

*Saccharomyces cerevisiae*에서 산화환원에 의한 *In Vitro* 단백질합성의 Thioredoxin에 중재된 조절

최상기*

순천대학교 생명과학전공

Thioredoxin-Mediated Regulation of Protein Synthesis by Redox in *Saccharomyces cerevisiae*. Choi, Sang Ki*. Department of Biological Sciences, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea – Redox signaling is one of way to regulate growth and death of cell in response to change of redox of proteins. To search whether translation is regulated by redox, we attempted *in vitro* translation assay under condition with or without DTT. Interestingly *in vitro* translation activity was increased up to 40% in the presence of dithiothreitol (DTT). Then we checked whether this positive effect by DTT was further accelerated by addition of thioredoxin (Trx). When a Trx purified from *Saccharomyces cerevisiae* was added to the *in vitro* translation extract, we observed a dose-dependent increase in translational activity. These results suggest the possibility of translation factors being redox-regulated via Trx *in vivo*.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, translation, dithiothreitol, thioredoxin, redox, signaling

단백질합성(translation)은 유전자 발현 및 세포 성장을 조절하는데 중요한 과정으로 알려져 있으며 여러 가지 외부환경이나 세포내의 필요에 따라서 그 증감이 조절된다. 단백질 합성과정을 전기(initiation), 증기(elongation), 말기(termination)의 세 단계로 나누어볼 때, 단백질 합성의 조절은 초기단계에서 빈번히 일어나고 있다. 단백질 합성의 초기단계는 개시코돈(initiation codon)인 AUG를 선택하는 과정이다. 최근 이 단계에 관여하는 eIF2B, eIF2 등 인자에 돌연변이가 발생되었을 때 인간에 VWM(Vanishing White Matter), Hypoglycemia 등의 치명적인 질병이 발생되는 것으로 밝혀졌다[1].

단백질 합성 초기단계에는 많은 진핵생물의 개시인자(eukaryotic initiation factors: eIF)라고 명명된 인자들이 관여한다. 외부의 환경에 따라 단백질 합성을 조절하는 여러 개시인자들이 있다. 첫째로 세 종류(α , β , and γ)의 구성원으로 형성된 eIF2는 여러 종류의 외부자극, virus 감염, heme 결핍, 아미노산 결핍, heat shock, 중금속노출, glucose 결핍 등에 의해 인산화되어 단백질 합성이 증감된다. 그 대표적인 예로 kinase인 PKR, HRI, GCN2 등은 eIF2의 α 구성원인 eIF2B에 의한 eIF2-GDP의 eIF2-GTP로의 전환이 잘 일어나지 않게 되어 궁극적으로 단백질 합성이 저해된다[7]. 두 번째로 eIF4E와 4E-BP(4E binding protein)가 있다. 단백질 합성률은 growth factor, hormone, mitogen 등에 의해 증가

되는데 이들의 자극에 의한 여러 신호전달과정에 의해 위의 두 인자들에 특이적으로 인산화가 일어나, 완전한 형태의 eIF4F를 만들어져 단백질 합성을 증진시킨다[6]. 일반적으로 알려진 단백질 합성 신호전달 과정으로는 nutrients, growth factors, insulin, glutamate, NMDA 등의 외부자극이 단백질 합성 인자를 인산화 시키는 kinase를 활성화 시키게 되고, 이로 인해 단백질 합성 인자(eIF4B, eIF4GI, 4E-BPs, eEF2)들과 리보솜의 구성원인 S6 등이 인산화 됨으로써 단백질 합성이 조절된다. 전체적인 단백질 합성의 조절은 크게 스트레스에 의한 반응과 세포증식을 위해 일어나는 현상으로 구분할 수 있다. 이 외에도 단백질 합성의 조절은 특정 유전자 수준에서도 일어나는데 주로 mRNA의 5' UTR(untranslated region)에 특정 염기서열 및 구조적으로 특징적인 부위가 존재할 때 발견된다.

