식물생명공학회지 제33권 제1호
Korean J. Plant Biotechnol.
Vol. 33, No. 1, 1~9 (2006)

산화 스트레스에 의존한 식물 및 진핵세포 2-시스테인 퍼록시레독신의 기능 조절

장호희[1,2], 김선영[1,2], 이상열[1,2*]
[1]환경생명과학 국가핵심연구센터, [2]경상대학교 응용생명과학부

Oxidative Stress-dependent Structural and Functional Regulation of 2-cysteine Peroxiredoxins In Eukaryotes Including Plant Cells

Ho Hee Jang[1,2], Sun Young Kim[1,2], Sang Yeol Lee[1,2*]
[1]Environmental Biotechnology National Core Research Center
[2]Division of Applied Life Sciences (BK21 Program), Gyeongsang National University, Jinju, 660-701, Korea.

ABSTRACT Peroxiredoxins (Prxs) are ubiquitously distributed and play important functions in diverse cellular signaling systems. The proteins are largely classified into three groups, such as typical 2-Cys Prx, atypical 2-Cys Prx, and 1-Cys Prx, that are distinguished by their catalytic mechanisms and number of Cys residues. From the three classes of Prxs, the typical 2-Cys Prx containing the two-conserved Cys residues at its N-terminus and C-terminus catalyzes H_2O_2 with the use of thioredoxin (Trx) as an electron donor. During the catalytic cycle, the N-terminal Cys residue undergoes a peroxide-dependent oxidation to sulfenic acid, which can be further oxidized to sulfinic acid at the presence of high concentrations of H_2O_2 and a Trx system containing Trx, Trx reductase, and NADPH. The sulfinic acid form of 2-Cys Prx is reduced by the action of sulfiredoxin which requires ATP as an energy source. Under the strong oxidative or heat shock stress conditions, 2-Cys Prx in eukaryotes rapidly switches its protein structure from low-molecular-weight species to high-molecular-weight protein structures. In accordance with its structural changes, the protein concomitantly triggers functional switching from a peroxidase to a molecular chaperone, which can protect its substrate denaturation from external stress. In addition to its N-terminal active site, the C-terminal domain including 'YF-motif' of 2-Cys Prx plays a critical role in the structural changes. Therefore, the C-terminal truncated 2-Cys Prxs are not able to regulate their protein structures and highly resistant to H_2O_2-dependent hyperoxidation, suggesting that the reaction is guided by the peroxidatic Cys residue. Based on the results, it may be concluded that the peroxidatic Cys of 2-Cys Prx acts as an 'H_2O_2-sensor' in the cells. The oxidative stress-dependent regulation of 2-Cys Prx provides a means of defense systems in cells to adapt stress conditions by activating intracellular defense signaling pathways. Particularly, 2-Cys Prxs in plants are localized in chloroplasts with a dynamic protein structure. The protein undergoes conformational changes again oxidative stress. Depending on a redox-potential of the chloroplasts, the plant 2-Cys Prx forms super-molecular weight protein structures, which attach to the thylakoid membranes in a reversible manner.

Key words: C-terminal truncation, high molecular weight, hydrogen peroxide signaling, chaperone, over-oxidation, reactive oxygen species, 2-Cys peroxiredoxin.

서 론

유해한 활성산소종 (reactive oxygen species; ROS)에 노출되어 나타나는 산화 스트레스는 모든 생물체에서 심각한 기능손상이나 질병을 유발시킨다. 활성산소종은 일반적으로 정상적인 호기성 대사과정 부산물로서 산소의 부분적인 환원에 의해서 생성될 뿐만 아니라 리간드-수용체에 매개되는 신호전달과정에 의해서도 생성된다고 알려

*Corresponding author Tel 055-751-5958 Fax 055-759-9363
E-mail: sylee@gsnu.ac.kr

져있다. 활성산소종은 많은 인산화 단백질과 전사인자를 활성화시키고, 세포주기, 분화, 세포사멸을 조절한다. 세포 내 superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$)과 H_2O_2는 peptide growth factor, cytokines 그리고, heterotrimeric GTP-binding protein-coupled receptor의 자극을 받은 세포에서 생성된다 (Burdon 1995; Martindale and Holbrook 2002). 따라서, 독성을 나타내는 농도보다 낮은 H_2O_2는 세포 내 이차신호전달 물질(second messenger)로 여겨지는데, 이러한 현상은 H_2O_2 생성을 특이적으로 저해시키면 platelet-derived growth factor와 angiotensin II에 의한 신호전달이 완전히 차단되는 결과로부터 알 수 있다 (Sundaresan et al. 1995; Ushio-Fukai et al. 1999). 그러나, 세포 내 활성산소종의 농도가 증가하면, 항산화 단백질과 재생단백질을 암호하는 유전자의 발현을 증가시켜 항상성을 회복시킴으로써 산화 스트레스에 대한 방어 신호전달 과정을 활성화시킨다 (Figure 1).

모든 호기성 생물체들은 산화 스트레스와 활성산소종에 의한 단백질의 변형 및 응집으로부터 세포들을 보호하기 위하여 (Butterfield et al. 1999; Kim et al. 2002), superoxide dismutase, catalase, 여러 가지 형태의 peroxidase를 포함한 많은 항산화 단백질 (Storz et al. 1990)과 다양한 chaperone 단백질을 보유하고 있다 (Hendrick and Hartl 1993). 대부분의 원핵세포와 진핵세포에서 thioredoxin (Trx)을 electron donor로 이용하여 H_2O_2, peroxinitrite, organic hydroperoxide를 환원하는 새로운 형태의 항산화

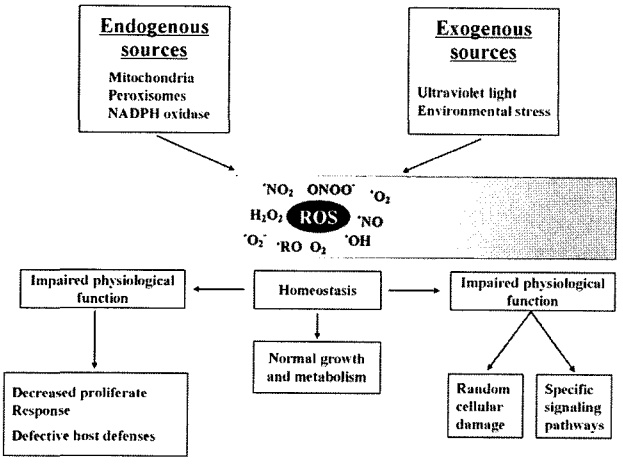

Figure 1. The sources and cellular responses to reactive oxygen species (ROS) (Ref: Finkel and Holbrook 2000). ROS are generated not only as a by-product of normal intracellular metabolism in mitochondria and peroxisomes but also as a result of exposure to UV and other environmental agents. Lowering ROS levels below the homeostatic set point may interrupt the physiological role of oxidants in cellular proliferation and host defense. Similarly, increased ROS may also be detrimental and lead to cell death or to acceleration in ageing and age-related diseases. Traditionally, the impairment caused by increase ROS is thought to result from random damage to proteins, lipids and DNA.

