

## Yeast Thioredoxin System의 발현, 정제 및 특성조사

정진숙 · 김명희<sup>1</sup> · 김강화\*

전남대학교 식품영양학과, <sup>1</sup>목포과학대학 식품영양과

**Expression, Purification and Characterization of Yeast Thioredoxin System. Jeong, Jin-Sook, Myung-Hee Kim<sup>1</sup>, and Kanghwa Kim\*.** Department of Food and Nutrition, Chonnam National University, Kwangju 500-757, <sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Mokpo Science College, Chonnam, 530-080, Korea - We carried out the expression and characterization of yeast thioredoxin system including thioredoxin 1 (Trx1), Trx2, thioredoxin reductase (TR), and a novel thioredoxin (Trx3), which was reported in the data base of *Saccharomyces* genome. The Trx1, 2 and TR were expressed as soluble proteins in *E. coli* and the sizes of purified proteins were equal to the reported their molecular weights. The expressed Trx3 was found in both soluble fraction and precipitate. The size of Trx3 purified from soluble fraction of *E. coli* crude extracts was estimated as 14 kDa on SDS-PAGE instead of 18 kDa for Trx3 in precipitate. N-terminal amino acid sequence of the small size of purified Trx3 from soluble fraction was analyzed as FQSSYTS which is correspond to the sequence from 20 to 26 for Trx3. Trx3 together with thioredoxin reductase and NADPH was able to reduce the disulfide bridge of insulin and 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Trx3 stimulated the antioxidant effect of thioredoxin peroxidase 1 (TPx1) which inhibited inactivation of glutamine synthetase (GS) in dithiothreitol (DTT) containing metal catalyzed oxidation system. The stimulation effect of Trx3 was 10% of the effect of either Trx 1 or Trx2. In addition, Trx3 could reduce the disulfide of TPx to thiol, so that the TPx had thioredoxin dependant peroxidase activity. In western blotting analysis, antibodies against purified Trx3 did not cross-react with crude extracts of yeast, purified Trx1, and Trx2 proteins. But, in PCR reaction using the cDNA library of yeast as a template, gene encoding of *trx3* was amplified.

**Key words:** thioredoxin, thioredoxin reductase, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), thioredoxin peroxidase 1

티오레독신(Thioredoxin, Trx)은 W-C-G-P-C의 보존된 활성부위를 갖는 단백질로[4] 이 활성부위의 dithiol이 disulfide로 가역적인 산화반응을 통해 많은 산화, 환원 반응을 촉매한다. 산화된 티오레독신인 Trx-S<sub>2</sub>는 NADPH와 티오레독신 환원효소에 의해 Trx-(SH)<sub>2</sub>로 환원된다. 환원된 티오레독신은 두 개의 thiol group을 가지고 있으며, 단백질의 노출된 S-S 결합을 효율적으로 환원시킬 수 있다. 티오레독신은 원핵세포에서 진핵세포에 이르는 모든 유기체에 존재하며, 다양한 생리적 기능을 나타낸다. 대장균에서 티오레독신은 ribonucleotide reductase의 전자공여체로서 DNA의 합성과 복구에 관여할 뿐 아니라, methionine sulfoxide reductase와 sulfate 동화과정에서 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase의 수소이온 공여체로 작용한다[3, 24]. 또한 대장균 티오레독신은 T7, M13 같은 박테리오파지의 생존에 필수적이다[2, 10, 19].

진핵생물의 경우 원핵세포와 마찬가지로 ribonucleotide reductase, methionine sulfoxide reductase, 3'-

phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase의 전자공여체로 작용할 뿐 아니라[7], -S-S-결합을 포함하는 단백질의 refolding을 쉽게 해주며[11], interleukin 2-receptor를 활성화시킨다는 연구보고가 있다[23]. 또한 NFκB와 같은 전사인자의 DNA 결합 활성을 조절하고[12], 림프세포와 다양한 human solid tumors(총질성종양)의 증식을 자극하며[5, 25], 과산화수소와 자유라디칼을 제거하고[20, 21], 산화적 스트레스에 대해 세포를 보호하는 등 효과적인 항산화물질로서의 기능을 하는 것으로 보고된 바 있다[18]. 최근, 티오레독신은 thioredoxin peroxidase 1(TPx1)의 항산화활성을 증가시키고, TPx1의 효율적인 전자공여체로서의 기능이 보고되었다[1, 9]. TPx1은 글루타민합성효소의 불활성화를 억제하는 항산화활성 뿐 아니라 티오레독신으로부터 전자를 제공받아 환원된 TPx1이 과산화수소를 제거하는 활성을 갖는 것으로 알려져 있다.

