



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0124385
(43) 공개일자 2010년11월29일

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0043348

(22) 출원일자 2009년05월19일

심사청구일자 2009년05월19일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

이상열

경남 진주시 망경동 한보아파트 106동 1806호

이중로

경남 진주시 망경동 동신아파트 1동 401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동완

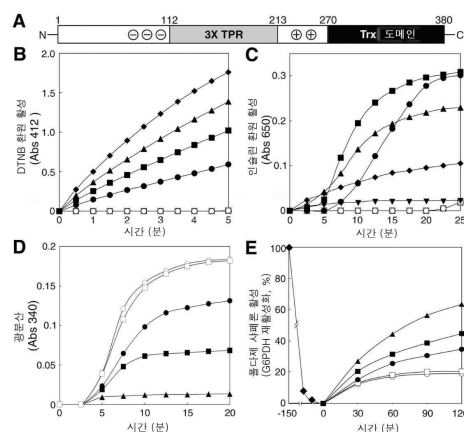
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 티오레독신 유사 단백질의 올리고머화를 통한 고온 저항성이 증진된 식물체

(57) 요약

본 발명은 티오레독신 유사 단백질의 올리고머화를 통한 고온 저항성이 증진된 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 고온 충격시 티오레독신 유사 단백질의 일종인 AtTDX 단백질(GenBank 수납 번호: NP_188415)이 올리고머화를 통해 저분자량 형태의 AtTDX 단백질의 폴다제 샤페론 및 이황화물 환원효소 기능을 고분자량 형태의 AtTDX 단백질 기능인 홀다제 샤페론으로 전환됨으로서 고온 저항성이 증진된 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이균오

경상남도 진주시 가좌동 주공그린빌 109동 304호

이승식

전북 정읍시 시기동 100번지 썬트럴 카운티 105동 1004호

장호희

경남 사천시 사천읍 선인리 대경파미르 102동 202호

이영미

경남 진주시 지수면 청원리 491

박진호

경상남도 사천시 벌리동 주공아파트 206동 1402호

문정찬

경상남도 사천시 용현면 장송 892

김선영

경남 진주시 가좌동 가좌2 주공아파트 213동 1205호

이선용

부산광역시 사하구 하단2동 공작아파트 나동 402호

채호병

경상남도 진주시 인사동 174-1

정영준

경상남도 진주시 옥봉동 176-1번지 대림아파트 511호

신미림

경상북도 포항시 남구 오천읍 원리 부영2차 123동 703호

김외연

경남 진주시 신안동 주공2차아파트 203동 203호

김민갑

경상남도 진주시 신안동 주공2차아파트 203동 203호

특허청구의 범위

청구항 1

이황화물 환원효소, 폴다제 샤페론 및 홀다제 샤페론 기능을 지닌 380개의 아미노산으로 구성된 AtTDX 단백질 (GenBank 수납 번호: NP_188415)에 있어서, 상기 단백질은 아미노산 잔기 112~213 위치에 3개의 테트라트릭코 펩타이드 반복(TPR) 도메인 및 아미노산 잔기 270~380 위치에 Trx 도메인을 포함함을 특징으로 하는 AtTDX 단백질

청구항 2

제 1항의 AtTDX 단백질 발현을 통한 고온 저항성 식물체

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 고온 저항성 식물체는 고온 충격시 AtTDX 단백질이 올리고머화를 통해 저분자량 형태의 AtTDX 단백질의 폴다제 샤페론 및 이황화물 환원효소 기능을 고분자량 형태의 AtTDX 단백질 기능인 홀다제 샤페론으로 전환됨으로서 고온 저항성이 증진됨을 특징으로 하는 고온 저항성 식물체

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 티오레독신 유사 단백질의 올리고머화를 통한 고온 저항성이 증진된 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 고온 충격시 티오레독신 유사 단백질의 일종인 AtTDX 단백질(GenBank 수납 번호: NP_188415)이 올리고머화를 통해 저분자량 형태의 AtTDX 단백질의 폴다제 샤페론 및 이황화물 환원효소 기능을 고분자량 형태의 AtTDX 단백질 기능인 홀다제 샤페론으로 전환됨으로서 고온 저항성이 증진된 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 이황 결합을 포함한 표적 단백질을 인식하고 환원시키는 티오레독신(Trx)의 능력이 산화환원-조절에 주요 역할이다. Trx의 환원 메커니즘은 그의 활성-사이트 Cys 잔기 주변을 위주로 하는 두 단계로 구성된다. Trx의 활성 Cys은 산화 기질의 이황 가교를 공격하고 기질과 Trx의 활성 Cys 잔기 사이의 혼합 이황 결합을 생성한다. 이후 다른 Cys은 그의 이황 결합을 공격하고 환원된 기질 및 산화된 Trx를 유리시킨다. 산화 Trx은 일반적으로 Trx 환원효소(TR) 및 NADPH에 의해 환원되어 촉매 사이클을 완료한다. 더욱이 Trx는 알려지지 않은 반응 메커니즘에 의해 T7-DNA 중합효소 및 사상 과지(phage)의 조립과 같은 여러 산화환원반응-독립적 세포 과정도 조절한다.

[0003] 포유류, 효모 및 *E. coli* 내에서 2 또는 3개의 동형이 존재하는 반면 식물에는 2개의 거대 Trx 패밀리 즉 Trx 및 Trx-유사 단백질이 존재한다. Trx 패밀리의 멤버는 별도의 Trx-모티프를 지니는 반면 Trx-유사 단백질은 Trx-모티프 이외에 두 번째 기능 도메인을 지닌다. 20개 이상의 다른 형태의 Trx 유전자가 아라비도시스 게놈 내에서 확인되었으나 Trx의 PKC-상호작용 중형, 글루타리독신-관련 단백질 및 단백질 이황화물 이성화 효소(PDI)를 포함하는 단지 소수의 Trx-유사 단백질만이 존재하고 이들 기능이 규명되고 있다.

- [0004] Trx-폴드(fold)를 포함한 단백질 중에 2-Cys 퍼옥시레독신(peroxiredoxin, Prx)은 열-충격 및 라디칼 스트레스에 반응하여 저분자량(LMW)에서 고분자량(HMW) 복합체로 그의 형태를 변경시키는 것으로 나타났다. 형태 변화는 퍼옥시다제에서 분자 샤페론(chaperone)으로의 기능 전환이 동반된다. 본 발명자들은 열-처리 아라비돕시스 현탁 세포 유래의 2-Cys Prx와 유사한 조절 양식을 지닌 열-충격-유도 HMW 복합 단백질을 선별 분리하였다.
- [0005] 이러한 선별 분리를 통해 본 발명자들은 380개의 아미노산으로 구성된 AtTDX 단백질(GenBank 수납 번호: NP_188415)이 아미노산 잔기 112~213 위치에서 3개의 테트라트리코펩타이드 반복(TPR) 도메인을 함유하고 아미노산 잔기 270~380 위치에서 Trx 도메인을 함유함을 확인함으로써 신규한 식물 특이적 Trx-유사 단백질을 분리하였다.
- [0006] TPR 도메인은 분자 샤페론의 특징적 특성인 단백질-단백질 상호작용 및 다수-단백질 복합체의 형성에 특히 중요하다. 샤페론은 크게 2개 그룹으로 분류된다: 변성된 단백질의 본래 상태로의 폴딩(folding)에 관여하는 폴다제 샤페론(foldase chaperone) 및 폴딩 중간물에 결합하여 그의 비-특이적 응집을 방지하는 홀다제 샤페론(holdase chaperone)이다.
- [0007] 본 발명은 아라비돕시스 Trx-유사 단백질, AtTDX가 그의 올리고머 상태에 의존적이고 이황화물 환원효소, 폴다제 샤페론 및 홀다제 샤페론으로 대안적으로 작용하는 다중 기능을 나타냄을 식물계에서 처음으로 입증하였다. 더욱이 본 발명은 AtTDX의 홀다제 샤페론 기능이 아라비돕시스 내에서 열-충격 저항성을 유의적으로 증가시킴을 확인하였다.
- [0008] 따라서 본 발명자들은 고온 충격시 티오레독신 유사 단백질의 일종인 AtTDX 단백질(GenBank 수납 번호: NP_188415)이 올리고머화를 통해 저분자량 형태의 AtTDX 단백질의 폴다제 샤페론 및 이황화물 환원효소 기능을 고분자량 형태의 AtTDX 단백질 기능인 홀다제 샤페론으로 전환시킴으로서 식물체의 고온 저항성을 증진시킴을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0009] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 고온 충격시 티오레독신 유사 단백질의 일종인 AtTDX 단백질(GenBank 수납 번호: NP_188415)이 올리고머화를 통해 저분자량 형태의 AtTDX 단백질의 폴다제 샤페론 및 이황화물 환원효소 기능을 고분자량 형태의 AtTDX 단백질 기능인 홀다제 샤페론으로 전환시킴으로서 식물체의 고온 저항성을 증진시킴을 측정코자 한 것이다.

과제 해결수단

- [0010] 본 발명의 목적은 이황화물 환원효소, 폴다제 샤페론 및 홀다제 샤페론 기능을 지닌 380개의 아미노산으로 구성된 AtTDX 단백질(GenBank 수납 번호: NP_188415)에 있어서, 상기 단백질은 아미노산 잔기 112~213 위치에 3개의 테트라트리코펩타이드 반복(TPR) 도메인 및 아미노산 잔기 270~380 위치에 Trx 도메인을 포함함을 특징으로 하는 AtTDX 단백질을 제공하는 것이다.

[0011] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 상기 AtTDX 단백질 발현을 통한 고온 저항성 식물체를 제공하는 것이다.

[0012] 이때 상기 고온 저항성 식물체는 고온 충격시 AtTDX 단백질이 올리고머화를 통해 저분자량 형태의 AtTDX 단백질의 폴다제 샤페론 및 이황화물 환원효소 기능을 고분자량 형태의 AtTDX 단백질 기능인 홀다제 샤페론으로 전환됨으로서 고온 저항성이 증진된 식물체임을 특징으로 한다.