Thiol(-SH)기는 효소, 전사인자, 막단백질을 포함한 많은 고분자구조의 기능에 필수적인 역할을 하며, -SH 기의 산화는 세포내의 산화제에 의해 발생된다. Glutaredoxin과 thioredoxin은 열에 안정한 작은 oxidoreductase로서 진화적으로 안정하여 세포내의 산화환원의 균형을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 효모는 모든 진핵생물과 같이 세포질과 미토콘드리아에 존재하는 많은 glutaredoxin과 thioredoxin isozyme을 포함하고 유전조작이 용이하기 때문에 진핵생물의 모델로 이용된다. 또한 이들 두 종류의 단백질은 기능적으로 상당히 겹치는 부분이 있지만 다르게 조절되고 있다[14]. 이들은 세포내에서 단백질의 접힘현상, 조절, dehydroascorbate의 환원, 산화적으로 손상된 단백질의 수선 과정과 sulphur 대사에 관련된다. 산화된 disulphide 형태의 thioredoxin은 NADPH와 thioredoxin reductase에 의해 직접

*Corresponding author

Tel: 82-61-750-3619, Fax: 82-61-750-3608

E-mail: sangkic@sunchon.ac.kr

환원되며, glutaredoxin은 NADPH에 의해 주어진 전자를 사용하여 glutathione에 의해 환원된다. 효모의 Orp1-Yap1 sensor 와 유사한 원핵생물의 단백질은 OxyR로써 세포의 H₂O₂ 항상성의 주요한 조절자이다. 이러한 sensor의 특별한 cysteine잔기가 H₂O₂에 반응하며, thiol의 산화환원과 관련된 기작에 의해 작용된다[13]. OxyR은 감지기능과 전사조절기능을 둘 다 갖지만 효모에서는 Orp1은 H₂O₂를 감지하고 이러한 신호를 cysteine에 기초한 일련의 redox로 전환되어 궁극적으로 조절자인 Yap1이 산화된다. H₂O₂는 특별한 cysteine 잔기에 직접 산화되어 H₂O₂와 같은 산화제가 매우 특수한 조절에 관여하고 cysteine을 경유한 redox 신호 전달에 역할을 한다. H₂O₂ sensor는 세포내 H₂O₂대사와 glutathione과 thioredoxin 경로에 의한 thiol redox의 조절과 밀접하게 연결된다.

본 논문에서는 산화환원에 의해 단백질합성이 조절되는지를 밝히고자 방법론으로 *in vitro* translation system을 이용하였으며, 이를 통해 산화환원이 실제 단백질합성을 조절하는 중요한 신호전달단자임을 밝혔다.

실험재료 및 방법

효모 DNA의 분리

효모균을 YpD(peptone 2%, yeast extract 1%, dextrose 2%) 액체배지에 진탕배양 하여 수확한 균체에 STES buffer (0.5M NaCl, 0.2M Tris-Cl, pH 7.6, 0.01M EDTA, pH 8.0, 1% SDS) 30 μ l를 넣어 잘 현탁시킨 후, 동량의 glass beads를 넣어 30초씩 4차례 vortex하여 균체를 파쇄하였다. 여기에 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) 200 μ l와 phenol/chloroform/isomyl alcohol(25/24/1) 200 μ l를 넣어 2분간 잘 섞어준 다음 원심분리하여 얻어진 상등액의 1/10배의 3M sodium acetate를 넣어주고, 2.5배로 100% 에탄올을 넣어 섞어준 다음 -20°C에서 2시간 보관하였다. 이를 원심분리한 후, 모인 침전물에 70% EtOH 1ml를 첨가하여 원심분리하였다. 침전물만 모인 tube의 뚜껑을 열어 30°C에서 30분간 말려 에탄올을 제거한 후에 멸균된 TE buffer 50 μ l에 yeast DNA를 녹였다.

