Journal of Natural Sciences
Pai Chai University, Korea
Vol. 14, No. 1 : 7~24, 2004

Haemophilus Influenzae TPx-GRX의 생화학적 특성연구

이동석, 김일한
배재대학교 자연과학대학 생명공학과

Biochemical characterization of *Haemophilus Influenzae* TPx-GRX

Dong-Suk Lee, Il-Han Kim
Department of Biochemistry, Graduate School of Paichai University
Taejeon 302-735, Korea

Thiol peroxidase인 E.*coli* AhpC의 아미노산 서열을 database를 이용해 분석하여, TPx와 상동성이 있는 새로운 형태의 Thiol peroxidase를 찾아내었다.

그 중 병원성을 갖는 박테리아인 *Haemophilus Influenzae*에서 존재하는 TPx와 유사하고, GRX와 함께 fusion 되어있는 새로운 형태의 단백질의 유전자를 클로닝하여 E.*coli*에서 과발현시켜 분리정제 하였다.

정제된 TPx-GRX는 환원제로 thiol 성분을 갖는 MCO system(Fe, DTT, Oxygen)에 의하여 Glutamine synthetase(GS)의 불활성화를 방어하는 티올 특이적 항산화활성을 갖고, peroxides를 제거하는 peroxidase 활성을 갖는 것을 밝혔다.

이 결과들로부터 TPx-GRX는 새로운 형태의 Thiol peroxidase임을 알 수 있었다. 더 나아가서 이 결과들은 TPx-GRX가 병원성 박테리아에서 oxidative stress를 막는 생리적으로 중요한 역할을 할 것이라는 것을 시사한다.

We found new type of thiol peroxidase, fused with GRX. (TPx-GRX) The TPx-GRX exists in pathogenic bacteria including *Haemophilus Influenzae*. This protein was homogeneously purified from the E.*coli* recombinant overexpressing TPx-GRX.

In the presence of a thiol-containing electron donor such as DTT, the purified TPx-GRX has potent the antioxidant activity to prevent the inactivation of GS by the MCO system, which is comprised of DTT, Fe^{3+}, and O^{2}. The antioxidant activity is much higher that other bacteria thiol peroxidase.

To investigate the peroxidase activity of TPx-GRX, we directly measured the peroxidase activity of TPx-GRX toward peroxides in terms of the removal of peroxides in the presence of GSH. This result demonstrates that the peroxidase activity of TPx-GRX.

These taken together results suggest that TPx-GRX is a new member of thiol peroxidase. These observations also suggest that in the pathogenic bacteria, TPx-GRX plays an important antioxidative role as a multiple array defence mechanism against oxidative stress.

I. 서 론

호기적 환경에서 Hydrogen peroxide(H_2O_2), Superoxide anion($\cdot O_2^-$), Hydroxyl radical($\cdot OH^-$)과 같은 활성 산소종은 호흡하는 동안에 산소분자의 불완전한 환원, 식작용(Phagocytosis)동안 respiratory burst에 연계된 NADPH의 산화, hemoglobin의 autooxidation, xenobiotics의 redox cycling등과 같은 많은 생리적인 과정에서 생성된다(1). $O_2+e^- \rightarrow O_2^-$, $2O_2^-+2H^+ \rightarrow O_2+H_2O_2$, $Fe_2^++H_2O_2 \rightarrow Fe_3^++OH^-+\cdot OH$, $O_2^-+H_2O_2 \rightarrow \cdot OH+OH^-+O_2$, $NADPH+2O_2 \rightarrow NADP^++2O_2+H^+$, $H_2O_2+Cl^-+H^+ \rightarrow H_2O+HOCl$ 등 여러 종류의 활성 산소종에 의해 암, 염증, 동맥경화증, 노화 등의 퇴행성 질병들이 발생한다는 보고가 많고, 이러한 해로운 영향을 막기 위해서 cell은 defense system으로 heme-containing enzyme인 catalases, selenium- dependent enzyme인 glutathione peroxidase(GSH Px), NADPH를 소비 glutathion을 생성하는 glutathione reductase, superoxide dismutases(SOD) 같은 다양한 항산화 효소를 갖추고 있다(2). 생체내 세포에서 산화손상의 형태의 다수는 H_2O_2에 의해 야기되어 졌고(3), 산화손상에 대하여 보호하기위한 세포는 H_2O_2 제거를 위해 다양한 항산화제를 보유하고 있다. 그들은 H_2O_2를 H_2O와 O_2로 전환을 촉매하는 Catalase를 포함하고 있으며, 동물에서는 H_2O_2 독성에 대하여 부가적으로 막을 수 있는 효소가 존재하는데 그것들은 alkyl hydroperoxide의 환원을 그들과 일치된 alcolhol과 H_2O로 촉매하는 glutathione peroxidase(GSH Px)를 가지고 있다. 또한 세포질이나 미토콘드리아에서 생성된 $\cdot O_2^-$는 superoxide dismutases (SOD)에 의해 H_2O와 $\cdot OH^-$로 전환되어진다. 그러나 원핵세포에서는 GSH Px의 증거가 없다(4).

생물학적계에서 자유라디칼 손상은 $\cdot OH^-$ 라디칼이 철과 구리 같은 전이금속 의존성 생성에 기인한다. 철 또는 구리는 산소와 반응하여 산소를 환원시키고 thiol 성분, 아스코르브산, NAD(P)H/NAD(P) oxidase와 같은 전자공여체들의 존재 하에서 활성산소종을 만든다. 그와 같은 전자공여체들은 Fe_3^+(또는 Cu^{2+})을 Fe_2^+로 (Cu^{2+})로 환원시킨다. 환원된 금속이온들

은 산소와 반응하여 Superoxide anion(· O_2^-)을 형성하고, $2O_2^-+2H^+ \rightarrow O_2+H_2O_2$ 와 같이 H_2O_2을 빨리 형성한다. 반대로 H_2O_2는 $Fe_2^+ + H_2O_2 \rightarrow Fe_3^+ + OH^- + \cdot OH$처럼 Fenton 반응을 통해 환원된 금속이온들과 반응하여 Hydroxyl radical(· OH^-)을 형성한다. 이렇게 형성된 Hydroxyl radical(· OH^-)은 매우 반응성이 높아 첨가 및 치환반응을 통하여 세포성분들과 반응하여 단백질, DNA, 지방등에 영향을 끼친다.

강력한 산화제인 Hydroxyl radical(· OH^-)은 많은 세포성분들과 확산조절에 접근하는 속도로 반응하고 막지방의 지질과산화(lipid peroxidation)와 단백질들의 산화를 유발시킨다. 어떤 효소에 환원된 철(Fe_2^+)이 Fenton 반응을 수반하였을 때 국부적으로 생긴 · OH^-은 Fe_2^+-결합자리에서 아미노산과 반응하여 그 효소의 활성을 손상시킨다.