대장균에서는 최근에 새로운 티오레독신(Trx2)이 클로닝, 발현됨에 따라 2 종류의 티오레독신이 보고되었다[13]. Trx2는 Trx1보다 아미노 말단에 32개의 아미노산이 더 많고, 활성부위가 아닌 아미노말단 부위에 존재하는 2개의 시스테인이 Trx2의 활성을 조절할 것으로 추

\*Corresponding author

Tel. 82-62-530-1334, Fax. 82-62-530-1339  
E-mail: kimkh@orion.chonnam.ac.kr

정되고 있다. 포유동물조직에서도 2종류의 티오레독신이 클로닝되고 발현되었는데, 최근에 발견된 Trx2는 Trx1보다 아미노말단에 60개의 아미노산이 더 많고, 이것은 미토콘드리아로 이동되는 신호로서의 기능을 하는 것으로 보고되었다[22]. 효모에서는 Trx1과 Trx2가 이미 클로닝되고, 특성이 조사되었다[6, 4]. 78%의 상동성을 갖는 이 두 유전자를 동시에 제거한 변이주는 cell cycle에 심각한 영향을 받았으며[15], generation time의 증가와 DNA 복제 속도의 감소를 야기하였다[16]. 또한 메티오닌 영양요구성, 과산화수소에 대한 민감성 증가[14], 글루타치온 환원효소가 결핍된 변이주에서 관찰된 것과 마찬가지로 산화된 글루타치온의 수준을 증가시킨다고 보고된 바 있다[17]. 효모의 게놈 서열 분석 결과 Trx1, 2 외에 상동성을 가진 Trx3가 알려졌다. Trx3의 염기서열로부터 추론된 아미노산 서열은 아미노말단에 Trx1, Trx2보다 25개의 아미노산이 더 많고, 활성 보존 잔기가 아닌 또 다른 2개의 시스테인잔기를 포함하고 있다. 본 연구에서는 아직 염기서열만이 알려졌을 뿐 특성이 규명되지 않은 효모의 Trx3를 Trx1, Trx2 및 티오레독신 환원효소(TR)와 더불어 대장균에 발현시킨 후 정제하여 인슐린 및 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 환원활성과 TPx1 단백질의 항산화활성에 미치는 특성을 비교 조사하였다.

## 재료 및 방법

### Trx1, 2, 3와 TR 유전자의 증폭 및 발현

Trx1에 대한 forward primer로 5'-Trx1(5'-ATCA-TATGGTTACTCAATTCAAACTGC-3')과 reverse primer로 3'-Trx1(3'-CGTTCGTAACGACGAT-TACGAATTGATCAA-5'), Trx2에 대한 forward primer, 5'-Trx2(5'-ATCATATGGTCACTCAATTA-AAATCCGCTTC-3')와 reverse primer, 3'-Trx2(3'-CGATAACGAAGGTTGCATATCTGATCAA-5'), 또한 TR에 대한 forward primer, 5'-TR(5'-ATCATATGG-TTCACAACAAAGTTACTATC-3')과 reverse primer, 3'-TR(3'-CTTTATGAATTGAAGGGATCTTATCT-GATCAT-5')을 각 유전자의 증폭에 사용하였다. 개시 코돈을 포함하는 forward primer에는 NdeI 제한효소 자리를 도입하였으며, 종결코돈을 포함하는 reverse primer에는 SpeI 제한효소 자리를 도입하였다. Trx3에 대한 primer는 forward primer, 5'-Trx3(5'-AACATATG-TTGTTCTATAAGCCTGTGAT-3')와 reverse primer, 3'-Trx3(3'-CTCTCCCTTAGTTTCTAGATACTT-AAGAA-5')를 사용하였으며, 각각 개시코돈과 NdeI, 종결코돈과 EcoRI 제한효소 자리를 도입하였다. 효모 genomic DNA를 template로 하여 각각의 forward와

reverse primers를 이용하여 증폭시킨 PCR 생성물을 pCRII TA cloning vector에 도입하여 염기서열을 확인한 다음 발현 벡터인 pET17b에 삽입한 후 BL21(DE3) 대장균에 도입하여 형질전환시키고, 발현이 확인된 콜로니를 선택하여 37°C에서 12시간 동안 ampicillin을 포함하는 LB 배지에 배양하였다. 다음날 새로운 배지에 1/100로 희석되도록 접종하고 배양하여 600 nm에서 흡광도가 0.7-0.8이 될 때 최종농도가 0.4 mM이 되도록 isopropylthiogalactoside(IPTG)를 가하고 37°C에서 3시간 더 진탕배양하였다. Trx3의 경우 거의 inclusion body를 형성하였으므로 수용성 단백질의 발현을 증가시키기 위해 IPTG를 첨가한 후 22°C에서 12시간 더 진탕 배양하였다.