효모에서 thioredoxin 유전자의 획득

NCBI에서 *S. cerevisiae* thioredoxin II(TR-II)의 유전자를 search하였다. 약 300 bp의 coding sequence에서 개시, 종결 코돈은 제외시키고 5'쪽(5'-GGATCCGTTACTCAATCAAACTGCC-3')에 BamHI, 3'쪽(5'-AGATCTAGCATTAGCAGCAATGGCTTG-3')에 BglII 제한효소 자리를 만들어 primer를 제작하였고 각각 forward와 reverse primer로 사용하였다. 이들 primer와 Taq DNA polymerase를 이용해 효모에서 추출한 효모 DNA를 주형으로 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. 얻어진 DNA를 pGEM-T vector에 cloning

하였으며, 박테리아로 형질전환시켜 plasmid DNA만을 분리한다. 얻어진 유전자를 GST-fusion을 위한 shuttle vector인 pEGKT로 cloning시킨 후 이를 효모에 형질전환 하였다[5].

GST-thioredoxin fusion protein의 분리

SC(yeast-nitrogen base 0.0045%, (NH₄)₂SO₄ 0.005%, dextrose 2%) 액체배지에 형질전환된 효모를 접종하여 30°C에서 200 rpm으로 하루 배양하였다. 다음 날 10% galactose와 2% raffinose가 첨가된 SC 액체배지에 전 배양액을 5%로 접종하여 38시간 이상 배양 후 원심분리하였다. 수확한 균체 무게의 PBS buffer를 동량 넣고 30초 동안 5차례 vortex시킨 다음 원심분리하여 회수한 상등액에 20% Triton X-100(20% v/v in PBS)을 1%(v/v)와 50% slurry(Glutathione Sepharose 4B)를 10%(v/v) 넣고 실온에서 30분간 반응시켰다. 이를 원심분리하여 얻어진 침전물에 PBS Buffer 1 ml를 넣고 조심스럽게 현탁한 후 원심분리하는 과정을 3차례 반복하여 세척하였다. 침전물에 glutathione elution buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10 mM glutathione) 30 μ l를 넣고 10분 후 원심분리하여 상층액을 수거하였다.

분리된 단백질을 SDS-PAGE 전기영동 후 Coomassie blue R-250로 staining 하였다[9]. GST fusion protein을 buffer(20 mM Tris, pH 7.5, 10% glycerol, 100 mM KCl, 1 mM DTT)에 넣고 4°C 냉장고에서 하루 동안 약하게 교반하며 투석하였다. GST-thioredoxin fusion protein은 bovin serum albumin을 표준시료로 Bradford방법으로 정량하였다[4].

Reporter luciferase mRNA 제조

Luciferase mRNA는 AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kits를 이용하여 luciferase mRNA를 *in vitro* 전사시켰다[12]. 전사된 RNA를 RNeasy column에 부착시키고 washing solution에 80% EtOH이 첨가된 buffer를 500 μ l 넣고 원심분리 한 후, 30~50 μ l의 RNase-free water를 column에 분주하고 1분 후 원심분리 하였다. 제조된 luciferase mRNA를 흡광도 260nm에서 정량 후 *in vitro* translation에 이용하였다.

효모에서 단백질 합성 추출액 제조 및 *in vitro* translation assay

효모를 YpD 액체배지에 배양하여 수확한 후 glass beads를 이용하여 세포를 분쇄하였으며 원심분리하여 상등액을 취하였다. 0.5 mM PMSF가 첨가된 HB buffer(30 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 2 mM dithiothreitol)로 이미 equilibration된 gel filtration column (Sephadex G-25)에 상등액을 올려놓은 후 같은 buffer로 흘러보내 용출된 분획을 얻었다. 260 nm에서 OD가 100 이상인 분획들을 모아 실험에 사용하였으며, 이를 단백질 합성

추출액이라 칭하였다. -80°C deep freezer에 보관하면서 *in vitro* translation시 사용하였다.