효모에는 5 종류의 thiol peroxidase가 존재하여 각 TPx의 동위효소가 고유한 생리적 역할을 할 가능성을 실험적으로 증명해 보고 되어있다(5). 또한 대장균에는 이미 알려진 AhpC 이외에 새로운 두 종류의 thiol peroxidase (p20, BCP)들이 존재함을 밝혀 생화학적 연구를 통하여 이 thiol peroxidase가 peroxidase의 활성을 지님을 알려졌다(6,7). 3 종류의 대장균 TPx 중에서 두 종류 (AhpC, BCP)는 원형질 (cytoplasm)에, 나머지 한 종류 (p20)는 periplasm에 각각 존재하고 있음을 밝혔다. 대장균 AhpC 아미노산 서열을 DNA database를 이용하여 분석해 보면 TPx와 상동성이 있는 새로운 형태의 단백질들을 발견할 수 있다.

이 단백질들은 그 생리기능이 밝혀져 있지 않은 단백질로 정의되어 있었지만, 대장균과 같은 비 병원성 박테리아에는 존재하지 않고, 모두가 *Haemophilus influenza, Vibrio cholera*등의 병원성 균에 만 존재하고 있었다. (아래 Clustal W 참조.)

CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment.

```
Nsp        -----MFSNREGQRVPQVTFRTRQNNEWVNVTTDDLFAGKTVAVFSLPGAFTPTCSSTHLP 56
NP         -----MVANRRGQRVPNVTFHTRKDNQWVDVTTDQLFANKTVVVFSLPGAYTPTCSSTHLP 56
VC2637     MRNTMFTSKEGQTIPQVTFPTRQGDAWVNVTSDELFKGKTVIVFSLPGAFTPTCSSTHLP 60
VP         -----MFVSKEGQNVPQVTFPTRQGDTWVNVTSDDLFKGKTVIVFSLPGAFTPTCSSSHLP 56
YP         -----MFTSQEGKKVPQVTFHTRQGDQWIDVTTDDLFSNKTVIVFSLPGAFTPTCSSSHLP 56
HS         ------MT-MEGKKVPQVTFRTRQGDQWVDVTTADLFDNKTVVLFSLPGAFTPTCSATHLP 54
PM         ------MTLMEGKKVPQVTFHTRQGDQWVDVTSAELFDNKTVVLFSLPGAFTPTCSSTHLP 55
HI         ------MSSMEGKKVPQVTFRTRQGDKWVDVTTSELFDNKTVIVFSLPGAFTPTCSSSHLP 55
NM         ---MALQDRTGQKVPSVVFRTRVGDTWKDVSTDDLFKGKKVVVFSLPGAFTPTCSSSHLP 57
RM         -MIQMLQSREGQRVPNVTFRVRANNEWKDVTTAELFDGKTVVLFSLPGAFTPTCSSTHLP 59
                  .    *: :*.*.* .* .: * :*:: :** .*.* :******:*****::***
```

```
Nsp       GYNELAKVFKDNGVDEIVCISVNDAFVMNEWAKTQEAENITLIPDGNGEFTEGMGMLVDK 116
NP        GYNELAGIFKENGVDDIICISVNDAFVMNEWSKDQEAENITLIPDGNGEFTEGMGMLVDK 116
VC2637    RYNELFPVFKEHGVDSILCVSVNDTFVMNAWKDDQNADNITFIPDGNGEFTDGMGMLVDK 120
VP        RYNELFPVFKEHGVDEILCISVNDAFVMNAWKHDQEAEHITFIPDGNGEFTDGMGMLVDK 116
YP        RYNELAGVFKQHGVDSILCVSVNDTFVMNAWKSDQHAENITFVPDGNGEFTKGMNMLVEK 116
HS        RYNELACEFKALGVDDIICVSVNDTFVMNAWKADQESENVTVIPDGNGEFTSGMGMLVDK 114
PM        RYNELACEFKALGVDSIICMSVNDTFVMNAWKADQECENVIVIPDGNGEFTEGMGMLVGK 115
HI        RYNELAPVFKKYGVDDILVVSVNDTFVMNAWKEDEKSENISFIPDGNGEFTEGMGMLVGK 115
NM        RYNELFGAFKENGVDAIYCVSVNDTFVMNAWAAEEESDNIYMIPDGNGEFTEGMGMLVGK 117
RM        RYNELAPVFAKQGVDAILCVSVNDTFVMNEWAKDQESENIVMIPDGNGEFTDGMGMLVDK 119
           ****   *   *** *  :****:**** *   :..::: .:********.**.*** *

Nsp       TDLGFGKRSWRYSMLVKDGVIEKMFIEPDVPGDPFEVSDAQTMLKHINPQAAKPKLVSLF 176
NP        SDLGFGKRSWRYSMLVRDGVINQMFIEPDEPGDPFKVSDAETMLRYINPQAVKPEVVSLF 176
VC2637    NDLGFGKRSWRYSMLVKDGVVEKMFIEPNEPGDPFKVSDADTMLKYIAPQYKVQESVTIF 180
VP        NDIGFGKRSWRYSMLVKDGVIEKMFIEPNEPGDPFKVSDADTMLNYIAPEYRTQESITVF 176
YP        ADLGFGPRSWRYSMLVRNGVVEKMFVEPNKPGDPFEVSDADTMLKYLAPDFKVQESVAVF 176
HS        TELGFGKRSWRYSMLVKNGVVEKMFIEPQEPGDPFKVSDADTMIKYLNPNWTEKPSVSII 174
PM        EDLGFGKRSWRYSMLVRNGIVEKMFVEPQEPGDPFKVSDADTMIKYLKPEWQAKPSVSVI 175
HI        EDLGFGKRSWRYSMLVKNGVVEKMFIEPNEPGDPFKVSDADTMLKYLAPQHQVQESISIF 175
NM        EDLGFGKRSWRYSMLVNDGVVEKMFIEPEEPGDPFKVSDADTMLQFVAPDWKAQESVAIF 177
RM        ADLGFGKRSWRYSMLVKDGVVDKMFIEPEEPGDPFKVSDADTMLNYIAPTAKQPDQVVVF 179
           ::*** *********.:*::::**:**: *****:****:**:..: *       : ::

Nsp       TKVGCPFCARAKAALQENGIEYEEITLGKGITTRSLRAVTGATTVPQVFIDGVLIGGSEA 236
NP        AKVGCPFCARAKAMLKEHGINYEEITLGKDITTRSLRAVTGATTVPQVFIDGKLIGGSEA 236
VC2637    TKPGCPYCAKAKQALIDAGLQYEELILGKDATTVSLRAVSGRTTVPQVFIGGKHIGGSDD 240
VP        TKPGCPFCMKAKQNLIDHGLQYEEVILGKDATSVSLRAITGRTTVPQVFIGGKHIGGSEE 236
YP        TKPGCPFCAKAKQMLQDHGLQYEEIVLGKDATTVSLRAVSGRSTVPQIFIGGRHIGGSDD 236
HS        TKPGCPFCAKAKTLLKEKGYTFEEIILGRDASTISVRAITGKTSVPQVFIGGQYIGGSDD 234
PM        TKPGCPYCAKAKALLKAKDYTFEEIVLGRDASTISVRAITGKTSVPQVFIGGKYIGGSEE 235
HI        TKPGCPFCAKAKQLLHDKGLSFEEIILGHDATIVSVRAVSGRTTVPQVFIGGKHIGGSDD 235
NM        TKPGCQFCAKAKQALQDKGLSYEEIVLGKDATVTSVRAITGKMTAPQVFIGGKYIGGSED 237
RM        SKIGCSHCAKAKQLLSDNGFEYIDVPLENKIRGKVLGAVSGEMTAPQVFINGKLVGGAEA 239
          :* ** .* :**  *   .  : :: * .      : *::*  :.**:**.*  :**::

Nsp       LTDYLSTIKQEKVGV 251
NP        LEAYFAAK------- 244
VC2637    LEVYLNQ-------- 247
VP        LETYLG--------- 242
YP        LEKYLPA-------- 243
HS        LAQYFA--------- 240
PM        LEKYFA--------- 241
HI        LEKYFA--------- 241
NM        LEAYLAKN------- 245
RM        LEQYLAR-------- 246
           *  *:
```