### Trx 1, 2, 3 및 TR 단백질의 정제

균체를 20 mM Tris(pH 7.6) 완충용액으로 현탁시키고 초음파로 파쇄한 후 원심분리하여 상등액을 조추출물로 사용하였다. 20 mM Tris 완충용액(pH 7.6)으로 평형시킨 DEAE-Sephacel이 충전된 관에 조추출물을 가하고 0.0-0.5 M NaCl 염 농도구배를 걸어 단백질을 용출시켰다. 각 분획에 대하여 DTNB 환원 활성을 측정하여 티오레독신 또는 티오레독신 환원효소 활성도를 갖는 분획을 모아 Centricon-10으로 농축하였다. 농축한 단백질 시료를 0.1 M NaCl이 포함된 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 평형시킨 Sephadex G-75관에 가하고 동일한 완충용액으로 단백질을 용출시켰다. DTNB 환원 활성을 갖는 분획을 모아 Centricon-10으로 농축하고 280 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질량을 정량하였다. 단백질 시료들을 SDS를 포함하는 15% acrylamide gel에 전기영동한 후 Coomassie Brilliant Blue R-250으로 염색하여 단백질 밴드를 관찰하였다.

### 아미노말단의 아미노산 서열 분석

아미노말단의 아미노산 서열 분석은 기초과학연구원 구조에 의뢰하였다. 수용성 분획의 아미노산 서열 분석을 위하여 Applied Biosystems precise 491 기기가 이용되었으며, 침전 분획의 아미노산 서열 분석은 Milligen 9050이 이용되었다.

### 항체 제조 및 Immunoblotting

정제한 Trx2 또는 Trx3 단백질을 adjuvant와 혼합하여 토끼에 피하주사한 후 얻은 혈액을 원심분리하여 상등액을 항혈청으로 사용하였다. 정제한 단백질 시료들을 SDS를 포함하는 15% acrylamide gel에 전기영동하고 나이트로셀룰로스 종이에 전기영동방법으로 이동시킨 후 1차 항혈청을 반응시키고 2차 항체인 alkaline phosphatase가 결합된 anti-rabbit goat IgG로 반응시킨 다음 ni-

tro blue tetrazolium chloride와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate로 발색시켰다.

**티오레독신의 활성 조사**

**인슐린 환원 활성** 80 μM 인슐린, 0.2 mM NADPH와 1 mM EDTA를 포함하는 50 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 10 μg의 티오레독신 환원효소를 가하고, 정제한 티오레독신 4 μg을 가하여 0.5 ml로 맞추고 25°C에서 NADPH의 산화를 340 nm에서의 흡광도 감소로 관찰하였다[13].

**DTNB 환원 활성** 0.1 mM NADPH, 티오레독신 환원효소 5 μg과 정제한 티오레독신 0.5 μg을 포함하는 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)에 1 mM이 되도록 DTNB를 가하고, 최종부피를 0.5 ml로 맞춘 후 412 nm에서 흡광도 증가를 측정하였다. DTNB는 1 mol의 Trx-(SH)<sub>2</sub>에 의해 환원되어 2 mol의 TNB를 생성하므로 2 mol의 TNB의 생성을 1 unit라 하였다. DTNB 환원 속도는 TNB의 몰 흡광계수인 13,600 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>을 이용하였다[13].

**효모 TPx1의 항산화활성을 증가시키는 티오레독신의 활성** 5 μg의 대장균 글루타민합성효소, 10 mM 디티오트레이톨, 3 μM의 3가 철이온을 포함하는 50 mM HEPES(pH 7.0) 완충용액에 효모 TPx1 항산화단백질을 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 남아있는 글루타민합성효소의 활성을 측정하였다[8]. 여기에 정제한 티오레독신을 첨가하였을 때의 효소 활성도 변화를 관찰하였다.