단백질들이 발견되었다. 처음에는 thioredoxin-dependent peroxidase (TPx)로 불렸다가, peroxiredoxin (Prx)으로 개명되었는데, 이는 AhpF로부터 전자를 받는 AhpC처럼 모든 단백질이 electron donor로 Trx를 사용하는 것은 아니기 때문이다 (Chae et al. 1994; Poole et al. 2000). 2-Cysteine peroxiredoxin (2-Cys Prx)은 Trx-folding motif를 가지고 있는 다른 단백질과 비교하여 전체적인 아미노산 서열의 유사성이 높지는 않지만, Trx-fold superfamily에 속한다는 사실이 밝혀졌다 (Schröder and Ponting 1998). 2-Cys Prx들이 항산화제로 작용한다는 많은 보고와 함께 세포분열, 분화, 면역반응, 성장조절, 종양촉진, 세포사멸 과정 등 세포 내 기능의 많은 부분에 관여하고 있다 (Hirotsu et al. 1999; Neumann et al. 2003). 하지만 2-Cys Prx의 다양한 연구에도 불구하고 세포 내에서의 정확한 기능은 아직 불분명하여 이에 대한 연구가 절실히 요구되고 있는 실정이다. 특히 2-Cys Prx가 catalase나 glutathione peroxidase (GPx)에 비해 H_2O_2 분해 효율이 매우 낮고 H_2O_2 농도가 증가하면 효소의 기질인 H_2O_2 자체에 의하여 쉽게 불활성 된다는 보고에 대해서는 peroxidase로서의 기능만으로는 설명하기에 어려운 반응들이 많이 존재한다 (Yang et al. 2002). 따라서, 본 총설에서는 다양한 생체반응에 관여하는 2-Cys Prx 효소가 어떠한 mechanism을 통하여 반응을 조절하는지의 기능 조절 mechanism과 기능적 변화에 따른 단백질의 구조적 변신과정을 살펴보고자 한다. 또한 2-Cys Prx의 산화-환원 조절에 의한 세포 내 신호전달에 있어서 현재까지 정립된 개념에 대한 최근 정보를 살펴보고자 한다.

2-Cys Prx의 H_2O_2 분해 반응 메커니즘

2-Cys Prx는 아미노 말단과 카르복시 말단에 잘 보존된 두 개의 cysteine 잔기를 가지고 있고 H_2O_2 분해반응에서 dimer로 작용한다. 두 개의 cysteine 잔기 중에서, 아미노 말단의 peroxidatic cysteine은 과산화물 기질에 대한 첫 번째 목표 부위이다. Figure 2에서는 이 review에서 중점적으로 다룰 typical 2-Cys Prx의 H_2O_2 분해 반응과정을 다른 Prx isotype인 atypical 2-Cys Prx, 1-Cys Prx 와 비교하였다 (Choi et al. 1999). 촉매반응은 두 단계로 나뉘어지는데 redox active cysteine이 그 중심에 있다. 첫 번째 단계에서, 모든 Prx isotype들의 peroxidatic cysteine은 과산화물 기질의 공격에 의해 cysteine sulfenic acid (Cys-SOH)로 산화된다 (Ellis and Poole, 1997; Wood et al. 2003a). 그리고 cysteine sulfenic acid를 분해하기 위한 두 번째 단계는 세 종류의 Prx들에 따라 다음과 같이 다르게 반응한다. 2-Cys Prx에 의해 생성된 disulfide bond는 Trx에 의해 특이적으로 환원되는 반면, 1-Cys Prx의 생리적인 electron donor와 그들의 생체 내에서의 기능은 명확하게 밝혀지지 않았다 (Fisher et al. 1999). Typical 2-Cys Prx의 산화된 sulfenic

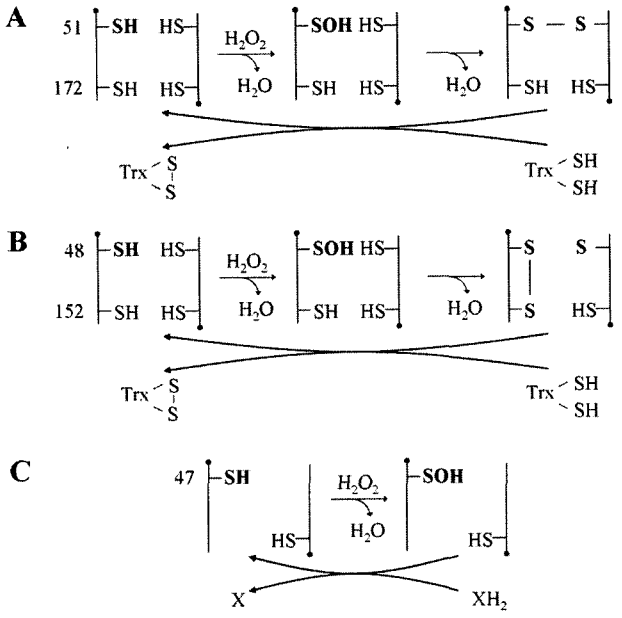

Figure 2. Reaction mechanisms of peroxidase activity in the three Prx classes (Ref: Rhee et al. 2005b). The conserved peroxidatic Cys in all three Prx classes is oxidized to Cys sulfenic acid (SOH) by peroxide substrates. In the typical 2-Cys Prx (A), Cys51-SH is attacked by the resolving Cys (Cys172-SH) from a different subunit and condenses to form an intermolecular disulfide bond. The atypical 2-Cys Prx (B) has the same mechanism as the typical 2-Cys Prx. However both the peroxidatic Cys and its corresponding resolving Cys are contained within the same subunit and the condensation reaction results in the formation of an intramolecular disulfide bond. The disulfide bond of 2-Cys Prx is reduced by thioredoxin. The 1-Cys Prx (C), containing only the peroxidatic Cys, is reduced by a thiol-containing electron donor (XH2) that has yet to be identified.