Haemophilus influenzae Rd(HI), Vibrio cholerae(VC2637),
Vibrio parahaemolyticus(VP), Yersinia pestis(YP), Neisseria meningitidis(NM),
Haemophilus somnus(HS), Nostoc sp.(Nsp), Pasteurella multocida(PM),
Nostoc punctiforme(NP), Ralstonia metallidurans(RM)

이 TPX는 지금까지 알려져 있지 않은 새로운 형태인 Thiol Peroxiodase Familiy로써 근간에 보고된바 있으나(8), 그 연구 결과는 이 단백질의 3차구조를 바탕으로 GSH Pertoxidase의 활성을 예측하는 수준에 머물고 있어서 작용기작을 포함한 효소화학적 연구가 필요하다.

이에 이 새로운 형태의 단백질을 대장균에서 발현시켜, 분리 정제하여 지금까지 알려진 항산화 단백질과 관련해 활성을 연구하고, 생리학적 역할 연구에 실험 목적을 두었다.

II. 재료 및 방법

1. *Haemophilus Influenzae* TPx-GRX와 GRX 부위(149 proline이하)가 없는 TPx domain을 발현균주에 클로닝

TPx-GRX foward primer는 5'GGAATTCCATATGTCTAGTATGGAAGGAAAAAAAG3', TPx-GRX revers primer는 5'CCGCGGATCCTTATGCAAAGTATTTTTCTAAATCGT3', 그리고 TPx domain의 revers primer는 5'CCGCGGATCCTTATGCAAGGTATTTCAACATA GTG3'로 (주)제노텍에 의뢰하여 제작하였다. 제작된 각 primers와 Taq polymerase, dNTP mixture(Takara 제품)를 PCR하여 *Haemophilus Influenzae*의 genomic DNA로부터 TPx-GRX와 TPx domain의 DNA를 얻었다. 이들을 agarose(USB사) gel에 전기 영동하여 확인했고, Geneclean을 한 후, restriction enzyme(BamHI과 NdeI)으로 digest하고, pT7-7 plasmid(IPTG에 의해 과 발현되는 T7 RNA polymerase promoter를 갖으며, ampicillin selection maker를 포함하고 있다.)와 ligation 하였다. 이를 제조된 XL1-blue competent cell 에 transformation하였고, 얻어진 colonies를 LB/Amp^{+} 배지에 키워 alkaline plasmid DNA 분리방법으로 plasmid DNA를 분리하였다. 이렇게 분리된 plasmid DNA를 protein

과 발현 균주인 BL21(DE3) competent cell 에 transformation하였다.

2. *Haemophilus Influenzae* TPx-GRX와 GRX 부위(149 proline이하)가 없는 TPx domain의 과대발현 및 균주파쇄

Transformation된 BL21 균주의 colonies를 10㎖ LB/Amp$^+$배지에 seed culture한 후, 5L LB/Amp$^+$배지에 1/250 되게 seed를 하고, 37℃ 200rpm으로 O.D 0.4 정도까지 배양하다가 500mM IPTG를 final 0.5mM로 넣어주고, 20℃에서 12hr 배양하여 과 발현 시킨다. 과 발현된 균주를 Centrifugation(5000rpm 4℃ 20min)하여 harvest하고, 이를 PBS buffer로 wash한 후, 다시 Centrifugation(5000rpm 4℃ 20min)하였다. 이렇게 모아진 균주를 50mM Tris pH7.4 buffer 30~40㎖에 풀어준 후, Sonics & Materials社의 Sonicator를 이용하여 duty cycle 50에 output control 8로 40초씩 30회 정도 sonication하여 균주를 파쇄한다. 이를 Centrifugation(18000rpm 4℃ 30min)하여 상등액과 혼탁물을 분리한다.

3. TPx-GRX와 TPx domain의 분리 · 정제

상등액을 Ammonium sulfate precipitation(salt out) 방법을 이용해 용해도에 따라 분리하였고, strong ion-exchanger인 Q-Sepharose FF resin(Pharmacia社) column과 Sephacryl S-100 resin (Pharmacia社) column을 이용, Liquid Chromatography (LC) system인 Phamacia社의 GradiFrac^{TM} system을 사용하여 분리, 정제하였다.

4. TPx-GRX와 TPx domain의 항산화 활성도 측정(GS assay).

항산화 단백의 항산화 활성은 정제된 GS가 DTT 를 함유하는 thiol- MCO(metal catalyze oxidation) System에 의해 불 활성화되는 것을 방어하는 활성도를 측정한다. 0.2㎕ GS, 10mM DTT , 3mM $Fe3^+$, 100mM Tris (pH7.0) Buffer에 TPx-GRX 또는 TPx domain을 함유하는 30㎕의 반응액을 37℃에서 15분간 불활성 시킨 다음, 여기에 0.4mM ADP, 150mM Glutamine, 10mM Potassium arsenate(K- AsO4), 20mM Hydroxylamine, 0.4mM $MgCl_2$ 및 100mM Tris (또는 Hepes) pH7.0 Buffer로 구성된 0.5㎖의 glutamyl transferase 활성 측정용액을 가하고, 37℃에서 10분간 반응시킨 후 $FeCl_3$, TCA 및 HCl을 함유하는 반응 정지액을 0.5㎖ 가하여 반응을 마치면 540nm에서 흡광도를 측정하여 남아있는 GS의 활성도를 측정한다.

