diameter of the ring and the central hole were approximately 14 and 5 nm, respectively.

후, 전자현미경을 관찰 하였다. Fig. 2c에서 보는 것처럼, decamer인 ring 형태의 oligomer는 적은 비율(약 30% 미만)로 관찰할 수 있는 반면, 비 규칙적인 형태는 (dimer 또는 tetramer) 70% 이상 관찰할 수 있었다. 이것은 monomer의 cystein 잔기의 SH는 H_2O_2 에 의해 물분자가 형성되어 떨어져 나옴과 동시에 monomer간 S-S결합이 형성됨으로써 Prx는 dimer (또는 tetramer) 형태를 형성할 것으로 추정된다. 또한, overoxidation 시킨 후 전자현미경 사진 (Fig. 2d)에서는 dimer (또는 tetramer)가 약 60%, 구 형태가 약 30%, 적은 비율로(약 10% 미만) ring 형태를 관찰할 수 있

었다. 이것은 overoxidation이 되었을 경우, 산화상태의 cystein 간의 S-S결합이 sulfinic acid (SO_2^-)로 변화게 될 때 Prx는 decamer와 구 형태의 oligomer로 변형됨을 추정할 수 있다. 따라서 이와 같은 결과로부터 H_2O_2 에 의해 disulfide bond는 가역적으로 변화됨을 알 수 있고, 또한 monomer간의 S-S결합(disulfide bond)은 dimer 형태를 유지하는 반면, 환원 상태(SH)에서는 monomer간의 S-S결합은 형성되지 않으므로 monomer간의 다른 어떤 형태의 상호작용에 의해 oligomer의 형태를 유지함을 생각할 수 있다.