단백질합성 cocktail은 6배 농축되도록 제조하여 단백질합성 반응액에 다음과 같이 최종농도가 되도록 첨가하였다. 22 mM HEPES buffer, pH 7.4, 120 mM KOAc, 2 mM MgOAc, 0.75 mM ATP, 25 mM creatine phosphate, 0.04 mM 20종류의 전체 아미노산, 1.7 mM dithiothreitol, 0.1 mM GTP, 0.1 unit creatine phosphokinase, 0.007 $\mu\text{l}/\mu\text{l}$ RNA inhibitor(Promega, USA). 단백질합성은 25°C 에서 행하였으며 위의 cocktail 존재 하에서 luciferase를 효율적으로 합성하는 조건을 이용하였다. 특정 단백질이 단백질합성에 미치는 효과를 알기위해 단백질합성반응에 이들을 넣고 반응시킨 후 반응물을 인광반응기질 100 μl 에 넣고 인광측정기(BioOrbit 1250 luminometer)로 측정하였다.

결과 및 고찰

환원제에 의한 단백질합성조절

단백질 합성 구성원의 산화, 환원 과정에 의한 단백질 합성 조절을 알아보기 위해 예비적으로 비 특이적인 환원제인 DTT 존재 하에 *in vitro* 단백질 합성활성을 관찰하였다.

In vitro 단백질합성반응을 위해 반응액 15 μl 에 1/2부피의 cocktail과 1/2부피의 효모 단백질 추출물을 섞은 후 25°C 에서 0분, 20분, 40분의 시간별로 반응시켰다. 이 때, cocktail 안의 구성원의 buffer A에 1.7 mM DTT를 넣은 것과 넣지 않은 것을 시료를 제조하여 반응시켰다. 이렇게 반응시킨 반응물 10 μl 와 luciferase assay substrate 100 μl 를 잘 섞은 후, 단백질 활성을 측정하였을 때 반응시간에 따라 luciferase 합성활성이 증가되었다. 특히 40분 반응 시에 반응물에서 DTT를 포함한 시료는 이를 포함하지 않은 시료에 비해 단백질 합성활성이 1.4배 정도로 높게 측정되었다. 이 결과는 단백질합성 반응액에 redox potential의 증진됨으로 단백질

합성이 좀 더 촉진되는 것을 알 수 있다(Fig. 1).

Thioredoxin을 이용한 단백질합성조절

비 특이적인 환원제인 DTT를 단백질합성 반응액에 첨가했을 때, 단백질합성이 증진되는 현상은, 반응액에 산화환원 조절 단백질인 thioredoxin를 첨가한다면 thiol기에 환원력이 효율적으로 전달되어 단백질합성이 더욱 촉진될 수 있다. 따라서 효모에서 thioredoxin유전자를 cloning하고 이를 효모에서 발현시켜 GST-thioredoxin을 분리하였다(Fig. 2). GST-thioredoxin을 glutathione-Sepharose resin에 부착시킨 후에 10mM glutathione이 첨가된 elution buffer로 용출시켰다. Fig. 2에서 보여지듯이, lane 3는 첫 번째 용출된 단백질보다 lane 5의 3번째 용출시킨 단백질이 비교적 순수분리됨을 나타낸다. *in vitro* 단백질합성반응 시, DTT 존재 하에 산화환원 조절 단백질인 thioredoxin을 농도별로 첨가하였을 때의 단백질 합성이 어떻게 변화되는지 알아보았다. 단백질합성 반응액에 DTT와 GST-thioredoxin을 첨가하여 잘 섞은 후 25°C 에서 25분간 반응시켰다. 이 때, 반응액에 DTT를 넣은 것과 넣지 않은 것을 제조하였고, GST-thioredoxin을 0 ng, 18 ng, 90 ng, 460 ng, 2300 ng 등 농도별로 넣어서 반응시켰다. 이렇게 반응시킨 반응물 10 μl 와 luciferase assay substrate 100 μl 를 잘 섞은 후, 단백질 활성을 측정하였을 때 thioredoxin의 농도가 높아질수록 활성이 높게 나타났다. 반응액에 DTT가 포함된 경우에 2,300 ng의 thioredoxin을 첨가한 시료는 이를 첨가하지 않은 것에 비해 단백질 합성활성이 약 5배 정도 높게 나왔다. 반면에 반응액에 DTT가 포함된 경우에 2,300 ng의 thioredoxin을 첨가한 시료는 이를 첨가하지 않은 것에 비해 단백질 합성활성이 약 3배 정도 높게 나왔다(Fig. 3). 이는 산화, 환원 조절 단백질인 thioredoxin을 첨가 시 단백질합성이 더욱 증진됨을 보여주고 있으며, 첨가된 DTT가 존재할 때 단백질합성이 배가됨을 확인하였다. 이러한 결과로 생체 내에서 특정한 환경 하