5. TPx-GRX와 TPx domain의 Peroxidase 및 glutathion peroxidase 활성을 측정하는 방법. (Fox 1 assay)

Peroxidase 활성은 peroxides(tert-Butyl hydroperoxide, Hydrogen peroxide, Cumene hydroperoxide, Linoleic acid hydroperoxide)를 substrates로 사용하여 환원제로 GSH를 가해 남아있는 peroxide양을 FOX 1 assay 방법으로 직접 측정한다. 500mM HEPES pH7.0 Buffer 12㎕, 그리고 0.5M NaCl 4㎕, TPx-GRX 또는 TPx domain 8㎕에 5mM GSH 3㎕를 10초 간격으로 넣고 37℃에서 30min간 반응시킨 후 Fox 1 solution을 1㎖ 넣고 room temperature에서 30min이상 방치하고, 560nm에서 흡광도를 측정한다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. *Haemophilus Influenzae* TPx-GRX와 TPx domain을 발현균주에 클로닝

*Heamophilus Influenzae*의 genomic DNA와 제작한 primer로 PCR하여 TPx-GRX와 GRX 부위(164 proline이하)가 없는 TPx domain의 gene을 얻었다. 이를 pT7-7에 ligation 하여 E.coli(XL1-Blue)에 transformation해서 plasmid를 얻었고, 소량을 restriction enzyme (BamHI과 NdeI) 으로 digest하여 확인하였다(Figure-1).

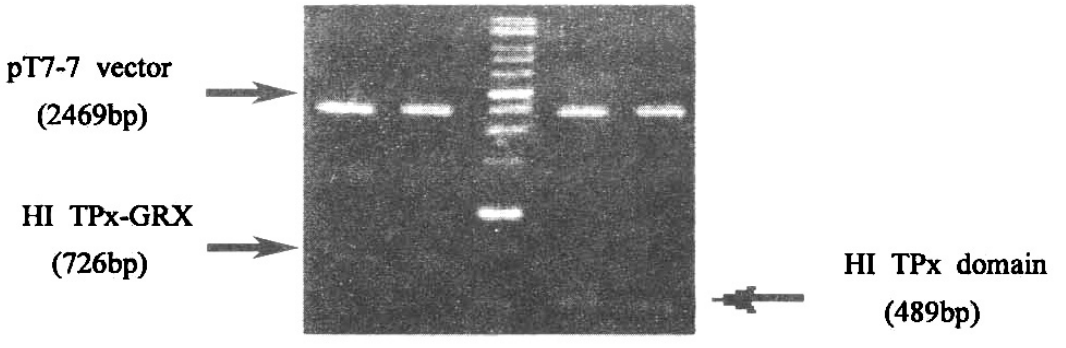

그림 1. Digestion of the isolated plasmid DNA to BamHI and NdeI.

클로닝된 pT7-7+TPx-GRX와 pT7-7+TPx domain을 restriction enzyme으로 소량 digest 하여 1% agarose gel로 확인한 결과.

2. *Haemophilus Influenzae* TPx-GRX의 E.coli(BL21-DE3)에서 과대발현 및 분리 정제.

BL21(DE3)에 transformation된 TPx-GRX를 500μM IPTG로 induction하여 20℃에서 12hr over expression 시켰고, 균주를 harvest해 sonication 하였다.

A. Q-Sepharose FF chromatography를 이용한 분리

BL21(DE3)의 crude extract를 Q-Sepharose FF chromatography에 Flow rate는 0.5㎖/min, 각 fraction vol.은 2.5㎖씩, AUSF는 1 로 적용하였고, gradient는 linear gradient로 50mM Tris/500mM NaCl pH7.4 buffer를 total 320ml 가하였다.

각 fraction의 단백질 양은 Figure-2a에 보였고, 단백질이 있는 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인하였다(Figure-2b).

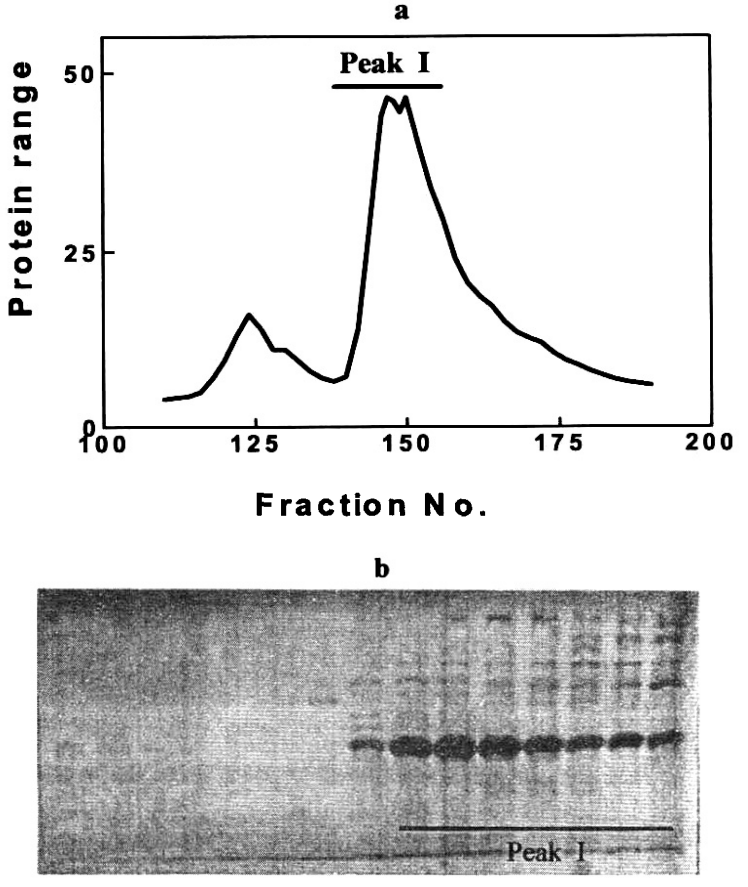

그림 2. TPx-GRX의 Q-Sepharose FF chromatography에 의한 분리.

a. TPx-GRX의 crude extract를 Q-Sepharose FF chromatography를 이용해 분리한 각fraction의 protein양을 나타낸 것. **b.** 각 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인한 것.

이로써 Peak I (faction NO. 144~159)을 얻었고, 이것을 합하여 concentration을 하였다.

B. Sephacryl S-100 chromatography를 이용한 분리.

Peak I을 concentration하여 미리 50mM Tris/200mM NaCl pH7.4 buffer로 평형이 된 Sephacryl S-100 column(100㎖)에 loading하였다.

Flow rate는 0.4㎖/min, 각 fraction vol.은 2㎖씩, AUSF는 0.5 로 적용하였다. 각fraction의 단백질 양은 Figure-3a에 보였고, 단백질이 있는 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인하였다(Figure-3b).