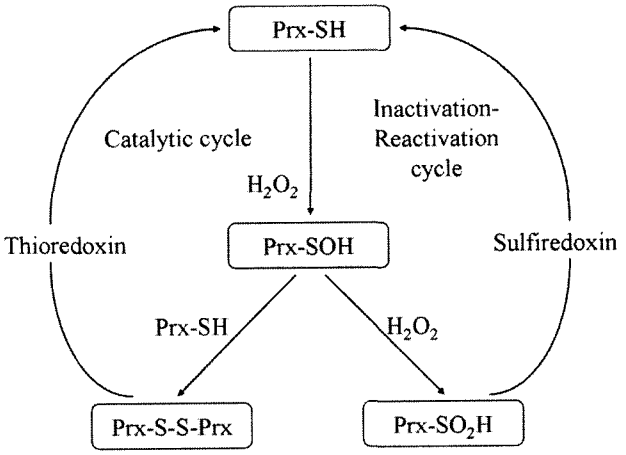

Figure 3. Reversible regulation of 2-Cys Prx activity by the H_2O_2 concentration and sulfiredoxin (Ref: Rhee et al. 2005a). During the catalytic cycle of 2-Cys Prx, the sulfenic acid of the peroxidatic Cys (Prx-SOH) undergoes further oxidation to sulfinic acid (Prx-SO_2H) at the presence of high H_2O_2 concentration, thus inactivating its peroxidase activity. Sulfiredoxin can reactivate the enzyme with the help of ATP hydrolysis, Mg^{2+}, and a thiol group as an electron donor. However, in the low level of H_2O_2, 2-Cys Prx catalyzes H_2O_2 with the formation of intermolecular disulfide bond, which can be reduced by thioredoxin.

acid (Cys-SOH)는 분자간 disulfide bond를 형성하기 위해 dimer의 다른 subunit에 존재하는 resolving cysteine과 결합한다. 그러나, 두 개의 cysteine은 황 원자 사이의 거리가 약 13 Å으로 멀리 떨어져 있기 때문에 (Schroder et al. 2000), 2-Cys Prx의 disulfide bond의 형성은 천천히 일어난다. 하지만 sulfenic acid (Cys-SOH)는 불안정하기 때문에, 촉매 반응 동안 안정한 sulfinic acid (Cys-SO_2H)로 더 쉽게 산화되어 높은 농도의 H_2O_2에서 peroxidase기능은 불활성화 된다 (Rabilloud et al. 2002; Yang et al. 2002). 진핵세포에 존재하는 2-Cys Prx와는 대조적으로, 원핵세포의 2-Cys Prx는 진핵세포 단백질의 카르복시 말단에 존재하는 GGLG와 YF-motif가 없어서 산화적 불활성에 민감하지 않다 (Wood et al. 2003b). 2-Cys Prx의 Cys-SH가 과산화된 sulfinc acid 형태로 변화되면 H_2O_2를 분해하는 peroxidase 활성이 완전히 사라지고, Trx에 의해 복구될 수 없게 된다. 이러한 peroxidase 불활성화 과정은 많은 양의 H_2O_2만으로는 Cys-SH의 과산화를 일으키지 못하고 H_2O_2, Trx, TR (thioredoxin reductase), NADPH가 모두 존재해야만 가능한데, 이는 2-Cys Prx의 과산화가 촉매반응 과정 중에 일어남을 의미한다. 과산화에 의한 2-Cys Prx의 peroxidase기능의 영구적인 불활성은 아주 효율적인 세포 시스템에 존재하기에는 너무 비경제적이다. 이러한 결과들로부터, H_2O_2가 높은 농도로 존재할 때 2-Cys Prx는 peroxidase 이외의 다른 기능을 가질 것이라고 유추할 수 있다. 이런 상황에서, 과산화된 2-Cys Prx를 환원시킬 수 있는 효소인 sulfiredoxin (Srx1)이 효모로부터 밝혀졌다 (Figure 3) (Biteau et al. 2003). 효모 Srx1의 발견에 이어서, human Srx와 sestrin이 동물 세포에서 과산화된 2-Cys Prx의 환원을 촉진한다고 보고되었다 (Chang et al. 2004; Budanov et al. 2004). 하나의 잘 보존된 cysteine 잔기를 가지고 있는 Srx1은 진핵세포에만 존재하는데, 이는 원핵세포의 2-Cys Prx가 산화적 불활성에 민감하지 않다는 관찰과 잘 일치한다. 진핵세포 2-Cys Prx의 cysteine-sulfinic acid를 환원시키기 위해서는 Srx1의 보존된 cysteine 잔기, ATP 가수분해, Mg^{2+}, electron donor로 이용되는 thiol 등을 필요로 한다.

열 충격이나 산화 스트레스에 의한 진핵세포 2-Cys Prx의 peroxidase로부터 chaperone으로의 구조적, 기능적 전환

진핵세포 2-Cys Prx가 과산화되어 peroxidase로서의 기능이 완전히 불활성화 된다는 사실로부터 2-Cys Prx의 sulfinic acid 형태는 산화 스트레스 조건에서 작용하는 보다 섬세한 조절 기능이 부가적으로 있을 것이라고 예상할

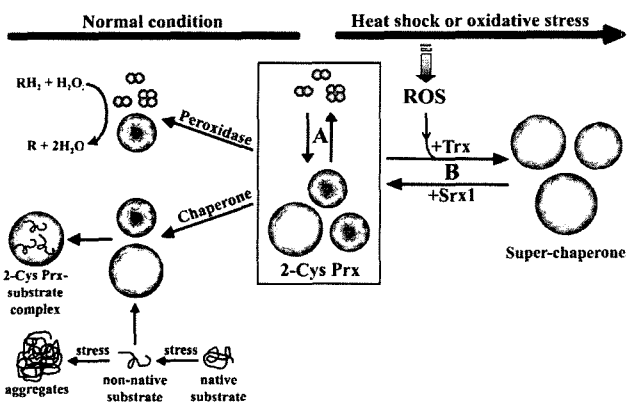

Figure 4. Oxidative-stress-dependent structural and functional switching of 2-Cys Prxs in yeasts (Ref: Jang et al. 2004). There are two classes of 2-Cys Prxs with different structures that are formed by two independent pathways: one is H_2O_2-insensitive (A), whereas the other is H_2O_2-sensitive (B). One class of 2-Cys Prxs consists of dimeric, tetrameric, and oligomeric species which form under normal conditions without the involvement of Cys^{47}. In the presence of the Trx system, the other class of high-molecular-weight (HMW) 2-Cys Prx can be formed by the Cys^{47}-mediated polymerization pathway. Reactive oxygen species (ROS) can be generated by external stresses such as heat shock or oxidative stress. Srx1 plays a critical role in the dissociation of the protein complexes into low-molecular-weight (LMW) protein species. The predominant function of the LMW 2-Cys Prx is as a Trx-dependent peroxidase, whereas the HMW proteins act as super-chaperones. The function of 2-Cys Prx is switched reversibly by heat shock or oxidative stress *in vivo*, accompanied by structural changes from LMW to HMW protein species. In this regulatory mechanism, the Cys^{47} residue of 2-Cys Prx acts as a highly efficient H_2O_2-sensor in yeast.