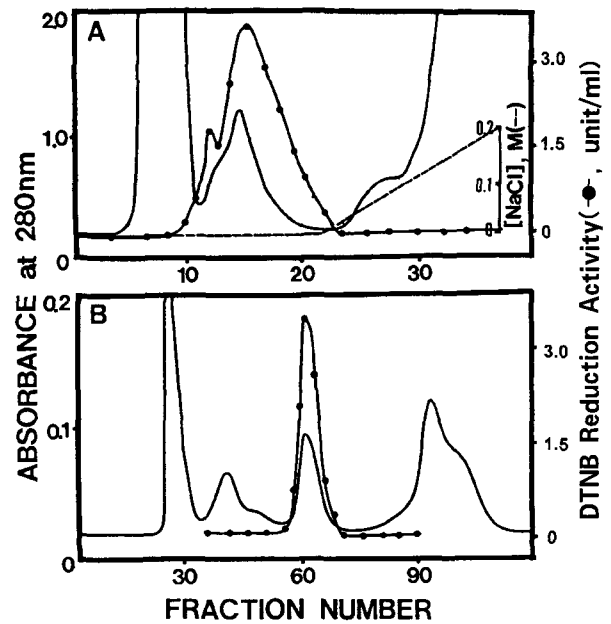
**효모 TPx1에 대한 전자공여체로서의 티오레독신의 활성** 0.2 mM NADPH, 티오레독신 환원효소 5 μg과 정제한 티오레독신 1 μg을 포함하는 50 mM HEPES(pH 7.0) 완충용액에 5 μg의 TPx1 항산화단백질과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 1 mM이 되도록 가하여 0.5 ml로 맞추고 NADPH의 산화를 340 nm에서 흡광도 감소로 관찰하였다[1]. NADPH의 몰 흡광계수인 6,220 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>을 이용하여 NADPH의 산화 속도를 계산하였으며, NADPH 1 μmole을 산화시키는 활성을 1 unit라 하였다.

**PCR을 이용한 유전자의 증폭** 효모 cDNA 유전자는 행(Clontech, 1007b)을 1/10로 희석한 후 95°C에서 5분간 열처리하여 template로 사용하였다. Trx3 유전자에 대한 forward와 reverse primer를 포함하는 반응혼합물을 94°C → 55°C → 72°C의 주기를 30회 반복하여 Trx3 유전자를 증폭하였다.

**결과 및 고찰**

**Trx1, 2, 3 및 TR의 발현 및 정제**

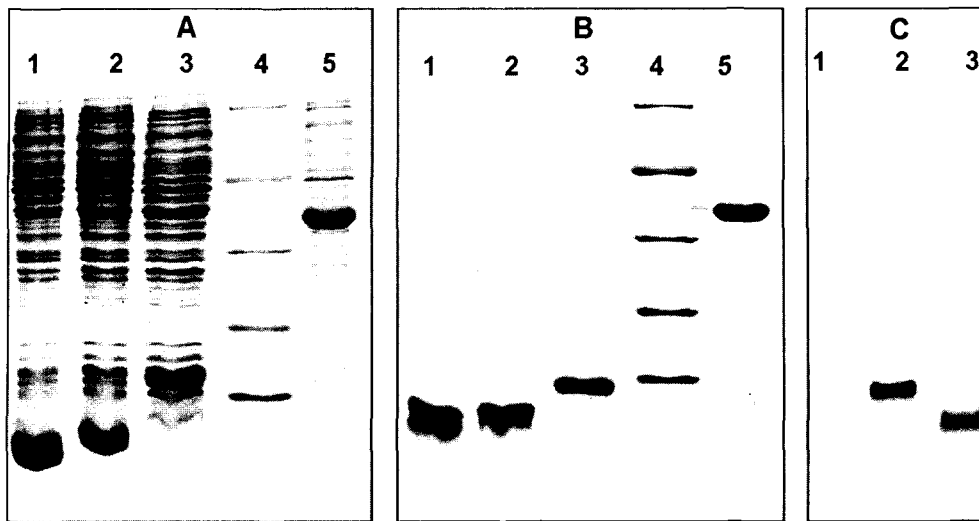
효모의 Trx1, 2, 3 및 TR을 발현시킨 대장균 조추출물



**Fig. 1. Purification of Trx3 from expressed *E. coli* cell extract.** A: DEAE-Sephacel chromatography, B: Sephadex G-75 gel-filtration chromatography.

을 전기영동한 결과 Trx1, 2, 3 및 TR 모두 발현이 잘 됨을 확인하였으며(Fig. 2A), Trx1, 2 및 TR의 경우 효모에서 정제한 단백질의 분자량인 12, 12, 35 kDa와 일치하였다[6]. Trx3의 경우 약 18 kDa 위치에서 발현된 단백질 밴드가 관찰되었는데(Fig. 2A), 이는 Trx3 유전자의 염기서열로부터 추론된 아미노산 서열의 분자량과 일치하였다. 보고된 Trx1, 2 및 Trx3의 아미노산 서열에 따르면 각각 104개, 103개 및 127개의 아미노산으로 구성되어 있으며 Trx3의 경우 Trx1, 2보다 아미노말단쪽으로 25개의 아미노산이 더 많다. 이 발현산물들을 원심분리하여 상층과 침전 분획으로 나누어 전기영동하였을 때 Trx1, 2 및 TR의 경우 발현된 단백질의 대부분은 상층분획에 존재하였다. 그러나 Trx3는 발현된 단백질의 대부분이 침전분획에 존재하였다. 따라서 수용성 단백질의 발현을 증가시키기 위해 22°C에서 발현을 유도하였는데 이 경우에도 더 많은 양이 침전분획에 존재하였다.