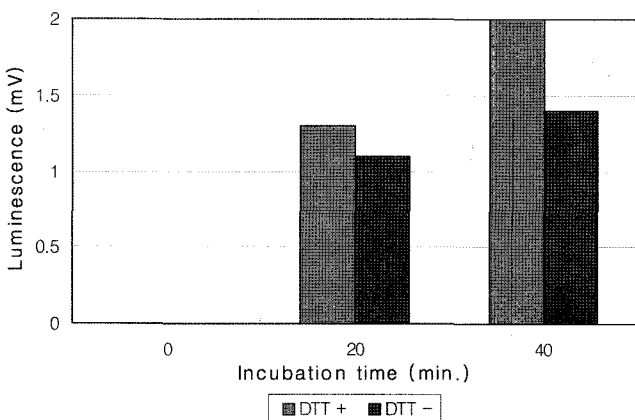


Fig. 1. Effect of translation activity by addition of reducing reagent to *in vitro* translation reaction. Each column represents the average of three independent measurements with s.d. < 10%.

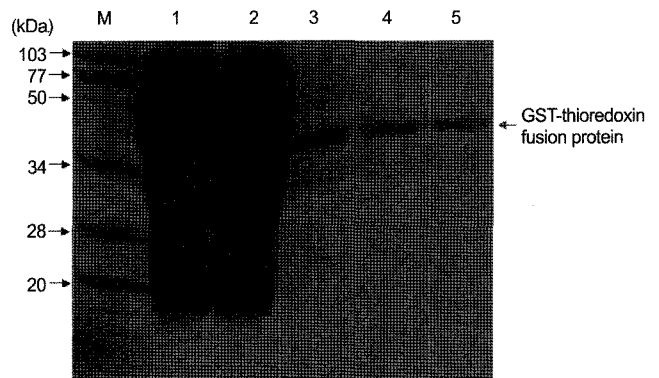


Fig. 2. SDS-PAGE of GST-thioredoxin fusion protein purified from yeast. M; low molecular marker, 1; crude extract, 2; crude extract after mixing with Glutathione Sepharose 4B resin, 3; 1st elution with glutathione elution buffer, 4; 2nd elution with glutathione elution buffer, 5; 3th elution with glutathione elution buffer.

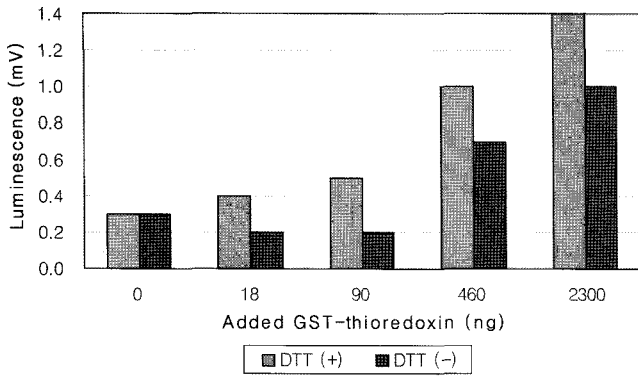


Fig. 3. Promotion of protein synthesis by addition of thioredoxin in *in vitro* translation reaction. Each column represents the average of three independent measurements with s.d. < 10%.