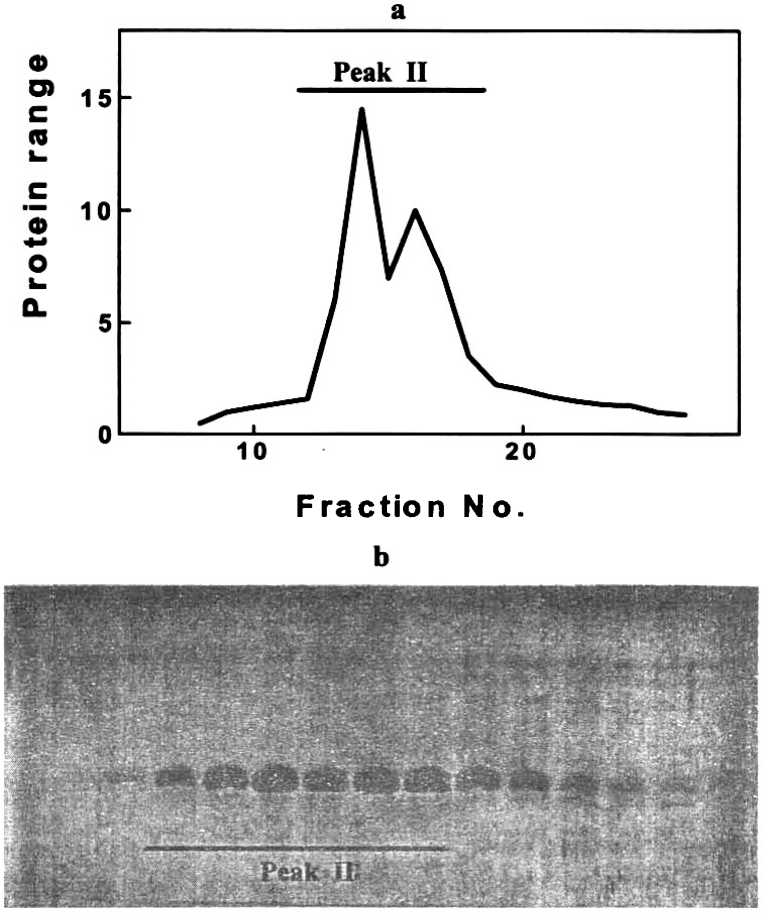

그림 3. TPx-GRX의 peak I을 Sephacryl S-100 chromatography를 이용한 분리.

a. TPx-GRX의 peak I을 concentration하여 Sephacryl S-100 chromatography를 이용해 분리한 각 fraction의 protein양을 나타낸 것. **b.** 각 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading 하여 확인한 것.

이로써 Peak II (faction NO. 14~19)을 얻었고, 이것을 합하여 concentration을 하여, 순수 분리된 1.79㎍/㎕의 TPx-GRX protein 약3㎖ 을 얻었다.

3. *Haemophilus Influenzae* TPx domain의 E.coli(BL21-DE3)에서 과대발현 및 분리 정제.

A. Ammonium sulfate precipitation (salt out)을 이용한 TPx domain 분리.

Ammonium sulfate에 대한 단백질의 용해도 차이에 따른 분리 방법으로 30, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80%로 분리하여 14% SDS-PAGE에 50㎍씩 loading 하였다(Figure-4). 60%와 70%에 상대적으로 impurity가 적고 TPx domain이 가장 많다.

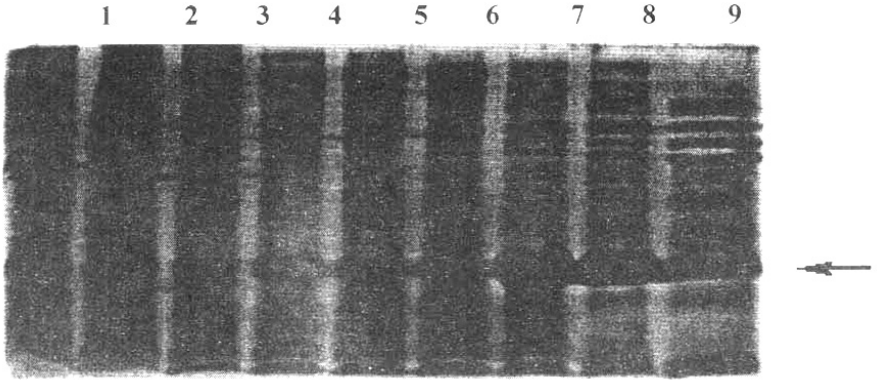

그림 4. TPx domain을 Ammonium sulfate precipitation 방법으로 분리.

파쇄하여 얻은 TPx domain의 crude extract를 ammonium sulfate precipitation 하여 14% SDS-PAGE에 50㎍씩 loading한 것.

1 line: 파쇄 후 pellet, 2 line: 30%, 3 line: 40%, 4 line: 45%, 5 line: 50%, 6 line: 55%, 7 line: 60%, 8 line: 70%, 9 line:80%

B. Sephacryl S-100 chromatography를 이용한 분리.

1) TPx domain 60% fraction의 Sephacryl S-100 chromatography

Ammonium sulfate precipitation으로 분리된 60%를 미리 50mM Tris/200mM NaCl

pH7.4 buffer로 평형이 된 Sephacryl S-100 column(100㎖)에 loading하였다. Flow rate는 0.4㎖/min, 각 fraction vol.은 2㎖씩, AUSF는 2로 적용하였다.

각 fraction의 단백질 양은 Figure-5a에 보였고, 단백질이 있는 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인하였다(Figure-5b).

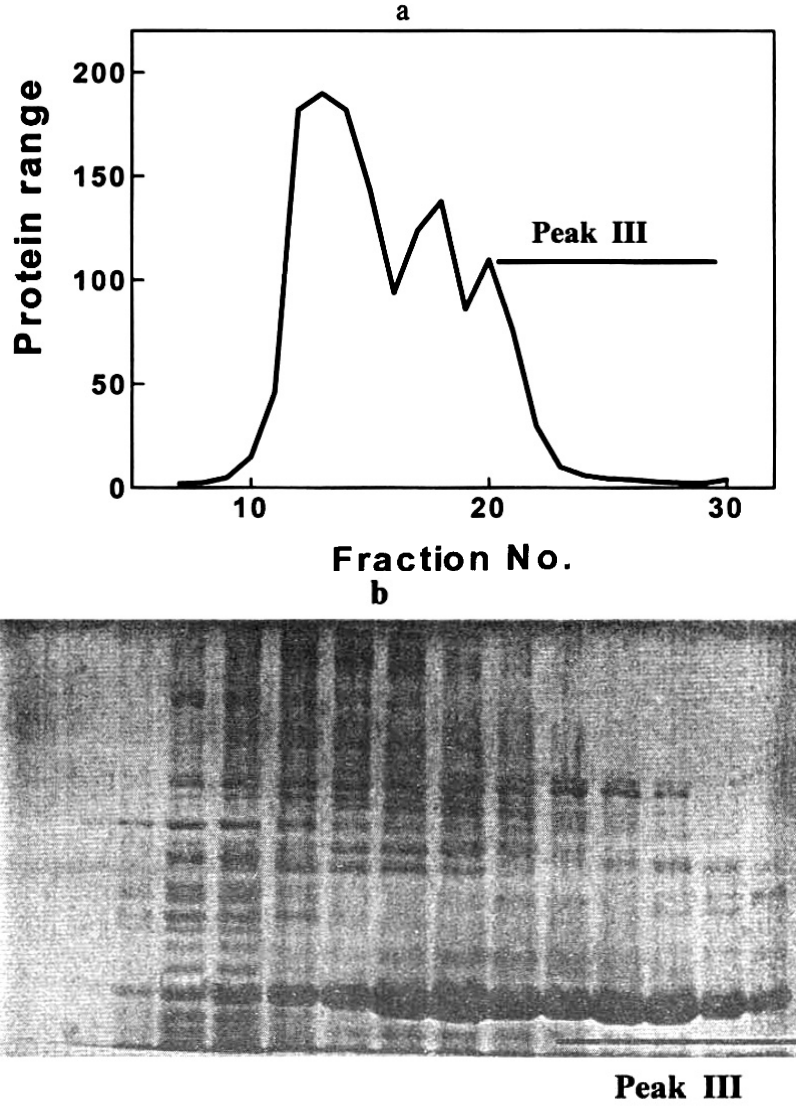

그림 5. TPx domain 60%의 Sephacryl S-100 chromatography를 이용한 분리.

a. Fractionation한 TPx domain의 60%를 Sephacryl S-100 chromatography를 이용해 분리한 각 fraction의 protein양을 나타낸 것. b.각 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인한 것.