수 있다. 다양한 연구 수행결과, 진핵세포 2-Cys Prx는 산화-환원 의존적으로 단백질의 구조와 기능이 정교하게 조절된다는 사실이 규명되었다 (Jang et al. 2004). 진핵세포 2-Cys Prx는 구조적 변화와 함께 peroxidase와 chaperone의 두 가지 기능을 나타내며 chaperone 기능에 의하여 열 충격과 화학적 스트레스에 의한 기질 변성을 효과적으로 방지하였다. 특히 2-Cys Prx의 기능적 전환은 4차 구조에서의 다양한 변화와 밀접하게 연관되어 있다는 것을 알았다. Size exclusion chromatography, native-PAGE와 전자현미경 분석법에 의한 결과로부터 2-Cys Prx가 여러 가지 크기의 단백질 복합체, 즉 high molecular weight (HMW) complex 구조의 sphere 모양 (1000 kDa 이상)과 ring 모양의 중간크기 복합체 그리고 불규칙한 low molecular weight (LMW) 단백질 (약 40에서 120 kDa)들로 구성되어 있다는 사실을 알았다. HMW complex는 chaperone 기능을 나타내는 반면, LMW 단백질은 peroxidase기능을 나타내고 중간 크기의 단백질에서는 peroxidase와 chaperone의 두 가지 기능 모두를 나타내었다. 진핵세포 2-Cys Prx의 peroxidase 활성을 나타내는 dimer가 HMW complex로 조합될 때 chaperone으로의 기능적 전환이 일어난다. 이러한 구조적, 기능적 전환은 열 충격이나 산화 스트레스에 의해 민감하게 조절된다. 비록 열 충격이나 산화 스트레스만으로도 chaperone 기능으로의 전환이 촉진되지만 열 충격과 산화 스트레스는 협동적으로 2-Cys Prx가 dimer에서 HMW complex의 구조로 전환되는 것을 촉진한다. LMW 단백질에서 HMW 단백질로의 구조적 변화는 Trx시스템 (Trx, Trx reductase, NADPH)의 존재에서만 일어나며 이러한 2-Cys Prx의 구조적인 전환에서 효소 촉매자리 cysteine (Cys 47)은 매우 중요한 역할을 수행한다. 그러므로 2-Cys Prx의 N-terminal cysteine의 돌연변이는 이 단백질의 구조적 전환능력을 완전히 상실시킨다는 결과로부터, 이 반응은 산화-환원 의존적으로 유발된다는 것을 알 수 있다. 따라서 2-Cys Prx의 N-terminal cysteine은 산화 스트레스를 받고 있는 세포에서 H_2O_2의 양을 인지할 수 있는 매우 효과적인 H_2O_2-sensor로 작용할 것으로 추정된다. 이와 같은 구조적 전환은 ATP를 사용하여 2-Cys Prx의 sulfinic acid의 환원을 촉매하는 Srx1를 발현하는 세포에서는 가역적으로 일어난다 (Biteau et al. 2003). H_2O_2를 제거하면 2-Cys Prx의 HMW complex는 Srx1의 작용에 의해 LMW 단백질로 분해됨과 동시에 chaperone에서 peroxidase로 기능적 전환이 일어난다. 결론적으로, 정상세포에서 진핵세포 2-Cys Prx는 작고 중간 크기 구조로 존재하여 peroxidase와 chaperone의 두 가지 기능을 나타내지만 세포가 열 충격이나 산화 스트레스를 받게 되면 2-Cys Prx의 LMW 형태는 HMW complex로 구조적 전환이 일어나서 chaperone 활성이 크게 증가하게 되어 세포를 산화스트레스로부터 보호한다 (Figure 4).

진핵세포 2-Cys Prx의 hyperoxidation과 구조적 전환에 있어서 카르복시 말단의 역할

진핵세포와 원핵세포의 2-Cys Prx가 카르복시 말단을 제외한 부분에서 아미노산 서열상에 높은 유사성을 보이지만 H_2O_2에 의한 불활성의 민감도는 매우 다르게 나타난다. 진핵세포 2-Cys Prx가 overoxidation에 매우 민감한 반면에 박테리아의 2-Cys Prx는 overoxidation에 대해 매우 강하다. Wood 등 (2003a)은 박테리아와 동물의 2-Cys Prx의 결정구조를 비교하여 대부분의 진핵세포 2-Cys Prx에서 특이적으로 나타나는 두 개의 아미노산 서열 부위를 규명하였는데 GGLG motif와 C-말단의 YF-motif로서 overoxidation에 대한 민감성을 구별할 수 있다. 2-Cys Prx의 반응 메커니즘에서 제시된 모델에 따르면, GGLG motif를 가지는 진핵세포 2-Cys Prx의 loop와 C-말단 extension motif를 가지는 helix는 서로 가깝게 packing되어 있고 H_2O_2 가수분해 과정 동안 peroxidatic cysteine을 둘러싸고 있다. 특히, 진핵세포 2-Cys Prx의 C-말단 helix가 peroxidatic 활성 자리 pocket을 단단히 숨기기 때문에 dimer의 다른 subunit에 존