효 과

[0013] 본 발명의 효과는 고온 충격시 티오레독신 유사 단백질의 일종인 AtTDX 단백질(GenBank 수납 번호: NP_188415)이 올리고머화를 통해 저분자량 형태의 AtTDX 단백질의 폴다제 샤페론 및 이황화물 환원효소 기능을 고분자량 형태의 AtTDX 단백질 기능인 홀다제 샤페론으로 전환시킴으로서 고온 저항성을 지닌 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 아라비돕시스 열-안정 및 식물 특이적 티오레독신(Trx)-유사 단백질의 일종인 AtTDX 단백질이 이황화물 환원효소, 폴다제 샤페론(foldase chaperone) 및 홀다제 샤페론(holdase chaperone)으로 작용하는 다중 기능을 확인한 것이다. 3개의 테트라트리카펩타이드(tetratricopeptide) 반복(TPR) 도메인 및 Trx 도메인을 포함하는 AtTDX의 활성은 그 단량체 상태 보다 올리고머 상태에서 활성을 발휘한다.

[0015] 이황화물 환원효소 및 폴다제 샤페론 기능이 AtTDX이 저분자량(LMW) 형태에서 우세한 반면 홀다제 샤페론 기능은 고분자량(HMW) 복합체에서 우세하다. TPR 도메인의 결실이 AtTDX 이황화물 환원효소 활성의 유의적인 증가 및 홀다제 샤페론 기능의 완전한 소실을 유발하기 때문에 본 발명의 데이터는 AtTDX의 TPR 도메인이 Trx의 활성 사이트를 차단하고 홀다제 샤페론 기능을 증진시키는데 중요한 역할을 함을 나타낸다.

[0016] AtTDX의 올리고머화 상태는 이황화물 환원효소 및 폴다제 샤페론으로부터 홀다제 샤페론으로의 동시 기능 전환으로 LMW에서 HMW 복합체로의 변환을 유발하는 열-충격에 의해 가역적으로 조절된다. 아라비돕시스 내 AtTDX의 과발현은 주로 그의 홀다제 샤페론 활성을 통해 식물에 대한 증가된 열-충격 저항성을 부여한다.

[0017] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0018] AtTDX의 다중 기능

[0019] 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 및 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 질량분석기(Maldi-Tof) 분석을 이용하여 본 발명은 2-Cys Prx와 유사한 방식으로 조절되는 열-유도 HMW 복합 단백질에 대해 열-처리 아라비돕시스 현탁 세포를 선별하였고, 식물 특이적 Trx-유사 단백질인 AtTDX를 분리하였다. AtTDX 단백질은 380개 아미노산으로 구성되고 아라비돕시스 염색체 3 상의 단일 복제 유전자에 의해 암호화된다(도 7). 이는 N-말단 영역(잔기 112와 213 사이) 내에 한 면에 의해 산성 잔기의 측면에 존재하고 다른 면에 의해 염기성 잔기의 측면에 존재하는 3개의 TPR 도메인 및 C-말단 내에 Trx-모티프를 지닌 이분 분자 구조를 포함한다(도 1A). 이황화물 환원효소 활성이 Trx의 특징이라는 가정 하에 본 발명은 박테리아에 의해 발현되는 재조합 AtTDX을 동질성 분석을 위해 정제하였고 환원제로서 NADPH 및 Trx 환원효소의 존재 하에 5,5'-디티오-비스(2-니트로벤조산)(DTNB)을 환원

시키는 그의 능력을 조사하였다. 본 발명자들은 DTNB 환원이 AtTDX의 함량 증가와 비례하게 증가되나 DTNB를 단백질 기질로서 인슐린으로의 교체시킨 경우는 더욱 복잡한 상호작용을 유발함을 관찰하였다. 0.5 mM 디티오 트라이톨(DTT)의 존재 시 인슐린 환원 활성은 10 μ M의 AtTDX까지 농도-의존적 방식으로 증가되었으나 20 μ M 이상의 AtTDX 농도에서는 유의적으로 감소되었다(도 1C). 도 1(B-C)에 나타난 결과는 기질에 대한 더욱 더 높은 몰비의 AtTDX의 경우 그의 이황화물 환원효소 활성에 의해 생성된 환원되고 부분적으로 변성된 인슐린 분자가 AtTDX에 의해 용해성 복합체 내로 즉시 포착되고, 이는 홀다제 샤페론 활성의 전형임을 강하게 제시한다.

[0020] 이러한 전제를 시험하기 위해 AtTDX의 홀다제 샤페론 활성이 기질로서 말산탈수소효소(MDH)를 이용하여 측정되었다. MDH는 AtTDX 단백질의 양을 증가시키며 함께 배양했을 때 열 응집을 방지하였고, 응집은 1 MDH : 6 AtTDX의 서브유닛 몰비에서 완전하게 차단되었다(도 1D). 더욱이 *E. coli* Trx가 폴다제 샤페론 기능을 나타낸다는 가정 하에 본 발명은 글루코스-6-인산탈수소효소(G6PDH)를 이용하여 AtTDX의 폴다제 샤페론 활성을 조사하였다. AtTDX의 폴다제 샤페론 기능을 이황화물 환원효소 기능과 구분하기 위해 G6PDH의 Cys-부재 형태가 사용되었다. 화학적으로-변성된 G6PDH를 이용하여 본 발명자들은 폴다제 샤페론 활성이 30 μ M AtTDX에서 2시간 이내에 고유 G6PDH 활성의 63%까지 달성되고 18%는 AtTDX의 부재시 재생됨을 발견하였다(도 1E). 그러나 본 발명자들은 AtTDX를 30 μ M 난백 알부민 (Ovalbumin)으로 교체한 경우 홀다제- 또는 폴다제-샤페론 활성 모두 검출되지 않았고, 이는 다중 활성이 AtTDX의 특정 기능에서 유래됨을 나타낸다.

[0021] 불연속-크기 다중 올리고머를 형성하는 재조합 AtTDX

[0022] HMW 복합체 형성은 홀다제 샤페론의 잘-보존된 특징이다. AtTDX가 아라비도시스 현탁 세포로부터 열-안정 HMW 단백질로서 분리되었고 홀다제 샤페론 기능을 나타내었기 때문에(도 1D) 본 발명은 재조합 AtTDX의 올리고머화 상태를 조사하였다. 정제된 AtTDX는 SEC에 의해 단량체, 이합체, 올리고머 및 HMW 복합체를 포함한 여러 별개의 피크로 분리되었다(도 2A). 중합체 상태는 10% 천연 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(Native-PAGE) 후 염색을 이용하여 확인되었다. Native-PAGE에 의해 측정시 SEC에 의해 분리된 단백질 분획은 50 kDa부터 1,000 kDa 이상의 크기까지의 범위였다(도 2B, 상단 패널). 그러나 AtTDX의 이론적 질량이 42,847 Da이나 분리된 단백질은 SDS-PAGE에서 ~53 kDa의 명백한 MW를 지닌 단일 단백질 밴드로 이동되었다(도 2B 하단 패널). 이러한 결과는 AtTDX의 다중 복합체가 변화 가능한 수의 단량체로 구성된 호모-폴리머임을 나타낸다. 더욱이 본 발명은 SEC-분리된 단백질을 환원 및 비-환원 SDS-PAGE를 수행하고, 항체의 면역-특이성을 검증 한 후 항-AtTDX 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 10). 비-환원 조건에서 F-I 및 F-II 단백질은 높은 SDS 농도에서도 SDS-저항성 올리고머로 존재하였다(도 2C). 그러나 β -머캅토에탄올의 추가는 다중 결합 단백질을 단량체로 완전하게 분열시켰고(도 2D), 이는 AtTDX의 HMW 복합체가 소수성 결합뿐만 아니라 이황 결합에 의해서도 결합됨을 나타낸다.

[0023] AtTDX의 올리고머 상태를 더욱 분석하기 위해 본 발명은 투과 전자 현미경(EM)에 의해 SEC의 피크 분획을 조사하였다. 음성적으로 염색된 AtTDX의 전자 현미경 사진은 여러 특정한 형태를 나타내었다: 구형-형태의 구체 구조, 단일- 또는 이중-층 고리-구조 및 불규칙적-형태의 작은 입자(도 2E). 본 발명자들이 F-I에서 관찰된 구체-형태 HMW 복합체를 회전 및 병진 정렬을 수행한 경우 이들은 고유벡터-고유값 데이터를 기반으로 3가지 그룹으로 분류될 수 있었다(도 2F, 패널 F-I). 투영된 이미지의 직경은 42~52 nm 범위였다. F-II의 단백질 구조를 정의하기 위해 잘 염색된 입자의 581개 정면 영상(end-on view) 및 224개 측면 영상(side-on view) 전체가 병진 및 회전적으로 정렬되었다. F-II 올리고머의 이미지 처리는 그리드 방향에 따라 2개의 기본 영상을 생성하였다: 정면 방향을 지닌 고리-형태 육합체 구조 및 적도면을 교차하여 2가 원소 구조를 형성하는 측면 방향을 지닌 이중-층 십이합체 구조(도 2F, 패널 F-II). F-III 단백질이 정사각형 사합체를 형성하나(도 2F, F-III: 6) F-IV 분획 내 단량체 및 이합체(도 2E)는 정사각형 구조를 생성하지 않았다.