이로써 Peak Ⅲ (faction NO. 20~27)을 얻었다.

2) TPx domain 70% fraction의 Sephacryl S-100 chromatography

Ammonium sulfate precipitation으로 분리된 70%를 미리 50mM Tris/200mM NaCl pH7.4 buffer로 평형이 된 Sephacryl S-100 column(100㎖)에 loading하였다. Flow rate는 0.4㎖/min, 각 fraction vol.은 2㎖씩, AUSF는 2로 적용하였다.

각 fraction의 단백질 양은 Figure-6a에 보였고, 단백질이 있는 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인하였다(Figure-6b).

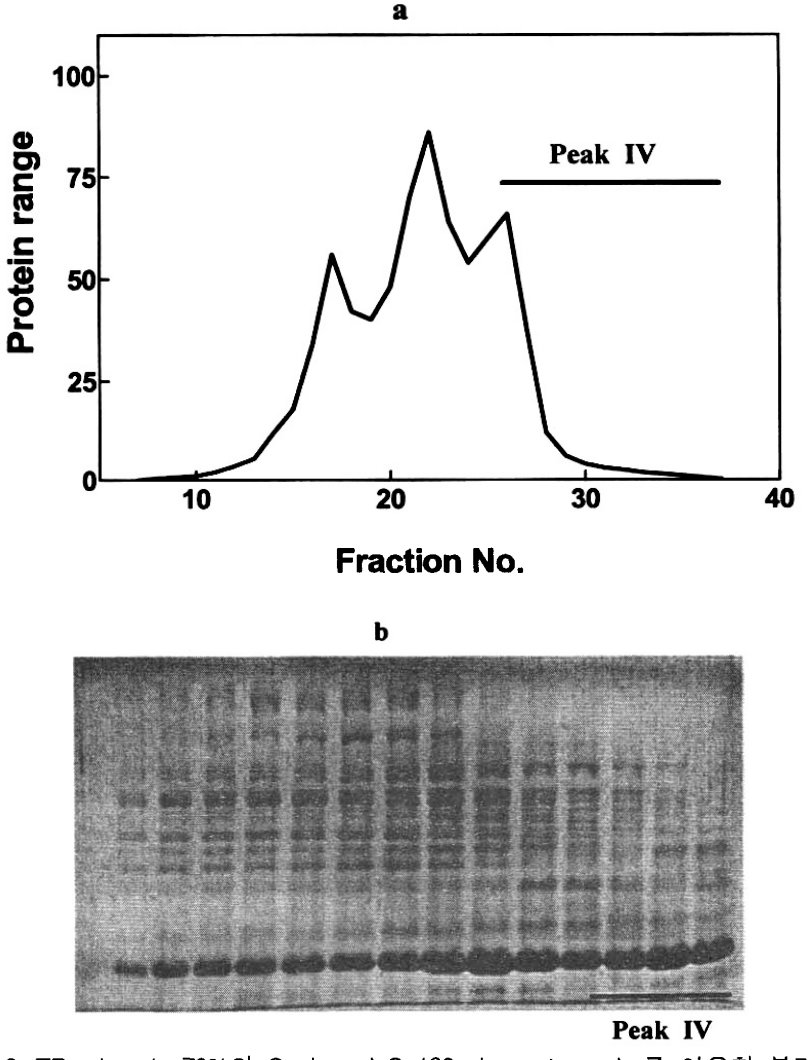

그림 6. TPx domain 70%의 Sephacryl S-100 chromatography를 이용한 분리.

a. Fractionation한 TPx domain의 70%를 Sephacryl S-100 chromatography를 이용해 분리한 각 fraction의 protein양을 나타낸 것. **b.**각 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인한 것.

이로써 Peak Ⅳ (faction NO. 16~25)을 얻었다.

3) TPx domain Peak Ⅲ 과 Ⅳ 합쳐 Sephacryl S-100 chromatography

두 번의 Sephacryl S-100 chromatography를 거쳐서 얻은 peak III,IV을 합하여 다시 Sephacryl S-100 column(100㎖)에 loading하였다. Flow rate는 0.4㎖/min, 각 fraction vol.은 2㎖씩, AUSF는 2로 적용하였다. 각 fraction의 단백질 양은 Figure-7a에 보였고, 단백질이 있는 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인하였다(Figure-7b).

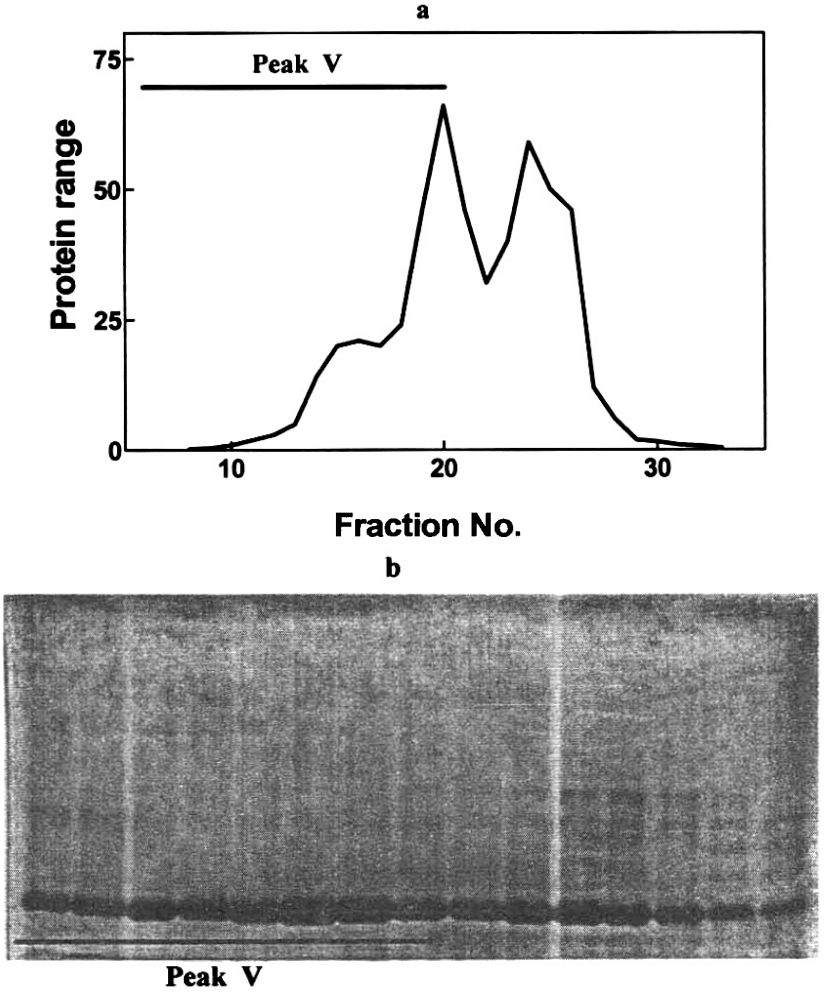

그림 7. Peak III 과 Ⅳ Sephacryl S-100 chromatography를 이용한 분리.