대장균에서 발현시킨 Trx3의 정제는 음이온교환수지와 gel 크로마토그래피 방법을 이용하였으며 대장균에서 발현시킨 Trx1, Trx2 및 TR 또한 동일한 방법으로 정제하였다(Fig. 1). 효모 Trx1, 2, 3 및 TR을 발현시킨 대장균 조추출물과 이로부터 정제한 Trx1, 2, 3 및 TR을 전기영동하여 분자량을 비교하였을 때 효모 Trx1, 2 및 TR을 발현시킨 대장균 조추출물의 단백질의 크기는 정제한 단백질의 크기와 서로 일치하였다(Fig. 2). 그러나 Trx3를 발현시킨 대장균 조추출물을 전기영동하였을 때의 분자량은 주로 약 18 kDa이었으나, 정제된 단백질은



**Fig. 2.** SDS-PAGE analysis of the yeast Trx1, Trx2 and Trx3.

Samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15%), and stained with Brilliant Blue R-250. A: Crude extracts of *E. coli*. B: Purified samples. Lane 1, Trx1; lane 2, Trx2; lane 3, Trx3; lane 4, Molecular weight marker (Top to bottom: phosphorylase b=97.4 kDa, ovalbumin=42.7 kDa, carbonic anhydrase=31.0 kDa, soybean trypsin inhibitor=21.5 kDa, lysozyme=14.4 kDa); lane 5, thioredoxin reductase. C: Immunoblotting analysis, probed with anti-Trx3 polyclonal antibody. Lane 1, Crude extracts of *E. coli* with empty vector; lane 2, crude extracts of *E. coli* expressed with Trx3; lane 3, purified Trx3.

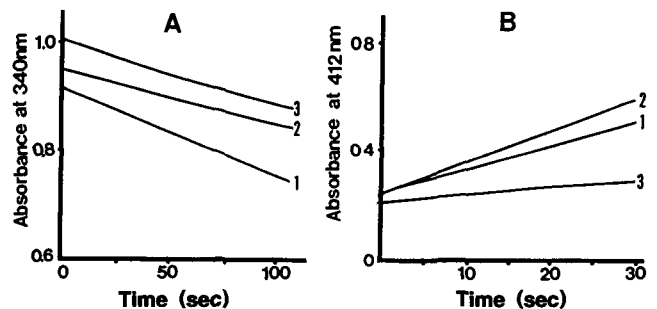
약 14 kDa이었다(Fig. 2). Trx3에 대한 항체로 immunoblotting 실험을 한 결과도 이와 같았다(Fig. 2C). 발현된 Trx3 단백질은 대부분 침전 분획에 존재하였으므로 수용성 분획으로부터 정제한 Trx3가 침전 분획의 발현 단백질과 같은 단백질인지 알아보기 위하여 각각 아미노말단의 아미노산 서열 분석을 하였을 때 상층 분획으로부터 정제한 단백질의 아미노산 서열은 FQSSYTS로 Trx3 유전자의 염기서열로부터 추론된 아미노산 서열의 20-26번에 해당하였다. 반면에 침전분획 중의 Trx3 아미노산 서열 분석 결과, MLFYK으로 보고된 아미노말단의 아미노산 서열과 일치하였다. 따라서 상층으로부터 정제한 단백질은 1-19번 아미노산이 없는 단백질로 생각되었다.

**티오레독신계의 활성조사**

**인슐린 환원 활성 조사** 정제한 Trx1, 2와 3의 인슐린의 disulfide를 환원시키는 활성을 조사하였는데 Trx3의 비활성도는 1.4 unit/mg.protein으로 Trx2와 서로 비슷한 정도의 활성을 보였다. 반면에, Trx1은 Trx2와 3에 비하여 활성도가 2배 정도 더 높았다(Fig. 3A).

**DTNB 환원 활성 조사** NADPH와 TR 존재시 Trx1, 2와 3의 DTNB 환원 활성은 각각 48, 61, 14.6 unit/mg.protein으로 Trx1과 Trx2의 활성은 서로 비슷하였고, Trx3의 활성은 Trx1 활성의 1/3 수준이었다(Fig. 3B).