[0024] 올리고머 상태와 결합하는 AtTDX의 다수 분획

- [0025] AtTDX의 올리고머 상태와 그의 기능간의 상관관계를 조사하기 위해 본 발명은 SEC 컬럼에서 분리된 분획 내 AtTDX의 3개의 정의된 분획을 조사하였다(도 11). HMW 복합체의 SDS-저항성 형태(도 2C, F-I)는 전체 단백질보다 4-배 내지 5-배 더 높은 홀다제 사페론 활성을 나타낸 반면, DTNB-환원 및 폴다제 사페론 활성은 나타내지 않았다(도 3, F-I). 이와 대조적으로 F-II 분획은 전체 단백질보다 약 1.5-배 높은 홀다제 사페론 활성 및 ~50% 낮은 DTNB-환원 및 폴다제 사페론 활성을 나타내었다. 본 발명자들이 LMW 분획의 활성을 전체 단백질과 비교한 경우 F-III 및 F-IV는 각각 약 1.3- 및 4-배 더 높은 폴다제 사페론 및 이황화물 환원효소 활성을 지닌 반면, 낮은 홀다제 사페론 활성(전체 단백질의 10% 이하의 활성)을 나타내었다. 이들 결과로부터 본 발명은 AtTDX의 기능이 그의 올리고머화 상태에 의해 결정되는 것으로 결론 내렸다. AtTDX의 다합체형성은 그의 홀다제 사페론 활성을 증가시키는 반면 분열은 그의 이황화물 환원효소 및 폴다제 사페론 기능을 증진시킨다.
- [0026] 3가지 기능에 중요한 AtTDX의 도메인은 *E. coli* 내에서 이들을 발현하는 많은 절단된 컨스트럭트를 제조하고 각각의 돌연변이체에 대해 활성을 측정함으로써 확인되었다(도 12). TPR 및 Trx 도메인 모두를 포함하는 40~380 돌연변이 단백질은 고유-AtTDX와 유사하게 기능하는 반면 이들 도메인 모두가 결여된 1~111 폴리펩타이드는 어떠한 활성도 나타내지 않았다. 고유-, 비-환원 및 환원 SDS-PAGE 겔에 의해 측정시 TPR 도메인을 포함하나 Trx 도메인을 포함하지 않는 돌연변이 단백질(1~266 및 40~266)은 고유-AtTDX보다 유의적으로 낮은 수치의 홀다제 사페론 활성을 나타내었으나 홀다제 사페론 활성은 올리고머 상태와 관련되지 않는 것으로 나타났다(도 13). 더욱이 Trx 모티프만을 포함한 단백질(270~380) 또는 TPR-결손 돌연변이 단백질(Δtpr)은 홀다제 사페론 활성이 없이 고유-AtTDX보다 4-배 더 높은 DTNB-환원 활성을 나타내었다. 이들 결과는 AtTDX의 TPR-도메인이 그의 홀다제 사페론에 필수적이고 그 도메인은 Trx 모티프가 이황화물 환원효소로 작용하는 것을 봉쇄함을 나타낸다. 더욱이 Cys 돌연변이 단백질(C304S, C307S, C304/307S)은 이황화물 환원효소 활성을 나타내지 않았으나 홀다제 사페론 활성을 나타내었고, 이는 350 위치의 추가적인 Cys(도 7)이 AtTDX의 머캡토에탄올 민감성 올리고머 형태가 아닌 SDS-저항성의 형성에 기여함을 나타낸다(도 13).
- [0027] AtTDX 올리고머화의 열-충격-매개된 전환 및 시험관 내 단백질 기능 상에서의 그의 효과
- [0028] 본 발명은 AtTDX 올리고머화 상태 상의 열-충격 처리 효과를 분석하였다. AtTDX의 HMW 복합체 농도는 LMW 단백질종의 동시 감소와 함께 배양 온도 감소에 따라 SEC-분리된 단백질에서 증가되었다(도 4A). 올리고머 상태의 열-충격 매개 전환은 Native-PAGE 수행 후 은 염색에 의해 확인되었다(도 4A, 삽입사진). 그 결과는 AtTDX의 LMW 단백질은 열-충격 동안 HMW 복합체 내로 소집됨을 나타낸다.
- [0029] 열-충격 후 올리고머 상태의 변화 이외에 AtTDX의 홀다제 사페론 기능이 유의적으로 증가되었다. 25~60℃의 온도 변화는 홀다제 사페론 활성에서 ~4.5-배 증가를 유발한 반면 DTNB-감소 및 폴다제 사페론 활성은 온도 감소와 함께 감소되었다(도 4B). 올리고머 변화 측정시 4,4'-디아닐리노-1,1'-바이나프틸-5,5'-디설포산(4,4'-dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-disulfonic acid, bis-ANS)의 결합이 열-처리 AtTDX에서 분석되었다. bis-ANS의 형광 강도는 높은 온도에서 증가되었고, 이는 증가된 온도에서 AtTDX의 더 많은 소수성 부위가 노출됨을 나타낸다(도 4C). 또한 AtTDX의 열-충격-의존적 올리고머 변화는 트립토판 형광을 이용하여 측정되었다. 감소된 형광 및 최대 방사는 온도 증가와 함께 더 긴 파장으로 이동되었다(도 4D). 이들 결과는 AtTDX의 열-충격 매개된 올리고머 변화는 그의 기능 전환과 밀접하게 관련됨을 나타낸다.
- [0030] 아라비도시스 태에서 열-내성을 증가시키는 AtTDX의 홀다제 사페론
- [0031] 생체 내에서 AtTDX의 생리적 기능을 이해하기 위해 본 발명은 아라비도시스 현탁 세포를 이용하여 다양한 길이의 시간 동안 40℃의 열-충격 처리 후 AtTDX 올리고머 상태의 변화를 조사하였다. 세포질 AtTDX의 올리고머 상태는 Native-PAGE 겔 상에서 AtTDX과 특이적으로 반응하는 항-AtTDX 항체의 이용으로 웨스턴 블롯에 의해 분석되었다(도 5A, 상단 패널). HMW AtTDX 복합체 농도는 열-충격 후 LMW 종의 동시 감소와 함께 감소되었다(도 5A, 상단 패널, 라인 1~4). 열-처리 세포가 그의 최적 온도(22℃)로 복구된 경우 HMW AtTDX 복합체의 농도는

서서히 감소되었고 거의 열-충격 전의 수준으로 회복되었다(도 5A, 상단 패널, 라인 4~7). 그러나 환원 SDS-PAGE 겔 상에서의 웨스턴 블롯팅에 의해 분석된 모든 표본 내 AtTDX의 단백질 수치는 거의 변화되지 않았다(도 5A, 하단 패널). AtTDX의 다중 기능이 그의 올리고머 상태에 의해 결정됨을 고려할 때(도 3), 열-충격은 AtTDX가 가역적 방식으로 생체 내에서 이황화물 환원효소 및 폴다제 샤페론에서 홀다제 샤페론으로 기능을 전환 시키도록 함이 가능하다.

[0032] 또한 본 발명은 형질전환 아라비도시스 내에서 AtTDX의 열-충격 매개된 올리고머 변화의 생리적 결과를 조사하였다. 야생형(WT) 라인, AtTDX 과발현 라인(OE), AtTDX 억제 라인(Sup) 및 홀다제 샤페론 기능만을 지닌 Cys-돌연변이(C304/307S)-AtTDX 과발현 라인을 포함하는 여러 라인의 아라비도시스 T₃-동접접합체가 분석되었다. 형질전환 식물체 내의 AtTDX의 발현 수치는 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정되었다(도 5B, 상단 패널). 과발현 및 억제 라인은 정상 성장 조건 하에서 야생형과의 표현형적 차이를 나타내지 않았고(도 5B, 하단 패널), 또한 5일간 38°C에서 열-스트레스 처리에 의해 유사하게 손상되었다. 그러나 열-스트레스 처리된 식물체가 그의 최적 온도로 회복된 경우(도 5C) 천연- 또는 C304/307S 돌연변이 AtTDX를 과발현하는 형질전환 라인은 스트레스-후 회복 기간 동안 회복되었다. 이러한 관찰은 아라비도시스 스트로마 HSP70의 결과와 일치한다. 이와 대조적으로 거의 대부분의 WT 식물체 및 억제 라인은 열-충격에 의해 유발된 손상으로부터 회복될 수 없었다(도 5C, 하단 패널). 열-스트레스를 회복시킬 수 없는 WT 및 억제 라인의 무능은 회복 기간 동안 엽록소 함량 및 광합성 수율을 측정함으로써 검증되었다(도 14). 아라비도시스의 WT 및 AtTDX-억제 라인의 열-충격-손상된 식물체는 회복 기간 동안 엽록소 함량 및 양자 수득량을 회복시키는데 실패한 반면 파라미터는 천연-AtTDX 및 C304/307S-AtTDX를 과발현하는 아라비도시스 라인에서는 충분히 회복되었다. 이들 결과는 AtTDX의 홀다제 샤페론 기능이 열-스트레스 및/또는 회복 단계 동안 열-충격으로부터 아라비도시스의 보호에 주요한 역할을 함을 나타낸다.

[0033] 열-내성 및 일일 온도 변동에 대한 빠른 적응이 고착성 식물체의 생존에 매우 중요하나 고등 식물에서 열-저항성을 부여하는 중요한 인자는 충분히 이해되지 않았다. 본 발명은 아라비도시스 내에서 열-안정성 및 다중-기능성 AtTDX가 주로 그의 홀다제 샤페론 기능을 통해 스트레스-후 기간 동안 열-충격 저항성에 중추적 역할을 함을 나타내었다. 특히 AtTDX의 다중 기능은 열-충격에 반응한 LMW에서 HMW로 가역적으로 전환하는 분리성-크기의 올리고머 상태와 밀접하게 관련된다. 본 발명의 결과는 도 6의 포괄적 모델에서 요약되어 있다. AtTDX의 명백한 기능은 기질 단백질에 대한 AtTDX의 몰비에 의해 조절된다(도 1). PDI는 유사하다: 기질에 대한 PDI의 더 높은 몰비의 존재시 PDI는 강한 홀다제 샤페론 활성을 나타내고, 낮은 PDI : 기질 비율은 항-샤페론 활성을 유발한다. 올리고머화-의존적 기능 변화는 인간 글리세르알데하이드-3-인산 탈수소효소(G3PD)에서도 관찰되었다. 그의 올리고머 상태에 따라 G3PD는 탈수소효소에서 세포핵 우라실-DNS 글리코실라제로 그의 기능을 변형시킨다. AtTDX의 TPR 도메인은 산화-스트레스 의존적 방식으로 효모 Ssb2, 세포질 HSP70과 상호작용하는 것으로 나타났고, Cys 잔기의 점 돌연변이는 이러한 상호작용을 증가시킨다. 유사하게는 본 발명은 AtTDX Cys-돌연변이체가 그의 홀다제 샤페론 활성을 유의적으로 증가시키고 그의 이황화물 환원효소 및 폴다제 샤페론 활성을 소실함을 입증하였다.