a. Fractionation한 TPx domain의 Peak Ⅲ 과 Ⅳ을 Sephacryl S-100 chromatography를 이용해 분리한 각 fraction의 protein양을 나타낸 것. b.각 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인한 것.

이로써 좀더 정제된 Peak Ⅴ(fraction NO.12~23) 얻었다.

4) TPx domain Peak Ⅴ를 Sephacryl S-100 chromatography

TPx domain peak Ⅴ를 다시 Sephacryl S-100 column(100㎖)에 loading 하였다. Flow rate는 0.4㎖/min, 각 fraction vol.은 2㎖씩, AUSF는 1로 적용하였다. 각 fraction의 단백질 양은 Figure-8a에 보였고, 단백질이 있는 fraction을 12% SDS-PAGE에 loading하여 확인하였다(Figure-8b).

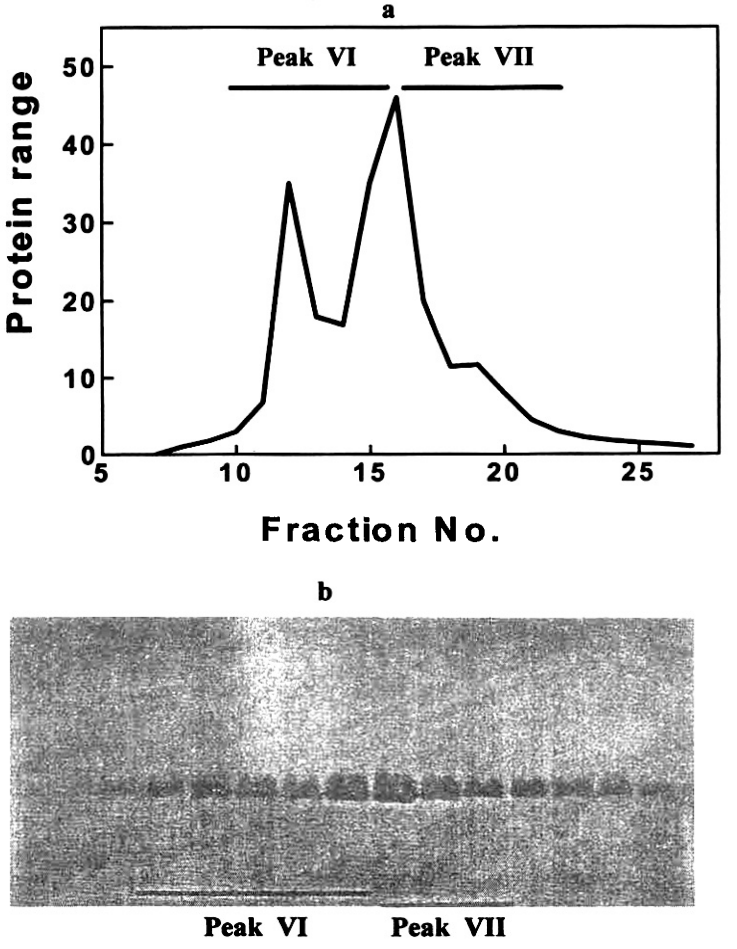

그림 8. Peak Ⅴ Sephacryl S-100 chromatography를 이용한 분리.

a. Fractionation한 TPx domain의 Peak V를 Sephacryl S-100 chromatography를 이용해 분리한 각 fraction의 protein양을 나타낸 것. **b.**각 fraction을 14% SDS-PAGE에 loading하여 확인한 것.

이로써 Peak VI (fraction NO.12~16) 과 Peak VII (fraction NO.17~19) fraction 을 얻었고, 이렇게 순수 분리된 TPx domain 각각의 농도는 4.48$\mu g/\mu \ell$와 5.05$\mu g/\mu \ell$ 이다.

4. TPx-GRX와 TPx domain의 항산화 활성도 측정. (GS assay)

E.coli에서 과대 발현시켜 정제된 TPx-GRX와 TPx domain의 항산화 활성을 MCO System (Fe, DTT, Oxygen)에 의한 E.coli의 Glutamine Synthetase의 산화를 방지하는 TPx의 억제활성에 의해 상대적인 항산화활성 (Protection Activity)을 측정하였다(Figure-9).

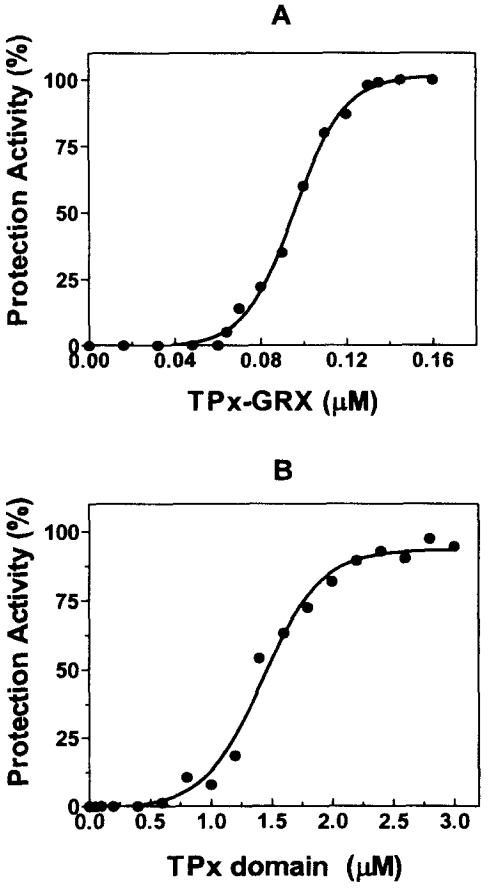

그림 9. TPx-GRX와 TPx domain의 항산화 활성.

MCO system에 의해 Glutamine Synthetase가 inactivation 되는 것을 억제하는 TPx-GRX(Figure 9-A)와 TPx domain(Figure 9-B)의 protection activity를 Glutamine Synthetase의 activity로 나타낸 것.