**효모 TPx1의 항산화활성에 미치는 티오레독신의 효과** 글루타민합성효소는 디티오트레이톨을 포함하는 금속 촉매산화계에 의해 효소활성도가 소실된다. 효모 TPx1

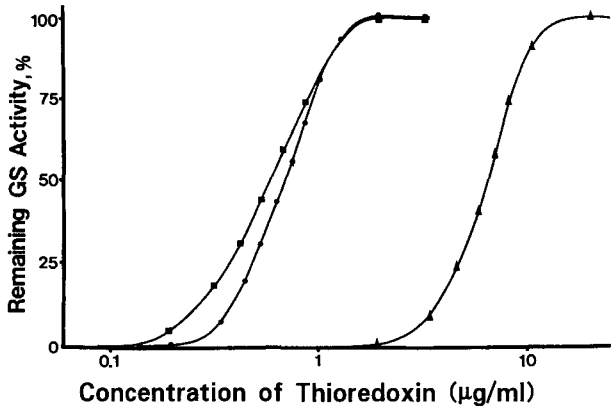


**Fig. 3.** Activity assay of thioredoxin reductase with Trx1, Trx2 and Trx3.

Thioredoxin reductase was assayed for its ability to reduce disulfide bonds of insulin (A) and DTNB (B) in the presence of NADPH and Trx1 (1), Trx2 (2), or Trx3 (3). Concentration of used thioredoxins was 1 µg/ml (A) and 8 µg/ml (B).

항산화단백질을 첨가하면 효소의 불활성화를 억제하고 [8], 이때 티오레독신이 존재하면 TPx1의 항산화활성이 약 10배 증가하는 것으로 보고된 바 있다[9]. 따라서 Trx1, 2와 마찬가지로 Trx3 또한 TPx1의 항산화 효과를 증가시키는지 조사하였다. Trx3 또한 TPx1의 효소 불활성화 억제 효과를 증가시켰는데 Trx1, 2의 IC<sub>50</sub>(글루타민합성효소의 불활성화를 50% 억제하는 단백질의 농도)이 0.7 µg/ml인데 반하여, Trx3는 6.5 µg/ml로 Trx1, 2의 1/10 수준이었다(Fig. 4).

**효모 TPx1에 대한 전자공여체로서의 활성** 효모 Trx1, 2는 티오레독신 환원효소에 의해 환원되어 효모 TPx1에 전자를 제공하여 과산화물을 분해한다고 보고되었다[1]. Trx3 또한 TPx1 단백질의 전자공여체가 될 수 있는지

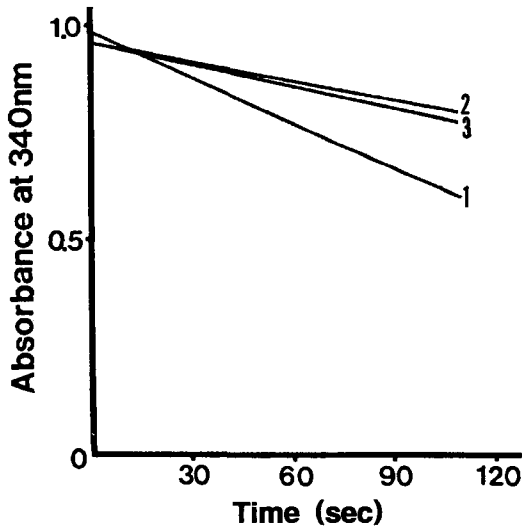


**Fig. 4. Comparison of glutamine synthetase protection in the presence of TPx1 and various concentrations of Trx1, Trx2 or Trx3.**

Protection of glutamine synthetase against the inactivation induced by the DTT/Fe<sup>3+</sup> oxidation system was measured in the presence of TPx1 (0.04 mg/ml) and various concentration (µg/ml) of Trx1 (●), Trx2 (■), or Trx3 (▲).

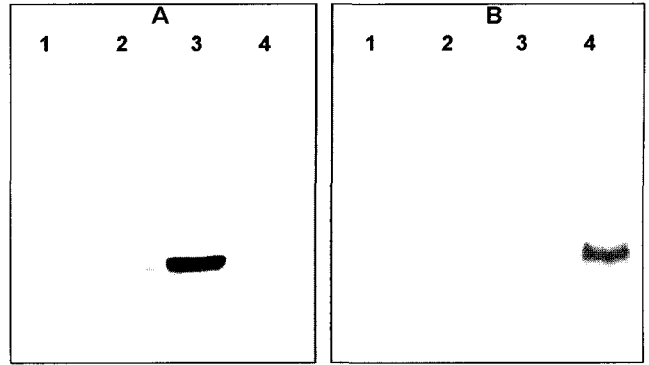
알아보기 위해 티오레독신 의존성 과산화물 분해활성을 조사하였다. TPx1의 티오레독신 의존적인 과산화물 분해활성은 Trx1, 2, 3의 경우 각각 5, 1.8, 2.2 unit/mg. protein으로 Trx3는 Trx2와 활성이 비슷하였으며, Trx1은 Trx2 또는 3보다 약 2.5배 높은 활성을 나타냈다(Fig. 5). 이 실험결과는 Trx3가 Trx1보다 TPx1 단백질을 환원시키는 전자공여체로서의 활성이 더 낮음을 시사해준다.