재하는 resolving cysteine과 disulfide bond를 형성하기가 매우 어렵다. 반면에, GGLG motif와 C-말단 YF-motif가 없는 박테리아 2-Cys Prx는 활성 자리 cysteine이 숨겨져 있는 구조적 특징을 가지지 않기 때문에 박테리아 2-Cys Prx의 활성 자리 부분은 C-말단 resolving cysteine과 결합할 때 입체적 장애가 없다. 이와 같은 구조적 유연성은 분자간 disulfide bond의 형성을 촉진하고 단백질의 과산화를 방지하여 산화적 불활성에 대한 강한 저항성을 나타내게 한다 (Wood et al. 2003b). 따라서, C-말단의 packing을 파괴하는 어떤 구조적 변화들은 과산화에 의해 불활성 되기 쉬운 효소를 저항성이 생기게 만든다. 산화적 불활성에서 2-Cys Prx의 C-말단 YF-motif의 중요성은 두 종류의 2-Cys Prx isotype을 발현하는 *Schistosoma mansoni*에서 명백하게 보여준다 (Sayed and Williams 2004). 두 가지 종류의 2-Cys Prx isotype 중 C-말단 YF-motif를 가지는 효소는 산화 스트레스에 의한 불활성에 매우 민감한 반면, 다른 isotype는 C-말단 꼬리가 결핍되어 있고 과산화에 저항성이 있다. 이러한 결과로부터, 진핵세포 2-Cys Prx의 C-말단 부위는 H_2O_2에 의한 불활성에 대한 민감성과 구조적 변화에 중요한 영향을 준다는 결론을 내릴 수 있다. 진핵세포의 2-Cys Prx가 산화 스트레스와 열 충격에 노출되었을 때 단백질의 구조와 기능이 전환된다는 결과 (Jang et al. 2004)들을 고려해 볼 때, 구조적인 변화와 과산화물에 의해 매개되는 과산화 현상 사이에는 밀접한 관계가 있음이 분명하다. 그러므로, 진핵세포 2-Cys Prx의 C-말단을 절단한 2-Cys Prx는 산화에 민감한 단백질 형태에서 저항력이 있는 형태로 변하게 됨을 확인하였고, 그 결과 산화적 스트레스에 직면해도 HMW complex를 형성하지 못할 뿐만 아니라 단백질의 기능변화도 유발되지 않음이 확인되었다 (Koo et al. 2002; Moon et al. 2005). 특히, calpain에 의해서 C-말단이 절단된 human 2-Cys Prx단백질이 적혈구에서 발견 (Cha et al. 2000)됨으로써 2-Cys Prx의 단백질 분해는 overoxidation에 대한 저항성을 만들어 생체 내 단백질 구조와 기능을 조절한다고 예측된다.

결론적으로, 진핵세포 2-Cys Prx는 낮은 농도의 H_2O_2에서는 항산화 단백질로서 기능을 하지만 높은H_2O_2농도에서는 단백질의 기능이 peroxidase에서 molecular chaperone으로 바뀌게 되며 이러한 기능조절을 위해서, 2-Cys Prx는 'YF-motif'를 가지는 C-말단 부위의 도움으로 H_2O_2에 의한 peroxidatic cysteine의 과산화를 통하여 단백질의 구조가 빠르게 변하게 되는 것이다. 이러한 결과는 산화 스트레스에 대한 단백질의 구조와 기능을 바꾸는 C-말단 YF-motif를 가지는 진핵세포 2-Cys Prx의 조절 메커니즘은 진핵세포의 진화 과정 중에 선택적으로 유도되었음을 제시하고 있다.

2-Cys Prx에 의한 H_2O_2 신호전달 조절

외부 자극에 반응해서 생성되어 빠르게 파괴되는 H_2O_2는 세포 내 신호 전달자로서 중요한 기준을 대부분 만족시키는 확산가능한 저분자량의 물질로서 세포내 모든 곳에 분포해 있는 물질이다. 또한, H_2O_2는 mild 산화제이기 때문에 단백질에 존재하는 cysteine잔기를 cysteine sulfenic, sulfinic acid 또는 disulfide로 산화 시킬 수 있으며 그들 모두는 다양한 세포 내 환원제에 의해 cysteine으로 쉽게 돌아갈 수 있다. 하지만, 대부분 cysteine thiol의 p*Ka* 값이 8.5 부근이고 또한 cysteine잔기는 cysteine thiolate anion ($Cys\text{-}S^-$)이 되는 것보다 H_2O_2에 의해 산화되기가 더 어렵기 때문에, 세포 내에서 H_2O_2에 의해 쉽게 산화되는 Cys-SH를 가지는 단백질은 매우 드물다. 그럼에도 불구하고, 어떤 단백질의 cysteine 잔기는 음전하 thiolate와 이웃한 양전하 아미노산 잔기들 사이의 전하 결합에 의해 그들의 p*Ka*값이 낮아져서 중성 pH에서 thiolate anion 형태로 존재한다. 2-Cys Prx는 낮은 p*Ka* cysteine잔기를 가지는 전형적인 단백질로서 앞에서 설명한 것과 같이 (Figure 2), active site cysteine은 H_2O_2를 포함한 다양한 산화제에 의해 특이적 산화의 표적이고 이러한 변형은 Trx시스템의 의해 되돌아갈 수 있다.

인간세포에서 H_2O_2는 아주 많은 양으로 존재하는 세포질 효소인 2-Cys Prx를 포함한 여러 종류의 항산화제에 의해 정상적인 수준으로 유지된다. 그러나 일시적으로 세포 내 과산화물의 양이 갑자기 증가하면 이런 효소들을 빠르게 불활성화되어 많은 신호전달 과정을 활성화 시킴으로써 세포 내에서 중요한 신호전달 반응을 유도하게 된다. 따라서 생성된 과산화물은 많은 단백질들의 중요한 cysteine잔기의 산화를 통해서 기능을 변화시키거나 단백질의 인산화 정도를 조절하기에 적당하다 (Chang et al. 2002). 독성의 hydroxyl radical로 쉽게 전환될 수 있는 높은 농도의 H_2O_2가 존재할 경우에, GPx나 catalase보다 활성 효율이 훨씬 낮은 2-Cys Prx는 H_2O_2를 제거하는 peroxidase 활성이 완전히 없어지고 HMW complex의 형성과 함께 높은 효율을 가지는 chaperone으로의 전환이 가능하다. 이런 기능적인 전환을 통해 독성 radical의 영향으로부터 세포 내 구성요소들의 손상을 보호할 수 있다. 이런 유해한 상황에서, catalase와 GPx는 과산화물이 정상수준으로 회복될 때까지 H_2O_2를 제거하게 되며 세포 내 H_2O_2 농도가 회복되면, 2-Cys Prx는 Srx1 의 도움으로 LMW 단백질 종으로 분해되어 peroxidase의 기능을 되찾게 된다 (Jang et al. 2004). 과산화물 농도에 비례하여 단백질의 구조와 기능이 조절되는 진핵세포 2-Cys Prx는 세포가 산화적인 스트레스에 대해 적응하기 위해 정교하게 진화된 것으로 추정된다.