Figure-9에서 보는바와 같이 TPx-GRX가 MCO system에서 항산화 활성이 있음을 알 수 있고, GRX 부위가 없는 TPx domain이 wild type의 TPx-GRX 보다 (10배 이상) 항산화 활성이 현저히 낮아지는 것을 볼 수 있다.

5. TPx-GRX와 TPx domain의 Peroxidase 및 glutathion peroxidase 활성을 측정하는 방법(Fox 1 assay).

E.coli에서 과대 발현시켜 정제된 TPx-GRX와 TPx domain의 peroxidase activity를 측정하였다. Peroxidase activity는 peroxides (tert-Butyl hydroperoxide, Hydrogen peroxide, Cumene hydroperoxide, Linoleic acid hydroperoxide)를 substrates로 사용하여 환원제로 GSH를 가해 남아있는 peroxide 양을 FOX 1 assay 방법으로 직접 측정하였다.(Figure-10)

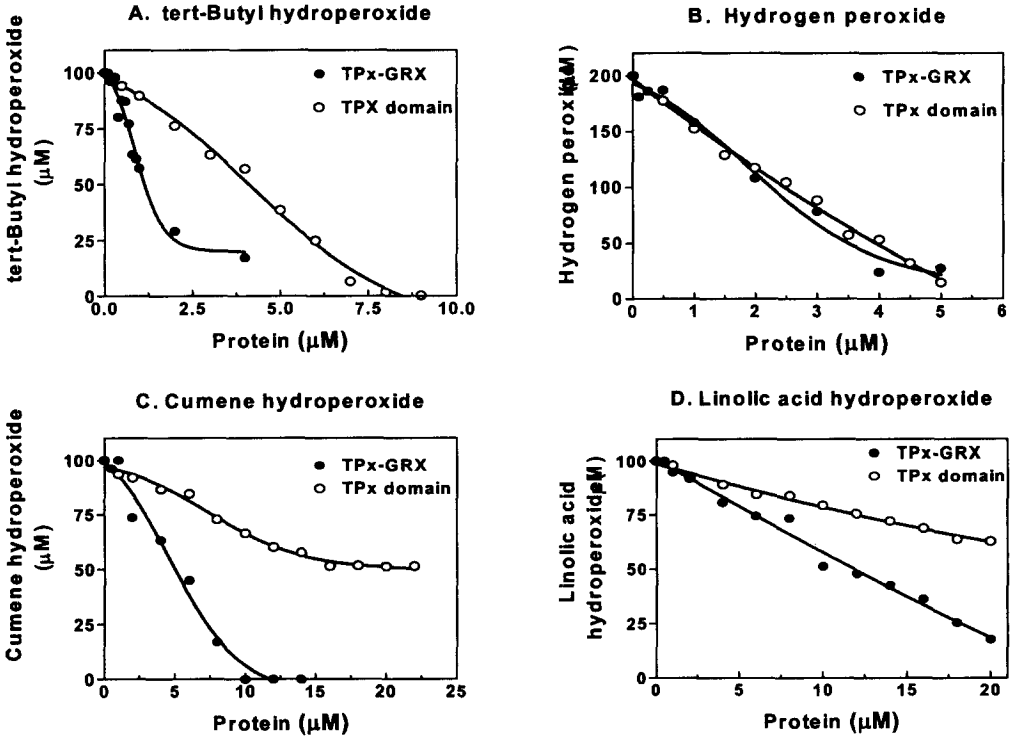

그림 10. TPx-GRX와 TPx domain의 peroxidase 활성.

Peroxides를 substrates로 사용하여 환원제로 GSH를 가해 TPx-GRX와 TPx domain의 농도에 따른 남아있는 peroxide 양을 FOX 1 assay 방법으로 직접 측정해 TPx-GRX와 TPx domain의 peroxidase activity를 나타낸 것.

Figure 10에서 보는바와 같이 TPx-GRX가 환원제(GSH)의 존재하에서 여러 peroxides (tert-Butyl hydroperoxide, Hydrogen peroxide, Cumene hydroperoxide, Linoleic acid hydroperoxide)를 제거시킴을 볼 수 있다.

또, GRX 부위가 없는 TPx domain이 wild type 보다 activity가 낮아짐을 알 수 있다.

Ⅳ. 결 론

Haemophilus Influenzae TPx-GRX와 GRX 부위(149 proline이하)가 없는 TPx domain을 *Haemophilus Influenzae*의 genomic DNA로부터 TPx-GRX와 TPx domain을 coding하는 DNA를 PCR을 이용해 얻어냈고, 이를 expression vector에 ligation하여 expression 균주에 transformation해서 overexpression 시켰다. 얻어진 균주를 파쇄하여 단백질을 얻어냈고, 이를 여러가지 chromatography를 이용해 TPx-GRX와 TPx domain을 순수 분리 정제하였다.

정제된 TPx-GRX가 항산화 단백질임을 증명하고자 MCO System (Fe, DTT, Oxygen)에 의한 E.coli의 Glutamine Synthetase의 산화를 방지하는 TPx의 억제활성에 의해 상대적인 항산화 활성 (Protection Activity)을 측정하였고, 이 TPx-GRX는 MCO System 존재하에서 항산화 활성을 갖는다. 그리고 TPx domain의 항산화활성이 wild type에 비해 10배 이상 낮아지며, 이는 GRX 부위가 항산화활성 기작에 작용함을 암시한다.

TPx-GRX의 Peroxidase 활성을 알아보기 위해 여러 가지 peroxide를 substrate로 사용하여 GSH의 존재 하에서, 농도에 따른 TPx-GRX에 의해 제거되고 남은 peroxide의 양으로 활성을 측정하였다. 그 결과 TPx-GRX는 여러 가지 peroxide를 제거하는 Peroxidase 활성을 갖는다. 또 GRX 부위가 없는 TPx domain이 wild type 보다 활성이 떨어짐으로써, GRX 부위가 electro donor로써 작용함을 알 수 있었다. 그리고 TPx-GRX가 여러가지 peroxides 중 tert-Butyl hydroperoxide와 Hydrogen peroxide에 더 높은 활성을 갖는 걸로 나타나, TPx-GRX가 substrate를 specific하게 선택함을 알 수 있었다.

Ⅴ. 참고문헌

(1) Halliwell, B., and Gutterridge, J. M. C. (1989) *Free radicals in biology and medicine*, 2nd, Clarendon press, Oxford.

(2) Fridovich, I. and Freeman, B. 1986, *Annu. Rev. Physiol.* 48, 693-702.

(3) McCord, J. M. 1974, *Science* 185, 529-531.

(4) Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F. and Ames, B. N., 1989, *J. Biol. Chem.* 264, 1488-1496.

(5) Park, S. G., Cha, M. K., Jeong, W., and Kim, I. H. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 5723-5732.

(6) Cha, M. K., Kim, H. K., and Kim, I. H. (1996) *J. Bacteriol.* 178, 5610-5614.

(7) Jeong, W., Cha, M. K., and Kim, I. H. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 2924-2930.

(8) Kim, S. J., Woo, J. R. and Ryo, S. E. (2003) *J. Biol. Chem. 278, 10790-10798*