Immuoblotting Trx3에 대한 항체와 효모 조추출물,



**Fig. 5. NADPH oxidation coupled by TR, Trx (1, 2, 3) and the TPx1 protein to the reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

NADPH oxidation was monitored as the decrease in A<sub>340</sub> in the presence of TR (0.01 mg/ml), the TPx1 protein (0.01 mg/ml), 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and Trx1 (1), Trx2 (2), or Trx3 (3). Concentration of used thioredoxins was 2 µg/ml.



**Fig. 6. Immunoblotting analysis.**

Samples were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (15%), blotted onto a nitrocellulose membrane, and probed with anti-Trx2 (A) and Trx3 (B) polyclonal antibodies. Lane 1, Yeast crude extract; lane 2, Trx1; lane 3, Trx2; lane 4, Trx3.

정제한 Trx1, 2 및 3 단백질의 교차실험을 했을 때 정제한 Trx3만이 양성반응을 나타내었다(Fig. 6B). 또한 Trx3가 발현된 대장균 조추출물과 empty vector만을 갖는 대장균 조추출물을 Trx3 항체와 반응시켰을 때 Trx3가 발현된 대장균 조추출물만이 양성반응을 나타내었다(Fig. 2C). 위의 4가지 시료를 Trx2에 대한 항체로 반응시켰을 때 효모 조추출물과 Trx1, 2 단백질이 양성반응을 보였는 바 Trx1은 Trx2에 비하여 50% 정도의 교차반응을 하였으며, Trx3는 전혀 교차반응을 하지 않았다(Fig. 6A). 이는 보고된 아미노산서열 분석 결과 Trx1과 2는 78% 정도의 상동성을 갖는데 반해 Trx3는 Trx1 또는 2와 33% 정도로 상동성이 상대적으로 낮기 때문으로 생각된다.

Trx1과 2는 효모로부터 정제된 바 있다[6]. Trx3가 효모에서 발견되는지 알아보기 위하여 효모 cDNA 유전자은행을 template로 하여 PCR 기법에 의해 Trx3 유전자가 증폭되는지 조사하였을 때 Trx3 유전자 크기인 약 380 bp의 DNA 조각이 증폭됨을 확인하였다(Fig. 7). 이로부터 Trx3는 효모에서 발견되는 단백질로 생각할 수 있었으나, Trx3에 대한 항체를 이용하여 immunoblotting을 하였을 때는 음성반응을 나타내는 서로 일치하지 않는 결과를 보여 주었다(Fig. 6B). 이는 Trx3 단백질이 어떤 특정 조건에서만 발견되는 단백질일 가능성을 제시해 준다. Trx3는 보존된 시스테인 잔기뿐 아니라 카르복시 말단쪽에 또 다른 시스테인 잔기를 2개 더 가지고 있다. Trx3가 효모에서 발견되는 단백질임과 만약 발견되는 단백질이라면 Trx1, 2와는 다른 어떤 특별한 기능을 갖는지 조사되어야 할 것이다.

**요 약**

효모의 전체 게놈 서열에서 확인된 새로운 티오레독신 (Trx3)과 이미 효모에서 티오레독신으로서의 기능이 보



**Fig. 7.** 1.5 % agarose gel electrophoresis.

PCR reaction was performed with forward Trx3 and reverse Trx3 primers for Trx3 and yeast genomic library (1) or yeast cDNA library (2) as a template. Lane 3, 1 kb DNA ladder.

고된 Trx1, 2 및 TR을 대장균에 발현시켜 정제후 활성을 비교, 조사하였다. Trx1, 2 및 TR은 대부분 수용성 분획에 발현되었으며, 이로부터 정제한 단백질의 분자량은 보고된 분자량과 일치하였다. Trx3는 수용성 분획과 침전 분획 모두에서 발현되었으며, 수용성 분획으로부터 정제한 Trx3의 분자량은 14 kDa이었고, 침전 분획의 Trx3는 18 kDa였다. 수용성 분획으로부터 정제한 Trx3의 아미노말단의 아미노산 서열은 FQSSYTS로 분석되었으며 이는 보고된 Trx3의 20번에서 26번의 아미노산에 해당하였다. NADPH, 티오레독신 환원효소와 함께 Trx3는 인슐린과 DTNB의 disulfide 결합을 환원시켰다. Trx3는 디티오프레이톨을 포함하는 금속촉매산화계에 의한 효소 불활성화를 억제하는 TPx1의 항산화효과를 증가시켰으며, TPx1의 항산화활성을 증가시키는 Trx3의 활성은 Trx1 또는 2의 10% 수준이었다. 또한 Trx3는 TPx1의 disulfide를 thiol로 환원시켜 TPx가 티오레독신의존성 과산화물 분해활성을 갖도록 하였다. Western blotting 실험 결과, Trx3에 대한 항체는 효모 조추출물과 정제된 Trx1 및 Trx2와는 교차반응 하지 않았다. 그러나, 효모 cDNA 유전자 은행을 template로 한 PCR 실험에서는 Trx3를 암호화하는 유전자가 증폭되었다.