[0034] T₃-형질전환 아라비도시스의 분자 분석은 AtTDX를 과발현하는 식물체가 WT 또는 억제 라인보다 회복 시기 동안 열-충격으로부터 더욱 더 빠르게 회복됨을 나타내었다(도 5 및 도 14). AtTDX를 과발현하는 식물체의 열-충격 저항성 특성은 AtTDX와 열-충격 유도된 부분적으로 변성된 세포성 단백질간의 안정적 복합체 형성 및 회복 기간 동안 이들 단백질을 리폴드(refold)하는 능력에서 기인하는 것으로 보인다. 마찬가지로 효모 HSP104는 스트레스-유도된 단백질 응집의 재활성화를 촉진시킴으로서 고온에서 세포의 생존을 증가시킨다.

[0035] 결론적으로 본 발명은 식물 특이적 AtTDX의 신규한 기능을 나타내고 열-충격에 반응한 AtTDX의 생리적 역할을 입증한다. 따라서 본 발명의 데이터는 정상 및 스트레스 조건 하에서 식물 방어를 조절하는 분자적 메커니즘을 이해하기 위한 중요한 단서를 제공한다.

- [0036] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 재료
- [0038] MDH의 NADH-의존적 형태의 돼지 심장 미토콘드리아, 무-Cys 형태의 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) G6PDH, 인슐린, DTT, bis-ANS 및 H₂O₂는 Sigma에서 구입하였다. Native-PAGE 및 SEC에 대한 분자 마커, 신속 성능 액체 크로마토그래피(FPLC)에 대한 Superdex 200 HR 10/30 컬럼 및 ovalbumin은 Amersham Biosciences에서 구입하였다.
- [0039] (실시예 1) 아라비도시스 현탁 세포로부터 열-안정적 HMW 복합 단백질의 분리
- [0040] 아라비도시스 현탁 세포 배양액(*Arabidopsis thaliana* L. Heynh, Ecotype Columbia)으로부터 제조된 세포질 추출물이 70℃에서 30분간 열-처리되었고 134,600 x g에서 15분간 원심분리되었다. 상층액은 Superdex 200 HR 컬럼을 이용하여 SEC 수행되었고 SEC의 공간 용적에서 용출된 HMW 복합체가 수집되었고 Hajheidari M, et al. J Proteome Res 6: 1451-1460, 2007에 기술된 바와 같이 2-D PAGE 및 MALDI-TOF 분석에 의해 확인되었다. 확인된 단백질 중에서 AtTDX가 본 발명의 표적으로 선택되었다.
- [0041] (실시예 2) AtTDX 유전자의 클로닝, *E. coli* 내 단백질 발현 및 항-AtTDX 항체의 제조
- [0042] AtTDX는 증합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 아라비도시스 cDNA 라이브러리로부터 클론되었다. 다양한 AtTDX DNA 컨스트럭트는 pET-28a 벡터(Novagen) 내로 서브클론되었고 *E. coli* BL21(DE3) 내로 형질전환되었다. His-태그된 AtTDX 단백질이 Ni-NTA 아가로스를 이용하여 정제되었고 트롬빈에 의해 분열되었다. 20 mM HEPES-KOH(pH 8.0) 내로 투석된 정제 AtTDX는 생화학적 분석 및 토끼 내로 단백질의 4회 주입에 의한 폴리클론 항체의 제조에 이용되었다.
- [0043] (실시예 3) 이황화물 환원효소, 폴다제 샤페론 및 홀다제 샤페론 활성의 측정
- [0044] AtTDX의 이황화물 환원효소는 NADPH 및 Trx 환원효소의 존재 하에 기질로서 DTNB 또는 환원제로서 0.5 mM DTT와 함께 인슐린을 사용하여 측정되었다. 폴다제 샤페론 활성은 Hansen JE et al., J Biol Chem 268: 21632-21636, 1993에 기술된 바와 같이 기질로서 6 M 요소-변성된 G6PDH를 사용하여 분석되었다. 간단하게는 변성된 G6PDH(10 μM)은 100 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.2) 내에서 100-배 희석되었고, AtTDX의 리폴딩 활성은 G6PDH 활성을 분석함으로써 모니터링되었다. 홀다제 샤페론 활성은 기질로서 MDH를 사용하여 측정되었다. 기질은 다양한 농도의 AtTDX와 함께 45℃에서 50 mM HEPES-KOH(pH 8.0)에서 배양되었다. 기질의 열 응집은 A₃₄₀에서 혼탁도 증가를 모니터링함으로써 측정되었다.
- [0045] (실시예 4) 형광도 측정
- [0046] 소수성 도메인의 노출은 SFM25 분광형광계(Kontron, 독일)로 bis-ANS 형광도를 측정함으로써 분석되었다. 여기 파장은 380 nm에서 조정되었고, 방사는 400 내지 600 nm 사이에서 스캔되었다. 내인성 트립토판 형광도의 분석을 위해 다양한 온도에서 30분간 인큐베이트된 AtTDX(100 μg/ml)는 여기 파장을 295 nm로 조정된 후 스캔되

었다.

[0047] (실시예 5) 크기 배제 크로마토그래피(SEC), PAGE 및 웨스턴 블롯 분석

[0048] SEC는 100 mM NaCl을 포함한 50 mM HEPES-KOH(pH 8.0) 완충액으로 평형된 Superdex 200 HR 컬럼을 이용하여 FPLC에 의해 25℃에서 수행되었다. 환원 또는 비-환원 조건 하의 SDS-PAGE, Native-PAGE 및 웨스턴 블롯팅은 Moon JC, et al., J Biol Chem 280: 28775-28784, 2005에 기술된 바와 같이 수행되었다.

[0049] (실시예 6) EM 및 이미지 처리

[0050] AtTDX의 상이한 MW 분획은 백열-방전 탄소-코팅 구리 그리드에 도포되었다. 단백질이 1~2분간 흡수되도록 한 후 그리드는 여러 방울의 탈이온수로 세척되고 1%(w/v) 우라닐 아세테이트로 염색되었다. 전자 현미경 사진은 120 kV의 가속 전압 및 21 K 및 52 K의 확대율에서 FEI Technai 12 현미경으로 기록되었다.

[0051] (실시예 7) 생체 내 열-충격 후 AtTDX의 올리고머화 변화

[0052] 생체 내 AtTDX의 올리고머화 변화는 아라비돕시스 현탁 세포를 이용하여 분석되었다. 세포는 130 rpm에서 진탕하면서 22℃에서 연속 백광($40 \mu\text{E m}^{-2}\text{S}^{-1}$) 조건 하에서 1.5%(w/v) 슈크로스를 함유한 Jouanneau and Peaud-Lenoel 배지 내에서 성장되었다. 열-충격 처리 동안 4-일령 배양액은 다양한 길이의 시간 동안 40℃에서 인큐베이트된 후 5일간 22℃로 이동되었다. 본 세포 유래의 전체 단백질은 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA 및 1 mM PMSF) 내에서 추출되었다. 올리고머화 변화는 Native-PAGE 겔 상에서 웨스턴 블롯팅에 의해 분석되었다.

[0053] (실시예 8) 형질전환 아라비돕시스 라인의 제조 및 열-충격 처리

[0054] 천연-AtTDX 또는 AtTDX C304/307S 돌연변이를 과발현하는 형질전환 아라비돕시스 식물체의 구축을 위해 천연 또는 돌연변이 cDNA 각각이 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터의 제어 하에 pBI121 내로 라이게이트되었다. 플라스미드는 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 내로 개별적으로 형질전환되었고 식물 침지 기술(floral dip technique)을 이용하여 아라비돕시스 내로 도입되었다. AtTDX의 발현 수치는 노던 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 관찰되었다. 그 결과 AtTDX를 과발현하는 7개 형질전환 아라비돕시스 라인이 수득되었고 과-발현자 생성시 동시-억제에 의해 11개의 억제 라인이 간단하게 수득되었다. 대표 라인의 열-충격 저항성은 4-주령 아라비돕시스 식물체를 이용하여 시험되었다. 존재하는 모든 데이터는 3 회 이상의 독립 측정의 평균이다.

[0055] (실시예 9) AtTDX와의 복합체 형성에 의한 부분적으로 변성된 인슐린 β -사슬의 용해

[0056] 다양한 농도의 AtTDX는 50 mM HEPES-KOH(pH 8.0) 완충액 내 30 μM 우 인슐린 및 0.5 mM DTT와 인큐베이트되었다. 인큐베이션 혼합물은 4℃에서 25,000 x g로 20분간 원심분리되었다. 용해성 상층액은 비-환원 SDS-PAGE 겔 상에서 분리되고 은 염색되었다.

[0057] (실시예 10) 올리고머 상태/기능 분석을 위한 절단 AtTDX 돌연변이 단백질의 제조

[0058] AtTDX의 다중 기능을 유발하는 도메인을 확인하기 위해 많은 절단 DNA 컨스트럭트가 PCR을 이용하여 제조되고 *E. coli* 내에서 발현되었다. AtTDX 단백질 내 Cys 잔기 역할을 분석하기 위해 본 발명자들은 Trx 모티프 내 AtTDX의 두 Cys 잔기 모두를 Ser(C304S, C307S 및 이중 돌연변이 C304/307S)로 교체하였다. AtTDX 돌연변이 단백질의 대부분이 높게 발현되고 *E. coli*로부터 균일하게 정제되었으나(도 12B) 1~217, 218~380 및 112~380 아미노산을 포함한 절단 단백질은 세포 함유물 소체로서 펠렛화되었고 분석에 포함되지 않았다.