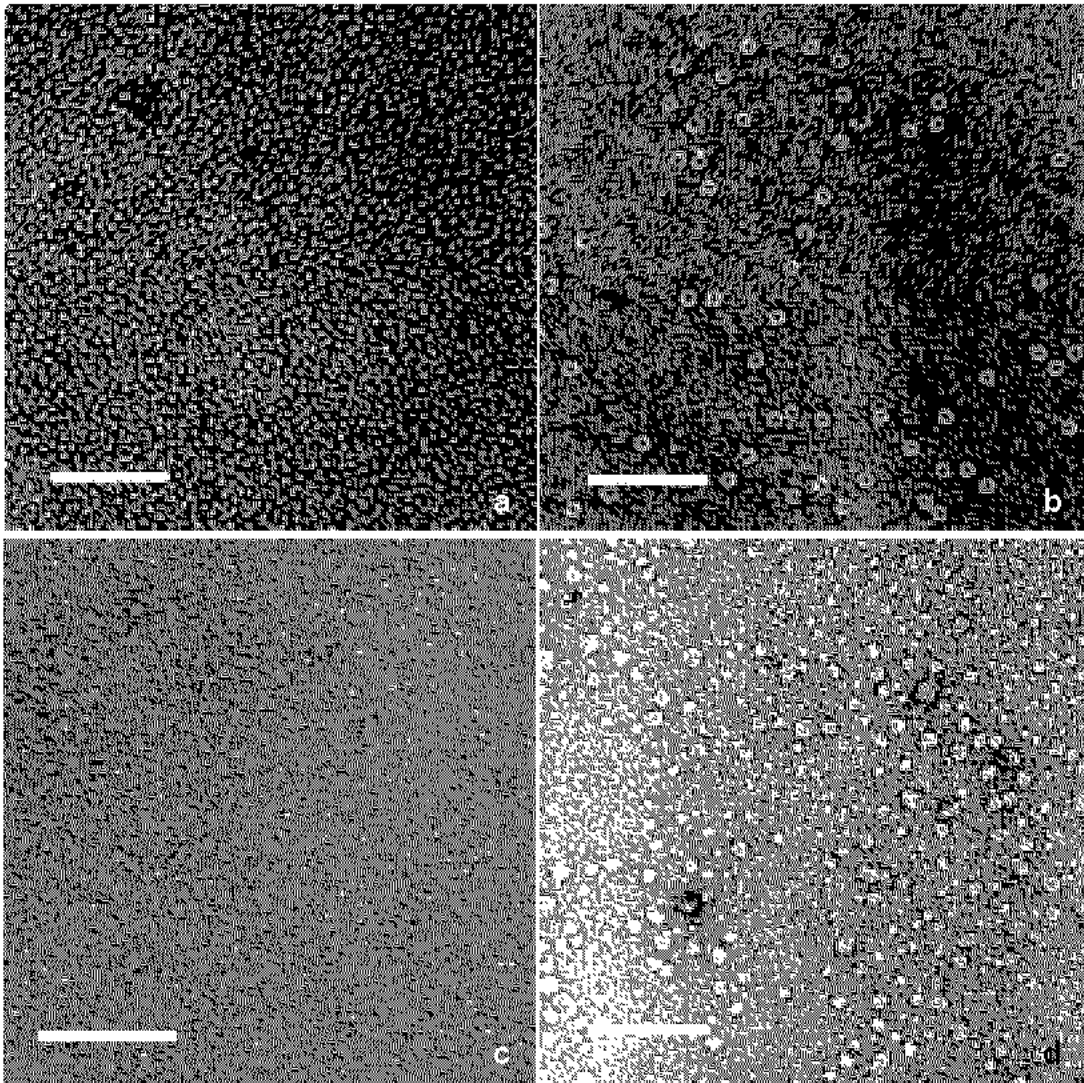


Fig. 2. Conformational change of yeast-Prxs by reduction and oxidation. Electron micrographs were obtained by negatively staining with 2% uranyl acetate. Scale bar represents 100 nm. a : Before treated with DTT, yeast-Prxs consist of dimer or tetramer. b : After treated with 10 mM DTT, yeast-Prxs showed decameric structure. c : After treated with 15 mM H_2O_2 , yeast-Prxs showed dimeric structure. d : After treated with 15 mM H_2O_2 overoxidation, yeast-Prxs showed dimer and spherical structure

3. pH, Salt가 Yeast Prx의 oligomerization에 미치는 영향

2-Cys Prx oligomer 특성에 대한 연구는 gel filtration, light scattering과 analytical ultracentrifugation 등

을 이용하고 있다(Wood et al., 2002). 2-Cys Prx의 oligomerization은 ionic strength와 낮은 pH, 높은 Mg^{++} 이온 또는 Ca^{++} 이온 농도에 관계됨이 보고된 바 있다(Kristensen et al., 1999; Chauhan & Mande, 2001). 산화/환원 상태에 따른 oligomer형태의 변화