## REFERENCES

- Chae, H. Z., S. J. Chung, and S. G. Rhee. 1994. Thiore-
- doxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J. Biol. Chem.* **269**: 27670–27678.
- Chamberlin, M. 1974. Isolation and characterization of prototrophic mutants of *Escherichia coli* unable to support the intracellular growth of T7. *J. Virol.* **14**: 509–516.
- Ejiri, S. I., H. Weissbach, and N. Brot. 1979. Reduction of methionine sulfoxide to methionine by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **139**: 161–164.
- Gan, Z. R. 1991. Yeast thioredoxin genes. *J. Biol. Chem.* **266**: 1692–1696.
- Gasdaska, J. R., M. Berggen, and G. Powis. 1995. Cell growth stimulation by the redox protein thioredoxin occurs by a novel helper mechanism. *Cell Growth Differ.* **6**: 1643–1650.
- Gonzalez Porqué, P., A. Baldesten, and P. Reichard. 1970. Purification of a thioredoxin system from yeast. *J. Biol. Chem.* **245**: 2363–2370.
- Holgren, A. 1985. Thioredoxin. *Annu. Rev. Biochem.* **54**: 237–271.
- Kim, K., I. H. Kim, K.-Y. Lee, S. G. Rhee, and E. R. Startman. 1988. The isolation and purification of a specific protector protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *J. Biol. Chem.* **263**: 4704–4711.
- Kwon, S. J., J. W. Park., W. K. Choi, I. H. Kim, and K. Kim. 1994. Inhibition of metal-catalyzed oxidation system by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 8–15.
- Lim, C. J., B. Haller, and J. A. Fuchs. 1985. Thioredoxin is the bacterial protein encoded by *fip* that is required for filamentous bacteriophage *f1* assembly. *J. Bacteriol.* **161**: 799–802.
- Lundstrom, J. and A. Holgren. 1990. Protein disulfide-isomerase is a substrate for thioredoxin reductase and has thioredoxin-like activity. *J. Biol. Chem.* **265**: 9114–9120.
- Matthews, J. R., N. Wakasugi, J. L. Virelizier, J. Yodoi, and R. T. Hay. 1992. Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- $\kappa$ B by reduction of a disulfide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res.* **20**: 3821–3830.
- Miranda-Vizuete, A., A. E. Damdimopoulos, and J. A. Gustafsson. 1997. Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**: 30841–30847.
- Mouaheb, N., D. Thomas, L. Verdoucq, P. Monfort, and Y. Meyer. 1998. *In vivo* functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 3312–3317.
- Muller, E. G. 1991. Thioredoxin deficiency in yeast prolong S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J. Biol. Chem.* **266**: 9194–9202.
- Muller, E. G. 1994. Deoxy ribonucleotides are maintained at normal levels in a yeast thioredoxin mutant defective in DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **269**: 24466–

- 24471.
17. Muller, E. G. 1996. A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Mol. Biol. Cell* **7**: 1805–1813.
  18. Nakamura, H., M. Matsuda, K. Furuke, Y. Kitaoka, S. Iwata, K. Toda, T. Inamoto, Y. Yamaoka, K. Ozawa, and J. Yodoi. 1994. Adult T-cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunology Lett.* **42**: 75–80.
  19. Russel, M. and P. Model. 1985. Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 29–33.
  20. Schallreuter, K. U. and J. M. Wood. 1986. The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **136**: 630–637.
  21. Spector, A., G. Z. Yan, R. R. Huang, M. J. McDermott, P. R. Gascoyne, and V. pigiet. 1988. The effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> upon thioredoxin-riched lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **263**: 4984–4990.
  22. Spyrou, G., E. Enmark, A. Miranda-Vizueté, and J. A. Gustafsson. 1997. Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **272**: 2936–2941.
  23. Tagaya, Y., Y. Maeda, A. Mitsui, N. Kondo, H. Matsui, and J. Yodoi. 1989. ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; Possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J.* **8**: 757–764.
  24. Tsang, M. L. and J. A. Schiff. 1976. Sulfate-reducing pathway in *Escherichia coli* involving bound intermediates. *J. Bacteriol.* **125**: 923–933.
  25. Wakasugi, N., Y. Tagaya, H. Wakasugi, A. Mitsui, M. Maeda, J. Yodoi, and T. Tursz. 1990. Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type 1 and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**: 8282–8286.

(Received August 12, 1998)