[0059] (실시예 11) 엽록소 함량 및 형광도 측정

[0060] 야생형 아라비도시스 및 AtTDX(OE) 및 AtTDX C304/307S 돌연변이(C304/307S)를 과발현하거나 내인성 AtTDX 단백질을 억제하는 형질전환 아라비도시스 식물체의 대표 T₃-라인의 열내성은 엽록소 함량 및 엽록소 형광도를 측정함으로써 분석되었다. 도 5C(상단 패널)에 약술된 바와 같이 실험을 위해 4-주령 아라비도시스 모종은 38℃에서 5일간 열-처리되었고 최적 생장 조건(22℃)으로 이동된 후 추가 5일간(회복 기간) 생장되었다. 회복 기간 동안 엽록소 함량 및 엽록소 형광도의 변화는 앞에서 조사되었다. 엽록소는 80%(v/v) 아세톤을 사용하여 추출된 후 측정되었다. 엽록소 형광도(PSII의 양자 수득량, Fv/Fm)는 휴대용 형광측정기(Handy PEA; Hansatech, King's Lynn, Norfolk, UK)로 측정되었다. 잎은 측정전 10분간 암-적응되었다. 각각의 식물 라인 유래의 3개 이상의 잎이 분석되었고 Fv/Fm 비율이 평가되었다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 이황화물 환원효소, 폴다제 사페론 및 홀다제 사페론으로서의 AtTDX의 다중 기능을 나타낸 것이다. 도 1(A)는 이분 AtTDX 단백질 구조의 개략도이다. N-말단 TPR 도메인은 산성($\ominus$) 및 염기성($\oplus$) 잔기의 측면에 위치하고 C-말단은 Trx 모티프를 지닌다. 도 1(B~C)는 AtTDX의 이황화물 환원 활성을 나타낸 것이다. NADPH 및 Trx 환원효소(B) 존재시 5 mM DTNB(B) 또는 0.5 mM DTT 존재시 30 μ M 인슐린을 이용한 이황 결합의 환원은 각각 A₄₁₂(B) 및 A₆₅₀(C)에서의 흡광도 변화에 의해 측정되었다. 사용된 AtTDX의 농도는 5 μ M($\bullet$), 10 μ M($\blacksquare$), 20 μ M($\blacktriangle$), 30 μ M($\blacklozenge$) 및 60 μ M($\blacktriangledown$)이었다. 도 1(D)는 AtTDX의 홀다제 사페론 활성을 나타낸 것이다. 1.8 μ M MDH의 열 응집은 43℃에서 MDH에 대한 AtTDX의 물비를 1:1($\bullet$), 3:1($\blacksquare$) 및 6:1($\blacktriangle$)로 조정하여 조사되었다. 도 1(E)는 AtTDX의 폴다제 사페론 활성을 나타낸 것이다. Cys가 없는 형태의 G6PDH(10 μ M)가 6 M 요소에서 2.5시간 동안 변성된 후 5 μ M($\bullet$), 10 μ M($\blacksquare$) 또는 30 μ M($\blacktriangle$)의 존재시 탈변성 완충액 내에서 리폴드되었다. 천연 G6PDH의 활성은 100%로 조정되었다. AtTDX 대신 30 μ M 난백 알부민 (ovalbumin)을 사용하거나($\square$) AtTDX와 난백 알부민 모두 부재한($\circ$) 반응이 대조군으로 사용되었다.

[0062] 도 2는 크로마토그래피, 전기영동 및 현미경 기술에 의해 분석된 AtTDX의 올리고머 상태를 나타낸 것이다. 도 2(A)는 Superdex 200 HR 컬럼을 사용하여 수행된 크기 배제 크로마토그래피(SEC)를 나타내고, 분획은 4가지 종류(F-I~F-IV))로 분리되었다. 동일한 컬럼 상에서 이동된 알려진 표준물질의 MW이 크로마토그램 내에 표시된다. 도 2(B)는 10% 천연-PAGE(상단 패널) 또는 12% 환원 SDS-PAGE(하단 패널) 겔 상에서 분리된 후 항-AtTDX 항체로 웨스턴 블롯된 도 2(A)의 SEC의 각각의 분획을 나타낸다. 도 2(C~D)는 비-환원(C) 및 환원(D) SDS-PAGE 겔에 의해 분리된 후 은 염색된 도 2(A)의 모든 단백질 분획을 나타낸다. 도 2(E)는 2% 우라닐 아세테이트로 음성 염색에 의해 분석된 도 2(A) 내 F-I 내지 F-IV 단백질의 전자 현미경 사진을 나타낸다. F-I의 삽입 사진에서 구형 HMW 복합체가 확대되었다. 도 2(F)는 AtTDX 복합체의 다변수 통계 분석을 나타낸 것이다. F-I 패널에서 구형 복합체는 고유벡터-고유값을 기반으로 한 특징의 유사성에 따라 분류되고 ~45.6(1), ~42.6(2) 및 ~51.7 nm(3)의 직경을 지닌다. F-II 패널에서 육합체 AtTDX(4)(~10.4 nm)의 정면 영상 및 적도면을 교차하는 다이어드(dyad)를 지닌 이중-층 십이합체 구조를 형성하는 AtTDX의 측면 투시도가 나타나 있고, 후자 구조는 도 2(E, 패널 F-II)에서 삼각형으로 표시되어 있다. ~7.7 nm의 직경을 지닌 사합체는 F-III(6)에 나타나 있고 도 2(E, 패널 F-III)에서 원형으로 표시되어 있다. 각 분류 내 입자 수는 각 패널 하단에 표시되어 있다.

- [0063] 도 3은 올리고머 상태와 관련된 AtTDX의 다중 기능을 나타낸 것이다. 홀다제 사페론, 폴다제 사페론 및 DTNB 환원효소 활성은 SEC로부터 수득된 동일한 양의 분획(도 11의 F-I~F-IV) 상에서 측정되었다. 각각의 분획 내 활성은 활성이 100%로 조정된 전체 단백질(전체)과 비교되었다.
- [0064] 도 4는 AtTDX 올리고머화 및 생체 내 활성의 열-충격-의존적 전환을 나타낸 것이다. 도 4(A)는 SEC에 의해 분석시 30분간 다양한 열-충격 처리에 반응하는 AtTDX 올리고머 상태 변화를 나타낸 것이다. 삽입 사진은 10% Native-PAGE 겔(상단 패널) 또는 12% SDS-PAGE 겔(하단 패널) 수행 후 은 염색 분석에 의해 확인된 AtTDX의 올리고머 상태를 나타낸다. 도 4(B)는 열-처리된 AtTDX의 홀다제 사페론, 폴다제 사페론 및 DTNB 환원효소 활성이 100%로 조정된 25℃에서 인큐베이트된 천연-AtTDX과 비교됨을 나타낸다. 도 4(C~D)는 bis-ANS 결합(C) 및 트립토판 형광(D)에 의해 측정된 AtTDX 소수성의 열-충격-의존적 변화를 나타낸다. AtTDX는 25℃(1), 45℃(2), 50℃(3), 55℃(4) 및 60℃(5)에서 30분간 인큐베이트되었다. 60℃에서 단독으로 인큐베이트된 bis-ANS 10 μM의 형광 스펙트럼이 (6)에 나타나 있다.
- [0065] 도 5는 아라비도시스 내의 열-충격 회복을 증진시키는 AtTDX의 홀다제 사페론 기능을 나타낸 것이다. 도 5(A)는 아라비도시스 현탁 세포 내 AtTDX 올리고머 상태의 열-충격 의존적 가역적 변화를 나타낸 것이다. 22℃에서 배양된 현탁 세포는 40℃에서 10, 30 또는 60분간 열-스트레스 처리되었다. 열-처리(레인 4) 60분 후 세포는 그의 최적 온도로 이동되고 다시 3, 6 또는 12시간 동안 인큐베이트되었다. 세포질 단백질은 처리 세포에서 추출되었고 동량(50 μg)이 Native-PAGE 겔(상단 패널) 및 환원 SDS-PAGE 겔(하단 패널)의 레인 상에 적가된 후 항-AtTDX-항체로 웨스턴 블롯팅되었다. 도 5(B)는 SDS-PAGE 겔 상에서 웨스턴 블롯팅에 의해 분석된 야생형(WT) 아라비도시스 및 AtTDX(OE), AtTDX Cys-돌연변이(C304/307S)를 과발현하는 형질전환 아라비도시스의 대표 T₃-라인 또는 내인성 AtTDX 단백질을 억제시키는 돌연변이체(Sup) 내의 AtTDX의 발현 수치(상단 패널)를 나타낸다. 22℃에서 4주간 생장된 아라비도시스 식물체는 하단 패널에 나타나 있다. 도 5(C)는 야생형(WT)과 형질전환 아라비도시스 모종간의 열-충격 내성 비교를 나타낸 것이다. 다양한 아라비도시스 모종의 열-충격 처리 및 회복의 스킵은 상단 패널에 나타나 있다.
- [0066] 도 6은 열-충격에 반응하는 AtTDX의 올리고머 상태 및 기능 변화의 대표 모델을 나타낸 것이다. 식물 세포가 열-충격에 노출되는 경우 LMW AtTDX는 HMW 복합체로 가역적으로 변화되고 동시에 이황화물 환원효소 및 폴다제 사페론 활성에서 홀다제 사페론 활성으로의 기능 전환된다. LMW AtTDX는 이황화물 환원효소 및 폴다제 사페론으로 우세하게 기능하는 반면 HMW 복합체 단백질은 홀다제 사페론으로 작용한다.
- [0067] 도 7은 식물 유래의 다른 TDX 단백질을 지닌 AtTDX의 아미노산 서열 정렬을 나타낸 것이다. 3개 TPR 도메인은 이중선으로 표시하였다. Trx 도메인은 단일 수평선으로 표시되어 있고 그의 활성 사이트는 사각형으로 표시되어 있다. 추정 세포핵 위치 신호(NLS)는 점선으로 표시되어 있다. 숫자는 아미노산 길이를 나타낸다. '*', ':' 및 '.'은 각각 충분히-, 강하게- 및 약하게-보존된 잔기를 나타낸다. 서열 내 대시(dash)는 정렬을 최적화하도록 도입된 갭을 나타낸다. GenBank 수납번호는 하기와 같다: 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) TDX(AtTDX: At3g17880), 벼(*Oryza sativa*) TDX(OsTDX: AK063980), 담배(*Nicotiana tabacum*) TDX(NtTDX: AY064253) 및 비티스 라브루스카(*Vitis labrusca*) TDX(ViTDX: AY036906). 다중 정렬은 ClustalW로 분석되었다.
- [0068] 도 8은 전기영동 및 Maldi-Tof 질량 분광법에 의해 정제된 AtTDX의 균질성을 나타낸 것이다. 다양한 농도의 AtTDX이 12% 환원 SDS-PAGE(A), 2-D PAGE(B) 및 10% 천연-PAGE(C) 겔 상에서 분리되고 은 염색으로 염색되었다. 2-D PAGE에 의해 2 μg AtTDX를 분리시킴으로서 수득된 단일 단백질 반점은 Maldi-Tof 분석되었고(D), 이는 본 단백질을 AtTDX로 확인시켰다(E). 하기 함량의 AtTDX 단백질이 SDS-PAGE 및 Native-PAGE 겔 상에 적가되었다: 0.2 μg(레인 1), 0.4 μg(레인 2), 0.6 μg(레인 3), 0.8 μg(레인 4), 1.0 μg(레인 5) 및 2 μg(레인 6). IEF, 등전 포커싱.
- [0069] 도 9는 AtTDX와의 복합체 형성에 의한 환원되고 부분적으로 변성된 인슐린 β-사슬의 용해를 나타낸 것이다. 다양한 농도의 AtTDX가 실온에서 25분간 0.5 mM DTT의 부재시(-) 또는 존재시(+) 30 μM 인슐린과 인큐베이트되었다. 반응 혼합물을 원심분리한 후(25,000 x g, 20분) 용해성 상청액 단백질은 15% 환원 SDS-PAGE를 수행한 후 은 염색되었고, 이는 반응 혼합물 내 인슐린의 DTT-매개 환원 또는 부분적 변성된 β-사슬의 용해성이 AtTDX의 농도 증가에 따라 비례하게 증가된다.
- [0070] 도 10은 항-AtTDX 항체의 면역-특이성을 나타낸 것이다. 도 10(A)는 4주간 생장된 아라비도시스 모종에서 추출된 용해성 단백질(50 μg)(레인 1), 아라비도시스 현탁 세포(레인 2), AtTDX를 과발현하는 *E. coli* 세포(레인