에서 일어나는 환원 현상이 단백질 합성 시 중요한 신호전달 과정임을 알 수 있다.

본 결과는 효모에서 환원력이 thioredoxin을 경유하여 단백질합성구성원에 전달되어 단백질합성이 증진되는 것을 보여주고 있다. 이러한 현상은 효모에서는 처음 관찰되었지만 식물과 동물에서는 산화환원이 단백질합성의 조절에 신호전달인자임을 나타내는 보고가 있다. Arabidopsis 세포질에 존재하는 thioredoxin과 접촉하는 표적단백질로서 항산화단백질, 단백질합성에 관련된 단백질, 단백질분해관련 단백질 및 여러 대사 관련효소 등이 생화학적인 방법으로 발굴되었다. 그 중 단백질합성인자로는 elongation factor-2, eukaryotic translation initiation factor 4A 등이다[15]. 또한 proteomics 방법으로 thioredoxin에 의해 환원되는 단백질로서 세포질에서 존재하는 elongation factor 1과 2를 비롯하여 chloroplast 단백질인 elongation factor Tu가 발견되었다[10]. 이전에 thioredoxin target으로 mitochondrial elongation factor Tu가 발견되었다[3].

Protein S-thiolation은 효모에서 산화적 스트레스에 반응하여 해당과정과 단백질합성과정이 표적이 되는 것으로 발견되었다[11]. 2 mM H₂O₂를 30분간 처리하였을 때 단백질이 S-thiolation 되는 단백질합성인자로는 elongation factor EF-1 α (Tef2)와 EF-1 β (Tef5), initiation factor Nip1(initiation factor eIF3의 구성원)과 작은 리보솜단백질 등이 보고되었다. Glutathione redox potential은 ROS에 의해 조절되어 *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast의 rubisco large subunit의 translation을 조절하는 것으로 보고되었다[8]. 무척추동물인 섬게가 수정 후에 redox potential의 변화되어 단백질합성인자인 eIF2B활성의 증가되는 것이 보고되었다[2]. 수정이 안 된 난자로 제조된 cell-free translation system은 2시간 배아에서 제조된 것보다 상당히 낮은 eIF2B활성을 보였으며, eIF2B를 첨가하였을 때 단백질합성 활성이 증진되었다. 또한 NADPH 재생시스템을 제공하면 eIF2B활성이 상

당히 촉진되었는데, 이는 수정에 의해 유도되는 NADPH양의 증가가 eIF2B를 활성화시킴을 나타낸다. 섬게의 난자와 배아에서 높은 양의 GSH는 난자의 수정 후 활성화에 높은 redox potential을 유지하는 것이 필수적임을 보여주는 것이다.

본 논문에서의 연구결과는 *in vitro* translation system을 통해서 산화환원이 실제 단백질합성을 조절하는 중요한 신호전달인자임을 밝혔다. 다음과정으로는 비 특이적인 환원제인 DTT가 아닌 생체내의 환원제로 작용되는 NADH 또는 NADPH 중 어떤 것이 주요한 단백질합성의 환원력으로 사용되는지를 규명하여야 할 것이다. 생체내의 주요한 thioredoxin, glutaredoxin을 통한 산화환원의 신호전달경로 중 어느 경로를 거치는지를 규명하여야 할 것이다.

요 약

Redox signaling은 단백질을 산화환원 시키는 세포의 중요 신호가 전달되어, 그 단백질의 기능이 변화함으로써 세포의 성장 및 사멸을 조절하게 되는 과정이다. 단백질 합성 구성원의 산화, 환원 과정에 의한 단백질 합성 조절을 알아보기 위해 환원제인 DTT 존재 하에 단백질 합성 활성을 관찰한 결과 DTT가 존재하지 않는 것에 비해 단백질합성이 1.4배 정도 증가됨이 관찰되어 redox potential을 보이는 것으로 보아 환원제가 단백질 합성을 좀 더 증진시키는 것으로 사료된다.