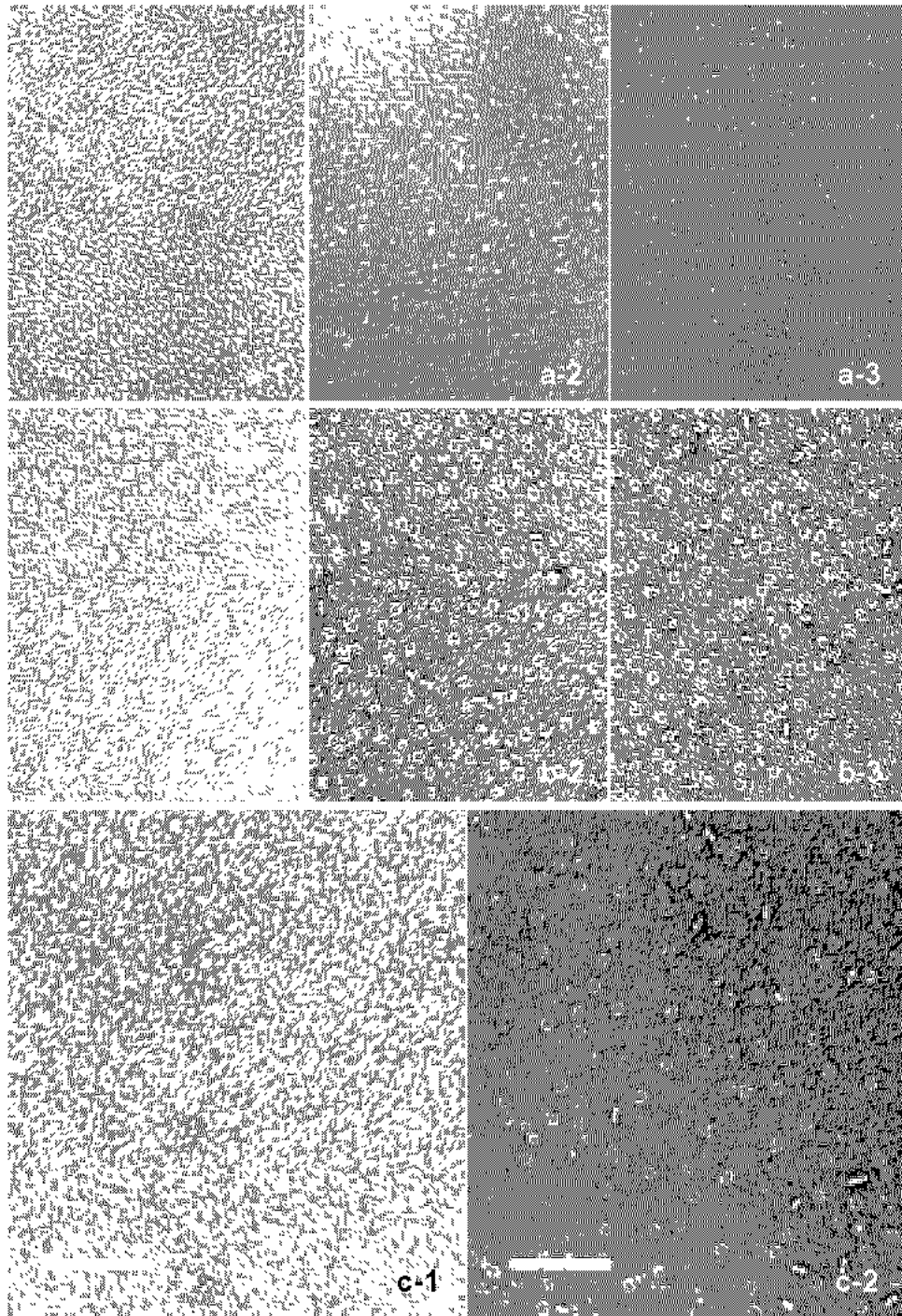


Fig. 3. Effect of salt, pH on oligomerization of yeast-Prx complex. a~b : Electron micrographs of yeast-Prx complexes were obtained with different pH. panel 1 : pH 7; panel 2 : pH 3; panel 3 : pH 10. c : Electron micrographs of yeast-Prx complexes were obtained in the absence (panel 1) or the presence (panel 2) of 150 mM NaCl. Scale bar represents 100 nm.

(Fig. 2) 에서 보는 것처럼, monomer간의 상호 작용은 S-S 결합으로 이루어지나, dimer간의 interaction은 아직 규명되지 않고 있다. Dimer간 또는 monomer간의 상호작용을 이해하기 위해 다른 pH (pH 3~10), 여러 농도의 NaCl (100~300 mM)에 Yeast Prx를 배양 후 전자현미경/image processing으로 구조적 변화를 관찰 하였다. 먼저 dimer(또는 decamer)를 중성에서 강염기와 강산성으로 pH를 변화시키어도 oligomer형태의 변화를 전혀 관찰 되지 않았다(Fig. 3a, b). 이와 같은 결과는 thiol-specific antioxidant protein (TAS; 23 kDa)이 pH변화에 따른 oligomer형태의 변화를 HPLC gel filtration chromatography를 이용하여 보고한 결과 즉, pH 5.4에서 300 kDa 이상의 분자량을 가지는 oligomer만 존재하며, pH 8.5에서 대부분 dimer 크기의 50 kDa의 분자량을 가지는 oligomer와 다른 크기의 oligomer도 존재함을 보고한 결과(Kristensen et al., 1999)와 일치되지 않음을 보여 주고 있다. pH변화에 따른 yeast Prx의 oligomer 구조의 변화가 없음을 non-ionic interaction이 oligomerization에 영향을 주지 못함을 알 수 있다. Ionic strength에 의해 conformation의 변화를 관찰하기 위해, Prx를 NaCl의 다른 농도 (100~300 mM)에 15분간 배양 후 전자현미경으로 관찰 하였다. dimer형태의 Prx (Fig. 3c)에 염으로 처리 후 dimer 형태는 급격히 감소하는 반면, decamer 형태의 oligomer가 증가됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 3d). 또한, 염의 농도가 증가 (150~300 mM)할수록 Prx는 decamer의 형태로 conformation의 변화가 증가됨을 보여주고 있다. 이로써, ionic interaction이 Prx의 oligomerization에 중요한 요소임을 추정할 수 있다.