3) 및 정제된 재조합 AtTDX(1 μ g)(레인 4)은 12% 환원 SDS-PAGE 겔 상에서 분리되었고 쿠마시 브릴리언트 블루(쿠마시 염색)으로 염색되었다. SDS-PAGE에 의해 분석된 단백질은 웨스턴 블롯팅을 위해 니트로셀룰로스 멤브레인 상에 옮겨지고 알칼리성 포스파타제 에세이를 이용하여 AtTDX에 대해 생성된 폴리클론 항체 1:20,000(v/v) 희석액으로 프로브되었고, 이는 항체의 AtTDX와의 특이적 면역-반응을 유발하였다(B~D). AtTDX의 항체 특이성은 야생형 아라비도시스(WT), AtTDX를 억제하는 형질전환 아라비도시스 라인(Sup) 및 아라비도시스의 T-DNA 삽입 $\Delta Athip$ 닉아웃 라인(Salk 라인 #016817)을 이용하여 분석되었다. 도 10(B)는 AtHIP 게놈 DNA 내 T-DNA 삽입 사이트의 위치를 나타낸다. AtHIP 게놈 cDNA는 10개 엑손(흑색 박스) 및 9개 인트론(흑색 박스 사이의 굵은 선) 및 비번역 영역(UTR: 백색 박스)을 포함한다. ATG, 개시 코돈; TAA, 종결 코돈. 도 10(C)는 야생형(WT) 아라비도시스, 형질전환 아라비도시스 억제 AtTDX(Sup) 및 아라비도시스 T-DNA 삽입 닉아웃 돌연변이 $\Delta Athip$ 내의 RT-PCR에 의해 측정된 AtTDX 및 AtHIP를 암호화하는 mRNA의 발현 수치를 나타낸다. 도 10(D)는 아라비도시스 식물체로부터 세포질 분획을 추출한 후 12% SDS-PAGE 겔 상에서 분리된 후 쿠마시 블루 염색(좌측 패널) 또는 항-AtTDX 항체로의 웨스턴 블롯팅(우측 패널) 수행됨을 나타낸다. 항-AtTDX 항체는 AtTDX와 특이적으로 면역-반응되었다.

[0071] 도 11은 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 분리된 4개 AtTDX 단백질 분획(F-I~F-IV)의 재크로마토그래피를 나타낸 것이다. AtTDX의 SEC-분리된 단백질 분획(F-I~F-IV)은 농축되고 도 2A와 동일한 조건 하에서 SEC에 의해 재크로마토그래피 분석되었다. 각각의 분획의 기능 활성이 특성화되었다.

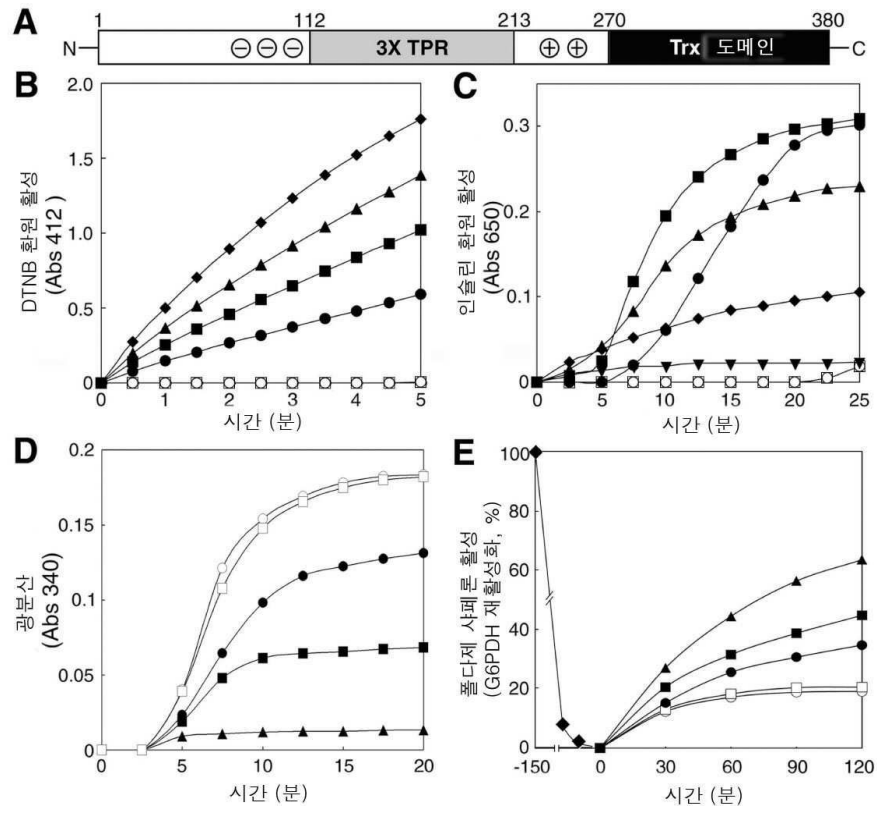
[0072] 도 12는 다양한 형태의 절단된 AtTDX의 기능 분석을 나타낸 것이다. 도 12(A)는 절단된 형태의 재조합 AtTDX의 개략적 도표를 나타낸다. 도 12(B)는 *E. coli* 내에서 발현되고 친화성 크로마토그래피에 의해 정제된 AtTDX 결실 컨스트럭트를 나타낸다. C304S, C307S 및 C304/307S는 Cys 잔기의 Ser로의 점 치환을 나타낸다. AtTDX의 정제 단백질은 12% SDS-PAGE 겔 상에서 분리되었고 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색되었다. 첫 번째 레인, 분자 마커. 도 12(C)는 다양한 결실 돌연변이체의 환원제로서 NADPH/Trx 환원효소를 이용한 DTNB-환원효소 활성($\square$), 폴다제 사페론 활성($\square$) 및 홀다제 사페론 활성($\blacksquare$)은 그 활성이 100%로 조정된 천연-AtTDX(WT)와 비교되었다.

[0073] 도 13은 웨스턴 블롯팅에 의해 분석된 도 12에 제공된 천연-AtTDX(WT), 절단 형태의 AtTDX(1~266 및 40~266) 및 Cys 돌연변이 AtTDX(C304/307S)의 올리고머화 상태를 나타낸 것이다. 천연-AtTDX(WT)의 정제 단백질, 다양한 형태의 절단 돌연변이 AtTDX(1~266 및 40~266) 및 Cys 돌연변이 AtTDX(C304/307S)는 10% 천연-PAGE(A), 12% 비-환원 SDS-PAGE(B) 및 환원 SDS-PAGE(C) 겔 상에서 분리되었고 항-AtTDX 항체로 웨스턴 블롯팅되었다. 단백질의 올리고머화 상태는 다양한 PAGE 조건 하에서 비교되었다.