DTT에 의한 이러한 현상은 산화환원 조절 단백질인 thioredoxin를 첨가한다면 thiol기에 환원력이 전달되어 단백질합성이 더욱 촉진되기 때문에 효모에서 thioredoxin유전자를 cloning하고 이로부터 효모에서 GST-thioredoxin을 분리하였다. DTT 존재 하에 산화환원 조절 단백질인 thioredoxin을 농도별로 첨가하였을 때의 단백질 합성이 어떻게 조절되는지 알아보았다. 반응액에 DTT를 넣은 것과 넣지 않은 것을 사용하여 thioredoxin을 0 ng, 18 ng, 90 ng, 460 ng, 2,300 ng의 농도로 각각 넣어서 반응시켜 보았다. 이렇게 반응시킨 반응물에서 만들어진 단백질 활성을 측정하였는데 thioredoxin의 농도가 높아질수록 그 활성이 높게 나타났으며, thioredoxin을 넣은 것이 넣지 않은 것에 비해 활성이 약 4배 이상 높게 나왔다. 이 결과는 산화환원 조절 단백질인 thioredoxin이 환원력을 단백질합성구성원에 효율적으로 전달하는데 기여함을 보여주는 것이며, 산화환원이 단백질 합성 시 중요한 신호전달 과정임을 암시한다.

감사의글

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2005-041-C00413).

REFERENCES

1. Abbott, C. M. and C. G. Proud. 2004. Translation factors: in sickness and in health. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 25-31.
2. Akkaraju, G. R., L. J. Hansen, and R. Jagus. 1991. Increase in eukaryotic initiation factor 2B activity following fertilization reflects changes in redox potential. *J. Biol. Chem.* **266**: 24451-24459.
3. Balmer, Y., W. H. Vensel, C. K. Tanaka, W. J. Hurkman, E. Gelhaye, N. Rouhier, J. P. Jacquot, W. Manieri, P. Schurmann, M. Droux, and B. B. Buchanan. 2004. Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 2642-2647.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the peptide of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
5. Choi S. K., D. S. Olsen, A. Roll-Mecak, A. Martung, K. L. Remo, S. K. Burley, A. G. Hinnebusch, and T. E. Dever. 2000. Physical and functional interaction between the eukaryotic orthologs of prokaryotic translation factors IF1 and IF2. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 7183-7191.
6. Gingras, A. C., B. Raught and N. Sonenberg. 1999. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 913-963.
7. Hinnebusch, A. G. 1994. Translational control of GCN4: an *in vivo* barometer of initiation-factor activity. *Trends Biochem. Sci.* **19**: 409-414.
8. Irihimovitch, V. and M. Shapira. 2000. Glutathione redox potential modulated by reactive oxygen species regulates translation of Rubisco large subunit in the chloroplast. *J. Biol. Chem.* **275**: 16289-16295.
9. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
10. Lemaire, S. D., B. Le. Guillon, P. Marechal, E. Keryer, M. Miginiac-Maslow, and P. Decottignies. 2004. New thioredoxin targets in *Chlamydomonas reinhardtii*. 2004. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**: 7475-7480.
11. Shenton, D. and C. M. Grant. 2003. Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **374**: 513-519.
12. Song, C., H. Paik, C. N. Seong, and S. K. Choi. 2006. An *in vitro* assay to screen for translation inhibitors. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 1646-1649.
13. Toledano, M. B., A. Delaunay, L. Monceau, and F. Tacnet. 2004. Microbial H₂O₂ sensors as archetypical redox signaling modules. *Trends Biochem. Sci.* **29**: 351-357.
14. Wheeler, G. L. and C. M. Grant. 2004. Regulation of redox homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol. Plant.* **120**: 12-20.
15. Yamazaki, D., K. Motohashi, T. Kasama, Y. Hara, and T. Hisabori. 2004. Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell. Physiol.* **45**: 18-27.

(Received Jan. 26, 2007/Accepted Mar. 6, 2007)