진핵세포 2-Cys Prx의 peroxidase가 세포내 신호전달자로서의 역할을 하게 되는 메커니즘은 아직 명확하게 밝혀지지 않았지만 증가된 H_2O_2 농도가 과산화물의 신호 전달

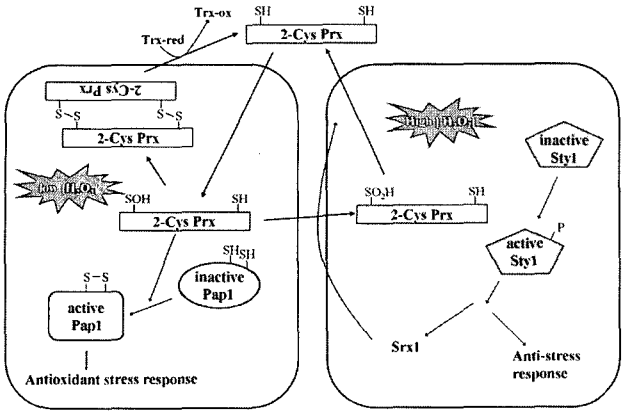

Figure 5. Regulation of intracellular signaling pathways by 2-Cys Prx in response to H_2O_2 concentration (Ref: Vivancos et al. 2005). Under normal conditions, the peroxide-induced activation of Pap1 requires the peroxidase activity of 2-Cys Prx for the formation of an intramolecular disulfide bond in Pap1. However under H_2O_2 stress, 2-Cys Prx is inactivated by the transformation of its peroxidatic Cys-SH to Cys-sulfinic acid, delaying Pap1 activation until the Sty1-dependent transcriptional response is activated. In turn, the phosphorylated (P) active Sty1 can activate the transcription of Srx1, which restores the peroxidase activity of 2-Cys Prx to reactivate Pap1.

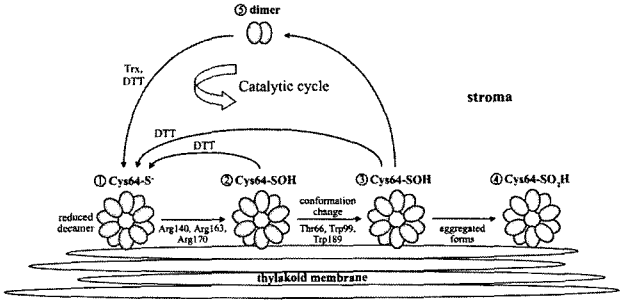

Figure 6. Model of the postulated reaction mechanism of plant 2-Cys Prx and its redox-dependent translocation in chloroplasts (Ref: Konig et al. 2003). 2-Cys Prx in plant cells exists as reduced decamer (*1*) and is oxidized in two steps to the sulfenic acid form involving specific amino acid residues (*2* and *3*). The decamer remains associated with the thylakoid membrane when overoxidation occurs (*4*). The regular catalytic cycle involves disulfide bridge formation with a conformational change (*5*). Trx or DTT regenerate 1 form.

을 활성화하게 되는 것은 분명한 것으로 생각된다. 사실, *Schizosacharomyces pombe*에서 스트레스에 의해 활성화되는 p38/JNK에 상응하는 MAP kinase인 Sty1은 2-Cys Prx의 peroxidatic cysteine과 Sty1의 cysteine 잔기 사이의 disulfide bond를 형성하여 활성화되는 mechanism은 잘 규명되어 있다 (Veal et al. 2004). *S. pombe*에서는 산화 스트레스에 반응하여 나타나는 두 개의 독립적인 생체방어 신호전달 과정으로 Pap1에 의한 것과 Sty1/Spc1의한 것이 존재하는데, 이들은 세포를 보호하는데 상호보완적으로 작용한다. Sty1은 높은 농도의 H_2O_2에서 세포의 생존에서 중요한 역할을 하며, Pap1은 낮은 농도로 존재할 때 이에 적응하기 위한 세포반응에 필요하다 (Quinn et al. 2002). 이런 신호전달 과정에서, 2-Cys Prx는 낮은 농도의 H_2O_2에서 Pap1의 upstream activator로서 작용하고 H_2O_2의 농도가 높아짐에 따라 suppressor로서 작용하게 된다 (Vivancos et al. 2005). 2-Cys Prx의 overoxidation은 Sty1-의존적 전사반응이 일어날 때까지 Pap1의 활성화를 지연시킨다. 이 반응에서, Srx1은 2-Cys Prx를 환원시킴으로써 2-Cys Prx-Pap1 사이의 redox-relay 반응과 Pap1의 활성화를 회복시킨다. 극심한 H_2O_2 스트레스에서 Srx1의 합성은 Sty1에 의존적이기 때문에, Sty1은 2-Cys Prx의 재활성화에 필수적이다. 이런 결과들은 2-Cys Prx의 cys-sulfinic acid 형성이 *S. pombe*에서 산화-환원 전환을 조절한다는 것을 암시한다. 2-Cys Prx-Pap1의 redox-relay 제어는 Pap1 목표유전자의 적당한 발현으로 조절되며, 이 과정은 H_2O_2-의존적인 신호전달과정의 활성에 매우 중요하다 (Figure 5).

식물 유래 2-Cys Prx의 단백질 구조 및 산화-환원 준위 변화에 따른 세포 내 이동

다른 진핵세포의 2-Cys Prx와는 다르게, 식물 2-Cys Prx 단백질은 nuclear genome에 의해 암호화 된 후에 chloroplast thylakoid 내의 stroma에 특이적으로 이동한다 (Baier and Dietz 1997; Cheong et al. 1999). 따라서 모든 식물 2-Cys Prx는 아미노 말단에 매우 높고 다양한 환원력을 가지고 활발하게 활성산소종를 생산해내는 세포기관인 chloroplast로 향하게 하는 signal peptide를 포함하고 있다. Chloroplast membrane에서, 단백질의 signal peptide는 단백질 이동 과정중 잘려나가 mature enzyme이 생성된다. 이러한 관점에서 볼 때, 식물 2-Cys Prx는 광합성에 관련된 특정 기능과 chloroplast 대사과정을 수행하기 위해서뿐만 아니라, 다양한 환경적인 스트레스, 특히 산화스트레스로부터 세포기관을 보호하기 위해 진화 되어 왔다고 추측된다. Chloroplast에서 식물 2-Cys Prx의 생리적인 역할은 2-Cys Prx의 발현을 부분적으로 억제하는 형질전환 *Arabidopsis*에서 확인되었는데, 제조된 형질전환 식물체는 초기 식물 발달 과정에서 광합성의 손상이 일어났고 chloroplast 단백질들의 산화적인 손상이 증가되는 현상을 보였다 (Baier and Dietz 1999). 식물 2-Cys Prx의 생리적 중요성은 감자의 chloroplast에 존재하면서 thioredoxin reductase로부터 2-Cys Prx로 전자를 전달하는 역할을 하는 스트레스 단백질인 CDSP32의 발현억제에 의해 증명되었다 (Broin and Rey 2003). CDSP32의 발현이 억제된 식물체에서, 가뭄과 methyl viologen의 처리는 chloroplast thylakoid의 지질 과산화를 증가시킴으로써 CDSP32가 없으면 2-Cys Prx의 재활성화가 저해되고 광합성 막의 지질 과산화가 현저하게