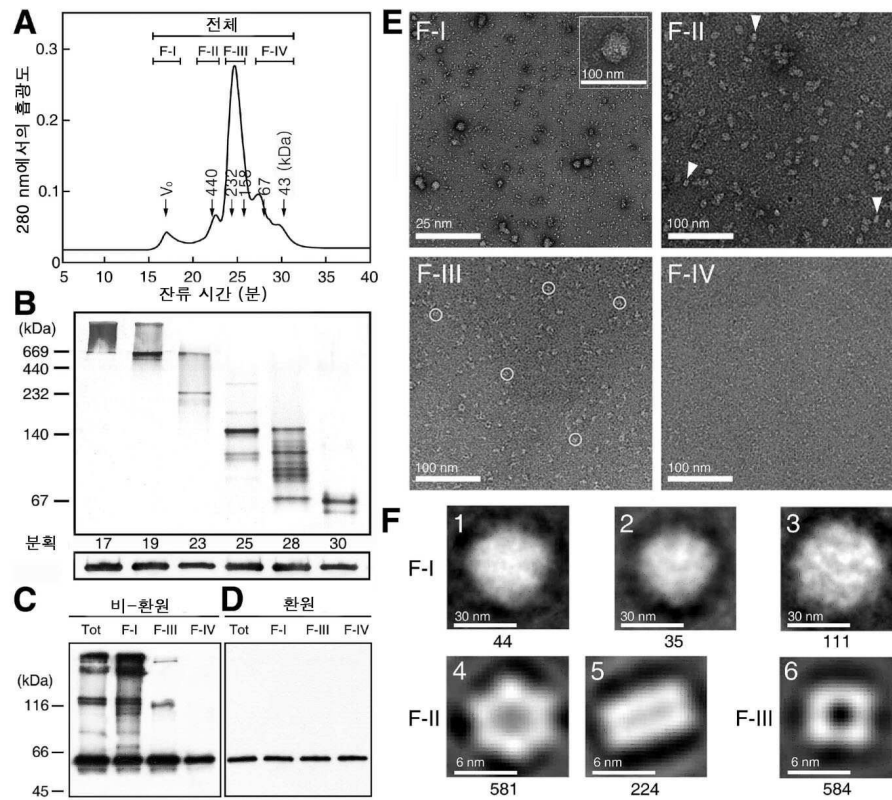
[0074] 도 14는 열-충격으로부터의 회복 기간 동안 형질전환 아라비도시스 식물체의 광합성 파라미터를 나타낸 것이다. 도 5C(상단 패널)에 약술된 바와 같이 야생형(WT), AtTDX 과발현 라인(OE), AtTDX 억제 라인(Sup) 및 Cys-돌연변이-AtTDX 과발현 라인(C304/307S)을 포함한 22°C에서 성장된 아라비도시스의 4-주령 T₃ 동형접합체 라인이 38°C에서 5일간 열-스트레스 처리된 후 최적 성장 조건(22°C)으로 복구되었다. 열-충격 및 회복 기간 동안 엽록소 함량의 변화(A) 및 양자 수득량(B)이 측정되었다. 22°C에서 성장된 아라비도시스 식물체의 광합성 파라미터(도 5C에서 ①로 표시된 백색 막대)는 38°C에서 5일간 열-스트레스 처리된 식물체(도 5C에서 ②로 표시된 회색 막대)와 비교되었고 식물체는 최적 성장 조건(22°C)에서 5일간 열-충격으로부터 회복되었다(도 5C에서 ③으로 표시된 흑색 막대).