참 고 문 헌

- Bryk R: Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* 407 : 211-215, 2000.
- Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG: Thioredoxin dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem* 269 : 27670-27678, 1994.
- Chauhan R, Mande SC: Characterization of the Mycobacterium tuberculosis H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity. *Biochem J* 354 : 209-215, 2001.
- Cheong G W, Guckenberger R, Fuchs K H, Gross H, Bameister 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.
- Cheong NE, Choi YO, Lee KO, Kim WY, Jung BG, Chi YH, Jeong JS, Kim K, Cho MJ, Lee SY: Molecular cloning, expression, and functional characterization of a 2Cys peroxiredoxin in Chinese cabbage. *Plant Mol Biol* 40 : 825-83, 1999.
- Demple B, Amabile Cuevas C.F: Redox redux; The control of oxidative stress responses. *Cell* 67 : 837-839, 1991.
- Dür R: Displacement field analysis: calculation of distortion measures from displacement maps. *Ultramicroscopy* 38 : 135-141, 1991.
- Finkel T: Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15 : 247-254, 2003.
- Harris JR, Schröder E, Isupov MN, Scheffler D, Kristensen P, Littlechild JA, Vagin AA, Meissner U: Comparison of the decameric structure of peroxiredoxin II by transmission electron microscopy and X ray crystallography. *Biochim Biophys Acta* 1547 : 221-234, 2001.
- Hegerl R: The EM program package; A platform of image processing in biological electron microscopy. *J Struct Biol* 116 : 30-34, 1996.
- Kang MS, Kim SR, Kwack P, Lim BK, Ahn SW, Rho YM, Seong IS, Park SC, Eom SH, Chung CH, Cheong GW: Molecular architecture of the ATP dependent CodW protease having N terminal serine active site. *EMBO J* 22 : 2893-2902, 2003.
- Kim K I, Cheong G W, Park S C, Ha J S, Woo K M, Chio S J, Chung C H: Heptameric Ring Structure of the Heat shock Protein ClpB, a Protein activated ATPase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 303: 655-666, 2000.
- Kristensen P, Rasmussen D, Kristensen BI: Properties of thiol specific anti oxidant protein or calpromotion in solution. *Biophys Res Commun* 262 : 127-131, 1999.
- 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.
- Plishker GA, Chevalier D, Seinsoth L, Moore RB: Calcium activated potassium transport and high molecular weight

- from of calpromotion. *J Biol Chem* 267 : 21839-21843, 1992.
- Poole LB, Ellis HR: Flavin dependent alkyl hydro peroxide reductase from *Samolla typhimurium*. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpC proteins. *Biochemistry* 35 : 56-64, 1996.
- Saxton WO, Pitt TJ, Horner M: Digital image processing the SEMPER system. *Ultramicroscopy* 4 : 133-139, 1979.
- Schröder E, Ponting CP: Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily. *Protein Sci* 7 : 2465-2468, 1998.
- Shau H, Kim A: Identification of natural killer enhancing factor (NKEF) as a major antioxidant in human red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 199 : 83-87, 1994.
- Wood ZA, Poole LB, Hantgan RR, Karplus PA: Dimers to doughnuts: redox sensitive oligomerization of 2 Cys peroxiredoxins. *Biochemistry* 41 : 5493-5504, 2002.
- Wood ZA, Poole LB, Hantgan RR, Karplus PA: Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300 : 605-653, 2003.

< 국문초록 >

티올특이성 산화환원 단백질인 peroxiredoxin (thiol specific peroxiredoxin, Prx) 은 거의 모든 생명체에 존재하며, reactive oxygen species (ROS)을 제거하는 역할을 수행한다. 전자현미경/image processing을 이용하여 세포의 방어기작에 중요한 기능을 수행하는 Prx의 구조를 분석하였다. Yeast Prx는 크게 세 가지의 다른 형태 즉, 구형태, ring 형태의 구조와 비 규칙적인 적은 입자로 구성되어 있음을 확인하였다. 또한 산화/환원 상태에서의 구조적 변화를 관찰하기 위해 DTT와 H₂O₂를 처리 후 전자현미경을 관찰 하였다. 환원상태의 (DTT 처리 후) yeast Prx는 많은 decamer 구조를 보여주는 반면, 산화상태에서는 (H₂O₂ 처리 후) dimer나 구형태의 구조를 보여 주고 있다. 또한 dimeric subunit간의 ionic interaction이 yeast Prx의 oligomerization에 중요한 인자임을 확인하였다.