증가한다고 추측된다. 다른 진핵세포에 있는 단백질과 같이, 식물의 2-Cys Prx의 활성자리 cysteine잔기는 H_2O_2 분해과정 중에 산화되고 농도 의존적으로 과산화물 기질에 의해 peroxidase 기능이 불활성화 된다. 식물에서 산화된 2-Cys Prx는 광합성 전자 전달 시스템으로부터 전자를 제공받는 electron donor 단백질인 Trx m 이나 Trx f에 의해 재생된다 (Konig et al. 2002).

저온, 가뭄 등을 포함하는 외부 스트레스에 대한 식물세포의 반응에서, 식물은 방어 신호 시스템을 활성화하기 위해서 redox potential을 섬세하게 조절한다. 식물 세포의 산화-환원 상태에 따라, 보리의 2-Cys Prx는 4차 구조가 dimer에서 super-complex로 변화되어 가역적으로 thylakoid membrane에 부착된다고 보고 되었다 (Figure 6). 산화적으로 저해된 2-Cys Prx의 단백질이 구조가 변하고 chloroplast의 thylakoid membrane에 부착된다는 결과로부터 식물 단백질이 H_2O_2를 분해하는 peroxidase기능 이외에 식물세포에서 2-Cys Prx는 산화, 환원 의존적인 신호 증폭을 일으키기 위해 chloroplast에서 구조적 redox sensor로 작용 할 것이라고 추측되고 있으며 이에 대한 연구가 요구되고 있다 (Konig et al. 2003).

결 론

식물을 포함한 고등 진핵 생물의 2-Cys Prx는 구조적, 기능적 변화를 통해 H_2O_2 신호전달 과정을 민감하게 조절한다. 이 과정에서 아미노 말단 peroxidatic Cys-SH는 세포에서 매우 효과적인 H_2O_2 sensor로 작용한다. 단백질의 구조적인 변화는 2-Cys Prx가 암에 대한 보호와 퇴행성 신경질환, 알츠하이머병, 다운신드롬, 갑상선암, 유방암, 폐암과 같은 여러 가지 인간 질병의 조절에 관여하는 peroxidase와 chaperone의 두 가지 기능을 가지게 한다. 2-Cys Prx가 없는 형질전환 쥐는 용혈성 빈혈과 여러 가지 악성 암에 의해 짧은 수명을 가진다는 보고로부터 2-Cys Prx가 여러 가지 질병으로부터 세포를 보호한다는 것을 예측할 수 있다 (Neumann et al. 2003). 식물 2-Cys Prx 중요성은 이 단백질이 억제 되거나 과발현된 형질전환 식물체에서 증명되었으며, 이 단백질은 식물체 외부의 스트레스로부터 식물을 보호하기 위해 산화-환원 의존적으로 단백질의 구조와 위치를 변화시킨다. 생체외 및 생체 내 결과들로부터 활성산소종의 농도를 조절하고 단백질의 변성을 방지하는 2-Cys Prx의 두 가지 기능은 대부분의 진핵세포에서 외부 스트레스와 병원균의 침입에 대항하는 세포의 반응에서 중추적인 역할을 할 것이라 생각되며 이 분야에 대한 많은 연구결과가 절실히 요구되고 있는 실정이다.

적 요

도처에 분포하는 peroxiredoxins (Prxs)은 세포 내 방어신호전달 과정에서 다양한 기능을 하는 것으로 나타났다. Prxs는 크게 typical 2-Cys Prx, atypical 2-Cys Prx와 1-Cys Prx의 세 부류로 분류되는데, 이것들은 cysteine 잔기의 수와 촉매기전에 따라 구분된다. 세 종류의 단백질 중, N-말단에 peroxidatic cysteine 잔기를 포함하는 typical 2-Cys Prx는 H_2O_2 분해과정 동안 과산화물-의존적인 sulfenic acid로의 산화와 thiol-의존적 환원과정이 순환되어 일어난다. Sulfenic acid는 고농도의 H_2O_2와 Trx, Trx reductase와 NADPH를 포함하는 촉매 요소의 존재하에 cysteine sulfenic acid로 과산화 될 수 있다. 과산화된 2-Cys Prx는 ATP 의존성 효소인 sulfiredoxin의 작용에 의해 천천히 환원된다. 세포가 강력한 산화나 열 충격 스트레스에 노출되면, 2-Cys Prx는 LMW 단백질에서 HMW complex로 구조를 변화시켜 peroxidase에서 chaperone으로 기능의 전환을 일으킨다. 2-Cys Prx의 C-말단 부분 역시 이러한 구조적 전환에 중요한 역할을 한다. 따라서, C-말단이 잘려진 단백질은 과산화가 되지 않고 단백질의 구조와 기능이 조절될 수 없다. 이러한 반응들은 활성 자리인 peroxidatic cysteine 잔기에 의해 일차적으로 유도되며, 그것은 세포에서 'H_2O_2 sensor'로서 작용하다. 2-Cys Prx의 가역적인 구조와 기능 변화는 세포가 외부자극에 적응하는 수단으로 작용하며, 아마도 세포 내 방어신호체계를 활성화 시키는 것으로 생각된다. 특히, chloroplast에 존재하는 식물 2-Cys Prx는 촉매반응 동안 주된 구조적인 변화를 나타내는 역동적인 단백질 구조를 가지고 있어서, 산화-환원 의존적으로 super-complex를 형성하고 가역적으로 thylakoid membrane에 부착한다.

사 사

본 연구 논문은 과기부/과학재단 주관의 환경생명과학 국가핵심연구센터 연구비 (grant #: R15-2003-012-01001-0)와 산업자원부 지방기술혁신사업 연구비 (grant #: RTI04-03-07)의 지원으로 수행되었음. 첫저자 및 두번째 저자는 Bk21 프로그램의 장학금을 지원받았음.