도면

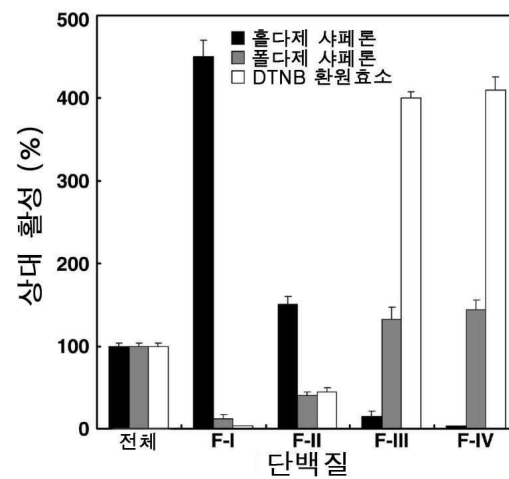
도면1



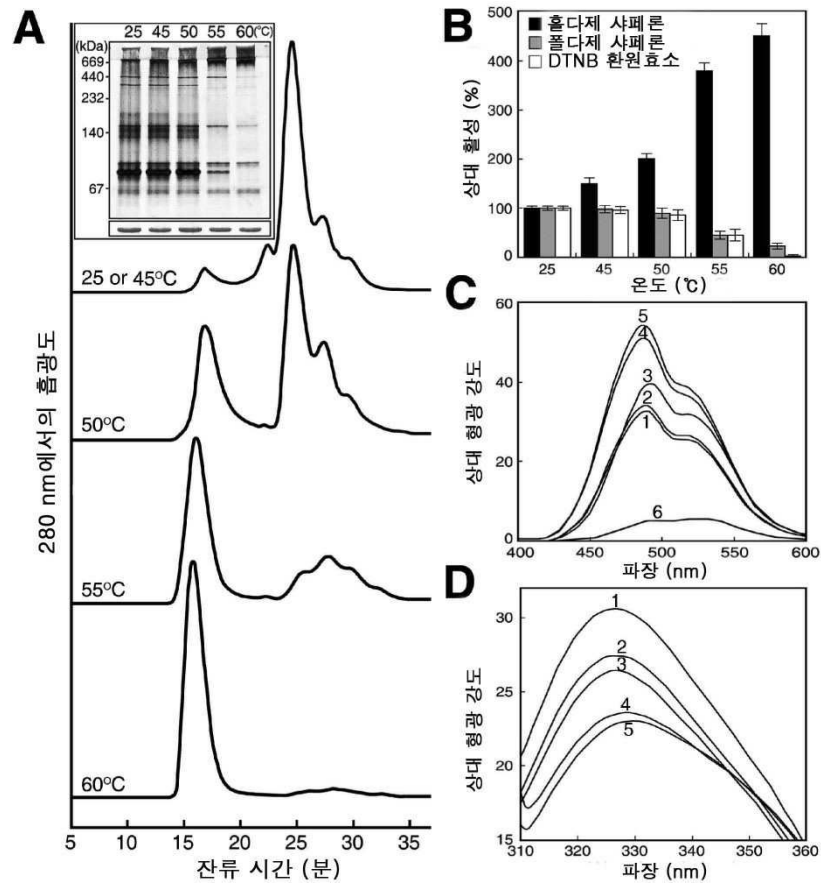
도면2



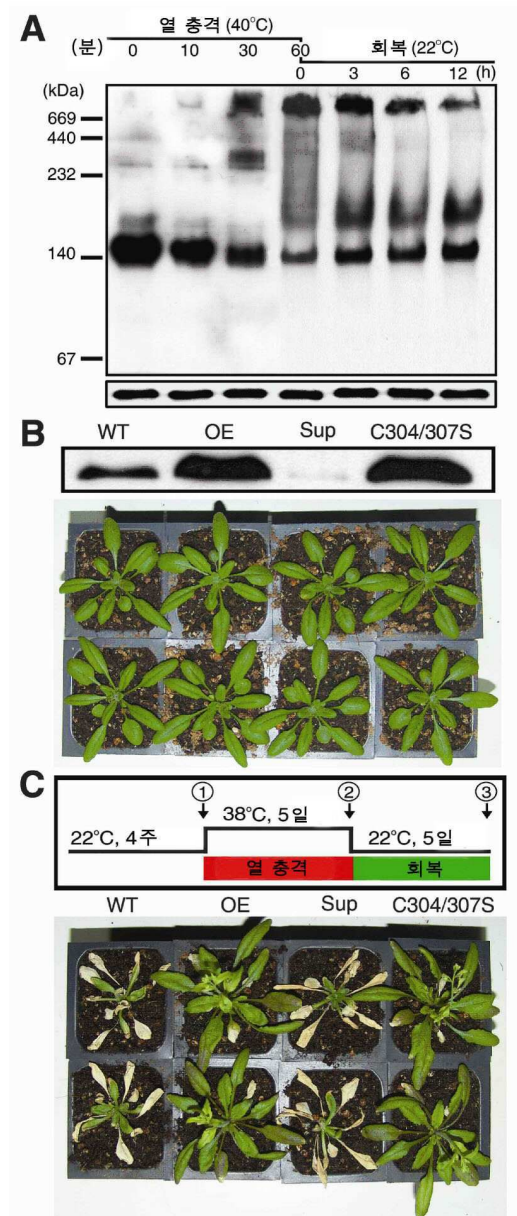
도면3



도면4



도면5

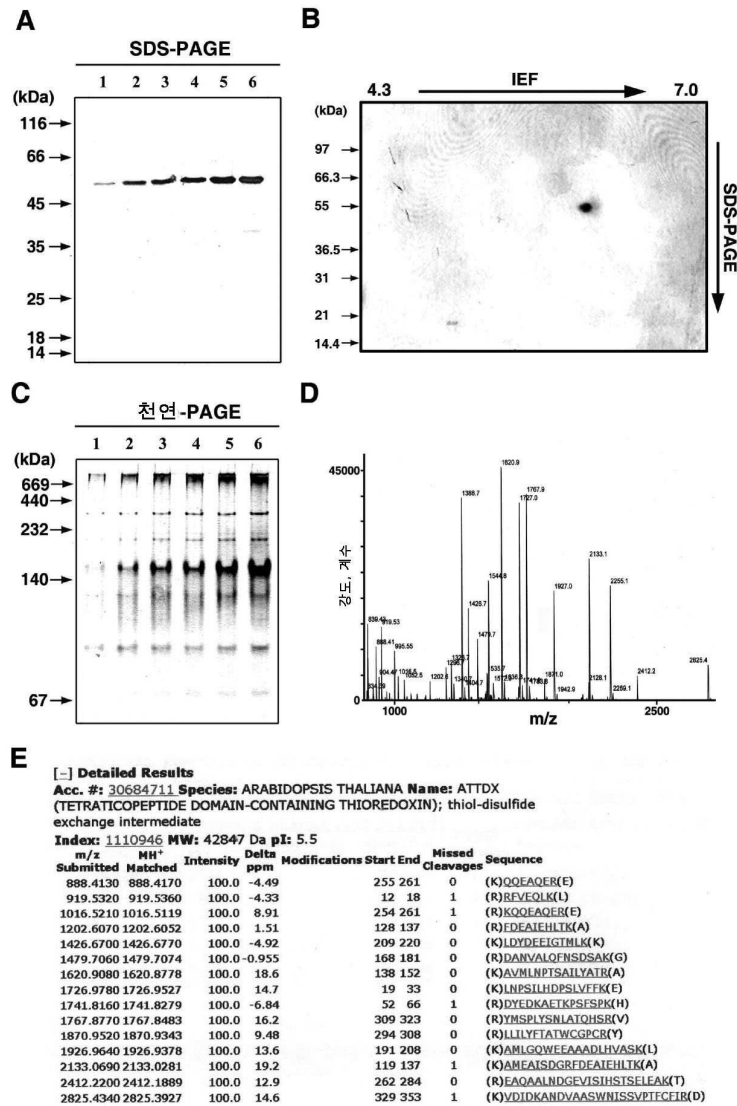


도면6

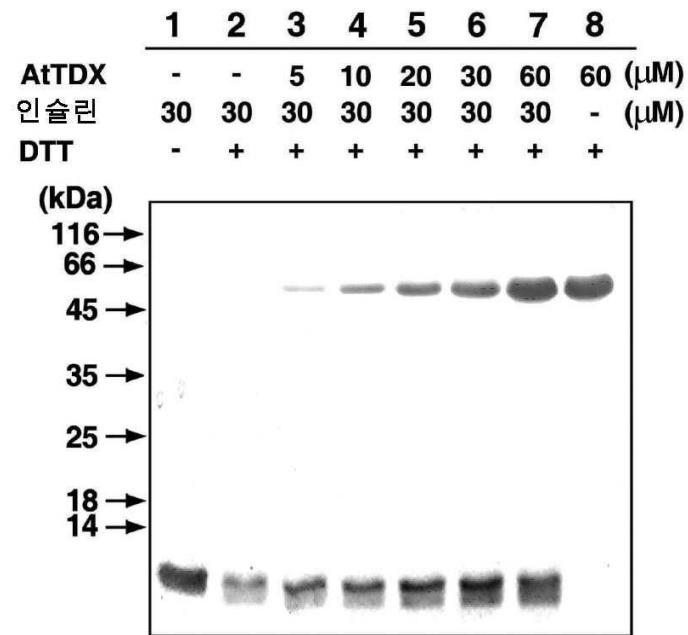


[illegible]

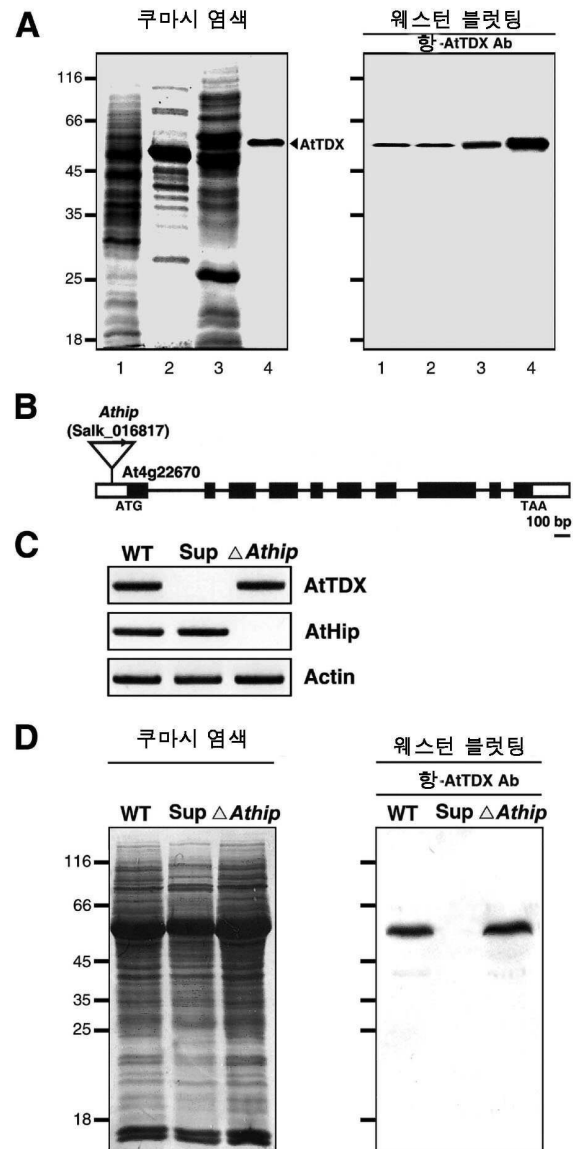
도면8



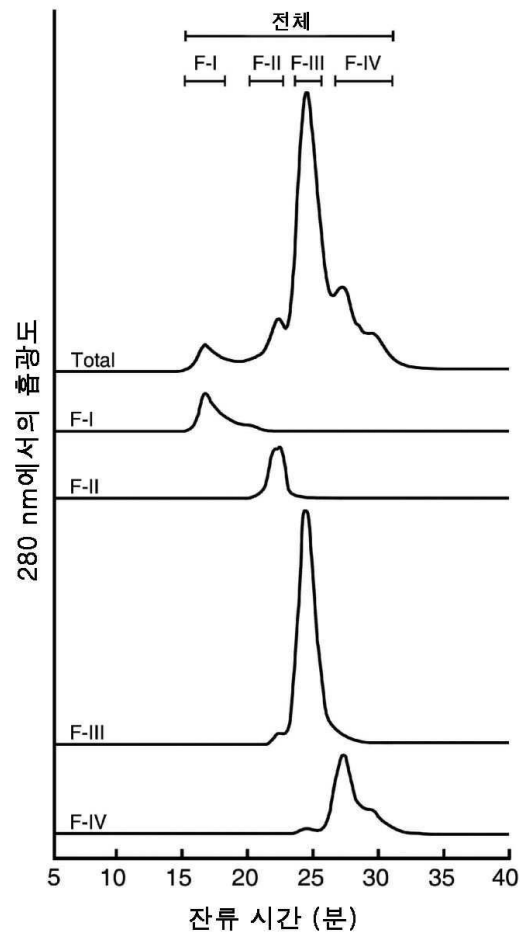
도면9



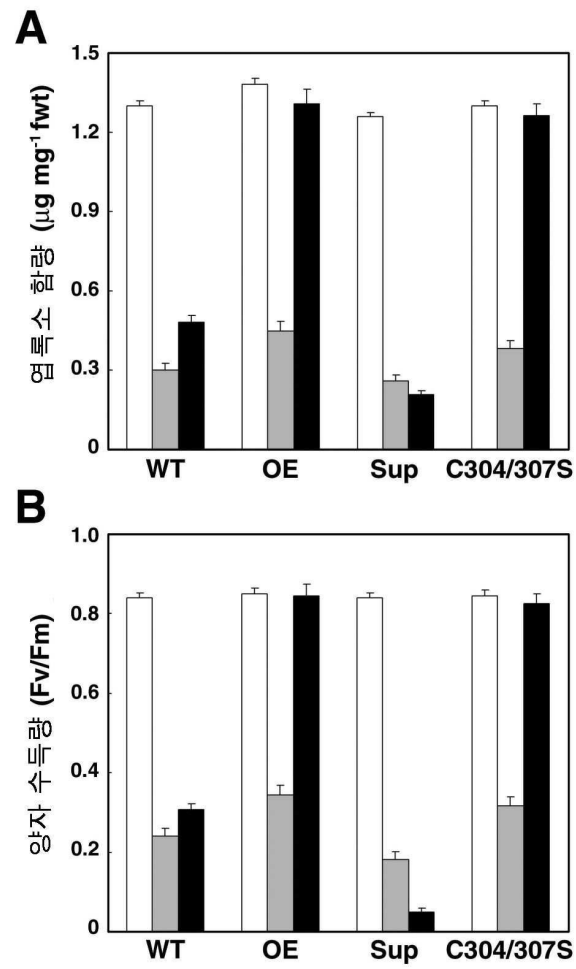
도면10



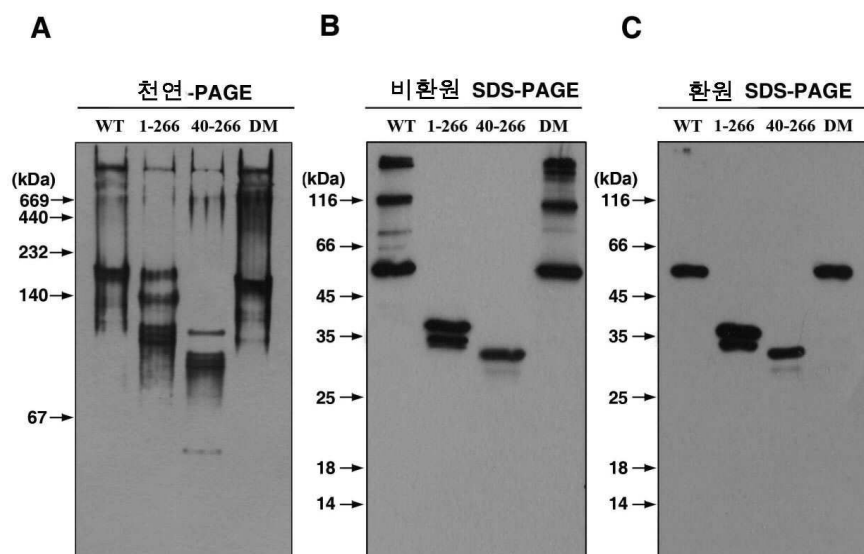
도면11



도면12



도면13



도면14