인용문헌

Baier M, Dietz KJ (1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear-encoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. Plant J 12: 179-190

Baier M, Dietz KJ (1999) Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic Arabidopsis. Plant Physiol 119: 1407-1414

Biteau B, Labarre J, Toledano MB (2003) ATP-dependent reduction of Cys-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. Nature 425: 980-984

Broin M, Rey P (2003) Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the BAS1 2-Cys peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylakoids under photooxidative stress. Plant Physiol 132: 1335-1343

Budanov AV, Sablina AA, Feinstein E, Koonin EV, Chumakov PM (2004) Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. Science 304: 596-600

Burdon RH (1995) Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. Free Radic Biol Med 18: 775-794

Butterfield DA, Yatin SM, Varadarajan S, Koppal T (1999) Amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress, neurotoxicity, and Alzheimer's disease. Methods Enzymol 309: 746-768

Cha MK, Yun CH, Kim IH (2000) Interaction of human thiol-specific antioxidant protein 1 with erythrocyte plasma membrane. Biochemistry 39: 6944-6950

Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. Proc Natl Acad Sci USA 91: 7017-7021

Chang TS, Jeong W, Choi SY, Yu S, Kang SW, Rhee SG (2002) Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. J Biol Chem 277: 25370-25376

Chang TS, Jeong W, Woo HA, Lee SM, Park S, Rhee SG (2004) Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. J Biol Chem 279: 50994-51001

Cheong NE, Choi YO, Lee KO, Kim WY, Jung BG, Chi YH, Jeong JS, Kim K, Cho MJ, Lee SY (1999) Molecular cloning, expression, and functional characterization of a 2Cys-peroxiredoxin in Chinese cabbage. Plant Mol Biol 40: 825-834

Choi YO, Cheong NE, Lee KO, Jung BG, Hong CH, Jeong JH, Chi YH, Kim K, Cho MJ, Lee SY (1999) Cloning and expression of a new isotype of the peroxiredoxin gene of Chinese cabbage and its comparison to 2Cys-peroxiredoxin isolated from the same plant. Biochem Biophys Res Commun 258: 768-771

Ellis HR, Poole LB (1997) Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify Cys sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. Biochemistry 36: 15013-15018

Finkel T (2003) Oxidant signals and oxidative stress. Curr Opin Cell Biol 15: 247-254

Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Natrue 408: 239-247

Fisher AB, Dodia C, Manevich Y, Chen JW, Feinstein SI (1999) Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase. J Biol Chem 274: 21326-21334

Hendrick JP, Hartl FU (1993) Molecular chaperone functions of heat shock proteins. Annu Rev Biochem 62: 349-384

Hirotsu S, Abe Y, Okada K, Nagahara N, Hori H, Nishino T, Hakoshima T (1999) Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product. Proc Natl Acad Sci USA 96: 12333-12338

Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. Cell 117: 625-635

Kim KS, Choi SY, Kwon HY, Won MH, Kang T-C, Kang JH (2002) Aggregation of α-synuclein induced by the Cu, Zn-superoxide dismutase and hydrogen peroxide system. Free Radic Biol Med 32: 544-550

Konig J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schurmann P, Dietz KJ (2002) The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. Proc Natl Acad Sci USA 99: 5738-5743

Konig J, Lotte K, Plessow R, Brockhinke A, Baier M, Dietz KJ (2003) Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. Role of the C terminus and the quaternary structure. J Biol Chem 278: 24409-24420

Koo KH, Lee S, Jeong SY, Kim ET, Kim HJ, Kim K, Song K, Chae HZ (2002) Regulation of thioredoxin peroxidase activity by C-terminal truncation. Arch Biochem Biophys 397: 312-318

Lee KO, Jang HH, Jung BG, Chi YH, Lee JY, Choi YO, Lee JR, Lim CO, Cho MJ, Lee SY (2000) Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. FEBS Lett 486: 103-106

Martindale JL, Holbrook NJ (2002) Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. J Cell Physiol 192: 1-15

Moon JC, Hah YS, Kim WY, Jung BG, Jang HH, Lee JR, Kim SY, Lee YM, Jeon MG, Kim CW, Cho MJ, Lee SY (2005) Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H_2O_2-induced cell death. J Biol Chem 280: 28775-28784

Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, Bronson RT, Fujiwara Y, Orkin SH, van Etten RA (2003) Essential role for the peroxiredoxin Prdx1

in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. Nature 424: 561-565

Poole LB, Reynolds CM, Wood ZA, Karplus PA, Ellis HR, Li Calzi M (2000) AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase. Eur J Biochem 267: 6126-6133

Quinn J, Findlay VJ, Dawson K, Millar JB, Jones N, Morgan BA, Toone WM (2002) Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H_2O_2 levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Mol Biol Cell 13: 805-816

Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, Benahmed M, Louisot P, Lunardi J (2002) Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site. J Biol Chem 277: 19396-19401

Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005a) Peroxiredoxins: A historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. Free Radic Biol Med 38: 1543-1552

Rhee SG, Yang K-S, Kang SW, Woo HA, Chang T-S (2005b) Controlled elimination of intracellular H_2O_2: Regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. Antioxid Redox Signal 7: 619-626

Sayed AA, Williams DL (2004) Biochemical characterization of 2-Cys peroxiredoxins from *Schistosoma mansoni*. J Biol Chem 279: 26159-26166

Schroder E, Ponting CP (1998) Evidence that peroxiredoxins are novel members of the thioredoxin fold superfamily. Protein Sci 7: 2465-2468

Schroder E, Littlechild JA, Lebedev AA, Errington N, Vagin AA, Isupov MN (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 A resolution. Structure Fold Des 8: 605-615

Storz G, Tartaglia LA, Farr SB, Ames BN (1990) Bacterial defenses against oxidative stress. Trends Genet 6: 363-368

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995) Requirement for generation of H_2O_2 for platelet-derived growth factor signal transduction. Science 270: 296-299

Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK (1999) Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 274: 22699-22704

Veal EA, Findlay VJ, Day AM, Bozonet SM, Evans JM, Quinn J, Morgan BA (2004) A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase. Mol Cell 15: 129-139

Vivancos AP, Castillo EA, Biteau B, Nicot C, Ayte J, Toledano MB, Hidalgo E (2005) A Cys-sulfinic acid in peroxiredoxin regulates H_2O_2-sensing by the antioxidant Pap1 pathway. Proc Natl Acad Sci USA 102: 8875-8880

Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB (2003a) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. Trends Biochem Sci 28: 32-40

Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003b) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. Science 300: 650-653

Yang KS, Kang SW, Woo HA, Hwang SC, Chae HZ, Kim K, Rhee SG (2002) Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site Cys to Cys-sulfinic acid. J Biol Chem 277: 38029-38036

(접수일자 2005년 12월 1일, 수리일자 2006년 1월 17일)